

**PROTEİN A BASKILANMIŞ SÜPERMAKROGÖZENEKLİ
POLİ (HİDROKSİETİL-METAKRİLAT) KRİYOJELLER**

**PROTEIN A IMPRINTED SUPERMACROPOROUS
POLY(HYDROXYETHYL-METACRYLATE) BASED
CRYOGELS**

SEVGİ ASLIYÜCE ÇOBAN

PROF. DR. ADİL DENİZLİ

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliğinin
Kimya Anabilim Dalı İçin Öngördüğü
Doktora Tezi Olarak Hazırlanmıştır.

2015

SEVGİ ASLIYÜCE ÇOBAN'ın hazırladığı “**Protein A Baskılanmış Süpermakrogözenekli Poli (Hidroksietil- Metakrilat) Kriyojeller**” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **KİMYA ANABİLİM DALI**' nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Adil DENİZLİ

Başkan / Danışman

.....

Prof. Dr. Handan YAVUZ ALAGÖZ

Üye

.....

Prof. Dr. Sinan AKGÖL

Üye

.....

Prof. Dr. Serdar ABACI

Üye

.....

Yrd. Doç. Dr. Fatma YILMAZ

Üye

.....

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **DOKTORA TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fatma SEVİN DÜZ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar gereği elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir bölümünü bu üniversitede veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

20/03/2015

SEVGİ ASLIYÜCE ÇOBAN

Canlarima

ÖZET

PROTEİN A BASKILANMIŞ SÜPERMAKROGÖZENEKLİ POLİ (HİDROKSİETİL-METAKRİLAT) KRİYOJELLER

Sevgi ASLIYÜCE ÇOBAN

Doktora, Kimya Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Adil DENİZLİ

Mart 2015, 95 Sayfa

Protein A bazı immunglobulinlerin (IgG₁, IgG₂, IgG₄) Fc reseptörleri ile birleşebilmekte, böylelikle antifagositer ve antikomplementer etkinlik gösterebilmektedir. Ayrıca bu protein *S. aureus*'un nonspesifik taşıyıcı olarak kullanıldığı koaglutinasyon testlerinin esasını oluşturmaktadır. Protein A IgG'ye spesifik olarak bağlanması nedeniyle IgG saflaştırılmasında kullanılan en önemli liganttir. Bu nedenle protein A ticari olarak büyük bir öneme sahiptir.

Moleküler baskılama, moleküler tanıma temelinde çok çeşitli maddelerin seçici olarak bağlanması temeline dayanan bir yöntemdir. Moleküler baskılanmış polimerler hazırlanması kolay, dayanıklı, ucuz ve moleküler tanıma yeteneği olan malzemelerdir. Moleküler baskılanmış polimerler afinite ayırma araçları olarak düşünülebilir.

Kriyojeller, kısmen donmuş ortamda radikalik polimerizasyon ile hazırlanmaktadır. Kriyojellerin ozmotik, kimyasal ve mekanik kararlılık ile eşsiz yapıları birleştiğinde

biyolojik nanopartiküller (plazmidler, virüsler, hücre organelleri) ve hatta tüm hücreler için cazip kromatografi matrisleri yapar.

Bu çalışmada Protein A saflaştırılması için Protein A baskılanmış süpermakrogözenekli poli(2-hidroksietil metakrilat) kriyojeller hazırlanmıştır. Hazırlanan kriyojellerin karakterizasyonunun ardından, Protein A adsorpsiyonunun optimum koşulları kesikli sistemde belirlenmiştir. Maksimum Protein A adsorpsiyonu sulu çözeltiden 18.1 mg/g olarak bulunmuştur. Baskılanmış kriyojelin Protein A bağıl seçicilik katsayıları Fc ve Protein G için sırasıyla 5.44 ve 12.56 kat daha büyük olarak bulunmuştur. Ardından bakteri hücre duvarından Protein A, FPLC (Hızlı Performans Sıvı Kromatografisi) kullanılarak ayrılmıştır. Son aşamada kriyojelin tekrar kullanılabilirliği incelenmiştir.

Anahtar Sözcükler: Protein A, Kriyojel, Radikalik Polimerizasyon, Moleküler Baskılama, Adsorpsiyon, *Staphylococcus aureus*, FPLC, Saflaştırma.

ABSTRACT

PROTEIN A IMPRINTED SUPERMACROPOROUS POLY(HYDROXYETHYL-METACRYLATE) BASED CRYOGELS

Sevgi ASLIYÜCE ÇOBAN

Doctor of Philosophy, Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Adil DENİZLİ

March 2015, 95 Pages

Protein A can be combined with Fc receptors of certain immunoglobulin (IgG₁, IgG₂, IgG₄), and thus can be antifagositer and anticomplementer activity. In addition, this protein was used as a nonspecific carrier with *S. aureus* coaglutination constitutes the basis of tests. Protein A is the most important ligand of IgG purification, due to the connection of specific IgG. Therefore Protein A is great importance commercially.

Molecular imprinting is a technology to create recognition sites in a macromolecular matrix using a template molecule. Molecularly imprinted polymers (MIP) are easy to prepare, stable, inexpensive and capable of molecular recognition. MIPs can be considered as affinity separation media.

Cryogels are gel matrices that are formed in moderately frozen solutions with radicalic polymerization. The unique structure of cryogels, in combination with their osmotic, chemical and mechanical stability, makes them attractive matrices for

chromatography of biological nanoparticles (plasmids, viruses, cell organelles) and even whole cells.

In this study, Protein A imprinted supermacroporous poly(2-hydroxyethyl methacrylate) cryogel was prepared for Protein A purification. The optimum conditions of protein A adsorption determined with batch system after characterization of the prepared cryogels. The maximum Protein A adsorption capacity was 18.1 mg/g from aquatic solution. The relative selectivity coefficients of imprinted particles for Protein A were 7.6 and 3.3 times greater than Fc and Protein G respectively. Then Protein A was separated from bacterial cell wall using FPLC (Fast Performance Liquid Chromatography). The Protein A imprinted cryogels could be used many times without decreasing their adsorption capacities significantly.

Keywords: Protein A, Cryogel, Radicalic Polymerization, Molecular imprinting, Adsorption, *Staphylococcus aureus*, FPLC, Purification.

TEŞEKKÜR

Bana bu çalımayı gerekleştirme fırsatı sunarak hayatıma yön veren ve desteğini benden esirgemeyerek her zaman yanımda olduğunu hissettiren değerli hocam Sayın Prof. Dr. Adil Denizli'ye,

Çalışmalarım boyunca desteğini esirgemeyen hocam Prof. Dr. Handan Yavuz Alagöz'e,

Bilimsel katkısını ve desteğini kilometrelerce uzaktan bile hissettiren hocam, abim Doç. Dr. Lokman Uzun'a,

Çalışmalarım boyunca bana destek olan Biyokimya Araştırma Grubundaki tüm arkadaşlarıma,

Desteğiyle her zaman yanımda olan canım arkadaşım Gizem Ertürk'e,

Hayatım boyunca desteklerini benden esirgemeyerek her zaman yanımda olan canım aileme,

Her anımda yanımda olan, her türlü zorlukta arkamda gücünü hissettiğim, bu süreçteki en büyük destekçim eşim, CAN'ıma,

Deneylerimin en zor kısmını benimle birlikte tamamlayan, yorgunluğumu benimle paylaşmak zorunda kalan, daha hayata gözlerini açmamış kızıma,

Sonsuz Teşekkürler...

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiii
KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Staphylococcus aureus.....	5
2.1.1. Staphylococcus aureus'un Üreme Koşulları	5
2.1.2. Staphylococcus aureus virulans ve patojenitesi	5
2.1.3. Staphylococcus aureus Hücre Duvarı Yapısı	7
2.2. Protein A.....	8
2.2.1. Monoklonal Antikorların Saflaştırılmasında Protein A.....	10
2.2.2. Rekombinant Protein A.....	14
2.3. Moleküler Baskılama Teknolojisi.....	16
2.3.1. Moleküler Baskılama Teknolojisinin Temel Prensipleri	17
2.3.2. Moleküler Baskılamada Kullanılan Ajanlar	20
2.3.3. Moleküler Baskılanmış Polimerlerin Karakterizasyonu	22
2.3.4. Moleküler Baskılanmış Polimerlerin Uygulamaları	24
2.4. Kriyojeller	25
2.4.1. Kriyotropik Jelleşmenin Temel Prensipleri	25
2.4.2. Kriyojellerin Sentezi ve Karakterizasyonu	29
2.4.3. Sentez Parametrelerinin Etkisi.....	36

3.	DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	43
3.1.	Kullanılan Kimyasal Malzemeler.....	43
3.2.	N-Metakriloil-(L)-Triptofan (MATrp) Monomerinin Sentezlenmesi.....	44
3.3.	Protein A Baskılanmış (MIP) ve Baskılanmamış (NIP) Poli(HEMA-MATrp) Kriyojel Kürelerin Hazırlanması.....	44
3.4.	Kalıp Molekülün (Protein A) Uzaklaştırılması.....	45
3.5.	Protein A Baskılanmış ve Baskılanmamış Poli(HEMA-MATrp) Kriyojel Kürelerin Karakterizasyonu.....	45
3.5.1.	FTIR ile Yapı Analizi.....	46
3.5.2.	Yüzey Alanı Ölçümleri.....	46
3.5.3.	Denge Şişme Oranının Belirlenmesi.....	46
3.5.4.	Poli(HEMA-MATrp) Kriyojellerin Yüzey Morfolojisi.....	47
3.5.5.	Elementel Analiz.....	47
3.6.	Adsorpsiyon Çalışmaları.....	48
3.6.1.	Sulu Çözeltiden Protein A Adsorpsiyonu.....	48
3.6.2.	Seçicilik Çalışmaları.....	49
3.7.	Doğal Kaynaklardan Protein A Saflaştırılması.....	50
3.7.1.	Hızlı Performans Sıvı Kromatografisi (FPLC) Analizi.....	50
3.7.2.	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE).....	52
3.8.	Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik Çalışmaları.....	53
3.9.	Protein A ile <i>Staphylococcus aureus</i> Tanıma Çalışmaları.....	53
4.	DENEYSEL SONUÇLAR ve TARTIŞMA.....	55
4.1.	MATrp Monomerinin Sentezi ve Karakterizasyonu.....	55
4.2.	Protein A Baskılanmış ve Baskılanmamış Poli(HEMA-MATrp) Kriyojel Kürelerin Karakterizasyonu.....	56
4.2.1.	FTIR ile Yapı Analizi.....	56
4.2.2.	Yüzey Alanı ölçümleri.....	58
4.2.3.	Şişme Özellikleri.....	59

4.2.4. Yüzey Morfolojisi.....	60
4.2.4.2. Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) İncelemeleri.....	61
4.2.5. Elementel Analiz	62
4.3. Adsorpsiyon Çalışmaları	63
4.3.1. Sulu Çözeltiden Adsorpsiyon Çalışmaları	63
4.3.2. Seçicilik Çalışmaları.....	75
4.3.3. Doğal Kaynaklardan Protein A adsorpsiyonu.....	76
4.3.3.1. Hızlı Performans Sıvı Kromatografisi (FPLC) Analizi.....	76
4.3.4. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik	78
4.4. Protein A ile <i>Staphylococcus aureus</i> Tanıma Çalışmaları	79
5. SONUÇLAR.....	82
KAYNAKLAR.....	87
ÖZGEÇMİŞ	95

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. <i>Staphylococcus aureus</i> 'un virulans faktörleri [9].....	8
Şekil 2.2. Beş homolog immünoglobulin bağlayıcı alt birim, ardından stafilokok genomunun en değişken bölümü olan bölge, X ve C-terminal ucunda bir sinyal ayırma motifinden oluşan Protein A'nın şematik görüntüsü [17].....	9
Şekil 2.3. Bakteriler tarafından rekombinant protein üretiminin şematik gösterimi.....	15
Şekil 2.4. Stafilokokal protein A [salgılama sırasında işlenen sinyal dizisi, (S), beş homolog IgG bağlama bölgesi (E, D, A, C) ve bir hücre duvarı bağlama bölgesinden oluşan ve hücre zarı ile bağlantılı bir protein olan XM]. B alt biriminin mühendislik ürününe karşılık gelen, yaygın olarak kullanılan Z alt biriminin şematik gösterimi [41].....	16
Şekil 2.5. Moleküler baskı işleminin şematik gösterimi: kalıp molekül ve polimerleşebilen fonksiyonel grup arasındaki tersinir etkileşimlerin oluşumunun ardından etkileşimlerin bir ya da daha fazlasını içerebilir. (A) tersine çevrilebilir kovalent bağlar, (B) kovalent olarak bağlı polimerleşebilen bağlayıcı gruplar, bu molekülün ayrılmasıyla kovalent olmayan etkileşimler için etkinleştirilir, (C) elektrostatik etkileşimler, (D) hidrofobik veya van der Waals etkileşimleri, (E) metal koordineli etkileşimler [50].	18
Şekil 2.6. Kriyotropik jelleşmenin şematik gösterimi.	28
Şekil 2.7. Farklı şekillerde hazırlanmış kriyojeller.	34
Şekil 2.8. Kriyojel kürelerin optik mikroskop görüntüsü. (a) -18 °C'de hazırlanan iyonik PAAc kriyojel küreler [80], (b) sıvı azot içinde dondurulmuş çözelti damlacıkları, (c) hazırlanmış PIB kriyojel küreler [77].....	35
Şekil 2.9. Çeşitli sıcaklıklarda hazırlanan fibroin kriyojellerin SEM görüntüleri [83]. ...	37
Şekil 2.10. -10 ° C'de hazırlanan PIB kriyojellerin (a) hızlı ve (b) yavaş dondurma koşulları altındaki SEM görüntüleri [73].	38

Şekil 2.11. Çeşitli fibroin derişimlerinde hazırlanan kriyojellerin SEM görüntüleri [83].	39
Şekil 3.1. Küre kriyojel sentez sisteminin şematik gösterimi.....	45
Şekil 3.2. Protein A baskılanmış poli(HEMA-MATrp) kriyojel kürelere sulu çözeltiden protein A adsorpsiyonu gerçekleştirmek için kullanılan kesikli sistem düzeneğinin optik görüntüsü.....	48
Şekil 3.3. FPLC sistemi ve kullanılan kolonun optik görüntüsü.	51
Şekil 4.1. MATrp komonomerinin molekül formülü.	55
Şekil 4.2. poli(HEMA-MATrp) molekül formülü.	55
Şekil 4.3. MATrp komonomerinin FTIR spektrumu.....	56
Şekil 4.4. PHEMA, poli(HEMA-MATrp) MIP ve poli(HEMA-MATrp) NIP kriyojellerin FTIR spektrumları.....	57
Şekil 4.5. Poli(HEMA) ve poli(HEMA-MATrp) MIP kriyojeller arasında alınan fark spektrumu.....	58
Şekil 4.6. PHEMA, Protein A baskılanmamış poli(HEMA-MATrp) (NIP) ve Protein A baskılanmış poli(HEMA-MATrp) (MIP) kriyojellerin şişme oranları.....	59
Şekil 4.7. Protein A baskılanmış poli(HEMA-MATrp) kriyojel kürelerin optik görüntüleri.	60
Şekil 4.8. Protein A baskılanmış poli(HEMA-MATrp) kriyojel kürelerin boyut dağılımı.	60
Şekil 4.9. Protein A baskılanmamış (NIP) poli(HEMA-MATrp) kriyojel kürelerin SEM görüntüleri.....	61
Şekil 4.10. Protein A baskılanmış (MIP) poli(HEMA-MATrp) kriyojel kürelerin SEM görüntüleri.	62
Şekil 4.11. Protein A adsorpsiyonuna pH etkisi; Protein A derişimi: 0.5 mg/mL; zaman: 120 dk; T: 25 °C.....	64

Şekil 4.12. Protein A adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisi; Protein A derişimi: 0.5 mg/mL; pH: 7.0; zaman: 120 dk; T: 25 °C.	65
Şekil 4.13. Protein A adsorpsiyon kapasitesine sıcaklığın etkisi; Protein A derişimi: 0.5 mg/mL; pH: 7.0; zaman: 120 dk.	66
Şekil 4.14. Protein A derişiminin adsorpsiyon kapasitesine etkisi; pH: 7.0; zaman: 120 dk; T: 25 °C.	67
Şekil 4.15. Protein A adsorpsiyonunun zamanla değişimi; pH: 7.0; T: 25°C.....	68
Şekil 4.16. Protein A baskılanmış ve baskılanmamış poli(HEMA-MATrp) kriyojeller için Langmuir adsorpsiyon izotermi.	70
Şekil 4.17. Protein A baskılanmış ve baskılanmamış poli(HEMA-MATrp) kriyojeller için Freundlich adsorpsiyon izotermi.	70
Şekil 4.18. Protein A baskılanmış poli(HEMA-MATrp) kriyojel için yalancı-birinci derece adsorpsiyon kinetiği.	74
Şekil 4.19. Protein A baskılanmış poli(HEMA-MATrp) kriyojel için yalancı-ikinci derece adsorpsiyon kinetiği.	74
Şekil 4.20. Sulu çözeltilerden yarışmalı adsorpsiyon. Protein A derişimi: 0.5 mg/mL; Fc derişimi: 0.5 mg/mL; ProG: 0.5 mg/mL; pH: 7.0; T: 25 °C.....	76
Şekil 4.21. <i>S. aureus</i> hücre lizatından Protein A'nın FPLC ile ayrılması. Akış hızı: 2.0 mL/dk; Dalga boyu: 254 nm.....	77
Şekil 4.22. SDS-PAGE görüntüsü, Sıra 1. Ticari Protein A Sıra 2. Desorbe edilen örnek (<i>Staphylococcus aureus</i> hücre lizatı), Sıra 3. Protein A saflaştırıldıktan sonraki çözelti (<i>Staphylococcus aureus</i> hücre lizatı), Sıra 4. Protein A saflaştırılmadan önceki çözelti (<i>Staphylococcus aureus</i> hücre lizatı), Sıra 5. Biomarker (Fermentas), Sıra 6. Desorbe edilen örnek (rekombinant <i>E. coli</i> hücre dışı salgısı), Sıra 7. Protein A saflaştırıldıktan sonraki çözelti (rekombinant <i>E. coli</i> hücre dışı salgısı), Sıra 8. Protein A saflaştırılmadan önceki çözelti (rekombinant <i>E. coli</i> hücre dışı salgısı).	78

Şekil 4.23. Protein A baskılanmış poli(HEMA-MATrp) kriyojellerin tekrar kullanılabilirliği. Protein derişimi: 0.5 mg/mL; pH: 7.0; T: 25°C, desorpsiyon ajanı: 0.1 M Na₂CO₃ ve 0.1 M NaOH.79

Şekil 4.24. Protein A baskılanmış (MIP) ve baskılanmamış (NIP) poli(HEMA-MATrp) kriyojellerin *Staphylococcus aureus* tutma kapasiteleri. *Staphylococcus aureus*: 6 x 10⁶ kob/mL T: 37°C.....80

Şekil 4.25. Protein A baskılanmış (MIP) poli(HEMA-MATrp) kriyojellerin *Staphylococcus aureus* tutunmasından sonra SEM görüntüleri.81

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Stafilokokal protein A'nın amino asit içeriği.	9
Çizelge 2.3. Farklı türlere ait immünoglobulinler ile Protein A'nın bağlanması.	12
Çizelge 2.4. Protein A temelli bazı ticari afinite matrisler.	14
Çizelge 4.1. MIP ve NIP kriyojel küreler için Langmuir ve Freundlich izotermi.	71
Çizelge 4.2. Protein A baskılanmış poli(HEMA-MATrp) kriyojel için yalancı-birinci ve ikinci derece kinetik verileri.	75
Çizelge 4.3. Protein A'ya göre Fc ve ProG için K_d ve k değerleri.	76
Çizelge 4.4. Kromatografik ayırma verileri.	77

KISALTMALAR DİZİNİ

AIBN	: azo N-N'-bis izobutironitri
BET	: Brunauer-Emmet-Teller yöntemi
DVB	: Divinilbenzen
EGDMA	: Etilen glikol dimetakrilat
FPLC	: Hızlı Performans Sıvı Kromatografisi
FTIR	: Fourier dönüşümlü infrared spektrofotometre
HEMA	: 2-Hidroksietil metakrilat
IgG	: İmmunoglobulin G
KBr	: Potasyum bromür
MATrp	: N-metakriloil-(L)-triptofan
MBAAM	: N,N-metilen bisakrilamid
MIP	: Moleküler baskılanmış polimer
Na₂CO₃	: Sodyum karbonat
NaOH	: Sodyum hidroksit
NIP	: Moleküler baskılanmamış polimer
NMR	: Nükleer manyetik rezonans
pAAM	: Poliakrilamid
PEG	: Polietilenglikol
PMNs	: Polimorfonükleer lökositler
PVA	: Polivinilalkol
SDS	: sodyum dodesil sülfat
SEM	: Taramalı elektron mikroskobu
SpA	: Stafilokokal protein A
TEMED	: H ₂ O ₂ /N,N,N',N'-tetra-metil-etilendiamin
TNFR1	: Tümör nekroz faktörü1
vWF	: von Willebrand faktörü

1. GİRİŞ

Stafilokokal protein A (SpA) gram pozitif bakteri olan *Staphylococcus aureus*'un hücre duvarında bulunan, alt birimlerden oluşmuş bir proteindir. SpA'nın insan, tavşan gibi çeşitli türlere ait IgG'ye yüksek afinitesi vardır [1]. SpA'nın gen dizilimi Uhlean ve arkadaşları tarafından 1984 yılında yapılmıştır [2]. SpA üç farklı bölgeden oluşur. Bunlar; salgılama sırasında sinyal sekansı olarak işlenen S [3], beş homolog IgG bağlama alanı olan E, D, A, B ve C ve SpA'nın hücre duvarına bağlandığı bölge olan XM'dir.

IgG bağlama bölgesinin her beş alt birim 58 amino asit içeren 3 antiparalel alfa-helikol yapıdan oluşur ve üç boyutlu yapısını hidrofobik çekirdek sayesinde korur. Ayrıca her alan belirli antikoların Fab kısımlarına karşı yüksek afinite gösterir [4]. IgG molekülünün Fc kısmının bağlanma merkezi B alanı ile ilgili bir çalışmada belirlenmiş ve sarmal 1 ve sarmal 2' nin 11 artık içerdikleri gösterilmiştir [5]. Ayrıca D alanı üzerinde yapılan başka bir çalışmada Fab bağlanma kısmının Fc bağlanma kısmından farklı bir yerde olduğu gösterilmiştir.

Bu bakteriyel protein IgG'ye seçici olarak bağlanma özelliğine sahip olmasından dolayı, birçok otoimmün hastalığın tedavisinde bağışıklık sistemini güçlendirmek için kullanılan IgG'nin saflaştırılmasında ticari kolonlarda kullanılan en önemli liganttir. SpA'nın saf bir halde eldesinin zahmetli olması ve birçok basamaktan oluşması bu proteini pahalı bir hale getirmiştir. Bu çalışmada pahalı bir protein olan SpA'nın, moleküler baskılanmış kriyojellerle düşük maliyette elde edilmesi hedeflenmiştir.

Çevre, ilaç ve biyoteknoloji alanlarında hızlı ve verimli yeni yöntemlere sürekli ihtiyaç duyulması, araştırmacıları, daha iyi, daha seçici ve hassas analitik çalışmaların yapılmasına yöneltmiştir. Moleküler tanıma temeline dayanan ayırma sistemleri arasında "Moleküler Baskılama" yöntemi ile hazırlanan taşıyıcılar hedef moleküle olan yüksek seçicilikleri nedeniyle oldukça ümit vaat etmektedirler. İlk defa 1972'de Günter Wulff ve çalışma grubu tarafından tanımlanan moleküler baskılama yöntemi, sentetik polimerlerde fonksiyonel grupların üç boyutlu yapılarının düzenlenmesiyle, oldukça seçici bağlanma bölgeleri elde etmek

amacıyla kullanılmıştır. Antibadi gibi biyoreseptörler, yüksek seçicilikleri nedeniyle özgül antijenlerini saflaştırmada popüler ligandlardır. Fakat yüksek seçiciliği olan bu biyolojik moleküller ortam şartlarından kolay etkilenir ve protein yapıları asidik şartlarda, yüksek sıcaklıklarda ya da proteolitik aktivite sonucunda denatüre olur. Antibadi/antijen ya da enzim/substrat gibi biyolojik sistemlerin tanıma mekanizmasını polimerik yapılara aktaran teknik "Moleküler Baskılama"dır [6].

Moleküler baskılanmış polimerler (MIP) üç önemli özellikleri nedeniyle yoğun olarak araştırmalara konu olmaktadır. Bunlardan birincisi, doğal reseptörlere yakın ölçüde seçicilik ve afiniteleri; ikincisi, doğal moleküllere göre kararlılıklarının yüksek olması; üçüncüsü ise hazırlanmalarının ve birçok farklı uygulamaya uyarlanmalarının kolay olmasıdır.

MIP adsorbentler ilaçların katı faz ekstraksiyonunda, proteinlerin, aminoasitlerin, DNA ve RNA'nın, peptidlerin, hormonların ayrılması ve saflaştırılmasında kullanılmaktadır. MIP'lerin bir diğer potansiyel kullanım alanı ilaç tasarımı, optik gibi alanlarda önemli olan kiral bileşiklerin ayrılmasıdır.

Moleküler baskılama yöntemi temel olarak üç basamaktan oluşmaktadır. İlk basamak ön-kompleksleşme basamağıdır. Fonksiyonel gruplar içeren polimerleşebilen uygun monomerler, kalıp ya da başka bir ifadeyle hedef moleküle kovalent veya non-kovalent etkileşimlerle bağlanarak kompleks oluştururlar. Bu basamakta kalıp etrafında fonksiyonel monomerin bağlandığı bir yapı oluşumu söz konusudur. Bu etkileşimde hedef molekülün üç boyutlu yapısı ve kimyasal özellikleri önemli bir yer tutar. İkinci basamak polimerleşme basamağıdır. Monomer-kalıp kompleksi, uygun bir çapraz bağlayıcının da kullanılmasıyla fonksiyonel monomer üzerinden polimerleştirilir. Üçüncü basamak kalıp molekülün yapıdan uzaklaştırılmasıdır. Yapıda hedef molekülün yerini alacak boşlukların oluşturulması amacıyla, kalıp molekül polimerden uzaklaştırılır. Uygun koşullar altında, bu boşluklar kalıp molekülün boyutunu, yapısını ve fizikokimyasal özelliklerini tanır, seçici ve etkin olarak kalıp molekülü bağlar.

Makrogözenekli polimerik malzemeler biyoteknolojide, biyotıpta ve eczacılık biliminde büyük ilgi görmektedir. Makrogözenekli polimerik malzemelerin sentezine klasik yaklaşımlar, indüklenmiş faz dağılmasını, gaz veya sıvı gözenek

oluşturucuların kullanımını, süper kritik uygulamaları veya kalıp sentezlerini içerir [7]. Son zamanlarda kriyotropik jelleşme tekniği negatif sıcaklıklarda hidrofilik makrogözenekli malzemelerin hazırlanmasında kullanılır. Bu polimerik gözenekli malzemeler kriyojeller olarak bilinirler. Kriyojeller pratik olarak bir jel oluşturan öncüllerden üretilirler ve birçok değişik morfoloji ve gözeneklere sahiptirler.

Kriyojeller, kısmen donmuş monomer veya polimer çözeltileri kullanılarak hazırlanan jel matrisleridir. Genel olarak kriyojeller birbirine bağlı makrogözeneklere (veya süpermakrogözeneklere) sahiplerdir. Bu özellikleri kriyojellerin nano-mikro ölçek aralığında herhangi bir difüzyon sorunu olmaksızın kullanımına olanak sağlamaktır. Kriyojellerin osmotik, kimyasal ve mekanik kararlılığının yanında eşsiz yapısal özellikleri sayesinde, biyolojik nanopartiküllerin (plazmitler, virüsler, hücre organelleri) ve hatta tam hücrelerin kromatografik ayrılmasında kullanılması mümkündür. Polimerik jeller, biyoteknolojide kromatografik malzeme, molekül ve hücrelerin immobilizasyonu için taşıyıcı, katı kültür ortamı ve elektroforez için matris olarak kullanılmaktadır. Polimerik jellerin geniş spektrumda kullanım olanağı bazı gereksinimlere sebep olmaktadır. Bu gereksinimler, biyolojik uygulamalar için yeni nesil jel malzemelerin geliştirilmesini ve üretimini tetiklemektedir. Biyoteknolojide uygulanma potansiyeli olan polimerik jellerden biri de kriyojellerdir. Kriyojeller, düşük veya yüksek molekül ağırlığına sahip monomer çözeltilerinin donma noktalarının altında gerçekleştirilen kriyojenik uygulama yöntemi ile hazırlanmaktadır. Kriyojeller, ilk olarak 1960'lı yıllarda rapor edilmiş ve büyük ilgi görmüştür.

Kriyotropik jelleşme, potansiyel olarak jelleşme kapasitesi olan sistemlerin kriyojenik işleme sokulmasıyla meydana gelen spesifik türdeki jel oluşumudur. Kriyojelin temel özelliği; sıcaklığın düşürülmesiyle jelleşme meydana geldiğinde, kriyojelleşmeyi soğutmayla oluşan jelleşmeden ayırt eden çözücünün zorunlu kristallenmesidir.

Kriyojellerin oluşumunda yarı donmuş sulu ortamda buz kristalleri gözenekli bir yapı oluşturur. Kalıp buz kristallerin erimesinden sonra gözenekler birbiriyle bağlanmış olur. Sistemin büyük çoğunluğunda gözenekler birbiriyle bağlantılı ve yüksek esnekliğe sahiptir. Klasik jellerin (çözeltileri homofaz sistemler iken) aksine

kriyojeller, heterofaz sistemde polimerleşir. Kriyojellerde makro ve mikrogözenekli yapılar da olabilir.

Kriyojellerin diğer özelliği, yüksek esnekliği ve süngersi morfolojisidir. Kriyojeller bu özellikleriyle, yüksek ve düşük molekül ağırlıklı öncüllerle ve sulu ortamda serbest radikal polimerizasyon ile negatif sıcaklıkta [8] hazırlanırlar. Kriyojellerin süngersi yapıları poliakrilamid (pAAM), polihidroksimetakrilat (pHEMA), polietilenglikol (PEG), dekstranmetakrilat, polivinilalkol (PVA) temeline dayanır. 1980'li yıllarda bilinmesine rağmen biyoayırma özellikleri son yıllarda fark edilen kriyojeller; disk, monolitik kolon ve küre şeklinde tasarlanabilmektedir. Moleküler baskılanmış kriyojeller antibadi, metal iyonları ve proteinlerin etkili ve seçici bir şekilde saflaştırıldığı çeşitli çalışmalar mevcuttur.

Sunulan çalışmanın amacı; protein A baskılanmış kriyojeller ile ticari değeri yüksek, pahalı bir protein olan SpA'nın yüksek saflıkla, tek basamakta *Staphylococcus aureus* hürce lizatından elde etmektir. Moleküler baskılama tekniği ile SpA seçici bir şekilde saflaştırılmasını sağlarken, geniş gözeneklere sahip kriyojel sayesinde tüm lizat akış problemi yaşanmaksızın adsorbentten geçirilebilecektir. Hazırlanan polimerlerin SpA ayırımı için tekrar tekrar kullanılabilir olması, ligant olarak başka bir pahalı protein kullanılmaması ve işlemin tek basamakta gerçekleşmesi, düşük maliyette SpA eldesi için büyük bir avantaj sağlayacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus, katalaz-negatif, sporsuz, 0.5-1.5 µm çapında, Gram (+) bir bakteri olup, Staphylococcaceae ailesinin üyesidir. İlk olarak 1978 yılında Robert Koch tarafından tanımlanmış, 1880 yılında Pasteur tarafından iltihaplı yaradan izole edilmiş, 1881 yılında Alexander Ogdson tarafından patojen olduğu belirtilmiş ve ürediğinde oluşturduğu üzüm salkımı görüntüsünden dolayı yunanca üzüm salkımı anlamına gelen “staphyle” terimi ilk kez kullanılmıştır. 1884 yılında ise Stafilokokların oluşturduğu sarı kolonilerde altın anlamına gele “aureus” kelimesi kullanılarak *Staphylococcus aureus* olarak adlandırılmıştır. Yine bu yılda stafilokoklar Micrococcaceae familyası içerisinde tanımlanmıştır. Yeni sınıflandırma ile de Staphylococcaceae familyası içine dahil edilmiştir.

2.1.1. *Staphylococcus aureus*'un Üreme Koşulları

Staphylococcus aureus, fakültatif anaerob bir bakteridir. Oksijenli ortamda üredikleri gibi ortam koşullarına göre oksijensiz de üreyebilirler. Optimum üreme sıcaklıkları 35-40 °C arasında olmasına karşın 7-48 °C arasında üremeleri mümkündür. 10-46 °C arasında ise toksin üretebilirler. Optimum 7.0-7.5 pH aralığında gelişen bu bakteriler 4.0-9.3 pH aralığında üreyebilirler. Toksin oluşturabilmeleri için gereken pH ise en az 4.9-5.1'dir. Yüksek tuz derişimlerine karşı oldukça dirençlidir. Yaklaşık % 10'luk tuz içerikli ortamlarda rahatlıkla gelişebilir.

2.1.2. *Staphylococcus aureus virulans* ve patojenitesi

Staphylococcus aureus tüm stafilokoklar arasında insan ve hayvanlarda en patojen tür olarak kabul edilir. *S.aureus* konakta infeksiyon oluştururken yapısında bulunan birçok yapısal elemanlardan, enzimlerinden ve toksinlerinden yararlanır. Bu patojenite faktörleri sayesinde fagositozdan kaçabilir, deri ve deri altına kolayca yayılabilir ve tipik apse formunu oluşturabilirler. Ayrıca toksinleri aracılığı ile farklı infeksiyonlara da neden olurlarlar ve antibiyotiklere karşı dirençlidirler.

S. aureus öncelikle sağlıklı çocuklarda ve erişkinlerde burun deliklerinin ön mukoza ve vücudun diğer nemli alanlarının yanı sıra kasık, perine ve perianal bölgede asemptomatik kolonizasyon yoluyla tutulur. Bebeklerde, doğdukları hafta içinde annelerinden aldıkları suşları kolonize hale gelir. Taşıma oranları yetişkinlere oranla çocuklarda daha yüksektir. *S. aureus* taşıyıcılığı oranları atopik dermatit, egzama, kronik deri ülserleri, ve diğer akut ve kronik deri koşulları ile ilişkili olan; insüline bağımlı diyabet; diyaliz; insan bağışıklık eksikliği virüsü (HIV) enfeksiyonu bulunan kişilerde daha yüksektir. Taşıyıcılar normal bireyler ile karşılaştırıldığında bir sonraki aşamada *S. aureus* enfeksiyonu gelişmesi için bir kaç kat daha yüksek riske sahiptir.

Cilt enfeksiyonlarının çoğundan *S. aureus* sorumludur. *S. aureus* enfeksiyonlarının yaklaşık % 5-10 invaziftir ve sık sık bakteremi ile ilişkilidir. *S. aureus* metisiline dirençli suşları vardır ve her yıl sağlık hizmeti ile ilişkili enfeksiyonların (hastane enfeksiyonu) % 50 ila 60'ına neden olur. 1990'ların öncesinde, metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA) suşları neredeyse sadece hastane veya sağlık hizmetlerinde çalışan kişilerde görülürken şimdi toplumda yaygın hale gelmiştir.

S. aureus, adhesinler, toksinler, enzimler, yüzey bağlı proteinler, kapsül polisakaritler dahil olmak üzere 50'den fazla hastalık oluşturma faktörü üretilebilir. Bu faktörlerin kodlayan genler kromozom üzerinde, ya temel genomunun bir parçası olarak ya da bakteriyofajların, patojenite adaları ve plazmidler dahil olmak üzere, mobil genetik elementlerin (artıklarından) içinde yer alabilir. Biyofilm oluşumu, vasküler kateterler veya implant cihazları gibi yabancı bir madde varlığında meydana gelir. Biyofilm bakteri hücrelerinin gömülü hale geldiği polisakkarit, DNA, protein gibi karmaşık bir ağıdır ve konak savunma mekanizmaları tarafından temizlenmesi için bakterileri ulaşılmaz hale getirir. Biyofilm içindeki organizmalar antimikrobiyal ajanlar tarafından öldürülmesi için metabolik olarak inaktif olma eğilimindedirler.

Virulans faktörleri, *S. aureus*'u dokularda barındırmak için, konak bağışıklık yanıtlarını bozmak için ve hücre hasarı ve doku invazyonunu kolaylaştırmak için etki eder.

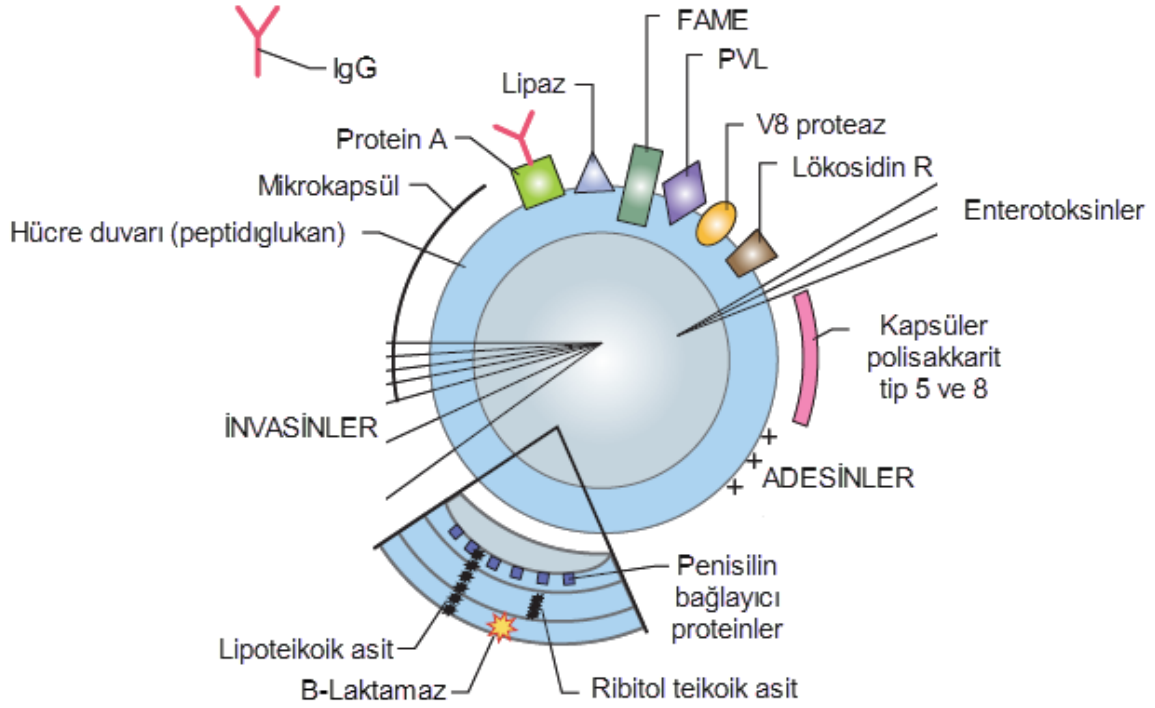
2.1.3. *Staphylococcus aureus* Hücre Duvarı Yapısı

Staphylococcus aureus hücre duvarının % 50'sini peptidoglikan tabaka oluşturur. Bu tabaka, N-asetilmuramik asit ve N-asetilglukozamin'den oluşan polisakkarit yapıdadır. Peptidoglikan tabaka insan monositlerinden polimorfonükleer lökositleri aktive eden interlökin-1 salınımını uyararak antikorların üretimini indükler ve inflamasyon oluşmasına neden olur.

Staphylococcus aureus hücre duvarının % 40'ı ise ribitol fosfat içeren polimer olan teikoik asitten oluşur. Teikoik asit hücre duvarına ya da membrana bağlı olabilir. Özgül reseptörleri ile birleşerek bakterinin konağa tutunmasını sağlar.

Ayrıca *Staphylococcus aureus*'un peptidoglikan tabakasında bulunan fibronektin bağlayan proteinler, clumping faktör, kollajen ve elastin bağlayan proteinler gibi büyük adhezinler de bulunur. Bunlar da bakterinin konak hücreye tutunmasına ve dokulara yayılmasına yardımcı olurlar.

Staphylococcus aureus'a özgü bir protein olan protein A, 42 000 Da ağırlığında, çoğunlukla peptidoglikan yapıya kovalent olarak bağlı olsa da hücre dışına da salınabilen bir proteindir. En önemli özelliği immün sistemde insan IgG'lerinin (IgG3 hariç) Fc kısmına bağlanmasıdır. Ekstrasellüler olarak salgılanan protein A antikorlara bağlanarak immün kompleks oluşturur. Stafilokokal protein A'nın antifagositik, kemotaktik ve mitojenik etkilerinin yanı sıra bakterinin koagülaz ve nükleaz aktiviteleri ile korelasyon göstermesi, antibiyotik etkinliğini azaltması gibi özelliklerinin olması bu proteinin patojenite kriteri olduğuna işaret etmektedir. *Staphylococcus aureus*'un hücre duvar yapıları Şekil 2.1 'de gösterilmiştir.

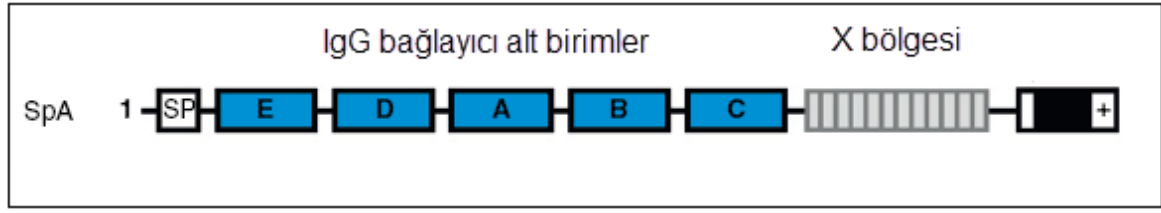


Şekil 2.1. *Staphylococcus aureus*'un virulans faktörleri [9]

2.2. Protein A

Staphylococcal protein A (SpA) Gram (+) bakterisi olan *Staphylococcus aureus*'ün hücre duvarında yoğun olarak bulunan yüzey proteindir. İlk olarak İmmunoglobulinleri çöktüren bakteriyel özelliği keşfedilmiştir [10]. Sonraki çalışmalarda ise SpA'nın IgG'nin Fc kısmına sıkıca bağlandığı [11], B lenfosit proliferasyonunu uyardığı [12], kendi klonal gelişimlerini uyararak hücre ölümünü tetiklediği gösterilmiştir [13].

Stafilokoklardan izole edilen SpA molekülü 56-61 rezidülük dört ila beş immunoglobulin bağlama bölgesi içerir [14]. Bu immunoglobulin bağlama bölgesini C-terminal ucunda çok tekrarlı değişken oktapeptit dizisi içeren Xr ve özgül sekansa sahip hücre duvarı bağlantı bölgesi içeren Xc alt birimlerinin oluşturduğu X bölgesi takip etmektedir (Şekil 2.2) [15],[16].



Şekil 2.2. Beş homolog immünoglobulin bağlayıcı alt birim, ardından stafilokok genomunun en değişken bölümü olan bölge, X ve C-terminal ucunda bir sinyal ayırma motifinden oluşan Protein A'nın şematik görüntüsü [17].

Protein A'nın 42 kDa'lık yapısı, aspartik ve glutamik asitler bakımından zengin ancak sistein yoksunu dört tekrar alanı içeren tek bir polipeptid zincirinden oluşur. Bu yapıda neredeyse hiç karbonhidrat bulunmazken sadece 4 dizi tirozin bulunur ve yapı triptofan içermez [18]. (Çizelge 2.1)

Çizelge 2.1. Stafilokokal protein A'nın amino asit içeriği.

Amino asit	Amino asit sayısı
Lizin	52
Histidin	4
Arjinin	4
Aspartik asit	80
Treonin	6
Serin	14
Glutamik asit	60
Prolin	28
Glisin	28
Alanin	36
Valin	8
Metionin	3
İzolösin	11
Lösin	28
Tirozin	4
Fenilalanin	12

SpA'nın, immüoglobulin bağlama bölgelerinden birine ait ko-kristal yapı sayesinde, bu bölgelerin iki adet immunoglobuluni, Fc ve Fab kısımlarından eş zamanlı olarak bağlayabileceği gösterilmiştir [19]. Fc_g'nin Stafilokokların hücre yüzeyine bağlanması, yüzey antijenlerini maskeleyerek stafilokokların Polimorfonükleer lökositler (PMNs) tarafından öldürülmesini engelleyen bir strateji olarak kabul edilmiştir [13]. Fab₂ alt biriminin haritalanması ile yapılan açıklamalar, SpA'nın VH3 tip3 B hücre reseptörü ile etkileşiminin açıklandığı önceki çalışmalarla uyum içindedir [20]. Aynı zamanda SpA'nın, von Willebrand faktörü (vWF) [21], gC1qR/p33 [22] ve tümör nekroz faktörü1 (TNFR1) ile etkileşiminin olduğu gösterilmiştir [23]. Aynı SpA dizisi, vWF ile bağlanabilmek için gerekli Fc_g bölgesi ile de etkileşime girmektedir [16]. vWF, endovasküler hasarlardan sonra trombosit yapışmasına aracılık eden büyük bir multimerik glikoproteindir [21]. gC1qR/p33, B hücreleri ve plateletler üzerinde yaygın bir şekilde ifade edilen yüzey proteindir [22]. Platelet etkileşimi ya da aktivasyonu, stafilokokal endokardit sırasında virulansın belirlenmesinde önemli bir faktördür [24]. SpA ayrıca EGFR ile etkileşime girerek, bir metalloproteaz olan ve soluk borusu epitelyum hücre yüzeyinden TNFR1'i ayıran TACE ile etkileşime girebilir [25]. Serbest TNFR1'in, TNF-a için hücre yüzeyine bağlı olan TNFR1'i yarışmaya sokarak enflamatuar cevabı azalttığı düşünülmektedir.

2.2.1. Monoklonal Antikorların Safılaştırılmasında Protein A

Monoklonal antikorların ilaç olarak kullanımı gün geçtikçe artmaktadır. 2008 yılında monoklonal antikorların 15 milyar doları aşan gelirleri, onları biyoterapötik ajanlar içinde en yüksek kazanç getiren ajan yapmıştır [26]. Dünya monoklonal antikor pazarında 2011 Eylül ve Kasım aylarında 2.3 milyar doları bulan yeni nesil terapötik antikorların gelirleri, ünlü araştırma şirketi Visiongain'in raporlarına göre 2015 yılında 62.3 milyar dolara ulaşacağı tahmin edilmiştir.

İlaç antikorlar en çok kanser, otoimmün hastalıklar ve enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaktadır. Fakat tedavi gereksinimini karşılamak için kullanılan antikorlar, safılaştırılmaları ve karakterizasyonları zor olan karmaşık proteinlerdir.

Yakın zamanda antikor üretiminde fabrika haline gelen Protein A kromatografisinin başarısı kanıtlanmıştır. Bununla birlikte, Protein A'nın maliyeti klasik kromatografi

reçinelerine göre çok daha pahalıdır. Bazı Protein A reçinelerin fiyatı litre başına 15 000 dolara kadar ulaşmaktadır. Protein A kromatografisine alternatif olabilecek farklı antikor saflaştırma teknikleri üzerinde çalışmalar yapılmış olmasına rağmen, şirketler ticari ölçekli monoklonal antikor saflaştırılması için Protein A'yı halen kullanmakta ve öngörülür gelecekte de kullanmaya devam edecekleri tahmin edilmektedir. Bu durumda üretim maliyetlerini düşürerek hastalar için ilaçları daha uygun hale getirmek gerekmektedir. Alternatif yöntemler yerine ticari olarak en etkin performansı veren Protein A kromatografisinin tercih edilmesinden dolayı bu yöntemin temel ligandı olan Protein A'nın maliyetini düşürmeye yönelik çalışmalar artmaktadır.

Protein A seçici olarak IgG'ler ile etkileşebilen, yaklaşık 42 kDa'lık *Staphylococcus aureus* hücre duvarı proteindir [27]. IgG₃ hariç insan IgG'lerinin tamamına kuvvetli bir şekilde bağlanır [28]. Tam boyda bir SpA, N-terminal ucundan sırası ile E,D,A,B ve C olmak üzere 5 homolog alt birimden ve bir hücre duvarı bağlanma bölgesinden oluşur [29]. SpA'nın beş alt biriminden her biri yaklaşık 58 amino asit içeren üç α -heliks demeti halinde düzenlenmiş, hidrofobik çekirdek ile stabilize edilmiş bir yapıdır. Bu alt birimlerin hepsi IgG ile bağlanabilir. Bu etkileşimler Stafilokokal enfeksiyon oluştuğunda yangı derecesinin artmasından sorumludur. Alt birimler IgG₁, IgG₂ ve IgG₄'ün Fc kısmına yaklaşık 10^8 (M⁻¹) afinite sabiti (K_A) ile güçlü, IgG₃ ile zayıf etkileşim gösterir [30]. Ayrıca her bir alt birim belirli antikorların Fab kısmı ile de yüksek afinite gösterir [5]. Bu alt birimlerden B'nin IgG ile etkileşimi en ilgi çekici olanıdır. Üçlü helikal yapıdaki B alt birimi, Fc'deki 9 amino asit ve B alt birimindeki 11 amino asit ile IgG'ye bağlanır. IgG'nin Fc bağlama bölgesi B alt biriminin birinci ve ikinci heiksteki 11 amino asit dizisi olduğu bir çalışmada gösterilmiştir [31]. Buna ek olarak başka bir çalışmada D alt birimi kullanılarak Fab bağlayıcı kısmın Fc bağlayıcı kısımdan farklı olduğu gösterilmiştir. Fab etkileşiminde yer alan 11 amino asitlik dizi ikinci ve üçüncü helikslerde yer almaktadır. Protein A ilk olarak *Staphylococcus aureus* hücre duvarından ekstrakte edilmiştir [18]. Daha sonraki çalışmalarda protein A'nın *S. aureus* kültür süpernatantına salgılandığı keşfedilmiştir [32]. İlerleyen yıllarda rekombinant DNA teknolojisindeki gelişmelerle birlikte Protein A, hücre duvarı alt birimi içermeyen *E. coli* hücreleri kullanılarak sentezlenmiştir [33], [34].

Çizelge 2.3. Farklı türlere ait immüoglobulinler ile Protein A'nın bağlanması.

Tür	Altsınıflar	Protein A
İnsan	IgG ₁	++
	IgG ₂	++
	IgG ₃	-
	IgG ₄	++
	IgA	Değişken
	IgD	-
	IgM	Değişken
Tavşan	Tamamı	++
Kobay	IgG ₁	++
	IgG ₂	++
Sığır		+
Fare	IgG ₁	+
	IgG _{2a}	++
	IgG _{2b}	+
	IgG ₃	+
	IgGM	Değişken
Tavuk	IgY	-

Güçlü bağlanma ++, orta etkileşim +, zayıf veya etkileşim yok -.

IgG, Protein A'yı Fc bölgesi ile bağlar [35]. Bu etkileşim doğada çok özel ve hidrofobiktir olmakla birlikte birkaç hidrojen bağı ve iki tuz köprüsü içerir. Yüksek seçiciliği sayesinde Protein A afinite kromatografisi ile % 98 saflıkta tek basamakta kompleks çözeltilerden ayırım gerçekleştirmek mümkündür [36]. Protein A'nın IgG'ler ile bilinen etkileşim özgülüğünün dezavantajı elüsyon için düşük pH gibi sert koşulların kullanımının zorunlu olmasıdır. Düşük pH seviyesindeki kararsızlık ve topaklanma eğilimi bazı antikorlar için sorun yaratabilmektedir. Fakat genel olarak sadece küçük miktarda topaklanmış DNA içeren safsızlıklar bulunur.

2.2.1.1. Afinite Destek Malzemelerine Ligand Olarak Protein A İmmobilizasyonu

Protein A, protein sıvı kromatografisi için uygun tüm destek malzemelerine immobilize edilmiştir. İlk olarak en popüler ürün İsveç'te Amersham (GE

Healthcare) firması tarafından siyanojen bromür (CNBr) ile aktive edilmiş Sefaroz CL 4B üzerine Protein A immobilize edilmiş kolonlardır. Bu kolonlarda yüksek seçicilik, düşük nonspesifik adsorpsiyon gözlenmiş olmasına rağmen agaroz yapıdan dolayı yüksek akış hızı için çok yumuşak kalmıştır. Bu nedenle büyük ölçekli uygulamalar için daha fazla oranda çapraz bağlayıcı içeren Sefaroz kolonlar kullanılmıştır. Modern Protein A sorbentler; gözenekli cam, gözenekli polimer jeller ile doldurulmuş mineral malzemeler ve diğer destek malzemelere dayanmaktadır [37]. Bu malzemeler yüksek akış hızında kolonun etkin çalışmasına izin verecek kadar dayanıklı malzemelerdir. Ticari olarak kullanılan bu ürünler Çizelge 2.4'te gösterilmiştir.

40 yılı aşkın süre önce antikor saflaştırmak için sabit faz olarak Protein A'nın kullanımını gösteren ilk raporların yayınlanmasından bu yana [38], [39] Protein A, klinik kullanım için monoklonal antikor saflaştırılmasında endüstriyel standart haline gelmiştir. Janssen Biotech firmasına ait Muronomab isimli ürün, akut transplant reddinin tedavisinde kullanılmak üzere 1986 yılında ABD Gıda ve ilaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanan bir CD3 spesifik monoklonal antikordur. Bu, üretim sürecinin saflaştırma basamağında Protein A kullanılan ilk üründür.

Protein A afinite kromatografisinin saflaştırma basamakları basittir: nötral pH'da bağlanma, asidik pH'da elüsyon gerçekleşir. Protein A afinite kromatografisinin endüstriyel ölçekte monoklonal antikor saflaştırılmasında evrensel kabulünün temel nedeni yöntem geliştirmenin kolaylığıdır.

Protein A afinite kromatografisinin dezavantaj ve kısıtlamalarını ortadan kaldırmakla birlikte maliyetini de düşürebilmek için çok sayıda çalışma vardır. En çok çaba matrise ligandın kemoseçici immobilizasyonunu sağlamak ve kolon temizliğinde kullanılan NaOH toleransını artırmak için rekombinant DNA tekniklerinin kullanılmasıyla gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 2.4. Protein A temelli bazı ticari afinite matrisler.

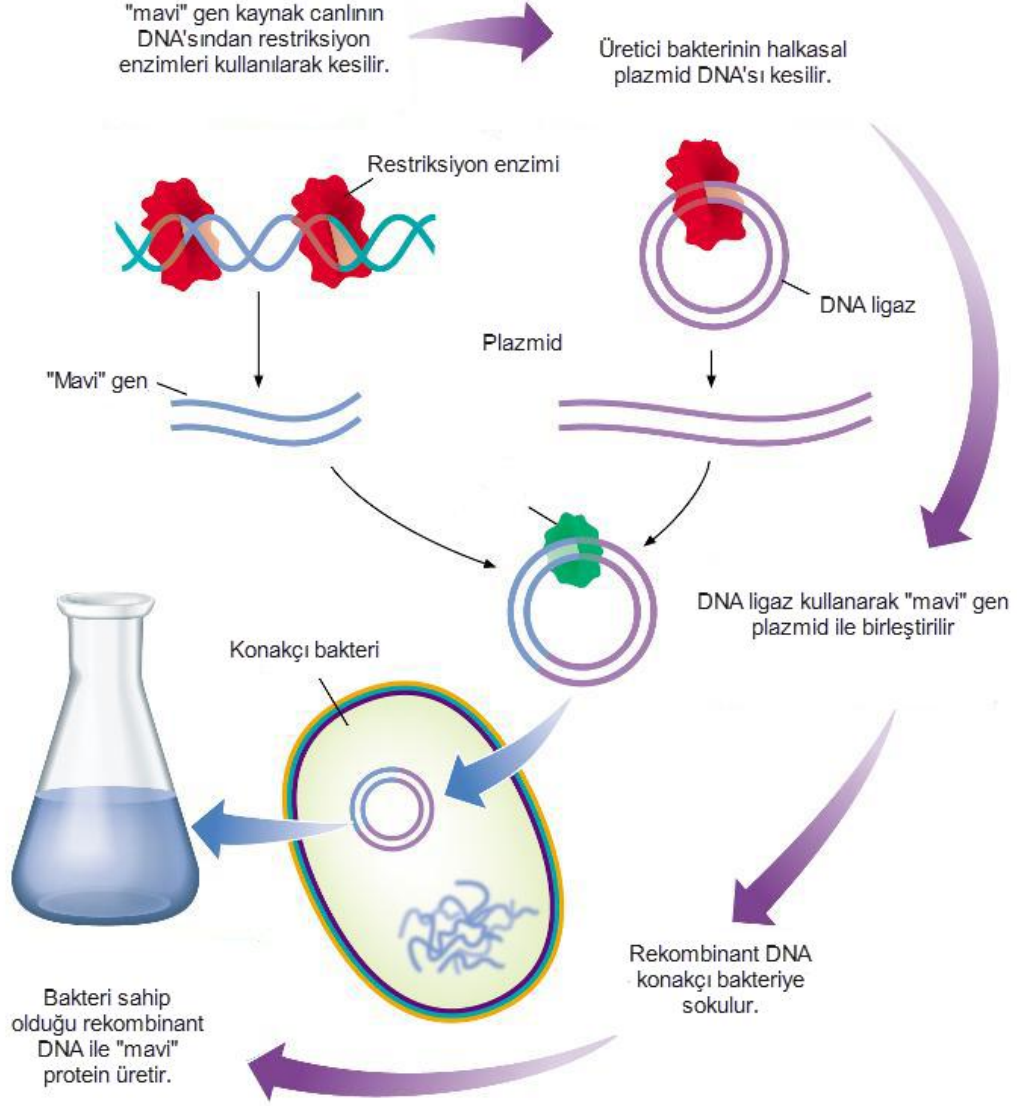
Sorbent	Firma	Matriks	Ligand
Protein A-Sepharose 6 FF Protein A-Sepharose 4 FF Protein A-Sepharose FF	GE Healthcare	Çapraz bağlı agaroz	nProtein A/rProtein A
MabSelect MabSelect Xtra MabSelect SuRe	GE Healthcare	Çapraz bağlı agaroz	rProtein A
ProSep A ProSep rA High capacity ProSep A High capacity ProSep-vA Ultra ProSep-vA High capacity	Bioprocessing/Millipore	Gözenekli cam	nProteinA /rProtein A
Protein A-Sepharose CL-4B	Fermentech	Sefaroz	nProtein A
Affi-gel-Protein-A gel Affi-gel-Protein-A gel Select	Bio-Rad	Çapraz bağlı agaroz	nProtein A
Eupergit C-Protein A	Röhn Pharma	N-Metilen-bis- metakrilamid	nProtein A
POROS 50 A POROS 50 LP POROS 50 A High Capacity	PerSeptive Biosystem	Polistiren/divinil benzen	rProtein A

Rekombinant Protein A (rProtein A), doğal Protein A (nProtein A)

2.2.2. Rekombinant Protein A

Rekombinant DNA teknolojisi, genetik rekombinasyon olaylarının yapay yollarla gerçekleştirilmesine dayanan, istenen DNA bölgesinin çoğaltılarak başka canlılara aktarıldığı genetik mühendisliği yaklaşımıdır. Rekombinant DNA teknolojisinin ilk çalışmaları 1971'de DNA'yı, özgül nükleotit dizilerinden kesmek için kullanılan "restriksiyon enzimleri" keşfi ile başlamış ve 1970'lerin ortalarından sonra da

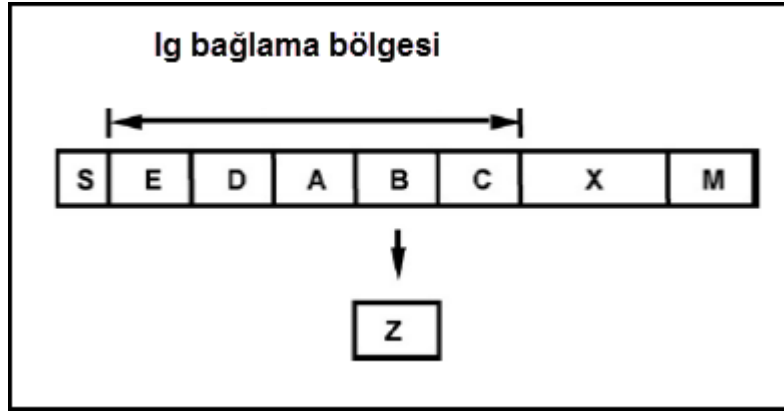
geliştirilmiştir. Yöntem temelde üç farklı amaç için kullanılmaktadır. Bunlar; genetik hastalıkların tanısı, mikrobiyolojik tanı ve endüstriyel protein üretimidir.



Şekil 2.3. Bakteriler tarafından rekombinant protein üretiminin şematik gösterimi.

Bu yöntemin endüstriyel amaçlı kullanımında ilk olarak hedef canlısının DNA'sı izole edilir. Hedef hücreden izole edilen DNA'nın klonlanacak bölgesi restriksiyon enzimleri ile kesilerek, bu bölgeyi konakçı hücreye aktaracak vektör olarak kullanılan plasmidlere aktarılır. Rekombinant DNA molekülleri (plasmid) konakçı hücreye transfer edilir ve konakçı istenen proteini üretmeye başlar. Bu teknikle rekombinant DNA tarafından konakçı canlıya ürettirilen proteine **rekombinant protein** adı verilir. Bu şekilde çeşitli amaçlar için istenen proteinlerin başka bir canlı tarafından üretilmesi mümkün olmaktadır (Şekil 2.3).

Rekombinant Protein A, stafilokokal Protein A'nın B alt biriminin, hidroksilamin kullanılarak füzyon proteinlerinin özel bölgelerdeki kimyasal parçalanmalara karşı direncini arttırmak için, 28 ve 29. dizideki hassas asparajin-glisin (Asn-Gly) dipeptitleri mutajen asparajin-alanin (Asn-Ala) dipeptitleri ile protein mühendislik teknikleri kullanılarak değiştirilmesi sonucu Z alt birimi oluşturulması ile elde edilir [3] (Şekil 2.4). Alaninin iki molekül arasındaki etkileşimden rahatsız olması nedeniyle, G29A ile ifade edilen tek mutasyonla B alt biriminin Fab ile etkileşimi azalmıştır [5]. IgG saflaştırmak için afinite ligandların kullanımı ile ilgili yapılan çalışmalarda Z alt biriminin IgG bağlama kapasitesi, doğal SpA ile mol olarak aynı bağlama kapasitesine sahip olduğu gösterilmiştir [40].



Şekil 2.4. Stafilokokal protein A [salgılaşma sırasında işlenen sinyal dizisi, (S), beş homolog IgG bağlama bölgesi (E, D, A, C) ve bir hücre duvarı bağlama bölgesinden oluşan ve hücre zarı ile bağlantılı bir protein olan XM]. B alt biriminin mühendislik ürününe karşılık gelen, yaygın olarak kullanılan Z alt biriminin şematik gösterimi [41].

2.3. Moleküler Baskılama Teknolojisi

Moleküler baskılama teknolojisi (MIT) günümüzde, antikor ve biyolojik reseptörler gibi doğal tanıyıcıları taklit edebilen sağlam moleküler tanıma merkezleri tasarlamak için kullanılan sentetik bir yaklaşımdır [6], [42].

Doğada bulunan tanıma süreçlerini taklit edebilen sentetik malzemelerin tasarımı, doğal sistemlere benzer tanıma yeteneğine sahip malzeme oluşturmak için moleküler baskılama üzerine yapılan araştırmalar son yıllarda önemli ve aktif bir alan haline gelmiştir. MIT; amino asitler ve proteinler [43], nükleotid türevleri, kirleticiler [44], uyuşturucu ve gıda maddeleri [45] dahil olmak üzere hem biyolojik

hem de kimyasal molekülleri tanıyabilen, çok yönlü ve gelecek vaat eden teknik olarak kabul edilmektedir. Ayrıca saflaştırma [46], kimyasal sensörler, kataliz, ilaç salınımı [47], biyolojik antikolar ve reseptör sistemleri gibi uygulama alanları bulunmaktadır.

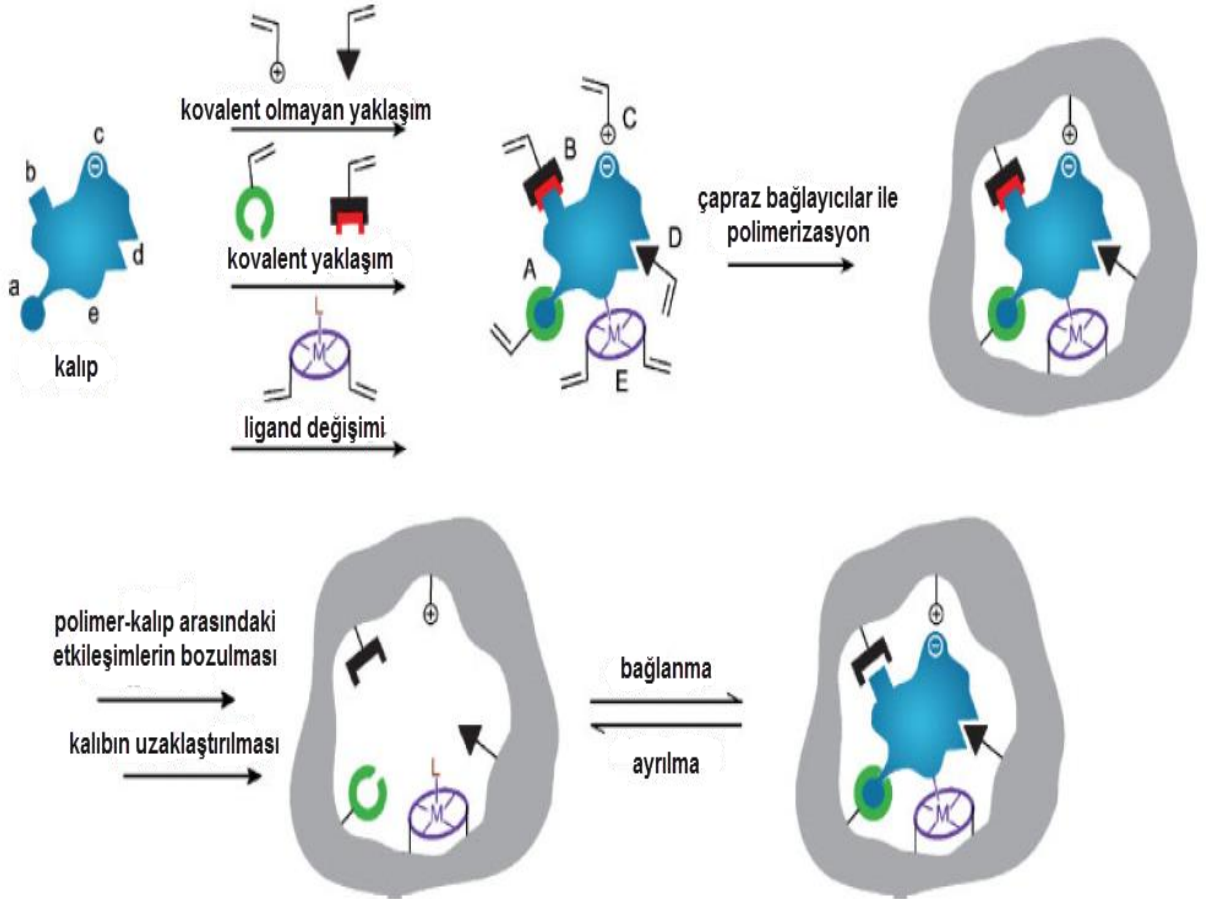
MIT bir kalıp molekül ve bir fonksiyonel monomer arasındaki kompleks oluşumuna dayanır. Bir çapraz bağlayıcının yeteri miktarda varlığında, üç boyutlu bir polimer ağı oluşturulur [48]. Polimerizasyon işleminden sonra, kalıp molekülün çıkarılmasıyla şekil, boyut ve kimyasal işlevleri açısından tamamlayıcı spesifik tanıma bölgeleri oluşur. Genel olarak kalıp molekül ve fonksiyonel gruplar arasındaki, hidrojen bağları, dipol-dipol ve iyonik etkileşimler gibi moleküller arası etkileşimlerin polimer matrisi içinde mevcut moleküller tanıma alanlarını oluşturur. Bu durumda, elde edilen polimer, sadece hedef molekülleri tanır ve onlara seçici olarak bağlanır.

Moleküler baskılanmış polimerlerin (MIPs) başlıca avantajları baskılama işleminde kullanılan hedef molekül için yüksek seçicilik ve afiniteye sahip olmasıdır. Bu tür baskılanmış polimerler protein ve nükleik asit gibi biyolojik sistemler ile karşılaştırıldığında yüksek sıcaklığa ve basınca, asitlere, bazlara, metal iyonlarına ve organik çözücülere karşı daha yüksek fiziksel sağlamlık ve dayanıklılığa sahiptir. Buna ek olarak, sentezlenmesinin daha az maliyetli olması ve polimerlerin oda sıcaklığında birkaç yıl depolanabilmesi, ayrıca tanıma bölgelerinin ve tutma kapasitesinin çok daha yüksek olması diğer avantajlarıdır.

2.3.1. Moleküler Baskılama Teknolojisinin Temel Prensipleri

Yukarıda belirtildiği gibi moleküler baskılama, yüksek çapraz bağlı seçici moleküler tanıma yeteneğine sahip polimerler sentezlemek için kullanılan bir tekniktir. Moleküler baskılamanın temel prensipleri Şekil 2.5'de özetlenmiştir. Buna göre, monomerin polimerizasyonu, polimer matrisin içine dahil olan hedef molekül (kalıp) varlığında gerçekleşir. İşlem, gözenek oluşturucu bir çözücü içinde çözülmüş kalıp molekül, fonksiyonel monomer, çapraz bağlayıcı ve başlatıcı ile başlatılır. Kararlı bir kalıp-monomer kompleksi oluşumu, moleküler tanıma başarısı açısından önemli olduğu için bu işlemde kalıp molekülü ile etkileşme girebilecek fonksiyonel monomer seçilir. Monomerler, kalıp etrafında uzamsal şekilde

konumlandırılır ve konumu çapraz bağlayıcıların kopolimerizasyonu ile sabitlenir. Elde edilen polimer, kalıp molekülü tamamlayıcı üç boyutlu yapı ile mikro boşluklara sahip olan makrogözenekli bir matristir. Kalıp molekülün şeklini tamamlayıcı olan bağlanma yerlerinin oluşturulması için, çözücü ile yıkayarak kalıp molekülün polimerden uzaklaştırılması sağlanır. Sonuç olarak, elde edilen polimer kalıp molekülü tanır ve kalıp moleküle seçici olarak bağlanır [49].



Şekil 2.5. Moleküler baskılama işleminin şematik gösterimi: kalıp molekül ve polimerleşebilen fonksiyonel grup arasındaki tersinir etkileşimlerin oluşumunun ardından etkileşimlerin bir ya da daha fazlasını içerebilir. (A) tersine çevrilebilir kovalent bağlar, (B) kovalent olarak bağlı polimerleşebilen bağlayıcı gruplar, bu molekülün ayrılmasıyla kovalent olmayan etkileşimler için etkinleştirilir, (C) elektrostatik etkileşimler, (D) hidrofobik veya van der Waals etkileşimleri, (E) metal koordineli etkileşimler [50].

Bağlanma bölgeleri, polimerizasyon esnasında oluşturulan etkileşimlere bağlı olarak farklı özellikler gösterir. Genellikle moleküler baskılama tekniği, polimerizasyon sırasında monomer ve kalıp molekül arasındaki etkileşimlerin niteliğine göre sınıflandırılır.

Günümüzde, MIP teknolojisinde kalıp molekül ve monomer arasında ön-polimerizasyon etkileşimine bağlı olarak kullanılan iki temel strateji vardır. Bunlardan ilki Wulff [51] tarafından tanıtılan kovalent etkileşimlere, ikincisi ise Mosbach [52] tarafından önerilen kalıp molekül ile fonksiyonel monomer arasındaki kovalent olmayan etkileşimlere dayanan yaklaşımdır.

2.3.1.1. Kovalent Baskılama

Kovalent baskılamada genel olarak kalıp moleküller, 4-vinilfenilboronik asit ve 4-vinilbenzilamin gibi uygun monomere kovalent bağlarla bağlanırlar. Polimerizasyondan sonra kovalent bağlar koparılarak kalıp molekül polimerden uzaklaştırılır. Molekülün tekrar bağlanması için de kovalent bağlar tekrar kurulur. Kovalent bağların daha karalı olması nedeniyle, kovalent baskılamanın uygulandığı protokollerde daha homojen bağlanma bölgesi dağılımı elde edilir. Ancak, kovalent baskılama daha az esnek bir yöntem olarak kabul edilir. Kalıp moleküller ve fonksiyonel monomerler arasındaki bağlar yeni bağlanmaların oluşabilmesi için hızlı geri dönüşümlü kovalent etkileşimler olmalıdır. Bu nedenle, kovalent baskılama için uygun olan kalıp moleküller sınırlıdır. Ayrıca, güçlü kovalent etkileşimlerin doğası gereği termodinamik dengeye ulaşmaları çok zor olduğu için bu tip etkileşimlerde bağlanma ve ayrılma yavaş olur.

2.3.1.2. Kovalent Olmayan Baskılama

Kovalent olmayan baskılamada ise kovalent baskılamada bulunan kısıtlamalar yoktur. Kovalent olmayan baskılama uygun bir çözücü içinde kalıp molekül-monomer kompleksleri arasındaki hidrojen bağları, iyonik etkileşimler, Van der Waals kuvvetleri, metal koordineli etkileşimler ve hidrofobik etkileşimler gibi çeşitli etkileşimlere dayanarak oluşturulmaktadır. Polimerizasyon ve kalıp molekülün uzaklaştırılmasından sonra işlevsellik kazanmış polimer matris aynı kovalent olmayan etkileşimler aracılığı ile hedef molekülü tekrar bağlayabilir. Böylece baskılamada kullanılacak moleküllerin çeşitliliği artar. Yukarıda sözü edilen avantajların yanı sıra bir başka avantaj da, sadece gerekli olan uygun bir çözücü içinde kalıp molekül ve monomerin karışmasıyla uygulanan işlemin basitliğidir.

Günümüzde, kovalent olmayan baskılama moleküler baskılama teknolojisi için en popüler ve genel sentez stratejisi haline gelmiştir.

2.3.2. Moleküler Baskılamada Kullanılan Ajanlar

Polimerleşme reaksiyonu, tipi ve monomer derişimi, çapraz bağlayıcı ve başlatıcı, sıcaklık ve polimerizasyon, bir manyetik alanın varlığı veya yokluğu, zaman ve ses gibi birçok faktör tarafından etkilenebilen, çok karmaşık bir işlem olarak bilinir. İdeal baskılanmış polimeri elde etmek için çeşitli faktörleri optimize etmek gerekir. Bu nedenle moleküler baskılanmış polimerlerin sentezi zaman alıcı bir süreç gerektirir. Mükemmel özelliklere sahip moleküler baskılanmış polimerlerin hazırlanması için, polimerik maddelerin bağlanma özellikleri üzerindeki bazı etkilerini araştırmak amacıyla çeşitli denemeler yapılmıştır. Moleküler baskılama sürecindeki en önemli adım uygun reaktif seçimidir.

2.3.2.1. Fonksiyonel Monomerler

Monomerin rolü, kovalent veya kovalent olmayan etkileşimler aracılığıyla kalıp molekül ile kompleks oluşturabilecek işlevsel grupları sağlamaktır. Kalıp molekül ve monomer arasındaki etkileşimlerin gücü moleküler baskılanmış polimerlerin afinitesini etkileyerek tanıma bölgelerinin doğruluğunu ve seçiciliğini belirler. Daha güçlü etkileşim ve daha kararlı bir kompleks, moleküler baskılanmış polimerlerin yüksek bağlanma kapasitesine sahip olmasını sağlar ve bu nedenle fonksiyonel monomerin doğru seçimi çok önemlidir. Zahmetli deneme-yanılma testleri genellikle uygun monomer seçmek için gerekmektedir. Moleküler baskılanmış polimerlerin tasarımını ve sentezini gerçekleştirmek için spektroskopik ölçümler, bilgisayar simülasyonu, izotermal titrasyon gibi yöntemler kalıp molekül ile daha kararlı kompleksler oluşturabilen optimum fonksiyonel monomerler seçmek amacıyla kullanılmaktadır.

Moleküler baskılama için yaygın olarak kullanılan monomerler, metakrilik asit (MAA), akrilik asit (AA), 2- ya da 4-vinilpiridin (2- veya 4-VP), akrilamid, trifluorometakrilik asit ve 2-hidroksietil metakrilat (HEMA) 'dır. MAA bir hidrojen bağ vericisi ve alıcısı olarak hareket etme yeteneğine sahip olduğu ve iyonik

etkileşimler için iyi uygunluk gösterdiği için 'evrensel' fonksiyonel monomer olarak kullanılmaktadır.

Genellikle, sentez sürecinde kalıp molekül ve monomer arasındaki molar oranları moleküler baskılanmış polimerlerin afinitesini ve baskı verimliliğini etkiler. Düşük molar oranları nedeniyle daha az kalıp-monomer komplekslerine ve polimerlerde daha az bağlayıcı alanlara neden olurken, aşırı yüksek mol oranlarına sahip olanlar azalan bağlanma seçiciliğine, daha az spesifik bağlanma alanlarına sahiptir. Bu nedenle, yüksek baskı verimi elde etmek için, monomerlerin kalıp moleküllere oranı (mol) optimize edilmelidir.

2.3.2.2. Çapraz Bağlayıcılar

Çapraz bağlayıcının rolü, baskılanmış moleküllerin etrafındaki fonksiyonel monomerlerin fonksiyonel gruplarını sabit tutabilmek için yüksek düzeyde çapraz bağlayıcı içeren sert polimerler oluşturmaktır. Kalıp molekül uzaklaştırıldıktan sonra oluşan boşluklar, tam şekil ve fonksiyonel gruplar olarak moleküler hedefi tamamlamalıdır. Çapraz bağlayıcıların türlerinin ve miktarlarının, moleküler baskılanmış polimerlerin seçicilik ve bağlama kapasiteleri üzerinde yüksek etkisi vardır. Çapraz bağlayıcıların seviyesi çok düşük olduğunda, moleküler baskılanmış polimerler sabit boşlukların şeklini koruyamazlar. Bununla birlikte çapraz bağlayıcıların yüksek miktarlarda kullanımı moleküler baskılanmış polimerlerin birim kütlesi başına düşen tanıma bölgelerinin sayısını azaltacaktır. Yaygın olarak kullanılan çapraz bağlayıcı maddeler, etilen glikol dimetakrilat (EGDMA), trimetilolpropan trimetakrilat (TRIM), *N, N*-metilenbisakrilamid (MBAA) ve divinilbenzen (DVB) 'dir.

Hidrofobik kuvvetler kompleks oluşum sürecine dahil olduğu takdirde, su ya da diğer protik çözücüler de seçilebilirken genellikle, tolüen veya kloroform gibi apolar, non-protik çözücüler moleküler baskılanmış polimerlerin sentezinde tercih edilir.

2.3.2.3. Başlatıcılar

Günümüzde moleküler baskılanmış polimerleri sentezlemek için kullanılan en yaygın yöntem serbest radikalik polimerizasyondur. Genel olarak, sentez işlemi toplu olarak veya çözelti içinde hafif reaksiyon koşulları altında gerçekleştirilir ve fonksiyonel grupların ile kalıp molekülün yapıları geniş bir aralık için tolerans gösterir. Polimerizasyon reaksiyonu çok hızlıdır. Genellikle azo N-N'-bis izobutironitril (AIBN) gibi bir azo-başlatıcı ile termal veya fotokimyasal olarak başlatılır.

2.3.2.4. Çözücüler

Ayrıca, çözücünün yapısı ve hacmi de moleküler baskılama sürecinde önemli bir rol oynamaktadır. Moleküler baskılanmış polimerlerin sentezi için en yaygın olarak kullanılan çözücüler toluen, kloroform, diklorometan ya da asetonitril'dir. Çözücüler, polimerleşme sürecinde tüm bileşenleri (monomer, şablon, başlatıcı, çapraz bağlayıcı) bir faza getirmekten ve gözenekli polimerlerde gözenekleri oluşturmaktan sorumludur. Çözücülerin hacminin artırılması ile moleküler baskılanmış polimerlerin iyi bir akış sağlamak için gerekli özelliği olan büyük gözenekleri üreterek polimerin gözenek hacmi genişletilebilir. Bu nedenle "gözenek oluşturucu" olarak çözücü kullanmak oldukça yaygındır. Kovalent olmayan baskılama yönteminin kullanıldığı polimerleşme reaksiyonlarında gözenek yapıcılar, kalıp molekül ile fonksiyonel monomer kompleks oluşumunu nasıl etkilediğini göz önünde bulundurarak seçilmelidir: kloroform veya toluen gibi daha az polar çözücüler, hidrojen bağları gibi polar kovalent olmayan etkileşimleri kolaylaştırarak kompleks oluşumunu artırırken; daha fazla polar çözücüler, ön-polimer kompleksindeki hidrojen bağların bozulmasını sağlayarak kovalent olmayan etkileşimleri ayırma eğilimindedir.

2.3.3. Moleküler Baskılanmış Polimerlerin Karakterizasyonu

Moleküler baskılanmış polimerleri, çözünmeyen yapılarından dolayı karakterize etmek zordur. Bununla birlikte, bazı analitik teknikler, katı faz nükleer manyetik rezonans (NMR) teknikleri [53], element mikro analizi ve Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR) [54] dahil olmak üzere polimer bileşiminin

kimyasal yapısı hakkında bilgi elde etmek için uygulanan yöntemler, moleküler baskılanmış polimerlerin kimyasal ve morfolojik özelliklerini belirlemek için de kullanılabilir. Katı faz NMR, çözünmeyen polimerlerin kimyasal bileşiminin belirlenmesi için yararlı bir yöntem olsa da CP-MAS (çapraz polarizasyon sihirli açılı spin) NMR spektrumu, moleküler baskılanmış polimerlerin karakterizasyonu için bir kaç çalışmada rapor edilmiştir [53]. Daha sık olarak FT-IR, fonksiyonel grupların değerlendirilmesi amacıyla polimere ilave edilmeden ve polimer ile fonksiyonel monomer arasındaki azalan veya yok olan spektrumları karşılaştırma yoluyla moleküler baskılanmış polimerlerin karakterizasyonu için kullanılmıştır.

Moleküler baskılanmış polimerlerin morfolojik özellikleri, polimer kürelerin doğal yapısını doğrulamak için ışık mikroskobu, polimerin makrogözenekli yapısını görüntülemek için taramalı elektron mikroskobu (SEM) gibi mikroskopik yöntemler kullanılarak incelenebilir. Ayrıca daha büyük gözenekler için uygun olan civa porozimetresinin de kullanılıyor olmasına rağmen, azot porozimetresinin kullanıldığı BET (Brunauer, Emmett ve Teller) analiz yöntemi yüzey alanı, gözenek hacmi, gözenek boyut dağılımı ve ortalama gözenek çapının belirlenmesinde kullanılan ana tekniktir.

Ancak, moleküler baskılanmış polimerlerin en önemli karakterizasyon basamağı, bağlama kapasitesi ve seçicilik gibi faktörlerin değerlendirildiği moleküler tanıma davranışlarının incelenmesine dayanır. Genellikle daha hızlı ve daha kolay bir yöntem olan kromatografik sabit faz moleküler baskılanmış polimerlerin bağlanma özelliklerinin analizinde doğrudan kullanılabilir. Scatchard analizi, kesikli tekrar bağlama deneylerinde moleküler baskılanmış polimerlerin bağlanma davranışlarını değerlendirmek için kullanılan ortak bir modeldir. Öte yandan Freundlich ve Langmuir-Freundlich izotermi moleküler baskılanmış kolon kromatografisinin özelliklerini anlamak için kullanılabilir en uygun teorik modeldir. Ayrıca sürekli heterojen bağlama modeli olarak adlandırılan bu yöntem, moleküler baskılanmış polimerlerin toplam bağlama bölgesini, heterojenlik indeksini yani bağlanma afinitesini iyi bir şekilde karakterize eder.

Moleküler baskılanmış polimerlerin değerlendirilmesinde farklı moleküllere karşı seçiciliğin belirlenmesi önemlidir. Genellikle kalıp molekülün yapısına bağlı olarak, polimerizasyon esnasında kalıp molekülün varlığı yüzey alanı ve gözeneklilik gibi

polimerin morfolojisinde genel değişimlere neden olduğundan, baskılanmış bölgeler kalıba özel olmayabilir. Diğer taraftan baskılama faktörü seçicilik sonuçları ile birlikte ele alınmalıdır. Çünkü belirli baskılanmış alanlardan ziyade kendi özel fizikokimyasal özellikleri nedeniyle başka bir yere bileşiğin daha iyi tutunması gerçekleşebilir.

2.3.4. Moleküler Baskılanmış Polimerlerin Uygulamaları

Moleküler baskılanmış polimerlerin kendine has özellikleri, onları ayırma ve saflaştırma alanlarında, sensörler ve biyosensörlerde, kataliz ve ilaç dağıtımı gibi farklı uygulama alanlarında son derece ilginç bir araç haline getirmiştir. Moleküler baskılama kromatografisi, önceden belirlenmiş seçicilik ile özel tasarlanmış desteklerin hazırlanmasını sağlayarak kromatografik ayırma için oldukça uygun olan moleküler baskılanmış polimerlerin en yaygın uygulama alanlarındandır. Optik açıdan saf olan bileşiklere olan talebin artması ile, özellikle ilaçların rasemik çözeltilerinin elde edildiği kiral ayırmalar, moleküler baskılanmış polimerlerin bir başka önemli uygulama alanı haline gelmiştir. Moleküler baskılanmış polimerlerde katı faz ekstraksiyonu sadece örneklerin ön deriştirilmesi ve temizlenmesi için değil aynı zamanda hedefin seçici bir şekilde analiz edilmesini sağlayan kompleks matrislerin seçici sorbentler olarak ortaya çıkmasını sağlamıştır.

Son zamanlarda bazı çalışmalar moleküler baskılanmış polimerlerin, immüno analizlerde kullanılan ve doğal antikorları taklit eden yapay bağlayıcılar olarak kullanıldığını göstermiştir.

Dikkate değer araştırmalarda, aynı zamanda, bazı tepkimeleri katalizlemek için de etken malzemeler olarak moleküler baskılanmış polimerlerin kullanıldığı gösterilmiştir. Katalitik özelliklere sahip moleküler baskılanmış polimerlerin doğal enzimleri taklit ettiği kabul edilerek enzim benzeri katalizlerde uygulanabilir.

Son olarak medikal tedavi edici alanlarda, belirli koşullarda moleküler baskılanmış polimerlerin biyoaktif molekülleri bağlayabilmesi, moleküler baskılama teknolojisini uygun dozaj formları oluşturmak için büyük bir potansiyel yapmıştır.

2.4. Kriyojeller

Polimerik kriyojeller, uygun öncüllere ait çözeltilerin ya da koloidal dağılımların kriyojenik işlemleri ile (donma - dondurarak saklama - çözünme) oluşturulan jel sistemleridir [55]. Kriyojeller mikroskopik düzeyde incelendiğinde, dondurulmuş moleküller veya kolloid çözeltiler hem katı madde (yani dondurulmuş çözeltideki kristal yapılar) hem de “donmamış sıvı mikrofaz” olarak adlandırılan bazı donmamış çözünenlerin bulunduğu heterofaz sistemlerden oluştuğu görülür [56]. Bu durumda donmuş çözücü kristalleri gözenek oluşturucu olarak görev yaparken, jelleşme sadece sistemin ikincil donmamış bölgelerinde oluşur. Böyle özel koşullar sonucunda jel oluşumu ile ortaya çıkan polimer malzemenin oldukça sıra dışı makrogözenekli morfolojileri ve işlenebilirlikleri sayesinde fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesinde önemli rol oynar.

Kriyojel terimi ilk olarak 1984 yılında dondurulmuş organik ortam içinde makromoleküler öncüllerin kimyasal çapraz bağlayıcılar ile hazırlanan polimerik malzemeleri tanımlamak için kullanılmıştır. Bu terim, jel ailesinin özel oluşum koşullarını vurgulayarak “kriyo” (yunanca don ya da buz anlamına gelen kryos’dan gelir) ve “jel” kelimelerinin birleştirilmesiyle oluşturulmuştur. Bunun yanı sıra farklı koşullarda dondurulmuş jeller için: kriyokoaservat [57], kriyokoagulat, kriyokonsantre jeller, anormal jeller, donma çözünme jelleri gibi isimler kullanılmıştır. Ancak 1980’lerin sonunda kriyojel teriminin kullanımı daha popüler ve yaygın hale gelmiştir.

2.4.1. Kriyotropik Jelleşmenin Temel Prensipleri

Geleneksel kovalent jellerle aynı şekilde kovalent kriyojeller, ya kovalent çapraz bağlanma polimerizasyonu ya da monomer ön-polikondensasyonu ile veya yüksek molekül ağırlıklı bileşiklerin çapraz bağlanması yolu ile (kimyasal ya da radyasyon ile), ikinci olarak ya moleküler-çözünmüş ya da koloidal dispersiyon formlarında hazırlanır. Kovalent olmayan (fiziksel) kriyojellerde ise başlangıç çözeltilerinde genellikle su/jelatin ve poli(akrilonitril)/N,N-dimetilformamid gibi çözeltileri belli bir sıcaklığın altında kendi kendine jelleşebilecek sistemler ya da jelatinize nişasta macunu gibi koloidal dağılımlar ya da “buza duyarlı” lateksler kullanılır. İyonik kriyojeller temelde, bazı makromoleküler öncüllerin yüklü grupları ile iyonik

bağlarla çapraz bağlantı kurabilen polielektrolit çözeltilerinden oluşturulabilir. Bütün bu durumlarda kriyojel hazırlama işlemi aşağıdaki temel aşamaları içerir.

- Besleme sisteminin hazırlanması
- Besleme sisteminin dondurulması
- Donmuş sistemin inkübasyonu
- Donmuş sistemin çözülmesi

Öncüllerin özelliklerini de içeren her basamak dahil olmak üzere kriyojel oluşumunun her aşaması jel oluşumunun etkinliğini ve dolayısıyla yapısını etkiler.

2.4.1.1. Besleme Sisteminin Hazırlanması

İlk bakışta, kriyojel öncüllerini içeren beslemenin hazırlanması oldukça basit ve rutin bir işlemdir. Bu, hem pozitif hem de negatif sıcaklıklarda herhangi bir jel malzemenin hazırlanması için gerekli bir basamaktır. Bununla birlikte, kriyotropik jel oluşumunun gerekli olan özelliklerini genellikle ilk sistemin hazırlanmasındaki bazı şartlar belirler. Örneğin, besleme sistemini dondurmadan önce jel öncüllerinin jelle dönüşümünü en aza indirmek gerekir. Aksi takdirde, eğer çözücünün kristalleşmesinden önce jelleşme olursa, ağırlık üç boyutlu yapısında bozulmalar olabilir. Böyle hızlı bir şekilde kemotropik jellerin oluşturulması sakıncalıdır çünkü kovalent bağlar, polimerik zincirlerin büyüyen çözücü kristalleri tarafından kolayca kaydırılarak ayrılmasına izin vermez.

Hala donmamış olan besleme sisteminin jelleşmesini ertelemek için iki yöntem vardır. İlk yöntem jelleşme reaksiyonları başlamadan önce mümkün olduğunca çabuk besleme sistemini dondurmaktır. Diğer yöntem ise, başlatıcı (polimerizasyon ile hazırlanan kriyojellerde) ya da çapraz bağlayıcıları (makromoleküler öncüllerin çapraz bağlanması ile hazırlanan kovalent kriyojellerde) eklemeyen önce sistemi donma noktasının üzerinde bir sıcaklığa getirerek soğutmaktır.

2.4.1.2. Besleme Sisteminin Dondurulması

Başlangıç öncüllerini içeren sistemin dondurulması, hem sonraki adımda kendiliğinden jel oluşumu için hem de elde edilen kriyojellerin özelliklerinin

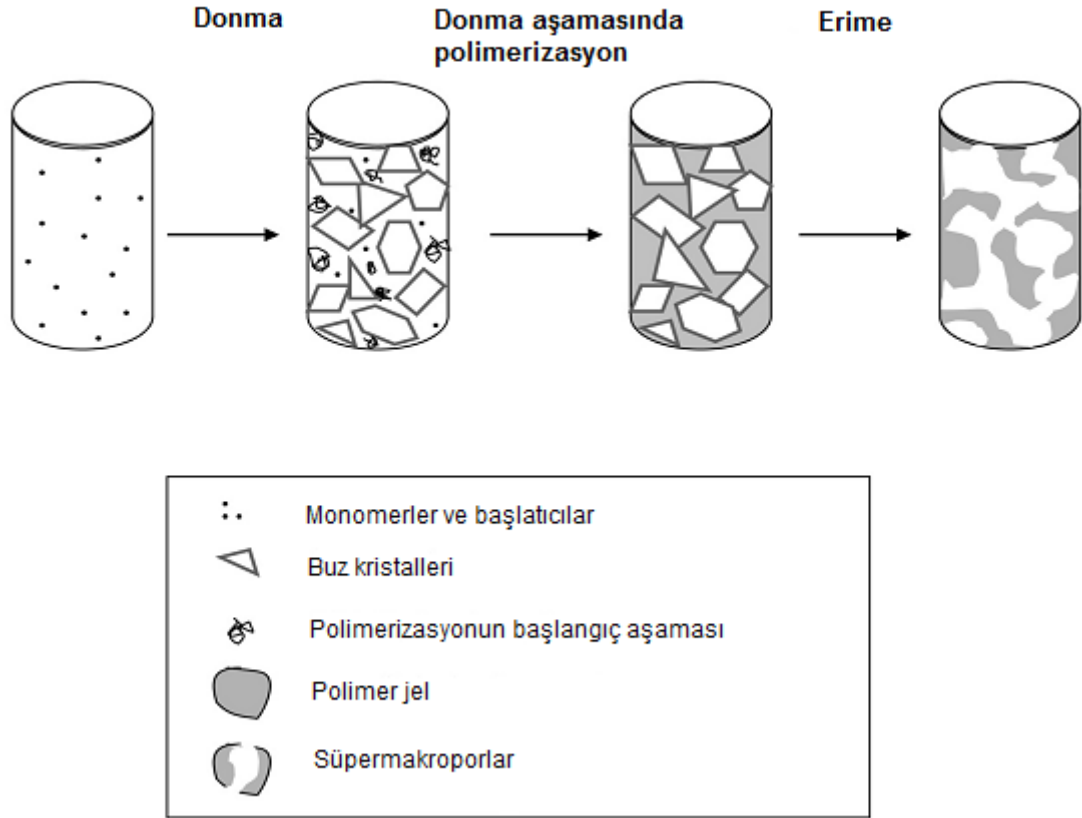
belirlenmesi açısından önemli bir basamaktır. Bunun nedeni, sıvı besleme sisteminin buza bağımlı katı sistem içinde dönüşümü sırasındaki bir arada gerçekleşen çeşitli işlemlerdir. Bu işlemler çözünmüş/dağılmış jelleşme bileşenlerin termal hareketliliğini, donmamış sıvı fraksiyonun hacmini, viskozitesini ve polaritesini değiştirebilir. Ayrıca, dondurucu koşullara bağlı olarak, bu şekilde elde edilen kriyojellerin makro-gözenekli morfolojisini kutuplaşma, boyut ve artan çözücü kristalleri şeklinde etkilemektedir. Diğer bir deyişle, öncül maddelerin başlangıçtaki moleküler ya da koloidal çözeltilerinin donma özellikleri sadece jelleşme verimliliğini değil aynı zamanda oluşan kriyojelin yapısal özelliğini de belirler.

Dondurma işleminin anahtar parametreleri; sıcaklık, soğutma hızı ve eğer özel işlemler kullanılırsa yönlendirilen ısı emici, başlangıç sıvı sistemin özelliği, kristalleşmeye özel olarak eklenmiş (örneğin, toz parçaları) ya da istemsiz olarak ortamda bulunan mikroplar, malzemenin termal iletkenliği, aşırı soğutulmuş olan ve dondurulacak besleme çözeltisini içeren kabın iç yüzeyinin özellikleridir. Bu durumda, çok düşük olmayan ortam sıcaklığında aynı anlama gelmeyen iki kelime olan soğutma hızı ve dondurma hızını tanımlamak gerekir. Örneğin soğutma hızı, hassas programlanabilir kriyostatlar kullanılarak, oldukça sıkı bir şekilde kontrol edilebilirken, çözücü kristalleşme hızına karşılık gelen dondurma hızı ise başta aşırı soğutmanın yoğunluğu olmak üzere birçok faktöre bağlıdır. Örneğin, çözünmüş polimer öncülerini içeren tozsuz besleme çözeltileri yavaş soğutma durumunda, aşırı soğutma etkisi “çok” olarak ifade edilebilir. Bu etki, daha sonra yüksek başlangıç kristalizasyon hızına ve yüksek kristalizasyon hızı da küçük boyutlu çözücü kristallerinin şekillendirilmesine neden olur.

2.4.1.3. Donmuş Sistemin İnkübasyonu

Jelleşme için önde gelen kimyasal reaksiyonlar esas olarak bu süre içinde ortaya çıktığı için, kovalent kriyojellerin sentezindeki temel basamak negatif sıcaklıkta donmuş halde jelleşme sisteminin bekletilmesidir. Fiziksel kriyojellerde ise gözenek kalıplarının oluşumu kolay anlaşılır değildir. Bununla birlikte her iki durumda da polimerik kriyojeller, öncüllerin yoğunlaşarak çözücünün kristallenmeye başladığı yer olan “donmamış sıvı mikrofaz” içinde gerçekleşir.

Donmamış sıvı mikrofaz teriminden yola çıkarak, kriyotropik jelleşme süreçlerinin bütün özelliklerini yansıtan şeması Şekil 2.6'da verilmiştir. Monomerik veya polimerik öncüllerini içeren besleme sistemi uygun negatif sıcaklıkta donarken, dondurulmuş sistem en az iki fazdan, yani çözücü kristalleri ve çözücünün yoğunlaştığı sıvı mikrofazdan oluşur. Bu sebeplerden dolayı jelleşme güçlenerek sıvı benzeri yapıların içinde katı derişiminin önemli ölçüde artmasına ve bu fazın içinde üçboyutlu polimerik bir ağın oluşumuna neden olur. Bu durumda, bir kriyojel öncülleri içeren ilk çözeltiye göre daha yoğun bir çözeltiden oluşturulur. Dondurulmuş sistem çözüldükten sonra, erimiş çözücü kristallerin yerine çok sayıda makrogözenek ortaya çıkar.



Şekil 2.6. Kriyotropik jelleşmenin şematik gösterimi.

2.4.1.4. Donmuş Sistemin Çözülmesi

Belirli bir süre donmuş haldeki inkübasyondan sonra jelleşme sisteminin çözülmesi kriyotropik jelleşme işlemlerinin son temel aşamasıdır. En az enerji tüketen

yöntem, uygun bir pozitif sıcaklıkta donmuş sistemin basit bir şekilde kendiliğinden çözündüğü yöntemdir. Reaksiyonları durdurularak jel fraksiyon veriminin mümkün olan maksimum değere ulaştığı durumda belirli bir kovalent kriyojel oluşumu esas olarak bu aşamada daha önce tamamlanır ve eritme koşulları genellikle önemsizdir. Fakat reaksiyon süresi ile jel fraksiyon veriminin değişikliğinin incelendiği bazı çalışmaları için jelleşmeyi durdurmak bazen gerekli olabilir. Bu durumda, aşırı ısınma olmadan hızlı buz çözme teknikleri mümkün olduğunca çabuk sistemi çözmek için kullanılmalıdır. Reaksiyonlar, ya yoğun seyreltme ile ya da ilgili kimyasalın inhibitörü, örneğin, radikalik reaksiyonlarda serbest radikal sürükleyici ilave edilerek durdurulabilir. Bazı durumlarda kısa süreli programlanmış mikrodalga [58], hızlı buz çözme ya da dondurulmuş sistemin hızla ısıtılması için kullanılabilir.

2.4.2. Kriyojellerin Sentezi ve Karakterizasyonu

Polimerik jeller sıvı içerisinde şişen çapraz bağlanmış polimerlerdir. İçindeki sıvı ile birlikte matris görevi gören polimer jel çözünen moleküllerin serbest difüzyonuna izin verir. Polimerik jeller çözücü içinde polimerik ya da monomerik çözünmelerle hazırlanabilir. Bununla birlikte en yaygın olarak kullanılan yöntem, bir monovinil monomer ile divinil monomerin (çapraz bağlayıcı) serbest radikalik kopolimerizasyonu ile çapraz bağlandığı yöntemdir. Hidrojel olarak adlandırılan hidrofilik jellerde, iyonik bir ko-monomer, sulu ortam içinde şişme kapasitesini arttırmak için monomer çözeltisine eklenir. Jellerin şişme kapasitesi, esneklik katsayısı ve heterojenite katsayısı gibi istenen özellikleri, reaksiyon bileşiklerinin derişimleri ayarlanarak elde edilebilir [59]. İyonik hidrojeller su ile temas halinde kendi kuru hacimlerinin 1000 katı kadar şişebilirler. Bu jeller ayrıca sıcaklık, pH, elektrik alanı gibi belirli dış uyarıcılara yanıt olarak da hacim değişikliği gösterir [60]. Hidrojel matrislerin tasarımına bağlı olarak bu hacim değişikliği geniş bir aralıktaki uyarıcı seviyesinde sürekli ya da kritik bir uyarıcı seviyesinde kesintili oluşabilir. Hidrojellerin bu özelliklerinin biyolojik sistemlere benzerliği son yıllarda büyük ilgi görmektedir. Günümüzde bu yumuşak ve akıllı polimerler modern biyoteknolojide kullanılan fonksiyonel polimerlerden en önemlisidir. Bunlar; ilaç salınım sistemlerinde, yapay organlarda, biyoteknolojik ayırma sistemlerinde, tarım ürünlerinin işlenmesi gibi birçok alanda kullanılmaktadır.

Bu alanda yapılan önemli araştırmalara rağmen jel bazlı cihazların tasarımı ve kontrolünde hala bazı sorunlar vardır. Örneğin, ağ gözenek boyutunu arttırmak için jelin çapraz bağlayıcı derecesi düşürüldüğünde, jelin kendi kendine bozunması hızlanır. Ayrıca, gevşek çapraz bağlı jeller şişmiş halde kırılındırılar; genellikle jelin ağ yapısında verimli enerji dağılımının eksikliği nedeniyle küçük zorlanmalarda bile kırılabilirler. Ayrıca jellerin dış uyarılara karşı yanıtı birçok uygulamada gerekli olduğu kadar hızlı değildir. Bu nedenle hızlı yanıt oranı ile birlikte iyi mekanik performans gösteren jellerin tasarımı, yumuşak malzemelerin birçok mevcut ve potansiyel uygulama alanları için son derece önemlidir.

Son dönemlerde jelleri daha dayanıklı hale getirebilmek için, çift ağ yapısı içeren jeller [61], topolojik jeller [62], hidrofobik yapılardan oluşturulan jeller [63] ve kil nanopartikül gibi mobil çapraz bağlayıcılar ile hazırlanan nanokompozit hidrojjeller [64] gibi bazı teknikler öne sürülmüştür. Bu tekniklerle enerji dağılım mekanizması düzenlenerek çatlak yayılımı yavaşlatılabilir ve jellerin mekanik özellikleri geliştirilirken, dış uyarılara oluşan tepki yavaşlar. Jel hacminin hızlı değişimi için uygulanan ortak strateji, jel ağı içinde birbirine bağlı gözenek yapısını oluşturmaktır. Birbirine bağlı gözenek yapısına sahip polimer ağları için, çözücünün adsorpsiyon veya porlara desorpsiyonu konveksiyoneldir ve gözeneksiz polimer ağlara hakim difüzyona göre daha hızlıdır. Makrogözenekli yapıya sahip polimer jelleri elde etmek için uygulanacak temel teknikler 1950'lerin sonunda keşfedilmiştir [8]. Bu teknik, monomer karışımının içinde çözünmüş olan kararlı bir maddenin varlığında (tepkimeye girmeyen seyreltici ya da gözenek oluşturucu) monomer-çapraz bağlayıcı karışımının serbest radikalik kopolimerizasyonunu içerir. Polimerizasyondan sonra, kararlı madde yüksek oranda polimer ağı içindeki yerini gözenekli yapıya bırakır. "Reaksiyon kaynaklı faz ayrılması" olarak bilinen bu gözenek oluşum mekanizması, topaklanmış polimer parçaları içeren makrogözenekli jellerin oluşmasına yol açar. Faz ayrılma yöntemiyle hazırlanan makrogözenekli jeller dış uyarılara hızlı tepki vermesine rağmen, topaklanma benzeri yapı mekanik dayanıklılıkta kaçınılmaz bir azalmaya neden olmuştur. Ayrıca jelleşme sırasında faz uyarılması için yüksek miktarda kullanılan çapraz bağlayıcı nedeniyle ağ yapı dış uyarılara duyarlı esnek polimer zinciri gibi davranmaz.

Kriyojelleşme, uyarıcılara hızlı cevap veren dayanıklı makrogözenekli jellerin hazırlanmasını sağlayan basit bir yöntemdir. Kriyojeller 30 yıl önce keşfedilmiş olmalarına rağmen olağanüstü özellikleri nedeniyle sadece son 10 yılda büyük dikkat çekmişlerdir. Örneğin faz ayrılma polimerizasyonu ile hazırlanan makrogözenekli jellerde oluşan kırılma gibi istenmeyen özellikler kriyojellerde gözlenmez. Kriyojeller oldukça sağlamdırlar ve yüksek deformasyon oluşturabilecek düzeyde uzama, burulma gibi etkilere dayanabilirler; herhangi bir çatlak oluşmadan neredeyse tamamen sıkıştırılabilirler. Kriyojelleşme tekniğinin doğal ilkesi deniz buzunun deniz suyundan daha az tuzlu oluşuna dayanır. Bu durumda tuzlu çözelti donduğunda tuzu reddeder. Sonuç olarak tuz, su içinde mükemmel çözünürlüğüne rağmen buz içinde çözünmez. Kriyojelleşme reaksiyonlarında genel olarak monomerler ve başlatıcı içeren reaksiyon çözeltisi sistemin donma noktası altında soğutulur; çünkü donmamış alan monomer ve başlatıcı açısından zengin olacağı için, polimerizasyon reaksiyonları sadece yüksek derişimde monomer içeren donmamış bölgelerde gerçekleşecektir. Donmamış tepkime bölgelerinde artmış monomer derişimi, kriyojellerin olağanüstü özelliklere sahip olmalarını sağlayan kriyojelleşme reaksiyonlarına özgü bir özelliktir. Elde edilen son malzemedeki gözenekli yapı, gözeneklerin oluşması için bir kalıp (gözenek yapıcı) olarak hareket eden çözücü kristallerinin varlığını gösterir. Sadece çözücü donma noktasının üzerindeki sıcaklıklara çıkarılarak kalıbın (örneğin, buz) yapıdan uzaklaştırılmasıyla kriyojel elde edilir. Kriyojelleşme tekniğinin faz ayırma tekniğine göre diğer bir avantajı, gözenek yapıcı maddeleri uzaklaştırmak için ikinci bir işleme gerek duyulmamasıdır. Faz ayrılma tekniği ile hazırlanan jellerdeki topaklanmış yapıların aksine kriyojeller, birkaç mikrometre kalınlığında duvarlarla ayrılmış düzenli dağılım gösteren yaklaşık 100 mikrometre genişliğinde gözeneklere sahiptir.

Temelde monomerlerin ya da doğrusal polimerlerin donmuş çözücü içinde çapraz bağlanma polimerizasyonu ile hazırlanan kriyojellerde kullanılan monomerler, çapraz bağlayıcılar, kriyojellerin hazırlanma teknikleri ve karakterizasyonlarından aşağıda bahsedilecektir.

2.4.2.1. Monomerik ve Polimerik Öncüller, Çapraz Bağlayıcılar

Çeşitli monovinil-divinil komonomer çiftleri serbest radikalik çapraz bağlanma polimerizasyonu ile kriyojellerin hazırlanmasında kullanılmıştır. Bunlardan başlıcaları akrilamid (AAm) [8], N,N-dietilakrilamid (DMA) [65], akrilik asit (AAc) [66], N,izopropilakrilamid (NIPA) [67], 2-hidroksietil metakrilat (HEMA) [68] gibi suda çözünen monomerler ile N,N-metilen(bis)akrilamid (BAAm), poli(etilen glikol diakrilat) ya da biyobozunur çapraz bağlayıcılardır. Nano boyutlu kil parçacıklar da (laponit) yüksek esnekliğe sahip kriyojellerin hazırlanmasında çok fonksiyonlu çapraz bağlayıcı olarak kullanılabilir. Amonyum persülfat (APS) ve N,N,N',N',tetrametilendiamin (TEMED) redoks çifti genellikle polimerizasyon reaksiyonlarını başlatmak için kullanılır. Radikalik başlatıcıların bozunmaları sıcaklığa bağlı olduğu için reaksiyon çözeltileri başlatıcı eklemenden önce soğutulmalıdır. Aksi takdirde polimerleşme geleneksel jellerde olduğu gibi reaksiyon sistemi donmadan başlar. Tercihen hidrokinon gibi polimerizasyon inhibitörleri, reaksiyon başlangıcını çözeltilerin donma noktasının ötesine kaydırmak için reaksiyon sistemine eklenebilir. Kriyojelleşme reaksiyonları da ultraviyole (UV) ya da elektron bombası radyasyonu ile başlatılabilir, böylece başlatma aşamasından önce reaksiyon ısı kontrol edilebilir. Ekleme-çıkarma zincir transferi (RAFT) gibi kontrollü radikalik polimerizasyon teknikleri, hem sulu hem de organik ortamda bulunan kriyojellerin hazırlanması için kullanılmıştır.

Kriyojeller sulu ya da organik çözücüler içinde kimyasal çapraz bağlayıcıların varlığında doğrusal polimerlerin başlatıcı olarak kullanımı ile hazırlanabilirler. Çeşitli doğal ve sentetik polimerler kriyojellerin hazırlanmasında kullanılmıştır. Proteinler için en yaygın çapraz bağlayıcı, sulu çözeltiler içinde peptit zincirlerindeki amin gruplarına karşı yüksek ölçüde aktif olan gluteraldehidtir. Proteinler (örneğin; jelatin, fibrinojen, kollajen ve albümin), polisakkaritler (örneğin; kitosan ve hiyaluronik asit), birer sentetik polimer olan poliakrilamid (AAm) ve poli(vinil alkol) (PVA) de donmuş çözücülerinde gluteraldehit ile çapraz bağlanabilir. Kriyojeller ayrıca, sulu çözelti içinde poli(etilen glikol)'ün son amino grubuna fonksiyonellik kazandırılarak heparin ile çapraz bağlanmasıyla hazırlanabilir. Bununla birlikte polimerik ön malzemelerden kriyojellerin hazırlanması için her zaman çapraz bağlayıcıya gerek yoktur. Örneğin; donmamış reaksiyon fazındaki

PVA zincirleri ile mikrokristalin alt birimleri arasında oluşan hidrojen bağları sayesinde PVA apraz bağlayıcı gibi davranır [69].

2.4.2.2. Çözücüler ve Kriyojelleşme Isısı

Su, biyolojik sistemlere uyumlu ve ucuz olduğu için kriyojelleşme reaksiyonlarında en çok kullanılan çözücüdür. Dimetil sülfoksit (DMSO) [67], dioksan [70], formamid [8], nitrobenzen [71], benzen [72], sikloheksan [73] gibi organik çözücüler nispeten daha yüksek donma noktasına sahiptir ve hidrofobik kriyojellerin hazırlanmasında kullanılmaktadır.

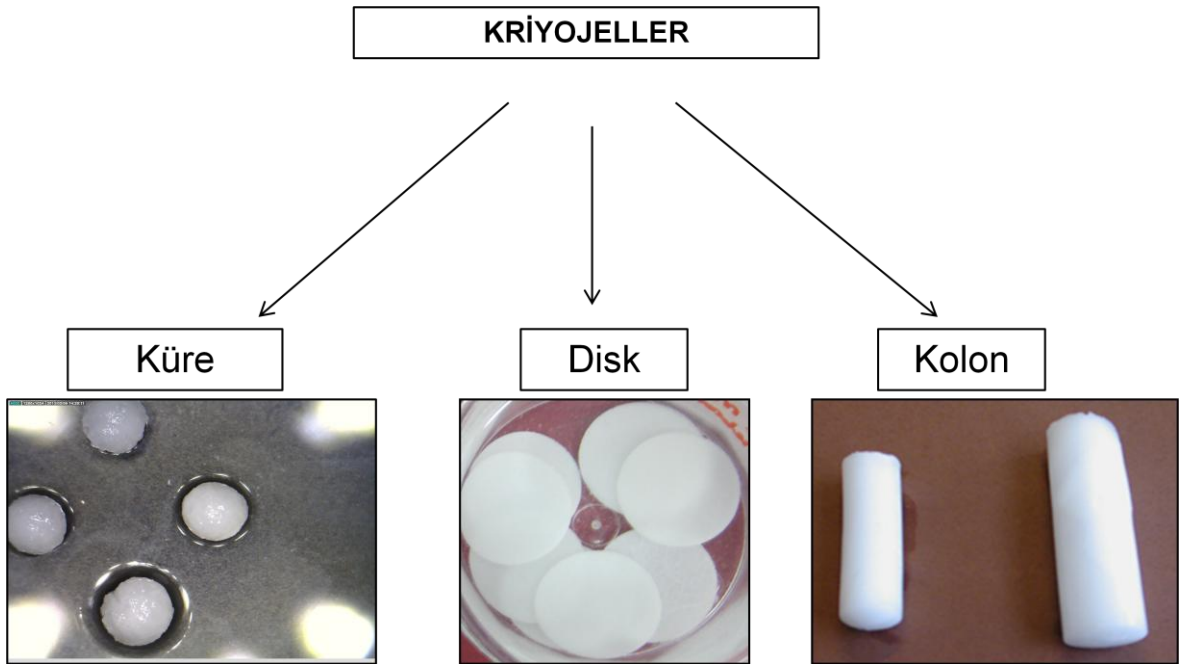
Donmamış alanlardaki reaksiyon bileşenlerinin kriyo-derişimi kriyojellerin hazırlanmasında önemli olduğu için jelleşme sıcaklığı (T_{prep}) en önemli deneysel parametrelerden biridir. Ilımlı sıcaklık olarak adlandırılan ve kriyojelleşme reaksiyonlarında yaygın olarak kullanılan terim, sistemin donma noktasının birkaç derece altında olan sıcaklık için kullanılır. T_{prep} genellikle çözücünün donma noktası 2-20 °C altında olacak şekilde ayarlanır. Buna ek olarak reaksiyon çözeltilsinin jelleşme ısısına ulaşması için uygulanan soğutma yöntemi de kriyojel özelliklerini etkiler. Örneğin sıvı aracılığı ile soğutma, hava aracılığı ile soğutmaya göre reaksiyon çözeltilsinin daha hızlı dondurarak küçük gözenek oluşumuna neden olur.

2.4.2.3. Monomer ya da Polimer Derişimi

Monomerik ya da polimerik çözeltilerin başlangıç derişimi kriyojel hazırlanmasının önemli bir parametresidir. Buz derişiminin etkisinden dolayı kriyojeller geleneksel jellere göre daha düşük derişimlerde hazırlanabilirler. Bu nedenle kriyojeller diğer jellere oranla daha geniş bir yoğunluk seviyesi aralığında üretilebilir; ancak çok düşük başlangıç derişimi ile hazırlanan kriyojellerin mekanik dirençleri zayıftır, normal derişim aralığı % 2-20'dir (ağırlık/hacim). Çünkü artan başlangıç derişimi ve azalan jelleşme sıcaklığı kriyojellerin gözenek boyutunu azaltır ve aynı zamanda mekanik kararlılığını artırır ve böylece bu sentez parametreleri kriyojellerin özelliklerini belirlemek için kullanılabilir.

2.4.2.4. Kriyojellerin Geometrisi

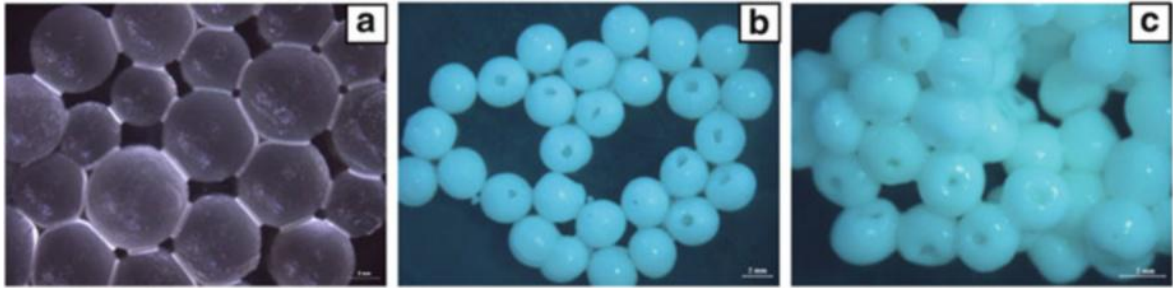
Kriyojeller kolon, disk ve küre gibi çeşitli şekillerde hazırlanabilirler [74] (Şekil 2.7). Kriyojellerin, biyomoleküllerin ayırımında kullanılması için monolitik kolonlar şeklinde üretimi, şırıngaların çıkışı kapatılarak reaksiyon çözeltisini şırıngaların içine doldurduktan sonra jelleşme sıcaklığına getirilen kriyostatın içine daldırılmasıyla hazırlanır [75]. Dondurulmuş desenin aynısını yeniden üretebilmek için her sentezde aynı hacimde reaksiyon çözeltisi ve aynı boyutta şırınga kullanılmalıdır [76]. Kriyojelleşme reaksiyonu tamamlandıktan sonra, kriyojel kolonlar oda sıcaklığına getirilir ve reaksiyona girmeyen maddelerin uzaklaştırılması için iyi bir çözücü ile yıkanır. Kriyojeller ayrıca iki cam levha arasına reaksiyon çözeltisinin enjekte edilmesiyle membran şeklinde de hazırlanabilir.



Şekil 2.7. Farklı şekillerde hazırlanmış kriyojeller.

Gözenekli malzemelerin tek parçadan oluşan bloklarının aksine, küre şeklinde hazırlanan kriyojeller farklı boyutlardaki kolonlara doldurulabilirler. Bununla birlikte, kriyojel kürelerin hazırlanmasındaki zorluklar nedeniyle bu konuda az sayıda yayın bulunmaktadır. Örneğin kriyojelleşme reaksiyonları normal süspansiyon polimerizasyon tekniği koşulları altında gerçekleştirilirse, dondurulmuş damlacıklar arasındaki çarpışmalar nedeniyle geniş bir boyut dağılımında aynı şekilli jel

parçaları elde edilir [77]. Kriyojel parçacıkları yoğun karıştırmaya karşı dirençli hale getirmek için, içi boş plastik bir taşıyıcı duvar içinde hazırlanabildiği gösterilmiştir. Yun ve arkadaşları, su ile karışmayan organik faz içinde sulu jelleşme çözeltisinin süspansiyonunu sağlayarak, mikroakışkan akış odaklama tekniğini kullanmışlardır [78]. Damlacıklar sıfırın altındaki sıcaklıkta bekletildikten sonra çapı 1 mm olan PAAm kriyojel kürelerin elde edilmesi amaçlanmıştır. Aljinatagaroz, PAAm ve DNA kriyojel küreler -15 ila -20 °C arasındaki sıcaklıklarda sürekli faz olarak kullanılan parafin yağı içine sulu reaksiyon çözeltisinin damla damla eklenmesiyle hazırlanmıştır [79]. Kriyojel kürelerin çapı, sulu fazı yağ fazına eklemek için kullanılan pipetin uç çapı değiştirilerek ayarlanabilir. Şekil 2.8.a'da -18 °C'de hazırlanan PAAm kriyojel küreler görülmektedir.



Şekil 2.8. Kriyojel kürelerin optik mikroskop görüntüsü. (a) -18 °C'de hazırlanan iyonik PAAc kriyojel küreler [80], (b) sıvı azot içinde dondurulmuş çözelti damlacıkları, (c) hazırlanmış PIB kriyojel küreler [77].

Hidrofobik kriyojel kürelerin hazırlanması da son yapılan çalışmalarda bildirilmiştir. Kriyojelleşme reaksiyonları dondurulmuş benzen çözeltisi içinde PIB ve kükürt monoklorürün çapraz bağlayıcı olarak kullanılmasıyla gerçekleştirilmiştir. % 10'dan daha az boyut dağılımı gösteren küresel milimetrik boyutlu PIB kriyojel küreler iki farklı teknikle hazırlanmıştır. İlk olarak reaksiyon çözeltisi donmuş organik damlacıklar oluşturmak için -196 °C'deki sıvı azot içine damlatılır. Daha sonra, dondurulmuş damlacıklar -18 °C'deki etanol içine aktarılır ve kriyojelleşme reaksiyonu karıştırılmadan gerçekleştirilir. Şekil 2.8.b'de sıvı azot içinde dondurulmuş çözelti damlacıkları ve Şekil 2.8.c'de hazırlanmış PIB kriyojel küreler görülmektedir. İkinci teknikte, -18 °C'deki sürekli sistem içine karıştırılmadan organik çözelti damla damla ilave edilir. Burada, sürekli fazın yoğunluğu damlacıkların çözeltiye yavaşça düşecek şekilde ayarlanmıştır. Organik damlacıkların yoğunluğuna yakın olan etilen glikol-etanol karışımı (hacimce 1/4)

bu reaksiyonda sürekli faz olarak kullanılmıştır. Kürelerin yüzeyindeki tek bir büyük deliğin oluşum mekanizması hala tam olarak bilinmemesine rağmen, dondurma ve daha sonra serbest yüzey enerjisinin en aza indirilmesi sırasındaki polimer-çözücü faz ayrımının bu durumdan sorumlu olabileceği düşünülmektedir.

2.4.2.5. Morfolojik ve Mekanik Karakterizasyon

Jellerin makrogözenekli yapısı üzerinde çalışmak, bu tür yumuşak malzemelerin gözenek yapısı tayininde standart bir yöntem olmadığı için zordur. Çevresel taramalı elektron mikroskopu (ESEM), optik mikroskop, konfokal lazer taramalı mikroskop (CLSM) gibi teknikler şişmiş haldeki kriyojellerin karakterizasyonu için kullanılabilir olsa da, kriyojellerin ince yapılarını ortaya çıkarmak için yeterli çözünürlüğe sahip değildir. Yüksek basınç altında jellerin sıkıştırılabilirliği nedeniyle civa porozimetresi ve gaz adsorpsiyon/desorpsiyon'u gibi teknikler karakterizasyon için uygun değildir ve sadece kuru malzemelere uygulanabilir. Taramalı elektron mikroskopu (SEM), kriyojellerin ince yapısının karakterizasyonu için uygun bir yöntem olurken, aynı zamanda jel örneklerinde yapısal değişikliklere neden olabilecek kurutma işlemi gerektirir. Bununla birlikte, dondurarak kurutma yöntemi ile numune hazırlamak gözenek yapılarında değişikliğe neden olmamaktadır. Bu nedenle SEM, genellikle kriyojellerin morfolojisini görselleştirmek ve ortalama gözenek boyutunu hesaplamak için kullanılır. Ayrıca kolon ya da küre şeklindeki kriyojellerin gözenek boyutları ve morfolojileri, akış özelliklerini tahmin etmek için de kullanılabilir.

2.4.3. Sentez Parametrelerinin Etkisi

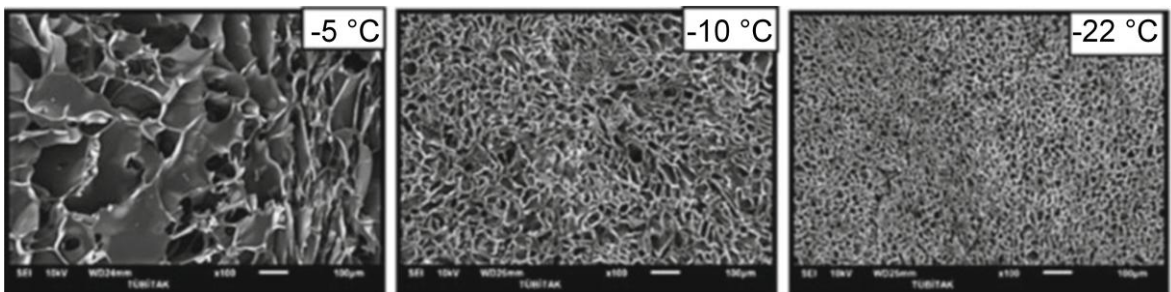
Kriyojellerin özellikleri, kriyojelleşme koşulları ve reaksiyon bileşenlerinin bileşimi de dahil olmak üzere bir çok parametreye bağlıdır. Bu bölümde gözenekli bir yapının kontrolü gibi zorluklardan ve kriyojel sentez parametrelerinin kriyojel morfolojisi üzerine etkilerinden bahsedilecektir.

2.4.3.1. Sıcaklık ve Donma Hızının Etkisi

Buz kristallerinin boyutunun, donma sıcaklığına bağlı olarak donma hızının değiştirilmesiyle kontrol edilebildiği bilinmektedir. Örneğin, büyük buz kristallerinin

oluşması için dondurma sıcaklığı mümkün olduğu kadar yüksek olmalı ve kristalleşme zamanı uzatılmalıdır. Küçük kristalleri oluşturmak için dondurma, çok düşük bir sıcaklıkta olmalı ve donma hızı buz kristallerinin büyüyeceği zamanı azaltmak için yüksek olmalıdır. Kriyojelleşme sistemlerinde çözücü kristalleri gözeneklerin oluşması için kalıp görevi gördüğü için, kriyojellerin gözenek boyutu ve jelleşme sıcaklığı arasında aynı ilişki bulunmaktadır. Düşük jelleşme sıcaklığı, reaksiyon çözeltisini soğuttuğu ve bundan dolayı reaksiyon çözeltisinin donma sıcaklığına kısa sürede ulaşmasını sağladığı için, jelleşme sıcaklığı ve soğutma hızı (veya her ikisi birden) kriyojellerin özelliklerini etkiler.

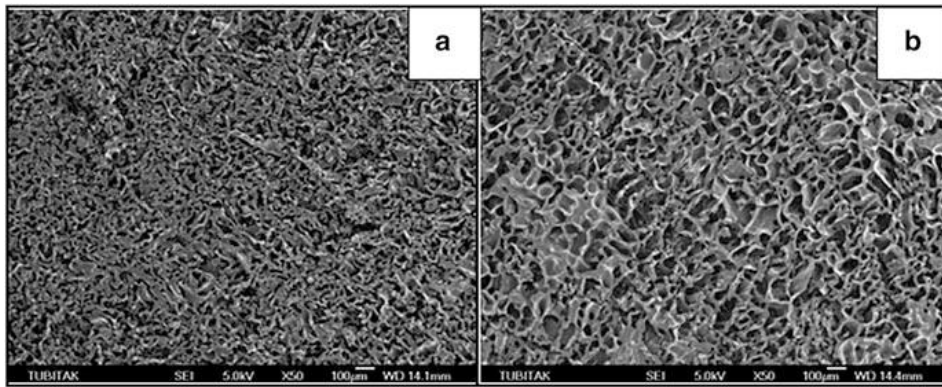
Ivanov ve arkadaşları PAAm kriyojellerin gözenek çapının sıcaklığa bağlı değişimini incelemişlerdir [81]. Kriyojeller, çapraz bağlayıcı olarak gluteraldehitin kullanıldığı sulu çözeltiler içinde doğrusal PAAm zincirlerinin çapraz bağlanması ile hazırlanmıştır. Kriyojelleşme sıcaklığı $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'den $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'ye düşürüldüğünde gözenek çapının $30\text{-}60\text{ }\mu\text{m}$ 'den $10\text{-}20\text{ }\mu\text{m}$ 'ye düştüğü gösterilmiştir [81]. Akrilamid ve BAAM monomerlerinden hazırlanan PAAm kriyojellerin jelleşme sıcaklığı $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'ye kadar düşürülmüş ve en büyük gözenek boyutu jelleşme sıcaklığı $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de iken elde edilmiştir. Jelleşme sıcaklığı -18 , -20 , $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'lerde gözenek çapları sırasıyla 22 , 32 , $60\text{ }\mu\text{m}$ bulunmuştur. Benzer sonuçlar, ayrıca, fibroin zincirlerinin veya DMA monomerinin sulu çözeltilerinden elde edilen kriyojeller için de rapor edilmiştir (Şekil 2.9). PSA (poli sodyum akrilat) kriyojellerde jelleşme sıcaklığı $-9\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'den $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'ye çıkarıldığında gözenek çapı $25\text{ }\mu\text{m}$ 'den $11\text{ }\mu\text{m}$ 'ye düşmüştür [82]. Düşük jelleşme sıcaklığı reaksiyon çözeltisinin hızlı donması anlamına geldiği için, donma hızı arttıkça çok sayıda çözücü kristallerinin oluşmasına rağmen, jelleşme sıcaklığının azalması ile gözenek boyutunun azalması uyumludur.



Şekil 2.9. Çeşitli sıcaklıklarda hazırlanan fibroin kriyojellerin SEM görüntüleri [83].

Hidrofilik kriyojeller içinde polihedral gözeneklerin oluşumu aşağıdaki gibi açıklanabilir [84]: çapraz bağlı hidrofilik polimerlerde su moleküllerinin üç şekilde bulunduğu bilinmektedir: (1) ağın ortasındaki gözlerde bulunan serbest su, (2) ağ zincirlerine bitişik bağlı su ve (3) bağlı su üzerine adsorbe edilmiş film tabakası şeklinde bulunan sudur. Serbest suyun donması ve bu şekilde oluşturulan buz kristallerinin büyümesi, buz kristallerinin çevresindeki hidratlanmış ağ zincirlerini gererek polimer ağının deformasyonuna neden olabilir. Polimer elastikiyeti ağ zincirlerinin kolay deformasyonuna izin verse de, sistemin yüksek viskozitesi kristallerin büyümesini yavaşlatabilir. Bunun bir sonucu olarak, tek bir şiş polimer zincirleri tarafından ayrılan polimer ağı örgü içindeki buz kristallerinin oluşmasını sağlayacaktır.

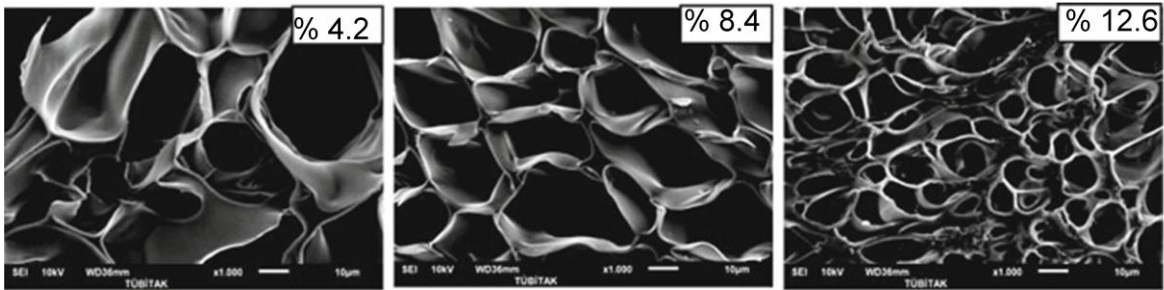
Ayrıca donma hızının, kriyojellerin morfolojisi üzerine etkilerini incelemek üzere de deneyler yapılmıştır. Bu amaçla, reaksiyon çözeltisinin bir kısmı hava ile temas halinde bir dondurucuda yavaşça dondurulurken diğer kısmı, sıvı ile temas halinde bir kriyostatta hızlı bir şekilde dondurulmuştur. Soğutma sıvısı yerine $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de hava yolu ile soğutma kullanıldığında başlangıç soğutma hızı $54\text{ }^{\circ}\text{C/dk}$ 'dan $4\text{ }^{\circ}\text{C/dk}$ 'ya düşmüştür [73]. Şekil 2.10'da, hızlı ve yavaş dondurma koşulları altında jelleşme sıcaklığı $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de sikloheksanda hazırlanan PIB jel ağının SEM görüntüleri verilmiştir. Burada gözenek büyüklüğünün donma hızı azaldıkça arttığı görülmektedir. Reaksiyon çözeltisinin donma hızını artırmak, büyük kristallerin oluşumunu engelleyerek çözücü kristallerinin büyümesi için gerekli olan süreyi azaltır. Böylece, çözüldükten sonra küçük gözeneklere yol açan küçük çözücü kristalleri, hızlı dondurma koşulları altında oluşturulur.



Şekil 2.10. $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de hazırlanan PIB kriyojellerin (a) hızlı ve (b) yavaş dondurma koşulları altındaki SEM görüntüleri [73].

2.4.3.2. Monomer ve Polimer Derişiminin Etkisi

Kriyojel ağ mimarisi ve morfolojisi esasen monomer derişimine bağlı değişim göstermezken, yapı boyutunda hassas değişimler gözlenir. PAAm kriyojellerde monomer derişimi % 3'ten % 10'a çıkarıldığında ortalama gözenek çapının 55 µm ile 10 µm arasında azaldığı tespit edilmiştir. Aynı zamanda gözenek duvarının ortalama kalınlığı 3 ile 15 µm arasında artmıştır. Plieva ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada fonksiyonel epoksi grubu içeren kriyojellerde -12 °C'de monomer derişimi % 6'dan % 22'ye çıkarıldığında gözenek çapının küçüldüğü ancak duvar kalınlığının arttığı bildirilmiştir [8]. Kirsebom ve arkadaşları monomer derişimi ağırlıkça % 3 olan poli(DMA) kriyojelleri % 12 olan poli(DMA) kriyojeller ile karşılaştırdıklarında daha büyük gözenek çapına ve daha ince duvar kalınlığına sahip olduklarını gözlemlemişlerdir. Buna karşın -22 °C'de hazırlanan PAMP hidrojelinde artan derişim ile gözenek boyutunun da arttığı bildirilmiştir. Bu durum, düşük monomer derişimlerinde hazırlanan bu tip polielektrolit jellerdeki geniş gözeneklerin çökmesine bağlanmaktadır [85]. Kriyojellerde reaksiyonlarında polimer ön bileşiklerinden başlayarak, artan polimer derişimi kalın gözenek duvarlarına fakat daha küçük gözeneklere neden olur. Örneğin; -18 °C'de hazırlanan fibroin kriyojellerde, fibroin derişimi % 4.2'den % 12.6'ya çıkarıldığında gözenek çaplarının 33±10 µm'den 10±3 µm'ye düştüğü gözlenmiştir (Şekil 2.11). Böylece, yüksek monomer ya da polimer derişimi daha küçük gözenek çapı ve daha kalın gözenek duvarı demektir. Başlangıç derişimi ve gözenek boyutu arasındaki ters ilişki, çözünen madde miktarının artmasıyla jelleşme esnasında donmayan mikroyapı miktarının artmasından kaynaklanmaktadır.



Şekil 2.11. Çeşitli fibroin derişimlerinde hazırlanan kriyojellerin SEM görüntüleri [83].

2.4.3.3. Yük Yoğunluğunun Etkisi

İyonik olmayan PAAM ve iyonik PAMP -22 °C'de aynı şartlar altında oluşturulan kriyojellerin gözenek çapları sırasıyla 100-150 ve 30-50 µm olarak gözlenmiştir. Böylece, gözenek boyutu ağ zincirlerinin yük yoğunluğunun artması ile azalmaktadır. Ayrıca hesaplamalar sonucunda ağ zincirlerinin yük yoğunluğunda bir artış, reaksiyon sisteminde buz hacim oranını azalttığı böylece hazırlanan jellerdeki gözeneklerin daha küçük olacağı tahmin edilmektedir [85].

2.4.3.4. Çapraz Bağlayıcı Derişiminin Etkisi

Çapraz bağlayıcı olarak BAAM kullanılarak hazırlanan PAAm ve PSA kriyojellerin farklı çapraz bağlayıcı seviyelerinde gözenek boyutlarının kayda değer bir değişime uğramadığı gözlenmiştir. Bununla birlikte, -18 °C'de çapraz bağlayıcı olarak EGDE kullanılarak hazırlanmış fibroin kriyojeller, EGDE miktarı 10 mmol/g'dan 30 mmol/g'a yükseltildiğinde gözenek çaplarının 55±10 µm'den 23±7 µm'ye düştüğü ve gözenek dağılımının azaldığı gösterilmiştir. Benzer şekilde çapraz bağlayıcı olarak S₂Cl₂'nin kullanıldığı kauçuk kriyojellerde S₂Cl₂ derişimi arttıkça hem gözenek dağılımının hem de ortalama gözenek çapının azaldığı yapılan çalışmada bildirilmiştir [72]. Bu durumun, çapraz bağlayıcı miktarı arttıkça jelin donmamış bölgelerindeki sertliğin artmasından dolayı gerçekleştiği düşünülmektedir.

2.4.3.5. Katkı Maddeleri ve Çözücülerin Etkisi

Düşük molekül ağırlıklı tuzların varlığı, sulu çözeltiler içinde meydana gelen kriyojellerin mikro yapılarını etkiler. Örneğin, sulu bir kriyojelleşme çözeltilisine NaCl veya CaCl₂ eklendiğinde kalın gözenek duvarları ve küçük gözenek çaplı malzemeler meydana gelir [86]. Reaksiyon karışımı içinde NaCl içeriği % 0'dan % 10'a çıkarıldığında PAMPS kriyojellerin gözenek çapı 30-50 µm'den 10-20 µm'ye düşmektedir. Bu olay, reaksiyon çözeltilisini tuzların eklenmesiyle donma sıcaklığının azalmasından kaynaklanmaktadır. Böylece dondurulmuş çözeltilinin hacmi artar ve daha küçük gözeneklerin oluşmasına neden olur. Reaksiyon çözeltilisi içindeki NaCl derişimi 0'dan % 10'a çıkarıldığında, AMPS-BAAM reaksiyon çözeltilisinin -22 °C'deki donma süresi 5 dakikadan 35 dakikaya çıkmıştır.

Ayrıca bu tür reaksiyon çözeltileri içine hidrokinon gibi bir polimerizasyon inhibitörü eklendiğinde, yüksek gözenek dağılımında daha küçük gözenekli PAAm kriyojeller elde edilir. Hidrokinon, reaksiyon çözeltisinin jelleşme noktasını donma noktasının dışına kaydırduğu için, buz kristallerinin sayısı artarken boyutları küçülür ve geniş dağılıma sahip küçük gözenekli PAAm kriyojellerin oluşmasına neden olur.

Kriyojelleşme sisteminde mikro veya nano-taneciklerinin eklenmesi ile artan esneklik katsayısına sahip hibrid kriyojeller üretilir [87]. Buna örnek olarak, PVA sulu çözeltisinin içine donma-çözünme işlemlerinden önce tetrametoksisilan eklenmesi ile bazı kriyojeller hazırlanmıştır [88]. Ayrıca sikloheksan içeren silika nanopartiküller PIB ile çapraz bağlanarak hazırlanmış ve çapraz bağlayıcı olarak S_2Cl_2 kullanılmıştır. Hibrid PIB kriyojellerin mikroyapısı iki tip gözenekten oluşur: Jelleşme sırasında gözenek oluşumu için kalıp gibi davranan sikloheksan kristalleri nedeniyle 10^1 m μ 'lık geniş gözenekler ve topaklanmış nanopartiküllerin arasındaki 10^{-1} - 10^0 m μ 'lık küçük gözenekler oluşur. Aslında sikloheksan kristalleri arasında bulunan nanopartiküller, hibrid kriyojellerde büyük gözeneklerin içinde birikir. Bu jeller nanopartikül içermeyen jellere göre 300 kat daha fazla esneklik katsayısına sahiptir.

Kriyojellerin iç morfolojisi, kriyojelleşme reaksiyonlarında kullanılan çözücülerin özelliklerine de bağlıdır. Bu etki, çözücü kristallerinin farklı şekilde oluşmasının yanı sıra polimer ve çözücü arasındaki etkileşimlerin sıcaklığa bağlı değişimlerini de içermektedir. Örneğin, -20 °C'de formamit içinde hazırlanan PAAm kriyojellerde iğne benzeri formamid kristallerinin oluşumunun bir sonucu olarak uzun gözenekli bir yapı elde edilir. Ayrıca, suda hazırlanan PNIPA kriyojellerin birbirine bağlı üçboyutlu gözenek yapısının aksine, dioksan/su ortamında hazırlanan kriyojellerin kapalı bir gözenek yapısına sahip kalın duvarlı gözenekleri (10-40 μ m) bulunur. Polimer-çözücü etkileşimlerinin kriyojel morfolojisi üzerine etkisi, aynı şartlar altında sikloheksan içinde ve benzen içinde oluşturulmuş PIB kriyojel kullanılarak gösterilebilir. Benzen ve sikloheksan benzer moleküler boyutlarının yanı sıra benzer dondurma ve eritme özelliklerine sahiptir; ikisi de yüksek sıcaklık düzensiz kristaller oluştururlar ve erime sıcaklıkları yakındır (sırasıyla, benzen ve sikloheksan için 5.5 ve 6.5 °C) [89]. Sikloheksanın kimyasal yapısı poliizobutilen'in tekrar birimlerinin birbirine çok yakın olmasından dolayı PIB için iyi bir çözücüdür.

Sikloheksanın aksine, benzen PIB için zayıf bir çözücüdür ve sıcaklık azaldıkça daha zayıf hale gelir. Benzen ve sikloheksan içinde hazırlanan PIB kriyojellerin SEM görüntüleri, farklı ağ yapısına sahip morfolojileri göstermektedir. Sikloheksan içinde hazırlanan kriyojeller normal morfolojilerinin aksine, benzen içinde oluşturulanların gözenek boyutları milimetre ile mikrometre arasında geniş bir boyut dağılımına sahiptir. Bundan başka, düşük sıcaklıkta sikloheksan içinde oluşturulan ve tüm gözenek hacmi 2.5 ml/g olan PIB jellerin aksine benzen içinde oluşturulan PIB jellerin jelleşme sıcaklığı -2 °C'den 18 °C'ye düşürüldüğünde gözenek toplam hacminin 6 ml/g 'dan 9 ml/g 'a yükseldiği bulunmuştur. Jellerin morfolojisinde gözlenen farklılıklar benzen içinde PIB zincirlerinin soğutma esnasındaki faz ayrılmasına bağlıdır.

Kriyojelleşme reaksiyonları güçlü çözücü/zayıf çözücü karışımı içinde gerçekleştirildiği takdirde, kriyojelleşmedeki gözenek yapısı oluşum mekanizması reaksiyona bağlı bir faz ayrılması ile birlikte uygulanabilir. Örneğin, -12 °C'de aseton-su karışımı içinde hazırlanan PAAm kriyojellerde iki tip gözenek oluşumu gözlenmiştir. 10-80 µm büyüklüğündeki gözenekler jelleşme esnasında bir kalıp olarak görev yapan buz kristalleri nedeniyle oluşurken, duvar içindeki mikrometreden daha küçük boyutlu gözenekler ise aseton ile zenginleştirilmiş donmamış fazdaki faz ayrılmasından dolayı oluşur (aseton PAAm için zayıf bir çözücüdür). DMSO-su karışımları belirgin bir donma noktası alçalması sergiler ve DMSO içeriği, hacimce yaklaşık % 30'dan daha az ise, reaksiyon sistemi -18 °C'de donacaktır. Gerçekten de, hacimce en az % 30 DMSO içeren çözücü karışımı içinde kriyojelleşme tekniği ile oluşturulan hidrojeldeki ağların çapı yaklaşık 10¹ mikron olan düzensiz büyük gözeneklerdir. Gözenekli olmayan hidrojel, % 25 DMSO içeren çözeltiler kullanılarak elde edilmiştir [85].

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Sunulan tez kapsamında yapılan deneysel çalışmalar aşağıdaki ana başlıklar altında toplanmıştır. Bu ana başlıklar:

- Fonksiyonel monomer N-metakriloil-(L)-triptofan metil ester (MATrp) sentezi,
- Protein A baskılanmış poli(HEMA-MATrp) (MIP), baskılanmamış poli(HEMA-MATrp) (NIP) ve poli(HEMA) kriyojellerin hazırlanması,
- MATrp ve polimerik kriyojellerin karakterizasyonu,
- Protein A baskılanmış poli(HEMA-MATrp) kriyojellerin Protein A adsorpsiyonu,
- Protein A baskılanmış poli(HEMA-MATrp) kriyojel kürelerin seçiciliğinin incelenmesi,
- Protein karışımından Protein A ayırımının FPLC (Hızlı Performans Sıvı Kromatografisi) ile incelenmesi,
- Protein A'nın saflığının Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE) ile belirlenmesi,
- Protein A desorpsiyonu ve kriyojel kürelerin tekrar kullanılabilirliğinin incelenmesidir,
- Protein A baskılanmış poli(HEMA-MATrp) kriyojel küreler ile *Staphylococcus aureus* tanıma çalışmalarının yapılması.

3.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Poli(HEMA-MATrp) kriyojellerin hazırlanmasında temel bileşen olarak kullanılan 2-hidroksietil metakrilat (HEMA), N,N-metilen bisakrilamid (MBAAM) ve L-triptofan metil ester Sigma (Sigma Chemical Co., ABD) firmasından temin edilmiştir. Reaktifler kullanılabildiği kadar 4 °C'de saklanmıştır. Kullanılan staphylococcal protein A ve streptococcal protein G Sigma (Sigma Chemical Co., ABD) firmasından temin edilmiştir ve kullanılmadığı zamanlar -20 °C'de muhafaza edilmiştir. Çalışmada kullanılan diğer kimyasalların tamamı Merck (Darmstadt, Almanya) firmasından temin edilmiştir ve analitik saflıktadır.

Deneylerde kullanılan su, yüksek akışlı selüloz asetat membran (Barnstead D2731) ile ters ozmoz Barnstead (Dubuque, IA) ROpure LP® birimi ve ardından Barnstead D3804 NANOpure® organik/kolloid uzaklaştırma birimi ve iyon değiştirici dolgulu kolon sistemi kullanılarak saflaştırılmıştır. Elde edilen saf suyun (deiyonize su) direnci 18 MΩ/cm'dir.

Deneylerde kullanılacak cam malzemeler 12 saat 4 M nitrik asitte bekletilerek temizlenmiş ve etüvde kurutulmuştur.

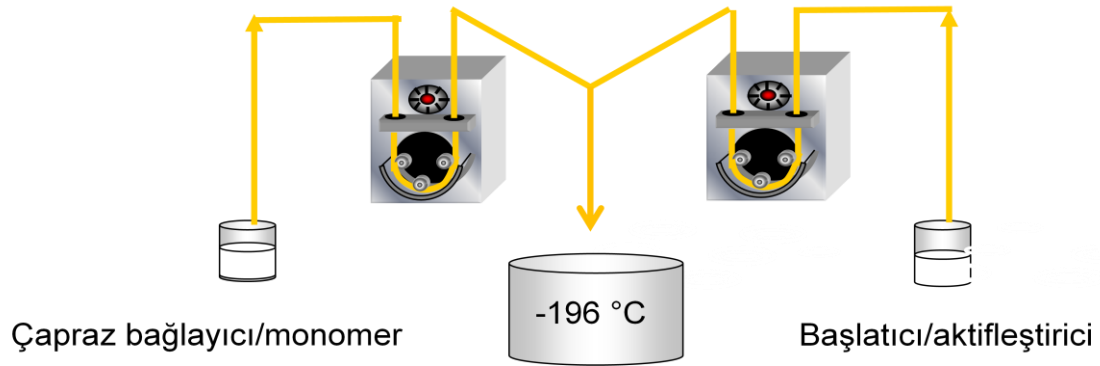
3.2. N-Metakroil-(L)-Triptofan (MATrp) Monomerinin Sentezlenmesi

N-Metakroil-L-triptofan metilester (MATrp) komonomeri aşağıda anlatılan şekilde sentezlenmiştir. İlk basamakta 5.0 g L-triptofan metilester ve 0.2 g hidrokinon 100 ml diklorometan (CH₂Cl₂) çözeltisi içinde çözülmüştür. Hazırlanan çözelti 0 °C'ye soğutulduktan sonra içine 12.74 g trietilamin eklenmiştir. 5.0 ml metakroil klorür yavaş bir şekilde bu çözeltiliye azot gazı atmosferinde eklenmiştir. Hazırlanan bu karışım manyetik ortamda 2 saat karıştırılmıştır. İşlem sonunda reaksiyona girmeden kalan metakroil klorür çözeltisi % 10'luk NaOH ile ekstrakte edilmiştir. Daha sonra dönen evaporatör aracılığıyla sulu faz buharlaştırılmıştır. Elde edilen katı (MATrp) etanol içinde çözülerek kullanıma hazır hale getirilmiştir.

3.3. Protein A Baskılanmış (MIP) ve Baskılanmamış (NIP) Poli(HEMA-MATrp) Kriyojel Kürelerin Hazırlanması

Poli(HEMA-MATrp) kriyojellerin hazırlanmasında izlenen yol şu şekildedir: MATrp (10 µmol) ve SpA (1 µmol) 10 mM pH 7 fosfat tamponu (2 ml) içerisinde manyetik karıştırıcıda 2 saat karıştırılmıştır. Daha sonra HEMA (1.30 ml) bu karışıma eklenerek karıştırılmaya devam edilmiştir. Aynı bir beherde MBAAM (0.283 g), suda (4.20 ml) çözülerek karışmaya devam eden monomer çözeltisine eklenmiştir. Böylece ilk çözelti karışımı hazırlanmıştır. İkinci çözelti karışımı ise başlatıcı/aktifleştirici çiftinden oluşmaktadır. Bunun için APS (0.02 g) ve TEMED (25 µl) suda (7.50 ml) çözülmüştür. İki peristaltik pompa "T sistem" oluşturacak şekilde birbirine eşit uzunlukta ve eşit çaptaki borularla bağlanmıştır (Şekil 3.1). Pompalardan birinden monomer/çapraz bağlayıcı çözeltisi diğerinden

başlatıcı/aktifleştirici çözeltisi eşit akış hızlarında (0.5 ml/dk) geçirilmiştir. T sistemin ucunda birleşen çözelti damlacıklar şeklinde -196 °C'da sıvı azot içinde polimerleşmeye bırakılmıştır. Tüm çözelti bittikten 15 dakika sonra damlacıklar polimerleşmenin tamamlanması için parafin yağına alınarak -12 °C'da 24 saat bekletilmiştir. Bu süre sonunda hazırlanan polimer oda sıcaklığına geldikten sonra reaksiyona girmemiş monomerlerin ve diğer atıkların polimerik yapıdan uzaklaştırılması için kriyojeller sürekli olarak su ile yıkanmıştır. Baskılanmamış Poli(HEMA-MATrp) kriyojel küreler aynı yöntemle, kalıp molekül olan protein A kullanılmadan sentezlenmiştir.



Şekil 3.1. Küre kriyojel sentez sisteminin şematik gösterimi.

3.4. Kalıp Molekülün (Protein A) Uzaklaştırılması

Hazırlanan kriyojellerden kalıp molekül olan Protein A'nın uzaklaştırılması için 0.1 M NaOH+0.1 M Na₂CO₃ çözeltisi kullanılmıştır. Protein baskılanmış kriyojeller oda sıcaklığında 48 saat süre ile 0.1 M NaOH+0.1 M Na₂CO₃ çözeltisi ile yıkanmıştır. Bu işlem kalıp molekül protein A molekülleri 224 nm'de UV spektrofotometresi ile tayin edilemeye kadar birkaç kez tekrarlanmıştır.

3.5. Protein A Baskılanmış ve Baskılanmamış Poli(HEMA-MATrp) Kriyojel Kürelerin Karakterizasyonu

Protein A baskılanmış ve baskılanmamış kriyojel kürelerin çeşitli özelliklerinin belirlenmesi için FTIR, elementel analiz, şişme testi, yüzey alanı ölçümleri gibi çeşitli karakterizasyon deneyleri yapılmıştır. Bu deneylerin detayları aşağıda anlatılmıştır.

3.5.1. FTIR ile Yapı Analizi

Poli(HEMA-MATrp) kriyojellerin yığın yapısı FTIR (FTIR 8000 Series, Shimadzu, Japan) ile incelenmiştir. Analizden önce kriyojeller vakum etüvünde 24 saat bekletilerek kurutulmuştur. FTIR spektrumlarının elde edilmesi için 2 mg örnek 98 mg KBr ile karıştırılarak havanda dövülmüştür. Ardından hidrolik preste 600 kg/cm² basınçta 10 dakika bekletilerek ince bir tablet haline getirilmiştir. Hazırlanan örneklerin spektrumları 4600-400 cm⁻¹ dalga boyu aralığında FTIR cihazında ölçülmüştür.

3.5.2. Yüzey Alanı Ölçümleri

Baskılanmış ve baskılanmamış Poli(HEMA-MATrp) kriyojellerin spesifik yüzey alanı BET cihazı (Quantochrome SI, Automated Surface Area and Pore Size Analyzer, Quantochrome, ABD) kullanılarak belirlenmiştir. Kriyojel örnekleri dikkatlice tartılmış ve örnek haznesine yerleştirilmiştir. Daha sonra, örneklerin azot atmosferinde 150 °C'de 1 saat gazı alınmıştır. Gaz adsorpsiyonu -210 °C' de ve desorpsiyonu oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Desorpsiyon basamağında elde edilen sonuçlar, yüzey alanı hesaplamalarında kullanılmıştır.

3.5.3. Denge Şişme Oranının Belirlenmesi

Poli(HEMA-MATrp) kriyojellerin denge şişme oranının belirlenmesinde aşağıda verilen yöntem izlenmiştir. Kuru kriyojeller ± 0.0001 duyarlıkla tartılmış ve 50 ml saf su içeren behere konulmuştur. Farklı zaman aralıklarında (1-120 dakika) ve 24 saat sonunda kriyojeller sudan alınmış ve süzgeç kağıdı yardımı ile yüzeydeki su uzaklaştırılarak tartılmıştır. Aşağıdaki eşitlik yardımı ile poli(HEMA-MATrp) kriyojellerin su içeriği belirlenmiştir.

$$\text{Şişme oranı (\%)} = [(W_s - W_0) / W_0] \times 100 \quad (3.1)$$

W_0 ve W_s sırası ile kriyojellerin şişmeden önceki ve sonraki ağırlıklarını (g) ifade etmektedir.

Poli(HEMA-MATrp) kriyojel kürelere ait makrogözenek miktarının belirlenmesi için ise aşağıdaki yöntem uygulanmıştır. İlk olarak denge şişme oranına ulaşmış olan

kriyojel küreler tartılmıştır. Daha sonra şişmiş kriyojel küreler, kriyojellerin makrogözeneklerinde bulunan suyun uzaklaştırılması için sıkılarak tartılmıştır. Kriyojel kürelere ait makrogözenek miktarı aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Makrogözenek miktarı (\%)} = [(W_1 - W_2) / W_1] \times 100 \quad (3.2)$$

Bu eşitlikte W_1 denge şişme oranına ulaşmış kriyojellerin ağırlığını (g) ifade ederken, W_2 denge şişme oranına ulaşmış kriyojellerin sıkıldıktan sonraki ağırlığını (g) ifade etmektedir.

3.5.4. Poli(HEMA-MATrp) Kriyojellerin Yüzey Morfolojisi

Poli(HEMA-MATrp) kriyojellerin yüzey ve yığın yapısı, yüksek büyütme sağlaması nedeniyle yüksek çözünürlüklü taramalı elektron mikroskobu (SEM) (QUANTA 400F Field Emission SEM, Hollanda) ile incelenmiştir. Bu amaçla ilk basamakta kriyojel küreler bütün halde iletken bir yapıştırıcıyla SEM örnek plakası üzerine tutturulmuştur. Daha sonra örnek yüzeyi vakum altında 200 Å kalınlığında metalik altın ile kaplanmış ve bu sayede yüzey iletken hale getirilmiştir. Hazırlanan örnekler SEM örnek yuvasına yerleştirilerek çeşitli büyütme oranlarında görüntüler alınmıştır.

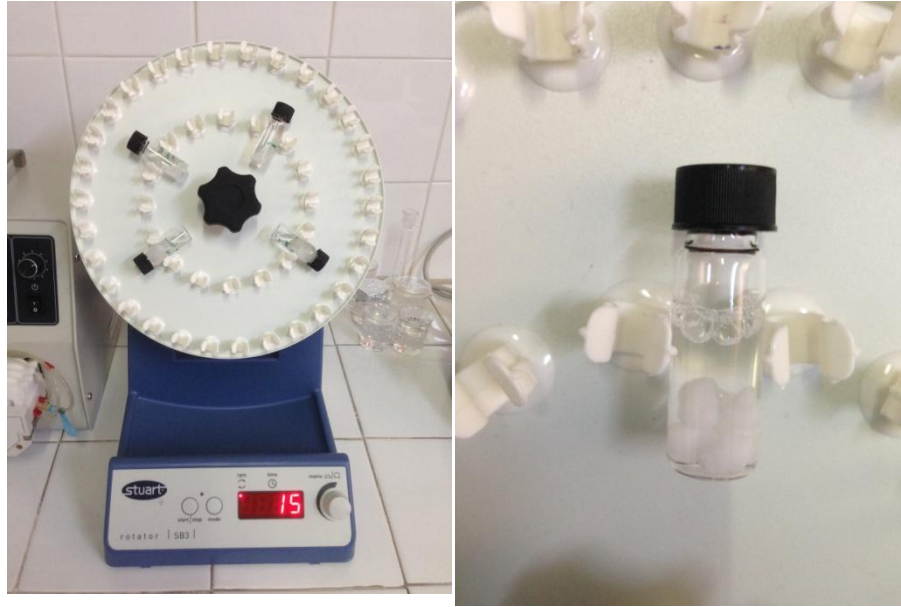
3.5.5. Elementel Analiz

Sentezlenen poli(HEMA), baskılanmış poli(HEMA-MATrp) ve baskılanmamış poli(HEMA-MATrp) kriyojeller, yapıdaki MATrp miktarının belirlenmesi için, elementel analiz cihazı kullanılmıştır. Örnekler ± 0.1 mg duyarlılıkla tartılarak elementel analiz cihazının (Thermo Scientific FLASH 2000 Serisi CHNS/O Analyzer, Cambridge, UK) alüminyum hücreesine yerleştirilmiştir. Tartılan örnekler cihaza konularak yanma işlemine tabi tutulmuş ve bu yanma reaksiyonu sonucunda örneğin karbon, hidrojen, oksijen, azot ve kükürt içeriği belirlenmiştir. Kriyojel yapısındaki MATrp içeriği azot (N) sitokiyometresinden hesaplanmıştır.

3.6. Adsorpsiyon Çalışmaları

3.6.1. Sulu Çözeltiden Protein A Adsorpsiyonu

Sulu çözeltiden protein A adsorpsiyonu deneyleri kesikli sistemde gerçekleştirilmiştir. Protein A baskılanmış kriyojeller, 2 ml protein A çözeltisi ile 2 saat rotatörde 15 rpm karıştırma hızında etkileştirilmiştir. Başlangıç protein A derişiminin (0.1-2.0 mg/ml), pH'nın (4.0-8.0), sıcaklığın (4-45 °C) ve iyonik şiddetin (0.1-1.0 M NaCl) adsorpsiyon hızına ve kapasitesine etkisi incelenmiştir. Şekil 3.2'de deneylerde kullanılan kesikli sistemin optik fotoğrafı gösterilmiştir.



Şekil 3.2. Protein A baskılanmış poli(HEMA-MATrp) kriyojel kürelere sulu çözeltiden protein A adsorpsiyonu gerçekleştirmek için kullanılan kesikli sistem düzeneğinin optik görüntüsü.

Çözeltideki protein A derişimleri, 224 nm'de spektrofotometrik (Shimadzu UV-1601, Japonya) olarak belirlenmiştir. Cihazın duyarlılığı periyodik olarak standart protein A çözeltisi ile kontrol edilmiştir. Deneyler ve ölçümler 3 kez tekrarlanmış ve sonuçların ortalaması alınmıştır. Gram polimer başına adsorplanan protein A miktarı (mg/g polimer) aşağıdaki eşitlikler kullanılarak hesaplanmıştır.

$$M_g = C_o \cdot q \cdot t \quad (3.3)$$

$$M_\zeta = C \cdot V \quad (3.4)$$

Bu eşitliklerde; M_g : kürelerle etkileşime giren protein A miktarı (mg); C_o : protein A başlangıç derişimi (mg/ml); q : akış hızı (ml/dk); t : zaman (dk); M_c : kolondan çıkan protein A miktarı (mg); C : adsorpsiyon sonrası protein A derişimi (mg/ml); V : kolon çıkışında toplanan çözelti hacmi (ml)'dir.

Polimerlerin protein A adsorpsiyon kapasitesi ise;

$$Q = [M_g - M_c] / m \quad (3.5)$$

eşitliği kullanılarak belirlenmiştir. Burada; m : kullanılan kriyojel ağırlığı (g)'dir.

3.6.2. Seçicilik Çalışmaları

Protein A baskılanmış P(HEMA-MATrp) kriyojellerin seçiciliğini göstermek için başka bir bakteriyel protein olan Protein G ve IgG Fc fragmenti yarışmacı proteinler olarak seçilmiştir. Seçilen proteinlerin 0.5 mg/ml derişimindeki sulu çözeltileri ayrı ayrı hazırlanmış ve kesikli sistemde 2 saat boyunca 15 rpm hızda Protein A baskılanmış ve baskılanmamış P(HEMA-MATrp) kriyojel kürelerle etkileştirilmiştir. Adsorplanan protein miktarları 280 nm'de UV spektrofotometrede ölçülen absorbans değerleri ile belirlenmiştir.

Protein G ve Fc fragmenti için Protein A'ya göre dağılma ve seçicilik katsayıları aşağıdaki eşitliğe göre belirlenmiştir:

$$K_d = [(C_i - C_f) / C_f] \times V / m \quad (3.6)$$

Eşitlikte K_d dağılma katsayısını (ml/g); C_i ve C_f protein başlangıç ve sonuç derişimlerini (mg/ml), V kullanılan sulu çözelti hacmini (ml) ve m kriyojelin ağırlığını (g) ifade etmektedir.

Yarışmacı türler varlığında bir proteinin bağlanması için seçicilik katsayısı Eşitlik 3.7'ye göre denge bağlanma verilerinden elde edilebilir.

$$K = K_{\text{kalıp protein}} / K_{\text{girişimci protein}} \quad (3.7)$$

Baskılanmış adsorbentle diğer protein moleküllerinin k değerleri baskılama seçiciliği hakkında yorum yapılmasına olanak verir. Bağlı seçicilik katsayısı (k') aşağıdaki eşitlik ile tanımlanır;

$$K' = K_{\text{baskılanmış}}/K_{\text{kontrol}} \quad (3.8)$$

3.7. Doğal Kaynaklardan Protein A Saflaştırılması

Protein A, *Staphylococcus aureus* hücre duvarı ve rekombinant *Escherichia coli* (*E. coli*) hücre dışı salgısı olmak üzere iki farklı doğal kaynaktan saflaştırılmıştır.

S. aureus kaynağı olarak *Staphylococcus aureus subsp. aureus* (ATCC® 29213™) ticari suşu kullanılmıştır. Bakteriler mannitol salt agar (MSA)'da 48 saat 37 °C'de üremeye bırakılmıştır. Ardından hücre parçalama çalışmaları için sıvı besiyeri olan Nutrient Broth'a alınmıştır. *S. aureus* hücre duvarını parçalamak için Gram (+) bakteri hücre duvarı parçalama yöntemi kullanılmıştır. Bunun için ilk olarak 500 IU/ml lizozim 10 mM pH 8 Tris-HCl tamponu içerisinde çözülerek stok hazırlanmıştır. Hazırlanan stoktan 25 µl, 1 ml bakteri hücre peletine eklenir ve ardından 350 µl 10 mM pH 8 Tris-HCl tamponu içerisinde 0.1 M NaCl, 1 mM EDTA, % 5 Triton X 100 (ağırlık/hacim) içeren çözeltiyle süspanse edilir. 30 dakika 37 °C'de inkübe edilmiştir. Ardından elde edilen lizat 5 L deiyonize su içerisinde karıştırılarak ve su sık sık değiştirilerek diyaliz edilmiştir.

Protein A üretmek için genetik yapısı değiştirilen rekombinant *E.coli*'nin besi ortamına salgıladığı hücre dışı salgısı kullanılmıştır. *E. coli* hücrelerinin ürettiği Protein A N-terminal kısmında saflaştırılmasını kolaylaştırmak amacıyla 6-Histidin işaret bölgesi içerir. Ayrıca rekombinant Protein A, B alt birimi yerine daha dayanıklı olan Z alt birimini içermektedir.

3.7.1. Hızlı Performans Sıvı Kromatografisi (FPLC) Analizi

Protein A baskılanmış poli(HEMA-MATrp) kriyojel küreler ile doğal ortamdaki kromatografik olarak ayırma FPLC ile gerçekleştirilmiştir. Ayırma işlemi sentezlenmiş olan Protein A baskılanmış poli(HEMA-MATrp) kriyojel kürelerin GE Healthcare (Amersham Bioscience, Uppsala, Sweden) kolonuna (10/10, 19-5001-01) doldurulması ile yapılmıştır. FPLC'de ayırma UV dedektör sistemi içeren AKTA-FPLC (Amersham Bioscience, Uppsala, Sweden) ile gerçekleştirilmiştir. Kullanılan FPLC cihazı M-925 karıştırıcısı, P-920 pompası, UPC-900 monitörü, INV-907 enjeksiyon valfi ve Frac920 fraksiyon kolektörü içermektedir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. FPLC sistemi ve kullanılan kolonun optik görüntüsü.

Protein A adsorpsiyonu MIP kriyojellerle gerçekleştirilmiş, doğal Protein A kaynağı kolona uygulanmıştır. FPLC'nin A ve B hareketli fazları sırasıyla 0.1 M NaCl içeren 10 mM Fosfat tamponu (pH 7.0) ve 0.1M Na₂CO₃ ve 0.1 M NaOH içeren elüsyon çözeltisidir. Kromatografik ayırma doğrusal gradiyenti 2 mL/dk akış hızında gerçekleştirilmiştir. % 100'lük A hareketli fazı ile 5 dakikalık başlangıç periyodunun ardından, B hareketli fazının miktarı % 0'dan % 100'e kadar 2 dakika içerisinde doğrusal gradiyentli olarak artırılmıştır. % 100'lük B hareketli fazı 5 dakika süreyle uygulandıktan sonra kolondan 2 dakika boyunca % 100'lük A hareketli fazı geçirilmiştir. Tüm tamponlar ve karışımlar kullanılmadan önce filtre edilmiş ve hava kabarcıkları uzaklaştırılmıştır. 100 µl *S. aureus* hücre lizati kolona uygulanarak sistemin absorbansı 256 nm'de kaydedilmiştir. Ayırma işlemi ise oda sıcaklığında yapılmıştır. t_0 , belirleyici olarak KBr kullanılmıştır. Kapasite (k') ve ayırma (α) faktörleri

$$k' = (t_R - t_0)/t_0, \alpha = k_2'/k_1' \quad (3.10)$$

eşitlikleri kullanılarak hesaplanmıştır. Bu eşitliklerde t_R proteinin alıkonma zamanı t_0 ise belirtecin (KBr) alıkonma zamanı, k_2' Protein A için kapasite faktörü ve k_1' ise ortamda bulunan diğer proteinlerin kapasite faktörünü belirtmektedir. R_s ayırma gücü ve teorik plaka sayısı (N) aşağıdaki eşitlik kullanarak hesaplanmıştır.

$$N = 5.54 (t_R / w_{0.5})^2 \quad (3.11)$$

$$R_s = 2 (t_{R,2} - t_{R,1}) / (w_2 + w_1) \quad (3.12)$$

$w_{0.5}$ karşılık gelen pikin taban yarı uzaklığı, $t_{R,1}$ ve $t_{R,2}$ bitişik iki yakın pikin alikonma zamanları, w_1 ve w_2 ise bitişikteki iki yakın pikin taban çizgisindeki genişliğidir.

3.7.2. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE)

Elektriksel bir alanda SDS varlığında jel üzerinde proteinlerin elektrik yüklerine göre yürütülmesine dayanan bu yöntemde, her bir protein ve proteinlerin alt ünitelerini jel üzerinde tek bant oluşturacak şekilde ayırt etmek mümkündür. Bu yöntem proteinlerin moleküler ağırlıklarını belirlemede kullanıldığı gibi saflaştırılmış proteinlerin saflık derecelerinin tayininde de sıkça kullanılır.

Protein A baskılanmış poli(HEMA-MATrp) kriyojel küreler ile *Staphylococcus aureus* hücre duvarından ve rekombinant *E. coli* hücre dışı salgısından saflaştırılan protein A'nın saflığının kontrol edilmesi için SDS-PAGE kullanılmıştır. SDS-PAGE % 12'lik akrilamid jel ile yürütülmüştür. Her iki doğal protein A kaynağı için adsorpsiyon öncesi, sonrası, desorpsiyon örnekleri ve işlem görmemiş ticari protein A örneği (1 mg/ml) aynı oranda numune tamponuyla karıştırılarak jele yüklenmiştir. Her numune ve standart % 20 gliserol, % 20 merkaptoetanol, % 4 sodyum dodesil sülfat (SDS), % 0.02 bromfenol blue (BPB) içeren numune yükleme tamponu ile karıştırılmıştır. Jel, yüklenen örneklerle ve % 0.1 SDS içeren yürütme tamponu (Tris-glisin, pH 8.3) varlığında 2 saat 100 V'ta yürütülmüştür. Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra jel gümüş boyama yöntemi ile boyanmıştır. Bu yöntem, renksiz olan gümüşün (Ag^{+1}) proteinlerdeki karboksil ve sülfidril gruplarına bağlanarak (Ag^0) proteinleri kahverengine dönüştürüp, onların görünür hale getirilmesine dayanır. Boyama işlemi için ilk olarak jel, metanol : asetik asit : su (50:5:45) karışımına alınarak en az bir saat bu çözeltide bekletilmiştir. Fiksasyon çözeltisi olarak adlandırılan bu çözeltide gece boyu bekletilmesinde bir sakınca yoktur. Ardından ortamdaki metanolun uzaklaştırılması için 1 saat deiyonize su ile yıkanmıştır. Daha sonra 1-2 dakika % 0.02 sodyum tiyosülfat çözeltisinde bekletildikten sonra tekrar deiyonize su ile yıkanarak % 0.1'lik gümüş nitrat ($AgNO_3$) çözeltisine alınmış ve 30 dakika bekletilmiştir. Son olarak % 0.004 formaldehit ve % 2 sodyum karbonat (Na_2CO_3) çözeltisi ile reaksiyon başlatılmıştır. İstenen renkler görüldükten sonra reaksiyon % 1'lik asetik asit çözeltisi ile

durdurulmuştur. Elektroferez uygulamasında protein standardı olarak, geniş spektrumlu Prestained protein marker (10- 170 kDa) kullanılmıştır.

3.8. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik Çalışmaları

Protein A desorpsiyonu 0.1 M NaOH+0.1 M Na₂CO₃ çözeltisi ile gerçekleştirilmiştir. Protein A adsorplamış olan baskılanmış kriyojeller oda sıcaklığında 2 saat desorpsiyon çözeltisi (2 ml) ile muamele edilmiştir. Desorpsiyon ortamındaki protein A derişimi 224 nm'de UV spektrofotometresi ile belirlenmiştir. Desorpsiyon oranı kriyojellere adsorplanan ve kriyojellerden desorbe olan protein A miktarından aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Desorpsiyon oranı (\%)} = \frac{\text{Desorpsiyon ortamına salınan Protein A}}{\text{Kriyojele adsorplanan Protein A miktarı}} \times 100 \quad (3.9)$$

Protein A baskılanmış poli(HEMA-MATrp) kriyojelin tekrar kullanılabilirliğini belirlemek üzere adsorpsiyon-desorpsiyon işlemi aynı kriyojeller kullanılarak 10 kez tekrar edilmiştir. Rejenerasyon ve sterilizasyon amacı ile kriyojel küreler, desorpsiyon işleminin ardından 50 mM NaOH çözeltisi ve deiyonize su ile yıkanmıştır.

3.9. Protein A ile *Staphylococcus aureus* Tanıma Çalışmaları

S. aureus kaynağı olarak *Staphylococcus aureus subsp. aureus* (ATCC® 29213™) ticari suşu kullanılmıştır. Bakteriler mannitol salt agar (MSA)'da 48 saat 37 °C'de üremeye bırakılmıştır. Ardından hücre ayırma deneylerinin yapılabilmesi için sıvı besiyeri olan Nutrient Broth'a alınmıştır. Burada formaldehit ile bakteriler inaktif hale getirilerek üremeleri durdurulmuştur. 1 ml'lik bakteri örnekleri Protein A baskılanmış (MIP) ve baskılanmamış (NIP) poli(HEMA-MATrp) kriyojel kürelerle 37 °C'de çalkalamalı etüvde 2 saat etkileştirilmiş ve ardından Plate count agar ile bakteri koloni sayımı yapılmıştır. Sayım için başlangıç ve işlem sonrası bakteri örnekleri Plate count agar'a ekilip 48 saat sonunda koloni sayımları yapılmıştır.

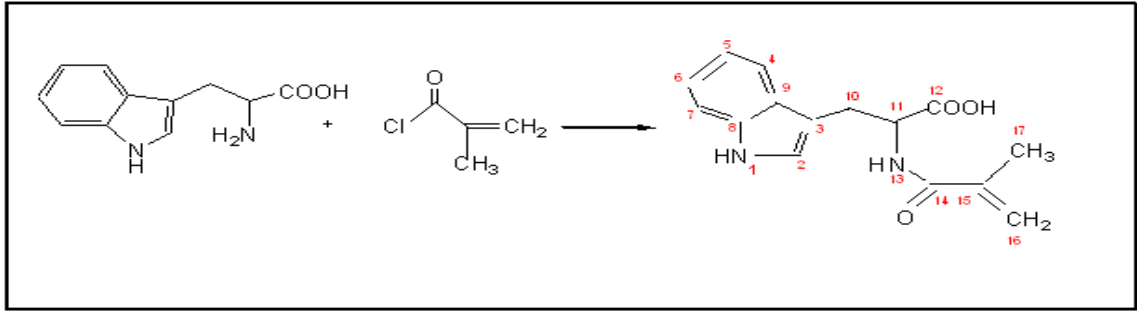
Protein A baskılanmış poli(HEMA-MATrp) kriyojel kürelerin yüzeyine tutunan *Staphylococcus aureus* hücrelerinin SEM ile görüntülenebilmesi için tutunan

bakteriler kriyojel yüzeyine fiske edilmiştir. Fiksasyon işlemi için *Staphylococcus aureus* hücreleri ile etkileştirilen kriyojel küreler etkileşimin ardından pH 7.4 PBS tamponu ile 10 dakika yıkandıktan sonra % 2.5'lük gluteraldehit çözeltisinde oda sıcaklığında gece boyu bekletilmiştir. Ardından % 20'den % 100'e kadar 10'ar birim arttırarak etanol çözeltisinde her basamakta 10 dakika olmak üzere bekletilmiştir. % 100'lük etanol çözeltisinde gece boyu bekletilen kriyojeller kurutulup SEM için hazır hale getirilmiştir.

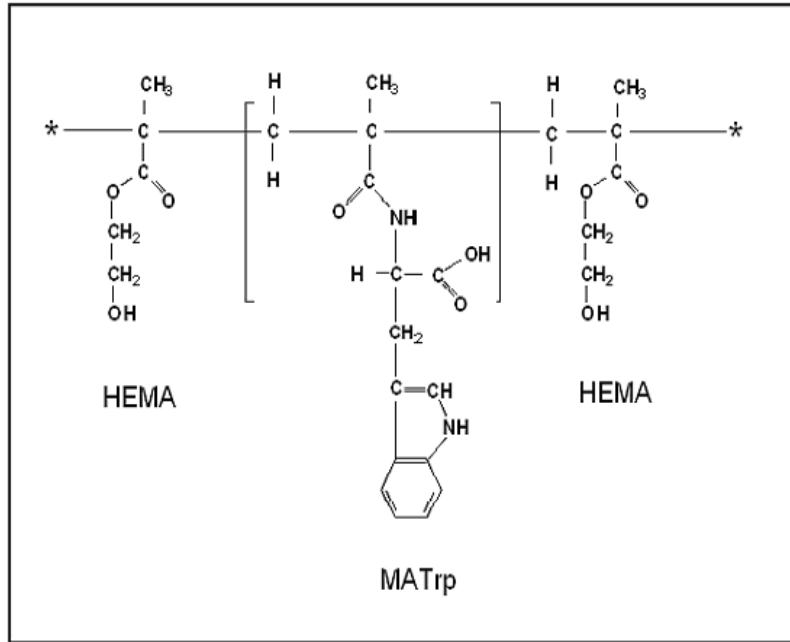
4. DENEYSEL SONUÇLAR ve TARTIŞMA

4.1. MATrp Monomerinin Sentezi ve Karakterizasyonu

N-metakriloil-(L)-triptofan (MATrp) sulu çözültiden ve doğal kaynaklardan Protein A'nın seçici bir şekilde saflaştırılabilmesi için fonksiyonel komonomer olarak seçilmiştir. MATrp komonomeri L-Triptofan ve Metakroil klorür moleküllerinden sentezlenmiş daha sonra Protein A ile 1/10 µmol oranında kompleksleştirildikten sonra, kompleks HEMA monomeri ile polimerleştirilerek poli(HEMA-MATrp) polimeri elde edilmiştir. Şekil 4.1 MATrp komonomerinin, Şekil 4.2, poli(HEMA-MATrp) polimerinin molekül şeklini göstermektedir.

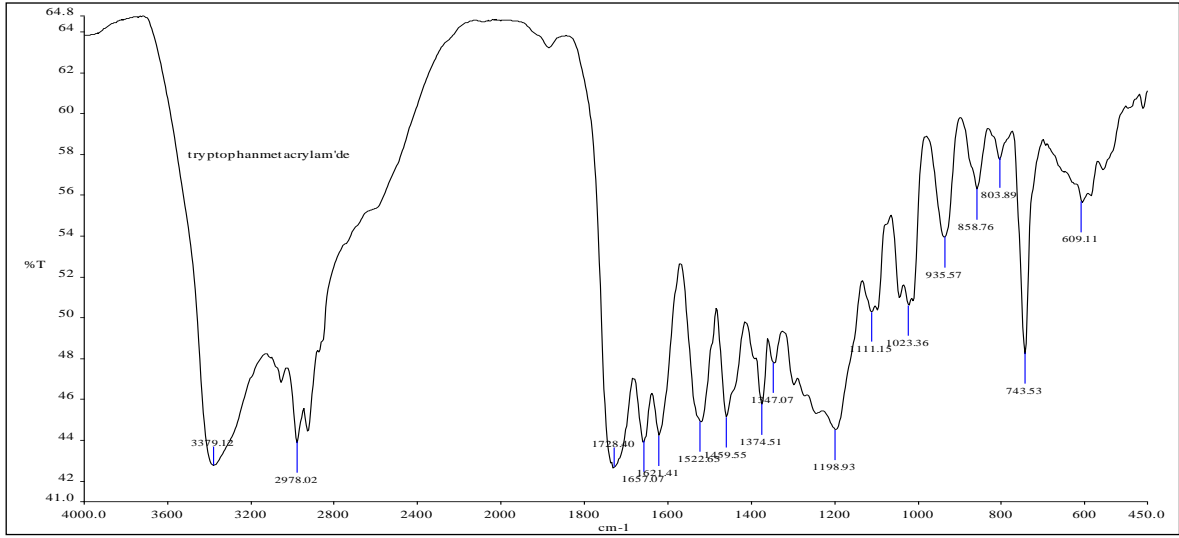


Şekil 4.1. MATrp komonomerinin molekül formülü.



Şekil 4.2. poli(HEMA-MATrp) molekül formülü.

Şekil 4.3 MATrp komonomerine ait FTIR spektrumunu göstermektedir. 3379 cm^{-1} deki adsorpsiyon bandı NH gerilme bandına aitken aromatik CH gerilme bandları 3100-3000 cm^{-1} arasında görülmektedir. 2978 cm^{-1} deki adsorpsiyon bandı alkil grubundaki CH gerilme bandına aittir. C=C gerilme bandı 1621 cm^{-1} de, NH eğilme bandı 1522 cm^{-1} de, C-N aromatik gerilme bandı 1458-1374 cm^{-1} de görülmektedir. 1347-1198 cm^{-1} deki eğilme bandı asidin C=O grubunun eğilme bandına aittir.



Şekil 4.3. MATrp komonomerinin FTIR spektrumu.

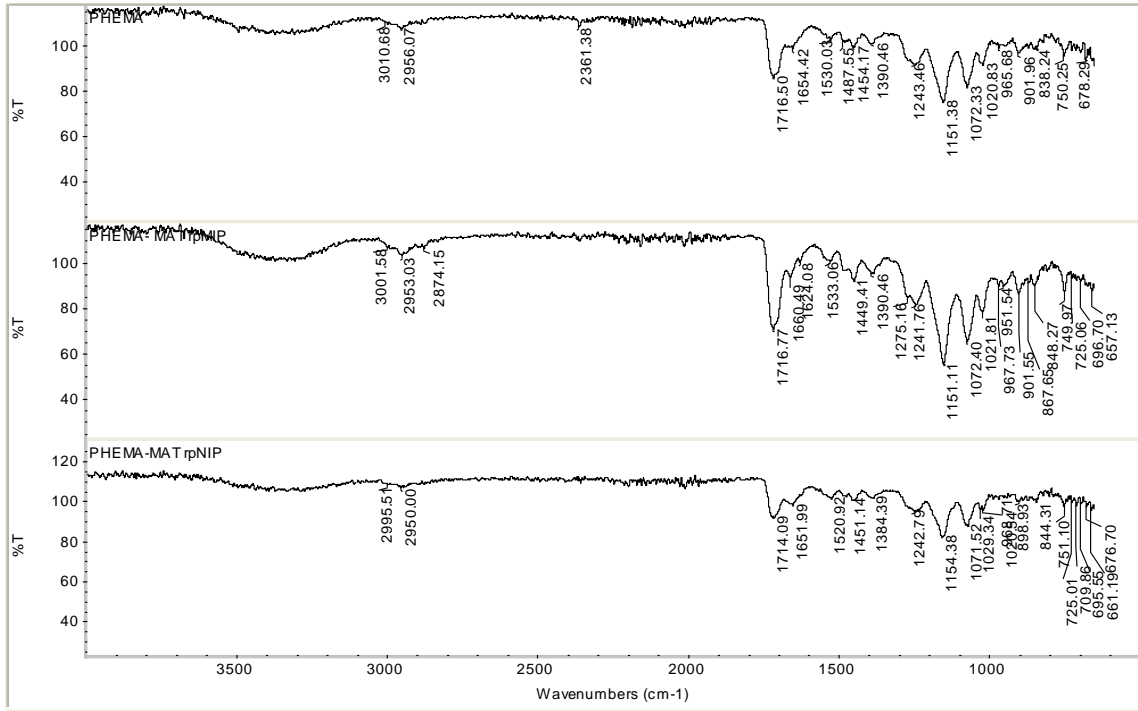
4.2. Protein A Baskılanmış ve Baskılanmamış Poli(HEMA-MATrp) Kriyojel Kürelerin Karakterizasyonu

Protein A baskılanmış Poli(HEMA-MATrp) kriyojel küreler, kriyopolimerizasyon yöntemi ile hazırlanmıştır. Sentezlenen kriyojeller, şişme özellikleri, yüzey alanı ölçümleri, boyut dağılımı, FTIR ve SEM ile karakterize edilmiştir.

4.2.1. FTIR ile Yapı Analizi

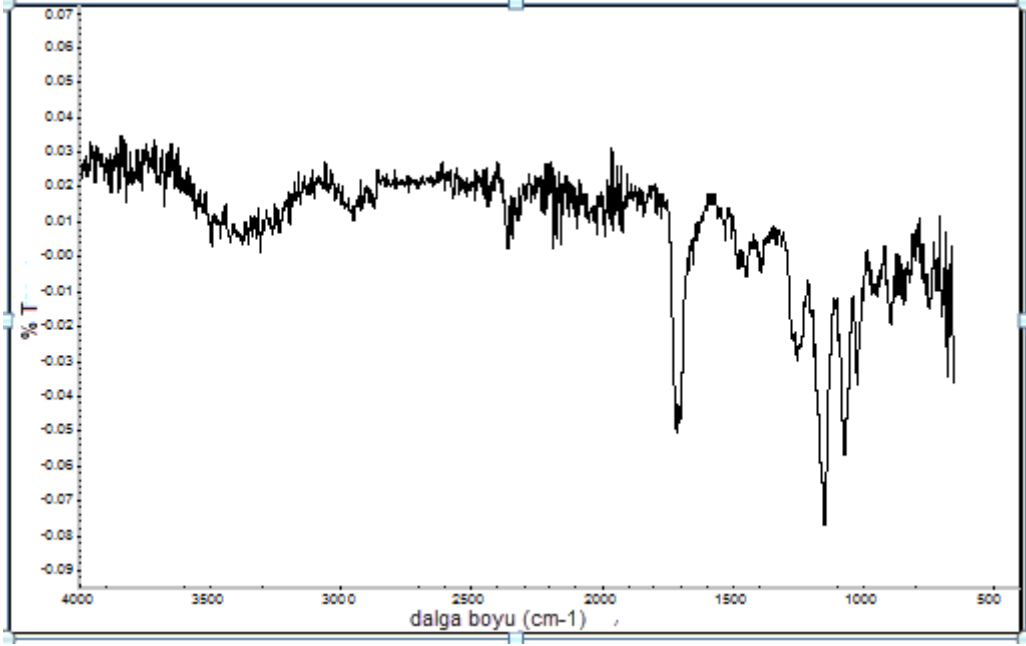
Şekil 4.4' de HEMA monomeri ve poli(HEMA-MATrp) NIP ve MIP kriyojellere ait FTIR analizini göstermektedir. Şekil 4. 4' de görüldüğü gibi HEMA monomeri 3420 cm^{-1} de (OH- gerilme), 2954 cm^{-1} de (CH gerilme), 1718 cm^{-1} de (C=O gerilme), 1633 cm^{-1} de (C=C gerilme) bandlarına sahiptir. MATrp monomerine ait 1533 cm^{-1} de (NH eğilme), 1454-1391 cm^{-1} de (CN aromatik) ve 1657 cm^{-1} de (C=O amit bandları) bandları MATrp monomerinin HEMA'nın yapısına katıldığını

göstermektedir. HEMA monomeri 2954 cm^{-1} de (CH eğilme), 1716 cm^{-1} de (C=O gerilme), 1633 cm^{-1} de (C=C gerilme bandı) bandlar göstermektedir.



Şekil 4.4. PHEMA, poli(HEMA-MATrp) MIP ve poli(HEMA-MATrp) NIP kriyojellerinin FTIR spektrumları.

PHEMA ve poli(HEMA-MATrp) MIP kriyojeller arasında alınan fark spektrumu yapıya triptofan amino asitinin katıldığını daha net göstermektedir (Şekil 4.5). Bu durumda poli(HEMA-MATrp) MIP kriyojelin verilerinden PHEMA kriyojelin verileri çıkarılarak geriye sadece MATrp'ye ait bantlar elde edilmiştir. Şekil 4.5 'de de görüldüğü gibi MATrp monomerinin 1533 cm^{-1} de (NH eğilme), $1449-1391\text{ cm}^{-1}$ (CN aromatik) ve 1657 cm^{-1} (C=O amit) deki bandları yapıya MATrp monomerinin katıldığını göstermektedir.



Şekil 4.5. Poli(HEMA) ve poli(HEMA-MATrp) MIP kriyojeller arasında alınan fark spektrumu.

4.2.2. Yüzey Alanı ölçümleri

Yüzey alanı ve gözenek boyutu dağılımı moleküler baskılanmış polimerlerde önemli özelliklerdir. Bu özellikler sıvı azot sıcaklığında azot adsorpsiyon/desorpsiyon izotermi ve 0.05-1.00 arası bağıl basınçları (P/P_0) ile ölçülmüştür.

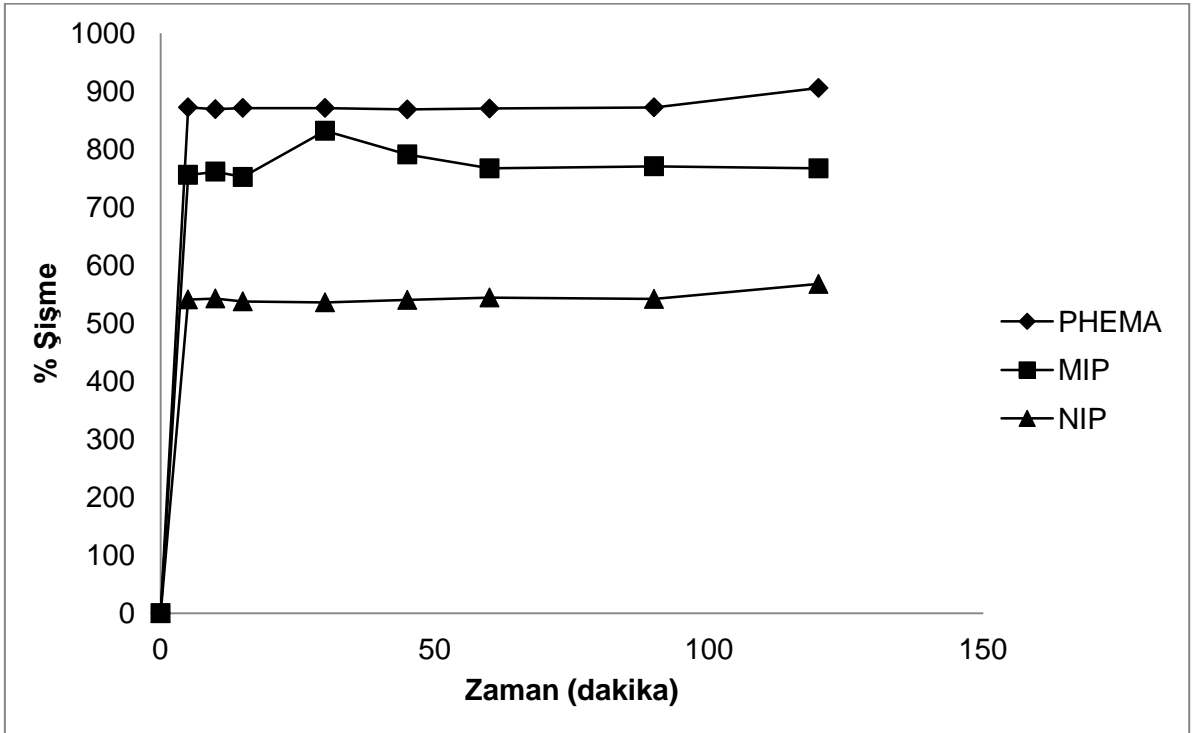
Protein A baskılanmış ve baskılanmamış kriyojellerin spesifik yüzey alanları sırasıyla $9.91 \text{ m}^2/\text{g}$ ve $6.18 \text{ m}^2/\text{g}$ olarak bulunmuştur. Baskılama işlemi, spesifik yüzey alanının artmasına sebep olmuştur. Bu durumun temel sebebi; kriyopolimerizasyon sırasında Protein A moleküllerinin varlığıdır. Baskılanmış kriyojelde Protein A'ya ait spesifik kavite oluşumu gözenek alanının artmasına neden olmuştur.

Ayrıca kriyojeller, Protein A ve diğer bakteri hücre duvarı proteinlerinin kolaylıkla difüze olabileceği kadar geniş gözeneklere sahiptir.

4.2.3. Şişme Özellikleri

Poli(HEMA) kriyojel küreler çapraz bağlı hidrofilik yapıya sahipken, Protein A baskılanmış poli(HEMA-MATrp) kriyojel küreler içerdikleri triptofan aminoasitinden dolayı hidrofobik yapıdadır.

Bu çalışmada hazırlanmış poli(HEMA), baskılanmamış poli(HEMA-MATrp) ve Protein A baskılanmış poli(HEMA-MATrp) kriyojellerin denge şişme oranları sırasıyla % 905, % 570 ve % 760'dır (Şekil 4.6). Makrogözenek oranları ise sırasıyla % 73, % 70 ve % 74'dür. Poli(HEMA) kriyojellerle karşılaştırıldığında yapıya MATrp girmesi ile denge şişme oranının her iki durumda da azaldığı gözlenmektedir. Bu sonuca hidrofobik yapıda bir aminoasit olan triptofanın yapıya girmesi neden olmuştur. Baskılanmış ve baskılanmamış kriyojeller karşılaştırıldığında ise baskılama işleminin kriyojellerin şişme oranını arttırdığı görülmektedir. Her iki yapının da hidrofobik olmasına karşın baskılanmış kriyojelde oluşan kavitelere kaynaklı olarak artan spesifik yüzey alanı ile açıklanabilir. Yani Protein A'nın oluşturduğu spesifik boşluklar şişme oranının artmasına sebep olmuştur.



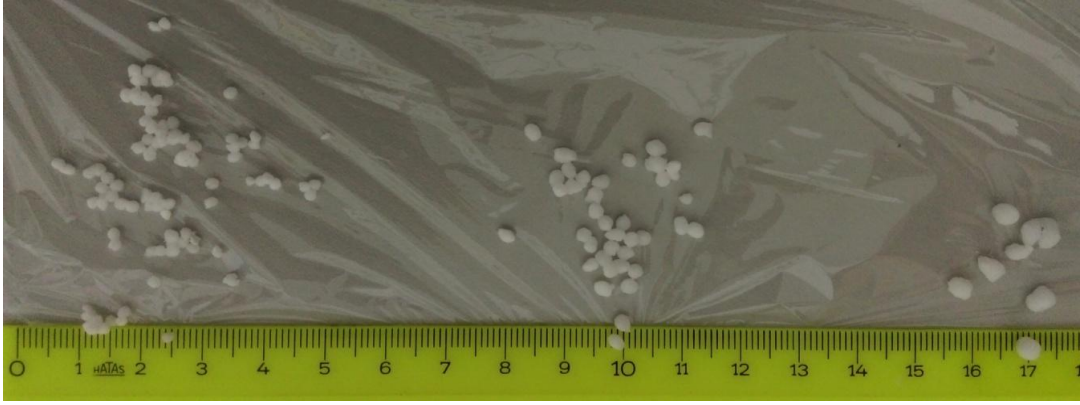
Şekil 4.6. PHEMA, Protein A baskılanmamış poli(HEMA-MATrp) (NIP) ve Protein A baskılanmış poli(HEMA-MATrp) (MIP) kriyojellerin şişme oranları.

4.2.4. Yüzey Morfolojisi

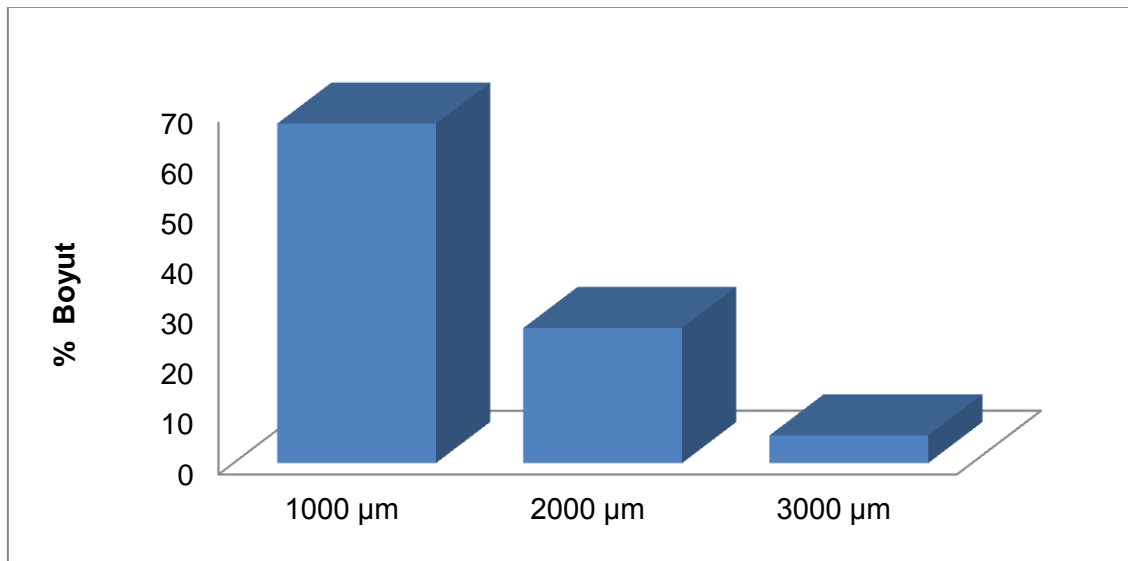
Protein A baskılanmış poli(HEMA-MATrp) kriyojel kürelerin yüzey morfolojisi ve içyapısı optik, elektron mikroskop fotoğrafları ve boyut dağılım analizi ile incelenmiştir.

4.2.4.1. Boyut Dağılımı

Sentezlenen Protein A baskılanmış poli(HEMA-MATrp) kriyojel kürelerin boyut dağılımı incelenmiş ve kriyojel kürelerin 1000 μm ile 3000 μm aralığında çaplara sahip olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.7). Kriyojel kürelerin boyut dağılımı; % 5.5 oranında 3000 μm , % 27 oranında 2000 μm , % 67.5 oranında 1000 μm 'dir.



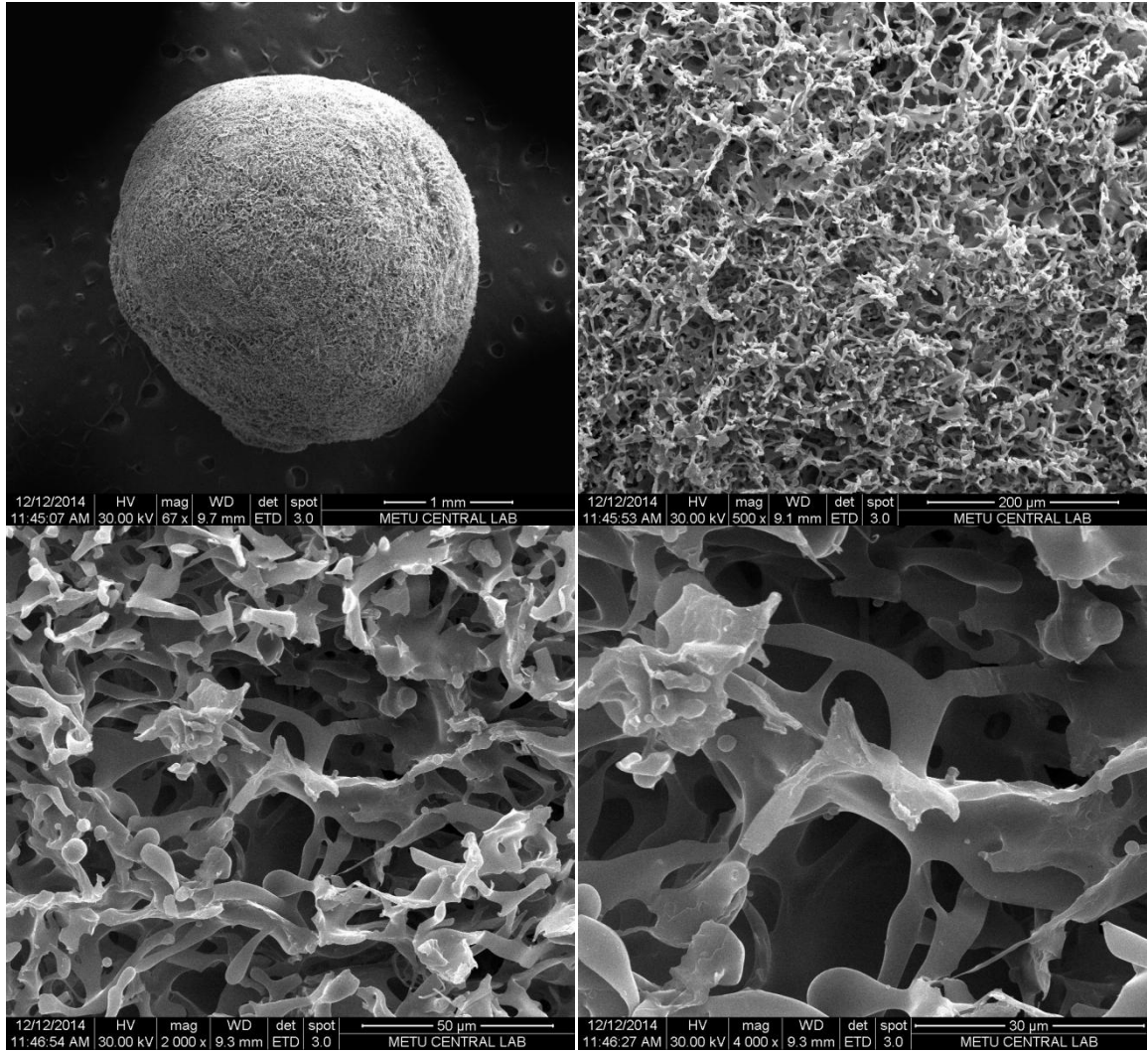
Şekil 4.7. Protein A baskılanmış poli(HEMA-MATrp) kriyojel kürelerin optik görüntüleri.



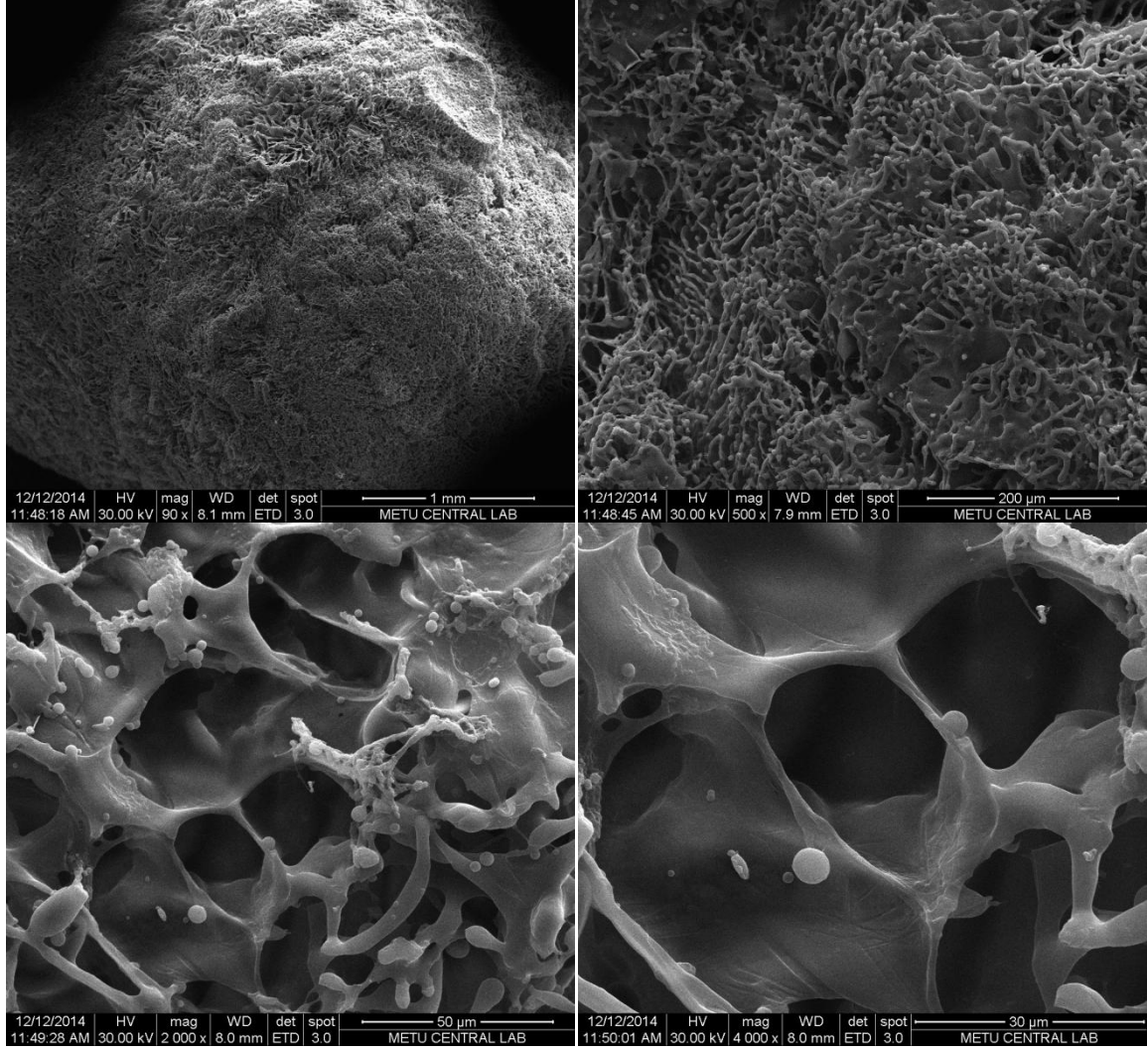
Şekil 4.8. Protein A baskılanmış poli(HEMA-MATrp) kriyojel kürelerin boyut dağılımı.

4.2.4.2. Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) İncelemeleri

Baskılanmış ve baskılanmamış poli(HEMA-MATrp) kriyojel kürelerin SEM fotoğrafları sırası ile Şekil 4.9 ve Şekil 4.10'da verilmiştir. Şekilden görüldüğü gibi, kriyojeller birbiriyle bağlantılı süpermakrogözenekli akış kanallarına sahiptir. Gözeneklerin boyutu 50 μm 'ye kadar ulaşmaktadır. Bu gözenekli yapı, kalıp molekül Protein A'nın kriyojel içerisine kolayca difüze olmasına olanak sağlamaktadır.



Şekil 4.9. Protein A baskılanmamış (NIP) poli(HEMA-MATrp) kriyojel kürelerin SEM görüntüleri.



Şekil 4.10. Protein A baskılanmış (MIP) poli(HEMA-MATrp) kriyojel kürelerin SEM görüntüleri.

4.2.5. Elementel Analiz

Elementel analiz ile azot sitokiyometrisinden faydalanılarak poli(HEMA-MATrp) kriyojellerin yapısına katılan MATrp miktarı belirlenmiştir. Protein A baskılanmış ve baskılanmamış kriyojellerin MATrp miktarı sırasıyla, 82.5 $\mu\text{mol/g}$ ve 71.5 $\mu\text{mol/g}$ polimer olarak bulunmuştur. HEMA ve diğer polimerizasyon bileşenlerinin azot içermediği not edilmelidir. Elementel analizle belirlenen azot miktarı polimer yapısına katılan MATrp gruplarından kaynaklanmaktadır.

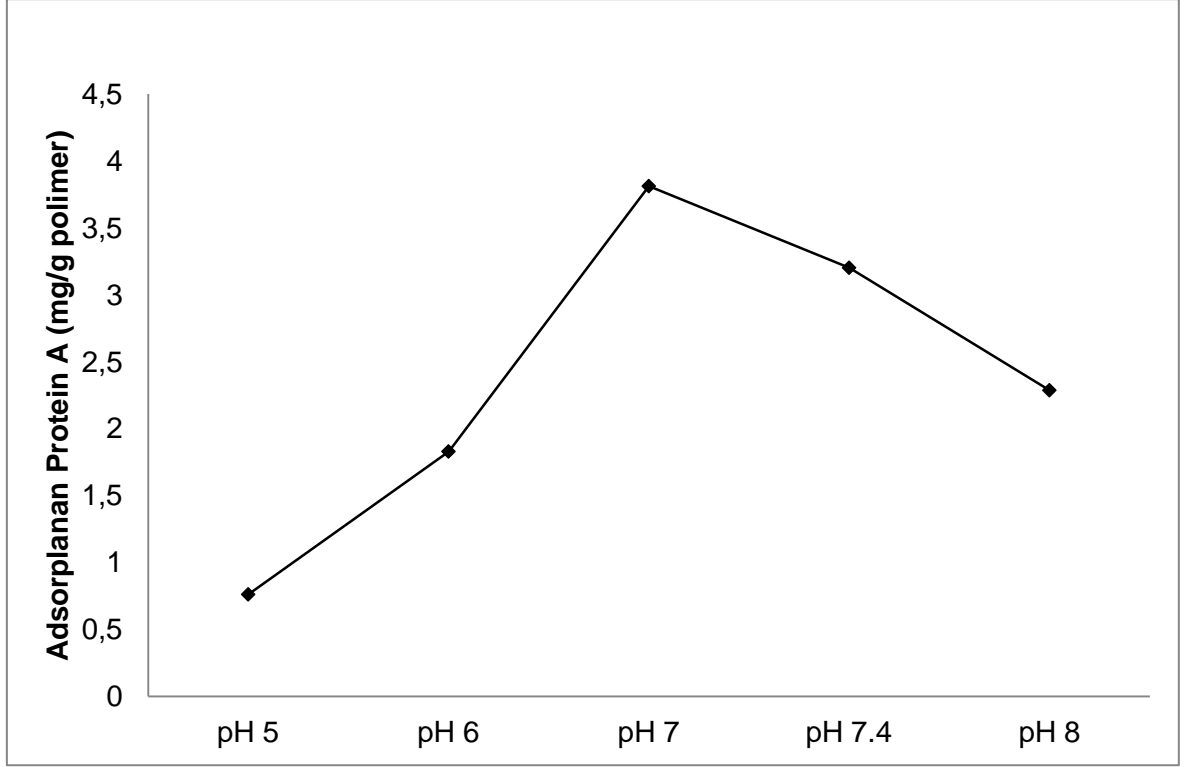
4.3. Adsorpsiyon Çalışmaları

4.3.1. Sulu Çözeltilerden Adsorpsiyon Çalışmaları

Bu bölümde; kriyojellerin optimum adsorpsiyon koşulları incelenmiş ve sulu çözeltilerden Protein A adsorpsiyonuna ait sonuçlara yer verilmiştir. Bu aşamada; ortam pH'sının, Protein A derişiminin, adsorpsiyon hızının, sıcaklığın, tuz derişiminin etkisi incelenmiş ve yarışmalı adsorpsiyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Elde edilen verilere, Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon izotermi uygulanarak uygun adsorpsiyon modeli belirlenmiştir. Protein A moleküllerinin adsorpsiyon işlemini kontrol eden mekanizmanın belirlenmesi için deneysel verilere yalancı birinci ve ikinci derece kinetik denklemler uygulanmıştır. Kriyojellerin tekrar tekrar kullanım olanağı, aynı kriyojelin 10 kez tekrarlanan adsorpsiyon-desorpsiyon işlemi ile gösterilmiştir. Baskılama işleminin seçiciliğinin belirlenmesi için yarışmacı proteinlere karşı dağılma ve seçicilik kat sayıları hesaplanmıştır.

4.3.1.1. pH'nın Etkisi

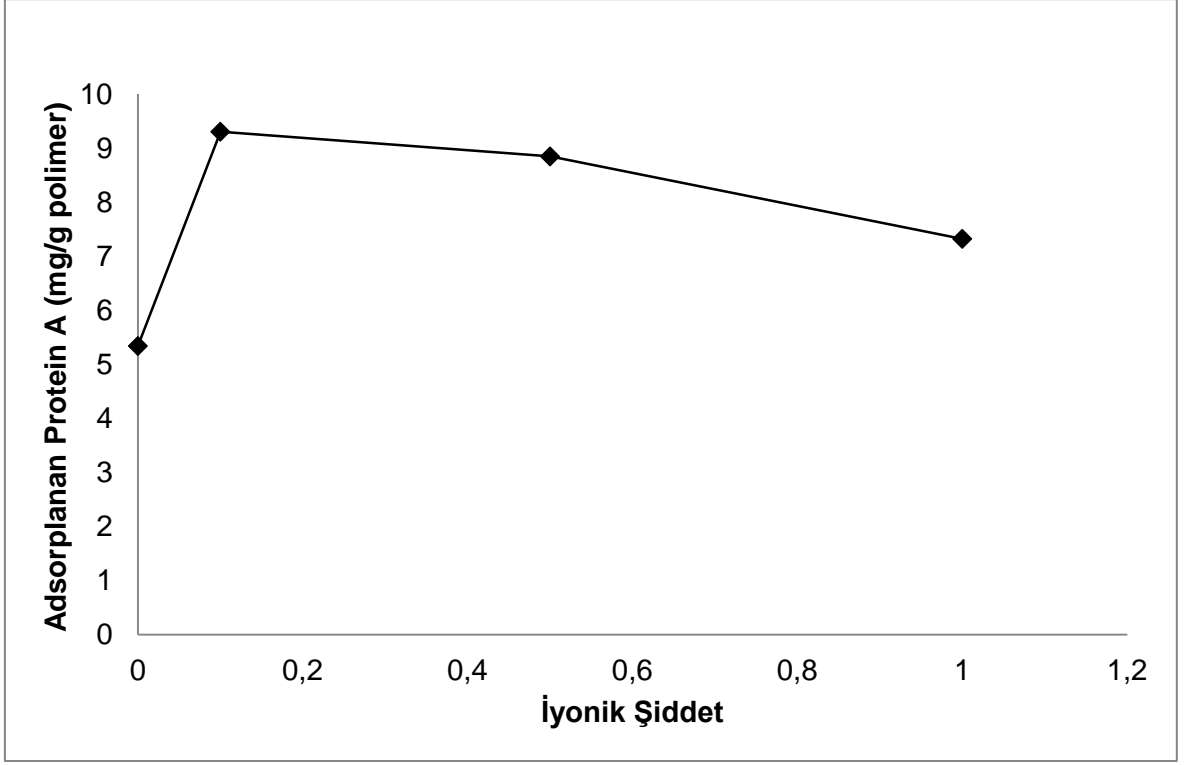
Protein A baskılanmış poli(HEMA-MATrp) kriyojel kürelerin Protein A adsorpsiyonuna pH'nın etkisi Şekil 4.11'de verilmiştir. Protein A adsorpsiyonu farklı pH aralıklarında (pH 5.0-8.0) incelenmiştir. MIP kriyojellere maksimum Protein A adsorpsiyonu pH 7.0 fosfat tamponunda gözlenmiş ve bu pH'daki maksimum adsorpsiyon miktarı 3.8 mg/g polimer olarak bulunmuştur. Bu durum şöyle açıklanabilir; moleküler baskılama işlemi için kalıp molekül olan Protein A ile komonomer olan MATrp'nin ön kompleksleşmesi nötral pH'da gerçekleştirilmiştir. Protein A'nın bu pH'daki moleküler konformasyonu Protein A baskılanmış poli(HEMA-MATrp) kriyojel küreler tarafından daha iyi tanınmakta ve daha yüksek afinite ile bağlanmaktadır. Bu verilerden yola çıkarak çalışma ortamı olarak pH 7.0 fosfat tamponu seçilmiştir.



Şekil 4.11. Protein A adsorpsiyonuna pH etkisi; Protein A derişimi: 0.5 mg/mL; zaman: 120 dk; T: 25 °C.

4.3.1.2. İyonik Şiddetin Etkisi

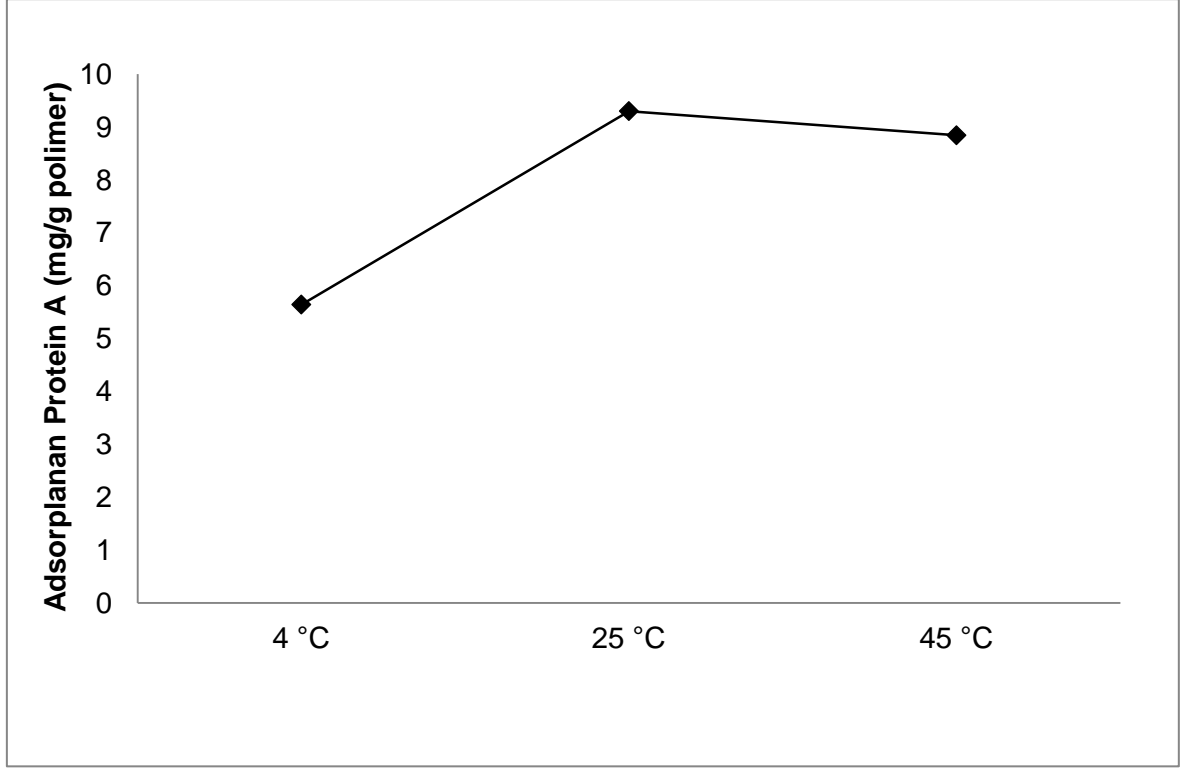
Protein A baskılanmış Poli(HEMA-MATrp) kriyojel kürelere Protein A adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisini belirlemek amacıyla; adsorpsiyon deneyleri farklı derişimlerde (0-1.0 M aralığında) sodyum klorür (NaCl) içeren 10 mM pH 7 fosfat tamponunda hazırlanan Protein A çözeltileri ile gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.12'de görüldüğü gibi, Protein A adsorpsiyon kapasitesi Protein A'nın çözünürlüğünün en iyi olduğu 0.1 M tuz derişiminde en yüksek seviyededir. Tuz derişimi 0.1 M'ın üzerine çıktığında ise adsorpsiyon kapasitesinde tekrar azalma gözlenmektedir. Bu olay yüksek tuz derişiminin baskılanmış bölgeleri maskeleyerek Protein A ile etkileşime girmesini azaltması ve adsorpsiyonun düşmesi olarak açıklanabilir.



Şekil 4.12. Protein A adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisi; Protein A derişimi: 0.5 mg/mL; pH: 7.0; zaman: 120 dk; T: 25 °C.

4.3.1.3. Sıcaklığın Etkisi

Protein A baskılanmış poli(HEMA-MATrp) kriyojel kürelere Protein A adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisini belirlemek amacıyla Protein A adsorpsiyon deneyleri farklı sıcaklıklardaki ortamlarda (4-45 °C) gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.13'de görüldüğü gibi en yüksek adsorpsiyon kapasitesi 25 °C'de gözlenmiştir. Adsorpsiyon kapasitesinde 45 °C'de bir miktar azalma olmasına karşın 25 °C'de gözlemlenen adsorbans değerlerine yakındır. Protein A baskılanmış kriyojel kürelerde 4 °C'de 5.64 mg/g, 25 °C'de 9.29 mg/g ve 45 °C'de 8.84 mg/g Protein A adsorpsiyonu sağlanmıştır. Sıcaklık ile Protein A adsorpsiyon ilişkisi, adsorpsiyon işleminde etkin olan temel etkileşimlerin belirlenmesi için önemli veriler sunmaktadır. Hidrojen bağları ve iyonik etkileşimlerin baskın olduğu durumlarda adsorpsiyon kapasitesindeki değişimler sıcaklıkla ters orantılı iken Van der Waals ve hidrofobik etkileşimlerinin baskın olduğu durumlarda ise adsorpsiyon kapasitesi sıcaklıkla doğru orantılı olarak değişmektedir. Hidrofobik etkileşimler, entropi artışıyla yürüyen etkileşimlerdir ve sıcaklık bu etkileşimleri arttırmaya yönelik etkide bulunur.

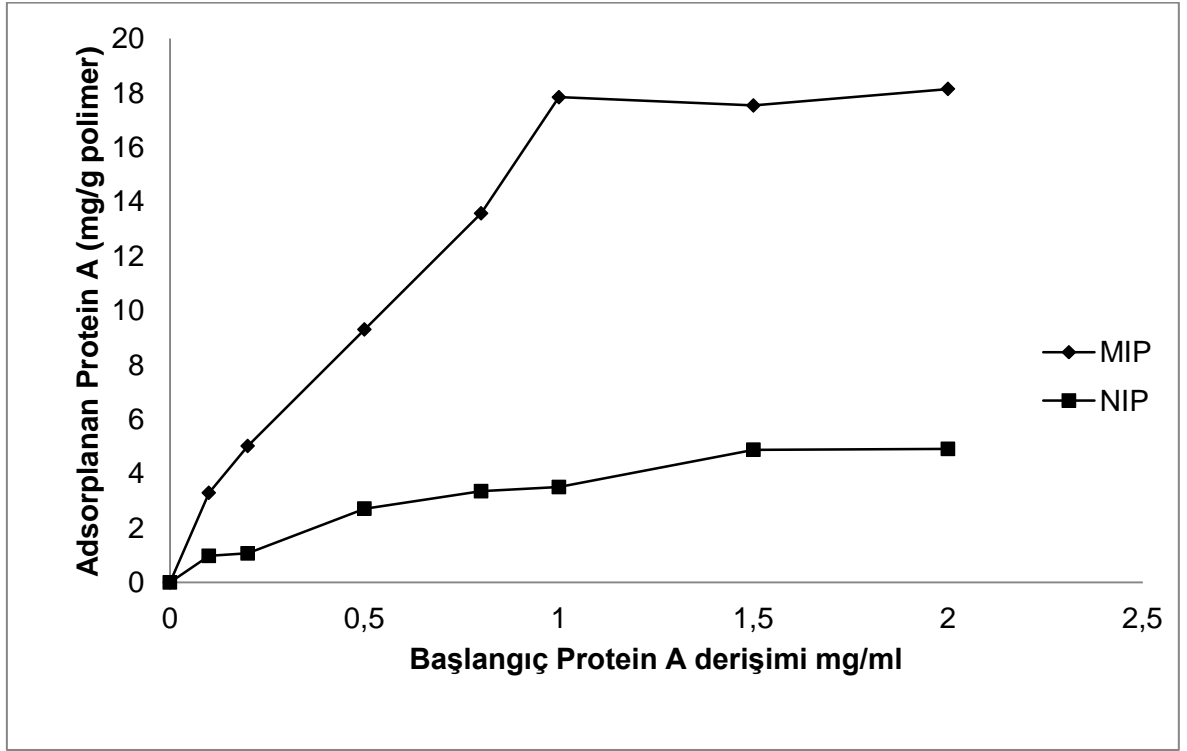


Şekil 4.13. Protein A adsorpsiyon kapasitesine sıcaklığın etkisi; Protein A derişimi: 0.5 mg/mL; pH: 7.0; zaman: 120 dk.

4.3.1.4. Başlangıç Derişiminin Etkisi

Baskılanmış ve baskılanmamış kriyojellere Protein A adsorpsiyonu, 0.1 M NaCl içeren 10 mM pH 7 fosfat tamponunda hazırlanan farklı derişimlerde (0-2 mg/ml) Protein A çözeltileri ile gerçekleştirilmiştir. Baskılanmış ve baskılanmamış kriyojellerin adsorpsiyon kapasitesinin, çözeltide bulunan Protein A derişimi ile değişimi Şekil 4.14'te verilmiştir. Şekilden görüldüğü gibi, çözeltideki Protein A derişiminin artmasıyla, birim kriyojel başına adsorplanan Protein A miktarı, başlangıçta hızlı artmakta ve yaklaşık 18 mg/ml değerinde Protein A'nın bağlanabileceği spesifik etkileşim bölgelerinin dolmasına bağlı olarak denge değerine ulaşmaktadır. Bu derişim değerinden sonra önemli bir artış gözlenmemiştir. Bu adsorpsiyon davranışında beklenen bir durumdur. Derişimin artması ile adsorpsiyon için sürücü kuvvet olan derişim farkı (ΔC) artmaktadır. Sürücü kuvvetin artması ile adsorpsiyon kapasitesinde de artış gözlenmektedir. Özellikle baskılanmış kriyojelin adsorpsiyon izoterminin başlangıcındaki keskin eğim, baskılama yöntemiyle MIP kriyojellik yapıda oluşturulan Protein A için

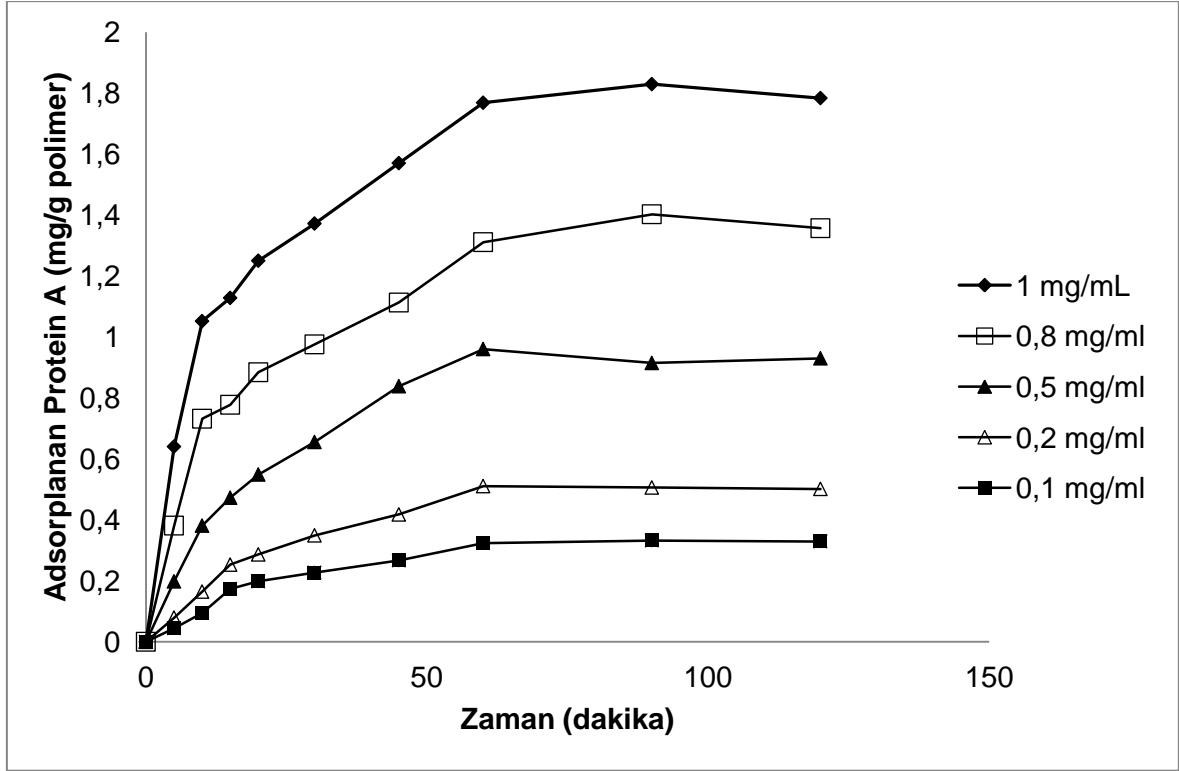
spesifik boşluklarla açıklanabilir. Baskılanmış ve baskılanmamış kriyojeller için maksimum adsorpsiyon kapasiteleri sırasıyla yaklaşık 18 mg/g ve 5 mg/g'dır.



Şekil 4.14. Protein A derişiminin adsorpsiyon kapasitesine etkisi; pH: 7.0; zaman: 120 dk; T: 25 °C.

4.3.1.5. Adsorpsiyon Hızı

Protein A moleküllerinin Protein A baskılanmış poli(HEMA-MATrp) kriyojellere adsorpsiyonunun zamana bağlı fonksiyonu Şekil 4.15'te verilmiştir. Adsorpsiyon ilk 20 dakikada oldukça hızlı gerçekleşmektedir. Spesifik boşlukların azalması ile 20 ile 60. dakikalar arasında adsorpsiyon yavaşlamaktadır. Protein A moleküllerinin polimer yüzeyindeki bağlanabileceği tüm aktif bölgelere bağlanması nedeni ile yaklaşık 60. dakikadan sonra adsorpsiyon kapasitesi denge değerine ulaşmaktadır. Bu süreden sonra adsorpsiyon kapasitesinde önemli bir değişim görülmemektedir. Artan Protein A miktarıyla birlikte adsorpsiyon kapasitesinin arttığı belirlenmiştir.



Şekil 4.15. Protein A adsorpsiyonunun zamanla değişimi; pH: 7.0; T: 25°C.

4.3.1.6. Adsorpsiyon İzotermi

Adsorpsiyon izotermi, her bir protein molekülünün adsorbentle etkileşimini karakterize etmek için kullanılmaktadır. Moleküllerin adsorbentle etkileşimini karakterize etmek için Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon modelleri uygulanmıştır. Adsorpsiyon izotermi iki faz dengede olduğu zaman çözeltilerdeki protein derişimi ile katı fazda adsorplanan protein miktarı arasında bir ilişki kurulmasını sağlar.

Langmuir adsorpsiyon modeli, her biri yalnızca bir molekül bağlayabilecek kapasitede olan belli sayıda tanımlanmış bölgeye adsorpsiyon olduğunu varsayar. Bu bölgelerin enerji düzeyi olarak eşdeğer olduğu ve komşu bölgelerde adsorplanan moleküller arasında etkileşim olmadığı kabul edilir. Langmuir adsorpsiyon izotermi Eşitlik 4.1 ile tanımlanır. Denge verilerinin eşitliğe uygulanmasıyla doğrusal bir grafik elde edilmesi, aşağıdaki eşitlikle tanımlanan Langmuir modelinin bu sistemlere uygulanabileceğini göstermektedir:

$$1/q_e = 1/q_{max} + 1/q_{max} \cdot b \cdot C_{eq} \quad (4.1)$$

Bu eşitlikte; q , kriyojele bağlanan Fe(III) miktarı ($\mu\text{g/g}$), C_{eq} çözültideki denge Fe(III) derişimi ($\mu\text{g/ml}$), b , Langmuir sabiti ($\text{ml}/\mu\text{g}$) ve q_{max} , teorik maksimum adsorpsiyon kapasitesini ($\mu\text{g/g}$) göstermektedir. Fe(III) adsorpsiyonu için deneysel verilere Langmuir izoterminin uygulanması ile elde edilen grafik Şekil 4.16'da verilmiştir.

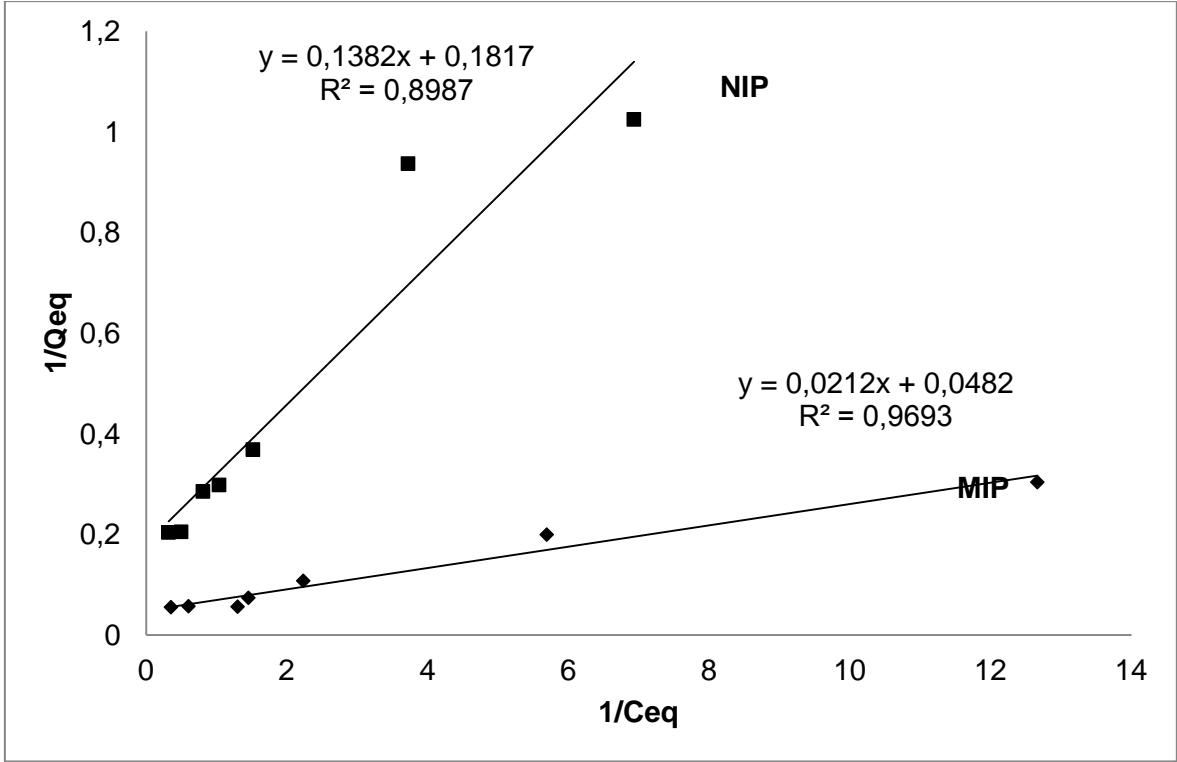
Freundlich izotermi adsorpsiyon dengesini tanımlayan eşitliklerdendir (Kerrigan et al., 1997). Freundlich eşitliği adsorbente metal adsorpsiyon enerjisinin komşu bağlanma bölgelerinin dolu olup olmadığına bağlı olarak değiştiğini varsayar (Aksu et al., 1999). Deneysel eşitlik aşağıdaki şekildedir;

$$q_e = K_F C_{eq}^{1/n} \quad (4.2)$$

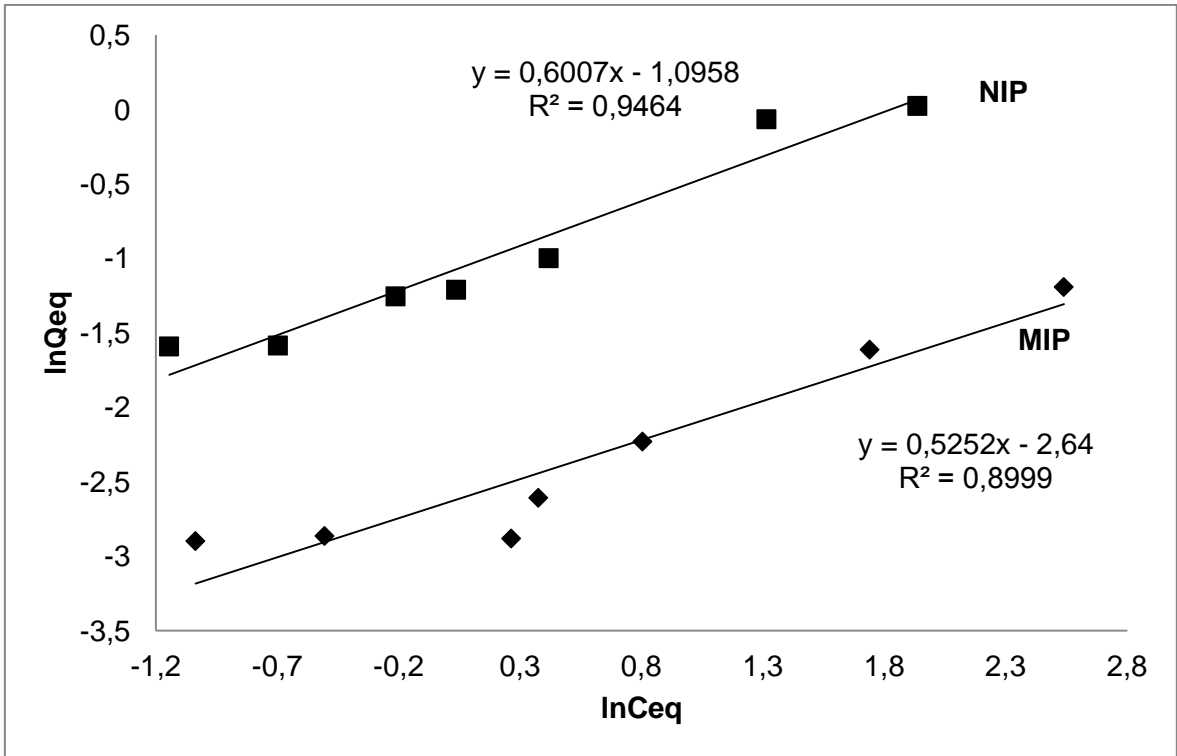
Bu eşitlikte; q_e , adsorpsiyon miktarı ($\mu\text{g/g}$), C_{eq} , çözültideki adsorbent derişimi ($\mu\text{g/mL}$)'dir. K_F ve $1/n$, sırasıyla adsorpsiyon kapasitesini ve adsorpsiyon şiddetini gösteren Freundlich sabitleridir. Bu eşitlik her iki tarafın logaritması alınarak daha kullanışlı hale getirilebilir:

$$\ln q_e = \ln K_f + 1/n \ln C_{eq} \quad (4.3)$$

Deneysel verilerin Freundlich modeline uygunluğu da incelenmiştir. Bu amaçla $\ln C_{eq}$ 'nin $\ln Q_{eq}$ 'ye karşı grafiği çizilmiştir (Şekil 4.17). Grafiğin doğrusal çıkması Freundlich adsorpsiyon izoterminin uygulanabilirliğini gösterir. Adsorpsiyon sabitleri kesim noktası ve eğimden hesaplanabilir. K_F ve $1/n$ çeşitli çevresel faktörlere bağlı olarak değişen deneysel sabitlerdir ve $1/n$, 0 ile 1 aralığında değişmektedir.



Şekil 4.16. Protein A baskılanmış ve baskılanmamış poli(HEMA-MATrp) kriyojeller için Langmuir adsorpsiyon izotermeleri.



Şekil 4.17. Protein A baskılanmış ve baskılanmamış poli(HEMA-MATrp) kriyojeller için Freundlich adsorpsiyon izotermeleri.

Deneyisel olarak belirlenen maksimum adsorpsiyon kapasitesi değerleri, baskılanmış poli(HEMA-MATrp) kriyojel için 18.1 mg/g ve baskılanmamış poli(HEMA-MATrp) kriyojel için 4.9 mg/g'dır. Langmuir izoterminden hesaplanan teorik maksimum adsorpsiyon kapasitesi değerleri ise; baskılanmış poli(HEMA-MATrp) kriyojel için 47.1 mg/g ve baskılanmamış poli(HEMA-MATrp) kriyojel için 7.2 mg/g'dır. Teorik olarak hesaplanan maksimum adsorpsiyon kapasitesi değerleri, deneysel olarak belirlenen değerlerden yüksektir. Langmuir izoterminden hesaplanan Langmuir sabitleri ve korelasyon katsayıları sırasıyla; baskılanmış poli(HEMA-MATrp) kriyojel için 0.4398 ml/mg ve 0.9693; baskılanmamış poli(HEMA-MATrp) kriyojel için 0.7606 ml/mg ve 0.8987'dir. Protein A baskılanmış poli(HEMA-MATrp) kriyojellerin korelasyon katsayısı Langmuir adsorpsiyon modelinin bu sisteme uygun olduğunu göstermektedir. Langmuir ve Freundlich izotermi için hesaplanan değerler Çizelge 4.1'de verilmiştir. Korelasyon katsayılarından adsorpsiyon işleminin Langmuir modeli ile tanımlanabileceği görülmektedir. Langmuir sabiti değeri (Q_{max}) deneysel verilerle uyumaktadır. Diğer taraftan K_F ve $1/n$ değerleri, Fe(III) iyonlarının kolayca ayrılabilirliğini ve dolayısıyla tercihli adsorpsiyonu gösterir. K_F değeri adsorbentin adsorpsiyon kapasitesinin bir göstergesidir; eğim, $1/n$, adsorpsiyon kapasitesine derişimin etkisini göstermektedir ve adsorpsiyon şiddetini ifade eder. Çizelgede görüldüğü gibi $1/n$ değerleri adsorpsiyon işlemi için yeterince düşüktür.

Çizelge 4.1. MIP ve NIP kriyojel küreler için Langmuir ve Freundlich izotermi.

Polimer	Deneysel Q (mg/g)	Langmuir sabitleri			Freundlich sabitleri		
		Q_{max} (mg/g)	b (ml/mg)	R^2	K_F	1/n	R^2
MIP	18.1	47.1	0.4398	0.9693	8.465	0.9775	0.8999
NIP	4.9	7.2	0.7606	0.8987	2.231	0.2794	0.9464

4.3.1.7. Adsorpsiyon Kinetiği

Kütle transferi ve kimyasal reaksiyon gibi adsorpsiyon işlemi kontrol eden mekanizmaların belirlenmesi için deneysel verilere birinci ve ikinci derece kinetik modeller uygulanmıştır. Ölçülen derişimlerin adsorbentin yüzey derişimine eşit olduğu varsayılmıştır. Lagergren'in birinci derece hız eşitliği çözümlenmiş

adsorpsiyonunda en çok kullanılan eşitliktir. Birinci dereceden hız eşitliği aşağıdaki şekilde tanımlanır:

$$dQ_t/dt=k_1(Q_{eq}-Q_t) \quad (4.4)$$

Eşitlikte; k_1 : yalancı-birinci derece adsorpsiyon hız sabiti (dk^{-1}), Q_{eq} ve Q_t sırasıyla: denge zamanında ve herhangi bir t anında adsorplanan protein miktarı (mg/g) göstermektedir. $t = 0$ 'da $Q_t = 0$ ve $t = t$ anında $Q_t = Q_t$ sınır koşulların uygulanıp integralinin alınması;

$$\log[Q_{eq}/(Q_{eq}-q_t)]=(k_1t)/2.303 \quad (4.5)$$

eşitliğini vermektedir. Eşitlik 4.5'in tekrar düzenlenmesiyle,

$$\log(Q_{eq}-Q_t)=\log(Q_{eq})-(k_1t)/2.303 \quad (4.6)$$

eşitlik 4.6 elde edilir. $\log(Q_{eq}-Q_t)$ 'ye karşılık t grafiğe geçirildiğinde elde edilen doğrunun y eksenini kesim noktasından $\log(Q_{eq})$ ve eğiminden $k_1/2.303$ değeri hesaplanabilmektedir.

Adsorpsiyon denge kapasitesine dayalı yalancı-ikinci derece denklem ise aşağıdaki şekilde tanımlanır:

$$Q_t/d_t=k_2(Q_{eq}-Q_t)^2 \quad (4.7)$$

Bu eşitlikte, k_2 yalancı-ikinci derece hız sabitidir (g/mg.dakika). Eşitlik 4.7'nin sınır koşullarda integrali alınarak ($t = 0$ 'da $Q_t = 0$ ve $t = t$ anında $Q_t = Q_t$),

$$[1/(Q_{eq}-Q_t)]=(1/Q_{eq})+k_2t \quad (4.8)$$

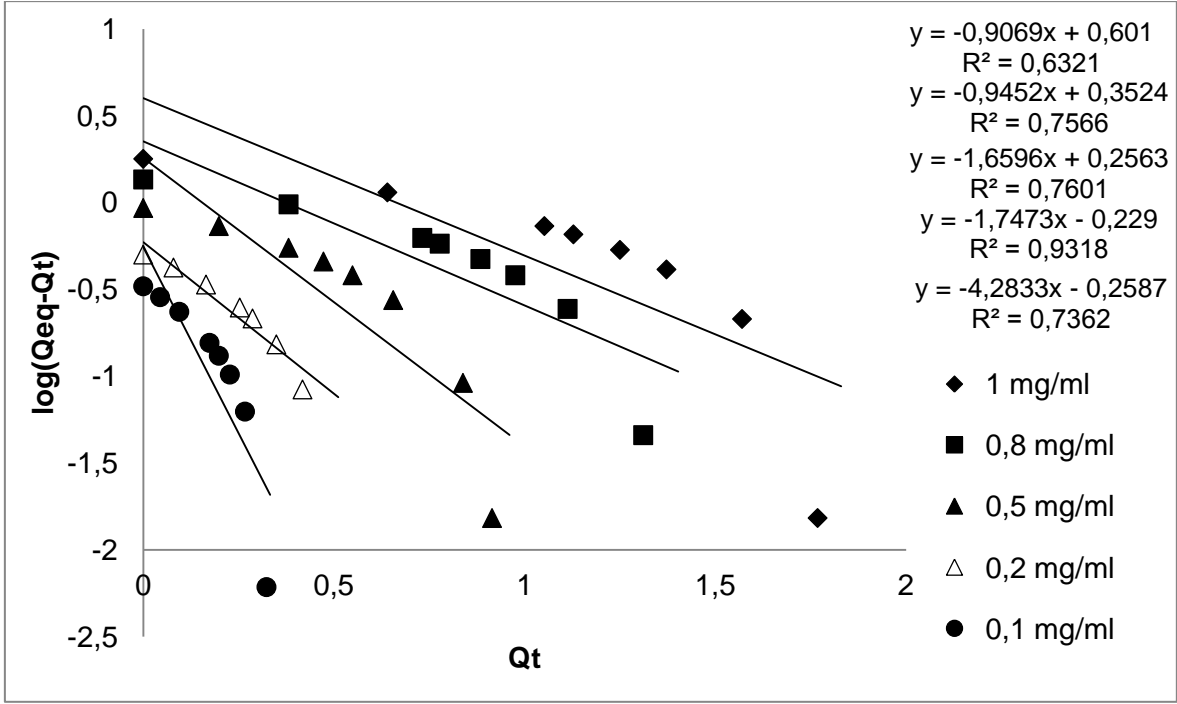
eşitliği elde edilir. Bu eşitliğin doğrusal hali,

$$(t/Q_t)=(1/k_2Q_{eq}^2)+(1/Q_{eq})t \quad (4.9)$$

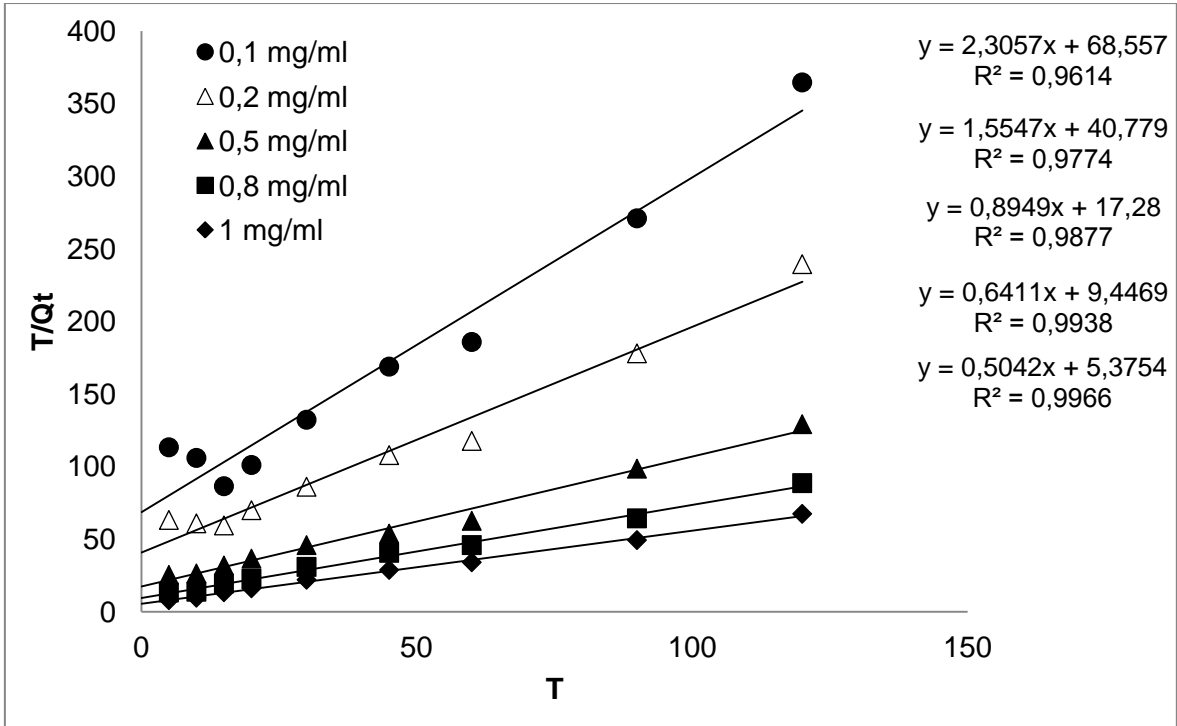
şeklinde dir. İkinci derece kinetiğin uygulanabilir olması için t/Q_t 'ye karşı t grafiğinin doğrusal olması gereklidir. Hız sabiti (k_2) ve denge adsorpsiyon miktarı (Q_{eq}) y eksenini kesim noktasından ve eğimden hesaplanabilmektedir. Deneysel verilerin kinetik analizi sonucunda elde edilen veriler Şekil 4.18 ve Şekil 4.19'da verilmiştir.

Protein A baskılanmış poli(HEMA-MATrp) kriyojellere ait kinetik analiz verilerinden hesaplanan birinci ve ikinci derece kinetik parametreleri Çizelge 4.2'de verilmiştir. Çizelgedeki korelasyon katsayıları incelendiğinde; protein baskılanmış kriyojellere ikinci derece kinetik modelinin daha uygun olduğu görülmektedir. Elde edilen teorik Q_{eq} değerleri de deneysel değerlere oldukça yakındır.

Hız kontrol mekanizması, adsorpsiyon işlemi sırasında üç olası mekanizmaya göre değişebilmektedir (1) Adsorpsiyon işleminin ilk aşamalarında dış yüzey kütle transferi veya film difüzyon işlemi. (2) Bu aşamaya reaksiyon veya sabit hız basamağı takip etmektedir. (3) Son aşamada ise adsorpsiyon işleminin önemli bir miktarda azaldığı gözenek içi difüzyon basamağı gerçekleşmektedir. Bu hız kontrol mekanizmaları, yalancı birinci derece kinetik model (difüzyon kontrollü) ve yalancı ikinci derece kinetik model (kimyasal kontrollü) ile açıklanmaktadır. Adsorpsiyon hızını belirleyen basamak analitin adsorbent yüzeyine difüzyonu ise; adsorpsiyon işlemi yalancı birinci derece adsorpsiyon modeli ile uyumluluk göstermektedir. Adsorpsiyon hızını belirleyen basamak analit ile adsorbent arasındaki etkileşim olduğu koşullarda ise; adsorpsiyon işlemi yalancı ikinci derece kinetik model ile uyumluluk göstermektedir. Birinci durumda adsorpsiyon işlemi difüzyon kontrollü; ikinci durumda ise kimyasal kontrollü olarak adlandırılmaktadır. Sonuç olarak; Protein A baskılanmış poli(HEMA-MATrp) kriyojellere Protein A adsorpsiyonunun herhangi bir difüzyon kısıtlaması olmaksızın; adsorpsiyon işlemi kimyasal kontrollü olarak gerçekleştiği belirlenmiştir.



Şekil 4.18. Protein A baskılanmış poli(HEMA-MATrp) kriyojel için yalancı-birinci derece adsorpsiyon kinetiği.



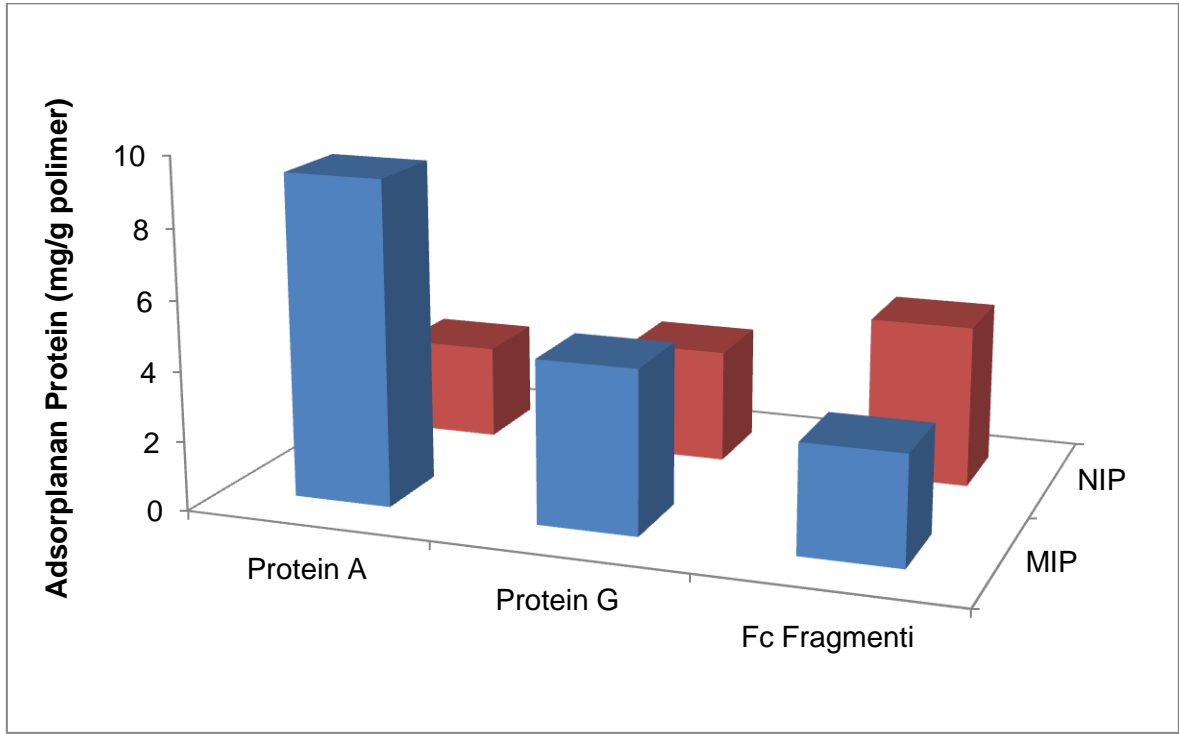
Şekil 4.19. Protein A baskılanmış poli(HEMA-MATrp) kriyojel için yalancı-ikinci derece adsorpsiyon kinetiği.

Çizelge 4.2. Protein A baskılanmış poli(HEMA-MATrp) kriyojel için yalancı-birinci ve ikinci derece kinetik verileri.

Fe(III) derişimi (mg/ml)	Yalancı-birinci derece			Yalancı-ikinci derece		
	Q_e (mg/g)	k_1 (1/dk)	R^2	Q_e (mg/g)	k_2 (g/mg.dk)	R^2
0.1	1.81	0.96×10^1	0.7362	0.43	0.0789	0.9966
0.2	1.69	0.40×10^1	0.9318	0.64	0.0598	0.9938
0.5	1.80	0.38×10^1	0.7601	1.11	0.0469	0.9877
0.8	2.25	0.22×10^1	0.7566	1.55	0.0440	0.9774
1	3.99	0.20×10^1	0.6321	1.98	0.0474	0.9614

4.3.2. Seçicilik Çalışmaları

Protein A baskılanmış ve baskılanmamış poli(HEMA-MATrp) kriyojel küreler ile seçicilik deneyleri başka bir Gram (+) bakteri *Streptococcus* hücre duvarı proteini olan Protein G (63 kD) ve Protein A ile spesifik etkileşime giren ve molekül ağırlığı Protein A'ya yakın olan IgG'nin Fc fragmenti (50 kD) ile yapılmıştır. Her bir protein MIP ve NIP kriyojel kürelerle kesikli sistemde etkileştirilmiş ve alınan başlangıç ve sonuç çözeltileri ile adsorplanan derişim miktarları belirlenmiştir. Her üç proteinin de 0.5 mg/mL derişiminde çözeltileri hazırlanmış ve deneyler 25 °C'de 2 saat süreyle gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.20'de yarışmalı adsorpsiyon sonuçları görülmektedir. Protein A'ya göre Protein G ve Fc fragmenti için K_d ve k değerleri, Çizelge 4.3'de verilmiştir. Protein A baskılanmış poli(HEMA-MATrp) kriyojellerin K_d değerleri, kontrol (baskılanmamış) örnekleri ile karşılaştırıldığında her durumda Protein A için yarışmacı protein moleküllerine göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Bağıl seçicilik katsayısı Protein A baskılanmış tanıma bölgelerinin afinitesini göstermektedir. Sonuçlar, Protein A baskılanmış polimerin Protein A moleküllerine Protein G moleküllerine göre 3.3 kat, Fc moleküllerine göre 7.6 kat daha seçici olduğunu göstermektedir. Sonuçlardan görüldüğü gibi baskılanmış kriyojelin seçiciliği molekül ağırlığı olarak Protein A molekülüne en yakın olan Fc için en düşüktür. Bu sonuç; kriyojel ile molekül etkileşiminde, baskılama yöntemi ile oluşturulan moleküler boşlukların büyüklüğünün önemli etkisini göstermektedir.



Şekil 4.20. Sulu çözeltiden yarışmalı adsorpsiyon. Protein A derişimi: 0.5 mg/mL; Fc derişimi: 0.5 mg/mL; ProG: 0.5 mg/mL; pH: 7.0; T: 25 °C.

Çizelge 4.3. Protein A'ya göre Fc ve ProG için K_d ve k değerleri.

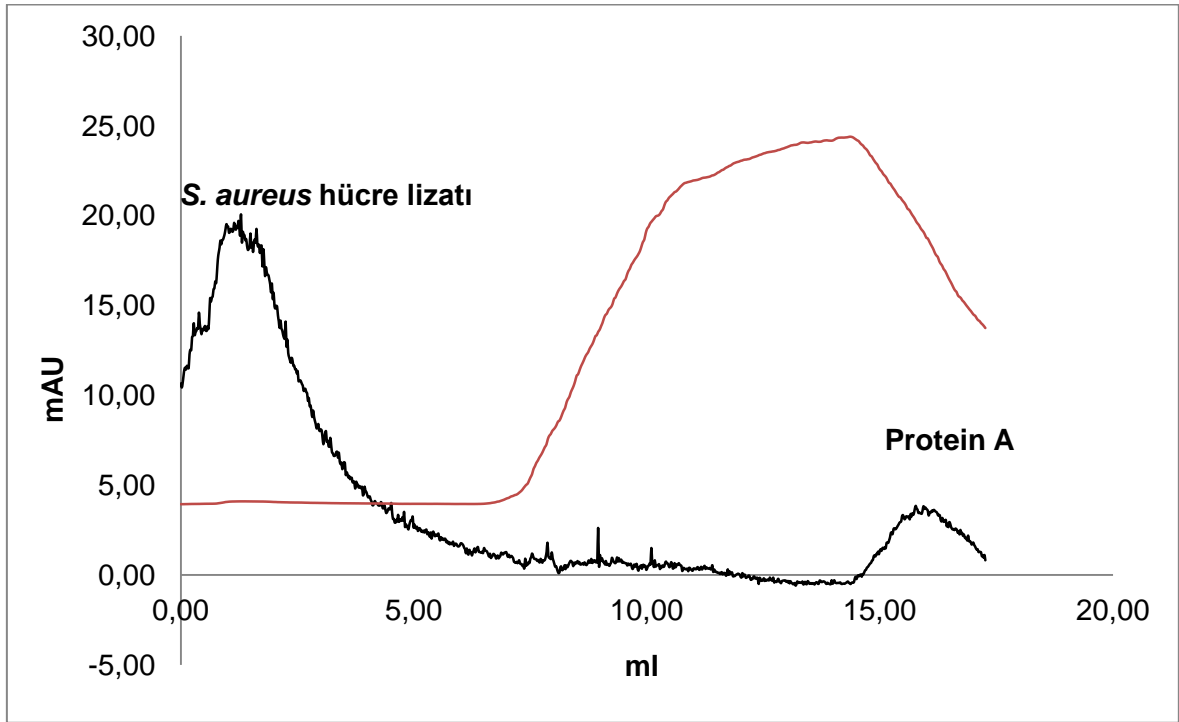
Protein	NIP		MIP		k'
	K_d (ml/g)	k	K_d	k	
ProA (42000 Da)	4.120	-	20.78	-	-
Fc (50000 Da)	6.527	0.356	9.838	2.720	7.633
ProG (63000 Da)	11.56	0.631	7.638	2.112	3.345

4.3.3. Doğal Kaynaklardan Protein A adsorpsiyonu

4.3.3.1. Hızlı Performans Sıvı Kromatografisi (FPLC) Analizi

Protein A baskılanmış poli(HEMA-MATrp) kriyojellerin doğal ortamda bulunan yarışmalı proteinlere karşı seçiciliği FPLC ile test edilmiştir. Ayırma işlemi sentezlenen Protein A baskılanmış poli(HEMA-MATrp) kriyojel kürelerin GE Healthcare kolonuna (10/10, 19-5001-01) doldurulması ile yapılmıştır. Protein A adsorpsiyonu MIP kriyojellerle gerçekleştirilmiş, parçalanmış bakteri hücre lizatı

kolona enjekte edilmiştir. Doğal kaynaktan protein A'nın ayrılmasına ait kromatografik veriler Şekil 4.21'de verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi protein karışımından Protein A'nın ayrılması 8.7 dk olarak bulunmuştur. t_R , N , k' , α , R_S değerleri Çizelge 4.4'de verilmiştir. Protein karışımları için hesaplanan R_S değerleri 4.4 olarak hesaplanmıştır. Bir kromatografi sistemindeki iki pikin birbirinden iyice ayrılması için R_S değerinin 1'den yüksek olması gerektiğinden Protein A ayırma değerlerinin iyi olduğu kabul edilebilir.



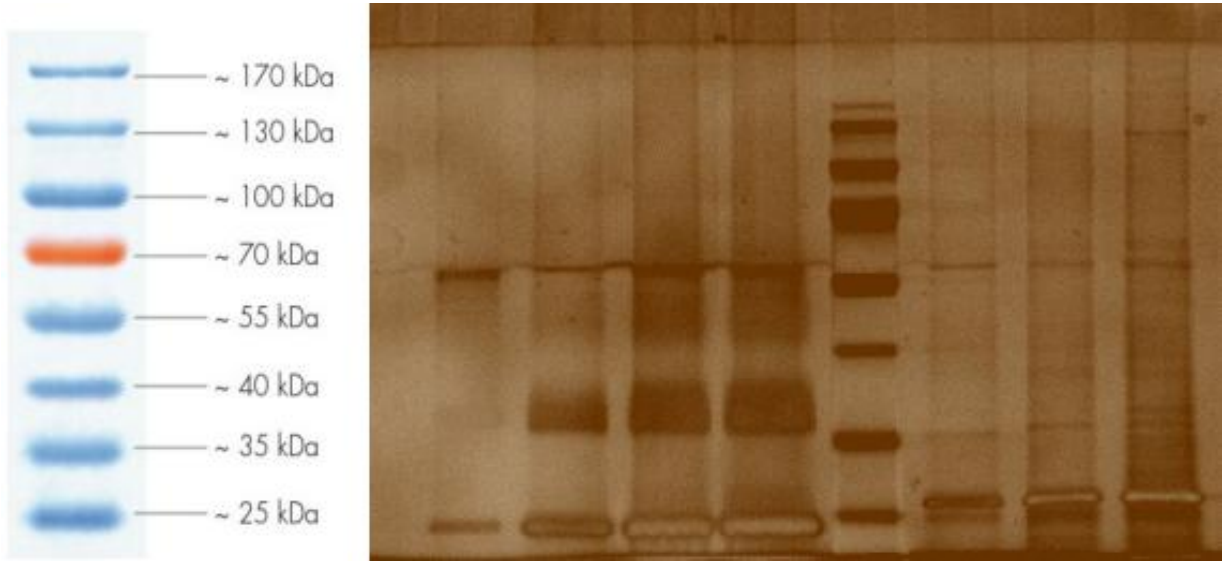
Şekil 4.21. *S. aureus* hücre lizatından Protein A'nın FPLC ile ayrılması. Akış hızı: 2.0 mL/dk; Dalga boyu: 254 nm

Çizelge 4.4. Kromatografik ayırma verileri

	t_R (dakika)	N (plaka)	k'	α	R_S
Protein A	8.7	9.84	28	12.01	4.4
Diğer bakteriyel proteinler	3	3.54	2.33	-	-

4.3.3.2. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE)

Protein A baskılanmış poli(HEMA-MATrp) kriyojel kürelerin, *Staphylococcus aureus* hücre lizati ve rekombinant *E. coli* hücre dışı salgısından saflaştırılan Protein A'nın moleküler ağırlığı ve saflığı SDS-PAGE ile kontrol edilmiştir (Şekil 4.22). Şekilde her iki desorpsiyon örneğinde de Protein A'ya ait bantlar görülmektedir. Şekilden de görüldüğü gibi, Protein A moleküllerine ait bantların şiddetleri adsorpsiyon işlemi sonrasında önemli miktarda azalmaktadır.

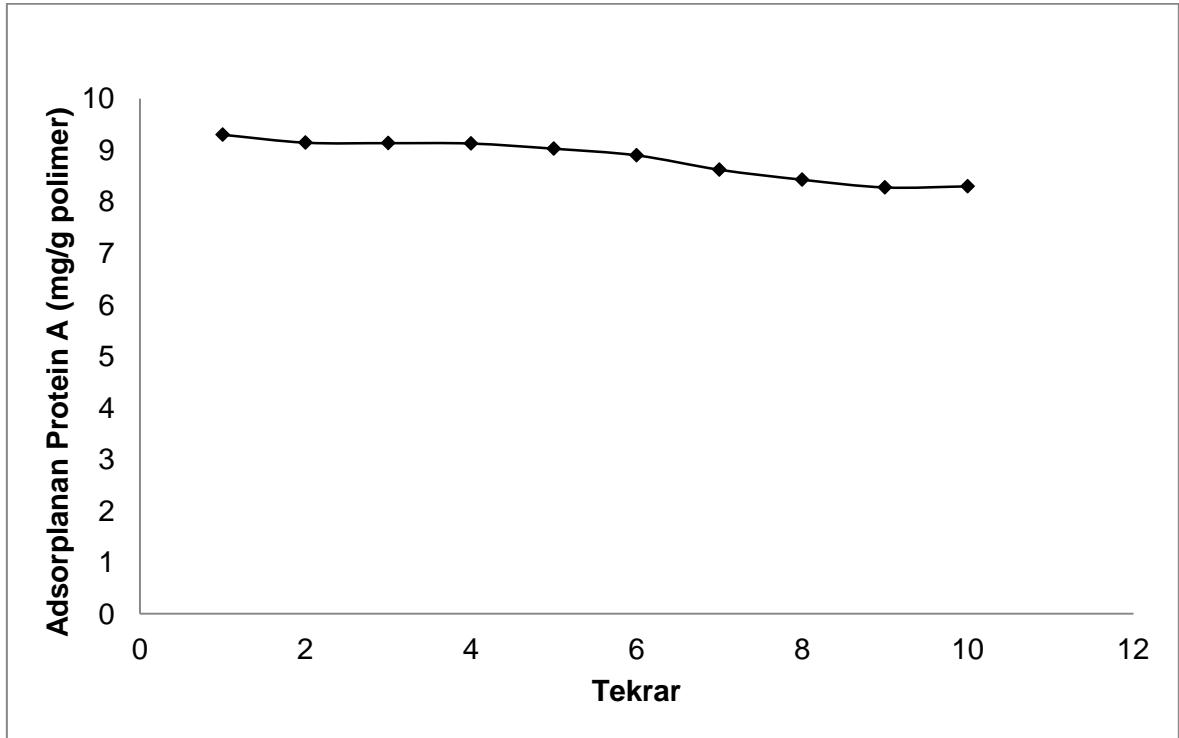


Şekil 4.22. SDS-PAGE görüntüsü, Sıra 1. Ticari Protein A, Sıra 2. Desorbe edilen örnek (*Staphylococcus aureus* hücre lizati), Sıra 3. Protein A saflaştırıldıktan sonraki çözelti (*Staphylococcus aureus* hücre lizati), Sıra 4. Protein A saflaştırılmadan önceki çözelti (*Staphylococcus aureus* hücre lizati), Sıra 5. Biomarker (Fermentas), Sıra 6. Desorbe edilen örnek (rekombinant *E. coli* hücre dışı salgısı), Sıra 7. Protein A saflaştırıldıktan sonraki çözelti (rekombinant *E. coli* hücre dışı salgısı), Sıra 8. Protein A saflaştırılmadan önceki çözelti (rekombinant *E. coli* hücre dışı salgısı).

4.3.4. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik

Bir biyoafinite adsorbentinde aranılan önemli özelliklerden biri de, bu malzemelerin defalarca tekrar tekrar kullanılabilmesidir. Rejenerasyon veya tekrar kullanılabilirlik olarak tanımlanan bu özellik ayırma işleminin maliyetini önemli ölçüde azaltan bir etmendir. Bu amaçla desorpsiyon deneyleri adsorpsiyon amacıyla kullanılan kriyojel kolon sisteminde incelenmiştir. Protein A adsorplanmış MIP kriyojel küreler 2 saat süreyle desorpsiyon çözeltisi ile kesikli sistemde muamele edilmiştir.

Desorpsiyon 0.1 M Na₂CO₃ ve 0.1 M NaOH çözeltisi ile gerçekleştirilmiştir. Protein A baskılanmış poli(HEMA-MATrp) kriyojel kürelerin tekrar kullanılabilirliğini belirlemek üzere adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü aynı kriyojel küreler kullanılarak on kez tekrarlanmıştır. Desorpsiyon oranı Protein A baskılanmış kriyojeller için % 89.2 olup, oldukça yüksektir. Bu verilere dayanarak tekrarlanan adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü sonucunda kriyojelin adsorpsiyon kapasitesinde önemli bir azalma olmaksızın tekrar tekrar kullanılabilirliği söylenebilir (Şekil 4.23). Bu sonuçlara göre 0.1 M Na₂CO₃ ve 0.1 M NaOH çözeltisinin uygun bir desorpsiyon ajanı olduğu ve kriyojelin adsorpsiyon kapasitesinde önemli bir azalma olmaksızın tekrar tekrar kullanılabilirliği söylenebilir.

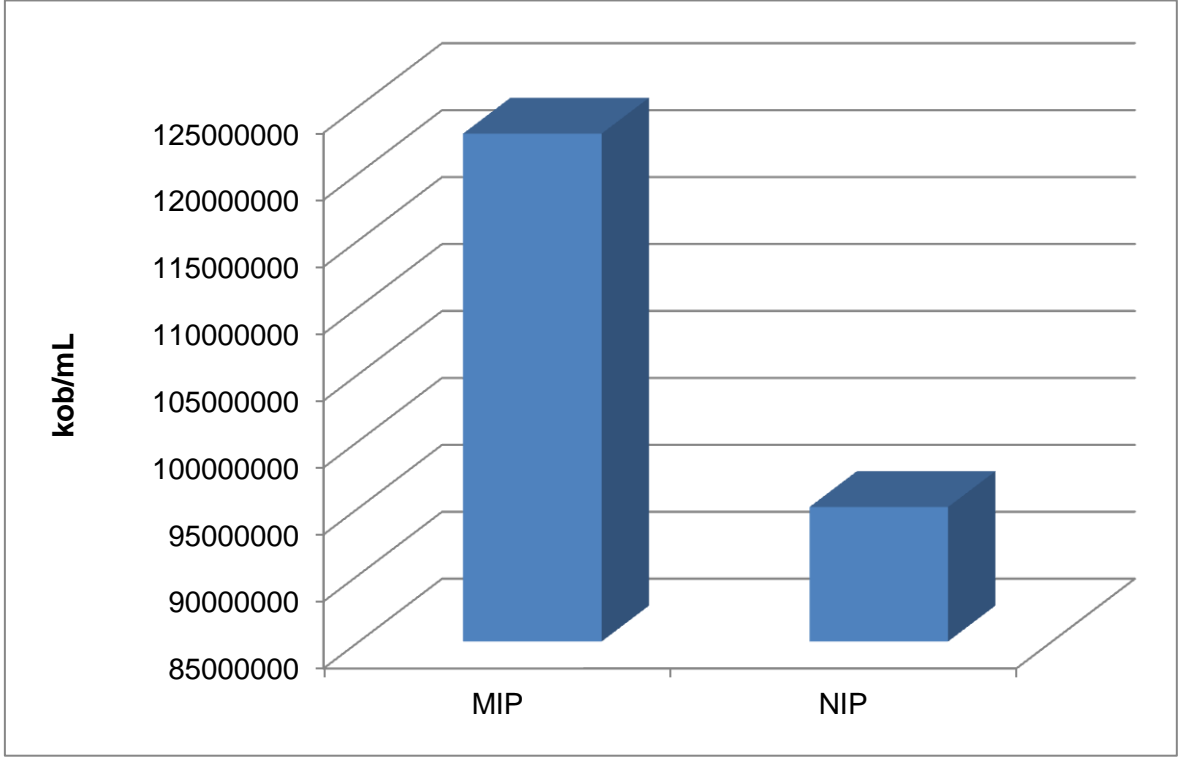


Şekil 4.23. Protein A baskılanmış poli(HEMA-MATrp) kriyojellerin tekrar kullanılabilirliği. Protein derişimi: 0.5 mg/mL; pH: 7.0; T: 25°C, desorpsiyon ajanı: 0.1 M Na₂CO₃ ve 0.1 M NaOH.

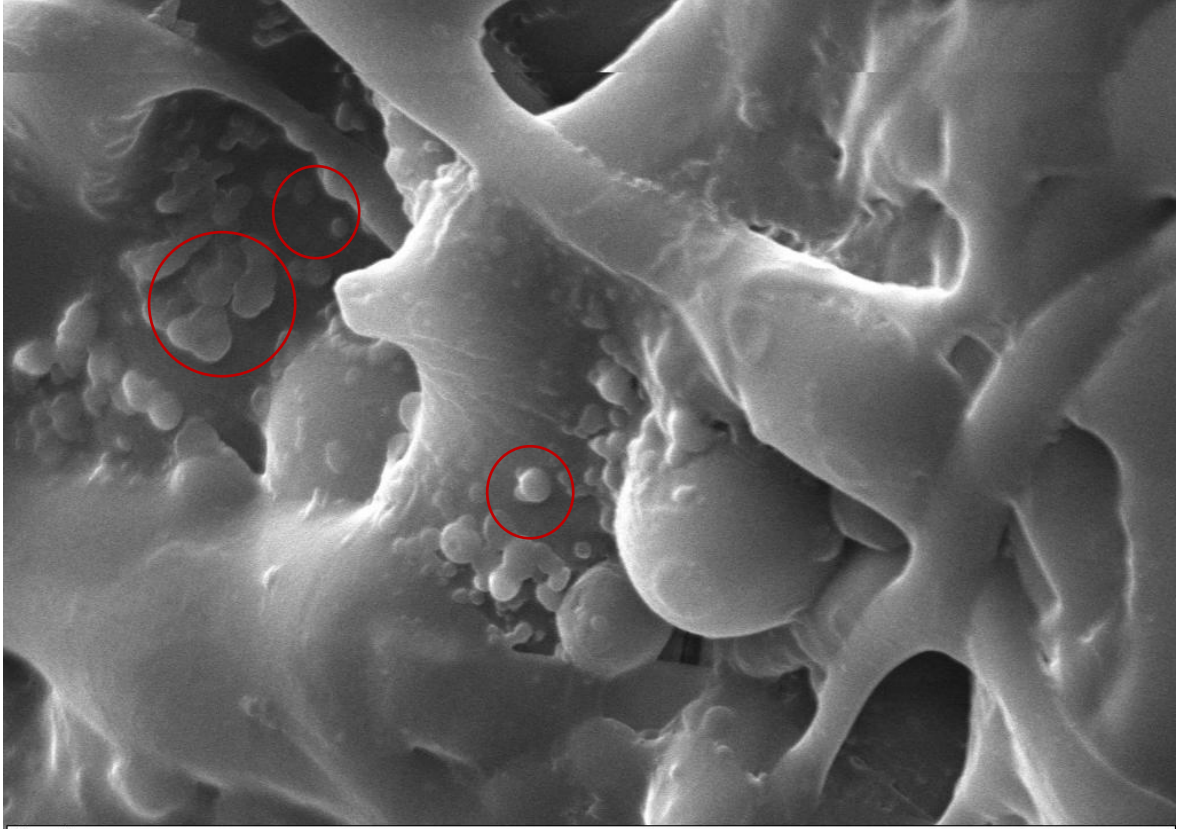
4.4. Protein A ile *Staphylococcus aureus* Tanıma Çalışmaları

Protein A baskılanmış (MIP) ve baskılanmamış (NIP) poli(HEMA-MATrp) kriyojellerin *Staphylococcus aureus* tutma kapasiteleri sırası ile 122×10^6 kob/ml ve 95×10^6 kob/ml olarak bulunmuştur. Protein A baskılanmış poli(HEMA-MATrp)

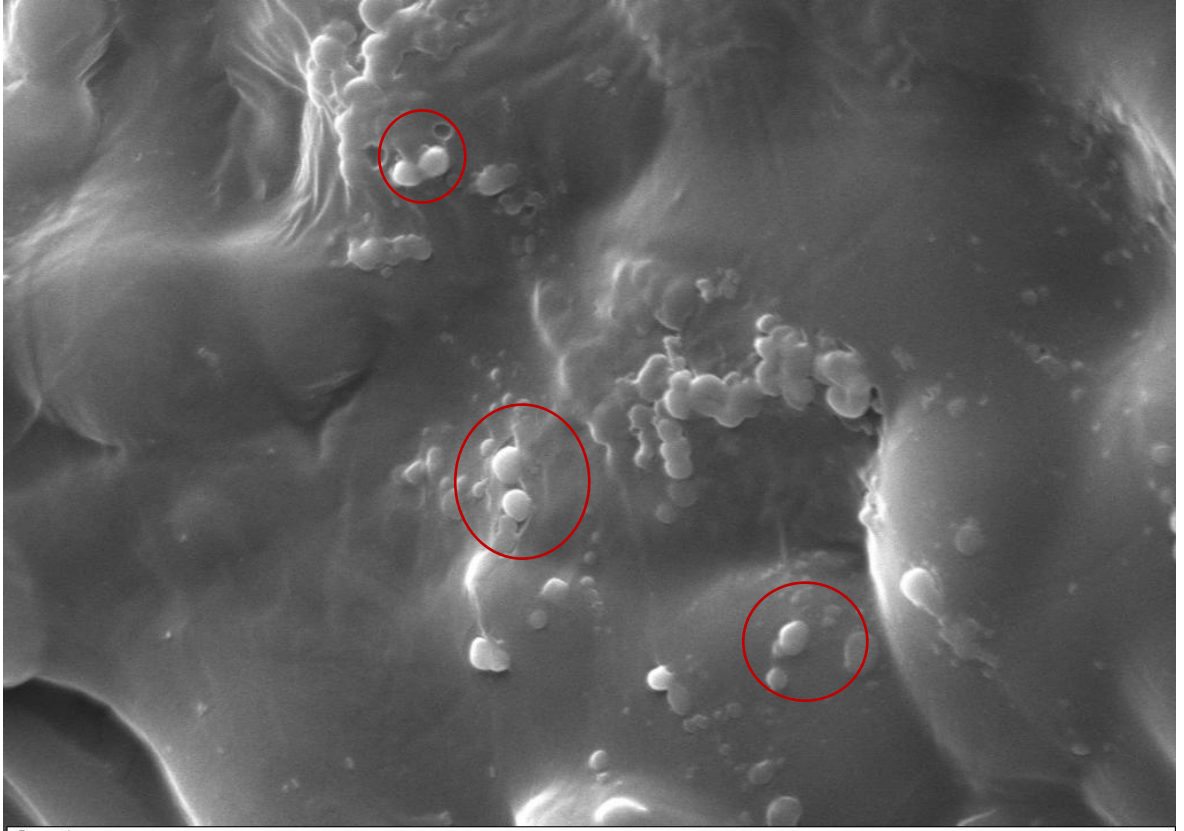
kriyojel kürelerin baskılanmamış poli(HEMA-MATrp) kriyojeller ile karşılaştırıldığında baskılama işlemi ile *Staphylococcus aureus* hücrelerinin kriyojellere tutunması artmıştır. Bu da tutunmanın, hücre yüzeyinde bulunan Protein A'nın polimer yüzeyinde bulunan Protein A'ya özgü kaviteler aracılığıyla olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.24. Protein A baskılanmış (MIP) ve baskılanmamış (NIP) poli(HEMA-MATrp) kriyojellerin *Staphylococcus aureus* tutma kapasiteleri. *Staphylococcus aureus*: 6×10^6 kob/mL T: 37°C.



2 μm^+ EHT = 15.00 kV Signal A = SE1 Mag = 13.00 K X Sample ID =



2 μm^+ EHT = 15.00 kV Signal A = SE1 Mag = 13.00 K X Sample ID =

Şekil 4. 25. . Protein A baskılanmış (MIP) poli(HEMA-MATrp) kriyojellerin *Staphylococcus aureus* tutunmasından sonra SEM görüntüleri.

5. SONUÇLAR

- MATrp monomeri, L-triptofan ester ile metakroil klorür arasındaki tepkime ile sentezlenmiştir. Elde edilen monomer FTIR çalışmaları ile karakterize edilmiştir. FTIR spektrumunda 3379 cm^{-1} deki adsorpsiyon bandı NH gerilme bandına aitken aromatik CH gerilme bandları $3100\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ arasında görülmektedir. 2978 cm^{-1} deki absorpsiyon bandı alkil grubundaki CH gerilme bandına aittir. C=C gerilme bandı 1621 cm^{-1} de, NH eğilme bandı 1522 cm^{-1} de, C-N aromatik gerilme bandı $1458\text{-}1374\text{ cm}^{-1}$ de görülmektedir. $1347\text{-}1198\text{ cm}^{-1}$ deki eğilme bandı asidin C=O grubunun eğilme bandına aittir.
- MATrp komonomerinin sentezlenen poli(HEMA-MATrp) NIP ve MIP kriyojellerin yapısına katılımını karakterize etmek için HEMA monomeri ve poli(HEMA-MATrp) NIP ve MIP kriyojellere ait FTIR analizini yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre HEMA monomeri 3420 cm^{-1} de (OH- gerilme), 2954 cm^{-1} de (CH gerilme), 1718 cm^{-1} de (C=O gerilme), 1633 cm^{-1} de (C=C gerilme) bandlarına sahiptir. MATrp monomerine ait 1533 cm^{-1} de (NH eğilme), $1454\text{-}1391\text{ cm}^{-1}$ de (CN aromatik) ve 1657 cm^{-1} de (C=O amit bandları) bandları MATrp monomerinin HEMA'nın yapısına katıldığını göstermektedir. HEMA monomeri 2954 cm^{-1} de (CH eğilme), 1716 cm^{-1} de (C=O gerilme), 1633 cm^{-1} de (C=C gerilme bandı) bandlar göstermektedir.
- HEMA ve MATrp'ın çapraz bağlayıcı ve kalıp molekül Protein A varlığında kriyopolimerizasyonu yöntemi ile elde edilen poli(HEMA-MATrp) kriyojeller kürelerin spesifik yüzey alanı $9.91\text{ m}^2/\text{g}$ olarak bulunmuştur. Baskılanmamış kriyojellerin spesifik yüzey alanı ise $6.18\text{ m}^2/\text{g}$ olarak bulunmuştur. Yüzey alanı baskılama işlemi ile oluşan boşluklar nedeniyle artmıştır.
- poli(HEMA) kriyojeller çapraz bağlı hidrofilik yapıda matrisler olmalarına karşın yapıyahidrofobik bir amino asit olan triptofanın katıldığı Protein A baskılanmış poli(HEMA-MATrp) kriyojeller, çapraz bağlı hidrofobik yapıdadırlar. Bu çalışmada hazırlanmış poli(HEMA), baskılanmamış

poli(HEMA-MATrp) ve Protein A baskılanmış poli(HEMA-MATrp) kriyojellerin denge şişme oranları sırasıyla % 905, % 570 ve % 760'dır. Makrogözenek oranları ise sırasıyla % 73, % 70 ve % 74'dür. PHEMA kriyojellerle karşılaştırıldığında yapıya MATrp girmesi ile denge şişme oranının azaldığı görülmektedir.

- Protein A baskılanmış poli(HEMA-MATrp) kriyojel kürelerin boyut dağılımı incelenmiş ve 1000 µm ile 3000 µm aralığında çaplara sahip olduğu gözlemlenmiştir. Kriyojel kürelerin boyut dağılımı; % 5.5 oranında 3000 µm, % 27 oranında 2000 µm, % 67.5 oranında 1000 µm'dir.
- Protein A baskılanmış (MIP) ve baskılanmamış (NIP) poli(HEMA-MATrp) kriyojel kolonların yüzey morfolojisi ve içyapısı taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile incelenmiştir. Taramalı elektron mikroskop (SEM) incelemeleri ile kriyojellerin birbiriyle bağlantılı geniş akış kanallarına sahip olduğu ve gözenek boyutlarının 30 µm'ye kadar ulaştığı gözlenmiştir.
- Protein A adsorpsiyonu farklı pH aralıklarında (pH5.0-8.0) incelenmiştir. MIP kriyojellere maksimum Protein A adsorpsiyonu 10 mM pH 7.0 fosfat tamponunda gözlenmiş ve bu pH'daki maksimum adsorpsiyon miktarı 3.81 mg Protein A/g polimer olarak bulunmuştur. Bu verilere göre çalışma ortamı olarak 10 mM pH 7.0 fosfat tamponu seçilmiştir.
- Protein A baskılanmış poli(HEMA-MATrp) kriyojel kürelere Protein A adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisini belirlemek amacıyla; adsorpsiyon deneyleri farklı derişimlerde (0-1.0 M aralığında) sodyum klorür (NaCl) içeren Protein A çözeltileri ile gerçekleştirilmiştir. En yüksek Protein A adsorpsiyon kapasitesi 0.1 M tuz derişiminde gözlenmiştir. Sonraki artan tuz derişimlerinde Protein A adsorpsiyon kapasitesi azalmaktadır. Bu sonuçlara göre çalışma ortamı 0.1 M NaCl içeren pH 7 fosfat tamponu olarak seçilmiştir.

- Protein A baskılanmış poli(HEMA-MATrp) kriyojel kürelere Protein A adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisini belirlemek amacıyla Protein A adsorpsiyon deneyleri farklı sıcaklıklardaki ortamlarda (4-45°C) gerçekleştirilmiştir. Sıcaklığın 25 °C'ye çıkarılması ile Protein A baskılanmış kriyojel kürelerde Protein A adsorpsiyon kapasitesi önemli oranlarda artmıştır. 45 °C'ye çıkarıldığında gözlenen azalma ise 25 °C'ye göre önemli ölçüde değildir. Protein A baskılanmış kriyojel kürelerde 4 °C'de 5.64 mg/g, 25 °C'de 9.29 mg/g ve 45 °C'de 8.84 mg/g Protein A adsorpsiyonu sağlanmıştır. Sıcaklık artışı ile birlikte adsorpsiyon kapasitesindeki artış; Protein A ile kriyojeller arasındaki baskın etkileşim türünün hidrofobik etkileşimler olduğunu göstermektedir.
- Başlangıç Protein A derişiminin adsorpsiyon kapasitesine etkisini belirlemek amacıyla hem baskılanmamış hem de baskılanmış kriyojeller kullanılmıştır. Protein A derişiminin artmasıyla birlikte birim kriyojel başına adsorplanan Protein A miktarı artmakta ve yaklaşık 1.0 mg/mL Protein A derişiminden sonra denge değerine ulaşmaktadır. Bu derişim değerinden sonra önemli bir artış gözlenmemiştir. Baskılanmış ve baskılanmamış kriyojeller için maksimum adsorpsiyon kapasiteleri sırasıyla 18.1 mg/g ve 4.9 mg/g'dır.
- Protein A baskılanmış poli(HEMA-MATrp) kriyojel kürelere Protein A adsorpsiyonunun zamana bağlı değişimini belirlemek amacıyla 0-120 dakika aralıklarındaki Protein A adsorpsiyonu incelenmiştir. Adsorpsiyon başlangıçta oldukça hızlı gerçekleşmektedir. Protein A moleküllerinin polimer yüzeyindeki bağlanabileceği tüm aktif bölgelere bağlanması nedeniyle yaklaşık 60 dakikada adsorpsiyon kapasitesi denge değerine ulaşmaktadır. Bu süreden sonra adsorpsiyon kapasitesinde önemli bir değişim görülmemektedir.
- Maksimum adsorpsiyon kapasitesi (Q_{max}) deneysel verilerden Protein A baskılanmış poli(HEMA-MATrp) kriyojeller için 18.1 mg Protein A/g kriyojel bulunmuştur. Teorik adsorpsiyon kapasitesi baskılanmış poli(HEMA-MATrp) kriyojel için 47.16 mg Protein A/g kriyojel bulunmuştur. Langmuir sabiti 0,439 mL/mg, korelasyon katsayısı (R^2) 0.9693'dür. Korelasyon katsayısı

Langmuir adsorpsiyon modelinin bu sisteme uygun olduğunu göstermektedir.

- Protein baskılanmış kriyojellere ikinci derece kinetik modelinin daha uygun olduğu görülmektedir. Elde edilen teorik Q_{eq} değerleri de deneysel değerlere oldukça yakındır. Sonuç olarak; Protein A baskılanmış poli(HEMA-MATrp) kriyojellere Protein A adsorpsiyonunda herhangi bir difüzyon kısıtlaması olmaksızın; adsorpsiyon işlemi kimyasal kontrollü olarak gerçekleştiği belirlenmiştir.
- Protein A baskılanmış ve baskılanmamış poli(HEMA-MATrp) kriyojel küreler ile seçicilik deneyleri bakteriyel protein olan Protein G (ProG) ve Fc fragmenti ile yapılmıştır. Sonuçlar Protein A baskılanmış polimerin Protein A moleküllerine Protein G moleküllerine göre 3.3 kat, Fc fragmentine göre 7.6 kat daha seçici olduğunu göstermektedir. Sonuçlardan görüldüğü gibi baskılanmış kriyojelin seçiciliği molekül ağırlığı olarak Protein A molekülüne en yakın olan Fc fragmenti için en düşüktür. Bu sonuç; kriyojel ile molekül etkileşiminde, baskılama yöntemi ile oluşturulan moleküler boşlukların büyüklüğünün önemli etkisini göstermektedir.
- Protein A baskılanmış poli(HEMA-MATrp) kriyojellerin doğal ortamda bulunan yarışmalı proteinlere karşı seçiciliği FPLC ile test edilmiştir. Ayırma işlemi sentezlenen Protein A baskılanmış poli(HEMA-MATrp) kriyojel kürelerin GE Healthcare kolonuna (10/10, 19-5001-01) doldurulması ile yapılmıştır. Protein A adsorpsiyonu MIP kriyojellerle gerçekleştirilmiş, parçalanmış bakteri hücre lizati kolona enjekte edilmiştir. Protein karışımından Protein A'nın ayrılması 8.7 dk olarak bulunmuştur. Protein karışımları için hesaplanan R_s değerleri 4.4 olarak hesaplanmıştır. Bir kromatografi sistemindeki iki pikin birbirinden iyice ayrılması için R_s değerinin 1'den yüksek olması gerektiğinden Protein A ayırma değerlerinin iyi olduğu kabul edilebilir.

- Protein A baskılanmış poli(HEMA-MATrp) kriyojellerle, doğal kaynaklardan saflaştırılan Protein A'nın moleküler ağırlığı ve saflığı SDS-PAGE ile kontrol edilmiştir. SDS-PAGE, % 12'lik akrilamid ayırma jeli ile gerçekleştirilmiştir.
- P[HEMA-MAH/Cu(II)] kriyojellerin tekrar kullanılabilirliğinin gösterilmesi için, adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü, aynı kriyojeller kullanılarak 10 kez tekrarlanmıştır. Desorpsiyon oranı Protein A baskılanmış için % 89.2 olup, oldukça yüksektir. Bu verilere dayanarak tekrarlanan adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü sonucunda kriyojelin adsorpsiyon kapasitesinde önemli bir azalma olmaksızın tekrar tekrar kullanılabilirliği söylenebilir.

KAYNAKLAR

- [1] D. Richman, P. Cleveland, M. Oxman, and K. Johnson, The binding of staphylococcal protein A by the sera of different animal species, *The Journal of Immunology*, 128, 2300-2305, **1982**.
- [2] M. Uhlen, B. Guss, B. Nilsson, S. Gatenbeck, L. Philipson, and M. Lindberg, Complete sequence of the staphylococcal gene encoding protein A. A gene evolved through multiple duplications, *Journal of Biological Chemistry*, 259,1695-1702, **1984**.
- [3] B. Nilsson, T. Moks, B. Jansson, L. Abrahmsén, A. Elmblad, E. Holmgren, *et al.*, A synthetic IgG-binding domain based on staphylococcal protein A, *Protein engineering*, 1, 107-113, **1987**.
- [4] L. Jendeberg, P. Nilsson, A. Larsson, P. Denker, M. Uhlén, B. Nilsson, *et al.*, Engineering of Fc 1 and Fc 3 from human immunoglobulin G to analyse subclass specificity for staphylococcal protein A, *Journal of immunological methods*, 201, 25-34, **1997**.
- [5] B. Jansson, M. Uhlén, and P. Å. Nygren, All individual domains of staphylococcal protein A show Fab binding, *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 20, 69-78, **1998**.
- [6] K. Mosbach and O. Ramström, The emerging technique of molecular imprinting and its future impact on biotechnology, *Nature Biotechnology*, 14, 163-170, **1996**.
- [7] K. Kabiri, H. Omidian, and M. Zohuriaan-Mehr, Novel approach to highly porous superabsorbent hydrogels: synergistic effect of porogens on porosity and swelling rate, *Polymer International*, 52, 1158-1164, **2003**.
- [8] F. M. Plieva, M. Karlsson, M.-R. Aguilar, D. Gomez, S. Mikhalovsky, and I. Y. Galaev, Pore structure in supermacroporous polyacrylamide based cryogels, *Soft Matter*, 1, 303-309, **2005**.
- [9] F. D. Lowy, Staphylococcus aureus infections, *New England Journal of Medicine*, 339, 520-532, **1998**.
- [10] K. Jensen, A normally occurring staphylococcus antibody in human serum, *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica*, 44, 421-428, **1958**.
- [11] R. Lindmark, K. Thorén-Tolling, and J. Sjöquist, Binding of immunoglobulins to protein A and immunoglobulin levels in mammalian sera, *Journal of Immunological Methods*, 62, 1-13, **1983**.

- [12] A. Forsgren, A. Svedjelund, and H. Wigzell, Lymphocyte stimulation by protein A of *Staphylococcus aureus*, *European journal of immunology*, 6, 207-213, **1976**.
- [13] P. K. Peterson, J. Verhoef, L. D. Sabath, and P. G. Quie, Effect of protein A on staphylococcal opsonization, *Infection and immunity*, 15, 760-764, **1977**.
- [14] J. Sjö Dahl, Repetitive sequences in protein A from *Staphylococcus aureus*, *European Journal of Biochemistry*, 73, 343-351, **1977**.
- [15] B. Guss, M. Uhlen, B. Nilsson, M. Lindberg, J. Sjöquist, and J. Sjö Dahl, Region X, the cell-wall-attachment part of staphylococcal protein A, *European Journal of Biochemistry*, 138, 413-420, **1984**.
- [16] O. Schneewind, A. Fowler, and K. F. Faull, Structure of the cell wall anchor of surface proteins in *Staphylococcus aureus*, *Science*, 268, 103-106, **1995**.
- [17] H. K. Kim, V. Thammavongsa, O. Schneewind, and D. Missiakas, Recurrent infections and immune evasion strategies of *Staphylococcus aureus*, *Current opinion in microbiology*, 15, 92-99, **2012**.
- [18] J. Sjöquist, B. Meloun, and H. Hjelm, Protein A isolated from *Staphylococcus aureus* after digestion with lysostaphin, *European Journal of Biochemistry*, 29, 572-578, **1972**.
- [19] M. Graille, E. A. Stura, A. L. Corper, B. J. Sutton, M. J. Taussig, J.-B. Charbonnier, *et al.*, Crystal structure of a *Staphylococcus aureus* protein A domain complexed with the Fab fragment of a human IgM antibody: structural basis for recognition of B-cell receptors and superantigen activity, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97, 5399-5404, **2000**.
- [20] E. H. Sasso, G. Silverman, and M. Mannik, Human IgM molecules that bind staphylococcal protein A contain VHIII H chains, *The Journal of Immunology*, 142, 2778-2783, **1989**.
- [21] J. Hartleib, N. Köhler, R. B. Dickinson, G. S. Chhatwal, J. J. Sixma, O. M. Hartford, *et al.*, Protein A is the von Willebrand factor binding protein on *Staphylococcus aureus*, *Blood*, 96, 2149-2156, **2000**.
- [22] T. Nguyen, B. Ghebrehiwet, and E. I. Peerschke, *Staphylococcus aureus* protein A recognizes platelet gC1qR/p33: a novel mechanism for staphylococcal interactions with platelets, *Infection and immunity*, 68, 2061-2068, **2000**.
- [23] M. I. Gómez, A. Lee, B. Reddy, A. Muir, G. Soong, A. Pitt, *et al.*, *Staphylococcus aureus* protein A induces airway epithelial inflammatory responses by activating TNFR1, *Nature medicine*, 10, 842-848, **2004**.
- [24] P. M. Sullam, A. S. Bayer, W. M. Foss, and A. L. Cheung, Diminished platelet binding in vitro by *Staphylococcus aureus* is associated with

- reduced virulence in a rabbit model of infective endocarditis, *Infection and immunity*, 64, 4915-4921, **1996**.
- [25] M. I. Gómez, M. O. Seaghdha, and A. S. Prince, Staphylococcus aureus protein A activates TACE through EGFR-dependent signaling, *The EMBO journal*, 26, 701-709, **2007**.
- [26] O. Leavy, Therapeutic antibodies: past, present and future, *Nature Reviews Immunology*, 10, 297-297, **2010**.
- [27] J. Sjöquist, J. Movitz, I. B. Johansson, and H. Hjelm, Localization of protein A in the bacteria, *European Journal of Biochemistry*, 30, 190-194, **1972**.
- [28] J. J. Langone, Protein A of Staphylococcus aureus and related immunoglobulin receptors produced by streptococci, *Adv Immunol*, 32, 157-252, **1982**.
- [29] S. Loefeldahl, B. Guss, M. Uhlen, L. Philipson, and M. Lindberg, Gene for staphylococcal protein A, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 80, 697-701, **1983**.
- [30] L. Jendeberg, P. Nilsson, A. Larsson, P. Denker, M. Uhlén, B. Nilsson, *et al.*, Engineering of Fc₁ and Fc₃ from human immunoglobulin G to analyse subclass specificity for staphylococcal protein A, *Journal of immunological methods*, 201, 25-34, **1997**.
- [31] J. Deisenhofer, Crystallographic refinement and atomic models of a human Fc fragment and its complex with fragment B of protein A from Staphylococcus aureus at 2.9- and 2.8- Å resolution, *Biochemistry*, 20, 2361-2370, **1981**.
- [32] R. Lindmark, J. MOVITZ, and J. SJÖQUIST, Extracellular Protein A from a Methicillin-Resistant Strain of Staphylococcus aureus, *European Journal of Biochemistry*, 74, 623-628, **1977**.
- [33] C. J. Duggleby and S. A. Jones, Cloning and expression of the staphylococcus aureus protein A gene in Escherichia coli, *Nucleic acids research*, 11, 3065-3076, **1983**.
- [34] P. M. Hammond, K. Philip, R. J. Hinton, and G. W. Jack, Recombinant protein A from Escherichia coli JM83, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 613, 863-867, **1990**.
- [35] H. Gouda, M. Shiraishi, H. Takahashi, K. Kato, H. Torigoe, Y. Arata, *et al.*, NMR study of the interaction between the B domain of staphylococcal protein A and the Fc portion of immunoglobulin G, *Biochemistry*, 37, 129-136, **1998**.

- [36] D. K. Follman and R. L. Fahrner, Factorial screening of antibody purification processes using three chromatography steps without protein A, *Journal of Chromatography A*, 1024, 79-85, **2004**.
- [37] R. Hahn, R. Schlegel, and A. Jungbauer, Comparison of protein A affinity sorbents, *Journal of Chromatography B*, 790, 35-51, **2003**.
- [38] H. Hjelm, K. Hjelm, and J. Sjöquist, Protein a from *Staphylococcus aureus*. Its isolation by affinity chromatography and its use as an immunosorbent for isolation of immunoglobulins, *FEBS letters*, 28, 73-76, **1972**.
- [39] G. Kronvall, A surface component in group A, C, and G streptococci with non-immune reactivity for immunoglobulin G, *The Journal of Immunology*, 111, 1401-1406, **1973**.
- [40] B. Jansson, C. Palmcrantz, M. Uhlén, and B. Nilsson, A dual-affinity gene fusion system to express small recombinant proteins in a soluble form: expression and characterization of protein A deletion mutants, *Protein engineering*, 3, 555-561, **1990**.
- [41] S. Hober, K. Nord, and M. Linhult, Protein A chromatography for antibody purification, *Journal of Chromatography B*, 848, 40-47, **2007**.
- [42] L. Ye and K. Mosbach, Molecular imprinting: synthetic materials as substitutes for biological antibodies and receptors†, *Chemistry of Materials*, 20, 859-868, **2008**.
- [43] A. Bossi, F. Bonini, A. Turner, and S. Piletsky, Molecularly imprinted polymers for the recognition of proteins: the state of the art, *Biosensors and Bioelectronics*, 22, 1131-1137, **2007**.
- [44] V. Pichon and F. Chapuis-Hugon, Role of molecularly imprinted polymers for selective determination of environmental pollutants, *Analytica Chimica Acta*, 622, 48-61, **2008**.
- [45] F. Puoci, G. Cirillo, M. Curcio, F. Iemma, U. Spizzirri, and N. Picci, Molecularly imprinted solid phase extraction for the selective HPLC determination of α -tocopherol in bay leaves, *Analytica chimica acta*, 593, 164-170, **2007**.
- [46] L. I. Andersson, Molecular imprinting: developments and applications in the analytical chemistry field, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 745, 3-13, **2000**.
- [47] F. Puoci, F. Iemma, and N. Picci, Stimuli-responsive molecularly imprinted polymers for drug delivery: A review, *Current drug delivery*, 5, 85-96, **2008**.
- [48] O. Ramström and K. Mosbach, Synthesis and catalysis by molecularly imprinted materials, *Current opinion in chemical biology*, 3, 759-764, **1999**.

- [49] G. Vasapollo, R. D. Sole, L. Mergola, M. R. Lazzo, A. Scardino, S. Scorrano, *et al.*, Molecularly imprinted polymers: present and future prospective, *International journal of molecular sciences*, 12, 5908-5945, **2011**.
- [50] C. Alexander, H. S. Andersson, L. I. Andersson, R. J. Ansell, N. Kirsch, I. A. Nicholls, *et al.*, Molecular imprinting science and technology: a survey of the literature for the years up to and including 2003, *Journal of molecular recognition*, 19, 106-180, **2006**.
- [51] G. Wulff, Molecular imprinting in cross-linked materials with the aid of molecular templates a way towards artificial antibodies, *Angewandte Chemie International Edition in English*, 34, 1812-1832, **1995**.
- [52] K. Mosbach, Molecular imprinting, *Trends in biochemical sciences*, 19, 9-14, **1994**.
- [53] K. M. Annamma and M. Beena, Design of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid imprinted polymer with high specificity and selectivity, *Materials Sciences and Applications*, 2, 131, **2011**.
- [54] R. Del Sole, A. De Luca, M. Catalano, G. Mele, and G. Vasapollo, Noncovalent imprinted microspheres: preparation, evaluation and selectivity of DBU template, *Journal of applied polymer science*, 105, 2190-2197, **2007**.
- [55] V. I. Lozinsky, Cryogels on the basis of natural and synthetic polymers: preparation, properties and application, *Russian chemical reviews*, 71, 489-511, **2002**.
- [56] G. B. Sergeev and V. Batyuk, Reactions in Frozen Multicomponent Systems, *Russian Chemical Reviews*, 45, 391, **1976**.
- [57] W. Schulze, D. Yu, and M. MacMasters, *Stärke*, 16, 41, **1964**.
- [58] V. Nikonorov, R. Ivanov, N. Kil'Deeva, L. Bulatnikova, and V. Lozinskii, Synthesis and characteristics of cryogels of chitosan crosslinked by glutaric aldehyde, *Polymer Science Series A*, 52, 828-834, **2010**.
- [59] G. Gerlach and K.-F. Arndt, *Hydrogel sensors and actuators: engineering and technology* vol. 6: Springer Science & Business Media, **2009**.
- [60] I. Galaev and B. Mattiasson, *Smart polymers: applications in biotechnology and biomedicine*: CRC Press, **2007**.
- [61] J. P. Gong, Y. Katsuyama, T. Kurokawa, and Y. Osada, Double-Network Hydrogels with Extremely High Mechanical Strength, *Advanced Materials*, 15, 1155-1158, **2003**.

- [62] Y. Okumura and K. Ito, The polyrotaxane gel: A topological gel by figure-of-eight cross-links, *Advanced Materials*, 13, 485-487, **2001**.
- [63] D. C. Tuncaboylu, M. Sari, W. Oppermann, and O. Okay, Tough and self-healing hydrogels formed via hydrophobic interactions, *Macromolecules*, 44, 4997-5005, **2011**.
- [64] K. Haraguchi and T. Takehisa, Nanocomposite hydrogels: a unique organic-inorganic network structure with extraordinary mechanical, optical, and swelling/de-swelling properties, *Advanced Materials*, 14, 1120, **2002**.
- [65] H. Kirsebom, G. Rata, D. Topgaard, B. Mattiasson, and I. Y. Galaev, Mechanism of cryopolymerization: diffusion-controlled polymerization in a nonfrozen microphase. An NMR study, *Macromolecules*, 42, 5208-5214, **2009**.
- [66] C. Bilici, S. Karayel, T. T. Demir, and O. Okay, Self-oscillating pH-responsive cryogels as possible candidates of soft materials for generating mechanical energy, *Journal of applied polymer science*, 118, 2981-2988, **2010**.
- [67] X.-Z. Zhang and C.-C. Chu, Thermosensitive PNIPAAm cryogel with superfast and stable oscillatory properties, *Chem. Commun.*, 1446-1447, **2003**.
- [68] M. Andac, F. Plieva, A. Denizli, I. Y. Galaev, and B. Mattiasson, Poly (hydroxyethyl methacrylate)-Based Macroporous Hydrogels with Disulfide Cross-Linker, *Macromolecular Chemistry and Physics*, 209, 577-584, **2008**.
- [69] V. Lozinsky and F. Plieva, Poly (vinyl alcohol) cryogels employed as matrices for cell immobilization. 3. Overview of recent research and developments, *Enzyme and microbial technology*, 23, 227-242, **1998**.
- [70] X.-L. Sun, W.-D. He, T.-T. Pan, Z.-L. Ding, and Y.-J. Zhang, RAFT cryopolymerizations of acrylamides and acrylates in dioxane at- 5° C, *Polymer*, 51, 110-114, **2010**.
- [71] V. Lozinsky, E. Vainerman, E. Titova, E. Belavtseva, and S. Rogozhin, Study of cryostructurization of polymer systems, *Colloid and Polymer Science*, 262, 769-774, **1984**.
- [72] D. Ceylan and O. Okay, Macroporous polyisobutylene gels: a novel tough organogel with superfast responsivity, *Macromolecules*, 40, 8742-8749, **2007**.
- [73] S. Dogu and O. Okay, Tough organogels based on polyisobutylene with aligned porous structures, *Polymer*, 49, 4626-4634, **2008**.

- [74] A. Tripathi and A. Kumar, Multi-Featured Macroporous Agarose–Alginate Cryogel: Synthesis and Characterization for Bioengineering Applications, *Macromolecular bioscience*, 11, 22-35, **2011**.
- [75] F. M. Plieva, J. Andersson, I. Y. Galaev, and B. Mattiasson, Characterization of polyacrylamide based monolithic columns, *Journal of separation science*, 27, 828-836, **2004**.
- [76] F. M. Plieva, I. N. Savina, S. Deraz, J. Andersson, I. Y. Galaev, and B. Mattiasson, Characterization of supermacroporous monolithic polyacrylamide based matrices designed for chromatography of bioparticles, *Journal of Chromatography B*, 807, 129-137, **2004**.
- [77] D. C. Tuncaboylu and O. Okay, Preparation and characterization of single-hole macroporous organogel particles of high toughness and superfast responsivity, *European Polymer Journal*, 45, 2033-2042, **2009**.
- [78] J. Yun, C. Tu, D.-Q. Lin, L. Xu, Y. Guo, S. Shen, *et al.*, Microchannel liquid-flow focusing and cryo-polymerization preparation of supermacroporous cryogel beads for bioseparation, *Journal of Chromatography A*, 1247, 81-88, **2012**.
- [79] N. Orakdogan, P. Karacan, and O. Okay, Macroporous, responsive DNA cryogel beads, *Reactive and Functional Polymers*, 71, 782-790, **2011**.
- [80] F. Topuz and O. Okay, Macroporous hydrogel beads of high toughness and superfast responsivity, *Reactive and Functional Polymers*, 69, 273-280, **2009**.
- [81] R. V. Ivanov, V. I. Lozinsky, S. K. Noh, S. S. Han, and W. S. Lyoo, Preparation and characterization of polyacrylamide cryogels produced from a high-molecular-weight precursor. I. Influence of the reaction temperature and concentration of the crosslinking agent, *Journal of applied polymer science*, 106, 1470-1475, **2007**.
- [82] L. Bromberg, A. Y. Grosberg, E. S. Matsuo, Y. Suzuki, and T. Tanaka, Dependency of swelling on the length of subchain in poly (N, N-dimethylacrylamide)-based gels, *The Journal of chemical physics*, 106, 2906-2910, **1997**.
- [83] F. Ak, Z. Oztoprak, I. Karakutuk, and O. Okay, Macroporous silk fibroin cryogels, *Biomacromolecules*, 14, 719-727, **2013**.
- [84] E. Okoroafor, M. Newborough, D. Highgate, and P. Augood, The thermal behaviour of water in crosslinked hydro-active polymeric structures: crystallization of water, *Journal of Physics D: Applied Physics*, 31, 3120, **1998**.
- [85] M. M. Ozmen, M. V. Dinu, E. S. Dragan, and O. Okay, Preparation of Macroporous Acrylamide-based Hydrogels: Cryogelation under Isothermal

Conditions, *Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry*, 44, 1195-1202, **2007**.

- [86] H. Kirsebom and B. Mattiasson, Cryostructuration as a tool for preparing highly porous polymer materials, *Polym. Chem.*, 2, 1059-1062, **2011**.
- [87] E. Podorozhko, E. D'yakonova, O. Y. Kolosova, L. Klabukova, and V. Lozinsky, A study of cryostructuring of polymer systems. 34. Poly (vinyl alcohol) composite cryogels filled with microparticles of polymer dispersion, *Colloid Journal*, 74, 708-716, **2012**.
- [88] V. I. Lozinsky, I. V. Bakeeva, E. P. Presnyak, L. G. Damshkaln, and V. P. Zubov, Cryostructuring of polymer systems. XXVI. Heterophase organic–inorganic cryogels prepared via freezing–thawing of aqueous solutions of poly (vinyl alcohol) with added tetramethoxysilane, *Journal of applied polymer science*, 105, 2689-2702, **2007**.
- [89] C. Alba-Simionesco, G. Dosseh, E. Dumont, B. Frick, B. Geil, D. Morineau, *et al.*, Confinement of molecular liquids: Consequences on thermodynamic, static and dynamical properties of benzene and toluene, *The European Physical Journal E: Soft Matter and Biological Physics*, 12, 19-28, **2003**.

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Sevgi ASLIYÜCE ÇOBAN

Doğum Yeri : Ankara

Medeni Hali : Evli

E-posta : sevgi@hacettepe.edu.tr

Adresi : Hacettepe Üniversitesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı
Beytepe/Ankara

Eğitim

Lise : 1995-2002 Ankara Anadolu Lisesi

Lisans : 2002-2007 Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü

Yüksek L. : 2007-2009 Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü

Doktora : 2009-2015 Hacettepe Üniversitesi Kimya Bölümü

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce : İyi seviyede

Almanca : Orta seviyede

İş Deneyimi

2008- Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Araştırma Görevlisi

Deneyim Alanları

Biyokimya, Biyomateryaller, Moleküler Baskılama

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

013D03601002 numaralı "Protein A Bakılanmış Süpermakrogözenekli Poli(Hidroksietil Metakrilat) Kriyojeller" adlı Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi Destek Projesi, 17 907 TL.

Tezden Üretilmiş Yayınlar

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar