

**ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI
2012-DR-006**

**KARBONİK ANHİDRAZ ENZİMİNİN
SAFLAŞTIRILMASI İÇİN
MOLEKÜLER BASKILANMIŞ KRİYOJELLERİN
HAZIRLANMASI VE KARAKTERİZASYONU**

Murat UYGUN

**Tez Danışmanları:
Prof. Dr. A. Alev KARAGÖZLER
Prof. Dr. Adil DENİZLİ**

AYDIN

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Kimya Anabilim Dalı Doktora Programı öğrencisi Murat UYGUN tarafından hazırlanan “Karbonik Anhidraz Enziminin Saflaştırılması İçin Moleküler Baskılanmış Kriyojellerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu” başlıklı tez, 13.11.2012 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

| Ünvanı, Adı Soyadı | Kurumu | İmzası |
|--------------------------------------|-------------------------|--------|
| Başkan: Prof. Dr. A. Alev KARAGÖZLER | ADÜ Fen-Ed. Fakültesi | |
| Üye : Prof. Dr. Erol AKYILMAZ | Ege Üniv. Fen Fakültesi | |
| Üye : Doç. Dr. Sinan AKGÖL | Ege Üniv. Fen Fakültesi | |
| Üye : Doç. Dr. Kubilay METİN | ADÜ Fen-Ed. Fakültesi | |
| Üye : Doç. Dr. M. Emin GÜNAY | ADÜ Fen-Ed. Fakültesi | |

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu doktora tezi, Enstitü Yönetim Kurulunun..... sayılı kararıyla/...../2012 tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Cengiz ÖZARSLAN
Enstitü Müdürü

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Bu tezde sunulan tüm bilgi ve sonuçların, bilimsel yöntemlerle yürütülen gerçek deney ve gözlemler çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce, sonuç ve bilgilere bilimsel etik kuralların gereği olarak eksiksiz şekilde uygun atıf yaptığımı ve kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

13/09/2012

İmza

Murat UYGUN

ÖZET**KARBONİK ANHİDRAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI İÇİN
MOLEKÜLER BASKILANMIŞ KRİYOJELLERİN
HAZIRLANMASI VE KARAKTERİZASYONU**

Murat UYGUN

Doktora Tezi, Kimya Anabilim Dalı
Tez Danışmanı: Prof. Dr. A. Alev KARAGÖZLER
İkinci Tez Danışmanı: Prof. Dr. Adil DENİZLİ
2012, 168 sayfa

Bu çalışmada, sığır kanından karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması için moleküler baskılanmış poli(HEMA-MAH) kriyojeller sentezlenmiştir. Sentezlenen kriyojellerin karakterizasyonu şişme, makrogözeneklilik ve akış hızı denemeleri ve FTIR, SEM, yüzey alanı ve elementel analiz ölçümleri yapılarak gerçekleştirilmiştir. Kriyojellerin maksimum şişme oranının gram kriyojel başına 8.01 g olduğu makrogözenekliliğin ise yaklaşık % 70 olduğu bulunmuştur. Kriyojel makrogözenekliliğinin artışı ile akış hızı da artmıştır. Kriyojel yapısına MAH monomerinin katıldığı elementel analiz ve FTIR analizleri ile gösterilmiş ve sentezlenen kriyojelin yüzey özellikleri SEM ile incelenmiştir. Kriyojelin oldukça gözenekli olduğu ve sünger benzeri bir morfolojiye sahip olduğu bulunmuştur. Karbonik anhidraz baskılanmış kriyojellerin yüzey alanı BET ölçümleri ile 29.3 m²/g olarak bulunmuştur. Maksimum karbonik anhidraz adsorpsiyonu pH 6.0 MES tamponu ile elde edilirken (3.16 mg/g kriyojel), sıcaklığın adsorpsiyon üzerine etkili olmadığı bulunmuştur. Artan tuz derişimi ile adsorpsiyon kapasitesi azalırken kromatografik akış hızı 4 mL/dak'ya çıkarıldığında adsorpsiyon kapasitesi şiddetli bir şekilde azalmıştır. Adsorplanan karbonik anhidrazın floresans spektrumu alınarak üç boyutlu yapısında bir değişiklik olmadığı gözlenmiştir. Kriyojellerin tekrar kullanılabilirliği 10 döngü boyunca incelenmiş ve adsorpsiyon kapasitesinde % 10'luk bir azalma meydana gelmiştir. Sentezlenen kriyojelin seçiciliği albumin, hemogloblin, IgG, γ -globulin ve lizozime karşı incelenmiş ve sırasıyla 15.26, 60.05, 21.88, 17.61 ve 17.42 kat yüksek seçicilik bulunmuştur. Sentezlenen karbonik anhidraz baskılanmış kriyojeller kullanılarak sığır kanından karbonik anhidraz enzimi yaklaşık % 80 verimle ve 84 kat saflaştırılmıştır ve saflık SDS-PAGE ve zimogram ile gösterilmiştir.

Anahtar sözcükler: Karbonik anhidraz, kriyojel, moleküler baskılanmış polimer.

ABSTRACT**PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF
MOLECULARLY IMPRINTED CRYOGELS FOR
CARBONIC ANHYDRASE PURIFICATION**

Murat UYGUN

Ph.D Thesis, Department of Chemistry
Supervisor: Prof. Dr. A. Alev KARAGÖZLER
Co-supervisor: Prof. Dr. Adil DENİZLİ
2012, 168 pages

In this study, molecularly imprinted poly(HEMA-MAH) cryogels were synthesized and used for purification of carbonic anhydrase from bovine blood. Cryogels were characterized by its swelling degree, macroporosity, flow rate and FTIR, SEM, surface area and elemental analysis. Maximum swelling degree of the cryogel was found to be 8.01 g H₂O/g while their macroporosity was about 70 %. Flow rate increased with increasing macroporosity. Incorporation of MAH monomer into cryogel structure was shown with elemental analysis and FTIR. With SEM photographs it was shown that cryogels were highly porous and had sponge like morphology. Their surface area was found to be 29.3 m²/g with BET studies. Maximum carbonic anhydrase adsorption was found to be 3.16 mg/g with MES buffer (pH 6.0) while temperature had no significant effect over the adsorption. Adsorption capacity was decreased with increased chromatographic flow rate to 4 mL/min. Tree-dimensional structure of the enzyme was studied with fluorometric analysis. Cryogels were re-used for 10 cycle and their adsorption capacity decreased only 10 %. Cryogel selectivity were investigated with albumin, hemoglobin, IgG, γ -globulin and lysozyme and found to be 15.26, 60.05, 21.88, 17.61 and 17.42, respectively. These cryogel used for purification of carbonic anhydrase from bovine blood and purified with 84 fold and 80 % recovery. Purity of the enzyme was shown with SDS-PAGE and zymogram.

Key words: Carbonic anhydrase, cryogel, molecularly imprinted polymer.

ÖNSÖZ

Tecrübeleri ve engin bilgilerinden yararlandığım, sadece akademik hayatta değil sosyal yaşantımda da örnek aldığım, sevgili danışman hocam Prof. Dr. A. Alev KARAGÖZLER'e, akademik hayatım boyunca bana kazandırdığı bilimsel bakış açısı ve tezimin gerçekleşmesinde bana verdiği maddi ve manevi destekten dolayı;

Bilimsel hayatımda kendisinden örnek aldığım, engin bilgilerini ve laboratuvar imkanlarını cömertçe sunan, ikinci danışman hocam sayın Prof. Dr. Adil DENİZLİ'ye, tez konumun seçimindeki ve tez çalışmalarım sırasındaki yoğun ilgisi ve desteklerinden dolayı;

Tez izleme komitemde yer alan, bilime ve hayata olan pozitif bakış açısı ile kendime örnek aldığım, değerli hocam Doç. Dr. Sinan AKGÖL'e, tez çalışmalarım sırasında bilgi ve tecrübelerini paylaşmasından dolayı;

Laboratuvar imkanlarını ve değerli bilgilerini her ihtiyaç olduğunda sunan ve tez izleme komitemde yer alan saygıdeğer hocam Doç. Dr. Kubilay METİN'e, verdiği destek ve yardımlarından dolayı;

Laboratuvar çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım Dr. Nilay BERELİ, Yrd. Doç. Dr. Lokman UZUN, Yrd. Doç. Dr. Emrah GİZİROĞLU, Arş. Gör. Mert SOYSAL, Arş. Gör. Rukiye YAVAŞER'e, değerli vakitlerini bana ayırdıkları için;

Tez çalışmamı FEF-10009 No'lu araştırma projesi ile destekleyen, Adnan Menderes Üniversitesi Rektörlüğü'ne ve olanaklarından yararlandığım Kimya Bölümü'ne;

Tezin gerçekleşmesinden yazımına kadar desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, bilgilerine ve tecrübelerine sıkça başvurduğum, sevgili eşim ve meslektaşım Doç. Dr. Deniz AKTAŞ UYGUN'a, bize yaşama sevinci veren biricik oğlumuza ve manevi desteklerinden dolayı sevgili aileme;

Sevgilerimi ve teşekkürlerimi sunuyorum.

Murat UYGUN

İÇİNDEKİLER

| | |
|---|-------|
| KABUL VE ONAY SAYFASI..... | iii |
| BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI..... | vii |
| ABSTRACT..... | ix |
| ÖNSÖZ..... | xi |
| SİMGELER DİZİNİ..... | xvii |
| ŞEKİLLER DİZİNİ..... | xxi |
| ÇİZELGELER DİZİNİ..... | xxiii |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 1.1. Karbonik Anhidraz Enzimi | 1 |
| 1.1.1. Karbonik Anhidraz Enziminin Kısa Tarihçesi | 1 |
| 1.1.2. CA Enzimi Hakkında | 3 |
| 1.1.3. CA Ailesi..... | 8 |
| 1.1.3.1. α -CA..... | 8 |
| 1.1.3.2. β -CA..... | 12 |
| 1.1.3.3. γ -CA | 15 |
| 1.1.3.4. δ -CA..... | 16 |
| 1.1.3.5. ε -CA | 17 |
| 1.1.4. CA'nın Metal İyon Spesifitesi | 18 |
| 1.1.5. CA Kataliz Mekanizması | 19 |
| 1.1.5.1. α -CA katalizi | 20 |
| 1.1.5.2. β -CA katalizi | 22 |
| 1.1.5.3. γ -CA katalizi | 24 |
| 1.1.6. CA Enzimlerinin Fizyolojik Fonksiyonları..... | 26 |
| 1.1.7. CA Enziminin Saflaştırılması | 27 |
| 1.2. Biyoteknolojide Polimerik Materyaller..... | 28 |
| 1.2.1. Polimerik Jeller | 28 |
| 1.3. Kriyojeller | 31 |
| 1.3.1. Kriyojellerin Hazırlanması..... | 33 |
| 1.3.2. Kriyojellerin Genel Özellikleri..... | 36 |
| 1.3.3. Kriyojellerin Kullanım Alanları..... | 37 |
| 1.3.3.1. Biyoayırmada kriyojeller | 38 |
| 1.3.3.2. Biyopolimerlerin immobilizasyonunda kriyojel matrisler | 38 |

| | |
|--|----|
| 1.3.3.3. Hücre immobilizasyonunda taşıyıcı olarak kriyojeller | 39 |
| 1.4. Moleküler Baskılama..... | 39 |
| 1.4.1. Moleküler Baskılamanın Esasları | 44 |
| 1.4.2. Moleküler Baskılamanın Genel Prensipleri..... | 45 |
| 1.4.3. Moleküler Baskılama Çeşitleri | 46 |
| 1.4.3.1. Kovalent baskılama | 47 |
| 1.4.3.2. Kovalent olmayan baskılama | 47 |
| 1.4.3.3. Taklit (dummy) moleküler baskılama | 48 |
| 1.4.4. Kovalent ve Kovalent Olmayan Baskılamanın Avantajları ve Dezavantajları..... | 49 |
| i) Kovalent Baskılama | 49 |
| ii) Kovalent Olmayan Baskılama | 50 |
| 1.4.5. Kısa Tarihçe | 51 |
| 1.4.5.1. Kovalent baskılama | 51 |
| 1.4.5.2. Kovalent olmayan baskılama | 51 |
| 1.4.5.3. Kovalent ve kovalent olmayan baskılamanın hidridizasyonu | 51 |
| 1.4.6. Moleküler Baskılanmış Polimerlerin Hazırlanması | 52 |
| 1.4.7. Moleküler Baskılanmış Polimerlerin Mikroçevresi | 53 |
| 1.4.8. Moleküler Baskılanmış Polimer Bileşimi..... | 53 |
| 1.4.9. Moleküler Baskılama Tekniği | 54 |
| 1.4.10. Moleküler Baskılanmış Polimerlerin Uygulamaları | 56 |
| 2. KAYNAK ÖZETLERİ..... | 59 |
| 2.1. Kriyojeller ile İlgili Önemli Çalışmalar | 59 |
| 2.2. Moleküler Baskılanmış Polimerler ile İlgili Önemli Çalışmalar | 73 |
| 2.3. Moleküler Baskılanmış Kriyojeller ile İlgili Önemli Çalışmalar | 77 |
| 2.4. Karbonik Anhidraz Enziminin Saflaştırılması ile İlgili Önemli Çalışmalar..... | 81 |
| 3. MATERYAL VE YÖNTEM | 89 |
| 3.1. Materyal..... | 89 |
| 3.2. Yöntem | 90 |
| 3.2.1. Poli(HEMA) Kriyojellerin Sentezlenmesi..... | 90 |
| 3.2.2. N-metakriloil-(L)-histidin (MAH) Monomerinin Sentezi | 91 |
| 3.2.3. Poli(HEMA-MAH) Kriyojellerin Sentezlenmesi | 92 |

| | |
|---|-----|
| 3.2.4. Karbonik Anhidraz Baskılanmış Poli(HEMA-MAH) Kriyojellerin (MIP) Sentezlenmesi | 93 |
| 3.2.5. Kriyojel Sentezinde Kullanılan MAH Monomerinin ve Karbonik Anhidraz Miktarının Optimizasyonu | 96 |
| 3.2.6. Sentezlenen Kriyojellerin Karakterizasyonu | 98 |
| 3.2.6.1. Şişme derecesi ölçümleri..... | 98 |
| 3.2.6.2. % makrogözeneklilik ölçümleri | 98 |
| 3.2.6.3. Akış hızı ölçümleri | 98 |
| 3.2.6.4. FTIR (Fourier Transform Infrared) spektrometre ölçümleri | 99 |
| 3.2.6.5. SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) ölçümleri | 99 |
| 3.2.6.6. Elementel analiz ölçümleri..... | 99 |
| 3.2.6.7. Yüzey alanı ölçümleri | 99 |
| 3.2.7. Protein Tayin Yöntemi | 99 |
| 3.2.8. Enzim Aktivite Denemeleri..... | 99 |
| 3.2.9. Desorpsiyon Ajanının Seçimi | 101 |
| 3.2.10. Karbonik Anhidrazın Kriyojellere Adsorpsiyonunun Optimizasyonu.... | 101 |
| 3.2.10.1. Adsorpsiyona pH'ın etkisinin incelenmesi | 101 |
| 3.2.10.2. Adsorpsiyona farklı tampon tiplerinin etkisinin incelenmesi..... | 101 |
| 3.2.10.3. Adsorpsiyona ortamdaki karbonik anhidraz derişiminin etkisinin incelenmesi..... | 102 |
| 3.2.10.4. Adsorpsiyon izotermelerinin tespiti | 102 |
| 3.2.10.5. Adsorpsiyona iyonik şiddetin etkisinin incelenmesi | 103 |
| 3.2.10.6. Adsorpsiyona sıcaklığın etkisinin incelenmesi | 103 |
| 3.2.10.7. Adsorpsiyona kromatografik akış hızının etkisinin incelenmesi | 103 |
| 3.2.10.8. Floresans spektrofotometre ölçümleri | 103 |
| 3.2.11. Kriyojelin Tekrar Kullanım Özellikleri ve Operasyonel Kararlılığı | 103 |
| 3.2.12. Serbest ve Kriyojelden Desorbe Karbonik Anhidrazın Isıl Kararlılığı ... | 104 |
| 3.2.13. Karbonik Anhidraz Baskılanmış Kriyojellerin Seçiciliği | 104 |
| 3.2.14. Sığır Eritrositlerinden Karbonik Anhidraz Saflaştırılması | 105 |
| 3.2.14.1. SDS-PAGE elektroforezi | 105 |
| 3.2.14.2. Zimogram boyaması..... | 106 |
| 4. BULGULAR VE TARTIŞMA | 107 |
| 4.1. Poli(HEMA-MAH) Kriyojellerin Fotoğrafı..... | 107 |
| 4.2. CA Adsorpsiyon Denemeleri | 107 |
| 4.3. Poli(HEMA-MAH) Kriyojellerin Karakterizasyonu | 109 |
| 4.3.1. Şişme Derecesi, Makrogözeneklilik ve Akış Hızı Sonuçları | 109 |

| | |
|--|-----|
| 4.3.2. FTIR (Fourier Transform Infrared) Spektrometre Sonuçları..... | 113 |
| 4.3.3. SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) Sonuçları | 115 |
| 4.3.4. Elementel Analiz Bulguları | 116 |
| 4.3.5. Yüzey Alanı Sonuçları | 116 |
| 4.4. Desorpsiyon Ajanının Seçimi | 116 |
| 4.5. Karbonik Anhidrazın Kriyojellere Adsorpsiyonunun Optimizasyonu | 118 |
| 4.5.1. Adsorpsiyona pH'ın Etkisi | 118 |
| 4.5.2. Adsorpsiyona Farklı Tampon Tiplerinin Etkisi..... | 119 |
| 4.5.3. Adsorpsiyona Ortamdaki Karbonik Anhidraz Derişiminin Etkisi..... | 120 |
| 4.5.4. Adsorpsiyona İyonik Şiddetin Etkisi..... | 124 |
| 4.5.5. Adsorpsiyona Sıcaklığın Etkisi | 127 |
| 4.5.6. Adsorpsiyona Kromatografik Akış Hızının Etkisi | 129 |
| 4.5.7. Floresans Spektrometrisi Sonuçları | 130 |
| 4.6. Kriyojelin Tekrar Kullanım Özellikleri ve Operasyonel Kararlılığı | 131 |
| 4.7. Serbest ve Kriyojelden Desorbe Karbonik Anhidrazın Isıl Kararlılığı | 133 |
| 4.8. Karbonik Anhidraz Baskılanmış Kriyojellerin Seçiciliği..... | 134 |
| 4.9. Sığır Eritrositlerinden CA Enziminin Saflaştırılması..... | 136 |
| 4.9.1. SDS-PAGE Elektroforezi..... | 137 |
| 4.9.2. Zimogram Boyaması | 138 |
| 5. SONUÇ | 141 |
| KAYNAKLAR..... | 145 |
| ÖZGEÇMİŞ..... | 163 |

SİMGELER DİZİNİ

| | |
|----------------|---|
| 2VP | 2-vinilpiridin |
| 4VP | 4- vinilpiridin |
| AFM | Atomik kuvvet mikroskobu |
| AIBN | azo-N,N'-bis-izobütironitril |
| Am | Akrilamid |
| AMPSA | 2-akriloil-2-metilporpan sülfonik asit |
| APBA | 3-aminofenilboronik asit |
| APS | amonyum persülfat |
| ATP | Adenozintrifosfat |
| BAAm | N,N'-metilen bisakrilamid |
| BHb | Sığır hemoglobini |
| BMP | Bazik kas proteini |
| BOC | t-bütilloksikarbonil |
| BSA | Sığır serum albumini |
| CA | Karbonik anhidraz |
| CARP | CA-ilişkili proteinler |
| CEL | Tavuk yumurta lizozimi |
| Cyt <i>c</i> | Sitokrom <i>c</i> |
| DEAE | Dietilaminoetil |
| DHEBAAm | N,N-(1,2-dihidroksietilen)-bisakrilamid |
| DMAA | Dimetilakrilamid |
| DMAEMA | 2-(dimetilamino) etil metakrilat |
| DMAEPMA | N-[3-(dimetilamino)propil]metakrilamid |
| DMAPA | N,N-dimetilaminopropilakrilamid |
| DNA | Deoksiribonükleik asit |
| DTT | Ditiyotritol |
| DVB | Divinil benzen |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EBAAm | N,N-etilen bisakrilamid |
| EDTA | Etilendiamin tetraasetik asit |
| EGDMA | Etilen glikol dimetakrilat |
| F | Fibrinojen |
| FMOC | 9-florenil metoksikarbonil |
| FTIR | Fourier Transform Infrared |
| GOD | Glukoz oksidaz |

| | |
|-------------------------------|---|
| GPI | Glikozilfosfatidilinositol |
| Hb | İnsan hemoglobini |
| HEPES | 4-(2-hidroksietil)piperazin-1-etansülfonik asit |
| HPLC | Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi |
| HRP | Yaban turbu peroksidazı |
| HSA | İnsan serum albumini |
| hTf | İnsan transferini |
| IDA | İminodiasetik asit |
| IgG | İmmunoglobulin G |
| LP | Laktoperoksidaz |
| LSZ | Lizozim |
| <i>M. lysodeikticus</i> | <i>Micrococcus lysodeikticus</i> |
| <i>M. thermoautotrophicum</i> | <i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i> |
| <i>M. thermophila</i> | <i>Methanosarcina thermophila</i> |
| MA | Metakrilamid |
| MAA | Metakrilik asit |
| mAb | monoklonal antibadiler |
| MAH | N-metakriloil-(L)-histidin |
| MES | 2-(N-morfolino)etan sülfonik asit |
| MIP | Moleküler baskılanmış polimer |
| MOPS | 3-(N-morfolino)propan sülfonik asit |
| MP | Mikroperoksidaz |
| Ni-NTA | Ni(II)-nitriloasetik asit kompleksi |
| NTBA | N-tert-bütillakrilamid |
| OEt | Etil ester |
| OMe | Metil ester |
| OT | Oksitoksin |
| <i>P. purpureum</i> | <i>Porphyridium purpureum</i> |
| <i>P. sativum</i> | <i>Pisum sativum</i> |
| pAAm | Poliakrilamid |
| PAGE | Poliakrilamid jel elektroforezi |
| pCyP18 | Klonlanmış domuz silkofinlin 18 |
| PDMAA | poli(dimetil akrilamid) |
| PEG | Poli(etilen glikol) |
| PEI | poli(etilen imin) |
| Phe | Fenil |

| | |
|-----------------------|--|
| PHEMA | poli(hidroksietil metakrilat) |
| p-NPA | p-nitro fenilasetat |
| polimiksin B | PMB |
| PPy | polipirol |
| PSR | Proton mekiği birimi |
| PVA | polivinil alkol |
| RNAaz | Ribonükleaz |
| <i>S. cerevisiae</i> | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |
| Sav | Streptavidin |
| SDS-PAGE | Sodyumdodesilsülfat poliakrilamid elektroforez |
| SEM | Taramalı elektron mikroskobu |
| T | Tripsin |
| <i>T. weissflogii</i> | <i>Thalassiosira weissflogii</i> |
| TAP | Triazofos |
| TEMED | N,N,N',N'-tetrametilen diamin |
| TRIM | Trimetilolpropan trimetakrilat |
| VP | Vazopresin |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | |
|---|-----|
| Şekil 1.1. İnsan CA II'nin aktif merkezi..... | 7 |
| Şekil 1.2. CA katalizli CO ₂ hidrasyonu için katalitik mekanizmanın şematik gösterimi..... | 8 |
| Şekil 1.3. İnsan CA II'nin yapısının şematik gösterimi | 11 |
| Şekil 1.4. β-CA enziminin Zn(II) koordinasyon yapılarının şematik gösterimi .. | 14 |
| Şekil 1.5. <i>M. thermophila</i> γ-CA'nın yapısının şematik gösterimi..... | 16 |
| Şekil 1.6. α-, β- ve γ-CA enzimlerinin üç boyutlu yapıları | 19 |
| Şekil 1.7. İnsan CA II aktif merkezinde Zn(II)'nin üç histidin amino asidi ile koordinasyonu | 21 |
| Şekil 1.8. Prokaryotik β-CA (<i>Porphyridium purpureum</i>) için önerilen katalitik mekanizma | 23 |
| Şekil 1.9. Cam için önerilen reaksiyon mekanizması | 25 |
| Şekil 1.10. Makrogözenekli kriyojellerin oluşumunun şematik gösterimi | 34 |
| Şekil 1.11. Moleküler baskılama işlemi adımlarının şematik gösterimi | 46 |
| Şekil 1.12. MIP'lerin hazırlanmasında kullanılan monomerler ve çapraz bağlayıcılar | 55 |
| Şekil 3.1. Poli(HEMA) kriyojellerin sentezi | 91 |
| Şekil 3.2. Poli(HEMA-MAH) kriyojellerin sentezi | 93 |
| Şekil 3.3. CA-MAH ön kompleksinin oluşumu | 94 |
| Şekil 3.4. Baskılanmış poli(HEMA-MAH) kriyojellerin sentezi..... | 95 |
| Şekil 3.5. Farklı MAH ve CA içeriklerine sahip ön kompleksin oluşumu | 96 |
| Şekil 3.6. pH denemelerinde kullanılan tamponlar ve pK _a değerleri | 102 |
| Şekil 4.1. Poli(HEMA-MAH) kriyojellerin kuru ve şişmiş durumdaki fotoğrafı..... | 107 |
| Şekil 4.2. 0,1 mol MAH monomeri içeren kriyojellerin % şişme derecelerinin karşılaştırılması | 109 |
| Şekil 4.3. 0,2 mol MAH monomeri içeren kriyojellerin % şişme derecelerinin karşılaştırılması | 109 |
| Şekil 4.4. 0,3 mol MAH monomeri içeren kriyojellerin % şişme derecelerinin karşılaştırılması | 110 |
| Şekil 4.5. Çapraz bağlı poli(HEMA) (a) ve poli(HEMA-MAH) (b) kriyojelin kimyasal yapısı..... | 114 |
| Şekil 4.6. Poli(HEMA-MAH)-poli(HEMA) fark spektrumu | 114 |
| Şekil 4.7. Poli(HEMA) (a ve b), baskılanmamış poli(HEMA-MAH) (c ve d) ve CA baskılanmış poli(HEMA-MAH) kriyojellerin SEM fotoğrafları | 115 |

| | |
|--|-----|
| Şekil 4.8. Karbonik anhidrazın baskılanmış poli(HEMA-MAH) kriyojele adsorpsiyonuna ve karbonik anhidraz aktivitesine pH'nin etkisi | 119 |
| Şekil 4.9. Poli(HEMA-MAH) kriyojellerine karbonik anhidraz adsorpsiyonuna farklı tampon tiplerinin etkisi | 120 |
| Şekil 4.10. Baskılanmış poli(HEMA-MAH) kriyojele karbonik anhidraz adsorpsiyonuna ve karbonik anhidraz aktivitesine karbonik anhidraz derişiminin etkisi | 121 |
| Şekil 4.11. Baskılanmamış poli(HEMA-MAH) kriyojele karbonik anhidraz adsorpsiyonuna ve karbonik anhidraz aktivitesine karbonik anhidraz derişiminin etkisi | 121 |
| Şekil 4.12. Poli(HEMA) kriyojele karbonik anhidraz adsorpsiyonuna ve karbonik anhidraz aktivitesine karbonik anhidraz derişiminin etkisi | 122 |
| Şekil 4.13. Baskılanmış poli(HEMA-MAH) kriyojellere karbonik anhidraz adsorpsiyonuna ilişkin Langmuir izotermi | 123 |
| Şekil 4.14. Baskılanmış poli(HEMA-MAH) kriyojellere karbonik anhidraz adsorpsiyonuna ilişkin Freundlich izotermi | 123 |
| Şekil 4.15. Poli(HEMA-MAH) kriyojel üzerine karbonik anhidraz adsorpsiyonuna ve aktivitesine iyonik şiddetin etkisi | 124 |
| Şekil 4.16. CA adsorpsiyonuna Ca^{2+} tuzlarının etkisi | 125 |
| Şekil 4.17. CA adsorpsiyonuna K^+ tuzlarının etkisi | 125 |
| Şekil 4.18. CA adsorpsiyonuna Mg^{2+} tuzlarının etkisi | 126 |
| Şekil 4.19. CA adsorpsiyonuna Na^+ tuzlarının etkisi | 126 |
| Şekil 4.20. CA adsorpsiyonuna NH_4^+ tuzlarının etkisi | 127 |
| Şekil 4.21. Poli(HEMA-MAH) kriyojele karbonik anhidraz adsorpsiyonu ve aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi | 128 |
| Şekil 4.22. Poli(HEMA-MAH) kriyojele karbonik anhidraz adsorpsiyonu ve aktivitesi üzerine kromatografik akış hızının etkisi | 129 |
| Şekil 4.23. Saf ve desorbe CA'nın floresans spektrumları | 131 |
| Şekil 4.24. Sentezlenen Poli(HEMA-MAH) kriyojellerinin tekrar kullanım sayıları ve operasyonel stabiliteleleri | 132 |
| Şekil 4.25. Serbest karbonik anhidrazın ısıl kararlılığı | 133 |
| Şekil 4.26. İmmobilize karbonik anhidrazın ısıl kararlılığı | 133 |
| Şekil 4.27. SDS-PAGE fotoğrafı | 137 |
| Şekil 4.28. Saf CA (1) ve CA baskılanmış poli(HEMA-MAH) kriyojellerden desorbe edilen CA'nın (2) zimogram fotoğrafları | 139 |

ÇİZELGELER DİZİNİ

| | |
|---|-----|
| Çizelge 1.1. Yüksek omurgalı α -CA izozimleri, CO ₂ hidraz aktiviteleri, sülfonamid inhibitörlere karşı afiniteleri ve hücre-altı yerleşimi ... | 6 |
| Çizelge 1.2. α -CA tarafından katalizlenen reaksiyonlar | 6 |
| Çizelge 1.3. Polimerik jellerin sınıflandırılması ve jel oluşum süreçleri | 29 |
| Çizelge 1.4. Sentezlenen kriyojellere ve uygulamalarına genel bir bakış | 32 |
| Çizelge 1.5. Sulu çözeltide peptid ve proteinlerin tanınması için sentezlenen MIP'lerin bir özeti | 42 |
| Çizelge 1.6. Kovalent ve kovalent olmayan baskılamanın bazı özelliklerinin karşılaştırılması | 49 |
| Çizelge 3.1. Kriyojellerin sentezinde kullanılan MAH monomeri ve CA miktarları | 97 |
| Çizelge 4.1. Farklı MAH ve karbonik anhidraz oranları kullanılarak hazırlanmış kriyojellerin karbonik anhidraz adsorpsiyonu kapasitelerinin karşılaştırılması | 108 |
| Çizelge 4.2. Kriyojellerin polimerizasyon verimi ve şişme özellikleri | 111 |
| Çizelge 4.3. Kriyojellerin makrogözeneklilik ve akış hızı özellikleri | 111 |
| Çizelge 4.4. Desorpsiyon ajanının seçimi | 117 |
| Çizelge 4.5. Desorpsiyon ajanının pH'ının seçimi | 117 |
| Çizelge 4.6. Desorpsiyon ajanı derişiminin seçimi | 118 |
| Çizelge 4.7. Karbonik anhidraz baskılanmış kriyojellerin seçicilikleri | 135 |
| Çizelge 4.8. Sığır eritrositi karbonik anhidraz enziminin CA baskılanmış poli(HEMA-MAH) kriyojelleri ile saflaştırılması | 138 |

1. GİRİŞ

1.1. Karbonik Anhidraz Enzimi

1.1.1. Karbonik Anhidraz Enziminin Kısa Tarihçesi

Karbonik anhidraz (CA; EC 4.2.1.1.) enzimi ilk kez 1933 yılında iki laboratuvar tarafından gerçekleştirilen çalışmaların direkt sonucu olarak eritrositlerde karakterize edilmiştir. Bu çalışmalarda eritrositlerden HCO_3^- 'in hızlı transferi için gerekli olduğu teorik olarak saptanan bir katalitik faktör araştırılmıştır. İki laboratuvar eş zamanlı olarak katalitik faktörü tanımlayan makale yayınlamışlardır. Cambridge Üniversitesindeki Dr. Roughton'un laboratuvarından tek bir enzimin ismini içeren hoş bir başlık ile bir makale hazırlanmış ("Carbonic Anhydrase: Its Preparation and Properties"), Philadelphia'dan Dr. Stadie'nin laboratuvarından ise daha az özlü bir başlıkla başka bir makale hazırlanmıştır ("The Catalysis of the Hydration of Carbon Dioxide and Dehydration of Carbonic Acid by the Enzyme Isolated from Red Blood Cells"). Cambridge makalesinin daha sık atıf almasının nedeni belki de yeni keşfedilen enzimin kendinden emin ismi kadar bilimsel ve öz başlığından dolayı olabilir.

1933'e kadar CA ilgi çeken bir enzim değildi. Bu enzim hakkındaki bunca yıllık büyük beklentilere karşılık araştırmacıların enzimi keşfi, tanımlaması ve bu katalitik faktöre "karbonik anhidraz" isminin verilmesi sonucu bilim camiasında sadece küçük bir heyecan yaratmıştı. Başlangıçta CA araştırmaları eritrositler ile ilgili olmuştur ve 1940'larda enzimin böbrekte keşfinden sonra ilgi ürenin asidifikasyonuna ve böbreğe kaymıştır. Bu arada ikinci dünya savaşının patlak vermesi ile Sör Hans Krebs Freiburg-im-Breisgau'daki laboratuvarından ayrılıp İngiltere'ye yerleşmiş ve İngilizce olarak CA inhibitörleri ve onun sülfonamid türevleri hakkında makaleler yazmıştır. Aynı zamanda ornitin hücre içi döngüsü ile üre sentezini de rapor etmiştir. Bundan sonra daha çok biyolojik döngüler keşfedilmiş ve araştırmalar bu yönde yoğunlaştırılmış ve gerçek enzim gibi hareket eden kofaktör ve efektörlü enzimler üzerinde durulmuştur. CA, bir fizyoloji ders kitabında gaz transportu üzerine yazılmış bölümde sadece bir paragraf içerisinde geçmiştir. Bu sırada, sülfonamid CA inhibitörleri geliştirilmiştir, bazıları spesifik CA inhibitörü olarak keşfedilmiş ve yüksek derişimlerde hayvan ve organ preparatlarına uygulanmıştır. Alt birim içermeme ve bu nedenle efektöre sahip olmama özelliği CA'yı farmakologlardan

uzaklaştırmıştır. Farmakologlar yüksek dozlarda CA inhibitörü asetazolamid verilmiş köpek ve ratların canlı kaldıklarını ve CA'nın gereksiz (nonessential) bir enzim olduğunu ifade etmişlerdir. CA üzerine yoğun araştırmaların yapılmasından yarım asırdan fazla bir süre önce halen CA'nın vücuttaki varlığını gösterecek kesin bir delil bulunmamıştır.

İlk CA derlemesi 1935 yılında birçok vücut organında CA aktivitesinin varlığı veya yokluğunun tanımlanması ile yayınlanmıştır. Dr. Roughton kesin olarak kaslarda CA aktivitesinin olduğunu ve karaciğerde ise olmadığını belirtmiştir. İlaveten kastaki aktivitenin zararlı olduğunu ifade etmiş ve bunun olası sebebinin de CA'nın eritrositler gibi vücudun her yerinde aynı fizyolojik fonksiyona sahip olmasını göstermiştir. 1935'den beri, çeşitli CA izozimleri kas ve karaciğerde bulunmuş ve insan vücudunda en azından onaltı farklı CA izoziminin bulunduğu ifade edilmiştir (Tashian ve Hewett-Emmett, 1984).

CA aktivitesi 1960'daki ilk saflaştırılmasından önce keşfini takip eden 30 yıl boyunca fizyologlar ve farmakologlar tarafından çeşitli dokularda yoğun bir şekilde araştırılmıştır. Enzimin o yıllardaki tek kaynağı yüksek aktivitede enzim içeren sığır eritrositidir. İnsan eritrositlerinden 1961 yılında yapılan saflaştırma iki CA formunu açığa çıkarmıştır, birisi düşük aktiviteye sahip ve diğerine göre daha fazla miktarda var olan enzim, diğeri ise düşük miktarlarda bulunmakla beraber sığır enzimideki gibi yüksek aktiviteye sahiptir. Bu yüksek ve düşük aktivitelere sahip enzimler başlarda (elektroforetik mobilitesine göre) CA C ve CA B olarak adlandırılırsalar da daha sonraları CA II ve CA I olarak isimlendirilmişlerdir. CA I ve CA II'nin amino asit dizileri 1970'lerin başında rapor edilmiş (Andersson vd., 1972; Lin ve Deutsch, 1973; Henderson vd., 1973; Lin ve Deutsch, 1974) ve CA II ve CA I'in x-ray kristal yapıları sırasıyla 1972 (Liljas vd., 1972) ve 1975 (Kanan vd., 1975) yıllarında yayınlanmıştır (Sly ve Hu, 1995).

1960'ların ortasına kadar CA'nın en dikkate değer özelliğinin karbondioksitin geri dönüşümlü hidrasyonu ile ilgili kesin özgülüğü olduğu düşünülüyordu. Fakat Pocker ve Meany (1965a,b) CA'nın ayrıca asetaldehitin hidrasyonunu katalizlediğini bulmuşlardır. Bu gözlem ilave katalitik çeşitliliğin araştırılması için birçok girişimin yapılmasına neden olmuştur ve enzimin çeşitli aldehyitlerin geri dönüşümlü hidrasyonu, 2,2-dihidroksi propiyonatın piruvata dehidrasyonu ve çeşitli aktifleşmiş esterlerin geri dönüşümsüz hidrolizini katalizlediği bulunmuştur.

Diğer başka çalışmalar ise esteraz aktivitesinin CA'nın kinetik analizinde çok kullanışlı olacağını ortaya atmışlardır (Pocker ve Beug, 1972).

İzozimlerin daha sonraki keşifleri ile numerik isimler keşif sıralarına göre verilmeye devam etmiştir. Sülfonamitlere dayanıklı bir CA erkek rat karaciğer homojenatında 1974 yılında bulunmuş ve bundan iki yıl sonra ise yine sülfonamitlere dayanıklı başka bir CA tavuk kasından elde edilmiştir. Hemen sonrasında, aynı 29 kDa'luk protein tavşan iskelet kasından saflaştırılmış ve bazik kas proteini (BMP) olarak isimlendirilmiştir. CA I ve CA II'ye göre düşük reaktivitesi ve sülfonamitlere karşı dayanıklılığı bu enzimin CA III olarak adlandırılan farklı bir enzim olarak tanınmasına neden olmuştur (Sly ve Hu, 1995).

Membran bağlı enzimin 1982 yılında sığır akciğerinden saflaştırılması CA IV'ün farklı bir enzim olarak tanımlanmasına izin vermiştir. Bu akciğer enzimini membrandan çözünür hale getirebilmek için güçlü deterjanlar gerekir, enzim 52 kDa ağırlığındadır ve karbohidrat içermektedir. İnsan CA IV enzimi böbrek proksimal hücre membranından ve insan akciğerinden de izole edilmiş ve son yıllarda oldukça yoğun biçimde çalışılmıştır (Sly ve Hu, 1995).

CA V nükleer kodlu mitokondriyal enzimdir. Mitokondrilerdeki CA aktivitesinden 1959 yılında şüphelenilmiş ve mitokondriyal metabolizma üzerine CA inhibitörlerinin etkisi ile varlığı gösterilmiştir (Sly ve Hu, 1995).

CA VI izozimi tükürükte bulunan salgı glikoproteinidir. 1946'da tükürükte CA aktivitesi tanımlanmasına rağmen ancak 1979'da tükürük CA'sı koyundan izole edilmiş ve diğer CA'lardan farklı olarak değerlendirilmiştir (Sly ve Hu, 1995).

CA VII, protein olarak tanımlanmasından önce diğer CA'lar ile genetik homolojisinden dolayı tanımlanmış ve bu yüzden "sanal enzim" olarak adlandırılmıştır (Sly ve Hu, 1995).

1.1.2. CA Enzimi Hakkında

Metaloenzim karbonik anhidraz (CA, EC 4.2.1.1) çok basit fakat önemli bir fizyolojik reaksiyon olan karbondioksitin bikarbonat ve protona hidrolizini katalizler (Eşitlik 1.1).



Bu reaksiyon katalizörsüz olarak da çok yavaş bir şekilde meydana gelir. Karbondioksit, bikarbonat ve proton filogenetik ağaç içindeki tüm yaşayan organizmalarda (*Bakteri*, *Archaea* ve *Eukarya*) birçok önemli fizyolojik işlemde esasi moleküller/iyonlar olduklarından ve bu organizmaların farklı doku/hücre kompartmanlarında bağıl olarak yüksek miktarlarda bulduklarından dolayı, CA en az beş kez bağımsız olarak evrim geçirmiştir ve günümüzde genetik olarak farklı beş enzim ailesi bilinmektedir: α -, β -, γ -, δ - ve ϵ -CA'lar (Supuran, 2010). α -CA hayvanlarda çok yaygındır ve omurgalılar tarafından eksprese edilen tek CA gen ailesidir. α -CA geni birçok bitki, alg ve bakteride de bulunmasına rağmen, bu canlılarda β -CA'lar daha baskındır. Bazı omurgasızlar da ayrıca β -CA geni bulundurur. γ -CA *Archaea* ve bazı bakterilerde bulunurken δ - ve ϵ -CA deniz diatomlarında (fitoplanktonların en yaygın tipi olan algler) bulunmaktadır. Tümü metaloenzimdir; α -, β - ve δ -CA'lar aktif bölgesinde Zn(II) iyonu içerirken, γ -CA muhtemelen Fe(II) enzimidir [fakat Zn(II) veya Co(II) iyonları ile de aktiftir]. ϵ -sınıfı fizyolojik reaksiyonu katalizlemek için Cd(II) veya Zn(II) kullanır. Beş enzim sınıfının üç boyutlu yapısı oligomerizasyon durumlarından dolayı birbirinden oldukça farklıdır: α -CA normalde monomer seyrekte olsa dimerdir, β -CA dimer, tetramer veya oktamer, γ -CA trimer iken, δ - ve ϵ -CA'lar muhtemelen monomerdir fakat son sınıf aynı protein iskeleti üzerinde üç farklı aktif merkez bulunduğu için dolayı pseudotrimerdir. δ -CA dışında tüm bu enzim sınıfları kristallendirilmiş ve karakterize edilmiştir (Gilmour, 2010).

CA'lar birçok organizmada solunum ve CO₂/bikarbonat taşınımı, pH ve CO₂ homeostasisi, çeşitli organ ve dokularda elektrolit salınımı, biyosentez reaksiyonları (glukoneogenez, lipogenez ve ureagenez gibi), kemik resorpsiyonu, kalsifikasyon, tümör oluşturma ve diğer pek çok fizyolojik veya patolojik işlemde kritik rol oynar, buna karşın algler, bitkiler ve bazı bakterilerde, fotosentez ve diğer biyosentez reaksiyonlarında önemli rol oynarlar. Diatomlarda δ - ve ϵ -CA'lar karbondioksit fiksasyonunda önemli rol oynar.

CA'ların katalitik mekanizması detaylı bir şekilde anlaşılmıştır. Tüm enzim sınıflarında enzimin metal hidroksit türü ($L_3-M^{2+}-OH^-$) katalitik olarak aktif türdür ve yakındaki hidrofobik cepte bulunan CO₂ molekülüne karşı güçlü nükleofil olarak davranır (nötral pH'ta). Bu metal hidroksit türü, aktif merkez yarığının dibinde yer alan metal iyonuna koordine olmuş sudan meydana gelir. Aktif merkez normalde su molekülü/hidroksit iyonuna ek olarak üç protein ligandı (L) ile tetrahedral geometride M(II) içerir, fakat Zn(II) ve Co(II) en azından γ -CA'da

trigonal bipiramit veya oktahedral koordinasyon geometrisinde bulunur. Birçok enzimde, metal-koordineli sudan metal hidroksit türünün oluşumu katalitik turnoverin hız belirleyen adımıdır, bazı α - ve ε -CA'ları $k_{cat}/K_M > 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ değerine ulaşarak CA'yı doğada bilinen en etkili katalizör haline getirir. Metal iyon ligantları α -, γ -, δ -CA'larda üç His amino asidi iken β - ve ε -CA'larda bir His iki Cys amino asididir. Bazı β -sınıfı enzimler dört amino asit ligandına sahiptir, bir His, iki Cys ve bir Asp Zn(II)'ye koordine olmuştur.

Günümüzde, memelilerde 16 farklı α -CA izoformu izole edilmiş ve karakterize edilmiştir (Çizelge 1.1.) . Bazıları sitozolik (CA I, CA II, CA III, CA VII ve CA XIII), bazıları membran bağlı (CA IV, CA IX, CA XII, CA XIV ve CA XV) olup CA VA ve CA VB mitokondriyal ve CA VI tükürük ve sütte salgılanmaktadır. Üç tane katalitik olmayan form bilinmektedir ve bunlar sitozolik olarak görünen CA-ilişkili proteinler (CARP) olarak tanımlanıp CARP VIII, CARP X ve CARP XI olarak isimlendirilmiştir (Supuran, 2010).

Karbondioksitin bikarbonata geri dönüşlü hidrasyonu (Çizelge 1.2.'de reaksiyon 1) olan fizyolojik reaksiyonuna ek olarak CA'lar birçok başka reaksiyonu da katalizler; örneğin: siyanatın karbamik aside (reaksiyon 2) veya siyanamidin üreye (reaksiyon 3) hidrasyonu, *gem*-diollere aldehit hidrasyonu (reaksiyon 4), karboksilik (reaksiyon 5) ve sülfonik (reaksiyon 6) esterlerin hidrolizi ve daha az incelenen hidrolitik reaksiyonlar (reaksiyon 7-9) (Çizelge 1.2.). CA III'ün fosfataz aktivitesi son zamanlarda rapor edilmiştir (Supuran vd., 2004). Günümüzde CA'ın CO₂ hidrasyonu dışında katalizlediği reaksiyonların hangisinin fizyolojik öneme sahip olduğu bilinmemektedir.

Çizelge 1.1. Yüksek omurgalı α -CA izozimleri, CO_2 hidraz aktiviteleri, sülfonamid inhibitörlere karşı afiniteleri ve hücre-altı yerleşimi

| İzozim | Katalitik aktivitesi (CO_2 hidrasyonu) | Sülfonamidlere karşı afinitesi | Hücre-altı yerleşimi |
|-----------|--|--------------------------------|-----------------------|
| CA I | Orta | Orta | Sitozol |
| CA II | Yüksek | Çok yüksek | Sitozol |
| CA III | Çok düşük | Çok düşük | Sitozol |
| CA IV | Yüksek | Yüksek | Membran-bağlı |
| CA VA | Düşük-vasat | Yüksek | Mitokondri |
| CA VB | Yüksek | Yüksek | Mitokondri |
| CA VI | Orta | Yüksek | Tükürük ve süte salgı |
| CA VII | Yüksek | Çok yüksek | Sitozol |
| CARP VIII | Katalitik değil | - | Sitozol |
| CA IX | Orta-yüksek | Yüksek | Membranlar arası |
| CARP X | Katalitik değil | - | Salgı |
| CARP XI | Katalitik değil | - | Salgı |
| CA XII | Düşük | Çok yüksek | Membranlar arası |
| CA XIII | Orta | Orta-yüksek | Sitozol |
| CA XIV | Orta | Yüksek | Membranlar arası |
| CA XV | Düşük | Bilinmiyor | Mebran bağlı |

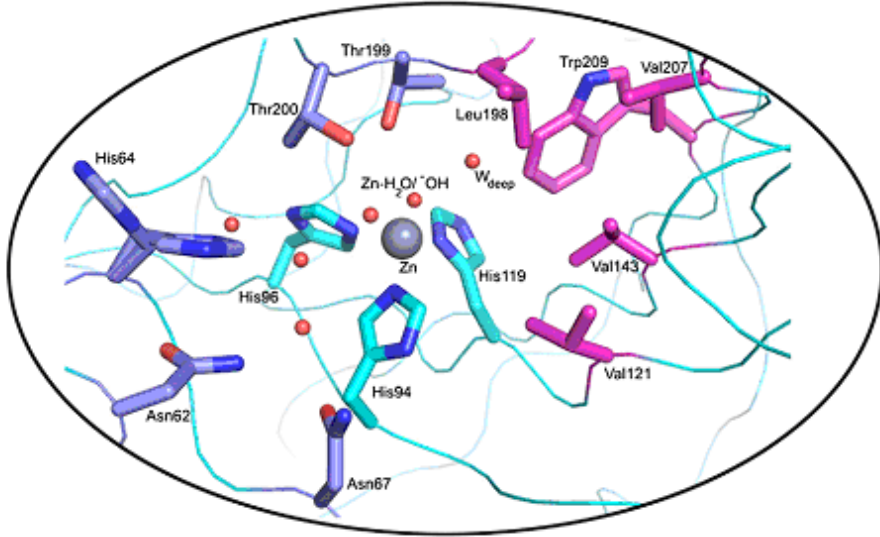
(Kaynak: Supuran ve Scozzafava, 2007).

Çizelge 1.2. α -CA tarafından katalizlenen reaksiyonlar

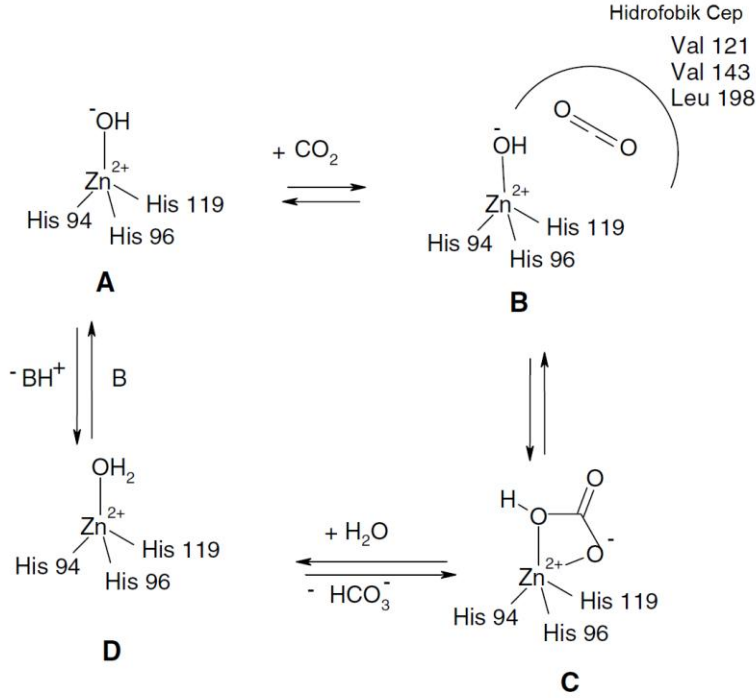
| Reaksiyon tipi | Reaksiyon |
|--|-----------|
| $\text{O}=\text{C}=\text{O} + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$ | 1 |
| $\text{O}=\text{C}=\text{NH} + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{H}_2\text{NCOOH}$ | 2 |
| $\text{HN}=\text{C}=\text{NH} + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{H}_2\text{NCONH}_2$ | 3 |
| $\text{RCHO} + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{RCH}(\text{OH})_2$ | 4 |
| $\text{RCOOAr} + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{RCOOH} + \text{ArOH}$ | 5 |
| $\text{RSO}_3\text{Ar} + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{RSO}_3\text{H} + \text{ArOH}$ | 6 |
| $\text{ArF} + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{HF} + \text{ArOH}$ | 7 |
| (Ar = 2,4-dinitrofenil) | |
| $\text{PhCH}_2\text{OCOC}l + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{PhCH}_2\text{OH} + \text{CO}_2 + \text{HCl}$ | 8 |
| $\text{RSO}_2\text{Cl} + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{RSO}_3\text{H} + \text{HCl}$ | 9 |
| (R = Me; Ph) | |

(Kaynak: Supuran ve Scozzafava, 2007).

X-ışını kristal yapıları 6 α -CA için tanımlanmıştır. Zn(II) iyonu CA katalizi için esastir. X-ışını kristalografik veriler göstermiştir ki, metal iyonu aktif merkez yarığının 15 Å derininde yer almaktadır ve üç histidin birimi (His 94, His 96 ve His 119) ve bir su molekülü/hidroksit iyonu ile koordine halindedir (Şekil 1.1.). Çinko-bağlı su ayrıca Thr 199 hidroksil grubu ile hidrojen bağı yapmıştır ve bu Glu 106'nın karboksilat birimine bağlıdır. Bu etkileşimler çinko-bağlı su molekülünün nükleofilitesini artırır ve substratın (CO_2) nükleofilik atak için uygun pozisyonu almasını sağlar. Enzimin aktif formu Zn(II)'ye hidroksit bağı halidir (Şekil 1.2. A). Bu güçlü nükleofil, hidrofobik cepte komşu gruplara (Val 121, Val 143 ve Leu 198) bağı olan CO_2 molekülüne atak yapar ve Zn(II) ile koordineli bikarbonat oluşumuna sebep olur. Bikarbonat iyonu su molekülü ile yer değiştirir ve çözeltiye salınır, böylece Zn(II) ile suyun koordinasyonu ile katalitik olarak inaktif olan enzimin asidik formu oluşur. Temel formun tekrar oluşması için, aktif merkez birimleri veya ortamdaki tampon tarafından protonun aktif merkezden çevreye transfer reaksiyonu gerçekleşir. Bu işlem şematik olarak Şekil 1.2.'de gösterilmiştir.



Şekil 1.1. İnsan CA II'nin aktif merkezi. Aktif merkez enzimin merkezine yakın bir konumdadır. Çinko üç histidin (türkuaz) ve bir su ile koordinelidir. Hidrofobik cepteki amino asitler mor ile gösterilmiştir ve bunlar CO_2 'in bağlanmasında sorunludurlar. Hidrofobik cebin karşısında bulunan hidrofilik cep (mavi) CO_2 'in yönelmesi ve proton transferinde görev alır (Domsic ve McKenna, 2010).



Şekil 1.2. CA katalizli CO₂ hidrasyonu için katalitik mekanizmanın şematik gösterimi.

Katalizde hız sınırlayan adım enzimin çinko-hidroksit halini oluşturan proton transferi reaksiyondur. CA II, CA IV, CA V, CA VII ve CA IX gibi katalitik olarak çok aktif izoenzimlerde, bu işlem aktif bölgenin girişindeki histidin amino asidi tarafından yürütülür (His 64). Bu aynı zamanda difüzyon kontrol sınırına yaklaşan CA II'nin neden bilinen en hızlı enzimlerden birisi ($k_{\text{cat}}/K_m = 1,5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) olduğunu açıklar (Supuran vd., 2003).

1.1.3. CA Ailesi

1.1.3.1. α -CA

Çoklu CA izoformlarının keşfi ile araştırmacılar memelilerde ek CA izoformlarının tanımlama üzerine yoğunlaşmışlardır. Kinetik özellikler, inhibitörlere duyarlılık, hücre içi konumu ve son zamanlarda moleküler dizi bilgileri kullanılarak, memelilerde 16 α -CA izoformu tanımlanmış ve bu izoformlar arasındaki evrimsel ilişki araştırılmıştır. Üç izoform, VIII, X ve XI, katalitik mekanizmanın merkezindeki çinko iyonu ile koordine olan üç histidin biriminin biri veya daha

fazlasının süstitusyonu nedeni ile katalitik aktiviteden yoksundur. Bu izoformlar CA-İlgili proteinler (CARP) olarak adlandırılır ve tümü de beyinde eksprese edilir (ve CA VIII diğer dokularda) fakat fonksiyonları bilinmemektedir. Diğer memeli enzimleri katalitik aktivite gösterir ve hücre içi konumlarına göre iki geniş grup altında sınıflandırılırlar. Bu izoformların çoğu çeşitli dokularda eksprese edilirler. Hücre içi CA'lar iki mitokondriyal (V_A ve V_B) ve beş sitozolik izoformu (I, II, III, VII ve XIII) içermektedir ve CA V_A ve CA V_B onları mitokondriye hedefleyen bir lider sekansa sahiptir. Sitozolik izoformlar arasında katalitik aktivite oldukça değişkendir: CA II (k_{cat} değeri $1 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ 'i geçer) ve VII için oldukça yüksekken, CA I ve III için oldukça düşüktür (sırasıyla CA II'nin katalitik aktivitesinin yaklaşık % 10'u ve % 1'i kadar). Bazı durumlarda, katalitik aktivitenin değişimi amino asit süstitusyonuna dayanmaktadır. Örneğin, CA III'ün düşük aktivitesi proton mekiği olarak davranan histidinin (His 64) yerine lizinin geçmesi nedeniyle proton transferindeki aksaklığa dayanmaktadır.

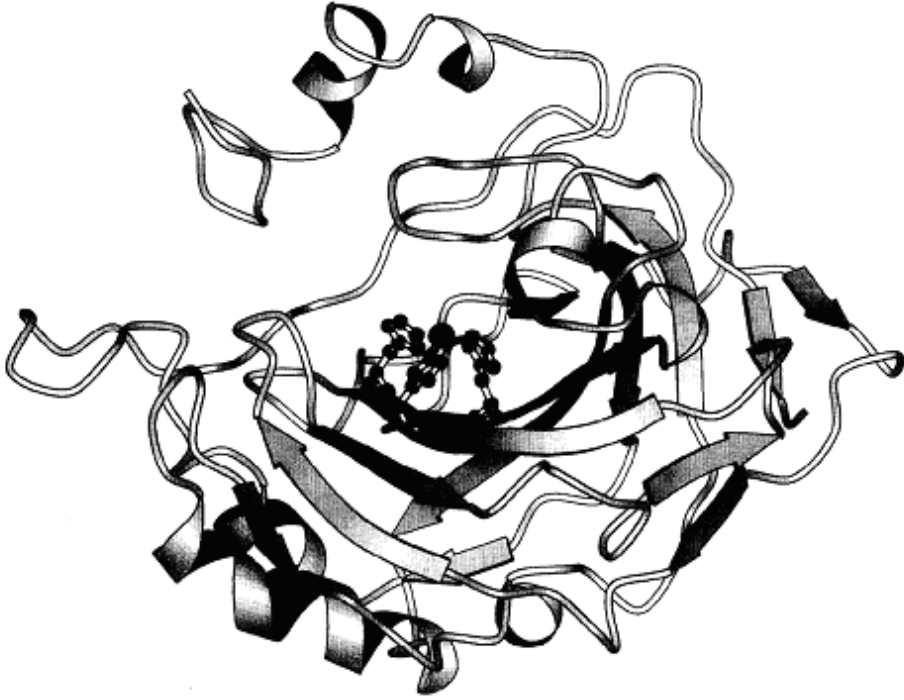
Hücre dışı CA'lar membran-bağlı izoformlar yanında (IV, IX, XII; XIV, XV) salgılanan tek form olan CA VI'yı da içerir. IX, XII ve XIV CA'lar tek geçişli transmembran proteinleri olarak eksprese edilirler (CA IX ve XII normal olarak böbrek veya gastrointestinal sistem gibi epitelyum dokuların bazolateral membranlarında oluşurken, CA XIV apikal membrana salgılanır). CA IV ve XV bir glikozilfosfatidilinositol (GPI) bağı ile plazma membranına gömülüdürler ve tipik olarak apikal membranda bulunmaktadırlar. Membran bağı CA'lar da değişken katalitik aktivitelere sahiptirler. CA IV'ün k_{cat} değeri CA II'ye yakın iken, IX, XII, XIV ve XV ortalama aktivitelere sahiptir (CA II'nin aktivitesinin % 22-34'ü kadar). Bu sebeple, memeli α -CA izoformları onlara spesifik fonksiyonlar kazandıran farklı hücre altı lokalizasyonlara ve katalitik aktivitelere sahiptirler. Birçok dokuda, çoklu CA izoformları eş zamanlı olarak çalışırlar; örneğin, memeli böbreği en azından üç izoform (CA II, IV ve XII) ve kemirgenler beş izoform (sayılan üç izoforma ek olarak XIV ve XV) eksprese eder. Renal asit-baz regülasyonu için gerekli asit-baz dengesini oluşturan ek bir fonksiyona sahiptirler (Gilmour, 2010).

α -sınıfı karbonik anhidrazlar memelilerdeki 16 izozimi ile en iyi karakterize edilendir. Bazı izozimler bazı hastalık durumlarının göstergesidir ve bunların tedavisinde sülfonamidler karbonik anhidraz aktivitesini inhibe ederek kullanılmaktadırlar.

α -sınıfı karbonik anhidrazlar katalizin mekanizması açısından en yoğun çalışılanlardır. Son ilerlemeler hız-sınırlayan proton transfer adımı üzerine odaklanmıştır. Çeşitli α -sınıfı izozimlerinde, His 64 kendisi ve çinko-bağlı su molekülü arasında bulunan aktif merkez su molekülünden bir protonu kabul eder. Bir proton mekiği birimi (PSR) olan His 64, PSR olarak fonksiyon gösteren diğer birimler ile yer değiştirebilir. Bu durum farklı yapılarıdaki araya giren su zincirleri ile meydana gelen proton transferinde önerilenler ile uyumludur. Gerçekte, moleküler dinamik simülasyonlar göstermiştir ki, araya giren su molekülü sayısı iki ile altı arası değişmektedir. İnsan CA-II kristal yapısı His 64'ü ya "içeri" (çinkoya doğru) ya da "dışarı" pozisyonda göstermektedir. His 64'ün bu değişimi aktif merkez ağzındaki aktif merkez suyu ve çözgen suyu arasındaki proton transferini kolaylaştırmaktadır (Tripp vd., 2001).

α -sınıfı karbonik anhidrazlar çinkoya pikomoların altında afiniteleri ile karakterize edilirler ki bu durum metaloproteinlere metal iyonunu bağlanmasının temel özelliklerinin araştırılması için örnek bir sistem oluşturmaktadır. Günümüzde çalışmalar metal bağlama özgülüğünü ve isteğini etkileyen çözgen termodinamikleri ve aktif merkezin yapısal özellikleri üzerine odaklanmıştır. Sonuçlar insan CA II'de hidrofobik merkez birimleri için önemli role işaret etmektedir ki bu durumda histidin ligandı çinko bağlamayı kolaylaştıracak fakat diğer metallerin bağlanmasını geometrik olarak engelleyecek şekilde yönelmiştir (Tripp vd., 2001)

İnsan CA I ve II, sığır CA III ve *E. coli* tarafından sentezlenen fare CA V'in kesilmiş formunun kristal yapıları saptanmıştır. Hint mandasından CA II'nin de yapısına ulaşılabilir. Bu izozim formlarının genel yapısı birbirlerine oldukça benzerdir. Moleküller yaklaşık $5 \times 4 \times 4 \text{ nm}^3$ boyutları ile neredeyse küreseldir. Molekülün geri kalanına gevşek olarak bağlı olan amino terminal bölgesinin (yaklaşık 24 amino asitlik) istinası ile bu α -CA tek-domainli protein olarak ele alınabilir. Hakim sekonder yapı molekülü iki yarıya bölen 10 bükülmüş ve kıvrılmış β -tabakadır (Şekil 1.3.). Paralel kıvrımların iki çifti dışında β -tabaka antiparaleldir. Az sayıda kısa heliksler molekülün yüzeyinde bulunmaktadır.



Şekil 1.3. İnsan CA II'nin yapısının şematik gösterimi. Heliksler ve β -katlanmalar sırasıyla kıvrımlar ve oklar ile gösterilmiştir. Çinko iyonu merkezde yuvarlak daire şeklinde gösterilmiştir. Ayrıca üç histidin ligandı da belirtilmiştir (Lindskog, 1997).

Enzimin yapısında aromatik amino asitlerin kümelendiği iki adet bölge bulunmaktadır. Bunlardan birisi, CA II'de Trp 5, Tyr 7, Trp 16 ve Phe 20'dir ve amino terminal ucu molekülün geri kalanına yapıştırır. Fare CA V'i aynı pozisyonlarda sırasıyla Glu, His, Trp ve Val içerir ve bu sebeple bu aromatik kümeden yoksundur. Bununla birlikte, CA V'in kesilmiş formu N-terminal uçtan itibaren 21 amino asitten yoksun olmasına rağmen tamamen aktiftir ve kristal yapı çalışmalarında kullanılmıştır. Dahası insan CA II'sinde N-terminal uçtaki 23 amino asitlik kısım protein stabilitesinde ve enzimatik aktivitesinde önemli bir kayıp olmadan uzaklaştırılabilir. Diğer ve daha geniş aromatik küme β -tabaka üzerinde bulunmaktadır. CA II'de Phe 66, Phe 70, Phe 93, Phe 95, Trp 97, Phe 176, Phe 179 ve Phe 226'dan oluşmaktadır.

Aktif merkez neredeyse molekülün merkezine ulaşan geniş, konik şekilli yarık içinde yer almaktadır. Çinko iyonu yarığın dibi yakınlarındadır. Dördüncü ligand olarak bir H_2O veya OH^- ile birlikte, His 94, His 96 ve His 119'un üç azot atomu

ile tetrahedral geometride koordineli haldedir. Ligantlar “indirekt ligantların” bir kabuğunun olduğu proteindeki diğer gruplara hidrojen bağı ile bağlanarak pozisyonlarını korurlar. Metal iyon ligantları ve indirekt ligantlar α -CA’ların tüm sekanslarında (His 96’ya ana zincir karbonil grubu ile bağlanan 244 birimi dışında) değişmezdir. Bununla birlikte, CA-İlgili proteinler (MN veya CA IX dışında) bir veya daha fazla çinko ligandından yoksundur.

Direkt ve indirekt çinko ligantlarına ek olarak, 17 amino asit birimi tüm α -CA’larda sıkı bir şekilde korunmuştur. Bu birimlerden bazıları katalitik aktivite için önemli iken, diğerleri protein yapısını sağlamlaştırmak ile ilgilidir. Gerçekte, α -CA’lar ve α -CA-İlgili proteinlerin bilinen tüm aileleri arasında sadece 10 amino asit birimi tamamen değişmezdir. Bunlar, Gln 28, Ser 29, Pro 30, Asn 61, Ser 105, Glu 117, Gly 196, Thr 199, Trp 209 ve Arg 246’dır. Bunlardan ikisi, Glu 117 ve Thr 199, aktif enzimde indirekt ligand olarak fonksiyon görürler (Lindskog, 1997).

1.1.3.2. β -CA

β -sınıfının anlaşılması α -sınıfının çok gerisinde kalmıştır. Gerçekte herhangi bir β -sınıf karbonik anhidraz için ilk kristal yapı 2000 yılında rapor edilmiştir (Mitsuhashi vd., 2000). Başlarda bu enzimin sadece bitkilerde var olduğu düşünülürken, günümüzde β -sınıfı karbonik anhidrazlar çeşitli alglerden izole edilmiş ve *Bacteria* ve *Archaea* türlerinde yaygın olarak bulunmuştur. β -sınıfının karakterizasyonu sonucu bu sınıfın diğer iki sınıftan keskin farklılıklarla ayrıldığını göstermektedir. α -sınıfı ve γ -sınıfı enzimler sırasıyla monomer ve trimer iken β -sınıfının üyeleri dimer, tetramer, hegzamer ve oktamerdir. Tetramer, hegzamer ve oktamer yapıdaki enzimlerin dimerlerin birleşmesiyle meydana geldiği önerilmektedir. Dahası, sekonder yapıdaki farklılıklar kristal yapıda da görülmektedir. Son olarak, β -sınıf kristal yapısı çinkonun iki sistein ve bir histidin ile bağlandığını göstermektedir.

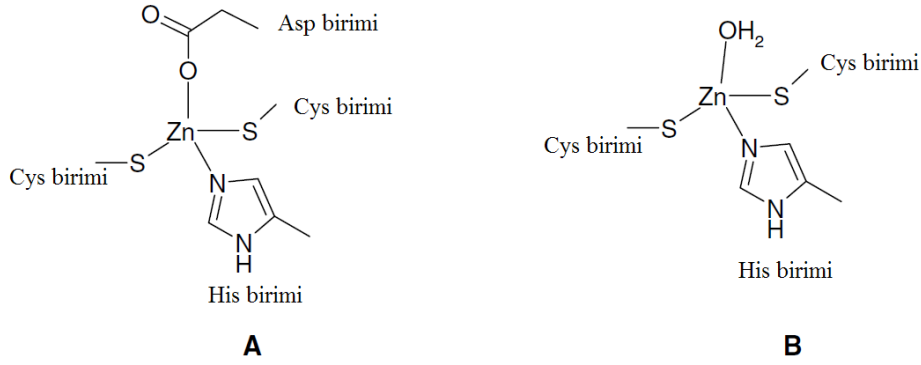
Filogenetik analizler sonucunda β -sınıfının diğer iki sınıftan daha çok değişkenlik gösterdiği anlaşılmıştır. Sekans analizlerinden sadece 5 birim, 3 çinko ligandı ve bir aspartat ve bir arjinin amino asidinin tamamen korunduğu sonucuna varılmıştır. Bitki amino asit dizisi aynı atadan gelen iki monofiletik tür oluşturur: çift çenekli ve tek çenekli bitkiler. Diğer amino asit dizileri aynı atadan beş türe ayrılır. Bu dizilerden birisi başlangıç olarak düşünülmektedir ve diğer türlere göre evrimsel olarak daha uzaktadır. Bu sınıf (*Archaea Methanobacterium thermoautotrophicum*

dan “Cab” enzim olarak temsil edilmiştir) bakterilerde *Archaea* ve Gram-pozitif türlerin sekanslarından oluşmaktadır. Bu dağılım bir kırmızı alg (*Porphyridium purpureum*), bezelye (*Pisum sativum*) ve prokaryotlar bir *Archaea* (*M. thermoautotrophicum*) ve bir bakteri (*Escherichia coli*) enzimlerinin kristal yapıları ile desteklenmiştir. Bezelye enzimi homodimerlerin bir dimeri iken algal enzim yapısal olarak ilgili ve her biri aktif merkeze sahip iki monomerli bir homodimerdir. *P. sativum* ve *M. thermoautotrophicum* (Cab) enzimlerinin aktif merkezlerinin çakıştırılması üç çinko ligandın neredeyse mükemmel bir uyumunu sergiler ve β -sınıfı aspartatları ve arjininleri korunmaktadır, bununla birlikte bir su molekülü sadece Cab'ta ligand halindedir. Asetatta kristallendirilen *P. sativum* enziminde bir asetat molekülü dördüncü çinko ligandı olarak su molekülü ile yer değiştirmiştir. İlginçtir ki, hem *P. purpureum* ve hem de *E. coli* enzimlerindeki dördüncü çinko ligandı β -sınıfının korunmuş aspartatıdır. *P. sativum* enziminin Gln 151, Phe 179 ve Tyr 205 birimleri A-F soylarındaki tüm ökaryotik ve bakteriyel enzimlerde korunmuşken *M. thermoautotrophicum* Cab enzimi gibi aynı atadan gelen (G soyu) diğer tüm karbonik anhidraz soylarının sekanslarında yok olmuştur. Bu gözlem ile önerilmiştir ki, β -sınıfı iki alt sınıftan oluşmaktadır: “bitki tipi” ve “Cab tipi”. İki alt sınıf arasındaki yapısal farklılıklar ve inhibitörlere verdikleri farklı cevaplar kataliz mekanizmalarının da farklı olacağı izlenimini vermektedir (Tripp vd, 2001)

Bakterilere ait birçok tür, bazı *Archaealar* (*Methanobacterium thermoautotrophicum* gibi), algler ve yüksek bitkilerin kloroplastları β -sınıfına ait CA taşırlar. Bu enzim ile α -CA arasındaki temel farklılık β -CA'ların oligomer olmalarıdır ve genellikle molekül kütleleri 25-300 kDa arasında değişen 2-6 monomerden oluşurlar. Bazı β -CA enzimlerinin X-ışını yapıları tanımlanmıştır. Bunlar kırmızı alg *Porphyridium purpureum*'dan, *Pisum sativum* kloroplastlarından, *Escherichia coli*'den ve *Archaeon* *M. thermoautotrophicum*'dan izole edilen enzimlerdir.

P. purpureum CA monomerleri iki içten tekrar eden bir α/β domaini ve üç α -heliksin eşdeğer motifinin çiftinden oluşan bir yapıya sahiptir. Bu motif α - veya γ -CA'larından oldukça farklıdır. Bu homodimerik CA yalancı 2-2-2 simetride bir tetramere benzer görünmektedir. β -CA α -sınıf enzimlerden bu sebeple oldukça farklıdır. Zn(II) iyonu enzimin tüm ailesinde kataliz için esastır, fakat koordinasyonları farklıdır. Dahası β -CA için deşikendir: prokaryotik β -CA Zn(II) iki sistein birimi, bir His birimi imidazolü ve bir Asp birimi karboksilatı ile

koordineli iken (Şekil 1.4. A), kloroplast enzimi Zn(II) iyonuna koordineli iki sistein, bir His birimi imidalozü ve bir su molekülü içerir (Şekil 1.4. B). Polipeptid zincir katlanması ve aktif merkez yapısı α -sınıf CA'larından oldukça farklıdır.



Şekil 1.4. β-CA enziminin Zn(II) koordinasyon yapılarının şematik gösterimi: (A) *Porphyridium purpureum* ve *Escherichia coli* enzimleri; (B) *Pisum sativum* ve *Methanobacterium thermoautotrophicum* enzimleri. (Supuran ve Scozzafava, 2007).

Dikotiledon bitki *P. sativum*'dan β-CA yapısı 1.93 Å'da incelenmiş ve molekülün dimer dimer düzenlenmesinde bir oktamere olduğu saptanmıştır. Aktif merkez iki monomerin arayüzünde yer almaktadır. Cys 160, His 220 ve Cys 223 katalitik çinko iyonunu bağlarken Asp 162 (Arg 164 tarafından yönlendirilmiş), Gly 224, Gln 151, Val 184, Phe 179 ve Tyr 205 asetik asit etkileşim halindedir. Substrat bağlama grupları α -CA aktif merkezdeki fonksiyonel gruplar ile bire bir benzerdir. Karşılıklı olan birimler ayna düzlemi ile birbirine üzerine katlanabilir. Bu sebeple, α -ve β -CA'ların farklı moleküler katlanmalara sahip olmalarına rağmen aktif merkez yapıları çok yakındır ve benzer kataliz mekanizmasına sahiptirler.

Cab dimer yapıdadır ve alt birimleri bitki-tipi β-CA'da gözlemlenene benzer katlanmalara sahiptir. Aktif merkez çinko iyonu Cys 32, His 87 ve Cys 90 amino asit birimleri ile birlikte tetrahedral koordinasyonu tamamlayacak şekilde su ile koordineli haldedir. Bitki- ve cab-tipi β-CA'lar arasındaki temel farklılık hidrofobik cebin organizasyonudur (yukarıda bahsedilen çinko koordinasyonu dışında) (Supuran ve Scozzafava, 2007).

1.1.3.3. γ -CA

γ -sınıfının 3,0 ile 4,5 milyar yıl önce evrimleştiği düşünülmektedir ve bu sebeple α -sınıfın 200-300 milyon yıl önceki evriminden önce gelmektedir. Karakterize edilen tek γ -sınıfı enzim *Archaeon Methanosarcina thermophila*'dan "Cam"'dır. Cam sol-el paralel β -heliks katlanma içeren bir homotrimerdir. Cam *E. coli*'de yüksek seviyelerde bir çinko enzimi verecek şekilde heterolog olarak üretilmiştir, bununla birlikte demir- ve kobalt-sübstitüe formları çinko enzimden daha yüksek CO₂ hidrasyon hızları sergilerler, bu sebeple Cam'ın fonksiyonu için *M. thermophila*'da çinkodan farklı geçiş metallerini kullandığı düşünülmektedir.

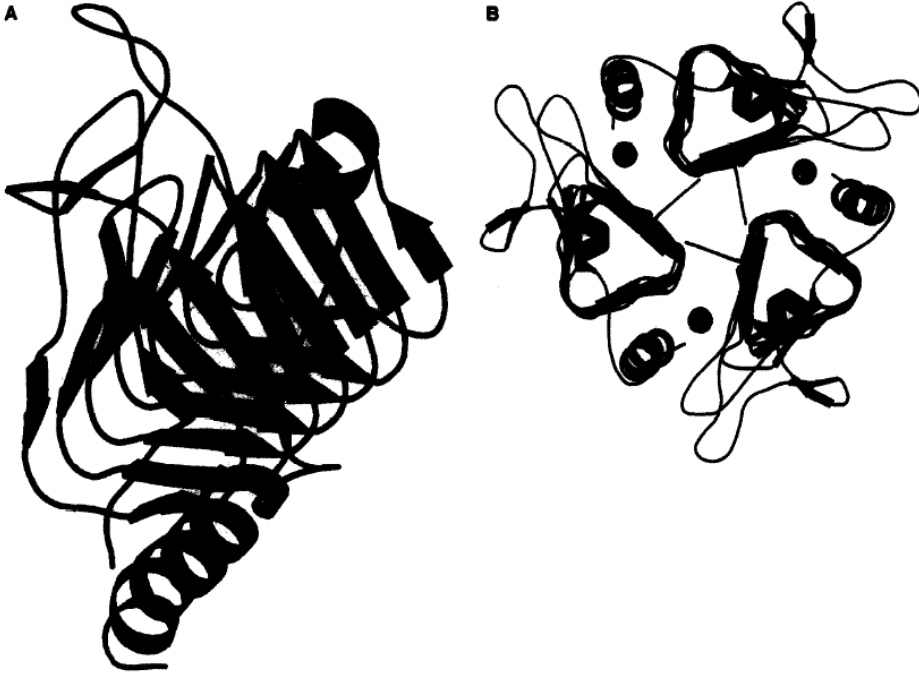
Cam hız sınırlayan adım olarak proton transportu ile katalizde bir metal hidroksit mekanizmasını kullanır. Birçok α -sınıfı enzimin tersine Cam substrat olarak *p*-nitrofenil asetat ile esteraz aktivitesi sergilemez ve sülfonamidler ile inhibisyonları α -sınıf ile karşılaştırıldığında düşüktür. Metal bağlama bölgesi monomerik α -sınıfına benzer şekilde tetrahedral geometrideki üç histidin biriminden oluşur, bununla birlikte Cam'da histidinlerin ikisi (His 81, His 122) bir monomerden verilirken diğeri (His 117) komşu monomerden sağlanmaktadır (Tripp vd., 2001).

Çinko içeren ve kobalt içeren Cam'ın kristal yapıları bağısız formda ve sülfat veya bikarbonat ile ko-kristallenmiş formda rapor edilmiştir. Cam kendini α - ve β -CA'lardan ayıran çeşitli özelliklere sahiptir. Bu sebeple, protein katlanması dışarı çıkan üç loop tarafından kesilen sol-el β -heliks motifinden oluşur ve yapı bir kısa ve bir uzun α -heliks tarafından devam eder. Cam monomeri yaklaşık 70 kDa molekül ağırlığındadır ve bir homotrimer oluşturmak üzere kendiliğinden bir araya gelir (Supuran ve Scozzafava, 2007). Aktif bölgedeki Zn(II) iyonu α -CA'da olduğu gibi üç histidin birimi ile koordineli haldedir, fakat α -CA'nın aktif merkezinde gözlenen tetrahedral geometriye karşın γ -CA aktif merkezi ek metal-bağlı su ligandı taşır, bu sebeple tüm koordinasyon geometrisi çinko-içeren Cam için trigonal-bipiramit, kobalt sübstitüe enzim için oktahedraldir. Metal iyona koordine olan His birimlerinin ikisi bir monomere (monomer A) ait iken üçüncü birim komşu monomere (monomer B) aittir. Bu sebeple, üç aktif merkez monomer çiftleri arasındaki arayüzde bulunmaktadır (Innoncenti vd., 2004).

M. thermophila'dan γ -CA yapısı Şekil 1.5.'de sunulmuştur. Bu mükemmel, trimerik molekül farklı atalardan geldiklerini vurgular şekilde α -CA'dan tamamen farklı katlanmalara sahiptir. Her bir alt birim her dönüşünde üç kısa büküme sahip

bir sol-el β -heliksin yedi döngüsüne sahiptir. Heliksin enine kesiti üçgen biçimlidir (İsviçre çikolataşı “Toblerone” şeklinde). β -heliksin tepesinde kısa bir α -heliks ve uzun bir C-terminal α -heliks vardır.

Çinko iyonu Şekil 1.5.’de gösterildiği gibi alt birimler arasında yer almaktadır ve bir alt birimdeki His 81 ve His 122 ile ve komşu alt birimdeki His 117 ile koordineli haldedir. Bir su molekölü bozulmuş tetrahedral koordinasyon geometrisi oluşturur. *M. thermophila* CA’sı ve insan CA II’deki metal merkezlerin üst üste çakıştırılması dikkate değer bir benzerlik vermektedir.



Şekil 1.5. *M. thermophila* γ -CA'nın yapısının şematik gösterimi (Lindskog, 1997).

1.1.3.4. δ -CA

1997’de, Roberts (1997) bir deniz diatomu *Thalassiosira weissflogii*’den 27 kDa’luk monomerik bir karbonik anhidrazın (TWCA1) saflaştırılmasını rapor etmiştir. Katalitik çinko X-ışını absorpsiyon spektroskopisi ile gösterilmiştir ve α -sınıf ve γ -sınıf karbonik anhidrazların aktif merkezlerine benzer şekilde üç histidin ve bir su molekölü ile koordine haldedir. Henüz kararlı-hal kinetiği rapor edilmemesine rağmen dördüncü ligand olarak bir su molekölünün varlığı bu enzimin diğer üç sınıfın çinko hidroksit mekanizmasını takip ettiği sonucunu

önermektedir. TWCA1 karbonik anhidrazın bilinen üç sınıfına benzer biyokimyasal özelliklere sahip olmasına rağmen TWCA1'i kodlayan genin sekansı bu üç sınıf ile önemli benzerlik taşımamaktadır. Ek olarak, bu sekansın *Archaea*, *Bacteria* ve *Eukarya* türlerinin sekansı ile benzerliği bulunamamıştır. Bu sebeple, TWCA1 karbonik anhidrazın dördüncü sınıfı için bir prototip olmuş ve δ -sınıfı olarak dizayn edilmiştir (Tripp vd., 2001).

X-ışını çalışmaları deniz diatomu *Thalassiosira weissflogii* CA'nın (TWCA1) aktif merkezinin memeli α -CA'ninkine şaşırtıcı şekilde benzediğini göstermektedir. Çinko üç histidin ligandı ve tek bir su molekülüne sahiptir ve çinkonun iki sistein kükürdü, bir histidin ve bir su molekülü ile koordine yaptığı yüksek bitkilerin β -CA'larından oldukça farklıdır. Diatom karbonik anhidrazı diğer karbonik anhidrazlar ile önemli bir sekans benzerliği göstermemektedir (Supuran ve Scozzafava, 2007).

1.1.3.5. ϵ -CA

T. weissflogii de oldukça şaşırtıcı bir keşif daha yapılmıştır: CA-tipi protein olan ilk kadmiyum-içeren enzim. Deniz diatomu *T. weissflogii* tipik deniz ortamında düşük çinko koşulları altında ve kadmiyum tuzları varlığında yaşamaktadır ve bu durum *T. weissflogii* de temel hücre içi Zn-gerektiren izoformu TWCA1'in seviyesi düşük kalmasına rağmen hücresel CA aktivitesinin artmasına neden olmaktadır. Cd işaretlemeli yürütme protein bantları göstermiştir ki, CA aktivitesi radyoaktif işaretli *T. weissflogii* lizatının doğal PAGE'nde TWCA1'den farklıdır. Cd proteinin seviyesi CO₂ ile ayarlanmaktadır ve bu durum bu enzimin karbon kazanma işleminde bir rolü olduğunu göstermektedir. CA-aktif fraksiyonların saflaştırılması 43 kDa'luk Cd-içeren proteinin izolasyonuna neden olmaktadır ve kısıtlı Zn derişimi koşulları altında *T. weissflogii*'in Cd-spesifik CA eksprese ettiğini göstermektedir ve karbon deriştirme mekanizması içinde çinko enzim TWCA1'in yerine geçmektedir (Supuran ve Scozzafava, 2007).

T. weissflogii üzerinde TWCA1'in seviyesinin düşük olduğu koşullarda eksprese edilen bu karbonik anhidrazın molekül kütlesi ve primer yapısı açısından diğer CA izozimleri ile bir homolojiye sahip olmamasından dolayı bu CA yeni bir CA sınıfı (ϵ -CA) olarak kabul edilmiştir (Tripp vd., 2001; Sawaya vd., 2006).

1.1.4. CA'ın Metal İyon Spesifitesi

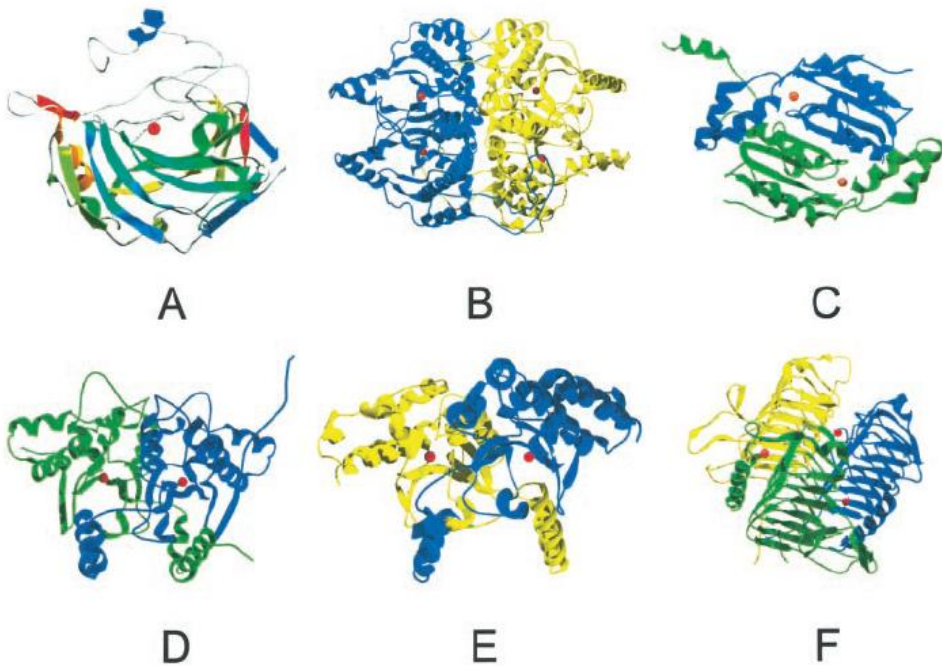
CA üzerine metal iyonu bağlama çalışmalarının çoğu insan ve sığır izozim II ve insan izozim I üzerinde gerçekleştirilmiştir. Çinko iyonu belirli şelatlayıcı ajanlara karşı diyaliz ile bu izozimlerden uzaklaştırılabilmektedir. Oluşan apoenzim inaktiftir, fakat ortama çinko ilave edildiğinde aktivitesini tamamen geri kazanmaktadır. Çeşitli metal iyonları apoenzime bağlanabilmektedir, fakat sadece Co^{2+} doğala benzer katalitik özelliklere sahip ürün vermektedir. Co^{2+} süstitüe enzimin spektroskopik özellikleri metal iyon merkezinin araştırılması ve yabancı ligandlar ile etkileşimlerinin incelenmesinde yararlı olmuştur. Håkansson vd. (1994) Co^{2+} süstitüe insan CA II'nin çinkoya benzer şekilde tetrahedral koordinasyonda olduğunu X-ışını kristalografi çalışmaları ile göstermişlerdir. Bununla birlikte, Cu^{2+} , Ni^{2+} ve Mn^{2+} -süstitüe türevlerin koordinasyon geometrileri farklıdır.

Çinko iyonu memeli CA'larında sıkıca bağlıdır. pH 7'de, insan CA II çinko iyonunun ayrışma sabiti 4 pM olarak hesaplanmıştır. Bağlı çinkonun inertliği bir kinetik engelin varlığında önemlidir. Bu sebeple, çinkonun kolaylaştırıcı bir etki olmadan ayrışmasının hızı sabiti pH 7'de insan CA II için $1.4 \times 10^{-6} \text{ sn}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır ve bu yaklaşık 5 günlük bir yarı-ömre tekabül etmektedir. $3.5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{sn}^{-1}$ lik bir ayrışma hız sabiti böylece hesaplanmıştır ve bu difüzyon kontrollü bağlanma reaksiyonundan üç ile dört kat daha yavaştır. 1,10-fenantrolin veya dipikolinat gibi bazı şelatlayıcı ajanlarının, protein-çinko-şelatlayıcı arasında bir ternari kompleksi oluşturarak çinko ayrılmasını hızlandırdığına inanılmaktadır.

CA molekülüne çinkonun sıkıca bağlanması için önemli bir faktör metal-bağlama merkezinin rijitliğidir. Håkansson vd. (1992) insan apo-CA II'nin yapısının çinko iyon bölgesini tutan bir su molekülü dışında holoenzim ile neredeyse aynı olduğunu bulmuşlardır. Böylece, sıkı çinko bağlanması ve katalitik fonksiyon için çinko ligandları optimum pozisyonda "indirekt ligantlar" ile tutulmaktadır. Bu sebeple, direkt çinko ligantlarını değiştirmek için yapılan tüm girişimler çinko iyon afinitesi ve katalitik aktivitede sert düşüslere sebep olmuştur (Lindskog, 1997).

1.1.5. CA Kataliz Mekanizması

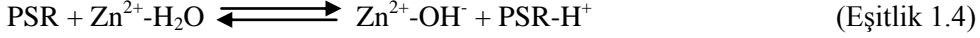
CA sınıflarının kökenlerinin bağımsız olmasının altını çizecek bir şekilde önemli bir sekans benzerliğine ve üç boyutlu yapıya sahip değildir (Şekil 1.6.). Bariz yapısal farklılıklara rağmen her bir CA sınıfı aktif merkezleri kataliz için gerekli bir çinko atomu içermektedir. Kinetik çalışmalar göstermiştir ki, CA iki adımlı bir izomekanizma kullanmaktadır. İlk adım, çinko bağlı hidroksitin CO₂'e nükleofilik atağıdır (Eşitlik 1.2). İkinci adım, çinko bağlı su molekülünün iyonizasyonu ve protonun aktif merkezden uzaklaşması ile aktif merkezin rejenerasyonudur (Eşitlik 1.3). Bu adımda, çinko iyonu Lewis asidi olarak davranarak suyun pK_a'sını ~14'den 7,0'ye düşürür.



Şekil 1.6. α -, β - ve γ -CA enzimlerinin üç boyutlu yapıları. (A) α -sınıf, insan CA II'si; (B) β -sınıf, *P. purpureum* CA'sı; (C) β -sınıf, *P. sativum* CA'sı; (D) β -sınıf, *M. thermoautotrophicum* CA'sı; (E) β -sınıf, *E. coli* CA'sı; (F) γ -sınıf, *M. thermophila* CA'sı (Tripp vd., 2001).



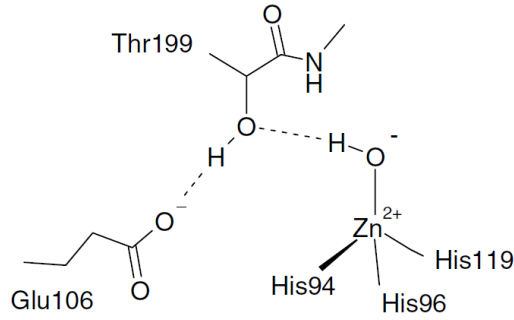
Karbonik anhidrazların çoğu 10^4 s^{-1} 'den daha yüksek k_{cat} değerlerine sahiptir. Bu durum protonu metal-bağlı sudan dış tampona "B" transfer edecek (Eşitlik 1.5) bir aracıyı "PSR" gerektirir (Eşitlik 1.4).



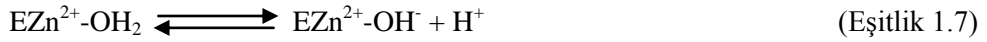
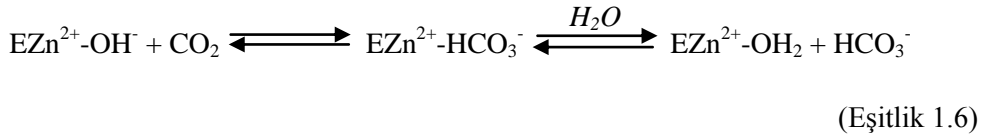
Aktif merkezden proton transportu k_{cat} değeri 10^4 s^{-1} 'den daha yüksek olan enzimler için hız-belirleyen adımdır. Bu sebeple, k_{cat} proton transportunun hızını yansıtırken (Eşitlik 1.3), katalitik etkinlik (k_{cat}/K_m) hidrasyon adımının (Eşitlik 1.2) göstergesidir ve proton transport hızına bağlı değildir (Tripp vd., 2001).

1.1.5.1. α -CA katalizi

Metal iyonu (günümüze kadar araştırılan tüm α -CA'larda Zn(II)'dir) kataliz için esastır. X-ışını kristalografik çalışmalar göstermiştir ki, metal iyonu aktif merkez yarığının 15 \AA dibinde yer almaktadır (Şekil 1.7.) ve üç histidin birimi (His 94, His 96 ve His 119) ve bir su molekülü/hidroksit iyonu ile koordine halindedir. Çinko bağlı su ayrıca Thr 199'un hidroksil birimi ile hidrojen bağı yapar ve Thr 199 ise Glu 106'nın karboksilat birimine bağlıdır. Bu etkileşimler çinko-bağlı su molekülünün nükleofilitesini artırır ve substratın (CO_2) nükleofilik atak için uygun pozisyona gelmesini sağlar (Şekil 1.2.). Enzimin aktif formu Zn(II)'ya bağlı hidroksit ile bazik formdur (Şekil 1.2. A). Bu güçlü nükleofil, komşusu konumundaki bir hidrofobik cepte (insan CA II'de Val 121, Val 143 ve Leu 198) bağlı olan CO_2 molekülüne atak yapar (Şekil 1.2. B) ve Zn(II) ile koordineli bikarbonatın oluşumuna neden olur (Şekil 1.2. C). Bikarbonat iyonu daha sonra bir su molekülü ile yer değiştirir ve çözeltiye salınır. Böylece Zn(II) koordineli su molekülü ile katalitik olarak inaktif olan enzimin asidik formu oluşur (Şekil 1.2. D). Bazik form A haline rejenere olmak üzere, aktif merkezden ortama bir proton transferi reaksiyonu gerçekleşir. Bu transfer aktif merkez birimlerince (His 64) veya ortamdaki tampon tarafından gerçekleştirilebilir. İşlem Eşitlik 1.6 ve 1.7'de şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 1.7. İnsan CA II aktif merkezinde Zn(II)'nin üç histidin amino asidi ile koordinasyonu.



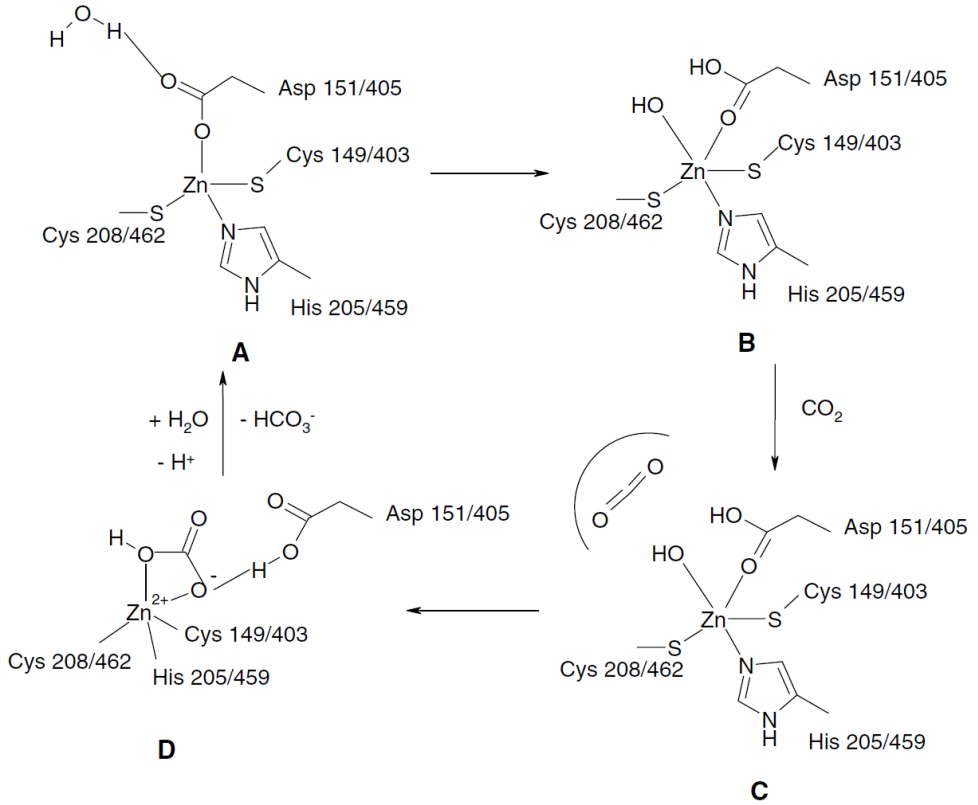
Katalizdeki hız belirleyen adım ikinci reaksiyondur, yani enzimin çinko-hidroksit türünü meydana getiren proton transferi. CA II, CA IV, CA II ve CA IX gibi katalitik olarak çok aktif izozimlerde bu işlem aktif merkezin girişinde yer alan histidin birimi (His 64) tarafından yönetilir (Supuran ve Scozzafava, 2007). His 64'ün imidazol halkası ve çinkoya bağlı çözgen direkt hidrojen bağı temasına sahip değildir, aralarındaki mesafe 0.74 nm'dir. Bununla birlikte, araya giren iki su molekülü vasıtası ile bir hidrojen bağı ilişkisi vardır. Dahası, His-64 yan zinciri iki tercih edilebilir konformasyona sahiptir, birisi His-64 protonlanmadığında baskın olarak görünen diğeri ise protonlandığı zamandır (Lindskog, 1997). Bu proton transferi aktif bölgenin köşesinden enzimin yüzeyine çıkan bir histidin birimleri kafes yapısı tarafından yönetilir ki bu durumda en etkili CA izozimi olan CA II için çok etkili proton transferi sağlanmış olur. Bu aynı zamanda neden CA II'nin bilinen en etkili enzimlerden birisi olduğunu difüzyon kontrol limitine yaklaşarak açıklar ($k_{\text{cat}}/K_m = 1.5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) (Supuran ve Scozzafava, 2007).

1.1.5.2. β -CA katalizi

Kinetik analizler β -sınıfı için çinko hidroksit mekanizmasının geçerli olduğunu göstermiştir. α -sınıfında olduğu gibi, *P. sativum* enziminin kristal yapısındaki çinko-bağlı asetat bikarbonatın aktif merkeze bağlanmasını taklit eder. Asetatın çinko bağlı oksijeni Asp 162 O- δ 1 ile hidrojen bağı yaparken ikinci oksijeni Gln 151'e hidrojen bağı ile bağlıdır. Bu durum bu birimlerin katalizde bir rolü olduğunu göstermektedir. Asetat ile Asp 162 O- δ 1 arasındaki bağ, α -sınıfı CA II izozimin Thr 199 O- δ 1 ile asetatın çinko bağlı oksijeni arasındaki hidrojen bağı ile özdeşdir. Thr 199 O- δ 1 CO₂ üzerine nükleofilik atak yapabilmesi için çinko-bağlı hidroksiti yönlendirmektedir. *P. sativum* aktif merkezindeki asetat ile Gln 151 arasındaki bağı Thr 199 N ile bikarbonatın ikinci oksijeni arasındaki hidrojen bağı ile örtüştüğü aktif merkezi üst üste bindirme çalışmaları ile ayrıca göstermiştir. Thr 199 N'in CO₂ ile hidrojen bağı yaparak CO₂'i elektrofilik olarak aktive ettiği önerilmektedir. Bu sebeple, Gln 151 ve Asp 162'in α -sınıf enzimlerdeki Thr 199 ile aynı rolü oynadıkları düşünülmektedir (Tripp vd, 2001).

Bazı β -CA üyelerinde Zn(II) ile direkt koordineli bir su olmadığı için (Şekil 8.A), temel problem α -CA için geçerli olan çinko-hidroksit mekanizmasının aynı zamanda β -ailesi için de geçerli olup olmadığıdır.

Sorunun cevabı Mitsuhashi vd. (2000) tarafından önerilen katalitik mekanizma ile verilmiştir (Şekil 1.8.).



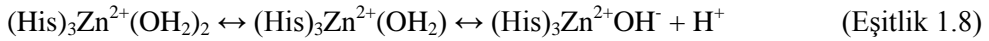
Şekil 1.8. Prokaryotik β -CA (*Porphyridium purpureum*) için önerilen katalitik mekanizma (Supuran ve Scozzafava, 2007).

P. purpureum enziminin bir monomerinde iki homolog tekrardan kaynaklanan iki adet simetrik yapısal motif olduğundan dolayı yukarıda belirtilen dört amino asit ile koordine yapmış iki Zn(II) iyonu bulunmaktadır. Bu durumda çiftler: Cys 149/Cys 403, His 205/His 459, Cys 208/Cys 462 ve Asp 151/Asp 405. Her bir metal iyonun yanında ayrıca çinko ligandı Asp 151/Asp 405'e ait oksijeni ile hidrojen bağı yapan bir su molekülü bulunmaktadır fakat çinko ile koordineli halde değildir (Şekil 1.8. A). Hipoteze göre, bu su molekülünden aspartat biriminin koordineli karboksilat birimine bir proton transferi gerçekleşir. Sonuçta trigonal-bipiramit geometride Zn(II) ile koordineli hidroksit iyonu oluşur (Şekil 1.8. B). Böylece, enzimin hidrofobik cebinde bağlı olan CO₂'e atak yapabilecek güçlü nükleofil meydana gelir (Şekil 1.8. C), sonuçta Zn(II) ye bağlı bikarbonat oluşmuş olur (Şekil 1.8. D). Bu araürün, β -sınıf enzim için çinkoya orijinal olarak koordineli aspartik asit biriminin koordineli bikarbonat ile hidrojen bağına katılması (Şekil 1.8. D) dışında α -CA katalitik döngü için (Şekil 1.2. C) önerilen

reaksiyon araürününe benzemektedir. Son adımda, koordineli bikarbonat bir proton ile birlikte çözeltiye salınır, tekrar Zn(II)'ya koordineli aspartat oluşur ve su molekülü ile hidrojen bağı yaparak yanında taşır. Enzim böylece yeni bir kataliz döngüsüne hazırdır (Supuran ve Scozzafava, 2007).

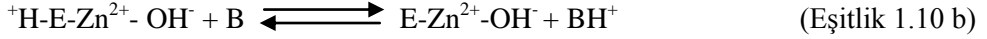
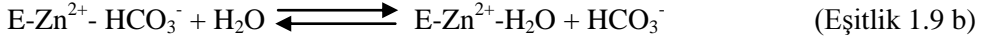
1.1.5.3. γ -CA katalizi

γ -CA'nın katalitik mekanizması α -sınıfı enzim için önerilene benzerdir. Zn(II) orijinal olarak rapor edildiği şekilde tetrakoordinatlı değil de pentakoordinatlıdır ve bu durumda metal iyonuna bağlı iki su molekülü vardır. Bu bulgular çinko hidroksit mekanizmasının γ -CA için geçerli olduğunu göstermektedir ve olasılıkla enzimin aktif merkezinden metal iyonunun trigonal-bipiramit ve tetrahedral türlerinin bir dengesini göstermektedir (Eşitlik 1.8) (Innoncenti vd., 2004).

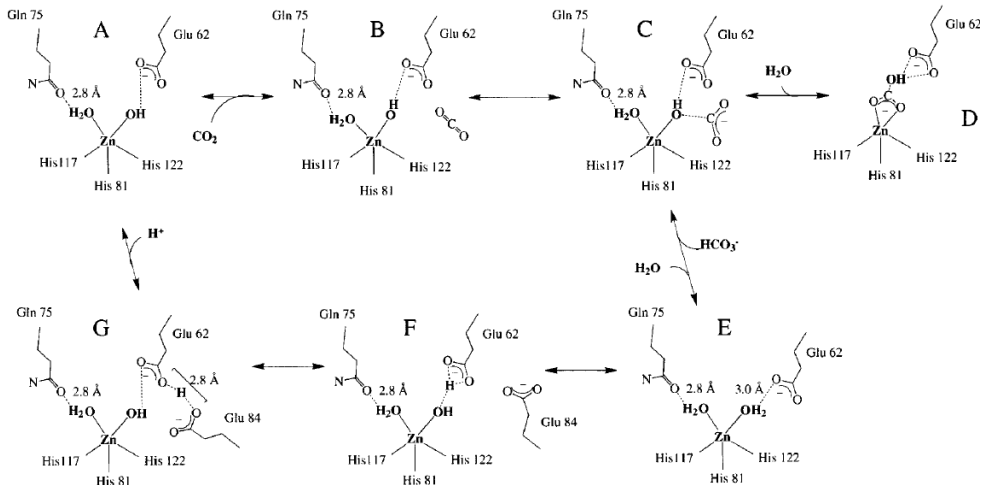


Aktif merkeze bağlı ligantlar Glu 62 yan zinciri ile bağlantılıdır ve bu yan zincir olasılıkla protonlanmıştır. Kompleksleşmemiş çinko-içeren Cam'da, Glu 62 ve Glu 84 yan zincirleri bir proton paylaşıyor gibi görünmektedir ve ek olarak, Glu 84 çoklu konformasyon sergilemektedir. Bu durum Glu 84'ün α -CA'nın reaksiyon mekanizmasında önemli bir öge olan proton mekiği olarak hareket ettiğini göstermektedir. α -CA'da bu genellikle aktif merkez histidini (genellikle His 64) ile gerçekleştirilir (Innoncenti vd., 2004).

Kinetik çalışmalar Cam tarafından CO₂'in hidrasyonunun insan CA II'si için önerilene benzer şekilde gerçekleştiğini göstermiştir. Buna göre reaksiyon "çinko-hidroksit" mekanizması üzerinden yürür. Tüm enzim kataliz reaksiyonu iki farklı yarı-reaksiyondan meydana gelmektedir. İlk yarı-reaksiyon CO₂ ve HCO₃⁻'in birbirine dönüşümüdür (Eşitlik 1.9 a ve 1.9 b) ve çinko hidroksit iyonunun CO₂ üzerine nükleofilik atağını gerektirir. Bu daha sonra çinko-bağlı HCO₃⁻'in su ile yer değiştirmesi gerçekleşir. İkinci yarı-reaksiyon hız-belirleyen ve aktif merkezde çinko hidroksiti oluşturan molekül içi ve molekül arası proton transfer adımından (Eşitlik 1.10 a ve 1.10 b) sorumludur.



Eşitlik 1.10 a ve 1.10 b’de belirtilen proton insan CA II’nin His 64 biriminin protonlanmasını göstermektedir ki bu His 64 aktif merkez çinkosu ve çözgen tamponu arasındaki proton transferini yönetmektedir. Molekül arası proton transferi (Eşitlik 1.10 a) doygun tampon derişiminde hız belirleyen adımdır. Düşük tampon derişimlerinde ise molekül içi transfer (Eşitlik 1.10 b) hız belirler. Reaksiyon mekanizması Şekil 1.9.’da özetlenmiştir (Iverson vd., 2000).



Şekil 1.9. Cam için önerilen reaksiyon mekanizması. (A) Zn²⁺ ilk yarı reaksiyonun başında bir su molekölü ve bir hidroksit ionu ile koordinasyona girer (Eşitlik 1.9 a ve 1.9 b). (B) Karbon dioksit hidrofobik cepten aktif merkeze giriş yapar. (C) Karbon dioksit çinkoya bağılı hidroksit ionuna atak yapar. (D) Bikarbonat çeşitli kararlı bağlanma modlarında bulunabilir. (E) İlk yarı reaksiyon çözgendeki su ile bikarbonatın yer değıştirmesi ile biter. (F) İkinci yarı reaksiyon (Eşitlik 1.10 a ve 1.10 b) çinkoya bağılı su molekölünün protonunu kaybetmesi ile başlar. Bu proton Glu 62 tarafından kabul edilir. (G) Glu 62’deki proton Glu 84’e transfer edilir. (Iverson vd., 2000).

1.1.6. CA Enzimlerinin Fizyolojik Fonksiyonları

CA enzimi çeşitli biyosentetik reaksiyonlar için gerekli olan CO_2 'in HCO_3^- 'a geri dönüşümlü hidrasyonunu katalizler. Bu biyosentetik reaksiyonlar; glukoneogenez, bazı amino asitlerin sentezi (piruvat karboksilaz yolu ile), lipogenez (asetil-CoA karboksilaz yolu ile), üreagenez (karbamoil fosfat sentetaz I yolu ile) ve pirimidin nükleotit biyosentezidir (karbamoil fosfat sentetaz II yolu ile). Bunların yanında bu enzim pH dengesi, iyon transportu, su ve elektrolit dengesi, kemik resorpsiyonu, kalsifikasyon ve tümörigenezde de rol oynamaktadır (Banerjee vd., 2004).

CA'nın katalizlediği CO_2 hidrasyonu dışındaki reaksiyonların (Çizelge 1.2.) fizyolojik öneme sahip olduğu açık değildir. Bu sebeple, sadece 1 reaksiyonunun bu enzimi ilgilendiren fizyolojik öneme sahip olduğu ele alınabilir.

Prokaryotlarda, CA'lar iki temel fonksiyona sahiptir: (i) farklı doku ve organizmalar arasında CO_2 /bikarbonat taşınımı, (ii) enzimatik reaksiyonlar için CO_2 /bikarbonatın temini. Sucul fotosentetik organizmalarda, ek bir rol olarak çevrede CO_2 kıtlığının üstesinden gelmede yardımcı olan CO_2 deriştirme mekanizması sayılabilir. Örneğin, *Chlamydomonas reinhardtii*'de bu CO_2 deriştirme mekanizması fotosistem II aracılı elektron transportu ile kloroplastların tilakoid membranları boyunca oluşturulan pH gradienti tarafından meydana gelir. Fotosentetik olmayan çoğu prokaryotta CA, aktif bölge civarına CO_2 /bikarbonat sağlama amaçlı olarak çalışır veya bu bileşikleri reaksiyon enerjilerini arttırmak için uzaklaştırır. Karboksilasyon/dekarboksilasyon işlemini yürüten prokaryotik CA'ların çoğu böylesi önemli bir fizyolojik fonksiyona sahiptir.

Homo sapiens'i de içeren omurgalılarda, CA'ların fizyolojik fonksiyonu son 70 yıldır yoğun bir şekilde araştırılmıştır fakat metaloenzimlerin bu büyük sınıfı hakkında halen bilinmesi gerekenler vardır. İzozim I, II ve IV asit/baz homeostasisin regülasyonu ve solunum ile ilgilidir. Bu kompleks işlemleri metabolize eden dokular ve boşaltım bölgeleri (akciğer, böbrek) arasındaki CO_2 /bikarbonat taşınımını, kılcal damarlar ve akciğer mikrodamarlarında CO_2 eliminasyonunun kolaylaştırılması, böbrek tübülleri ve toplayıcı kanallarındaki H^+ 'nin eliminasyonunu ve böbreklerde proksimal tübül hücrelerinde ve Henle ilmeklerinde bikarbonatın reabsorpsiyonunu içerir. Genellikle izozim I, II ve IV bu işlemler ile ilgilidir. Gözlerde ikincil ürün olan bikarbonatça zengin göz sıvısının

(izozim CA II, CA IV ve CA XII tarafından oluşturulur) bulunmasından dolayı CA'ların görme ile ilgili olduğu düşünülmektedir ve fonksiyonlarındaki bozukluklar yüksek göz tansiyonuna ve glukomaya neden olur. CA II ayrıca kemik oluşumu ve osteoklastların farklılaşması veya osteoklastlarda kemik resorpsiyonu için asit temini gibi fonksiyonlar ile ilgilidir. CA'lar pek çok diğer doku/organlarda elektrolit salgılanması ile ilgilidir, örneğin: koroid pleksusda (beyinde serebrospinal sıvının üretildiği bölge) pH'ı regüle ederek ve bikarbonat sağlayarak serebrospinal sıvı üretimi, asinal ve duktal hücrelerde tükürük üretimi, mide parietal hücrelerinde gastrik asit üretimi, safra üretimi, pankreatik sıvı üretimi ve intestinal iyon transportu. CA'lar ayrıca tat ve koku alma, gastro-intestinal yolu aşırı pH koşullarından (aşırı asidik veya aşırı bazik) korumada, seminal sıvının pH'ının ve bikarbonat derişiminin regülasyonunda, kas fonksiyonlarında ve hücresele strese adaptasyonda etkilidir. CA V gibi bazı izozimler, pankreas β hücrelerinde sinyallenen insülin salgılanması gibi moleküler sinyal işlemleri ile de ilgilidir. İzozim II ve VA glukoneogenez, yağ asitlerinin *de novo* biyosentezi ve pirimidin baz sentezi için bikarbonat sağladığından dolayı önemli metabolik işlemler ile ilgilidir. Son olarak, bazı izozimler (CA IX, CA XII ve CARP VIII gibi) tümörlerde oldukça boldur ve onkogeneze ve tümör ilerlemesi ile ilgilidir (Supuran ve Scozzafava, 2007).

1.1.7. CA Enziminin Saflaştırılması

CA CO_2 'in HCO_3^- 'a geri dönüşümlü hidrasyonunu katalizler. Bu reaksiyon glukoneogenez, bazı amino asitlerin sentezi (piruvat karboksilaz yolu ile), lipogenez (asetil-CoA karboksilaz yolu ile) üreagenez (karbamoil fosfat sentetaz I yolu ile) ve pirimidin nükleotid biyosentezi (karbamoil fosfat sentetaz II yolu ile) gibi birçok biyosentez reaksiyonları ile ilgilidir. Bunun yanında bu enzim pH dengesi, iyon transportu, su ve elektrolit dengesi, kemik resorpsiyonu, kalsifikasyon ve tümör oluşumu ile ilgilidir. Çeşitli CA inhibitörleri antiglukoma, antikönvülsan, anti epileptik, antiürolitik ve antikanser ajanı olarak kullanılmaktadır ve bu inhibitörlerin bir kısmı ilaç olarak kabul edilmiştir. Kanser tedavisinde kullanılmak üzere hazırlanan bazı CA inhibitörler geliştirilme aşamasındadır, bazılarının ise klinik denemeleri devam etmektedir (Banerjee vd., 2004). Metabolizma ve kanser oluşumu yanında bu enzimin hücre büyümesi ve apoptosiz ile de ilgisi vardır (Supuran vd., 2004). Tüm bu çalışmaların yapılabilmesi ve sürdürülebilmesi için oldukça saf ve bol miktarda CA'a gereksinim duyulmaktadır ve bu gereksinim sonucu yüksek verimde CA

saflaştırma teknikleri geliştirilmiştir. Öncü CA saflaştırma çalışmalarında (Meldrum ve Roughton, 1933) enzim etanol-kloroform ile çöktürülerek saflaştırılmıştır. Daha sonraları klasik protein saflaştırma adımlarının izlendiği amonyum sülfat çöktürmesi ve arkasından diyaliz işlemi ile iyon değişim kromatografisi ile saflaştırma çalışmaları yapılmıştır (Demir vd., 1997a). CA'a spesifik inhibitörlerin keşfi ile söz konusu inhibitörlerin afinite ligandı olarak kullanıldığı afinite kromatografisi teknikleri ile daha saf ve daha verimli şekilde CA saflaştırılması çalışmaları yapılabilmektedir (Ceyhun vd., 2011). Afinite tekniğinin farklı bir uygulaması olan metal afinite kromatografisi de CA saflaştırılmasında kullanılmıştır (Banerjee vd., 2004).

1.2. Biyoteknolojide Polimerik Materyaller

Biyolojik olarak aktif saf bileşiklere (düşük moleküler kütleli bileşikler, DNA ve proteinler gibi biyopolimerler, virüsler, hücresel organeller ve hatta tüm hücre) karşı sürekli artan talep biyoayırmada kullanılagelen polimerik materyallerin iyileştirilmesini ve yeni materyallerin geliştirilmesini gerektirmektedir (Dainiak vd, 2007). Yeni polimerik materyallerin gelişimi uygulamalı biyokimya devrim etkisi yapmıştır. Polimerik materyaller protein ve nükleik asitlerin saflaştırılması ve izolasyonu yanında yapılarının ve fonksiyonlarının da aydınlatılmasında hızlı gelişmelere izin vermiştir. Bu sebeple, yeni bazen de farklı özelliklere sahip orijinal polimerik materyallerin geliştirilmesi biyoteknoloji alanında büyük ilgi çekmektedir (Lozinsky vd., 2002). Bu amaçla makrogözenekli polimerik materyallerin geliştirilmesi özellikle biyomedikal, biyoteknolojik ve ilaç biliminde büyük ilgi çekmektedir. Gözenekli polimerik materyallerin sentezlenmesinde kullanılan klasik yaklaşım, sıvı veya gaz gözenek oluşturuçuların, süperkritik ortamın (CO₂ gibi) ve kalıp sentezinin kullanımını ve faz ayrımını içerir (Plieva vd., 2007).

1.2.1. Polimerik Jeller

Modern polimer kimyası açısından jeller, değişken olmayan ve nispeten kararlı bağlar ile bir arada tutulan makromoleküllerin üç boyutlu ağ yapısı oluşturduğu *çözgen-immobilize edilmiş* polimer sistemleridir. Bu ağ yapısının morfolojisi (monofaz veya heterofaz) bağların kimyasal doğası ve jel üretim metodu ile saptanır. Polimer ağ tarafından bağlanmış çözgen (hidrojel durumunda su) polimer

kütlenin çökmesini engelleyerek ve çözeltinin jel içine ve dışına difuzyonuna izin vererek jelin kararlılığını sürdürmede kritik bir rol oynar (Lozinsky vd., 2003).

Polimer ağ yapısındaki moleküller arası bağın doğasına göre jeller iki gruba ayrılabilir: kimyasal ve fiziksel jeller. Polimerik jellerin sınıflandırılması ve jel oluşum süreçleri Çizelge 1.3.'de gösterilmiştir.

Çizelge 1.3. Polimerik jellerin sınıflandırılması ve jel oluşum süreçleri

| Jel tipi | Jel oluşumu | Örnekler | Yorum |
|--------------------|--|--|--|
| Kemotropik jeller | Üç boyutlu kovalent ağ yapısı oluşturan moleküller arası kimyasal bağlar | - Poliakrilamid jeller, - Polisitren veya poliakrilat temelli iyon-değişim reçineleri - Sephadex olarak bilinen çapraz bağlı dekstran jeller | Jellerin geniş bir grubudur. Jel oluşumu monomerik öncüllerin polimerizasyonu veya polimerik öncüllerin kovalent çapraz bağlanması ile meydana gelir. Bu jeller biyoteknolojide çok yaygın kullanılırlar. |
| İyonotropik jeller | İyon değişim reaksiyonları moleküller arası iyonik (tuz) bağlarının oluşumunu sağlar | - Aljinat-polilizin veya kitosan-polifosfat karışım matrisleri gibi polielektrolit kompleks temelli jeller | Bu jeller belirli koşullar altında kararlıdır fakat ortamın pH'ı veya iyonik bileşimi değiştirildiğinde kolaylıkla çözünebilir. Bu jeller immobilize mikrobiyal, bitki ve hayvan hücreleri için taşıyıcı olarak kullanılırlar. |

Çizelge 1.3. (devam)

| | | | |
|---------------------|--|---|--|
| Şelatotropik jeller | Şelasyon reaksiyonları kararlı moleküller arası bağların oluşumuna neden olur. | Multivalent güçlü koordinasyon verebilen iyonlarının ilavesi ile gel oluşumu gözlenir. Örneğin, kitosan çözeltisine Cu(II) veya Co(II) eklenmesi veya karboksimetil selüloz çözeltisine Cr(III) ilavesi veya aljinatın Ca ile çapraz bağlanması | Ca-aljinat jeller hücre immobilizasyonunda kullanılmaktadır fakat diğer şelatropik jellerin henüz bir biyoteknolojik uygulaması yoktur. |
| Solvotropik jeller | Çözgen bileşiminin değiştirilmesi ile jelleşme meydana gelir. | Jeller koaservasyon işleminin bir sonucu olarak oluşur. Bu tip jelleşme süluloz nitrat veya selüloz asetat filmler ve fiberlerin üretiminde kullanılmaktadır | Jeller polimer çözeltisine çözgen olmayan bileşenin eklenmesi ile oluşur. Böylece polimerin ortama olan afinitesi azalır ve polimer-polimer arası kovalent olmayan etkileşimler meydana gelir. Biyoteknolojik uygulamaları hakkında herhangi bir doküman yoktur. |
| Termotropik jeller | Jelleşme başlangıç polimer çözeltisinin ısıtılması ile oluşur. | - Hidrofobik olarak modifiye edilmiş hidroksietil selüloz jeller - Ovalbumin ve yumurta beyazı jelleri | Moleküller arası hidrofobik etkileşimler jel oluşum sürecinde önemli bir role sahiptir. |

Çizelge 1.3. (devam)

| | | | |
|----------------------------------|--|---|--|
| Psikrotropik jeller | Başlangıç polimer çözeltisinin soğutulması (dondurmadan) ile meydana gelen jeller. | - Jelatin jeller - Nişasta jeller - Agaroz ve agar-agar jeller - Karragenan jeller | Psikrotropik jeller çok iyi tanımlanmıştır. Biyoteknolojide katı hücre kültür ortamı olarak, kromatografik materyal olarak ve elektroforez matriksi olarak kullanılmaktadır. |
| Kriyotropik jeller (Kriyojeller) | Jelleşme başlangıç sisteminin dondurulması ile gerçekleşir. | Tez içerisinde açıklanmıştır. | |

(Kaynak: Lozinsky vd., 2003).

Jeller makromoleküllerin elektrostatik etkileşimler ile bağlandığı kovalent olarak çapraz bağlı, iyonotropik jeller ve makromoleküllerin hidrofobik etkileşimler ve hidrojen bağları ile bağlandığı fiziksel jeller olmak üzere ayrılabilir.

Jel oluşumu sıvı bir çözen sisteminde gerçekleştiğinde çözelti, oluşan jelin ağ yapısı tarafından immobilize edilir. Genel olarak, yapısallaşan polimerik sistem akış kabiliyetini kaybeder, fakat ağ yapısı içindeki çözenin difüzyonel hareketliliği sadece çözünen bileşiklerin jel içine difüzyonuna izin verecek şekilde azalır (Lozinsky vd., 2002).

Günümüzde, sıfırının altında sentez anlamına gelen kriyotropik jelleşme tekniği hidrofilik makrogözenekli materyallerin hazırlanmasında kullanılmaktadır (Plieva vd., 2007).

1.3. Kriyojeller

Biyoteknolojide önemli potansiyele sahip yeni tip polimerik jellerin birisi de kriyojellerdir. Donma koşullarında meydana gelen jelleşme ürünleri kriyojeller (Yunancada donma veya buz anlamındadır) olarak isimlendirilir. Kriyojeller yoğun gözenekli polimerik materyaller olup jel oluşturan herhangi öncüllerden ve

çeşitli morfolojilerde ve gözeneklilikte sentezlenebilir. Kriyotropik jelleşme (veya kriyoyapılaşma) jelleşme kabiliyetine sahip sistemin kriyojenik uygulamasının (dondurma, donma durumunda belirli bir süre depolama ve çözme) bir sonucu olarak meydana gelen spesifik bir jel oluşturma tipidir. Kriyojelleşmenin başlıca özelliği çözgenin kristallenmesidir (Dainiak vd., 2007). Kriyojeller ilk olarak yaklaşık 40 yıl önce rapor edilmiştir (Lozinsky vd., 2002) ve kriyojellerin polimerik jellerden oldukça farklı özellikleri dikkatleri üzerine çekmiştir (Lozinsky vd., 2003).

Kriyojeller buz kristallerinin erimeden sonra içten bağlı sürekli gözenekleri oluşturan ve porojen olarak davrandığı yarı donmuş sulu ortamda sentezlenirler. Büyük içten bağlı gözenekler ve yüksek elastikiyet kriyojellerin temel karakteridir. Geleneksel jellerin (çözgenin polimer yapısına bağlı olduğu homo fazlı sistemler) tersine kriyojeller çözgenin (su) hem gözeneklerde hem de polimer yapısında bulunduğu hetero fazlı sistemlerdir. Jel öncüllerinin ve kullanılan kimyasal reaksiyona bağlı olarak kriyojelin mikro ve makro gözenekli yapısı değişebilir.

Sünger benzeri morfolojiye sahip kriyojellere örnek olarak poliakrilamid (pAAm), poli(dimetil akrilamid) (pDMAA), poli(hidroksietil metakrilat) (pHEMA), polietilen glikol (PEG), dekstran metakrilat ve polivinil alkol (PVA) verilebilir (Çizelge 1.4.). Bu kriyojeller monolitik çubuk, disk ve tabaka şeklinde sentezlenebilir (Plieva vd., 2007).

Çizelge 1.4. Sentezlenen kriyojellere ve uygulamalarına genel bir bakış

| Monomer/polimer öncüller | Gösterim | Gözenek boyutu (μm) | Morfoloji | Kullanım alanı |
|--------------------------|----------|----------------------------------|-----------------------|--------------------------------------|
| Akrilamid | pAAm | 1-200 | Süngerimsi ve elastik | Kromatografi ve hücre kültür desteği |
| Akrilamid | Aşı-pAAm | 1-100 | Süngerimsi ve elastik | Kromatografi |
| Dimetilakrilamid | PDMAA | 1-120 | Süngerimsi ve elastik | Kromatografi ve hücre kültür desteği |

Çizelge 1.4. (devam)

| | | | | |
|----------------------------------|------------|-------|-----------------------|--|
| Polivinil alkol | m-PVA | 1-80 | Süngerimsi ve elastik | Kromatografide monolitik destek ve biyobozunmayan hücre kültü desteği |
| Polivinil alkol | b-PVA | 0.1-1 | Elastik | Mekanik tutuklama ile hücre immobilizasyonu ve enzimlerin kimyasal immobilizasyonu |
| Hidroksietil metakrilat | HEMA | 1-200 | Süngerimsi ve elastik | Hücre kültür desteği |
| Dekstran metakrilat | Dex-MA | 1-100 | Süngerimsi ve elastik | Hücre kültür desteği |
| Hidroksietil metakrilat-L-laktat | HEMA-LLA-D | 1-100 | Süngerimsi ve elastik | Biyobozunur hücre kültür desteği |
| Dekstran | | | | |
| Agaroz | Ags-MG | | Süngerimsi ve elastik | Hücre kültür desteği |
| Polietilen glikol | PEG | 1-100 | Süngerimsi ve elastik | Hücre kültür desteği |
| N-izopropil akrilamid | NIPAAM | 1-100 | Süngerimsi ve elastik | Hücre kültür desteği |

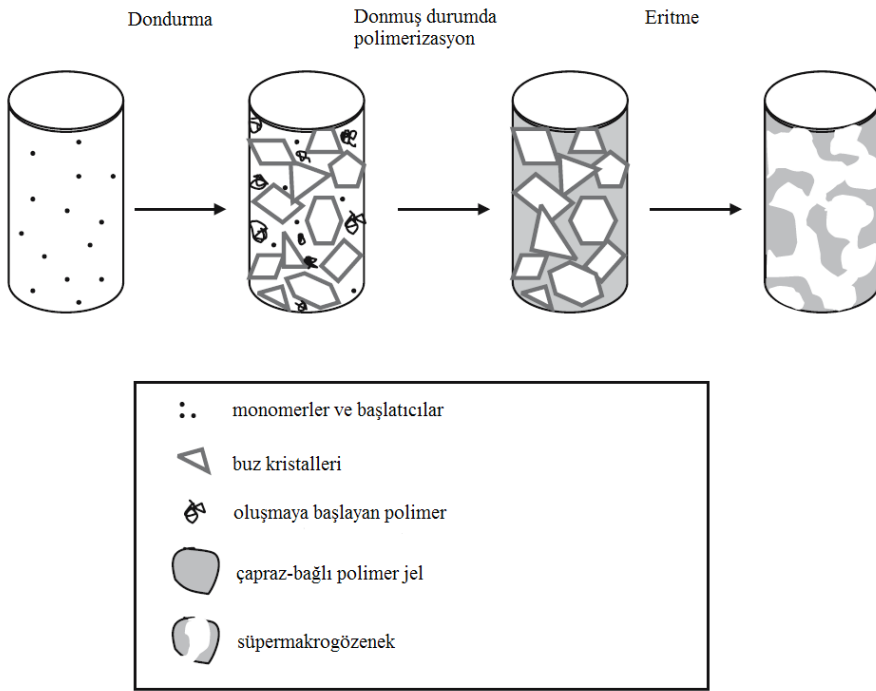
(Kaynak: Plieva vd., 2007).

1.3.1. Kriyojellerin Hazırlanması

Kriyojellerin gözenek yapısı donma sıcaklığı, çözünen monomerlerin derişimi ve başlatıcı sistemin (amonyum persülfat ve N,N,N',N'-tetrametiletilediamin) bileşimi ile kontrol edilebilir (Plieva vd., 2007).

Kimyasal reaksiyon (kriyojelleşme) hızının ve çözgen kristalizasyon hızının uygun şekilde kontrol edilmesi ile istenilen özelliklerde kriyojeller sentezlenebilir. Tipik olarak kriyojeller, büyüyen buz kristallerin porojen olarak ve erimeden sonra içten

bağlı gözenekler için kalıp olarak davrandığı -10 ile -20 °C aralığındaki düşük sıcaklıklardaki sulu çözeltilerde hazırlanır. Reaksiyon karışımı donuyorken, donmuş monolitik blok iki temel bölümü içerir: buz kristalleri ve donmayan sıvı mikrofaz olarak adlandırılan donmamış bölge. Kimyasal reaksiyon bu donmayan sıvı mikrofazda gerçekleşir. Reaktif içermeyen çözen kristalleri donma sırasında büyür ve sürekli bir donmuş iskelet sistemi oluşuncaya kadar diğer kristaller ile kaynaşır. Kimyasal reaksiyonun tamamlanmasından sonra erime ile sürekli makro gözenekli kanallara sahip bir sistem meydana gelmiş olur (Şekil 1.10.) (Dainiak vd., 2007).



Şekil 1.10. Makrogözenekli kriyojellerin oluşumunun şematik gösterimi (Dainiak vd., 2007).

Öncü çalışmalarda, ılımlı donma koşullarında çözenin bir kısmının halen donmamış (donmamış sıvı mikrofaz) olduğu gösterilmiştir. Çözünen bileşikler bu donmayan çözen bölgesinde derişir. İlimli düşük sıcaklıklarda makroskopik katı sistem iki faz içerir, donan saf çözenin polikristalin fazı ve yukarıda belirtilen başlangıç çözeltilinde var olan tüm çözünmüş bileşenleri içeren donmamış sıvı mikrofaz. Mikrofazın hacmi başlangıç çözeltilisinden önemli oranda az olduğundan

çözünen bileşenlerin derişmesi söz konusudur. Mikrofazdaki çözünen bileşiklerin yüksek derişimi kimyasal reaksiyonu hızlandırır (Lozinsky vd., 2002).

Kriyojel oluşum basamaklarını detaylı olarak inceleyecek olursak, genel olarak bir başlangıç sistemi herhangi bir jel oluşturan öncüllerin bir karışımını içerir. Jelleşme hızının çok hızlı olmaması kritiktir, aksi halde örnekler donmadan önce jelleşme meydana gelir. Donmuş sistem heterojendir ve katı faz (donmuş çözgenin kristali) ile donmamış sıvı mikrofazı içerir. Mikrofazın hacmi çözgenin doğasına, çözünen bileşiklerin başlangıç derişimine, donma sırasındaki örneğin sıcaklığına, çözünen ve çözünmeyen katkı maddelerine bağlıdır. Donmayan fazın donmuş faza oranı toplam örneğin % 0,1-10'u kadardır. Donmuş örneğin eritilmesinden sonra, oluşan jel makrogözenekli yapıdadır. Donmuş çözgenin kristalleri gözenek oluşturan ajan veya porojen olarak davranır. Bu kristallerin erimesi kriyojel üzerinde sıvı çözgen ile dolu boşluklar bırakır. Jel ve sıvı arayüzündeki yüzey gerilimi başlangıçta keskin uçlu boşlukların şeklinin yuvarlaklaşmasını sağlar. Kriyojelin heterofaz ve heterogözenekli (makro ve mikro gözeneklerin bir kombinasyonu) morfolojisi fiziksel özelliklerin eşsiz bir kombinasyonunu sağlar (Lozinsky vd., 2002).

Yarı donmuş reaksiyon karışımında, çözünmüş reaktifler (jel öncülleri) kimyasal reaksiyonun meydana geldiği donmamış sıvı mikrofazda derişmiş haldedir. Bu sebeple gözenek duvarları geleneksel jellerin lokal polimer derişimleri ile karşılaştırıldığında yüksek lokal polimer derişimine sahiptir. Gözenek duvarlarındaki artan lokal polimer derişimi kriyojellere yeterli mekanik dayanımı sağlar. Kriyojellerin içten bağlı 100 µm'ye kadar geniş gözenekleri oldukça yoğundur ve gözenek duvarları boşluk içermemektedir. Buna karşılık geleneksel jeller homojendir ve mikro gözeneklidir. Gözenek duvarlarındaki yoğun polimerik fazdan dolayı kriyojeller oda sıcaklığında sentezlenen geleneksel jellerden daha az şişer. Gözenek duvarlarındaki yoğun polimerin zayıf şişmesi kriyojellere elastikiyet verirken yoğun içten bağlı gözenek sistemi kriyojelin sünger benzeri morfolojiye sahip olmasını sağlar (Plieva vd., 2007).

Kriyojel üretimi aşağıdaki gibi kısaca özetlenebilir:

1. Kriyotropik jeller donan örnek içerisinde var olan donmamış mikrofazda meydana gelir.

2. Kriyojeller temelde makrogözeneklidir ve genelde sünger benzeri materyallerdir.
3. Donma noktası üzerindeki sıcaklıklardaki geleneksel jelleşme ile karşılaştırıldığında kriyotropik jelleşme için gerekli polimer derişimi donmamış sıvı mikrofazdaki jel öncüllerinin kriyoderişmesi nedeniyle azalmıştır.
4. Genelde ılımlı donmuş örneklerdeki kriyojelleşme donma üzerindeki sıcaklıklardaki geleneksel jelleşmeden daha hızlı ilerlemektedir.
5. Kriyojelleşmenin sıcaklık bağımlılığı, jelleşmeyi kolaylaştıran faktörler (kriyoderişme) ile yavaşlatan faktörler (düşük sıcaklık, donmamış sıvı mikrofazdaki vizkosite) arasındaki yarışmadan dolayı genelde bir optimuma sahiptir.
6. Kriyojelin özellikleri kriyojelleşme sıcaklığı, örneğin donma durumunda bekleme zamanı, donma/erime oranı, çözgenin doğası ve çözünen ve çözünmeyen katkılar ile değiştirilebilir (Lozinsky vd., 2002).

1.3.2. Kriyojellerin Genel Özellikleri

Kriyotropik jelleşme sonucu diğer jeller ile karşılaştırıldığında çok farklı morfolojilerde polimerik materyaller meydana gelir. Kriyojeller herhangi kimyasal tipte olabilir – kovalent, iyonik veya kovalent olmayan. Açıkta ki, sadece sıcaklık-başlatıcılı (termotropik) öncüller kriyojel hazırlanmasında kullanılamazlar.

Çözgen bağlı polimerik materyallerin dondurulup-kurutulması ile kriyojellere benzer makro ve mikro yapılarla sahip materyallerin oluşumu sağlanabilir. Çözgen donmasını takip eden çözgen kristallerinin (sulu sistemler durumunda buz) süblimleşmesi polimerik materyallerde içten bağlı gözenek sistemlerini oluşturur. Bununla birlikte, donmayan sıvı mikrofazda jel oluşumu gözlenmez. Donarak kurutulmuş materyaller sadece filmler, tabaka ve küçük boncuklar gibi ince objeler halinde üretilebilir. Buna karşılık, kriyojeller blok, silindir, tüp, granül, disk gibi herhangi istenilen şekilde üretilebilir. Dahası, kriyojellerin üretimi donarak kurutulmuş materyallerden düşük basınç altında çözgenin uzaklaştırılmasına gerek olmadığı için daha kolaydır (Lozinsky vd., 2003).

Büyük ve yoğun içten bağlı gözeneklerin varlığından dolayı, kriyojeller gözenekli yapısı bozulmadan kurutulabilir. Kurutma kriyojelin depolanmasını kolaylaştırdığından dolayı bu hidrofilik materyallerin en önemli özelliklerinden birisidir. Düşük ve yüksek molekül kütleli öncüllerden hazırlanan kriyojeller hızlı tekrar-şişme kinetikleri ile karakterize edilirler ve kuru örnekler sulu ortama bırakıldıklarında birkaç dakika içinde tekrar orijinal boyutuna şişerler. Büyük ve yoğun içten bağlı makrogözeneklerin varlığından dolayı kriyojeller çok düşük akış dirençlerine sahiptir (Dainiak vd., 2007).

Biyoayırma açısından polimerik kriyojellerin en çekici özelliği donan çözgen tarafından oluşturulan makrogözenekler ve makrogözeneklerin duvarlarını oluşturan polimer makromolekülleri arasındaki mikrogözeneklerdir. Kriyojeldeki makrogözenekler sünger benzeri morfolojiye sahip olmasının yanında aynı zamanda gözenekler birbirleri ile içten bağlıdır. Donan çözeltinin kristalleri diğer kristallerin köşeleri ile karşılaşıncaya kadar büyüdüklerinden dolayı kriyojellerde bu gözenek morfolojisi oluşur.

Makrogözenek boyu kriyojenik sisteme bağlı olarak birkaç yüz mikrometre kadar büyük olabilir. Donma sıcaklığını düşürmek küçük çözgen kristali sayısını artırır ve böylece gözenekler küçülür. Dahası, düşük sıcaklıklarda donmayan sıvı hacmi azalır ve bu sebeple küçük hacminden dolayı donmayan jel öncüllerinin kriyoderişmesi daha fazla olacağından gözenek duvarları inceler fakat oluşan polimer daha yoğundur (Lozinsky vd., 2002).

1.3.3. Kriyojellerin Kullanım Alanları

Kriyojellerin uygulamaları onların gözenekli yapısı ve operasyonel kararlılığı ile belirlenir (Plieva vd., 2007). Günümüzde, polimerik jeller kromatografik materyal, moleküllerin ve hücrelerin immobilizasyonu için taşıyıcı, elektroforez ve immunodifüzyon için matriks ve katı kültür ortamı için jel destek olarak biyoteknolojinin çok farklı uygulamalarında kullanıma sahiptir (Lozinsky vd., 2003). Temel uygulama alanları: immobilize hücreler ve enzimler ile biyokataliz, hedefin saflaştırılması için biyoayırma, hücre organellerinin, virüslerin, mikrobiyal ve memeli hücrelerinin kromatografisi ve memeli hücre kültürü için üç boyutlu matriks olarak biyomedikal uygulamalardır (Plieva vd., 2007).

1.3.3.1. Biyoayırmada kriyojeller

Modern biyoteknoloji süreçlerinin önemli bir uygulaması fermantasyon ortamları veya parçalanmış hücre süpernatantlarından hedef ürünün ayrılması ve saflaştırılmasıdır. Kromatografi, hem analitik hem de büyük ölçekte, downstream (aşağıya doğru) ayırma işlemlerinde baskın teknolojidir. Sabit durağan fazlı geleneksel dolgu-yatak kromatografisi, zarıflığı ve yüksek ayırma gücüne rağmen, temel sınırlamalara sahiptir: partikül içeren sıvıların işlenmesindeki yetersizliği, örneğin, hücre süspansiyonları veya berraklaştırılmamış ham hücre homojenatları. Partiküllerin kromatografik taşıyıcı boncukları arasında sıkışması kolonun akış direncini artırır ve giderek akışı tamamen bloke eder. Bu dezavantajın üstesinden gelmek üzere genişletilmiş (expanded)-yatak kromatografisi önerilmiştir. Buna rağmen, tüm avantajlarına rağmen, genişletilmiş-yatak kromatografisi spesifik tipte kolonlar ve ekipman gerektirir ve geleneksel dolgu-yatak kromatografik sistemlerine uygun değildir. Akışı bloke etmeyen ve hücre kalıntıları ve hatta tüm hücreye uygun yeterli gözenek boyutlarında dolgu-yatak kromatografisi taşıyıcılarının üretimi ilgi çekmektedir. Kriyojellerin gözenekliliği, onları böylesi süpermakrogözenekli kromatografik materyaller için uygun aday yapmaktadır (Lozinsky vd., 2003).

Kriyojeller, işlenmemiş ham ekstraktlardan ve hatta fermantasyon ortamından ekstraselüler proteinlerin direkt ayırmasına izin veren ilginç kromatografik materyaller sunar. Kriyojel temelli kromatografik materyaller, biyopartiküllerin (hatta virüsler, mikrobiyal hücreler ve memeli hücreleri) kromatografik olarak izole edildiği ve ayrıldığı yeni bir biyoayırma alanı açmıştır.

700-900 µm çapında ve 1 µm gözeneklere sahip boncuk halindeki kriyojeller düşük molekül kütleli hedeflerin ayrılmasında kullanılmıştır. Biyopartiküllerin kromatografisi için hazırlanan kriyojeller AAm, DMAAm, PVA, agaroz, dekstran-MA gibi jel oluşturan öncüllerden hazırlanmaktadır. Böylece farklı fonksiyonlara (iyon-değişim, affinite ve hidrofobik) sahip kriyojeller kromatografik ayırmalarda başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Plieva vd., 2007).

1.3.3.2. Biyopolimerlerin immobilizasyonunda kriyojel matrisler

Kriyojellerin yüksek operasyonel kararlılıkları ve fizikokimyasal karakteristikleri onların hücre ve enzim immobilizasyonunda kullanımına izin vermektedir. İmmobilize biyopolimer matrisi olarak kriyojellerin kullanımının geleneksel jellere nazaran daha iyi sonuçlar verdiği hakkında bilgiler bulunmaktadır. Örneğin, kriyojel makrogözeneklerine immobilize enzimler ile üretilen biyokataliz makromoleküler substratın işlenmesine izin verir, çünkü substrat makrogözeneklere karışmadan difüzenir. Kriyojel kolonlar gibi biyopartiküllerin ayrılması için geliştirilen süpermakrogözenekli sürekli yataklar, tapa-akışlı (plug-flow) biyoreaktörler için son derecede uygundur (Lozinsky vd., 2003).

1.3.3.3. Hücre immobilizasyonunda taşıyıcı olarak kriyojeller

Çeşitli kriyojellerin uygun fizikokimyasal özellikleri ve spesifik gözenekliliği hücre immobilizasyonu için taşıyıcı olarak kullanımlarına olanak vermektedir. Kriyojel-tip taşıyıcılar kullanarak hücre immobilizasyonu, biyopolimerlerin immobilizasyonuna benzer şekilde, bağlama (kovalent veya adsorpsiyon) veya tutuklama tekniklerini kullanır (Lozinsky vd., 2003).

Kriyojellerin bir diğer kullanım alanı ise hücre kültürü uygulamaları için üç boyutlu iskelet olarak kullanımınıdır. Bu işlemler için uygun olabilmesi açısından gözenekli materyal 100'lerce µm çapında gözenekleri içermeli, biyoyumlu olmalı ve yeterli mekanik kararlılığa sahip olmalıdır. İlgilenilen dokuya ve spesifik uygulamaya bağlı olarak iskelet materyalin gereksinimleri farklı olacaktır (Dainiak vd., 2007).

1.4. Moleküler Baskılama

Tüm yaşayan sistemler moleküller arası etkileşimleri temel alır ve tanıma bu etkileşimlerde meydana gelir. Membranlar, DNA çift sarmalı ve hücre gibi kompleks yapıların oluşumu temelde bu tip etkileşim işlemlerinin birçoğunun sonucudur. Molekülü bir arada tutan güçlü (kovalent) etkileşimlerin tersine, bu kompleksler oluşumuna ve yıkımına izin veren zayıf bağlanma etkileşimleriyle bir arada tutulur. Bu dinamik özellik birçok biyolojik işlemin çalışmasında bir ön koşul olmakla birlikte, farklı birimler arasındaki hızlı organizasyon olasılığı DNA replikasyonu, enzimatik kataliz ve protein sentezi gibi çeşitli reaksiyonların

temelidir. Dahası moleküler etkileşimler, kimyasal ve biyolojik iletişimin de temelidir. Hormon cevabı ve hücre adhezyonu gibi moleküler ilişkileri kapsayan tüm işlemler, moleküller veya molekül grupları arasındaki “zayıf” etkileşimlerin bir sonucudur. Ayrıca, immün sistemdeki tanıma, tanımlama ajanlarının moleküler tanınmasına dayanır. Bu moleküler etkileşim yaşamın kendiliğinden ifade edilmesinden sorumludur.

Moleküler etkileşim konsepti çok eskidir. Yunan ve Roma imparatorluğu tarafından da kullanılmıştır. On dokuzuncu yüzyılın ikinci yarısından itibaren Johannes Diderik van der Waals'ın gaz halindeki atomlar arasındaki etkileşimler ve Alfred Werner'in koordinasyon kimyası üzerine teorileri gibi çalışmalar ile bu etkileşimler hakkındaki modern fikirler ortaya çıkmaya başlamıştır. Bin sekiz yüz doksan dört yılında, Emil Fischer enzim ve substratı arasındaki meşhur “anahtar ve kilit” modelini sunmuştur. Bu isabetli saptamada, enzim substrata nazaran çok daha büyük olan yüzeyinde substratın şekline uygun bir yarık ve çukura sahiptir. Böylece, substrat bir anahtar gibi enzimin aktif bölgesindeki kilide uyar.

Çok moleküllü kimya çalışmaları, farklı moleküller arasındaki zayıf fakat genellikle kompleks etkileşimleri temel alır ve doğal bağlanma olaylarını taklit etme kabiliyeti uzun yıllar bilim adamlarının ilgisini çekmiştir ve bu çalışmalar enzimler ve antikorlardakine benzer doğal bağlanmaların taklit edildiği biyomimetik (biyoyapay) kimya alanının kurulmasına neden olmuştur. “Biyomimetik” terimi genelde bir kimyasal işlemin bir biyokimyasal reaksiyonu taklit ettiği herhangi bir durumu ifade eder. Biyokimyasal sistemlerin mekanizması ve yapısı bilindiğinden dolayı bilim adamları bilgilerini sentetik stratejilere doğru kaydırmaya çalışmaktadırlar. Genellikle bu sentetik yaklaşım biyolojik sistemin kompleksliğini “minyatürize” ederek azaltmayı amaçlamıştır. Makromoleküler peptid iskeletinden yoksun fakat enzimin aktif bölgesindeki geometride düzenlenmiş katalitik olarak aktif grupları taşıyan enzimler (yapay enzimler) örnek olarak verilebilir.

Biyolojik sistemlerde, moleküler kompleksler genellikle hidrojen bağı, iyon çifti ve hidrofobik etkileşimler gibi birçok kovalent olmayan etkileşimler tarafından meydana getirilir. Bu etkileşimler tek başına ele alınıp kovalent bağlar ile karşılaştırıldığında zayıf olmalarına rağmen, bu zayıf etkileşimlerin birkaçının müşterek etkisi kompleksin yüksek stabiliteye sahip olmasını sağlar (Yan ve Ramström, 2005)

Moleküler baskılanmış polimerler (MIP) bir kalıp molekülün varlığında fonksiyonel monomer veya polimerlerin çapraz bağlanması ile sentezlenen sentetik materyallerdir. Kalıp uzaklaştırıldığında boyutu, şekli ve fonksiyonel grupların yönelimi açısından kalıp molekül ile komplementer bir boşluk meydana gelir. Boşluğun boyutu ve şekli kalıp veya benzer moleküllerin tanınmasına izin verirken, fonksiyonel grupların yönelimi sadece kalıp molekülün seçici olarak bağlanmasına izin verir. Yıllar içerisinde MIP'lerin hazırlanması ve uygulamaları hakkında birçok çalışma olmasına rağmen, bu çalışmaların çoğu düşük molekül kütleli kalıp molekülleri üzerine yoğunlaşmıştır.

Moleküler baskılanmış peptidler ve proteinler üzerine öncülük eden çalışmaların çoğu kromatografik çalışmalarda durağan faz oluşturmak üzere kalıp molekül olarak amino asit türevlerini kullanan Mosbach (Janiak ve Kofinas, 2007) tarafından yürütülmüştür. Yapılan ilk baskılama çalışmasında organik çözümlerdeki kalıp molekül seçici bir şekilde tanınmıştır. Bu çalışma peptid ve proteinleri tanıyan yapay reseptörlerin sentezi için bir alt yapı oluşturmuştur. Biyolojik öneme sahip moleküllerin çoğu suda çözünürdür ve antijen-antikör gibi birçok doğal tanıma olayı sulu ortamda gerçekleşir. Bu sebeple, doğal işlemleri taklit etme yeteneğine sahip materyaller ve aygıtlar üretmek üzere proteinleri ve peptidleri sulu ortamda tanıma yeteneğine sahip yapay reseptörlerin hazırlanması üzerine yoğun bir ihtiyaç bulunmaktadır. Örneğin, sulu çözeltilerde protein veya peptid birimlerini seçici bir şekilde tanıyabilen MIP'ler klinik analizler ve medikal diagnostik uygulamalarda substrat olarak kullanılma potansiyeline sahiptir. Ek olarak, bu MIP'ler peptidlerin ve proteinlerin kromatografik saflaştırılması ve analizi için katı faz olarak da kullanılabilir. Son olarak, yüksek afinite, seçicilik ve bağlama kapasitesine sahip ve düşük spesifik olmayan bağlanma sergileyen MIP'lerin sentezi, biyolojik tanıma olaylarında meydana gelen temel etkileşimlerin çalışılmasında araştırmacılara ucuz ve kolay bir metot sağlayabilir. Sulu sistemlerden peptid ve proteinlerin seçici bir şekilde ayrılması için MIP'lerin kullanımına ilişkin bazı çalışmalar Çizelge 1.5.'de özetlenmiştir.

Çizelge 1.5. Sulu çözeltide peptid ve proteinlerin tanınması için sentezlenen MIP'lerin bir özeti.

| Kalıp | Fonksiyonel monomer | Çapraz-bağlayıcı |
|----------------|----------------------------|-------------------------|
| BSA, CEL | DMAEPMA | BAAm |
| | MAA | |
| BHb | Am | BAAm |
| BHb | MA | Piperazin diakrilamid |
| | Maleik asit | |
| BSA | NTBA | BAAm |
| | Am | |
| Cyt C | Am | BAAm |
| hTf | Am | BAAm |
| Hb | Am | BAAm |
| | Am | |
| LSZ | AA | BAAm |
| | DMAPA | |
| BSA | Hekzafloropropilen | N/A |
| F | Disakkarit | |
| IgG | Disakkarit | |
| LSZ | Disakkarit | |
| RNAaz | Disakkarit | |
| Sav | Disakkarit | |
| pCyP18 | AA | DVB |
| T | Am | BAAm |
| | Kitosan | |
| BHb | Am | BAAm |
| | | |
| HRP | APBA | N/A |
| | Am | |
| GOD | MAA | DHEBAAm |
| | | |
| MP | APBA | N/A |
| LP | APBA | N/A |
| Hb | APBA | N/A |
| BOC-Gly-OH | MAA | EGDMA |
| BOC-Gly-Phe-OH | MAA | EGDMA |
| H-Gly-OEt | MAA | EGDMA |
| H-Phe-Gly-OH | MAA | EGDMA |

Çizelge 1.5. (devam)

| | | |
|--|--------------------------------|------------------|
| H-Phe-OMe | MAA | EGDMA |
| FMOC-Phe-Gly-OH | MAA | EGDMA |
| FMOC-Phe-OH | MAA | EGDMA |
| Lys-Trp-Asp | 2VPy | DVB |
| D-Phe | β -Siklodektrin AMPSA | BAAm |
| OT | MAA | EGDMA |
| YPLG | MAA | EGDMA |
| GLY | MAA | EGDMA |
| N-Ac-L-Phe-L-Trp-OMe | MAA | EGDMA |
| Dipeptidlerin N-terminal histidin amino asidi | Ni-NTA | BAAm |
| AYLKKATNE | Am | EBAAm |
| VVSTQTALA | GPEG-200-diakrilat | |
| VP | AA | N-Acr-L-Cyc-NHBn |
| OT | An N-Benzilakrilamid | |

BSA: sığır serum albumin; CEL: tavuk yumurta lizozimi; BHb: sığır hemoglobini; Cyt C: sitokrom C; hTf: insan transferini; Hb: insan hemoglobini; LSZ: lizozim; IgG: immunoglobulin G; F: fibrinojen; RNAaz: ribonükleaz; SA_v: strepavadin; pCyp18: klonlanmış domuz silkofinlin 18; T: tripsin; GOD: glukoz oksidaz; HRP: yaban turbu peroksidazı; MP: mikroperoksidaz; LP: laktoperoksidaz; BOC: *t*-bütiloksikarbonil; Phe: fenil; OEt: etil ester; FMOC: 9-florenil metoksikarbonil; OT: oksitosin; OMe: metil ester; VP: vazopresin; DMAEPMA: N-[3-(dimetilamino)propil]metakrilamid; MAA: metakrilik asit; Am: akrilamid; MA: metakrilamid; NTBA: N-tert-bütilakrilamid; DMAPA: N,N-dimetilaminopropilakrilamid; APBA: 3-aminofenilboronik asit; 2VPy: 2-vinilpiridin; AMPSA: 2-akriloil-2-metilporpan sülfonik asit; Ni-NTA: Ni(II)-nitriloasetik asit kompleksi; PEG: poli(etilen glikol); BAAm: N,N'-metilen bisakrilamid; DVB: divinil benzen; EGDMA: etilen glikol dimetakrilat; DHEBAAm: N,N-(1,2-dihidroksietilen)-bisakrilamid; EBAAm: N,N-etilen bisakrilamid (Kaynak: Janiak ve Kofinas, 2007).

Peptid ve proteinleri hedefleyen polimerik reseptör oluşturmak amacıyla birçok farklı strateji bulunmaktadır. Genellikle hedef molekül ile güçlü kalıp etkileşimleri oluşturan fonksiyonel gruplar yoğun olarak kullanılır. Elektrostatik ve metal-

şelatlayıcı gruplar bu fonksiyonel gruplara örek olarak verilebilir. Ek olarak, kalıp molekül ile sentetik reseptör arasındaki yapısal etkileşimler de kullanılabilir. Hidrofobik ve hidrojen bağı gibi zayıf etkileşimlerden de bazı durumlarda yararlanılabilir (Janiak ve Kofinas, 2007).

1.4.1. Moleküler Baskılamanın Esasları

Endüstride ve günlük yaşamda sentetik reseptörlerin kullanımına ilişkin bazı dezavantajlar vardır:

- 1) Oldukça düşük miktarlarda bulunması. MIP sentezi beş veya daha fazla adım gerektirir ve bu yüzden sadece çok düşük miktarlarda (örn. 1 g) polimer elde edilir. Bu sebeple endüstriyel kullanım için pahalı olacaktıdır.
- 2) Büyük moleküller için reseptör dizaynının zor olması. Bazı durumlarda yapı iskelesi sadece birkaç angstrom boyutlarındadır. Bu koşullarda iki yada daha fazla fonksiyonel grubun bir arada yerleşimi oldukça zordur.
- 3) Tahmin edilen moleküler tanıma için uygun reaksiyona sahip sentetik reseptörün sentezinin zorluğu. Su içerisinde moleküler tanıma, hidrojen bağlarının kolayca bozulmasından dolayı zordur. Doğal reseptörlerde olduğu gibi, su içerisinde hidrojen bağı oluşturacak polimerik yapı gereklidir.

Moleküler baskılama metodu, bu problemlere en umut verici çözüm olarak görünmektedir. Basitçe, bir kalıbın varlığında uygun fonksiyonel monomerlerin polimerizasyonu ile istenilen reseptörler istenilen özelliklerde ve kilogram (hatta ton) ölçeklerinde ucuz bir şekilde üretilebilmektedir. Büyük kalıp moleküller için de reseptörler oluşturulabilir. Komplike organik sentezlere gerek yoktur. Üstelik bağlanma bölgelerindeki kimyasal koşullar uygun monomerler, çapraz bağlama ajanları ve/veya komonomerlerin kombinasyonu ile kolayca düzenlenebilir. Bu özellikler moleküler baskılama metodunu en çekici metotlardan biri haline getirmiştir (Komiya vd., 2003).

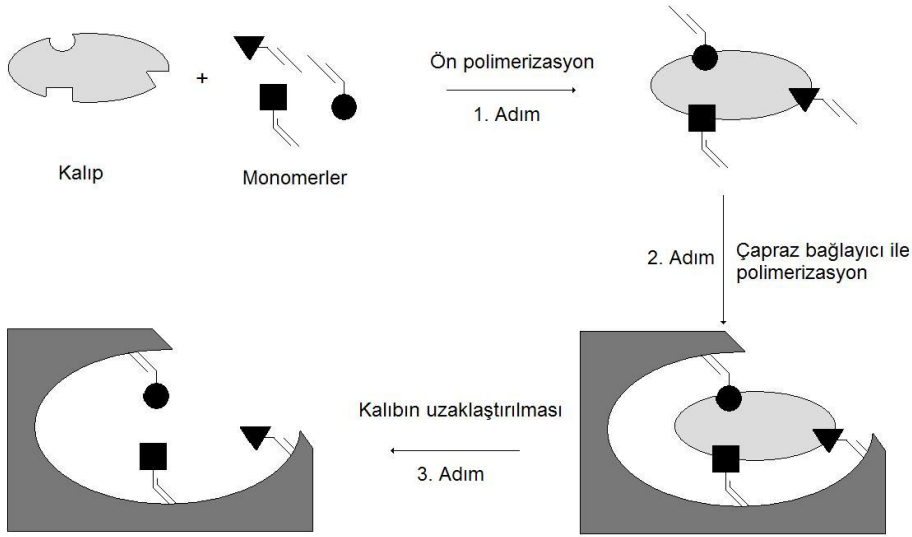
1.4.2. Moleküler Baskılamanın Genel Prensipleri

Bir kalıp molekül çözeltide çeşitli fonksiyonel moleküller ile etkileşime girer. Bu etkileşimler: hidrojen bağı, elektrostatik, apolar ve diğer tüm kovalent olmayan etkileşimlerdir. Burada, fonksiyonel monomerler fonksiyonel grupları kalıp ile komplementer olacak şekilde düzenlenirler. Daha sonra, eğer kalıp molekül sistemden hızlı bir şekilde uzaklaştırılırsa ne olur? Tahmin edileceği üzere, tüm fonksiyonel moleküller düzenlerini kaybederek gelişigüzel hareket etmeye başlar. Sonuç olarak, kalıp molekül üzerine oluşan hafıza hızlı bir şekilde yok olur. Moleküler baskılama metodunda, bu gelişigüzellik fonksiyonel moleküllerin bir polimer iskelet üzerine bağlanması ile minimize edilir. Böylece çözeltinin bir fotoğrafı oluşur ve kalıp molekülün yapısı bu polimer içinde kalıplanır.

Moleküler baskılama işlemi aşağıdaki üç adımdan oluşur (Şekil 1.11.):

- 1) Bir kalıp molekül ve fonksiyonel monomer arasında kovalent veya kovalent olmayan etkileşimin gerçekleşmesi.
- 2) Bu monomer-kalıp yapısının polimerizasyonu.
- 3) Kalıbın polimerden uzaklaştırılması.

Birinci adımda, fonksiyonel monomer ve kalıp bir kovalent bağ ile (kovalent baskılama işleminde) veya kovalent olmayan etkileşimler ile (kovalent olmayan baskılama işleminde) birbirine bağlanır. İkinci adımda, etkileşen türlerin yapısı polimerin üç boyutlu ağ yapısında dondurulur. Fonksiyonel birimler (fonksiyonel monomerden kaynaklanan) kalıp ile topolojik olarak komplementer durumdadır. Üçüncü adımda, kalıp molekül polimerden uzaklaştırılır. Polimerde kalıp molekülün oluşturduğu bölge bir çukur (boşluk) olarak kalır. Uygun koşullar altında bu boşluk kalıbın boyutu, yapısı ve diğer fizikokimyasal özelliklerini yeterli bir şekilde tanır ve bu molekülü (veya analoglarını) etkili ve seçici olarak bağlar (Komiya vd., 2003).



Şekil 1.11. Moleküler baskılama işlemi adımlarının şematik gösterimi.

1.4.3. Moleküler Baskılama Çeşitleri

Günümüzde moleküler baskılama amacıyla iki farklı yaklaşım uygulanmaktadır. Bunlardan birisi Wulff vd. (1977) tarafından geliştirilen “kovalent” yaklaşımdır. Bu yaklaşımda polimerizasyondan önce kalıp-monomer iskeleti geri dönüşümlü kovalent bağ ile oluşturulur ve polimer ile kalıp arasındaki tanıma bu bağın oluşumu ve kırılmasına bağlıdır. Diğer yaklaşım ise Klaus Mosbach ve arkadaşları tarafından ortaya atılan “kovalent olmayan” yaklaşımdır (Arshady ve Mosbach, 1981). Bu yaklaşımda kalıp ve monomer(ler) arasındaki ön düzenlenme kovalent olmayan veya (zayıf) metal koordinasyon etkileşimleri ile oluşturulur ve sonraki tanıma işlemi bu etkileşimlere dayanır. Bu stratejilere paralel olarak tüm bu yaklaşımların avantajlarının bir kombinasyonu olacak şekilde başka bir metot daha geliştirilmiştir. Bu yöntemde baskılama adımında güçlü kovalent bağlar kullanılırken polimerden kalıbın uzaklaştırılmasından sonra tanıma işleminde kovalent olmayan etkileşimler kullanılır. Bu yöntem yarı-kovalent yaklaşım olarak adlandırılırken oldukça fazla ilgi çekmektedir (Yan ve Ramström, 2005).

1.4.3.1. Kovalent baskılama

Başarılı bir kovalent baskılamanın anahtarlardan birisi fonksiyonel monomer ile kalıbı bağlayacak olan kovalent bağın seçimidir. Bu bağ birbiri ile çelişen şekilde hem “kararlı” hem de “geri dönüşümlü” karakterde olmalıdır. Yani, yeteri kadar kararlı olmalı ve polimerizasyon sırasında sağlam kalmalı fakat daha sonra baskılanma etkisi bozulmadan ılıman koşullar altında kolaylıkla yıkılabilmelidir. Hedef kalıbı hızlıca bağlaması (ve salması) için kovalent bağın oluşumu ve yıkımı hızlı olmalıdır. Öte yandan, bu termodinamik ve dinamik gereksinimleri yerine getiren kovalent bağların sayısı azdır. Günümüzde bu şekilde uygulanabilen bağlar: boronik asit esterleri, asetaller, ketaller, Schiff bazları, disülfid bağları ve koordinasyon bağlarıdır.

1.4.3.2. Kovalent olmayan baskılama

Kovalent olmayan baskılama için reaksiyon prosedürleri kovalent baskılamaya göre daha basittir. Fonksiyonel monomerler polimerizasyon karışımında kalıp ile basit bir şekilde karıştırılır ve çapraz bağlayıcı ajan ile kopolimerleştirilir. Fonksiyonel monomer ve kalıp arasındaki ürün kovalent olmayan etkileşimler ile *in situ* oluşturulur ve polimerde kalıplanır. Kovalent bağda olduğu gibi polimerizasyondan önce kovalent konjugatın sentezine gerek yoktur. Dahası, polimerizasyondan sonra kalıp basit bir ekstraksiyon işlemi ile kolayca uzaklaştırılır. Birçok pratik öneme sahip molekül (ilaç, herbisit, biyolojik olarak aktif bileşikler ve çevre kirleticileri) kovalent olmayan etkileşim için gerekli hidroksil, karboksil, amino ve amid gibi polar gruplara sahiptir. Basitliği ve çok yönlülüğü nedeniyle kovalent olmayan moleküler baskılama yoğun bir şekilde uygulanmaktadır.

Prensip olarak, baskılama için herhangi bir kovalent olmayan etkileşim kullanılabilir. Bununla birlikte, monomer ve kalıp arasındaki uzaklık ve yönelime oldukça bağlı olan hidrojen bağları moleküler tanıma amacıyla en uygundur. Bu nedenle, gerekli fonksiyonel grupları (karboksil, amino, piridin, hidroksil ve amid grubu gibi) taşıyan çeşitli monomerler seçilebilir. Kovalent olmayan etkileşimin doğası her bir bileşenin pK değeri ile yönetilir. Asit ve baz çok güçlü olduğunda, proton asitten baza aktarılır ve böylece ürün çoğu zaman elektrostatik etkileşimler ile oluşur. Elektrostatik etkileşim uzaklık ve yönelime daha az bağlı olduğundan moleküler tanıma için elverişsizdir. Orta sert asit ve baz kombinasyonu

durumunda, hem asit hem de bazda proton bulunur ve bu durumda hidrojen bağı baskındır. Bu koşullar altında etkili baskılamaya ulaşılabilir. Eğer asit ve baz zayıf ise, etkileşim çok zayıftır ve baskılama için uygun değildir.

1.4.3.3. Taklit (dummy) moleküler baskılama

Bu metot bazı biyolojik olarak aktif bileşikler (dioksin gibi) veya çevresel hormonlara karşı yapay reseptör hazırlamak amacıyla kullanılır. Bu kalıplar ile moleküler baskılama işlemleri yapılmak istendiğinde elde yeteri kadar kalıp molekülün hazır olmadığı görülecektir. Ayrıca, kalıp molekül laboratuvar kullanımları için çok toksik yada tehlikeli olabilir. Bu koşullarda, “direkt” moleküler baskılama yapmak çok zor olacaktır. Bu durumda, gerçek kalıba benzer yapıya sahip olan fakat daha kolay ulaşılabilir (toksik olmayan) uygun bir bileşik kalıp olarak kullanılır (Komiya vd., 2003).

Diğer teknikler yüzey baskılama ve iskele baskılama teknikleridir. Bu tekniklerde, etkileşimsel elementleri doğru düzende tutma yeteneğine sahip bir organizasyonel element kullanılır ve “çapraz bağlayıcı” protokolden çıkartılır. Bu, fonksiyonel element ile doğru şekilde donatılmış bir moleküler iskelet veya çeşitli yapıların büyüyen yüzeyleri olabilir. Bu yapay tanıma neden olan kalıp-destekli sentez, böylece çok direkt bir yolla gerçekleştirilir (Yan ve Ramström, 2005).

Tüm bu yaklaşımlar kendi avantaj ve dezavantajlarına sahiptir ve sistemin seçimi hangi kalıbın ve hangi uygulamanın spesifik olarak hedeflendiğine bağlıdır. Genellikle, kovalent ve yarı kovalent yaklaşım iyi tanımlanmış tanıma bölgeleri oluşturmada başarılı bir şekilde kullanılır fakat bu teknikler kullanılacak kalıba bağlı olarak bazı dezavantajlara sahiptir. Temelde, benzer durum metal-koordinasyon etkileşimlerinin kullanımı için doğrudur ve bu sebeple bu yaklaşım daha spesifik sistemler için tercih edilmektedir. Kovalent olmayan yaklaşım genelde çok yönlü doğaya sahip olduğu kabul edilir ve neredeyse herhangi tip kalıplar için de kullanılabilir. Bunun yanında, etkileşimin doğal zayıflığı bu yaklaşımın kontrolünü daha da zorlaştırır. Bu yaklaşım ayrıca çözgen polaritesine çok duyarlıdır. Yine de, bu yaklaşım çoğu araştırmacılar tarafından kullanılmakta ve literatürdeki uygulamaların çoğunda bu teknik uygulanmıştır (Yan ve Ramström, 2005).

1.4.4. Kovalent ve Kovalent Olmayan Baskılamanın Avantajları ve Dezavantajları

Genel olarak, kovalent olmayan baskılama çok çeşitli kalıp moleküllere kolaylıkla uygulanabilmektedir. Baskılamanın zorluğuna rağmen kovalent baskılama genelde diğer yöntemlere nazaran daha üstündür. Diğer karakteristikler Çizelge 1.6.'da açıklanmıştır. İhtiyaçlara ve operasyonun durumuna bağlı olarak bu iki metottan biri seçilebilir.

Çizelge 1.6. Kovalent ve kovalent olmayan baskılamanın bazı özelliklerinin karşılaştırılması.

| | Kovalent | Kovalent olmayan |
|--|-----------------|------------------|
| Monomer-kalıp konjugatın sentezi | Gerekli | Gerekli değil |
| Polimerizasyon koşulları | Oldukça serbest | Sınırlı |
| Polimerizasyondan sonra kalıbın uzaklaştırılması | Zor | Kolay |
| Kalıbın tekrar bağlanması ve uzaklaştırılması | Yavaş | Hızlı |
| Bağlama bölgesinin yapısı | Belirgin | Az belirgin |

(Kaynak: Komiyama vd., 2003)

Kovalent ve kovalent olmayan baskılama işlemlerinin avantajları ve dezavantajları aşağıda özetlenmiştir.

i) Kovalent Baskılama

Avantajları:

1. Monomer-kalıp konjugatları kararlıdır ve stokiyometriktir ve bu sebeple moleküler baskılama işlemi (aynı zamanda polimer üzerindeki bağlanma bölgesi) göreceli olarak kesindir.
2. Konjugat kovalent bağ ile oluştuğu ve yeterince kararlı olduğu için çok çeşitli polimerizasyon koşulları (yüksek sıcaklık, yüksek veya düşük pH ve çok polar çözügen gibi) uygulanabilir.

Dezavantajları:

1. Monomer-kalıp konjugatının sentezi genelde zahmetlidir ve ekonomik değildir.
2. Geri dönüşlü kovalent bağ sayısı sınırlıdır.
3. Baskılama etkisi bazı durumlarda oldukça sert koşullar gerektiren 3. Adımda (kovalent bağın bozulması adımı) azalır.
4. Kalıbın tekrar bağlanması ve ayrılması kovalent bağın oluşumu ve yıkımını gerektirdiğinden yavaştır.

ii) Kovalent Olmayan Baskılama

Avantajları:

1. Kovalent monomer-kalıp konjugat sentezi gereksizdir.
2. Kalıp kovalent olmayan zayıf etkileşimler ile bağlı olduğu için polimerden oldukça ılımlı koşullarda kolaylıkla uzaklaştırılabilir.
3. Kalıbın tekrar bağlanması ve ayrılması oldukça hızlıdır.

Dezavantajları:

1. Baskılama işlemi daha az kesindir (monomer-kalıp etkileşimi kararsızdır ve stokiyometrik değildir).
2. Polimerizasyon koşulları karışımda kovalent olmayan ürünün oluşumunu maksimize edecek şekilde dikkatlice seçilmelidir.
3. Fonksiyonel monomerin fazla olması genelde bağlanma seçiciliğini azaltan spesifik olmayan bağlanma bölgelerinin oluşumuna neden olur (Komiyama vd., 2003).

1.4.5 Kısa Tarihçe

1.4.5.1. Kovalent baskılama

İlk kovalent baskılama çalışması Wulff ve arkadaşları tarafından 1977 yılında rapor edilmiştir (Wulff vd., 1977). Bu çalışmada *p*-vinilbenzenboronik asit ile 4-nitrofenil- α -D-mannopiranozit (kalıp)'ın 2:1 kovalent konjugatı sentezlenmiş ve bu konjugat metil metakrilat ve etilen dimetakrilat (çapraz bağlayıcı monomer) ile kopolimerleştirilmiştir. Polimerizasyondan sonra, polimerdeki boronik asit ester bağı yıkılır ve 4-nitrofenil- α -D-mannopiranozit uzaklaştırılır. Tasarlandığı şekilde, hazırlanan polimer kalıp molekülü kuvvetli ve seçici bir şekilde bağlamıştır. Kovalent konjugattaki iki boronik asit grubunun karşılıklı konformasyonu ve kalıbın yapısı kalıplanmıştır. Benzer olarak Shea ve Dougherty (1986), kalıbın karbonil grubu ile fonksiyonel monomerdeki 1,3-diol grubu arasında ketal konjugatı oluşturmuş ve bu kovalent konjugatı moleküler baskılamada kullanmışlardır.

1.4.5.2. Kovalent olmayan baskılama

Mosbach ve çalışma arkadaşları moleküler baskılamada kalıp ve fonksiyonel monomer arasında kovalent bağın oluşumuna gerek olmadığını hatta kovalent olmayan etkileşimlerin yeterli şekilde çalıştığını göstermiştir (Arshady ve Mosbach, 1981; Vlatakis vd., 1993). Basitçe, reaksiyon ortamında kalıp ve fonksiyonel monomerin karıştırılmasıyla kovalent olmayan ürün kendiliğinden oluşur ve başarılı bir moleküler baskılama etkisi elde edilir. Örneğin, metakrilik asit ile teofillin (bir ilaç) baskılanmasında kovalent olmayan kalıp-monomer ürünü hidrojen bağları ve elektrostatik etkileşimler ile oluşmuştur. Aynı strateji, çeşitli ilaçların, insektisitlerin ve diğer pratik öneme sahip kimyasalların baskılanmasında başarılı bir şekilde kullanılmıştır. Baskılama metodunun bu kadar basit olmasına rağmen baskılama etkisinin böylesine dikkate değer olması şaşırtıcıdır.

1.4.5.3. Kovalent ve kovalent olmayan baskılamanın hibridizasyonu

Kovalent baskılamının keskin hatlı doğası ve kovalent olmayan baskılamının (hızlı kalıp bağlama) avantajları kombine edilmiştir. Polimer, kovalent baskılamada olduğu gibi hazırlanır fakat kalıbın bağlanması kovalent olmayan

etkileşimlerle gerçekleştirilir. Kovalent baskılamanın dezavantajlarından birisi olan yavaş kalıp bağlanması ve kalıp uzaklaştırılması bu yaklaşım ile çözülmüştür.

Günümüzde, moleküler baskılama metodu istenilen bölgeye kolayca ve ekonomik şekilde kalıp molekülün bağlanmasında yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Amaç yapay reseptörlerin hazırlanması olarak sınırlandırılmamıştır, çok geniş kullanım alanlarına sahiptir. Molekülleri çözeltide dondurmanın ve immobilize etmenin alternatif metodu yoktur. Biyomoleküllerin kalıp olarak kullanımı moleküler biyoloji ve farmakolojide gelecek vaat etmektedir. Bu nedenle bu metot 21. yüzyılın anahtar metodlarından biri olarak önerilmektedir (Komiyama vd., 2003).

1.4.6. Moleküler Baskılanmış Polimerlerin Hazırlanması

Moleküler baskılama işlemi kovalent ya da kovalent olmayan uygun baskılama yaklaşımının seçimi ile başlar. Bu seçimi birçok faktör etkiler; bunlardan en önemlisi kalıp moleküldür. Kalıp molekül üzerindeki fonksiyonel grupların tipi ve ulaşılabilirliği seçimde önemli rol oynar. Kalıbın yapısı, boyutu ve çözünürlüğü ile baskılanmış materyalin son-kullanımı da baskılama metodunun seçimini etkiler. Spesifik yaklaşım seçildikten sonra, iyi kalıp-monomer kompleksi kalıp-spesifik tanıma bölgelerinin oluşumuna yol göstereceğinden bir fonksiyonel monomer seçilmelidir. Çapraz-bağlayıcı, polimerizasyon başlatıcısı ve çözgen gibi diğer bileşenler de polimerin performansını ve yapısını etkiler ve bu sebeple dikkatlice seçilmeli ve çalışılmalıdır.

Serbest-radikal polimerizasyonu uygulandığında, polimerizasyon termal veya fotokimyasal olarak başlatılır, böylece başlatıcının yıkımı ve serbest radikallerin oluşumu başlar. Bu radikal oluşumu daha sonra çapraz bağlı polimerik ağ yapının oluşumuna neden olan çapraz-bağlayıcı ve fonksiyonel monomerin polimerizasyonunu başlatır. Dikkat edilmelidir ki polimerizasyon kalıp molekülün varlığında gerçekleştirilir ve bu sebeple kalıp moleküller bu işlemin sonunda polimerik ağ yapının içinde tutulur. Hazırlanan moleküler baskılanmış polimer daha sonra geliştirilir. Eğer polimer bir katı monolit olarak hazırlandı ise, partiküller öğütme ve eleme ile 10-25 µm boyutlarına getirilir.

Moleküler baskılanmış polimerlerin bağlama çalışmalarında kullanımdan önce tek bir adım kalmıştır – polimer matriksten orijinal kalıp molekülün ekstraksiyonu. Farklı baskılama işlemleri için çeşitli ekstraksiyon protokolleri geliştirilmiştir.

Kovalent ve metal koordinasyon yaklaşımında, kalıp ve fonksiyonel element arasında oluşan bağı kırarak uygun bir ajana gereksinim duyulacaktır. Kovalent olmayan yaklaşımda iyonik veya hidrojen bağlarını etkili bir şekilde bozduğu için bir asidik veya bazik bileşen içeren polar bir çözügen kullanılır, böylece kalıp molekülün kendi bağlanma bölgelerinden ayrımı gerçekleşir. Metanol gibi uçucu bir çözügen ile son yıkama reaktiflerin uzaklaştırılmasını ve polimerin kurutulmasını kolaylaştırır (Yan ve Ramström, 2005).

1.4.7. Moleküler Baskılanmış Polimerin Mikroçevresi

Kalıp ve MIP reseptör arasındaki olası etkileşimlere ek olarak, bağlanma bölgesini çevreleyen mikroçevre MIP'lerin hedef moleküllerini tanıma etkinliği üzerinde önemli bir role sahiptir. Bu sebeple, sentezlenmiş olan ve farklı koşullar altında test edilen MIP'ler arasında kantitatif bir karşılaştırma yapmak çok zordur. Kalıp-reseptör tanınmasında iyonik etkileşimlerin baskın olduğu durumlarda iyonik kuvvetin etkisi çalışılmalıdır. MIP'lerin bağlama kapasitesi üzerine tampon bileşiminin ve iyonik şiddetin etkisini gözleyebilmek üzere birçok tampon sistemi kullanılmıştır. Sadece tampon içeriğinin kendisi değil aynı zamanda bağlama çözeltisinin iyonik şiddeti de MIP'lerin etkinliğinin saptanmasında önemli rol oynar. MIP'lerin bağlama kapasitesinin inhibisyonu, tuz derişimindeki değişim tarafından meydana gelen polimer konformasyonundaki değişim ve/veya bağlama bölgesini çevreleyen mikroçevredeki değişimlerin bir sonucu olarak meydana gelir. Örneğın, tuzlar hem hedef hem de kalıp bölgelerini koruyan yüksek mobiliteye sahip anyon ve katyonlara ayrıldığından dolayı yük-perdeleme etkisi yüksek tuz derişimlerinde kalıp ile iyonik etkileşimleri bloke etmektedir. Tampon bileşiminin iyonik şiddetin etkisi diğer sistemlerde çalışılmamıştır, fakat oldukça yüksek olasılıkla bu iki değişken MIP sistemleri üzerine oldukça yüksek etkiye sahiptir.

1.4.8. Moleküler Baskılanmış Polimer Bileşimi

Baskılamada kullanılan MIP'lerin yapısı ve bileşimi hedef molekülün tanınmasında oldukça yüksek etkiye sahiptir. Sığır serum albumin varlığında sentezlenmiş albumin baskılanmış MIP hidrojeller kullanılarak yapılan albumin bağlanma denemeleri, adsorpsiyonun sentez sırasında kullanılan başlangıç BSA derişimine şiddetle bağı olduğunu göstermiştir. Bu durum, sentez sırasında

yüksek kalıp derişiminin çok sayıda bağlanma bölgesi oluşturması gerçeği ile açıklanabilir (Janiak ve Kofinas, 2007).

Lizozim baskılanmış silika boncuklar üzerine çalışmalar göstermiştir ki, boncuklar üzerine adsorplanan lizozim miktarı, partiküllerin sentezi sırasında kullanılan fonksiyonel monomerlerin bileşimine bağlıdır. Bu bağlılık, reseptör ve kalıp arasındaki kompleksleşmede maksimum derecede sorumlu sentetik reseptör üzerindeki yüklü gruplar arasındaki bazı optimum mesafelerin varlığını göstermiştir. Ayrıca çapraz bağlayıcı ajan da, kendi hedef molekülüne yüksek afiniteye sahip sentetik reseptörleri oluşturmada kritik bir faktördür (Janiak ve Kofinas, 2007).

1.4.9. Moleküler Baskılama Tekniği

MIP'ler tipik olarak, bir kalıp ve porojenik çözgenin varlığında fonksiyonel monomerler ve çapraz bağlayıcıların serbest radikal kopolimerizasyonu ile hazırlanır. Günümüzde kontrollü polimerizasyon işlemlerinde atom transfer radikal polimerizasyonu, halka açılması polimerizasyonu ve başlatıcısı kullanılmaktadır. Kovalent olmayan baskılama yaklaşımında, seçici bağlanmanın oluşmasından sorumlu olan temelde hidrojen bağları ve iyonik etkileşimler baskındır.

Baskılanmış polimerin fiziksel formu performansı üzerine önemli etkilere sahiptir. Örneğin, MIP'ler yüksek performanslı ayırmlar için gerekli bağlanma bölgesine (veya bölgesinden) kalıbın hızlı bağlanması (veya ayrılması) gereken HPLC durağan fazı olarak kullanılacaksa, 5 ile 25 µm çapında eşboyutlu küresel partiküllerin kullanılması gerekmektedir. Aynı zamanda, 1 µm'den küçük ve eş boyutlu MIP'ler çözgen içinde kararlı süspansiyon oluşturmalarından dolayı immunoanalizler için daha uygundur. İnce film formatındaki MIP'ler sensör uygulamaları için tercih edilmektedir.

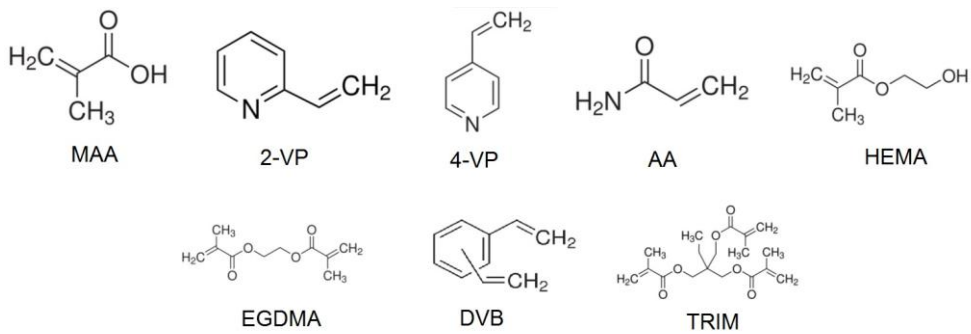
MIP'ler genellikle monolitik makrogözenekli materyallerin oluştuğu yığın polimerizasyonu ile hazırlanır. Bunlar daha sonra ezilir, öğütülür ve uygun partikül boyutuna elenir. Öğütme ve eleme işlemleri zaman kaybettiren uygulamalardır ve takip eden uygun partiküllerin çöktürülmesi işlemi ise oldukça fazla miktarda polimer kaybına neden olur. Elde edilen MIP'ler bazen düzgün

olmayan şekillerdedir ve bu durum kromatografik amaçlı uygulamalar için uygun değildir.

Bugüne kadar, küçük moleküllerden (metal iyonları, ilaçlar, amino asitler, şekerler gibi) protein, hücre ve kristaller gibi büyük öğelere kadar çok sayıda bileşik baskılanmıştır. Sentezlenen sentetik reseptörler kalıplarına karşı oldukça iyi tanıma göstermişlerdir. Baskılama matrisleri sadece organik polimerler olarak sınırlanamaz. Baskılama ayrıca proteinler gibi biyomakromoleküller ve silika gibi inorganik materyaller kullanılarak da gerçekleştirilebilir (Zhang vd., 2006).

Fonksiyonel monomer ile etkileşim MIP'lerin afinitesini etkiler, bu nedenle doğru fonksiyonel monomer seçimi moleküler baskılamada önemlidir. En iyi sonuç kalıbın birden daha fazla bağlanma bölgelerine bağlanması ile elde edilir. En önemli etkileşim tipleri: i) kovalent bağ, ii) π - π etkileşimi, iii) hidrojen bağı, iv) hidrofobik/van der Waals etkileşimleri ve v) iyonik bağ. Farklı tipte etkileşimler farklı seviyede spesifikliğe sebep olur.

Moleküler baskılamada kullanılan tipik monomerler, metakrilik asit (MAA), 2- ve 4-vinilpiridin (2- ve 4-VP), akrilamid (AA) ve 2-hidroksietil metakrilat (HEMA)'tır. Etilen glikol dimetakrilat (EGDMA) en yaygın çapraz bağlayıcıdır, diğer çapraz bağlayıcılar; divinilbenzen (DVB) ve trimetilolpropan trimetakrilat (TRIM)'tır (Şekil 1.12.).



Şekil 1.12. MIP'lerin hazırlanmasında kullanılan monomerler ve çapraz bağlayıcılar

(<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/AdvancedSearchPage.do>; erişim tarihi: 11.08.2012).

Rijit ve yüksek yoğunlukta polimerik ağ elde etmek üzere çapraz bağlayıcının aşırısı ilave edilir (çapraz bağlayıcının fonksiyonel monomere molar oranı 5:1 dir). Bu baskılanmış bölgenin şeklinin boyutunun korunmasını sağlar ve farklı çevrelere, büzülme ve şişmeye dayanım sağlar.

Kalıp-monomer kompleksinin oluşumundan sonra, bir azo başlatıcı (genellikle azo-N,N'-bis-izobütironitril, AIBN) polimerizasyon karışımına eklenir. Serbest radikal polimerizasyonu 40-60 °C'ye ısıtarak veya UV radyasyon ile fotokimyasal homoliz (0-15 °C) ile başlatılır. Düşük sıcaklıklarda hazırlanan MIP'lerin daha iyi moleküler tanımayaya sahip olduğu gözlenmiştir. Bu durum, oluşan polimerde daha iyi tanımlanmış baskıya neden olan daha elverişli entropik koşulları nedeniyle düşük sıcaklıkta ön-polimerizasyon karışımındaki kalıp molekül ile monomerlerin daha kararlı kompleksler oluşturmaları ile açıklanabilir (Lasakova ve Jandera, 2009).

1.4.10. Moleküler Baskılanmış Polimerlerin Uygulamaları

Günümüzde, moleküler baskılama kimya, biyokimya ve biyoteknolojinin birçok alanında yoğun bir şekilde çalışılmıştır. Özellikle kovalent olmayan baskılama tekniği, hazırlanmasındaki yüksek esneklik sebebiyle yoğun ilgi çekmektedir. Gerçekte, kovalent olmayan yaklaşımda organik senteze gerek yoktur. Bu sebeplerden dolayı, kovalent olmayan baskılanmış polimerler temelde üç farklı alanda kullanılmaktadır, ayırma ve izolasyon; antikor taklitleri (biyotaklit analiz ve sensörlerde); ve enzim taklidi kataliz ve organik sentezler.

MIP uygulamalarının en yoğun çalışıldığı alanlardan birisi el yapımı (tailor-made) ayırma materyalleri olarak kullanımlarıdır. Özellikle, rasemik karışımların kiral ayrımı optik olarak saf bileşiklere artan talepten dolayı yoğun ilgi çekmektedir.

Proteinlerin önemli biyolojik ve teknolojik öneminden dolayı proteinlere seçici olarak bağlanma yeteneğine sahip MIP'lerin geliştirilmesi üzerine ilgi giderek artmıştır. Bununla birlikte, protein yapılarının kompleksliği, amino asit sekanslarının farklılığı, katlanma hareketleri ve yapılarının ve fonksiyonlarının çevreye bağlı olması (örn, çözgen, sıcaklık, pH ve iyonik şiddet) protein spesifik MIP'lerin hazırlanmasında aşılması gereken durumlardır. Ayrıca, proteinler baskılanmış polimer içerisine tutuklanacak kadar büyük olduklarından ve

geleneksel baskılama metotları kullanıldığında ekstrakte edilmeleri zor olduğundan dolayı yeni baskılama stratejilerine ihtiyaç duyulmuştur.

Baskılanmış polimerler, farmakötik bileşiklerin kiral ayrımı, geleneksel ilaç ve otların ham ekstraktlarından aktif ilaç bileşenlerinin ayrılması, ilaç sentezi sırasında yan ürünlerin uzaklaştırılması, ilaç taraması, ilaç analizi ve ilaç dağıtımı gibi çeşitli ilaç geliştirme alanlarında güçlü potansiyele sahiptir. Yüksek seçici materyaller olarak MIP'ler genelde enzimlerin, antikorların ve reseptörlerin bağlanma veya aktif bölgelerinin taklidi olarak ele alınmaktadır. Bu sebeple MIP'ler yeni inhibitörler ve antagonistlerin taranmasında umut verisi alternatif materyaller olarak görülmektedir (Zhang vd., 2006).

Seçici protein bağlanması alanındaki günümüz laboratuvar uygulamaları genelde, ekstraksiyon ve biyosensörde kullanılacak ve analizde ve izolasyonda spesifik protein tutuklayacak olan antikor temellidir. Bununla birlikte, bu tip sistemler çok pahalıdır ve sadece tek kullanımlık işlemler için uygundur. Bu sebeple, biyolojik eşdeğerlerine seçicilik ve spesifite açısından benzer olan ve ucuz, dayanıklı ve tekrar kullanılabilir alternatiflere büyük ilgi vardır. Bu tip materyallerin potansiyel uygulamaları laboratuvar ötesine kolaylıkla geçebilir. Biyolojik ve hücresel açıdan, biyolojik olarak fonksiyonel proteinler seyrek de olsa bağımsız olarak hareket eder ve protein-protein etkileşimleri tüm hücre regülasyonu ve kontrolünde baskındır. Bu sebeple, biyolojik sistemleri kontrol etkisi olabilen kullanışlı araçlar olarak protein seçici MIP'ler geliştirilmektedir (Turner vd., 2006).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Kriyojeller ile İlgili Önemli Çalışmalar

Kriyojel sentezi hakkındaki ilk çalışma Peppas tarafından (1975) rapor edilmiştir. Peppas yaptığı çalışmada, poli(vinil alkol) (PVA) çözeltisini -20 °C'de dondurmuş ve sonrasında 23 °C'de eritmiştir. Sentezlenen süpermakrogözenekli PVA kriyojel partiküllerin boyutlarının 1.6-2.3 µm aralığında olduğu bulunmuştur.

Kriyojel çalışmalarının ivmelenmesini sağlayan çalışmalar Lozinsky ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir. Grubun 1981 yılında yayınladığı çalışmada (Vainerman vd., 1981) tiyol içeren poli(akril amid) kriyojeller dondurma-eritme işlemi ile hazırlanmış ve jel oluşumunun polimer zincirindeki serbest -SH gruplarının oksidasyonu ile meydana geldiği ifade edilmiştir. Lozinsky vd. (1982) tarafından gerçekleştirilen başka bir çalışmada kitosan kriyojeller glutarik dialdehit ile çapraz bağlanarak hazırlanmıştır. Sentezlenen kriyojelin özellikleri üzerine kitosan derişiminin ve donma sıcaklığının etkileri incelenmiştir. Grubun 1984 yılındaki çalışmalarında kriyoyapılaşma üzerine organik çözenlerin etkisi incelenmiştir (Lozinsky vd., 1984a). Çalışmada iki farklı reaksiyon sistemi denenmiştir: a) dimetilsülfoksit içerisinde N-vinilpirrolidon-maleik anhidrit ve 4,4'-diaminodifeniloksit karışımı; b) nitrobenzen içerisinde SnCl₄ varlığında polistiren ve *p*-ksilen diklorür karışımı. Çalışma sonunda organik ortamın kriyoyapılaşma üzerine etkisinin sulu sistemlerin jelleşme sistemine benzer olduğu belirtilmiştir. Aynı yıl yapılan başka bir çalışmada (Lozinsky vd., 1984b) çözen, vinil monomer-divinil monomer ve başlatıcı sisteminin kriyoyapılaşma üzerine etkisinin incelenmesi amacıyla çözen olarak suyun kullanıldığı akrilamid, N,N'-metilen-bis-akrilamid, amonyum persülfat ve N,N,N',N'-tetrametiletilediamin sistemi incelenmiştir. Kriyoderişme olayının ifade edildiği çalışmada sentezlenen kriyojelin ozmotik karakterleri araştırılmıştır. Sentezlenen bu kriyojellerin yüzey özellikleri Belavtsave vd. (1984) tarafından incelenmiştir. Bu amaçla, optik mikroskopi, taramalı ve transmisyon elektron mikroskopi teknikleri uygulanmıştır. Çalışma sonunda sentezlenen kriyojellerin makrogözenekli yapıları incelenmiştir. Lozinsky vd. (1986) işlem sıcaklığının poli(akrilamid) kriyojellerin yapısı üzerine etkilerini incelemişlerdir. Bu amaçla kriyojenik uygulama sıcaklığı -10 ile -30 °C aralığında değiştirilmiş ve sıcaklık ile gözenekli kriyojelin makroyapısının önemli oranda etkilendiği ifade

edilmiştir. Bulgular elektron mikroskopisi ve hidrodinamik ölçümlerle de doğrulanmıştır.

Lusta vd. (1988) poliakrilamid kriyojeller üzerine *E. coli* hücrelerini immobilize etmişlerdir. İmmobilizasyon üç farklı yöntemle gerçekleştirilmiştir: (1) reaksiyon karışımına hücrelerin eklenmesi ve kriyopolimerizasyon; (2) hücrelerin kriyojel gözeneklerine glutarik dialdehit ile bağlanması; (3) polimerik matriksin gözeneklerinin modifiye edilmesi. Her üç yöntemle elde edilen *E. coli* immobilize kriyojellerin yapıları araştırılmıştır. İlk iki yöntem ile immobilize edilen hücreler uzun süre canlı kalamazken üçüncü yöntem ile daha uzun süre canlı kalan hücreler elde edilmiştir.

Doretti vd. (1998) poli(etilen glikol) ile modifiye edilmiş glukoz oksidazı poli(vinil alkol) kriyojel membran içerisine immobilize etmişler ve elde edilen kriyojelleri amperometrik glukoz sensörü olarak kullanmışlardır. Sensör davranışları hidrojen peroksit elektrod ile elektrokimyasal olarak incelenmiştir. Standart çözeltilerdeki glukoz derişimi 5×10^{-5} – 5×10^{-3} mol/L aralığında saptanmıştır. Sensörün kararlılığı, pH ve sıcaklık etkisi gibi analitik karakterleri araştırılmıştır ve sensörün tayin sınırı 3×10^{-5} mol/L olarak hesaplanmıştır. Sensör 4 °C'de 2 ay bekletildiğinde dahi elektrod sinyalinde sadece % 5'lik bir azalma meydana gelmiştir. Optimum cevabın alındığı pH 6.0 (fosfat tamponu) olarak bulunurken sıcaklık artışı ile cevabın arttığı gözlenmiştir.

Polimerik kriyojellerin biyoayırmadaki potansiyeli Lozinsky ve arkadaşlarının (2002) derlemesinde verilmiştir. Bu derlemede, kriyojellerin eşsiz makrogözenekli yapısı, ozmotik, kimyasal ve mekanik dayanımı belirtilmiş ve proteinler, membran parçaları, virüsler, hücre organelleri ve hatta tüm bir hücreyi de içeren çok çeşitli örneklerin kromatografisi için matriks olarak kullanım potansiyeli ifade edilmiştir. Ayrıca, kromatografik materyaller olarak kriyojellerin boncuk formunda veya silindirik bloklar (monolit) şeklinde kullanılabileceği ifade edilmiştir. Makrogözenekli yapısından dolayı biyokataliz immobilizasyonunda matriks olarak uygulamaları ve avantajları gösterilmiştir ve kriyojel uygulamalarının yeni potansiyelleri üzerinde durulmuştur.

İmmobilize metal afinite kromatografisini kullanarak ham hücre homojenatlarından His-etiketli rekombinant laktat dehidrogenazın [(His)₆-LDH] direkt saflaştırılması için iminodiasetik asit ile modifiye edilmiş

süpermakrogözenekli monolitik poli(akrilamid) kriyojel kolonların kullanımı Arvidsson vd. (2003) tarafından çalışılmıştır. Çalışmada, süpermakrogözenekli matriks akrilamid, alil glisidil eter ve N,N'-metilen-bis(akrilamid)in radikalik kopolimerizasyonu ile hazırlanmıştır. Elde edilen polimer içten bağlı 10-100 µm boyutlarında gözeneklere sahiptir. İminodiasetik asit kriyojele kovalent olarak bağlanmıştır ve termofilik *Bacillus stearothermophilus* kaynaklı fakat *E. coli*'den üretilen rekombinant (His)₆-LDH'ın immobilize metal afinite kromatografik saflaştırılmasında kullanılmıştır. Geniş gözenek boyutlarından dolayı kolona uygulanacak ham ekstraktın ön filtrasyonuna veya santrifüj edilmesine gerek kalmamıştır. Kolona bağlanan (His)₆-LDH'ın elüsyonu için 10 mM imidazol çözeltisi kullanılmıştır ve enzimin saflığı SDS-PAGE ile gösterilmiştir.

Plieva vd. (2004) süpermakrogözenekli monolitik akrilamid temelli kriyojelleri, fonksiyonel monomerler ve çapraz bağlayıcı N,N'-metilen bisakrilamid ile akrilamidin radikal kriyopolimerizasyonu ile hazırlamışlardır. Sentezlenen kriyojellerin 5-100 µm'lik gözenek boyutlarına sahip olduğu bulunmuştur. Monolitin yatak hacminin yaklaşık % 90'ı içten bağlı süpermakrogözenekleri dolduran su iken monolitik hacmin yaklaşık % 10'u gözenek duvarlarıdır. Kriyojelin protein bağlama kapasitesinin (immobilize metal afinite kromatografisi durumunda lizozim ve anyon değiştirici kolon durumunda sığır serum albumin) yanında *E. coli* hücrelerini bağlama özellikleri de incelenmiştir. Lizozim saflaştırma çalışmalarında kriyojellere imidodiasetik asit bağlanmış ve Cu²⁺ ile şelatlaştırılmıştır. İyon değişim kolonu olarak ise kriyojel hazırlanırken fonksiyonel monomer olarak 2-(dimetilamino)etil metakrilat (DMAEMA) kullanılmıştır. *E. coli* saflaştırılmasında da DMAEMA fonksiyonel monomerini içeren kriyojeller hazırlanmış ve bağlanan *E. coli*'nin desorpsiyonu için NaCl tuz gradienti kullanılmıştır (0.2 M-1.0 M). Hazırlanan bu süper makrogözenekli monolitik kolonlar biyolojik partiküllerin ve hatta hücrelerin kromatografik olarak saflaştırılması ve izolasyonu için ayırma destekleri olarak gelecek vaat ettikleri vurgulanmıştır. Kolon hacminin yaklaşık % 90'ı içten bağlı süpermakrogözeneklerden oluştuğundan dolayı kolondaki geri basınç değerlerinin oldukça düşük olduğu gözlenmiştir. Kriyojelin gözenek boyutu ve gözenek morfolojisinin kullanılan monomerlerin derişimi ve dondurma sıcaklığı ile kontrol edildiği ifade edilmiştir.

Dainiak vd. (2004) süpermakrogözenekli dimetilakrilamid (DMAA) kullanarak seyreltilmemiş ve temizlenmemiş hücre kültürü ortamlarından direkt olarak proteinlerin kazanımı için kromatografik yakalama/saflaştırma adımı tanımlamışlardır. Adsorbanın gözeneklerinin içten bağlı karakteri ve boyutları (10-100 μm) tüm hücre fermantasyon ortamının kolonu tıkamadan çıkışına izin vermektedir. Cu^{2+} -iminodiasetik asit (IDA) DMAA kriyojeller *E. coli* hücre kültüründen $(\text{His})_6$ -etiketli tek zincirli Fv antikör parçasının $[(\text{His})_6\text{-scFv}]$ izolasyonu ve saflaştırılması için kullanılmıştır. Bağlı protein 0.2 M'lık imidazol veya 20 mM'lık EDTA kullanılarak elüe edilmiştir ve hemen hemen hücre içermemektedir. Cu^{2+} -IDA kriyojel kolon ile kromatografik yakalama 300 ve 600 cm/h akış hızlarında denenmiştir ve % 84-96 $(\text{His})_6\text{-scFv}$ geri kazanımı ve 13-15 kat saflaştırma kat sayısı sergilemiştir. DMAA kriyojel adsorbanlar mekanik olarak ve sert temizleme prosedürlerine karşı dayanıklıdır ve bağlı olarak ucuzdur.

Yapılan bir çalışmada, protein A immobilize edilmiş dimetil akrilamid (DMAAm) monolitik kriyojelleri ve polivinil alkol (PVA) kriyojel boncukları ile CD34 yüzey antijeni sentezleyen insan akut myeloid leukemia KG-1 hücrelerinin tutulması ve insan kan lenfositlerinin fraksiyonlanması gerçekleştirilmiştir (Kumar vd., 2005). Afinite ligandı (protein A) reaktif PVA-kriyojel boncuklar ve epoksi-türevlendirilmiş monolitik kriyojeller üzerine farklı immobilizasyon teknikleri ile kimyasal olarak bağlanmıştır. Hücrelerin monolitik kriyojellere bağlanma oranı (% 90-95) kriyojel boncuklara nazaran (% 76) daha yüksektir. Protein A kriyojel boncuklara bağlı B-lenfositler T-lenfositlerden ayrılabilmiştir ve bağlı B-lenfositlerin yaklaşık % 91'i canlılıklarında önemli bir kayıp olmadan geri kazanılmıştır.

Hanora vd. (2005) yaptıkları bir çalışmada, polietilenimin (PEI), polimiksin B (PMB) ve lizozimi kriyojel kolonlara immobilize ederek bakteriyel endotoksinleri yakalamaya çalışmışlardır. Kriyojellerin geniş gözenek boyutlarından dolayı kriyojel kolonu 10 mL/dakika gibi yüksek hızlarda kullanma olasılığı vardır. PEI, PMB ve lizozim immobilize edilmiş Sepharose CL-4B ile doldurulmuş kolonlar kullanılarak bu hızlarda çalışmak imkansızdır. Yapılan çalışmada, *E. coli* hücre lizatından bakteriyel toksinler pH 3.6'da direkt olarak yakalanmıştır.

Markvicheva vd. (2005) yaptıkları immobilizasyon çalışmasında kimotripsini bir kompozit poli(N-vinil kaprolaktam)-kalsiyum aljinat (PVCL-CaAlg) içerisine tutuklamışlar ve poli(vinil alkol) (PVA) kriyojel boncuklara kovalent olarak

bağlamışlar, lipaz enzimini ise aldehit taşıyan PVA kriyojel boncuklara kovalent olarak bağlamışlardır. immobilize edilen enzimlerin aktiviteleri de ayrıca çalışılmıştır. α -kimotripsin ve lipaz asetonitril/su ortamında (su içeriği % 0.5-20.0) yüksek aktivite göstermişler ve birkaç ay için yüksek depolama kararlılığı sergilemişlerdir. Tekrar kullanım için immobilize α -kimotripsin ve lipazın yüksek operasyonel kararlılığı (toplam 912 saate adar) ayrıca gösterilmiştir. Jele immobilize edilmiş enzimler asetonitril/su sistemlerinde amino asit etil esterlerin Schiff bazlarının enantioselektif hidrolizi ile optikçe saf L-fenilalanin elde edilebilmiştir.

Sulu çözeltiler ve insan plazmasından insan immunoglobulin-G (IgG)'nin concanavalin A immobilize edilmiş poli(akrilamid-allil glisidil eter) monolitik kriyojellere bağlanması çalışmaları Babaç vd. (2006) tarafından gerçekleştirilmiştir. Yığın polimerizasyonu ile hazırlanan kriyojeller içten bağlı 10-100 μm boyutlarında gözeneklere sahiptir. Concanavalin A bu kriyojele epoksi grupları üzerinden kovalent olarak bağlanmıştır. Concanavalin A bağlanmış bu kriyojellere maksimum IgG adsorpsiyonu pH 7.4'de 6.7 mg/g olarak bulunmuştur. İnsan plazması kullanıldığında ise daha yüksek adsorpsiyon kapasiteleri bulunmuştur (25.6 mg/g). Kriyojellere bağlanan IgG 2.0 M'luk NaCl ile elüe edilirken kriyojellerin 10 adsorpsiyon/desorpsiyon döngüsü boyunca adsorpsiyon kapasitelerinde bir azalma olmadığı görülmüştür.

Nanometre boyutlarında partikülleri gömülü olarak taşıyan süpermakrogözenekli monolitik kriyojeller akrilamid, N,N'-metilen-bis-akrilamid, alil glisidil eter ve Fe_3O_4 nanopartiküllerinin radikal kriyojenik kopolimerizasyonu ile Yao vd. (2006) tarafından sentezlenmiştir. Hazırlanan bu kriyojelin gözenek boyutları 10-50 μm olarak bulunurken, bu gözenek açıklığı mikrobiyal hücrelerin ve hücre kalıntılarının geçişine izin verecek ölçüdedir. Kriyojellere protein adsorpsiyonunda model molekül olarak sığır serum albumin kullanılmıştır ve kriyojeller 274 mg albumin/g düzeyinde adsorpsiyon kapasitesi sergilemişlerdir. Kriyojele albumin adsorpsiyonu albuminin izoelektrik noktasına ($\text{pI} = 4.7$) yakın bir pH değerinde ($\text{pH} = 4.6$) maksimuma ulaşmıştır. Adsorplanan albumin NaOH veya Na_2HPO_4 gibi alkali koşullar altında desorbe edilmiştir. Yapılan çalışmada 0.5 M Na_2HPO_4 ($\text{pH} 9.4$) elüsyon ajanı olarak kullanılmıştır ve desorpsiyon oranı % 90.1 olarak bulunmuştur.

İmmobilize concanavalin A içeren kriyojel monolitler ile hücrelerin kromatografik ayrılmasının yapıldığı bir çalışmada (Dainiak vd., 2006), *S. cerevisiae* ve *E. coli* hücrelerinin birbirlerinden kromatografik olarak ayrılması amaçlanmıştır. Denemelerde epoksi ile aktive edilmiş poliakrilamid kriyojelleri kullanılmış ve concanavalin A kriyojele uygun koşullar altında kovalent olarak bağlanmıştır. Hazırlanan immobilize concanavalin A içeren kriyojeller üzerine *S. cerevisiae* hücreleri tutulurken *E. coli* hücreleri kolona bağlanmadan terk etmişlerdir. Bağlı *S. cerevisiae* hücreleri ise 0.3 M'lık metil α -D-manno-piranozid ile elüe edilmiştir. Kolonu terk eden *E. coli* hücrelerinin saflığı yaklaşık % 100 iken adsorbandan elüe edilen canlı *S. cerevisiae* hücreleri % 95 saflıktadır.

Kumar vd. (2006) yeni tip bir süpermakrogözenekli, monolitik, kriyojel afinite adsorbani geliştirmişler ve bu adsorbani insan fibrosarkoma hücresi HT1080 serisinden ürokinazın spesifik olarak saflaştırmakta kullanmışlardır. Yapılan çalışmada, epoksi ile aktive edilmiş poliakrilamid ve Sepharose'a Cu(II) iminodiasetik asit (IDA) kullanılarak bağlanmıştır. Cu(II)-IDA-poliakrilamid kriyojel kolonu kullanılarak yaklaşık 27 katlık bir ürokinaz saflaştırılması elde edilmiştir ve yaklaşık 814 Plough unitesi (PU)/mg protein enzim aktivitesine ulaşılmış ve enzim verişimi yaklaşık % 80 olarak bulunmuştur. Cu(II)-IDA-Sepharose kolonu ile daha yüksek verim elde edilmesine rağmen kriyojel matrikse göre seçiciliği düşüktür (spesifik aktivite = 161 PU/mg protein ve saflaştırma katsayısı = 5.3). Elde edilen ürokinazın saflığı ayrıca SDS-PAGE ve zimogram ile de gösterilmiştir.

Nilsang vd. (2007) tarafından monoklonal antibadilerin (mAb) uzun süreli ve sürekli üretimi için hibridoma hücrelerini kültüre etmek için süpermakrogözenekli kriyojel biyoreaktörleri geliştirilmiştir. Çalışmada kollajen tip II'nin J1 epitopuna (GERGAAGIAGPK; amino asitler, 551-564) karşı antibadi sentezleyen hibridoma M2139 klonu bir kriyojel kolona immobilize edilmiştir. Hücreler inoküle edildikten sonraki 48 saat içerisinde matrikse bağlanmış ve kriyojel matriks içerisinde büyümüşür. Hücreler 15 gün lag fazdadır ve sirküle olan ortama mAb sentezlemektedir. Ekspontiyal fazda hücreler günde 6.5 μ g/mL mAb üretmişlerdir. Otuzaltı gün sonunda ise mAb derişimi 130 μ g/mL'ye ulaşmıştır. Saflaştırma sonrası mAb verimi 67.5 mg/L'dir ve bu değer T-flask batch kültürlerinden üç kat daha fazladır. Ortam değiştirildiğinde bile kriyojel kolonlardaki hücreler halen aktiftir ve mAb üretmektedir. Biyoreaktör 55 gün boyunca herhangi bir kontaminasyon olmadan sürekli kullanılabilmiştir. ELISA

sonuçları ve arthritis denemeleri, kriyojel kolonda büyüyen hücreler tarafından sentezlenen antibadilerin ticari CL-1000 kültür ortamlarında büyüyen hücrelerden elde edilen antibadilerden farklı olmadığını da göstermiştir.

Noppe vd. (2007), rekombinant insan laktoferrin ve von Willebrand faktörleri için yüksek bağlama afinitesine sahip bir peptid sentezleyen fajı poli(dimetilakrilamid) monolitik kolona kovalent olarak bağlamışlardır. Makrogözenekli polimerin geniş gözenek boyutları (10-100 μm) ligant olarak kullanılan fajların monolitik kolonu tıkamadan bağlanabilmesini sağlamıştır. Sentezlenen monolitik kolonlar kazein miselleri ve yağ globülleri (1-10 μm boyutlarında) içeren süt ve hatta kan hücreleri (20 μm boyutlarına kadar) içeren tam kan gibi partikül içeren ortamlardan hedef proteinlerin direkt afinite saflaştırılmasında kullanılmıştır. Bu yeni geliştirilen monolitik kriyojellerin makrogözeneklerine immobilize edilmiş bakteriofaj temelli platform sayesinde spesifik adsorbanların seçici ve hızlı gelişimi için antikorlara uygun alternatifler geliştirilebilmiştir.

Demiryas vd. (2007), poli(akrilamid-allil glisidil eter) [poli(AAm-AGE)] kriyojelleri kriyopolimerizasyon yöntemi ile sentezlemişlerdir. Hazırlanan kriyojellere Cibacron Blue F3GA boyası epoksi gruplarının üzerinden kovalent olarak bağlanmıştır. Kriyojellerin karakterizasyonları şişme çalışmaları, FTIR, SEM ve elementel analiz ölçümleri ile gerçekleştirilmiştir. Cibacron Blue F3GA bağlı poli(AAm-AGE) kriyojeller insan serum albuminin (HSA) sulu çözeltisinden ve insan plazmasından adsorpsiyonu ve desorpsiyonu çalışmalarında kullanılmıştır. Kriyojeller üzerine maksimum HSA adsorpsiyonu pH 5.0 asetat tamponunda 27 mg/g olarak bulunmuştur. İnsan plazmasından yapılan çalışmada ise daha yüksek adsorpsiyon kapasitesi elde edilmiştir (74.2 mg/g). Kriyojellerde adsorplanan HSA, 0.5 M NaCl içeren 0.1 M Tris/HCl tamponu kullanılarak desorbe edilmiştir. HSA'in adsorpsiyon kapasitesinde önemli bir azalma olmadan poli(AAm-AGE) kriyojellere tekrar tekrar adsorbe ve desorbe edilebilmiştir.

Andaç vd. (2008), biyobozunur süpermakrogözenekli poli(HEMA) kriyojelleri poli(etilen glikol) diakrilat ve N,N'-bis(metakriloil)-L-sistein çapraz bağlayıcılarının varlığında sentezlemişlerdir. Hazırlanan kriyojellerin yüksek oranda içten bağlı mikrometre boyutlarında gözeneklere ve iyi mekanik dayanıma sahip olduğu bulunmuştur. Ditiyotreitil (DTT) gibi indirgeyici ajanların varlığında biyobozunur poli(HEMA) kriyojeller küçük parçalara ayrılmıştır. Biyobozunma hızı çapraz bağ yoğunluğu ve DTT derişimi ile kontrol edilmiştir.

Derazshamshir vd. (2008) tavuk yumurtası lizoziminin afinite saflaştırılması için Zn^{2+} -şelatlanmış poli(HEMA-MAH) kriyojeller hazırlamışlardır. Sentezlenen kriyojeller elementel analiz, SEM, FTIR ve şişme çalışmaları ile karakterize edilmiştir ve bu monolitik kriyojelin denge şişme derecesi 5.62 g H_2O/g kriyojel olarak bulunmuştur. Kriyojelin MAH içeriği 45.8 $\mu\text{mol/g}$ kriyojeldir. Sentezlenen bu kriyojeller sulu çözeltilerinden lizozimin adsorpsiyonu ve desorpsiyonunda kullanılmıştır. Maksimum lizozim adsorpsiyonu pH 7.0'da 209 mg/g olarak bulunmuştur ve spesifik olmayan bağlanmanın oldukça düşük olduğu (7.5 mg/g) gösterilmiştir.

Yan vd. (2008), yüksek akış hızlarında anyon değiştirici süpermakrogözenekli bir kriyojel kolon kullanarak maya fermantasyon ortamından ATP izolasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Kriyojel boncuklarda saf ATP'nin alıkonma ve elüsyon koşulları 2, 5 ve 10 cm/dak akış hızlarında incelenmiştir ve ATP bağlanma kapasitesi saptanmıştır. Fermantasyon sıvısından ATP adsorpsiyonu denemeleri gerçekleştirilmiş ve analizler HPLC ile yapılmıştır. Çalışmanın sonunda yüksek akış hızlarında dahi ayrılan ATP'nin saflığı % 98 oranlarında bulunmuş ve geliştirilen bu metot ile ATP'nin fermantasyon sıvılarından hızlı ve yüksek-safılıkta saflaştırılabildiği gösterilmiştir.

Kriyojellerin mikrobiyolojideki uygulamalarına değinilen bir derlemede Plieva vd. (2008) hücre ve virüs süspansiyonlarının işlenmesi, hücre ayrılması ve hücre kültürü uygulamalarında kriyojellerin uygulamaları hakkında bilgiler verilmiştir. Derlemede, kriyojellerin hazırlama teknikleri hakkında bilgi verilirken, kriyojellerin özelliklerine de değinilmiştir. Kriyojellerin hücre immobilizasyonunda kullanımına da yer veren çalışmada, immobilizasyonda mekanik tutuklama ve gözenek yüzeyine immobilizasyon olmak üzere iki temel tekniğin kullanıldığı belirtilmiştir.

Wang vd. (2008) hazırladıkları kriyojele sığır serum albuminin çeşitli koşullar altında (farklı akış hızları, çözelti pH'ı ve elüentin bileşimi gibi) adsorpsiyonu ve desorpsiyonu davranışlarını belirlemek amacıyla bir dizi deneme yapmışlardır. Bu amaçla poliakrilamid kriyojeller cam kolon içerisinde sentezlenmiş ve bu kriyojellere iminodiasetik asit (IDA) bağlanmıştır. Bu kriyojellere Zn^{2+} ve Ni^{2+} yüklenerek Zn^{2+} -IDA-kriyojeller ve Ni^{2+} -IDA-kriyojeller elde edilmiştir. Bu kriyojellerin geçirgenlikleri ve teorik plaka sayıları hesaplanmış ve kriyojel yapısı SEM ile incelenmiştir. Sonuçlar, her iki kriyojelin de içten bağlı

süpermakrogözeneklere (10-80 µm gözenek boyutlarında) ve yüksek su geçirgenliğine sahip olduğunu ($\sim 10^{-11} \text{ m}^2$) göstermiştir. Albumin bağlanma kapasitesi üzerine pH'nın etkisi incenmiş ve maksimum bağlanmanın albuminin izoelektrik noktasına (pI = 4.7) yakın bir değerde (pH = 4.6) gerçekleştiği gözlenmiştir. Bağlanma kapasitesi Zn^{2+} -IDA-kriyojel için 4.5 mg/mL ve Ni^{2+} -IDA-kriyojel için 3.9 mg/mL olarak bulunurken bağlanan albumin imidazol ile elue edilmiştir.

Hedström vd. (2008) sıfırın altındaki sıcaklıklarda albumin ve kitosani glutaraldehit ile çapraz bağlayarak yeni bir monolitik makrogözenekli materyal geliştirmişlerdir. Makrogözenekli kriyojel yapısı çözgenin etkili bir şekilde materyalden geçişine izin vermiştir. Yapılan farklı bir uygulama ise, albumin yerine aktif enzimler (glukoz oksidaz ve peroksidaz) yerleştirilerek milimolar seviyesinde glukoz analizine imkan verecek makrogözenekli biyokatalizör üretim mümkün olmuştur. Gerçekleştirilen başka bir uygulamada ise, proteolitik enzimler olan savinaz ve esperaz glutaraldehit kullanılarak gözenek duvarlarındaki serbest amino gruplarına bağlanmıştır ve yüksek performanslı on-line protein sindirim sistemi kurulmuştur.

Yapılan başka bir immobilizasyon çalışmasında Belyaeva vd. (2008), termolizin enzimin polivinil alkol kriyojeller üzerine immobilize etmişlerdir. Farklı bileşimlerdeki polar organik çözgen karışımında ve sulu ortamlardaki enzim aktivitesi ve kararlılığı incelenmiştir.

Papancea vd. (2008) DNA taşınımı için PVA-DNA kriyojel membranlar hazırlamışlardır. Çift zincirli DNA başarılı bir şekilde PVA kriyojelleri içerisine yerleştirilmiştir. Elde edilen kriyojel kimyasal çapraz bağlayıcılar gibi potansiyel toksik türleri içermemektedir ve bunun bir sonucu olarak ilaç ve medikal uygulamalarda kullanılabilir. Elde edilen kriyojeller iyi mekanik dayanım özelliklerine sahiptirler. Floresans mikroskopi ve UV ve FTIR spektroskopisi ölçümlerinden DNA'nın kriyojel içine tutuklandığı görülmüştür ve SEM ile kriyojelin yüzey özellikleri incelenmiştir. DNA'nın PVA içerisindeki alıkonma zamanlarından yola çıkılarak kriyojel ve DNA arasındaki etkileşimlerin güçlü olduğu sonucuna varılmıştır. Sonuçlar hazırlanan bu PVA kriyojellerin DNA taşınımında gelecek vaat eden bir materyal olduğunu göstermektedir.

Yılmaz vd. (2009) N-metakriloil-L-triptofan içeren poli(2-hidroksietil metakrilat) temelli süpermakrogözenekli hidrofobik kriyojeller [poli(HEMATrp)] sentezlemişler ve yumurta akından lizozim saflaştırılmasında kullanmışlardır. Sentezlenen kriyojellerin 60-100 µm gözenek boyutlarına ve 50 m²/g'lık spesifik yüzey alanına sahip olduğu bulunmuştur. Kriyojelin karakterizasyonu şişme denemeleri, FTIR ve SEM ile yapılırken, denge şişme değerleri p(HEMA) için 7.18 g H₂O/g, p(HEMATrp) için 6.99 g H₂O/g olarak hesaplanmıştır. Lizozimin sulu çözeltilerinden p(HEMA) ve p(HEMATrp) üzerine adsorpsiyonu sırasıyla 2.9 ve 46.8 mg/g olarak bulunmuştur. Adsorplanan lizozim molekülleri 0.5 M etilen glikol çözeltisi ile % 91 geri kazanım ile desorbe edilmiştir. Yumurta akından saflaştırılan lizozimin saflığı SDS-PAGE ile gösterilmiştir. Lizozimin denatürasyonu florimetrik ölçümler ile araştırılmış ve adsorpsiyon ve desorpsiyon adımları sonrasında denatürasyonun olmadığı gözlenmiştir. Saflaştırılan enzimin spesifik aktivitesi *M. lysodeikticus* kullanılarak 43,140 U/mg olarak bulunmuştur ve bu değer saf lizozimin aktivitesine oldukça yakındır.

İnsan plazmasından immunoglobulin G (IgG) saflaştırılması için protein A bağlı süpermakrogözenekli poli(HEMA) kriyojelleri Alkan vd. (2009) tarafından hazırlanmıştır. Kriyojellerin içten bağlı 10-200 µm boyutlarında gözeneklere sahip olduğu SEM fotoğraflarından görülmüştür. Protein A hazırlanan kriyojellere siyanojen bromür aktivasyonu ile bağlanmıştır. p(HEMA)/protein A kriyojelleri üzerine sulu çözeltilerden maksimum IgG adsorpsiyonu pH 7.4'de 83.2 mg/g olarak bulunmuştur. p(HEMA) kriyojelleri üzerine spesifik olmayan bağlanma ise sadece 0.38 mg/g dolaylarındadır. Kriyojellere IgG adsorpsiyonu kapasitesi artan kromatografik akış hızı ile azalırken, artan sıcaklık ile artmıştır. Kriyojelin makrogözenekli yapısı kan hücrelerinin kolonu tıkamadan geçişine izin vermektedir ve insan plazmasından yüksek adsorpsiyon kapasiteleri elde edilmiştir (88.1 mg/g). Adsorplanan IgG 0.1 M'lık glisin-HCl tamponu (pH 3.5) ile % 85 saflıkta desorbe edilmiştir. İnsan plazmasından adsorplanan IgG'nin saflığı SDS-PAGE ile gösterilmiştir ve geri kazanımı % 80.7 olarak bulunmuştur.

Billakanti ve Fee (2009) katyon değişimi ile sütte az bulunan proteinlerin ekstraksiyonu için kriyojel monolitler sentezlemiş ve karakterize etmişlerdir. Gözenek boyutu 10-100 µm olan kriyojel küçük basınç düşüşü özellikleri sergilemektedir. Kriyojelin denge bağlama kapasitesi 4.5 mg/mL olarak bulunmuştur. Kriyojelden elüe edilen proteinlerin saflığı SDS-PAGE ile gösterilirken % 90'dan daha yüksek oranlarda saflık gözlenmiştir.

Orrego ve Valencia (2009) glutaraldehit ile çapraz bağlanmış kitosan kriyojel membranlar hazırlamışlar, karakterize etmişler ve lipaz enzimi immobilizasyonunda kullanmışlardır. Kriyojelin karakterizasyonu termogravimetrik analiz, diferansiyel tarama kalorimetrisi ve türevlendirilmiş termogravimetri yöntemleri ile yapılmıştır ve kitosan membranın degradasyon sıcaklığının (~272 °C) çapraz bağlı örneklerde yüksek sıcaklıklara kaydığı (~280 °C) görülmüştür. Membranın yüzey özellikleri ise atomik kuvvet mikroskobu kullanılarak incelenmiştir ve ortalama gözenek boyutu 199-322 nm aralığında bulunmuştur. Lipaz enzimi başarılı bir şekilde membranlar üzerine immobilize edilirken, en etkili protein bağlanması ve en yüksek protein yükleme kapasitesi glutaraldehit ile çapraz bağlanmış kitosan kriyojeller ile elde edilmiştir.

Stanescu vd. (2010) lakkaz immobilizasyonu için makrogözenekli poli(vinil alkol) taşıyıcılar geliştirmişlerdir. Lakkaz enzimi küresel şekilde ve 0.8-1.6 mm çapındaki kriyojellere glutaraldehit aktivasyonu ile immobilize edilmiştir ve gram kriyojel başına 0.57 mg enzim bağlanmıştır. İmmobilizasyondan sonra enzim aktivitesinde bir azalma olurken optimum pH değeri 4.7'den 3.8'e kaymıştır. İmmobilize enzimin kararlılığında da serbest enzime göre yaklaşık 33 katlık bir artış olmuştur. Stanescu ve arkadaşlarının 2011 yılında gerçekleştirdikleri bir diğer lakkaz immobilizasyonu çalışmasında ise destek materyali olarak poli(akril amid) kriyojelleri kullanmışlar ve bu desteği iminodiasetik asit (IDA) ile fonksiyonelleştirmişlerdir. IDA ile koordinasyon yapan Cu^{2+} ile enzimin metal şelat afinitesinden yararlanarak desteğe bağlanması sağlanmıştır. İmmobilize enzim 60 °C'de 50 saat sonunda başlangıç aktivitesinin % 85'ini korurken serbest enzim bu süre zarfında aktivitesinin tamamını yitirmiştir. Enzimin K_m değeri immobilizasyon ile artarken V_{max} değeri azalmıştır. İmmobilize enzimin k_{cat} değeri ise serbest enzime göre yaklaşık 2 kat azalmıştır. Acid Blue 62 boyasını giderme potansiyeli de incelenen immobilize enzimin 24 saat sonunda % 75 oranında boya giderdiği gözlenirken, serbest enzimde bu oran % 80'dir.

Metakrilat temelli metal şelat kriyojel disklerin insan IgG'sini bağlama kapasitesi Prasana ve Vijayalakshmi (2010) tarafından çalışılmıştır. Bu amaçla ilk olarak kriyojele IDA bağlanmış ve bu sayede yapıya Cu^{2+} , Ni^{2+} ve Zn^{2+} iyonlarının şelatlanması sağlanmıştır. Kriyojellere IgG bağlama kapasitesi farklı tampon sistemlerinde (Tris-asetat, fosfat, MES, MOPS ve asetat) ve farklı akış hızlarında (1.0-5.0 mL/dak.) denenmiştir. Cu^{2+} 'nin ligand olarak kullanıldığı kriyojeller ile en yüksek IgG bağlama kapasitesi elde edilmiştir (14-16 mg/mL). Ni^{2+} iyonu

ligand olarak kullanıldığında adsorpsiyon kapasitesi 7-9 mg/mL'ye düşerken Zn^{2+} ile bu kapasite 0.5 mg/mL'de kalmıştır. Hazırlanan kriyojeller ile insan serumundan ve fare karın iltihabı suyundan IgG saflaştırılması denemeleri yapılmış ve saflıkları SDS-PAGE ile gösterilmiştir.

Papancea vd. (2010) sulu çözeltilerden metal iyonlarının ayrılması için PVA kriyojel membranlar geliştirmişlerdir. Hazırladıkları kriyojel membranın karakterizasyonunu SEM, FTIR ile yapmıştır. Kriyojel membranların metal iyonlarını uzaklaştırma kapasitesi % 11 ile % 60 arasında değişirken bu kriyojellerin ağır metallerin geri dönüşümü ve geri kazanımında uygun ayırma matriksleri olduğu vurgulanmıştır.

Triphati ve Kumar (2011) agaroz-aljinat kriyojelleri monolit, levha, disk ve boncuk gibi farklı formatlarda sentezlemişler ve farklı biyomühendislik uygulamalarını araştırmışlardır. Bu kriyojeller yumuşak doku özelliklerine benzer mekanik dayanıma sahip olmakla beraber, yüksek içten bağlı makrogözenekli yapıya sahiptir ve bozunabilir. Fibroblast hücreleri (NIH-3T3) bu kriyojeller üzerine iyi yapışmakta ve üremektedir. Kriyojel boncuk ve monolit uygulamaları da ayrıca bu matriksler üzerine bakteriyel hücrelerin (BL21) etkili immobilizasyonu ile denenmiştir ve herhangi bir hücre kopuşu olmadan sürekli fermantasyon sistemlerinden ürün elde etmede kullanım potansiyelleri incelenmiştir. Bu kriyojeller ayrıca atık sulardaki nikel ve bakır gibi metalleri bağlayarak onların geri kazanımı için filtre olarak da potansiyele sahiptir. Sentezlenen kriyojellerin iyi biyobozunma kinetiklerine sahip olduğu gözlenmiş ve bu hibrit kriyojellerin diğer biyomühendislik uygulamaları için de potansiyelinin olabileceği ifade edilmiştir.

Kostova vd. (2011) yeni bir sıcaklığa duyar poli(etoksitrietilenglikol asetat) (PETEGA) kriyojel hazırlamışlardır ve bunu kontrollü ilaç salımı sistemi olarak kullanmışlardır. PETEGA kriyojel toksik değildir ve makrogözenekli yapısı sayesinde 31 °C'de hızlı faz geçişi sergilemektedir. PETEGA kriyojellerin toksisitesi insan hücresi (kolon epitelyum, B-hücresi, T-hücresi ve miyeloid hücreler) serileri ile incelenmiştir ve kriyojellerin sitotoksik aktiviteden yoksun oldukları gözlenmiştir. PETEGA kriyojeller 8 saatten daha uzun zaman periyotlarında verapamil hidroklorür ilacını (antihipertansif, antiaritmik ve antianjinal ilaç) sürekli bir şekilde salmıştır. PETEGA kriyojellerin ilaç salım

özellikleri aynı zamanda poliakrilamid, poli(N-izopropilakrilamid) ve poli(2-hidroksietil metakrilat) temelli diğer kriyojel sistemler ile de karşılaştırılmıştır.

Cu²⁺ bağlı sporopolenin (*Lycopodium clavatum*'dan elde edilen doğal biyopolimer) partiküllerini içerisinde gömülü olarak taşıyan süpermakrogözenekli poli(2-hidroksietil metakrilat) kriyojeller Erzengin vd. (2011) tarafından hazırlanmış ve insan serum albüminin afinite saflaştırılmasında kullanılmıştır. Bu amaçla ilk olarak Cu²⁺ iyonları sporopolenin partiküllerine bağlanmış ve daha sonra bu partiküller poli(HEMA) kriyojellerinin hazırlanacağı polimerizasyon ortamına aktarılmıştır. Hazırlanan kriyojellerin yüzey özellikleri SEM ile incelenmiş ve oldukça gözenekli olduğu ve gözenek boyutlarının 10-50 µm çapında olduğu gözlenmiştir. Albumin adsorpsiyonuna pH, akış hızı ve sıcaklığın etkileri incelenmiş ve optimum koşullar pH 8.0 fosfat tamponu, 0.5 m/dak. akış hızı ve 5 °C ortam sıcaklığı ile elde edilmiştir. Bu koşullar altındaki albumin adsorpsiyonu 677.4 mg/g polimer olarak bulunmuştur. Adsorplanan albumin 1.0 M NaCl içeren 0.05 M asetat tamponu (pH 5.0) ile % 96.3 oranında desorbe edilmiştir. İnsan plazmasından albuminin saflaştırılması denemeleri sonunda ise daha yüksek adsorpsiyon kapasiteleri elde edilmiştir (775.42 mg/g) ve adsorplanan albuminin saflığı SDS-PAGE ile gösterilmiştir.

Fajların metakrilat kriyojeller üzerine bağlanması Smrekar vd. (2011) tarafından incelenmiştir. Çalışmada 3 farklı bakteriofaj (T7, lamda ve M13) kullanılmış ve içlerinden M13 fajının en yüksek bağlanma kapasitesine sahip olduğu gösterilmiştir (1.2 mg/mL). Buna karşın T7 ve lamda daha düşük kapasitelerde bağlanmıştır (0.9 mg/mL). Ortamdaki NaCl derişimi 0 M'dan 0.2 M'a çıkarıldığında lamda fajının kapasitesi 5 kat artmakla beraber T7 ve M13 fajlarının kapasitelerinde bir değişim olmamıştır. Optimum koşullar altında 3 fajın geri kazanımları % 100'e kadar ulaşmıştır.

Poli(HEMA-MAH) kriyojel disklerin plazmit DNA saflaştırılmasında kullanıldığı bir çalışmada Perçin vd. (2011) kriyojelleri serbest radikal polimerizasyonu ile hazırlamışlardır. Sentezlenen kriyojellerin SEM fotoğraflarından oldukça gözenekli olduğu ve içten bağlı geniş gözeneklere (10-100 µm) sahip olduğu görülmüştür. Elde edilen kriyojellerin plazmit DNA bağlama kapasitesi 13.35 mg/g düzeylerinde bulunurken poli(HEMA) kriyojeller ile bu değer 50 µg/g'a düşmüştür. Kriyojellere adsorpsiyonun artan NaCl derişimi ile azaldığı gözlenirken, maksimum plazmit DNA adsorpsiyonu 25 °C'de bulunmuştur.

Plazmit DNA geri kazanım değeri ise % 90 olarak hesaplanmıştır. Hazırlanan kriyojeller *E. coli* hücrelerinden plazmit DNA saflaştırılmasında kullanılmış ve saflık etidyum bromür ile boyanmış agaroz jel elektroforezinde gösterilmiştir.

Sistemik lupus eritematozis hastalarının plazmasından anti-dsDNA antibadisinin uzaklaştırılması için DNA taşıyan süpermakrogözenekli poli(HEMA) kriyojeller hazırlanmıştır (Özgür vd., 2011). Kriyojelin SEM fotoğraflarından gözenek boyutunun 10-200 µm aralığında olduğu görülmüş ve kriyojel içindeki gözenek hacminin % 67.5 olduğu hesaplanmıştır. Kriyojel poli(etilenimid) ile reaksiyona girerek sonrasında DNA'nın kriyojele bağlanması sağlanmıştır (53.4 mg DNA/g kriyojel). Plazma anti-dsDNA-antibadisi derişimi kolon uygulaması ile zaman içinde 780 IU/mL'den 80 IU/mL'ye düşürülebilmştir. Maksimum anti-dsDNA-antibadisi adsorpsiyon kapasitesi 70×10^3 IU/g olarak bulunmuştur.

IgG saflaştırılması için yüksek adsorpsiyon kapasitesine sahip yeni bir adsorban elde etmek üzere Sun vd. (2012a) süpermakrogözenekli agaroz boncuk gömülü agaroz-kitosan kompozit monolitik kriyojelleri sentezlenmişlerdir. Sentezlenen kriyojeller divinilsülfon ile aktive edilerek 2-merkaptopiridin bağlanmıştır ve IgG saflaştırılmasında kullanılmıştır. Kriyojelin morfolojisi SEM ile analizlenmiş ve gözenek boyutu 10-100 µm aralığında bulunmuştur. Spesifik yüzey alanı 350 m²/g olan kriyojellerin IgG adsorpsiyon kapasitesi 71.4 mg/g olarak hesaplanmıştır. Akış hızının artışı ile adsorplanan IgG miktarı azalırken maksimum IgG adsorpsiyonu için pH 7.5 fosfat tamponu (25 mM) kullanılmıştır. Hazırlanan kriyojeller adsorpsiyon kapasitesinde bir azalma olmadan 15 kez kullanılabilmiştir. İnsan plazmasında tek adımda saflaştırılan IgG'nin saflığı elektroforez ile gösterilmiş ve ortalama geri kazanımı % 90 olarak hesaplanmıştır.

Sun vd. (2012b) glikoproteinlerin afinite saflaştırılması için agaroz/kitosan kompozit süpermakrogözenekli monolitik (AC CM) kriyojelleri hazırlamışlardır. Bu amaçla AC CM kriyojelleri agaroz ve kitosan çözeltilerinin çapraz bağlayıcı olarak glutaraldehit kullanılarak kriyopolimerizasyonu ile sentezlenmiş ve 3-aminofenilboronik asit ligandı kriyojele kovalent olarak bağlanmıştır. Elde edilen kriyojel temel yumurta beyazı glikoproteinlerinden ovalbumin ve ovotransferinin afinite saflaştırılmasında kullanılmıştır. Kriyojelin morfolojisi SEM ile analizlenmiş ve içten bağlı gözeneklerin 10-100 µm boyutlarında oldukları görülmüştür. Glikoproteinler için spesifik tanımaya sahip kriyojellerin mekanik dayanımı da yüksektir. Sulu çözeltilerinde ovalbuminin kriyojellere maksimum

bağlanma kapasitesi 55.6 mg/g'dır. Kriyojel adsorpsiyon kapasitesinde bir azalma olmadan 11 kez tekrar kullanılabilmiştir. Yumurta beyazından ovalbumin ve ovotransferinin geri kazanımı sırasıyla % 89 ve % 93 oranlarındadır.

Andaç vd. (2012) yaptıkları bir çalışmada, insan serumundan albuminin seçimli olarak uzaklaştırılması için Cibacron Blue F3GA bağlı poli(HEMA) kriyojeller hazırlanmıştır. Sentezlenen poli(HEMA)-Cibacron Blue F3Ga kriyojel afinite kolonunun karakterizasyonu jelleşme verimi, şişme derecesi, makrogözenek hacmi, FTIR ve SEM ile gerçekleştirilmiştir. Albumin adsorpsiyonuna pH'ın etkisi incelenmiş ve pH 5.0'de maksimum bağlanma gözlenmiştir. Kromatografik akış hızının artışı ile kolona adsorplanan albumin miktarında azalma meydana gelmiştir. Ortamın iyonik şiddetinin artırılması ile albumin adsorpsiyon kapasitesi düşmüştür. Sulu çözeltisinden albuminin kriyojeller üzerine maksimum adsorpsiyon kapasitesi 343 mg/g olarak bulunurken seyreltilmemiş serumdan albuminin maksimum adsorpsiyonu 950 mg/g'dır. Son olarak insan serumundan albumin saflaştırılması gerçekleştirilmiş ve saflık SDS-PAGE ile kontrol edilmiştir.

2.2. Moleküler Baskılanmış Polimerler ile İlgili Önemli Çalışmalar

Sellergren vd. (1988) metakrilik asit monomeri ve fenilalanin arasında kovalent olmayan etkileşimleri kullanarak yüksek enantiyoseçicili moleküler baskılanmış polimerler sentezlemişlerdir. Fenilalanin bağlama kapasitesi 1.5 mg/g olan polimerin ayırma faktörü 3.5'dur. Baskılama sırasında kalıp ile metakrilik asit monomeri arasında 1:2'lik bir kompleks oluştuğu ¹H NMR ölçümleri ile gösterilmiştir.

Tamoksifen baskılanmış metil metakrilat temelli polimerler Rashid vd. (1997) tarafından sentezlenmiştir. Sentezlenen polimerlerin biyolojik örneklerden tamoksifenin katı faz ekstraksiyonu için kullanımı araştırılmıştır. Metanol-asetik asit karışımı ile elüe edilen örneklerde % 97 tamoksifen geri kazanımı bulunmuştur. Kan plazması ve idrarda tamoksifenin varlığı ve ekstraksiyonu HPLC kullanılarak gösterilmiştir.

Kalıp molekül olarak 7-hidroksikumarinin kullanıldığı moleküler baskılanmış etilen glikol dimetakrilat polimerler Walshe vd. (1997) tarafından hazırlanmıştır. Sentezlenen polimerler katı faz ekstraksiyon adsorbanı olarak kullanılmış ve geri

kazanımı % 90.36 olarak bulunmuştur. Baskılanmış polimerlerin seçiciliği kumarin, 7-dietilamino-4-metilkumarin ve amitriptiline karşı incelenmiş ve polimerin herhangi bir girişim olmadan sadece 7-hidroksikumarini bağladığı ifade edilmiştir.

Baggiani vd. (2000) kovalent olmayan baskılama tekniği ile kortizol baskılanmış etilen glikol dimetakrilat polimerler sentezlenmişlerdir. Polimerin etkinliği HPLC kullanılarak kortizon, kortikosteron, progesteron, 11-ketoprogesteron, 11 α -hidroksiprogesteron, 17 α -hidroksiprogesteron, kortizol 21-hemisüksinat ve kortizol 21-asetata karşı incelenmiş ve seçicilik katsayısı sırasıyla 2.99, 3.64, 10.4, 9.29, 2.02, 14.6, 9.71 ve 4.01 olarak bulunmuştur.

Taklit baskılamanın yapıldığı bir çalışmada (Matsui vd., 2000) atrazinin katı faz ekstraksiyonu için dibütilmelamin baskılanmış metakrilik asit polimerler sentezlenmiştir. Hazırlanan atrazinin seçiciliği polimerlerin % 97 geri kazanıma ve 50 kat zenginleştirme faktörüne sahip olduğu bulunmuştur. Sentezlenen polimerin seçiciliği simazin, propazin, cıyanazin, terbütiazin, ametrin, prometrin, terbütrin ve asulama karşı incelenmiş ve seçicilik katsayısı sırasıyla 17.2, 14.2, 8.1, 15.7, 13.2, 9.8, 9.2 ve 0.3 olarak bulunmuştur. Triam, propizamit ve iprodiona karşı seçiciliği 0.0 olarak hesaplanmıştır.

Chen vd. (2001) klorfenamin baskılanmış etilen dimetakrilat polimerler sentezlenmişlerdir. Hazırlanan polimerlerin seçiciliğinin oldukça yüksek olduğu ve klorfenaminin difenhidraminden kolayca ayrılabilirdiği ve 4.68 kat daha seçici olduğu belirtilmiştir. Baskılama işleminde iyonik etkileşimlerin etkili olduğu ifade edilen çalışmada 0.02 $\mu\text{mol/L}$ derişimindeki klorfenaminin 50 kat deriştirildiği ve geri kazanımının pH 5.0'da % 90 olduğu bulunmuştur.

L-glutamin için moleküler baskılanmış Nylon-6 polimerler Reddy vd. (2002) tarafından sentezlenmiş ve karakterizasyonu FTIR ve SEM analizleri ile yapılmıştır. Hazırlanan baskılanmış polimerlerin L-glutamin bağlama etkinlikleri D-glutamin, L-glutamik asit ve D-glutamik aside karşı incelenmiştir. L-glutaminin denge bağlanma sabiti $4.9 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ iken D-glutamin için bu değer $1.5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ olarak bulunmuştur.

Yapılan bir çalışmada (Fernandez-Alvarez vd., 2008) sulu çözeltilerden endokrin parçalanma ürünlerinin uzaklaştırılması için moleküler baskılanmış polimerler

geliştirilmiştir. Kalıp olarak 17 β -estradiol ile sentezlenen moleküler baskılanmış polimerler, bu bileşiklerin sulu çözeltilerinden ekstraksiyonu için test edilmiştir. Baskılanmış polimerler kullanıldığında 17 β -estradiol aseton ile tek bir elüsyon adımı sonunda % 73 oranında geri kazanılırken baskılanmamış polimerler ile bu oran % 46'da kalmıştır. Sentezlenen polimerler kapasitelerinde bir kayıp olmadan ek ekstraksiyon-rejenerasyon döngülerinde defalarca kullanılabilmiştir.

Chen vd. (2010) moleküler baskılanmış polipirol (PPy) dolgulu elektrot kolonlar hazırlamışlar ve potansiyel kontrolü ile triptofan enantiyomerlerini ayırmadaki etkinliği incelemişlerdir. Sentezlenen PPy'nin karakterizasyonu siklik voltamogram, FTIR ve floresans spektrofotometrisi ile yapılmıştır. Çalışmada baskılanmış PPy elektrot kolonlarının L-triptofanın tutulmasını etkili bir şekilde arttırdığı ve triptofan enantiyomerlerini ayırdığı gözlenmiş ve baskılanmanın diğer amino asit enantiyomerlerin de enantiyoseçimli bir biçimde tanınmasında kullanılabileceği vurgulanmıştır.

Gao vd. (2010) yeni yüzey baskılama tekniği kullanarak hazırlanan sitizin baskılanmış materyalin hazırlanmasını ve tanıma performansını incelemişlerdir. Bu amaçla mikron boyutundaki silika jel partiküller üzerine metakrilik asit aş polimerizasyonu ile ilave edilmiştir. Sitizin moleküler baskılanmış materyal ise etilen glikol diglisidil eterin çapraz bağlayıcı ajan olarak kullanılması ile elde edilmiştir. Hazırlanan sitizin baskılanmış polimerlerin sitizine karşı bağlama karakteristikleri kesikli ve kolon metotları ile incelenmiş ve ayrıca matrin ve oksimatrin (kimyasal yapıları sitizine benzer moleküller) kullanılarak baskılanmış materyalin seçiciliği de incelenmiştir. Sitizine karşı seçicilik matrin ve oksimatrine göre sırasıyla 12.08 ve 15.05 kat daha fazla bulunmuştur.

Sitokrom *c*'nin poliakrilamid monolitlere baskılandığı bir başka çalışmada, Liu vd. (2010) baskılanmış polimerleri kalıp molekülün (sitokrom *c*) HPLC ile tanınmasında kullanmışlardır. Baskılanmış poliakrilamid monolitlerin SEM fotoğrafları çekilmiş ve yapının içten bağlı çoklu gözenekli olduğu ve gözenek boyutunun 1-3 μ m olduğu bulunmuştur. Baskılama işlemi sonrasında kalıp molekül SDS (% 10'luk) içeren asetik asit (% 10'luk) çözeltisi ile uzaklaştırılmıştır. Sitokrom *c* ve onun yarışmacı proteini lizozimin baskılanmış polimerdeki alıkonma zamanları çalışılmış ve mobil fazın pH değeri 4.0 iken alıkonma faktörleri sırasıyla 2.0 ve 1.0 olarak bulunmuştur. Bununla birlikte baskılanmamış polimerde her iki yarışmacı proteinin de alıkonma faktörleri

1.1'dir. Sentezlenen polimerlerin bozulmadan ve ayırma performansı azalmadan bir ay boyunca kullanılabilirdiği de ifade edilmiştir.

Jiang vd. (2010) çekirdek materyali olarak diatomit kullanarak yeni bir kitosan baskılama adsorbanı hazırlamışlar ve yüzey baskılama teknolojisi ile Pb^{2+} 'un baskılanmasında kullanmışlardır. Sentezlenen adsorbanın karakterizasyonu FTIR ile yapılırken yapının epiklorhidrin ile çapraz bağlandığı gösterilmiştir. Yeni geliştirilen bu adsorbanın maksimum Pb^{2+} adsorpsiyon kapasitesi 139.6 mg/g olarak bulunmuştur. Adsorpsiyon hızı oldukça yüksektir ve 3 saat içinde dengeye ulaşmaktadır. Sentezlenen yeni adsorban 10 döngüye kadar adsorpsiyon kapasitesinde bir düşüş olmadan tekrar kullanılabilir.

Xie vd. (2010) kalıp molekül olarak triazofos (TAP) kullanarak çökelme polimerizasyon metodu ile moleküler baskılanmış polimer sentezlemiştir. Sentezlenen TAP baskılanmış polimerlerin SEM fotoğrafları çekilmiş ve boyutlarının yaklaşık 0.7 μm olduğu görülmüştür. Moleküler baskılanmış polimer örnek çözeltilerden TAP'u seçici olarak adsorplamaktadır. Adsorplanan TAP luminol- H_2O_2 'in kemilüminesansını güçlü bir şekilde arttırmaktadır. Bu artış TAP'un on-line zenginleştirilmesinde ve tanınmasında bir metot olarak uygulanmıştır. Kemilüminesansdaki artış TAP derişimi ile lineer ilişki içindedir ve deteksiyon limiti 2.5 nM'dır. Bu ticari kemilüminesans analizlerinden düşük bir değerdir. Bu metot bitki örneklerindeki TAP'un tayininde başarılı bir şekilde uygulanmıştır.

Şener vd. (2011) lizozim baskılanmış poli(etilen glikol gimetakrilat-N-metakrilolil-L-histidin metilester) (PEDMAH) nanopartiküllerini (yaklaşık 50 nm) iki fazlı mini-emülsiyon polimerizasyonu ile hazırlamışlar ve daha sonra yüzey plazmon rezonans (SPR) sensör yüzeyine bağlamışlardır. Kalıp lizozimi uzaklaştırmak için 1.0 M NaCl çözeltisi (pH 8.0, fosfat tamponunda) kullanılmıştır. Lizozim baskılanmış SPR nanosensör FTIR, AFM ve elipsometri ile karakterize edilmiştir. Farklı lizozim derişimlerine karşı nanosensörün cevabı incelenmiş ve artan derişim ile cevabın da arttığı fakat 350 nM civarında bir plato değerine ulaşıldığı gözlenmiştir. Sentezlenen nanosensör sulu ve doğal kompleks kaynaklardan, yumurta akından ve hatta 32.3 mM kadar düşük lizozim derişimine sahip kaynaklardan dahi lizozim molekülünü saptayabilme yeteneğine sahiptir. Hesaplanan tayin limiti, birleşme ve ayrışma sabitleri sırasıyla 84 pM, 108.71

nM^{-1} ve $9.20 pM^3$ 'dir. Nanosensörün seçiciliğini araştırmak üzere ise sitokrom *c* molekülü kullanılmış ve lizozime karşı 2.13 kat daha seçici olduğu belirlenmiştir.

Sentetik lipaz elde etme ve transesterifikasyon reaksiyonlarında kullanımı çalışmaları Kecili vd. (2012) tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla *p*-nitrofenilpalmitat için seçici yeni bir polimer moleküler baskılama tekniği ile hazırlanmıştır. Uygun monomerlerin sentezi ve kalıp olarak *p*-nitrofenilpalmitatın kullanımı ile elde edilen baskılanmış polimerin bağlama karakterleri değerlendirilmiştir. Sentetik enzimin optimum pH'ı ve sıcaklığının yanında K_m ve V_{max} değerleri de incelenmiştir. Sentetik lipaz ve serbest lipazın optimum pH değeri 8.0 olarak bulunurken optimum sıcaklık her iki tip enzim için de $40 ^\circ C$ 'dir. Sentetik lipazın K_m ve V_{max} değerleri Lineweaver-Burk grafiğinden sırasıyla $1.4 \times 10^{-2} mM$ ve $0.68 mM/dak$ olarak okunmuştur. Hazırlanan sentetik enzimin katalitik aktivitesinin 10 kullanım sonunda sadece % 9 oranında azaldığı belirtilmiştir.

2.3. Moleküler Baskılanmış Kriyojeller ile İlgili Önemli Çalışmalar

Endokrin parçalanma ürünü kirleticilerinin uzaklaştırılması için moleküler baskılanmış makrogözenekli polimer/kriyojel kompozit sistemleri Le Noir vd. (2007) tarafından çalışılmıştır. Bu amaçla ilk olarak endokrin parçalanma ürününün seçici adsorpsiyonunda kalıp olarak 17β -estradiol kullanılarak moleküler baskılanmış polimerler sentezlenmiştir. Kompozit jel/moleküler baskılanmış monolitler daha sonra sıfırın altındaki sıcaklıklarda hazırlanmıştır. Hazırlanan kriyojelin spesifik yüzey alanı $376 m^2/g$ olarak bulunurken SEM fotoğraflarından oldukça gözenekli bir yapıya sahip olduğu görülmüştür. İki $\mu g/L$ 'lik sulu çözeltilerinden 17β -estradiolün tamamen uzaklaştırılması polivinil alkol (PVA) makrogözenekli jel/moleküler baskılanmış monolitler kullanılarak elde edilirken baskılanmamış polimerler ile sadece % 49-74'lük uzaklaştırma bulunmuştur. Oldukça yüksek akış hızlarında dahi bağlama kapasitesinin azalmamasının yanında monolitlerin kolay hazırlanması bu makrogözenekli jel/moleküler baskılanmış polimer sistemlerinin endokrin parçalanma ürünlerinin temizlenmesinde sorbentler olarak kullanmasını sağlamaktadır.

Bereli vd. (2008) yumurtadan lizozim saflaştırmak için lizozim baskılanmış süpermakrogözenekli poli(HEMA-MAH) (MAH metal koordinasyon monomeri olarak seçilmiştir) kriyojelleri serbest radikal polimerizasyonu ile $-12 ^\circ C$ 'de

hazırlamışlardır. Sentezlenen kriyojellerin oldukça gözenekli oldukları, ince gözenek duvarlarına ve geniş içten bağlı gözeneklere sahip oldukları çekilen SEM fotoğraflarından görülmüştür. Hazırlanan kriyojelin sulu çözeltilerden lizozim adsorpsiyonu kapasitesi 22.9 mg/g polimer düzeyindedir. Kriyojellere lizozim adsorpsiyonu kapasitesi artan akış hızı ile azalırken, maksimum adsorpsiyon kapasitesi pH 7.0 HEPES tamponu kullanılarak elde edilmiştir. Lizozim baskılanmış kriyojellerin seçiciliği sığır serum albumin ve sitokrom c'ye karşı incelenmiş ve hazırlanan kriyojelin bu proteinlere karşı sırasıyla 4.6 ve 3.2 kat daha seçici olduğu bulunmuştur. Yumurtadan saflaştırılan lizozimin saflığı % 94 olarak bulunurken geri kazanımı % 86 düzeyindedir.

Bilirubinün süpermakrogözenekli poli(HEMA-MAT) kriyojellerine baskılandığı bir çalışmada insan plazmasından bilirubinün adsorpsiyonu gerçekleştirilmiştir (Baydemir vd., 2009a). Baskılanmış kriyojelin sentezindeki ilk adımda bilirubin ile MAT kompleksleştirilir ve daha sonra serbest radikal polimerizasyonu ile -12 °C'de polimerleştirilmiştir. Kalıp molekülün (bilirubin) polimerik yapıdan uzaklaştırılmasından sonra elde edilen bilirubin baskılanmış kriyojeller sulu çözeltilerden bilirubin adsorpsiyonu amacıyla kullanılmıştır ve maksimum adsorpsiyon kapasitesi 3.6 mg/g polimer olarak bulunmuştur. Bilirubinün kolesterol ve testosterona karşı seçiciliği incelenmiş ve kriyojellerin bilirubine karşı sırasıyla 7.3 ve 3.2 kat seçici olduğu bulunmuştur. Sentezlenen kriyojeller birçok kez ve adsorpsiyon kapasitesinde önemli bir azalma olmadan bilirubin adsorpsiyonunda kullanılmıştır. Yüksek seçiciliği ve tekrar kullanım özelliklerinden yola çıkarak bilirubin baskılanmış kriyojellerin klinik hemoperfüzyon materyali olarak kullanım potansiyeli araştırılmıştır.

Bilirubinün insan plazmasından seçici olarak uzaklaştırılması için yapılan başka bir çalışmada (Baydemir vd., 2009b) gömülü bilirubin baskılanmış partiküller içeren süpermakrogözenekli kriyojeller sentezlenmiştir. Bu amaçla ilk adımda bilirubin MAT ile kompleksleştirilmiş ve bilirubin baskılanmış poli(HEMA-MAT) monolit yığın polimerizasyonu ile hazırlanmıştır. Hazırlanan bilirubin baskılanmış monolit 100 µm boyutlarında öğütülmüştür. İkinci adımda, moleküler baskılanmış partikülleri gömülü olarak taşıyan süpermakrogözenekli poli(HEMA) kriyojeller serbest radikal polimerizasyonu ile sentezlenmiştir. Sentezlenen gömülü bilirubin baskılanmış partikül içeren kriyojellerin bilirubin adsorpsiyon kapasitesi 10.3 mg/g polimer olarak bulunmuştur. Baskılanmış kriyojelin kolesterol ve testosterona karşı sırasıyla 8.6 ve 4.1 kat seçici olduğu saptanmıştır.

Karsinojenik potansiyele sahip olan bromatın içme sularından uzaklaştırılması için seçici kompozit kriyojeller Hajizadeh vd. (2010) tarafından sentezlenmiştir. Bu amaçla moleküler baskılanmış kitosan temelli polimerler ve sol-jel iyon değişim adsorbanları (inorganik) hazırlanmıştır. Her iki adsorbanın da adsorpsiyon kinetikleri, izotermi, pH etkisi ve seçici adsorpsiyon davranışları detaylı bir şekilde incelenmiştir. Adsorpsiyon denemeleri baskılanmış polimerin bromata karşı daha seçici olduğunu göstermiştir. Kriyojelin rejenerasyonu 0.1 M NaOH ve 0.1 M NaCl ile yıkamak suretiyle gerçekleştirilmiş ve beş döngü boyunca kullanımda kriyojelin adsorpsiyon kapasitesinde bir azalma olmamıştır.

Nehir suyundan ve şaraptan bisfenol A'nın katı faz ekstraksiyonu için moleküler baskılanmış polimer/kriyojel kompozitler Baggiani vd. (2010) tarafından hazırlanmıştır. Bu amaçla ilk önce bisfenol A'nın bir benzeri olarak 4,4'-dihidroksi-2,2-difenil-1,1,1,3,3,3-trifloropropan ile 4-vinilpiridin ve trimetilolpropan trimetakrilatın termal polimerizasyonu ile bisfenol A için tanıma özelliklerine sahip baskılanmış polimerler sentezlenmiştir. Yaklaşık 10 µm boyutlarında ögütülen polimer, daha sonra poli(akrilamid-co-N,N'-metilenbisakrilamid kriyojel içerisine gömülmüştür. Hazırlanan kriyojeller ile nehir örneklerinden bisfenol A'nın ön deriştirilmesi gerçekleştirilmiş ve kantitatif ekstraksiyonunun 10 ng/L'ye kadar uygulanabilir olduğu gösterilmiştir.

İyon baskılanmış kriyojeller kullanılarak beta talasemi hastalarının plazmalarından demirin uzaklaştırılması Aslıyüce vd. (2010) tarafından yapılmıştır. Çalışmada, Fe³⁺ baskılanmış poli(hidroksietil metakrilat-N-metakriloil-(L)-sistein metil ester) [poli(HEMA-MAC)] kriyojelleri radikalik kriyopolimerizasyon ile hazırlanmış ve polimerizasyon sonunda kalıp (Fe³⁺) 0.1 M EDTA ile uzaklaştırılmıştır. Kriyojelin spesifik yüzey alanı 32.7 m²/g olarak bulunurken, yüzey özellikleri SEM ile incelenmiş ve gözenek boyutlarının ortalama 150 µm olduğu gözlenmiştir. Poli(HEMA-MAC)-Fe³⁺ kriyojelleri üzerine maksimum Fe³⁺ adsorpsiyonu kapasitesi 75 µg/g olarak bulunmuştur. Hazırlanan kriyojelin seçiciliği Ni²⁺ ve Cd²⁺ iyonlarına karşı denenmiş ve sırasıyla 10.5 ve 2.3 kat daha seçici bulunmuştur.

İnsan kanından hemoglobinin uzaklaştırılması için hemoglobin baskılanmış poli(HEMA-MAH) kriyojeller hazırlanmıştır (Derazshamshir vd., 2010). Sentezlenen kriyojeller FTIR, SEM, şişme çalışmaları, akış dinamiği ve yüzey alanı ölçümleri ile karakterize edilmiştir. Baskılanmış kriyojelin yüzey alanı BET

metodu ile 92.3 m²/g olarak ölçülmüştür. Seçici bağlanma denemeleri miyoglobinin ve sığır serum albumin gibi yarışmacı proteinlerin varlığında gerçekleştirilmiştir ve hemoglobin baskılanmış kriyojellerin miyoglobine göre 38.0 kat, sığır serum albüminine karşı ise 12.0 kat seçici olduğu bulunmuştur. Hemoglobin baskılanmış kriyojellerin seçiciliği HPLC ile de gösterilmiştir. Kan hemolizatından hemoglobinin uzaklaştırılması ayrıca SDS-PAGE kullanılarak doğrulanmıştır.

N-izopropylakrilamid ve N-[3-(N,N'-dimetilamino)propil]akrilamidin kopolimerinden oluşan baskılanmış ısı duyarlı kriyojeller Burova vd. (2011) tarafından -10 °C'de ve moleküler kalıp olarak ibuprofen kullanılarak hazırlanmıştır. Şişmiş haldeki kriyojelin geri dönüşümlü termotropik katlanması yüksek-duyarlıklılı diferansiyel taramalı kalorimetri ile çalışılmıştır. Kalıp ligandın (ibuprofen) varlığında geçiş sıcaklığı 33.2'den 30.0 °C'ye düşmüştür. Katlanmış ve şişmiş kriyojeller tarafından ibuprofenin bağlanma sabiti sırasıyla 119 M⁻¹ ve 5 M⁻¹ olarak bulunmuştur. İbuprofenin kriyojel üzerine maksimum bağlanma değeri 0.327 mmol/g olarak hesaplanırken molekülün yapısal analogları çok daha düşük oranlarda bağlanmıştır. İbuprofen için baskılanmış kriyojelin seçiciliği nedeniyle hazırlanan bu kriyojellerin buldukları ortam sıcaklığına bağlı olarak ibuprofeni salma özellikleri incelenmiştir.

Tamahkar vd. (2011) sitokrom *c* baskılanmış poli(HEMA-MAH) kriyojelleri hazırlamışlar ve protein karışımlarından sitokrom *c*'nin ayrılmasında kullanmışlardır. Bu amaçla ilk adımda, Cu²⁺ MAH ile kompleksleştirilmiş ve sitokrom *c* baskılanmış kriyojeller monomerlerin serbest radikal kriyopolimerizasyonu ile -12 °C'de sentezlenmiştir. Kriyojelin süngerimsi gözenekli yapısı SEM ile gösterilmiştir. Kalıp sitokrom *c* polimerden 0.5 M NaCl çözeltisi ile uzaklaştırılmıştır. Adsorpsiyon denemeleri sonunda maksimum sitokrom *c* adsorpsiyon değeri 126 mg/g polimer olarak bulunmuştur. Kriyojele adsorplanan sitokrom *c* artan akış hızı ile azalmıştır. Adsorpsiyona pH'in etkisi de incelenmiş ve pH 9.0'da maksimum bağlanma bulunmuştur. Kriyojelin seçiciliği lizozim ve sığır albüminine karşı denenmiş ve sitokrom *c*'ye karşı sırasıyla 1.7 ve 5.2 kat seçici olduğu gözlenmiştir. Seçicilik aynı zamanda hızlı protein kromatografisi ile de gösterilmiştir.

Yumurta beyazından lizozimin saflaştırıldığı bir çalışmada Bereli vd. (2011) L-histidin baskılanmış poli(HEMA-MAH) kriyojelleri kriyopolimerizasyon ile hazırlamışlardır. Kalıp L-histidin 1.0 M KSCN ile uzaklaştırılmıştır ve elde edilen

histidin baskılanmış kriyojel sulu çözeltilerinden lizozimin adsorpsiyonunda kullanılmıştır. Kriyojelin karakterizasyonu şişme ölçümleri, SEM ve makrogözeneklilik değerleri ile yapılmıştır. Baskılanmış kriyojelin şişme derecesi 8.15 g H₂O/g iken baskılanmamış kriyojel gramı başına 6.44 g H₂O bağlamaktadır. SEM fotoğraflarından kriyojelin birkaç yüz mikrometreye kadar gözenek boyutlarına sahip olduğu görülmüş, makrogözenekliliğin ise baskılanmamış için % 59.9 baskılanmış için ise % 68.4 olduğu bulunmuştur. Kriyojel üzerine maksimum lizozim adsorpsiyonu 54.2 mg/g polimer olarak bulunmuştur. Hazırlanan kriyojellerin lizozime olan seçiciliği ribonükleaz A'ya karşı 4.5 kat, sitokrom c'ye karşı 2.4 kat olarak bulunmuştur ve seçicilik hızlı protein sıvı kromatografisi ile de gösterilmiştir. Baskılanmış kriyojeller uzun depolama kararlılığına sahiptir ve adsorpsiyon kapasitesinde önemli bir düşüş olmadan defalarca kullanılabilir. Baskılanmış kriyojeller uzun depolama kararlılığına sahiptir ve adsorpsiyon kapasitesinde önemli bir düşüş olmadan defalarca kullanılabilir.

Aslıyüce vd. (2012) anti-hepatit B yüzey antibadisinin (anti-HBs) hızlı protein sıvı kromatografisi ile saflaştırılması için moleküler baskılama temelli kompozit kriyojel membranlar hazırlamışlardır. Sentezlenen kriyojellerin karakterizasyonu şişme testleri, SEM ve FTIR ile yapılmıştır. Saflaştırma çalışmalarından önce ise adsorpsiyon koşulları (akış hızı, anti-HBs derişimi, zaman ve iyonik şiddet) optimize edilmiştir. Saptanan optimum koşullarda maksimum anti-HBs adsorpsiyon kapasitesi 701.4 mL/g olarak hesaplanmıştır. Moleküler baskılanmış kriyojelin seçiciliği anti-hepatit A antibadisi ve total immunoglobulin E'ye karşı denenmiştir ve sırasıyla 5.45 ve 9.05 kat daha seçici bulunmuştur. Bağlanan anti-HBs'nin elüsyonu 1.0 M NaCl içeren fosfat tamponu (pH 7.4) ile gerçekleştirilmiştir. Baskılanmış kriyojelin kapasite ve ayırma faktörü, teorik plaka sayısı ve alıkonması gibi kromatografik parametreler anti-HBs molekülü için sırasıyla 5.48; 6.02; 1153.9 ve 1.72 olarak hesaplanmıştır. Son olarak moleküler baskılanmış kriyojeller anti-HBs pozitif insan plazmasından anti-HBs'nin spesifik olarak saflaştırılmasında kullanılmıştır.

2.4. Karbonik Anhidraz Enziminin Saflaştırılması ile İlgili Önemli Çalışmalar

Karbonik anhidraz saflaştırılması ile ilgili ilk çalışmalar 1933 yılında birbirinden bağımsız olarak yayınlanan Meldrum ve Roughton'un "Carbonic Anhydrase: Its Preparation and Properties" isimli çalışması (1933) ve Stadie ve O'Brien'in "The Catalysis of the Hydration of Carbon Dioxide and Dehydration of Carbonic Acid

by the Enzyme Isolated from Red Blood Cells” isimli çalışmasıdır (1933). Meldrum ve Roughton araştırmalarında CA’ın kan plazmasında değil de kırmızı kan hücreleri içinde olduğunu belirtmişler ve enzimin birincil fizyolojik öneminin akciğerlerde bikarbonatı CO₂’e çevirmek olduğunu ifade etmişlerdir. Enzimin aktivitesini bikarbonatın CO₂’e dönüşüm hızını ölçerek hesaplamışlardır. Enzim kırmızı kan hücreleri hemolizatından hemoglobinin koagülasyon ile ayrılması sonucu saflaştırılmıştır. Bu yöntemde kırmızı kan hücre hemolizati alkol ile daha sonra ise kloroform ile muamele edilerek santrifüj edilmiş ve süpernatantın toplam kan CA enziminin % 50’sini içerdiği belirtilmiştir. Bu ham örnek daha sonra Al(OH)₃ üzerine adsorpsiyon ve ultrafiltrasyon adımları ile daha ileri saflaştırılmıştır. Bu saf ürünün kandakinden 1800 kat daha aktif olduğu ve hemoglobin, hematin, katalaz, peroksidaz ve oksidazdan yoksun olduğu bulunmuştur. Yapılan çalışmalar sonunda enzimin pH 3-12 arasındaki çözeltelerde kararlı olduğu ve enzimin sulu çözeltilerinin 65 ° C’de 30 dakikada aktivitesini tamamen yitirdiği gözlenmiştir. Enzimin CO, siyanitler, sülfidler, azitler, Cu, Ag, Au, Zn, Hg ve fenilüretan tarafından inhibe edildiği bulunmuştur.

Stadie ve O’Brien’in çalışmaları da CA kırmızı kan hücrelerinden alkol-kloroform çöktürülmesi ile ayrılmıştır. Elde edilen süpernatant kuruluğa kadar evapore edilmiş ve kuru örnek alkol ile tekrar ekstrakte edilmiştir. Tekrar evapore edilen örnek suda çözünebilmektedir ve kullanılıncaya kadar kuru halde saklanmıştır. Araştırmacılar serum içerisinde enzimin olmadığını belirtmişler. Enzimin 70 °C’de hızlı bir şekilde inaktive olduğunu ve KCN ile inhibe olduğunu belirtmişlerdir.

Hove vd. (1940) CA’yı sığır kanında alkol-kloroform metodu ile saflaştırmıştır. Kırmızı kan hücrelerindeki çinkonun tümünün enzime bağlı olduğu bulunmuştur. KSCN’in enzimi tamamen inhibe ettiği belirtilmiş ve çalışmada CA’ın temelde kırmızı kan hücrelerinde bulunduğu fakat diğer dokularda da farklı fonksiyonlara sahip olabileceği ifade edilmiştir.

Keilin ve Mann (1940) sığır ve koyun eritrositlerinden ve gastrik mukozasından CA saflaştırmışlar ve enzimin eritrosit hemolizatından 150 kat yüksek aktiviteye sahip olduğunu bulmuşlardır. Sığır kanının litresi başına yaklaşık olarak 200 mg CA enzimi saflaştırılmıştır. Çinkonun enzimin aktivitesindeki öneminin belirtildiği bu çalışma çinkonun organizmadaki fizyolojik fonksiyonunun anlatıldığı ilk araştırmadır.

Petermann ve Hakala (1942) sığır CA'nın sedimentasyon katsayısını 2.8 S. difüzyon sabitinin 9.0×10^{-7} sq cm/s, molekül ağırlığının ise 30000 olduğunu bulmuşlardır. Enzimin elektroforetik mobilitesi pH 5.0 ve 9.0 arasında incelenmiş ve izoelektrik noktasının pH 5.3 olduğu göstermişlerdir. Saflaştırılan enzimin yine de % 15 safsızlık içerdiğini belirtmişlerdir.

Krebs (1948) 25 farklı sülfonamid bileşiğinin CA enzimin inhibe etme kapasitesini incelemiş ve CA aktivitesini % 50 inhibe eden inhibitör derişimlerini farklı sıcaklıklarda (0 ve 15 °C'de) bulunmuştur. Test edilen inhibitörler arasından p-toluen sülfonamid bileşiğinin en yüksek inhibitör etkiye sahip olduğu bulunmuştur.

Heterosiklik ve aromatik sülfonamidlerin CA inhibitörü olarak kullanımı Miller vd., (1950) tarafından incelenmiş ve incelenen inhibitörlerden bazılarının sülfonamide göre 100 ile 2000 kat daha etkin olduğu bulunmuştur.

Rickli vd. (1964) insan eritrosit hemolizatından hidroksiapatit kolonu kullanılarak kromatografik olarak ayrılmış farklı aktivitelere sahip iki CA enzimi saflaştırmışlardır. Bunlardan birisi CA B olarak adlandırılmış ve eritrositlerdeki miktarı diğerine (CA C) nazaran 5 kat daha fazla olmasına rağmen spesifik aktivitesinin oldukça düşük olduğu bulunmuştur. CA C'nin ise aktivitesinin CA B'den çok yüksek olduğu ifade edilmiştir. Her iki enzimin de molekül kütlesi 30000 civarında bulunmuş ve her bir enzimin molekülü başına 1 çinko atomu içerdiği gösterilmiştir. CA B ve CA C'nin izoelektrik noktaları sırasıyla pH 5.7 ve 7.3 olarak bulunmuştur.

Henderson vd. (1976) insan CA C'yi saflaştırmışlar ve primer yapısını aydınlatmışlardır. Tek bir polipeptid zincirinden oluşan yapının 259 amino aside sahip olduğu ve disülfid köprüsü içermediği gösterilmiştir.

1982 yılında Whitney ve Briggles sığır akciğerinden membran bağlı bir CA'ı saflaştırmışlardır. Enzimin sodyum dodesil sülfata (SDS) önemli derecede dayanıklı olduğu bulunmuştur. Enzim SDS'de çözülmüş ve afinite kromatografisi ve jel filtrasyon ile saflaştırılmıştır. Saflaştırılan enzimin glukozamin, galaktoz ve sialik asit taşıdığı bulunmuştur. Enzimin molekül kütlesi SDS-poliakrilamid jel elektroforezi kullanılarak 52000 olarak bulunmuştur. Enzimin ayrıca disülfid bağları da içerdiği bulunmuştur.

Karlsson vd. (1995) *Chlamydomonas reinhardtii*'den CA saflaştırmak amacıyla amonyum sülfat çöktürmesi, anyon değişim kromatografisi ve hidrofobik etkileşim kromatografisini kullanmışlardır. Saflaştırılan enzimin 1260 Wilbur-Anderson unitesi/mg protein spesifik aktiviteye sahip olduğu hesaplanmış ve saflaştırma katsayısı 2280 olarak bulunmuştur. Enzimin molekül kütlesi SDS-PAGE ile 29.5 kDa olarak hesaplanmıştır.

Demir vd. (1997a) olgun havuç yaprak ve köklerinden karbonik anhidraz enzimini DEAE-selüloz iyon değişim kromatografisi ile saflaştırmışlar ve karakterize etmişlerdir. Yaprak ve kökten sırasıyla 75 ve 73 kat saflaştırılan karbonik anhidrazın optimum sıcaklık ve pH değerleri saptanmıştır. Her iki örnek için de optimum sıcaklık 75 olarak bulunurken yaprak ve kökten saflaştırılan CA'nın optimum pH'ı sırasıyla 9.0 ve 8.5 olarak bulunmuştur. Enzimin 22800 Da'luk alt birimlerden meydana gelen 137800 Da'luk bir hegzamer olduğu bulunmakla beraber 45700 Da'luk bir karbonik anhidraz dimeri de ayrıca saptanmış ve bu dimerin yapraklarda daha yoğun olarak bulunduğu ifade edilmiştir. Saflaştırılan karbonik anhidraz miktarı yapraklarda daha fazla iken kökteki enzim aktivitesi daha yüksektir. Enzim aktivitesi için yapay substrat olarak *p*-nitrofenil asetat kullanılmış ve karbonik anhidrazın esteraz aktivitesi ölçülmüştür. Saflaştırılan CA'nın saflığı ayrıca SDS-PAGE ile de gösterilmiştir.

Demir vd. (1997b) *Nicotiana tabacum* yapraklarından amonyum sülfat çöktürmesi ve DEAE-selüloz kolon kromatografisi ile CA saflaştırmışlardır. Enzimin aktivitesi iki farklı substrat (CO₂ ve *p*-nitrofenil asetat) için de saptanmıştır. Enzim 40.7 kat saflaştırılırken saflık SDS-PAGE ile kontrol edilmiştir. Enzimin optimum pH'ı 6.9, optimum sıcaklığı ise 40 °C olarak bulunmuştur. Enzimin ve alt biriminin molekül kütlesi sırasıyla 137000 ve 22800 daltondur. Bu sonuçlardan enzimin 6 alt birim içerdiği çıkarılmaktadır.

Deniz suyu ve temiz suda yetiştirilmiş dil balığı *Platichthys flesus* solungaçlarından ve eritrositlerinden CA'nın saflaştırılması, karakterizasyonu ve immunohistokimyasal lokalizasyonu Sender vd. (1999) tarafından çalışılmıştır. CA'nın saflaştırılması için *p*-aminometilbenzensülfonamid-agaroz ile afinite kromatografisi uygulanmıştır ve enzimin saflığı SDS-PAGE elektroforezi ile gösterilmiştir.

Özensoy vd. (2004) yaptıkları bir çalışmada, afinite kromatografisi ile CA izozimlerinin saflaştırılması için yeni bir metot geliştirmişlerdir. Bu amaçla p-aminobenzensülfonamid ile türevlendirilmiş EUPERGIT^R C-250L kullanılmıştır. Hazırlanan jel ile insan CA'ı 258 kat, sığır CA'ı ise 478 kat saflaştırılmıştır ve saflık SDS-PAGE ile kanıtlanmıştır.

Banerjee vd. (2004) metal afinite kromatografi kullanarak CA'ı saflaştırmışlardır. Bu amaçla, Sepharoz-iminodiasetat (IDA)-Zn²⁺ kolonu hazırlamışlar ve insan CA II'nin Zn²⁺ iyonuna olan ilgisi sebebiyle kolona bağlanması sağlanmıştır. Enzim kaynağı olarak insan CA II'si sentezleyen rekombinant E. coli hücreleri kullanılmıştır. Toplam enzim geri kazanımı % 76 olarak bulunurken enzimin saflığı SDS-PAGE ile gösterilmiştir.

Hisar vd. (2006) gökkuşağı alabalığı solungaçlarından CA saflaştırmışlar ve kinetik özelliklerin incelenmişlerdir. Saflaştırma adımı için Sepharose-4B-L-tirozin-sülfonamid afinite jel kromatografisi kullanılmış ve 104.8 kat saflaştırma elde edilmiştir. Enzimin molekül kütlesi SDS-PAGE ile 28 kDa bulunurken jel filtrasyon kromatografisi ile 27 kDa olarak bulunmuştur. Optimum pH, kararlı pH ve optimum sıcaklık sırası ile 9.5, 8.2 (0.025 M borik asit tamponu) ve 17.5 °C olarak bulunmuştur. p-nitrofenilasetat substratı için K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 8.13 mM ve 2.10 µmol/mg protein/dak dır.

Demir vd. (2007) *Elephas trogontherii* (bozkır fili) kemiğinin (yaklaşık 0.3-0.5 milyon yıllık) farklı bölgelerinden (periferik dışı, sitozolik, periferik içi ve tüm) 4 CA izozimini Sepharose 4B-L-tirozin sülfonamid afinite kromatografisi ile saflaştırmışlar ve kinetik özelliklerini bilinen CA izozimleri ile karşılaştırmışlardır. Enzimin saflığı SDS-PAGE ile gösterilmiştir. Periferik dışı, sitozolik, periferik içi ve tüm kemikten elde edilen CA'nın saflaştırma katsayısı sırasıyla 395.6, 652.8, 1091 ve 429.3; jel filtrasyon kromatografisi ile saptanan molekül kütleleri ise sırasıyla 37, 36, 35 ve 39 kDa'dur. Optimum sıcaklıklar 10-20, 30, 30 ve 60 °C iken optimum pH'lar 7.5-11, 7.5-10, 7.5-10 ve 7.5'dir. Enzimin K_m değeri sırasıyla 4.83, 6.80, 4.53 ve 3.86 mM, V_{max} değerleri 0.00097, 0.0149, 0.00249 ve 0.00072 µmol/L.dak olarak bulunmuştur.

Sharma vd. (2009) CaCO₃'ca zengin toprak örneklerinden *Pseudomonas fragi*'den ekstraselüler CA saflaştırmışlardır. CA afinite kromatografisi ile tek adımda % 86 verimle ve 4.52 kat saflaştırılmıştır. Bu amaçla, besi ortamından % 75'lik

amonyum sülfat ile çöktürülen örnek direkt olarak agarozu bağı p-aminometil-benzensülfonamid afinite kolonuna uygulanmıştır. Kolona bağlanan CA 100 mM sodyum asetat, 500 mM NaClO₄ ve 0.01 mM EDTA ile elüe edilmiştir. Saflaştırılan CA'nın molekül kütlesi Sephadex G-100 kullanılan jel filtrasyon kromatografisi ile hesaplanırken proteinin alt birimlerinin molekül ağırlığı SDS-PAGE ile tayin edilmiştir. 31.0 kDa'luk alt birimlerden oluşan trimerik bir protein olan CA'nın 7.0-8,5 pH ve 35-45 °C sıcaklık aralığında kararlı olduğu bulunmuştur. Kurşun, civa ve EDTA'nın CA aktivitesi üzerine inhibe edici etkilerine karşın çinko, demir ve kadmiyum aktiviteyi arttırmaktadır.

Ramanan vd. (2009) karbon dioksitin biyo-ayrılması için *Citrobacter freundii*'den CA saflaştırmışlardır. Saflaştırma amacıyla jel filtrasyon ve sonrasında iyon değişim kromatografisi uygulanmıştır ve saflık SDS-PAGE ile gösterilmiştir. Enzimin molekül kütlesinin 24 kDa olduğu saptanmıştır.

Gökkuşuğu alabalığı solungaçlarından saflaştırılan CA enzimi üzerine bazı pestisitlerin *in vitro* ve *in vivo* etkileri Ceyhun vd. (2010) tarafından incelenmiştir. CA'nın saflaştırılması için Sepharose 4B-anilin-sülfonamid afinite kromatografisi kullanılmıştır ve 214 katlık bir saflaştırma elde edilmiştir. Toplam CA saflaştırma verimi % 52.88 iken spesifik aktivite 413.53 EU/mg protein olarak hesaplanmıştır. Saflık ayrıca SDS-PAGE ile 29 kDa'daki tek bant ile de gösterilmiştir. Deltametrin, diazinon, propoksür ve sipermetrin pestisitleri ile *in vitro* CA aktivitesi doza bağı olarak inhibe olmaktadır. Deltametrin, diazinon, propoksür ve sipermetrinin IC₅₀ değerleri sırasıyla 0.137, 0.267, 0.420 ve 0.460 µM'dır. Ayrıca deltametrinin *in vivo* çalışmaları gökkuşuğu alabalığı CA aktivitesi üzerinde gerçekleştirilmiştir ve CA üç derişimde (0.25, 1.0 ve 2.5 µg/L) 24 ve 48 saatte önemli ölçüde inhibe olmuştur.

Teleost balık *Dicentrarchus labrax* solungaçlarından α-CA'nın saflaştırılması, karakterizasyonu ve bazı anyonlara karşı inhibisyon çalışmaları Ekinci vd. (2011) tarafından gerçekleştirilmiştir. Saflaştırma işlemi tek adımlı Sepharose 4B-tirozin-sülfonamid afinite kromatografisi ile gerçekleştirilmiştir. Afinite kolonunda tutulan enzim 1.0 M NaCl/25 mM Na₂HPO₄ (pH 7.0) çözeltisi ile elüe edilmiştir. Enzim 84.9 kat ve % 58 verimle saflaştırılmış ve spesifik aktivitesi 838.9 U/mg protein olarak bulunmuştur. Enzimin saflığı SDS-PAGE ile gösterilmiştir. Enzimin optimum pH'ı ve sıcaklığı sırasıyla 8.0 ve 10 °C olarak bulunmuştur. Optimum iyonik şiddet ise 400 mM olarak bulunmuştur. Saflaştırılan CA'nın

kinetik parametreleri de 4-nitrofenil asetat substratına karşı esteraz aktivitesi için saptanmış ve K_m değeri 1.595 mM, V_{max} değeri ise 0.509 $\mu\text{mol/dak.}$ olarak hesaplanmıştır. Saflaştırılan enzime karşı H_2NSO_3^- , I^- , SCN^- , NO_3^- , NO_2^- , N_3^- , Br^- , Cl^- , SO_4^{2-} ve F^- anyonlarının inhibitör etkileri incelenmiş ve sülfamik asit, iyodür ve tiyosiyanatın güçlü inhibitör oldukları NO_3^- , NO_2^- ve N_3^- anyonlarının ise ortalama inhibitör aktivitesine sahip oldukları bulunmuştur.

Cincinelli vd. (2011) Antarktik fok *Leptonychotes weddellii*'nin çeşitli organlarından (karaciğer, böbrek, bağırsak, kalp, akciğer ve dalak) α -CA saflaştırmışlar ve çeşitli anyonlar ve sülfonamidlerin CA üzerine inhibitör etkilerini incelemişlerdir. Saflaştırma işlemi CH Sepharose 4B-4-(2-aminoetil)-benzensülfonamid afinite kolonu ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen CA'nın saflığı SDS-PAGE elektroforezi ile gösterilmiştir. Saflaştırılan enzimin kinetik parametreleri de incelenmiş ve k_{cat}/K_m değeri ($1.4 \times 10^8 \text{M}^{-1}\text{S}^{-1}$) doğadaki en aktif enzimlerden birisi olan insan CA II'nin k_{cat}/K_m değerine ($1.5 \times 10^8 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) oldukça yakın olarak bulunmuştur. Enzimin Michaelis-Menten sabiti (K_m) de insan CA II'ye benzer olarak fok enzimi için 7.5 mM, insan CA II için 9.3 mM bulunmuştur. Enzim, siyanat, tiyosiyanat, siyanit, bikarbonat, karbonat, sülfamid, sülfamat, fenilboronik/fenillarsonik asitten şiddetli bir biçimde inhibe olmaktadır. Diklorfenamid, zonisamid, sakarin ve hidroklorotiazit ise zayıf inhibitörlerdir.

Teleost balık *Dicentrarchus labrax* karaciğerinden CA saflaştırılması ve karakterizasyonu ilk kes Ceyhun vd. (2011) tarafından yapılmıştır. Saflaştırma işlemi Sepharose 4B-tirozin-sülfonamid kullanılarak tek adımlı afinite kromatografisi ile gerçekleştirilmiştir. Enzim % 46 verim ile 78.8 kat saflaştırılmış ve spesifik aktivitesi 751.72 U/mg protein olarak bulunmuştur. Kolona bağlanan CA 1.2 M NaCl/25 mM Na_2HPO_4 (pH 6.3) ile elüe edilmiştir. Saflaştırılan enzimin molekül kütlesi jel filtrasyon kromatografisi ile 30.2 kDa olarak saptanmıştır. Saflık ayrıca SDS-PAGE ile gösterilmiştir. Optimum pH'ı 7.5, optimum sıcaklığı 25 °C, optimum iyonik şiddeti 10 mM'dır ve pH 8.5'da da kararlıdır. Enzimin kinetik parametreleri 4-nitrofenil asetatın substrat olarak kullanıldığı esteraz aktivitesi ile saptanmıştır ve K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 0.44 mM ve 0.249 $\mu\text{mol/dak}$ olarak bulunmuştur. Araştırmacılar ayrıca enzim aktivitesi üzerine Al^{3+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} , Co^{3+} , Ag^+ , Zn^{2+} ve Hg^{2+} iyonlarının inhibitör etkilerini incelemişlerdir. Al^{3+} ve Cu^{2+} güçlü inhibisyona neden olurken, Pb^{2+} iyonunun ortalama bir inhibisyona sahip olduğu diğer iyonların ise daha zayıf inhibe edici etki gösterdiği bildirilmiştir.

Ores vd. (2012) sığır eritrositlerinden CA saflaştırmışlar ve karbon dioksitin enzimatik olarak yakalanmasını incelenmişlerdir. Bu amaçla, iki farklı saflaştırma tekniği uygulanmıştır: ilki farklı çözen oranlarının çalışıldığı kloroform ve etanol organik çözenleri ile ekstraksiyon; diğeri ise amonyum sülfat çöktürmesi (farklı yüzde doygunluk değerlerinde). Karbon dioksit her teknik ile elde edilen enzim ile kalsiyum karbonat olarak çöktürülerek yakalanmıştır. Etanol ve kloroform ile ekstrakte edilen enzimin aktivitesi 2623 U/mL, geri kazanımı % 98 ve saflaştırma faktörü 104 kat iken % 60'lık amonyum sülfat ile çöktürülen enzimin aktivitesi 2162 U/mL, geri kazanımı % 66 ve saflaştırma faktörü ise 1.4 kattır. Her iki işlem ile saflaştırılan enzim ekstraktları karbon dioksit yakalamada kullanılmıştır ve endüstriyel karbondioksit yakalamada kullanılabilecek iyi bir alternatif olarak görülmektedir.

Termofilik bakteri *Sulfurihydrogenibium* sp. YO3AP1'den yeni bir CA Capasso vd. (2012) tarafından izole edilmiş ve karakterize edilmiştir. Bu CA'ı kodlayan gen klonlanmış ve *E. coli*'de üretilerek histidin seçicili nikel afinite jeli ile 16 kat saflaştırılmıştır. Saflık aynı zamanda SDS-PAGE ile de gösterilmiştir. Enzimin α -sınıfına ait olduğu, monomer yapıda ve 26.1 kDa molekül kütlesine sahip olduğu ve esteraz aktivitesi gösterdiği bulunmuştur. Kinetik parametreler substrat olarak CO₂ ve *p*-nitrofenilasetat kullanılarak saptanmıştır. Termoaktivite ve termostabilite çalışmaları enzimin 0-100 °C aralığında aktif olduğunu ve 100 °C'de 2 saat sonunda aktivitesini tamamen koruduğunu göstermiştir. Poliüretan köpüklere immobilize edilen enzimin oldukça aktif olduğu ve 100 °C'de 50 saat boyunca aktif kaldığı bulunmuştur.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Deneyleerde, Shimadzu (UV-1601) spektrofotometre, Cole & Palmer (Masterflex, C/L) peristaltik pompa, Ohaus (Pioneer, PA 214 C) 0.1 mg duyarlıkta terazi, Velp (Multistirrer 15) manyetik karıştırıcı, Hanna (pH 211) pH metre, Hettich (Universal 32R) ve Sigma (3K30) santrifüj, Bio-Rad (Mini-Protean tetra) elektroforez aygıtı ve Bio-Rad (PowerPac Basic) güç kaynağı, Memmert (UNB 400) etüv, VWR (1180S) sirkülatörlü su banyosu, Memmert (WB14) su banyosu, Bandelin (Sonorex RK255H) ultrasonik banyo, GFL (2001/4) saf su cihazı, Millipore (Simplicity) ultra saf su cihazı, Axygen (Axyjet) otomatik pipetler kullanılmıştır.

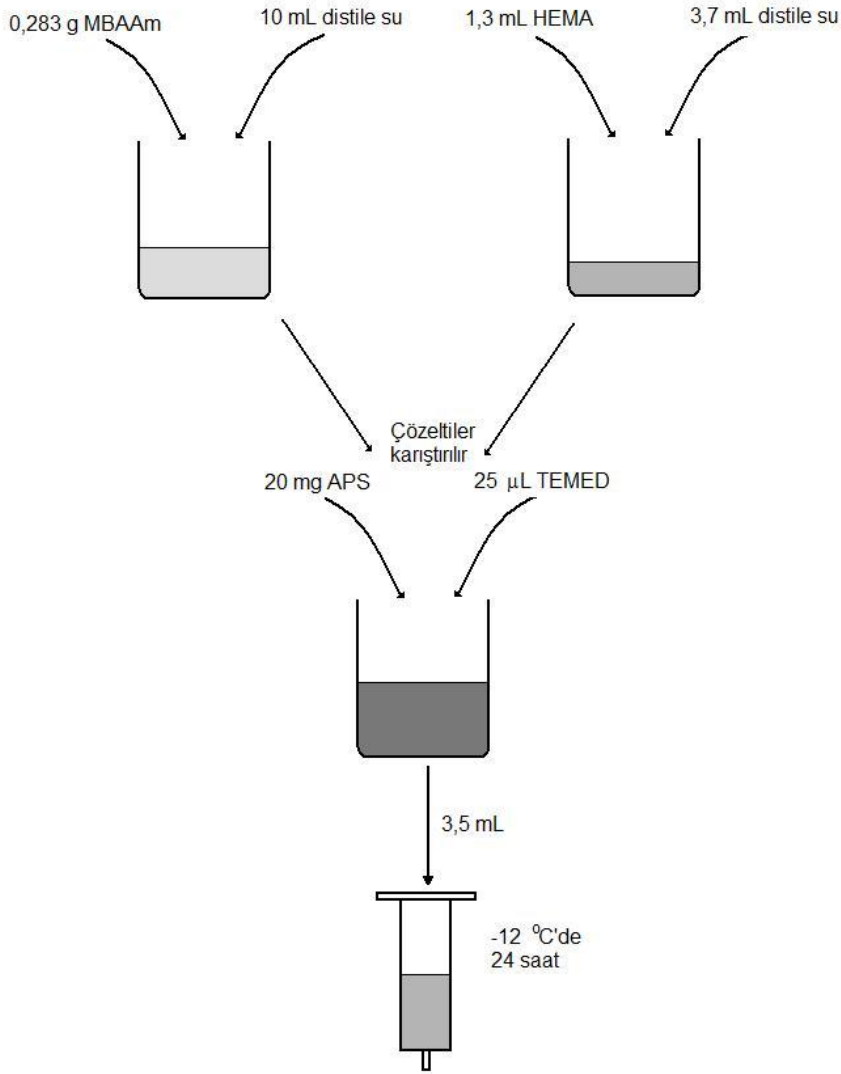
Karbonik anhidraz II (sığır eritrositinden), 2-hidroksietil metakrilat (HEMA), N,N'-metilen bis(akrilamid) (MBAAm), amonyum persülfat (APS), N,N,N',N'-tetrametilen diamin (TEMED), *p*-nitro fenilasetat (*p*-NPA), bromtimol mavisi, potasyum tiyosiyanat, borik asit, 2-(N-morfolino)etansülfonik asit (MES), 3-(N-morfolino)propansülfonik asit (MOPS), albumin (sığır serum), hemoglobin (sığır serum), IgG (sığır serum), γ -globulin (sığır serum), SDS, Tris-baz, akrilamid, gliserol, bromfenol mavisi, glisin, etanol, amonyum sülfat, sodyum bromür, sodyum sülfat, magnezyum nitrat, kalsiyum klorür, histidin metil esteri, hidrokinon, trietil amin, metakriloil ve elektroforez standart protein karışımı [miyozin (tavşan kanı, 205 kDa), β -galaktozidaz (*E. coli*, 116 kDa), fosforilaz B (tavşan kanı, 97 kDa), albumin (sığır serum, 66 kDa), albumin (yumurta akı, 45 kDa), karbonik anhidraz (sığır eritrosit, 29 kDa)] Sigma (Steinheim, Almanya)'dan; sodyum klorür, sodyum nitrat, amonyum klorür, amonyum asetat, potasyum sülfat, potasyum klorat, etil asetat, sodyum hidroksit ve sodyum asetat Riedel-de Haën (Seelze, Almanya)'dan; dipotasyum hidrojen fosfat, potasyum bromür, Tris-HCl, asetonitril, etilendiamin tetraasetik asit (EDTA), amonyum tiyosiyanat, amonyum nitrat, sodyum tiyosiyanat, sodyum iyodür, magnezyum klorür, potasyum klorür, diklor metan ve metanol Merck (Dramstadt, Almanya)'dan; potasyum dihidrojen fosfat, magnezyum sülfat ve asetik asit Carlo Erba (Rodano, İtalya)'dan, Commassie Brilliant Blue G-250, etilen glikol, kalsiyum nitrat ve lizozim (yumurta beyazı) Fluka (Steinheim, Almanya)'dan; 4-(2-hidroksietil)piperazin-1-etansülfonik asit (HEPES) ve β -merkaptotanol AppliChem (Darmstadt, Almanya)'dan temin edilmiştir.

Polimer karakterizasyonu için Adnan Menderes Üniversitesi Bilim Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezinde bulunan FTIR spektrofotometresi (Varian, FTS 7000, ABD), İnönü Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırma merkezinde bulunan elementel analiz cihazı (Leco, CHNS-932, ABD), İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Malzeme Araştırma Merkezinde bulunan taramalı elektron mikroskobu (SEM) (FEI, Quanta 250 FEG, ABD) ve BET cihazı (Micromeritics, Gemini V, ABD), Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Biyokimya Anabilim Dalında bulunan floresans spektrometre cihazı (Shimadzu, RF53010, Japonya), kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Poli(HEMA) Kriyojellerinin Sentezlenmesi

Poli(HEMA) kriyojellerinin sentezlenmesi için 0.283 g N,N'-metilen-bis(akrilamid) (MBAAm) 10.0 mL distile suda, 1.3 mL 2-hidroksietil metakrilat (HEMA) 3.7 mL distile suda çözülmüştür. Ayrı beherler içerisinde buz banyosunda çözülen reaktifler daha sonra karıştırılarak üzerine 20.0 mg amonyum persülfat (APS) eklenmiştir. Karışımın üzerine 25.0 µL N,N,N',N'-tetrametilen diamin (TEMED) eklenerek hızlı bir şekilde enjektör (5.0 mL hacim, 0.8 cm çap) içerisine 3.5 mL alınmıştır. Ağız parafilm ile kapatılan enjektör -12 °C'de 24 saat bekletildikten sonra oda sıcaklığına alınarak donmuş olan suyun erimesi sağlanmıştır. Poli(HEMA) kriyojellerin sentezi Şekil 3.1.'de şematik olarak gösterilmiştir. Oluşan kriyojel peristaltik pompa kullanılarak 200 mL distile su ile yıkanmış ve monomer artıklarından temizlenmiştir. İşlem dört tekrarlı olarak yapılmıştır.



Şekil 3.1. Poli(HEMA) kriyojellerin sentezi.

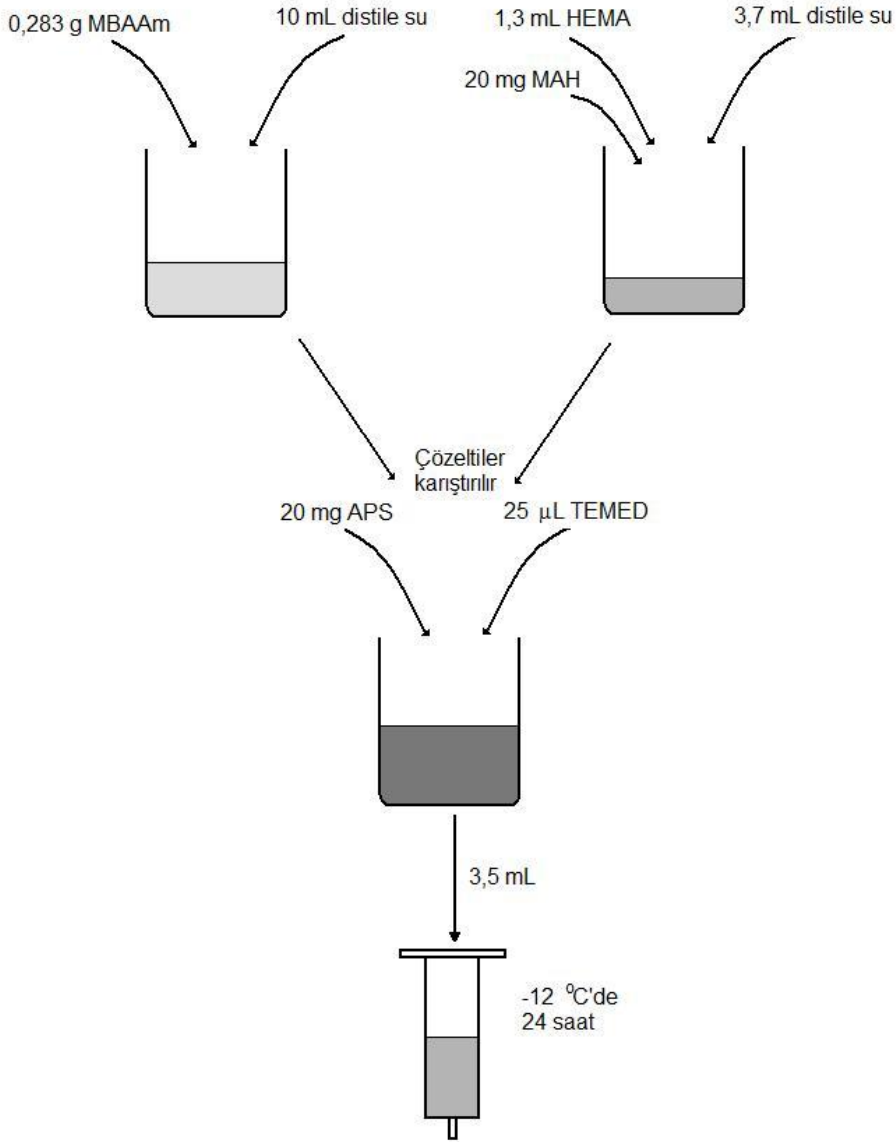
3.2.2. N-metakriloil-(L)-histidin (MAH) Monomerinin Sentezi

Karbonik anhidraz baskılanmış kriyojellerin hazırlanmasında fonksiyonel monomer olarak MAH kullanılmıştır. MAH monomerinin sentezi Hacettepe Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim dalı tarafından gerçekleştirilmiştir. MAH sentezi için; 5.0 g histidin metil esteri ve 0.2 g hidrokinoon 100 mL CH_2Cl_2 içerisinde çözülmüş ve çözelti 0 °C'ye soğutulmuştur. Çözelti üzerine 12.74 g trietilamin eklendikten sonra 5.0 mL

metakrioloil klorür azot ortamında bu çözeltiye eklenmiş ve 2 saat oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Bu kimyasal reaksiyon periyodu sonunda reaksiyona girmeyen metakrioloil klorür 50.0 mL % 10'luk NaOH ile ekstrakte edilmiştir. Sıvı faz döner buharlaştırıcıda evapore edilmiş ve kalıntı (MAH) etanol ve etilasetatda kristallendirilmiştir.

3.2.3. Poli(HEMA-MAH) Kriyojellerinin Sentezlenmesi

Poli(HEMA-MAH) kriyojellerinin sentezlenmesi için 0.283 g MBAAm 10.0 mL distile suda, 1.3 mL 2-hidroksietil metakrilat (HEMA) ve 20.0 mg MAH karışımı 3.7 mL distile suda çözülmüştür. Aynı beherler içerisinde buz banyosunda çözülen reaktifler daha sonra karıştırılarak üzerine 20.0 mg APS eklenmiştir. Karışımın üzerine 25.0 µL TEMED eklenerek hızlı bir şekilde enjektör (5.0 mL hacim, 0.8 cm çap) içerisine karışımdan 3.5'er mL alınmıştır. Ağız parafilm ile kapatılan enjektör -12 °C'de 24 saat bekletildikten sonra oda sıcaklığına alınarak donmuş olan suyun erimesi sağlanmıştır. Poli(HEMA-MAH) kriyojellerin sentezi Şekil 3.2.'de şematik olarak gösterilmiştir. Oluşan kriyojel 200 mL distile su ile peristaltik pompa yardımıyla yıkanmış ve monomer artıklarından temizlenmiştir. İşlem dört tekrarlı olarak yapılmıştır.

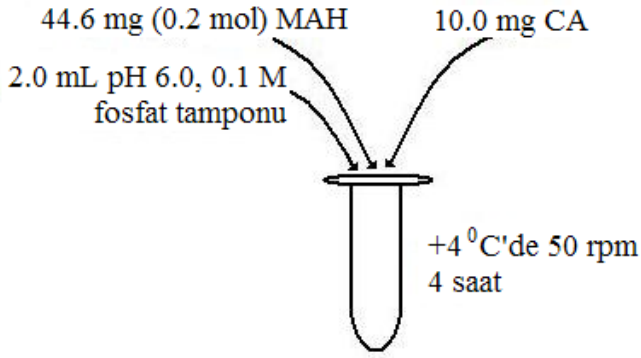


Şekil 3.2. Poli(HEMA-MAH) kriyojellerin sentezi.

3.2.4. Karbonik Anhidraz Baskılanmış Poli(HEMA-MAH) Kriyojellerinin (MIP) Sentezlenmesi

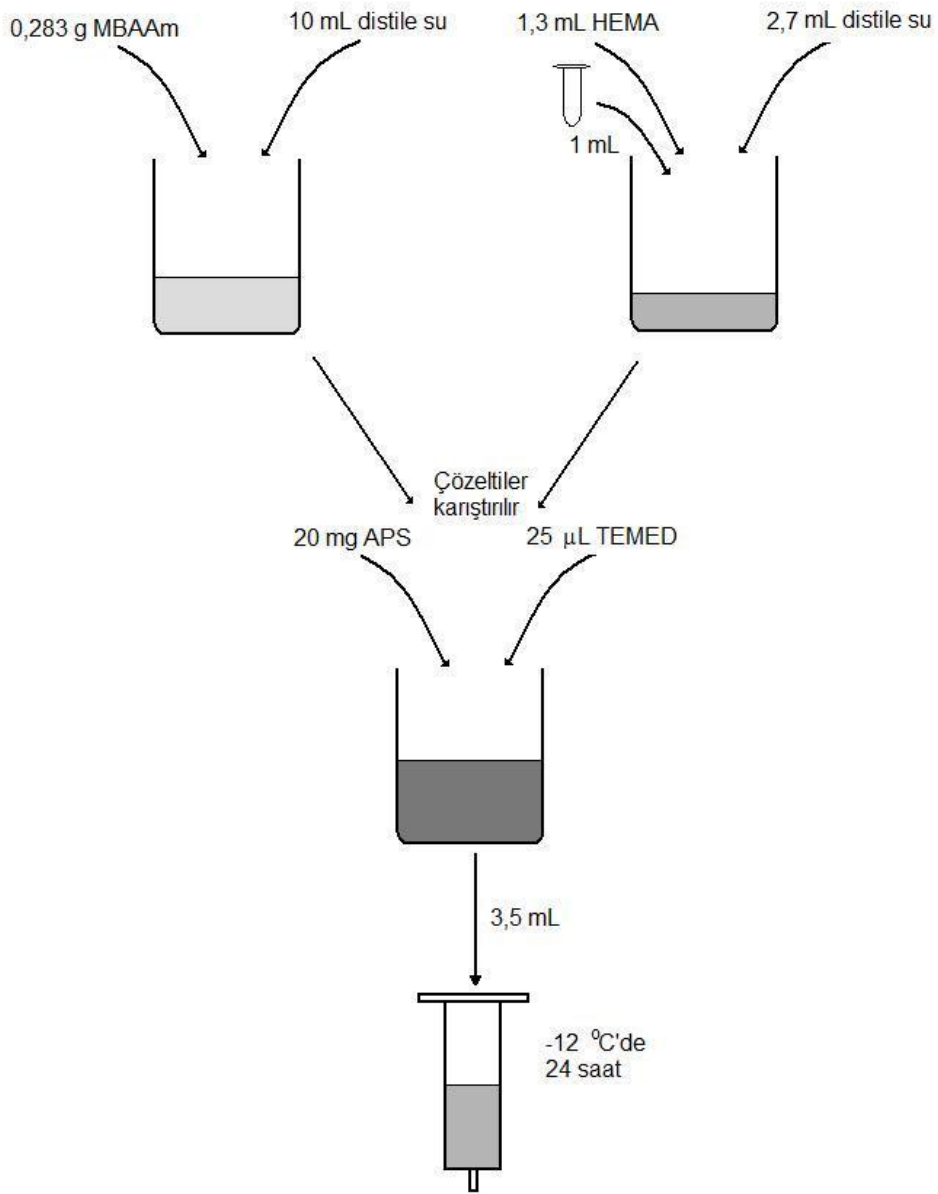
0.2 mol (44.6 mg) MAH monomeri ve 10.0 mg karbonik anhidraz 2.0 mL pH 6.0 fosfat tamponunda (0.1 M) çözülerek 4 saat boyunca +4 °C ve 50 rpm'de karıştırılarak ön kompleks oluşumu sağlanmıştır. Ön kompleks hazırlık aşaması Şekil 3.3.'de şematik olarak gösterilmiştir. Hazırlanan bu kompleksten 1.0 mL

alınarak 1.3 mL HEMA monomeriyle karıştırılmış ve çözelti hacmi 5.0 mL'ye saf su ile tamamlanmıştır. Elde edilen çözelti 0.283 g MBAAm (10.0 mL distile suda) ile karıştırılarak üzerine 20.0 mg APS eklenmiştir. Karışımın üzerine 25.0 μ L TEMED eklenerek hızlı bir şekilde enjektör (5.0 mL hacim, 0.8 cm çap) içerisine karışımdan 3.5 mL alınmıştır. Ağız parafilm ile kapatılan enjektör -12 °C'de 24 saat bekletildikten sonra oda sıcaklığına alınarak donmuş olan suyun erimesi sağlanmıştır. Oluşan kriyojel 200 mL distile su ile yıkanarak monomer artıklarından temizlenmiştir.



Şekil 3.3. CA-MAH ön kompleksinin oluşumu.

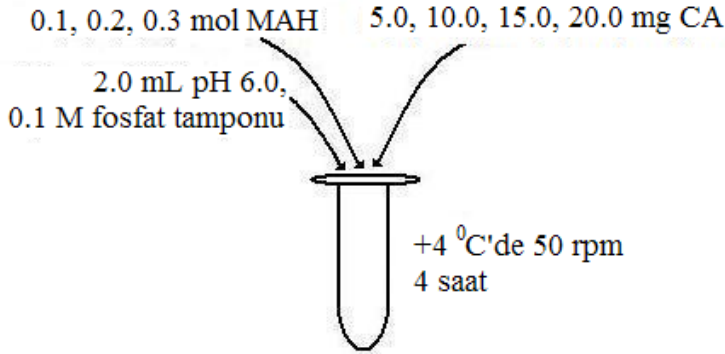
Baskılanmış poli(HEMA-MAH) kriyojellerin sentezi Şekil 3.4.'de şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 3.4. Baskılanmış poli (HEMA-MAH) kriyojellerin sentezi.

3.2.5. Kriyojel Sentezinde Kullanılan MAH Monomerinin ve Karbonik Anhidraz Miktarının Optimizasyonu

Kriyojel sentezinde fonksiyonel monomer olarak kullanılan MAH miktarı ile baskılama işleminde kullanılan karbonik anhidraz miktarını optimize etmek üzere Çizelge 3.1.'de gösterilen oranlar kullanılarak kriyojeller hazırlanmıştır. Bunun için farklı miktarlardaki MAH monomeri (0.1, 0.2 ve 0.3 mol) ve karbonik anhidraz (5.0, 10.0, 15.0 ve 20.0 mg) 2.0 mL pH 6.0 fosfat tamponunda (0.1 M) çözülmüş ve 4 saat boyunca +4 °C ve 50 rpm'de karıştırılarak ön kompleks oluşumu sağlanmıştır. Ön kompleksin hazırlanması şematik olarak Şekil 3.5.'de gösterilmiştir. Hazırlanan bu kompleksten 1.0 mL alınarak 1.3 mL HEMA monomeriyle karıştırılmış ve çözelti hacmi saf su ile 5.0 mL'ye tamamlanmıştır. Elde edilen çözelti 0.283 g MBAAm (10.0 mL distile suda) ile karıştırılarak üzerine 20.0 mg APS eklenmiştir. Karışımın üzerine 25.0 µL TEMED eklenerek hızlı bir şekilde enjektör (5.0 mL hacim, 0.8 cm çap) içerisine karışımdan 3.5 mL alınmıştır. Ağız parafilm ile kapatılan enjektör -12 °C'de 24 saat bekletilmiştir. Yirmi dört saat sonunda örnek oda sıcaklığına alınarak donmuş olan suyun erimesi sağlanmış ve oluşan kriyojel 200 mL distile su ile yıkanarak monomer artıklarından temizlenmiştir. Baskılanmış olan karbonik anhidrazı kriyojelden sökmek üzere kriyojel, 20.0 mL 1,0 M NaCl içeren pH 4.0 asetat tamponu (0.1 M) ile yıkanmıştır.



Şekil 3.5. Farklı MAH ve CA içeriklerine sahip ön kompleksin oluşumu.

Çizelge 3.1. Kriyojellerin sentezinde kullanılan MAH monomeri ve CA miktarları.

| Kriyojel Adı | MAH miktarı (mol) | CA miktarı (mg) |
|------------------|-------------------|-----------------|
| NIP ₁ | 0.1 | - |
| NIP ₂ | 0.2 | - |
| NIP ₃ | 0.3 | - |
| CA ₁ | 0.1 | 5.0 |
| CA ₂ | 0.1 | 10.0 |
| CA ₃ | 0.1 | 15.0 |
| CA ₄ | 0.1 | 20.0 |
| CA ₅ | 0.2 | 5.0 |
| CA ₆ | 0.2 | 10.0 |
| CA ₇ | 0.2 | 15.0 |
| CA ₈ | 0.2 | 20.0 |
| CA ₉ | 0.3 | 5.0 |
| CA ₁₀ | 0.3 | 10.0 |
| CA ₁₁ | 0.3 | 15.0 |
| CA ₁₂ | 0.3 | 20.0 |

NIP: Karbonik anhidraz baskılanmamış polimerler.

CA: Karbonik anhidraz baskılanmış polimerler

Kriyojel içeriğindeki MAH ve CA miktarının optimizasyonu için farklı MAH monomeri (0.1, 0.2 ve 0.3 mol) ve CA (5.0, 10.0, 15.0 ve 20.0 mg) içeren kriyojellere karbonik anhidrazın adsorpsiyonu deneyleri yapılmıştır. Bunun için 0.5 mg/mL (pH 6.0, 0.1 M fosfat tamponunda) derişiminde hazırlanmış karbonik anhidrazın 3.0 mL lik çözeltisi bir peristaltik pompa yardımı (0.5 mL/dk ve 2 saat süre ile) ile sürekli sistemde kriyojelden geçirilmiştir. İki saat sonunda kriyojele bağlanmayan CA çözeltisinde protein ve aktivite tayini yapılmıştır. Kriyojelde adsorplanan CA 10.0 mL, 1.0 M NaCl çözeltisi (0.1 M; pH 4.0 asetat tamponunda) ile desorbe edilerek yine bu örnekte protein ve aktivite tayini yapılmıştır. Başlangıç ve son protein miktarlarına ve aktivitelerine bakılarak en yüksek oranda karbonik anhidraz bağlayan MAH monomeri miktarı tespit edilmiştir. Ayrıca hazırlanan kriyojellerde, % şişme derecesi, bağlanan suyun gram cinsinden şişme derecesi, makrogözeneklilik ve akış hızı ölçümleri yapılmıştır.

3.2.6. Sentezlenen Kriyojellerin Karakterizasyonu

3.2.6.1. Şişme derecesi ölçümleri

Sentezlenen kriyojellerin [poli(HEMA), baskılanmamış poli(HEMA-MAH), farklı derişimlerde MAH monomeri ve CA içeren baskılanmış poli(HEMA-MAH)] şişme derecelerinin tayini için kriyojeller 24 saat boyunca 60 °C’de kurutulmuştur. Kurumuş kriyojeller tartılıp, saf su içerisine bekletilmiş (25 °C’de) ve belirli zaman aralıkları ile adsorplanan su miktarı ölçülüp kriyojellerin şişme karakterleri incelenmiştir. Kriyojellerin % şişme derecesi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\% \text{ Şişme derecesi} = [(m_{\text{şişmiş polimer}} - m_{\text{kuru polimer}})/m_{\text{kuru polimer}}] \times 100$$

Kriyojellerin şişme derecesi ise aşağıdaki eşitlik ile hesaplanmıştır:

$$\text{Şişme derecesi} = (\text{Dengede adsorplanan su kütlesi}/\text{kuru kriyojel kütlesi})$$

3.2.6.2. % makrogözeneklilik ölçümleri

Sentezlenen kriyojellerin makrogözeneklilik oranının saptanması amacıyla kriyojeller denge şişme oranına kadar şişirilip tartılmıştır. Daha sonra jeller makrogözeneklerindeki suyun uzaklaştırılması için sıkılmış ve tartılmıştır. Kriyojellerin % makrogözenekliliği aşağıdaki eşitlik ile hesaplanmıştır:

$$\% \text{ Makrogözeneklilik} = [(m_{\text{şişmiş polimer}} - m_{\text{sıkılmış polimer}})/m_{\text{kuru polimer}}] \times 100$$

3.2.6.3. Akış hızı ölçümleri

Gözenekli monolitlerin (örn. kriyojeller) kromatografide kullanımı sıvının gözenekler içinden kolayca geçişini gerektirir. Akış direnci bu açıdan çok önemlidir ve sıvının monolit içerisinden geçişi için gerekli basınç mümkün olduğu kadar az olmalıdır. Yüksek akış hızı kromatografik materyalin çok sayıda gözeneğe sahip olması ve yüksek makrogözeneklilik oranı ile ulaşılabilir (Plieva vd., 2004). Akış hızı, bir metrelik su kolonu tarafından oluşturulan hidrostatik basınç altında suyun kriyojel kolondan akış hızı olarak hesaplanabilir. Bunun için bir erlenden 1 metrelik silikon hortum ile sifon yaptırılarak alınan su kriyojel kolondan geçirilmiş ve kolondan 1 dakikada geçen su hacmi ölçülmüştür.

3.2.6.4. FTIR (Fourier Transform Infrared) spektrometre ölçümleri

Sentezlenen kriyojellerin FTIR spektrumunun alınması için kurutulan ve toz haline getirilen örnekler KBr ile homojen bir şekilde karıştırılmış ve pellet haline getirilmiştir. Hazırlanan pellet FTIR spektrometresine yerleştirilerek FTIR spektrumu ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

3.2.6.5. SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) ölçümleri

Sentezlenen kriyojellerin yüzey morfolojisi taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak incelenmiştir. Bunun için kurutulan ve toz haline getirilen örnekler SEM cihazına yerleştirilerek SEM fotoğrafları çekilmiştir.

3.2.6.6. Elementel analiz ölçümleri

Sentezlenen kriyojellerin karakterizasyonda MAH monomerinin kriyojel yapısına girip girmediğinin tespiti için kriyojeller elementel analiz işlemine tabi tutulmuştur. Bu işlem için toz haline getirilen kriyojellerde toplam azot tayini elementel analiz cihazı kullanılarak yapılmıştır.

3.2.6.7. Yüzey alanı ölçümleri

Sentezlenen kriyojellerin yüzey alanı BET cihazı kullanılarak tayin edilmiştir. Bu amaçla, kurutularak toz haline getirilen kriyojel örnekleri BET cihazına verilmiş ve ölçümler gerçekleştirilmiştir.

3.2.7. Protein Tayin Yöntemi

Çalışmalar boyunca tüm protein tayinleri Bradford'a (1976) göre yapılmıştır. Bunun için farklı derişimlerde hazırlanan protein standartlarının 50.0 µL'si 2.5 mL Commassie Brilliant Blue G-250 çözeltisi ile karıştırıldıktan sonra 595 nm'de köre karşı absorpsiyonları ölçülmüştür. Köre örnek yerine saf su kullanılarak hazırlanmıştır.

3.2.8. Enzim Aktivite Denemeleri

Sentezlenen kriyojellere karbonik anhidraz adsorpsiyonu denemeleri ve karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması denemelerinin her aşamasında karbonik anhidraz enzimi aktivitesi ölçüleceğinden enzimin substratına doygun olduğu

substrat derişimi tespiti yapılmıştır. Karbonik anhidraz enziminin aktivitesi *p*-nitro fenilasetat (*p*-NPA) substratı kullanılarak, Pocker ve NG'ye göre yapılmıştır (1973). Bunun için farklı derişimlerde hazırlanan *p*-nitro fenilasetat ($4.5 \times 10^{-4} - 1.0 \times 10^{-1} M$) ve enzim örneği HEPES tamponuna ilave edilerek ($5.0 \times 10^{-2} M$, pH 7.2) birim zamanda 400 nm'deki absorpsiyonun ($\Delta A/\Delta t$) artışı izlenmiştir. Aktivite ölçümü prosedürü aşağıda gösterilmiştir:

| <u>KÖR</u> | <u>ÖRNEK</u> |
|-------------------------------------|-------------------------------------|
| 0,95 mL HEPES | 0,9 mL HEPES |
| - | 50 µL enzim |
| 50 µL <i>p</i> -NPA (asetonitrilde) | 50 µL <i>p</i> -NPA (asetonitrilde) |

Karbonik anhidraz enzim aktivitesi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.

$$U = \frac{\Delta A \times V \times 1000}{\epsilon \times d \times \Delta t}$$

Burada V, spektrofotometre küvetindeki son hacim (mL); ϵ , *p*-NPA'nın molar absorbans katsayısı ($18400 M^{-1}cm^{-1}$); d, ışık yolu (10 mm) dur.

Kan örneklerinde esteraz aktivitesine sahip olabilen diğer bileşenlerden dolayı bu örneklerdeki CA aktivitesi doğal substratı olan CO₂ kullanılarak incelenmiştir (Rickli, 1964). Bu yöntem CO₂'in HCO₃⁻'a dönüşümü ile meydana gelen pH değişiminin ölçülmesini içerir. Bu amaçla 100 mL saf su içerisinde CO₂ gazı 30 dakika süreyle geçirilerek doğgun substrat çözeltisi hazırlanmıştır. Kör deneme için 2.0 mL Tris-HCl tampon ($2.0 \times 10^{-2} M$, pH 8.3) üzerine 100 µL bromtimol mavisi indikatörü ilave edilmiştir. Karışım üzerine 2.0 mL substrat çözeltisi ilave edilmiş ve çözeltinin rengini maviden sarıya dönme süresi ölçülmüş ve t₀ olarak kaydedilmiştir. Enzim denemesi için ise yine 2.0 mL Tris-HCl tamponu üzerine 100 µL bromtimol mavisi ilave edilmiştir. Bu karışım üzerine 100 µL enzim çözeltisi eklenerek substrat çözeltisinin ilavesi ile renk değişim süresi ölçülmüştür. Burada ölçülen süre t olarak kaydedilmiştir ve Rickli aktivitesi aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır:

$$\text{Bir Rickli Birimi (IU)} = \frac{t_0 - t}{t} \quad \text{Spesifik Aktivite} = \frac{t_0 - t}{t \times \text{mg protein}}$$

3.2.9. Desorpsiyon Ajanının Seçimi

Kriyojele bağlanan karbonik anhidraz enzimini desorbe etmek için literatürde uygulamaları olan 4 farklı desorpsiyon ajanı kullanılmıştır [Tris-HCl, KSCN, Etilen glikol ve NaCl (Ozensoy et al vd., 2004; Krungkrai vd., 2001; Sharma vd., 2009; Domsic vd., 2008; Yu vd., 2006; Miyamoto vd., 1996; Guliev vd., 2003)]. Bunun için kriyojel 20 mL desorpsiyon ajanı ile sürekli sistemde 4 saat boyunca yıkanmıştır. Yıkama işlemi desorpsiyon ortamında protein kalmayınca kadar (280 nm’de absorpsiyon görülmeinceye kadar, 10 mL hacimlerde, 2 saat) adım adım tekrarlanmıştır. Desorpsiyon ajanları farklı pH ve derişimlerde uygulanarak, kriyojele bağlanan karbonik anhidrazı en az adımda desorbe eden desorpsiyon ajanı seçilmiştir.

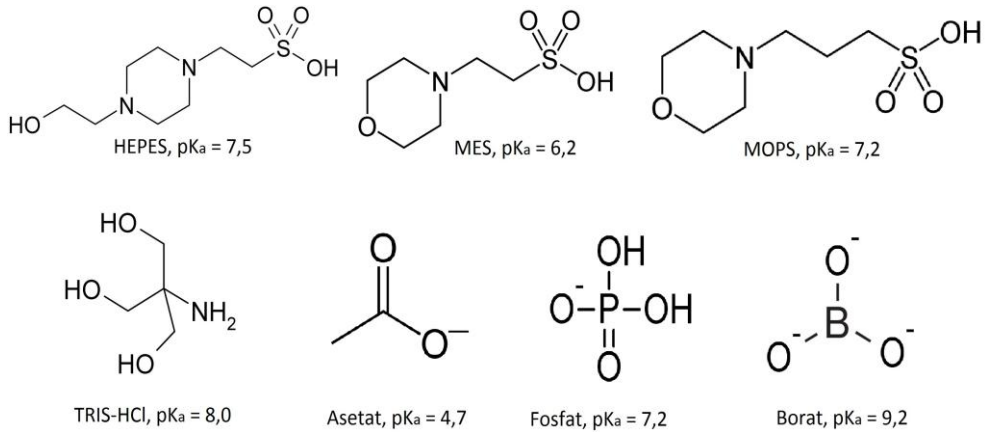
3.2.10. Karbonik Anhidrazın Kriyojellere Adsorpsiyonunun Optimizasyonu

3.2.10.1. Adsorpsiyona pH’ın etkisinin incelenmesi

Kriyojellere karbonik anhidraz adsorpsiyonu üzerine pH’ın etkisini incelemek üzere, adsorpsiyon işlemleri farklı pH’larda tamponlar kullanılarak tekrarlanmıştır. Bu amaçla pH 4.0 – 5.5 aralığında asetat tamponu (0.1 M); pH 6.0 – 7.5 aralığında fosfat tamponu (0.1 M) ve pH 8.0 – 10.0 aralığında boraks tamponu (0.1 M) kullanılmıştır. Kriyojeller öncelikle kullanılacak olan tampon çözeltiler (10.0 mL) ile sürekli sistemde 2 saat dengelenmiş ve farklı tampon çözeltilerde hazırlanan karbonik anhidraz çözeltileri sistemden geçirilerek bağlanan protein miktarları tayin edilmiştir.

3.2.10.2. Adsorpsiyona farklı tampon tiplerinin etkisinin incelenmesi

Karbonik anhidraz baskılanmış poli(HEMA-MAH) kriyojellerine karbonik anhidraz adsorpsiyonuna farklı tampon çözelti tiplerinin etkisi incelenmiş ve bu amaçla HEPES (pH 7.0, 7.5, 8.0), MES (pH 5.5, 6.0, 6.5), MOPS (pH 6.5, 7.0, 7.5, 8.0), Tris-HCl (pH 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0), Asetat (pH 4.0, 4.5, 5.0, 5.5), Fosfat (pH 6.0, 6.5, 7.0, 7.5) ve Borat (pH 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10.0) tampon çözeltileri kullanılmıştır. Tampon çözeltilerin hazırlanmasında kullanılan bileşiklerin formülleri ve pK_a değerleri Şekil 3.6.’da verilmiştir.



Şekil 3.6. pH denemelerinde kullanılan tamponlar ve pKa değerleri.

3.2.10.3. Adsorpsiyona ortamdaki karbonik anhidraz derişiminin etkisinin incelenmesi

Karbonik anhidraz derişiminin adsorpsiyon üzerine etkisini incelemek üzere protein derişimi 0.05 – 2.00 mg/mL aralığında değiştirilmiştir. Spesifik olmayan bağlanmanın gözlenmesi amacıyla denemeler baskılanmamış kriyojeller kullanılarak tekrarlanmıştır.

3.2.10.4. Adsorpsiyon izotermelerinin tespiti

Baskılanmış kriyojellere CA adsorpsiyon verileri kullanılarak adsorpsiyonun kinetiği araştırılmıştır. Bu amaçla Langmuir ve Freundlich izotermeleri kullanılmıştır.

Langmuir izotermi aşağıdaki eşitlik kullanılarak elde edilmiştir:

$$q = q_{\max} b C_e / (1 + b C_e)$$

burada q , Langmuir tek tabaka adsorpsiyon kapasitesi (mg/g); C_e , denge karbonik anhidraz derişimi (mg/mL); b , tek tabaka adsorpsiyonu gösteren Langmuir adsorpsiyon denge sabitidir.

Freundlich izotermi ise aşağıdaki eşitlik ile gösterilir:

$$q = K_F C_e^{1/n}$$

burada K_F , Freundlich adsorpsiyon sabiti (mg/g); C_e , denge karbonik anhidraz derişimi (mg/mL); n , sistemin heterojenliğini ifade eden Freundlich sabitidir (Derazshamshir, 2010).

3.2.10.5. Adsorpsiyona iyonik şiddetin etkisinin incelenmesi

Adsorpsiyonu etkileyen bir diğer önemli parametre ortamın iyonik şiddetidir. Farklı iyonik şiddetlerde (0-1.0 M NaCl) hazırlanan protein çözeltileri kriyojel kolondan geçirilerek iyonik şiddetin adsorpsiyona olan etkisi incelenmiştir. Ayrıca $Ca(NO_3)_2$, $CaCl_2$, K_2SO_4 , KCl , $KClO_4$, $Mg(NO_3)_2$, $MgCl_2$, $MgSO_4$, Na_2SO_4 , Na asetat, NaBr, NaCl, NaI, $NaNO_3$, NaSCN, $(NH_4)_2SO_4$, NH_4 asetat, NH_4Cl , NH_4NO_3 , NH_4SCN tuzlarının da CA adsorpsiyonu üzerine etkileri üzerine çalışılmıştır.

3.2.10.6. Adsorpsiyona sıcaklığın etkisinin incelenmesi

Karbonik anhidrazın kriyojellere adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisinin incelenmesi için ortam sıcaklığı 4.0 – 60.0 °C aralığında değiştirilmiştir.

3.2.10.7. Adsorpsiyona kromatografik akış hızının etkisinin incelenmesi

Kromatografik akış hızının karbonik anhidraz bağlanması üzerine etkisinin incelenmesi için akış hızı 0.1 – 4.0 mL/dak aralığında değiştirilmiştir.

3.2.10.8. Floresans spektrofotometri ölçümleri

Adsorpsiyon koşullarının CA enziminin konformasyonu üzerine etkisini incelemek üzere floresans spektrometrisi ölçümleri yapılmıştır. Bu amaçla, saf CA ve kolondan desorbe edilen CA enzimlerinin floresans spektrumları alınmış ve enzimin uyarım ve yayım dalga boylarında bir kaymanın olup olmadığı incelenmiştir.

3.2.11. Kriyojelin Tekrar Kullanım Özellikleri ve Operasyonel Kararlılığı

Sentezlenen karbonik anhidraz baskılanmış kriyojelin tekrar kullanım özelliklerinin araştırılması amacıyla, kriyojel 10 döngü boyunca adsorpsiyon ve desorpsiyon işlemlerine maruz bırakılmış ve kriyojele adsorplanan karbonik anhidraz miktarları hesaplanmıştır. Kriyojelin operasyonel kararlılığını belirlemek

üzere, kriyojele 10 döngü boyunca karbonik anhidraz adsorplanmış ve desorbe edilen karbonik anhidrazın aktivitesi ölçülmüştür.

3.2.12. Serbest ve Kriyojelden Desorbe Karbonik Anhidrazın Isıl Kararlılığı

Serbest karbonik anhidrazın ısıl kararlılığını belirlemek üzere hazırlanan karbonik anhidraz çözeltileri farklı sıcaklıklarda (4, 15, 25, 35, 45, 55, 65 ve 75 °C) 5 saat inkübe edilmişler ve çözeltilerden 1'er saat ara ile örnekler alınarak aktiviteleri ölçülmüştür. Kriyojelden desorbe karbonik anhidrazın ısıl kararlılığını belirlemek üzere ise hazırlanan karbonik anhidraz çözeltileri farklı sıcaklıklarda (4, 15, 25, 35, 45, 55, 65 ve 75 °C) ve farklı zaman aralıklarında (1-5 saat) sürekli sistemde kriyojellerden geçirilmiş ve adsorplanan karbonik anhidraz desorbe edilerek aktiviteleri ölçülmüştür.

3.2.13. Karbonik Anhidraz Baskılanmış Kriyojellerin Seçiciliği

Karbonik anhidraz baskılanmış kriyojellerin seçiciliklerinin araştırılması amacıyla hazırlanan kriyojellere karbonik anhidraz yerine albumin (sığır serum), hemoglobin (sığır), lizozim (yumurta akı), IgG (sığır serum) ve γ -globulin (sığır serum) proteinlerinin adsorpsiyon özellikleri incelenmiştir.

Moleküler baskılanmış polimerlerin moleküler tanıma seçiciliği, dağılma katsayısı (K_d) ve seçicilik katsayısı (k) ile değerlendirilir (Kuchen et al, 1988 ve Dai et al, 1999).

K_d dağılma katsayısı aşağıdaki eşitlik kullanılarak karbonik anhidraz ve diğer yarışmacı proteinler için hesaplanmıştır:

$$K_d = [(C_i - C_f)/C_f]V/W$$

Burada C_i ve C_f proteinin sırasıyla başlangıç ve son derişimleridir. V çözelti hacmi ve W kullanılan polimerin kütlesidir.

k seçicilik katsayısı ise:

$$k = K_{d1}/K_{d2}$$

formülü ile hesaplanmıştır.

Burada K_{d1} ve K_{d2} sırasıyla kalıp ve yarışmacı proteinin dağılıma katsayılarıdır.

Protein seçiciliği üzerine baskılanmanın etkisini göstermek üzere kullanılan bağıl seçicilik katsayısı (k') aşağıdaki eşitlik yardımı ile hesaplanmıştır:

$$k' = k_{\text{baskılı}}/k_{\text{baskısız}}$$

Burada ifade edilen $k_{\text{baskılı}}$ ve $k_{\text{baskısız}}$ sırası ile baskılanmış ve baskılanmamış polimerlerin k değerleridir.

3.2.14. Sığır Eritrositlerinden Karbonik Anhidraz Saflaştırılması

Taze sığır kanı Aydın Belediyesi mezbahasından temin edilmiştir. Kuagülasyonu önlemek amacıyla sığır kanı 0.1 M EDTA içeren cam şişelere alınmıştır. Kan örnekleri 1500 rpm'de 15 dakika santrifüjlenerek plazmanın ve beyaz kan hücrelerinin ayrılması sağlanmıştır. Çöken eritrositler % 0.9'luk NaCl çözeltisi ile 2 defa yıkanmış ve hacminin 1.5 katı soğuk su ile hemoliz edilmiştir. Eritrosit zarları ve bütün hücreler + 4 °C'de 20 000 rpm'de 30 dakika santrifüj edilerek uzaklaştırılmıştır (Şentürk vd., 2009). Elde edilen hemolizatın pH'ı katı MES kullanılarak 6.0'ya ayarlanmıştır. Hemolizattaki CA'nın adsorpsiyonu için 5.0 mL hemolizat alınarak baskılanmış poli(HEMA-MAH) kriyojellerine sürekli sistemde bir peristaltik pompa yardımı ile 2 saat boyunca uygulanmıştır. Kriyojele adsorplanan CA'nın desorpsiyonu 1.0 M NaCl içeren asetat tamponu (pH 4.0) ile gerçekleştirilmiştir. Hemolizatta ve desorbe edilen CA örneklerinde protein tayinleri yapıp CA aktiviteleri Rickli yöntemine göre ölçülmüştür ve örneklerin elektroforezi yapılmıştır.

3.2.14.1. SDS-PAGE elektroforezi

Kriyojeller ile saflaştırılan CA'nın saflığı SDS-PAGE kullanılarak incelenmiştir (Laemmli, 1970). Elektroforez jeli hazırlanmasında ilk aşamada % 10'luk ayırma jeli hazırlanmıştır. Bu amaçla 2.55 mL saf su, 1.66 mL ayırma tamponu (2.8×10^{-3} M SDS içeren pH 8.8 3.0 M Tris-baz tamponu) ve 2.2 mL % 30'luk akrilamid/N,N'-metilenbis akrilamid çözeltisi karıştırılmıştır. Altı mikrolitre TEMED ve 43 µL APS (% 10'luk) eklendikten sonra jel bir enjektör yardımı ile elektroforez camları arasına dökülmüştür. Jelin hava ile teması % 70'lik etil alkol kullanılarak kesilmiş ve jelin polimerleşmesi için 1 saat beklenmiştir. % 5'lik yoğunlaştırma jelinin ayırma jelinin üzerine dökülmesinden önce jel üzerindeki

alkol bir kurutma kağıdı ile uzaklaştırılmıştır. Yoğunlaştırma jelini hazırlamak üzere, 965 µL saf su, 416 µL yoğunlaştırma tamponu (3.5×10^{-4} M SDS içeren pH 8.8 0.5 M Tris-baz tamponu) ve 278 µL % 30'luk akrilamid/bisakrilamid çözeltisi ile karıştırılmıştır. Daha sonra üzerine 1.7 µL TEMED ve 17 µL % 10'luk APS ilave edilerek cam plakalar arasına dökülmüş ve elektroforez tarakları yerleştirilmiştir. Jel in polimerleşmesi için 1 gece beklenmiştir.

Örnekler ve standart proteinleri elektroforeze verilmeden önce pH 8.5 yükleme tamponu (12.5 mL 1 M pH 6.8 Tris-baz, 40 mL % 10'luk SDS, 20 mL gliserol, 2.0 mL % 2'lik brom fenol mavisi ve 5 mL % 5.0'lik β-merkapto etanol) ile karıştırılmış ve 5 dakika kaynar su banyosunda bekletilmiştir. Taraklar elektroforez jelinden dikkatlice çıkartılıp oluşan kuyucuklar yarısına kadar pH 8.5 yürütme tamponu ile (2.5×10^{-2} M Tris-baz, 0.2 M glisin, 3.5×10^{-3} M SDS) doldurulmuştur. Örneklerden 15 µL kuyucuklara yüklenmiş ve elektroforez tankı kuyucuklar örtülecek şekilde yürütme tamponu ile doldurulmuştur. Üst jele 100 V 20 mA, alt jele ise 200 V 40 mA elektrik akımı verilerek örneklerin yürütmesi sağlanmış ve elektroforez işlemi 90 dakika sonunda tamamlanmıştır.

Yürütme işlemi bittikten sonra cam plakalar arasından çıkartılan jeller ilk önce boyama çözeltisi (Commasie Brilliant Blue G-250) içerisine alınarak bir gece bekletilmiştir. Daha sonra boyanan jeller birinci yıkama çözeltisinde (400 mL metanol, 70 mL asetik asit, 530 mL saf su) ardından ikinci yıkama çözeltisinde (50 mL metanol, 70 mL asetik asit, 880 mL saf su) 6'şar saat bekletilerek boyanan jeller temizlenmiştir. Protein bantları belirgin hale gelen jellerin fotoğrafları çekilmiştir.

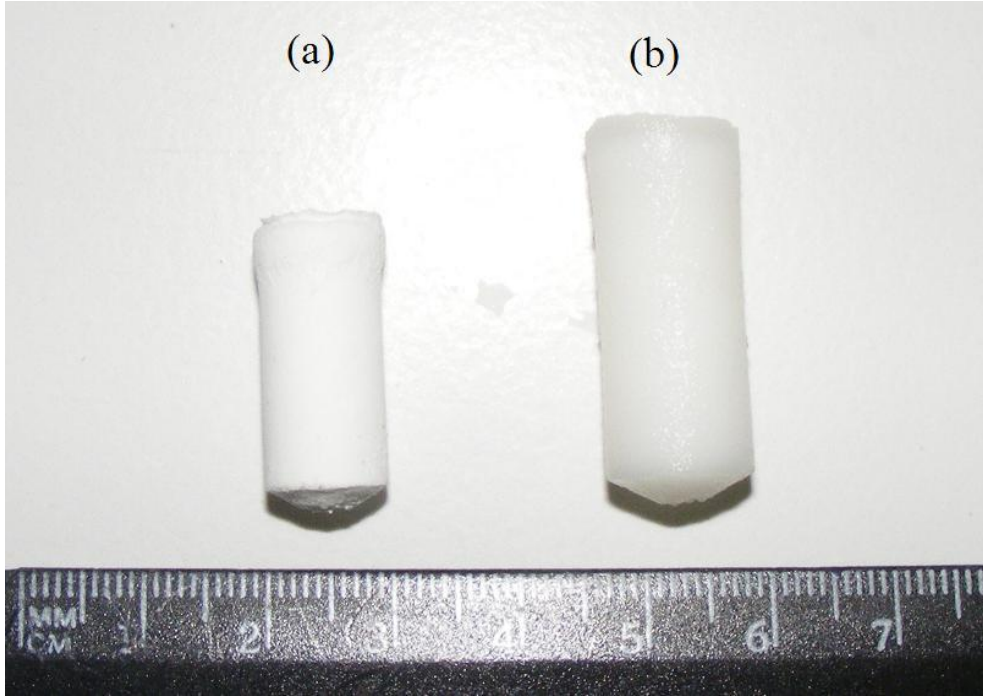
3.2.14.2. Zimogram boyaması

Elektroforez sonunda sadece CA bantlarını görünürleştirmek amacıyla zimogram işlemi yapılmıştır. Bu amaçla, yukarıda belirtildiği şekilde elektroforez jeli dökülmüştür. Örnekler yürütmede ise SDS'siz yürütme tamponu kullanılmıştır. Doksan dakika sonunda alınan jeller 0.1 M borat tamponu (pH 9.0) ve % 0.1'lik bromtimol mavisi karışımında 10 dakika bekletilmiştir. Daha sonra jeller filtre kağıdı ile kurutulmuş ve doygun CO₂ çözeltisi içerisine konulmuştur. Mavi arka plan üzerinde beliren sarı bantlar CA'nın o bölgede ve aktif olduğunu göstermektedir (Manchenko, 2003).

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. Poli(HEMA-MAH) Kriyojellerin Fotoğrafi

Sentezlenen poli(HEMA-MAH) kriyojeller opak, süngerimsi ve elastiktir. Kolaylıkla sıkılarak gözeneklerindeki suyu bırakabilir. Kriyojellerin kuru ve şişmiş haldeki fotoğrafları Şekil 4.1.'de gösterilmiştir. Şekilde görülen kuru kriyojeller [Şekil 4.1. (a)] sulu ortama konulduklarında hızlı bir şekilde şişerek orijinal boyutuna [Şekil 4.1. (b)] ulaşmaktadırlar.



Şekil 4.1. Poli(HEMA-MAH) kriyojellerin kuru ve şişmiş durumdaki fotoğrafı.

4.2 CA Adsorpsiyon Denemeleri

Maksimum karbonik anhidraz adsorpsiyonunun saptanması amacıyla hazırlanan kriyojellerden sürekli sistemde 2 saat boyunca 0.5 mg/mL derişiminde karbonik anhidraz çözeltisi geçirilmiş ve adsorplanan karbonik anhidraz miktarı başlangıç ve son protein derişiminin Bradford metoduna göre saptanması ile hesaplanmıştır. Karşılaştırma yapılması amacıyla poli(HEMA) ve baskılanmamış poli(HEMA-MAH) kriyojellerinin de adsorpsiyon kapasiteleri incelenmiştir. Elde edilen veriler Çizelge 4.1.'de sunulmuştur.

Çizelge 4.1. Farklı MAH ve karbonik anhidraz oranları kullanılarak hazırlanmış kriyojellerin karbonik anhidraz adsorpsiyonu kapasitelerinin karşılaştırılması.

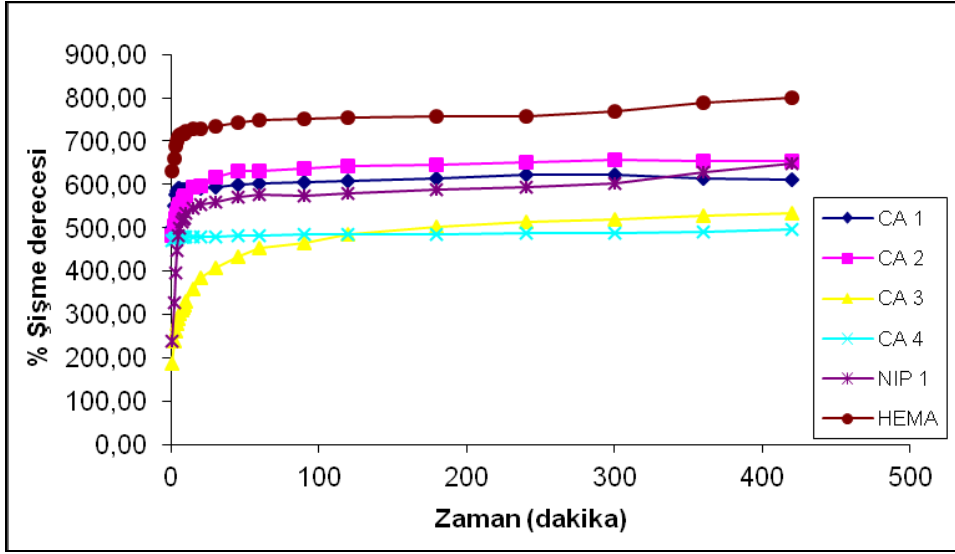
| Kriyojel Adı | MAH içeriği (mmol/15.0 mL) | CA derişimi (mg/15.0 mL) | CA adsorpsiyonu (mg/g kriyojel) |
|------------------------|-------------------------------|-----------------------------|------------------------------------|
| HEMA | - | - | 0.058 ± 0.036 |
| NIP ₁ | 0.1 | - | 0.161 ± 0.088 |
| NIP ₂ | 0.2 | - | 0.201 ± 0.126 |
| NIP ₃ | 0.3 | - | 0.116 ± 0.047 |
| CA ₁ | 0.1 | 5.0 | 1.765 ± 0.089 |
| CA ₂ | 0.1 | 10.0 | 2.533 ± 0.088 |
| CA ₃ | 0.1 | 15.0 | 2.469 ± 0.074 |
| CA ₄ | 0.1 | 20.0 | 2.066 ± 0.112 |
| CA ₅ | 0.2 | 5.0 | 1.847 ± 0.140 |
| CA ₆ | 0.2 | 10.0 | 2.118 ± 0.098 |
| CA ₇ | 0.2 | 15.0 | 2.075 ± 0.150 |
| CA ₈ | 0.2 | 20.0 | 2.000 ± 0.132 |
| CA ₉ | 0.3 | 5.0 | 2.174 ± 0.025 |
| CA₁₀ | 0.3 | 10.0 | 2.652 ± 0.064 |
| CA ₁₁ | 0.3 | 15.0 | 2.119 ± 0.056 |
| CA ₁₂ | 0.3 | 20.0 | 1.585 ± 0.055 |

MAH miktarı sabit tutulup karbonik anhidraz derişimi değiştirildiğinde, 10.0 mg karbonik anhidraz içeren kriyojellerin diğerlerine nazaran daha fazla karbonik anhidraz bağladığı saptanmıştır. MAH miktarının artışı ile bağlanan karbonik anhidraz miktarı artmıştır. Çizelge 4.1.'de görüldüğü gibi CA₁₀ olarak adlandırılan kriyojeller kullanılarak daha yüksek karbonik anhidraz adsorpsiyonu değerleri elde edilmiştir. Baskılanmamış kriyojellere bağlanan protein miktarı oldukça düşük bulunurken, baskılanma ile adsorpsiyon kapasitesinde belirgin artışlar gözlenmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda optimizasyon çalışmaları CA₁₀ koşullarında devam edilmiştir.

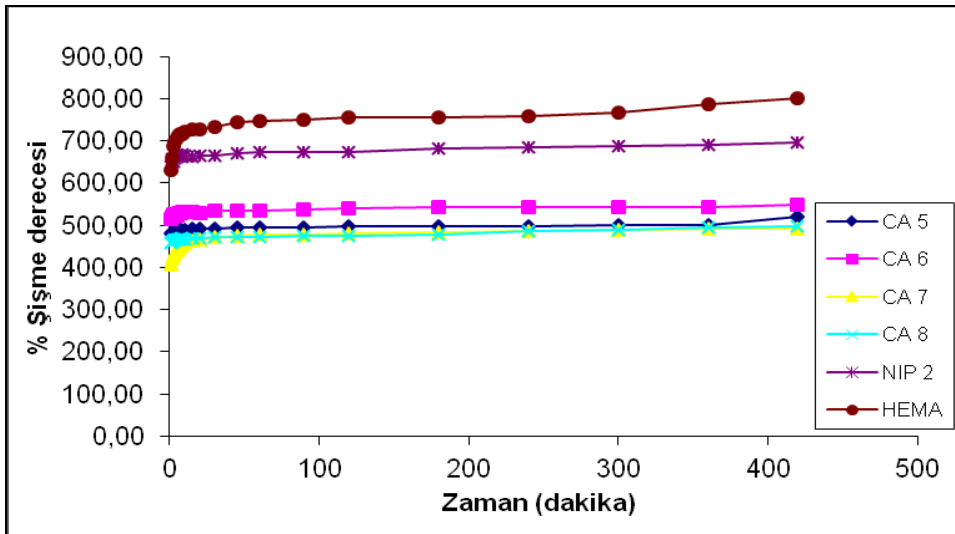
4.3. Poli(HEMA-MAH) Kriyojellerin Karakterizasyonu

4.3.1. Şişme derecesi, Makrogözeneklilik ve Akış Hızı Sonuçları

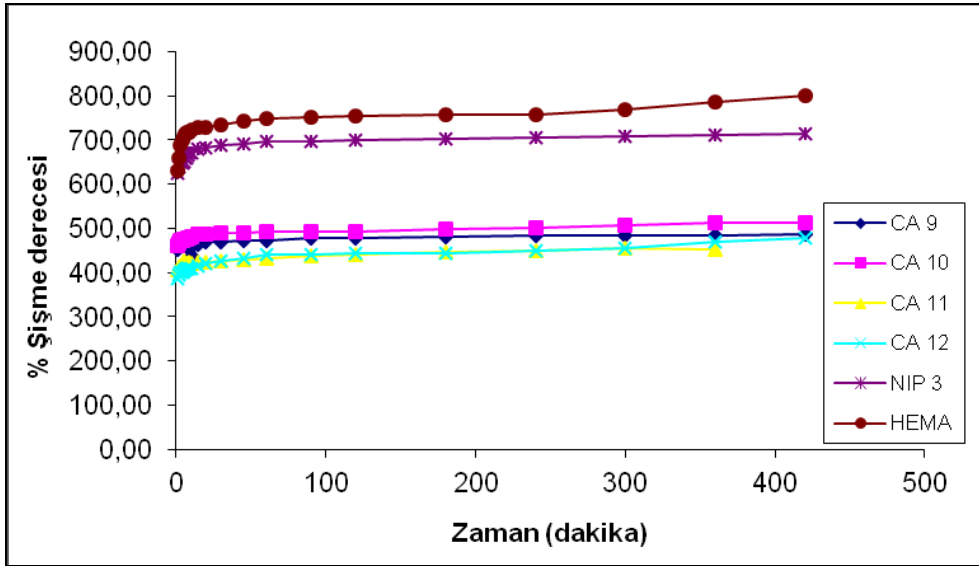
Hazırlanan kriyojellerin zamana bağlı olarak değişen % şişme değerleri Şekil 4.2., 4.3. ve 4.4.'de verilmiştir.



Şekil 4.2. 0.1 mol MAH monomeri içeren kriyojellerin % şişme derecelerinin karşılaştırılması. Sıcaklık: 25 °C, süre: 420 dakika.



Şekil 4.3. 0.2 mol MAH monomeri içeren kriyojellerin % şişme derecelerinin karşılaştırılması. Sıcaklık: 25 °C, süre: 420 dakika.



Şekil 4.4. 0.3 mol MAH monomeri içeren kriyojellerin % şişme derecelerinin karşılaştırılması. Sıcaklık: 25 °C, süre: 420 dakika.

Şekil 4.2.-4.4.'e bakıldığında; maksimum su bağlama kapasitesinin poli(HEMA) kriyojeller ile elde edildiği görülmektedir. Baskılanmamış kriyojellerde ise MAH içeriği arttıkça kriyojellerin su adsorpsiyonu kapasitesi de artmıştır. Baskılanmış kriyojellerin % şişme değerlerine bakıldığında ise 10 mg karbonik anhidraz içeren kriyojeller ile diğerlerine nazaran daha yüksek şişme değerlerine ulaşıldığı görülmektedir.

Hazırlanan kriyojellerin polimerizasyon verimini hesaplamak üzere ilk önce kriyojeller sabit tartıma gelinceye kadar 60 °C'de kurutulmuş ve kriyojelin kuru ağırlığı kaydedildi. Polimerizasyon verimi aşağıdaki eşitlik ile hesaplanmıştır.

$$\text{Polimerizasyon verimi} = (m_{\text{kuru}}/m_t) \times 100$$

burada m_{kuru} kuru kriyojelin kütlesi, m_t ise polimerizasyon karışımındaki monomerlerin toplam kütlesidir.

Sentezlenen kriyojellerin karakterizasyonuna ilişkin elde edilen veriler aşağıdaki tabloda özetlenmiştir. Burada CA içeriği g kriyojel başına mg cinsinden, MAH içeriği ise kütlece yüzde olarak verilmiştir.

Çizelge 4.2. Kriyojellerin polimerizasyon verimi ve şişme özellikleri.

| Kriyojel | CA içeriği (mg/g kriyojel) | MAH içeriği (%) | Polimerizasyon verimi (%) | Şişme derecesi (g H ₂ O/g kriyojel) |
|------------------|----------------------------|-----------------|---------------------------|--|
| HEMA | - | - | 98.59 | 8.01 |
| NIP ₁ | - | 1.31 | 92.70 | 6.50 |
| NIP ₂ | - | 2.62 | 92.54 | 6.96 |
| NIP ₃ | - | 3.93 | 93.33 | 7.14 |
| CA ₁ | 2.90 | 1.31 | 99.57 | 6.11 |
| CA ₂ | 5.80 | 1.31 | 97.72 | 6.53 |
| CA ₃ | 8.70 | 1.31 | 95.15 | 5.34 |
| CA ₄ | 11.60 | 1.31 | 91.99 | 4.95 |
| CA ₅ | 2.90 | 2.62 | 99.08 | 5.19 |
| CA ₆ | 5.80 | 2.62 | 96.13 | 5.48 |
| CA ₇ | 8.70 | 2.62 | 89.75 | 4.91 |
| CA ₈ | 11.60 | 2.62 | 85.37 | 4.98 |
| CA ₉ | 2.90 | 3.93 | 99.78 | 4.87 |
| CA ₁₀ | 5.80 | 3.93 | 97.46 | 5.13 |
| CA ₁₁ | 8.70 | 3.93 | 94.90 | 4.55 |
| CA ₁₂ | 11.60 | 3.93 | 97.00 | 4.77 |

Çizelge 4.3. Kriyojellerin makrogözeneklilik ve akış hızı özellikleri.

| Kriyojel | CA içeriği (mg/g kriyojel) | MAH içeriği (%) | Makro gözeneklilik (%) | Akış hızı (cm/saat) |
|------------------|----------------------------|-----------------|------------------------|---------------------|
| HEMA | - | - | 69.20 | 60.57 |
| NIP ₁ | - | 1.31 | 71.14 | 55.71 |
| NIP ₂ | - | 2.62 | 70.27 | 66.00 |
| NIP ₃ | - | 3.93 | 70.94 | 58.57 |
| CA ₁ | 2.90 | 1.31 | 65.35 | 59.71 |
| CA ₂ | 5.80 | 1.31 | 70.94 | 77.14 |
| CA ₃ | 8.70 | 1.31 | 61.89 | 70.00 |
| CA ₄ | 11.60 | 1.31 | 64.63 | 69.71 |
| CA ₅ | 2.90 | 2.62 | 59.78 | 82.86 |
| CA ₆ | 5.80 | 2.62 | 70.44 | 93.71 |
| CA ₇ | 8.70 | 2.62 | 62.05 | 84.86 |
| CA ₈ | 11.60 | 2.62 | 60.66 | 78.00 |
| CA ₉ | 2.90 | 3.93 | 55.82 | 77.71 |
| CA ₁₀ | 5.80 | 3.93 | 61.23 | 84.86 |
| CA ₁₁ | 8.70 | 3.93 | 57.71 | 82.86 |
| CA ₁₂ | 11.60 | 3.93 | 62.77 | 73.71 |

Çizelge 4.2.'de görüldüğü üzere kriyojellerin polimerizasyon verimleri oldukça yüksek bulunmuştur. MAH miktarına bağlı olarak şişme derecelerinde bir artış gözlenmekle birlikte, maksimum şişme derecesi % 3.93 MAH içeren kriyojeller ile elde edilmiştir. Baskılanmış polimerlerde ise 5.80 mg CA içeren kriyojellerin

yüksek su tutma kapasitesine sahip olduğu bulunmuştur. Kriyojellerin sentezlendiği ve karakterize edildiği birçok çalışmada benzer şişme değerleri saptanmıştır. Demiryas vd. (2007) sentezlediği poli(akrilamid-allil glisidil eter) kriyojellerin su bağlama kapasitesini 6.84 g H₂O/g kriyojel olarak bulmuştur. Poli(HEMA-MAH) kriyojellerin sentezlendiği bir başka çalışmada (Derazshamshir vd., 2008) ise kriyojelin denge şişme oranı 5.62 g H₂O/g kriyojel olarak belirtilmiştir. Bereli vd. (2008) poli(HEMA-MAH) kriyojeller sentezlemişler ve bu kriyojellere lizozim enzimini baskılamışlardır. Baskılanmamış ve baskılanmış poli(HEMA-MAH) kriyojellerin denge şişme değerleri sırasıyla 8.63 ve 9.12 g H₂O/g kriyojel olarak bulunmuştur. Baydemir vd. (2009a) tarafından hazırlanan bilirubin baskılanmış ve baskılanmamış poli(HEMA-MAT) kriyojellerin denge şişme değerleri sırasıyla 10.5 ve 8.8 g H₂O/g kriyojel olarak bulunmuştur. Yılmaz vd. (2009) yeni bir hidrofobik destek maddesi [poli(HEMA-Trp)] sentezlemişler ve lizozim saflaştırılmasında kullanmışlardır. Hazırladıkları kriyojel yapıdaki polimerin denge su bağlama kapasitesi incelenmiş ve poli(HEMA) kriyojelin denge şişme değeri 7.18 g H₂O/g kriyojel olarak bulunurken poli(HEMA-Trp) kriyojelin şişme değeri 6.99 g H₂O/g kriyojel olarak bulunmuştur.

Baskılanmış kriyojellerin makrogözenekliliği, CA miktarının artışı ile önemli bir değişiklik göstermezken, MAH oranının artışı ile genelde azalmıştır. Baskılanmamış kriyojellerde ise makrogözeneklilikte önemli bir değişim görülmemiştir. Yüksek şişme derecesine sahip kriyojellerin aynı zamanda yüksek makrogözenekliliğe sahip olduğu gözlenmiştir. Bu durum, makrogözeneklilik artışı ile bu gözeneklere adsorplanan su miktarının da fazla olması ile açıklanabilir. Yan vd. (2008) sentezledikleri N,N,dimetilaminoetil metakrilat ile aşılansmış poliakrilamid kriyojeller ile % 85 oranında makrogözenekliliğe ulaşmışlardır. Derazshamshir vd. (2010) tarafından sentezlenen poli(HEMA) kriyojellerin makrogözenekliliği % 81'e kadar çıkarken hemoglobun baskılanmış poli(HEMA) kriyojellerin makrogözenek oranı % 79 olarak bulunmuştur.

Kromatografik akış hızları incelendiğinde ise, en yüksek akış hızının CA₆ kod numaralı kriyojel ile elde edildiği görülmüştür. Kriyojellerin CA içeriği arttıkça akış hızının ilk önce arttığı, daha sonra ise azaldığı gözlenirken, % 2.62 MAH içeren kriyojellerdeki akış hızının diğerlerine nazaran daha hızlı olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.3.). Makrogözeneklilik ve akış hızı arasında bir orantı gözlenmiştir, zira yüksek makrogözeneklere sahip kriyojellerde sıvı akışının da

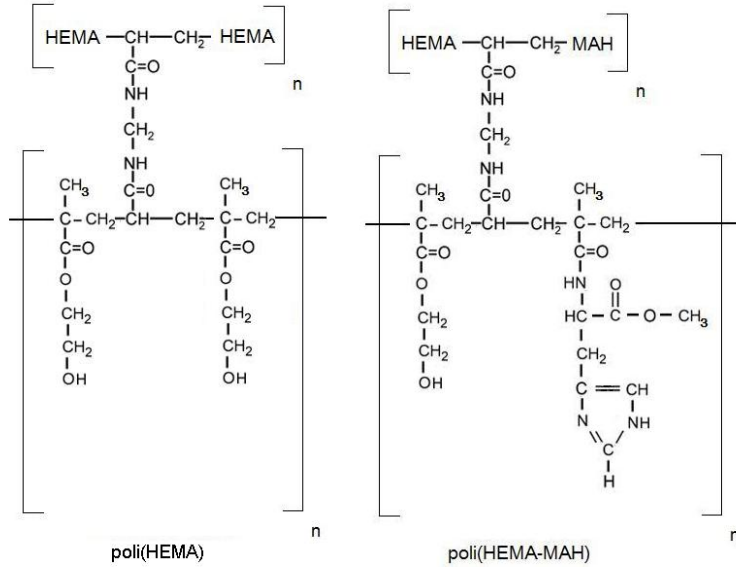
hızlı olması beklenen bir durumdur. Hemoglobinin poli(HEMA-MAH) kriyojellere baskılandığı bir çalışmada (Derazshamshir vd., 2010) oldukça yüksek akış hızlarına çıkılmıştır (980 cm/saat).

4.3.2. FTIR (Fourier Transform Infrared) Spektrometre Sonuçları

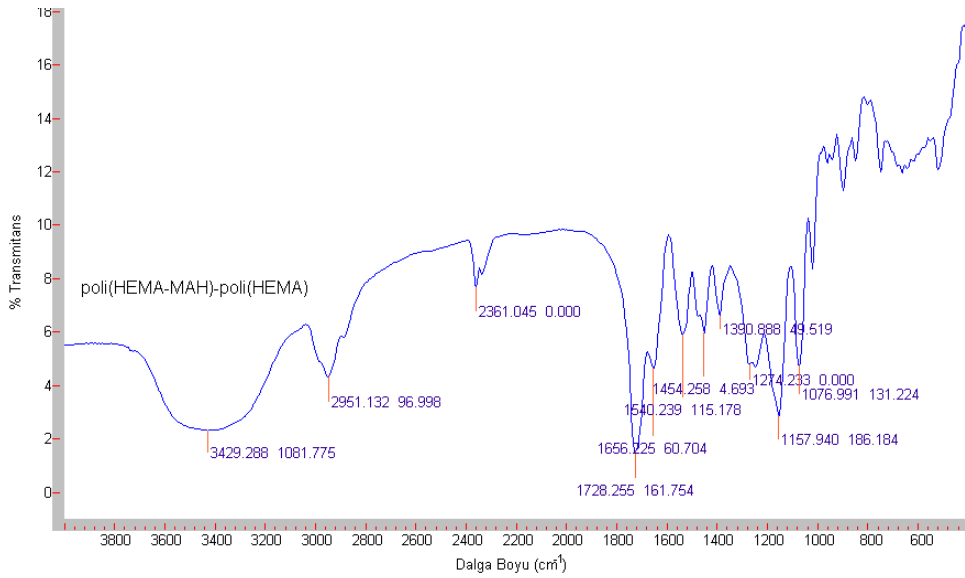
Sentezlenen poli(HEMA) ve poli(HEMA-MAH) kriyojelinin kimyasal yapısı Şekil 4.5. (a) ve Şekil 4.5. (b)'de gösterilmiştir. Şekilden de görüldüğü üzere kriyojelin sentezinde kullanılan N-N'-metilenbisakrilamidin de yapıya katılması ile her iki kriyojeli de birbirinden ayıracak spesifik bantlar gözlenememektedir. Bu amaçla poli(HEMA-MAH) FTIR spektrumundan poli(HEMA) FTIR spektrumunun çıkarılması ile elde edilen fark spektrumu kriyojelin karakterizasyonunda kullanılabilir. İki spektrumun birbirinden çıkarılması ya da diğer adı ile fark spektrumu, üst üste binen bantların temizlenmesinde ve/veya deneysel spektrumların basitleştirilmesinde kullanılan bir yöntemdir. Fark spektrumu, bant değişimlerinin tüm tiplerine duyarlı bir spektroskopik metottur ve spektrumların yorumlanmasında ideal bir araçtır. Teorik olarak 2 tip fark spektrumu vardır. Birinci tip fark spektrumu özellikle çözümden kaynaklanan istenmeyen bantların elimine edilmesi amacı ile uygulanırken, ikinci tip benzer şekil, frekans ve yoğunluktaki bantları elimine etmek amacı ile benzer iki spektrumun birbirinden çıkarılmasını içerir (Gradadolnik, 2003). Şekil 4.6.'da poli(HEMA-MAH)-poli(HEMA) fark spektrumu görülmektedir. Bu durumda fark spektrumunda MAH monomerine ait bantların gözlenmesi beklenmektedir. Şekilden de görüldüğü gibi 3400 cm^{-1} civarında karakteristik -NH ve CH_3 gerilme bantları ve 1720 cm^{-1} 'de karbonil grubuna ait C=O gerilme bantları görülmektedir. 1659 cm^{-1} civarında gözlenen amid I bağı ve 1540 cm^{-1} civarındaki amid II bağı gerilme titreşimleri MAH monomerinin yapısından kaynaklanmaktadır. 1450 cm^{-1} ve 1390 cm^{-1} civarında -CH_2 ve -CH_3 'e ait gerilme titreşimleri görülürken 1270 cm^{-1} 'de karbonil grubuna bağlı C-O gerilme bantları bulunmaktadır. 1100 cm^{-1} civarında ise karbonil grubunu içeren C-C-C gerilme bantları görülmektedir. Bu sonuçlar ışığında kriyojel yapısına MAH monomerinin katıldığı söylenebilir.

(a)

(b)



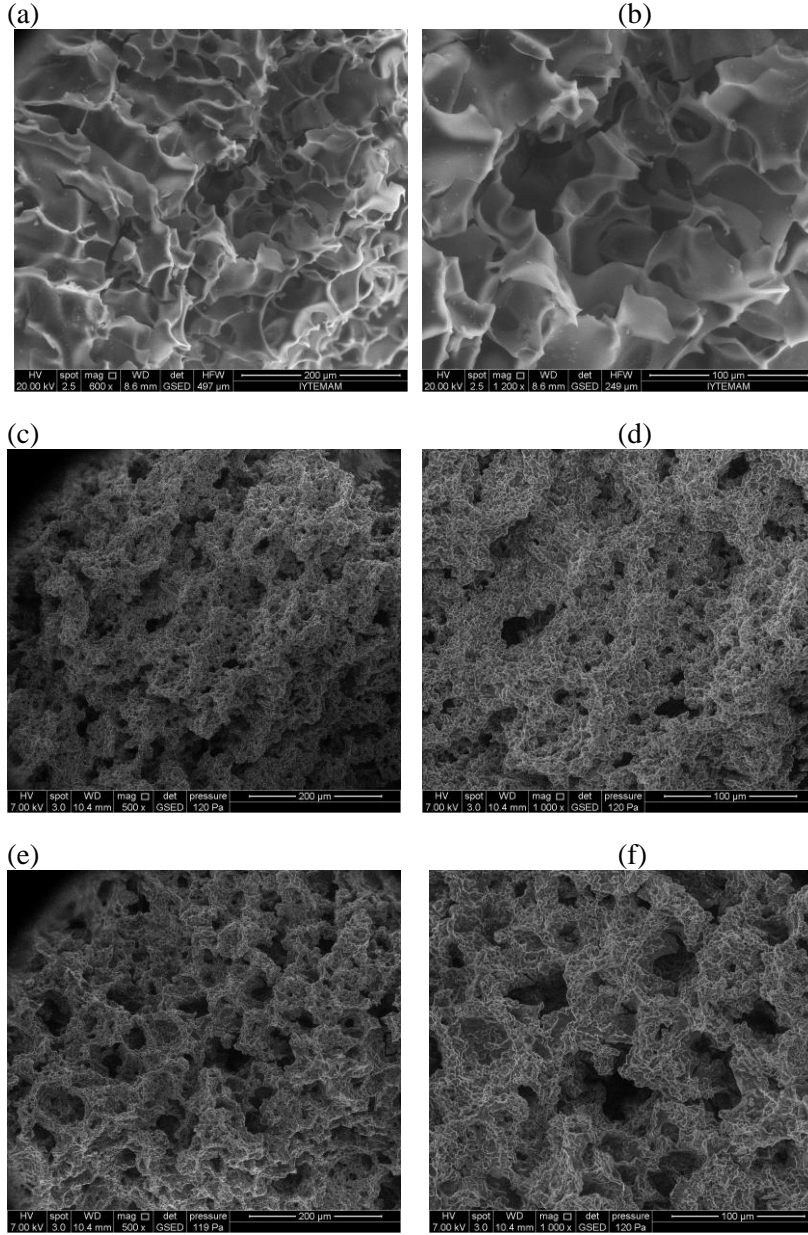
Şekil 4.5. Çapraz bağlı poli(HEMA) (a) ve poli(HEMA-MAH) (b) kriyojelin kimyasal yapısı.



Şekil 4.6. Poli(HEMA-MAH)-poli(HEMA) fark spektrumu.

4.3.3. SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) Sonuçları

Sentezlenen poli(HEMA) kriyojellerin, baskılanmamış poli(HEMA-MAH) kriyojellerin ve CA baskılanmış poli(HEMA-MAH) kriyojellerin SEM fotoğrafları sırasıyla Şekil 4.7. a-b; Şekil 4.7. c-d ve Şekil 4.7. e-f'de gösterilmiştir.



Şekil 4.7. Poli(HEMA) (a ve b), baskılanmamış poli(HEMA-MAH) (c ve d) ve CA baskılanmış poli(HEMA-MAH) kriyojellerin SEM fotoğrafları.

Şekil 4.7.'de görüldüğü gibi sentezlenen kriyojeller oldukça gözenekli olup gözenek çapları 10-100 µm arasında değişmektedir. Gözenekler birbirlerine bağlı olup gözenek duvarları oldukça incedir ve kriyojeller üzerinde makrogözeneklerin yoğun olarak bulunduğu gözlenmektedir. Yapıya MAH monomerinin katılması ile kriyojel morfolojisi değişirken baskılanmış ve baskılanmamış kriyojellerin yüzey yapıları birbirine oldukça benzer bulunmuştur.

4.3.4. Elementel Analiz Bulguları

Sentezlenen kriyojellerin elementel analiz sonuçlarına göre içerdikleri azot yüzdesi poli(HEMA) kriyojeli için % 2.612 iken poli(HEMA-MAH) kriyojeli için % 2.808 olarak bulunmuştur. Poli(HEMA-MAH) kriyojelindeki azot miktarında gözlenen bu fark yapıya eklenen MAH monomerinden kaynaklanmaktadır. Bu verilerden yola çıkarak HEMA temelli kriyojel yapısına MAH monomerinin katıldığı sonucuna varılmıştır.

4.3.5. Yüzey Alanı Sonuçları

BET analizleri sonunda poli(HEMA) kriyojellerin spesifik yüzey alanının 23.6 m²/g olarak bulunurken CA baskılanmamış ve CA baskılanmış poli(HEMA-MAH) kriyojellerin spesifik yüzey alanları sırasıyla 27.9 ve 29.3 m²/g olarak bulunmuştur. MAH monomerinin yapıya girmesi ile kriyojel yüzey alanında artış gözlenirken baskılanmanın bir sonucu olarak kalıp molekülün ayrılması ile oluşan boşlukların etkisi ile baskılanmış kriyojellerin yüzey alanlarında da artış gözlenmiştir ve benzer bulgular diğer çalışmalarla da gösterilmiştir (Aslıyüce vd., 2010, Koç vd., 2011). Paralel sonuçlar SEM fotoğraflarında görülmektedir. Poli(HEMA) kriyojeller oldukça pürüzsüz iken MAH monomerinin yapıya girmesi ile kriyojel morfolojisi değişmiş ve pürzülü bir hal alarak yüzey alanı genişlemiştir. Baydemir vd. (2009b) tarafından hazırlanan bilirubin baskılanmış partiküller içeren poli(HEMA) kriyojellerin spesifik yüzey alanı 27.8 m²/g olarak bulunmuştur. Derazshamshir vd. (2010) tarafından sentezlenen hemoglobin baskılanmış poli(HEMA) kriyojellerin yüzey alanı 92.3 m²/g olarak bulunmuştur.

4.4. Desorpsiyon Ajanının Seçimi

Kriyojele bağlanan karbonik anhidraz enzimini desorbe etmek için 4 farklı desorpsiyon ajanı kullanılmıştır (0.2 M, pH 7.0 Tris-HCl; 0.2 M, pH 7.0 KSCN; 0.2 M, pH 7.0 Etilen glikol; 0.2 M, pH 7.0 NaCl) ve kriyojele adsorplanmış olan

CA'nın tamamen desorpsiyonu için gereken desorpsiyon aşamaları Çizelgeler 4.4. - 4.6.'da verilmiştir.

Çizelge 4.4. Desorpsiyon ajanının seçimi.

| Döngü sayısı | Desorpsiyon ajanı | | | |
|--------------|--|-----------------|--------------------------|-----------------|
| | Tris-HCl (0.2 M) | KSCN (0.2 M) | Etilen glikol (0.2 M) | NaCl (0.2 M) |
| | Desorbe Edilen Protein (280 nm'de Absorpsiyon) | | | |
| 1 | 0.009 | 0.009 | 0.002 | 0.011 |
| 2 | 0.005 | 0.005 | 0.002 | 0.004 |
| 3 | 0.003 | 0.003 | 0.001 | 0.003 |
| 4 | 0.001 | 0.001 | 0.001 | 0.0 |
| 5 | 0.0 | 0.0 | 0.001 | - |

Yapılan desorpsiyon çalışmaları sonunda kriyojele bağlanan karbonik anhidrazın 0.2 M; pH 7.0 NaCl çözeltisi ile 3 döngü sonunda tamamen desorbe olduğu görülmüştür. Desorpsiyon ajanı olarak seçilen 0.2 M NaCl'ün desorpsiyon kapasitesi farklı tampon çözeltilerde (farklı pH'larda) incelenmiştir (pH 3.0–5.0; 0.1 M asetat tamponu; pH 6.0–8.0; 0.1 M fosfat tamponu). Karbonik anhidrazın kriyojelden tamamen desorpsiyonu için gerekli döngü sayısı Çizelge 4.5.'de verilmiştir.

Çizelge 4.5. Desorpsiyon ajanının pH'ının seçimi.

| Döngü sayısı | Desorpsiyon ajanı | | | | | |
|--------------|--|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | NaCl (pH 3.0) | NaCl (pH 4.0) | NaCl (pH 5.0) | NaCl (pH 6.0) | NaCl (pH 7.0) | NaCl (pH 8.0) |
| | Desorbe Edilen Protein (280 nm'de Absorpsiyon) | | | | | |
| 1 | 0.006 | 0.012 | 0.011 | 0.010 | 0.011 | 0.008 |
| 2 | 0.004 | 0.005 | 0.005 | 0.006 | 0.004 | 0.005 |
| 3 | 0.003 | 0.0 | 0.002 | 0.003 | 0.003 | 0.003 |
| 4 | 0.002 | - | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.001 |
| 5 | 0.0 | - | - | - | - | 0.0 |

Yapılan desorpsiyon çalışmaları sonunda 0.1 M pH 4.0 asetat tamponundaki 0.2 M NaCl ile kriyojele bağlanan karbonik anhidrazın iki döngü sonunda kriyojelden desorbe edildiği görülmüştür. Desorpsiyon ajanı daha ileri optimize edilerek farklı NaCl derişimleri (0.2; 0.5; 1.0 ve 2.0 M) incelenmiş ve kriyojelden karbonik

anhidrazın tamamen desorpsiyonu için gerekli döngü sayısı Çizelge 4.6.'da verilmiştir.

Çizelge 4.6. Desorpsiyon ajanı derişiminin seçimi.

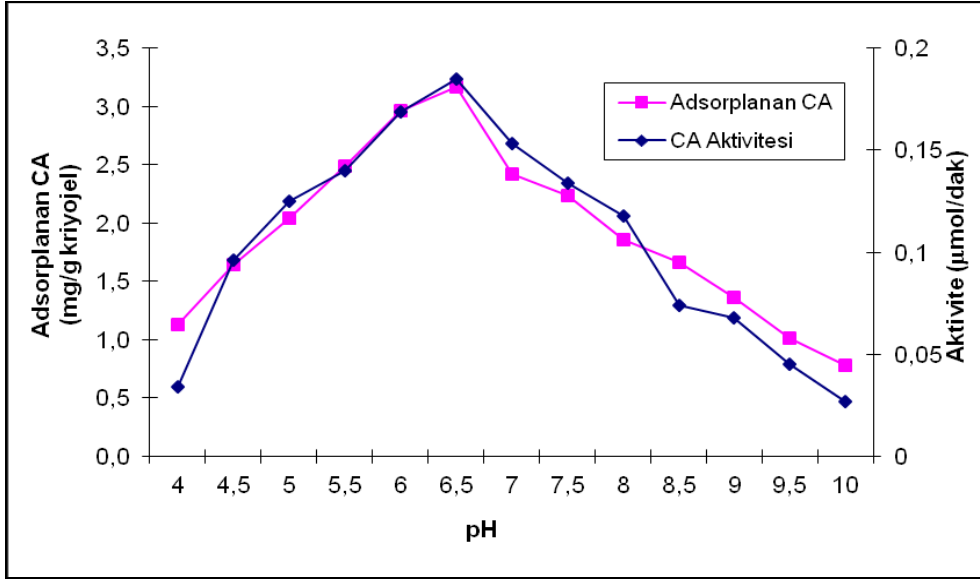
| | Desorpsiyon ajanı | | | |
|--------------|--|-----------------|-----------------|-----------------|
| | NaCl (0.2 M;) | NaCl (0.5 M) | NaCl (1.0 M) | NaCl (2.0 M) |
| Döngü sayısı | Desorbe Edilen Protein (280 nm'de Absorpsiyon) | | | |
| 1 | 0.012 | 0.011 | 0.015 | 0.013 |
| 2 | 0.005 | 0.004 | 0.0 | 0.002 |
| 3 | 0.0 | 0.0 | - | 0.0 |

1.0 M NaCl kullanılarak kriyojelle bağlanan karbonik anhidrazın kriyojelden tek basamakta desorbe edildiği görülmüştür ve bundan sonraki çalışmalarda desorpsiyon ajanı olarak pH 4.0 asetat tamponunda hazırlanmış 1.0 M NaCl'ün kullanılmasına karar verilmiştir.

4.5. Karbonik Anhidrazın Kriyojellere Adsorpsiyonunun Optimizasyonu

4.5.1. Adsorpsiyona pH'ın Etkisi

Kriyojellere karbonik anhidraz adsorpsiyonu üzerine pH'ın etkisini incelemek üzere, adsorpsiyon işlemleri farklı pH'larda tampon çözeltilerde gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla pH 4.0 – 5.5 aralığında asetat tampon çözeltisi (0.1 M); pH 6.0 – 7.5 aralığında fosfat tampon çözeltisi (0.1 M) ve pH 8.0 – 10.0 aralığında borat tampon çözeltisi (0.1 M) kullanılmıştır. Kriyojeller öncelikle kullanılacak olan tampon çözeltiler (10.0 mL) ile sürekli sistemde 2 saat dengelenmiş ve farklı tampon çözeltilerde hazırlanan karbonik anhidraz çözeltileri sistemden geçirilerek bağlanan protein miktarları tayin edilmiştir. pH'ın karbonik anhidraz adsorpsiyonuna etkisi ve kriyojelden desorbe edilen karbonik anhidraz enzimlerinin aktiviteleri Şekil 4.8.'de görülmektedir.



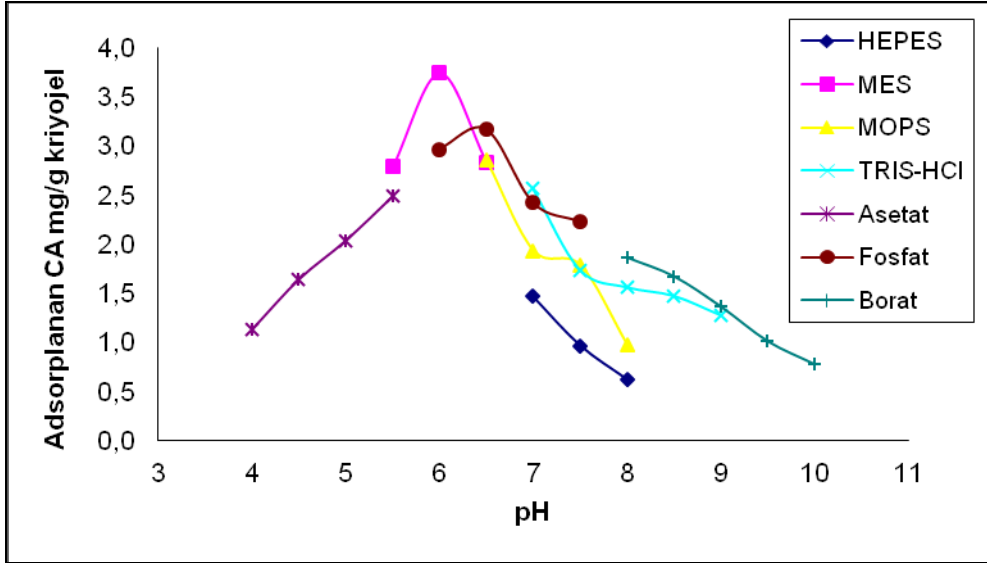
Şekil 4.8. Karbonik anhidrazın baskılanmış poli(HEMA-MAH) kriyojelle adsorpsiyonuna ve karbonik anhidraz aktivitesine pH'nin etkisi. Sıcaklık: 25 °C, karbonik anhidraz derişimi: 0.5 mg/mL, kromatografik akış hızı: 0.5 mL/dakika.

Şekil 4.8.'den görüldüğü üzere maksimum adsorpsiyon pH 6.5 fosfat tamponu kullanılarak elde edilmiştir (3.16 mg/g kriyojel). Kullanılan sığır karbonik anhidrazın izoelektrik pH'ı 5.9'dur. İsoelektrik pH civarında protein kriyojel ile etkileşebileceği maksimum iyonize formdadır. pH 6,5'de protein kısmen anyoniktir ve bu durum karbonik anhidrazın MAH monomerindeki histidin birimleri ile olan etkileşimini arttırabilir. Bununla birlikte ön kompleks oluşumunda pH 6.0 fosfat tamponunun kullanılması da pH hafızası etkisi nedeniyle adsorpsiyonda etkili olabilir (Derazshamshir vd., 2010).

Şekil 4.8.'deki aktivite değerlerine bakılacak olursa, en yüksek aktivitenin pH 6.5'de yürütülen örneğe ait olduğu görülmektedir. Adsorpsiyon çalışmalarında en yüksek adsorpsiyona bu örnek ile ulaşılmıştır ve desorpsiyon ile toplanan enzim aktivitesini korumuştur.

4.5.2. Adsorpsiyona Farklı Tampon Tiplerinin Etkisi

CA baskılanmış poli(HEMA-MAH) kriyojellere CA adsorpsiyonuna farklı tampon tiplerinin etkisi incelenmiş ve deneysel bulgular Şekil 4.9.'da verilmiştir.

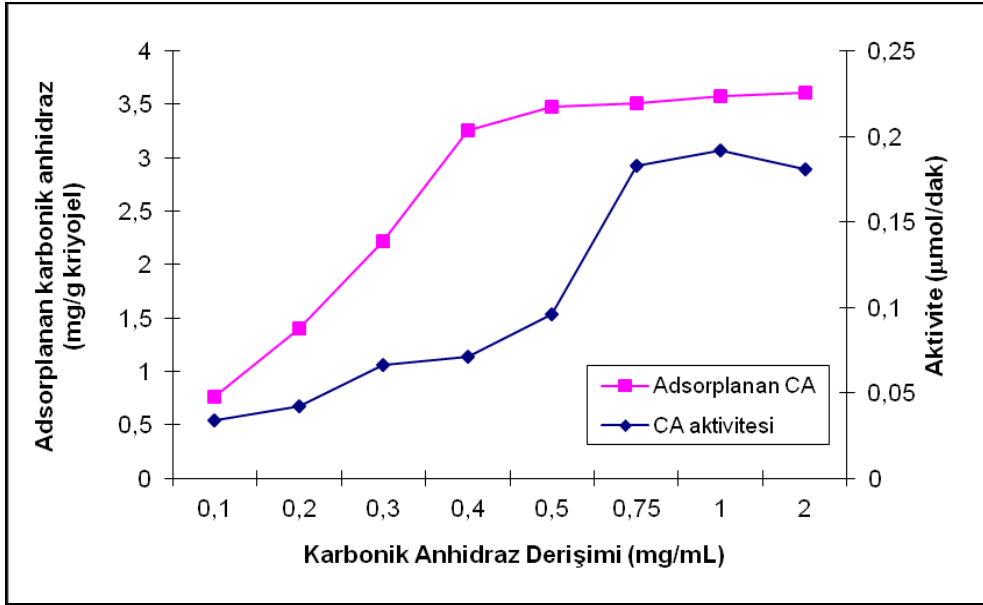


Şekil 4.9. Poli(HEMA-MAH) kriyojellerine karbonik anhidraz adsorpsiyonuna farklı tampon tiplerinin etkisi. Sıcaklık: 25 °C, karbonik anhidraz derişimi: 0.5 mg/mL, kromatografik akış hızı: 0.5 mL/dakika.

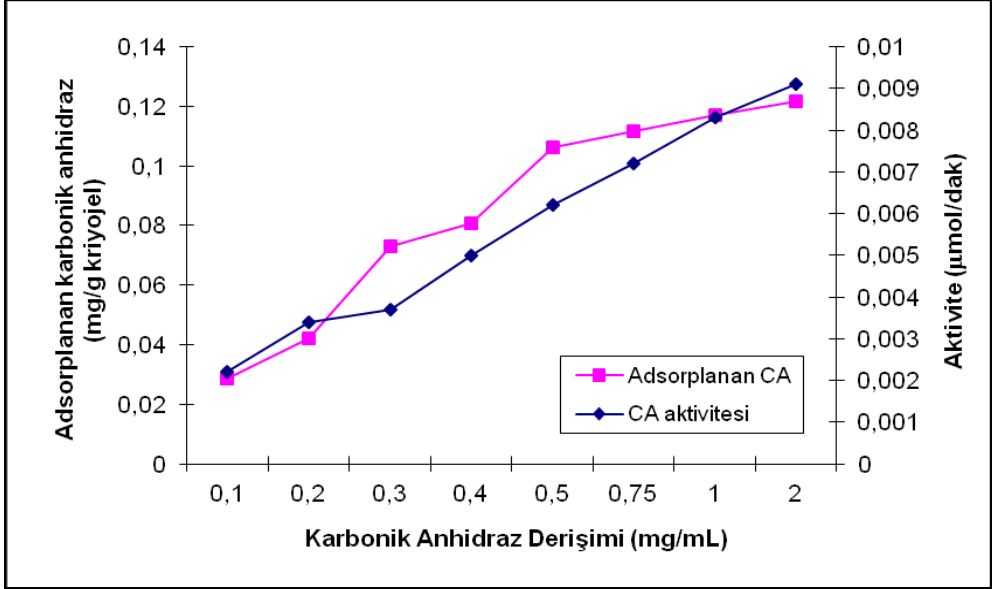
Şekil 4.9.'dan görüldüğü üzere maksimum karbonik anhidraz adsorpsiyonu pH 6.0'da MES tamponu kullanıldığında elde edilmiştir. Fosfat, asetat, Tris-HCl ve borat tamponları üzerlerinde bir veya daha fazla fakat aynı işaretli yük taşımaktadır (yapılan bu çalışmada sadece negatif). Buna karşı MES, MOPS ve HEPES gibi zwitter iyonik tamponlar zıt işaretli yükler içermektedirler. Yapılan çalışmada maksimum karbonik anhidraz adsorpsiyonu MES tamponu kullanılarak elde edilmiştir. Bu durum şu şekilde açıklanabilir; diğer tampon sistemlerinin iyonları karbonik anhidraz ile iyon-iyon etkileşimi içerisinde girerek karbonik anhidraz bağlanma bölgelerini maskeleyebilir. Fakat MES tamponu kullanılması durumunda bu maskeleme işlemi muhtemelen minimumdur; bu nedenle maksimum adsorpsiyon elde edilmiş olabilir (Akgöl vd., 2007).

4.5.3. Adsorpsiyona Ortamdaki Karbonik Anhidraz Derişiminin Etkisi

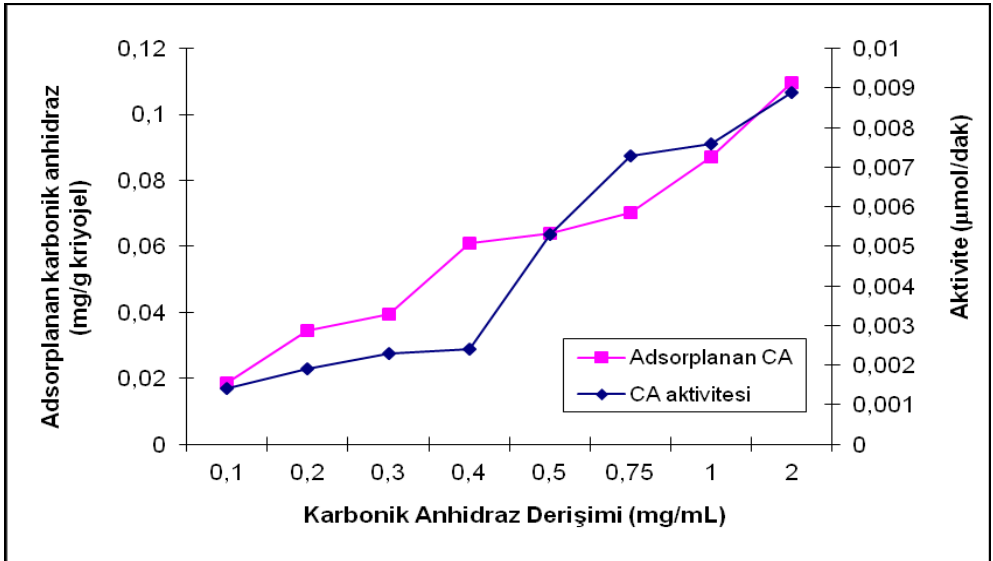
Karbonik anhidraz derişiminin adsorpsiyon üzerine etkisini incelemek üzere protein derişimi 0.05 – 2.00 mg/mL aralığında değiştirilmiştir. Spesifik olmayan bağlanmanın gözlenmesi amacıyla denemeler baskılanmamış kriyojeller kullanılarak tekrarlanmıştır. Karbonik anhidraz derişiminin adsorpsiyona etkisi ve kriyojellerden desorbe edilen karbonik anhidraz aktiviteleri Şekiller 4.10., 4.11. ve 4.12.'de görülmektedir.



Şekil 4.10. Baskılanmış poli(HEMA-MAH) kriyojele karbonik anhidraz adsorpsiyonuna ve karbonik anhidraz aktivitesine karbonik anhidraz derişiminin etkisi. Sıcaklık: 25 °C, pH: 6.0 MES tamponu, kromatografik akış hızı: 0.5 mL/dakika.



Şekil 4.11. Baskılanmamış poli(HEMA-MAH) kriyojele karbonik anhidraz adsorpsiyonuna ve karbonik anhidraz aktivitesine karbonik anhidraz derişiminin etkisi. Sıcaklık: 25 °C, pH: 6.0 MES tamponu, kromatografik akış hızı: 0.5 mL/dakika.

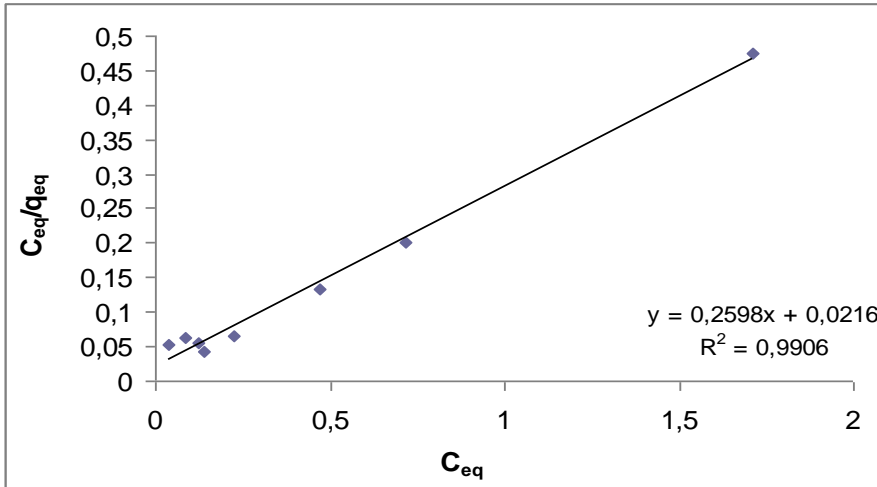


Şekil 4.12. Poli(HEMA) kriyojele karbonik anhidraz adsorpsiyonuna ve karbonik anhidraz aktivitesine karbonik anhidraz derişiminin etkisi. Sıcaklık: 25 °C, pH: 6.0 MES tamponu, kromatografik akış hızı: 0.5 mL/dakika.

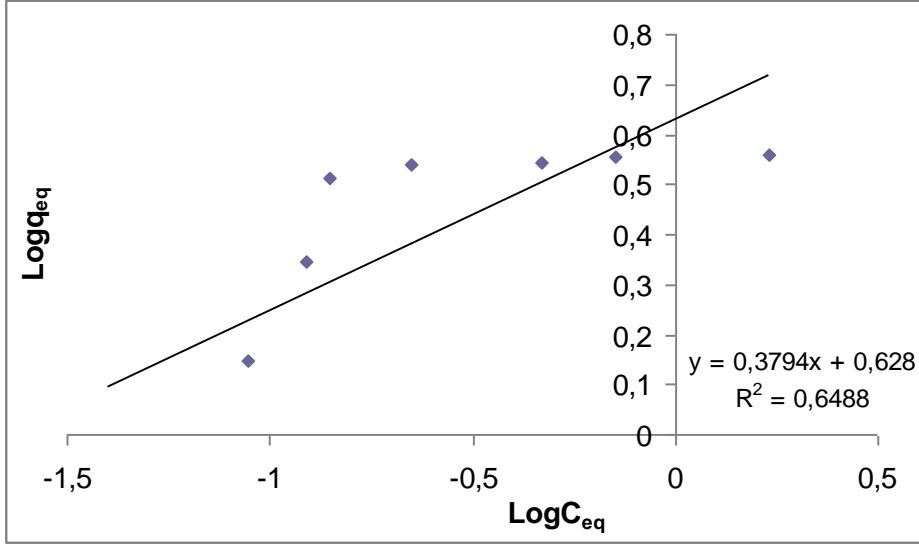
Şekillerde görüldüğü gibi enzim derişimi arttıkça adsorpsiyon artmış ancak 0.5 mg/mL derişimden itibaren doygunluk değerine ulaşılmıştır. Bu derişimden itibaren kriyojel üzerindeki tüm bağlanma bölgeleri dolmuş durumdadır ve bu yüzden kriyojel daha fazla karbonik anhidraz bağlayamamaktadır. Poli(HEMA) ve baskılanmamış poli(HEMA-MAH) kriyojellere spesifik olmayan bağlanma ise oldukça düşük bulunmuştur.

Şekil 4.10.-4.12.'e bakıldığında karbonik anhidraz derişiminin artışı ile başlangıç aktivitelerinde bir artış görülmektedir. Poli(HEMA) ve baskılanmamış kriyojellerin desorpsiyon ortamlarındaki enzim aktivitesi, baskılanmış olanlara nazaran, çok daha düşük bulunmuştur. Poli(HEMA) ve baskılanmamış kriyojellere adsorplanan enzim miktarlarının çok az olmasından dolayı bu beklenen bir durumdur. Baskılanmış kriyojelden desorpsiyon ile alınan enzim çözeltisinin aktivitesi enzim derişimi artışı ile artmış ve 0.5 mg/mL derişimden itibaren sabitlenmiştir. Bu bulgular adsorpsiyon bulguları ile örtüşmektedir. 0.5 mg/mL derişiminden itibaren kriyojеле bağlanan karbonik anhidraz miktarı sabitlenmiştir ve kriyojelden desorbe edilen enzim miktarının da birbirine yakın olmasından dolayı desorbe enzim aktiviteleri de birbirlerine yakın bulunmuştur.

Elde edilen sonuçlar kullanılarak adsorpsiyonun kinetiği araştırılmıştır. Bu amaçla Langmuir ve Freundlich izotermi kullanılmıştır. Şekil 4.13. ve 4.14.'de Langmuir ve Freundlich izotermi görülmektedir.



Şekil 4.13. Baskılanmış poli(HEMA-MAH) kriyojellere karbonik anhidraz adsorpsiyonuna ilişkin Langmuir izotermi.

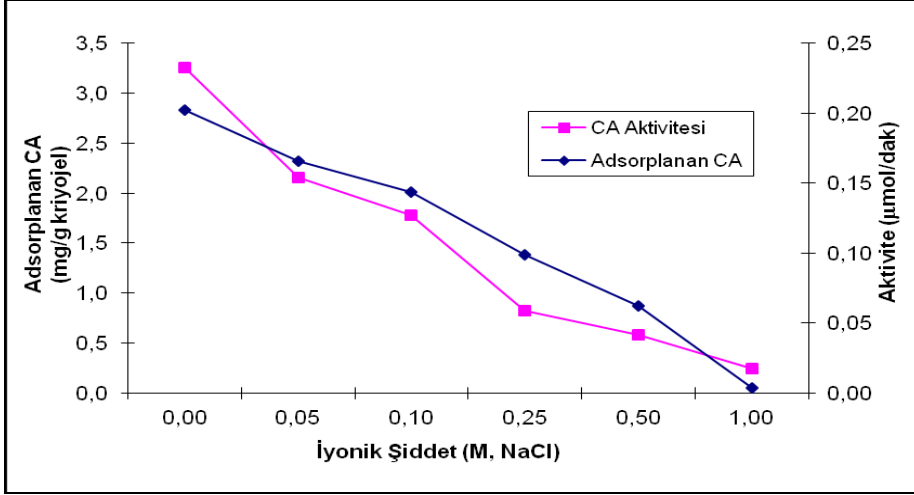


Şekil 4.14. Baskılanmış poli(HEMA-MAH) kriyojellere karbonik anhidraz adsorpsiyonuna ilişkin Freundlich izotermi.

İzotermelerin korelasyon katsayılarına bakıldığında adsorpsiyonun Langmuir izotermine ($R^2 = 0.99$) uygun olarak ilerlediği sonucu çıkarılabilir. Bu durum karbonik anhidrazın baskılanma ile oluşturulan belli bağlanma bölgelerine tek tabakalı olarak bağlandığını göstermektedir.

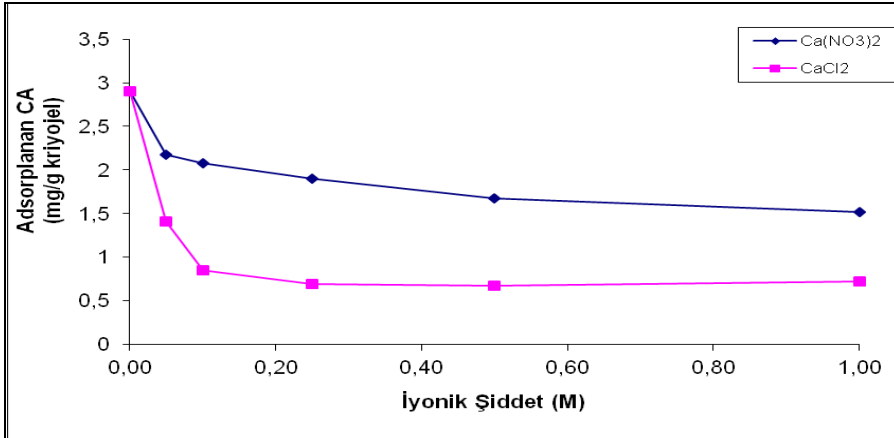
4.5.4. Adsorpsiyona İyonik Şiddetin Etkisi

Adsorpsiyonu etkileyen bir diğer önemli parametre ortamın iyonik şiddetidir. Farklı iyonik şiddetlerde (0-1.0 M NaCl) hazırlanan protein çözeltileri kriyojel kolondan geçirilerek iyonik şiddetin adsorpsiyona etkisi ve kriyojelden desorbe edilen karbonik anhidraz enzimlerinin aktiviteleri incelenmiştir. Deneysel bulgular Şekil 4.15.'de verilmiştir.

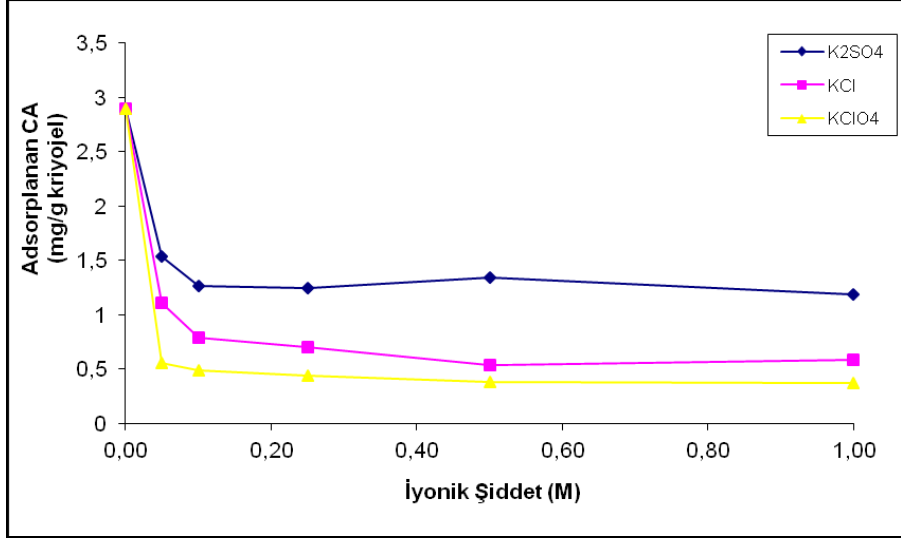


Şekil 4.15. Poli(HEMA-MAH) kriyojel üzerine karbonik anhidraz adsorpsiyonuna ve aktivitesine iyonik şiddetin etkisi. Sıcaklık: 25 °C, karbonik anhidraz derişimi: 0.5 mg/mL, pH: 6.0 MES tamponu, kromatografik akış hızı: 0.5 mL/dakika.

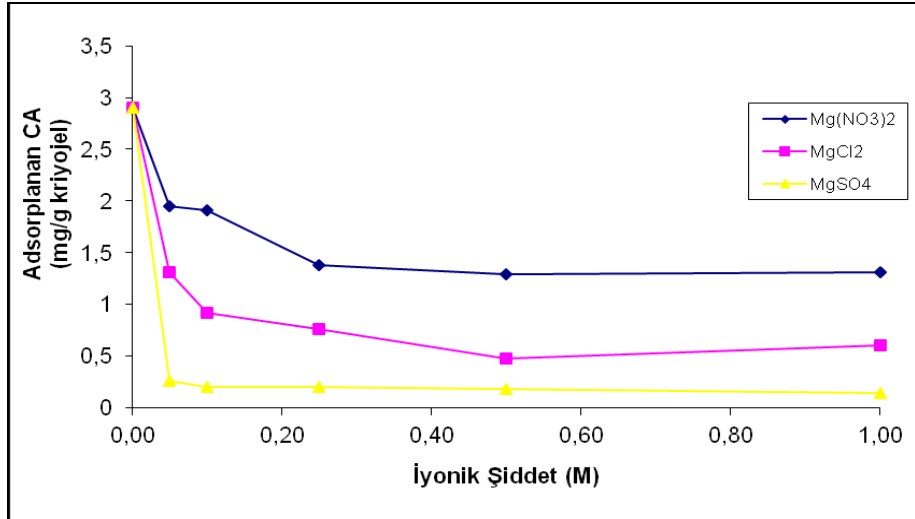
CA baskılanmış poli(HEMA-MAH) kriyojellere CA adsorpsiyonu üzerine farklı tuz tiplerinin de etkisi incelenmiş ve artan tuz derişimlerine bağlı olarak adsorpsiyon kapasitelerinde önemli azalmalar gözlenmiştir. Deney sonuçları katyonlarına göre gruplandırılmış halde Şekiller 4.16. – 4.20.’de verilmiştir.



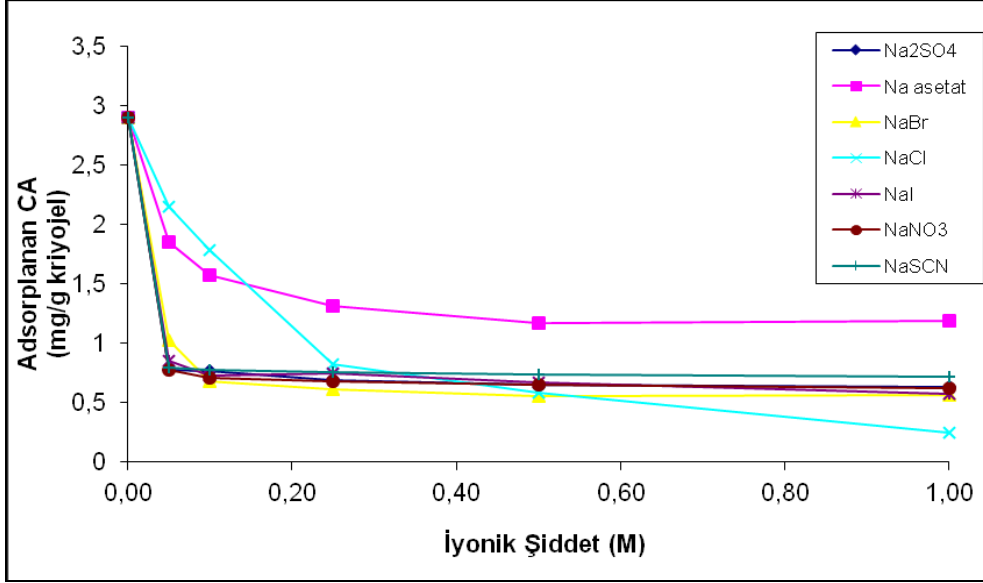
Şekil 4.16. CA adsorpsiyonuna Ca²⁺ tuzlarının etkisi. Sıcaklık: 25 °C, karbonik anhidraz derişimi: 0.5 mg/mL, pH: 6.0 MES tamponu, kromatografik akış hızı: 0.5 mL/dakika.



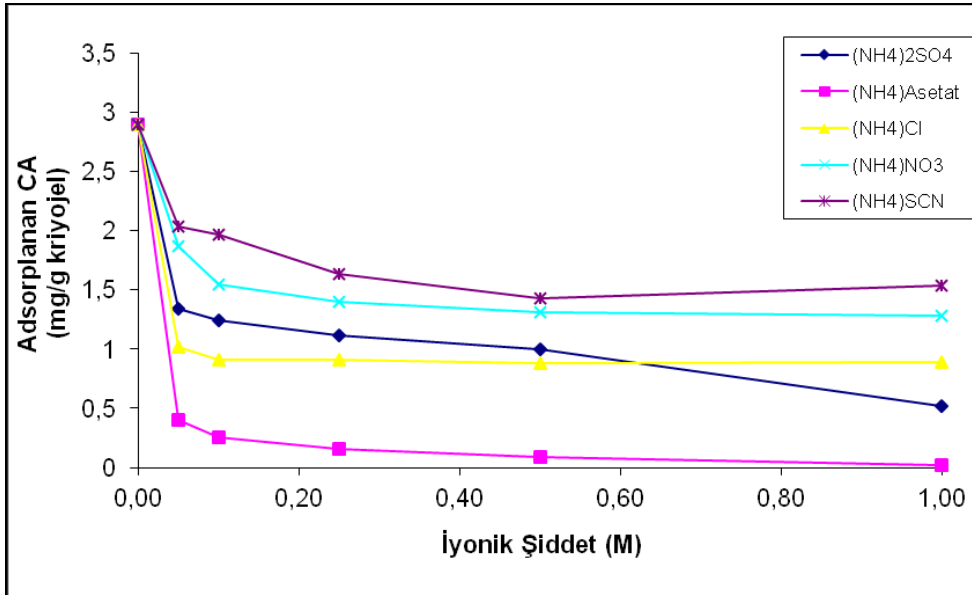
Şekil 4.17. CA adsorpsiyonuna K⁺ tuzlarının etkisi. Sıcaklık: 25 °C, karbonik anhidraz derişimi: 0.5 mg/mL, pH: 6.0 MES tamponu, kromatografik akış hızı: 0.5 mL/dakika.



Şekil 4.18. CA adsorpsiyonuna Mg²⁺ tuzlarının etkisi. Sıcaklık: 25 °C, karbonik anhidraz derişimi: 0.5 mg/mL, pH: 6.0 MES tamponu, kromatografik akış hızı: 0.5 mL/dakika.



Şekil 4.19. CA adsorpsiyonuna Na⁺ tuzlarının etkisi. Sıcaklık: 25 °C, karbonik anhidraz derişimi: 0.5 mg/mL, pH: 6.0 MES tamponu, kromatografik akış hızı: 0.5 mL/dakika.

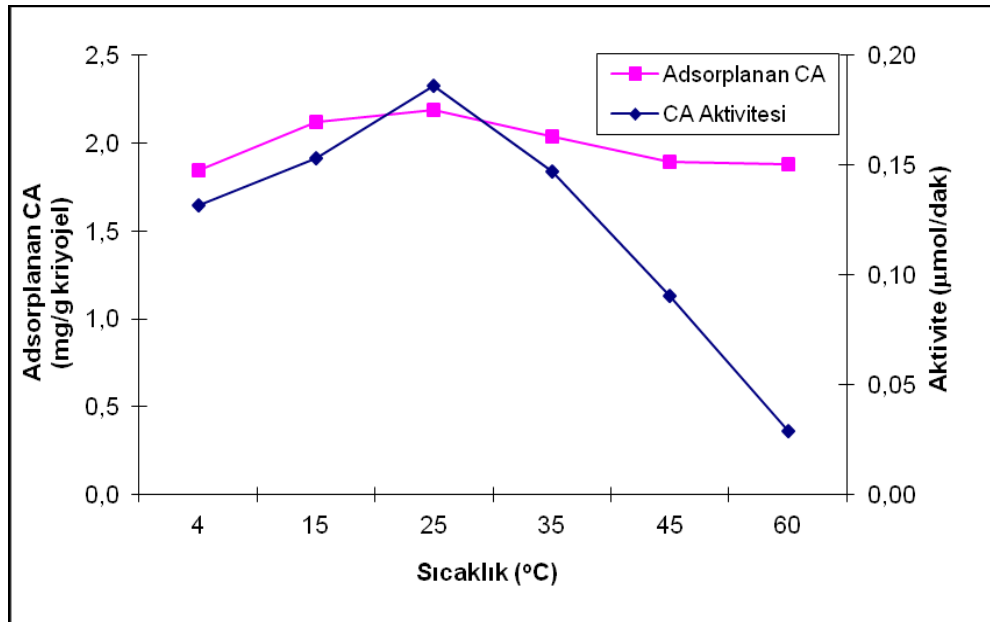


Şekil 4.20. CA adsorpsiyonuna NH₄⁺ tuzlarının etkisi. Sıcaklık: 25 °C, karbonik anhidraz derişimi: 0.5 mg/mL, pH: 6.0 MES tamponu, kromatografik akış hızı: 0.5 mL/dakika.

Şekillerden de görüldüğü üzere iyonik şiddetin 0'dan 1.0 M'a artışı ile adsorpsiyon kapasitesi hızlı bir şekilde düşmüştür. Bağlanmada temel olarak iyonik bağların etkili olduğu düşünülürse bu durum beklenen bir sonuç olacaktır. Desorpsiyon ajanı olarak 1.0 M'lık NaCl çözeltisinin kullanılması da bu sonucu açıklamaktadır. Artan iyonik şiddet ile adsorpsiyon kapasitesindeki azalma Bereli vd. (2008) tarafından da gözlenmiştir. Bu araştırmacılar ortam NaCl derişiminin 0'dan 0.1 M'a arttırılması ile lizozim adsorpsiyonu kapasitesi 16.6'dan 6.7 mg/g kriyojelle düşmüştür.

4.5.5. Adsorpsiyona Sıcaklığın Etkisi

Karbonik anhidrazın kriyojellere adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisinin incelenmesi için ortam sıcaklığı 4.0 – 60.0 °C aralığında değiştirilmiştir. Farklı sıcaklıklarda elde edilen adsorpsiyon değerleri ve kriyojelden desorbe edilen karbonik anhidraz enzimlerinin aktiviteleri Şekil 4.21.'de görülmektedir.



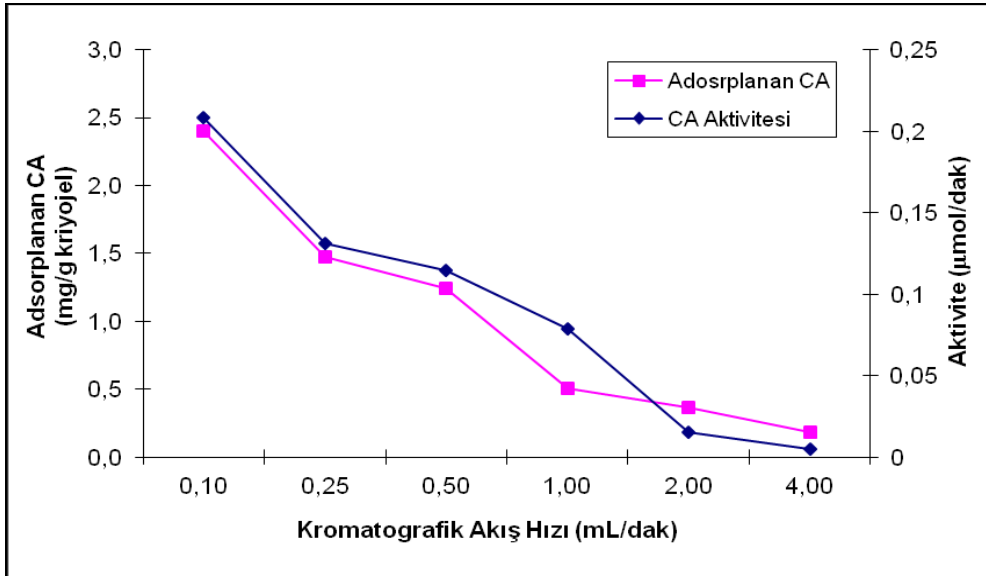
Şekil 4.21. Poli(HEMA-MAH) kriyojelle karbonik anhidraz adsorpsiyonu ve aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi. Karbonik anhidraz derişimi: 0.5 mg/mL, pH: 6.0 MES tamponu, kromatografik akış hızı: 0.5 mL/dakika.

Şekil 4.21.'e bakıldığında sıcaklık artışı ile CA adsorpsiyununda önemli bir değişimin olmadığı söylenebilir. Fakat sıcaklık artışı ile adsorpsiyon oldukça küçük bir miktar artarken 25 °C'den itibaren adsorpsiyon kapasitesinde yine küçük bir azalma gözlenmiştir. Bu azalma yüksek sıcaklıklarda molekül üç boyutlu yapısındaki değişimler ve kriyojel ve protein molekülleri arasındaki etkileşimleri bozabilecek termodinamik etkilerden kaynaklanabilir. Polimere proteinlerin bağlanmasına sıcaklığın etkisi bağlanmanın şekline bağlı olarak değişebilir. Adsorpsiyon ekzotermik bir işlem olduğundan dolayı adsorpsiyon kapasitesi genellikle sıcaklık ile azalır (Altıntaş vd., 2006). Bununla birlikte, hidrofobik etkileşimlerin etkili olduğu durumlarda sıcaklığın artması ile adsorpsiyon kapasitesi belirgin olarak artmaktadır (Akgöl vd., 2005).

Şekil 4.21.'de görüldüğü gibi sıcaklığın 25 °C'ye artışı ile adsorpsiyonun da artmasına bağlı olarak enzim aktivitesi de artmış, bu sıcaklıktan sonra ise azalmaya başlamıştır. Değerler incelendiğinde 45 ve 60 °C uygulamalarının başlangıç ve desorpsiyon ortamlarında adsorpsiyon çok fazla değişmemesine rağmen aktivite çok azalmıştır. Bu durum, enzimin bu sıcaklıklarda 2 saat boyunca muamele edilmesi sonucu denaturasyona uğramış olması ile açıklanabilir.

4.5.6. Adsorpsiyona Kromatografik Akış Hızının Etkisi

Kromatografik akış hızının karbonik anhidraz bağlanması üzerine etkisinin incelenmesi için akış hızı 0.1 – 4.0 mL/dak aralığında değiştirilmiştir. Akış hızının adsorpsiyona ve kriyojelden desorbe edilen karbonik anhidraz enzimlerinin aktiviteleri üzerine etkisi Şekil 4.22.'de görülmektedir.



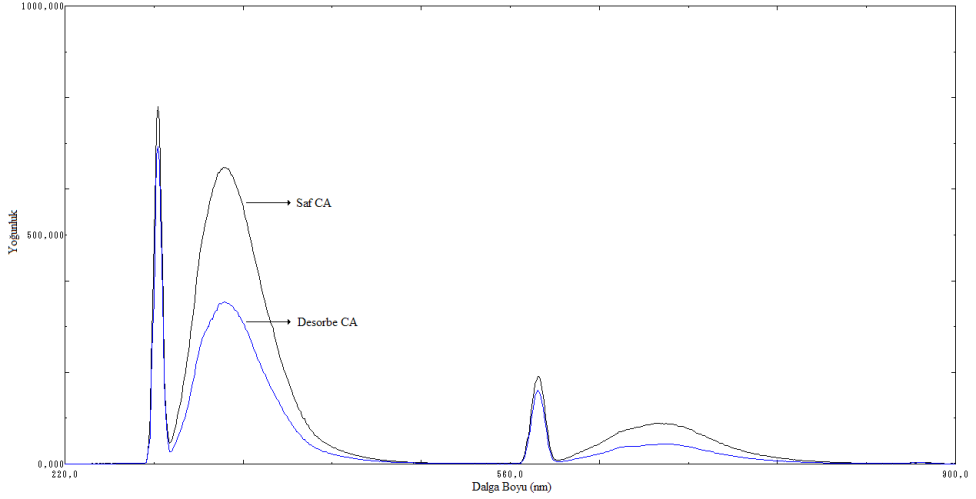
Şekil 4.22. Poli(HEMA-MAH) kriyojele karbonik anhidraz adsorpsiyonu ve aktivitesi üzerine kromatografik akış hızının etkisi. Sıcaklık: 25 °C, karbonik anhidraz derişimi: 0.5 mg/mL, pH: 6.0 MES tamponu.

Şekil 4.22.'de görüldüğü üzere akış hızının artışı ile adsorpsiyon kapasitesi önemli oranda azalmıştır. Kromatografik akış hızının 0.1 mL/dak'dan 4.0 mL/dak'ya arttırılması ile adsorpsiyon kapasitesi 2.401 mg/g kriyojelden 0.185 mg/g kriyojele düşmüştür. Yüksek akış hızlarında karbonik anhidrazın kriyojel ile etkileşme süresinin kısılması ve uygun pozisyonda etkileşme olasılığının azalması nedeniyle adsorpsiyon kapasitesi azalmış olabilir (Aslıyüce et al, 2010). Derazshamshir vd. (2008) hazırladıkları poli(HEMA-MAH) kriyojelleri ile lizozim adsorpsiyonu çalışmaları gerçekleştirmişler ve yapılan optimizasyon denemelerinde kromatografik akış hızının 0.5'den 3.0 mL/dak'ya artışı ile adsorpsiyon oranının % 64.9 seviyesinde azaldığını rapor etmişlerdir. Babac vd, (2006) IgG saflaştırılması için hazırladıkları poli(akrilamid-allil glisidil eter) kriyojellerin adsorpsiyon kapasitesinin artan akış hızı ile önemli oranda azaldığını rapor etmişlerdir. Plieva vd. (2004) 2-(dimetilamino)etil metakrilat ile tüvelendirdikleri poli(akrilamid) kriyojellerini hazırlamışlar ve sığır serum albumin saflaştırılmasında kullanmışlardır. Akış hızı denemeleri içerisinde akış hızının 0.5'den 12.0 mL/dak'ya arttırılması ile adsorpsiyon kapasitesinin % 68.4 oranında azaldığı bulunmuştur. Wang vd. (2008) imidodiasetik asit kriyojeller sentezlemişler ve albumin saflaştırılmasında kullanmışlar ve albumin bağlanma kapasitesinin artan akış hızı ile azaldığını gözlemişlerdir. Bereli vd. (2008)

poli(HEMA-MAH) kriyojellere lizozim adsorpsiyonunu incelemiş ve kromatografik akış hızının 0.5'den 4.0 mL/dak'ya artışı ile adsorpsiyon kapasitesinin 22.5'den 6.3 mg/g kriyojele düştüğünü gözlemlemişlerdir. Baydemir vd. (2009a) tarafından hazırlanan bilirubin baskılanmış poli(HEMA-MAT) kriyojeller üzerine bilirubin adsorpsiyonunun artan akış hızı ile (0.5'den 4.0 mL/dak'ya) azaldığı (2.7'den 0.6 mg/g'a) gözlenmiştir. Baydemir vd. (2009b) bilirubin baskılanmış poli(HEMA-MAT) partikülleri gömülü olarak taşıyan poli(HEMA) kriyojeller hazırlamışlar ve kromatografik akış hızının artışı ile adsorpsiyon kapasitesinde azalma gözlemlemişlerdir. Yılmaz vd. (2009) tarafından sentezlenen poli(HEMA-Trp) kriyojellere lizozim adsorpsiyonuna kromatografik akış hızının etkisi incelenmiş ve akış hızı 0.5'den 2.0 mL/dak'a arttırıldığında adsorpsiyon kapasitesinin 58.4'den 22.3'e düştüğü gözlenmiştir. Sun vd. (2012a) agaroz-kitosan kompozit kriyojelleri hazırlayarak IgG saflaştırılmasında kullanmışlar ve kromatografik akış hızını 1.0'den 7.0 mL/dak'ya çıkarttıklarında IgG adsorpsiyon kapasitesinin 28.5'den 4.0 mg/g'a düştüğünü göstermişlerdir. Şekilde görüldüğü gibi akış hızının artışı ile kriyojele bağlanan enzim miktarının azalmasına bağlı olarak enzim aktivitesinde de düşüşler gözlenmiştir.

4.5.7. Floresans Spektrometrisi Sonuçları

Alınan floresans spektrumlarından CA enziminin iki farklı uyarım (291 ve 581 nm) ve yayım (341 ve 673 nm) dalga boyuna sahip olduğu gözlenmiştir. Şekil 4.23.'de saf CA (0.05 mg/mL) ve kolondan desorbe edilen CA'nın (0.03 mg/mL) floresans spektrumları görülmektedir. Her iki örneğin de aynı dalga boylarında uyarıldığı ve yayım yaptığı Şekil 4.23.'de gösterilmiştir. Bu sonuçlar ışığında poli(HEMA-MAH) kriyojeller ile saflaştırılan CA enziminin konformasyonunda bir değişimin olmadığı ve denemeler boyunca herhangi bir denatürasyon probleminin gerçekleşmediği sonucuna varılabilmektedir.

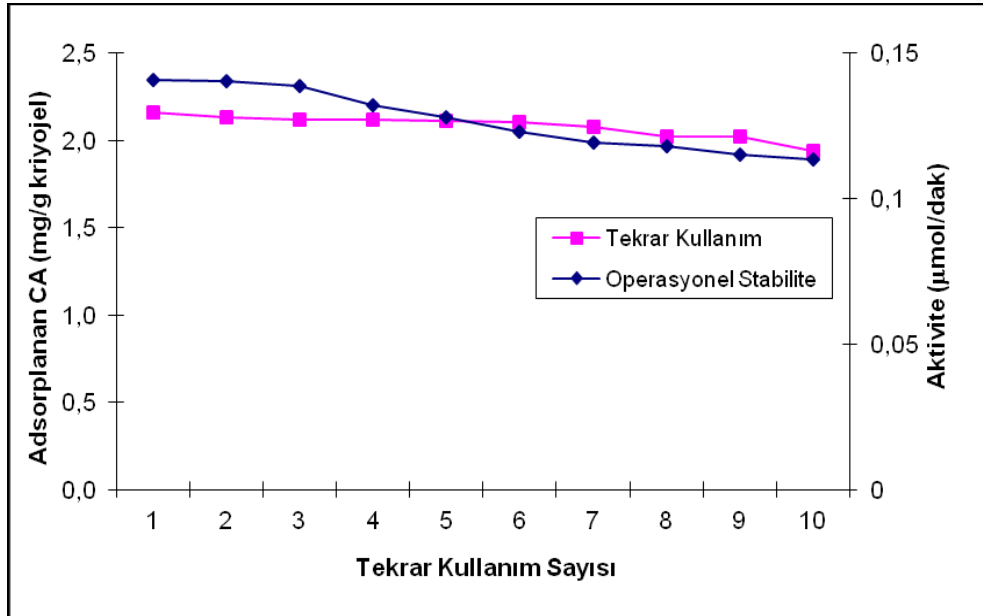


Şekil 4.23. Saf ve desorbe CA'nın floresans spektrumları.

Yılmaz vd. (2009) hazırlamış oldukları kriyojele lizozim adsorpsiyonunu incelemişler ve adsorpsiyon sonrasında lizozim enziminin yapısında bir değişimin olup olmadığını gözlemek üzere floresans spektrometresini kullanmışlardır. Bu araştırmacılar saf lizozim ve kriyojelden desorbe edilen lizozimin floresans spektrumlarında herhangi bir farklılık gözlenmediğinden lizozimin adsorpsiyonu ve desorpsiyonu aşamalarında yapısının değişmediği ve herhangi bir denatürasyona uğramadığını belirtmişlerdir.

4.6. Kriyojelin Tekrar Kullanım Özellikleri ve Operasyonel Kararlılığı

Sentezlenen CA baskılanmış poli(HEMA-MAH) kriyojeller 10 döngü boyunca CA adsorpsiyonunda kullanılmış ve her döngü sonunda desorbe edilerek yıkanmış ve diğer döngü için dengelenmiştir. Ayrıca desorbe edilen CA örneklerinin de aktiviteleri bakılarak operasyonel kararlılıkları incelenmiştir. Elde edilen adsorpsiyon ve aktivite sonuçları Şekil 4.24.'de gösterilmiştir.

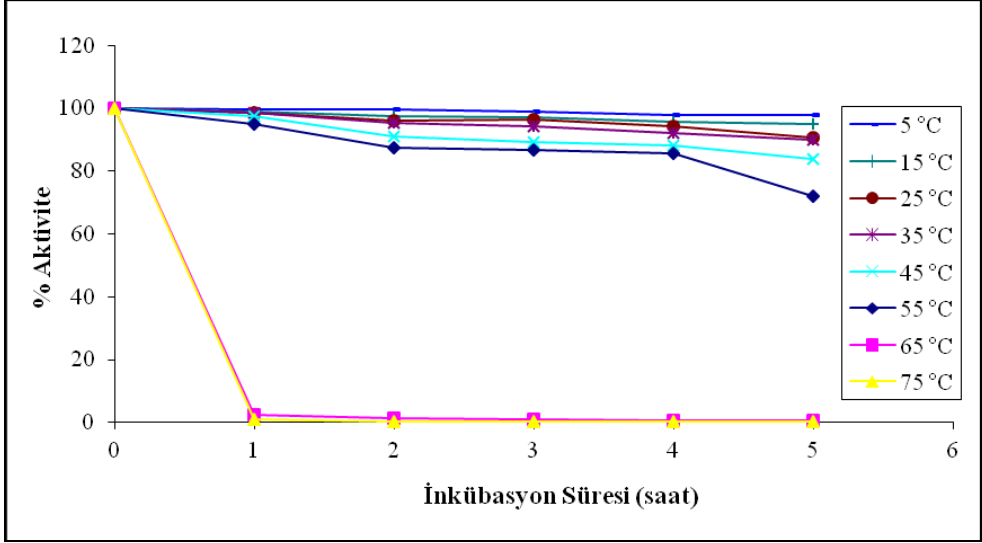


Şekil 4.24. Sentezlenen Poli(HEMA-MAH) kriyojellerinin tekrar kullanım sayıları ve operasyonel stabilite. pH: 6,0 MES (0,1 M), sıcaklık: 25 °C, karbonik anhidraz derişimi: 0,5 mg/mL, kromatografik akış hızı: 0,5 mL/dakika.

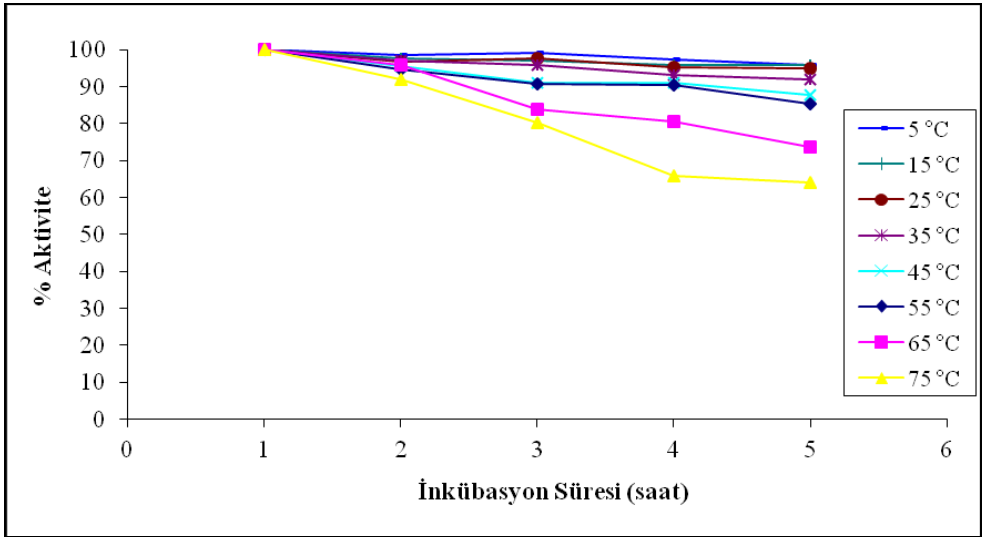
Şekil 4.24.'den görüldüğü üzere kriyojeller 10 döngü boyunca adsorpsiyon kapasitesinden önemli bir azalma olmadan karbonik anhidraz adsorplamıştır. On adsorpsiyon-desorpsiyon aşamasından sonra kriyojellere karbonik anhidraz adsorpsiyonu kapasitesi % 10,2'lik bir azalma göstermiştir. Babac vd. (2006) grubunun hazırladıkları poli(akrilamid allil glisidil eter) kriyojellerinin IgG adsorpsiyon kapasitesi 10 döngü boyunca araştırılmış ve kapasitede sadece % 2,0'lik bir azalma olmuştur. Sentezlenen kriyojellerin operasyonel stabilite ise ilk üç döngü sonunda önemli oranda değişmezken 10 döngü sonunda % 19 oranında azalmıştır. Kriyojelin tekrar kullanılabilirliğinde gözlenen adsorplanan enzim miktarındaki azalma aktivitenin düşmesinde etkili olabilir. Özdemir (2009) poliüretan köpüklere immobilize ettiği karbonik anhidrazın tekrar kullanımını araştırmış ve 7 döngü boyunca karbonik anhidraz aktivitesinde önemli bir azalma gözlememiştir. Bilirubin baskılanmış poli(HEMA-MAT) kriyojellerin (Baydemir vd. 2009a) tekrar kullanım özellikleri incelenmiş ve 10 döngü sonunda bilirubin adsorpsiyon kapasitesinde % 10'luk bir azalma meydana gelmiştir.

4.7. Serbest ve Kriyojelden Desorbe Karbonik Anhidrazın Isıl Kararlılığı

Serbest ve immobilize karbonik anhidrazın ısıl kararlılık değerleri sırasıyla Şekil 4.25. ve Şekil 4.26.'da verilmiştir.



Şekil 4.25. Serbest karbonik anhidrazın ısıl kararlılığı.



Şekil 4.26. İmmobilize karbonik anhidrazın ısıl kararlılığı.

Şekiller 4.25. ve 4.26.'dan da görüldüğü üzere serbest ve desorbe karbonik anhidrazın düşük sıcaklıklarda oldukça kararlı olduğu ve 55 °C'de 5 saat sonunda enzimlerin aktivitelerini sırasıyla % 18 ve % 15 oranında azalmıştır. 65 ve 75 °C'de ise serbest karbonik anhidrazın aktivitesi ilk 1 saat içerisinde neredeyse tamamen yok olmuştur. Kriyojelden desorbe edilmiş karbonik anhidraz enziminde ise 65 °C'de 5 saat sonunda % 26 aktivite kaybı gözlenirken, 75 °C'de % 36 oranında aktivite kaybı gözlenmiştir. Zhang vd. (2009), hidrokalsit içeren nanokompozit hidrojelere karbonik anhidraz enzimini immobilize etmişler ve benzer bulgulara varmışlardır. Çalışmalarında, 50 °C'deki 1 saatlik inkübasyon sonunda serbest karbonik anhidrazın aktivitesinin neredeyse tamamını yitirdiğini fakat immobilize formdaki karbonik anhidrazın aktivitesinin % 65'ini koruduğunu bulmuşlardır. Özdemir (2009) karbonik anhidraz enziminin kararlılığını incelemek üzere serbest ve poliüretan köpüklere immobilize ettiği karbonik anhidrazı 4°C'de inkübe ederek belirli zaman aralıklarında aktivitelerine bakmıştır. 4 °C'de immobilize karbonik anhidraz aktivitesini korurken serbest karbonik anhidraz neredeyse aktivitesinin tamamını kaybetmiştir. Aynı çalışmada immobilize karbonik anhidrazın oda sıcaklığında dahi 45 gün boyunca aktivitesini önemli ölçüde koruduğu bulunmuştur. Hosseinkhani vd. (2003) karbonik anhidrazı Sepharose üzerine immobilize etmişler ve 65 °C'deki termal kararlılığının serbest karbonik anhidrazdan önemli ölçüde yüksek olduğunu bulmuşlardır.

4.8. Karbonik Anhidraz Baskılanmış Kriyojellerin Seçiciliği

Hazırlanan CA baskılanmış poli(HEMA-MAH) kriyojellerin seçiciliği albumin, hemoglobin, IgG, γ -globulin ve lizozime karşı incelenmiştir. Seçicilik denemelerinde kullanılan albumin, hemoglobin, IgG ve γ -globulin sığır kanında olup sığır kanından CA saflaştırılması aşamasında oluşacak olası girişimleri test etmek amacıyla kullanılmıştır. Denemede kullanılan lizozim ise molekül kütlesi 14000 Da olan bir enzimdir ve seçicilik üzerine molekül boyutunun etkisinin incelenmesi amacıyla kullanılmıştır. Deneysel bulgular Çizelge 4.7.'de özetlenmiştir.

Çizelge 4.7. Karbonik anhidraz baskılanmış kriyojellerin seçicilikleri.

| Protein | Poli(HEMA-MAH) kriyojel | | CA Baskılanmış Poli(HEMA-MAH) kriyojel | | |
|--------------------|-------------------------|-------------|---|--------------|-------|
| | K_d (mL/g) | K | K_d (mL/g) | k | k' |
| Karbonik Anhidraz | 9.59 ± 0.26 | - | 140.87 ± 11.29 | - | - |
| Albumin | 6.77 ± 0.62 | 1.42 ± 0.13 | 6.51 ± 0.30 | 21.67 ± 1.00 | 5.26 |
| Hemoglobin | 8.68 ± 0.36 | 1.11 ± 0.05 | 2.13 ± 0.08 | 66.29 ± 2.58 | 10.05 |
| IgG | 45.09 ± 5.86 | 0.22 ± 0.03 | 30.29 ± 3.54 | 4.70 ± 0.59 | 11.88 |
| γ -Globulin | 25.03 ± 6.42 | 0.40 ± 0.12 | 21.28 ± 2.74 | 6.70 ± 0.93 | 7.61 |
| Lizozim | 88.36 ± 11.88 | 0.11 ± 0.02 | 76.07 ± 16.00 | 1.90 ± 0.38 | 7.42 |

Hazırlanan karbonik anhidraz baskılanmış kriyojellerin karbonik anhidraza karşı diğer yarışmacı proteinlere göre daha seçici olduğu k' değerleri karşılaştırılarak gözlenmiştir. Kriyojeller karbonik anhidraza albumine göre 15 kat daha seçici iken hemoglobine göre 60 kat daha seçicidir. CA baskılanmış kriyojel karbonik anhidraza karşı IgG'ye göre 22 kat γ -globuline karşı ise 17.5 kat seçicidir. Lizozime karşı hesaplanan seçicilik değeri ise 17.4 kattır. Hedef molekül ve bağlanma bölgesi arasındaki boyut, şekil, bağlanma bölgesi ve spesifik bağlanma etkileşimlerinin varlığından dolayı moleküler baskılanmış polimerler kalıp moleküllerini tanıyabilmektedirler. Dahası hedef molekül ile bağlanma bölgesi arasındaki etkileşimin kuvveti moleküler baskılanmış polimerin seçiciliğini belirlemektedir (Dai vd., 2011). Karbonik anhidraz albumin ve hemoglobine göre daha küçük lizozime göre daha büyük bir proteindir (Karbonik anhidraz, 30000 Da; albumin, 67000 Da; hemoglobin, 64000 Da; lizozim, 14000). Baskılama sırasında oluşan karbonik anhidraza özgü kalıplara boyut olarak daha büyük olan albumin ve hemoglobinin daha az bağlanması beklenen bir durumdur. Buna karşın molekül kütleleri birbirinden pek de farklı olmayan bu proteinler kriyojellere farklı

ilgilerle bağlanmıştır. Bu durum albumin ve hemoglobinin üç boyutlu yapıları ile açıklanabilir. Hemoglobin küresel bir protein iken albuminin üç boyutlu yapısı elipsoittir ve muhtemelen bu elipsoit yapının uçları kriyojelin baskılanmış boşluklarına spesifik olmayan bir biçimde bağlanmaktadır. Lizozime karşı ise 17.54 katlık bir seçicilik gözlenmiştir. Küçük boyutlara sahip olan bu molekülün CA baskılanmış boşluklarda aktif olarak bağlanamayacağı açıktır. Sığır serum IgG'si ve γ -globulinine karşı sırasıyla bulunan 21.8 ve 17.5'lük seçicilik katsayısı bu proteinlerin yüksek olan molekül kütlelerinden kaynaklanmaktadır (sırasıyla 152000 Da ve 158000 Da). Ayrıca söz konusu yarışmacı proteinler ile gözlenen bağlanma doğrudan kriyojelin baskılama bölgelerine değil de kriyojel yüzeyine spesifik olmayan bağlanmanın bir sonucu olarak ortaya çıkmıştır ve yarışmacı proteinler arasında gözlenen bu farklılık söz konusu proteinlerin yüzeyinde bulunan farklı grupların farklı seçiciliklerinden kaynaklanmış olabilir. Baydemir vd. (2009a) tarafından hazırlanan bilirubin baskılanmış poli(HEMA-MAT) kriyojellerin bilirubine karşı seçicilikleri kolesterol ve testosterona karşı denenmiş ve kriyojelin seçiciliği sırasıyla 7.3 ve 3.2 kat daha fazla bulunmuştur. Baydemir vd. (2009b) tarafından hazırlanan bilirubin baskılanmış partiküller içeren poli(HEMA) kriyojellerin seçicilikleri de ayrıca kolesterol ve testosterona karşı incelenmiş ve kriyojelin bu yarışmacı ajanlara karşı bilirubine sırasıyla 8.6 ve 4.1 kat seçici olduğu ifade edilmiştir. Demirin sistein bazlı poli(HEMA) kriyojellere baskılandığı bir çalışmada (Aslıyüce vd., 2010) demirin seçici adsorpsiyonunun araştırılması amacıyla yarışmacı nikel ve kadmiyum iyonları kullanılmış ve demir baskılanmış kriyojelin yarışmacı metallere karşı sırasıyla 2.3 ve 10.5 kat seçici olduğu bulunmuştur. Sitokrom c baskılanmış poli(HEMA) kriyojeller Tamahkar vd. (2011) tarafından sentezlenmiş ve baskılanmış kriyojelin seçiciliği albumin ve lizozime karşı incelenmiştir. Sitokrom c baskılanmış kriyojelin sitokrom c'ye karşı seçiciliği albumine karşı 5.23 kat, lizozime karşı ise 1.74 kat yüksek bulunmuştur. Derazshamshir vd. (2010) tarafından sentezlenen hemoglobin baskılanmış poli(HEMA) kriyojellerin hemoglobine olan seçiciliği miyoglobine ve albumine karşı sırasıyla 38 ve 12 kat seçici olduğu bulunmuştur.

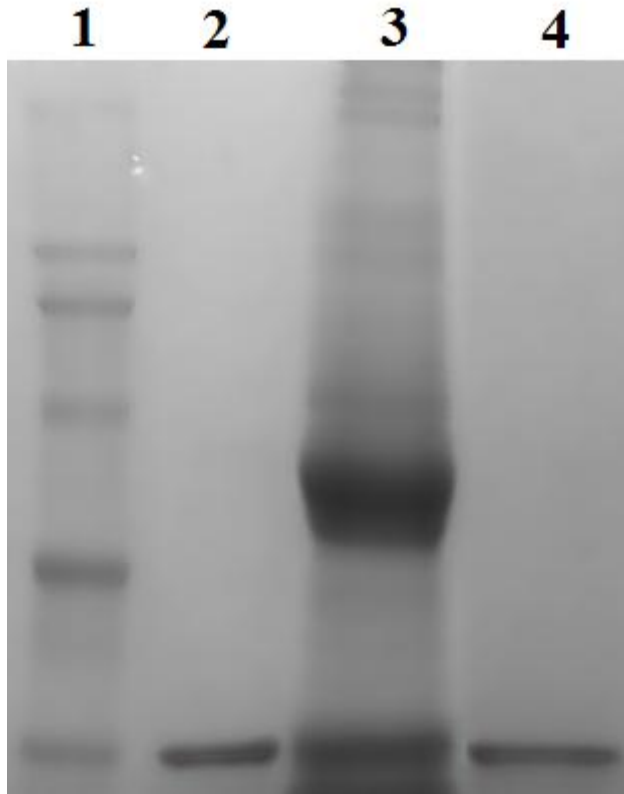
4.9. Sığır Eritrositlerinden CA Enziminin Saflaştırılması

CA enziminin saflaştırılması için optimize edilen koşullar altında sığır kanından CA enziminin saflaştırılması çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Yapılan adsorpsiyon denemeleri sonunda kriyojele bağlanan CA enzimi desorbe edilerek elde edilen

enzimin saflığı SDS-PAGE ile gösterilirken enzimin aktivitesi ölçülerek saflaştırma tablosu (Çizelge 4.8.) oluşturulmuştur.

4.9.1. SDS-PAGE Elektroforezi

Kriyojellerden desorbe edilen CA enziminin saflığı SDS-PAGE ile gösterilmiştir (Şekil 4.27.). Şekil 4.27.'deki 1 nolu sıra elektroforez standart proteinlerini, 2 nolu sıra saf CA enzimini, 3 nolu sıra ham hemolizatu, 4 nolu sıra saflaştırılan CA enzimini ifade etmektedir. Görüldüğü gibi CA sığır eritrositlerinden tek bir adımda ve başarılı bir şekilde saflaştırılmıştır.



Şekil 4.27. SDS-PAGE fotoğrafı. Sıra 1: protein standartlar [yukarıdan aşağıya doğru: miyozin (tavşan kanı, 205 kDa), β -galaktozidaz (*E. coli*, 116 kDa), fosforilaz B (tavşan kanı, 97 kDa), albumin (sığır serum, 66 kDa), albumin (yumurta akı, 45 kDa), karbonik anhidraz (sığır eritrosit, 29 kDa)]; sıra 2: Saf CA; sıra 3: ham hemolizat; sıra 4: CA baskılanmış poli(HEMA-MAH) kriyojellerden desorbe edilen örnek.

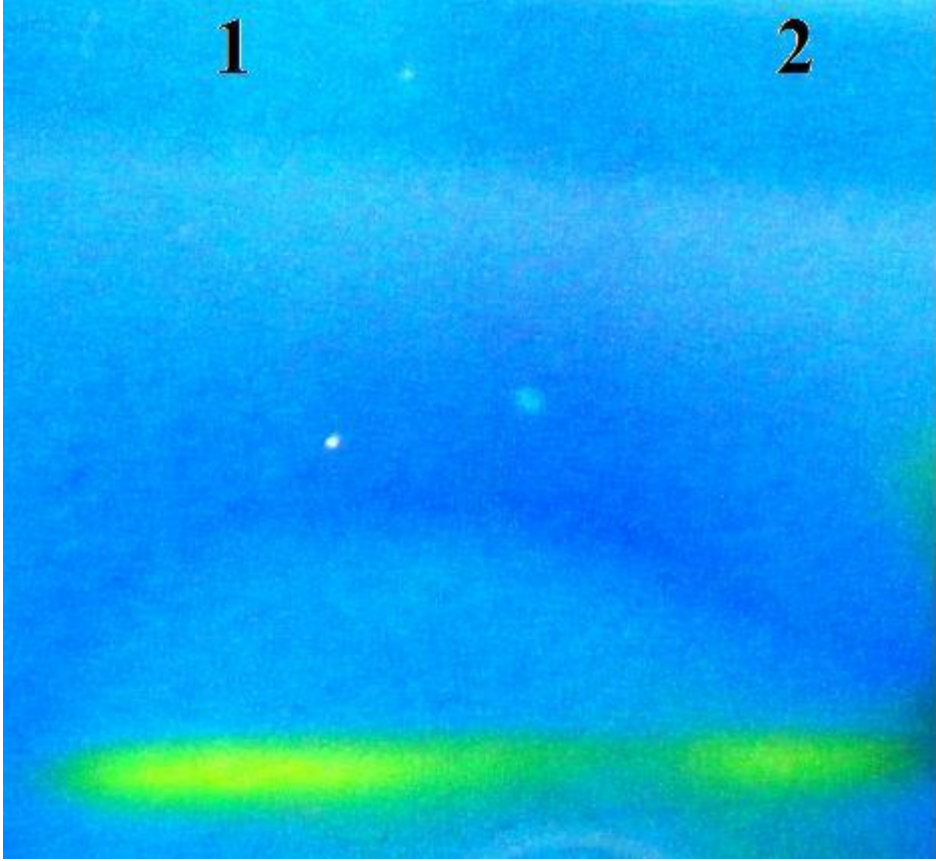
Çizelge 4.8. Sığır eritrositi karbonik anhidraz enziminin CA baskılanmış poli(HEMA-MAH) kriyojelleri ile saflaştırılması

| Saflaştırma Adımı | Total Protein (mg) | Aktivite (Unite) | Total Aktivite (Unite) | Spesifik Aktivite (Unite/mg) | % verim | Saflaştırma Katsayısı |
|--|--------------------|------------------|------------------------|------------------------------|---------|-----------------------|
| Hemolizat | 10.49 | 89.250 | 267.75 | 25.523 | 100 | 1 |
| Baskılanmış kriyojeller ile saflaştırılan CA | 0.099 | 21.262 | 212.62 | 2143.313 | 79.41 | 83.98 |

Çizelgeden görüldüğü üzere CA baskılanmış poli(HEMA-MAH) kriyojelleri ile sığır eritrositlerinden CA enzimi % 79.41 verimle ve yaklaşık 84 kat saflaştırılmıştır.

4.9.2. Zimogram Boyaması

Elektroforez ile ayrılan CA'nın enzimatik aktivitesi sayesinde görüntülenmesi amacıyla zimogram boyaması yapılmış ve Şekil 4.28.'de gösterilen zimogram fotoğrafı elde edilmiştir. Zimogramdaki 1 nolu sıra saf CA enzimini 2 nolu sıra ise saflaştırılan CA enzimini göstermektedir. Görüldüğü üzere her iki enzimin konumları mavi zemin üzerinde sarı lekeler şeklindedir ve bu durum enzimlerin aktivitelerini koruduklarını belirtmektedir.



Şekil 4.28. Saf CA (1) ve CA baskılanmış poli(HEMA-MAH) kriyojellerden desorbe edilen CA'nın (2) zimogram fotoğrafları.

5. SONUÇ

- Yapılan bu çalışmada, karbonik anhidrazın sıgır kanından saflaştırılması için karbonik anhidraz baskılanmış poli(HEMA-MAH) kriyojeller sentezlenmiştir.
- Kriyojenik uygulama sonucu $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de sentezlenen kriyojellerin sünger benzeri bir yapıya sahip oldukları, sıkıldıklarında ise gözeneklerindeki suyu kolayca verebildikleri gözlenmiştir.
- Kurutulmuş kriyojelin sulu ortama konulduğunda hızlı bir şekilde şiştiği ve birkaç dakika içinde orijinal boyutuna ulaştığı bulunmuştur.
- Jelleşme işlemi için polimerizasyon verimi % 90'lar civarında bulunurken baskılanmış kriyojellerin şişme oranları baskılanmamış olanlardan daha azdır. En yüksek şişme oranı ise 8.01 g H₂O/g kriyojel ile poli(HEMA) kriyojeldir.
- Kriyojellerin makrogözenekliliği % 70'ler civarında iken akış hızı özellikleri kriyojel yapısına giren MAH monomeri miktarını artışı ile artmıştır.
- Sentezlenen kriyojeller arasında 0,3 mmol MAH ve 10 mg karbonik anhidraz kullanılarak hazırlanan kriyojellerin en yüksek karbonik anhidraz adsorpsiyonu değerlerine sahip olduğu gözlenmiştir (2.65 mg/g kriyojel).
- Sentezlenen kriyojelin karakterizasyonu FTIR, SEM, elementel analiz ve yüzey alanı ölçümleri yapılarak gerçekleştirilmiştir.
- FTIR ve elementel analiz ölçümleri ile HEMA temelli kriyojel yapıya MAH monomerinin katıldığı gösterilmiştir.
- Kriyojellerin SEM fotoğrafları ile yapının oldukça gözenekli olduğu ve gözenek boyutunun 10-100 µm arasında değiştiği gözlenmiştir.
- Poli(HEMA) kriyojellerin spesifik yüzey alanının 23.6 m²/g olarak bulunurken CA baskılanmamış ve CA baskılanmış poli(HEMA-MAH) kriyojellerin spesifik yüzey alanları sırasıyla 27.9 ve 29.3 m²/g olarak bulunmuştur.

- Kriyojel kolona bağlanan karbonik anhidrazın desorpsiyonu işlemleri için 1.0 M NaCl içeren pH 4.0 asetat tamponu (0.1 M) kullanılmıştır.
- Karbonik anhidraz baskılanmış kriyojellere karbonik anhidraz adsorpsiyonuna pH'ın etkisi incelenmiş ve maksimum karbonik anhidraz adsorpsiyonu pH 6.5'da bulunmuştur. Bununla birlikte farklı tampon tiplerinin de etkisi incelenmiş ve pH 6.0 MES tamponu kullanılarak en yüksek adsorpsiyon oranlarına ulaşılmıştır.
- Karbonik anhidraz derişiminin adsorpsiyon üzerine etkisi incelenmiş ve artan karbonik anhidraz derişimi ile adsorpsiyon kapasitesinin arttığı fakat 0.5 mg/mL derişimden sonra bir doygunluk değerine ulaşılmıştır. Buna karşılık poli(HEMA) kriyojellerin ve baskılanmamış poli(HEMA-MAH) kriyojellerin adsorpsiyon kapasiteleri oldukça düşük olarak bulunmuştur.
- Derişim verilerinden yola çıkarak adsorpsiyon izotermleri incelenmiş ve Langmuir izoterminin daha uygun olduğu sonucu çıkarılmıştır.
- Ortam iyonik şiddetinin değiştirilmesi ile adsorpsiyona olan etkileri farklı tuzlar kullanılarak incelenmiş ve tüm tuz bileşenleri için artan iyonik şiddet ile (0-1.0 M) adsorpsiyon kapasitelerinin önemli oranda azaldığı bulunmuştur.
- Sıcaklığın adsorpsiyon kapasitesi üzerine çok önemli bir etkisi olmadığı ve 25 °C'de bir maksimuma sahip olduğu ifade edilmesine rağmen yüksek sıcaklıklarda enzimin denatüre olabileceğinden dolayı 25 °C'de çalışılmıştır.
- Kromatografik akış hızının artışı ile adsorplanan karbonik anhidraz miktarlarında azalma meydana gelmiştir.

- Gerçekleştirilen adsorpsiyon-desorpsiyon işlemleri sırasında enzimde meydana gelebilecek yapısal değişimler ve denatürasyonun incelenmesi amacıyla floresans spektroskopisi ölçümleri gerçekleştirilmiş ve başlangıç enzim çözeltisinin ve kriyojelden desorbe edilen enzim çözeltisinin her ikisinin de aynı uyarım ve yayım dalga boylarına sahip olduğu gözlenmiş ve enzimde herhangi bir yapısal değişimin olmadığı sonucu çıkarılmıştır.
- Sentezlenen kriyojel 10 döngü boyunca kullanılmış ve karbonik anhidraz adsorpsiyonu kapasitesi 10 döngü sonunda sadece % 10 oranında azalırken operasyonel kararlılıkları 10 döngü sonunda % 19 oranında azalmıştır.
- Kriyojelden desorbe edilen enzimin ısı kararlılığı incelendiğinde ise düşük sıcaklıklarda serbest enzime benzer özellikler sergilerken yüksek sıcaklıklarda immobilizasyonun da bir avantajı olarak kararlılığının önemli oranda arttığı gözlenmiştir.
- Sentezlenen kriyojelin karbonik anhidraz enzimine olan seçiciliği albumin, hemoglobin, IgG, γ -globulin ve lizozime karşı incelenmiş ve kriyojelin seçiciliği sırasıyla 15.26, 60.05, 21.88, 17.61 ve 17.42 kat yüksek bulunmuştur.
- Sentezlenen kriyojeller kullanılarak sıgır eritrositlerinden karbonik anhidraz enzimi saflaştırılmıştır. Saflaştırma işlemi sonunda karbonik anhidraz enzimi aktivite geri kazanımı % 79.41 ve saflaştırma katsayısı 83.98 olarak bulunmuştur. Enzimin saflığı SDS-PAGE ile gösterilirken enzimin aktif olduğu zimogram ile de gösterilmiştir.

Yapılan bu çalışma moleküler baskılama tekniği kullanılarak hazırlanan kriyojellerin enzim saflaştırılmasına yönelik kullanılmasındaki nadir örneklerdendir. Karbonik anhidrazın moleküler baskılama tekniği kullanılarak saflaştırılmasına yönelik ise literatürdeki ilk çalışma olacaktır. Geliştirilen bu teknik, fizyolojik olarak önemli ve kanser gibi birçok hastalık ile ilişkili olan karbonik anhidrazın basit ve hızlı bir şekilde saflaştırılmasına izin verecektir. Diğer karbonik anhidraz sınıflarının ve izozimlerinin de baskılanması çalışmaları

yapılarak bu enzimlerin saflaştırılması çalışmaları gerçekleştirilebilecektir. Karbonik anhidrazın hastalıklarla ilgili izozimlerinin hızlı bir şekilde saflaştırılması ile bu enzimleri inhibe edecek bileşiklerin araştırılması ve geliştirilmesi çalışmalarına ivme kazandırılacak ve hastalıkların tedavi edilmesi mümkün olacaktır. Ayrıca yeni CA izozimlerin ve sınıflarının saflaştırılması o enzimlerin katalitik etkinlikleri ve mekanizmaları hakkında yeni ve doğru bilgiler elde etmemizi sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- Akgöl, S., Bereli, N., Denizli, A. 2005. Magnetic dye affinity beads for the adsorption of β -casein. **Macromolecular Bioscience**, 5: 786-794.
- Akgöl, S., Özkara, S., Uzun, L., Yılmaz, F., Denizli, A. 2007. Pseudospecific magnetic affinity beads for immunoglobulin-G depletion from human serum. **Journal of Applied Polymer Science**, 106: 2405-2412.
- Alkan, H., Bereli, N., Baysal, Z., Denizli, A. 2009. Antibody purification with protein A attached supermacroporous poly(hydroxyethyl methacrylate) cryogel. **Biochemical Engineering Journal**, 45: 201-208.
- Altıntaş, E.B., Denizli, A. 2006. efficient removal of albumin from human serum by monosize dye-affinity beads. **Journal of Chromatography B**, 832: 216-223.
- Andaç, M., Galaev, I.Y., Denizli, A. 2012. Dye attached poly(hydroxyethyl methacrylate) cryogel for albumin depletion from human serum. **Journal of Separation Science**, 35: 1173-1182.
- Andaç, M., Plieva, F.M., Denizli, A., Galaev, I.Y., Mattiasson, B. 2008. Poly(hydroxyethyl methacrylate)-based macroporous hydrogels with disulfide cross-linker. **Macromolecular Chemistry and Physics**, 209: 577-584.
- Andersson, B., Nyman, P.O., Strid, L. 1972. Amino acid sequence of human erythrocyte carbonic anhydrase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 48: 670-677.
- Arshady, R., Mosbach, K. 1981. Synthesis of substrate-selective polymers by host-guest polymerization. **Die Makromolekulare Chemie**, 182: 687-692.
- Arvidson, P., Plieva, F.M., Lozinsky, V.I., Galaev, I.Y., Mattiasson, B. 2003. Direct chromatographic capture of enzyme from crude homogenate using immobilized metal affinity chromatography on a continuous supermacroporous adsorbent. **Journal of Chromatography A**, 986: 275-290.

- Aslıyüce, S., Bereli, N., Uzun, L., Onur, M.A., Say, R., Denizli, A. 2010. Ion-imprinted supermacroporous cryogel, for in vitro removal of iron out of human plasma with beta thalassemia. **Separation and Purification Technology**, 73: 243-249.
- Aslıyüce, S., Uzun, L., Rad, A.Y., Unal, S., Say, R., Denizli, A. 2012. Molecular imprinting based composite cryogel membranes for purification of anti-hepatitis B surface antibody by fast protein liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, 889-890: 95-102.
- Babac, C., Yavuz, H., Galaev, I.Y., Pişkin, E., Denizli, A. 2006. Binding of antibodies to concanavalin A-modified monolithic cryogel. **Reactive & Functional Polymers**, 66: 1263-1271.
- Baggiani, C., Baravalle, P., Giovannoli, C., Anfossi, L., Giraudi, G. 2010. Molecularly imprinted polymer/cryogel composites for solid-phase extraction of bisphenol A from river water and wine. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 397: 815-822.
- Baggiani, C., Giraudi, G., Trotta, F., Giovannoli, C., Vanni, A. 2000. Chromatographic characterization of a molecular imprinted polymer binding cortisol. **Talanta**, 51: 71-75.
- Banerjee, A.L., Swanson, M., Mallik, S., Srivastava, D.K. 2004. Purification of recombinant human carbonic anhydrase-II by metal affinity chromatography without incorporating histidine tags. **Protein Expression and Purification**, 37: 450-454.
- Baydemir, G., Bereli, N., Andaç, M., Say, R., Galaev, I.Y., Denizli, A. 2009a. Bilirubin recognition via molecularly imprinted supermacroporous cryogels. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 68: 33-38.
- Baydemir, G., Bereli, N., Andaç, M., Say, R., Galaev, I.Y., Denizli, A. 2009b. Supermacroporous poly(hydroxyethyl methacrylate) based cryogel with embedded bilirubin imprinted particles. **Reactive & Functional Polymers**, 69: 36-42.

- Belavtseva, E.M., Titova, E.F., Lozinsky, V.I., Vainerman, E.S., Rogozhin, S.V. 1984. Study of cryostructurization of polymer systems V. Electron microscopic studies of cross-linked polyacrylamide cryogels. **Colloid & Polymer Science**, 262: 775-779.
- Belyaeva, A.V., Smirnova, Y.A., Lysogorskaya, E.N., Oksenoit, E.S., Timofeeva, A.V. Lozinskii, V.I., Filippova, I.Y. 2008. Biocatalytic properties of thermolysis immobilized on polyvinyl alcohol cryogel. **Russian Journal of Bioorganic Chemistry**, 34: 435-441.
- Bereli, N., Andaç, M., Baydemir, G., Say, R., Galaev, I.Y., Denizli, A. 2008. Protein recognition via ion-coordinated molecularly imprinted supermacroporous cryogels. **Journal of Chromatography A**, 1190: 18-26.
- Bereli, N., Saylan, Y., Uzun, L., Say, R., Denizli, A. 2011. L-histidine imprinted supermacroporous cryogels for protein recognition. **Separation and Purification Technology**, 82: 28-35.
- Billakanti, J.M., Fee, C.J. Characterization of Cryogel monoliths for extraction of minor proteins from milk by cation exchange. **Biotechnology and Bioengineering**, 103: 1155-1163.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 72: 248-251.
- Burova, T.V., Grinberg, N.V., Kalinia, E.V., Ivanov, R.V., Lozinsky, V.I., Aşvarez-Lorenzo, C., Grinberg, V.Y. 2011. Thermo responsive copolymer cryogel possessing molecular memory: synthesis, energetics of collapse and interaction with ligands. **Macromolecular Chemistry and Physics**, 212: 72-80.
- Capasso, C., De Luca, V., Carginale, V., Caramuscio, P., Cavalheiro, C.F.N., Cannio, R. Rossi, M. 2012. Characterization and properties of a new thermoactive and thermostable carbonic anhydrase. **Chemical Engineering Transactions**, 27: 271-276.

- Ceyhun, S.B., Şentürk, M., Erdoğan, O., Küfrevioğlu, Ö.İ. 2010. In vitro and in vivo effects of some pesticides on carbonic anhydrase enzyme from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gills. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 97: 177-181.
- Ceyhun, S.B., Şentürk, M., Yerlikaya, E., Erdoğan, O., Küfrevioğlu, Ö.İ., Ekinci, D. 2011. Purification and characterization of carbonic anhydrase from the teleost fish *Dicentrarchus labrax* (European seabass) liver and toxicological effects of metal on enzyme activity. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 32: 69-74.
- Chen, W., Liu, F., Zhang, X., Li, K.A., Tong, S. 2001. The specificity of a chlorphenamine-imprinted polymer and its application. **Talanta**, 55: 29-34.
- Chen, Z.D., Wei, J.X., Wang, W.C. Kong, Y. 2010, Separation of tryptophan enantiomers with molecularly imprinted polypyrrole electrode column. **Chinese Chemical Letters**, 21: 353-356.
- Cincinelli, A. Martellini, T., Innocenti, A., Scozzafava, A., Supuran, C.T. 2011. Purification and inhibition studies with anions and sulfonamides of an α -carbonic anhydrase from the Antarctic seal *Leptonychotes weddellii*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 19: 1847-1851.
- Dai, C-M., Geissen, S-U., Zhang, Y-L., Zhang, Y-J., Zhou, X-F. 2011. Selective removal of diclofenac from contaminated water using molecularly imprinted polymer microspheres. **Environmental Pollution**, 159: 1660-1666.
- Dai, S., Burleigh, M.C., Shin, Y., Morrow, C.C., Barnes, C.E., Xue, Z. 1999. Imprint coating: A novel synthesis of selective functionalized ordered mesoporous sorbents. **Angewandte Chemie International Edition**, 38: 1235-1239.
- Dainiak, M.B., Galaev, I.Y., Kumar, A., Plieva, F.M., Mattiasson, B. 2007. Chromatography of living cells using supermacroporous hydrogels, cryogels. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, 106: 101-127.

- Dainiak, M.B., Galaev, I.Y., Mattiasson, B. 2006. Affinity cryogel monoliths for screening for optimal separation conditions and chromatographic separation of cells. **Journal of Chromatography A**, 1123: 145-150.
- Dainiak, M.B., Kumar, A., Plieva, F.M. Galaev, I.Y., Mattiasson, B., 2004. Integrated isolation of antibody fragments from microbial cell culture fluids using supermacroporous cryogels. **Journal of Chromatography A**, 1045: 93-98.
- Demir, N., Demir, Y. 1997b. Carbonic anhydrase from *Nicotiana tabacum* leaves. **Turkish Journal of Chemistry**, 21: 111-117.
- Demir, N., Demir, Y., Yıldırım, A. 1997a. Carbonic anhydrases from leaves and roots of *Daucus carota*. **Phytochemistry**, 44: 1247-1250.
- Demir, Y., Nadaroğlu, H., Demir, N. 2007. Purification and some properties of carbonic anhydrase from *Elephas trogontherii* (Steppe elephant) bone. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, 44: 252-256.
- Demiryas, N., Tüzmen, N., Galaev, I.Y., Pişkin, E., Denizli, A. 2007. Poly(acrylamide-allyl glycidyl ether) cryogel as a novel stationary phase in dye-affinity chromatography. **Journal of Applied Polymer Science**, 105: 1808-1816.
- Derazshamshir, A., Baydemir, G., Andaç, M., Say, R., Galaev, I.Y., Denizli, A. 2010. Molecularly imprinted PHEMA-based cryogel for depletion of hemoglobin from human blood. **Macromolecular Chemistry and Physics**, 211: 657-668.
- Derazshamshir, A., Ergün, B., Peşint, G., Odabaşı, M. 2008. Preparation of Zn²⁺-chelated poly(HEMA-MAH) cryogel for affinity purification of chicken egg lysozyme. **Journal of Applied Polymer Science**, 109: 2905-2913.
- Domsic, J.F., Avvaru, B.S., Kim, C.U., Gruner, S.M., McKenna, M.A., Silverman, D.N., McKenna, R. 2008. Entrapment of carbon dioxide in the active site of carbonic anhydrase. **The Journal of Biological Chemistry**, 283, 30766-30771.

- Domsic, J.F., McKenna, R. 2010. Sequestration of carbon dioxide by the hydrophobic pocket of the carbonic anhydrases. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1804: 326-331.
- Doretto, L., Ferrara, D., Gattolin, P., Lora, S., Schiavon, F., Veronese, F.M. 1998. PEG-modified glucose oxidase immobilized on a PVA cryogel membrane for amperometric biosensor applications. **Talanta**, 45: 891-898.
- Ekinci, D., Ceyhan, S.B., Şentürk, M., Erdem, D., Küfrevioğlu, Ö.İ., Supuran, C.T. 2011. characterization and anions inhibition studies of an α -carbonic anhydrase from teleost fish *Dicentrarchus labrax*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 19: 744-748.
- Erzengin, M., Ünlü, N., Odabaşı, M. 2011. A novel adsorbent for protein chromatography: supermacroporous monolithic cryogel embedded with Cu^{2+} -attached sporopollenin particles. **Journal of Chromatography A**, 1218: 484-490.
- Fernandez-Alvarez, P., Le Noir, M., Guieysse, B., 2008. Removal and destruction of endocrine disrupting contaminants by adsorption with molecularly imprinted polymers followed by simultaneous extraction and phototreatment. **Journal of Hazardous Materials**, 163: 1107-1112.
- Gao, B., Niu, Q., Du, R. 2010. Preparation and recognition performance of cytosine alkaloid-imprinted material prepared using navel surface molecular imprinting technique. **Journal of Separation Science**, 33: 1338-1348.
- Gilmour, K.M. 2010. Perspectives on carbonic anhydrase. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 157: 193-197.
- Gradadolnik, J. 2003. Infrared difference spectroscopy: Part I. Interpretation of the difference spectrum. **Vibrational Spectroscopy**, 31: 279-288.
- Guliev, N.M., Babaev, G.G., Bairamov, Sh.M., Aliev, D.A. 2003. Purification, Properties and Localization of two carbonic anhydrase from *Amaranthus cruentus* leaves. **Russian Journal of Plant Physiology**, 50: 213-219.

- Hajizadeh, S., Kirsebom, H., Galaev, I.Y., Mattiasson, B. 2010. Evaluation of selective composite cryogel for bromate removal from drinking water. **Journal of Separation Science**, 33: 1752-1759.
- Hakansson, K., Carlsson, M., Svensson, L.A., Liljas, A. 1992. Structure of native and apo carbonic anhydrase II and structure of some of its anion-ligand complexes. **Journal of Molecular Biology**, 277: 1192-1204.
- Hakansson, K., Wehnert, A., Liljas, A. 1994. X-ray analysis of metal-substituted human carbonic anhydrase II derivatives. **Biological Crystallography**, 50: 93-100.
- Hanora, A., Plieva, F.M., Hedström, M., Galaev, I.Y., Mattiasson, B. 2005. Capture of bacterial endotoxins using a supermacroporous monolithic matrix with immobilized polyethyleneimine lysozyme or polymyxin B. **Journal of Biotechnology**, 118: 421-433.
- Hedström, M., Plieva, F., Galaev, I.Y., Mattiasson, B. 2008. Monolithic macroporous albumin/chitosan cryogel structure: a new matrix for enzyme immobilization. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 390: 907-912.
- Henderson, L.E., Henriksson, D., Nyman, P.O. 1973. Amino acid sequence of human erythrocyte carbonic anhydrase C. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 52: 1388-1394.
- Henderson, L.E., Henriksson, D., Nyman, P.O. 1976. Primary structure of human carbonic anhydrase C. **The Journal of Biological Chemistry**, 251: 5457-5463.
- Hisar, O., Beydemir, Ş., Bülbül, M., Yanık, T. 2006. Kinetic properties of carbonic anhydrase purified from gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Journal of Applied Animal Research**, 30: 185-188.
- Hosseinkhani, S., Gorgani, M.N. 2003. Partial unfolding of carbonic anhydrase provides a method for its immobilization on hydrophobic adsorbents and protects it against irreversible thermoinactivation. **Enzyme and Microbial Technology**, 33: 179-184.

- Hove, E., Elvehjem, C.A., Hart E.B. 1940. The relation of zinc to carbonic anhydrase. **Journal of Biological Chemistry**, 136: 425-434.
- Innocenti, A., Zimmerman, S., Ferry, J.G., Scozzafava, A., Supuran, C.T. 2004. Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of the zinc and cobalt γ -class enzyme from the archaeon *Methanosarcina thermophila* with anions. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 14: 3327-3331.
- Iverson, T.M., Alber, B.E., Kisker, C., Ferry, J.G., Rees, D.C. 2000. A closer look at the active site of γ -class carbonic anhydrases: High-resolution crystallographic studies of the carbonic anhydrase from *Methanosarcina thermophila*. **Biochemistry**, 39: 9222-9231.
- Janiak, D.S., Kofinas, P. 2007. Molecular imprinting of peptides and proteins in aqueous media. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 389: 399-404.
- Jiang, W., Su, H., Huo, H., Tan, T. 2010. Synthesis and properties of surface molecular imprinting adsorbent for removal of Pb^{2+} . **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 160: 467-476.
- Kanan, K.K., Notstrand, B., Fridborg, K., Lövgren, S., Ohlsson, A., Petef, M. 1975. Crystal structure of human erythrocyte carbonic anhydrase B. Three-dimensional structure at a nominal 2.2-Å resolution. **Proceedings of The National Academy Sciences**, 72: 51-55.
- Karlsson, J., Hiltonen, T., Husic, H.D., Ramazanov, Z., Samuelsson, G. 1995. Intracellular carbonic anhydrase of *Chlamydomonas reinhardtii*. **Plant Physiology**, 109: 533-539.
- Kecili, R., Say, R., Ersöz, A., Hür, D., Denizli, A. 2012. Investigation of synthetic lipase and its use in transesterification reactions. **Polymer**, 53: 1981-1984.
- Keilin, D., Mann, T. 1940. Carbonic anhydrase. Purification and nature of the enzyme. **Biochemical Journal**, 34: 1163-1176.
- Koç, İ., Baydemir, G., Bayram, E., Yavuz, H., Denizli, A. Selective removal of 17β -estradiol with molecularly imprinted particle-embedded cryogel system. **Journal of Hazardous Materials**, 192: 1819-1826.

- Komiyama, M., Takeuchi, T., Mukawa, T., Asanuma, H. 2003. Molecular Imprinting. From Fundamentals to Applications. Wiley, Weinheim.
- Kostova, B., Momekova, D., Petrov, P., Momekov, G., Toncheva-Moncheva, N., Tsvetanov, C.B., Lambov, N. 2011. Poly(ethoxytriethyleneglycol acrylate) cryogels as novel sustained drug release system for oral application. **Polymer**, 52: 1217-1222.
- Krebs, H.A. 1948. Inhibition of carbonic anhydrase by sulphonamides. **Biochemical Journal**, 43:525-528.
- Krungskrai, S.R., Suraveratum, N., Rochanakij, S., Krungskrai, J. 2001. Characterization of carbonic anhydrase in *Plasmodium falciparum*. **International Journal of Parasitology**, 31: 661-668.
- Kuchen, W., Schram, J. 1988. Metal-ion selective exchange resins by matrix imprint with methacrylates. **Angewandte Chemie International Edition**, 27: 1695-1697.
- Kumar, A., Bansal, V., Andersson, J., Roychoudhury, P.K., Mattiasson, B. 2006. Supermacroporous cryogel matrix for integrated protein isolation. Immobilized metal affinity chromatographic purification of urokinase from cell culture broth of a human kidney cell line. **Journal of Chromatography A**, 1103: 35-42.
- Kumar, A., Caballero, A.R., Plieva, F.M., Galaev, I.Y., Nandakumar, K.S., Kamihira, M., Holmdahl, R., Orfao, A., Mattiasson, B., 2005. Affinity binding of cells to cryogel adsorbents with immobilized specific ligands: effect of ligand coupling and matrix architecture. **Journal of Molecular Recognition**, 18: 84-93.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structure protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227: 690-685.
- Lasakova, M., Jandera, P. 2009. Molecularly imprinted polymers and their application in solid phase extraction. **Journal of Separation Science**, 32: 799-812.

- Le Noir, M., Plieva, F., Hey, T., Guieysse, B., Mattiasson, B. 2007. Macroporous molecularly imprinted polymer/cryogel composite system for the removal of endocrine disrupting trace contaminants. **Journal of Chromatography A**, 1154: 158-164.
- Liljas, A., Kanan, K.K., Bergsten, P.C., Waara, I., Fridborg, K., Strandberg, B., Carlbom, U., Jarup, L., Lövgren, S., Petef, M. 1972. Crystal structure of human carbonic anhydrase C. **Nature New Biology**, 235: 131-137.
- Lin, K.D., Deutsch, H. 1973. Human carbonic anhydrase-XI. The complete primary structure of carbonic anhydrase B. **The Journal of Biological Chemistry**, 248: 1885-1893.
- Lin, K.D., Deutsch, H. 1974. Human carbonic anhydrase-XII. The complete primary structure of the C isozyme. **The Journal of Biological Chemistry**, 249: 2329-2337.
- Lindskog, S. 1997. Structure and mechanism of carbonic anhydrase. **Pharmacology & Therapeutics**, 74: 1-20.
- Liu, J., Deng, Q., Yang, K., Zhang, L., Liang, Z., Zhang, Y. 2010. Macroporous molecularly imprinted monolithic polymer columns for protein recognition by liquid chromatography. **Journal of Separation Science**, 33: 2757-2761.
- Lozinsky, V.I., Vainerman, E.S., Ivanova, S.A., Titova, E.F., Shtilman, M.I., Belavtseva, E.M., Rogozhin, S.V. 1986. Study of cryostructurization of polymer systems. VI. The influence of the process temperature on the dynamics of formation and structure of cross-linked polyacrylamide cryogels. **Acta Polymerica**, 37: 142-146.
- Lozinsky, V.I., Galaev, I.Y., Plieva, F.M., Savina, I.N., Jungvid, H., Mattiasson, B. 2003. Polymeric cryogels as promising materials of biotechnological interest. **TRENDS in Biotechnology**, 21: 445-451.
- Lozinsky, V.I., Plieva, F.M., Galaev, I.Y., Mattiasson, B. 2002. The potential of polymeric cryogels in bioseparation. **Bioseparation**, 10: 163-188.

- Lozinsky, V.I., Vainerman, E.S., Korotaeva, G.F., Rogozhin, S.V. 1984a. Study of cryostructurization of polymer systems III. Cryostructurization in organic media. **Colloid & Polymer Science**, 262: 617-622.
- Lozinsky, V.I., Vainerman, E.S., Rogozhin, S.V. 1982. Study of cryostructurization of polymer systems II. The influence of freezing of a reacting mass on the properties of products in the preparation of covalently cross-linked gels. **Colloid & Polymer Science**, 260: 776-780.
- Lozinsky, V.I., Vainerman, E.S., Titova, E.F., Belavtseva, E.M., Rogozhin, S.V. 1984. Study of cryostructurization of polymer systems IV. Cryostructurization of the system: Solvent-vinyl monomer-divinyl monomer-initiator of polymerization. **Colloid & Polymer Science**, 262: 769-774.
- Lusta, K.A., Starostina, N.G., Gorkina, N.B., Fikhte, B.A., Lozinsky, V.I. 1988. Immobilization of E. coli cells in polyacrylamide-based microporous cryogels. **Prikladnaia Biokhimiia Mikrobiologia**, 24: 504-513.
- Manchenko, G.P. 2003. Handbook of Detection of Enzymes on Electrophoretic Gels. CRC Press, 482-483, Boca Raton, ABD.
- Markvicheva, E.A., Lozinsky, V.I., Plieva, F.M., Kochetkov, K.A., Rumsh, L.D., Zubov, V.P., Maity, J., Kumar, R., Parmar, V.S., Belokon, Y.N. 2005. Gel-immobilized enzymes as promising biocatalysts: Results from Indo-Russian collaborative studies. **Pure and Applied Chemistry**, 77: 227-236.
- Matsui, J., Fujiwara, K., Ugata, S., Takeuchi, T. 2000. Solid-phase extraction with a dibutylmelamine-imprinted polymer as triazine herbicide-selective sorbent. **Journal of Chromatography A**, 889: 25-31.
- Meldrum, N.U., Roughton, F.J.W. 1933. Carbonic anhydrase. Its preparation and properties. **The Journal of Physiology**, 80: 113-142.
- Miller, W.H., Dessert, A.M., Roblin, R.O. 1950. Heterocyclic sulfonamides as carbonic anhydrase inhibitors. **Journal of American Chemical Society**, 72: 4893-4896.

- Mitsuhashi, S., Mizushima, T., Yamashita, E., Yamamoto, M., Kumasaka, T., Moriyama, H., Ueki, T., Miyachi, S., Tsukihara, T. 2000. X-ray structure of β -carbonic anhydrase from the red alga, *Porphyridium purpureum*, reveals a novel catalytic site for CO₂ hydration. **The Journal of Biological Chemistry**, 275: 5521-5526.
- Miyamoto, H., Miyashita, T., Okushima, M., Nakano, S., Morita, T., Matsushiro, A. 1996. A carbonic anhydrase from the nacreous layer in oyster pearls. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 93: 9657-9660.
- Nilsang, S., Nandakumar, K.S., Galaev, I.Y., Rakshit, S.K., Holmdahl, R., Mattiasson, B., Kumar, A. 2007. Monoclonal antibody production using a new supermacroporous cryogel bioreactor. **Biotechnology Progress**, 23: 932-939.
- Noppe, W., Plieva, F.M., Vanhoorelbeke, Deckmyn, H., Tuncel, M., Tuncel, A., Galaev, I.Y., Mattiasson, B. 2007. Macroporous monolithic gels, cryogels, with immobilized phages from phage-display library as a new platform for fast development of affinity adsorbent capable of target capture from crude feeds. **Journal of Biotechnology**, 131: 293-299.
- Ores, J.C., Sala, L., Cerveira, G.P., Kalil, S.J. 2012. Purification of carbonic anhydrase from bovine erythrocytes and its application in the enzymatic capture of carbon dioxide. **Chemosphere**, 88: 255-259.
- Orrego, C.E., Valencia, J.S. 2009. Preparation and characterization of chitosan membranes by using a combined freeze gelation and mild crosslinking method. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, 32: 197-206.
- Özdemir, E. 2009. Biomimetic CO₂ sequestration : 1. Immobilization of carbonic anhydrase within polyurethane foam. **Energy Fuels**, 23: 5725-5730.
- Ozensoy, O. Arslan, O., Sinan, S.O. 2004. A new method for purification of carbonic anhydrase isozymes by affinity chromatography. **Biochemistry (Moscow)**, 69: 216-219.

- Özgür, E., Bereli, N., Türkmen, D., Ünal, S., Denizli, A. 2011. PHEMA cryogel for in-vitro removal of anti-dsDNA antibodies from SLE plasma. **Materials Science and Engineering C**, 31: 915-920.
- Papancea, A., Valente, A.J.M. Patachia, S. 2010. PVA cryogel membranes as a promising tool for the retention and separation of metal ions from aqueous solutions. **Journal of Applied Polymer Science**, 118: 1567-1573.
- Papancea, A., Valente, A.J.M., Patachia, S., Miguel, M.G., Lindman, B. 2008. PVA-DNA cryogel membranes: characterization, swelling and transport studies. **Langmuir**, 24: 273-279.
- Peppas, N.A. 1975. Turbidimetric studies of aqueous poly(vinyl alcohol) solution. **Die Makromolekulare Chemie**, 176: 3433-3440.
- Perçin, I., Sağlar, E., Yavuz, H., Aksöz, E., Denizli, A. 2011. Poly(hydroxyethyl methacrylate) based affinity cryogel for plasmid DNA purification. **International Journal of Biological Macromolecules**, 48: 577-582.
- Petermann, M.L., Hakala, N.V. 1942. Molecular kinetic and electrophoretic studies on carbonic anhydrase. **Journal of Biological Chemistry**, 145: 701-705.
- Plieva, F.M., Galaev, I.Y., Mattiasson, B. 2007. Macroporous gels prepared at subzero temperatures as novel materials for chromatography of particulate-containing fluids and cell culture applications. **Journal of Separation Science**, 30: 1657-1671.
- Plieva, F.M., Galaev, I.Y., Noppe, W., Mattiasson, B. 2008. Cryogel application in microbiology. **Trends in Microbiology**, 16: 543-551.
- Plieva, F.M., Savina, I.N., Deraz, S., Andersson, J., Galaev, I.Y., Mattiasson, B. 2004. Characterization of supermacroporous monolithic polyacrylamide based matrices designed for chromatography of bioparticles. **Journal of Chromatography B**, 807: 129-137.

- Pocker, Y., Meany, J.E. 1965a. The catalytic versatility of carbonic anhydrase from erythrocytes. The enzyme-catalyzed hydration of acetaldehyde. **Journal of American Chemical Society**, 87: 1809-1811.
- Pocker, Y., Meany, J.E. 1965b. The catalytic versatility of erythrocyte carbonic anhydrase. I. Kinetic studies of the enzyme-catalyzed hydration of acetaldehyde. **Biochemistry**, 4: 2535-2541.
- Pocker, Y., Beug, M.W. 1972. Kinetic studies of bovine carbonic anhydrase catalyzed hydrolyses of para-substituted phenyl esters. **Biochemistry**, 11: 698-707.
- Pocker, Y., Ng, J.S.Y. 1973. Properties and carbon dioxide hydration kinetics. **Biochemistry**, 12: 5127-5134.
- Prasanna, R.R., Vijayalakshmi, M.A. 2010. Characterization of metal chelate methacrylate monolithic disk for purification of polyclonal and monoclonal immunoglobulin G. **Journal of Chromatography A**, 1217: 2660-3667.
- Ramanan, R., Kannan, K. Sivanesan, S.D., Mudliar, S., Kaur, S., Tripathi, A.K., Chakrabarti, T. 2009. Bio-sequestration of carbon dioxide using carbonic anhydrase enzyme purified from *Citrobacter freundii*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 25: 981-987.
- Rashid, B.A., Briggs, R.J., Hay, J.N., Stevenson, D. 1997. Preliminary evaluation of a molecular imprinted polymer for solid-phase extraction of tamoxifen. **Analytical Communications**, 34: 303-305.
- Reddy, P.S., Kobayashi, T., Abe, M., Fujii, N. 2002. Molecular imprinted nylon-6 as a recognition material of amino acids. **European Polymer Journal**, 38: 521-529.
- Rickli, E.E., Ghazanfar, S.A.S., Gibbons, B.H., Edsall, J.T. 1964. Carbonic anhydrases from human erythrocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, 239: 1065-1078.
- Roberts, S.B. 1997. Carbonic anhydrase in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii* (*Bacillariophyceae*). **Journal of Phycology**, 33: 845-850.

- Sawaya, M.R., Cannon, G., Heinhorst, S., Tanaka, S., Williams, E.B., Yeates, T.O., Kerfeld, C.A. 2006. The structure of β -carbonic anhydrase from the carboxysomal shell reveals a distinct subclass with one active site for the price of two. **The Journal of Biological Chemistry**, 281: 7546-7555.
- Sellergren, B., Lepistö, M., Mosbach, K. 1988. Highly enantioselective and substrate-selective polymers obtained by molecular imprinting utilizing noncovalent interactions. NMR and chromatographic studies on the nature of recognition. **Journal of American Chemical Society**, 110: 5853-5960.
- Sender, S., Böttcher, K., Cetin, Y., Gros, G. 1999. Carbonic anhydrase in the gills of seawater and freshwater-acclimated flounders *Platichthys flesus*: Purification, characterization and immunohistochemical localization. **The Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, 47: 43-50.
- Şener, G., Uzun, L., Say, R., Denizli, A. 2011. Use of molecular imprinted nanoparticles as biorecognition element on surface plasmon resonance sensor. **Sensors and Actuators B: Chemical**, 160: 791-799.
- Şentürk, M., Gülçin, İ., Daştan, A., Küfrevioğlu, Ö.İ., Supuran, C.T. 2009. Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of human erythrocyte isozyme I and II with a series of antioxidant phenols. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 17: 3207-3211.
- Sharma, A., Bhattacharya, A., Singh, S. 2009. Purification and characterization of an extracellular carbonic anhydrase from *Pseudomonas fragi*. **Process Biochemistry**, 44: 1293-1297.
- Shea, K.J., Dougherty, T.K. 1986. Molecular recognition on synthetic amorphous surfaces. The influence of functional group positioning on the effectiveness of molecular recognition. **Journal of American Chemical Society**, 108: 1091-1093.
- Sly, W.S., Hu, P.Y. 1995. Human carbonic anhydrase and carbonic anhydrase deficiencies. **Annual Review of Biochemistry**, 64: 375-401.

- Smrekar, F., Ciringer, M., Ales, S., Podgornik, A. 2011. Characterization of methacrylate monoliths for bacteriophage purification. **Journal of Chromatography A**, 1218: 2438-2444.
- Stadie, W.C., O'Brien, H. 1933. The Catalysis of the hydration of carbon dioxide and dehydration of carbonic acid by an enzyme isolated from red blood cells. **The Journal of Biological Chemistry**, 103: 521-529.
- Stanescu, M.D., Fogorasi, M., Shaskolskiy, B.L., Gavrilas, S., Lozinsky, V.I. 2010. New potential biocatalysts by laccase immobilization in PVA cryogel type carrier. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 160: 1947-1954.
- Sun, S., Tang, Y., Fu, Q., Liu, X., Du, W., Guo, L., Zhao, Y. 2012b. Preparation of agarose/chitosan composite supermacroporous monolithic cryogels for affinity purification of glycoproteins. **Journal of Separation Science**, 35: 893-900.
- Sun, S., Tang, Y., Fu, Q., Liu, X., Guo, L., Zhao, Y., Chang, C. 2012a. Monolithic cryogels made of agarose-chitosan composite and loaded with agarose beads for purification of immunoglobulin G. **International Journal of Biological Macromolecules**, 50: 1002-1007.
- Supuran, C.T. 2010. Carbonic anhydrase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 20: 3467-3474.
- Supuran, C.T., Scozzafava, A. 2007. Carbonic anhydrase as targets for medicinal chemistry. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 15: 4336-4350.
- Supuran, C.T., Scozzafava, A., Casini, A. 2003. Carbonic anhydrase inhibitors. **Medicinal Research Reviews**, 23: 146-189.
- Supuran, C.T., Scozzafava, A., Conway, J. 2004. Carbonic Anhydrase. Its Inhibitors and Activators. CRC Press, Boca Raton.
- Tamahkar, E., Bereli, N., Say, R., Denizli, A. 2011. Molecularly imprinted supermacroporous cryogels for cytochrome *c* recognition. **Journal of Separation Science**, 34: 3433-3440.

- Tashian, R.E., Hewett-Emmett, D. 1984. *Biology and Chemistry of The Carbonic Anhydrase*. The New York Academy of Science, New York.
- Tripathi, A., Kumar, A. 2011. Multi-featured macroporous agarose-alginate cryogel: synthesis and characterization for bioengineering applications. **Macromolecular Bioscience**, 11: 22-35.
- Tripp, B.C., Smith, K., Ferry, J.G. 2001. Carbonic anhydrase: New insights for an ancient enzyme. **The Journal of Biological Chemistry**, 276: 48615-48618.
- Turner, N.W., Jeans, C.W., Brain, K.R., Allender, C.J., Hlady, V., Britt, D.W. 2006. From 3D to 2D: A review of the molecular imprinting of proteins. **Biotechnology Progress**, 22: 1474-1489.
- Vainerman, E.S., Lozinsky, V.I., Rogozhin, S.V. 1981. Study of cryostructurization of polymer systems I. Structure formation in solutions of thiol-containing polymers under freezing-thawing. **Colloid & Polymer Science**, 259: 1198-1201.
- Vlatakis, G., Andersson, L.I., Muller, R., Mosbach, K. 1993. Drug assay using antibody mimics made by molecular imprinting. **Nature**, 361: 645-647.
- Walshe, M., Howarth, J., Kelly, M.T., O'Kennedy, R., Smyth, M.R. 1997. The preparation of a molecular imprinted polymer to 7-hydroxycoumarin and its use as a solid-phase extraction material. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 16: 319-325.
- Wang, L., Shen, S., He, X., Yun, J., Yao, K., Yao, S.J. 2008. Adsorption and elution behaviors of bovine serum albumin in metal-chelated affinity cryogel beds. **Biochemical Engineering Journal**, 42: 237-242.
- Whitney, P.L., Briggler, T. 1982. Membrane-associated carbonic anhydrase purified from bovine lung. **The Journal of Biological Chemistry**, 257: 12056-12059.

- Wulff, G., Grobe-Einsler, R., Sarhan, A. 1977. Enzyme-analogue built polymers, 4. On the synthesis of polymers containing chiral cavities and their use for the resolution of racemates. **Die Makromolekulare Chemie**, 178: 2799-2816.
- Xie, C., Zhou, H., Gao, S., Li, H. 2010. Molecular imprinting method for on-line enrichment and chemiluminescent detection of the organophosphate pesticide triazophos. **Microchimica Acta**, 171: 355-362.
- Yan, C., Shen, S., Yun, J., Wang, L., Yao, K., Yao, S.J. 2008. Isolation of ATP from a yeast fermentation broth using cryogel column at high flow velocities. **Journal of Separation Science**, 31: 3879-3883.
- Yan, M., Ramström, O. 2005. *Molecularly Imprinted Materials*. Science and Technology. Marcel Dekker, New York.
- Yao, K., Yun, J., Shen, S., Wang, L., He, X., Yu, X. 2006. Characterization of a novel continuous supermacroporous monolithic cryogel embedded with nanoparticles for protein chromatography. **Journal of Chromatography A**, 1109: 103-110.
- Yilmaz, F., Bereli, N., Yavuz, H., Denizli, A. 2009. Supermacroporous hydrophobic affinity cryogels for protein chromatography. **Biochemical Engineering Journal**, 43: 272-279.
- Yu, Z., Xie, L., Lee, S., Zhang, R. 2006. A novel carbonic anhydrase from the mantle of the pearl oyster (*Pinctada fucata*) **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**, 143: 190-194.
- Zhang, H., Ye, L., Mosbach, K. 2006. Non-covalent molecular imprinting with emphasis on its application in separation and drug development. **Journal of Molecular Recognition**, 19: 248-259.
- Zhang, Y-T, Zhi, T-T, Zhang, L., Huang, H., Chen, H-L. 2009. Immobilization of carbonic anhydrase by embedding and covalent coupling into nanocomposite hydrogel containing hydrotalcite. **Polymer**, 50: 5693-5700.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Murat UYGUN
Doğum Yeri ve Tarihi : AYDIN-07.12.1978

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyokimya Bölümü
Yüksek Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri
Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı
Doktora Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri
Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı
Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

a) Makaleler

-SCI

1. Akgöl, S., Öztürk, N., Karagözler, A.A., Uygun, D.A., Uygun, M., Denizli, A. "A New Metal-Chelated Beads for Reversible Use in Uricase Adsorption". Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 51, 36-41 (2008).

2. Uygun, D.A., Uygun, M., Karagözler, A., Öztürk, N., Akgöl, S., Denizli, A. "A novel support for antibody purification: Fatty acid attached chitosan beads". Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 70, 266-270 (2009).

3. Avcıbaşı, N., Uygun, M., Çorman, M.E., Akgöl, S., Denizli, A. "Application of Supermacroporous Monolithic Hydrophobic Cryogel in Capturing of Albumin". Applied Biochemistry and Biotechnology, 162, 2232-2243 (2010).

4. Demiral, M.A., Uygun, D.A., Uygun, M., Kasirga, E., Karagözler, A.A. "Biochemical response of *Olea europaea* cv. Gemlik to short-term salt stress". Turkish Journal of Biology, 35, 433-442 (2011).

-Diğer

b) Bildiriler

-Uluslar arası

1. Uygun, M., Karagözler, A.A., Uygun, D.A. Immobilization of α -amylase onto PVA-alginate beads. International Enzyme Engineering Symposium, Ege Üniversitesi, Kuşadası, 01-05 Ekim 2008, (Poster).

2. Demiral, M.A., Karagözler, A.A., Doğru, S., Uygun, D.A., Bağcı, Y., Uygun, M. Status of some chemical and biochemical parameters of *Salvia Halophila* hedge (Lamiaceae). International Meeting on Soil Fertility Land Management and Agroclimatology, Kuşadası, 29 October-1 November 2008, (Poster).

3. Uygun M., Uygun D.A., Karagözler A.A., Aktaş K. Antioxidant activity of *Petrorhagia lycica* (Davis) Ball & Heywood leaf extracts. 6th CMAPSEEC (6th Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries), Gazi Üniversitesi, Antalya, 18-22 Nisan 2010, (Poster).

4. Uygun D.A., Uygun M., Karagözler A.A., Aktaş K., Özdemir C., Özkan M. Antioxidant activity of *Salvia tchihatcheffii* (Fisch. & Mey.) Boiss. leaf extracts. 6th CMAPSEEC (6th Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries), Gazi Üniversitesi, Antalya, 18-22 Nisan 2010, (Poster).

5. Çetinyürek F., Yavaşer R., Uygun M., Karagözler A.A. Investigation of antioxidant properties of *Myrtus communis* FRUIT. 6th CMAPSEEC (6th Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries), Gazi Üniversitesi, Antalya, 18-22 Nisan 2010, (Poster).

6. Uygun M., Uygun D.A., Sunna Ç., Karagözler A.A., Aktaş K. Antioxidant activity of *Phlomis lycia* D.Don leaf extracts. 6th CMAPSEEC (6th Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries), Gazi Üniversitesi, Antalya, 18-22 Nisan 2010, (Poster).

7. Uygun M., Karagözler A.A., Denizli A. Molecularly Imprinted Cryogel for Purification of Carbonic Anhydrase from Bovine Erythrocyte. The 9th International Conference on Carbonic Anhydrase, Atatürk Üniversitesi, Antalya, 11-15 April 2012, (Poster).

-Ulusal

1. Aktaş D., Uygun M., Karagözler A.A. Bitki Karbonik Anhidraz Enziminin Kısmi Saflaştırılmasına Kromatografik İşlem Sırasının Etkisi. V. Ulusal Kromatografi Kongresi, Anadolu Üniversitesi, Eskişehir, 30 Haziran - 2 Temmuz 2004 (Poster).

2. Karagözler A.A., Aktaş D., Uygun M., Kavas C., Kırgil A. Zeytin (*Olea europaea* L.) yaprağının antioksidan özelliklerinin incelenmesi. XIX. Ulusal Kimya Kongresi, Ege Üniversitesi, Kuşadası, 30 Eylül – 4 Ekim 2005 (Poster).

3. Karagözler A.A., Aktaş D., Uygun M., Ak E., Yücecengiz Ç. Isırgan Otu (*Urtica dioica* L.) yaprağının antioksidan özelliklerinin incelenmesi. XIX. Ulusal Kimya Kongresi, Ege Üniversitesi, Kuşadası, 30 Eylül – 4 Ekim 2005 (Poster).

4. Karagözler A.A., Uygun M., Aktaş D., Caba S., Hacıoğlu C. Kekik bitkisinin antioksidan özelliklerinin incelenmesi. XIX. Ulusal Kimya Kongresi, Ege Üniversitesi, Kuşadası, 30 Eylül – 4 Ekim 2005 (Poster).

5. Karagözler A.A., Uygun M., Aktaş D., Öztürk N. Kapari (*Capparis spinosa* L.) tomurcuklarının antioksidan özelliklerinin incelenmesi. XIX. Ulusal Kimya Kongresi, Ege Üniversitesi, Kuşadası, 30 Eylül – 4 Ekim 2005 (Poster).

6. Uygun D.A., Öztürk N., Uygun M., Karagözler A.A., Akgöl S., Denizli A. Reaktif imidazol grubu taşıyan metal-şelat afinite mikrokürelere ürikaz immobilizasyonu. VI. Ulusal Kromatografi Kongresi, Dokuz Eylül Üniversitesi, İzmir, 28-30 Haziran 2006 (Sözlü Sunum).

7. Uygun D.A., Karagözler A.A., Başbülbul G., Uygun M., Oryaşın E. Aydın yöresinden toplanan zeytin yaprağı (*Olea europaea* L.) ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitelerinin incelenmesi. 18. Ulusal Biyoloji Kongresi, Adnan Menderes Üniversitesi, Kuşadası, 26-30 Haziran 2006 (Poster).

8. Uygun M., Karagözler A.A., Başbülbul G., Uygun D.A., Bıyık H.H. Aydın yöresinden toplanan Kapari (*Capparis spinosa* L.) ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitelerinin incelenmesi. 18. Ulusal Biyoloji Kongresi, Adnan Menderes Üniversitesi, Kuşadası, 26-30 Haziran 2006 (Poster).

9. Karagözler A.A., Uygun D.A., Uygun M. *Opopanax hispidus* (Friv.) Gris. (Sarı Ot) ve *Rosemarinus officinalis* L. (Biberiye)'nin antioksidan kapasitelerinin ve prolin düzeylerinin incelenmesi. XX. Ulusal Kimya Kongresi, Erciyes Üniversitesi, Kayseri, 04-08 Eylül 2006 (Poster).

10. Uygun M., Karagözler A.A. *Aspergillus niger* ATCC 9642'nin Ca-Alginat Küreleri Üzerine İmmobilizasyon Koşullarının Optimizasyonu. XX. Ulusal Kimya Kongresi, Erciyes Üniversitesi, Kayseri, 04-08 Eylül 2006 (Poster).

11. Uygun D.A., Uygun M., Karagözler A.A., Akgöl S. Linoleik asit ile modifiye edilmiş kitosan partiküllere immunoglobulin G'nin bağlanması. 21. Ulusal Kimya Kongresi, İnönü Üniversitesi, Malatya, 23-27 Ağustos 2007 (Poster).

12. Acar D.Ö, Uygun M., Uygun D.A., Karagözler A.A. Malatya ve Aydın yöresi kiraz ağacı yapraklarının bazı antioksidan özellikleri. 21. Ulusal Kimya Kongresi, İnönü Üniversitesi, Malatya, 23-27 Ağustos 2007 (Poster).

13. Uygun M., Başbülbul G., Karagözler A.A. Alangüllü (Germencik/Aydın) termal kaynağından izole edilen *Geobacillus thermoglucosidasius* HBB.269'un boya giderme kapasitesinin incelenmesi. 21. Ulusal Kimya Kongresi, İnönü Üniversitesi, Malatya, 23-27 Ağustos 2007 (Poster).

14. Uygun, M., Öztürk, N., Karagözler, A.A., Akgöl, S. Preparation of Fe(III) Attached Poly(Alginate-Chitosan) Microparticles for Ferritin Adsorption. IV. Ulusal Afinite Teknikleri Kongresi, Muğla Üniversitesi, Marmaris, 4-7 Mayıs, 2008 (Sözlü).

15. Uygun, M., Karagözler, A.A. Aspergillus niger ATCC 9642'nin Ca-Alginat Küreler Üzerine İmmobilizasyonu ve ES Blue 4BL ve ES Red BWS Boyalarının Gideriminde Kullanılmasının Araştırılması. XXII. Ulusal Kimya Kongresi, Doğu Akdeniz Üniversitesi, Mağusa, 06-10 Ekim, 2008 (Poster).

16. Karagözler A.A., Uygun D.A., Uygun M., Gökbulut C. Bazı bitkilerde HPLC ile melatonin analizi. Kromatografi 2009, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Trabzon, 26-29 Eylül 2009, (Poster).

17. Gökbulut C., Uygun M., Uygun D.A., Karagözler A.A. Melatonin ve bazı indol bileşiklerinin HPLC ile yan yana analizi. Kromatografi 2009, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Trabzon, 26-29 Eylül 2009, (Poster).

18. Uygun M., Öztürk N., Özçalışkan E., Akgöl S., Denizli A. Kriyojel Matrikste Lektin Afinitite Etkileşimleri ile Sukroz Hidrolizi. VI. Ulusal Afinitite Teknikleri Kongresi, Aksaray Üniversitesi, Aksaray, 26-29 Mayıs 2010 (Poster).

19. Uygun M., Karagözler A.A., Denizli A. Karbonik Anhidraz Baskılanmış Kriyojellerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu. Kromatografi 2010, Atatürk Üniversitesi, Erzurum, 16-19 Haziran 2010 (Poster).

20. Uygun M., Karagözler A.A., Denizli A. Karbonik Anhidraz Saflaştırılması için Moleküler Baskılanmış Kriyojellerin Hazırlanması ve Saflaştırma Koşullarının Optimizasyonu. XXV. Ulusal Kimya Kongresi, Atatürk Üniversitesi, Erzurum, 27 Haziran-2 Temmuz, 2011 (Poster).

21. Karagözler A.A., Uygun D.A., Uygun M., Gökbulut C. Bazı Hayvan Örneklerinde HPLC ile Melatonin Düzeyi Belirlenmesi. XXV. Ulusal Kimya Kongresi, Atatürk Üniversitesi, Erzurum, 27 Haziran-2 Temmuz, 2011 (Poster).

22. Uygun M., Yavaşer R., Karagözler A.A. Kitosan kriyojellerin hazırlanması, karakterizasyonu ve invertaz immobilizasyonunda kullanılması. Kromatografi 2011, Dicle Üniversitesi, Diyarbakır, 7-10 Eylül 2011 (Poster).

c) Katıldığı Projeler

1. Alginat üzerine *Aspergillus sp*'nin immobilizasyon koşullarının ve çevre örneklerine uygulanabilirliğinin araştırılması. Adnan Menderes Üniversitesi, FEF-05002 No'lu araştırma projesi. Proje Çalışanı, 2005-2006.

2. Bitki ve hayvan dokularının Melatonin içeriğinin HPLC Yöntemi ile Tayini. Adnan Menderes Üniversitesi, FEF-06014 No'lu araştırma projesi. Proje Çalışanı, 2006-2011.

3. Zeytin bitkisinde mineral bitki besin maddelerinin ve bazı biyokimyasal parametrelerin mevsimsel değişiminin incelenmesi. Adnan Menderes Üniversitesi, ZRF-08008 No'lu araştırma projesi. Proje Çalışanı, 2008-2011.

4. Karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması için moleküler baskılanmış kriyojellerin hazırlanması ve karakterizasyonu. Adnan Menderes Üniversitesi, FEF-10009 No'lu araştırma projesi. Proje Çalışanı, 2010-devam ediyor.

İŞ DENEYİMİ

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl : Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Araştırma Görevlisi, 2004-2012.

Adnan Menderes Üniversitesi, Koçarlı Meslek Yüksekokulu, Öğretim Görevlisi, 2012-devam ediyor.

İLETİŞİM

E-posta Adresi : muygun@adu.edu.tr

Tarih : 11/08/2012