

**ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
2014-YL-014**

**PROTEOMİK ÇALIŞMALARDA ALBÜMİN
UZAKLAŞTIRILMASINDA
KARAYOSUNLARININ
KULLANILABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

Efe ŞAMLI

**Tez Danışmanı:
Prof. Dr. Adnan ERDAĞ**

AYDIN

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Efe ŞAMLI tarafından hazırlanan Proteomik Çalışmalarda Albümin Uzaklaştırılmasında Karayosunlarının Kullanılabilirliğinin Araştırılması başlıklı tez, 14.03.2014 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

	Ünvanı, Adı Soyadı	Kurumu	İmzası
Başkan	: Prof. Dr. Adnan ERDAĞ	Adnan Menderes Üniv.	
Üye	: Prof. Dr. Sinan AKGÖL	Ege Üniversitesi	
Üye	: Doç. Dr. Mesut KIRMACI	Adnan Menderes Üniv.	

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Yüksek Lisans tezi, Enstitü Yönetim KurulununSayılı kararıyla 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.

...../...../2014

İmza
Efe Şamlı

ÖZET

PROTEOMİK ÇALIŞMALARDA ALBÜMİN UZAKLAŞTIRILMASINDA KARAYOSUNLARININ KULLANILABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Efe ŞAMLI

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Adnan ERDAĞ

2014, 87 sayfa

Çalışmalarda kullanılmak üzere *Antitrichia californica* Sull., *Pterogonium gracile* (Hedw.) Sm., *Hypnum cupressiforme* Hedw. ve *Homalothecium sericeum* (Hedw.) Bruch, Schimp. & W.Gümbel türlerine ait karayosunları, 2012 yılı Ekim ayında Aydın/Koçarlı mevkiinden toplandı. Deney materyalinin karakterizasyonu için SEM görüntüleme, FTIR spektrumları ve Elementer Analiz gibi tekniklerden faydalandı. Karakterizasyonu gerçekleştirilen bitki partikülleri, proteinlere karşı pseudo-spesifik afinite gösteren bir ligand olan IMEO ile silanlandı. Bu çalışmada protein yapıdaki BSA'nın, karayosunu partikülleri tarafından tutulması hedeflenerek, bu amaç doğrultusunda silanlanmış ve silanlanmamış bitki partikülleri ile adsorpsiyon denemeleri gerçekleştirildi. Adsorpsiyonun maksimum olduğu, sıcaklık, inkübasyon süresi, ortam pH'ı, BSA başlangıç derişimi ve iyonik şiddet gibi deney şartlarının tespit edilmesini amaçlayan denemeler sırasında deney ortamına protein salımı gerçekleştiği gözlemlendi. Bitkisel partiküllerin yıkanması ile bu durumun üstesinden gelinmeye çalışılsa da yıkanan bitkiler ile gerçekleştirilen deneylerde tekrar ortama protein salımı gerçekleştiği tespit edildi. Bu nedenle ortama protein salan bitkisel materyalin proteomik çalışmalarda albümin uzaklaştırma için kullanılmasının uygunsuz olduğuna karar verildi.

Anahtar sözcükler: Proteomik, Albümin Uzaklaştırma, Karayosunu, IMEO, BSA

ABSTRACT

A RESEARCH ON USAGE POSSIBILITY OF MOSSES FOR ALBUMIN REMOVAL IN PROTEOMIC STUDIES

Efe ŞAMLI

M.Sc. Thesis, Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Adnan ERDAĞ

2014, 87 pages

Antitrichia californica Sull., *Pterogonium gracile* (Hedw.) Sm., *Hypnum cupressiforme* Hedw. and *Homalothecium sericeum* (Hedw.) Bruch, Schimp. & W.Gümbel moss materials were collected from Aydın/Koçarlı location in October, 2012. Characterization of the plant materials were carried out by using technics such as SEM imaging, FTIR spectrums and Elemental Analysis. Characterized plant materials were silanized by IMEO, which is a pseudo-specific ligand for protein affinity. In this study, the BSA protein adsorption capability of both silanized and non-silanized plant materials were tried. During the experiments for revealing the maximum adsorption of BSA to the plant material by testing certain parameters such as temperature, incubation time, pH, BSA initial concentration and ionic strength, it was found out that there have been a protein release to the test medium. This release was tried to be prevented or removed by washing the plant material. The washed plant material still released protein to the medium. Thus it was concluded that the plant material releasing protein to the medium is improper for its use in albumin removal for proteomic studies.

Key words: Proteomics, Albumin Removal ,Moss, IMEO, BSA.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans dönemim boyunca bana her konuda destek olan, tüm bilgi, deneyim ve kaynaklarını kullanımına sunan saygıdeğer danışmanım Prof. Dr. Adnan ERDAĞ'a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım boyunca sürekli fikir danıştığım, biyokimya alanında kritik tavsiyeleriyle bana yol göstericilik yapmış olan kıymetli akademisyen Prof. Dr. Sinan AKGÖL'e ve gerçekleştirdiğim deneylerde işbirliği içinde çalıştığımız, kendilerinden ancak bir biyokimya laboratuvarında öğrenilebilecek çok değerli bilgiler edindiğim, başta Emir ÖZÇALIŞKAN olmak üzere tüm Biorege ekibine çok teşekkür ederim.

Her koşulda benimle olan aileme ve her zaman desteğini yanımda hissettiğim Nilay ORUÇ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	iii
BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI	v
ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	ix
TEŞEKKÜR.....	xi
SİMGELER DİZİNİ.....	xvii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xxi
1. GİRİŞ	1
1.1. Karayosunu Hücre Çeperinde Bulunan Moleküller	3
1.1.1. Selüloz.....	3
1.1.2. Hemiselüloz.....	4
1.1.2.1. Ksiloglukan	5
1.1.2.2. Ksilanlar	5
1.1.2.3. Mannanlar	5
1.1.2.4. Üronik asitler.....	6
1.1.3. Pektin.....	7
1.1.3.1. Homogalakturonan	7
1.1.3.2. Ramnogalakturonan	7
1.1.4. Glikoproteinler	8
1.1.5. Lignin Benzeri Fenolikler	9
2. MATERYAL VE YÖNTEM	26
2.1. Materyal	26
2.1.1. Bitkilerin Toplanması.....	26
2.1.1.1. Araştırma materyallerinin (bitkilerin) özellikleri	26
2.1.2. Kullanılan Ekipman.....	27
2.2. Yöntem.....	28
2.2.1. Bitkilerin Denemelere Hazırlanması	28
2.2.2. Bitki Örneklerinin Karakterizasyonu	32
2.2.2.1. FTIR (Fourier Transform Infrared Spektrofotometre) ölçümleri.....	32
2.2.2.2. SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) gözlemleri	33
2.2.2.3. Elementer analiz.....	34

2.2.3. Ön Çalışma: Bitki Örneklerine Albümin Adsorpsiyonu Koşullarının İncelenmesi	35
2.2.3.1. Bitki örneklerine albümin adsorpsiyonuna pH'ın etkisinin incelenmesi	35
2.2.3.2. Bitki örneklerine albümin adsorpsiyonuna inkübasyon süresinin etkisinin incelenmesi	35
2.2.3.3. Bitki örneklerine albümin adsorpsiyonuna BSA başlangıç derişiminin etkisinin incelenmesi.....	36
2.3. Deneylerde kullanılacak maddelerin hazırlanması ve standart grafiklerinin çizilmesi	36
2.3.1. BSA standart grafiğinin çizilmesi	36
2.3.2. Bradford reaktifi çözeltilisinin hazırlanması ve standart grafiğinin çizilmesi	37
3. BULGULAR	39
3.1. Bitki Örnekleri.....	39
3.1.1. Deney ortamına salınan protein miktarının tespit edilmesi	44
3.1.2. Bitkisel materyalin yıkanması	44
3.2. SEM (Taramalı Elektron Mikroskopu) Gözlemleri.....	45
3.3. Elementer Analiz	49
3.4. FTIR (Fourier Transform Infrared Spektrometre) Ölçümleri.....	51
3.5. Bitki Örneklerinin Albümin Adsorpsiyonu Koşullarının Belirlenmesi.....	56
3.5.1. Ön Çalışma: Silanlanmamış Bitki Örneklerinin Adsorpsiyon Koşullarının Belirlenmesi	56
3.5.1.1. Silanlanmamış Pterogonium gracile örneği için inkübasyon süresi denemesi	57
3.5.1.2. Silanlanmamış Pterogonium gracile örneği için BSA başlangıç derişimi denemesi	57
3.5.1.3. Silanlanmamış Pterogonium gracile örneği için pH denemesi.....	58
3.5.2. Silanlanmış Bitki Türleri İçin Albümin Adsorpsiyonu Koşullarının Belirlenmesi	59
3.5.2.1. Hypnum cupressiforme türü için Albümin adsorpsiyonuna pH'ın etkisinin belirlenmesi.....	60
3.5.2.2. Homalothecium sericeum türü için Albümin adsorpsiyonuna pH'ın etkisinin belirlenmesi	60
3.5.2.3. Pterogonium gracile türü için Albümin adsorpsiyonuna pH'ın etkisinin belirlenmesi.....	61

3.5.2.4. <i>Antitrichia californica</i> türü için Albümin adsorpsiyonuna pH'ın etkisinin belirlenmesi.....	62
4. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	63
KAYNAKLAR	73
ÖZGEÇMİŞ	87

SİMGELER DİZİNİ

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
AYDN	Adnan Menderes Üniversitesi Herbariumu
BSA	Sığır Serum Albümini
CoMMP	Kobalt(II)-değiştirmeli Matris Metaloproteinaz
DNA	Deoksiribonükleik Asit
FTIR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy
HEMA	Hidroksietil Metakrilat
IgG	İmmünoglobülin G
IMEO	3-(2-imidazoline-1-yl)propyl(triethoxysilane)
MRI	Manyetik Rezonans Görüntüleme
PHEMA	Poli Hidroksietil Metakrilat
RNA	Ribonükleik Asit
SEM	Scanning Electron Microscope
UV	Ultra Violet (Mor Ötesi)
2-D PAGE	İki Boyutlu Poliakrilamid Jel Elektroforezi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Selüloz molekülünün yapısı	4
Şekil 1.2. Hemiselüloz molekülleri	4
Şekil 1.3. Mannan ve Üronik Asitler.....	6
Şekil 1.4. Pektin	6
Şekil 1.5. Homogalakturonan.....	7
Şekil 1.6. Pektin moleküllerine bağlı bulunabilen bazı gruplar	8
Şekil 1.7. Bazı glikoproteinler.....	8
Şekil 1.8. Lignin	9
Şekil 1.9. UV ışık altında <i>Fontinalis antipyretica</i> hücre çeperindeki floresans.....	10
Şekil 1.10. Afinite kromatografisinin şematik gösterimi	11
Şekil 2.1. Karayosunu örneklerinin ön kurutma aşaması	29
Şekil 2.2. Analitik eleme makinesi.....	30
Şekil 2.3. Eleklere dağılmış olan bitki parçacıkları.....	31
Şekil 2.4. Farklı tanecik boylarına sahip bitkilerin muhafaza edilmesi	32
Şekil 2.5. FTIR spektrofotometresi cihazı.....	33
Şekil 2.6. SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu)	34
Şekil 2.7. BSA standart grafiği ve denklemi	37
Şekil 2.8. Bradford reaktifi standart grafiği ve denklemi.....	38
Şekil 3.1. <i>Hypnum cupressiforme</i> türünün elek analizi sonucu ortaya çıkan tanecik dağılım grafiği	39
Şekil 3.2. <i>Homalothecium sericeum</i> türünün elek analizi sonucu ortaya çıkan tanecik dağılım grafiği	40
Şekil 3.3. <i>Pterogonium gracile</i> türünün elek analizi sonucu ortaya çıkan tanecik dağılım grafiği	40
Şekil 3.4. <i>Antitrichia californica</i> türünün elek analizi sonucu ortaya çıkan tanecik dağılım grafiği	41
Şekil 3.5. <i>H. cupressiforme</i> 125 mm elekten geçen parçaların mikroskop görüntüsü	42
Şekil 3.6. <i>H. sericeum</i> 125 mm elekten geçen parçaların mikroskop görüntüsü ...	42
Şekil 3.7. <i>P. gracile</i> 125 mm elekten geçen parçaların mikroskop görüntüsü	43

Şekil 3.8. <i>A. californica</i> 125 mm elekten geçen parçaların mikroskop görüntüsü	43
Şekil 3.9. <i>P. gracile</i> türüne ait bitki partiküllerinin yıkaması sırasında belirli saatlerde ortamda ölçülen protein derişimi	45
Şekil 3.10. <i>H. cupressiforme</i> 125 µm altı partiküllerin SEM ile genel görünümü	46
Şekil 3.11. <i>H. cupressiforme</i> 125 µm altı partiküllerin SEM ile bitki yüzeyi genel görünümü	47
Şekil 3.12. <i>H. cupressiforme</i> 125 µm altı partiküllerin SEM ile partikül yüzeyi görünümü	48
Şekil 3.13. <i>H. cupressiforme</i> 125 µm altı partiküllerin yüzey kıvrımlarının SEM görüntüsü	49
Şekil 3.14. Silanlanmış <i>H. cupressiforme</i> örneğinde elementer analizin gerçekleştirildiği bölgenin SEM fotoğrafı	50
Şekil 3.15. Elementer analiz sonucunda elde edilen spektrum	50
Şekil 3.16. <i>Hypnum cupressiforme</i> bitkisine ait FTIR spektrumu	51
Şekil 3.17. <i>Homalothecium sericeum</i> bitkisine ait FTIR spektrumu	52
Şekil 3.18. <i>Pterogonium gracile</i> bitkisine ait FTIR spektrumu	52
Şekil 3.19. <i>Antitrichia californica</i> bitkisine ait FTIR spektrumu	53
Şekil 3.20. Silanlanmış <i>Hypnum cupressiforme</i> bitkisine ait FTIR spektrumu	53
Şekil 3.21. Silanlanmış ve normal <i>Hypnum cupressiforme</i> bitkisine ait FTIR spektrumlarının birlikte gösterimi	54
Şekil 3.22. Tüm bitkilere ve silanlanmış <i>H. cupressiforme</i> örneğine ait FTIR spektrumlarının birlikte gösterimi	55
Şekil 3.23. Silanlanmamış <i>P. gracile</i> bitkisi üzerine albümin adsorpsiyonuna başlangıç derişiminin etkisi	58
Şekil 4.1. Her türe ait silanlanmış bitki partikülleriyle gerçekleştirilen pH denemesi verilerinin aynı grafikte gösterimi	69

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Afinite kromatografisinin kullanıldığı biyolojik sistemler.....	12
Çizelge 1.2. Afinite kromatografisinin başlıca 20 alt dalı.....	12
Çizelge 2.1. Deneyde kullanılan bitkilerin Adnan Menderes Herbaryumu'na kaydedilen örneklerinin herbaryum numaraları.....	26
Çizelge 2.2. Elek analizinde kullanılan büyüklük aralıkları	29
Çizelge 3.1. Bitkisel partiküllerin 2 saatlik inkübasyonu sonunda deney ortamlarının ölçümleri	44
Çizelge 3.2. Elementer analiz sonucunda tespit edilen silisyum atomlarının, C ve O atomlarına adet ve kütlece oranını gösteren tablo.....	51
Çizelge 3.3. Silanlanmamış <i>P. gracile</i> örneğinde ortamda bulunan protein derişiminin geçen süre ile değişimi	57
Çizelge 3.4. Silanlanmamış <i>P. gracile</i> örneğinde başlangıç konsantrasyonunun adsorpsiyona etkisinin incelendiği deneyin sonuçları.....	57
Çizelge 3.5. Silanlanmamış <i>P. gracile</i> örneğinde ortamda bulunan proteinin farklı ortam pH'larındaki derişim değerleri	59
Çizelge 3.6. Silanlanmış <i>H. cupressiforme</i> örneğinde ortamda bulunan proteinin farklı ortam pH'larındaki derişim değerleri.....	60
Çizelge 3.7. Silanlanmış <i>H. cupressiforme</i> örneğinde verilen pH değerlerinde ortamda bulunan proteinin Bradford reaktifi ile elde edilen derişimi.....	60
Çizelge 3.8. Silanlanmış <i>H. sericeum</i> örneğinde ortamda bulunan proteinin farklı ortam pH'larındaki derişim değerleri	61
Çizelge 3.9. Silanlanmış <i>H. sericeum</i> örneğinde verilen pH değerlerinde ortamda bulunan proteinin Bradford reaktifi ile elde edilen derişimi.....	61
Çizelge 3.10. Silanlanmış <i>P. gracile</i> örneğinde ortamda bulunan proteinin farklı ortam pH'larındaki derişim değerleri	61
Çizelge 3.11. Silanlanmış <i>P. gracile</i> örneğinde verilen pH değerlerinde ortamda bulunan proteinin Bradford reaktifi ile elde edilen derişimi.....	62
Çizelge 3.12. Silanlanmış <i>A. californica</i> örneğinde ortamda bulunan proteinin farklı ortam pH'larındaki derişim değerleri.....	62
Çizelge 3.13. Silanlanmış <i>A. californica</i> örneğinde verilen pH değerlerinde ortamda bulunan proteinin Bradford reaktifi ile elde edilen derişimi.....	62

1. GİRİŞ:

Karayosunları basit yapılı bitkiler olup, boyları birkaç milimetreden (*Ephemeropsis* Goebel), bir metreye kadar değişen uzunluklarda olabilir (*Polytrichum commune* Hedw. ve 70 cm boylanabilen *Dawsonia superba* Grev.) (Crum, 2001). *Fontinalis antipyretica* Hedw. var. *gigantea* (Sull.) Sull. türü ise 2 metreye kadar boylanabilir (su akımı doğrultusunda büyüme) (Demir, 2011).

Sorbent olarak biyolojik ajanların kullanılması uzun yıllardır araştırmacıların ilgisini çekmiştir. Günümüzde de sorbent olarak bitkilerin kullanılması giderek yaygınlaşmaktadır. Düşük maliyetle elde edilebilmeleri ve geri dönüştürülebilir olmaları, işlemin genel verimi açısından önem taşımaktadır. Özellikle tarımsal faaliyetlerden oluşan atığın bol ve düşük maliyetli oluşu araştırmacıları bu konularda çalışma yapmaya itmiştir. Fitosorbentler ile yapılan çalışmalar atık sulardan ağır metallerin, boyaların ve petrol türevlerinin temizlenmesi şeklinde ana gruplara ayrılabilir (Demir, 2011).

Atıksulardan ağır metallerin temizlenmesi amacıyla yapılan çalışmalar arasında Cr(VI) tutulması için, *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze meyveleri kullanılması (Vagheti vd., 2008), *Pinus sylvestris* L. kozalaklarının kullanılması (Ucun vd., 2002), fıstık kabuğunun kullanılması (Witek-Krowiak vd., 2011), *Passiflora edulis* Sims meyve kabuğunun kullanılması (Jacques, 2007), *Cocos nucifera* L. (hindistan cevizi) lifi kullanılması (Gonzales vd., 2008), Ni(II) tutulması için *Azadirachta indica* A. Juss. yapraklarının kullanılması (Bhattacharyya vd., 2009), *Moringa oleifera* Lam. kabuğu kullanılması (Reddy, 2011), *Cochlospermum gossypium* (L.) DC. sakızı kullanılması (Vinod vd., 2010), Cd için su bitkisi olan *Hydrilla verticillata* (L. f.) Royle (Bunluesin vd., 2007), *Scolymus hispanicus* L. (Barka vd., 2010) kullanılması, Cu(II) tutulması için *Acacia leucophala* Link ağaç kabuğu tozu (Munagapati vd., 2010), *Arachis hypogaea* L. meyve kabuğu kullanılması (Witek-Krowiak vd., 2011), Pb için *Pinus sylvestris* kozalağı (Ucun vd., 2003), *Phaseolus vulgaris* L., *Ficus religiosa* L. yaprakları (Özcan vd, 2009) kullanımı örnek olarak verilebilir. Atıksulardan boyar madde uzaklaştırılması için *Araucaria angustifolia* (Vagheti vd., 2008), *Pyracantha coccinea* M. Roem. meyvesi (Akar vd., 2009), *Ananas comosus* (L.) Merr. yaprakları (Chowdhury vd., 2011), *Paulownia tomentosa* (Thunb.) Steud. (Deniz ve Saygıdeğer, 2010), *Prunus dulcis* (Mill.) D.A. Webb (Şentürk vd., 2010), *Thuja orientalis* L. (Akar vd., 2008), *Cupressus sempervirens* L.

(Fernandez vd., 2010), *Capsicum annuum* L. tohumları (Tunalı Akar vd., 2011), işlenmemiş zeytin atığı (prina) (Akar vd., 2009) ve *Phaseolus vulgaris* L. kullanılan bitkilerden bazılarıdır.

Karayosunları yüzey yapıları ve kolay erişilebilir olmaları sebebiyle fitosorbent olarak çeşitli çalışmalarda kullanılmışlardır. Karayosunları kullanılarak yapılan çalışmalara Cd(II) ve Cr(III) tutulması için *Hylocomium splendens* (Hedw.) Schimp. kullanılması (Sarı vd., 2008), 137Cs ve 90Sr tutulması için *Funaria hygrometrica* Hedw. kullanılması (Balarama Krishna vd., 2004), Pd için *Racomitrium lanuginosum* (Hedw.) Brid. (Sarı vd., 2009) kullanılması, Co ve Sr için *Rhytidiadelphus squarrosus* (Hedw.) Warnst. (Maresova vd., 2011) kullanılması, atıksulardan boyar madde uzaklaştırılması için *Dicranella varia* (Hedw.) Schimp. kullanılması (Akkaya ve Özer, 2005) örnek olarak verilebilir.

Dünya üzerinde geniş yayılıma sahip bir karayosunu olan *Sphagnum*'un ağır metal tutma özellikleri çeşitli çalışmalarla belirlenmiştir (Brown vd., 2000). Bu amaçla Amerikan Maden Bürosu yaptığı çalışmalarda gözenekli polisülfon kürecikler üzerine immobilize edilmiş mikroorganizmalara ek olarak immobilize *Sphagnum* da denemiştir. Bu şekilde çinko, kadmiyum ve diğer metallerin seçici olarak ortamdan uzaklaştırıldığı sonucuna ulaşılmıştır (Ferguson vd., 1989). *Sphagnum* L.'un ticari olarak kullanımı ise genellikle petrol ürünlerinin ortamdan uzaklaştırılmasına yönelik olmuştur. Özellikle kuru haldeyken hidrofobik özellikler kazanan *Sphagnum*, petrolü tutma özelliği dolayısı ile kirlenmiş alanların temizliğinde kullanılmaktadır. Su üzerinde kaldığı için su üstü kirliliğin temizlenmesi amacıyla kullanılabilir. Bu ürünler genellikle toz haline getirilerek hazırlanmış olarak piyasaya sürülmüştür. Hyro-Weed (Innovative Technologies Group LLC), Peat-sorb (Zorbit Technologies Inc.), Oclansorb Plus (Hi Point Industries Ltd.), Enviropeat (Envirotech Solutions) ve Norveç'teki Kallak Torustrofabrikk'in turbalık alanlardan hasat ettiği bitkisel materyaller bu amaçla geliştirilmiş, petrol ürünleri ve kimyasal kirliliğin temizlenmesi için kullanılan ticari ürünlerdir. (Demir, 2011).

Bazı karayosunu türlerinde yaprak hücrelerinin yüzeylerinde süslemeler bulunmaktadır. En yaygın görülen süsleme tipi papillalardır. Genel tanımıyla papilla, hücre yüzeyindeki farklı şekillere sahip çıkıntılardır. Basit, C-şekilli veya dallanmış yapıda olabilirler. Benzer şekilde mamillalar da hücre lümeninin dışarı doğru çıkarak oluşturduğu çıkıntılardır (Buck ve Goffinet, 2000). Bu yapıların en

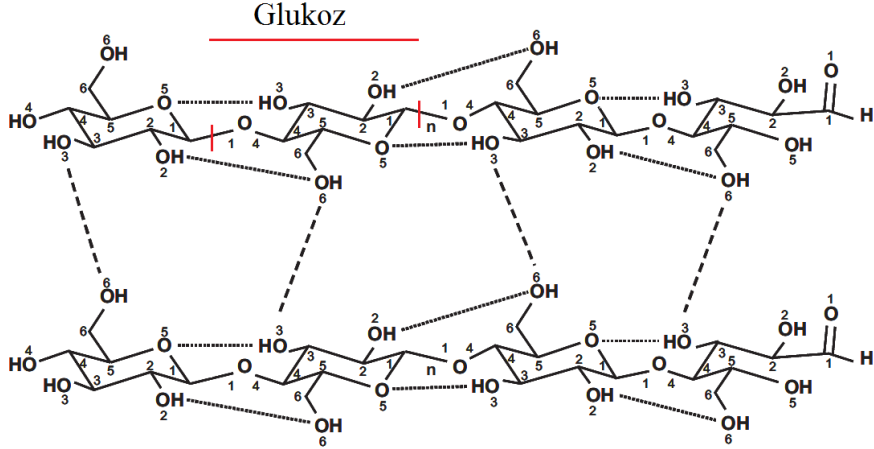
önemli özelliği yüzey alanını önemli ölçüde artırıyor olmalarıdır. Yoğun papillaya sahip bir yaprağın yüzey alanı önemli ölçüde artarak tutunması istenen molekül için avantaj oluşturur (Demir, 2011)

Gelişen tüm bitki hücrelerinin etrafı polisakkaritlerce zengin bir primer çeper ile çevrilidir. Tohumlu trakeofitlerin primer çeperleri selüloz hemiselüloz ve pektin çok miktarda bulunmak üzere bunun yanında yapısal glikoproteinler, mineraller, enzimler ve fenolik esterler de içerir (Carpita ve Gibeaut, 1993). Biryofitlerin çeper yapısı ise çok daha az bilinmektedir. Örnek olarak her ne kadar genetik ve fizyolojik olarak *Physcomitrella patens* (Hedw.) Bruch & Shimp. yakından inceleniyor olsa da şaşırtıcı şekilde hücre çeperine çok az ilgi gösterilmiştir (Lee vd., 2005). Primer hücre çeperi bitkilerde genel olarak selüloz mikrofibriller ve bunları birbirlerine bağlayan ksiloglukanlardan meydana gelir. Bu yapı çeperin fiziksel dayanıklılığını sağlar. Pektin ağı ise hücrelerin birbirlerine yapışmasını sağlar, poröziteyi ve iyonik durumu etkiler. Pektin ağı aynı zamanda glikan çapraz bağlı selüloz ağının özelliklerine ve çeper yapılanmasına etki eder. (Lee vd., 2005). Karayosunu hücre çeperinin kimyasal yapısından daha genişçe bahsedilecek olursa aşağıdaki kısımlara ayrılarak incelenmesi uygun olur.

1.1. Karayosunu Hücre Çeperinde Bulunan Moleküller

1.1.1. Selüloz

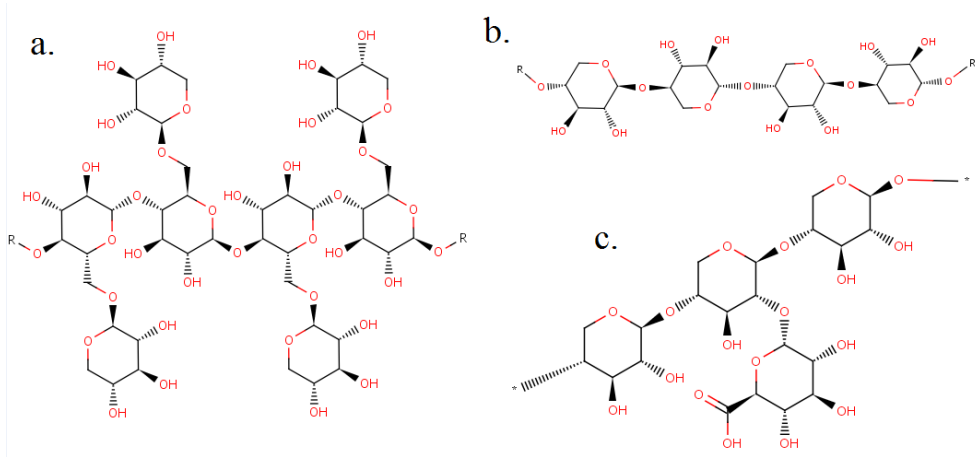
Ana yapı olarak 5-20 nm'lik mikrofibriller halinde bulunur. β -1,4 bağlı D-glukoz ünitelerinden meydana gelir. Selülozun genel yapısını gösteren Şekil 1.1.'de kesikli çizgi ile gösterilen bağlar zincirler arasındaki hidrojen bağlarını, noktalama ile gösterilen bağlar ise zincir içerisindeki hidrojen bağlarını ifade etmektedir (Festucci-Buselli vd., 2007). Roberts ve arkadaşları (2012) yaptıkları çalışmada kullanılan tüm karayosunlarında selülozun çeper yapısında bulunduğunu belirtmiştir.



Şekil 1.1. Selüloz molekülünün yapısı ve bir glukoz molekülünün bu yapı içerisinde gösterimi (Festucci-Buselli vd., 2007'den değiştirilerek)

1.1.2. Hemiselüloz

Selüloz mikrofibrillerini birbirine bağlayan nötr polimerlerdir. Değişken bir yapıya sahiptirler, seyreltik asit yada bazlarla bile hidrolize uğrayabilirler. Hemiselüloz bir çok farklı molekül grubunu içerir:



Şekil 1.2. Hemiselüloz molekülleri a. Ksiloglukan b. β -1,4-Ksilan c. Glukuronoksilan (www.brenda-enzymes.org'dan değiştirilerek)

1.1.2.1. Ksiloglukan

Ksiloglukanlar (Şekil 1.2.a.) matriks polisakkaritleridir. Selüloz ağlarını (Şekil 1.1.) çapraz bağlayarak çeperin yapısal düzenlenmesinde ve porözitesinde rol alırlar (Kremer vd., 2004). XXXG yada XXGGG gibi çeşitli dallanma tiplerine sahip olabilirler. Propper ve Fry (2003)'ün gerçekleştirdiği çalışmada birçok farklı karayosunu örneğinde tespit edilmiştir. Çalışmada ayrıca ksiloglukanın tüm kara bitkilerinde bulunduğu belirtilmiştir.

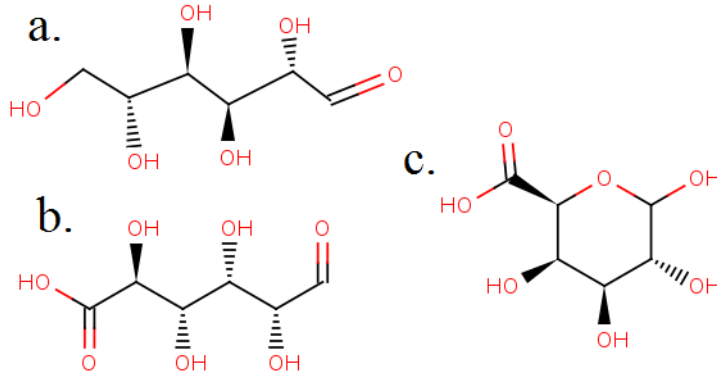
1.1.2.2. Ksilanlar

Redükleyici uçlara sahip değildirler. Yakın zamanda yapılan çalışmalar *Funaria hygrometrica*'nın da içinde bulunduğu altı karayosunu türünde ksilana spesifik epitopların tespit edilmediğini göstermekle birlikte (Carafa vd., 2005), ksilana spesifik epitoplar *Physcomitrella patens*'te CoMMP (kobalt(II)-değiştirmeli matris metaloproteinaz) ile tespit edilmiştir (Roberts vd., 2012). Ayrıca şeker bağlanma analizleri biryofit çeperinde β -1,4-bağlı ksilan (Şekil 1.2.b.) varlığını ortaya koymuştur (Moller vd., 2007). Glukoronoksilan (Şekil 1.2.c.) ve β -1,4-D-ksilan yan dalları bulunabilir. Bunun yanında Kulkarni ve arkadaşlarının (2012) gerçekleştirdiği çalışmada immün yöntemler ile yaprak hücrelerinde ve aksiller tüylerde ksilan tespit edilirken, protonemal filamentler ve gövdede ksilana rastlanmamıştır.

1.1.2.3. Mannanlar

Mannanlar kimyasal analizi gerçekleştirilen birçok karayosununun çeper yapısında bulunmaktadır (Geddes ve Wilkie, 1971; Popper ve Fry, 2003) ve *Physcomitrella patens* türünde CoMMP, kimyasal analiz ve immünoetiketleme ile tespit edilmiştir (Lipman vd., 2007; Moller vd., 2007; Nothnagel ve Nothnagel, 2007; Lee vd., 2011; Roberts vd., 2012). Glukomannanlar (Şekil 1.3.) gymnospermlerin sekonder çeperlerinin büyük bir kısmını meydana getirmektedir (tüm çeperin %10'u), dikotil çeperlerinin ise daha az bir kısmını meydana getirir (%3-5) (Matheson, 1990). Glukomannanların (Şekil 1.3. b,c) bir eğreltinin sekonder çeperinin %15 kadarını meydana getirdiği tespit edilmiştir (Bremner ve Wilkie, 1971). Karayosunlarında ise Mannoz (Şekil 1.3.) %15'ten çok daha yüksek oranlarda bulunur. Bu açıdan kompozisyonel olarak biryofitlerin primer yapıdaki çeperlerini eğreltiler ile

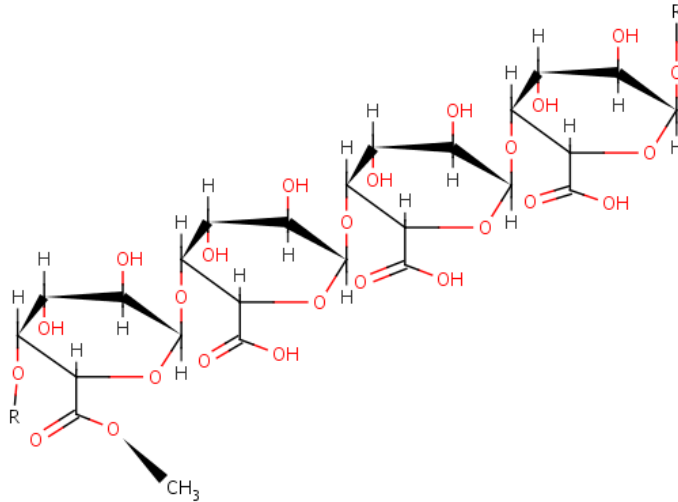
angiosperm ve gymnospermlerin sekonder çeperlerine benzetmek daha doğru olur (Popper ve Fry, 2003).



Şekil 1.3. Mannan ve Üronik Asitler a. Mannoz b. Glukuronik asit c. Galakturonik asit (www.brenda-enzymes.org'dan değiştirilerek)

1.1.2.4. Üronik asitler

Popper ve Fry (2003) gerçekleştirdikleri çalışmada primitif karayosunlarının Glukuronik asit (Şekil 1.3.b.) ve Galakturonik asit (Şekil 1.3.c.) bakımından çok zengin olduklarını, ancak daha gelişmiş ve kuruma toleransları daha yüksek olan biryofitlerin bu maddeleri çok az bulundurduklarını belirtmiştir.



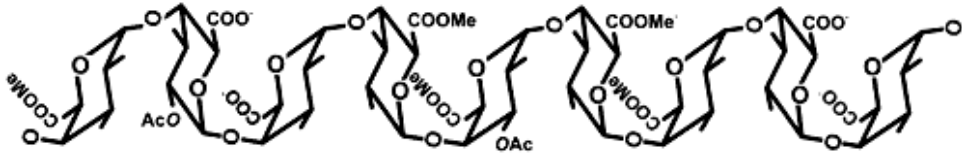
Şekil 1.4. Pektin (www.brenda-enzymes.org)

1.1.3. Pektin

Çeper yapısında bulunan Ca gibi iyonlar pektin benzeri moleküllerin yapı ve özelliğini belirleyici niteliktedir. Pektin, 2 ana tip molekülden oluşur:

1.1.3.1. Homogalakturnan

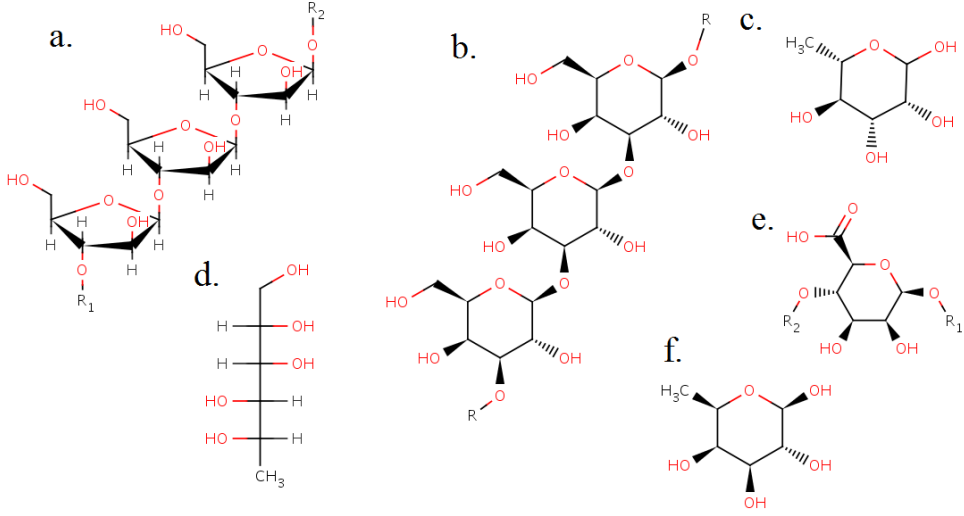
Moller ve arkadaşlarının (2007) gerçekleştirdikleri çalışmada *P. patens*'te homogalakturnan (Şekil 1.5.) tespit edildiğini ve çeper pektininde bulunan homogalakturnanın (Galakturonik asit polimeri) negatif yüklü uçlara sahip olduğunu belirtmiştir. Konno ve arkadaşlarının (2010) gerçekleştirdiği bir bakır adsorpsiyonu deneyinde, pH 8,6 alkali ortamda homogalakturnanın beta gruplarının kesilmesiyle de bakırın serbest kaldığı belirtilmiştir. Deneyde Cu'nun %40'tan fazlası homogalakturnan'a güçlü şekilde bağlanmıştır.



Şekil 1.5. Homogalakturnan (Bazı karboksil grupları metillenmiş halde)
(www.ccrcc.uga.edu'dan değiştirilerek)

1.1.3.2. Ramnogalakturnan

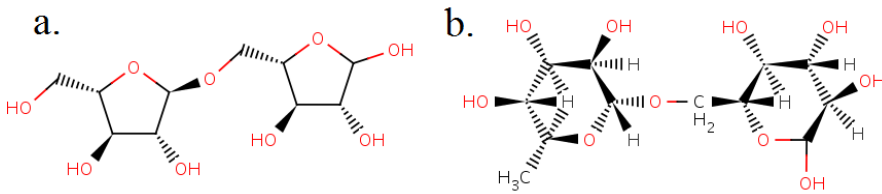
Arabinan ve galaktan (Şekil 1.6.a,b.) yan zincirlere sahiptir. Konno ve arkadaşlarının (2010) gerçekleştirdikleri deneyde bakırın geri kalanı bu molekülün üronik asit yan zincirlerine bağlanmıştır. Gerçekleştirilen birçok çalışma ile biryofit çeperinde ramnogalakturnan I (Ligrone vd., 2004; Kremer vd., 2004) ve ramnogalakturnan II (Matsunaga vd., 2004) tespit edilmiştir. B-1,4-galaktan, α -1,5-arabinan ve çapraz bağlanmış borat, 3-O-metilramnoz, 1,2,4,5-tetra-O-asetil-3-O-metilramnitol, 5-keto-D-mannuronik asit, 2-O-metil-L-fukoz gibi çeşitli moleküller (Şekil 1.6.) ramnogalakturnan'a bağlı olarak bulunabilir.



Şekil 1.6. Pektin moleküllerine bağlı bulunabilen bazı gruplar a. Arabinan
b. Galaktan c. Ramnoz d. L-Ramnitol e. β-D-Mannuronik asit f. β-D-Fukoz (www.brenda-enzymes.org'dan değiştirilerek)

1.1.4. Glikoproteinler

Arabinogalaktan proteinleri, proteoglikanların, "hidroksiprolin bakımından zengin glikoproteinler" süperfamilyasına dahil farklı ve heterojen bir grubudur (Lee vd., 2005). Çeperde ramnogalakturnan'a bağlı halde arabinogalaktan proteinleri bulunur. Bu proteinler hücrenin genişlemesinde görev yapar. Gerçekleştirilen birçok çalışma ile biryofit hücre çeperinde arabinogalaktan proteinleri tespit edilmiştir (Lee vd., 2005; Moller vd., 2007). Bu proteinlere bağlı olarak 3-O-metil-L-ramnozil, 1,3,6-galaktopiranozil, arabinofuranozil, arabinopiranozil, (1,4)-glukoronopiranozil (Şekil 1.7.) bulunabilir (Roberts vd., 2012).

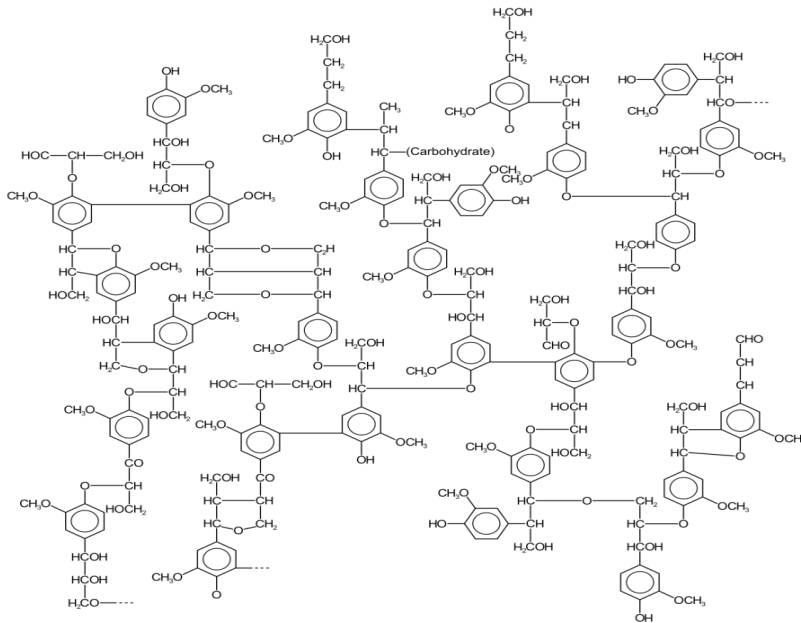


Şekil 1.7. Bazı glikoproteinler a. alfa-L-arabinofuranozil-(1,5)-L-arabinofuranoz b. 6-O-alfa-L-ramnozil-D-glukopiranoz (www.brenda-enzymes.org'dan değiştirilerek)

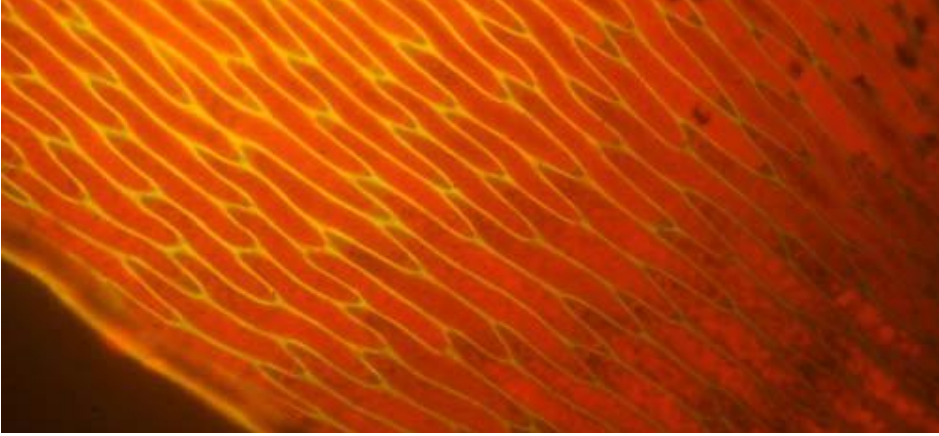
1.1.5. Lignin Benzeri Fenolikler

Kremer ve arkadaşlarının (2004) gerçekleştirdikleri çalışmada ligninin (Şekil 1.7.a.) karayosunlarında bulunmadığı belirtilmiştir. Bu bulgu gerçekleştirilen diğer çalışmalar ile de paralellik göstermektedir (Proskauer, 1960; Hebant, 1974; Ligrone vd., 2000). Ancak *Physcomitrella patens*'te, lignin biyosentez enzimlerini kodlayanlara homolog genlerin keşfedilmesiyle lignin benzeri yapıtaşlarının karayosunlarında bulunduğu belirlenmiştir (Xu vd., 2009). Ligninler heteropolimer hidrofobik fenolik bileşiklerdir. p-hidroksifenil (H), guaiacil (G) ve sirinjil (S) ünitelerinin karbohidratları birleşerek lignini oluştururlar ve bu sayede çeper sertleşir (Ligrone vd., 2007). Biryofitlerde G+S yapısındaki moleküller en yüksek oranda bulunmaktadır.

Biryofit çeperinde bulunan fenolik bileşikler, çeperin asit hidrolizine karşı dirençli olmasını sağlar. Glime (2007), çalışmasında biryofitlerin hayatta kalabilmek için çeşitli pigmentleri ve herbivorlardan korunmaya yarayan bileşikleri bulduklarını ifade etmiş, UV ışık ile incelediği *Fontinalis antipyretica* yaprağında hücre çeperinde floresans tespit ederek, bunun çeperdeki fenolik bileşiklerden kaynaklandığını belirtmiştir (Şekil 1.9.).



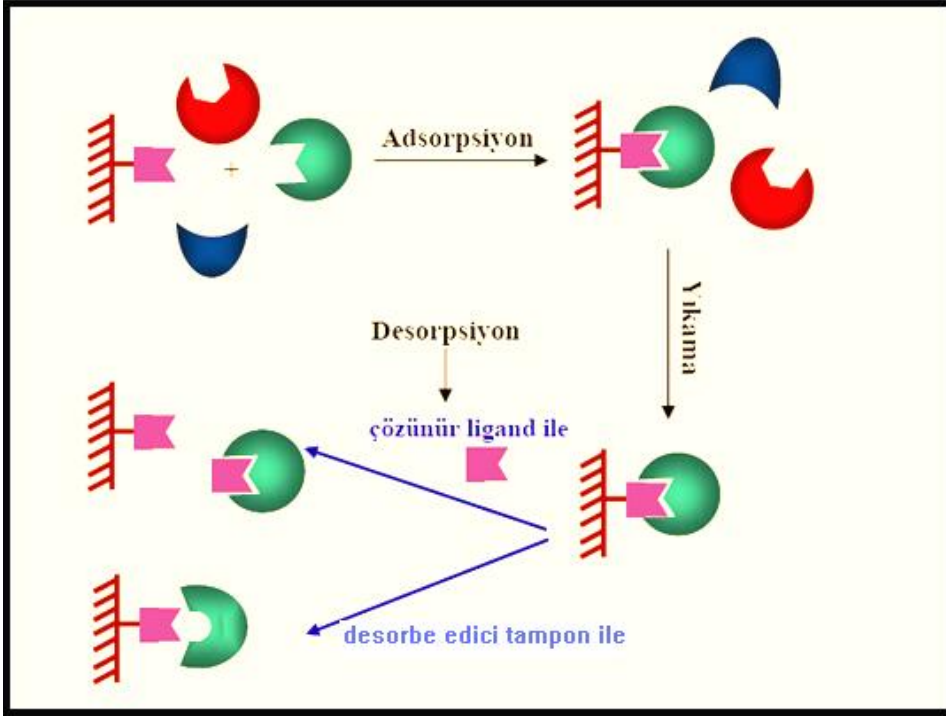
Şekil 1.8. Lignin (Glazer ve Nikaido, 2007)



Şekil 1.9. UV ışık altında *Fontinalis antipyretica* hücre çeperindeki floresans (Glime, 2007).

Araştırmalarımız teknik açıdan incelendiğinde, deneylerde kullanılan ana yöntemin afinite kromatografisi olduğu görülür. Afinite kromatografisi, biyomoleküllerin tanımlanması, saflaştırılması ve ayrılması için iyi bilinen bir yöntemdir ve yüksek spesifitede moleküler tanıma esasına dayanır. Bu metotta, spesifik bir tanıma özelliğine sahip bir molekül, uygun bir desteğe immobilize edilir (Denizli ve Pişkin, 2001). İzole edilecek molekül, matrikse immobilize edilen tamamlayıcı ligand tarafından seçici bir şekilde tutulur. Afinite kromatografisinde ligand stabilitesi gün geçtikçe önem kazanmaktadır. Dolayısıyla günümüzde yüksek molekül kütleli biyolojik ligandlar düşük molekül kütleli pseudo-spesifik ligandlar ile değiştirilmektedir (Huang ve Carbonell, 1999; Gomez ve Strumia, 2008; Özkara vd., 2003).

Afinite kromatografisi bir çeşit adsorpsiyon kromatografisi olup, saflaştırılması istenen molekülün, matriks adı verilen bir katı destek materyaline kovalent olarak immobilize edilmiş bir komplementer bağlanma bileşiğine (ligand) spesifik ve tersinir bağlandığı bir tekniktir (Keha ve Küfrevioğlu, 2000). Kullanılacak ligandın saflaştırılacak madde için spesifik ve tersinir bağlanma afinitesi olmalıdır. Ligand olarak enzimler, koenzimler, kofaktörler, antibadiler, aminoasitler, oligopeptidler, oligonükleik asitler ve nükleik asitlerin de (DNA, RNA) bulunduğu çok sayıda biyofonksiyonel molekül kullanılabilir (Denizli ve Pişkin 2001). Afinite kromatografisinin şematik gösterimi Şekil 1.10.'da verilmiştir.



Şekil 1.10. Afinite kromatografisinin şematik gösterimi. (Türkcan, 2012)

Katı fazdaki bağlama özelliğinin özgüllüğü, seçici bağlama maddesinin (ligand) destek matrisine kovalent bağlanmasıyla sağlanır. Katı fazda örnekten istenen madde seçimli olarak tutulur. Bağlanmayan maddelerin yıkanarak kolondan uzaklaştırılmasından sonra, ayrılan (tutunan, saflaştırılan vb.) madde, sıvı (mobil) fazın iyonik kuvveti veya pH'ı değiştirilerek kolondan elüe edilir. Ligand ile ilgili olarak aranan anahtar özellik, destek matrisine kovalent bağlı ligantın kolona bağlı kalabilmesi ve hedef molekül serbest bırakıldıktan sonra da biyolojik olarak aktif olabilmesidir (Türkcan, 2012).

Afinite kromatografisi enzim, antibadi gibi büyük moleküllerin saflaştırılmasında veya küçük bileşiklerin ayrılmasında kullanılır. Ayrıca hücre ayırma işlemleri de afinite kromatografisi teknikleri kullanılarak gerçekleştirilebilir. Çizelge 1.1.'de afinite kromatografisinin en çok kullanıldığı biyolojik sistemler gösterilmiştir (Keha ve Küfrevioğlu 2000).

Çizelge 2.1. Afinite kromatografisinin kullanıldığı biyolojik sistemler. (Keçili, 2006)

Safılaştırılacak Madde	Ligand
Enzim	Substrat, inhibitör, kofaktör
Antikor	Antijen, virüs, hücre
Lektin	Polisakkarit, glikoprotein, hücre yüzey reseptörü, hücre
Nükleik asit	Komplementer baz dizisi, nükleik asit polimeraz, bağlayıcı protein
Hormon	Reseptör protein
Vitamin	Taşıyıcı protein
Hücre	Hücre yüzeyi spesifik proteini, lektin

Çizelge 1.2. Afinite kromatografisinin başlıca 20 alt dalı.

1. Hidrofobik kromatografi	11. Perfüzyon afinite kromatografisi
2. İmmunoafinite kromatografisi	12. Tiyofilik afinite kromatografisi
3. Kovalent afinite kromatografisi	13. Yüksek performans afinite kromatografisi
4. Metal-şelat afinite kromatografisi	14. Afinite yoğunluk perturbation
5. Moleküler baskılama afinite kromatografisi	15. Kütüphane türevli afinite kromatografisi
6. Membran temelli afinite kromatografisi	16. Afinite çöktürme
7. Affinite kuyruk kromatografisi	17. Afinite elektroforez
8. Lektin afinite kromatografisi	18. Afinite kapiler elektroforez
9. Boya ligand afinite kromatografisi	19. Santrifüj afinite kromatografisi
10. Reseptör afinite kromatografisi	20. Afinite itme kromatografisi

Matriks, biyospesifik ligandın üzerine kovalent olarak bağlandığı materyaldir. Matrikse kovalent olarak bağlanan ve ayrılması veya safılaştırılması istenen biyomoleküle özel, seçimli afinite gösteren ve onu spesifik olarak tanıyıp bağlayan maddelere ligand adı verilir. (Keçili, 2006)

Biyomoleküllerin saflaştırılmasında birçok ligand kullanılmaktadır. İmmobilize edilmiş lektin birçok glikoprotein saflaştırılmasında kullanılır. Hormon reseptörleri hormonların, hormonlar da reseptörlerin saflaştırılmasında kullanılır. İmmünoafinite ile antibadiler antijenlerin saflaştırılmasında kullanılır. Birçok biyomolekülün ligand olarak kullanılması düşünülse de çok pahalı olmaları ve kararlılıklarının düşük olması sebebi ile tercih edilmezler. Pseudo-spesifik (biyomimetik) ligandların geliştirilmesi ile bu tip dezavantajlar büyük ölçüde giderilmiştir (Keçili, 2006).

Tekniğin uygulanması aşamasında dikkat edilmesi gereken diğer bir konu da ligand-molekül arasındaki afinite dir. Eğer afinite çok zayıfsa adsorpsiyon gerçekleşmez. Buna karşın kuvvetli bir afinite olması durumunda adsorbe olmuş proteinin yıkanması zorlaşacaktır. Uygun koşulların elde edilmesi bu tekniğin verimli şekilde kullanılmasını sağlayacaktır. (Demir, 2011)

Matriks seçimi: Katı desteğin ve matriks ile afinite ligandı arasındaki kovalent bağlanmanın doğru şekilde seçilmesi, afinite kromatografisinin başarısını doğrudan etkilemektedir. Katı desteklerin immobilize afinite ligandının kararlılığı üzerinde etkileri vardır. Bazı katı desteklerin kendileri de afinite ligandı içerebilirler. Kromatografi işleminde kullanılacak taşıyıcı matrikste bulunması gereken bazı özellikler şu şekilde sıralanabilir;

1. Çözünür olmamalıdır.
2. Yeterli geçirgenliğe ve geniş spesifik alana sahip olmalıdır.
3. Bağlanma, adsorpsiyon, desorpsiyon ve rejenerasyon koşullarına karşı kimyasal olarak kararlı olmalıdır.
4. Mikrobiyal ve enzimatik ataklara karşı dirençli olmalıdır.
5. Afinite ligandlarının bağlanmasına izin verecek kimyasal reaktiviteye sahip olmalıdır.
6. Proteinlerin nonspesifik etkileşimlerinden etkilenmemek için hidrofilik ve nötral karakterde olmalıdır.
7. Endüstriyel uygulamalar için ekonomik olmalıdır.

Ligand seçimi: Afinite kromatografisinde kullanılacak çok sayıda ligand vardır ve bunların bir çoğu biyolojik kökenlidir. Kolon içinde biyolojik ligand kullanılması nedeniyle bu yöntem biyoafinite kromatografisi veya biyospesifik adsorpsiyon olarak da adlandırılabilir. Birçok biyolojik ligandın yüksek spesifiteye sahip olması, biyoafinite kromatografisini çoğu bileşiğin saflaştırılması için ideal yöntem haline getirmiştir.

İyi bir ligand aşağıdaki özelliklere sahip olmalıdır:

1. Ligand izole edilebilecek şekilde protein ile tersinir kompleksler oluşturmalıdır.
2. Kromatografik uygulamaya uygun spesifiteye sahip olmalıdır.
3. İzole edilen protein veya ligandı etkilemeden ortamdaki basit bir değişimle kompleks kolayla ayrılabilmelidir.
4. Matrikse kolayca immobilize edilebilmek üzere birtakım kimyasal özelliklere sahip olmalıdır.
5. Kararlı komplekslerin oluşumu için kompleks sabiti yeterince yüksek olmalıdır. (Hage ve Ruhn, 2006)

Bazı durumlarda ligandla matriks arasına eklenebilen karbon zincirlerine Ara kollar (Spacer arms) denir. Biyolojik maddelerin aktif bölgelerinin molekülün derin kısımlarında olması durumlarında destek matriksiyle liganda tutunan maddeler arasındaki istenmeyen etkileşimleri önlemek amacıyla matriksle ligand arasına bir kol yerleştirilir. Bu arakolun uzunluğu kritiktir. Eğer çok kısa olursa beklenen etkiyi gösteremez ve ligand, örnek içindeki hedef maddeleri bağlayamaz. Çok uzun olursa ayırma işleminin seçiciliği azalır ve ara kol ile örnekteki maddeler ile hidrofobik etkileşime girerler. Küçük ligandları (enzim inhibitörleri) doğrudan matrikse bağlamak suretiyle hazırlanan adsorbanlar, matriks ile liganda bağlanan maddeler arasında sterik engellemelerden dolayı küçük ayırma kapasitesi gösterebilirler. Bu durumlarda uzantı kolları, etkili bağlanmayı kolaylaştırmak için matriksle ligand arasına yerleştirilirler (Keçili, 2006).

Yüzey modifikasyonları mikroelektronik, biyoteknoloji ve ayırma bilimi alanlarında aktif bir araştırma alanıdır (Öztürk vd., 2008; Özkara vd., 2004; Çanak vd., 2004). Uygulamanın türüne bağlı olarak yüzey modifikasyonları,

fiziksel/kimyasal bağlanma yada istenen moleküllerle yüzey kaplama şeklinde yapılabilmektedir (Singh ve Way, 2005). Yüzeylerin kimyasal yada fiziksel modifikasyonları ile adhezyon, ıslanabilirlik, biyo-uyumluluk ve yüzeyin bağlanma afinitesi gibi özellikler, özel gereksinimleri sağlayacak şekilde değiştirilerek ayarlanabilmektedir (Ma vd., 2005). Modifiye materyaller günümüzde iyi şekilde bilinmekte, biyoloji, tıp ve çevre gibi bir çok alanda potansiyel kullanımları nedeniyle derinlemesine incelenmektedir. Bu uygulamalara enzim (Guo vd., 2003) ve protein ayırmaları (Akgöl ve Denizli, 2004), RNA ve DNA saflaştırmaları (Elaissari ve Bourrel, 2001), kanser teşhisi için rezonans görüntüleme (MRI) teknikleri ile, kontrollü ilaç taşıyıcılar ve hipertermi gibi uygulamalarla kanser terapisi (Sousa vd., 2001) örnek olarak gösterilebilir.

Organik bileşiklerle partiküllerin yüzey modifikasyonlarının gerçekleştirilmesi organik buhar yoğunlaştırma, polimer kaplama, sürfaktan bağlama ve direkt silanizasyon gibi farklı teknikler ile sağlanabilmektedir. Direkt silanizasyon stabilitenin artırılması ve yüzey alanı özelliklerinin kontrolü açısından çekici bir yöntemdir (Takafuji vd., 2004). Silan bir bağlama ajanıdır ve çift fonksiyonlu molekülü hem açık bileşik dolgu partiküllerine, hem de bağlayıcı reçineye bağlanır (Lin vd., 2000). Silan bileşikleri farklı desteklerin üzerindeki hidroksil grupları ile etkileşime girer (Soares vd., 2004; Gries vd., 1998; Öztürk vd., 2007a). Literatürde silan moleküllerinin önce destek yüzeyinde yada solvent içerisindeki iz miktarda su varlığı ile hidrolize olduğu, daha sonra ise yüzey ile bir kovalent bağ yaptığı belirtilmektedir (Silberzan vd., 1991). Öztürk ve arkadaşlarının (2008) gerçekleştirdikleri çalışmada IMEO molekülünün pseudo-spesifik bir ligand olduğu ve silanizasyon ajanı olarak kullanıldığı belirtilmiştir.

Sürfaktan maddelerin, protein ve lipit membranlar için denatüran ve çözünürlüğü arttırıcı ajan olarak işlevlerinin anlaşılması amacıyla, sürfaktan maddeler ile proteinler arasındaki etkileşim geniş şekilde incelenmiştir (Ananthapadmanabhan, 1993; Steinhardt ve Reynolds, 1969; Jones, 1975; Kaneshina vd., 1973; Nozaki vd., 1974; Jones vd., 1975; Hiramatsu vd., 1977; Valstar vd., 2000; Valstar vd., 2001; Vasilescu vd., 1999; Moriyama vd., 2003). Protein ile sürfaktan arasında iki ana etkileşim gözlenmiştir. Bunlar, elektrostatik ilgi sayesinde spesifik bağlanma ve hidrofobik afinite nedenli olarak sürfaktanın proteinle işbirliği içerisindeki birlikteliğidir. Moleküler düzeyde sürfaktan ile protein arasındaki etkileşim önemli bir araştırma alanıdır. Aynı zamanda bu araştırmalar, proteinlerin amino asit

dizilimleri ile ifade edilen kendilerine özgü primer yapılara sahip kompleks biyomakromoleküller olmaları nedeniyle karmaşık çalışmalardır. Sürfaktan moleküllerin proteinlerin hangi bölgelerine ve nasıl bağlandığı önemli bir konudur. Diğer bir önemli nokta ise sürfaktan maddelerin hangi yapısal özelliğinin bu moleküllerin proteine bağlanmasını sağladığıdır.

Lu ve arkadaşları (2006) tarafından gerçekleştirilen çalışmanın sonucunda, BSA'nın sürfaktana bağlanmasını sağlayan en önemli faktörün hidrofobik zincir uzunluğu olduğu tespit edilmiştir. Anyonik sürfaktanın alkil zincir uzunluğu arttıkça BSA daha yüksek oranda sürfaktana bağlanmıştır. Çeşitli kimyasal grupların bağlı olduğu anyonik sürfaktanlar arasında yapılan karşılaştırmada, grup değişiminin büyük bir fark yaratmadığı gözlenmiştir.

Sharma ve arkadaşlarının (2010), BSA'nın selüloz ve çeşitli selüloz türevlerine bağlanmasının denendiği çalışmalarında, diğer selüloz türevleriyle karşılaştırıldığında doğal selülozun BSA sorpsiyonu için gayet uygun bir yapıda olduğu belirlenmiştir. Denenen selüloz türevlerine BSA bağlanma verimlerinin yüksekten düşüğe doğru sırasıyla Metil metakrilat, Selüloz, Hidroksietil metakrilat ve Glisidil metakrilat şeklinde sıralanabileceği belirtilmiştir.

Ayırma, bir karışımın birbirinden farklı iki veya daha fazla ürün haline getirilmesi işlemi olarak tanımlanabilir. Ayırma işlemi kimya, petrokimya ve farmasötik sanayinde en büyük maliyeti oluşturan işlemlerden biridir. Adsorpsiyonda tutma işini yapan madde adsorban veya sorbent adını alır. Adsorpsiyon yönteminde işlemin verimi sorbentin kalitesi ve özellikleriyle doğrudan ilişkilidir (Yang, 2003). Biyosorpsiyon işlemi cansız biyokütlenin sorbent ve sorbat arasındaki afinite ilişkisine dayanan pasif bir olaydır (Volesky, 2007).

Biyofinite kromatografisinin başlıca amacı biyomoleküllerin saflaştırılması ve ayrılmasıdır. Son yıllarda biyofinite kromatografisi sadece proteinlerin değil, aynı zamanda nükleik asit ve hücrelerin ayrılmasında da başarıyla uygulanmıştır.

Protein Saflaştırma: Proteinlerin saflaştırılması afinite kromatografisinin ana amacıdır. Biyofinite kromatografisi tekniğinin geliştirilmesi (matriks seçimi, metot geliştirilmesi), protein saflaştırmanın bir fonksiyonu olarak yapılmıştır. Bu alanda, proteinlerin saflaştırılması ya gerçek biyospesifik afinite ya da pseudo-biyospesifik afinite kromatografisi ile yapılır. İlk durumda ligand, bir substrat,

kofaktör, reseptör veya antibadi olabilir. İkinci durumda ligand, basit (aromatik, hidrofobik vb.) ya da kompleks etkileşimde bulunan sentetik ya da doğal bir moleküldür. Örnek olarak albümin, dehidrojenazlar ve kinaz gibi pek çok proteine afinite gösteren immobilize edilmiş Cibacron Blue verilebilir.

Hücre Saflaştırma: Hücre ayırmaları için afinite kromatografisi, glutaraldehit, aktiflenmiş AcA ve Mersalil-Trisakril C üzerine immobilize edilmiş antibadilerin kullanımıyla başarılı bir şekilde uygulanmıştır. Avidin-Ultragel A4R de hücre ayırımı için ilginç ve çok yönlü bir araçtır.

Elüsyon, hücre uygulamasına etki edebilecek iyonik kuvvet veya pH değişimlerinin olmadığı fizyolojik koşullarda gerçekleştirilir. Üç tür elüsyon söz konusudur: Yarışmalı elüsyon, mekanik elüsyon, çift adsorpsiyon-desorpsiyon mekanizması. Rekabete dayalı elüsyon, ligand lektin olduğunda genellikle şekerlerle gerçekleştirilir. Mekanik elüsyon cam çubuk kullanılarak yumuşak bir hızlandırmayla süspansiyonda gerçekleştirilir. Çift adsorpsiyon mekanizması, ligand ve jel arasında ayrılabilir bağları içerir.

Nükleik Asit Ayırma: Nükleik asitler, diğer biyomoleküllerle çok sayıda afinite etkileşimlerine sahiptirler. Çift sarmallı DNA oluşumu, pürin ve pirimidin bazları arasındaki (Hidrojen bağları, hidrofobik etkileşimler, yük-transfer etkileşimleri gibi) baz çiftlenme etkileşimleri sonucudur. Kromozomların oluşumunda, histonlarla DNA'nın birleşmesi ile DNA zincirinde çok sayıda enzimin davranışı bu etkileşimlere birkaç örnektir. Nükleik asitler üç farklı tür etkileşimi içerir: Baz etkileşimlerini tamamlayıcı, proteinlerle etkileşim, belirli aromatik moleküllerle etkileşim. Protein ve enzimlerle biyoafinite, genellikle nükleik asitlerin immobilizasyonuna dayanır. Bu afinite tamamlayıcı sistem, immobilize DNA üzerine proteinlerin etkileşimiyle DNA'nın saflaştırılmasını açıklar. Yine de bazı durumlarda histonlar DNA'nın ayrılması için ligand olarak kullanılırlar. Nükleik asitler ve bazı aromatik moleküller arasındaki afinite mekanizmaları, pürin ve pirimidin bazları ve DNA sarmalı ve dışındaki elektrostatik etkileşim prosesleri arasındaki etkileşim nedeniyledir. Bu oluşum, yük-transfer etkileşimlerini, hidrofobik ve tamamlayıcı iyonik yükleri içerir (Keçili, 2006).

Çalışmamızda kullanılan teknik Pseudo-Spesifik Afinite Kromatografisidir. 1987'de Cram, Lehn ve Pederson'un Nobel Ödülü almasından günümüze kadar geçen dönemde moleküler tanıma ifadesi büyük ilgi görmüştür. Moleküllerin

biyolojik ve kimyasal özelliklerinden yararlanarak ayrılma ve saflaştırılmasında “Afinite Kromatografisi”, seçiciliği ve duyarlılığı ile eşsiz bir yer tutmaktadır. Afinite kromatografisinde klasik ayırma yöntemlerinden farklı olarak molekülleri seçici olarak tanıma yeteneğine sahip ligandlar kullanılmaktadır. Afinite kromatografisi ile proteinler, enzimler, hormonlar, antibadiler ve antijenler gibi biyolojik moleküllerin saflaştırılması başarı ile gerçekleştirilmiştir. Ancak endüstriyel boyutta düşünüldüğünde yöntemin en önemli dezavantajı kullanılan ligandların oldukça pahalı olmasıdır. Ayrıca biyolojik ligandlar (proteinler, enzim substratları ve inhibitörleri, nükleik asitler ve hormon reseptörleri vb.) oldukça büyük moleküllerdir. Yaşanan bu gibi sıkıntılar, seçiciliği yüksek ve daha ucuz yöntemlerin geliştirilmesi ile sonuçlanmıştır (Türkcan, 2012). Son yıllarda biyomoleküllerin saflaştırılmasında biyoligandların yerine pseudo-spesifik (biyomimetik) ligandlar kullanılmaya başlanmıştır. Biyomimetik ligandların temelini moleküler tanıma oluşturur. Özellikle biyolojik tanıma özelliğine sahip yapıların keşfi ve bu etkileşimlerin mekanistik olarak aydınlatılması ile moleküler tanıma yeteneği olan yapay moleküllerin geliştirilmesi büyük önem kazanmıştır (Keçili, 2006).

Biyomimetik ligandlar biyolojik molekülleri taklit ederek saflaştırılması istenen hedef molekül ile moleküler tanıma temeline göre etkileşebilen yapay moleküllerdir. Bu tür ligandların kullanıldığı afinite kromatografisi türüne “Pseudo-afinite kromatografisi” denir (Keçili, 2006). Pseudo-spesifik moleküller, ayırma ve saflaştırmanın yanı sıra biyoteknoloji, tıp ve biyoanalitik alanlarında da kullanılmaktadır. Pseudo-spesifik ligandlar biyoligandlara göre önemli avantajlara sahiptirler (Bueno, 1996). Bu avantajlar arasında kolaylıkla sterilize edilebilmeleri ile küçük boyutlu, ucuz ve tekrar kullanılabilir olmalarını sayabiliriz. Aynı zamanda pseudo-spesifik ligandların afinite sabitleri düşüktür ve zayıf afinite ligand ailesine aittirler. Buna rağmen elektrostatik, hidrofobik ve Van der Waals etkileşimleri ile hidrojen bağları gibi etkilerin tümü, seçici ve kuvvetli bir bağlanma ile sonuçlanmaktadır. Uygulama esnasında matriksten sızma durumunda herhangi bir immün cevaba neden olmamaları, pseudo-spesifik ligandların biyoligandlara üstünlüklerinden biridir (Huang ve Carbonell 2000; Baumbach vd, 2009). Ayrıca bu ligandlar biyoligandlara göre daha kararlı olup yüksek miktarlarda ve düşük maliyette üretilebilmektedirler.

Pseudo-spesifik ligandlar ilgili ilk çalışmalar ligand olarak tekstil boyalarının kullanılmasıyla gerçekleştirilmiştir. Tekstil boyalarının en büyük özelliği, protein

yapısındaki dipeptit bağlarını taklit edebilmeleridir. Tekstil boyalarının hedef moleküle spesifitesini arttırmak için uç gruplar takılabilir ya da moleküller yeniden dizayn edilebilirler. Bu yeni tip boyalara “Biyomimetik boyalar” adı verilir. İlk biyomimetik boya tripsin saflaştırılması için diaminometil benzen grubu aracılığıyla klorotriazin halkasını reaktive etmek için benzamidin kullanılmasıyla hazırlanmıştır (Keçili, 2006).

Pseudo-spesifik afinite kromatografisi kullanılarak gerçekleştirilen çalışmalara Huse ve arkadaşlarının (2002) çalışması ile Öztürk ve arkadaşlarının (2008) çalışması örnek gösterilebilir. Huse ve arkadaşları (2002), PHEMA (Poli(hidroksietil metakrilat)) nanopartiküllerinin hidrofilik yapılar olduğunu belirtmiştir. Çalışmada ayrıca molekülün ticari olarak ulaşılabilir ve ucuz olması, toksik olmaması, IgG (immünoglobülin G) ile spesifik etkileşime girebilen bir pseudo-spesifik imidazol halkasına ve farklı katı matrikslere tutunmasını sağlayan $-Si(OEt)_3$ şeklinde bir yapışkan uca sahip olması özelliklerinden dolayı IMEO'nun (3-(2-imidazoline-1-yl)propyl(triethoxysilane)) silanizasyon ajanı olarak seçildiği belirtilmiştir. İmidazol halkası (protein yapısındaki histidin yan zincirleri), hidrofobik etkileşim, van der Waals etkileşimleri, elektrostatik etkileşimler ve hidrojen bağlarını gösterebilen "amixed mod" etkileşim mekanizması ile bilinmektedir. Öztürk ve arkadaşlarının (2008) aynı çalışmasında reaktif imidazol içeren IMEO, pseudo-spesifik ligand olarak kullanılarak, nanopartiküllere kovalent olarak bağlanmıştır. PHEMA-IMEO nanopartikülleri IgG'nin insan plazmasından afinite kromatografisi ile ayrılması amacıyla kullanılmıştır. PHEMA nanopartiküllerine IgG bağlanması 5,2mg/g dır. PHEMA-IMEO nanopartiküllerine bağlanma ise 843mg/g olarak çok daha yüksek bir değer bulunmuştur. PHEMA-IMEO partiküllerine IgG, bağlanma kapasitesinde belirgin bir düşüş olmaksızın tekrar tekrar ayrılıp bağlanabilmektedir. Spesifik olmayan etkileşimlerin saptanabilmesi için IgG' nin PHEMA nanopartiküllerine bağlanması da gerçekleştirilmiştir. Spesifik olmayan bağlanma 5,2 mg/g olarak bulunmuştur. Silanizasyon, IgG' nin bağlanma oranını çok arttırarak 843 mg/g' a yükseltmiştir. Bu artışın IMEO molekülü ile IgG arasındaki özel bir etkileşim dolayısıyla olduğu açıktır. Plazmadaki IgG konsantrasyonu arttıkça birim başına IgG bağlanma oranı 8 mg/mL civarına kadar yükselir ve burada platoya ulaşır. Bu noktaya kadar gözlenen hızlı artış ise silenize edilmiş PHEMA nanopartiküllerine bağlı IMEO molekülü ile IgG arasındaki yüksek afiniteyi ifade etmektedir. Deneylerde IMEO salımı gözlenmemesi IMEO molekülünün PHEMA nanopartiküllerine güçlü bir

şekilde immobilize olduğunu göstermektedir. Yukarıda incelenen çalışmalar IgG proteini ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızda kullanılan BSA'nın (sığır serum albümininin) da protein yapıda bir molekül olması dolayısıyla aynı IgG gibi davranacağı ve yüzeye bağlanmış IMEO molekülü sayesinde bitki çeperine bağlanma ilgisinin artacağı öngörülmektedir.

Geniş çaplı DNA sekanslama biyomedikal araştırmaları kısa zamanda değişime uğratmıştır. İnsan genlerinin büyük ölçüde ortaya çıkarılması ile birlikte, karmaşık biyolojik süreçlerin anlaşılması ve biyolojik problemlerin çözülmesi için bir "fabrika" yaklaşımı benimsenmek istenmektedir. 1990 yılından itibaren biyolojik kütle spektrometrisi güçlü bir analitik metot olarak ortaya çıkmış ve protein tayininde hemen hemen tüm sınırları ortadan kaldırmıştır. Bu gelişme ile birlikte insan genetik kodunun kolayca ulaşılabilir hale gelmesi adeta yeni bir çağı başlatmıştır. Günümüzde gen ürünlerinin fonksiyonel analizleri yada "fonksiyonel genomik", proteinlerin geniş çaplı lokalizasyon, karakterizasyon ve etkileşim çalışmaları sayesinde, proteomik teknikler yardımıyla gelişmektedir (Pandey ve Mann, 2000).

Proteomik alanı, bir arada bulunan yüksek çeşitlilikteki proteinlerin yapısal ve fonksiyonel özelliklerinin tanımlanması ile ilgilenir ve günümüzde kompleks protein karışımlarındaki proteinlerin tanımlanmasında etkili bir yöntem haline gelmiştir (Mann ve Jensen, 2003). Bu alan çok hızlı şekilde büyümekte ve aynı zamanda proteomik teknikleri yaygınlaştıkça ve daha fazla biyolojik soruya cevap aranmaya başlandıkça ivme kazanmaktadır. Ancak proteomik alanının hızlı ilerlemesi her ne kadar ilgi çekici olsa da, beraberinde birçok teknik sorun getirmiştir (Wilkins vd., 2006).

Proteomikteki en önemli gelişme, jel üzerinde ayrılmış proteinlerin karakterizasyonu için kütle spektroskopisinin kullanılmaya başlanmasıdır. Bu sayede proteinlerin sadece gösterilmesi değil, ayrıldıktan sonra analiz edilmesi de mümkün olmuştur. Kütle spektrometrisi klasik yöntem olan Edman degradasyonunun yerini almıştır. Yüksek duyarlılığı, protein karışımlarını analiz edebilmesi, ve daha doğru sonuçlar vermesi nedeniyle aynı zamanda protein kimyası alanında da bu sistem tercih edilmeye başlanmıştır. Bu yöntem jelde ayrılmış proteinlerin, belirli bir sekansa spesifik olan tripsin gibi bir enzim ile parçalanması prensibine dayanır. Analiz aşamasında peptitlerin proteinlere tercih edilmesinin nedeni, jelde ayrılmış proteinlerin uzaklaştırılması ve kütle

spektrometrisi ile analiz edilmesinin daha zor olmasıdır. Ayrıca proteinlerin molekül ağırlıkları genellikle veritabanı tanımlaması için uygun değildir. Buna karşın peptitler jelden kolayca uzaklaştırılırlar ve az sayıda da olsa belirli peptitlerin bir arada tespit edilmeleri, kolayca bir proteinin tayin edilmesi için yeterlidir.

Veritabanlarında büyük miktarda genomik veri birikmeye başladıkça, bilim adamları tamamen ortaya konmuş genetik kodun biyolojik fonksiyonu açıklamak için yetersiz olduğunu farketmişlerdir. Hücre normal olarak bir çok metabolik ve regülatör yol izi sayesinde hayatta kalmaktadır. Genler ile protein içeriği, yani proteom arasında direkt ve lineer bir ilişki yoktur. Proteomik bilimi genomik bilimi için tamamlayıcı özelliktedir. Çünkü proteomik, hücrede asıl işlevleri gören gen ürünlerini incelemeye odaklanmıştır. Bu nedenle proteomik ilaç üretimine direkt olarak etki etmektedir, çünkü tüm ilaçların etki edecekleri hedefleri proteinlerdir.

Genetik bilginin sekansının açıkça ortaya konması ile ortaya çıkan veri aslında burada fonksiyonel bir genin bulunduğunu göstermez. Biyoenformatik biliminin gelişmişliğine rağmen genomik veri içerisinden genleri doğru şekilde tespit etmek zordur. Yakın akraba organizmaların genomlarının çıkarılması ile elde edilen verileri karşılaştıran "karşılaştırmalı genomik" her ne kadar bu problemin çözümüne yardımcı olsa da, ana yapının tespit edilebilmesi için göze alınan hata payı çok yüksektir. Bu durum özellikle tamamen gözden kaçabilecek küçük genler ile, bilinen diğer genlere homolog özellikte olmayan genler için ortaya çıkmaktadır. Yakın zamanda gerçekleştirilen bir çalışma ile Mycoplasma genitalium'un 340 geni için gerçekleştirilen çıkarımlarda hata payının en az %8 olduğu ortaya koyulmuştur. Bu basit canlıya göre çok daha geniş olan insan genomunun benzer bir hata payı ile değerlendirilmesi sonucunda ne gibi sonuçların ortaya çıkacağı kolayca öngörülebilir. Genetik sekans değerlendirilirken bir gen ürününün proteomik teknikler ile doğrulanması aşaması genomun anlamlandırılması için bir ilk adım niteliğindedir. Bunun yanında DNA sekansında görülmeyen izoformlar yada posttranslasyonel modifikasyonlar gibi protein modifikasyonları sadece proteomik metodoloji sayesinde belirlenebilmektedir. Sekans üzerinden ortaya çıkarılması çok zor olan gen ürünlerinin lokalizasyonu deneysel olarak belirlenebilmektedir. Proteoliz, geri dönüştürme ve hücre kompartımanlarında tutulma gibi mekanizmalar ile proteinlerin regülasyonu genleri değil, gen ürünlerini etkilemektedir. Son olarak

protein-protein etkileşimleri ve organel gibi hücresel yapıların moleküler kompozisyonu sadece protein bazında açıklığa kavuşturulabilmektedir (Pandey ve Mann, 2000).

Pandey ve Mann (2000), çalışmalarında proteomik araştırmaları üç ana alana ayırmıştır: Proteinleri ve post translasyonel modifikasyonlarını geniş çaplı olarak tanımlamak için protein mikro karakterizasyonu, protein seviyelerinin incelenmesiyle birçok farklı hastalık için potansiyel marker özelliğindeki proteinlerin karşılaştırılabilmesini sağlayan diferansiyel görüntüleme proteomik çalışmaları, kütle spektrometrisi ve "yeast two-hybrid system" gibi teknikler kullanılarak protein-protein etkileşimlerinin araştırılması.

Vücutta kana temas eden her organ ve doku, kan içerisindeki proteinlerin miktarını ve özelliğini değiştirmekte yada kana yeni proteinler eklemektedir. Bu sayede serum proteomu organ yada dokuların anormal yada patolojik durumlarını yansıtabilmektedir. (Petricoin vd., 2002). Serum ve plazma hastalık işaretleyicilerini görüntülemek için önemli ortamlardır (Steel vd., 2003; Tabar vd., 2000). Serumda bulunan ve birçok hastalığın erken teşhis, teşhis, takip ve tedavisi açısından önemli olabilecek proteinlerin (işaretleyici proteinler) keşfedilebilmesi için proteomik metotlar geliştirilmiştir (Zhou vd., 2002; Wulfskuhle vd., 2002; Petricoin vd., 2002; Liotta ve Petricoin, 2000; Prasanna vd., 2000; Emmert-Buck vd., 2000). Gelişmekte olan klinik proteomik ve geniş çaplı biyolojik tekniklerin başarısı, proteinlerin hızlı şekilde saflaştırılma, ön ayrılma ve analizlerine olanak sağlayacak sistemlerin geliştirilmesi ve ulaşılabilirliğine bağlıdır (Haney vd., 2003). Çözeltiler içerisindeki proteinlerin analizi rutin olarak 2 boyutlu poliakrilamid jel elektroforezi (2-D PAGE) ile gerçekleştirilmektedir. Günümüzde proteom bilgisini 2-D PAGE' den daha etkili şekilde ortaya çıkarabilen bir yöntem olmamakla birlikte, 2-D PAGE' in uygulanabilirliği, noktaların birleşmesi ve düşük yoğunlukta bulunan proteinlerin sınırlı şekilde görüntülenebilmesi gibi problemler nedeniyle sınırlıdır (Locke vd., 2002). Yine de jelde tespit edilen proteinlerin sayısını etkileyen tutarsız örnek yükleme ve boyamanın olmamasından dolayı, analitik bütünlük 2-D PAGE tekniğinin doğasında vardır (Wilkins vd., 2006).

Medikal açıdan bakıldığında, en zengin ve bilgi sağlayan proteom kan serumuna aittir. Çünkü neredeyse tüm hücreler kan ile bağlantılı haldedir ve herhangi bir hasar ya da ölüm halinde hücre içeriklerinin bir kısmını kana salarlar (Anderson

vd., 2004). Prensipite basit görünmesine rağmen, pratikte serum proteomunu analiz etmek oldukça zordur (Veenstra vd., 2005). Serum, tuzlar, lipitler, elektrolitler, peptit ve aminoasitler gibi küçük metabolitler şeklinde özetlenebilecek çeşitli moleküllerin haricinde, mililitre başına 60-80 miligram protein içerir (Chan vd., 2004). Bu proteinler içinden albümin, toplam protein miktarının yüzde 50 ila 55'ini meydana getirir (Anderson ve Anderson, 2002). Albümin ile birlikte diğer birkaç protein (immünoglobülinler, transferrin, haploglobin ve lipoproteinler) serumdaki tüm proteinlerin yüzde 90'ını meydana getirir. Geri kalan %10'luk kısım 12 proteinden meydana gelir. Ancak en sona kalan %1'den de küçük dilimde biyo-işaretleyici olma potansiyeline sahip oldukları için büyük önem taşıyan, düşük yoğunluktaki proteinler bulunur (Tirumalai vd., 2003). Yüksek dinamizme sahip bu ortamdaki protein analit konsantrasyonu, kütle, izoelektrik nokta, hidrofobiklik derecesi ve post translasyonel modifikasyonlar gibi protein özellikleri, serumun proteomik incelemeler amacıyla kullanılabilir en zor örnek olmasına neden olur (Hortin vd., 2008).

Proteomikte en önemli aşamalardan biri de protein örneğinin elde edilmesi ve düzenlenmesidir. Genomda tespit edilen 100.000 gen içerisinde bir hücrenin ifade ettiği yaklaşık 10.000 gen olduğunu düşünelim, ki dokularda daha yüksek miktarlarda gen ifade edilir. Dolayısıyla biyolojik örneklerdeki protein çeşidi değişken olarak 1.000.000 gibi seviyelerde olabilir. En iyi 2 boyutlu jeller bile aynı anda en fazla 1.000 proteini analiz edebilir. Bu durum ham bir protein örneği kullanıldığında sadece çok yüksek miktarda bulunan proteinlerin tespit edilebilmesi ile sonuçlanır. İdeal çözüm ise afinite bazlı protein ayırma teknikleri ile ham protein örneğinin işlenerek karmaşıklığının azaltılmasıdır (Pandey ve Mann, 2000).

Albümin koloit ozmotik kan basıncına önemli ölçüde katkıda bulunan fizyolojik fonksiyonlara sahiptir. Aynı zamanda iç ve dış kaynaklı, safra asitleri, bilirubin, amino asitler (özellikle triptofan, tirozin ve sistein), metal iyonları (bakır, çinko, kalsiyum, magnezyum vb.), steroidler (progesteron, testosteron, aldosteron ve kortizol), uzun zincirli yağ asitleri ve ilaçlar gibi birçok maddenin taşınma, dağıtım ve metabolizmasında rol alır (Akgöl vd., 2004). Albümin, tanı ve terapide birçok kullanıma sahip bir plazma proteindir (Karakoç vd., 2009). Dünya çapında her yıl yüzlerce ton üretilen albümin, günümüzde diğer tüm farmasötik maddelerden daha yüksek miktarda kullanılmaktadır (Avcıbaşı vd., 2010). Albümin uygulaması akut hastaların sıvı idaresinde 50 yılı aşkın süredir

kullanılmaktadır (Norbert, 1976). Albümin terapisi ABD' de hipovolemi yada şok yanmaları, hipoalbüminemi yada hipoproteinemi, cerrahi, travma, kardiyopulmoner by-pass, akut solunum bozukluğu sendromu, hemodiyaliz, akut nefroz, hiperbilirubinemi, akut karaciğer yetmezliği, assit (ascites) ve akut peritonit'te protein bakımından zengin sıvıların ayrılmasında, pankreatit, mediastinit ve yaygın selülit gibi rahatsızlıklar için lisanslı bir yöntemdir (Wilkes ve Navickis, 2001). Albümin uzaklaştırması ve izolasyonu günümüzde kandan Cohn'un klasik damıtma metoduyla (Cohn vd., 1946) gerçekleştirilebilmektedir. Cohn'un metodu, proteinlerin çeşitli pH, iyonik kuvvet ve sıcaklıklarda etanol kullanılarak çöktürülmesi temeline dayanır. Ancak kan proteinlerinin endüstriyel damıtılmasında kullanılan en eski yöntem olan bu teknik, yüksek oranda spesifik değildir ve denatüre olmuş proteinleri açığa çıkarabilir (Stotz vd., 1990). Akgöl ve arkadaşlarının (2007) da çalışmalarında belirttiği gibi, albümin medikal kullanım için yüksek saflık gerektirir. Biyoteknoloji, biyokimya, farmasötik bilimi ve tıp, proteinlerin izolasyonu ve saflaştırılması için daha yüksek güvenilirliğe sahip ve daha etkili bir yöntem ihtiyacı duymaktadır (Kassab vd., 2000; Altıntaş vd., 2006; Öztürk vd., 2007b.).

Örneğin karmaşıklığının, yüksek bollukta bulunan proteinlerin uzaklaştırılması ile azaltılması, mecburi olarak serum proteomu çalışmalarının ilk basamağını temsil eder. Ön ayırma ve albümin uzaklaştırılması analize giren protein miktarını düşürdüğünden, bu yöntem ile düşük yoğunlukta bulunan proteinlerin gözlenmesi ve bağl ifade edilme seviyeleri artırılmış olur (Locke vd., 2002). Ön ayırma veya albümin uzaklaştırma konusunda birçok yöntem açıklanmıştır (Steel vd., 2003; Haney vd., 2002; Locke vd., 2002). Ancak bu yöntemler tekrar kullanılabilir değildir ve monoklonal antikor temeline dayanan teknikler ise çok pahalıdır. İzoelektrik yakalama (Herbert ve Righetti, 2000), cibacron mavi sepharose afinite kolon kromatografisi (Travis vd., 1976) ve peptit afinite kolon kromatografisi (Sato, vd., 2002), albümin uzaklaştırılması ile ilgili birçok farklı stratejiden bazılarıdır.

Son yıllarda protein içeriğinin belirlenmesinde plazmadan albümin ve immüoglobulinlerin uzaklaştırılması için birçok ticari ürün geliştirilmiştir. "Aurum Serum Protein Minikit" (Bio-Rad, ABD), "ProteoExtract Albumin/IgG Removal kit" (Merck, Almanya), "Multiple Affinity Removal Column" (Agilent Technologies, ABD), "POROS Affinity Depletion Cartridges" (Applied Biosystems, ABD) ve "Albumin-IgG Removal Kit" (Amersham Biosciences,

İsviçre) bunlardan bazılarıdır. Albümin ve immünoglobulinlerin uzaklaştırılmasında ticari ürünlerin birçoğunda kullanılan temel yaklaşım albümine karşı afinitesi yüksek bir tekstil boyası olan Cibacron Blue F3GA, immünoglobulinler için ise Protein A/G kullanmaktır.

Hacettepe Üniversitesi Kimya Bölümü, Biyokimya Anabilim Dalı laboratuvarlarında yürütülen çalışmalarda özellikle albümin ve IgG uzaklaştırılmasına yönelik polimerik malzemeler hazırlanmış ve etkinlikleri ticari ürünler ile karşılaştırılmıştır. Altıntaş ve arkadaşlarının (2007) çalışmasında plazmadan albümin ve IgG'nin etkin olarak uzaklaştırıldığı rapor edilmiştir. Albümini ayırmak için Biyo-afinite yaklaşımı kullanılmış ve %99,3 uzaklaştırma verimine ulaşılmıştır. Ticari bir malzeme olan "Aurum Serum Protein Minikit" (Bio-Rad, ABD), albümini maksimum %96,4 etkinlikle albümini serumdan uzaklandırmaktadır. Proteom analizi klinik araştırmalarda yeni ufuklar açmasına rağmen elde edilen veri miktarını ve duyarlılığını arttırmak için daha alınması gereken uzun bir yol vardır (Denizli ve Küfrevioğlu, 2010).

Bu tez çalışmasının amacı, proteomik çalışmalarda normalde sentetik polimerlerle gerçekleştirilen albümin uzaklaştırılması işleminin, biryofit dokularının doğal polimerler içeren hücre çeperi kullanılarak gerçekleştirilmesidir. Karayosunlarının, geniş yayılışa sahip olmaları sebebiyle doğadan direkt olarak toplanabilmesi yada katı veya sıvı ortamda kolaylıkla kültüre edilebilmesi mümkündür. Bu sayede bu yöntem proteomik çalışmalar için sentetik polimerlerden daha ekonomik bir yol olarak araştırmacılara sunulabilir. Aynı zamanda polimer sentezi sırasında harcanan hammadde, zaman ve emek de ortadan kaldırılmış olur. Bu yöntemin bir diğer yararı da doğaya bırakılacak muhtemel atıkların sentetik değil zaten doğal olan bir materyal olması ve geri dönüşümünün çok daha hızlı olmasıdır. Karayosunu hücre çeperinin yapısal olarak sentetik HEMA polimerine benzemesi, hali hazırda literatürde bulunan pek çok yüzey modifikasyonunun bu doğal hammadde için de kullanılabilir olmasını sağlar. Bu sayede bu yöntem sadece albümin yada protein adsorpsiyonu ile sınırlı kalmayarak birçok farklı biyoteknolojik işlevde kullanılabilir.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Bitkilerin Toplanması

Çalışmalarda kullanılmak üzere ülkemizde özellikle Batı Anadolu'da geniş yayılışa sahip olan *Antitrichia californica* Sull., *Pterogonium gracile* (Hedw.) Sm., *Hypnum cupressiforme* Hedw. ve *Homalothecium sericeum* (Hedw.) Bruch, Schimp. & W.Gümbel türleri araştırma materyali olarak kullanılmıştır.

Belirlenen karayosunu türlerinin toplanması amacıyla 2012 yılı Ekim ayında Aydın / Koçarlı (Mersinbeleni köyü - N 37° 37' 23.44", E 27° 39' 14.90" - 475 m yükseklik) Mevkii'nde arazi çalışması gerçekleştirilmiştir. Arazi çalışmasında toplanan bitkiler uygun plastik torbalara alınarak laboratuvar ortamına getirilmiştir. Bitki türlerinin teşhisi Adnan Menderes Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Botanik Anabilim dalında ilgili literatür (Kürschner, 2012) kullanılarak uzmanlarca yapılmış ve birer örnek Adnan Menderes Üniversitesi Herbariyumu'nda (AYDN) korumaya alınmıştır. Örneklerin herbariyum numaraları tabloda verilmiştir.

Çizelge 2.1. Deneyde kullanılan bitkilerin Adnan Menderes Herbariyumu'na kaydedilen örneklerinin herbariyum numaraları

<i>Hypnum cupressiforme</i>	AYDN 3288
<i>Homalothecium sericeum</i>	AYDN 3289
<i>Pterogonium gracile</i>	AYDN 3290
<i>Antitrichia californica</i>	AYDN 3291

2.1.1.1. Araştırma materyallerinin (bitkilerin) özellikleri:

Hypnum cupressiforme: Yaprakları 2 mm uzunluğunda, uzun ve düzgün bir uca sahip ve belirgin şekilde kıvrıktır. Yapraklarda genellikle kosta bulunmaz. Sürgün uçları parlak yeşil iken bitkinin daha alt kısımları kahverengiye doğru dönen bir görünüme sahiptir. Bir gaga ile sonlanan kapsülleri sıkça görülür.

Homalothecium sericeum: Yeşil yada sarımsı yeşil ve uzun ana sürgünler yere yakın şekilde gelişir. Bu ana sürgünler üzerinde ıslakken yukarıya, kuruyken ana sürgüne doğru kıvrılan yan sürgünler bulunur. Kuru bitki ıslanıldığında yan sürgünler hızlıca açılır ve üzerlerindeki yapraklar da dışarıya doğru açılır. Yapraklar 2.5-3 mm uzunluğunda, belirgin bir katlanmaya sahip, dar mızrak ucu şeklinde ve her iki kenarından eşit oranda düzgün bir şekilde gelen uzun bir uca sahiptir. Yaprak kenarları az miktarda dişlidir. Kapsüller düz ve silindirikdir.

Pterogonium gracile: Orta boyutlu kahverengimsi yeşil öbekler halinde bulunur. Üst kısımlarında dallanmalar gösterir. Kuru iken birbiri üzerine kapanmış şekilde olan yapraklar bikiye pürüzsüz bir görünüm kazandırır. Ancak oram neminin artmasıyla yaprakları hemen açılır. 1-1.5 mm uzunluğundaki yapraklar üçgen şekillidir. Genellikle yaprağın dörtte birine kadar uzanan bir kosta bulunduran yapraklar, dişli ve akut bir uca sahiptir. Kapsül nadiren görülür.

Antitrichia californica: Bitkiler kuru olduğunda koyu yeşil, nemli olduğunda parlak yeşil renktedir. Substrat üzerinde halı oluşturan ve yayılan bir yapıya sahiptir. Yaprakları kuru olduğunda imbrikat, nemli olduğunda dik-açık haldedir. Ovat-lanseolat, uç kısmı dentikulattır. Ülkemizin önemli bir kısmında yaygın olarak ve büyük kütleler halinde bulunur.

2.1.2. Kullanılan Ekipman

Bitki teşhisi aşamasında stereo mikroskop ve araştırma mikroskobu (Olympus BX-50) kullanılmıştır. Bitkilerin kurutulma işlemi etüvde gerçekleştirilmiştir. Kurutulan bitkiler seramik havan ile parçalanmıştır.

Kurutma sonrası öğütülen karayosunu örneklerinin partikül boyutlarının belirlenmesi aşamasında Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümünde bulunan 500, 355, 250 ve 125 µm delik büyüklüğüne sahip elekler ve Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümünde bulunan analitik eleme makinesi (Retsch AS 200) kullanılmıştır.

Parçalanmış olan kuru bitkilerin karakterizasyon çalışmasında Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Deri Mühendisliği Bölümünde bulunan FTIR spektrofotometresi (Perkin Elmer - Spectrum 100), İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Malzeme Araştırma Merkezi'nde bulunan Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM, Quanta

250 FEG) kullanılmıştır. Bitki örneklerinin içerisindeki suyun tamamen uzaklaştırılmasını gerektiren işlemler öncesinde Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde bulunan liyofilizatör kullanılmıştır.

Rutin laboratuvar çalışmalarında karıştırma işlemleri için açısız karıştırıcı ve çoklu manyetik karıştırıcı (IKA Werke - RO 10), santrifüjleme işlemi için santrifüj (Eppendorf AG - MiniSpin plus), tamponların pH ayarlaması için pH metre (NeoMet ISTE pH-240L), absorbans ölçümleri için spektrofotometre (Thermo-Evolution 60), örneklerin çözünmesinde kullanılmak üzere ultrasonik banyo (Bandelin Sonorex-RK 100 H), tartım işlemleri için 0.1 mg hassasiyette terazi (Kern ABS) ve otomatik pipetler (Eppendorf Research) kullanılmıştır.

Adsorpsiyon denemelerinde kullanılan BSA, tampon çözeltilerin hazırlanmasında kullanılan Sodyum Asetat, Sodyum Karbonat, Sodyum Sitrat ile Bradford Reaktif hazırlanmasında kullanılan Coomassie Blue, Etanol ve fosforik asit gibi kimyasallar Merck ve Sigma-Aldrich gibi çeşitli firmalardan, bitki partiküllerinin silanlanmasında kullanılan IMEO ise Fluka'dan, temin edilmiştir.

2.2. Yöntem

2.2.1. Bitkilerin Denemelere Hazırlanması

Toplanan karayosunu örnekleri yetiştikleri ortam itibariyle yoğun olarak tortu ve döküntü içermektedir. İlerleyen çalışmalarda sonuçları etkilememesi açısından bu tortuların mümkün olduğunca ayıklanmasına çalışılmıştır. Bu amaçla ilk aşamada bitkiler henüz tam olarak kurumadan alt kısımlarında yer alan kaba tortuları elle ve makasla ayıklanmıştır. Buna ek olarak ölü kısımların bozunumuyla ortaya çıkabilecek istenilmeyen bileşiklerden sakınmak amacıyla canlılığını yitirmeye başlamış olan kısımları kesilmiş, canlı ve nispeten temiz kısımlar kurutulma aşaması için ayrılmıştır. Bu şekilde hazırlanan bitki örnekleri distile su kullanılarak yıkanmış ve yaprakların arasında kalması muhtemel tortulardan olduğunca arındırılmaya çalışılmıştır. Yıkama ve temizleme işlemlerinden geçirilen bitkiler kurutma kağıdı üzerinde oda sıcaklığında bekletilerek kabaca nemini vermesi sağlanmıştır (Şekil 2.1.). Bitkiler son olarak 1 hafta süreyle 40 °C sıcaklıkta etüvde tutularak kurutulmuştur. Tamamen kuruyan bitkiler seramik havan yardımı ile ezilmiş ve toz haline getirilerek kavanozlarda saklanmıştır.

Kavanozlarda saklanan bitki örnekleri Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü araştırma laboratuvarında elek analizine tabi tutulmuştur. Elek analizi, toz halindeki örneğin elek sistemine yukarıdan yüklenmesi ve cihazın titreşimler oluşturması sonucunda tanecik boyutlarına göre ayrılması işlemidir. Elek analizi için kullanılan analitik eleme makinesi (Retsch AS 200 Digit), Şekil 2.2.'de gösterilmiştir. Analiz için temel olarak 5 farklı tanecik boyu aralığı tercih edilmiştir.

Çizelge 2.2. Elek analizinde kullanılan büyüklük aralıkları

500 μm 'dan büyük tanecik boyu
500 μm – 355 μm tanecik boyu
355 μm – 250 μm tanecik boyu
250 μm – 125 μm tanecik boyu
125 μm 'den küçük tanecik boyu



Şekil 2.1. Karayosunu örneklerinin ön kurutma aşaması (Şekildeki örnek *Homalothecium sericeum* türüdür)



Şekil 2.2. Analitik eleme makinesi

Ölçüm işlemine başlamadan önce metal elekler yumuşak uçlu bir fırça yardımıyla temizlenerek, ve ardından da distile sudan geçirilerek gözeneklerin açılması ve varsa yabancı maddelerin uzaklaştırılması sağlanmıştır. Daha sonra kurutulan elekler, sırasıyla 500 μm , 355 μm , 250 μm , 125 μm delik büyüklüğüne sahip metal elekler ve metal toplama kabı, büyük gözenekli elek en üstte kalacak şekilde cihazın üstüne yerleştirilmiştir. En üstteki metal eleğe bir türe ait bitki örneği yerleştirildikten sonra cihaz 30 dakika süreyle % 80'lik sallama şiddetiyle çalıştırılmış ve toz haline getirilmiş bitki parçacıklarının eleklerle dağılması beklenmiştir. Süre sonunda elekler dikkatlice cihazdan ayrılarak her eleğin içeriği kağıt üzerine alınmış ve ağırlıkları tartılmıştır (Şekil 2.3). Ayrım sonunda oluşan fraksiyonlar ayrı kaplara alınarak muhafaza edilmiştir (Şekil 2.4). Bu işlem *Antitrichia californica*, *Homalothecium sericeum*, *Pterogonium gracile* ve *Hypnum cupressiforme* türleri için sırasıyla tekrarlanmıştır. Ayrım ve tartım işlemi

sonucunda her tür için grafik oluşturulmuştur. Etkileşim yüzeyinin yüksek olmasının, adsorpsiyon işleminin verimini arttıracığı düşünülerek deneylerde 125 µm'dan küçük boyuttaki partiküllerin kullanılmasına karar verilmiştir.

Bu partiküllerle yapılan ön denemelerde ortama protein salımı gerçekleştiğinin tespiti üzerine deneylerde kullanılacak olan tüm bitkisel materyalin distile su ile yıkanarak proteinden arındırılması sağlanmıştır. Ortama salınan protein miktarının tespit edilmesi ve yıkamalar sırasında elde edilen veriler kaydedilerek grafikleri çizilmiştir.

BSA molekülünün bitkisel partiküllerin yüzeylerine olan ilgisini attırmak için IMEO adı verilen silanlama ajanı pseudo-spesifik bir ligand olarak kullanılmıştır. IMEO'nun bitki partiküllerinin yüzeyine bağlanması işleminde, 3.5 g bitki içeren 1 mL bitki örneği için 0.5 mL IMEO, 2 mL'lik eppendorflarda 1 gün süre ile inkübasyona bırakılmıştır. Bu sürenin ardından bitki örnekleri defalarca distile su ile yıkanarak bağlanmamış IMEO'nun ortamdaki uzaklaştırılması sağlanmıştır.



Şekil 2.3. Eleklere dağılmış olan bitki parçacıkları

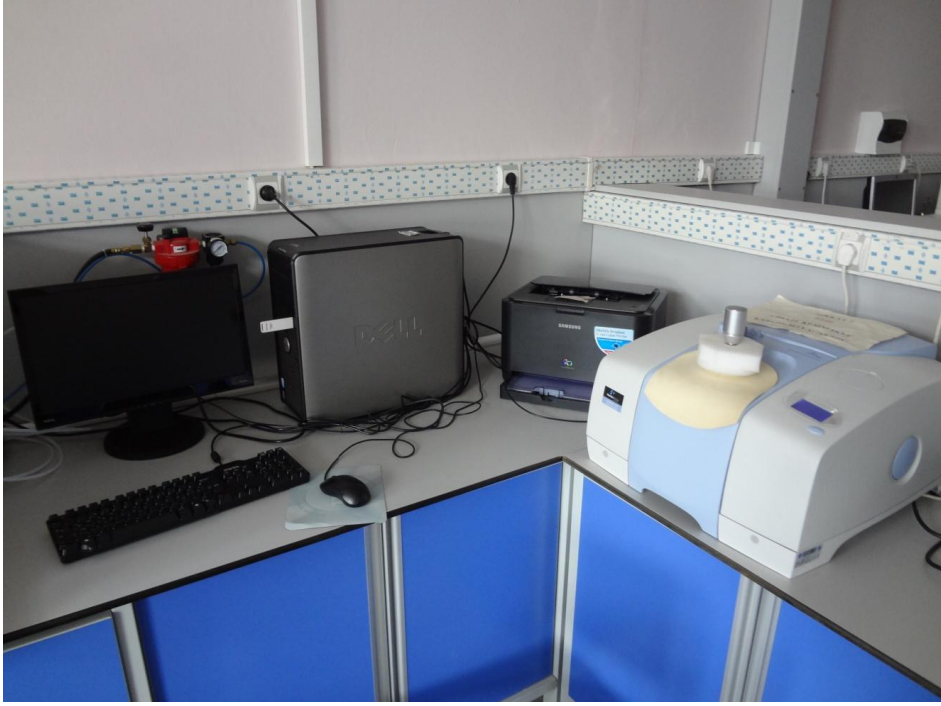


Şekil 2.4. Farklı tanecik boylarına sahip bitkilerin muhafaza edilmesi

2.2.2. Bitki Örneklerinin Karakterizasyonu

2.2.2.1. FTIR (Fourier Transform Infrared Spektrofotometre) ölçümleri

FTIR spektrometresi bir ışın ayırıcı, sabit ve hareketli aynadan oluşan bir prensibe sahiptir. Örnek üzerine gönderilen ışınlar yapıyı oluşturan atomlar arasındaki bağlarda titreşim oluşturur. Farklı dalga boylarıyla tarama yapıldıktan sonra oluşan spektrum yorumlanarak yapının içerdiği kimyasal gruplar hakkında bilgi sahibi olunur (Jiang, 2003). Bitkilerin FTIR spektrumları FTIR spektrofotometresi (Perkin Elmer - Spectrum 100) kullanılarak elde edilmiştir (Şekil 2.5). Bu amaçla yıkanmış ve kurutulmuş bitki parçaları liyofilize edilmiştir. Daha sonra örnekler cihaza yerleştirilerek FTIR spektrum ölçümleri yapılmıştır.



Şekil 2.5. FTIR spektrofotometresi cihazı

2.2.2.2. SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) gözlemleri

SEM gözlemleri için IMEO molekülü ile silanlanmış *Hypnum cupressiforme* türüne ait karayosunu örneği kullanılmıştır. Silanlama işlemi sonrasında yıkanıp kurutulan karayosunu örneği daha sonra liyofilize edilmiştir. Örnek iletkenliğe sahip olmadığı için inceleme başlığı üzerine çift taraflı iletken bant ile yapıştırılarak sabitlenmiştir. Yerleştirme işleminin ardından iletkenliği artırarak görüntü kalitesini iyileştirme amacıyla altın kaplama aşamasına geçilmiştir. 10 dakika süreyle vakum ortamında kaplaması gerçekleştirilen örnek daha sonra SEM cihazının içine yerleştirilmiş ve görüntülenmeye hazır hale gelmiştir (Şekil 2.6). SEM gözlemleri Quanta marka FEG 250 taramalı elektron mikroskobu kullanılarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 2.6. SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) (İzmir Yüksek Teknoloji Ens.)

2.2.2.3. Elementer analiz

Silanlanmış *Hypnum cupressiforme* örneğine IMEO molekülünün bağlanıp bağlanmadığının tespit edilebilmesi için elementer analiz gerçekleştirilmiştir. Elementer analiz, SEM görüntüsü alınması esnasında, bitkinin genel görünümünü temsil edebilecek bir bölgenin seçilerek fotoğrafının çekilmesi, ve bu fotoğraf üzerinden o bölgede bulunan elementlerin kalitatif - yarı kantitatif analizlerinin gerçekleştirilmesine olanak sağlamaktadır.

2.2.3. Ön Çalışma: Bitki Örneklerine Albümin Adsorpsiyonu Koşullarının İncelenmesi

Kurutularak toz haline getirilmiş bitki örneklerinden 125 µm'den küçük partikül boyuna sahip olanlar adsorpsiyon (yüzeyde tutma) incelemeleri için seçilmiştir. Bitkilere BSA adsorpsiyonu deneyleri kesikli sistem kullanılarak incelenmiştir. Bu amaçla bitkiler BSA çözeltisi ile denge süresi boyunca açısız karıştırıcıda karıştırılmıştır. Adsorpsiyona ortam pH'ının, BSA başlangıç derişiminin ve inkübasyon süresinin etkisi incelenmiştir.

2.2.3.1. Bitki örneklerine albümin adsorpsiyonuna pH'm etkisinin incelenmesi

Farklı pH çözeltilerinde (pH 1.2, 2.0 ve 8.0 fosfat tamponu; 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 ve 7.0 sitrat tamponu; 9.0 karbonat tamponu), derişimleri 0.25 mg/mL olan BSA çözeltileri hazırlanmış, bu çözeltilerden 1'er mL alınarak spektrofotometrede 280 nm'de absorbansları okunmuştur (silanlanmamış partiküllerle gerçekleştirilen süre denemesinde 0,5 mg/mL ve pH denemesinde 0,1 mg/mL derişimindeki BSA çözeltileri kullanılmıştır). 2 mL'lik eppendorflara, içerisinde 0,25 mg/mL BSA bulunan 1,5 mL tampon çözelti ile 3 mg bitki örneği konularak 2 saat süre ile açısız karıştırıcıda karıştırılmıştır. Süre sonunda örneklerden 1'er mL alınarak 20 dakika süreyle 14,500 rpm'de santrifüjlenmiştir. Daha sonra süpernatant alınarak 280 nm'de absorbansı okunmuştur. Elde edilen verilerden aşağıdaki denklem kullanılarak adsorpsiyon değerleri elde edilerek grafik oluşturulmuştur.

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

Eşitlikte yer alan Q, birim bitki üzerine adsorplanan BSA kütlesini (mg/g); C₀ bitki ile etkileşime girmeden önceki BSA derişimini; C bitki ile etkileşime girdikten sonraki BSA derişimini; V toplam hacmi (mL), m deneylerde kullanılan bitki kütlesini (g) belirtmektedir.

2.2.3.2. Bitki örneklerine albümin adsorpsiyonuna inkübasyon süresinin etkisinin incelenmesi

Albüminin belirli inkübasyon süreleri sonunda bitkisel materyale bağlanma miktarlarının tespit edilmesi amacıyla, bitki miktarı 3 mg, ortam pH'ı 5.0 ve BSA

başlangıç derişimi 0.25 mg/mL olmak üzere, 0, 15, 30, 60, 90, 120 dakikalık inkübasyonlar sonucunda 280 nm'de süpernatant absorbanları ölçülmüş ve adsorpsiyon miktarına inkübasyon süresinin etkisini gösteren grafik çizilmiştir. Adsorpsiyonun en yüksek olduğu süre seçilerek diğer deneylerde bu inkübasyon süresi kullanılmıştır.

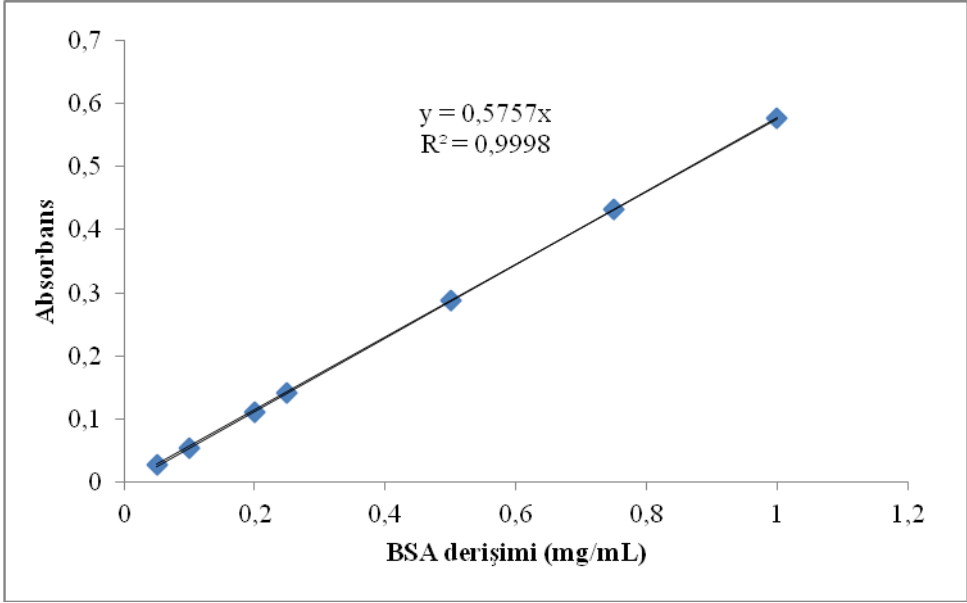
2.2.3.3. Bitki örneklerine albümin adsorpsiyonuna BSA başlangıç derişiminin etkisinin incelenmesi

Adsorpsiyona BSA başlangıç derişiminin incelenmesi amacıyla derişimleri 15; 25; 35; 45 mg/mL olan BSA çözeltileri hazırlanmıştır. Bu çözeltiler 25°C'de, pH 5.0 sitrat tamponunda 2 saat boyunca bitki ile muamele edilmiştir. Her derişimde adsorplanan albümin miktarı hesaplanarak albümin derişimine karşı adsorplanan albümin miktarını gösteren grafik çizilmiştir. Bu grafikten bitkinin maksimum adsorpsiyon kapasitesi bulunmuştur. Bu verilerden bir Q değeri, yani mg bitki başına adsorplanan g albümin miktarı tespit edilerek bir grafik çizilmiştir.

2.3. Deneylerde Kullanılacak Maddelerin Hazırlanması Ve Standart Grafiklerinin Çizilmesi

2.3.1. BSA Standart Grafiğinin Çizilmesi

BSA standart grafiğinin çizilmesi, deneylerde ölçülen absorban değerlerinin derişim değerlerine çevrilmesi için gerekli olduğu için deneylere başlanmadan önce 0.05, 0.1, 0.2, 0.25, 0.5, 0.75 ve 1 mg/mL derişimlerde olduğu bilinen BSA çözeltileri hazırlanmıştır. Bu çözeltilerin 280 nanometrede absorbanları ölçülerek BSA standart grafiği çizilmiştir (Şekil 2.7.).



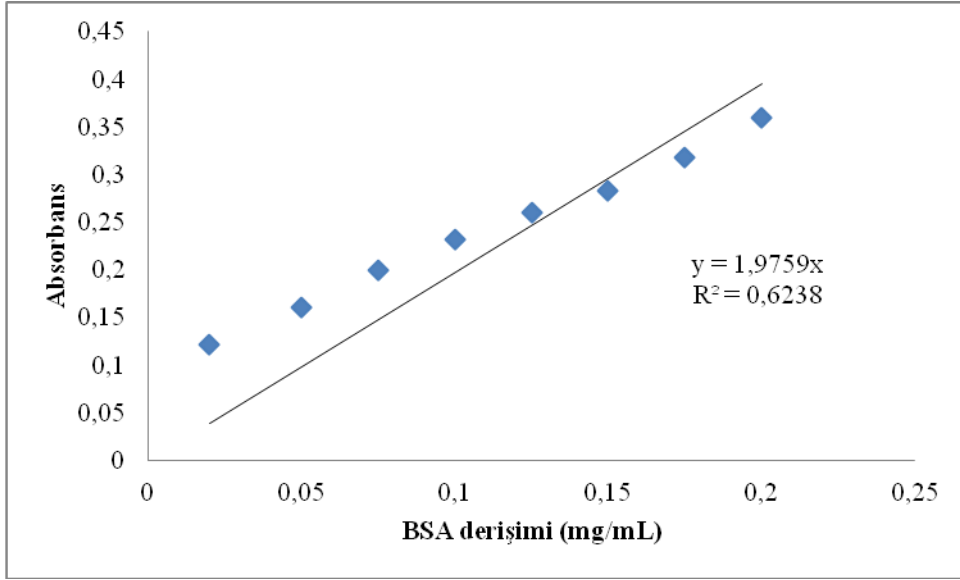
Şekil 2.7. BSA standart grafiği ve denklemi

Deneylerdeki 280 nm absorbans değerleri derişim değerlerine çevrilirken, grafikte elde edilen denklem kullanılmıştır.

2.3.2. Bradford Reaktif Çözeltilisinin Hazırlanması Ve Standart Grafiğinin Çizilmesi

40 mg Coomassie Blue boyası 50 mL %95'lik etanolde çözülmüştür. Ardından 45 mL %88'lik fosforik asit bu karışıma yavaş yavaş eklenmiştir. Solüsyon distile su ile 1 L'ye tamamlanarak süzölmüş ve şişelenmiştir.

Bradford reaktifi hazırlandıktan sonra 0.2, 0.175, 0.15, 0.125, 0.1, 0.075, 0.05, 0.02 mg/mL derişime sahip BSA standartları hazırlanmıştır. Bu standartların hazırlanan Bradford Reaktifi ile muamelesi sonunda spektrofotometrede 595 nm'de ölçümler alınarak kaydedilmiş ve Bradford Reaktifi standart grafiği çizilmiştir (Şekil 2.8.).



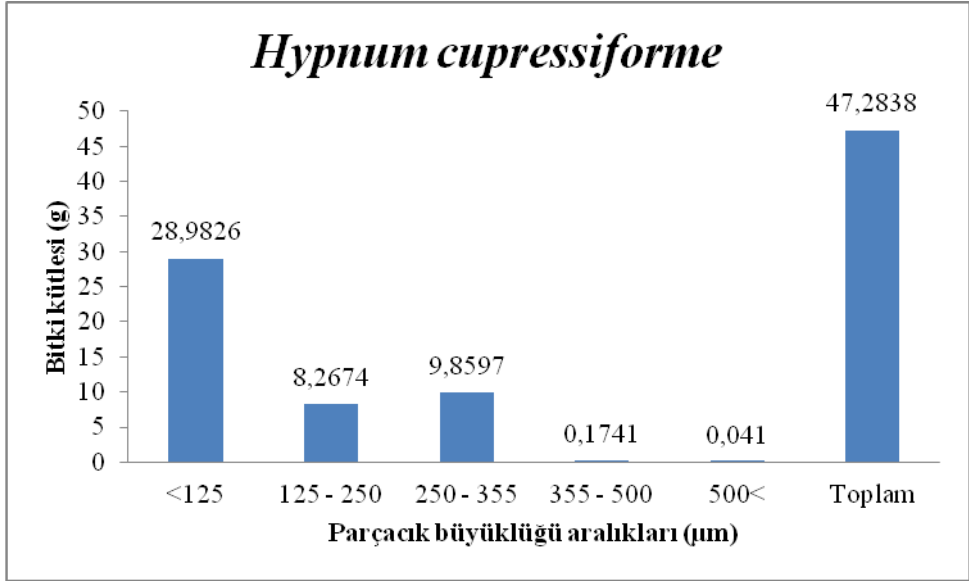
Şekil 2.8. Bradford reaktifi standart grafiği ve denklemi

Bradford Reaktifi kullanılan deneylerdeki absorbans değerleri derişim değerlerine çevrilirken, grafikte elde edilen denklem kullanılmıştır.

3. BULGULAR

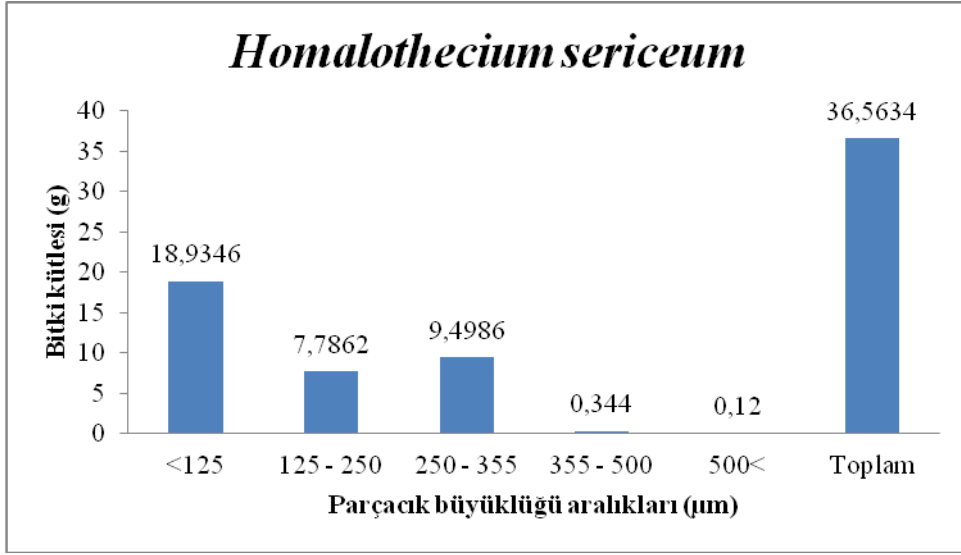
3.1. Bitki Örnekleri

Toplanarak kurutulan ve toz haline getirilen bitki örnekleri elek analizine tabi tutulmuş ve elde edilen fraksiyonlar ayrı ayrı tartılarak muhafaza edilmiştir. Yapılan tartım işlemleri sonucunda ortaya çıkan dağılım Şekil 3.1 – 3.4’de sunulmuştur.



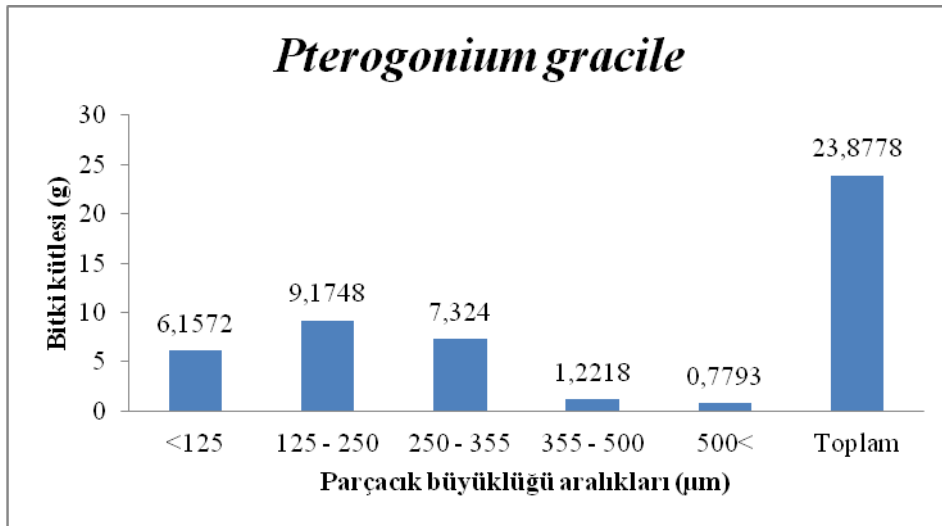
Şekil 3.1. *Hypnum cupressiforme* türünün elek analizi sonucu ortaya çıkan tanecik dağılım grafiği

Hypnum cupressiforme için deneylerde kullanılan 125 µm altı tanecik boyutuna sahip partiküller (28,9 g) toplam kütleinin (47,2 g) yaklaşık %61’ini oluşturmaktadır.



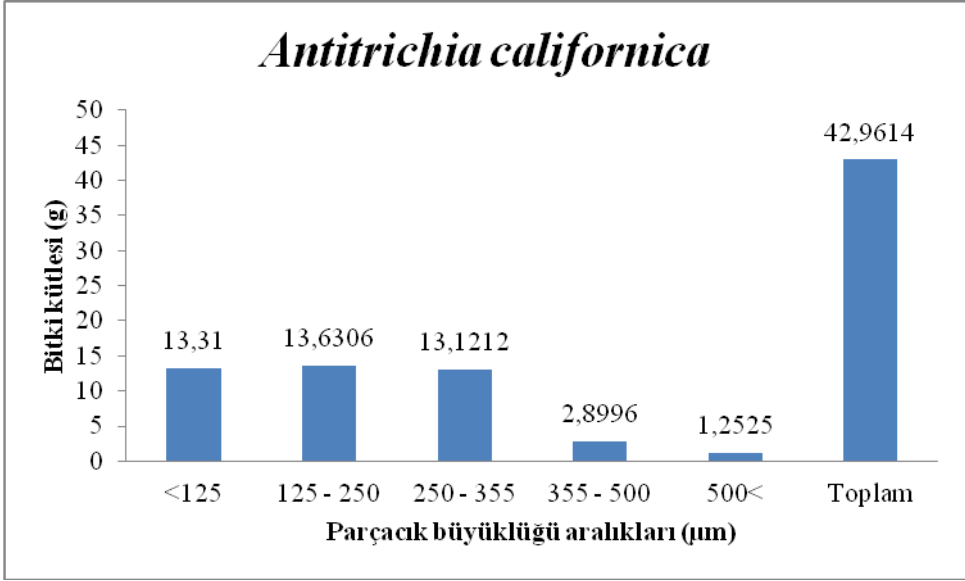
Şekil 3.2. *Homalothecium sericeum* türünün elek analizi sonucu ortaya çıkan tanecik dağılım grafiği

Homalothecium sericeum için deneylerde kullanılan 125 µm altı tanecik boyutuna sahip partiküller (18,9 g) toplam kütleinin (36,5 g) yaklaşık %51'ini oluşturmaktadır.



Şekil 3.3. *Pterogonium gracile* türünün elek analizi sonucu ortaya çıkan tanecik dağılım grafiği

Pterogonium gracile için deneylerde kullanılan 125 µm altı tanecik boyutuna sahip partiküller (6,1 g) toplam kütleinin (23,8 g) yaklaşık %25'ini oluşturmaktadır.

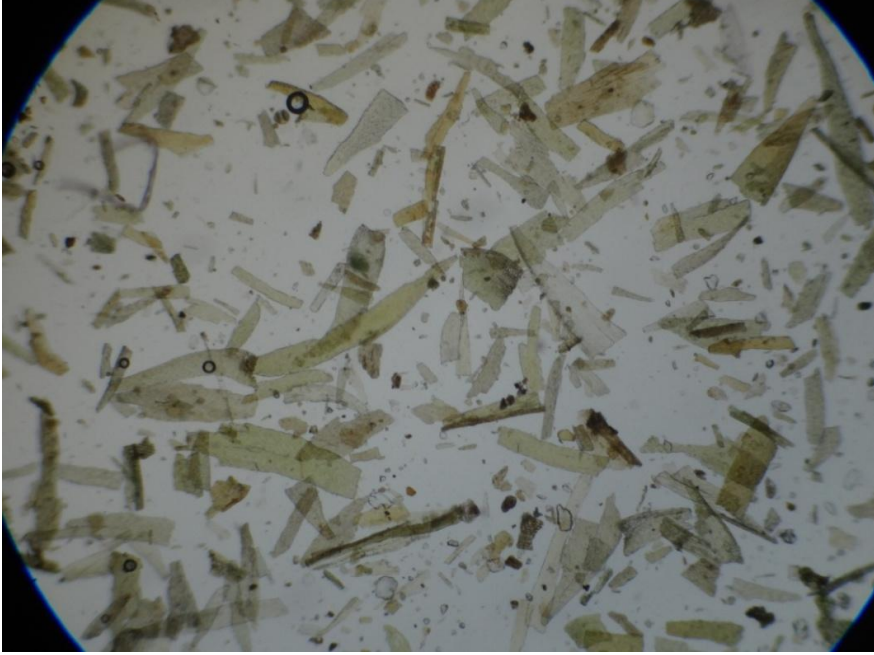


Şekil 3.4. *Antitrichia californica* türünün elek analizi sonucu ortaya çıkan tanecik dağılım grafiği

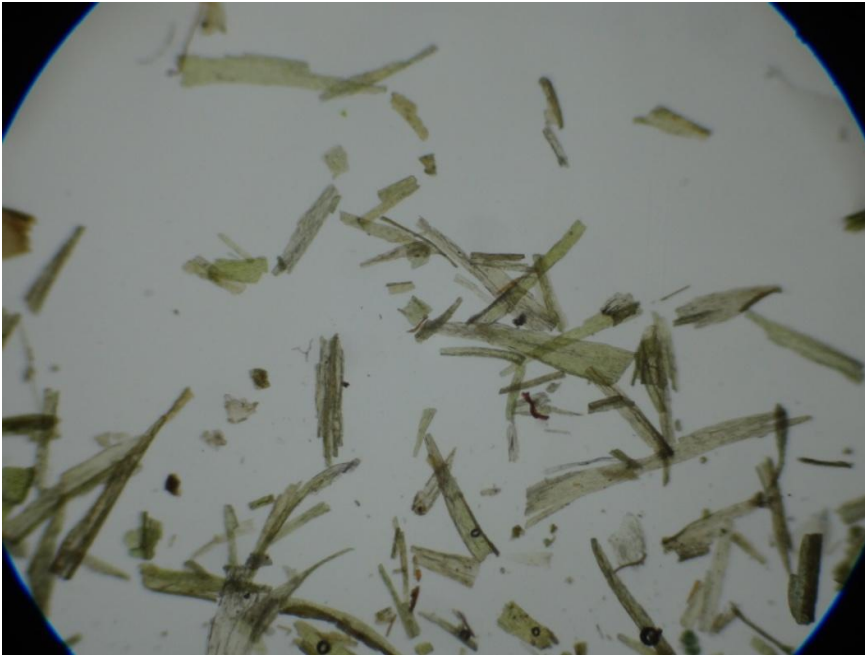
Antitrichia californica için deneylerde kullanılan 125 µm altı tanecik boyutuna sahip partiküller (13,3 g) toplam kütleinin (42,9 g) yaklaşık %31'ini oluşturmaktadır.

Eleme işlemi sonrasında diğer tanecik büyüklüklerine sahip partiküller tekrar öğütme işlemine tabi tutularak kullanılabilirlerdir.

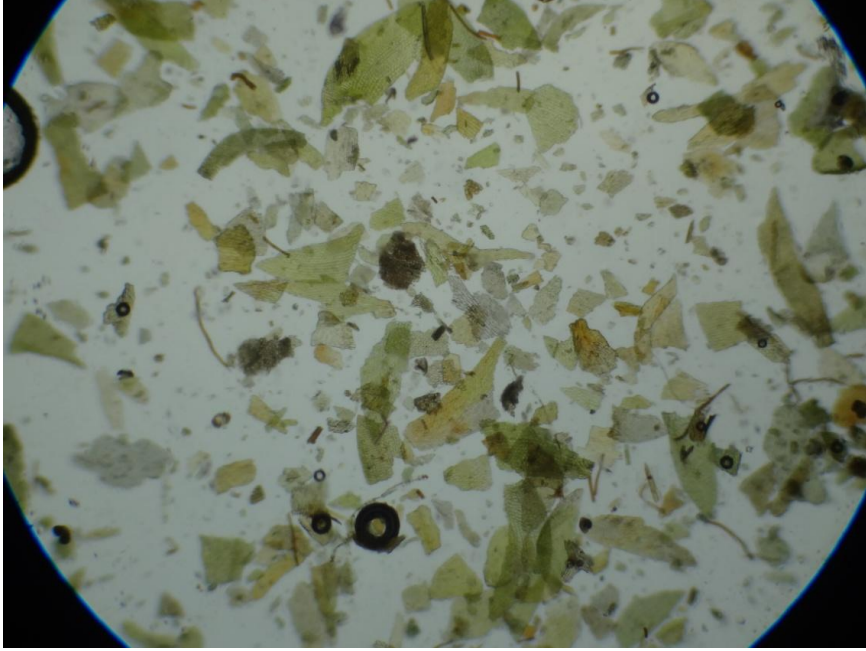
125 µm altı parçaların mikroskopik görüntüleri aşağıda verilmiştir (Şekil 3.5 – 3.8). Eni 125 µm altında olan bazı bitki parçaları elekten dik olarak geçebildiğinden bu dağılımda 125 µm'den büyük parçalar bulunabilmektedir. Bu durum her eleme işleminde tekrar edebileceği için elde edilebilir en olası büyüklük tasnifi olarak değerlendirilmiştir.



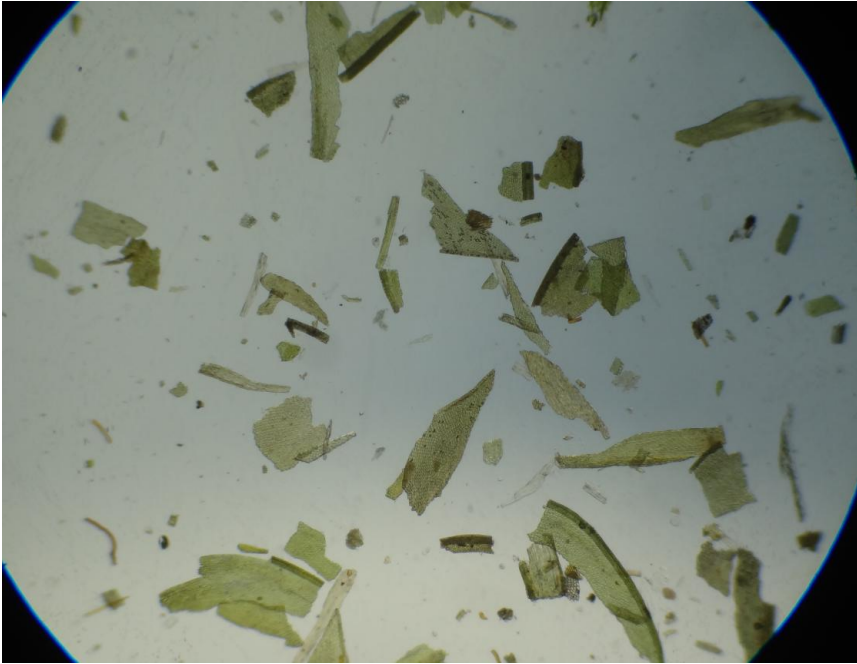
Şekil 3.5. *H. cupressiforme* 125 mm elekten geçen parçaların mikroskop görüntüsü



Şekil 3.6. *H. sericeum* 125 mm elekten geçen parçaların mikroskop görüntüsü



Şekil 3.7. *P. gracile* 125 mm elekten geçen parçaların mikroskop görüntüsü



Şekil 3.8. *A. californica* 125 mm elekten geçen parçaların mikroskop görüntüsü

3.1.1. DeneY Ortamına Salınan Protein Miktarının Tespit Edilmesi

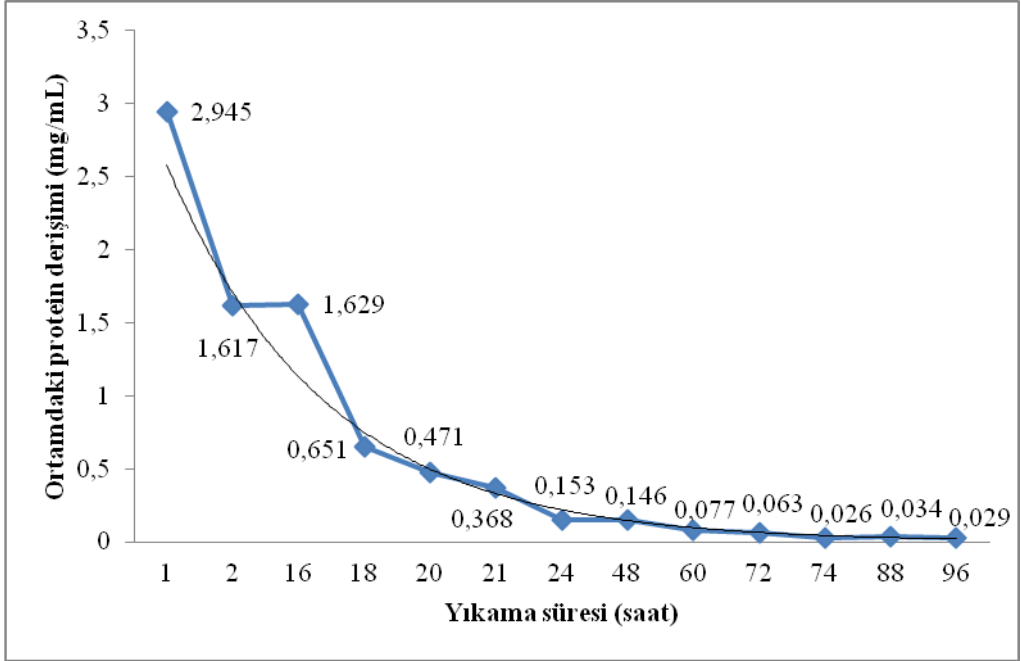
Deneylerde kullanılacak olan 125 µm'den küçük partikül boyutuna sahip, ayrı ayrı her tür için 3 mg bitkisel materyal, 1 mL distile su içerisinde 2 saat süre ile inkübasyona bırakılarak içlerindeki proteinlerin ortama geçmesi sağlanmıştır. Bu işlem sonrasında 20 dakika süre ile 14500 devirde santrifüjleri gerçekleştirilen örneklerin süpernatantlarının hem 260, hem de 280 nm dalga boyunda absorpsanları ölçülmüştür. 280 nm'de ölçülen absorpsan değerleri ayrıca bir fikir edinilmek üzere standart denklemi yardımıyla derişim verilerine dönüştürülmüştür. Absorpsan ve derişim verileri aşağıda verilen tabloda gösterilmiştir (Çizelge 3.1.).

Çizelge 3.1. Bitkisel partiküllerin 2 saatlik inkübasyonu sonunda deney ortamlarının ölçümleri

Bitki Örneği	Absorpsan		Derişim (mg/mL)
	280 nm	260 nm	280 nm
<i>Hypnum cupressiforme</i>	0,372	0,404	0,65
<i>Homalothecium sericeum</i>	0,333	0,395	0,58
<i>Pterogonium gracile</i>	0,355	0,39	0,62
<i>Antitrichia californica</i>	0,296	0,409	0,52

3.1.2. Bitkisel Materyalin Yıkaması

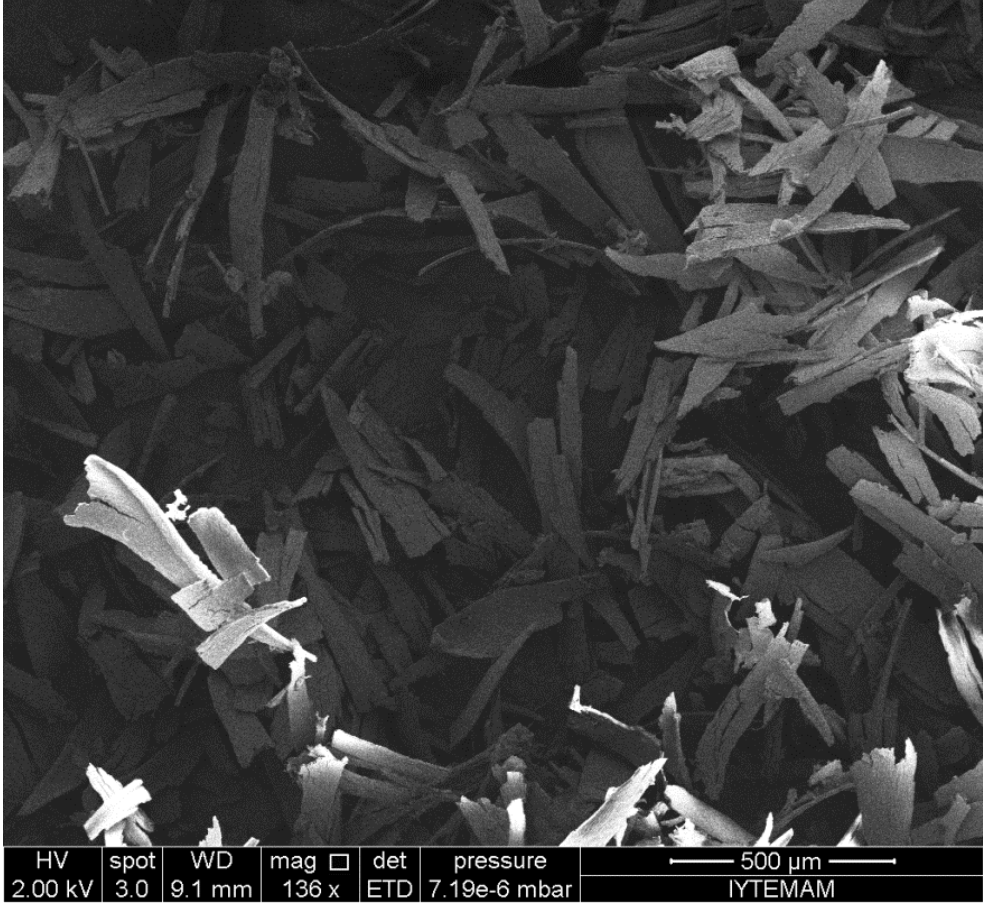
Bitkisel materyallerin yıkamasına *P. gracile* türü ile başlanmıştır. Yıkamalar sırasında 1 g bitki örneği önce (24x1.5 mL'lilik eppendorf ile) 36 mL'lik hacimde distile suya koyularak eppendorflarda yıkamaya başlanmıştır. Belirli saat aralıklarında eppendorflar santrifüjlenerek üst fazda 280 nm'de absorpsan okunup, alınan üst fazın yerine distile su koyularak yıkama işlemine devam edilmiştir. Elde edilen veriler incelendiğinde bu yıkama hacminin yetersiz kaldığı ve artırılması gerektiğine karar verilerek bitkisel materyal 250 mL'lik hacimde saf suya aktarılmış ve yıkamaya devam edilmiştir. Yıkama süreci boyunca elde edilen tüm veriler ile bir grafik çizilmiştir (Şekil 3.9.).



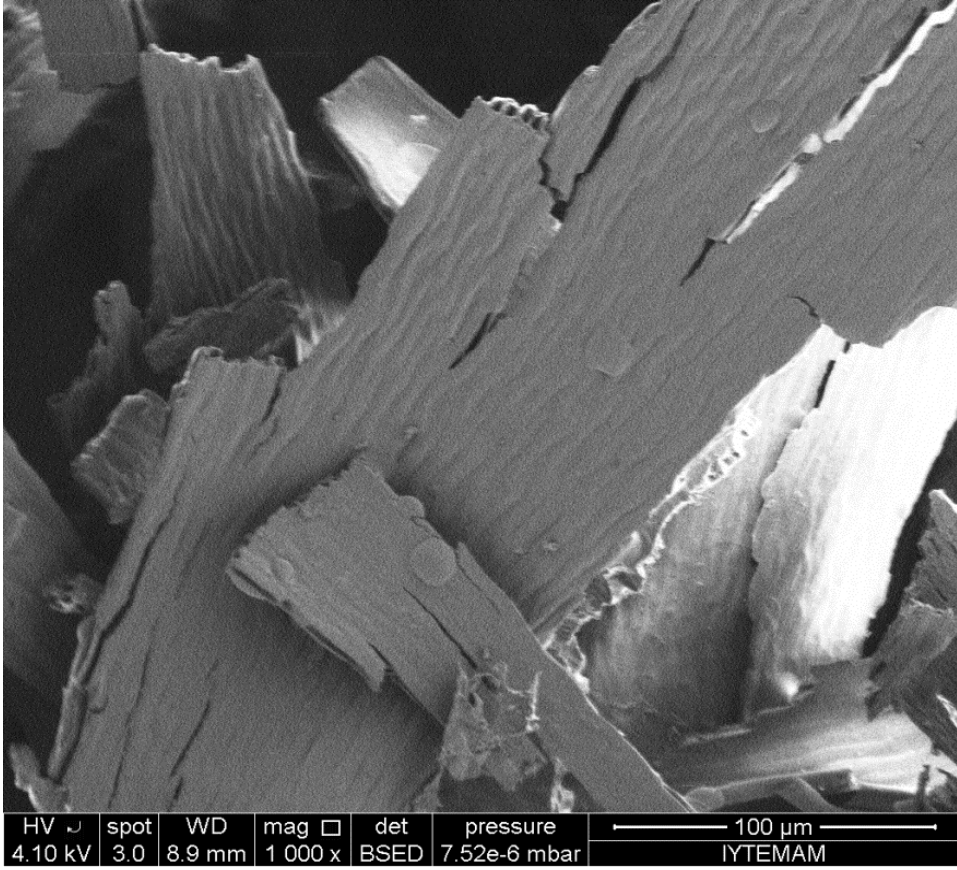
Şekil 3.9. *P. gracile* türüne ait bitki partiküllerinin yıkanması sırasında belirli saatlerde ortamda ölçülen protein derişimi

3.2. SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) Gözlemleri

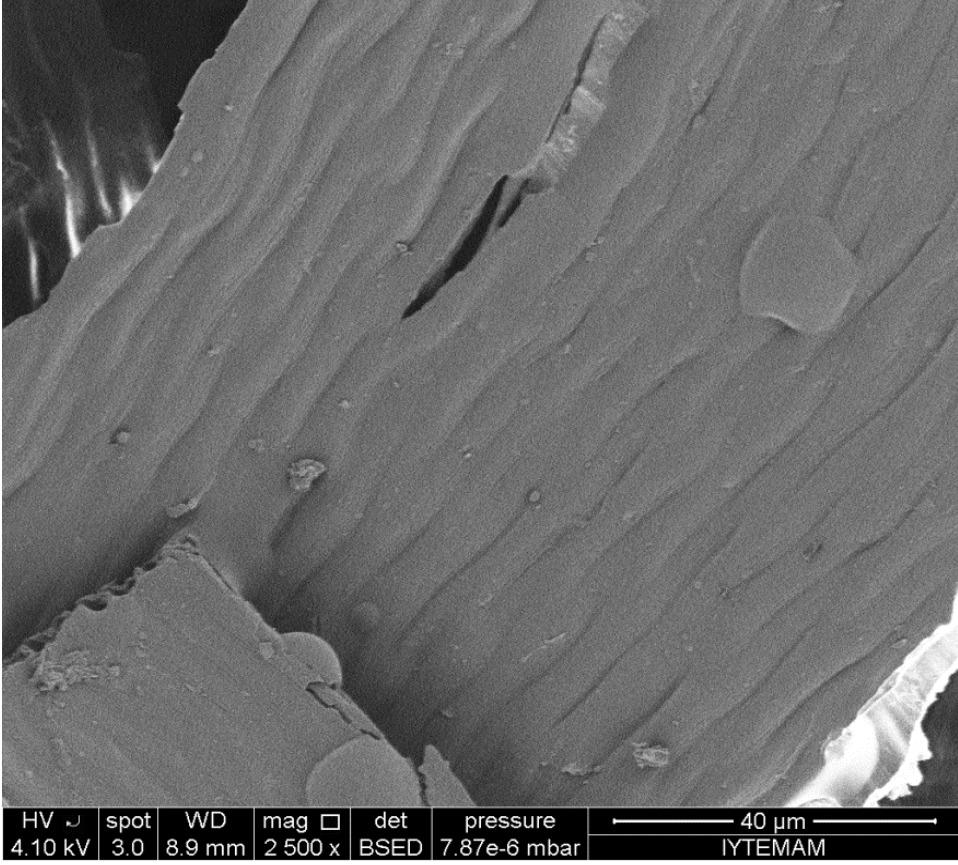
Hypnum cupressiforme türüne ait 125 µm altı silanlanmış partiküllerin SEM görüntülemesi yapılmıştır. Örneklerin görüntülenmesi aşamasında yüzey özelliklerini karakterize edebilecek bölgelerin seçilmesine özen gösterilerek ve farklı büyüklüklerde görüntü alınarak, fitosorbent olarak kullanılacak bitkilerin yüzey morfolojileri hakkında fikir sahibi olunmuştur (Şekil 3.10. – 3.13.).



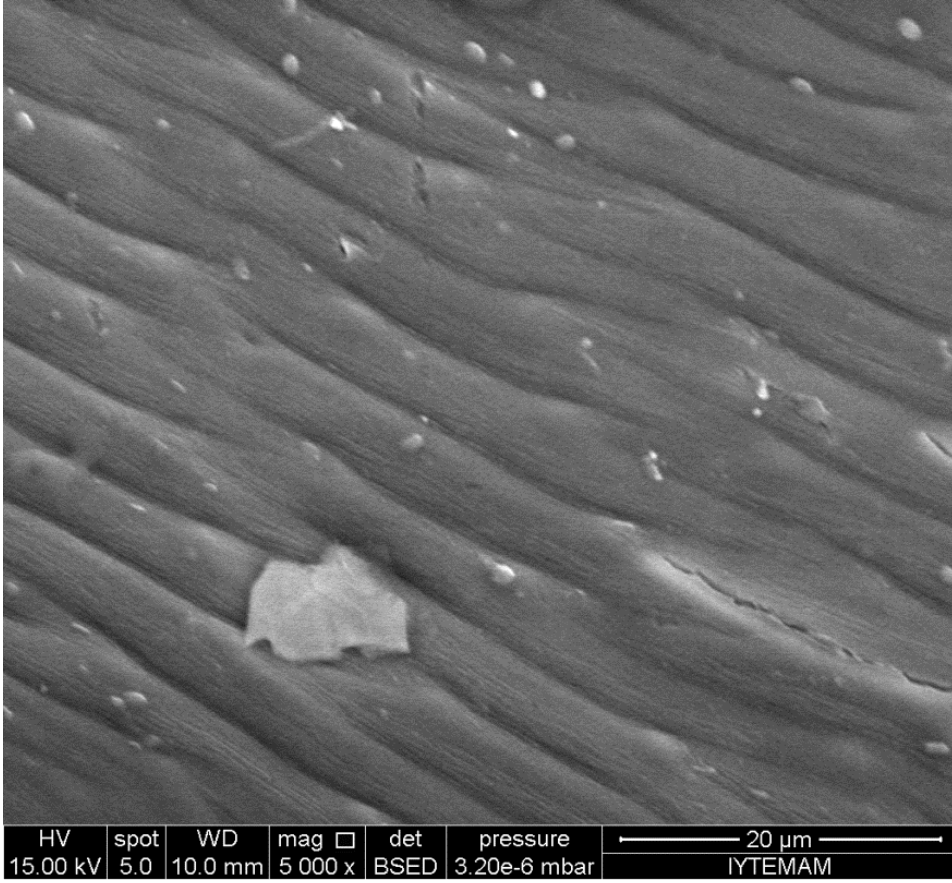
Şekil 3.10. *H. cupressiforme* 125 µm altı partiküllerin SEM ile genel görünümü (136x büyütme)



Şekil 3.11. *H. cupressiforme* 125 µm altı partiküllerin SEM ile bitki yüzeyi genel görünümü (1000x büyütme)



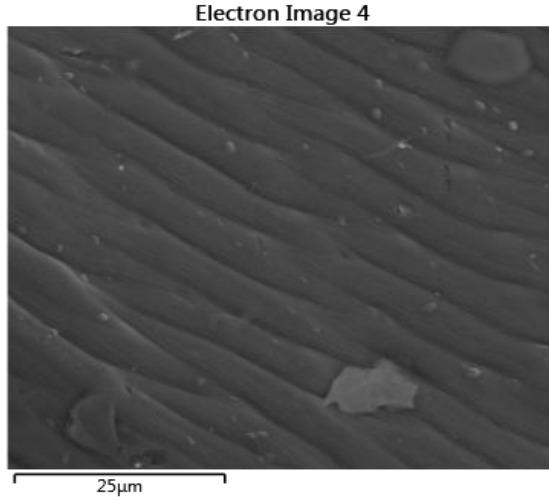
Şekil 3.12. *H. cupressiforme* 125 µm altı partiküllerin SEM ile partikül yüzeyi görünümü (2500x büyütme)



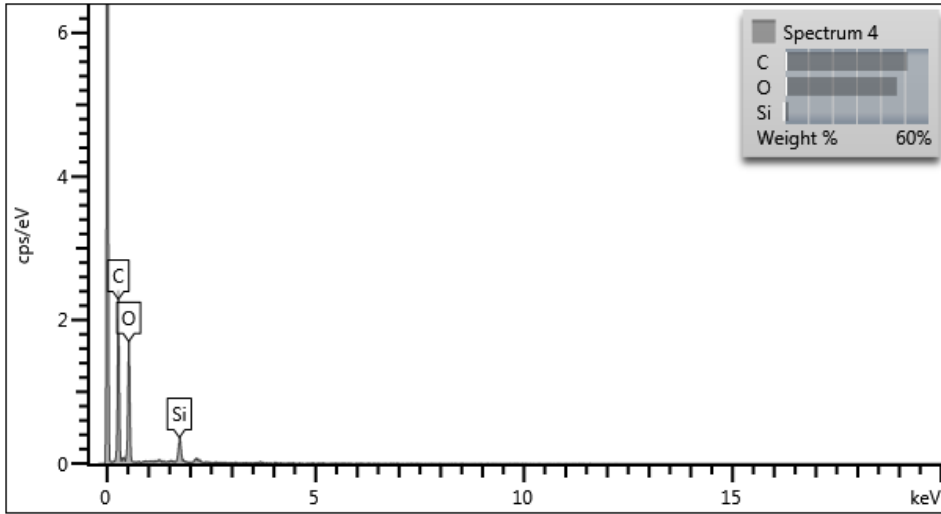
Şekil 3.13. *H. cupressiforme* 125 μm altı partiküllerin yüzey kıvrımlarının SEM görüntüsü (5000x büyütme)

3.3. Elementer Analiz

SEM görüntüsü alınması için hazırlanan *H. cupressiforme* bitkisine ait olan ve silanlama işlemi geçirmiş partiküllere IMEO molekülünün bağlanıp bağlanmadığının tespit edilmesi için elementer analiz gerçekleştirilmiştir. Elementer analiz sonucunda elde edilen veriler aşağıda gösterilmiştir.



Şekil 3.14. Silanlanmış *H. cupressiforme* örneğinde elementer analiz gerçekleştirildiği bölgenin SEM fotoğrafı



Şekil 3.15. Elementer analiz sonucunda elde edilen spektrum

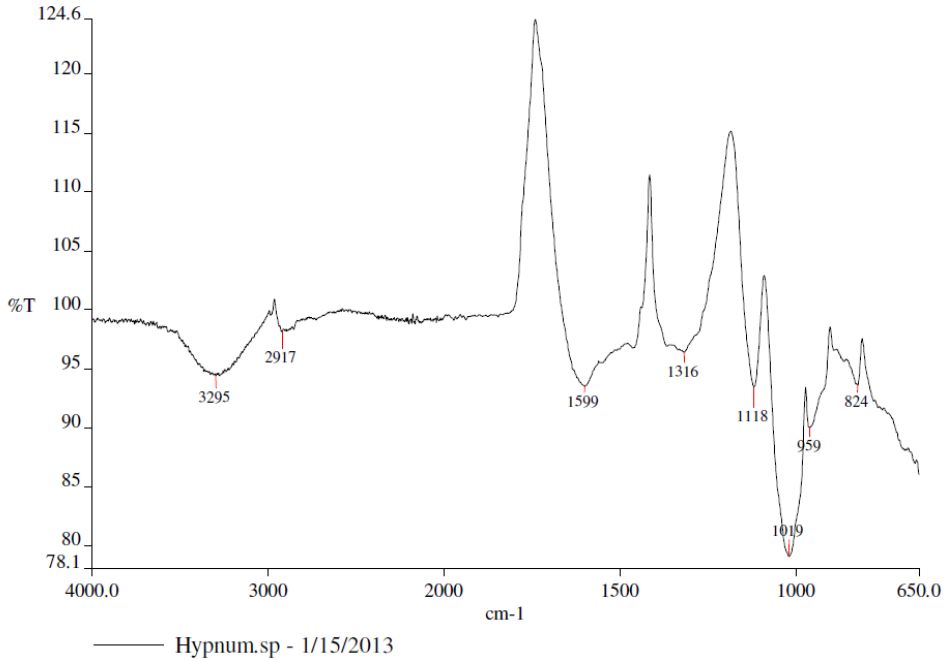
Çizelge 3.2. Elementer analiz sonucunda tespit edilen silisyum atomlarının, C ve O atomlarına adet ve kütlece oranını gösteren tablo

Element	Kütlece Yüzde	Atomik Yüzde
C	51.17	58.68
O	46.89	40.37
Si	1.94	0.95
Toplam:	100.00	100.00

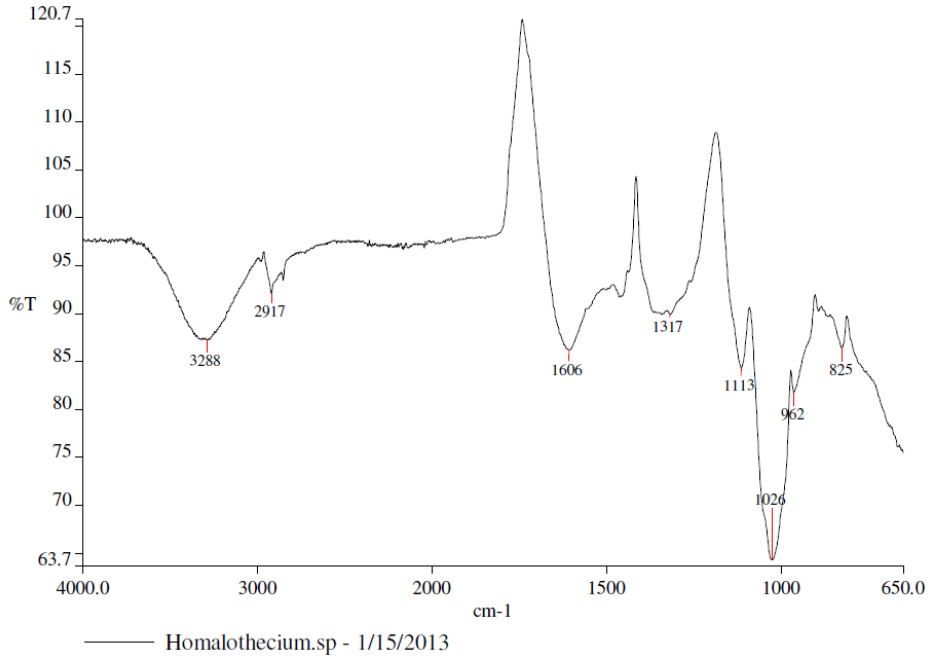
Gerçekleştirilen elementer analiz ile IMEO ile yüzey modifikasyonu gerçekleştirilmiş olan *Hypnum cupressiforme* yüzeyinde silisyum tespit edilmiştir.

3.4. FTIR (Fourier Transform Infrared Spektrometre) Ölçümleri

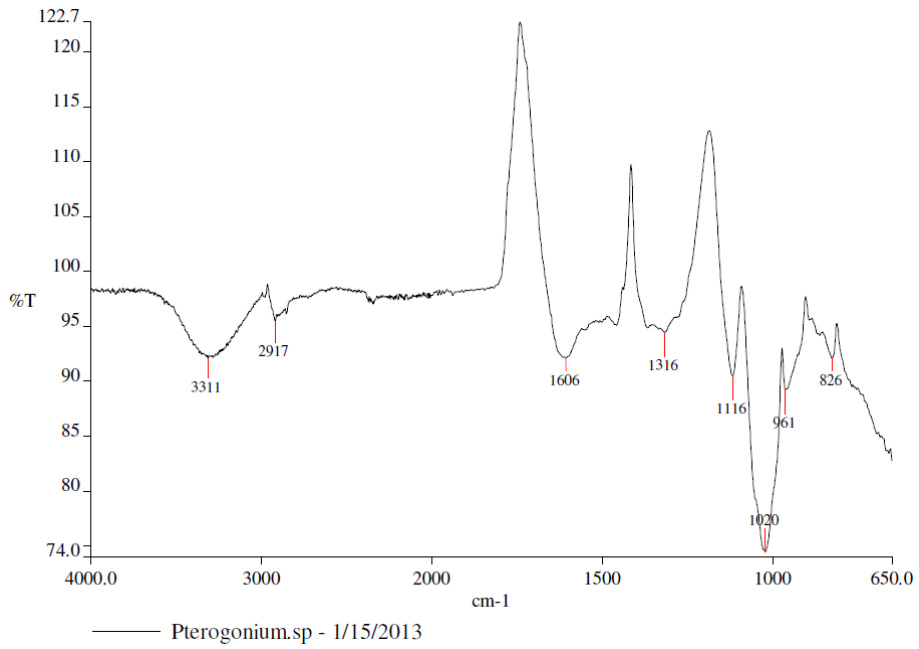
Bitki örneklerinin yüzeylerinde bulunan kimyasal grupların tespit edilmesi için FTIR ölçümleri gerçekleştirilmiştir. İncelenen bitki örneklerinin FTIR spektrumları aşağıda verilmiştir (Şekil 3.16 – 3.22).



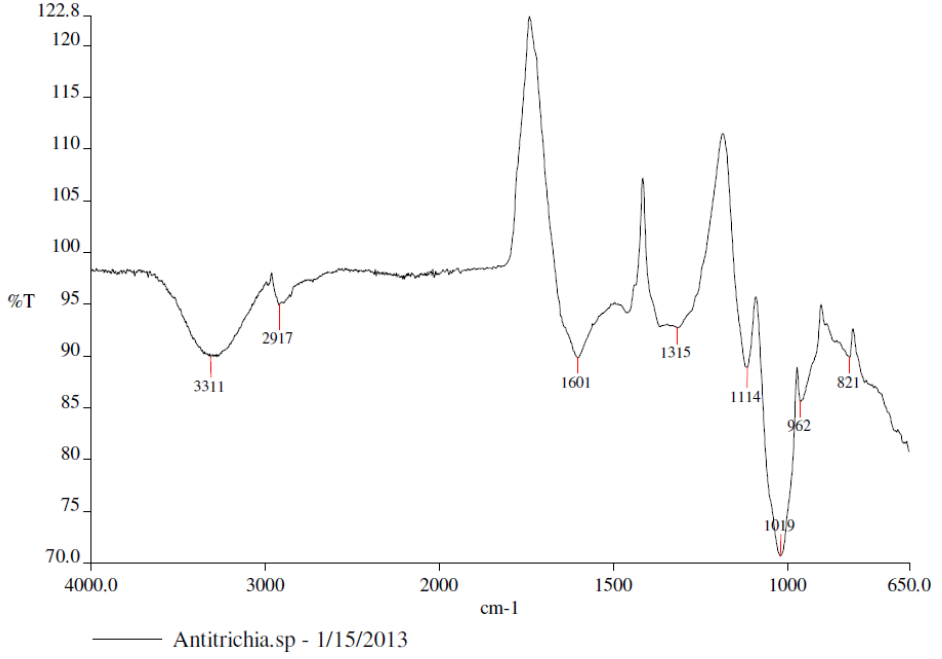
Şekil 3.16. *Hypnum cupressiforme* bitkisine ait FTIR spektrumu



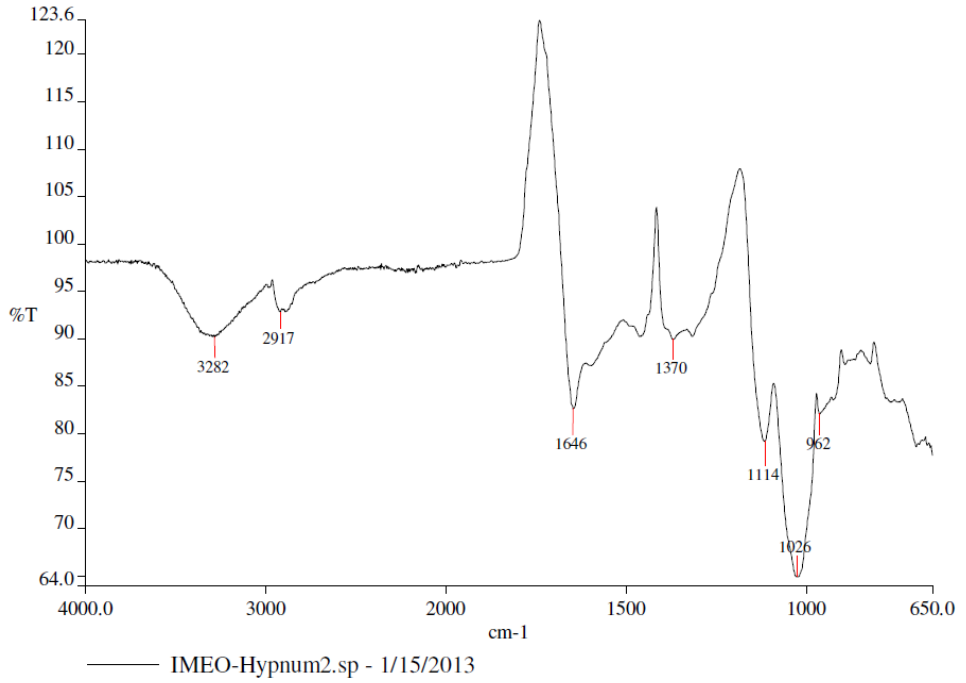
Şekil 3.17. *Homalothecium sericeum* bitkisine ait FTIR spektrumu



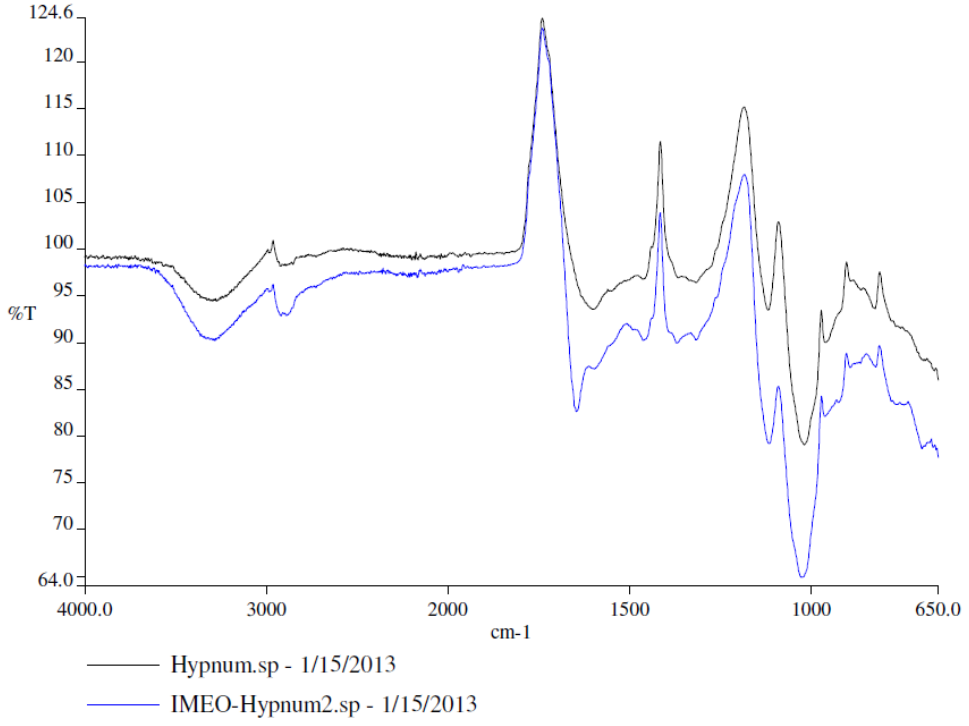
Şekil 3.18. *Pterogonium gracile* bitkisine ait FTIR spektrumu



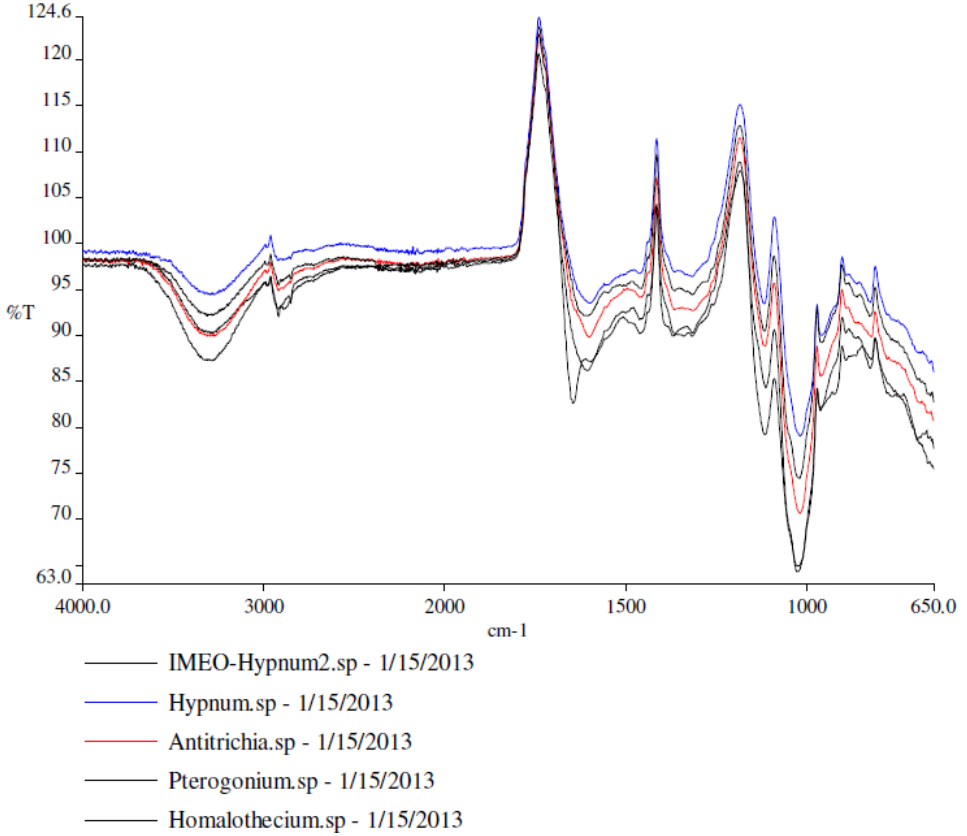
Şekil 3.19. *Antitrichia californica* bitkisine ait FTIR spektrumu



Şekil 3.20. Silanlanmış *Hypnum cupressiforme* bitkisine ait FTIR spektrumu



Şekil 3.21. Silanlanmış ve normal *Hypnum cupressiforme* bitkisine ait FTIR spektrumlarının birlikte gösterimi



Şekil 3.22. Tüm bitkilere ve silanlanmış *H. cupressiforme* örneğine ait FTIR spektrumlarının birlikte gösterimi

Bitki örneklerinin FTIR spektrumlarının incelemesiyle elde edilen sonuçlar şu şekildedir:

- Hidrojen bağı O-H gerilme titreşim frekansı $3100-3500\text{ cm}^{-1}$ arasında geniş bir bant şeklinde gözlenir (3311 cm^{-1} 'deki bant).
- Alifatik bileşiklerde C-H gerilme titreşim frekansları 3000 cm^{-1} 'in biraz altında gözlenir (2917 cm^{-1}).
- Ayrıca karboksilli asitlerde 3000 cm^{-1} civarında O-H gerilme titreşim frekansına ait band da gözlenir.
- Spektrumda 1600 cm^{-1} 'lerde gözlenen absorpsiyon bantları C=O grubuna ait gerilme titreşim frekansını belirtir. Ayrıca 1600 cm^{-1} 'lerde aromatik

halka C-C gerilme titreşim frekanslarına ait absorpsiyon bandları gözlenebilir.

- 1300 cm^{-1} civarında C-O gerilme titreşim frekansına ait bant görülmektedir.
- 1000-1200 cm^{-1} arasında ise O-H eğilme titreşim frekansına ait bandları gözlemek mümkündür.
- Eterlerde 1100-1200 cm^{-1} arasında gözlenen C-O gerilme bandı belirgindir.
- Ayrıca C-N gerilme bandı ise 1300 cm^{-1} civarında belirgin bir biçimde gözlenebilir.
- Aldehitlerde 1700 cm^{-1} 'deki C=O gerilme titreşimi, 2800 cm^{-1} civarında bir veya iki C-H gerilme bandı ile birlikte gözlenir.
- Ester, lakton ve karboksilli asitlerde C=O gerilme titreşimi 1100 cm^{-1} - 1300 cm^{-1} arasında çıkan C-O gerilme titreşimi ile birlikte.

Bu genel yaklaşım göz önüne alınarak spektrumlar incelendiğinde tüm türlerde eter, ester ve aldehit grupları, lakton halkası, aromatik ve alifatik bileşikler ile karboksilli asitlerin bulunduğu ortaya çıkmaktadır. Bu veriler de bitkisel yüzeyin genel olarak hidrofobik özellikte olduğuna işaret etmektedir.

3.5. Bitki Örneklerinin Albümin Adsorpsiyonu Koşullarının Belirlenmesi

3.5.1. Ön Çalışma: Silanlanmamış Bitki Örneklerinin Adsorpsiyon Koşullarının Belirlenmesi

Ön deneme niteliğindeki bu deneylerde henüz yıkanmamış olan *Pterogonium gracile* ile pH, BSA başlangıç derişimi ve inkübasyon süresi deneyleri yapılarak sonuçlar grafiklere aktarılmıştır.

3.5.1.1. Silanlanmamış *Pterogonium gracile* örneği için inkübasyon süresi denemesi

Çift tekrarlı olarak gerçekleştirilen bu deneyde silanlanmamış *P. gracile* türüne ait bitki örnekleri kullanılarak 15, 30, 60, 90, 120 dakikalık inkübasyon süreleri sonucunda 280 nm dalga boyunda absorpsiyonlar ölçülerek, BSA standart denklemi yardımıyla bu değerler derişim değerlerine çevrilmiştir. Elde edilen veriler Çizelge 3.3.'te gösterilmektedir.

Çizelge 3.3. Silanlanmamış *P. gracile* örneğinde ortamda bulunan protein derişiminin geçen süre ile değişimi (mg/mL cinsinden)

Deneme Grupları	İnkübasyon Süresi (Dakika)					
	0 (C _i)	15	30	60	90	120
Deney grubu 1	0,5	0,849	0,826	0,849	0,84	0,845
Deney grubu 2	0,5	0,844	0,849	0,854	0,845	0,847
Kontrol grubu	0	-	-	-	-	0,878

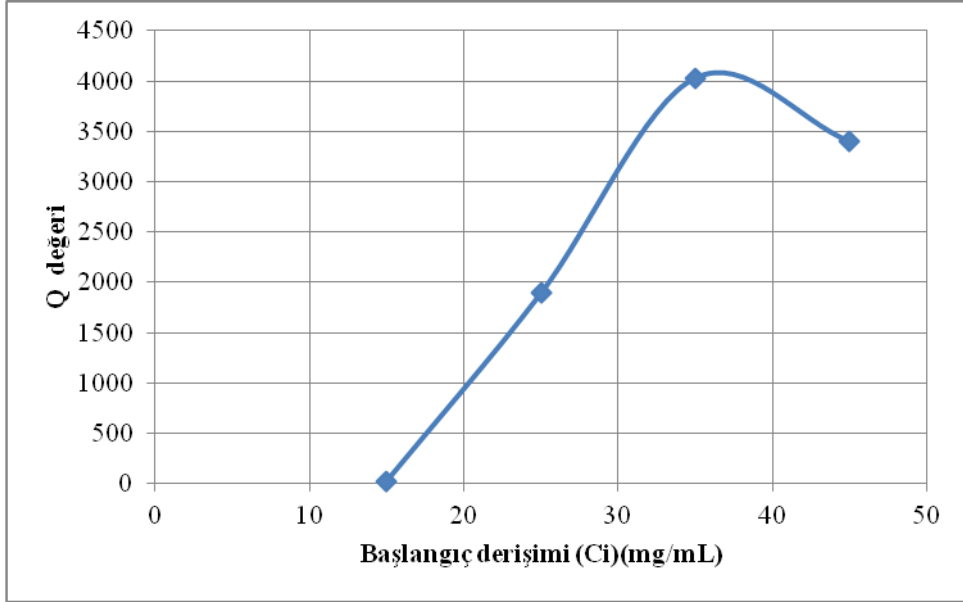
3.5.1.2. Silanlanmamış *Pterogonium gracile* örneği için BSA başlangıç derişimi denemesi

Bu denemede silanlanmamış *P. gracile* örneği kullanılarak BSA başlangıç konsantrasyonunun bitki yüzeyine adsorpsiyonuna etkisi incelenmiştir. Bu amaçla BSA başlangıç derişimi 15, 25, 35 ve 45 mg/mL olan deney grupları kullanılmış ve yapılan deneyde elde edilen veriler çizelgede gösterilmiştir.

Çizelge 3.4. Silanlanmamış *P. gracile* örneğinde başlangıç konsantrasyonunun adsorpsiyona etkisinin incelendiği deneyin sonuçları

Parametre	Derişimler (mg/mL)			
	15	25	35	45
Başlangıç derişimi	14,54	21,75	30,33	39,16
Son derişim	14,49	17,97	22,27	32,35
Q değeri	25,77	1890,35	4029,9	3402,64

Bu veriler ile $Q = [(C_0 - C)V]/m$ formülü yardımıyla (bkz. Kısım 2.2.3.1.) gram bitki başına adsorplanan albümin miktarı hesaplanarak Q değerleri ile grafik çizilmiştir (Şekil 3.23.).



Şekil 3.23. Silanlanmamış *P. gracile* bitkisi üzerine albümin adsorpsiyonuna başlangıç derişiminin etkisi

Şekil 3.23.'te görüldüğü üzere bitki üzerine maksimum albümin adsorpsiyonu 35 mg/mL başlangıç derişiminde gerçekleşmiştir.

3.5.1.3. Silanlanmamış *Pterogonium gracile* örneği için pH denemesi

Çift tekrarlı gerçekleştirilen bu deneyde silanlanmamış *P. gracile* türüne ait bitki örnekleri ile adsorbe olan albümin miktarına ortam pH'ının etkisi incelenmiştir. Bu amaçla ortam pH'ı 3, 4, 5, 6, 7, 8 ve 9 olan iki deney grubu için 2 saatlik inkübasyonun ardından 280 nm'de absorbands değerleri okunmuş, ve BSA standart denklemi ile bu değerler derişim değerlerine çevrilmiştir. Elde edilen derişim verileri Çizelge 3.5.'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.5. Silanlanmamış *P. gracile* örneğinde ortamda bulunan proteinin farklı ortam pH'larındaki derişim değerleri (mg/mL cinsinden)

Deneme Grupları	Ortam pH'ı						
	3	4	5	6	7	8	9
Deney grubu 1	0,33	0,38	0,45	0,62	0,68	0,69	0,63
Deney grubu 2	0,38	0,4	0,46	0,57	0,62	0,61	0,68
Kontrol grubu	0,27	0,33	0,33	0,52	0,56	0,53	0,58
C _i	0,14	0,13	0,07	0,1	0,08	0,13	0,09

Çizelge 3.5.'te görülen deney grupları, en alt satırda gösterilen C_i başlangıç derişimlerinde BSA içeren ortamlarda, kontrol grubu ise sadece ilgili pH seviyesindeki tampon çözelti içerisinde, 2 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Görüldüğü gibi içerisinde hiç BSA koyulmamış ortamdaki kontrol grubu bitkileri yine protein salımı göstermiştir ve bunun sonucu olarak her iki deney grubunda da gözlenen son protein konsantrasyonu, başlangıçta ortama eklenen miktardan daha yüksek miktarda ortaya çıkmıştır.

3.5.2. Silanlanmış Bitki Türleri İçin Albümin Adsorpsiyonu Koşullarının Belirlenmesi

Bu deneylerde IMEO ligandı ile yüzey modifikasyonları gerçekleştirilmiş bitki partikülleri kullanılmıştır. Bu bitkiler IMEO ile muamele edilmeden önce içerdikleri proteinleri tamamen bırakana kadar yıkanmışlardır. 0,01M iyonik şiddet ve oda sıcaklığı şartlarında gerçekleştirilen deneyler 3 mg bitkinin deney ortamında 2 saatlik inkübasyonu sonucunda 14500 rpm'de 30 dakika santrifüj uygulanmıştır. Üst fazlardan alınan 280 nm'deki absorbans verileri BSA standart denkleminde uygulanarak derişim verileri elde edilmiştir. Bu sonuçları desteklemek amacıyla bu üst fazdan bir miktar alınarak Bradford yöntemi uygulanarak 595 nm'de absorbans değerleri alınmıştır. Her iki veri türü için de ayrı ayrı tablolar oluşturulmuştur.

3.5.2.1. *Hypnum cupressiforme* türü için Albümin adsorpsiyonuna pH'ın etkisinin belirlenmesi

H. cupressiforme bitkisinde albümin adsorpsiyonuna pH'ın etkisine ait tablo aşağıda verilmiştir (Çizelge 3.6.). Bradford reaktifi ile alınan sonuçlar ise Çizelge 3.7.'da verilmiştir.

Çizelge 3.6. Silanlanmış *H. cupressiforme* örneğinde ortamda bulunan proteinin farklı ortam pH'larındaki derişim değerleri (mg/mL)

Deneme Grupları	Ortam pH'ı				
	4	5	6	7	8
Deney grubu 1	0,121	0,138	0,152	0,159	0,146
Deney grubu 2	0,12	0,136	0,152	0,153	0,151
Kontrol grubu	0,112	0,124	0,164	0,162	0,157
C _i	0,139	0,136	0,146	0,151	0,159

Çizelge 3.7. Silanlanmış *H. cupressiforme* örneğinde verilen pH değerlerinde ortamda bulunan proteinin Bradford reaktifi ile elde edilen derişimi (mg/mL)

Deneme Grupları	Ortam pH'ı				
	4	5	6	7	8
Deney grubu 1	0,184	0,234	0,239	0,246	0,238
Deney grubu 2	0,191	0,238	0,238	0,237	0,244
Kontrol grubu	0,164	0,195	0,23	0,231	0,232

3.5.2.2. *Homalothecium sericeum* türü için Albümin adsorpsiyonuna pH'ın etkisinin belirlenmesi

H. sericeum bitkisinde albümin adsorpsiyonuna pH'ın etkisine ait tablo aşağıda verilmiştir (Çizelge 3.8.). Bradford reaktifi ile alınan sonuçlar ise Çizelge 3.9.'de verilmiştir.

Çizelge 3.8. Silanlanmış *H. sericeum* örneğinde ortamda bulunan proteinin farklı ortam pH'larındaki derişim değerleri (mg/mL)

Deneme Grupları	Ortam pH'ı				
	4	5	6	7	8
Deney grubu 1	0,124	0,147	0,156	0,156	0,145
Deney grubu 2	0,121	0,148	0,162	0,153	0,144
Kontrol grubu	0,113	0,145	0,17	0,184	0,174
C _i	0,138	0,146	0,149	0,151	0,163

Çizelge 3.9. Silanlanmış *H. sericeum* örneğinde verilen pH değerlerinde ortamda bulunan proteinin Bradford reaktifi ile elde edilen derişimi (mg/mL)

Deneme Grupları	Ortam pH'ı				
	4	5	6	7	8
Deney grubu 1	0,19	0,249	0,265	0,264	0,249
Deney grubu 2	0,196	0,21	0,264	0,265	0,258
Kontrol grubu	0,179	0,206	0,259	0,256	0,269

3.5.2.3. *Pterogonium gracile* türü için Albümin adsorpsiyonuna pH'ın etkisinin belirlenmesi

P. gracile bitkisinde albümin adsorpsiyonuna pH'ın etkisine ait tablo aşağıda verilmiştir (Çizelge 3.10.). Bradford reaktifi ile alınan sonuçlar ise Çizelge 3.11.'de verilmiştir.

Çizelge 3.10. Silanlanmış *P. gracile* örneğinde ortamda bulunan proteinin farklı ortam pH'larındaki derişim değerleri (mg/mL)

Deneme Grupları	Ortam pH'ı				
	4	5	6	7	8
Deney grubu 1	0,137	0,143	0,155	0,154	0,146
Deney grubu 2	0,137	0,144	0,148	0,156	0,141
Kontrol grubu	0,127	0,134	0,159	0,18	0,161
C _i	0,157	0,15	0,162	0,156	0,155

Çizelge 3.11. Silanlanmış *P. gracile* örneğinde verilen pH değerlerinde ortamda bulunan proteinin Bradford reaktifi ile elde edilen derişimi (mg/mL)

Deneme Grupları	Ortam pH'ı				
	4	5	6	7	8
Deney grubu 1	0,197	0,205	0,202	0,234	0,248
Deney grubu 2	0,215	0,212	0,237	0,219	0,246
Kontrol grubu	0,17	0,174	0,237	0,239	0,246

3.5.2.4. *Antitrichia californica* türü için Albümin adsorpsiyonuna pH'ın etkisinin belirlenmesi

A. californica bitkisinde albümin adsorpsiyonuna pH'ın etkisine ait tablo aşağıda verilmiştir (Çizelge 3.12.). Bradford reaktifi ile alınan sonuçlar ise Çizelge 3.13.'de verilmiştir.

Çizelge 3.12. Silanlanmış *A. californica* örneğinde ortamda bulunan proteinin farklı ortam pH'larındaki derişim değerleri (mg/mL)

Deneme Grupları	Ortam pH'ı				
	4	5	6	7	8
Deney grubu 1	0,129	0,155	0,162	0,157	0,134
Deney grubu 2	0,138	0,15	0,166	0,162	0,136
Kontrol grubu	0,127	0,141	0,175	0,185	0,172
C _i	0,152	0,155	0,157	0,149	0,152

Çizelge 3.13. Silanlanmış *A. californica* örneğinde verilen pH değerlerinde ortamda bulunan proteinin Bradford reaktifi ile elde edilen derişimi (mg/mL)

Deneme Grupları	Ortam pH'ı				
	4	5	6	7	8
Deney grubu 1	0,194	0,239	0,257	0,26	0,265
Deney grubu 2	0,206	0,237	0,253	0,263	0,259
Kontrol grubu	0,168	0,198	0,252	0,26	0,261

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Afinite kromatografisi, albümin uzaklaştırılması için günümüzde birçok araştırmacının kullandığı bir yöntemdir (Huse vd., 2002; Öztürk vd., 2008). Bu yöntemde inert dolgu maddesi üzerine, tutulması istenen maddeye spesifik olan ligandlar bağlanarak çeşitli yüzey modifikasyonları da gerçekleştirilmektedir. Bu sayede tutulması istenen molekül ile dolgu maddesi arasında spesifik bir afinite sağlanabilmektedir. Örneğin Öztürk ve arkadaşları (2008) gerçekleştirdikleri çalışmada IMEO molekülünü yarı spesifik bir ligand olarak PHEMA polimeri üzerine bağlamış ve protein yapıdaki IgG'nin insan plazmasından izole edilmesi amacıyla afinite kromatografisi tekniğini kullanarak başarılı sonuçlar elde etmişlerdir. Ancak bu çalışmadaki gibi sentetik polimerlerin kullanılması durumu, saflaştırma yada uzaklaştırma işlemleri için harcanan emek ve maddi kaynağa, polimer sentezleme işleminin de eklenmesine neden olmaktadır. Bu sentez işlemi, endüstriyel ölçüdeki üretim de göz önünde bulundurulduğunda, kaynak ve emek kaybının yanı sıra bir çok kimyasal maddenin doğaya atık olarak bırakılmasına da neden olmaktadır. Tez çalışmamız, proteomik çalışmalardaki albümin uzaklaştırma işlemi için inert katı destek maddesi olarak bu sentetik polimerler yerine karayosunu partiküllerinin kullanılabilirliğinin araştırılmasını kapsamaktadır. Bu işlem için karayosunlarının kullanılması, bitkilerin doğadan toplanması, yıkanması ve parçalanması dışında başka bir uğraş gerektirmeksizin albümin uzaklaştırma işleminin gerçekleştirilebilmesine olanak sağlayacaktır. Aynı zamanda doğaya atık olarak kimyasal maddeler değil, sadece bitki partikülleri bırakılacaktır. Bu amaç dahilinde çalışmamızda doğada geniş yayılışa sahip karayosunu türleri kullanılmıştır. Kullanılan karayosunu türlerinin doğada halı formunda saf birlikler halinde bulunmaları da doğadan toplanmaları açısından kolaylık sağlamaktadır. Türler arasında elde edilen bitkisel materyal miktarı açısından bir karşılaştırma yapmak gerekirse (Kısım 3.1.), yapılan öğütme ve eleme işlemleri sonrasında 125 µm altı parçaların kütlelerinin toplam kütleyle oranında *Hypnum cupressiforme* türü %61 ile ilk sırada gelmektedir. Bu türü %51 ile *Homalothecium sericeum* türü takip etmektedir. Aynı öğütme ve eleme işlemleri sonrasında bu iki türden daha fazla miktarda 125 µm altı partikül kütlesi elde ediliyor olması bu iki türün tercih edilebilmesi açısından önem taşımaktadır.

Gerçekleştirilen SEM görüntülemesinin sonucunda (Kısım 3.2.) da tespit edildiği üzere karayosunlarının yüzeylerinde çeşitli girinti ve çıkıntıların bulunması, gerek

kolon uygulamalarında basınç düşmesini azaltan, gerekse de adsorban etkinliğinin araştırıldığı bu bitkilerin yüzey alanlarını artıran bir özellik olarak belirlenmiştir.

Yapılan mikroskopik incelemeler sırasında bitkilerin üzerinde temizlenmesi mümkün olmayan mikroskopik partiküller gözlenmiştir (Şekil 3.13.). Yıkama işlemleri sonucunda bile temizlenemeyen bu partiküller bitkilerin doğal ortamdan alınmalarının sonucudur. Doku kültürü teknikleriyle yetiştirilen bitkilerde bu gibi kirlilikler olmayacaktır. Elde edilen adsorpsiyon sonuçlarının değerlendirilmesi aşamasında bitkilerin yüzeylerindeki adsorpsiyon bölgelerinin bir kısmının kirlilik sebebiyle kapalı olabileceği, bunun da bitkinin adsorpsiyon kapasitesini düşürebileceği söylenebilir. Bu noktadan hareketle maliyet/verim incelemesi yapılırken doğal ortamından alınan bitkiler ile elde edilecek verim ile kültüre alınacak bitkilerden elde edilecek verim karşılaştırılabilir (Demir, 2011).

IMEO molekülünün bitki partikülüne bağlanmış olduğunun kalitatif tespiti, içerdiği silan grubunun yapısında bulunan silisyumun bitki yüzeyinde gözlenmesi ile mümkün olmaktadır. Gerçekleştirilen elementer analiz sonucunda bitki yüzeyinde silisyum tespit edilmiştir (Kısım 3.3.). Bu da IMEO'nun bitkiye bağlanmış olduğunu göstermektedir.

Ön deneme niteliğindeki, *Pterogonium gracile* türüne ait bitki partikülleri kullanılarak gerçekleştirilen, bitki yüzeyine albümin adsorpsiyonuna inkübasyon süresi, ortam pH'ı ve BSA başlangıç derişiminin incelendiği deneyler sonucunda ortaya çıkan veriler bir bütün halinde aşağıda yorumlanmaktadır:

İlk olarak inkübasyon süresinin albümin adsorpsiyonuna etkisinin incelendiği deneyde (Kısım 3.5.1.1.), deneyin sonunda deney gruplarında ortamda 0,84 mg/ml protein, kontrol grubunda ise 0,87 mg/mL protein tespit edilmiştir. Çizelge 3.3.'e ilk bakışta verilerin tutarsızlığı dikkat çekmektedir. Başlangıç derişimi olarak içerisine 0,5 mg/ml BSA eklenerek deneye başlatılmış olan deney grupları, deney sonunda 0,845 civarında, kontrol amacıyla sadece bitki ve distile sudan oluşan kontrol grubu ise başlangıçta hiç protein eklenmemiş olmasına rağmen deney gruplarından da yüksek olarak 0,878 mg/ml protein içermektedir. Bu tutarsızlık bitkiden ortama geçen protein miktarının ne kadar olduğu konusunda şüphe yaratmakla birlikte kalitatif açıdan bakıldığında kontrol grubunda ortama protein salınması zaten hiç bir şekilde kabul edilebilir değildir. Ancak bu deneyde dikkat çeken bir diğer nokta ilk 15 dakika sonunda da 2 saatlik sürenin sonunda da aynı

miktarda proteinin ortamda bulunması olmuştur. Bu durum ortama salınan protein miktarının zamanla artmadığını gösterdiğinden, ortaya çıkan bu proteinin, bitki parçalanması sırasında hücrel yapıların bütünlüğünün bozulması nedeniyle serbest kalmış olan hücre içi materyal kaynaklı olduğu düşünülmüştür. Bu proteinlerin 125 µm'den küçük boyutta partikülleri içeren "bitkisel toz" içerisinde serbest halde bulunduğu tahmin edilerek bu durumun bitkisel materyalin yıkanması sonucunda ortadan kaldırılabilceği düşünülmüştür. Deney sonundaki değerlerin başlangıç değerlerinden yüksek çıkması nedeniyle Q değerleri de negatif bulunmakta ve bir grafik de çizilememektedir. Bitkisel materyalin ortama protein bıraktığına dair ilk belirti bu deneyde ortaya çıkmıştır. Bu sorunun nedenleri ve bir çözüm yolu düşünülürken ön deneme kapsamında planlanmış olan diğer deneylere geçilmiştir.

Normal bir insanda kanda bulunan albümin miktarı 38,5 mg/ml olduğu için (Öztürk vd. 2008), BSA başlangıç derişiminin adsorpsiyon miktarına etkisinin incelendiği sonraki deneyde (Kısım 3.5.1.2.) 15 ila 45 mg/ml aralığında denemeler gerçekleştirilmiştir. Deney sonuçlarından Q değerleri hesaplanarak sonuçlar Şekil 3.23'te grafik ile ifade edilmiştir. Şekilde görülmektedir ki maksimum adsorpsiyon 35-36 mg/mL'lik BSA başlangıç konsantrasyonunda gerçekleşmektedir. Bu deneyde de önceki deneydeki kadar bitkisel materyal kullanılmıştır, dolayısıyla bitkilerin ortama salmış olabileceği protein miktarı da önceki deneydeki miktar kadardır. Ancak bu deneydeki yüksek derişimlerde, önceki deneydeki düşük derişimlerde gözlenebilen derişim farkı ihmal edilebilir bir değer olarak ortaya çıkacağından farkedilemeyebilir. Bu nedenle bitkisel materyalin ortama protein salıp salmadığından emin olunamaz. Bu durumun kesinleşmesi ancak tekrar düşük bir derişim ile çalışılır ise mümkün olacaktır. Her ne kadar derişim yükseltildiğinde daha olumlu sonuçlar elde edilse de, bu belirsizliğin ortadan kaldırılabilmesi için sonraki tüm deneylerde BSA başlangıç derişiminin düşük tutulmasına karar verilmiştir. Çünkü amacımız bu olumlu sonuçları bitkiden ortama protein salımı gerçekleşmeden elde edebilmektir.

Farklı ortam pH'larında bitki yüzeyine gerçekleşen adsorpsiyon miktarının incelendiği denemede (Kısım 3.5.1.3.) başlangıç derişimi yukarıda belirtilen nedenlerden dolayı 0,1 mg/ml seviyesine indirilmiştir. Ancak deney gruplarına eklenen ve her pH aralığı için 1 mg/mL civarında olması gereken BSA başlangıç derişimini ifade eden C_i (başlangıç derişimi) satırındaki verilerin dengesizliği dikkat çekmektedir. Yine de otomatik pipetlerden kaynaklandığı düşünülen bu

dengelesizlik çok düşük derişimleri ifade ettiği için deney verilerinin birbirleri arasında karşılaştırılmasına engel teşkil etmemektedir. Bu deney ile incelenen durum hangi pH aralıklarında bitkilerin daha az yada daha fazla protein bırakacakları olmuştur. Bu amaçla pH 3 ila 9 aralığındaki ortam pH'larında gerçekleştirilen deney sonucunda kontrol grubunda, asidik pH'tan bazik pH'a doğru giderek artan şekilde, pH 3, 4 ve 5'te 0,30 mg/ml, pH 6 ila 9 aralığında ise 0,54 mg/ml civarında protein ortamda tespit edilmiştir. Bu salımın belirli pH aralıklarında neden daha yüksek miktarda gerçekleştiği, kullanılan karayosunlarının hücre çeperi bileşenleri hakkında kesin bir bilgi sahibi olunmaması nedeniyle anlaşılamamaktadır. Ancak tezin giriş kısmında da değinildiği gibi zayıf asit yada bazlar ile hidrolize uğrayabilen moleküllerin (hemiselüloz gibi) çeper yapısında bulunduğu bilinmektedir. Protein salım miktarındaki bu değişimin, bu şekilde asidik yada bazik pH'lardan etkilenen moleküller nedeniyle çeper yapısının değişmesiyle, dokudaki hücrelerin içerisinden yada çeperin kendi yapısından ortama geçen proteinden kaynaklandığı tahmin edilmektedir.

Sılanlanmamış ve yıkama işleminde geçmemiş *Pterogonium gracile* türüne ait partiküllerle gerçekleştirilen, ön deneme niteliğindeki bu üç deneyin sonucunda bitkisel materyalden deney ortamına protein salımı gerçekleştiği tespit edilmiştir. Bu sonuçlar göz önünde bulundurularak bitkilerin, içerdikleri tüm proteini kaybedene kadar distile su ile yıkanmalarına karar verilmiş ve bundan sonraki tüm denemelerde yıkanmış bitkiler kullanılmıştır. Ayrıca sonraki deneyler farklı otomatik pipetler kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Her ne kadar bu üç ön deneme gerçekleştirilirken ortamdaki protein miktarının tespiti sadece 280 nm dalga boyunda ölçülen absorbans değerleri kullanılarak ortaya konmuş olsa da, bu verileri destekleyecek nitelikte veriler daha sonraki (sılanlanmış partiküller ile gerçekleştirilen) deneylerde Bradford reaktifi kullanılarak da elde edilmiştir. Bunun yanında proteinlerin 280 nm, DNA'nın ise 260 nm dalga boyundaki absorbans değeri ile tespit edildiği bilinmektedir. Ancak bazı kaynaklarda bu her iki tip molekölün de, diğer molekölün tespit edildiği dalga boyundaki absorbans üzerine girişim yapabildiği belirtilmektedir (Nucleic Acid and Protein Quantitation Methods, www.promega.com). Bu ihtimal göz önünde bulundurularak bitkilerin yıkama işleminde distile su ile 2 saatlik muameleleri sonucunda ortamdaki protein ve DNA miktarının ayrı ayrı tespit edilmesi ve olası bir girişim etkisinin ortaya çıkarılması amacıyla hem 260, hem

de 280 nm dalga boyunda absorpsiyon değerleri incelenmiştir (Çizelge 3.1.). Elde edilen verilerin birbirinden bağımsız değiştiklerinin gözlenmesi sonucunda böyle bir girişim etkisinin meydana gelmediği tespit edilmiştir. Aynı çizelgede derişim sütununda bitkilerden ortama salınan protein miktarının ne denli yüksek olduğu gözlenmektedir. Bu çizelgede ifade edilene benzer şekilde bitkisel proteinlerin ortama en yüksek miktarda geçişi Kısım 3.5.1.2.'deki Çizelge 3.5.'te pH=7 sütununda gözlenmiştir. *P. gracile* türüne ait bitkilerle gerçekleştirilen pH denemesine ait tabloda sütunda başlangıç derişimi 0,08 mg/mL olarak, deney sonu derişimi ise 0,68 mg/ml olarak tespit edilmiştir. Burada derişimdeki 0,6 mg/mL'lik artış, bitkilerin distile suda inkübe edilmelerinin sonuçlarını ifade eden Çizelge 3.1.'de *P. gracile* satırındaki 0,62 mg/mL'lik derişim verisi ile yüksek ölçüde paralellik göstermektedir. Diğer deneylerde kullanılan farklı pH'lardaki tüm ortamlarda gözlenen en yüksek salımın pH 7 ve distile su ortamında gerçekleşmesi, bitkilerin yıkanması için distile suyun uygun bir ortam olduğunu göstermektedir.

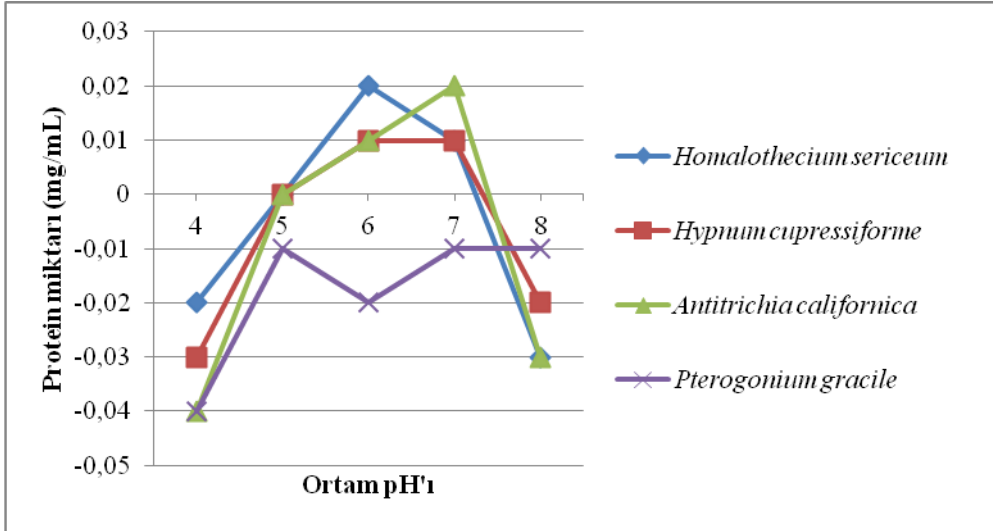
Proteomik çalışmaların eser miktardaki proteinlerin tespit edilmesini amaçladığı, Tirumalai ve arkadaşlarının (2003) da çalışmalarında belirttiği gibi sıkça ifade edilmektedir. Proteomik çalışmalar ile keşfedilen bu eser miktardaki proteinler daha sonra hastalıkların teşhis edilmesi gibi (Petricoin vd., 2002; Steel vd., 2003; Tabar vd., 2000) çok önemli ve kritik amaçlar için kullanılmaktadır. Karayosunlarının, bu tez çalışması kapsamında ortaya koyulmak istenilen potansiyel kullanımının proteomik amaçlı albümin uzaklaştırma olması, bitkisel materyalden deney ortamına olası bir protein geçişini son derece sakıncalı kılmaktadır. Bu nedenle bitkilerin ortama protein bırakma durumunun ortadan kaldırılması amacıyla silanlanmış bitki partikülleri kullanılarak yapılacak denemeler öncesinde bir yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. *P. gracile* türüne ait bitki partiküllerinin yıkama işlemi sonunda elde edilen verilerin gösterildiği grafikte (Şekil 3.9.) de görüldüğü üzere son 24 saatte gözlenen absorpsiyon değerlerinin bir değişim göstermemesinin üzerine yıkamanın yeterli olduğuna karar verilmiştir. Ancak yıkamanın bu son evresinde dahi çok zayıf ta olsa bir absorpsiyon ölçülmüştür. Bu absorpsiyonun ortama salınan bitki proteininden mi yoksa başka bir maddeden mi kaynaklandığı kesin olarak bilinmemekle birlikte yıkama işleminde bir minimum değere ulaşıldığı için silanlama işlemine geçilmiştir.

BSA molekülünün bitkisel partiküllerin yüzeylerine olan ilgisini attırmak için IMEO adı verilen silanlama ajanı pseudo-spesifik bir ligand olarak kullanılmıştır.

Gerçekleştirilen birçok çalışmada (Huse vd., 2002; Öztürk vd., 2008) İMEO molekülünün, proteinlerin adsorbana olan afinitesini arttırdığı belirtilmektedir. Gerçekleştirilen silanlama işlemi sadece yıkanmış bitki partiküllerine uygulanmıştır. Silanlanmış partiküller ile gerçekleştirilen deneylerde de deney grubu olarak silanlanmış partikül, kontrol grubu olarak ise aynı türe ait yıkanmış bitki örneği kullanılmıştır. Dolayısı ile her iki örnek te yıkanmış olduğu için bu deneylerde, ön denemelerde gözlenen bitkisel materyalden ortama protein salımının gerçekleşmeyeceği öngörülmüştür. Ancak yapılan deneyler sonucunda (Kısım 3.5.1.2.), *P. gracile* ile gerçekleştirilen ön denemelerde olduğu kadar yüksek miktarda (Çizelge 3.5. pH=7 sütunundaki 0,6 mg/mL'lik artış gibi) olmasa da, bir miktar protein salımının gerçekleştiği gözlenmiştir.

Dört türe ait yıkanmış ve silanlanmış partiküllerle gerçekleştirilen, ortam pH'ının albümin adsorpsiyonuna etkisinin denendiği bu dört deneyde (Kısım 3.5.2.) elde edilen veriler genel olarak karşılaştırıldığında, deney grubuna belirli miktarda protein eklenmiş olmasına rağmen deney sonunda ortamda kontrol grubuyla yaklaşık aynı miktarda protein tespit edilmiştir. Benzer bir durum kısım 3.5.1.1.'deki inkübasyon süresi denemesinde de karşımıza çıkmıştır. Ancak dikkati çeken bir diğer nokta yıkama işleminin etkisini ifade eden şekilde, yıkanmamış örneklerle gerçekleştirilen denemelerde olduğu gibi C_i değerlerinin üzerinde deney sonu protein derişimleri değil, C_i değerlerinin altında yada buna yakın değerlerin gözlenmesidir. Bradford reaktifinin proteinler ile spesifik olarak etkileşerek ortamda protein varlığını gösterdiği bilinmektedir. Bu deneylerde bitkisel materyalden ortama protein geçişi olduğu, Kısım 3.5.2. dahilindeki deneylerde gerçekleştirilen Bradford reaktifi uygulamaları sonucunda da kalitatif olarak desteklenmektedir.

Silanlanmış bitki partiküllerine albümin adsorpsiyonuna pH'ın etkisinin incelendiği bu 4 deneyin verileri tek bir grafikte karşılaştırılacak olursa Şekil 4.1.'deki grafik ortaya çıkmaktadır. Grafikte gösterilen değerler, deneylerin sonunda ortamda tespit edilen protein miktarından deneylerin başlangıcında ortama eklenen BSA miktarının çıkarılması ile elde edilmiştir. Yani bu değer bitkinin ortama bıraktığı protein miktarından adsorbe edebildiği protein miktarının çıkarılmasına eşdeğerdir. Bir başka deyişle grafik "bitkinin farklı ortam pH'larında protein uzaklaştırma işlevine uygunluğu"nu ifade etmektedir. Dolayısı ile negatif değerler, bitkinin protein adsorpsiyonuna daha uygun olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.1. Her türe ait silanlanmış bitki partikülleriyle gerçekleştirilen pH denemesi verilerinin aynı grafikte gösterimi

Grafik genel olarak incelenecek olursa, pH değeri 6 ila 7 olduğunda deney sonunda ortamda en yüksek miktarlarda protein kalmaktadır. pH değeri 5 iken ise deney sonunda ortamda tespit edilen protein miktarı, yaklaşık olarak deney başlangıcında ortama eklenen protein miktarı kadardır. pH=4 ve pH=8'de ise deney sonunda ortamda başlangıçtakinden daha az miktarda protein tespit edilmiştir. Ancak *P. gracile* türüne ait örnekler bu genellemeye uymamaktadır. Bu tür ile gerçekleştirilen deneylerde her zaman deney sonunda ortamdaki protein miktarı başlangıçtakinden azdır. Bu durum *P. gracile* türüne ait bitkisel partiküllere daha fazla BSA adsorpsiyonu gerçekleştiğini ifade edebileceği gibi, adsorpsiyonun daha yüksek oranlarda gerçekleşmediğini, ancak bu bitki türünün yıkama işlemine diğer bitki türlerine göre daha iyi cevap verdiğini gösteriyor da olabilir. Ortaya çıkan protein salım problemini bir yana bırakacak olursak, Şekil 4.1.'den de gözlenebileceği gibi bu dört tür arasından *P. gracile* türüne ait bitki örneği albümin uzaklaştırma işlemindeki kullanım potansiyeli açısından öne çıkmıştır. Ayrıca BSA adsorpsiyonu için düşük pH değerleri yüksek pH değerlerine göre daha uygun ortamlar oluşturmaktadır denilebilir.

Sonuç olarak proteomik amaçlı olan bu tez çalışmasını genel hatlarıyla değerlendirecek olursak, bitkisel materyalden deney ortamına protein geçişi büyük bir problem olarak ortaya çıkmaktadır. Deneylerin sonucunda ortamda ölçülen

absorbansın protein kaynaklı olduğu Bradford reaktifi denemeleri ile de desteklenmektedir. Bu protein salımının bitkilerin uzun süreler boyunca yıkanmasından sonra dahi ortaya çıkışının nedeni bilinmemektedir. Ancak giriş kısmında da bahsedildiği gibi, hücre çeperi asidik ve bazik pH'a karşı duyarlı olan bir çok bileşeni içermektedir. Bu çeper yapıtaşlarından bazılarının (örneğin Hemiselüloz), belirli pH aralıklarında çeper yapısından koparak deney ortamına karışıyor olabileceği, yada parçalanarak, kendisine bağlı bulunan glikoprotein gibi çeper yapıtaşlarının ortamda serbest kalmasına neden olabileceği düşünölmektedir.

Karşılaşılan protein salım problemleri nedeniyle, bitkisel partiköllerde IMEO ile gerçekleştirilen yüzey modifikasyonunun BSA adsorpsiyonuna etkisi tespit edilememiştir. Her ne kadar daha yüksek yoğunlukta protein çözeltileri kullanılarak yapılacak deneylerde ortama salınan proteinin miktarı ihmal edilebilir boyutlara düşecek de olsa (Kısım 3.5.1.2.), tezin proteomik amaçlı olması nedeniyle bu deney şartları denenmemiştir.

Şekil 4.1.'de gözleendiği gibi, ortam pH'ının 5 olduğu deneylerde deneyin başlangıcında ortama eklenen ve sonunda ortamda tespit edilen protein miktarının aynı olması, BSA molekülünün yüzeylere tutunma özelliğinin yüzeyin (hücre çeperinin ortam pH'ındaki) yapısına göre değişkenlik göstermesinden dolayı gerçekleşmiş olabilir. Mooney ve arkadaşları (1996) gerçekleştirdikleri çalışmada 0,05 mg/mL'nin altındaki konsantrasyonlarda BSA'nın genel olarak hidrofobik yüzeylere tutunurken, sadece pH 5,5 civarında bir noktada hidrofilik bir yüzeye tutunmakta olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışma BSA molekülünün adsorpsiyon özelliğinin, tutunduğu yüzeyin özelliğinin yanında aynı zamanda ortamdaki protein derişimi ile de değişebildiğini göstermektedir. Bu durum adsorpsiyon mekanizmasının ortaya çıkarılmasını daha da karmaşık hale getirmektedir. FTIR analizinin sonucunda bitkisel yapının genel olarak hidrofobik olduğu tespit edilmiştir. Ancak bitkisel materyalden ortama salınan protein nedeniyle ortaya çıkan karmaşık durum adsorpsiyon mekanizması hakkında bir tahmin yapmayı imkansız hale getirmektedir.

Tezin giriş kısmında incelendiği üzere bitki hücre çeperi çok sayıda, farklı türlerde ve yüksek oranda polimerik materyalden oluşur. Karayosunu çeperlerinde bulunan maddeler genel olarak incelendiğinde bu yapıda açıkta bulunan çok sayıda hidroksil (OH⁻) ucunun olduğu görülür. Bu durum tez kapsamında gerçekleştirilen FTIR analizi sonuçları ile de desteklenmektedir. Bu açıdan karayosunu hücre

çeperi, HEMA olarak adlandırılan polimerik materyal ile yüksek benzerlik göstermektedir. Bu durum, HEMA polimeri kullanılarak gerçekleştirilen çalışmaların gelecekte bitki hücre çeperi kullanılarak da gerçekleştirilebileceğini düşündürmektedir. Benzer şekilde HEMA polimeri üzerinde gerçekleştirilen yüzey modifikasyonları (örneğin IMEO gibi ligandlar) bitki hücre çeperi için de kullanılabilir.

Bu tez çalışmasında karayosunu partiküllerinin adsorban olarak kullanıldığı BSA adsorpsiyonu, proteomik çalışmalarda kullanılması amacıyla incelenmiştir. Çalışmalar sırasında karşılaşılan bir çok problemin sebebi, bu gibi alanlarda bitkilerin yeni yeni kullanılmaya başlanması nedeniyle açıklığa kavuşturulamamıştır. Bunlardan en önemlisi ise kesin ve doğru sonuçlara varılabilmesi için öncelikle deney ortamında meydana gelen protein salımının nedeninin anlaşılması, ve bu salımın gerçekleşmeyeceği deney şartlarının tespit edilmesidir. Bir diğer önemli nokta da literatürde karayosunlarının çeper kimyası hakkında yeterli bilginin bulunmamasıdır. Çeper kimyası hakkında yapılacak daha ileri araştırmalar ile albümin uzaklaştırması gibi işlemlerde bitkisel hücre çeperinin sentetik polimerler yerine kullanılabilirliği daha doğru şekilde test edilebilir. Gelecekte proteomik amaçlı ve bitkilerin kullanılacağı bu gibi çalışmalara olanak sağlayacak ön çalışmalar gerçekleştirilmelidir. Bu sayede proteomik çalışmalarda albümin uzaklaştırması için kullanılan polimerlerin sentezlenmesi için harcanan emek ve kaynak ile ortaya çıkan zararlı kimyasal atıklar ortadan kaldırılabilir.

KAYNAKLAR

- Akar, T., Özcan, A.S., Tunalı, S., Özcan, A. 2008. Biosorption of a textile dye (acid blue 40) by cone biomass of *Thuja orientalis*: Estimation of equilibrium, thermodynamic and kinetic parameters. **Bioresource Technology**, 99: 3057-3065.
- Akar, T., Tosun, İ., Kaynak, Z., Özkara, E., Yeni, O., Şahin, E.N., Tunalı Akar, S. 2009. An attractive agro-industrial by-product in environmental cleanup: Dye biosorption potential of untreated olive pomace. **Journal of Hazardous Materials**, 166: 1217-1225.
- Akgöl, S., Denizli, A. 2004. Novel metal-chelate affinity sorbents for reversible use in catalase adsorption. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 28: 7-14.
- Akgöl, S., Türkmen, D., Denizli, A. 2004. Cu(II)-incorporated, histidine-containing, magnetic-metal-complexing beads as specific sorbents for the metal chelate affinity of albumin. **Journal of Applied Polymer Science**, 93: 2669-2677.
- Akgöl, S., Tüzmen, N., Denizli, A. 2007. Porous dye affinity beads for albumin separation from human plasma. **Journal of Applied Polymer Science**, 105: 1251-1260.
- Akkaya, G., Özer, A. 2005. Biosorption of acid red 274 (AR 274) on *Dicranella varia*: Determination of equilibrium and kinetic model parameters. **Process Biochemistry**, 40: 3559-3568.
- Altıntaş, E.B., Yavuz, H., Say, R., Denizli, A. 2006. Methacryloylamidoglutamic acid having porous magnetic beads as a stationary phase in metal chelate affinity chromatography. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, 17: 213-226.
- Altıntaş, E.B., Tüzmen, N., Uzun, L., Denizli, A. 2007. Immobilized metal affinity adsorption for antibody depletion from human serum with monosize beads. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, 46: 7802-7810.
- Ananthapadmanabhan, K.P. 1993. Surfactant solutions: Adsorption and aggregation properties. In: Interactions of Surfactants with Polymers and Proteins, (E.D. Goddard, K.P. Ananthapadmanabhan Eds.), CRC Press, pp.5-59, London.

- Anderson N.L., Anderson N.G. 2002. The human plasma proteome: History, character, and diagnostic prospects. **Molecular & Cellular Proteomics**, 1: 845-867.
- Anderson, N.L., Polanski, M., Pieper, R., Gatlin, T., Tirumalai, R.S., Conrads, T.P., Veenstra, T.D., Adkins, J.N., Pounds, J.G., Fagan, R., Lobley, A. 2004. The human plasma proteome: A nonredundant list developed by combination of four separate sources. **Molecular & Cellular Proteomics**, 3: 311-326.
- Avcıbaşı, N., Uygun, M., Çorman, M.E., Akgöl, S., Denizli, A. 2010. Application of supermacroporous monolithic hydrophobic cryogel in capturing of albumin. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, 162: 2232-2243.
- Balarama Krishna, M.V., Rao, S.V., Arunachalam, J., Murali, M.S., Kumar, S., Manchanda, V.K. 2004. Removal of ^{137}Cs and ^{90}Sr from actual low level radioactive waste solutions using moss as a phyto-sorbent. **Separation and Purification Technology**, 38: 149-161.
- Barka, N., Abdennouri, M., Boussaoud, A., Makhfouk, M. 2010. Biosorption characteristics of Cadmium(II) onto *Scolymus hispanicus* L. As low-cost natural biosorbent. **Desalination**, 258: 66-71.
- Baumbach, G.A., Lebing, W.R., Hammond, D.J., Wydick, J.E. 2009. A highly purified antithrombin I_n concentrate prepared from human plasma fraction Iv-1 by affinity chromatography. **Vox Sanguinis**, 67: 117.
- Bhattacharyya, K.G., Sarma, J., Sarma, A. 2009. *Azadirachta indica* leaf powder as a biosorbent for Ni(II) in aqueous medium. **Journal of Hazardous Materials**, 165: 271-278.
- Bremner, I, Wilkie, K.C.B. 1971. The hemicelluloses of bracken. II. A galacturomannan. **Carbohydrate Research**, 20: 193-203.
- BRENDA (Braunschweig Enzyme Database), Technische Universität Braunschweig, Department of Biochemistry and Bioinformatics. [<http://www.brenda-enzymes.org/>], Erişim Tarihi: 06.01.2014.
- Brown, P.A., Gill, S.A., Allen, S.J. 2000. Metal removal from waste water using peat. **Water Research**, 34: 3907-3916.
- Brzeski, H., Katenhusen, R.A., Sullivan, A.G., Russell, S., George, A., Somiari, R.I., Shriver, C. 2003. Albumin depletion method for improved plasma

- glycoprotein analysis by twodimensional difference gel electrophoresis. **BioTechniques**, 35: 1128-1133.
- Buck, W.R., Goffinet, B. 2000. Morphology and Classification of Mosses, In: Bryophyte Biology (Shaw, A. J., Goffinet, B. Eds.) Cambridge University Press, pp.71-123, England.
- Bueno, S.M.A., Legallais, C., Haupt, K., Vijayalakshmi, M.A. 1996. Experimental kinetic aspects of hollow fiber membrane-based pseudobioaffinity filtration process for igg separation from human plasma. **J. Membr. Sci.**, 117: 45-56.
- Bunluesin, S., Kruatrachue, M., Pokethitiyook, P., Upatham, S., Lanza, G.R. 2007. Batch and continuous packed column studies of cadmium biosorption by *Hydrilla verticillata* biomass. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 103: 509-513.
- Carafa, A., Duckett, J.G., Knox, J.P., Ligrone, R. 2005. Distribution of cell-wall xylans in bryophytes and tracheophytes: New insights into basal interrelationships of land plants. **New Phytologist**, 168: 231-240.
- Carpita, N.C., Gibeaut D.M. 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants: Consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. **The Plant Journal**, 3: 1-30.
- CCRC (Complex Carbohydrate Research Center), University of Georgia, ABD, [www.ccrc.uga.edu], Erişim Tarihi: 09.01.2014.
- Chan, K.C., Lucas, D.A., Hise, D., Schaefer, C.F., Xiao, Z., Janini, G.M., Buetow, K.H., Isaaq, H.J., Veenstra, T.D., Conrads, T.P. 2004. Analysis of the human serum proteome. **Clinical Proteomics**, 1: 101-225.
- Chowhurdy, S., Chakraborty, S., Saha, P. 2011. Biosorption of basic green 4 from aqueous solution by *Ananas comosus* (pineapple) leaf powder. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. 84: 520-527.
- Cohn, E.J., Strong, L.E., Hughes, W.L.J., Mulford, D.J., Ashworth, J.N., Melin, M., Taylor, H.L. 1946. Preparation and properties of serum and plasma proteins. IV. a system for the separation into fractions of the protein and lipoprotein components of biological tissues and fluid. **J. Am. Chem. Soc.**, 68: 459-475.
- Crum, H.A. 2001. Structural Diversity of Bryophytes. University of Michigan Herbarium, U.S.A.

- Çanak, Y., Özkara, S., Akgöl, S., Denizli, A. 2004. Pseudo-specific bioaffinity chromatography of immunoglobulin-G. **Reactive & Functional Polymers**, 61: 369-377.
- Demir, M.E. 2011. Çeşitli Biryofit Türlerinin Protein-Antikor Safılaştırılmasında Spesifik Sorbent Etkinliğinin Araştırılması. Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Aydın.
- Deniz, F., Saygıdeğer, S.D. 2010. Equilibrium, kinetic and thermodynamic studies of acid orange 52 dye biosorption by *Paulownia tomentosa* Steud. Keaf powder as a low-cost natural biosorbent. **Bioresource Technology**, 101: 5137-5143.
- Denizli A., Pişkin E. 2001. Dye-ligand affinity systems. **J. Biochem. Biophys. Methods**, 49: 391-416.
- Denizli, A., Küfrevioğlu, Ö.İ. 2010. Protein Kromatografisi ve Yeni Nesil Polimerik Sistemler. Pozitif Matbaacılık Ltd. Şti., Ankara.
- Elaissari, A., Bourrel, V. 2001. Thermosensitive magnetic latex particles for controlling protein adsorption and desorption. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, 225: 151-155.
- Emmert-Buck, M.R., Gillespie, J.W., Paweletz, C.P., Ornstein, D.K., Basrur, V., Appella, E., Wang, Q.H., Huang, J., Hu, N., Taylor, P., Petricoin, E.F. 2000. An approach to proteomic analysis of human tumors. **Molecular Carcinogenesis**, 27: 158-165.
- Ferguson, C.R., Peterson, M.R., Jeffers, T.H. 1989. Removal of metal contaminants from waste waters using biomass immobilized in polysulfone beads. In: *Biotechnology in Minerals and Metal Processing* (Scheiner, B.J., Doyle, F.M., Kawatra, S.K. Eds.), Society of Mining Engineers Inc., U.S.A.
- Fernandez, M.E., Nunell, G.V., Bonelli, P.R., Cukierman, A.L. 2010. Effectiveness of *Cupressus sempervirens* cones as biosorbent for the removal of basic dyes from aqueous solutions in batch and dynamic modes. **Bioresource Technology**. 101: 9500-9507.
- Festucci-Buselli, R.A., Otoni, W.C., Joshi, C.P. 2007. Structure, organization, and functions of cellulose synthase complexes in higher plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, 19: 1-13.

- Geddes, D.S., Wilkie, K.C.B. 1971. Hemicelluloses from the stem tissues of the aquatic moss *Fontinalis antipyretica*. **Carbohydrate Research**, 18: 333-335.
- Glazer, A.N., Nikaido, H. 2007. *Microbial Biotechnology: Fundamentals of Applied Microbiology*, Cambridge University Press, England.
- Glime, J.M. 2007. *Bryophyte Ecology. Volume 1. Physiological Ecology*. [<http://www.bryoecol.mtu.edu/>]. Erişim tarihi 8.12.2013.
- Gries, H., Mutzel, W., Zurth, C., Weinmann, H.J. 1998. Magnetic particles for diagnostic purposes. US Patent No: 5,746,999. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Gomez, C.G., Strumia, M.C. 2008. Synthesis and modification of supports with an alkylamine and their use in albumin adsorption. **Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry**, 46: 2557-2566.
- Gonzales, M.H., Araujo, G.C.L., Pelizaro, C.B., Menezes, E.A., Lemos, S.G., de Sousa, G.B., Nogueira, A.R.A. 2008. Coconut coir as biosorbent or Cr(VI) removal from laboratory wastewater. **Journal of Hazardous Materials**, 159: 252-256.
- Guo, Z., Bai, S., Sun, Y. 2003. Preparation and characterization of immobilized lipase on magnetic hydrophobic microspheres. **Enzyme and Microbial Technology**, 32: 776-782.
- Hage, D.S., Ruhn, P.F. 2006. An introduction to affinity chromatography. In: *Handbook of Affinity Chromatography* (Hage, D.S. and Cazes, J. Eds.), Taylor and Francis, pp.2-14, New York.
- Haney, P.J., Draveling, C., Durski, W., Romanowich, K., Walid Qoronfleh, M. 2003. SwellGel: A sample preparation affinity chromatography technology for high throughput proteomic applications. **Protein Expr. Purif.**, 28: 270-279.
- Hebant, C. 1974. Studies on the development of the conducting tissue-system in the gametophytes of some Polytrichales. II. Development and structure at maturity of the hydroids central strand. **J. Hattori Bot. Lab.**, 38: 565-607.
- Herbert, B., Rhigetti, P.G. 2000. A turning point in proteome analyses: Sample prefractionation via multicompartement electrolyzers with isoelectric membranes. **Electrophoresis**, 21: 3639-3648.

- Hiramatsu, K., Ueda, C., Iwata, K., Arikawa, K., Aoki, K. 1977. The interaction of bovine plasma albumin with cationic detergent. Studies by binding isotherm, optical rotation and difference spectrum. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, 50: 368-372.
- Hortin, G.L., Sviridov, D., Anderson, N.L. 2008. High-abundance polypeptides of the human plasma proteome comprising the 4 logs of polypeptide abundance. **Clinical Chemistry**, 54: 1608-1616.
- Huang, P.Y., Carbonell, R.G. 1999. Affinity chromatographic screening of soluble combinatorial peptide libraries. **Biotechnology And Bioengineering**, 63: 633-641.
- Huang, P.Y., Carbonell, R.G. 2000. Affinity chromatographic screening of soluble combinatorial peptide libraries. **Biotechnology And Bioengineering**, 63: 633.
- Huse, K., Böhme, H.J., Scholz, G.H. 2002. Purification of antibodies by affinity chromatography. **J. Biochem. Biophys. Methods**, 51: 217-231.
- Jacques, R.A., Lima, E.C., Dias, S.L.P., Mazzocato, A.C., Pavan, F.A. 2007. Yellow passion-fruit shell as biosorbent to remove Cr(III) and Pb(II) from aqueous solution. **Separation and Purification Technology**, 57: 193-198.
- Jones, M.N. 1975. *Biological Interfaces: An Introduction to the Surface and Colloid Science of Biochemical and Biological Systems*. Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam.
- Jones, M.N., Skinner, H.A., Tipping, E. 1975. The interaction between bovine serum albumin and surfactants. **Biochem. J.**, 147: 229-234.
- Kaneshina, S., Tanaka, M., Kondo, T., Mizuno, T., Aoki, K. 1973. Interaction of bovine serum albumin with detergent cations. **Bull. Chem. Soc. Jpn**, 46: 2735-2738.
- Kassab, A., Yavuz, H., Odabaşı, M., Denizli, A. 2000. Human serum albumin chromatography by Cibacron Blue F3GA-derived microporous polyamide hollow-fiber affinity membranes. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, 746: 123-132.
- Keçili, R., 2006. Antipirin Bazlı Monolitik Kolon Geliştirilmesi Ve Penisilin Amidohidrolaz Enzimi Ayrılmasında Kullanımı. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara.

- Keha, E., K uhrevioğlu,  . 2000. Temel Biyokimya,  afak Yayınları, Ankara.
- Konno, H., Nakashima, S., Katoh, K. 2010. Metal-tolerant moss *Scopelophila cataractae* accumulates copper in the cell wall pectin of the protonema. **Journal of Plant Physiology**, 167: 358-364.
- Kremer, C., Pettolino, F., Bacic, A., Drinnan, A. 2004. Distribution of cell wall components in *Sphagnum* hyaline cells and in liverwort and hornwort elaters. **Planta**, 219: 1023-1035.
- Kulkarni, A.R., Pe a, M.J., Avci, U., Mazumder, K., Urbanowicz, B.R., Pattathil, S., Yin, Y., O'Neill, M.A., Roberts, A.W., Hahn, M.G., Xu, Y., Darvill, A.G., York, W.S. 2012. The ability of land plants to synthesize glucuronoxylans predates the evolution of tracheophytes. **Glycobiology**, 22: 439-451.
- Lee, K.J., Knight, C.D., Knox, J.P. 2005. *Physcomitrella patens*: A moss system for the study of plant cell walls. **Plant Biosystems**, 139: 16-19.
- Lee, K.J., Marcus, S.E., Knox, J.P. 2011. Cell wall biology: perspectives from cell wall imaging. **Molecular plant**, 4: 212-219.
- Liepman, A.H., Nairn, C.J., Willats, W.G., S orensen, I., Roberts, A.W., Keegstra, K. 2007. Functional genomic analysis supports conservation of function among cellulose synthase-like A gene family members and suggests diverse roles of mannans in plants. **Plant physiology**, 143: 1881-1893.
- Ligrone, R., Duckett, J.G., Renzaglia, K.S. 2000. Conducting tissues and phyletic relationships of bryophytes. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.**, 355: 795-813
- Ligrone, R., Carafa, A., Lumini, E., Bianciotto, V., Bonfante, P., Duckett, J.G. 2007. Glomeromycotean associations in liverworts: a molecular, cellular, and taxonomic analysis. **American Journal of Botany**, 94: 1756-1777.
- Ligrone, R., Carafa, A., Duckett, J.G., Renzaglia, K.S., Ruel, K. 2008. Immunocytochemical detection of lignin-related epitopes in cell walls in bryophytes and the charalean alga *Nitella*, **Plant Systematics and Evolution**, 270: 257-272.
- Lin, C.T., Lee, S.Y., Keh, E.S., Dong, D.R., Huang, H.M., Shih, Y.H. 2000. Influence of silanization and filler fraction on aged dental composites. **Journal of Oral Rehabilitation**, 27: 919-926.

- Liotta, L., Petricoin, E. 2000. Molecular profiling of human cancer. **Nat. Rev. Genet.**, 1: 48-56.
- Locke, V.L., Gibson, T.S., Thomas, T.M., Corthals, G.L., Rylatt, D.B. 2002. Gradiflow as a prefractionation tool for twodimensional electrophoresis. **Proteomics**, 2: 1254-1260.
- Lu, R.C., Cao, A.N., Lai, L.H., Xiao, J.X. 2006. Effect of anionic surfactant molecular structure on bovine serum albumin (BSA) fluorescence. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**, 278: 67-73.
- Ma, D., Hugener, T.A., Siegel, R.W., Christerson, A., Mårtensson, E., Önnby, C., Schadler, L.S. 2005. Influence of nanoparticle surface modification on the electrical behaviour of polyethylene nanocomposites. **Nanotechnology**, 16: 724-731.
- Mann, M., Jensen, O.N. 2003. Proteomic analysis of post-translational modifications. **Nature biotechnology**, 21: 255-261.
- Maresova, J., Pipiska, M., Rozložnik, M., Hornik, M., Remenarova, L., Augustin, J. 2011. Cobalt and strontium sorption by moss biosorbent: Modeling of single and binary metal systems. **Desalination**, 266: 134-141.
- Matheson, N.K. 1990. Mannose-Based Polysaccharides. In: *Methods In Plant Biochemistry. Volume 2: Carbohydrates* (Dey P.M. and Harborne, J. B., Eds.), Academic press, pp.371-413, London.
- Matsunaga, T., Ishii, T., Matsumoto, S., Higuchi, M., Darvill, A., Albersheim, P., O'Neill, M.A. 2004. Occurrence of the primary cell wall polysaccharide rhamnogalacturonan II in pteridophytes, lycophytes, and bryophytes. Implications for the evolution of vascular plant. **Plant Physiology**, 134: 339-351.
- Moller, I., Sørensen, I., Bernal, A.J., Blaukopf, C., Lee, K., Øbro, J., Pettolino, F., Roberts, A., Mikkelsen, J.D., Knox, J.P., Bacic, A., Willats, W.G. 2007. High-throughput mapping of cell-wall polymers within and between plants using novel microarrays. **The Plant Journal**, 50: 1118-1128.
- Mooney, J.F., Hunt, A.J., McIntosh, J.R., Liberko, C.A., Walba, D.M., Rogers, C.T. 1996. Patterning of functional antibodies and other proteins by photolithography of silane monolayers. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 93: 12287-12291.

- Moriyama, Y., Kawasaki, Y., Takeda, K. 2003. Protective effect of small amounts of sodium dodecyl sulfate on the helical structure of bovine serum albumin in thermal denaturation. **Journal of Colloid and Interface Science**, 257: 41-46.
- Munagapati, V.S., Yarramuthi, V., Nadavala, S.K., Alla, S.R., Abburi, K. 2010. Biosorption of Cu(II), Cd(II) and Pb(II) by *Acacia leucocephala* bark powder: Kinetics, equilibrium and thermodynamics. **Chemical Engineering Journal**, 157: 357-365.
- Norbert, W., Tietz, M. 1976. *Fundamental of Clinical Chemistry*. W.B. Saunders, London.
- Nothnagel, A.L., Nothnagel, E.A. 2007. Primary cell wall structure in the evolution of land plants. **Journal of Integrative Plant Biology**, 49: 1271-1278.
- Nozaki, Y., Reynolds, J. A., Tanford, C. 1974. The interaction of a cationic detergent with bovine serum albumin and other proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, 249: 4452-4459.
- Özcan, A.S., Tunalı, S., Akar, T., Özcan, A. 2009. Biosorption of lead(II) ions onto waste biomass of *Phaseolus vulgaris* L.: Estimation of the equilibrium, kinetic and thermodynamic parameters. **Desalination**, 244: 188-198.
- Özkara, S., Garipcan, B., Pişkin, E., Denizli, A. 2003. N-methacryloyl-(L)-histidinemethylester carrying a pseudospecific affinity sorbent for immunoglobulin-G isolation from human plasma in a column system. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, 14: 761-776.
- Özkara, S., Akgöl, S., Çanak, Y., Denizli, A. 2004. A novel magnetic adsorbent for immunoglobulin-g purification in a magnetically stabilized fluidized bed. **Biotechnology Progress**, 20: 1169-1175.
- Öztürk, N., Günay, M.E., Akgöl, S., Denizli, A. 2007a. Silane-modified magnetic beads: Application to immunoglobulin g separation. **Biotechnology Progress**, 23: 1149-1156.
- Öztürk, N., Akgöl, S., Arısoy, M., Denizli, A. 2007b. Reversible adsorption of lipase on novel hydrophobic nanospheres. **Separation and Purification Technology**, 58: 83-90.

- Öztürk, N., Bereli, N., Akgöl, S., Denizli, A. 2008. High capacity binding of antibodies by poly(hydroxyethyl methacrylate) nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 67: 14-19.
- Pandey, A., Mann, M. 2000. Proteomics to study genes and genomes. **Nature**, 405: 838-846.
- Petricoin III, E.F., Ardekani, A.M., Hitt, B.A., Levine, P.J., Fusaro, V.A., Steinberg, S.M., Mills, G.B., Simone, C., Fishman, D.A., Kohn, E.C., Liotta, L.A. 2002. Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. **Lancet**, 359: 572-577.
- Petricoin, E.F., Ornstein, D.K., Paweletz, C.P., Ardekani, A., Hackett, P.S., Hitt, B.A., Velasco, A., Trucco, C., Wiegand, L., Wood, K., Simone, C.B., Levine, P.J., Linehan, W.M., Emmert-Buck, M.R., Steinberg, S.M., Kohn, E.C., Liotta, L.A. 2002. Serum proteomic patterns for detection of prostate cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, 94: 1576-1578.
- Popper, Z.A., Fry, S.C. 2003. Primary cell wall composition of bryophytes and charophytes. **Annals of Botany**, 91: 1-12
- Prasanna, L., Misk, D.E., Hinderer, R., Michon, J., Geiger, J.D., Hanash, S.M. 2000. Identification of beta-tubulin isoforms as tumor antigens in neuroblastoma. **Clin. Cancer Res.**, 6: 3949-3956.
- Proskauer, J. 1960. Studies on the Anthocerotales VI. On spiral thickening in the columella and its bearing on phylogeny. **Phytomorphology**, 10: 1-19
- Reddy, D.H.K., Ramana, D.K.V., Seshaiyah, K., Reddy, A.V.R. 2011. Biosorption of Ni(II) from aqueous phase by *Moringa oleifera* bark, a low cost biosorbent. **Desalination**, 268: 150-157.
- Roberts, A.W., Roberts, E.M., Haigler, C.H. 2012. Moss cell walls: Structure and biosynthesis. **Frontiers in Plant Science**, 3: 1-7
- Rothmund, D.L., Locke, V.L., Liew, A., Thomas, T.M., Wasinger, V., Rylatt, D.B. 2003. Depletion of the highly abundant protein albumin from human plasma using the GradiFlow. **Proteomics**, 3: 279-287.
- Sarı, A., Mendil, D., Tüzen, M., Soylak, M. 2008. Biosorption of Cd(II) and Cr(III) from aqueous solution by moss (*Hylocomnium splendens*) biomass: Equilibrium, kinetic and thermodynamic studies. **Chemical Engineering Journal**, 144: 1-9.

- Sarı, A., Mendil, D., Tüzen, M., Soylak, M. 2009. Biosorption of palladium(II) from aqueous solution by moss (*Racomitrium lanuginosum*) biomass: Equilibrium, kinetic and thermodynamic studies. **Journal of Hazardous Materials**, 162: 874-879.
- Sato, A. K., Sexton, D.J., Morganelli, L.A., Cohen, E.H., Wu, Q.L., Conley, G.P., Streltsova, Z., Lee, S.W., Devlin, M., DeOliveira, D.B., Enright, J., Kent, R.B., Wescott, C.R., Ransohoff, T.C., Ley, A.C., Ladner, R.C. 2002. Development of mammalian serum albumin affinity purification media by peptide phage display. **Biotechnology Progress**, 18: 182-192.
- Şentürk, H.B., Özdeş, D., Duran, C. 2010. Biosorption of rhodamine 6G from aqueous solutions onto almond shell (*Prunus dulcis*) as a low cost biosorbent. **Desalination**, 252: 81-87.
- Silberzan, P., Leger, L., Ausserre, D., Benattar, J.J. 1991. Silanation of silica surfaces. A new method of constructing pure or mixed monolayers. **Langmuir**, 7: 1647-1651.
- Singh, R.P., Way, J.D., Dec, S.F. 2005. Silane modified inorganic membranes: Effects of silane surface structure. **Journal of Membrane Science**, 259: 34-46.
- Sharma, R.K., Singh, J., Chauhan, G.S. 2010. Study of immobilization of protease and sorption of BSA on cellulose, cellulose derivatives, and graft copolymers. **Bio Resources**, 5: 2547-2555.
- Soares, C.J., Giannini, M., Oliveira, M.T.D., Paulillo, L.A.M.S., Martins, L.R.M. 2004. Effect of surface treatments of laboratory-fabricated composites on the microtensile bond strength to a luting resin cement. **J Appl Oral Sci**, 12: 45-50.
- Sousa, M.H., Rubim, J.C., Sobrinho, P.G., Tourinho, F.A. 2001. Biocompatible magnetic fluid precursors based on aspartic and glutamic acid modified maghemite nanostructures. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, 225: 67-72.
- Steel, L.F., Trotter, M.G., Nakajima, P.B., Mattu, T.S., Gonye, G., Block, T. 2003. Efficient and specific removal of albumin from human serum samples. **Mol. Cell Proteomics**, 2: 262-270.
- Steinhardt, J., Reynolds, J.A. 1969. Multiple Equilibria In Proteins. Academic Press, New York.

- Stotz, J.F., Rivat, C., Geschier, C., Colosetti, P., Streiff, F. 1990. Chromatography purification of a high purity human plasmatic albumin for clinical or biological uses. **Swiss biotech**, 8: 7-10.
- Tabar, L., Dean, P.B., Kaufman, C.S., Duffy, S.W., Chen. H.H. 2000. A new era in the diagnosis of breast cancer. **Surg. Oncol. Clin. N. Am.**, 9: 233-277.
- Takafuji, M., Ide, S., Ihara, H., Xu, Z. 2004. Preparation of poly(1-vinylimidazole)-grafted magnetic nanoparticles and their application for removal of metal ions. **Chem. Mater.**, 16: 1977-1983.
- Tirumalai, R.S., Chan, K.C., Prieto, D.A., Issaq, H.J., Conrads, T.P., Veenstra, T.D. 2003. Characterization of the low molecular weight human serum proteome. **Mol Cell Proteomics**, 2: 1096-1103.
- Tunalı Akar, S., Görgülü, A., Akar, T., Çelik, S. 2011. Decolorization of reactive blue 49 contaminated slolutions by *Capsicum annuum* seeds: Batch and continuous mode biosorption applications. **Chemical Engineering Journal**, 168: 125-133.
- Türkcan, C. 2012. DNA İzolasyonu İçin Pseudospesifik Nanoyapılar. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İzmir.
- Travis, J., Bowen, J., Tewksbury, D., Johnson, D., Pannell, R. 1976. Isolation of albumin from whole human plasma and fractionation of albumin-depleted plasma. **Biochem. J.**, 157: 301-306.
- Ucun, H., Bayhan, Y.K., Kaya, Y., Çakıcı, A., Algur, O.F. 2002. Biosorption of chromium(VI) from aqueous solution by cone biomass of *Pinus sylvestris*. **Bioresource Technology**, 85: 155-158.
- Ucun, H., Bayhan, Y.K., Kaya, Y., Çakıcı, A., Algur, O.F. 2003. Biosorption of lead (II) from aqueous solution by cone biomass of *Pinus sylvestris*. **Desalination**, 154: 233-238.
- Vagheti, J.C.P., Lima, E.C., Royer, B., Brasil, J.L., Cunha, B.M., Simon, N.M., Cardosa, N.F., Norena, C.P.Z. 2008. Application of Brazilian-pine fruit coat as a biosorbent to removal of Cr(VI) from aqueous solution - Kinetics and equilibrium study. **Biochemical Engineering Journal**, 42: 67-76.
- Valstar, A., Almgren, M., Brown, W., Vasilescu, M. 2000. The interaction of bovine serum albumin with surfactants studied by light scattering. **Langmuir**, 16: 922-927.

- Valstar, A., Vasilescu, M., Vigouroux, C., Stilbs, P., Almgren, M. 2001. Heat-set bovine serum albumin-sodium dodecyl sulfate gels studied by fluorescence probe methods, NMR, and light scattering. **Langmuir**, 17: 3208-3215.
- Vasilescu, M., Angelescu, D., Almgren, M., Valstar, A. 1999. Interactions of globular proteins with surfactants studied with fluorescence probe methods, **Langmuir**, 15: 2635-2643.
- Veenstra, T.D., Conrads, T.P., Hood, B.L., Avellino, A.M., Ellenbogen, R.G., Morrison, R.S. 2005. Biomarkers: Mining the biofluid proteome. **Mol. Cell Proteomics**, 4: 409-418.
- Vinod, V.T.P., Sashidhar, R.B., Sreedhar, B. 2010. Biosorption of nickel and total chromium from aqueous solution by gum kondagogu (*Cochlospermum gossypium*): A carbohydrate biopolymer. **Journal of Hazardous Materials**, 178: 851-860.
- Volesky, B. 2007. Biosorption and me. **Water Research**, 41: 4017-4029.
- Wilkes, M.M., Navickis, R.J. 2001. Patient survival after human albumin administration. **Ann. Intern. Med**, 135: 149-164.
- Wilkins, M.R., Appel, R.D., Van Eyk, J.E., Chung, M., Görg, A., Hecker, M., Huber, L.A., Langen, H., Link, A.J., Paik, Y.K., Patterson, S.D., Pennington, S.R., Rabilloud, T., Simpson, R.J., Weiss, W., Dunn, M.J. 2006. Guidelines for the next 10 years of proteomics. **Proteomics**, 6: 4-8.
- Witek-Krowiak, A., Szafran, R.G., Modelski, S. 2011. Biosorption of heavy metals from aqueous solutions onto peanut shell as a low cost biosorbent. **Desalination**, 265: 126-134.
- Wulfkuhle, J.D., Sgroi, D.C., Krutzsch, H., McLean, K., McGarvey, K., Knowlton, M., Chen, S., Shu, H., Sahin, A., Kurek, R., Wallwiener, D., Merino, M.J., Petricoin, E.F., Zhao, Y., Steeg, P.S. 2002. Proteomics of human breast ductal carcinoma *in situ*. **Cancer Res.**, 62: 6740-6749.
- Xu, Z., Zhang, D., Hu, J., Zhou, X., Ye, X., Reichel, K., Stewart, N.R., Syrenne, R.D., Xiaohan, Y., Gao, P., Shi, W., Doepcke, C., Sykes, R.W., Burris, J.N., Bozell, J.J., Cheng, Z.M., Hayes, D.G., Labbe, N., Davis, M., Stewart, C.N., Yuan, J. 2009. Comparative genome analysis of lignin biosynthesis gene families across the plant kingdom. **BMC bioinformatics**, 10: 3.

- Yang, T.Y. 2003. Adsorbents: Fundamentals and Applications. Hohn Wiley & Sons, New Jersey.
- Zhou, G., Li, H., DeCamp, D., Chen, S., Shu, H., Gong, Y., Flaig, M., Gillespie, J. W., Hu, N., Taylor, P.R., Emmert-Buck, M.R., Liotta, L.A., Petricoin, E.F., Zhao, Y. 2002. 2D differential in-gel electrophoresis for the identification of esophageal scans cell cancer-specific protein markers. **Mol. Cell Proteomics**, 1:117-124.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Efe Şamlı

Doğum Yeri ve Tarihi : İzmir, 12.09.1987

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi Biyoloji Bölümü

Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

Katıldığı Kongreler : 18. Ulusal Biyoloji Öğrenci Kongresi (4-9.08.2011 Marmara Üniversitesi)

İLETİŞİM

E-posta Adresi : efesamli2002@hotmail.com

Tarih :