

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ



**BİLECİK ŞEYH EDEBALI
ÜNİVERSİTESİ**

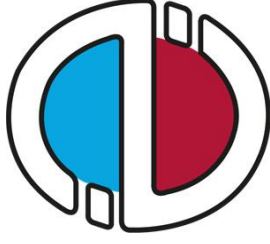
**Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı**

**LAKTOFERRİN SAFLAŞTIRILMASI İÇİN ANTİKOR
ÇAPRAZ BAĞLI KRİYOJEL KOLON**

**Şengül YAZICIOĞLU AÇIKGÖZ
Yüksek Lisans Tezi**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Rıdvan SAY**

**BİLECİK, 2014
Ref. No: 10042586**



ANADOLU ÜNİVERSİTESİ



**BİLECİK ŞEYH EDEBALI
ÜNİVERSİTESİ**

**Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı**

**LAKTOFERRİN SAFLAŞTIRILMASI İÇİN ANTİKOR
ÇAPRAZ BAĞLI KRİYOJEL KOLON**

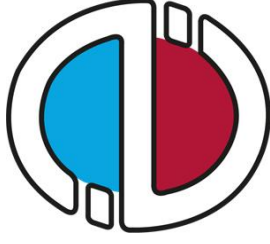
Şengül YAZICIOĞLU AÇIKGÖZ

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Rıdvan SAY

BİLECİK, 2014



ANADOLU UNIVERSITY



**BİLECİK ŞEYH EDEBALI
UNIVERSITY**

**Graduate School of Science
Department of Chemistry**

**ANTIBODY CROSS-LINKED CRYOGEL COLUMN FOR
LACTOFERRİN PURIFICATION**

**Şengül YAZICIOĞLU AÇIKGÖZ
Master's Thesis**

**Adviser
Prof. Dr. Rıdvan SAY**

BİLECİK, 2014

 <p>BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ KİMYA ANABİLİM DALI</p>	<p>YÜKSEK LİSANS</p> <p>JÜRİ ONAY FORMU</p>
---	--

Bilecik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun tarih ve sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 25/06/2014 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Şengül YAZICIOĞLU AÇIKGÖZ' ün "Laktoferrin Saflaştırılması İçin Antikor Çapraz Bağlı Kriyojel Kolon" başlıklı tez çalışması Kimya Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE (TEZ DANIŞMANI) : Prof. Dr. Rıdvan SAY

ÜYE : Doç. Dr. Erdal EREN

ÜYE : Doç. Dr. Cihan DARCAN



ONAY

Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/...../.....tarih ve/..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

TEŞEKKÜR

Lisans ve yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve tecrübe olarak çok şey öğrendiğim, laboratuvar ve tez çalışmalarım sırasında maddi, manevi desteğini esirgemeyen saygıdeğer hocam Sayın Prof. Dr. Rıdvan SAY'a, yüksek lisans eğitimime başladığım günden itibaren destekleyici yaklaşımıyla beni motive eden değerli hocam Doç. Dr. Erdal EREN'e, araştırmalarım konusunda bana yardımcı olan ve sorularımı özveriyle yorumlayıp yanıtlayan çok değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Halil BERBER'e, tez yazım aşamasında katkılarıyla beni yalnız bırakmayan Araş. Gör. Özlem BİÇEN ÜNLÜER'e, laboratuvar çalışmalarında yardımlarını gördüğüm Gülnur DÖNMEZ'e teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Yine bu zorlu ve uzun süreçte sabırla yanımda olup, hiçbir fedakarlıktan kaçınmadan bana olan güvenini her daim hissettiğim sevgili eşim Bülent AÇIKGÖZ'e, kendisine özellikle tez yazım aşamasında vakit ayıramadığım halde bana gösterdiği sabrı nedeniyle biricik kızım Zeynep Nisa AÇIKGÖZ'e, son olarak yapabileceklerim konusunda manevi desteklerini hep dile getiren aile üyelerim ve arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Haziran -2014

Şengül YAZICIOĞLU AÇIKGÖZ

ÖZET

Laktoferrin (Lf), sütte bulunan ve önemli biyolojik aktivitelere sahip bir glikoproteindir. Yapılan tez çalışması ile vücut salgılarında bulunan, demir içeren bir savunma proteini olan ve tümör büyümesini de engelleyen Lf'nin inek sütünden saflaştırılması için anti-laktoferrin (anti-Lf) antikoru çapraz bağlı yeni nesil kriyojel kolon geliştirilmesi ve afinite kromatografisi amaçlı kullanılması hedeflenmiştir.

Bu amaçla; gözeneklerine anti-Lf tutturulmuş çapraz bağlı kriyojel kolon sentezlenmiştir. P(Anti-Lf-co-HEMA) kriyojeli kolon dolgu maddesi olarak kullanılmış ve Lf'nin Hızlı Protein Sıvı Kromatografisi (FPLC) ile ayırımı sağlanmıştır. İnek sütünden elde edilen Lf'nin saflığı SDS-PAGE ile araştırılmıştır. Geliştirilen kolonun karakterizasyonu şişme testi, FT-IR, SEM ve BET analizleri ile yapılmıştır.

Sonuç olarak; R. SAY tarafından WIPO ve USPTO patenti alınan fotoduyarlı konjugasyon yöntemi (ANADOLUCA) kullanılarak Lf 'yi yüksek seçicilikte ayırabilen ve tekrar kullanılabilen bu kolonlar ilk kez geliştirilmiştir. Geliştirilen bu kolonlar, kanser, aşı ve görüntüleme teknolojileri için önemli bir ajan olan Lf'nin saflaştırılması için bir alternatif oluşturacaktır.

Anahtar Kelimeler: İnek sütü, Laktoferrin, Kriyojel, ANADOLUCA, Saflaştırma, Affinite Kromatografisi

ABSTRACT

Lactoferrin (Lf) is a glycoprotein which is found in milk and has significant biological activities. In this thesis, improving of a new generation cross linked anti-lactoferrin (anti-Lf) antibody cryogel column and using it in affinity chromatography have intended for the purification of Lf which is found in body fluids, a defense protein containing iron and inhibits growth of tumor from cow milk.

For this purpose, cross-linked cryogel column which contains anti-Lf in its pores has synthesized. P(Anti-Lf-co-HEMA) cryogel has used as column filling (extender) material and Lf separation has provided by Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC). The purity of Lf obtained from cow milk has investigated by SDS-PAGE. The swelling test, FT-IR, SEM and BET analyses have applied for the characterization of the column.

As a result; the columns which have high selectivity for Lf and are reusable have improved for the first time using photosensitive conjugation method (ANADOLUCA) which has WIPO and USPTO patented by R. Say. These developed columns will be an alternative for the purification of Lf which is an important agent for cancer, vaccine and imaging technologies.

Key words: Cow milk, Lactoferrin, Cryogel, ANADOLUCA, Purification, Affinity chromatography

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ÇİZELGELER DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. Glikoproteinler.....	3
1.1.1.Glikoproteinlerin Yapısı	3
1.1.2.Glikoproteinlerin Sınıflandırılması.....	3
1.1.3.Glikoproteinleri İncelemede Kullanılan Başlıca Önemli Yöntemler.....	5
1.2. Laktoferrin	6
1.2.1. Laktoferrin Dizisinin Özellikleri	8
1.2.2. Laktoferrinin Moleküler Yapısı	9
1.2.3. Laktoferrinin Biyolojik Aktivitesi	12
1.2.3.1. Antibakteriyal Etki	14
1.2.3.2. Antiviral Etki.....	15
1.2.3.3. Antifungal Etki.....	17
1.2.3.4. Antiparaziter Etki	17
1.2.3.5. İmmün Sistem Üzerine Etkisi	18
1.2.3.6. Antikanserojen Etki.....	18
1.2.3.7. Enzimatik Etki.....	19
1.2.4. Laktoferrinin Klinik Uygulamaları.....	19
1.2.5. Doğal ve Rekombinant Laktoferrin Üretimi.....	20
1.2.6. Laktoferrinin Kullanım Alanları.....	21
1.3. Protein Saflaştırma Yöntemleri	22
1.3.1. Kromatografik Yöntemler	22
1.3.2. Elektroforez Yöntemleri	25
1.4. Kriyojel.....	31

1.4.1. Karyotropik Jelasyon İşleminin Temel Karakteristik Özellikleri	31
1.4.2. Jel ve Kriyojel Arasındaki Farklılıklar	32
1.4.3. Kriyojel Yapısına Eki Eden Faktörler	34
1.4.4. Kriyojel Hazırlanması.....	34
1.4.5. Kriyojellerin Uygulama Alanları.....	35
1.4.6. Kriyojellerin Karakterizasyonu	36
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	38
2.1. Materyal.....	38
2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	38
2.1.2. Kullanılan Cihazlar	38
2.1.3. Hızlı Protein Sıvı Kromatografisi (FPLC).....	39
2.1.3.1. FPLC Cihazı.....	39
2.1.4. Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM).....	40
2.2. Yöntem	42
2.2.1. P(Anti-Lf- co- HEMA) Kriyojel Kolon Hazırlanması	42
2.2.1.1 P(Anti-Lf-co-HEMA) Kriyojel Kolon Karakterizasyon İşlemleri.....	44
2.2.2. İnek Sütünden Laktoferrinin Saflaştırılması.....	45
2.2.2.1. İnek Sütünün Homojenizasyon İşlemi	46
2.2.2.2. İnek Sütünden Laktoferrinin Kromatografik Ayrımı ..	46
2.2.2.3. Saflaştırılan Laktoferrinin Karakterizasyon İşlemi	47
2.2.3. Adsorpsiyon- Desorpsiyon Çalışmaları	50
2.2.3.1. P(Anti-Lf-co-HEMA) Kriyojellerin Lf Adsorpsiyonuna Akış Hızının Etkisi.....	50
2.2.3.2. Anti-Lf Çapraz Bağlanmış Kriyojellerden Laktoferrin Desorpsiyon İşlemleri	51
2.2.3.3. P(Anti-Lf-co-HEMA) Kriyojellerin Laktoferrin Adsorpsiyonuna İyonik Şiddetin Etkisi	51
3. SONUÇLAR, TARTIŞMA VE ÖNERİLER.....	52
3.1. P(Anti-Lf-co-HEMA) Kriyojel Kolon Karakterizasyonu	52
3.1.1. Şişme Testi.....	52

3.1.2. Yüzey Morfolojisi Analizi.....	52
3.1.3. BET Yöntemi ile Yüzey Alanı Ölçümü.....	53
3.1.4. FT-IR Analizi.....	54
3.2. Anti-Lf Çapraz Bağlanmış Kriyojellerde Adsorpsiyon Çalışmaları	55
3.2.1. Laktoferrinin Başlangıç Derişiminin Etkisi.....	55
3.2.2. Akış Hızı Etkisi.....	55
3.2.3. İyonik Şiddet Etkisi	55
3.2.4. Adsorpsiyon İzotermi	56
3.2.5. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik.....	60
3.3. İnek Sütünden Laktoferrinin Saflaştırılması.....	61
3.3.1. İnek Sütünden Laktoferrinin Kromatografik Ayırımı	61
3.3.2. Saflaştırılan Laktoferrinin Karakterizasyonu	63
KAYNAKLAR	65
ÖZGEÇMİŞ.....	73

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 1.1: Çeşitli biyolojik sıvılarda bulunan Lf miktarları.....	7
Çizelge 1.2: Sığır ve insan kaynaklı laktoferrinde bulunan aminoasitler ve sayıları	9
Çizelge 1.3: Laktoferrinin endüstride kullanıldığı ürünler	21
Çizelge 3.1: Kriyojel gözeneklerine çapraz bağlanmış anti-Lf moleküllerinin Lf adsorpsiyonunu gösteren Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon izotermelerinin karşılaştırılması	59

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.1. Bir N-bağlı glikoprotein (N asetil glikozaminin asparajine bağlanması).....	4
Şekil 1.2. Bir O-bağlı glikoprotein (N asetil galaktozaminin serine bağlanması).....	4
Şekil 1.3. Laktoferrinin öngörülen yapısı	10
Şekil 1.4. 2.8 Angstrom çözünürlükte sığır laktoferrinin 3 boyutlu yapısı.....	11
Şekil 1.5. Lf 'ye ait kabul edilmiş demir bağlayıcı cep bölgesi.....	12
Şekil 1.6. Laktoferrinin biyoaktif veya fonksiyonel özellikleri.....	12
Şekil 1.7. Laktoferrinin antibakteriyal aktivitesinin mekanizması.....	15
Şekil 1.8. Laktoferrinin antiviral etki mekanizması.....	16
Şekil 1.9. Afinite kromatografisinin temel prensibi	24
Şekil 1.10. Afinite kromatografisinin şematize edilmesi.....	25
Şekil 1.11. Poliakrilamidin oluşum reaksiyonu	27
Şekil 1.12. Elektroforezde kullanılan materyaller	29
Şekil 1.13. Proteinlerin elektroforetik saflaştırma aşamaları.....	30
Şekil 1.14. Farklı şekillerde üretilen kriyojeller	33
Şekil 1.15. Kriyojellerin süngerimsi gözenek yapısını gösteren SEM görüntüsü	33
Şekil 1.16. Kriyojellerin oluşum süreci	35
Şekil 1.17. Kan hücrelerinin kromatografik olarak kriyojel kolondan geçirilmesi	36
Şekil.2.1. Deneysel çalışmalarda kullanılan FPLC cihazı	39
Şekil 2.2. SEM donanımının şematize edilmesi	42
Şekil 2.3. Fotosensitif P(Anti-Lf-co-HEMA) kriyojel sentezinin şematize edilmesi.....	43
Şekil 2.4. Şırınga içerisinde elde edilen kriyojel kolon	44
Şekil 2.5. İnek sütünden laktoferrinin FPLC cihazı ile ayrımının şematize edilmesi.....	47
Şekil 3.1. P(Anti-Lf-Co-HEMA) büyütme oranlarında kriyojel SEM görüntüleri.	53
Şekil 3.2. Gözeneklerine Anti-Lf çapraz bağlanmış akrilamid temelli kriyojel FTIR spektrumu.....	54
Şekil 3.3. Lf başlangıç derişimi etkisi.....	55
Şekil 3.4. Lf adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisi.....	56
Şekil 3.5. Lf molekülü için Langmuir adsorpsiyon modeli	58
Şekil 3.6. Lf molekülleri için Freundlich adsorpsiyon modeli	59

Şekil 3.7. Kriyojel gözeneklerine çapraz bağlı Anti-Lf moleküllerin rejenerasyonu	60
Şekil 3.8. İki enjeksiyona ait Lf' nin FPLC kromatogramı.	62
Şekil 3.9. Laktoferrine ait SDS-PAGE görüntüsü	63

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

- APS:** Amonyum Persülfat
- ATR:** Attenuated Total Reflectance
- BET:** Gözenek Alanı Tayin Yöntemi
- bLf:** Sığır Laktoferrini
- CBB-R250:** Commasie brilliant blue
- DNA:** Deoksiribonükleik asit
- dH₂O:** Destile su
- ELISA:** Enzyme- Linked İmmunosorbent Assay
- FPLC:** Hızlı Protein Sıvı Kromatografisi
- FT-IR:** Fourier Transform Infrared Spektrometre
- HEMA:** Hidroksi Etil Metakrilat
- HPLC:** Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi
- HS:** Heparan sülfat
- hLf:** İnsan Laktoferrini
- kDa:** Kilodalton
- Lf:** Laktoferrin
- MATyr:** Metakriloil tirozin
- MATyr- Ru(bipy)₂-MARyr:** (2-2-bipiridil) MATyr-MATyr-rutenyum (II)
- MBAAD:** Metilen Bisakrilamid
- μ:** mikro
- Native-PAGE:** Native-Poliakrilamid Jel Elektroforez
- NMR:** Nükleer Manyetik Rezonans Spektrometre
- P(HEMA):** PoliHidroksi Etil Metakrilat
- PBS:** Fosfat buffer saline
- rLf:** Rekombinant Laktoferrin
- SEM:** Taramalı Elektron Mikroskobu
- SDS-PAGE:** Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforez
- TEMED:** Tetrametilen Etilen Diamin
- Tris:** Tris (hidroksimetilaminometan)

1. GİRİŞ

İnsanlar, yüzyıllardır deneme yanılma yoluyla, yaşamlarını sürdürmek için farkında olmadan fermantasyon, mayalanma gibi biyokimyasal süreçleri kullanmışlardır. 20. yy başlarında patlayıcı madde yapmak amacıyla aseton eldesinde kullanılmış olan fermantasyon teknolojisi endüstriyel alana taşınmış ve bu teknolojinin kullanımı 20.yy ortalarında ise antibiyotik üretimiyle iyice yaygınlaşmıştır. 1970’li yıllardan günümüze kadar ise hem proteinler ve metabolik döngülere ilişkin bilgilerimiz artmış hem de DNA’nın enzimler aracılığıyla kesilip değiştirilebilmesi ve bir canlıdan başkasına aktarılmasına olanak sağlayan teknolojiler gelişmiştir. İlerleyen teknoloji ve son buluşlar nedeniyle yeni ürünlere olan gereksinim biyoteknolojinin günümüzdeki etkinliğini ve önemini ortaya koymuştur.

Biyoteknoloji, diğer bilim dallarının çalışma alanlarına ait buluşları faydalı ticari ürünlere dönüştürerek kendi önemini ön plana çıkarmakta ve talepleri karşılama noktasında diğer teknolojilerden ayrılmaktadır. Biyoteknoloji kapsamında yapılan çalışmalar mikrobiyoloji, biyokimya, moleküler biyoloji, hücre biyolojisi, immünoloji, protein mühendisliği, enzimoloji ve biyopreses teknolojileri gibi farklı çalışma alanlarını kapsar. Bu nedenledir ki biyoteknoloji birçok bilimsel disiplinle karşılıklı ilişki içerisinde kendini geliştirmeye devam etmektedir.

Son çeyrek yüzyılda, moleküler biyoloji ve gen teknolojisi alanlarında büyük gelişmeler sağlanmış ve bu sayede biyoteknolojinin hızlı değişim ve ilerleyişi ön plana çıkmıştır. Biyoteknoloji, zaman içerisinde çok daha fazla sayıda sanayi ve hizmet sektörünü çalışma alanına dahil etmiştir. Sağlık alanından tarıma, kimya mühendisliğinden çevre korumaya, gıda üretiminden enerji üretimine kadar yaşamın pek çok ihtiyacını karşılayan sektörler biyoteknolojinin çalışma alanı içerisinde yer almaktadır.

Biyoteknoloji, geleceğin şekillenmesi noktasında belirleyici olacak ve özellikle sağlık, ilaç ve tarım alanlarında büyük gelişmelerin gerçekleşmesine olanak sağlayacaktır. Günümüzde çok büyük bir öneme sahip biyomoleküllerin elde edilmesinde biyoteknolojik yöntemler kullanılır.

Lf de biyoteknolojik yöntemlerle elde edilebilen bir glikoproteindir. Lf yaklaşık 50 yıl önce keşfedilmiş demir bağlayıcı bir protein olmakla beraber demir taşıyıcı serum

transferrin, ovotransferin ve melanotransferrin ile birlikte transferrin familyasının bir üyesidir.

İnsanlar, inekler, keçiler, atlar, köpekler ve kemirgenler gibi birçok memelinin mukoza epitel hücrelerinde sentezlenen Lf, ayrıca balıklar tarafından da üretilir. Bu çok fonksiyonel glikoprotein gözyaşı, salya, vajinal sıvılar, meni, bronş ve burun sıvılarında, safra, sindirim sistemi sıvıları, ürin, süt ve ilk süt gibi salgılarda bulunur. Birçok antimikrobiyal protein lizozom, kollektin ve Lf içerir.

Değişik dokulardaki geniş yayılımından dolayı, Lf çok fonksiyonlu bir proteindir. Çünkü demir emilimi döngüsü, bağışıklık sistemi tepkileri, antioksidan etkinliği, antikarsinogenik özellik göstermek gibi birçok fizyolojik fonksiyonu vardır. Yine de, antimikrobiyal özellikleri en çok çalışma yapılan alanıdır.

Bu tez kapsamında; vücuttaki salgılarda bulunan, demir içeren bir savunma proteini olan ve tümör büyümesini de engelleyen Lf'nin süttten saflaştırılması için anti-Lf antikoru çapraz bağlı yeni nesil kriyojel kolon geliştirilmesi ve afinite kromatografi amaçlı kullanımı hedeflenmiştir. Fotoduyarlı konjugasyon yöntemi (ANADOLUCA) kullanılarak ilk kez üretilen Lf'yi yüksek seçicilikte ayırabilecek ve tekrar kullanılabilir bu kolonlar, kanser, aşı ve görüntüleme teknolojileri için önemli bir ajan olan Lf'nin saflaştırılması için önemli bir alternatif olacaktır.

Lf'yi ayırma ve saflaştırma işlemlerinde makro gözeneklerine anti-Lf çapraz bağlanmış kriyojel kolon hazırlanmıştır. Hazırlanan bu kriyojel kolonun gözeneklerine çapraz bağlanmış anti-Lf'nin inek sütünden homojenize edilen Lf ile etkileşimi sonucu Lf'nin ayırımı ve saflaştırılması hedeflenmiştir.

Lf'nin çeşitli bakteri, mantar, protozoa ve virüslerin sebep olduğu bulaşıcı hastalıkların tedavisinde gösterdiği yararlı etkileri nedeniyle ayırım ve saflaştırılması son derece önemlidir. Bu amaçla; fotosensitif yolla sentezlenmiş anti-Lf çapraz bağlanmış kriyojel kolonlar katı destek materyali olarak kullanılarak hızlı protein sıvı kromatografisi (FPLC) cihazı ile Lf'nin inek sütünden ayırımı gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın sonunda; elde edilen verilere göre FPLC cihazı ile anti-Lf kriyojel kolon kullanılarak inek sütünden ayırımı sağlanan Lf'nin, standart Lf ile kıyaslandığında daha az maliyetle ve yüksek saflıkta elde edildiği gözlemlenmiştir.

1.1. Glikoproteinler

Glikoproteinler polipeptid iskeletlerine kovalent olarak bağı oligosakkarit zincirlerini (1-20 şeker) içeren proteinlerdir. Glikoproteinler, glikokonjugatların (bir karbonhidratın protein veya lipide kovalent bağlanması) veya karma karbonhidratların bir sınıfıdır. Kompleks karbonhidratların üç sınıfı olan glikoproteinler, proteoglikanlar ve glikolipidler genellikle hep birlikte “Glikokonjugat” olarak adlandırılır (Ünüböl ve Ünsal, 2010).

Glikoproteinler bakteriden insana kadar canlıların çoğunda bulunur. Glikojen ve glikoz dışındaki karbonhidrat, vücutta glikolipid ve glikoproteinlerin bir parçası olarak bulunmaktadır. Farklı işlevlere sahip birçok protein glikoprotein yapısındadır, bunların karbonhidrat içeriği % 1-85 arasındadır. Albümin dışında plazma proteinlerinin hemen tümü glikoprotein yapısındadır. Hücre zarı proteinlerinin birçoğu önemli miktarda karbonhidrat taşır. Kan grubu maddelerinin bir kısmı glikoproteindir (Yavuz, 2001).

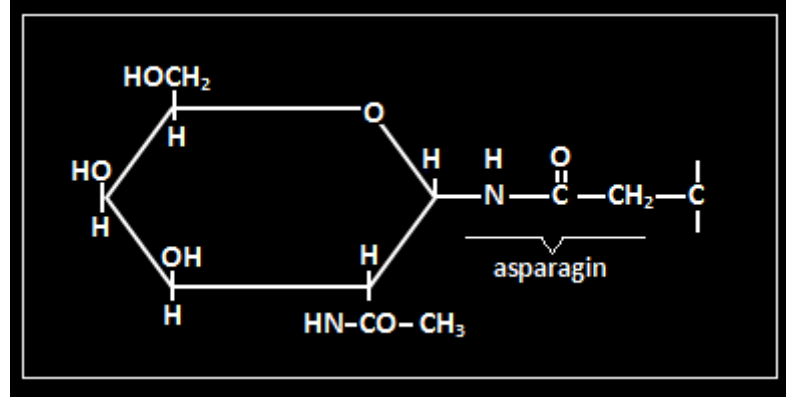
1.1.1. Glikoproteinlerin yapısı

Glikoproteinlerin karbonhidrat kısmında glikoz, galaktoz, mannoz, fukoz, N-asetil glikozamin, N-asetil galaktozamin, N-asetilnöraminik asit (sialik asit) olmak üzere başlıca 7 çeşit monosakkarid bulunur. Bu monosakkaridler, değişik sıralama ve farklı bağ yapıları ile bir araya gelirler ve sonuçta çok sayıda karbonhidrat zinciri yapısı ortaya çıkar. Bunlardan başka daha az sıklıkla rastlanan arabinoz ve ksiloz vardır. Oligosakkarit olarak adlandırılan bu karbonhidrat zincirleri glikoproteinlerin peptid omurgasına asparajin, serin, treonin, hidroksilizin veya hidroksipirolin aminoasitlerinin biri üzerinden bağlanmıştır (Ünüböl ve Ünsal, 2010).

1.1.2. Glikoproteinlerin sınıflandırılması

Glikoproteinler içerdikleri bağ tiplerine göre ve buldukları yerlere göre sınıflandırılırlar (Çiftçi, 2006).

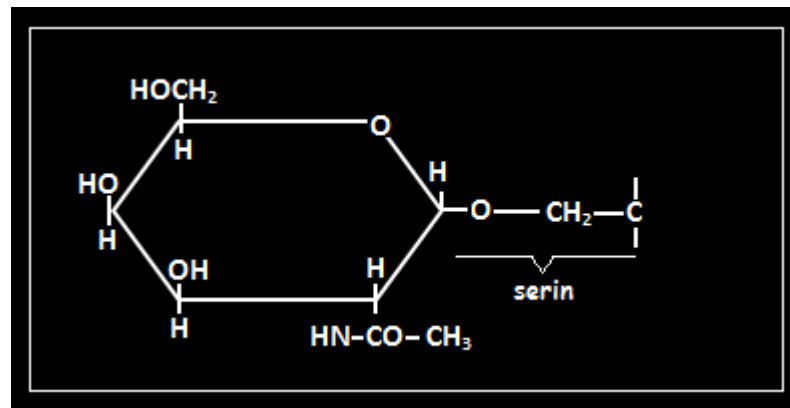
İçerdikleri bağ tipine göre glikoproteinler, N-glikozidik ve O-glikozidik bağı içerenler olmak üzere ikiye ayrılırlar. N-glikozidik bağı içeren glikoproteinlerde şeker, asparajin yan zincirinin amid grubuna bağlanır (Şekil 1.1). Ovalbumin, immunglobulinler, orosomukoid başlıca N-bağı glikoproteinlere örnek olarak verilebilir.



Şekil 1.1. Bir N-bağlı glikoprotein (N asetil glikozaminin asparajine bağlanması) (Ünüböl ve Ünsal,2010).

Glikoproteinlerin ana sınıfını N-glikozidik bağli glikoproteinler oluşturur. Plazma proteinleri de bu grup içerisinde yer alır. Bu proteinler kolayca ulaşılabilir durumda oldukları için bu sınıfa ait proteinler daha fazla incelenmiştir. Hem zara bağli hem de dolaşımda yer alan glikoproteinler bu sınıfta yer alır.

O-glikozidik bağli glikoproteinlerde ise şeker, serin veya treoninin aminoasidinin R grubunun hidroksiliyle bağlanır (Şekil 1.2). O-glikozidik bağli glikoproteinlere birçok membran proteini, mûsinler, proteoglikanlar, kollajenler örnek olarak verilebilir.



Şekil 1.2. Bir O-bağlı glikoprotein (N asetil galaktozaminin serine bağlanması) (Ünüböl ve Ünsal,2010).

Glikoproteinler buldukları yerlere göre başlıca memeli glikoproteinleri, balık glikoproteinleri, bitki glikoproteinleri, bakteri glikoproteinleri, viral glikoproteinler ve

paraziter glikoproteinler olarak da sınıflandırılabilirler (Ünüböl ve Ünsal, 2010; Çiftçi, 2006).

1.1.3. Glikoproteinleri incelemede kullanılan başlıca önemli yöntemler

Glikoproteinleri saflaştırmak için proteinler ve enzimleri saflaştırmada kullanılan klasik yöntemler kullanılabilir. Glikoproteinlerin izolasyonu ve karakterizasyonu için birçok kromatografik/elektroforetik yöntem geliştirilmiştir. Afinite kromatografisi tek başına kullanılabileceği gibi genel kromatografik/elektroforetik yöntemlerle de birleştirilerek kullanılabilir. Bu şekilde, biyolojik önemi olan immünglobulinler, seruloplazmin, eritropoetin gibi glikoproteinler saflaştırılabilir. Kromatografik olarak saflaştırılan glikoproteinlerin yapısındaki glikan zincirleri kütle spektrofotometresi ve NMR spektrofotometresi belirlenebilir. Son zamanlarda glikoproteinlerin mikro heterojenitesinin kalitatif ve kantitatif belirlenmesinde yüksek performanslı kapiller elektroforez, iki boyutlu poliakrilamid jel elektroforezi, atışlı amperometrik belirlemeli yüksek pH anyon değişim kromatografisi gibi teknikler kullanılmaktadır (Çiftçi, 2006).

Glikoproteinleri incelemede kullanılan başlıca önemli yöntemler kısaca aşağıda açıklanmıştır;

- **Kromatografik Yöntemler:** Bunlardan en önemlileri İnce Tabaka Kromatografisi (Thin Layer Chromatography) (TLC), Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography) (HPLC), Gaz Kromatografisi (Gass Chromatography) (GC) dir.
- **Lektin Affinite Kromatografisi:** Bu yöntem kullanılan özgül lektine bağlanan glikoproteinler ve glikopeptidleri saflaştırmak için kullanılır.
- **NMR Spektroskopisi:** Özgül şekerlerin dizgisinin, bağlarının ve glikozid bağlarının anomer doğasının açıklanmasında kullanılan yöntemdir.
- **Kütle Spektroskopisi:** Molekül kütlesi, bileşimi, dizgisi ve bazen bir glikan zincirinin dallanması hakkında bilgi veren yöntemdir.
- **Periodik Asit-Schiff Ayırıcı:** Elektroforetik ayırımdan sonra glikoproteinleri pembe bantlar halinde gösteren yöntemdir.

- **Kültür Hücrelerinin Radyoaktif Şekerle İnkübasyonu:** Bu yöntemde elektroforetik ayırımdan sonra elde edilen glikoproteinlerin radyoaktif bantlar halinde saptanması sağlanır.
- **Uygun Glikozidaz veya Fosfolipazla İşleme:** Elektroforetik göçte oluşan kayma; N-glikan veya O-glikan bağlarına sahip proteinler arasında ve büyük miktarda mannoz ve N-glikanlar arasında ayırım yapmaya yardım eder.
- **Metilasyon Analizi:** Şekerler arasındaki bağların belirlenmesinde kullanılan analiz yöntemidir.
- **Aminoasit veya cDNA Dizgi Analizi:** Proteindeki aminoasit dizisinin belirlenmesini sağlamak amacıyla başvurulan yöntemdir (Ünüböl ve Ünsal, 2010).

1.2. Laktoferrin

Lf ilk kez 1939 yılında sığır sütünden Sorensen ve ark. tarafından izole edilmiştir. Bu çok fonksiyonlu proteinle ilgili ciddi araştırmalar, Lf'nin 1960 yılında aynı anda üç bağımsız laboratuvar tarafından insan sütünde ana demir bağlayıcı protein olarak belirlenip izole edilmesiyle başlamıştır. 1984 yılında insandaki Lf'nin moleküler yapısı ve aminoasit dizisi keşfedilmiştir. (Vogel ve Sicairos, 2012 ; Tomita vd.,2008; Adlerova vd., 2008). Keşfi yaklaşık 50 yıl önceye dayanan Lf, yapısında demir içeren bir glikoproteindir. Bu sebepten yapısında demir bulunduran transferrin, ovotransferrin ve melanotransferrin ile birlikte transferrin ailesinin bir üyesidir (García-Montoya vd., 2012).

Lf'nin molekül kütlesi 80 kDa'dır (Stuart vd.,2012). Yüksek miktarda protein içeren sütteki kazein; besleyici fonksiyona sahipken, sütteki diğer proteinler de memelilerin salgı bezlerinde ve yeni doğanlarda özel fonksiyonlara sahip proteinlerdir. Birçok memeli sütünde, farklı biyolojik fonksiyonlara sahip ve demir içeren, Lf ve transferrin bir arada bulunur. Ancak bu proteinler her zaman aynı anda bulunmayabilirler. Laktasyon süresince insan sütündeki baskın protein Lf'dir ve Lf iki demir iyonu bağlama kapasitesine sahiptir. Lf'nin demir bağlama afinitesi oldukça yüksektir. Lf'nin demir bağlama afinite katsayısı, transferrininkinden 300 kat daha

büyüktür ve temel yapısı sayesinde demir iyonlarını düşük pH' larda da tutabilir (Conesa vd., 2008; Teng vd., 2002).

İlk kez süttten elde edildiği için bu ismi alan Lf, sadece sütte bulunan bir protein değildir (Avcı ve Sel, 2004). Lf insan, inek, köpek, keçi gibi daha birçok memeliyi de içeren canlılarda mukoz epitel hücreleri tarafından üretilir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, gökkuşağı alabalıklarının yumurtalarından da moleküler biyoloji teknikleri kullanılarak Lf üretilebileceğini göstermiştir. Lf, en çok süt ve kolostrum yapısında bulunmakla beraber ayrıca gözyaşı, tükürük, vajinal akıntılar, sperm, burun ve bronşiyal akıntılar, safra, gastrointestinal (mide-bağırsak) salgıları, ürin gibi mukozal salgılarda, bulunur. Lf, kazeinden sonra sütte en yüksek oranda bulunan proteindir (Esen vd., 2013; Gonzalez-Chavez vd., 2009).

Çizelge 1.1: Çeşitli biyolojik sıvılarda bulunan Lf miktarları (Steijns ve van Hooijdonk,2000).

BİYOLOJİK SIVI	MİKTARLAR
Kolostrum sütü	>7 mg/ml
Anne sütü	>1-2 mg/ml
Gözyaşı sıvısı	>2,2 mg/ml
Seminal sıvı	>0,4-1,9 mg/ml
Eklemler sıvısı	>10-80 µg/ml
Tükürük	>7-10 µg/ml
İnek sütü	>20--200 µg/ml
İnek kolostrum sütü	>1.5 mg/ml

Çok sayıdaki memeli sütünde bulunan Lf 'nin insan, domuz, at, inek, bufalo, koyun, keçi, deve ve fareyi kapsayan dokuz memeli türündeki aminoasit dizilimi bilinmektedir (Baker ve Baker, 2005). Ayrıca Lf Afrika filinin sütünde de bulunmuştur. Düşük sayıda aminoasite sahip Lf'lerin benzerliği insan ve fare arasında %70-74 oranındadır. Diğer taraftan inek, bufalo, keçi, ve koyun türü memelilerde bulunan Lf'ler, benzerlik oranı %90' ın üzerinde olan aminoasit zincirleri içermektedirler (Conesa vd., 2008).

Lf birçok vücut sıvısında bulunmaktadır (Çiftçili vd., 2000). Lf, vücut sıvıları olan kan plazması ve amniyotik sıvı içerisinde de bulunur. Lf' nin yüksek bir demir bağlama afinitesine sahip olması, onun yüksek asitliği de içeren geniş bir pH aralığında

bu özelliğini koruyabilen tek transferrin olmasını sağlar. Ayrıca proteolize (protein sindirimi) karşı yüksek bir dayanıklılık gösterir.

Pozitif yüke sahip olan Lf, çok sayıda dokuya dağılmış ve bu özellik onun birçok fonksiyona sahip olmasına neden olmuştur. Canlı yapısında gerçekleşen çok sayıdaki fizyolojik olayla yakından ilişkilidir. Bu olaylara bağırsakta demir emiliminin düzenlenmesi; bağışıklık sistemine antioksidanlık, antikanserojenlik ve iltihap söküçülük gibi konulardaki katkısı örnek verilebilir. Son zamanlarda en çok çalışılan fonksiyonu ise antimikrobiyal etkisidir. Lf' nin antimikrobiyal özelliği genellikle iki mekanizma sayesinde gerçekleşir. Bunlardan birincisi, enfeksiyonlu bölgede mikroorganizmayı besinden yoksun bırakarak bakteriyostatik etki yaratan demir ayrılmasıdır. Diğer mekanizma ise, Lf molekülü ile enfeksiyon sebebi mikroorganizmanın direkt olarak etkileşimidir. Lf içindeki pozitif aminoasitler bakteri, virüs, küf ve parazit hücrelerinin yüzeylerindeki anyonik moleküller ile etkileşime girip hücrenin yıkımına sebep olur (Gonzalez-Chavez vd.,2009).

Lf, yapısında demir içermesi ve demirin bağlanması durumunda kırmızı bir renk oluşturmasından dolayı kırmızı protein ismiyle de anılmaktadır (Yıldırım vd., 2011).

1.2.1. Laktoferrin dizisinin özellikleri

İnsan sütünde bulunan Lf' nin (hLf) nükleotid dizisi, ilk kez Rey ve arkadaşları 1990 yılında keşfedilmiş ve daha önce keşfedilen aminoasit dizileri ile karşılaştırılmıştır. Lf genleri türler arasındaki benzerliğini korur. Yapılan veri tabanı araştırmaları sonucunda on üç farklı canlı türün nükleotid dizileri ortaya çıkarılmıştır. Nükleotidlerin ikili özdeşlikleri %78 ile %100 arasında değişiklik göstermiş olup en çarpıcı sonuçların primatlar arasında olduğu görülmüştür. İnsanlar ve şempanzeler arasındaki benzerlik oranı %95-98 'lere ulaşırken, insanlar ve orangutanlar arasındaki benzerlik oranı %79' a düşmektedir. Yine, at ve deveye ait Lf ile insan Lf i' arasında %81; domuz, inek, yak, su bufalosu, boğa ve keçiye ait Lf ile insan Lf'i arasında 78 dizi özdeşliği bulunmaktadır. Tespit edilen bu dizi özdeşlikleri oranları Lf' nin oldukça korunmuş bir dizi familyasına sahip olduğunu gösterir. Ayrıca Lf ve transferrin arasındaki dizi özdeşliği de %60-65 arasındadır. Yapısal olarak Lf'leri, Tf'lerden ayıran en büyük özellik, eski bir duplikasyon (kopya) olayından evrimleştiği düşünülen iki lob arasındaki peptid bağlayıcısının bir çok prolin kalıntısı içermesidir (García-Montoya vd., 2012).

Yapılan çalışmalar yaklaşık sonuçlar vermekle beraber Metz-Boutigue vd.' nin 1984 yılında yapmış oldukları çalışmada insan kaynaklı Lf' nin (hLf) 82.4 kDa'lık bir molekül ağırlığına sahip olduğu ve 702 adet aminoasitten oluştuğu belirtilmektedir. Yine Pierce vd.' nin 1991 yılında yaptıkları çalışmada sığır Lf 'nin (bLf), molekül ağırlığı 83.1 kDa, aminoasit sayısı 689 olarak verilmiştir. Aşağıda yer alan Çizelge 1.2' de bLf ve hLf' e ait aminoasit içerikleri verilmiştir.

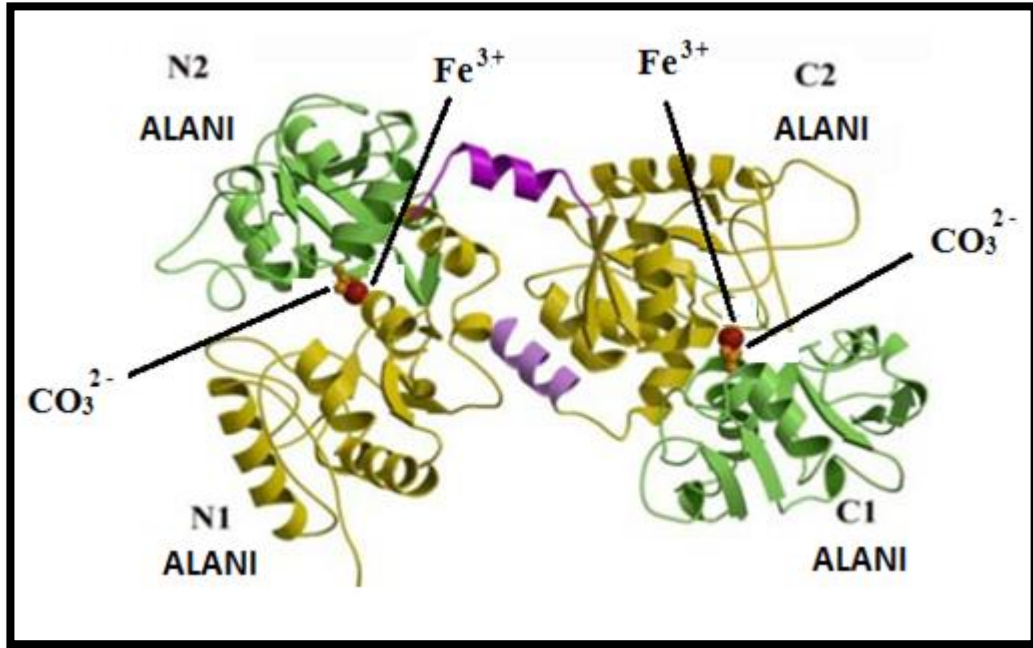
Çizelge 1.2: Sığır ve insan kaynaklı Lf' de bulunan aminoasitler ve sayıları (Pierce vd.,1991).

Aminoasit adı	bLf	hLf
Alanin	67	63
Prolin	30	35
Arjin	39	43
Lisin	54	46
Asparagin	29	33
Valin	47	48
Triptofan	13	10
Sistein	34	42
Treonin	36	31
İzolösin	15	16
Serin	45	50
Glutamin	29	27
Glutamik asit	40	42
Fenil alanin	27	30
Metionin	4	5
Lösin	65	58
Glisin	48	54
Tirosin	22	21
Aspartik asit	36	38
Histidin	9	9
TOPLAM	689	691

1.2.2. Laktoferrinin moleküler yapısı

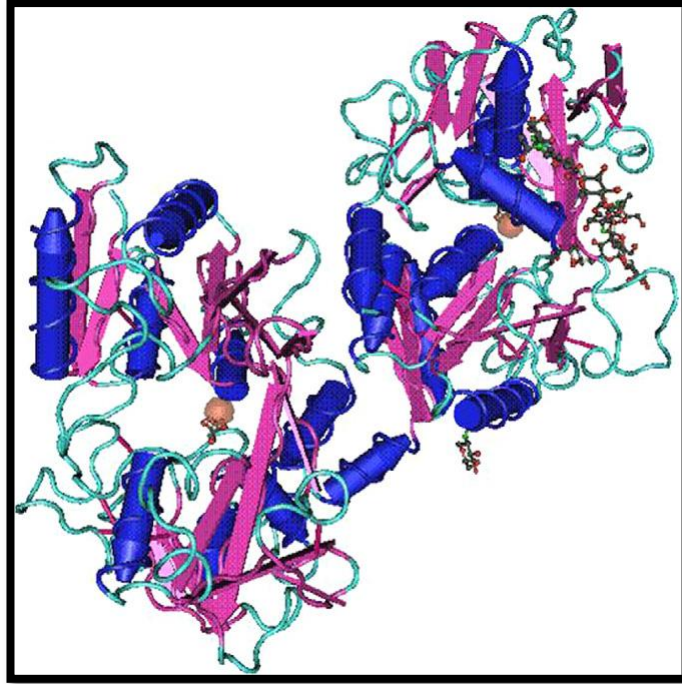
692 aminoasitten oluşan Lf, iki demir bağlama bölgesine sahiptir ve tek polipeptid zincirinden oluşur. Bu polipeptid zinciri ikiye katlanarak simetrik N-(amino) ve C-(karboksi) loblarını oluşturur. 1 ile 333. aminoasitler arası lob N- terminali, 346 ile 692. aminoasitler arası lob C- terminali olarak adlandırılır. Loblar, 334–344 aminoasitler arası bir α -heliks yapı ile birbirilerine bağlanır. İki lob birbirleri ile %33 - %41 arası yüksek homologluk gösterir.

Her bir lob α -heliks ve β -plaka yapı formunda iki alt alana (domain) ayrılır. Bu nedenle Lf molekülü N1, N2, C1 ve C2 olmak üzere 4 domainle gösterilir. Her iki lob Fe^{3+} yanında karbonat iyonu (CO_3^{2-}) da içerir. Böylelikle Lf'deki pozitif yük dengelenmektedir. Lf'ye Fe^{3+} iyonlarından başka Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} ve Mn^{2+} iyonlarının da bağlandığı görülmüştür.



Şekil 1.3. Lf'nin öngörülen yapısı (Berlutti vd., 2011).

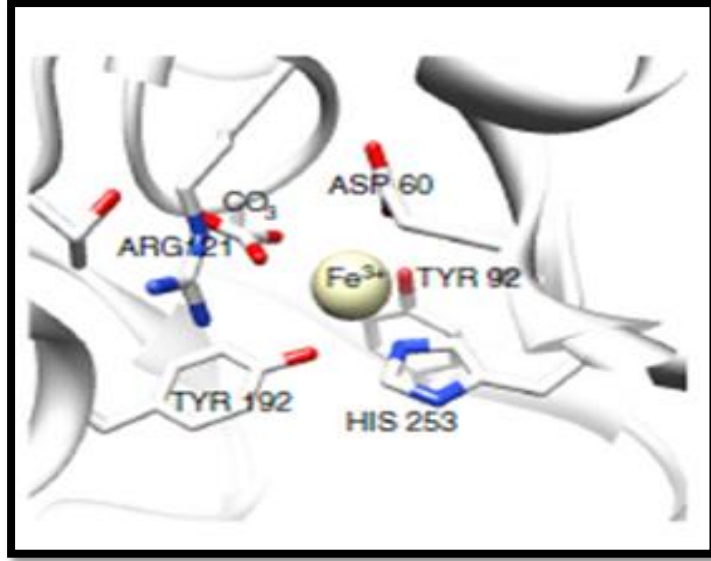
Geri dönüşümlü Fe^{3+} bağı sayesinde Lf, Fe^{3+} içermeden (apo-Lf) veya içererek (holo-Lf) var olabilir ve demirin bağlı olup olmama durumuna göre farklı 3 boyutlu konformasyona sahiptir. Apo-Lf açık konformasyona (yapıya) sahipken proteolize karşı dayanıksızdır. Holo-Lf ise proteolize karşı daha dayanıklı ve kapalı bir yapıya sahiptir. (Gonzalez-Chavez vd., 2009; Kanyshkova vd., 2001; Steijns ve van Hooijdonk, 2000)



Şekil 1.4. 2.8 Angström çözünürlükte sığır Lf'nin 3 boyutlu yapısı (García-Montoya vd., 2012).

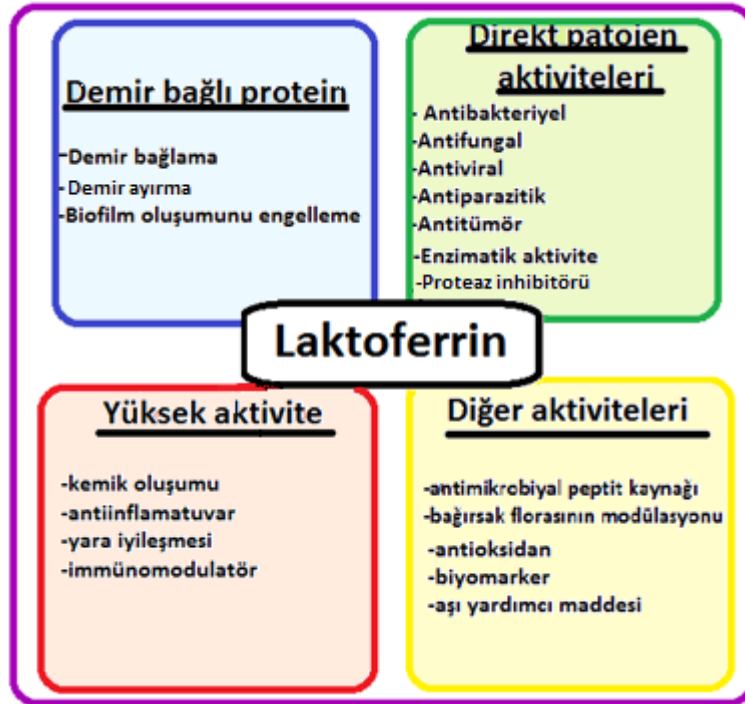
Her iki lobta da demir bağlamada rol oynayan ortak aminoasitler Asp, Tyr ve His aminoasitleridir. N-lob'ta His253, Tyr92, Tyr192, Asp60; C-lopta His253, Tyr435, Tyr528, Asp395 aminoasitleri demir bağlar. Lf'nin demir bağlama kapasitesi karbonat iyonu (CO_3^{2-}) varlığına bağlıdır. Arg121 aminoasidi ise CO_3^{2-} iyonunu bağlayan aminoasittir. Lf, ayrıca izoelektrik noktası 8.0-8.5 olan pozitif yüklü bir proteindir.

Apo-Lf ve holo-Lf'deki ortak yapısal iskelet sebebiyle, moleküler şekillerini diğer Lf türlerinden alınan kristalografik veriler kullanarak modellemek mümkündür (Şekil 1.5) (García-Montoya vd., 2012).



Şekil 1.5. Lf'ye ait kabul edilmiş demir bağlayıcı cep bölgesi (García-Montoya vd., 2012).

1.2.3. Laktoferrinin biyolojik aktivitesi



Şekil 1.6. Lf'nin yararlı fonksiyonel özellikleri (Vogel, 2012).

Lf'nin yüksek demir bağlama kapasitesine sahip olması ve bu özelliğini geniş bir pH aralığında (özellikle de çok düşük pH değerlerinde) korumaya devam etmesi, proteolize karşı gösterdiği dayanıklılık, sahip olduğu pozitif yük ve birçok farklı vücut sıvılarında bulunması gibi özellikleri onu çok fonksiyonlu kılar. Lf'nin immün sistem üzerindeki olumlu etkileri yanında antibakteriyal, antifungal, antiviral, antiprotozoal, antioksidant, antikanserojen, kemik sağlığını iyileştirici, bağırsakta demir absorpsiyonunu düzenleyici, antienflamatuar, immünomodulasyon ve hücre gelişimini kontrol edici özellikleri de göstermesi onun oldukça etkili ve önemli bir glikoprotein olmasına neden olur (Yıldırım vd.,2011).

Lf'nin demir-bağlama özelliği ona biyolojik aktivite kazandırır. Lf, gram-negatif bakterilerin dış membranı ile etkileşime girerek membran stabilitesini bozar. Bu da bakteride koruyucu katman işlevi gören lipopolisakkaritlerin bakteri yapısından ayrılmasına yol açar. Lf antibiyotik özellik göstererek birçok mikroorganizmaya karşı hem bakterisidal hem de bakteriyostatik olarak etkir. Lf dış çürümesi etmeni *Streptococcus mutans* ve diğer birçok gram pozitif ve negatif bakterilere örneğin *E. coli*, *Salmonella Typhimurium*, *Shigella dysenteriae*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus stearothermophilus* ve *Bacillus subtilis*'e karşı antimikrobiyal etkiye sahiptir. Pepsinle muamele edilen veya asidik pH'da ısıtılma tabi tutulan Lf'den açığa çıkan peptidlerin de antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir.

Lf antioksidan aktiviteye de sahiptir. Bu aktivitesi demir bağlama özelliğinden ve sistein aminoasidi açısından zengin bir protein olmasından kaynaklanmaktadır. Ayrıca Lf'nin antiviral ve antikanserojen özelliğe sahip olduğu da belirtilmektedir.

Lf'nin kemik gelişimi üzerine olumlu etkileri de olduğu ortaya konulmuştur. Bu etkisini osteoblastların (kemik oluşturan hücreler) gelişimini teşvik ve osteoklastları (kemiği bağlayan hücreler) inhibe ederek gösterdiği belirlenmiştir. Yapılan çalışmalar aynı zamanda Lf'nin osteoporozun önlenmesinde ve tedavisinde kullanılabileceğini göstermektedir (Gür vd., 2010).

Lf yeni doğanlarda *Escherichia coli*, bazı *Bacillus* bakterilerine karşı koruyucu bir etkiye sahiptir Bu özelliğini ortamdaki demiri şelatlayıp mikroorganizmayı demirden yoksun bırakıp mikroorganizmanın gelişim faaliyetlerini engelleyerek gösterir (Özen ve Kılıç, 2007).

Lf antimikrobiyal etkisini, mikroorganizmaların büyük çoğunluğu için esansiyel özellikteki iyonları bağlayıp mikroorganizmaların yararlanamayacağı duruma getirmekle göstermektedir (Öztürk vd., 2006).

Lf tükürüğe de antimikrobiyal özelliğini veren bileşenlerden biridir (Alpöz vd., 2007).

Lf'ye ait önemli biyolojik aktiviteler ayrı başlıklar altında aşağıda açıklanmaktadır.

1.2.3.1. Antibakteriyal etki

Lf, vücutta antimikrobiyal aktiviteyi artırmaktadır. Ayrıca Lf gelişmek için demire ihtiyaç duyan bakterilerin çoğalmasını demiri bağlayarak önlemektedir. Yeni çalışmalarla desteklenen başka bir önleme mekanizmasında ise Lf'nin bakterinin dış membranındaki lipopolisakaritleri kopararak bakterisidal bir etki göstermesinden bahsedilmektedir (Alpkent ve Kubat, 2003).

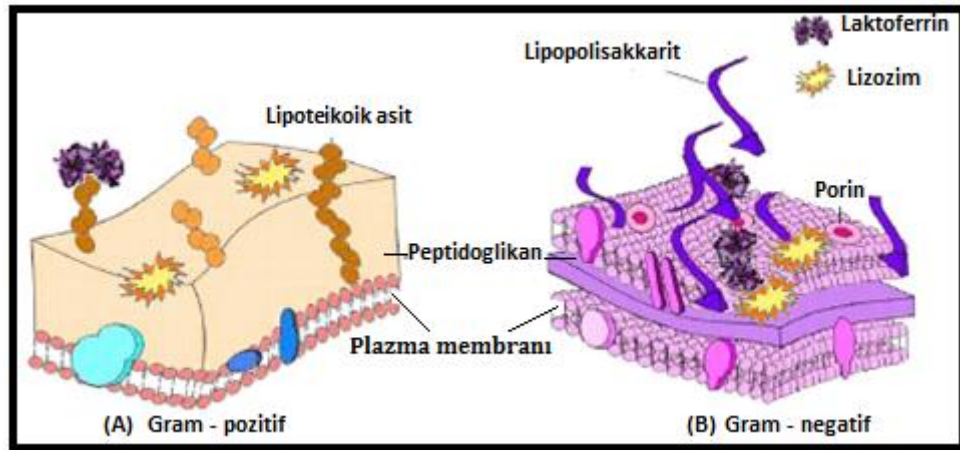
Lf'nin antibakteriyal etkisi gram-pozitif ve gram negatif bakterilerde hem in vivo (yaşayan organizma içinde) hem de in vitro (laboratuvar ortamında) olarak belgelenmiştir.

Bakteri patojenlerinden demirin ayrılması bakteri gelişimini inhibe eder ve enfeksiyon bölgesinde bakteriyi bu mineralin kullanımından yoksun bırakır. Sonuç olarak virülans etkileri azaltarak enfeksiyonlu bölgeyi düzene sokar. Lf'nin antibakteriyal fonksiyonu bakteri yüzeyi ile doğrudan etkileşime girmesinden kaynaklanır. 1988 yılında, Lf'nin lipopolisakarit (LPS) ile etkileşime girerek gram-negatif bakterilerin dış zarına zarar verdiği gösterilmiştir. Lf'nin pozitif yüklü N-ucu, LPS ile bakteri katyonları (Ca^{2+} ve Mg^{2+}) arasında etkileşimi engeller ve *E.coli* içerisindeki müşterek çoğalmaya müdahale eder. Lf'nin LPS ya da diğer yüzey proteinleriyle olan etkileşimi, artan Lf konsantrasyonuyla birlikte mukozadan salgılanan lizozim gibi doğal antibakteriyallerin de dozunu artırır. Ayrıca Lf'nin N-ucu lobunda serin proteaz aktivitesine rastlanmıştır. Lf, *H. Influenza* içerisinde arjinin bakımından zengin bölgelerde proteinleri bağlayarak; proteaz etkinin olduğu bölge N-ucu lobunda konumlanır ve böylelikle virülans etki azalır ve kolonileşme azaltılmış olur.

İn vitro ve in vivo çalışmalar sonucunda Lf'nin bakterinin konak hücreye tutunmasını önleyici kabiliyeti olduğu gözlemlenmiştir. Tutunmayı inhibe eden özellik tam olarak bilinmemekle birlikte, Lf'nin oligomanozit glikanlarının bakteriyeye

adezinlere bağlanarak konuk hücre reseptörleriyle etkileşimini engellediği düşünülmektedir.

Lf, Gram-pozitif bakterilere karşı antibakteriyal etkisini ise bazı bakterilerin (örneğin *Micrococcus luteus*) yüzeyinde bulunan proteinlerine tutunarak göstermektedir. Yine Gram-pozitif bakterilere karşı antibakteriyel özelliğini hücre duvarında bulunan Lipoteikoik asitlerle reaksiyona girerek de gösterebilmektedir (García-Montoya vd.,2012).



Şekil 1.7. Lf'nin antibakteriyal aktivitesinin mekanizması. (A) Gram-pozitif bakteri: Lf hücre duvarında negatif yüklü moleküllerle örneğin lipoteikoik asitle reaksiyona girerek hücre duvarının yükünü nötralize eder ve lizozim gibi diğer antimikrobiyal bileşiklerin etkisini artırır. (B) Gram-negatif bakteri: Lf lipopolisakkaritin lipit kısmı ile reaksiyona girerek membran stabilitesi ve geçirgenliğine zarar verir (Gonzalez-Chavez vd.,2009).

1.2.3.2. Antiviral etki

Lf, önemli bir biyolojik fonksiyon olan anti virütik etkiye sahiptir. Lf, insan ve hayvanlara bulaşan RNA ve DNA virüslerinin birçoğuna karşı antiviral etkiye sahiptir. Ayrıca, adenovirüsler ve enterovirüsler gibi kılıfsız virüslere karşı da aynı etkiyi göstermektedir (Yılmaz ve Tosun, 2012).

Yapılan araştırmalar Lf'nin kılıflı virüslerden, HIV (Harmsen vd., 1995), hepatit B (Hara vd., 2002), hepatit C (Ikeda vd., 2000), hantavirüs (Murphy vd., 2000), kılıfsız virüslerden ise adenovirüs (Arnold vd.,2000), rotavirüs (Superti vd., 1997), poliovirüse (Marchetti vd., 1999) karşı antiviral etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

Lf, antiviral fonksiyonunu genellikle viral enfeksiyonun başlangıç safhasında gösterir. Antiviral etkisini virüslere direkt bağlanarak veya virüsün konakçı hücreye bağlandığı spesifik ve spesifik olmayan reseptörlere bağlanarak gösterir. Antiviral

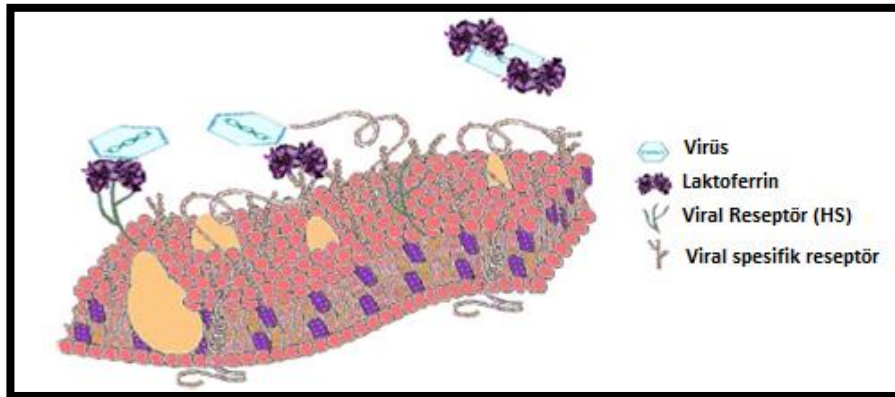
etkisini ayrıca immün hücreler üzerindeki etkisiyle de ortaya koymaktadır. Lf'nin virüs partiküllere veya viral reseptörlere bağlanabilme fonksiyonu bu proteine, antiviral ilaçlar için selektif dağıtıcı olarak kullanılabilme fırsatını doğurmaktadır (Yıldırım vd., 2011).

Lf sütteki derişiminin 10'da biri kadarıyla bile solunum sistemi virüslerini inhibe edebilmektedir.

HIV tedavisi hala tam olarak efektif olarak yapılamadığından tıp için büyük bir mücadele olmaya devam etmektedir. Vitro çalışmalar göstermektedir ki; insan plazması ve süt proteinlerinde bulunan Lf, HIV'e karşı güçlü bir aktivite ortaya koymaktadır. Bu etki, bulunduğu hücre içinde virüsün replikasyonunun (çoğalmasının) inhibe edilmesi sayesinde sağlanmaktadır.

Lf'nin antiviral etkisinin nasıl olduğu konusunda çok sayıda varsayım ortaya konulmuştur (Şekil 1.8). Oldukça kabul gören bir hipoteze göre; Lf, virüs reseptörlerinden heparan sülfata bağlanarak (HS) bağlanarak glikozaminoglikanları bloke eder. Lf ve HS arasındaki bağ, virüs ile gireceği hücre arasındaki ilk etkileşimi engeller ve dolayısıyla hücrenin enfekte olmasının önüne geçilir.

Lf'nin aynı zamanda hayvanları etkileyen Friend virüs kompleksi, feline calicivirus ve feline immunodeficiency (bağışıklık sistemini çökerten) virüs gibi virüsler üzerinde de antiviral etkisi gözlenmiştir.



Şekil 1.8. Lf'nin antiviral etki mekanizması (Gonzalez-Chavez vd., 2009).

1.2.3.3. Antifungal etki

Lf ayrıca antifungal (mantar önleyici) etkiye de sahiptir. Özellikle *Candida* türleri üzerindeki etkileri araştırılmış ve önemli bulgular elde edilmiştir. *Candida* mukozal yüzeylerde kolonileşebilen bir mantardır.

1971'de Kirkpatrick ve çalışma arkadaşları, *Candida spp.* kullanarak yaptıkları araştırmada Fe^{3+} bağlama/ayırma yeteneğinden dolayı Lf' nin antibakteriyal özellik gösterdiğini görmüşlerdir. Wakabayashi vd.'nin 1996 yılında yaptığı çalışmada Lf'nin *Candida albicans* mantarına karşı etkisi araştırılmış ve bakterilerde yaptığı gibi hücre geçirgenliğini değiştirmek vasıtasıyla mantarları yok ettiği gözlemlenmiştir. Lf, *Candida* kökenli mantarlar üzerine etkisini hücre yüzeyine bağlanıp hücre duvarına zarar vererek gösterir. Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalar da Lf' nin antifungal etkisini doğrulamıştır. 2003'te yapılan çalışma göstermiştir ki; oral yolla yapılan Lf tedavisi oral candidiasis (dilde maya üremesi) hastalığına karşı başarılı olmuştur (García-Montoya vd.,2012).

Lf'nin antifungal etki gösterdiği *Candida* türlerine *C. Tropicalis*, *C. krusei*, *C. albicans*, *C.guilliermondii*, *C. parapsilosis* ve *C. Glabrata* örnek olarak verilebilir (Jenssen ve Hancock, 2009).

1.2.3.4. Antiparaziter etki

Lf' nin antiparazitik etkisini gösteren çalışmalar genellikle vitro olarak yapılmış, Fe^{+3} varlığı ve yokluğunda moleküler ilişkiler gözlemlenmiştir. Bu aktivite aynı zamanda full molekülden türetilmiş peptidler kullanılarak da gösterilmiştir.

Tek hücreliler tarafından sebep olunan İntestinal Amoebiasis enfeksiyonu, 5 yaş altındaki çocukların ishale yakalanmasındaki birinci, ölümlerine sebep olmada ise dördüncü sırada olan enfeksiyondur. Enfeksiyona *Entamoeba Histolytica* sebep olur. *Entamoeba Histolytica* bağırsak mekanizmasını istila etmek için kompleks bir mekanizma kullanır ve sonucunda amipli kalın bağırsak iltihabına sebep olur. Sütte bulunan ve müthiş bir amoebisidal etkiye sahip olan Apo-Lf, *E.Histollytica* ile vitro etkileşime girer ve tropozoit membranındaki yağlar ile bağ kurarak membranın dağılmasına ve parazitin zarar görmesine sebep olur (Gonzalez-Chavez vd., 2009).

Apo-Lf'nin holo-Lf'ye göre antiparaziter aktivitesinin daha yüksek olduğu ifade edilmektedir (Ikada, 2005).

1.2.3.5. İmmün sistem üzerine etkisi

Lf konakçı savunma mekanizmasında önemli rol oynamaktadır. Lf, mikroorganizmaların konakçı hücreye tutunmasını ve kolonize olup çoğalmasını önleyerek veya onları öldürerek etki göstermektedir. Lf'nin doğal (spesifik olmayan) ve sonradan kazanılan (spesifik immünite) bağışıklık üzerinde etkili olduğu birçok araştırmacı tarafından ortaya konmuştur. Pozitif yüklü Lf bağışıklık sisteminde bulunan birçok hücrenin yüzeyindeki negatif yüklü moleküllere bağlanarak aktivasyon, farklılaşma ve çoğalma gibi selüler yanıtlara neden olabilmektedir. Lf hücre çekirdeğine taşınabildiğinden burada DNA'ya bağlanarak farklı sistemleri de aktifleştirebilmektedir (Yıldırım vd., 2011).

1.2.3.6. Antikanserojen etki

Lf'nin anti-tümör özellikleri yaklaşık olarak 20 yıl önce keşfedilmiş ve sayısız laboratuvar çalışmasında sığır Lf'nin (bLf) farelere ağız yoluyla verilerek, kimyasal olarak başlatılmış tümör oluşumunu azalttığı kanıtlanmıştır. O zamandan beri, insanlar üzerinde yapılan çalışmalar ağızdan alınan Lf'nin kanser gelişimine karşı faydalı etkileri olduğunu göstermektedir.

bLf'nin metastazı engelleyici bir etkiye sahip olduğu ve nakledilmiş tümörlerin gelişimini engellediği tespit edilmiştir. Lf kanserdeki sitokin üretimini düzenleme yeteneği vardır. İn vitro ortamda tümör gelişimini durdurabilir. Ek olarak, farelerdeki tümörün rekombine insan Lf'si (rhLf) ile tedavisi gelişimlerini inhibe eder. Yakın zamanda yapılan klinik denemelerde insan kaynaklı Lf'nin kolon kanseri gelişimi riskini azalttığı izlenmiştir. Göğüs kanserinde Lf tümör hücrelerinin gelişimini engeller.

bLf'nin THP-1 insan monositik lösemi hücrelerinde programlanmış hücre ölümünü sağladığı da ayrıca gösterilmiştir. Lf'nin anti-tümör rolündeki başarıları birçok araştırmacı tarafından açıkça sağlanmış olsa da, bunun arkasında yatan mekanizma hala tam olarak anlaşılmamıştır. Bu nedenle, bu konu üzerinde daha çok araştırma yapılması gerekmektedir (García-Montoya vd. 2012).

1.2.3.7. Enzimatik etki

Lf' nin farklı bir takım enzimatik etkilere sahip olduğu bilinmekte, ancak bunun sebebine dair kesin bilgiler hala araştırma konusu olmaya devam etmektedir. Lf serin, proteaz, amilaz, DNAz, RNAz (ribonükleaz A) ve ATPaz gibi enzimlerin sahip olduğu etkilere sahiptir. Bu enzimatik farklılığının nedeninin proteinin yapısından kaynaklı izoformlarının bulunması, glikolizasyon derecesi, tersiyer yapı (holo veya apo-Lf) ve oligomerizasyon derecesi gibi özelliklerinden dolayı olabileceği düşünülmektedir.

Lf' nin bir izoformu olan apo-Lf' nin RNAz etkisine de sahip olduğu tespit edilmiştir (Yıldırım vd.,2011).

1.2.4. Laktoferrinin klinik uygulamaları

Lf' nin klinik uygulamaları hastalığın tanısı, tedavisi ve önlenmesi işlemlerinde kullanılarak test edilmiştir ve bunlar aşağıdaki şekilde sıralanabilir:

1) Lf' nin ilk uygulama alanı bebek mamalarıdır. Bebek maması ile beslenen bebeklerin bağırsaklarında emzirilen bebeklere göre, daha az demir emilimi gerçekleştiği çok sayıda çalışmada görülmüştür. Lf' nin büyük bir kısmı bebeklerin bağırsağında emilir ve buradan kan dolaşımına katılır.

2) Lf ayrıca *Bifidobakterium* ve *Lactobasillus* gibi laktik asit bakterilerinin çoğalmasını düzenler. Bu bakteriler vücudu zararlı bakterilerden korumaktadır.

3) Lf *Helicobakter pylori* tedavisinde, hastalığın tekrarlandığı vakalarda ikinci tedavi olarak test edilmiştir. bLF ile desteklenen hastalarda, enfeksiyondan kurtulma çok daha hızlı gerçekleşmiştir.

4) Antibakteriyelerde olduğu gibi Lf, antiviral ilaçlarla da sinerjik etki göstermektedir. Örneğin; HCV tedavisinde ribavirin ile HIV tedavisinde zidovudine (AZT analogu) ile inhibitör etki göstermesi sağlanmıştır. Bu sinerjik kombinasyon, en dirençli türdeki patojenleri bile çok hassas hale getirebilme ve gelişimlerini inhibe edebilme anlamına gelmektedir.

5) Lf' nin koruyucu etkisi de test edilmiş ve aşılarda destekleyici olarak kullanılmıştır. Örneğin, BCG (Bacille Calmette-Guerin) aşısında destekleyici olarak kullanılmıştır. Lf bu şekilde kullanıldığında aşırı hassas cevabın gecikme süresini uzatır ve *Mycobacterium tuberculosis* bakterisi tarafında oluşturulan patolojik etkiyi en aza indirir (Gonzalez-Chavez vd., 2009).

1.2.5. Doğal ve rekombinant laktoferrin üretimi

Lf' nin fonksiyonel karakteristiğinden dolayı, çalışmalar onun gıda katkısı veya ilaç olarak üretilmesi ve saflaştırılması üzerine yoğunlaştırılmıştır. Molekülün yapısına bağlı olarak kullanılan protein saflaştırma stratejileri üç türdür.

a) Lf pozitif yüke sahip olduğu için, katyon değişimli reçinelerde efektif olarak absorbe edilir ve tuz solüsyonları kullanılarak %95'ten yüksek saflıklarda ayrıştırılabilir.

b) Lf, Fe³⁺ bağlar ve bu sayede metal iyon afinite kromatografisi ile saflaştırılabilir.

c) Ayrıca, Lf glikozlu bir protein olduğu için Concanavalin A afinite kromatografisi ile de saflaştırılabilir.

Ancak, daha yüksek miktarlarda Lf ihtiyacı sebebiyle, rekombinant Lf elde etmek için stratejiler geliştirilmiş ve bu güne kadar, prokaryotik ve ökaryotik hücreleri içeren çok sayıda Lf üretim sistemi kullanılmıştır.

Lf ayrıca hem bitki hem hayvanlar olmak üzere ökaryotik organizmalardan da elde edilebilir. Mikroenjeksiyon yöntemi kullanılarak süt bezlerine viral taşıyıcılar eklenmesi ile rLf (rekombinant, biyolojik türlerden elde edilen) üretebilen genetik yapısı değiştirilmiş canlılar türetilmiştir. Bu hayvanlar, keçiler, fareler, tavşanlar ve ineklerdir. Pirinçte her bir gram tohumdan 1,6 mg protein elde edilebildiği görülmektedir.

Rekombinant formda Lf ve Lf peptidi üretim sistemlerinin çoğunda, üretilen Lf ile doğal Lf arasında fiziksel, biyokimyasal ve biyolojik karakteristikler benzerdir ve çoğunlukla bu benzerlik birbirinden ayırt edilmeyecek seviyededir. Bu benzerlikler, moleküler ağırlığı, glikolizasyon derecesini, antimikrobiyal ve antiinflamatuvar aktiviteyi, termostabiliteyi (ısı karşısında stabilite) ve Fe³⁺ bağlama yeteneğini de kapsar. Bu stratejiler yüksek miktarlarda rLf üretiminin verimli, ekonomik ve geniş çapta gerçekleştirilmesi için kullanılmaktadır (Gonzalez-Chavez vd.,2009).

1.2.6. Laktoferrinin kullanım alanları

Sahip olduğu biyolojik fonksiyonlardan dolayı geniş bir uygulama alanına sahip olan Lf gıda, kozmetik, mama ve hayvan yemleri gibi alanlarda yaygınca kullanılmaktadır (Çizelge 1.3). Lf, antimikrobiyal ve prebiyotik özelliklerinden dolayı çok fonksiyonlu gıda katkı maddesi olarak kabul edilmektedir. Lf'nin gıdalarda, bebek mamalarında, sporcu beslenmesinde kullanılan gıdalarda, sakızlarda ve ağız bakım (diş macunu, ağız yıkama gargaralarında) ve kozmetik ürünlerinde katkı maddesi olarak kullanılması önerilmektedir.

Lf'nin et ürünlerinde kullanılmasına Amerika Birleşik Devletlerinde izin verilmiştir. Lf ve aktive edilmiş Lf'nin (inek sütü Lf'nin gıda kaynaklı bir glikozaminglikana örneğin galaktozca zengin polisakkarit veya karragenana immobilize edilmiş haline aktive edilmiş Lf denilmektedir.) et endüstrisi için uygun bir doğal koruyucu olduğu araştırmacılar tarafından bildirilmiştir. Lf katıldığı et ürününün rengini, kokusunu ve görünüşünü değiştirmemektedir. Üretim anında ete kolayca uygulanan Lf etin yüzeyinde kalarak üretim sonrası patojen ve bozulma etmeni bakterilerin gelişmesine de engel olmaktadır.

Çizelge 1.3: Lf'nin endüstride kullanıldığı ürünler (Yıldırım vd., 2011).

Ürün adı	Lf'nin etkisi
Süt kaynaklı bebek mamaları	Yapay anne sütlerinde patojenlere karşı direnç sağlamak
Süt ve yoğurt	Prebiyotik
Sağlık ürünleri	Hamile bayanlarda demir emilimini artırmak ve bağışıklığı güçlendirmek
Fonksiyonel gıda ve içecekler	Demir çözünürlüğü ve emilimini artırmak
Kozmetik ürünler	Hijyen, antioksidan, nemlendirme
Ağız bakım ürünleri ve sakızlar	Ağız hijyenini artırmak
Yem katkıları	Kedilerde virüs hassasiyetini yok etmek

1.3. Protein Saflaştırma Yöntemleri

Lf canlı kaynaklı bir biyomoleküldür. Bulunduğu kaynakta kendisi gibi yüzlerce glikoprotein ve protein yapısında biyomolekül bulunur ve bu kadar çok çeşitlilik arasından Lf'yi izole etmek kolay değildir. Pek çok biyomolekülün yapısı, ortamın pH'ından, sıcaklığından ve ortamdaki kimyasal maddelerden etkilenecek şekilde değişebilir. Bu nedenle kullanılacak yöntemin iyi seçilmesi ve şartların hassas bir şekilde ayarlanması gerekir. İzole edilmesi istenilen molekül, birden fazla ayrıştırma yönteminin bir arada ve sırayla kullanılması ile de ayrıştırılabilir. Uygulanan yöntemler, ayrıştırmak için kullanılırken aynı zamanda saflaştırmak amacıyla da kullanılabilir.

Günümüz biyoteknolojik olanakları doğrultusunda kullanılan yöntemler oldukça gelişmiş durumdadır. Geliştirilmiş olan protein saflaştırma yöntemleri ile biyomoleküllerin kimyasal yapısı, molekül kütlesi ve diğer özellikleri aydınlatılabilmektedir.

Belli başlı protein saflaştırma yöntemlerini aşağıdaki şekilde sıralayabiliriz:

1. Kromatografik yöntemler
2. Elektroforez yöntemler
3. Kütle spektroskopisi
4. ELİSA (Enzyme-linked immunosorbent assay) yöntemi
5. Santrifügasyon yöntemler

Yaptığımız bu tez çalışmasında, inek sütünden Lf ayırımında ilk olarak kromatografik yöntemlerden afinite kromatografisi kullanılmıştır. Daha sonra; ayırımı sağlanan Lf elektroforez yöntemlerinin alt grubunda yer alan SDS-PAGE yöntemi ile saflaştırılmıştır. Tez çalışmamız kapsamında kullandığımız yöntemler aşağıda ayrıntılı şekilde açıklanmıştır.

1.3.1. Kromatografik yöntemler

Kromatografi, karmaşık karışımlardaki kimyasal bileşimlerin ayrılması, tanınması ve tayini için yaygın olarak kullanılan bir analitik metottur.

Kromatografi yüzyılımızın başlarında Rus botanikçisi Mikhail Tswett, tarafından bulunmuştur. Tswett, çözeltileri ince boyutta kalsiyum karbonat içeren bir kolondan geçirerek klorofil ve ksantofil gibi bitki pigmentlerini ayırmak için bu tekniği kullanmıştır. Ayrılmış türler kolonda renkli bantlar halinde görüldükleri için, Yunanca

renk anlamına gelen *chroma* ve yazmak anlamına gelen *graphein* sözcüklerini birleştirerek metoda *kromatografi* adını vermiştir.

Kromatografik yöntemlerde durgun faz ve hareketli faz olmak üzere iki tür faz vardır. Karışımdaki bileşenler, akış halindeki gaz veya sıvı bir fazla birlikte, durgun faz üzerinden geçirilir; bileşenlerin göç hızlarına bağlı olarak ayırma gerçekleşir (Skoog vd., 1999).

Kromatografik yöntemleri aşağıdaki şekilde sınıflandırabiliriz:

a) Ayırma mekanizmalarına göre

- İyon değişim kromatografisi,
- Jel filtrasyon kromatografisi,
- Adsorpsiyon kromatografisi,
- Partisyon kromatografisi,
- Affinite kromatografisi

b) Ayırıcı materyale göre

i) Düzlemsel kromatografi

- İnce tabaka kromatografisi
- Kağıt kromatografisi

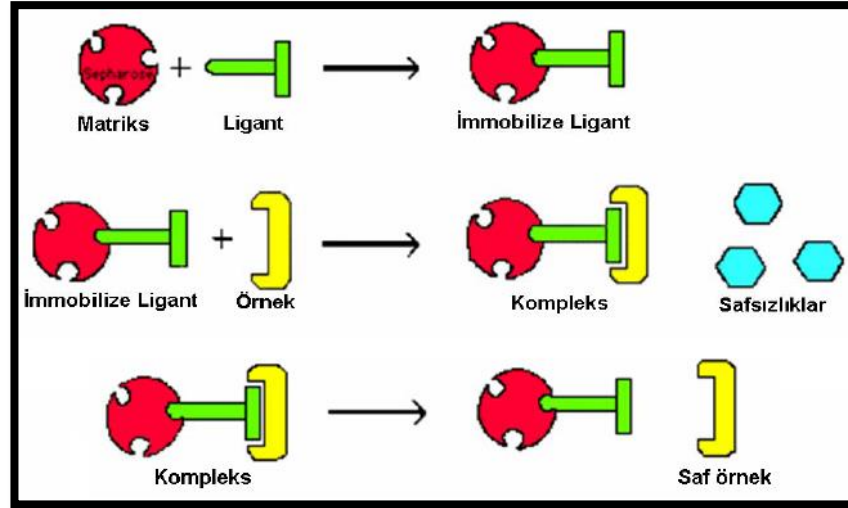
ii) Kolon kromatografisi

- Gaz kromatografisi (GC)
- Sıvı kromatografisi (LC)
- Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC)

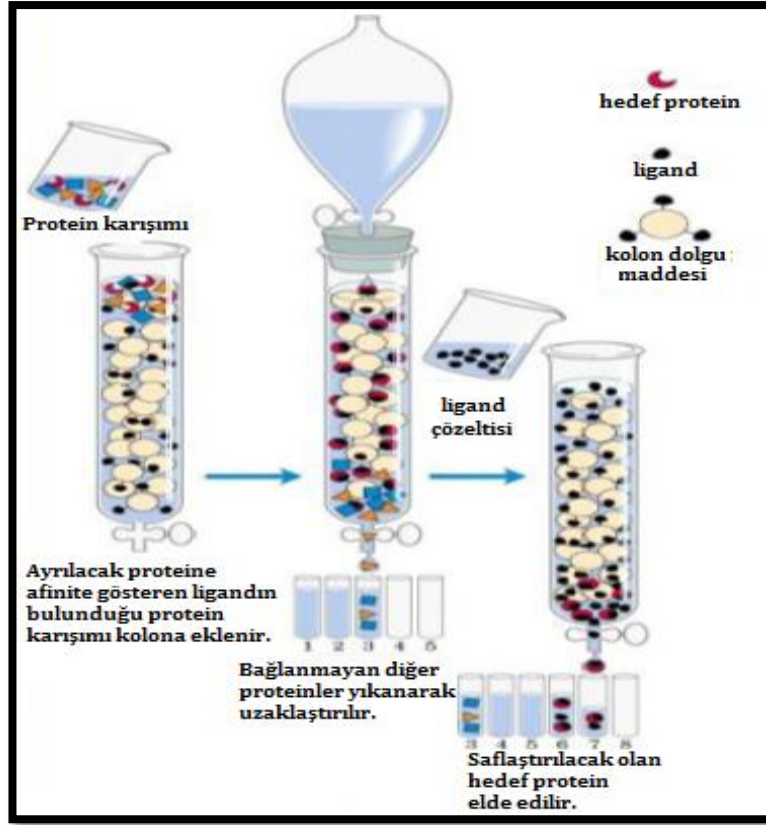
Sunulan tez kapsamında ayırım mekanizmasına göre afinite kromatografisi, ayırıcı materyale göre ise sıvı kromatografisinin alt grubu olan hızlı protein sıvı kromatografisi (FPLC) kullanılmıştır. Afinite kromatografisi aşağıda ayrıntılı olarak açıklanmıştır. (FPLC yöntemi ise ilerleyen bölümlerde ayrıntılı olarak ele alınacaktır.)

Afinite Kromatografisi: Biyolojik ya da fizyolojik bir karışım içinde bulunan proteinler afinite kromatografisi sayesinde tek basamakta oldukça saf halde elde edilirler (Şekil 1.9). Afinite kromatografisinin temeli adsorbsiyona dayanır. Enzim, hormon vb. spesifik proteinlerin saflaştırılmasında kullanılır. Kolonun dolgu maddesine (dekstran, poliakrilamid, selüloz vb.), spesifik protein ile kompleks yapabilen bir ligand bağlanır. Ligand ile kompleks yapan spesifik protein, katı desteğe bağlanarak kolonda

tutulurken; serbest proteinler kolonu terkederler. Bağlı protein, daha sonra, pH değişikliği / tuz çözeltileri veya ligand ilavesiyle kolondan elüe edilir (Ünlüsayın vd., 2009).



Şekil 1.9. Afinite kromatografisinin temel prensibi (<http://protein.ege.edu.tr>, 31/05/2014 Saat 01.18).



Şekil 1.10. Afinite kromatografisinin şematize edilmesi (Dönmez, 2012).

1.3.2. Elektroforez yöntemleri

Elektroforez, yüklü moleküllerin elektriksel alanda ayrılmaları temeline dayanan bir yöntemdir. Proteinlerin analizinde ve ayrılmasında oldukça yaygın olarak kullanılır. Proteinlerin molekül ağırlığının tespitinde, yapısının aydınlatılmasında, miktarının belirlenmesinde ve saflaştırılmasında kullanılır (Beyazbenli, 2006).

Bu teknikte, yapıları birbirine çok benzeyen ve doğal olarak bir arada bulunan molekül ya da partiküller taşıdıkları yük ve büyüklüklerine göre birbirlerinden ayrılırlar.

Elektroforez yönteminin uygulanacağı maddenin elektrikle yüklenebilir özelliğe sahip olması gerekir. Proteinler taşıdıkları aminoasitlerden dolayı amfoterik bir yapıya sahip olduklarından kolayca elektriksel yükü yüklenebilirler. Bu sebepten elektroforez için en uygun moleküllerdir.

Bir protein molekülünün üzerindeki toplam yükün sıfır olduğu pH' a "izoelektrik nokta" denir. Proteinler izoelektrik noktadayken elektroforez ortamında göç edemezler. Bu durumu ortadan kaldırmak için proteinleri izoelektrik noktadan uzak asit veya alkali tamponlarla (pozitif veya negatif yüklerle) yüklemek gerekir. Protein

elektroforezinde izoelektrik noktadan kaçınmak için genellikle pH 8.0 ile 9.0 arasında değişen alkali tamponlar kullanılır. Böylece elektroforetik destek materyali üzerinde daha fazla absorpsiyona neden olmadan ve izoelektrik noktası düşük olan proteinleri de separe edecek şekilde yüklenme sağlanmış olur. Sonuçta alkali ortamda negatif olarak yüklenmiş olan proteinler anoda doğru göç ederler (İldeş, 2006).

Bu yöntemle ayrıştırılması yapılacak olan örnek, bir destek ortamına uygulanır. Bu destek ortamı hareketsiz, sabit fazdır ve sabit faz olarak kağıt, asetat, selüloz, agaroz ve daha çok poliakrilamid jeller kullanılır. Sabit ortamın gözeneklerinin moleküllerin geçişine uygun olması gerekir. Hareketli faz olarak ise kesintisiz göç sağlamak üzere çoğunlukla tampon çözeltiler kullanılır. Jeller, içerisinde uygun bir tampon bulunan bir elektroforez aygıtına yerleştirilerek işlem gerçekleştirilir. Numune uygulaması ise, en üstteki yoğunlaştırıcı jel üzerine uygulanır. Akım uygulamasıyla bileşenler uygun büyüklükteki porlardan geçerek; molekül büyüklüğü ve elektrik yüklerine göre separe olurlar. Katı jel desteği ile ayırımı yapılacak moleküllerin hareketi, moleküllerin yüküne, boyutuna, biçimine, kimyasal içeriğe ve uygulanan elektriksel alana bağlıdır (Reed vd.,2007; İldeş, 2006).

Elektroforez yöntemlerinin sınıflandırılması, kullanılan destek materyalinin çeşidine ve uygulanan numune tipine iki şekildedir:

A. Uygulanan numune tipine göre sınıflandırma

1. Protein Elektroforezi
2. Lipoprotein Elektroforezi
3. Hemoglobin Elektroforezi
4. İmmün Elektroforezi
5. İzoelektrik Fokusing Elektroforezi
6. İzoenzim Elektroforez

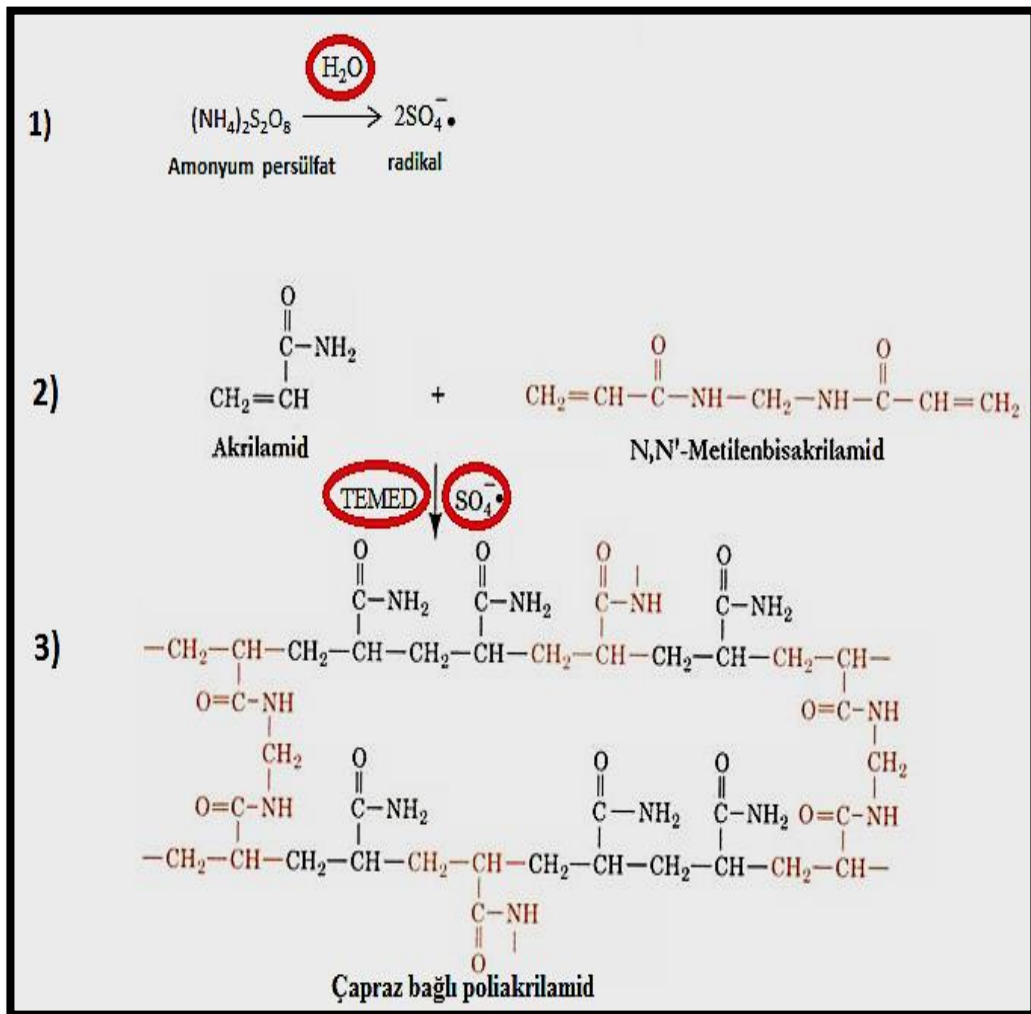
B. Kullanılan destek materyalinin çeşidine göre sınıflandırma

1. Kağıt Elektroforezi (P.E.)
2. Agar Elektroforezi (A.E.)
3. Agaroz jel Elektroforezi (A.G.E.)
4. Nişasta jel Elektroforezi (S.G.E.)
5. Selüloz asetat Elektroforezi (C. A.E.)
6. Poliakrilamid jel Elektroforezi (P. A.G.E.) (İldeş, 2006).

Sunulan tez çalışmasında; ayırımı sağlanan Lf'nin saflık derecesinin tayin edilmesinde elektroforez çeşitlerinden jel elektroforezi kullanılmıştır. Bu nedenle poliakrilamid jel elektroforezi ayrıntılı olarak aşağıda açıklanmıştır.

Poliakrilamid jel Elektroforezi (PAGE), ayırırda poliakrilamid jellerin kullanıldığı ve daha çok proteinlerin ayrıştırılması için kullanılan bir elektroforetik yöntemdir.

Aşağıda Şekil 1.11' de akrilamid polimerleşme reaksiyonu verilmiştir.



Şekil 1.11. Poliakrilamidin oluşum reaksiyonu
(<http://biyokure.org>, 16.05.14, Saati 17.51).

Jel yapısındaki polimerde; ana gövdeyi oluşturmak üzere nörotoksik bir madde olan akrilamid, çapraz bağlayıcı olarak ise N,N'-metilen-bis akrilamid kullanılır.

Polimerleşme reaksiyonunda akrilamid molekülleri yan yana bağlanarak düz zincirler oluştururlar. Bisakrilamid molekülleri ise iki akrilamid zinciri arasında çapraz bağlanmalar oluşturur. Böylece ağimsı bir yapı meydana gelir. Gözenek büyüklüğü kullanılan akrilamid ve bis akrilamid miktarına bağlıdır. Bu yüzden çoğunlukla jel formülasyonunda bis akrilamid konsantrasyonu % 5'e ayarlanıp sabit tutulurken jel üzerindeki gözeneklerin büyüklüğü akrilamid derişimi ayarlanarak belirlenir.

Kullanılan APS, polimerleşmenin gerçekleşmesi için gerekli olan serbest radikallerin kaynağıdır. TEMED ise polimerleşme reaksiyonunu hızlandırarak katalizör görevi görür (www.yyu.edu.tr, 28/04/2014 Saat 00:26).

Poliakrilamid jel kullanılarak yapılan ayırmada numunedeki bileşenler daha iyi ayrılır. PAGE' de gerçekleşen ayırım hem moleküler elekleme hem de elektroforetik harekete dayanır (Reed vd., 2007; Tanbay, 2007).

Çok çeşitli ürünler için ayırma gücünün yeterli olması, kullanımının kolay ve zaman kazandırıcı olması, karşılaştırma gerektiren çalışmalarda, birçok örneğin birlikte yan yana ayrıştırılabilmesi, poliakrilamid jel elektroforezi ile ayrıştırılmış örneklere, gümüş (silver) gibi hassas boyama metotlarının geliştirilmesi gibi özellikler PAGE yönteminin tercih edilme nedenleridir.

Elektroforezde iki tür tampon sistemi kullanılır. Bunlar; kesiksiz (continuous) ve kesikli (discontinuous) tampon sistemleridir. Tek bir ayırıcı jelin kullanıldığı sistemler kesiksiz sistem olarak adlandırılır ve bu sistemde tanklarda ve jelde aynı tampon kullanılır. Farklı tamponlarda hazırlanan iki jelden oluşan sistemlere ise kesikli sistem adı verilir. Kesikli sistemde büyük porlu yükleme (stacking) jeli (örneğin %5 total akrilamid içerir.); (2) küçük porlu ayırma (separating) jeli (örneğin %10 total akrilamid içerir) kullanılır. Ayrıca kesikli sistemde farklı tamponlar kullanılır.

Poliakrilamid jel elektroforezi jel bileşimine göre Native (doğal) ve SDS (sodyum dodesil sülfat) jel elektroforezi olmak üzere iki türdür. Doğal (native) jel elektroforezinde kullanılan tamponlar; deterjanlar ve diğer denatüre edici maddeleri içermediğinden, ayırım doğal koşullarda gerçekleşir. Ayırım sonrası proteinlerin doğal yapıları bozulmaz.

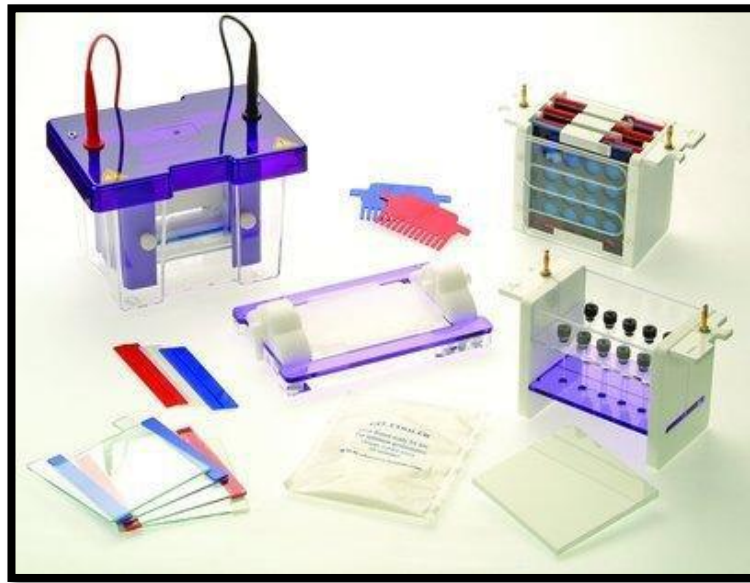
Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS PAGE) yönteminde, adından da anlaşılacağı üzere protein moleküllerinin alt birimlerini birbirinden ayıran, yani proteinlerin doğal yapısını bozan anyonik deterjan sodyum dodesil sülfat (SDS) kullanılır. Sodyum dodesil (lauril) sülfat (SDS) anyonik bir

deterjandır ve etkileşime girdiği proteinlerin net yüklerini maskeleyerek onların eksi (-) yükle yüklenmesine neden olur. Böylece tüm proteinler negatif yüklü molekül dizileri oluşturur ve mol kütlelerine göre katottan anoda doğru göç ederler.

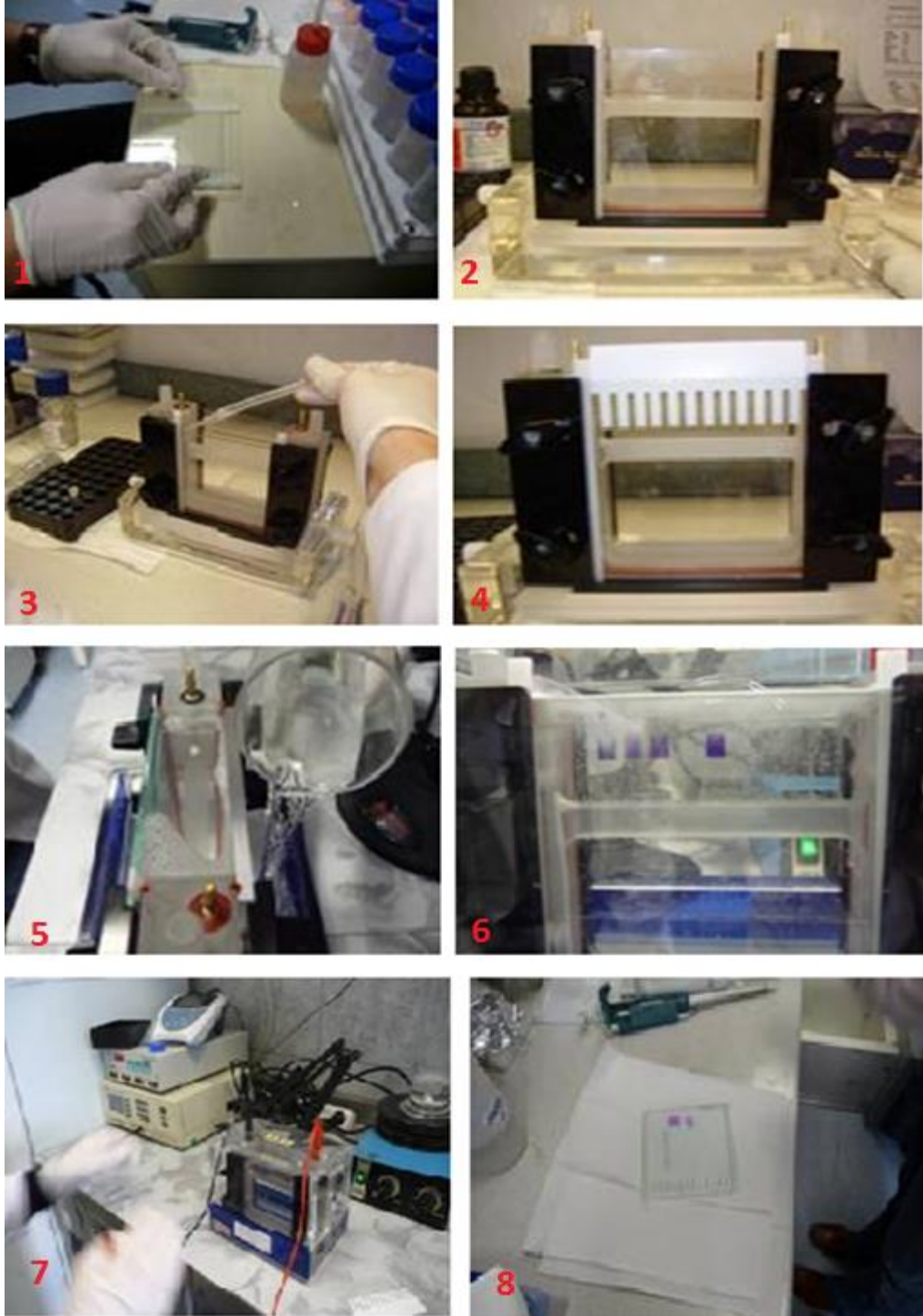
Bu yöntem proteinlerin saflığının kontrolü ve mol kütlelerinin saptanması amacıyla kullanılır. Proteinler denatüre (SDS içeren) bir jelde molekül büyüklüğüne; doğal (native) bir jelde ise molekül biçimi, büyüklüğü ve yüküne göre ayrılırlar. SDS-PAGE yönteminde molekül ağırlığı bilinmeyen protein örnek, molekül ağırlığı bilinen standart proteinlerle birlikte, aynı jel üzerinde yan yana ceplere uygulanır ve ayrı hatlarda elektroforetik olarak ayrılır.

Boyama sonrasında jelde gözlenen bantların bir standart markörle karşılaştırılması ile proteinin mol kütlesi hakkında bir fikir edinilebilir.

Bu yöntem daha çok proteinlerin mol kütlelerini saptamak amacıyla kullanılır. Yine, küresel proteinler ısıtılıp dördüncül yapıları bozularak monomerlerinin ayrıştırılmasında da kullanılabilir. (Simon, 2001; Hames ve Rickwood,1996; Beyazbenli, 2006).



Şekil 1.12. Elektroforezde kullanılan materyaller (Dönmez, 2012).



Şekil 1.13. Proteinlerin elektroforetik saflaştırma aşamaları

(<http://www.norbil.hacettepe.edu.tr> ,31/05/2014 Saat :18.37)

Yaptığımız çalışmada SDS-PAGE yöntemi kullanılarak Lf'nin saflık derecesi kontrol edilmiştir.

1.4. Kriyojel

Kriyojel yunanca kökenli bir sözcüktür. Buz ve soğuk anlamına gelen *kryos* ile jel anlamına gelen *gel* sözcüklerinin bir araya gelmesiyle *kriyojel* sözcüğü oluşmuştur. Monomerik veya polimerik yapıdaki reaktiflerin uygun çözücülerdeki çözeltilerinin dondurulması sırasında şekillenen jel matriksine kriyojel denir. Soğukta yapılan jel anlamına gelen kriyojellerin yapısında birbirine bağlı büyük gözenekler vardır. Bu gözenekler deneysel olarak, herhangi bir büyüklükteki çözünenlerin difüzyonuna, aynı zamanda nano partiküllerin, mikropartiküllerin kütle geçişlerine uygun yapıdadır.

Kriyojeller yapısal olarak sünger morfolojisine sahiptir. Sünger morfolojisine sahip bu gözenek sistemi çözünen maddelerin kriyojel içinden madde kaybı olmadan geçişine olanak sağlar. Kriyojellerin temel yapı, osmotik basınç, kimyasal ve mekanik dayanıklılık gibi özellikleri dikkate alındığında, biyomoleküllerin kromatografisi kriyojel yapıları kullanışlı bir dolgu maddesi haline getirir.

Kriyojellerin üretimi karyotropik jelasyon yöntemiyle yapılır. Bu işlem genellikle dondurma-eritme şeklinde gerçekleştirilir. Kriyojel hazırlama sürecinde ilk aşama monomer, monomer karışımları veya polimer uygun bir çözücünde çözülür. Elde edilen çözelti içerisine uygun çapraz bağlayıcı ve gerekli katalizör eklenir. Hazırlanan karışım donmak üzere belirli bir süre dondurucuda bekletilir. Buz haline dönüşen karışım oda sıcaklığında bekletilerek polimer içinde oluşan buz kristallerinin erimesi sağlanır. Erimeyle birlikte kriyojel oluşumu da başlar. Polimerin sıcaklığı oda sıcaklığına ulaştığında içerisindeki buz kristalleri iyice erir. Elde edilen ve yapısında birbirine bağlantılı gözenekleri içeren yapı kriyojeldir. Termotropik (sıcaklık değişimi ile faz değiştiren) jeller kriyojel hazırlanma sürecinde öncü madde olarak kullanılmaz (Biçen, 2009).

1.4.1. Karyotropik jelasyon işleminin temel karakteristik özellikleri

- Kriyojel öncüsü olan monomer ya da polimeri içeren çözelti çözücü kristalizasyon noktasının birkaç santigrat derece altında dondurulur. Elde edilen donmuş yapı katı faz olarak görünmesine rağmen aslında heterojen yapıya sahiptir. Bu heterojen yapı donmuş çözücü kristalleri içerisinde donmamış sıvı mikro faz içerir.

- Jel öncüleri donmuş yapı içerisindeki donmamış sıvı mikrofaz içerisinde yoğunlaşır.

- Donmuş çözücü kristalleri yapıda gözenek oluşturma işlevini görür. Jel matrisi oda sıcaklığına getirildiğinde çözücü kristalleri erir ve gözenekler meydana gelir. Gözenekler çözücü sıvı ile dolar.
- Çözücü ve jel fazı arasında var olan yüzey tansiyonu, gözeneklerin şeklinin oluşumunda ve gözenek yüzeylerinin pürüzsüz olmasında etkilidir.
- Kriyojelin polimerik yapısı, polimer zincirleri arasında oluşmuş mikro gözenekler içerir. Böylelikle, kriyojeller hem heterofaz hem de hetero gözenekler içerirler.

1.4.2. Jel ve kriyojel arasındaki farklılıklar

Karyotropik jelasyon ile üretilen polimerik materyallerin morfolojik yapıları donmamış sistemlerde üretilen jeller ile karşılaştırıldığında oldukça farklıdır. Kriyojeller kimyasal-kovalent, iyonik veya kovalent olmayan bağlarla oluşabilirler.

Bazı istisnalar ile birlikte, dondurma-kurutma yöntemi ile üretilmiş materyaller çözücüye daldırıldığında (polimer çözünmeden şişer) makro ve mikro yapısı kriyojellere benzer materyaller oluşur. Solventin donması, çözücü kristallerinin süblimleşmesini taklit eder ve polimerik materyal içerisinde birbiri ile bağlantılı gözeneklerden oluşan sistem meydana gelir. Fakat donmamış sıvı mikrofazda jel oluşumu yer almaz.

Dondurularak kurutulmuş materyaller, sadece ince objeler olarak üretilebilirler, örneğin, filmler, plakalar veya küçük boncuklar şeklinde. Teknik açıdan dondurularak kurutulmuş silindirler veya kalın bloklar üretmek hiç de pratik değildir. Bu durumdan farklı olarak, kriyojeller istenilen herhangi bir şekilde üretilebilirler, örneğin, bloklar, silindirler veya diskler şeklinde (Şekil 1.14).

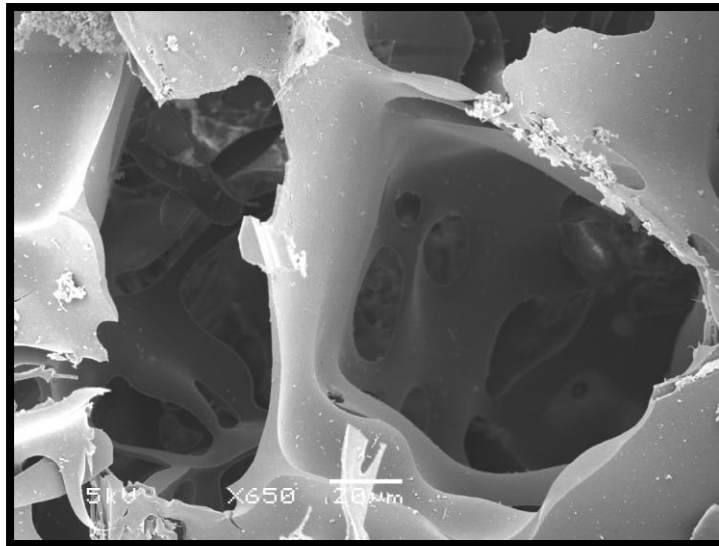
Buna ek olarak, kriyojellerin üretimi dondurularak kurutulmuş materyallerin üretiminden daha basittir, çünkü düşük basınçta çözücü giderimi süreci gerekli değildir.



Şekil 1.14. Farklı şekillerde üretilen kriyojeller (Biçen, 2009).

Geniş, birbiri ile bağlantılı gözenekler kriyojellerin ana karakterini oluşturmaktadır; bazı kriyojeller de süngerimsi morfolojiye sahiptirler. Bu tip süngerimsi jellerde gözenek yapısı çözünen maddelerin konveksiyonel aktarım ile taşınmasını sağlar. Homo faz geleneksel jellerde çözünenlerin difüzyonu kriyojellerdeki kadar kolay değildir.

Kriyojellerin makro gözeneklerinin boyutları, 10 ile 100 mikrometreden sadece birkaç mikrometreye kadar değişir (Şekil 1.15). Birbiri ile bağlantılı geniş gözenekler birçok kriyojeli biyoteknolojik uygulamalar için iyi birer aday haline getirmektedir (Bölgen, 2008).



Şekil 1.15. Kriyojellerin süngerimsi gözenek yapısını gösteren SEM görüntüsü (Biçen, 2009).

1.4.3. Kriyojel yapısına etki eden faktörler

I. Dondurma

Kriyojellerin makro gözenekleri çok farklı (mikrometre) boyutlarda olabilir. Gözenek boyutu farklı değişkenlere bağlıdır. Dondurma sıcaklığı ne kadar düşükse o kadar küçük boyutlu çözücü kristalleri oluşur ve böylece daha küçük boyutlu gözenekler meydana gelir. Daha küçük boyutlu kristaller oluşmasının nedeni, nükleasyonun artması ve birçok küçük kristal oluşumunun birçok yerden başlamasıdır. Ayrıca, düşük sıcaklıklarda, donmamış sıvı mikrofazın hacmi azalır ve böylece daha ince ve fakat daha yoğun gözenek duvarları oluşur.

Dondurma sıcaklığı ne kadar yüksek ise, büyüyen buz kristallerinin boyutu o kadar büyük olur ve daha büyük gözenekli kriyojeller elde edilir. Fakat yüksek dondurma sıcaklığı uygulanan kriyojelasyon rejimlerinde, çözeltilerin donmama süper soğuk duruma gelme riski vardır. Bu yüzden sıcaklık reaksiyon karışımını donduracak şekilde ayarlanmalıdır.

II. Çapraz bağlayıcı miktarı

Kriyojeller hazırlanırken çapraz bağlayıcı miktarı ne kadar az kullanılırsa yapıdaki çapraz bağ oranı da o kadar az olur. Bu da suda şişme oranını o kadar artırır.

III. Konsantrasyonun etkisi

Başlangıç reaksiyonunun konsantrasyonu ne kadar yüksek ise kadar yoğun ve kırılğan matriksler elde edilirken, ne kadar az ise o kadar elastik ve süngerimsi matriksler elde edilir (Bölgen, 2008).

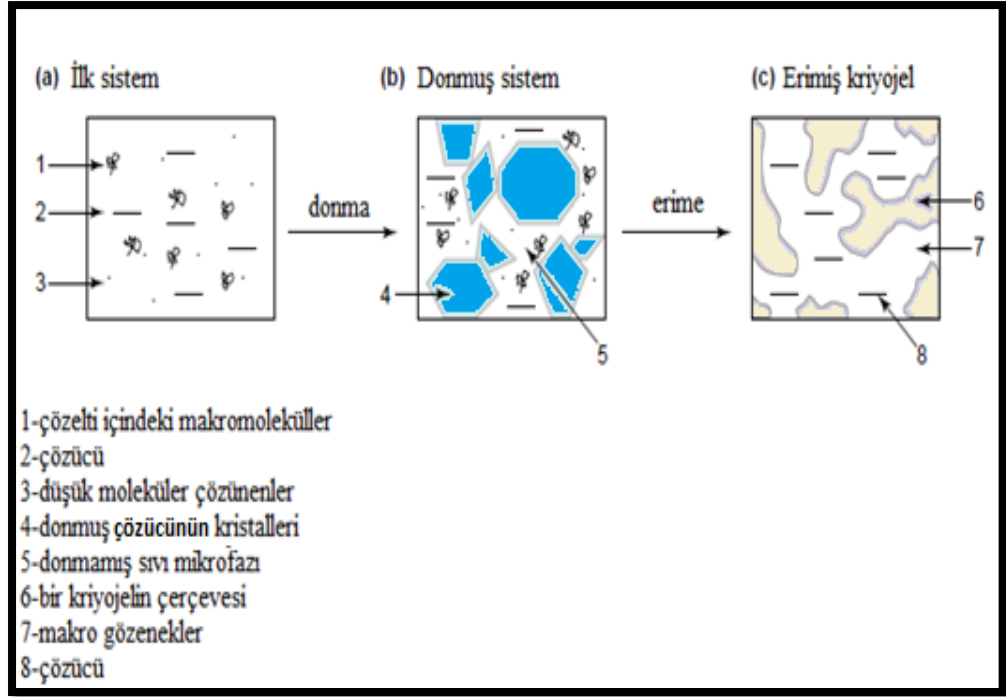
1.4.4. Kriyojel hazırlanması

Bir kriyojel elde etmenin genel prosedürü şu şekildedir (Şekil 1.16):

1. Makromoleküller ile düşük moleküler çözünenlerin (monomer, monomer karışımı veya polimer) çözücü ile birlikte oluşturduğu homojen karışım dondurulur.

2. Dondurulmuş karışımda donmuş çözeltilerin polikristalleri oluşur. Donmuş sistem içerisinde kristallerle birlikte donmamış bir mikrofaz bir arada bulunur.

3. Donmuş sistem kontrollü olarak eritilir. Oda sıcaklığına gelen kriyojellerin polimerik iskeleti oluşur, fakat aynı zamanda çok çok az miktarda çözücü de sistemde bulunmaktadır. Yani kriyojellerin polimer fazı, polimer zincirleri arasında oluşmuş mikro gözenekler içerir. Dolayısıyla kriyojeller hem heterofaz hem de hetero gözenekli bir yapıya sahip olurlar (Vladimir I. L. vd., 2003).



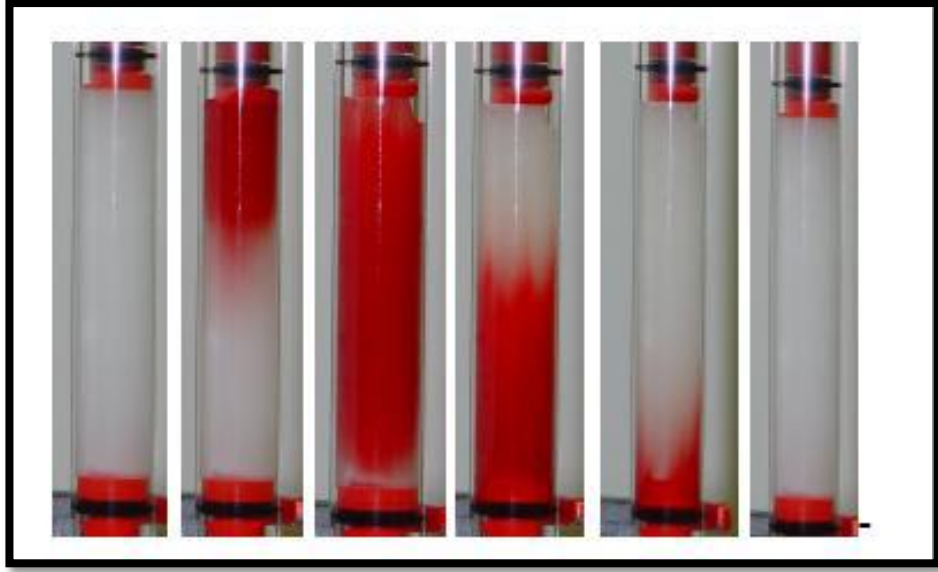
Şekil 1.16. Kriyojellerin oluşum süreci (Vladimir I. L. vd., 2003).

1.4.5. Kriyojellerin uygulama alanları

Kriyojeller kendilerine has mükemmel yapılarıyla kan hücrelerinin ayırımında afinite matriksi olarak (Şekil 1.17), memeli hücrelerinin kültür ortamı olarak, doku mühendisliğinde ve günlük hayatta filtre ve membran olarak kullanılmaktadır.

Kromatografik alanda kolon dolgu maddesi olarak kullanıldıklarında kolonda geri basınç oluşturmadıklarından verimli ayırımlar elde etmede kullanılırlar.

Kan hücrelerinin ayırımında afinite matriksi olarak kullanımına bakıldığında; dimetil akrilamid, N-izopropil akrilamidten sentezlenen kriyojellere protein-A, antibody ya da metal ligandlar gibi spesifik ligandlar immobilize edildiğinde seçici bağlanmayla ayrılması istenen hedef hücrelerin (kök hücre, kanser hücreleri, makrofajlar) kromatografisi için kullanım alanının olduğu görülmektedir.



Şekil 1.17. Kan hücrelerinin kromatografik olarak kriyojel kolondan geçirilmesi (Biçen, 2009).

1.4.6. Kriyojellerin karakterizasyonu

Kriyojellerin karakterizasyonu, taramalı elektron mikroskopuyla (SEM), Fourier dönüşümlü infrared spektroskopisi (FT-IR)'nin azaltılmış toplam yansıma (ATR) moduyla, azot adsorpsiyon porozimetri (BET) yöntemiyle ve şişme testlerinin uygulanmasıyla gerçekleştirilmektedir.

Sunulan tez çalışmamızda sentezlenen P(Anti-Lf-co-HEMA) kriyojelin karakterizasyon işlemleri SEM, IR analizleri, azot adsorpsiyon porozimetri (BET) yöntemiyle yüzey alanı ölçümü ve şişme testi yapılarak gerçekleştirilmiştir.

SEM cihazı ile elde edilen görüntülerle kriyojel yapısı aydınlatılır. Polimerik yapıdaki kriyojelde bulunan gözeneklerin büyüklüğü, gözeneklerin sıklığı vb. bilgilere bu yöntemle ulaşılmaktadır. SEM ile görüntüleme yapmak için önce kriyojel kurutulur ve sonrasında altın ile kaplama yapılarak cihazdan görüntü alınır.

FT-IR analizi ile polimerik yapıdaki kriyojelin sahip olduğu fonksiyonel gruplar belirlenir. Spektrumlar IR cihazının ATR modunda çalışılarak alınır. Bu amaçla kuru haldeki kriyojeller kristal üzerine konular ve üzerine infrared ışığı gönderilerek maddenin spektrumu alınır.

Azot adsorpsiyon porozimetri yöntemiyle, kriyojelin yüzey alanı, gözenek boyutu, gözenek hacmi, parçacık boyutu ve gözenek dağılımı gibi özellikleri

belirlenmektedir. BET metoduna göre yapılan analizlerle $-198\text{ }^{\circ}\text{C}$ deki sıvı azot ortamında azot (N_2) gazı adsorpsiyonu tekniğine dayalı olarak katıların m^2g^{-1} olarak yüzey alanları ölçülebilmektedir.

Şişme testiyle kriyojellerin su tutma kapasitesi ve su tuttuğunda hacmindeki esneme oranı belirlenmektedir. Bir kriyojel kolonda su tutma kapasitesinin fazla olması kolonun istenilen süngerimsi gözenek yapısına sahip olduğunu göstermektedir. Esneme oranı fazla olduğunda ise kriyojel kolonun gözenek boyutu kolondan geçecek her molekülün boyutuna uyum sağlayabileceği ve hedef molekül kolondan geçerken gözenekli yapının herhangi bir zarar görmeyeceği anlamına gelmektedir. Böylece; kriyojel kolonlar tekrar tekrar kullanılarak düşük maliyette ve yüksek saflıkta ürünler elde edilmiş olacaktır.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Standart Lf (mouse monoclonal B-8), Santa Cruz Bioteknoloji firmasından temin edilmiştir. İnek sütü örneği Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Öğrenci Kantininden temin edilmiştir. Akrilamid (AAm, %99) Sigma–Aldrich’ten temin edilmiştir. Amonyum Persülfat (APS), N, N'- Metilen bisakrilamid (MBAAD) Fluka, Chemica ve N, N, N', N'- Tetrametiletildiamin (TEMED) Fluka, BioChemica firmalarından elde edilmiştir. 2-hidroksietil metakrilat (HEMA), tris hidroksimetil aminomethan (Tris) Merck firmasından elde edilmiştir. Sodyum dihidrojen fosfat dihidrat ve potasyum dihidrojen fosfat Riedede Haen ve sodyum dodesil sülfat Alfa Aesar firmasından temin edilmiştir.

Tüm cam malzemeler kullanılmadan önce seyreltilmiş HNO₃ çözeltisi ile yıkanmıştır. Deneylerde kullanılan su; yüksek akışlı selüloz membranlı Branstead (Dubuque, IA) Ropure LP®ters ozmoz ünitesinde işleme tabi tutulduktan sonra Barnstead D3804 NANOpure® organik/kolloidal uzaklaştırma ve dolgulu iyon değişim sistemi kullanılarak saflaştırılmıştır. Tampon ve örnek çözeltileri 0.2 µm membran’dan (Sartorius, Göttingen, Germany) geçirilerek filtre edilmiştir.

2.1.2. Kullanılan cihazlar

Adsorpsiyon-desorpsiyon çalışmaları için hazırlanan standart Lf çözeltilerinin absorbansları, Biotek marka Synergy Hydrid Reader (H1) model mikroplate okuyucu kullanılarak ölçülmüştür. Çözeltilerin homojenizasyonu için Bandelin Sonorex ultrasonik banyo kullanılmıştır. Çözeltilerin pH değerleri WTW Series pH 730 Inolab-pH-metresi ile ayarlanmıştır. Kriyojel karakterizasyon işlemi için Zeiss Ultra Plus SEM, Bruker IFS 66 v/S marka FTIR cihazı kullanılmıştır. Ayırma ve saflaştırma basamağında Amersham Biosciences Akta FPLC model hızlı protein sıvı kromatografisi cihazı kullanılmıştır. Saflaştırılan Lf karakterizasyonunda Thermo Scientific EC 250-90 SDS-PAGE elektroforez güç kaynağı ve Cleaver Scientific Ltd. SDS- PAGE küveti kullanılmıştır.

2.1.3. Hızlı protein sıvı kromatografisi (FPLC)

Hızlı protein sıvı kromatografisi (FPLC), kompleks karışımlardan proteinlerin ayrılmasını veya saflaştırılmasını sağlayan bir kromatografi cihazıdır. Yüksek basınçlı sıvı kromatografisinden (HPLC) farklı olarak daha düşük basınçlarda çalışır ve genellikle cam veya teflon bileşenlerden oluşur. Cihaz genellikle biyokimya ve enzimoloji alanlarında kullanılır (Kunz ve Lonnerdal, 1989).

FPLC ile kullanılan kolonlar; makromolekülleri, yük, boyut, hidrofobisite veya biyotanıma esaslarına göre ayırabilirler. Bu nedenle amaca yönelik uygun bir kolon seçmek gereklidir. Sistem protein, peptid vb. ayırımlarını kısa sürede gerçekleştirebilen bir sıvı kromatografi sistemidir. Aynı zamanda mikro düzeyde saflaştırma ve preparatif bazda HPLC analizleri yapmak için uygundur. FPLC cihazı ayrılan türlerin UV absorbansını ölçmekle birlikte; ortamın, iletkenlik ve pH ölçümünü de yapabilmektedir.

Hızlı Protein Sıvı Kromatografisi (FPLC), dörtlü bir pompa, UV-Vis, floresans ve kırılma indisi dedektörleri, bir kolon fırını, enjektör birimi ve fraksiyon toplama parçalarından oluşmuştur. Sistem protein, peptid vb. ayırımlarını kısa sürede gerçekleştirebilen bir tür hızlı performans sıvı kromatografi sistemidir. Aynı zamanda mikro düzeyde saflaştırma ve preparatif boyutta HPLC analizleri yapmak için uygundur (Diltemiz, 2011).

2.1.3.1. FPLC cihazı



Şekil 2.1. Deneysel çalışmalarda kullanılan FPLC cihazı

1) Dedektörler

- **UV-Vis dedektör:** Ksenon flaş hem UV görünür bölge aralığında çalışır (190-700nm).
- **Floresans dedektör:** Floresans dedektörüyle luminesans, fosforesans, kemilüminesans ve bioluminesans ölçümleri mümkündür.
- **Kırılma indisi dedektörü:** Polimerler, hidrokarbonlar, karbonhidratlar, alkoller ve yağ asitleri gibi absorbans yapamayan bileşiklerin analizleri için idealdir.

2) Pompalar: Güçlü mekanik motoru 4000 psi (275 bar) geri basınçlarına kadar karşılığında 50ml/dak pompalayabilir.

3) Fraksiyon toplayıcısı: 18 mm çapındaki tüpler için 144 parça kapasitesi vardır.

4) Kolonlar

- **İyon-değiştirme metodu için:** Sefarozla önceden paketlenmiş Q XL or SP XL ortamı, 20 ml preparatif anyon ve katyon değişim kolonları yüksek yükleme kapasitesi ve hızlı elüsyon sağlar.
- **Jel filtrasyon metodu için:** Hiload 16/60 superdex 200pg ve Hiload 26/60 superdex 75pg kolonları bulunur. Superdex 75 prep peptidler, daha büyük proteinler, oligosakkaritler yani Mr 3000-70000, için uygundur.

5) Örnek özellikleri: 100µL-5mL arasında berrak ve safsızlıklardan arındırılmış sıvı örnek. Biliniyorsa protein miktarı veya derişimi de verilmelidir.

6) Uygulamaları: Peptidlerin, proteinlerin, antikorların, nükleik asitlerin ve oligosakkaritlerin ayrılması ve karakterizasyonu ([merlab.metu.edu.tr.](http://merlab.metu.edu.tr), 13/05/2014 Saati,14:10)

2.1.4. Taramalı elektron mikroskobu (SEM)

İnsan gözünün çok ince ayrıntıları görebilme olanağı sınırlıdır. Bu nedenle görüntü iletimini sağlayan ışık yollarının mercekle değiştirilerek, daha küçük ayrıntıların görülebilmesine olanak sağlayan optik cihazlar geliştirilmiştir. Ancak bu cihazlar, gerek büyütme miktarlarının sınırlı oluşu ve gerekse elde edilen görüntü

üzerinde işlem yapma imkânının olmayışı nedeniyle araştırmacıları bu temel üzerinde yeni sistemler geliştirmeye itmiştir. Elektronik ve optik sistemlerin birlikte kullanımı ile yüksek büyütme üzerinde işlem ve analizler yapılabilen görüntülerin elde edildiği cihazlar geliştirilmiştir. Elektrooptik prensipler çerçevesinde tasarlanmış taramalı elektron mikroskobu (Scanning Electron Microscope-SEM), bu amaca hizmet eden cihazlardan birisidir.

Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) birçok dalda araştırma-geliştirme çalışmalarında kullanımı yanında biyolojik bilimlerde, tıp ve kriminal uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. İlk ticari taramalı elektron mikroskobu 1965' de kullanılmaya başlanmış, bundan sonra teknik gelişmeler birbirini izlemiştir.

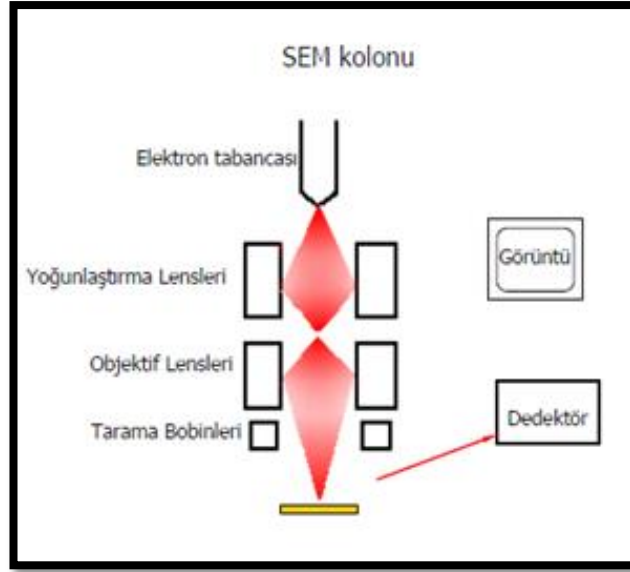
SEM' in çalışma prensibinde yüksek voltaj ile hızlandırılmış elektronlar örnek üzerine odaklanır. Elektron ve örnek atomları arasında oluşan çeşitli girişimler sonucunda meydana gelen etkiler uygun algılayıcılarda toplanır. Sinyal güçlendiricilerinden geçirildikten sonra bir katot ışınları tüpünün ekranına aktarılmasıyla görüntü elde edilir. Günümüzde SEM' in ayırım gücü 0,05 nm'ye kadar inmiştir. Büyütme miktarı ise 5X - 300 000X arasında değişmektedir.

Modern sistemlerde bu algılayıcılardan gelen sinyaller dijital sinyallere çevrilip bilgisayar monitörüne de verilmektedir.

Gerek ayırım gücü (resolution), gerek odak derinliği (depth of focus) gerekse görüntü ve analizi birleştirebilme özelliği, taramalı elektron mikroskobunun kullanım alanını genişletmektedir. Örneğin 1000X büyütmede optik mikroskobun odak derinliği yalnızca 0.1 µm iken taramalı elektron mikroskobunun odak derinliği 30 µm' dir.

Geleneksel SEM incelemesi için örnekler iletken olmalıdır. Bu nedenle metalik olmayan örneklerin kurutulduktan sonra, vakumlu ortamda ve argon gazı varlığında kaplanmaları gereklidir. Kaplama materyali olarak genellikle altın kullanılmakla birlikte; platin, osmiyum, iridyum, tungsten, krom, grafit gibi metaller de kullanılabilir. Örnekler statik elektrik şarjını önleyecek kadar iletken olsalar dahi, çözümülemeyi artırmak ve sinyalleri kuvvetlendirmek için kaplanmaları önerilir.

Taramalı elektron mikroskobu yöntemi ile çok detaylı gözlem yapılabilen, fakat büyütme derecesinden dolayı sadece çok küçük alanlar incelenebilmektedir (malzembilimi.net, 16.05.2014 Saat 18.30; Ünver, 2011).



Şekil 2.2. SEM donanımının şematize edilmesi (<http://www2.aku.edu.tr>, 16.05.2014 Saat 18:33).

2.2. Yöntem

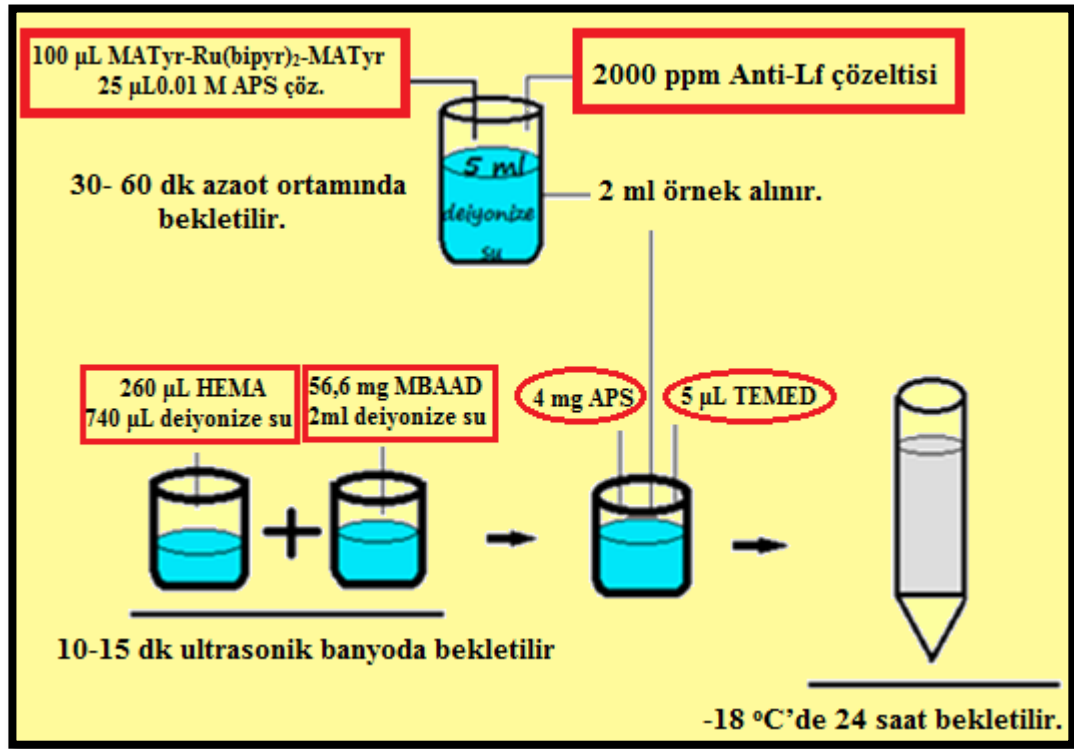
Gerçekleştirdiğimiz tez çalışmasında yapılan deneysel çalışmalar genel olarak üç başlık altında toplanabilir:

1. P(Anti-Lf- co- HEMA) kriyojel kolon hazırlanması
 - P(Anti-Lf- co- HEMA) kriyojel kolon karakterizasyon işlemleri
2. İnek sütünden Lf'nin saflaştırılması
 - İnek sütünden Lf'nin kromatografik ayırımı
 - Saflaştırılan Lf'nin karakterizasyon işlemi
3. Adsorpsiyon-desorpsiyon çalışmaları

2.2.1. P(Anti-Lf- co- HEMA) kriyojel kolon hazırlanması

Lf'nin inek sütünden kromatografik ayırımında kullanılmak üzere biyouyumlu, büyük gözenekli ve geri basınç üretmeksizin ayırım sağlayan fotosensitif P(Anti-Lf- co- HEMA) kriyojel sentezlenmiştir.

Kriyojel Sentez Aşamaları:



Şekil 2.3. Fotosensitif P(Anti-Lf-co-HEMA) kriyojel sentezinin şematize edilmesi.

1) ANADOLUCA yöntemiyle kriyojel elde etmek üzere ilk işlem olarak 5ml deiyonize suda 2000 ppm'lik anti-Lf çözeltisi hazırlanmıştır. Üzerine 100 µL MATyr-Ru(bipyridine)₂-MATyr çözeltisi ilave edilmiştir (Say R. vd., 2011). İkinci işlem olarak 0,02 g APS 5 ml suda çözünerek 0,01 M'lık çözelti hazırlanmıştır. Bu çözeltiden 25 µL karışıma ilave edilmiş ve daha sonra azot ortamında 30-60 dk karışması beklenmiştir.

2) Birinci faz olarak 260 µL HEMA'ya, 740 µL deiyonize su eklenmiştir. Oluşan karışım, ultrasonik karıştırıcıya konularak homojenize edilmiştir.

3) 56,6 mg MBAAD'e 2 mL deiyonize su eklenerek ikinci faz elde edilmiş ve oluşan karışım homojenize edilmiştir. Elde edilen iki faz birleştirilmiş ve üzerine 1. maddede hazırlanışı açıklanan 2000 ppm'lik anti-Lf çözeltisinden 2 mL eklenerek çoklu karıştırıcıda homojenizasyon sağlanmıştır.

4) Daha sonra bir süre buz banyosunda bekletilerek üzerine soğukta polimerizasyon başlatıcısı olarak 4 mg APS eklenmiş ve çoklu karıştırıcıda 10 dk

bekletilmiştir. $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de bekletilen şırınga içerisine homojenize olmuş karışım konulmuş ve soğukta polimerleşmeyi sağlayan $5\text{ }\mu\text{L}$ TEMED eklenerek $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de buz banyosunda 2 saat bekletildikten sonra $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 24 saat bekletilmiştir.

5) Elde edilen kolon materyali, fotosensitif P(Anti-Lf-co-HEMA) kriyojelidir.



Şekil 2.4. Şırınga içerisinde elde edilen kriyojel kolon.

2.2.1.1. P(Anti-Lf-co-HEMA) kriyojel kolon karakterizasyon işlemleri

Yaptığımız tez çalışmasında P(Anti-Lf-co-HEMA) kriyojel kolonun karakterizasyon işlemlerinde yapılan deneysel çalışmalar şişme testi, yüzey morfolojisi analizi, BET yöntemi ile yüzey analizi ve FTIR analizi yapılarak incelenmiştir.

- **Şişme Testi**

Tez kapsamında sentezlenen gözeneklerine Anti-Lf çapraz bağlanmış kriyojellerin su tutma oranı şişme testleriyle ölçülmüştür. Şişme testini uygulamak için sentezlenen kriyojel kurutulmuş ve kurutulan kriyojelin su tutma oranı deiyonize su kullanılarak volumetrik yöntemle belirlenmiştir. Öncelikle kuru kriyojel mezüre konulup en üst noktası tüpte işaretlenmiştir ve sonrasında tüp deiyonize su ile doldurularak oda sıcaklığında şişmesi her 30 dakikada bir kriyojelin yüksekliğinin işaretlenmesi ile belirlenmiştir. Tüpteki şişmiş kriyojelin yüksekliği E.2.1'e göre şişme oranının hesaplanmasında kullanılmıştır.

$$\text{Şişme oranı (\%)} = [(h_{\text{şişmiş}} - h_{\text{kuru}})/h_{\text{kuru}}] \times 100 \quad (\text{E.2.1})$$

$h_{\text{şişmiş}}$: şişen kriyojelin yüksekliği

h_{kuru} : kuru kriyojelin yüksekliği

- **Yüzey Morfolojisi Analizi**

Gözeneklerine anti-Lf çapraz bağlanmış kriyojellerin yüzey morfolojisi, Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) (Zeiss Ultra Plus) kullanılarak belirlenmiştir. Örnekler analiz edilmeden önce kurutulmuş ve kuru kriyojeller örnek haznesine yerleştirilmiş, altın ile kaplandıktan sonra SEM ile görüntüleri alınmıştır.

- **FTIR- ATR Analizi**

Kolon içerisinde anti-Lf çapraz bağlanmış kriyojellerin FTIR spektrumları, FTIR spektrometresinde ATR modu kullanılarak elde edilmiştir. FT-IR spektrumları hafifletilmiş toplam yansıtma (ATR; Attenuated Total Reflectance) yöntemi kullanılarak görüntülenmiştir. Bu yöntem; absorpsiyon bantlarının dalga boyunda azalma meydana getirerek daha az emekle ve örnek kalınlığından bağımsız olarak soğurganlığı çok fazla olabilen farklı maddelerin spektrum analizlerine olanak sağlayabilmektedir.

Kriyojeller oda sıcaklığında kurutulmuş ve FTIR spektrumları çekilmiştir.

- **BET yöntemi ile yüzey alanı ölçümü**

1 g kriyojel tartılarak BET yöntemiyle yüzey analizi yapan Quantachrome Nova 2200e marka cihaza yerleştirilmiştir. Sıvı azot ile muamele edilerek ilk önce kriyojellerin gözeneklerinde bulunabilecek su uzaklaştırıldıktan sonra yapının fiksasyonu yapılmıştır. 10 noktaya analiz yapılarak kriyojelin 1 gramının yüzey alanı bulunmuştur.

2.2.2. İnek sütünden laktoferrinin saflaştırılması

Bu tez çalışmasında inek sütünden Lf'nin saflaştırılması amacıyla gerçekleştirilen deneysel çalışmalar; inek sütünün homojenizasyon işlemi, inek sütünden Lf'nin kromatografik ayırımı, saflaştırılan Lf karakterizasyon işlemleri olmak üzere üç alt başlık altında gerçekleştirilmiştir.

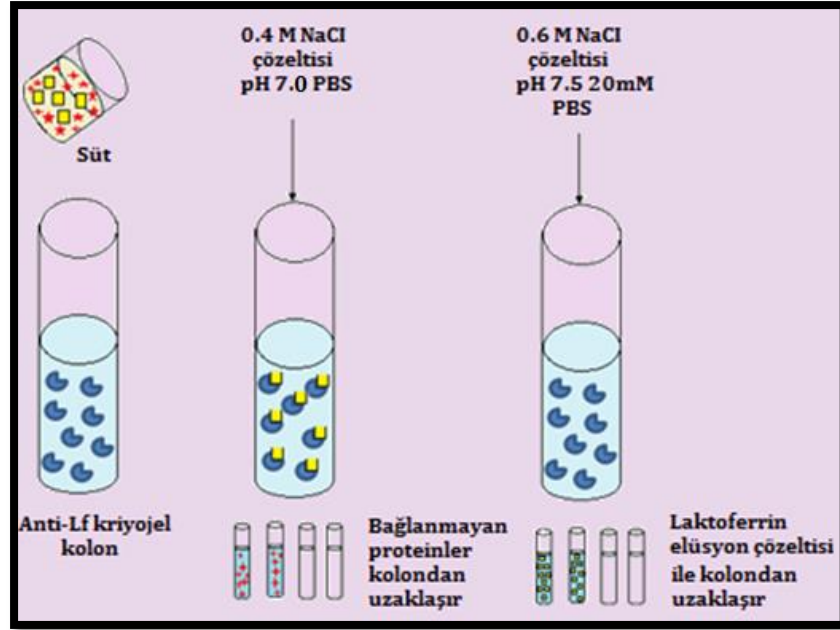
2.2.2.1. İnek sütünün homojenizasyon işlemi

Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Öğrenci Kantini'nden alınan 200 mL'lik inek sütünden 3 mL alınıp yağ, lipid vb. bileşenleri ayırmak için mavi süzgeç kağıdından süzme işlemi yapılmıştır.

2.2.2.2. İnek sütünden laktoferrinin kromatografik ayrımı

Homojenize edilmiş inek sütünden Lf ayırımını sağlamak için FPLC cihazı ve kolon dolgu maddesi olarak gözeneklerine anti-Lf çapraz bağlanmış P(Anti-Lf-co-HEMA) kriyojel kullanılmıştır. Yapılan testler sonucunda optimum akış hızı 2.0 mLdk-1 olarak belirlenmiştir. Tutma çözeltisi olarak PBS tamponunda 0,4 M NaCl çözeltisi (pH 7.0) kullanılmıştır. Lf tutma çözeltisi yardımıyla P(Anti-Lf-co-HEMA) kriyojel kolona taşınmıştır. Hazırlanan P(Anti-Lf-co- HEMA) kriyojel kolonda Lf hapsedilirken inek sütünde bulunan diğer biyolojik materyaller kolona tutunmadan sistemi terk etmiştir.

Lf, iyonik gücün fazla olduğu fizyolojik, bazik pH 'larda anti-Lf molekülüne afinite göstermemektedir. Bu özellikten yararlanılarak 20 mM sodyum fosfat (pH 7,5) tamponu içerisinde 0,6 M NaCl çözeltisi elüsyon çözeltisi olarak kullanılmıştır. Böylece; anti-Lf ile Lf etkileşimi inhibe edilerek P(Anti-Lf-co-HEMA) kriyojel kolonda tutulan Lf'nin kolondan uzaklaştırılması sağlanmıştır (Şekil 2.5). Kolondan çıkan Lf toplama kabına aktarıldıktan sonra liyofilizasyon işlemine tabi tutularak elüsyon çözeltisinin uzaklaştırılması sağlanmıştır.



Şekil 2.5. İnek sütünden Lf'nin FPLC cihazı ile ayrımının şematize edilmesi.

2.2.2.3. Saflaştırılan laktoferrinin karakterizasyon işlemi

İnek sütünden kromatografik ayrımı gerçekleştirilen Lf'nin karakterizasyonu ve saflaştırılması sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel (SDS-PAGE) elektroforezi ile gerçekleştirilmiştir.

- **SDS-PAGE**

SDS PAGE yöntemi proteinlerin saflığının kontrolü, molekül ağırlıklarının saptanması ve konsantrasyon çeşitliliğinin belirlenmesi amacıyla kullanılmaktadır. Molekül ağırlığı bilinmeyen örnek, molekül ağırlığı bilinen standart proteinlerle birlikte, aynı jel üzerinde yan yana ceplere uygulanır ve ayrı hatlarda elektroforetik olarak ayrılır. Boyama sırasında jelde gözlenen bantların karşılaştırılması ile proteinin molekül ağırlığı hakkında bir fikir edinilebilir.

Sunulan tez çalışmasında dikey jel elektroforezi hazırlanmıştır. Cam plaklar arasında 1,5 mm 'lik aralık bırakılarak, jelin dökülmesi için döküm ayağına cam plaklar monte edildi. Ayırıştırma ve yürütme jeli olarak % 10'luk poliakrilamid jel hazırlanmış ve cam plaklar arasında jel çözeltisi dökülmüştür. Daha sonra örneklerin jel üzerinde ilerleyebileceği kuyucukların oluşmasını sağlayan tarak dikkatlice yerleştirilmiş ve jel polimerleşmeye bırakılmıştır. Jel polimerleştikten sonra, tarak dikkatlice çıkarılmış ve örnekler kuyucuklara uygulanmadan önce kuyucuklar rezervuar tamponu ile

Jel tamponu	3,9 mL
% 10 'luk SDS	0,15 mL
% 10 APS	0,15 mL
TEMED	0,006 mL
dH ₂ O	5,814 mL

- h)** Boyama çözeltilisi (% 0.025 CBBR, % 40 Metanol, % 7 Asetik asit) 0.5 Coomassie brilliant blue R-250, 800 mL metanol içinde çözülünceye kadar karıştırılmış ve 140 mL asetik asit ilave edilip hacim, su ile 2 litreye tamamlanmıştır.
- i)** Boya çıkarma çözeltilisi I (% 50 metanol, % 10 asetik asit) 500 mL metanol üzerine 100 mL asetik asit ilave edildikten sonra toplam hacim su ile 1 litreye tamamlanmıştır.
- j)** Boya çıkarma çözeltilisi II, (% 5 metanol, % 7 asetik asit) 100 mL metanol üzerine 140 mL asetik asit (glacial) ilave edildikten sonra toplam hacim su ile 2 lt 'ye tamamlanmıştır.
- k)** Numune ve Standart Çözeltileri
Saflaştırılan Lf numunemizden 0,008 g tartılmış ve distile su ile 40 µL' ye tamamlanmıştır. Yine aynı şekilde standart olarak kullanılan ticari Lf'den de 0,008 g tartılmış ve distile su ile 40 µL' ye tamamlanmıştır.

SDS-PAGE için molekül ağırlığı standardı olarak ticari Lf kullanılmıştır. 10'ar µL numune ve standart çözeltileri üzerine 10'ar µL 5 x SDS-PAGE yükleme çözeltilisi eklenmiştir. Numune ve standart çözeltileri 3 dk kaynar su banyosunda bekletilerek denatüre edilmiş ve buz banyosuna alınarak soğumaya bırakılmıştır. Çözeltiler soğuduktan sonra 10 'er µL alınarak kuyucuklara otomatik pipet ile yüklenmiştir. Kuyucuk başı 20 mA akım verilerek elektroforez başlatılmış ve işaret boya bandı jelden çıkmadan elektroforez işlemi durdurulmuştur. Elektroforez işlemi yaklaşık 4 saat sürmüştür. Jel dikkatlice elektroforez kabininden çıkarıldıktan sonra boyama çözeltilisi içine konulmuş ve 24 saat süre ile boya içerisinde bırakıldıktan sonra, boyama

çözeltisinden çıkarılarak distile su ile yıkanmıştır. Daha sonra, boya çıkarma 1 çözeltisinde 3-4 saat süre ile karıştırıcı ile çalkalanarak bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda boya çıkarma çözeltisi II'ye alınmış ve böylece jel yüzeyindeki boya tamamen uzaklaştığında sadece protein bantları boyalı kalmıştır.

2.2.3. Adsorpsiyon- desorpsiyon çalışmaları

Sulu çözeltilerden, Lf adsorpsiyonu kesikli sistemde çalışılmıştır. Adsorpsiyon-desorpsiyon çalışmaları için başlangıç derişimi etkisi ve akış hızı çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Başlangıç derişimi etkisini incelemek üzere 3 ppm, 5 ppm, 7 ppm ve 10 ppm'lik standart çözeltisi mikropate okuyucuda okutulmuş ve kalibrasyon grafiği elde edilmiştir. Daha sonra 4 mg anti-Lf çapraz bağlı kriyojelden standart çözeltiler geçirilerek tekrar mikropate okuyucuda (Biotek marka Synergy Hybrid Reader (H1)) okutulmuş ve Lf derişimi spektrofotometrik olarak 280 nm' de tayin edilmiştir. Cihazın cevabı bilinen derişimdeki Lf standart çözeltileri ile periyodik olarak kontrol edilmiştir. Birim kütle başına, gözeneklerine anti-Lf çapraz bağlanmış kriyojellere adsorplanan Lf miktarlarının hesaplanmasında E.2.2 eşitliği kullanılmıştır.

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

Bu eşitlikte Q, birim polimer kriyojel başına adsorplanan Lf miktarını (mgg^{-1}), C_0 ve C sulu çözeltideki Lf'nin başlangıç ve son derişim değerlerini (mgL^{-1}), V sulu çözelti hacmini (mL) ve m ise kullanılan kriyojellerin kütlelerini (g) vermektedir.

2.2.3.1. P(Anti-Lf-co-HEMA) kriyojellerin Lf adsorpsiyonuna akış hızının etkisi

Gözeneklerine anti-Lf çapraz bağlanmış P(Anti-Lf-co-HEMA) kriyojelin Lf adsorpsiyonuna akış hızının etkisi FPLC'de çalışılarak incelenmiştir. Hazırlanan P(Anti-Lf-co-HEMA) kriyojel FPLC de kolon dolgu maddesi olarak kullanılmış 0.3, 0.5, 0.8, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 mLdk^{-1} akış hızlarında çalışılarak Lf'nin ayrımı için optimum akış hızı belirlenmiştir.

2.2.3.2. Anti-Lf çapraz bağlanmış kriyojellerden laktoferrin desorpsiyon işlemleri

Kriyojel gözeneklerine adsorbe olan Lf, fosfat tamponu pH 7.5 içerisinde 0.6 M NaCl çözeltisi kullanılarak desorbe edilmiştir. Desorpsiyon çalışmalarında desorpsiyon reaktifi, kriyojelden periyodik olarak geçirilmiştir. Kolondan çıkan çözelti içerisine

alınan Lf spektrofotometrik yöntemle tayin edilmiştir. Kriyojel kolonlardan Lf'nin desorpsiyon yüzdelерinin hesaplanmasında E.2.3 eşitliğine kullanılmıştır.

$$\text{Desorpsiyon (\%)} = \frac{\text{Desorpsiyon ortamına salınan Lf}}{\text{Adsorplanan Lf}} \times 100 \quad (\text{E.2.3})$$

Lf adsorpsiyonu için hazırlanan kriyojellerin tekrar kullanılabilirliğinin test edilmesi amacıyla Lf adsorpsiyon ve desorpsiyon çalışmaları 10 kez aynı kriyojel kolonda gerçekleştirilmiştir.

2.2.3.3. P(Anti-Lf-co-HEMA) kriyojellerin laktoferrin adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisi

Tez çalışması kapsamında sentezlenen kriyojellere Lf'nin adsorpsiyonuna ilişkin iyonik şiddetin etkisini incelemek üzere farklı konsantrasyonlarda hazırlanan NaCl çözeltileri kullanılmıştır.

3. SONUÇLAR, TARTIŞMA VE ÖNERİLER

3.1. P(Anti-Lf-co-HEMA) Kriyojel Kolon Karakterizasyonu

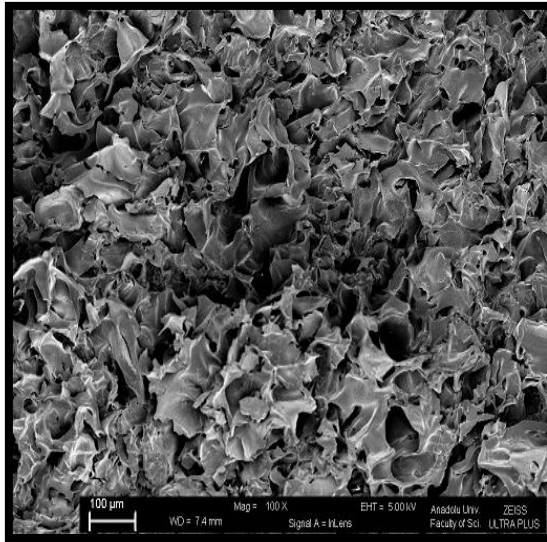
3.1.1. Şişme testi

Gözeneklerinde Anti-Lf çapraz bağlanmış P(Anti-Lf-co-HEMA) kriyojelin denge şişme oranı % 182,58 olarak bulunmuştur. P(Anti-Lf-co-HEMA) kriyojel opak, elastik ve süngerimsi yapıya sahiptir. Bu kriyojel, gözeneklerinde bulunan suyu elle basınç uygulanarak kolaylıkla dışarıya verebilir. Basınç uygulanmış kriyojel parçası su içerisine bırakıldığında birkaç saniye içerisinde suyu gözeneklerinde depolayarak normal şeklini ve boyutunu alır. Kriyojellerin karakteristik özelliklerine bakıldığında hacimlerinin % 150'sine kadar su tutma kapasitesine sahip olduğu görülmektedir. Bu bilgi ışığında, sentezlenen P(Anti-Lf-co-HEMA) kriyojelin oldukça hidrofilik yapıda olduğu görülmektedir.

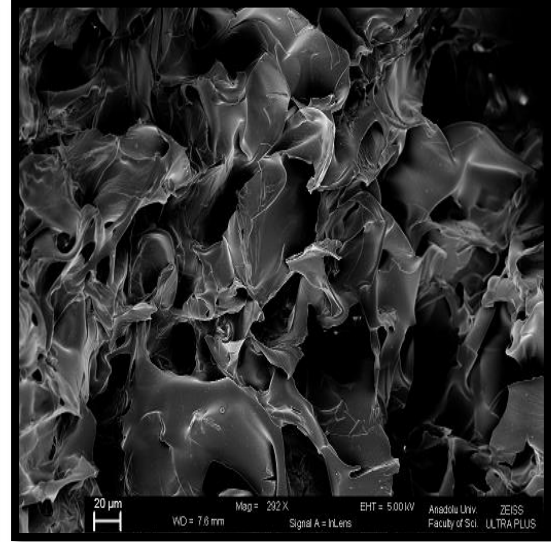
3.1.2. Yüzey morfolojisi analizi

Gözeneklerinde Anti-Lf çapraz bağlanmış kriyojelin yüzey morfolojisi taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak analiz edilmiştir.

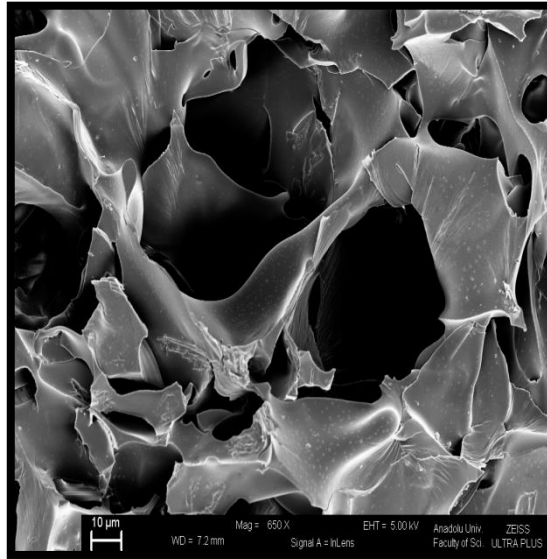
Elde edilen kriyojelde gözenek dağılımı ve yapıdaki gözenek örgüsü homojen yapıdadır. Kriyojelin gözenek büyüklüğü Lf moleküllerinin boyutundan daha büyük olup kolondan Lf'nin geçişi kolaylıkla gerçekleşmektedir. Kriyojellerin gözenek yoğunluğu ve geniş gözeneklere sahip olması düşük akış direnci sağladığından, yüksek kapasitede ayırma sağlamaktadır. Anti-Lf akrilamid kriyojel gözenekleri içerisine çapraz bağlanmış ve Lf ayrımı için gözenekli, yüzey alanı geniş, katı bir destek maddesi oluşturmuştur.



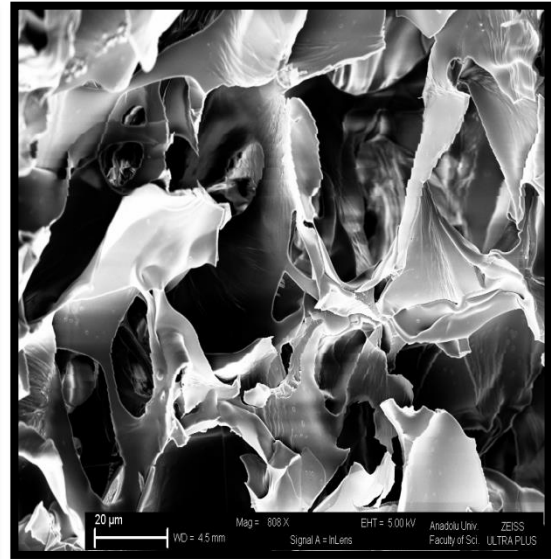
(a)



(b)



(c)



(d)

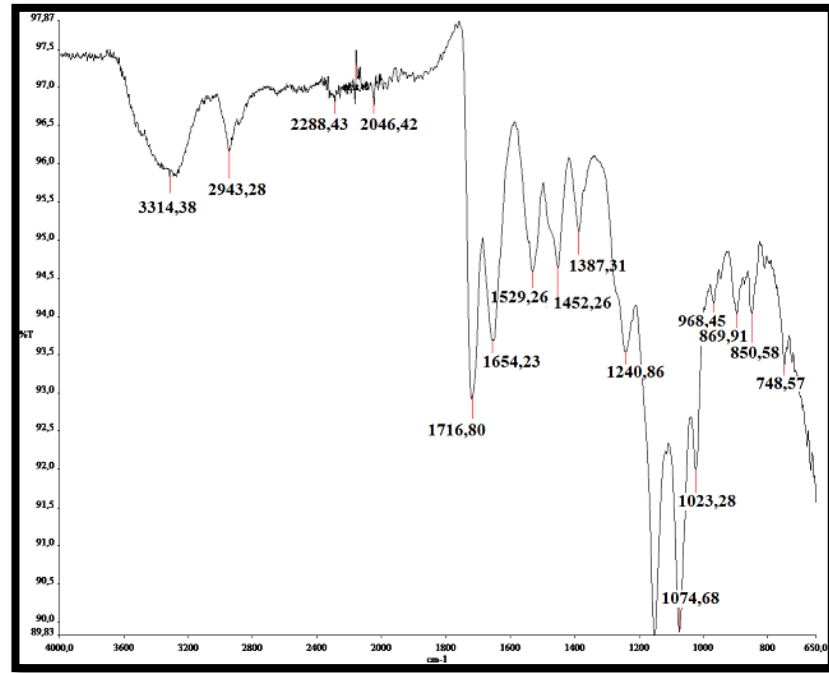
Şekil 3.1. P(Anti-Lf-Co-HEMA) (a) 100X (b) 292X (c) 650X (d) 808X büyütme oranlarında kriyojel SEM görüntüleri.

3.1.3. BET yöntemi ile yüzey alanı ölçümü

Anti-Lf çapraz bağlanmış kriyojelin spesifik yüzey alanı BET yöntemi ile $30.5 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Literatürle kıyaslandığında, Baydemir ve ark.'nın "Süpermakroporlu P(HEMA) tabanlı kriyojeller bilirubin baskılı partikül gömülmesi" adlı çalışmasında PHEMA kriyojellerin yüzey alanı $14.2 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$ bulunmuştur (Baydemir

vd.,2009). Akkuş B.'nin ‘‘Penisilin G Açılaz Saflaştırılması İçin Yeni Destek Materyali’’ adlı yüksek lisans tezinde hazırlanan kriyojellerin spesifik yüzey alanı $25.8 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$ bulunmuştur (Akkuş, 2012). Sonuç olarak sentezlenen kriyojellerin yüzey alanları ne kadar büyük olursa gözeneklerine daha fazla Lf molekülü tutunabilecek ve böylelikle daha fazla miktarda Lf saflaştırılacaktır.

3.1.4. FT-IR analizi



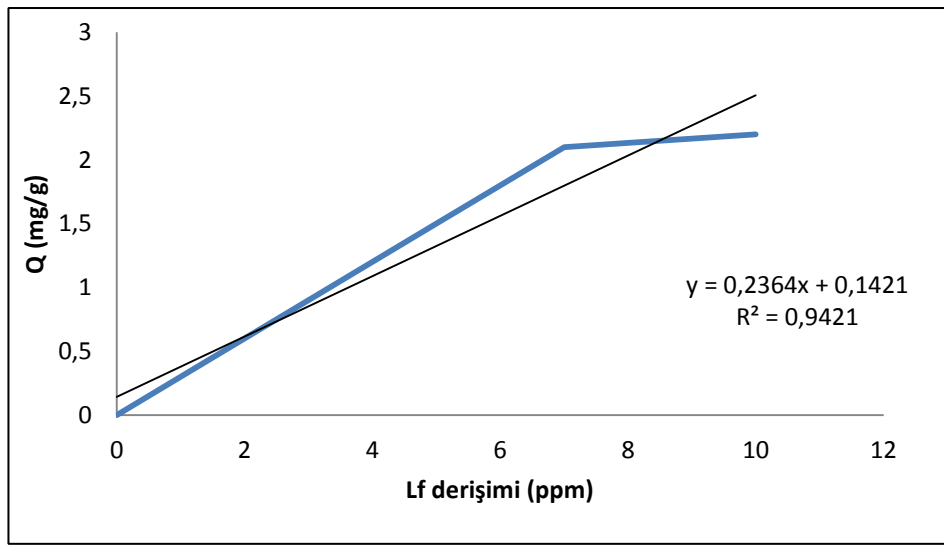
Şekil 3.2. Gözeneklerine Anti-Lf çapraz bağlanmış akrilamid temelli kriyojel FTIR spektrumu.

Kriyojel akrilamid temelli olduğu için akrilamid kriyojelin karakteristik pikleri olan 1717 cm^{-1} C=O bandı, 1654 cm^{-1} N-H bandı eğilmesi (akrilamidteki karakteristik -CONH₂ grubuna ait pik), 3314 cm^{-1} aminoasitlere ait N-H gerilmesi, 1452 cm^{-1} C-H eğilme bandı pikleri görülmektedir. Ayrıca antikora ait aminoasitlerin içerdiği karboksilik asitlerin hidroksil bandı varlığı 3300 cm^{-1} civarındaki genişlemeden de anlaşılmaktadır.

3.2. Anti-Lf İçeren Kriyojellerde Adsorpsiyon Çalışmaları

3.2.1. Laktoferrinin başlangıç derişiminin etkisi

Şekil 3.3’de kriyojel gözeneklerine adsorplanan Anti-Lf moleküllerinin Lf başlangıç derişimine etkisi verilmiştir. Kriyojelin birim kütlesi başına adsorplanan Anti-Lf miktarı, Lf başlangıç derişiminin artması ile artmıştır. Kriyojel polimerinin aktif bağlanma boşluklarının doygunluğa ulaşması, Lf derişiminin 10 mgL^{-1} değerine ulaşmasına kadar devam etmektedir. Kriyojel içerisinde tutunan maksimum Lf miktarı $2,2 \text{ mgg}^{-1}$ olarak bulunmuştur.



Şekil 3.3. Lf başlangıç derişimi etkisi.

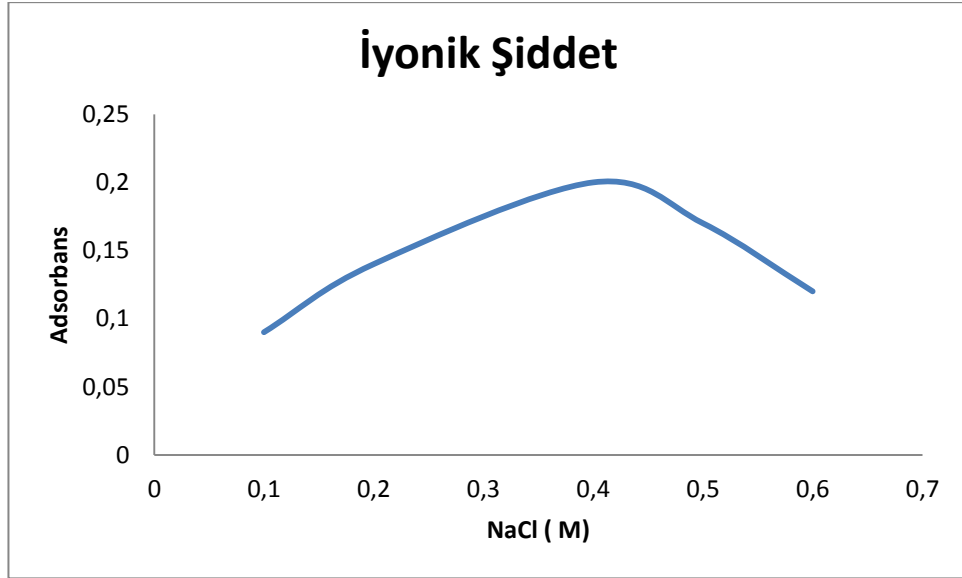
3.2.2. Akış hızı etkisi

Lf adsorpsiyonu ile ilgili akış hızı çalışmaları, gözeneklerine anti-Lf çapraz bağlanmış kriyojelin FPLC cihazında kolon olarak kullanılması ve 100'er μL enjekte edilen inek sütünün farklı akış hızlarında geçirilmesiyle elde edilen pik alanlarının karşılaştırılması sonucunda yapılmıştır. FPLC cihazında 0,3, 0,5, 0,8, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 mLdk^{-1} akış hızlarında çalışılmış ve maksimum adsorpsiyonun 2,0 mLdk^{-1} akış hızında olduğu tespit edilmiştir.

3.2.3. İyonik şiddet etkisi

Tez çalışması kapsamında sentezlenen kriyojele Lf'nin adsorpsiyonuna ilişkin iyonik şiddetin etkisini incelemek üzere 0,1; 0,2; 0,4; 0,5 ve 0,6 M derişimlerde hazırlanan NaCl çözeltileri kullanılmıştır.

Lf adsorpsiyonuna iyonik gücün etkisi Şekil 3.4' de gösterilmiştir. Elde edilen verilerden yola çıkılarak maksimum adsorpsiyonun 0,4 M NaCl çözeltisi kullanıldığında gerçekleştiği tespit edilmiştir.



Şekil 3.4. Lf adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisi.

3.2.4. Adsorpsiyon izotermi

Adsorpsiyon, adsorbent yüzeyinde biriken madde derişimi ve çözeltide kalan madde derişimi arasında bir denge oluşuncaya kadar devam eder. Adsorpsiyon dengesini belirtmek için, sabit sıcaklıkta dengede çözeltide kalan çözünen derişimine karşı adsorbentün birim ağırlığında adsorbe edilen çözünen miktarının değişimi izlenerek adsorpsiyon izotermi adı verilen eğriler elde edilir. Gazlar için derişim genellikle mol yüzdesi veya kısmi basınç olarak verilir. Çözeltiler için ise derişim kütle birimleri olarak verilir (mg/l, ppm vs.). Biyolojik ayırmalar açısından üç tür izoterm (lineer, Freundlich ve Langmuir) önemlidir. Fiziksel ve kimyasal adsorpsiyonlarda, dengeyi belirlemek amacıyla Langmuir, Freundlich, Brunauer – Emmett – Teller (BET) izotermi olmak üzere başlıca üç matematiksel model bulunmaktadır.

Sunulan tezde adsorpsiyon izotermi, her bir molekülün adsorbanlarla etkileşimlerinin karakterizasyonu için kullanılmıştır.

Adsorpsiyon izotermi, iki faz dengede iken katı faza adsorbe olan molekül miktarı ve çözeltideki moleküllerin derişimi arasında ilişki kurulmasını sağlar. Yapılan tez çalışmasında elde edilen veriler Langmuir, Freundlich izotermine uygulanmıştır.

Langmuir adsorpsiyon modeli, her biri yalnız bir molekülü tutmaya elverişli belirli sayıdaki tanımlanmış bölümlere moleküllerin adsorbe olduğunu varsayar. Bu bölümlerin enerji olarak eşdeğer olduğu ve yakın bölümlerdeki adsorbe olmuş moleküllerle arasında hiçbir etkileşim olmayacak kadar birbirinden uzak olduğu varsayılır. Langmuir denklemi E. 3.1 ile aşağıdaki şekilde gösterilebilir.

$$Q=Q_{\max}bC_{\text{eq}} / (1+bC_{\text{eq}}) \quad (\text{E.3.1})$$

Q= Adsorbana adsorplanmış Lf derişimi (mgg^{-1})

C_{eq}= Çözeltideki Lf denge derişimi (mgL^{-1})

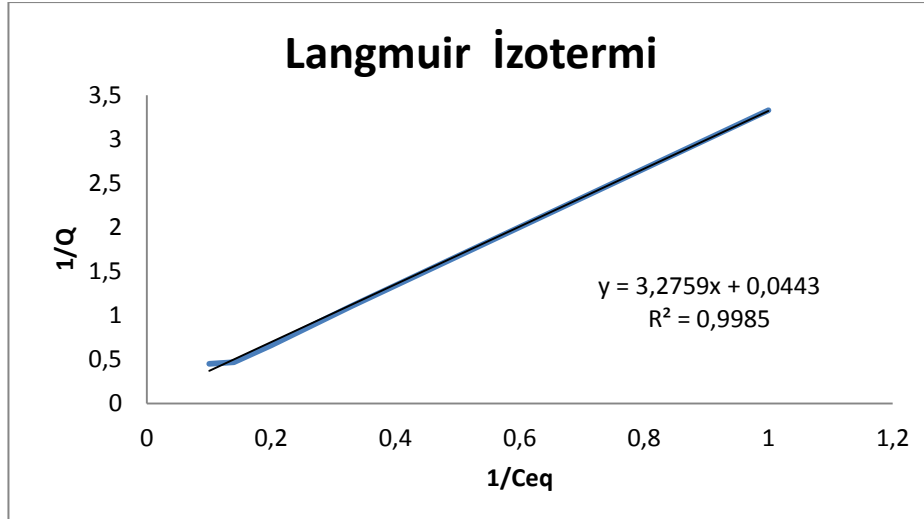
b= Langmuir sabiti (Lmg^{-1})

Q_{max}= Maksimum adsorpsiyon kapasitesi (mgg^{-1})

Bu denklem E. 3.2. ile aşağıdaki gibi lineer hale getirilebilir.

$$1/Q = [1/(Q_{\max}b)][1/C_{\text{eq}}] + [1/Q_{\max}] \quad (\text{E.3.2})$$

$1/Q$ 'ya karşı $1/C_{\text{eq}}$ grafiğe geçirildiğinde; kesim $1/Q_{\max}$, eğim ise $1/Q_{\max}b$ ' yi verir. Şekil 3.5'de Lf molekülünün adsorpsiyonu için Langmuir adsorpsiyon modelinin grafiği verilmiştir.



Şekil 3.5. Lf molekülü için Langmuir adsorpsiyon modeli.

Adsorpsiyon izotermi, Lf'nin adsorpsiyon özelliklerini değerlendirmek amacıyla yapılan kesikli deneylerle belirlenmiştir. Deneysel çalışmalarda elde edilen veriler sonucunda, Lf' nin adsorpsiyonu için maksimum adsorpsiyon kapasitesi (Q_{max}) elde edilmiştir. Kriyojel gözeneklerindeki anti-Lf için, korelasyon katsayısı (R^2) 0.9985 gibi yüksek bir değer, maksimum adsorpsiyon kapasitesi $22,573 \text{ mgg}^{-1}$ ve Langmuir sabiti ise $73,948 \text{ mg}^{-1}$ olarak bulunmuştur.

Sunulan tez çalışmasında sisteme uygulanan ikinci adsorpsiyon modeli ise Freundlich izotermidir. Freundlich eşitliği adsorban yüzeyinde adsorplanan adsorbent miktarının üstel bir fonksiyon olduğu eşitliktir. Freundlich izotermi genellikle sıvı çözeltilerden adsorpsiyon için kullanılır. Freundlich denklemi ideal olarak temiz ve homojen olmayan katı yüzeylerdeki adsorpsiyonlar için Alman fizikokimyacı Herbert Max Finlay Freundlich tarafından deneysel çalışmalar sonucu türetilmiştir. (Sarıkaya 1993). Aşağıda verilen eşitlik Freundlich denklemi olarak ifade edilmektedir.

$$\ln Q = \ln K_f + n \cdot \ln C_{eq} \quad (\text{E.3.3})$$

Bu eşitlikte;

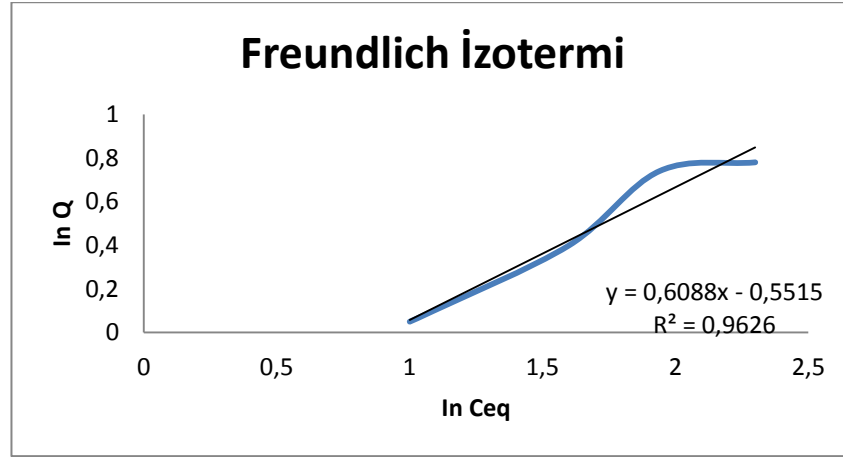
Q = Adsorbana adsorplanmış Lf derişimi (mgg^{-1})

C_{eq} = Çözeltideki Lf denge derişimi (mgL^{-1})

n = Freundlich sabiti

K_f = Freundlich adsorplanma kapasitesi

Denklemden yer alan $\ln Q'$ ya karşı $\ln C_{eq}$ grafiğe geçirildiğinde y eksenini kestiği noktadan K_f ve eğimden de n sabitleri bulunabilir. Şekil 3.6'da gözeneklerine Anti-Lf çapraz bağlanmış kriyojeldeki Lf adsorpsiyonu için Freundlich adsorpsiyon modelinin grafiği yer almaktadır.



Şekil 3.6. Lf molekülleri için Freundlich adsorpsiyon modeli.

Tez kapsamında sentezlenen kriyojelin, Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon izotermelerinin sonuçları karşılaştırılırsa; elde edilen grafiklerin regresyon sabitlerine (R^2) bakıldığında Langmuir için hesaplanan değer (0,9985), Freundlich için hesaplanan değerden (0,9626) daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu sonuç Lf adsorpsiyonunun Langmuir izotermine uyduğunu göstermektedir. Sonuç olarak kısıtlı sayıda bağlanma bölgesi içeren bir yüzey üzerine tek tabakalı bir adsorpsiyon gerçekleştiği ifade edilebilir.

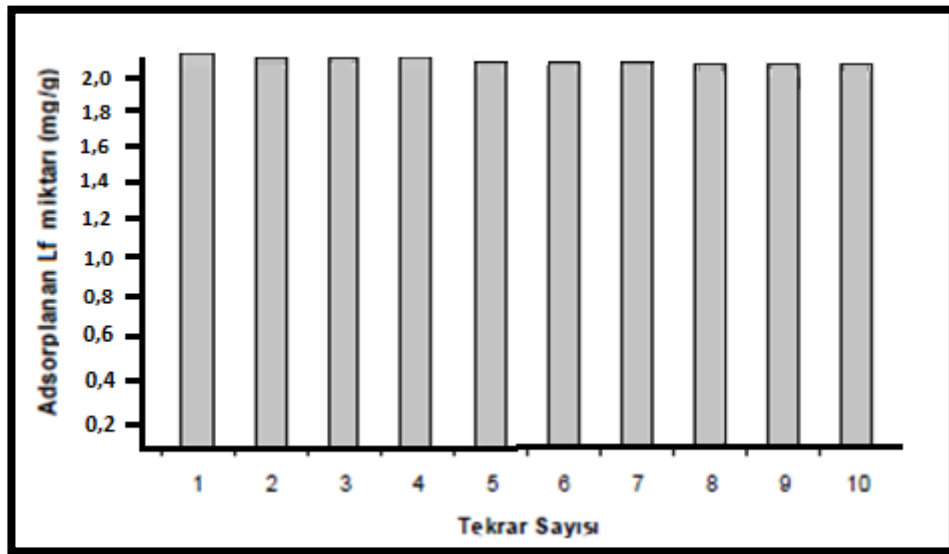
Çizelge 3.1: Kriyojel gözeneklerine çapraz bağlanmış anti-Lf moleküllerinin Lf adsorpsiyonunu gösteren Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon izotermelerinin karşılaştırılması

	Deneysel	Langmuir			Freundlich		
		Q(mg/g)	Qm(mg/g)	b(L/g)	R ²	Kf(L/g)	n
Kriyojelde Lf	2,2	22,573	73,948	0,9985	0,5691	0,6088	0,9626

3.2.5. Desorpsiyon ve tekrar kullanılabilirlik

Gözeneklerine anti-Lf çapraz bağlanmış kriyojelden adsorpsiyonla bağlanan Lf, PSB pH 7.5 tamponu içerisinde hazırlanan 0,6 M NaCl çözeltisi kullanılarak desorbe edilmiştir. Desorpsiyon çalışmalarında 50 ml desorpsiyon reaktifi olan 0,6 M NaCl (PSB pH 7.5 tamponu içerisinde) kriyojel kolondan periyodik olarak geçirilmiştir. Kolondan çıkan çözelti içerisine alınan Lf, spektrofotometrik yöntemle tayin edilmiştir. 1 saat sonra adsorplanan Lf miktarının % 45' i, 4 saat sonunda ise % 95' i kriyojelden desorban çözeltisine alınmıştır.

Gözeneklerine anti-Lf çapraz bağlanmış kriyojellerin tekrar kullanılabilirliğinin test edilmesi amacıyla Lf adsorpsiyon-desorpsiyon çalışmaları 10 kez aynı kriyojel kolon kullanılarak yapılmış ve kriyojel içerisindeki Lf adsorpsiyon kapasitesinde kayda değer bir düşüş olmadığı saptanmıştır. Sonuç olarak tez kapsamında sentezlenen ve deneysel çalışmalarda bir yıl boyunca kullanılan kriyojel kolonun Lf adsorpsiyonunda önemli bir kayıp olmadan diğer çalışmalarda da tekrar kullanılabilirliğinin oldukça yüksek olduğunu söylemek mümkündür.



Şekil 3.7. Kriyojel gözeneklerine çapraz bağlanmış Anti-Lf moleküllerin rejenerasyonu.

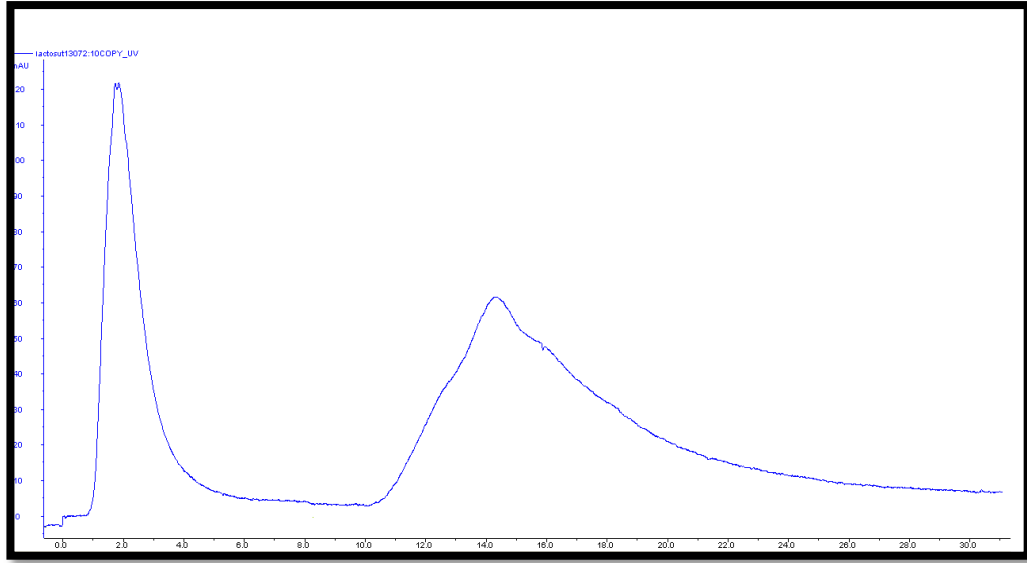
3.3. İnek Sütünden Laktoferrinin Saflaştırılması

3.3.1. İnek sütünden laktoferrinin kromatografik ayırımı

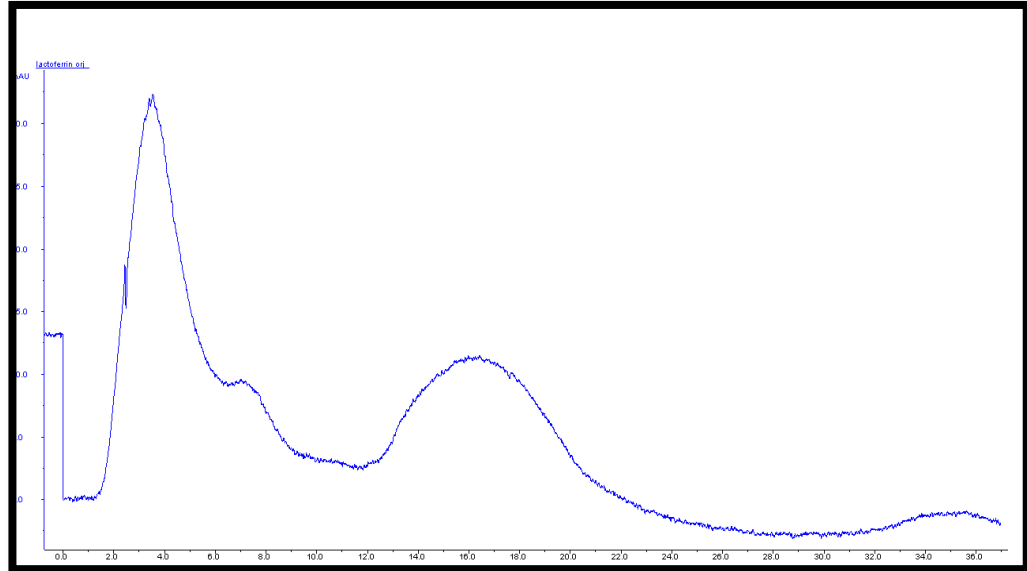
İnek sütünden Lf^r nin kromatografik ayırımı, FPLC cihazı kullanılarak yapılmıştır. FPLC cihazında, kolon dolgu maddesi olarak, gözeneklerine anti-Lf çapraz bağlanmış kriyojel kullanılmıştır.

Ayırım işleminin gerçekleştirilmesinde yüklenen inek sütü numunesi 0,4 M NaCl çözeltisi (pH 7.0 fosfat tamponu) kullanılarak dengeye getirilip bağlanma sağlanırken; elüsyon işlemi pH 7.5 fosfat tamponunda 0.6 M NaCl çözeltisi kullanılarak yapılmıştır. Sonuç olarak P(Anti-Lf-co-HEMA) kriyojel kolonda adsorplanan Lf moleküllerinin iyonik güç artırılarak fizyolojik ve bazik pH 'larda (pH>7.5) anti-Lf ile etkileşim göstermeyip kolondan ayrılması sağlanmıştır.

Kromatografi işlemi için cihazın akış hızı 2.0 mL dak⁻¹ olarak ayarlanmıştır. 3mL inek sütü mavi süzgeç kağıdından süzölmüş, 100'er µL olarak 4 defa cihaza enjekte edilerek Lf^r ye ait kromatogramlar elde edilmiştir. Kromatogramlar incelendiğinde (Şekil 3.8) 2. dakikada gelen pikin, kriyojel kolona tutunmadan geçen inek sütündeki diğer proteinlere ait olduğu, alıkonma zamanı 16 dakika olan 2. pikin ise Lf^r ye ait pik olduğu tespit edilmiştir. Bu dakikada kolondan çıkan sıvı fraksiyon kabında toplanarak 48 saat süre ile liyofilizasyonu yapılmıştır.



(a)



(b)

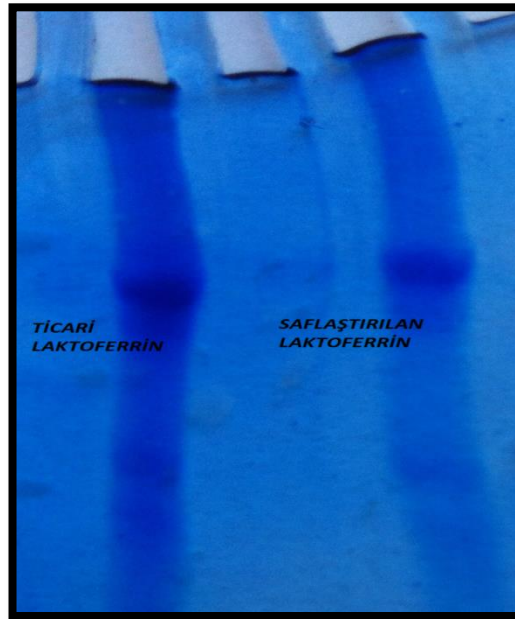
Şekil 3.8. a ve b iki enjeksiyona ait Lf' nin FPLC kromatogramı.

Liyofilizasyon işlemiyle kolondan çıkan ve Lf içeren çözeltinin çözücüsü azot atmosferinde uçurularak katı partiküller elde edilmiştir. Elde elden bu partiküllerin Lf olup olmadığını belirlemek için SDS-PAGE elektroforezi ile analiz yapılarak sonuçlar ticari Lf ile karşılaştırılmıştır.

3.3.2. Saflaştırılan laktoferrinin karakterizasyonu

Sunulan tez çalışmasında saflaştırılan Lf' nin karakterizasyon işlemi poliakrilamid jel elektroforezin bir türü olan SDS-PAGE yöntemi kullanılarak yapılmıştır. SDS-PAGE, protein yapılarını molekül büyüklüklerine göre ayıran bir ayırıştırma tekniğidir. Deneylerde Amersham Pharmacia marka mini elektroforez cihazı kullanılmıştır.

Hazırlanan % 10'luk akrilamid jel iki cam arasına dökülmüştür ve jel içine kuyucuk açmak amacıyla tarak yerleştirilmiştir. Kuyucuklara sırasıyla ticari ve saflaştırılan Lf 10 µL olacak şekilde enjekte edilmiştir. Yürütme tamponu tankın içine döküldükten sonra güç kaynağı çalıştırılmış ve kuyucuk başına 20 mA akım sabit kalmak üzere elektrik verilmiştir. Numunelerin yürümesi 4 saat sürmüştür. Daha sonra jel 24 saat boyunca boya çözeltisinde bekletildikten sonra yıkama çözeltisi ile jel yüzeyindeki boya uzaklaştırılmıştır. Şekil 3.9'da SDS-PAGE elektroforez yöntemi kullanılarak %10'luk akrilamid jel üzerinde yürütülen ticari ve saflaştırılan Lf spotları görülmektedir.



Şekil 3.9. Lf'ye ait SDS-PAGE görüntüsü.

Lf'nin molekül kütlesi 80 kDa 'dır. Jelin sol tarafında görülmekte olan spot ticari Lf'ye ait olup, sağ tarafta görülen spot ise inek sütünden kromatografik ayırımı gerçekleştirilen Lf'ye aittir.

SDS-PAGE sonucunda elde edilen jel görüntüsünden yararlanılarak ticari ve saflaştırılan Lf spotlarının 80 kDa'da ve aynı hizada olduğu görülmektedir. Ayrıca; ticari Lf 'nin, SDS-PAGE'te tek spot verdiği görülmektedir. Ayrımı yapılan Lf'nin de ticari Lf gibi tek spot verdiği gözlemlenmektedir. Dolayısıyla kromatografik ayrımı gerçekleştirilen Lf'nin saflık derecesinin oldukça yüksek olduğu söylenilebilir.

Sonuç olarak inek sütünden Lf'yi saflaştırmak üzere özel bir çalışma yapılmış olup, fotoduyarlı aminoasit monomer bağlayıcılar sayesinde ışık yoluyla sağlanan elektron aktarımının proteinlerde bulunan tirozin, sistein ve triptofana atkılanarak tek adımlı, biyouyumlu bağlanmayla çok sayıda farklı mikro ve nano yüzeyli yapılar oluşturulmasına dayanan ANADOLUCA yöntemiyle (Say R. , 2011) spesifik fotosensitif P(Anti-Lf-co-HEMA) kriyojel kolon ilk kez sentezlenmiş ve Lf bu yöntemle ilk kez yüksek saflıkta elde edilmiştir.

KAYNAKLAR

- Adlerova L., Bartoskova A., Faldyna M., “ Lactoferrin: a review “ , *Veterinari Medicina*, 53 (9): 457–468 (2008).
- Akkuş B., “ Penisilin G Açılaz Saflaştırılması İçin Yeni Destek Materyali”, Yüksek Lisans Tezi, *Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kimya Anabilim dalı, Eskişehir, 2012.
- Alpkent Z., Kubat U., “ Anne Sütünde Bulunan Biyoaktif Maddeler “, Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, *Gıda Mühendisliği Dergisi*, 41-45 (2003).
- Alpöz E., Karavana S., Pelin Güner P., Baloğlu E., Boyacıoğlu H., ” Ağız İçi Nemlendirici Özelliği Olan İki Jelin (Oralbalance ve Bioextra) Viskozite Özelliklerinin Değerlendirilmesi “, *Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi*, 17(3):29-34 (2007).
- Arnold D., Di Biase A. M., Marchetti M., Pietrantonio A., Valenti P., Seganti L. et al., “Antiadenovirus activity of milk proteins: lactoferrin prevents viral infection” *Antiviral Research*, 53: 153-158 (2002).
- Avcı G. ve Sel T., “ Laktasyon periyodundaki Ankara keçilerinde süt ve serum laktoferrin düzeyleri”, *Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi* 51: 181-187 (2004).
- Baker E. N., & Baker, H. M. ,” Lactoferrin molecular structure, binding properties and dynamics of lactoferrin ” *Cell Molecular and Life Science*, 62:2531-2539 (2005).
- Baydemir G., Bereli N., Andaç M., Say R., Galaev I. Y., Denizli A.,”Supermacroporous poly(hydroxyethylmethacrylate) based cryogel with embedded bilirubin imprinted particles”, *Elsevier*, 69(1): 36–42 (2009).
- Berlutti F., Pantanella F, Natalizi T., Frioni A., Paesano R., Polimeni A. and Valenti P., “ Antiviral Properties of Lactoferrin—A Natural Immunity Molecule “ *Molecules* , 16: 6992-7018 (2011).

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Beyazbenli Ş., “ Konya Bölgesinde Yayılış Gösteren Bazı Vicia l. (Leguminosae) Türlerinin Tohum Protein Profillerinin Sds-Page ile Belirlenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, *Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Konya, 2006.
- Biçen Ö., “Moleküler Baskılanmış Polimer Tabanlı Kriyojel Ayırma Sistemleri ve Biyo-ayırma Uygulamaları”, Yüksek Lisans Tezi, *Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kimya Anabilim dalı, Eskişehir, 2009.
- Bölgen N., Hema-Laktat-Dekstran Kriyojellerin Üretimi ve Doku Mühendisliğinde Uygulamaları “, Doktora Tezi, *Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Biyomühendislik ABD, Ankara, 2008.
- Conesa C., Sánchez L., Rota C, Pérez a M.-D., Calvo M., Farnaud S., Evans R.W., “Isolation of lactoferrin from milk of different species: Calorimetric and antimicrobial studies” *Elsevier*, 150: 131-139 (2008).
- Çiftçi E., “Enterococcus faecalis Suşlarında Protein Profiline Antijenik Glikoproteinler Yönünden Değerlendirilmesi “, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, *Biyokimya ABD*, Ankara, 2006.
- Çiftçili S. ve ark. “Bakteriyel Gastroenteritlerde Dışkıda laktoferrin Düzeyleri”, *Türk Aile Hekimliği Dergisi*, 4(1-4): 19-23 (2000).
- Diltemiz Emir S.,” Aletli Analiz Laboratuvarı”, *Anadolu Üniversitesi Web-Ofset*, Eskişehir, 2011.
- Dönmez G., “ Neo-Natal Fc Feseptör (Fcrn) Saflaştırılması İçin Kolon Geliştirilmesi”, Yüksek Lisans Tezi, *Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Eskişehir, 2012.
- Esen G., Akış I., Ateş A., Yardibi H., Hoştürk G., Öztapak K., “ EcoRI Polymorphism in Intron 6 of the Bovine Lactoferrin Gene in South Anatolian Red and East Anatolian Red Cattle Breeds ”, *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 39(2):183-188 (2013).

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- García-Montoya I.A., Cendon T.S., Arévalo-Gallegos S., Q. Rascón-Cruz “Lactoferrin a multiple bioactive protein: An overview “ *Biochimica et Biophysica Acta* **1820** ,226–236 (2012).
- Gonzalez-Chavez S.A., Arevalo-Gallegos S., Rascon-Cruz Q., “Lactoferrin: structure, function and applications” *International Journal of Antimicrobial Agents*, 33: 1-8 (2009).
- Gür F.,Güzel M., Öncül N., Yıldırım Z., Yıldırım M., “ Süt Serum Proteinleri ve Türevlerinin Biyolojik ve Fizyolojik Aktiviteleri”, *Akademik Gıda Dergisi*, 8 (1):23-31 (2010).
- Hara, K., Ikeda, M., Saito, S., Matsumoto, S., Numata, K., Kato, N., Tanaka, K., Sekihara, H., “ Lactoferrin inhibits hepatitis B virus infection in cultured human hepatocytes”, *Hepatology Research*, 24: 228 (2002).
- Harmsen, M. C., P. J. Swart, M. P. de Béthune, R. Pauwels, E. de Clercq, T. H. The, and D. K. F. Meijer,” Antiviral effects of plasma and milk proteins: lactoferrin shows potent activity against both human immunodeficiency virus and human cytomegalovirus replication in vitro”, *The Journal of Infectious Diseases* 172: 380-388 (1995).
- Hames B.D., Rickwood D., “Gel Electrophoresis of proteins: a practical approach” ,*Oxford University Press*,2:149-164 (1996).
- Hacettepe Üniversitesi Nörolojik Bilimler ve Psikiyatri Enstitüsü, “Western Blotting Yöntemi”, http://www.norbil.hacettepe.edu.tr/west_ornek.shtml , 31/05/2014 Saat 18.37
- Zihnioğlu, F.,“Ege Üniversitesi Protein Analitiği”, <http://protein.ege.edu.tr/Konular/PROTEINsafla%FE.pdf> , 31/05/2014 Saat 01.18

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Ikeda M., Nozakia A., Sugiyama K., Tanaka, T., Naganuma A., Tanaka K., Sekihara H., Shimotohno K., Saito M., Kato N.,” Characterization of antiviral activity of lactoferrin against hepatitis C virus infection in human cultured cells”, *Virus Res.*, 66(1): 51-63 (2000).
- Ikada H., Tanaka T., Shibahara N., “Short report: inhibitory effect of lactoferrin on in vitro growth of Babesia caballi”, *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 73:710–712 (2005).
- İldeş E., “ Kars Çayı’nda Yaşayan Orthrias Angorae Bureschi ve Orthriaspanthera’nın Sarkoplazmik Proteinlerinin Sodyum Dodesil Sülfat- Poliakrilamid Jel Elektroforeziyle Taksonomik Yönden İncelenmesi “, Yüksek Lisans Tezi, *Kafkas Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kars, 2006
- Jenssen, H. and Hancock R.E.W., “Antimicrobial properties of lactoferrin “, *Biochimie* 91: 19-29 (2009).
- Kanyshkova T.G., Buneva V.N., Nevinsky G.A., “Lactoferrin and its biological functions “ *Biochemistry (Moscow)*, 66: 1–7 (2001).
- Kunz C., ve Lonnerdal B., “Human milk proteins: separation of whey proteins and their analysis by polyacrylamide gel electrophoresis, fast protein liquid chromatography (FPLC) gel filtration, and anion-exchange chromatography,” *American Journal of Clinical Nutrition*, 49:464-470 (1989).
- Metalurji ve Malzeme Bilimi Portalı, “Taramalı Elektron Mikroskobu”, [http://malzemebilimi.net/dersnotlari/Malzeme%20Karaktrizasyonu%20ve%20X%20I%FE%FDnlar%FD/Elektron%20Taramal%FD%20Mikroskop%20\(SEM\).pdf](http://malzemebilimi.net/dersnotlari/Malzeme%20Karaktrizasyonu%20ve%20X%20I%FE%FDnlar%FD/Elektron%20Taramal%FD%20Mikroskop%20(SEM).pdf), 16.50.2014 saat18.30.
- Marchetti, M., Superti, F., Ammendolia, M.G., Rossi, P., Valenti, P., Seganti, L., “Inhibition of poliovirus type 1 infection by iron-, manganese-, and zinc-saturated lactoferrin”, *Medical Microbiology and Immunology* 187: 199– 204 (1999).

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- ODTÜ Merkez Laboratuvarı, “Hızlı Protein Sıvı Kromatografisi”
[,http://merlab.metu.edu.tr/hizli-performansli-sivi-kromatografi](http://merlab.metu.edu.tr/hizli-performansli-sivi-kromatografi), 13.05.2014 saat
 14.10.
- Metz-Boutigue, M.H., J. Jolles, J. Mazurier, F. Schoentgen, D. Legrand et al., “Human lactotransferrin: Amino acid sequence and structural comparisons with other transferrins”, *European Journal Biochemistry*, 145: 659-676 (1984).
- Murphy M. E., Kariwa H., Mizutani T., Yoshimatsu K., Arikawa J., Takashima I., “In vitro antiviral activity of lactoferrin and ribavirin upon hantavirus” *Archives of Virology* 145: 1571–1582 (2000).
- Özcan A., “ Biyomoleküller için Molekül Baskılanmış Polimerik Yapay Reseptör Geliştirilmesi ve Biyokromatografi Uygulamaları ” , Doktora Tezi, *Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Üniversitesi*, Eskişehir, 2007.
- Özen A. E., Kılıç M., “ Peynir Altı Suyundan Elde Edilen Serum Proteinlerinin Fonksiyonel Özellikleri ”, *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, (3): 45-49 (2007).
- Öztürk U., Gürbüz Ü., Çalım H.D., “Besinlerin Muhafazasında Bazı Doğal Antimikrobiyal Sistemlerin Rolü ve Önemi ”, *Türkiye 9. Gıda Kongresi*; 24-26 Mayıs, Bolu, 2006.
- Pierce, A., D. Colavizza, M. Bennaissa, P. Maes, A. Tartar, J. Montreuil and Spik G., “Molecular cloning and sequence analysis of bovine lactotransferrin”, *European Journal Biochemistry*, 196: 177-184 (1991).
- Reed R., Holmes D., Weyers J., and Jones A. ,“Practical Skills in Biomolecular Sciences”, *Edinburg Gate, Harlow,England*, 320-336 (2007).
- Skoog D. A., West D. M., Holler F. J., “ Analitik Kimya Temelleri Cilt II “ *Bilim Yayıncılık*, Ankara,1999

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Say R., Keçili R., Biçen Ö., Yılmaz Şişman F., Hür D., Denizli A. ve Ersöz A. ‘‘ A novel nanoprotein particle synthesis: Nanolipase’’, *Process Biochemistry*, 46: 1688–1692 (2011).
- Say R., ‘‘Photosensitive Aminoacid-Monomer Linkage and Bioconjugation Applications in Life Sciences and Biotechnology’’ *US 20110311505 A1*, The Uniteden States Patent, 2011.
- Simon R., ‘‘ Protein Purification Tecniques’’, *Oxford University Press*, 2: 38 (2001).
- Stuart G. Dashper, Yu Pan, Paul D. Veith, Yu-Yen Chen, Elena C. Y. Toh, Sze Wei Liu, Keith J. Cross and Eric C. Reynolds, *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 56(3):1548 (2012) .
- Steijns J.M., van Hooijdonk, A.C., ‘‘Occurrence, structure, biochemical properties and technological characteristics of lactoferrin’’ *British Journal of Nutrition* 84: 11-17 (2000).
- Superti, F., Ammendolia, M.G., Valenti, P., Seganti, L., ‘‘ Antirotaviral activity of milk proteins: lactoferrin prevents rotavirus infection in the enterocyte-like cell line HT-29’’, *Medicine Microbiology and* , 186: 83-91 (1997).
- Tomita M., Wakabayashi H.,Shin K., Yamauchi K., Yaeshima T., Iwatsuki K.,‘‘ Twenty-five years of research on bovine lactoferrin applications ‘‘ *Elsevier*, 91:25-57 (2008).
- Tanbay E.,‘‘Protein ayırma ve saflaştırma yöntemleri, elektroforez ve ikiyönlü elektroforez ‘‘, Yüksek Lisans Tezi, *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Erciyes, 2007.
- Teng C. T.,1Beard C., and Gladwell W., ‘‘ Differential Expression and Estrogen Response of Lactoferrin Gene in the Female Reproductive Tract of Mouse, Rat, and Hamster ‘‘ *Biology of Reproduction* 67:1439–1449 (2002).

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Ünlüsayın M, Erdilal R., Çağatay T., ‘‘ Balık Proteinlerinin Saflaştırılmasında Kullanılan Son Yöntemler ‘‘ , *Journal of Sciences*, 3(4): 298-309 (2009).
- Ünüböl A. S., Uysal H. ‘‘Glikoproteinlerin Yapısı ve Fonksiyonları’’ *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi*, 24 (2): 107 – 114 (2010).
- Ünver S., ‘‘ Farklı İrrigasyon Solüsyonlarının ve Işıklı Aktive Olan Dezenfeksiyon Sistemlerinin Enterococcus Faecalis Biyofilmi Üzerindeki Antimikrobiyal Etkinliklerinin İn Vitro Olarak İncelenmesi’’, Doktora Tezi, *Başkent Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 2011.
- Vladimir I. L., Galaev I., Plieva F.M., Savina I.N., Jungvid H.and Mattiasson B., ‘‘ Polymeric cryogels as promising materials of biotechnological interest’’, *TRENDS in Biotechnology*, 21(10):445-451 (2003).
- Vogel H. J. and Sicairos N. L. ‘‘Preface to the special issue on lactoferrin ’’ *Biochemistry and Cell Biology*, 90(3):1 (2012).
- Vogel H. J., ‘‘ Lactoferrin, a bird's eye view’’, *Biochemistry & Cell Biology*, 90(3): 233-240 (2012).
- Wakabayashi H., Abe S., Okutomi T., Tansho S., Kawase K., Yamaguchi H., ‘‘Cooperative anti-Candida effects of lactoferrin or its peptides in combination with azole antifungal agents’’ *Microbiol Immunol*, 821–825 (1996).
- Yüzüncü Yıl Üniversitesi , ‘‘Poliakrilamid Jel Elektforezi’’, www.yyu.edu.tr/abis/admin/.../4784_05122013230203_38315.doc , 28.04.2014 Saat 00.26
- Afyon Kocatepe Üniversitesi, ‘‘Taramalı Elektron Mikroskobu’’, [http://www2.aku.edu.tr/~hitit/DERSLER/BAHAR/MALZEME%20KARAKTERIZASYON%20TEKNIKLERI/TARAMALI%20ELEKTRON%20MIKROSKOBU\[6\].pdf](http://www2.aku.edu.tr/~hitit/DERSLER/BAHAR/MALZEME%20KARAKTERIZASYON%20TEKNIKLERI/TARAMALI%20ELEKTRON%20MIKROSKOBU[6].pdf) , 16.05.2014 Saat 18.33.
- Yavuz Ö., ‘‘ Glycoproteins and Biomedical Importance’’, *Turkish Journal of Medical Sciences* ,21 (2001).

KAYNAKLAR (devam ediyor)

Yıldırım Z., Tokatlı M., Öncül N., Yıldırım M., ‘’ Laktoferrinin Biyolojik Aktivitesi’’,
Akademik Gıda Dergisi, 9(6): 52-63 (2011).

Yılmaz B., Tosun H.,’’ Sütte Bulunan Doğal Antimikrobiyal Sistemler ve Bunların
Gıda Sanayinde Kullanımı’’, *C.B.Ü. Fen Bilimleri Dergisi* , 8(1):11– 20 (2012).

ÖZGEÇMİŞ



Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Şengül YAZICIOĞLU AÇIKGÖZ

Doğum Yeri ve Tarihi : Zonguldak 08 / 07 / 1976

Eğitim Durumu

Lisans Öğrenimi : Hacettepe Üniversitesi Eğitim Fakültesi Kimya Öğr.

İş Deneyimi

Projeler

Tübitak Kimya Olimpiyatları Formatör Öğretmen Programı I.Aşama (Ankara - 2011)

Tübitak Kimya Olimpiyatları Formatör Öğretmen Programı II. Aşama (Antalya - 2011)

Tübitak Kimya Olimpiyatları Formatör Öğretmen Programı III.Aşama (Antalya - 2012)

Çalıştığı Kurumlar

Bursa İlhan Parseker Teknik ve Endüstri Meslek Lisesi / Md. Yrd.	2011 -
Bursa Anadolu Kız Lisesi / Kimya Öğrt.	2010- 2011
Bursa İpekçilik Anadolu İmam Hatip Lisesi / Kimya Öğrt.	2006- 2010
Bursa Fertur İlköğretim Okulu / Sınıf Öğrt.	2002- 2006
Bursa Büyük Dershane / Kimya Öğrt.	2001- 2002
Bartın Hedef Dershanesi / Kimya Öğrt.	1999- 2000

İletişim

Adres : İlhan Parseker Teknik ve Endüstri Meslek Lisesi
Tel : 0 224 248 85 36
E-Posta Adresi : senyazac@hotmail.com

Diğer:

Bursa Büyükşehir Belediye Konservatuarı TSM Bölümü Mezunu (2006-2010)

Tarih**İmza**