

**T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI
2017-YL-053**

**ÜROKİNAZ SAFLAŞTIRILMASI İÇİN
MANYETİK NANOPARTİKÜLLERİN
HAZIRLANMASI VE KARAKTERİZASYONU**

Sinem EVLİ

**Tez Danışmanı:
Prof. Dr. Deniz AKTAŞ UYGUN**

AYDIN

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Sinem EVLİ tarafından hazırlanan “Ürokinaz Saflaştırılması için Manyetik Nanopartiküllerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu” başlıklı tez, 14.12.2017 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

	Ünvanı, Adı Soyadı	Kurumu	İmzası
Başkan :	Prof. Dr. A. Alev KARAGÖZLER	ADÜ	
Üye :	Prof. Dr. Sinan AKGÖL	EGE ÜNİV.	
Üye :	Prof. Dr. Deniz AKTAŞ UYGUN	ADÜ	

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Yüksek Lisans Tezi, Enstitü Yönetim Kurulunun Sayılı kararıyla tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Aydın ÜNAY

Enstitü Müdürü

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

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

....../....../2017

Sinem EVLİ

ÖZET

ÜROKİNAZ SAFLAŞTIRILMASI İÇİN MANYETİK NANOPARTİKÜLLERİN HAZIRLANMASI VE KARAKTERİZASYONU

Sinem EVLİ

Yüksek Lisans Tezi, Kimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Deniz AKTAŞ UYGUN

2017, 64 sayfa

Bu tezde, manyetik poli(2-hidroksietil metakrilat) [p(HEMA)] nanopartiküller sürfaktansız emülsiyon polimerizasyonu tekniği ile sentezlenmiştir. Manyetik p(HEMA) nanopartiküllere Cibacron Blue F3GA kovalent olarak bağlanmış ve boya molekülleri Cu^{2+} iyonları ile şelatlaştırılmıştır. Ürokinazın Cu^{2+} ile şelatlaştırılmış Cibacron Blue bağlı manyetik poli(HEMA) nanopartiküllere adsorpsiyonu gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen manyetik nanopartiküllerin 80 nm boyutunda, küresel yapıda ve manyetik özellikte olduğu gözlenmiştir. Manyetik nanopartiküllere bağlanan Cibacron Blue F3GA miktarı 28.125 $\mu\text{mol/g}$ polimer olarak bulunmuştur. Yapıya katılan Cu^{2+} miktarı 10.229 $\mu\text{mol/g}$ polimer olarak hesaplanmıştır. Sentezlenen Cu^{2+} ile şelatlaştırılmış Cibacron Blue bağlı manyetik poli(HEMA) nanopartiküllere farklı ortam koşulları (pH, başlangıç ürokinaz derişimi, iyonik şiddet ve sıcaklık) altında ürokinaz adsorpsiyonu gerçekleştirildiğinde maksimum adsorpsiyon kapasitesi 630.43 mg/g polimer olarak bulunmuştur. Langmuir adsorpsiyon izoterminin bu adsorpsiyon işlemine uygulanabilir olduğu gözlenmiştir. Adsorplanan ürokinazın desorpsiyonu 1.0 M NaCl ile gerçekleştirilmiş ve desorpsiyon oranı % 96 olarak bulunmuştur. Beş kez tekrar edilen adsorpsiyon-desorpsiyon işleminden sonra adsorplanan ürokinaz miktarında önemli bir azalma gözlenmemiştir. Bu çalışma, yeni sentezlenen bu destek materyalinin biyolojik kaynaklardan ürokinaz saflaştırılması için kullanılabileceğini vadetmektedir.

Anahtar Kelimeler: Ürokinaz, manyetik nanopartiküller, Cibacron Blue F3GA, İMAK, boya ligand

ABSTRACT
**PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF MAGNETIC
NANOPARTICLES FOR
UROKINASE PURIFICATION**

Sinem EVLİ

M. Sc. Thesis, Department of Chemistry
Supervisor: Prof. Dr. Deniz AKTAŞ UYGUN
2017, 64 pages

In this thesis, magnetic poly(2-hydroxyethyl methacrylate) [p(HEMA)] nanoparticles were synthesized by surfactant free emulsion polymerization technique. Cibacron Blue F3GA was covalently attached to the magnetic p(HEMA) nanoparticles and Cu^{2+} ions were then chelated to dye molecules. Urokinase was adsorbed onto Cu^{2+} -Cibacron Blue F3GA derived magnetic p(HEMA) nanoparticles. Synthesized magnetic nanoparticles was about 80 nm in diameter, spherical and carried magnetic character. Incorporation rate of Cibacron Blue for magnetic nanoparticles was found to be 28.125 $\mu\text{mol/g}$ polymer. The Cu^{2+} ions loaded was calculated to be 10.229 $\mu\text{mol/g}$ polymer. This Cu^{2+} -Cibacron Blue F3GA derived magnetic p(HEMA) nanoparticles were used for urokinase adsorption under different conditions (i.e. pH, enzyme initial concentration, ionic strength, temperature). Maximum adsorption capacity was found to be 630.43 mg/g polymer for Cu^{2+} -Cibacron Blue F3GA derived magnetic p(HEMA) nanoparticles. It was observed that Langmuir adsorption isotherm was applicable in this adsorption process. The urokinase adsorbed Cu^{2+} -Cibacron Blue F3GA derived magnetic p(HEMA) nanoparticles was desorbed with 1.0 M NaCl and desorption rate was found to be 96 %. It was also analyzed that adsorption capacity did not changed significantly after five adsorption/desorption cycles. This study promised that synthesized support material could be used for urokinase purification from biological samples.

Key Words: Urokinase, magnetic nanoparticles, Cibacron Blue F3GA, IMAC, dye ligand

ÖNSÖZ

Bu çalışmada, manyetik nanopartiküller sentezlenmiş ve sentezlenen manyetik nanopartiküllerin karakterizasyon deneyleri gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan manyetik nanopartiküllere ürokinaz adsorpsiyonu kesikli sistemde gerçekleştirilmiştir. Çalışma Adnan Menderes Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Araştırma Laboratuvarında yürütülmüştür.

Başta yüksek lisans eğitimim boyunca tez çalışmamın planlanması ve tamamlanmasında benden maddi ve manevi hiçbir desteği, güler yüzünü, samimiyetini ve özellikle yüksek enerjisini hiçbir zaman esirgemeyen, değerli bilgilerini benimle paylaşan, kıymetli zamanını ayırıp sabırla ve büyük bir ilgiyle bana faydalı olabilmek için elinden gelenden fazlasını sunan ve danışman hoca statüsünü hakkıyla yerine getiren sevgili danışman hocam sayın Prof. Dr. Deniz AKTAŞ UYGUN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Araştırmalarım süresince sahip olduğu engin bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan ve gelecekteki mesleki hayatımda da bana verdiği değerli bilgilerden faydalanacağımı düşündüğüm değerli hocam sayın Prof. Dr. A. Alev KARAGÖZLER'e teşekkürü borç bilirim.

Laboratuvar çalışmalarım ve tez yazımım sırasında büyük bir sabırla benden hiçbir zaman yardımlarını esirgemeyen, bilgilerinden ve tecrübelerinden yararlandığım, Adnan Menderes Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Araştırma Laboratuvarındaki öğrencilere ve öğretim üyelerine her zaman ışık olan değerli hocam Doç. Dr. Murat UYGUN'a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımda tecrübelerini benimle paylaşmaktan çekinmeyen değerli Arş. Gör. Rukiye YAVAŞER TOMAY'a, çalışma ortamımı güzelleştiren Doktora Öğrencisi Çağdaş SUNNA'ya ve Yüksek Lisans Öğrencileri Hande ORHAN, Melis BAYRAKTAROĞLU, Bernis GİRGİN ve Onur KORKMAZ'a; bu çalışmayı FEF-13020 No'lu araştırma projesi olarak destekleyen Adnan Menderes Üniversitesi Rektörlüğü'ne teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak bana her koşulda güvenen, çalışmalarım ve öğrenim hayatım boyunca her kararında arkamda olan, desteklerini bir an olsun düşünmeden sunan annem Ayşen EVLİ, babam Mehmet EVLİ, kardeşlerim Sinan EVLİ ve Süleyman Atalay EVLİ'ye tüm kalbimle teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	iii
BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM	v
ÖZET.....	vii
ABSTRACT	ix
ÖNSÖZ	xi
KISALTMALAR DİZİNİ.....	xvii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xxii
1. GİRİŞ	1
1.1. Plazma-Fibrinolitik Sistemi.....	1
1.1.1. Fibrinoliz	1
1.1.2. Fibrinolitikler	1
1.1.3. Plazminojen-Plazmin Sistem.....	2
1.2. Ürokinaz	3
1.2.1. Ürokinazın Olası Kaynakları.....	4
1.2.2. Ürokinazın Yapısı	5
1.2.3. Ürokinazın Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	9
1.2.4. Ürokinazın Etki Mekanizması.....	10
1.3. İmmobilize Metal İyonu Afinite Kromatografisi	11
1.3.1. İmmobilize Metal İyonu Afinite Kromatografisinin Mekanizması Teknikleri, Destekleri, Şelatlayıcı Ligandları, Metal İyonları	13
1.4. Boya Ligand Afinite Kromatografisi	16
1.5. Manyetik Nanopartiküller	18
1.5.1. Enzim Saflaştırılmasında Manyetik Nanopartiküller	19
2. KAYNAK ÖZETLERİ	21

3. MATERYAL VE YÖNTEM	26
3.1. Kimyasal ve Cihazlar	26
3.2. Yöntem.....	26
3.2.1. Manyetik Nanopartiküllerin Hazırlanması	26
3.2.2. Manyetik Nanopartiküllere Cibacron Blue F3GA'nın Bağlanması	29
3.2.3. Cibacron Blue F3GA'nın Bağlı Manyetik Nanopartiküllerin Cu^{2+} ile Şelatlaştırılması.....	29
3.3. Cu^{2+} ile Şelatlaştırılmış Boya Bağlı Manyetik Nanopartiküllerin Karakterizasyonu.....	30
3.3.1. FTIR (Fourier Transform Infrared Spektrofotometre) Ölçümleri	30
3.3.2. ESR (Elektron Spin Rezonans) Ölçümleri	30
3.3.3. SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) Ölçümleri	31
3.3.4. EDX (Enerji Dağılımlı X-ışını) Analizi	31
3.4. Cu^{2+} ile Şelatlaştırılmış Boya Bağlı Manyetik Nanopartiküllere Ürokinaz Adsorpsiyonu Koşullarının İncelenmesi	31
3.4.1. Ürokinaz Adsorpsiyonuna pH'ın Etkisinin İncelenmesi	31
3.4.2. Ürokinaz Adsorpsiyonuna Ürokinaz Başlangıç Derişiminin Etkisinin İncelenmesi	33
3.4.3. Ürokinaz Adsorpsiyonuna İyonik Şiddetin Etkisinin İncelenmesi.....	34
3.4.4. Ürokinaz Adsorpsiyonuna Sıcaklığın Etkisinin İncelenmesi	35
3.4.5. Cu^{2+} ile Şelatlaştırılmış Cibacron Blue F3GA Bağlı Mag-Nano-p(HEMA) Polimerinden Ürokinaz Desorpsiyonu ve Nanopartiküllerin Tekrar Kullanılabilirliğinin İncelenmesi	36
3.4.6. Ürokinaz Aktivitesi Tayini	36
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	38
4.1. Cu^{2+} ile Şelatlaştırılmış Boya Bağlı Manyetik Nanopartiküllerin Karakterizasyonu.....	38
4.1.1. FTIR (Fourier Transform Infrared Spektrofotometre) Ölçümleri	39

4.1.2. ESR (Elektron Spin Rezonans) Ölçümü	40
4.1.3. SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) Ölçümü	41
4.1.4. EDX (Enerji Dağılımlı X-ışını) Analizi	42
4.2. Cu^{2+} ile Şelatlaştırılmış Boya Bağlı Manyetik Nanopartiküllere Ürokinaz Adsorpsiyonu ve Desorpsiyonu Koşullarının İncelenmesi	44
4.2.1. Ürokinaz Adsorpsiyonuna pH Etkisinin İncelenmesi	44
4.2.2. Ürokinaz Adsorpsiyonuna Ürokinaz Başlangıç Derişiminin Etkisinin İncelenmesi	45
4.2.3. Ürokinaz Adsorpsiyonuna İyonik Şiddetin Etkisinin İncelenmesi	46
4.2.4. Ürokinaz Adsorpsiyonuna Sıcaklığın Etkisinin İncelenmesi	47
4.2.5. Adsorpsiyon İzotermi	48
4.2.6. Cu^{2+} ile Şelatlaştırılmış Boya Bağlı Manyetik Nanopartiküllerden Ürokinaz Desorpsiyonu ve Nanopartiküllerin Tekrar Kullanılabilirliğinin İncelenmesi	51
4.2.7. Ürokinaz Aktivitesi Tayini	52
5 . SONUÇ	53
KAYNAKLAR	55
ÖZGEÇMİŞ	63

KISALTMALAR DİZİNİ

t-PA	: Doku tipi plazminojen aktivatörü
u-PA	: İdrar tipi plazminojen aktivatörü
UK	: Ürokinaz
PAI	: Plazminojen aktivatör inhibitörleri
SMC	: Yumuşak kas hücreleri
CTA	: Trombolitik Ajanlar Komitesi
u-PAR	: Ürokinaz tipi plazminojen aktivatör reseptörü
GFD	: Büyüme faktörü benzeri alan
PAI-1	: Plazminojen aktivatör inhibitörü-1
K	: Kringle alan
P	: Proteaz alanı
HMW	: Yüksek moleküler ağırlıklı
LMW	: Düşük moleküler ağırlıklı
ATF	: Amino termal kısım
IMAK	: İmmobilize metal iyonu afinite kromatografisi
IDA	: İminodiasetik asit
NTA	: Nitriлотriasetik asit
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
TALON	: Karboksi metillenmiş aspartik asit
TED	: Tris (karboksimetil) etilendiamin
E. coli	: <i>Escherichia coli</i>
Lys	: Lizin
Ile	: İzolösin
Phe	: Fenilalanin
Tyr	: Tirozin

Cys	: Sistein
PVA	: Poli(vinil alkol)
NADH	: Nikotinamid adenin dinükleotit (redükte)
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (redükte)
EDX	: Enerji dağılımlı X-ışını analizi elektroforezi
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu
ESEM	: Çevresel Taramalı Elektron Mikroskopu
FTIR	: Fourier transform infrared spectrophotometer
HEMA	: 2-hidroksietil metakrilat
U	: Ünite
Fe ₃ O ₄	: Magnetit
EGDMA	: Etilen glikol dimetakrilat
rpm	: Revulation per minute (dakikadaki devir sayısı)
p(HEMA)	: poli(2-hidroksietil metakrilat)
u-PAR	: Ürokinaz tipi plazminojen aktivatörü reseptörü
SP	: Sepharoz katyon değişimi kolonu
CHO	: Çin hamsterı yumurtalığı
NHS	: Dihidroksisüksinimid
EDC	: 1-Etil-3-(3-Dimetilaminopropil)karboimid
GMA	: Glisidil metakrilat
IU	: Uluslararası unite birimi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Hücre yüzeyinde ürokinazın proteolitik işlenmesiyle oluşan ürokinaz fragmentleri	6
Şekil 1.2. Tek zincirli ve iki zincirli ürokinaz formları.....	7
Şekil 1.3. Ürokinaz ile fibrinolitik sistemin şematik gösterimi.....	11
Şekil 1.4. Tri-(IDA), tetra-(NTA) IMAK ligandlarındaki His etiketindeki birimler ve metal iyonları arasındaki etkileşimin şematik gösterimi	13
Şekil 3.1. Manyetik nanopartiküllerin hazırlanması	27
Şekil 3.2. Polimerizasyona katılmayan nanopartiküllerin uzaklaştırılması için çöktürülmesi ve oluşan p(HEMA) manyetik nanopartiküllerin yıkanması işlemi.....	28
Şekil 3.3. Manyetik nanopartiküllere Cibacron Blue F3GA'nın bağlanması	29
Şekil 3.4. Cibacron Blue F3GA bağlı manyetik nanopartiküllerin Cu^{2+} ile şelatlaştırılması.....	30
Şekil 3.5. Ürokinaz adsorpsiyonuna pH'ın etkisinin incelenmesi.....	32
Şekil 3.6. Ürokinaz adsorpsiyonuna ürokinaz başlangıç ürokinaz derişiminin etkisinin incelenmesi	33
Şekil 3.7. Ürokinaz adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisinin incelenmesi	34
Şekil 3.8 Ürokinaz adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisinin incelenmesi	35
Şekil 4.1. Manyetik nano poli(HEMA) nanopartiküllere Cibacron Blue F3GA'nın bağlanması	38
Şekil 4.2. Manyetik nano poli(HEMA) nanopartiküllerin FTIR spektrumu	39
Şekil 4.3. Cu^{2+} ile şelatlaştırılmış Cibacron Blue F3GA bağlı manyetik nanopartiküllerin FTIR spektrumu	40
Şekil 4.4. Manyetik nanopartiküllerin ESR spektrumu.....	41
Şekil 4.5. Cu^{2+} ile şelatlaştırılmış Cibacron Blue F3GA bağlı manyetik nanopartiküllerin SEM görüntüsü	42
Şekil 4.6. Cu^{2+} ile şelatlaştırılmış Cibacron Blue F3GA bağlı manyetik nanopartiküllerin EDX spektrumu	43

Şekil 4.7. Cu^{2+} ile şelatlaştırılmış Cibacron Blue F3GA bağlı manyetik EDX spektrumlarının alındığı bölgeler.....	43
Şekil 4.8. Cu^{2+} ile şelatlaştırılmış Cibacron Blue F3GA bağlı manyetik nanopartiküllere ürokinaz adsorpsiyonuna pH'ın etkisi	45
Şekil 4.9. Cu^{2+} ile şelatlaştırılmış Cibacron Blue F3GA bağlı manyetik nanopartiküllere ürokinaz adsorpsiyonuna ürokinaz başlangıç derişiminin etkisi	46
Şekil 4.10. Cu^{2+} ile şelatlaştırılmış Cibacron Blue F3GA bağlı manyetik nanopartiküllere ürokinaz adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisi.....	47
Şekil 4.11. Cu^{2+} ile şelatlaştırılmış Cibacron Blue F3GA bağlı manyetik nanopartiküllere ürokinaz adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi.....	48
Şekil 4.12. Cu^{2+} ile şelatlaştırılmış Cibacron Blue F3GA bağlı manyetik nanopartiküllere ürokinaz adsorpsiyonunun Langmuir adsorpsiyon izotermi.....	50
Şekil 4.13. Cu^{2+} ile şelatlaştırılmış Cibacron Blue F3GA bağlı manyetik nanopartiküllere ürokinaz adsorpsiyonunun Freundlich adsorpsiyon izotermi.....	50
Şekil 4.14. Cu^{2+} ile şelatlaştırılmış Cibacron Blue F3GA bağlı manyetik nanopartiküllerin tekrar kullanılabilirliğinin incelenmesi	51

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Ürokinazın farklı kaynakları	5
Çizelge 1.2. Ürokinazın proteolitik işlemi	8
Çizelge 1.3. Farklı ürokinaz formlarının karşılaştırılması	9
Çizelge 1.4. İMAK’da kullanılan bazı şelatlayıcı bileşikler	16
Çizelge 1.5. Boya-ligand afinite desteklerinin avantajları	17
Çizelge 1.6. Boya-ligand afinite kromatografisinin protein ve enzim saflaştırılması uygulamalarına örnekler	18
Çizelge 4.1. Cu^{2+} ile şelatlaştırılmış Cibacron Blue F3GA bağlı manyetik nanopartiküllerin EDX analizine ilişkin elde edilen değerler	44
Çizelge 4.2. Langmuir ve Freundlich izotermlerinin kinetik sabitleri	51
Çizelge 4.3. Serbest, adsorbe ve desorbe ürokinaz aktivitelerinin Unite, Plough ve CTA birimleri	52

1. GİRİŞ

1.1. Plazma-Fibrinolitik Sistemi

1.1.1. Fibrinoliz

Tüm memeli türlerinin kanında bulunan bir enzim sistemi ile fibrin kan pıhtısının çözünmesine fibrinoliz denir. Fibrinolitik sistem, plazma zimojen proteini olan plazminojeni, onun aktifleştirilmiş ürünü proteolitik enzim plazmini, plazminojen aktivatörlerini, inhibitörleri, hem plazmin hem de plazminojen aktivatörlerinin inhibitörlerini, fibrinojen ve fibrini içerir. Plazma fibrinolitik sisteminin temel reaksiyonu farklı plazminojen aktivatörler aracılığı ile sınırlı bir proteolitik bölünmeyle bir plazminojenin, aktif proteolitik enzim olan plazmine dönüştürülmesidir. Plazminojen aktivatörler endotel hücrelerden ve diğer dokulardan sentezlenir ve salınır. Plazmin, fibrin ve fibrinojen de dahil olmak üzere çeşitli plazma koagülasyon proteinlerini hidroliz etme kapasitesine sahiptir. Fibrinolitik sistemin aktivitesi, hem plazminojen aktivatörleri hem de plazminin proteolitik etkisini inhibe eden inhibitörler ile ayarlanır. Fibrinolitik sistemin ana bileşenleri plazminojenin kendisi, serin proteaz benzeri bir tripsinin zimojeni, iki plazminojen aktivatörü ve üç proteaz inhibitörüdür. Kan dolaşımında oluşan başlıca iki aktivatör şunlardır: doku tipi plasminojen aktivatörü (t-PA) ve ürokinaz (UK) olarak da adlandırılan idrar tipi plazminojen aktivatörü (u-PA) (Kunamneni vd., 2008a).

1.1.2. Fibrinolitikler

Kan pıhtılaşması terapötik müdahale gerektiren ve aşırı reaksiyon oluşturabilen savunma mekanizmasının bir örneğidir. Şu an normal dokularda kan koagülasyonu (pıhtılaşma) ile fibrinoliz (pıhtılaşmış kanın çözülmesi) arasında sabit bir dinamik denge olduğu bilinmektedir. Bu durumda uygun dengelenmenin korunması son derece önemlidir. Eğer fibrinoliz patolojik bir sebeple artarsa aşırı kanamaya neden olur. Diğer yandan, fibrinoliz zayıflarsa, tromboz (kan damarlarında oluşan ve kan damarlarında kalan pıhtılar) ve embolizm (dolaşımdaki pıhtı parçalarından kaynaklanan ani kan damar tıkanıklıkları) adı verilen pıhtı oluşumunun tercih edildiği koşullar meydana gelir. Bunlar yaşam için tehdit edici olabilirler. Kronik durumlarda, kolesterol ve diğer yağlı maddeler kan damarlarındaki pıhtılaşmış tortular etrafında toplanabilir. Bu patolojik durum iyi belirlendiğinde, buna

ateroskleroz, arterlerin sertleşmesi denir. Düzeltici cerrahi teknikler yanında kimyasal antikoagülanlar (heparin gibi) mevcut olmasına rağmen, akut tromboz ve emboliler (akut tromboembolik vasküler hastalıklar olarak bir araya toplanmış olan) Batı Dünyası'nın orta yaşlı ve yaşlı popülasyonlarında halen en büyük hastalık ve ölüm nedenidir. Pıhtı oluşumu ve çözünme arasındaki denge kontrolü için vücut tarafından kullanılan mekanizma bir seri proenzimleri, enzimleri, proaktivatörleri ve aktivatörleri içeren bir komplekstir.

Bu kritik dengeyi korumada tıpkı doğanın enzimleri kullandığı gibi insan da dengesini kaybettikten sonra dengeyi eski haline getirmek için enzimlerin nasıl kullanılacağını öğrenir. Klinik çalışmalar, terapötik tromboliz (pıhtıların çözünmesi) için en iyi yaklaşımın, pıhtıyı çözen, plazminojeni plazmine dönüştürülebilir bir enzimin damar içi enjeksiyonu olduğunu göstermiştir. Bu tür tedavi, trombolitik veya fibrinolitik tedavi olarak bilinmektedir. Bunun için en sık kullanılan enzimler streptokinaz (bakterilerden) ve ürokinazdır (insan böbrek hücrelerinden). Son yirmi yılda görülen terapötik olarak kullanılan üç "yeni" trombolitik enzim Arvin (Malezya çingiraklı yılanından), reptilaz (Güney Amerika yılanından) ve brinazdır (*Aspergillus oryzae*'den) (Kunamneni vd., 2008a).

1.1.3. Plazminojen-Plazmin Sistem

Plazminojen karaciğerde sentezlenen, 90 kDa molekül ağırlığına sahip bir glikoproteindir. Plazminojen aktivatörler tarafından enzimatik olarak fibrinolitik enzim plazmine dönüştürülür. Kan pıhtısının oldukça geniş ağ yapısı, plazminin polimerize fibrin molekülleri arasına serbestçe girmesini sağlar böylece pıhtının çözünmesini kolaylaştırır. Fibrinlerin üçlü sarmal kısımlarını parçalayan plazma serin proteazı olan plazmin, zimojen plazminojenin proteolitik bölünmesiyle oluşur.

Plazminojen aktivatörler dokuda (t-PA), plazmada ve idrarda (UK) bulunur. t-PA kılcal damar ve pulmoner arterlerin vasküler endotelinde ve hücrelerin mikrozomal fraksiyonunda bulunur. t-PA, bölgesel anemi, damar büzüp açan ilaçlar ve egzersiz dahil olmak üzere bir takım uyarıcılara yanıt olarak kan dolaşımına salınır. Kan dolaşımına salınan t-PA, doku plazminojen aktivatör inhibitörleri ile (PAI'ler) kompleks oluşturarak kan dolaşımında hızla inaktive edilir ve yarı ömrü yaklaşık beş dakikadır. İdrardaki aktivatör, ürokinaz, yapısal olarak doku plazminojen aktivatöründen farklıdır ve öncelikle böbreklerde üretilir.

Üriner sistem potansiyelini korumaya yardımcı olan idrara salınır. Endotel ürokinaz, muhtemelen plazma aktivatör aktivitesinin küçük bir bölümüne katkıda bulunur.

Pıhtı oluştuğunda, az miktarda plazminojen fibrin ipçiklerinde sıkışır. Plazminojen aktivatörler, vasküler endotelden veya hasarlı dokulardan bölgesel olarak salınır, trombüsün fibrinine bağlanır ve plazminojeni plazmine dönüştürür. Kendi yüzeyinden fibrine bağlanır ve bu konformasyonda oldukça etkili olan antiplazmin α_2 inhibitöründen kendini korur. Fibrin daha sonra sindirilir (Kunamneni vd., 2008a).

1.2. Ürokinaz

Tromboz, kan damarlarında trombüsün oluştuğu ciddi bir klinik durumdur. Trombolitik tedavi, esasen trombolitikler aracılığıyla trombüsü çözen önemli bir tedavi yöntemidir (Feng Bi vd., 2009). Trombozun çeşitli tipleri her yıl çok sayıda ölüme sebep olmaktadır. Sadece Amerika Birleşik Devletleri'nde pulmoner akciğer embolinin veya akciğerlerde pıhtı oluşumunun yılda 1 milyon hastayı etkilediği düşünülmektedir. Bu durum, plazminojen aktivatörlerini içeren ajanlara olan gereksinimin artması ile sonuçlanmıştır. Plazminojen aktivatörleri, plazminojenin plazmine dönüşümünü katalize ederler. Plazmin kan damarlarındaki fibrin pıhtılarını çözdüğünden, plazminojen aktivatörler tromboembolik hastalıkların tedavisinde intravenöz olarak uygulanır. Sonuç olarak 2005 yılında plazminojen aktivatörlerinin dünyadaki pazarı 1,5 milyar dolara ulaşmıştır. Bu durum plazminojen aktivatörlerinin üretilmesinde yeni ve ucuz yöntemlerin geliştirilmesini zorunlu hale getirmiştir. Kullanımdaki temel plazminojen aktivatörleri streptokinaz, ürokinaz ve doku plazminojen aktivatörüdür. Bunların içerisinde ürokinaz doku plazminojen aktivatörüne göre daha üstün özelliklere sahiptir ve streptokinazın aksine insan orijinli olduğundan antijenik değildir. Bu bilgiler değerlendirildiğinde temel olarak idrardan elde edilen ürokinaz çok popüler bir kardiyovasküler ajandır. Bununla birlikte insan idrarındaki çok düşük düzeyleri nedeniyle *in vitro* olarak kültüre edilmiş insan hücreleri ürokinazın üretimi ve saflaştırılması için önemli bir alternatif olmuştur (Bansal vd., 2006a).

Ürokinazın ilk ana kaynağı 1951'de Williams tarafından da belirtildiği gibi insan idrarıdır (Williams, 1951). Daha sonra ürokinaz insan embriyonik böbrek hücrelerinin kültürlerinden hazırlanmıştır.

Ürokinaz, birçok fizyolojik işlemde yer alan endojen bir maddedir. Kan pıhtılarının çözünmesini gerektiren birçok hastalığın tedavisinde kullanılan terapötik olarak önemli, hayat kurtarıcı bir fibrinolitik enzimdir (Kunamneni vd., 2008b).

1.2.1. Ürokinazın Olası Kaynakları

Ürokinaz ilk olarak insan idrarında keşfedilmiştir ve buradan izole edilmiştir. Daha ileri araştırmalar, ürokinazın vasküler endotelial, yumuşak kas hücreleri (SMC), epitel hücreler, fibroblastlar, monositler/makrofajlar ve aynı zamanda farklı kaynaklı kötü huylu tümör hücreleri tarafından salgılandığını açığa çıkarmıştır. Hücre kültürlerinin (50–100 ng/mL), idrarda bulunana (10–15 ng/mL) kıyasla daha büyük miktarda ürokinaz ürettiği bildirilmiştir. İnsan plazması da en az 10 µg/L ürokinaz-reaktif madde içermektedir (Bansal vd., 2006a). Ürokinazın başlıca kaynağı olan idrardan saflaştırılması meşakkatli ve uzun bir işlemdir ve de oldukça pahalıdır. Ayrıca elde edilen verim 6 CTA (Trombolitik Ajanlar Komitesi)'nin bildirdiği ünite/L idrardan daha az bir seviyededir. Bu değer, bu enzimin bir klinik dozunu üretmek için [7500-8000 CTA ünite] en az 1500 L idrar gerektiğini göstermektedir. Buna karşılık ürokinaz, insan böbrek hücrelerinin konfluent kültürlerinden 800 CTA birim/mL'lik derişimlerde toplanabilir. Son yıllarda ürokinaz üretimi ve izolasyonu için insan hücre kültürleri kullanılmaktadır. Günümüzde ürokinaz üretimi ve izolasyonu için kullanılan hücre kısımlarının listesi aşağıda verilmiştir:

- İnsan embriyo böbrek hücreleri.
- İnsan akciğer adenokarsinom hücre hattı.
- Normal insan umbilikal ven endotel hücreleri.
- İnsan fibroblastları.
- İnsan miyelom hücreleri.
- BHK-21/N hücreleri (Kunamneni vd., 2008a).

Farklı kaynaklardan elde edilen farklı formlardaki ürokinazın Çizelge 1.1'de moleköl ağırlıkları verilmiştir (Bansal vd., 2006a).

Çizelge 1.1. Ürokinazın Farklı Kaynakları (Bansal vd., 2006a).

Kaynak	Moleküler Ağırlık (kDa)	Aktivite	Referans
HT1080 hücreleri	64-55	Aktif	Bansal vd., 2006a
HUVEC	95	İnaktif	Booyse vd., 1988a
HUVEC	53	Aktif	Booyse vd., 1988b
CALU-3, ATCC, HTB-55	53	Aktif	Stump vd., 1987
İdrar	95-100	Aktif	Hayashi vd., 1985
HEp-3 hücreleri	53	İnaktif	Wun vd., 1982a
İnsan böbrek hücreleri	53	Oldukça aktif	Hiroyuki vd., 1982
İnsan hücreleri	53	Aktif	Vetterlein vd., 1980
Ticari ürokinaz	100	Aktif	Burges vd., 1965
İdrar	54	Aktif	Sobel vd., 1952

HT1080: İnsan epitel hücre kültürü

HUVEC: İnsan umbilikal ven endotel hücreleri

CALU-3 (ATCC, HTB-55): İnsan akciğer adenokarsinom hücre hattı

HEp-3: İnsan akciğer epitel hücreleri

1.1.2. Ürokinazın Yapısı

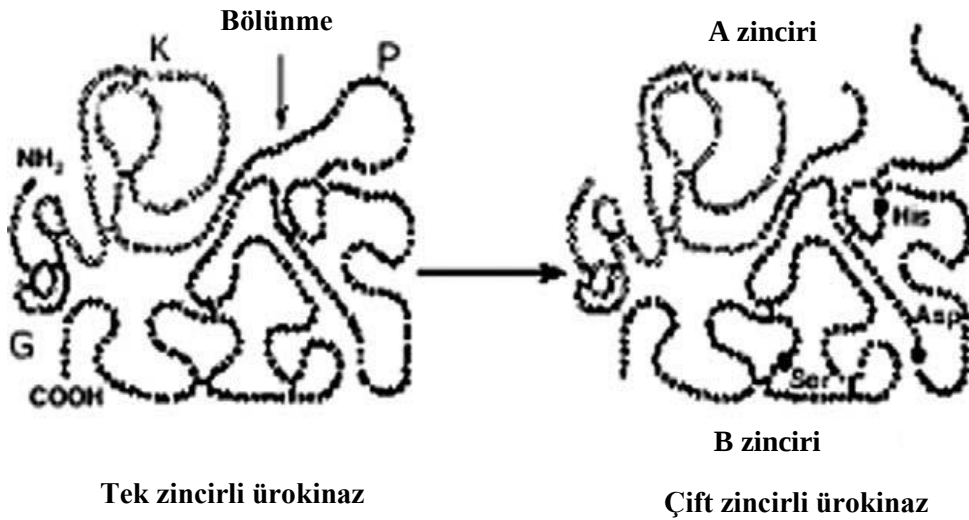
In vivo ortamda molekül kütlesi 55 kDa olan tek bir polipeptit zinciri olarak sentezlenmiştir ve bu protein 411 amino asit içerir. Ürokinaz yapısı 3 domain bulundurur:

- N-terminal epidermal büyüme faktörü benzeri domain,
- kringle domain ve
- C-terminal katalitik domain.

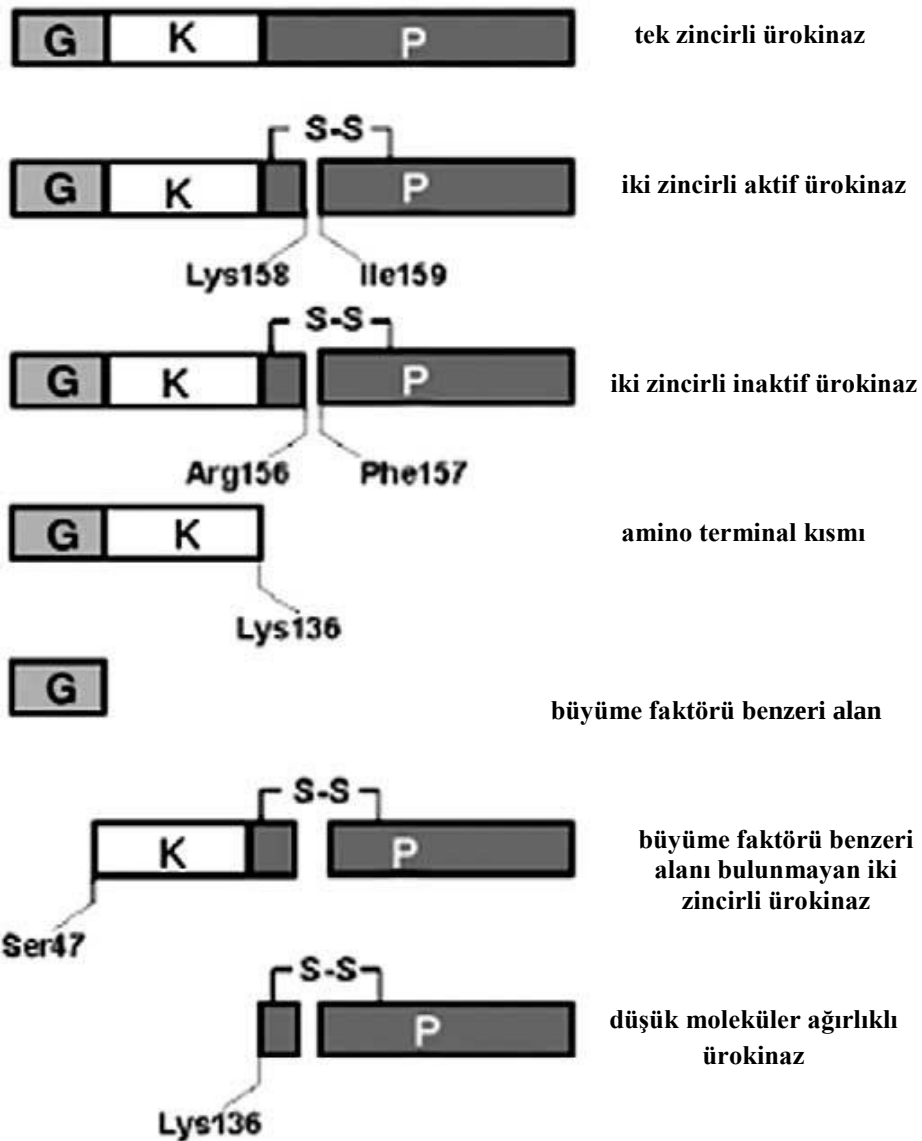
Ürokinazın u-PAR ile etkileşiminden "büyüme faktörü benzeri domain" (GFD) sorumludur. Ürokinazın proteaz bölgesi serin proteazlar için spesifik bir amino asit üçlüsü His₂₀₄, Asp₂₅₅ ve Ser₃₅₆ ile temsil edilen enzimin aktif bölgesini içerir. Ürokinazın kringle domaini spesifik inhibitör PAI-1 (plazminojen aktivatör inhibitörü-1) ile etkileşen bir sekansı içerir. Proteinin her domaini iç disülfid bağları tarafından desteklenen sert bir yapıya sahiptir. Bunlardan üçü GFD'de bulunur, üçü kringle ve altı bağ pr41oteolitik domainde bulunmaktadır. Site-

spesific mutajenik çalışmalar, katalitik alanda disülfid köprülerin, plazminojen aktivatörünün amidolitik ve fibrinolitik aktivitelerinin sürdürülmesi için gerekli olduğunu göstermiştir (Kunamnen, vd., 2008).

Plazmin, tek zincirli ürokinazı tamamen aktif olan iki zincirli forma dönüştürür. Şekil 1.1’de gösterildiği gibi iki zincirli ürokinaz plazminojenin aktivitesini artırır. Ürokinazdaki bir dizi bağ hücre yüzeyinde proteinin çeşitli varyasyonlarının oluşumu ile proteolitik bölünmeye uğrarlar (Şekil 1.2, Çizelge 1.2). Ürokinazın bu çoklu formları molekül ağırlıkları, substrat spesifiteleri ve katalitik aktiviteleri açısından birbirlerinden farklıdır (Çizelge 1.3) (Bansal vd., 2006a).



Şekil 1.1. Hücre yüzeyinde ürokinazın proteolitik bölünmesiyle oluşan ürokinaz fragmentleri. G, büyüme faktörü benzeri domain; K, kringle domain; P, proteaz domain (Bansal vd., 2006a).



Şekil 1.2. Tek zincirli ve iki zincirli ürokinaz formları. G, büyüme faktörü benzeri alan; K, kringle alanı; P, proteaz alanı (Bansal vd., 2006a).

Çizelge 1.2. Ürokinazın Proteolitik İşlemi (Bansal vd., 2006a).

Aktivatör	Substrat/ (bölünme konumu)	Oluşturulan ürokinaz formu	Aktivite	Referans
Triptaz, plazmin, kallikrein, kan pıhtılaşma faktörü XIIa, kateşin B	Tek zincirli ürokinaz/ Lys ₁₅₈ Ile ₁₅₉	HMW çift zincirli	Aktif	Stack vd., 1994
Trombin	Tek zincirli ürokinaz/ Arg ₁₆₈ Phe ₁₅₇	HMW çift zincirli	İnaktif	Ichinose vd., 1986
Plazmin	Çift zincirli ürokinaz/ Lys ₁₃₅ Lys ₁₃₆	LMW çift zincirli	Aktif	Stump vd., 1986

Lys: Lösin

Ile: İzolösin

Arg: Arjinin

Phe: Fenilalanin

HMW: Yüksek moleküler ağırlıklı

LMW: Düşük moleküler ağırlıklı

Çizelge 1.3. Farklı Ürokinaz Formlarının Karşılaştırılması (Bansal vd., 2006a).

Ürokinaz	Moleküler ağırlık (kDa)	Trombolitik aktivite	Fibrin özgülülüğü	Referans
Çift zincirli (HMW) (idrar)	53	Yüksek	Düşük	Soberano vd., 1976
Çift zincirli (LMW) (idrar)	32	Düşük	Düşük	Samama vd., 1979
Tek zincirli hücre sel (LMW)	32	Yüksek	Düşük	Stump vd., 1986
Tek zincirli (HEp-3)	53	Sıfır	Yüksek	Wun vd., 1982b
Tek zincirli (idrar)	95-100	Yüksek	Yüksek	Hayashi vd., 1985
Tek zincirli (CALU-3)	54	Düşük	Yüksek	Stump vd., 1987
Tek zincirli (ticari preperat)	53	Düşük	Yüksek	Stump vd., 1987
Tek zincirli (hücre sel)	53	Düşük	Yüksek	Stump vd., 1987

HMW: Yüksek moleküler ağırlıklı

LMW: Düşük moleküler ağırlıklı

HEp-3: İnsan akciğer epitel hücre kültürü

CALU-3: İnsan akciğer adenokarsinom hücre hattı

1.2.3. Ürokinazın Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Ürokinaz renksiz bir proteindir, geniş bir pH ve sıcaklık aralığında yüksek bir kararlılık derecesine sahiptir. Ürokinazın amino terminal kısmı (ATF) 130 amino asit dizisi uzunluğundadır. 2- α -heliks ve iki anti-paralel β -plakadan oluşur. Amino terminal kısmı bir büyüme faktörü domain ve bir kring domain olmak üzere iki domain içerir. Fukozu (magenta) ligand olarak bağlar. Fukoz bir deoksi-şekerdir, bir veya daha fazla hidroksil (-OH) grubunun bir hidrojen (-H) ile yer değiştirdiği bir monosakarittir. Fukozun kimyasal formülü $C_6H_{12}O_5$ 'dir. Amino terminal kısmı ayrıca Cys₁₁-Cys₁₉, Cys₁₃-Cys₃₁, Cys₃₃-Cys₄₂, Cys₅₀-Cys₁₃₁, Cys₇₁-Cys₁₃₃, ve Cys₁₀₂-Cys₁₂₆ disülfid bağlarını içerir.

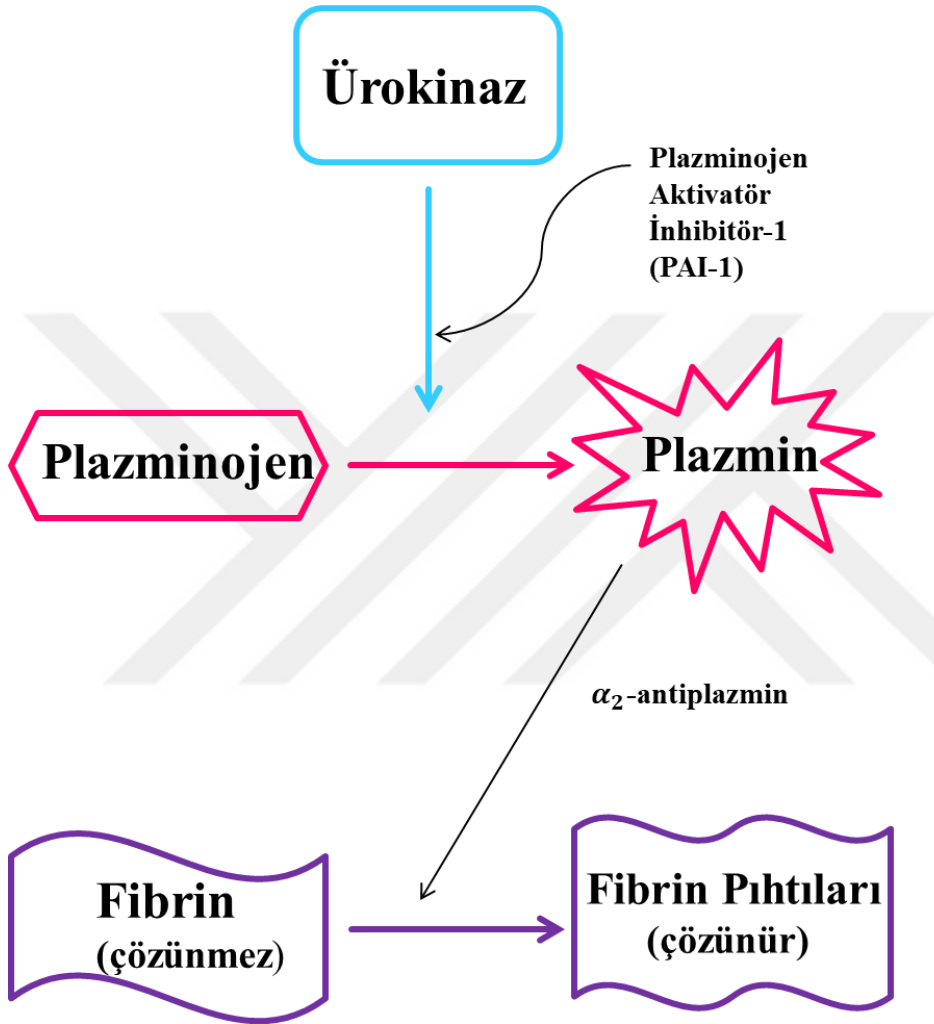
Ürokinazın birçok moleküler boyutta bulunabileceği bilinmekteydi. İki ana biçim olduğu görülmüştür: düşük moleküler ağırlık (LMW, 33-kDa) formu ve yüksek moleküler ağırlık (HMW, 57-kDa) formu. İdrardan izole edilen ürokinazın genelde LMW formunda bulunduğu tespit edildi. HMW formunun doğal yapı olduğu ve hücre sel proteazlarla LMW formuna dönüştürüldüğü ileri sürülmüştür. Ancak,

belirli koşullar altında, standart enzim kinetiği yöntemleriyle denendiğinde HMW formunun daha aktif olduğu bulunmuştur.

Enzim orta derecede kararlıdır. Liyofilize formda yıllar boyunca veya 1 mg/mL veya daha yüksek derişimlerde steril çözeltilerde bozdolabı sıcaklıklarında aylarca aktivitesini korur. Çok düşük tuz derişimlerinde çökmenin meydana gelmesiyle aktivite kaybı olur. Fibrinolitik deneyde yüzey denatürasyonunu önlemek için insan serum albumin fraksiyonu V veya jelatin gibi bir protein ilave edilmesi önerilir (Kunamneni vd., 2008a).

1.2.4. Ürokinazın Etki Mekanizması

Ürokinaz [EC 3.4.99.26], proenzim/zimojen plazminojeni spesifik olarak parçalayarak aktif enzim plazmin oluşturan kuvvetli bir plazminojen aktivatörüdür (Şekil 1.2). L-lizin ve L-arginin esterlerini hidroliz edebilen bir tripsin benzeri enzimdir. Plazminojendeki Arg-Val bağının birinci dereceden kinetik olarak bölünmesini spesifik olarak katalize eder. Aktif plazmin daha sonra kan pıhtılarının fibrin polimerlerini parçalayabilir. Bell vd. ürokinaz tarafından gerçekleştirilen fibrinolizin indüksiyon mekanizmasını incelemişler ve ürokinazı, plazminojeni ve fibrinojeni içeren sistemlerde bir plazminojen-fibrinojen kompleksi oluşana kadar ürokinazın plazminojeni etkili bir şekilde aktive etmeyebileceğini öne sürmüşlerdir (Bell vd., 1974).



Şekil 1.3. Ürokinaz ile fibrinolitik sistemin şematik gösterimi (Kunamneni vd., 2008b).

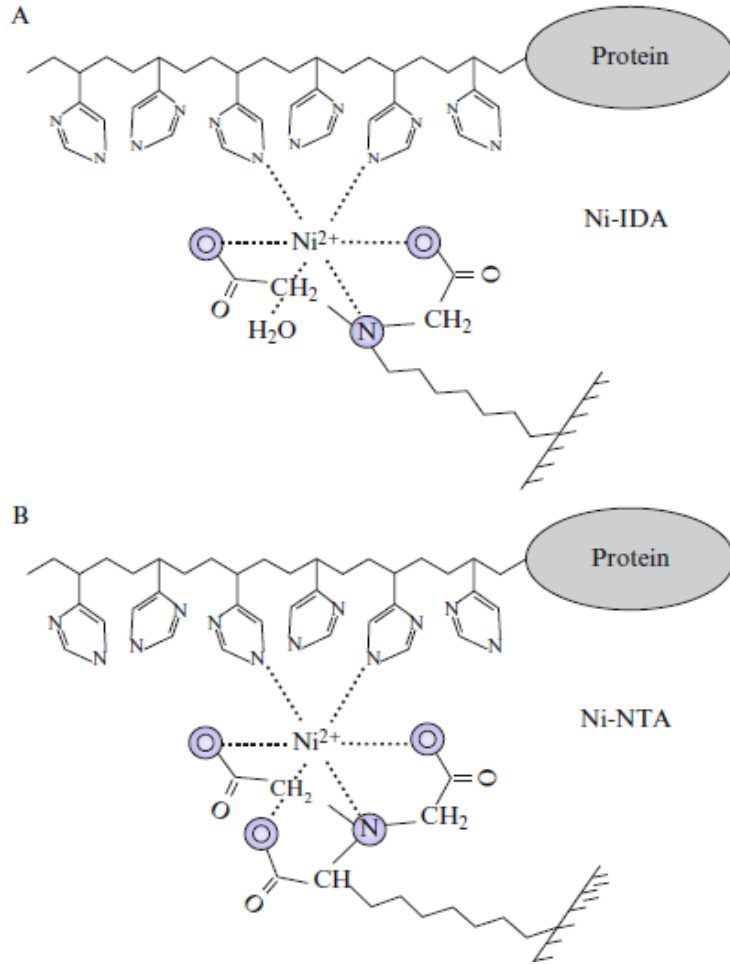
1.3. İmmobilize Metal İyonu Afinite Kromatografisi

İmmobilize metal afinite kromatografisi (IMAK) kavramı ilk olarak Porath vd. (1975) tarafından ifade edilmiş ve uygulanabilirliği gösterilmiştir. Sulu çözeltilerde histidin ve sisteine Zn (II), Cu (II), Ni (II) ve Co (II) gibi geçiş metal iyonlarının bilinen afinitesine dayanmaktadır ve protein çözeltilerini fraksiyonlamak için bir desteğe “güçlü bir şekilde sabitlenmiş” metal iyonlarını kullanma fikrine kadar uzanmıştır (Hearon vd., 1948). Porath’ın, metali agaroz sabitlemek için kullandığı şelatlayıcı ligand iminodiasetik asit (IDA), bugün

birçok ticari IMAK reçinesinde halen kullanılmaktadır. Porath, 1975 yılında immobilize metallerin histidin içeren proteinlere olan afinitesini belirtmiştir (Porath vd., 1975).

Porath'ın yayınlarından sonraki yıllarda yeni IMAK teknolojisi Sulkowski (1985) tarafından yapılan ilk IMAK incelemesinde çeşitli proteinlerin ve peptidlerin saflaştırılmasıyla başarıyla değerlendirilmiş ve özetlenmiştir. Bu gelişme, 1970'lerin sonundaki rekombinant tekniklerin ve modern moleküler biyolojinin hızla olgunlaşmasıyla ve 1980'lerde geliştirilmiş bir şelatlayıcı ligand olan nitrilotriasetik asitin (NTA) keşfi ile hızlanmıştır (Hochuli vd, 1987). Bu arada, NTA bazlı destekler kullanılarak rekombinant proteinlerin saflaştırılması IMAK'in en önemli uygulamasını temsil etmektedir (Hochuli vd, 1988). Bir His-etiketlenmiş proteininin immobilize metal iyonu ile etkileşiminin başlıca mekanizması Şekil 1.3'de sunulmuştur (Block vd., 2009).

IMAK, çeşitli proteinler için afinite ligandları olan, metal iyonlarını tutuklamak için katı kromatografik destekler üzerine kovalent bağlı şelatlayıcı bileşiklerin kullanıldığı bir saflaştırma tekniğidir (Porath vd., 1975). Afinite kromatografisinin diğer formlarında olduğu gibi IMAK, hızlı saflaştırma ve ürünün önemli ölçüde saflığının gerekli olduğu durumlarda kullanılır; diğer afinite ayırma teknolojileri ile kıyaslandığında yüksek derecede spesifik olarak sınıflandırılmaz ancak orta derecede spesifiktir. Endüstriyel uygulamalar için büyük ölçekli saflaştırma prosedürleri geliştirilirken IMAK-ligand kararlılığının, yüksek miktarda protein yüklemenin, ılımlı elüsyon koşullarının, basit rejenerasyonun ve düşük maliyetin faydaları ön plana çıkmaktadır (Gaberc-Porekar, 2001).



Şekil 1.4. (A)Tri-(IDA), (B) tetra-(NTA) IMAK ligandlarındaki His etiketindeki birimler ve metal iyonları arasındaki etkileşimin şematik gösterimi (Block vd., 2009).

1.3.1. İmmobilize Metal İyonu Afinit Kromatografisinin Mekanizması, Teknikleri, Destekleri, Şelatlayıcı Ligandları, Metal İyonları

IMAK'de proteinlerin adsorpsiyonu immobilize bir metal iyonu ve protein yüzeyindeki elektron verici grupları arasındaki koordinasyona dayanmaktadır. En yaygın olarak kullanılan, elektron çifti alıcıları olan ve Lewis asitleri olarak düşünülebilen geçiş metali iyonları Cu (II), Ni (II), Zn (II), Co (II), Fe (III)'dür. Kromatografik desteğe bağlı olan şelatlayıcı bileşiklerde bulunan, elektron verici atomlar (N, S, O), metal iyonlarını koordine etme ve işgal edilen koordinasyon

bağlarının sayısına bağlı olarak iki dişli, üç dişli vb. metal şelatları oluşturma yeteneğine sahiptir. Geriye kalan metal koordinasyon bölgeleri su molekülleri tarafından işgal edilir ve proteindeki uygun elektron verici gruplar ile yer değiştirebilirler. Ayrıca amino terminal uçların yanı sıra, bazı amino asitler yan zincirlerindeki elektron verici atomlar nedeniyle bağlanma için uygundur. Glu, Asp, Tyr, Cys, Arg, Lys ve Met gibi birçok amino asit birimleri bağlanmaya katılmasına rağmen İMAK'deki asıl protein bağlanması esas olarak histidin birimlerinin varlığına dayanır. Şelat metal iyonlarına bağlanmaya katkıda bulunabilen serbest sisteinler nadiren uygun, indirgenmiş durumda bulunurlar. Bununla birlikte, Trp, Phe ve Tyr'in aromatik yan zincirleri erişilebilir histidin birimlerinin yakınındaysa, bağlanmaya katkıda bulunabilir (Cheung vd., 2012).

İMAK desteğine bir proteinin adsorpsiyonu, histidin birimlerindeki imidazol azotlarının protonsuz formda olduğu bir pH'da, genellikle nötr veya hafif bazik ortamda gerçekleştirilir. Genellikle spesifik olmayan elektrostatik etkileşimleri azaltmak için oldukça yüksek iyonik güce sahip tamponlar (0.1 - 1.0 M NaCl içeren) kullanılırken tamponun kendisi şelatlanmış metal iyonuna koordineli olarak bağlanmamalıdır. Hedef proteinin elüsyonu; protonasyon, ligand değişimi veya metal iyonunun EDTA gibi daha kuvvetli bir şelatlayıcı maddeyle ekstraksiyonu ile sağlanır. Daha düşük pH veya daha düşük pH gradientleri olan elüsyon tamponları hedef proteinin elüsyonu için yaygın olarak kullanılır. Bununla birlikte, bir proteinin İMAK desteğine adsorpsiyonu histidin birimlerinde imidazol azotlarının protonsuz bulunduğu bir pH'da gerçekleştirilir. Bu durumda, İMAK kolonları imidazol proton pompası etkisinden kaynaklanan pH düşüşünden kaçınmak için kromatografik ayırmadan önce imidazol ile doymuş ve dengelenmiş olmalıdır (Gaberc-Porekar vd., 2001).

Protein saflaştırmada seçicilik, metal ligandın seçimi, şelatlayıcı bileşiğin yapısının değişimi, afinite kollarının değişimi, ligand yoğunluğu, tuzların konsantrasyonu ve yarışmalı ajanlar gibi çeşitli yaklaşımlarla gerçekleştirilebilir. Örneğin, insan büyüme hormonu söz konusu olduğunda şelatlayıcı destekte ligand olarak kullanılan IDA-Cu (II) yoğunluğunun azaltılması daha yüksek protein saflığı ve artan verimle sonuçlanmıştır (Liesiene vd., 1997). Bir proteinin bir metal şelatlayıcıya afinitesi, koordinasyona katılan metal iyonuna bağlıdır. Şelatlayıcı olarak iminodiasetik asit (IDA) kullanıldığında metallerin proteinlere afinitesi aşağıda sıralandığı gibidir:

$\text{Cu (II)} > \text{Ni (II)} > \text{Zn (II)} \geq \text{Co (II)}$

Al (III), Ca (II), Fe (III), Yb (III) gibi güçlü Lewis asidi olan metal iyonları, oksijen açısından zengin aspartik ve glutamik asit gruplarını veya fosfat gruplarını tercih ederler ve bu durum glutamik veya aspartik asit bakımından zengin afiniteye sahip yeni afinite desteklerinin elde edilmesine olanak sağlar.

IDA bugüne kadar en çok kullanılan şelatlayıcı bileşiktir. Birçok firmadan ticari olarak temin edilebilir. Son birkaç yıl içinde birçok şelatlayıcı bileşik immobilizasyon ve saflaştırma için kullanılmaktadır (Çizelge 1.4). Genel olarak, NTA ve TALON (karboksimetillenmiş aspartik asit ticari ismi: CM-Asp) gibi beş dişli (tetradentat) ligandlar, metal iyonları için üç dişli (tridentat) şelatlayıcı IDA'dan daha yüksek afiniteye sahiptirler; ancak bir koordinasyon bölgesinin kaybı nedeniyle daha düşük protein bağlanması sergilerler. Bu, pentadentat TED şelatlayıcı ligandında daha belirgindir. Bu durumda iki değerlikli metal iyonu çevresindeki oktahedral düzenlemede protein bağlanması için yalnızca bir koordinasyon bölgesi kalmıştır.

Klasik sabit fazlar, agaroz veya çapraz bağlı dekstran gibi yumuşak jel matrisleridir. Polisakkaritler biyolojik olarak uyumludur ve kolayca aktive edilirken, düşük mekanik dayanıklılık ve büyük basınç düşüşü sergilemeleri sanayide kullanımlarını sınırlamaktadır. Diğer yandan, silika gibi inorganik destekler mükemmel mekanik özelliklere sahiptirler; ancak proteinler için geri dönüşümsüz nonspesifik adsorpsiyon sergilemektedirler (Cheung vd., 2012).

Çizelge 1.4. İMAK'da kullanılan bazı şelatlayıcı bileşikler (Gaberc-Porekar vd., 2001).

Şelatlayıcı bileşik	Koordinasyon	Metal iyonları	Referans
Aminohidroksamik asit	iki dişli	Fe (III)	Ramadan ve Porath, 1985
Salisilaldehit	iki dişli	Cu (II)	Leibler vd., 1996
8-Hidroksi-kinolin (8-HQ)	iki dişli	Al (III), Fe (III), Yb (III)	Zachariou vd., 1996
İminodiasetik asit (IDA)	üç dişli	Cu (II), Zn (II), Ni (II), Co (II)	Porath vd., 1975
Dipikolilamin (DPA)	üç dişli	Zn (II), Ni (II)	Porath vd., 1992
Orto-fosfoerin (OPS)	üç dişli	Fe (III), Al (III), Ca (II), Yb (III)	Zachariou vd., 1993
N-(2-piridilmetil) amino asetat	üç dişli	Cu (II)	Chaouk vd., 1999
2,6-Diaminometil piridin	üç dişli	Cu (II)	Chaouk vd., 1999
Nitrilotriasetik asit (NTA)	dört dişli	Ni (II)	Hochuli vd., 1987
Karboksimetilat aspartik asit (CM-Asp)	dört dişli	Ca (II), Co (II)	Porath vd., 1992
N,N,N'-tris(karboksimetil) etilendiamin (TED)	beş dişli	Cu (II), Zn (II)	Porath vd., 1992

1.4. Boya Ligand Afinite Kromatografisi

Boya ligand kromatografisi, proteinleri saflaştırmak için immobilize tekstil boyalarını kullanan bir afinite kromatografisi tekniğidir. Boya ligand adsorbentleri, son 30 yılda protein saflaştırılmasındaki en önemli gelişmelerden birini temsil eder. Boya ligandları proteinleri spesifik veya bir dizi spesifik olmayan etkileşimlerle bağlayabilmektedirler. Boya-ligand ve proteinler arasındaki etkileşim, elektrostatik, hidrofobik ve hidrojen bağlarının kompleks kombinasyonu ile sağlanmaktadır. Çeşitli boya ligand destekleri substratların, kofaktörlerin veya bağlayıcı ajanların konfigürasyonunu taklit edebilme yeteneğinden dolayı dehidrogenazlar, kinazlar, plazma proteinleri ve çeşitli proteinlerin izolasyonu için kullanılmıştır. Cibacron Blue F3GA Procion blue gibi boya ligandlarının adenilil içeren kofaktörleri gerektiren enzimlere yüksek afinite

sergilediği gösterilmiştir [örneğin NAD(H), NADP(H)] (Chronopoulou ve Labrou, 2014).

Boya ligandlar sentetik olmalarına rağmen kolay immobilizasyon, yüksek kimyasal ve biyolojik kararlılık, yüksek bağlanma kapasitesi ve düşük maliyet nedeniyle spesifik biyolojik ligandlara kıyasla bazı avantajlara sahiptir (Çizelge 1.5).

Çizelge 1.5. Boya-ligand afinite desteklerinin avantajları (Labrou ve Chronopoulou, 2014).

Boya-ligand afinite desteklerinin avantajları
Düşük maliyet
Toplu miktarlarda kolaylıkla temin edilebilir
Farklı pH'lardaki elüsyon tamponlarında aktivite kaybının olmaması
Reaktif gruplar vasıtasıyla desteğe kolayca bağlanma
Geniş bir protein yelpazesi için yüksek bağlanma kapasitesine sahip olma

Triazin boyaların, bir amino köprüsü ile birleştirilen iki yapısal olarak farklı birimden oluşmaktadır. Kromofor birim (azo, antrakinon veya ftalosiyanın) renk verir ve reaktif birim, çözünmeyen desteğe kovalent bağlanma alanı sağlar. Boya kimyasında araştırılan ilk ve en başarılı reaktif birim, siyanürik klorür (1,3,5-sim-triklorotriazin)'dür.

Bir boya-ligand kromatografik basamağın başarılı bir şekilde çalışmasına birçok faktör katkıda bulunur. Bunlar, matris türü ve ligand konsantrasyonu, adsorpsiyon ve elüsyon koşulları, akış hızı ve kolon geometrisi gibi destek özelliklerini içerir. Bunların arasında adsorpsiyon ve elüsyon adımları başarılı bir ayırma için özenle optimize edilmeli veya tasarlanmalıdır (Chronopoulou ve Labrou, 2014).

Farmasötik proteinlerin saflaştırılmasında boya-ligand afinite kromatografisinin geniş çaplı uygulaması bulunmaktadır. Son zamanlardaki bazı örnekler faktör B, faktör C2, faktör II, faktör IX, tripsin, kimotripsin ve proteinazın saflaştırılmasını içermektedir. Ayrıca, insan rekombinant α -interferonu, bir mimetik boya-ligand desteğinde tek aşamalı bir işlem kullanılarak saflaştırılmıştır. Diğer örnekler

folikül uyarıcı hormon, hipofiz gonadotropinler, risin A zinciri ve insan serum albüminini içerir.

Farmasötiklerin afinite kromatografisinde geniş çaplı ve başarılı bir şekilde uygulanmasına rağmen, sızıntısı ve toksisitesi üzerine endişeler biyofarmasötik imalatıta kullanımlarını sınırlamıştır. Bu yöntemler kullanılarak saflaştırılan proteinler, analitik ve teknik kullanımlar için uygundur. Büyük ölçekli proteinlerin ve enzimlerin saflaştırılmasında boya ligand afinite kromatografisinin uygulama örnekleri Çizelge 1.6’da verilmiştir (Labrou, 2003).

Çizelge 1.6. Boya ligand afinite kromatografisinin protein ve enzim saflaştırılması uygulamalarına örnekler (Labrou, 2003).

Saflaştırılmış enzim/protein	Kaynak	Ligand	Referans
Fosfotransferaz ATP: AMP	Sığır kalbi	Cibacron Blue F3GA	Ito vd., 1980
Lizozim	Sığır serum albümini	Cibacron Blue F3GA	Denizli vd., 1998
Alkol dehidrogenaz	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Reactive Green 19	Kaya vd., 2013
Laktoperoksidaz	Peyniraltı suyu	Triazin boyalar	Urtasun vd., 2017
Alkalın fosfataz	Buzağı bağırsağı	Biyomimetik boyalar	Wang vd., 2006
Galaktoz oksidaz	<i>Dactylium dendroides</i>	Biyomimetik boyalar	Mazitsos vd., 2002
Lizozim	Yumurta akı	Reactive Blue 4 ve Reactive Red 120	Arıca vd., 2005
Alkol dehidrogenaz	Sığır karaciğeri	Procion Red	Shibusawa vd., 2004

1.5. Manyetik Nanopartiküller

Manyetik nanopartiküller, manyetik sıvılar, kataliz, biyoteknoloji/biyotıp, manyetik rezonans görüntüleme, veri depolama ve çevresel iyileştirme de dahil olmak üzere geniş bir disiplin alanındaki araştırmacılar için büyük ilgi

görmektedir. Çeşitli bileşimlere sahip manyetik nanopartiküllerin sentezi için bir takım uygun yöntemler geliştirilmekle birlikte, bu tür manyetik nanopartiküllerin yukarıda listelenen alanlara başarılı bir şekilde uygulanması farklı koşullar altındaki partiküllerin kararlılığına oldukça bağlıdır. Öngörülen uygulamaların çoğunda kritik bir değerin altında olduğunda (genellikle 10-20 nm civarında), partiküller en iyi performansı gösterir. Nanopartiküller büyük bir sabit manyetik momente sahiptirler ve göz ardı edilebilir bir artık mıknatıslanma (artık manyetizma) ve koersivite (manyetizasyonu sıfıra getirmek için gereken alan) ile uygulanan manyetik alanlara verdikleri hızlı tepkiler ile dev bir paramanyetik atom gibi davranırlar (Schüth vd., 2007). Çeşitli teknolojik uygulamalar, birçok araştırmanın odak noktası olmakla birlikte manyetik nanopartiküller ayrıca malzeme mühendisliği, fizik, kimya, jeoloji, biyoloji ve tıp alanlarında araştırma araçları olarak da kullanılmaktadır (Kodama, 1999).

Manyetik nanopartiküllerden oluşan malzemelerin özellikleri, parçacıkların hem içsel özelliklerinin hem de parçacıklar arasındaki etkileşimlerin bir sonucudur. Bununla birlikte, bu boyut aralığındaki parçacıklarla ilişkili kaçınılması zor bir sorun, uzun süreler boyunca içsel kararsızlıklarıdır. Bu tür küçük partiküller yüksek yüzey alanı/hacim oranı ile ilişkili enerjiyi azaltmak için agregatlaşmaya eğilimlidirler. Dahası, yalın metalik nanopartiküller kimyasal olarak oldukça aktiftirler ve havada kolayca okside olurlar. Bu durum genellikle dispersitenin ve manyetizmanın kaybedilmesine ile sonuçlanır. Birçok uygulama için, yalın manyetik nanopartiküllerin sentez sırasında veya sonrasında bozunmaya karşı kimyasal olarak stabilize edilmesine yönelik koruma stratejilerinin geliştirilmesi çok önemlidir. Bu stratejiler, organik türlerle aşılama veya kaplanmasını, yüzey aktif maddeler veya polimerler ya da silis veya karbon gibi inorganik bir tabaka ile kaplanmasını içerir. Birçok durumda, koruyucu kabuklar nanopartikülleri yalnızca stabilize etmekle kalmaz, aynı zamanda istenen uygulamaya bağlı olarak diğer nanopartiküller veya çeşitli ligandlarla daha ileri fonksiyonelleştirilmesi için de kullanılabilir. Fonksiyonelleştirilmiş nanopartiküller, kataliz, biyolojik işaretleme ve biyolojik ayırma uygulamaları için oldukça umut vericidir (Schüth vd., 2007).

1.5.1. Enzim Safılaştırılmasında Manyetik Nanopartiküller

Nanobiyoteknolojinin ortaya çıkışı, birçok sağlık ve çevre sorununu çözmek için yeni tekniklerin geliştirilmesine büyük katkıda bulunmuştur. Nanometre boyutundaki manyetik nanopartiküller, son derece küçük boyutları ve büyük

spesifik yüzey alanı, eşsiz fiziksel ve kimyasal özelliklerinden dolayı büyük ilgi görmüştür. Manyetik nanopartiküller veri depolama aygıtlarından cilt bakım ürünlerine kadar birçok uygulamada kullanılmaktadır. Son yıllarda manyetik nanopartiküller ilaç salım sistemleri, biyosensörler, su arıtma sistemleri ve biyomoleküler ayırma/saflaştırma uygulamalarında toksik olmadığından ve güçlü manyetik özelliklerinden ötürü hem tıp hem de biyoloji alanlarında kullanılmaktadır.

Protein saflaştırma, biyoteknolojide yapılan ilerlemelerde temel bir gereklilik haline gelmiştir. Biyoteknolojide, antikör bazlı ayırma veya hedef proteini bağlamak için spesifik etiketler içeren bir matriks kullanılarak afinite proteininin saflaştırılması yaygın olarak kullanılan yöntemlerdir. Manyetik nanopartiküller, küçük bir numune hacmi için bile diğer katıların varlığında, seçilen hedef biyomolekülleri etkili bir şekilde yakalamak için basit ve hızlı bir yöntem olarak kullanılabilir. Proteinler/peptidler gibi biyomoleküllerin saflaştırılması ve immobilizasyonu için süperparamanyetik demir oksit nanopartikülleri gibi manyetik nanopartiküllerin kullanılması aşağıdaki avantajlara sahiptir:

- Büyük miktarda protein örneğini bağlamak için yüksek spesifik yüzey alanına sahiptirler.
- İstenen yüzey özelliklerine sahip biyomoleküller seçici olarak hedeflenir ve reaksiyon karışımından manyetik alan uygulanmasıyla kolaylıkla ayrılırlar.
- Saflaştırma işleminde santrifüjleme, süzme, vb. gibi birkaç adımı ortadan kaldırılabilir.

Manyetik ayırmayı kullanmak yumuşak ve hızlı bir alternatif sunmaktadır; hedefler istenen manyetik parçacık yüzeyinde yakalanır ve harici bir manyetik alan kullanılarak örnekten hızlı bir ayrılma sağlanır (Okoli vd., 2011).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Trombozun çeşitli tipleri her yıl çok sayıda ölüme sebep olmaktadır. Sadece Amerika Birleşik Devletleri'nde pulmoner akciğer embolinin veya akciğerlerde pıhtı oluşumunun yılda 1 milyon hastayı etkilediği düşünülmektedir. Bu durum, plazminojen aktivatörlerini içeren ajanlara olan gereksinimin artmasına neden olmaktadır. Plazminojen aktivatörleri plazminojenin plazmine dönüşümünü katalizlerler. Ürokinaz, plazmin oluşmasının bir sonucu olarak tromboembolik hastalıkların tedavisinde damar içinden uygulanarak kan damarlarındaki fibrin pıhtısının çözünmesini sağlar. Sonuç olarak plazminojen aktivatörlerine olan ilgi giderek artmış ve 2005 yılında plazminojen aktivatörlerinin dünyadaki pazarı 1,5 milyar dolara ulaşmıştır. Bu durum plazminojen aktivatörlerinin elde edilmesi için yeni ve ucuz yöntemlerin geliştirilmesini zorunlu hale getirmiştir. Kullanımdaki temel plazminojen aktivatörleri streptokinaz, ürokinaz ve doku plazminojen aktivatörüdür. Bunların içerisinde ürokinaz doku plazminojen aktivatörüne göre daha üstün özelliklere sahiptir ve streptokinazın aksine insan kaynaklı olduğundan antijenik değildir. Bu bilgiler değerlendirildiğinde temel olarak idrardan elde edilen ürokinaz çok popüler bir kardiyovasküler ajandır. Bununla birlikte insan idrarındaki çok düşük düzeyleri nedeniyle *in vitro* olarak kültüre edilmiş insan hücreleri ürokinazın üretimi ve saflaştırılması için önemli bir alternatif olmuştur (Bansal ve Roychoudhury, 2006). Bu çalışmada da ürokinaz saflaştırılmasında kullanılabilecek nano boyutta yeni bir destek materyalinin sentezlenmesi ve ürokinaz adsorpsiyonu ve desorpsiyonu koşullarının araştırılması amaçlanmıştır.

Literatürde ürokinaz saflaştırılması ile ilgili birçok çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalara örnekler şöyledir:

Hou ve Zaniwski (1990), köpük flatasyonu ve amonyum sülfat çöktürmesi yoluyla işlenmiş insan idrarından ham ürokinazı SP kartuşu ile saflaştırmışlardır. SP kartuşu kullanıldığında enzimin spesifik aktivitesinde altı kattan daha fazla artış ve ardından çinko şelatlanmış afinite kartuşu kullanıldığında spesifik aktivitede on sekiz kattan daha fazla artış olduğunu görmüşlerdir.

Clonis ve Lowe (1991) monodispers sentetik makrogözenekli küreleri içeren afinite desteklerinin düşük işlem basınçlarında proteinlerin yüksek kapasitede ve yüksek rezolüsyon ile ayrılmasında kullanılabileceğini göstermişlerdir. Bu araştırmacılar maksatlı olarak dizayn edilmiş biyomimetik boyalarını Dynospheres

XP-3507 kürelerine kovalent olarak bağlamışlar ve buzağı ince bağırsağı alkalın fosfataz ve insan idrarı ürokinazını ham ekstraktlardan saflaştırmak için kullanmışlardır. Araştırmacılar bu çalışma ile spesifik olarak dizayn edilmiş afinite ligandları ile eş boyutlu destek materyallerinin kombinasyonunun, yüksek performans afinite kromatografisinde proteinlerin saflaştırılması için güçlü bir yaklaşım olduğunu rapor etmişlerdir.

Takahashi vd. (2000), hidrofobik bölgeye sahip bir destek materyalini kullanarak hidrofobik etkileşim kromatografisi ile insan idrarından ürokinaz enzimini saflaştırmışlardır. Bu hidrofobik afinite matrisini, Sepharoz CL-6B üzerine 6-aminokaproik asidi immobilize ederek ve ardından desteğin hidrofobik bölgesinin bir kısmına p-aminobenzomidin bağlayarak hazırlamışlardır. Bu destek matrisi ile insan idrarından düşük ve yüksek molekül kütesine sahip ürokinaz enzimlerini yüksek verimle saflaştırmışlardır.

Fahey vd. (2000), rekombinant ürokinaz plazminojen aktivatörü fragmentini *E. coli*'de ekspresse ederek, üç aşamalı bir işlem ile saflaştırmışlardır. İlk adımda Triton X-100 ve üre ile yıkama ve santrifüjleme yapmışlar ve daha sonra denatüre proteinler tampon değişimi ile renatüre etmişlerdir. Ardından büyüklük dışlama ortamı kullanarak örneği fraksiyonlamışlar ve renatüre ürokinazı iyon değişim kromatografisi ile deriştirmişlerdir.

Gao vd. (2002), tek zincirli ürokinaz ile çift zincirli ürokinaz arasındaki temel yapısal farklılığın Lys₁₅₈-Ile₁₅₉ arasındaki tek bir bağın parçalanması olduğunu göstermişlerdir. Tek zincirli ürokinaz için monolitik spesifik bir antibadi farelerde üretilerek saflaştırılmış, ardından immunoafinite kromatografisi için ligand olarak kullanılmıştır. Ürokinaz plazminojen aktivitesi rekombinant CHO hücrelerinden yaklaşık 50 kat ve % 96.3 verimle saflaştırılmıştır.

Bansal vd. (2006b), insan böbrek hücreleri HT080'nin hücre kültürü ortamından ürokinaz saflaştırmak için bir entegre ürün kazanım sistemi geliştirmişlerdir. Cu (II)-immunodiasetik asit (IDA)-poliakrilamid kriyojel kolonu, HT1080 hücre kültürü için jelatin bağlı pAAM-kriyojel biyoreaktörü ile entegre edilerek ürokinaz tutuklamak için kullanılmıştır. Ürokinazın tutuklandığı kolon entegre sistemden uzaklaştırıldıktan sonra bağlanan ürokinaz elüe edilmiştir. Metal afinite kromatografisi ile 4.5 kat saflaştırma sağlanmış ve enzimin spesifik aktivitesi 1300 Plough ünitesi/mg protein olarak bulunmuştur. Cu (II)-IDA-pAAM kriyojel

kolonundan elde edilen enzim benzamidin-Sepharoz afinite kolonu ile ileri saflaştırmaya tabii tutulmuştur. Bu iki adımlı saflaştırma sonunda ürokinaz 45.5 kat saflaştırılmış ve spesifik aktivitesi 13 550 Plough ünitesi/mg protein olarak bulunmuştur.

Kumar vd. (2006), yeni süper makrogözenekli Cu (II) bağlı epoksi aktiviteli poliakrilamid kriyojel afinite desteği hazırlayarak insan fibrosarkoma hücre hattı HT1080'den ürokinaz enziminin saflaştırılmasını gerçekleştirmişlerdir. Ayrıca bu yeni kriyojel matriksi ile entegre biyoreaktör sisteminde ürokinazın sürekli ayırımı için kullanılan geleneksel Sepharoz bazlı afinite desteğinin performansını karşılaştırmışlardır. Araştırmacılar ürokinaz saflaştırılmasında kriyojel bazlı IMAK desteğinin seçiciliğinin Cu (II)-IDA-Sepharoz kolonundan daha yüksek olduğunu göstermişlerdir.

Bansal vd. (2007), insan böbrek hücre kültüründen ürokinaz saflaştırmak için tek adımlı bir saflaştırma işlemi geliştirmişlerdir. Bu amaçla sülfopropil-Sepharoz iyon değişim kolonunu hazırlamışlar ve insan böbrek hücre kültür ortamından (HT1080) yüksek ve düşük molekül ağırlığına sahip ürokinaz tipi plazminojen aktivatörünü saflaştırmışlardır.

Literatürde ürokinaz immobilizasyonu için yapılan birçok çalışma bulunmaktadır. Bunlara örnekler:

König vd. (1999), ürokinaz enziminin immobilizasyonu için politetra floroetilen (PTFE) üzerinde fonksiyonel yüzey gruplarının oluşmasını sağlamışlardır. Daha sonra enzimi fonksiyonel yüzey grupları vasıtasıyla NHS ve EDC kimyasını kullanarak poli(akrilik asit) aşılınmış PTFE üzerine kovalent olarak immobilize etmişlerdir. Altı günlük saklama süresi sonunda enzimin aktivitesinde herhangi bir düşüş olmadığını görmüşlerdir.

Choi vd. (2001), polipropilen (PP) film üzerine GMA monomerini radyasyon başlatıcılı olarak aşılama ve L-Phe; D,L-Phe; L-Cys; D,L-Tyr amino asitleri ile modifiye etmişlerdir. Daha sonra bu destek materyaline ürokinaz enzimini adsorpsiyon yoluyla immobilize etmişlerdir. Araştırmacılar dört farklı amino asit ile modifiye edilmiş PP film üzerine ürokinaz adsorpsiyonu değerlerini L-Phe > D,L-Phe > D,L-Tyr > L-Cys şeklinde bulmuşlardır.

Suh vd. (2003), çok noktalı amin bağlaması vasıtasıyla aktive edilmiş Sepharoz 6B-CL2'ye ürokinaz enzimini kovalent olarak bağlamışlardır. Ayrıca immobilize ürokinazın artan pH ve sıcaklık stabilitesine sahip olduğunu rapor etmişlerdir.

Yang vd. (2003), iki diatomit türü üzerine ürokinaz enziminin adsorpsiyonunu gerçekleştirmişlerdir. Bu araştırmacılar diatomitlerin partikül boyutu, yüzey yapısı, elektrik potansiyeli ve izoelektrik noktası arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Ayrıca adsorplanan ürokinaz miktarı ve izoelektrik nokta arasındaki ilişkiyi tartışmışlardır.

Lai vd. (2005), poliüretan tüpleri 3 ay süre ile tavşan kasına yerleştirmişler ve implante edilen tüplerin inflamatuvar yanıtı üzerinde ürokinaz immobilizasyonunun etkisini 1 hafta, 1 ay ve 3 aylık süreler için araştırmışlardır. İmplant edilen poliüretan tüpler etrafında mononükleer WBC toplanması gerçekleşmiş ve bir ay sonra doruğa ulaşmış fakat bu ürokinaz immobilizasyonu ile önemli oranda azaltılabilmektedir.

Totani vd. (2008), bir plazminojen aktivatörü olan ürokinazı alkil zincirleri ve tiyol grupları taşıyan PVA ile türevlendirilmiş Langerhans adacıkları yüzeyine immobilize etmişlerdir. Araştırmacılar ürokinaz immobilize edilmiş adacıkların, kan pıhtısının adacık yüzeyinde kontrol edilebildiğini gösteren fibrinolitik özellikler sergilediğini rapor etmişlerdir. İnsülin salınımını azaltan bu adacık üzerine ürokinaz immobilizasyonu çalışmasının intraportal adacık transplantasyonu sonrası erken doku kaybını azaltmada umut verici olduğunu bildirmişlerdir.

Bi vd. (2009), ürokinaz ve dekstran kaplı manyetik nanopartiküllerin kovalent biyokonjugasyonunu gerçekleştirmişler ve karakterize etmişlerdir. Daha sonra bu ürokinaz bağlı manyetik nanopartikülleri, manyetik alan altında fare arteriovenöz şönt trombozu modelinde başarılı bir şekilde kullanmışlardır. Onlar tromboliz tedavisinin bu şekilde bir manyetik alan ile istenen bölgeye doğrudan uygulanabileceğini vurgulamışlardır.

Chen vd. (2011), fibrinolitik enzim olan ürokinazın ve antikoagulant enzim olan trombomodulin, fosfolipid konjuge poli(etilen glikol) ile adacık yüzeyine koimmobilizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Ürokinazı ve trombomoduli tiyol/maleimid kullanarak maleimid-poli(etilen glikol)-fosfolipid konjugatı yardımıyla adacık yüzeyine immobilize etmişlerdir. Ürokinaz ve trombomodulin

aktiviteleri adacık yüzeyinde korunmuştur. Ayrıca yüzey modifikasyonları adacıkların morfolojisini veya glukoz derişimindeki değışimlere cevapta insülin salım kabiliyetini etkilememiştir.



3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Kimyasal ve Cihazlar

Deneylerde Vestel (White FR 540) buzdolabı, Beko (7216DF) dondurucu, Clifton çalkalamalı su banyosu, Memmert (Beschicung-Loading Modell 100-800) etüv, Radwag (AS220 C/2) analitik terazi, Sigma (3-30 KS) santrifüj cihazı, Hanna (pH 211) pH metre, Shimadzu (UV-1601) spektrofotometre, Wisd (WB-22) soğutmalı su banyosu, Daihan (MSH-20D) sıcaklık ayarlı karıştırıcı, Ultrasonic (LC30) ultrasonik banyo, Velp (Multistirrer 15) çoklu manyetik karıştırıcı, Heidolph (Promax 202) çalkalayıcı, GFL (2001/4) saf su cihazı, Isolab (CAPP) otomatik pipetler, milipore (Simplicity UV, 18,2 mΩ cm) ultra saf su cihazı kullanıldı.

İnsan böbrek hücrelerinden saflaştırılmış ürokinaz ve plazmin substratı Gly-Arg p-nitroanilid-HCl, poli (vinil alkol) [PVA], potasyum persülfat (KPS), etil alkol, metil alkol, Cibacron Blue F3GA Sigma'dan temin edildi; magnetit (Fe_3O_4), etilenglikol dimetakrilat (EGDMA) Alridch'den temin edildi; 2-hidroksietil metakrilat (HEMA) Merck-Schuchardt'dan temin edildi; NaOH, CuSO_4 Riedel'den temin edildi.

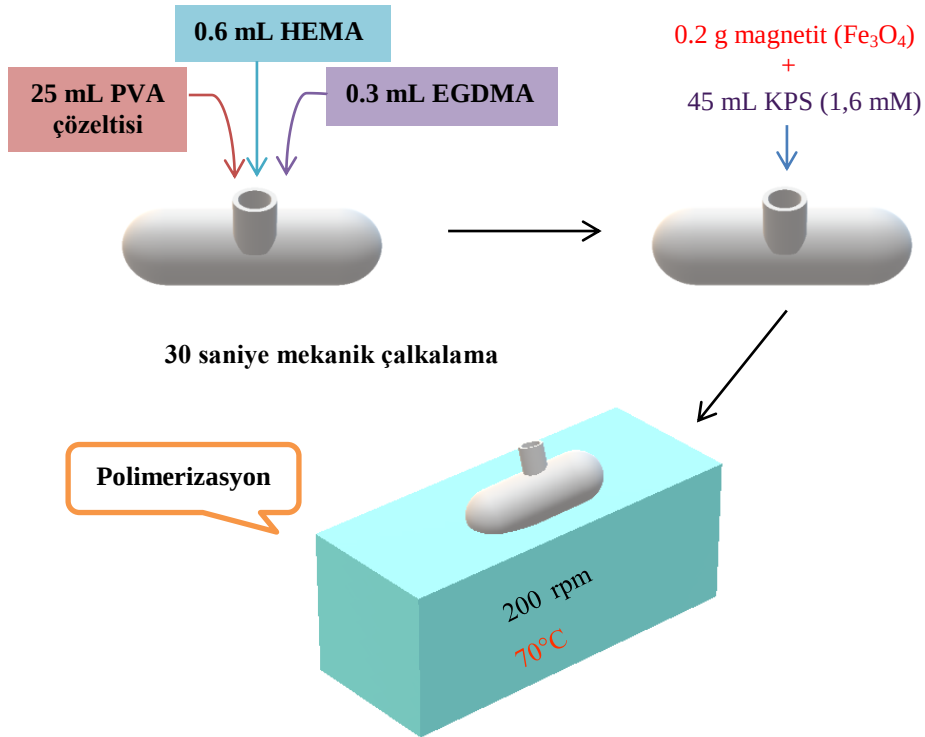
Sentezlenen nanopartiküllerin karakterizasyonunu gerçekleştirmek için Manisa Celal Bayar Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nde bulunan FTIR spektrofometresi (BX Perkin Elmer), İzmir İleri Teknoloji Enstitüsü Araştırma Merkezi'nde bulunan Taramalı Elektron Mikroskobu (Phillips XL-30S FEG), Atomik Kuvvet Mikroskobu (Digital Instruments-MMSPM Nanoscope IV) ve Enerji Dağılımlı X-ışını analiz cihazı (LEO, EVO 40 Carl Zeiss NTS, Peabody, Massachusetts) ve Selçuk Üniversitesi İleri Teknoloji Araştırma-Uygulama Merkezi'nde bulunan Elektron Spin Rezonans Spektrometresi (JEOL JES-FA300) cihazı kullanıldı.

3.2. Yöntem

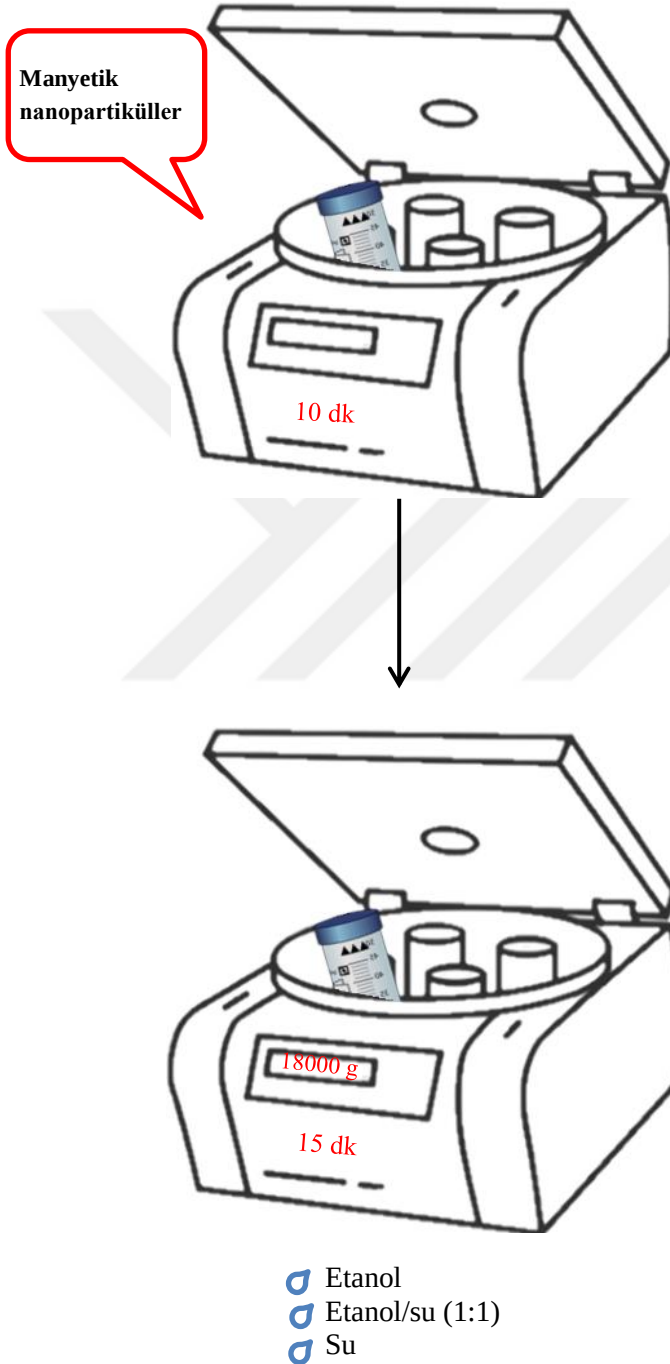
3.2.1. Manyetik Nanopartiküllerin Hazırlanması

Bu tezde kullanılan manyetik nanopartiküller emülsiyon polimerizasyonu tekniği ile 2-Hidroksietil metakrilat (HEMA) monomerinin magnetit varlığında polimerleştirilmesi ile hazırlandı. Bu amaçla 0.01 mg/mL derişiminde 45 mL

hazırlanan PVA çözeltisinden 100 mL hacimli cam reaktöre 25 mL PVA çözeltisi (d: 1.269 g/mL), 0.6 mL HEMA (d: 1,074 g/mL) ve 0.3 mL EGDMA (d:1,051 g/mL) alınarak 30 saniye mekanik olarak çalkalandı ve üzerine 0.2 g magnetit (Fe_3O_4) ilave edildi. Daha sonra polimerizasyon ortamına başlatıcı olarak 45 mL KPS (1,6 mM) eklenerek 70°C'deki çalkalamalı su banyosunda polimerizasyon gerçekleştirildi ve polimerizasyonun tamamlandığı renk değişimi ile izlendi. Polimerizasyona katılmayan manyetik partikülleri uzaklaştırmak için 10 dakika boyunca düşük hızda santrifüjleme yapıldı. Oluşan poli(HEMA) manyetik nanopartiküller ise 18000 g'de 15 dakika santrifüjlenerek çöktürüldü ve sırasıyla etanol, etanol/su (1:1), su ile yıkandı. Çöktürme ile manyetik nanopartiküller polimerizasyon hacmi kadar (yaklaşık 71 mL) saf su içerisine alınarak ultrasonikatörde emülsiyon oluşturmaları sağlandı. Mikrobiyal büyümenin olmaması için manyetik nanopartiküllere derişimi % 0.002 olacak şekilde NaN_3 çözeltisi ilave edildi ve manyetik nanopartiküller + 4°C'de saklandı.



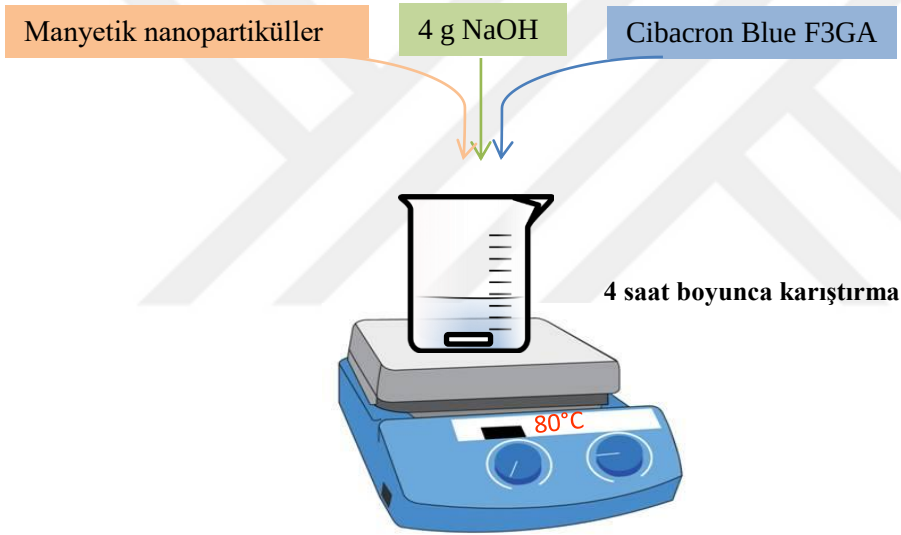
Şekil 3.1. Manyetik nanopartiküllerin hazırlanması



Şekil 3.2. Polimerizasyona katılmayan nanopartiküllerin uzaklaştırılması için çöktürülmesi ve oluşan p(HEMA) manyetik nanopartiküllerin yıkanması işlemi

3.2.2. Manyetik Nanopartiküllere Cibacron Blue F3GA'nın Bağlanması

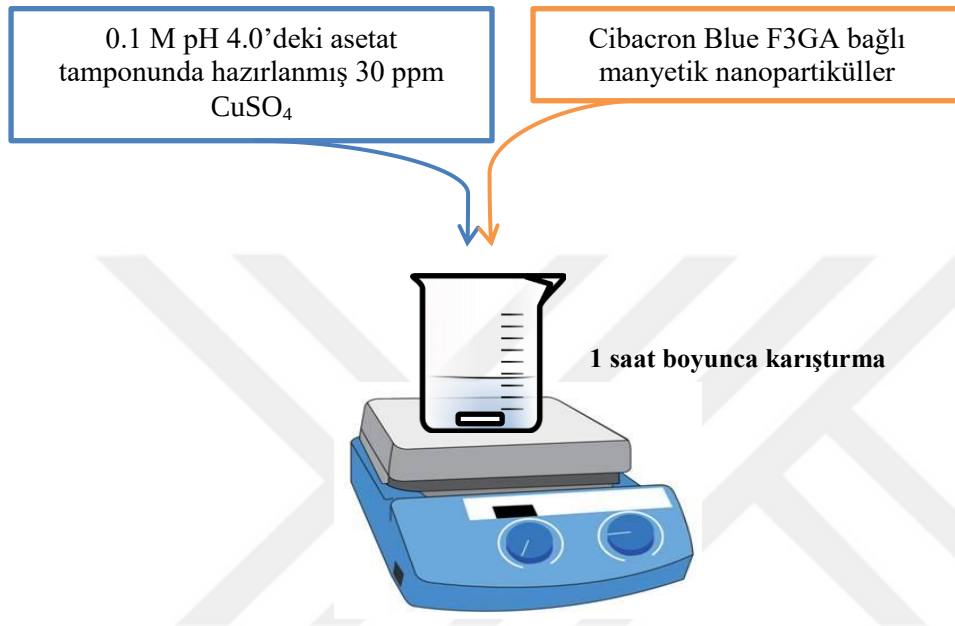
Sentezlenen poli(HEMA) manyetik nanopartiküllerine Cibacron Blue F3GA nükleofilik yer değiştirme reaksiyonu ile bağlandı. Bu amaçla manyetik nanopartiküller (0.1 g/100 mL) 80°C'de sodyum hidroksit içeren (4 g) 100 mL Cibacron Blue F3GA (2.0 mg/mL) ile 4 saat boyunca karıştırıldı ve daha sonra reaksiyona katılmamış boya moleküllerinin uzaklaştırılması için sırasıyla manyetik nanopartiküller saf su, metanol ve tekrar saf su ile yıkandı.



Şekil 3.3. Manyetik nanopartiküllere Cibacron Blue F3GA'nın bağlanması

3.2.3. Cibacron Blue F3GA Bağlı Manyetik Nanopartiküllerin Cu^{2+} ile Şelatlaştırılması

Cibacron Blue F3GA bağlı manyetik nanopartiküllerin Cu^{2+} iyonları ile şelatlaştırılması için 0.1 M pH 4.0'deki asetat tamponunda hazırlanmış 30 ppm CuSO_4 çözeltisi manyetik nanopartikül ile 1 saat boyunca karıştırıldı ve bu sürenin sonunda manyetik nanopartiküller çöktürülerek saf su ile yıkandı. Cu^{2+} iyonları ile şelatlaştırılmış boya bağlı manyetik nanopartiküller +4°C'de % 0.002 NaN_3 çözeltisi içinde saklandı.



Şekil 3.4. Cibacron Blue F3GA bağlı manyetik nanopartiküllerin Cu^{2+} ile şelatlaştırılması

3.3. Cu^{2+} ile Şelatlaştırılmış Boya Bağlı Manyetik Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

3.3.1. FTIR (Fourier Transform Infrared Spektrofotometre) Ölçümleri

Manyetik poli(HEMA) nanopartiküllerinin ve Cu^{2+} şelatlaştırılmış Cibacron Blue F3GA bağlı poli(HEMA) nanopartiküllerinin FTIR spektrumu, BX Perkin Elmer FTIR cihazı kullanılarak elde edildi. Bu amaçla örnekler 0.1 g KBr pelet haline getirildi ve FTIR spektrumu alındı.

3.3.2. ESR (Elektron Spin Rezonans) Ölçümleri

Sentezlenen poli(HEMA) nanopartiküllerin yapısına manyetik partiküllerin katıldığını göstermek için kurutulmuş örneğin oda sıcaklığında ESR spektrumları alındı.

3.3.3. SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) Ölçümleri

Sentezlenen manyetik nanopartiküllerin partikül boyutu, şekil ve yüzey özellikleri SEM analizleri ile incelendi.

3.3.4. EDX (Enerji Dağılımlı X-ışını) Analizi

Sentezlenen manyetik nanopartiküllerin yapısına katılan Cibacron Blue F3GA ve Cu^{2+} miktarı, EDX analizi kullanılarak hesaplandı.

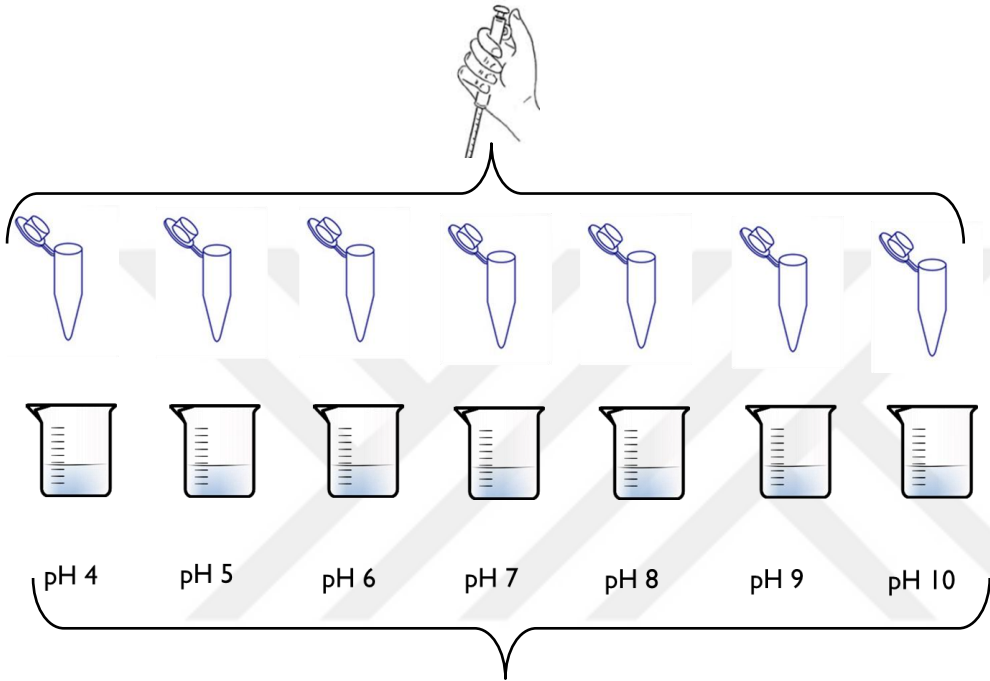
3.4. Cu^{2+} ile Şelatlaştırılmış Boya Bağlı Manyetik Nanopartiküllere Ürokinaz Adsorpsiyonu Koşullarının İncelenmesi

Cu^{2+} ile şelatlaştırılmış boya bağlı manyetik nanopartiküllere ürokinaz adsorpsiyonu için nanopartiküller kesikli sistemde ürokinaz çözeltisi ile 2 saat boyunca muamele edildi. Adsorpsiyona pH'ın, ürokinaz başlangıç derişiminin, iyonik şiddetin ve sıcaklığın etkisi incelendi.

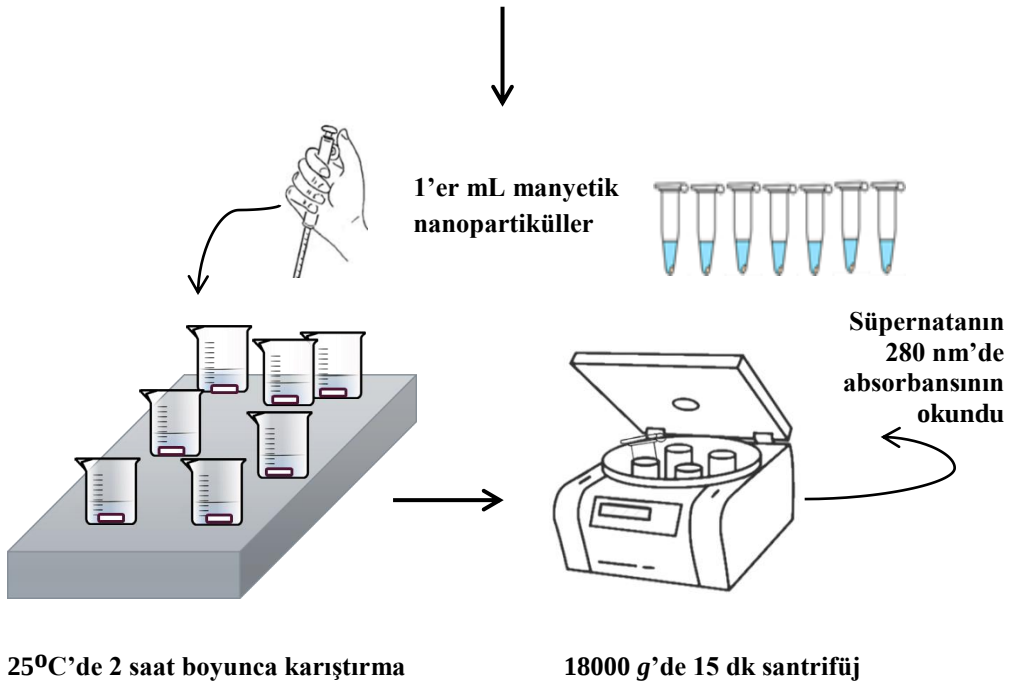
3.4.1. Ürokinaz Adsorpsiyonuna pH'ın Etkisinin İncelenmesi

Cu^{2+} ile şelatlaştırılmış boya bağlı manyetik nanopartiküllere ürokinaz adsorpsiyonu farklı pH'lardaki tampon çözelti ortamlarında incelendi. Bu amaçla adsorpsiyon çalışmaları 0.1 M derişimlerinde hazırlanan asetat (pH 4.0-5.0), fosfat (pH 6.0-7.0-8.0) ve karbonat (pH 9.0-10.0) tampon çözeltilerinde gerçekleştirildi. Bu tampon ortamlarında hazırlanan 0.1 mg/mL derişimindeki 3'er mL'lik ürokinaz çözeltilerinden 1'er mL alınarak 280 nm'de absorbansları okundu. Kalan 2'şer mL'lik enzim çözeltilerine 1'er mL manyetik nanopartiküllerden eklenerek 25°C'de 2 saat boyunca manyetik karıştırıcıda (100 rpm hızla) karıştırıldı ve bu sürenin sonunda alınan 1 mL'lik örnek 18000 g'de 15 dakika santrifüjlenerek süpernatanın 280 nm'de absorbansı okundu. Başlangıç ve denge arasındaki protein miktarları kullanılarak farklı pH'larda manyetik nanopartiküllere adsorplanan ürokinaz miktarları hesaplandı.

1'er mL başlangıç çözeltilerinin 280 nm'de absorbanlarının okunması



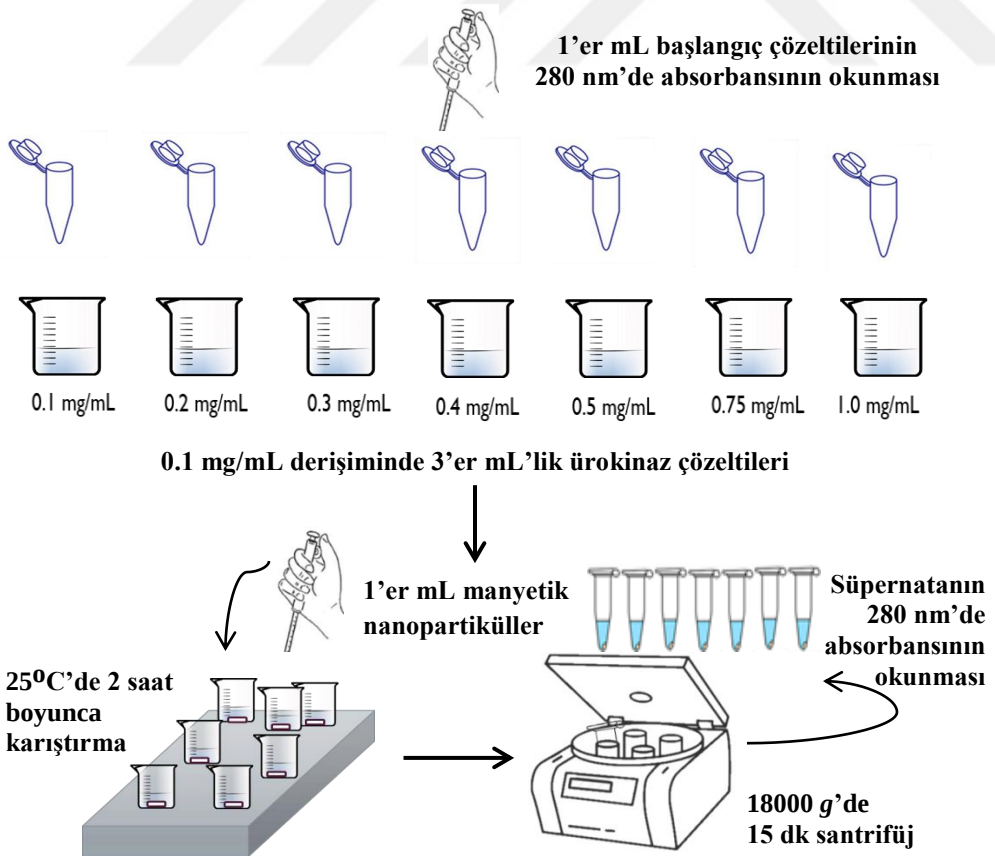
0.1 mg/mL derişiminde 3'er mL'lik ürokinaz çözeltileri



Şekil 3.5. Ürokinaz adsorpsiyonuna pH'ın etkisinin incelenmesi

3.4.2. Ürokinaz Adsorpsiyonuna Ürokinaz Başlangıç Derişiminin Etkisinin İncelenmesi

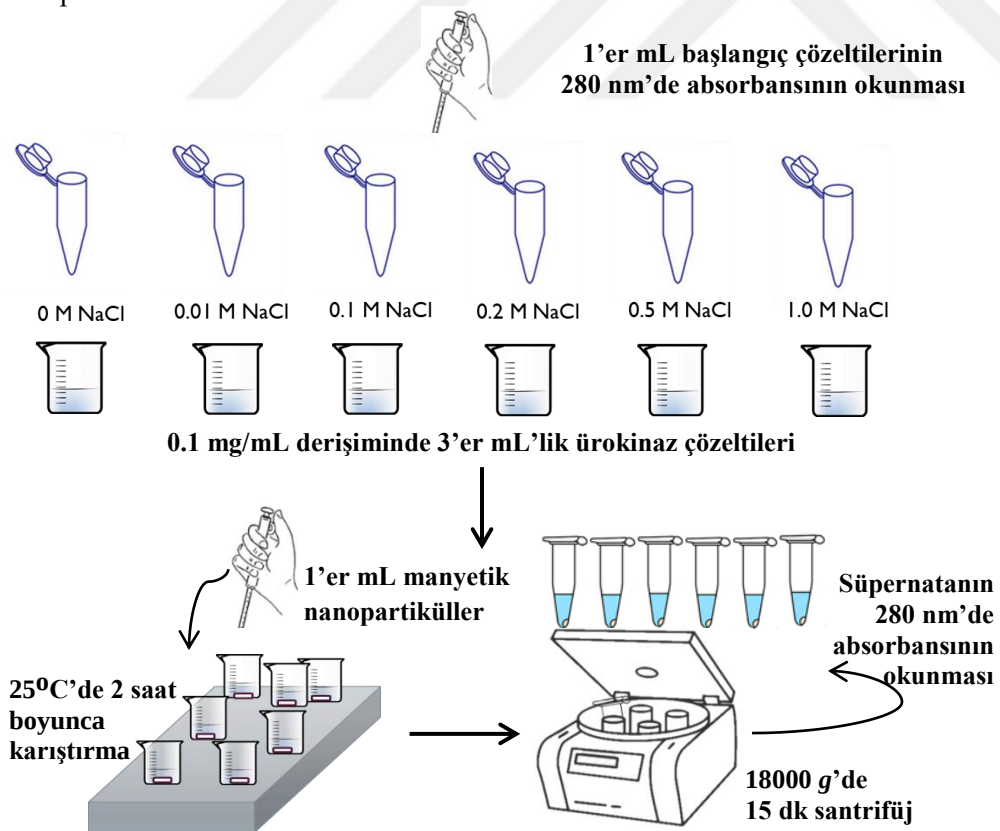
Cu^{2+} ile şelatlaştırılmış boya bağlı manyetik nanopartiküllere ürokinaz adsorpsiyonu 0.1 M derişiminde hazırlanan karbonat (pH 9.0) tampon çözeltisindeki farklı ürokinaz derişimlerinde gerçekleştirildi. Bu tampon ortamında hazırlanan 0.1; 0.2; 0.3; 0.4; 0.5; 0.75; 1.0 mg/mL derişimlerinde 3'er mL'lik ürokinaz çözeltilerinden 1'er mL alınarak 280 nm'de absorbansları okundu. Kalan 2'şer mL'lik enzim çözeltilerine 1'er mL manyetik nanopartiküllerden eklenerek 25°C'de 2 saat boyunca manyetik karıştırıcıda (100 rpm hızla) karıştırıldı ve bu sürenin sonunda alınan 1 mL'lik örnek 18000 g'de 15 dakika santrifüjlenerek süpernatanın 280 nm'de absorbansı okundu. Başlangıç ve denge arasındaki protein miktarları kullanılarak farklı ürokinaz derişimlerinde manyetik nanopartiküllere adsorplanan ürokinaz miktarları hesaplandı.



Şekil 3.6. Ürokinaz adsorpsiyonuna ürokinaz başlangıç derişiminin etkisinin incelenmesi

3.4.3. Ürokinaz Adsorpsiyonuna İyonik Şiddetin Etkisinin İncelenmesi

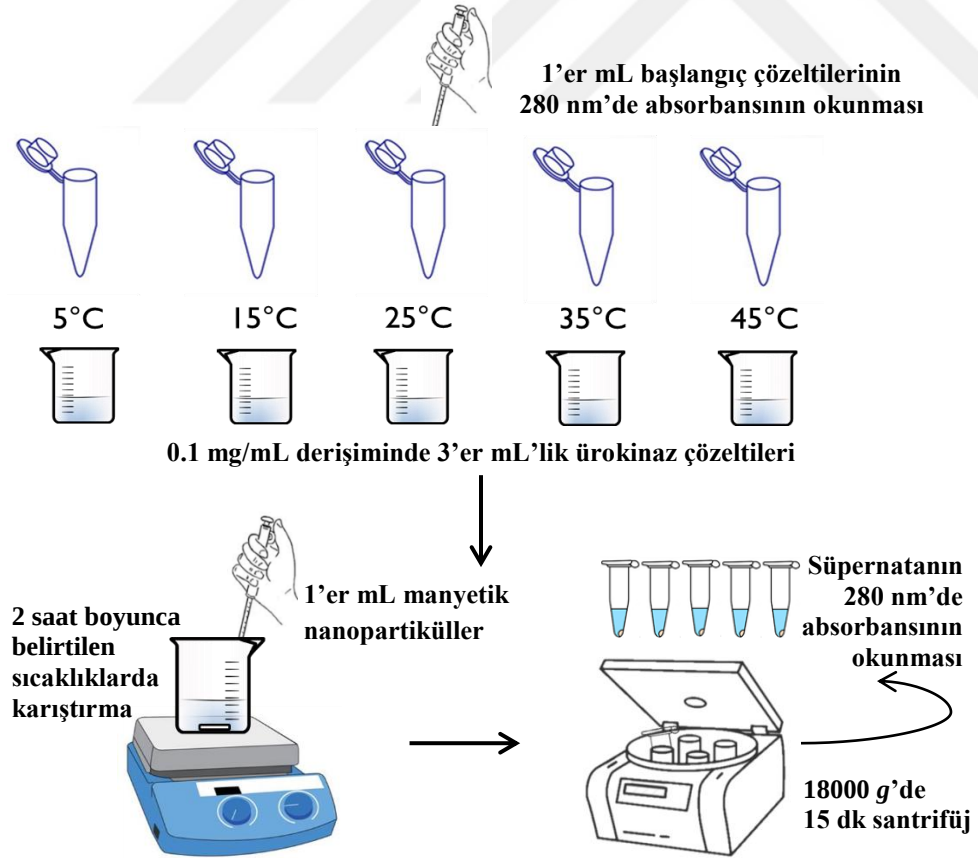
Cu^{2+} ile şelatlaştırılmış boya bağlı manyetik nanopartiküllere ürokinaz adsorpsiyonu 0.1 M derişiminde hazırlanan karbonat (pH 9.0) tampon çözeltisinde farklı iyonik şiddet ortamlarında gerçekleştirildi. Bu tampon ortamında hazırlanan 0.1 mg/mL derişiminde 3'er mL'lik ürokinaz çözeltilerine derişimleri 0; 0.01; 0.1; 0.2; 0.5; 1.0 M olan NaCl eklendi. 3'er mL'lik ürokinaz çözeltilerinden 1'er mL alınarak 280 nm'de absorbansları okundu. Kalan 2'şer mL'lik enzim çözeltilerine 1'er mL manyetik nanopartiküllerden eklenerek 25°C'de 2 saat boyunca manyetik karıştırıcıda (100 rpm hızla) karıştırıldı ve bu sürenin sonunda alınan 1 mL'lik örnek 18000 g'de 15 dakika santrifüjlenerek süpernatanın 280 nm'de absorbansı okundu. Başlangıç ve denge arasındaki protein miktarları kullanılarak farklı iyonik şiddet değerine göre manyetik nanopartiküllere absorplanan ürokinaz miktarları hesaplandı.



Şekil 3.7. Ürokinaz adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisinin incelenmesi

3.4.4. Ürokinaz Adsorpsiyonuna Sıcaklığın Etkisinin İncelenmesi

Cu^{2+} ile şelatlaştırılmış boya bağlı manyetik nanopartiküllere ürokinaz adsorpsiyonu 0.1 M derişiminde hazırlanan karbonat (pH 9.0) tampon çözeltisinde farklı sıcaklıklarda gerçekleştirildi. Bu amaçla, 0.1 mg/mL derişimindeki 3'er mL'lik ürokinaz çözeltileri 5; 15; 25; 35; 40°C'deki sıcaklıklarda hazırlandı. Bu sıcaklıklardaki çözeltilerden 1'er mL alınarak 280 nm'de absorbansları okundu. Kalan 2'şer mL'lik enzim çözeltilerine 1'er mL manyetik nanopartiküllerden eklenerek 2 saat boyunca belirtilen sıcaklıklarda manyetik karıştırıcıda (100 rpm hızla) karıştırıldı ve bu sürenin sonunda alınan 1 mL'lik örnek 18000 g'de 15 dakika santrifüjlenerek süpernatanın 280 nm'de absorbansı okundu. Başlangıç ve denge arasındaki protein miktarları kullanılarak farklı sıcaklıklarda manyetik nanopartiküllere adsorplanan ürokinaz miktarları hesaplandı.



Şekil 3.8. Ürokinaz adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisinin incelenmesi

3.4.5. Cu^{2+} ile Şelatlaştırılmış Cibacron Blue F3GA Bağlı Mag-Nano-p(HEMA) Polimerinden Ürokinaz Desorpsiyonu ve Nanopartiküllerin Tekrar Kullanılabilirliğinin İncelenmesi

Cu^{2+} ile şelatlaştırılmış Cibacron Blue F3GA bağlı mag-nano-p(HEMA) polimerinin tekrar kullanılabilirliğini araştırmak için ürokinaz adsorpsiyonu ve ardından desorpsiyonu deneyleri gerçekleştirildi. Desorpsiyon ajanı olarak 1.0 M NaCl kullanıldı. 25°C'de pH 9.0 karbonat tamponunda hazırlanan 0.1 mg/mL derişimindeki ürokinazın nanopartiküllere adsorpsiyonu Bölüm 3.4.1'de anlatıldığı gibi gerçekleştirildi. Daha sonra enzim bağlı nanopartiküller santrifüj yardımıyla adsorpsiyon ortamından ayrılarak desorpsiyon çözeltisi ile 25°C'de 100 rpm'lik bir hızda, 2 saat boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. 3.0 mL'lik örnekten 1.0 mL alınarak 18000 g'de 10 dakika boyunca santrifüjlendi ve süpernatanın 280 nm'de absorbansı okundu. Okunan absorbans değerlerinden ürokinaz derişimleri hesaplanarak % desorpsiyon oranı bulundu.

Desorpsiyon işleminden sonra Cu^{2+} ile şelatlaştırılmış Cibacron Blue F3GA bağlı mag-nano-p(HEMA) polimeri pH 9.0 karbonat tamponu ile yıkanarak tekrar ürokinaz adsorpsiyonu için kullanıldı. Adsorpsiyon-desorpsiyon işlemleri 5 kez tekrar edilerek adsorplanan ürokinaz miktarı, döngü sayısına karşı grafiğe geçirildi.

3.4.6. Ürokinaz Aktivitesi Tayini

Ürokinaz aktivitesi tayini Tait vd. (1995) tarafından önerilen metod ile gerçekleştirildi. Bu amaçla kör küvetine 850 µL pyro-Glu-Gly-Arg-p-nitroanilid-HCl ve 50 µL pH 9.0 karbonat tamponu, örnek küvetine kromojenir bir substrat olan 850 µL pyro-Glu-Gly-Arg-p-nitroanilid-HCl ve 50 µL ürokinaz enzimi alınarak, 405 nm'deki absorbans artışı takip edildi. Bir ünite ürokinaz, 37°C'de ve pH 9.0'da, dakikada 1 µmol substratın ürüne dönüştürülmesi için kullanılan enzim miktarı olarak tanımlandı ve ünite hesabı Eşitlik 3.1'e göre yapıldı.

$$U = \frac{\Delta A \times V}{\epsilon \times d \times \Delta t} \times sf \quad (\text{Eşitlik 3.1})$$

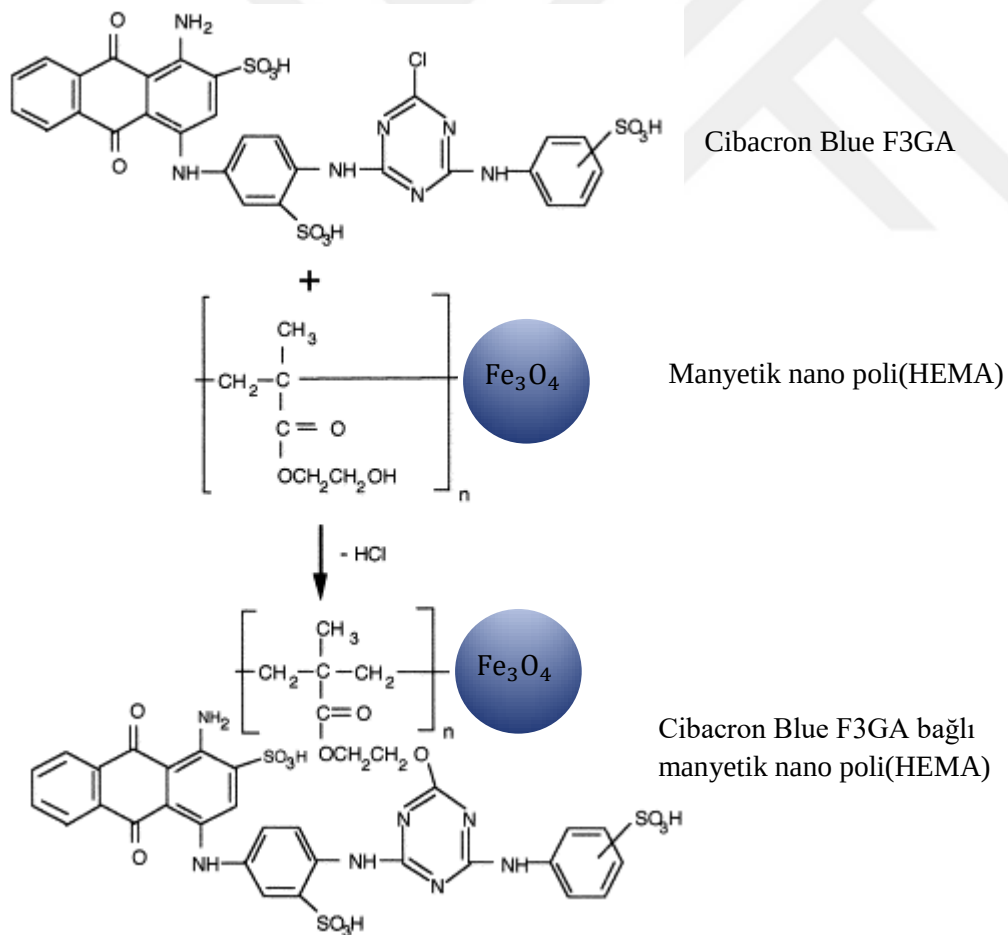
Burada V , spektrofotometrik küvetteki son hacim (mL); ϵ , p-nitroanilin molar absorpsiyon katsayısı (9.62 mL/ μ mol.cm); d , ışık yolu (1,0 cm); sf , seyreltme faktörü, ΔA absorbans değişimidir.

Büyük Britanya’da ürokinazın aktivitesi Plough birimi şeklinde ifade edilir. CTA birimi ise Amerika Birleşik Devletleri’nde ürokinaz aktivitesi için kullanılan ifadedir. Ploug birimleri ile IU arasında resmi bir sayısal ilişki olmasa da 1.5 IU ile 1 Ploug biriminin eşdeğer olduğu kabul edilmiştir. 1 CTA ünitenin IU ile aynı olduğu varsayılmıştır (Philo vd., 1981).

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Cu^{2+} ile Şelatlaştırılmış Boya Bağlı Manyetik Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

Bu tezde HEMA monomeri kullanılarak manyetik nano poli(HEMA) sentezlenmiştir. Sentezlenen manyetik nanopartiküllere Cibacron Blue F3GA kovalent olarak bağlanmış daha sonra nanopartiküller Cu^{2+} ile şelatlaştırılmıştır. Şekil 4.1 manyetik nano poli(HEMA)'ya Cibacron Blue F3GA'nın bağlanmasını göstermektedir.



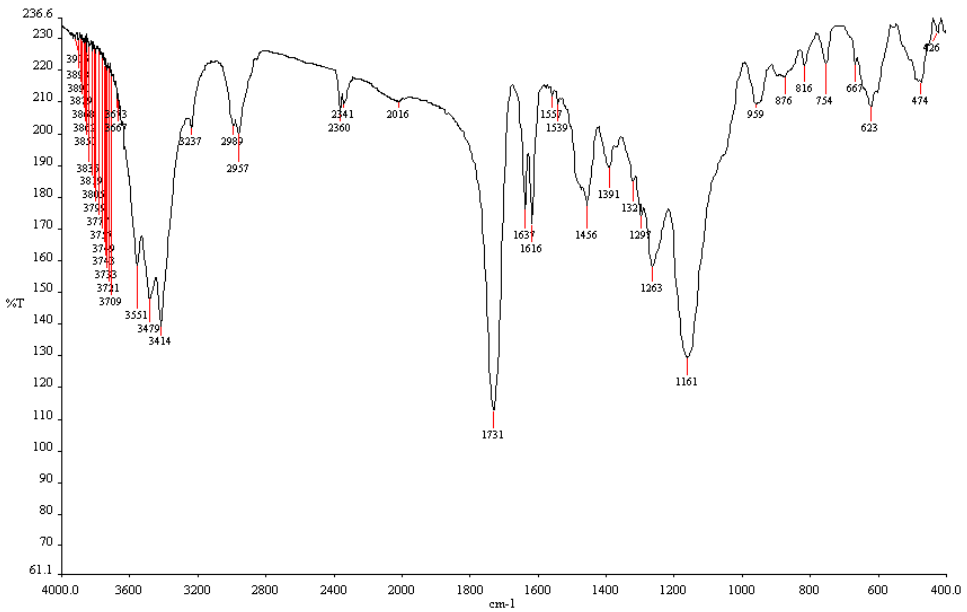
Şekil 4.1. Manyetik nano poli(HEMA) nanopartiküllere Cibacron Blue F3GA'nın bağlanması.

Elde edilen manyetik nanopartiküllerin karakterizasyonu için FTIR, ESR, SEM ve EDX analizleri gerçekleştirilmiştir.

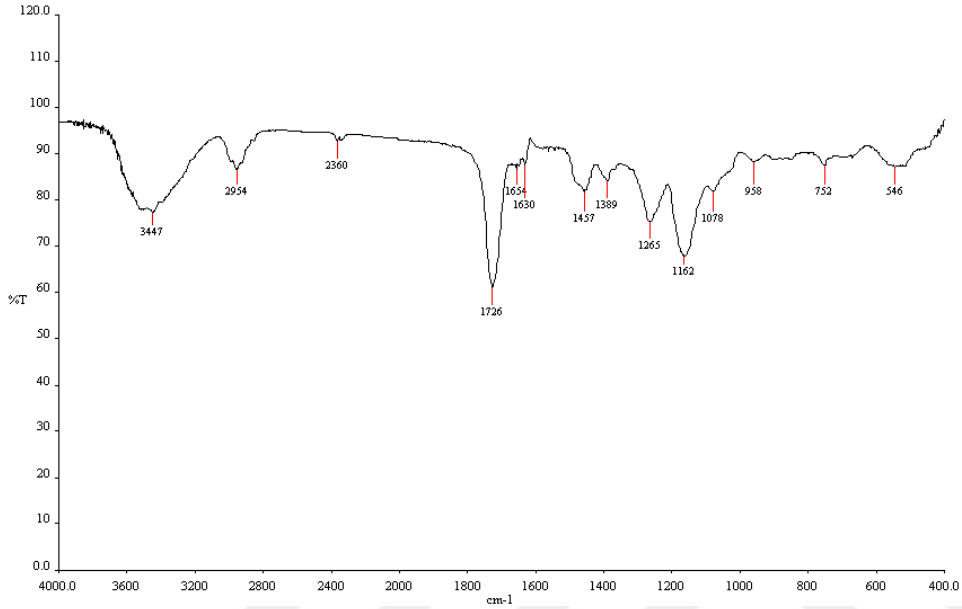
4.1.1. FTIR (Fourier Transform Infrared Spektrofotometre) Ölçümleri

Boya içermeyen manyetik poli(HEMA) nanopartiküllerin FTIR spektrumu Şekil 4.2’de, Cu^{2+} ile şelatlaştırılmış Cibacron Blue F3GA bağlı manyetik nanopartiküllerin FTIR spektrumu ise Şekil 4.3’de görülmektedir. Bu spektrumlarda, 1260 cm^{-1} ve 1160 cm^{-1} civarında C-O gerilme bantları ve 1450 cm^{-1} civarında C-H esneme bantları, 1730 cm^{-1} civarında güçlü C=O gerilmeleri, 2900 cm^{-1} civarında C-H gerilmeleri, $3400\text{-}3500$ arasında ise N-H ve O-H gerilmeleri görülmektedir.

Boyanın polimere bağlandığını gösteren bantlar Şekil 4.3’de görüldüğü üzere 1078 cm^{-1} civarında S-O gerilme ve 1390 cm^{-1} civarında gözlenen güçlü S=O gerilme bantlarıdır. Ayrıca, 960 cm^{-1} C=C esneme bandı, $1630\text{-}1610\text{ cm}^{-1}$ civarında C=C esneme bantları gözlenmektedir. C=C yapısı polimerik yapıya boyanın bağlanması ile girmiştir (Doğan vd., 2012).



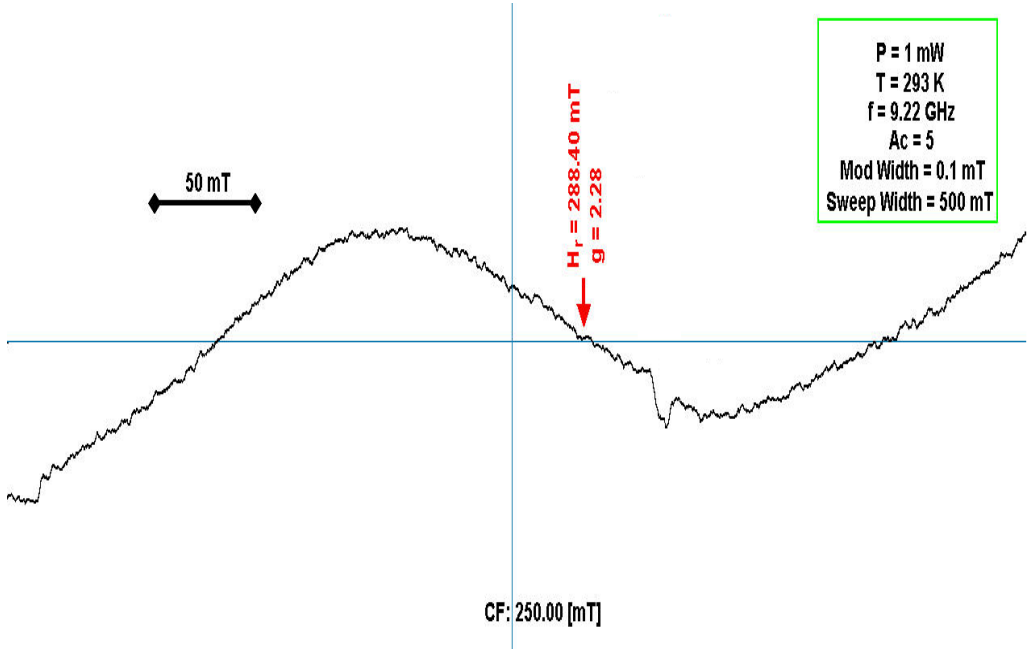
Şekil 4.2. Manyetik poli(HEMA) nanopartiküllerin FTIR spektrumu.



Şekil 4.3. Cu^{2+} ile şelatlaştırılmış Cibacron Blue F3GA bağlı manyetik nanopartiküllerin FTIR spektrumu.

4.1.2. ESR (Elektron Spin Rezonans) Ölçümü

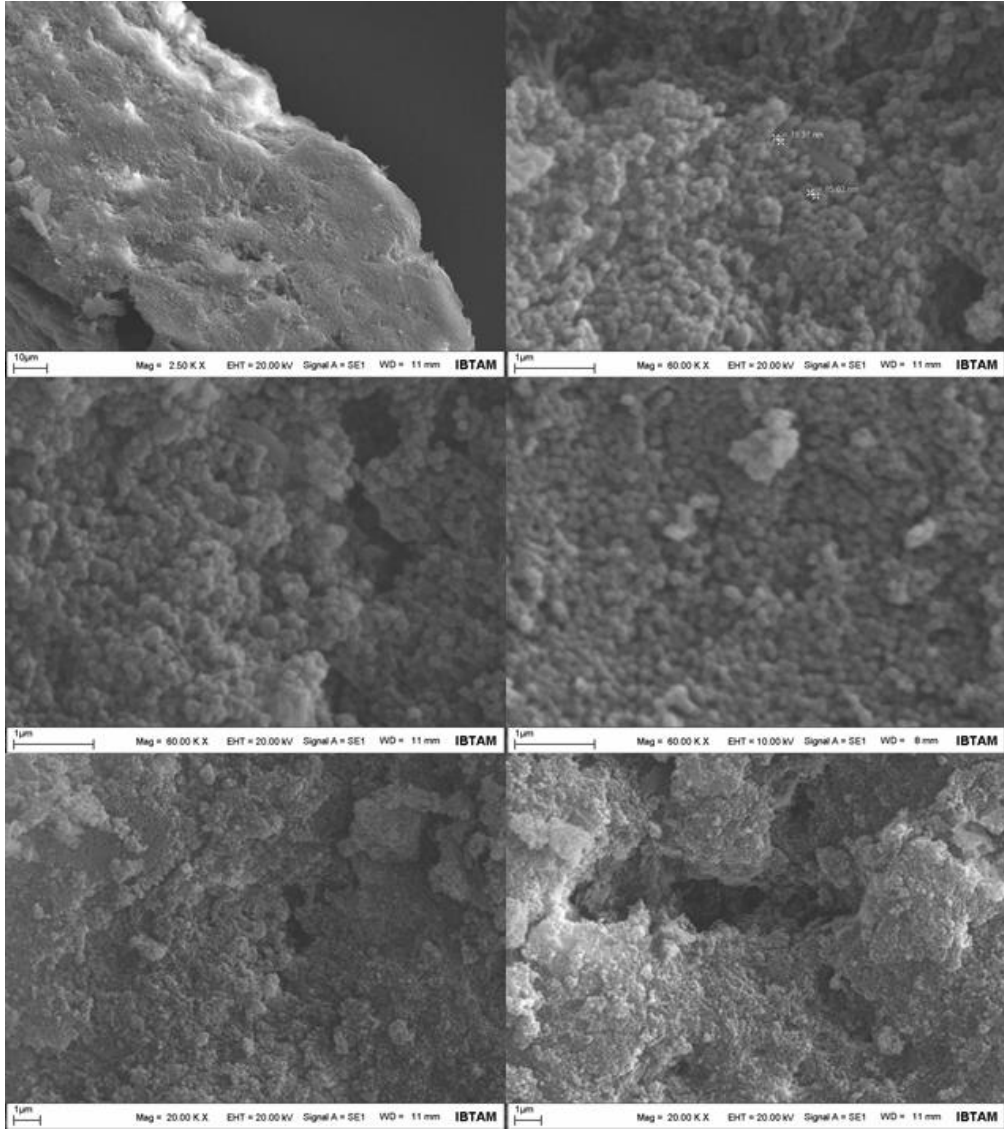
Sentezlenen polimerik yapının manyetik özellik kazanıp kazanmadığı ESR spektrumu çekilerek değerlendirilmiş ve elde edilen spektrum Şekil 4.4’de gösterilmiştir. Sentezlenen manyetik nanopartiküllere artan dış bir manyetik alan uygulandığında başlangıçta yerel manyetik alan şiddeti artmakta ancak artışın devamında vektörel olarak ters yönde manyetik alan şiddeti azalarak sıfıra düşmektedir. Dış manyetik alan artışı ile yerel manyetik alan şiddeti artarak sinüs eğrilerine benzer bir grafik göstermektedir. Bu spektrumda elde edilen H_r değeri (manyetik alan rezonansı) kullanılarak g faktörü 2.28 olarak hesaplanmıştır. Literatürde Fe^{3+} için g faktörü değerleri 1.4-3.1 (düşük spin kompleksleri) ve 2.0-9.7 (yüksek spin kompleksleri) olarak bildirilmiştir (Kaya vd, 2013). Bu değerlerle karşılaştırıldığında sentezlenen nanopartiküllerin manyetik özellik kazandığı görülmektedir.



Şekil 4.4. Manyetik nanopartiküllerin ESR spektrumu.

4.1.3. SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) Ölçümleri

Sentezlenen Cu^{2+} ile şelatlaştırılmış Cibacron Blue F3GA bağlı manyetik nanopartiküllerin SEM fotoğrafları Şekil 4.5’de gösterilmiştir. SEM fotoğraflarından manyetik nanopartiküllerin 80 nm boyutta ve küresel yapıda olduğu görülmektedir.

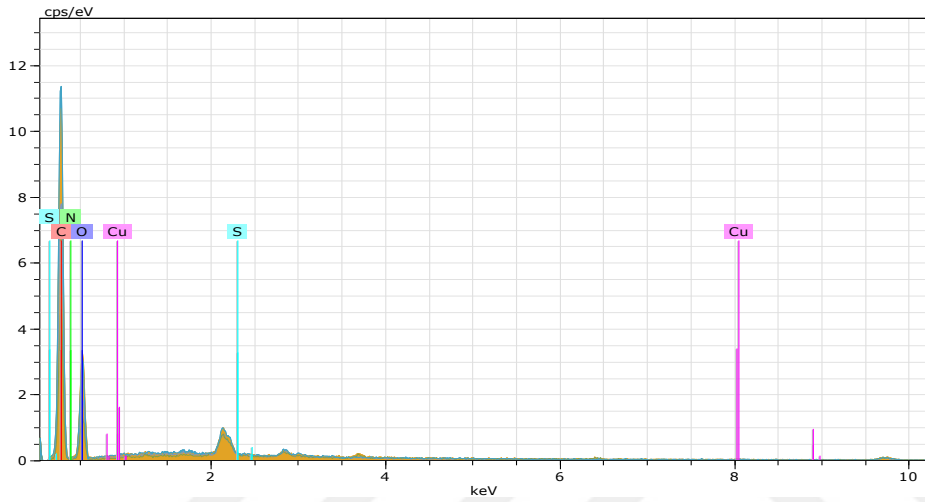


Şekil 4.5. Cu^{2+} ile şelatlaştırılmış manyetik nanopartiküllerin SEM görüntüleri.

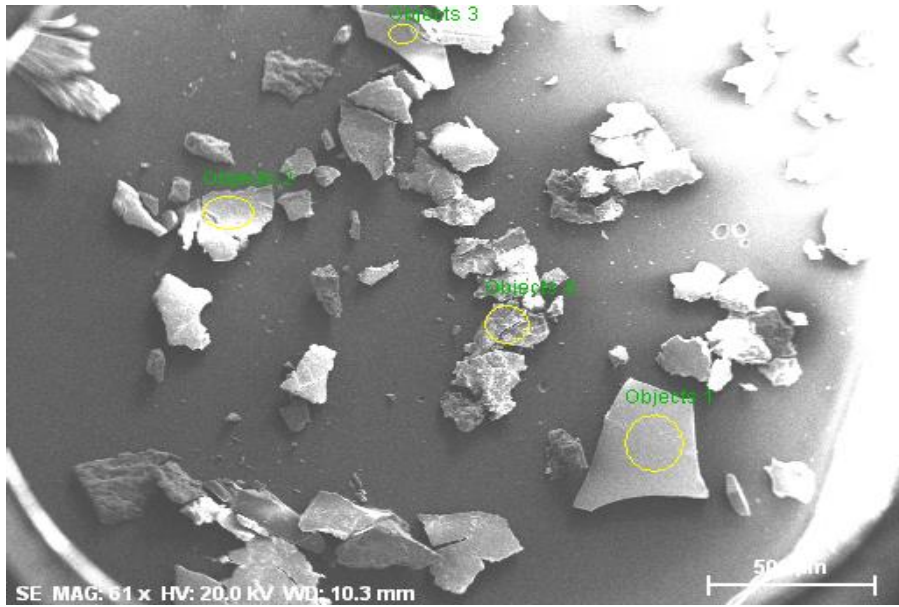
4.1.4. EDX (Enerji Dağılımlı X-ışını) Analizi

Cu^{2+} ile şelatlaştırılmış Cibacron Blue F3GA bağlı manyetik nanopartiküllerin EDX analizine ilişkin elde edilen değerler sırasıyla Şekil 4.6 ve Şekil 4.7’de gösterilmiştir. Sentezlenen manyetik nanopartiküllere Cibacron Blue F3GA’nın katıldığı S stokiyometrisi kullanılarak hesaplanmış ve 28.125 $\mu\text{mol/g}$ polimer olarak bulunmuştur. Bu polimerik yapıdaki boya molekülleri ile şelatlaşan Cu^{2+}

miktarı ise yine stokiyometrik hesapla 10.229 $\mu\text{mol/g}$ polimer olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.6. Cu^{2+} ile şelatlaştırılmış Cibacron Blue F3GA bağlı manyetik nanopartiküllerin EDX spektrumu.



Şekil 4.7. Cu^{2+} ile şelatlaştırılmış Cibacron Blue F3GA bağlı manyetik nanopartiküllerin EDX spektrumlarının alındığı bölgeler.

Çizelge 4.1. Cu^{2+} ile şelatlaştırılmış Cibacron Blue F3GA bağlı manyetik nanopartiküllerin EDX analizine ilişkin elde edilen değerler

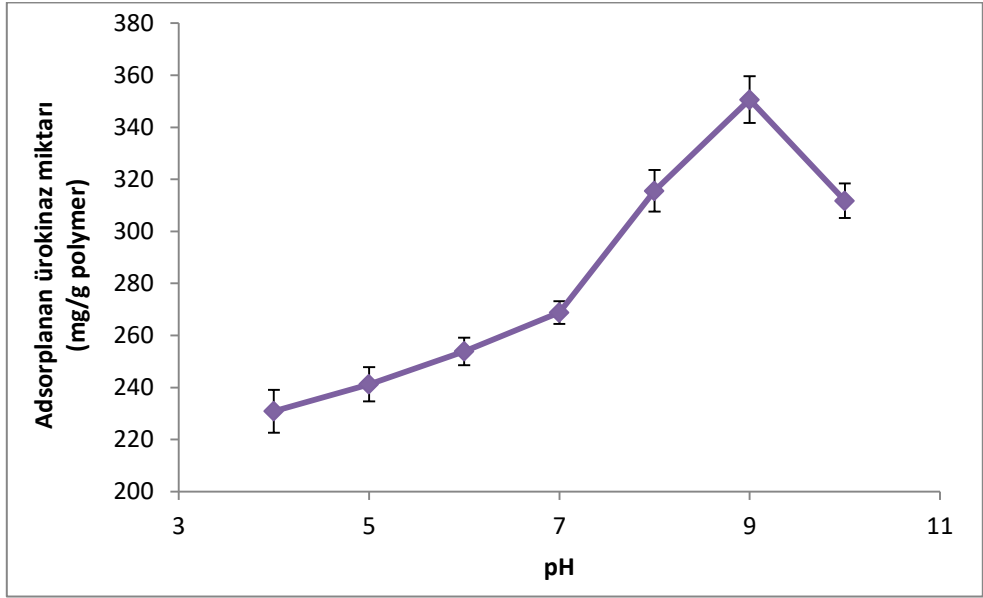
Spectrum	% C	% N	% O	% S	% Cu
Objects 2	58.17	3.75	37.15	0.27	0.65

4.2. Cu^{2+} ile Şelatlaştırılmış Boya Bağlı Manyetik Nanopartiküllere Ürokinaz Adsorpsiyonu ve Desorpsiyonu Koşullarının İncelenmesi

4.2.1. Ürokinaz Adsorpsiyonuna pH Etkisinin İncelenmesi

Cu^{2+} ile şelatlaştırılmış boya bağlı manyetik nanopartiküllere ürokinaz adsorpsiyonu pH 4.0 ile pH 10.0 arasında incelenmiştir (Şekil 4.8). Maksimum ürokinaz adsorpsiyonu pH 9.0'da gerçekleştiği gözlenmiştir. İnsan böbrek hücre kültüründen izole edilen ürokinaz için literatürde rapor edilen izoelektrik nokta değeri 8.66'dır. Proteinler izoelektrik noktalarında negatif ve pozitif yüklere sahip olup toplam yükleri sıfırdır. Proteinlerin maksimum adsorpsiyonlarının genellikle izoelektrik nokta civarında olduğu yapılan birçok çalışmada gösterilmiştir. Bu çalışmada da ürokinazın izoelektrik noktası olan 8.6 değerine yakın değer olan pH 9.0'da maksimum adsorpsiyon gözlenmiştir. Bu da ürokinaz ve Cibacron Blue F3GA arasında hidrofobik, elektrostatik ve hidrojen bağı gibi etkileşimlerin olası olduğunu göstermektedir (Witt ve Roskoski, 1980). İlaveten İMAK'de protein üzerindeki histidin, sistein ve triptofan amino asitleri ile metal iyonlarının koordinasyona katılması olasıdır. Özellikle pH 9.0'da negatif yüklü olan histidin birimlerinin Cu (II) iyonları ile etkileşmesinin proteinin adsorpsiyonunu önemli miktarda artırdığı düşünülmektedir (Tekiner vd., 2015). Ürokinazın p(HEMA) manyetik nanopartiküllere non-spesifik adsorpsiyonu ise 9.15 mg/g olarak bulunmuştur. Ürokinazın Cibacron Blue F3GA bağlı p(HEMA) manyetik nanopartiküllere adsorpsiyonu ise 189.05 mg/g olarak bulunmuştur. Ayrıca p(HEMA) manyetik nanopartiküllere ve Cibacron Blue F3GA bağlı p(HEMA) manyetik nanopartiküllere ürokinazın adsorpsiyonu daha önce anlatılan yöntemde pH 9.0 karbonat tamponunda gerçekleştirilmiştir. p(HEMA) manyetik nanopartiküllere ürokinaz adsorpsiyonu 9.20 mg/g olarak bulunmuştur. ve

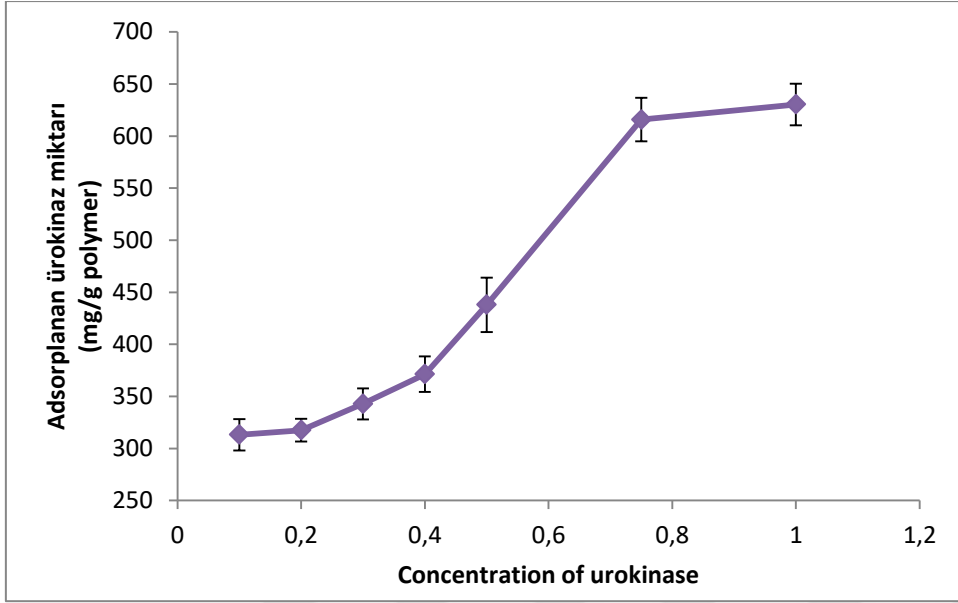
Cibacron Blue F3GA bağlı p(HEMA) manyetik nanopartiküllere ise ürokinaz adsorpsiyonu 189.05 mg/g polimer olarak bulunmuştur.



Şekil 4.8. Cu^{2+} ile şelatlaştırılmış Cibacron Blue F3GA bağlı manyetik nanopartiküllere ürokinaz adsorpsiyonuna pH'nın etkisi. Başlangıç ürokinaz derişimi: 0.1 mg/mL; inkübasyon süresi: 2 saat; sıcaklık: 25°C

4.2.2. Ürokinaz Adsorpsiyonuna Ürokinaz Başlangıç Derişiminin Etkisinin İncelenmesi

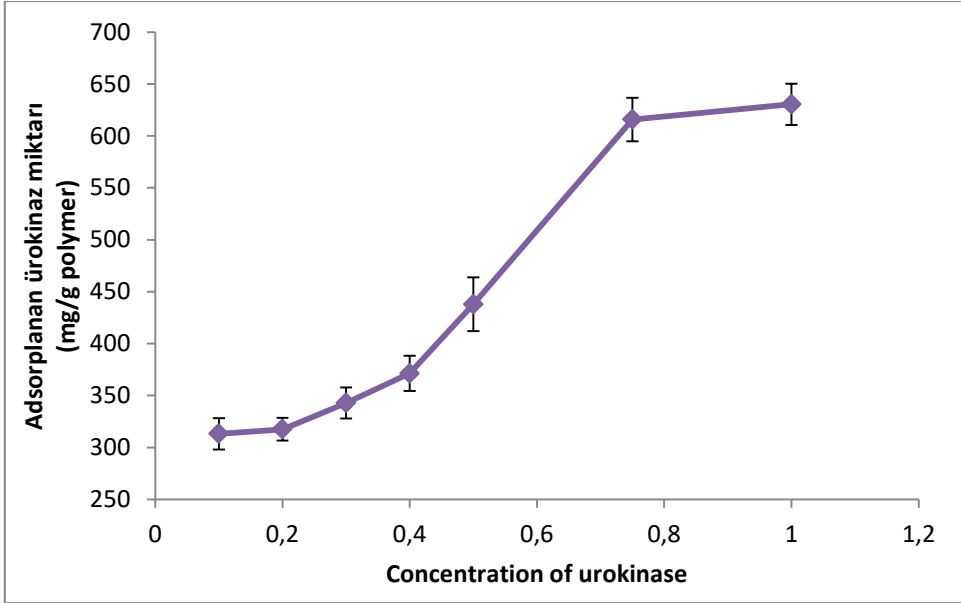
Cu^{2+} ile şelatlaştırılmış boya bağlı manyetik nanopartiküllere ürokinaz adsorpsiyonuna, ürokinaz başlangıç derişiminin etkisi 0.1-1.0 mg/mL ürokinaz derişiminde incelenmiştir. Şekil 4.9'da da görüldüğü üzere 0.75 mg/mL ürokinaz derişimine kadar adsorplanan ürokinaz derişimi hızlı bir şekilde artmış; 1 mg/mL derişiminde ise doygunluğa ulaşmıştır. Adsorpsiyon kapasitesindeki bu hızlı artış Cu^{2+} ile şelatlaştırılmış Cibacron Blue F3GA grupları ile ürokinaz arasındaki yüksek afiniteyi göstermektedir. Şekil 4.13'den görüldüğü üzere 1.0 mg/mL ürokinaz derişiminde maksimum ürokinaz adsorpsiyonu 630.43 mg/g polimer olarak bulunmuştur. Bu değer literatür ile karşılaştırıldığında oldukça yüksek bir değerdir. Choi vd. GMA aşlanmış polipropilen filmini L-Phe ile modifiye etmişler ve bu destek üzerine ürokinaz adsorpsiyonunu yaklaşık 14 mg/g olarak bulmuşlardır (Choi vd., 2001).



Şekil 4.9. Cu^{2+} ile şelatlaştırılmış Cibacron Blue F3GA bağlı manyetik nanopartiküllere ürokinaz adsorpsiyonuna ürokinaz başlangıç derişiminin etkisi. pH: 9.0; inkübasyon süresi: 2 saat; sıcaklık: 25°C

4.2.3. Ürokinaz Adsorpsiyonuna İyonik Şiddetin Etkisinin İncelenmesi

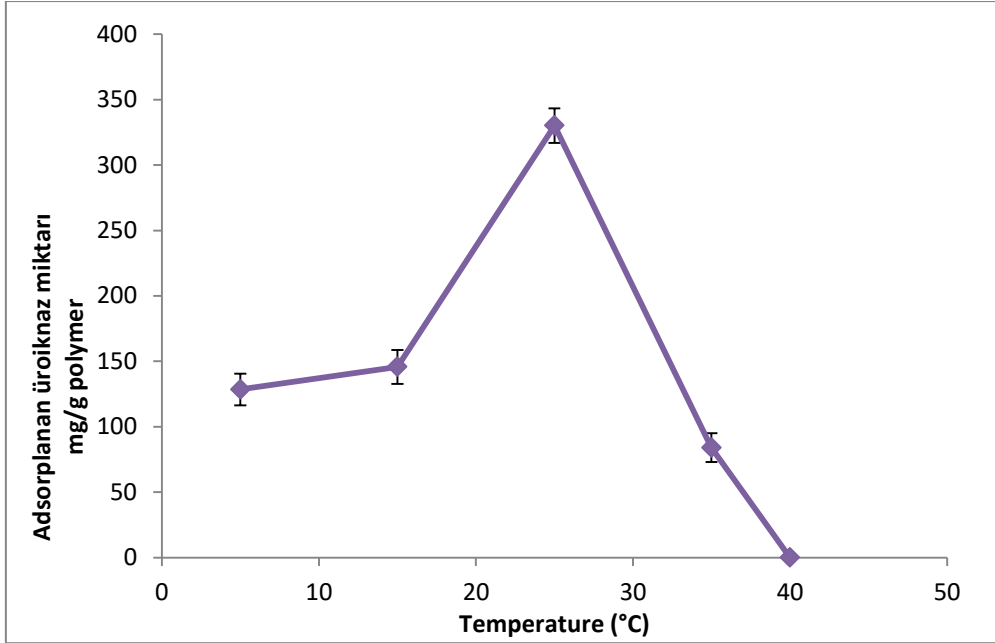
Cu^{2+} ile şelatlaştırılmış Cibacron Blue F3GA bağlı manyetik nanopartiküllere ürokinaz adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisi 0.1-1.0 M NaCl kullanılarak incelenmiştir. Şekil 4.10'da görüldüğü gibi iyonik şiddetin artışına bağlı olarak adsorpsiyon kapasitesi azalmış ve 1.0 M NaCl derişiminde ise sıfıra yakın bir değerde ürokinaz adsorpsiyonu gözlenmiştir. İyonik şiddet artışı ile adsorpsiyon kapasitesindeki bu azalma Cu^{2+} ile şelatlaştırılmış Cibacron Blue F3GA bağlı manyetik nanopartiküller ve ürokinaz arasındaki elektrostatik etkileşimlerin azalmasından kaynaklanabilir.



Şekil 4.10. Cu^{2+} ile şelatlaştırılmış Cibacron Blue F3GA bağlı manyetik nanopartiküllere ürokinaz adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisi. Başlangıç ürokinaz derişimi: 0.1 mg/mL; pH: 9.0; inkübasyon süresi: 2 saat; sıcaklık: 25°C

4.2.4. Ürokinaz Adsorpsiyonuna Sıcaklığın Etkisinin İncelenmesi

Cu^{2+} ile şelatlaştırılmış Cibacron Blue F3GA bağlı manyetik nanopartiküllere ürokinaz adsorpsiyonu 4-40 °C arasında incelenmiş ve Şekil 4.11’de gösterilmiştir. En yüksek adsorpsiyon kapasitesi 0.1 mg/mL ürokinaz derişiminde 25°C’de 330,17 mg/g polimer olarak bulunmuştur. Sıcaklığın 4°C’den 25°C’ye artması ise Cu^{2+} ile şelatlaştırılmış Cibacron Blue F3GA bağlı manyetik nanopartiküller ve ürokinaz arasındaki hidrofobik etkileşimlerin artışına bağlıdır. Ancak 25°C’den sonra adsorpsiyon kapasitesindeki azalma elektrostatik etkileşimler, metal koordinasyon bağları ve hidrojen bağlarının zayıflaması ve proteinin üç boyutlu yapısının değişmesi ile açıklanabilir (Demirci, 2017).



Şekil 4.11. Cu^{2+} ile şelatlaştırılmış Cibacron Blue F3GA bağlı manyetik nanopartiküllere ürokinaz adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi. Başlangıç ürokinaz derişimi: 0.1 mg/mL; pH: 9.0; inkübasyon süresi: 2 saat.

4.2.5. Adsorpsiyon İzotermi

Adsorpsiyon tipleri temel olarak adsorpsiyon izotermi kullanılarak tanımlanır. Bir proteinin adsorpsiyonunda adsorplanan protein derişimine karşı denge protein derişimi grafiği kullanılarak adsorpsiyon izotermi çıkarılmaktadır. Adsorpsiyon işleminin tipini anlamak için en çok kullanılan adsorpsiyon izotermi Langmuir ve Freundlich izotermidir.

Langmuir modeli, adsorpsiyon işlemi için eşit enerjili iyi tanımlanmış bağlanma bölgelerinin olduğunu, tüm bağlanma bölgelerinin birbirinden uzakta bulunduğunu, bu bağlanma bölgeleri arasında herhangi bir etkileşim olmadığını ve her birinin yalnızca bir molekülü bağlayabildiğini varsayar. Bu özellikleri nedeniyle enerji ve entalpileri eşdeğerdir ve Langmuir modeli aşağıdaki eşitlik ile ifade edilebilir (Eşitlik 4.1):

$$q_e = \frac{q_m \cdot K_a \cdot C_e}{1 + K_a \cdot C_e} \quad \text{Eşitlik 4.1}$$

Bu eşitlik Eşitlik 4.2'deki gibi lineerleştirilebilir:

$$\left(\frac{C_e}{q_e}\right) = \left(\frac{C_e}{q_m}\right) + \left(\frac{1}{q_m \cdot K_a}\right) \quad \text{Eşitlik 4.2}$$

Burada K_a , adsorpsiyon denge sabiti (mg/mL); C_e , bağlanmayan ürokinaz derişimi (mg/mL); q_e , adsorplanan ürokinaz derişimi (mg/mL) ve q_m desteğin birim kütlesi başına adsorplanan maksimum ürokinaz miktarı (mg/g).

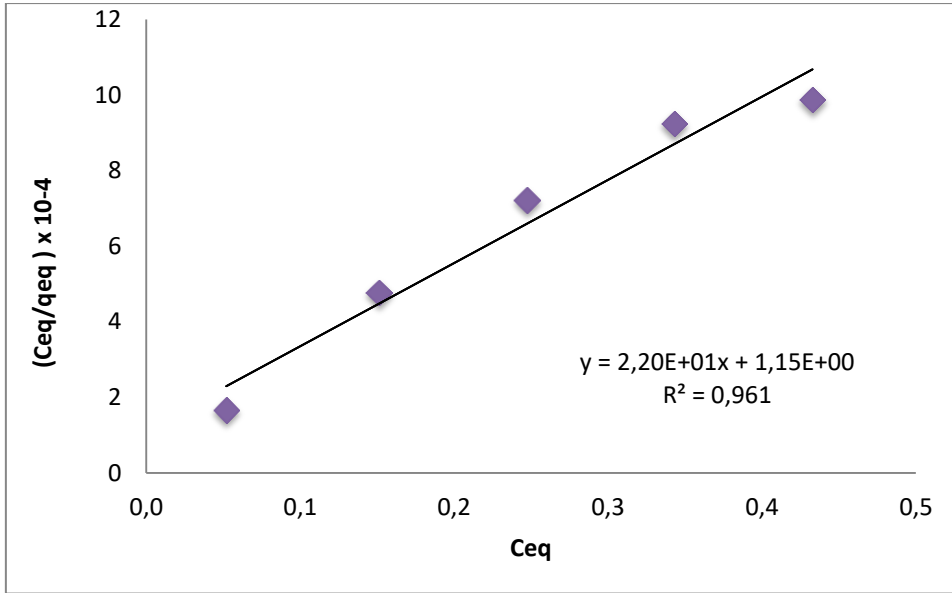
Bir diğer adsorpsiyon tipi Freundlich izotermidir. Bu eşitlik, adsorban yüzeyinde adsorplanan adsorbent miktarının üstel bir fonksiyon olduğu eşitliktir. Langmuir modelinin aksine Freundlich modeli çok tabakalı adsorpsiyonu ifade eder.

$$q_e = K_f \cdot C_e^{1/n} \quad \text{Eşitlik 4.4}$$

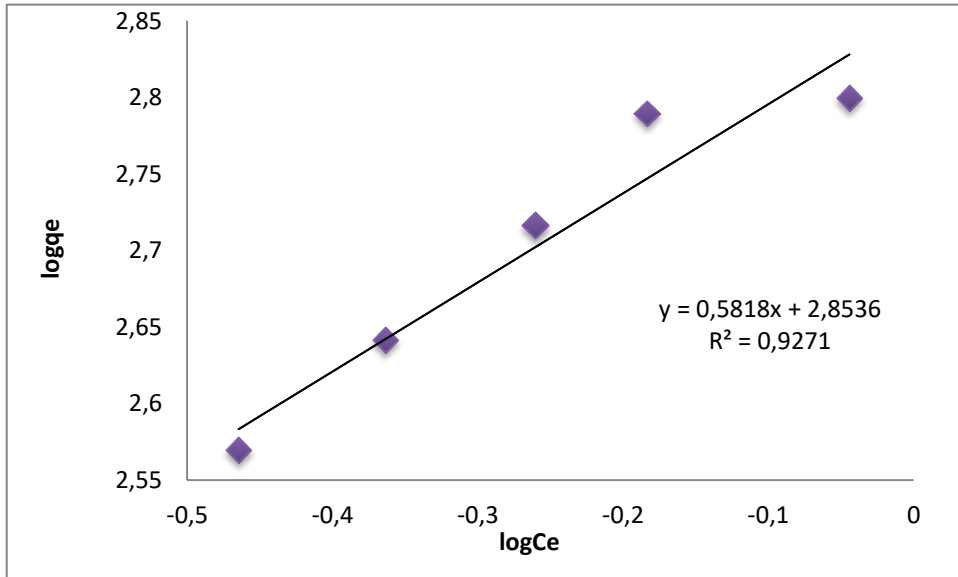
$$\ln q_e = \ln K_f + \frac{1}{n} \ln C_e \quad \text{Eşitlik 4.5}$$

Burada q_e , adsorplanan ürokinaz derişimi (mg/mL); C_e , bağlanmayan ürokinaz derişimi (mg/mL); K_f , desteğin bağıl adsorpsiyon kapasitesini (mg/g); n ise adsorpsiyonun şiddetini ifade eder.

Cu^{2+} ile şelatlaştırılmış Cibacron Blue F3GA bağılı manyetik nanopartiküllere ürokinaz derişimine ilişkin Langmuir ve Freundlich izotermeleri sırasıyla Şekil 4.12 ve Şekil 4.13'de, bu izotermelerden elde edilen kinetik sabitler Çizelge 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.12. Cu^{2+} ile şelatlaştırılmış Cibacron Blue F3GA bağlı manyetik nanopartiküllere ürokinaz adsorpsiyonunun Langmuir adsorpsiyon izotermi. pH: 9.0; inkübasyon süresi: 2 saat; sıcaklık: 25°C



Şekil 4.13. Cu^{2+} ile şelatlaştırılmış Cibacron Blue F3GA bağlı manyetik nanopartiküllere ürokinaz adsorpsiyonunun Freundlich adsorpsiyon izotermi. pH: 9.0 tamponu; inkübasyon süresi: 2 saat; sıcaklık: 25°C

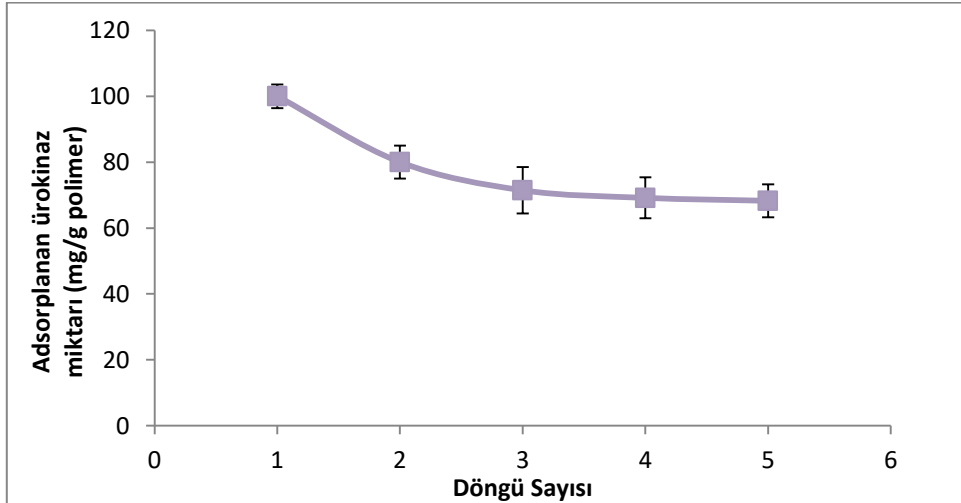
Çizelge 4.2. Langmuir ve Freundlich izotermilerinin kinetik sabitleri

Langmuir adsorpsiyon izotermi	Freundlich adsorpsiyon izotermi
$q_m = 454.54 \text{ mg/g}$	$K_f = 713.84 \text{ mg/g}$
$b = 19.13 \text{ mL/mg}$	$1/n = 0.5818$
$R^2 = 0.961$	$R^2 = 0.9271$

Çizelge 4.2'deki korelasyon katsayıları (0.961; 0,9271) karşılaştırıldığında Cu^{2+} şelatlaştırılmış boya bağlı manyetik nanopartiküllere ürokinaz adsorpsiyonunun Langmuir adsorpsiyon izotermine daha uygun olduğu görülmektedir.

4.2.6. Cu^{2+} ile Şelatlaştırılmış Cibacron Blue F3GA Bağlı Manyetik Nanopartiküllerden Ürokinaz Desorpsiyonu ve Nanopartiküllerin Tekrar Kullanılabilirliğinin İncelenmesi

Sentezlenen Cu^{2+} ile şelatlaştırılmış Cibacron Blue F3GA bağlı manyetik nanopartiküllerin tekrar kullanılabilirliğini göstermek için bu destek materyaline ürokinaz enzimi adsorbe edilmiş ve ardından desorpsiyonu gerçekleştirilmiştir. Desorpsiyon oranı % 96 olarak bulunmuştur. Adsorpsiyon ve ardından desorpsiyon işlemi 5 kez denenmiş ve adsorpsiyon kapasitesinde önemli bir azalma görülmemiştir.



Şekil 4.14. Cu^{2+} ile Şelatlaştırılmış Cibacron Blue F3GA bağlı manyetik nanopartiküllerin tekrar kullanılabilirliğinin incelenmesi

4.2.7. Ürokinaz Aktivitesi Tayini

Çizelge 4.3. Serbest, adsorbe ve desorbe ürokinaz aktivitelerinin Unite, Plough ve CTA birimleri

	Aktivite (Unite)	Spesifik Aktivite (Unite/mg protein)	Amidolitik Aktivite (Plough)	Spesifik Aktivite (PU/mg protein)	Aktivite (CTA)	Spesifik Aktivite (CTA/mg protein)
Serbest Ürokinaz	0.0022	0.44	0.0033	1657	0.0022	0.44
Adsorbe Ürokinaz	0.0021	0.42	0.0031	1663.98	0.0021	0.42
Desorbe Ürokinaz	0.0018	0.36	0.0027	1451.61	0.0018	0.36

Bu çalışmada kullanılan serbest ürokinaz, adsorbe ürokinaz ve desorbe edilmiş ürokinazın aktivitesine ilişkin veriler Çizelge 4.3’de gösterilmiştir. Aktivite Unite, Plough ve CTA birimleri ile verilmiştir. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde adsorbe ve desorbe ürokinazın, serbest enzimin aktivitesine yakın aktivite sonuçları gösterdiği görülmektedir. Kumar vd. (2006) ürokinaz saflaştırılmasına ilişkin yaptığı çalışmada Plough aktivite birimini kullanarak saflaştırdığı ürokinazın aktivitesini 814.2 PU/mg protein olarak rapor etmişlerdir. Bu tezde kullanılan ürokinaz ticari olarak saf halde satın alınmıştır ve aktivitesinin yüksek olması beklenen bir durumdur.

5. SONUÇ

Bu çalışmada, yeni bir destek materyali olan Cu^{2+} ile şelatlaştırılmış Cibacron Blue F3GA bağlı manyetik nanopartiküller hazırlanmıştır. Manyetik nanopartiküllerin karakterizasyon deneyleri yapılmış, fiziksel ve kimyasal özellikleri incelenmiştir. Sentezlenen nanopartiküllere ürokinaz adsorpsiyonu ve desorpsiyonu deneyleri ile bu destek materyalinin ürokinaz saflaştırılmasında kullanılabilirliği araştırılmıştır.

FTIR analizi ile Cibacron Blue F3GA boyasının manyetik nanopartiküllere kovalent olarak bağlandığı görülmüştür. Daha sonra bu boya molekülleri Cu^{2+} ile şelatlaştırılmıştır. Polimerik yapıya katılan Cibacron Blue F3GA miktarı 28.125 $\mu\text{mol/g}$ polimer; Cu^{2+} miktarı ise 10.229 $\mu\text{mol/g}$ polimer olarak bulunmuştur.

SEM fotoğrafları sentezlenen manyetik nanopartiküllerin morfolojisi hakkında bilgi vermiş, nanopartiküllerin küresel yapıda ve 80 nm boyutunda olduğu gözlenmiştir.

ESR ölçümleri nanopartiküllerin manyetik özellik kazandığını göstermiştir.

Cu^{2+} ile şelatlaştırılmış Cibacron Blue F3GA bağlı manyetik nanopartiküllere ürokinaz adsorpsiyonu farklı tampon çözeltilerinde (pH 4.0-5.0 asetat tamponu; 6.0-8.0 fosfat tamponu; 9.0-10.0 karbonat tamponu; 0.1 M) denenmiştir ve nanopartiküllere maksimum ürokinaz adsorpsiyonu 0.1 mg/mL ürokinaz derişiminde pH 9.0 karbonat tamponunda 350,61 mg/g polimer olarak bulunmuştur.

Cu^{2+} ile şelatlaştırılmış Cibacron Blue F3GA bağlı manyetik nanopartiküllere ürokinaz adsorpsiyonunda iyonik şiddet etkisinin incelenmesinde farklı derişimlerdeki (0; 0.01; 0.1; 0.2; 0.5; 1.0 M NaCl) tuz çözeltileri eklenmiş ve iyonik şiddetin artırılmasıyla ürokinaz adsorpsiyonundaki kapasitenin azaldığı gözlenmiştir.

Cu^{2+} ile şelatlaştırılmış Cibacron Blue F3GA bağlı manyetik nanopartiküllere ürokinaz adsorpsiyonunda sıcaklığın etkisinin incelenmesinde, sıcaklığın 4 °C'den 25°C'ye kadar artması ile adsorplanan ürokinaz miktarı artmış daha sonra sıcaklığın 40°C'ye kadar arttırılması ile adsorplanan ürokinaz miktarı sifıra kadar düşmüştür.

Cu^{2+} ile şelatlaştırılmış Cibacron Blue F3GA bağlı manyetik nanopartiküllere ürokinaz adsorpsiyonuna ilişkin Langmuir ve Freundlich izotermi değerlendirildiğinde korelasyon katsayılarının karşılaştırılmasıyla nanopartiküllere ürokinaz adsorpsiyonunun Langmuir adsorpsiyon izotermine daha uygun olduğu görülmüştür.

Cu^{2+} ile şelatlaştırılmış Cibacron Blue F3GA bağlı manyetik nanopartiküllerden ürokinazın desorpsiyonu, desorpsiyon ajanı olarak 1,0 M'lık NaCl çözeltisi kullanılarak araştırılmıştır. Desorpsiyon oranı % 96 olarak hesaplanmış ve 5 kez tekrar edilen adsorpsiyon-desorpsiyon işleminden sonra adsorplanan ürokinaz miktarında önemli bir azalma gözlenmemiştir.

Cu^{2+} ile şelatlaştırılmış Cibacron Blue F3GA bağlı manyetik nanopartiküllere adsorpsiyonu gerçekleştirilen ürokinazın, serbest ürokinazın ve hazırlanan nanopartiküllerden desorbe edilmiş ürokinazın aktivite deneyleri gerçekleştirilmiştir. Ürokinaz aktivitesi, plazmin ve ürokinaz substratı olan pyro-Gly-Arg-p-nitroanilid-HCl üzerindeki etkisi ile tespit edilmiştir.

Yapılan bu çalışmanın sonuçları bu tezde sentezlenen yeni destek materyalinin başarılı bir şekilde ürokinaz adsorpsiyonu ve desorpsiyonunda kullanılabileceğini göstermiştir. Bu çalışma bu destek materyalinin biyolojik bir kaynaktan ürokinaz saflaştırılmasında kullanılabileceğini vadetmektedir. Ayrıca bu destek materyaline adsorpsiyon yoluyla yapılan bu immobilizasyon işlemi immobilize enzimlere güzel bir örnektir ve tıbbi uygulamalarda kullanım bulması olasıdır.

KAYNAKLAR

- Arıca M.Y., Bayramoğlu G. 2005. Purification of lysozyme from egg white by Reactive Blue 4 and Reactive Red 120 dye-ligands immobilised composite membranes. **Process Biochemistry**, 40: 1433–1442.
- Bansal V., Roychoudhury P. K. 2006a. Production and purification of urokinase: A comprehensive review. **Protein Expression and Purification**, 45: 1–14.
- Bansal V., Roychoudhury P.K., Mattiasson B., Kumar A. 2006b. Recovery of urokinase from integrated mammalian cell culture cryogel bioreactor and purification of the enzyme using p-aminobenzamidine affinity chromatography. **Journal of Molecular Recognition**, 19(4): 332-9.
- Bansal V., Roychoudhury P.K., Kumar A. 2007. Urokinase Separation from Cell Culture Broth of a Human Kidney Cell Line. **International Journal of Biological Sciences**, 3(1): 64–70.
- Bell P.H., Dziobkowski C.T., Englert M. 1974. A sensitive fluorometric assay for plasminogen, plasmin and streptokinase. **Analytical Biochemistry**, 61: 200-208.
- Bi F., Zhang J., Su Y., Tang Y., Liu J. 2009. Chemical conjugation of urokinase to magnetic nanoparticles for targeted thrombolysis. **Biomaterials**, 30: 5125–5130.
- Block H., Maertens B., Spriestersbach, A., Brinker N., Kubicek J., Fabis R., Labahn J., Schafer F. 2009. Chapter 27 Immobilized-metal affinity chromatography (IMAC): a review. **Methods in Enzymology**, pp. 439-473.
- Booyse F.M, Lin P.H, Traylor M., Bruce R. 1988a. Purification and properties of a single-chain urokinase-type plasminogen activator form produced by subcultured human umbilical vein endothelia cells. **Journal of Biological Chemistry**, 263: 15139–15145.

- Booyse F.M., Scheinbuks J., Lin P.H., Traylor M., Bruce R. 1988b. Isolation and interrelationships of the multiple molecular tissue-type and urokinase-type plasminogen activator forms produced by cultured human umbilical vein endothelial cells. **Journal of Biological Chemistry**, 263: 15129–15138.
- Burges R.A, Brammer K.W., Coombes J.D. 1965. Molecular weight of urokinase. **Nature**, 208: 894.
- Chaouk H., Hearn M.T. 1999a. Examination of the protein binding behaviour of immobilised copper (II)-2,6-diaminomethylpyridine and its application in the immobilised metal ion affinity chromatographic separation of several human serum proteins. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, 39: 161–177.
- Chaouk H., Hearn M.T. 1999b. New ligand, N-(2-pyridylmethyl) aminoacetate, for use in the immobilised metal ion affinity chromatographic separation of proteins. **Journal of Chromatography A**, 852: 105–115.
- Chen H., Teramura Y., Iwata H. 2011. Co-immobilization of urokinase and thrombomodulin on islet surfaces by poly(ethylene glycol)-conjugated phospholipid. **Journal of Controlled Release**, pp. 229-234.
- Cheung R.C.F., Wong J.O., Bun Ng T. 2012. Immobilized metal ion affinity chromatography: a review on its applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 96: 1411–1420.
- Choi S., Kwang-Pill L., Young C.H. 2001. Adsorption of urokinase by polypropylene films with various amine groups. **Journal of Applied Polymer Science Pages**, pp. 2851–2858.
- Chronopoulou E., Labrou N.E. 2014. Synthesis and Application of Dye-Ligand Affinity Adsorbents. **Methods in Molecular Biology**, 1129: 263-276.
- Clonis Y.D., Lowe C.R. 1991. Monosized adsorbents for high-performance affinity chromatography: Application to the purification of calf intestinal alkaline phosphatase and human urine urokinase. **Journal of Chromatography A**, pp. 103-111.

- Demirci B., Bereli N., Aslıyüce S., Baydemir G., Denizli A. 2017. Protein C recognition by ion-coordinated imprinted monolithic cryogels. **Seperation Science**, pp. 1610–1620.
- Denizli A., Şenel S., Arıca M.Y. 1998. Cibacron Blue F3GA and Cu (II) derived poly(2-hydroxyethylmethacrylate) membranes for lysozyme adsorption. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 11: 113–122.
- Derewenda, Z. S. 2004. The use of recombinant methods and molecular engineering in protein crystallization. **Methods**, 34: 354–363.
- Doğan A., Özkara S., Sarı M.M., Uzun L., Denizli A. 2012. Evulation of human interferon adsorption performance of Cibacron Blue F3GA attached cryogels and interferon purification by using FPLC system. **Journal of Chromatography B**, 893-894: 69-76.
- Fahey E.M., Chaudhuri J.B., Binding P. 2000. Refolding and purification of a urokinase plasminogen activator fragment by chromatography. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, 14: 225-235.
- Gaberc-Porekar V., Menart V. 2001. Perspectives of immobilized-metal affinity chromatography. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, 49: 335–360.
- Gao L.H., Hu X.W., Wu Q.F., Xiao C.Z., Xu Z.P., Zhang Z.G. 2002. Single-chain urokinase-type plasminogen activator (scu-PA) purification by immuno-affinity chromatography. **Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao**, 3: 356-359.
- Hayashi S., Yamada K., Ogikubo H. 1985. Urokinase with high fibrin affinity found in human urine. **Ketsueki to Myakkan**, 16: 317–320.
- Hearon, J. 1948. The configuration of cobaltihistidine and oxy-bis (cobalt histidine). **Journal of the National Cancer Institute**, 9: 1–11.
- Hiroyuki S., Kosugi T., Matsuo O., Mihara H. 1982. Physicochemical properties of highly purified plasminogen activator (single chain urokinase) of kidney culture. **Nippon Ketsueki Gakkai Zasshi**, 45: 119–128.

- Hochuli E., Doebeli H., Schacher A. 1987. New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. **Journal of Chromatography**, 411: 177–184.
- Hochuli, E., Bannwarth, W., Döbeli, H., Gentz, R., and Stuber, D. 1988. Genetic approach to facilitate purification of recombinant proteins with a novel metal chelate adsorbent. **Biotechnology**, 6: 1321–1325.
- Hou K.C., Zaniewski R. 1990. Purification of urokinase by combined cation exchanger and affinity chromatographic cartridges. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, pp. 297-306.
- Ichinose A., Fujikawa K., Suyama T. 1986. The activation of pro-urokinase by plasma kallikrein and its inactivation by thrombin. **Journal of Biological Chemistry**, 261: 3486–3489.
- Ito Y., Tomaselli A.G., Lafayette H.N. 1980. ATP:AMP Phosphotransferase from Baker's Yeast. **European Journal of Biochemistry**, 105: 85-92.
- Kaya N., Uygun D.A., Akgöl S., Denizli A. 2013. Purification of Alcohol Dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae* Using Magnetic Dye-Ligand Affinity Nanostructures. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 169: 2153–2164.
- Kodama R.H. 1999. Magnetic nanoparticles. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, 200: 359-372.
- König U., Nitschke M., Menning A., Sperling C., Simon F., Arnhold C., Werner C., Jacobasch H. J. 1999. Plasma modification of polytetrafluoroethylene for immobilization of the fibrinolytic protein urokinase. **Surface and Coatings Technology**, pp. 1011-1015.
- Kumar A., Mattiasson B., Roychoudhury P.K., Bansal V. 2006. Recovery of urokinase from integrated mammalian cell culture cryogel bioreactor and purification of the enzyme using p-aminobenzamidine affinity chromatography. **Journal of molecular recognition**, 19: 332-339.

- Kunamneni A., Devi Ravuri B., Ellaiah P., Prabhakhar T., Saisha V. 2008a. Urokinase - A strong plasminogen activator. Standard Review. **Academic Journals**, 3: 58-70.
- Kunamneni A., Ravuri B. D., Saisha V, Ellaiah P., Prabhakhar T. Urokinase-a Very Popular Cardiovascular Agent 2008b. **Recent Patents on Cardiovascular Drug Discovery**, 3: 45-58.
- Labrou N.E. 2003. Design and selection of ligands for affinity chromatography. **Journal of Chromatography B**, 790: 67–78.
- Lai Z.F., Imamura T., Koike N., Kitamoto Y. 2005. Urokinase-immobilization suppresses inflammatory responses to polyurethane tubes implanted in rabbit muscles. **Journal of Biomedical Materials Research A**, 76(1): 81-85.
- Leibler D., Rabinkov A., Wilchek M. 1996. Salicylaldehyde-metal-amino acid ternary complex: a new tool for immobilized metal affinity chromatography. **Journal of Molecular Recognition**, 9: 375–82.
- Liener I.E., Friedenon B. 1970. Methods in Enzymology. Perlman G. E., Lorand L. (Editors). **Academic Press, New York**, 19: 261-273.
- Liesiene J., Racaityte K., Morkeviciene M., Valancius P., Bumelis V. 1997. Immobilized metal affinity chromatography of human growth hormone. Effect of ligand density. **Journal of Chromatography A**, pp. 27-33.
- Mazitsos C.F., Rigden D.J., Tsoungas P.G., Clonis Y.D. 2002. Galactosyl-biomimetic dye-ligands for the purification of Dactylium dendroides galactose oxidase. **Journal of Chromatography A**, 954: 137–150.
- Okoli C., Magali Boutonnet, Laurence Mariey, Jar s S., Rajarao G. 2011. Application of magnetic iron oxide nanoparticles prepared from micro emulsions for protein purification. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, 86: 1386–1393.

- Philo R.D., Gaffney P.J. 1981. Assay methodology for urokinase: Its use in assessing the composition of mixtures of high- and low-molecular weight urokinase. **Thrombosis Research**, pp. 81-88.
- Porath J., Carlsson J., Olsson I., Belfrage G. 1975. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. **Nature**, 258: 598–599.
- Porath J. 1992. Immobilized metal ion affinity chromatography. **Protein Expression Purification**, 3: 263–281.
- Ramadan N, Porath J. 1985. Fe^{3+} -hydroxamate as immobilized metal affinity-adsorbent for protein chromatography. **Journal of Chromatography**, 321: 93–104.
- Samama M., Cazenave B., Otero A.M. 1979. Urokinase I and II activity. **Thrombosis and Haemostasis**, 40: 578–580.
- Schüth F., An-Hui Lu, Salabas E. L. 2007. Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application. **Angewandte Chemie International Edition**, 46: 1222 – 1244.
- Shibusawa Y., Fujiwara T., Shindo H., Ito Y. 2004. Purification of alcohol dehydrogenase from bovine liver crude extract by dye-ligand affinity counter-current chromatography. **Journal of Chromatography B Analytical Technologies in Biomedical Life Science**, 25: 239-244.
- Sobel G.W., Mohler S.R., Jones N.W., Dowdy A.B.C., Guest M.M. 1952. Urokinase: an activator of plasma profibrinolysin extracted from urine. **American Journal of Physiology**, 171: 768–769.
- Soberano M.E., Ong E.B., Johnson A.J., Levy M., Schoellmann G. 1976. Purification and characterization of two forms of urokinase. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Enzymology**, 445: 763–773.
- Stack M.S., Johnson D.A. 1994. Human mast cell tryptase activates single chain urinary-type plasminogen activator (Pro-urokinase). **Journal of Biological Chemistry**, 269: 9416–9419.

- Stump D.C, Lijnen H.R., Collen D. 1986. Purification and characterization of a novel low molecular weight form of single-chain urokinase type plasminogen activator. **Journal of Biological Chemistry**, 261: 17120–17126.
- Stump D.C, Stassen J.M, Demarsin E., Collen D. 1987. Comparative thrombolytic properties of single-chain forms of urokinase-type plasminogen activator. **Blood**, 69: 592–596.
- Suh C.W., Choi G.S., Lee E.K. 2003. Enzymic cleavage of fusion protein using immobilized urokinase covalently conjugated to glyoxyl-agarose. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 37(Pt 2): 149-55.
- Sulkowski, E. 1985. Purification of proteins by IMAC. **Trends in Biotechnology** 3: 1–7.
- Tait J.F., Engelhardt S., Smith C., Fujikawa K. 1995. Prourokinase-annexin V chimeras. Construction, expression, and characterization of recombinant proteins. **Journal of Biological Chemistry**, 270, 21594-21599.
- Takahashi R., Akiba K., Koike M., Noguchi T., Ezure Y. 2000. Affinity chromatography for purification of two urokinases from human urine. **Journal of Chromatography B Biomedical Science Applied**, 26: 71-78.
- Tekiner P., Perçin I., Ergün B., Yavuz H., Aksöz E. 2012. Purification of urease from jack bean (*Canavalia ensiformis*) with copper (II) chelated poly(hydroxyethyl methacrylate-N-methacryloyl-(L)-histidine methyl ester) cryogels. **Journal of Molecular Recognition**. 11: 549-54.
- Totani T., Teramura Y., Iwata H. 2008. Immobilization of urokinase on the islet surface by amphiphilic poly(vinyl alcohol) that carries alkyl side chains. **Biomaterials**, 29(19): 2878-2883.
- Urtasun N., Baieli M.F., Hirscha D.B., Martínez-Ceron M.C., Cascone O., Wolmana F.J. 2017. Lactoperoxidase purification from whey by using dye affinity chromatography. **Food and bioproducts processing**, 103: 58–65.

- Vetterlein D., Bell T.E., Young P.L., Roblin R. 1980. Immunological quantitation and imunoadsorption of urokinase-like plasminogen activators secreted by human cells. **Journal of Biological Chemistry**, 255:3665–3672.
- Wang J., Liu D., Peng X., An L. 2006. Synthesis of new ‘biomimetic’ dye-ligands and their application in the purification of alkaline phosphatase. **Separation and Purification Technology**. pp. 141-146.
- Williams J.R.B. 1951. The fibrinolytic activity of urine. **International Journal of Experimental Pathology**, 32: 530-537.
- Witt J.J., Roskoski R. 1980. Adenosine cyclic 3',5'-monophosphate dependent protein kinase: active site directed inhibition by Cibacron Blue F3GA. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, pp. 143–148.
- Wun T.C., Ossowski L., Reich E. 1982a. Proenzyme form of human urokinase, **Journal of Biological Chemistry**. 257: 7262–7268.
- Wun T.C., Schleuning W.D., Reich E. 1982b. Isolation and characterization of urokinase from human plasma, **Journal of Biological Chemistry**, 257: 3276–3283.
- Yang Y., Zhang J., Yang W., Wu J., Chen R. 2003. Adsorption properties for urokinase on local diatomite surface. **Applied Surface Science**. pp. 20-28.
- Zachariou M., Traverso I., Hearn M.T. 1993. High-performance liquid chromatography of amino acids, peptides and proteins: CXXXI. o-phosphoserine as a new chelating ligand for use with hard Lewis metal ions in the immobilized-metal affinity chromatography of proteins. **Journal of Chromatography** 646: 107–120.
- Zachariou M., Hearn M.T. 1996. Application of immobilized metal ion chelate complexes as pseudocation exchange adsorbents for protein separation. **Biochemistry**, 35: 202–211.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Sinem EVLİ

Doğum Yeri ve Tarihi : Ereğli/1992

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi,

Fen Edebiyat Fakültesi

Kimya Bölümü

Yüksek Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi,

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Yabancı Diller : İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

A) Makaleler

- Evli S., Orhan H., Aktaş P., Uygun M., Uygun D.A. 2017. Starch Hydrolysis by Amyloglucosidase Attached Cryogel Matrix. **Bulletin of Materials Science.** (*Değerlendirmede*)

B) Bildiriler

Ulusal

-Evli S., Orhan H., Aktaş P., Uygun M., Uygun D.A. Amiloglukozidazın Geri Dönüşümlü İmmobilizasyonu için Metal Şelat Afinite Kriyojellerinin Hazırlanması. **11. Ulusal Afinite Teknikleri Kongresi** (15-17 Haziran 2017), Kuşadası, Aydın. Sözlü Bildiri.

-Orhan H., Evli S., Dabanca M.B., Başbülbul G., Uygun M., Uygun D.A. Bakteri Öldürücü Enzim Bağlı Nanopartiküller. **11. Ulusal Afinite Teknikleri Kongresi** (15-17 Haziran 2017). Kuşadası, Aydın. Poster Sunumu.

-Bayraktaroğlu M., Orhan H., Evli S., Uygun D.A., Akgöl S., Uygun M. Amiloglukozidaz Adsorpsiyonu için Lektin Bağlı Afinite Kriyojelleri. **11. Ulusal Afinite Teknikleri Kongresi** (15-17 Haziran 2017), Kuşadası, Aydın. Poster Sunumu.

C) Katıldığı Projeler

- 1) Ürokinazın Saflaştırılması için Manyetik Nanopartiküllerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu. ADÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu. Proje No: FEF-17002. Proje araştırmacısı.
- 2) Ağır Metallerin Gideriminde Kriyojellerin Kullanımı. ADÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu. Proje No: FEF-17008. Proje araştırmacısı.

İLETİŞİM

E-Posta Adresi : sinemevli@hotmail.com

Tarih :.././....