

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SENTETİK VİRAL PEPTİDLER KULLANILARAK
POLİELEKTROLİT ESASLI
BİYOKONJUGATLARIN GELİŞTİRİLMESİ**

Yüksek Kimyager Zafer Ömer ÖZDEMİR

**FBE Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Programında
Hazırlanan**

DOKTORA TEZİ

Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Zeynep AKDESTE (YTÜ)

İSTANBUL, 2008



DOKTORA TEZ JÜRİSİ KARAR TUTANAĞI

Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Doktora öğrencisi 02515301 no.lu Zafer Ömer ÖZDEMİR'in

**“SENTETİK VİRAL PEPTİDLER KULLANILARAK
POLİELEKTROLİT ESASLI BİYOKONJUGATLARIN
GELİŞTİRİLMESİ”**

konulu doktora tez sınavı 23 Ocak 2009 günü saat 10.00'da, tabi olduğu “YTÜ Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği” nin ilgili maddeleri uyarınca YTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Salonunda yapılmıştır.

Jürimiz, adı geçen öğrencinin tez savunmasını ve sorulara verdiği yanıtları değerlendirerek tezinin



Kabulüne



Reddine



Düzeltilme yapılmasına ve altı ay içinde tekrar sınava girmesine

OYBİRLİĞİ / ~~OYÇOKLUĞU~~ ile karar vermiştir.

Y.Doç.Dr.Zeynep AKDESTE
(Tez Danışmanı)

Prof.Dr.Hüseyin YILDIRIM

Prof.Dr.Mehmet EROĞLU

Prof.Dr.Nesrin EMEKLİ

Prof.Dr.İnci Arisan ATAÇ

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
KISALTMA LİSTESİ	vii
ŞEKİL LİSTESİ	ix
ÖNSÖZ	xvii
ÖZET	xviii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Polielektrolitler	3
2.1.1 Homopolielektrolitler	4
2.1.2 Poliamfolitler	7
2.2 İyonik Polimerizasyon	11
2.2.1 İyonik Polimerizasyona Uygun Monomerler	11
2.2.2 Anyonik Polimerizasyon	15
2.2.3 Anyonik Polimerizasyon Mekanizması	17
2.2.4 Katyonik Polimerizasyon	25
2.2.5 Katyonik Polimerizasyon Mekanizması	25
2.3 Katyonik Halka Açılması Polimerizasyonu	32
2.4 Polimerlerde Molekül Kütlesi	38
2.4.1 Sayıca Ortalama Mol Kütlesi ($\bar{M}_n$)	38
2.4.2 Viskozite Ortalama Mol Kütlesi ($\bar{M}_v$)	39
2.4.3 Ağırlıkça Ortalama Mol Kütlesi ($\bar{M}_w$)	39
2.4.4 z-Ortalama Mol Kütlesi ($\bar{M}_z$)	40
2.4.5 Molekül Kütlesi Dağılımı	40
2.5 Mark-Houwink Denklemi	41
2.6 Polimerlerde Boyut	43
2.7 Konidin ve Polimerleşmesi	44
3. MİKRODALGA ENERJİSİ	46
3.1 Mikrodalga Tarihçesi	46
3.2 Mikrodalga Teorisi	48
4. PEPTİD SENTEZİ	52
4.1 Peptid Sentezi Tarihçesi	52
4.2 Amino asitlerin Adlandırılması	54
4.3 Peptid tanımı ve adlandırılması	56
4.4 Amino asitlerin ve peptidlerin fizikokimyasal özellikleri	58
4.5 Peptid Sentezinin Mekanizması	58
4.6 Peptid Sentezinde Mikrodalga Kullanımı	66
4.7 Sentezlenen Peptid Dizileri	69
5. BİYOKONJUGAT SENTEZİ	71
6. KULLANILAN ÖLÇÜM YÖNTEMLERİ	72
6.1 Büyüklükçe Ayırma Kromatografisi (BAK)	72
6.1.1 Ayırma Prensipleri	72
6.2 FT-IR Spektroskopisi	74
6.3 Zeta Potansiyeli ve boyut Ölçümü	75
6.4 LC-MS	76
6.4.1 İyonlaştırma	77
6.4.1.1 Elektrosprey iyonlaştırma (ESI)	78
6.4.2 Kütle Analizörleri	79
6.4.3 Peptidlerin Ters Faz Sıvı Kromatografisi (RP-HPLC) ile Ayrılması	81

6.4.3.1	Peptidlerin Ters Faz Sıvı Kromatografisi (RP-HPLC) ile Ayrılmasını Etkileyen Faktörler.....	82
6.4.3.2	RP-HPLC/ESI-MS ile Analiz.....	86
6.5	Amino Asit Analizi.....	87
6.6	UV-VIS Spektroskopisi.....	89
6.7	Fluoresans Spektroskopisi Ölçümleri.....	89
7.	DENEYSEL KISIM.....	91
7.1	Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler.....	91
7.1.1	Kullanılan Cihazlar.....	91
7.1.2	Kullanılan Kimyasallar Maddeler.....	93
7.2	Polimer Sentezi.....	94
7.2.1	Sentezde Kullanılan Çözücülerin Kurutulması ve 2-(2-hidroksietil)piperidin'in Vakum Destilasyonu.....	94
7.2.2	2-(2-kloroetil)piperidin hidroklorür Tuzu Sentezi.....	96
7.2.3	Konidin Sentezi.....	98
7.2.4	Konidin'in Polimerizasyonu.....	100
7.2.4.1	Poli(1-azabisiklo[4.2.0]oktan) Polimerinin Bromo Asetik Asit (BrAcOH) İle Modifikasyonu.....	119
7.3	Peptid Sentezi ve Analizleri.....	121
7.3.1	Peptid Sentez.....	121
7.3.2	VP1 135-161 peptid dizisinin analizleri.....	121
7.3.2.1	VP1 135-161a peptid dizisinin analizleri.....	122
7.3.2.2	VP1 135-161b peptid dizisinin analizleri.....	124
7.3.3	VP1 200-213 peptid dizisinin analizleri.....	126
7.3.4	VP1 40-60 peptid dizisinin analizleri.....	128
7.3.5	NP 55-69 peptid dizisinin analizleri.....	131
7.3.6	HA 91-108 peptid dizisinin analizleri.....	135
7.3.7	Melanoma 155-163 peptid dizisinin analizleri.....	139
7.4	Peptidlerin Preparatif Saflaştırılması.....	141
7.5	Peptidlerin FT-IR Analizlerinin Toplu Yorumu.....	142
7.6	Amino asit analizinin yapılışı.....	143
7.7	Biyokonjugatların Sentezi ve Analizi.....	145
7.7.1	Mikroalga destekli polimer peptid biyokonjugatının sentezi.....	145
7.7.1.1	Hesaplamalar.....	145
7.7.2	VP1 135-161 ile yapılan çalışmalar.....	147
7.7.2.1	Mikroalga Teknolojisi Kullanılarak Organik Ortamda Sentetik Polianyon VP/AA Kopolimeri (25/75; $\overline{M}_w$ 80.000) ile Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteinin Sentetik Peptid Antijenlerini içeren Fiziksel Kompleks ve Biyokonjugatların HPLC-Viscotek ve Fluoresans Sonuçları.....	147
7.7.2.2	Fluoreskamin Yöntemi ile VP/AA-Peptid Biyokonjugatlarına ait Amino Grubu Sayısı ve Konjugasyon Derecesinin Saptanması.....	152
7.7.2.3	Fiziksel Kompleks ve Biyokonjugatlardaki Amino Grubu Sayısının Tayini.....	153
7.7.2.4	Fluoreskamin Yöntemi ile Amino Grubu Sayısı ve Konjugasyon Derecesinin Saptanmasına ait Deney Sonuçları.....	154
7.7.3	LPS çalışmaları için hazırlanan biyokonjugatlar.....	154
7.7.3.1	Poli-4-vinil Piridin (P4VP) %100 Etilbromür ve %10 Setilbromür-%90 Etilbromür ile Alkilizasyonu.....	155
8.	SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	156
8.1	Polimer sentezinin Sonuç ve Tartışması.....	156
8.2	Peptid Sentezinin sonuç ve tartışması.....	160
8.2.1	LC-ESI-MS analizleri Sonuç ve Tartışması.....	160

8.3	Amino Asit Analiz Sonucu ve Tartışması	164
8.4	Biyokonjugat sentezi sonuçlar ve tartışması.....	166
8.5	Mikrodalga yöntemiyle sentezlenen biyokonjugatın klasik yöntemle sentezlenen biyokonjugatlarla kıyaslanmasına ait Sonuç ve Tartışma.....	169
8.6	Tez çalışmasının çıktılarının Tartışması	174
9.	KAYNAKLAR	175

SİMGE LİSTESİ

ΔC	Konsantrasyondaki değişim
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece
$\Delta \text{RI}_{\text{Alan}}$	RI kromatogramında pik alanlarındaki değişim
$[\eta]$	İntrinsik viskozite
μL	Mikrolitre
μm	Mikrometre
$\text{\AA}$	Angström
C	Derişim
cm	Santimetre
Da	Dalton
dk	Dakika
DP	Viskozimetre giriş ve çıkış arasındaki basınç farkı
g	Gram
GHz	Giga herzt
IP	Viskozimetre kapillerlerinin iç basınçları farkı
K_{RI}	RI dedektörünün kalibrasyon sabiti
M	Molar
mg	Miligram
MHz	Mega herzt
mL	Mililitre
mV	Milivolt
$\overline{M}_n$	Sayıca-ortalama molekül ağırlığı
$\overline{M}_v$	Viskozite ortalama molekül ağırlığı
$\overline{M}_w$	Ağırlıkça-ortalama molekül ağırlığı
$\overline{M}_z$	Z-ortalama molekül ağırlığı
n	Mol
n_0	Çözücünün kırılma indisi
nm	Nanometre
R_g	Dönme yarıçapı (Radius of gyration)
R_h	Hidrodinamik yarıçap
V	Hacim
V_{enj}	Enjekte edilen hacim
W	Watt
ϵ_p	Molar absorbans
η	Viskozite

λ	Dalga Boyu
μm	Mikro metre

KISALTMA LİSTESİ

(M + H) ⁺	Protonlanmış (pozitif yüklü) moleküler iyon, MH ⁺ olarak da yazılır
aa	Amino asit (Amino asitlere ait kısaltmalar Çizelge 4.1 de verilmiştir)
Ab	Antikor
Ag	Antijen
AlCl ₃	Alüminyum klorür
APCI	Atmosferik Basınç Kimyasal İyonlaştırma
APPI	Atmosferik Basınç Foto İyonlaştırma
BAK	Büyükölçek Ayırma Kromatografisi
BF ₃	Bor (III) florür
Boc	BenzylOxyCarbonyl
BrAcOH	Bromo asetik asit
BSA	Bovin serum albumin (Sığır Serum Albümini)
CH ₃ COOH	Asetik Asit
CP	Kopolimer
DC	Doğru akım
DCM	Diklor metan
DIEA	Diisopropil etil amin
DMF	Dimetil formamid
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorid
EDT	Etan di tiol
EK	Elektrostatik Kompleks
ESI-MS	Elektrospray iyonizasyon-kütle spektrometri
FMDV	Şap Hastalığı Virüsü (Foot and Mouth Disease Virus)
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
FT-ICR	Fouriertransform iyon-siklotron rezonans
FT-IR	Fourier Transform Infrared
GFC	Jel filtrasyon kromatografisi
GPC	Jel geçirgenlik kromatografisi
HA	Haemagglutinin
HBTU	N-[(1H-Benzotriazol-1-yl)(dimethylamino)methylene]-N-methylmet- hanaminium hexafluorophosphate N-oxide
HCl	Hidroklorik Asit
HCTU	1H-Benzotriazolium-1-[bis(dimethylamino)methylene]5-chloro hexa- fluorophosphate (1-),3-oxide
HF	Hidroflorik asit
HOBt	1-Hydroxybenzotriazole
HPLC	Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi
HSA	Human Serum Albumin
Ig	İmmünoglobülin
IPA	İyon çifti ajanı (Ion Pairing Agent)
KK	Kovalent Konjugat
LAC	Sıvı adsorbsiyon kromatografisi
LALLS	Dar açılı lazerli ışık saçılması

LPS	Lipopolisakkarit
LS	Işık Saçılması
M	Molekül kütlesi
m/z	Kütle - yük oranı
MALDI	Matriks Destekli Lazer Dezorpsiyon İyonlaştırma
MALS	Çok açılı ışık saçılması
MAOS	Mikrodalga Destekli Organik Sentez (Microwave Assisted Organic Synthesis)
MFC	Meme kanseri hücresi
M-H	Mark-Houwink denklemi
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromür
MWD	Molekül kütlesi dağılımı
Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	Disodyum hidrojen fosfat heptahidrat
NaCl	Sodyum klorür
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	Sodyum dihidrojen fosfat dihidrat
NaN ₃	Sodyum azid
NMP	N-Methylpyrrolidinone
NP	Nükleoprotein
ODS	Octadesil silil
OPA	O-phthaldehyde
PAA	Poliakrilik Asit
PBS	Fosfat tamponu (Phosphate Buffer Saline)
PDI	Poli dispersite indeksi
PE	Polielektrolit
PEG	Poli(etilen glikol)
PEK	Polielektrolit Kompleks
PSS	Poli(sodyum stiren sülfonat)
PVEP	Kuarternize poli-4-vinilpiridin
PVP	Poli-4-vinilpiridin
RADAR	Radyo yönlendirme ve sıralama (Radio Direction And Ranging)
RALS	Dik açılı ışık saçılması
Rf	Radyo frekans
RI	Kırılma İndisi
RP-HPLC	Ters faz (Reversed Phase) Yüksek Performanslı sıvı kromatografisi
SA	Serum Albümin
SBR	Stiren-bütadien blok kopolimeri.
SBS	Stiren-bütadien-stiren terpolimeri
SEC	Moleküler eleme kromatografisi
SnCl ₄	Kalay klorür
TFA	Trifluoro asetik asit
TIC	Toplam İyon Kromatogramı
TiCl ₄	Titanyum klorür
UV	Ultra Violet
VIS	Viskozimetri
VP/AA	Vinil Prolidon-Poliakrilik Asit kopolimeri

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1 Bazı polielektrolitler, (a) poli(vinilpiridinyum), (b) sodyum polistiren sülfonat, (c) poli(dialildimetilamonyum klorür).....	3
Şekil 2.2 Poli(akrilik asit)in sulu çözeltideki dissosiasyonu.....	4
Şekil 2.3 İki sentetik polielektrolitin kimyasal yapısı. (a) poli(sodyum stiren sülfonat) (PSS) ve (b) ise poli(akrilik asit)tir (PAA). Her ikisi de negatif yüklü polielektrolitlerdir. PSS kuvvetli bir polielektrolitken PAA zayıf bir polielektrolittir.....	4
Şekil 2.4 (a) İntegral tipe örnek olarak lineer poli(etilen imin) ve (b) asılı tipe örnek olarak poli(vinilamin).....	5
Şekil 2.5 Çözeltiye tuz ilavesi sonucu polielektrolit zincirinin yumak konformasyonunu alması.	6
Şekil 2.6 Yüksüz polimerlerde ve polielektrolitlerde viskozite-derişim ilişkisi.....	6
Şekil 2.7 Poliamfolitlerin pH cevabına bağlı olarak örnek yapıları.....	8
Şekil 2.8 Maleik asit anhidrid ile N-metildiallilaminin kopolimerlerinin intrinsik viskozitesinin pH'la değişimi (Dautzenberg vd., 1994).....	9
Şekil 2.9 Proteinlerin poliamit yapısı.	10
Şekil 2.10 Proteinlerin ortam pH'ına göre yük durumları.	10
Şekil 2.11 BSA'nın pH'a bağlı yük değişimi.	11
Şekil 2.12 Çift bağın heterolitik kırılması.	12
Şekil 2.13 Poli(akrilonitril) ve poli(vinil klorür)'ün radikalik aktif merkezlerinin rezonans kararlılığı.	12
Şekil 2.14 Poli(akrilonitril)'de siyano gruplarının rezonans kararlılığına etkisi.	13
Şekil 2.15 Vinil eterlerin polimerizasyonunda elektron itici grupların katyonik aktif ucu rezonansla kararlı hale getirmesi (R, elektron itici grup).....	13
Şekil 2.16 C-O bağındaki yük dağılımı.	15
Şekil 2.17 Formaldehitteki C=O bağının yük dağılımı. Kısmi yükler negatiften pozitive doğru sırasıyla kırmızı, sarı, yeşil, turkuaz ve mavi şeklinde gösterilmiştir.	15
Şekil 2.18 Metakrilamit, etil metakrilat ve vinil asetat'ın yapıları.	16
Şekil 2.19 Poli(metil siyanoakrilat)'ın yapısı.	16
Şekil 2.20 Anyonik polimerizasyon mekanizması.	18
Şekil 2.21 Lityum-karbon bağının heterolitik parçalanması.....	18
Şekil 2.22 Anyonik polimerizasyonda başlatıcıdan oluşan anyonun monomere bağlanması.	18
Şekil 2.23 Doğrudan monomere elektron aktarımı ile olan başlatmada metalik sodyumun monomere elektron aktarması.	19
Şekil 2.24 İki radikal-anyonun birleşerek dianyon oluşturmaları.	19
Şekil 2.25 Doğrudan monomere elektron aktarımı ile olan polimerizasyonda büyüme basamağı.....	19
Şekil 2.26 Anyonik polimerizasyonda büyüme basamağı.....	19
Şekil 2.27 Çeşitli yan grupların anyonik polimerizasyonun hızına olan etkisi.	20
Şekil 2.28 Suyun anyonik polimerizasyonu sonlandırması.	20
Şekil 2.29 Naftalin ve sodyumdan negatif yüklü aktif merkezin oluşumu.....	21
Şekil 2.30 Naftalin radikal-anyonunun monomere elektron aktarımı.	21
Şekil 2.31 İki radikal-anyonun birleşerek anyonik aktif merkezler oluşturmaları.	21
Şekil 2.32 Stiren-bütadien (SBR) blok kopolimeri.....	22
Şekil 2.33 Stiren-bütadien-stiren terpolimeri (SBS) oluşumu.	22
Şekil 2.34 Karbonillerin anyonik polimerizasyonunda başlama adımı.	23
Şekil 2.35 Karbonillerin anyonik polimerizasyonunda büyüme adımı	23
Şekil 2.36 Katyonik polimerizasyonla polimerleşen monomerlere örnek.....	25
Şekil 2.37 Bazı kuvvetli asitlerin iyonlaşma reaksiyonları.....	25

Şekil 2.38 Protonun monomere aktarılarak ilk katyonik aktif merkezin oluşması.....	26
Şekil 2.39 H ₂ SO ₄ 'in protonunu monomere aktarması.	26
Şekil 2.40 Protonik asitlerin yüksek nükleofilik özellikteki anyonlarının katyonik polimerizasyonu durdurması.	26
Şekil 2.41 Bazı kokatalizörlerin Lewis asitleri ile reaksiyonları.	27
Şekil 2.42 Katalizör/kokatalizör oranının polimerizasyon hızına etkisi.	27
Şekil 2.43 BF ₃ ve suyun oluşturduğu katalizör/kokatalizör kompleksinin vinil monomeri ile başlama tepkimesi.	27
Şekil 2.44 İyot molekülünün oluşturduğu katalizör/kokatalizör kompleksi.	28
Şekil 2.45 Vinil monomeri için büyüme adımı.	28
Şekil 2.46 Katyonik polimerizasyona monomerdeki –R gruplarının etkisi.	29
Şekil 2.47 Karşıt iyon türünün katyonik polimerizasyonun hızına etkisi.	29
Şekil 2.48 Katyonik polimerizasyonda zincir transfer tepkimesi.	30
Şekil 2.49 Katyonik polimerizasyonda monomere hidrür aktarımı.	30
Şekil 2.50 Katyonik polimerizasyonda karşıt iyon transfer tepkimesi.	30
Şekil 2.51 Nükleofilik bir karşıt iyonun katyonik aktif merkezle birleşerek polimerizasyonu durdurması.	31
Şekil 2.52 Aktif merkezlerin XA türü safsızlıklarla sonlanma reaksiyonu.	31
Şekil 2.53 Formaldehitin BF ₃ /su katalizör/kokatalizör sistemi kullanılarak katyonik polimerizasyonu.	32
Şekil 2.54 Heterosiklik ve vinil monomerlerin katyonik aktif merkezleri.	32
Şekil 2.55 Vinil monomerlerinin protonlanması.	33
Şekil 2.56 Halkalı eterlerde protonlanmayla oksonyum iyonlarının oluşumu.	33
Şekil 2.57 Halkalı eterlerin protonlanması ve büyüme reaksiyonu.	33
Şekil 2.58 Protonik asitlerle başlamada denge reaksiyonu.	34
Şekil 2.59 Nükleofilik anyonun katyonik halka açılması polimerizasyonunu sonlandırması.	34
Şekil 2.60 Katyonik halka açılması polimerizasyonunda aktif merkezlerin ortamdaki nükleofillerle olan reaksiyonları.	35
Şekil 2.61 Katyonik halka açılması polimerizasyonunda büyüme reaksiyonu.	35
Şekil 2.62 Katyonik halka açılması polimerizasyonunda zincir transferi.	35
Şekil 2.63 Katyonik halka açılması polimerizasyonunda zincir transferinden sonra aktif merkezin oluşması.	36
Şekil 2.64 Katyonik aktif merkezin karşıt iyonla verdiği reaksiyon.	36
Şekil 2.65 Tersinir reaksiyonla karşıt iyonun polimer zincirinden ayrılması.	36
Şekil 2.66 Azot içeren nükleofilik monomerin Br ⁻ iyonu ile yarışması.	37
Şekil 2.67 Zayıf nükleofil olan halkalı eterler monomerinin karşıt iyonla yarışması.	37
Şekil 2.68 Triflat iyonunun oksijen içeren halkalı monomer ile yer değiştirme reaksiyonu.	37
Şekil 2.69 Katyonik halka açılması polimerizasyonunun büyüme adımı.	38
Şekil 2.70 Polimerlerde molekül ağırlığı dağılımı.	40
Şekil 2.71 Polimerlerde ideal olmayan molekül ağırlığı dağılımı.	41
Şekil 2.72 a'nın polimer şekline göre değerleri.	42
Şekil 2.73 Hidrodinamik yarıçap R _H küre için, R _S 'e (Stokes yarıçapına) eşittir.	43
Şekil 2.74 Tanecik-çubuk modelinde, kütle merkezi r _G ve gyration yarıçapı R _g	44
Şekil 2.75 Konidin (1-azabisiklo[4.2.0]oktan) monomerinin yapısı.	44
Şekil 2.76 Poli(1-azabisiklo[4.2.0] oktan)'ın oluşum mekanizması.	45
Şekil 3.1 Tekli mod mikrodalga cihazı (Discovery, CEM).	47
Şekil 3.2 Çoklu mod mikrodalga cihazı (MicroSYNTH, Milestone).	48
Şekil 3.3 Elektromanyetik Spektrum.	49
Şekil 3.4 Mikrodalga'nın bileşenleri.	49
Şekil 3.5 Geleneksel ısıtma & Mikrodalga ile ısıtmanın karşılaştırması.	50
Şekil 4.1 A Theodor Curtius'un çalışması, B Emil Fischer in çalışması.	52

Şekil 4.2 Boc ve Fmoc N α koruma grupları.....	54
Şekil 4.3 Amino asitlerin genel formül gösterimi.....	54
Şekil 4.4 Amino asitlerin toplu halde şematik gösterimi.....	56
Şekil 4.5 Peptid bağının oluşumu.....	57
Şekil 4.6 Peptid bağının ve bağ uzunluklarının Glisilglisin di peptidinde gösterimi.....	57
Şekil 4.7 Bir peptid dizisinde N- ve C- uçlarının gösterimi.....	58
Şekil 4.10 Sentez sırasında reçine üzerinde peptid zincirinin durumu.....	60
Şekil 4.11 Peptid sentezi döngüsü.....	60
Şekil 4.13 Fmoc grubunun piperidinle eliminasyon mekanizması.....	62
Şekil 4.14 Peptid sentezinde kullanılan aktivatörler.....	63
Şekil 4.15 Peptid sentezinin aktivasyon ve bağlanma aşamalarının mekanizması.....	64
Şekil 4.16 Peptid sentezinde yan zincir koruma gruplarının TFA ile eliminasyonunun mekanizması.....	65
Şekil 4.17 Peptid sentezinde geçici ve kalıcı koruma gruplarının eliminasyonu (Kimmerlin ve Seebach, 2005).....	66
Şekil 4.18 a) Mikrodalga fırın ve özel yapım katı-faz reaksiyon kabı (Yu vd., 1992).....	67
b) Otomatik mikrodalga (tekli mod) destekli peptid sentezleyici (Libery, CEM).....	67
Şekil 6.1 BAK’de ayırma mekanizması (Lough ve Wainer, 1992).....	73
Şekil 6.2 BAK’de dedektörlerden elde edilen veriler.....	74
Şekil 6.3 Negatif yüklü partikülün zeta potansiyeli (Zetasizer Nano Series User Manual).....	76
Şekil 6.4 İyonlaştırma tekniklerinin kullanılmaya uygun olduğu moleküllerin polarite ve molekül ağırlığı aralıkları.....	77
Şekil 6.5 ESI’nin çalışma sistemi.....	78
Şekil 6.6 ESI de damlalardan iyon oluşumu.....	79
Şekil 6.7 Polipeptidlerin ters faz kolon içerisinde mobil fazdan dolgu materyaline adsorplanması ve sonra tekrar mobil faza geçmesi.....	81
Şekil 6.8 Kolonlarda kullanılan adsorbent partiküllerinin özellikleri.....	83
Şekil 6.9 İnsan büyüme hormonunun enzimatik parçalanmayla oluşan fragmentlerinin kromatogramları.....	84
Şekil 6.10 (a) Beş standart peptidden oluşan karışımın farklı TFA konsantrasyonlarındaki kromatogramları, (b) Beş standart peptidden oluşan karışımın farklı iyon çifti konsantrasyonlarındaki kromatogramları.....	85
Şekil 6.11 Standart peptidlerden oluşan bir karışımın farklı pH’lardaki kromatogramları.....	85
Şekil 6.12 İnsan büyüme hormonunun enzimatik parçalanma ürünlerinin farklı sıcaklıklardaki kromatogramları.....	86
Şekil 6.13 LC-MS cihazında kromatogram oluşumu.....	86
Şekil 6.14 Amino asit analiz sisteminin bileşenleri (Shimadzu).....	87
Şekil 6.15 Amino asitlerin OPA ile türevlendirilmesi.....	87
Şekil 6.16 Amino asit analiz sisteminin akım şeması (Shimadzu).....	88
Şekil 6.17 Floresans özellik gösteren aminoasitler.....	90
Şekil 7.1 2-(2-hidroksietil)piperidin’in kimyasal yapısı.....	94
Şekil 7.2 2-(2-hidroksietil) piperidin’in FT-IR spektrumu.....	95
Şekil 7.3 2-(2-hidroksietil) piperidin’in UV spektrumu (306 nm A _{maks} =0.321).....	95
Şekil 7.4 2-(2-kloroetil)piperidin hidroklorür’ün kimyasal yapısı.....	96
Şekil 7.5 2-(2-kloroetil)piperidin hidroklorür sentezinde birinci aşama.....	96
Şekil 7.6 2-(2-kloroetil)piperidin hidroklorür sentezinde ikinci aşama.....	96
Şekil 7.7 2-(2-hidroksietil)piperidinden 2-(2-kloroetil) piperidin hidroklorür tuzunun sentezi.....	97
Şekil 7.8 2-(2-kloroetil) piperidin hidroklorür tuzu FT-IR spektrumu.....	97
Şekil 7.9 1-azabisiklo[4.2.0]oktan monomerine ait FT-IR spektrumu.....	98
Şekil 7.10 2-(2-kloroetil)piperidin hidroklorür tuzu (kırmızı) ve 1-azabisiklo[4.2.0]oktan monomerine (mavi) ait UV spektrumları.....	99

Şekil 7.11 1-azabisiklo[4.2.0]oktan monomerine ait ^1H NMR spektrumu.....	99
Şekil 7.12 Kloroform ortamında $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/1000 olan polikonidine ait FT-IR spektrumu (başlatıcı CH_3I).....	101
Şekil 7.13 $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}=1/1000$ olan farklı başlatıcılar kullanılarak sentezlenen polikonidine ait UV spektrumları (a=metil iyodür, b=benzoil klorür, c=trimetilsilan bromür, d=t-bütil bromür ile başlatılmıştır.).....	102
Şekil 7.14 $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/2000 Metanolde (yeşil), 1/2000 Metanol-1,4-dioksan karışımında (kırmızı), 1/2000 kloroformda (mavi), 1/2000 kloroformda 7 günde (siyah) sentezlenen polimerlere ait Zeta-Sizer grafikleri.	103
Şekil 7.15 Farklı $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranlarında sentezlenen polimerlere ait Zeta-Sizer grafikleri	104
Şekil 7.16 $\overline{M}_w=9900$ (kırmızı), $\overline{M}_w=4300$ (siyah), $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/2000 Metanol-1,4-dioksan karışımında bromo asetik asit ile reaksiyona sokulmuş, $\overline{M}_w=23067$ (mavi), $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/2000 Metanol-1,4-dioksan karışımında bromo asetik asit ile reaksiyona sokulmuş, $\overline{M}_w=23662$ (yeşil) sentezlenen polimerlere ait Zeta-Sizer grafikleri.	105
Şekil 7.17 Metanol-1,4-dioksan karışımında $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/2000 (6 mol monomer/1 L çözelti, başlatıcı CH_3I) (kırmızı), Metanol-1,4-dioksan karışımında $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/2000 (3 mol monomer/1 L çözelti, başlatıcı CH_3I) (siyah), Metanol-1,4-dioksan karışımında $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/3000 (mavi), Metanol-1,4-dioksan karışımında $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/3000 mikrodalga ile sentezlenen (yeşil) polikonidinlere ait Zeta-Sizer grafikleri.	106
Şekil 7.18 $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}=1/1000$ olan farklı başlatıcılar kullanılarak sentezlenen polikonidine ait refraktif indeks ve UV kromatogramları. metil iyodür (siyah), benzoil klorür (yeşil), trimetilsilan bromür (kırmızı), t-bütil bromür (mavi)..	107
Şekil 7.19 $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}=1/1000$ olan farklı başlatıcılar kullanılarak sentezlenen polikonidine ait ışık saçılması ve viskozite kromatogramları. metil iyodür (siyah), benzoil klorür (yeşil), trimetilsilan bromür (kırmızı), t-bütil bromür (mavi).	108
Şekil 7.20 Kloroform ortamında $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/1000 (kırmızı), Metanol-1,4-dioksan karışımında $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/2000 (koyu yeşil), Metanol-1,4-dioksan karışımında $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/3000 (açık yeşil), Metanol-1,4-dioksan karışımında $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/3000 ve mikrodalga enerjisi ile sentezlenmiş (mavi), Metanol-1,4-dioksan karışımında $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/3000 ve mikrodalga enerjisi ile ikinci çöktürme sonunda sentezlenen (siyah) polimerlere ait refraktif indeks ve UV kromatogramları.	110
Şekil 7.21 Kloroform ortamında $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/1000 (kırmızı), Metanol-1,4-dioksan karışımında $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/2000 (koyu yeşil), Metanol-1,4-dioksan karışımında $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/3000 (açık yeşil), Metanol-1,4-dioksan karışımında $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/3000 ve mikrodalga enerjisi ile sentezlenmiş (mavi), Metanol-1,4-dioksan karışımında $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/3000 ve mikrodalga enerjisi ile ikinci çöktürme sonunda sentezlenen (siyah) polimerlere ait ışık saçılması ve viskozite kromatogramları.....	111
Şekil 7.22 Kloroform ortamında $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/500 (siyah), Kloroform ortamında $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/2000 (koyu yeşil), Kloroform ortamında $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/2000 (kırmızı), Metanol-1,4-dioksan karışımında $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/2000 (mavi), Metanol-1,4-dioksan karışımında $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/2000 ve mikrodalga enerjisi ile sentezlenmiş (açık yeşil) polimerlere ait refraktif indeks ve UV kromatogramları.	113
Şekil 7.23 Kloroform ortamında $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/500 (siyah), Kloroform ortamında $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/2000 (koyu yeşil), Kloroform ortamında $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$	

oranı 1/2000 (kırmızı), Metanol-1,4-dioksan karışımında $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/2000 (mavi), Metanol-1,4-dioksan karışımında $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/2000 ve mikrodalga enerjisi ile sentezlenmiş (açık yeşil) polimerlere ait ışık saçılması ve viskozite kromatogramları.....	114
Şekil 7.24 Metanol-1,4-dioksan karışımında $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/2000 ve mikrodalga enerjisi ile sentezlenmiş (siyah), kloroformda $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/2000 olan ve mikrodalga enerjisi ile sentezlenmiş (koyu yeşil), kloroformda $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/2000 (kırmızı), kloroformda $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/2000 (mavi), Metanol-1,4-dioksan karışımında $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/2000 ve ikinci çöktürme sonunda sentezlenen (açık yeşil) polimerlere ait refraktif indeks ve UV kromatogramları.....	116
Şekil 7.25 Metanol-1,4-dioksan karışımında $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/2000 ve mikrodalga enerjisi ile sentezlenmiş (siyah), kloroformda $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/2000 olan ve mikrodalga enerjisi ile sentezlenmiş (koyu yeşil), kloroformda $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/2000 (kırmızı), kloroformda $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/2000 (mavi), Metanol-1,4-dioksan karışımında $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/2000 ve ikinci çöktürme sonunda sentezlenen (açık yeşil) polimerlere ait ışık saçılması ve viskozite kromatogramları.....	117
Şekil 7.27 Polikonidinin BrAcOH ile modifikasyonunun şematik gösterimi.	119
Şekil 7.28 polikonidine –COOH grubunun eklenmesi.	120
Şekil 7.29 Ham VP1 135-161a peptid dizisi için TIC.	122
Şekil 7.30 VP1 135-161a'nın 18.321 – 19.446 dk'ları arası kütle spektrumu.	122
Şekil 7.31 Saf VP1 135-161a peptid dizisi için TIC.....	122
Şekil 7.32 Saf VP1 135-161a'nın 8.596 - 9.017 dk'ları arası kütle spektrumu.	123
Şekil 7.33 Saf VP1 135-161a peptid dizisi için UV kromatogramı.....	123
Şekil 7.34 VP1 135-161a peptid dizisi için FT-IR sonucu.	124
Şekil 7.35 Ham VP1 135-161b peptid dizisi için TIC.	124
Şekil 7.36 Ham VP1 135-161b peptid dizisinin UV kromatogramı.....	125
Şekil 7.37 Ham VP1 135-161b peptid dizisinin 13.254 – 14.188 dk'ları arası kütle spektrumu.	125
Şekil 7.38 Ham VP1 135-161b peptid dizisinin 14.229 – 15.121 dk'ları arası kütle spektrumu.	125
Şekil 7.39 Ham VP1 200–213 peptid dizisine ait TIC.	126
Şekil 7.40 Ham VP1 200–213 peptid dizisinin 16.5 – 17.6 dk'ları arası kütle spektrumu.	126
Şekil 7.41 Saflaştırılmış VP1 200–213 peptid dizisine ait TIC.....	127
Şekil 7.42 Saflaştırılmış VP1 200-213'ün 17.0 – 18.0 dk'ları arası kütle spektrumu.	128
Şekil 7.43 VP1 40–60 peptid dizisi için TIC.....	128
Şekil 7.44 VP1 40-60 peptid dizisi için UV kromatogramı.....	129
Şekil 7.45 VP1 40–60 peptid dizisinin 13.417 – 15.400 dk'ları arası kütle kromatogramı.	129
Şekil 7.46 VP1 40-60 peptid dizisinin 14.600 - 15.096 dk'ları arası kütle kromatogramı.	129
Şekil 7.47 VP1 40–60 peptid dizisi için FT-IR sonucu.	131
Şekil 7.48 Ham NP 55–69 peptid dizisine ait TIC.	131
Şekil 7.49 Ham NP 55–69 peptid dizisinin UV kromatogramı.....	132
Şekil 7.50 Ham NP 55–69 peptid dizisinin 9.642 – 17.125 dk'ları arası kütle spektrumu.	132
Şekil 7.51 Ham NP 55–69 peptid dizisinin 14.517 – 15.338 dk'ları arası kütle spektrumu.	132
Şekil 7.52 Saflaştırılmış NP 55–69 peptid dizisine ait TIC.....	133
Şekil 7.53 Saflaştırılmış NP 55–69 peptid dizisinin UV kromatogramı.....	134
Şekil 7.54 Saflaştırılmış NP 55–69 peptid dizisinin 16.813 – 17.800 dk'ları arası kütle spektrumu.	134
Şekil 7.55 NP 55–69 peptid dizisi için FT-IR sonucu.	134
Şekil 7.56 Ham HA 91–108 peptid dizisine ait TIC.....	135
Şekil 7.57 Ham HA 91–108 peptid dizisine ait UV kromatogramı.....	135
Şekil 7.58 Ham HA 91–108 peptid dizisinin 15.700 – 24.725 dk'ları arası kütle spektrumu.	136

Şekil 7.59 Ham HA 91–108 peptid dizisinin 19.525 – 20.233 dk'ları arası Kütle spektrumu.	136
Şekil 7.60 Saflaştırılmış HA 91–108 peptid dizisine ait TIC.	137
Şekil 7.61 Saflaştırılmış HA 91–108 peptid dizisinin UV kromatogramı.	137
Şekil 7.62 Saflaştırılmış HA 91–108 peptid dizisinin 9.217 – 10.063 dk'ları arası kütle spektrumu.	138
Şekil 7.63 HA 91–108 peptid dizisi için FT-IR sonucu.	138
Şekil 7.64 Melanoma 155–163 dizisine ait TIC.	139
Şekil 7.65 Melanoma 155–163 peptid dizisine ait UV kromatogramı.	139
Şekil 7.66 Melanoma 155–163 peptid dizisinin 21.080 – 21.660 dk'ları arası kütle spektrumu.	140
Şekil 7.67 Melanoma 155–163 peptid dizisi için FT-IR sonucu.	140
Şekil 7.68 VP1 135–161a dizisinin RP-HPLC saflaştırmasına ait UV kromatogramı.	141
Şekil 7.69 VP1 200–213 dizisinin RP-HPLC saflaştırmasına ait UV kromatogramı.	141
Şekil 7.70 Peptid dizileri için FT-IR sonuçlarının toplu gösterimi.	142
Şekil 7.71 Amino asit analizinde standardın kromatogramı.	143
Şekil 7.72 VP1 200-213 peptidinin amino asit bileşimini gösteren floresans kromatogramı.	144
Şekil 7.73 İki farklı yöntemle sentezlenen biyokonjugatların UV kromatogramı.	146
Şekil 7.74 0.01 M PBS pH 7'de hazırlanmış örneklerin BAK analiz sonuçları.	148
Şekil 7.75 0.01 M PBS pH 7'de hazırlanmış örneklerin BAK analiz sonuçları.	149
Şekil 7.76 0.01 M PBS pH 7'de hazırlanmış konjugatların floresans sonuçları.	149
Şekil 7.77 0.01 M PBS pH 7'de hazırlanmış konjugatların Zeta-Sizer aletinde alınan boyut ve zeta potansiyel ölçüm sonuçları.	150
Şekil 7.78 $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}} = 2$ oranına sahip VP/AA(25/75)-Peptid biyokonjugatının sıcaklık değişimine bağlı floresans şiddeti (Mansuroğlu, 2007).	151
Şekil 7.79 $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}} = 2$ oranına sahip VP/AA(50/50)-Peptid biyokonjugatının sıcaklık değişimine bağlı floresans şiddeti (Mansuroğlu, 2007).	151
Şekil 7.80 0.01 M PBS pH 7'de hazırlanmış konjugatların BAK sonuçları.	152
Şekil 7.81 Çeşitli biyokonjugatların floresans şiddet değişim grafiği.	154
Şekil 8.1 Kloroform ortamında $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/500 (siyah), Kloroform ortamında $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/2000 (koyu yeşil), Kloroform ortamında $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/2000 (kırmızı), Metanol-1,4-dioksan karışımında $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/2000 (mavi), Metanol-1,4-dioksan karışımında $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/2000 ve mikrodalga enerjisi ile sentezlenmiş (açık yeşil) polimerlere ait refraktif indeks ve UV kromatogramları.	157
Şekil 8.2 Kloroform ortamında $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/500 (siyah), Kloroform ortamında $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/2000 (koyu yeşil), Kloroform ortamında $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/2000 (kırmızı), Metanol-1,4-dioksan karışımında $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/2000 (mavi), Metanol-1,4-dioksan karışımında $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/2000 ve mikrodalga enerjisi ile sentezlenmiş (açık yeşil) polimerlere ait ışık saçılması ve viskozite kromatogramları.	158
Şekil 8.3 Kloroform ortamında $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/1000 olan polikonidine ait FT-IR spektrumu (başlatıcı CH_3I).	159
Şekil 8.5 VP1 200-213'ün tam dizisine ait değerler.	162
Şekil 8.6 VP1 200-213'ün bir R eksik dizisine ait değerler.	162
Şekil 8.7 VP1 200-213'ün iki R eksik dizisine ait değerler.	163
Şekil 8.8 A) Ham NP 55–69 peptid dizisine ait TIC. B) Ham NP 55–69 peptid dizisinin 16.9–19.3 dk'ları arasının kütle spektrumu.	163
Şekil 8.9 VP1 200–213 peptidinin amino asit bileşimini gösteren floresans kromatogramı.	164
Şekil 8.10 Peptid polimer konjugatının yeni yöntemle sentezinin mekanizması.	167
Şekil 8.11 Mikrodalga ile biyokonjugasyon reaksiyonlarında kullanılan polimerler.	168
Şekil 8.12 LPS ve LPS'nin polimerlerle konjugatlarına ait İndirekt ELISA Sonuçları	169
Şekil 8.13 0.01 M PBS pH 7'de hazırlanmış örneklere ait Zeta Sizer aletinde alınan boyut ve	

zeta potansiyel ölçüm sonuçları	170
Şekil 8.14 Mikrodalga destekli olarak sentezlenen iki farklı konjugatın fluoresans kıyaslaması.	171
Şekil 8.15 Mikrodalga ile klasik yöntemin BAK kıyaslaması.....	172
Şekil 8.16 İki farklı yöntemle sentezlenen konjugatların, fiziki karışımın ve peptidin fluoresans analizi.....	173
Şekil 8.17 Polimer zincirine bağlı tek tip peptidle sentezlenen konjugatın.....	174
Şekil 8.18 Polimer zincirine bağlı farklı özellikteki peptidlerle sentezlenen	174

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge 2.1 Bazı monomerlerin polimerizasyon yöntemleri.	14
Çizelge 2.2 Anyonik polimerizasyon başlatıcıları.	17
Çizelge 2.3 İyonik polimerizasyonda kullanılan bazı çözücülerin dielektrik sabitleri ve k_p değerleri.	24
Çizelge 2.4 Anyonik polimerizasyonda kullanılan çözücünün yapı üzerine etkisi.	24
Çizelge 2.5 Mark-Houwink denkleminde a sabitinin teorik değerleri (Pasch ve Trathnigg, 1999).	42
Çizelge 3.1 Farklı Çözücülerin Absorbsiyon Dereceleri.	51
Çizelge 4.1 Amino asitlerin sistematik isimleri ve kısaltmaları.	55
Çizelge 4.2 Sentezi yapılan peptid dizileri ve teorik mol kütleleri.	70
Çizelge 7.1 Dört dedektörlü büyüklükçe ayırma kromatografisi ile belirlenen sabitler (Şekil 7.18 ve Şekil 7.19'daki örnekler için).	109
Çizelge 7.2 Dört dedektörlü büyüklükçe ayırma kromatografisi ile belirlenen sabitler (Şekil 7.20 ve Şekil 7.21'deki örnekler için).	112
Çizelge 7.3 Dört dedektörlü büyüklükçe ayırma kromatografisi ile belirlenen sabitler (Şekil 7.22 ve Şekil 7.23'deki örnekler için)	115
Çizelge 7.4 Dört dedektörlü büyüklükçe ayırma kromatografisi ile belirlenen sabitler (Şekil 7.24 ve Şekil 7.25'deki örnekler için).	118
Çizelge 7.5 FT-IR analizi yapılan Peptid dizileri.	142
Çizelge 7.6 Standardın kromatogramına ait sonuçlar.	144
Çizelge 7.7 VP1 200–213 peptidinin kromatogramına ait veriler.	144
Çizelge 8.1 Dört dedektörlü büyüklükçe ayırma kromatografisi ile belirlenen sabitler (Şekil 8.1 ve Şekil 8.2'deki örnekler için)	159
Çizelge 8.2 Sentezi yapılan peptid dizileri ve amino asit sayıları.	160
Çizelge 8.3 VP1 200–213 peptidinin kromatogramına ait veriler.	165
Çizelge 8.4 VP1 200–213 peptidinin kromatogramının yorumlanması.	165

ÖNSÖZ

Çalışmamın şekillenmesinde büyük emeği bulunan, benden yardımlarını esirgemeyen, değerli tez hocam Yrd. Doç. Dr. Zeynep AKDESTE'ye ve doktora çalışmama başladığım andan vefatına kadar tez danışmanlığımı yapan,engin bilgisi ve tez çalışmalarım süresince yaptığı değerlendirmeler ile çalışmamın her yönü ile ilerlemesinde yardımcı olan, bizlerin her yönde önünü açan ve bu gelişmiş teknoloji ile çalışmama olanak sağlayan, 14 Haziran 2007'de aramızdan ayrılan, Biyomühendislik Bölümü Kurucu Başkanı merhum Prof. Dr. Mehmet Mustafaev AKDESTE (1944–2007)'ye içten teşekkür ederim.

Tez çalışmama 25-DPT–07–04–01 nolu Biyomedikal Malzemeler projesi ile destek veren T.C. Başbakanlık Devlet Planlama Teşkilatı'na ve proje yürütücüsü Prof. Dr. Sabriye PİŞKİN'e sağladıkları destek için teşekkür ederim.

Ayrıca sağladığı destek dolayısıyla YTÜ Biyomühendislik Bölüm başkanı Prof. Dr. Huriye KUZU'ya teşekkür ederim.

Tez için gerekli olan analizleri gerçekleştirmemde yardımlarını esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Araş. Gör. Eray DALGAKIRAN'a (Boyut ve Zeta potansiyel ölçümleri), Araş. Gör. Namık AKKILIÇ'a ve Araş. Gör. Kadriye KIZILBEY'e (HPLC analizleri) ve Araş. Gör. Yunus SARIÇAY'a (BAK analizleri), Araş. Gör. Yasemin Budama BATTAL'a (Fluoresans ölçümleri) teşekkür ederim. Ayrıca sentezlenen konjugatların immünoloji çalışmalarından ve analizlerinin yapılmasından dolayı Araş. Gör. Dr. Banu MANSUR'a ve Araş. Gör. Serap DERMAN'a, hücre çalışmalarındaki katkılarından dolayı Prof. Dr. Adil ALLAHVERDİYEV ve grubuna teşekkür ederim.

Tez çalışmamın her aşamasında desteklerini, yardımlarını ve arkadaşlıklarını esirgemeyen MSc. Erdem KARABULUT'a (özellikle polimer ve peptid sentezlerinde) ve Araş. Gör. Murat TOPUZOĞULLARI'na (özellikle LC-MS ve RP-HPLC analizlerinde) ayrıca teşekkür ederim.

Bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Prof. Dr. Nükhet ÖCAL'a, Yrd. Doç. Dr. Çiğdem YOLAÇAN'a, Araş. Gör. Gökçe GÖKSU'ya ve Tübingen Üniversitesinden Prof. Dr. Dieter KAUFMANN'a, teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca bana her türlü desteği sağladıkları için sevgili Anne ve Babam'a, destekleri ve özverilerinden dolayı eşime ve çocuklarım Asude Betül ve Yiğit Yahya'ya teşekkür ederim.

Son olarak bana ve bu teze emeği geçmiş herkese teşekkür ederim.

ÖZET

Sentetik peptidlerin suda çözünebilen polielektrolitlerle konjugasyonu sonucunda oluşan biyokonjugatlar biyolojik açıdan önem taşımakta ve sentetik aşılarda geliştirilmesi gibi biyomedikal uygulamalar için büyük potansiyel vaat etmektedirler. Son yıllarda fonksiyonel biyopolimer sistemlerin geliştirilmesine yönelik çok sayıda çalışma yapılmaktadır. Bugüne kadar yapılmış çalışmalarda biyolojik özellikli polielektrolitlerin sentezi, karakterizasyonu ve kullanım çeşitliliği üzerinde daha çok durulmuştur.

Bu çalışmada sentetik peptidlerle polielektrolitlerin mikrodalga destekli biyokonjugasyonu amaçlanmıştır. Çalışmada kullanılan viral peptidlerin tamamı tez kapsamında araştırma laboratuvarında mikrodalga destekli katı fazda peptid sentezi yöntemi (SPPS) ile sentezlenmiş ve LC-ESI-MS ile karakterize edilmiştir. Sentezlenen peptidlerden birinin aminoasit analizi yine bu çalışma kapsamında gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan polielektrolitlerden polikonidinin, bu tez kapsamında önce monomeri sentezlenmiş sonrasında çeşitli başlatıcılar ile homopolimerizasyonu gerçekleştirilmiştir. Polikonidin biyobozunur yapısı ile biyokonjugat sentezi için ideal bir polimerdir. Çalışmada kullanılan bir diğer polielektrolit olan vinil pirolidon / akrilik asit kopolimeri (VP/AA)'de biyobozunur yapıda bir polimerdir.

Peptid polielektrolit biyokonjugatlarının mikrodalga desteği ile organik ortamda HBTU/HOBt aktivatörleri varlığında sentezlenmesi, biyokonjugat sentezi alanına getirilmiş bir yeniliktir. Bu yeni yöntem, karbodiimid varlığında su ortamında yapılan klasik biyokonjugasyon sentezi yöntemine göre peptidlerin bağlanması yönünden daha etkilidir. Bu yeni yöntemle reaksiyon kısa sürede tamamlanmakta ve biyokonjugat çöktürme ile ortamdan ayrılabilir. Her biri özel bir amaçla belirlenmiş olan farklı hastalıkların (Şap, Grip, Melanoma) antijenik özellikli viral kapsid peptidlerin polielektrolitlerle biyokonjugasyonu sayesinde sentetik aşı prototipi geliştirmek mümkün olacaktır. Bu tez kapsamında sentezlenen biyokonjugatların bir kısmının immünolojik analizleri çalışma grubumuz tarafından yapılmış bir kısmı ise yapılmaktadır. İmmünolojik analiz sonuçları umut vaat edicidir.

Anahtar kelimeler: biyokonjugasyon, katı fazda peptid sentezi, LC-ESI-MS, mikrodalga, polielektrolit, polikonidin.

ABSTRACT

Bioconjugates which are synthesized by reaction of synthetic peptides and polyelectrolytes are biologically important. Their application on biological fields has great potential. There are lots of research related to functional biopolymer systems in last years. These researchs are about synthesis, characterization and application properties of biologically important polyelectrolytes.

This work is aimed to microwave assisted bioconjugate synthesis of synthetic peptides and polyelectrolytes. Viral peptides, which are used in this work, are synthesised with microwave assisted solid phase peptide synthesis (SPPS) method in research laboratory. These peptides are characterized with LC-ESI-MS system. Also amino acid analysis of one peptide sequence is done. Polyconidine is one of the polyelectrolytes used in this work. Firstly monomer of polyconidine is synthesised, after homopolymer of conidine is synthesised with different initiator types. Polyconidine is biodegradable polymer and it is an ideal polymer for preparation of bioconjugates. Vinyl pyrrolidone/acrylic acid copolymer (VP/AA) is another polymer which is used in this work. VP/AA has biodegradable properties, too.

Bioconjugate synthesis of peptide and polyelectrolytes with microwave assisted by HBTU/HOBt activators in organic media is a novel application. This new method is more effective than classical method which in water media with carbodiimid activation. The new methods advantages are, time consuming and precipitation properties. Peptides which synthesised in this work selected from viral capsid part of three different diseases (FMDV, Influenza, Melanoma). Synthesis of synthetic vaccine can be possible conjugation of polyelectrolytes and with peptides which choosed for a specified reason. Immunological research with synthesized bioconjugates is processed by our research group. Results of immunological analysis is hopefulness.

Key words: bioconjugation, LC-ESI-MS, microwave, polyelectrolyte, polyconidine, solid phase peptide synthesis

1. GİRİŞ

Doğal ve sentetik makro moleküllerin biyokonjugatları tıp, ilaç ve mühendislikte ilaç taşınması, enzim immobilizasyonu ve hücre biyoreaktörleri gibi özel uygulama alanlarına sahiptir (Scranton vd., 1995; Mustafaev vd., 1998).

Bu çalışmada, sentezi yapılan biyokonjugatlar, taşıyıcı olarak kullanılan bir polimer ile buna farklı yollarla bağlanan sentetik peptidlerin oluşturduğu yapılardır. Biyokonjugatların hazırlanmasında, taşıyıcı olarak sıklıkla polielektrolitler kullanılmaktadır. Bu tez çalışmasında bir yenilik olarak biyokonjugatların sentezinde mikrodalga enerjisi kullanılmıştır.

Polielektrolitler yapılarında pozitif veya negatif yüklü gruplar bulunduran makro moleküllerdir. Polielektrolitlerin proteinlerle reaksiyonlarının incelenmesi Morawetz, Rice ve Katchalski'nin çalışmalarıyla başlamıştır (Morawetz ve Hughes 1952; Rice vd., 1954; Katchalski vd., 1954; Morawetz, 1965). Son zamanlarda sentetik polielektrolitlerin fizyolojik aktivitesi ve bunların ilaç preparatları için taşıyıcı olarak kullanılması, bu tür polimerlerin sentez yöntemlerinin ve fizikokimyasal özelliklerinin incelenmesini gerekli kılmaktadır (Mustafaev, 1996b; Radeva, 2001). Sentetik polielektrolitler, proteinleri kovalent bağlarla modifiye etmekte, antijenik proteinlerin bağışıklık sisteminde immünojenliğinin artırılmasında (ya da azaltılmasında) (Petrov vd., 1992) ve vücuttan atılma sürelerinin uzatılması için sıkça kullanılmaktadır. Bununla birlikte, viral antijenlerin polielektrolitlerle konjugatları güçlü koruyucu özellikler göstermektedir (Petrov vd., 1992) ve yeni nesil sentetik aşı bileşikler olarak düşünülmektedir.

Polimerler içerisinde, yapısında (+) ve (-) yük bulunduran makro moleküller gerek suda çözünmeleri gerekse biyomakromoleküllerle etkileşimleri açısından özel bir yer teşkil etmektedirler. Canlı organizmada var olan biyomakromoleküllerin (proteinler, nükleik asitler, polisakkaritler vb.) veya organellerin (hücre membran yüzeyi, doku yüzeyleri vb.) (-) yüklerinden dolayı biyomakromoleküllerin, (-) yüklü polielektrolitlerle etkileşiminin incelenmesi çok etkin olarak yapılmaktadır.

Yapısında heteroatom bulunduran organik bileşiklerin polimerizasyonu ile ilgili önceki yıllarda önemli çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalar, yapısında heteroatom bulunduran polimerlerin bazılarının biyobozunur özellikte olduğunu göstermiştir.

Polikonidin yapısında azot atomu bulunduran biyobozunur özellikte bir polielektrolittir. Polikonidin dışında literatürde poli(1-azabisiklo[3.1.0]heksan), poli(1-azabisiklo[2.2.2]oktan), poli(1,4-diazabisiklo[2.2.2]oktan) gibi bazı polimerlerle de çalışılmıştır. Bu yeni poliaminlerin sentezi fizyolojik aktifliklerinden dolayı önem taşımaktadır.

Bu tez çalışmasında 2-(2-hidroksietil)piperidin'den çıkılarak konidin monomeri sentezlenmiş

ve bu monomer kullanılarak farklı molekül ağırlıklarına sahip poli(konidin) sentezi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen polimerler bromo asetik asit (BrAcOH) ile polimer iskeletine karboksilli asit fonksiyonel grubu kazandırılarak, tez çalışması kapsamında sentezlenen sentetik viral peptidlerle biyokonjugatları sentezlenmiştir. Polikonidin iskeletine karboksilik asit fonksiyonel grubu kazandırılması ile polimer, poliakrilik aside benzemekte fakat biyobozunur olması ile poliakrilik asitten farklı olmaktadır. BrAcOH ile modifiye edilen Polikonidinin, poliakrilik aside kimyasal yapısı yönünden benzemesinden dolayı poliakrilik asit model sistem olarak alınmıştır. Biyokonjugat sentezinde polielektrolit olarak biyobozunur özellikli VP/AA kopolimeri de kullanılmıştır. VP/AA bu tez kapsamı dışında çalışma grubumuz tarafından literatürdeki yöntemle (Uelzmann, 1958) sentezlenmiştir.

Biyokonjugatın oluşturulmasında kullanılan peptidlerin tamamı, Türkiye’de ilk defa katı faz yöntemi kullanılarak mikrodalga destekli katı fazda peptid sentez cihazı (Liberty, CEM) ile tez kapsamında laboratuvarında sentezlenmiş, karakterize edilmiş ve saflaştırılmıştır. Sentezin laboratuvarımızda yapılması sayesinde istenilen peptid dizilerine floresans özellikli Triptofan (Trp, W) amino asidi eklenerek, oluşturulan biyokonjugatın yapısı ve biyokonjugasyon reaksiyonunun spektrofotometrik incelenmesi imkanı doğmuştur.

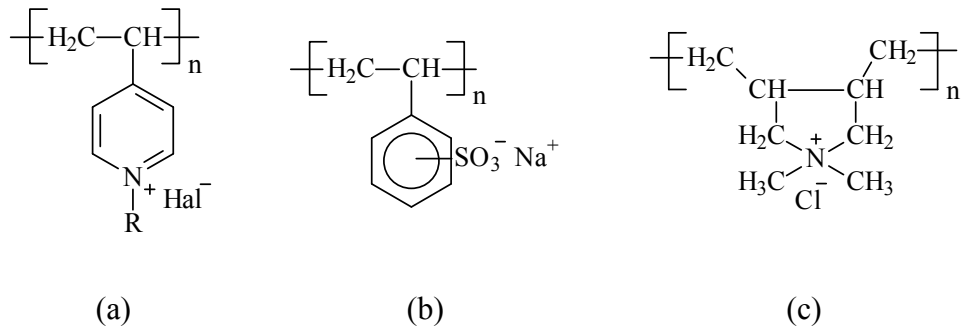
Biyokonjugat sentezi yapılırken, karbodiimid varlığında su ortamında gerçekleştirilen klasik biyokonjugat sentez yöntemi kullanılmamış. Bunun yerine yeni bir yaklaşım olarak mikrodalga destekli organik ortamda HBTU/HOBt aktivatörleri varlığında biyokonjugatlar sentezlenmiştir. Yeni yöntemde peptid polimer bağlanması klasik yöntemle göre daha kısa sürede, daha etkili yapılabilmektedir.

Hazırlanan biyokonjugatlar sentetik aşı prototipi geliştirilmesi amacı ile kullanılmaktadır ve bu biyokonjugatların canlı organizmayı koruma özelliği gösterebilmesi vb. özelliklerden dolayı bu çalışma sonuçlarının uluslararası düzeyde tüm Türkiye sağlık sektörüne ve ekonomisine büyük katkısı olacaktır. Bu çalışma ile nitelik olarak ülkemizin hedeflediği ileri teknolojiye uyum sağlayacak polimer ve protein teknolojisi birlikteliğinde, ileri biyoteknolojik malzemelerin üretimi yapılacaktır. Bu nedenlerden dolayı sunulan tez çalışması, temel bilimler uygulamalı araştırma alanlarını içine alan disiplinler arası nitelikte geniş kapsamlı bir çalışmadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Polielektrolitler

Polielektrolit terimi kovalent olarak bağlı anyonik veya katyonik grupları ve bu gruplara bağlı “counter” iyonları olan polimer sistemleri için kullanılmaktadır (Şekil 2.1) (Dautzenberg vd., 1994). Tüm monomerlerinde aynı işaretli yüklere sahip polielektrolitlere homopolielektrolit adı verilmektedir. Hem anyonik hem de katyonik grupların kovalent olarak bağlı bulunduğu makro moleküller ise poliamfolitler olarak isimlendirilmektedirler. Doğada bol miktarda protein yapılı poliamfolit bulunmakla birlikte sentetik yollarla da poliamfolitler elde edilebilir. Poliamfolitlerin izoelektrik noktalarında molekül üzerindeki net yük toplamı sıfıra eşittir.

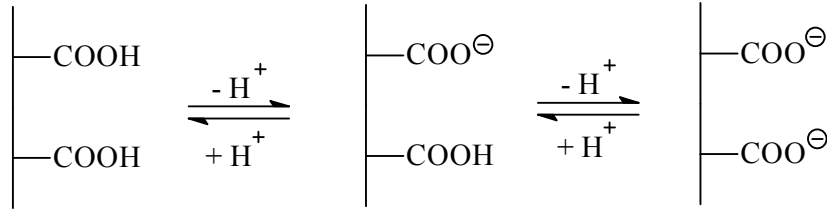


Şekil 2.1 Bazı polielektrolitler, (a) poli(vinilpiridinyum), (b) sodyum polistiren sülfonat, (c) poli(diallildimetilamonyum klorür).

Prensipte, herhangi bir kimyasal yapının polimer zincirine uygun sayıda iyonik grup kovalent olarak bağlanmasıyla yapıyı uygun bir pH’da suda çözünür hale getirilerek bir polielektrolit elde edilebilir. Polielektrolitler genelde bir katılma veya kondenzasyon polimerleşmesi reaksiyonu ile elde edilebilir. Ayrıca polielektrolit yapıdaki pektin gibi anyonik polisakkaritler ve çok sayıda proteinler doğadan edinilebilir. Nişasta ve selüloz gibi iyonik olmayan doğal polimerler kimyasal modifikasyonla polielektrolite dönüştürülebilir. Polifosfatlar ve polisilikatlar da inorganik polielektrolitler olarak sayılabilir (Dautzenberg vd., 1994).

2.1.1 Homopolielektrolitler

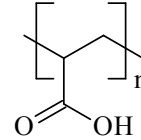
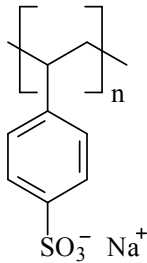
Polielektrolitler, her bir tekrarlayan birimi (monomeri) bir elektrolit grup taşıyan polimerlerdir. Bu elektrolit gruplar sulu çözeltilerde dissosiyasyon olup polimeri yüklü hale getirirler (Şekil 2.2). Polielektrolitlerin özellikleri hem elektrolitlere (tuzlar) hem de polimerlere benzemektedir ve bazen poli tuzlar olarak adlandırılmaktadırlar. Çözeltileri, tuzlar gibi, elektriği iletir ve polimerler gibi, viskozdur. Polipeptidler, proteinler, DNA gibi çoğu biyolojik molekül polielektrolit formundadır.



Şekil 2.2 Poli(akrilik asit)in sulu çözeltideki dissosiasyonu.

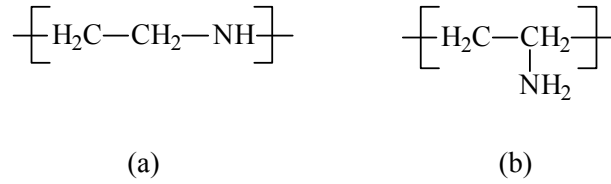
Polielektrolitin çözeltideki davranışlarından sorumlu iyonik grupların çeşidi yukarıda anlatılan polielektrolit zinciri yapılarının çeşidinden çok daha azdır. Polielektrolitlerin içindeki davranışlarını etkileyen başlıca dört faktörden söz edilebilir:

1. Polimere bağlı yüklü gruplar anyonik ve katyonik olarak sınıflandırılır. Bu gruplar da güçlü ve zayıf asitler ve bazlar olarak ikiye ayrılabilir. Kuvvetli bir polielektrolit çözeltide tüm iyonlarına ayrışabilir. Bunun aksine, zayıf bir polielektrolit tüm iyonlarına ayrışamaz. Bu sebeple, zayıf polielektrolitler çözelti içinde tamamen yüklü değildirler ve pH değiştirilerek üzerlerindeki yük dağılımı ayarlanabilir.



Şekil 2.3 İki sentetik polielektrolitin kimyasal yapısı. (a) poli(sodyum stiren sülfonat) (PSS) ve (b) ise poli(akrilik asit)tir (PAA). Her ikisi de negatif yüklü polielektrolitlerdir. PSS kuvvetli bir polielektrolitken PAA zayıf bir polielektrolittir.

2. Bununla birlikte, iyonik grubun asit ve baz kuvvetlerinin yanında polimer zinciri boyunca uzanan bitişik anyonik ve katyonik yükler arasındaki ortalama uzaklık polielektrolit davranışının tayininde önemli bir parametredir. Bu yük yoğunluğu, iyonik kısımlar arasındaki ortalama uzaklık olarak tanımlanabilir. Bu ortalama yük yoğunluğunun yanında zincir boyunca uzanan iyonik grupların dağılımı da polielektrolit özelliklerini (çözünübilirlik, vb) önemli ölçüde etkileyebilmektedir. Bir kural olarak, eğer bir kopolimerde her on monomerik birimin, birden fazla iyonik kısmı varsa tipik polielektrolit davranışı beklenir.
3. Asit-baz kuvveti ve yük yoğunluğuna ek olarak, polielektrolit özelliklerinin saptanmasında, makro iyonun molekül geometrisinde yüklü kısımların yerleşimi üçüncü önemli noktadır. Şekil 2.4'e göre, iyonik gruplar ya polimerin ana zincirinin bir birimi olarak (integral tip) ya da bir spacer ile ana zincire asılı olarak (yan zincirlerde) bulunur. Yüklü grupların geometrik yeri özellikle polianyon-polikasyon kompleksi oluşumu ile ilgilidir.

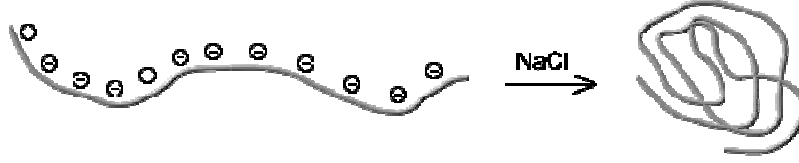


Şekil 2.4 (a) İntegral tipe örnek olarak lineer poli(etilen imin) ve (b) asılı tipe örnek olarak poli(vinilamin).

4. Düşük molekül ağırlıklı “counter” (karşıt, eşlenik) iyonların türünün çözeltideki tüm sistemin özellikleri üzerinde (önemli ölçüde çözünürlük ve yapı oluşumunda) güçlü bir etkisi vardır. Bu iyonların önemini anlamak için şu örneği verebiliriz: poli(diallildimetilamonyum) polikasyonunun klorürlü hali suda kolayca çözünürken, iyodürlü hali daha zor çözünür (Dautzenberg vd., 1994).

Herhangi bir polimerin konformasyonu özellikle polimerin yapısı ve çözeltiyle ilişkisi gibi çeşitli etkenlere bağlıdır. Çözelti içindeki yüksüz bir lineer polimer zinciri rastgele yumak konformasyonu gösterirken, lineer polielektrolit üzerindeki yükler birbirlerini iterler (Coulomb itmesi) ve eksi yüklerin birbirlerini itmesini azaltıcı en uygun konformasyon olan uzanmış halde bulunmaya eğilim gösterir (Şekil 2.5). Bu düzenleme, polielektrolit çözeltilerinin viskozitesinin yükselmesine yol açar. Polielektrolit çözeltilerinin özellikleri sulu ortamın iyonik şiddetine bağlıdır. İyonik şiddetin artmasıyla viskozitenin değişmesi makro iyondaki elektrik yükleri arasındaki itme kuvvetinin engellenmesinden dolayı gerçekleşir ve

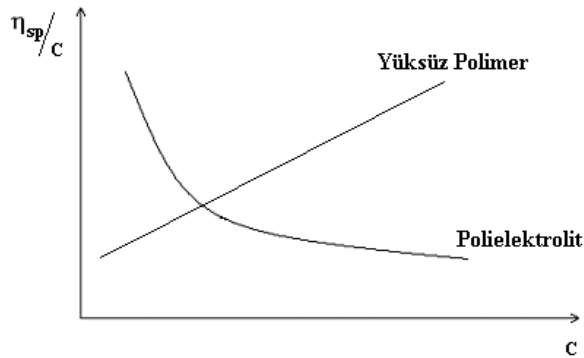
iyonik şiddet daha fazla arttığında yüksüz makro moleküllere benzer davranış göstermeye başlar.



Şekil 2.5 Çözeltiye tuz ilavesi sonucu polielektrolit zincirinin yumak konformasyonunu alması.

İyonik şiddetin yanında, ortamın pH'ı da zayıf polielektrolitlerin özelliklerini etkiler. Çünkü iyonik grupların dissosiyasyon derecesi ve polielektrolitin yük yoğunluğu değişir. Polielektrolit çözeltilerinin diğer bir özelliği ise yüksek iyonik iletkenlikleridir. Elektrik alanı altında, küçük molekül ağırlıklı iyonlardan daha yavaş olmakla birlikte makro iyonlar göç etmektedirler (Dautzenberg vd., 1994).

Polimerlerde derişim arttıkça viskozite artarken polielektrolitlerde derişim azalırken viskozite artar (Şekil 2.6). Bunun nedeni azalan derişimle artı ve eksi yüklerin birbirlerini itmeleri ve polielektrolitin şişmesidir.



Şekil 2.6 Yüksüz polimerlerde ve polielektrolitlerde viskozite-derişim ilişkisi.

1970'li yılların başlarında immünolog ve kimyacıların ortak çalışmaları ile bazı polielektrolitlerin bağışıklık yanıtına kuvvetli etkisi aydınlatılmış ve yapay polielektrolitlerin bu gibi amaçlar için daha uygun olduğu belirlenmiştir (Mustafaev, 2004). Çünkü bu polielektrolitlerin sentezi ve modifikasyonu daha kolaydır, istenen molekül ağırlığında, elektrik yükünde, konformasyonda veya yüksek moleküler yapıda elde etmek olasıdır. Suda iyi çözünürler ve bilinen yapılarda çeşitli kompleksleri sentezlemek mümkündür.

Polielektrolitlerde molekül ağırlığı polimerleşme derecesi ile orantılıdır. Polimerleşme derecesinin artması istenilen kompleksin oluşumunu destekleyici yönde etki eder ve polimerin bağlanma miktarında artış gözlenir. Bunun yanı sıra polielektrolit çözeltilerinin elektrokimyasal özellikleri genellikle poliiyonun zincir boyuna bağlıdır; yani polikompleksin çökmesi vb. özellikler polimerin polimerleşme derecesine bağlıdır (Mustafaev, 1996a).

2.1.2 Poliamfolitler

Polimer iskeletindeki ya da yan zincirde bulunan iyonik gruplar, polinükleotidler ve proteinler gibi makromoleküllerin sınıflandırılmasında oldukça önem taşımaktadır. Polimerler iyon içeriğine göre polielektrolitler ve poliamfolitler olarak iki gruba ayrılabilirler. Polielektrolitler katyonik veya anyonik grupları içerirken, poliamfolitler katyonik ve anyonik grupların her ikisini birden yapılarında bulundurur.

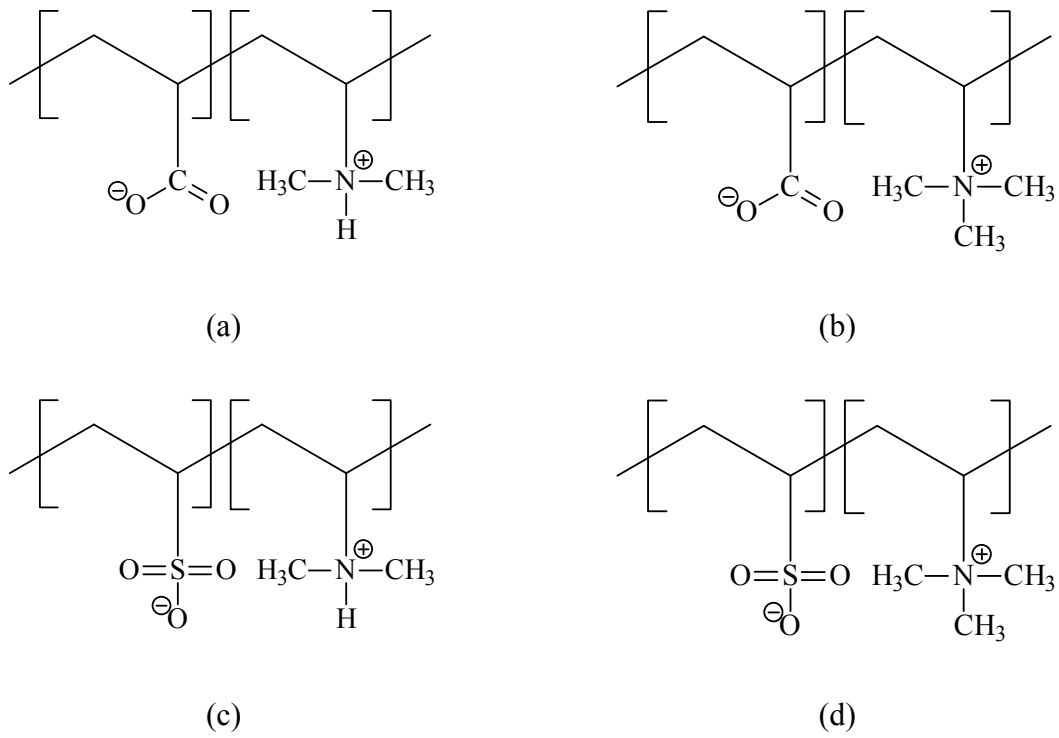
Polielektrolitlerin karakteristik bir özelliği düşük konsantrasyonlarda, deiyonize suda geniş bir hidrodinamik hacme ulaşabilmeleridir. Bu etkiye polimer zinciri boyunca yer alan yüklü gruplar arasındaki coulombik itme kuvveti neden olur ve zincirin çubuğa benzer bir konformasyonda bulunmasını sağlar. Elektrolit eklenmesiyle ya da pH değişimiyle, coulombik itme kuvvetleri engellenir. Bunun sonucunda zincirin hidrodinamik hacmi azalır ve entropik olarak daha uygun konformasyona geçer.

Polielektrolitlerin aksine, poliamfolitlerin yapı özellikleri anyonik ve katyonik monomer birimleri arasındaki coulombik çekme kuvvetleri tarafından yönlendirilmektedir. Anyonik veya katyonik gruplar yeteri kadar fazla olduğunda ($\geq 10-15$ mol %), yüklü grupların itme gücü, polielektrolitlerin tipik davranışlarında olduğu gibi zincir konformasyonunda gerilmelere neden olur. Anyonik ve katyonik grupların molar oranı birbirine yaklaştıkça coulombik etkileşimler globular (küresel) konformasyona neden olurlar ve birçok durumda deiyonize suda çözünmezler. Elektrolit eklenmesiyle ya da pH'nın değiştirilmesiyle düzensiz bir yumak konformasyonu gözlemlenebilir ve çözünme kolaylaştırılabilir. Bu davranış çoğunlukla “antipolielektrolit etkisi” olarak adlandırılmaktadır ve elektrolitlerin varlığında viskozitede bir artışa neden olmaktadır. Bu davranışı açıklamak üzere çeşitli teoriler ortaya atılmıştır (Merle, 1987; Higgs ve Joanny, 1991).

Yük dengesi etkilerine ek olarak, monomer birimlerine eklenmiş iyonik grupların doğası poliamfolitlerin davranışını etkilemektedir. En açık etki pH ayarlaması yapılarak iyonik grupların nötralize edilmesi ile gözlemlenebilir. Aslında, poliamfolitler pH cevabına bağlı

olarak dört sınıfa ayrılır.

Poliamfolitler nötrale edilmiş katyonik ve anyonik grupların her ikisini içerebilir (Şekil 2.7). Bu sistemler tipik olarak, anyonik bir tür olan karboksilat grubunu ve katyonik grup olarak da amin hidrohalojenürü içerirler (a). İkinci olarak, katyonik grup pH'a duyarsızken (kuaterner alkil grupları gibi), anyonik gruplar nötrale olabilir (b). Sülfonat gruplarında olduğu gibi anyonik grup pH'a duyarsızken katyonik gruplar nötrale olabilir (c). Son olarak, uygun pH'da baştanbaşa anyonik ve katyonik gruplar yüklü kalabilir (d). pH etkisinin yanında, yüklü grupların hidrate olması ve karşıt yüklü gruplar arasındaki gerilim gibi diğer önemli faktörler de göz önünde bulundurulmalıdır.

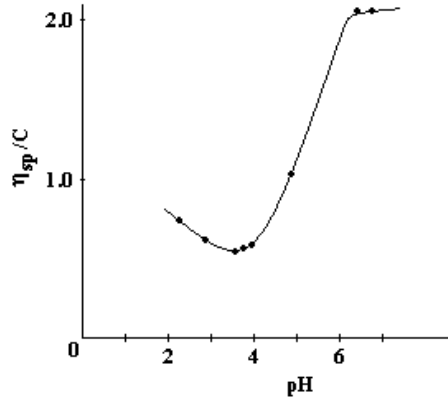


Şekil 2.7 Poliamfolitlerin pH cevabına bağlı olarak örnek yapıları.

Bu sistemlerin keşfinin ardındaki mantık, proteinler gibi biyolojik makromoleküllerin sulu çözeltideki davranışlarını derinlemesine anlaşılmasını sağlamaktır. Birçok sentetik sistem, elektroforetik mobilitesinin olmadığı ve minimum viskoziteyle saptanmış pH değerinde bir izoelektrik noktasına (pI) sahiptir (Higgs ve Joanny, 1991). Ayrıca izoelektrik noktanın altında veya üstündeki pH değerlerinde viskozitede artış gözlenmektedir.

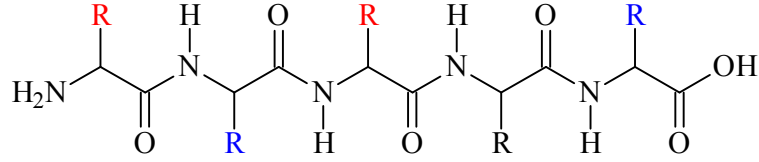
İzoelektrik noktada yüklü gruplar arasındaki güçlü çekim sayesinde polimer intramoleküler olarak bir araya toplanmaktadır ve oldukça kompakt bir yapı meydana gelmektedir. pH

izoelektrik noktanın altına veya üstüne çekildiğinde bazik veya asidik gruplar nötralleşir, benzer yüklü gruplar arasındaki coulombik itme gücü nedeniyle polimer zinciri gerilir ve viskozitede artış gözlemlenir. İzoelektrik noktada çözücünün niteliğinin, elektrolit eklenmesi sonucu arttığı gösterilmiştir. Çözünürlük ve pH cevabı, asidik ve bazik grupların kuvvetini etkileyen yakın komşu etkileşimler gibi mikro yapılara da bağlıdır.



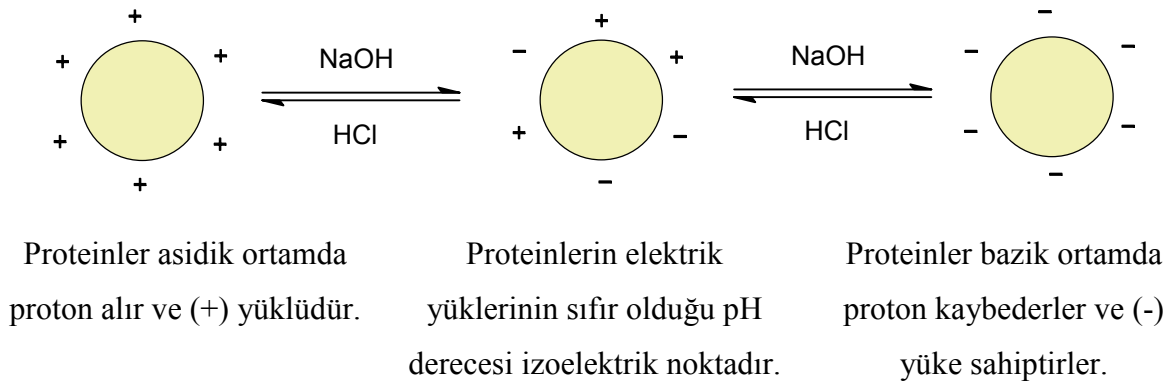
Şekil 2.8 Maleik asit anhidrid ile N-metildiallilaminin kopolimerlerinin intrinsik viskozitesinin pH’la değişimi (Dautzenberg vd., 1994).

Sülfonat grubuna bağlı olarak anyonik türdeki poliamfolitler incelenmiştir. Karboksilat gruplarından daha zayıf baz olan sülfonat grupları uygun pH aralığının üzerinde sulu çözeltide iyonize olurlar. Bu sistemlerle ilgili çalışmalar elektrolitlerin varlığında elektrostatik etkileşimler üzerine odaklanmıştır. Katyonik ve anyonik yük oranı birbirine yaklaşmaya başladığında kopolimer bazı nedenlerden dolayı deiyonize suda çözünmez hale gelir ve çözünür olabilmesi için kritik bir konsantrasyonda tuz ilavesi gerektirmektedir. Daha fazla tuz eklenmesi üzerine viskozitedeki artıştan anlaşılabileceği gibi bu sistemler “antipolielektrolit” davranış gösterirler. Bu tip poliamfolitler deiyonize suda intermoleküler (molekül içi) düzenlenmeye eğilim gösteren iyonik olmayan (nonionic) bir hidrofilik termonomeri de kapsamaktadır. Bu düzenlenmeler elektrolit ilavesi ile bozulabilir (McCormick ve Salazar, 1992). Doğal polimerlerden olan proteinler, yapıtaşları olan aminoasitlerin farklı fonksiyonel özellikteki yan grupları nedeniyle poliamfolit sınıfına girerler ve peptid bağından dolayı poliamit yapısındadırlar. Şekil 2.9’da **kırmızı R grubu asidik**, **mavi R grubu bazik** yan grupları temsil etmektedir.



Şekil 2.9 Proteinlerin poliamit yapısı.

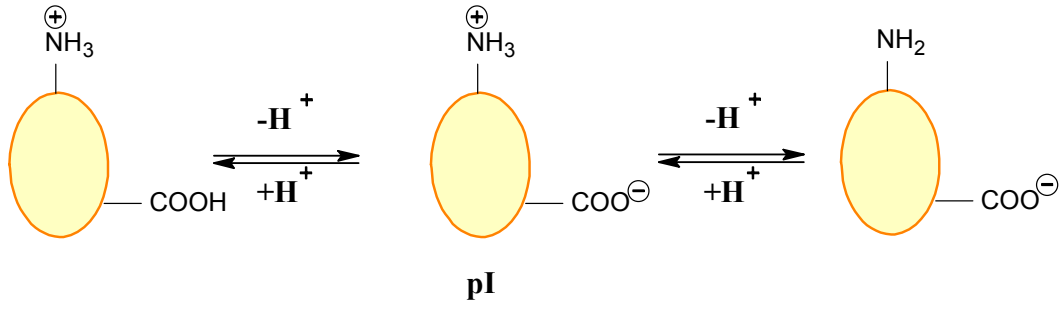
Proteinlerin yapısında **asidik** ve **bazik** amino asitler bulunmaktadır. Bu nedenle proteinler poliamfolit özellik göstermektedirler. Bu proteinler proton verebilir veya proton alabilirler. Asidik ortamlarda proteinler fazladan protona sahip olduklarından net pozitif bir yüke, bazik ortam koşullarında ise eksik protona sahip olduklarından net bir negatif yüke sahip olacaklardır. Amino asitlerin net elektrik yüklerinin sıfır olduğu pH derecesine izoelektrik nokta (pI) adı verilmektedir (Şekil 2.10).



Şekil 2.10 Proteinlerin ortam pH'ına göre yük durumları.

Eğer bir protein izoelektrik noktasının pH koşullarında bulunuyorsa en az çözünür haldedir ve en kolay çöktürülebilir durumdadır. İzoelektrik noktası (pI) nötral pH civarında bulunan pek çok proteinde asidik ve bazik amino asit sayısı birbirine eşit durumdadır.

Proteinler de amino asitler gibi titre edilebilirler. Çünkü proteinlerde titre edilebilecek pek çok yan grup bulunmaktadır. Fakat titrasyon eğrileri oldukça kompleks bir durum göstermektedir. Proteinlerin genel titrasyon eğrilerini üç pH bölgesine ayırarak incelemek mümkündür. Örneğin pH 1,5 – 6 arası karboksil grubunun iyonize olduğu sınırları belirtmektedir. pH 6 – 8,5 arası ise histidin (His, H) amino asidine ve α -amino grubuna atfedilmektedir. pH 8,5'dan yukarısı ise lizinin (Lys, K) ϵ -amino grubunun, tirozinin (Tyr, Y) fenolik hidroksil grubunun ve sisteinin (Cis, C) sülfhidril (-SH) grubunun iyonize olduğu pH sınırları olarak kabul edilmektedir (Gözükara, 1997).



Şekil 2.11 BSA'nın pH'a bağlı yük değişimi.

Bovine Serum Albumin (BSA) proteini de bir poliamfolittir ve şu özelliklere sahiptir:

Albümin genelde serum albümini veya plazma albümini anlamında kullanılır. Albümin kan dolaşımında en çok bulunan proteindir ve kanın kolloid osmotik basıncının % 80'ini oluşturmaktadır (Carter ve Ho, 1994). Serum albüminin kan pH'ını ayarlayan başlıca sorumlu olduğu düşünülmektedir. Memelilerde albümin preproalbumin olarak karaciğerde sentezlenir (Figge vd., 1991). Sinyal peptidlerinin uzaklaştırılmasından sonra oluşan proalbuminin N-terminal ucundaki altı peptid uzaklaştırılır. Kan dolaşımına verilen albüminin yarılanma ömrü 19 gündür.

2.2 İyonik Polimerizasyon

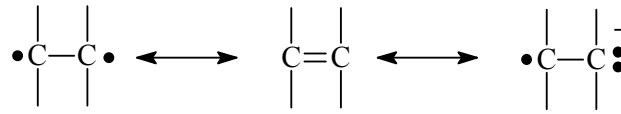
İyonik polimerizasyon, zincir büyümesinden artı ya da eksi yüklü aktif merkezlerin sorumlu olduğu katılma polimerizasyonu türüdür. Monomer molekülleri zincir uçlarındaki iyonik aktif merkezlere radikalik polimerizasyona benzer şekilde katılarak polimer molekülünü büyütürler. Aktif merkezin yükü eksi ise anyonik katılma polimerizasyonu; artı ise katyonik katılma polimerizasyonu tanımlamaları kullanılır (Saçak, 2004).

2.2.1 İyonik Polimerizasyona Uygun Monomerler

Serbest radikallerle başlatılan katılma polimerizasyonu monomer türü açısından fazla seçici değildir, çoğu vinil monomeri radikalik mekanizma üzerinden polimerleşebilir. İyonik polimerizasyon ise seçicidir. Radikalik yolla polimerleşmeye yatkın bir monomer, anyonik ya da katyonik mekanizma üzerinden polimerleşmeyebilir. Bazı monomerler için tersi de söz konusudur.

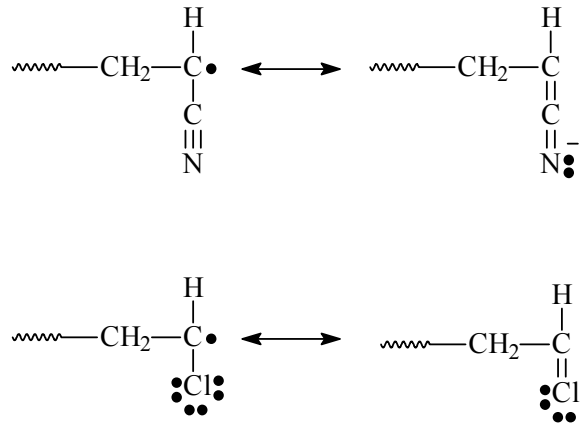
Katılma polimerizasyonuna uygun monomerlerde, karbon-karbon çift bağı (olefinlerde) veya karbon-oksijen çift bağı (aldehit ve ketonlarda) polimerizasyona olanak sağlayan noktalardır.

Karbon-karbon çift bağı, π bağının homolitik veya heterolitik kırılmasıyla düzenlenir.



Şekil 2.12 Çift bağı heterolitik kırılması.

Radikaller elektriksel açıdan nötral olduklarından π bağı ile tepkimeye girmede özel koşullar aramazlar. Poli(akrilonitril) ve poli(vinil klorür) örneklerinde olduğu gibi radikalik aktif merkezin rezonans kararlılığı monomerin yan grupları tarafından sağlanır.

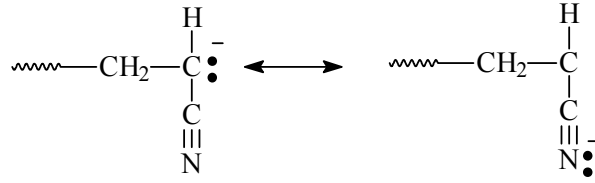


Şekil 2.13 Poli(akrilonitril) ve poli(vinil klorür)'ün radikalik aktif merkezlerinin rezonans kararlılığı.

Bir monomerin iyonik yöntemle polimerleşip polimerleşmeyeceği, monomer üzerindeki yan grubun (-R) kimyasal yapısına yakından bağlıdır. Yan grubun çift bağ elektron yoğunluğu üzerine etkisi ve oluşacak anyon ya da katyonu kararlı kılma yeteneği, polimerizasyonun tipini belirler.

Yan grup siyano ve karbonil (ester, keton, asit veya aldehit) gibi elektron çekici özellikte ise, karbon-karbon çift bağındaki elektron yoğunluğunu azaltarak anyonik başlatıcıların etkisini kolaylaştırır.

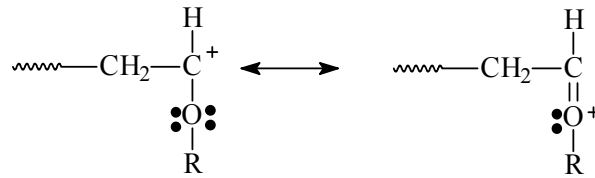
Poli(akrilonitril)'de olduğu gibi -CN türü elektron çekici gruplar, aynı zamanda büyümekte olan anyonik merkezlerin rezonansla kararlılığını da sağlar (Şekil 2.14).



Şekil 2.14 Poli(akrilonitril)’de siyano gruplarının rezonans kararlılığına etkisi.

Monomerde; alkoksi, alkil, alkenil, 1,1-dialkil, fenil türü elektron itici yan grup bulunduğunda, karbon-karbon çift bağındaki elektron yoğunluğu artar ve katyonik başlatıcıların etkisi kolaylaşır.

Elektron itici gruplar, vinil eterlerin polimerizasyonunda olduğu gibi, büyümekte olan katyonik aktif ucu rezonansla kararlı hale getirir (Şekil 2.15).



Şekil 2.15 Vinil eterlerin polimerizasyonunda elektron itici grupların katyonik aktif ucu rezonansla kararlı hale getirmesi (R, elektron itici grup).

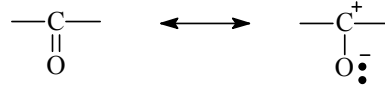
Akrilonitril’in her iki iyonik mekanizma üzerinden polimerleşebileceği görülmektedir. Benzer şekilde, indüktif etkileri açısından elektron itici olan stiren ve 1,3-bütadien monomerleri anyonik türlerin kararlılıklarını sağlayabildikleri için her iki iyonik yöntemle polimerleşebilirler.

Çizelge 2.1 bazı monomerlerin polimerizasyonunda kullanılabilecek başlatıcı türlerini (hangi yöntemle polimerleşebilecekleri) göstermektedir. Stiren, izopren, akrilonitril gibi monomerler birkaç polimerizasyon yöntemiyle polimerleşirken, izobüten yalnızca katyonik başlatıcılarla polimerleşir.

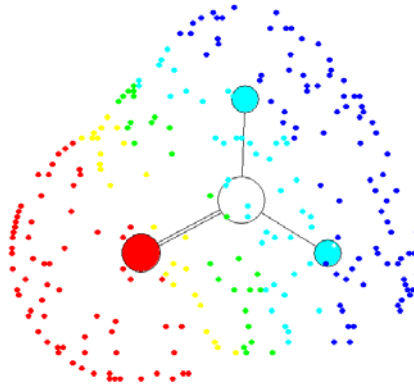
Çizelge 2.1 Bazı monomerlerin polimerizasyon yöntemleri.

Monomer	Serbest radikalik	Anyonik	Katyonik	Koordinasyon
Etilen	+	-	+	+
Propilen	-	-	-	+
Stiren	+	+	+	+
İzobüten	-	-	+	-
İzopren	+	+	-	+
Vinil klorür	+	-	-	+
Viniliden klorür	+	+	-	-
Vinil florür	+	-	-	-
Tetrafloretilen	+	-	-	+
Vinil eterler	-	-	+	+
Vinil esterler	+	-	-	-
Akrilonitril	+	+	-	+
Akrilik esterler	+	+	-	+
Metakrilik esterler	+	+	-	+
N-vinil karbazol	+	-	+	-
N-vinil pirolidon	+	-	+	-

Aldehit ve ketonlar karbon-oksijen çift bağının polarlığı nedeniyle radikalik başlatıcılar yerine iyonik başlatıcılarla polimerleşirler.



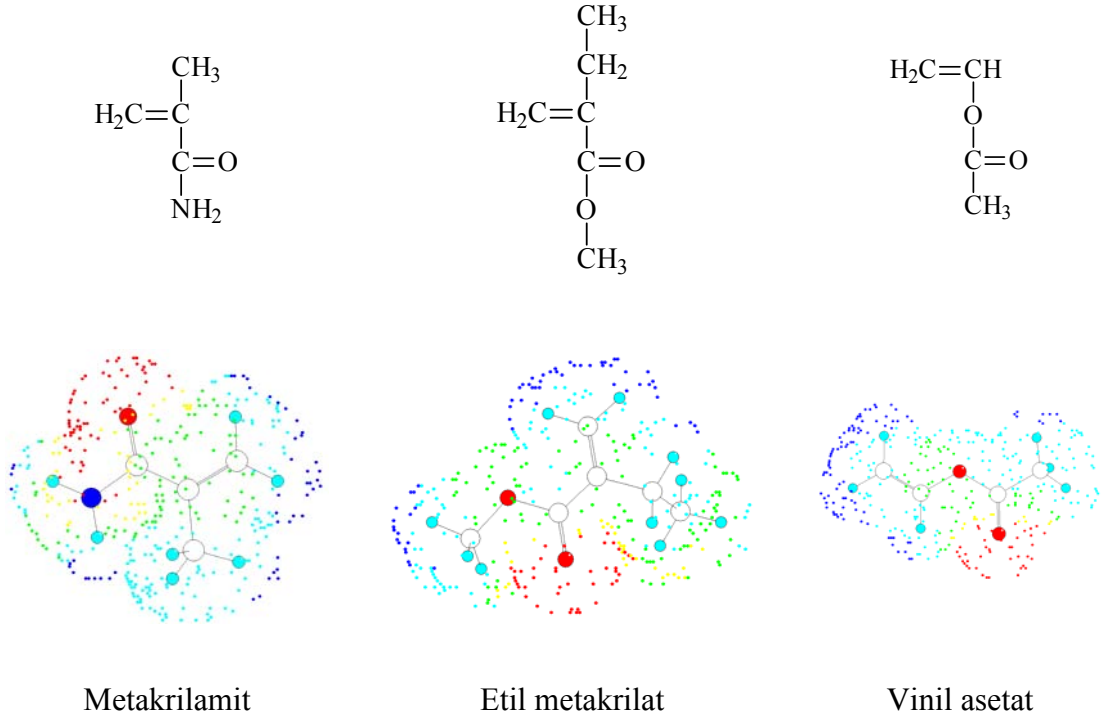
Şekil 2.16 C-O bağındaki yük dağılımı.



Şekil 2.17 Formaldehitteki C=O bağının yük dağılımı. Kısmi yükler negatiften pozitif doğru sırasıyla kırmızı, sarı, yeşil, turkuaz ve mavi şeklinde gösterilmiştir.

2.2.2 Anyonik Polimerizasyon

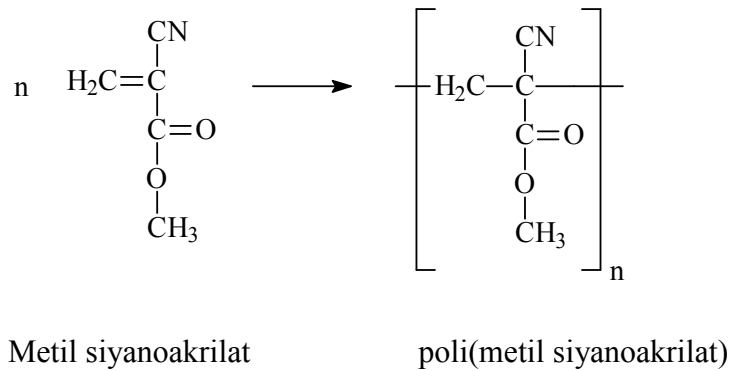
Anyonik polimerizasyonda büyüme sağlayan aktif uçlar anyonik karakterdedir ve polimerizasyon genelde karbanyonlar üzerinden ilerler. Akrilamit, metakrilamit, stiren, akrilonitril, metilmetakrilat, etil akrilat, viniliden klorür, vinil asetat gibi elektron çekici gruplar taşıyan monomerler anyonik yolla polimerleşirler.



Şekil 2.18 Metakrilamit, etil metakrilat ve vinil asetat'ın yapıları.

Japon yapıştırıcısı olarak bilinen yapıştırıcı, metil siyanoakrilat monomeridir. Metil siyanoakrilatta iki elektron çekici grup bulunur ve bu özelliği nedeniyle anyonik polimerizasyona oldukça yatkındır.

Atmosferde veya yapıştırılacak yüzeylerde bulunan eser miktardaki su molekülleri metil siyanoakrilatın polimerizasyonunu başlatır. Polimerizasyon, yapıştırılacak yüzeyler üzerinde gerçekleştiği için, her iki yüzey örgüsünü tam anlamıyla örten polimerik film oluşur ve bu film tabakası yapıştırılan parçaları sıkıca bir arada tutar.



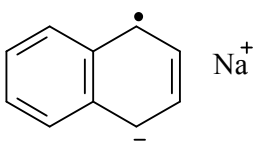
Şekil 2.19 Poli(metil siyanoakrilat)'ın yapısı.

2.2.3 Anyonik Polimerizasyon Mekanizması

Anyonik polimerizasyon diğer zincir tepkimelerine benzer şekilde başlama, büyüme, zincir transferi ve sonlanma adımları üzerinden ilerler. Ancak, safsızlıklardan arındırılmış anyonik polimerizasyon sistemlerinde sonlanma tepkimeleri önemsizdir ve sonlanma olmadığı varsayılır. Ayrıca, anyonik polimerizasyon genelde düşük sıcaklıklarda gerçekleştirildiği için, dallanma ve zincir transfer tepkimelerinin de anlamı yoktur.

Anyonik polimerizasyonu başlatmada değişik kimyasal maddelerden veya iyonlaştırıcı ışınlar gibi etkenlerden yararlanılır (Çizelge 2.2). Önemli anyonik polimerizasyon başlatıcılarından olan organik lityum bileşikleri, lityum metali ve bir organik halojenürün etkileşimiyle; Grignard bileşikleri, magnezyum ve organik halojenürler kullanılarak hazırlanır. Alüminyum alkil bileşikleri atmosferde kendiliğinden alevlenebilir, organik lityum ve Grignard bileşikleri katı halde izole edilirlse patlayıcıdır. Bu nedenle sözü edilen başlatıcılar, inert atmosfer altında ve uygun çözücü içerisinde kullanılmalıdır.

Çizelge 2.2 Anyonik polimerizasyon başlatıcıları.

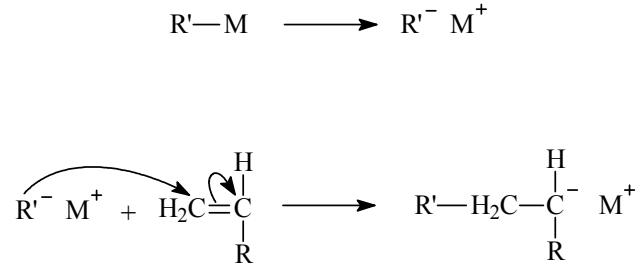
Başlatıcı	Örnek
Alkali metaller	Na, K
Metal alkil veya aril bileşikleri	n-C ₄ H ₉ Li, (C ₆ H ₅) ₃ CNa
Grignard bileşikleri	RMgX (R=alkil veya aril, X=halojen)
Alüminyum alkiler	AlR ₃
Organik radikal-anyonlar	
İyonlaştırıcı ışınlar	χ- ve γ- ışınları, hızlandırılmış elektronlar

Anyonik polimerizasyonun başlaması iki ayrı mekanizmayı izler. Bunlar;

- Başlatıcının eksi yüklü parçasının karbanyon verecek şekilde monomere katılması
- Başlatıcıdan monomere doğrudan elektron aktarımı

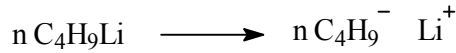
şeklindedir.

Başlatıcının eksi yüklü parçasının monomere katıldığı başlatmada, monomer ve başlatıcı Şekil 2.20’de verilen genel tepkimeye uygun olarak etkileşir ve başlatıcının eksi yüklü kısmı doğrudan monomere katılarak ilk anyonik aktif merkez oluşur.

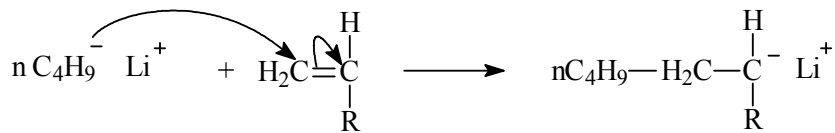


Şekil 2.20 Anyonik polimerizasyon mekanizması.

Tepkimede; R'-M, n-bütil lityum gibi bir anyonik başlatıcıyı, R ise fenil ya da siyano gibi elektron çekici bir grubu göstermektedir (Şekil 2.21). Çoğu anyonik başlatıcı iyon çifti halinde tepkimeye girer. Örneğin n-bütil lityum, lityum-karbon bağının heterolitik parçalanmasıyla, anyon ve katyon verir. Başlatıcıdan oluşan anyon (n-C₄H₉⁻) monomerin elektron çekici grubunun (-R) bağlı olduğu karbona değil diğerine bağlanır (Şekil 2.23).

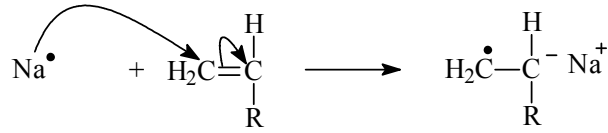


Şekil 2.21 Lityum-karbon bağının heterolitik parçalanması.



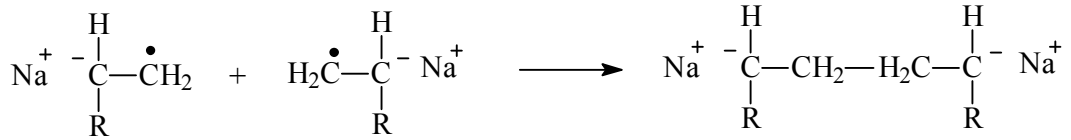
Şekil 2.22 Anyonik polimerizasyonda başlatıcıdan oluşan anyonun monomere bağlanması.

Doğrudan monomere elektron aktarımı ile olan başlatmada metalik sodyum gibi başlatıcılar monomere elektron vererek anyonik polimerizasyonu başlatırlar. Polimerizasyonun ilk aşamasında Şekil 2.23’teki gibi bir radikal anyon oluşur.



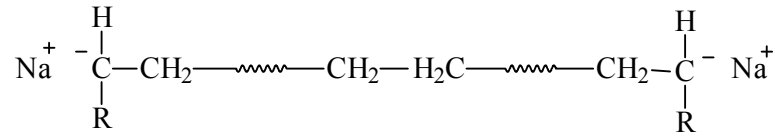
Şekil 2.23 Doğrudan monomere elektron aktarımı ile olan başlatmada metalik sodyumun monomere elektron aktarması.

İkinci adımda, iki radikal-anyon birleşerek, dimerleşir ve bir dianyon verir.



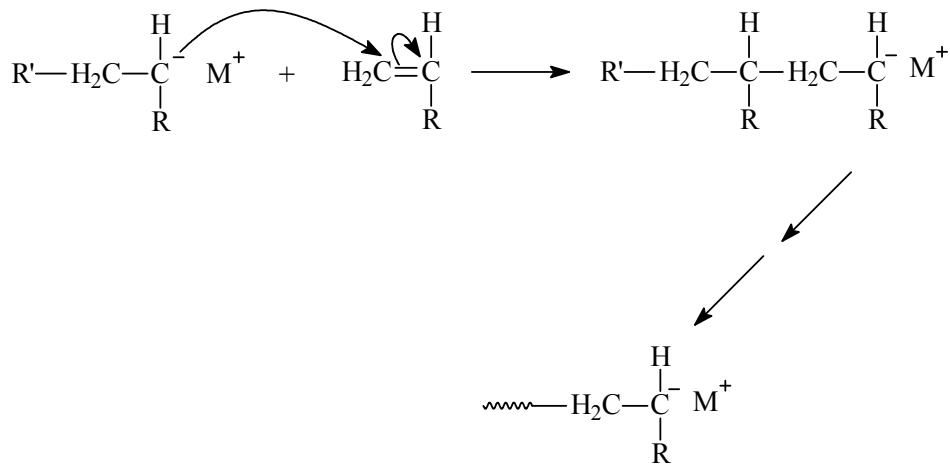
Şekil 2.24 İki radikal-anyonun birleşerek dianyon oluşturmaları.

Büyüme, dianyonun iki ucundan ilerleyerek Şekil 2.25'te yapısı verilen polimer zinciri elde edilir.



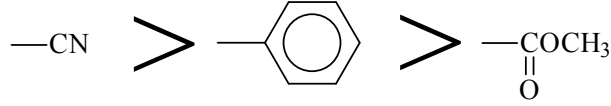
Şekil 2.25 Doğrudan monomere elektron aktarımı ile olan polimerizasyonda büyüme basamağı.

Büyüme adımında monomer molekülleri ard arda zincir ucundaki iyon çifti arasına yerleşir.



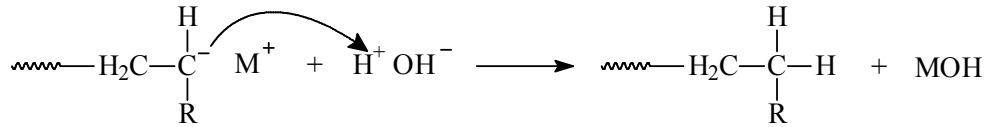
Şekil 2.26 Anyonik polimerizasyonda büyüme basamağı.

Büyüme hızı ve başlama hızı monomerdeki -R grubunun yapısına yakından bağlıdır. Şekil 2.27’de gösterildiği gibi karbanyon kararlılığını artırıcı gruplar taşıyan monomerlerin anyonik polimerizasyonu daha hızlı ilerler.



Şekil 2.27 Çeşitli yan grupların anyonik polimerizasyonun hızına olan etkisi.

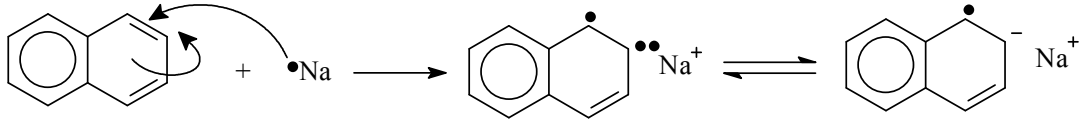
Anyonik polimerizasyon sistemlerinde normalde sonlanma tepkimeleri gözlenmez. Büyüme adımları ortamdaki monomer molekülleri tamamen harcanana kadar sürer. Sonlanmaya; karbondioksit, su, alkol gibi dışarıdan ortama katılan maddeler ya da sistemde bulunabilecek safsızlıklar neden olur.



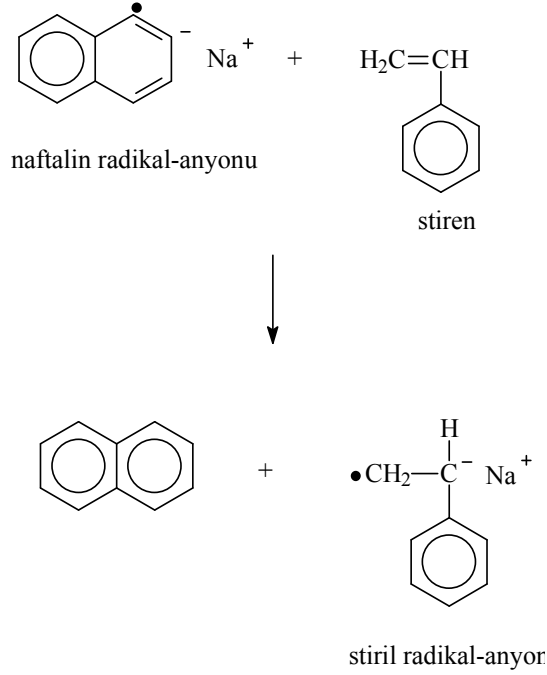
Şekil 2.28 Suyun anyonik polimerizasyonu sonlandırması.

Uygulamada deney kaplarının tamamen sudan arıtılması olası değildir. Deney kaplarının iç yüzeyinde eser miktardaki adsorblanmış su molekülleri veya cam yüzeyindeki –SiOH grupları da sonlanma tepkimelerine katılabilir. Çoğu anyonik polimerizasyon ortamı, aktif anyonik merkezlerden dolayı renklidir. İyi hazırlanmış anyonik sistemler renklerini uzun zaman koruyabilir ve bu süre içerisinde aktif merkezler canlılığını sürdürür (Saçak, 2004; Karabulut, 2007).

Saf ortamlarda gerçekleştirilen anyonik polimerizasyon sistemlerinde polimer zincirlerindeki anyonik merkezler, aktifliklerini uzun süre koruyabilirler (canlı polimer). Canlı polimerizasyon ortamına sonradan benzer veya farklı bir monomer katıldığında zincir büyümesi yeniden başlar. Canlı polimer veya canlı polimer sistemi kavramı, sonlanmamış iyonik polimerizasyon ortamı için kullanılır. İlk ayrıntılı araştırılan canlı anyonik polimerizasyon sistemi Scwarc tarafından çalışılan stirenin, naftalinin sodyum tuzuyla başlatılan polimerizasyonudur. Naftalin ve sodyumdan Birch indirgenmesiyle (Smith ve March, 2001) oluşan, naftalin radikal-anyonu monomere elektron aktararak stiril radikal-anyonu oluşturur.

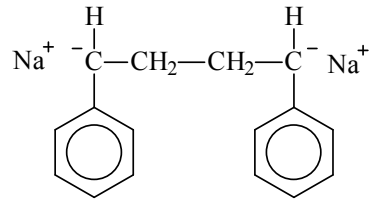


Şekil 2.29 Naftalin ve sodyumdan negatif yüklü aktif merkezin oluşumu.



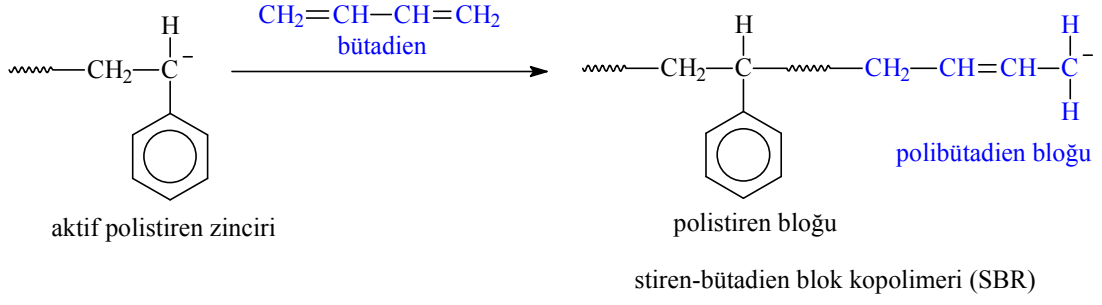
Şekil 2.30 Naftalin radikal-anyonunun monomere elektron aktarımı.

Polimerizasyonun stiril radikal-anyonunun iki ucundaki radikalik ve anyonik merkezler üzerinden ilerleme olasılığı vardır. Ancak, elektron spin rezonans çalışmaları sözü edilen sistemde radikal oluşumunun önemsiz olduğunu göstermiştir. Bu nedenle iki tane radikal-anyonun birleşerek dimerleştiği ve polimerizasyonun dimerin iki ucundaki anyonik aktif merkezler üzerinden ilerlediği öne sürülmüştür (Şekil 2.33).



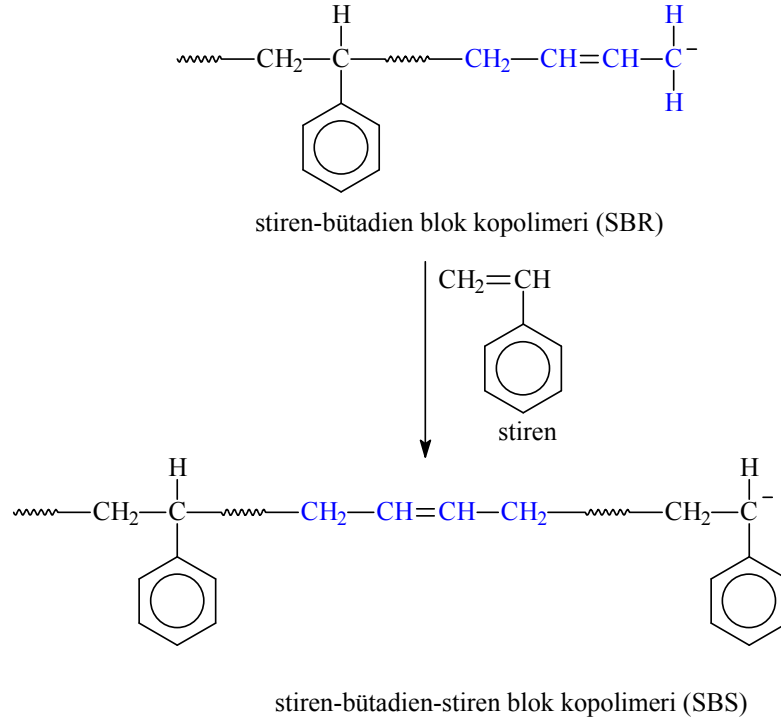
Şekil 2.31 İki radikal-anyonun birleşerek anyonik aktif merkezler oluşturmaları.

Canlı polimer sistemleri blok kopolimer sentezine oldukça uygundurlar. Örneğin, stirenin anyonik polimerizasyonu ile hazırlanan aktif polistiren zincirlerinin bulunduğu ortama bütadien monomeri katılarak stiren-bütadien (SBR) blok kopolimeri elde edilir (Şekil 2.34).



Şekil 2.32 Stiren-bütadien (SBR) blok kopolimeri.

Canlılığını koruyan stiren-bütadien blok kopolimerinin bulunduğu ortama yeniden stiren katılarak, stiren-bütadien-stiren terpolimerine (SBS) geçilir (Şekil 2.34).

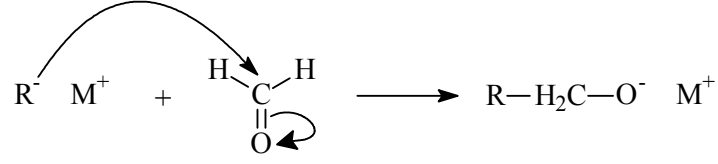


Şekil 2.33 Stiren-bütadien-stiren terpolimeri (SBS) oluşumu.

Başlama tepkimelerinin hızlı olması nedeniyle canlı polimer sistemlerinden elde edilen polimerlerin mol kütlesi dağılımı dardır. Monomerik aktif merkezlerin tamamı hemen polimerizasyonun başlangıcında oluşur ve hızla monomer katarak polimerizasyon sonunda benzer uzunluklara erişirler. Anyonik polimerizasyon düşük sıcaklıklarda yürütüldüğü için zincir transfer tepkimelerinin fazlaca gözlenmemesi de düşük mol kütleli polimer oluşumuna neden olur.

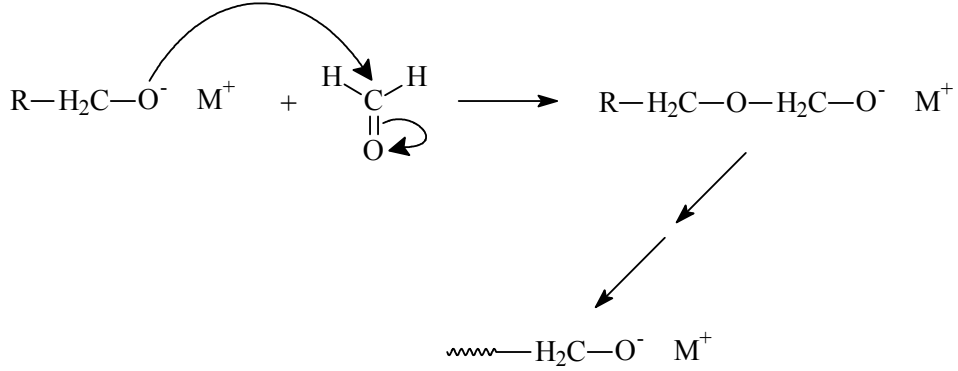
Karbonillerin anyonik polimerizasyonu vinil monomerlerinin polimerizasyonuna benzerdir.

Örneğin, başlatıcının eksi yüklü kısmının doğrudan monomere katıldığı başlama adımı Şekil 2.36 gösterildiği gibi ilerler ve ilk anyonik aktif merkez oluşur.



Şekil 2.34 Karbonillerin anyonik polimerizasyonunda başlama adımı.

Büyüme adımında monomer molekülleri ard arda zincir ucundaki iyon çifti arasına yerleşir (Şekil 2.35).



Şekil 2.35 Karbonillerin anyonik polimerizasyonunda büyüme adımı

İyonik polimerizasyon, radikalik katılma polimerizasyonuna benzer şekilde genel zincir tepkimeleri üzerinden ilerler. İki polimerizasyon yöntemi arasındaki en önemli fark, zincir büyümesini sağlayan aktif merkezlerin türünden kaynaklanır. Radikalik polimerizasyonda zincir büyümesinden radikaller, iyonik polimerizasyonda artı ve eksi yüklü iyonlar sorumludur.

Kinetik açıdan değerlendirildiğinde, radikalik ve iyonik polimerizasyon arasında belirgin farklar olduğu görülür.

1. Radikalik polimerizasyonun başlatılmasında kullanılan organik başlatıcıların ısı parçalanması yüksek aktivasyon enerjisi gerektirir. Buna karşın iyonik polimerizasyonun başlama aktivasyon enerjisi oldukça düşüktür.
2. Radikalik polimerizasyonda sonlanma tepkimelerine aktif iki polimer zinciri katılır. İyonik polimerizasyonda iki benzer yükün etkileşimi söz konusu olmadığı için, olası sonlanma tepkimelerinde bir tane polimer zinciri yer alır.
3. Radikalik polimerizasyon hızı üzerine fazla etkisi olmayan çözücü türü, iyonik

polimerizasyonda önemlidir ve polimerizasyon hızını etkiler.

Kullanılan çözücünün dielektrik sabitinin büyüklüğü, başlatıcı iyonlarının polimerizasyon ortamında iyon çifti halinde ya da tamamen ayrılmış iyonlar halinde bulunmasında belirleyici rol oynar. Yüksek dielektrik sabitine sahip çözücünde polimerizasyon serbest iyonlar üzerinden ilerlerken, dielektrik sabiti düşük çözücünde serbest iyonlar yanında iyon çiftleri de polimerizasyondan sorumludur (Çizelge 2.3). Ayrıca, anyonik polimerizasyonda elde edilen polimerin yapısı kullanılan çözücü ve karşıt iyon (katyon) türünden etkilenir (Çizelge 2.4).

Çizelge 2.3 İyonik polimerizasyonda kullanılan bazı çözücülerin dielektrik sabitleri ve k_p değerleri.

Çözücü	Dielektrik sabiti	k_p (L/mol s)
Benzen	2,2	2
Dioksan	2,2	5
Tetrahidrofuran	7,6	550
1,2-dimetoksietan	5,5	3800

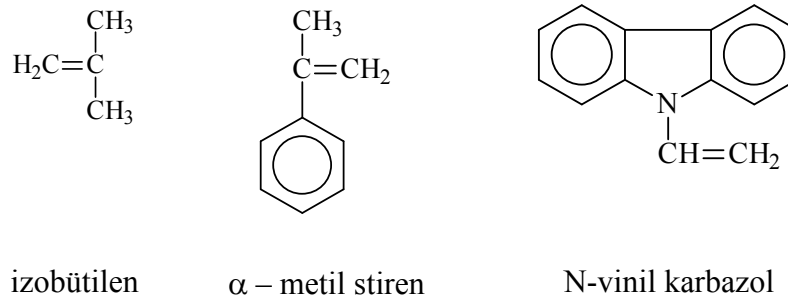
Çizelge 2.4 Anyonik polimerizasyonda kullanılan çözücünün yapı üzerine etkisi.

Karşı iyon (katyon)	Çözücü	1,4-cis	1,4-trans	1,2-katılması	3,4-katılması
Li^+	Pentan	94	-	-	6
Li^+	Pentan-THF	-	25	10	65
Li^+	THF	-	-	25	75
Li^+	Dietil eter	-	50	5	45
Na^+	Pentan	eser	40	7	53
K^+	Pentan	eser	55	7	38

Belirtilen nedenlerden dolayı, iyonik polimerizasyonun kinetiği radikalik polimerizasyondan karmaşıktır. Başlama tepkimesi tipinin polimerizasyon sistemlerine bağlı olması, genel bir mekanizma vermeyi engeller. Kinetik incelemeler yapılırken, başlatıcının tamamen (ya da önemli oranda) iyonlarına ayrışan türden olup olmadığını göz önüne almak gerekir. Başlatıcının tamamen iyonlarına ayrıştığı anyonik polimerizasyon sistemlerinin kinetiği daha basittir.

2.2.4 Katyonik Polimerizasyon

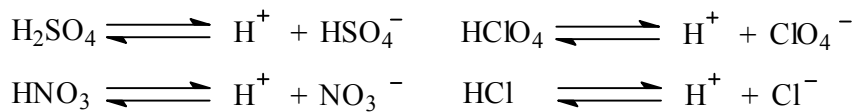
Katyonik polimerizasyon, artı yüklü aktif merkezler üzerinden ilerleyen iyonik polimerizasyon. Katyonik başlatıcılar kullanılarak başlatılır ve stiren, N-vinilkarbazol, α -metil stiren, bütadien, izobütilen gibi elektron verici gruplar taşıyan monomerler bu yöntemle polimerleşirler.



Şekil 2.36 Katyonik polimerizasyonla polimerleşen monomerlere örnek.

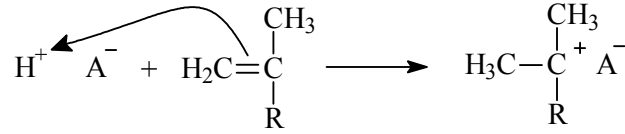
2.2.5 Katyonik Polimerizasyon Mekanizması

Radikalik ve anyonik katılma polimerizasyonu gibi katyonik polimerizasyon da bir zincir tepkimesidir. Bu nedenle radikalik ve anyonik polimerizasyonda gözlenen başlama, büyüme, zincir transferi ve sonlanma tepkimeleri katyonik polimerizasyon için de geçerlidir. Katyonik polimerizasyon, kuvvetli protonik asitler ve Lewis asitleriyle başlatılabilir. Kuvvetli asitler iyonlaşıp kolayca proton verirler (Şekil 2.39).



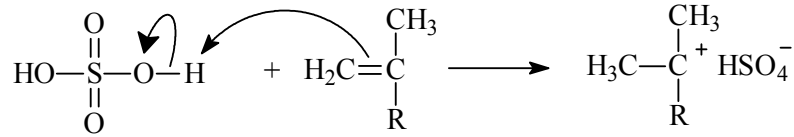
Şekil 2.37 Bazı kuvvetli asitlerin iyonlaşma reaksiyonları.

Ortamda bir olefin monomeri bulunduğunda, HA şeklinde gösterilen kuvvetli protonik asit, katılmayla monomere bir proton aktarır ve ilk katyonik aktif merkezi oluşturur.



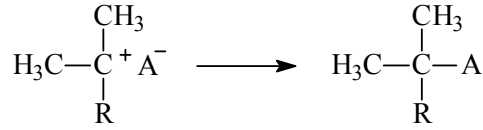
Şekil 2.38 Protonun monomere aktarılmasıyla ilk katyonik aktif merkezin oluşması.

Bu genel tepkime H_2SO_4 için Şekil 2.39’da gösterilmiştir.



Şekil 2.39 H_2SO_4 ’in protonunu monomere aktarması.

Nükleofilik özelliği yüksek asitlerin anyonları, protonlanmış monomerle birleşir ve polimerizasyonu ilerleyemez.

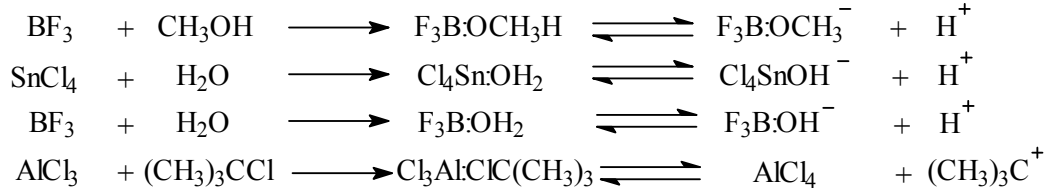


Şekil 2.40 Protonik asitlerin yüksek nükleofilik özellikteki anyonlarının katyonik polimerizasyonu durdurması.

Bu nedenle, nükleofilik özelliği yüksek halojen anyonları veren HCl gibi halojenür asitleri katyonik polimerizasyonu başlatmada etkili değildir. Anyonu daha az nükleofilik olan perklorik, sülfürik ve fosforik asit türü kuvvetli asitler bazı monomerlerin katyonik mekanizmayla polimerleşmesini sağlayabilirler.

Lewis asitleri, yaygın kullanılan katyonik başlatıcılardır ve AlCl_3 , TiCl_4 , ZnCl_2 , SnCl_4 gibi Lewis asitleri katyonik polimerizasyonu başlatabilir.

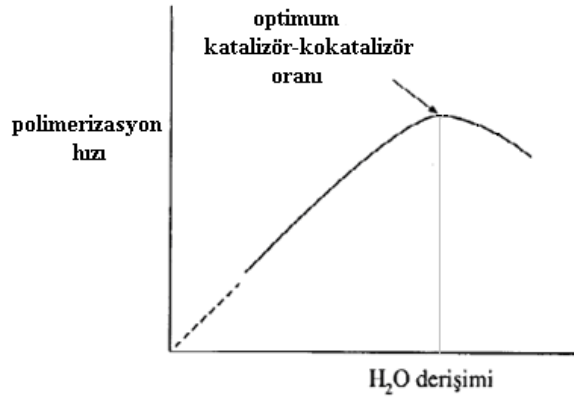
Lewis asitleri, genelde, tek başlarına katyonik polimerizasyonu başlatmada yetersizdirler, proton verme özelliğine sahip kokatalizör ya da yardımcı katalizör denilen bileşikler yanında etkindirler. Su, metanol gibi bileşikler Lewis asitleri yanında kokatalizör görevi yaparlar ve Lewis asitleri ile Şekil 2.41’de verilen tepkimelere girerler.



Şekil 2.41 Bazı kokatalizörlerin Lewis asitleri ile reaksiyonları.

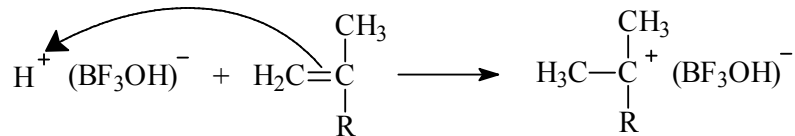
En yüksek polimerizasyon hızına katalizör, kokatalizör ve çözücü türüne bağlı olarak değişen bir optimum katalizör/kokatalizör oranında ulaşılır. Şekil 2.42’de kokatalizör/katalizör oranının polimerizasyon hızı üzerine etkisini gösteren tipik bir grafik verilmiştir. Polimerizasyon hızı kokatalizör derişimiyle önce artar, daha sonra bir maksimumdan geçerek azalır.

Şekildeki eğri sıfır su derişimine ekstrapole edilirse, polimerizasyon hızı da sıfır değerini alır. Bu nedenle, bütün katyonik başlatıcıların polimerizasyon ortamında H^+ A^- şeklinde iyon çiftleri halinde bulunduğu düşünülür. İyon çiftinin protonu, monomerin çift bağındaki karbonlardan yan grup etkisiyle kısmen eksi yüklü hale gelmiş olanına katılır ve kararlı bir karbonyum iyonu oluşturur.



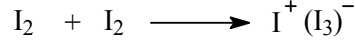
Şekil 2.42 Katalizör/kokatalizör oranının polimerizasyon hızına etkisi.

BF_3 ve suyun verdiği katalizör/kokatalizör kompleksinin bir vinil monomeriyle vereceği başlama tepkimesi Şekil 2.43’de gösterilmiştir.



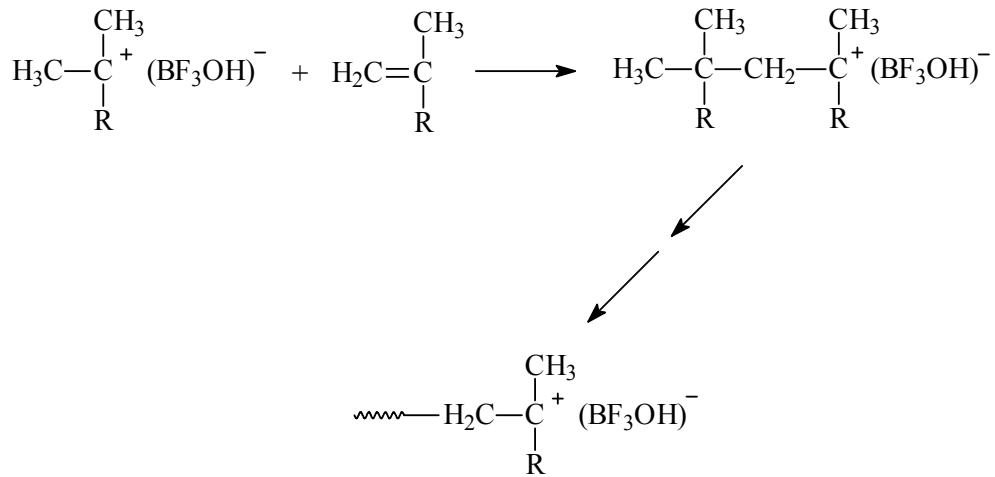
Şekil 2.43 BF_3 ve suyun oluşturduğu katalizör/kokatalizör kompleksinin vinil monomeri ile başlama tepkimesi.

I_2 , iyonlaştırıcı ışınlar. Cu^+ veya oksonyum iyonları katyonik polimerizasyonu başlatabilir. Örneğin, I_2 Şekil 2.44'te verilen tepkimeyle katalizör/kokatalizör kompleksi verir.



Şekil 2.44 İyot molekülünün oluşturduğu katalizör/kokatalizör kompleksi.

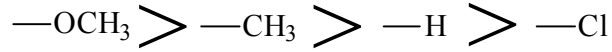
Monomer moleküllerinin ard arda katyon-anyon bağı arasına yerleştiği adım büyüme adımıdır. Başlatıcı olarak BF_3/H_2O katalizör/kokatalizör kompleksinin kullanıldığı bir vinil monomeri için büyüme adımı Şekil 2.45'de gösterildiği gibi ilerler.

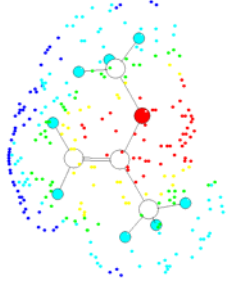
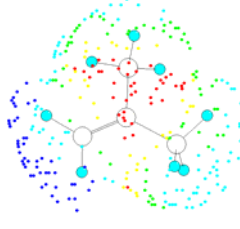
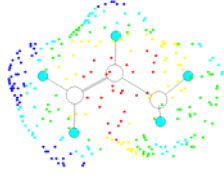
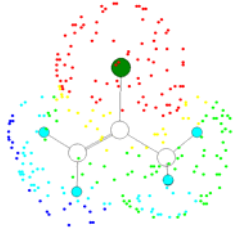


Şekil 2.45 Vinil monomeri için büyüme adımı.

İlk katılımla dimer oluşur ve benzer katılımlarla polimer zinciri büyür. Büyüme adımı, zincir transfer tepkimeleri hızının düşük olduğu düşük sıcaklıklarda hızla ilerler.

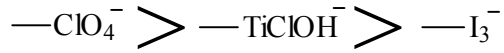
Büyüme hızı ve başlama hızı monomerdeki $-R$ grubunun yapısına yakından bağlıdır. Karbokasyon kararlılığını artıran gruplar taşıyan monomerlerin katyonik polimerizasyonu daha hızlı ilerler. Şekil 2.46'da gösterildiği gibi halojen bulunduran monomerlerde hız yavaştır.



			
-OCH ₃	-CH ₃	-H	-Cl

Şekil 2.46 Katyonik polimerizasyona monomerdeki -R gruplarının etkisi.

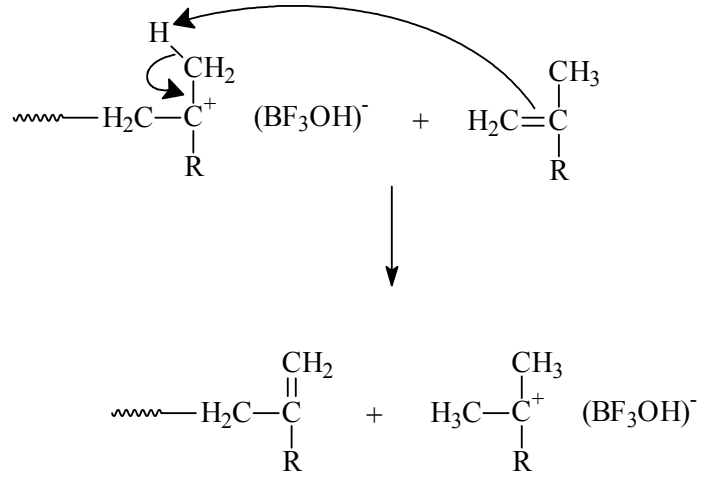
Katyonik polimerizasyon hızını karşıt (counter) iyon türü de etkiler. Büyük ve gevşek bağlı karşı iyonlarda hız daha yüksektir.



Şekil 2.47 Karşıt iyon türünün katyonik polimerizasyonun hızına etkisi.

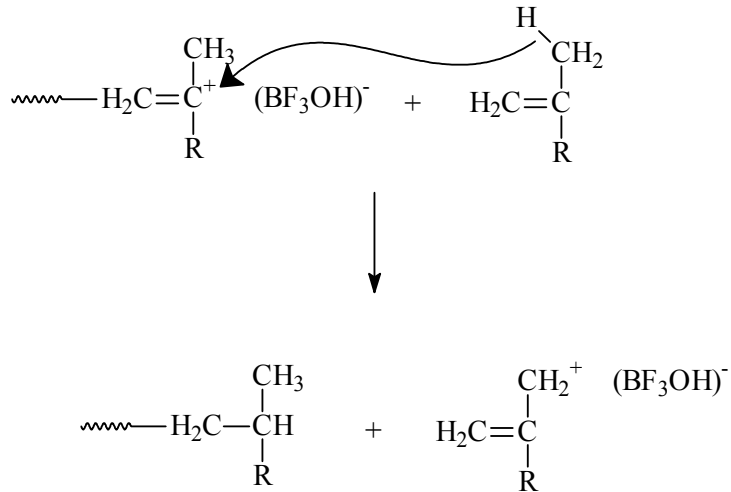
Düşük sıcaklıklarda yürütülen katyonik polimerizasyonda zincir transfer tepkimeleri önemsizdir ve yüksek mol kütleli polimer elde edilir. Zincir transferi oda sıcaklığı yakınlarında hızlanır ve anlam kazanır.

Katyonik polimerizasyonda gözlenen en önemli zincir transfer tepkimesi monomere transferdir. Katyonik aktif merkez ucundaki katalizör/kokatalizör kompleksi monomere aktarılır (kısaca proton transferi denir). Sonlanan zincirin ucunda çift bağ bulunur ve monomerden oluşan yeni karbonyum iyonu polimerizasyonu sürdürebilir.



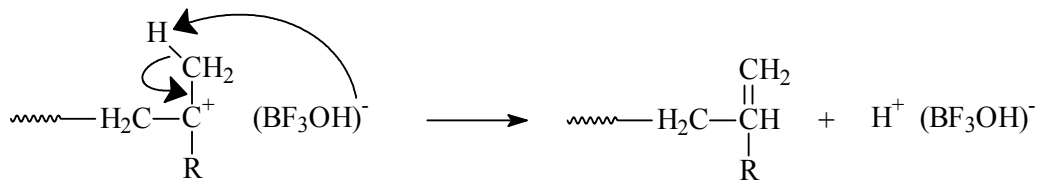
Şekil 2.48 Katyonik polimerizasyonda zincir transfer tepkimesi.

Monomere transfer, hidrür aktarımı şeklinde de olabilir.



Şekil 2.49 Katyonik polimerizasyonda monomere hidrür aktarımı.

Karşıt iyon transfer olarak bilinen bir diğer zincir transfer tepkimesinde katalizör/kokatalizör kompleksi yeniden oluşur.



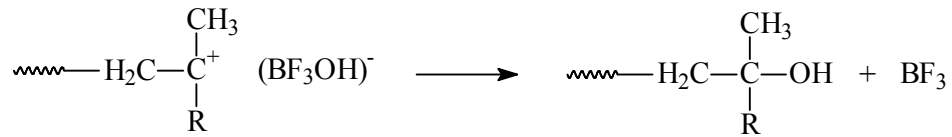
Şekil 2.50 Katyonik polimerizasyonda karşıt iyon transfer tepkimesi.

Zincir transfer tepkimelerinde ortamda bulunan safsızlıklar, dışarıdan sisteme katılan

maddeler ve çözücü de katılabilir.

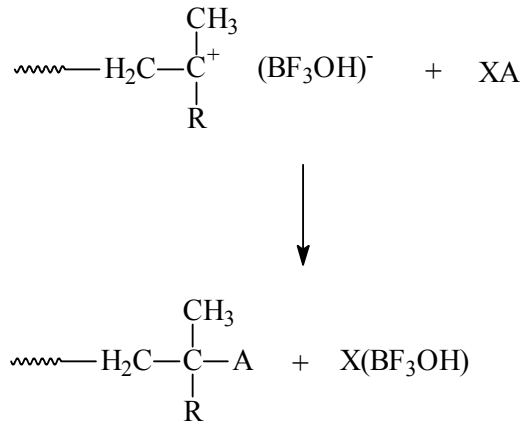
Yukarıda incelenen zincir transfer tepkimeleriyle polimer zincirleri aktifliklerini yitirir ve sonlanırlar. Transferle oluşan yeni katyonik merkez, genelde, monomer katabilme yeteneğine sahiptir. Bu nedenle, monomer katmayı sürdürerek polimerizasyon hızını etkilemez.

Polimerizasyon hızını etkileyen sonlanmalardan birisi, yeterince nükleofilik olan bir karşı iyonun katyonik aktif merkezle birleşmesidir (katalizör ayrılır).



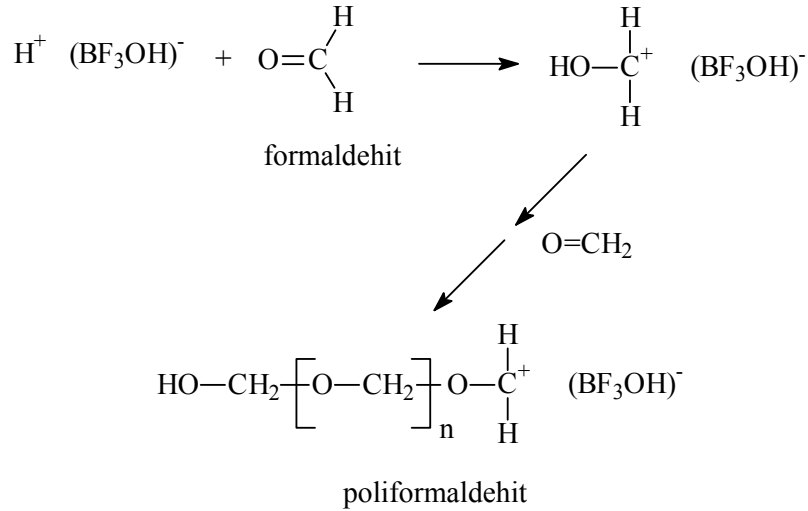
Şekil 2.51 Nükleofilik bir karşıt iyonun katyonik aktif merkezle birleşerek polimerizasyonu durdurması.

Aktif merkezler ortamda bulunabilecek eser miktarda su, alkol, asit gibi maddelerle (XA) etkileşerek de sonlanabilirler.



Şekil 2.52 Aktif merkezlerin XA türü safsızlıklarla sonlanma reaksiyonu.

Aldehitler katyonik polimerizasyona yatkın bileşiklerdir. Formaldehit, BF_3/Su katalizör/kokatalizör sistemi kullanılarak polimerleştirilebilir. Polimerizasyon mekanizmasının genel olefinlerin katyonik polimerizasyon mekanizmasına uyduğu ve Şekil 2.53'deki adımları izlediği sanılmaktadır.



Şekil 2.53 Formaldehitin BF_3/su katalizör/kokatalizör sistemi kullanılarak katyonik polimerizasyonu.

2.3 Katyonik Halka Açılması Polimerizasyonu

Katyonik halka açılması polimerizasyonu başlatıcının monomer molekülü ile reaksiyona girerek oluşturduğu katyonik aktif merkez üzerinden yürüyen polimerizasyon türüdür. Katyonik halka açılması polimerizasyonu diğer iyonik polimerizasyonlarda olduğu gibi başlama, büyüme ve sonlanma adımlarını izler.

Başlama basamağı başlatıcı ve monomer molekülünün aktif merkezi oluşturmak üzere girdiği reaksiyondur.

Katyonik halka açılması polimerizasyonunda bu prosesin tek bir adımda olması gözlenmez. Vinil ve heterosiklik monomerlerin polimerizasyonlarının başlatılması farklılıklar gösterir (Şekil 2.54).



Şekil 2.54 Heterosiklik ve vinil monomerlerin katyonik aktif merkezleri.

Vinil monomerlerinin protonlanması büyüyen parçaların aynı yapıya sahip olduğu doğrudan

- a) Protonik asitler güçlü asit olmalıdır. Bu durum asit-baz denge reaksiyonunun sağa kaymasına neden olur (Şekil 2.58).



Şekil 2.58 Protonik asitlerle başlamada denge reaksiyonu.

- b) Protonik asitler iyonik aktif merkezlerin reaktifliğini bozmayacak zayıf nükleofilik anyonlar taşınmalıdır. Aksi durum sonlanmaya neden olabilir.



Şekil 2.59 Nükleofilik anyonun katyonik halka açılması polimerizasyonunu sonlandırması.

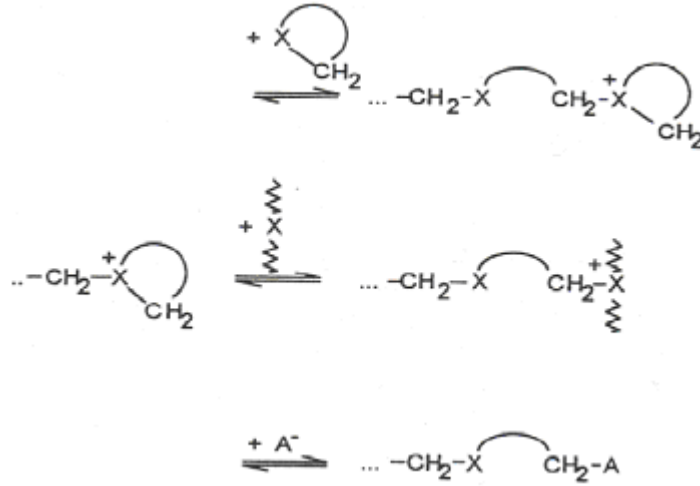
Pek çok asidin pKa ve H₀ değerleri bilinse de kuvvetli asit tanımı çoğu kez görelidir. Çünkü Şekil 2.60'daki denge reaksiyonunda görüldüğü gibi dengenin yönü heterosiklik monomerin bazlığına bağlıdır. Bu bazlık halkalı asetallerdeki gibi düşük veya halkalı aminlerde olduğu gibi yüksek olabilir. Bu yüzden halka açılması polimerizasyonunda protonik asitlerin davranışlarının genel geçer bir kuralı yoktur.

Ticari olarak mevcut olan birçok protonik asit vardır. Triflorometan sülfonik asit (triflik asit), florosülfonik asit ve perklorik asit saf olarak elde edilebilir. İlk iki asit destilasyonla saflaştırılabilir, kaynama noktaları sırasıyla 162 °C ve 165 °C dir. Perklorik asit yükseltgeyici özelliği ve saklanmasıdaki güçlükler nedeniyle daha az tercih edilir.

HX türü asitler de (X=halojen) başlatıcı olarak kullanılabilir. Yalnız bu asitler görece yüksek nükleofilik anyonlar içerdiklerinden düşük nükleofilik özellikteki monomerlerin polimerizasyonunda kullanılmazlar.

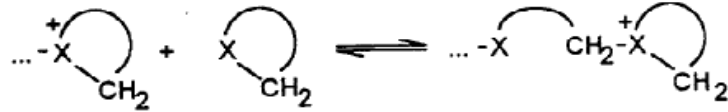
Güçlü nükleofilik halkalı monomerlerin polimerizasyonunda (oksazolinler, halkalı aminler gibi) monomer Br⁻ ve I⁻ iyonlarıyla kolaylıkla yarışır. Bu monomerler için HBr ile başlatma yüksek molekül ağırlığına sahip polimerler verir.

Katyonik halka açılması polimerizasyonunda aktif merkezler üç farklı monomerin saldırısı ile karşı karşıyadır. Bunlar monomerin kendisi, polimerin tekrarlanan zincirleri ve karşıt iyondur.



Şekil 2.60 Katyonik halka açılması polimerizasyonunda aktif merkezlerin ortamdaki nükleofillerle olan reaksiyonları.

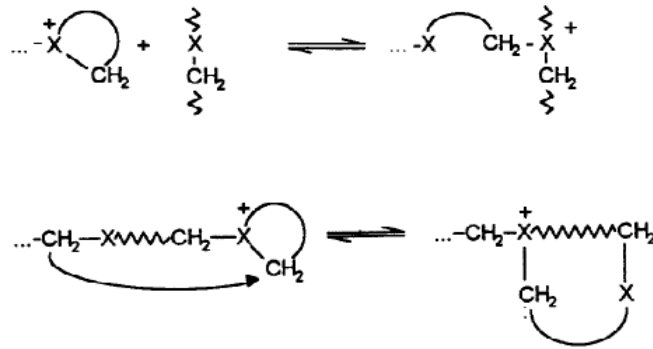
Bu üç reaksiyon da S_N2 mekanizmasını izleyen nükleofilik süstitüsyon reaksiyonlarıdır. Üç reaksiyon da birbiri ile yarışmalıdır ve bu yarışma monomer, polimerin tekrarlanan kısmı ve karşıt iyonun nükleofilliğine bağlıdır. Birinci reaksiyon büyüme reaksiyonudur.



Şekil 2.61 Katyonik halka açılması polimerizasyonunda büyüme reaksiyonu.

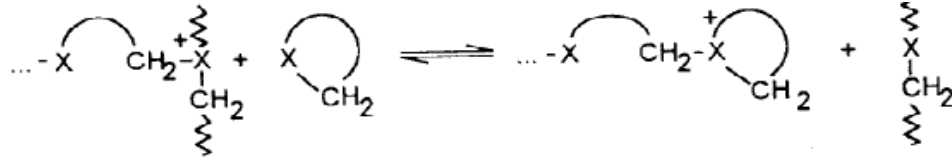
Halka büyüklüğüne bağlı olarak tersinir (beşli ve daha fazla üyeli halkalarda) veya tersinmez (üçlü ve dördü halkalarda) olarak yürüyebilir.

İkinci reaksiyon polimere zincir transferi reaksiyonudur. Son durumda bir makro halkalı yapı oluşabilir.



Şekil 2.62 Katyonik halka açılması polimerizasyonunda zincir transferi.

Yine bu reaksiyonlar da monomerin yapısına bağlı olarak tersinir ya da tersinmez olabilir. Eğer sonuçta oluşan gelişmiş (dallanmış) veya makro halka oluşturmuş yapı aktif değilse, bu yapılar ne molekül içi (intramoleküler) halkalaşma yapabilirler ne de bir sonraki monomer molekülüyle etkileşebilirler. Bu durum polimerizasyonun durmasına neden olur ve sonlanma gerçekleşir. Eğer Şekil 2.62'deki reaksiyon tersinir ise veya gelişmiş katyonik merkez aktifse bir sonraki monomer molekülü ile reaksiyon verebilir (Şekil 2.63).



Şekil 2.63 Katyonik halka açılması polimerizasyonunda zincir transferinden sonra aktif merkezin oluşması.

Yani bu durumda dallanmış olan veya makro halkalı yapı oluşturan aktif zincirin sadece başka bir aktif yapıya dönüştüğü görülür. Şekil 2.64'deki reaksiyon halkalı asetallerin reaksiyonlarında etkili rol oynar.

Üçüncü yarışmalı reaksiyon aktif merkezin karşıt iyon ile yaptığı reaksiyondur. Bu reaksiyon da tersinir veya tersinmez olarak yürüyebilir.



Şekil 2.64 Katyonik aktif merkezin karşıt iyonla verdiği reaksiyon.

Tersinmez reaksiyon büyümeyi durdurur. Eğer Şekil 2.64'deki reaksiyon tersinir ise bu kovalent bağlı yapı bir sonraki monomer molekülü ile reaksiyon verir.



Şekil 2.65 Tersinir reaksiyonla karşıt iyonun polimer zincirinden ayrılması.

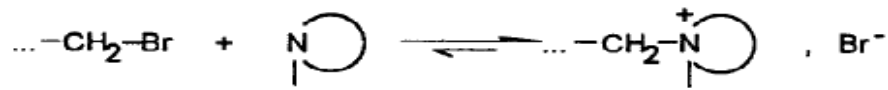
Katyonik aktif merkezin verdiği bu üç yarışmalı reaksiyon da katyonik halka açılması polimerizasyonunun en temel reaksiyonlarıdır.

Monomerin nükleofilik parçasının (heteroatom) varlığından dolayı, polimer sistemin içerisinde nötral bir bileşen değildir. Polimerin dallanmış aktif merkezleri ve monomer polimerizasyon ortamındadır.

Polimerin tekrarlanan kısmının nükleofilliği eğer monomerin nükleofilliğinden fazlaysa bütün polimerizasyon prosesi polimerin tekrarlanan kısmının verdiği reaksiyonlarla devam eder.

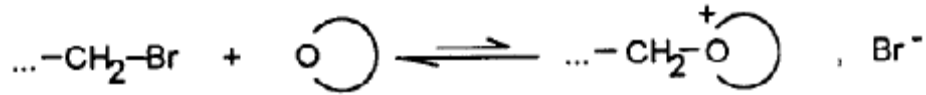
Eğer karşıt iyonun rekombinasyonu ile kovalent yapı oluşturan iyonik merkezler nükleofilik monomer veya tekrarlanan polimer birimlerinin reaksiyonuna maruz kalırsa karşıt iyonla yer değiştirebilirler. Bu reaksiyonların olup olmayacağı monomer ve karşıt iyonun nükleofilliklerine bağlıdır.

Kuvvetli nükleofilik olan azot içeren hetero halkalılar yine kuvvetli nükleofilik Br^- iyonu ile yer değiştirebilirler (Şekil 2.66).



Şekil 2.66 Azot içeren nükleofilik monomerin Br^- iyonu ile yarışması.

Böylece brom ile sonlanmış makro moleküller tekrardan kovalent aktif merkezlere dönüşmüş olurlar. Bu durum halkalı iminlerin ve oksazolinlerin polimerizasyonunda görülür. Benzer durum çok daha zayıf nükleofil olan halkalı eterlerin varlığında ters olarak görülür (Şekil 2.67).



Şekil 2.67 Zayıf nükleofil olan halkalı eterler monomerinin karşıt iyonla yarışması.

Yani aktif merkezin brom ile rekombinasyonu sonlanmayı başlatır. Öte yandan perklorat (ClO_3^-) veya triflat ($\text{OSO}_2\text{CF}_3^-$) gibi çok daha zayıf nükleofil olan karşıt iyonlar oksijen içeren bazlarla yer değiştirirler (Şekil 2.68).



Şekil 2.68 Triflat iyonunun oksijen içeren halkalı monomer ile yer değiştirme reaksiyonu.

Bütün bu reaksiyonlar katyonik halka açılması polimerizasyonunda büyüme adımının temel bir mekanizması olduğunu göstermektedir. Bu mekanizma bimoleküler $\text{S}_\text{N}2$ tipi reaksiyondur.



Şekil 2.69 Katyonik halka açılması polimerizasyonunun büyüme adımı.

Beş üyeli halkalı eter olan tetrahidrofuranın SbF_6^- karşıt iyonuyla polimerizasyonu bu tür bir mekanizmaya en iyi örnektir.

2.4 Polimerlerde Molekül Kütlesi

Hemen hemen tüm polimerler, farklı derecede polimerleşmiş moleküllerin bir karışımıdır. Bu çok dağılımlılık bazı sentetik oligomerlerde ve proteinler gibi doğal polimerlerde görülmez. Tek dağılımlı (monodispers) polimerlerin tek bir molekül ağırlığı bulunmaktadır. Polimerler genelde çok dağılımlıdır (polidispers) ve bir molekül ağırlığı dağılımına sahiptirler. Bu sebeple polimerlerin molekül ağırlıkları ortalama bir değer olarak ifade edilmektedir. Polimerlerin molekül ağırlıkları farklı şekillerde belirtilebilir (Teraoka, 2002):

Polimerler birkaç farklı molekül ağırlığı ile tanımlanabilirler. Bunlar;

Sayıcı ortalama mol kütlesi: $\overline{M}_n$

Viskozite ortalama mol kütlesi: $\overline{M}_v$

Arlıkça ortalama mol kütlesi: $\overline{M}_w$

z-ortalama mol kütlesi: $\overline{M}_z$ 'dir.

2.4.1 Sayıcı Ortalama Mol Kütlesi ($\overline{M}_n$)

Sadece çözeltide bulunan moleküllerin sayısına duyarlı olan ve karışımdaki hiçbir taneciğin boyutundan etkilenmeyen kaynama noktası alçalması, donma noktası yükselmesi, osmotik basınç gibi özelliklerin (sayısal veya kolligatif özellikler) kullanılmasıyla belirlenen ortalama molekül ağırlığına sayıcı ortalama molekül ağırlığı denir. Böyle özellikler için önemli olan ortalama molekül ağırlığı tüm polimer kütesinin polimer molekülleri sayısına bölümü ile elde edilen ağırlıktır. Sayıcı ortalama molekül ağırlığı küçük mol ağırlıklı türlerin ağırlık kesrindeki değişimlere çok hassastır, çünkü küçük moleküller için az bir madde miktarı çok sayıda molekül demektir. Sayıcı ortalama molekül ağırlığı,

$$\overline{M}_n = \frac{\sum_i N_i M_i}{\sum_i N_i} \quad (2.1)$$

formülü ile hesaplanır. Burada N_i , i moleküllerinin polimer kütlesi içindeki sayısı, M_i i moleküllerinin molekül ağırlığıdır. i moleküllerinin kütle içindeki mol kesri, X_i ,

$$X_i = \frac{N_i}{\sum N_i} \quad (2.2)$$

eşitliği ile gösterilirse eşitliği

$$\overline{M}_n = \sum X_i M_i \quad (2.3)$$

şeklini alır.

2.4.2 Viskozite Ortalama Mol Kütlesi ($\overline{M}_v$)

$$\overline{M}_v = \left[\frac{\sum_i N_i M_i^{1+a}}{\sum_i N_i M_i} \right]^{\frac{1}{a}} \quad (2.4)$$

Denklem (2.4)'te a , zincir şekline göre değişen bir sabittir. $\overline{M}_v$ 'nin sayısal büyüklüğü $\overline{M}_n$ ve $\overline{M}_w$ arasına düşer, $\overline{M}_w$ 'ye daha yakındır. Sabit olan a 'nın değeri 1 olursa, $\overline{M}_v = \overline{M}_w$ eşitliği sağlanır. Viskozite mol kütlesi, intrinsik viskozite ve Mark-Houwink denklemi ile belirlenir.

2.4.3 Ağırlıkça Ortalama Mol Kütlesi ($\overline{M}_w$)

Sadece polimer moleküllerinin sayısına değil aynı zamanda her bir polimer molekülünün boyutuna ve ağırlığına duyarlı olan ışık saçılması gibi yöntemlerle belirlenen ortalama molekül ağırlığına ağırlıkça ortalama molekül ağırlığı denir. Bu ortalama ağırlık, büyük moleküllerin toplam polimer ağırlığının daha çoğunu oluşturduğu gerçeğine dayanır. Ağırlıkça ortalama mol ağırlığı,

$$\overline{M}_w = \frac{\sum_i M_i^2 N_i}{\sum_i M_i N_i} \quad (2.5)$$

formülü ile hesaplanır. Burada i moleküllerinin polimer kütlesi içindeki sayısı, M_i i moleküllerinin molekül ağırlığıdır.

2.4.4 z-Ortalama Mol Kütlesi ($\overline{M}_z$)

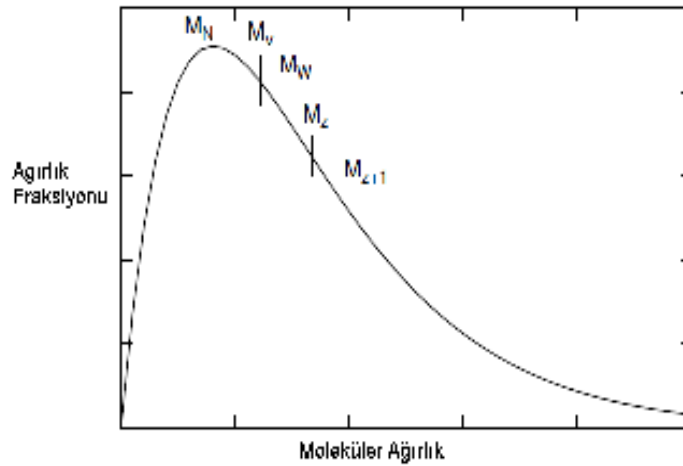
$\overline{M}_z$ olarak simgelenen z-ortalama mol kütlesi şu şekilde tanımlanabilir (Teraoka, 2002):

$$\overline{M}_z = \frac{\sum_i N_i M_i^3}{\sum_i N_i M_i^2} \quad (2.6)$$

Z ortalama mol kütlesi sedimentasyon eşitliği ile belirlenir.

2.4.5 Molekül Kütlesi Dağılımı

Mükemmel bir şekilde tek dağılımlı olan bir polimer için $\overline{M}_n = \overline{M}_w = \overline{M}_z$ olur. Diğer polimerler için (çok dağılımlı, polidispers) $\overline{M}_n < \overline{M}_v < \overline{M}_w < \overline{M}_z$ şeklindedir. Eğer bu polimer örneği için bir molekül ağırlığı dağılımı çizer ve anlatılan ortalama molekül ağırlıklarını grafik üzerinde işaretlersek ağırlıkça ortalama molekül ağırlığı dağılımının yüksek molekül ağırlıklı kısmında ve sayıca ortalama molekül ağırlığı ise dağılımın düşük molekül kısmına yakın olur (Teraoka, 2002).



Şekil 2.70 Polimerlerde molekül ağırlığı dağılımı.

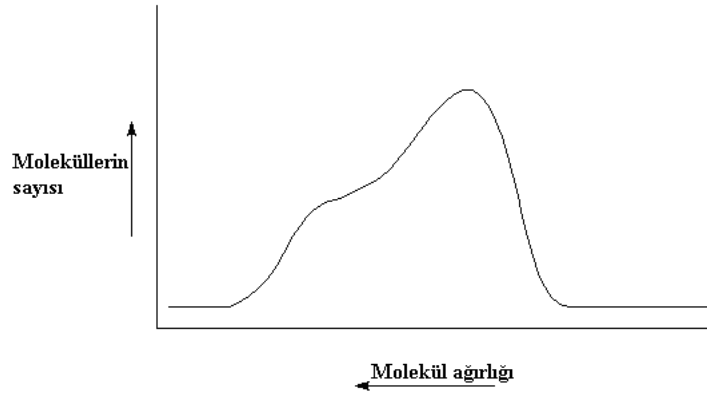
Eğer tüm polimer molekülleri aynı molekül ağırlığında ise, tüm molekül ağırlığı ortalamaları aynı olur. Bu pratikte yapay polimerler için geçerli değildir. Bir polimerin molekül ağırlığı dağılımı genişliğinin ölçüsü olan molar ağırlık dağılımı (MWD) veya polidispersite indeksi (PDI) kavramı kullanılır. Bu ağırlıkça ortalama molekül ağırlığının sayıca ortalama molekül ağırlığına oranıdır. Molar ağırlık dağılımı 1'e yaklaştıkça molekül ağırlığı dağılımı daralır.

$$\text{MWD} = \overline{M}_w / \overline{M}_n \text{ 'dir}$$

$\overline{M}_w / \overline{M}_n > 1$ ise polimer örneği polidispers,

$\overline{M}_w / \overline{M}_n = 1$ ise polimer örneği monodisperstir.

Molar ağırlık dağılımının dar olması polimerin bazı özelliklerini homojenleştirir. Örneğin polimerin sertliğini, uzamaya karşı direncini, ısı ve kimyasal direncini artırır ve çözünürlüğünü azaltır. Bunun sebebi polimer kütlesi içinde bulunabilecek kısa zincirlerin plastikleştirici etkisi yaparak polimerin kristal yapısını azaltmasıdır. Tüm zincirler aynı boyda olursa bu etki olmayacak, polimer en iyi şekilde kristalleşecektir. Molar ağırlık dağılımı genişledikçe polimer örneğinin de her türlü özelliği de heterojenleşecektir. Molar ağırlık dağılımı grafiğinde bir polimer örneğindeki polimer moleküllerinin gerçekte kaç tanesinin ortalama molekül ağırlığına sahip, kaçının daha ağır, kaçının daha hafif olduğu görülür.



Şekil 2.71 Polimerlerde ideal olmayan molekül ağırlığı dağılımı.

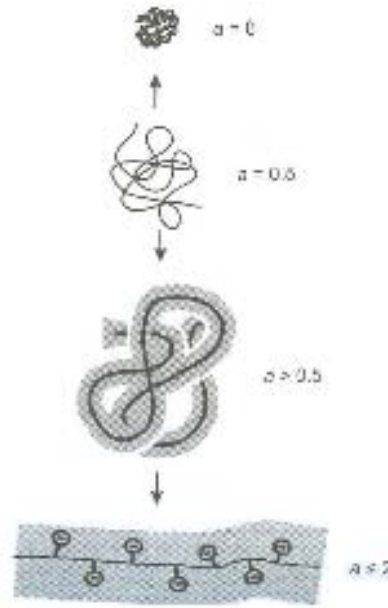
2.5 Mark-Houwink Denklemi

İntrinsik viskozite bir polimerin karakteristik özelliklerinden biridir, konsantrasyon belirli miktarda arttığında çözeltinin viskozitesindeki artışı göstermektedir. İntrinsik viskozite, deneysel olarak, Mark-Houwink denklemi (Kuhn–Mark–Houwink–Sakurada denklemi olarak da bilinir) (Gooch, 2007) ile ifade edilmektedir:

$$[\eta] = K \overline{M}_v^a \quad (2.7)$$

Bu eşitlikte $[\eta]$ intrinsik viskoziteyi, $\overline{M}_v$ polimerin molekül kütlesini temsil etmektedir. K ve a (bazı kaynaklarda α olarak gösterilmektedir) ise polimere ait sabit değerlerdir ve literatür kaynaklarından kolaylıkla bulunabilirler. a sabiti, polimer zincirinin üç boyutlu yapısıyla

bağlantılıdır.



Şekil 2.72 a'nın polimer şekline göre değerleri.

Şekil 2.72'de gösterildiği gibi çözeltide polimer zinciri çubuk şeklinde ise $a = 2$ değerini alır. Polimer zincirinin alabileceği diğer bir şekil ise katı küre konformasyonudur ve bu durumda $a=0$ değerini almaktadır. Bu iki uç konformasyon arasında kalan konformasyonlardaki polimer zincirleri için $0 < a < 2$ eşitliği geçerlidir (Kulicke ve Clasen, 2004).

2.7 eşitliği doğrusal bir denklem haline getirilebilir:

$$\log[\eta] = \log K + a \log \bar{M} \quad (2.8)$$

Bu denklem kullanılarak çizilen $\log[\eta] - \log \bar{M}$ grafiğinden K ve a sabitleri elde edilmektedir. Grafiğin y-eksenini kestiği nokta K değerini, grafiğin eğimi ise a değerini vermektedir.

Çizelge 2.5 Mark-Houwink denkleminde a sabitinin teorik değerleri (Pasch ve Trathnigg, 1999).

Konformasyon	a
Çubuk	1,7-2
Yumak	0,5-0,9
Disk	0,5
Küre	0

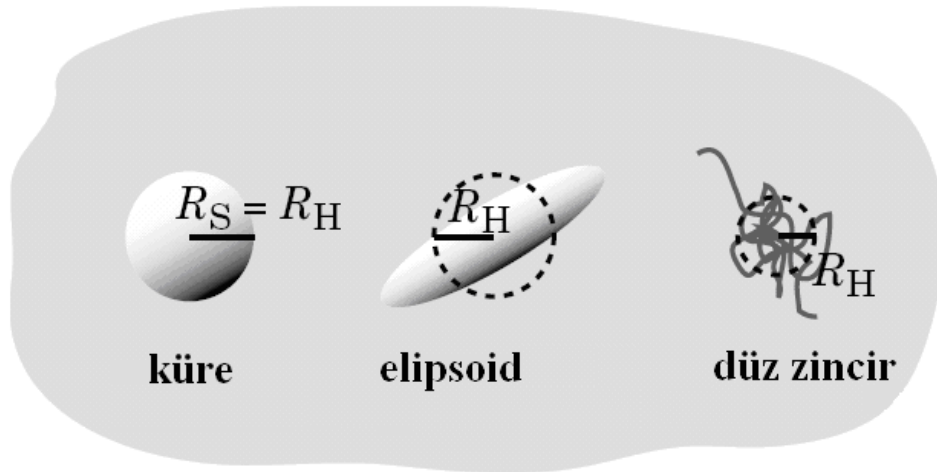
2.6 Polimerlerde Boyut

Çözelti içindeki polimerlerin boyutu en çok hidrodinamik yarıçap (R_h) ve dönme (gyration) yarıçapı (R_g) ile ifade edilmektedir (Teraoka, 2002).

$$D = \frac{k_B T}{\xi} \quad \text{Nerst-Einstein denklemi} \quad (2.9)$$

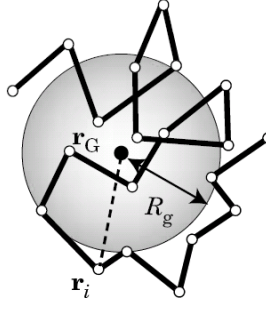
$$\xi = 6\pi n_s R_s \quad (2.10)$$

$$D = \frac{k_B T}{6\pi n_s R_s} \quad \text{Bir kürenin difüzyon sabiti} \quad (2.11)$$



Şekil 2.73 Hidrodinamik yarıçap R_h küre için, R_s 'e (Stokes yarıçapına) eşittir.

BAK (GPC) analizi ile zincir sertliğinin (stiffness) bir ölçüsü olarak polimer zincirinin hidrodinamik yarıçapı ölçülür. R_h çözelti içinde hareket eden polimerlerin çözelti ile etkileşimlerinden ve dinamik özelliklerinden kaynaklanmaktadır. Doğru bir ölçüm yapılabilmesi için örneğin zincir sertliğinin referansına benzemesi gerekmektedir. Işık saçılması kalibrasyonu ile bu problem ortadan kaldırılır. Çünkü ışık saçılması polimer zincir çapını direkt olarak ölçmektedir. Bu yöntem Benoit ve ekibi tarafından geliştirilmiştir (Benoit vd., 1967; Stein ve Powers, 2006). Bir diğer deyişle polimer birimlerinin polimerin kütle merkezine olan uzaklıklarının ortalaması olarak tanımlanan R_g 'yi (dönme yarıçap) ölçmek için referansa ihtiyaç yoktur R_g ışık saçılması ile direkt olarak ölçülmektedir.



Şekil 2.74 Tanecik-çubuk modelinde, kütle merkezi r_G ve gyration yarıçapı R_g .

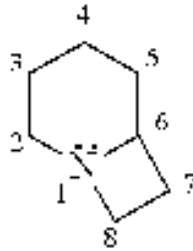
Bir polimerin R_g 'si zayıf çözücülerde iyi çözücülere göre daha küçüktür. Ayrıca, molekül ağırlıkları aynı olsa bile aynı polimerin dallanmış hali dallanmamış haline göre daha büyük R_g 'ye sahiptir. R_h/R_g oranı polimerin çözelti içindeki konformasyonu hakkında bilgi vermektedir.

2.7 Konidin ve Polimerleşmesi

1-azabisiklo[4.2.0]oktan (konidin), ilk kez Lavagnino ve çalışma grubu tarafından (Lavagnino vd., 1960) sentezlenen ve homopolimerizasyonu yapılan, yapısında hetero atom olarak N içeren bisiklik bir maddedir. Halkalardan biri 6 üyeli diğer halka ise 4 üyelidir ve polimerleşme 4 üyeli halka üzerinden katyonik halka açılması polimerleşmesi şeklinde yürümektedir (Schulz vd., 1989).

Konidinin polimerleşmesi katyonik halka açılması reaksiyonu ile olmaktadır. Konidinin polimerleşmesi hakkında literatürde çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (Rasvodovskii vd., 1974; Nekrasov ve Berestetskaya, 1984; Matjaszewski, 1983; 1984; Mühlbach ve Schulz, 1988).

Tez kapsamında biyobozunur yapıda bir homopolimer olan polikonidinin sentezi, bu homopolimerin monomeri olan konidinin (1-azabisiklo[4.2.0]oktane) sentezi ile başlanmıştır.



Şekil 2.75 Konidin (1-azabisiklo[4.2.0]oktan) monomerinin yapısı.

3. MİKRODALGA ENERJİSİ

3.1 Mikrodalganın Tarihçesi

Mikrodalga teknolojisinin gelişimi II. Dünya Savaşı sırasında RADAR cihazlarının sabit frekansta mikrodalga üretmesi için magnetron tasarımı çalışmaları ile başlamıştır Raytheon şirketinden Percy LeBaron Spencer mikrodalga enerjisinin yiyecekleri ısıtabildiğini radar dalgaları ile deney yaparken cebindeki çikolatanın erimesi ile kazara keşfetmiştir. Daha sonraki çalışmalar mikrodalga fırınların, geleneksel fırınlara göre yiyeceklerin iç sıcaklığını daha çabuk arttırdığını göstermiştir. Bu gelişmelerden sonra, 1954 yılında ilk ticari mikrodalga fırın evlerde kullanılmaya başlamıştır (Neas ve Collins, 1988; Mingos ve Baghurst, 1997).

20. yy. sonlarına doğru modifiye edilmiş evsel mikrodalga fırınlar ile laboratuvar da deneysel çalışmalar yapılmaya başlanmıştır. Mikrodalga radyasyonunun organik sentezlere etkisi 1980'lerin ortasına kadar incelenmemiştir. Mikrodalga destekli organik kimya alanında ilk iki makale 1986'da yayınlanmıştır (Gedye vd., 1986; Giguere vd., 1986). Bundan sonra pek çok organik kimyacı mikrodalga enerjisi kullanımının sentetik reaksiyonları üzerine olan yararlı etkilerini kullanmıştır. Mikrodalga destekli organik sentez alanında (MAOS) 3000'den fazla makale yayınlanmıştır ve bu alandaki çalışmalar artarak devam etmektedir. (Kappe ve Stadler, 2005). Mikrodalga enerjisi kullanılarak gerçekleştirilen organik reaksiyonlarla ilgili pek çok makale ve kitap yayınlanmıştır (Lindström vd., 2001; Kappe, 2004; Loupy, 2006).

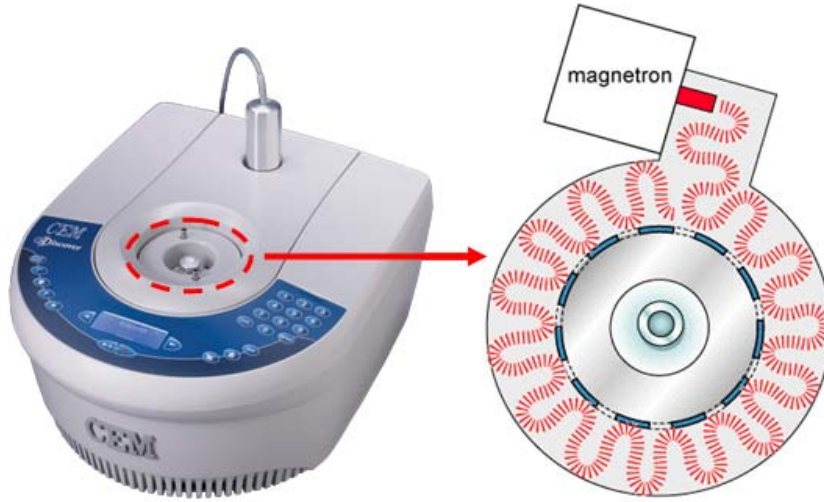
1980'lerde laboratuvarlarda kullanılmak üzere özel tasarlanmış endüstriyel mikrodalga fırınların üretimi başlamıştır. Bu çoklu mod (multi-mode) sistemler sıcaklık ve basınç sensörlü, otomatik güvenlik kontrolüyle donatılmış, sıkılaştırılmış kapı ile kapatılmış korozyona dayanıklı çelik bir kutu şeklindeydi. Bu sistemler büyük ölçekli laboratuvar çalışmaları için idealdi fakat küçük ölçekli sentetik kimya işlemlerinde bazı temel sınırlamaları vardı. Son zamanlarda, tek mod (single-mode) teknoloji ile daha birörnek (uniform) ve yoğunlaştırılmış mikrodalga gücü üretmek mümkün hale gelmiştir. Bu yeni sistemler mikrodalga sentezde yeni kapasiteler sağlayan bilimde çığır açabilecek kilit faktörde özelliklere sahiptir (Hayes, 2002; Kappe ve Dallinger, 2006).

Tekli Mod Cihazlar

Tekli mod cihazının en ayırt edici özelliği, alanların karışımı ile sabit dalga örnekleri oluşturma kabiliyetidir. Bu alanlar aynı genişlikte fakat farklı salınım yönlerine sahiptirler. Bu

ara yüz mikrodalga enerjisinin şiddetinin sıfır olduğu noktalarda düğüm (node) düzenleri oluştururken, mikrodalga enerjisinin büyüklüğünün en yüksek olduğu noktalarda antidüğüm (antinode) düzenleri oluşturur.

Bir tekli mod cihazının tasarımını yöneten faktör magnetrondan numunenin uzaklığıdır. Bu uzaklıkla sabit elektromanyetik dalga örneğinin antidüğümünde (antinode) numunenin yerleştirilmiş olmasını kesinleştirmelidir.



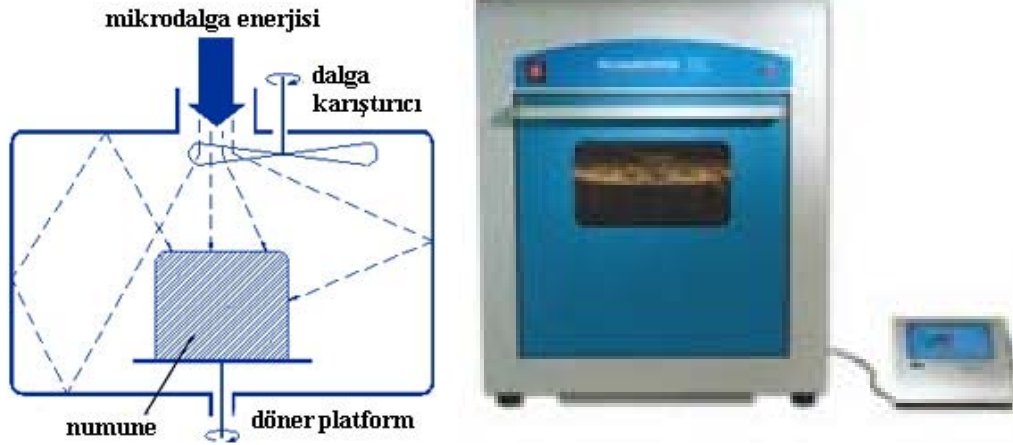
Şekil 3.1 Tekli mod mikrodalga cihazı (Discovery, CEM).

Tekli mod cihazlarının avantajı yüksek ısıtma oranıdır. Bunun nedeni numunenin mikrodalga radyasyon yoğunluğunun en yüksek olduğu noktaya yerleştirilmesidir. Tekli mod cihazın dezavantajlarından biri her seferinde sadece bir numune kabı için uygulama gerçekleştirilmesidir. Bu cihazlar hacmi 0,2–50 ml olan kapalı kap koşulları (250 °C, 20 bar) ve 150 ml ye kadar ki açık kap koşulları için uygundur (Kappe, 2004).

Bu cihazlarda reaksiyon karışımının soğutulması basınçlı hava veya özel bir düzenekle sıvı azot kullanılarak yapılabilir. Bu soğutma sistemi cihazın önemli bir özelliğidir. Sonuç olarak cihaz daha kullanışlı olmaktadır. Tekli mod mikrodalga ısıtma donanımları yaygın olarak küçük miktarlardaki ilaç sentezi, otomasyon ve kombinatoriyal kimya uygulamaları için kullanılmaktadır.

Çoklu Mod Cihazlar

Çoklu mod cihazların en temel özelliği numuneye sabit dalga örneği gönderme uygulamasından kaçınılarak üretilmiş olmalarıdır. Şekil 3.2’de Çoklu mod mikrodalga cihazının içindeki düzenek ve Milestone firmasının MicroSYNTH çoklu mod mikrodalga cihazı ve kumanda paneli gösterilmektedir.



Şekil 3.2 Çoklu mod mikrodalga cihazı (MicroSYNTH, Milestone).

Amaç cihazın içinde olabildiğince mikrodalga radyasyonunu dağıtabilmektir. Ne kadar dağıtılırsa mikrodalga radyasyonu o derece yayılır ve cihazda ısıtma daha etkili gerçekleşir.

Sonuç olarak bir tekli mod mikrodalga cihazının sadece bir reaksiyon kabı içerebilmesinin aksine bir çoklu mod mikrodalga cihazı, aynı reaksiyon karışımlarından pek çoğunu bir arada içerebilir. Bu özellik sayesinde çoklu mod mikrodalga cihazı hacimli ısıtma ve kimyasal analiz yöntemleri için kullanılabilir. Çoklu mod cihazlarının birçoğunda, birkaç litrelik reaksiyon karışımlarının ısıtılması sağlanabildiği gibi bu reaksiyonlar açık ya da kapalı kap koşullarından her hangi birisine de sahip olabilir. Günümüzdeki araştırmalar ile tekli ve çoklu mod cihazlarında kilolarca madde hazırlanmasına imkân sağlayacak koşulların geliştirilmesi için önemli sonuçlar alınmıştır.

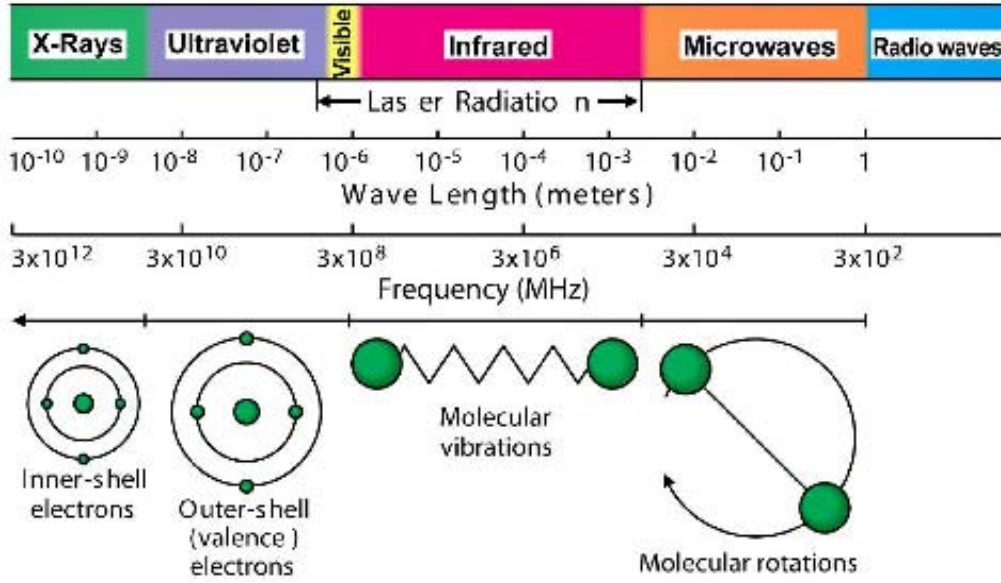
Çoklu mod cihazının en önemli dezavantajı dağıtılan radyasyonla ısıtılan numunelerin verimli şekilde kontrol edilememesidir. Bu nedenle de art arda ısıtılan benzer ya da aynı tip numuneler için eşit ısıtılma koşulları sağlanmayabilir.

3.2 Mikrodalga Teorisi

Mikrodalga radyasyonu görece düşük manyetik spektrumda bir enerji formudur. Bu tip ışıma X-ray, UV, görünür ve infrared enerji spektrumlarının aşağısında ve 300 ile 300,000 megahertz (MHz) frekans aralığındadır. Bu frekans aralığındaki enerjiden moleküler dönme hareketi etkilenir, moleküler yapı etkilenmez. Yani mikrodalga ışıması X-rays, UV ve infraredten bile düşük frekansta olduğundan kimyasal bağları kıramaz, sadece döndürebilir.

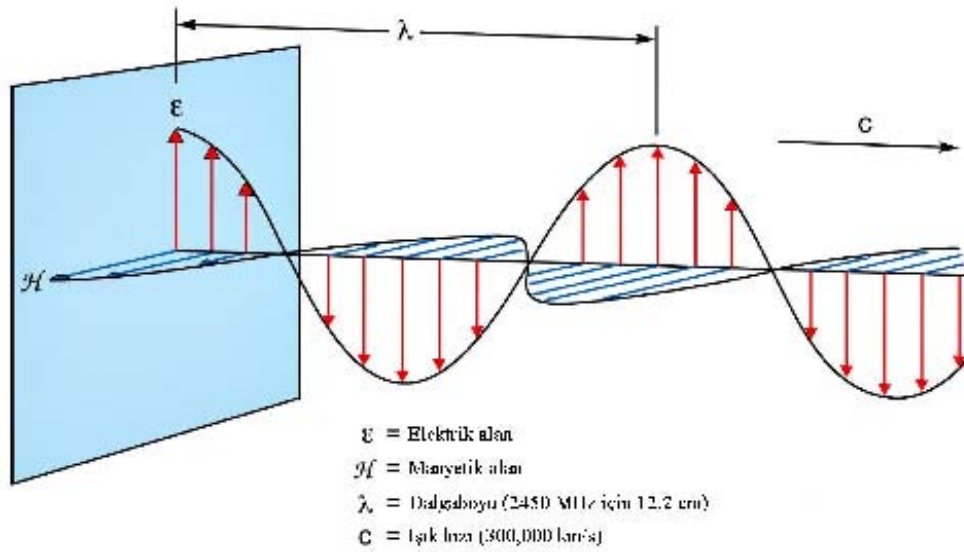
Plank kanununa göre ($E = \frac{hc}{\lambda}$) değerlendirme yapıldığında da görülecektir ki madde–

mikrodalga etkileşmesinde ki enerji değeri yaklaşık 1 J/mol değerindedir ve Brown hareketininkinden daha azdır (Galema, 1997; Loupy, 2006).



Şekil 3.3 Elektromanyetik Spektrum.

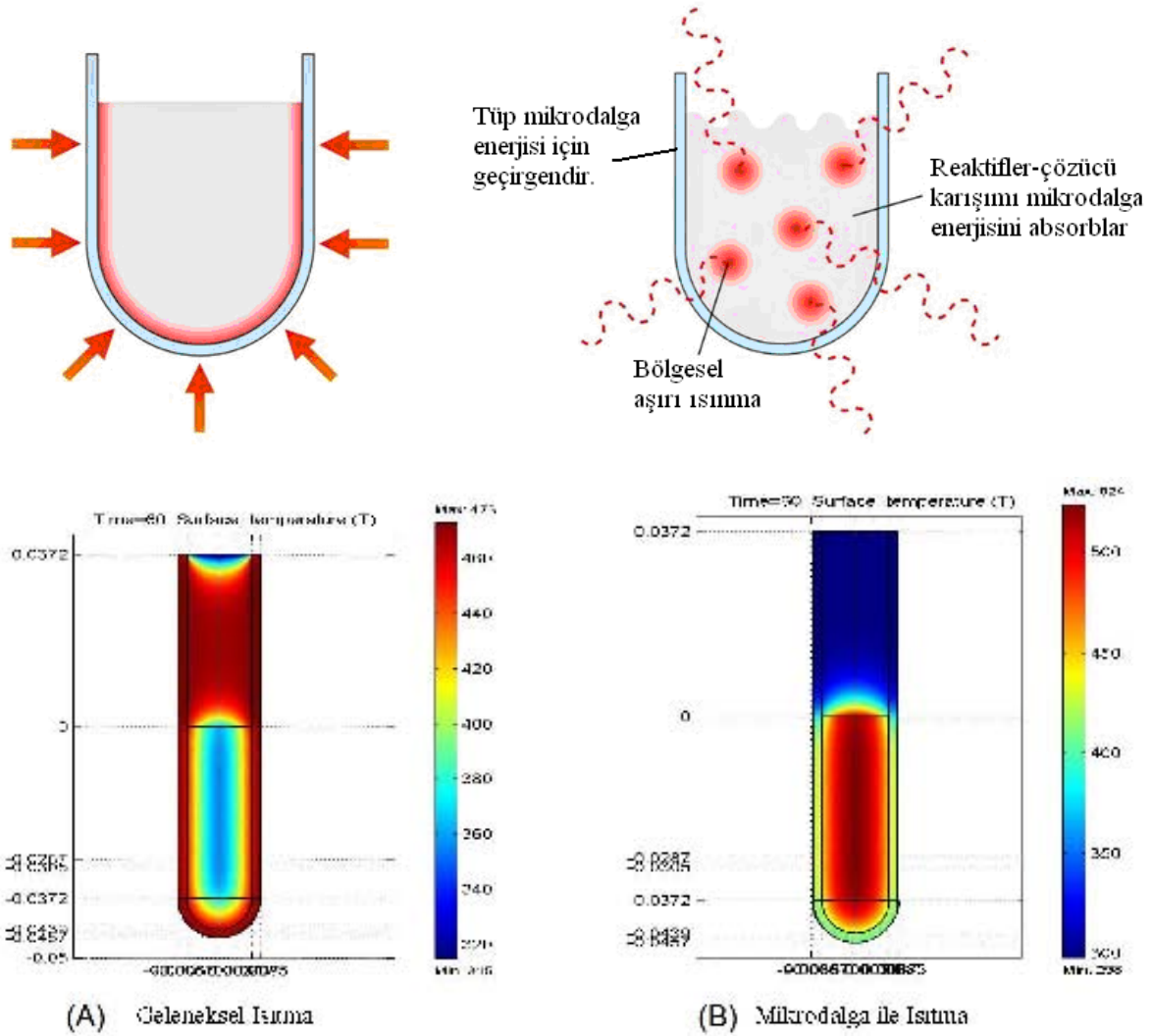
Bir mikrodalga çok hızlı olarak, ışık hızında seyahat eder. Buna karşın, frekansa göre çeşitli boylardadır. Ticari mikrodalga cihazlarında kullanılmak üzere 4 frekansa izin verilmiştir. Bu frekanslar; 915 MHz, 2450 MHz, 5800 MHz ve 22125 MHz'dir. 2450 MHz frekansı 12,2 cm boylundadır. Bu ölçü uygun giriş derinliğindedir ve mikrodalga standart örneğin içinde seyahat edebilir.



Şekil 3.4 Mikrodalga'nın bileşenleri.

Şekil 3.4'te de görüldüğü gibi, bir mikrodalganın iki bileşeni vardır: Bunlar elektrik alan ve

manyetik alandır. Elektrik alan dipol sahibi veya iyonlaşmış durumdaki herhangi bir molekülle etkileşebilir. Çünkü o bir dalgadır ve elektrik alanı sabit şekilde pozitiften negatife ve geriye salınımdadır. Bu salınımlar moleküllerin uygun kutbunu değişen alana doğru ayarlaması (çevirmesi) sayesinde dönmesine yol açarlar. Moleküller hareket ederken, yan ürün olarak ısı veya termal enerji üretirler. Bundan dolayı yaygın olarak mikrodalga ısıtmasına hızlı ısı artışı eşlik eder.



Şekil 3.5 Geleneksel ısıtma & Mikrodalga ile ısıtmanın karşılaştırması.

aktivasyonla ısıtır. Mikrodalga ile ısıtmada 2 kazanım sağlanır. 1) reaksiyon kabı yerine, reaksiyon karışımına daha etkili ısı transferi ve 2) merkezdeki reaksiyon bileşenleri reaksiyon kabının yakınındakilerle birlikte aynı anda ısınırlar (Kappe, 2004). Şekilde görülen bölgesel aşırı ısınmalar karıştırma ile giderilir ve homojen ısınma elde edilir.

Her çözücü ve kimyasal mikrodalga enerjisini farklı absorblar. Her birinin molekülde sahip olduğu polarlık farklıdır. Bu nedenle mikrodalga alanında daha az veya daha çok etkilendirler. Örneğin çok polar bir çözücü, kuvvetli dipole sahip olduğundan daha fazla dönme hareketi yapacaktır. Düşük polariteli bir bileşik daha az mikrodalga enerjisi absorblayacaktır. Maalesef çözücü polaritesi gerçek mikrodalga absorpsiyonunu belirleyen tek faktör değildir, fakat referans olması açısından kolaylık sağlar. Çizelge 3.1’de gösterildiği gibi çoğu organik çözücü absorblayıcı olarak 3 kategoriye ayrılır: düşük, orta ve yüksek absorblayıcılar. Düşük absorblayıcılar genellikle hidrokarbonlardır, yüksek ve orta absorblayıcılar ise alkoller ve su gibi çok polar bileşiklerdir.

Çizelge 3.1 Farklı Çözücülerin Absorpsiyon Dereceleri.

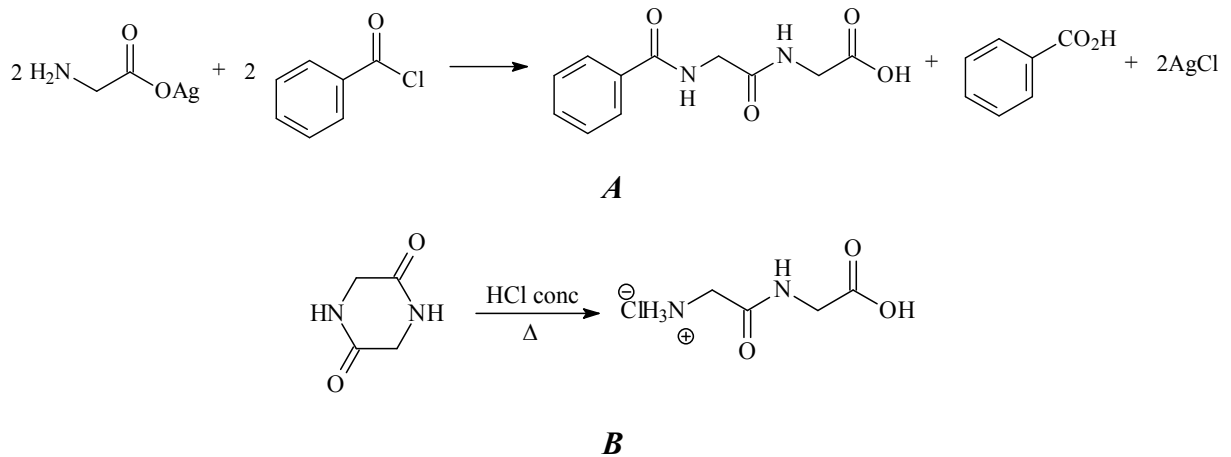
Absorpsiyon Derecesi	Çözücüler
Yüksek	DMSO, EtOH, Propanol, Nitrobenzen, Formik asit, Etilen Glikol
Orta	Su, DMF, NMP, Bütanol, Asetonitril, HMPA, Metil Etil Keton, Aseton ve diğer ketonlar, Nitrometan, o-Diklorbenzen, 1,2 Dikloreten, 2-Metoksietanol, Asetik Asit, Trifluoroasetik Asit
Düşük	Kloroform, Diklormetan, Karbon Tetraklorür, 1,4-Dioksan, THF, Etil Asetat, Piridin, Trietilamin, Toluen, Benzen, Klorobenzen, Ksilen, Pentan, Heksan ve diğer hidrokarbonlar

4. PEPTİD SENTEZİ

Peptid ve proteinlerin yer aldığı biyolojik işlemler hakkında bilgi sahibi olmak, bu işlemlerin kontrolü ve sonuçları bakımından büyük önem taşımaktadır. Peptidler hücre-hücre haberleşmesi, metabolizma, immün cevap ve üreme gibi pek çok biyokimyasal işlemde yer almaktadırlar (Nijkamp ve Parnham, 2005; Wnek ve Bowlin, 2008). Peptidlerin fizyolojik ve biyokimyasal işlemlerdeki çok büyük rolü onların potansiyel ilaç adayı olmalarını arttırıcı etkiye yol açmıştır (Loupy, 2006). Son 10 yılda peptid araştırmalarında büyük artış olmuştur. Peptid araştırmaları alanında yılda ortalama 20.000 makale yayınlanmaktadır (Sewald ve Jakubke, 2002).

4.1 Peptid Sentezi Tarihçesi

Peptid sentezinin tarihçesi 1881 yılında Theodor Curtius'un doktora tezi (Curtius, 1882) sırasında ilk N- ucu korunmuş dipeptid olan benzoylglycylglycine'i glisinin gümüş tuzunu benzoil klorid ile reaksiyona sokarak elde etmesi ile başlar. Yine aynı tarihlerde Emil Fischer'inde (Fischer ve Fourneau, 1901) peptid sentezi çalışmaları vardır (Fields, 1997; David ve Margaret, 2002; Kimmerlin ve Seebach, 2005).



Şekil 4.1 **A** Theodor Curtius'un çalışması, **B** Emil Fischer in çalışması.

Sonraki yıllarda özellikle organik kimyacıların peptid sentezine ilgisi devam etmiştir. 1932 yılında Nα koruma grubu olan Benziloksikarbonil (Z, Cbz) geliştirilmiştir (Bergmann ve Zervas, 1932). 1953 yılında du Vigneaud halkalı bir peptid olan oxytocin hormonunu

sentezlemiştir. (du Vigneaud vd., 1953). Bu çalışması ile du Vigneaud 1955 yılında Nobel Kimya ödülüne layık görülmüştür.

1962 yılına kadar peptid sentezi çözelti fazında gerçekleştirilmekteydi. 1962 yılında Bruce Merrifield Katı fazda peptid sentezi (Solid Phase Peptide Synthesis, SPPS) metodunu geliştirmiş (Merrifield, 1962) ve 1963 yılında yayınlamıştır (Merrifield, 1963). Bu çalışmasıyla 1984 yılında Nobel Kimya ödülüne layık görülmüştür (Merrifield, 1984). Merrifield aynı zamanda ilk yarı otomatik peptid sentez cihazını da geliştiren kişidir (Jakubke ve Sewald, 2008).

Peptid sentezi geleneksel olarak iki kategoride toplanır. Bunlardan biri klasik Çözelti yöntemi, diğeri ise, katı faz yöntemleridir. Klasik metotlar, 20. yy. başından bu yana kullanılmakta olan bir yöntemdir. Son yıllarda çözelti yöntemi ile kısa peptid dizilerinin sentezi ilaç sektöründeki önemini korusa bile SPPS yöntemi ile peptid sentezi (özellikle uzun peptid dizilerinde) yaygınlaşmıştır (Jakubke ve Sewald, 2008).

SPPS'nin prensibi oldukça basittir. Büyüyen zincir (peptid veya başka tür bir oligomer olabilir) stabil ve katı bir parçacık (katı faz, reçine) üzerine tutturulur. Ve sentez süresi boyunca bu reçine üzerinde bağlı kalır. Sentez sırasında diğer çözünebilen kimyasallar filtrasyon ve yıkama ile uzaklaştırılırlar. En son aşamada istenilen ürün katı fazdan ayrılır. Saflaştırma ve karakterizasyon işlemleri istenilen ürünün serbest çözeltisi içinde devam ettirilir (Atherton ve Sheppard, 1989).

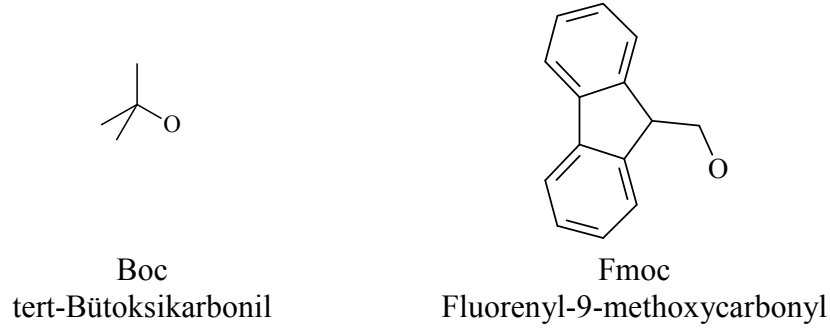
SPPS'de katı faz olarak genellikle yaklaşık 100-200 mesh (150-75 μ m) boyutlarında polistiren reçine kullanılmakta ve peptid zinciri bu reçine üzerinde amino asitlerin birbirlerine eklenmesi ile uzamaktadır. Yine bu metotta amino asit yan zincirleri (R) ve amino asitlerin N- uçları koruma grupları ile korunmaktadır. Koruma grupları ile hem amino asidin yan zincirleri birbirleri ile reaksiyondan korunur hemde dizinin doğru olması (yani her amino asit eklenmesinde dizinin sadece 1 amino asit uzaması sağlanır).

Koruma gruplarının peptid sentezinde kullanılması büyük bir gelişmeye neden olmuştur. İlk geliştirilen ve bugün bile yaygın olarak kullanılan koruma grubu Benziloksikarbonil (veya Cbz)'dir (Bergmann ve Zervas, 1932). Cbz, geliştiricisi olan Leonidas Zervas'ın adına ithafen Z olarak da adlandırılır.

Merrifield'in geliştirdiği metotta her amino asit eklenmesinde N- ucundaki ($N\alpha$) koruma grubu olan Boc'i, kaldırmak için TFA kullanmak gerekmektedir (McKay ve Albertson, 1957). TFA çok güçlü bir kimyasaldır ve havadaki buharları, sağlık için tehlikeli bir kimyasal olan HF'i oluşturur (Dikshith, 2008).

Bu zorluklar daha kolay uzaklaştırılabilen bir $N\alpha$ koruma grubu olan Fmoc (9-

Fluorenylmethoxycarbonyl) koruma grubunun peptid sentezinde kullanılması ile bir ölçüde giderilmiştir (Carpino ve Han, 1972). Fmoc koruma grubu baza karşı duyarlı olduğundan piperidin, piperazin gibi bazlarla kolayca uzaklaştırılabilir.

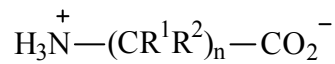


Şekil 4.2 Boc ve Fmoc N α koruma grupları.

4.2 Amino asitlerin Adlandırılması

Peptidler amino asitlerin kondenzasyonla birleşmesi ile oluştuklarından, amino asitlerin adlandırılması ve özelliklerinin bilinmesi peptidler hakkında bilgi sahibi olmak açısından önemlidir.

“Amino asit” terimi genellikle *aminoalkanoik asit* ifadesi yerine kullanılır ve Şekil 4.3’teki gibi gösterilir. Bu gösterimde n=1 için α -amino asitler ve n=2 için β -amino asitler elde edilir. Şekil 4.3’te R¹ ve R², amino asit yapısında bulunabilen yan grupları temsil etmektedir.



Şekil 4.3 Amino asitlerin genel formül gösterimi.

Amino asitlerin ve peptidlerin adlandırılması 1983’te Uluslararası Biyokimya Birliği (International Union of Biochemistry) tarafından kabul edilen adlandırma ve semboller kuralları çerçevesinde yapılır. (IUPAC-IUB, 1984). Genelde amino asitler yaygın isimleri ile adlandırılırlar. Amino asitler Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1’de de görüldüğü gibi aminoasitlerin adlandırılmasında 3 harfli ve 1 harfli kısaltmalar kullanılmaktadır. Bu kısaltmalar sayesinde uzun peptid / protein dizileri karışıklıktan uzak bir şekilde yazılabilmektedir.

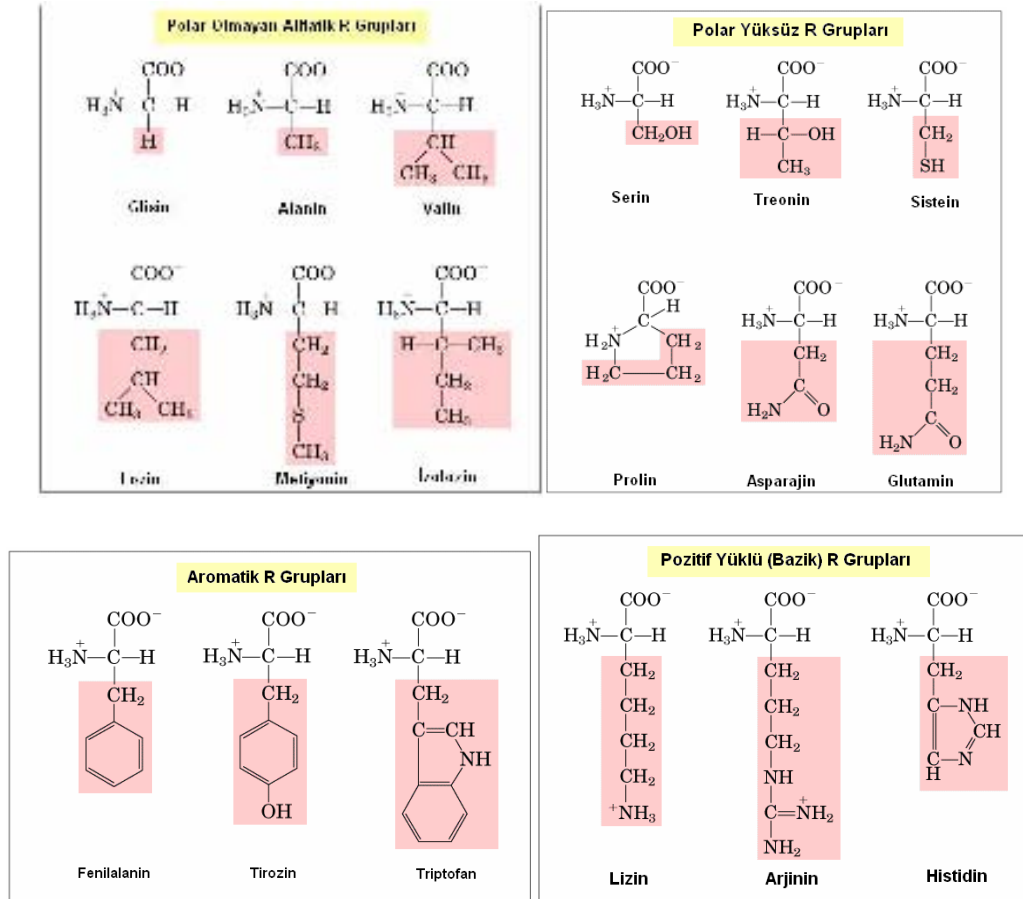
Çizelge 4.1 Amino asitlerin sistematik isimleri ve kısaltmaları.

Genel İsim	Üç Harf	Bir Harf	Sistematik İsim
Alanine	Ala	A	2-Aminopropanoic acid
Arginine	Arg	R	2-Amino-5-guanidinopentanoic acid
Asparagine	Asn	N	2-Amino-3-carbamoylpropanoic acid
Aspartic acid	Asp	D	2-Aminobutanedioic acid
Cysteine	Cys	C	2-Amino-3-mercaptopropanoic acid
Glutamine	Gln	Q	2-Amino-4-carbamoylbutanoic acid
Glutamic acid	Glu	E	2-Aminopentanedioic acid
Glycine	Gly	G	Aminoethanoic acid
Histidine	His	H	2-Amino-3-(1H-imidazol-4-yl)propanoic acid
Isoleucine	Ile	I	2-Amino-3-methylpentanoic acid
Leucine	Leu	L	2-Amino-4-methylpentanoic acid
Lysine	Lys	K	2,6-Diaminohexanoic acid
Methionine	Met	M	2-Amino-4-(methylthio)butanoic acid
Phenylalanine	Phe	F	2-Amino-3-phenylpropanoic acid
Proline	Pro	P	Pyrrolidine-2-carboxylic acid
Serine	Ser	S	2-Amino-3-hydroxypropanoic acid
Threonine	Thr	T	2-Amino-3-hydroxybutanoic acid
Tryptophan	Trp	W	2-Amino-3-(1H-indol-3-yl)propanoic acid
Tyrosine	Tyr	Y	2-Amino-3-(4-hydroxyphenyl)propanoic acid
Valine	Val	V	2-Amino-3-methylbutanoic acid
Asp veya Asn	Asx	B	
Glu veya Gln	Glx	Z	
Ile veya Leu	Xle	J	
Belirsiz	Xaa	X	

Doğada 700'den fazla amino asit tanımlanmış olup bunların çoğu α -amino asittir. Bunların tamamına yakını serbest halde ya da büyük moleküllere bağlı olarak (peptid veya proteinlerin bir bileşeni olarak ya da başka türlü yapıların parçası şeklinde), bakteri, fungi ve alglerden sağlanır.

20 amino asit (gerçekte, 19 α -amino asit ve 1 α -imino asit) genlerin kontrolünde protein sentezi için canlı hücrelerde kullanılır. Bu 20 amino asit bütün yaşam formlarında peptid ve proteinlerin en temel yapı elemanları oldukları için çok özel bir yere sahiptirler.

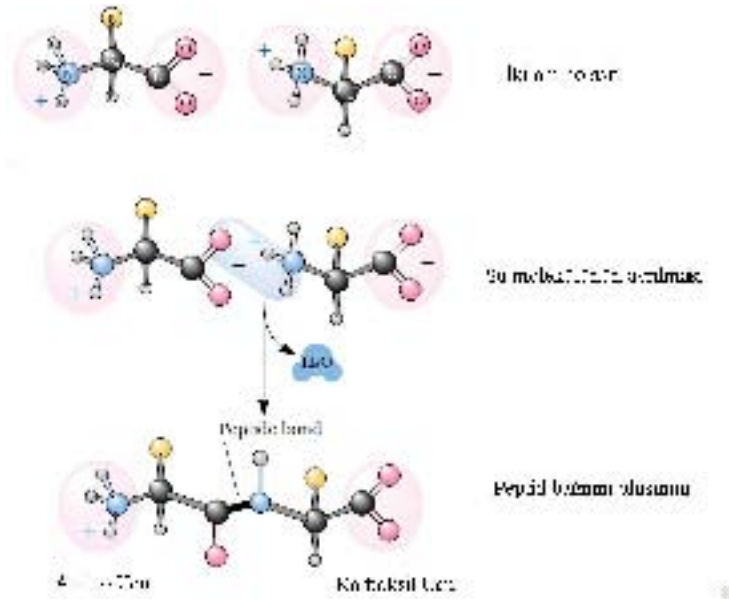
“Kodlanmış amino asit” terimi, bu 20 amino asit için “protein amino asidi” yada “birincil protein amino asidi” terimlerinden daha iyi ve çoğunlukla bu terim kullanılır.



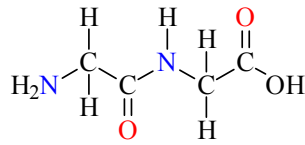
Şekil 4.4 Amino asitlerin toplu halde şematik gösterimi.

4.3 Peptid tanımı ve adlandırılması

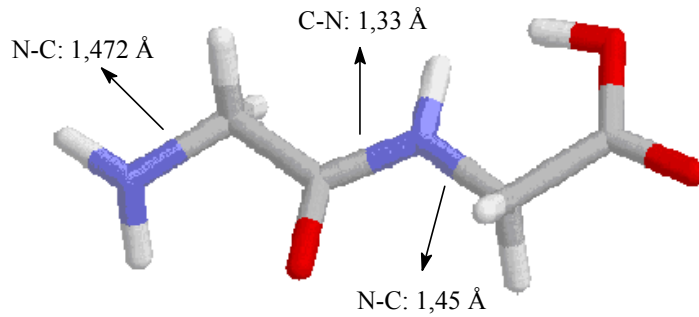
Polimer kimyasının dili ile polipeptidler 2 veya daha fazla farklı amino asidin kopolimeri veya düzensiz poli(amid)ler'dir. Genel olarak $\text{H}-[\text{NH}-\text{CR}_1\text{R}_2-\text{CO}]_m\text{OH}$ şeklinde gösterilirler (Barrett ve Elmore, 2004). Peptid kelimesini ilk kez Emil Fischer kullanmıştır (Nispen, 1987). Amino asitler arasındaki peptid bağları amid bağından oluşur (Şekil 3.5'te $\text{C}=\text{O}$ ile N arasındaki bağ). Peptid bağı, karbonil ve amin fonksiyonel grupları arasında olduğundan amid bağıdır. Peptid bağı oluşumunda ortamdaki 1 mol su ayrılır (Şekil 4.5) (Pauling, 1950; Garret ve Grisham, 1996).



Şekil 4.5 Peptid bağının oluşumu.



Glisilglisin dipeptidi



Şekil 4.6 Peptid bağının ve bağ uzunluklarının Glisilglisin dipeptidinde gösterimi

Peptid bağı rezonanstan dolayı çift bağ karakteri taşır ve bağ uzunluğu (C-N 1,33 Å), sp^3 hibritleşmiş karbonla azotun yaptığı bağdan (1,45 Å) daha kısadır. Peptid bağının çift bağ karakterinden dolayı bu bağa katılan atomlar aynı düzlemdedirler.

Peptidlerin adlandırılmasında da bazı temel kurallar vardır. Amino asitlerin peptid bağı ile bir araya gelmesi ile peptidler oluşur. İki aminoasidin (aa) bir araya gelmesi ile dipeptid, üç aa'ın bir araya gelmesi ile tripeptid yapıları oluşur. Şekil 4.6 'da bir dipeptid olan glisilglisin gösterilmektedir. Oluşan bu peptidlerin adlandırılması da standart hale getirilmelidir. Bu standarda göre peptid dizisi yazılırken dizinin amino ucu (N- ucu) SOLDA ve karboksil ucu

(C- ucu) SAĞDA olacak şekilde yazılır.



Şekil 4.7 Bir peptid dizisinde N- ve C- uçlarının gösterimi.

4.4 Amino asitlerin ve peptidlerin fizikokimyasal özellikleri

Amino asitlerin fizikokimyasal özellikleri aşağıda sıralanan maddelere göre belirlenir

- (a) 0-14 pH aralığında bulunan gruplara (amino, karboksil, tiol, fenolik hidroksi, guanidino ve amidazole),
- (b) hidrofobik grupların (alkil, aril ve indol) varlığı veya yokluğuna,
- (c) nötral hidrofilik grupların (alifatik hidroksi ve yan zincirdeki amid grupları) varlığı veya yokluğuna bağlıdır.

Peptidlerin özellikleri de aynı faktörlere bağlıdır. Fakat hatırlanmalıdır ki n amino asit içeren bir düz (lineer) peptidde her durumda 1 adet amino ucu ve 1 adet karboksil ucu bulunmaktadır.

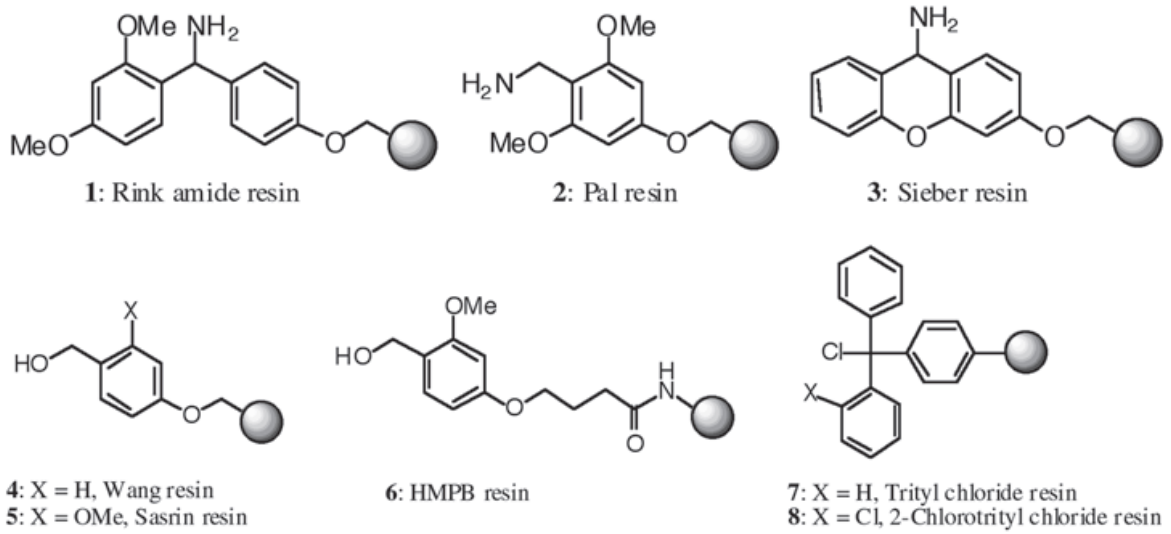
4.5 Peptid Sentezinin Mekanizması

Katı halde peptid sentezini gerçekleştirebilmek için katı hal olan reçineye ihtiyaç vardır. Reçine, üzerinde ilk amino asidin bağlanabileceği aktif gruplar taşıyan küresel formda bir polimer yumağıdır. Genelde bu kürenin çapı 100-200 mesh (150-75 µm) ölçüsü civarındadır. Reçine üzerindeki aktif grupların sayısı (substitution) sentezlenecek peptidin teorik verimini hesaplamada ve bu sentez için gerekli kimyasalların (korumanın kaldırılması, aktivasyon, bağlanma) miktarını belirlemede önemlidir.

SPPS de kullanılan katı faz, kimyasal olarak inert, mekanik olarak sağlam, kullanılan solventlerde hiçbir şekilde çözünmeyen ve kolayca filtre edilebilir olmalıdır. Kuru resin tanecikleri peptid sentezinde kullanılan solventlerle (DCM, DMF, vb.) 5–6 kat büyüklüklerine kadar şişme özelliğine sahip olmalıdırlar.

Reçine materyaline ilk amino asidin bağlanabilmesi için kimyasal fonksiyonel grup içeren

linker adı verilen kimyasal yapılar bağlanır.

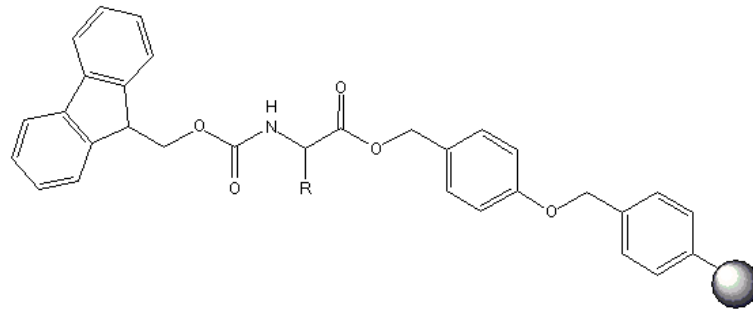


Şekil 4.8 Peptid sentezinde kullanılan reçine türleri.

Şekil 4.8’de 1, 2, 3 numaralı reçineler amid türü sentezde, 4 (Wang, 1973), 5, 6, 7, 8 numaralı reçineler ise asit türü sentezde kullanılan reçinelerdir (Howl, 2005). Amid türü sentezde kırma (cleavage) işleminden sonra C- ucunda $-NH_2$ grubu bulunur. Asit türü sentezde ise kırma (cleavage) işleminden sonra C- ucunda $-COOH$ grubu bulunur.

Bu reçineler ticari olarak temin edilebilmektedir. Sentezde kullanılan reçineler yüklenmiş (pre-loaded) ve yüklenmemiş (unloaded) olabilirler. Yükleme tabiri reçine üzerine ilk amino asidin bağlanması için kullanılır.

Yüklenmiş reçine kullanmak daha avantajlıdır. Çünkü yüklenmiş reçinelerde dizinin ilk amino asidi reçine üzerinde bulunmakta ve SPPS ile bu amino asidi eklemek mümkün olmamaktadır. Reçine üzerine ilk amino asidin eklenmesi için özel prosedürler uygulanmaktadır (Atherton ve Sheppard, 1989).

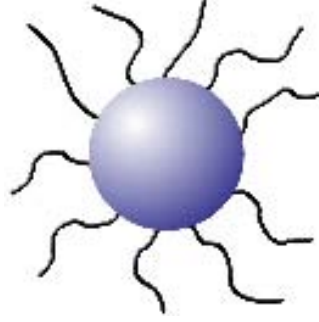


Şekil 4.9 Fmoc korumalı Ala amino asidi yüklenmiş Wang Reçinesi.

Yüklü reçinelerde kendi aralarında farklılık gösterirler.

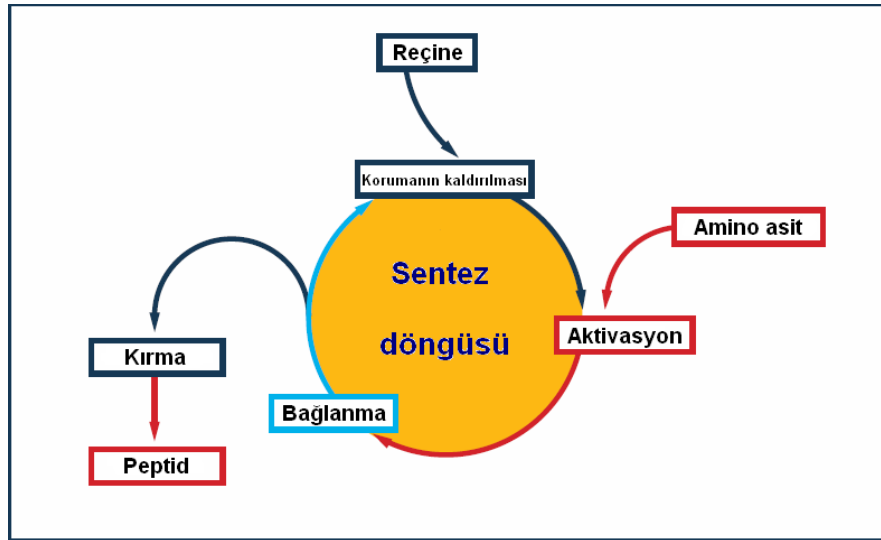
- a) Az yüklü (Lower loaded)
- b) Çok yüklü (Higher loaded)

Yüklemeden kaynaklanan bu özellik sentez için çok önemlidir. Çünkü çok yüklü reçine kullanıldığında reçine üzerinde büyüyen peptid dizilerinin agregasyonu (özellikle uzun ve hidrofobik etkileşime yatkın) artacak ve bu istenmeyen bir durum olan eksik amino asit eklenmesine (deletion) yol açacaktır. Bu nedenle genellikle az yüklü reçineler tercih edilirler.

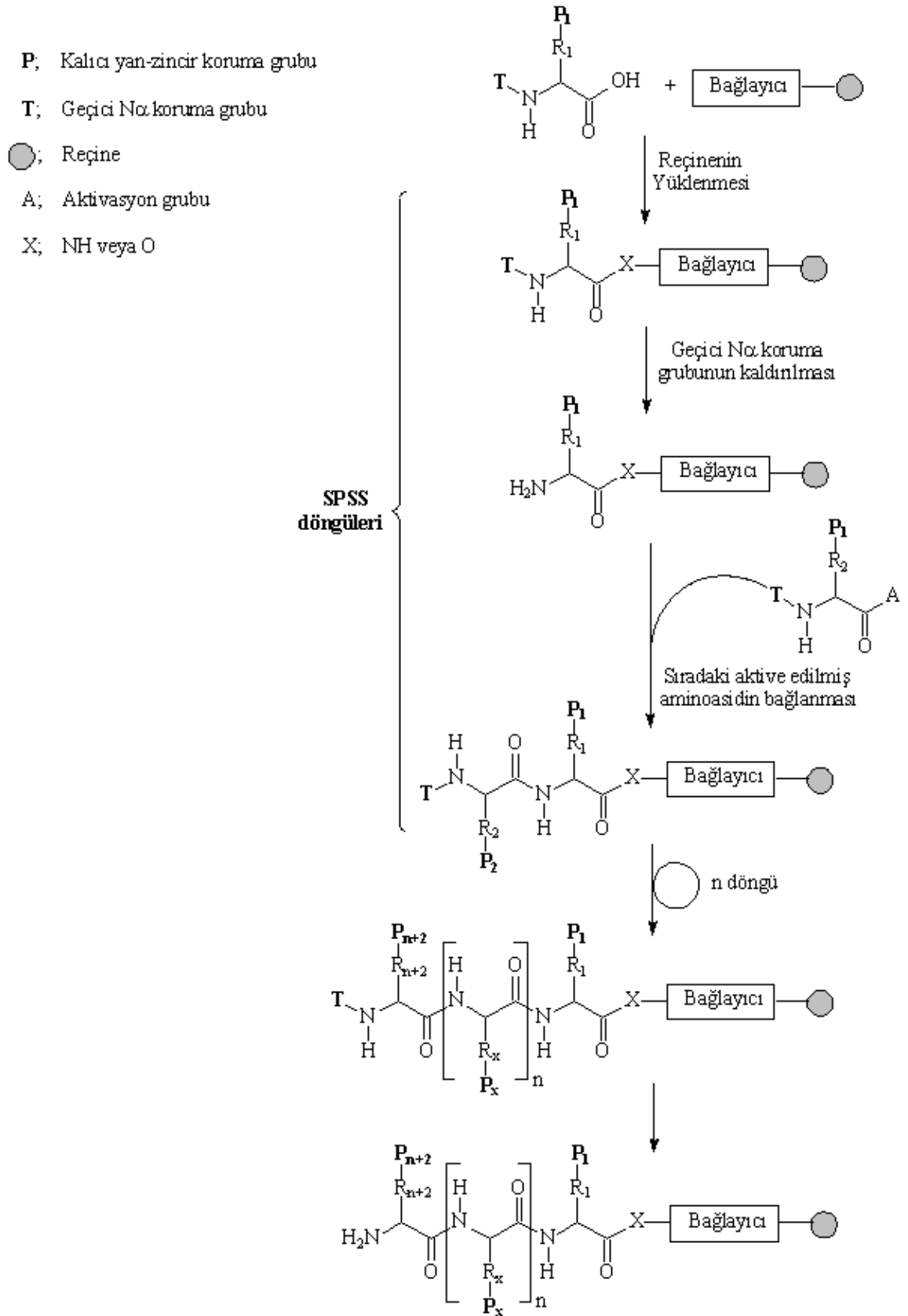


Şekil 4.10 Sentez sırasında reçine üzerinde peptid zincirinin durumu.

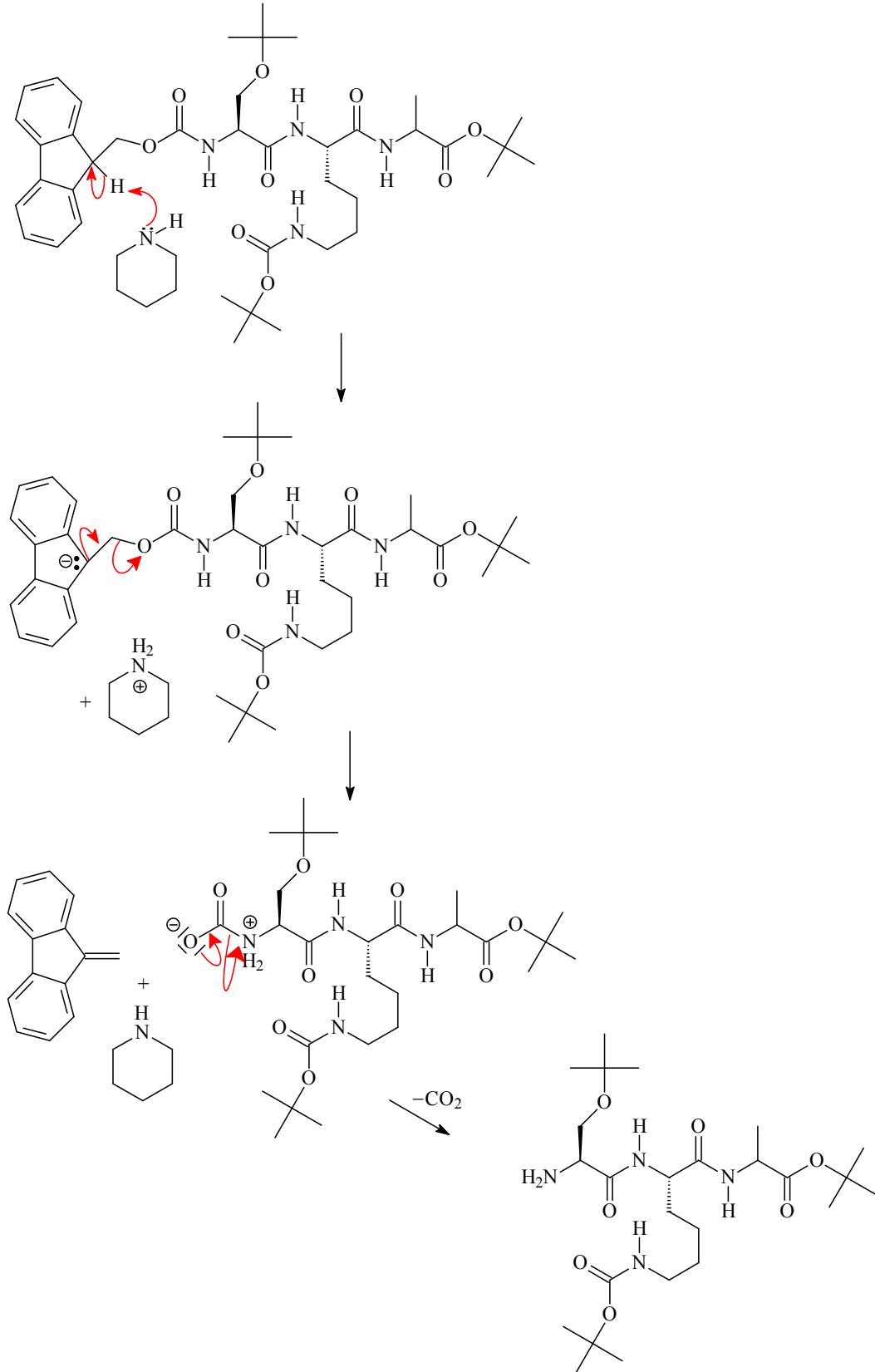
Katı halde peptid sentezi temelde 3 aşamadan oluşur. Korumanın kaldırılması (Deprotection), karboksil grubunun aktive edilmesi (Activation), peptid bağının oluşması (Coupling). Bu işlemler bir döngü halinde istenilen dizi elde edilene kadar devam eder. Son adımda, en son eklenmiş aminoasidin koruma grubu kaldırılarak (final deprotection) N- ucu serbest bırakılabilir. Bu işlem yapılmazsa peptid dizisinin N- ucu koruma grubu kaldırılana kadar inaktif olarak kalır. Son işlem olarak asetilasyon (Capping) da yapılabilir. Asetilasyonla peptidin N- ucu asetillenmiş ve korunmuş olur.



Şekil 4.11 Peptid sentezi döngüsü.



Şekil 4.12 SPPS'nin akım şeması (Howl, 2005).

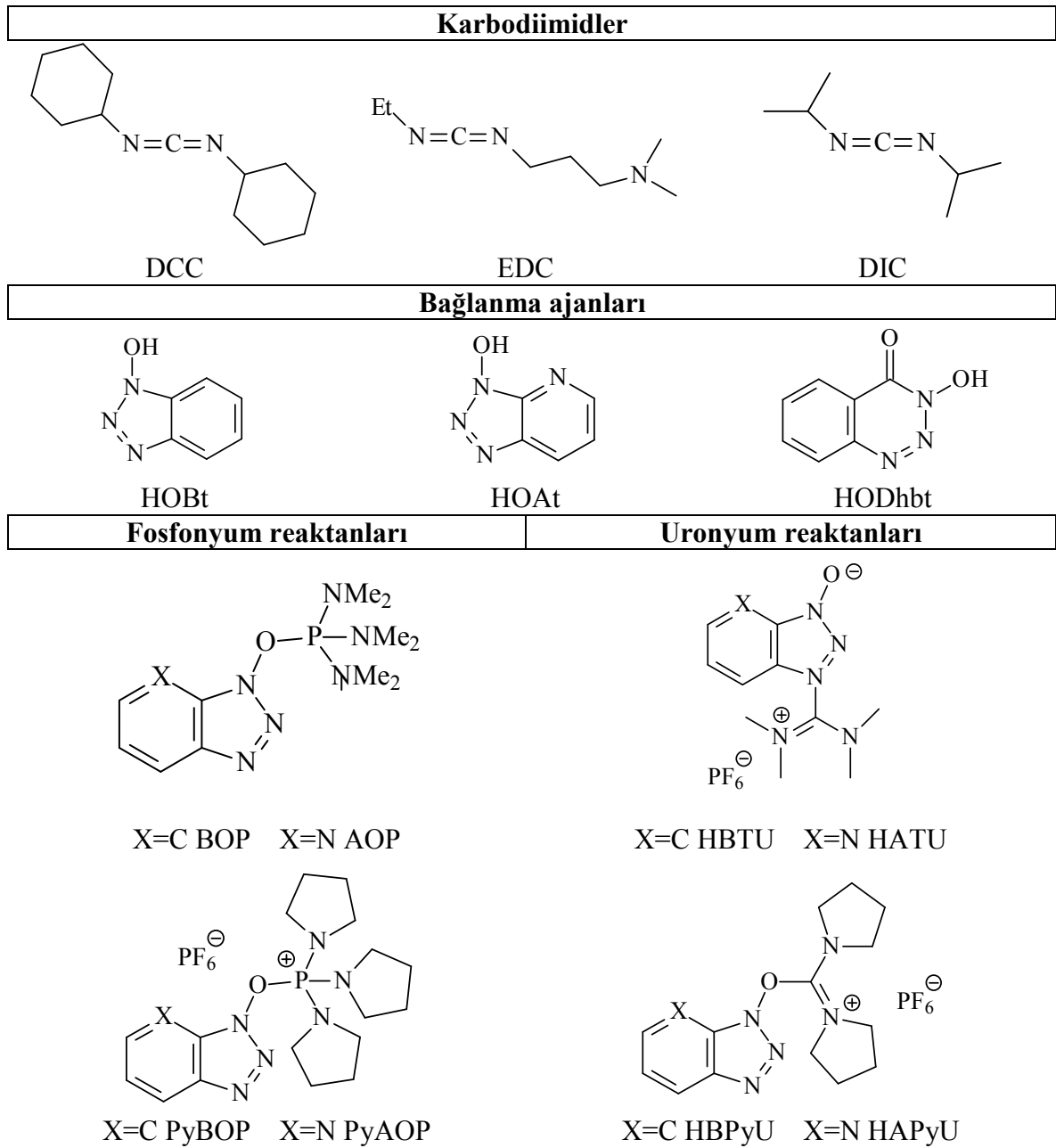


Şekil 4.13 Fmoc grubunun piperidinle eliminasyon mekanizması.

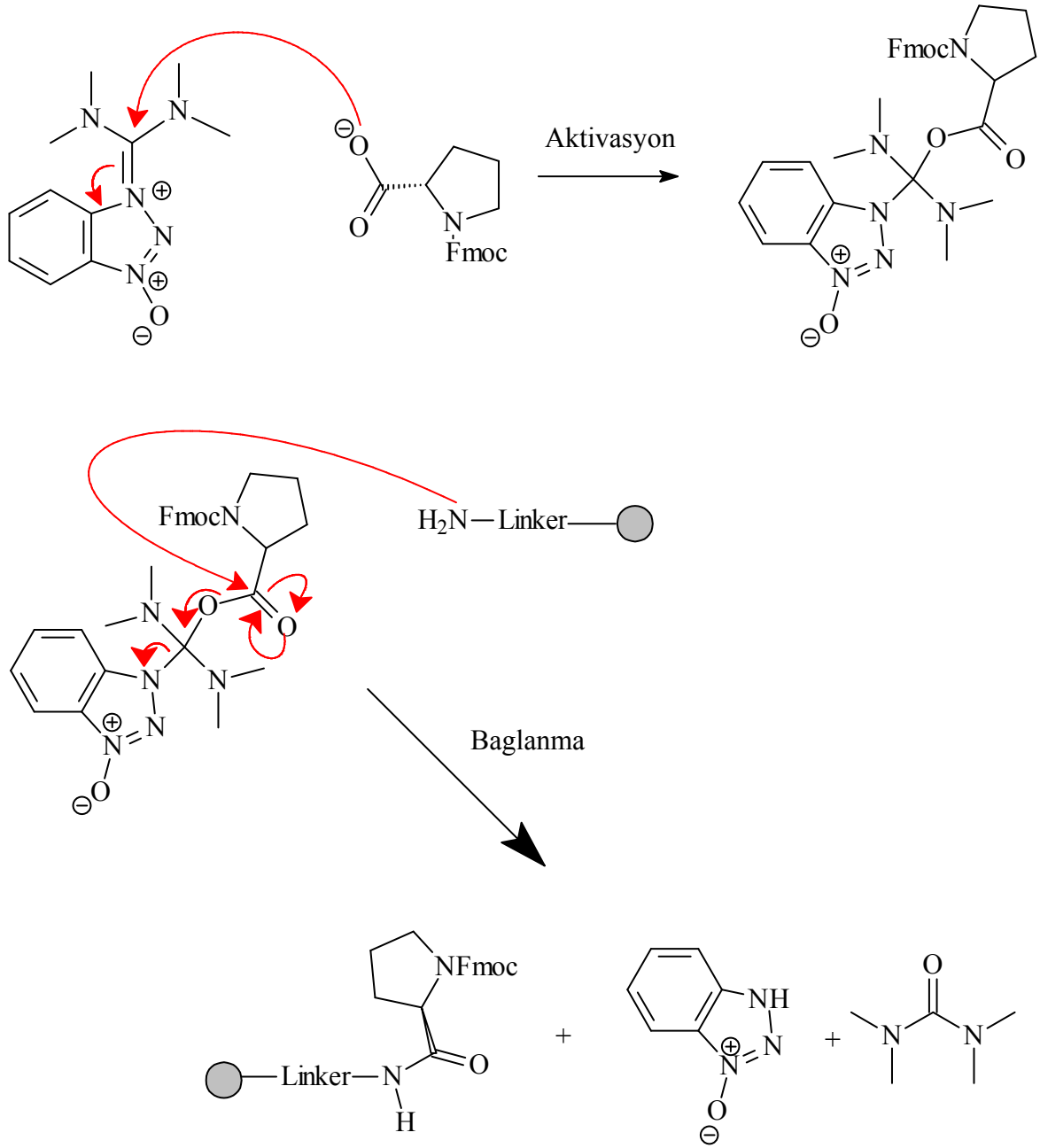
Dizideki peptidler sırasıyla; serin (ter-bütil eter korumalı), lizin (ϵ -O tert-bütil carbamate

korumalı), glisin (tert-bütil eter korumalı)'dir. Fmoc grubunun, yan zincir korumalı bir üçlü peptidin N- ucundan, E1_{cb} reaksiyonuna göre eliminasyonu Şekil 4.13'te gösterildiği gibidir (Bruckner, 2002). E1_{cb} reaksiyonu 2 aşamalıdır ve ara ürünü bir karbanyondur (Smith ve March, 2001).

Peptid sentezinin başarısı, geçici (Fmoc, t-Boc) ve kalıcı (yan zincir koruma grupları) koruma gruplarının düzenlenmesi ile peptid zincirinin uzaması için seçilen aktivatörlerin etkinliğine bağlıdır. Zaman içinde yeni aktivatörlerin geliştirilmesi ile aktivatör etkinliği artırılmıştır (Albericio vd., 1998).

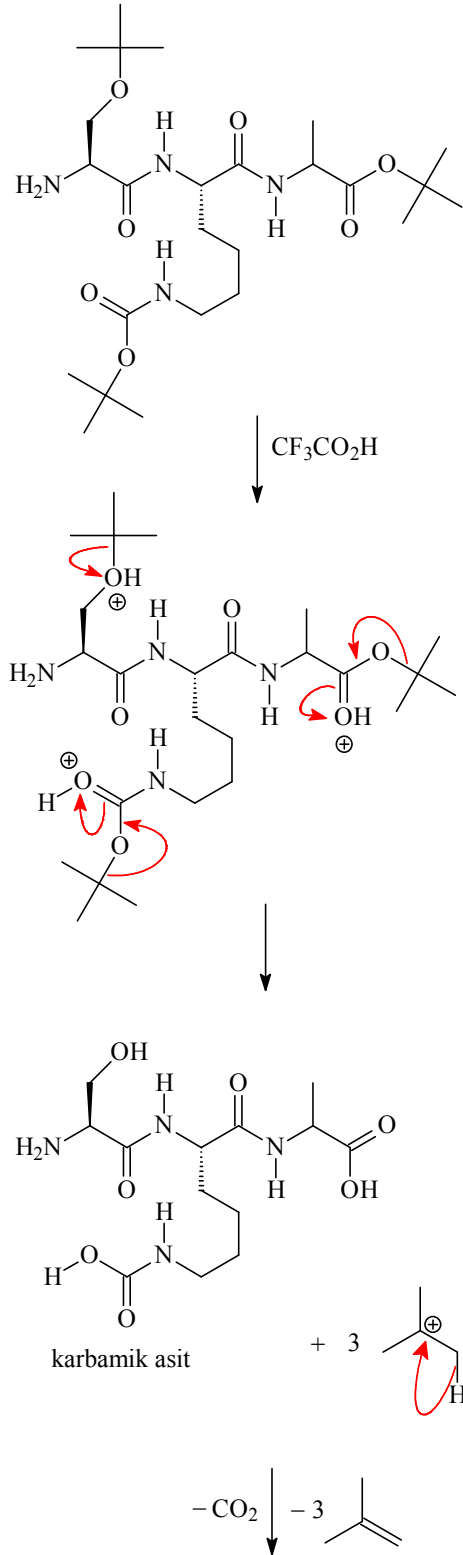


Şekil 4.14 Peptid sentezinde kullanılan aktivatörler.



Şekil 4.15 Peptid sentezinin aktivasyon ve bağlanma aşamalarının mekanizması.

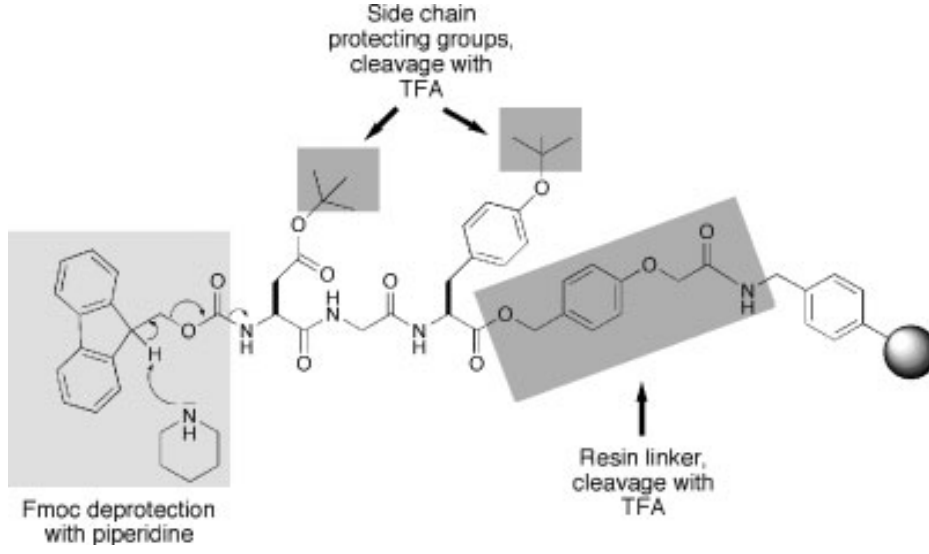
Karbonil grubunun aktivasyonu karbodiimidler ile yapılabildiği gibi yeni geliştirilen Uronyum ve Fosfonyum türü aktivatörlerle de yapılabilir. Günümüzde bu yeni türdeki aktivatörler, rasemizasyona daha az yol açtıkları için tercih edilmektedirler (Sewald ve Jakubke, 2002). Şekil 4.15'te HBTU ile yapılan aktivasyon ve bağlanma reaksiyonları gösterilmektedir.



Şekil 4.16 Peptid sentezinde yan zincir koruma gruplarının TFA ile eliminasyonunun mekanizması.

Karbamik asitten bir mol CO_2 ayrılması ile peptid molekülü son halini alır. Reaksiyon E1 reaksiyonudur ve karbokatyon üzerinden yürür (Bruckner, 2002). Şekil 4.16'da C- ucundaki

amino asit olan glisin tersiyer bütıl eter korumalı olarak gösterilmiştir. Daha geniş kapsamda düşünürsek TFA ile kırma “cleavage” işlemi ile peptid dizisi reçineden de ayrılır.



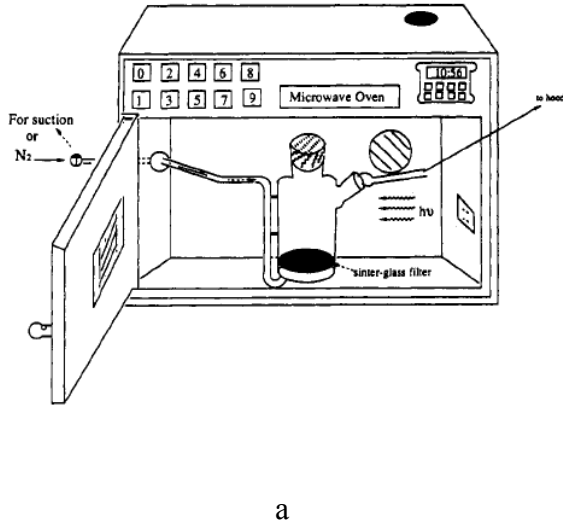
Şekil 4.17 Peptid sentezinde geçici ve kalıcı koruma gruplarının eliminasyonu (Kimmerlin ve Seebach, 2005).

Şekil 4.17'de gösterildiği gibi bağlayıcının peptide bağlandığı kısım kimyasal olarak yan zincir koruma grubunun ki ile aynıdır ve TFA etkisi ile peptid reçineden bu yolla ayrılır.

Kırma işlemi sırasında meydana gelen katyonik ürünlerin, yan zincirleri elektronca zengin Trp, Tyr ve Met gibi amino asitlere atak etmesini engellemek için “scavenger” adı verilen EDT, fenol, thioanisol vb. gibi ek maddeler kırma kokteyli ortamına eklenir. Bu maddeler genelde yumuşak (soft) nükleofildirler (Jones, 1997). Scavenger’ların eklenmesinde dizide yer alan amino asitler dikkate alınmalıdır. Örneğin dizide Trp amino asidi olduğunda EDT eklemek Trp’yi oksidasyona karşı büyük ölçüde koruyacaktır (Grant, 1992).

4.6 Peptid Sentezinde Mikrodalga Kullanımı

Peptid sentezinde mikrodalga kullanımı ilk kez 1992 yılında yapılan bir çalışma ile olmuştur. (Yu vd., 1992). Bu çalışmada ev tipi bir mikrodalga fırın çeşitli modifikasyonlarla sentez yapılabilir duruma dönüştürülmüştür. Şekil 4.18’de ilk mikrodalga destekli katı-faz peptid sentezinin yapıldığı ev tipi mikrodalga fırın (Yu vd., 1992) ve günümüzde kullanılan otomatik mikrodalga destekli peptid sentezleyicilerden biri (Libery, CEM) gösterilmiştir.



a

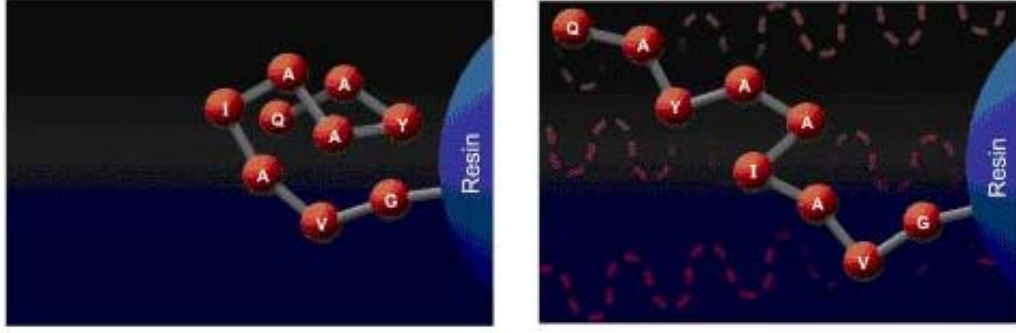


b

Şekil 4.18 a) Mikrodalga fırın ve özel yapım katı-faz reaksiyon kabı (Yu vd., 1992).
b) Otomatik mikrodalga (tekli mod) destekli peptid sentezleyici (Libery, CEM).

Bilindiği gibi mikrodalga fırınlar çoklu mod özelliğindedir. Bu tip çoklu mod cihazlarda sıcak noktalar oluşabildiğinden homojen bir enerji dağılımı söz konusu olamaz. Fakat tekli mod cihazlar mikrodalga enerjisini bir noktaya yönelttiğinden mikrodalga iletimi yönünden daha etkindirler.

Peptid sentezinde sürekli olarak mikrodalga enerjisi verilmemekte, sadece reaksiyon sırasında belirlenen sürelerde veya belirlenen sıcaklığa ulaşılana kadar verilmektedir. Mikrodalga'nın dipol etkileşimlerden kaynaklanan titreştirme özelliği peptid sentezinde önemli etkinliğe sahiptir. Mikrodalga'nın titreştirme özelliği sayesinde reçine üzerinde büyüyen peptid zincirinde meydana gelebilecek bir problem olan zincirlerin girişimi "agregasyon" engellenmiş olur. Sıklıkla uzun peptid dizilerinde karşılaşılan zincir girişimi dizide, eksik amino asit eklenmesi "deletion" gibi hasarlara yol açar. Sentez sırasında eksik amino asit eklenmesi sonuç ürünü direkt olarak etkiler.

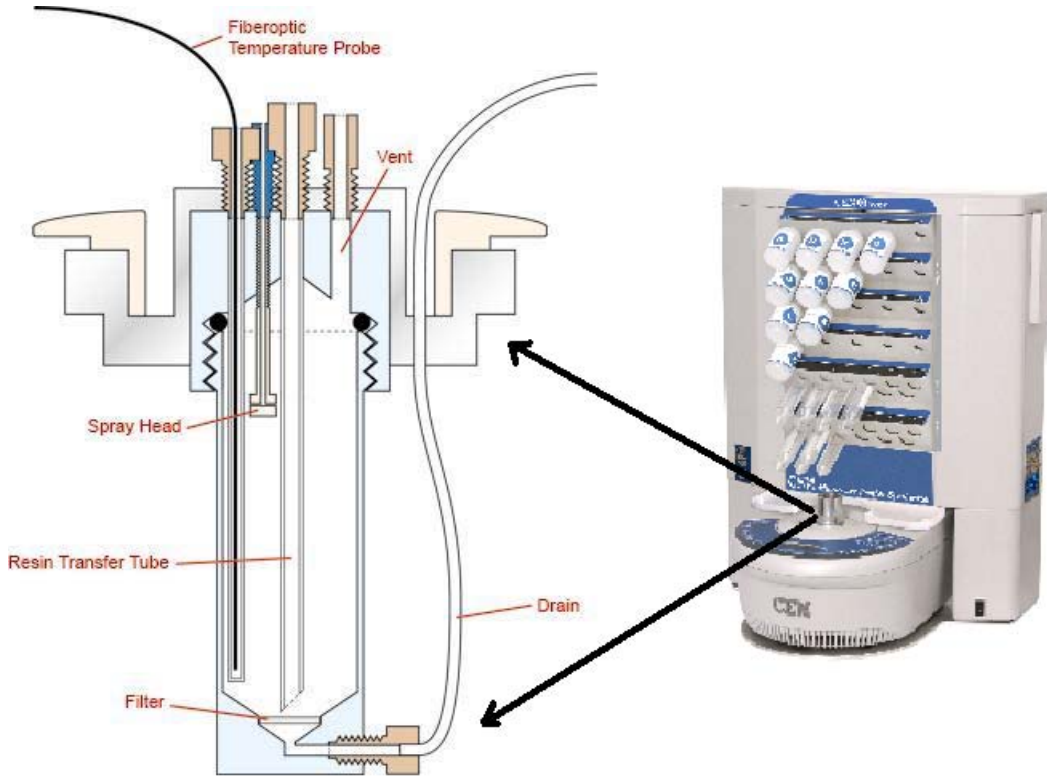


a) mikrodalga uygulanmazken

b) mikrodalga uygulanırken

Şekil 4.19 Mikrodalgaın reçine üzerindeki peptid zincirine etkisi.

Liberty mikrodalga destekli peptid sentezleyicide peptid sentezi Şekil 4.20’de gösterilen reaksiyon kabında gerçekleştirilir. Reaksiyon kabı Liberty sisteminin bir parçası olan Discovery mikrodalga ünitesinin ortasında yer alır. Sistemde her türlü ekleme, filtrasyon vb. işlemler inert gazla yapılır.



Şekil 4.20 Liberty mikrodalga peptid sentezleyicide reaksiyon kabı.

Reaksiyon kabına reçine hariç her tür kimyasal “spray head” kısmından inert gaz yardımıyla otomatik olarak eklenir. Reçine uygun şekilde şişirildikten sonra bir falkon tüp içinde cihaza yerleştirilir. Reçinenin reaksiyon kabına transferi “resin transfer tube” yolu ile yapılır. Sentez

sırasında karıştırma sağlamak amacıyla reaksiyon kabına “drain” kısmından kabarcıklar verilir. Sentezde mikrodalga sürekli uygulanmamakta belirli sıcaklık aralığında uygulanmaktadır. Bu sıcaklık aralığı ve süresi;

Fmoc grubunun kaldırılması için; 55 W, maksimum 45 °C toplam 2 dakika süreyle ve Bağlanma (Coupling) için; 25 W, maksimum 75 °C toplam 3 dakika süreyle şeklindedir. Sıcaklık değişimi fiber optik prob ile anlık olarak izlenmekte ve kaydedilmektedir.

Sentez döngüsü sonrasında reaksiyon kabı içeriği filtre kısmından süzülerek “drain” yolu ile atığa gönderilir. Sentez döngüsü bittiğinde reçine “resin transfer tube” ile reaksiyon kabından başlangıçta sisteme yerleştirildiği kısma transfer edilir. Reaksiyon kabında gerçekleşen işlemler özetle bunlardır.

4.7 Sentezlenen Peptid Dizileri

Bu doktora tezi kapsamında 3 farklı viral hastalığa ait toplam 7 adet farklı peptid dizisi mikrodalga destekli katı hal peptid sentez cihazı ile (CEM, Liberty) sentezlenmiş ve LC-MS ile karakterize edilmiştir. Bu analizlerin yanı sıra FT-IR ve aminoasit analizörü ile de analizler yapılmıştır. Bu peptid dizilerinden en uzununu 28 amino asitli VP1 135-161b dizisi, en kısası ise 10 amino asitlik Melanoma 155–163 dizisidir.

Peptidler Fmoc SPPS metodu ile mikrodalga destekli olarak sentezlenmiştir. C- ucunda bulunan amino asit Wang Reçine üzerinde yüklenmiş olarak alınmıştır. Fmoc grubunun kaldırılması için DMF içinde %20 piperidin çözeltisi kullanılmıştır. Aktivatör olarak HBTU/HOBt karışımı, aktivatör baz olarak DIEA/NMP karışımı kullanılmıştır.

Mikrodalga uygulaması;

Fmoc grubunun kaldırılması için; 55 W, maksimum 45 °C toplam 2 dakika süreyle.

Coupling; 25 W, maksimum 75 °C toplam 3 dakika süreyle uygulanmıştır.

Sentezin sonraki aşaması olan kırma işlemi için reçine üzerindeki peptid DCM/DMF ile yıkanmış daha sonra kurutulmuş ve kırma işlemine hazır hale getirilmiştir.

Kırma işlemi reçine üzerindeki peptidin TFA/EDT/Thioanisol/Su/Fenol karışımından oluşan kırma kokteylinde 1,5–2 saat çalkalanır vaziyette bırakılması ile yapılmıştır.

Sentezi yapılan peptid dizileri ve teorik mol kütleleri Çizelge 4.2’de gösterilmiştir:

Çizelge 4.2 Sentezi yapılan peptid dizileri ve teorik mol kütleleri.

Dizinin Adı	Peptid dizisi	Teorik mol kütlesi g/mol
VP1 135–161a	SKYSTTGERTRGDLGALAARVATQLPA	2791,15
VP1 135–161b	WSKYSTTGERTRGDLGALAARVATQLPA	2977,23
VP1 200–213	WDRHKQRIIAPAKQLG	1917,24
VP1 40–60	WVKINNTSPTHVIDLMQTHQHG	2556,88
HA 91–108	WSKAFSNCYPYDVPDYASL	2226,47
NP 55–69	WRLIQNSLTIERMVLSA	2030,43
Melanoma 155–163	WQLSLLMWIT	1290,59

Bu dizilerden VP1 40–60, VP1 135–161, VP1 200–213 peptid dizileri Şap hastalığına (Foot-and-mouth disease virus, FMDV) yol açan virüsün kapsid proteinine aittir (Collen vd., 1991; van Lierop vd., 1995; Du vd., 2007; Greenwood vd., 2008). Bu dizilerden VP1 135–161b, VP1 200–213 ve VP1 40–60 peptid dizilerinin N- ucuna floresans analizleri için Trp aminoasidi eklenmiştir.

HA 91–108 ve NP 55–69 peptid dizileri influenza peptidleridir (Yedidia ve Arnon, 1997; Arnon ve Yedidia, 2003). Bu peptid dizilerinin de N- ucuna floresans analizleri için Trp aminoasidi eklenmiştir.

Melanoma 155–163 peptid dizisi bir deri hastalığı olan Melanoma hastalığına yol açan virüsün kapsid peptididir (Loftus vd., 1998; Khleif, 2004). Peptid dizisinin N- ucuna floresans analizleri için Trp aminoasidi eklenmiştir.

5. BİYOKONJUGAT SENTEZİ

Biyokonjugat, biyolojik kaynaktan ve farklı bir kaynaktan gelen moleküllerin bir araya gelmesi ile oluşan moleküler yapıdır. Konjugasyon işlemi uygun fonksiyonel grupları üzerlerinde taşıyan, farklı kaynaklardan gelen moleküllerin bir araya getirilmesidir.

Doğanın peptidlerle dolu olması, açıkça biyoaktif özellik taşımaları ve biyobozunur yapıda olmaları sentetik peptidlerin sentezi için iyi nedenlerdir. Bununla birlikte peptidlerin in vivo şartlarda taşınması çeşitlilik göstermektedir. Enzimatik degradasyon peptidlerin yaşam süresini azaltmaktadır. Bu degradasyonu engellemenin bir yolu da peptidlerin polimerlerle konjugasyonunu yapmaktır (Larijani vd., 2006).

Bu tez kapsamında, biyokonjugatların sentez amacı;

- a) Peptidlerin tek başlarına immün cevap oluşturmaya elverişli olmaması (Özbal, 2000),
- b) Organizma içinde, peptidlerin daha uzun süre ile kalmasını sağlamaktır.

Bir molekülün immün cevap oluşturabilmesi için belli büyüklüğün üzerinde olması gereklidir. Bu nedenle küçük moleküller, Freud adjuvant Alum gibi maddelerle birlikte organizmaya verilir. Fakat bu maddeler organizma için toksik özellik gösterirler. Organizmanın sağlığı için taşıyıcı olarak toksik olmayan polimerler veya proteinler kullanılır (Mustafaev, 2004).

Bu tez kapsamında sentezlenen biyokonjugatlar polimerler ile peptidlerin kovalent biyokonjugasyonuna dayanır.

Tezde bir yenilik olarak mikrodalga destekli organik (DMF) ortamda HBTU/HOBt aktivatörleri varlığında biyokonjugatlar sentezlenmiş ve olumlu sonuçlar alınmıştır.

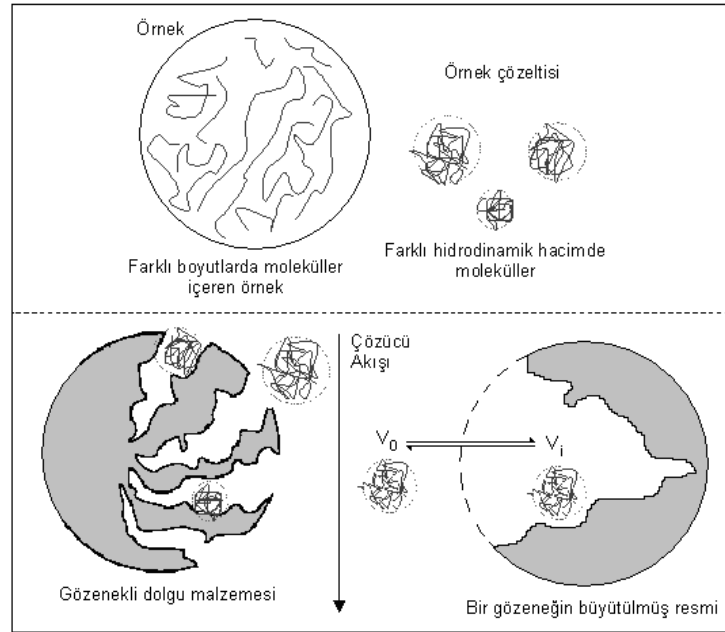
6. KULLANILAN ÖLÇÜM YÖNTEMLERİ

6.1 Büyüklükçe Ayırma Kromatografisi (BAK)

Büyüklükçe ayırma kromatografisi (BAK) (Moleküler eleme kromatografisi (SEC), jel filtrasyon, jel geçirgenlik ve sterik eleme kromatografisi) dolgu malzemesinin ortalama gözenek çapına bağlı olarak makromoleküllerin hidrodinamik çaplarına (R_h) göre sadece entropik olarak kontrol edilen bir ayırma işlemidir. Bu teknikle ayırma işlemi ilk olarak Lathve ve Ruthven tarafından tanımlanmıştır. İlerleyen yıllarda farklı araştırmacılar tarafından çeşitli alanlarda değişik amaçlarla kullanılan BAK, hem sentetik polimerler hem de biyopolimerler için doğru ve güvenilir bir analiz yöntemi haline gelmiştir (Vijayalakshmi, 2002).

6.1.1 Ayırma Prensibi

İdeal BAK'de ayırma işlemi, makromoleküllerin hidrodinamik hacimleri ve şekilleri ile sabit fazın gözenek büyüklüğü ve şekline bağlı olarak gerçekleşmektedir. Analizi yapılan moleküller, dolgu malzemesinin dışında kalan hacimle gözeneklerin içindeki hacimler arasında dağılırlar. Ayırma sırasında belirli bir anda her bir molekül türünün belli bir kısmı gözeneklerin içinde bulunur. Molekül ne kadar küçük ise gözenek içerisinde o kadar çok molekül bulunur (büyük moleküllerin tamamı gözeneklerin dışındadır). Büyük moleküller sterik engellemeden dolayı gözeneklere giremezken küçük moleküllerin önemli bir kısmı gözeneklere girerler. Böylece küçük moleküller kolon içinde büyüklere göre daha uzun süre kalırlar. Sabit faz partiküllerinin dışarısında kalan büyük moleküller ise hareketli fazla birlikte hareket ederler. Bu sebeple büyük moleküller küçük moleküllerden daha önce kolondan çıkarlar (Vijayalakshmi, 2002).



Şekil 6.1 BAK’de ayırma mekanizması (Lough ve Wainer, 1992).

Seçicilik terimi ayırma derecesini ya da bir numune içindeki farklı moleküller arasındaki alıkonma zamanını tanımlayan bir terimdir. BAK dolgu malzemesinin daha yüksek seçiciliği, çözünenin şekil ve boyutunu ya da dolgu malzemesinin gözeneklerinin boyut ve şeklini değiştirmedikçe çözücüü değiştirerek elde edilemez. Çözünen moleküllerin alıkonma hacimleriyle (ya da alıkonma hacmiyle ilgili bir fonksiyonla) boyutları arasında çizilen bir grafik kolonun seçiciliğini gösterecektir.

Kromatografi çeşitli maddeleri (biyolojik moleküller, sentetik polimerler, sentetik peptidler vb.) incelemek için kullanılan fizikokimyasal bir yöntemdir. Metot bileşenlerin, 10 cm (HPLC) ile 30 cm (GC) arasında değişen boylarda kalibre edilmiş tüplerden oluşan kromatografik kolon içerisinden geçerken ayrılması temeline dayanmaktadır ve kolonda sabit faz olarak silika jel, çapraz bağlı polimer gibi özel dolgu maddeleri bulunur (Kosarev ve Muranov, 2003).

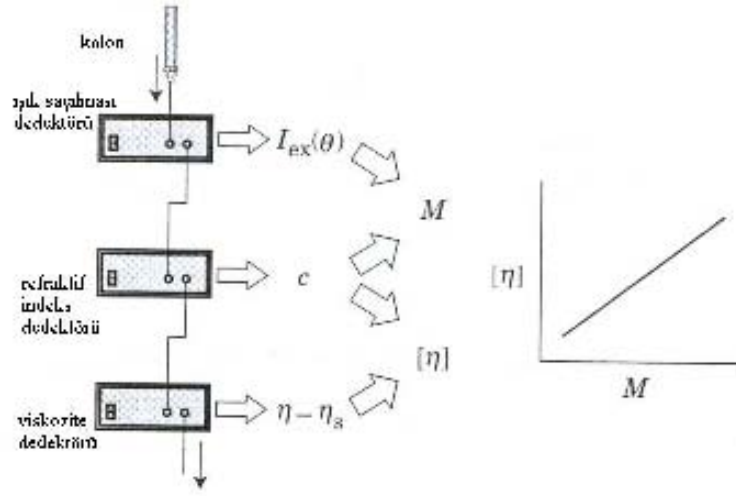
Büyükölükçe Ayırma Kromatografisi polimer, protein, peptid vb. bileşenlerin fiziksel etkileşimler doğrultusunda; molekül ağırlığı, boyutu ve şekli temel alınarak sıvı kromatografi ile ayrılmasında kullanılmaktadır. Monomerik, oligomerik ya da polimerik çoklu bileşenli sistemler, mikro gözeneklere sahip sabit fazda, büyükölükçe ayırma prensibine göre ayrılmaktadır.

Bu şekilde farklı boyutlardaki moleküllerin karışımından oluşan çözeltide her bir molekülün hidrodinamik çapı ve hidrodinamik hacmi birbirlerinden farklı olacaktır.

Büyükölükçe ayırma kromatografisinde UV, RI, ışık saçılması (LS) ve viskozite dedektörleri

kullanılabilmektedir.

Kullanılan bu dedektörlerden elde edilen verilerle Mark-Houwink eğrisi çizilebilir. Şekil 6.2’de dedektörlerden elde edilen veriler gösterilmiştir.



Şekil 6.2 BAK’de dedektörlerden elde edilen veriler.

Yapılan analizler, Shim-Pack Diol 300 kolonda, 1.0 ml/dak akış hızıyla, 25 C° sıcaklıkta ve 0,01 M PBS, %0,05 NaN₃ pH 7 ile hazırlanan mobil fazda gerçekleştirilmiştir.

6.2 FT-IR Spektroskopisi

Çalışmada sentezlenen maddelerin yapısal ve fonksiyonel gruplarının özelliklerini incelemek için FT-IR Spektroskopisi kullanılmıştır.

Son 40 yılda yapı aydınlatılmasında kullanılan yeni analiz tekniklerinin (NMR, MS, v.b.) geliştirilmesi ile İnfrared Spektrometresinin etkisi azalmış olsa da hala önemli bir rolü vardır. Elektromanyetik spektrumun dalga boyu 0.75 μm ile 1000 μm arasında kalan bölgeye *infrared bölgesi* adı verilir. İnfrared bölgesini, yakın (0.75 μm–2.5 μm), orta (2.5 μm–15 μm) ve uzak (15 μm–1000 μm) infrared olarak üçe ayrılabilir (Griffiths ve de Haseth, 2007).

İNfrared absorpsiyon spektroskopisine titreşim spektroskopisi de diyebiliriz Bunun sebebi infrared ışınlarının molekülün titreşim hareketleri tarafından absorplanmasıdır. Çünkü infrared ışıması UV ve görünür bölge ışıması gibi elektronik geçişleri sağlayacak kadar yüksek enerjili değildir. Ancak moleküldeki dönme ve titreşim düzeyleri arasındaki geçişleri sağlayabilir.

Bir molekülün infrared ışımasını absorplayabilmesi için dipol momentinde bir değişim olması gerekmektedir.

Modern infrared düzenekleri spektrum elde etmek için hızlı bir Fourier analizi uygular ve Fourier transform infrared (FT-IR) spektrometreleri olarak bilinirler.

6.3 Zeta Potansiyeli ve boyut Ölçümü

En az bir boyutu 1 nm – 1 µm arasında olan peptid, protein gibi katı bir maddenin sıvı bir çözücü içinde çözünmesiyle oluşan kolloidal sisteme kolloidal süspansiyon denir. Kolloidal sistemlerin doğalarını gösteren en önemli özelliklerden ikisi, partikül boyutu ve yüzey özellikleridir.

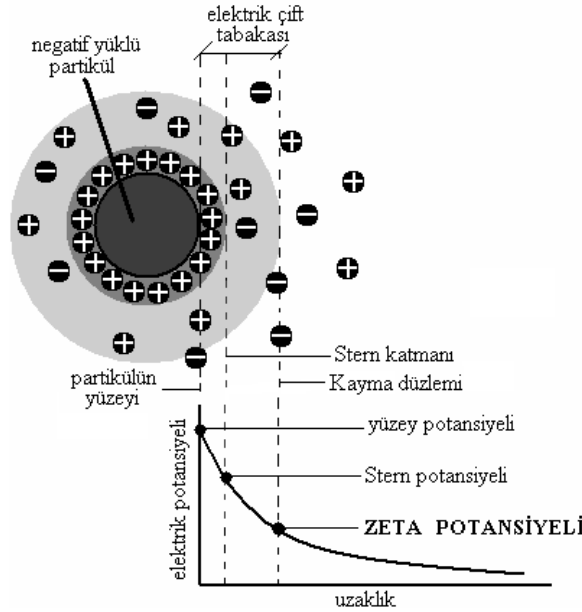
Peptid, protein, polimer çözeltilerinin ya da bunların karışımlarının ortalama boyut analizlerinde Zetasizer Nano ZS cihazında; 633 nm dalga boyunda 4,0 mV He-Ne lazer kullanılarak 25 °C’de Foton Korelasyon Spektroskopisi Yöntemi uygulanarak ölçüm yapılmaktadır. Viskozitenin 0,8872 cP ve kırılma indisinin 1,33 olarak alındığı ölçümlerde tüm çözeltiler 0,22 µm’lik membranlardan filtre edilerek analiz edilmiştir. Bir korelatör tarafından kaydedilen zaman ölçümlerinden $G_2(\tau)$ saçılma şiddetine ait otokorelasyon fonksiyonu bulunur, bu fonksiyona en iyi uyan 3. dereceden polinom saptanır, polinomun katsayılarından translasyonel difüzyon katsayısı D ve polidispersite sabiti hesaplanır. Boyut değeri, Stokes-Einstein denkleminde bulunur.

$$D = \frac{k.T}{3.\pi.\eta.R} \quad k = \text{Boltzman Sabiti, } T = \text{Mutlak sıcaklık, } \eta = \text{Çözücü viskozitesi} \quad (6.1)$$

Peptid, protein, polimer çözeltilerinin ya da bunların karışımlarının Zeta Potansiyeli analizlerinde ise Zetasizer Nano ZS cihazında bir kapiler hücre içerisinde Lazer Doppler Elektroferez (LDE) tekniği uygulanarak ölçüm yapılmaktadır. Viskozitenin 0,8872 cP, dielektrik sabitinin 79; $f(ka)$ ’nın 1.50 (Smoluchowski) olarak alındığı 25 °C’de ki ölçümlerde tüm çözeltiler 0,22 µm’lik membranlardan filtre edilerek analiz edilmiştir.

Çalışmamızda zeta potansiyel ölçümü için pH=7’de negatif yüklü olan VP/AA kopolimeri ve peptid molekülü temel alınmıştır. VP/AA-peptid biyokonjugat partikülleri ortamda bulunan iyonlarla girdiği elektrostatik etkileşim sonucu pozitif iyonları çekerken negatif iyonları da iterek partikül yüzeyinin hemen dışında, pozitif iyonların yüzeye sıkı bağlı olduğu ve Stern katmanı denilen bir tabaka oluşturmaktadır. Stern katmanından sonra iyonların hareket edebildiği bir difüz bölgesi mevcuttur. Difüz bölgesinde; hayali olarak var olduğu düşünülen

bir **Kayma düzlemi** vardır ve bu düzlemin içinde kalan pozitif iyonlar, partikülle birlikte hareket etmeye zorlanırken, dışında kalanlar ise bağımsız olarak hareket edebilmektedirler. Molekölün Stern katmanındaki elektrik potansiyeline **Stern potansiyeli**, kayma düzlemindeki elektrik potansiyeline ise **Zeta Potansiyeli** denmektedir ve Zeta Potansiyeli Henry denkleminden hesaplanmaktadır.



$$U_E = \frac{2 \cdot \epsilon \cdot z \cdot f(ka)}{3 \cdot \eta} \quad (6.2)$$

U_E = Elektroforetik hareketlilik,

ϵ = Ortamın dielektrik sabiti,

η = Ortamın viskozitesi ve

$f(ka)$ = Henry Fonksiyonu

Şekil 6.3 Negatif yüklü partikülün zeta potansiyeli (Zetasizer Nano Series User Manual).

6.4 LC-MS

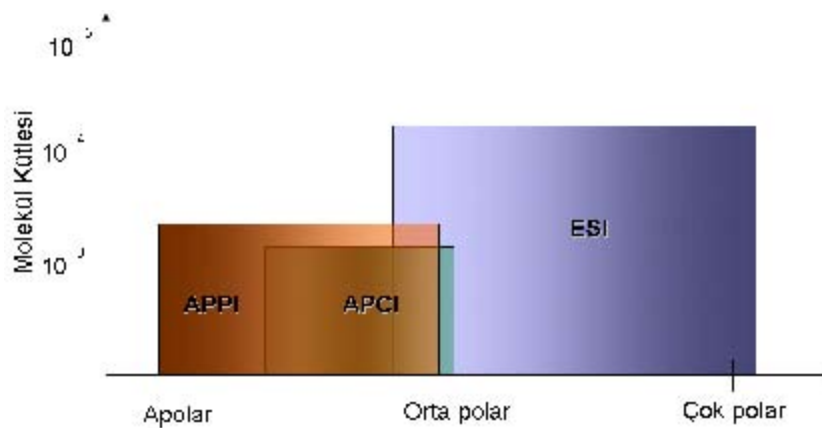
Çalışmada sentezlenen peptidlerin molekül ağırlığını ve saflığını tayin etmek üzere LC-ESI-MS sistemi kullanılmıştır.

LC-MS temel olarak HPLC ile MS'in birlikte kullanıldığı bir sistemdir. LC-MS 1970'lerde kullanılmaya başlanılmıştır (Niessen ve Tinke, 1995; Pramanik vd., 2002; Niessen, 2006), ve günümüzde biyolojik maddelerin analizinde en çok başvurulan laboratuvar cihazlarından biridir. Bunun altında yatan sebep düşük konsantrasyonlarda analize imkân vermesi, yapısal analizi olanaklı kılması, otomatik olarak kullanılabilmesidir. LC-MS ile fizyolojik sıvıların, ilaç etkileşimlerinin incelenmesi, proteinlerin ve peptidlerin yapı analizleri yapılabilmektedir. HPLC, kütle spektrometresine bağlandığında, kolondan birçok bileşen çıkarken her birinin kütle spektrumu aynı anda alınabilir. Bazı durumlarda, eğer ölçümler yeterli doğrulukla yapılırsa, protein veya peptidin hangi protein veya peptid olduğu saptanabilir.

Kütle spektrometresinde aslında molekülün kütlesi değil, kütle/yük (m/z) oranı tayin edilmektedir. Kütle spektrumu ise iyon miktarıyla m/z arasında çizilen bir grafikdir. Molekülün yüke sahip olması için iyonlaştırılması gerekmektedir ve bu işlem gaz fazında gerçekleştirilir. LC-MS cihazı 4 temel kısımdan oluşmaktadır. Bu kısımlar sırasıyla HPLC, iyonlaştırıcı, kütle analizörü ve dedektördür.

6.4.1 İyonlaştırma

MS'teki en önemli basamak analitlerin gaz fazındaki iyonlara dönüştürüldüğü iyonlaştırma işlemidir. Çoğu iyonlaştırma işlemi genelde iki basamaklıdır: Önce örnek gaz hale getirilir ve sonra iyonlaştırılır. Çoğu biyolojik örnek yüksek molekül ağırlığına sahip olduğu için gaz hale dönüştürülmeleri oldukça zordur. Son yıllarda yapılan çalışmalarda büyük ve uçucu olmayan moleküllerin çoğu gaz fazındaki iyonlara çevirecek yeni iyonlaştırma teknikleri geliştirilmiştir (Montaudo ve Lattimer, 2002). Bu tekniklerden en önemlileri elektrosprey iyonlaştırma (ESI) ve matriks destekli lazer dezorpsiyon iyonlaştırma (MALDI) yöntemleridir. Bu yöntemler atmosferik basınç kimyasal iyonlaştırma (APCI) ve atmosferik basınç foto-iyonlaştırma (APPI) tekniklerinin gelişmesini sağlamıştır. Genellikle ESI, APPI ve APCI'ye göre daha duyarlıdır (Kromidas, 2005). ESI, APCI ve APPI tekniklerinin kullanıldıkları alanlar Şekil 6.4'te görülmektedir.

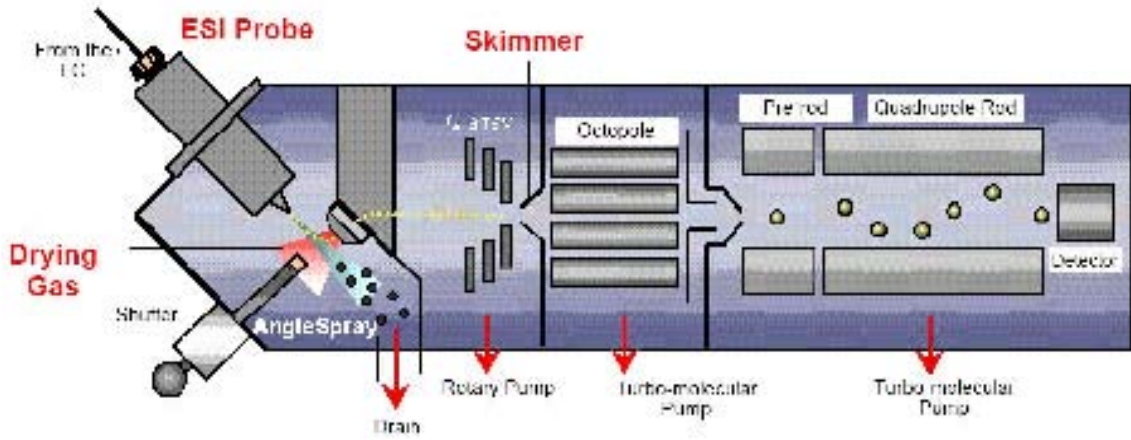


Şekil 6.4 İyonlaştırma tekniklerinin kullanılmaya uygun olduğu moleküllerin polarite ve molekül ağırlığı aralıkları.

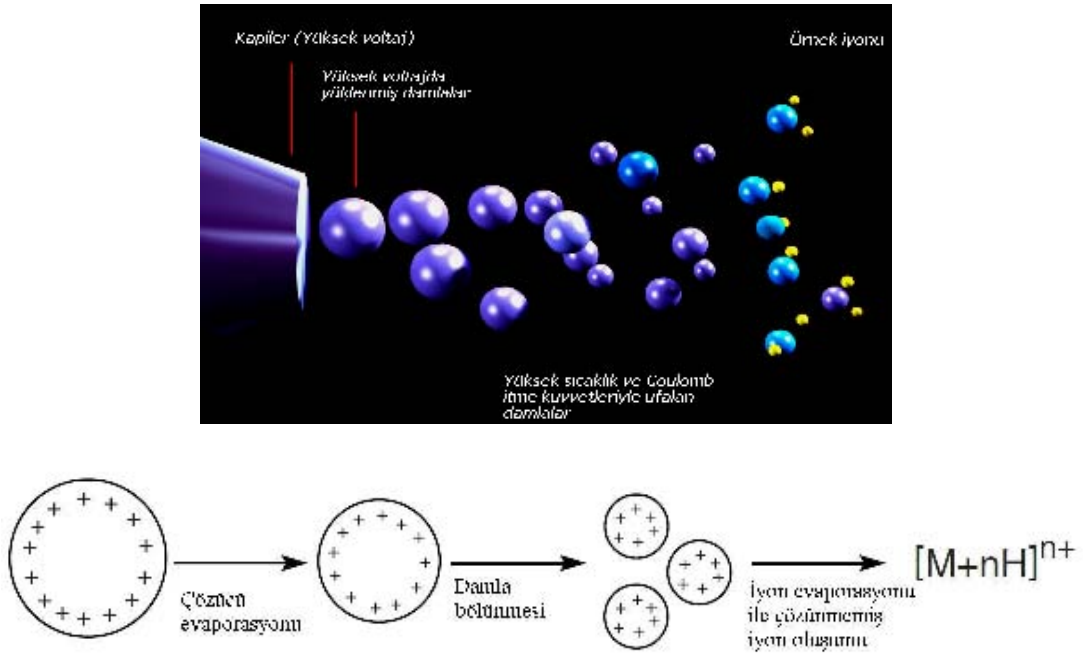
6.4.1.1 Elektrosprey iyonlaştırma (ESI)

İlk olarak 1984'te kullanılmaya başlanmıştır (Yamashita ve Fenn, 1984). Bu yöntemin geliştirilmesi büyük bir yenilik olmuş, John B. Fenn ve Koichi Tanaka büyük biyolojik moleküllerin analizlerinde ESI ve desorption iyonizasyon yöntemlerini geliştirdikleri için 2002 yılında Nobel Kimya ödülünü paylaşmışlardır (Smith, 2004).

Bu yöntemde, çözelti içindeki analit 0,5–4,5 kV voltaj uygulanmış bir kapiler vasıtasıyla atmosferik basınç altındaki odacığa püskürtülerek iyonlaştırılır. Çözelti içine örneğin iyonlaşmasını sağlamak için TFA, Formik asit gibi kimyasallar eklenir. Püskürtme N_2 vb. bir inert gazla yapılmaktadır. Kullanılan kapilerin çapına bağlı olarak uygulanan voltaj değeri değişmektedir. Püskürtülen sıvı, yüklü damlacıklardan oluşan bir aerosol halini alır. Yüklü damlacıklar uygulanan voltaja göre (+) veya (-) yüklenmiş analit ve çözücü moleküllerini içerirler. İyonlar çözücü moleküllerinden ayrılarak vakumla birlikte kütle analizörüne giderler (Kearle ve Tang, 1993; Gaskell, 1997).



Şekil 6.5 ESI'nin çalışma sistemi.



Şekil 6.6 ESI de damlalardan iyon oluşumu.

Biyolojik moleküllerin iyonlaşmasını sağlayan, üzerlerindeki fonksiyonel gruplardır. Bu gruplardan proton koparak veya bu gruplara proton katılarak molekül iyonlaşır. Proteinler, peptidler, oligonükleotidler ve diğer biyolojik moleküller üzerlerindeki birçok fonksiyonel gruptan iyonlaşabilirler, bu sebeple molekül ağırlığı doğrudan bulunamaz. Moleküllerin çok sayıda yüklenmesi molekül ağırlığını bulmayı güçleştirse de ESI yönteminin birçok avantajı bulunmaktadır. Çok yüksek molekül ağırlığına sahip moleküller bu yöntemle analiz edilebilir, çok büyük moleküller iyonlaştırılabilir, ayrıca kovalent olmayan bağlarla bağlanmış biyomakromoleküler kompleksler yine bu yöntemle incelenebilir. HPLC yöntemi için de uygun bir iyonlaştırma yöntemidir. ESI'nin önemli bir dezavantajı çözeltide kullanılan tuz miktarı arttıkça analit moleküllerinin iyonlaşması zorlaşmaktadır. Analit moleküllerinin yüksek konsantrasyonlarında da iyonlaşma zorlaşmaktadır.

6.4.2 Kütle Analizörleri

Farklı tipteki kütle analizörleri farklı yöntemler kullanarak iyonları ölçmektedir. Çoğu analitik ölçümde, bahsedilmesi gereken iki önemli nokta bulunmaktadır: doğruluk ve kesinlik. MS cihazında ölçümün kesinliği rezolüsyona (iki pikin birbirinden ayrılması) bağlıdır.

Günümüzde kullanımda olan beş temel kütle analizörü bulunmaktadır. Bunlar iki grupta

toplanabilir: yollu analizörler ve tuzaklı analizörler. Yollu analizörlerde iyonlar iyon kaynağını bir ışın demetiyle terk ederler ve analizörde ilerleyerek dedektöre ulaşırlar. Tuzaklı analizörlerde ise, iyonlar analizörde tutulur. İyonlar ya analizörün içinde oluşurlar ya da bir iyonlaştırma kaynağından gelirler.

Sektörler

Tüm sektör analizörler manyetik bir sektör içerirler ve bir kısmı da elektrik sektör içerir. İyon kaynağından gelen iyonlar manyetik bir alanın çevresinde döndürülürler ve alanın merkezine göre sabit bir yarıçapa sahip olurlar. Sabit bir manyetik alan kuvveti ve sabit bir hızlandırıcı potansiyel için sadece belirli momentum/yük oranına sahip iyonlar manyetik alanın giriş ve çıkışındaki yarıklardan geçebilecektir. Manyetik sektör aslında iyonları hem momentumlarına göre ayırmakta hem de aynı momentuma sahip iyonları da yarıktan geçerken açılarında meydana gelen farklılıklara göre ayırmaktadır (yönelim odaklanması).

Kütle spektrumu manyetik alan kuvveti taranarak oluşturulur. Rezolüsyonu düşüktür, bu sebeple çoğu sektör analizörde manyetik sektörden önce elektrik sektör bulunur. Elektrik sektör iyonları kinetik enerji/yük oranlarına göre ayırmaktadır. Tüm iyonların kinetik enerji/yük oranları aynıdır ve bu sektör de iyonlara yönelin odaklanması yapmaktadır. Her iki sektör de beraber kullanılarak çift odaklanma yapılabilir ve çok yüksek rezolüsyon değerlerine ulaşılabilir.

Kuadrupol

Maliyeti düşük bir analizördür ve kullanımı kolaydır. Diğer dedektörlere göre daha düşük voltajlarda çalışırlar ve sektör ve TOF analizörlere göre daha küçüktürler.

Kuadrupolde kütle ayrımı dinamik bir elektrik alanda iyonların hareketiyle gerçekleşir ve doğrudan m/z oranına bağlıdır. Kütle analizi, radyo frekans (rf) voltajlarının ve doğru akımın (DC) uygulandığı dört silindirik çubuk arasında gerçekleşir. Rf voltajının zamanla değişmesine bağlı olarak hareket eşitlikleri ikinci dereceden diferansiyel denklemlerdir. Silindirik çubukların boyutları ve rf frekansı sabit tutularak ve rf ile dc voltajlarının şiddeti artırılarak farklı m/z 'ye sahip iyonlar sırasıyla dedektöre gönderilir.

Kuadrupolün fiziksel özelliklerine bağlı olarak, analiz edilebilecek en yüksek m/z değeri 300–4000 arasında değişmektedir. Hassasiyeti diğer analizörlere göre daha düşüktür. Genelde ayırma teknikleriyle beraber kullanılan bir analizördür.

Kuadrupol-iyon tuzağı

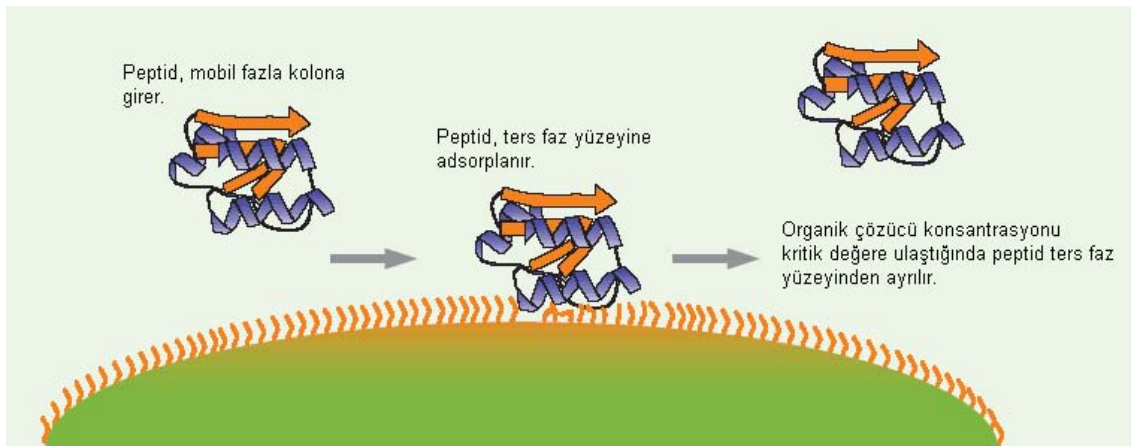
Kuadrupol analizörlerine benzemektedir. Kuadrupolde iki eksenle elektrik alan uygulanırken, iyon tuzağında üç eksenle de elektrik alan uygulanır. Bu yüzden iyonlar bir alanda tutulurlar. Kuadrupol analizörde, iyonların kuadrupol boyunca sabit bir yörüngesi bulunmaktadır, fakat iyon tuzağında bu yörünge kararsız olmalıdır. Yörüngelerini kararsız hale getirmek için cihazda uygulanan rf voltajı artırılır. Bu yöntem 1980'lerde keşfedilebilmiştir.

Kullanılan iyon tuzağı analizörler genelde kuadrupollere benzer m/z ölçüm aralığına sahiptirler. Ama kuadrupollere göre hassasiyetleri daha yüksektir.

6.4.3 Peptidlerin Ters Faz Sıvı Kromatografisi (RP-HPLC) ile Ayrılması

Ters faz (reversed phase) kromatografisi biyomoleküllerin analizi ve saflaştırılmasında sıkça kullanılan bir yöntemdir. Bunun sebebi ise yöntemin sahip olduğu yüksek çözünürlüktür. Birbirlerinden tek bir amino asit farkı olan peptidler bile bu yöntemle birbirlerinden ayrılabilirler.

Ters faz HPLC, doğal ve sentetik peptidlerin saflaştırılmasında, enzimatik parçalanmaya uğramış proteinlerin peptid fragmentlerinin ayrılmasında, proteinlerin konformasyonlarının ve bozunma ürünlerinin incelenmesinde kullanılmaktadır.



Şekil 6.7 Polipeptidlerin ters faz kolon içerisinde mobil fazdan dolgu materyaline adsorplanması ve sonra tekrar mobil faza geçmesi.

Küçük moleküller dağılma (partisyon) ile RP-HPLC'de ayrılırken peptidler partisyon için çok büyüktürler. Bunun yerine, kolona girdikten sonra hidrofobik yüzeye adsorplanırlar. Yani peptidler hidrofobiklik derecelerine göre ayrılırlar (Aguilar, 2004). Mobil faz içindeki organik

çözücü konsantrasyonu kritik değere ulaştığında ise mobil faza geçerek kolonu terk ederler. Küçük peptidler ise her iki mekanizmayla da kolon içinde ayrılmaktadır.

Peptid moleküllerinin büyük bir kısmı mobil fazla etkileşirken molekülün hidrofobik “ayağı” ters faz yüzey ile etkileşir. Ters faz HPLC tekniğinde peptidlerin hidrofobik kısımlarındaki farklılıklara göre ayırma gerçekleşir. Hidrofobik kısımlardaki farklılıklar amino asit dizisinden ve konformasyondan ileri gelmektedir.

Peptidin sabit fazdan ayrılmasını sağlayacak organik çözücü konsantrasyonu belli ve sabit bir değer olduğu için bu değere ulaşıldığında peptid moleküllerinin tamamı aynı anda sabit fazı terk ederler. Peptid sabit fazdan ayrıldıktan sonra ters faz yüzeyiyle çok az etkileşir veya hiç etkileşmez.

Bu sebeplerden dolayı ayırma sırasında izokratik elüsyon pek yapılmaz. Peptidlerin ters faz HPLC ayırmalarında çoğunlukla gradient elüsyon tercih edilir ve genelde gradientin eğimi (birim zamandaki organik çözücü konsantrasyon değişimi) düşük tutulur (Stadalius vd., 1984).

6.4.3.1 Peptidlerin Ters Faz Sıvı Kromatografisi (RP-HPLC) ile Ayrılmasını Etkileyen Faktörler

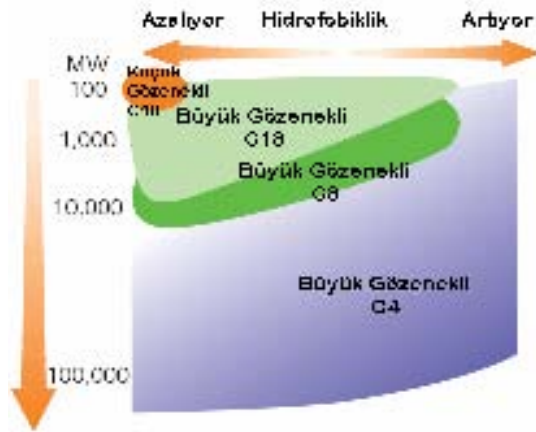
6.4.3.1.1 Kolon

HPLC adsorbent materyalleri gözenekli partiküllerdir ve etkileşim olacak yüzey genelde bu gözeneklerin içerisinde. Peptidlerin adsorplanıp ayrılması için öncelikle bu gözeneklere girmeleri gerekmektedir. Günümüzde çoğu peptid ayırması 300 Å'luk gözenekleri olan partiküllerle gerçekleştirilmektedir. Molekül kütlesi 2000 Da'dan düşük olan peptidler 100 Å'luk gözenekleri olan partiküllerle ayrılmaktadır.

Partiküllerin büyüklüğü ise piklerin genişliğini etkilemektedir. Partikül küçüldükçe piklerin genişliği daralmaktadır.

Ters faz HPLC adsorbentleri silika matrikse hidrofobik fazın bağlanması ile oluşturulmaktadır. Hidrofobik fazı oluşturan hidrokarbon grubu genelde 4 (C4), 8 (C8) ya da 18 (C18) karbon içeren lineer bir alifatik zincirdir. C18 kolonlar genelde molekül kütlesi 5000 daltondan az olan peptidler için tercih edilmektedir. Hidrofobik peptidler ve genelde proteinler için C4 kolonlar kullanılmaktadır. C8 kolonlar C18 kolonlara benzemektedir, fakat ayırmada küçük değişiklikler yapmak için kullanılabilir. Fenil kolonlar C4 kolonlardan daha az hidrofobiktir ve bazı peptidler için benzersiz bir seçicilik göstermektedirler.

Kolonlarda kullanılan adsorbent partiküllerinin özelliklerinin peptid ayırmalarında meydana getirdikleri farklar Şekil 6.8’de özetlenmektedir.



Şekil 6.8 Kolonlarda kullanılan adsorbent partiküllerinin özellikleri.

Silika esaslı HPLC kolonlarından başka, bu kolonların çalıştırılmayacağı şartlarda çalışabilen polimer esaslı kolonlar da bulunmaktadır. Örneğin polistiren-divinilbenzen polimer ile yapılmış kolonlarda 1 M NaOH veya 1 M HCl içeren mobil fazlarla yıkanabilir.

Kolonun uzunluğu diğer faktörler kadar ayırmayı etkilememektedir. Çünkü peptidler kolonun girişinde adsorbente tutunurlar. Bu sebeple genelde 5–15 cm’lik kolonlar kullanılmaktadır. Kolon uzunluğu ayırmadan çok örnek kapasitesi ve kolon basıncını etkilemektedir. Uzun kolonlara daha fazla örnek verilebilirken bu kolonların basıncı daha yüksek olacaktır.

Kolonun çapı da ayırmayı çok fazla etkilemez. Daha çok örnek kapasitesini, dedektörün hassasiyetini ve solvent kullanımını etkiler. Kolon çapı daraldıkça mobil fazın akış hızı düşürülür, daha az çözücü kullanılır, dedektörün ölçüm hassasiyeti artar, yani çok seyreltik örnekler dahi saptanabilir. LC-MS için genelde çok dar kolonlar kullanılmaktadır.

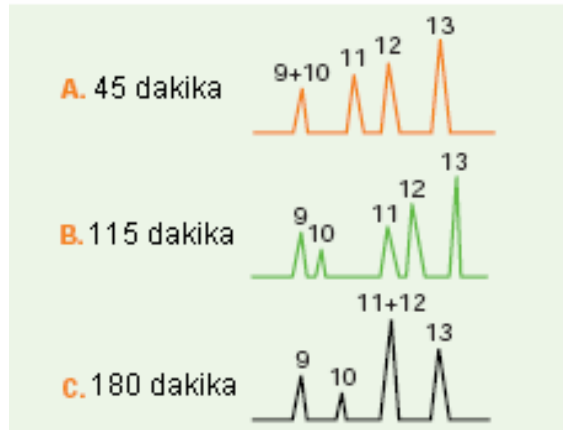
6.4.3.1.2 Mobil faz

Organik çözücü kullanmanın amacı kolonda tutunmuş peptidlerin mobil faza geçerek kolondan çıkmalarını sağlamaktır. Bunun için çeşitli çözücüler kullanılabilir:

- Asetonitril: En çok kullanılanlardan biridir. Toplanan fraksiyonlardan uzaklaştırılması kolaydır. Viskozitesi ve UV absorpsiyonu azdır.
- İzopropanol: Genelde büyük ve çok hidrofobik proteinlerde kullanılır. Viskozitesinin çok yüksek olması kullanım alanını azaltmıştır.

- Etanol: Sanayi tipi saflaştırmalarda kullanılmaktadır. Hidrofobik ve membran proteinlerinin ayrılmasında kullanılır.
- Metanol ve diğer çözücüler: Diğer çözücülere göre daha avantajlı özellikleri bulunmamaktadır.

Organik çözücü konsantrasyonunun yavaşça arttırılması daha keskin piklerin oluşumunu ve daha iyi ayırmayı sağlamaktadır.

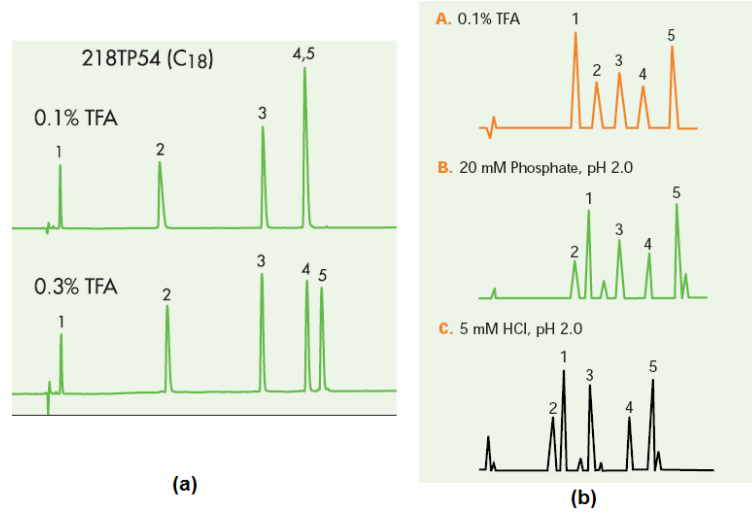


Şekil 6.9 İnsan büyüme hormonunun enzimatik parçalanmayla oluşan fragmentlerinin kromatogramları.

6.4.3.1.3 İyon Çifti Ajanları

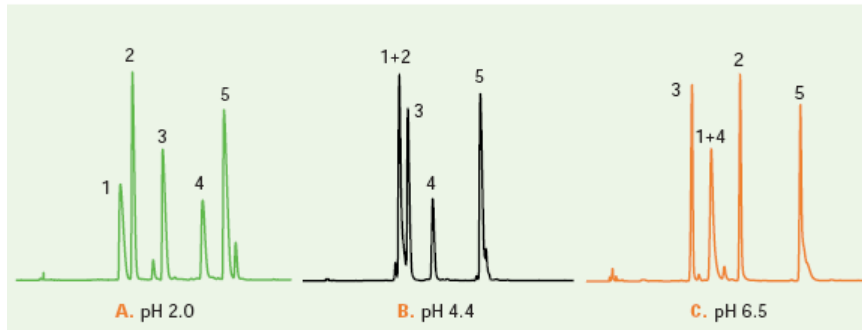
İyon çifti ajanları (IPA) mobil fazın pH'ını ayarlarlar ve peptidle etkileşerek ayırmanın daha iyi olmasını sağlarlar. IPA olarak en çok TFA kullanılmaktadır. Çünkü uçucudur ve uzaklaştırılması kolaydır, UV absorpsiyonu analiz dalga boylarında çok azdır ve iyi bir peptid çözüldürücüsüdür. Fakat TFA'nın pozitif iyon modunda iyon baskılayıcı (ion suppressive) özelliği vardır. Bundan kaçınmak için TFA yerine formik asit kullanılabilir (García, 2005). Genelde % 0,1 (v/v) konsantrasyonunda mobil faza eklenir. Daha fazla veya daha az eklenmesinin pik şekillerinde ve alıkonma zamanlarında önemli etkileri bulunmaktadır (Lennarz ve Lane, 2002).

TFA dışında trietilamonyum fosfat (TEAP), formik asit, asetik asit, fosforik asit, heptaflorobütirik asit (HFBA), pentafloropropiyonik asit (PFPA) ve HCl de iyon çifti ajanı olarak kullanılabilir (Shibue vd., 2005). Farklı iyon çifti ajanı kullanımı sonucu aynı peptid için farklı kromatogramlar elde edilir.



Şekil 6.10 (a) Beş standart peptidden oluşan karışımın farklı TFA konsantrasyonlarındaki kromatogramları, (b) Beş standart peptidden oluşan karışımın farklı iyon çifti konsantrasyonlarındaki kromatogramları.

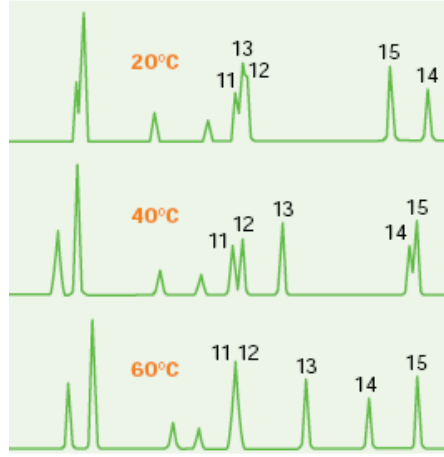
Peptidlerin RP-HPLC’de ayrılması genelde pH’a duyarlıdır. Asidik ve bazik yan zincirlerin protonlanması veya bu gruplardan protonun uzaklaşması alıkonma zamanlarına etki etmektedir.



Şekil 6.11 Standart peptidlerden oluşan bir karışımın farklı pH’lardaki kromatogramları.

6.4.3.1.4 Sıcaklık

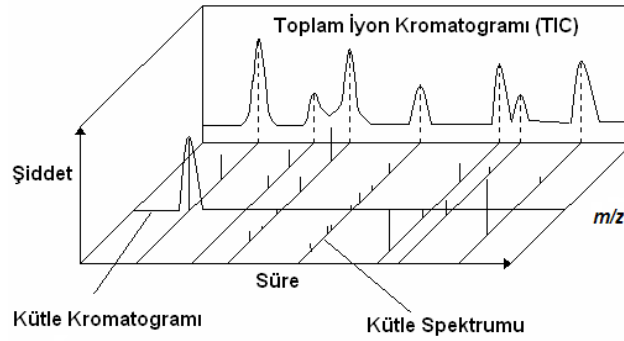
Sıcaklık her kromatografi çalışmasında olduğu gibi peptidlerin kromatografisinde de önemlidir. En iyi ayırma için uygun sıcaklığın bulunması gerekmektedir.



Şekil 6.12 İnsan büyüme hormonunun enzimatik parçalanma ürünlerinin farklı sıcaklıklardaki kromatogramları.

6.4.3.2 RP-HPLC/ESI-MS ile Analiz

Bu sistem ile analiz yapıldığında Şekil 6.13'deki toplam iyon kromatogramı oluşmaktadır. Bu kromatogramdaki her nokta, o anda MS dedektörü tarafından yapılan taramayla oluşmuş spektrumdaki piklerin şiddetlerinin toplamıdır. Spektrumlarda x eksen m/z oranını, y eksen şiddeti vermektedir.



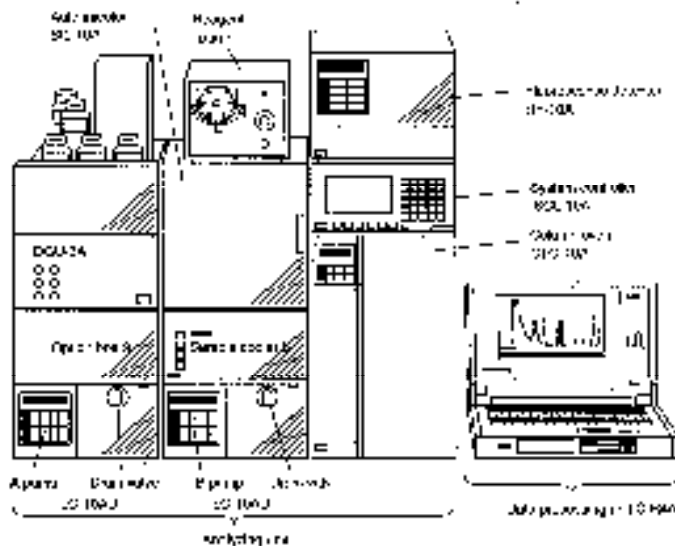
Şekil 6.13 LC-MS cihazında kromatogram oluşumu.

Elektrosprey iyonlaştırma (ESI) kullanıldığında moleküle ya proton bağlanır (pozitif mod) ya da proton kopartılır (negatif mod). Ölçüm sırasında oluşan iyonlardan molekülün kütlesinin bulunması için (6.3)'te verilen formüllerden faydalanılır. Burada önemli olan nokta ise molekül kütlesinin hesaplanması için aynı molekülün en az iki farklı yüklü iyonuna ihtiyaç duyulmasıdır. Bu sayede iki bilinmeyenli iki denklem kullanılarak doğru molekül kütlesi hesaplanır.

$$m/z = \frac{MW + nH^+}{n} \text{ veya } m/z = \frac{MW - nH^+}{n} \quad (6.3)$$

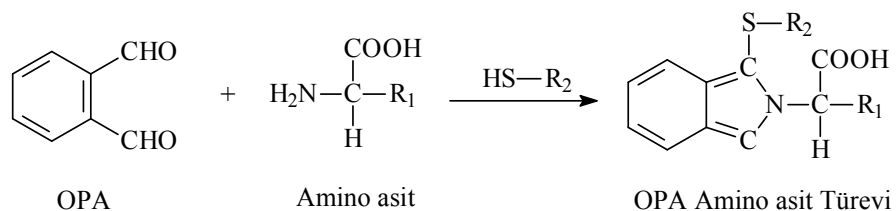
6.5 Amino Asit Analizi

Amino asit analizi, analiz örneğinin peptid dizisini veya % amino asit bileşimini belirlemede kullanılan yöntemdir. Bu tez kapsamında amino asit analizi, sentezlenen peptid dizisinin saflaştırma sonrasında % amino asit bileşimini belirlemek için kullanılmıştır. Şekil 6.14'te amino asit analiz sistemin parçaları bir arada verilmiştir.

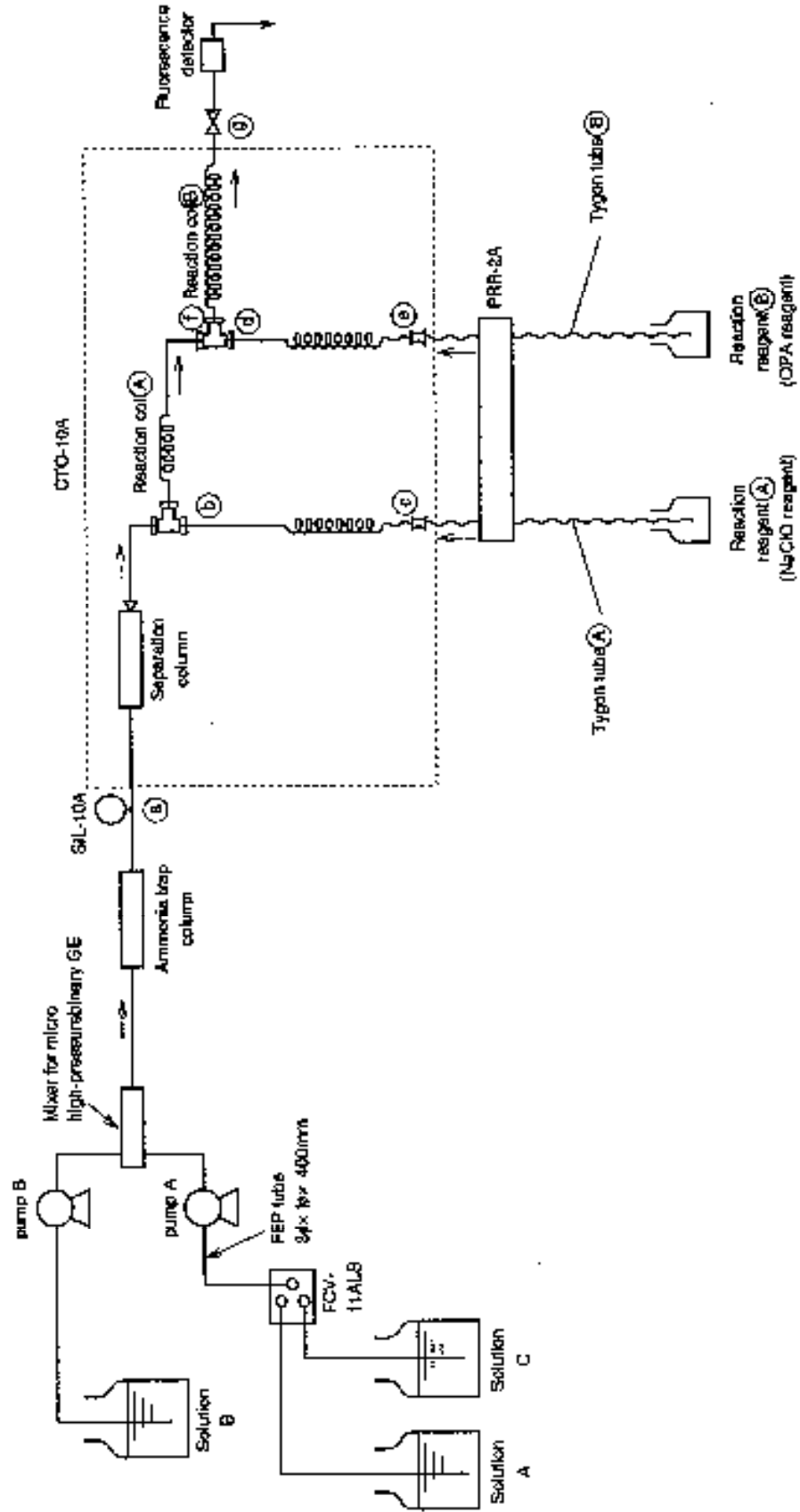


Şekil 6.14 Amino asit analiz sisteminin bileşenleri (Shimadzu).

Sistem HPLC sistemleri gibi çalışmakta olup farklı yanı analiz örneğinin ayırma kolonuna girmeden önce O-phthaldehyde (OPA) ile türevlendirilmesidir. Sistemin Na ve Li tipi olmak üzere 2 temel çalışma metodu vardır. Çalışılacak metoda göre reaktanlar seçilir.



Şekil 6.15 Amino asitlerin OPA ile türevlendirilmesi.



Şekil 6.16 Amino asit analiz sisteminin akım şeması (Shimadzu).

OPA ile türevlendirilen amino asitler floresans özellik kazanmaktadırlar. Bu sayede floresans dedektöründe okunabilmektedirler. Şekil 6.16'da gösterildiği gibi türevlendirme işlemi ayırma kolonu sonrasında yapılmakta ve dedektöre giden yol türevlendirmenin tam olarak gerçekleşebilmesi için kasıtlı olarak uzun tutulmaktadır.

6.6 UV-VIS Spektroskopisi

Bu çalışmada maddelerin UV özelliğinin belirlenmesi amacıyla UV-VIS Spektroskopisi kullanılmıştır.

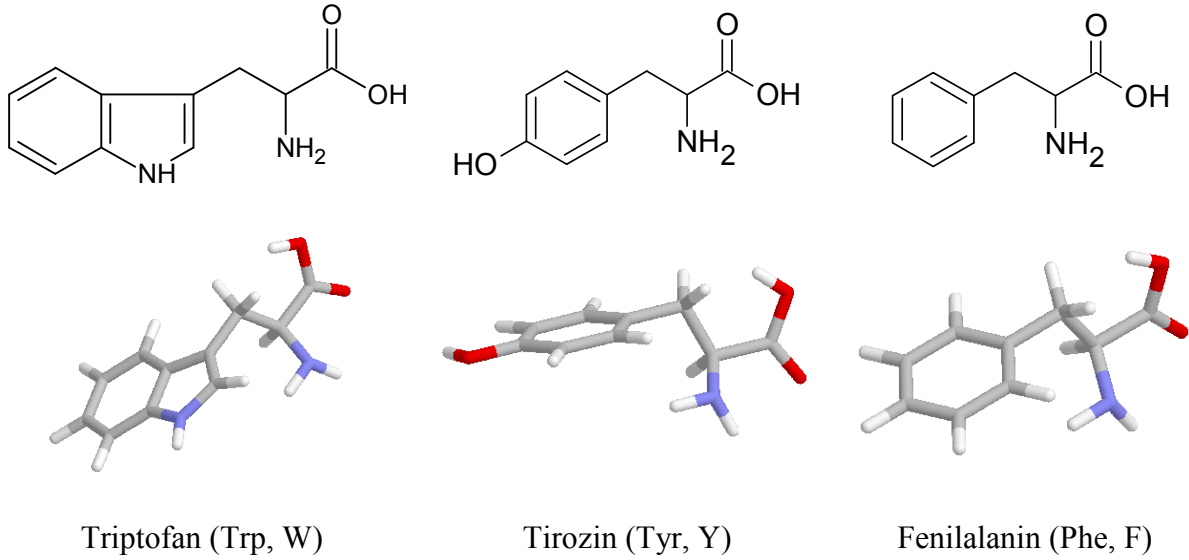
Tek renkli ve I_0 şiddetindeki ışık demeti kalınlığı 1 cm olan bir tüpte bulunan çözeltideki moleküller tarafından absorblandığında şiddeti azalır ve tüpü I şiddetinde terk eder. Bu azalma Lambert-Beer eşitliği ile ifade edilir.

$$\frac{\log I_0}{I} = \epsilon bc = A \quad (6.4)$$

Burada c mol/lit cinsinden derişimi, b de cm cinsinden örnek kabının kalınlığını ve ϵ lt/mol.cm cinsinden molar sönümlenme katsayısını temsil etmektedir. A'ya ise absorbans ya da optik yoğunluk denir.

6.7 Floresans Spektroskopisi Ölçümleri

Spektroskopi, elektromagnetik dalga ile moleküllerin etkileşmesini inceleyen deneysel tekniklerin en önemlilerinden biridir. Floresans spektroskopisi ise maddenin floresans özelliği üzerine kurulmuştur ve absorbsiyon spektroskopisine benzemektedir ancak absorbsiyon spektroskopisine göre daha hassastır. Floresans spektroskopisi ile birçok madde milyonda birin altındaki hassasiyetle tayin edilebilir. Floresans özelliği gösteren maddelerin sayısının az olması yöntem için bir dezavantaj olsa da seçiciliğinin yüksek olması yöntemin önemli avantajlarından bir tanesidir (Lakowicz, 1999). Proteinlerin ve peptidlerin yapısında bulunan amino asitlerden Triptofan (Trp, W), Tirozin (Tyr, Y) ve Fenilalanin (Phe, F) floresans özellik gösterirler. Bunların içinde en yüksek floresansa veren amino asit Triptofan'dır.



Şekil 6.17 Floresans özellik gösteren aminoasitler.

Çalışmamızda kullanılan peptidlerin birçoğunun (Örneğin, Şap Hastalığı Virüsünün VP1 kapsid proteininin 135–161 peptid dizisinin) N- terminal uç kısmına eklenen Triptofan amino asidi sayesinde yapıya floresans özelliği kazandırılmıştır.

Serbest haldeki proteinde, proteinin dış kısmında daha serbest halde bulunan Trp sulu ortamla etkileşim içerisindedir ve daha düşük enerjili ışıma ile uyarılabilmektedir. Konjugasyon gerçekleşip Trp sulu ortamdan uzaklaşıp daha içeriye hidrofobik bölgeye girdikten sonra uyarma için gereken enerji artacaktır.

$$E = \frac{hc}{\lambda} \quad (6.5)$$

Eşitliğinde de görüldüğü üzere uyarma için gereken enerjinin artması dalga boyunun küçülmesine yani λ_{maks} değerinde daha küçük dalga boyuna doğru kaymaya (blue shift) neden olacaktır. Uyarıldığı dalga boyu kayan molekülün yaptığı floresans ışımanın λ_{maks} değeri de buna bağlı olarak küçülecek ve blue shift verecektir.

Çalışmamızda öncelikle serbest peptidin λ_{maks} değerleri floresans spektrumları alınarak saptanmıştır sonrasında elde edilen konjugatlardaki Trp'ın konformasyon değişikliğine bağlı olarak değişen λ_{maks} değerleri saptanış ve gözlenen kaymalar yardımı ile konjugasyon oluşumu incelenmiştir.

7. DENEYSEL KISIM

7.1 Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler

7.1.1 Kullanılan Cihazlar

4 Dedektörlü BAK Sistemi (Viscotek TDA 302 üçlü dedektör dizisi, Viscotek Model 2501 UV dedektörü, Viscotek GPCmax VE2001 örnek ünitelerinden oluşur); Sentezi yapılan polimerler, peptid ve konjugatların analizinde kullanılmıştır.

Amino Asit Analiz Sistemi (Shimadzu); Sentezlenen peptid dizilerinin % aminoasit bileşiminin belirlenmesinde kullanılmıştır.

Azot Jeneratörü (PEAK Scientific); LC-MS cihazının taşıyıcı gaz olarak kullandığı saf azot gazının üretilmesinde ve bazı polimer sentezlerinde gerekli olan inert atmosferin oluşturulmasında kullanılmıştır.

Çalkalayıcı (Heidolph Unimax 1010); Peptid sentezinin kırma (cleavage) işleminde çalkalama işlemi için kullanılmıştır.

Döner Buharlaştırıcı (Heidolph Laborota 4010); Peptid sentezinde kırma işlemi sonrasında kokteylin uzaklaştırılması işleminde kullanılmıştır.

Enjektör filtresi, 0,22 µm (Sartorius MiniSart RC); Analiz cihazlarına verilen örneklerin süzülmesi işleminde kullanılmıştır.

Etüv (Binder); Sentezlerde gerekli olan sabit sıcaklık ortamının sağlanmasında kullanılmıştır.

FT-IR (Perkin Elmer Spektrum One); FT-IR analizlerinin yapılmasında kullanılmıştır.

FT-IR (Shimadzu Prestige-21); FT-IR analizlerinin yapılmasında kullanılmıştır.

Hassas Terazî (OHAUS Explorer Pro); Hassas ağırlık ölçümlerinde kullanılmıştır.

HPLC Sistemi (Shimadzu); Peptidlerin ve biyokonjugatların analizinde kullanılmıştır.

Isıtmalı vakum kabı (Büchi Glass Oven B-585); Eterle çöktürülen peptidlerin ısı uygulamadan vakumda kurutulmasında kullanılmıştır.

Karıştırıcı, Vorteks (Heidolph Reax top); Peptidlerin sentez sonrası yıkama işleminde ve kırma sonrası eterle çöktürme işleminde kullanılır.

LC-MS Sistemi (Shimadzu); Peptidlerin karakterizasyonunda kullanılmıştır.

Mekanik Karıştırıcı (Heidolph RZR 1); Konidin sentezinde karıştırma işleminde kullanılmıştır.

Mikrodalga Destekli Peptid Sentez Cihazı (CEM Liberty); Peptidlerin sentezinde kullanılmıştır.

Mikrodalga Sentez Cihazı (CEM Discovery); Mikrodalga destekli konjugasyon sentezinde kullanılmıştır.

pH metre (Hanna pH 221); pH ölçümlerinin yapılmasında kullanılmıştır.

Preparatif HPLC Sistemi (Shimadzu); Peptidlerin saflaştırılması işleminde kullanılmıştır.

Saf su cihazı (Millipore Elix 70); Laboratuvarda kullanılan 2. kalite suyun üretilmesinde ve saf su üretilmesi için besleme ünitesi olarak kullanılmıştır.

Soğutmalı Sirkülasyon Banyosu (Thermo Digital Plus); Konidin sentezinde soğuk ortamın sağlanmasında kullanılmıştır.

Steady State Floresans Spektrometre (PTI QM-4/2003); Floresans ölçümlerinde kullanılmıştır.

Titreşimli su banyosu (Bandelin Sonorex); Gradient çözücülerinin içinde bulunan gaz kabarcıklarının giderilmesi (degas) işleminde ve zor çözünen peptidlerin çözünmesine yardım etmek için kullanılmıştır.

Ultra Saf Su Cihazı (Millipore Milli-Q Gradient); Deneylerde kullanılan suyun üretilmesinde kullanılmıştır.

UV-VIS Spektrofotometre (Shimadzu UV-1700 PharmaSpec); UV ölçümlerinde kullanılmıştır.

Zetasizer (Malvern Nano ZS); Boyut ölçümlerinde kullanılmıştır.

7.1.2 Kullanılan Kimyasallar Maddeler

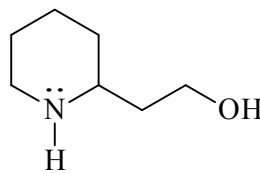
Madde Adı	Firma Adı	Katalog No
1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropil) kardobodimid hidroklorid (EDC)	Sigma	E7750
2-piperidin etanol	Acros Organics	157611000
2-Propanol	Merck	1.01040.2500
2-propanol LC-MS CHROMASOLV	Riedel-de H��en	34965
Asetik asit	Fluka	45731
Asetonitril CHROMASOLV	Sigma	34851
Benzoil Klorür	Sigma	24,054-0
DCM	Riedel-de H��en	24233
Dietileter	Riedel-de H��en	24005
DMF	Fluka	40255
EDT	Aldrich	398020
Etanol	Riedel-de H��en	32221
Etil asetat	Riedel-de H��en	27227
Fenol	Riedel-de H��en	16017
Floreskamin	Sigma	F9015
Fmoc-Ala-OH	Aldrich	531480
Fmoc-Ala-Wang resin LL (Reçine)	Novabiochem	04-12-2074
Fmoc-Arg(Pbf)-OH	Fluka	47616
Fmoc-Asn(Trt)-OH	Fluka	47672
Fmoc-Asp(OtBu)-OH	Fluka	47618
Fmoc-Cys(Trt)-OH	Fluka	47695
Fmoc-Gln(Trt)-OH	Fluka	47674
Fmoc-Glu(OtBu)-OH	Fluka	47625
Fmoc-Gly-OH	Fluka	47627
Fmoc-Ile-OH	Fluka	47628
Fmoc-Leu-OH	Fluka	47633
Fmoc-Leu-Wang resin LL (Reçine)	Novabiochem	04-12-2082
Fmoc-Lys(Boc)-OH	Fluka	47624
Fmoc-Met-OH	Fluka	47634
Fmoc-Phe-OH	Aldrich	338338
Fmoc-Pro-OH	Fluka	47636
Fmoc-Ser(tBu)-OH	Aldrich	53,519-2
Fmoc-Thr(tBu)-OH	Aldrich	53,518-4
Fmoc-Trp(Boc)-OH	Fluka	47561
Fmoc-Tyr(tBu)-OH	Fluka	47623
Fmoc-Val-OH	Fluka	47638
Formik asit	Fluka	94318
HBTU	Fluka	12804
HCl	Riedel-de H��en	07102
Heksadesil bromür	Aldrich	23,445-1
HOBt	Fluka	54804
Kalsiyum klorür	Merck	1.02382.5000
Kalsiyumoksit	Merck	1.02106.0500

Kloroform	Riedel-de H��en	24216
KOH	Riedel-de H��en	06009
Metanol	Riedel-de H��en	24229
Metil iyodür	Aldrich	I 850-7
NaCl	Fluka	71376
NaN ₃	Applichem	A1430
NaOH	Riedel-de H��en	06203
NMP	Sigma	M6762
Piperidin	Merck	8.22299.2500
Poliakrilik asit ($\overline{M}_w$ 100 000)	Aldrich	523925
Sodyum dihidrojen fosfat (NaH ₂ PO ₄ .7H ₂ O)	Riedel-de H��en	04269
Sodyum hidrojen fosfat (Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O)	Fluka	71647
t-bütil bromür	Fluka	19700
TFA	Fluka	91700
THF	J. T. Baker	9441
Thioaniso��le	Fluka	88470
Tiyonil klorid (SOCl ₂)	Fluka	88952

7.2 Polimer Sentezi

Bu bölümde tez kapsamında sentezlenen polimerler anlatılmaktadır.

7.2.1 Sentezde Kullanılan           n Kurutulması ve 2-(2-hidroksietil)piperidin'in Vakum Destilasyonu



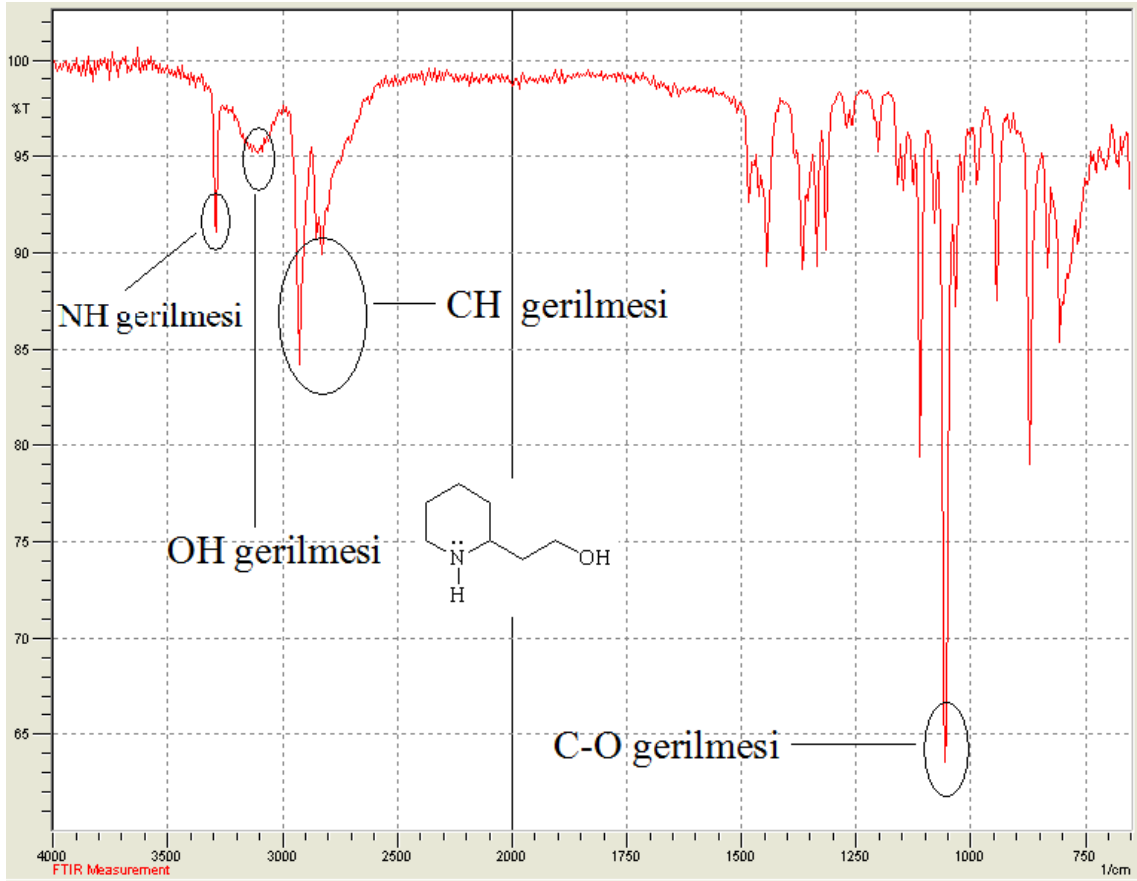
Şekil 7.1 2-(2-hidroksietil)piperidin'in kimyasal yapısı.

Sentezden önce kullanılacak           n kurutma işlemleri gerçekleştirildi. Kuru etanol (C₂H₅OH) elde etmek için 100 g CaO k  l fırında 600   C'de 6 saat bekletildi. K  l fırından   ıkarılan CaO sıcak halde iken etil alkolün içerisine eklendi. Etil alkol ve CaO karışımını iki parça halinde 6 saat süre ile refluks edildi. Daha sonra destilasyon ile kuru etil alkol alındı.

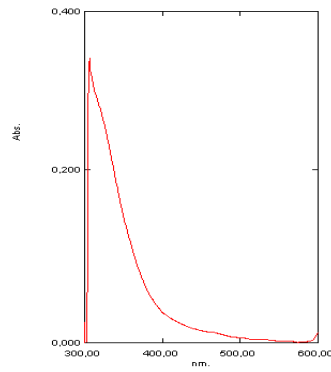
600 ml kloroform (CHCl₃) içerisine 200 g CaCl₂ eklendi ve bir gece (10 saat) oda sıcaklığında bekletildi. Bir gece sonra CaCl₂ s  z  ld   ve kloroformun içerisine 150 g CaSO₄ eklendi. Bu şekilde geri soğutucu altında 2,5 saat refluks edildi. 2,5 saat sonunda destilasyon

ile kuru kloroform elde edildi.

2-(2-hidroksietil)piperidin'in saflaştırılması vakum destilasyonu ile gerçekleştirildi. 60 g 2-(2-hidroksietil)piperidin vakum destilasyonu ile destile edildi.

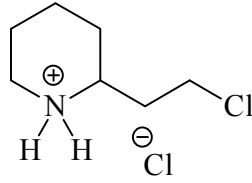


Şekil 7.2 2-(2-hidroksietil) piperidin'in FT-IR spektrumu.



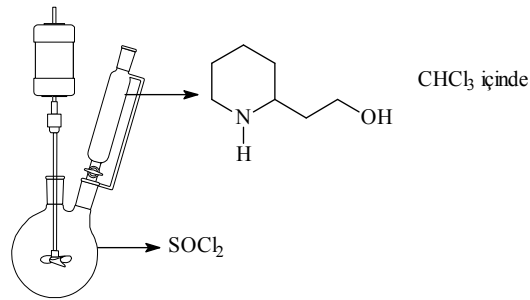
Şekil 7.3 2-(2-hidroksietil) piperidin'in UV spektrumu (306 nm $A_{\text{maks}}=0.321$).

7.2.2 2-(2-kloroetil)piperidin hidroklorür Tuzu Sentezi



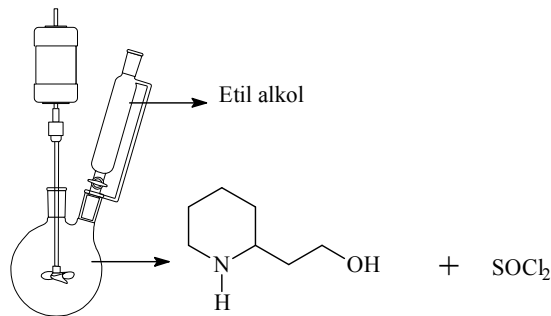
Şekil 7.4 2-(2-kloroetil)piperidin hidroklorür'ün kimyasal yapısı.

2-(2-kloroetil)piperidin hidroklorür (e.n.= 230 °C) tuzu elde etmek için yeni destile edilmiş 2-(2-hidroksietil)piperidin (e.n.= 38 °C, k.n.= 234 °C) ile tanyonil klorid reaksiyona sokuldu. 78 ml SOCl_2 üzerine 90 ml CHCl_3 da çözülmüş 60 g 2-(2-hidroksietil)piperidin çok yavaş bir şekilde ilave edildi. Bu sırada sistem sürekli ve hızlı bir karıştırmaya tabi tutuldu. Ayrıca reaksiyon ortamı sıcaklığının 0 °C'nin altında olması sağlandı. Eklemeden sonra sistem oda sıcaklığına ısıtıldı ve yaklaşık 2 saat süreyle oda sıcaklığında karışmaya bırakıldı.



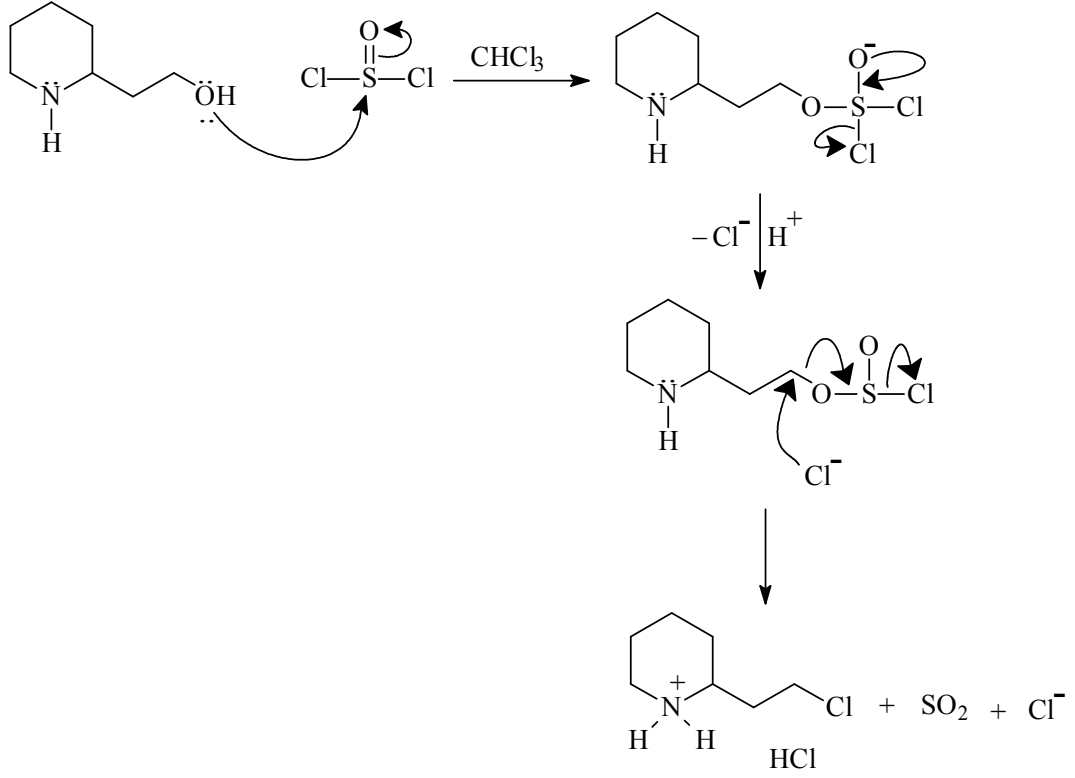
Şekil 7.5 2-(2-kloroetil)piperidin hidroklorür sentezinde birinci aşama.

Damlatma hunisi ile 70 ml etil alkol yavaşça, 1 saat içerisinde kısımlar halinde reaksiyon ortamına eklendi. Bu sırada karıştırmaya devam edildi. Reaksiyon ortamının sıcaklığı artırılarak elde edilen tuzun çözünmesi sağlandı. Çözünme gerçekleştikten sonra 2 saat süreyle reflüks edildi. Reflüks işlemi sistem inert gaz (N_2) altına alınarak yapıldı.

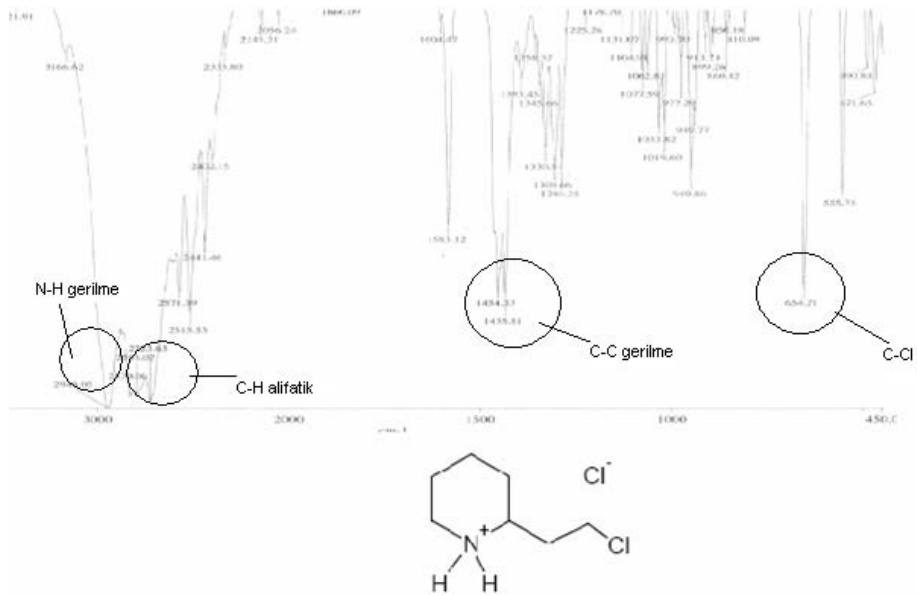


Şekil 7.6 2-(2-kloroetil)piperidin hidroklorür sentezinde ikinci aşama.

Refluks işleminden sonra reaksiyon düzeneği oda sıcaklığına gelinceye kadar bekletildi. Bir gün sonra elde edilen tuz, soğuk etanol ve dietil eter ile yıkandı ve vakum altında kurutuldu. Böylece beyaza yakın renkte 2-(2-kloroetil)piperidin hidroklorür tuzu elde edildi.



Şekil 7.7 2-(2-hidroksietil)piperidinden 2-(2-kloroetil) piperidin hidroklorür tuzunun sentezi.

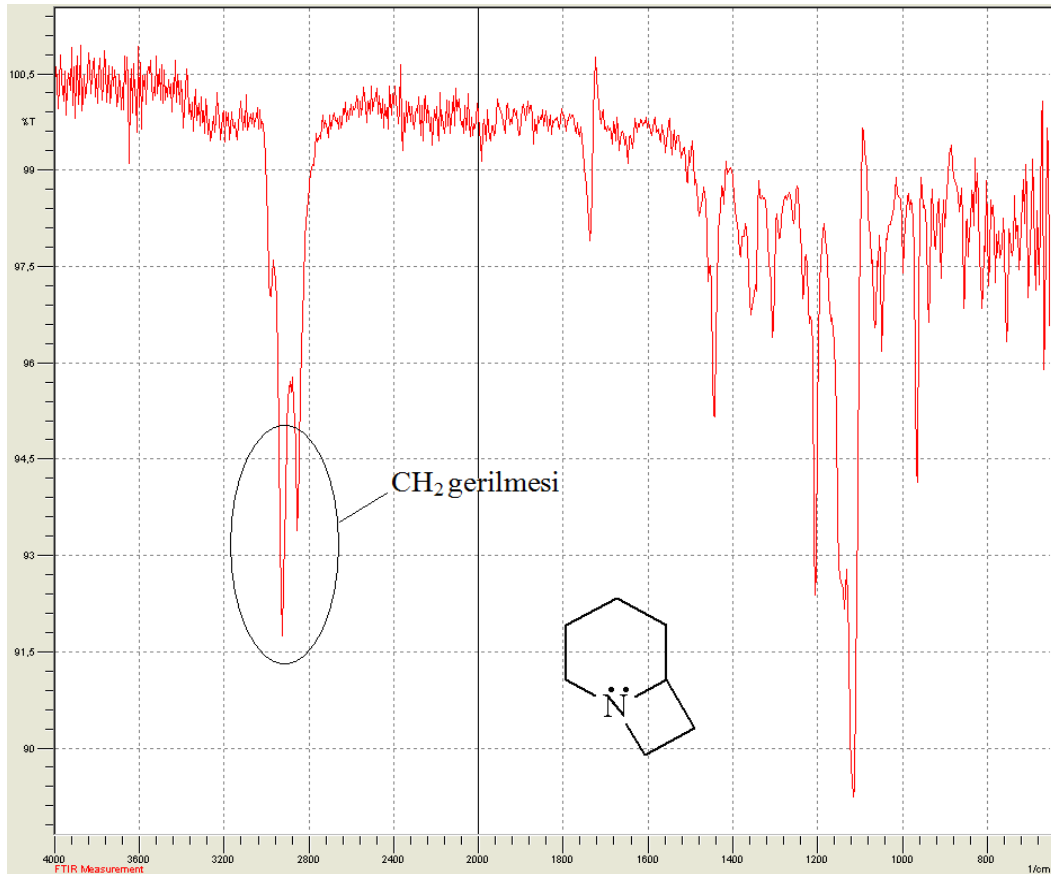


Şekil 7.8 2-(2-kloroetil) piperidin hidroklorür tuzu FT-IR spektrumu.

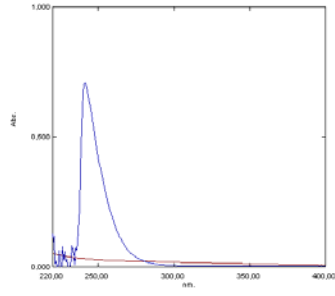
7.2.3 Konidin Sentezi

36,4 g 2-(2-kloroetil)piperidin hidroklorür 1,6 L suda çözüldü. Hafif sarı renkli bu çözeltiye 16,8 g NaOH eklendi ve karıştırıldı. Hazırlanan bu sistem 65 °C da 2 saat süreyle refluks edildi. Refluks işleminden sonra çözeltiye yavaş bir şekilde 129,76 g KOH eklendi ve çözünme sağlandı. Çözeltinin pH'ı 13 olarak ölçüldü. Sistemin destilasyonuna başlandı ve her seferinde 800 ml olmak üzere toplam 8 adet destilasyon ürünü toplandı. Destilasyona, toplanan destilatların pH'ı 7 olana kadar devam edildi. Toplanan her destilata 40 g KOH ilave edildi ve çözünme sağlandı. Bu çözelti 100'er ml dietil eter ilavesiyle 6 kez ekstraksiyona tabi tutuldu. Ekstraksiyon sonucunda toplanan organik fazlar bir araya getirilerek fraksiyonlu destilasyon yapıldı. Bu destilasyonda eter fazı uçurularak uzaklaştırıldı.

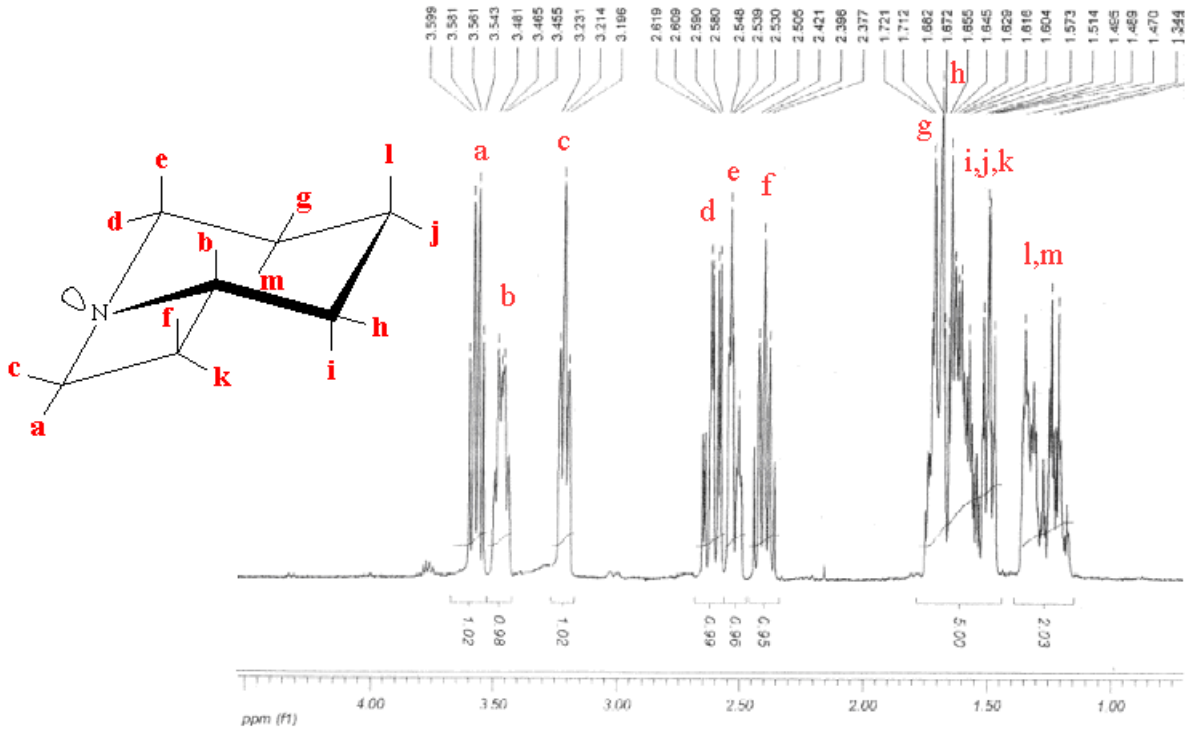
Uzaklaştırma işleminden sonra 1-azabisiklo[4.2.0]oktan elde edildi.



Şekil 7.9 1-azabisiklo[4.2.0]oktan monomerine ait FT-IR spektrumu.



Şekil 7.10 2-(2-kloroetil)piperidin hidroklorür tuzu (kırmızı) ve 1-azabisiklo[4.2.0]oktan monomerine (mavi) ait UV spektrumları.



Şekil 7.11 1-azabisiklo[4.2.0]oktan monomerine ait ^1H NMR spektrumu.

Reaksiyon sonunda 6,8 g konidin monomeri sentezlenmiştir. Reaksiyon verimi yaklaşık % 19'dur.

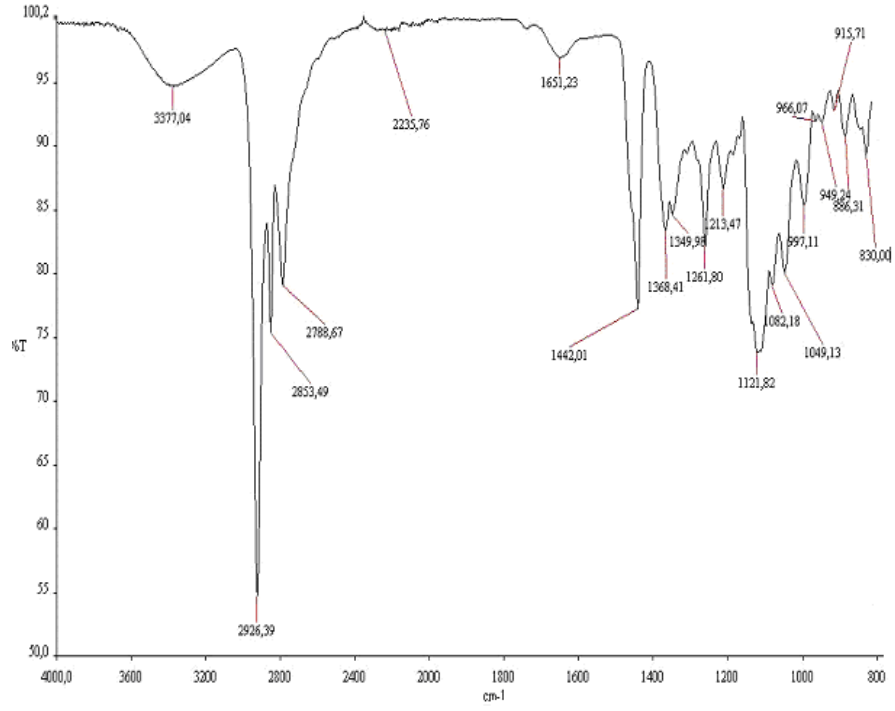
7.2.4 Konidin'in Polimerizasyonu

Polimerizasyon için, sentezlenen konidin monomer olarak kullanılmış ve katyonik halka açılması polimerizasyonu farklı başlatıcılar varlığında polimerizasyon yürütülmüştür. Başlatıcı olarak RX tipi alkil halojenürler (metil iyodür, etil bromür, heksadesil bromür, t-bütül bromür, trimetilsilan bromür ve benzoil klorür) kullanılmıştır.

Polimerizasyonda başlatıcı olarak kullanılan alkil halojenürdeki kısmi pozitif yük taşıyan $-R^{\delta+}$ grubu konidindeki azot atomuna bağlanarak kuarterner amonyum tuzu oluşturur. Başlatıcıdan gelen karşıt iyon ise $(-X^{\delta-})$ polimerizasyon ortamında negatif yüklü grup olarak bulunur ve kuarterner amonyum tuzunun etrafında çevrelenir. Oluşan amonyum tuzu ilk katyonik aktif merkezdir ve polimerizasyon bu pozitif yüklü merkez üzerinden yürür. Ortamda bulunan monomer güçlü bir nükleofildir ve katyonik aktif merkezdeki azetidin halkasına saldırarak dörtlü halkanın açılmasına neden olur. Pozitif yük zincir sonuna taşınır ve polimerizasyon yeni monomerlerin bağlanmasıyla devam eder.

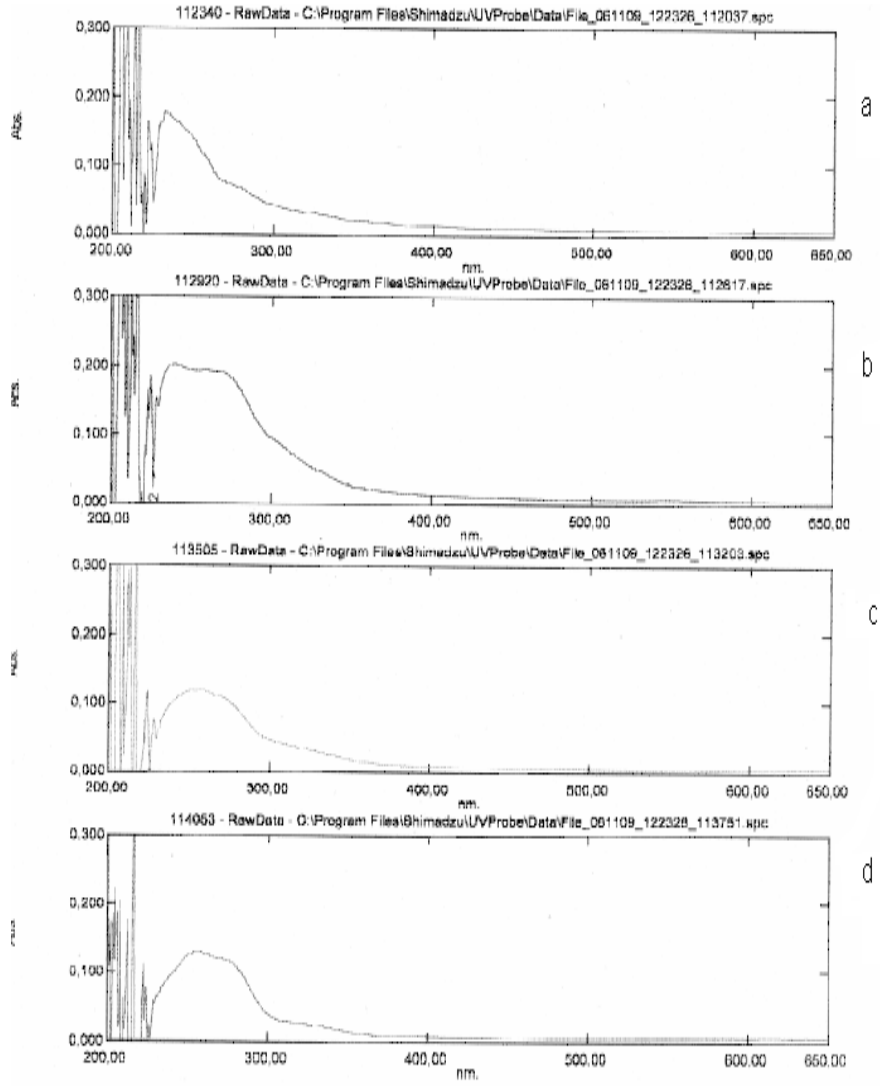
Polimerizasyon başlatıcı/monomer mol oranları değiştirilerek tekrarlanmıştır. Prensipde bu tür polimerizasyonlarda başlatıcı miktarının çok az tutulması tercih edilir. Yaşayan tip polimerlerde sonlanma reaksiyonlarının gerçekleşmediği teorik olarak öngörülse de başlatıcıdan gelen negatif yüklü karşıt iyonlar katyonik aktif merkeze bağlanarak polimerizasyonu durdurabilirler. Bu nedenle ortamda karşıt iyonların miktar olarak az olması tercih edilir.

Sentezlenen polimerlerin çöktürülmesi için su kullanıldı. Yaşayan tip polimer sistemlerinde polimerizasyonun sonlanması karşıt iyonun aktif merkeze bağlanması, tersinir olmayan zincir transferi, ortamda bulunan çözücüler ve safsızlıkların etkisi ile gerçekleşir. Polimer çözeltisine su ilavesi polimerizasyonu tamamen durdurur.

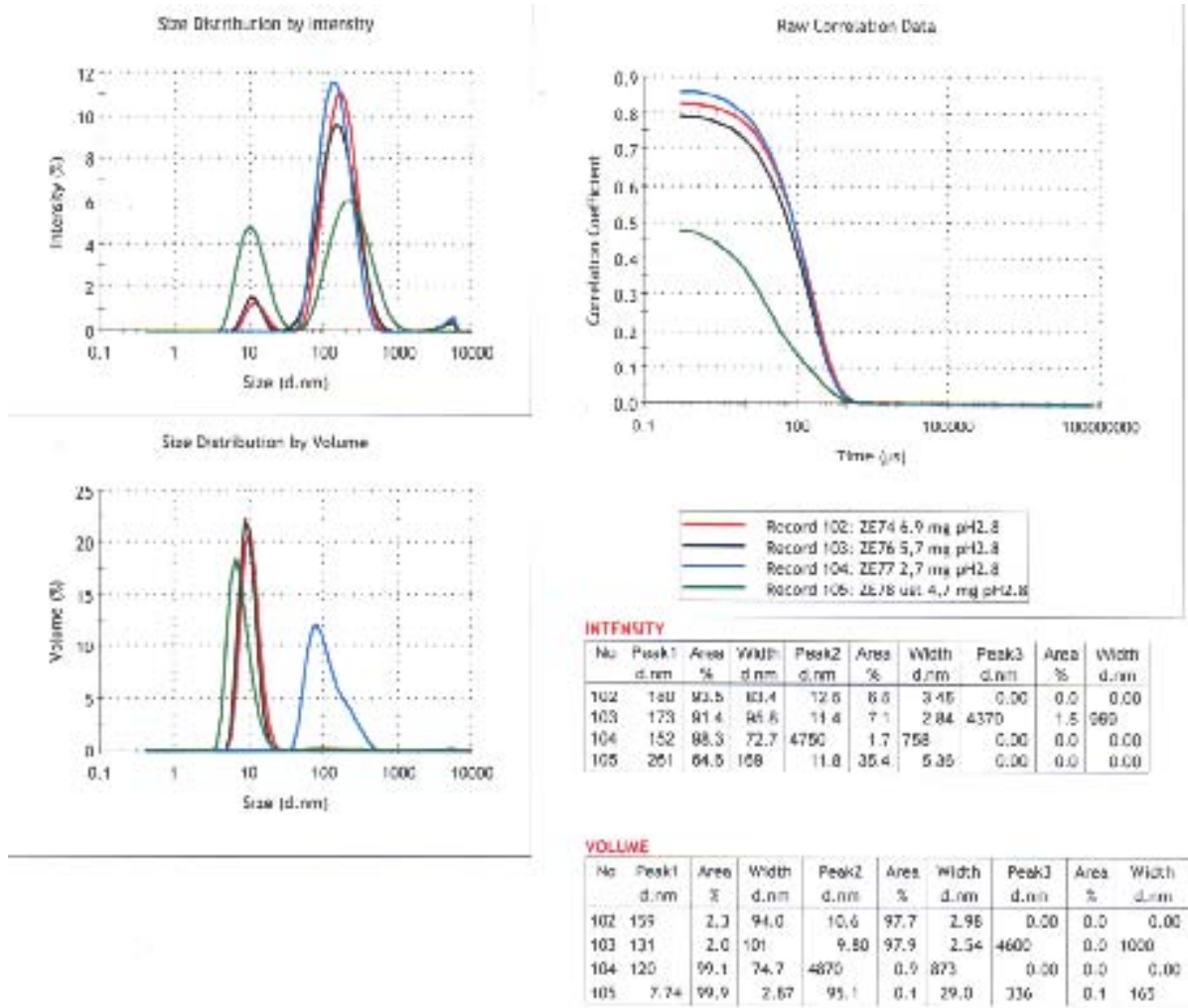


Şekil 7.12 Kloroform ortamında $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/1000 olan polikonidine ait FT-IR spektrumu (başlatıcı CH_3I).

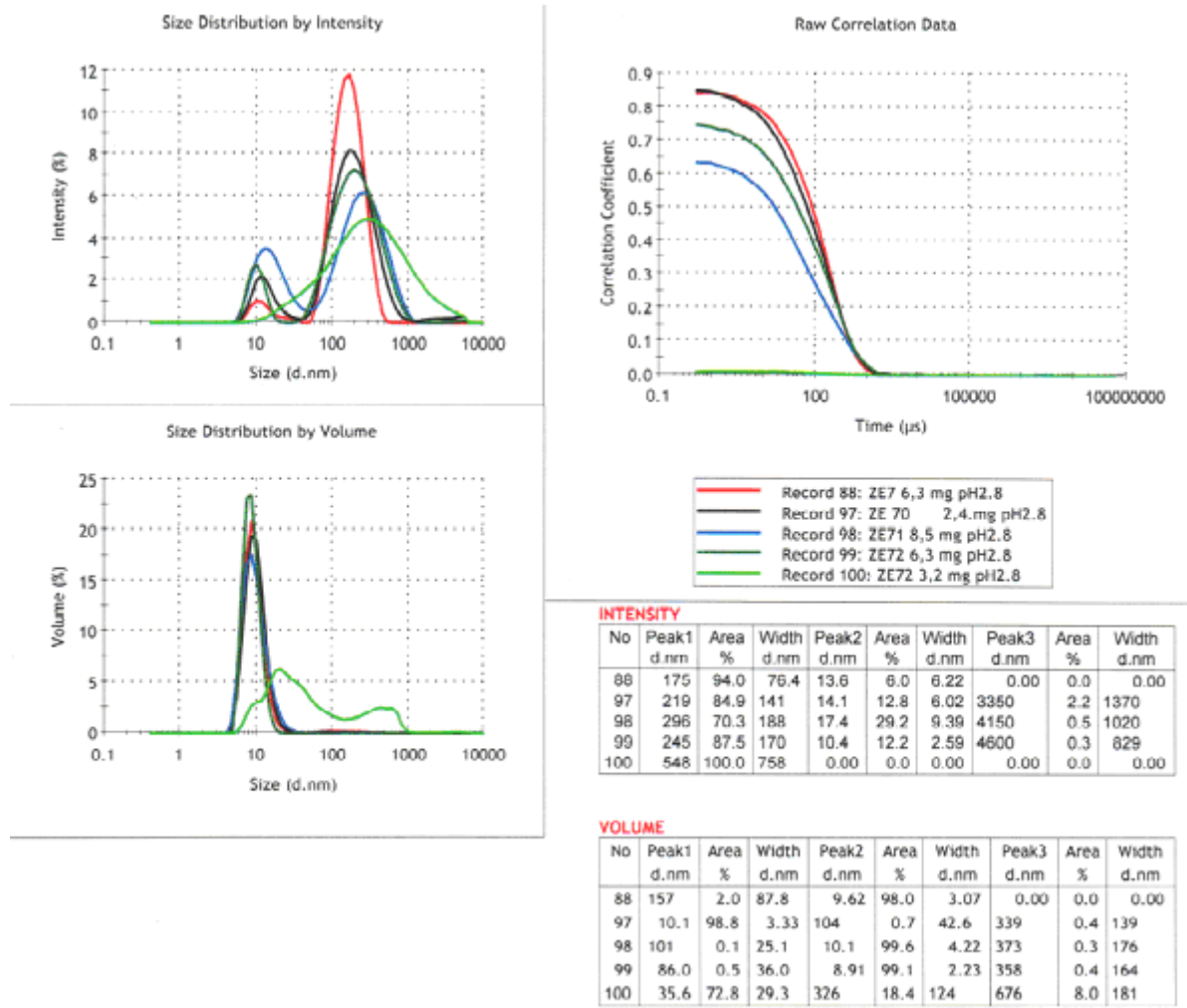
Diğer $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranlarında sentezlenen FT-IR analiz sonuçları da benzer olduğundan burada yer verilmemiştir.



Şekil 7.13 $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}=1/1000$ olan farklı başlatıcılar kullanılarak sentezlenen polikonidine ait UV spektrumları (a=metil iyodür, b=benzoil klorür, c=trimetilsilan bromür, d=t-bütil bromür ile başlatılmıştır.)

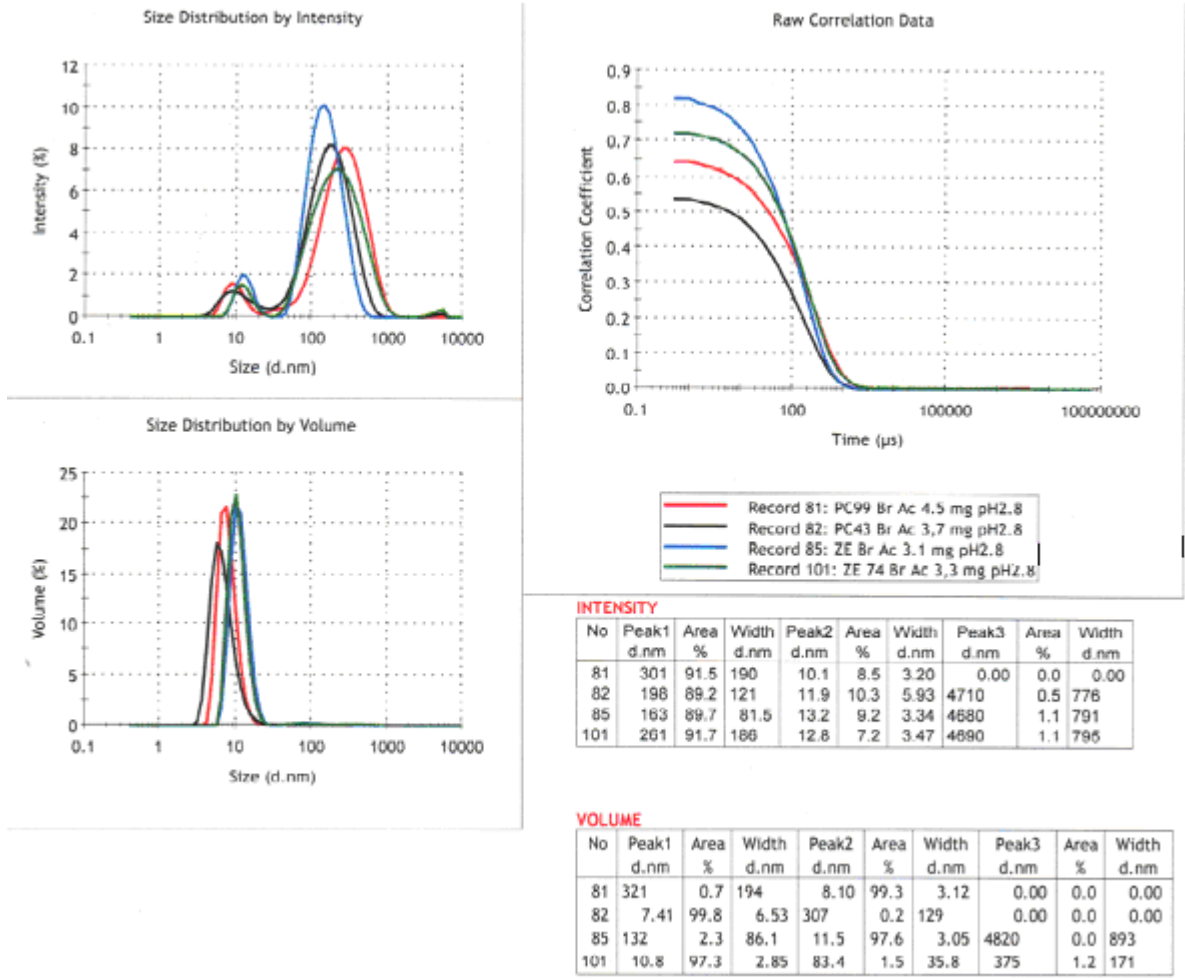


Şekil 7.14 $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/2000 Metanolde (yeşil), 1/2000 Metanol-1,4-dioksan karışımında (kırmızı), 1/2000 kloroformda (mavi), 1/2000 kloroformda 7 günde (siyah) sentezlenen polimerlere ait Zeta-Sizer grafikleri.

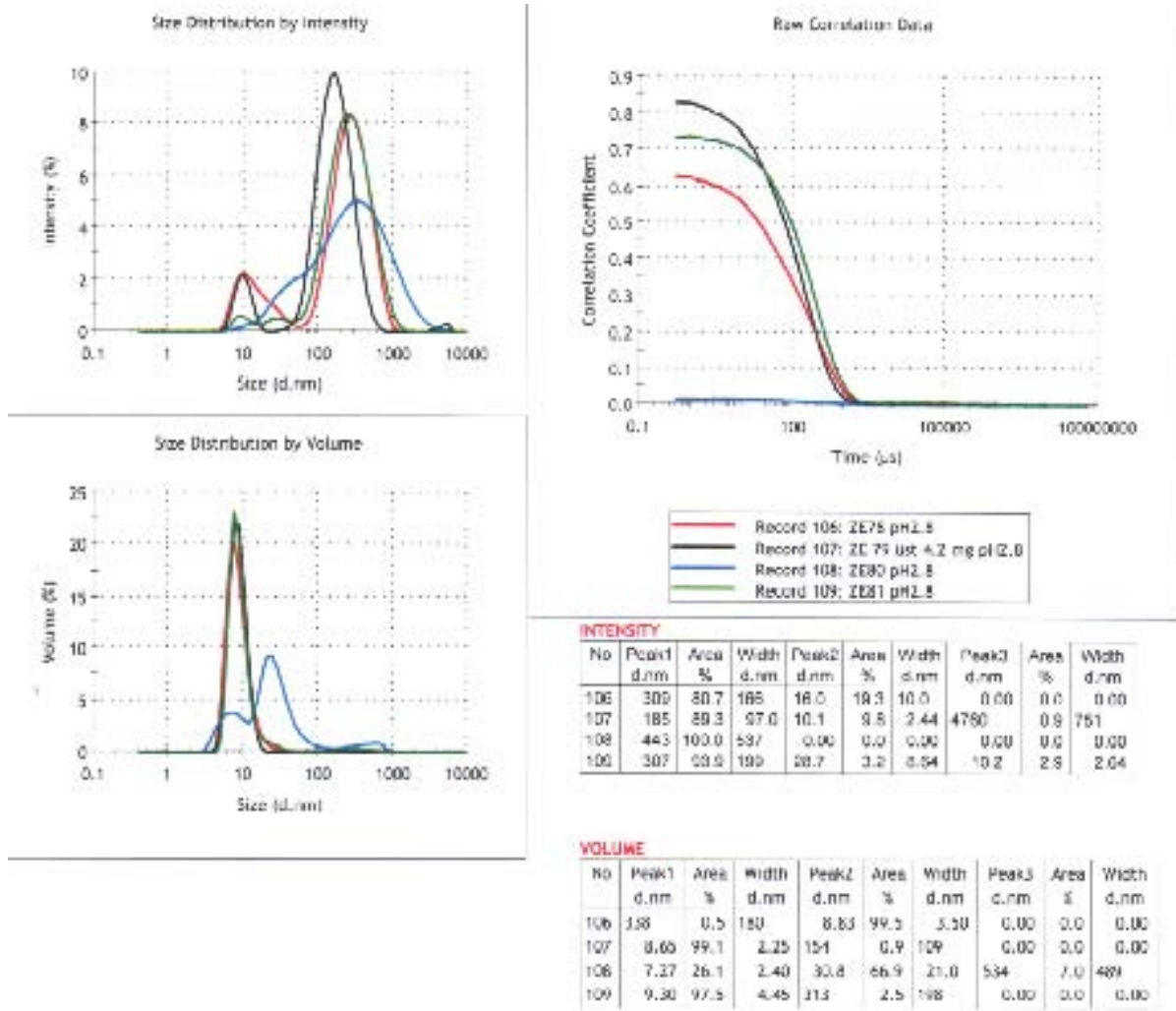


Şekil 7.15 Farklı $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranlarında sentezlenen polimerlere ait Zeta-Sizer grafikleri

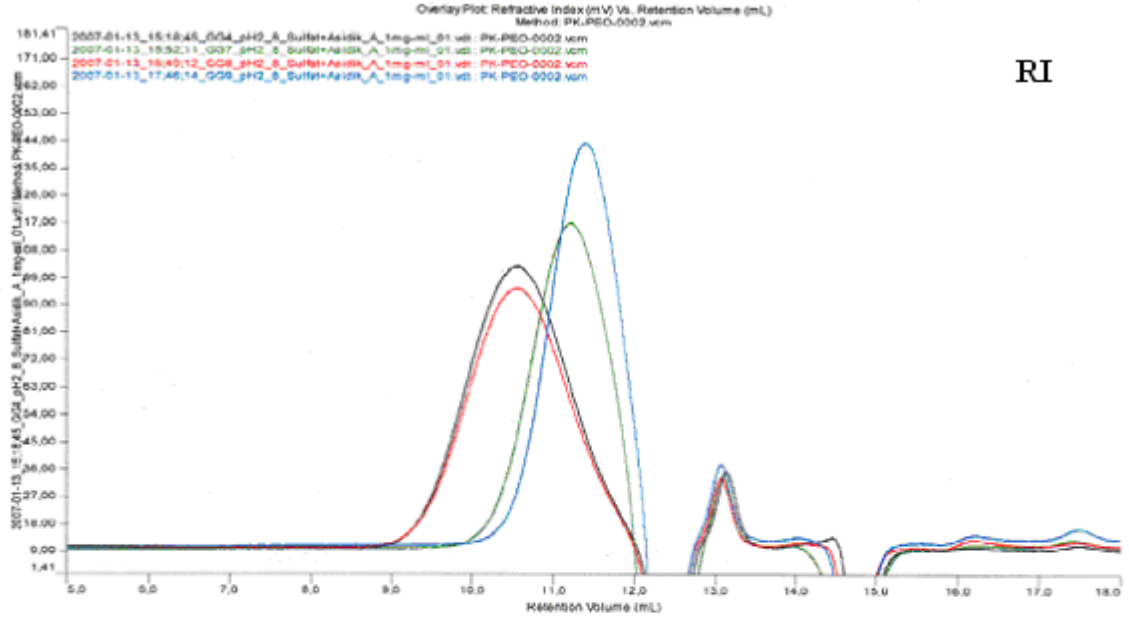
$n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/1000 kloroformda (siyah), 1/500 kloroformda (mavi), 1/2000 kloroformda (koyu yeşil), 1/2000 kloroformda 7 günde (kırmızı) sentezlenen polimerlere ait Zeta-Sizer grafikleri.



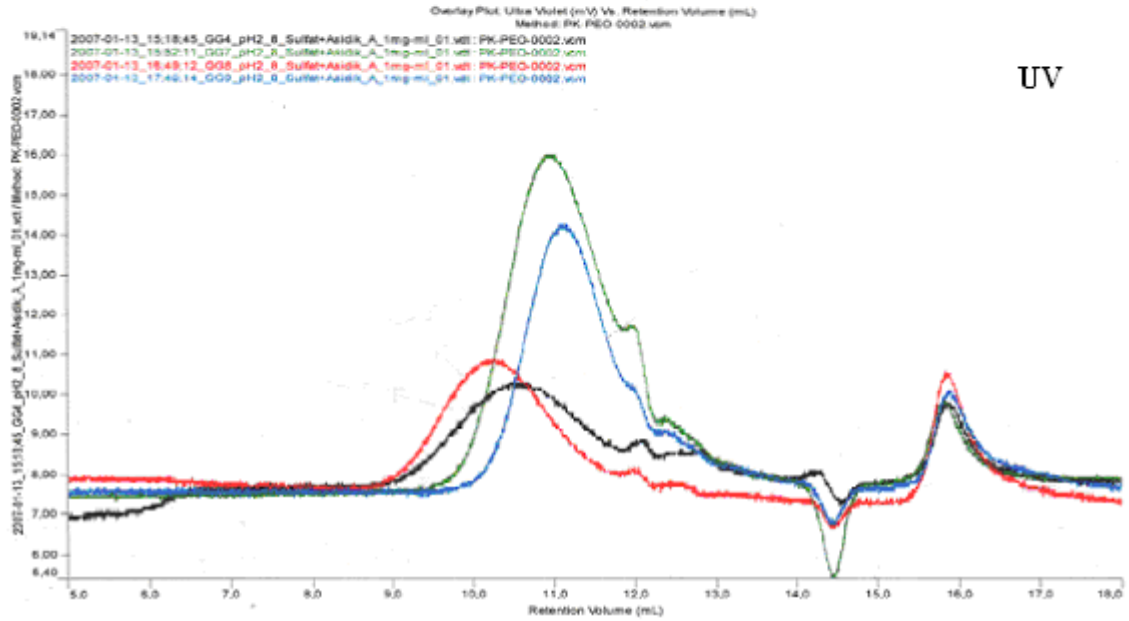
Şekil 7.16 $\overline{M}_w=9900$ (kırmızı), $\overline{M}_w=4300$ (siyah), $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/2000 Metanol-1,4-dioksan karışımında bromo asetik asit ile reaksiyona sokulmuş, $\overline{M}_w=23067$ (mavi), $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/2000 Metanol-1,4-dioksan karışımında bromo asetik asit ile reaksiyona sokulmuş, $\overline{M}_w=23662$ (yeşil) sentezlenen polimerlere ait Zeta-Sizer grafikleri.



Şekil 7.17 Metanol-1,4-dioksan karışımında $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/2000 (6 mol monomer/1 L çözelti, başlatıcı CH_3I) (kırmızı), Metanol-1,4-dioksan karışımında $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/2000 (3 mol monomer/1 L çözelti, başlatıcı CH_3I) (siyah), Metanol-1,4-dioksan karışımında $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/3000 (mavi), Metanol-1,4-dioksan karışımında $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/3000 mikrodalga ile sentezlenen (yeşil) polikonidinlere ait Zeta-Sizer grafikleri.

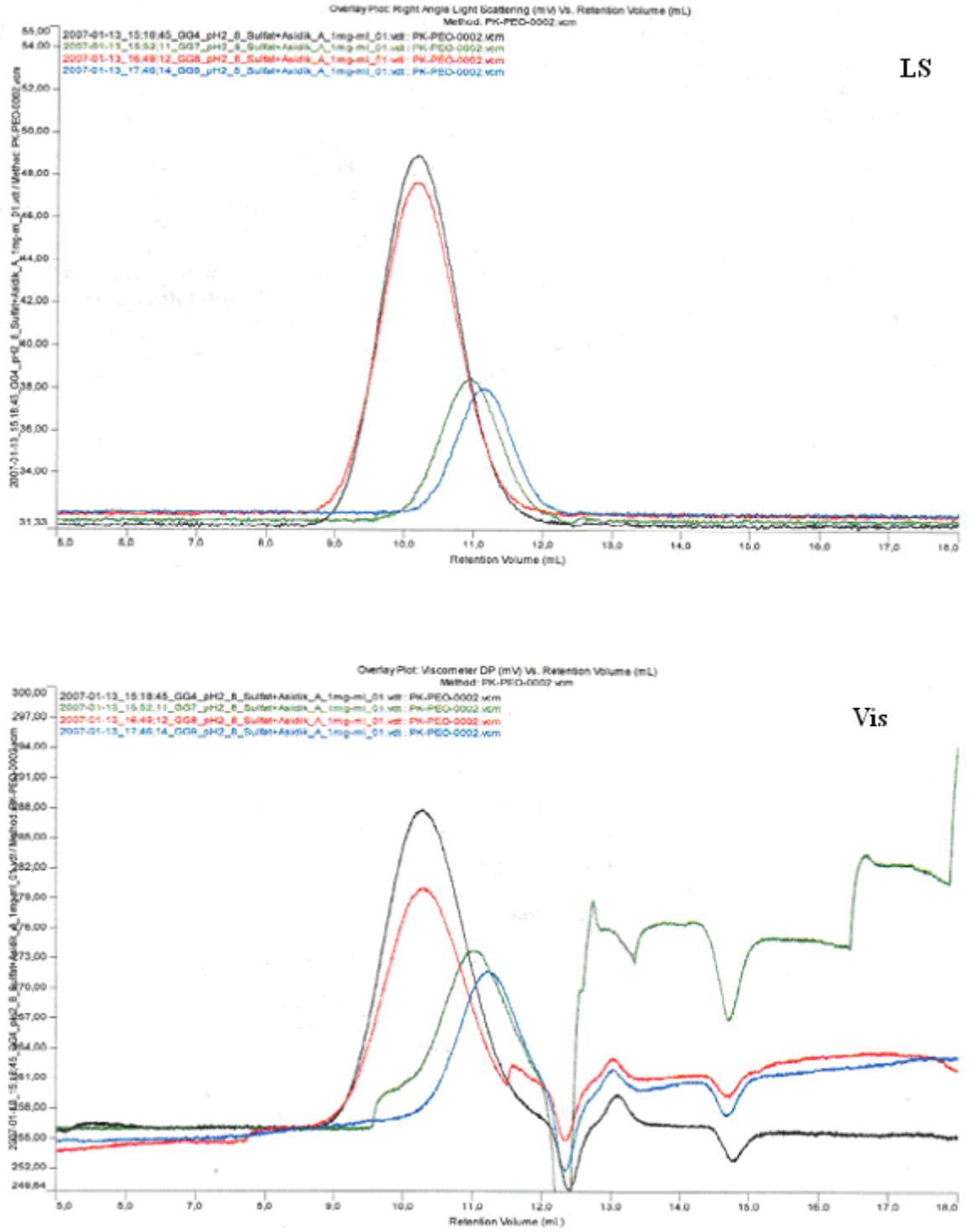


RI



UV

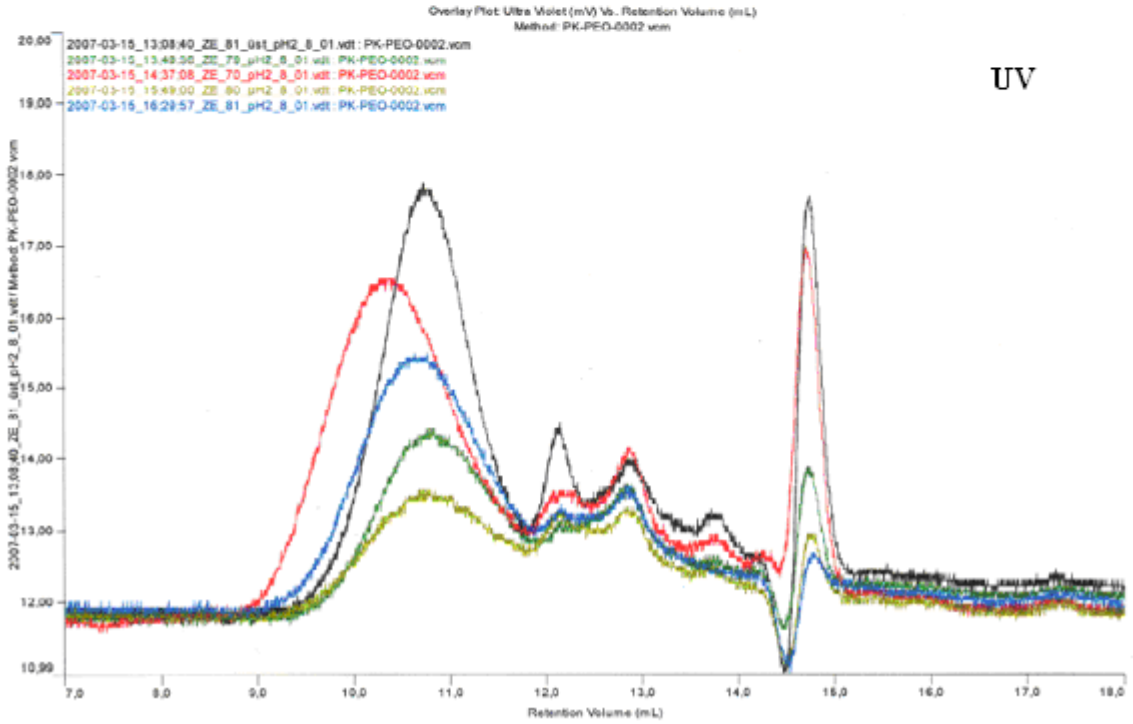
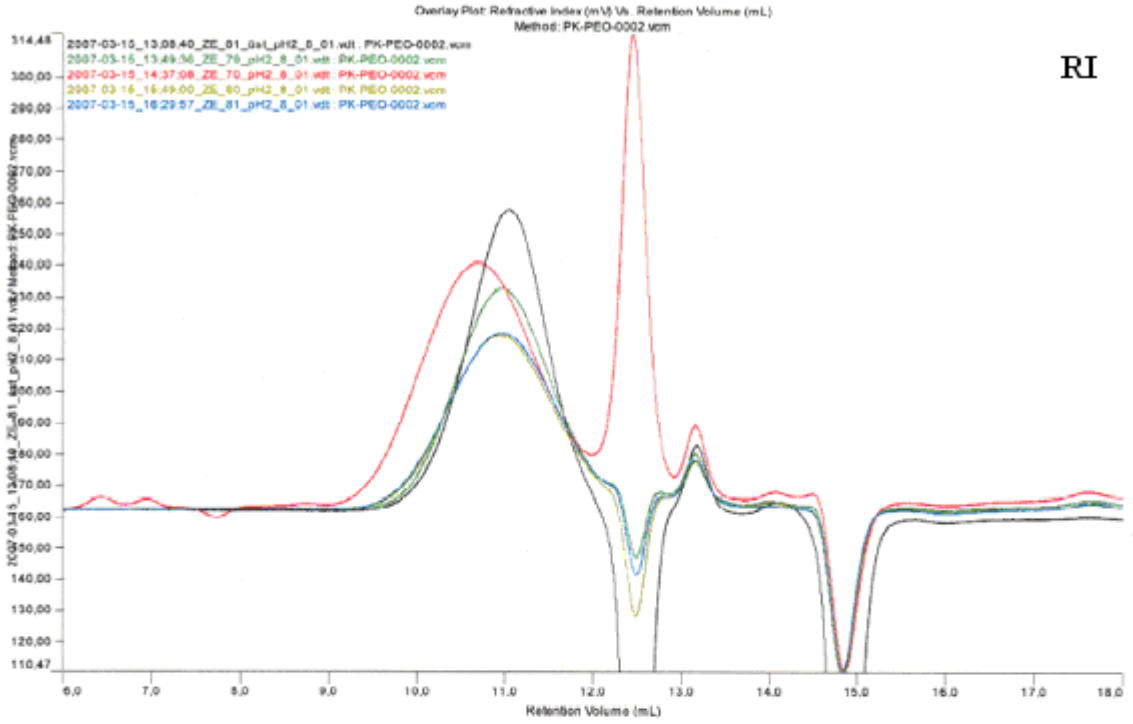
Şekil 7.18 $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}=1/1000$ olan farklı başlatıcılar kullanılarak sentezlenen polikonidine ait refraktif indeks ve UV kromatogramları. metil iyodür (siyah), benzoil klorür (yeşil), trimetilsilan bromür (kırmızı), t-bütıl bromür (mavi).



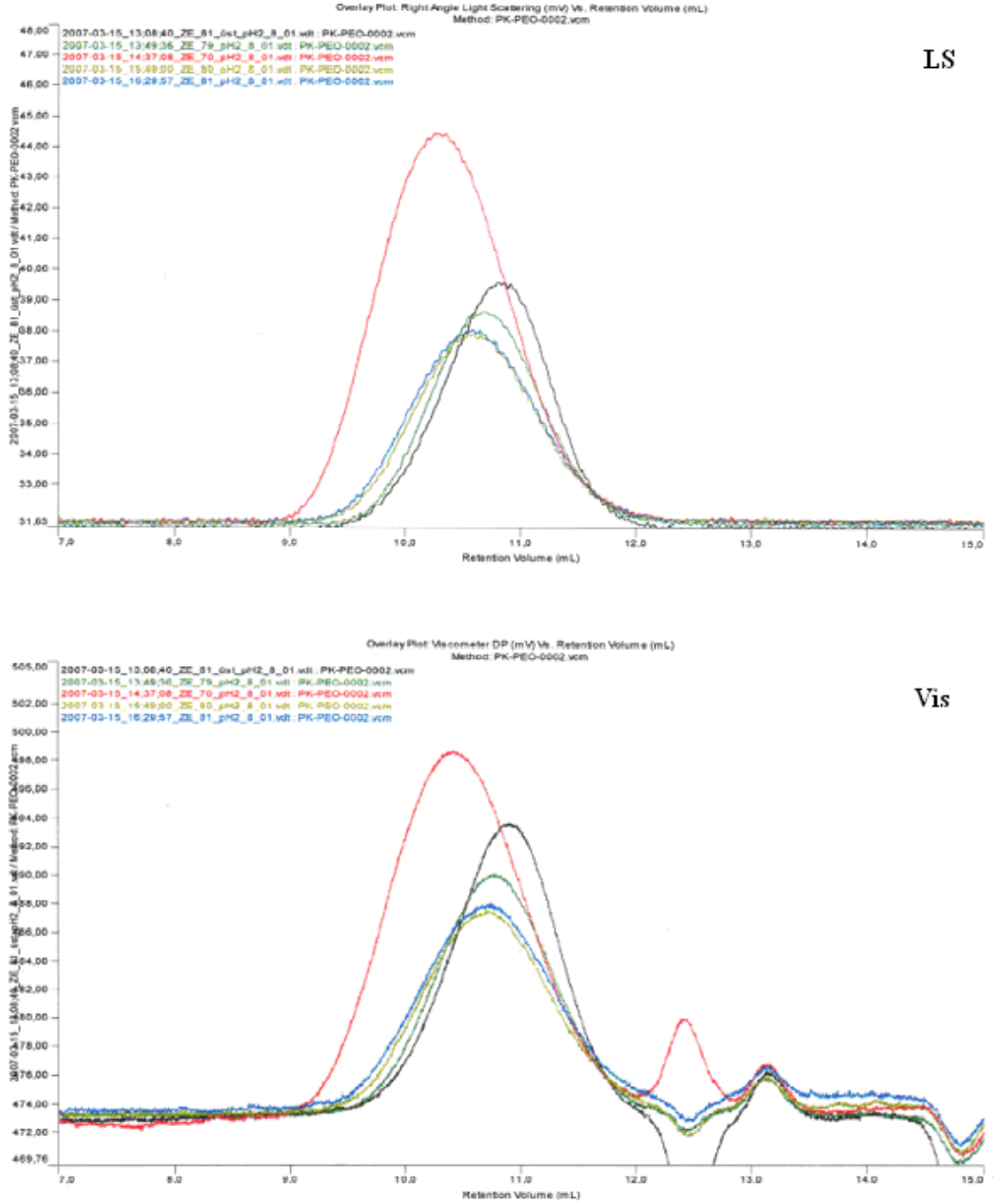
Şekil 7.19 $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}=1/1000$ olan farklı başlatıcılar kullanılarak sentezlenen polikonidine ait ışık saçılması ve viskozite kromatogramları. metil iyodür (siyah), benzoil klorür (yeşil), trimetilsilan bromür (kırmızı), t-bütıl bromür (mavi).

Çizelge 7.1 Dört dedektörlü büyüklükçe ayırma kromatografisi ile belirlenen sabitler (Şekil 7.18 ve Şekil 7.19'daki örnekler için).

Başlatıcı (mg)	$n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı	$\overline{M}_w$	$\overline{M}_n$	$\frac{\overline{M}_w}{\overline{M}_n}$	R_h (nm)	Mark Houwink a	Mark Houwink log K	Çözgen	IV (dl/g)
CH ₃ I	1/1000	29556	20279	1,457	5,876	0,607	-3,029	MetOH	0,4747
Benzoil klorür	1/1000	12626	9831	1,284	3,756	0,556	-2,856	MetOH	0,3024
TMS- Br	1/1000	31802	20953	1,518	5,808	0,651	-3,287	MetOH	0,4300
t-bütil bromür	1/1000	8032	6304	1,274	2,736	0,613	-3,151	MetOH	0,1713



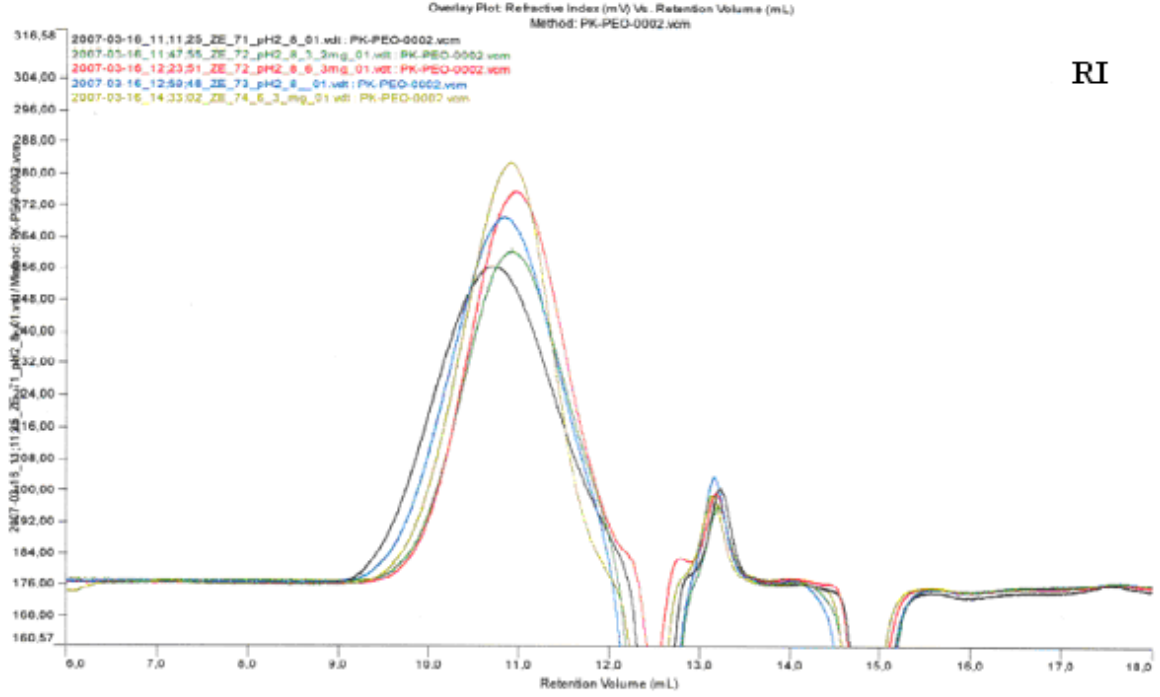
Şekil 7.20 Kloroform ortamında $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/1000 (kırmızı), Metanol-1,4-dioksan karışımında $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/2000 (koyu yeşil), Metanol-1,4-dioksan karışımında $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/3000 (açık yeşil), Metanol-1,4-dioksan karışımında $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/3000 ve mikrodalga enerjisi ile sentezlenmiş (mavi), Metanol-1,4-dioksan karışımında $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/3000 ve mikrodalga enerjisi ile ikinci çöktürme sonunda sentezlenen (siyah) polimerlere ait refraktif indeks ve UV kromatogramları.



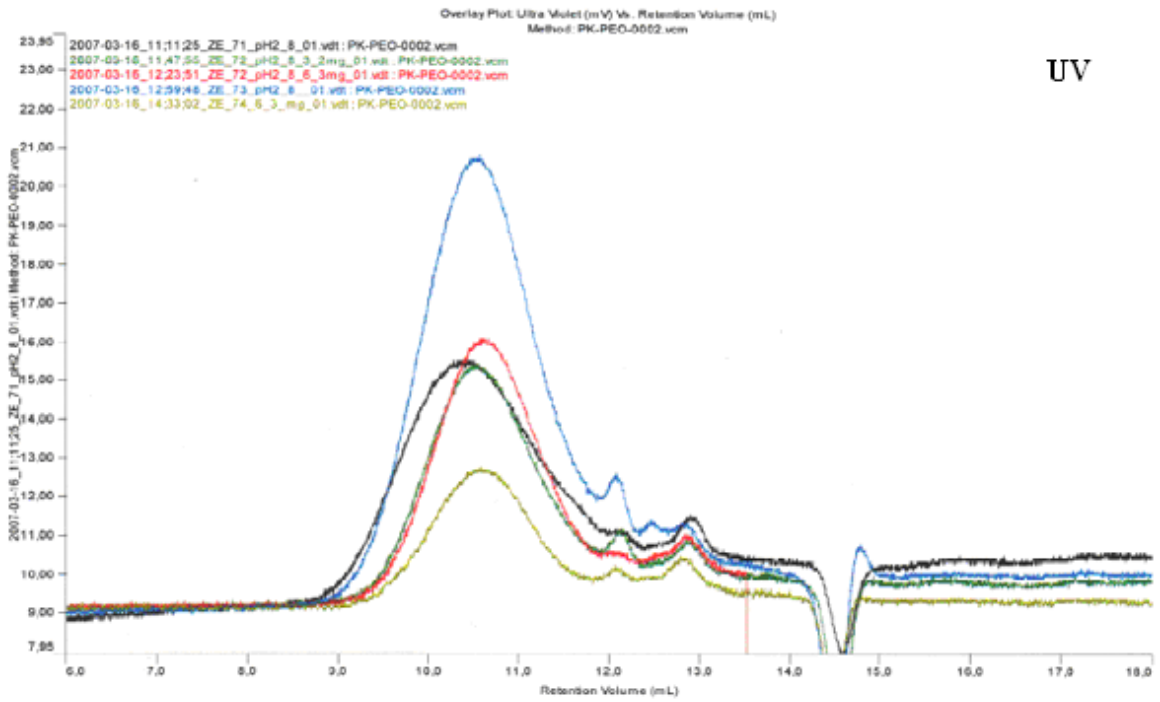
Şekil 7.21 Kloroform ortamında $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/1000 (kırmızı), Metanol-1,4-dioksan karışımında $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/2000 (koyu yeşil), Metanol-1,4-dioksan karışımında $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/3000 (açık yeşil), Metanol-1,4-dioksan karışımında $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/3000 ve mikrodalga enerjisi ile sentezlenmiş (mavi), Metanol-1,4-dioksan karışımında $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/3000 ve mikrodalga enerjisi ile ikinci çöktürme sonunda sentezlenen (siyah) polimerlere ait ışık saçılması ve viskozite kromatogramları.

Çizelge 7.2 Dört dedektörlü büyüklükçe ayırma kromatografisi ile belirlenen sabitler (Şekil 7.20 ve Şekil 7.21'deki örnekler için).

Polimer Kodu	Başlatıcı (mg)	$n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı	$\overline{M}_w$	$\overline{M}_n$	$\frac{\overline{M}_w}{\overline{M}_n}$	R_h (nm)	Mark Houwink a	Mark Houwink log K	Çözgen	IV (dl/g)
ZE 81 Üst	CH ₃ I (0,5)	1/3000	20320	16474	1,233	4,165	0,682	-3,552	MetOH-1,4-Dioksan (1:2)	0,2386
ZE 79	CH ₃ I (0,5)	1/2000	23583	15991	1,475	4,182	0,663	-3,559	MetOH-1,4-Dioksan (1:2)	0,2138
ZE 70	CH ₃ I (0,5)	1/1000	29819	18689	1,596	5,463	0,628	-3,206	CHCl ₃	0,3845
ZE 80	CH ₃ I (0,5)	1/3000	31170	20289	1,536	4,374	0,680	-3,764	MetOH-1,4-Dioksan (1:2)	0,1870
ZE 81	CH ₃ I (0,5)	1/3000	30140	18841	1,600	4,363	0,661	-3,654	MetOH-1,4-Dioksan (1:2)	0,1939

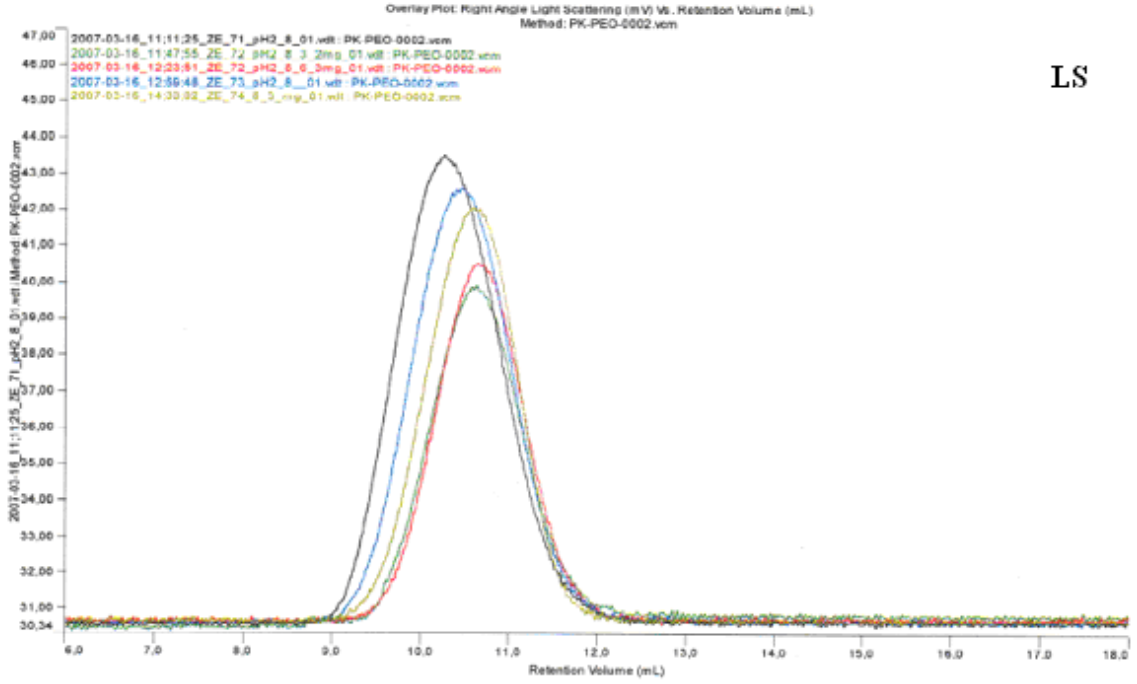


RI

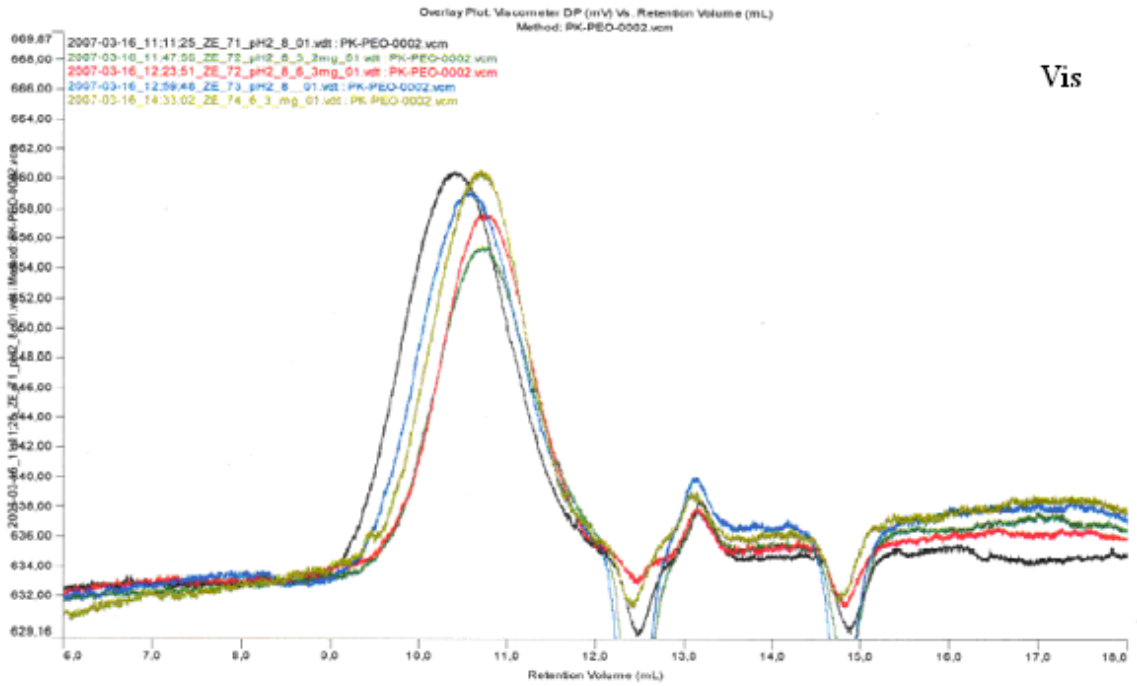


UV

Şekil 7.22 Kloroform ortamında $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/500 (siyah), Kloroform ortamında $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/2000 (koyu yeşil), Kloroform ortamında $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/2000 (kırmızı), Metanol-1,4-dioksan karışımında $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/2000 (mavi), Metanol-1,4-dioksan karışımında $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/2000 ve mikrodalga enerjisi ile sentezlenmiş (açık yeşil) polimerlere ait refraktif indeks ve UV kromatogramları.



LS

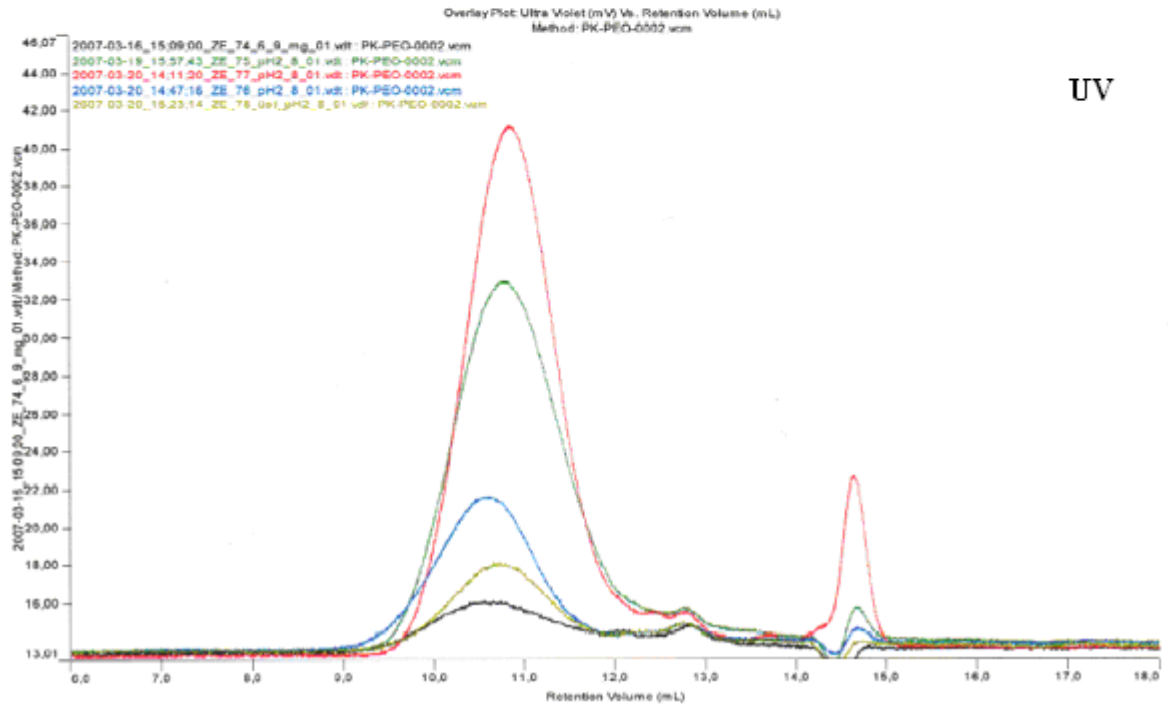
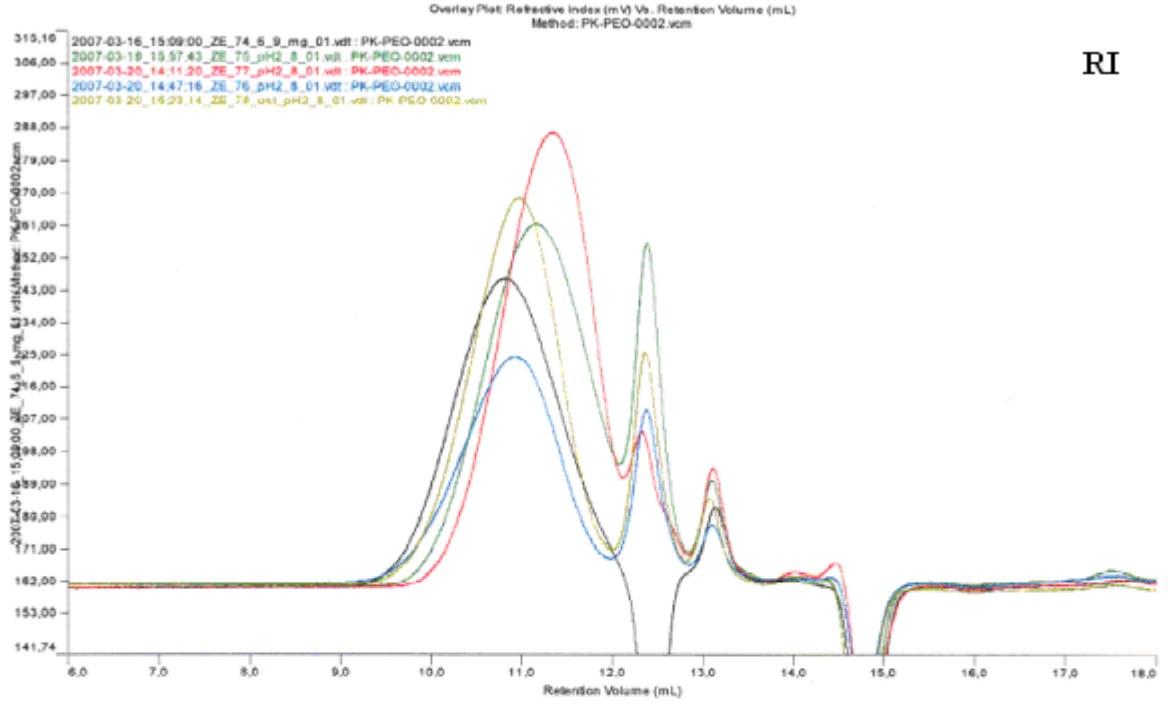


Vis

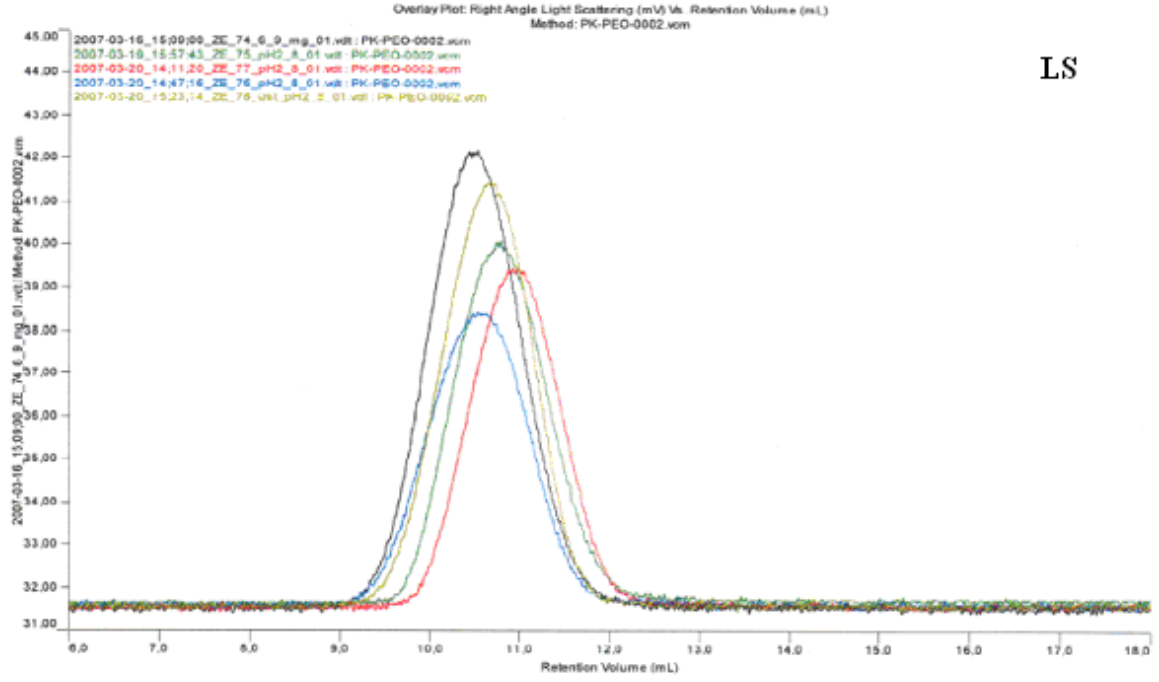
Şekil 7.23 Kloroform ortamında $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/500 (siyah), Kloroform ortamında $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/2000 (koyu yeşil), Kloroform ortamında $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/2000 (kırmızı), Metanol-1,4-dioksan karışımında $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/2000 (mavi), Metanol-1,4-dioksan karışımında $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/2000 ve mikrodalga enerjisi ile sentezlenmiş (açık yeşil) polimerlere ait ışık saçılması ve viskozite kromatogramları.

Çizelge 7.3 Dört dedektörlü büyüklükçe ayırma kromatografisi ile belirlenen sabitler (Şekil 7.22 ve Şekil 7.23'deki örnekler için) .

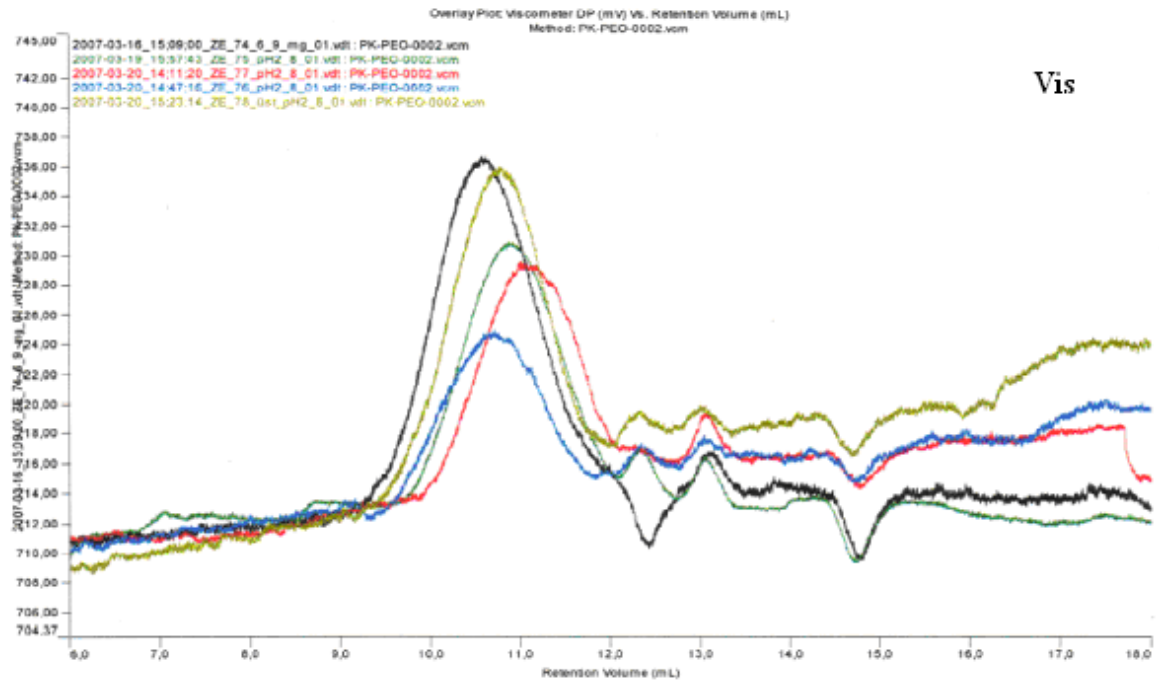
Polimer Kodu	Başlatıcı (mg)	$n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı	$\overline{M}_w$	$\overline{M}_n$	$\overline{M}_w/\overline{M}_n$	R_h (nm)	Mark Houwink a	Mark Houwink log K	Çözgen	IV (dl/g)
ZE 71	CH ₃ I (0,5)	1/500	27160	16953	1,602	5,286	0,663	-3,336	CHCl ₃	0,3830
ZE 72	CH ₃ I (0,5)	1/2000	22415	16555	1,354	4,504	0,587	-3,097	CHCl ₃	0,2792
ZE 73	CH ₃ I (0,5)	1/2000	23067	15813	1,459	4,809	0,661	-3,334	MetOH-1,4 Dioksan	0,3352
ZE 74	CH ₃ I (0,5)	1/2000	23662	16095	1,470	4,830	0,664	-3,202	MetOH-1,4 Dioksan	0,3299



Şekil 7.24 Metanol-1,4-dioksan karışımında $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/2000 ve mikrodalga enerjisi ile sentezlenmiş (siyah), kloroformda $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/2000 olan ve mikrodalga enerjisi ile sentezlenmiş (koyu yeşil), kloroformda $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/2000 (kırmızı), kloroformda $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/2000 (mavi), Metanol-1,4-dioksan karışımında $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/2000 ve ikinci çöktürme sonunda sentezlenen (açık yeşil) polimerlere ait refraktif indeks ve UV kromatogramları.



LS

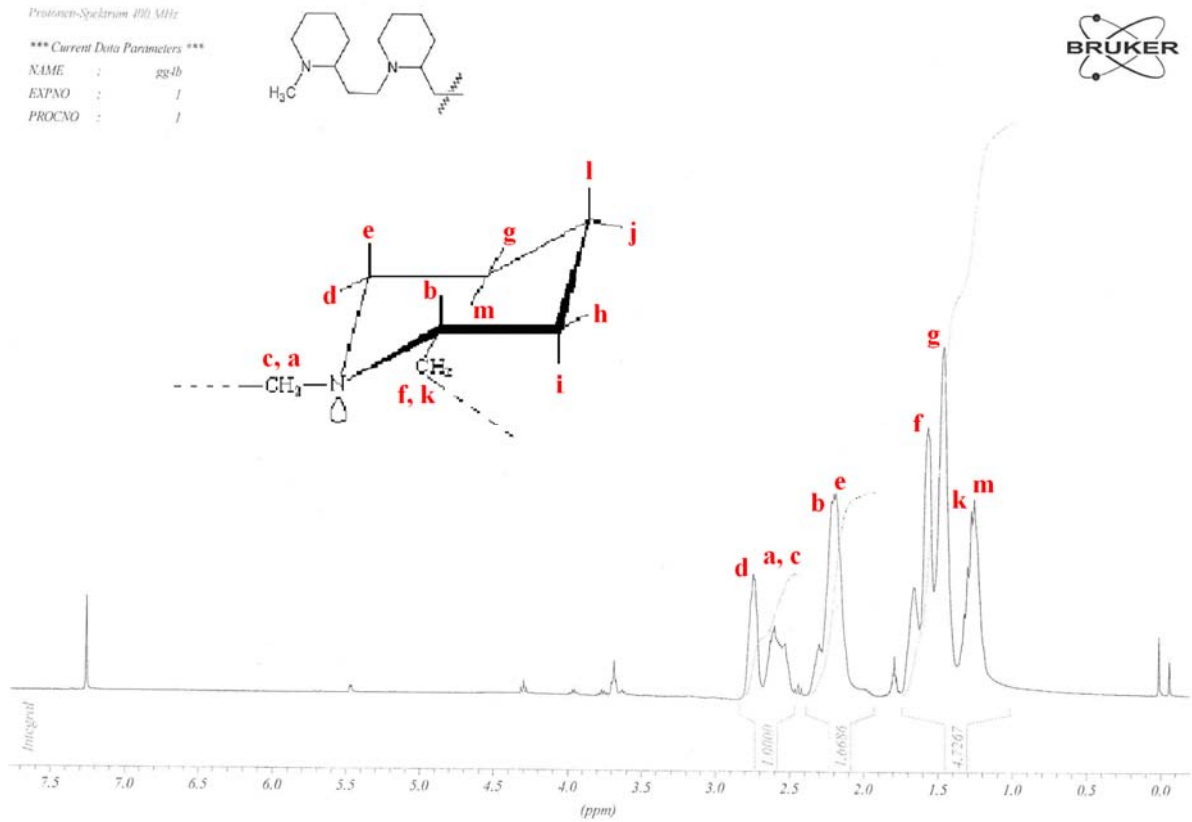


Vis

Şekil 7.25 Metanol-1,4-dioksan karışımında $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/2000 ve mikrodalga enerjisi ile sentezlenmiş (siyah), kloroformda $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/2000 olan ve mikrodalga enerjisi ile sentezlenmiş (koyu yeşil), kloroformda $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/2000 (kırmızı), kloroformda $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/2000 (mavi), Metanol-1,4-dioksan karışımında $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/2000 ve ikinci çöktürme sonunda sentezlenen (açık yeşil) polimerlere ait ışık saçılması ve viskozite kromatogramları.

Çizelge 7.4 Dört dedektörlü büyüklükçe ayırma kromatografisi ile belirlenen sabitler (Şekil 7.24 ve Şekil 7.25'deki örnekler için).

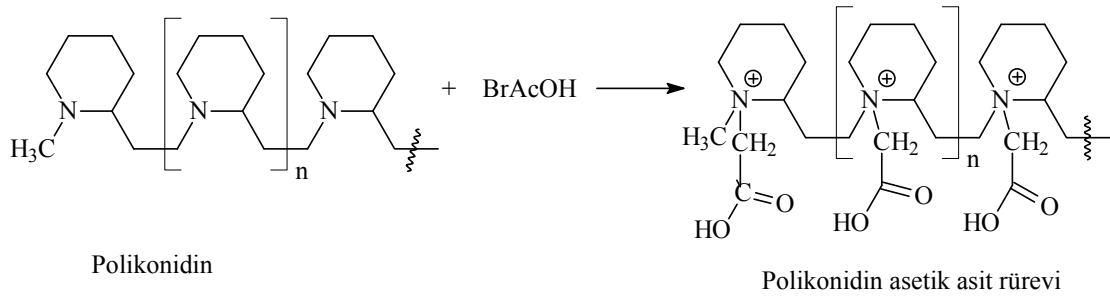
Polimer Kodu	Başlatıcı (mg)	$n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı	$\overline{M}_w$	$\overline{M}_n$	$\frac{\overline{M}_w}{\overline{M}_n}$	R_h (nm)	Mark Houwink a	Mark Houwink log K	Çözgen	IV (dl/g)
ZE 74	CH ₃ I (0,5)	1/2000	23662	16095	1,470	4,830	0,624	-3,202	MetOH-1,4-Dioksan (1:2)	0,3299
ZE 75	CH ₃ I (0,5)	1/2000	9382	3808	2,464	3,036	0,628	-3,076	CHCl ₃	0,2317
ZE 76	CH ₃ I (0,5)	1/2000	34298	25086	1,367	4,224	0,560	-3,340	CHCl ₃	0,1506
ZE 78 Üst	CH ₃ I (0,5)	1/2000	18183	13696	1,328	4,300	0,607	-3,109	MetOH-1,4-Dioksan (1:2)	0,2991



Şekil 7.26 Polikonidinin ¹H NMR analiz sonucu.

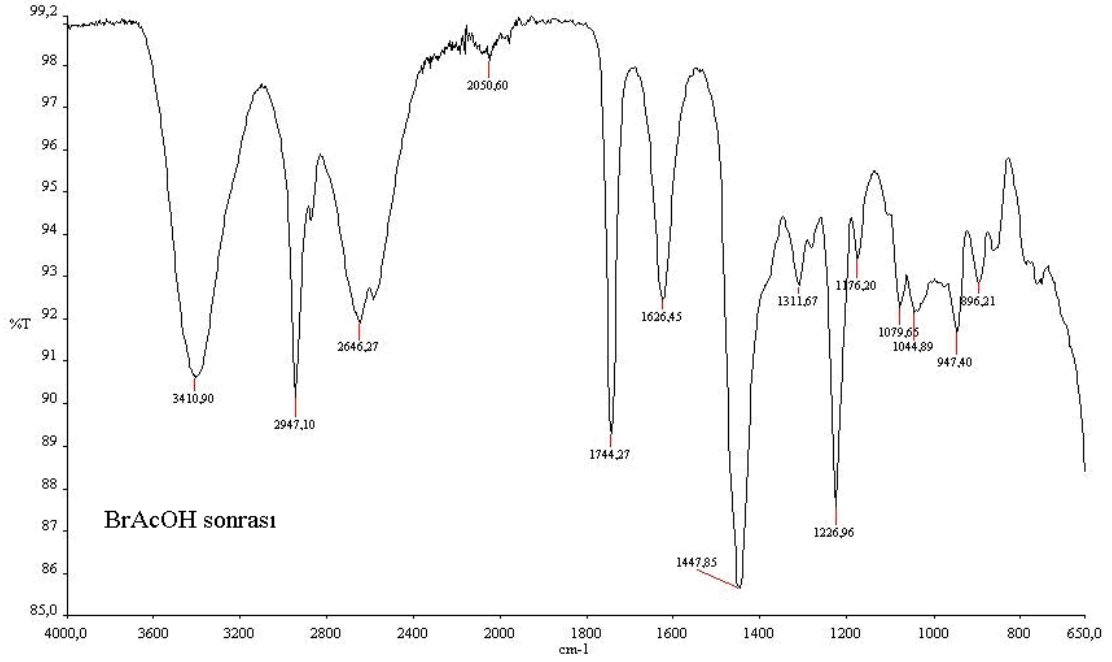
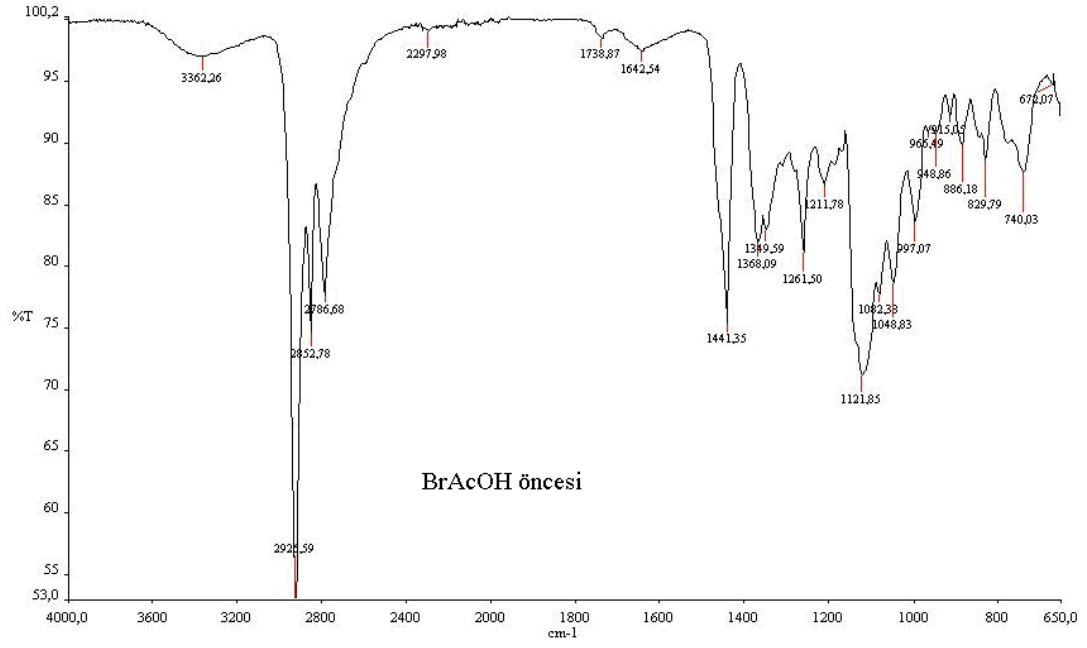
7.2.4.1 Poli(1-azabisiklo[4.2.0]oktan) Polimerinin Bromo Asetik Asit (BrAcOH) İle Modifikasyonu

Poli(1-azabisiklo[4.2.0]oktan) pozitif yüklü bir polielektrolittir. Polielektrolitlere amaca uygun olarak istenilen yapısal özelliklerin kazandırılması için çeşitli yöntemlerle ve farklı kimyasallarla modifikasyon yapılabilir. Bu çalışmada sentezlenen farklı molekül ağırlığına sahip polimerlerden ikisi bromo asetik asit ile reaksiyona sokulmuştur.



Şekil 7.27 Polikonidin BrAcOH ile modifikasyonunun şematik gösterimi.

Bunun için $\overline{M}_w=23067$ Da olan polimerden 59 mg alındı ve 5 ml metanolde çözöldü. Çözeltiye 69 mg bromo asetik asit eklendi ve inert ortamda (N₂ gazı geçirilerek) dört gün boyunca etüvde 70 °C’de bekletildi. Dört gün sonunda elde edilen modifiye polimer etil asetatın aşırısı ile çöktüröldü ve vakum altında kurutuldu. Aynı işlemler $\overline{M}_w=23662$ Da olan polikonidin için de tekrarlandı.



Şekil 7.28 polikonidine –COOH grubunun eklenmesi.

1744 cm⁻¹ ve 1626 cm⁻¹ 'de oluşan bantlar polimere –COOH fonksiyonel grubunun eklendiğini göstermektedir.

7.3 Peptid Sentezi ve Analizleri

7.3.1 Peptid Sentez

Peptidler 0,1 mmol ölçeğinde sentezlemiştir. Sentezde her dizinin C- ucunda bulunan amino asidin yüklü olduğu reçine kullanılmıştır. Sentez için gerekli kimyasalların hesabı PepDriver yazılımı ile hesaplanmıştır. Sentezde ise aminoasitler 0,2 M, aktivatörler 0,5 M ve aktivatör bazlar 2 M olarak kullanılır.

Bir peptid dizisinin sentezi için PepDriver ile belirlenen miktarda kimyasal sisteme yerleştirilmelidir. Senteze başlamadan önce sistem DMF ile yıkanır, kalibrasyonu yapılır ve senteze hazır hale getirilir. Ana çözelti olarak kullanılan DMF ve yıkamalarda kullanılan DCM yeterli miktarda sistemde kendilerine ait bölüme yerleştirilir. Amino asitler belirlenen miktarda tartılarak her biri için hazırlanan plastik şişelerde DMF’te çözülürler. Aktivatörler ve aktivatör bazlarda yine istenilen ölçüde hazırlanırlar. Fmoc grubunu uzaklaştırmak için DMF içinde % 20’lik piperidin çözeltisi hazırlanır. Hazırlanan kimyasallar cihaz üzerinde kendilerine ait bölümlere yerleştirilir.

Peptid dizilerinin hepsinin LC-MS analizi aşağıda belirtilen şartlarda yapılmıştır.

25C° Oda Sıcaklığı,

Mobil Faz A: Su, % 0,1 TFA,

Mobil Faz B: Asetonitril, % 0,1 TFA,

Akış Hızı: 0,2 mL/dak,

Elüsyon Gradienti: % 25–40 Mobil Faz B,

Dedektör Voltajı: 1,5 kV,

Gaz Akış Hızı: 1,5 L/dak,

CDL Sıcaklığı: 300 °C,

Kolon: Teknokroma Tracer Excel 120 ODS-A, 5µm, 20x0,21 cm,

Hesaplamalarda H = 1,0078 g/mol olarak alınmıştır.

7.3.2 VP1 135-161 peptid dizisinin analizleri

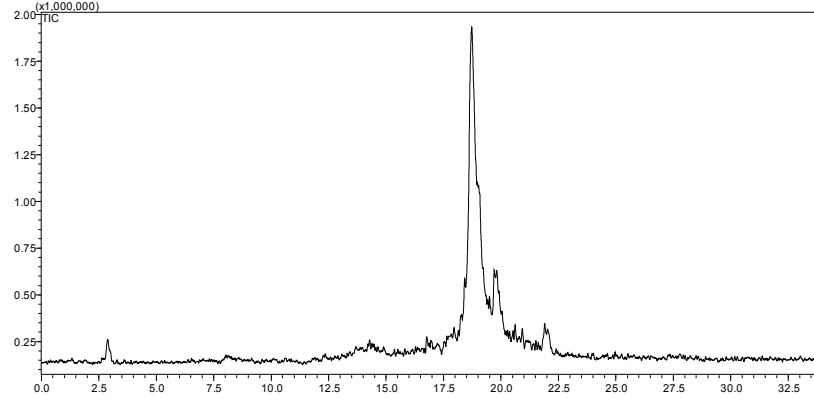
VP1 135-161 peptid dizisi N- ucunda Trp bulunmayan (a) ve bulunan (b) olarak iki farklı dizi olarak sentezlenmiştir.

7.3.2.1 VP1 135-161a peptid dizisinin analizleri

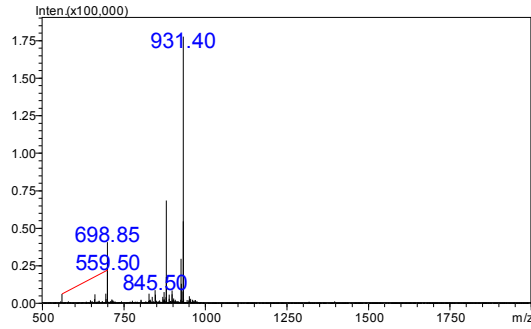
VP1 135-161a;

S¹K²Y³S⁴T⁵T⁶G⁷E⁸R⁹T¹⁰R¹¹G¹²D¹³L¹⁴G¹⁵A¹⁶L¹⁷A¹⁸A¹⁹R²⁰V²¹A²²T²³Q²⁴L²⁵P²⁶A²⁷,

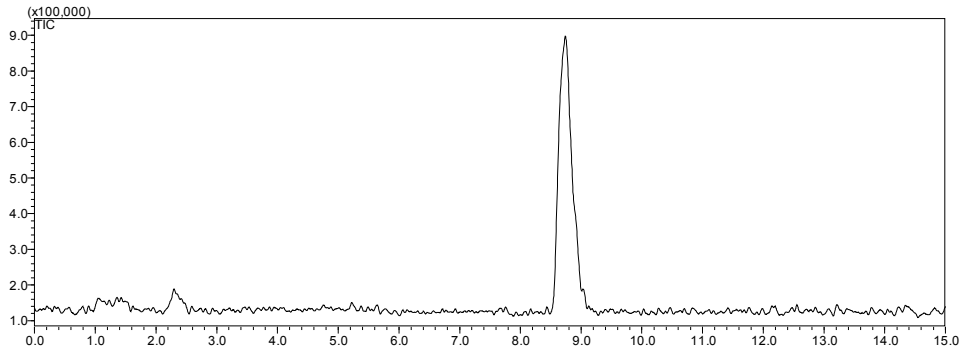
Teorik Mol kütlesi 2791,15 g/mol



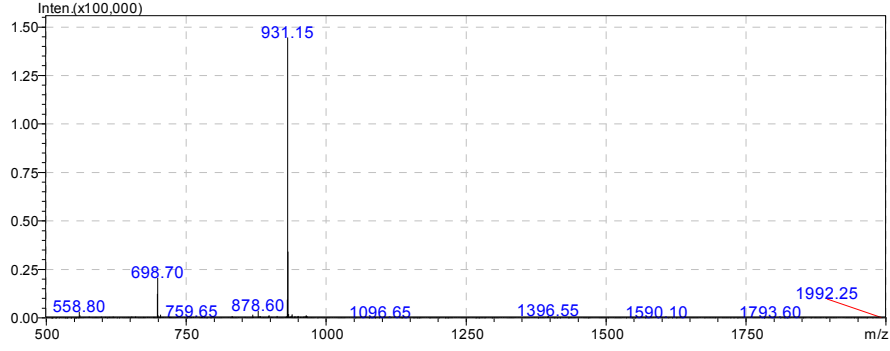
Şekil 7.29 Ham VP1 135-161a peptid dizisi için TIC.



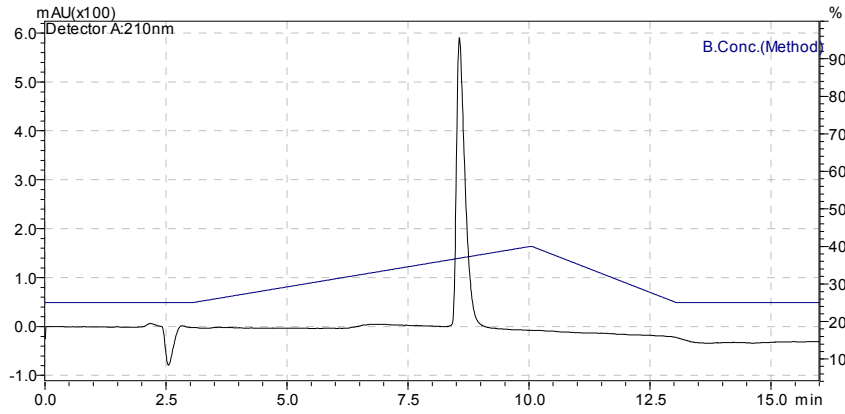
Şekil 7.30 VP1 135-161a'nın 18.321 – 19.446 dk'ları arası kütle spektrumu.



Şekil 7.31 Saf VP1 135-161a peptid dizisi için TIC.



Şekil 7.32 Saf VP1 135-161a'nın 8.596 - 9.017 dk'ları arası kütle spektrumu.



Şekil 7.33 Saf VP1 135-161a peptid dizisi için UV kromatogramı.

Mol kütesinin hesabı:

$$931,15 = \frac{(M + n_1H)}{n_1} \rightarrow 931,15n_1 = M + n_1H \rightarrow M = n_1(931,15 - 1,0078)$$

$$698,70 = \frac{(M + n_2H)}{n_2} \rightarrow 698,70n_2 = M + n_2H \rightarrow M = n_2(698,70 - 1,0078)$$

↓

$$n_1(930,1422) = n_2(697,6922) \rightarrow \frac{n_1}{n_2} = \frac{3}{4}$$

↓

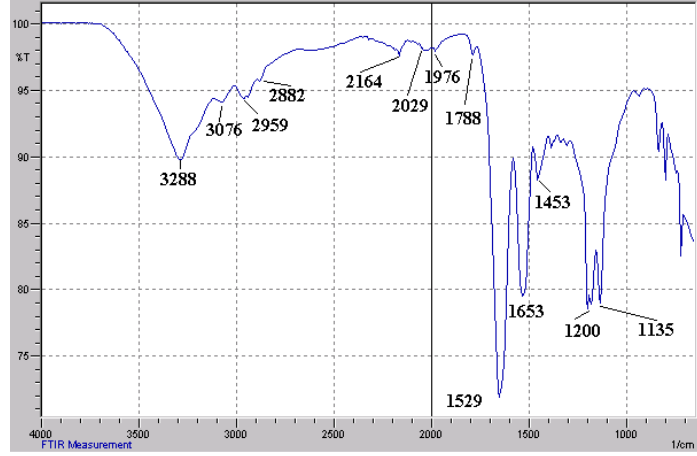
$$n_1 = 3$$

$$n_2 = 4$$

↓

VP1 135-161a peptid dizisi için Hesaplanan Molekül Kütlesi $M = 2790,42$ g/mol

Teorik Molekül Kütlesi $M = 2791,15$ g/mol



Şekil 7.34 VP1 135-161a peptid dizisi için FT-IR sonucu.

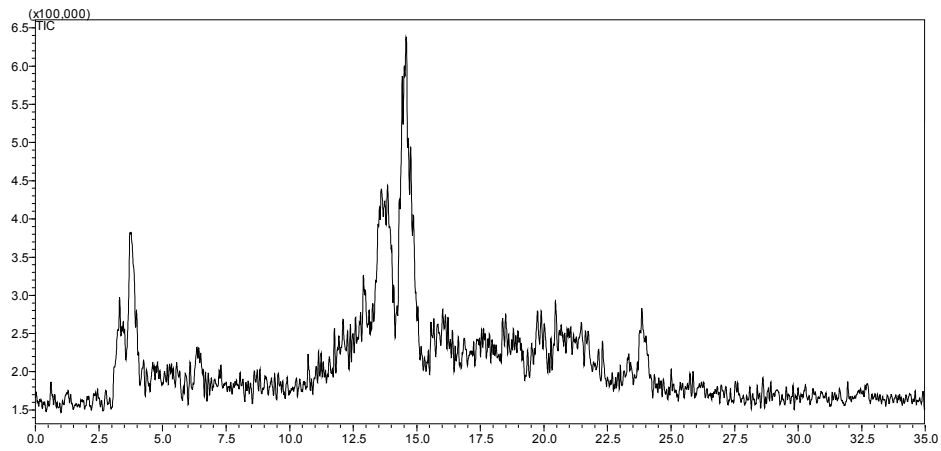
7.3.2.2 VP1 135-161b peptid dizisinin analizleri

Tez kapsamında sentezi yapılan en uzun zincire sahip peptid dizisidir.

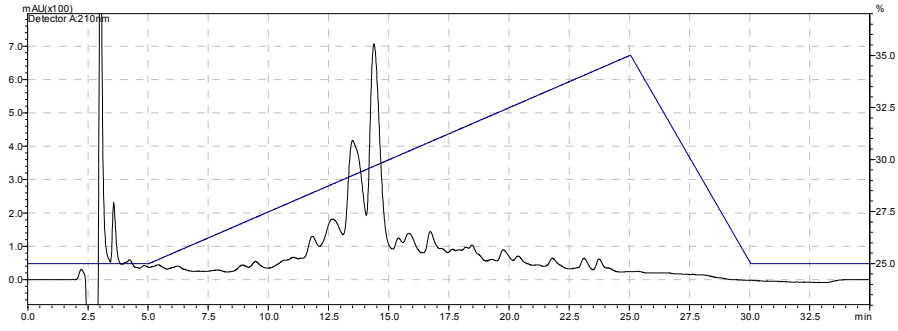
VP1 135-161b;

$W^1S^2K^3Y^4S^5T^6T^7G^8E^9R^{10}T^{11}R^{12}G^{13}D^{14}L^{15}G^{16}A^{17}L^{18}A^{19}A^{20}R^{21}V^{22}A^{23}T^{24}Q^{25}L^{26}P^{27}A^{28}$,

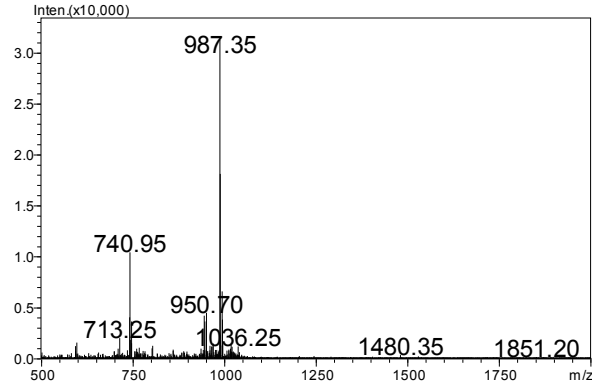
Teorik Mol kütlesi 2977,23 g/mol



Şekil 7.35 Ham VP1 135-161b peptid dizisi için TIC.



Şekil 7.36 Ham VP1 135-161b peptid dizisinin UV kromatogramı.

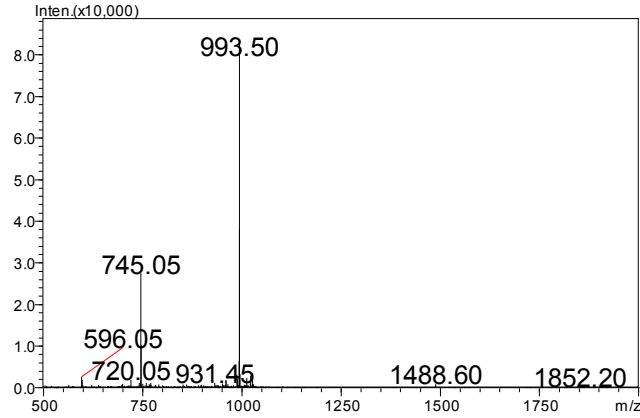


Şekil 7.37 Ham VP1 135-161b peptid dizisinin 13.254 – 14.188 dk'ları arası kütle spektrumu.

$$1480,35 = [M+2H^+]^{2+}$$

$$987,35 = [M+3H^+]^{3+}$$

$$740,95 = [M+4H^+]^{4+} \rightarrow M = 2959,84 \text{ g/mol Bir mol H}_2\text{O eksik dizi}$$



Şekil 7.38 Ham VP1 135-161b peptid dizisinin 14.229 – 15.121 dk'ları arası kütle spektrumu.

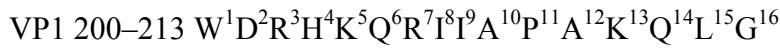
$$1488,60 = [M+2H^+]^{2+}$$

$$993,50 = [M+3H^+]^{3+}$$

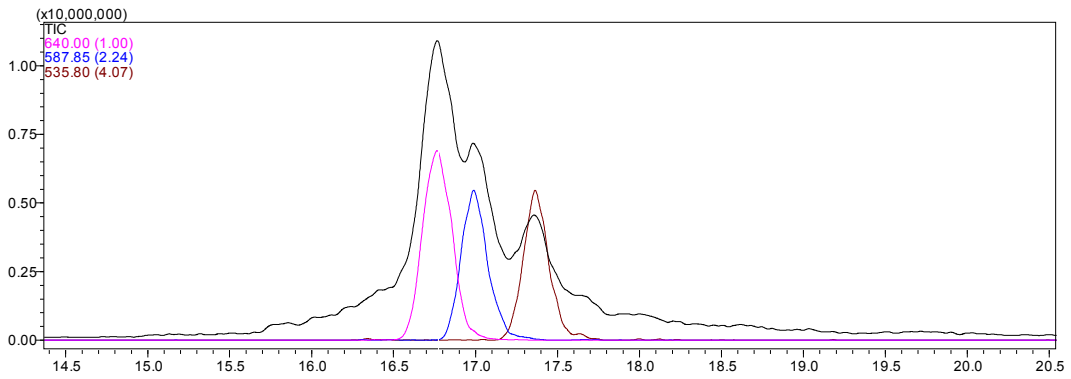
$$745,50 = [M+4H^+]^{4+}$$

$$596,05 = [M+5H^+]^{5+} \rightarrow M = 2977,012 \text{ g/mol}$$

7.3.3 VP1 200–213 peptid dizisinin analizleri

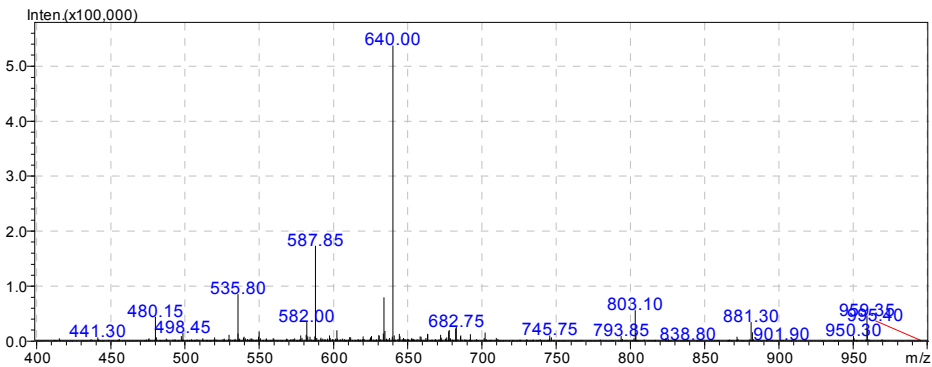


Teorik Mol Kütlesi 1917,24



Şekil 7.39 Ham VP1 200–213 peptid dizisine ait TIC.

Şekilde 3 ayrı peptid dizisinin varlığı gözlenmektedir. Bunlar sırasıyla pembe renkli 640,00, mavi renkli 587,85 ve kahverengi 535,80 pikleridir. Piklerin sırası aynı zamanda kolondan çıkış sırasını da verdiği için polarlık sırası pembe pik > mavi pik > kahverengi pik şeklindedir. Çünkü peptidler, analizi gerçekleştirdiğimiz kolona apolar etkileşimle bağlanmaktadır.



Şekil 7.40 Ham VP1 200–213 peptid dizisinin 16.5 – 17.6 dk'ları arası kütle spektrumu.

Şekil 7.39 ve 7.40’da gözlenen 3 temel pik bulunmaktadır. Peptidin mol kütlesini teorik olarak 1917,24 g/mol’dür. Buradan yola çıkarak bir hesaplama yaparsak (pembe pikin istenilen dizi olduğu düşünülerek);

$$640,00 = \frac{(M + n_1H)}{n_1} \rightarrow 640,00n_1 = M + n_1H \rightarrow 1917,24 = n_1(640,00 - 1,0078)$$

$$n = 3 \text{ iyonlaşma sayısı}$$

Buradan mavi pik için mol kütlesi: 1760,55 g/mol,

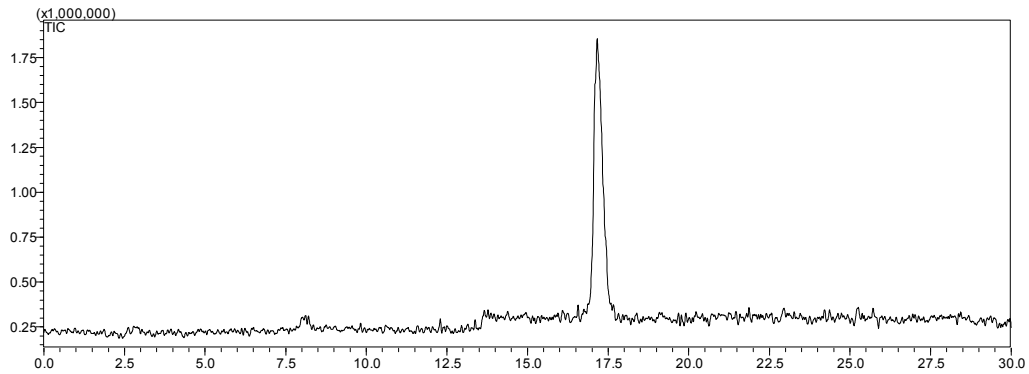
Kahverengi pik için mol kütlesi: 1604,40 g/mol bulunur.

Bu 3 peptid dizisi arasında sabit bir azalma olduğu görülür.

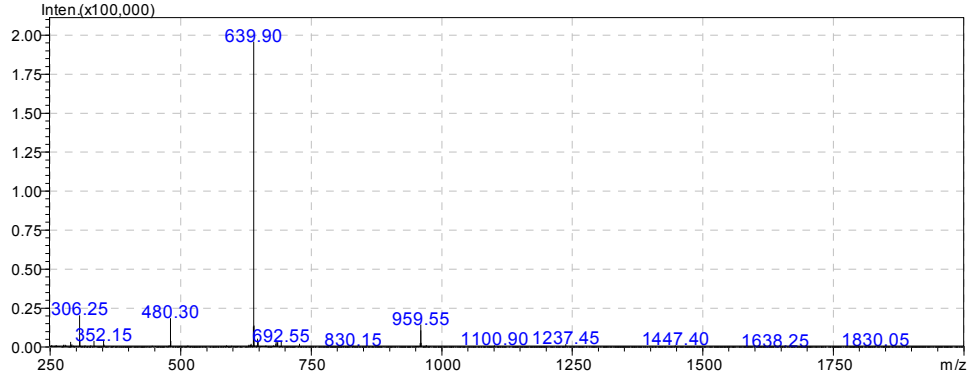
$$1917,24 - 1760,55 = 156,69$$

$$1760,55 - 1604,40 = 156,15$$

Bu değer Arg amino asidine karşılık gelmektedir. Bu hesaplardan varılan sonuç sentez sırasında “deletion” olarak adlandırılan bir eksilme olduğudur. WDRHKQR IIAPAKQLQ kırmızı ile gösterilen Arg amino asidi kahverengi pik in gösterdiği dizide hiç bulunmamakta mavi pik in gösterdiği dizide ise 1 adet bulunmaktadır. Yapılan saflaştırma işlemi ile pembe pik diğerlerinden ayrılarak saf olarak elde edilmiştir. Şekil 7.41 ve 7.42’de saflaştırılmış VP1 200–213 peptid dizisine ait veriler bulunmaktadır.



Şekil 7.41 Saflaştırılmış VP1 200–213 peptid dizisine ait TIC.

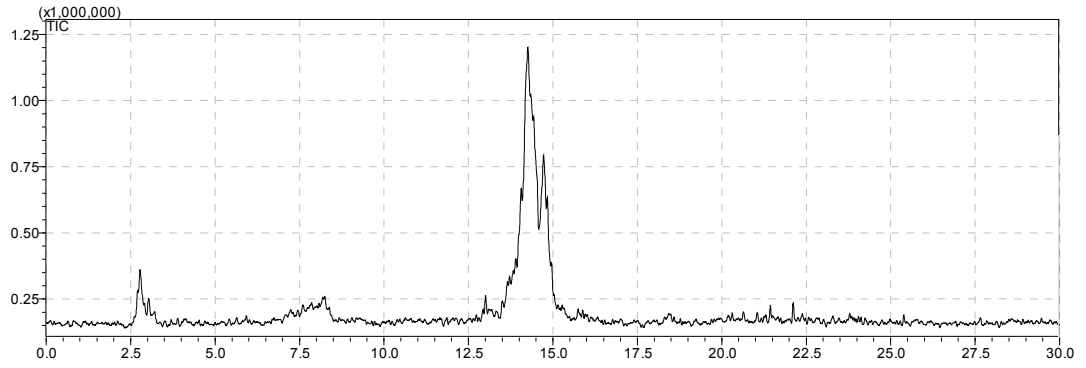


Şekil 7.42 Saflaştırılmış VP1 200-213'ün 17.0 – 18.0 dk'ları arası kütle spektrumu.

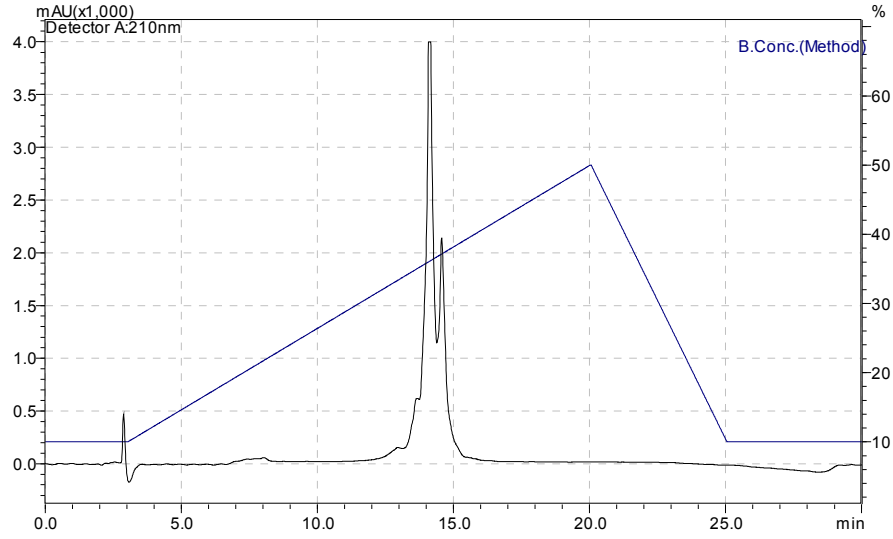
7.3.4 VP1 40–60 peptid dizisinin analizleri

VP1 40–60 W¹V²K³I⁴N⁵N⁶T⁷S⁸P⁹T¹⁰H¹¹V¹²I¹³D¹⁴L¹⁵M¹⁶Q¹⁷T¹⁸H¹⁹Q²⁰H²¹G²²

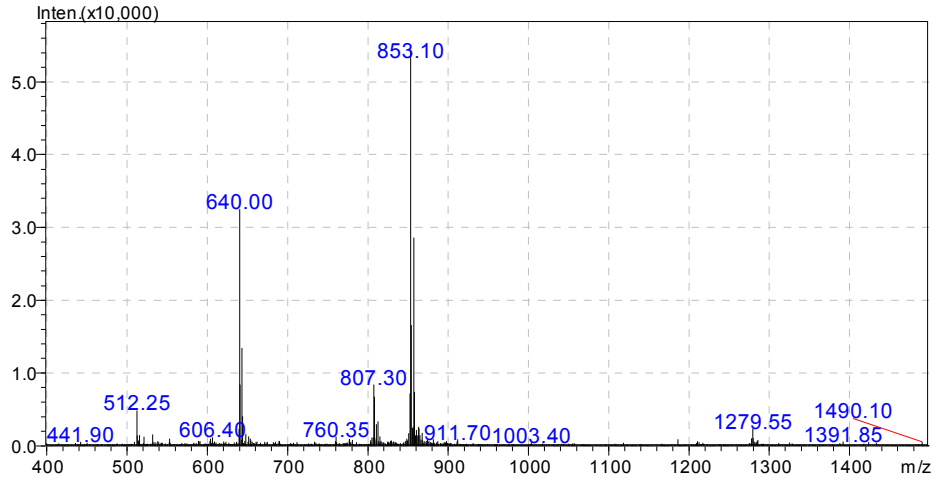
Teorik Mol Kütlesi; 2556,88 g/mol



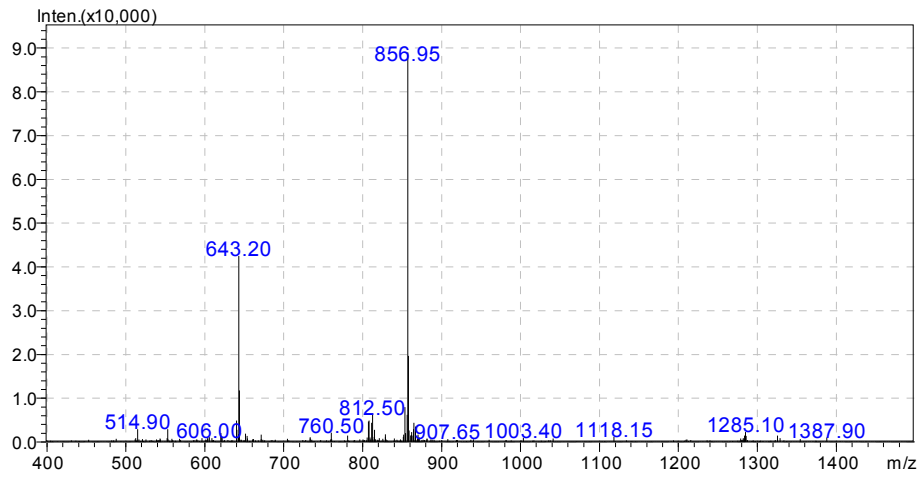
Şekil 7.43 VP1 40–60 peptid dizisi için TIC.



Şekil 7.44 VP1 40-60 peptid dizisi için UV kromatogramı.



Şekil 7.45 VP1 40–60 peptid dizisinin 13.417 – 15.400 dk'ları arası kütle kromatogramı.



Şekil 7.46 VP1 40-60 peptid dizisinin 14.600 - 15.096 dk'ları arası kütle kromatogramı.

TIC ve UV kromatogramlardan anlaşılacağı üzere analizi yapılan VP1 40–60 peptid dizisi için biri daha küçük olmak üzere 2 pik bulunmaktadır. MS piklerinden hesap yapılması sonucu

Molekül ağırlığının hesaplanması:

14.600 – 15.096 dk'lar arası

$$640,00 = \frac{(M + n_1H)}{n_1} \rightarrow 640,00n_1 = M + n_1H \rightarrow M = n_1(640,00 - 1,0078)$$

$$853,10 = \frac{(M + n_2H)}{n_2} \rightarrow 853,10n_2 = M + n_2H \rightarrow M = n_2(853,10 - 1,0078)$$

↓

$$n_1(638,9922) = n_2(852,0922) \rightarrow \frac{n_1}{n_2} = \frac{4}{3}$$

↓

$$n_1 = 4$$

$$n_2 = 3$$

↓

VP1 40–60 peptid dizisi için Hesaplanan Molekül Kütlesi M = 2556,3 g/mol

Teorik Molekül Kütlesi M = 2556,88 g/mol

13.417 – 15.400 dk'lar arası (küçük pik)

$$643,20 = \frac{(M + n_1H)}{n_1} \rightarrow 643,20n_1 = M + n_1H \rightarrow M = n_1(643,20 - 1,0078)$$

$$856,95 = \frac{(M + n_2H)}{n_2} \rightarrow 856,95n_2 = M + n_2H \rightarrow M = n_2(856,95 - 1,0078)$$

↓

$$n_1(642,1922) = n_2(855,9422) \rightarrow \frac{n_1}{n_2} = \frac{4}{3}$$

↓

$$n_1 = 4$$

$$n_2 = 3$$



VP1 40–60 peptid dizisi için Hesaplanan Molekül Kütlesi $M = 2568,76 \text{ g/mol}$

Teorik Molekül Kütlesi $M = 2556,88 \text{ g/mol}$

Analiz sonuçlarına göre küçük pik içerisindeki dizide $+12 \text{ g/mol}$ fazlalık bulunmaktadır. Diziye ilave olunan bu kısım diziyi daha hidrofobik hale getirmiştir. Bu durum muhtemelen ortamdan bir iyonun yapışması nedeniyledir.

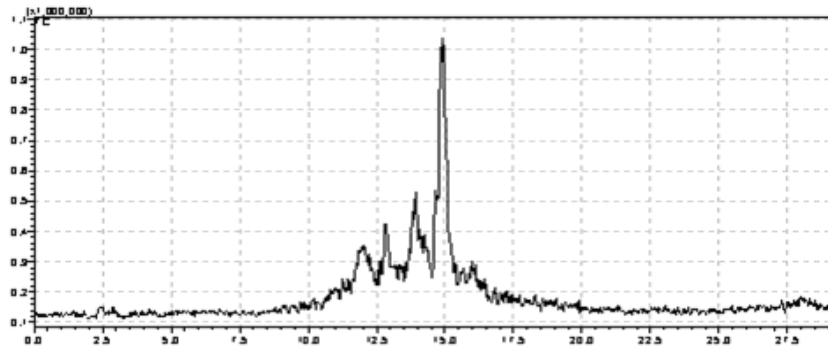


Şekil 7.47 VP1 40–60 peptid dizisi için FT-IR sonucu.

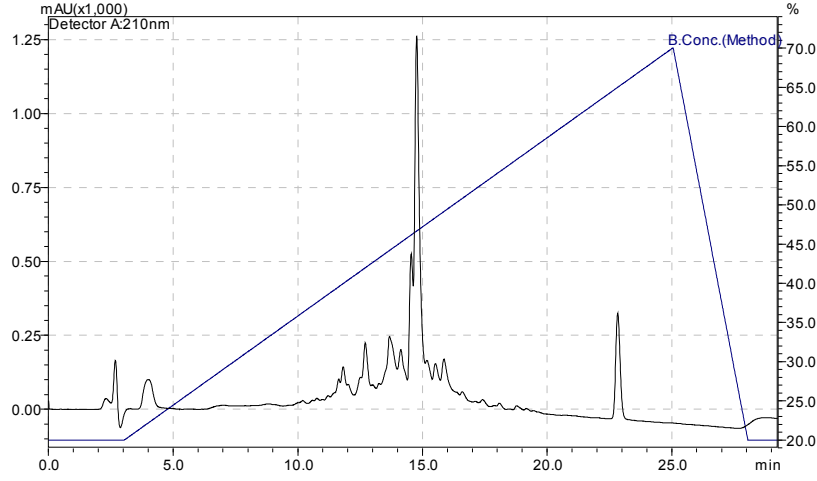
7.3.5 NP 55–69 peptid dizisinin analizleri

NP 55–69; $W^1R^2L^3I^4Q^5N^6S^7L^8T^9I^{10}E^{11}R^{12}M^{13}V^{14}L^{15}S^{16}A^{17}$;

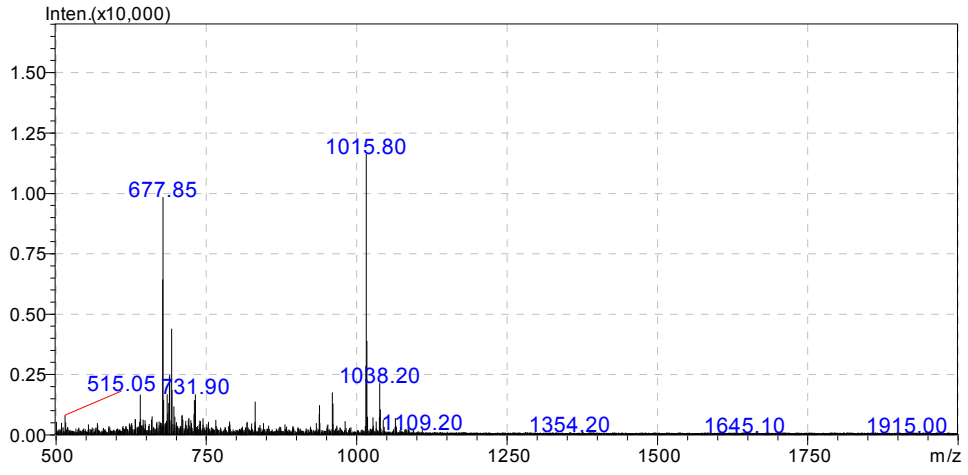
Teorik Mol Kütlesi: $2030,43 \text{ g/mol}$



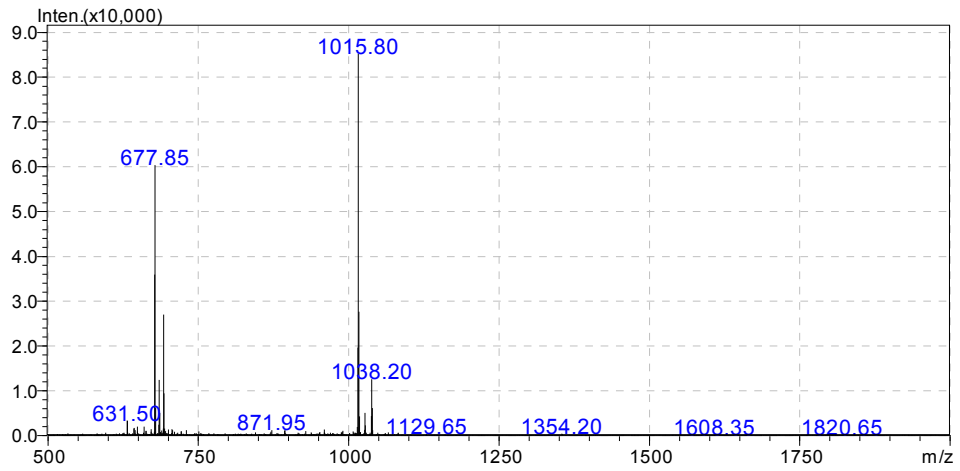
Şekil 7.48 Ham NP 55–69 peptid dizisine ait TIC.



Şekil 7.49 Ham NP 55–69 peptid dizisinin UV kromatogramı.



Şekil 7.50 Ham NP 55–69 peptid dizisinin 9.642 – 17.125 dk' ları arası kütle spektrumu.



Şekil 7.51 Ham NP 55–69 peptid dizisinin 14.517 – 15.338 dk' ları arası kütle spektrumu.

$$677,85 = \frac{(M + n_1H)}{n_1} \rightarrow 677,85n_1 = M + n_1H \rightarrow M = n_1(677,85 - 1,0078)$$

$$1015,80 = \frac{(M + n_2H)}{n_2} \rightarrow 1015,80n_2 = M + n_2H \rightarrow M = n_2(1015,80 - 1,0078)$$

↓

$$n_1(676,8422) = n_2(1014,7922) \rightarrow \frac{n_1}{n_2} = \frac{3}{2}$$

↓

$$n_1 = 3$$

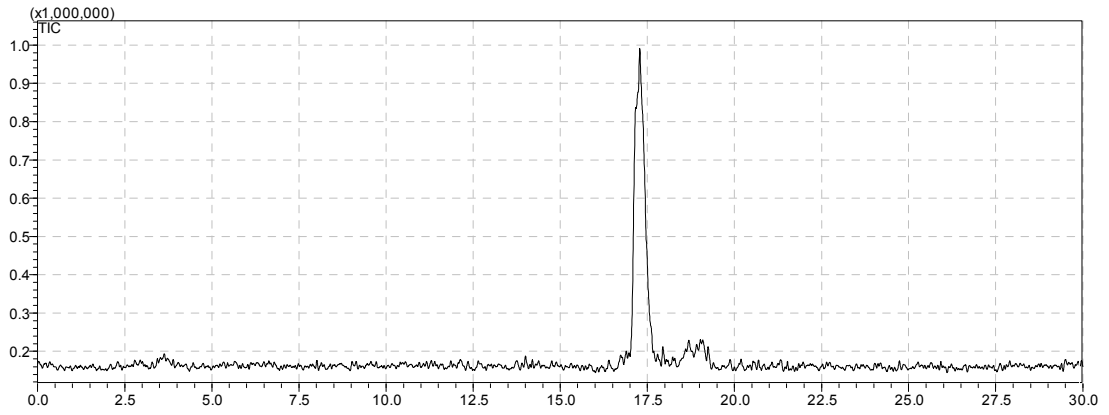
$$n_2 = 2$$

↓

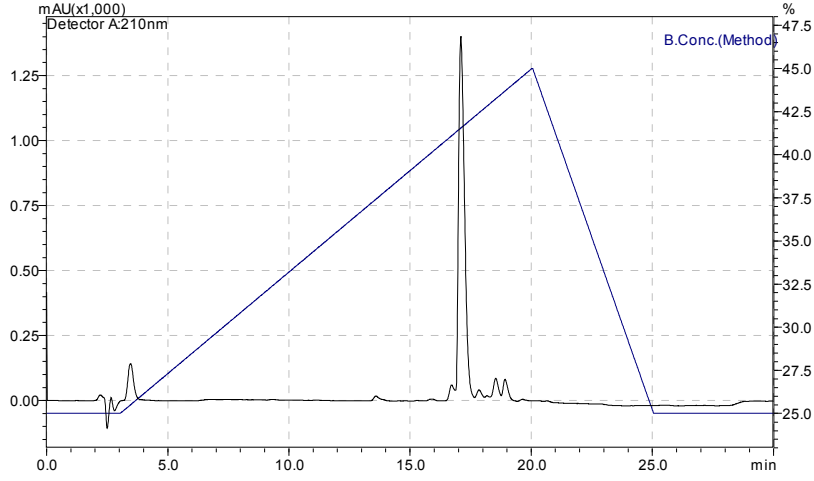
NP 55–69 peptid dizisi için Hesaplanan Molekül Kütlesi $M = 2030,52 \text{ g/mol}$

Teorik Molekül Kütlesi $M = 2030,43 \text{ g/mol}$

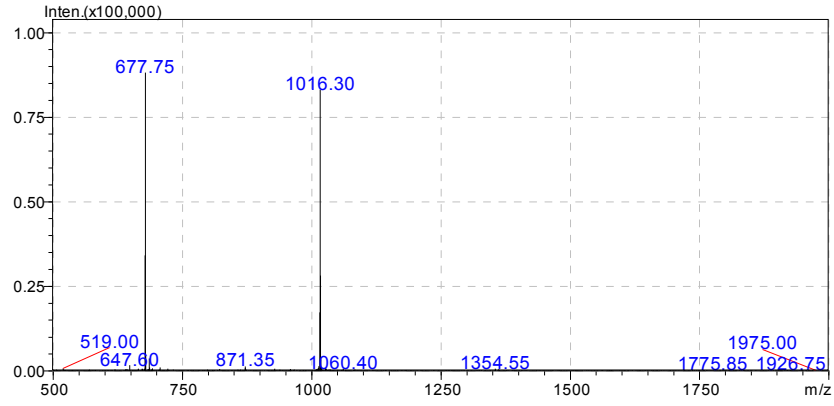
Şekil 7.49'daki kromatogramdaki safsızlıklardan temizlemek için RP-HPLC'de saflaştırma işlemi yapıldı. Şekil 7.52-54'te saflaştırma sonrasına ait kromatogramlar bulunmaktadır.



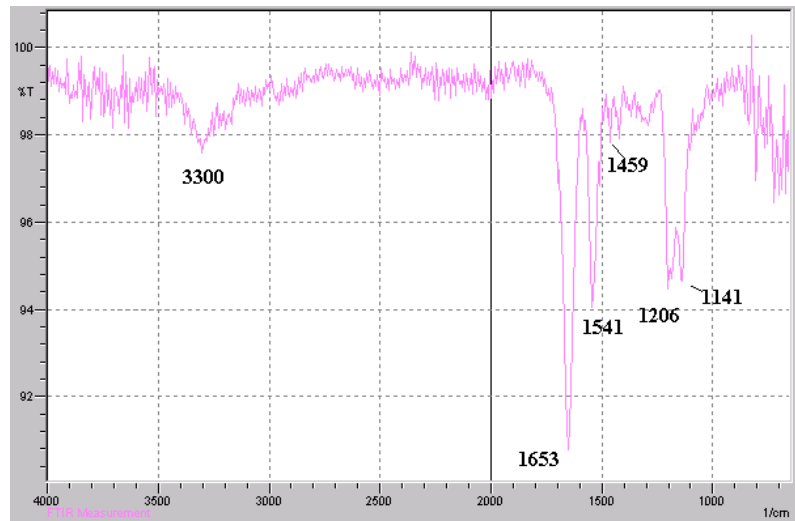
Şekil 7.52 Saflaştırılmış NP 55–69 peptid dizisine ait TIC.



Şekil 7.53 Safaştırılmış NP 55–69 peptid dizisinin UV kromatogramı.



Şekil 7.54 Safaştırılmış NP 55–69 peptid dizisinin 16.813 – 17.800 dk’ları arası kütle spektrumu.

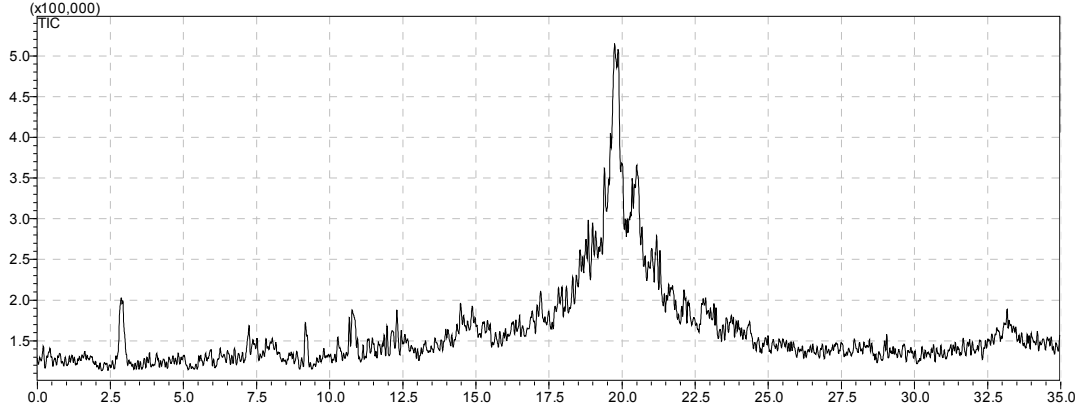


Şekil 7.55 NP 55–69 peptid dizisi için FT-IR sonucu.

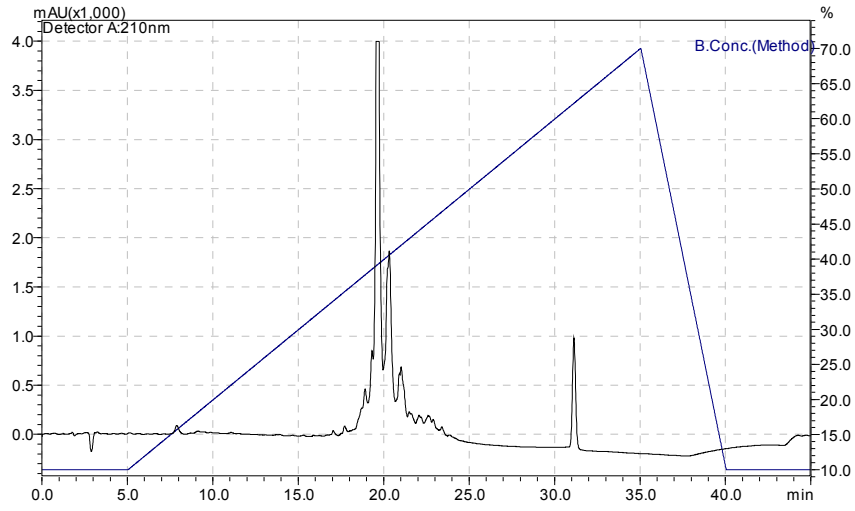
7.3.6 HA 91–108 peptid dizisinin analizleri

HA 91–108; W¹S²K³A⁴F⁵S⁶N⁷C⁸Y⁹P¹⁰Y¹¹D¹²V¹³P¹⁴D¹⁵Y¹⁶A¹⁷S¹⁸L¹⁹

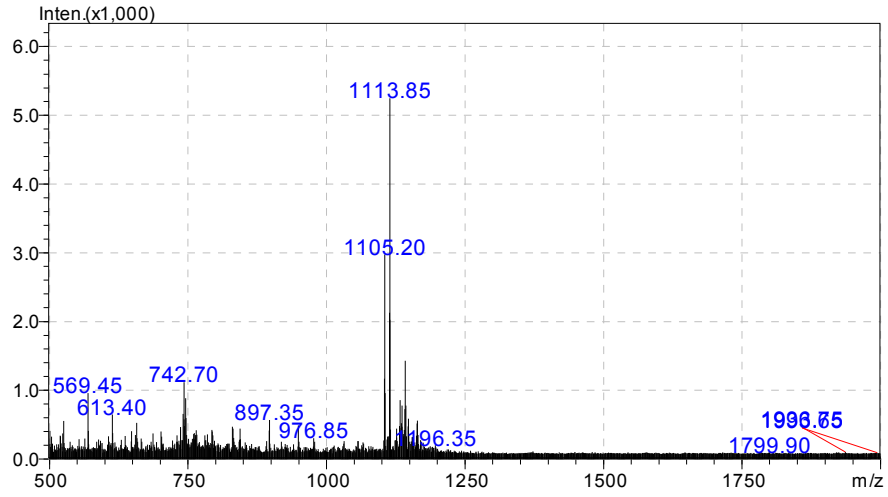
Teorik Mol Kütlesi: 2226,47 g/mol



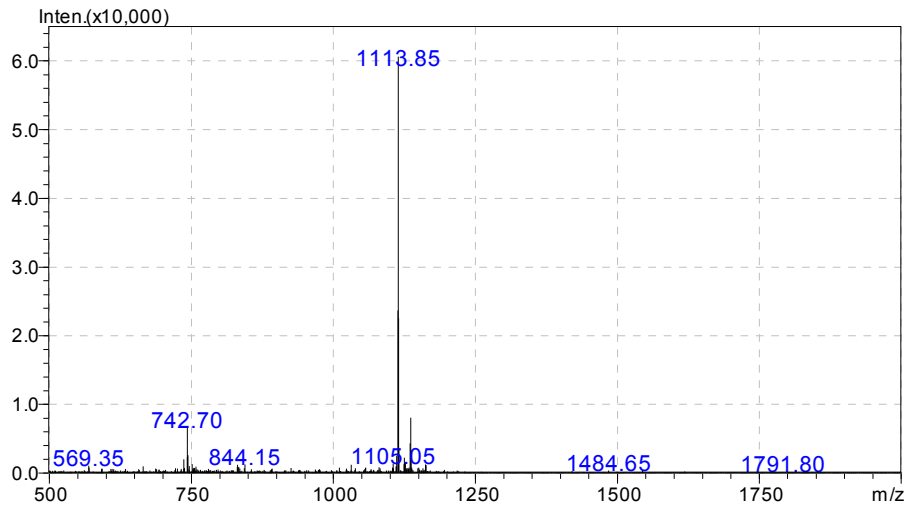
Şekil 7.56 Ham HA 91–108 peptid dizisine ait TIC.



Şekil 7.57 Ham HA 91–108 peptid dizisine ait UV kromatogramı.



Şekil 7.58 Ham HA 91–108 peptid dizisinin 15.700 – 24.725 dk’ları arası kütle spektrumu.



Şekil 7.59 Ham HA 91–108 peptid dizisinin 19.525 – 20.233 dk’ları arası Kütle spektrumu.

$$742,70 = \frac{(M + n_1 H)}{n_1} \rightarrow 742,70 n_1 = M + n_1 H \rightarrow M = n_1 (742,70 - 1,0078)$$

$$1113,85 = \frac{(M + n_2 H)}{n_2} \rightarrow 1113,85 n_2 = M + n_2 H \rightarrow M = n_2 (1113,85 - 1,0078)$$

↓

$$n_1 (741,6922) = n_2 (1112,8422) \rightarrow \frac{n_1}{n_2} = \frac{3}{2}$$

137

↓

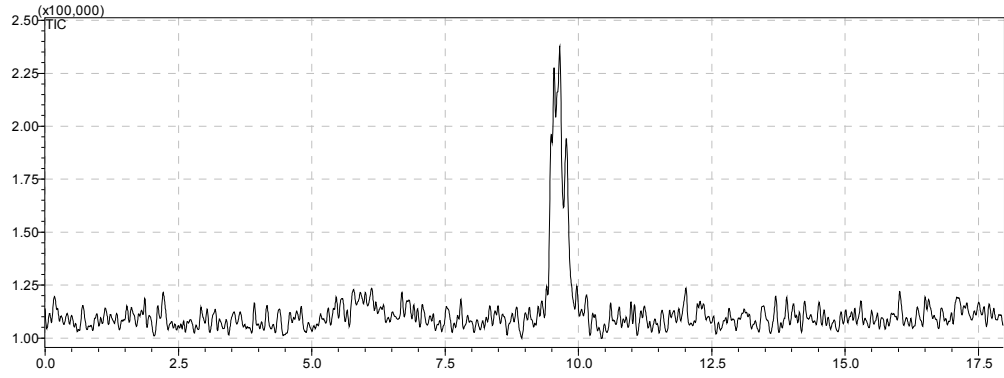
$$n_1 = 3$$

$$n_2 = 2$$

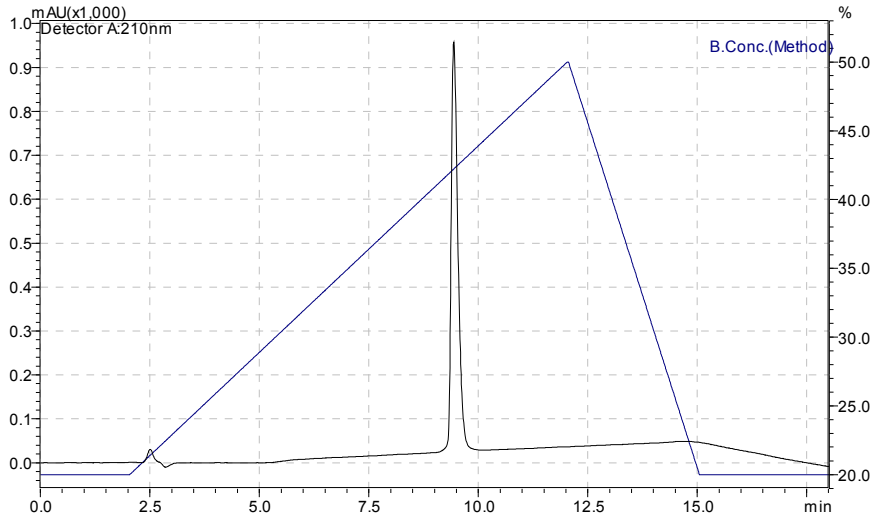
↓

HA 91–108 peptid dizisi için Hesaplanan Molekül Kütlesi $M = 2225,08 \text{ g/mol}$

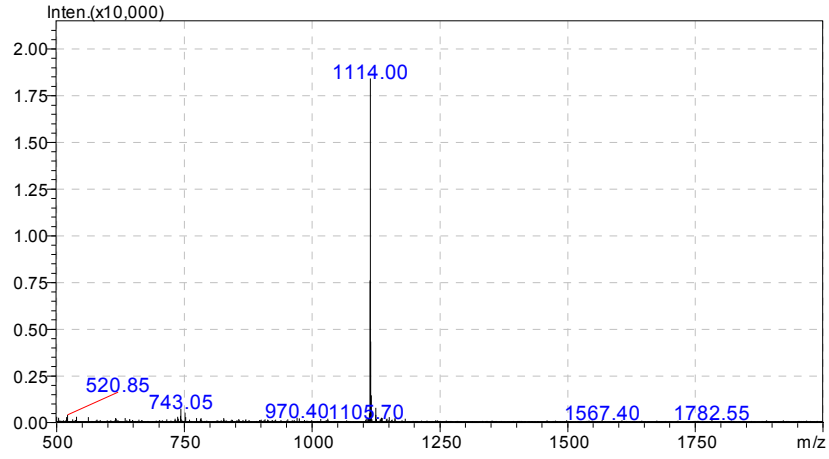
Teorik Molekül Kütlesi $M = 2226,47 \text{ g/mol}$



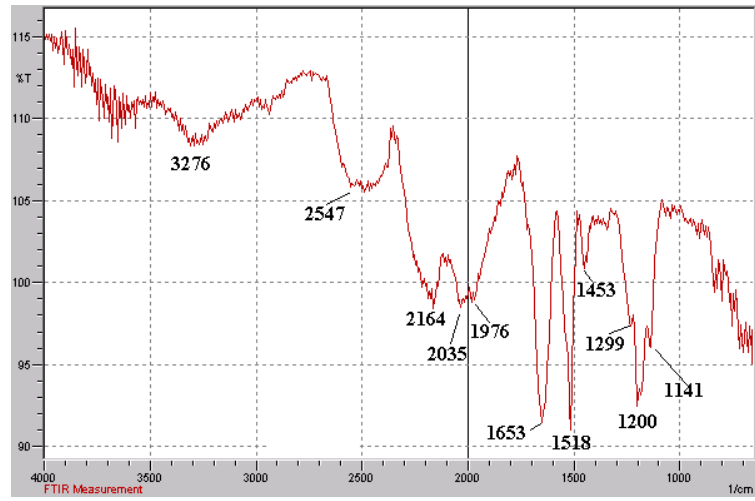
Şekil 7.60 Saflaştırılmış HA 91–108 peptid dizisine ait TIC.



Şekil 7.61 Saflaştırılmış HA 91–108 peptid dizisinin UV kromatogramı.



Şekil 7.62 Safılaştırılmış HA 91–108 peptid dizisinin 9.217 – 10.063 dk'ları arası kütle spektrumu.

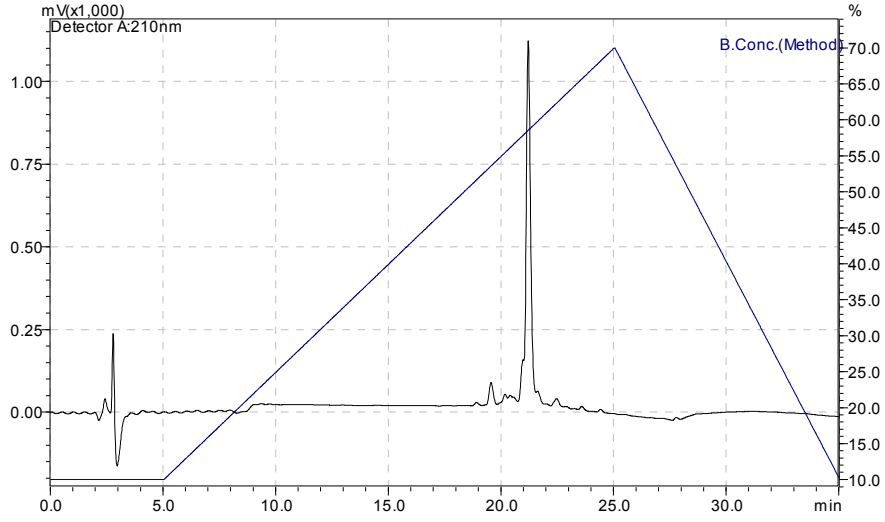


Şekil 7.63 HA 91–108 peptid dizisi için FT-IR sonucu.

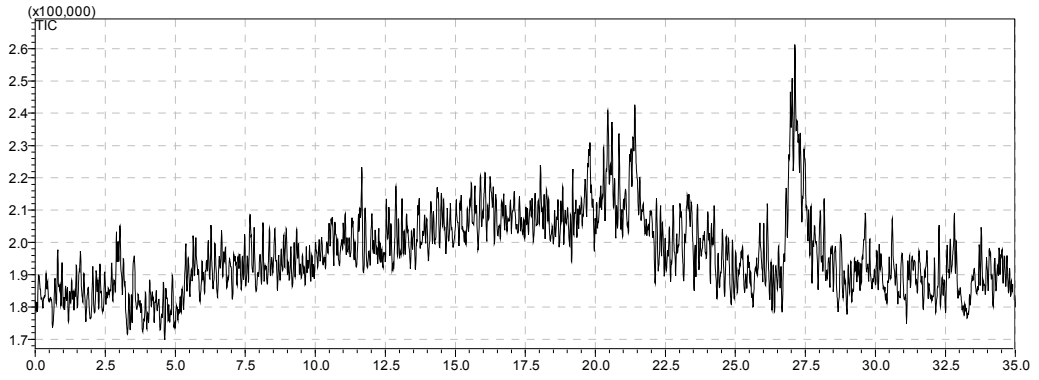
7.3.7 Melanoma 155–163 peptid dizisinin analizleri

Melanoma 155–163; W¹Q²L³S⁴L⁵L⁶M⁷W⁸I⁹T¹⁰;

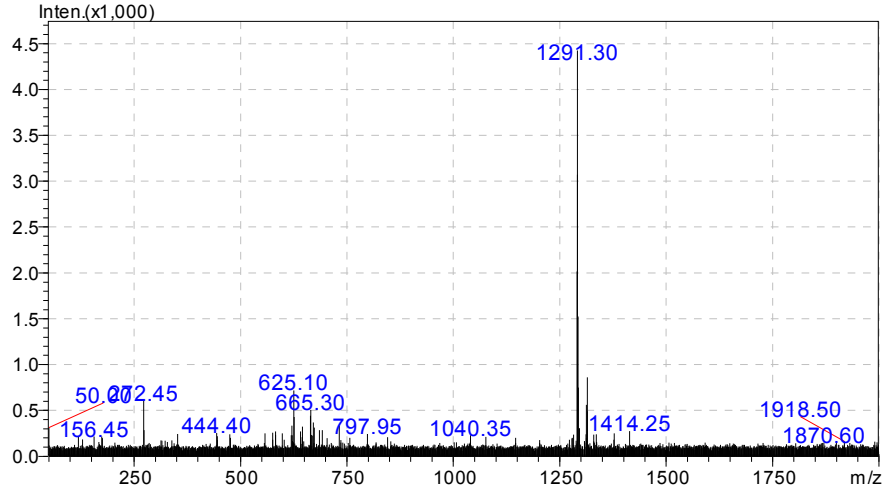
Teorik Mol Kütlesi: 1290,59 g/mol



Şekil 7.64 Melanoma 155–163 dizisine ait TIC.



Şekil 7.65 Melanoma 155–163 peptid dizisine ait UV kromatogramı.

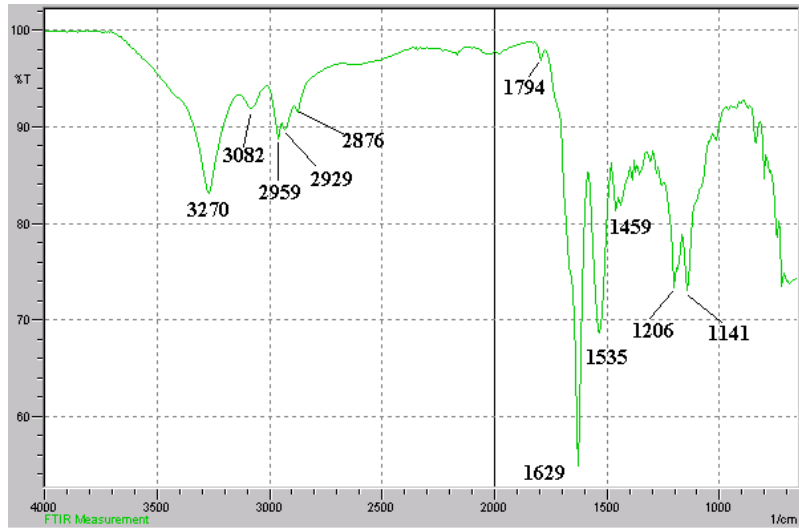


Şekil 7.66 Melanoma 155–163 peptid dizisinin 21.080 – 21.660 dk'ları arası kütle spektrumu.

Şekil 7.65 ve Şekil 7.66'dan da anlaşıldığı gibi peptid iyonlaşmamıştır. Sadece üzerine 1 H⁺ piki mevcuttur.

Melanoma 155-163peptid dizisi için Hesaplanan Molekül Kütlesi M=1290,30 g/mol

Teorik Molekül Kütlesi M=1290,59 g/mol

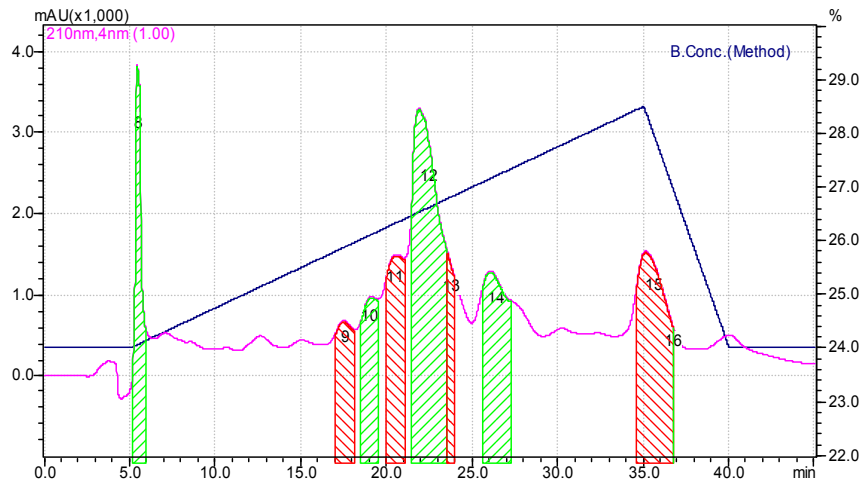


Şekil 7.67 Melanoma 155–163 peptid dizisi için FT-IR sonucu.

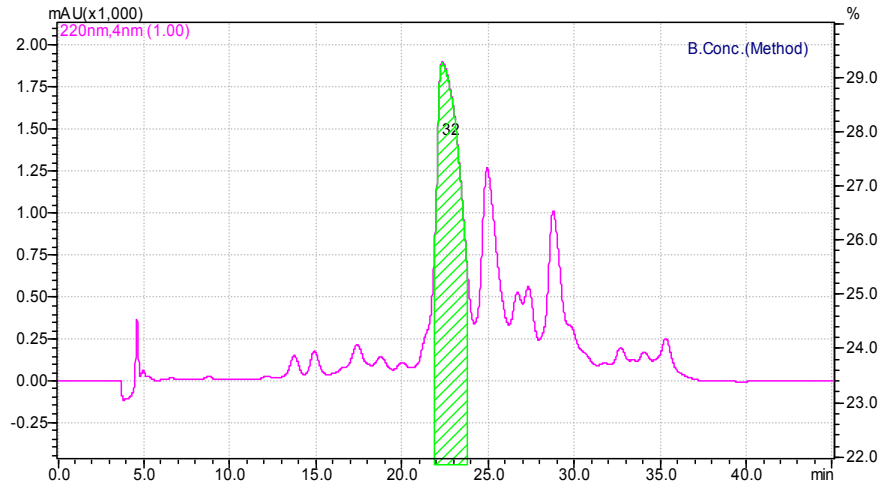
7.4 Peptidlerin Preparatif Saflaştırılması

Preparatif saflaştırma işlemi peptidler LC-MS ile karakterize edilip uygun gradient belirlendikten sonra RP-HPLC sisteminde belirlenen piklerin toplanması ile yapılmıştır. Saflaştırma kolonu olarak Shimadzu Shimpack PRC-ODS 22 mm X 25 cm kolon kullanılmıştır.

Saflaştırması yapılan 2 peptide ait UV kromatogramları Şekil 7.68 ve 7.69’da verilmiştir. Taralı alanlar toplanan kısmı, taralı alan üzerindeki sayılar toplamanın yapıldığı deney tüpü numarasını belirtmektedir.



Şekil 7.68 VP1 135–161a dizisinin RP-HPLC saflaştırmasına ait UV kromatogramı.



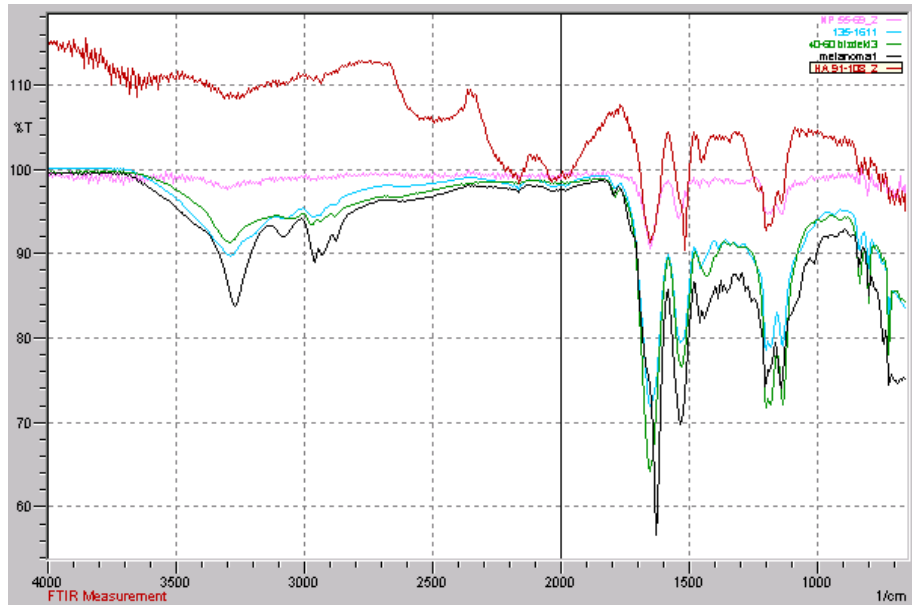
Şekil 7.69 VP1 200–213 dizisinin RP-HPLC saflaştırmasına ait UV kromatogramı.

7.5 Peptidlerin FT-IR Analizlerinin Toplu Yorumu

FT-IR analizi yapılan peptid dizilerinin amino asit içeriği karşılaştırılarak dizi içeriği hakkında bilgi sahibi olunmaya çalışılmıştır.

Çizelge 7.5 FT-IR analizi yapılan Peptid dizileri.

Dizinin Adı	Peptid dizisi
VP1 135–161a	SKYSTTGERTRGDLGALAARVATQLPA
VP1 200–213	WDRHKQRRIAPAKQLG
VP1 40–60	WVKINNTSPTHVIDLMQTHQHG
HA 91–108	WSKAFSNCYPYDVPDYASL
NP 55–69	WRLIQNSLTIERMVLSA
Melanoma 155–163	WQLSLLMWIT



Şekil 7.70 Peptid dizileri için FT-IR sonuçlarının toplu gösterimi.

Yapılan FT-IR analizleri ile peptidlere ait karakteristik bantlar Şekil 7.70’de görülmektedir.

FT-IR analiz sonuçlarından yola çıkarak peptidlerin yapısı hakkında fikir sahibi olmak toplanan verilerle pek mümkün olmamakta, fakat daha sistematik bir çalışma ile bunun mümkün olabileceği görülmektedir.

7.6 Amino asit analizinin yapılışı

Tez kapsamında VP1 200–213 peptid dizisinin amino asit analizi yapılmıştır. Analizde standart amino asit karışımı ile analiz şartlarında amino asitlerin kromatogramda çıktığı yerler belirlenir.

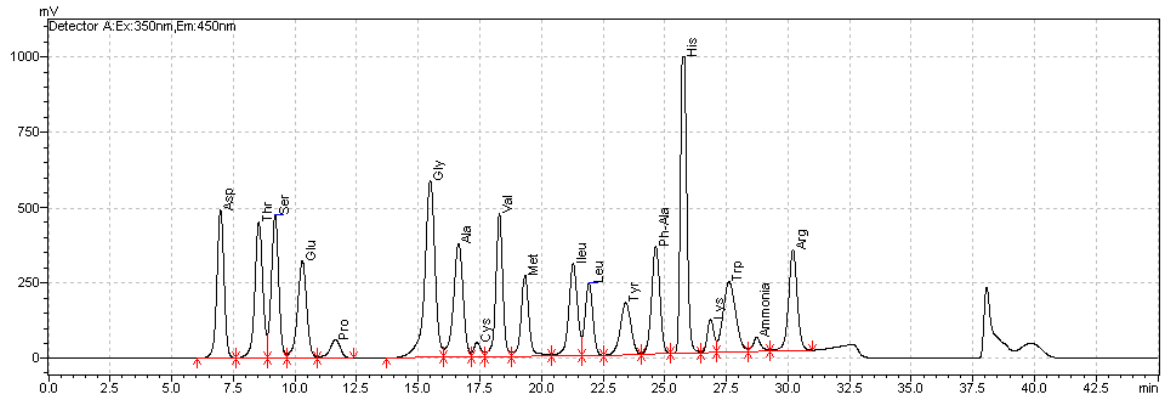
Analiz Na ve Li olmak üzere 2 farklı yöntemle yapılabilir. Bu iki yöntem için kullanılan kimyasallar farklıdır. Bu çalışmada Na yöntemi kullanılmıştır.

Analizde kullanılan kolonlar;

Analitik kolon: Shim-pack Amino Na

Amonyak trap kolon: ISC-30Na'dır.

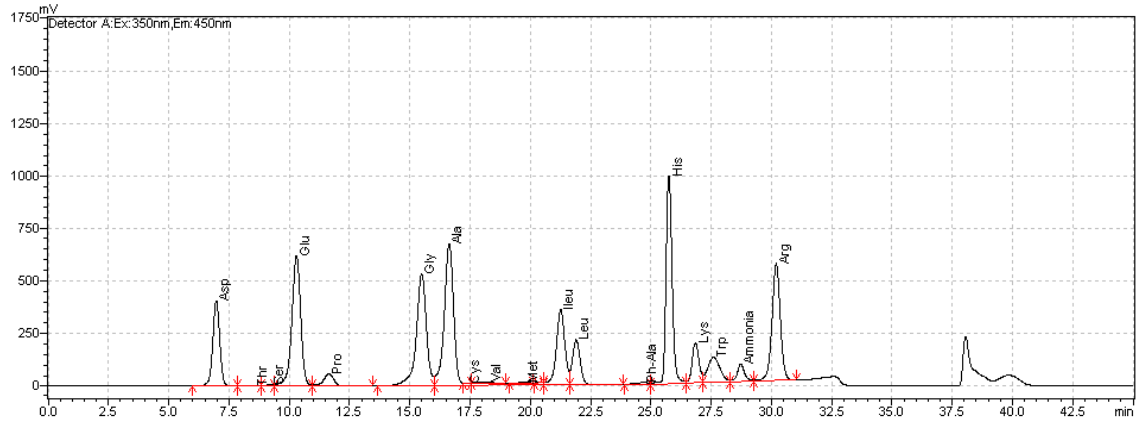
Analizi yapılan VP1 200–213 peptid dizisi $W^1D^2R^3H^4K^5Q^6R^7I^8A^9P^{10}A^{12}K^{13}Q^{14}L^{15}G^{16}$ dir. Peptid 6N HCl ile muamele edilerek etüvde 120 °C'de 6 saat bekletilir. Yapılan bu işlemle peptid bağları kırılarak amino asitler serbest hale geçerler. Hazırlanan örnek, standardın ardından analiz sistemine verilir, oluşan kromatogramdaki alanlardan yola çıkılarak hazırlanan konsantrasyonlarla dizideki amino asitlerin her birinin sayısı belirlenir.



Şekil 7.71 Amino asit analizinde standardın kromatogramı.

Çizelge 7.6 Standardın kromatogramına ait sonuçlar.

Compound Table View					
ID#	Name	Type	Channel	Ret. Time	Conc.1
1	Asp	Target	Detector A - C	6.978	0.1
2	Thr	Target	Detector A - C	8.533	0.1
3	Ser	Target	Detector A - C	9.189	0.1
4	Glu	Target	Detector A - C	10.295	0.1
5	Pro	Target	Detector A - C	11.644	0.1
6	Gly	Target	Detector A - C	15.486	0.1
7	Ala	Target	Detector A - C	16.636	0.1
8	Cys	Target	Detector A - C	17.385	0.05
9	Val	Target	Detector A - C	18.286	0.1
10	Met	Target	Detector A - C	19.327	0.1
11	Ileu	Target	Detector A - C	21.289	0.1
12	Leu	Target	Detector A - C	21.925	0.1
13	Tyr	Target	Detector A - C	23.419	0.1
14	Ph-Ala	Target	Detector A - C	24.636	0.1
15	His	Target	Detector A - C	25.792	0.1
16	Lys	Target	Detector A - C	26.854	0.1
17	Trp	Target	Detector A - C	27.611	0.1
18	Ammonia	Target	Detector A - C	28.732	0.1
19	Arg	Target	Detector A - C	30.199	0.1



Şekil 7.72 VP1 200-213 peptidinin amino asit bileşimini gösteren floresans kromatogramı.

Çizelge 7.7 VP1 200–213 peptidinin kromatogramına ait veriler.

Compound Table View											
ID#	Name	Ret. Time	Conc.	Channel	Peak#	Area	Height	Mark	Peak Start	Peak End	Area%
1	Asp	6.972	0.08244	Detector A - Ch1	1	8052336	402529		5.975	7.842	6.9393
2	Thr	8.531	0.00035	Detector A - Ch1	2	35521	1577		7.850	8.817	0.0306
3	Ser	9.217	0.00135	Detector A - Ch1	3	132498	6601	V	8.817	9.367	0.1142
4	Glu	10.297	0.19169	Detector A - Ch1	4	15878368	817471	V	9.367	10.950	13.6836
5	Pro	11.646	0.09272	Detector A - Ch1	5	1863125	57789	SV	10.950	13.483	1.4332
6	Gly	15.492	0.09104	Detector A - Ch1	6	15400411	530249		13.658	16.008	13.2717
7	Ala	16.633	0.19909	Detector A - Ch1	7	20122159	672635	SV	16.008	20.567	17.3408
8	Cys	17.355	0.00083	Detector A - Ch1	8	16422	1362	T	17.217	17.533	0.0142
9	Val	18.234	0.00154	Detector A - Ch1	9	141702	3824	TV	17.533	18.983	0.1221
10	Met	19.749	0.00124	Detector A - Ch1	10	74402	2969	T	19.108	20.117	0.0641
11	Ileu	21.261	0.11939	Detector A - Ch1	12	8865510	357507	V	20.567	21.625	7.6401
12	Leu	21.904	0.09356	Detector A - Ch1	13	4848890	213823	V	21.625	23.833	4.1787
13	Tyr	No peak is detected.									
14	Ph-Ala	24.703	0.00402	Detector A - Ch1	14	332555	8585		23.908	24.983	0.2866
15	His	25.750	0.09681	Detector A - Ch1	15	17123278	986798	V	24.983	26.475	14.7565
16	Lys	26.845	0.17604	Detector A - Ch1	16	3732494	189710	V	26.475	27.175	3.2166
17	Trp	27.601	0.05098	Detector A - Ch1	17	4235186	118578	V	27.175	28.300	3.6498
18	Ammonia	28.730	0.16741	Detector A - Ch1	18	1815503	84231	V	28.300	29.263	1.5646
19	Arg	30.196	0.16453	Detector A - Ch1	19	13544808	554992	V	29.263	31.067	11.6726

7.7 Biyokonjugatların Sentezi ve Analizi

Bu kısımda tez kapsamında sentezlenen peptidler ve polimerler ile çeşitli biyokonjugatların hazırlanma metotları ve çeşitli yöntemlerle analizleri verilmiştir.

Sentezlenen viral peptidlerin bir kısmı diğer tez çalışmalarında kullanılmakta ve araştırmaları devam etmektedir.

7.7.1 Mikrodalga destekli polimer peptid biyokonjugatının sentezi

Bu tez çalışmasının getirdiği en büyük yenilik, polimer peptid biyokonjugatlarının sentezinin organik (DMF) ortamında HBTU/HOBt aktivatörleri ile mikrodalga destekli olarak kısa sürede (toplam 2 saat) yapılmasıdır. Daha önceki yapılan çalışmalar su (PBS) ortamında karbodiimid varlığında 24 saat süreyle yapılmaktaydı.

Bu iki biyokonjugat sentez yöntemini kıyaslamak için paralel bir çalışma yapılmıştır.

Mikrodalga destekli organik ortamda sentezlenen konjugatın sentezi aşağıda anlatıldığı gibi yapılmıştır,

$n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}} = 2$ oranına ait orana ait biyokonjugatın sentezi: 10 mgr VP/AA kopolimeri (25/75; $\overline{M}_w = 80.000$) 5 ml DMF içerisinde çözüldü. VP/AA kopolimerinin karboksil gruplarının aktivasyonu 18,3 mg HBTU ($M_w = 379.24$ g/mol) ve 6,7 mg HOBt ($M_w = 135.12$ g/mol) eklenerek yapıldı. 0,9 mg Şap Hastalığı Virüsüne ait 135–161 peptid dizisi ($M_w = 2974$ g/mol) 4 ml DMF içerisinde çözüldü. 0,3 ml DIEA ve 0,7 ml NMP baz çözeltisi peptid üzerine eklendi. Peptid çözeltisi polimer çözeltisi üzerine eklendi ve manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. 25 W, 26–75 °C sıcaklık arasında 3 dakika süre aralıklarla Discovery ünitesi içerisinde mikrodalga verildi. Örnek çözelti 50 ml falkon tüp içerisine alındı ve üzerine 35 ml soğuk (-20 °C) etil asetat eklenerek çöktürüldü. Çökelti -6 °C'de 5000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Elde edilen konjugatın yapı ve karakterizasyonu, kromatografik [Dört Dedektörlü-UV, Refraktif İndeks, Viskozite ve ışık saçılması, kromatografik sistem]), spektroskopik ve fluorimetrik yöntemlerle incelendi.

7.7.1.1 Hesaplamalar

VP/AA kopolimeri $\Rightarrow \overline{M}_{\text{VP/AA}} = 80\,000$ Da

135–161 için $\Rightarrow M_{\text{peptid}} = 2975$ Da

$$\frac{n_{peptid}}{n_{VP/AA}} = \frac{c_{peptid} \cdot \overline{M}_{VPAA}}{c_{VP/AA} \cdot \overline{M}_{peptid}} = 2; 4$$

- 1) $n_{peptid}/n_{VP/AA} = 2$ olan VP/AA – Peptid Biyokonjugat Çözeltisi

$$c_{peptid} = 0.09 \text{ g/100ml} = 0.9 \text{ mg/ml}$$

- 2) $n_{peptid}/n_{VP/AA} = 4$ olan VP/AA – Peptid Biyokonjugat Çözeltisi

$$c_{peptid} = 0.15 \text{ g/100ml} = 1.5 \text{ mg/ml}$$

-N ucunda Trp amino asidi içermeyen 136-161 $\Rightarrow$ 2791 Da

- 3) $n_{peptid}/n_{VP/AA} = 8$ olan VP/AA – Peptid Biyokonjugat Çözeltisi

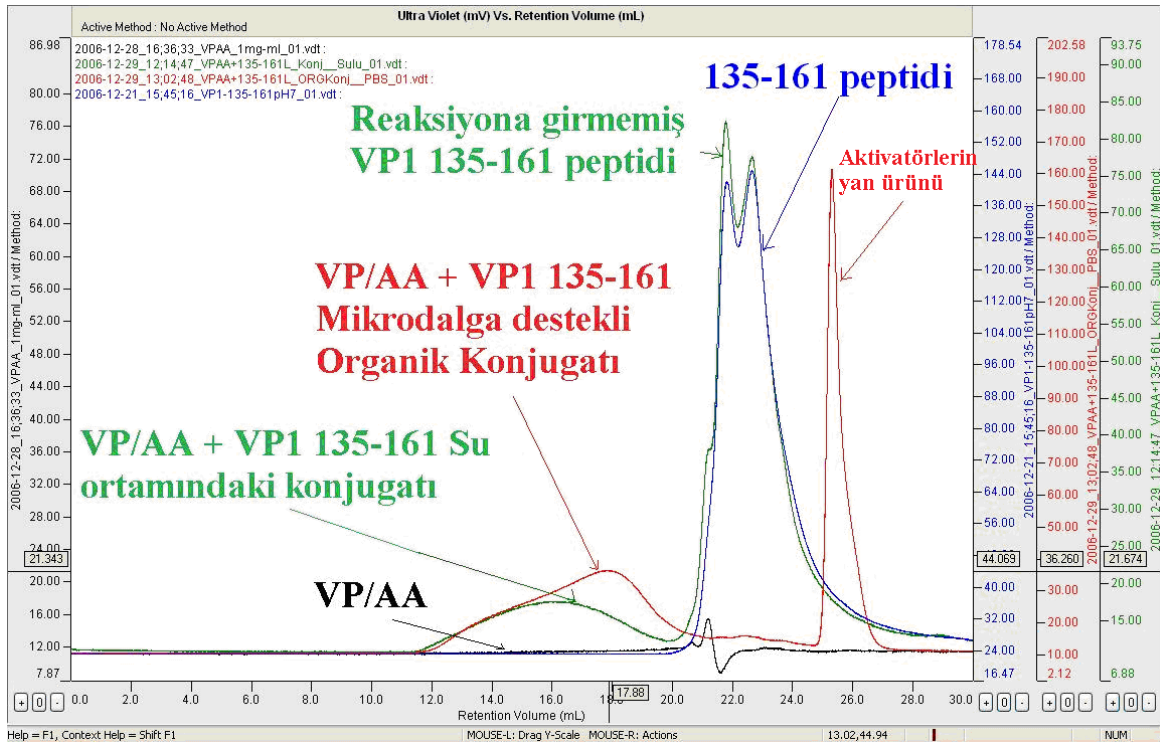
$$c_{peptid} = 0.27 \text{ g/100ml} = 2.7 \text{ mg/ml}$$

- 4) $n_{peptid}/n_{VP/AA} = 12$ olan VP/AA – Peptid Biyokonjugat Çözeltisi

$$c_{peptid} = 0.41 \text{ g/100ml} = 4.1 \text{ mg/ml}$$

Bu çalışmada $n_{peptid}/n_{VP/AA} = 2$ oranında hazırlanmış biyokonjugatlara ait BAK-UV grafiği Şekil 7.73'te verilmiştir.

Sulu ortamda hazırlanan biyokonjugat çalışma grubumuz tarafından hazırlanmıştır (Mansuroğlu, 2007).



Şekil 7.73 İki farklı yöntemle sentezlenen biyokonjugatların UV kromatogramı.

Mikrodalga destekli organik ortamda sentezlenen VP/AA VP1 135–161 biyokonjugatının BAK analizinde daha önceden polimerin çıktığı yerde UV piki veren polimer görünümlü bir pik görüldü. Peptidin olduğu yerde tamamen yok oluş gözlemlendi.

Paralel yürütülen sulu ortamda karbodiimidle yapılan çalışmada yine konjugat oluşumu gözlemlendi fakat ortamda reaksiyona girmemiş peptid olduğu BAK analizi sonucunda görüldü.

Bu sonuçlar göstermektedir ki mikrodalga destekli olarak organik ortamda yapılan konjugasyon daha hızlı yürümekte ve peptidin tamamı reaksiyona girmektedir.

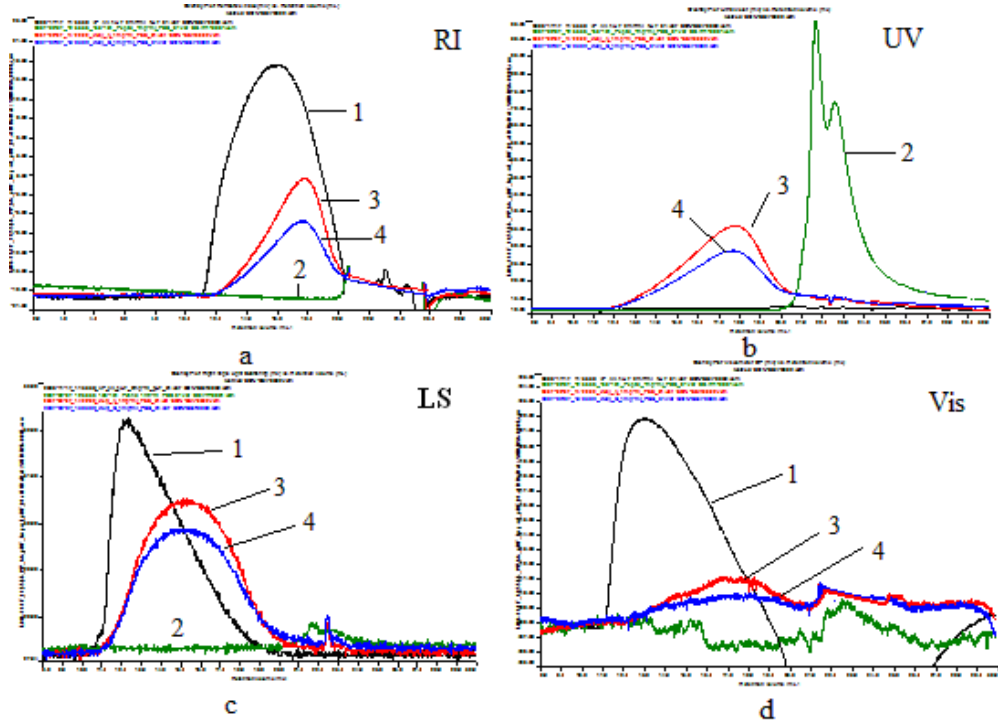
7.7.2 VP1 135–161 ile yapılan çalışmalar

Bu bölümde, bu tez kapsamında sentezlenen VP1 135–161 dizili peptidle çalışma grubumuzun elde ettiği deney sonuçlarına (Mansuroğlu, 2007) yer verilmiştir. Adı geçen çalışmada kullanılan *“organik ortamda sentezlenen mikrodalga destekli polimer peptid biyokonjugatı”* bu tez kapsamında sentezlenmiştir. Organik ortamda sentezlenen mikrodalga destekli polimer peptid konjugatına ait analiz sonuçları, sulu ortamda karbodiimid varlığında sentezlenen konjugatlarla birlikte kıyaslamalı olarak verilmiştir.

7.7.2.1 Mikrodalga Teknolojisi Kullanılarak Organik Ortamda Sentetik Polianyon VP/AA Kopolimeri (25/75; $\overline{M}_w$ 80.000) ile Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteinin Sentetik Peptid Antijenlerini İçeren Fiziksel Kompleks ve Biyokonjugatların HPLC-Viscotek ve Floresans Sonuçları

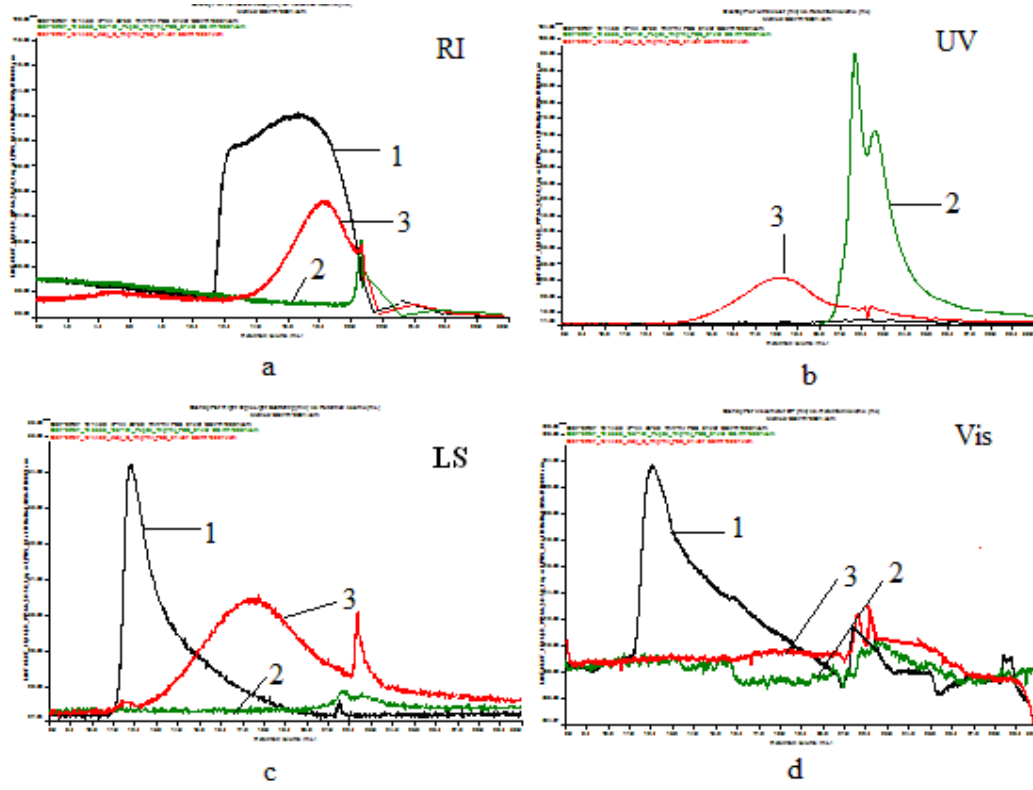
Mikrodalga teknolojisi kullanılarak, organik ortamda sentezlenen VP/AA-Peptid biyokonjugatlarında farklı oranda akrilik asit içeren VP/AA (25/75; $\overline{M}_w$ 80.000) ve VP/AA (50/50; $\overline{M}_w$ 80.000) kopolimerleri kullanıldı.

Mikrodalga teknolojisi kullanılarak, organik ortamda farklı oranda akrilik asit içeren VP/AA (25/75; $\overline{M}_w$ 80.000) ve VP/AA (50/50; $\overline{M}_w$ 80.000) kopolimeri ile bileşenlerinin $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}} = 2, 4$ oranlarında VP/AA-Peptid biyokonjugatları sentezlendi. Sentezlenen VP/AA-Peptid biyokonjugatının yapı ve karakterizasyonu BAK ve HPLC cihazlarında kromatografik olarak yapıldı. Ayrıca Zetasizer cihazında boyut (nm) ve zeta potansiyel ölçümü yapıldı.



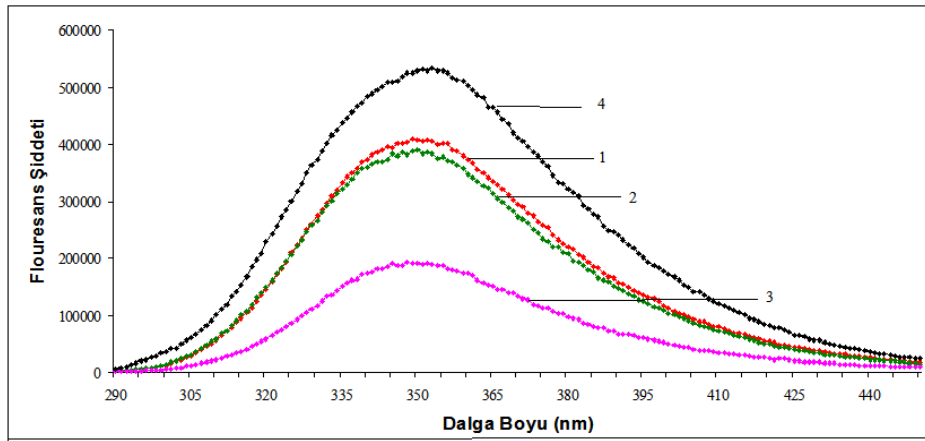
Şekil 7.74 0.01 M PBS pH 7’de hazırlanmış örneklerin BAK analiz sonuçları.

(1) % 0,2 VP/AA (25/75; $\overline{M}_w=80.000$) Kopolimeri, (2) % 0,006 Şap Hastalığı Virüsünün fonksiyonel antijen özelliği taşıyan yapısal VP1 Kapsid Proteinin 135–161 Peptidi, (3) VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ($n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}} = 2$), (4) VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ($n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}} = 4$) ait BAK Kırılma İndisi dedektörü (a), UV dedektörü (b), Işık Saçılması dedektörü (c), Viskozite dedektörü (d) kromatogramları (Mansuroğlu, 2007)



Şekil 7.75 0.01 M PBS pH 7’de hazırlanmış örneklerin BAK analiz sonuçları.

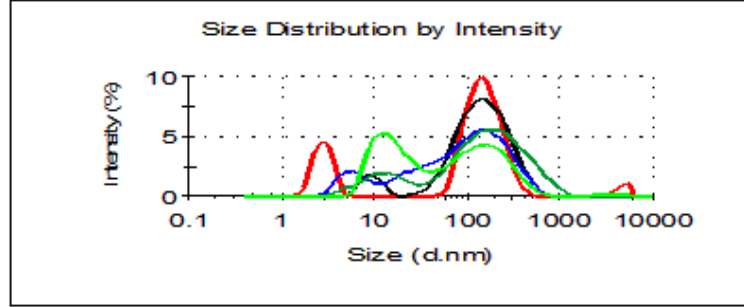
(1) % 0,2 VP/AA (50/50; $\overline{M}_w=80.000$) Kopolimeri, (2) % 0. 006 Şap Hastalığı Virüsünün fonksiyonel antijen özelliği taşıyan yapısal VP1 Kapsid Proteinin 135–161 Peptidi (3) VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ($n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=4$) ait BAK Kırılma İndisi dedektörü (a), UV dedektörü (b), Işık Saçılması dedektörü (c), Viskozite dedektörü (d) kromatogramları (Mansuroğlu, 2007).



Şekil 7.76 0.01 M PBS pH 7’de hazırlanmış konjugatların fluoresans sonuçları.

(1) VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ($n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=2$; $\lambda_{\text{maks}}= 350$), (2) VP/AA-Peptid

Biyokonjugatı ($n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=4$; ($\lambda_{\text{maks}}= 350$), (3) VP/AA(50/50)-Peptid Biyokonjugatı ($n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=4$; $\lambda_{\text{mak}}350$) (4) % 0. 05 Şap Hastalığı Virüsünün fonksiyonel antijen özelliği taşıyan yapısal VP1 135–161 dizili peptidine ait ($\lambda_{\text{maks}}= 353$) floresans sonuçları (Mansuroğlu, 2007).

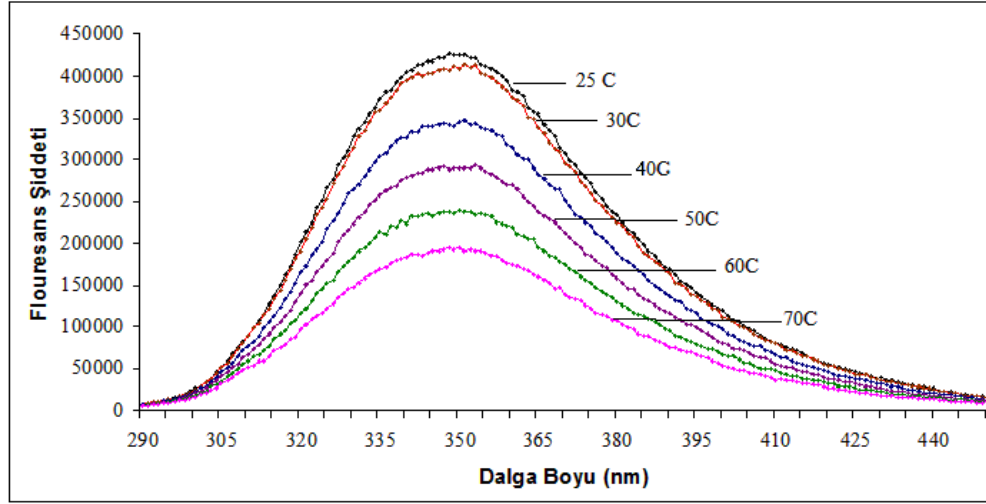


Örnekler	Boyut	Zeta Potansiyeli
% 0.1 Şap Hastalığı Virüsünün fonksiyonel antijen özelliği taşıyan yapısal VP1 Kapsid Proteinin 135–161 Peptidi	2.49	-13.5
% 0.5 VP/AA (25/75, $\overline{M}_w$ 80 000) Kopolimeri	7.91	-33
VP/AA-Peptid Fiziksel Karışımı ($n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=2$)	4.92	-22.5
Mikrodalga Teknolojisi Kullanılarak organik ortamda sentezlenen VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ($n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=2$)	10.1	-16.1
EDC çapraz bağlayıcısı varlığında Yöntem 2'ye göre sentezlenen VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ($n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=2$)	6.39	-18.7

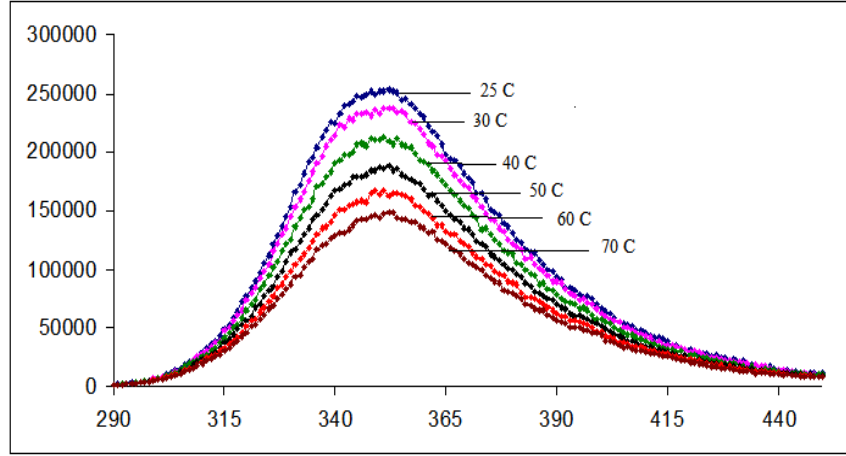
Şekil 7.77 0.01 M PBS pH 7'de hazırlanmış konjugatların Zeta-Sizer aletinde alınan boyut ve zeta potansiyel ölçüm sonuçları.

(1) % 0.006 Şap Hastalığı Virüsünün fonksiyonel antijen özelliği taşıyan yapısal VP1 Kapsid Proteinin 135–161 Peptidi , (2) % 0.5 VP/AA Kopolimeri, (3) VP/AA-Peptid Fiziksel Karışımı ($n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=2$), **Mikrodalga Teknolojisi Kullanılarak organik ortamda sentezlenen VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ($n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=2$)**, (4) EDC çapraz bağlayıcısı varlığında sentezlenen VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ($n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=2$) ait Zeta-Sizer cihazında alınan boyut ve zeta potansiyel ölçüm sonuçları (Mansuroğlu, 2007).

Mikrodalga teknolojisi kullanılarak, organik ortamda sentezlenen VP/AA-Peptid biyokonjugatlarının sıcaklık değişimine bağlı floresans şiddeti ölçüldü.



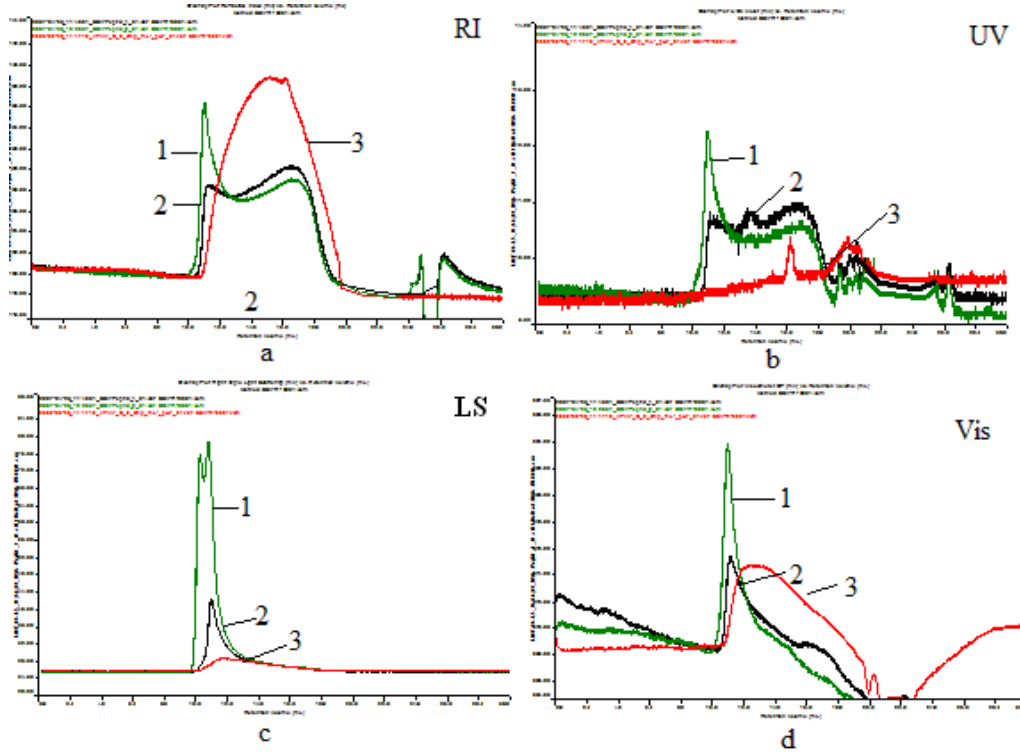
Şekil 7.78 $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}} = 2$ oranına sahip VP/AA(25/75)-Peptid biyokonjugatının sıcaklık değişimine bağlı fluoresans şiddeti (Mansuroğlu, 2007).



Şekil 7.79 $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}} = 2$ oranına sahip VP/AA(50/50)-Peptid biyokonjugatının sıcaklık değişimine bağlı fluoresans şiddeti (Mansuroğlu, 2007).

Şekil 7.78 ve 7.79 deki grafiklerde sıcaklığın artışına bağlı olarak fluoresans şiddeti azalmaktadır. Bilindiği üzere sıcaklığın artışı, çözeltideki moleküllerin kinetik enerjisini arttırdığından daha fazla moleküller arası çarpışma meydana gelmesine neden olmaktadır. Dolayısıyla moleküller sahip oldukları enerjinin bir kısmını ortama verdiklerinden fluoresans şiddeti azalır. Bu nedenle sıcaklık artışı ile doğru orantılı olarak fluoresans şiddeti azalmaktadır.

Aynı VP/AA-Peptid biyokonjugatları klasik yöntemle, –N terminal ucunda Trp amino asidi içermeyen 135-161 peptid dizisi ile $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}} = 8; 12$ oranlarında sentezlendi. Sentezlenen VP/AA-Peptid biyokonjugatının BAK analiz sonuçları:



Şekil 7.80 0.01 M PBS pH 7’de hazırlanmış konjugatların BAK sonuçları.

(1) VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ($n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=12$), (2) VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ($n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=8$), (3) % 0,2 VP/AA Kopolimerine (25/75; 80 000) ait BAK Kırılma İndisi dedektörü (a), UV dedektörü (b), Işık Saçılması dedektörü (c), Viskozite dedektörü (d) kromatogramları (Mansuroğlu, 2007).

7.7.2.2 Fluoreskamin Yöntemi ile VP/AA-Peptid Biyokonjugatlarına ait Amino Grubu Sayısı ve Konjugasyon Derecesinin Saptanması

Bu çalışmada tek başına fluoresans özellik göstermeyen ancak primer (birincil) alifatik amin grupları ile reaksiyona girdiğinde fluorophor özellikte ürün oluşturan Fluoreskamin kullanılarak VP/AA-Peptid biyokonjugatlarının konjugasyon derecesi hesaplandı. Peptid moleküllerinin VP/AA kopolimeri ile oluşturduğu konjugatların konjugasyon derecesi serbest peptid ve fiziksel komplekslerle karşılaştırmalı olarak yapıldı (Mansuroğlu, 2007).

Hesaplamalar:

Her bir çözelti için $n_{\text{fluoreskamin}}/n_{\text{peptid}}$ (n_f/n_p) oranı hesaplanarak bu oranlar için λ_{maks} dalga boyundaki I_{maks} Fluoresans şiddetlerine göre çizilen grafikten peptiddeki serbest amino grubu sayısı tayin edilir.

Şap Hastalığı Virüsünün VP1 136–161 peptidinin çözeltideki konsantrasyonu % 0.003'dür.

VP/AA kopolimeri $\Rightarrow \bar{M}_{VP/AA} = 80\,000\text{ Da}$

135–161 için $\Rightarrow M_{\text{peptid}} = 2975$

$$\frac{n_f}{n_p} = \frac{2\mu\text{l} \cdot \frac{2\text{mg}}{1000\mu\text{l}} \cdot \frac{1\text{mol}}{278\text{g}}}{4\text{ml} \cdot \frac{4,51\text{mg}}{142,8\text{ml}} \cdot \frac{1\text{mol}}{2977\text{g}}} \rightarrow \frac{n_f}{n_p} = 0,34$$

$$\frac{n_f}{n_p} = \frac{4\mu\text{l} \cdot \frac{2\text{mg}}{1000\mu\text{l}} \cdot \frac{1\text{mol}}{278\text{g}}}{4\text{ml} \cdot \frac{4,51\text{mg}}{142,8\text{ml}} \cdot \frac{1\text{mol}}{2977\text{g}}} \rightarrow \frac{n_f}{n_p} = 0,68$$

$$\frac{n_f}{n_p} = \frac{8\mu\text{l} \cdot \frac{2\text{mg}}{1000\mu\text{l}} \cdot \frac{1\text{mol}}{278\text{g}}}{4\text{ml} \cdot \frac{4,51\text{mg}}{142,8\text{ml}} \cdot \frac{1\text{mol}}{2977\text{g}}} \rightarrow \frac{n_f}{n_p} = 1,35$$

$$\frac{n_f}{n_p} = \frac{12\mu\text{l} \cdot \frac{2\text{mg}}{1000\mu\text{l}} \cdot \frac{1\text{mol}}{278\text{g}}}{4\text{ml} \cdot \frac{4,51\text{mg}}{142,8\text{ml}} \cdot \frac{1\text{mol}}{2977\text{g}}} \rightarrow \frac{n_f}{n_p} = 2,03$$

$$\frac{n_f}{n_p} = \frac{16\mu\text{l} \cdot \frac{2\text{mg}}{1000\mu\text{l}} \cdot \frac{1\text{mol}}{278\text{g}}}{4\text{ml} \cdot \frac{4,51\text{mg}}{142,8\text{ml}} \cdot \frac{1\text{mol}}{2977\text{g}}} \rightarrow \frac{n_f}{n_p} = 2,71$$

$$\frac{n_f}{n_p} = \frac{24\mu\text{l} \cdot \frac{2\text{mg}}{1000\mu\text{l}} \cdot \frac{1\text{mol}}{278\text{g}}}{4\text{ml} \cdot \frac{4,51\text{mg}}{142,8\text{ml}} \cdot \frac{1\text{mol}}{2977\text{g}}} \rightarrow \frac{n_f}{n_p} = 4,06$$

$$\frac{n_f}{n_p} = \frac{30\mu\text{l} \cdot \frac{2\text{mg}}{1000\mu\text{l}} \cdot \frac{1\text{mol}}{278\text{g}}}{4\text{ml} \cdot \frac{4,51\text{mg}}{142,8\text{ml}} \cdot \frac{1\text{mol}}{2977\text{g}}} \rightarrow \frac{n_f}{n_p} = 5,08$$

$$\frac{n_f}{n_p} = \frac{36\mu\text{l} \cdot \frac{2\text{mg}}{1000\mu\text{l}} \cdot \frac{1\text{mol}}{278\text{g}}}{4\text{ml} \cdot \frac{4,51\text{mg}}{142,8\text{ml}} \cdot \frac{1\text{mol}}{2977\text{g}}} \rightarrow \frac{n_f}{n_p} = 6,1$$

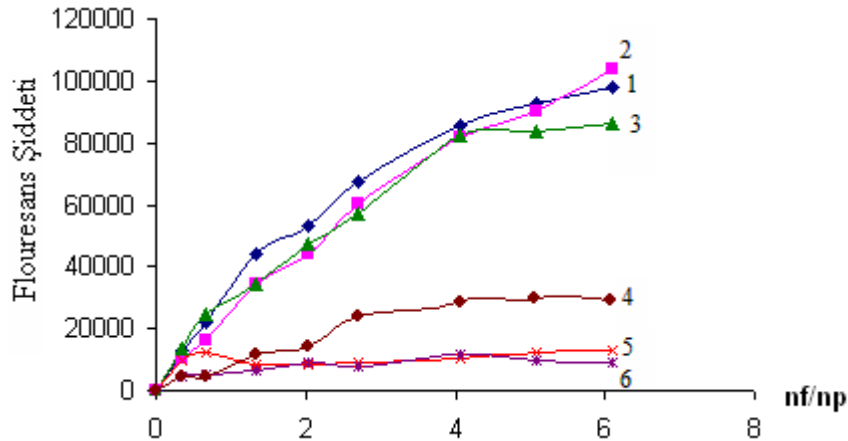
$$\frac{n_f}{n_p} = \frac{44\mu\text{l} \cdot \frac{2\text{mg}}{1000\mu\text{l}} \cdot \frac{1\text{mol}}{278\text{g}}}{4\text{ml} \cdot \frac{4,51\text{mg}}{142,8\text{ml}} \cdot \frac{1\text{mol}}{2977\text{g}}} \rightarrow \frac{n_f}{n_p} = 7,46$$

$$\frac{n_f}{n_p} = \frac{52\mu\text{l} \cdot \frac{2\text{mg}}{1000\mu\text{l}} \cdot \frac{1\text{mol}}{278\text{g}}}{4\text{ml} \cdot \frac{4,51\text{mg}}{142,8\text{ml}} \cdot \frac{1\text{mol}}{2977\text{g}}} \rightarrow \frac{n_f}{n_p} = 8,8$$

7.7.2.3 Fiziksel Kompleks ve Biyokonjugatlardaki Amino Grubu Sayısının Tayini

4,51 mg Peptid 142,8 ml borik asit tamponunda içerisinde olacak şekilde çözülür. Çözeltiden 4'er ml'lik 10 adet numune alınır. 10 numune üzerine sırası ile 2 µl, 4 µl, 8 µl, 12 µl, 16 µl, 24 µl, 30 µl, 36 µl, 44 µl, 52 µl Fluorescamine çözeltisinden eklenir. Manyetik karıştırıcı üzerinde 1,5 dakika karıştırma yapıldıktan sonra 390 nm'de uyarma yapılarak çözeltinin Floresans Spektrumu alınır (Mansuroğlu, 2007).

7.7.2.4 Fluoreskamin Yöntemi ile Amino Grubu Sayısı ve Konjugasyon Derecesinin Saptanmasına ait Deney Sonuçları



Şekil 7.81 Çeşitli biyokonjugatların floresans şiddet değişim grafiği.

(1) % 0,003 Şap Hastalığı Virüsünün 135–161 peptid dizisi, (2) VP/AA-Peptid Fiziksel Kompleksi ($n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=2$), (3) VP/AA-Peptid Fiziksel Kompleksi ($n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=4$), (4) EDC çapraz bağlayıcısı varlığında sentezlenen VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ($n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=2$), (5) *Mikroalga Teknolojisi kullanılarak organik ortamda sentezlenen VP/AA-Peptid Biyokonjugatı* ($n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=2$) (6) *Mikroalga Teknolojisi kullanılarak organik ortamda sentezlenen VP/AA-Peptid Biyokonjugatı* ($n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=4$) ait floresans şiddet değişimi (Mansuroğlu, 2007).

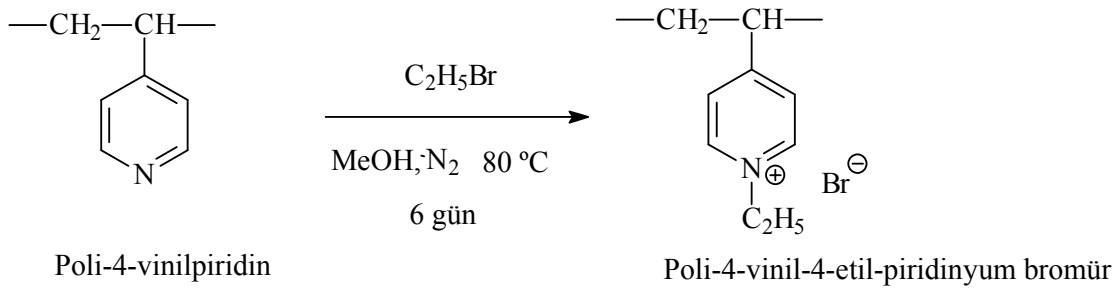
7.7.3 LPS çalışmaları için hazırlanan biyokonjugatlar

Bu bölümde Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümünde doktora çalışmasını tamamlayan Dr. Ayşe Nalbantsoy'un çalışmalarında (Nalbantsoy, 2008) kullanması için sentezlenen polimer LPS biyokonjugatlarının sentezi ve immünoloji sonuçları anlatılmıştır.

Salmonellosis dünyada önemli zoonoz hastalıklar arasındadır. Çoğunlukla *Salmonella* Typhimurium yaygın olarak görülmektedir. Lipopolisakkarit ise birçok gram (-) negatif bakterinin dış membranını oluşturan ve endotoksin olarak da adlandırılan başlıca bileşenlerdendir. LPS yüksek hidrofobik özellik gösteren lipit (*lipid A*) grubuna kovalent olarak bağlanmış uzun polisakkarit zinciridir. Türe göre değişken uzun hidrofilik polisakkarit zinciri O antijen olarak adlandırılmaktadır ve gram (-) enfeksiyonlarında immünite oluşumunda spesifik antijenik cevabın oluşmasından sorumludur.

7.7.3.1 Poli-4-vinil Piridinin (P4VP) %100 Etilbromür ve %10 Setilbromür-%90 Etilbromür ile Alkilizasyonu

Konjugatların oluşumunda daha etkin etkileşimleri sağlamak amacıyla P4VP'nin 2 modifikasyonu hazırlanmıştır. Bu amaçla iki farklı şişede 30 mg P4VP 10 ml metanolde çözdürüldükten sonra 1. şişeye 30 µl bromoetan (%100 etilasyon), 2. şişeye 10 µl heksadesil bromid (1-bromoheksadekan) (%10 setilasyon için) eklenerek manyetik karıştırıcıda 200 rpm'de, oda sıcaklığında çözdürüldü ve sistem, azot atmosferine alındı. Daha sonra şişeler 80°C'de 6 gün bekletilmiştir. Etilasyon yapılan 1. şişedeki örnek çöktürme işlemine alınarak setilasyonu tamamlanan örneğe 30 µl bromoetan (%90 etilasyon) eklenip sistem azot atmosferine alındıktan sonra tekrar 80 °C'de 6 gün bekletilmiştir. Çöktürme işlemi 40 ml - 20 °C etil asetatla gerçekleştirilmiş ve 5000 rpm, -3°C'de 10 dakika santrifüj sonrası vakum altında cam fırında kurutulan örnekler analize alınmıştır.



Şekil 7.82 PVP'nin C₂H₅Br ile alkilasyonu.

Reaksiyonun Kontrolü

1. Destile suda (pH 7.0) çözünürlüğü (1 mg / ml) kontrol edilmiş,
2. FT-IR spektrofotometrede spektrumu alınarak P4VP'nin spektrumu ile karşılaştırılmıştır.

P4VPEtBr ve P4VPEtStBt ile LPS'nin Konjugasyonu

Konjugasyon ortamında final konsantrasyonları LPS 1 mg / ml (ultra saf su pH 7.2) farklı miktarlarda polimerle (0.5, 1, 2 mg / ml ultra saf su, pH 7.4) oda sıcaklığında konjugasyonları oluşturulmuştur. LPS polimer üzerine yavaş yavaş manyetik karıştırıcıda (200 rpm) eklenerek 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 4000 rpm oda sıcaklığında 10 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatantta oluşan biyokonjugatların boyut ölçümü (Zetasizer), yapı ve karakterizasyonu BAK ile kromatografik analizleri yapılmıştır.

8. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu tez çalışmasından elde edilen sonuçları bir liste halinde şu şekilde sıralayabiliriz.

- 1) Konidin sentezi ve biyobozunur özellikli polikonidin polimerinin sentezi ve bu polimere –COOH fonksiyonel grubunun kazandırılması.
- 2) 3 farklı viral hastalığın (Şap, Grip, Melanoma) immünojenik özelliğe sahip 7 farklı kapsid peptid dizilerinin mikrodalga destekli katı faz peptid sentezi ile sentezlenmesi ve LC-ESI-MS sistemi ile karakterizasyonunun yapılması.
- 3) Sentezi yapılan dizilerden birinin (VP1 200-213) amino asit analizinin gerçekleştirilmesi.
- 4) Farklı polielektrolitlerle, sentezlenen peptidlerin yeni bir yöntem olan mikrodalga destekli, organik ortamda HBTU/HOBt aktivatörleri varlığında biyokonjugasyonunun gerçekleştirilmesi.
- 5) Yeni yöntemle sentezlenen biyokonjugatın klasik yöntemle sentezlenen biyokonjugatla kıyaslanması.
- 6) Gelecekte yapılacak sentetik aşı prototipi geliştirme çalışmalarına kaynak teşkil etmesi.

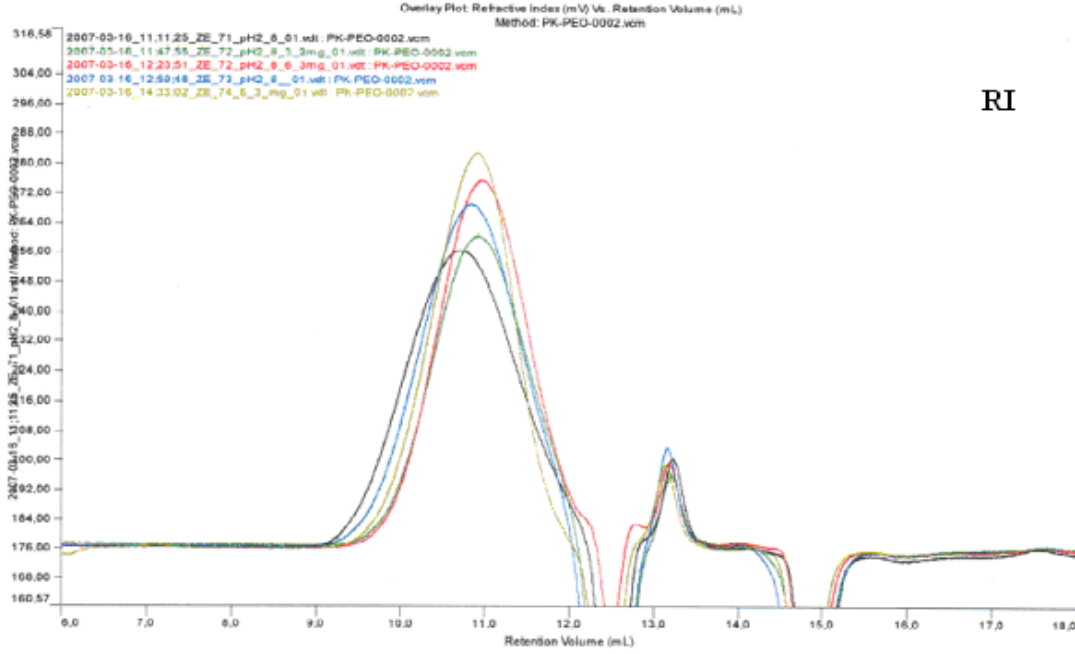
Takip eden bölümlerde bu listenin geniş açıklaması bulunmaktadır.

8.1 Polimer sentezinin Sonuç ve Tartışması

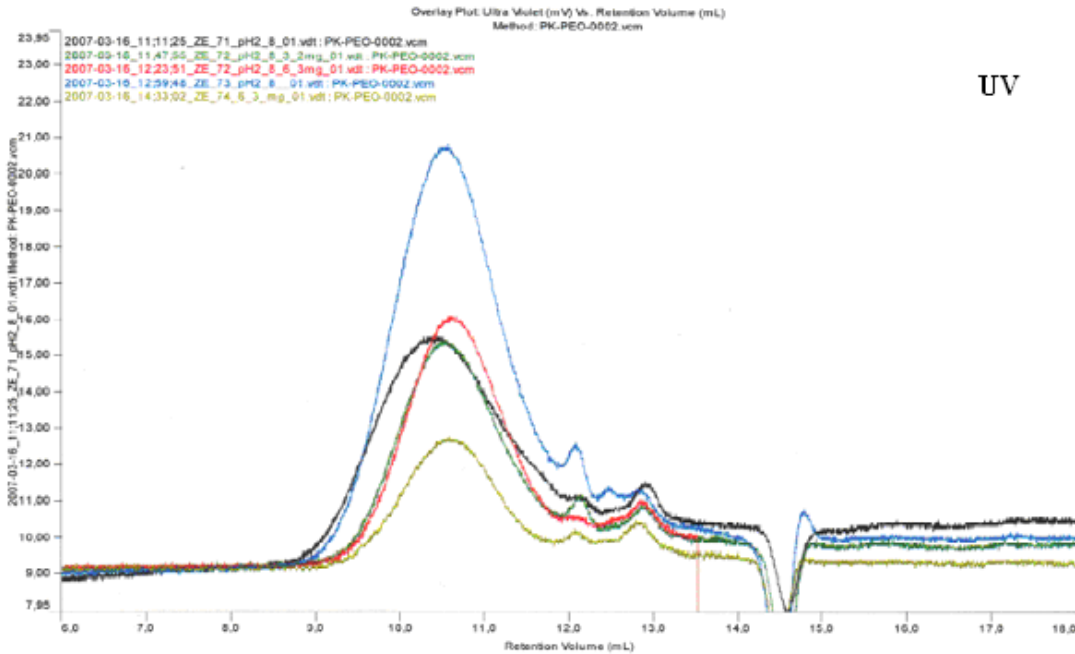
Biyobozunur özellikteki polielektrolitler biyolojik uygulamalar açısından oldukça önemlidirler. Bu çalışmada sentezi yapılan polikonidin ana zincirinde bulunan N-C bağlarından dolayı biyobozunurdur ve bu özelliği nedeniyle sentetik aşı prototipi için taşıyıcı molekül olarak kullanılmaya adaydır.

Sentetik peptidlerin polimere bağlanabilmesi için polimer zinciri üzerinde peptidlerin bağlanabileceği aktif grupların (–COOH, –NH₂, vb.) bulunması gereklidir. Fakat polikonidin zincirinde bu tür aktif gruplar bulunmamaktadır. Bu problem polikonidin BrAcOH ile reaksiyona sokularak polimer zincirine –COOH gruplarının eklenmesi ile giderilmiştir. Bu sayede poliakrilik asit gibi üzerinde –COOH grupları bulunduran fakat aynı zamanda yapısında bulunan N-C bağlarından dolayı biyobozunur özellik gösteren bir poliamfolit yapı elde edilmiştir.

Sentezlenen polimerlerin yapısal analizleri FT-IR ve ^1H NMR ile yapılmıştır. Molekül ağırlıkları BAK analizleri ile belirlenmiştir. Şekil 8.1 ve 8.2’de sentezlenen polikonidin dizilerinden birine ait BAK analiz sonuçları verilmiş ve Çizelge 8.1’de veriler tablo halinde verilmiştir.

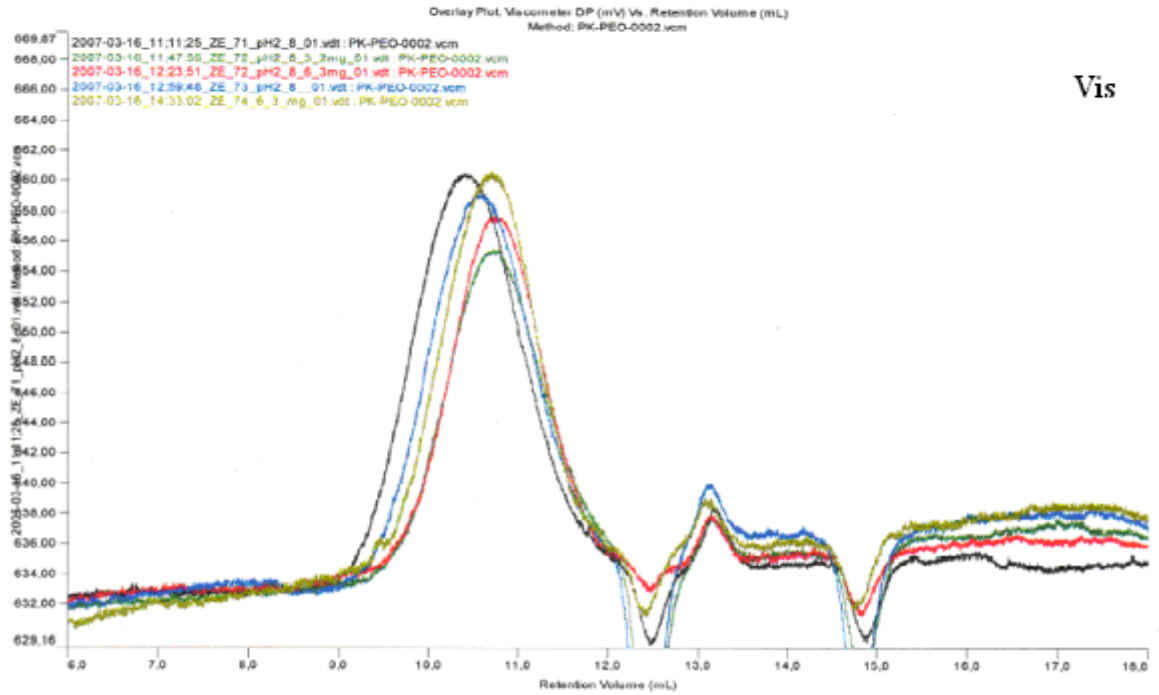
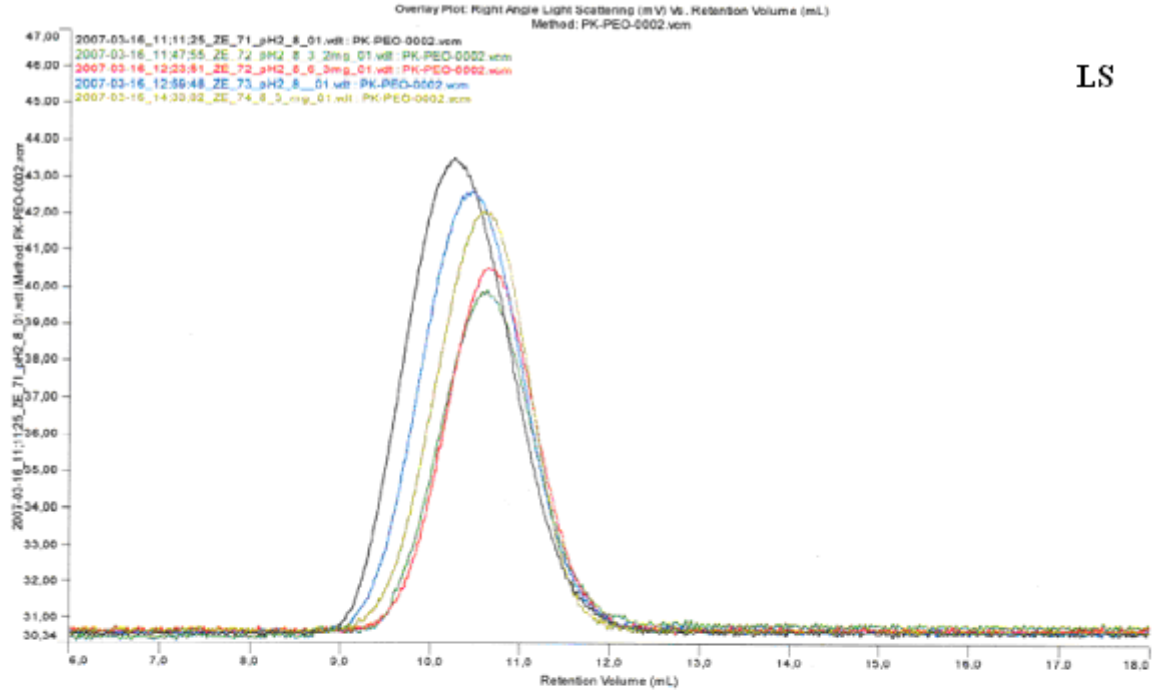


RI



UV

Şekil 8.1 Kloroform ortamında $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/500 (siyah), Kloroform ortamında $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/2000 (koyu yeşil), Kloroform ortamında $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/2000 (kırmızı), Metanol-1,4-dioksan karışımında $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/2000 (mavi), Metanol-1,4-dioksan karışımında $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/2000 ve mikrodalga enerjisi ile sentezlenmiş (açık yeşil) polimerlere ait refraktif indeks ve UV kromatogramları.

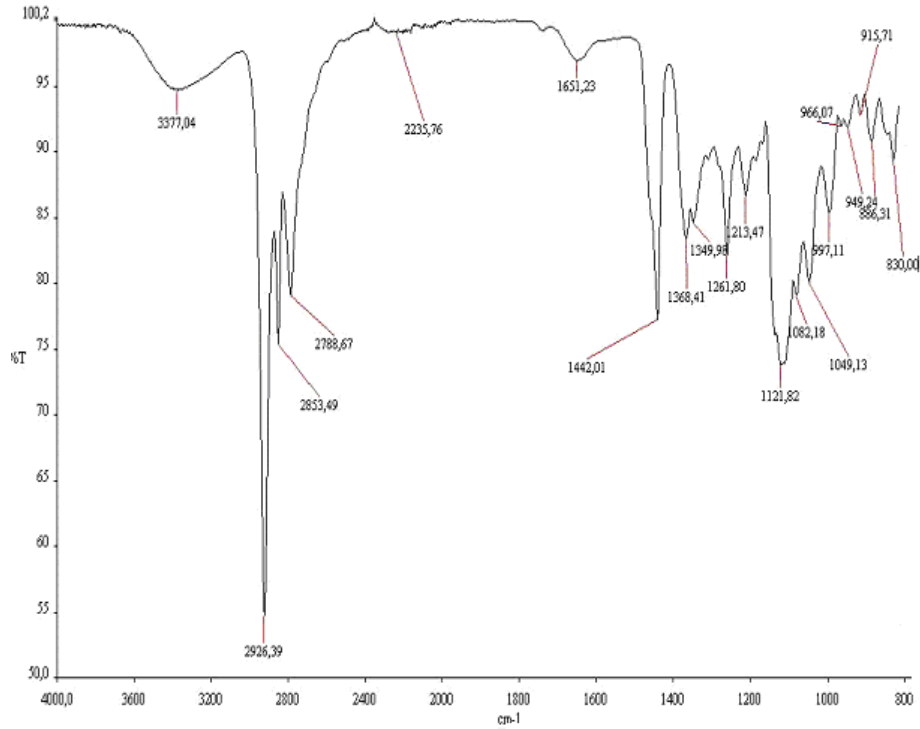


Şekil 8.2 Kloroform ortamında $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/500 (siyah), Kloroform ortamında $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/2000 (koyu yeşil), Kloroform ortamında $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/2000 (kırmızı), Metanol-1,4-dioksan karışımında $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/2000 (mavi), Metanol-1,4-dioksan karışımında $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/2000 ve mikrodalga enerjisi ile sentezlenmiş (açık yeşil) polimerlere ait ışık saçılması ve viskozite kromatogramları.

Çizelge 8.1 Dört dedektörlü büyüklükçe ayırma kromatografisi ile belirlenen sabitler (Şekil 8.1 ve Şekil 8.2'deki örnekler için) .

Polimer Kodu	Başlatıcı (mg)	$n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı	$\overline{M}_w$	$\overline{M}_n$	$\overline{M}_w/\overline{M}_n$	R_h (nm)	Mark Houwink a	Mark Houwink log K	Çözgen	IV (dl/g)
ZE 71	CH ₃ I (0,5)	1/500	27160	16953	1,602	5,286	0,663	-3,336	CHCl ₃	0,3830
ZE 72	CH ₃ I (0,5)	1/2000	22415	16555	1,354	4,504	0,587	-3,097	CHCl ₃	0,2792
ZE 73	CH ₃ I (0,5)	1/2000	23067	15813	1,459	4,809	0,661	-3,334	MetOH-1,4 Dioksan	0,3352
ZE 74	CH ₃ I (0,5)	1/2000	23662	16095	1,470	4,830	0,664	-3,202	MetOH-1,4 Dioksan	0,3299

Elde edilen sonuçlar sentezlenen polimerlerin monodispersite ve ortalama molekül ağırlığı olarak birbirlerine yakın olduğunu göstermektedir.



Şekil 8.3 Kloroform ortamında $n_{\text{başlatıcı}}/n_{\text{monomer}}$ oranı 1/1000 olan polikonidine ait FT-IR spektrumu (başlatıcı CH₃I).

FT-IR analizi ile 2926–2788 cm⁻¹ bantları ile CH₂ gruplarının varlığı gözlenmiş ve 3377cm⁻¹’deki bant da NH gerilmesine aittir. Polimerin yapısında başkaca bir fonksiyonel grup bulunmamaktadır.

8.2 Peptid Sentezinin sonuç ve tartışması

Peptid sentezi ayrı bir çalışma alanı olarak son 20 yılda çok büyük bir hızla gelişmektedir. Peptidlerin tamamen doğal yapıda olması ve vücutta pek çok işlev görmesi onların ilaç geliştirme çalışmalarında kullanılmasını mümkün hale getirmektedir.

Sentezi yapılacak viral peptidler, Grip, Şap ve Melanoma viral hastalılarının kapsid proteinlerinden belirlenen kısımlar amaca uygun olarak literatür kaynaklarından belirlenmiş ve gerekli görülen modifikasyonlar (-N ucuna Trp eklemek gibi) yapılarak sentezleri SPPS yöntemi ile yapılmıştır.

Tez kapsamında, 3 farklı viral hastalığın (Şap, Grip, Melanoma) immünolojik özelliğe sahip 7 farklı kapsid peptid dizisi mikrodalga destekli katı faz peptid sentezi ile sentezlendi ve LC-ESI-MS sistemi ile karakterizasyonu yapıldı.

Sentezlenen peptid dizileri Çizelge 8.2’de verilmiştir.

Çizelge 8.2 Sentezi yapılan peptid dizileri ve amino asit sayıları.

Dizinin Adı	Peptid dizisi	Amino Asit Sayısı
VP1 135–161a	SKYSTTGERTRGDLGALAARVATQLPA	27
VP1 135–161b	WSKYSTTGERTRGDLGALAARVATQLPA	28
VP1 200–213	WDRHKQRRIAPAKQLG	16
VP1 40–60	WVKINNTSPTHVIDLMQTHQHG	22
HA 91–108	WSKAFSNCYPYDVPDYASL	19
NP 55–69	WRLIQNSLTIERMVLSA	17
Melanoma 155–163	WQLSLLMWIT	10

Günümüzde özellikle uzun zincirli peptidlerin sentezinde ulaşılan son nokta mikrodalga destekli katı halde peptid sentezidir. Bu tez çalışmasında kullanılan viral peptidler tez kapsamında mikrodalga destekli olarak sentezlenmiş, karakterize edilmiş ve saflaştırılmıştır. Sentezlenen peptidler sadece bu tezde kullanılmakta kalmamış bitmiş ve devam etmekte olan tez çalışmalarında da kullanılmaktadır. Bu yönüyle sunulan tez çalışması bölümümüzde devam etmekte olan çalışmalara da kaynak temin etmektedir.

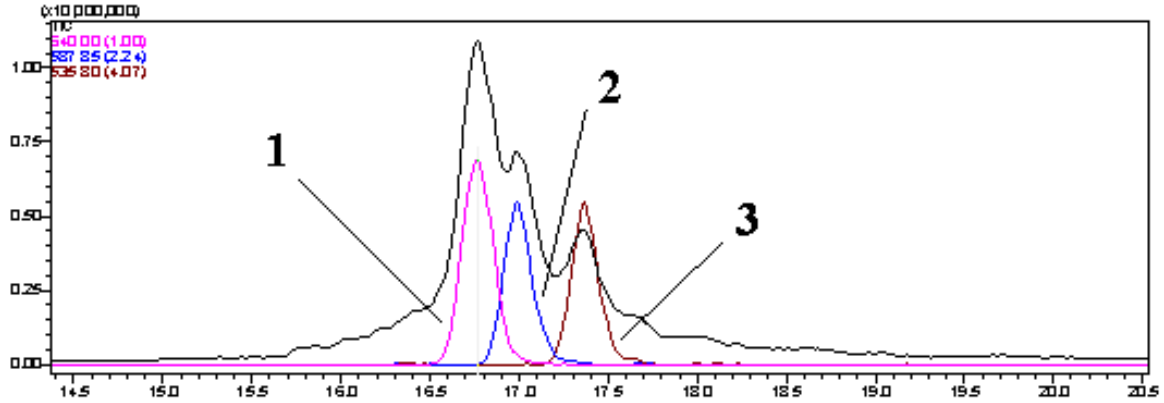
8.2.1 LC-ESI-MS analizleri Sonuç ve Tartışması

LC-ESI-MS küçük molekül ağırlığına sahip moleküllerin, molekül yapılarını bozmadan analizine imkân sağlayan bir analiz yöntemidir. Tez çalışmamda sentezlenen peptidlerin tamamının karakterizasyonu için LC-ESI-MS kullanılmıştır. Bu analizler sonucunda sentez

ürünlerinin saflığının iyi derecede olduğu belirlenmiştir.

Sentez sırasında ortaya çıkan istenmeyen durumlar (dehydration, deletion, vb.) yapılan karakterizasyon analizinde ortaya çıkmaktadır. Buna örnek olarak VP1 200–213 dizisinin analizi verilebilir. VP1 200–213 dizisinin analizinde gözlenen pikler eksik amino asit içeren dizileri göstermektedir.

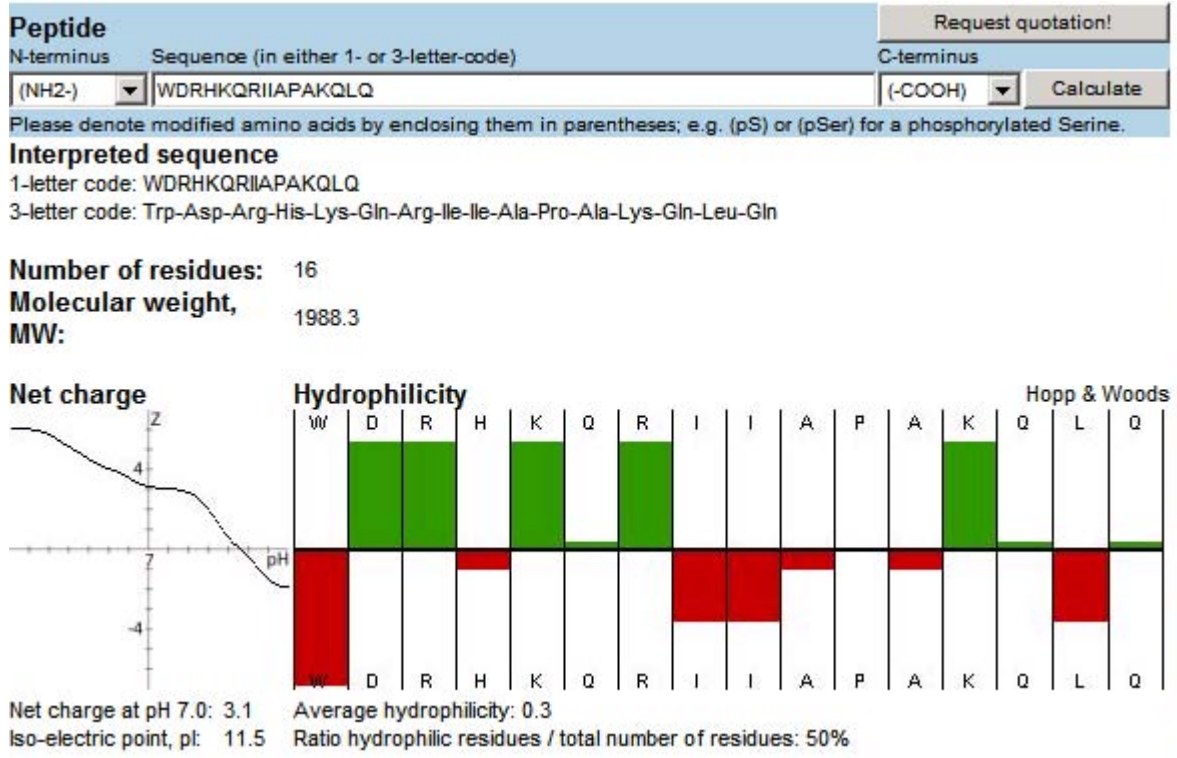
VP1 200–213 dizisi: W¹D²R³H⁴K⁵Q⁶R⁷I⁸A⁹P¹⁰A¹¹K¹²Q¹³L¹⁴Q¹⁵Q¹⁶ ‘dir.



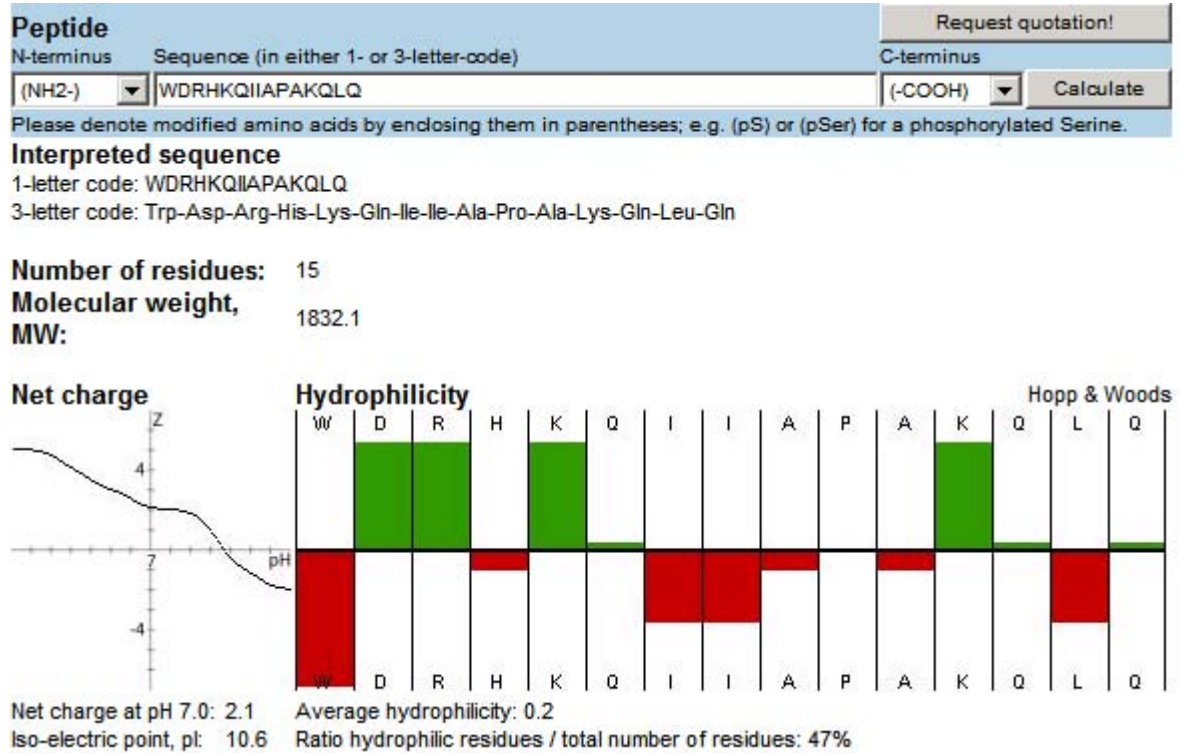
Şekil 8.4 Ham VP1 200–213’e ait UV kromatogramı.

Şekilde 8.4’te görülen piklerin hidrofillik sıralaması 1 > 2 > 3’tür. Çünkü peptid dizisinin hidrofobik karakteri arttıkça peptidin kolondan ayrılması daha uzun zaman alır. Yapılan hesaplar ile bu diziler arasında R (Arg) farkı olduğu görülmüştür. Hesapla ilgili geniş açıklama bölüm 7.3.3’te yapılmıştır.

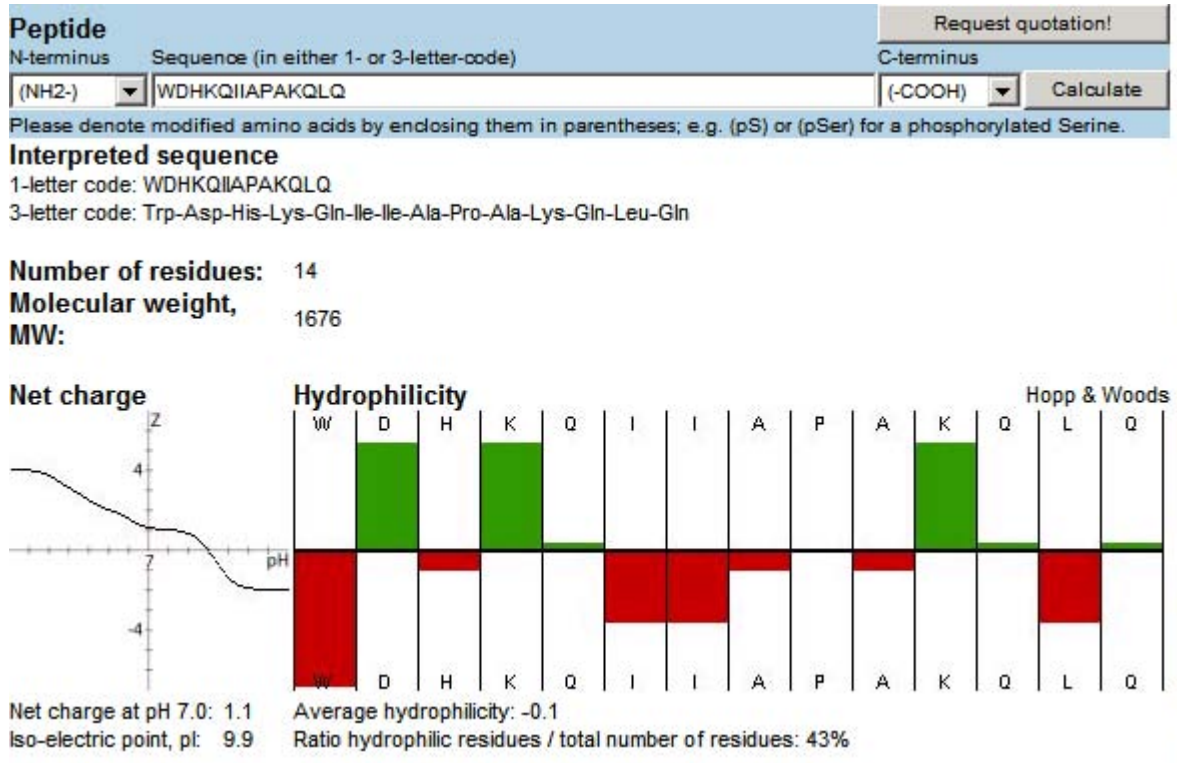
Hesaplama yazılımları ile de bir yaklaşım yapmak mümkündür. www.innovagen.se internet adresinde bulunan bir hesaplama (Hopp ve Woods, 1981) yazılımı ile yapılan hesaptan elde edilen pH 7.0’daki net yük, pI ve ortalama hidrofillik değerleri gibi veriler Şekil 5-7’de verilmiştir.



Şekil 8.5 VP1 200-213'ün tam dizisine ait değerler.

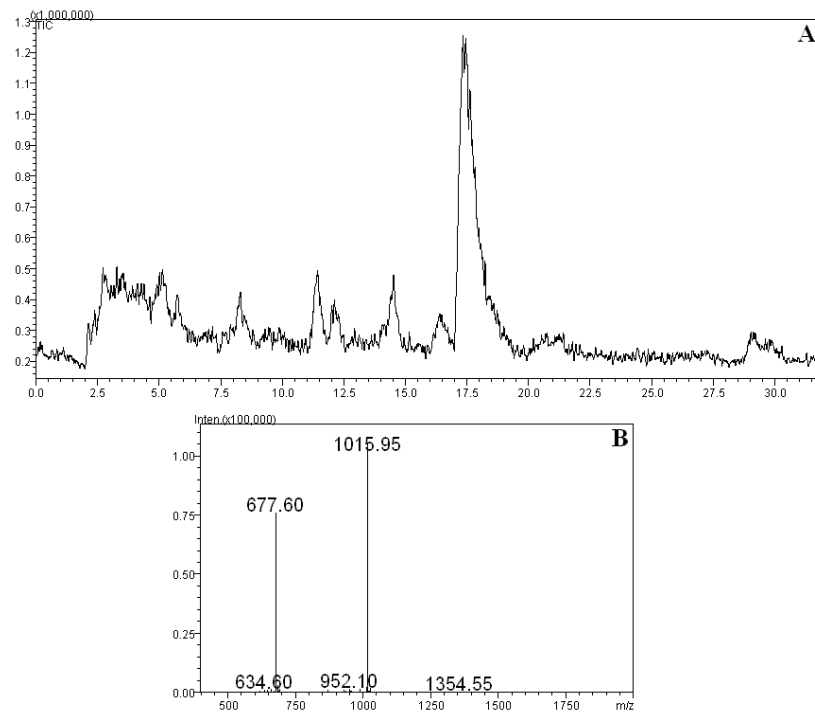


Şekil 8.6 VP1 200-213'ün bir R eksik dizisine ait değerler.



Şekil 8.7 VP1 200-213'ün iki R eksik dizisine ait değerler.

NP 55–69 peptid dizisinin LC-ESI-MS analizinde de çok az da olsa eksik dizi (deletion) oluşmuştur. Eksik amino asitlerin nasıl tespit edildiği aşağıda anlatıldığı gibi yapılmıştır.



Şekil 8.8 A) Ham NP 55–69 peptid dizisine ait TIC. B) Ham NP 55–69 peptid dizisinin 16.9–19.3 dk'ları arasının kütle spektrumu.

NP 55–69 dizisi: W¹R²L³I⁴Q⁵N⁶S⁷L⁸T⁹I¹⁰E¹¹R¹²M¹³V¹⁴L¹⁵S¹⁶A¹⁷

Teorik M_w = 2030.52 g/mol

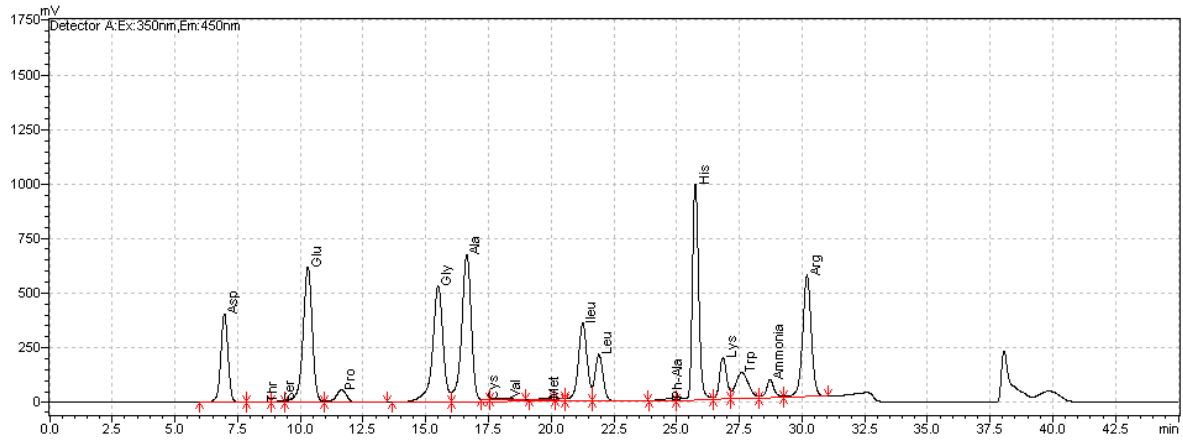
Şekil 8.8 A’da solda görülen diğer piklerin molekül ağırlığı 1375.25 g/mol ve 1916.78 g/mol’dür. 2030.52 ile 1916.78’in arasındaki fark 131’dir ve M (Met) amino asidine karşılık gelmektedir. 2030.52 ile 1375.25’in arasındaki fark 655.27’dir ve 5 amino aside karşılık gelmektedir. Bunların hangi amino asitler olduğu Peptide Companion yazılımı ile bulunabilir. Bu yazılımla yapılan incelemede eksik amino asitlerin 2 R (Arg), 2 I veya L (Ile veya Leu) ve V (Val) oldukları bulunmuştur. I ve L birbirlerinin yapısal izomeri olduklarından aynı molekül ağırlığına sahiptirler (Sepetov vd. 1993).

8.3 Amino Asit Analiz Sonucu ve Tartışması

Tez kapsamında sentezlenip, saflaştırılan VP1 200–213 peptid dizisinin % amino asit bileşimini belirlemek amacıyla amino asit analizi yapılmıştır.

Analizi yapılan dizi VP1 200–213; W¹D²R³H⁴K⁵Q⁶R⁷I⁸A¹⁰P¹¹A¹²K¹³Q¹⁴L¹⁵G¹⁶ dir. Bu dizinin 3 harf kodlu gösterimi

Trp¹-Asp²-Arg³-His⁴-Lys⁵-Gln⁶-Arg⁷-Ile⁸-Ile⁹-Ala¹⁰-Pro¹¹-Ala¹²-Lys¹³-Gln¹⁴-Leu¹⁵-Gly¹⁶’dir



Şekil 8.9 VP1 200–213 peptidinin amino asit bileşimini gösteren fluoresans kromatogramı.

Çizelge 8.3 VP1 200–213 peptidinin kromatogramına ait veriler.

ID#	Name	Ret. Time	Conc.	Channel	Peak#	Area	Height	Mark	Peak Start	Peak End	Area%
1	Asp	6.972	0.08244	Detector A - Ch1	1	8052336	402529		5.975	7.842	6.8393
2	Thr	8.531	0.00035	Detector A - Ch1	2	35521	1577		7.850	8.817	0.0306
3	Ser	9.217	0.00135	Detector A - Ch1	3	132498	6601	V	8.817	9.367	0.1142
4	Glu	10.297	0.19169	Detector A - Ch1	4	15878368	817471	V	9.367	10.950	13.6836
5	Pro	11.646	0.09272	Detector A - Ch1	5	1663125	57789	SV	10.950	13.483	1.4332
6	Gly	15.492	0.09104	Detector A - Ch1	6	15400411	530249		13.658	16.008	13.2717
7	Ala	16.633	0.19909	Detector A - Ch1	7	20122159	672635	SV	16.008	20.567	17.3408
8	Cys	17.355	0.00083	Detector A - Ch1	8	16422	1362	T	17.217	17.533	0.0142
9	Val	18.234	0.00154	Detector A - Ch1	9	141702	3824	TV	17.533	18.983	0.1221
10	Met	19.749	0.00124	Detector A - Ch1	10	74402	2969	T	19.108	20.117	0.0641
11	Ileu	21.261	0.11939	Detector A - Ch1	12	8865510	357507	V	20.567	21.625	7.6401
12	Leu	21.904	0.09356	Detector A - Ch1	13	4848890	213823	V	21.625	23.833	4.1787
13	Tyr	No peak is detected.									
14	Ph-Ala	24.703	0.00402	Detector A - Ch1	14	332555	8585		23.908	24.983	0.2866
15	His	25.750	0.09681	Detector A - Ch1	15	17123278	986798	V	24.983	26.475	14.7565
16	Lys	26.845	0.17604	Detector A - Ch1	16	3732494	189710	V	26.475	27.175	3.2166
17	Trp	27.601	0.05098	Detector A - Ch1	17	4235186	118578	V	27.175	28.300	3.6498
18	Ammonia	28.730	0.16741	Detector A - Ch1	18	1815503	84231	V	28.300	29.283	1.5646
19	Arg	30.196	0.16453	Detector A - Ch1	19	13544808	554992	V	29.283	31.067	11.6726

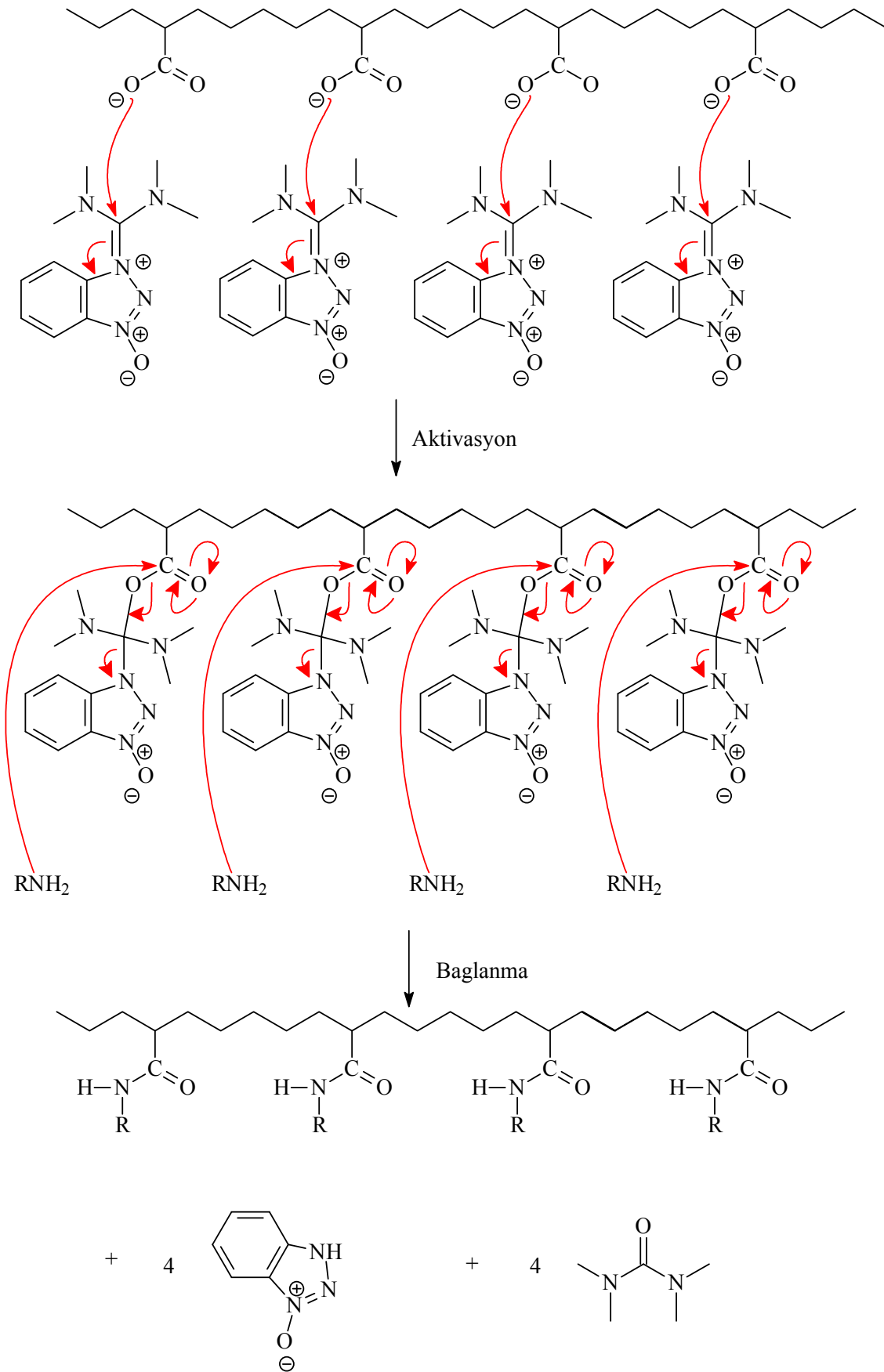
Çizelge 8.4 VP1 200–213 peptidinin kromatogramının yorumlanması.

Kolondan çıkış sırası	Amino asit	Kromatogramdan elde edilen konsantrasyon değeri	Yuvarlama sonrası elde edilen değer
1	Asp	0.08244	1
2	Glu	0.19169	2
3	Pro	0.09272	1
4	Gly	0.09104	1
5	Ala	0.19909	2
6	Ile	0.11939	2
7	Leu	0.09356	1
8	His	0.09681	1
9	Lys	0.17604	2
10	Trp	0.05098	1
11	Arg	0.16453	2

Çizelge 8.2’de görüleceği gibi yapılan amino asit analizi ile; VP1 200-213 dizisinin 1 molünde; 1 mol Asp, 2 mol Gln, 1 mol Pro, 1 mol Gly, 2 mol Ala, 1 mol Leu, 1 mol His, 2 mol Lys, 1 mol Trp, 2 mol Arg olmak üzere 11 çeşit amino asit bulunduğu ve toplam olarak amino asit sayısının 14 olduğu bulunmuştur. Gerçekte ise dizide 16 amino asit bulunmaktadır. Bunun sebebi bu yöntemle Gln (Q)’yi belirlemenin mümkün olmamasıdır. Bu durum göz önüne alındığında yapılan analiz oldukça başarılıdır.

8.4 Biyokonjugat sentezi sonuçlar ve tartışması

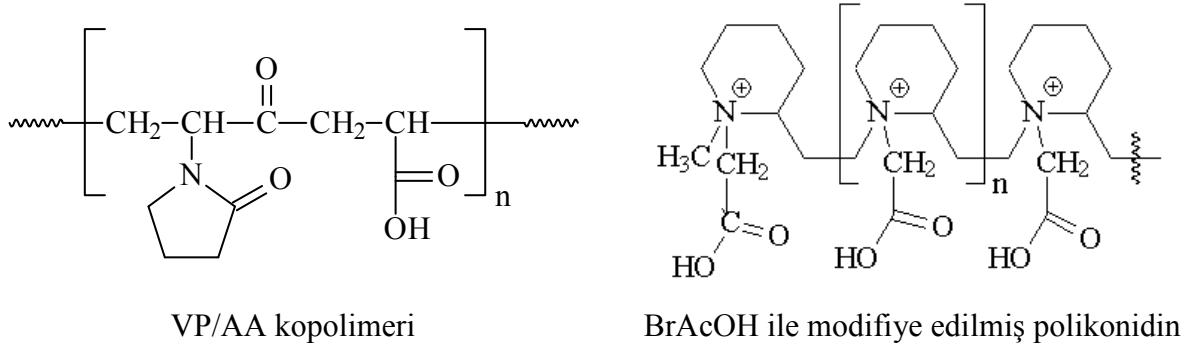
Sentetik yapıda aşı prototipi geliştirme amacına ulaşabilmek için sentezi yapılan peptidler ve polimerlerin biyokonjugatları hazırlanmıştır. Biyokonjugat sentezinde daha önceki çalışmalarda kullanılan su ortamında karbodiimid varlığında yapılan klasik yöntem yerine mikrodalga destekli organik ortamda HBTU/HOBt aktivatörleri varlığında yeni bir yöntem kullanılmıştır. Şekil 8.10’da yeni yöntemin mekanizması gösterilmektedir. Şekil 8.10’da polimer zinciri üzerindeki –COOH grupları gösterilmiş diğer fonksiyonel gruplar gösterilmemiştir.



Şekil 8.10 Peptid polimer konjugatının yeni yöntemle sentezinin mekanizması.

Şekil 8.10'da gösterilen mekanizma, peptid sentezindeki aktivasyon mekanizmasının polimere uyarlanmış halidir. Şekil 8.10'da polimer zinciri üzerindeki $-\text{COOH}$ grupları gösterilmiş diğer fonksiyonel gruplar gösterilmemiştir. Karbonil grubu aktivatörü olarak HBTU kullanılmıştır. RNH_2 , peptid zincirleri için genel gösterimdir.

Biyokonjugat sentezinde polimer olarak, Şekil 8.11'de gösterilen VP/AA kopolimeri ve BrAcOH ile modifiye edilmiş polikonidin kullanılmıştır.



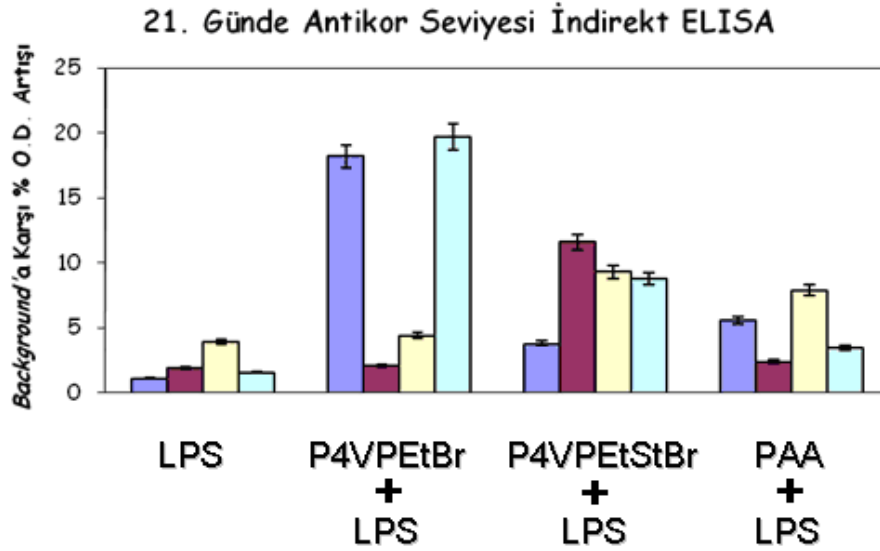
Şekil 8.11 Mikrodalga ile biyokonjugasyon reaksiyonlarında kullanılan polimerler.

Bu tez çalışmasının getirdiği en büyük yenilik mikrodalga destekli organik ortamda HBTU/HOBt aktivatörleri varlığında biyokonjugat sentez yöntemin geliştirilmesidir. Literatürde ilk olan bu yöntemle sentezlenen biyokonjugatın fareler üzerinde yapılan immünoloji çalışmaları ve kullanılan polimerlerin toksisite analizleri bölümümüzde var olan hücre kültür laboratuvarında yapılmıştır (Mansuroğlu, 2007). İmmünoloji sonuçları yeni yöntemle sentezlenen konjugatın etkin biçimde işlev gördüğünü göstermektedir.

Bir diğer biyokonjugat anlatılan biyokonjugatlardan farklı olarak Polimer protein arasında yapılmıştır. Polimer olarak üzerine etil ve setil grupları bağlanmış PVP polimeri kullanılmış ve bu polimerin LPS ile konjugatı hazırlanmıştır (Nalbantsoy, 2008).

Ege Üniversitesi Biyomühendislik bölümü ile ortaklaşa yürütülen bu çalışmada bu tez kapsamında daha sağlam yapıda biyokonjugatların sentezlenebilmesi için polimerin etil ve setil grupları ile modifikasyonu, polikonidinin BrAcOH ile olan reaksiyonundaki gibi yapılmıştır.

Alkilasyonunu yaptığımız PVP polimeri ile Ege Üniversitesi Biyomühendislik bölümünde hazırlanan biyokonjugatların immünoloji çalışmalarına ait sonuçlar Şekil 8.12'de verilmiştir.



Şekil 8.12 LPS ve LPS'nin polimerlerle konjugatlarına ait İndirekt ELISA Sonuçları
(Nalbantsoy, 2008).

Şekil 8.12'de görüldüğü gibi 3 farklı polimerin (P4VPEtBr, P4VPEtStBr, PAA) ayrı ayrı LPS ile konjugatları farklı seviyelerde antikor titri vermişlerdir. P4VPEtBr ile LPS'nin konjugatı en yüksek antikor titrini vermiştir.

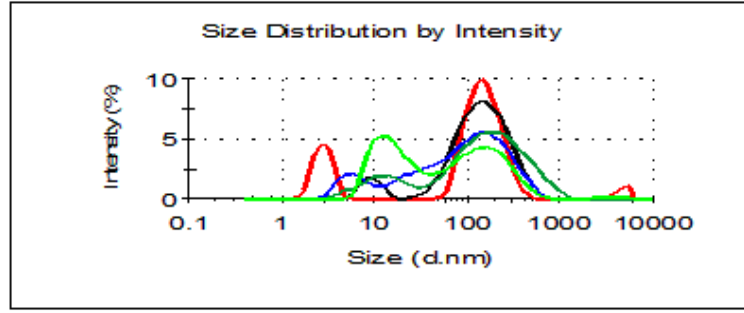
8.5 Mikrodalga yöntemiyle sentezlenen biyokonjugatın klasik yöntemle sentezlenen biyokonjugatlarla kıyaslanmasına ait Sonuç ve Tartışma

Bu tez kapsamında mikrodalga yöntemiyle sentezlenen biyokonjugatlardan VP/AA kopolimeri ile hazırlanan biyokonjugatların analizleri çalışma grubumuz tarafından yapılmıştır. Burada 2 farklı yöntemle sentezlenen biyokonjugatların analiz sonuçlarından yola çıkarak, yapısal olarak ne gibi farklılıklar gösterdikleri üzerinde durulacaktır.

En dikkat çekici kıyaslama biyokonjugatların ve kullanılan polimerin Zeta-Sizer analizinde görülmektedir.

Sentezlenen biyokonjugatın yapılan Zeta-Sizer analizinde, klasik yöntemle sentezlenen biyokonjugatlara göre daha az kompakt yapıda olduğu görüldü.

Bunun nedeni olarak polimer üzerine daha fazla peptid bağlanması ve peptidlerin daha hareketli bir halde bulunmaları gösterilebilir. Bu öneriyi doğrular nitelikte klasik yöntemle sentezlenen biyokonjugatın yükü daha negatiftir. Negatif yük değerinin polimer üzerinde bağ yapmamış $-COOH$ değerini gösterdiği göz önüne alındığında yeni yöntemle sentezlenen biyokonjugatın daha çok peptid içerdiği anlaşılmaktadır.



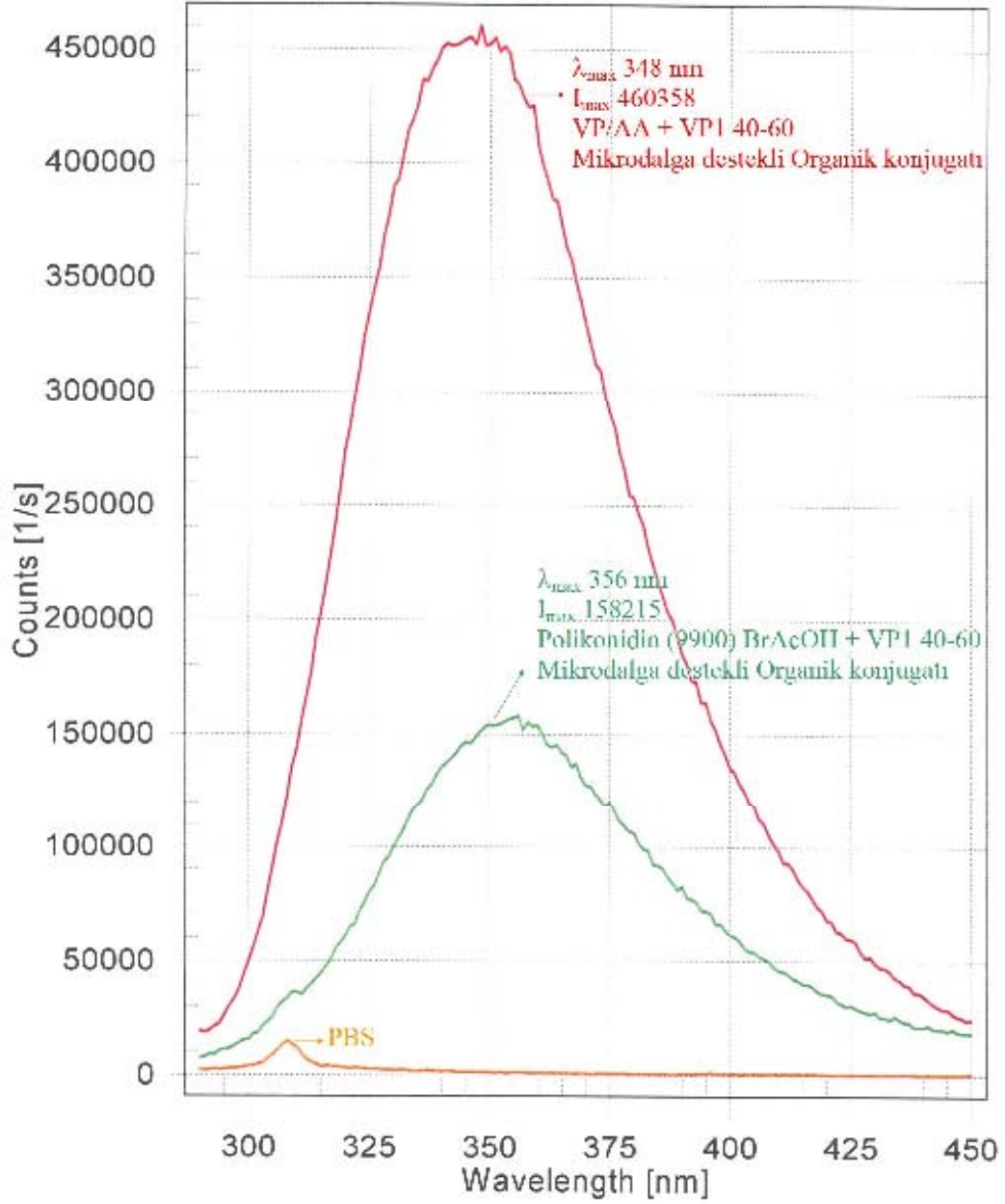
Örnekler	Boyut	Zeta Potansiyeli
% 0.1 Şap Hastalığı Virüsünün fonksiyonel antijen özelliği taşıyan yapısal VP1 Kapsid Proteinin 135–161 Peptidi	2.49	-13.5
% 0.5 VP/AA (25/75, $\overline{M}_w$ 80 000) Kopolimeri	7.91	-33
VP/AA-Peptid Fiziksel Karışımı ($n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=2$)	4.92	-22.5
<i>Mikrodalga Teknolojisi Kullanılarak organik ortamda sentezlenen VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ($n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=2$)</i>	10.1	-16.1
EDC çapraz bağlayıcısı varlığında sentezlenen VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ($n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=2$)	6.39	-18.7

Şekil 8.13 0.01 M PBS pH 7’de hazırlanmış örneklere ait Zeta Sizer aletinde alınan boyut ve zeta potansiyel ölçüm sonuçları

Şekil 8.13’te (1)% 0.006 Şap Hastalığı Virüsünün fonksiyonel antijen özelliği taşıyan yapısal VP1 Kapsid Proteinin 135–161 Peptidi, (2)% 0.5 VP/AA Kopolimeri, (3)VP/AA-Peptid Fiziksel Karışımı ($n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=2$), ***Mikrodalga Teknolojisi Kullanılarak organik ortamda sentezlenen VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ($n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=2$)***, (4) EDC çapraz bağlayıcısı varlığında sentezlenen VP/AA-Peptid Biyokonjugatı ($n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}=2$) ait Zeta Sizer aletinde alınan boyut ve zeta potansiyel ölçüm sonuçları (Mansuroğlu, 2007).

Yeni yöntemle sentezlenen biyokonjugatlardan birinin (VP/AA ile yapılan) floresans analizi beklenen doğrultuda olmuştur. Yani bağlanma gerçekleşikten sonra maviye kayma gözlenmiştir. Fakat BrAcOH ile modifiye edilmiş polikonidin ile sentezlenen biyokonjugatın

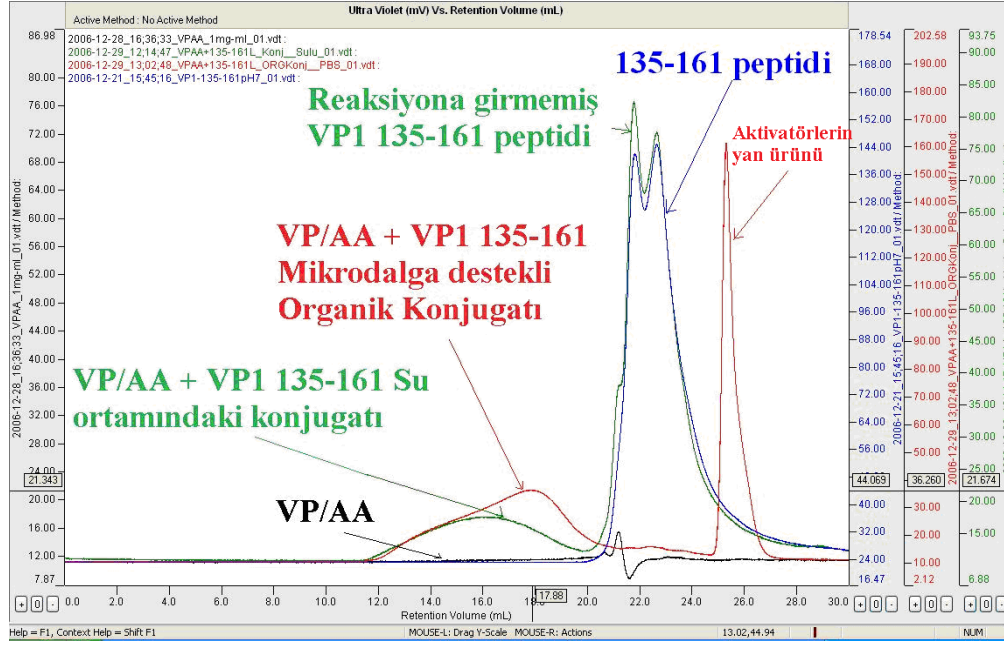
fluoresans analizinde kırmızıya kayma gözlenmiştir. Bu farklılık kullanılan polimerler arasındaki elektrik yükü farkından kaynaklanabilir. Çünkü VP/AA negatif yüklü bir polimerken BrAcOH ile modifiye edildikten sonra polikonidin poliamfolit yapı özelliği göstermektedir (Şekil 8.14).



Şekil 8.14 Mikrodalga destekli olarak sentezlenen iki farklı konjugatın fluoresans kıyaslaması.

PBS'nin fluoresans analizinde 309 nm de bir pik görülmüştür. Bu pik sudan kaynaklanmaktadır.

İki konjugat arasında şiddet farkının yanı sıra 8 nm'lik bir kırmızıya kayma gözlenmiştir. Bu kaymaya polimerlerin peptidle olan bağlanma şekli yol açmış olabilir.

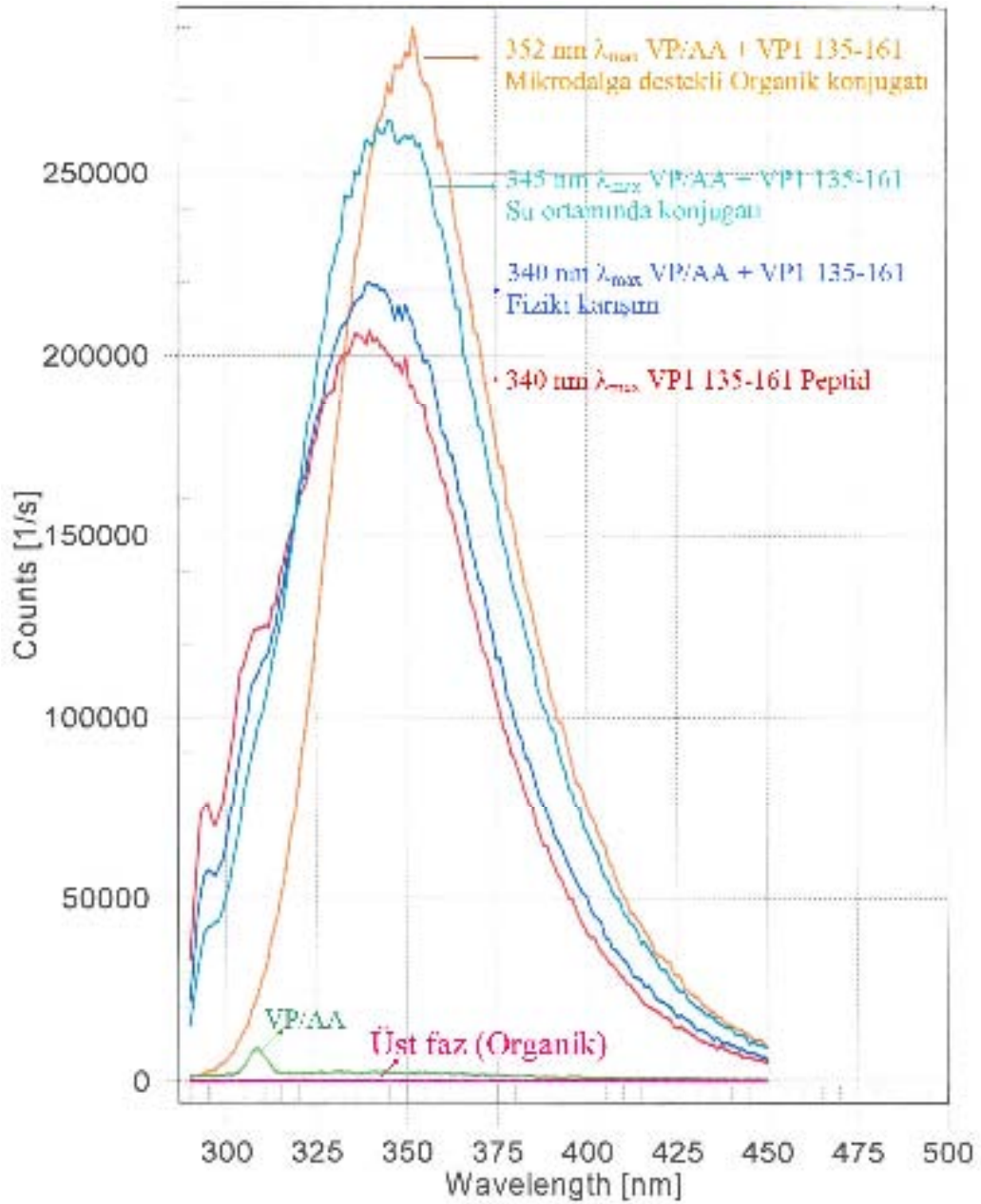


Şekil 8.15 Mikrodalga ile klasik yöntemin BAK kıyaslaması.

Yeni geliştirilen mikrodalga işle konjugat sentez yönteminin klasik yöntemle kıyaslamasını yapmak amacıyla, klasik yöntemle ve mikrodalga yöntemi ile sentezlenen konjugatların BAK analizi yapılmıştır. Şekil 8.15'ten de görüldüğü üzere mikrodalga ile yapılan konjugat sentezinde ppetidlerin tamamı reaksiyona girmiş iken klasik yöntemde reaksiyona girmeyen peptidler bulunmaktadır.

Bu sonuç yeni geliştirilen konjugasyon yönteminin daha etkin bir biçimde polimer peptid konjugasyonunu gerçekleştirdiğini göstermektedir.

Şekil 8.16'da iki farklı yöntemle sentezlenen konjugatların fluoresans analizi bulunmaktadır.

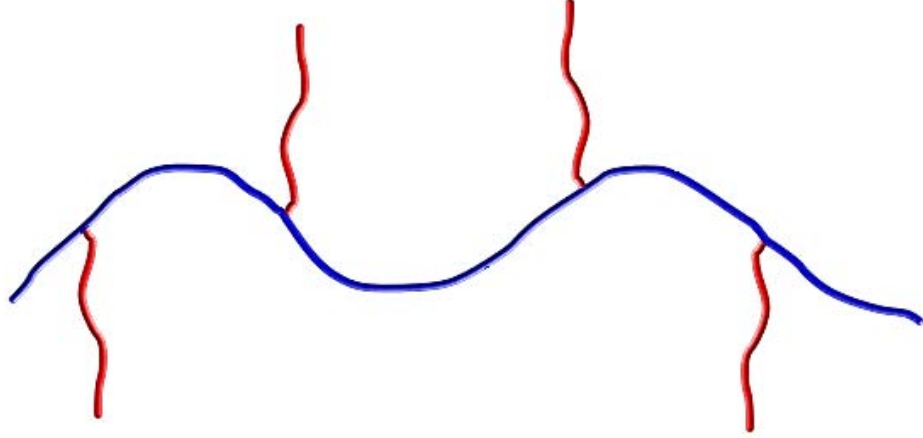


Şekil 8.16 İki farklı yöntemle sentezlenen konjugatların, fiziki karışımın ve peptidin fluoresans analizi.

Şekil 8.16'da, Şekil 8.15'te gösterilen biyokonjugatların PBS içinde fluoresans analizi verilmiştir. Bu sonuca göre mikrodalga yöntemiyle sentezlenen biyokonjugatta kırmızıya kayma gözlenmiştir. Bu durum konjugatın büyüklüğü ve daha fazla sayıda peptid içermesi ile açıklanabilir.

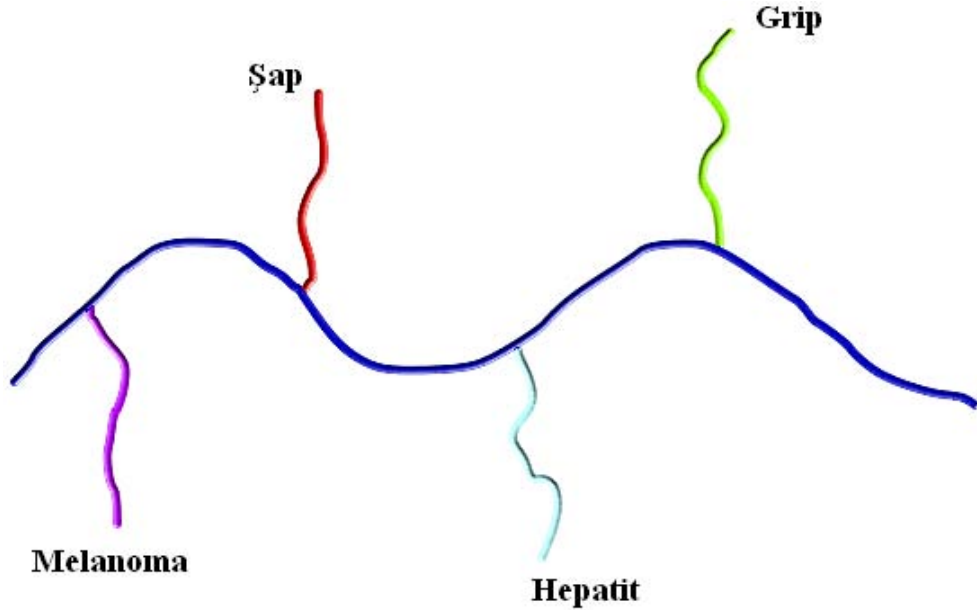
8.6 Tez çalışmasının çıktılarının Tartışması

Bu çalışmanın çıktıları sentetik aşı prototipi geliştirme çalışmalarına büyük katkı sağlamıştır. Bu çalışmada Şekil 8.17’de gösterildiği gibi bir tür polimere bir tür sentetik peptid bağlanmıştır. Şekil 8.17’de mavi çizgi taşıyıcı olan polimeri, kırmızı çizgi ise peptidi sembolize etmektedir.



Şekil 8.17 Polimer zincirine bağlı tek tip peptidle sentezlenen konjugatın şematik gösterimi.

Bu haliyle biyokonjugat sadece bir tür hastalığa karşı etkin olabilecektir. Bu tez çalışmasında yeni bir yaklaşımla mikrodalga destekli olarak geliştirilen konjugasyon yöntemi ile yakın gelecekte Şekil 8.18’de gösterildiği gibi aynı polimer zinciri üzerinde birden fazla hastalığa karşı etkili aşı geliştirmek mümkün olacaktır.



Şekil 8.18 Polimer zincirine bağlı farklı özellikteki peptidlerle sentezlenen şematik konjugatın gösterimi.

9. KAYNAKLAR

- Aguilar, M.-I. (Editör), (2004), *Methods in Molecular Biology*, vol. 251, HPLC of Peptides and Proteins: Methods and Protocols, Humana Press Inc., Totowa, NJ.
- Albericio, F., Bofill, J.M., El-Faham, A., Kates, S.A, (1998), "Use of Onium Salt Based Coupling Reagents in Peptide Synthesis", *J. Org. Chem.*, 63., 9678-9683.
- Arnon, R., Ben-Yedidia, T., (2003), "Old and New Vaccine Approaches", *International Immunopharmacology*, 3, 1195–1204.
- Atherton, E., Sheppard, R.C., (1989), *Solid Phase Synthesis; A Practical Approach*, IRL Press.
- Barrett, G.C., Elmore, D.T., (2004), *Amino Acids and Peptides*, Cambridge University Press.
- Benoit, H., Remp, P., Grubisic, Z.J., (1967), *Poly. Soc.*, B5, 753.
- Bergmann, M., Zervas, L., (1932), *Chem. Ber.*, 65, 1192.
- Bruckner, R., (2002), *Advanced Organic Chemistry, Reaction Mechanism*, Elsevier.
- Carpino, L.A., Han, G.Y., (1972), "9-Fluorenylmethoxycarbonyl amino-protecting group" *J. Org. Chem.* 37, 3404–3409.
- Carter, D.C., Ho, J.X., (1994), "Structure of serum albumin", *Adv. Protein Chem.*, 45, 153-203.
- Collen T, Di Marchi R, Doel TR., (1991), "A T cell epitope in VP1 of foot and-mouth disease virus is immunodominant for vaccinated cattle", *J. Immunol.*, 146(2), 749–55.
- Curtius, T., (1882), "Ueber einige neue Hippursäureanalog constituerte synthetisch dargestellte Aminosäuren", *J. Prakt. Chemie*, 26, 145–208.
- Dautzenberg, H., Jaeger, W., Kötz, J. (1994), *Polyelectrolytes: formation, characterization, and application*, Hanser Publishers, Munich.
- David, I.J., Margaret M., (2002), *The Cambridge Dictionary of Scientists* 2nd Ed., Cambridge University Press.
- Dikshith, T. S. S., (2008), "Safe use of chemicals: a practical guide", CRC Press Taylor & Francis Group
- du Vigneaud, V., (1953), *J. Am. Chem. Soc.*, 75, 4879.
- Du, Y., Jiang, P., Li, Y., He, H., Jiang, W., Wang, X., Hong, W., (2007), "Immune responses of two recombinant adenoviruses expressing VP1 antigens of FMDV fused with porcine granulocyte macrophage colony-stimulating factor", *Vaccine*, 25, 8209–8219.

- Fields, G.B. (Editör), (1997), "Methods in Enzymology, Volume 289 Solid-Phase Peptide Synthesis", Academic Pres.
- Figge, J., Rossing, T.H., Fencel, V., (1991), "The role of serum-proteins in acid-Base Equilibria", *J. Lab. Clin. Med.* 117, 453-467.
- Fischer, E., Fourneau, E., (1901), Ueber einige Derivate des Glykokolls", *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, 34, 2868–2879.
- Galema, S.A., (1997), "Microwave chemistry", *Chem. Soc. Reviews*, Vol. 26, 233-238.
- García, M.C., (2005), "The effect of the mobile phase additives on sensitivity in the analysis of peptides and proteins by LC-ESI-MS", *J. Chromatogr. B*, 825, 111.
- Garrett, R.H., Grisham C.M., (1996), *Biochemistry*, Harcourt College Pub.
- Gaskell, S.J., (1997), "Electrospray: principles and practice", *J. Mass Spectrom.*, 32, 677.
- Gedye, R., Smith, F., Westaway, K., Ali, H., Baldisera, L., Laberge, L., Rousell, J., (1986), "The use of microwave ovens for rapid organic synthesis", *Tetrahedron Lett.*, 27, 279-82.
- Giguere, R.J., Bray, T.L., Duncan, S.M., Majetich, G., (1986) "Application of commercial microwave ovens to organic synthesis", *Tetrahedron Lett.*, 27, 4945-48.
- Gooch, J.W., (2007), *Encyclopedic Dictionary of Polymers*, Springer Science Business Media.
- Gözükara, E. M. (1997), *Biyokimya, Nobel Tıp Kitapevleri*, İstanbul.
- Grant, G.A. (Editör), (2002), *Synthetic Peptides: A User's Guide*, 2. Ed., Oxford University Pres, Inc.
- Greenwood, D.L.V., Dynonc, K., Kalkanidis, M., Xiang, S., Plebanski, M., Scheerlinck, J.P.Y., (2008), "Vaccination against foot-and-mouth disease virus using peptides conjugated to nano-beads", *Vaccine*, 26(22), 2706-2713.
- Griffiths, P.R., de Haseth, J.A., (2007), *Fourier Transform Infrared Spectrometry*, 2. Ed., Wiley-Interscience.
- Hayes, B.L., (2002), *Microwave Synthesis: Chemistry at the Speed of Light*, CEM Publishing: Matthews, NC.
- Higgs, P.G., Joanny, J.F., (1991), "Theory of polyampholyte solutions", *J. Chem. Phys.*, 94, 2, 1543.
- Hopp T.P., Woods K.R., (1981), Amino acid scale: Hydrophilicity, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:3824-3828.
- Howl, J., (2005), *Peptide synthesis and applications*, *Methods in molecular biology*; 298, Humana Press Inc.
- IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN), (1984), *Nomenclature and Symbolism for Amino Acids and Peptides Recommendations 1983*, *Pure & Appl. Chem.*, Vol. 56, No. 5, pp. 595—624.
- Jakubke, H., Sewald N., (2008), *Peptides from A to Z*, Wiley-Vch, Weinheim.

- Jones, J., (1997), Amino Acid and Peptide Synthesis, Oxford Science Publications.
- Kappe, C.O., (2004), "Controlled microwave heating in modern organic synthesis", *Angew. Chem. Int. Ed.* 43, 6250–6284.
- Kappe, C.O., Dallinger, D., (2006), "Nature Reviews, Drug Discovery; The impact of microwave synthesis on drug discovery; 51, 63; Vol 5; January.
- Kappe, C.O.; Stadler, A.; (2005), *Microwaves in organic and medicinal chemistry*, Wiley-VCH.
- Karabulut, E., (2007), Poli(1-Azobisiklo[4.2.0] oktan) ve Türevlerinin Sentezi ve Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, FBE Biyomühendislik Anabilim Dalı.
- Katchalski E., Berger A., Neumann H., (1954), *Nature*, Vol 173, 998.
- Kebarle, P., Tang, L., (1993), "From ions in solution to ions in the gas phase", *Anal. Chem.*, 65, 972A.
- Khleif, S.N. (Editör), (2004), *Cancer Treatment and Research Tumor Immunology and Cancer Vaccines*, Kluwer Academic Publishers.
- Kimmerlin, T., Seebach, D., (2005), "100 years of peptide synthesis': ligation methods for peptide and protein synthesis with applications to β -peptide assemblies", *J. Peptide Res.*, 65, 229–260.
- Kosarev, E.L., Muranov, K.O., (2003), "Chromatography + Recovery = Superresolution chromatography", *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*, 502, 764–767.
- Kromidas, S., (2005), *More Practical Problem Solving in HPLC*, WILEY-VCH Verlag.
- Kulicke, W.M., Clasen, C., (2004), *Viscosimetry of Polymers and Polyelectrolytes*, Springer-Verlag.
- Lakowicz, J.R., (1999), *Principles of Fluorescence Spectroscopy* 2nd Ed., Kluwer Academic/Plenum Publishers
- Larijani, B., Rosser, C.A., Woscholski, R., (2006), *Chemical Biology Applications and Techniques*, John Wiley & Sons Ltd, West Sussex, England.
- Lavagnino, E.R., Chauvette, R.R., Cannon, W.N., Kornfeld E.C., (1960), "Conidine-Synthesis, Polymerization and Derivatives", *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. 82, 2609-2613.
- Lennarz, W.J, Lane, M.D. (Editör); (2002), *Encyclopedia of Biological Chemistry*, Pearson, J.D., "HPLC Separation of Peptides", Cilt 2, 396-401
- Lindström, P., Tierney, J., Wathey, B., Westman, J., (2001), "Microwave assisted organic synthesis – a review", *Tetrahedron* 57, 9225.
- Loftus, D.J., P. Squarcina, M.B. Nielsen, C. Geisler, C. Castelli, N. Odum, E. Appella, G. Parmiani, and Rivoltini, L., (1998), "Peptides derived from self-proteins as partial agonists and antagonists of human CD8(+) T-cell clones reactive to melanoma/melanocyte epitopeMART1(27–35)", *Cancer Res* 58:2433–2439.

- Lough, W.J., Wainer, W. (1992), *High Performance Liquid Chromatography-Fundamental Principles and Practice*, Blackie Academic & Professional, New York.
- Loupy, A., (2006), *Microwaves in Organic Synthesis 2nd Ed.*, Wiley-Vch, Weinheim.
- Mansuroğlu, B., (2007), “Biyohibrid Yapılı Polimer Peptid Konjugatlarının Geliştirilmesi”, Doktora Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, FBE Biyokimya Anabilim Dalı.
- Matyjaszewski, K., (1984a), “Cationic polymerization of 1-azabicyclo[4.2.0]octane, 1 Alkylation”, *Makromol. Chem.* 183, 37-49.
- Matyjaszewski, K., (1984b), “Cationic polymerization of 1-azabicyclo[4.2.0]octane, 2^a) Reactivities of ions and ion pairs”, *Makromol. Chem.* 185, 51-66.
- Matyjaszewski, K., (1996), *Cationic Polymerizations: Mechanisms, Synthesis and Applications*, Markel Dekker, Inc., New York.
- McCormick, C.L., Salazar, L.C., (1992), “Water soluble copolymers: 44. Ampholytic terpolymers of acrylamide with sodium 2-acrylamido-2-methylpropanesulphonate and 2-acrylamido-2-methylpropanetrimethyl-ammonium chloride”, *Polymer*, 33, 4384.
- McKay, S.C., Albertson, N.F., (1957), *J. Am. Chem. Soc.* 79, 4686.
- Merle, Y., (1987), “Synthetic polyampholytes. 5. Influence of nearest-neighbor interactions on potentiometric curves”, *J. Phys. Chem.*, 91, 3092-3098.
- Merrifield, R. B., (1962), *Fed. Proc. Fed. Amer. Soc. Exp. Biol.*, 21, 412.
- Merrifield, R. B., (1963), “Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide”, *J. Am. Chem. Soc.*, 85, 2149–2154.
- Merrifield, R. B., (1984), “Solid Phase Peptide Synthesis Nobel lecture”, 8 December, The Rockefeller University, 1230 York Avenue, New York, N.Y. 10021-6399.
- Mingos, D.M.P., Baghurst, D.R., (1997), “Microwave-Enhanced Chemistry Fundamentals, Sample Preparation, and Applications”, *American Chemical Society*, ch. 1, pp 3-53.
- Montaudo, G., Lattimer. R., (2002), *Mass spectrometry of polymers*, CRC Press, Florida
- Morawetz H., (1965), *Macromolecules in Solution*, N.Y.
- Morawetz, H., Hughes, W.L.J., (1952), “The interaction of proteins with synthetic polyelectrolytes. I. Complexing of bovine serum albumin”, *J. Phys. Chem.*, 56, 64-69.
- Mustafaev, M.I. (2004), “Functionally Biopolymer Systems”, *Sigma Mühendislik ve Fen Bilimleri Dergisi*, Sayı 4.
- Mustafaev, M.I., (1996a) “Biyopolimerler”, TÜBİTAK, Gebze/Kocaeli.
- Mustafaev, M.I., (1996b), “Polyelectrolytes in Immunology: Fundamentals and Perspectives”, 20, 126-138.
- Mustafaev, M.I., Osada, Y., Endo, T., (1998), “Advanced Biopolymer Systems”, *First Japanese-Turkish Workshop Materials. TUBİTAK-Marmara Araştırma Merkezi*, pp: 1-76.
- Mühlbach, K., Schulz, R.C. (1988), “Polymers of 1-azabicyclo[4.2.0]octane, 1 Structure of monomer and homopolymer”, *Macromol. Chem.*, 189, 1267-1277.

- Nalbantsoy, A., (2008), "Salmonella Enteritidis, Salmonella Gallinarum, Salmonella Pullorum O ve H Aantijenlerine Karşı Monoklonal Antikor Üretimi", Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Bornova, İzmir
- Neas, E.D.; Collins, M.J. "Introduction to Microwave Sample Preparation Theory and Practice", J. American Chemical Society 1988, ch. 2, pp 7-32.
- Nekrasov, A.V., Berestetskaya, T.Z., (1984), "Kinetics and Mechanism of Copolymerization of Conidine and b-Propiolactone", Polymer Science U.S.S.R. Vol. 26, No. 5, 1165-1169.
- Niessen, W.M.A., (2006), Liquid Chromatography–Mass Spectrometry 3th Ed., CRC Press, Taylor & Francis Group, Florida.
- Niessen, W.M.A., Tinke, A.P., (1995), "Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. General Principles and Instrumentation", J. Chromatogr. A, 703, 37-57.
- Nijkamp, F.P., Parnham, M.J., (2005), Principles of Immunopharmacology, Birkhauser, Verlag.
- Nispen J.w. van, (1987), "Synthesis and analysis of (poly)peptides", Pure & Appl. Chem., Vol. 59, No. 3, pp. 331-344.
- Özbal, Y., (2000), Temel İmmünoloji 2. Baskı, Nobel Tıp Kitapevleri.
- Pasch, H., Trathnigg, B., (1999), HPLC of Polymers, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Pauling, L., (1950), College Chemistry Introductory Textbook of General Chemistry,
- Petrov, R.V., Mustafaev, M.I., Norimov; A.Sh., (1992), Physico-Chemical Criteria for The Construction of Artificial Immunomodulators and Immunogens on the Basis of Polyelectrolyte Complexes, Harwood Acad. publ. GmbH, UK.
- Pramanik, B.N., Ganguly, A.K., Gross M.L., (2002), Applied electrospray mass spectrometry, Marcel Dekker Inc., New York.
- Radeva, T. (2001), Physical Chemistry of Polyelectrolytes, Marcel Dekker Inc., New York.
- Rasvodovskii, E.F., Nekrasov, A.V., Pushchaeva, L.M., Morozova, I.S., Markevich, M.A., Berlin, A.A., Ponomarenko, A.T., Enikolopyan, N.S., (1974), "Mechanism of Nitrogen-Containing Cyclic Polymerization", J. Macromol. Sci.-Chem., A8(2), 241-264.
- Rice R.V., Stahmann M.A., Alberty R.A., (1954), J. Biol. Chem., Vol 209, 1.
- Saçak, M., (2004), Polimer Kimyası, Gazi Kitabevi, Ankara.
- Scranton, A.B., Rangarajan, B., Klier, J., (1995), "Biomedical applications of polyelectrolytes, Biopolymers II. Berlin", Springer.
- Sepetov N.F., Issakova O.L., Lebl M., Swiderek K., Stahl D.C., Lee T.D., (1993), "The use of hydrogen-deuterium exchange to facilitate peptide sequencing by electrospray tandem mass spectrometry", Rapid Comm. Mass Spectrom. 58(1): 58-61.
- Sewald, N.; Jakubke, H.; (2002) "Peptides: Chemistry and Biology", Wiley–VCH.
- Shibue, M., Mant, C.T., Hodges, R.S., (2005), "Effect of anionic ion-pairing reagent concentration (1–60 mM) on reversed-phase liquid chromatography elution behaviour of peptides", Journal of Chromatography A, 1080, 58–67.

Shulz, R.C., Schmidt, M., Schwarzenbach, E., Zöller, J., (1989), Makromol. Chem., Macromol. Symp., 26, 221-231.

Smith, M.B., March, J., (2001), March's advanced organic chemistry: reactions, mechanisms, and structure, 5th Ed., John Wiley & Sons.

Smith, R.M., (2004), Understanding Mass Spectra: A Basic Approach 2nd Ed., John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.

Stadalius, M.A., Gold, H.S., Snyder, L.R., (1984), "Optimization model for the gradient elution separation of peptide mixtures by reversed-phase high-performance liquid chromatography. Verification of retention relationships", *J. Chromatogr.*, 296, 31.

Stein, R.S., Powers, J., (2006), Topics in Polymer Physics, Imperial College Press, 57 Shelton Street Covent Garden, London.

Teraoka, I., (2002), Polymer Solutions An Introduction To Physical Properties, John Wiley & Sons, Inc., New York.

Uelzmann, H., (1958), *J. Polymer Sci.* 33, 377-379.

van Lierop, M. J. C., Wagenaar, J.A., van Noort, J.M., Hensen, E.J., (1995), *Journal of Virology*, 69, 4511-4514.

Vijayalakshmi, M.A., (2002), Biochromatography Theory and Practice, Taylor and Francis London & NY.

Wang, S., (1973), *J. Am. Chem. Soc.*, 95, 1328-1333.

Wnek, G.E., Bowlin, G.L., (2008), *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical engineering*, Informa Healthcare USA, Inc. 52 Vanderbilt Avenue New York, NY 10017.

Yamashita, M., Fenn, J.B., (1984), "ESI ion source. Another variation of the free-jet theme", *J. Phys. Chem.*, 88, 4451.

Yedidia, T.B., Arnon, R., (1997), "Synthetic peptide-based vaccines against influenza", *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*.

Yu, H.M., Chen, S.T., Wang, K.T., (1992), "Enhanced Coupling Efficiency in Solid-Phase Peptide Synthesis by Microwave Irradiation", *Organic Chemistry*, V57, 18, 4781-4784.

Elektronik Kaynaklar

[1] www.innovagen.se/

[2] Peptide Companion, Ver 1.24, CoshiSoft/PeptiSearch.

[3] PepDriver, Ver 2.x CEM.

ÖZGEÇMİŞ

Doğum tarihi 12.04.1977

Doğum yeri İstanbul

Lise 1991–1994 Bakırköy Lisesi

Lisans 1994–1998 İstanbul Teknik Üniversitesi Fen-Edebiyat Fak.
Kimya Bölümü

Yüksek Lisans 1998–2002 İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı, Organik Kimya Programı

Doktora 2003- Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı, Biyokimya Programı

Çalıştığı kurumlar

2004- YTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Araştırma Görevlisi