T.C.

GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ESCHERICHIA COLI SU TRANSFER PROTEİNİ (AQUAPORİN) KULLANILARAK MEMBRAN YAPISININ GELİŞTİRİLMESİ VE SU GEÇİRME KAPASİTESİNİN İYİLEŞTİRİLMESİ

NUR GAZALE BİROL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÇEVRE MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

GEBZE

2017

T.C.

GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ESCHERICHIA COLI SU TRANSFER PROTEİNİ (AQUAPORİN) KULLANILARAK MEMBRAN YAPISININ GELİŞTİRİLMESİ VE SU GEÇİRME KAPASİTESİNİN İYİLEŞTİRİLMESİ

NUR GAZALE BİROL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÇEVRE MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

DANIŞMANI

PROF. DR. MELEK ÖZKAN

GEBZE

2017

T.R.

GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

DEVELOPMENT OF MEMBRANE STRUCTURE USING *ESCHERICHIA COLI* WATER TRANSFER PROTEIN (AQUAPORIN) AND IMPROVEMENT OF WATER PERMEABILITY

NUR GAZALE BİROL

A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF

MASTER OF SCIENCE

DEPARTMENT OF ENVIRONMENTAL ENGINEERING

THESIS SUPERVISOR

PROF. DR. MELEK ÖZKAN

GEBZE

2017

GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ	**YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU**

GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 15/06/2017 tarih ve 2017/31 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 22/06/2017 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Nur Gazale BİROL'un tez çalışması Çevre Mühendisliği Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE
(TEZ DANIŞMANI) : Prof. Dr. Melek ÖZKAN

ÜYE : Doç. Dr. Pınar ERGENEKON

ÜYE : Prof. Dr. Elif ERHAN

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun

...../...../..... tarih ve ...../..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

Doç. Dr. Arif Çağdaş AYDINOĞLU
Gebze Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

Biyomimetik, doğada bulunan sistemlerin örnek alınması ve taklit edilmesi ile üretilen maddeleri, mekanizma ve sistemleri ifade etmekte kullanılır. Biyomimetik yaklaşımla her alanda olduğu gibi çevre mühendisliği alanında da doğadaki benzersiz ve mükemmel modelleri örnek alan yeni ürünler geliştirilmektedir. Bu tez çalışması doğadaki hücre zarının su geçirgenliğinde rol alan mekanizmanın sentetik bir membrana uygulanması temeline dayanmaktadır. Çalışmanın amacı, sentetik bir membrana hücre zarının su geçirme mekanizmasını düzenleyen aquaporin proteinlerinin uygulanması suretiyle doğal hücre zarı davranışını kazandırmaktır. Bu amaçla ilk önce *Escherichia coli aqpZ*, pGEX-4T-2 vektörüne klonlanmış ve *E. coli* BL21 hücrelerinde ifade edilmiştir. 200 kDa GST etiketli AqpZ, tetramer formunda hücre zarından saflaştırılmıştır. Elde edilen tetramer, pH (pH=3) ve yüksek β-merkaptoetanol konsantrasyonu gibi denatüre edici ajanlara karşı yüksek direnç göstermiştir. GST etiketli AqpZ proteinleri ihtiva eden fosfatidilserin/fosfatidilkolin (PS: PC) ve 1,2-dioleoil-sn-glisero-3-fosfokolin (DOPC) lipozomları hazırlanmıştır. Aquaporin içeren lipozomların su geçirme kapasitesi, boş lipozomlardan daha yüksek bulunmuştur, bu da GST etiketli tetramerinin işlevsel olduğunu kanıtlamıştır. Su geçirme hızı beklenildiği gibi 100 nm membran ile hazırlanan lipozomlarda, 200 nm membran ile hazırlanan lipozomlardan daha yüksek çıkmıştır. DOPC'nin su geçirme hızı ölçümleri için daha uygun olduğu gösterilmiştir. 100 nm DOPC lipozomundaki AqpZ su geçirme katsayısı (k) kontrol ile karşılaştırıldığında 57.55 s^{-1} fark görülmüştür. Tezin son aşamasında ise hazırlanan lipozomların sentetik su geçirmez bir membran yüzeyine gömülerek işlevselliği test edilmiştir.

E. coli aquaporinlerini içeren polisülfon bir membran hazırlanmış ve karakterize edilmiştir. Bu biyomimetik membran ile dead-end (ölü uçlu) reaktör sistemi kullanılarak yapılan filtrasyonlarda kontrole kıyasla daha hızlı su geçişi sağladığı tespit edilmiştir. Akı artışı membranın aquaporin mekanizmasının sentetik olarak hazırlanmış membranda işlediğini, malzemenin biyolojik asılına başarılı bir şekilde benzetildiğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: AquaporinZ, biyomimetik membranlar, lipozom

SUMMARY

Biomimetics is used to describe the materials, mechanisms and systems produced by sampling and simulating systems found in nature. In the field of environmental engineering, new products are being developed that exemplify unique and excellent models in the nature, as well as being a biomimetic approach. This thesis study is based on the application of the mechanism that plays a role in the water permeability of the natural cell membrane to a synthetic membrane. The aim of the work is to acquire natural cell membrane behavior through the application of aquaporin proteins, which regulate the water permeation mechanism of a synthetic membrane cell membrane. For this purpose, *Escherichia coli aqpZ* was first cloned into the pGEX-4T-2 vector and expressed in *E. coli* BL21 cells. 200 kDa GST labeled AqpZ was purified from the cell lysate in tetramer form. The obtained tetramer showed high resistance to counteracting agents such as pH (pH = 3) and high β-mercaptoethanol concentration. Liposomes of phosphatidylserine / phosphatidylcholine (PS: PC) and 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC) containing GST-labeled AqpZ proteins were prepared. Aquaporin-containing liposomes have a higher water permeability than empty liposomes, proving that the GST-labeled tetramer is functional. The rate of water transfer was higher than that of liposomes prepared with 100 nm membrane as expected, compared with liposomes prepared with 200 nm membrane. DOPC has been shown to be more suitable for water velocity measurements. The AqpZ k water permeability coefficient (1/s) in the 100 nm DOPC liposome was 57.55 s^{-1} compared to the control.

A polysulfone membrane containing *E. coli* aquaporins was prepared and characterized. It has been found that this biomimetic membrane provides faster water transfer through filtration using the dead-end reactor system. The flux enhancement has shown that the aquaporin mechanism of the membrane operates synthetically prepared membrane, successfully mimicking the biological origin of the material.

Key Words: AquaporinZ, biomimmetic membranes, liposomes

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca her türlü bilimsel katkıyı sunup, tezimin oluşmasında ve tamamlanmasında yoğun katkıları olan, Sayın Prof. Dr. Melek ÖZKAN'a, sağlamış olduğu motivasyon ve yakın ilgiden dolayı,

Laboratuvar çalışmalarında bana son derece değerli tecrübeler kazandıran, deneysel çalışmalarda bana önemli destektelerde bulunan ve imkân sağlayan,

Tezin oluşumuna sebep olan 115Z245 No'lu "Halofilik bakteri *Halomonas elongata* akuaporini kullanılarak biomimetik bir nanofiltrasyon membranı hazırlanması" projesini destekleyen ve bana Proje Asistanı olarak çalışma imkânı sağlayan TÜBİTAK'a,

Çalışmalarım boyunca desteğini hiç esirgemeyen sevgili aileme, yapılan bütün çalışmalarda benimle birlikte mesai harcayan, her türlü desteği gösteren Ar. Gör. Faruk CAN'a, Hilal YILMAZ'a, Gazel Öyküm ÖZDEMİR'e, Osman Cahit Demirci'ye teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
TABLOLAR DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği	1
2. BİYOMİMETİK TEKNOLOJİSİ	4
2.1. Çevre Teknolojilerinde Biyomimetik	5
3. HÜCRE ZARI ve AQUAPORİNLER	6
3.1. Hücre Membranının Kanal Yapısı	6
3.2. Fosfolipidler	8
3.2.1. PC (Phosphatidylcholine)	9
3.2.2. PS (Phosphatidylserine)	9
3.2.3. DOPC (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine)	10
3.3. Aquaporinin Yapısı	11
4. ÇEVRE TEKNOLOJİLERİNDE MEMBRAN PROSESLER	14
4.1. Membran Proseslerin Avantaj ve Dezavantajları	15
4.2. Membranların Uygulama Alanları	16
4.3. Basınç Sürücülü Membran Prosesler	17
4.3.1. Mikrofiltrasyon (MF)	18
4.3.2. Ultrafiltrasyon (UF)	18
4.3.3. Nanofiltrasyon (NF)	18
4.3.4. Ters Osmoz (RO)	19
4.3.4.1. Denzi Suyunun Tuzsuzlaştırılması	20
4.4. Organik Membranlar	22

4.4.1. Selüloz Asetat (CA) Membranlar 22
4.4.2. Polisülfon (PS) Membranlar 22
4.4.3. Poliamit (PA) Membranlar 23
4.5. Konsantrasyon Poliarizasyonu 23
5. MATERYAL ve METOT 24
5.1. Klonlama ve Protein Sentezi 24
5.2. Kompetan Hücre Hazırlama 26
5.3. Genomik DNA izolasyonu 26
5.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) 26
5.5. Klonlama ve Vektörlerin İfade Edilmesi 27
5.6. Aquaporin Proteinlerinin İfade Edilmesi ve Membran Proteinlerinin Saflaştırılması 28
5.7. SDS-PAGE Analizi 29
5.8. BSA (Bovine Serum Albumin) Analizi 29
5.9. Lipozom 31
5.9.1. Lipozom Hazırlama 31
5.9.2. Aquaporin Proteini İçeren Lipozom Hazırlama 32
5.9.3. Lipozomların Karakterizasyonu 32
5.9.4. Lipozomların Su Geçirgenliklerinin Tespiti 33
5.10. Membran Yapımı 34
5.10.1. İnce Film Polisülfon Membran Substratının Hazırlanması 34
5.10.2. Aquaporin Keseciklerinin Sabitlendiği Membran Tabakanın Hazırlanması 35
5.10.3. SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) Analizi 36
5.10.4. Dead-End (Ölü Uçlu) Reaktör Sistemi İle *E. coli* Aquaporini İçeren Membranların Su Geçirme ve Tuz İtme Kapasitelerinin Ölçümü 37
6. BULGULAR 38
6.1. *E. coli* Aquaporin Geninin Klonlanması 38
6.1.1. *E. coli* Aquaporin Geninin PCR İle Çoğaltılması 38
6.1.2. *E. coli* Aquaporin Geninin pGEX 4T-2 Vektörüne Klonlanması 39
6.2. Protein Üretimi ve Saflaştırılması 43

6.2.1. Aquaporin Proteinlerinin Hücre Zarından Saflaştırılması 44
6.2.2. Besiyerinin Protein İfadesine Etkisi 45
6.2.3. Boncuk ve Numune Miktarlarının Saflaştırmaya Etkisi 48
6.2.4. pH'nın ve β-merkaptaethanol'ün Saflaştırmaya Etkisi 49
6.2.5. Farklı Sürelerde %1 SDS Boyada Bekletmenin Protein Denatürasyonuna Etkisi 50
6.3. Lipozom 51
6.3.1. Lipozomların Işık Mikroskobu Altında İncelenmesi 51
6.3.2. Nano Zetasizer Analizi 52
6.3.3. Aquaporinlerin Su Transfer Hızlarının Ölçümleri 54
6.4. Membran Çalışmaları 58
6.4.1. Membranların SEM Görüntülemesi 59
6.4.2. Dead-End (Ölü Uçlu) Reaktör Sistemi İle Membran Filtrasyonu 62
7. TARTIŞMA ve SONUÇ 65
KAYNAKLAR 70
ÖZGEÇMİŞ 74
EKLER 75

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler ve Kısaltmalar		Açıklamalar
AQP	:	Aquaporin
bç	:	Baz çifti
BSA	:	Bovine Serum Albumin
CMBA	:	4-chloromethyl benzoic acid
Da	:	Dalton
DNA	:	Deoksiribo Nükleik Asit
DOPC	:	1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
DSÖ	:	Dünya Sağlık Örgütü
ED	:	Elektrodiyaliz
G.B.	:	Gözenek Boyutu
GST	:	Glutation s transferaz
HF	:	Hiperfiltrasyon
IPTG	:	Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
J_v	:	Akı ($L/m^2.sa$)
J_{SR}	:	Tuz itme akısı
LB	:	Luria Broth
LDH	:	Laktat Dehidrogenaz
LMH	:	$Litre/m^2.saat$
LPS	:	Lipopolisakkarid
M	:	Marker
MF	:	Mikrofiltrasyon
MIPS	:	Major Intrinsic Proteins
MPD	:	m- Phenylene-diamine
NF	:	Nanofiltrasyon
OG	:	Octyl β-D-glucopyranoside
PBI	:	Polybenzimidazole

PBS	:	Phosphate Buffered Saline
PC	:	Phosphatidylcholine
PCR	:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PDI	:	Polydispersity index
P_f	:	Su Geçiş Hızı
ppm	:	Parts per million
PS	:	Phosphatidylserine
PVA–COOH	:	carboxy-methyl PVA
RO	:	Ters Osmoz
rpm	:	Rounds per minute
SEM	:	Taramalı Elektron Mikroskobu
TMC	:	Trimesoyl chloride
UF	:	Ultrafiltrasyon
UV	:	Ultraviolet
WCP	:	Water Channel Proteins
X-Gal	:	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl β-D-Galactopyranoside
βME	:	β-mercaptoethanol
*Δ*osm	:	Osmolarite Farkı

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No:		Sayfa
3.1:	Fosfolipid Yapısı.	8
3.2:	PC fosfolipidinin moleküler yapısı.	9
3.3:	PS fosfolipidinin moleküler yapısı.	9
3.4:	PS-PC lipidlerinin birleşme modeli.	9
3.5:	DOPC fosfolipidinin molekül yapısı.	10
3.6:	Akuaporin Kanal Proteini Yapısı.	11
3.7:	Akuaporin Su Transfer Mekanizması.	12
3.8:	Deniz suyu tuzsuzlaştırma prosesinde akuaporin yerleştirilen membranların kullanılması.	13
4.1:	Gözenek Boyutları ve Tutabildikleri Bileşenlere Göre Membranlar.	14
4.2:	Osmoz ve ters osmoz proses şeması.	20
4.3:	Selüloz asetat'ın kimyasal formülü.	22
4.4:	Polisülfon'un kimyasal formülü.	22
4.5:	Poliamidin kimyasal formülü.	23
5.1:	pGEM-T Kolay Klonlama Vektörü Haritası.	25
5.2:	pGEX-4T-2 Klonlama Vektör Haritası.	25
5.3	BSA Standart Eğrisi.	30
5.4:	İnce Film Yöntemi İle Lipozom Yapımı.	31
5.5:	Lipidlerin Oluşum Basamakları.	32
5.6:	Stopped-Flow Işık saçılım Spektrometre cihazının çalışma mekanizması.	33
5.7:	a) Polisülfon membran tabakasının hazırlanışı, b) Hazırlanan PS membran.	34
5.8:	Hazırlanan MPD çözeltileri.	35
5.9:	Kaplaması yapılan membranlar.	35

5.10:	a) Ara yüzey polimerizasyonu ile polisülfon membran tabakasının kaplanması, b) Kaplama yapılan membran.	36
5.11:	Ara yüzey polimerizasyonu kimyasal reaksiyonu.	36
5.12:	Dead-end Sistemi.	37
6.1:	*E. coli* BL21 aquaporin geninin PCR ile çoğaltılması.	38
6.2:	*E. coli* aquaporini taşıyan pGEM-T ile PCR doğrulaması.	38
6.3:	Ligasyonda kullanılacak DNA ürünlerinin konsantrasyonları.	39
6.4:	pGEX-4T-2- E. coli aquaporini ligasyon sonucu.	40
6.5:	pGEXT-4T-2 E. coli aquaporini transformantlarından elde edilen plazmidler.	41
6.6:	*E. coli* aquaporin genini taşıyan pGEX 4T plazmidinin SalI ve NotI enzimleri ile kesimi.	42
6.7:	Membran proteinlerinin saflaştırması sonucu elde edilen tetramer aquaporinin gözlemlenmesi.	44
6.8:	Besiyerlerinin aquaporin üretimine etkisi.	45
6.9:	Aquaporin füzyon tetramerinin thrombin ile kesimi.	46
6.10:	Seyreltilmiş *E. coli* auaporin proteinin trombin ile kesimi.	47
6.11:	Saflaştırma rezini ve numune miktarlarının saflaştırmaya etkileri.	48
6.12:	a) pH'ın protein denatürasyonuna etkisi 1) pH 3, 2) pH 4, 3) pH 7, 4) pH 8, 5) Marker, b) β-merkaptaethanol'ün protein denatürasyonuna etkileri.	49
6.13:	Farklı sürede boyada bekletmenin protein denatürasyonuna etkisi.	50
6.14:	Lipozom ışık mikroskop görüntüsü (100X).	51
6.15:	100 nm membran ve PS-PC lipidleri ile hazırlanan lipozomların Nano Zetasizer ölçümü.	52
6.16:	200 nm membran ve DOPC lipidleri ile hazırlanan lipozomların Nano Zetasizer ölçümü.	53
6.17:	Membran Yapısı.	58
6.18:	Membran reddetme tabakasının hazırlanması esnasında gerçekleşen tepkime.	58

6.19: Kaplama yapılmayan PS membran yüzey görüntüsü. 59
6.20: Yüzeyi boş (lipozomsuz) kaplanan membran yüzey görüntüsü. 59
6.21: Yüzeyi lipozomlu kaplanan membran yüzey görüntüsü. 60
6.22: Yüzeyi boş (lipozomsuz) kaplanan membran kesit görüntüsü. 60
6.23: Yüzeyi lipozomlu kaplanan membran kesit görüntüsü. 61
A1.1: Thermoficher page ruler prestained protein ladder. 70
A1.2: Fermentas Prestained Protein MW Marker. 70

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo No:		**Sayfa**
4.1:	Tipik Membran Sistemlerinin Özellikleri.	17
4.2:	Basınç Sürücü Kuvvetli Membran Türlerine Göre Giderim Verimleri.	17
5.1:	pGEX-4T-2 vektörüne klonlamak için kullanılan primerler.	27
5.2:	BSA Standart Hazırlama Miktarları.	29
6.1:	*E. coli* aquapoirn geninin pGEX-4T-2 vektörüne klonlanması (ligasyon koşulları) ve *E. coli* DH5α hücrelerine transformasyonu.	40
6.2:	Nano Zetasizer Ölçüm Sonuçları.	52
6.3:	Aquaporin proteini içeren ve protein içermeyen lipozomların su transfer hızlarının k (1/s) su transfer katsayısı değerleri kullanılarak kıyaslanması.	55
6.4:	Lipozomların Su Geçirme Hızları.	57
6.5:	Dead-end filtrasyonunda alınan akı verileri.	63
6.6:	Dead-end ölçümü sonucu alınan iletkenlik değerleri.	63
6.7:	Membranların tuz itme hızları.	64

1. GİRİŞ

Küresel su kaynaklarının yönetimi, 21. yüzyılın en önemli zorluklarından birini teşkil etmektedir. Önümüzdeki 50-75 yıl içinde dünya nüfusu üç milyar veya daha fazla artacak ve kentsel alanlarda yaşayan insan sayısı iki kattan fazla olacaktır. Dünyanın nüfus artışının büyük kısmı, suyun hali hazırda kritik derecede az olduğu ve insanların yoksul olduğu gelişmekte olan ülkelerde görülmesi beklenmektedir. Bugün bile, 1 milyardan fazla insanın güvenli ve uygun fiyatlı içme suyuna erişimi yoktur. Bilim ve teknoloji, küresel su kıtlığına bağlı olarak ortaya çıkan korkunç sorunların üstesinden gelmek için gerekli olan çözümleri geliştirmede hayati bir rol oynamaktadır [1].

1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

Biyomimetik, doğada bulunan sistemlerin örnek alınması ve taklit edilmesi ile üretilen maddeleri, mekanizma ve sistemleri ifade etmekte kullanılır. Bilim dünyası her geçen gün tıp ve biyokimya dalları başta olmak üzere endüstrinin her dalında bu yaklaşımla doğadaki benzersiz ve mükemmel modelleri örnek alan yeni ürünler geliştirmektedir. Biyomimetik yaklaşım doğadaki tasarımları en az malzeme ve enerji ile en fazla verim almaları, kendi kendilerini onarma özellikleri, geri-dönüşümlü ve doğa-dostu olmaları, sessiz çalışmaları, estetik, dayanıklı ve uzun ömürlü olmaları bakımından teknolojik çalışmalara örneklik edecek mükemmel sistemler olarak ele alır.

Malzeme bilimi biyomimetik alanın en gözde uygulama alanlarından birisidir. Doğada mevcut sistemlerin içeriğinde ve mekanizmasında yer alan özellikler, organik sistemdeki işlevini sürdürecek şekilde sentetik sistemlere adapte edilebilir. Geliştirilen bu biyomimetik malzeme invivo veya invitro şekilde suni organ tasarımından, ilaç üretimi ve tedavi süreçlerine, robotik sistemlerden, nanoteknolojik ürünlere, kimya ve çevre uygulamalarına kadar çeşitli alanlarda yer bulabilir.

Günümüzde her alanda biyomimetik çalışmalar yürütülmektedir. Baykuş tüylerinin çentikli yapısının incelenmesi, sahip olduğu hava akış kontrolünün ve uçuş sırasında gürültünün azaltılmasında önemli rolü olduğunun bulunması havacılık

endüstrisnde mühendislik uygulamaları için potansiyel bir çalışma konusu olmuştur [2]. Canlı hücrelerdeki membranlardan oluşan biyolojik zarlar, bilinen tüm canlı organizmaların yapısal ve fonksiyonel yapı taşlarıdır. Hücrenin bütünlüğünü korur, içeriyi dışarıdan ayırır ve aynı zamanda hücrenin içine ve dışına maddenin naklini sağlar. Doğa bu ihtiyacı, lipid çift tabaka içerisinde bulunan yüksek verimli ve özelleşmiş trasnport proteinleri ile yapmaktadır. Biyomimetik sensör / ayırma teknolojisinin geliştirilmesinde, canlı hücre membranlarında bulunan bu sistem örnek alınarak biyomimetik membranlar tasarlanmaktadır [3].

Bu tez çalışması doğadaki hücre zarının su geçirgenliğinde rol alan mekanizmanın sentetik bir membrana uygulanması temeline dayanmaktadır. Çalışmanın amacı, sentetik bir membrana hücre zarının su geçirme mekanizmasını düzenleyen aquaporin proteinlerinin uygulanması suretiyle doğal hücre zarı davranışını kazandırmaktır. Biyomimetik malzeme doğadaki mükemmel örneğine benzemesi ölçüsünde başarılı olacaktır. Biyomimetik özellikte tasarlanacak malzemenin su geçirgenlik özellikleri bakımından bazı üretim ve arıtım teknolojilerinde uygulanma kapasitesi bulunmaktadır. Literatürde *Escherichia coli* AqpZ ile yapılan çalışmalar bulunmaktadır. Kumar ve arkadaşları (2007) [4] tarafından yapılan çalışma sonucunda aquaporinZ proteini yerleştirilen membranların su geçirgenikleri ve bileşenleri ayırma kabiliyetinin aquaporinZ proteini içermeyen membranlara göre artış gösterdiği görülmüştür. Aynı sonuca yaptıkları çalışmalar sonucunda Sun ve arkadaşları (2013) [5], Xie ve arkadaşları (2013) [6], Zhao ve arkadaşları (2012) [7] ve Qi ve arkadaşları da (2016) [8] ulaşmışlardır. Biyomimetik malzeme tasarımında polisülfon membran ve su transfer proteini olarak *Escherichia coli* AqpZ kullanılmıştır.

Biyomimetik özellikteki membranın tasarım aşamaları/yöntem:

i) pGEX-4T-2 vektörüne *E. coli-aqp* geni klonlanmıştır.

ii) pGEX-4T-2-*E.coli-aqp* geni taşıyan BL21 hücrelerinden membran proteinlerinin saflaştırılması prosedürü uygulanarak AqpZ proteinleri saflaştırılmıştır.

iii) Saflaştırılan proteinler film rehidrasyonu yöntemi ile hazırlanan lipozomlar içerisine yerleştirilmiştir.

iv) Elde edilen proteolipozomlar üretilen polisülfon substrat üzerine ara yüzey polimerizasyonu yöntemi kullanılarak yerleştirilerek membran yapılmıştır.

Bu tez çalışması kapsamında geliştirilecek malzeme aşağıdaki parametreler açısından incelenecektir/karakterize edilecektir:

i) Stopped-Flow ışık saçılımı spektrometresi ile su geçirgenlik hızı ile doğru orantılı olan k su geçirgenlik katsayısı (1/s) değerleri

ii) Elde edilen k değerleri ile su geçirgenlik hızlarının tespit edilmesi

iii) Nano ZetaSizer cihazı ile yapılan lipozomların boyut analizi

iv) SEM görüntüsü alınarak yüzey yapısının incelenmesi

v) Dead-end filtrasyon sistemi ile üretilen proteolipozomlu ve protein içermeyen membranların akılarının tespit edilmesi

vi) Membranların tuz itme hızlarının iletkenlik ölçümü ve akı değerleri ile tespit edilmesi.

2. BİYOMİMETİK TEKNOLOJİSİ

Evrim, doğanın zorluklarının çoğunu kalıcı çözümlere yol açarak çözmüştür. Doğa her zaman insan kazanımlarına ilham kaynağı olmuş ve etkili materyaller, yapılar, araçlar, mekanizmalar, süreçler, algoritmalar, yöntemler, sistemler ve diğer birçok faydaya yol açmıştır. Biyomimetik olarak da bilinen bu alan, heyecan verici gelecek teknolojileri için yeni yeteneklere ilham vermek için muazzam bir potansiyel sunmaktadır. Yüzmek için kanatçık kullanımı gibi basit kopyaların yapılmasını içeren çok sayıda biyomimetik başarı örneği vardır. Diğer örnekler, aerodinamik ilkelerinden sonra mümkün olan uçma ustalığı da dahil olmak üzere daha karmaşıklığı taklit etmeyi içermektedir. Robotik oyuncaklar ve film konuları da dahil olmak üzere biyomimetiklerden bazı ticari uygulamalar giderek daha fazla görülmektedir. Biyomimetiğin daha önemli faydaları arasında, gerçek uzuvları taklit eden protezlerin geliştirilmesi, işitme, görme ve kontrol etmede yardımcı olması için beynin arayüzüyle duyu arttırıcı mikroçiplerin geliştirilmesi bulunmaktadır.

Otto H. Schmitt tarafından ortaya atılan biomimetik terimi, doğanın yöntem, mekanizma ve süreçlerinin taklit edilmesi çalışmalarını temsil eder. Doğa'nın yetenekleri, birçok alanda insan yeteneklerine göre daha üstündür ve birçok özelliklerini benimsemek, teknolojimizi önemli ölçüde geliştirebilir [9].

Biyolojik yapılar sayısız avantaja sahiptir. Arıların yaptığı petekler buna bir örnektir. Arılar etkin paketleme konfigürasyonu için petek oluştururlar ve düşük ağırlığı ve yüksek mukavemeti için peteklerin aynı yapısal şekli, birçok uçak parçasının üretilmesi için kullanılır [10].

Doğada suyun hücre membranından geçişi ise biyolojik yapıların sahip olduğu bir diğer avantajdır. Hücre membranında bulunan aquaporin kanal proteinleri sayesinde suyun hücre membranı boyunca geçişi sağlanarak diğer çözünmüş bileşikler hücre membranının dışında tutulur. Bu yapıdan esinlenilerek biyomimetik membranlar geliştirmek mümkündür. Geliştirilen bu membranlar sayesinde ise içme suyu eldesi amacı ile deniz suyunun tuzdan arıtımını yapmak mümkün hale gelmektedir.

2.1. Çevre Teknolojilerinde Biyomimetik

Çevre alanında biyomimetik gelişmelerin en belirgini örnekleri geliştirilen membranlardır. Membran teknolojisi, son birkaç on yıl içinde, doğal avantajları ve yeşil yapılar olması nedeni ile yaygın bir teknoloji haline gelmiştir. Damıtma, adsorpsiyon ve benzeri konvansiyonel teknolojilere kıyasla az miktarda katkı maddesi ve daha düşük enerji tüketimi yetmektedir. Çoğu membran işlemi genellikle faz geçişi gerekmeden ve normal ortam koşullarında gerçekleştirilir. Ek olarak membran Işlemler, uygun ölçeklenebilirlik sağlayabilir, bu da işlem ölçeği veya çalışma modunun kolaylıkla ayarlanabileceği anlamına gelir. Şu günlerde, biyomimetik membran teknolojisi, özellikle kimyasal ve biyolojik alanda geniş bir uygulama yelpazesinde en önemli teknolojilerden biri haline gelmiştir. Atıksu arıtımı, deniz suyu tuzdan arındırma ve atmosferik gaz ayrımı gibi endüstriyel ölçekli ayrımlardan, biyolojik aktif bileşen zenginleştirme ve saflaştırma gibi daha küçük ölçekli ayrımlar için kullanılmaktadır

Çevre alanında geliştirilen biyomimetik membranların büyük bir kısmı canlı hücre membranları örnek alınarak tasarlanmaktadır. Canlı hücre membranlarının maddeleri ayırmada yüksek kabiliyeti vardır. Su, oksijen, karbondioksit, etanol ve üre gibi küçük moleküller, hücre membranlarını basit difüzyonla kolaylıkla geçebilir. İyonlar veya küçük organik moleküller gibi diğer maddeler ise kolaylaştırılmış difüzyon veya protein aracılı taşıyıcılar ile aktif nakliye yoluyla hücre zarları vasıtasıyla taşınır. Tüm bu süreçler çözünenlerin ve suyun hareketinin düzenlenmesinde çok önemli bir rol oynamaktadır. İntegral membran proteinlerinin önemli bir ailesi, ana intrensek protein (MIP) ailesidir. Bunların arasında, su kanal proteinleri olan aquaporin proteinleri bulunmaktadır. Bu proteinler hücre membranı boyunca su molkeüllerinin geçişine izin verirken diğer çözünmüş bütüm molekülleri iterler [11].

3. HÜCRE ZARI ve AQUAPORİNLER

3.1. Hücre Membranının Kanal Yapısı

Bakteriyel dış zar, olağandışı işlevsel özelliklere sahiptir. Lipofilik çözünür maddelere karşı çok düşük geçirgenlik ve hidrofilik çözünür maddelere karşı yüksek geçirgenlik göstermektedir. Bu işlevsel özellikler, LPS (lipopolisakkarid) ve porinlerin varlığı ve bu bileşenlerin moleküler organizasyonu ile ilişkilendirilebilir. Bunları kullanarak, gram negatif bakteriler çok etkili bir geçirgenlik bariyeri görevi gören ve aynı zamanda besin maddelerinin verimli bir şekilde difüzyonuna izin veren bir tabaka oluşturabilirler [12].

Geçtiğimiz yıllarda, birkaç bakteri porininin üç boyutlu yapıları yüksek çözünürlüklü olarak belirlenmiştir. Bu görüntüleme yöntemleri alışılmadık bir mimari türü olan içi boş kanalları ortaya koymaktan başka, çeşitli yapı-işlev ilişkilerini ayrıntılı olarak araştırmayı mümkün kılmışlardır [13].

Porinler ve spesifik kanalların her ikiside, küçük eriyiklerin transmembran difüzyonuna izin veren su dolu gözenekler üretir; kanallar içinde spesifik ligand bağlama alanları bulunur. Kanalların çapları genellikle 1 nm civarındadır ve bu nedenle, çözünenlerin porin kanalları içerisinden nüfuz etme oranları, çözünen molekülün büyüklüğü, şekli, hidrofobikliği veya yükünden güçlü bir şekilde etkilenir. Kanallarda, belli bağlanma alanlarının varlığı, düşük konsantrasyonlarda mevcut olduklarında dahi bazı ligandların difüzyonunu çok önemli ölçüde hızlandırabilir [14].

Aquaporin kanal proteini de hücrede bulunan ve özel mekanizması ile hücre membranında suyun geçişini sağlayan hücre membran proteinleridir.

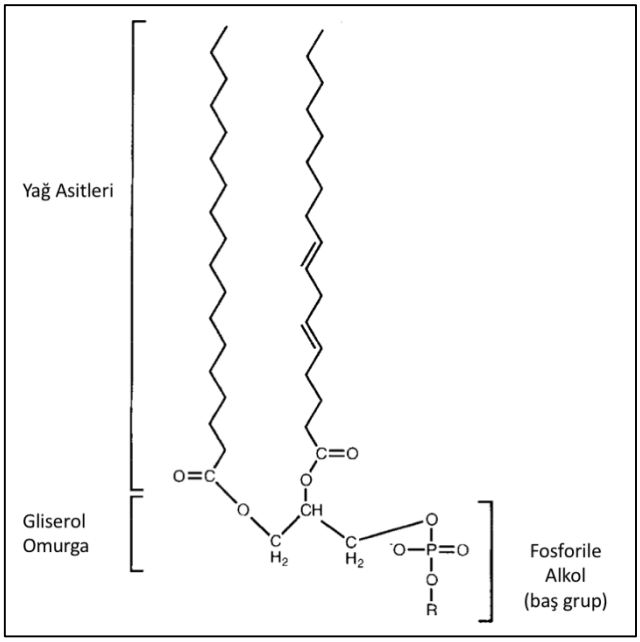
Canlıların sahip olduğu “biyolojik membranlar (hücre zarları)” olağanüstü bir su transfer yeteneğine sahiptirler. Aktif canlı hücrelerin toplam ağırlığının%60-95'i sudur. İlk membran transport proteini 1992’de bulunmuştur. Uzun yıllar boyunca, suyun basit bir difüzyonla hücre zarı boyunca hareket ettiği düşünülüyordu. Bununla birlikte, biyolojik membranlardaki su hareketi, lipit iki katmanlı basit difüzyon ile tam olarak açıklanamamıştır [15]. Hücre zarından su geçişi difüzyonla da gerçekleşebilmesine karşın artık akuaporinlerin su transferinde 10-100 kat artış sağladığı bilinmektedir. Akuaporinlerin suya karşı seçiciliği o kadar yüksektir ki

protonlar bile (H_3O^+) akuaporinler tarafından itilmektedir [16]. Akuaporinler önceleri "Water Channel Proteins (WCP)" olarak adlandırılmış, tüm canlılarda bulunmasa da tek hücreli canlılardan (Arkea, Bakteri, Maya ve Protozoa) gelişmiş organizmalara kadar (bitki, hayvan ve insan) birçok canlıda yüzlerce akuaporin keşfedilmiştir. Bakteriler de gelişmiş bitki ve hayvanlarda olduğu gibi akuaporinlere sahiptirler (örneğin *E. coli aqpZ*). Akuaporinler hücrenin ve membranın fonksiyonlarını yerine getirebilmesi için su moleküllerinin (ve/veya diğer küçük nötral moleküllerin) hızlı geçişine ihtiyaç duyan tüm membranlarda bulunur. Biyolojik membranlar ve su geçirgenliği şimdilerde çok daha detaylı bilinmektedir [17].

Günümüzde aquaporinler tuzlu suyun arıtımı amacıyla filtrasyon membranları yüzeyine yerleştirilmektedir.

3.2. Fosfolipidler

Fosfolipidlerin genel kimyasal yapısı gliserol omurgasına sahiptir. Şekil 3.1'de [18] fosfolipidin yapısı gösterilmektedir. Fosfolipidin lipid yapısı, uzun zincirli yağ asitlerine bağlıdır. Fosforik asidin kalan oksijen gruplarından biri, gliserol, kolin, etanolamin, serin ve inositol de dahil olmak üzere çeşitli organik moleküllere esterlenebilir. Bağlanmış alkol ile birlikte fosfat kısmı, fosfolipidin baş grubunu temsil eder.



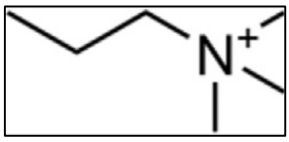
Şekil 3.1: Fosfolipid Yapısı.

Fosfolipidler sulu ortama yerleştirildiğinde, lipit baş gruplarının su ile hidrofilik etkileşimi, çok tabakalı ve tek katmanlı sistemlerin (veziküllerin) oluşumuyla sonuçlanır. Vesiküller, biyolojik membranlara benzeyen, küresel bir kabuk şeklinde basit lipid çift tabakalarından oluşur. Lipozomların hazırlanması için çeşitli doğal ve sentetik fosfolipitler mevcuttur. İçeri çekme kabiliyeti nedeniyle, lipozomlar ilaç taşıyan yapılar veya veziküller olarak düşünülmektedir [18].

Fosfolipitler, mükemmel biyouyumluluk ve özel amfifilik özelliklere sahiptir. [19]

3.1.1. PC (Phosphatidylcholine)

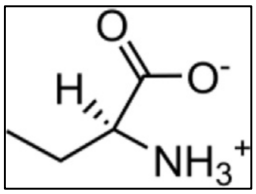
Sinir iletici asetilkolin sentezinin önemli bir elemanıdır ve beyni besleyici ve zekâ geliştirici işleve sahiptir (Şekil 3.2 [19]). Doğal bir fosfolipiddir [19].



Şekil 3.2: PC fosfolipidinin moleküler yapısı.

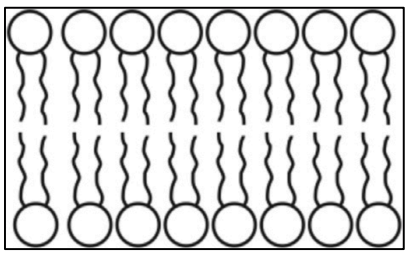
3.1.2. PS (Phosphatidylserine)

Sinir hücrelerinin işlevinin iyileştirilmesinde, sinir impulsunun iletiminin düzenlenmesinde ve beynin hafıza fonksiyonunun arttırılmasında görev almaktadır (Şekil 3.3 [19]). Doğal bir fosfolipiddir [19].



Şekil 3.3: PS fosfolipidinin moleküler yapısı.

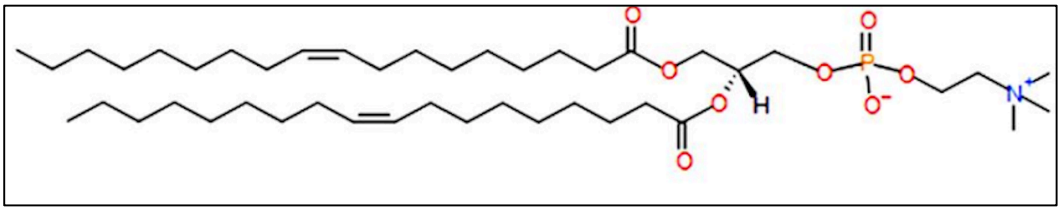
PS ve PC bir arada kullanılmaktadır. Lipidlerin aldığı molekül Şekil 3.4'te [19]verilmiştir.



Şekil 3.4: PS-PC lipidlerinin birleşme modeli.

3.1.3. DOPC (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine)

DOPC sentetik bir fosfolipiddir (Şekil 3.5 [19]). DOPC'nin faz değştirme sıcaklığı -17℃'dir.



Şekil 3.5: DOPC fosfolipidinin molekül yapısı.

Sentetik ve doğal fosfolipidlerin hem avantajları hem de dezavantajları vardır. Sentetik fosfolipidlerin avantajları nispeten kararlı olmaları ve saflıklarının yüksek olmasıdır. Dezavantajı ise fiyatlarının nispeten yüksek olmasıdır. Bununla birlikte, doğal fosfolipidlerin dezavantajları; saflık kontrolünün zor olması ve doğanın dengesiz olmasından kaynaklı kullanım ve depolama sürecinde lizofosfolipidlere metabolize olmalarıdır. Bu nedenle lipozomları hazırlamak için doğal fosfolipidleri seçerken kaynak dikkate alınmalıdır [19].

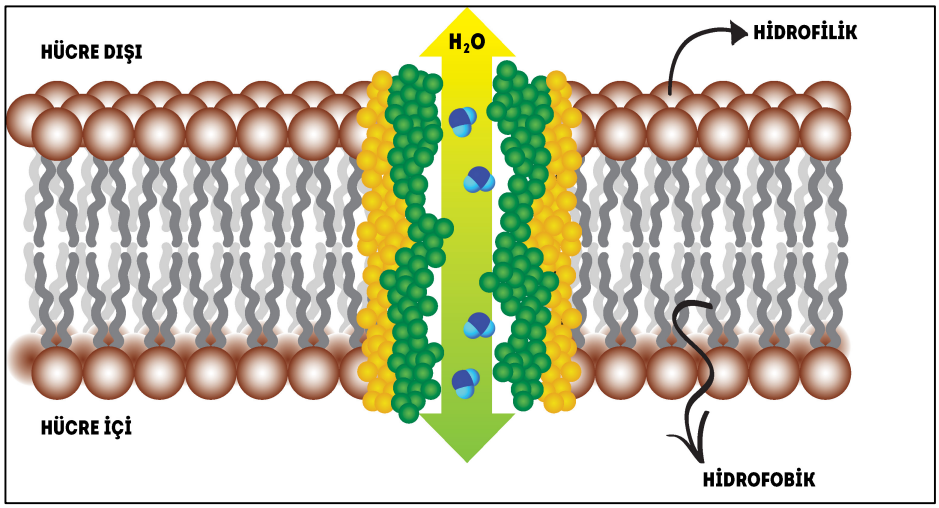
Bu çalışma esnasında doğal ve sentetik fosfolipidlerin ikisi de denenmiştir. Yukarıa belirtilen sebeplerden dolayı DOPC ile yapılan deneyler daha iyi sonuçlanmıştır.

3.2. Aquaporinin Yapısı

En çok çalışılan aquaporinler memeli ve damarlı bitkilerde bulunan su kanallarıdır. Memelilerde, AQP0'dan AQP12'ye (Verkman ve diğerleri, 2000 [20]) kadar 13 farklı aquaporin proteini vardır ve bitki genomlarında 30'dan fazla su kanalı bulunmaktadır (Alleva ve diğerleri, 2012 [21]).

AQP1'in yapısına ve işlevine ilişkin ilk bilgiler *Xenopus laevis* oosit'deki dizi analizleri ve ekspresyon çalışmalarından gelmiştir [22].

Akuaporinler, membranı çevreleyen altı adet öz bölge (domaine), su geçirgenliği ve çözünür madde tutunumunu sağlayan porları oluşturan korunmuş yüklü amino asitlerden oluşan özel saat camı yapısına sahiptirler [23]. Kapanmayan yapıdadırlar. Su iki yönede hareket eder ve akış yönü konsantrasyona bağlı olarak düzenlenir. Aquaporin yapısı Şekil 3.6'da verilmiştir.



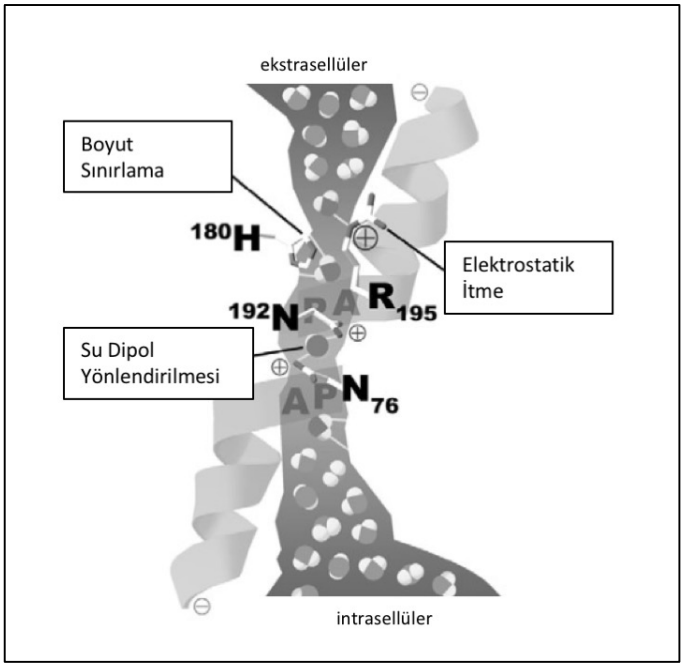
Şekil 3.6: Akuaporin Kanal Proteini Yapısı.

Aquaporinler; hemen hemen tüm canlı organizmalarda bulunan, 26-34 kDa aralığında molekül ağırlıkları olan major intrinsic proteins (MIPS) olarak adlandırılan iyi korunmuş ve eski bir protein ailesine aittir. [24] Memeli aquaporinlerinin birçoğu (örneğin AQP1, AQP2, AQP4 ve AQP5) suyun geçişi için oldukça seçici olduğu görülürken, bazıları (akuagliseroporinler olarak adlandırılır) gliserolü (örn. AQP3 ve AQP8) ve hatta daha büyük çözünür maddelere karşı (AQP9) seçicidir [20].

Eşsiz ve spesifik geçirgenlik özellikleri göz önüne alındığında, AQP1'in yapısının

belirlenmesine yönelik büyük çaba sarf edilmiştir. Saptanan dizi, daha önce tarif edilmemiş bir topoloji ortaya koymuştur; asparagin-prolin-alanin (NPA) ihtiva eden iki oldukça korunmuş halkayla (B ve E) üç transmembran alanından oluşan iki tandem tekrar oluşur. İlginç bir şekilde, tekrarların 180°'de birbirlerine göre yönlendirildiği tahmin edilmiştir [16]. 4 monomer birleşerek bir tetramer oluştururlar. Su moleküllerinin geçişleri monomerlerin ortasından olur. Sadece H_2O molekül boyutunun geçebileceği biçimde tasarlanmıştır. Varsa bağlı 3. bir H^+ iyonu bile geçiş sırasında hücre dışına itilir.

Histidin 180 ve Arginin 195 aminoasitleri pordaki en dar yapıyı oluştururlar (Şekil 3.7 [25]) ve sadece suyun geçişine izin verirler. Arg 195 pozitif yüklü olduğundan diğer K+, Na+ gibi çözünen molekülleri iter. Arg 195 ve NPA motifleri su moleküllerini alt alta sıralı bir şekilde hidrojen bağlarıyla yönünü değiştirerek hareketini sağlarlar [25].



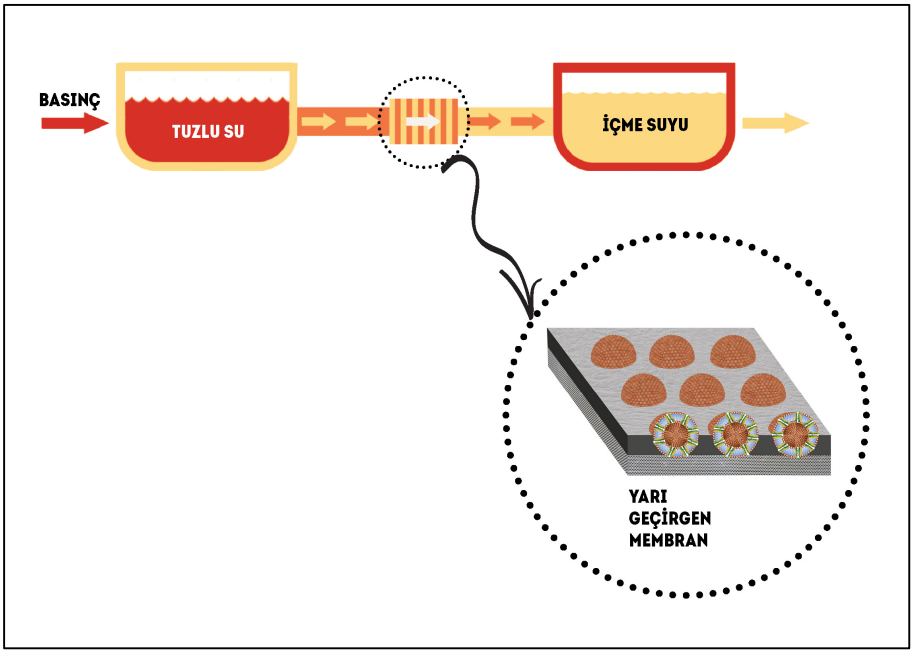
Şekil 3.7: Akuaporin Su Transfer Mekanizması.

Su transferi için lipid çift katmanındaki bir dizi proteinin varlığı ilk olarak 2003 yılında aquaporinlerin keşfi ile Nobel Ödülünü kazanan Peter Agre tarafından rapor edilmiştir. Aquaporinler, su moleküllerinin geçmesini sağlayan ve diğer tüm çözünen maddeleri reddeden membran proteinleridir. Farklı hücre membranlarında

aquaporinlerin bulunması üzerine çok sayıda araştırma yapılmıştır ve canlıların, biyolojik membranlarında su taşıma kapasitesi yüksek olan aquaporin kanal proteini olduğu anlaşılmıştır.

Aquaporin proteini bakteri ve arkealarda yaygın değildir, bu canlılarda membranda su transferi pasif difüzyon veya spesifik olmayan gözeneklerle sağlanmaktadır (Soupene ve diğerleri 2002 [26]). Şimdiye kadar, gram negatif bakteriler *E. coli* (Calamita ve diğerleri, 1995 [27]) ve *Rhodobacter sphaeroides* (Erbakan ve diğerleri, 2015 [28]), gram pozitif bakteriler *Lactococcus lactis* (Froger ve ark., 1995 [29]), maya *Saccharomyces cerevisiae* (Andre ve ark., 1995 [30]) ve nihayetinde *Methanothermobacter marburgensis* Archea dahil olmak üzere farklı mikroorganizmalarda birçok aquaporin bulunmuştur.

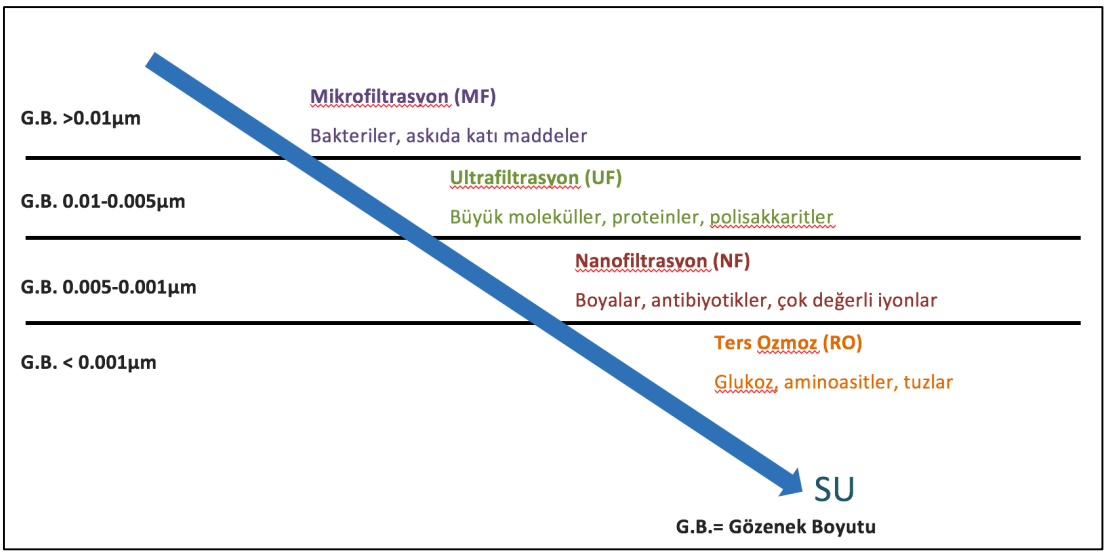
Yüksek su geçirgenliği (her bir akuaporin su kanal proteininden saniyede $\sim 10^9$ su molekülü geçebilir) ve üstün seçicilik nedeniyle (su kanal proteini yalnızca suyun tamamen ayrılması sırasında su geçişine izin verdiği için) dikkati çekmektedir. Akuaporinlerin membran içine entegrasyonu, membranın su geçirgenliğinin artmasını sağlamaktadır [8]. Anlatılan proses şeması Şekil 3.8'de verilmiştir.



Şekil 3.8: Deniz suyu tuzsuzlaştırma prosesinde akuaporin yerleştirilen membranların kullanılması.

4. ÇEVRE TEKNOLOJİLERİNDE MEMBRAN PROSESLER

Membranlar çevre, enerji ve endüstriyel geniş uygulama alanı bulmuş ve önemli bir yer kazanmıştır. Membran filtrelemede parçacık boyutlarının aralığı çözünmüş bileşenleri kapsayacak şekildedir (0,0001-1µm). Membranın rolü, belirli bileşenlerin geçişine izin verecek ve sıvı içinde bulunan diğer bileşenleri koruyacak seçici bir bariyer olarak işlev görmektir [31]. Membran modülüne gelen akış, besleme akışı olarak bilinir. Ayırma işlemi membranın kimyasal ve fiziksel özelliklerine bağlıdır. Sürücü kuvvet; basınç farkı, yoğunlaşma (kimyasal potansiyel) farkı, elektriksel potansiyel farkı ve sıcaklık farkının biri veya bir kaçı olabilir. Ayırma işlemi gözenekli membranlarda boyut, şekil ve yük ayrımına göre, gözeneksiz membranlarda ise sorpsiyon ve difüzyon modeline göre kontrol edilir. Membran performansı seçicilik ve akı parametreleriyle belirlenir. Membran prosesler giderilecek ve/veya ayrılacak bilşenlerin yapı ve durumuna bağlı olarak sınırlandırılabilir (Şekil 4.1). Özellikle su arıtımı için önerilen membran prosesler; mikrofiltrasyon (MF), ultrafiltrasyon (UF), nanofiltrayon (NF), hiperfiltrasyon (ters osmoz (RO)), elektrodiyaliz (ED), mikrobiyal yakıt hücresi, membran distilasyonu olarak sınıflandırılır [32].



Şekil 4.1: Gözenek Boyutları ve Tutabildikleri Bileşenlere Göre Membranlar.

4.1. Membran Proseslerin Avantaj ve Dezavantajları

Sudaki geniş zararlı kitlesi için mikrofiltrasyon, ultrafiltrasyon, nanofiltrasyon ve ters ozmos sistemler uygulanır. Membran proseslerin avantajları arasında başlıca;

- Kesiksiz ve otomatik işletme sağlayan sürekli proses olmaları,
- Az enerji kullanımı,
- Belirli bir boyut sınırlandırması olmaması,
- Modüler olarak tasarımının yapılabilmesi,
- Kirletici yapı ve kimyası üzerinde etki yapmaması,
- Güvenilir ve oldukça iyi düzeyde çıkış suyu kalitesi sağlamaları,
- Kimyasal katkı ihtiyacının olmaması (ilave kimyasallara ihtiyaç duymaması),
- Düşük alan ihtiyacı,
- Yüksek konsantrasyonlarda uygulanabilmesi,
- Taşınabilir olması,
- Herhangi bir inşaat gerektirmemesi,
- Maliyetinin gün geçtikçe daha da aşağılara çekilmesi,
- Ürün bozulmasının azaltılması gibi avantajları vardır.

Ancak bu avantajlarının yanısıra dezavantajları da membran teknolojisinin daha yaygın kullanımını sınırlamaktadır. Dezavantajları aşağıda sıralanmıştır.

- Membran üretim ve pazarlama maliyetlerinin yüksek olması,
- Membran prosesler nadiren 2 saf ürün üretirler. Bunlar hemen hemen her zaman az miktarda ikinci bileşen ile kirlenmiş halde bulunurlar. Bazı durumlarda bir ürün ozmotik basınç probleminden dolayı sadece tutularak konsantre edilebilir. Diğer durumlarda süzüntü akısı materyallerin önemli miktarını içerebilir.
- Membran seçiciliği sınırsız olmadığından konsantre olarak alıkonulan bileşen çeşitliliği sınırlıdır.

- Membran prosesler distilasyon gibi proseslerle kıyaslandığında, tek aşamada işletilmeleri zordur. Genellikle iki veya üç aşamalıdırlar. Ancak aşama arttıkça seçicilik azalır.

- Membranlar proses çözeltileri ile kimyasal uyumsuzlukları olabilir. Bu da verimi düşürür ve maliyeti artırır.

- Polimerik membran modüller genellikle yüksek sıcaklıklarda işletilmeleri mümkün değildir. Yüksek sıcaklık gerektiren işlemlerde membranların yapıları kısa sürede bozulur.

- Membran prosesler genellikle düşük akılarda işletilirler. Bu durum daha fazla modülün kullanılması gerektirir.

- Membran proseslerde besleme akı ve konsantrasyonlarına bağlı olarak kısa sürede kirlenebilir ve gözenekleri tıkanabilir. Membranların kirlenmesi ve gözeneklerin tıkanması düşük akıya sebep olur. Ayrıca membranların kısa süreli değiştirilmesi veya temizlenmesi gerektirdiğinden maliyeti artırır [33].

4.2. Membranların Uygulama Alanları

Membranlar; endüstriyel gazların ayrılması, su ve atıksuların arıtılmasının yanısıra, sıvı çözeltilerden ve havadan partikül maddelerin ayrılması gibi diğer önemli bir çok uygulamada kullanılmaktadır. Ayrıca elektrokimyasal proseslerde iyon ayırma, kan ve idrarın diyalizi, membran bazlı sensörler, tedavi edici ilaçların kontrollü salgılanması gibi birçok işlemde de kullanılmaktadır [34]. Birkaç uygulama alanına örnek vermek gerekirse; biyoenerji üretimi, sertlik giderimi, organik maddelerin ayrılması ve giderilmesi, tuzlu ve acı sudan içme suyu eldesi, deniz suyundan içme ve kullanma suyu eldesi, tuzlu ve acı sulardan tuz ve metal giderimi, protein çözeltilerinin yoğunlaştırılması, bakteri ayırma ve giderimi, vb. proseslerde membranlar kullanılmaktadır.

4.3. Basınç Sürücülü Membran Prosesler

Basınç sürücülü membran prosesler endüstrilerde en çok kullanılan sistemlerdir. Bunlar por boyutlarına bağlı olarak ters osmoz (RO), nanofiltrasyon (NF) ultrafiltrasyon (UF) ve mikrofiltrasyon (MF)'dan oluşmaktadır. Ayırma işlemi bu yöntemlerde, basınç sürücü kuvvet etkisiyle molekül boyutuna veya molekül kütlesine göre olmaktadır [35].

Kullanılacak membran ve uygulama biçimi dikkate alındığında, membran proses özellikleri ve membran kalınlığına göre uygulanacak basınç türü ve miktarı değişir. Genel olarak basınç sürücü kuvvet ile işletilen membran proseslerin özellikleri ve giderim verimleri aşağıdaki Tablo 4.1 ve Tablo 4.2' de verilmiştir.

Tablo 4.1: Tipik Membran Sistemlerinin Özellikleri.

PARAMETRELER	MF	UF	NF	RO
İşletme Basıncı (Bar)	1-4	2-7	10-40	15-100
Gözenek Boyutu (µm)	0.1-1.5	0.01-0.05	0.001-0.01	<0.0002

Tablo 4.2: Basınç Sürücü Kuvvetli Membran Türlerine Göre Giderim Verimleri.

Membran Türü	Gözenek Çapı, µm	≥ µm partikül veya organizma giderimi	Virüs giderimi	MWCO (Dalton)	Tuz (NaCl) giderimi
MF	0.1-0.5	≥ 99.9 (≥ 3 log)	< %90 (<1 log)	> 200.000	-
UF	0.005-0.1	≥ 99.9 (≥ 3 log)	< %90 (<1 log)	10.000-200.000	-
NF	0.001	-	-	250-500	%0-95
RO	0.001	-	-	<200	>%95

4.3.1. Mikrofiltrasyon (MF)

En yaygın kullanılan basınç sürücülü membran prosesi mikrofiltrasyondur. Mikrofiltrasyon (MF) mikron veya daha küçük partiküllere sahip sıvı veya gazları ayırmak için kullanılır. Por boyutları 0.1 ile 1.4 µm aralığındadır. MF yaklaşık 0.05 ile 2 µm çap aralalığına sahip, nispeten düşük basınç uygulamalı, 100-400kPa (15-60 Psi), makro molekülleri ve askıda katıları ayırma yeteneğine sahip bir membran ayırma prosesidir. Tipik olarak nişasta, bakteri, yağ, maya, silt ve alg ve benzeri maddeler giderilebilir [33].

4.3.2. Ultrafiltrasyon (UF)

Ultrafiltrasyon, işletme açısından mikrofiltrasyona benzemektedir. Por boyutları 0.05-1 nm arasında değişir. UF membranları, 50-250 nm arasında değişen ve esas filtrasyon olayının gerçekleştiği üst tabaka ve yüksek geçirgenlik ve seçiciliği olan bir alt tabaka ile desteklenmiştir. Bu tür membranlar akışkandan çözünmüş molekülleri ve küçük partikülleri ayırmak için kullanılırlar. Ayırmada temel etken moleküler büyüklüğü olmakla beraber, molekül şekli ve yükü de rol oynamaktadır [33].

4.3.3. Nanofiltrasyon (NF)

Nanofiltrasyon; 0.001-0.005 µm'den küçük por çapına sahip, monovalent iyonların geçişine izin verirken, divalent iyonların geçişine izin vermeyen, 200-300 molekül ağırlık aralığındaki organik bileşenlerin tutulmasını sağlayan, ters osmoz ve ultrafiltrasyon arasında bir bölgedeki sıvıyı ayıran ve ters osmoz prosesine göre daha düşük basınçlarda uygulanabilen bir prosestir. Bu proses hem değerli bileşenlerin geri kazanılması için, hem de istenmeyen bileşenlerin giderilmesi için kullanılabilir. Sularda renk, koku ve tat oluşturan bileşenlerin giderilmesinde ve kirletici bileşenlerin büyük bir çoğunluğunun giderilmesinde kullanılır [33]. Ters osmoz ile ilgili önceki çalışmaların çoğunun amacı, % 99'dan daha fazla tuz itme yeteneğine sahip membranlar üretmekti. Günümüzde, daha düşük sodyum klorür reddetme yeteneğine sahip olan ancak daha yüksek su geçirgenliğe sahip membranlar

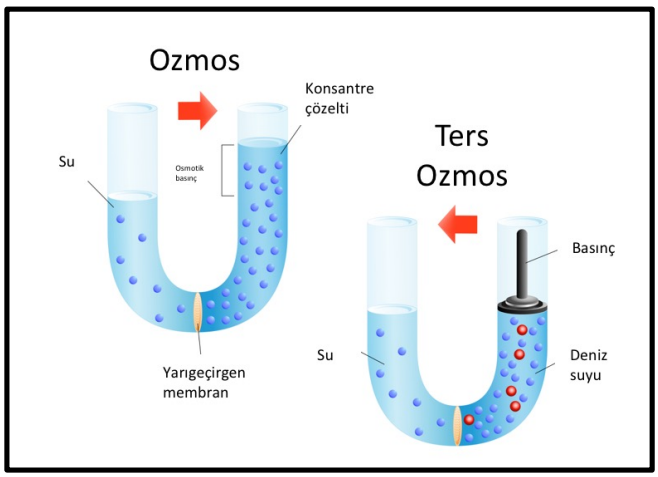
üretilmiştir. Ters osmoz membranları ile ultrafiltrasyon membranları arasında bir geçiş bölgesine giren bu membranlar düşük basınçlı ters osmoz veya daha yaygın olarak nanofiltrasyon membranları olarak adlandırılır. Tipik olarak, nanofiltrasyon membranları % 20-80 arasında sodyum klorür itme yeteneği ve 200-1000 Da moleküler aralığındaki çözünmüş organik çözeltileri engelleme yeteneğine sahiptir [36].

4.3.4. Ters Osmoz (RO)

Ters osmoz düşük molekül ağırlıklı çözünmüş maddelerin, çözeltiden giderilmesi amacıyla kullanılmaktadır. İlk zamanlarda RO sistemleri hiperfiltrasyon (HF) olarak da isimlendirilmiştir.

Ters osmoz membranların çalışma prensibi osmoz (diyaliz) ile doğrudan ilişkilidir. Osmotik basınç ile su, osmotik denge sağlanana kadar, az konsantre taraftan konsantre çözelti kısmına doğru akar. Ters osmoz ise, bir membana basınç uygulanması ile (yoğun çözelti tarafına), çok yoğun ortamdan suyun membrandan diğer tarafa, diğer bir tabir ile az yoğun tarafa geçişidir (Şekil 4.2). Membranın yoğun tarafındaki sıvıya basınç uygulanırsa suyun akış yönü yoğun kısımdan az yoğun kısma döndürülebilir. Böylece giderilmek istenen yoğun kirletici bileşenler membranda tutularak saf su eldesi sağlanır. Bu olaya, yani suyun daha fazla konsantre olan çözeltiden, yüksek basınç ile seyreltilmiş çözeltiye doğru akmasına, ters osmoz (RO) veya hiperfiltrasyon (HF) denir.

Ayırma prosesleri içerisinde ters osmoz membran prosesi en karmaşık uygulama prosesidir. Gözenek çapları 0.1-1.5 nm arasında değişen membranlar kullanılmaktadır. Gözenek boyutları nano ölçekte olduğu için su, virüs ve bazı solvent molekülleri membrandan geçerken, düşük molekül ağırlığına sahip organik ve inorganik bileşikler membrandan geçemezler.



Şekil 4.2: Osmoz ve ters osmoz proses şeması.

Ters osmoz sistemlerinin yaklaşık yarısı tuzlu suyun veya deniz suyunun desalinasyonunda kullanılırken, %40' lık bir diğer bölüm ise elektronik, ilaç ve enerji üretim endüstrileri için ultra saf su üretiminde kullanılır. Geri kalan kısım ise, kirlilik kontrolü ve gıda işleme gibi küçük uygulamalarda kullanılır [36].

4.3.4.1. Deniz Suyunun Tuzsuzlaştırılması

Deniz suyunun bölgeye bağlı olarak %3,2-4,2'lik bir tuz konsantrasyonu vardır. Bu yüksek tuzluluk nedeniyle, yalnızca %99,3 veya daha fazla tuz reddine sahip membranlar, tek bir geçişte 500 ppm'den daha az çözünmüş tuz içeren içilebilir su üretebilir. Birinci nesil selüloz asetat membranların deniz suyunu tuzdan arındırma işlemi, %97-99 indirgeme ile sınırlıydı. Poliamid hollow fiber ve ara yüzey bileşimlerinin gelişmesiyle, uygun deniz suyu membranları elde edilmiştir ve bu teknolojiyi kullanan birçok tesis kurulmuştur. DSÖ (Dünya Sağlık Örgütü) standardı olan <500 ppm'den daha az miktarda tuz içeren içme suyuna ihtiyaç duyulmaktadır ve bu membranlar tuz konsantrasyonunu 100-200 ppm'e kadar düşürerek içme suyunu tek bir geçişte üretebilmektedir. Bu kalitedeki suyun eldesi için genellikle tek aşamalı deniz suyu sistemi ve tek aşamalı tuzlu su sisteminin seri bağlandığı iki geçişli bir sistem gereklidir. Yüksek basınçlı deniz suyu sistemi hemen hemen tüm tuzu giderir. Daha sonra düşük basınçlı tuzlu su sistemi, 100-200 ppm tuz hedefine ulaşmak için kalan tuzu giderir. Tuzlu su sistemindeki konsantre çözelti, deniz suyu sisteminin beslemesine geri dönüştürülür.

Erken deniz suyu ters osmoz tesisleri, 100 bar'a kadar çok yüksek basınçlarda çalışıyordu, ancak membranlar geliştikçe, çalışma basınçları 50-60 bara düşmüştür. Deniz suyunun ozmotik basıncı yaklaşık 23 bar'dır ve reddedilen tuzlu suyun ozmotik basıncı 40 bar kadar olabilir, bu nedenle osmotik basınç bir tesiste net çalışma basıncını belirgin şekilde etkiler [36].

Ters osmoz (RO) membran prosesler, tuzların ve küçük moleküler yabancı maddelerin yüksek verimle uzaklaştırılmasından dolayı, tuzdan arındırma ve su arıtımı için kullanılan en son teknolojidir. Tipik bir RO sürecinde, su yüksek tuzluluk tarafından düşük tuzluluk tarafına hidrolik basınç altında membran boyunca akar ve çeşitli tuz ve kirleticiler membran tarafından reddedilir. RO membranları tarafından yüksek kaliteli su üretilebilmesine karşın, enerji tüketimi önemlidir ve membranın nispeten düşük su geçirgenliğinden etkilenmektedir. Canlı hücrelerde bulunan su tranfer mekanizması RO kullanımı sonucu meydana gelen sorunlara çare olabilecek niteliktedir.

Akuaporinler (AQP'ler), diğer tüm çözünen maddelerin geçmesini engelleyerek, canlı hücrelerdeki plazma membranlarından yüksek hızda, seçici olarak su moleküllerini transfer etmek için nano filtreler olarak işlev gören transmembran su kanalı proteinleridir. Aquaporin proteinleri ve amfifilik fosfolipitlerden veya kopolimerlerden oluşan biyomimetik zarların, yüksek akılı ve düşük enerji tüketen su arıtma işlemlerinde büyük potansiyele sahip olabileceği düşünülmektedir [6].

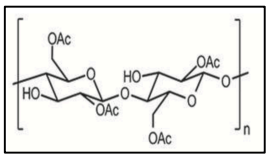
Tez çalışması kapsamında aquaporin proteinleri ile kaplanmış biyomimetik membranlar tasarlanmış ve üretilmiştir. Üretilen membranların susbtrat katmanı organik bir membran olan polisülfon seçilmiştir.

4.4. Organik Membranlar

Organik membranlar, endüstriyel membran proseslerin çoğu, doğal veya sentetik polimerlerden yapılmıştır. Doğal polimerler yün, kauçuk (polisoprin) ve selülozdan oluşurken, sentetik polimerler ise poliamit (PA), polisülfon (PS) ve politetra oroetilen (Te on) ve benzeri materyalden oluşmaktadır. Organik membran materyallerinde polimer veya makromoleküler olanları en önemlileridir [33]. Yaygın olarak kullanılan polimerik membranlar;

4.4.1. Selüloz Asetat (CA) Membranlar

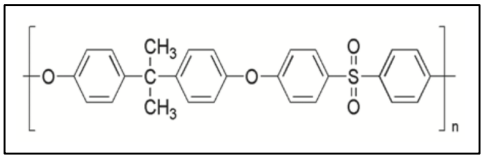
Selüloz ve türevlerinden imal edilmişlerdir. Adsorblama özellikleri zayıftır. Üretimleri kolay ve maliyetleri nispeten düşüktür. Yüksek sıcaklıklarda işletilemezler. Aşındırıcı kimyasallara karşı nispeten dayanıklıdırlar. 3-8 pH aralıklarında işletilirler [33]. Kimyasal formülü;



Şekil 4.3: Selüloz asetat'ın kimyasal formülü.

4.4.2. Polisülfon (PS) Membranlar

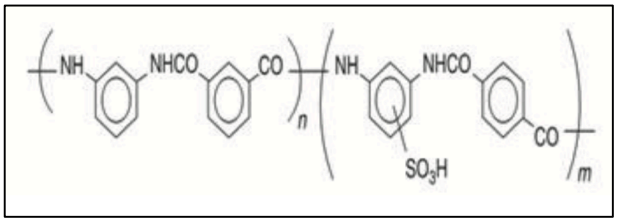
Poliamit ve selüloz asetat organik membran çeşitlerine göre polisülfan membranlar daha az hidrofiliktir. Kimyasal ve fiziksel şartlara karşı daha kararlıdırlar. 75oC'ye kadar dayanırlar (sıcaklık aralığı geniştir). 1-13 pH aralığında işletilebilirler. Aşındırıcı kimyasallara karşı dirençleri diğer membranlarla kıyaslandığında yüksektir. Üretilmeleri kolaydır [33]. Kimyasal formülü;



Şekil 4.4: Polisülfon'un kimyasal formülü.

4.4.3. Poliamit (PA) Membranlar

Aromatik poliamitlerden imal edilirler. Selüloz asetatlara göre daha iyi termal ve kimyasal yapı özelliklerine sahiptirler. Selüloz diasetattan sonra ençok kullanılan ikinci polimerdir. Selüloz asetat membranlara göre pH aralığı daha geniştir. 2-10 pH aralıklarında işletilirler. Poliamitler kompozit membran imalatında üst tabaka malzemesiolarak kullanılmaktadır [33]. Kimyasal formülü;



Şekil 4.5: Poliamidin kimyasal formülü.

4.5. Konsantrasyon Poliarizasyonu

UF ve RO gibi proseslerde sıvı-sıvı veya sıvı-katı ayırmada önemli bir faktördür. Polarizasyon ve tıkanma olayı, standart koşullarda membran sisteminde bir verim düşüşü meydana getirir. Meydana gelen düşüş akıda oluşan azalma şeklinde kendini gösterir. Özellikle makromoleküller ve partikül maddeler, polarizasyon ve tıkanmaya sebep olurlar. Akıda düşüş meydana getiren polarizasyon ve tıkanma, membran yüzeyinde ilave bir bariyer oluşturarak, membran direncini arttırırlar.

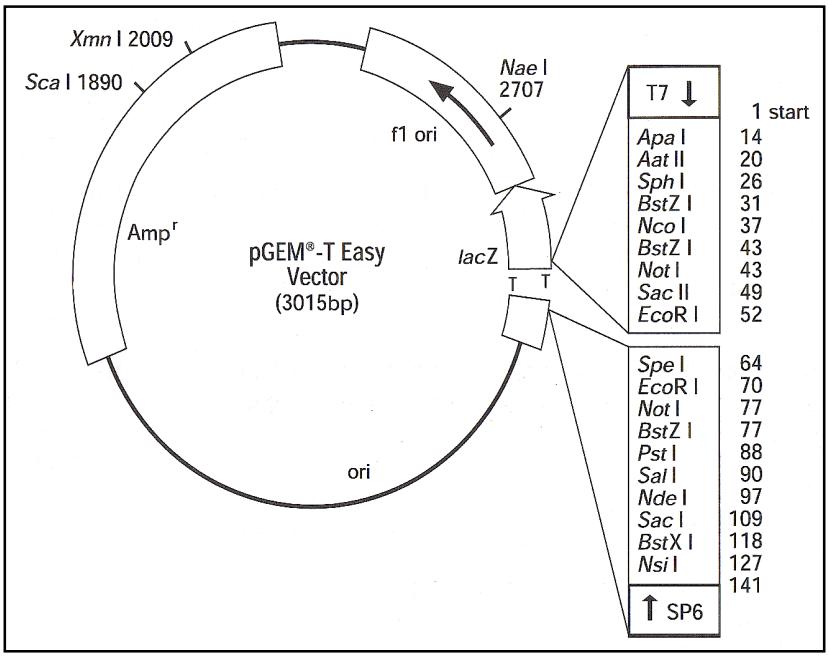
Membran, besleme çözeltisi içindeki tutulması istenen maddeleri tutarak, boyutu membran gözenek boyutlarından küçük bileşenlerin ve suyun geçmesini sağlar. Bu arada membran yüzeyinde tutulan bileşenlerden dolayı bir konsantrasyon artışı sağlanır. Bu artıştan dolayı membran yüzeyine yakın kısımlarda süzülme hızı sıfıra yakındır ve değişen oranlarda sınır tabakası teşekkül etmektedir. Bu membrana yakın sınır tabakasındaki konsantrasyon artışı, konsantrasyon polarizasyonu olarak adlandırılır[37].

5. MATERYAL ve METOT

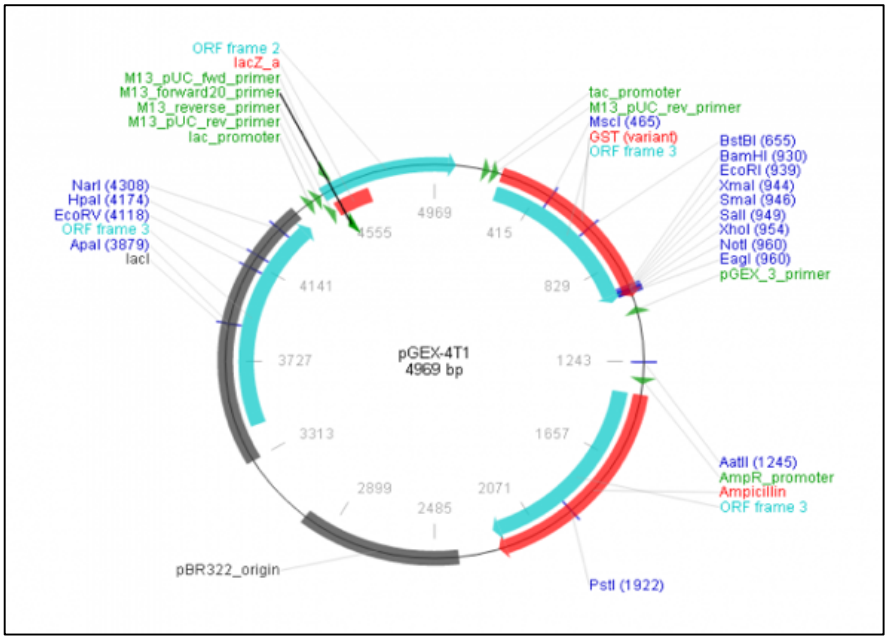
Tez çalışmasında biyomimetik membran tasarımı yapılmış ve üretimi gerçekleştirilmiştir. Canlı hücrelerin membranlarında bulunan su transfer mekanizması sentetik bir membrana aktarılmıştır. Bu amaç için ilk önce kullanılması hedeflenen aquaporin proteininin geni pGEX-4T-2 saflaştırma vektörüne klonlanmıştır. Bu sayede bakteriye aquaporin proteini daha fazla üretme kabiliyeti verilmiştir. Bakterinin ürettiği aquaporin proteinleri membran proteinlerinin saflaştırılması prosedürüne uyularak saf halde elde edilmiştir. Proteinlerin işlevlerini yerine getirebilmesi ve stabil kalabilmeleri için lipozom yapıları elde edilmiştir ve proteinler bu yapıların içine gömülmüşlerdir. Stopped-flow ışık saçılımı spektrometresi ile üretilen proteolipozomların su geçirgenliklerine bakılmıştır. Daha sonra proteolipozomlar üretilen polisülfon substrat üzerine ara yüzey polimerizasyonu yöntemi ile kaplanmıştır. Membran su geçirme ve tuz itme kapasitesindeki değişimi görmek için dead-end filtrasyon sistemi kullanılmıştır.

5.1. Klonlama ve Protein Sentezi

Escherichia coli aquaporin geninin çoğaltılması amacıyla yüksek protein ekspresyonuna sahip oldukları için *E. coli* BL21 hücreleri kullanılmıştır. Bu hücreler laboratuvarımızda bulunmaktadır. *E. coli* DH5α kompetan hücre olarak seçilmiştir. Kolay klonlama vektörü olarak pGEM-T (Şekil 5.1 [38]) ve klonlama vektörü olarak ise pGEX-4T-2 kullanılmıştır. Laboratuvarımızda pGEX-4T-2 (Şekil 5.2 [39]) vektörü SalI ve NotI enzim bölgeleri arasında LDH (laktat dehidrogenaz) geni klonlanmış halde bulunmaktadır. Bu vektör SalI ve NotI enzimleri ile kesilerek içinde bulunan gen çıkarılmış ve lineer hale gelen pGEX-4T-2 vektörü jelden saflaştırılarak ligasyona hazır hale getirilmiştir. pGEX-4T-2 plazmidi Glutation S transferaz tag'ı içermektedir ve klonlanan genlerin ürünleri Glutation sefaroz afinite boncukları ile saflaştırılmaktadır. pGEX-4T-2 klonlama vektöründe klonlanan gen GST (glutation s transferaz enzim) genine bitişik olarak klonlanmakta, gen ifadesi sonucunda GST-gen füzyon proteini ifadesi olmaktadır. GST den hemen sonra gelen trombin kesim bölgesinden kesim sonucunda klonlanan genin proteini ve GST birbirinden ayrılabilmektedir.



Şekil 5.1: pGEM-T Kolay Klonlama Vektörü Haritası.



Şekil 5.2: pGEX-4T-2 Klonlama Vektör Haritası.

Uçlarında SalI ve NotI (New England Biolabs, Beverly, MA) enzim kesim bölgeleri olan primerler tasarlanmıştır. Klonlama esnasında Tag DNA Polymerase ve DNA ligaz enzimi (Thermo Scientific, Waltham, MA) kullanılmıştır.

5.2. Kompetan Hücre Hazırlama

Kompetan hücre hazırlamak amacıyla LB (10 g/L NaCl, 5 g/L Yeast exract, 10 g/L Peptone) besiyerinde OD600: 0,5 absorbans seviyesine kadar üretilen *E. coli* hücreleri (DH5α veya BL21 suşları) RbCl divalent katyonları ile muamele edilerek kompetan hale getirilmişlerdir. Solüsyon 1 (30 mM Potasyum Asetat, 10 mM $CaCl_2$, 100 mM RbCl ve % 15 Gliserol) ve solüsyon 2 (10 mM MOPS, 75 mM $CaCl_2$, 10 mM RbCl ve % 15 Gliserol) ile yıkanan hücre peleti sıvı nitrojende dondurulduktan sonra -70° C de saklanmışlardır.

5.3. Genomik DNA İzolasyonu

Genomik DNA izolasyonu için hücreler uygun besiyerinde gece boyu üretilmişlerdir ve 10 ml hücre kültürü çöktürülerek genomik DNA izolasyon kiti (Thermo Scientific, Waltham, MA) kullanılarak genomik DNA izole edilmiştir.

5.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

PCR klonlama kiti (Thermo Scientific, Waltham, MA) kullanılarak, 28 µL su, 50 ng şablon DNA, 5 µL 10X PCR $Mg2^+$ tampon, 50 pmol her primer (Tablo 5.1), 5 µL 2 mM dNTP ve 1.25 U Taq polimeraz içeren reaksiyon karışımı kullanılarak 94°C 10 dk (ilk döngü), 94°C 1dk, 55° C 1 dk, 72°C 1 dk olmak üzere 35 döngü ve son döngüde 72°C 10 dk koşulları ve sıralaması ile PCR gerçekleştirilmiştir. PCR karışımı en basit haliyle kullanılmıştır. DNA yı açmak amacıyla PEG veya DMSO kullanılmamıştır. 100 µl lik karışıma 1 µl (100 ng civarında) genomik DNA kalıp DNA olarak eklenmiştir. Primerlerin konsantrasyonları 100 mM dır. Her bir primer çiftinden 100 µl lik karışıma 2 µl eklenmiştir.

Tablo 5.1: pGEX-4T-2 vektörüne klonlamak için kullanılan primerler.

PRİMER (SalI, NotI)	DİZİ
ECAQGXF	GGTCGACGTTCAGAAAATTAGCAGC (SalI)
ECAQGXR	CGCGGCCGCTTAATTACGCTTTTCCAGC (NotI)

5.5. Klonlama ve Vektörlerin İfade Edilmesi

*E. coli '*ye ait ifadesi arttırılan DNA parçaları pGEM-T kolay klonlama vektörüne klonlanmış ve ardından yapılan DH5α kompetan hücreleri içine atılmıştır. pGEM-T kolay klonlama vektörü ile mavi beyaz koloni seçimi yapılabilmektedir. transformasyon sonucu oluşan koloniler IPTG ve X-Gal içeren katı besiyerleri üzerinde büyüdüklerinde kendi içine kapanan plazmidler içeren koloniler mavi renkte, gen klonlaması başarılı olan plazmidleri içeren koloniler ise beyaz renkte görünürler. Beyaz kolonilerden seçilerek tekrar katı besiyerine petriye ekilmiştir. Seçilen beyaz kolonilerin katı besiyeri (NaCl 10 g/L, yeast extract 5 g/L, peptone 10 g/L, agar 14 g/L, 100 mg/L Amfisilin) üzerinde bir gece büyütülmesinin ardından hücrelerin plazmidleri Pure Yield Plasmid Miniprep System (Promega, Madison, WI) kullanılarak izole edilmiştir. *E. coli* aquaporin genini taşıyan pGEX-4T-2 plazmidinin DNA dizilemesi (Iontek, İstanbul) yaptırılmış ve *E. coli* aquaporin genini taşıdığı doğrulanmıştır. İzole edilen plazmidlerin uçları ve hedef DNA parçasının uçları SalI ve NotI enzimleri ile kesilmiştir. DNA jel elektroforezinde (Thermo Scientific, Waltham, MA) kesilen parçalar yürütülmüş ve istenen boyuttaki DNA parçaları jelden kesilerek SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI) kiti kullanılarak jel ekstraksiyonları yapılmıştır. Jelden saflaştırılan hedef gen ve aynı enzimlerle lineer hale getirilmiş pGEX-4T-2 vektörü 1:4 oranında karıştırılarak T4 DNA ligase (Thermo Scientific, Waltham, MA) enzimi kullanılarak pGEX-4T-2-ECAQP vektörünü oluşturmak için 16°C, 18 saat ligasyon yapılmıştır. Daha sonra elde edilen ligaz ürünü pGEX-4T-2-ECAQP *E. coli* DH5α kompetan hücrelerinin içine aktarılmıştır. 37°C'de bir gece 100 µg/mL ampicillin içeren besiyerlerinde büyütülen transformantların plazmidleri tekrar plazmid izolasyon kiti ile kullanılarak izole edilerek uçları SalI ve NotI enzimleri ile kesilmiş ve DNA jel elektroforezinde yürütülmüştür. Aynı zamanda izole edilen plazmidler ile tasarlanan primerler kullanılarak PCR yapılmıştır. Bu iki yöntem sayesinde genin başarılı bir şekilde klonlandığı gösterilen plazmidin DNA dizi analizi yapılmıştır. Bu plazmid daha sonra protein ifadesinin yüksek olduğu *E. coli* BL21 suşuna aktarılmıştır.

5.6. Aquaporin Proteinlerinin İfade Edilmesi ve Membran Proteinlerinin Saflaştırılması

Membran proteinlerinin saflaştırılması Erbakan *et. al.* (2015)'e göre yapılmıştır. pGEX-4T-2-*aqpZ taşıyan* BL21 hücreleri10mL LB'ye eklenerek gece boyunca 37°C'de büyütülmüştür. Büyüyen bakteri kültüründe 1mL alınarak yeni antibiyotikli LB'ye (1000mL) ekilmiş ve 37°C'de gece boyunca çalkalanarak büyütülmüştür. Ertesi gün 1mM olacak şekilde IPTG eklenerek 3 saat boyunca büyütülmeye devam edilmiştir. 8000 rpm'de hücreler 30 dk, oda sıcaklığında çöktürülmüş ve supernatant atılmıştır. Pellet -80°C'de 1 saat bekletildikten sonra Lysis Buffer'dan (100 mM K_2HPO_4, 1 mM $MgSO_4$, 1 mM PMSF, 0.02 mg/ml RNase, 1 mg/ml lysozyme at pH = 7.0) 5 mL pellet üzerine eklenmiş ve hücrelerin çözünmesi sağlanmıştır. 4°C'de sonikatörde (Hielsher) hücreler parçalanmıştır (min. 1dk'dan 30 tekrar, 0.5 cycle). 10.000 xg'de 4°C'de 20 dk santrifüj edilmiş ve supernatant alınmıştır. Supernatantın içerisindeki membran proteinlerini çöktürmek için 100.000 xg'de 4°C'de 1 saat santrifüj edilmiştir. Pelletin üzerine 3 mL Solubilization Buffer (5% Triton-X, 100 mM K_2HPO_4 (pH = 7.0), 200 mM NaCl, 10% glycerol, 2 mM β-mercaptoethanol (βME)) eklenmiş ve pelet pipet yardımı ile çözülmüştür. Pelletin solüsyon içerisinde tamamen çözünmesi için numune bütün gece buzda bekletilmiştir. Numune 0.45 µ'lik fitreden geçirilmiştir. Supernetant Glutathione sepharose 4B (GE Healthcare) boncukları ile 1 saat oda sıcaklığında (23°C'de) çalkalanarak (100 rpm) inkübe edilmiştir. Numune boncuk karışımı karışım hacminin 6 katı kadar Wash Solution (100 mM K_2HPO_4 (pH = 7.0), 1% Triton-X, 200 mM NaCl, 10% glycerol, 2 mM βME) ile yıkanmıştır. İstenen proteinler %10 Glycerol içeren 10mM Reduced Glutathione çözeltisi ile ayrıştırılmıştır.

5.7. SDS-PAGE Analizi

Saflaştırılan proteinler %12 separating ve %5 stacking protein jelleri yapılarak SDS-PAGE ile analiz edilmiştir. Proteinler Coomassie brilliant blue R250 ile hazırlanan boya ile 6:1 (protein:boya) oranında karıştırılarak jellere yüklenmiştir. Saf proteinlerin yanına ekler kısmında verilen protein markerları (Thermoficher page ruler prestainedprotein ladder, Fermentas Prestained Protein MW Marker) yüklenmiştir. Jeller güç kaynağından ilk başta 100 V ile beslenmiştir ve numuneler separating jele geldiklerinde voltaj 200V'a çıkarılmıştır.

5.8. BSA (Bovine Serum Albumin) Analizi

1 mg/mL standart bovine serum albumin (BSA) % 0.9 NaCl çözeltisi içerisinde çözülmüştür. Daha sonra 25 mg Coomassie brillant blue G-250, 12.5 mL %95 ethanolda çözdürülerek, 25 mL %85 fosforik asit (H_3PO_4) eklenmiştir. Bu boya çözeltisi 250 mL'ye tamamlanarak Bradford çözeltisi hazırlanmıştır. Kullanılacağı zaman 5 kat sulandırılmıştır. Whatman no.1 filtreden geçirilmiş ve bir cam şişede, oda sıcaklığında saklanmıştır. Aşağıdaki Tablo 5.2' de belirtilen standart konsantrasyonları hazırlanmıştır.

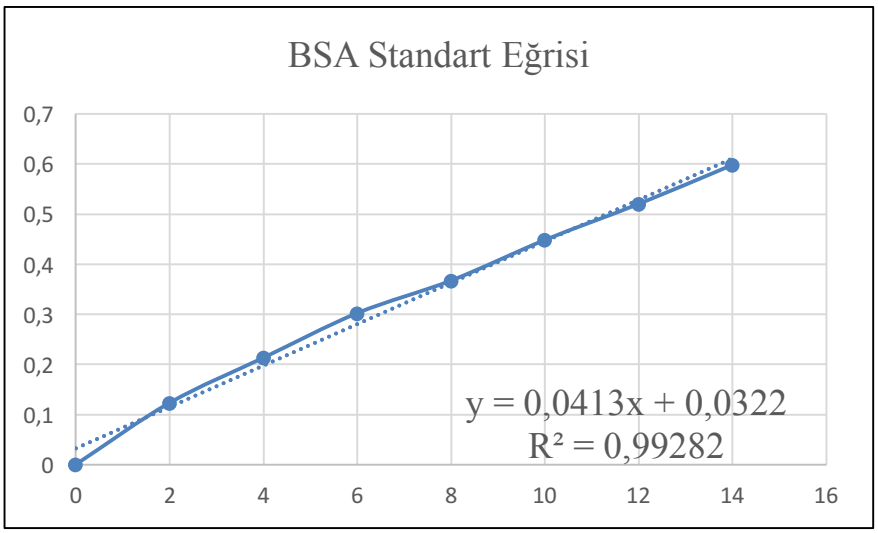
Tablo 5.2: BSA Standart Hazırlama Miktarları.

BİLEŞİKLER	Tüp No							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1 mg/mL BSA(µL)	00	2	4	6	8	10	12	14
% 0.9 NaCl (µL)	100	00	00	00	00	00	00	00
Bradford Çözeltisi(µL)	900	998	996	994	992	990	988	986
Toplam Hacim (mL)	1	1	1	1	1	1	1	1

Hazırlanan standartların renklerinin sabitlenmesi için 10 dakika beklenmiştir. 595 nm'ye ayarlı UV Spektrofotometresi Cintra 20 (GBC Scientific Equipment Pty Ltd., Australia) cihazı ile 1 numaralı kör tüpüne karşı 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 nolu tüplerin absorbans değerleri okunmuştur. Bu veriler kullanılarak standart eğri çizilmiştir. Daha

sonra bu standart eğri kullanılarak konsantrasyonu bilinmeyen proteinlerin konsantrasyonları tespit edilmiştir.

Tabloda verilen BSA solusyonundan 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 µL alınarak standart eğri oluşturulmuştur. Şekil 5.3'de, oluşturulan BSA standart eğrisi verilmiştir. BL21 hücrelerinden saflaştırılan GST-AqpZ protein numuneleri UV Spektrofotometresi Cintra 20 (GBC Scientific Equipment Pty Ltd., Australia) cihazı ile kör standart kullanılarak absorbans değerleri okunmuştur. Okunan değerlerin konsantrasyon karşılıkları standart eğri üzerinden hesaplanmıştır.

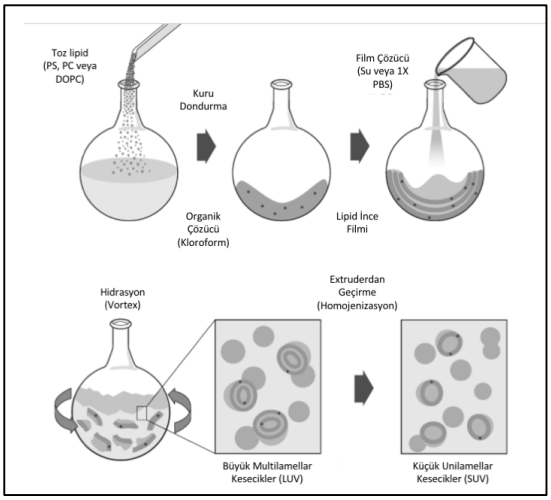


Şekil 5.3: BSA Standart Eğrisi.

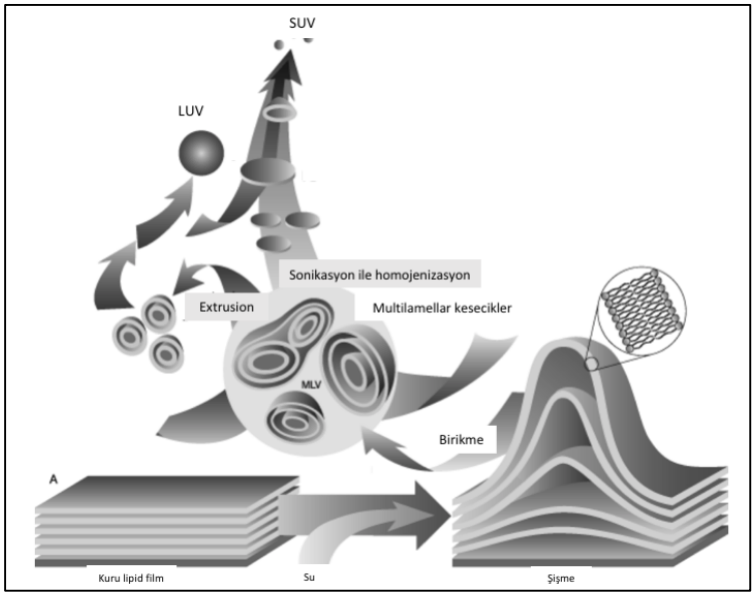
5.9. Lipozom

5.9.1. Lipozom Hazırlama

Lipozomlar film rehidrosyon yöntemi ile hazılanmıştır [7]. Deneyler esnasında 3 farklı lipid kullanılmıştır. Bunlar PS (Phosphatidylserine) (Avanti Polar Lipids INC, Alabama, USA), PC (Phosphatidylcholine) (Avanti Polar Lipids INC, Alabama, USA) ve DOPC (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) (Avanti Polar Lipids INC, Alabama, USA)'dir. PS ve PC belli oranlarda karıştırılarak, DOPC ise tek başına kullanılmıştır. 10-20 mg/mL konsantrasyonundaki PS ve PC, PC:PS oranı 4:1 olacak şekilde round bottom flask'a eklenmiştir. DOPC kullanıldığında ise istenen konsantrasyona göre round bottom flaska eklenmiştir. Eklenen sıvı döndürülerek iyice uçurulmuştur. Bu işlem sayesinde lipidler cam yüzeyinde ince bir film oluşturmuştur. +4°C'de 1-2 saat bekletilerek rehidrasyon aşaması için istenilen son konsantrasyona göre deiyonize su veya 1X PBS (phosphate buffered saline) (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4, 2 mM KH_2PO_4) ilave edilmiş ve vortekslenerek ince film haline getirilen lipidler çözdürülmüştür. Extruder (Avanti Polar Lipids INC, Alabama, USA) kullanılarak lipozomlar yuvarlak ve aynı boyuta getirilmişlerdir. Bu işlem için 1000 nm, 200 nm ve 100 nm por çapına sahip membranlar (Whatman, Maidstone, UK) kullanılmıştır (Şekil 5.4 [40]). Lipozomların aynı boyuta getirilmesi ile polydispersity index (PDI) düşürülmüştür (Şekil 5.5 [40]).



Şekil 5.4: İnce Film Yöntemi İle Lipozom Yapımı.



Şekil 5.5: Lipidlerin Oluşum Basamakları.

5.9.2. Aquaporin Proteini İçeren Lipozom Hazırlama

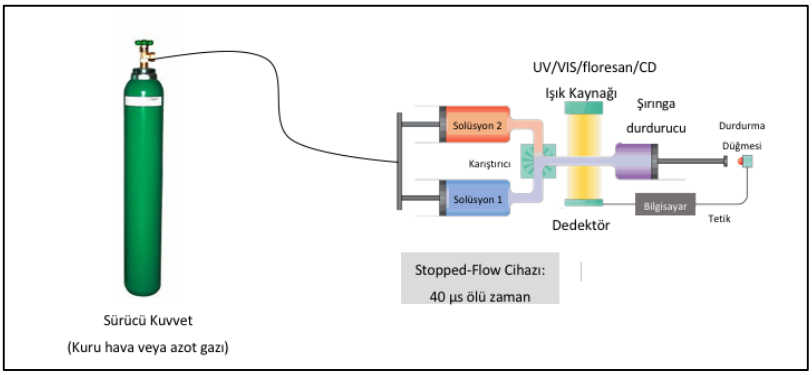
Aquaporin içeren lipozomlar elde etmek için vorteks basamağından sonra, protein:lipid oranı 1:200 olacak şekilde protein ve %1 olacak şekilde Octyl β-D-glucopyranoside (OG) deterjanı (Sigma-Aldrich, USA) eklenmiştir. Protein ve deterjan eklenen çözelti 1 saat oda sıcaklığında karıştırılarak bekletilmiş ve deterjan eklemesi ile yüklenen proteinlerin lipozomlara girmesi sağlanmıştır. Lipozomlar yağdan oluştukları için deterjan lipozomların yapılarını bozmaktadır. Bu nedenle proteinlerin lipozomlara yerleştirilmesinin ardından Bio-Beads (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) eklenerek deterjan çözeltiden uzaklaştırılmıştır.

5.9.3. Lipozomların Karakterizasyonu

Lipozomların boyutları ve polydispersity index (PDI) değerleri Nano Zetasizer (NanoZS, Malvern Instruments Limited, UK) kullanılarak oda sıcaklığında (22℃) ölçülmüştür.

5.9.4. Lipozomların Su Geçirgenliklerinin Tespiti

SX20 Stopped Flow Işık Saçılımı Spektrometre (Applied Photophysics, UK) cihazı ile lipozomların su geçirgenlikleri ölçülmüştür. Su geçirgenlikleri ozmotik çözelti olarak NaCl içeren su kullanılarak tespit edilmiştir. Şekil 5.6'da sistemin çalışma mekanizması verilmiştir. Sistemde bulunan şırıngalardan birine lipozomlu çözelti, diğerine ise tuzlu su ilave edilmiştir. Cihazın çalışma prensibi bu iki çözeltinin basınç sürücü kuvvet altında belirli miktarlarda cihaz içerisindeki küvette hızlı bir şekilde karışmalarını sağlamak üzerine kuruludur.



Şekil 5.6: Stopped-Flow Işık saçılım Spektrometre cihazının çalışma mekanizması.

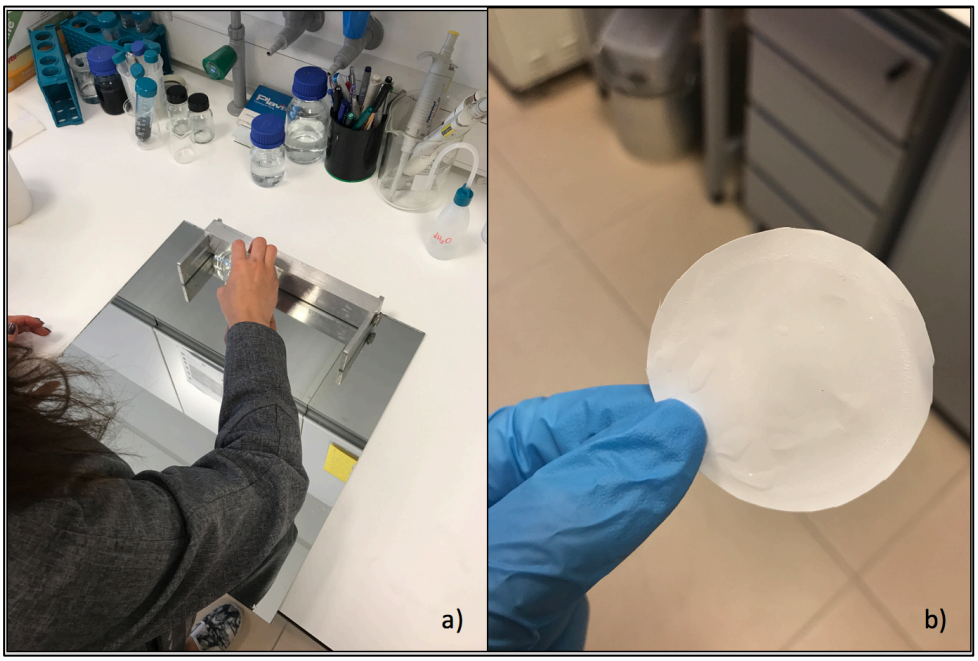
Karışım neticesinde ozmolarite farkı nedeniyle lipozomlar bünyelerinde bulundurdukları suyu dışarı bırakmaktadırlar. Bu olay 5–20 ms gibi kısa bir sürede gerçekleşmektedir. Su çıkışının hızı ışık saçılımı ile belirlenmektedir. Bu çalışmada, protein yerleştirilen lipozomların su çıkış hızlarının, protein içermeyen boş lipozomların su bırakma hızlarından daha hızlı olması beklenmektedir. Su çıkış hızı ölçüm sonucunda elde edilen k değeri ile doğru orantılıdır. Ölçülen k değeri verilen eşitlik (5.1)'de yerine konarak su geçiş hızı (P_f) bulunmaktadır. Formülde; S/V_0 değeri lipozomların yüzey alanının başlangıç hacmine oranı, V_w suyun kısmi molar hacmi (18 cm^3/mol), Δosm ise lipozom içerisindeki sıvı ile lipozom dışarısında bulunan sıvının arasındaki osmolarite farkıdır.

$$P_f = \frac{k}{S/V_O \times V_w \times \Delta Osm} \tag{5.1}$$

5.10. Membran Yapımı

5.10.1. İnce Film Polisülfon Membran Substratının Hazırlanması

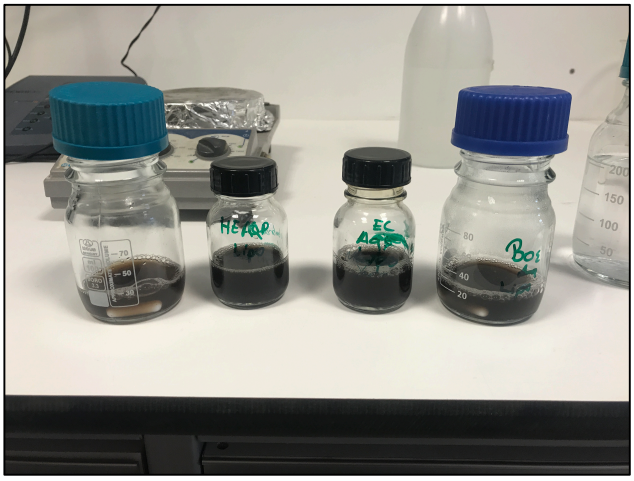
Membranlar [7]' te verilen yönteme göre hazırlanmıştır. Polimer substrat (wt% 16 PS, wt% 77 NMP, wt% 5 PEG ve wt% 2 LiCl) 70 ° C'de karıştırılmış, gazdan arındırılmış ve oda sıcaklığına (23 ° C) soğutulmuştur. 20 ml'lik çözelti, Universal Blade film aplikatörü (Paul N. Gardner, Pompano Beach, FL, USA) kullanılarak 200 µm kalınlığa sahip temiz bir cam levha üzerine dökülmüştür. Alt tabaka filminin bulunduğu cam plaka, oda sıcaklığında PS alt tabakası oluşturmak için musluk suyuna daldırılmıştır (Şekil 5.7).



Şekil 5.7: a) Polisülfon membran tabakasının hazırlanışı, b) Hazırlanan PS membran.

5.10.2. Aquaporin Keseciklerinin Sabitlendiği Membran Tabakanın Hazırlanması

PS substratı ilk önce % 1 MPD (m-Phenylene-diamine), % 0,1 SDS ve 1 mg / ml proteo-lipozom içeren MPD solüsyonuna (Şekil 5.8) 10 dakika batırılmıştır (kaplanmış kör örnek için MPD çözeltisi proteo-lipozom içermez). Batırılmış alt tabaka, 30 dakika boyunca oda sıcaklığında yatay bir şekilde tutulmuş ve fazla çözelti azot gazı ile giderilmiştir. Yüzeyi MPD çözeltisi ile kaplı olan PS substrat üzerine itici katmanı oluşturmak için trimesoyl chloride (TMC) çözeltisi (n-Heksan içinde % 0.1 TMC) dökülmüştür (Şekil 5.9).

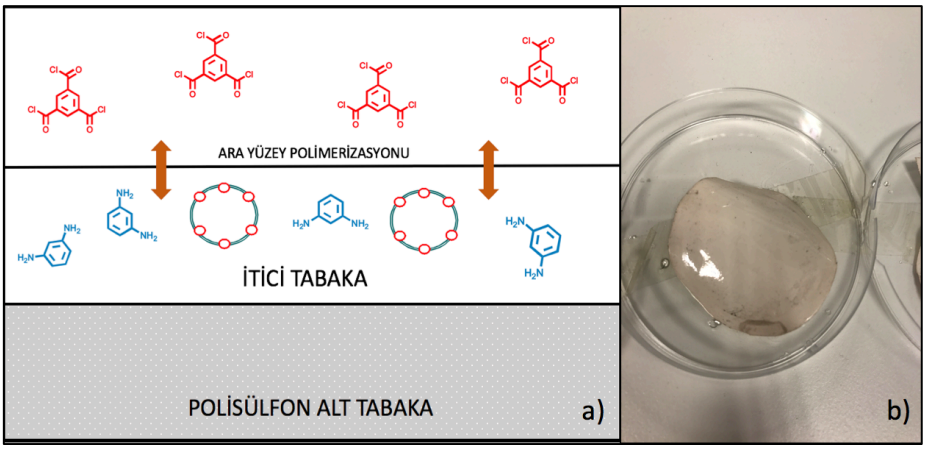


Şekil 5.8: Hazırlanan MPD çözeltileri.



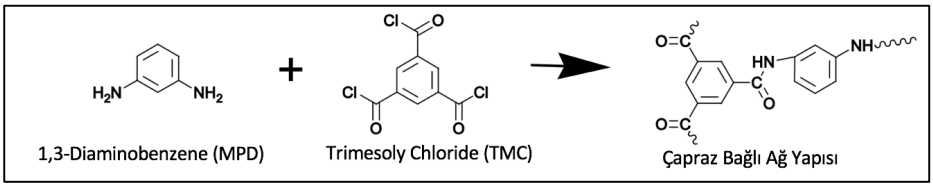
Şekil 5.9: Kaplaması yapılan membranlar.

Ardından fazla monomeri gidermek için membranlar gece boyunca akan musluk suyu altında tutulmuştur. İşlem sonunda membranlar Milli-Q suda saklanmıştır. Yukarıda anlatılan prosedürün kimyasal olarak nasıl gerçekleştiği Şekil 5.10'da verilmiştir.



Şekil 5.10: a) Ara yüzey polimerizasyonu ile polisülfon membran tabakasının kaplanması, b) Kaplama yapılan membran.

Ara yüzeyde gerçekleşen polimerizasyonun kimyasal reaksiyonu Şekil 5.11'de gösterilmiştir.



Şekil 5.11: Ara yüzey polimerizasyonu kimyasal reaksiyonu.

5.10.3. SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) Analizi

Hazırlanan ve kurutulmuş zarların morfolojileri SEM analizi (Philips XL30 SFEG, Amsterdam, Hollanda) ile gözlenmiştir. Enine kesit görüntüsü almak için, kurutulmuş numuneler sıvı nitrojene batırılmış ve kırılmıştır. Görüntülemeden önce membran örneklerin üzeri altın tabakası ile kaplanmıştır.

5.10.4. Dead-End (Ölü Uçlu) Reaktör Sistemi İle *E. coli* Aquaporini İçeren Membranların Su Geçirme ve Tuz İtme Kapasitelerinin Ölçümü

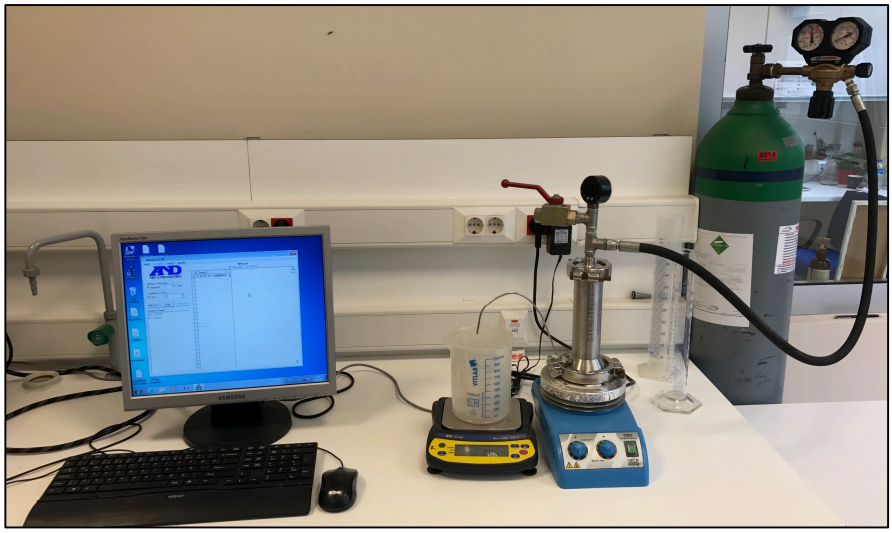
Deneylerde Sterlitech Corporation dead-end membran sistemi (HP4750, USA) kullanılmıştır (Şekil 5.12). Membran alanı 14,6 cm^2 ve besleme çözeltisi 250 mL'dir. Membran, sistem içerisindeki disk üzerine yerleştirilmiş ve daha sonra ekipman bir araya getirilmiştir. Tuzlu çözeltiyi filtrelemek için 5 bar basınç uygulanmış ve filtrasyon esnasında numune 300 rpm'de karıştırılmıştır. Filtrat hassas ölçek ile ölçülmüştür.

Membran akıları (J_v) ve tuz itme hızları (J_{SR}) aşağıda verilen eşitlik (5.2) ve (5.3) kullanılarak hesaplanmıştır.

$$J_v = \frac{V}{A} \times \Delta t \tag{5.2}$$

$$J_{SR} = \left(C_{inf} - C_{eff}\right) \times J_v \tag{5.3}$$

V (L) belirli bir zaman periyodunda toplam filtrelemeyi, t (sa) zamanı, A (m^2) membran alanını, J (L/m^2.sa) akışı, C_{inf} giriş çözeltisinin tuz konsantrasyonunu ve C_{eff} membrandan süzülen çözeltinin tuz konsantrasyonunu göstermektedir.



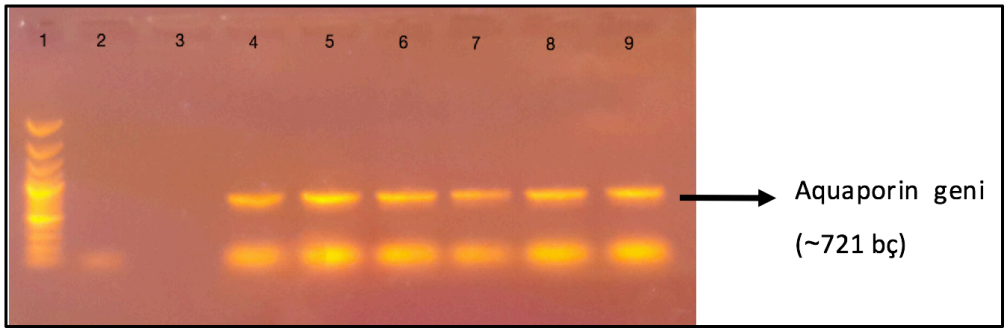
Şekil 5.12: Dead-end Sistemi.

6. BULGULAR

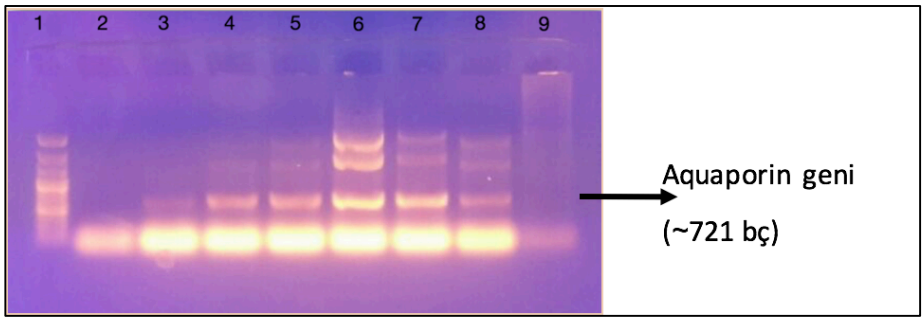
6.1. *E. coli* Aquaporin Geninin Klonlanması

6.1.1. *E. coli* Aquaporin Geninin PCR İle Çoğaltılması

E. coli BL21 bakterisinin genomik DNA'sı genomik DNA kiti (Thermo, Waltham, Massachusetts, United States) ile elde edilmiş ve *aqpZ* genine özgü primerler kullanılarak çoğaltılmıştır. Bu DNA parçası yöntem kısmında anlatıldığı şekilde pGEM-T vektörüne klonlanmıştır. Elde edilen beyaz kolonilerden elde edilen plazmidler PCR doğrulaması için kullanılmıştır. Şekil 6.1'de *aqpZ* genine ait 721 bç uzunluğundaki PCR ürünleri görülmektedir.



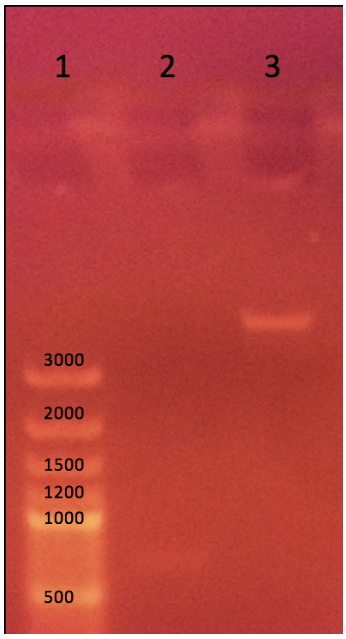
Şekil 6.1: *E. coli* BL21 aquaporin geninin PCR ile çoğaltılması.
1: Marker, 2: negatif kontrol 4-9: PCR da çoğaltılmış aquaporin geni.



Şekil 6.2: *E. coli* aquaporini taşıyan pGEM-T ile PCR doğrulaması.
1: Marker, 2: Negatif kontrol, 3: pGEM-T 4, 4: pGEM-T 6, 5: pGEM-T 7, 6: pGEM-T 8, 7: pGEM-T 9, 8: pGEM-T 10, 9: pGEM-T mavi koloniden elde edilen plazmid.

6.1.2. *E. coli* Aquaporin Geninin pGEX 4T-2 Vektörüne Klonlanması

Bu tez çalışmasında saflaştırma vektörü olarak pGEX-4T-2 kullanılmıştır. pGEX-4T-2 vektöründe klonlanan gen ürünü GST ile füzyon proteini halinde üretilmektedir. GST saflaştırma prosedürü ile çok daha saf ürün elde edildiği için bu vektör tercih edilmektedir. Vektör yöntem kısmında anlatıldığı şekilde SalI ve NotI enzimleri kullanılarak lineer hale getirilmiş ve ligasyon için jelden saflaştırılmıştır. Şekil 6.3'te ligasyon için kullanılacak lineer pGEX-4T-2 ve *aqp*Z geninin konsantrasyonları görülmektedir.



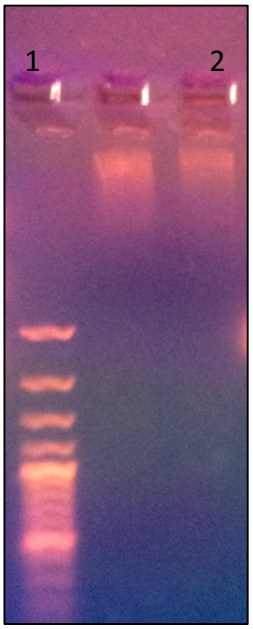
Şekil6.3: Ligasyonda kullanılacak DNA ürünlerinin konsantrasyonları.
1: Marker, 2: *E. coli* aquaporini, 3: pGEX-4T-2.

Şekil 6.3'te görülen konsantrasyona sahip DNA ürünleri aşağıdaki koşullarda 16°C'de 18 saat ligasyona tabi tutulmuşlardır. Elde edilen transformant koloni sayısı ve sonuç tabloda (Tablo 6.1) verilmiştir.

Şekil 6.3'te görülen pGEX-4T-2-*E.coli* aquaporini bandları kullanılarak ligasyon yapılmıştır. Yapılan ligasyon ürünleri jele yüklenmiş ve aşağıdaki bandlar elde edilmiştir. Ligasyon sonucunda vektör ve insert DNA'ların kaybolduğu ve daha büyük boyutlarda yeni DNA ürünleri oluştuğu görülmüştür (Şekil 6.4).

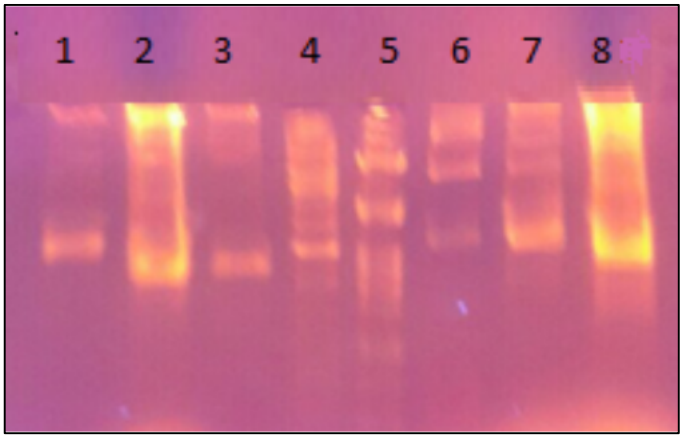
Tablo 6.1: *E. coli* aquapoirn geninin pGEX-4T-2 vektörüne klonlanması (ligasyon koşulları) ve *E. coli* DH5α hücrelerine transformasyonu.

Ligasyon Ürünleri	**µL**	**Transformant Sayısı**	**Sonuç**
pGEX 4T	2	5	+
E. coli aquaporini	4		
Tampon	1		
Ligaz	2		
Toplam Hacim	10		



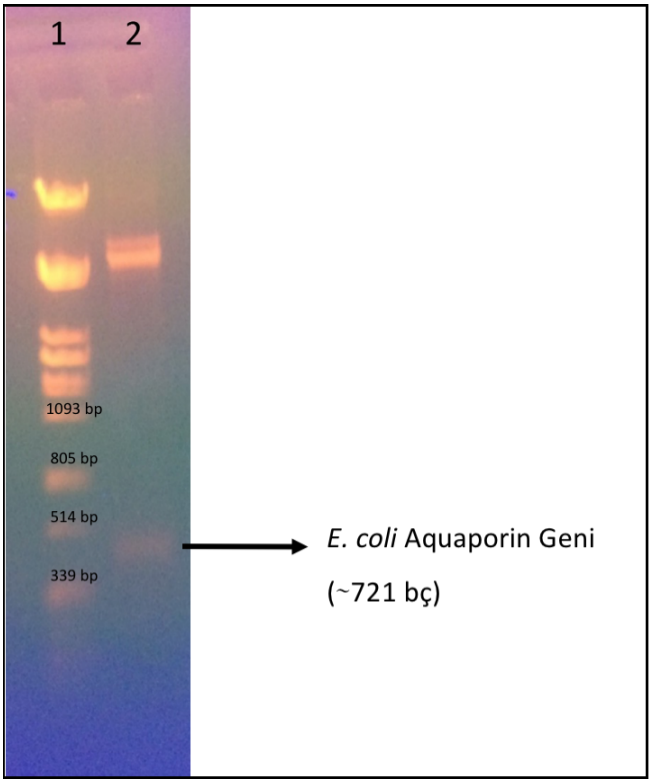
Şekil 6.4: pGEX-4T-2- *E. coli* aquaporini ligasyon sonucu.
1: Marker, 2: pGEX-4T-2- *E. coli* aquaporini ligasyon sonucu.

pGEXT-4T-2 vektörüne yapılan ligasyon ve transformasyonda elde edilen beş adet transformantın plasmidlerinin boyutları kontrol edilmiştir (Şekil 6.5). İçlerinden biri klonlamanın doğrulanması amacıyla enzim kesimine tabi tutulmuştur.



Şekil 6.5: pGEXT-4T-2 *E. coli* aquaporini transformantlarından elde edilen plazmidler. 1-3: Transformantlardan elde edilen plazmidler (1-3), 4, 6: pGEX 4T-2-LDH plasmidi, 5: Lamda Pst marker, 7-8: Transformantlardan elde edilen plazmidler (4 ve 5).

Şekil 6.5'e bakıldığında 1. ve 6. kuyucuklara yüklenmiş olan transformant plazmidlerinin diğerlerine kıyasla daha büyük olduğu görülmektedir. Bu iki plazmid aquaporin genini taşıyıp taşımadıklarının anlaşılması amacıyla SalI ve NotI enzimleri ile kesilmiştir. 1 numaralı transformanttan elde edilen plazmidin çift enzim kesiminden sonra geni taşıdığı anlaşılmıştır. 721 bazlık aquaporin genine ait DNA Şekil 6.6'da verilen jel fotoğrafında gözlemlenmiştir. Bu sonuç *E. coli* aquaporin geninin pGEX-4T-2 vektörüne başarılı bir şekilde klonlandığını kanıtlamaktadır.



Şekil 6.6: *E. coli* aquaporin genini taşıyan pGEX 4T plazmidinin SalI ve NotI enzimleri ile kesimi. 1: Lamda Pst marker, 2: Kesilmiş plazmid.

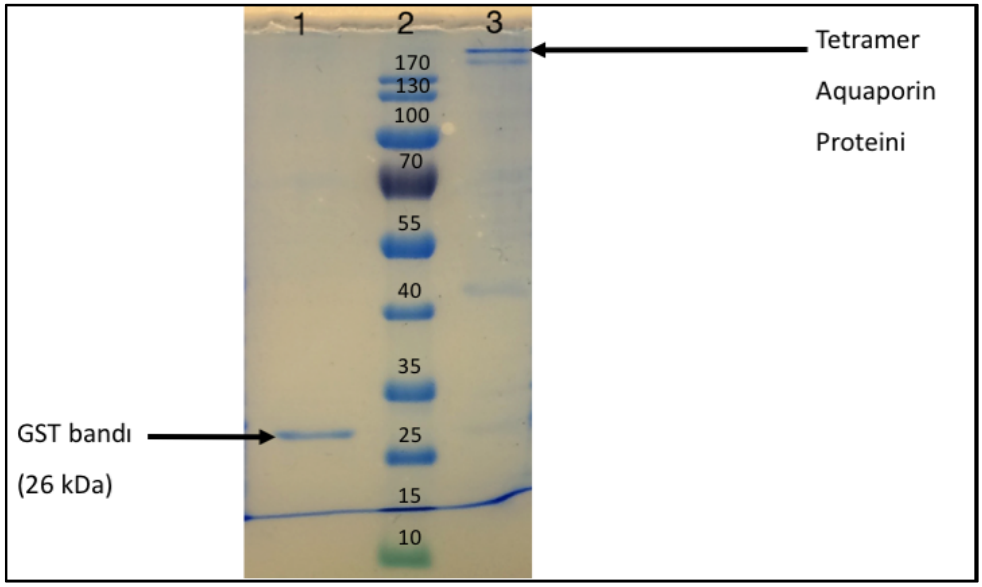
E. coli aquaporin genini taşıyan pGEX-T-2 plazmidinin DNA dizilemesi yaptırılmış ve *E. coli* aquaporin genini taşıdığı doğrulanmıştır. Elde edilen rekombinant plazmid protein ifadesi için BL21 hücrelerine aktarılmıştır.

6.2. Protein Üretimi ve Saflaştırılması

Su transferinden sorumlu olan Aquaporin proteinleri hücre membranında bulunmaktadırlar. Ancak saflaştırma vektörlerine klonlanan rekombinant proteinlerin sitoplazmada bulunma olasılığını da dikkate alarak rekombinat GST-AqpZ proteini öncelikle sitoplazmada olup olmadığına bakılmıştır. *E. coli* aquaporini proteininin üretimi amacıyla, recombinant BL21 hücreleri pGEX-4T-2 plazmidinin kullanım kılavuzunda verilen prosedürlere uyarak LB besiyerinde IPTG varlığında üretilmiştir. GST yaklaşık 26 kDa ağırlığında olup, yaklaşık 24 kDa ağırlığında aquaporin ile birleştiğinde 50 kDa'luk bir füzyon proteini beklenmektedir. Aquaporinler dimer veya tetramer yapıda olabildikleri için daha yüksek ağırlıkta görülebilmektedirler. Protein saflaştırma aşamalarından sonra, sitoplazma proteinleri ve ikluzyon cisimcikleri içinde beklenen boyutlarda bir proteine rastlanmamıştır.

6.2.1. Aquaporin Proteinlerinin Hücre Zarından Saflaştırılması

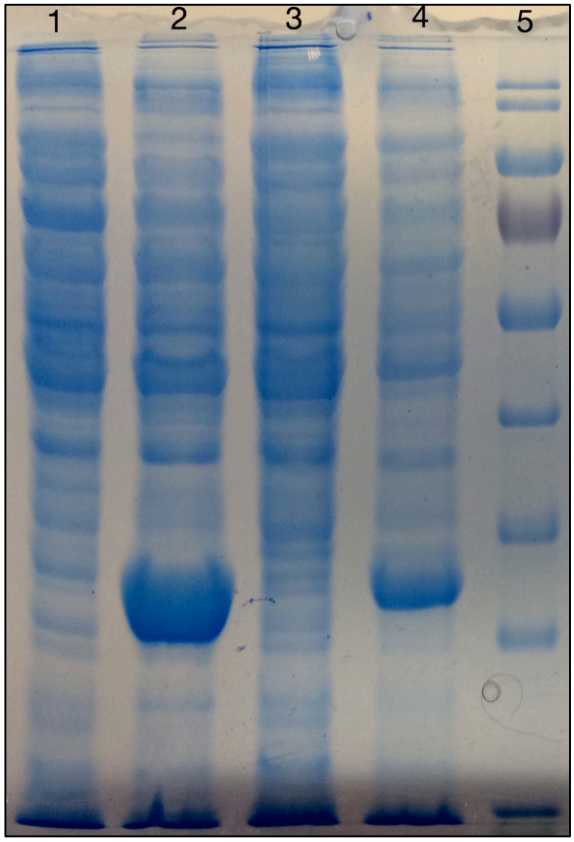
Membranda lokalize olan aquaporinlerin saflaştırılması amacıyla *E. coli* hücrelerinin membran proteinleri ultrasantrifüj kullanılarak çıkarılmıştır. GST-AqpZ proteini bu membran proteinlerinden saflaştırılmıştır. Aşağıdaki şekilde görüldüğü gibi *E. coli* aquaporin proteini tetramer halinde saf olarak elde edilmiştir. Boş plazmid içeren BL21 hücrelerinden elde edilen proteinlerden yapılan saflaştırma sonucunda GST proteini saf olarak elde edilmiştir (Şekil 6.7).



Şekil 6.7: Membran proteinlerinin saflaştırması sonucu elde edilen tetramer aquaporinin gözlemlenmesi. 1: Kontrol, 2: Marker, 3: Rekombinat *E. coli* aquaporin proteini.

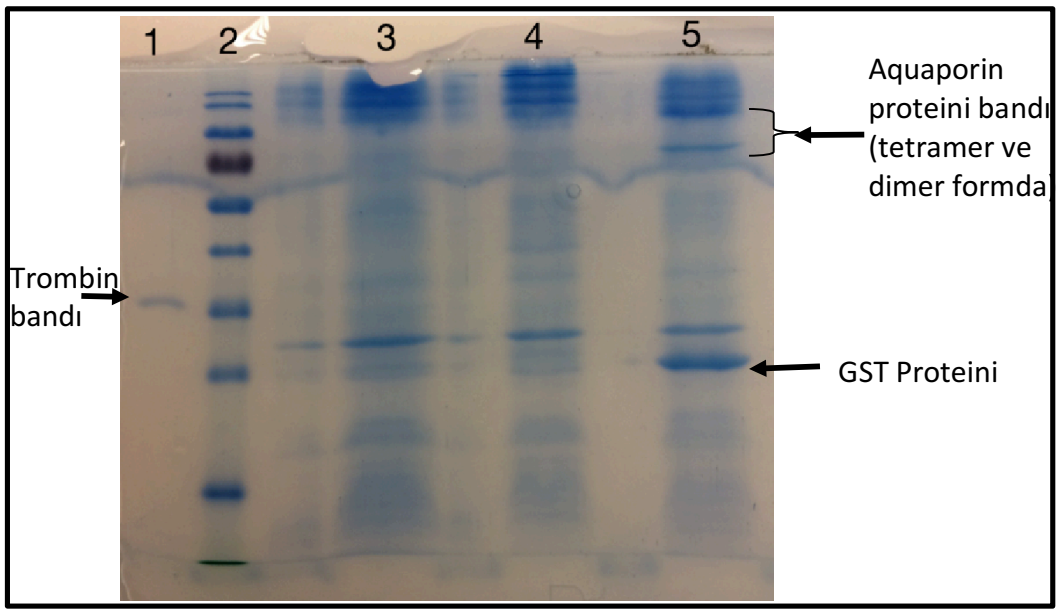
6.2.2. Besiyerinin Protein İfadesine Etkisi

Farklı besiyerinin protein ifadesi etkisini görmek amacıyla rekombinant hücreler 2X YTA ve LB olmak üzere 2 farklı besiyerinde üretilmiş ve çoğalan hücrlerin membran proteinleri elde edilmiştir. Şekil 6.8'de ki jelin 1. ve 3. kuyucuklardaki proteinlerde 200 kDa civarındaki aquaporin tetrameri olduğu düşünülen bantların daha kalın olduğu görülmüş ve bu nedenle daha sonraki üretimler LB besiyeri kullanılarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 6.8: Besiyerlerinin aquaporin üretimine etkisi. 1: 2X YTA besiyerinde üretilen *E. coli* aquaporin lizatı, 2: 2X YTA besiyerinde üretilen kontrol lizatı, 3: LB besiyerinde üretilen *E. coli* aquaporin lizatı, 4: LB besiyerinde üretilen kontrol lizatı.

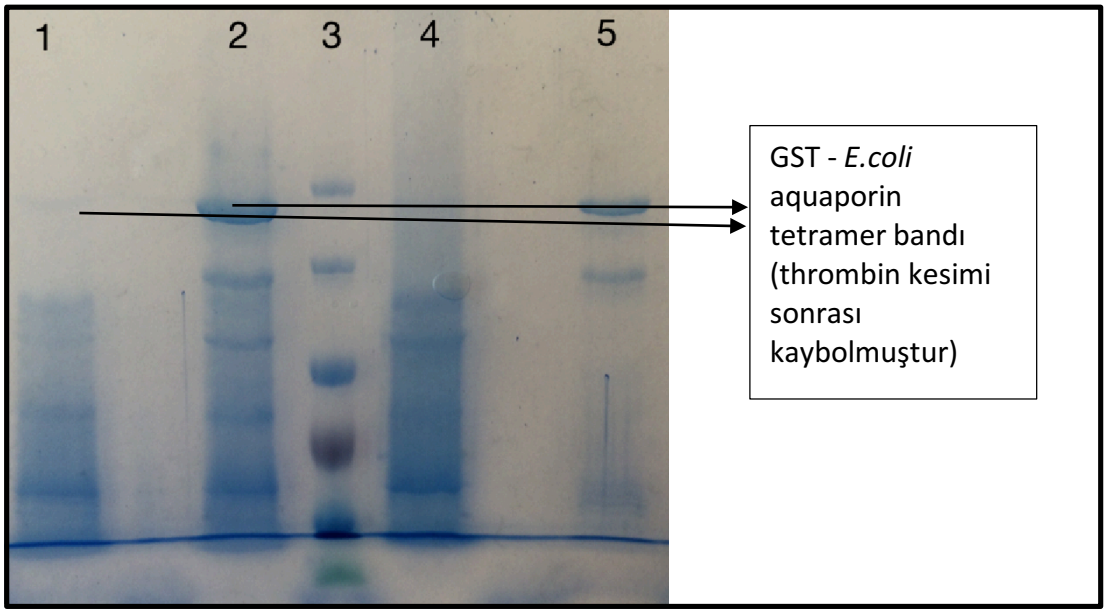
200 kDa civarındaki proteinin GST-AqpZ füzyon protein olduğunun anlaşılması amacıyla GST ve aquaporin thrombin enzimi ile birbirinden ayrılmıştır. Aşağıdaki şekilde saflaştırılan proteinlerin thrombin ile kesim sonucunda üst bandın kaybolduğu, yaklaşık 100 ve 70 kDa civarında bandlar oluştuğu (bu proteinlerin GST içermeyen aquaporin tetramer ve dimerleri olduğu düşünülmektedir) ve 30 kDa civarında GST proteininin çıktığı görülmektedir (Şekil 6.9). Proteinler kolona tutulu iken thrombin kesimi yapıldığında ise beklenen sonuç alınamamıştır (GST lerin kolona tutunması ve yalnızca aquaporinlerin inmesi gerekmekteydi). Ependorfta bekletilerek ve santrifüj kullanılarak yapılan saflaştırma sonrası thrombin kesimi daha başarılı sonuç vermiştir.



Şekil 6.9: Aquaporin füzyon tetramerinin thrombin ile kesimi. 1: Trombin, 2: Marker, 3: Kolonda Trombin ile kesilen *E. coli* aquaporini, 4: Kesim işlemi yapılmayan *E. coli* aquaporini, 5: Kolondan indirildikten sonra Trombin ile kesilen *E. coli* aquaporini.

Şekil 6.9'da görülen SDS-PAGE jelinin konsantrasyonu %12 olduğu için yüksek moleküler ağırlığa sahip proteinler sıkışık görünmektedirler. Jel konsantrasyonu %10'a düşürüldüğünde üst bantların daha fazla ayrışmış ve bu nedenle daha net gözlemlenmiştir (Şekil 6.10). Tetramer GST-AqpZ proteininin thrombin ile kesimi sonucunda GST'nin kesilip ayrılması nedeniyle ağırlığı düşük protein bandları görülmüştür. (Jel konsantrasyonu değiştiğinde tetramer proteinlerin boyutları

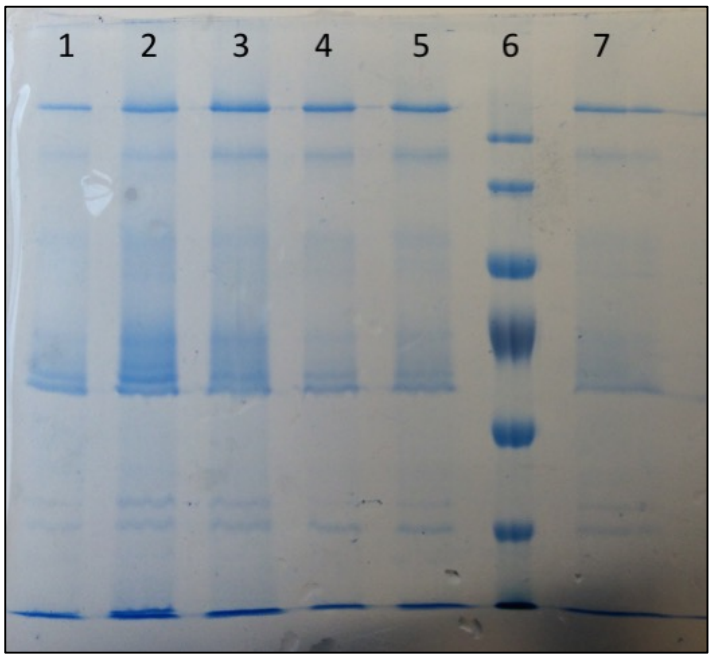
marker bandlarına göre daha farklı büyüklükte görülebilmektedir ve jeldeki yerlerinde de ufak değişiklikler görülmektedir).



Şekil 6.10: Seyreltilmiş *E. coli* auaporin proteinin trombin ile kesimi.
1: Saflaştırıldıktan sonra trombin ile kesilen *E. coli* auaporini, 2: Kesim işlemi yapılmayan *E. coli* auaporini, 3: Marker, 4: Kolonda Trombin ile kesilen *E. coli* auaporini, 5: Kesim işlemi yapılmayan seyreltilmiş *E. coli* auaporini.

6.2.3. Boncuk ve Numune Miktarlarının Saflaştırmaya Etkisi

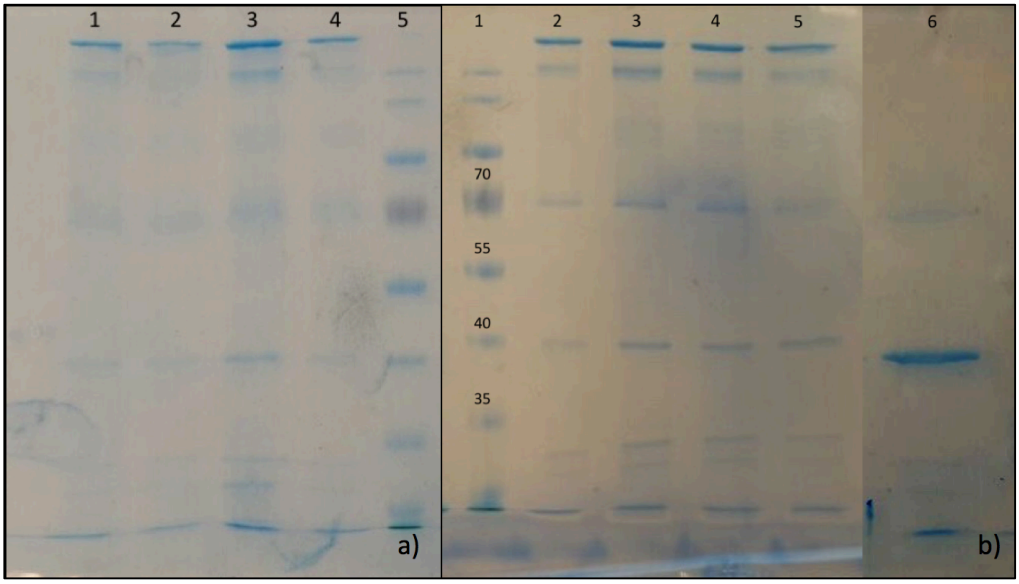
GST sefaroz 4B boncuk rezin miktarı ve membran protein miktarlarının saflaştırmaya etkileri incelenmiştir. Numune veya boncuk miktarının değiştirilmesi saflaştırma üzerinde herhangi bir değişikliğe sebep olmamıştır (Şekil 6.11).



Şekil 6.11: Saflaştırma rezini ve numune miktarlarının saflaştırmaya etkileri. 1: 500 µL *E. coli* membran proteini ve 30 µL rezin, 2: 1000 µL *E. coli* membran proteini ve 30 µL rezin, 3: 1500 µL *E. coli* membran proteini ve 30 µL rezin, 4: 500 µL *E. coli* membran proteini ve 30 µL rezin, 5: 500 µL *E. coli* membran proteini 40 µL rezin, 6: Marker, 7: 500 µL *E. coli* membran proteini 50 µL rezin.

6.2.4. pH'nın ve β-merkaptaethanol'ün Saflaştırmaya Etkisi

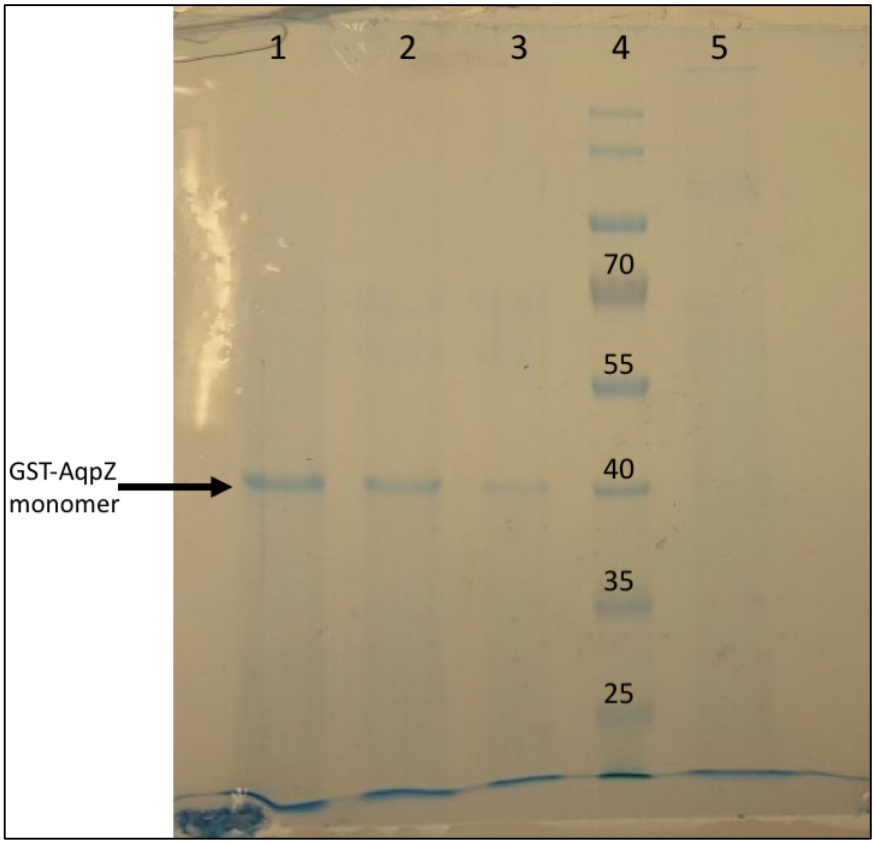
GST-AqpZ füzyon proteininin çeşitli koşullara dayanıklılığını ölçmek amacıyla proteinler farklı denatüre edici ajanlar içeren yükleme boyalarında bekletilmiş ve protein jeline yüklenmişlerdir. Bu koşullar farklı pHve β-merkaptaethanol konsantrasyonları ve %1 SDS ortamında farklı sürelerde bekletme şeklindedir. pH'nın düşürülmesi proteinin tetramer yapısını bozmamıştır ancak β-merkaptaethanol konsantrasyonunun 1000 mM'a yükseltilmesi 50 kDa civarındaki GST-aquaporin fuzyon monomer bandın konsantrasyonunu artırmıştır (Şekil 6.12).



Şekil 6.12: a) pH'ın protein denatürasyonuna etkisi. 1: pH 3, 2: pH 4, 3: pH 7, 4: pH 8, 5: Marker, b) β-merkaptaethanol'ün protein denatürasyonuna etkileri 1: Marker, 2: Kontrol, 3: 125 mM β-merkaptaethanol, 4: 250 mM β-merkaptaethanol, 5: 500 mM β-merkaptaethanol, 6: 1000 mM β-merkaptaethanol.

6.2.5. Farklı Sürelerde %1 SDS Boyada Bekletmenin Protein Denatürasyonuna Etkisi

Farklı sürelerde %1 SDS içeren protein yükleme boyasında bekletilmiş numunelerde protein denatürasyon etkisine bakılmıştır. %1 lik SDS ortamında 1-3 gün bekletilen tetramerlerin monomer forma dönüştüğü görülmüştür (Şekil 6.13).

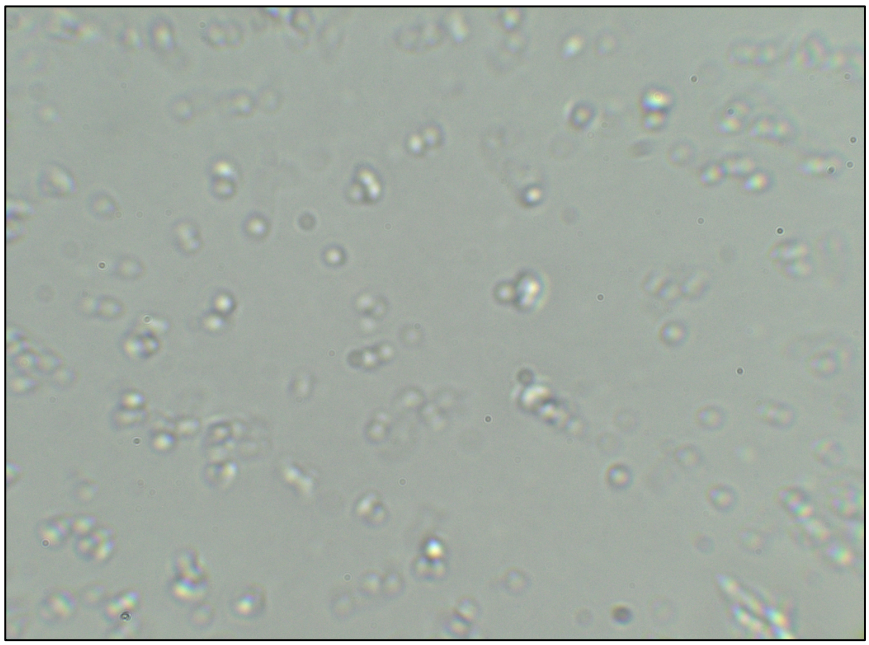


Şekil 6.13: Farklı sürede boyada bekletmenin protein denatürasyonuna etkisi. 1: 3 gün %1 SDS loading dye ile bekledi, 2: 2 gün %1 SDS loading dye ile bekledi, 3: 1 gün %1 SDS loading dye ile bekledi, 4: Marker, 5: Kontrol.

6.3. Lipozom

6.3.1. Lipozomların Işık Mikroskobu Altında İncelenmesi

Aquaporinlerin su geçirme kapasiteleri fosfolipid içerikli lipozomlara yerleştirilerek ölçülebilmektedir. Bu amaçla Başlık 5.9.2'de belirtilen yöntem ile protein içermeyen ve aquaporin proteini içeren lipozomlar hazırlanmıştır. Hazırlanan lipozomlar Accu-Scope 3025 ışık mikroskobu (Accu-Scope INC, US) altında incelenmiştir.



Şekil 6.14: Lipozom ışık mikroskop görüntüsü (100X).

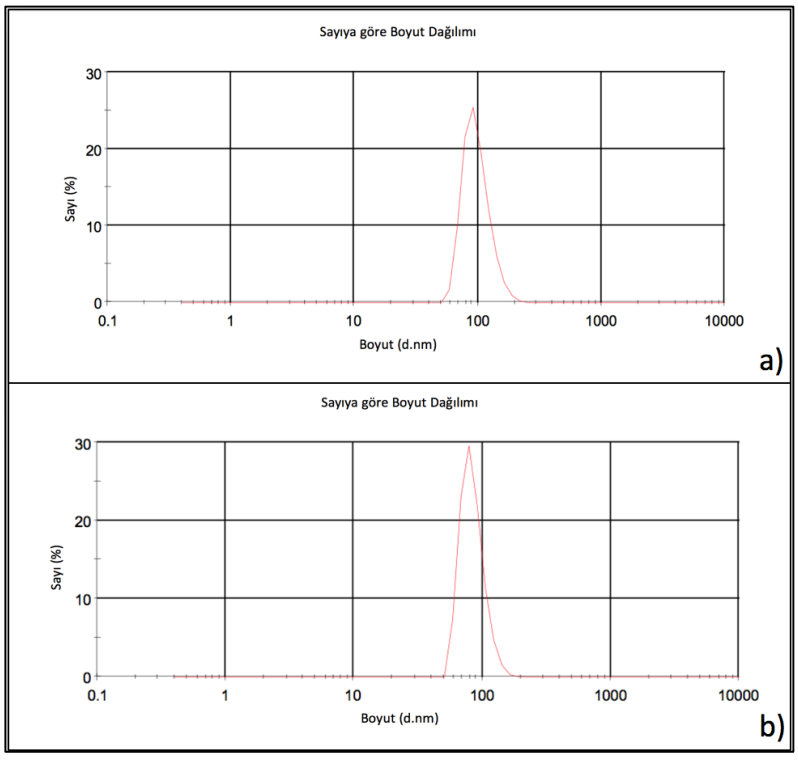
Görüntüleme sonucunda elde edilen lipozomlar şeffaf yuvarlaklar şeklinde gözlemlenmiştir ve boyutlarının homojen olduğu tespit edilmiştir (Şekil 6.14).

6.3.2. Nano Zetasizer Analizi

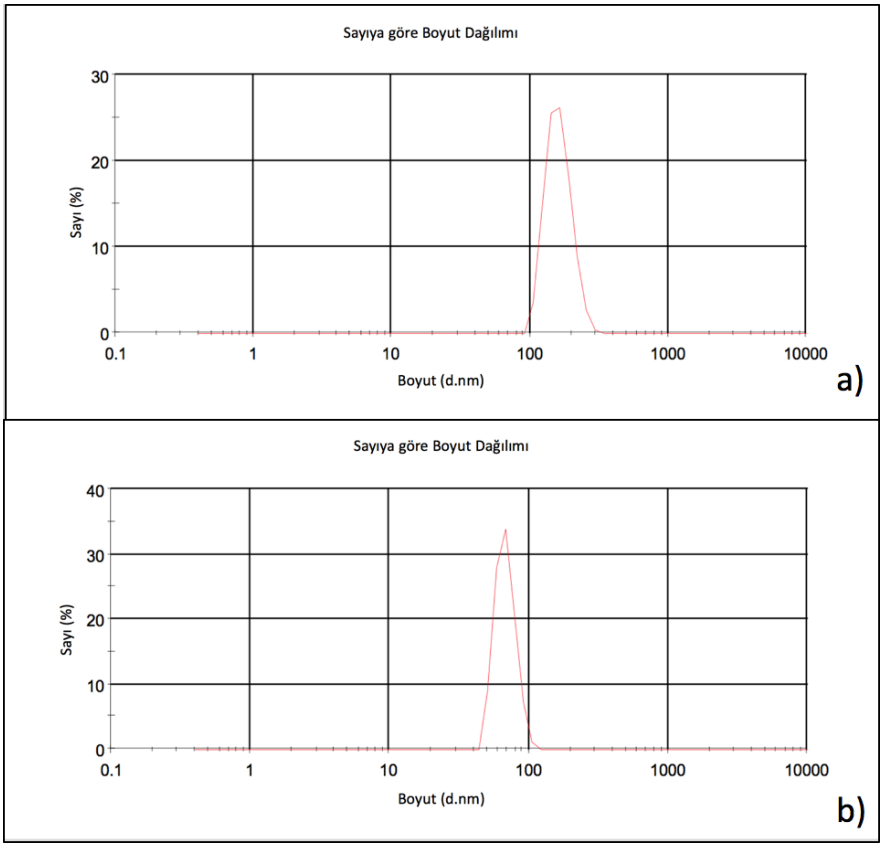
100 nm filtreden geçirilerek hazırlanan PS:PC lipozomlarının boyut analizi Nano Zetasizer (NanoZS, Malvern Instruments Limited, UK) kullanılarak oda sıcaklığında (20℃) ölçülmüştür. 0.5 mg/mL konsantrasyonunda hazırlanan aquaporin proteini içermeyen ve içeren lipozomların boyutları ve Polydispersity index (PDI) değerleri aşağıdaki figürlerde görülmektedir.

Tablo 6.2: Nano Zetasizer Ölçüm Sonuçları.

	PS-PC -AqpZ	PS-PC +AqpZ	DOPC -AqpZ	DOPC +AqpZ
Z-ortalama (d.nm)	119.7	99.9	174.8	107.4
PdI Değerleri	0.069	0.066	0.146	0.190



Şekil 6.15: 100 nm membran ve PS-PC lipidleri ile hazırlanan lipozomların Nano Zetasizer ölçümü. a) Protein içermeyen, b) Aquaporin proteini içeren



Şekil 6.16: 200 nm membran ve DOPC lipidleri ile hazırlanan lipozomların Nano Zetasizer ölçümü. a) Protein içermeyen, b) Aquaporin proteini içeren

100 nm membran ve PS-PC lipidleri ile hazırlanan lipozom sonuçlarına bakıldığında (Tablo 6.2) protein içermeyen lipozom çapı 119.7 nm ve *E. coli* aquaporini içeren lipozom çapı 99.9 nm olarak ölçülmüştür. 200 nm membran ve DOPC lipidleri ile hazırlanan lipozom sonuçlarında ise protein içermeyen lipozom çapı 174.8 nm ve *E. coli* aquaporini içeren lipozom çapı 107.4 nm olarak ölçülmüştür. Aquaporin içeren lipozomların boyutları, aquaporin içermeyen lipozomlara göre daha küçük bulunmuştur. Bunun nedeni lipozomlara aquaporin yerleştirilmesi sonucunda lipozomların bir miktar su kaybetmesi şeklinde açıklanabilir. Ölçüm sonuçlarında da lipozomlara aquaporin yerleştirme işleminin başarılı olduğu bu küçülmenin gözlenmesi ile anlaşılmıştır. PdI değerlerinin düşük olması ise ölçüm sonuçlarının güvenilir olduğunu göstermektedir.

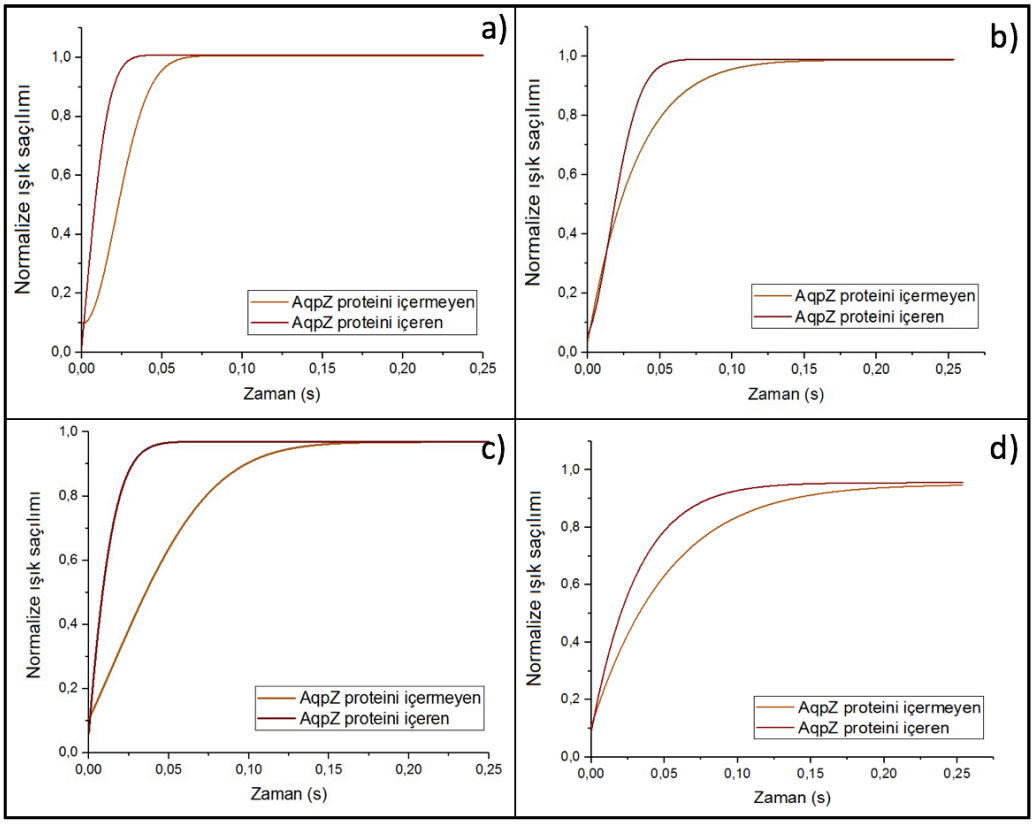
6.3.3. Aquaporinlerin Su Transfer Hızlarının Ölçümleri

Başlık 5.9.1 ve 5.9.2'de verilen prosedür ile protein içermeyen (boş) ve aquaporin proteini içeren lipozomlar hazırlanmıştır. Farklı tuz konsantrasyonlarında stopped-flow ışık saçılımı spektrometresi ile hazırlanan lipozomların su bırakma hızlarına bakılmıştır. Su bırakma hızı ölçüm sonucunda elde edilen k değeri ile doğru orantılıdır. Bu nedenle k değeri ne kadar büyük ise lipozomlardaki su geçişi o kadar hızlıdır denebilir. Denemeler farklı por boyutuna sahip extruder membranları ve farklı yağlar kullanılarak tekrarlanmıştır. Kullanılan yağlar PS-PC (Phosphatidylserine – Phosphatidylcholine) ve DOPC (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine)'dir. Kullanılan extruder membranlarının por boyutları ise 100 nm ve 200 nm'dir. Stop Flow ışık saçılımı spektrometresi cihazı ülkemizde yaygın kullanılan bir cihaz olmadığı için beklenen sonuçların alınması için bazı optimizasyonlar yapılması gerekmiştir. Ölçümlerde tuz konsantrasyonu ve lipozom konsantrasyonlarının önemli olduğu görülmüştür.

İlk ölçümler için osmotik çözelti olarak 0.2 M NaCl konsantrasyonundaki tuzlu su ve 0.5 mg/mL konsantrasyonunda hazırlanan lipozomlar kullanılmıştır. Bu denemeler sonucunda alınan ölçümler beklenen şekilde çıkmadığı için birkaç deneme sonucunda 10 mg/mL konsantrasyonunda lipozom ve minimum 0.85 M NaCl konsantrasyonundaki tuzlu su çözeltisi kullanılmaya karar verilmiştir. Tablo 6.3'te sonuçları verilen deneyler için lipozomlar 10 mg/mL konsantrasyonunda hazırlanmış ve 0.85 M NaCl ve 1.5 M NaCl çözeltileri kullanılmıştır.

Tablo 6.3: Aquaporin proteini içeren ve protein içermeyen lipozomların su transfer hızlarının k (1/s) su transfer katsayısı değerleri kullanılarak kıyaslanması.

Lipozom Boyutu	PS-PC				DOPC			
	0,85 M NaCl		1,5 M NaCl		0,85 M NaCl		1,5 M NaCl	
	- AqpZ	+ AqpZ	- AqpZ	+ AqpZ	- AqpZ	+ AqpZ	- AqpZ	+ AqpZ
100 nm	38.53	93.59	-	-	19.00	76.55	66.00	102.00
200 nm	29.45	38.00	48.68	59.68	16.00	31.50	21.37	41.00



Şekil 6.17: Aquaporin proteini içeren ve protein içermeyen lipozomların su geçirme hızlarının karşılaştırılması. a) PS-PC 100 nm membran, b) PS-PC 200 nm membran, c) DOPC 100 nm membran, d) DOPC 200 nm membran

Benzer çalışmalar ([6], [5], [4]) incelendiğinde *E.coli* aquaporin proteini ile yapılan lipozomların su geçirme hızlarının protein içermeyen lipozomlara göre daha hızlı olduğu gözlenmiştir. Bu çalışmada da aynı sonuçlara ulaşılmıştır. Su geçiş hızlarındaki en büyük fark, DOPC ve 100 nm membran ile hazırlanan lipozomların 0.85 M NaCl konsantrasyonundaki denemeler sonucu görülmüştür (Şekil 6.17).

Su geçirme hızları (Pf) sadece 0.85 M NaCl konsantrasyonu ile yapılan ölçümler için hesaplanmıştır. Aşağıda yalnıca 200nm boş DOPC için bir hesaplama örneği verilmiştir. Buna göre Δosm lipozomların içinde bulunan PBS lipozomların ölçüm sırasında karıştırıldığı 0.85 M NaCl için hesaplanmıştır. Osmolarite değerleri solüsyonların ieltkenlikleri öçülerek hesaplanmıştır. Alınan iletkenlik verileri 0,64 sabit sayısı ile çarpılarak mg/L iyon miktarı hesaplanmıştır. Bu hesap yapılırken PBS içerisinde diğer moleküllere oranla NaCl konsantrasyonunun yüksek olması nedeniyle PBS osmolaritesi NaCl iyonu üzerinden hesaplanmıştır.

- 0.85 M NaCl için iletkenlik = 71197.7 µs/cm
- 1X PBS için iletkenlik = 15950.2 µs/cm
- Δ iletkenlik = 71197.7 µs/cm − 15950.2 µs/cm = 55247.5 µs/cm
- mg/L NaCl=55247.5 µs/cm × 0.64 = 35358.4 mg/L
- [NaCl] = 35.36 g/L ÷ 58.44 g/mol= 0.61 M
- NaCl molekülü 2 iyon içermektedir: ΔOsm = 0.61 × 2 = 1.2 Osm

Hesaplamalar bu değer kullanılarak eşitlik (5.1)'de verilen denklem kullanılarak yapılmıştır. Lipozomların yarıçapları Nano Zetasizer ölçümlerinde elde edilen değerlerdir. 100 nm membran PS-PC ve 200 nm membran DOPC lipidleri ile hazırlanan lipozomlar için su geçirme hızları hesaplanmıştır (Tablo 6.4).

Aquaporin proteini içermeyen, 200 nm membran ve DOPC lipidi kullanılarak hazırlanan lipozomlar için P_f hesabı örnek olarak aşağıda sunulmuştur:

- k = 16.00 s^{-1} (stopped flow ölçüm sonucu)
- r = 87.4 nm (200 nm çapındaki boş lipozom için Nano Zetasizer ölçüm sonucu)
- ΔOsm = 1.2 Osm
- V_w = 18 cm^3/mol

Yukarıda verilen değerler eşitlik (5.1)' de yerine konulmuştur.

$$P_f = \frac{k}{S/V_O \times V_w \times \Delta Osm} \quad (5.1)$$

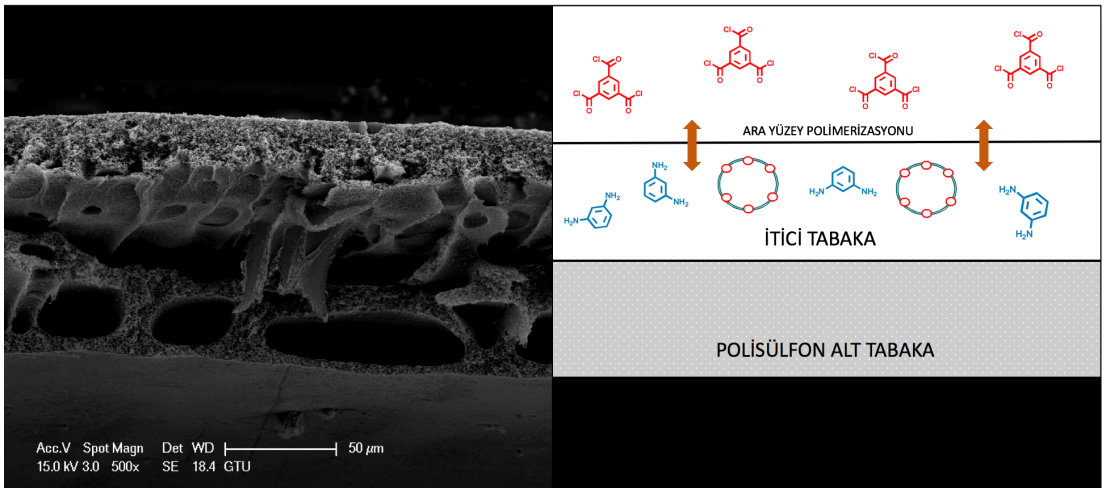
Tablo 6.4: Lipozomların Su Geçirme Hızları.

Lipozom Karakteri	Su Geçirme Hızı (P_f) ($\times 10^{-3}$ cm/s)	
	- AqpZ	+ AqpZ
100 nm PS-PC	3.6	7.2
200 nm DOPC	2.2	2.6

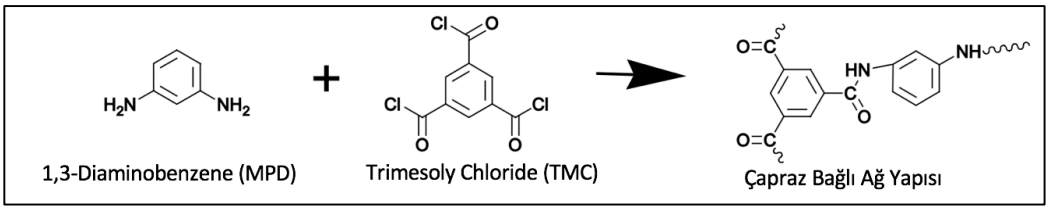
Yapılan hesaplamalar sonucunda Tablo 6.4'te görüldüğü gibi aquaporin proteini içeren lipozomların su transfer hızları daha yüksek bulunmuştur.

6.4. Membran Çalışmaları

Başlık 5.10.1 ve 5.10.2 altında anlatılan membran hazırlama yöntemi kullanılarak lipozom içeren, lipozom içermeden sadece kaplama yapılan ve hiç kaplama yapılmayan membranlar hazırlanmıştır. Membranın katmanları ve her katmandaki moleküler yapılar Şekil 6.18'de SEM görüntüsü üzerinde gösterilmiştir.



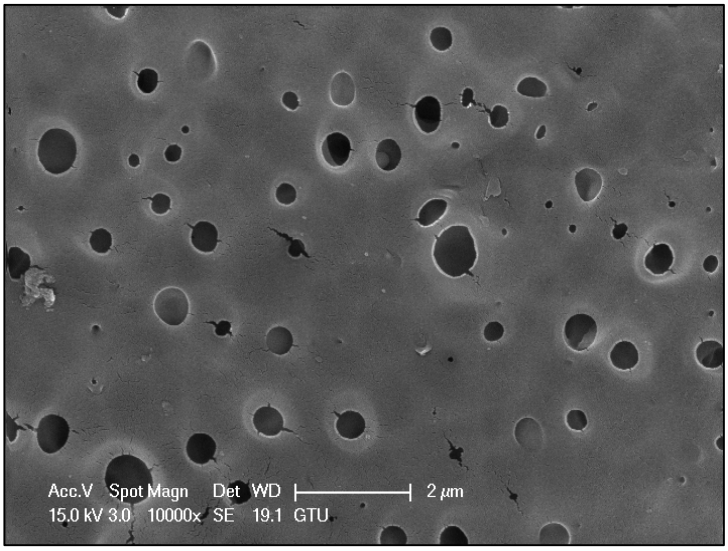
Şekil 6.18: Membran Yapısı.



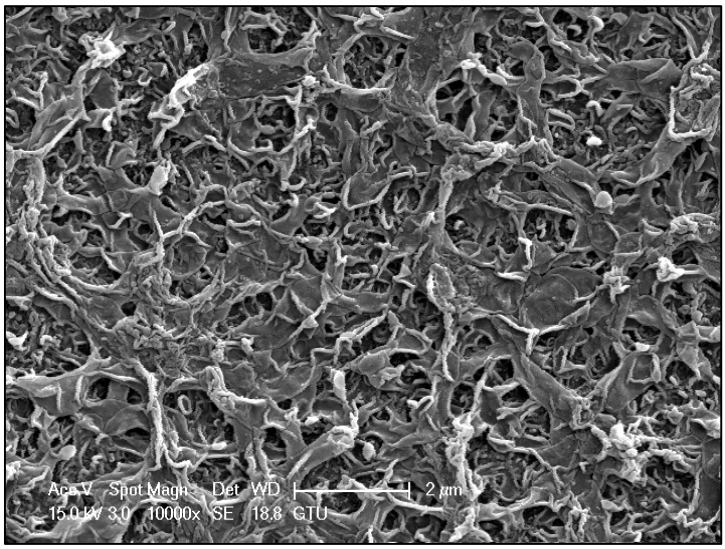
Şekil 6.19: Membran reddetme tabakasının hazırlanması esnasında gerçekleşen tepkime.

6.4.1. Membranların SEM Görüntülemesi

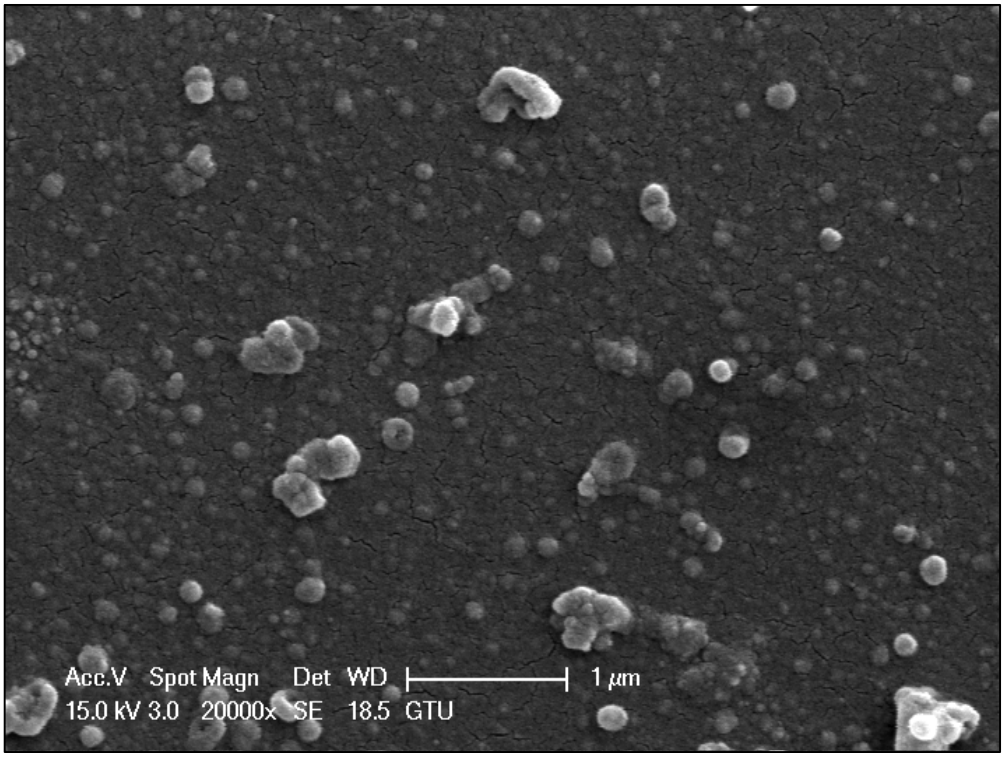
3 farklı hazırlanan membran için SEM görüntüsü yüzey ve kesit için alınmıştır (Şekil 6.20, Şekil 6.21, Şekil 6.22, Şekil 6.23, Şekil 6.24). SEM görüntüleri ile lipozomların başarılı bir şekilde membran yüzeyine yerleştirildiği görülmüştür. Şekil 6.20 ve Şekil 6.21'de ise kaplama işleminin membran yüzeyinde yarattığı değişim açıkça görülmektedir.



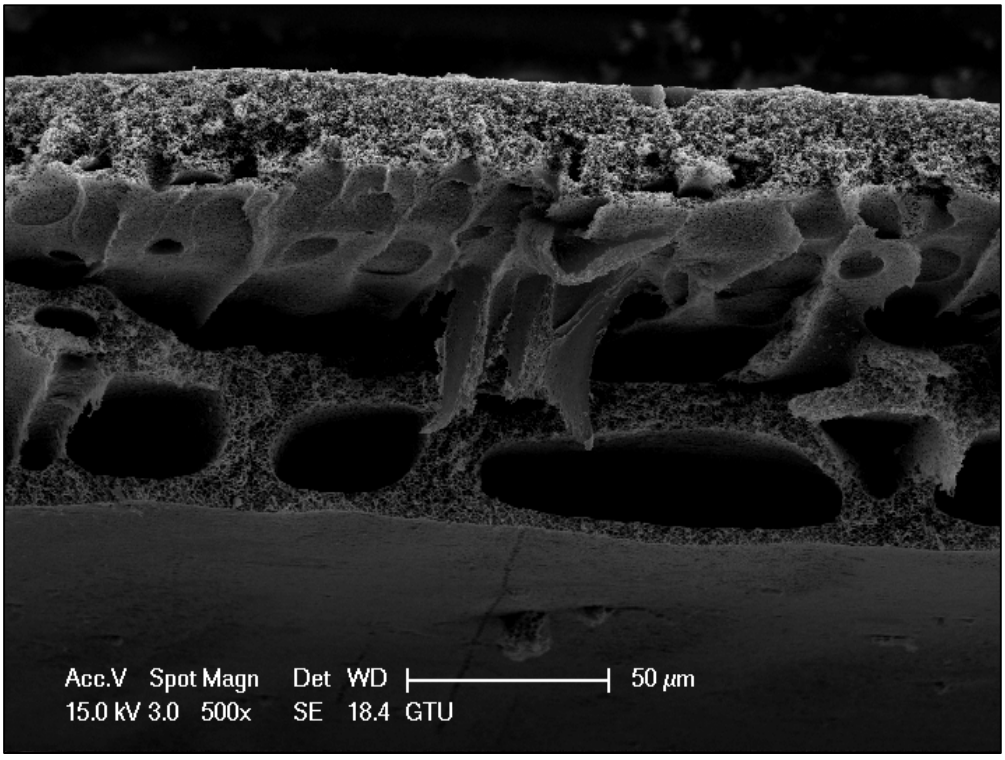
Şekil 6.20: Kaplama yapılmayan PS membran yüzey görüntüsü.



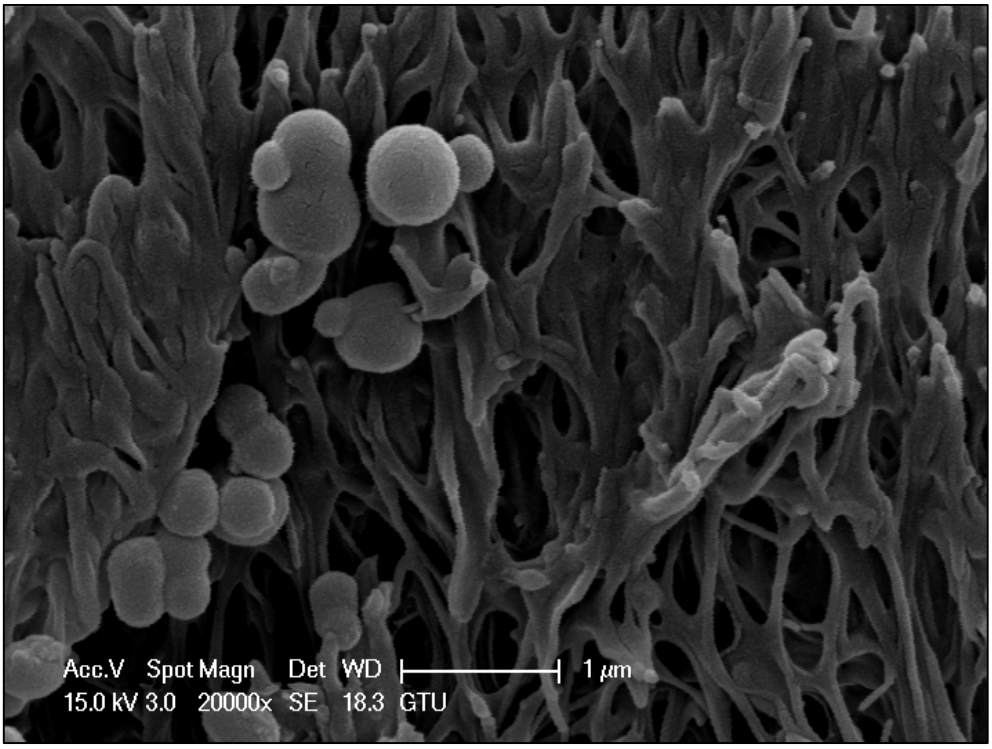
Şekil 6.21: Yüzeyi boş (lipozomsuz) kaplanan membran yüzey görüntüsü.



Şekil 6.22: Yüzeyi lipozomlu kaplanan membran yüzey görüntüsü.



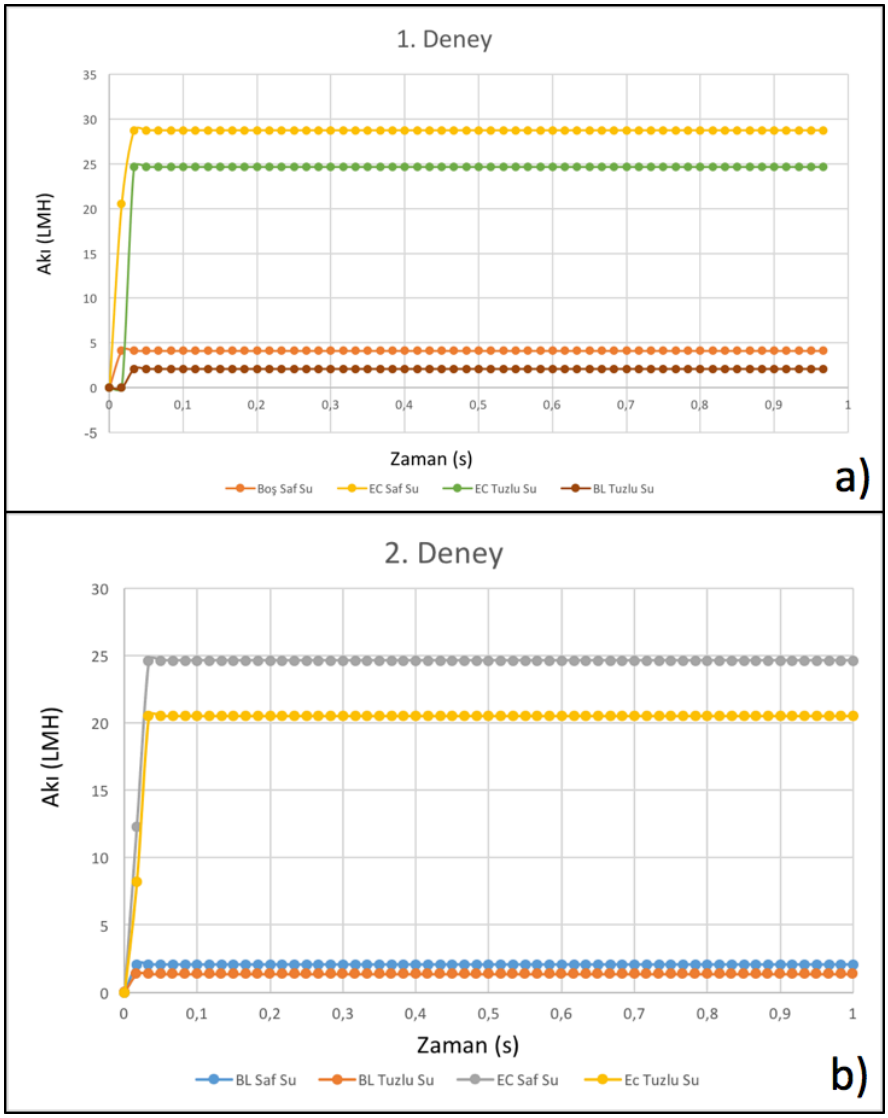
Şekil 6.23: Yüzeyi boş (lipozomsuz) kaplanan membran kesit görüntüsü.



Şekil 6.24: Yüzeyi lipozomlu kaplanan membran kesit görüntüsü.

6.4.2. Dead-End (Ölü Uçlu) Reaktör Sistemi İle Membran Filtrasyonu

Hazırlanan aquaporin proteini içeren ve içermeyen membranların başlık 5.10.4'te verilen dead-end filtrasyon sistemi ile besleme solüsyonu olarak saf su ve 10 mM NaCl içeren su kullanılarak 5 bar basınç altında akıları ölçülmüştür. Bu deney iki kez tekrar edilmiştir ve her deneyde yeni yapılmış membranlar kullanılmıştır. Deneyler sonucunda elde edilen akı-zaman grafikleri Şekil 6.25'te verilmiştir.



Şekil 6.25: Şekil 6.25: Dead-end filtrasyon sistemi ile membranların saf su ve 10 mM NaCl için elde edilen akı-zaman grafikleri. a) 1. Deney, b) 2. Deney

Yapılan iki deney sonucunda da elde edilen sonuçlar benzerdir. Membran yüzeyinin aquaporin içeren lipozomlarla kaplanması membranların su geçirme hızılarını artırmıştır. Akı değerlerinin karşılaştırması Tablo 6.5'te verilmiştir.

Tablo 6.5: Dead-end filtrasyonunda alınan akı verileri.

	AKI (LMH)	
	1.Deney	2.Deney
- AqpZ (Saf Su)	4.1	2.1
+ AqpZ (Saf Su)	28.8	24.7
- AqpZ (10 mM NaCl)	2.1	1.36
+ AqpZ (10 mM NaCl)	24.7	20.6

1. Deney sonucunda saf su geçişlerinde aquaporinlerin varlığı akı değerinde yaklaşık 6 kat artışa, tuzlu su geçişlerinde ise ∼11 kat bir artışa neden olmuştur. 2. deney sonuçlarına bakıldığında aquaporin içeren membranların saf su geçişlerinde ∼ 11 kat ve tuzlu su geçişlerinde ∼14'lük bir artış olduğu görülmüştür.

Membranların tuz itme kapasitesinin tespit edilmesi için 10 mM NaCl içeren su besleme suyu olarak kullanılmış ve membranlardan geçen suların iletkenliklerine bakılmıştır. Su içerisindeki NaCl konsantrayonunun artmasının iletkenliği arttıracağı bilinmektedir. Bu sebeple girişte ölçülen iletkenliğin çıkışta azalması beklenmektedir. Tablo 6.6'te alınan iletkenlik değerleri sağlıklı bir karşılaştırma yapılabilmesi için akı değerleri ile birlikte verilmiştir.

Tablo 6.6: Dead-end ölçümü sonucu alınan iletkenlik değerleri.

	İLETKENLİK (mg/L)	
	1.Deney	2.Deney
Tuzlu Su (10 mM NaCl)	746.9	746.9
- AqpZ (kontrol membranı)	377.6 (2.1 LMH)	559.4 (1.36 LMH)
+ AqpZ	597.76 (24.7 LMH)	629.8 (20.6 LMH)

İletkenlik sonuçlarına bakıldığında aquaporin içeren membranların, tuzu, aquaporin proteini içermeyen membranlara oranla daha az ittiği görülmüştür. Aquaporin içeren membranlar 1. deneyde %19.97 oranında ve 2. deneyde %15.68 oranında tuz itmiştir. Buna karşılık aquaporin içermeyen lipozomlar ile hazırlanan membranlar 1. deneyde %49.44 ve 2. deneyde %25.11 oranında tuz itmiştir. Membran yüzeyi su geçirgenliği oldukça düşük olan bir tabaka ile kaplı olması, aquaporin içermeyen lipozomların su geçişi için herhangi bir kanal içermemesi ve doğal olarak lipid bir yapının suyu ve aynı zamanda tuz iyonlarını kolay geçirmemesi nedeniyle kontrol membranlarında tuz itme değerleri yüksek bulunurken su geçirme hızları oldukça düşüktür. Membranların tuz arıtma kapasitesi akı değerlerinden bağımsız değerlendirilmemelidir.

Membranların tuz itme hızları eşitlik (5.3) kullanılarak hesaplanmıştır. Bulunan değerler Tablo 6.7'da verilmiştir.

Tablo 6.7: Membranların tuz itme hızları.

	TUZ İTME HIZI ($mg/m^2.sa$)	
	1.Deney	2.Deney
- AqpZ	775.5	255.0
+ AqpZ	3683.6	2412.3

Membranların tuz itme hızları incelendiğinde, *E. coli* aquaporini proteini içeren membranların aquaporin içermeyen kontrol membranlara göre çok daha verimli olduğu görülmektedir. Tuz itme hızları 1. deneyde yaklaşık 5 katına ve 2. deneyde ise yaklaşık 10 katına çıktığı gözlenmiştir.

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Dünyada ki global sorunların en büyüklerinden biri su problemidir. Dünyanın dörtte üçü su olsada, bunun yalnızca %3'ü tatlı sudur. Desalinasyon; yani tuzlu su içerisinde ki tuzun arıtılması işlemi günümüzde şimdilik su problemine bulunan en iyi çözümdür. Ozmos denen mekanizma ile doğada tuz konsantrasyonu az olan sular tuz konsantrasyonu çok olan sulara doğru hareket eder. Fakat desalinasyon prosesi için bu işlemin tersini yapmak gerekir. Bu işlem yüksek basınç gerektirdiğinden; yüksek enerji gerekir ve bu da ekonomik değildir. Dünyada kullanılan bu membran proseslerini iyileştirmek ve geliştirmek için birçok çalışma yürütülmektedir.

Tez çalışması kapsamında bu amaca hizmet edecek yeni bir biyomimetik membran tasarlanmış ve üretimi gerçekleştirilmiştir. Canlı hücrelerin membranlarında bulunan su transfer mekanizması sentetik bir membrana aktarılmıştır. Bu mekanizma aktarılırken aquaporin proteinleri kullanılmıştır ve proteinlerin işlevi bozulmamıştır.

Agre ve arkadaşları [16] biyolojik membranların sahip olduğu mükemmel su taşıma mekanizmasının yapıtaşı olan aquaporinZ proteinlerini keşfetmişlerdir. Bu buluşu sayesinde Peter Agre 2008 yılında Nobel kimya ödülünün sahibi olmuştur.

Tuzlu sudan içme suyu eldesi için kullanılan membran proseslerinin iyileştirilmesinde aquaporinZ proteinin kullanılması çeşitli çalışmalara konu olmuştur. Bu çalışmalardan bir tanesi Kumar ve arkadaşları [4] tarafından yapılmıştır. Bu çalışma sonunda aquaporinZ proteini yerleştirilen membranların su geçirgenkilleri ve bileşenleri ayırma kabiliyetinin aquaporinZ proteini içermeyen membranlara göre artış gösterdiği görülmüştür. Aynı sonuca Sun ve arkadaşları [5], Xie ve arkadaşları [6], Zhao ve arkadaşları [7] ve Qi ve arkadaşları da [8] yaptıkları çalışmada ulaşmışlardır.

E. coli AqpZ aquaporini, ilk olarak Calamita ve arkadaşları (1995) [27] tarafından klonlanmıştır. Daha sonraki karakterizasyon çalışmaları Borgnia ve arkadaşları (1999) [15] tarafından yürütülmüş ve aquaporin tetramerinin gliserol geçirgenliğine karşı oldukça kararlı olduğu gösterilmiştir. *AqpZ*; ekspresyon özelliklerinin incelenmesi için çeşitli araştırmacılar tarafından (Lian ve ark. 2009 [41], Xu ve ark. 2010 [42], Wang ve ark. 2015 [43]) ve detaylı yapı analizi için Savage ve arkadaşları (2003) tarafından farklı ifade vektörlerine klonlanmıştır.

Su arıtımı ve ters osmoz proseslerinde kullanılan filtrasyon membranlarının tuz reddi kapasitesinin arttırılması gibi farklı alanlarda uygulama potansiyeline sahip olduklarından, yüksek saflıkta ve yüksek hacimlerde aquaporinlerin üretimi önemlidir. Bu amaçla, His etiketli *aqpZ*'nin su taşıma potansiyeli daha önce birçok araştırmada karakterize edilmiştir (Borgnia ve arkadaşları 1999 [15]; Kumar ve arkadaşları 2007 [4]; Erbakan ve arkadaşları 2014 [44]).

Bu tez çalışması kapsamında ilk olarak *E. coli*'nin AqpZ proteini saf halde elde edilmek üzere pGEX-4T-2 vektörüne klonlanmıştır. Klonlama PCR ve enzim kesimi sonucu doğruladıktan sonra rekombinant plasmid dizi analizine gönderilmiş ve BLAST aramasında klonlanan *E. coli* BL21 gen disisinin gen bankasında bulunan *E. coli K12-aqpZ* genine %99 benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir.

Klonlama başarıyla tamamlandıktan sonra rekombinat pGEX-4T-2 vektörü yerleştirilmiş BL21 hücreleri büyütülmüş ve protein ekspresyonu için IPTG ile indüklenmiştir. Saf GST-AqpZ proteini tetramer formda elde edilmiştir.

Farklı protein ifadelerinin birbirlerine göre üstünlükleri ve dezavantajları vardır. GST etiketi, yüksek protein verimliliği, proteolize dirençliliği ve bir adımda saflaştırma şansı olduğu için tercih edilmektedir[45]. Bu çalışmada, GST-AqpZ, hücre zarı içinde verimli bir şekilde eksprese edilmiş ve yerleştirilmiştir ve GST-AqpZ, inklüzyon cisimcikleri veya hücre sitoplazmasında bulunmamıştır.

AqpZ tetrameri, tetramer yapısını karakterize etmek için pH, SDS ve β-merkaptoetanol gibi farklı denatüre edici ajanlar içerisinde inkübe edilmiştir. Çalışmamızda pH 3-8 olan tamponda inkübasyon sonucunda tetramer GST etiketli AqpZ'de herhangi bir değişiklik meydana gelmemiştir. %1-3 SDS'de 1-3 gün inkübasyon, tetramer formun bozulmasına neden olmuş ve monomer haline gelmesine neden olmuştur. 125-500 mM β-merkaptoetanolde bekletme tetramer yapısını değiştirmemiştir. Sadece en yüksek miktar β-merkaptoetanol konsantrasyonu (1M), SDS PAGE jelinde monomer görünümü ile sonuçlanmıştır. Buna karşın, Borgnia ve arkadaşlarının (1999) çalışmasında [15], 1000 mM-merkaptoetanolün, histagged AqpZ'nin agregasyonuna neden olduğu bulunmuştur. Sonuçlar, GST etiketinin, denatüre edici maddelere karşı protein direncini artırabileceğini göstermektedir.

Saflaştırılmış AqpZ proteinleri, akuaporin içeren lipozomların hazırlanması için kullanılmıştır. Lipozomların boyut ve şekil analizi için SEM görüntüleri ve Nano Zetasizer ölçümleri alınmıştır. SEM fotoğrafları PS:PC ve DOPC lipozomlarının homojen olduğunu göstermektedir.

AquaporinZ proteini içeren lipozomların su transfer hızları, beklendiği gibi protein içermeyen lipozomlara kıyasla daha yüksek bulunmuştur. Bu sonuç GST ile birlikte ifade edilen AqpZ'nin işlevsel tetramer yapısınının bozulmadığını göstermektedir. Lipozomların farklı lipidler (DOPC ve PS:PC) ile hazırlanması AqpZ'den su geçişini etkilemiştir.

Sentetik bir fosfolipid olan DOPC'nin, aquaporin su transfer kapasitesinin ölçümü için daha verimli olduğu bulunmuştur, çünkü DOPC lipozomları boş olan (aquaporin içermeyen) su transfer oranının, boş PS: PC lipozomlarından daha az olduğu bulunmuştur. Soya fasulyesi PC'ye kıyasla sızıntı oranının düşük olması nedeniyle, yumurta PC özellikle ilaç kapsülleme çalışmaları için tercih edilmiştir (Wang ve ark., 2009 [41]). PC lipidi, negatif yüklü bir fosfolipid olan PS ile karıştırıldığında, lipozomun hidrofilitesi artar ve bu, su transfer oranının artmasına neden olabilir. Sentetik lipozomların daha istikrarlı özelliklere sahip olduğu ve saflıklarının daha yüksek olduğu bilinmektedir (Li ve ark., 2015 [19]).

Lipozom boyutu, boş ve AqpZ içeren lipozomların su geçirgenlik hızını etkileyen bir parametre olduğu görülmüştür.

Su filtreleme ve tuz reddinde daha verimli membranların imalatı, yüksek tuz giderme maliyetini düşürmek için bir çözüm olabilir. Akuaporin içeren filtrasyon membranlarının üretilmesine yönelik çalışmalar gün geçtikçe artmakta, ancak literatürde hala çok az çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmaların çoğunda *E. coli* aquaporinleri kullanılmıştır. Örneğin Kumar ve ark. (2012) [46] ve Li ve ark. (2015) [19], *E. coli* AqpZ'yi kullanarak aquaporin ile hareketsiz hale getirilmiş biyomimetik membranlar geliştirmişlerdir. Çalışmaların sonuçları, oldukça tatmin edicidir, *E. coli* aquaporin gömülü membranların su geçirgenliği ve tuz reddi kapasitesi yüksektir.

Bu araştırmalarda polisülfon destekleyici polimer malzeme olarak ve kaplamalar esnasında TMC-MPD kullanılmış ve çapraz akış veya dead-end filtrasyon sistemleri uygulanmıştır. Wagh ve arkadaşlarının (2015) çalışmasında aquaporin taşıyan lipozomlar için gum arabic kullanılmış ve membran yapımı için

polybenzimidazole (PBI), 4-chloromethyl benzoic acid (CMBA), carboxy-methyl PVA (PVA–COOH) kullanılmıştır. Çalışma sonucunda aquaporin içeren membranların tuz itme kapasitesi oldukça yüksek bulunmuştur [47].

Canlı hücre membranındaki su transfer mekanizması başarılı bir şekilde sentetik membran üzerine aktarılmıştır. DOPC lipozomları daha kararlı olduğundan, membran yapımında akuaporinler DOPC'ye gömülmüş ve kaplanmış polisülfon membranda immobilize edilmiştir. Çalışmamız Zhao ve arkadaşlarının (2012) [7] çalışmasına benzer olup, aynı immobilizasyon yöntemini kullanılıştır. Filtrasyon deneyleri sonucunda aquaporin içeren membranların su filtrasyon hızları, protein içermeyen lipozom içeren membranlardakinden daha yüksek bulunmuş ve aquaporinlerin, membranların su akış hızlarını arttırdığı düşünülmekedir. Tuz itme kapasitesi aquaporin içeren membranlar için 1. deneyde %19.97, 2. deneyde %15.68 ve buna karşılık aquaporin içermeyen lipozomlar ile hazırlanan membranlar için 1. deneyde %49.44 ve 2. deneyde %25.11 olarak bulunmuştur. Zhao ve ark., bu yöntemin, *E. coli* aquaporin içeren membranların tuz reddi kapasitesini arttırmak için modifiye edilmesi veya geliştirilmesi gerektiğini belirtmiştir [7]. Filtrasyon deneyleri için dead-end filtrasyon sistemini kullanılmıştır. Basıncın uygulanması aquaporinlerin yapısını da etkileyebileceği düşünülmektedir.

E. coli aquaporin proteini ile hazırlanan membranların akıları oldukça hızlı bulunmuşken tuz itme kapasitesinin protein içermeyen membranlara kıyasla daha düşük olduğu görülmüştür. Ancak bu değerler analiz edilirken yalnızca % tuz itme değerlerine bakılarak bir değerlendirme yapılması sağlıklı olmayacaktır. Çünkü burada akı değeri, saatte itilen tuz miktarını etkileyen önemli bir parametredir. Aquaporin içeren membranların su akıları oldukça yüksek olmasına karşın tuz itme kapasiteleri %15-18 civarındadır. Bu nedenle saatte arıtılan tuzlu su miktarı düşünülürse bu tez kapsamında hazırlanan AqpZ içeren membrabların tuz arıtımında kullanılma potansiyeli yüksektir. Aquaporinlerin varlığı membranların tuz itme hızlarında 1. deneyde yaklaşık 4 kat ve 2. deneyde ise yaklaşık 9 kat artışa neden olmuştur. Ancak membranların % tuz itme kapasitelerinin arttırılması çok daha verimli tuz arıtımı sağlayacaktır, bunun için lipozom hazırlama esnasında kullanılan protein:lipozom oranının, lipozom boyutunun ve membran yüzeyine ilave edilen

lipozom konsantrasyonunun ayrıca sıcaklık gibi çevresel parametrelerinde optimize edilmesi gerekmektedir.

Bu tez çalışmasında ara yüzey polimerizasyonu tercih edilmesindeki en önemli sebepler; methodun basit, ekonomik ve yüzeyde bozulma olmadan geniş yüzeylerde membran hazırlanabilmesidir. Elektron mikroskop görüntüleri de göstermiştir ki lipozomlar membran yüzeyindeki MPD-TMC tabakasında yapıları bozulmadan kimyasal olarak bağlanmış ve hedeflenen malzeme başarılı bir şekilde üretilmiştir. Yüksek mekanik dayanıklılığın yüksek ve stabil olması tuz arındırma prosesinde kritik bir gerekliliktir. Ayrıca yapılan kaplama lipozomlara çevresel faktörlere karşı bir koruma sağlamaktadır. Üretilen membranlar ile daha yüksek tuz konsantrasyonları (deniz suyu tuz oranı) ile ileride denemeler yapılmalıdır. Akı artışı membranın akuaporin mekanizmasının ne kadar başarılı şekilde adapte edildiğini göstermektedir. Çalışma, çevre teknolojileri açısından biyomimik yaklaşımının yeni malzeme geliştirme konusundaki kapasitesini ortaya koymaktadır. Bu çalışma ileride yapılacak çalışmalardaki benzer yaklaşımlara ışık tutacak niteliktedir.

KAYNAKLAR

[1] Jury W. A., Vaux H., (2005), "The role of science in solving the world's emerging water problems", Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america, 102 (44), 15715-15720.

[2] Bachmann T., Wagner H., (2011), "The three-dimensional shape of serrations at barn owl wings: towards a typical natural serration as a role model for biomimetic applications", Journal of Anatomy, 219 (2), 192-202.

[3] Nielsen C. H., (2009), "Biomimetic membranes for sensor and separation applications", Analytical and Bioanalytical Chemistry, 395 (3), 697-718.

[4] Kumar M., Grzelakowski M., Zilles J., Clark M., Meier W., (2007), "Highly permeable polymeric membranes based on the incorporation of the functional water channel protein Aquaporin Z", Proceedings of the National Academy of Sciences, 104 (52), 20719-20724.

[5] Sun G., Chung T.-S., Jeyaseelan K., Armugam A., (2013), "Stabilization and immobilization of aquaporin reconstituted lipid vesicles for water purification", Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 102, 466-471.

[6] Xie W., He F., Wang B., Chung T.-S., Jeyaseelan K., Armugam A., Tong Y. W., (2013), "An aquaporin-based vesicle-embedded polymeric membrane for low energy water filtration", Journal of Materials Chemistry A, 1 (26), 7592-7600.

[7] Zhao Y., Qiu C., Li X., Vararattanavech A., Shen W., Torres J., Hélix-Nielsen C., Wang R., Hu X., Fane A. G., Tang C. Y., (2012), "Synthesis of robust and high-performance aquaporin-based biomimetic membranes by interfacial polymerization-membrane preparation and RO performance characterization", Journal of Membrane Science, 423–424, 422-428.

[8] Qi S., Wang R., Chaitra G. K. M., Torres J., Hu X., Fane A. G., (2016), "Aquaporin-based biomimetic reverse osmosis membranes: Stability and long term performance", Journal of Membrane Science, 508, 94-103.

[9] Bar-Cohen Y., (2006), "Biomimetics—using nature to inspire human innovation", Bioinspiration & Biomimetics, 1 (1), 1.

[10] Gordon J. E., Gordon J. E., (1991), "The new science of strong materials: or why you don't fall through the floor", Edition, Penguin UK.

[11] Zhao J., Zhao X., Jiang Z., Li Z., Fan X., Zhu J., Wu H., Su Y., Yang D., Pan F., (2014), "Biomimetic and bioinspired membranes: preparation and application", Progress in Polymer Science, 39 (9), 1668-1720.

[12] Nikaido H., Vaara M., (1985), "Molecular basis of bacterial outer membrane permeability", Microbiological reviews, 49 (1), 1.

[13] Schirmer T., (1998), "General and specific porins from bacterial outer membranes", Journal of Structural Biology, 121 (2), 101-109.

[14] Nikaido H., (1992), "Porins and specific channels of bacterial outer membranes", Molecular Microbiology, 6 (4), 435-442.

[15] Borgnia M. J., Kozono D., Calamita G., Maloney P. C., Agre P., (1999), "Functional reconstitution and characterization of AqpZ, the E. coli water channel protein", Journal of Molecular Biology, 291 (5), 1169-1179.

[16] Agre P., King L. S., Yasui M., Guggino W. B., Ottersen O. P., Fujiyoshi Y., Engel A., Nielsen S., (2002), "Aquaporin water channels - from atomic structure to clinical medicine", The Journal of Physiology, 542 (1), 3-16.

[17] Benga G., (2012), "On the definition, nomenclature and classification of water channel proteins (aquaporins and relatives)", Molecular Aspects of Medicine, 33 (5), 514-517.

[18] Vemuri S., Rhodes C., (1995), "Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review", Pharmaceutica Acta Helvetiae, 70 (2), 95-111.

[19] Li J., Wang X., Zhang T., Wang C., Huang Z., Luo X., Deng Y., (2015), "A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems", Asian Journal of Pharmaceutical Sciences, 10 (2), 81-98.

[20] Verkman A., Mitra A. K., (2000), "Structure and function of aquaporin water channels", American Journal of Physiology-Renal Physiology, 278 (1), F13-F28.

[21] Alleva K., Chara O., Amodeo G., (2012), "Aquaporins: another piece in the osmotic puzzle", FEBS Lett, 586 (19), 2991-2999.

[22] Murata K., Mitsuoka K., Hirai T., Walz T., (2000), "Structural determinants of water permeation through aquaporin-1", Nature, 407 (6804), 599.

[23] Jung J. S., Preston G. M., Smith B. L., Guggino W. B., Agre P., (1994), "Molecular structure of the water channel through aquaporin CHIP. The hourglass model", Journal of Biological Chemistry, 269 (20), 14648-14654.

[24] Zhao C.-X., Shao H.-B., Chu L.-Y., (2008), "Aquaporin structure–function relationships: water flow through plant living cells", Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 62 (2), 163-172.

[25] Yasui M., (2004), "Molecular mechanisms and drug development in aquaporin water channel diseases: structure and function of aquaporins", Journal of Pharmacological Sciences, 96 (3), 260-263.

[26] Soupene E., King N., Feild E., Liu P., Niyogi K. K., Huang C.-H., Kustu S., (2002), "Rhesus expression in a green alga is regulated by CO2", Proceedings of the National Academy of Sciences, 99 (11), 7769-7773.

[27] Calamita G., Bishai W. R., Preston G. M., Guggino W. B., Agre P., (1995), "Molecular cloning and characterization of AqpZ, a water channel from Escherichia coli", Journal of Biological Chemistry, 270 (49), 29063-29066.

[28] Shen Y.-x., Si W., Erbakan M., Decker K., De Zorzi R., Saboe P. O., Kang Y. J., Majd S., Butler P. J., Walz T., (2015), "Highly permeable artificial water channels that can self-assemble into two-dimensional arrays", Proceedings of the National Academy of Sciences, 112 (32), 9810-9815.

[29] Faucheux S., Froger G., (1995), "Decision-making under environmental uncertainty", Ecological Economics, 15 (1), 29-42.

[30] André B., (1995), "An overview of membrane transport proteins in Saccharomyces cerevisiae", Yeast, 11 (16), 1575-1611.

[31] Cheryan M., (1998), "Ultrafiltration and microfiltration handbook", Edition, CRC press.

[32] Metcalf, Eddy, Burton F. L., Stensel H. D., Tchobanoglous G., (2003), "Wastewater engineering: treatment and reuse", Edition, McGraw Hill.

[33] Aslan M., (2016), "Membran Teknolojileri", 1. Baskı, Türkiye Çevre Koruma Vakfı.

[34] Nicolaisen B., (2003), "Developments in membrane technology for water treatment", Desalination, 153 (1-3), 355-360.

[35] Scott K., Hughes R., (2012), "Industrial membrane separation technology", Edition, Springer Science & Business Media.

[36] Baker R. W., (2004), "Membrane technology and applications", John Wiley & Sons, Ltd, 96-103.

[37] Sablani S., Goosen M., Al-Belushi R., Wilf M., (2001), "Concentration polarization in ultrafiltration and reverse osmosis: a critical review", Desalination, 141 (3), 269-289.

[38] Web 1, (2017), https://worldwide.promega.com/products/pcr/pcr cloning/pgem-t-vector-systems/), (Erişim Tarihi: 20.05.2017).

[39] Web 2, (2017), http://www.tiandz.com/product/2572.html, (Erişim Tarihi: 20.05.2017).

[40] Web 3, (2017), https://avantilipids.com/tech-support/liposome-preparation/, (Erişim Tarihi: 15.05.2917).

[41] Lian J., Ding S., Cai J., Zhang D., Xu Z., Wang X., (2009), "Improving aquaporin Z expression in Escherichia coli by fusion partners and subsequent condition optimization", Applied Microbiology and Biotechnology, 82 (3), 463-470.

[42] Xu Z., Lian J., Cai J., (2010), "Efficient expression of aquaporin Z in Escherichia coli cell-free system using different fusion vectors", Protein and Peptide Letters, 17 (2), 181-185.

[43] Ding W., Cai J., Yu Z., Wang Q., Xu Z., Wang Z., Gao C., (2015), "Fabrication of an aquaporin-based forward osmosis membrane through covalent bonding of a lipid bilayer to a microporous support", Journal of Materials Chemistry A, 3 (40), 20118-20126.

[44] Erbakan M., Shen Y.-x., Grzelakowski M., Butler P. J., Kumar M., Curtis W. R., (2014), "Molecular cloning, overexpression and characterization of a novel water channel protein from Rhodobacter sphaeroides", PLoS One, 9 (1), e86830.

[45] Harper S., Speicher D. W., (1997), "Expression and purification of GST fusion proteins", Current Protocols in Protein Science, 6.6. 1-6.6. 21.

[46] Kumar M., Habel J. E., Shen Y.-x., Meier W. P., Walz T., (2012), "High-density reconstitution of functional water channels into vesicular and planar block copolymer membranes", Journal of the American Chemical Society, 134 (45), 18631-18637.

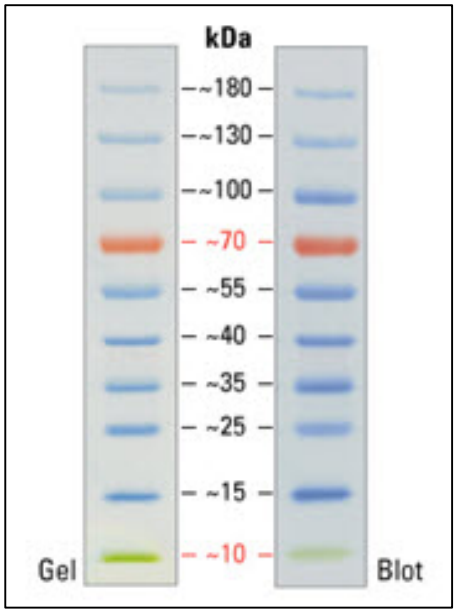
[47] Wagh P., Parungao G., Viola R. E., Escobar I. C., (2015), "A new technique to fabricate high-performance biologically inspired membranes for water treatment", Separation and Purification Technology, 156, 754-765.

ÖZGEÇMİŞ

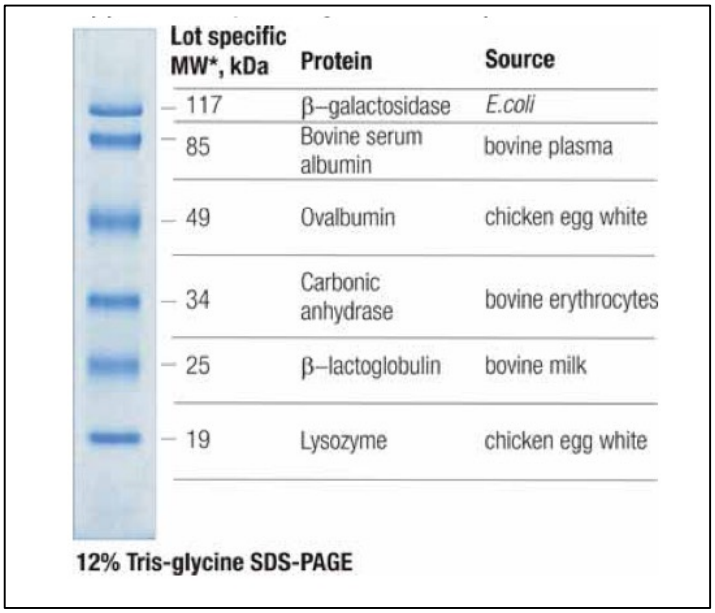
1992 yılında İstanbul'da doğdu. Erenköy Kız Lisesi'nde lise eğitimini gördü. 2010 yılında Hacettepe Üniversitesi Fizik Mühendisliği bölümünde lisans eğitimine başladı. 2015 yılında mezun oldu. 2015 yılında Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Çevre Mühendisliği Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladı.

EKLER

Ek A: Kullanılan Jel Markerları



Şekil A1.1: Thermoficher page ruler prestained protein ladder



Şekil A1.2: Fermentas Prestained Protein MW Marker