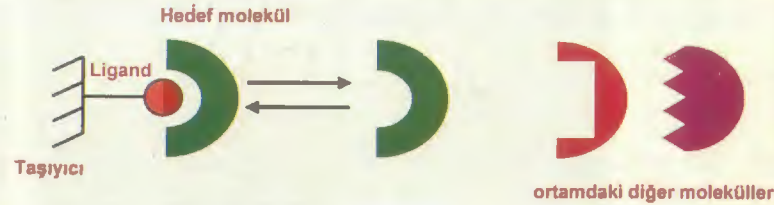


Cram, Lehn ve Pederson'un 1987'de Nobel ödülünü almalarından bu yana "Moleküler Tanıma" ifadesi dünyanın her yerinde büyük ilgi görmeye başlamıştır. Moleküler tanıma bütün temel biyolojik süreçlerde makromoleküllerin seçici etkileşimlerine rehberlik eder. Dolayısıyla moleküler tanıma kavramı, kimyasal, fizyolojik ve farmakolojik birçok olayın anlaşılmasında etkin bir araç olabilir. Biyoteknolojide biyolojik tanıma özelliğine sahip yapıların keşfi ve bu etkileşimlerin mekanistik olarak kavranması teşhis ve tedavi amacıyla kullanılan biyofonksiyonel yapay moleküllerin geliştirilmesi ve seçici ayırma-saflaştırma yöntemlerinin temellerinin oluşturulmasının çıkış noktalarıdır.

Modern biyoteknolojilerde karşılaşılan en önemli sorunlardan biri de biyomoleküllerin (proteinler, enzimler, hormonlar, antibiyotikler ve antijenler gibi) bulunduğu çok bileşenli karmaşık ortamlardan (kan, vücut sıvıları ve mikrobiyal kültür ortamları gibi) seçici olarak kazanılması ya da saflaştırılmasıdır. Bu moleküllerin elde edilmesinde tüm maliyetin yüzde 50-80'ini ayırma ve saflaştırma işlemleri oluşturmaktadır. Günümüzde laboratuvar ya da

endüstriyel ölçekli yaklaşımlarda boyut, elektriksel yük, yoğunluk gibi ayırt edici özelliklerden yararlanılarak biyomoleküller saflaştırılmaktadır. Bu amaçla, çok değişik yöntemler geliştirilmiş olmasına rağmen halen konuyla ilgili yoğun araştırmalar devam etmektedir. Klasik ayırma yöntemlerinde "Seçicilik"ten bir başka deyişle "Moleküler Tanıma" kavramlarından bahsetmek güçtür. Proteinler, antikor ve antijenler, ilaçlar ve hücreler gibi birçok biyolojik yapının, biyolojik ve kimyasal özelliklerinden yararlanarak izole edilmesinde ve saflaştırılmasında kullanılan "Afinite kromatografisi", saflaştırma teknikleri arasında seçiciliği ve duyarlılığı ile eşsiz bir yer tutmaktadır. Klasik yöntemlerden farklı olarak, bu teknikte biyolojik moleküller çok seçici olarak "Biyolojik Tanıma" yeteneğine sahip "Ligandlar" kullanılarak saflaştırılır (Şekil 1).

Ligand, kimyasal bağ ve "Taşıyıcı" adı verilen katı bir desteğe bağlanır. Taşıyıcı olarak genellikle değişik şekil ve geometrilere (mikroküreler, membranlar ve hollow-fiberler gibi) hazırlanan polimerler kullanılmaktadır (Şekil 2). Afinite kromatografisinde ligand olarak proteinler, enzim substratları ve inhibitörleri, antikor ve antijenler, nükleik asitler, hormon

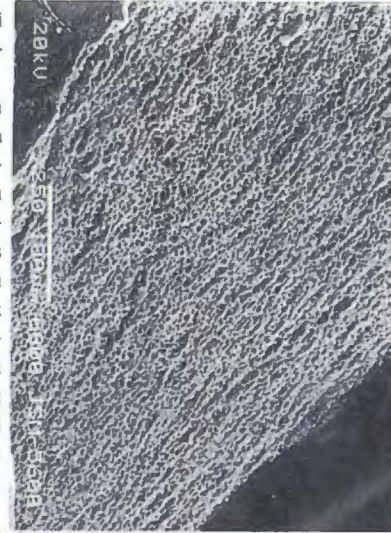
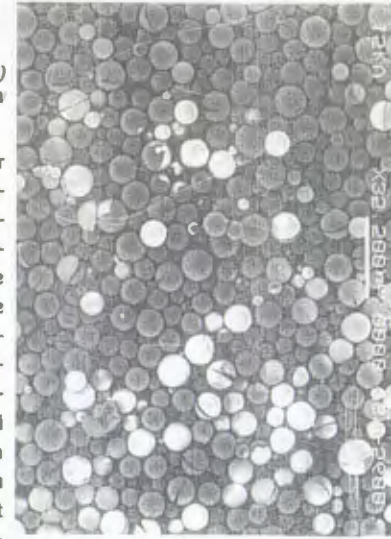


Şekil 1- Biyofanille Kromatografisinin Temel Prensipleri.

Prof.Dr. Adil Denizli
Hacettepe Üniversitesi Kimya Bölümü
Biyokimya ABD Başkanı
Biyokimya Anabilim Dalı Türkiye Bilimler Akad. Üyesi

Proteinlerin Bugünü ve Geleceği

Şekil 2- Biyofanille Taşıyıcıları; (a) Mikroküre, (b) Membran, (c) Hollow Fiber.



reseptörleri ve karbonhidratlar gibi biyomoleküller kullanılmaktadır. Afinite kromatografisi ile yüzlerce biyomolekülün saflaştırılması başarı ile gerçekleştirilmektedir. Afinite kromatografisi ile hedef proteinin çok saf olarak elde edilmesinin yanısıra, DNA, glikolipidler, toksinler ve virüsler gibi kirletici unsurları protein yapılarından uzaklaştırmaları da mümkündür. Fakat yöntemin endüstriyel boyutlarda uygulanmasında en önemli kısıtlayıcı faktör "Ligand"ın oldukça pahalı olmasıdır.

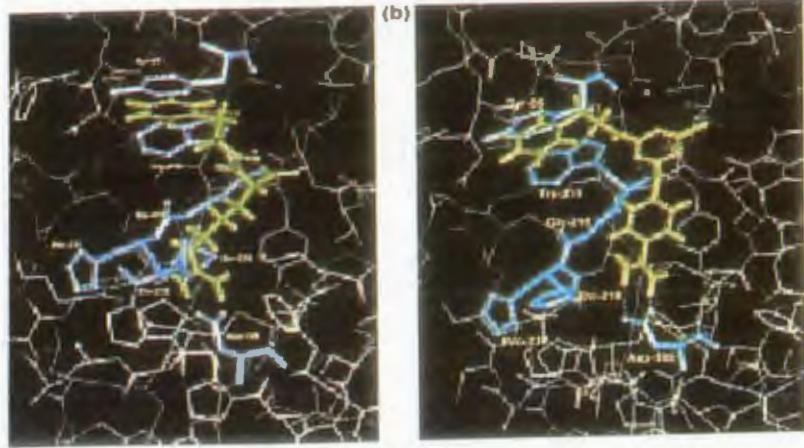
Biyolojik kökenli ligandların diğer dezavantajları arasında büyük molekül olmaları, biyolojik kökenlerinden dolayı yapılarındaki kirletici maddelerin varlığının tespiti için hassas analitik yöntemlerin gerekliliği ve sterilizasyona karşı düşük kararlılıkları sayılabilir. Bu nedenlerden dolayı "Biyolojik Seçiciliği" yüksek ve daha ucuz yöntemlerin geliştirilmesi yönünde araştırmalar yoğun olarak devam etmektedir.

Biyomimetik Ligandlar

Son yıllarda, biyolojik molekülleri taklit ederek saflaştırılması istenilen hedef protein ile moleküler tanıma temeline göre etkileşim kurabilen "Biyomimetik" yapay ligandların geliştirilmesi yönünde önemli adımlar atılmıştır. Biyomimetik moleküllerin ayırma ve saflaştırma işlemlerinin yanısıra biyoteknoloji, tıp ve biyoanalitik alanlarında son derece yararlı kullanımları da söz konusudur. Son yıllarda özellikle bilgisayar simülasyon-modelleme sistemlerindeki ve

kombinatoriyal kimyadaki önemli gelişmeler sonucunda çok seçici ligandların sentezlenmesi mümkün hale gelmiştir. Biyomimetik ligandların biyo-ligandlara göre en önemli avantajı ucuz ve küçük moleküller olmasıdır. Ayrıca sterilenebilme kolaylıkları ve tekrar tekrar kullanıma izin vermeleri de biyomimetik ligand taşıyan afinite taşıyıcılarının maliyetlerini önemli ölçüde azaltan unsurlar arasında sayılabilir. Biyomimetik ligandlara ilk örnekler dipeptid gibi protein yapısından varolan doğal motifleri taklit eden tekstil boyalardır. Yakın dönemde geliştirilen biyomimetik ligandlar ile hücre kültürlerinden monoklonal antikorların ve insan plazmasından immunoglobulin-G (IgG) alt sınıflarının saflaştırılmasında önemli başarılar elde edilmiştir. IgG saflaştırılmasında kullanılan en önemli afinite ligandı "Staphylococcus aureus" bakterisinin hücre duvarından elde edilen "Protein A"dır. Fakat Protein A çok pahalı bir molekül olduğundan Protein-A mimetik ligand geliştirilmiştir. Şekil 3 a'da Protein A-IgG arasındaki kompleks yapı (yeşil, fenil alanin tirozin dipeptid motifini, noktalı çizgiler ise molekül içi ve moleküller arası hidrojen bağlarını göstermektedir), Şekil 3 b'de ise Protein A mimetik ligand ve IgG kompleks yapının moleküler modeli görülmektedir (kırmızı, ligand molekülünü göstermektedir).

Bir başka örnek ise kallikrein için geliştirilen biyomimetik ligandlardır. Bu kapsamda Şekil 4 a domuz pankreatik



Şekil 3- (a) Protein A-IgG. (b) Biyomimetik Ligand-IgG Kompleks Yapısı.

karşı kullanılan ve kanser tedavisinde önemli bir ticari protein olan interferonun saflaştırılmasında da yapay biyomimetik ligandların kullanıldığı not edilmektedir. Bu örneklerin yanı sıra çok sayıda biyomolekülün biyomimetik ligandlar ile saflaştırıldığı vurgulanması gereken bir husustur.

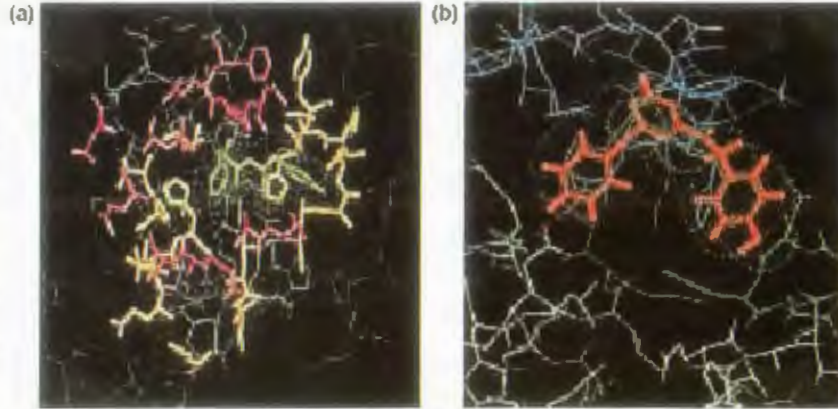
biyomimetik ligandlar ile saflaştırıldığı vurgulanması gereken bir husustur.

Moleküler Baskı Yöntemi

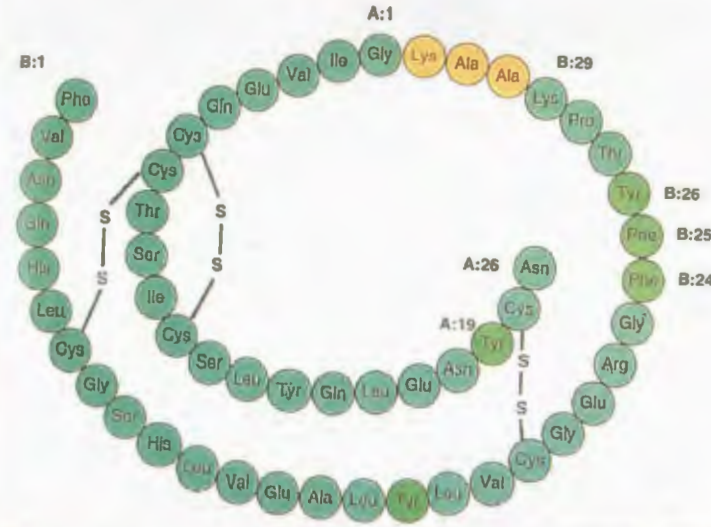
Moleküler tanıma temeline dayanan ayırma sistemleri arasında "Moleküler Baskı" yöntemi ile hazırlanan taşıyıcılar hedef moleküle olan yüksek seçicilikleri nedeniyle oldukça ümit vaatmektedirler. Moleküler baskı yönteminin temeli Şekil 7'de şematize edilmiştir. Bu yöntem üç basamaktan oluşmaktadır. Birinci basamakta hedef molekülün (kalıp) fonksiyonel grup taşıyan polimerleşebilen bir monomer ile kompleks oluşumu gerçekleşir. Bu

kallikreini ve doğal kallikrein substratı kininojenin arginin-fenilalanin motifinin etkileşimini, Şekil 4 b ise kallikrein'in saflaştırılması amacıyla sentezlenen biyomimetik ligandın domuz pankreatik kallikreinin substrat bağlanma bölgesi ile etkileşiminin moleküler modelini göstermektedir. Son dönemde bir başka önemli biyomimetik ligand grubu insülin için geliştirilmiştir. İnsülin insanda şeker metabolizmasını kontrol eden ve şeker hastalığı tedavisinde kullanılan çok önemli bir ticari proteindir. Şekil 5'de rekombinant insülin analogunun aminoasit dizilimi, bilgisayar destekli molekül model yapısı ve yapay biyomimetik ligand ile muhtemel etkileşim modeli verilmiştir.

Şekil 6'da insülin için geliştirilen biyomimetik ligandın kimyasal yapısı ve insülin ile etkileşim modeli verilmiştir. Moleküler modelleme, moleküler tasarım ve ilgili hesaplamalarda Silikon Grafik 4D/35 Personal Iris Work Station programının kullanıldığı not edilmektedir. HIV virüsü tarafından

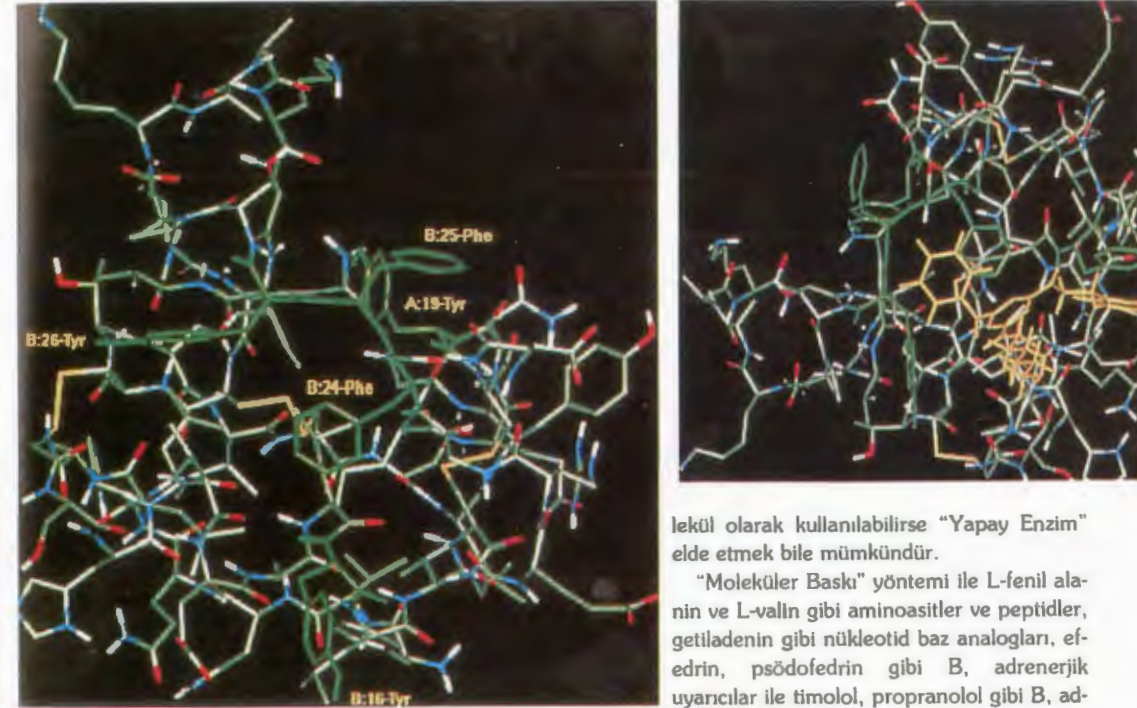


Şekil 4- Kallikrein Ligand Kompleksleri, (a) Domuz Pankreatik Kallikreini ve Doğal Kallikrein Substratı Kininojenin Arginin-Fenilalanin Motifinin Etkileşimini, (b) Biyomimetik Ligand-Domuz Pankreatik Kallikreinin kompleks Yapısı.



Şekil 5- İnsan İnsülin M13 Analogunun Yapısı, (a) Aminoasit Dizilimi, (b) Bilgisayar Destekli Molekül Etkileşim Modeli. Yeşil Renk ile Aromatik Kalıntılar ile Dimer Bağlanma Arayüzey Oluşumunu Gösterilmiştir. (c) Bilgisayar Destekli Yapay Ligand-İnsülin Analog Etkileşim Modeli; Sarı Renk ile B16 Tirozin ve B24 Fenil Alanin üzerinden Ligandın etkileşim bölgesi gösterilmiştir.

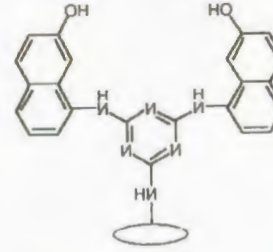
"baskılanmış" bağlanma bölgeleri saflaştırılmak istenen moleküle yüksek seçicilik ve ilgi gösterir. Moleküler baskı yöntemi ile çok ilginçtir ki istenilen enzim tepkimelerinin eğer substratları, ürünleri ya da geçiş analogları kalıp mo-



basamakta kalıp etrafında fonksiyonel monomerin bağlandığı bir yapı oluşumu söz konusudur. Bu etkileşimde hedef molekülün üç boyutlu yapısı ve kimyasal özellikleri önemli bir yer tutar. İkinci basamakta bu kompleks yapı fonksiyonel monomer üzerinden polimerleştirilir. Son basamakta ise oluşan polimer yapıdan hedef molekülü ya da bir başka deyişle kalıp molekül uzaklaştırılır. Hedef molekülün yapıdan uzaklaştırılmasından sonra bu

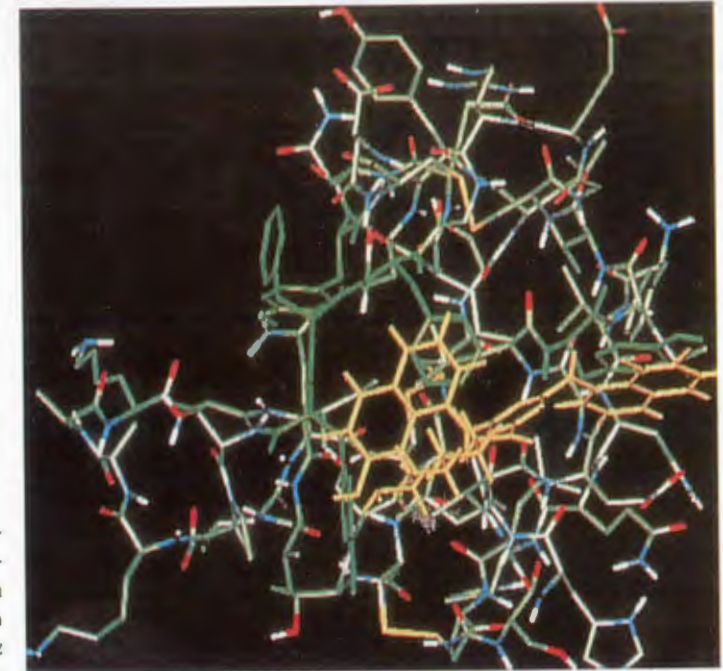
lekül olarak kullanılabilirse "Yapay Enzim" elde etmek bile mümkündür.

"Moleküler Baskı" yöntemi ile L-fenil alanin ve L-valin gibi aminoasitler ve peptidler, getiladenin gibi nükleotid baz analogları, efedrin, psödofedrin gibi B, adrenerjik uyarıcılar ile timolol, propranolol gibi B, adrenerjik blokerler ve naproxen gibi anti-eflamatuvar ilaçlar, kolesterol, kortikosteroidler, testosteron, a, hidrokspirogesteron ve kastasteron gibi hormonlar, fenil a-p- mannopiranosid gibi şekerler için baskılanmış polimer temelli afinite taşıyıcıları hazırlanmıştır. Sonuç olarak bu moleküler baskılanmış ve hedef molekülü tanıma yeteneği olan taşıyıcı polimerlerin saflaştırılması istenilen hedef moleküllere mükemmel bir seçicilik



Şekil 6- İnsan İnsülin M13 Analoğu için Geliştirilen Biyomimetik Ligand ve Protein ile Etkileşimi (Sarı Renk ile B16 Tirosin ve B24 Feni. Alaninin M13 Analoğunun Dimer Bağlanma Bölgesi ile Etkileşimi göstermiştir.

gösterdiği ve büyük bir başarı ile uygulanabildiği belirlenmiştir. Moleküler baskılanmış taşıyıcıların son dönemdeki önemli alt bölümlerinden biri de afinite-temelli katı faz özütlemesidir. Moleküler baskılanmış polimerlerin hedef moleküle afinitesinin çok kuvvetli olduğu bazı durumlarda kromatografik işlemlerde hedef molekülün yapıdan geri alınmasının çok yavaş gerçekleştiği gözlenmiştir. Katı faz özütlemesinde hedef molekülün taşıyıcı



cal Biology, 5 (2001) 248-256.

2. T.Takeuchi, J.Haginaka, Separation and sensing based molecular recognition using molecularly imprinted polymers, J. Chromatography B, 728 (1999) 1-20.



Şekil 7- Moleküler Baskılanmış Polimer Hazırlanmasının Şematik Gösterimi.

üzerine bağlanmasından sonra diklorometan ile yıkama ve metanol ile özütleme işlemleri gerçekleştirilmektedir. Moleküler baskılanmış katı faz özütlemesi ile AIDS ile ilgili pönemi hastalığının tedavisinde kullanılan pentamidin ilacının saflaştırılmasında başarı ile kullanılmıştır. Moleküler baskılanmış katı faz özütlemesinin bir diğer uygulaması ile cerrahi müdahaleler esnasında anestezi amacıyla kullanılan sameridinin saflaştırılmasıdır.

1. C.R. Lowe, Combinatorial approaches to affinity chromatography, Current Opinion in Chemi-

3. A.Denizli, E.Pişkin, E., Dye-ligand affinity systems, J.Biochemical and Biophysical Methods, 49 (2001) 391-416.

4. S.Özkara, H.Yavuz, S.Patır, Y.Arıca, A.Denizli, Separation of Human immunoglobulin-G with L-histidine Immobilised Pseudo-specific Bioaffinity Adsorbents, Separation Science and Technology, 37 (2002) 717-731.

5. B.Garipcan A.Denizli, A.Novel Chromatographic Affinity Support Material for Separation of Immunoglobulin-G from Human Plasma, Macromolecular Bioscience, 2 (2002) 135-144.