

Sevgi Aslyüce, Deniz Türkmen, Adil Denizli

Hacettepe Üniversitesi, Kimya Bölümü

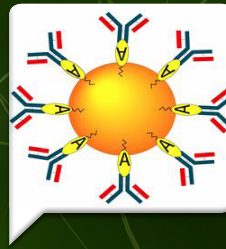
# BAKTERİ DUVARINDAKİ MUCİZE: PROTEİN A

**H**ücrelerin duvarları yapılarında bilmediğimiz binlerce biyomolekül bulunduruyor. Protein A'da bu biyomoleküllerden sadece biri. Biyokimyacılar ilk defa 1958 yılında bu proteini *Staphylococcus aureus*'un hücre duvarından izole etmişler. Yapılan biyokimyasal analizlerde bu proteinin özellikle büyük ölçekte üretimi de gündeme gelmiş. Rekombinant DNA teknolojisindeki gelişmeler sonucunda protein A hücre duvarına ihtiyaç olmadan *Escherichia Coli* hücreleri kullanılarak üretilmiştir.

## Stafilokok Protein A

Stafilokok protein A (SpA) Gram pozitif bakteri olan *Staphylococcus aureus*'un hücre duvarında yoğun olarak bulunan bir proteindir. İlk olarak İmmunoglobulinleri çöktüren bakteriyel özelliği

keşfedilmiştir. Sonraki çalışmalarda ise SpA'nın IgG'nin Fc kısmına sıkıca bağlandığı, B lenfosit çoğalmasını uyardığı, kendi klonal gelişimlerini uyararak hücre ölümünü tetiklediği gösterilmiştir. Protein A'nın molekül



ağırlığı 42 kDa'dır. Yapısında aspartik asit ve glutamik asitler bol miktarda bulunurken sistein hiç yoktur. Protein A dört tekrar bölümü içeren tek polipeptid zincirinden oluşur. Bu yapıda neredeyse hiç karbohidrat ve triptofan yoktur sadece 4 dizi tirozin bulunur.

## Rekombinant Protein A

Rekombinant Protein A, stafilokokal Protein A'nın B alt biriminin, hidroksilamin kullanılarak füzyon proteinlerinin özel bölgelerdeki kimyasal parçalanmalara karşı direncini arttırmak için, 28 ve 29. dizideki hassas asparajin-glisin (Asn-Gly) dipeptitleri mutajen asparajin-alanin (Asn-Ala) dipeptitleri ile rekombinant teknikleri kullanılarak değiştirilmesi sonucu Z alt birimi oluşturulması

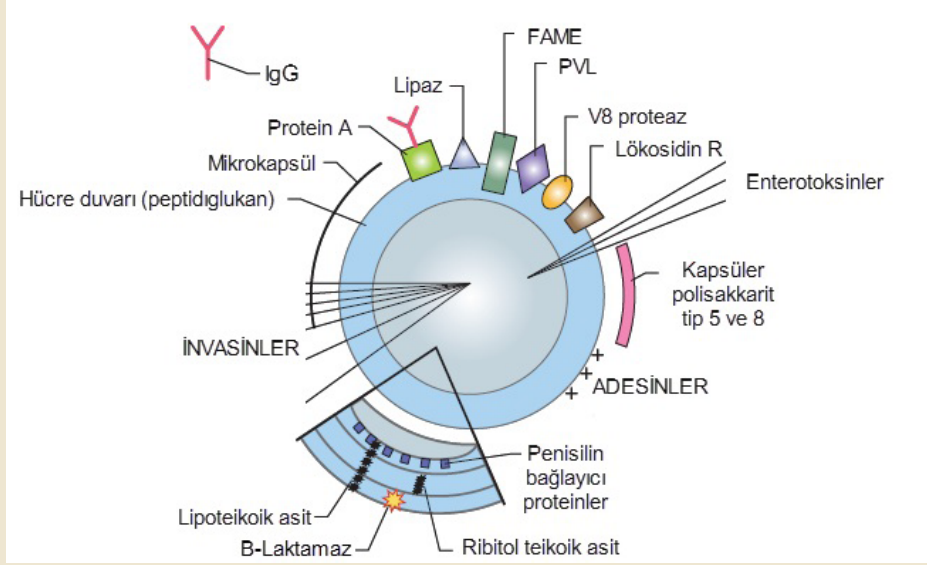
*"Antikor saflaştırılmasında Protein A kromatografisinin başarısı kanıtlanmıştır. Bununla birlikte, Protein A'nın maliyeti klasik kromatografi reçinelerine göre çok daha pahalıdır."*

ile elde edilir. Alaninin iki molekül arasındaki etkileşimden rahatsız olması nedeniyle, G29A ile ifade edilen tek mutasyonla B alt biriminin Fab ile etkileşimi azalmıştır. IgG saflaştırmak için afinite ligandların kullanımı ile ilgili yapılan çalışmalarda Z alt biriminin IgG bağlama kapasitesi, doğal SpA ile mol olarak aynı bağlama kapasitesine sahip olduğu gösterilmiştir.

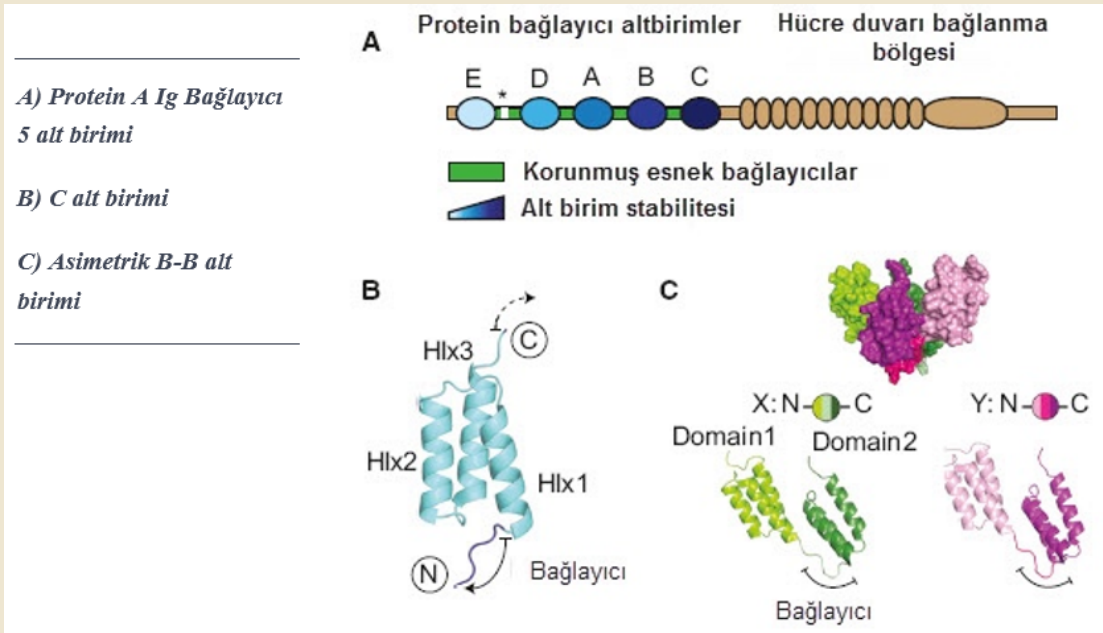
## Monoklonal Antikorların Saflaştırılmasında Protein A

Monoklonal antikorların ilaç olarak kullanımı gün geçtikçe artmaktadır. 2008 yılında monoklonal antikorların 15 milyar doları aşan gelirleri, onları biyotedavi ajanları içinde en yüksek kazanç getiren ajan yapmıştır. Dünya monoklonal antikor pazarında 2011 Eylül ve Kasım aylarında 2.3 milyar doları bulan yeni





*Staphylococcus aureus*'un hücre duvarı yapısı.



nesil tedavi antikorlarının gelirleri, ünlü araştırma şirketi Visiongain'in raporlarına göre 2017 yılında 65 milyar dolara ulaşacağı tahmin edilmiştir. İlaç antikorlar en çok kanser, otoimmün hastalıklar ve enfeksiyon tedavisinde kullanılmaktadır. Fakat bu antikorlar saflaştırılmaları ve karakterizasyonları zor olan karmaşık proteinlerdir.

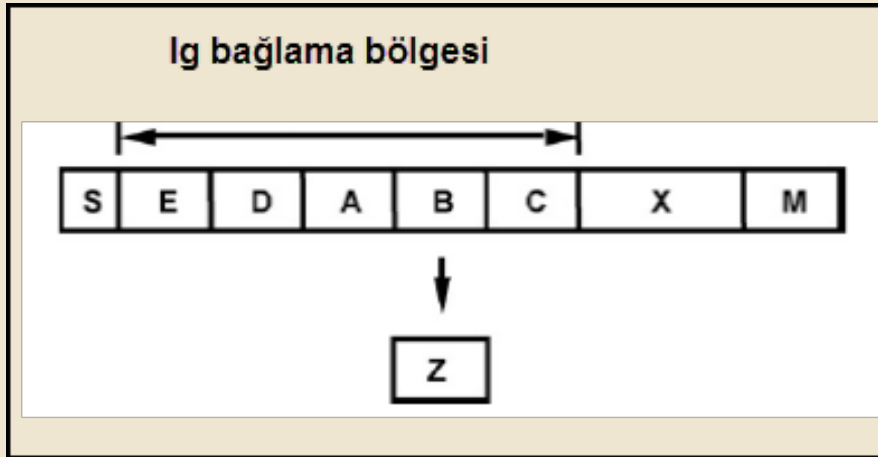
Antikor saflaştırılmasında Protein A kromatografisinin başarısı kanıtlanmıştır. Bununla birlikte, Protein A'nın maliyeti

klasik kromatografi reçinelerine göre çok daha pahalıdır. Bazı Protein A reçinelerin fiyatı litre başına 15000 dolara kadar ulaşmaktadır. Protein A kromatografisine alternatif olabilecek farklı antikor saflaştırma teknikleri üzerinde çalışmalar yapılmış olmasına rağmen, şirketler ticari ölçekli monoklonal antikor saflaştırılması için Protein A'yı halen kullanmakta ve yakın gelecekte de kullanmaya devam edecekleri tahmin edilmektedir. Bu durumda üretim maliyetlerini düşürerek hastalar için ilaçları daha uygun hale

getirmek gerekmektedir. Alternatif yöntemler yerine ticari olarak en etkin performansı veren Protein A kromatografisinin tercih edilmesinden dolayı bu yöntemin temel ligandı olan Protein A'nın maliyetini düşürmeye yönelik çalışmalar artmaktadır.

Protein A seçici olarak IgG'ler ile etkileşebilen, yaklaşık 42 kDa'luk *Staphylococcus aureus* hücre duvarı proteini. IgG3 hariç insan IgG'lerinin tamamına kuvvetli bir şekilde bağlanır.

Amino asit	Amino asit sayısı
Lizin	52
Histidin	4
Arjinin	4
Aspartik asit	80
Treonin	6
Serin	14
Glutamik asit	60
Prolin	28
Glisin	28
Alanin	36
Valin	8
Metionin	3
İzolösin	11
Lösin	28
Tirozin	4
Fenilalanin	12



Rekombinant Protein A Ig bağlayıcı alt birimleri (B alt birim yerine mutajen Z alt birimi)

Tam boyda bir SpA, N-ucundan sırası ile E,D,A,B ve C olmak üzere 5 homolog alt birimden ve bir hücre duvarı bağlanma bölgesinden oluşur. SpA'nın beş alt biriminden her biri yaklaşık 58 amino asit içeren üç-sarmal demeti halinde düzenlenmiş, hidrofobik çekirdek ile kararlı hale getirilmiş bir yapıdır. Bu alt birimlerin hepsi IgG ile bağlanabilir. Bu etkileşimler Stafilokokal enfeksiyon oluştuğunda yangı derecesinin artmasından sorumludur. Alt birimler IgG1, IgG2 ve IgG4'ün Fc kısmına yaklaşık  $10^8$  (M-1) afinite sabiti (KA) ile güçlü, IgG3 ile

zayıf etkileşim gösterir. Ayrıca her bir alt birim belirli antikolların Fab kısmı ile de yüksek afinite gösterir. Bu alt birimlerden B'nin IgG ile etkileşimi en ilgi çekici olanıdır. Üçlü sarmal yapıdaki B alt birimi, Fc'deki 9 amino asit ve B alt birimindeki 11 amino asit ile IgG'ye bağlanır. IgG'nin Fc bağlama bölgesi B alt biriminin birinci ve ikinci sarmaldaki 11 amino asit dizisi olduğu bir çalışmada gösterilmiştir. Buna ek olarak başka bir çalışmada D alt birimi kullanılarak Fab bağlayıcı kısmın Fc bağlayıcı kısımdan farklı olduğu gösterilmiştir. Fab etkileşiminde yer alan

11 amino asitlik dizi ikinci ve üçüncü sarmallarda yer almaktadır.

IgG, Protein A'yı Fc bölgesi ile bağlar. Bu etkileşim doğada çok özel ve hidrofobik olmakla birlikte hidrojen bağı ve tuz köprüsü de içerir. Yüksek seçiciliği sayesinde Protein A afinite kromatografisi ile % 98 saflıkta tek basamakta kompleks çözümlerden saflaştırma yapmak mümkündür. Protein A'nın IgG'ler ile bilinen etkileşim özgüllüğünün dezavantajı elüsyon için düşük pH gibi sert koşulların kullanımının zorunlu olmasıdır. Düşük pH seviyesindeki kararsızlık ve topaklanma eğilimi bazı antikolar için sorun yaratabilmektedir. Fakat genel olarak sadece küçük miktarda topaklanmış DNA içeren safsızlıklar bulunur.

#### Afinite Destek Malzemelerine Protein A Bağlanması

Protein A, protein kromatografisi için farklı destek malzemelerine immobilize edilmiştir. En yaygın ürün Amersham (GE Healthcare) firması tarafından siyanojen bromür (CNBr) ile aktive edilmiş Sefaroz CL 4B üzerine Protein A immobilize edilmiş kolonlardır. Bu kolonlarda yüksek seçicilik, düşük istenmeyen etkileşimler gözlenmiştir. Agaroz yüksek akış hızları için uygun bir taşıyıcı değildir. Bu nedenle büyük ölçekli uygulamalarda çapraz bağlı Sefaroz kolonlar kullanılmıştır. Modern Protein A adsorbentler genellikle gözenekli cam ve polimerik partiküllerdir. Bu malzemeler yüksek akış hızında kolonun etkin çalışmasına izin verecek kadar dayanıklı malzemelerdir.

40 yılı aşkın süre önce antikor saflaştırmak için sabit faz olarak Protein A'nın kullanımını gösteren ilk raporların yayınlanmasından bu yana Protein A, klinik kullanım için monoklonal antikor saflaştırılmasında standart yöntem haline gelmiştir. Janssen Biotech firmasına ait Muronomab isimli ürün, akut transplant reddinin tedavisinde kullanılmak üzere 1986 yılında ABD Gıda ve İlaç Dairesi tarafından onaylanan bir CD3 özgül monoklonal antikordur. Bu, üretim

Protein A-immoglobulin etkileşimi.

Tür	Altsınıflar	Protein A
İnsan	IgG <sub>1</sub>	++
	IgG <sub>2</sub>	++
	IgG <sub>3</sub>	-
	IgG <sub>4</sub>	++
	IgA	Değişken
	IgD	-
	IgM	Değişken
Tavşan	Tamamı	++
Kobay	IgG <sub>1</sub>	++
	IgG <sub>2</sub>	++
Sığır		+
Fare	IgG <sub>1</sub>	+
	IgG <sub>2a</sub>	++
	IgG <sub>2b</sub>	+
	IgG <sub>3</sub>	+
	IgGM	Değişken
Tavuk	IgY	-

Güçlü bağlanma ++, orta etkileşim +, zayıf veya etkileşim yok -.

sürecinin saflaştırma basamağında Protein A kullanılmıştır. Protein A afinite kromatografisinin saflaştırma basamakları basittir: nötral pH'da bağlanma, asidik pH'da elüsyon gerçekleşir. Protein A afinite

kromatografisinin endüstriyel ölçekte monoklonal antikor saflaştırılmasında evrensel kabulünün temel nedeni yöntem geliştirmenin kolaylığıdır. Protein A afinite

kromatografisinin maliyetini azaltmak için çok sayıda çalışma yapılmaktadır.