

# PROTEİNLERİN SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

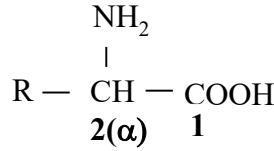
**Prof. Dr. Nuriye AKEV**

Modern farmasötik biyoteknoloji ürünlerinin çoğu protein yapısındadır. Dolayısıyla burada protein yapısını öncelikle hatırlatmak gerekir.

## PROTEİNLERİN YAPISI

Proteinler, amino asitlerin peptid (amid) bağlarıyla bağlanmasından oluşan ve bir veya birden fazla polipeptid zinciri içeren makromoleküllerdir.

Amino asitler hem **asidik** hem **bazik** grupları içerirler. Karboksil (–COOH) grubu asidik, amino (–NH<sub>2</sub>) grubu bazik özelliktedir. Amino asitler içerdikleri bu iki grup nedeniyle **amfoter maddeler**'dir. Bu iki grubu **alkil kökü** birbirine bağlar.



Amino asit genel formülü  
(R: alkil kökü)

**İzoelektrik nokta (İ.P.)** şu şekilde tarif edilebilir: Amino asitlerin iç tuz halinde bulundukları yani elektrikçe nötral oldukları pH'a izoelektrik nokta denir. Her amino asidin kendine özgü bir İ.P. sı vardır.

İzoelektrik noktasında bulunan bir amino asit çözeltisine asit katılırsa, amino asit katyon haline dönüşür. Alkali katılırsa, amino asit anyon haline dönüşür.

Amino asit karışımı içeren bir çözeltiden elektrik akımı geçirilirse yani **elektroforez** yapılsa anyon şeklinde olanlar anoda, katyon şeklinde olanlar katoda göç eder, izoelektrik noktalarında bulunanlar göç etmez. Bu suretle bir karışımdaki amino asitler birbirlerinden ayrıştırılabilir.

20 amino asit ve kısaltılmış adları (3 harfli, tek harfli) Tablo 1'de verilmiştir.

Sadece L- amino asitler bulunur. Glisin asimetric C atomu içermeyen tek amino asittir. Amino asitlerin reaksiyona giren grupları α-karbon atomuna bağlı olan ve R ile gösterilen yan zincirleridir. Amino asitlerin bu R grupları arasındaki itme ve çekmeler ile oluşan bağlar polipeptid zincirinin son yapısını belirler. Polar olmayan alifatik amino asitlerin (Gly, Ala, Val, Leu, Ile ve Pro) yan zincirleri kimyasal olarak reaksiyona giren grupları içermezler. Bu amino asitleri içeren polipeptid zincirlerinde bu R grupları kovalan olmayan bir şekilde, hidrofobik olarak etkileşirler, bu da protein konformasyonunu stabilize edici bir etki gösterir.

Aromatik amino asitlerin (Phe, Tyr ve Trp) yan zincirleri çok reaktif olmamakla birlikte, UV ışınını absorbe ettiklerinden (280 nm'de bilhassa Tyr ve Trp) proteinlerin tanınmasında ve miktar tayininde etkilidirler.

**Tablo 1.** Doğada bulunan başlıca 20 amino asid ve kısaltılmış adları.

| R grubuna göre sınıflandırma | Amino asidin adı                                                   | Kısaltılmış adı 3 harfli                      | Kısaltılmış adı tek harfli      |
|------------------------------|--------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|---------------------------------|
| <b>Alifatik</b>              |                                                                    |                                               |                                 |
| Monoamino monokarboksilik    | Glisin<br>Alanin<br>Valin<br>Lösin<br>İzolösin<br>Serin<br>Treonin | Gli<br>Ala<br>Val<br>Leu<br>Ile<br>Ser<br>Thr | G<br>A<br>V<br>L<br>I<br>S<br>T |
| Monoamino dikarboksilik      | Aspartik asid<br>Glutamik asid<br>Asparagin<br>Glutamin            | Asp<br>Glu<br>Asn<br>Glu                      | D<br>E<br>N<br>Q                |
| Diamino monokarboksilik      | Lizin                                                              | Lys                                           | K                               |
| Kükürtlü                     | Sistein<br>Metionin                                                | Cys<br>Met                                    | C<br>M                          |
| Guanido gruplu               | Arginin                                                            | Arg                                           | R                               |
| <b>Siklik</b>                |                                                                    |                                               |                                 |
| Karboksilik                  | Fenilalanin<br>Tirozin                                             | Phe<br>Tyr                                    | F<br>Y                          |
| Heterosiklik                 | Triptofan<br>Histidin<br>Prolin                                    | Trp<br>His<br>Pro                             | W<br>H<br>P                     |

Proteinler üç veya bazen de dört yapının birbirini tamamlamasıyla oluşur.

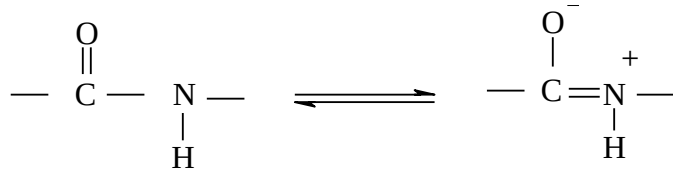
#### **Birincil yapı**

Belirli amino asidlerin, belirli sayıda ve belirli bir diziliş sırasına göre peptid bağlarıyla birleşmelerinden oluşur. Bu suretle oluşan zincirinin bir ucunda serbest amino grubu, diğer ucunda serbest karboksil grubu bulunur. Birincil yapı: amino asid tam dizilişi ve disülfür bağlarının yerini gösterir.

#### **İkincil yapı**

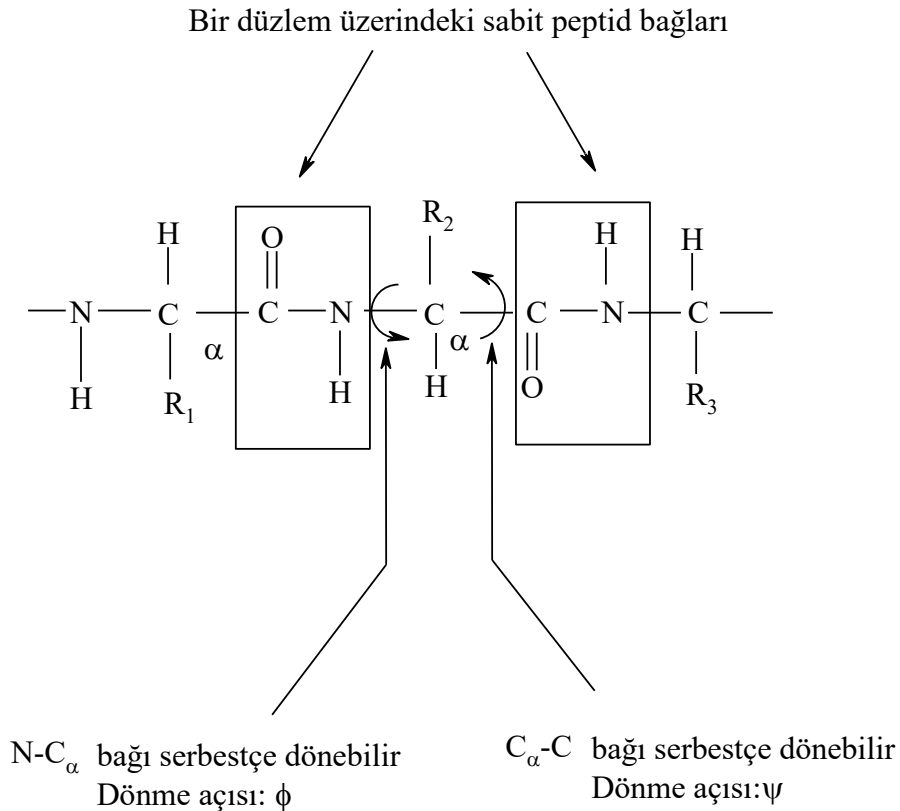
Bir polipeptid zinciri içindeki peptid bağlarının  $-N-H$  ve  $-C=O$  grupları arasında (molekülüçi) veya birkaç polipeptid molekülünün peptid bağlarının karşılıklı  $-N-H$  ve  $-C=O$  grupları arasında (moleküllerarası) hidrojen bağlarının teşekkülü sonucunda meydana gelen konformasyon proteinin ikincil yapısını oluşturur.

Peptid bağının  $-N-H$  grubunun ortaklanmamış elektron çiftleri ile  $-C=O$  grubu arasındaki mezomeri dolayısıyla karbon-azot bağı kısmen çift bağ özelliği gösterir:



Bu nedenle peptid grubu bir düzlem üzerinde bulunur ve polipeptid zinciri bu çift bağın etrafında serbestçe dönemez. Halbuki bir amino asidin C-2 ( $\alpha$ -karbon) atomu ile karbonil karbonu ve C-2 atomu ile azot atomu arasındaki bağlar tam anlamı ile tek bağlar olduğu için, polipeptid zinciri C-2 atomu etrafında peptid grubunun bulunduğu düzlemin her iki tarafına, serbestçe dönebilir. Sonuç olarak, bazıları diğerlerinden daha sabit çeşitli polipeptid konformasyonları mümkün olur. Bunlar arasında en dayanıklı konformasyonlar polipeptid zincirindeki  $-\text{N}-\text{H}$  ve  $-\text{C}=\text{O}$  gruplarına hidrojen bağları ile bağlı olanlardır.

Bir peptid bağı sabit olduğu halde, polipeptid zincirindeki diğer iki bağ serbestçe dönebilir. Bunlar  $\text{N}-\text{C}_\alpha$  ve  $\text{C}_\alpha-\text{C}$  bağlarıdır (Şekil 1). Polipeptid zinciri birbirlerine göre hareket edebilen birçok düzlemden oluşan bir yapı olarak tarif edilebilir.  $\text{N}-\text{C}_\alpha$  bağının dönme açısı  $\phi$  ( $\phi = \text{fi}$ ),  $\text{C}_\alpha-\text{C}$  bağının açısı ise  $\psi$  ( $\psi = \text{psi}$ ) olarak adlandırılır (Şekil 1). Polipeptid zincirindeki her amino asit için fiziksel olarak mümkün olan  $\phi$  ve  $\psi$  açıları hesaplanabilir ve bu açı çiftleri birbirlerine karşılık olarak Ramachandran grafikleri adı verilen diyagramlarda gösterilir. Bu açılar proteinin üç-boyutlu yapısının bir göstergesidir.



**Şekil 1.** Polipeptid zincirinde sabit peptid bağının (çerçeve içinde) ve serbestçe dönebilen  $\text{N}-\text{C}_\alpha$  ve  $\text{C}_\alpha-\text{C}$  bağlarının şematik gösterimi.

İkincil yapıda  $\alpha$ -helezonun bir çevriminde 3.6 amino asid artığı bulunur. Amino asidlerin yan zincirleri helezonun dış tarafına yönelmişlerdir. Prolin  $\alpha$ -helezonu bozucu etki gösterir. Helezon yapısı hidrojen bağları ile stabilize edilir. Proteinlerin birçoğunda  $\alpha$ -helezon ve  $\beta$ -kırmalı tabaka konformasyonu, birlikte bulunur. Bu yapılar birbirlerinden “ilmek (loop) şeklindeki” bölgelerle ayrılmışlardır. Değişik uzunluk ve şekildeki bu ilmekler, polipeptid zincirinin katlanarak üçüncül yapıyı almasını sağlarlar. Ayrıca ilmek bölgeleri proteinin biyolojik işlevinde de rol oynarlar (enzimlerin aktif bölgesi).

İkincil yapıyı hidrojen bağları oluşturur. Hidrojen bağları; hidrojen atomu ile elektronegatif atomlar olan azot ve oksijen arasında meydana gelir. Hidrojen bağları molekül içinde veya moleküller arasında meydana gelebilir, bunun sonucunda da ikincil yapının iki tür konformasyonu ortaya çıkar.

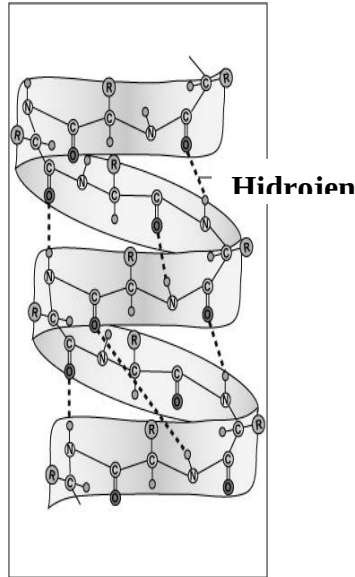
- 1-  $\alpha$ -Helezon konformasyonu (molekül içi hidrojen bağları)
- 2-  $\beta$ -Konformasyonu (kırmalı tabaka yapısı, moleküller arası hidrojen bağları)

### $\alpha$ - Helezon konformasyonu

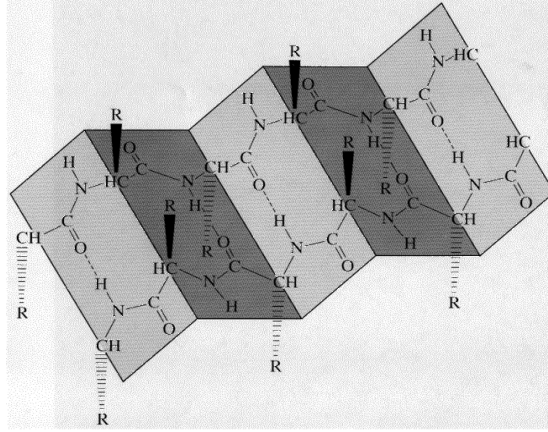
Bir polipeptid zincirindeki  $-N-H$  ve  $-C=O$  grupları arasında hidrojen bağlarının meydana gelmesi (molekül içi hidrojen bağları) sonucunda bu polipeptid zinciri düşey bir eksen etrafında helezon şeklinde kıvrılır. Bu yapıya, ikincil yapının  $\alpha$ -helezon konformasyonu denir (Resim 1).

### $\beta$ - konformasyon (kırmalı tabaka yapısı)

Birkaç polipeptid zinciri aralarındaki hidrojen bağlarının oluşmasıyla bir araya gelirler. Eğer bu peptid zincirlerinin karboksi uçları aynı yönde uzanıyorsa **paralel**, zıt yönlerde ise **antiparalel** olarak adlandırılır (Resim 2). İpek fibroininin ikincil yapısı antiparalel  $\beta$ -kırmalı tabaka şeklindedir.



**Resim 1.** Proteinlerin ikincil yapısının  $\alpha$ -helezon konformasyonu.



**Resim 2.** Proteinlerin ikincil yapısında  $\beta$ -kırmalı tabaka yapısı.

### Üçüncül yapı

Helezonlaşmış ve bükülmüş polipeptid zincirinin kendi üzerine yumak tarzında katlanmasıyla meydana gelir. Bu şekilde katlanmış proteinler globuler proteinlerdir.

Üçüncül yapıyı oluşturan bağlar:

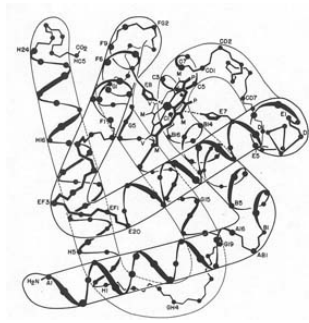
- Hidrojen bağları,
- İyon bağları,
- Van der Waals çekmeleri,
- Kovalan bağlar (disülfür bağları). Bu bağlar amino asitlerin “R” grupları arasında (-NH<sub>2</sub> ve -COOH grupları dışındaki gruplar arasında) oluşur.

Bu bağlarda oluşan üçüncül yapı sonucunda:

- 1- Globuler (yumak şeklinde)
- 2- Fibriler (lifsel) proteinler meydana gelir.

### ***Globuler (yumak şeklinde) proteinler***

Helezonlaşmış ve bükülmüş, yani ikincil yapıları oluşmuş proteinlerin kendi üzerine yumak tarzında katlanmasıyla meydana gelir. Örn. Miyoglobin (Resim 3). Globuler proteinler enzimler, hormonlar, antikorlar gibi biyolojik fonksiyon gösteren maddelerdir.



**Resim 3.** Miyoglobin molekülünün üçüncül yapısı.

Üçüncül yapı proteinin üç boyutlu yapısını oluşturur.

### ***Fibriler (lifsel) proteinler***

a) İkincil yapıları  $\alpha$ -helezon tarzında olan polipeptid zinciri aynı şekilde ikincil yapısı oluşmuş bir başka polipeptid zinciriyle yeni bağlar oluşması sonucunda birleşir, bu suretle fibriler (lifsel) proteinler meydana gelir.

b) İkincil yapısı  $\beta$ -konformasyon tarzında olan bir çift polipeptid zinciri, ikincil yapısı  $\beta$  konformasyon tarzında olan başka bir çift polipeptid zinciri arasında meydana gelen bağlar sonucunda birleşir ve fibriler proteinler oluşur.

Fibriler proteinler, üçüncül yapılarındaki güçlü disülür ( $-S-S-$ ) bağları nedeniyle dış etkenlere ve proteinleri hidroliz eden enzimlere karşı çok dayanıklıdır ve suda çözünmezler. Fibriler proteinler, dokuların yapısını oluşturur. Örnek:  $\alpha$ -keratin (deri, tırnak, saçta), kollajen (kemik, kıkırdak, bağ dokusu), elastin (tendon, arter, esnek dokularda), fibrinojen.

Proteinlerin ikincil yapıları sabit değildir, ancak üçüncül yapıları sabittir.

### **Dördüncül yapı**

Üçüncül yapıları bulunan proteinlerin, protomer denilen alt birimlerinin hidrojen bağları, van der Waals çekmeleri, iyon bağları ile polimerize olmalarıyla dördüncül yapı oluşur, Örn. Hemoglobin, 4 altbirim içerir (Resim 4).



**Resim 4.** Hemoglobin molekülü  
(Fe-protoporfirin bileşiği olan “hem” grupları koyu renkte gösterilmiştir).

Proteinler bileşim ve çözünürlüklerine göre: basit proteinler ve bileşik proteinler olmak üzere ikiye ayrılırlar.

**Bileşik proteinler**, protein yapısında olmayan ve prostetik grup olarak adlandırılan bir kısım içerirler ve hidrolizle, prostetik grup + amino asidlere ayrılırlar. Bunlar prostetik gruplarına göre: glikoproteinler, lipoproteinler, fosfoproteinler, metalloproteinler, kromoproteinler ve nukleoproteinler gibi adlar alırlar.

Proteinin birincil yapısı DNA'daki genetik bilginin tercümesiyle oluştuktan sonra, üçüncül ve dördüncül yapılar, bükülmüş ve kıvrılmış polipeptid zincirinin **post-translasyonel** (tercüme sonrası) **değişikliklere** uğramasıyla oluşurlar. Bu değişiklikler proteinlerin çoğunda ribozomları terk ettikten sonra olur, bazılarında ise ribozoma bağlıyken olabilir. Bu değişiklikler proteinin stabilitesini ve biyolojik aktivitesini belirler. Başlıca post-translasyonel değişiklikler:

- **Proteolitik işleme** (processing): sindirim enzimleri ve kan pıhtılaşmasında rolü olan enzimler, proteolize uğradıktan sonra aktive olurlar.
- **Glikozilasyon:** Karbohidrat birimlerinin eklenmesiyle bazı proteinlerin çözünürlüğü artar, bazıları ise aktive olurlar. Karbohidrat birimlerini ekleyen enzimler olan *glikoziltransferazlar* hücrenin endoplazmik retikulumunda bulunurlar.
- **Fosforilasyon:** Polipeptid yapısındaki çeşitli hormonların aktivitelerini düzenler.
- **Asetilasyon:** İşlevi bilinmiyor.
- **Açılasyon:** Bazı proteinlerin biyolojik zarlara gömülmesini sağlayabilir.
- **Amidasyon:** Proteinlerin stabilitesini ve aktivitesini etkiler.
- **Sülfasyon:** Bazı nöropeptidlerin biyolojik aktivitesini etkiler.
- **Hidroksilasyon:** Bazı proteinlerin yapı bütünlüğü için önemlidir.
- **$\gamma$ -Karboksilglutamat oluşması:** Bazı kan proteinlerinin kalsiyumu bağlayabilmesi için önemlidir.
- **ADP-ribozilasyon:** Birçok proteinin biyolojik aktivitesini düzenler.
- **Disülfür bağlarının oluşması:** Bazı proteinlerin konformasyonlarını stabilize eder (skleroproteinlerin dayanıklılığı bunlardan ileri gelir).

## PROTEİNLERİN ÖZELLİKLERİ

**Molekül ağırlıkları:** Genellikle büyük moleküllerdir. Molekül ağırlıkları çok farklıdır. Hemoglobin: 64.500, serum albumin: 69.000, serum  $\gamma$ -globulin: 160.000-1.000.000, fibrinojen: 341.000 vb.

**Denatürasyonları:** Proteinler dayanıksız maddelerdir, bir takım dış etkenlerle proteinlerin doğal özelliklerini kaybetmelerine ve yeni özellikler kazanmasına **denatürasyon** denir. Denatürasyon ile proteinlerin birincil yapı dışındaki tüm yapıları bozulur, ikincil ve üçüncül yapıdaki bağlar açılır, birincil yapıdaki peptid bağları ise bozulmaz. Isı, UV ve X-ışınları, asid, alkali, organik çözücüler denatüre edici ajanlardır. Yumurtanın pişirilmesi sırasında katılaşması; yumurta proteinlerinin denatürasyona uğramasıdır, denatüre olan proteinler eski haline dönemezler, diğer bir deyişle tekrar sıvı şekle geçemezler.

Denatürasyonun proteinin biyolojik aktivitesini de yok etmesi, aktivite ve yapı arasında kesin bir bağıntı olduğunu gösterir. Bir proteinin yapısını aydınlatmak için sadece amino asid dizilişini bilmek yeterli değildir. Daha önce belirtildiği gibi, amino asid dizilişi belirlenen ve hücrelerin ribozomlarında sentez edilen protein, post-translasyonel (tercüme sonrası) değişikliklere uğrayarak katlanır bükülür. Bir proteinin yapısını tam olarak aydınlatmak için amino asid dizilişini saptadıktan sonra x-ışını difraksiyonu ve nükleer manyetik rezonans (NMR) gibi fiziksel yöntemlerden yararlanılır. Proteinlerin labil olmaları saflaştırılmaları ve müstahzar haline getirilmeleri sırasında zorluklara neden olur.

**Elektroforez:** Proteinler hem bazik ( $-\text{NH}_2$ ) hem asidik gruplar ( $-\text{COOH}$ ) içerdikleri için amfolit (amfoter) maddelerdir, izoelektrik noktaları vardır. Bu noktada eşit negatif ve pozitif yük taşırlar. Elektroforez, proteinlerin amfoter özelliklerine dayanılarak uygulanan bir

yöntemdir. Proteinlerin izoelektrik noktaları dışındaki bir pH'da elektrik alanında göç etmelerine **elektroforez** denir. Elektroforez nötral ortamda yapılırsa; İ.P.'ları asid tarafta olan proteinler negatif yüklü olduğundan anoda göç eder, İ.P.'ları bazik tarafta bulunan proteinler pozitif yüklü olduğundan katoda göç eder. Elektroforez, protein karışımında bulunan tüm proteinlerin izoelektrik noktalarının üzerindeki bir pH'da yapılırsa tüm proteinler negatif yük taşıdıklarından anoda göç eder, ancak göçme hızları farklıdır, çünkü negatif yükü en fazla olanlar en önde, negatif yükü en az olanlar en arkada göç eder. Bu yöntem, klinikte çeşitli serum proteinlerinin anomalilerinin teşhisinde kullanılır. Poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) proteinlerin saflaştırılması sırasında elde edilen proteinin saflığının kontrolü için kullanılır. PAGE'nde homojen görünen protein (tek band olarak görüntülenen) saflaştırılmış olarak kabul edilir.

**Çöktürülmeleri:** Proteinler; ısı, çeşitli tuzlar (amonyum sülfat, magnezyum sülfat, sodyum sülfat), organik çözücüler, ısı, asid ve bazlarla çöktürülebilir, ancak tuzlar dışındakilerle yapılan çöktürme proteinleri denatüre eder ve proteinler bir daha doğal şekillerine dönemez. Buna karşın tuzlarla yapılan çöktürme proteinleri denatüre etmez, yani koruyucu çöktürmedir. Tuzlar, protein moleküllerinin etrafındaki su moleküllerini çeker, bu suretle su moleküllerini kaybetmiş olan protein molekülleri birbirleriyle birleşerek misel halinde çöker. Bu şekilde çöktürülen proteinlerin tuzları, dializle ortamdan uzaklaştırılarak proteinler saf halinde elde edilir.

## PROTEİNLERİN AMİNO ASİD DİZİLİŞİNİN (SEKANSININ) BELİRLENMESİ

1. Kimyasal dizi analizi (**Edman degradasyonu**). 1970'lere kadar kullanılan tek yöntem. Buna göre amino asid dizilişi ilk saptanan protein İnsulin (Sanger 1953). Önceleri fazla miktarda protein gerektiriyordu, günümüzde gelişen teknolojiyle µg veya mg protein yeterli oluyor.
2. Fiziksel parçalamadan sonra analiz: **Kütle spektrometrisi** (Mass spectrometry)
3. Günümüzde alternatif yöntem olarak söz konusu proteinin gen sekansının belirlenmesi sonucunda amino asid dizilişinin saptanması: **Gen sekanslama**. Web'den bilinen proteinler için databazlara ulaşılabilir. European Bioinformatics Institute (EBI) ve Swiss Institute for Bioinformatics'in işbirliğiyle gerçekleştirilen, Swiss-Prot en çok kullanılan databazdır.

Bu üç yöntem aslında birbirini tamamlar ve birbirinin kontrolü olarak da kullanılır.

### Proteinin üç boyutlu yapısının belirlenmesi

Bir proteinin amino asid dizilişinin belirlenmesi sadece proteinin birincil yapısını aydınlatır ve tam yapısını (ikincil, üçüncül ve dördüncül yapılarını) belirlemek için yeterli değildir. Burada moleküller ve bağlar sisteminin uzaydaki konumları ve proteinin üç boyutlu yapısı belirlenir. Bunun için çok daha ileri teknoloji gerektiren ileri fiziksel yöntemler kullanılır. Bunlar:

- **X-ışını difraksiyonu**
- **NMR**
- **Elektron mikroskopisi** gibi yöntemlerdir

Ancak bir proteinin ikincil ve üçüncül yapısının belirlenmesi hiç de kolay değildir. Bu yüzden amino asid dizilişi bilinen proteinlerin sayısı ile üç boyutlu yapıları aydınlatılmış olan proteinlerin sayısı arasında büyük fark vardır. Bir proteinin amino asid dizilişinden o proteinin



üç boyutlu yapısı hakkında bir fikir edinmek için bilinen proteinlere göre hazırlanmış istatistiksel yöntemlerden veya fizikokimyasal kriterlerden yararlanılır, ancak bu yöntemlerin doğruluk oranı da %50-70 arasında değişir. Şimdilik genellikle bir proteinin üç boyutlu yapısı, çeşitli polipeptidlerin amino asit dizilişleri ile üç boyutlu yapıları ile hazırlanan bilgisayar programlarından yararlanılarak olasılık hesapları yapılarak aydınlatılmaya çalışılmaktadır.

## BİR ÇÖZELTİDEKİ PROTEİNİN BELİRLENMESİ VE MİKTAR TAYİNİ İÇİN KULLANILAN YÖNTEMLER

Proteinlerin biyolojik bir materyelden saflaştırılması sırasında hem karakterizasyonlarının hem de miktar tayinlerinin yapılması gereklidir. Bu amaçla kullanılan yöntemlerden bazıları Tablo 2’de gösterilmiştir.

**Tablo 2.** Proteinlerin belirlenmesinde ve miktar tayinlerinde kullanılan başlıca yöntemler.

| Yöntem                               | Hassasiyet     | Etki tarzı                                                                                                                                                                     | Avantajları                                                 | Dezavantajları                                                                                                |
|--------------------------------------|----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>280 nm’de absorbens (UV)</b>      | 0.02-3.0 mg/ml | Aromatik amino asitlerin R gruplarının 280 nm’deki absorbensine dayanır.                                                                                                       | Kolay, hızlı, numuneye zarar vermediğinden, numune azalmaz. | Hassasiyeti düşük, değişik proteinlerin aynı konsantrasyonu farklı absorbens değerleri verir.                 |
| <b>205 nm’de absorbens (uzak UV)</b> | 1.0-100µg/ml   | Peptid bağları bu dalga boyunda absorpsiyon verir.                                                                                                                             | Kolay, hızlı, numuneye zarar vermediğinden, numune azalmaz. | Bütün UV-VİS spektrofotometreler bu dalga boyunda ölçemez, tamponlar da bu dalga boyunda absorbens verebilir. |
| <b>Ninhidrin</b>                     | 20-50 µg       | Proteinler d. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ile 100°C’de inkübe edilerek hidroliz edilir. Amino asitlerin ninhidrin ile verdikleri pembe renk 570 nm’de absorpsiyon gösterir. | Hassas, diğer aromatik bileşikler reaksiyona girmez.        | Hidroliz süresi uzun ve derişik asid kullanılması tehlikeli                                                   |
| <b>Bisinkonik asid</b>               | 20-100µg/ml    | Bakır ayırıcı, protein tarafından indirgendiğinde bisinkonik asid ile reaksiyona girer ve 562 nm’de absorpsiyon gösteren bir bileşik verir.                                    | Hassas ve kolay, diğer bileşikler reaksiyona girmez         | Pahalı. Koşullar değiştirilirse farklı sonuçlar elde edilebilir.                                              |
| <b>Biuret</b>                        | 1-10 mg/ml     | Bakır ayırıcının proteinlerle verdiği menekşe renkli bileşik 550 nm’de absorbens gösterir.                                                                                     | Ucuz ve kolay. Diğer bileşikler reaksiyona girmez.          | Hassasiyeti düşük.                                                                                            |
| <b>Bradford</b>                      | 150-750µg/ml   | Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının proteinlere bağlanması esasına dayanır. Maksimum absorbens 595 nm.                                                                    | Kolay ve hızlı, orta derecede hassas.                       | Alkali pH’taki tamponlar deneye etki eder.                                                                    |
| <b>Lowry</b>                         | 30-150µg/ml    | Bakır/fosfomolibdik/fosfotungstik asid ayırıcı proteinle etkileşerek 750 nm’de absorbens gösteren bir bileşik verir.                                                           | Hassas.                                                     | Ayırıcıların hazırlanması uzun süreli ve biraz uğraşmalı.                                                     |
| <b>Gümüşle boyama</b>                | 150 ng-20µg/ml | Gümüş iyonlarının proteinlere bağlanması esasına dayanır.                                                                                                                      | Çok hassas.                                                 | Kelatlayıcı ajanlar, deterjanlar ve indirgen maddeler reaksiyona etki edebilir.                               |

## PROTEİNLERİN HAYVANSAL KAYNAKLARDAN ELDE EDİLMESİ

Rekombinant tekniklerin geliştirilmesinden önce, tedavide kullanılan proteinler geleneksel olarak, hayvansal dokulardan elde edilmekteydi. Bunların başlıcaları Tablo 3'te gösterilmiştir. Tabii hem hayvanların büyük miktarlarda öldürülmesinin sakıncaları hem de gerek insan kanından gerekse hayvan kanı ve materyelinden elde edilen proteinlerde bakteriyel ve virutik kontaminasyonun tehlikesi son yıllarda rekombinant teknoloji ile bertaraf edilmiştir. Ayrıca doku reddi tehlikesi de ortadan kalkmıştır.

**Tablo 3.** Geleneksel olarak hayvansal kaynaklardan elde edilen ve tedavide kullanılan bazı proteinler.

| Protein                                   | Kaynak                                                | Kullanılışı                                      |
|-------------------------------------------|-------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| <b>İnsulin</b>                            | Domuz/sığır pankreası                                 | Tip 1 diabet tedavisi                            |
| <b>Glukagon</b>                           | Domuz/sığır pankreası                                 | İnsulinin oluşturduğu hipogliseminin giderilmesi |
| <b>Folikülü stimüle eden hormon (FSH)</b> | Domuz hipofizi veya menopoz sonrasındaki kadın idrarı | Hayvanlarda süperovülasyon oluşturulması         |
| <b>İnsan korionik gonadotropin (HCG)</b>  | Gebe kadın idrarı                                     | İnfertilite tedavisi                             |
| <b>Eritropoietin</b>                      | İdrar                                                 | Anemi tedavisi                                   |
| <b>Kan pıhtılaşması faktörleri</b>        | İnsan plazması                                        | Hemofili tedavisi                                |

## PROTEİN YAPISINDAKİ BİR BİYOFARMASÖTİĞİN SAFLAŞTIRILMASI VE MÜSTAHZAR HALİNE GETİRİLMESİ

Proteinler çeşitli kaynaklardan elde edilebilirler. Proteinlerin endüstriyel ve laboratuvar ölçeğinde saflaştırılmalarında genellikle aynı yollar takip edilir. Proteinin fizikokimyasal özellikleri saflaştırma yönteminin seçilmesinde önemlidir. Bunlar: çözünme yeteneği, molekül ağırlığı ve yüküdür. Rekombinant proteinlere bir “etiket” takılarak söz konusu proteine ortamdan daha kolay ayrılmasını sağlayacak bir özellik kazandırılır. Tabii burada saflaştırmanın ne amaçla yapıldığı önem kazanır. Bilimsel araştırma amaçlı saflaştırmada ileri derecede bir saflaştırma gerekir ancak elde edilen miktar 100 mg-1 g arasında olabilir. Halbuki tedavide kullanılacak proteinler endüstriyel ölçekte saflaştırılırlar ve 10-100 kg miktarlarında elde edilmeleri gerekir. Sütten elde edilen ve gıda endüstrisinde kullanılan proteinler için ise 100 000 kg düzeylerine çıkılabilir. Burada saflaştırma oranı daha düşük tutulur.

Proteinler belirli hücreler tarafından eksprese edilip üretildikten sonra, bu hücrelerden arındırılarak saflaştırılmaları ve müstahzar haline getirilmeleri gerekir. Bu olaya “downstream processing” adı verilmektedir.

Proteinlerin saflaştırılması, kontaminasyonu önlemek için “temiz-oda (clean-room)” koşullarında gerçekleştirilmelidir. Kullanılan su enjektabl preparatlarda kullanılan yüksek saflıktaki su olmalıdır.

Proteinler pH değişikliklerinden kolaylıkla etkilenerek denatüre olurlar ve biyolojik aktivitelerini kaybederler. Biyofarmasötiklerin çoğu nötral pH'ta pH 5-8 arasında stabilize gösterirler. Bu yüzden saflaştırma sırasında saf su yerine saf su ile hazırlanan tampon çözeltiler kullanılır.

Biyofarmasötik proteinlerin saflaştırılmasında izlenen genel akış şeması Şekil 2’de gösterilmiştir. Şimdi bu basamakları adım adım görelim:

Birinci basamakta proteinin üretildiği kaynaktan geri kazanımı söz konusudur. Eğer hayvansal bir hücreden elde ediliyorsa, protein genellikle ortama salgılanır diğer bir deyişle hücre-dışı (ekstraselüler)’dir. Protein, rekombinant bakteriler tarafından üretilmişse hücre içine salgılanır. Her iki durumda ilk adım hücrelerin toplanmasıdır. Bunun için genellikle santrifüjleme bazen de mikrofiltrasyon işlemleri uygulanır. Ürün hücre dışındaysa hücreler inaktive edilerek (otoklavlama ile) atılır, protein sıvı kısımdan daha ileri tekniklerle saflaştırılır. Ürün hücre içindeyse bakteri hücreleri çöktürüldükten sonra hücre çeperi parçalanarak hücre içeriğiyle birlikte söz konusu proteinin açığa çıkması sağlanır.

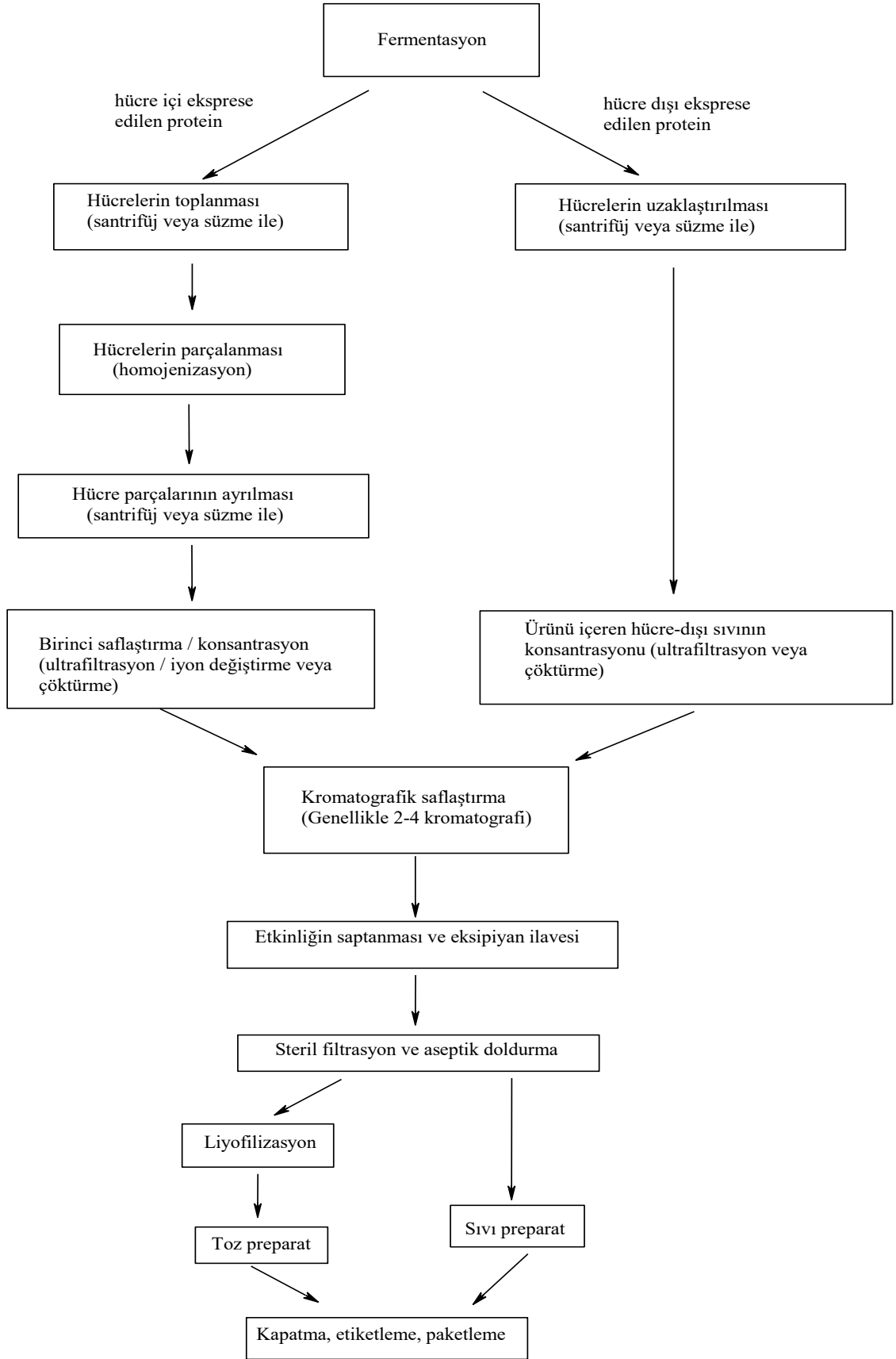
Bakterilerin parçalanması hücre duvarının varlığından dolayı zordur. Bakteri hücre duvarının parçalanmasında kullanılan teknikler Tablo 4’de gösterilmiştir.

**Tablo 4.** Bakteri hücrelerinin parçalanmasında kullanılan tekniklerden bazıları.

|                                             |
|---------------------------------------------|
| Kimyasal muamele: Deterjanlar               |
| Antibiyotikler                              |
| Organik çözücüler (örn: aseton, toluen)     |
| Denatüre edici ajanlar (örn: üre, guanidin) |
| Alkali ile muamele                          |
| Sonikasyon                                  |
| Homojenizasyon                              |
| Abraziflerle çalkalama (cam bilyeler)       |
| Lizozim ile muamele                         |

Denatüre edici ajanlar bakteri hücre duvarını eritmekte etkin oldukları halde elde edilecek proteinin de denatürasyonuna neden olabileceklerinden bazı mahzurlar taşırlar. Bu yüzden homojenizasyon ve cam bilyelerle karıştırma gibi mekanik yöntemler tercih edilir. Burada da oluşan ısı uygun bir soğutma sistemi ile bertaraf edilir. Homojenizasyondan sonra kalan hücre parçaları santrifüj veya mikrofiltrasyon ile uzaklaştırılır.

Nukleik asidin uzaklaştırılması: Hücre homojenatında bulunan nukleik asitler bazı durumlarda ortamın viskozitesini artırarak çalışmayı zorlaştırırlar. Hem hücreleri çöktürmek için gereken santrifüj hızı artar hem de yüksek viskozite filtrasyonu zorlaştırır. Proteinin tam olarak saf elde edilmesinde de nukleik asidden arınmış olması gerekir.



**Şekil. 2.** Biyofarmasötik bir proteinin saflaştırılmasında ve müstahzar haline getirilmesinde izlenen genel akış şeması.

Bu amaçla iki yöntem kullanılır:

- Çöktürme: Katyonik (+ yüklü) moleküller, negatif yüklü RNA ve DNA'ya bağlanarak nukleik asitleri çöktürürler. Bu amaçla en çok kullanılan madde, uzun zincirli katyonik bir polimer olan **polietilenimin**'dir. Ancak bu maddenin reaksiyona girmeyen monomerinin çok az da olsa saflaştırma ortamında kalması, kanserojen etki yaratabileceğinden kullanımında çekince doğmuştur.
- Nukleazlarla muamele: son zamanlarda etkin, ucuz olması dolayısıyla tercih edilen yöntemdir. Nukleazların kendileri de insan organizması için zararsız maddelerdir.

Bundan sonraki basamakta hücrelerden arındırılan protein çözeltisi konsantre edilir. Konsantrasyon için,

- Tuzlarla veya etanolla çöktürme, santrifüj ve çöken proteinin küçük bir hacimde çözülmesi,
  - Ultrafiltrasyon ile konsantrasyon (tercih edilen)
  - İyon değiştirme kromatografisi,
- gibi yöntemler kullanılabilir.

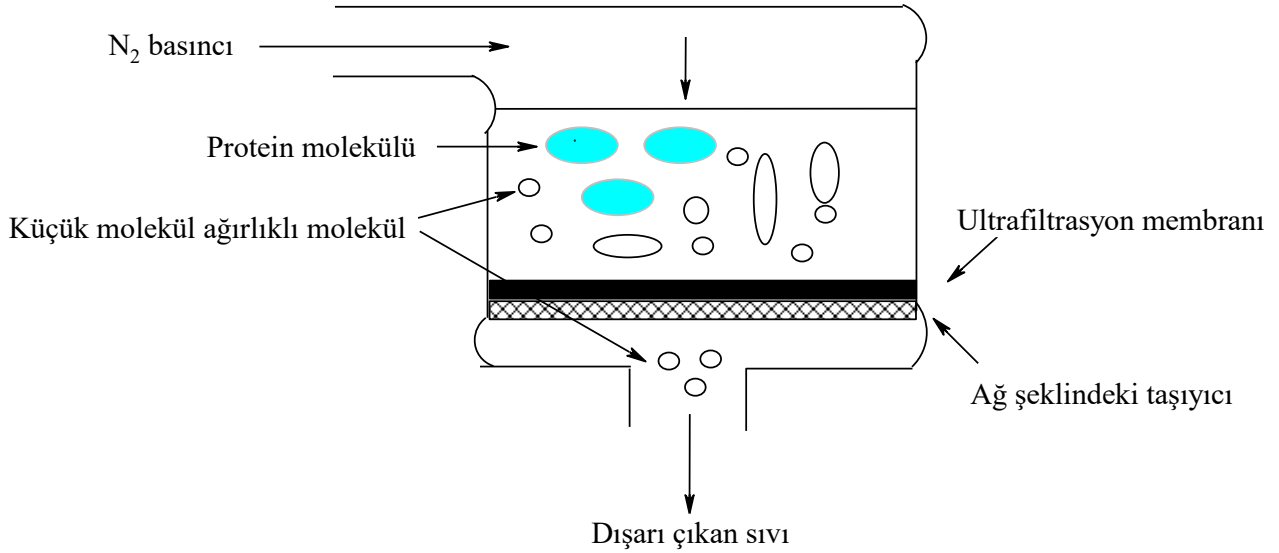
### Ultrafiltrasyon

Çözeltiden hücreleri ve hücre parçalarını uzaklaştırmak için kullanılır. Bu amaçla kullanılan membran filtrelerin delik (por) büyüklükleri 0.1-10 µm arasındadır. Bu delikler hücre parçalarını tutacak ama protein gibi makromolekülleri geçirecek şekilde ayarlanmıştır. En çok kullanılan membranlar 3, 10, 30, 50, ve 100 kDa molekül ağırlarındaki proteinleri geçirmeyecek şekilde ayarlanmıştır. Ultrafiltrasyon membranları genellikle **selüloz asetat** veya **selüloz nitrattan** yapılmışlardır. **Polivinil klorür** veya **polivinil karbonat** da kullanılabilir.

Ultrafiltrasyonda genellikle karıştırıcı-hücre sistemi kullanılır. Hücrenin dibinde bulunan ağ şeklindeki bir süporun (taşıyıcı) üzerine membran yerleştirilir ve konsantre edilecek çözelti membranın üzerine dökülür. Genellikle azot gazı ile basınç uygulanır. Filtrenin (membranın) delik büyüklüğünden daha küçük olan moleküller, su, tuzlar v.s. alta geçerken filtrenin üzerinde tutulan protein çözeltisi böylece konsantre olur (Şekil 3). Bu moleküllerin membranı tıkamasını önlemek için devamlı karıştırma uygulanır. Büyük miktarlardaki ultrafiltrasyonlarda endüstriyel ölçekte, yerine kartuş şeklindeki membranlar kullanılır.

Ultrafiltrasyon son zamanlarda birçok üstünlüğü yüzünden proteinlerin konsantrasyonunda tercih edilir bir yöntem olmuştur. Bu üstünlükleri:

- Yumuşak bir yöntem olduğundan proteinlerin bioaktivitelerini etkilemez.
- % 99 gibi bir verim elde edilir.
- Diğer yöntemlere göre hızlıdır.
- Çok az yardımcı ekipman (teçhizat) gerektirir.



Şekil. 3. Laboratuvar ölçeğinde bir ultrafiltrasyon cihazının şematik gösterimi (Walsh s.138)

## Kromatografi ile İleri Saflaştırma

### Ek Kaynaklar:

- Kuşçu, I., Berkan, H. Biokimya Lisansüstü Programı Ders Notları, İstanbul, 1988.
- Pharmacia Fine Chemicals, Sephadex®—gel filtration in theory and practice.
- Pharmacia Fine Chemicals, Sephadex® ion exchangers, a guide to ion exchange chromatography
- Pharmacia Fine Chemicals, Affinity Chromatography, principles & methods.

Protein üretildiği kaynak hücreden ayrıldıktan sonra homojen hale gelene kadar, diğer bir deyişle istenen biyolojik aktiviteyi göstermeyen proteinler uzaklaştırılarak, saflaştırılmalıdır. Bunun için genellikle sütun kromatografisi kullanılır.

Genellikle birbirini izleyen 2-4 kromatografik yöntem kullanılır. Diğer bir deyişle protein ard arda en az 2 sütundan geçirilerek saflaştırılır. En çok kullanılan yöntemler, Tablo 5'te gösterilmiştir.

Sütun kromatografisinin prensibi, proteinleri iki faz arasında ayrıştırarak birbirlerinden ayrılmalarını sağlamaktır. Bu iki faz:

- 1-Katı (stasyoner) faz: genellikle sütun dolgu maddesi (matriks)
- 2- Sıvı (mobil): genellikle sütundan geçirilen bir tampon çözelti (elüsyon çözeltisi, elüant).

Jel filtrasyon dışındaki tüm kromatografiler proteinlerin sütun dolgu maddesine adsorbsiyonu prensibine dayanır. Uygun bir sıvı ortamda çözülmüş olan protein dolgu maddesi ile doldurulmuş sütuna uygulanır. Sütunlar genellikle camdan veya plastikten yapılmışlardır. Endüstriyel ölçekteki dev sütunlar için ise paslanmaz çelik kullanılır. Protein dolgu maddesi tarafından adsorplanarak tutulur. İdeal koşullarda sadece saflaştırılacak proteinin tutulması diğerlerinin ise elüsyon tamponuyla ilk başta elüe olmaları istenir. Daha sonra değişen molaritelerdeki veya değişen tuz konsantrasyonlarındaki tamponlar basamaklı veya sürekli olarak sütundan geçirilerek, sütuna bağlanmış olan proteinler fraksiyonlar halinde deney tüplerinde, bir fraksiyon toplayıcı aracılığıyla toplanır. Her deney tübü protein ve biyolojik aktivite açısından test edilerek bir elüsyon grafiği çizilir. Bu grafik bilgisayar programı ve bir "recorder" aracılığıyla kaydedilebilir (Şekil 5). Endüstriyel ölçekte tüm bu

işlemler bilgisayar programları ile sıkı bir şekilde kontrol edilir. Bu ölçekte toplanan fraksiyonlar birkaç litre olabilir.

**Tablo 5.** Protein saflaştırılmasında en çok kullanılan kromatografik yöntemler.

| <b>Teknik</b>                       | <b>Ayırma prensibi</b>                                                              |
|-------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| Jel-filtrasyon kromatografisi       | Proteinlerin büyüklüklerine, molekül ağırlıklarına göre                             |
| İyon değiştirme kromatografisi      | Proteinlerin yüzeylerindeki yük farklarına göre                                     |
| Hidrofobik etkileşme kromatografisi | Proteinlerin yüzey hidrofobisitelerindeki farklılıklara göre                        |
| Afinite kromatografisi              | Proteinin belirli bir liganda olan ilgisine göre                                    |
| Kromatofokusing                     | Proteinlerin izoelektrik noktalarındaki farklılıklara göre                          |
| Hidroksilapatit kromatografisi      | Proteinler ile kalsiyum fosfat dolgu maddesi arasındaki kompleks etkileşimlere göre |

Genellikle bir iyon değiştirici kromatografi ve bir jel filtrasyon tekniği birlikte kullanılır. Afinite kromatografisi, belirli moleküllere spesifik ilgisi bilinen proteinleri saflaştırmak için tercih edilir.

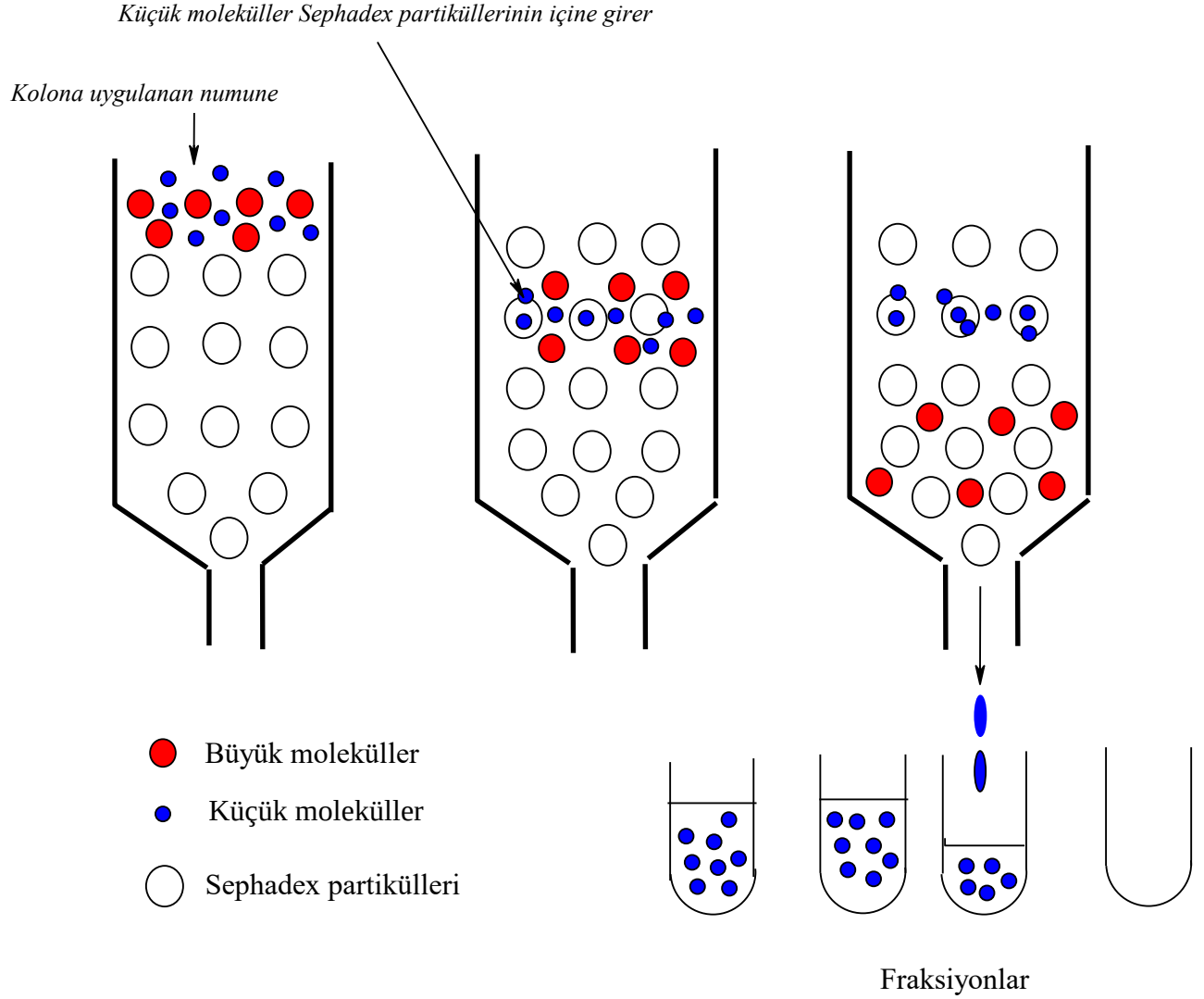
Bu kromatografilerde genellikle düşük bir basınç uygulanır. Endüstriyel protein saflaştırmasında bazen yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) de kullanılır. HPLC son bir saflaştırma evresi olarak örneğin yüksek saflıkta insulin preparatları için kullanılmıştır.

#### **Jel filtrasyon (Jel kromatografisi)** (proteinlerin büyüklüklerine göre ayrılması)

Jel filtrasyon, maddeleri molekül büyüklüklerine (molekül ağırlıklarına) göre ayırtıran bir tür kromatografik yöntemdir. Burada değişik şişme özelliği gösteren Sephadex® jelleri kullanılır. Sephadex® (Sefadeks) modifiye edilmiş bir dekstrandır. Dekstran makromolekülleri üç boyutlu bir polisakkarid ağı oluştururlar. Dekstranlar, bileşimlerindeki glukozlarda bulunan hidroksil gruplarının çokluğu nedeniyle Sephadex kuvvetli hidrofil karakterdedir ve suda şişme özelliği gösterir. Şişme özelliklerine göre boncuk büyüklüğü değişen çeşitli Sephadex tipleri bulunmaktadır. Saflaştırılacak proteinin molekül ağırlığına göre jelin boncuk büyüklüğü seçilir. Jeli oluşturan boncukların gözenekli bir yapısı vardır, boncuklar arasında da boşluklar bulunur (Resim 5). Bu boşluklar jelin içinde şiştiği çözeltiyi içerir, boncuklar arasındaki boşlukta bulunan çözelti hamcına “boş hacim” (void volume) adı verilir. Büyük moleküller gözenekler içine giremedikleri için boncuklar arasındaki boşluklardan geçerek ilerler küçük moleküller ise, boncukların yüzeylerindeki gözeneklere girer ve bir süre buralarda kaldıktan sonra çözücü tarafından sürüklenerek ilerler, bundan dolayı küçük moleküllerin ilerleyişi engellenmiş olur. Sonuç olarak elüsyon sırasında, önce büyük moleküller daha sonra küçük moleküller elüe olur (Şekil 4). Böylece moleküller sütundan azalan molekül ağırlıklarına göre çıkarlar. Jel filtrasyon tekniğine “size-exclusion chromatography” (büyüklüğe göre ayırma) adı da verilir. Sephadex jelleri bir elüsyondan sonra kolaylıkla rejenere edilerek tekrar kullanılabilme avantajına da sahiptirler.

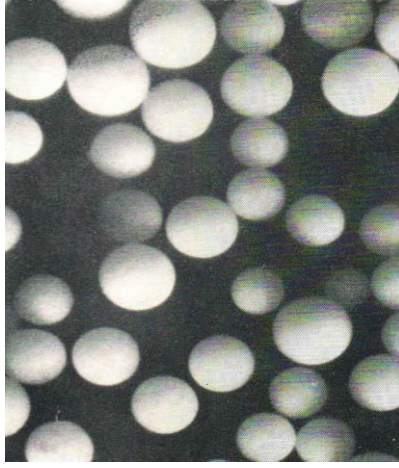
Jel filtrasyonda, hem kolona tatbik edilen numunenin hacminin küçük olması gerektiğinden hem de protein, uygun tamponun büyük hacimlerde kolondan geçirilmesiyle elüe edildiğinden, saflaştırılan protein tekrar seyreltik ve çok hacimli bir hale gelir ve tekrar ultrafiltrasyonla konsantre edilmesi gerekir. Ayrıca elüsyon düşük basınç altında yapıldığından uzun süre alır. Bunlar da ek maliyet getireceğinden endüstride pek tercih

edilmez. Jel filtrasyon tekniği bu yüzden protein saflaştırılmasının erken evrelerinde nadiren kullanılır, genellikle son evrede, protein artık aşağı yukarı saf halde ve küçük bir hacimde konsantre durumdayken, bu yöntemden yararlanılır. Laboratuvar ölçeğinde bir jel filtrasyon düzeneği şekil 5'te görölmektedir.

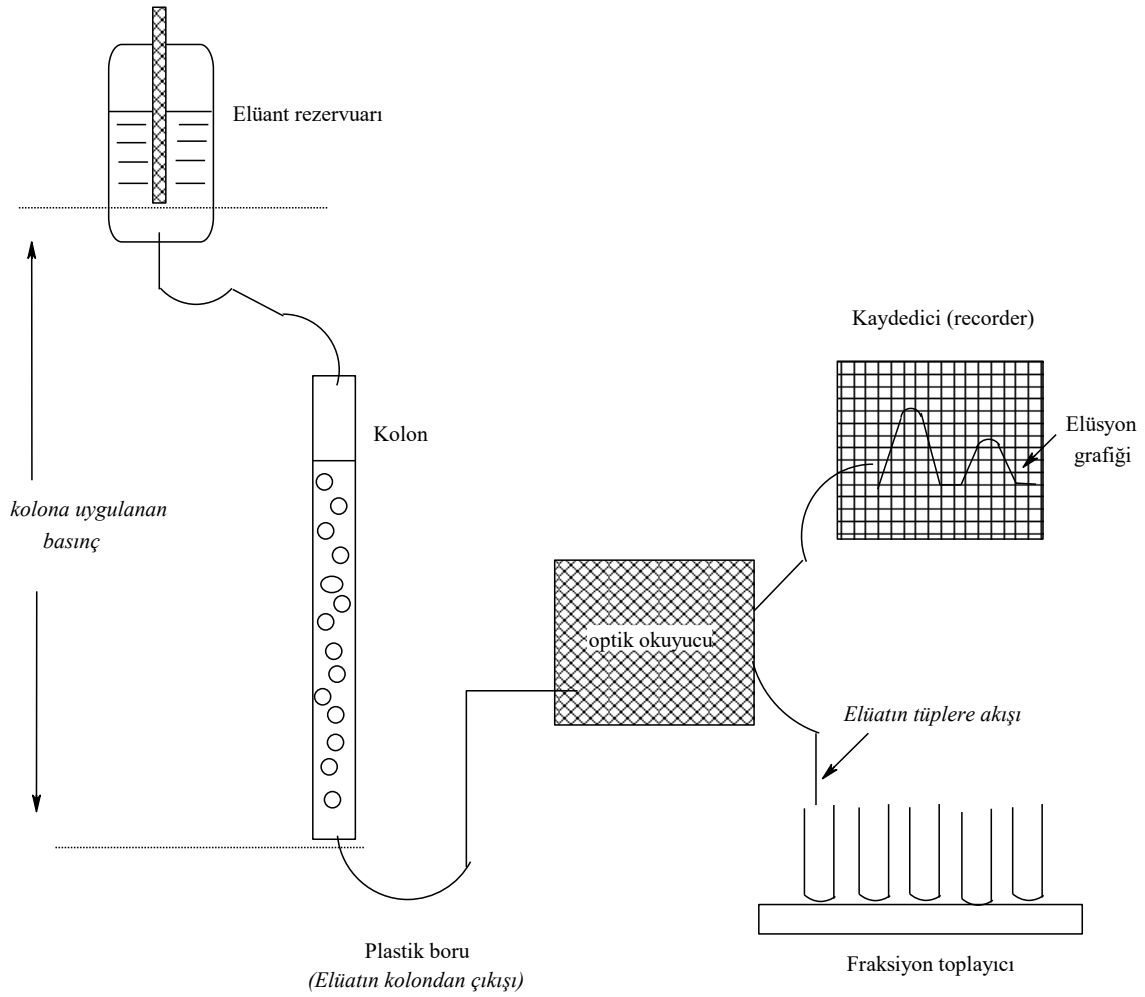


**şekil 4.** Sephadex jel filtrasyonunun presibinin şematik gösterimi.  
(Sephadex gel filtration in theory and practice kitapçığından)





**Resim 5.** Polimerize olmuş Sephadex partikülleri.  
(Sephadex gel filtration in theory and practice kitapçığından)



**Şekil 5.** Jel filtrasyon düzeneğinin şematik gösterimi.

## İyon değiştirme kromatografisi (Ion Exchange chromatography)

İyon değiştirme kromatografisinde kolon materyeli olarak, iyon değiştirici maddeler (ion exchangers) kullanılır. Bir iyon değiştirici, suda çözünmeyen polimerik yapıda bir matriks ve buna kimyasal bağlarla bağlı + veya – yük taşıyan fonksiyonel gruplardan oluşmuştur. Süspansiyon halindeyken bu fonksiyonel gruplara “karşıt iyon” (counter ion) adı verilen zıt yüklü iyonlar elektrostatik olarak bağlı durumdadır. Karşıt iyonlar, aynı yüke sahip başka iyonlarla, reversibl olarak yer değiştirebilirler. Bu sırada matrikste herhangi bir değişiklik meydana gelmez.

Matriks + yüklü fonksiyonel gruplar taşıyorsa, karşıt iyonlar – yüklüdür ve – yüklü başka iyonlarla yer değiştirebilirler. Bu iyon değiştiricilere **anyon değiştirici** denir. Matriks – yüklü fonksiyonel gruplar taşıyorsa, karşıt iyonlar + yüklüdür ve + yüklü başka iyonlarla yer değiştirebileceklerinden, bu iyon değiştiriciler **katyon değiştirici** adını alırlar (şekil 6).

İyon değiştiricilerin matriks kısmı, alüminyum silikat, sentetik bir reğine ya da bir polisakkarit türevi olabilir. Ancak bir iyon değiştiricinin en önemli özelliği fonksiyonel gruplarından ileri gelir. Bu grupların niteliği iyon değiştiricinin sınıfını ve kuvvetini belirler. Bu grupların toplam sayısı ise iyon değiştiricinin kapasitesi hakkında bilgi verir. Katyon değiştiricilerin fonksiyonel grupları, fenolik hidroksil, karboksil ve sülfonik gruplardır (Tablo 6). Anyon değiştiricilerde alifatik ya da aromatik amino grupları bulunur. Sülfonik ve kuaterner amino grupları kuvvetli, ötekiler ise zayıf iyon değiştiricileri meydana getirirler.

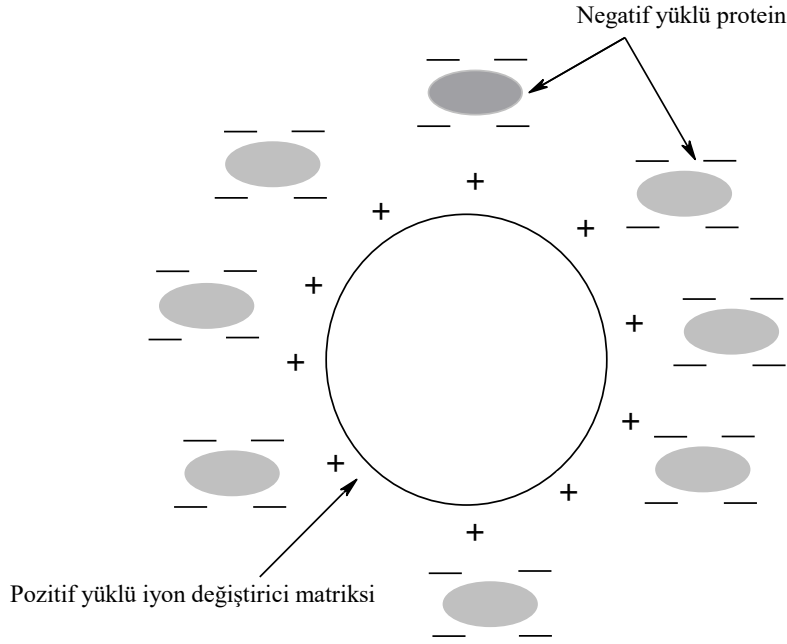
Özetlersek, iyon değiştiriciler, temas ettikleri çözeltideki bazı iyonları bünyelerine alan ve onların yerine, aynı yükte, bir başka iyon veren, yüksek polimerik yapıda maddeler olarak tanımlanabilir.

100 yıla yakın bir süredir bilinen Permutit ve Zeolit adlı maddeler sodyum alüminyum silikat yapısında olup, su ile karıştırıldıkları zaman, suda bulunan kalsiyum iyonlarını bağlarlar ve eşit miktarda sodyum iyonunu suya verirler. Bu nedenle suyun sertliğinin giderilmesinde kullanılırlar. Bu olay reversibl olup  $Ca^{+2}$  iyonları ile doymuş Permutit veya Zeolit, NaCl çözeltisi ile yıkanır, bağlamış oldukları  $Ca^{+2}$  iyonlarını vererek  $Na^{+}$  iyonlarını yeniden bünyelerine alırlar ve bu şekilde rejenere edilmiş olurlar. Daha sonraları iyon değiştiricilerin yapımında sentetik reğineler kullanılmıştır. Ancak proteinlerle yapılan çalışmalarda reğinelerin kullanımı sınırlıdır. Büyük moleküllü ve dayanıksız maddeler olan proteinler, reğineler tarafından kolayca denatüre edilebilirler ya da irreversibl olarak bağlanabilirler. Bu nedenle iyon değiştirici reğineler, daha çok, küçük moleküllü globuler proteinlerin ve peptidlerin saflaştırılmasında kullanılır.

Proteinlerin saflaştırılmasında, reğinelerin yerini polimerik yapıda selüloz ve dekstran türevleri almıştır. Bunların kolon dolgu maddesi olarak su tutma ve suda şişme özellikleri dolayısıyla avantajları vardır ve proteinleri denatüre etmezler.

Proteinleri meydana getiren 20 farklı amino asidin 7 tanesi + veya – yüklü yan zincirler içerirler. Bunlardan, – yüklü olan asidik amino asidler: aspartik ve glutamik asid ve + yüklü olan bazik amino asidler: arginin, histidin ve lizindir. Bir proteinin net yükü, bu amino asidlerin protein molekülündeki sayılarına ve protein çözeltisinin pH'ına bağlıdır. Bir proteinin yüksüz olduğu pH'a hatırlanacağı gibi o proteinin “izoelektrik noktası” adı verilir. Proteinin izoelektrik noktasının üzerindeki pH'ta tüm proteinler – yüklü, altındaki pH'larda ise + yüklüdürler.

Kovalan olarak bağlanmış + gruplar içeren iyon değiştiricilere anyon değiştiriciler denir. İyon değiştirme kromatografisinde anyon değiştirici kullanılıncı matrikse aminoetil veya DEAE (dietilaminoetil) grubu gibi pozitif yüklü bir molekül bağlanır, negatif yüklü olan protein DEAE ile yer değiştirerek sütuna bağlanır, daha sonra protein kolondan elüsyon tamponunun pH'ı veya tuz konsantrasyonu değiştirilerek elüe edilir.



**Şekil 6.** İyon değiştirme kromatografisinin prensibi. Burada anyon değiştirici gösterilmiştir. Katyon değiştirici bunun tersidir.

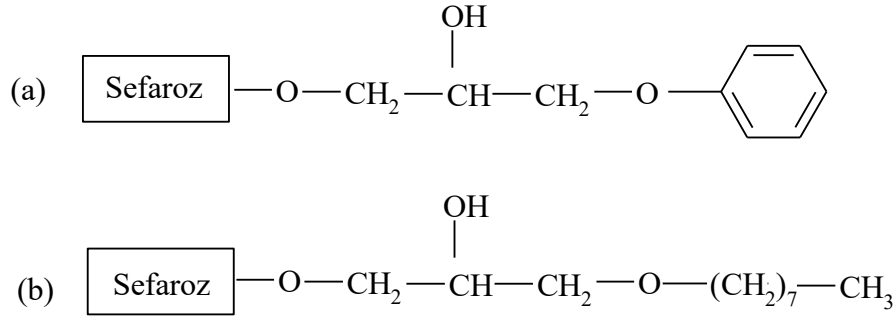
**Tablo 6.** İyon değiştirme kromatografisinde en çok kullanılan iyon değiştiriciler.

| Grup adı                  | Grup yapısı                                | İyon değiştirme şekli |
|---------------------------|--------------------------------------------|-----------------------|
| Dietilaminoetil (DEAE)    | $-O-(CH_2)_2-NH^+-(CH_2-CH_3)_2$           | Anyon                 |
| Kuaterner amonyum (Q)     | $-CH_2-NH^+-(CH_3)_3$                      | Anyon                 |
| Kuaterner aminoetil (QAE) | $-O-(CH_2)_2-N^+(C_2H_5)_2-CH_2-CHOH-CH_3$ | Anyon                 |
| Karboksimetil (CM)        | $-O-CH_2-COO^-$                            | Katyon                |
| Metil sülfonat (S)        | $-O-CH_2-SO_3^-$                           | Katyon                |
| Sülfopropil (SP)          | $-CH_2-CH_2-CH_2SO_3^-$                    | Katyon                |

### Hidrofobik etkileşme kromatografisi (hydrophobic interaction chromatography)

Proteinlerde bulunan 20 amino asitten 8 tanesi, R gruplarının polar olmayan yapısından dolayı hidrofobik (suyu sevmeyen) olarak nitelendirilir. Bunlar: Alanin, Valin, Lösin, İzolösin, Metiyonin, Fenilalanin, Triptofan ve Prolin'dir. Proteinlerin çoğu bu hidrofobik amino asitler molekülün iç kısmında kalacak ve böylece etraftaki su ile etkileşmeye girmeyecek şekilde katlanmışlardır. İçte kalan bu gruplar diğer hidrofobik gruplarla etkileşirler. Hidrofobik amino asitlerden az bir kısmı ise proteinin yüzeyinde yer alırlar ve protein molekülünün çevresindeki sulu ortamla reaksiyona girerler. Proteinlerin yüzeylerindeki bu hidrofobik amino asitlerin miktarına bağlı olarak değişik hidrofobisiteleri vardır. Hidrofobik etkileşme kromatografisi proteinleri değişen hidrofobisitelerine göre ayırmayı hedefler. Burada uygun bir matrikse kovalan olarak bağlanmış olan hidrofob moleküller ile proteinin yüzeyindeki hidrofob gruplar arasındaki etkileşmeler söz konusudur.

Matriks olarak en çok agaroz jel olan Sepharose® (Sefaroz) ve ona bağlı gruplar olarak oktil- ve fenil- grupları kullanılır (Şekil 7).



**Şekil 7.** Hidrofobik etkileşme kromatografisinde kullanılan (a) fenil-, (b) oktil-, sefarozun şematik yapıları.

Hidrofobik etkileşme kromatografisi ile proteinlerin ayrılması, protein, jel matriksi ve sulu ortam arasındaki etkileşimlere bağlıdır. Çözeltinin iyonik gücünün tuz ilavesiyle artırılması, proteinin hidrofobisitesini artırır. Tuz ilavesi proteinin etrafındaki su moleküllerini çekerek proteinin çevresindeki hidrofobik grupları açığa çıkarır. Dolayısıyla bu kromatografide proteinler yüksek iyonik güce sahip çözeltilerde çözündürülerek kolona uygulanırlar ve kolondan geçerken hidrofobik etkileşmeyle kolona tutunurlar. En hidrofobik yapıya sahip protein kolona en güçlü bağlanandır. Proteinler elüantın iyonik gücü düşürülerek kolondan elüe edilirler.

### Afinite kromatografisi

Afinite kromatografisi proteini özgün biyolojik aktivitesine göre ayırabildiği için, genellikle en etkin protein saflaştırma yöntemi olarak belirtilir. Bu teknik, belirli bir kaynaktan elde edilecek maddeye karşı biyolojik afinite (ilgi) gösteren dolgu maddesi kullanılarak uygulanan bir tür adsorpsiyon kromatografisidir. Enzimler için bir tür immobilizasyon tekniği olduğu da söylenebilir.

Kolona doldurulan dolgu maddesine (matrikse) saflaştırılması istenen proteine spesifik olan (örneğin, protein bir enzimse substratı veya kofaktörü) bir fonksiyonel grup (biyospesifik ligant) kovalan olarak bağlanır. Kolondan içinden ayrılması istenen proteini de içeren karışım geçirildiğinde, protein spesifik ligantına bağlanarak kolona adsorbe olur. Bundan sonra karışımda bulunan ve kolona bağlanmayan diğer maddeler, uygun elüantlar geçirilerek kolondan uzaklaştırılır. Daha sonra adsorpsiyonun gerçekleştiği elüsyon koşulları değiştirilerek adsorbe olan biyolojik aktif protein kolondan elüe edilir. Burada çözeltinin polaritesini değiştiren etilen glikol gibi bir maddenin ilavesi ya da ligantla yarışmaya girecek bir maddenin (örneğin, ligant enzimin substratıysa substrat analogunun) ilavesi söz konusu olabilir. Bu şekilde ayrılması istenen madde, karışımdaki diğer maddelerden arındırılarak elde edilmiş olur.

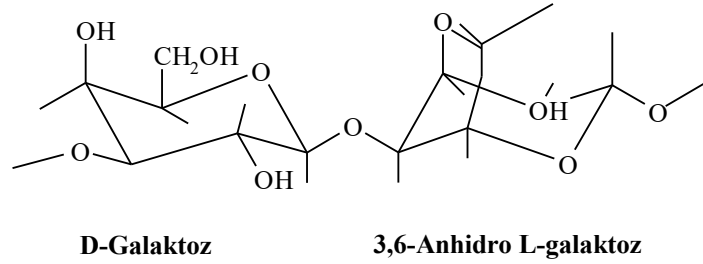
Bazı maddelerin afinite kromatografisiyle saflaştırılmasında kullanılan ligantlar Tablo 7’te gösterilmiştir.

Afinite kromatografisinde matriks olarak kullanılan en uygun madde agarozdur. Agaroz, deniz yosunlarındaki agar-agar adlı heteropolisakkaritten elde edilir. Agaroz, tekrarlanan D-galaktoz ve 3,6-anhidro-Lgalaktoz birimlerinden oluşur (Şekil 8). Agaroz matriks üzerine birçok kimyasal grup (fonksiyonel grup) kovalan olarak bağlanabilir ve bu fonksiyonel gruplarla birçok maddeler kenetlenilebilir. Piyasada en çok kullanılan Sepharose® (Sefaroz)’dur.

**Tablo 7.** Afinite kromatografisinde kullanılan bazı ligantlar. (Pharmacia kitapçığı)

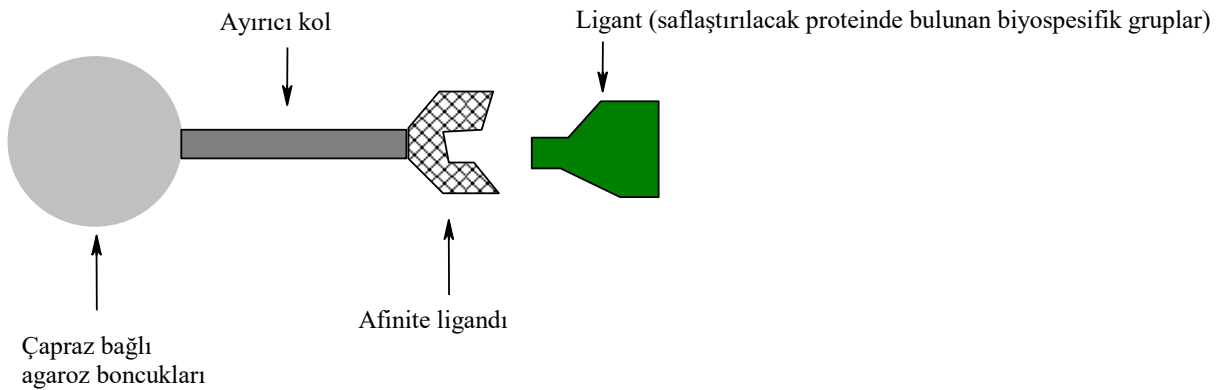
| Saflaştırılacak madde | Ligant                                             |
|-----------------------|----------------------------------------------------|
| Enzim                 | Substrat, substrat analogu, kofaktör, inhibitör    |
| Antikor               | Antijen, virüs, hücre                              |
| Lektin                | Polisakkarid, glikoprotein, hücre yüzeyi reseptörü |
| Nukleik asit          | Tamamlayıcı baz sekansı, histon, polimeraz         |
| Hormon, vitamin       | Reseptör, taşıyıcı protein                         |
| Hücre                 | Hücre yüzeyi spesifik proteini, lektin             |

**Agaroz**



**Şekil 8.** Agarozun yapısı.  
(Pharmacia afinite kitapçığı)

Çeşitli agarozların fonksiyonel grup içeren şekilleri olduğu gibi, bu fonksiyonel gruplara başka gruplar da bağlanarak agarozun daha spesifik olarak belirli moleküllere afinite göstermesi sağlanabilir. Biyolojik proteinlerin aktif bölgeleri genellikle molekülün iç kısmında derinde bir yerdedir ve küçük ligantlarla (örneğin enzimin substratı) hazırlanan matrikslere çok düşük düzeyde bağlanır. Esasen matrikse bağlı grupların mümkün olduğunca matriksten uzak olması daha uygundur, çünkü bu şekilde matrikse adsorbe olacak molekül matriksten uzaklaşmış olur ve matriks ile adsorbe olacak madde arasında spesifik olmayan elektrostatik çekimler engellenmiş olur. Matrikse bağlı fonksiyonel grupları matriksten uzaklaştıran ara gruplara **ayırıcı kol** (spacer arm) adı verilir. Ayırıcı kol ne kadar uzun olursa matriks ile matrikse adsorbe olacak madde arasındaki spesifik olmayan çekim kuvvetleri yok olacağından madde doğrudan doğruya matriksteki liganttaki fonksiyonel gruplara bağlanır (Şekil 9). Ayırıcı kol olarak en çok kullanılan kimyasal madde **siyanojen bromür (CNBr)**'dür. Çok toksik bir madde olduğundan genellikle hazır ticari preparatları CNBr ile aktive edilmiş Sefaroz 4B kullanılır.



**Şekil 9.** Afinite kromatografisinin prensibinin şematik gösterimi (Walsh, G. s 149).

Afinite kromatografisi çok kısa sürede uygulanabilen bir yöntemdir, çünkü çoğunlukla çok küçük hacimli kolonlar kullanılır. Bu yöntemle, genellikle diğer yöntemlerle elde edilemeyen 1000 gibi saflaştırma oranlarına aşağı yukarı % 100 verimle ulaşılabilir. Bir saflaştırma protokolüne afinite kromatografisi basamağının eklenmesi basamak sayısını azaltarak zaman kazanılmasını sağlar. Ancak gerek afinite adsorbanlarının çok pahalı olması, gerekse ayırıcı kolların ve uygun koşulların sağlanmasının güçlüğü ve pahalılığı yöntemin endüstriyel ölçekteki dezavantajlarını oluşturur. Ayrıca saflaştırma sürecinin ilk aşamalarında afinite kromatografisinin kullanılması tavsiye edilmez, zira ham ekstraktlardan henüz uzaklaştırılmamış olan çeşitli enzimler pahalı afinite jellerin degradasyonuna ve bozulmasına neden olabilir.

Afinite kromatografisinin başka çeşitleri de vardır. Bunlar:

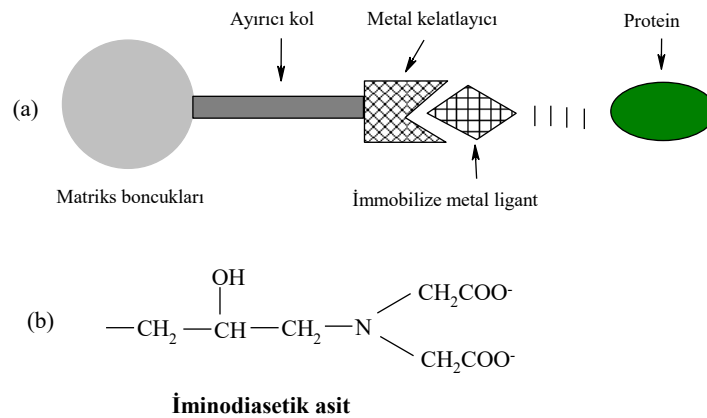
**İmmunoafinite kromatografisi:** Antijenlerin saflaştırılmasında kullanılabilir. Ligant olarak antikorlar kullanılır.

**Protein A kromatografisi:** IgG'nin saflaştırılmasında kullanılır. *Staphylococcus aureus*'un ürettiği ve protein A olarak adlandırılan bir proteinin immunoglobulin G (IgG)'nin F<sub>c</sub> bölgesine bağlanmasından yararlanır.

**Lektin afinite kromatografisi:** Lektinler spesifik karbohidrat birimlerine bağlanma özelliği gösteren ve bitkiler, omurgasızlar ve omurgalıları tarafından sentezlenen proteinlerdir. Bitkilerden elde edilenlere fitohemaglutininler adı da verilir. Lektinlerin birçoğunun bağlandığı spesifik karbohidrat birimleri aydınlatılmış olduğundan bu lektinler ligant olarak glikoproteinlerin saflaştırılmasında kullanılabilir. Ancak lektinlerin saflaştırılmasının da pahalı olmasından dolayı endüstride kullanımı şimdilik sınırlıdır.

**Boya afinite kromatografisi:** Bazı proteinlerin triazin boyar maddesine bağlanma özelliklerinden yararlanır. Burada matriks olarak Mavi Dekstran (Blue Dextran) kullanılır. Mavi Dekstran, yüksek molekül ağırlıklı bir polisakkarid olan dekstrana kovalan olarak bağlanmış bir triazin boyasından (Cibacron Blue F3G-A) ibarettir. Başka triazin boyaları da kullanılmaktadır. Ucuz ve yüksek afiniteli bir yöntem olması gibi avantajlarının bulunmasına karşılık, hangi spesifik proteinin hangi koşullarda kolona bağlandığının saptanmasının zorluğu dolayısıyla kullanımı sınırlıdır. Triazin boyalarındaki negatif yüklü sülfonat grupları kromatografiye iyon değiştirici bir özellik kazandırırken, boyalardaki aromatik gruplar, hidrofobik etkileşme özelliği de gösterebilir.

**Metal kelat afinite kromatografisi:** Burada kromatografi matriksine ayırıcı kol aracılığıyla metal iyonları bağlanır ve saflaştırılacak proteinin yüzeyindeki bazik grupların, genellikle histidin artıklarının yan zincirlerinin, bu metallerle yaptığı zayıf bağlardan yararlanır. Kelatlama yapan ajan olarak genellikle iminodiasetat kullanılmaktadır (Şekil 10).



**Şekil 10.** (a) Metal kelat afinite kromatografisi prensibinin şematik gösterimi.  
(b) En çok kullanılan metal kelatörü olan iminodiasetik asidin formülü.

## Hidroksilapatit kromatografisi

Hidroksilapatit doğada fosfat kayalarında bulunan bir mineraldir, ayrıca kemiklerin mineral yapısını da oluşturur. Laboratuarda hidroksilapatit hazırlamak için önce, eşit miktar ve molaritede disodyum fosfat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) ve kalsiyum klorür ( $\text{CaCl}_2$ ) çözeltileri karıştırılır. İnaktif kalsiyum fosfat ( $\text{Ca}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )'tan ibaret ve bruşit (bruchite) olarak adlandırılan beyaz bir çökelti oluşur. Daha sonra bunun sıcakta NaOH ile muamele edilmesiyle aktif hidroksilapatit [ $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ ] elde edilir (Tiselius ve ark. 1956) (Resim 6).

Hidroksilapatit iyon değiştirici özellikler gösterir. Bununla birlikte, diğer iyon değiştiricilerin genel kurallarına her zaman uymaz. Protein adsorpsiyonunun, hidroksilapatit matriksteki hem kalsiyum hem de fosfatla etkileşimden oluştuğu düşünülmektedir. Ampirik bir yöntem olup, birçok özelliği ve çalışma koşulları deneysel olarak belirlenmiştir. Protein kolondan genellikle potasyum fosfat gradienti ile elüe edilir.



**Resim 6.** Laboratuvarımızda hidroksilapatit elde edilmesi için kurulan düzenek.

Bu şekilde elde edilen hidroksilapatit, buzdolabında bekletilirse kromatografik özelliklerini 1 yıl süreyle korur. Kolon materyeli olarak hazırlanan madde, çok küçük hidroksilapatit kristallerinin agregasyonu ile oluşmuştur. Şiddetli dış etkenler bu yapıyı bozabilirler. Bu nedenle, hazırlanması sırasında karıştırıcının hızı düşük tutulmalı ve ılımlı bir kaynama sağlanmalıdır. Aksi halde, ele geçen madde ince partiküllü olur, kolonun doldurulması sırasında sorunlar çıkar ve iyi bir akış hızı temin edilemez.

## Kromatofokusing

Proteinleri izoelektrik noktalarına göre ayıran bir yöntemdir. İzoelektrik odaklama olarak adlandırılır. Burada kolona doldurulan anyon değiştiriciden farklı bir pH'ta elüsyon gerçekleştirilerek, kolona uygulanan karışımdaki proteinlerin izoelektrik noktalarına göre ayrışmaları sağlanır. Maksimum ayrışma için kolona lineer bir pH gradienti uygulanır.

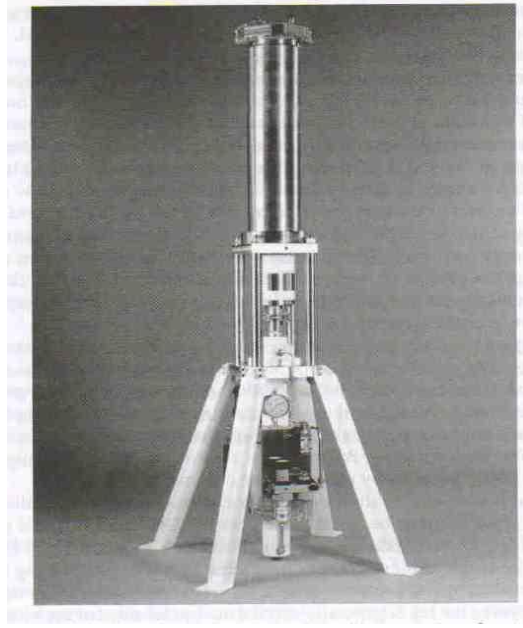
## Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC)

Şimdiye kadar anlatılan kromatografik yöntemler nispeten düşük basınç altında yapılırlar. Bu yüzden bir numunenin ayrışması saatler sürebilir. Bu düşük basınç proteinlerin kolona difüzyonu ve adsorpsiyonu için gereklidir aksi takdirde protein bandları genişler ve düşük ayrışma meydana gelir. Bu yüzden normal kromatografilerde kullanılan adsorbanlar

yüksek basınçlar için uygun değildir. HPLC için öncelikle yüksek basınçta sabit elüsyon hızları sağlayan pompalara ve bu basınçlara dayanıklı kolonlara ihtiyaç vardır. Mikropartiküllü bir stasyonier faz (matriks) içeren çapları çok dar kolonlar kullanılır. HPLC protein saflaştırılmasında analitik amaçlar için kullanılırsa kolon çapları, 4-4.6 mm yükseklikleri 10-30 cm, endüstride preparatif amaçlarla kullanılırsa, çapları 80 cm ve yükseklikleri 1 m kadardır.

Küçük moleküllü proteinler (insulin, büyüme hormonu ve bazı sitokinler) HPLC ile biyolojik aktivite kaybına uğramadan ayrılabilirler. Endüstriyel ölçekte HPLC insulin ve IL2 (İnterlökin 2)'nin saflaştırılmasında kullanılmaktadır. Bu şekilde diğer yöntemlerle saatler süren kromatografi süreleri dakikalara inmektedir. Dezavantajı ise pahalı olması ve kapasitenin düşük olmasıdır.

HPLC'ye alternatif bir yöntem **FPLC (fast protein liquid chromatography)**'dir. Bu teknikte HPLC'ye göre daha düşük basınçlar kullanılır.



**Resim 7.** Preparatif ölçekte HPLC sütunu (15 cm çapında), tanı ve tedavi amaçlı kullanılan proteinlerin saflaştırılmasında kullanılır. Prochrom Nancy Fransa tarafından imal edilmiştir. (Walsh, G. Pharmaceutical Biotechnology, s. 157, Wiley, 2007).

## REKOMBİNANT PROTEİNLERİN SAFLAŞTIRILMASI

Rekombinant teknoloji ile elde edilen proteinler, diğer kaynaklardan elde edilen proteinler gibi, daha önce bildirilen protein saflaştırma akış şemasına göre saflaştırılırlar. Burada ilave olarak genetik mühendislikten yararlanılarak istenilen proteine, spesifik peptid veya protein “etiket” veya “işaret”ler (tags) bağlanabilir. Bu işaretler proteinin saflaştırılma işlemini kolaylaştırmak amacıyla söz konusu proteine belirli özellikler katar. Örneğin, bir proteinin C-terminal ucuna poliarginin veya polilizin kalıntısının eklenmesi proteine kuvvetli bir + yük getirir ve böylece katyon değiştirici kromatografiyle saflaştırılmasını kolaylaştırır. Etiketler, proteinin genetik koduyla etiketi kodlayan gen sekansının birleştirilmesi ile takılır ve böylece istenen özelliğe sahip hibrid proteinler oluşturulur. Tabii saflaştırmanın sonunda bu etiketin kaldırılması gerekir, bu da kimyasal (siyanojen bromür veya hidroksilamin kullanılır) veya enzimatik (sekans-spesifik proteazlar veya C-terminal için karboksipeptidaz A kullanılır) olarak gerçekleştirilir. Ancak tüm bu işlemler sırasında saflaştırılan proteinin zarar



görmemesi gerekir. Bu yüzden bazen etiketin kaldırılmasında ilave bir kromatografi gerekebilir.

## SON ÜRÜNÜN FORMÜLASYONU

Protein yukarıda anlatılan tüm işlemler sonucunda aşağı yukarı % 98-99 saflıkta elde edilmiş olur. Ancak proteinler labil (dayanıksız) olduklarından formülasyonları uzun süre saklanabilmelerini sağlayacak şekilde yapılmalıdır. Bunun için:

- Ürünü stabilize eden çeşitli ekşiyanlar ilave edilir
- Ürün 0.22 µm'den filtre edilerek sterilize edilir ve aseptik koşullarda doldurulur.
- Ürün piyasaya toz şeklinde çıkacaksa liyofilize edilir.

Ürünün çözelti halinde mi toz halde mi piyasaya sunulacağı proteinin çözelti halindeki dayanıklılığına bağlıdır. Bu da deneysel olarak saptanır. Bazı proteinler gerekli stabilize edici ajanların varlığında ve soğukta uzun süre dayanıklıdır, bazıları ise çözelti halinde sadece birkaç saat biyolojik aktivitelerini muhafaza ederler.

Proteinler 40-50°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda denatüre olarak biyolojik aktivitelerini kaybedeceklerinden yüksek sıcaklıklarda sterilize edilemezler. Bundan dolayı, tedavide parenteral olarak kullanılan protein çözeltileri **ultrafiltrasyonla sterilize edilir**. Burada 0.22µm çapında filtreler kullanılır. Bu çaptaki filtreler bakterileri ve mantarları tutar, ancak tüm virusler ve mikoplazmalar için geçerli değildir. Tabii terapötik proteinlerin doldurma işlemleri de tamamiyle aseptik tam otomasyonlu sistemlerle yapılmalıdır.

## KAYNAKLAR

- Can, A., Akev, N. Eczacılık Fakültesi Öğrencileri için Biokimya Dersleri. İst. Üniv. Yayın No. 4776, Eczacılık Fakültesi Yayın No. 82, 2008.
- Tiselius, A., Hjerten, S., Levin, Ö. Protein chromatography on calcium phosphate columns. Arch. Biochem. Biophys. 65, 132-155, 1956.
- Walsh, Gary, Pharmaceutical Biotechnology, Concepts and Applications, John Wiley & Sons Ltd. 2007.
- Walsh, Gary, Proteins, Biochemistry and Biotechnology, John Wiley & Sons Ltd. 2002.