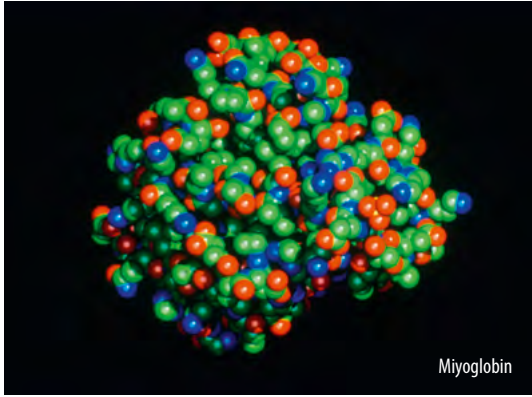


Makromoleküllerin Kristalografisi

Biyolojik makromoleküllerin yapılarının anlaşılması canlıların vücutlarında meydana gelen süreçlerin anlaşılması açısından çok önemli. Örneğin biyolojik moleküllerin yapılarının ve birbirleriyle etkileşimlerinin detaylı bir biçimde kavranmasıyla pek çok hastalığın çaresi bulunabilir. 1913'te yapısı çözümlenen ilk malzeme olan elmas, sadece karbon atomlarından oluşan, basit yapılı bir maddeydi. Yıllar içinde teknoloji geliştikçe, kristalografi ile incelenen maddeler giderek karmaşıklaştı. 2000'de yapısı çözümlenen ribozom, hidrojen atomları haricinde yaklaşık 280.000 atomdan oluşuyordu.



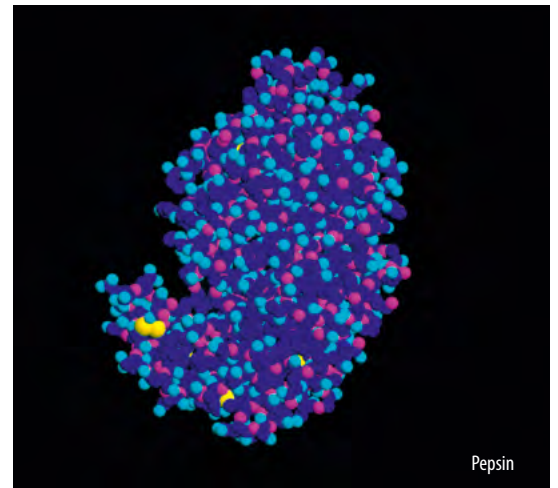
Makromoleküllerin kristalografisinin 1934 yılında X-ışınlarının pepsin moleküllerinden kırınımının gözlemlenmesiyle başladığı söylenebilir. Bu devasa moleküllerin incelenmesini zorlaştıran en önemli etken içinde buldukları ortamdan soyutlandıkları zaman yapılarının bozulmasıdır. Farklı molekülleri kristal yapısında bir arada tutan kuvvetler zayıftır ve kristaller %90 oranında çözücü moleküller içerebilir. Makromolekülleri çevreleyen çözücü moleküller ortamdan uzaklaştığı zaman makromoleküllerin yapısı bozulur. Fakat makromoleküller çok küçük de olsa kristaller oluşturur. Büyük sayılabilecek bir protein kristali genellikle 100 mikrometreden küçüktür. Bu kristallerin içinde yaklaşık 10^{13} protein molekülü bulunur.

Bernal ve Crowfoot'un 1934 yılında sulu ortamda tutulan makromoleküllerin kristal yapısını koruduklarını keşfetmesiyle makromoleküllerin kristalografisi gelişmeye başladı. Yapısı çözümlenen ilk protein,

miyoglobin oldu (1958). Bu proteinin uzun zincirinin düzensiz bir biçimde kıvrık ve dolanık olması bilim insanlarını şaşırtmıştı. Kristalografi kullanılarak yapısı keşfedilen ilk enzim ise lizozimdir (1965). Bu enzimin molekülleri, hidrojen atomları haricinde yaklaşık 1260 atom içeriyordu. Otuz beş yıl sonra kristalografi ile yapısı çözümlenen ribozomlar (hücrelerde proteinlerin üretildiği devasa yapılar) ise hidrojen atomları haricinde yaklaşık 280.000 atomdan oluşuyordu.

Bugüne kadar makromoleküller ile yapılan kristalografi deneylerinin büyük çoğunluğu (yaklaşık %95'i) çok düşük sıcaklıklarda gerçekleştirildi. Bu durumun nedeni X-ışınlarının kristal yapısında sebep olduğu hasarın düşük sıcaklıklarda çok daha az olması. Örneğin X-ışınlarının 100 Kelvin sıcaklıktaki bir kristalde neden olduğu hasar, oda sıcaklığındaki bir kristalde neden olduğu hasarın 1/70'i kadar. 100 Kelvin sıcaklık biyolojik süreçlerin gerçekleştiği sıcaklıklara göre çok düşük olsa da, aynı proteinlerle farklı sıcaklıklarda yapılan araştırmalar amino asit zincirlerinin yapılarının sıcaklıktan etkilenmediğini gösteriyor.

Makromolekül kristalografisi deneylerinin en zor aşaması, kırınım desenleri elde etmek için kullanılacak niteliklerde kristaller elde edilmesidir. Kristalleştirme yapılmadan önce yeterli miktarda protein elde edilmesi ve saflaştırılması gerekir. Saflaştırma sırasında büyük miktarda protein kaybolabilir. Ancak saflığın artması kristallerin oluşması ihtimalini artırdığı için saflaştırma aşaması çok önemlidir.



Kristallerin üretilmesi hakkında uzun zamandır yapılan araştırmalara rağmen, hangi proteinlerin hangi koşullarda kristalleşeceği hâlâ tahmin edilemiyor. Kristalleşmenin hangi koşullarda gerçekleşeceğinin bulunması amacıyla önce çeşitli sıcaklıkların, protein derişimlerinin, pH'ların taranması gerekiyor. Artık büyük hacimli sıvıları çok küçük hacimlere bölebilen kristalleştirme robotları sayesinde binlerce farklı koşul kısa zamanda incelenebiliyor. Deneilerin en çok zaman alan aşamasının kristallerin toplanması olduğu söylenebilir. Henüz bu işlemi yapabilen otomatik cihazlar olmadığı için deneilerin bu aşaması diğer aşamalardan daha uzun sürüyor.



Lipidik kübik faz

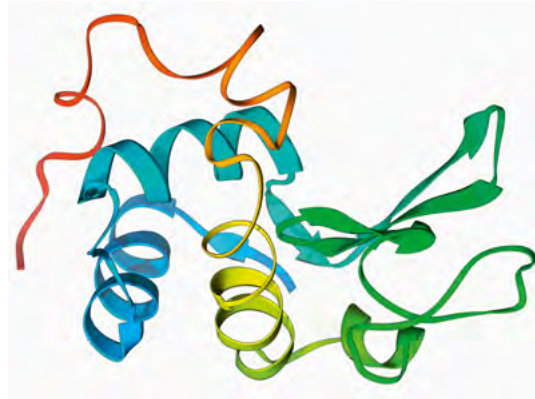
Gelişmekte olan teknolojiler makromolekül kristalografisinin yeni alanlara doğru yol almasını sağlıyor. Bu alanlar arasında senkrotronlarda oda sıcaklığında yapılan çalışmaları sayabiliriz. Senkrotronlardaki X-ışını kaynaklarının yoğun olması küçük kristallerle deney yapılmasını kolaylaştırıyor. Ancak X-ışınlarının kristal yapısında hasarlara neden olması hâlâ bir sorun. Kristallere gönderilen ışınlar önemli bir hasara sebep olmadan önce yeterli miktarda veri toplanması gerekiyor. Kristallerde meydana gelen hasarın nasıl azaltılabileceği üzerine araştırmalar devam ediyor.

Makromolekül kristalografisinin gelişmekte olduğu alanlardan bir diğeri, hücre zarı proteinlerinin kristalografisi. İnsanların DNA'sında kodlanmış proteinlerin yaklaşık %30'u hücre zarı proteinleridir. Ancak protein veri tabanındaki yaklaşık 97.000 proteinin sadece 1400 kadarı hücre zarı proteini. Bu durumun en önemli sebebi hücre zarı proteinlerini kristalleştirmenin zorluğu. Proteinleri kristalleştirmek için kullanılan standart yöntem, içinde proteinler bulunan çözeltilerden su moleküllerinin uzaklaştırılmasına dayanıyor. Ancak hücre zarı proteinleri, doğaları gereği suda çözünmüyor. Eğer suda çözünselerdi, bir hücreyi çevresinden ayıran hücre zarını oluşturamazlardı. Dolayısıyla hücre zarı proteinlerini kristalleştirmek için başka proteinleri kris-

talleştirmek için kullanılanlardan farklı yöntemler kullanmak gerekir. Bu durum kristalleşmeye uygun koşulların araştırılarak bulunmasını çok zorlaştırır.

Kristalleştirilebilmeleri için hücre zarı proteinlerinin hücre zarındakine benzeyen bir ortamda bulunması gerekir. Bugün bu proteinler ile ilgili çalışmalar, lipidik kübik faz adı verilen bir ortam kullanılarak yapılıyor. Bu ortamdaki lipid molekülleri, su kanalları çevresindeki üç boyutlu, içi boş bir yapı iskeleti gibi düzenlenir ve hücre zarı proteinleri bu yapının içinde aynı doğrultuda yönlenir. Bu yöntem kullanılarak bugüne kadar pek çok protein incelendi ve böylece bazı biyolojik süreçler daha iyi anlaşıldı. Örneğin H⁺/Ca²⁺ taşınma mekanizmaları, hücre zarı proteinlerinin kristalografisi sayesinde bulundu. İleride yapılacak çalışmaların proteinlerle lipidler arasındaki etkileşimlerin de daha iyi anlaşılmasını sağlayacağı düşünülüyor.

Sonuç olarak makromolekül kristalografisinin gelişmekte olan bir alan olduğunu söyleyebiliriz. Proteinlerin yapıları hakkındaki bilgilerimiz arttıkça biyolojik süreçleri daha iyi kavramaya başlıyoruz. Özellikle hücre zarı proteinleri konusundaki çalışmalar çok önemli. Bugün ilaç olarak kullanılan pek çok madde hücre zarlarındaki enzimleri, reseptörleri ve taşıyıcıları hedef alıyor. Hücre zarı proteinlerinin yapılarının ve diğer moleküllerle etkileşimlerinin daha iyi anlaşılması pek çok hastalığın tedavisi için etkin yöntemler geliştirilmesini sağlayabilir. Makromoleküllerin kristal içindeki yapıları kristalleştirme sırasında takip edilen prosedürlere bağlı olduğu için, proteinlerin yapılarını ve birbirleriyle etkileşimlerini daha iyi anlayabilmek için zaman-çözümlenmeli kristalografi çalışmalarına ağırlık verilmesi de ayrıca önemli.



Lizozim

Kaynaklar

- Garman, E. F., "Developments in x-ray crystallographic structure determination of biological macromolecules", *Science*, Cilt 343, s. 1102, 2014.
- Service, R. F., "Gently does it", *Science*, Cilt 343, s. 1094, 2014.