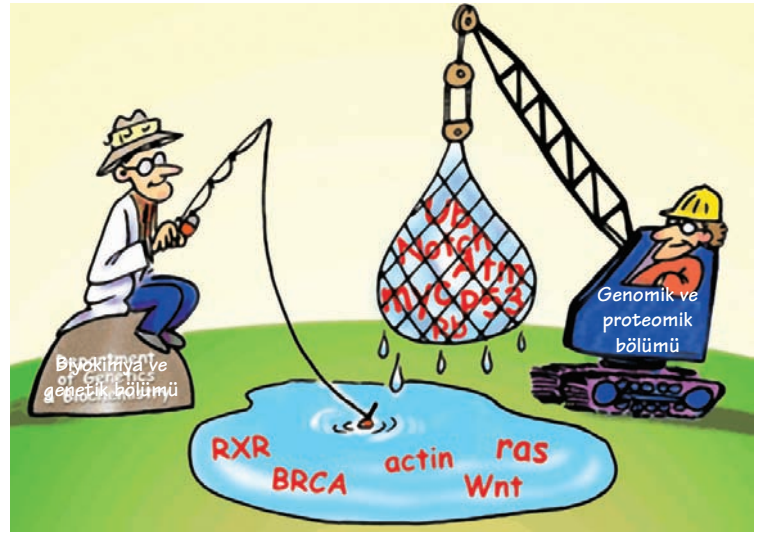


PROF. DR. ADİL DENİZLİ ANLATIYOR

PROTEİN ANALİZİ

Bilimsel devrimlerin ardı arkası kesilmiyor. Çok değil, bundan 3-4 yıl öncesine kadar biliminsanları genlerin işlevlerini ortaya çıkaracak diye düşündükleri genomik uygulamalar için “sağlık alanında bir devrim” betimlemesini yapıyorlardı. Yani bu uygulamalarla tıbbi çalışmalarda da kökten bir değişim olacak ve genlerin ortaya çıkarılmış işlevleri, diğer biyoteknoloji ve bilgi teknolojileriyle bir araya geldiğinde hastalıkların önlenmesi, teşhisi, tedavisi kolaylıkla gerçekleşebilecekti. 1950’li yıllarda başlayan çalışmaların sonucunda, 1990 yılının Ekim ayında “İnsan Genom Projesi” başlatıldı. 18 ülkenin destek verdiği bu projenin amacı insanın gen haritasının, yani genetik şifresinin çözülmesiydi. Çözüldü de... Ancak özellikle hastalıkların teşhisi ve tedavisi konusunda beklenen sonuç tam anlamıyla elde edilemedi; genom çalışmalarına dayanan teşhis yaklaşımları klinik kullanım için uygun ve pratik değildi. Biliminsanları bu durgunluğa dinamizm kazandırmanın yolunu da buldular: Genlerin kodladığı proteinlerin yapısını ortaya koymak. Bunun için de “proteom analizi” adı verilen proteinlerin şifresini ortaya çıkarmaya yönelik analitik yöntemlerle karşımıza çıktılar.



25 Nisan 1953’te Nature dergisinde, Watson ve Crick imzalı bir makale yayımlandı. “Nükleik Asitlerin Moleküler Yapısı: Deoksiriboz Nükleik Asit İçin Bir Yapı” başlıklı ve 128 satırdan oluşan bu metnin içeriğinde DNA’nın, yani yaşamın şifresinin moleküler yapısı açıklanıyordu. Bilim tarihinde bir dönüm noktası olan bu çalışmayla dünyadaki yaşamın şifresi, bir hücreli den memelilere kadar tüm canlıların hücrelerinde yer alan DNA’nın yapısı açıklanıyordu; ki, biz insanlar yaşamımızı ve sağlığımızı biçimlendiren bu anahtar ele geçirdikten sonra sırayla başka bilinmeyenleri de çözümledik.

Ardından genler üzerinde bir devrim gerçekleştirdik. İnsan hücresinde bulunan ve DNA üzerinde yer alan genleri tanımladık. Böylece, “saçımızın rengi, burnumuzun görünümü, ellerimizin biçimi, kısaca bizi fiziksel olarak tanımlayan öğelerimiz yanısıra doğuştan ileri gelen ya da sonradan ortaya çıkan hastalıklar da hep bu genlerin marifetiyle, işlevselliğiyle gerçekleşiyor” bilgisine sahip olduk. Bize ait 26.000 genin tanımının yapılması, insan gen haritasının belirlenmesi demektir. Ancak salt genleri tanımlamak, hastalıkların önlenmesinde, teşhisinde ve tedavisinde yeterli gelmedi. Asıl

önemli kısım, canlı tanımına anlamını veren moleküllerin, yani proteinlerin tanımının yapılmasıydı; ki, hücre içinde, hücreler arasında gerçekleşen kimyasal tepkimeler anlaşılabilirdi. Hücrelerin canlılıklarını nasıl koruduklarının, birbirleriyle nasıl haberleştiklerinin, hücre yapısının nasıl geliştiğinin, hücre çeşitliliğinin nasıl sağlandığının, kısaca yaşamın temelini açıklanmasında proteinlerin daha derinlemesine anlaşılmasıyla bir başka devrimin kapısı aralandı. Proteomik araştırmalar için proteom analizi çalışmaları başlatıldı ve yepyeni bir araştırma alanı daha doğdu.

Proteom analiziyle hastalıkların gelişim süreçlerini de kapsayan birçok biyolojik olayla proteinlerin yapısal ve işlevsel çeşitliliği arasında ilişki kurularak, sağlıklı ve hastalıklı durumda farklılaşan proteinler belirlenebilecek. Bu proteinlerin belirlenmesiyle de kanser, kalp-damar hastalıkları, hemofili ve osteoartrit gibi birçok hastalığa daha iyi sonuçlar veren teşhis ve tedavi yöntemleri geliştirilerek yeni ilaçlar üretilenebilecek. Yani proteomik ya da proteom analiziyle proteinlerin işlevleri aydınlanacak. Ancak proteom analizi oldukça da zor bir işlem. Öyle ki, bu konuda çalışan uzmanlar bu analizi "DNA'nın analiziyle kıyaslanamayacak kadar zor" diye ifade ediyorlar. Bu zorlu konuyla ilgili olarak, alanının üstatlarından biri olan, kanser başta olmak üzere birçok hastalığın teşhis ve tedavisinde yol gösterici olacak biyoteknolojik araştırmalara imzasını atmış, TÜBA Üyesi, 2006 TÜBİTAK Bilim Ödülü sahibi, Hacettepe Üniversitesi Kimya Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Adil Denizli'den bilgi aldık. Dr. Denizli, Hacettepe Üniversitesi Kimya Bölümü Biyokimya laboratuvarlarında, "çocuklarım" dediği genç bilimcilerden oluşan ekibiyle birlikte proteom analizi konusunda da evrensel bilime katkıda bulunan oldukça önemli çalışmalar yapıyor.

Önce "Proteom" sözcüğü hakkında bilgi verir misiniz?

"PROTEOM" bir organizma ya da dokunun genomu tarafından ifade edilen proteinlere verilen ad. PROTEin ve GENOM sözcüklerinin birleştirilmesiyle oluşturulmuş. Proteom sözcüğü ilk kez 1994'te, Marc Wilkins tarafından önerilmiş.

Proteom analiziyle ne yapılır?

"Proteomik" olarak tanımlanan "proteom analizi" proteinlerin yapısal özelliklerinin belirlenmesini, işlevlerinin aydınlatılmasını kapsar. Protein analizi DNA analiziyle karşılaştırılmayacak kadar zordur. DNA yalnızca dört yapı taşından oluşurken doğal proteinler 20 farklı amino asitten oluşur ve üç boyutlu yapıları işlevlerini etkiler. Sizin de belirttiğiniz gibi, hastalıklara özgü proteinlerin belirlenmesini amaçlayan iki önemli biyomoleküler disiplin var: "genomik" ve "proteomik". Genomik çalışmalarda hastalık ya da fizyolojik süreçle ilgili genler ta-



nımlanmaya çalışılır. Hastalığın farklı aşamalarında bazı genlerin ifade oranının, yani işlevselliğinin artacağı ya da azalacağı düşüncesiyle, bu genlerden oluşan mRNA düzeyleriyle hastalığın ilerleyişi arasında bir ilişki kurulmaya çalışılır.

Ancak hem insan dokularında, hem de maya hücrelerinde mRNA'ların ifade düzeyleriyle bu mRNA'lardan kodlanan proteinlerin miktarları arasındaki ilişki konusunda kuşkular var. Bunun yanı sıra bir gen, birçok biyolojik işleve sahip farklı proteinler kodlamakta ve bu proteinler transkripsiyon (çevrim) sonrası değişimlere uğramakta. Çoğu durumda, transkripsiyon sonrası değişimler de gen işlevinden bağımsız. Bu nedenlerden dolayı, çok fazla miktarda bilimsel veri olmasına karşın genomik çalışmalara dayanan teşhis yaklaşımları klinik kullanım için uygun ve pratik değil.

Aslında bu durumu daha net ortaya koymak için bir kıyaslama da yapabiliriz. Proteom ile genom arasındaki temel farklılıklar bu şekilde daha iyi anlaşılır.

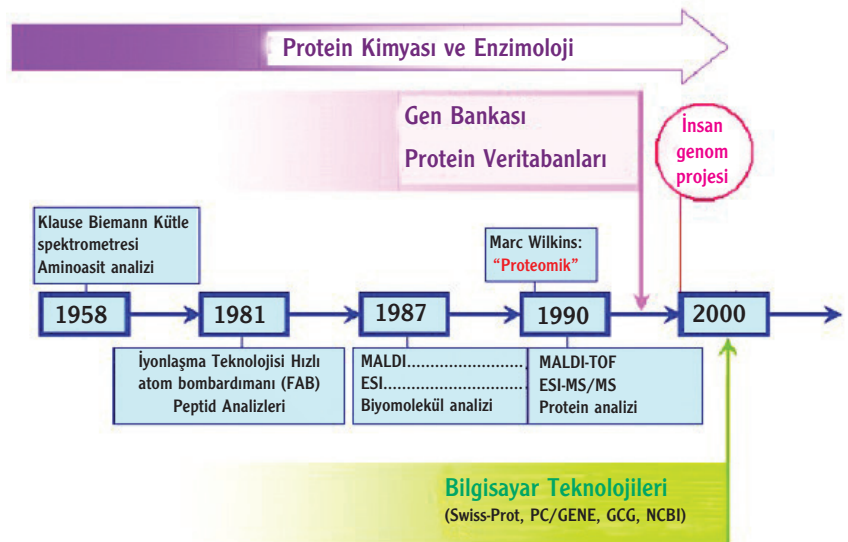
Bir organizmanın bir genomu ama birçok proteomu vardır. Bu nedenle proteom analizi genom analizine göre daha karmaşıktır ve çok daha güçlü analitik tekniklere gereksinim duyar. Genom ve proteom arasındaki diğer önemli bir fark da, genomun durağan olması ve zaman içinde değişmemesi. Buna karşın hücre proteinler dinamik ve sürekli değişime uğrarlar. Hücre zarına bağlanabilirler, diğer proteinlerle etkileşime girerler, şeker, yağ ya da fosfat gibi gruplar kazanarak değişime uğrayabilirler. Proteinler ve/veya modifiye (değişmiş) proteinler, hücre tipine ya da farklı hastalık aşamalarına göre, hatta aynı hücrede farklı etkilerle farklılaşabilirler. Proteinlerin miktarları da değişkendir. Örneğin insan kanında albumin derişimi, interlökin-6'dan 106 kat daha fazladır.

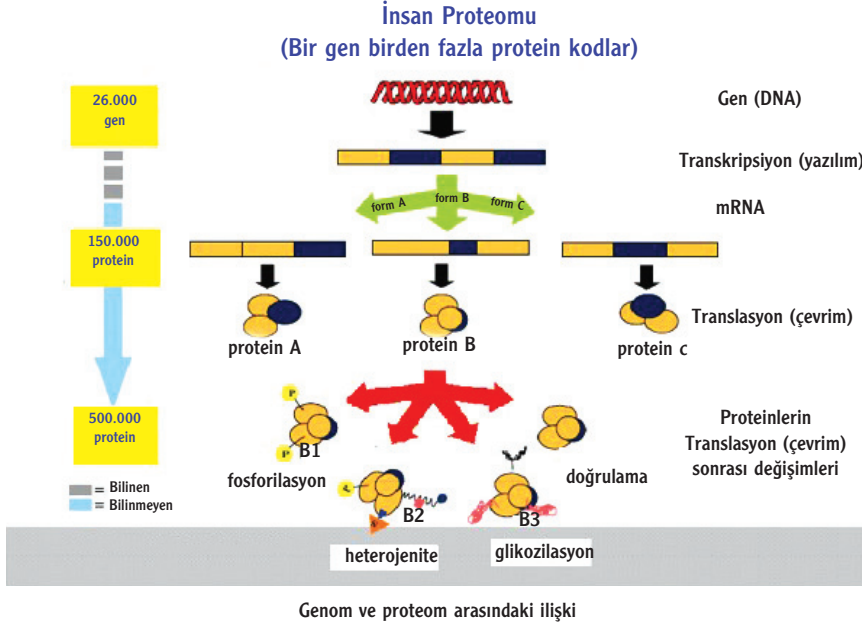
Genomun durağan yapısının aksine proteomun dinamik yapısı, proteomu organizmada gerçekleşen olayların gerçek ve eşzamanlı belirteci yapar. Dolayısıyla bir organizmanın proteomunu tanımlamak, genomu tanımlamaktan çok daha yararlıdır.

Anlaşılan o ki, bir organizmayı oluşturan hücrelerin tümü aynı genoma sahip olmalarına rağmen, genomda depolanan bilgi, değişik hücre türlerini oluşturmak için değişik hücrelerde farklı şekilde kullanılıyor.

Evet. Başlıca hastalıklar genlerin yanlış birleşiminden kaynaklanır. Hastalığa neden olan genlerin belirlenmesi bir, iki hatta on değişik kişiden alınan genomu sıralayarak bulunamaz. Proteomlar üzerinde çalışılarak hasta-

Proteom Analizinin Tarihsel Gelişimi





İklk genleri belirlemek daha kolaydır. Hastalıkların gelişimine diğer bir neden, normal bir proteinin yanlış biçimde değişime uğramasıdır. Bu değişim, genomik çalışmalarla belirlenemez. Yani anlaşılacağı gibi proteinler hastalıkların teşhisinde daha etkili. Zaten tedavi için hemen hemen tüm ilaçların hedefleri de proteinler.

Proteom analizinin türlerinden biraz söz eder misiniz? Bir de uygulama alanları neler, bu konuyu biraz daha ayrıntılandırabilir miyiz?

Proteom analizi de kendi içinde bölümlere ayrılır. Hücre ya da dokuda ifade edilen proteinleri belirleyen “ekspresyon proteomik”; proteinlerin üç boyutlu tayiniyle ilgilenen “yapısal proteomik”, proteinlerin işlevlerini inceleyen “işlevsel proteomik”, hücrelerle hangi küçük moleküllerin etkileştiğini inceleyen bir yaklaşım olan “kemoproteomik”, protein-protein etkileşimi ve proteinlerin hücre içindeki yerleşiminin belirlenmesini kapsayan “hücre-haritası proteomik” en temel olanları. En önemli uygulamaları da elbette tıp alanında. Bu uygulamalarla hastalıklara özgü proteinlerin belirlenmesi ve hastalığın profilendirilmesi sağlanıyor. Ama farklı uygulamalar da var; örneğin, genel hücre biyolojisi, gen işlevleri, düzenleme mekanizmaları, metabolik yollar gibi bilgilendirici genel uygulamalarda; tarımda; direnç mekanizmaları, verimlilik ve kalitenin artırılması, hastalık yapıcı parazit etkileşimlerini ortaya koymada; alerji ve toksikolojide; yeni ilaçların bulunması

ve geliştirilmesinde; teşhis ve tedaviye yönelik çalışmalarda geniş bir uygulama alanı bulmakta proteomik.

Belirttiğiniz bu analizler için farklı farklı teknikler mi söz konusu?

Proteomun karmaşık yapısı nedeniyle çok güçlü analitik tekniklere ihtiyaç vardır. Genel olarak kullanılan teknikler tek ve iki boyutlu elektroforez, kapiler elektroforez, kromatografi (ters faz, iyon değişim, afinite vb.) ve ultrafiltrasyon teknikleri.

Proteom analizinde iki farklı yaklaşım söz konusudur. Aşadığıdaki şeklin B bölümünde gösterilen yaklaşımda örnekte yer alan proteinler, yukarıda belirtilen teknikler kullanılarak ayrılır ve ardından her bir protein kütle spek-

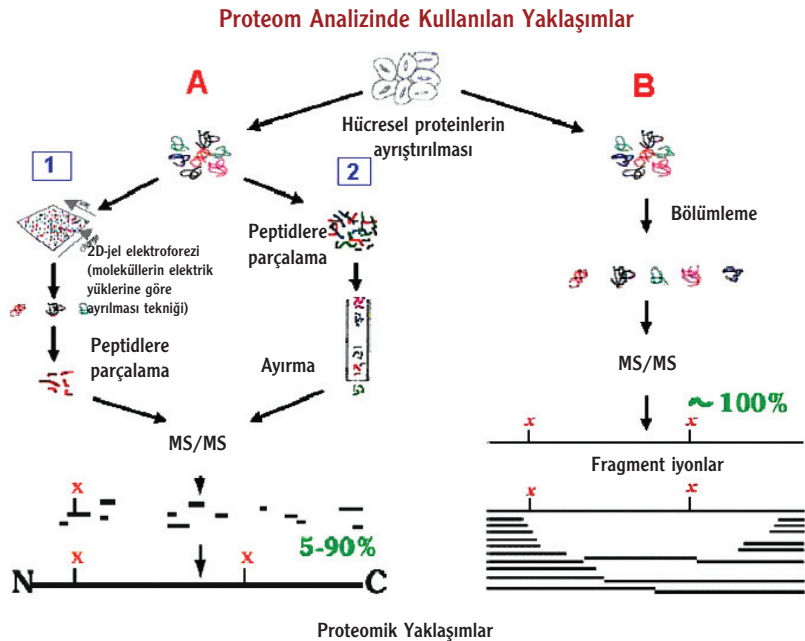
troskopisiyle analiz edilir. “A” harfiyle belirtilen diğer yaklaşımdaysa iki farklı strateji uygulanabilir. 1. stratejide proteinler saflaştırılır ve her bir protein proteaz enzimi (tripsin) ile parçalanarak oluşan peptid parçaları kütle spektroskopisiyle analiz edilir. 2. stratejideyse tüm proteinleri içeren karışım tripsin ile peptidlerine parçalanır ve ardından ayırma işlemine tabi tutularak kütle spektroskopisiyle, karışımda bulunan proteinler tayin edilir.

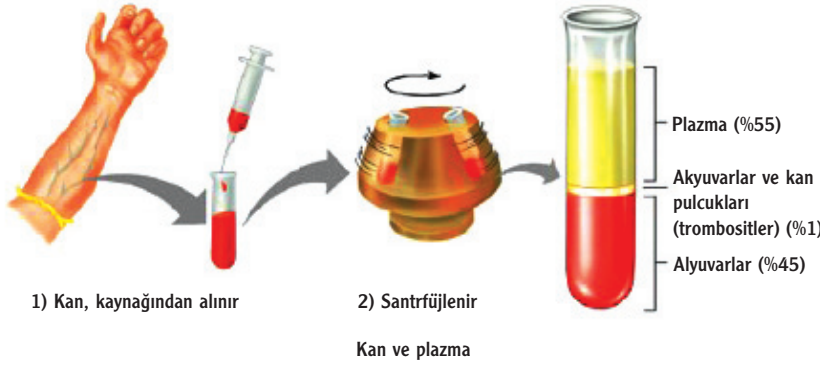
Proteomikte hangi örnekler kullanılır?

Proteom çalışmalarında beyin, kalp, karaciğer, akciğer, kas, pankreas, dalak, testis gibi insan dokularının yanı sıra beyin sıvısı, idrar, tükürük, hücreler arası sıvı, amniyotik sıvı, kan plazması ve serum gibi biyolojik sıvılar kullanılabilir. En çok çalışılan biyolojik sıvı, kan plazması ve serumdur. Kan santrifüjlendikten sonra üstte kalan sarı renkli kısım plazma olarak adlandırılır ve kanın % 55’lik kısmını oluşturur. Plazma pıhtılaşma proteinlerini de içerir ve bu proteinlerin ayrılmasından sonra geriye kalan kısım serumdur.

En çok çalışılan biyolojik sıvı olarak neden kan plazması kullanıyorsunuz?

Hastalık teşhisinde de kullanılan temel malzemedir kan. Mililitrede 60-80 mg protein, yani yüksek derişimde protein içerir. Kanın farklı organlar ve dokularla temasta bazı proteinlerinin ayrılmasına ve var olan proteinlerin





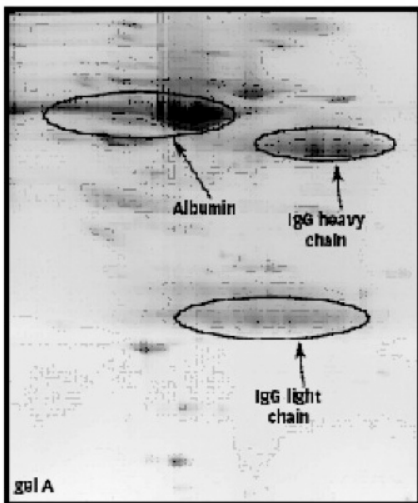
değişimine yol açar. Bu proteinlerin belirli bir fizyolojik durum ya da hastalık durumunda değişime uğraması olasıdır. İnsan plazma proteinleri üzerine yapılan son değerlendirmeler, vücutta yer alan ana protein kategorilerinin büyük çoğunluğunun kan plazmasında yer aldığını da göstermiştir. Yani çok sayıda protein içermesi nedeniyle plazma, hastalıklara özgü proteinlerin belirlenmesi için ideal bir kaynak. Ancak plazma proteomu, yapısında yer alan proteinlerin geniş derişim aralığı (10^{10}) nedeniyle oldukça karmaşıktır da. Örneğin kanda albumin derişimi 30-50 mg/mL gibi yüksek bir değerdedir. Hastalıklara özgü proteinler; örneğin sitokinler ve prostat spesifik antijen (PSA) ise pg/mL (yani mililitrede bir pikogram; ki, bu da gramın trilyonda biri demektir) düzeyindedir. Tüm plazma proteinlerinin % 90'ını 10 protein, % 9'unu ise 12 protein oluşturur ve hastalıklara özgü proteinler geriye kalan % 1'lik kısımda yer alır.

Plazmada en fazla bulunan proteinler hangileri?

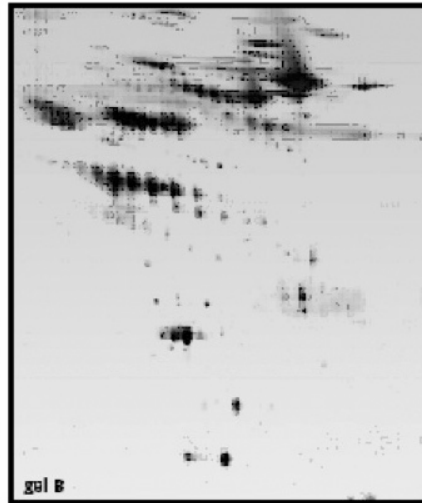
Plazma Proteinleri	
Albumin	% 54
IgG	% 17
Apolipoproteinler	% 4.0
α 1-Antitripsin	% 3.8
α 2-Makroglobulin	% 3.6
IgA	% 3.5
Transferrin	% 3.3
Haptoglobulin	% 3.0
IgM	% 2.0
α 1-Asit Glikoprotein	% 1.3
Diğer	% 4.5

Albumin ve immuno-globulinler. Bu proteinler plazma proteinlerinin % 80'ini oluştururlar ve az miktardaki diğer proteinleri maskelerler. Örneğin, iki boyutlu jel elektroforezinden önce bu proteinler uzaklaştırılmazsa, jelde hastalıklara özgü proteinlere ait noktaları tespit etmek neredeyse olanaksızdır. Dolayısıyla bu proteinlerin uzaklaştırılması, proteom analizinde büyük önem taşır.

Son yıllarda plazma protein içeriği-



A) Albumin ve IgG uzaklaştırılmadan önce



B) Albumin ve IgG uzaklaştırıldıktan sonra

Albumin ve IgG'nin uzaklaştırılması



Poli (glisidil metakrilat) mikrokürelerin SEM fotoğrafı

nin belirlenmesinde albumin ve immuno-globulinlerin uzaklaştırılması için birçok ticari ürün geliştirilmiştir. Bu ürünlerin birçoğunda kullanılan temel yaklaşım, albumine çekilmeye yüksek yatkınlık gösteren bir tekstil boyası olan "Cibacron blue", immunoglobulinler için ise "Protein A/G" kullanmaktır.

Laboratuvarlarınızda gerçekleştirdiğiniz çalışmalardan biraz söz eder misiniz?

Çalışmalarımızda özellikle albumin ve IgG uzaklaştırılmasına yönelik polimerik malzemeler hazırlandı ve etkinlikleri ticari ürünleriyle karşılaştırıldı. Uluslararası bilimsel dergilerde yayımlanan çalışmalarda plazmadan albumin ve IgG'nin etkin olarak uzaklaştırıldığı rapor edildi. Albumini ayırmak için boya-afinite (çekim yatkınlığı) yaklaşımından yararlanıldı ve % 99,3 uzaklaştırma verimine ulaşıldı. Ticari bir malzeme olan Aurum Serum Protein Minikit (Bio-Rad, USA) albumini en az %96,4 etkinlikle uzaklaştırıyor. IgG uzaklaştırılmasındaysa, "immobilize metal afinite kromatografisi" kullanıldı. Hazırlanan manyetik mikrokürelere Cu^{+2} iyonları yüklendi ve plazmadan IgG uzaklaştırma etkinliği araştırıldı. Uzaklaştırma, literatürde ilk kez manyetik kolonlarda gerçekleştirilmiş oldu. IgG ortamdan %99,4 etkinlikle uzaklaştırıldı.

Yeni ufuklara gidiyoruz. Çok heyecan verici...

Evet, proteom analizi klinik araştırmalarda yeni ufuklar açıyor; ama buna rağmen elde edilen veri miktarını ve duyarlılığını artırmak için daha alınması gereken uzun bir yol var.

Gülğün Akbaba

Kaynaklar

E.B. Altıntaş, A. Denizli, J. Chromatogr. B 832 (2006) 216.

M. Karataş, S. Akgöl, H. Yavuz, R. Say, A. Denizli, Int. J. Biol. Macromol. 40 (2007) 254