

Protein-Polielektrolit Kompleks ve Konjugatlarının Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Yöntemi ile İncelenmesi

[Investigation of protein-polyelectrolyte complex and conjugates by high performance liquid chromatography methods]

Banu Mansuroğlu,
Kadriye Kızılbey,
Serap Derman,
Zeynep Mustafaeva

Yıldız Teknik Üniversitesi Kimya Metalurji
Fakültesi
Biyomühendislik Bölümü, 34201
Esenler, İstanbul-Türkiye

Yazışma Adresi
[Correspondence Address]

Arş.Gör. Serap Derman

Yıldız Teknik Üniversitesi Kimya Metalurji
Fakültesi
Biyomühendislik Bölümü, 34201
Esenler, İstanbul
Tel:+90-212-383-46-56
Fax:+90-212-383-46-25
e-mail:serapacar5@gmail.com

Kayıt Tarihi : 19 Ağustos 2010 ; Kabul Tarihi : 11 Ocak 2011
[Registered : 19 August 2010 ; Accepted : 11 January 2011]

ÖZET

Amaç: Sığır Serum Albumin ile poli(N-Vinil-2-pirolidon-co-akrilik asit) arasında elektrostatik etkileşimle oluşan kompleksler ve kovalent bağlanma ile elde edilen konjugatlar sentezlenen bu makromoleküllerin biyoteknoloji ve tıp alanındaki öneminden dolayı intermoleküler model sistem olarak incelenmiştir.

Gereç ve Yöntemler: Bu çalışma kapsamında suda çözünür özellikteki protein-polielektrolit kompleks ve biyokonjugatları değişik molar oranlarda hazırlanarak yüksek performanslı sıvı kromatografisi kullanılarak incelenmiştir.

Bulgular ve Sonuçlar: Kompleks oluşumunun moleküllerin molar oranlarına ve çözeltinin pH değerine bağlı olduğu gözlenmiştir. Sığır Serum Albumin ve poli(N-Vinil-2-pirolidon-co-akrilik asit) molekülleri zıt yüklü olduklarında [pH≤pI (izoelektrik pH)] iki molekül elektrostatik etkileşimler sonucunda bir araya gelmektedir, daha yüksek pH değerlerinde ise kararlı kompleks oluşumu gözlenmemektedir. Bu nedenle proteinlerin izoelektrik pH değerlerinden daha yüksek pH değerlerinde moleküller birbirlerine çapraz bağlayıcılar kullanılarak kovalent olarak bağlanmaktadır. Yüksek performanslı sıvı kromatografisinden elde edilen sonuçlar polimerin molar oranının artması ile protein-polielektrolit kompleks ve konjugatlarının miktarlarının arttığını serbest sığır serum albumin miktarının ise azaldığını göstermiştir.

Anahtar Sözcükler: Sığır serum albumin, N-Vinil-2-pirolidon, polielektrolit, protein-polielektrolit kompleks, biyokonjugasyon

ABSTRACT

Objective: Intermolecular complex by electrostatic interaction and specifically coupled conjugates between bovine serum albumin and poly (N-Vinyl-2-pyrrolidone-co-acrylic acid) were investigated as an intermolecular model system due to their importance in biotechnology and medicine.

Material and Method: In this study, water soluble protein-polyelectrolyte complexes and bioconjugates at different molar ratios were characterized by using high performance liquid chromatography.

Results and Conclusion: It was observed that the complex formation depends on the molar ratio of molecules and pH of the solutions. When bovine serum albumin and poly (N-Vinyl-2-pyrrolidone-co-acrylic acid) are oppositely charged [pH≤pI (isoelectric pH)] two macromolecules associate through electrostatic interactions. There is no interaction and stable complex formation between these molecules at higher pH levels. Therefore these molecules bound covalently to each other by using cross linkers when pH levels higher than the pI of the protein. High Performance Liquid Chromatography analysis showed that the amount of protein-polymer complex is increased by the increase in molar ratio of polymer, and the amount of free bovine serum albumin is decreased.

Key words: Bovine serum albumin, N-Vinyl-2-pyrrolidone, polyelectrolyte, protein-polyelectrolyte complex, bioconjugation.

Giriş

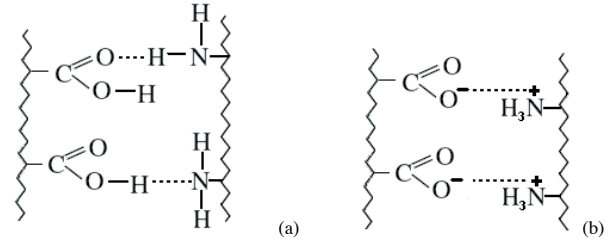
Protein-polielektrolit kompleks ve konjugatları biyolojik açıdan önemli birçok mekanizmanın ortaya konulmasına yardımcı olmakta, bunun yanı sıra protein saflaştırma, enzim immobilizasyonu, immunoloji ve biyosensörler gibi birçok uygulama alanlarında çalışma konusu olmaktadır. Polielektrolitler, proteinlerin kararlılığını, çözünürlüğünü ve biyo uyumluluğunu geliştirdiğinden biyoteknoloji ve tıp alanında oldukça yaygın kullanım alanı bulmaktadır [1-5]. Protein molekülleri doğal ve sentetik polielektrolitlerle kuvvetli olarak etkileşmekte [6-8] ve bu etkileşim sonucunda; suda çözünür kompleksler, kompleks koaservatlar (sıvı-sıvı faz ayrımı) veya amorf çöküntüler (katı-sıvı faz ayrımı) meydana gelmektedir [7-12].

Protein-polielektrolit komplekslerinin oluşumunda; polielektrolitin molekül ağırlığı, esnekliği, fonksiyonel gruplarının yapısı, yük yoğunluğu, hidrofilik ve hidrofobik dengesi ve biyo uyumluluğu gibi kimyasal özelliklerinin yanı sıra, reaksiyon ortamının pH değeri, iyonik kuvveti, bileşenlerin konsantrasyonları, karışımdaki molar oranları ve sıcaklık gibi birçok parametre etkili olmaktadır [9]. Protein-polielektrolit kompleksleri ile ilgili günümüze kadar yapılan çalışmalar ve elde edilen sonuçlar özetlendiğinde;

- i) Protein-polielektrolit kompleksleri hidrojen bağları ve elektrostatik çekim kuvvetleri ile oluşmaktadır (Şekil 1),
- ii) Kompleks oluşumu sonucunda 3 boyutlu yapıda meydana gelen değişimlerden dolayı biyokimyasal fonksiyonlarında değişiklik meydana gelmektedir [13],
- iii) Tuz içermeyen sistemlerde, protein molekülleri ile esnek polielektrolitler üzerindeki zıt yüklü gruplar aracılığı ile stokiyometrik iyon çiftleri (tuz köpürleri) oluşturmaktadırlar [14-15],
- iv) Protein ve polielektrolitler arasında oluşan iyon çiftleri; pH'nın değiştirilmesi, ortama iyon ya da çoklu iyon eklenmesi gibi durumlarda birbirlerinden ayrılabilirler [16].

Proteinler aminoasit kompozisyonlarına bağlı olarak farklı izoelektrik nokta değerlerine sahiptirler ve $pH=pI$ (izoelektrik pH) değerinde iyonlaşmış olmalarına rağmen dış ortama karşı nötral yapıda bulumaktadırlar. İzoelektrik noktalarından daha düşük pH ortamında net pozitif yüke ($H_3N^+ \dots \dots \dots -COOH$) sahip olduklarından; anyonik polielektrolitlerle, izoelektrik noktalarından daha yüksek pH ortamında ise net negatif yüke ($H_2N \dots \dots \dots -COO^-$) sahip olduklarından katyonik polielektrolitlerle kuvvetli olarak etkileşirler [9-10,17]. $pH \leq pI$ olduğu sistemlerde protein üzerindeki pozitif yük öbekleri anyonik polielektrolit üzerindeki negatif yüklü gruplar ile elektrostatik çekim oluşturmakta böylece kararlı polielektrolit kompleksler (PEK) meydana gelmektedir [4,8,18].

Son yıllarda biyolojik makromoleküllerin aktivasyon kimyası kullanılarak sentetik polimerlere biyokonjugas-



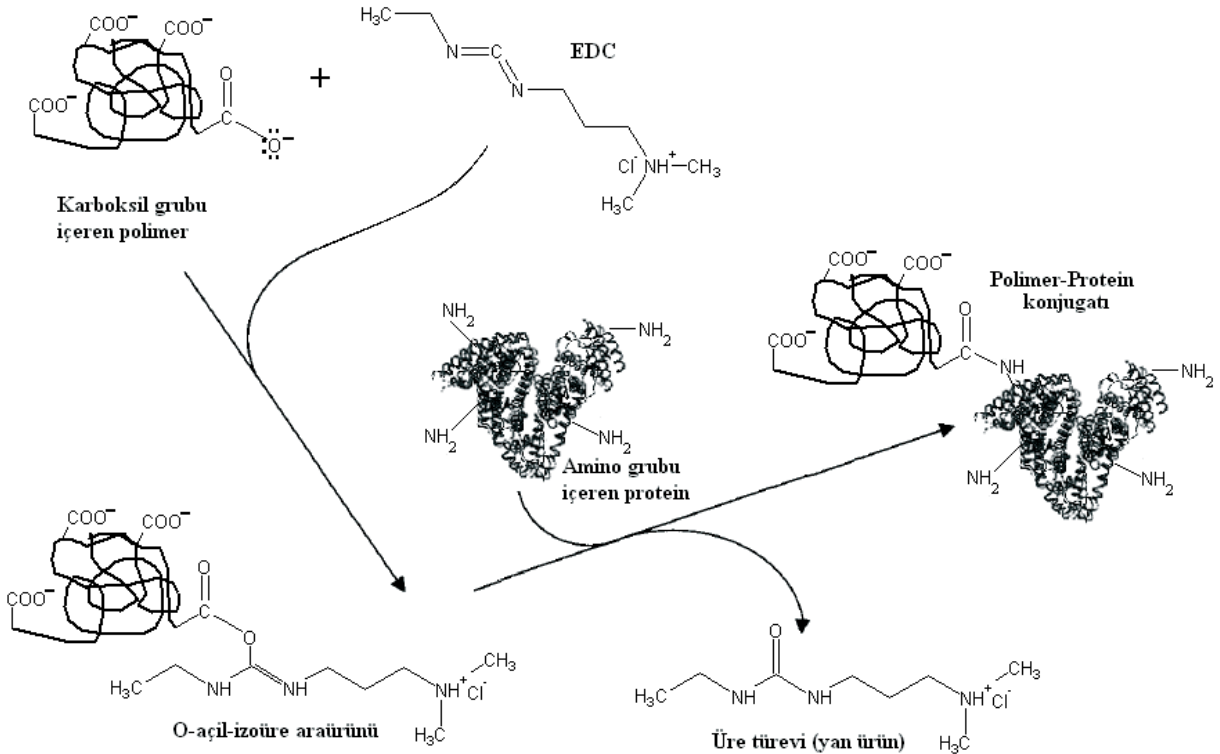
Şekil 1. Polielektrolit ve protein arasındaki hidrojen köprü bağları (a) ve elektrostatik etkileşim (b).

yonu sonucu her iki molekülün de fonksiyonel özelliklerini taşıyan yeni bir hibrit molekül oluşturulması çalışmaları yapılmaktadır.

Biyokonjugatlarının geleneksel yöntemlerle sentezlenmesi makromoleküllerin sulu çözeltideki fonksiyonel gruplarının aktivasyonu ile gerçekleşmektedir. Bilinen tüm biyokonjugasyon reaksiyonlarında taşıyıcı moleküllerin fonksiyonel gruplarının aktivasyonu ve proteinlere bağlanması için 1-etil -3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorür (EDC) gibi çeşitli çapraz bağlayıcılar kullanılmaktadır [19]. 1-etil -3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorür aracılığı ile polimerlerin karboksil gruplarının modifikasyonu ve proteinlerin amino gruplarının, aktifleştirilmiş polimer gruplarına amid bağı oluşturarak kovalent olarak bağlanması Şekil 2'de gösterildiği üzere iki adımda gerçekleşmektedir. İlk adımda taşıyıcı özellikteki polimerin karboksil grupları karbodiimid ile aktive edilmekte ve O-açilizoüre kararsız ara ürünü oluşmaktadır. Sonrasında ortama ilave edilen proteindeki amino grupları bu kararsız ara ürüne saldırarak reaksiyon vermekte ve amid bağı oluşumu üzerinden polimer-protein biyokonjugatları sentezlenmektedir [4,20-27]. Polimerin karboksil gruplarının proteinin amino gruplarına bağlanmasıyla gerçekleşen kondenzasyon reaksiyonunda yan ürün olarak üre türevi meydana gelmekte ve diyaliz ya da ultrafiltrasyon gibi çeşitli saflaştırma yöntemleri ile uzaklaştırılmaktadır. Mustafaev ve çalışma arkadaşları [2,4] proteinlerin akrilik asid ve kopolimerleri ile kompleks oluşumunu ve konjugat sentezi reaksiyonlarını incelemiş ve elde edilen sonuçlardan karbodiimid varlığında karboksil grubu ile amin grubu arasında meydana gelen kondenzasyon reaksiyonundan önce hızla protein-polimer komplekslerinin oluştuğunu saptamışlardır.

Petrov ve arkadaşları [27] tarafından yapılan çalışmada poliakrilik asidin (PAA) immun sistem üzerinde yüksek uyarıcı etkisinin olduğu gösterilmiştir, ancak yüksek toksisitesinden dolayı hazırlanan preparatlar immunolojide geniş kullanım alanı bulamamıştır. Bu nedenle Rafikov ve arkadaşları PAA'nin toksisitesini düşürmek için PAA'nin N-Vinilpirolidon ile çeşitli oranlarda ve farklı molekül ağırlıklarında kopolimerlerini sentezleyerek bu kopolimerlerin de en az PAA kadar immun sistemde uyarıcı etkisi olduğunu göstermişlerdir.

Sığır Serum Albumin organizmanın dolaşım sisteminin çeşitli alanlarında yoğun olarak bulunan bir proteindir



Şekil 2. 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid hidroklorür (EDC) çapraz bağlayıcısı kullanılarak BSA proteinin P(VP-co-AA) kopolimeri ile konjugasyon reaksiyonu

ve birçok ilacın taşınmasında-depolanmasında önemli roller üstlenmektedir. BSA molekülü; düşük maliyeti, kolay temini ve insan serum albumini ile homolog yapıda olmasından dolayı genellikle çalışmalarda model protein olarak kullanılmaktadır [28].

Bu çalışmada ilk kez tarafımızca farklı konsantrasyonlarda BSA-P(VP-co-AA) kompleks ve konjugatları hazırlanmış, oluşturulan kompleks ve konjugatların kompozisyon analizleri yüksek performanslı sıvı kromatografi sisteminde moleküler eleme prensibine dayanarak yapılmıştır [4].

Gereç ve Yöntem

Çalışmada kullanılan sıgır serum albumin (BSA), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid hidroklorür (EDC) Sigma'dan, disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4), sodyum hidroksit (NaOH), sodyum klorür (NaCl), benzoil peroksit (BP), kobalt naftanat, N-vinil-2-pirolidon (VP), akrilik asit (AA), sodyumazid (NaN_3) Fluka'dan, sodyum dihidrojen fosfat (NaH_2PO_4), hidroklorik asit (HCl), Tetrahidrofuran (THF) ise Riedel-de Haën firmasından sağlanmıştır. Çözeltilerin hazırlanmasında Millipore MilliQ Gradient sistemden elde edilen ultra-saf su kullanılmıştır.

N-Vinil-2-Pirolidon-Akrilik asit Kopolimer (2:1) Sentezi [29]

N-Vinil-2-pirolidon akrilik asit kopolimeri P(VP-co-AA) Uelzmann tarafından özetlenen işleme göre serbest radikal polimerizasyonu ile sentezlenmiştir [29] ve sentez reaksiyonunun şematik gösterimi Şekil 3'de veril-

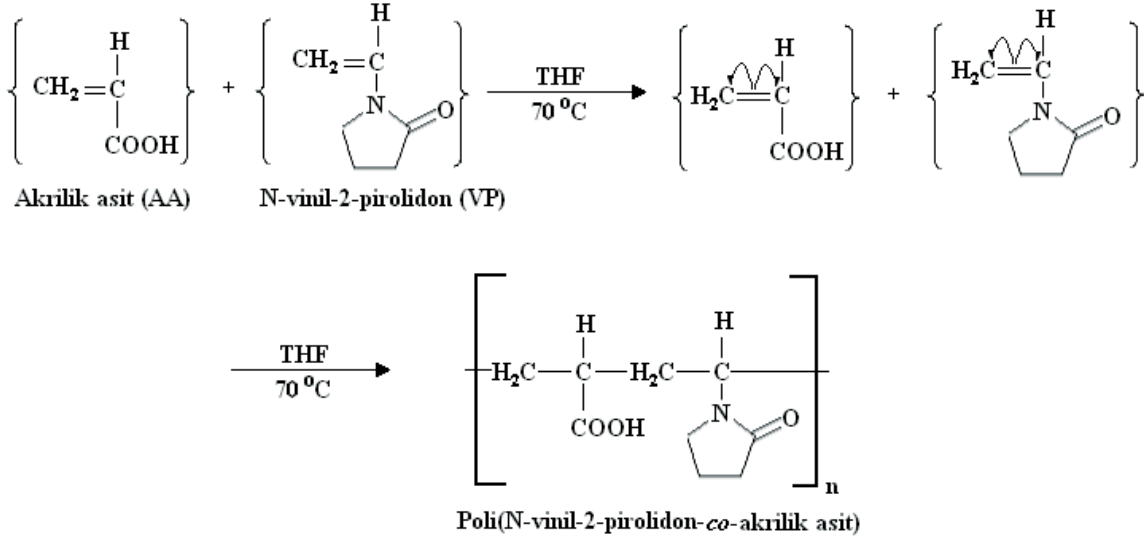
miştir. Akrilik asit ve N-vinil-2-pirolidon molar oranları 1:2 olacak şekilde THF çözücüsü içerisinde kobalt naftanat varlığında benzoil peroksit başlatıcısı ile karıştırılmıştır. N_2 gazı ortamında 65-70 °C'de, 3 saat süren polimerizasyon işlemi sonucunda katı beyaz çökelti halinde kopolimer elde edilmiştir. Kopolimer çökeltisi filtre kâğıdından süzöldükten sonra 40°C'de vakum altında kurutulmuştur. Reaksiyon verimi kuru kopolimer kütlesi üzerinden %95 olarak hesaplanmıştır. Sentezlenen VP-co-AA polimerinin moleküler eleme kromatografisi ile analizi sonucu molekül ağırlığı 120.000 Da olarak hesaplanmıştır.

N-Vinil-2-Pirolidon-Akrilik asit Kopolimerinin artan oranlarında BSA-P(VP-co-AA) Komplekslerinin Hazırlanması

Artan konsantrasyonlardaki (0,18 mg/ml; 0,45 mg/ml; 0,91 mg/ml; 1,36 mg/ml; 1,80 mg/ml) P(VP-co-AA) çözeltileri ve BSA stok çözeltisi (3 mg/ml) 0.15 M sodyum klorür (NaCl) içeren asetat tamponunda (pH=5.0) hazırlanmıştır. Her oran için aynı hacimde alınan BSA çözeltilerinin üzerine farklı konsantrasyonlardaki (0,18 mg/ml; 0,45 mg/ml; 0,91 mg/ml; 1,36 mg/ml; 1,80 mg/ml) P(VP-co-AA) çözeltileri eklenerek kompleksler hazırlanmıştır.

N-Vinil-2-Pirolidon-Akrilik asit Kopolimerinin artan oranlarında BSA-P(VP-co-AA) Konjugatlarının Sentezi

Artan konsantrasyonlarda (1,82 mg/ml; 5,45 mg/ml; 9,09 mg/ml) P(VP-co-AA) çözeltileri ve BSA stok çözeltisi



Şekil 3. Poli(N-vinil-2-pirolidon-co-akrilik asit) polimerine ait sentez reaksiyonu

(1 mg/ml) 0.15 M sodyum klorür içeren fosfat tampon çözeltisinde (pH=7.0) hazırlanmıştır. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan P(VP-co-AA) çözeltilerinin pH değerleri 5.0'a ayarlanmış ve kopolimerdeki karboksil gruplarının aktivasyonu için ortama $n_{\text{EDC}}/n_{\text{AA}}=1:1$ molar oranında 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorür eklenmiştir. Kopolimerin karboksil gruplarının aktivasyonu sonrasında, örneklerin üzerine BSA stok çözeltisinden eklenmiş ve konjugasyon reaksiyonu için karışım 1 gece +4 °C'de bekletildikten sonra son pH değeri NaOH çözeltisi ile 7.0'a ayarlanmıştır.

HPLC - Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Sistemi

Suda çözünür BSA-P(VP-co-AA) konjugat ve kompleksleri moleküler eleme kromatografisi kullanılarak molekül boyutuna göre yapılan ayrımlarla literatürde belirtilen yöntemle incelenmiştir [4-5]. Ölçümlerde Shim-Pack Diol-300 (7.9 mm ID x 50 cm) kolonla beraber Shim-Pack Diol ön kolonu (4.0 mm x 5 cm) oda sıcaklığında kullanılmış ve ölçümler UV detektörde 280 nm'de alınmıştır. Örnekler mobil faz olan fosfat tamponu ile pH=7'de Shimadzu model LC-6AD pompa kullanılarak 1 ml/dak akış hızı ile 40 mPa (6000 psi) basınçta kolondan geçirilmiştir. Tüm örnekler enjeksiyon öncesi 0,45 µl Sartorius RC-membrandan geçirilerek filtre edilmiştir. Örnekler analiz için 20 µl olacak şekilde sisteme enjekte edilmiştir. Moleküler eleme kromatografisinde kullanılan kolon Aldolaz (150 kDa), HSA (66 kDa), FMDV sentetik peptid (2,97 kDa) standartları ile doğrulanmıştır.

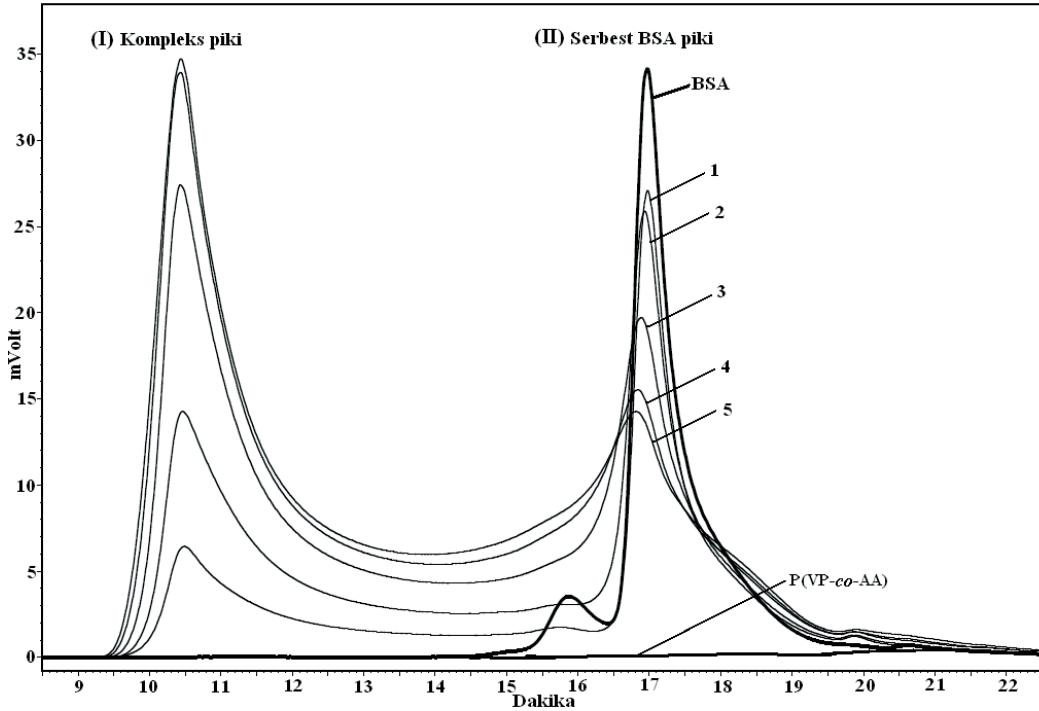
Bulgular

Moleküler Eleme Kromatografisi polimer, protein, peptid vb. bileşenlerin fiziksel etkileşimler doğrultusunda; molekül ağırlığı, boyutu ve şekli temel alınarak sıvı

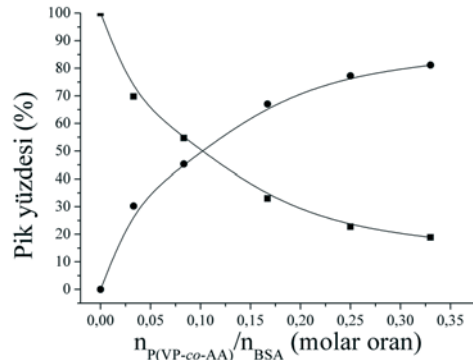
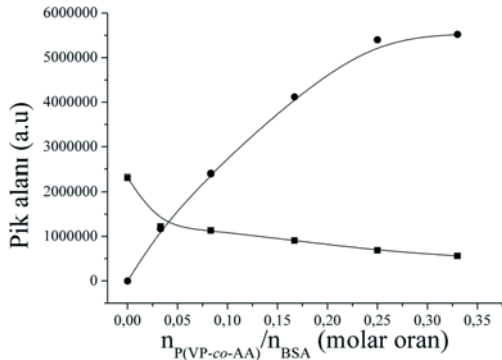
kromatografisi ile ayrılmasında kullanılmaktadır [30]. Bu çalışmada sentezlenen BSA-P(VP-co-AA) kompleks ve konjugatlarının oluşumunun gösterilmesi amacı ile Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) kullanılmıştır. Çalışmamızda kullanılan polielektrolit özellikteki VP-co-AA polimeri üzerindeki karboksil grupları, pH 5.0 değerinde iyonize olarak (-COO⁻) bulunmaktadır ve molekülün negatif yüklenmesini sağlamaktadır. BSA proteini ise izoelektrik noktası civarındaki bu pH değerinde üzerinde hem negatif hem de pozitif yük grupları taşımaktadır (-COO⁻, H₃N⁺). İki molekül üzerindeki zıt yüklü gruplar arasında meydana gelen elektrostatik etkileşim sonucunda polielektrolit kompleksler oluşmaktadır.

pH 5.0 değerinde BSA proteinin sabit, P(VP-co-AA)'in artan konsantrasyonları ile hazırlanan kompleksler yüksek performanslı sıvı kromatografi sisteminde moleküler eleme prensibine dayanarak analiz edilmiş ve analiz sonucu Şekil 4'de verilmiştir. BSA proteininin elüsyon profili incelendiğinde; 17.-19. dakikalar arasında monomer piki ve giderek azalan şiddetlerde, 16. dakikada dimer, 15. dakikada ise trimer piki verdiği görülmektedir. P(VP-co-AA) ise 280 nm'de taban çizgisine benzer bir çizgi olarak karakterize edilmektedir. BSA ile P(VP-co-AA)'in etkileşimi sonucu serbest hallerdeki BSA ve P(VP-co-AA) polimerinden daha büyük molekül boyutuna ve molekül ağırlığına sahip BSA-P(VP-co-AA) kompleksi olduğundan komplekslere ait pikler 10. dakika civarında gözlenmektedir.

Oluşan kompleksler kendi aralarında kıyaslandıklarında P(VP-co-AA)'nın molar oranının artması ile beraber komplekslere ait piklerin alıkonma zamanlarının ve pik şiddetlerinin arttığı, serbest BSA pikinin şiddetinin ise azaldığı görülmektedir.



Şekil 4. BSA (3mg/ml) ve P(VP-co-AA) (1mg/ml) ile karşılaştırmalı olarak, pH 5.0'da $n_{P(VP-co-AA)}/n_{BSA}$ artan oranlarında hazırlanan komplekslere ait HPLC kromatogramı [$n_{P(VP-co-AA)}/n_{BSA}$ oranları 0,033 (1), 0,083 (2), 0,167 (3), 0,25 (4), 0,33 (5)] (UV detektör 280 nm)



Şekil 5. pH 5.0'da hazırlanan kompleks ve serbest BSA'ya ait pik alanları (a), toplam alandaki serbest BSA ve komplekslerin alan yüzdeleri (b)

Şekil 4'de verilen kromatograma ait alanlar hesaplandığında artan kopolimer konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak komplekse ait pik alanının arttığı, serbest BSA molekülünün pik alanının ise azaldığı görülmüştür (Şekil 5a). Kromatogramdaki toplam alanı oluşturan kompleks ve serbest BSA alan yüzdeleri ise şekil 5b'de verilmiştir. En küçük kompleks oranı için ($n_{P(VP-co-AA)}/n_{BSA} = 0,033$) ortama eklenen BSA'nın %47'sinin kompleks oluşumuna katıldığı, en büyük kompleks oranı için ise ($n_{P(VP-co-AA)}/n_{BSA} = 0,33$) ortamdaki BSA'nın %75.71'nin kompleks oluşumuna katıldığı ve %25.29'unun serbest kaldığı görülmüştür.

BSA proteini izoelektrik noktası $pI=4,9$ olduğundan pH 7.0 değerinde negatif yüklüdür bu nedenle çalışmada kullanılan anyonik özellikteki VP-co-AA polimeri pH

7.0 değerinde moleküller arasında kompleks oluşmaktadır. Daha önceki yapılan çalışmalarda, spektroskopik analizler sonucunda da proteinlerin izoelektrik noktalarının üzerindeki pH değerlerinde anyonik kopolimerler ile kompleks oluşturmadığı gösterilmiştir [4,10-11,13,17]. Bu çalışmada ise yenilik olarak toksik olmayan ve biyoyumluluk gösteren N-Vinil-2-Pirolidon-Akrilik asit kopolimeri ile çalışılmış ve intermoleküler kompleks oluşumu kromatografik yöntemle incelenmiş, daha önceki çalışmalarla uyum gösteren sonuçlar elde edilmiştir.

Tarafımızca yapılan çalışmada; literatürde yer alan sonuçlara ek olarak kopolimerin artan molar oranına bağlı olarak komplekslerin alıkonma zamanlarının arttığı, yani daha fazla protein molekülünün yapıya girmesi so-

nucu molekül ağırlığının artmasının yanında üç boyutlu yapıda kompaktlaşma meydana geldiği böylece globular yapıdaki komplekslerin moleküler boyutunun küçüldüğü gösterilmiştir.

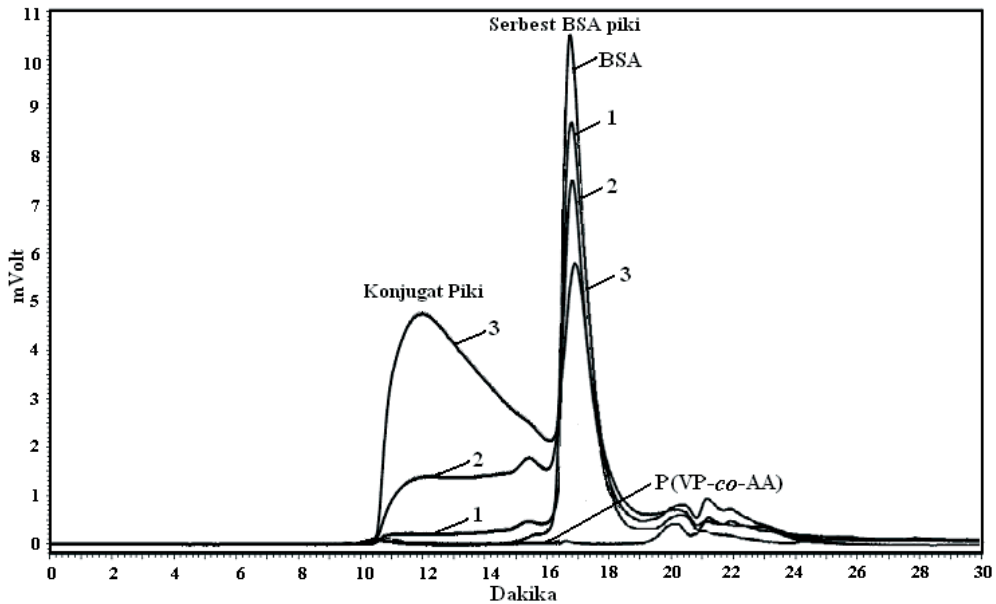
Protein-polielektrolit kompleks oluşumunun yanı sıra bu makalede pH 7.0'da birbiri ile etkileşime girmeyen BSA ve P(VP-co-AA) moleküllerini birbiri ile bağlamak amacı ile kovalent konjugasyon yöntemi uygulanmış ve BSA proteini VP-co-AA polimerine 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodimid hidroklorür çapraz bağlayıcısı kullanılarak Şekil 2'de verilen reaksiyon üzerinden bağlanmıştır. Sentezlenen biyokonjugatların yüksek performanslı sıvı kromatografisi analizi Şekil 6'da gösterilmiştir.

Sentezlenen polimer-protein konjugatlarının kromatogramları incelendiğinde artan kopolimer konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak daha fazla BSA molekülünün konjugasyon reaksiyonuna katıldığı görülmüştür. Bu durum $n_{P(VP-co-AA)}/n_{BSA}=1$ oranı için ortamda reaksiyona girecek daha fazla kopolimer kalmadığından ortamdaki BSA'nın % 14'ünün reaksiyona girmesi ile reaksiyonun sonlandığı şeklinde açıklanabilmektedir. Reaksiyona girecek kopolimer konsantrasyonunun artması ile $[n_{P(VP-co-AA)}/n_{BSA}=3]$ daha fazla BSA molekülünün reaksiyona girdiği (% 26) ve son oran için $n_{P(VP-co-AA)}/n_{BSA}=5$ ortamdaki BSA'nın % 43'ünün tükendiği saptanmıştır. Bu sonuçlar konjugasyon reaksiyonu temel alınarak açıklanırsa kopolimer miktarının artması ile aktive olacak karboksil grubu sayısının arttığı ve reaksiyondaki stokiyometrik orana bağlı olarak daha fazla amino grubunun yani daha fazla protein molekülünün reaksiyona katıldığı düşünülmektedir. Şekil 6'da verilen kromatogramda 10. dakika gözlenen konjugata ait UV pik şiddetindeki artış da bu görüşü doğrulamakta ve oluşan konjugat miktarının arttığını göstermektedir.

Tartışma

Globular proteinlerin polielektrolitlerle etkileşimi ile kararlı protein-polielektrolit komplekslerinin (PEK) oluşturulması biyoteknoloji ve tıp alanındaki biyomedikal uygulamalarda yaygın olarak çalışılmaktadır [13,17,32-33]. Malay ve arkadaşları [35] hiyaluronik asit (HA) ve ipek fibroin (SF) arasındaki kompleks oluşumunu değişik pH'larda incelemişler ve SF-HA komplekslerinin oluşumunun pH'a, biyopolimer oranına (hiyaluronik asit) ve toplam biyopolimer miktarına bağlı olduğunu göstermişlerdir. Literatürde verilen bir başka çalışmada ise BSA proteini ile poliakrilik asit polimerinin (PAA) pH=4 değerinde artan protein konsantrasyonlarında kompleksleri hazırlanmış ve kritik protein konsantrasyonunun üzerinde oluşan suda çözünmeyen komplekslerin suda çözünür hale dönüştüğü gösterilmiştir [4].

Çalışmamızda yüksek performanslı sıvı kromatografisi sistemi kullanılarak, literatürde verilen çalışmadan [4] farklı olarak biyoyumlu ve toksik olmayan ve suda çözünür özellikteki P(VP-co-AA) polimeri ile BSA proteini arasında oluşan kompleks ve sentezlenen kovalent konjugatlar bir arada incelenmiştir. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi sisteminde kompleks ve konjugatlar başlangıç molekülleri ile ürünlerin kompozisyon analizleri yapılarak karşılaştırılmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlar literatürdeki mevcut çalışmalarla [4, 10-11, 31, 35] paralellik göstermiştir ve BSA proteininin pI noktası civarında P(VP-co-AA) polimeri ile kompleks oluşturduğunu, proteinin pI noktasının üzerindeki değerlerde ise kompleks oluşumunun gözlenmediği sonuçlarımızda saptanmıştır. Ayrıca artan polimer konsantrasyonu ile daha fazla proteinin kompleks oluşumuna katıldığı ve yapının daha da kompaktlaştığı komplekslerin alıkonma zamanlarının artması BSA proteininin izoelektrik nok-



Şekil 6. BSA (1mg/ml) ve P(VP-co-AA) (1mg/ml) ile karşılaştırmalı olarak, pH=7.0'da $n_{P(VP-co-AA)}/n_{BSA}$ artan oranlarında hazırlanan konjugatlara ait HPLC kromatogramı [$n_{P(VP-co-AA)}/n_{BSA}$ oranları 1 (1), 3 (2), 5 (3)] (UV detektör 280 nm)

tası ve altındaki pH değerlerinde anyonik polielektrolit ile pozitif yük öbekleri arasında elektrostatik etkileşim ile protein-polielektrolit kompleksi oluşturmaktadır (pH 5, Şekil 4). pH değeri arttırıldığında ise protein üzerindeki negatif yük öbekleri ile anyonik polimer arasında kompleks oluşumu görülmemektedir. Bu nedenle pH 7 değerinde negatif yüklü olan iki molekül Şekil 2'de verilen reaksiyon üzerinden kovalent olarak birbirine bağlanmıştır.

Protein-polielektrolit kompleks ve biyokonjugatları karşılaştırıldığında sentezlenen biyokonjugatların, elektrostatik etkileşim sonucu oluşan komplekslere göre daha kompakt bir yapıya sahip olduğu da bu çalışmamızda gösterilmiştir. Çalışmadaki sonuçlar incelendiğinde, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodimid hidroklorür varlığında meydana gelen konjugasyon reaksiyonundan önce, protein-polielektrolit kompleks oluşumunun gerçekleştiği ve oluşan komplekslerin konjugasyon reaksiyonu için öncülük ettiği saptanmıştır. Biyolojik moleküller ile oluşturulan biyomalzemeler sıklıkla fizyolojik pH değerinde kullanıldığından pH 7.0 değerinde negatif yüklü olan bu iki molekülün çapraz bağlayıcılar kullanılarak bağlanması polimer-protein yapılı yeni biyomalzemelerin üretiminde önemli olabilir.

Sonuç olarak, çalışmamızda elde ettiğimiz; toksik olmayan ve suda çözünür özellikteki P(VP-co-AA) polimeri ile BSA proteini arasında oluşan kompleks ve sentezlenen kovalent konjugatlar tıpta tanı ve tedavi amaçlı ilaç dağılım sistemlerinde, enzim immobilizasyonunda, protein saflaştırmada, biyolojik sensörlerin ve uyarı-cevap sistemlerinin geliştirilmesinde aday moleküller olabilirler.

Bilgilendirme ve Teşekkür

Yıldız Teknik Üniversitesi, Biyomühendislik kurucu Bölüm Başkanı rahmetli hocamız Prof.Dr. Mehmet Mustafaev AKDESTE'ye teşekkür ederiz. Bu çalışma Devlet Planlama Teşkilatının 25-DPT-07-04-01 numaralı projeksi desteğinde gerçekleştirilmiştir.

Kaynaklar

- [1] Mustafaev MI. (1996) Biyopolimerler, s. 9-120, Marmara Araştırma Merkezi Matbaası, Kocaeli.
- [2] Kizilbey K, Mansuroglu B, Derman S, Budama Battal Y, Mustafaeva Akdeste Z. (2009) Conjugation of BSA Protein and VP/AA Copolymers. IJNES 3(2):36-40.
- [3] Heredia KL. and Maynard HD. (2007) Synthesis of protein-polymer conjugates. Org. Biomol. Chem. 5: 45-53.
- [4] Akkilic N, Mustafaeva Z, Mustafaev M. (2007) High performance liquid chromatography study of water soluble complexes and covalent conjugates of Polyacrylic acid with bovine serum albumin. Journal of Applied Polymer Science.105: 3108-20.
- [5] Topuzoğulları M, Çimen NS, Mustafaeva Z, Mustafaev M. (2007) Molecular-weight distribution and structural transformation in water-soluble complexes of poly(acrylic acid) and bovine serum albumin. European Polymer Journal. 43: 2935-46.
- [6] Seyrek E, Dubin PL, Tribet C, Gamble EA. (2003) Ionic Strength dependence of protein-polyelectrolyte interaction. Biomacromolecules. 4(2):273-82.
- [7] Boeris V, Spelzini D, Peleteiro S, Pico G, Romanini D, Farruggia B. (2008) Chymotrypsin-poly vinyl sulfonate interaction studied by dynamic light scattering and turbidimetric approaches. Biochimica et Biophysica Acta. 1780(9): 1032-37.
- [8] Park JM, Muhoberac BB, Dubin PL, Xia J. (1992) Effects of Protein Charge Heterogeneity in Protein-Polyelectrolyte Complexation. Macromolecules. 25(1): 290-5.
- [9] Dumitriu S, Chornet E, (1998) Inclusion and release of proteins from polysaccharide-based polyion complexes. Adv. Drug Deliv. Rev. 31: 223-46.
- [10] Sotiropoulou M, Bokias G, Staikos G, (2005) Water-soluble complexes through coulombic interactions between bovine serum albumin and anionic polyelectrolytes grafted with hydrophilic nonionic side chains. Biomacromolecules 6(4):1835-8.
- [11] Chodankar S, Aswal VK, Kohlbrecher J, Vavrin R, Wagh AG. (2008) Structural study of coacervation in protein-polyelectrolyte complexes. Physical Review E 78 031913: 1-3.
- [12] Jong HGB. (1949) Colloid Science Vol. II. Elsevier, Amsterdam
- [13] Braia M, Porfiri MC, Farruggia B, Pico G, Romanini D. (2008) Complex formation between protein and poly vinyl sulfonate as a strategy of proteins isolation. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 873(2): 139-43.
- [14] Takahashi D, Kubota Y, Kokai K, Izumi T, Hirata M, Kokufuta E. (2000) Effects of Surface Charge Distribution of Proteins in Their Complexation with Polyelectrolytes in an Aqueous Salt-Free System, Langmuir, 16(7): 3133-40.
- [15] Cooper CL, Dubin PL, Kayitmazer AB, Turksen S. (2005) Protein-polyelectrolyte complexes. Current Opinion in Colloid and Interface Science. 10: 52-78.
- [16] Tsuboi A, Izumi T, Hirata M, Xia J, Dubin PL, Kokufuta E. (1996) Complexation of proteins with a strong polyanion in an aqueous salt-free system. Langmuir 12: 6295-303.
- [17] Vardhanabhuti B, Yucel U, Coupland JN, Foegeding EA. (2009) Interactions between β -lactoglobulin and dextran sulfate at near neutral pH and their effect on thermal stability. Food Hydrocolloids 23(6): 1511-20.
- [18] Wong SS. (1993) Chemistry of protein conjugation and cross-linking. CRC Press Inc., London.
- [19] Dilgimen AS, Mustafaeva Z, Demchenko M, Kaneko T, Osada Y, Mustafaev M. (2001) Water-soluble covalent conjugates of bovine serum albumin with anionic poly(N-isopropylacrylamide) and their immunogenicity. Biomaterials 22(17): 2383-92.
- [20] Mustafaev MI., Sarac AS. (1996) The Polymeric Materials Encyclopedia: Synthesis, Properties and Application. s. 5771-77, CRC Press.
- [21] Kabanov VA, Evdakov VP, Mustafaev MI, Antipina AD. (1977) Cooperative interaction of serum albumin with quaternized poly-4-vinyl pyridine and structure of the complexes. Mol Biol. 11: 582.
- [22] Kabanov VA, Zevin AB, Mustafaev MI, Kasaikin VA. (1980) Soluble interpolymeric complexes of polyamines and polyammonium salts, s. 173-92, Pergamon Pres, New York and Oxford.
- [23] Xia Y, Dubin PL. (1994) Protein-Polyelectrolyte Macromolecular complexes in chemistry and biology, s. 247-271, Springer-Berlin
- [24] Li Y, Mattison KW, Dubin PL, Havel HA, Edwards SL. (1996) Light scattering studies of the binding of bovine serum albumin to a cationic polyelectrolyte. Biopolymers.38(4): 527-33.
- [25] Guney O, Sarac AS, Mustafaev MI. (1997) Fluorescence and turbidimetry study of complexation of human serum albumin with polycations. J Bioact Compat Polymers; 12: 231-44.

- [26] Basalp A, Mustafaeva Z, Mustafaev MI, Bermek E. (2000) Immune response to 17 beta-estradiol involved in polymer gels: antigen specificity and affinity of hybridoma clones. *Hybridoma* 19(6): 495-499.
- [27] Rafikov RZ, Sakhibov AD, Akhmedzhanov RI, Aliev U. (1986) Pharmacokinetics of copolymers of n-vinylpyrrolidone with acrylic acid. *Pharmaceutical Chemistry Journal*20(3): 157-9.
- [28] Wang N, Ye L, Zhao BQ, Yu JX. (2008) Spectroscopic studies on the interaction of efonidipine with bovine serum albumin. *Braz J Med Biol Res.* 41(7):589-95.
- [29] Uelzmann H. (1958) Copolymers of acrylic acid and N-vinylpyrrolidone-2. *Journal of Polymer Science*, 33(126): 377-9.
- [30] http://www.pb.izm.fhg.de/epc/060_equipment/020_chromatography/020_sec/index.html
- [31] Serefoglou E, Oberdisse J, Staikos G. (2007) Characterization of the Soluble Nanoparticles Formed through Coulombic Interaction of Bovine Serum Albumin with Anionic Graft Copolymers at Low pH. *Biomacromolecules.* 8(4):1195–99.
- [32] Mattiasson B, Kumar A, Galaev IY. (1998) Affinity precipitation of proteins: design criteria for an efficient polymer J. *Mol. Recognit.* 11(1-6): 211-6.
- [33] Nath S, Patrickios CS, Hatton A. (1995) Turbidimetric Titration Study of the Interaction of Proteins with Acrylic Polyampholytes. *Biotechnol. Progr.* 11(1): 99-103.
- [34] Ulrich S, Seijo M and Stoll S. (2006) The many facets of polyelectrolytes and oppositely charged macroions complex formation. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 11 (5): 268-272.
- [35] Malay Ö, Bayraktar O, Batıgün A. (2007) Complex coacervation of silk fibroin and hyaluronic acid. *International Journal of Biological Macromolecules*, 40: 387-393.