

Kriyojellerin afinite uygulaması

Burcu Eren¹, Okan Zenger¹, Gözde Baydemir Peşint^{*1}

¹ *Adana Alparslan Türkes Bilim ve Teknoloji Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik, Adana*

Geliş Tarihi:27.06.2019

Kabul Tarihi:29.10.2019

Özet

Kriyojeller makro gözenekli çapraz bağlı polimerik yapılardır. Afinite kromatografisi, biyolojik sistemlerde doğal olarak oluşan veya yapay olarak oluşturulabilen seçici adsorpsiyon sistemine dayanan bir kromatografi çeşididir. Kriyojellerin geniş gözenekleri ve üstün akış özellikleri bu malzemelerin farklı afinite uygulamalarında kullanımına olanak tanımıştır. Afinite kromatografi çeşitleri, özellikle biyomakromolekülerin seçici ayrıştırmasında oldukça sık kullanılmaktadır. Ayırma, saflaştırma ve seçici moleküler tanıma dayalı uygulamalarda kriyojellerin avantajlarında faydalanılmıştır. Bu derlemede ise, kriyojellerin üretimi ve afinite kromatografisi çeşitleriyle yapılan çalışmalara yer verilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Afinite kromatografisi, Kriyojeller, Moleküler baskılama

Affinity applications of cryogels

Abstract

Cryogels are macroporous cross-linked polymeric structures. Affinity chromatography is a type of chromatography based on some adsorption purposes, which is either naturally occurring or artificially formed in biological systems. The wide pores and superior choice properties of cryogels have enabled these materials to be used in different affinity applications. The types of affinity chromatography were quite common when some of the biological biomacromolecules were separated. Advantages of cryogels have been utilized in applications for separation, purification and molecular recognition. In this review, the production of cryogels and affinity chromatography types have been summerized.

Keywords: Affinity chromatography, Cryogels, Molecularly imprinting

*Sorumlu yazar (Corresponding author): Gözde Baydemir Peşint, gpesint@atu.edu.tr
Artibilim:Adana Alparslan Turkes BTU Fen Bilimleri Dergisi

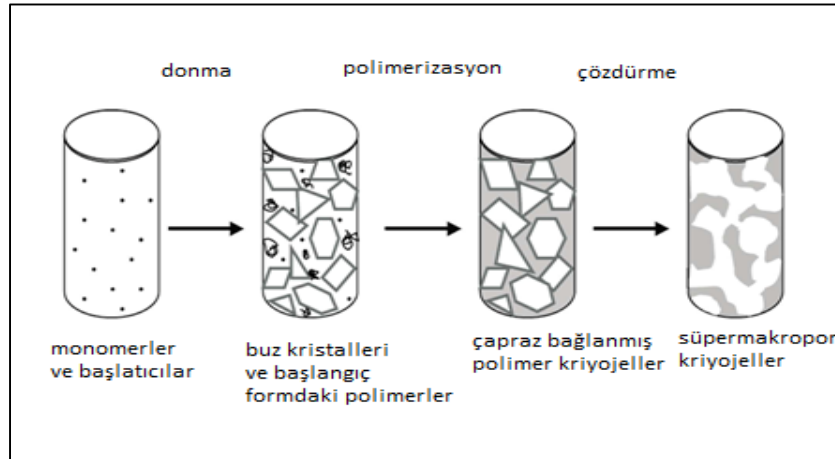
Kriyojellerin afinite uygulaması

1. Giriş

Tıp ve biyoteknolojideki hızlı teknolojik ilerlemeler, yüksek oranda saflaştırılmış biyomoleküller için artan bir talebe yol açmaktadır. Günümüzde tercih edilen yöntemlerden birisi, afinite bazlı ayırma işlemleridir. Ayırma işlemi gerçekleştirilirken monolitik materyal olarak gözenekli yapıya sahip polimerler tercih edilmektedir. Bunlardan en önemlileri arasında makro gözenekli kriyojelleri sayabiliriz. Bu sistemler sıfırın altı sıcaklıklarda sentezlenir ve üç boyutlu bir sünger benzeri morfoloji gösterirler. Yüksek gözeneklilik, mekanik stabilite ve dayanıklılık gibi benzersiz özelliklerden ve biyomoleküllerin spesifik olmayan adsorpsiyonunu azaltan hidrofilik karakteristiğinden dolayı, kriyojeller, afinite ayrılması için ideal olarak görülmektedir. "Kriyojel" terimi ilk olarak 1984 yılında sıfırın altında sentezlenen polimerik kimyasal çapraz bağlanma ile hazırlanan polimerik jeller için kullanılmıştır [1].

2. Kriyojeller ve Afinite Uygulamaları

Kriyojeller, çeşitli araştırma alanlarında uygulamalara sahip, sıfırın altındaki sıcaklıklarda hazırlanan ve birbirine bağlı olarak bulunan gözenekli jellerdir. Kriyojelasyon işleminin ideal olarak bazı aşamalarla gerçekleştiği düşünülmektedir. Bunlar 4 başlıkta incelenebilir: Buz kristali oluşumu, çapraz bağlanma ve polimerizasyon ile faz ayrılması, buzlu kristallerin çözülmesi ardından birbirine bağlı gözenek oluşumudur[1,2].



Şekil 1. Kriyojelin yapım basamaklarının şematik gösterimi

Kriyojeller oluşturulurken öncelikle spesifik tanıma kabiliyetine (ligand) sahip bir molekül; destek matrisi olarak makro gözenekli kriyojel üzerinde immobilize edilir. İzole edilecek olan hedef molekül, tamamlayıcı ligand tarafından, hedef molekülü içeren çözelti karışımının uygun koşullar altında kriyojel kolonundan geçirilmesi vasıtasıyla seçici bir şekilde yakalanır. Hedef moleküller daha sonra spesifik olarak rekabetçi bir ligand kullanılarak veya spesifik olarak pH, iyonik kuvvet ya da sıcaklık gibi fiziksel parametrelerin değiştirilmesi ile ayrıştırılır, böylece ligand ve hedef molekül arasındaki etkileşim ortadan kaldırılır ve hedef moleküller saf bir şekilde elde edilir[3].

Büyük gözenek boyutları (100 nm'ye kadar), kısa difüzyon yolu, iyi biyoyumluluk, esneklik ve yüksek mekanik dayanıklılık gibi kriyojenlerin olumlu özellikleri, onları biyo-ayırma ve saflaştırma işlemlerinde vazgeçilmez kılmıştır. Kriyojellerin hazırlanması kolaydır. Ayrıca onlar, maliyeti düşük

adsorbanlardır. Bu nedenle bir kriyojel numunesinin ardışık çalışmaları sırasında çapraz kontaminasyonu önlemek amacıyla , kullanımından sonra atılıp tekrar yenileri hazırlanabilir[3,4].

Kriyojeller, üç boyutlu çapraz bağlanmış polimerlerdir ve çok yüksek bir çapraz bağlanma, şablon çıkarma işleminde düşük verimlilik gibi bazı dezavantajlara neden olabilir. Ayrıca, hedef molekül ile kompleks oluşturacak fonksiyonel monomerin türü de, yeniden bağlama verimini ve seçiciliğini etkileyebilir. Kriyojel üretiminde kullanılan bazı fonksiyonel monomerler, hedef moleküller, uygulama alanları ve verimleri Tablo 1'de gösterilmiştir[4].

Tablo 1. Kriyojellerin uygulama alanları ve bazı özellikleri

Fonksiyonel monomer	Hedef molekül	Uygulama Alanı	Verim	Kaynakça
N- (Metakrilolil) -L-sistein metil ester	Plazmada insan immünoglobulin G'nin Fc fragmanı	Tanı ve teşhis	86.9 mg / g MIP kriyojelleri ve 1.49 kat daha fazla seçicilik	[16]
N- (Metakrilolil) -L-fenilalanin	Plazmadaki insan serum albümini	Proteome araştırmaları	25.5 mg / g MIP kriyojeli ve 6.8 kat daha fazla seçicilik	[17]
N,N'- Metilenbisakrila mid	İdrar örnekleri için mikroalbümin	Biyosensörler	Düşük algılama sınırı ve yüksek seçicilik	[18]
N,N'- Metilenbisakrila mid	Tavuk yumurtasının beyazındaki lizozim	Kromatografik ayırıştırma için monolitik sütun olarak	36.3 mg / g MIP kriyojelleri ve 1.58 kat daha fazla seçicilik	[19]
N- (Metakrilolil) -L-triptofan	İnsan plazmasındaki miyogloblin	Tanı ve teşhis	35.96 mg / g MIP kriyojelleri ve 2.5 kat daha fazla seçicilik	[20]

Bir proteinin ayrılması; moleküler ebadı, net yükü, biyospesifik özellikleri ve hidrofobisitesi gibi birçok biyolojik ve fizikokimyasal özelliklerine bağlıdır. Afinite kromatografisi türleri bu alanda oldukça sık kullanılmaktadır. İmmobilize metal afinite kromatografisi (IMAC), boya-afinite kromatografisi, hidrofobik etkileşim kromatografisi (HIC),boronat afinite kromatografisi ve immünoafinite kromatografisi protein saflaştırmasında en yaygın kullanılan yöntemler olarak sayılabilir. Bu konularda yapılmış pek çok çalışma örneği ise bu yayında raporlanmaktadır [5].

İmmobilize metal afinite kromatografisi (IMAC), IMAC, metal iyonlarının metal iyon afinitesi ile biyomoleküller arasındaki seçici etkileşime dayanır. Ayrılma, bir Lewis asidinin (elektron çifti alıcısı), örneğin Cu (II), Ni (II), Zn (II) gibi şelatlı metal iyonlarının, elektron verici atomlar (N, O ve S gibi) ile protein yüzeyinde gerçekleşen etkileşimlerine dayanır [6].

Ni (II) gibi bazı metal iyonları, uzun süreli terapi durumunda farmasötik proteinlerin saflaştırılmasında toksisite sorunlarına yol açabilir. Ancak metallerin düşük maliyeti, fizyolojik pH

Kriyojellerin afinite uygulaması

aralığındaki performansları, durağan fazının yenilenme kolaylığı ve ligandın yüksek stabilitesi, IMAC'ın avantajlı özellikleridir[7].

Son zamanlarda yapılan bir çalışmada, süper-gözenekli monolitik kriyojel IMAC afinite matrisi ile ürokinazın; insan fibrosarkom HT1080 hücre hattının şartlandırılmış ortamından yakalanması ve saflaştırılması için uygulanabilirliğine bakılmıştır. Bu çalışmada, sürekli hücre kültürü kriyojel biyoreaktöründe Cu (II) -IDA-poliakrilamid kriyojeli ve Cu (II)-IDA Sepharose matrislerinden elde edilen kültür sıvılarından ürokinazın izolasyonu ve saflaştırılması çalışılmıştır[8].

IMAC çalışmaları, protein ve enzim saflaştırması için de uygulanabilir. Bunlar arasında, Cu (II) iyonlarıyla şelatlı poli (hidroksietil metakrilat) (PHEMA) bazlı monolitik kriyojel, sıçan karaciğer homojenatından sitokrom c'nin saflaştırılması için başarıyla kullanılmıştır. Bu çalışmalar için, bir sentezlenmiş fonksiyonel monomer, yani polimerizasyon sırasında doğrudan PHEMA kriyojellerine katılan N-metakrilolil- (1) -histidin metil ester (MAH) ve ligand olarak Cu (II) kullanılmıştır[9].

Boya afinite kromatografisi, immobilize edilmiş boyaların birçok protein üzerindeki bağlanma yerleri için yüksek afinitesine dayanan bir protein saflaştırma işlemidir. Ticari olarak temin edilebilirler, ucuzdurlar ve özellikle hidroksil grupları taşıyan matrislerde kolayca hareketsiz hale getirilebilirler. Boyalar doğada sentetik olarak bulunurlar ve afinite ligandları olarak sınıflandırılırlar. Substratların, kofaktörlerin veya bu proteinler için bağlayıcı ajanların yapısını taklit ederek birçok proteinin aktif bölgeleri ile etkileşime girebilirler[10].

Bir çalışmada, 2-hidroksietil metakrilat (HEMA) ve Cibacron Blue F3GA (CB); ana monomer ve boya ligand olarak seçilmiştir. Daha sonra, Cibacron Blue F3GA ekli süper-gözenekli poli (2-hidroksietil metakrilat) [poli (HEMA) / CB] kriyojeller hazırlanmış ve şişme testi, taramalı elektron mikroskobu, element analizi ve FTIR kullanılarak karakterize edilmiştir[11].

Poli (HEMA) / CB kriyojellerinin maksimum adsorpsiyon kapasitesi, pH 6.0'da 38.2 mg / g olarak elde edilmiştir. İnsan dişeti fibroblast ekstraktından interferon saflaştırması için hızlı protein sıvı kromatografisi (FPLC) sistemi kullanılmıştır. Sonuç olarak, poli (HEMA) / CB kriyojellerinin, interferonun hızlı, ucuz ve spesifik saflaştırılması için iyi bir uygulama potansiyeline sahip olduğu görülmüştür [11].

Hidrofobik etkileşim kromatografisi, hidrofobik proteinlerin, bu proteinlerin yüzeyi üzerindeki hidrofobik ligandlar ve polar olmayan bölgeler arasındaki hidrofobik etkileşimler yoluyla ayrılmasına dayanır. Deraz ve diğ., sabit ortam olarak immobilize edilmiş hidrofobik ligandlar kullanarak (oktil ve fenil) makro gözenekli poliakrilamid monolitik kriyojeller (pAAM) üretmişlerdir. Bu çalışmada, iki hidrofobik ligand (oktil ve fenil) ile sabit pAAM ortamı arasında fonksiyonel epoksi grupları vasıtasıyla pAAM monolitine kovalent bağlanma gerçekleştirilmiştir[12].

Bir diğer çalışma ise, bir hidrofobik ligand ve hedef enzimin yüzeyindeki polar olmayan bölgeler arasındaki hidrofobik etkileşimlere dayandırılmıştır. PHEMATrp kriyojel, seyreltilmiş yumurta akısından lizozimin saflaştırılması için etkili bir hidrofobik adsorban olarak görev yapmıştır. Bu kriyojelde, yüksek adsorpsiyon kapasitesi ve %91'lik bir geri kazanım ile lizozim için yüksek seçicilik gözlenmiştir. Elde edilen maksimum lizozim adsorpsiyonu, ilgili literatürle oldukça karşılaştırılabilir bir değer olan 46.8 mg / g olmuştur[13].

Nükleik asit bileşenlerinin ve karbonhidratların ayrılması için boronat afinite kromatografisinin kullanımı, ilk olarak 1970 yılında Weith ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir. O zamandan beri, boronatin özgüllüğü, nükleik asitler, karbonhidratlar, glikoproteinler ve enzimler de dahil olmak üzere

çok çeşitli cis-diol içeren bileşiklerin ayrılması için kullanılmıştır. Boronat afinite kromatografisi için temel etkileşim, boronat ligandları ve cis-dioller arasındaki esterleşmedir[14].

Bir çalışmada, PHEMA bazlı 4-vinil fenil boronik asit (VPBA) ile fonksiyonelleştirilmiş kompozit kriyojel hazırlandı ve bir HPLC kolonunda malzeme olarak kullanılarak seçici IgG ayrılması çalışması gerçekleştirildi. Çalışma, kompozit kriyojel kolonunun yüksek afinite ve seçicilik özelliklerini koruyarak yeniden kullanılabilirliğini göstermiştir. Ayrıca IgG gibi endüstriyel açıdan önemli glikoproteinlerin, etkin bir şekilde ayrılması ile maliyet açısından güzel bir avantaj sağlanmıştır[14].

Başka bir çalışmada, Poli (HEMA-ko-VPBA) 4-vinil fenil boronik asit (VPBA) (ağırlıkça% 6: 1) kriyojel, RNA'nın mayadan izole edilmesi için kullanılmıştır. Hazırlanan matris, iyi gözeneklilik ve yeterince yüksek RNA bağlama kapasitesi göstermiştir. RNA'nın riboz şekerinin cis-diolü, büyük oranda poli (HEMA-ko-VPBA) 'ın boronat kısmı ile etkileşime girmiş ve tersinir siklik ester meydana getirmiştir. İkincil etkileşimler de yine RNA moleküllerinin boronat kısmına bağlanmasında rol oynamışlardır. DNA moleküllerinde 2-hidroksil grubunun bulunmaması nedeniyle kolonda tutulmaları gözlemlenmemiştir. Son kısımda ise, bağlı RNA molekülleri, boronat afiniteli kriyojel kolonundan geri kazanılmıştır [15].

Antikorlar, birçok uygulamada, özellikle tanısal ve terapötik ajanlar olarak kullanılırlar. Antikorların saflaştırılması için kullanılan çeşitli teknikler arasında, immünoafinite kromatografisi en yaygın olanıdır. Bir çalışmada, Fc fragmanı baskılı poli (hidroksietil metakrilat) kriyojeli (MIP), anti-hIgG'nin insan plazmasından IgG saflaştırması için hazırlanmıştır. Adsorpsiyon kapasitelerini karşılaştırmak amacıyla baskısız poli (hidroksietil metakrilat) kriyojeli (NIP) de anti-hIgG'nin rasgele immobilizasyonu için hazırlanmıştır[16,17].

İmmobilize anti-hIgG miktarı, NIP sütunu için 19.8 mg / g ve MIP sütunu için 23.7 mg / g olarak hesaplanmıştır. Hareketsizleştirilmiş anti-hIgG miktarı, NIP ve MIP kolonları için hemen hemen aynı olmasına rağmen, IgG adsorpsiyon kapasitesinin, MIP / anti-hIgG için NIP / anti-hIgG kolonundan üç kat daha yüksek olduğu bulunmuştur[16].

Başka bir çalışmada, proteome uygulamalarında kullanılmadan önce hemoglobinin insan kanından tükenmesi için moleküler olarak baskılanmış bir kompozit kriyojeller hazırlanmıştır [17].

3. Sonuç ve tartışma

Kriyojeller yeni nesil polimerik malzemeler olup çeşitli uygulama alanlarına sahiptirler. Üstün yapısal özellikleri ile (düşük akış direnci, birbiri ile bağlantılı gözenekler, tekrar kullanılabilirlik vb) ayırma, saflaştırma, moleküler tanımayı amaçlayan çok sayıda afinite uygulamalarının gerçekleştirilmesine olanak tanıyan kriyojeller; sağlık, çevre, gıda gibi birçok alanda ileri çalışmaların literatüre katılmasına katkı sağlayacak potansiyele sahiptir.

Kaynakça

- [1] Reichelt, S. (2015). Affinity chromatography: Methods and protocols. New York: Humana Press.
- [2] Kahveci, M.U., Beyazkılıç, Z., Yagci, Y. (2010). Polyacrylamide cryogels by photoinitiated free radical polymerization. J. Polym. Sci.: Part A: Polym. Chem., 48, 4989–4994.

Kriyojellerin afinite uygulaması

- [3] Hajizadeh, S., Kirsebom, H., Leistner, A., Mattiasson, B. (2012). Composite cryogel with immobilized concanavalin A for affinity chromatography of glycoproteins. *J. Sep. Sci.*, 35, 2978–2985.
- [4] Kirsebom, H., Topgaard, D., Galaev, I.Y., Mattiasson, B. (2010). Modulating the porosity of cryogels by influencing the nonfrozen liquid phase through the addition of inert solutes. *Langmuir*, 26, 16129–16133.
- [5] Garcia, F.A.P., Pires, K.M.V. (1993). in: J.F. Kennedy, J.M.S. Cabral (Eds.), *Chromatography*, Wiley, London, p. 415.
- [6] Akgöl, S., Denizli, A. (2004). Novel metal-chelate affinity sorbents for reversible use in catalase adsorption. *J. Mol. Catal.*, 28, 7–14.
- [7] Karatas, M., Akgöl, S., Yavuz, H., Say, R., Denizli, A. (2007). Immunoglobulin G depletion from human serum with metal chelated beads under magnetic field. *Int. J. Biol. Macromol.*, 40, 254–260.
- [8] Kumar, A., Bansal, V., Andersson, J., Roychoudhury, P.K., Mattiasson, B. (2006). Supermacroporous cryogel matrix for integrated protein isolation- Immobilized metal affinity chromatographic purification of urokinase from cell culture broth of a human kidney cell line. *Journal of Chromatography A*, 1103(1), 35-42.
- [9] Cimen, D., Denizli, A. (2012). Immobilized metal affinity monolithic cryogels for cytochrome c purification. *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, 93, 29–35.
- [10] Andac, C.A., Andac, M., Denizli, A. (2007). Predicting the binding properties of cibacron blue F3GA in affinity separation systems. *Int. J. Biol. Macromol.*, 41, 430–438.
- [11] Dogan, A., Özkara, S., Sari, M.M., Uzun, L., Denizli, A. (2012). Evaluation of human interferon adsorption performance of Cibacron Blue F3GA attached cryogels and interferon purification by using FPLC system. *J. Chromatogr. B*, 893(894), 69–76.
- [12] Deraz, S., Plieva, F.M., Galaev, I.Yu., Karlsson, E.N., Mattiasson, B. (2007). Capture of bacteriocins directly from non-clarified fermentation broth using macroporous monolithic cryogels with phenyl ligands. *Enzyme Microbial. Technol.*, 40, 786–793.
- [13] Yilmaz, F., Bereli, N., Yavuz, H., Denizli, A. (2009). Supermacroporous hydrophobic affinity cryogels for protein chromatography. *Biochem. Eng. J.*, 43, 272–279.
- [14] Li, H., Liu, Z. (2012). Recent advances in monolithic column-based boronate-affinity chromatography. *Trends Anal. Chem.*, 37, 148–161.
- [15] Saylan, Y., Bereli, N., Uzun, L., Denizli, A. (2014). Monolithic boronate affinity columns for IgG. *Sep. Sci. Technol.*, 49, 1555–1565.
- [16] Bereli, N., Ertürk, G., Tümer, M.A., Say, R., Denizli, A. (2013). Oriented immobilized anti-hIgG via Fc fragment-imprinted PHEMA cryogel for IgG purification. *Biomed. Chromatogr.*, 27, 599–607.

- [17] Andac, M., Galaev, I.Y., Denizli, A. (2013). Molecularly imprinted poly(hydroxyethyl methacrylate) based cryogel for albumin depletion from human serum. *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, 109, 259–265.
- [18] Fatoni, A., Numnuam, A., Kanatharana, P., Limbut, W., Thavarungkul, P. (2014). A novel molecularly imprinted chitosan–acrylamide, graphene, ferrocene composite cryogel biosensor used to detect microalbumin. *Analyst*, 139, 6160–6167.
- [19] Rabieizadeh, M., Kashefimořrad, S.M., Naeimpoor, F. (2014). Monolithic molecularly imprinted cryogel for lysozyme recognition. *J. Sep. Sci.*, 37, 2983–2990.
- [20] Ertürk, G., Bereli, N., Ramteke, P.W., Denizli, A. (2014). Molecularly imprinted supermacroporous cryogels for myoglobin recognition. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 173, 1250–1262.