

itüdergisi/c**fen bilimleri**

Cilt:8, Sayı:1, 127-135

Kasım 2010

Katı yüzeylere özgül bağlanan peptidlerin moleküler karakterizasyonu

Urartu Özgür Şafak ŞEKER^{*1}, Candan TAMERLER^{*1}, Mehmet SARIKAYA²¹İTÜ Fen Bilimleri, İleri Teknolojiler, Moleküler Biyoloji-Genetik ve Biyoteknoloji Programı, 34469, Ayazağa, İstanbul²Washington Üniversitesi, Malzeme Bilimi ve Mühendisliği Bölümü, Seattle, Washington Eyaleti, Amerika Birleşik Devletleri

Özet

Anorganik yüzeyler çeşitli kimyasal gruplar kullanılarak fonksiyonel hale getirilmektedirler. Bu moleküllerin yüzeylerde oluşturdukları kendiliğinden örgütlenen yapılar ile yüzeylere istenilen fonksiyonellik kazandırılmaktadır. Ancak, kullanılan kimyasal moleküler bağlayıcılar tek bir yüzeye özgül olmamakta, birden fazla yüzeye afinite göstermektedirler. Çoklu malzeme içeren yüzeylerde kimyasal bağlayıcılarla aşılamayan bu durum, son yıllarda kombinatoriyel biyoloji yöntemleri ile yeni nesil peptid moleküler bağlayıcılar kullanılarak aşılmaya çalışılmaktadır. Yönlendirilmiş evrim yolu ile faj gösterim ve hücre yüzey gösterim teknikleri kullanılarak farklı malzeme yüzeylerine özgül olan peptidlerin moleküler bağlayıcılar olarak kullanımı biyo-nanoteknolojik çalışmalarda artan oranda ilgi toplanmaktadır. Bu çalışma kapsamında altın, platin ve silika yüzeylerine özgül olarak seçilmiş peptidlerin, adsorpsiyon kinetik parametreleri, peptidlerin yapısal özelliklerine bağlı olarak incelenmiştir. Bu çalışma dahilinde peptidlerin anorganik yüzeylerle etkileşimleri yüzey plazmon spektrometresi ile incelenmiştir. Deneylerde, peptidlerin ilk seçilmiş dizileri ile çoklu tekrarlarından oluşmuş diziler kullanılmıştır. Çalışma sonucunda platine özgül PtBP2, silikaya özgül bağlanan QBPI ve altına özgül bağlanan GBP, moleküllerinde bu peptidlerin orijinal aminaasit dizilerinin üçlü tekrarlarının yüzeylerde kaplama yüzdesini artırdığı görülmüştür. Ancak platine özgül PtBP1 ve silikaya özgül QBP2 peptidlerinde aynı durum gözlenememiştir. Bu çalışma sonucunda anorganik yüzeylere özgül peptidlerin göstermiş oldukları yüksek yüzey kaplama oranları sayesinde, katı yüzeylerin işlevselleştirilmesi için iyi birer moleküler bağlayıcı oldukları saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Peptidler, yüzey işlevselliği, moleküler tanıma, biyo-nanoteknoloji.

*Yazışmaların yapılacağı yazar: Urartu Özgür Şafak ŞEKER. sekerur@itu.edu.tr; Tel: (212) 285 67 85.

Bu makale, birinci yazar tarafından İTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, İleri Teknolojiler Anabilim dalı, Moleküler Biyoloji-Genetik ve Biyoteknoloji Programı'nda tamamlanmış olan "Kinetic and thermodynamic analysis of genetically engineered inorganic binding peptides for bionanotechnology" adlı doktora tezinden hazırlanmıştır. Makale metni 23.09.2009 tarihinde dergiye ulaşmış, 11.11.2009 tarihinde basım kararı alınmıştır. Makale ile ilgili tartışmalar 30.04.2011 tarihine kadar dergiye gönderilmelidir.

Molecular binding characterization of genetically engineered solid binding peptides

Extended abstract

Molecular recognition abilities of peptides and proteins have been exploited to create new generation of biomimetic molecular linkers. Peptide based molecular linkers were selected using combinatorial biology techniques, namely cell surface and phage display methods. Genetically engineered peptides for inorganics (GEPI) were screened and selected from phage display or cell surface display libraries. GEPIs were first characterized using qualitative techniques. However, this test was used as a preliminary step for the classification of the GEPIs. In this study we focused on the surface coverage of GEPIs.

In the molecular characterization of GEPIs, adsorption kinetics and thermodynamics of GEPIs were realized in conjugation with secondary structural analysis of GEPIs. To characterize binding kinetics and thermodynamics of GEPIs, we employed surface plasmon resonance sensor. The sensing capability of SPR was only limited for adsorption on gold surface. We employed a reflectivity model, improved in Sarıkaya group, to extend the sensing capability of SPR for the materials other than gold, namely platinum and silica surfaces. The reflectivity model guided us to prepare the right architecture for platinum and silica coated SPR chip surfaces.

The surface coverage for gold binding peptide (l-GBP), platinum binding peptides (l-PtBP1 and l-PtBP2) and silica binding peptides (l-QBP1 and l-QBP2) were determined. We carried out the surface coverage experiments for the one repeat of the peptides as they were selected from the libraries. GBP, gold binding peptide was selected from a cell surface display library. It is a 14 mer peptide and in previous studies it was demonstrated to have a high affinity to gold. Here we employed a surface coverage analysis for both l-GBP and its concatamer form 3l-GBP. For surface coverage analysis of GBP we found that there is a difference between l-GBP and 3l-GBP. The increase in surface coverage was not as prominent as the increase in binding affinity. We observed that the surface coverage of peptides were greatly influenced by the concentration of the peptide. Interestingly the difference in surface coverage of GEPIs was noticed at low concentrations of the peptides.

In silica binding peptides groups, we tested two distinct silica binding peptides. QBP1 and QBP2. Both of the peptides were designed using bioinformatics tools, based on the knowledge generated from a combinatorially selected phage display library members. For QBP1 we noticed that, there is a difference in the surface coverage of the concatamer form, 3l, of the peptide. Interestingly we did not see any difference in the surface coverage of the one repeat and three repeat forms of QBP2. They seem similar to each other. The increase in the surface coverage upon displaying the concatamer forms of the peptides is regardless that the peptides are strong binder or not.

We observed a comparable behaviour in the Pt binding peptides with the silica binding peptides in case of the repeating concatamers on surface coverage of the peptides. Here we investigated two platinum binders PtBP1 and PtBP2. They were both selected from phage display library as 7mer cyclic peptides. In PtBP1 peptide we did not observe any difference between the surface coverage values of l-PtBP1 and 3l-PtBP1. However, we noticed a difference between the surface coverages of l-PtBP2 and 3l-PtBP2. Despite of the fact that they were the strong binding peptides, they behaved differently in their surface coverage analysis. Here we demonstrated the surface coverages of PtBPs, QBPs and GBPs as a function of concentration. All of these peptides were the strongest binders for their corresponding surfaces. However, we explored a difference for their adsorption properties. Here we showed that the surface coverage of the peptides is not increasing as the number of GEPIs is increasing. The increase in the surface coverage of a GEPI is depended to the primary structure information of GEPI. Since the primary structure determines the secondary structure, we can conclude that, if the increase in the number of the repeats of GEPI favor for the conformational stability on the surface, then the surface coverage of the given GEPI increases. Surface coverage of a GEPI can be tuned by changing the conformational constraints affecting its structural stability on the surface. These properties make inorganic binding peptides ideal self assembling molecular tools for bionanotechnological applications.

Keywords: Inorganic binding peptides, surface plasmon resonance, bio-nanotechnology, surface coverage.

Giriş

Anorganik yüzeylerin işlevsel hale getirilmesi; biyoteknoloji, biyotıp, elektronik, malzeme ve özellikle ara kesitte olan biyo-nanoteknoloji alanları açısından önem taşımaktadır (Whitesides vd., 1991; Sarıkaya vd., 2003).

Katı yüzeyleri işlevsel hale getirilmesi amacıyla kimyasal bağlayıcı moleküller kullanılmaktadır. (Love vd., 2005) Çoğunlukla değişik uzunlukta karbon zincir uzunluğuna sahip fonksiyonel bir uç barındıran bu bileşikler (amin, karboksil, benzen halkası) tiyol ve silan tabanlı moleküllerdir (Mrksich vd., 1995).

Tiyol ve silan bazlı bu moleküler bağlayıcılar kullanılmak suretiyle altın, gümüş, bakır, demir gibi metaller ile silika, kuvarz gibi metal oksitler ve çeşitli yarı iletken katı yüzeyler fonksiyonel hale getirilmişlerdir. Kimyasal moleküler bağlayıcılar birden fazla yüzeye karşı seçicilik göstermeden bağlanabilmektedirler (Love vd., 2005).

Ancak çoklu malzeme içeren yüzeylerin işlevselleştirilmesi için gerekli olan seçiciliği kimyasal ve özgül olmayan- bağlayıcılarla yapmak mümkün olmamaktadır. Yüzey işlevselleştirilmesi amacıyla kullanılacak olan moleküler bağlayıcıların seçici olması ve farklı malzeme yüzeylerine farklı afinite göstermeleri, çoklu malzeme sistemleri için elzem bir hal almaktadır. Anorganik malzemelere özgülük gösteren yeni nesil moleküler bağlayıcıların seçilmesi amacıyla biyolojik sistemlerin temel yapı taşı olan ve birçok yaşaamsal faaliyette düzenleyici görev yapan protein ve peptidlerin çalışma mekanizmaları örnek alınabilir (Sarıkaya 1999; Sarıkaya 2003).

Bazı protein ve peptidlerin biyolojik sistemlerde bulunan anorganik yapıların (diş, kemik, kabuk ve hücre içi nanomalzemeler) oluşumunda düzenleyici olarak da yer aldıkları bilinmektedir (Tamerler, 2007). Bu benzetimden yola çıkarak doğada varolmayan ancak teknolojik amaçlar için gerekli olan anorganik yüzeylere özgül protein ve peptidlerin seçimleri işlemi yapılmıştır (Sarıkaya vd., 2003; Whaley vd., 2000). Anor-

ganiklere özgül peptidler olarak adlandırılan bu moleküller, kombinatoriyel biyoloji yöntemleri adı verilen faj gösterim (Smith, 1985) ve hücre yüzey gösterim (Wittrupp, 2001) teknolojileri kullanılarak yönlendirilmiş evrim yolu ile yüksek sayıda faj klonu içeren faj kütüphanelerinden seçilmektedirler. Faj kütüphanesinde yer alan, fajların kılıf proteinlerinde gösterilen peptidlerin aminoasit (aa) zincir uzunlukları, yedi, oniki ya da ondört (aa) olarak değişmektedirler. Anorganiklere özgül olan bu peptidler terminolojik olarak GEPI (Genetically engineered peptide for inorganics) terimi ile adlandırılmaktadırlar (Sarıkaya vd., 2003).

Son on yılda metal malzemelere, [Au (Brown, 1997), Pt (Şeker vd., 2009); Pd (Sarıkaya vd., 2003), Ti (Sano vd., 2005)], metal oksit malzemelere [Cu₂O (Choe vd.,2007), SiO₂ (Şeker vd., 2009), ZnO₂ (Choe vd.,2007)], yarı iletken malzemelere [GaAs, GaN (Whaley vd., 2000)] ve mineral malzemelere [hidroksiapatit (Gungormus vd., 2008), ve mika (Donatan vd., 2009)] karşı seçilmiş pek çok GEPI rapor edilmiştir. Birinci basamakta seçimleri yapılan GEPI molekülleri, öncelikle yarı nicel yöntemler olan; floresans mikroskopi yöntemleri ve kültür sayım yöntemleri kullanılarak sınıflandırılmaktadırlar (Sarıkaya vd., 2004; Pender vd., 2006).

Ancak yarı nicel analizler sonucunda yapılan sınıflandırmalar GEPI moleküllerinin teknolojik sorunların çözümünde kullanımı için gereken bağlanma kinetikleri üzerine yeterli bilgiyi sağlamamaktadırlar.

Altına özgül bir GEPI olan GBP (gold binding peptide) kullanılarak yapılan bir çalışmada, GBP taşıyan alkalen fosfat (AP) enziminin boyutu ve şekli kontrol edilebilen altın nanotane-cikleri sentezlenmesinde GBP'nin etkinliği gösterilmiştir (Brown vd., 2000).

Yeni yapılan bir çalışmada da beş tekrarlı GBP molekülü içeren AP proteininin altın yüzeyine kontrollü ve hedeflenmiş bir şekilde tutuklanması sağlanarak, sterik etkileme ile AP enziminin aktivitesinin artırılması sağlanmıştır (Kacar vd., 2009). Park ve diğerleri (2006) tarafından

yapılan bir çalışmada da GBP'in yeşil floresans proteine genetik yöntemlerle eklenmesi ile elde edilen yapının altın yüzeyine olan afinitesi belirlenerek, yine desenlenmiş altın yüzeyi üzerine tutuklanması yapılmıştır. Anorganik yüzeylere enzim ve protein tutuklanmasının yanısıra, GEPI molekülleri kullanılarak nanopartiküllerin çoklu malzeme yüzeylerine tutuklanması da yapılmıştır. Yapılan bu çalışmada da GBP molekülünün altın yüzeyine olan seçiciliği ortaya konmuştur (Tamerler vd., 2006).

TiBP (titanyuma özgül protein) molekülleri kullanılarak yapılan malzemelerde yüzey modifikasyonu sonucunda titanyum yüzeylerinin biyoaktif hale getirilerek, bu yüzeylerde ökaryotik doku hücrelerinin büyümesi ve gelişmeleri sağlanmıştır (Kashiwagi vd., 2009).

Katmanlı yapıların (layer by layer) oluşturulması yeni nesil piller ve optoelektronik cihazların tasarımı ve gerçekleştirilmesi açısından önem taşımaktadır. GEPIler kullanılarak katmanlı yapıların oluşturulması gözlenmiş ve bu işlemlerin kontrollü olarak yapılması sağlanmıştır (Sano vd., 2006).

Bu uygulamalarda kullanılan GEPI'lerin moleküler karakterizasyonu için nitel ve nicel analizler gerçekleştirilerek bağlanma kinetiklerinin ortaya konması gerekmektedir (Şeker vd., 2009). Nitel olarak bağlanma kinetiklerini ortaya konmuş olması bu moleküllerinin kontrollü olarak kullanılabilmesini kolaylaştırmakta ve molekül üzerinde istenilen değişikliklerin yapılmasına olanak sağlamaktadır. Ancak GEPI moleküllerinin, moleküler bağlanma karakterizasyonunda bilinen protein-protein etkileşim yöntemlerinin Doğrudan kullanımı söz konusu olamamaktadır. Hali hazırda var olan yüzey plazmon rezonans spektrometresi, kuvar kristal mikroterazi gibi sistemlerin kullanımında, farklı yüzeylerin kullanımını ile ilgili kısıtlamalar ortaya çıkmaktadır. Özellikle yüzey plazmon rezonans spektrometresinin kullanımında sadece altın yüzeyinin kullanılabilmesi, bu yöntemde farklı malzemelere karşı seçilen peptidlerin karakterizasyonu açısından sorunlar yaşanmasına neden olmaktadır (Şeker vd., 2007; 2009).

Bu çalışma kapsamında, grubumuzda geliştirilen matematiksel bir model kullanılarak yüzey plazmon rezonans spektrometresinin, altından farklı yüzeylerin de kullanılarak analiz yapılması sağlanmıştır. Bu sayede altına, platine ve silika yüzeylerine özgül peptidlerin bağlanma katsayıları saptanmıştır. Saptanan bu katsayılar aracılığı ile de bu peptidlerin seçildikleri yüzeyler üzerindeki yüzey kaplama oranları hesaplanmış ve bu durum aynı peptidlerin üç tekrarlı konformasyonları içinde denenerek GEPI lerin yüzey kaplama durumları üzerinde peptidlerin çoklu tekrarlarının etkisi incelenmiştir.

Materyal ve yöntem

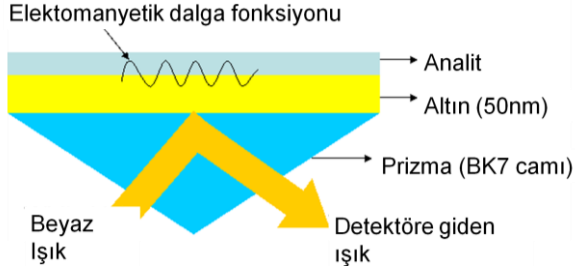
Peptid çözeltileri ve tampon çözeltiler

Bu çalışma kapsamında üç farklı malzemeye özgül peptid ve bu üç farklı peptidin üçer tekrarlı konformasyonları kullanılmıştır. Altına bağlanan özgül peptid (GBP-MHGKQATSGTIQS), platine özgül bağlanan peptidler (PTSTGQA ve QSVTSTK), silikaya özgül bağlanan peptidler Fmoc katı hal peptid sentez methodu ile sentezlenmiştir (United Biochemical Research, U.S.A.). Sentezlenen peptidler daha sonra C-18 ters faz kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Sentezlenen peptidleri -N ve -C uçlarında herhangi bir bloklama yapılmamıştır.

Farklı GEPI leri içeren peptid çözeltileri, PtBP1, PtBP2, QBP1, and QBP2, SPR ölçümleri için (55 mM KH₂PO₄, 45 mM Na₂CO₃ and 200 mM NaCl) PC tampon çözeltisinde; GBP1 peptid çözeltisi ise farklı bir fosfat tamponunda (1:3 mixture of 10 mM KH₂PO₄, 10 mM K₂HPO₄, and 100 mM KCl) hazırlanmıştır. Tüm çözeltilerin pH değerleri 7.4'e ayarlanmıştır. Kullanılan peptidlerden hiç biri zwitterion formunda hazırlanmamıştır.

SPR (surface plazmon rezonans) deneyleri

SPR dört kanallı bir sistem kullanılarak yapılmıştır. Kullanılan sistem Çek Cumhuriyeti Bilimler Akademisi, Fotonik ve Elektronik Enstitüsü tarafından üretilmiştir. Kullanılan alet 0.0001 birimlik refraktif indeks değişikliklerini saptayabilmektedir. SPR deneylerinde kullanılan sensör yüzeyleri sputter kaplayıcı kullanılarak altın, silika ve platin kaplanmışlardır.



Şekil 1. Yüze plazmon rezonans tayf ölçüm sisteminin şematik gösterimi

Peptidlerin yüzey kaplama kesri

hesaplamalarının yapılması

Adsorpsiyon olaylarının modellenmesi amacıyla kullanılan en yaygın eşitlik Langmuir adsorpsiyon modelidir. Langmuir adsorpsiyon modeli aşağıdaki şekilde ifade edilmektedir (Karpovich vd., 1994):

$$\theta(t) = \frac{C}{C + (k_d/k_a)} [1 - \exp(-(k_a C + k_d)t)] \quad (1)$$

C , peptid konsantrasyonu; θ , peptidin yüzey kaplanma kesri, k_a adsorpsiyon katsayısı ve k_d de peptidin desorpsiyon katsayısı olarak desorpsiyon dengesinin kurulduğu andaki denge adsorpsiyon katsayısı K_{eq} olarak adlandırılmaktadır ve bu değer aşağıdaki şekilde hesaplanmaktadır.

$$K_{eq} = (k_a/k_d) \quad (2)$$

Langmuir adsorpsiyon modeli kullanılarak her bir peptidin ilgili anorganik yüzeye olan afinite katsayıları hesaplanmıştır. Buradan yola çıkılarak her bir peptid için yüzey kaplama fraksiyonları hesaplanmıştır.

Deneysel çalışma sonuçları

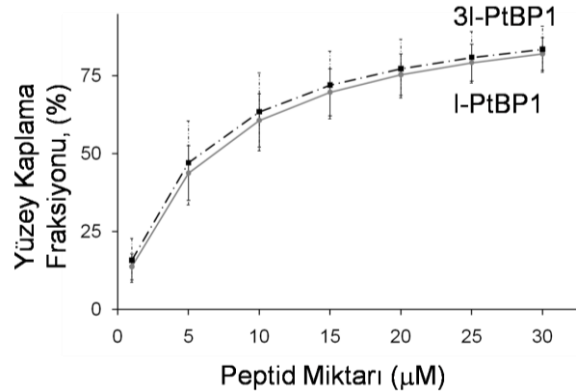
Platine özgül bağlanan peptidler

Platine özgül olarak bağlanan PtBP1 ve PtBP2 peptidleri faj gösterim yöntemi kullanılarak seçilmişlerdir. Seçilen bu peptitler tek tekrarlı ve üç tekrarlı olarak iki ayrı formda sentezlenmişlerdir (1-PtBP1, PTSTGQA ve 31-PtBP1).

Her iki peptit molekülünün de platin yüzeyine karşı afiniteleri olmakla beraber, tekrarlı yapının bu afiniteyi artırması beklenebilir.

Bu peptidlerin Pt yüzeyine karşı sahip oldukları bağlanma katsayıları yüzey plazmon rezonans spektroskopisi (SPR) kullanılarak saptanmıştır. Ancak SPR ın kullanımında altın yüzeyinden farklı olarak platin ya da silika kullanılması mümkün olmamaktadır. Bu durum silika ve platinin yüzey plazmon-larının olmamasından kaynaklanmaktadır (Kovalenko vd., 2001). Bu amaçla önceki çalışmamızda ortaya koyduğumuz yöntemle SPR yüzeyleri hazırlanarak bu çalışmada da kullanılmıştır.

Yapılan SPR deneyleri sonrasında elde edilen bağlanma katsayıları önceki çalışmamızda 1-PtBP1 için 0.16×10^6 olarak ve 31-PtBP1 için de 0.19×10^6 olarak saptanmıştır (Şeker vd., 2009). Bu çalışmada da bu verilerden yola çıkılarak peptidlerin yüzey kaplama yüzdeleri hesaplanmıştır. Platine özgül peptidlere ait yüzey kaplama oranları Şekil 2 de verilmektedir.

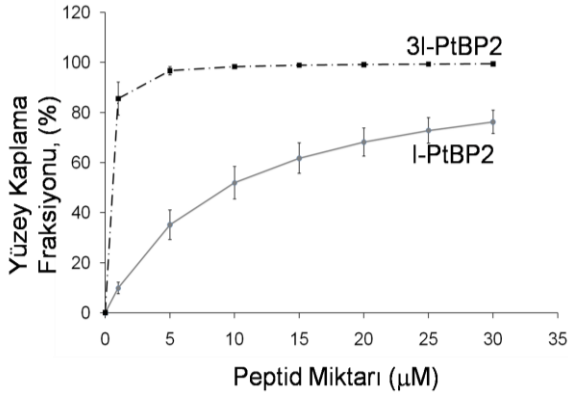


Şekil 2. PtBP1 peptidinin tek tekrarlı ve üç tekrarlı formları için platin yüzeyinin kaplama fraksiyonlarının karşılaştırılması

Şekil 1'de görüldüğü üzere PtBP1 peptidin üç tekrarlı hale getirilmiş olması, bu peptidin yüzey kaplama fraksiyonunu artırmamış sadece çok az miktarda bir farklılık yaratmıştır. Bunun nedeni ise PtBP1 molekülünün yüzey olan afinitesinin üç tekrarlı hale getirildiğinde artış göstermemesidir.

PtBP2 ile yapılan çalışmalarda ise PtBP1 de olduğu gibi tek ve üç tekrarlı peptid formları kullanılmıştır. 1-PtBP2 ve 31-PtBP2 için önceki çalışmamızda afinite katsayıları $0.16 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ ve $6.73 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. 1-PtBP2 ve

3I-PtBP2'nin Pt yüzeyine adsorpsiyonlarında yüzey kaplama kesirleri Şekil 3'te verilmektedir.



Şekil 3. PtBP2 peptidinin tek tekrarlı ve üç tekrarlı formları için platin yüzeyini kaplama fraksiyonlarının karşılaştırılması

Buna göre, PtBP2 peptidinin, PtBP1 den farklı olarak üçlü tekrarlı formu daha yüksek bir bağlanma göstermektedir. Bunun nedeni olarak PtBP1 peptidinin hem tek tekrarlı formu hem de üç tekrarlı formunun aynı afinitiyeye sahip olması, ancak PtBP2 de peptidin yüzey üzerindeki konformasyonunun tekrar sayısı arttıkça daha stabil hale gelmesi söylenebilir.

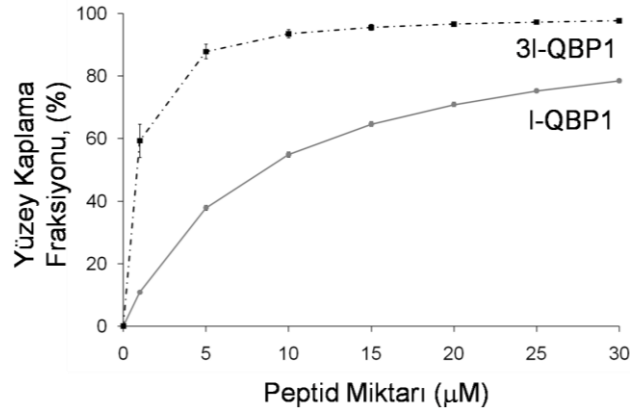
Silikaya özgül bağlanan peptidler

Silikaya özgül olarak bağlandığı tespit edilmiş olan peptidler QBP1 ve QBP2 faj gösterim yöntemi ile seçilmişlerdir. Bu peptidlerin bağlanma katsayıları daha önceki bir çalışmada saptanmıştır (Şeker vd., 2009). Burada ise bu peptidlerin Langmuir adsorpsiyon davranışlarına göre yüzey kaplama oranları ortaya konmaktadır. QBP1 ve QBP2 peptidlerinde de hem tek tekrarlı hem de üçlü tekrarlı peptidlerin silika yüzeyine bağlanma davranışları incelenmiştir.

I-QBP1 (RLNPPSQMDPPF) ve 3I-QBP1 (RLNPPSQMDPPFRLNPPSQMDPPFRLNPPSQMDPPF) peptidlerinin yüzey kaplama fraksiyonları hesaplanarak Şekil 4'te gösterilmiştir.

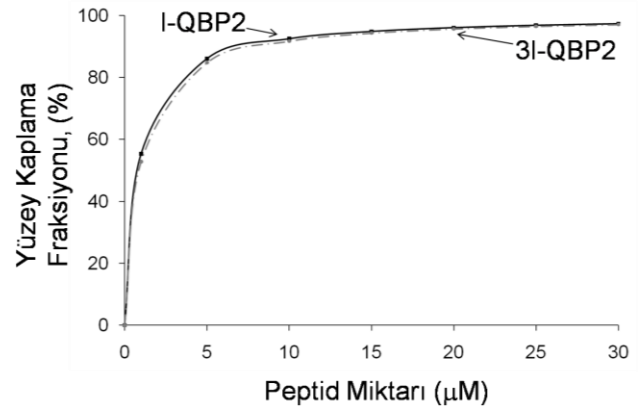
I-QBP1 ve 3I-QBP1 peptidlerinin silika yüzeyinde meydana gelen kendiliğinden örgütlenmiş yapıların silika yüzeylerini kaplama oranları yukarıda karşılaştırılmıştır. Buna göre QBP1 pep-

tidinin üç tekrarlı olan formunun silika yüzeyine daha fazla afinite gösterdiği ve silika yüzeyinde daha fazla bir bölgeyi kapladığı görülmektedir. Denge durumunda silika yüzeyinin peptidler tarafından kaplanma oranları arasındaki farkın azaldığı gözlenmektedir. QBP1 peptidinin silika yüzeyine olan afinitesi, peptidin tekrarlı yapılarına bağlı olarak artış göstermektedir.



Şekil 4. QBP1 peptidinin tek tekrarlı ve üç tekrarlı formları için silika yüzeyini kaplama fraksiyonlarının karşılaştırılması

QBP2 de silikaya bağlanan diğer bir peptid olarak incelenmiştir. QBP2 nin SPR ile silika yüzeyine olan afinitesinin belirlenme çalışmaları sonucunda elde edilen denge durumu yüzey kaplama oranları Şekil 5'te verilmiştir.



Şekil 5. QBP2 peptidinin tek tekrarlı ve üç tekrarlı formları için silika yüzeyini kaplama fraksiyonlarının karşılaştırılması

QBP2 (QTWPPPLWFSTS) de, QBP1 den farklı olarak, peptidin tekrarlı formu ile tekrarsız for-

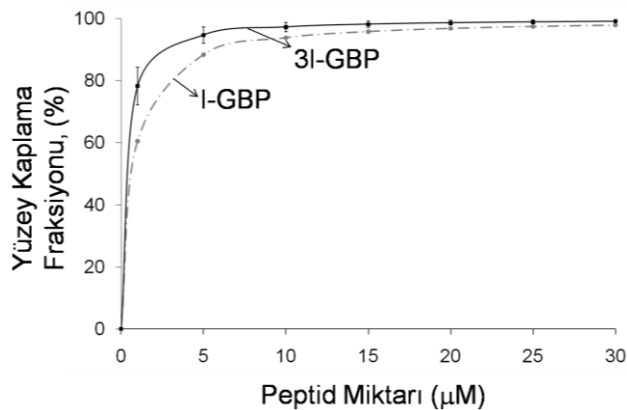
mu arasında yüzey kaplama yüzdesi bakımından hiç bir farklılığın olmadığı görülmektedir. Buradan yola çıkarak QBP2 peptidinin sahip olduğu aminoasit diziliminin silikaya olan bağlanmasının peptidin sahip olduğu yan zincirlerden bağımsız olduğu görülmektedir. Hem QBP2’de hem de QBP1 yer alan prolin aminoasitlerinin etkisi, yapılan diğer çalışmalar göz önüne alındığında (Oren vd., 2007), bu aminoasitlerin peptidin güçlü bağlanmasından sorumlu olduğu düşünülse bile bu deneyde elde edilen bilgiler ışığında sadece prolin gruplarının varlığı değil aynı zamanda konformasyona etkilerinden dolayı pozisyonlarının da önemli olduğu söylenebilir.

Altına özgül bağlanan peptid

Altına özgül olarak bağlanan peptid olarak ele alınan GBP (MHGKQATSGTIQS), önceki bir çalışmada seçilerek farklı uygulamalarda kullanılmıştır. Bu kapsamda, GBP nanotanecek sentezi (Brown vd., 2000), biosensor yüzeyi hazırlanması (Soh vd., 2003, Park vd., 2009) nanotanecek immobili-zasyonu çalışmalarında kullanılmıştır (Tamerler vd, 2006).

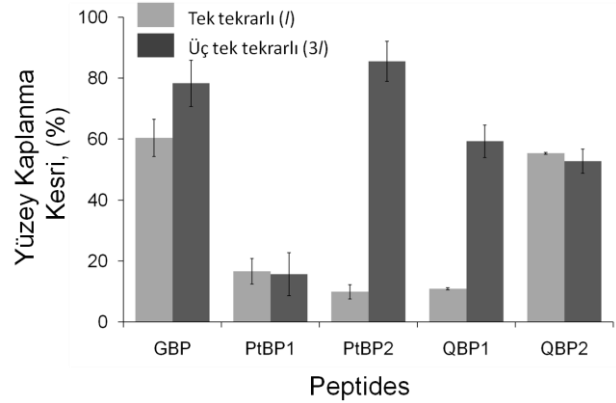
GBP, peptidinin sahip olduğu yüzey kaplama oranı, bu peptidin farklı formları için hesaplanmıştır.

Şekil 6’da bu peptid için gerçekleştirilen SPR deneylerinden yola çıkılarak hazırlanan altın yüzeyi kaplama yüzdeleri ortaya konmuştur.



Şekil 6. GBP peptidinin tek tekrarlı ve üç tekrarlı formları için silika yüzeyini kaplama fraksiyonlarının karşılaştırılması

GBP peptidinin aminoasit dizisi tekrar sayısı arttıkça, düşük konsantrasyonlarda altın yüzeyini kaplama oranlarında farklılık görülmektedir. Ancak bu farklılığın yüksek konsantrasyonlarda azaldığı görülmüştür.



Şekil 7. Anorganiklere özgül peptidlerin yüzey kaplama kesirlerinin tekli ve çoklu peptid formları için karşılaştırılması

Şekil 7’de en düşük peptid konsantrasyonu için peptidlerin sahip olduğu yüzey kaplama kesirleri karşılaştırılmaktadır. QBP1 ve PtBP2 peptitlerinde yüzey kaplama kesrinin aminoasit dizisinin tekrarlanmasının bir fonksiyonu olarak değiştiği gözlenmektedir. Aynı etki diğer peptidlerde aynı oranda gözlenememiştir.

Sonuçlar ve tartışma

Bu çalışma kapsamında Pt-, kuvarz ve altına özgül olarak bağlanan peptidlerin modifiye bir yüzey plazmon rezonans spektrometresi kullanılarak yüzey kaplama fraksiyonları hesaplanmıştır. Bu çalışma kapsamında her bir peptidin hem faj gösterim çalışmalarında seçildikleri orjinal dizilerinin hem de bu dizilerin üçlü tekrarlarından oluşan peptitlerin kinetik ve termodinamik analizleri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlardan yola çıkılarak tekrarlı dizilerden oluşan her peptidin sahip olduğu bağlanma karakteristikleri aminoasit dizilimine göre değişmektedir. Öte yandan bu çalışmadan elde edilen veriler ışığında anorganiklere özgül bağlanan peptidlerin katı yüzeylere olan bağlanma afinitelerinin, peptidlerin sahip olduğu dizilimlerin modifiye edilmesi ile kontrol edilebileceği ortaya konmaktadır.

Anorganiklere özgül peptitlerin katı yüzeyler üzerindeki yüzey kaplama oranlarının peptidin sahip olduğu konformasyonun yanısıra yüzeyde adsorpsiyon sonrasında sahip olduğu difüzyon özellikleri de yüzeyde peptidin kapladığı alanın oranını belirlemektedir (So vd., 2009).

Bu çalışmada da anorganiklere özgül olarak bağlanan peptitlerin, bağlanmasında birincil ve ikincil yapıların kontrol edilebilmesinin, peptitlerin yüzey afinitesi bakımından önemli olduğu gösterilmiştir. Peptitlerin bağlanma mekanizmaları ile ilgili daha detaylı bilgiye sahip olmak için katı yüzeylere adsorpsiyonlarının termodinamik ve yapısal değişimlerinin, yüzey üzerinde izlenmesi gerekmektedir. Buna bağlı olarak anorganiklere özgül peptitlerin oluşturdukları supramoleküler yapılar biyoteknolojik uygulamalar açısından önem taşımaktadırlar. Biyolojik moleküller tarafından oluşturulan bu yapılar kullanılarak, kimyasal sentez yöntemleri ile elde edilenlerden daha kontrollü mikro ve nano sistemlerin oluşturulması mümkün olacaktır.

Kaynaklar

- Brown, S., (1997). Metal recognition by repeating polypeptides, *Nature Biotechnology*, **15**, 3, 269-272.
- Brown, S., Sarikaya, M. ve Johnson, E., (2000). A genetic analysis of crystal growth, *Journal of Molecular Biology*, **299**, 725-735.
- So., C.R., Tamerler, C. ve Sarikaya, M., (2009). Adsorption, diffusion and self-assembly of an engineered gold binding peptide on Au(111) by atomic force microscopy, *Angewandte Chemie International Edition*, **48**, 5174-5177.
- Choe, W.S., Sastry, M.S.R., Thai, C.K., Dai, H., Schwartz, D.T. ve Baneyx, F., (2007). Conformational control of inorganic adhesion in a designer protein engineered for cuprous oxide binding, *Langmuir*, **23**, 11347-11350.
- Donatan, S., Yazici, H., Bermek, H., Sarikaya, M., Tamerler, C. ve Urgen, M., (2009). Physical elution in phage display selection of inorganic-binding peptides, *Materials Science & Engineering C-Biomimetic and Supramolecular Systems*, **29**, 14-19.
- Oren, E.E., Tamerler, C., Sahin, D., Hnilova, M., Seker, U.O.S., Sarikaya, M. ve Samudrala, R., (2007). A novel knowledge-based approach to design inorganic binding peptides, *Bioinformatics*, **23**, 2816-2822.
- Gungormus, M., Fong, H., Kim, W., Evans, J. S., Tamerler, C. ve Sarikaya, M., (2008). Regulation of in vitro calcium phosphate mineralization by combinatorially selected hydroxyapatite-binding peptides, *Biomacromolecules*, **9**, 3, 966-973.
- Karpovich, D.S. ve Blanchard, G.J., (1994). Direct measurement of the adsorption kinetics of alkanethiolate self-assembled monolayers on a microcrystalline gold surface, *Langmuir*, **10**, 9, 3315-3322.
- Kashiwagi, K., Tsuji, T. ve Shiba, K., (2009). Directional BMP-2 for functionalization of titanium surfaces, *Biomaterials*, **30**, 1166-1175.
- Kovalenko, S.A. ve Lisitsa, M.P., (2001). *Semiconductor Physics, Quantum Electronics & Optoelectronics*, **4**, 352-357.
- Love, J.C., Estroff, L.A., Kriebel, J.K., Nuzzo, R.G. ve Whitesides, G.M., (2005). Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology, *Chemical Reviews*, **105**, 4, 1103-1169.
- Mrksich, M., Sigal, G.B. ve Whitesides, G.M., (1995). Surface-plasmon resonance permits in-situ measurement of protein adsorption on self-assembled monolayers of alkanethiolates on gold, *Langmuir*, **11**, 4383-4385.
- Park, T.J., Lee, S.Y., Lee, S.J., Park, J.P., Yang, K.S., Lee, K.B., Ko, S., Kim, T., Kim, S.K., Shin, Y.B., Chung, B.H., Ku, S.J., Kim, (2006). Protein nanopatterns and biosensors using gold binding polypeptide as a fusion partner, *Analytical Chemistry*, **78**, 7197-7205.
- Pender, M.J., Sowards, L.A., Hartgerink, J.D., Stone, M.O. ve Naik, R.R., (2006). Peptide-mediated formation of single-wall carbon nanotube composites, *Nano Letters*, **6**, 1, 103, 40-44.
- Sano, K.I., Sasaki, H. ve Shiba, K., (2006). Utilization of the Pleiotropy of a peptidic aptamer to fabricate heterogeneous nanodot-containing multilayer nano structures, *Journal of the American Chemical Society*, **128**, 1717-1722.
- Sano, K.I., Sasaki, H. ve Shiba, K., (2005). Specificity and biomineralization activities of Ti-binding peptide-1 (TBP-1), *Langmuir*, **21**, 3090-3095.
- Sarikaya, M., (1999). Biomimetics: Materials fabrication through biology, *Proceedings, The National Academy of Sciences of the United States Of America*, **96**, 75, 14183-14185.
- Sarikaya, M., Tamerler, C., Jen, A.K.Y., Schulten, K. ve Baneyx, F., (2003). Molecular biomimetics: nanotechnology through biology, *Nature Materials*, **2**, 9, 577-585.
- Sarikaya, M., Tamerler, C., Schwartz, D.T. ve Baneyx, F.O., (2004). Materials assembly and

- formation using engineered polypeptides, *Annual Review of Materials Research*, **34**, 373-408.
- Seker, U.O.S., Wilson, B., Dincer, S, Evans, J.S., Tamerler, C. ve Sarikaya, M., (2007). Adsorption behaviour of genetically engineered platinum binding peptides, *Langmuir*, **23**, 7895-7900.
- Seker, U.O.S., Wilson B., Sahin D., Tamerler, C. ve Sarikaya, M., (2009). Quantitative binding analysis of genetically engineered peptides, *Biomacromolecules*, **10**, 250-257.
- Smith, G.P., (1985). Filamentous fusion phage - novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface, *Science*, **228**, 1315-1317.
- Soh, N., Tokuda, T., Watanabe, T., Mishima, K., Imato, T., Masadome, T., Asano, Y., Okutani, S., Niwa, O. ve Brown, S., (2003). A surface plasmon resonance immunosensor for detecting a dioxin precursor using a gold binding polypeptide, *Talanta*, **60**, 4, 733-745.
- Kacar, T., Zin, M.T., So, C., Wilson, B., Ma, H., Gul-Karaguler, N., Jen, A.K-Y., Sarikaya, M. ve Tamerler, C., (2009). Directed self-immobilization of alkaline phosphatase on micro-patterned substrates via genetically-fused metal-binding peptide, *Biotechnology and Bioengineering*, **103**, 696-705.
- Park, T.J., Zheng, S., Kang, Y. J. ve Lee S.Y., (2009). Development of a whole-cell biosensor by cell surface display of a gold-binding polypeptide on the gold surface, *FEMS Microbiology Letters*, **293**, 141-147.
- Tamerler, C., Duman, M., Oren, E.E., Gungormus, M., Xiong, X., Kacar, T., Parviz, B.A. ve Sarikaya, M., (2006). Materials specificity and directed assembly of a gold-binding peptide, *Small*, **2**, 11, 1372-1378.
- Tamerler, C. ve Sarikaya, M., (2007). Molecular biomimetics: Utilizing nature's molecular ways in practical engineering, *Acta Biomaterialia*, **3**, 289-299.
- Whaley, S.R., English, D.S., Hu, E.L., Barbara, P.F. ve Belcher, A.M., (2000). Selection of peptides with semiconductor binding specificity for directed nanocrystal assembly, *Nature*, **405**, 665-668.
- Whitesides, G.M., Mathias, J.P. ve Seto, C.T., (1999). Molecular self-assembly and nanochemistry - A chemical strategy for the synthesis of nanostructures, *Science*, **254**, 5036, 1312-1319.
- Wittrup, K.D., (2001). Protein engineering by cell-surface display, *Current Opinion in Biotechnology*, **12**, 395-399.