

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**T.C. YÖNEKLENERİM KURULU
DOKÜMANTASYON BİREKİ**

DOKTORA TEZİ

AKCİĞER YÜZEY PROTEİNİ SP-C BENZERİ
SENTETİK PEPTOİDLERİN SENTEZİ

Elif (SARI) LOĞOĞLU

104432

KİMYA ANABİLİM DALI

ANKARA

2001

Her Hakkı Saklıdır

Prof. Dr. Atilla ÖKTEMER danışmanlığında Elif LOĞOĞLU tarafından hazırlanan bu çalışma 15/05/2001 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya (Biyokimya) Anabilim Dalı'nda Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

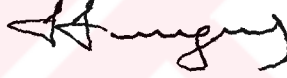
Başkan: Prof. Dr. Atilla ÖKTEMER



Prof. Dr. Nesrin HASIRCI



Prof. Dr. Sibel SUNGUR



Doç. Dr. Selma ATEŞ



Doç. Dr. Murat ELÇİN



Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Esmâ KILIÇ
Enstitü Müdürü

ÖZET
Doktora Tezi

AKCİĞER YÜZEY PROTEİNİ SP-C BENZERİ
SENTETİK PEPTOİDLERİN SENTEZİ
Elif (SARI) LOĞOĞLU

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Atilla ÖKTEMER

Biyomedikal uygulamalarda ister doğal kaynaklı olsun, ister sentetik olsun ciğer yüzey proteinlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu proteinler polime yapısındadır ve uzunluğu ve amino asit sırası kontrollüdür. Akciğere ai yüzey aktif maddeler lipit bir karışım olup nefes alıp verme işleminde ye alırlar. Yüzey aktif olma özelliklerinden dolayı hava gerilimini düşürmel suretiyle hava keseciklerinin genişlemesi için gerekli olan basıncı azaltır Yirmi dokuz haftadan daha önce doğan bebeklerde bu proteinleri salgılanmsı henüz akciğer yüzeyinde başlamamıştır ve yüzey akti proteinlerin yerleştirme tedavisi yapılmadığı takdirde bebek ölecektir. Bu çalışmada, akciğerde bulunan yüzey aktif proteini-C (SP-C)'nin taklid biyomedikal uygulamalar için geliştirilmiştir. Bu nedenle amino asitlerin analoglarının yan zincirleri koruma grupları ile bloke edilmiştir. Bloke olmuş amino asit analogları alt birim yöntemiyle SP-C'nin sentezinde kullanılmıştır. Alt-birim sentez yöntemi Zuckermann ve arkadaşlar tarafından 1992 de geliştirilmiştir. Çalışmada son basamak olarak sentezlenen SP-C'nin yapısı HPLC, NMR, Kütle spektropileri ile aydınlatılmaya çalışılmıştır.

2001, 60 sayfa

ANAHTAR KELİMELER: Amino asitler, peptit, peptoid, yüzey akti protein-C

ABSTRACT
Ph.D. Thesis

**SYNTHESIS OF SYNTHETIC PEPTOIDS SIMILAR TO LUNG
SURFACE PROTEIN SP-C**

Elif (SARI) LOĞOĞLU

**Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry**

Supervisor: Prof. Dr Atilla ÖKTEMER

In biomedical applications, we need lung surfactant proteins whether it is natural or synthetic. These synthetic proteins are in polymer structure and its length and amino acid sequence are controlled. Pulmonary surfactant is a mixture of proteins and lipids that enables normal breathing. By virtue of its unique surface active properties, lung surfactant markedly decreases the surface tension at the air-liquid interface of the myriad tiny air-sacs. Preterm infants who have gestated for less than 29 weeks (7 ¼ months) typically have not yet begun to secrete lung surfactant into alveolar space and will suffocate after delivery without surfactant replacement therapy. In this study, biomimetic lung surfactant C developed for biomedical application. For this reason, amino acid side analogous side chains protected with protecting groups. Finally, this amino acid analogous used for SP-C synthesis in submonomer protocol. The sub-monomer synthesis protocol developed by Zuckermann et al at 1992. At the end of study; The latest step is identification SP-C structure with HPLC, NMR, Mass spectroscopy.

2001, 60 pages

Keywords: Amino acids, peptide, peptoids, surfactant protein -C

TEŞEKKÜR

Tez alıőmam esnasında benden bilimsel ve manevi desteğini esirgemeyen sayın hocam (Kimya Bölüm Başkanı ve Dekan Yardımcısı) Prof. Dr. Atilla Öktemer'e sonsuz teşekkür ederim. Her zaman olduğu gibi tez çalıőmalarımnda da beni destekleyen eşime teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
SİMGELER DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ	1
1.1. <u>POLİPEPTOİDLER HAKKINDA GENEL BİLGİ</u>	3
1.2. <u>YÜZEY AKTİF PROTEİNLERİ (SP)</u>	4
1.3. <u>TEZİN AMACI</u>	6
2. KURAMSAL TEMELLER	7
2.1. <u>POLİ-N-SÜBSTİTÜE GLİSİN'İN SENTEZİ</u>	7
2.2. <u>PEPTİT SENTEZLEYİCİSİ (433A) İLE POLİPEPTOİD SENTEZİ</u>	9
2.3. <u>POLİPEPTOİDLER VE POLİPEPTİTLER ARASINDAKİ FARKLILIKLAR</u> ..	10
2.4. <u>POLİPEPTOİD SENTEZİ İÇİN YAN ZİNCİR KORUMANIN GEREKLİLİĞİ</u> 11	
2.5. <u>YAN ZİNCİR BLOKE YÖNTEMLERİ</u>	11
3. MATERYAL VE METOTLAR	23
3.1. <u>DENEYSEL PLANLAR</u>	23
3.2. <u>KORUMA YÖNTEMLERİ</u>	23
3.2.1. <u>-OH Gruplarını Koruma Yöntemi</u>	23
3.2.2. <u>-NH₂ Gruplarının Korunma Yöntemi</u>	24
3.2.3. <u>-COOH Grubunun Korunma Yöntemi</u>	24
3.2.4. <u>-SH Grubunun Korunma Yöntemi</u>	25
3.2.5. <u>-CONH₂ Gruplarının Korunması Yöntemi</u>	26
3.2.6. <u>İndol Halka grubunun Korunması</u>	27

3.2.7.	<u>-C(NH)NH₂ Gruplarının Korunması</u>	28
3.3.	<u>BAZI AMİNOASİT ANALOGLARI İÇİN HEGZAMER PEPTİT ZİNCİRLERİNİN SENTEZİ</u>	28
3.3.1.	<u>Sistein Analogu İçin Hegzamer</u>	28
3.3.2.	<u>Metionin Analogu Hegzamer Sentezi</u>	29
3.3.3.	<u>Serin Analogu İçin Hegzamer Zinciri</u>	29
3.3.4.	<u>Glutamik Asit Analogu İçin Hegzamer</u>	29
3.3.5.	<u>Lizin Analogu İçin Hegzamer</u>	29
3.3.6.	<u>Lözin Analogu İçin Hegzamer</u>	29
3.3.7.	<u>İzolözin Analogu İçin Hegzamer</u>	30
3.3.8.	<u>Triptofan Analogu İçin Hegzamer</u>	30
3.4.	<u>SP-C PEPTOID'İN SENTEZİ</u>	30
3.4.1.	<u>Bütün Sp-C'nin Sentezi</u>	30
4.	<u>ARAŞTIRMA BULGULARI</u>	33
5.	<u>SONUÇLAR VE TARTIŞMALAR</u>	34
5.1.	<u>DENEYSEL SONUÇLAR</u>	34
5.2.	<u>SP-C'NİN SENTETİK SONUÇLARININ TARTIŞILMASI</u>	34
5.3.	<u>YAN ZİNCİR KORUMANIN SONUÇLARININ TARTIŞILMASI</u>	36
5.4.	<u>POLİPEPTOID HEGZAMER ZİNCİRLERİNİN SONUÇLARININ TARTIŞILMASI</u>	36
	<u>KAYNAKLAR</u>	37
	<u>EKLER</u>	43

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. R1, R2, R3 yan zincirleri ile birlikte bir peptoid trimeri	3
Şekil 1.2. N-Süstitüe olmuş oligomer veya polipeptoid	4
Şekil 1.3. Yüzey aktif protein-B (SP-B)	5
Şekil 2.1. Poliipeptoidin sentetik protokolünün şematik gösterimi	8
Şekil 2.2. Bir 433A peptit sentez cihazının görüntüsü	9
Şekil 2.3. N-Süstitüe glisin pentamer peptoidin yapısı görülmektedir	10
Şekil 2.4. Merrifield'in ilk reçenesi	12
Şekil 2.5. Tirozinin OH grubunun korunma reaksiyonu	13
Şekil 2.6. Tirozinin hidroksil grubunun t-bütül ile korunması	14
Şekil 2.7. -COOH varlığında -NH ₂ 'nin korunması	16
Şekil 2.8. Aktif Asparagin dehidrojenasyon mekanizması	19
Şekil 2.9. Arginin türevlerinde δ -laktam şeklinde eşleme	20
Şekil 2.10. Boc-Trp(For)-OH'ın sentezi	22
Şekil 2.11. Fmoc-Trp(Boc)-OH'ın sentezi	22
Şekil 3.1. OH fonksiyonlu grubun triizopropilsililklorür ile korunması	23
Şekil 3.2. S-Trt-etilaminin sentezi	25
Şekil 3.3. Karbobenzoksi-glisinaminin sentezi	26
Şekil 3.4. Nindol-Formilriptaminin sentezi	27
Şekil 3.5. N ω , ω' -dikarbobenzoksiagmatinin sentezi	28
Şekil 5.1. SP-C'nin yapısı	35

SİMGELER DİZİNİ

A	Alanin
Asn	Asparagin
Boc	Bütüloksikarbonil
Bzl	Benzilamin
C	Sistein
D	Aspartik asit
DIC	Diizopropilkarbodiimid
DMF	Dimetilformamit
E	Glutamik asit
F	Fenilalanin
Fmoc	9-fluorimetoksikarbonil
G	Glisin
Gln	Glutamin
H	Histidin
HPLC	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
I	İzolözin
K	Lizin
L	Lözin
M	Metionin
N	Asparajin
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
NRDS	Yeni doğan solunum bozukluğu sendromu
NSG	N-Süstitie Glisin
P	Prolin
Q	Glutamin
RDS	Solunum bozukluğu sendromu
S	Serin
SP-A	Yüzey aktif Protein A
SP-B	Yüzey aktif Protein B
SP-C	Yüzey aktif Protein C
SP-D	Yüzey aktif Protein D
SPPS	Katı faz yüzeyinde polimer sentezi
T	Treonin
TFA	Trifloroasetik asit
V	Valin
W	Triptofan
Y	Tirozin

1. GİRİŞ

Biyomedikal uygulamalarda kullanılmak üzere amino asit sırası ve molekül ağırlığı belli olan doğada bulunmayan polimerlerin sentezlenmesine ihtiyaç vardır. Bu maddelerde aranan başlıca özellikler; doğal proteinlerin yapılarını ve etkinliklerini iyi bir şekilde taklit edebilmesi, immunojenik olmaması, canlı ortamda kararlı halde bulunabilir olmasıdır. Bu tür polimerlere taklit etme özelliğinden ötürü, biyomimetik proteinler denmektedir (Biyomimetik yunanca taklit anlamına gelmektedir). Biyotaklit polimerlerin tasarımında, doğal proteinler bu açıdan iyi bir model oluşturmaktadır. İnsan insülininin sentezinde buradan hareketle sentez başarılmıştır (Akaji, 1993).

Bu çalışmada, akciğerde bulunan yüzey aktif özellikli yüzey aktif proteini - C (SP-C)'nin taklitleri, medikal uygulamalarda kullanılmak amacıyla tasarlanmıştır. Bu çalışmanın en heyecanlandırıcı yanı, biyokimya ve polimer kimyasının esaslarının bir araya getirilebilmesine şans tanmasıdır.

Akciğere ait yüzey aktif proteinler, memelilerin akciğerlerinin iç yüzeyini kaplayan lipid ve proteinlerden oluşan bir karışım olup nefes alıp-verme işleminde yer alır. Ciğerde bulunan yüzey aktif proteinler, hava keseciklerindeki hava-sıvı ara yüzeyinin yüzey gerilimi üzerinde önemli etkide bulunurlar. Ara yüzeyin yüzey gerilimini düşürmek suretiyle hava keseciklerinin genişlemesi için gerekli basınç miktarı azalır ve bunun sonucu olarak nefes alma işlemi daha az bir enerjiyle gerçekleşir. (Clements, 1957; Clements, 1958).

Bunun yanı sıra akciğer yüzey aktif proteinleri, hava-sıvı ara yüzeyinde yoğun ve oldukça düzenli bir film tabakası oluşturmaktadırlar. Böylelikle yüzey gerilimi hemen hemen sıfıra inmek suretiyle nefes alma işlemi düzenli olarak gerçekleşmektedir (Clements 1958; Putz, 1994).

Doğal akciğer yüzey aktif proteinler %90-95 yağlar (özellikle fosfolipitler) ve % 5-10 yüzey proteinlerinden (SP) oluşmaktadır (Notter, 1997; Creuwels, 1947). Hem protein hem de fosfolipit kısımlar, akciğer yüzeyinin fiziksel aktivitesinde kritik rol oynamaktadırlar (King, 1972).

Bu karışımın (yağ ve akciğer yüzey proteinleri) faz davranışı son yıllarda pek çok bilim adamı tarafından çalışılmıştır (Nag 1998, Wang 1995, Wang 1996, Lipp 1996, Lipp 1997).

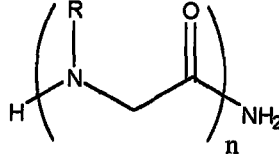
Akciğer yüzey aktif proteinleri ve onların ara yüzey ile etkin olan etkileşimleri yeni yeni anlaşılmaya başlanmıştır. Şimdiye kadar elde edilen bilgilerin ışığında, yüzey aktif protein SP-C'nin özellikleri şöyle sıralanabilir;

- Hava-sıvı ara yüzeyinde fosfolipitin (özellikle fosfatidil kolin ve dipalmitoilfosfatidilkolin) absorpsiyonunu hızlandırır.
- Solunum döngüsünde, alveol yüzeyinde fosfolipitlerin tek tabaka halinde yeniden dizilmesini kolaylaştırır.
- Bu fosfolipit tabakanın faz davranışı, hava keseciğinin (alveol) yüzey gerilimi en düşük olacak şekilde düzenler.

Alveol yüzeylerinde bu proteinlerin eksikliği, önemli sağlık sorunlarına neden olabilmektedir; örneğin endüstrileşmiş ülkelerde, bebek ölümlerinin nedenlerinin en başında “Yenidoğan Solunum Bozukluğu” NRDS (Neonatal Respiratory Distress syndrome) gelmektedir ve artık sendromun, ciğerlerdeki bu yüzey aktif proteinlerin eksikliğinden kaynaklandığı bilinmektedir. Bu proteinlerin yokluğundan dolayı yüzey gerilimi önemli derecede artarak akciğerdeki alveoller hasara uğramakta ve ölümler sonuçlanmaktadır. Genel olarak, 29 haftalıktan (7,25 ay) daha az hamilelik döneminden sonra doğan bebeklerin alveol yüzeylerinde, ciğer yüzey gerilimi proteinleri henüz oluşmamışlardır (Georke 1986). Bu durumda ciğerler yetersiz kalır ve nefes verme işleminde içeriye doğru çökme eğilimi gösterirler. Solunum Bozukluğu Sendromundan (RDS: Respiratory Distress Syndrome) müzdarip hastalara mekanik yolla hava verilemez; çünkü ciğer dokuları bu durumda hasara uğrar. Doğum esnasında yapay ya da hayvansal bazlı bir yüzey aktif yerleştirilme işlemi uygulanmadığı takdirde hasta ölecektir. Günümüzde ciğerin düzgün şekilde çalışmasına en uygun hayvan yüzey aktif proteinler, sığır ve domuz kökenlidir. Tabii, hiç kuşkusuz, hayvan kaynaklı yüzey aktif proteinlerde en başta aranan özellik, vücudun bağışıklık sistemi ile uyumlu olmasıdır.

İnsan yüzey aktif proteinleri SP-B ile SP-C'nin işlevlerini tam olarak yerine getirecek sentetik maddelere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışmada, polipeptoid yapıdan yararlanılarak, SP-C taklidi geliştirilmeye çalışılmıştır. Bu yapay polimer, polipeptitlere benzemekte ise de, yan zincirler α -karbon üzerinden değil, ana zincir üzerindeki azot üzerinden olmaktadır. Bu polipeptit-taklidi yapının avantajı, bunların peptitlere göre yan zincirlerle birlikte düşük maliyette daha kolay sentezlenebilir olmalarıdır. Ayrıca peptit zinciri üzerine ‘amino asit’ yan zincirleri eklenmiş bu N-süstitüe polipeptoidler, proteaza karşı oldukça dayanıklılık göstermektedirler ve canlı ortamda bağışıklık sistemi bu maddelere karşı çok önemli bir tepki göstermezler (Simon, 1992) .

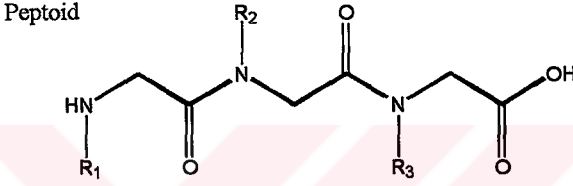
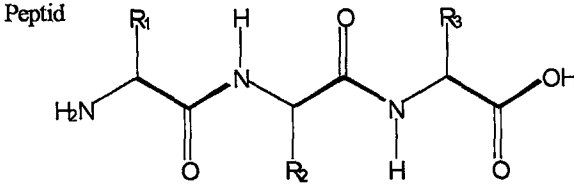
1.1. Polipeptoidler Hakkında Genel Bilgi



Şekil 1.1. N-Süstitüe olmuş oligomer veya polipeptoid (NSG)

Poli-N-süstitüe glisinler (NSG, Şekil 1.1) yani polipeptoidler, bir peptit poliglisin zinciri esasına dayalı olup, doğada bulunmazlar ve özel olarak dizilmiş polimerdir. Polipeptite göre polipeptoidin farkı, yan zincirlerin α -karbon üzerinde değilde amit azotu üzerinde bulunmasıdır (Simon 1992), (Zuckermann, 1992) (Şekil 1.2). Çeşitli yan zincirler içeren bir çok polipeptoidin hazırlanması mümkündür, üstelik bu işlemler kolay ve çok pahalı değildir. Polipeptoidler polipeptitlerle oldukça benzerlikler göstermektedirler; öyle ki bazı peptit hormonlarına karşılık gelen polipeptoid bileşikleride biyolojik reseptörlere karşı aynı etkiyi göstermektedirler. Ayrıca N-Süstitüe grupların bulunması, peptit ana zincirinin proteaz enzimlerine karşı daha dayanıklı olmasını mümkün kılmaktadır (Miller, 1995). Bu da biyotaklit polipeptoidlerin, doğal peptitlere göre canlı ortamda kararlı olacağını göstermektedir.

Otomatik peptit sentezleyici kullanılarak, yüzün üstünde monomere sahip özel sıralı, uzun zincirler % 98'i bulan verimlerle elde edilmişlerdir (Zuckermann 1992). Şimdiye kadar reaksiyon yeteneği % 98'den büyük olan 30'dan fazla monomeren oluşan özel sıralı, uzun zincirlerin sentezi otomatik sentezleyicide gerçekleştirilmiştir (Zuckermann 1992).



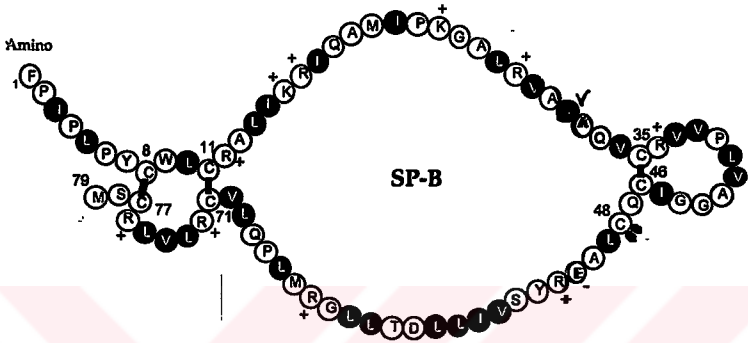
Şekil 1.2. R1, R2, R3 yan zincirli polipeptit ile polipeptoidin karşılaştırılması

1.2. Yüzey aktif Proteinleri (SP)

Yüzey aktif özellikli olan dört farklı ciğer yüzey proteinleri genelde alveol üzerindeki lipitlerle birlikte bulunmaktadırlar. Bunlar iki ana grup altında toplanabilirler. Hidrofilik özellikli SP-A ve SP-D yüzey aktif proteinleri ve hidrofobik özellikli SP-B ve SP-C yüzey aktif proteinleri.

Yüzey aktif Protein B (SP-B): 79 amino asitten oluşmuş küçük, hidrofobik bir proteindir ve çok fazla sistein kalıntısı içerir. Doğal SP-B proteini üç molekül içi ve birde molekül dışı olmak üzere dört disülfit bağı içermektedir. SP-B' nin yapısı Şekil-1.3'den görülmektedir.

Yüzey aktif Protein C (SP-C): İkinci önemli hidrofobik yüzey aktif proteindir. Eğer proteinin aktif yüzey monotabakası uzaklaştırılırsa, geriye kalan 35 hidrofobik kalıntı yalnızca organik çözücülerde, en çok %80 Asetonitril/su karışımı ile kloroformda çözünmektedir.



Şekil 1.3. Yüzey aktif protein-B (SP-B)

Yüzey aktif protein A ve D (SP-A, SP-D): Hidrofilik proteinlerdir. SP-A ve SP-D, solunum yoluyla alınan patojenlere karşı ilk savunma hattı görevi görerek, bağışıklık açısından önemli rol oynarlar. Büyük hacimli, glikozil grupları bağlı ve karmaşık yapıya sahip SP-A, fosfolipidin yeniden dizilmesini düzenlemek ve alveolün II tipindeki hücrelerinin salgıda bulunmalarını engellemek suretiyle yüzey aktif metabolizmasını kontrol ederler (Khour, 1993), (Korfhagen, 1996), (Ikegami, 1997). SP-A ayrıca, aşırı yüzey aktif protein lipidlerinin “tübüler miyelin” adı verilen iki tabakalı mikro yapılar (yağ depolama kanalları) içerisinde birikmesini sağlar (Williams, 1991).

SP-A ve de SP-D'nin her ikisinde yüzey gerilimini düşürmeden sorumlu olmamalarından ötürü dışarıdan ciğer yüzey aktif proteinlerin yerleştirilmesinde onlardan yararlanılmaz (Creuwels, 1997). Araştırmalar, küçük hidrofobik SP-B ve SP-C proteinlerinin alveol yüzeyindeki yüzey gerilimini düşürülme işini üstlendiklerini göstermiştir (Notter 1997). SP-B, SP-A ve Ca^{++} iyonlarıyla etkileşerek tübüler miyelinin oluşmasını mümkün kıldığından çok işlevli bir proteindir.

SP-B ve SP-C'nin herbiri bağımsız olarak (ama sinerjetik yani birbirlerinin etkilerini artırarak) yüzey aktif lipidlerle etkileşerek, nefes alma işlemini kolaylaştırmaktadırlar (Wang 1996). Herbiri ara yüzeye fosfolipitlerin hızlı şekilde adsorpsiyonunu kolaylaştırırlar ve alveollerin genişleme ve büzülmesi esnasında tek tabakalı fosfolipitin hızlı bir şekilde yeniden dizilmesini sağlarlar. Her ikisi ayrıca, tek tabakanın faz davranışında etkilerler ve böylelikle alveollerdeki çökmeyi engellerler (Wang,1996), (Taneva, 1994). Bu açıdan SP-B'nin ve SP-C'nin her ikisi de önemli unsurlar olmasına karşın SP-B fizyolojik olarak en etkin olanıdır. Ancak SP-C'nin yapısı SP-B'nin yapısına göre daha basit olmasından dolayı SP-C ve onun benzerleri türevleri üzerinden gidilmiştir.

1.3. Tezin Amacı

Polipeptoidler sentetik olarak elde edilebilen, kararlı, bağışıklık sistemiyle etkileşmeyen sentetik bir protein sınıfını teşkil etmektedirler (Kirshenbaum, 1998). Aynı zamanda yüzey aktif protein yerleştirme tedavisinin maliyetini de düşürmektedir.

Bu çalışmada yüzey aktif proteinleri arasında en basit yapıda olan SP-C ye benzer peptoid tarzı türevi oluşturulmaya çalışılmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

Bu bölümde Poli-N-sübstitüe-glisin yani polipeptoid ile polipeptit arasındaki farklılıklar ve polipeptoid sentezi için yan zincir korumanın gerekliliği tartışılacaktır. Verilen bilgiler polipeptoid sentezinin geçmiş hakkında kısa bir özet sağlamaktadır. Bu çalışmalar poli-N-sübstitüe glisin ve polipeptoid senteziyle ilgilidir. Ayrıca bu reaksiyonların avantajları ve dezavantajları ortaya konulmaktadır.

2.1. Poli-N-Sübstitüe Glisin'in Sentezi

Polipeptoidler, polipeptitler gibi uygun katfaz sentez yöntemi ile sentezlenebilmektedirler. Bu yöntemde göre ilk amino asit karboksil ucundan polistiren reçineye benzilester bağı ile bağlanmaktadır. Sentez tamamlandıktan sonra bu bağ kopararak peptit serbest hale getirilmektedir. İkinci aminoasitin amino grubu t-butiloksikarbonil (t-Boc) grubu ile korunmaktadır. Daha sonra bu amino asitin karboksil grubu ile polistiren üzerindeki amino asitin amin grubu ile reaksiyon vererek bir peptit bağı oluşturulmaktadır. Diizopropilkarbodiimid ise reaksiyon için ılımlı koşullar oluşturduğundan gereklidir. Polipeptit zinciri tamamlandığında reçine polipeptitten uzaklaştırılmakta ve polipeptit saflaştırılmaktadır. Bütün bu işlemler otomatik olarak çalışan bir cihaz içinde mümkün olmaktadır. Otomatik olarak çalışan aletle bradikinin, angiotensin ve tiroksin gibi hormonların ve gramisidin-S gibi antibiyotiklerin sentezi de mümkün hale gelmiş bulunmaktadır. Otomatik peptit sentezi cihazında insülin hormonu sentezi de yapılmaktadır. Böylece doğal olarak meydana gelen aktif biyolojik moleküllere yapı ve aktivite bakımından çok benzeyen analog moleküllerin sentez yolu da açılmış bulunmaktadır.

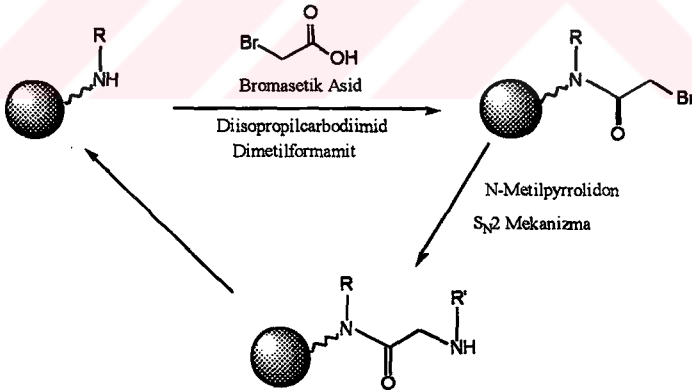
Polipeptoidlerin elde edilmesi için "Alt birim" denilen (sub-monomer) adı verilen sentez yöntemi yukarıda bahsedilen katı-faz sentez yöntemine göre hem daha hızlı hem daha etkin hem de daha elverişli olmaktadır. Reaksiyona α karboksil ucu korunmuş monomerlerle başlamak gereği bulunmadığından , alt-birim sentezinde bu basamak olmamaktadır. Dolayısıyla sentez yönteminde α -ucunun koruma grubunun uzaklaştırılması aşamasında bulunmamakta ve sonuçta sentezde zaman kazanılmaktadır. Alt birim sentez yöntemi Zuckermann ve çalışma arkadaşları tarafından geliştirilmiştir (Zuckermann, 1992).

Amit türevleri, Şekil 2.1.'de gösterildiği gibi katı destek görevi yapan

polistiren mikrokürecikleri üzerine tutturulmuştur. Her N-Süstitüe glisin monomeri, peptoid polimerinin uzatılması işleminde ortamda bulunan iki alt birimin bir araya gelmesiyle oluşmaktadır. Dolayısıyla, polipeptoidlerin ard arda iki kondenzasyon kopolimerizasyonuyla meydana geldikleri düşünülebilir. Haloasetik asit olarak α -bromasetik asit, düşük maliyet, kararlılık açılarından en uygundur. Ayrıca α -bromasetik asitdeki karboksilik asit grubu, reçineye bağlı sekonder amino grubunun açılması amacıyla diizopropilkarbodiimitle (DIC) kolayca reaksiyona girebilmektedir. Böylece reaksiyon sonucunda yüksek verimle α -bromasetamit meydana gelmektedir.

Yan zincirler daha sonra bir primer aminle etkileştirilir. S_N2 mekanizmasıyla Br grubunun yer değiştirmesi sonucu sekonder amin oluşur.

Bu iki basamak her bir monomer biriminin eklenmesi için ardarda tekrar edilirler. İstenilen polipeptoid sentezlendiğinde, oluşan madde trifluoroasetik asitle (TFA) etkileştirilerek reçineden uzaklaştırılır ve HPLC ile saf hale getirilir.



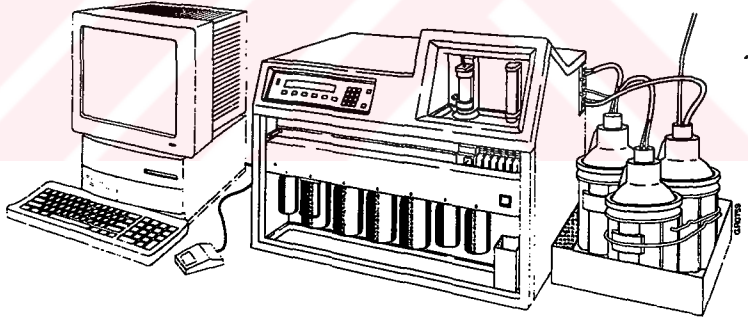
Şekil.2.1. Polipeptoidin sentetik protokolünün şematik gösterimi

Hem reaksiyonun daha hızlı gerçekleşmesi hem de araştırmacıdan gelebilecek hataların önlenmesi bakımından bu sentez otomatik hale getirilmiş peptit sentezleyici aletle yapılmaktadır. Aslında bu alet peptit sentezi için uygun olduğundan bazı değişiklikler yapılarak peptoid sentezi yapılmaktadır.

2.2. Peptit Sentezleyicisi (433A) ile Polipeptoid sentezi

Peptit sentezinde kullanılan alet (433A) küçük modifikasyonlarla peptoid sentezinde de kullanılmıştır..

Bu değişiklikler amino asit şişesine N-N'-diizopropilkarbodiimit ve bromasetikasit koyulmasına imkan sağlamaktadır. Şekil 2.2'den otomatik peptit sentez aleti görülmektedir.



Şekil 2.2. Bir 433A peptit sentez cihazının görünüşü

Peptit sentezinde kullanılan reçine peptoid sentezinde de kullanılmıştır. Polipeptoid için kullanılan reçine C-terminal amit peptidi için kullanılanla aynıdır. Peptoid sentezinde reçinedeki Fmoc grubu 20/5 (v/v) piperidin / dimetilformamit ile uzaklaştırılacaktır.

Dimetilformamit (DMF) N-N'-diisopropilkarbodimit (DIC)'de çözülmüştür. Bromasetikasit ile 1.2 M amino reçine asetillenir. Karışım 35 derecede 40 dakika çalkalanır, kurutulur ve DMF ile yıkanır.

Reaksiyon sonunda polipeptoid kolayca karakterize edilebilir. Bu türünlerin karakterize edilmesi analitik dönüşümlü-faz HPLC ve kütle spektrometrisi ile olmaktadır.

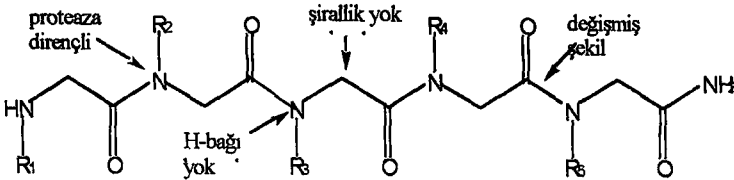
2.3. Polipeptoidler Ve Polipeptitler Arasındaki Farklılıklar

Polipeptoidleri, polipeptitlerle karşılaştırdığımızda pek çok önemli farklılıklar bulunmaktadır. İlk olarak, α -karbon üzerinde süstitüe gruplar bulunmadığından peptoidin ana zincirinde şiral merkez bulunmaz. İkinci olarak polipeptoidlerde amit protonlarının olmamasından dolayı polimer zincirleri arasında hidrojen bağı mümkün değildir (Scholtz, 1991).

Diğer önemli özelliklerinden biri de proteine benzer yapıdaki moleküllerin biyofiziksel işlevlerinde ve katlanmasında, şiral merkezde hidrojen bağlarının önemleri deneysel çalışmaları düzenlemek açısından için ideal model oluşturmaktadır.

Üçüncü olarak, moleküler modelleme ve NMR'la kısa oligomer çalışmaları (Simon 1992; Moehle 1996; Bradley 1996) peptoid zincirindeki amitlerin cis ve trans yapılarının her ikisinin bir arada bulunabileceğini göstermiştir. (Halbuki polipeptoidlerde trans amit yapısı daha baskındır.) Bütün bu bulgular peptoid kısımları içeren kollagen analoglarında gözlenmiştir.

Polipeptitlere benzer olarak polipeptoidlerde katı-faz yöntemi kullanılarak özel sıralı olarak sentezlenebilir. İlk polipeptoid temelli, peptit taklitleri olan Fmoc ile korunmuş NSG peptoid monomeri 1992'de sentezlenmiştir. Polipeptoidin farklılıkları şekil 2.3'de görülmektedir.



Şekil 2.3. N-Süstitüe glisin pentamer peptoidin yapısı

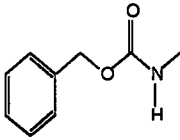
2.4. Polipeptoid Sentezi İçin Yan Zincir Korumanın Gerekliği

SP-B ve SP-C'de kullanılan aminoasitlerin analoglarının yan zincirlerinde bulunan fonksiyonlu grupların polipeptoid sentezinde kondenzasyon vermeleri için bu grupların bloke edilmesi gerekmektedir.

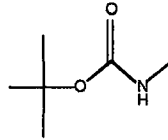
2.5. Yan zincir bloke yöntemleri

N^α-Terminal Gruplarının Korunması:

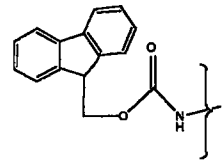
N^α-terminal grubunun koruyucu grupları genellikle bir üretan (alkoksi karbonil) ve bunun değişik türevleridir (Lloyd Williams 1997). Üretan grupları kolayca fonksiyonel gruba bağlanabilmektedir. Sentezden sonra bu grup 20 °C'de H₂/Pd'la indirgenerek uzaklaştırılabilir. Peptit veya peptoid sentezinde genellikle üretan tabanlı üç farklı N^α-amin koruma grubu kullanılmaktadır. Benziloksikarbonil grubu (1) Z olarak bilinir bunun nedeni keşfedicisi Leonidas Zervas'ın adının verilmesidir. Bu grubun uzaklaştırılması hidrojenlenme ile veya güçlü bir asit ile asitlendirilmesi ile olmaktadır. *t*-bütiloksikarbonil grubu (2) (BOC) (Z) güçlü bir asit olan TFA ile muamele edilerek, 9-fluormetoksikarbonil (Fmoc) (3) grubu ise sıvı amonyak ya da oda sıcaklığında piperidin, morfolin, etanolaminle muamele edilerek ile uzaklaştırılabilmektedir (Carpino, 1972).



Benziloksikarbonil (1)



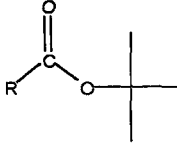
t-bütiloksikarbonil (2)



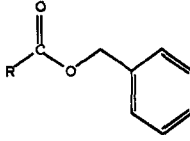
9-fluormetoksikarbonil (3)

C-Terminal Gruplarının Korunması:

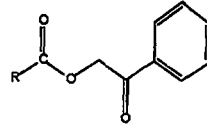
Çözeltide C-terminal koruma grupları *t*-bütil ester (4), benzil ester (5), ve fenasil ester (6) dir. Basitçe metil ve etil esterlerdir bazen sentetik plana bağlı olarak bunların kullanılması avantajlıdır. *T*-bütil ester asitli ortamda kolayca uzaklaştırılabilir. Benzil ester katalitik hidrojenleme ile uzaklaştırılabilir.



t-bütil ester (4)

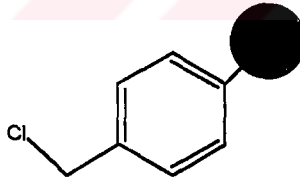


benzil ester (5)



fenasil ester (6)

Katı faz yönteminde (SPPS) C-terminal koruma grubu polistiren veya poliamit bazlı bir polimer olabilir. Merrifield'in ilk reçinesi klometillenmiş polistirendir daha sonra değişik tipte reçineler geliştirilmiştir. Bunlardan en önemli olan Sheppard tarafından geliştirilmiş poliamit bazlı reçinedir (Lloyd-Williams, 1997). Merrifield'in ilk reçinesinin genel kimyasal yapısı aşağıda Şekil 2.5 de verilmiştir.

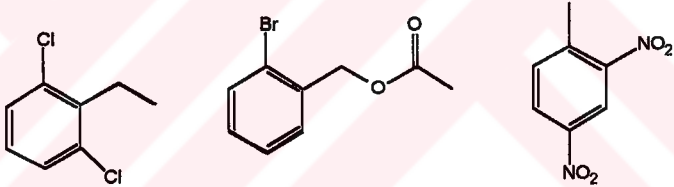


Şekil 2.4. Merrifield'in ilk reçinesi

-OH Gruplarının Korunması:

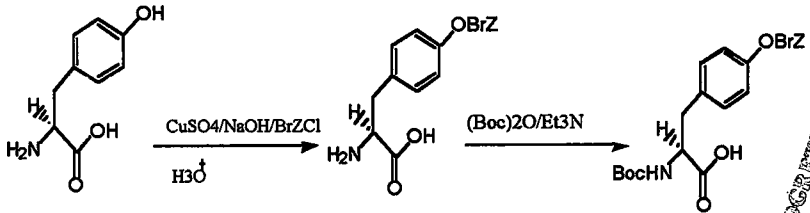
Serin ve treonin amino asitlerinin hidroksil grupları asetilleme reaktifleri ile reaksiyon verebilmektedir. Serin, treonine göre daha kolay reaksiyon vermektedir.

SPPS'de bu amino asitler genellikle Boc/Bzl ortamında benzil veya Fmoc/*t*-But ortamında *t*-Bütül ile korunmuştur. Benzil bazı gruplar sıvı hidrojen ile muamele edildiğinde, *t*-bütül eter ile bloke edilmiş gruplar TFA ile muamele edildiğinde serbest kalabilmektedir, yani uzaklaştırılabilir. Serin ve Treonin'in hidroksillerinin korunması için pek çok basamak gereklidir. Serin , Treonin'in hidroksili ve Tirozin'in fenolik grubu asetilleme reaktifleri ile reaksiyon vermekteler. Tirozin amino asitinin hidroksil grubu pek çok bloke grup ile korunmabilmiştir. Orjinal olarak, tirozinin hidroksil grubu benzil eter ile korunmuştur (Lloyd-Williams, 1997). Boc/Bzl katı faz yüzeyinde, tirozin normalde 2,6-diklorobenzil (7) veya 2-bromobenziloksikarbonil (Brz) (8) grupları ile korunabilir. 2,4-Dinitrofenil (Dnp) (9) grubu tirozinin fenol grubunu korumak için kullanılabilir



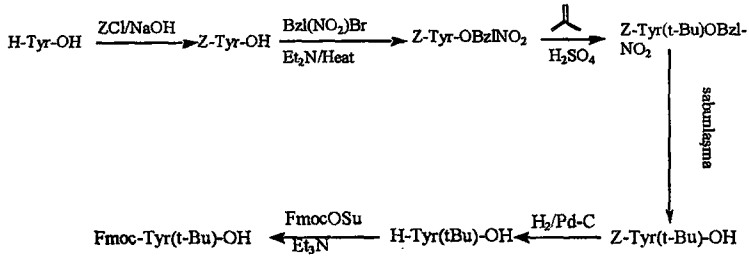
2,6-diklorobenzil (7) 2-bromobenziloksikarbonil (8) 2,4-Dinitrofenil (Dnp) (9)

Ancak bunların yani koruma gruplarının hiçbiri 3-alkilleme, yani ürün için önemli sayılacak ölçüde gerçekleşmez. Bunların birleşimi (ya da işbirliği) ile aminoasitin bakır şelat oluşturması başarılabilir. Bu grubun (Brz) hidroksili serbest bırakması Şekil 2.5'de görülmektedir.



Şekil 2.5. Tirozinin OH grubunun korunma reaksiyonu

Sentez reaksiyonu hayli uzundur, fakat bu şema yinede aşağıda basamaklar halinde Şekil 2.6'da gösterilmiştir (Lloyd-Williams, 1997).



Şekil 2.6. Tirozinin hidroksil grubunun t-bütül ile korunması

Tirozin analogunun hidroksil grubunun korunması görüldüğü gibi oldukça zordur. Korunmuş tirozin kullanmak daha uygundur. Serin gibi treonin amino asitlerinin analogu olarak 2-triizopropilsililoksi türevleri hazırlanır (Zuckermann, 1994).

Triizopropilsilili uzaklaştırmak için %95 TFA, %5 su (25 ml, 15 dakika, oda sıcaklığında) kullanılır. Bunu yıkama ve asetik asit ile kristallendirme izler.

-NH₂ Gruplarının Korunması

Lizinin N^o-amino grubunun ve lizinin analogu olan 1,4- Diaminobutanın amin gruplarından birinin korunması peptit veya peptoid sentezinde zorunludur. Diğer bir deyişle; amino grubunun alkillenmesi peptit veya peptoid zincirlerinin dallanmasına izin verir. N^o-amino grubunu korumak için N^α-amino grubunu farklandırmak gerekir.

Alternatif olarak, N^α-amino grubunun nükleofilliği ile N^o-amino grubunun nükleofilliğini karşılaştırdığımızda, N^o-amin grubu seçici olarak korunabilecektir. α-Amino koruma işlemi benzaldehyt ile yapılabilir iken N^o- amino grubu Schiff bazı (10) olarak korunabilmektedir.

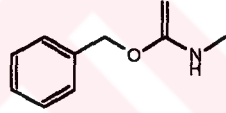
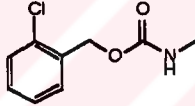
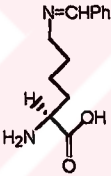
Normalde Boc/Bzl sentezinde . N^o- amino grubu 2-klorobenziloksikarbonil (ClZ) (11) grubu ile korunabilir. Bu reaksiyonda benziloksi karbonil (12) grubu daha az kullanışlıdır ve N^o-Boc grubunun uzaklaştırmak için asidik şartlar gereklidir. N^α-Boc grubunun uzaklaştırılması N^o-Boc taşınmasına sebep olur. Sonuç olarak . N^o-uzaklaşması ise peptitin dallanmasına neden

olur (Lloyd Williams, 1997). Bu durumlarda ortogonal olan N^o -amin grubunun korunması gereklidir.

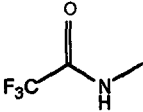
Dallanmış peptitlerin katı-gaz sentezi, örneğin lizinin N^o-amino koruma grubunun uzaklaştırılması peptitdeki diğer koruma gruplarını etkilemeksizin bağımsız gerçekleşir. Lizinin yan zincirinin ortogonal korunması için pek çok alternatif bulunmaktadır. Fakat en çok kullanılan olanlar arasında trifloroasetil (13) (Tfa) , 3-nitro-2- piridinsülfenil (14) (Npys), 1-(4,4-dimetil-2,6- dioksosikloheksildien)etil (15) (Dde) ve alliloksikarbonil (Alliloksi) (16) vardır. N^o-Tfa koruma asitlendirme için kararludur ve N^o-korunması içinde uygundur. Piridin ile muamele ise ayrılan grubun taşınması için gereklidir.

N-*t*-bütoksikarbonil (Boc) α , ω -alkandiaminler uygulaması bulunan pek çok sentetik prosedür için kullanılan reaktiflerdir (Krapeho, 1990) .

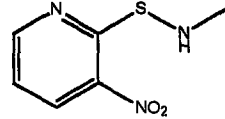
Pek çok α , ω -alkandiaminler ticari olarak uygundur ve mono N-Boc diaminlerin hazırlanmasında başlangıç maddesi olarak kullanılır.



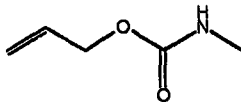
Schiff bazı (10) 2-klorobenziloksikarbonil (11) benziloksikarbonil (12)



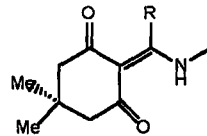
trifloroasetil (13)



3-nitro-2- piridinsülfenil (14)



alliloksikarbonil (15)



dimetil-2,6-dioksosikloheksildien)etil (16)

-COOH Gruplarının Korunması

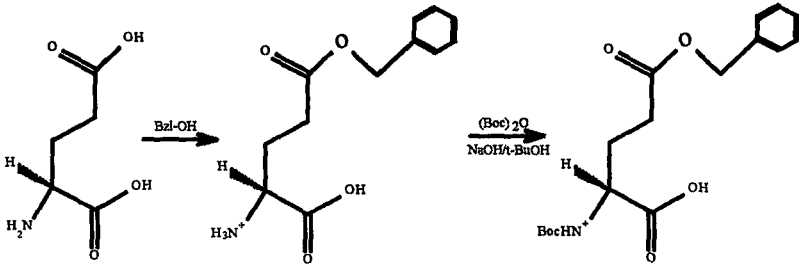
Aspartik ve glutamik asitin karboksilik asit yan zinciri peptit sentezi için korunmuş olmalıdır. Aksi takdirde asit grubunun aktifliği nedeniyle peptit zincirinde dallanma ve amit şeklinin oluşmasına neden olacaktır. Asitler için en genel olarak kullanılan koruma grupları, amin grubu Boc ile korunmuş aminoasitler için sikloheksilesterlerdir veya Fmoc/*t*-Bu yaklaşımında *t*-bütil esterlerdir. Sikloheksil esterleri klasik benzil esterlerinden daha kullanışlıdır, çünkü sentez sırasında aspartimitten daha etkindir. (Bodanszky, 1978)

Aspartik ve glutamik asitin yan zincirinin seçici korunması için karboksilik asit gruplarının farklılaşması gerekir. En basit yol, serbest amin grubunun direk asit katalizi ile esterleştirilmesidir. Bu şartlar altında diaminin protanlanması α - karboksilik asitin aktivitesini azaltır. Bu glutamik asit için Şekil 2.7'de gösterilmiştir. Aspartik asitte benzer olarak reaksiyon vermektedir.

Alternatif olarak, Aspartik ve glutamik asitin her ikisinin karboksil grupları, molekül içi anhidrit şekli oluşması ile kimyasal olarak farklılaştırılabilir.

Lizinin korunması için tartışılan şelat formu aynı zamanda Asp ve Glu'nun yan zincirini korumak için kullanılabilir.

Burada, amino asitin bakır şelat formu tekrar alkil halojenür ile serbest karboksil grubunun reaksiyonu ile yan zincir korunmuş olmaktadır (Van Heeswijk, 1982).



Şekil 2.7. -COOH varlığında -NH₂'nin korunması

Eğer aspartik ve glutamik asitin yan zinciri için ortogonal koruma gerekli ise Boc/Bzl de kararlı 9-florometil (Fmoc) grubunu kullanarak bloke edilebilir (Lloyd-Williams, 1997).

-SH Gruplarının Korunması

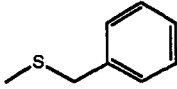
Sisteinin yan zincirinin korunması; peptit veya peptoid sentezinde zorunludur. Sülfür grupları iyi nükleofildir ve açılme reaksiyonlarında amin ile etkin olarak tamamlanabilir. İlave olarak, sülfürler, disülfür vermek için hava ile yükseltgenmektedir. Sisteinin korunması; peptit ve peptoid kimyasında, sülfür köprülerinin oluşmasının öneminden dolayı yoğun olarak çalışılmıştır (Lloyd Williams 1997). Bu disülfür köprülerinin gerekliliği sisteini korumak için kullanılan gruplarada fazla gereksinim gösterir. En uygun sisteinin yan zincirini koruma grubu moleküldeki diğer fonksiyonlu gruplar için uygulanarak bulunmalıdır. Çoklu disülfür köprüleri içeren peptit veya peptoid kompleksleri başarıyla sentezlenebilmektedir.

Sülfür köprülerinin şekillenmesi genellikle sisteinin korunmuş olmasından dolayı sentezin sonunda gerçekleştirilir. Diğer aminoasitlerin fonksiyonlu grupları peptit zincirinin sentezi sırasında kararlı olması gerekmektedir. Bütün sentetik yöntemde en önemli nokta; diğer yan zincir korumalarının varlığında, hem sülfür koruma grubunun, hem de peptit veya peptoid deki ana koruma gruplarının asidik uzaklaştırılmasının kararlı olmasını sağlamaktır. Orjinal olarak, S-benziltiyoeter, sistein veya onun analogunun yan zincirini korumak için kullanılmaktadır. Sübstitüe olamamış benzil grupları sıvı amonyakta sodyum ile veya 25°C de sıvı hidrojen florür ile uzaklaştırılmaktadır. Sübstitüe olmuş benziltiyo eter (17), S-p-metil-benzil (Meb) (18), S-p-metoksibenzil (Mob) (19), S-trimetoksibenzil (Tmob) (20), S-trifenilmetil (Trt) (21) peptit veya peptoidin kompleks sentezi için geliştirilmiş ve incelenmiştir.

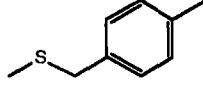
Meb ve Mob tiyoeterlerin uzaklaştırılması sıvı HF gerektirir, eğer düşük sıcaklıkta ise komşu bileşiklerin sübstitüe olmamış olması gerekmektedir. Tmob ve Trt grupları trifloroasetik asite dayanıklıdır. Böyle olunca, Meb ve Mob, Boc/Bzl katı faz yüzeyindeki sentezde, Tmob ve Trt ise Fmoc/t-Bu yaklaşımında kullanılabilir.

S-t- bütül koruma (22), bilinmeyen bir şekilde asidik (HF) uzaklaştırma için 0 °C'de dayanıklı olmasına rağmen 20°C'de uzaklaştırılabilir. Peptit sentezindeki diğer önemli koruma grupları ise Acn (23) ve Tacn (24) gruplarını içermektedir. Acn Boc/Bzl ve Fmoc/t-Bu'nin her ikisiyle

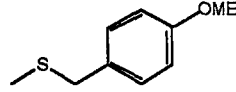
uygundur ve iyot ile yükseltgen muamele etmekle veya talyumtrifloraasetat ile uzaklaştırılabilmektedir. Tacm ise Boc/Bzl'de kullanılır ve sekonder bir amin ile muamele uzaklaştırılır.



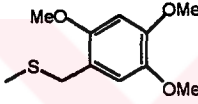
benzilyo eter (17)



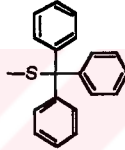
S-p-metil-benzil (18)



S-p-metoksibenzil



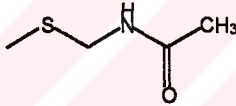
S-trimetoksibenzil (20)



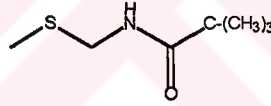
S-trifenilmetil (21)



S-t-bıttıl (22)



Asetamidometil (23)

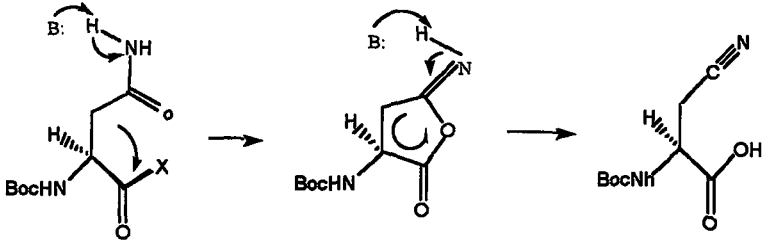


Trimetilasetamidometil (24)

-CONH₂ Gruplarının Korunması

Asparagin (Asn) ve glutaminin (Gln) amit yan zincir fonksiyonlu grupları katı faz yüzeyinde peptit sentezinde genellikle korunmadan bırakılır. Ana problem eğer önlem alınmazsa eşleşme ile amit, nitrile dehidrojene olabilir (Lloyd-Williams, 1997). Mekanizması ise Şekil 2.8.'den görülebilir.

Korunmamış yan zinciri olan aktive olmuş Asn ve Gln türevleri şekil 2.8'den gördüğü gibi molekül içi siklik reaksiyonlar vererek, nitril (25), süksinimit (26) ve glutarimit (27) oluştururlar. (Kisfaludy, 1975). Daha da ileri giderek, Gln proglutamik asit (28) türevi vermek için halkalaşabilir, bu reaksiyon zayıf asitler tarafından katalizlenmiştir (Lloyd-Williams, 1997).



Şekil 2.8. Aktif Asparajinin dehidrojenasyon mekanizması

Bu reaksiyonda meydana gelebilecek yan reaksiyonlardan önemli (ciddi olmamasına rağmen) ana zincir reaksiyon koşullarının akıllı seçimi ile kaçınılabılır. Özellikle Asn ve Gln diklorometanda ve DMF de az çözünmesine rağmen, Fmoc N^α-korunmuş Asn ve Gln'de çözünürlük kaydedeğer olarak artmıştır. Bu sonuçlarla yan zincir korumanın avantajına ilave olarak Fmoc/*t*-but katı faz yüzeyinde sentezde özellikle ikincil yapının kararlı şekillenmesinde, hidrojen bağlarının azalmasında ve eşleşme oranının azaltılmasına yardımcı olabilir. Peptit veya peptoid sentezi sırasında Asn ve Gln ve onların analoglarının yan zincirlerdeki fonksiyonlu grupların neden korunduğunu açıklayan faktörler ve onların incelenmesi henüz güncellik kazanmaya başlamıştır (Lloyd-Williams, 1997).

Boc/Bzl sentezi için, Ksantenil (Simonishi, 1962) (Xan) (29) veya 4,4'-dimetoksibenzhidril (Mbh) (30) (Lloyd-Williams, 1997), Asn ve Gln'nin yan zinciri koruma sırasında kullanılabilir. Boc grubunun uzaklaştırılması için asidik şartlar uygundur dolayısıyla Xan ve Mbh'in her ikisinin yan zincir koruması peptit veya peptoid zincirinden planlı olarak uzaklaştırılabilir.

-C(NH)NH₂ Gruplarının Korunması

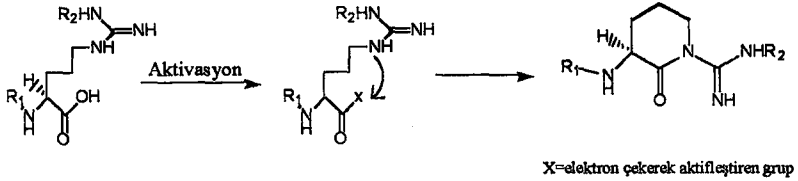
Arjininin δ-guanidino grubu kuvvetli bazdır (Pka=12,5) ve protonlama çözeltide peptit sentezinde sıklıkla kullanılan basit bir koruma metodudur (Lloyd-Williams, 1997).

Molekül içi ile ilgili zayıf çözünürlük ve problemler iyon-değiştirici reçineler gibi davranan peptitlerin protonlanması sonucunda artar, sentez sırasında anyonların değişmesine sebep olur. Bu amino asitin yan zincirini korumak için daha etkili ve tatmin edici bir yöntem araştırılmalıdır. Arjinin ihtiva eden peptitlerde ara sıra yan zincirde reaksiyon gözlenir. Böyle

geçişler amonyaklaşma veya HBr veya HF gibi güçlü asit ile gözlenmiştir (Lloyd-Williams, 1997).

Ana yan reaksiyonlar Şekil 2.9'da gösterildiği gibi δ -laktamın oluşması için C-terminalin aktive olması ve halkalaşması olup bu amino asit ile ilgilidir.

Bu durum temel koşullarda yan zincir korunmadan bırakıldığında yan

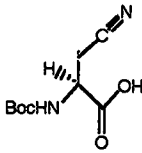


Şekil 2.9. Arginin türevlerinde δ -laktam şeklinde eşleme

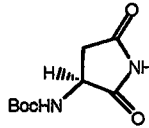
reaksiyonlar önemli olabilir ve ω -pozisyonundaki guanidino fonksiyonlu grubu koruma grubu ile bloke edildiğinde böyle siklik reaksiyonları elimine edilir (Lloyd-Williams, 1997). δ - ω -dikoruma türevlerinde δ -amino grubunun korunması siklik reaksiyonları elimine eder. Nitro grubunun (29), Argininin yan zincir için faydalı olduğu bulunmuştur. Koruma işlemi kolay fakat uzaklaştırması zordur. Arilsülfonil temelli koruma grupları şimdilerde guanidino için en çok kullanılan koruma grubudur.

SPPS'de Boc/Bzl için tosil grupları (Ramachandran, 1962) (30) yeterlidir.

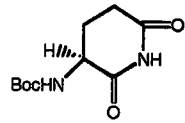
Tosil grubu tekrarlanan Boc-de koruma zinciri için karardır fakat sentezin sonunda sıvı HF ile muamele edilerek uzaklaştırılır. Fmoc/*t*-Bu için 4-metoksi-2,3,6-trimetilbenzilsülfonil (Mtr) grubu (31), 2,2,5,7,8-pentametilkroman-sülfonil (Pmc) (32) ve 2,2,4,6,7-pentametildihydrobenzofuran-5-sülfonil (Pbf) grup (33) kullanılır ve bunların uzaklaştırılması pratikte daha kolaydır.



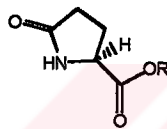
nitril (25)



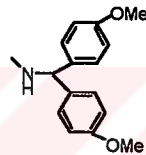
süksinimit (26)



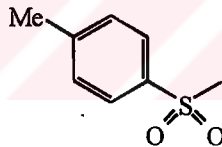
glutarimit (27)



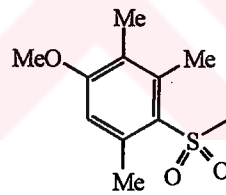
proglutamik asit (28)



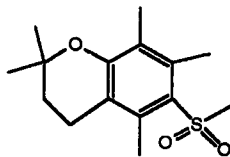
4,4'-dimetoksibenzhidril (29)



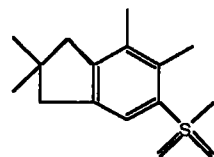
Tosil (30)



(Mtr) (31)



Pmc (32)

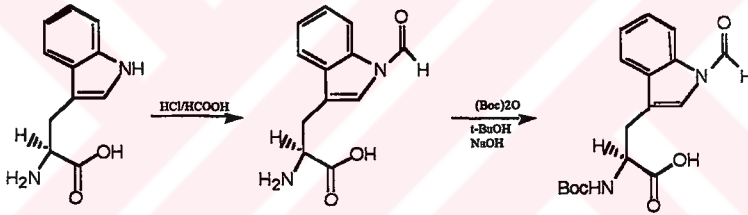


Pbf (33)

İndol Halka grubunun Korunması

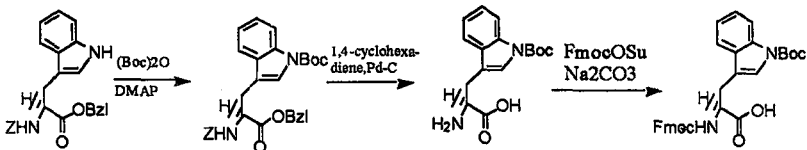
Triptofan indol halkası kolayca birden fazla pozisyonda elektrofilik sübtütüsyon reaksiyonu vermektedir (Lloyd-Williams, 1997). İlave olarak bu aminoasit aynı zamanda asidik ortamda atmosferik oksijen tarafından yükseltgen parçalanmaya karşı çok hassastır. Bunun anlamı triptofan, hem N^{α} -Boc korumamın uzaklaştırılması hemde özellikle katı destekten peptitin hidrolizi esnasında risklidir. Triptofan ihtiva eden peptitlere sentez sırasında işlem yapmak (müdahale) etmek problemlidir ve uygun bir yan ürün yok edici (scavengers) gereklidir. Yine de, triptofanın yan zinciri genellikle peptit sentezinde korunmuş değildir. Bunun nedeni için daha genel yaklaşım indol azot atomu ile elektron çekici grubun işbirliği sonucudur. Bu indol çekirdeğinin elektron yoğunluğu istenmeyen alkillemenin miktarını azaltır.

Boc/Bzl sentezinde triptofanın korunması için en popüler seçim N-formil (For) grubudur. Reaksiyonun gidişi Şekil 2.10'da görüldüğü gibidir.



Şekil 2.10. Boc-Trp(For)-OH'nin sentezi

Bunun uzaklaştırılması hidrazin ve hidroksil amin ile veya piperidinin çözeltisi ile muamelesi ile başarılabilir. Temel koşullar altında N^{indol} -formil grubu N^{α} -amino grubuna göç edebilir. Bu reaksiyon koşullarının dikkatli seçimi ile normal olarak kontrol edilebilir. Fmoc/*t*-Bu peptit sentezi için Boc grup indol azot atomunun korunması için kullanılabilir (Lloyd-Williams, 1997). Fmoc-Trp (Boc)-OH'nin sentezi Şekil 2.11'de gösterildiği gibidir.



Şekil 2.11. Fmoc-Trp(Boc)-OH'nin sentezi

3. MATERYAL VE METOTLAR

3.1. Deneysel Planlar

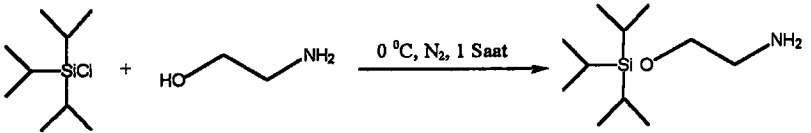
Bu çalışma genelinde ciğer yüzey aktif proteini C'nin sentezi hedeflenmiştir. Bu sentezi gerçekleştirmek için öncelikle SP-C'nin yapısı incelenmiş ve yapıda yer alan 35 aminoasit tek tek incelenmiştir. Bu aminoasitlerin üzerinde bulunan -OH, -SH, -NH₂, indol halkası, -COOH, CONH₂, -C(NH)NH₂ yan gruplarını içerenler bulunmaktadır. Bu yan zincirde bulunan grupların bloke edilmesi istenmeyen reaksiyonlar bakımından önemlidir. Yalnız bloke işlemleri peptoid sentezleneceği için her aminoasit için seçilen analogları üzerinde yapılacaktır. Bundan sonra yine sentezlenen bloke olmuş analoglar altılı peptoid sentezinde denenecektir. En son aşamada SP-C'nin sentezi üzerinde çalışılacaktır.

3.2. Koruma Yöntemleri

3.2.1. -OH Gruplarını Koruma Yöntemi

Serin ve treonin analogları olarak 2-(Triizopropilsilil)oksietanolamin sentezlenmiştir (Zuckermann, 1994). 2-(Triizopropil)sililklorür diklormetan'da çözünerek 2-Amino-etanol ile birlikte bir saat azot altında 0 °C'de reaksiyona sokuldu. Yıkama ve çekme işlemlerinden sonra Na₂SO₄ ile kurutulup, süzüldü. Reaksiyon verimi % 90 olarak gerçekleşti. Sentezlenen bileşiğin yapısı EK.1 den görülebileceği gibi kütle spekturumu ile desteklendi.

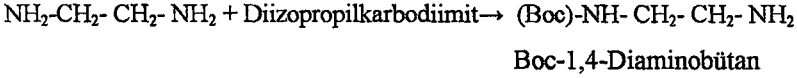
Triizopropilsilil grubunu peptoid zincirinden uzaklaştırmak için %95 TFA, %5 su (25 ml, 15 dakika, oda sıcaklığında) kullanıldı.



Şekil 3.1. -OH fonksiyonlu grubun triizopropilsililklorür ile korunması

3.2.2. $-NH_2$ Gruplarının Korunma Yöntemi

N-*t*-bütoksikarbonil(boc) α,ω -alkandiaminler pek çok sentetik yöntemde uygulaması bulunan, kullanışlı reaktiflerdir (Krapcho, 1990).



Pek çok α,ω -alkandiaminler ticari olarak bulunduğu için, bunlar mono N-Boc diaminlerin hazırlanmasında başlangıç maddesi olarak kullanılmaktadır. α,ω -alkandiaminlerinin di-*t*-bütildikarbonat ile dioksanda muamelesi (6-7:1) di-*t*-bütil için istenen mono-korunmuş N-(Boc) α,ω -alkandiaminlerin yüksek verimlerde oluşmasına izin vermektedir. Bis-Boc- α,ω -alkandiaminler küçük miktarlarda oluşmaktadır. Bu iki yanlı korunmuş olan ve tek taraflı korunmuş olan ürün alkandiaminlerin sudaki çözünürlüklerinden yararlanarak kolayca uzaklaştırılabilir. Su ile uzaklaştırmayı izleyen dioksan uzaklaştırmasından sonra çözünmeyen bis ürününün süzme ile ayrılmasıdır. Suda çözünebilir mono korunmuş diaminler sulu fazdan metilen klorür ile çekilerek ayrılabilir. Reaksiyon verimi %65 olarak gerçekleşti. Elde edilen mono korunmuş yapı EK.2 den görüleceği gibi kütle spektrumu ile desteklenmiştir.

3.2.3. -COOH Grubunun Koruma Yöntemi

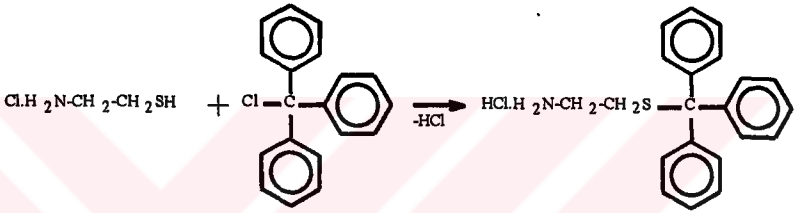
β -Aleninbenzilester-p-toluen sülfonatu sentezlemek için β -aleninestiler hidroklorürü kullanıldı. β -aleninestiler.HCl(2,3g) benzil alkole de kuru HCl (gaz) ile doyuruldu. Belirli bir süre oda sıcaklığında karıştırıldı. Sonra, çözelti yeniden kuru HCl ile doyuruldu. HCl nin fazlası ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra oluşan şurup suda çözüldü, 0°C'de soğutuldu ve Ph 10'a getirilip % 50 buz ve potasyum karbonat ile soğutuldu. Benzil ester etil asetat ile çekildi.

Organik fazı kurutma işlemlerinin ardından, oda sıcaklığında vakumda kurutmak için buharlaştırıldı. Ürünün verimi çok düşüktü (%20). Bu nedenle bu senteze devam edilmedi.

β -Alanin-*t*-Bütillesteri piyasadan hazır alınarak aspartik asit ve Glutamik asit analogu olarak kullanıldı.

3.2.4. -SH Grubunun Korunma Yöntemi

S-Trifenilmetiletilamin(S-Trt-Etilamin) için 2-Aminoetantiyol.HCl'inin çözeltisi dimetilformamid içine ilave edildi tritilklorür ile karıştırılıp oda sıcaklığında iki gün çalkalandı. Sodyum asetat çözeltisinin ilavesiyle, S-Trt-etilamin bileşiği trifenilkarbinol ile birlikte ayrıldı. Toplanan çökelek yıkandı ve aseton ile 15 dakika kum banyosunda gerisoğutucuda ısıtılmasından sonra saf S-Trt-etilamin soğutma ile kristallendi (Zervas,1962). Kütle ve ^{13}C spektrumları EK 3, EK 4 den görülmektedir.



Şekil 3.2. S-Trt-etilaminin sentezi

S-(4-Metilbenzil)etilamin için Trietilamin ve 4-metil-benzilbromür 2:1 (v/v) etanol-su da çözülerek 2-Aminoetantiyol.HCl çözeltisine ilave edildi. 12 saat karıştırıldı ve süzüldü. Süzülen tabaka (kek) su ile iyice yıkandı ve 3:2 (v/v) etanol-su'dan S-(4-metilbenzil) etilamin beyaz bir katı olarak kristallendirildi. Bu deney aynı zamanda 2-Aminoetantiyol'de bulunan amin grubunu korur. Fakat orijinal literatür de ise amin korunmamışdı. Bu çalışmada ilk kez amin korunması denenip sonra asıl reaksiyon olan tiyol grubunun korunması gerçekleştirildi.

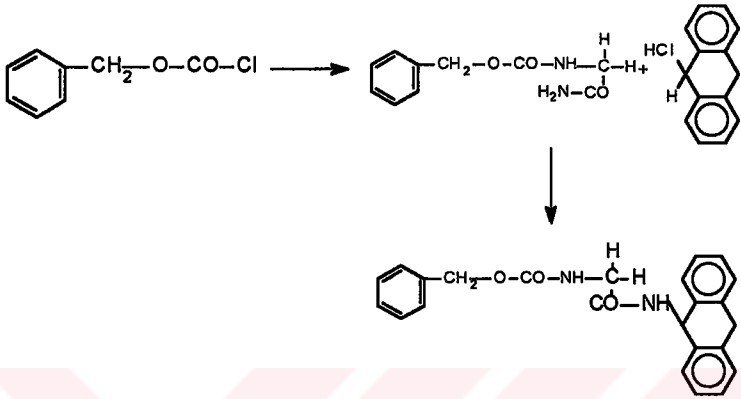
S-Asetamidometiletilamin (S-Acm-etilamin) için N-(hidroksimetil)asetamidin karışımı ve 2-Aminoetantiyol.HCl'inin sudaki çözeltisi ve konsantr olmuş HCl buz banyosunda soğutuldu. Üzeri cam kapatıldı ve oda sıcaklığında azot altında 1-2 gün bekletildi. İnce tabaka kontrolü (n-Bütillalkol-asetikasit-su, (10:2:3)) reaksiyonun tamamlandığı anlaşıldığında, karışım 40 °C de vakumda konsantr edildi ve saf (susuz) etanol suyun çok az miktarını bile uzaklaştırmak için defalarca ilave edildi. Son katı çok az metanolde oda sıcaklığında çözüldü ve bulanık hale gelinceye kadar susuz eter ilave edildi (Veber, 1972).

S-tert-bütül-etilamin (S-t-Bu-etilamin) için 2-Aminoetantiyol.HCl dioksanda ve izobütülen ile 0 °C'de konsantre H₂SO₄ varlığında muamale edildi. Karışım oda sıcaklığında 1 gün çalkalandı, izobütülenin fazlası soğutma ve basıncın kaldırılmasından sonra buharlaştırıldı. Berrak çözelti buzlu -sulu NaHCO₃ ve eter ile çekildi. Eter ekstraktı su, 0,1 N HCl ve tekrar, su ile yıkandı kurutuldu ve şurup buharlaştırıldı. Kalan eter-petrolelerinden kristallendirildi. Reaksiyonun verimi %90 olarak gerçekleşti.

3.2.5. -CONH₂ Gruplarının Korunması Yöntemi

Glutamin analogu için glisinamit kullanıldı. Burada önemli olan nokta önce amin sonra amit azotunu korunmuş olması gereğidir. Kütle spektrumu EK.5 den görülmektedir.

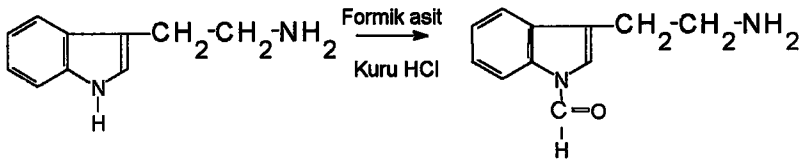
Bu işlem için önce N^{amin}-karbobenzoksi-Glisinamit sonra N^{amin}-karbobenzoksi-N^{amit}-ksantilglisin amit sentezlendi. Sonra karbobenzoksi grubu tiyonil klorür (SOCl₂) ile uzaklaştırıldı. N^{amin}-karbobenzoksi-glisinamit sentez reaksiyonu aşağıda görülmektedir.



Şekil 3.3. Karbobenzoksi-glisinamitin sentez reaksiyonu

3.2.6. İndol Halka grubunun Korunması

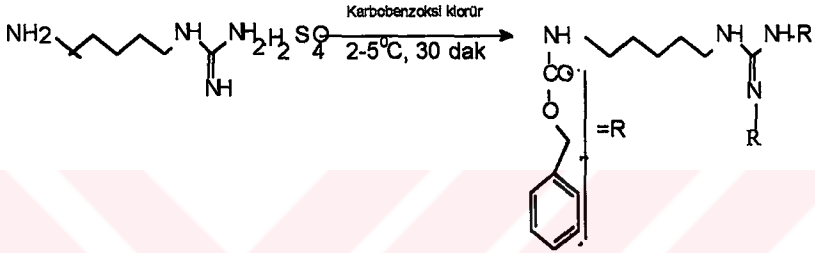
Triptofan analogu olarak seçilen triptamin formil grubu ile formik asit beraberinde ve kuru HCl altında reaksiyona sokularak %58 verimle reaksiyon gerçekleştirildi. Kütle ve ^{13}C spektumları EK 6 ve EK 7 den görülmektedir.



Şekil 3.4. N^{in} -formiltriptamin

3.2.7. -C(NH)NH₂ Gruplarının Korunması

Arginin analogu olarak agmatin sülfat kullanıldı. Agmatin sülfat karbobenzoksiklorür ile 2-5 °C'de reaksiyona sokuldu. Reaksiyon %40 verimle gerçekleşti. Reaksiyonun gidişi aşağıda görülmektedir. Sentezlenen yapının kütle ve ¹³C spektrumları EK 8, EK 9 dan görülmektedir.



Şekil 3.5. N^{w,w}-dikarbobenzoksiagmatin

3.3. Bazı Aminoasit Analogları İçin Hegzamer Peptit Zincirlerinin Sentezi

3.3.1. Sistein Analogu İçin Hegzamer

Korunmuş olan sistein analogu S-Trt-tiyoeetilamini test etmek için S-Trt-tiyoeetilamin (örnek) dimetilsülfoksit'de (DMSO) çözüldü., Her biri 1M 3 benzilamin örneği Bzl-sis-bzl-sis-bzl-sis polipeptoid sentez sırası için hazırlandı. Fmoc-amit reçine katı destek olarak kullanıldı.

Reaksiyonun sonunda uzaklaştırma işlemi için %95 TFA ve %5 su çözeltisi polipeptoid ile reçine üzerine ilave edildi ve 20 dakika çalkalandı , süzüldü ve sıvı üzerine eşdeğer miktar su ilave edildi.

HPLC'de (HPLC örneği için 100 µl örnek +100µlsu + 100µlasetonitril) (Dynamax Model SD-200) analiz edildi.

Kütle spektrumu (VG/70-250SE) alındı. Kütle ve HPLC spektrumları EK 10, EK 11 den görülmektedir.

3.3.2. Metionin Analogu Hegzamer Sentezi

Metionin analogu 2-(metiltiyo)etilamini hegzamer zincirinde test etmek için iki örnek kartuşu hazırlandı. Tekrar dört benzilamin örneği Bzl-mer-bzl-mer-bzl (Molekül ağırlığı: 876) polipeptoid sentez sırası için hazırlandı. Katı destek olarak Fmoc-amit kullanıldı. HPLC'de analizden sonra kütle spektrumu alındı. Kütle spektrumu EK 12 den görülmektedir.

3.3.3. Serin Analogu İçin Hegzamer Zinciri

Serin analogu 2-(triizopropilsilil)etanolamin (molekül ağırlığı: 217) ve 1 M üç örnek hazırlandı. Yine üç ayrı benzilamin örneği hazırlandı ve peptoid sentezi 3.2.2'de olduğu gibi yapıldı ve HPLC ve kütle spektrumları alındı. Peptoid zincirinde serin analogu reaksiyonu gerçekleştirmiştir. Sıra Bzl-ser-bzl-ser-bzl-ser (molekül ağırlığı: 761)'dir. Kütle spektrumu EK 13 den görülmektedir

3.3.4. Glutamik Asit Analogu İçin Hegzamer

Glutamik asit analogu olan β -alanin-*t*-bütlesteri hegzamerde test etmek için iki glutamik analog örneği hazırlandı. İlk kez HCl tuzu analogdan uzaklaştırıldı. Dört benzil amin örneği hazırlandı ve Bzl-Glu-Bzl-Bzl-Glu-bzl sırasında sentez yapıldı. Sentez 3.2.2'deki gibi yapıldı ve HPLC analizinden sonra kütle spektrumu alındı. Serin analogu hegzamer içinde çok iyi çalıştığından sentez başarılı oldu. Kütle spektrumu EK 14 den görülmektedir.

3.3.5. Lizin Analogu İçin Hegzamer

Lizin analogu olarak sentezlenen Boc-1,4-Diamino-bütanın DMSO veya diğer çözücülerdeki çözünürlük probleminden dolayı Boc-1,2-diaminoetan kullanıldı. Boc-1,2-diaminoetan örneği ve 3 benzilamin örneği hazırlandı. Hegzamer sentezi 3.2.2'deki gibi ve sırası Bzl-lys-bzl-lys-bzl-lys şeklinde gerçekleştirildi. HPLC'de analizi yapıldı ve kütle spektrumu alındı Kütle spektrumu EK 15 den görülmektedir

3.3.6. Lözin Analogu İçin Hegzamer

Lözin analogu olarak izobütilamin kullanıldı, üç tane lözin örneği, üç tane benzilamin hazırlandı ve 3.2.2'deki gibi sentez yapıldı Sıra Bzl-leu-bzl-leu-

bzl-leu şeklindeydi (Molekül ağırlığı: 800). Kütle spektrumu EK 16 dan görülmektedir

3.3.7. İzolözin Analogu İçin Hegzamer

İzolözin analogu için sek-butil amin kullanıldı. üç tane izolözin örneği hazırlandı ve hegzamer 3.2.2'deki gibi sentezlendi. HPLC spektrumu ve kütle spektrumu alındı. Sırası ise bzl-Ile-bzl-Ile-bzl-Ile 'dir. Kütle spektrumu EK 17 den görülmektedir

3.3.8. Triptofan Analogu İçin Hegzamer

Triptofan analogu olarak seçilen triptamin bloke edildikten sonra elde edilen Nⁱⁿ-Formil triptamini hegzamerde test etmek üzere üç örnek hazırlandı Tekrar üç tane benzilamin örneği Bzl-trp-bzl-trp-bzl-trp sırasında hazırlamak için sentez yapıldı. Katı destek olarak Fmoc-amit reçine kullanıldı.

Uzaklaştırma işlemi için %95 TFA ve %5 Su polipeptoid ile reçine üzerine ilave edildi. 90 dakika çalkalanır, süzülür ve aynı hacimde su ilave edildi. HPLC analizi yapıp kütle spektrumu alındı. Kütle spektrumu EK 18 den görülmektedir

3.4. Sp-C Peptoid'in Sentezi

3.4.1. Bütün Sp-C'nin Sentezi

Ön hazırlıkları yapılan SP-C'nin sentezi 433 A peptit sentezcisiyle (mod 3-Fadmoc 0,25 Mon prevPK) gerçekleştirilmeye çalışıldı.

SP-C sırası 1-35: FGIPCCPVHLKRLLVVVVVVLIVVVIVGALLMGL-COOH
Çift katlı

Sentezin yapılışı:

Reçine: HMP (p-Benziloksibenzilalkol) kullanıldı. Bütün amino asitlerin analogları sırasıyla dizildi ve deney otomatik sentezcide başlatıldı ve reaksiyon 96 saat sürdü.

SP-C'nin Reçineden uzaklaştırılması

SP-C için kullanılan toplam karışım ;

100mg kristal fenol ; 0,25 ml EDTA; 0,5 ml tiyoanisol; 0,5 ml bidestile su; 10 ml TFA'dan oluşmaktadır.

Yukardaki karışım üçe bölünür (A,B ve C) ve bunlardan biri seçilir.

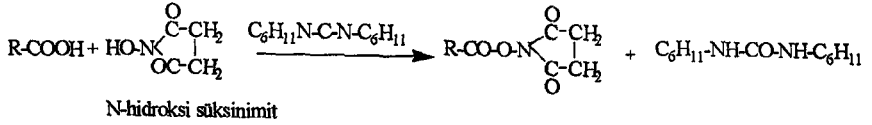
Not: Karışım B'nin uzaklaştırması dört Arg (Pmc) içeren peptite kadar başarılı olduğu için kullanılıyor, bazen de daha fazla koruma gerekli olabilir. Bu reaksiyon 3 saat sürmektedir. Kurutulmuş peptit reçinesini mikro manyetik karıştırıcı içeren yuvarlak dipli balona yerleştirilir. Balon buz banyosunda soğutulur. Uzaklaştırıcı karışım ilavesinden sonra, balonu buz banyosundan uzaklaştırılır ve oda sıcaklığına gelmesine izin verilir. Camın ağzı kapatılır ve 1,5 saat oda sıcaklığında reaksiyonu karıştırılır. Peptit, TFA çözeltisinden ayrılır. Ayrırma işlemi süzme ile yapılır:

Reaksiyon zamanı bittikten sonra, reaksiyon karışımı peptit çözeltisinden reçine desteğini ayırmak için sinterleşmiş cam süzgeç ile yuvarlak dipli balona süzüldü. Kalan en ufak reçineyi balondan almak için yaklaşık 1 ml TFA reaksiyon balonuna ilave edilerek elde edilen bu karışım daha önceki gibi süzüldü. Balon tekrar 5-10 ml DCM ile çalkalanır ve aktıldı. TFA ve DCM filtratları birleştirildi. Filtratın hacmi yaklaşık 1-2 ml oluncaya kadar evaporatörde konsantre hale getirilir. Su banyosunda sıcaklığı 40°C'yi geçmemelidir, aksi takdirde peptite zarar verebilir. 50 ml veya daha fazla dietil eter ilave edilir. Konsantre edilmiş reaksiyon karışımına peptiti ayırmak için süzülür. Katı yüksek vakumlu desikatöre konularak kurutulabilir. Kurutmadan sonra, peptit sulu çözeltide yeniden kristallendirmek için çözülür.

Analitik HPLC'de Vydac C4 60 kolonda peptoid SP-C piki gözlemek için analiz yapıldı. SP-C'yi test için 100 ml TFA'da ve 6 ml asetik asitte yeniden çözüldü. Hazırlanmış HPLC örneği +200ml örnek Vydac C4 kolonda %10-95 ACH peptoidi HPLC de analiz edildi. Kütle spektrumundan SP-C hidrofobikliğinden dolayı gözlenemedi.

Palmitilleme Reaksiyonu

Sentetik SP-C peptidi N-(palmitoil)süksinimitin esterinin iki katı miktarı ile trifluoro etanolde reaksiyona sokuldu. (N-hidroksi süksinimit esterlerini kullanarak uzun-zincirli yağaçil-CoA tiyoesterlerin sentezi (Blecher, 1981) 10mM fosfat tamponu ile PH 7'de (9:1 v/v) 24 saatte yapılabildi. Palmitillenmiş ürünün molekül ağırlığı kütle spektrometrisi ile bulundu (Al-Arif, 1969; Lapidot, 1967;).



4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Aminoasit analogları için koruma sonuçları

En küçük peptid sentezi için bile yan zincir blokesinin gerekli olduğunu daha önce açıklanmıştı. Bu nedenle amino asit analogları için yapılan deneylerde histidin, prolin için etkili bir koruma metodu geliştirilememiştir. Aspartik asit ve glutamik asit için pek çok grup olmasına rağmen yüzey aktif protein sentezinde kullanılmak üzere etkili bir grup geliştirilememiştir. Yine glutamin azotu için yapılan deneyler sonuçsuz kalmıştır. Diğer amino asitler bunlar yüzey aktif protein-C'nin yapısında olan amino asitlerdir ki bunlar için uygun koruma yöntemleri geliştirilmiştir.

Amino asit analoglarının hegzamer sentezi sonuçları

Koruma grupları ile aminlerin sentezinden sonra bu aminler altılı peptoid zinciri sentezlenerek test edildi. Metiyonin analogu hariç diğerleri bu testte istenen sonucu vermiştir.

Yüzey aktif proteini-C'nin sentez sonuçları

Yüzey aktif protein peptoid sentezi daha önce hakkında detaylı bilgi verdiğimiz 433A peptid sentezleyicisi ile yapılmıştır. Ancak bu sentezlenen ürünümüzün hidrofobik özelliğinden dolayı saflaştırılması aşamasında ve hem kütle hemde HPLC işlemleri sırasında problemlerle karşılaşmıştır.

Peptoid yüzey aktif protein-C'nin palmitillenmesinin sonucu

Sentezlediğimiz protein-C'nin insan vücudundaki ile benzer olması için 5. ve 6. karbondaki sisteinlerden palmitillenmesi gerekiyordu. Bu nedenle palmitillenme reaksiyonu yapılmıştır. Kütle spektrumundan palmitillendiği görülmüş olup fakat saflaştırılması aşamasında yine problemlerle karşılaşmıştır.

YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
OKUMANTASYON MERKEZİ

5. SONUÇLAR VE TARTIŞMALAR

5.1. Deneysel Sonuçlar

Deneysel çalışmalarımızla amino asitlerin analoglarının yan zincirleri bloke edildi ve bu bloke olmuş aminoasitler yüzey aktif proteini SP-C'nin sentezinde kullanıldı. Sentezlenen SP-C'nin fizyolojik özellikleri, doğal SP-C'nin fizyolojik aktivite deneyleri ile de birleştirilerek bilim dünyasına sunulursa önemli katkıda bulunacağı açıktır.

5.2. Sp-C'nin Sentetik Sonuçlarının Tartışılması

SP-C'nin hidrofobikliği pek çok organizmada uygulama aşamasında problem olduğundan insan SP-C sırası yeniden dizayn edilirken pek çok aminoasit diğeri ile yer değiştirerek (hidrofobikliği azaltmak için) sentez yapılmıştır. Bu şekilde formüle edilen SP-C'nin canlı ve cansız ortamlarda iyi biyofiziksel aktivite gösterdiği görülmüştür. Bazı araştırmacılar insan SP-C sırasına dayalı olarak valini , alanin ile periyodik olarak değiştirmek suretiyle sentezlemeyi başardılar. Fakat sentezlenen bu SP-C artık insan SP-C sırasıyla aynı değildir ve belkide immün sistemine karşı fazla duyarlılık gösterecektir. Yenidoğan bebekte yeterince immün sistemine sahip olmadığından dışardan verilen hayvansal kaynaklı proteinlere karşı oldukça dayanıksızdır. Daha büyük olan çocuklar ve orta yaşlılar da bile bazı problemler olmasına karşı dayanıklılık biraz daha fazladır. Özetle hayvandan ekstrakte edilmiş yüzey aktif proteinleri beraberinde bazı antijenik faktörlerle, enfeksiyon maddelerinde getirdiğinden hastalarda dirençle karşılaşmaktadır. Bu nedenle bu tezde sentezlenmeye çalışılan peptoid taklitlerinin geliştirilmesi ve sentezi önemlidir.

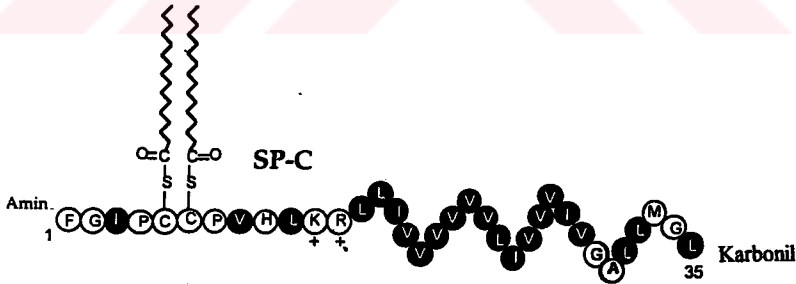
Hidrofobik polivalin dilimiyle molekülün helis yapısı güçlendiği için sırada benzer olarak değişikliklerin yapılması SP-C'nin yapısının aydınlatılmasında yardımcı olmuştur. Bu sentezlenen SP-C polipeptit yapısında olup tam anlamıyla istenen ürün değildir ancak yine de polipeptit SP-C ve polipeptoid Sp-C'nin sentezi için başlangıç niteliğindedir.

Fujiwara ve Notter (Takei, 1996; Wang, 1996) SP-C proteininin peptit taklitlerini sentezlemeye odaklanmışlardır. Wang SP-C'nin tüm zincirini sentezleyip, palmitelleme reaksiyonunda geçekleştirmiştir. Mayer-hligge'de insan-uyumlu ciğer yüzey aktif proteini SP-C'yi sentezledi (Mayer-Fligge Petra, 1998). İnsan uyumlu yüzey proteini SP-C'nin etkili sentezi yarı-otomize katı faz sentezcisi ile Fmoc sentez yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. SP-C'nin iki sistein amino asiti (beş ve

altıncı sırada yer almaktadır) palmitillenmiştir. Bu grup yani palmitoil grubu özellikle onun in vivo ortamda aktivite göstermesi için önemlidir. Palmitoil grubu SP-C'nin hidrofobikliğini artırmaktadır. Yine 11. ve 12. konumda yer alan pozitif yüklü lizin ve arjinin SP-C'nin polar fosfolipid gruplarla bağlanmasında önemli rol oynamaktadır.

Polipeptoid SP-C'nin sentezi farklı gruplar tarafından çalışılmasına rağmen henüz gerçekleştirilmemiştir. Bu çalışmada valini alanin ile değiştirmeden yapmaya çalıştık., dolayısıyla SP-C çok hidrofobik olduğundan palmitillenmeden önce ve sonra HPLC ve kütle spektrometresinde analiz etmek mümkün olmadı. Ancak sentezlenen SP-C'nin kütle spektrumundan saf olmadığı gözlemlendi.

Akciğer yüzey aktif proteini SP-C'yi sentezlediğimize inanıyoruz. HPLC ve kütle sonuçlarında problemle karşılaşmamıza rağmen , sadece sentezlediğimiz SP-C yi görebilmemiz gereklidir. Peptid SP-C ve polipeptoid SP-C hakkındaki çalışmalarımız daha iyi sonuçlar alınca kadar devam edecektir.



Şekil 5.1. SP-C'nin yapısı

5.3. Yan Zincir Korumamın Sonuçlarının Tartışılması

En kk peptit ve peptoidin kontrollü sentezi için yan grupların korunması gerekir. Genel olarak $-OH$, $-C(O)NH_2$, $-SH$, $-İndol$ azotu, $-NHC(NH)NH_2$, $-NH_2$ grupları için koruma reaksiyonları hakkında geniş bilgilerimiz ve deneyimimiz oldu. $-OH$, indol azotu, $-SH$, $-NHC(NH)NH_2$, $-NH_2$ grupları için iyi sonuçlar elde ettik. Sadece glutamin amit azotunu koruma reaksiyonu çalışmadı. Bu alışma esnasında, amin ve diğer fonksiyonlu gruplar hakkında ve bu yan zincirlerin korunması hakkında deneysel ve teorik olarak pek çok sonuç elde ettik.

5.4. Polipeptoid Hezamer Zincirlerinin sonuçlarının Tartışılması

Koruma grupları ile aminlerin sentezinden sonra, bu aminleri altılı polipeptoid zincirinde denendi. Bunun yanı sıra bazı aminoasit analoglarının korunmaya ihtiyaç olmadığı daha önce açıklanmıştı. Hepsi çok iyi çalışmasına rağmen metiyonin analogu altılı peptoid zincirinde istenen sonucu vermedi. Metiyonin analogu ailleme esnasında veya yan grup uzaklaştırması sırasında bilinmeyen yan reaksiyonlar vermiştir.

KAYNAKLAR

- Al-Arif, A., Blecher, M et al. 1969. Synthesis of fatty acyl CoA and other thiol esters using N-hydroxysuccinimide esters of fatty acids. *J. Lipid Res*, 10; 1969,344-345
- Blecher, M. 1981. Synthesis of Long-chain fatty acyl-CoA thioesters using N-hydroxysuccinimide esters. *Methods in Enzymology*, 72; 404-408.
- Bodanszky M., Vigneaud, V, et al. 1959. A method of synthesis of long peptide chains using a synthesis of oxytocin as an example. *J.Org.Chem*,81; 5688-5691.
- Clements, J.A 1957. Surface tension of lung extracts. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 95: 170-172.
- Clements, J.A.,E.S.Brown, et al. 1958. Pulmonary surface tension and the mucus lining of the lungs: Some theoretical considerations. *J. Appl. Physiol* 12: 262-268.
- Creuwels, L. A. J.M.; R. A. Demel, et al. 1993. Effect of acylation on structure and function of surfactant protein C at the air-liquid interface. *J.Biol.Chem.* 268; 26752-26758.
- Creuwels, L. A. J. M., M. G. van Golde, et al. 1997. The pulmonary surfactant system: Biochemical and clinical aspects. *Lung* 175; 1-39.
- Curstedt, T., J. Johansson, et al. 1988. Low molecular mass surfactant protein type I: The primary structure of a hydrofobic 8-kDa polypeptide with 8 half cystine residues. *Eur. J. Biochem.* 172; 521-525.
- Curstedt, T., J. Johansson et al. 1990. Hydrophobic surfactant-associated polypeptoids: SP-C is a lipopeptide with two palmitolated cysteine residues, whereas SP-B lacks covalently linked fatty acyl groups. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87; 2985-2989.

- Georke, J. and J. A. Clements 1986. Alveolar surface tension and lung surfactants. *Handbook of Physiology: The Respiratory System--Control of breathing*. Bethesda, MD, American Physiology Society. sect. 3, vol. II, part 1, chapt. 9: 247-261
- Ikegami, M.I T.R. Korfhagen, et al. 1997. Yüzey aktif Metabolism in surfactant protein A-deficient mice. *Am. J. Physiol.* 16; L479-L485
- Johansson, J., T. Curstedt et al. 1991. Srfactant protein B: Disulfide bridges, structural properties, and kringle similarities. *Biochemistry* 30; 6917-6921.
- Johansson, J., H. Jörnvall, et al. 1992. Human surfactant polypeptide SP-B disulfide bridges, C-terminal end, and peptide analysis of the airway from. *FEBS Lett.*301; 165-167
- Johansson, J., T. Curstedt, et al. 1994. The proteins of the lung surfactant system. *Eur. Respir .J.* 7; 372-391.
- Khoor, A., M. E. Gray, et al. 1993. Developmental Expression Of SP-and SP-A mRNA in The Proximal and Distal Epithelium in The Human Fetus and Newborn. *J.Histochem. Cytochem.* 41; 1311-1319
- King, R. J. and J. A. Clements 1972. Surface active materials from dog lung. II. Composition and physiological correlations. *Am. J. Physiol.* 223; 715-726
- Kirshenbaum, K., A. e. Barron, et al. 1998. Sequece-specific polypeptoids: A diverse family of heteropolymers with stable secondary structure. *Proc. Natl.Acad.Sci., U.S.A.* 95; 4303-4308.
- Kisfaludy, L., Schön, I., at al. 1975 *J.Am, Chem. Soc.* 97;5588.
- Korfhagen, T.R., m.d. Bruno, et al. 1996. Altered surfactant function and structure in SP-A gene targeted mice. *Proc. natl. Acad. Sci. USA* 93; 9594-9599

- Krapcho, A.P. and C.S. Kuell 1990. Mono-Protected diamines—N-t-butoxycarbonyl-alpha, omega-alkanediamines from alpha, omega-alkanediamines *Synthetic Communications* 20; 2559-2564.
- Lapidot, Y., Rappoport, S et al. 1967 . Use of esters of N-acylaminoacids. *J. Lipid Res*, 8;142-145.
- Lipp, M. M., K.Y.C. Lee, et al. 1996. Phase and morphology changes in lipid monolayers induced by SP-B protein and its amino-terminal peptide. *Science* 273; 1196-1199
- Lipp, M. M., K. Y. C. Lee, et al. 1997. Fluorescence, polarized fluorescence, and Brewster angle microscopy of palmitic acid and lung surfactant protein B monolayers. *Biophys. J.* 72; 2783-2804
- Lloyd-Williams, p.,f. Albericio, et al. 1997. *Chemical Approaches To The Synthesis Of Peptides And Proteins*. Boca Raton, CRC Press.
- Melacini, G.,Y., Feng, et al. 1996. Collagen-based structurescontaining the peptoidresidue *N*-Isobutylglycine(Nleu). 6. Conformational analysis ofGly-Pro-Nleu sequences by ¹H-NMR, CD,and molecular modeling. *J.Am.Chem. Soc.* 118; 10725-10732.
- Merrifield, R. B. 19630. Solid-Phase peptide synthesis. 1. Thesynthesis of a tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* 85; 2149-2154.
- Merrifield, , R. B. 1986. Solid-Phase peptide synthesis. *Science* 232: 341-347. (Synthesis and Structural Characterization of human identical Lung Surfactant SP-C Protein. Mayer-Fliggge Petra at all. *Journal of peptide science* 4; 355-363.
- Miller, S. M., R. J. Simon, et al. 1995. Comparision of the proteolytic susceptibilities of homologous L-amino acid, D-aminoacid, and N-substitued Glycine peptide and peptoid oligomers. *Drug Development Research* 35 20-32.

- Morrow M. R., S. Taneva, et al. 1993. 2 H-NMR studies of the effect of pulmonary surfactant SP-C on the 1,2-dipalmitoyl-sn-glycerol-3-phosphocholine headgroup: A model for transbilayer peptides in surfactant and biological membranes. *Biochemistry* 32: 11338-11344.
- Nag, K., J. Perez-Gill, et al. 1998. Phase transitions in films of lung surfactant at the air-water interface. *Biophys. j.* 74: 2983-2995.
- Notter, R. H. and Z Wang 1997. Pulmonary yüzey aktif: physical chemistry, physiology, and replacement. reviews in *Chemical Engineering* 13: 1-118.
- Pastrana, B., A. J. Mautone, et al. 1991. FTIR studies of secondary structure and orientation of pulmonary yüzey aktif SP-C and its effect on the dynamic surface properties of phospholipids. *Biochemistry* 30: 10058-10064.
- Pattle, R. E., 1995. Properties, function, and origin of alveolar lining layer. *Nature* 175: 1125-1126
- Pérez-Gil, J., A. Cruz, et al. 1993. "Solubility of hydrophobic surfactant proteins in organic solvents/water mixtures: Structural studies on SP-B and SP-C in aqueous organic solvents and lipids. *Biochim. Biophys. Acta* 1168: 261-270.
- Putz, G., J. Georke, et al. 1994. Comparison of captive and pulsating bubble surfactometers with use of lung surfactants. *J. Appl. Physiol.* 76: 1425-1431.
- Ramachandran, J., Li C.H. et al. 1962. Preparation of crystalline NG-Tosylarginine derivatives. *İbid*, 27: 4006-4009.
- Scholtz, J. M., S. Marqusee, et al. 1991. Determination of the enthalpy change for the alpha-helix-to-coil transition of an alanine peptide in water. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 2633-2637.
- Scholtz, J. M., S. Marqusee, et al. 1991. Calorimetric determination of the enthalpy change for the α -helix to coil transition of an alanine peptide in water. 88; 2854-2858.

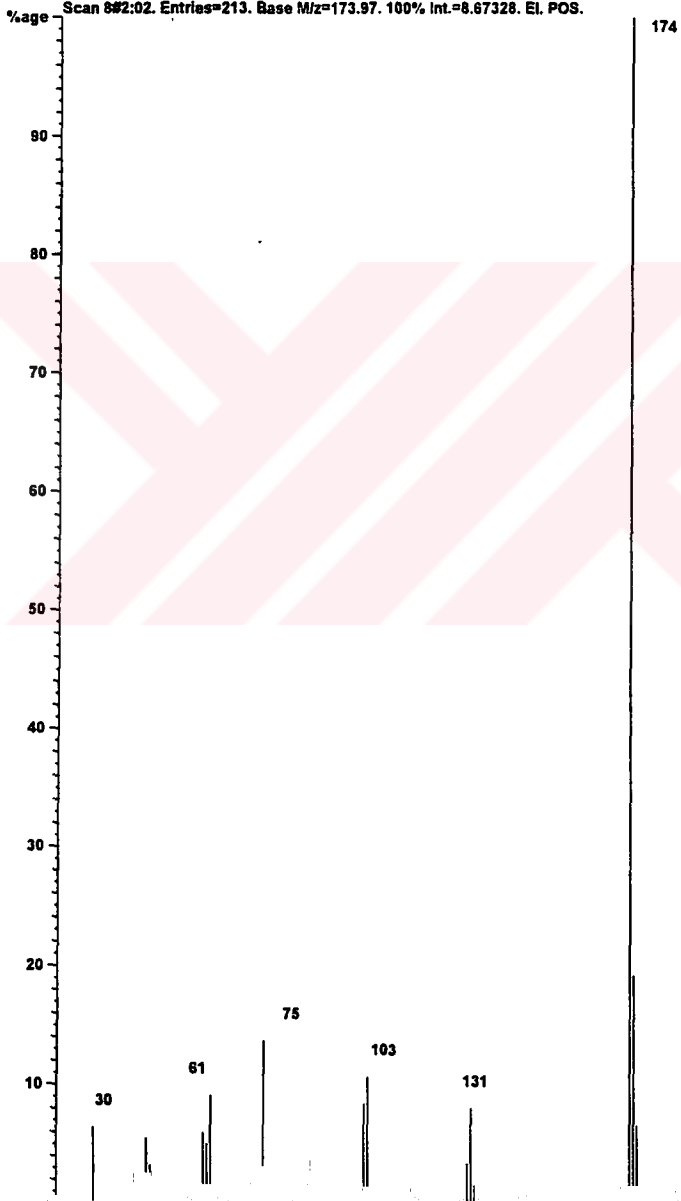
- Shiffer, K., S. Hawgood et al. 1993. Lung surfactant proteins SP-B and SP-C alter the thermodynamic properties of the phospholipid membrane: A differential calorimetry study. *Biochemistry* 32: 590-597.
- Simon, R. J., R. S. Kania, et al. 1992. Peptoids: A modular approach to drug discovery. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 9367-9371.
- Simonishi, Y., et al. (1962). C-terminal. I. Protection amide-nitrogen with xanthyl group during peptide synthesis. *J. Org. Chem.* 35:1966-1971.
- Stults, J.T., P.R. Griffin, 1991 Lung yüzey aktif protein sp-c from human, bovine, and canine sources contains palmityl thioester linkages." *Am. J. Physiol* 261, L125.
- Takei, T., Y. Hashimoto, et al 1996. The surface properties of chemically synthesized peptides analogous to human pulmonary surfactant protein SP-C. *Biol. Pharm. Bull.* 19, 1247-1253,
- Taneva, S. and K.M.W. Koegh 1994. Pulmonary surfactant proteins SP-B and SP-C in spread monolayers at the air-water interface. III. Proteins SP-B plus SP-C with Phospholipids in spread monolayers. *Biophys. J.* 66; 1158-1166.
- Van Den Bussche, G., A. Clercx, et al 1992. Structure and orientation of the surfactant-associated protein C in a lipid environment. *Eur. J. Biochem.* 203: 201-209,
- Wang, Z., S. B. Hall, et al. 1995. Dynamic surface activity of films of lung surfactant phospholipids, hydrophobic proteins, and neutral lipids. *J. Lipid Res.* 36: 1283-1293
- Wang, Z., S. B. Hall, et al. 1996. Poles of different hydrophobic constituents in the adsorption of pulmonary surfactant. *Journal of Lipid Research* 37: 790-798.
- Veber D., Milkowski J.D, et al. 1972. Acetamidomethyl. A novel thiol protecting group for cysteine. *J. Am. Chem. Soc.* 26:5456-5461.

- Williams, M.C., S. Hawgood, et al 1991. Changes in lipid structure produced by surfactant proteins SP-A, SP-B, and SP-C. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 5: 41-50.
- Zervas L., Photaki I, et al. 1962. On cysteine and cystine peptites.I. new s-protecting groups for cysteine. *J. Org. Chem*, 84:38867-3879.
- Zuckermann, R. N., j. m. Kerr, et al. 1992. Efficient method for the preparation of peptoids [oligo (N-substitued) glycines] by submonomer solid-phase synthesis. *J.Am. Chem. Soc.* 114: 10646-10647
- Zuckermann, R., N. E. J. Martin, et al. 1994. Discovery of nanomolar ligands for 7-Transmembrane G-Protein-Coupled Receptors From A Diverse N-(Substitued) Glcine Peptoid Library. *J. Med. Chem* 37: 2678-2685.

File Name : c:\maspec2\data\c121610.ms2
File Type : Lo-Res Centroid
File Source : Acquired on MASPEC II system [msw/9775]
File Title : Serine Analogue
Instrument : VG70-250SE
Notes : EI (70eV)

SCAN GRAPH. Flagging=Nom.M/z.

Scan 6#2:02. Entries=213. Base M/z=173.97. 100% Int.=8.67328. EI. POS.



ethylamine in 50/50 ACN/H2O, direct injection

ES051201 53 (0.997) Cm (48:53)

Sc

100

181.0

105.2

%

106.0

122.0

143.1

146.0

163.1

162.1

202.1

227.1

263.2

284.2

324.2

321.3

325.2

343.2

421.4

Trit-II in ACN/H₂O, direct injection
016A 26 (0.978) Cm (18.31)

243.1

Scan ES+
2.33e6

244.1

245.1

228.2

208.0

150.3

283.1

320.1

392.1

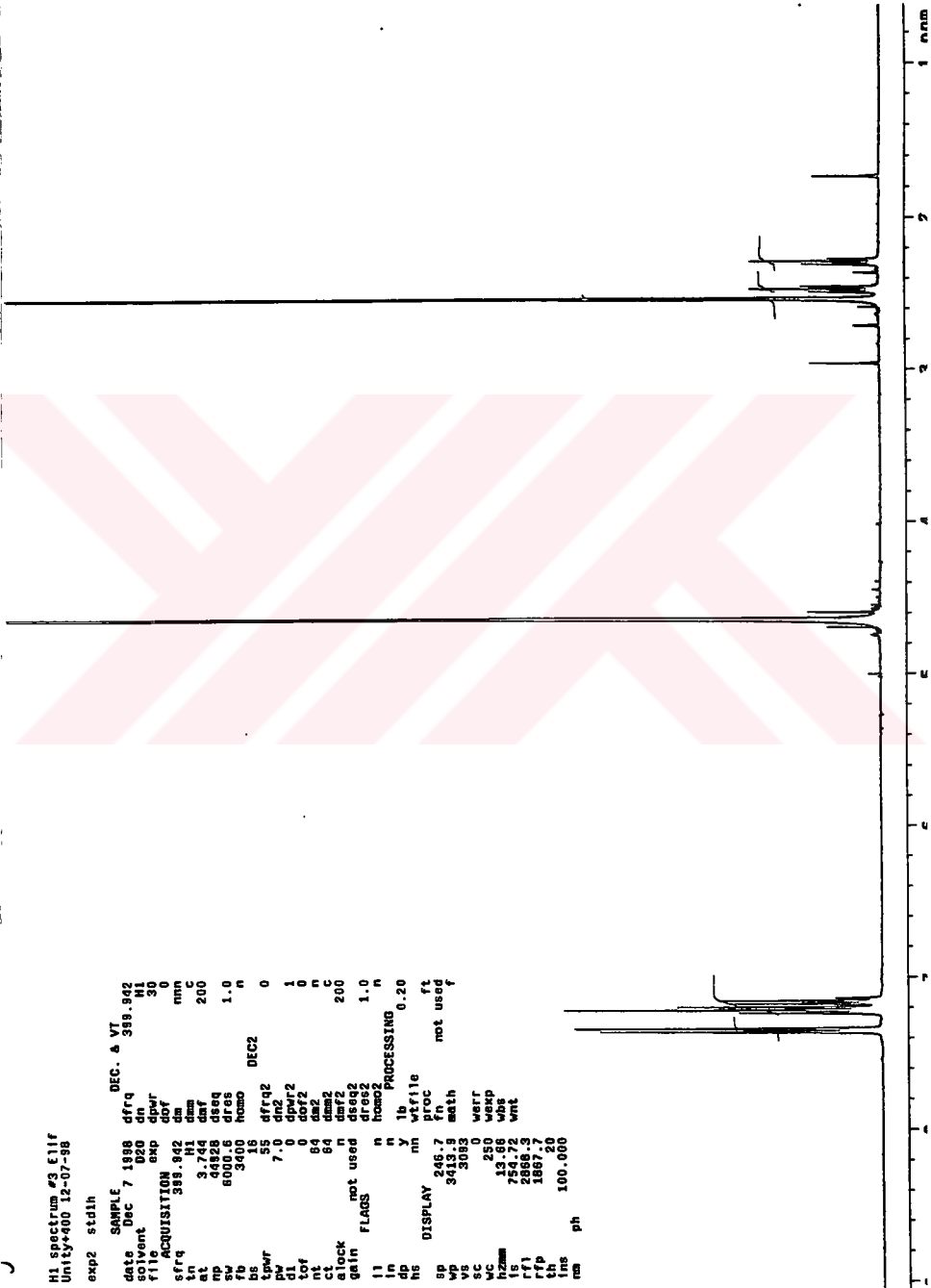
458.3

H1 spectrum #3 E11f
 Unity+400 12-07-98

exp2 std1h

```

SAMPLE          DEC. & VT
date            Dec 7 1998      dfrq 389.942
time            12:07:30        dphw 30
f1              exp            0
ACQUISITION    exp            0
sfrq           389.942         dm    min
tn             3.261           dmw   min
nt             44828           dsq   min
sp             6000.6          dres 1.0
fb             3400           homo  n
bs             55             dfrq2 0
dphw           7.0           dn2   0
d1             0             dpr2  1
tof            0             dof2  0
nt             84           dms   n
sl             0             dmf2 200
slck           not used
gain           not used
FLAGS          n             dseq2 1.0
              n             dres2
              n             homo
              n             lb
              y             PROCESsing 0.20
              y             vtrfile
hs            DISPLAY 246.7     nh     ft
              3413.5          proc   not used
              3083          math
              0             werr
              12            wexp
              754.72         wmt
              2868.3        rfi
              1867.7        rfp
              100.000       lts
              ph           cm
  
```



in ACN, direct injection
1007D 19 (0.722) Cm (6:10+19:23)-11:13

Scan ES+
1.39e5

100

165.1

132.1

209.1

206.2

166.1

200.1

226.1

210.1

133.1

155.1 157.1

171.2

184.1 193.2

211.1

227.1

247.1 250.1 256.1 267.1

313.2

345.5

%

ormyl-Tyramine in ACN , direct injection

Formula: C₁₀H₁₁N (0.05) C₁₀H₁₁N (0.1)

149.1

Scan ES+
6.13e5

172.0

M.H.AC

160.0

144.0

143.1

180.1

230.1

161.0

173.0

145.1

201.1

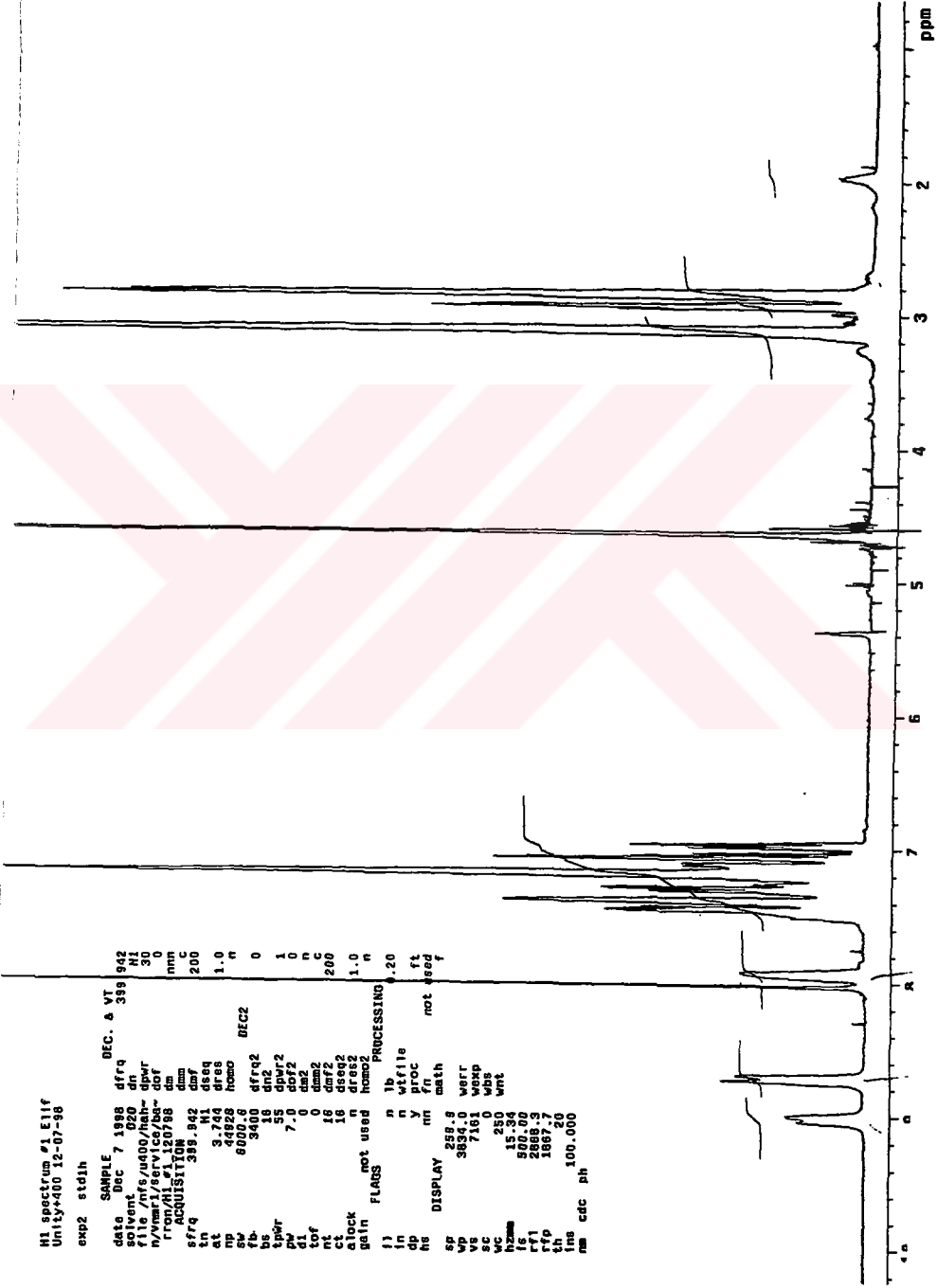
231.1

H1 spectrum #1.E11f
 Unity400 12-07-98

exp2 stdjh

```

SAMPLE      DEC. & VT  389.942
date  Dec 7 1998  dfrc
solvent  D2O  dn      H1
file  /nfs/ud00/hah-  H1
      /nfs/ud00/hah-  H1
      /com/H1#120798  dn
      ACQUISITION    dn
      389.942  dnf  200
sfreq
tn      3.71  dsag
cp      48928  dn
sp      6000.6  homo  DECC2
bs      3400  dfrc2  0
ds      18  dn2
dpr      55  dpr2  1
d1      7.0  ds2  0
nt      18  dnf2  0
ct      18  dsag2  0
gain  not used  homo2  1.0
      FLANS  n  lb  n  wfile  ft
      dn  n  y  proc  not 4092 f
      nm  nm  math
      DISPLAY 258.5  verr
      wp      3834.0  werr
      sc      7161  wexp
      wc      250  wps
      hzmax  15.34  wnt
      fs      500.00
      rfp      1889.3
      th      20
      lns 100.000
nm  cdc  dh
  
```



-Anoün ACN, direct injection
1030H 16 (0.612) Cm (16:20-33:38)

Scan ES+
3.6465

399.13

00



400.13

533.12

265.19

223.23

122.41

127.32

145.32

194.26

224.24

266.19

291.12

337.14

355.15

392.03

401.14

457.08

489.14

534.12

535.13

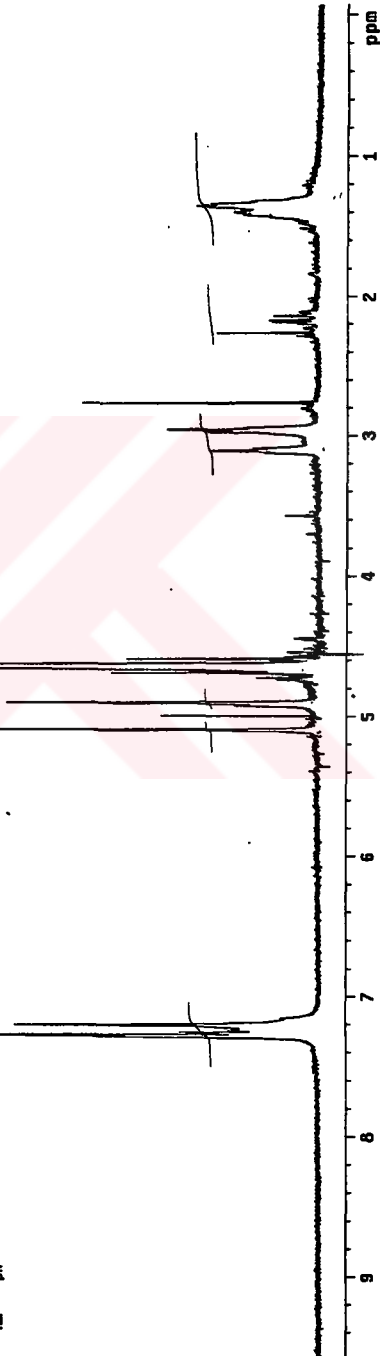
%

HL spectrum #2 511f
 Unity400 12-07-88

exp2 stdih

```

SAMPLE          DEC. & VT
date 08c 7 1988  dfrq 389.942
solvent 020  dn  n1
file 30  dpwr 30
ACQUISITION  exp 0
sfrq 389.942  dm  mmn
n1  n  dm  1
a1  3.744  dm  200
ns  44828  dseg 1.0
sw  8000.6  dres 1.0
fb  3400  homo  DEC2
ps  55  dfrq2 0
dpwr 7.0  dn2 0
d1  7.0  dpwr2 1
nt  0  dof2 0
rt  84  dm2  n
sm  6  dm2  n
clock  n  dm2  200
gain  not used  dseg2
flags  not used  dres2 1.0
l1  n  homo2  n
l2  n  y  lb  PROCESSING 0.20
hs  nt  wflia  ft
DISPLAY 28.1  fn  mat used f
wp  32264  math
sc  12264 0  warr
lc  250  wexp
hzmm  15.44  was
f1  2867.3  wnt
rff  1887.7
tms  100.000
nm  ph
  
```



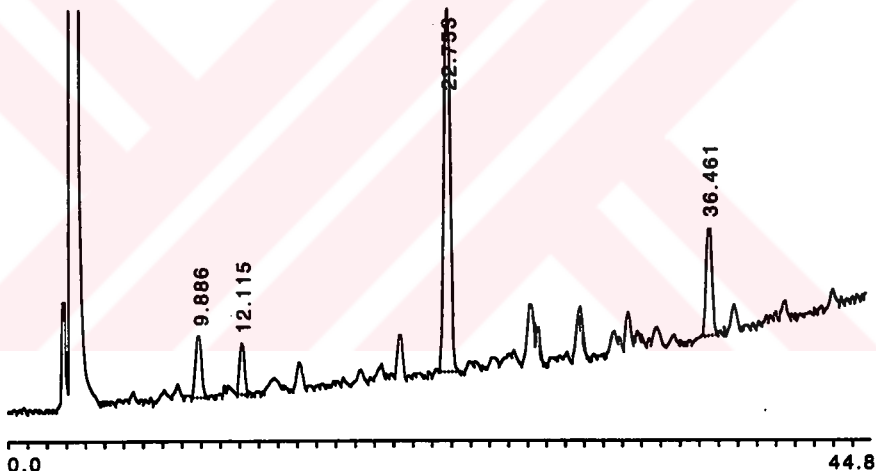
Date: Mon, Nov 9, 1998 6:13 PM

Data: cysteine test-09nov98

Sample: Vydac C4@ 60C
20 -95% ACN:H2O
cysteine test
11-9-98

Method: 20-95% Peptoid
Sampling Int: 0.1 Seconds

Data:

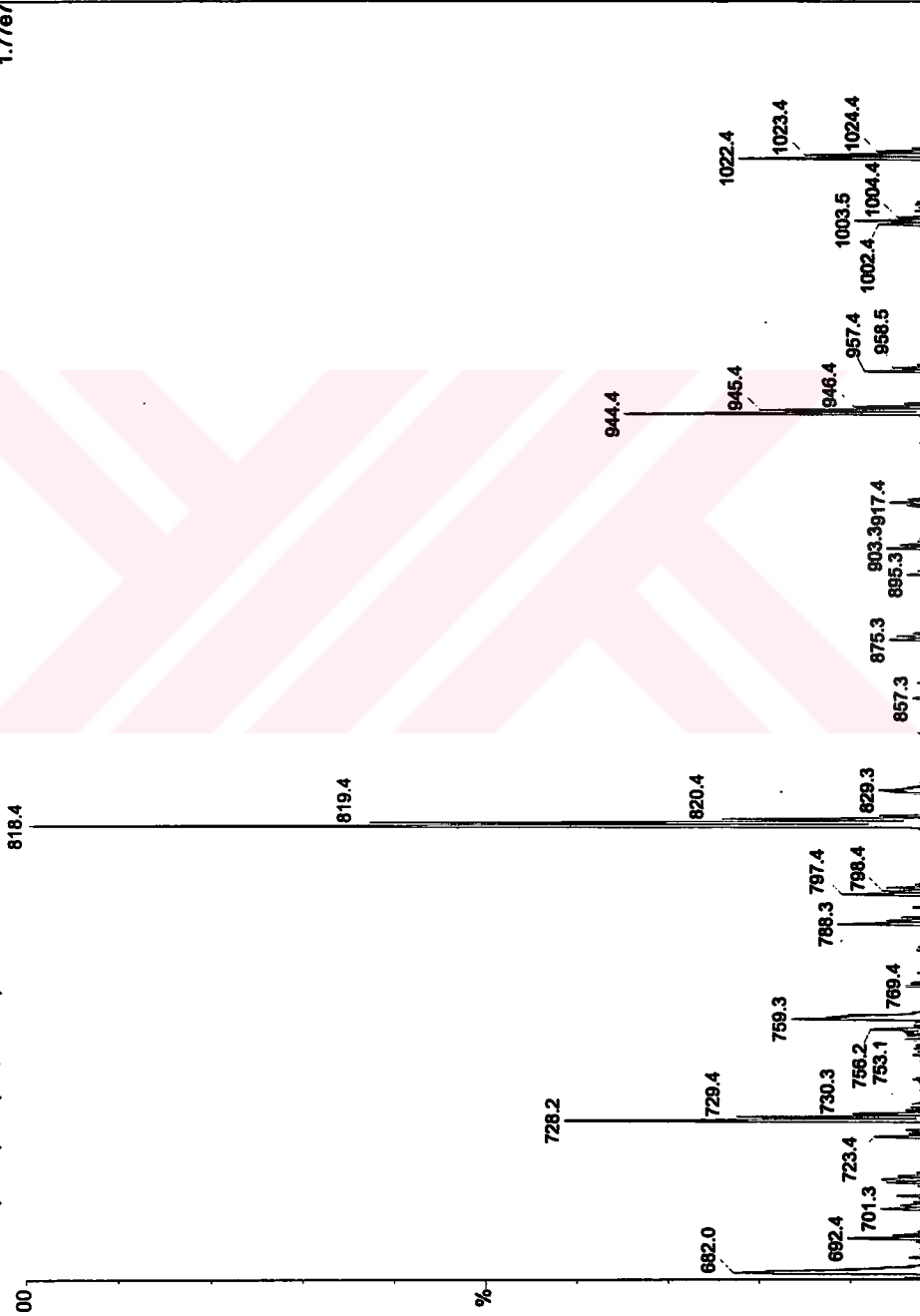


Analysis: Channel A

Peak No.	Time	Type	Height(μ V)	Area(μ V-sec)	Area%
1	9.886	N	1187	18877	9.724
2	12.115	N	993	12754	6.570
3	22.753	N	7242	125015	64.403
	27.151	N1	68	2422	1.247
	27.500	N2	263	35	0.018
	29.708	N	306	2481	1.278
4	36.461	N	2126	32529	16.757
Total Area				194113	99.997

-test in ACN/H₂O, loop injection
1124C 1 (2.360) Sm (SG, 2x0.45)

Scan ES+
1.77e7



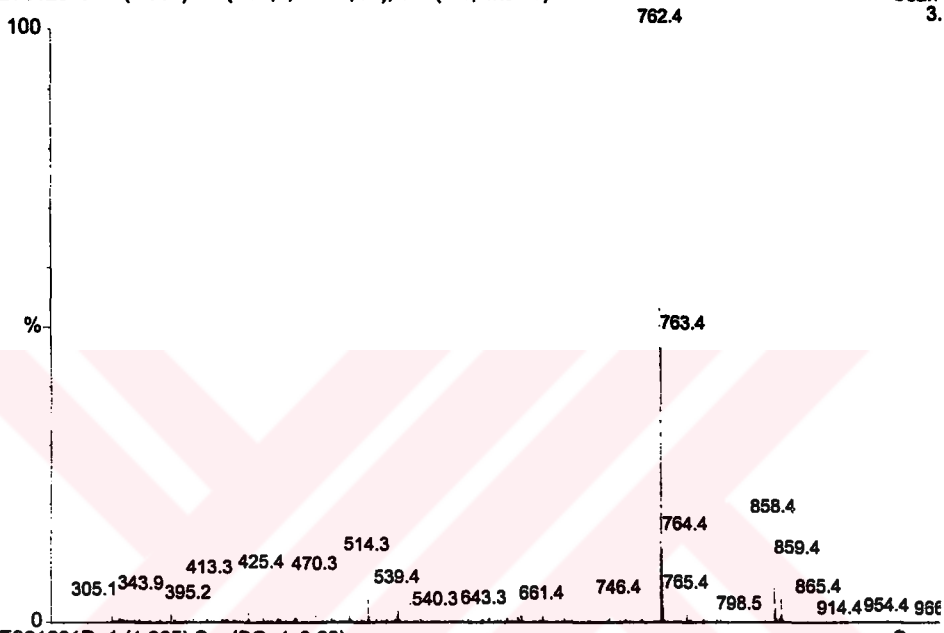
Met-ano-III In ACN/H2O direct injection
E981106D 19 (0.722) Cm (17:21-11:14)

Scan ES+
3.9965



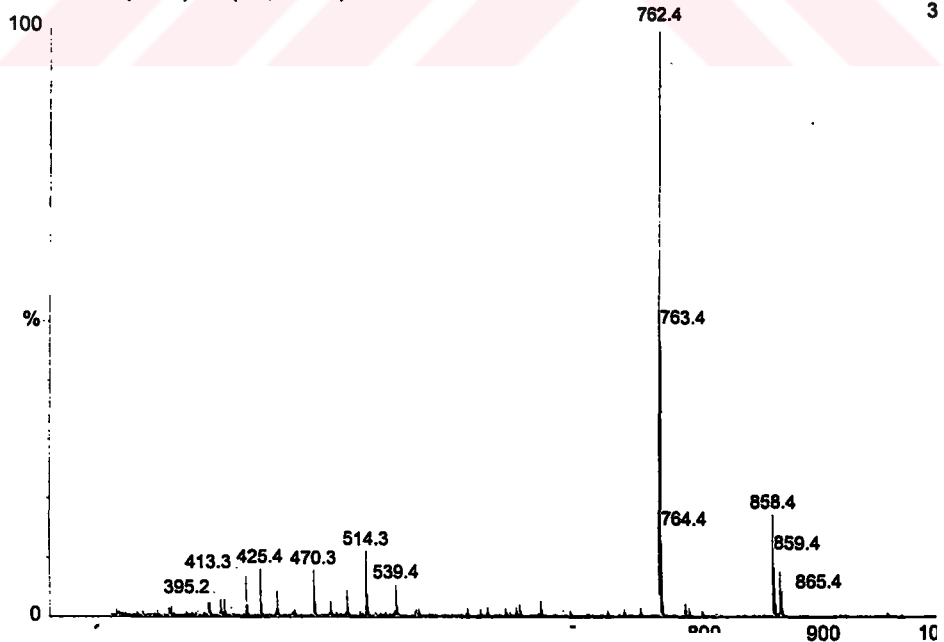
Serine-test in ACN/H2O, loop injection
E981201D 1 (1.965) Cn (Cen,2, 80.00, Ht); Sm (SG, 4x0.60)

Scan 3.



E981201D 1 (1.965) Sm (SG, 4x0.60)

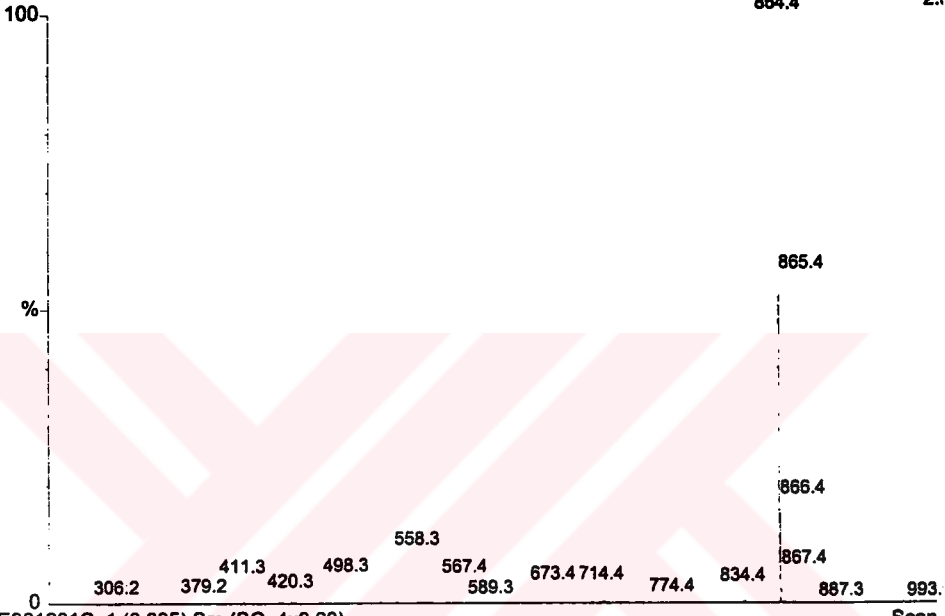
Scan 3



Glu-test in ACN/H2O, loop injection

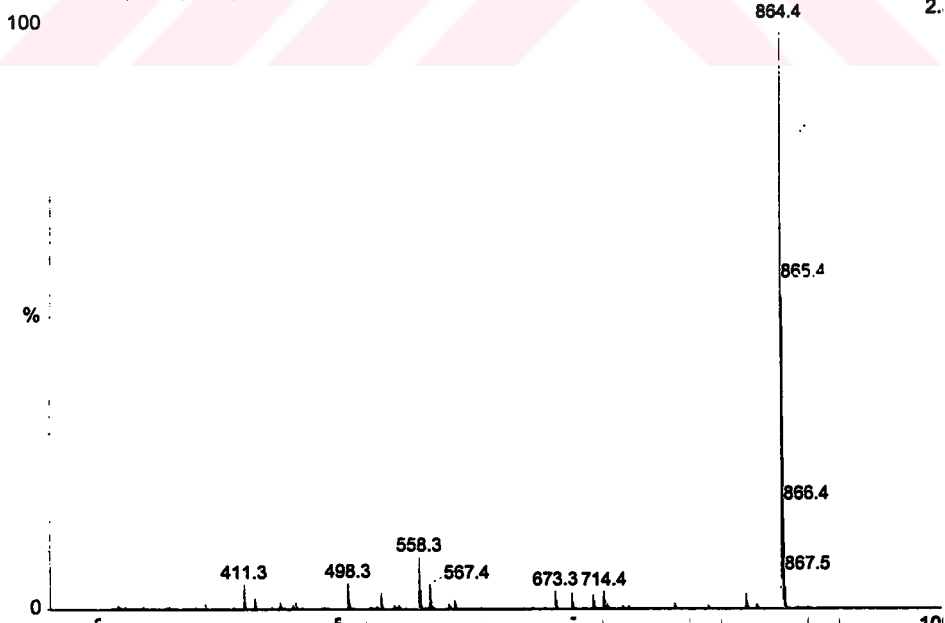
E981201C 1 (0.935) Cn (Cen,2, 80.00, Ht); Sm (SG, 4x0.60)

Scan 2.



E981201C 1 (0.935) Sm (SG, 4x0.60)

Scan 2.



s-test in ACN/H₂O, loop infection
B1124B 1 (1.661) Sm (SG, 2x0.45)

10

%

759.4

760.5

761.5

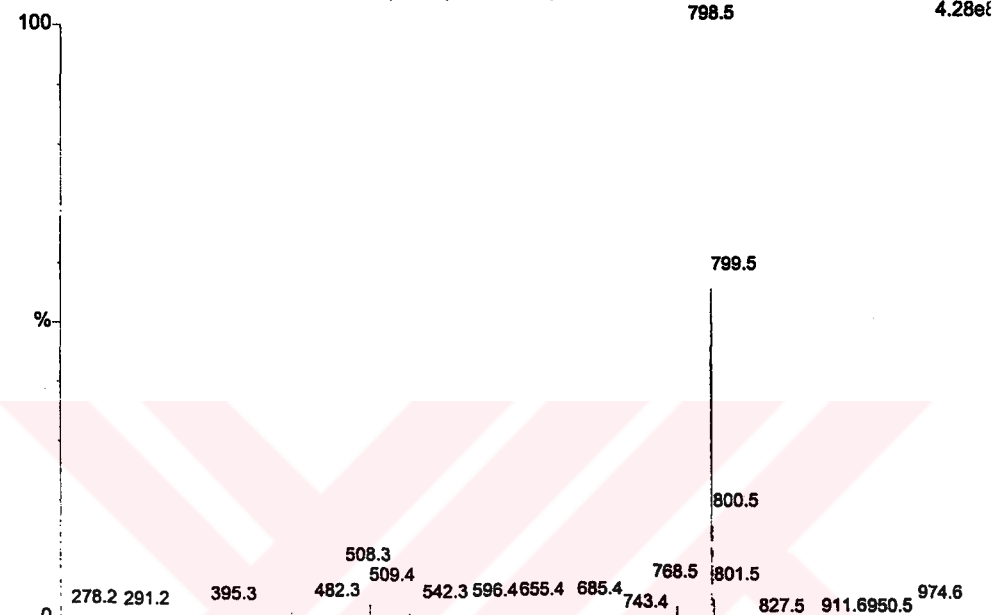
Scan ES+
2.24e7



Leu-test in ACN/H2O, loop injection

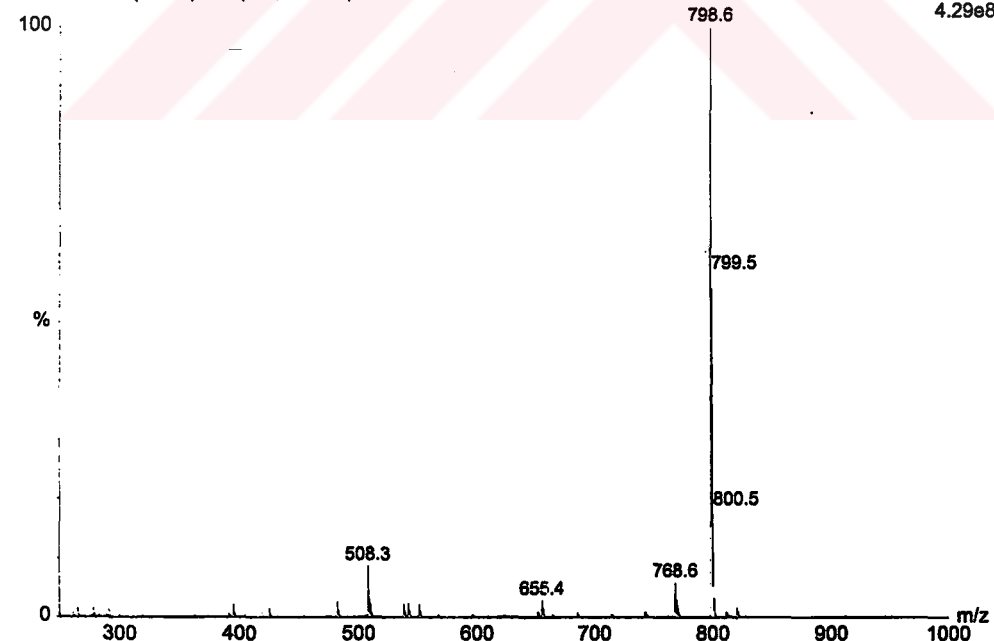
E981201A 1 (1.134) Cn (Cen,2, 80.00, Ht); Sm (SG, 4x0.60)

Scan ES+
4.28e8



E981201A 1 (1.134) Sm (SG, 4x0.60)

Scan ES+
4.29e8



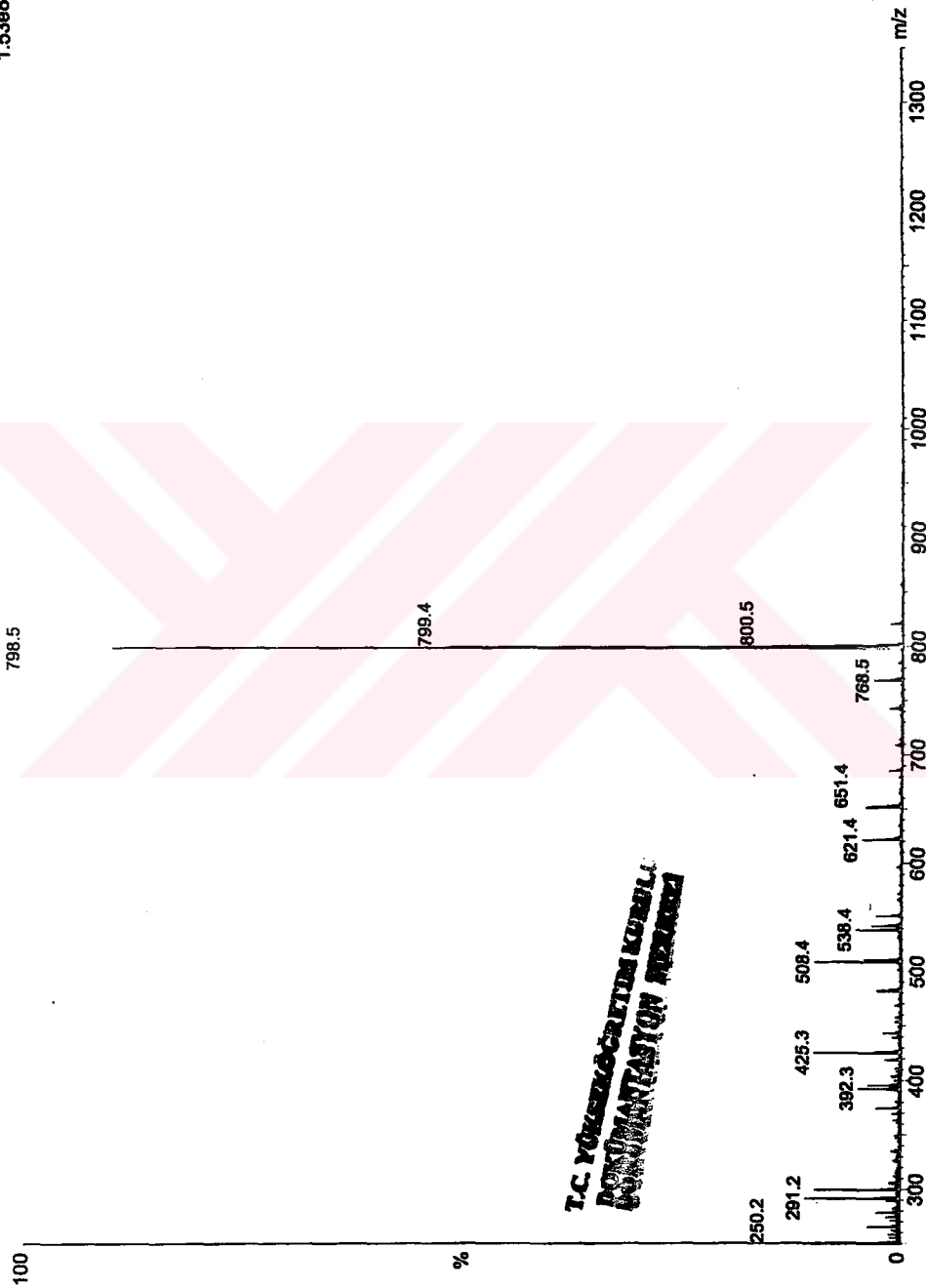


Handwritten text, possibly a signature or date, written vertically in black ink. The text is heavily obscured by a dense, irregular pattern of black ink splatters and dots, making it illegible.



6mer Ile test in ACN, loop injection
E981124F 1 (1.290) Sm (SG, 2x0.45)

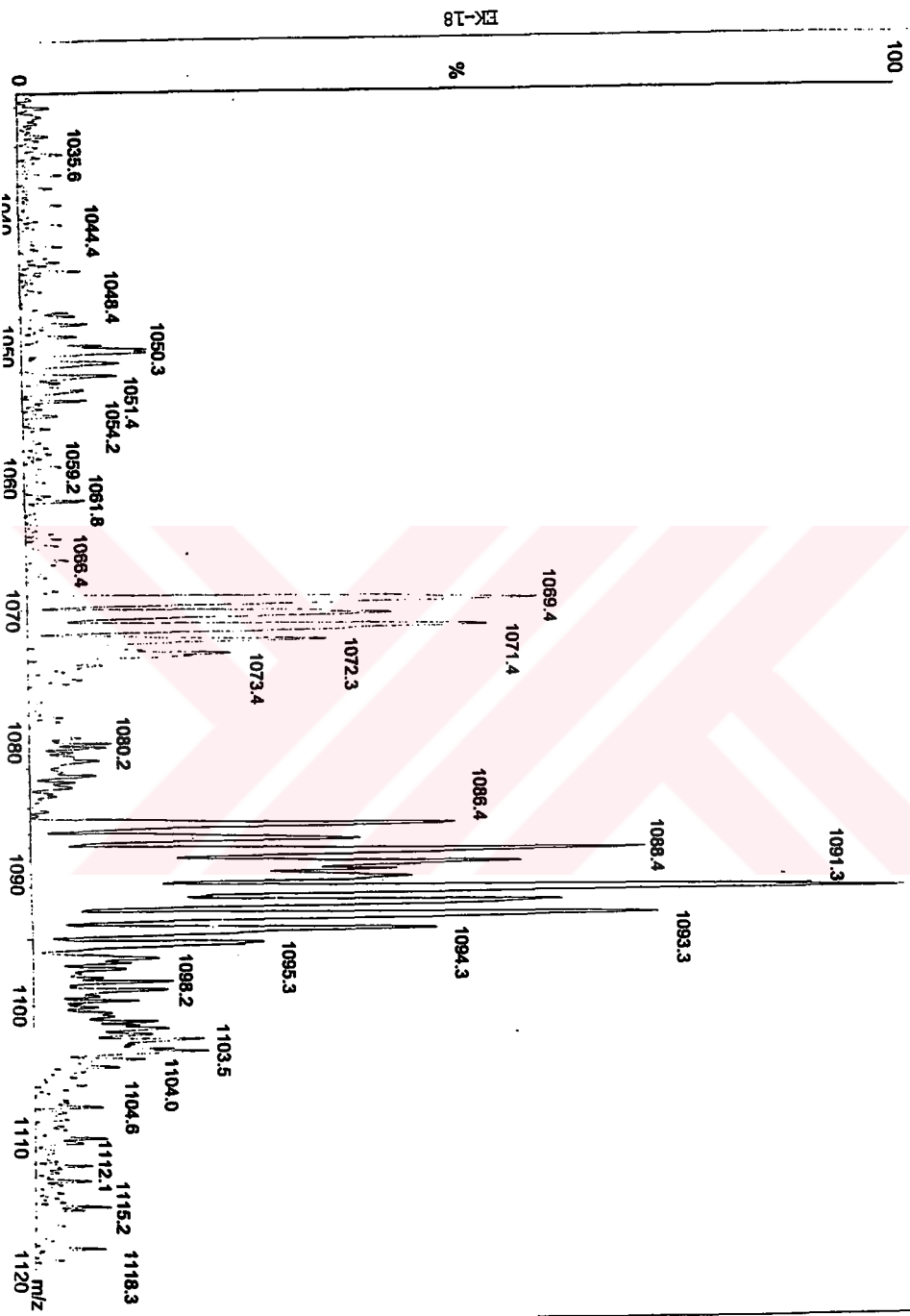
Scan ES+
1.53e8



T.C. YÖZÜMLÜ ÇERİTİM KURULU
KONUMANTASYON BİRİMİ

TRP-test in ACN/H2O, loop injection
E981124A 1 (1.589) Sm (SG, 2x0.45)

Scan ES+
1.51e6



EK-18

ÖZGEÇMİŞ

1969'da Kadiri'de doğdu. 1990'da Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümünden kimyager olarak mezun olup aynı üniversiteye Araştırma Görevlisi olarak girdi. 1993 yılında Biyokimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans öğrenimini tamamladı. Evli ve iki çocuk annesidir.