

**T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KÜÇÜK MOLEKÜL AĞIRLIKLIL SIÇAN İDRAR PROTEİNLERİNİN  
KARAKTERİZASYONU**

**Fatma Gül TANRIKULU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
KİMYA ANABİLİM DALI**

**2013**



**T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KÜÇÜK MOLEKÜL AĞIRLIKLİ SIÇAN İDRAR PROTEİNLERİNİN  
KARAKTERİZASYONU**

**Fatma Gül TANRIKULU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
KİMYA ANABİLİM DALI**

Bu tez 12/07/2013 tarihinde aşığıdaki jüri tarafından oybirliğı ile kabul edilmiştir.

Yrd. Doç. Dr. Sevil AKSU (Danışman)

Yrd. Doç. Dr. Mehmet Akif KILIÇ

Yrd. Doç. Dr. Aslıhan GÜNEL



## ÖZET

### KÜÇÜK MOLEKÜL AĞIRLIKLİ SIÇAN İDRAR PROTEİNLERİNİN KARAKTERİZASYONU

Fatma Gül TANRIKULU

**Yüksek Lisans Tezi, Kimya Anabilim Dalı**  
**Danışman: Yrd. Doç. Dr. Sevil AKSU**  
**Temmuz 2013, 100 sayfa**

Bu çalışma, Wistar tipi erkek sıçanın idrarında bulunan düşük molekül ağırlıklı proteinlerin ve bunların izoformlarının araştırılması amacıyla yapılmıştır. Deneyler için 2 adet sağlıklı erkek Wistar sıçanı kullanılmıştır. Sıçan idrarlarında bulunan proteinler iki boyutlu jel elektroforezi yöntemiyle birbirlerinden ayrılarak saflaştırılmıştır. İdrar örneklerinde bulunan düşük molekül ağırlıklı proteinlerden iki boyutlu jellerde görünür hale getirilebilen 29 adet spot tanımlanmıştır. Bunların tanımlanması için MALDI-TOF-kütle spektrometri yöntemi kullanılmıştır. Kütle ölçümleriyle her bir spot için peptit kütle parmak izi (PMF) spektrumları elde edilmiştir. Spektrumlardan yararlanarak bir protein veri tabanı olan MASCOT'ta taramalar sonucunda, spotlarda bulunan proteinler tanımlanmıştır. 19 spot  $\alpha$ 2u-globulin, diğer 10 spot çeşitli proteinler ile eşleşerek sonuç vermiştir.

Proteinlerin büyük bir çoğunluğu  $\alpha$ 2u-globulin proteini ile eşleştiğinden dolayı, bunların sahip olabilecekleri sekans dizileri araştırılmıştır. Bu araştırma için NCBI (National Center for Biotechnology Information) veri tabanı kullanılmıştır. Bu veri tabanında,  $\alpha$ 2u-globulin proteini için verilmiş olan ve aminoasit farklılıkları bulunan 15 adet kayıtlın sekans dizilerine göre, spotların hangi sekansla eşleştiği araştırılarak tespit edilmeye çalışılmıştır. Spektrumlarda tespit edilen peptid piklerine göre farklı sekanslar arasından her bir spotun olası protein izoformları için ayırım yapılabilmektedir. Birçok spotun PMF sonuçları ile seçilmiş peptidleri alınan MS-MS sonuçları ile de desteklenmiştir.

**ANAHTAR KELİMELER:**  $\alpha$ 2u-globulin, iki boyutlu jel elektroforezi, ana idrar proteini (MUP), kütle spektrometrisi.

**JÜRİ:** Yrd. Doç. Dr. Sevil AKSU (Danışman)  
Yrd. Doç. Dr. Mehmet Akif KILIÇ  
Yrd. Doç. Dr. Aslıhan GÜNEL

## ABSTRACT

### CHARACTERIZATION OF SMALL MOLECULAR WEIGHT RAT URINE PROTEINS

**Fatma Gül TANRIKULU**

**MSc Thesis in Chemistry**

**Supervisor: Asst. Prof. Dr. Sevil AKSU**

**July 2013, 100 pages**

In this study was made to investigate small molecular weight proteins and their isoforms were investigated in male Wistar rat urine. Two healthy Wistar rats were used for the experiments. Proteins found in the urine of rats were separated and purified with the two-dimensional gel electrophoresis technique. Out of the small molecular weighted proteins found in the urine samples twenty nine of the spots visualised on two dimensional gels were identified. For identification of them MALDI-TOF mass spectrometry was used. Measuring masses we will get peptide mass fingerprint spectra for each spot. Proteins found in the spots were identified using the data reached from the spectra by searching in the protein database MASCOT. 19 spots matched with  $\alpha$ 2u-globulin and the other 10 spots matched with various other proteins.

Because most of the proteins matched with  $\alpha$ 2u-globulin, it was examined in which sequence they are. For this examination the NCBI (National Center for Biotechnology Information) database was used. It was tried to determine the sequences matching with the proteins found in the spots according to the 15 recorded sequences for the  $\alpha$ 2u-globulin protein with aminoacid differences. According to the detected peptide peaks in the spectra, for each spot separation of possible protein izoforms within different sequences could be done. For a lot of spots the PMF results were supported with the MS/MS results taken for selected peptides.

**KEYWORDS:**  $\alpha$ 2u-globulin, two-dimensional gel electrophoresis, major urinary protein (MUP), mass spectrometry

**COMMITTEE:** Asst. Prof. Dr. Sevil AKSU (Supervisor)  
Asst. Prof. Dr. Mehmet Akif KILIÇ  
Asst. Prof. Dr. Aslıhan GÜNEL

## ÖNSÖZ

Günümüzde proteomik çalışmaları, birçok alanda oldukça yaygınlaşmıştır. Proteomik, çoklu protein sistemlerinin karşılıklı etkileşimlerini veya geniş sistemin bir parçası olarak yer alan farklı proteinleri incelediğinden dolayı analizler doğrudan kompleks karışımlar üzerinden yapılır. Proteomik teknolojileri proteinlerin global profillerini anlamamıza ve protein modifikasyonlarını açıklamamıza imkan sağlamaktadır. Böylelikle yeni biyo-belirteçlerinin ve ilaç tedavilerinin belirlenmesinde yeni yaklaşımların geliştirilmesine de olanak sağlamaktadır.

İnsan idrarında, günlük atılması gerek protein miktarı ve türleri tanımlanmıştır. Eğer bu özelliklerde bir farklılık oluşursa bu durum çeşitli rahatsızlara işaret eder. Bunun yanı sıra hayvanların idrarında protein miktarının artması doğal bir durumdur. Sıçan idrarında en yoğun bulunan  $\alpha 2u$  globulinin, feromonal iletişimin başlıca kaynağı olduğu öne sürülmüştür. Düşük molekül kütleli proteinlerdeki feromonal moleküllerinin birikmesi, feromon iletişimde önemli bir yeri vardır. Bu iletişim aynı cins olan hayvanlardaki liderlik, konum belirleme, alan hakimiyeti gibi durumlarının anlaşılmasına da yardımcı olmaktadır. Bu çalışmada  $\alpha 2u$ -globulinin izoform çeşitliliğinin yanı sıra, incelenen bölgedeki diğer proteinlerinin de tanımlanması çalışılmıştır.

Bana tez çalışmam sırasında yardımcı olan, yol gösteren ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Sevil AKSU'ya (Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi), hiçbir zaman yardımlarını benden esirgemeyen Sayın Yrd. Doç. Dr. Mehmet Akif KILIÇ'a (Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi), deneylerimde kullandığım örnekleri sağlayan Sayın Doç. Dr. Fridevs MOR'a (Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi), kütle çalışmalarında yardımcı olan Sayın Prof. Dr. Talat YALÇIN ve çalışma ekibine (İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Fen Fakültesi), kütle çalışmalarımı bizzat ilgilenen Sayın Uzman Dr. Filiz YEŞİLIRMAK'a (İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Fen Fakültesi), maddi ve manevi desteklerini benden hiçbir zaman esirgemeyen babam Sayın Ali TANRIKULU ve annem Sayın Nurten TANRIKULU'na, tez yazma çalışmalarında bana yardımcı olan kardeşim Sayın Serap TANRIKULU'na, her zaman yanımda olan ve manevi desteklerini eksik etmeyen Sayın Yrd. Doç. Dr. Sevilay CENGİZ'e, bölüm hocalarıma ve bölüm arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Genomik ve Proteomik.....	1
1.1.1. Tanımları.....	1
1.1.2. Tarihsel Gelişimleri.....	2
1.2. Proteomik Çalışmalar.....	3
1.2.1. Önemi ve amacı.....	3
1.2.2. Proteomiğin uygulama alanları.....	3
1.2.3. Proteomik yönteminin sınırları.....	3
1.2.4. Proteomik çalışmalarında kullanılan yöntemler.....	3
1.2.4.1. Kromatografi.....	4
1.2.4.2. Elektroforez.....	6
1.2.4.3. İki boyutlu jel elektroforezi.....	8
1.2.4.4. Kütle spektrometrisi (MS).....	13
1.3. İdrar Proteomiği.....	16
1.3.1. İdrar oluşumu ve önemi.....	16
1.3.2. $\alpha$ 2u-globulin protein ailesi.....	17
1.4. Çalışmanın amacı.....	19
2. MATERYAL ve METOT.....	20
2.1. Materyal.....	20
2.1.1. İdrar örnekleri.....	20
2.1.2. Kimyasallar.....	20
2.2. Metot.....	21
2.2.1. İdrarların toplanması.....	21
2.2.2. Elektroforez işlemleri.....	22
2.2.2.1. Örneklerin hazırlanması.....	22
2.2.2.1.1. İki boyutlu jel elektroforezi için örnek hazırlama.....	22
2.2.2.2. Protein miktar tayini.....	22
2.2.2.3. Tek boyutlu jel elektroforezi.....	22
2.2.2.3.1. % 15'lik SDS-PAGE jeli.....	23
2.2.2.4. İki boyutlu jel elektroforezi.....	23
2.2.2.4.1. Birinci boyut-izoelektrik fokuslama.....	23
2.2.2.4.2. İkinci boyut-SDS-PAGE.....	25
2.2.3. Jel boyama işlemleri.....	26
2.2.3.1. Gümüş boyama.....	26
2.2.3.2. Coomassie Brilliant Blue boyama.....	27
2.2.4. Kütle ölçümleri.....	27
2.2.4.1. Spotların kesilmesi ve jellerdeki boyanın uzaklaştırılması.....	28
2.2.4.2. İndirgeme, alkilleme ve tripsin ile proteinlerin kesilmesi.....	28



2.2.4.3. Analiz için peptidlerin ekstraksiyonu .....	29
2.2.4.4. Zip-Tip işlemi .....	29
2.2.4.5. Matriksin Hazırlanması.....	30
3. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	32
3.1. İki Boyutlu Jel Elektroforezi Çalışmaları.....	33
3.1.1. 1 nolu idrar örneğinin 2D jellerin eldesi .....	33
3.1.2. 2 nolu idrar örneğinin 2D jellerin eldesi .....	35
3.2. Kütle Analizleri .....	35
3.2.1. Spot 1.....	36
3.2.2. Spot 4.....	38
3.2.3. Spot 6.....	40
3.2.4. Spot 7.....	42
3.2.5. Spot 11.....	43
3.2.6. Spot 12.....	45
3.2.7. Spot 16.....	46
3.2.8. Spot 19.....	47
3.2.9. Spot 24.....	48
3.2.10. Spot 25.....	49
3.2.11. Spot 26.....	50
3.2.12. Spot 28.....	51
3.2.13. Spot 29.....	52
3.2.14. Spot 30.....	54
3.2.15. Spot 33.....	55
3.2.16. Spot 34.....	56
3.2.17. Spot 35.....	57
3.2.18. Spot 36.....	58
3.2.19. Spot 37.....	59
3.2.20. Spot 18.....	61
3.2.21. Spot 20.....	62
3.2.22. Spot 23.....	63
3.2.23. Spot 38.....	64
3.2.24. Spot 59.....	65
3.2.25. Spot 60.....	66
3.2.26. Spot 70.....	67
3.2.27. Spot 74.....	68
3.2.28. Spot 75.....	69
3.2.29. Spot 76.....	70
3.2.30. $\alpha$ 2u-globulin protein sekanslarının özellikleri.....	72
3.2.31. MS-MS Sonuçları.....	77
3.2.31.1. Spot 31: 777 peptidi .....	78
3.2.31.2. Spot 31: 931 peptidi .....	80
3.2.31.3. Spot 31: 1056 peptidi .....	82
3.2.31.4. Spot 31: 2395 peptidi .....	84
3.2.31.5. Spot 10: 931 peptidi .....	86
3.2.31.6. Spot 10: 1026 peptidi .....	88
4. SONUÇ .....	91
5. KAYNAKLAR .....	93
ÖZGEÇMİŞ	

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

### Simgeler

$\alpha$	Alfa
°C	Derece santigrat
L	Litre
mg	Miligram
mL	Mililitre
M	Molarite

### Kısaltmalar

aa	Aminoasit
APS	Amonyum persülfat
CBB	Coomassie Brilliant Blue G-250
DTT	Ditiyotreitol
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
2-DE	2 Boyutlu Elektroforez
2D	2 Boyutlu
PAGE	Poliakrilamid Jel Elektroforezi
pI	İzoelektrik Nokta
PMF	Peptid Kütle Parmakizi
MS	Kütle Spektrometrisi
MS	Kütle Spektrometresi
MUP	Ana İdrar Proteini
MW	Molekül kütlesi
SDS	Sodyumdodesil Sülfat

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Proteomik çalışmalarında kullanılan genel çalışma akışının şeması.....	4
Şekil 1.2. Kromatografi'nin sınıflandırılması.....	5
Şekil 1.3. Poliakrilamid jelinin sentezi.....	11
Şekil 1.4. Cam sandviç ve SDS-PAGE jelinin hazırlanma aparatları.....	12
Şekil 1.5. Bir kütle spektrometresinin şematik gösterimi.....	14
Şekil 1.6. MALDI'nin şematik gösterimi.....	15
Şekil 1.7. Peptidlerin parçalanma şekilleri.....	16
Şekil 1.8. $\alpha$ 2u-globulin proteininin tersiyer yapısı.....	18
Şekil 2.1. İzoelektrik fokuslama düzeneği.....	24
Şekil 2.2. SDS-PAGE düzeneği.....	26
Şekil 2.3. MALDI-TOF/MS'de kullanılan target.....	30
Şekil 3.1. Protein miktar tayini için kalibrasyon grafiği.....	32
Şekil 3.2. 1 nolu sıçan idrarının gümüş boyalı 2D jel resmi (138 $\mu$ g).....	33
Şekil 3.3. 1 nolu sıçan idrarının gümüş boyalı 2D jel resmi (194 $\mu$ g) .....	34
Şekil 3.4. 1 nolu sıçan idrarının CBB boyalı 2D jel resmi .....	34
Şekil 3.5. 2 nolu sıçan idrarının gümüş boyalı 2D jel resmi .....	35
Şekil 3.6. 2 nolu sıçan idrarının CBB boyalı 2D jel resmi .....	35
Şekil 3.7. 1 no'lu spotun PMF spektrumu.....	36
Şekil 3.8. 1 no'lu spotun PMF spektrumunun bir bölgesi.....	37
Şekil 3.9. 1 no'lu spotun eşleşen dizisi.....	38
Şekil 3.10. 4 no'lu spotun PMF spektrumu.....	38
Şekil 3.11. 4 no'lu spotun eşleşen dizisi.....	39
Şekil 3.12. 6 no'lu spotun PMF spektrumu.....	40

Şekil 3.13. 6 no'lu spotun PMF spektrumlarının bazı bölgeleri.....	41
Şekil 3.14. 6 no'lu spotun eşleşen dizisi.....	42
Şekil 3.15. 7 no'lu spotun PMF spektrumu.....	42
Şekil 3.16. 7 no'lu spotun eşleşen dizisi.....	43
Şekil 3.17. 11 no'lu spotun PMF spektrumu.....	43
Şekil 3.18. 11 no'lu spotun eşleşen dizisi.....	44
Şekil 3.19. 12 no'lu spotun PMF spektrumu.....	45
Şekil 3.20. 12 no'lu spotun eşleşen dizisi.....	45
Şekil 3.21. 16 no'lu spotun PMF spektrumu.....	46
Şekil 3.22. 16 no'lu spotun eşleşen dizisi.....	46
Şekil 3.23. 19 no'lu spotun PMF spektrumu.....	47
Şekil 3.24. 19 no'lu spotun eşleşen dizisi.....	47
Şekil 3.25. 24 no'lu spotun PMF spektrumu.....	48
Şekil 3.26. 24 no'lu spotun eşleşen dizisi.....	49
Şekil 3.27. 25 no'lu spotun PMF spektrumu.....	49
Şekil 3.28. 25 no'lu spotun eşleşen dizisi.....	50
Şekil 3.29. 26 no'lu spotun PMF spektrumu.....	50
Şekil 3.30. 26 no'lu spotun eşleşen dizisi.....	51
Şekil 3.31. 28 no'lu spotun PMF spektrumu.....	51
Şekil 3.32. 28 no'lu spotun eşleşen dizisi.....	52
Şekil 3.33. 29 no'lu spotun PMF spektrumu.....	52
Şekil 3.34. 29 no'lu spotun eşleşen dizisi.....	53
Şekil 3.35. 30 no'lu spotun PMF spektrumu.....	54
Şekil 3.36. 30 no'lu spotun eşleşen dizisi.....	54

Şekil 3.37. 33 no'lu spotun PMF spektrumu.....	55
Şekil 3.38. 33 no'lu spotun eşleşen dizisi.....	55
Şekil 3.39. 34 no'lu spotun PMF spektrumu.....	56
Şekil 3.40. 34 no'lu spotun eşleşen dizisi.....	56
Şekil 3.41. 35 no'lu spotun PMF spektrumu.....	57
Şekil 3.42. 35 no'lu spotun eşleşen dizisi.....	57
Şekil 3.43. 36 no'lu spotun PMF spektrumu.....	58
Şekil 3.44. 36 no'lu spotun eşleşen dizisi.....	58
Şekil 3.45. 37 no'lu spotun PMF spektrumu.....	59
Şekil 3.46. 37 no'lu spotun eşleşen dizisi.....	59
Şekil 3.47. $\alpha$ 2u-globulin olarak tanımlanmış spotların jeldeki konumları.....	60
Şekil 3.48. 18 no'lu spotun PMF spektrumu.....	61
Şekil 3.49. 18 no'lu spotun eşleşen dizisi.....	62
Şekil 3.50. 20 no'lu spotun PMF spektrumu.....	62
Şekil 3.51. 20 no'lu spotun eşleşen dizisi.....	63
Şekil 3.52. 23 no'lu spotun PMF spektrumu.....	63
Şekil 3.53. 23 no'lu spotun eşleşen dizisi.....	64
Şekil 3.54. 38 no'lu spotun PMF spektrumu.....	64
Şekil 3.55. 38 no'lu spotun eşleşen dizisi.....	65
Şekil 3.56. 59 no'lu spotun PMF spektrumu.....	65
Şekil 3.57. 59 no'lu spotun eşleşen dizisi.....	66
Şekil 3.58. 60 no'lu spotun PMF spektrumu.....	66
Şekil 3.59. 60 no'lu spotun eşleşen dizisi.....	67
Şekil 3.60. 70 no'lu spotun PMF spektrumu.....	67

Şekil 3.61. 70 no'lu spotun eşleşen dizisi.....	68
Şekil 3.62. 74 no'lu spotun PMF spektrumu.....	68
Şekil 3.63. 74 no'lu spotun eşleşen dizisi.....	69
Şekil 3.64. 75 no'lu spotun PMF spektrumu.....	69
Şekil 3.65. 75 no'lu spotun eşleşen dizisi.....	70
Şekil 3.66. 76 no'lu spotun PMF spektrumu.....	70
Şekil 3.67. 76 no'lu spotun eşleşen dizisi.....	71
Şekil 3.68. Spot 31'in 777 peptidinin MS-MS spektrumu.....	78
Şekil 3.69. Spot 31'in 777 peptidinin MS-MS MASCOT tarama sonucu.....	79
Şekil 3.70. Spot 31'in 931 peptidinin MS-MS spektrumu.....	80
Şekil 3.71. Spot 31'in 931 peptidinin MS-MS MASCOT tarama sonucu.....	81
Şekil 3.72. Spot 31'in 1056 peptidinin MS-MS spektrumu.....	82
Şekil 3.73. Spot 31'in 1056 peptidinin MS-MS MASCOT tarama sonucu.....	83
Şekil 3.74. Spot 31'in 2395 peptidinin MS-MS spektrumu.....	84
Şekil 3.75. Spot 31'in 2395 peptidinin MS-MS MASCOT tarama sonucu.....	85
Şekil 3.76. Spot 10'un 931 peptidinin MS-MS spektrumu.....	86
Şekil 3.77. Spot 10'un 931 peptidinin MS-MS MASCOT tarama sonucu.....	87
Şekil 3.78. Spot 10'un 1026 peptidinin MS-MS spektrumu.....	88
Şekil 3.79. Spot 10'un 1026 peptidinin MS-MS MASCOT tarama sonucu.....	89

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Poliakrilamid sentezi için kullanılan kimyasal maddeler.....	10
Çizelge 2.1. %15'lik SDS-PAGE jelin bileşimi.....	23
Çizelge 2.2. Küçük kapiler için IEF yürütme koşulları.....	25
Çizelge 2.3. Büyük kapiler için IEF yürütme koşulları.....	25
Çizelge 2.4. İkinci boyut için yürütme koşulları.....	26
Çizelge 3.1. İdrar örneklerinin kalibrasyon eğrisi için elde edilen veriler.....	32
Çizelge 3.2. $\alpha$ 2u-globulin proteini olarak tanımlanan spotların spektrumlarındaki ortak kütleler.....	60
Çizelge 3.3. Çalışılmış olan 29 spot için eşleşen protein sonuçları.....	72
Çizelge 3.4. Spotların tanımlama sonuçları; dizi uyumu (sequence coverage), referans sekans numaraları, sekansların aminoasit sayıları, teorik MW ve pI değerleri.....	72
Çizelge 3.5. Spotların teorik $\alpha$ 2u-globulin protein dizilerine göre eşleştirilmesi.....	74





# 1. GİRİŞ

## 1.1. Genomik, Proteomik

### 1.1.1. Tanımları

Genom ifadesi ilk kez 1920 yılında Hans Winkler tarafından bir hücrenin veya organizmanın gen bütünlüğü anlamında kullanılmaya başlanmıştır. Genom, DNA'nın taşıdığı tüm genetik bilgiyi ifade eder. Genom ilk kez, günümüzde de hala yaygın olarak kullanılan, DNA dizi incelenmesi yöntemini geliştiren Frederick Sanger tarafından 1977 yılında saptanmaya başlanmıştır (Sanger vd 1977). 1986 yılında fare genetiği üzerine çalışan Thomas Roderick genomun dizilenmesi, karakterizasyonunu ve haritalanmasını yapabilmek için genom ifadesini önermiştir (Kuska 1998). Genom, bir canlının sahip olduğu bütün yapısal ve işlevsel fonksiyonları kodlayan genlerini kapsar. Fakat genomik çalışmaları, bir organizmanın genlerinin hangi oranda kullanıldığı hakkında bilgi vermez. Ayrıca, bir gen, birçok biyolojik işleve sahip farklı proteinler kodlamakta ve bu proteinler sentez sonrası değişimlere uğramaktadır. Gen ürünlerinin sentez sonrası değişimleri, hücrede buldukları yerler ve göreceli miktarlarının anlaşılması için genomik sonrası bilgilere ihtiyaç vardır. Yapılan bu genomik çalışmaları proteomik çalışmalar izlemiştir. Fakat proteom genomdan daha karmaşıktır. Organizmanın genomu yaşamı boyunca bariz bir şekilde değişiklik göstermezken, zamana ve koşullara bağlı olarak proteomu oldukça değişiklik gösterebilir. Yani proteomik, bir hücrenin yapı ve işlevlerini anlamada genomikten daha fazla bilgi sağlamaktadır. Bu noktada proteom ve proteomik teknolojisi karşımıza çıkmaktadır.

Proteom sözcüğü ilk kez 1994 yılında Marc Wilkins tarafından kullanılmaya başlanmıştır (Wilkins vd 2006). 1997 yılında da ilk kez Peter James tarafından proteomik ifadesi bir makalede yer almıştır (James 1997). Proteom, bir hücrenin, organın veya organizmanın sahip olduğu tüm proteinlerin bileşimini ifade eder.

Günümüzde proteom tanımını genişleten kavramların tam olarak açıklanabilmesi için, çeşitli bilim insanları tarafından yeni ifadeler üretilmiştir. Jungblut vd. tarafından ilk kez kullanılmaya başlanmış olan "protein species" olarak adlandırılan protein türleri bu ifadelerden biridir (Jungblut vd 1996, 2008). Splicing türleri ve posttranslasyonel modifiye proteinleri arasında ayrımını sağlar. Bu terime karşılık gelen diğer bir ifade de "isoform"dur. İlişkili genlerin protein ürününe protein izoformu denilmiştir. Bu ifade, IUBMB (International Union of Biochemistry and Molecular Biology)'nin adlandırma kuralları doğrultusunda (Jungblut vd 2008) belirlenmiştir. Bu konuda bir kısım araştırmacıya göre de "proteoform" ifadesinin kullanılması uygun görülmüştür, aynı proteinin primer yapısında farklılık gösteren çeşidi olarak ifade edilmiştir. Bu yeni ifade "isoform" veya "protein species" ifadelerinin yerine kullanılmıştır. "Proteoform" ifadesini kullananlara göre "isoform" ifadesi yetersiz kalmıştır. Proteoform ifadesinin, tek genden oluşturularak meydana gelen değişik protein ürünleri için, birçok kaynağa göre kullanılması açıklayıcı olmuştur.

### 1.1.2. Tarihsel Gelişimleri

DNA’da meydana gelen değişimler bir süre sonra kalıtsal olarak aktarılmaya başlar ve bu sayede DNA’nın taşıdığı bilgiler nesiller boyu aktarılmış olur. 1950’li yıllara kadar bu şekilde kabul edilmiş, 1952’de Alfred Hershey ve Martha Chase tarafından DNA’nın kalıtımdaki rolü tasdiklenmiştir. İnsan DNA’sının tek görevi proteinlere ait bilgiyi gelecek nesillere aktarması olarak düşünülmüştür. Bununla beraber bilim insanları tarafından bu konu daha fazla araştırılmaya başlanmıştır, daha sonra insan DNA’sının büyük bir kısmında protein kodlamayan bölge olduğu ortaya çıkarılmıştır. İnsan genomunun şifresinin çözülmesi amaçlı, tüm insan genom dizisinin belirlenmesi için ilk defa 1984-1986 yılları arasında Amerika Birleşik Devletleri Enerji Bakanlığında (İngilizcesi, DOE) bilimsel toplantılarda tartışılmıştır. Bu projenin başka bir amacı da diğer organizmaların genomunu insan genomu ile karşılaştırmak olmuştur. 18 ülke tarafından desteklenen bu proje: “İnsan Genom Projesi” 1990 yılında 15 yıllık araştırma süreciyle başlatılmıştır. 10 yılın sonunda (1993-2003) bu projenin çalışmaları sonlandırılmıştır (Venter 2003). O güne kadar olan tahminlere göre insan genomunda yaklaşık 3 milyar DNA bazı ve 100.000-120.000 arasında gen olduğu düşünülmüştür. Projenin sonucuna göre insan genomu ~ 3.164.700.000 nükleotitten oluştuğu ve toplam gen sayısı 25.000-29.000 arasında olduğu tespit edilmiştir. Fakat protein sayısının daha fazla olduğu bilindiğinden, “1 genin 1 proteini kodladığı” hipotezi insan genomu için bu projeye çürütülmüştür. Bununla beraber 2003 yılında tamamlanmış olan projeye birlikte çok büyük olan protein dünyasını aydınlatmak için bu alandaki çalışmalara ağırlık verilmiştir.

İnsan proteom organizasyonu (HUPO), 2001 yılında birçok önemli girişimler için kurulmuştur. Bu proje, plazma proteomu, beyin proteomu, karaciğer proteomu, protein standartları/biyoinformatik ve büyük ölçekli antikor üretimi dahil bazı teknolojiler üzerine odaklanmıştır. Genel olarak HUPO ile, proteomik alanında gelişimi hızlandırmak, eğitim ve araştırmalarda uluslararası işbirlikçileri teşvik ve organize etmek amaçlanmıştır (Hanash ve Celis 2002). İnsan proteom projesi (HPP), mevcut ve gelişmekte olan tekniklerin kullanılmasıyla sistematik olarak bütün insan proteom haritasının ortaya çıkarılabilmesi için tasarlanmıştır. Bu projenin tamamlanması ile hücresel düzeyde insan biyolojisi anlayışı, tedavi edici ve koruyucu sağlık uygulamalarının gelişimini teşkil etmektedir. 2010 yılının başlarında HUPO, her gen lokusundan proteinleri, “bilgi omurgası” ile insan proteom haritasını meydana getirmek için gen merkezli bir yaklaşım önermiştir (HUPO 2010). Önümüzdeki yıllarda HUPO; koordine olmuş insan proteomik çapraz analizlerini kolaylaştırmak ve teşvik için toplanmaya devam edecektir ve bu süreç içerisinde HUPO HPP topluluklarının oluşturulmasını sürdürecektir (Legrain 2011).

Proteinler aminoasitlerin birbirlerine peptid bağları ile bağlanmasından oluşan, canlı organizmada en fazla bulunan makromoleküllerdir. Farklı aminoasitlerin, farklı sayılarda ve değişik modellerle bağlanmasıyla çok sayıda farklı proteinin oluşumu meydana gelir. Bu protein çeşitliliği “ alternatif splicing” olarak adlandırılan alternatif uç birleştirme ile gerçekleşmektedir. Öncül mRNA’nın modifikasyonlar geçirerek olgun mRNA’yı oluşturması sırasında splicing ile gen üzerindeki intron adı verilen dizilerin çıkarılması sayesinde, ekzon adındaki protein kodlayan dizilerin bir araya gelmesi,

protein çeşitliliğini sağlamış olur (Padgett vd 1986, Smith vd 1989). Canlı organizmanın içinde bulunan proteinlerin sentez kontrolü, genlerin yani DNA'nın kontrolü altındadır.

## **1.2. Proteomik Çalışmalar**

### **1.2.1. Önemi ve amacı**

Proteomik ile kompleks olan hücrenin yapısı ve görevleri hakkında genomikten daha fazla bilgi elde edilir. Proteomiğin amacı: sadece proteinlerin tanımlanması ve miktarlarının ölçülmesiyle değil de proteinlerin bulunduğu yerleri, geçirdikleri değişimleri, etkileşimleri ve işlevleri hakkında da bilgiler vermektir.

### **1.2.2. Proteomiğin uygulama alanları**

Fenotip belirlemede en doğru yöntem proteomik olarak belirlenmiştir ve güvenilirliği açısından da oldukça iyidir. Proteomiğin, tıp alanında önemli yeri vardır. Bunlardan bazıları: hastalıkların teşhisinde, patojenik mikroorganizmalara karşı geliştirilen aşı ve ilaçların geliştirilmesinde, terapötik uygulamaların takibinde önemli yer tutmaktadır. Proteomik, kullanılan örnek içerisinde bulunan az miktardaki marker niteliğinde proteinlerin tespit edilebilmesi için, proteinlerin ayırımında oldukça hassas bir yöntemdir. Bu proteinlerin tanımlanması, var olan hastalığın gelişimindeki ilgisi ve bu verilerin bilgi deposunda toplanıp değerlendirilebilmesi sayesinde hastalıkların altında yatan gizli mekanizmaların tespit edilebilmesi amaçlanmıştır.

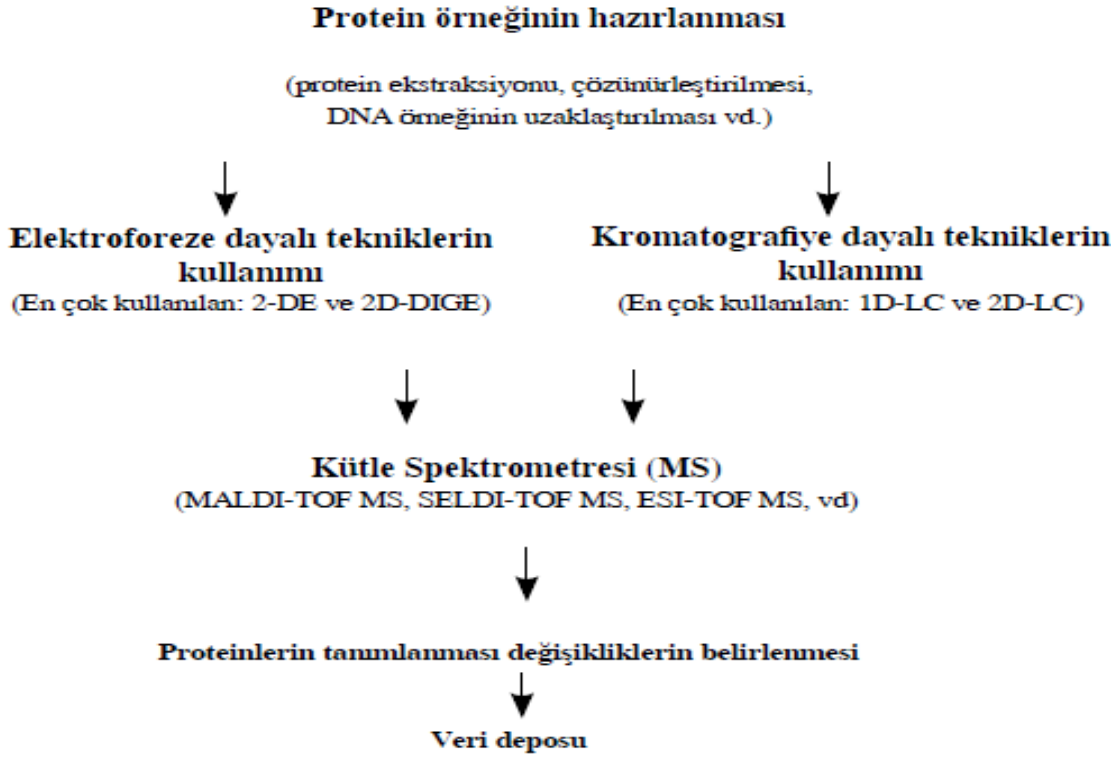
### **1.2.3. Proteomik yönteminin sınırları**

Bazı biyolojik örneklerde, protein ekstraksiyon yöntemleri uygulanamamaktadır. Bunun başlıca nedeni hidrofobik özellikteki proteinler ve bununla beraber iki boyutlu elektroforez jellerinde bu proteinlerin görünür hale getirilememiş olmasındandır denilebilir. Eğer ki analiz edilecek proteinlerin çoğu bu hidrofobik özelliği taşımaya devam ederse proteomik yöntemi bu proteinler için yetersiz kalabilir.

Bazen de proteomik çalışmalarda analiz için kullanılacak örnek miktarları yetersiz kalmaktadır. Proteinlerin tanımlanabilmesi için yetersiz olabilir veya analiz edilen proteinlerin düşük konsantrasyonlarda olması, bu proteinlerin tespitini sağlayamayabilir.

### **1.2.4. Proteomik çalışmalarında kullanılan yöntemler**

Proteomik çalışmaları, öncelikle proteinlerin belirli ayırma yöntemleriyle birbirlerinden ayrılmasını sağlar ve daha sonrada birbirinden ayrılmış olan bu proteinlerin tanımlanması temeline dayanmaktadır. Bu işlem basamakları bir tabloda toplanabilir.



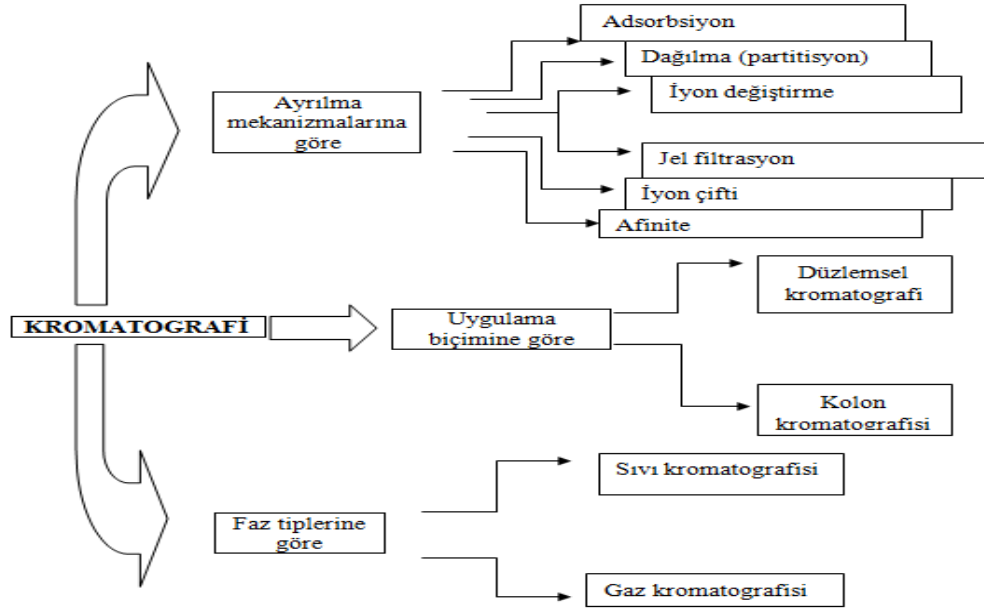
Şekil 1.1. Proteomik çalışmalarında kullanılan genel çalışma akışının şeması

Yukarıdaki şemada da görüldüğü gibi ya elektroforez yöntemi veya kromatografiye dayalı teknikler kullanılarak proteinlerin saflaştırma işlemleri gerçekleştirilmektedir.

#### 1.2.4.1. Kromatografi

Proteomik çalışmalarda en çok elektroforez yöntemleri kullanılmasına rağmen, kromatografik yöntemler de çok fazla kullanılmaktadır. Proteinler analizleri için; büyüklük, şekil, net yük, yüzeydeki hidrofobik gruplar, sistemde kullanılmış olan sabit faza bağlanma kapasitesi gibi farklı özelliklere sahip olduklarından kromatografik yöntemlerle ayrılmaları ve saflaştırılmaları mümkündür.

Bir karışım içerisinde bulunan maddelerin, biri sabit diğeri hareketli olan, birbirleriyle karışmayan iki fazlı sistemde ayrılması ve saflaştırılması yöntemine kromatografi denir. Bu yöntemin temel prensibi, çeşitli maddelerin hareketli faz yardımıyla, sabit faz üzerinde değişik hızlarla hareket etmesi veya sürüklenmesine dayanır. Bir kromatografide amaç belirli süre içerisinde ayrımı gerçekleştirmektir. Ama burada ayırmayı etkileyen parametreler vardır. Bunlar: tür, boyut, bileşim, akış hızı, dedektör türü, örnek derişimi, örnek hacmi gibi özelliklerdir.



Şekil 1.2. Kromatografi'nin sınıflandırılması

Şekil 1.2.'de de görüldüğü gibi birçok kromatografi yöntemi vardır fakat bunlar içerisinde proteinlerin saflaştırılmasında en çok kullanılanlar: kolon kromatografisi, iyon değiştirme kromatografisi, afinite kromatografisi ve HPLC (Yüksek performanslı sıvı kromatografisi)'dir.

**İyon Deęiřtirme Kromatografisi:** Çözeltide bulunan iyonların, ters yüklü destek katısı iyonlarına (diethylaminoethylsüloz ve karboxymethylsüloz) olan ilgisine dayalı ayırmadır. İyonların bir katı ve sıvı arasında tersinir bir şekilde değiştirildiği işleme iyon değiştirme denir. Katı, iyon değiştirici olarak kullanılır. Kompleks anorganik maddeler ya da suda çözünmeyen organik polimerler iyon değiştirici olarak kullanılabilirler. Durgun faz zayıf ya da kuvvetli, katyon ya da anyon değiştirici bir reçinedir. Reçinenin sabit yükü (-) ise buna katyon değiştirici reçine, (+) ise de anyon değiştirici reçine olarak adlandırılır. Bu işlemler sırasında reçine tamamen iyonlaşmış olması gerekmektedir. Hareketli faz genellikle tamponlanmış: istenilen iyonların oluşmasına neden olan belli bir pH değerinde sulu çözeltidir ve yükü katının sabit yükünün tersi olan zıt iyonu içerir. Yükü hareketli fazın zıt iyonlarıyla aynı olan iyonik yapıdaki örnek bileşenleri katıya bağlanmak için zıt iyonlarla yarışır ve zıt iyonu yerinden ederek katıya kuvvetle bağlanan uygun yükte bileşenler kolonda uzun süre kalırken, katıya zayıfça bağlanan, uygun yükte olmayan veya yüksüz olan bileşenler kolonu çabuk terk ederler.

**Kolon Kromatografisi:** Kromatografi yöntemlerinden proteinlere en çok uygulanan kolon kromatografisidir. Kolon kromatografisinde, kolonun içerisine dolgu maddesi, çözücü ve ayırmak istenilen maddeler sırasıyla konulur. Ayrılacak maddeler kolona konulduktan sonra, kolonun üst kısmından çözücü eklenir, istenilen madde çözelti halinde kolondan ayrılabilir. Kolon kromatografisinde, çözücüyü ya da maddeyi yukarıdan ilave ederken dolgu maddesinin yüzeyinin bozulmamasına dikkat edilmelidir. Bunu sağlamak için çözücü ve madde yavaşça ve damla damla eklenmelidir. Kolonun aşağısında madde akışı başladıysa, uygun bir başlıkla beraber çözücüde akış hızına

uygun olarak kolonun yukarisından damlatılmalıdır. Eğer çözücünün kolon üzerinde yürümesi hızlandırılmak istenirse, kolonun üst kısmında basınç yaratılabilir.

**Afinite Kromatografisi:** Kolonun dolgu maddesine, spesifik protein ile kompleks yapabilen bir ligand bağlanır. Ligand ile kompleks yapan spesifik protein, katı desteğe bağlanarak kolonda tutulurken; serbest proteinler kolonu terk ederler. Bu yöntem ile enzim, hormon gibi spesifik proteinler saflaştırılabilir.

**Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC):** Bir sıvıda çözülmüş bileşenler, bir kolon içerisinde bulunan genellikle katı bir destek üzerindeki sabit faz ile farklı etkileşimlere girerek, kolon içinde değişik hızlarda ilerler. Farklı alıkonma zamanına sahip bu bileşenler kolonu değişik zamanlarda terk ederler ve böylece birbirlerinden ayrılırlar.

Yukarıda kromatografik yöntemler ilede proteinlerin birbirlerinden ayrılabilceği anlatılmıştır. Fakat bu çalışmada kromatografik yöntemler kullanılmamıştır.

#### **1.2.4.2. Elektroforez**

Elektrik akımın etkisi ile, sıvı bir ortamda yüklü parçacıkların veya partiküllerin bir yerden başka bir yere göçüne, başka bir değişle belli bir elektrik yüküne sahip biyomoleküllerin elektriksel bir alanda sahip oldukları elektrik yüküne bağlı olarak anot veya katoda göç etme prensibine elektroforez denir (Vesterberg 1993). Doğru akım uygulanarak oluşturulan elektriksel alan etkisindeki iyonlar sabit hızla hareket ederler ve buradaki hız elektrik akım şiddetiyle orantılıdır.

Bir iyonun bir ortam içinde sabit hızla hareket etmesi ve hareket hızının iyonun biçimine bağlı olması çok önemli bir yere sahiptir. Mobiliteyi birbirinden farklı iki iyon içeren bir çözeltinin, aynı elektriksel alanında aynı yönde kazandıkları hızlar birbirinden farklı olmaktadır. Hızların farklı olması ile belli sürelerde alınan yolların farklı olacağı açıktır.

Proteinlerin ilk analizinde kullanılan elektroforez yöntemi Tiselius tarafından ilk kez 1937'de tanımlanan serbest solüsyon elektroforezi "moving boundary" olarak da tanımlanan elektroforez yöntemidir. Bu elektroforez yöntemi; "U" şeklindeki kuartz bir borunun içinden elektrik akımı geçirilerek gerçekleştirilmiştir. Bu elektroforez yöntemi günümüzde de hala kullanılmaktadır.

Yüklü makromoleküllerin elektriksel alan altındaki göçleri ile moleköl karışımları birbirinden ayrılarak özellikleri ve konsantrasyonları belirlenebilir. Protein moleküllerinin farklı moleköl ağırlıkları ve farklı elektriksel özellikleri sayesinde elektroforez yöntemiyle tespit edilebilirler.

Elektroforez tekniğinin değişik biçimleri vardır: kağıt elektroforezi, serbest veya hareketli cephe elektroforezi, kuşak elektroforezi, disk elektroforezi, izoelektrik odaklama, SDS jel elektroforezi gibi.

Kağıt elektroforezi: proteinler için oldukça iyi bir yöntem olmasına rağmen, yükü az olan düşük kütleli aminoasitlerin kolaylıkla dağılmalarından dolayı, bu tür moleküller için uygun değildir. Bu düşük kütleli moleküllerin difüzyonunu engellemek için elektriksel alan altındaki yüksek elektrik akımından dolayı cihazda aşırı ısınma problemleri meydana gelmektedir (Pehlivan 1997).

Serbest veya hareketli cephe elektroforezi: serbest elektroforezde U şeklinde bir borunun alt kısmı protein karışımı içeren bir tampon çözeltisi ile doldurulurken, üst kısmı saf tamponla doldurularak elektroforez sistemi oluşturulur. U borusunun uçlarına pozitif ve negatif kutuplarına bağlanmış elektrotlar yerleştirilir, güç kaynağı sayesinde negatif yüklü iyonlar anoda, pozitif yüklü iyonlar katoda doğru harekete başlar. İyon göçleri başladığı zaman, proteinsiz tampon çözeltisinde kırılma indexi değişikliğinden dolayı desenler meydana gelmeye başlar ve buradaki belli başlı proteinlerin birbirlerine olan hız farklılıkları ve yönleri boru içinde yapılacak optik ölçümler sayesinde belirlenebilir (Çelebi 2000).

Kuşak elektroforezi: diğer yöntemlere göre daha az örnekle, daha az ayırma gücüne sahiptir. Bu yöntemde katı bir destek (filtre kağıdı veya selüloz asetat) ortamında, proteinlerle etkileşmeyen ve proteinlerin hareketini etkilemeyen maddeler kullanılmaktadır. Elektroforez işlemi proteinlerin ilerleyebildikleri kuşak noktalarına kadar yürütülür ve daha sonra proteinlere tutunabilen bir boya yardımı ile boya yoğunluğunu ölçen bir dansitometre ile tarama işlemiyle tespit edilebilir.

Disk elektroforezi: kuşak elektroforezine benzer bir yöntemdir. Buradaki destek ortamı pH değeri ve gözenek büyüklükleri farklı olan iki ayrı jelden oluşmaktadır. Buradaki jel matrisi sürekli olmadığından dolayı, İngilizce de sürekli olmayan anlamına gelen “discontinuous” kelimesinin başındaki disc kelimesi kullanılmıştır (Çelebi 2000). Disk elektroforezindeki proteinler, önce büyük por büyüklüğü daha sonra küçük por büyüklüğü olan jellerden geçerek yüksek ayırma gücüne sahip bir şekilde, ayrılmaları sağlanır.

İzoelektrik odaklama: “elektrofocusing” olarak da adlandırılan bu yöntemde jel içerisinde bir pH gradiyenti oluşturulmaktadır. Buradaki karışım içerisinde bulunan her bir protein kendi izoelektrik noktasına eşit olduğu jel bölgesinde odaklanarak kalırlar. Proteinlerin iyi ayrılmaları sayesinde, her proteinin kendine özgü keskin bantları oluşur (Yıldırım 1985).

Sodyum dodesilsülfat poliakrilamid-jel elektroforezi: proteinlerin moleküler büyüklüklerine göre ayrılmaları sağlanır. Poliakrilamid jellerle yapılan elektroforez, örnekteki bileşenlerin daha iyi ayrışmalarına yol açar çünkü ayrışım hem moleküler ekleme hem de elektroforetik harekete dayanır.

Proteinlerin elektroforetik ayrımında kullanılan jel materyali: nişasta, agaroz, selüloz ve poliakrilamid jelidir. Bu jeller arasında en iyi ayırım poliakrilamid jeli ile gerçekleştirilir. SDS-PAGE elektriksel alanda protein moleküllerinin moleküler büyüklüklerine göre kantitatif olarak ayırma esasına dayalı bir elektroforez yöntemidir. Sodyumdodesilsülfat (SDS) anyonik bir deterjandır ve etkileşime girdiği proteinlerin net yüklerini maskeler ve böylece tüm proteinler negatif yüklenirler molekül ve molekül

ağırlıklarına göre katottan anota doğru göç ederler. Bir nörotoksik madde olan akrilamid monomerlerinin uzun zincirler ve çapraz bağlantılar oluşturacak şekilde polimerizasyonu N,N'-metilen-bisakrilamidde bulunan serbest fonksiyonel gruplar barındıran moleküller ile gerçekleştirilmektedir. TEMED reaksiyon başlatıcısı olarak gereklidir, polimerizasyon başlatıcısı olarak kullanılan APS (amonyumpersülfat) ise radikal başlatıcısı olarak görev alır.

#### 1.2.4.3. İki boyutlu jel elektroforezi

İlk kez 1975 yılında Patrick O'Farrel ve Joachim Klose birbirlerinden bağımsız olarak iki boyutlu jel elektroforezi yöntemini tanımlamışlardır. Zaman içerisinde jel kalınlığı azalmış, hassasiyet ve çözünürlük artmıştır. 1995 yılında Klose ve Kobalz tarafından geliştirilmiş ve son haline getirilmiştir. İki boyutlu jel elektroforezi yöntemi ile proteinler öncelikle birbirlerinden izoelektrik noktalarına göre, daha sonra da molekül ağırlıklarına göre ayrılmış olurlar. Bu yöntem diğer elektroforetik yöntemlere göre daha hassas bir yöntemdir.

İki boyutlu jel elektroforezinde en önemli basamakların başında örnek hazırlama kısmı gelmektedir. Bu işlemi bu kadar önemli yapan, çalışılan doku veya hücrelerdeki tüm proteinleri çözünür hale getirebilmektir. Proteinlerin çözünürlüğünün çok iyi olabilmesi için örnek hazırlama temiz ve titiz yapılmalıdır. Gerekirse uygun ajanlar kullanılır. İyi hazırlanmamış bir protein örneğinden iyi jeller elde edilemeyecektir. Örnek hazırlama da en fazla yapılan hatalar: protein-tampon oranının yanlış olması, protein ve tampon çözeltisinin birbirlerine uygun olmaması, geciktirilmiş ısınma, aşırı ısınma, çözünmemiş materyalin giderilmesindeki başarısızlık, ortamdaki tuzların ve katıların uzaklaştırılmamış olmasıdır.

İdrar örnekleriyle çalışılırken, örneğe üre, ditiyotritol, amfolit karışımı ve proteaz inhibitör karışım tamponu şeklinde eklenmiştir. Bu tampon çözeltisinin kullanılmasındaki amaç, proteinlerin denatüre edilmesi, örnek tamponundaki tiyol reaktif sayesinde disülfid bağların kırılması ve proteinlerin tek konformasyon yapısına dönüşmesidir. Bunun yanında proteaz inhibitörleri sayesinde ortamdaki proteazlar inhibe edilmektedir.

Jel elektroforezinin birinci boyutunu izoelektrik fokuslama (IEF) oluşturur. İzoelektrik fokuslama, bir pH gradiyetinde yapılan elektroforezdir. Ortamda var olan makromoleküller (-) veya (+) yüklere sahip olduğu sürece gradiyent boyunca izoelektrik noktalarına rastlayan pH'ya kadar göç ederler. Proteinler, izoelektrik noktalarının buldukları çevrelerinin pH'ına eşit oluncaya kadar jel içerisinde hareket ederler. Bu pH'ta net yük 0 olur ve migrasyon sonlanır. Daha sonra elektroforetik güçler nedeniyle bir miktar geriye doğru göçer. Bu teknikle de proteinler, izoelektrik noktalarına, dolayısıyla da yüklerine göre çok duyarlı şekilde ayrıştırılabilirler. İzoelektrik nokta değerlerinde 0,02 pH'lık fark olan protein molekülleri bile ayrı bantlar şeklinde gözlemlenebilirler.

Elektroforezde kullanılan tampon sistemi yerine anotta kuvvetli bir asit, katotta da kuvvetli bir baz kullanılır ve aradaki jel ortamına da gerektiği kadar amfolit solüsyonu katılırsa amfolitlerin anoda yakın kısmında (+), katoda yakın kısmında (-) net



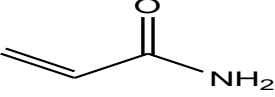
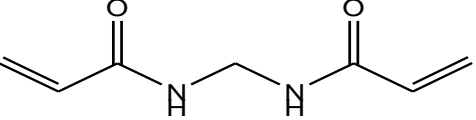
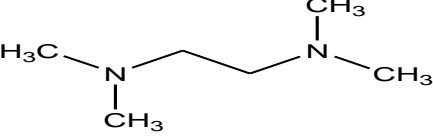
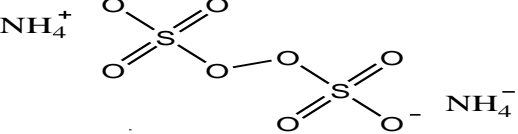
yükleri olur. Bu sebepten dolayı ortama elektrik akımı verildiğinde negatif yüklü iyonlar anota, pozitif yüklü iyonlar katota doğru hareket eder. Bu hareketlilik ortamında çevresel pH'sının kendi izoelektrik noktalarına eşit olduğu bölgelerde hareketsiz kalırlar. Bundan dolayı, en asidik amfolitler katota yakın olacak şekilde izoelektrik noktalarına göre sıralanırlar.

Jel elektroforezinin ikinci boyutunu SDS-PAGE (sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi) alır. Bu teknik ile proteinler bağıl kütlelerine göre ayrılmış olurlar. Birden fazla polipeptid zinciri içeren (oligomerik) proteinlerin kaç alt birimden oluştuklarını ve alt birimlerden her birinin molekül ağırlıklarını saptamak amacı ile uygulanan bu yöntem SDS-PAGE olarak adlandırılır. Protein örnekleri öncelikle SDS deterjanı ile muamele edilir ve proteinler alt birimlerine ayrılır. Bu alt birimler SDS ile kompleks oluştururlar. Kompleksler içinde, deterjan polipeptide hidrofobik zinciri ile sıkıca bağlanarak polipeptid yüzeyinde deterjanın hidrofilik kısmının olduğu bir deterjan tabakası ile maskelenmiş olur. Meydana gelmiş olan SDS-polipeptid kompleksleri, jel üzerine konulduğu zaman ortamdaki hızını belirleyen temel etken molekül kütlesi olurken, elektrik akımı etkisi ise filtrasyon olayının itici gücü görevini üstlenmektedir. Bu yöntemle, molekül ağırlığı bilinen referans protein ile bilinmeyen protein elektroforeze tabi tutulurlar ve her ikisi birbiriyle karşılaştırılarak konumları belirlenir, böylelikle karşılaştırma tekniği ile bilinmeyen proteinin molekül ağırlığı tespit edilmiş olur.

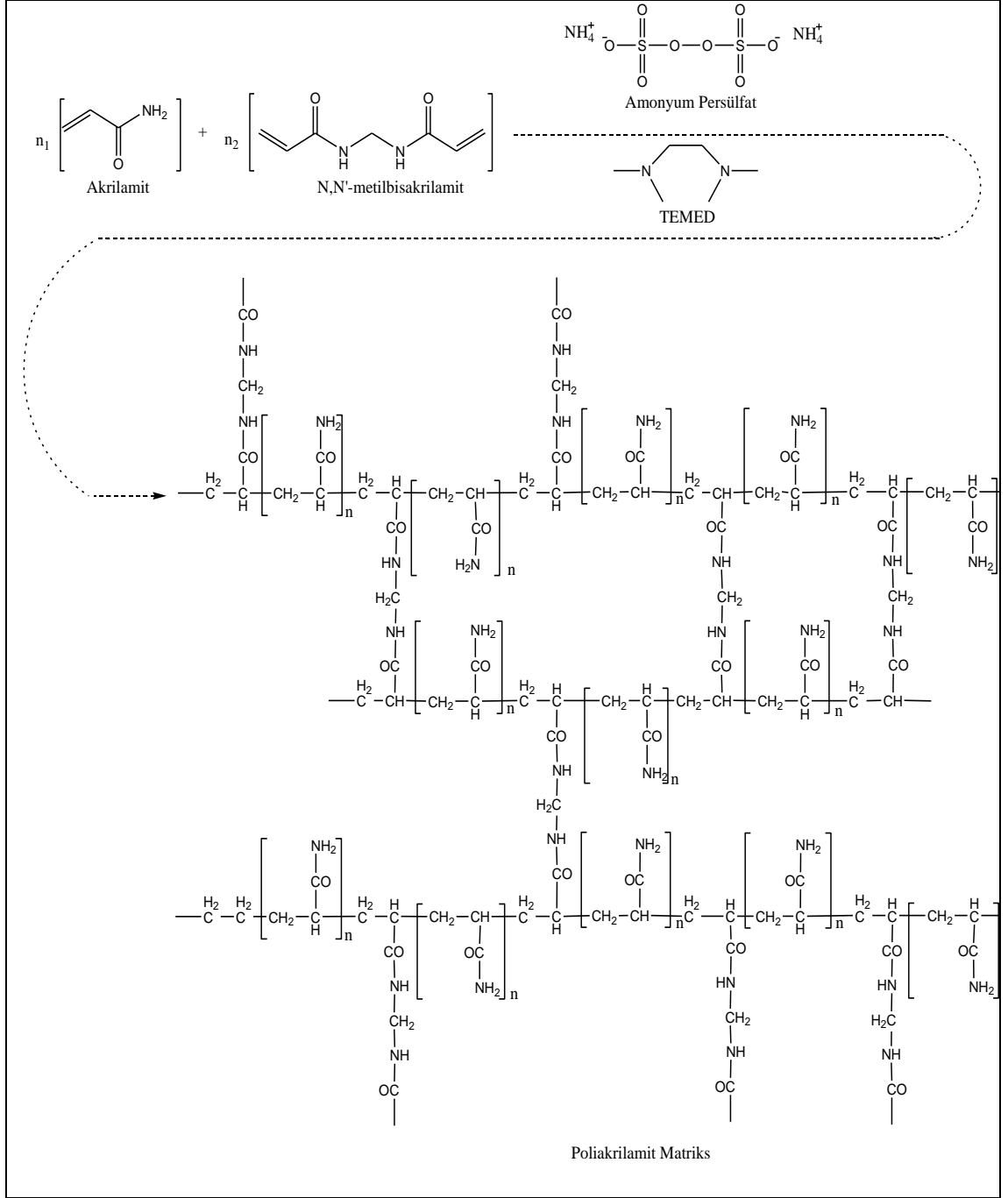
Elektroforezin başarılı bir şekilde gerçekleştirilebilmesi için örnek ile reaksiyon vermeyen ve örneklerin elektrik akım etkisi altında ilerlemesini engellemeyen bir zemin kullanılmalıdır. Protein elektroforezi için poliakrilamid jeli en uygun zemindir. Bu jelde proteinler için uygun por büyüklüğü seçilmelidir. Por büyüklüğü, değişen monomer konsantrasyonları ile kolaylıkla değiştirilebilir ve polimerizasyon koşulları tarafından tespit edilebilir.

Poliakrilamid jeli, bir radikal oluşturucu tarafından katalizlenen akrilamid ile N,N'-metilen bisakrilamidin birlikte polimerize edilmesiyle elde edilir. Burada katalizör olarak TEMED (tetrametilendiamin), polimerizasyon başlatıcısı olarak da APS (amonyumpersülfat) kullanılır.

Çizelge 1.1. Poliakrilamid sentezi için kullanılan kimyasal maddeler

AKRİLAMİD	
N,N'-METİLEN-BİSAKRİLAMİD	
TEMED (TETRA METİLEN Dİ AMİN)	
APS (AMONYUM PERSÜLFAT)	

Amonyum persülfat sulu çözeltide çözüldüğünde serbest radikal iyonları oluşur. Bu radikal iyonları akrilamid ile bir araya geldiğinde, serbest radikal akrilamid üzerine taşınır. Aktive edilmiş bu akrilamid molekülü çevresindeki diğer akrilamid molekülleri ile etkileşerek uzunca bir polimer oluşturur. Polimer parçaları bir araya gelerek N,N'-metilen bisakrilamid sayesinde çapraz bağlanmaları ile poliakrilamid jeli oluşturulmuş olur. Bu jelin oluşum reaksiyonunu Şekil 1.3.'de şematize edilmiştir.



Şekil 1.3. Poliakrilamid jelinin sentezi

Oluşturulmuş poliakrilamid jelleri, % T (g/100 mL içindeki toplam monomerin ağırlık yüzdesi yani akrilamid miktarı) ve % C (toplam monomerin yüzdesi gibi bisakrilamidin oranı yani çapraz bağlanma derecesi) değerleri tarafından karakterize edilirler. Analiz edilecek örneğe göre bu iki değer miktarı değiştirildikçe, poliakrilamid jelinin por büyüklükleri de değiştirilmiş olur.

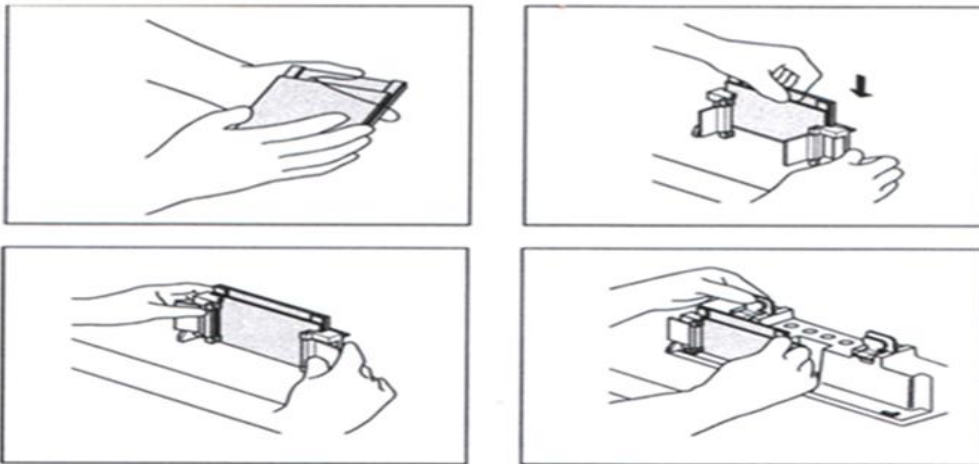
$$\% T = \frac{\text{Akrilamid (g) + bis (g)}}{\text{Hacim (ml)}} \times 100$$

$$\% C = \frac{\text{Bis (g)}}{\text{Akrilamid (g) + bis (g)}} \times 100$$

%C değeri sabit tutulup, %T değeri arttırılırsa por büyüklüğü küçülürken; %T sabit kalıp, %C azar azar arttırılırsa gözenek büyüklüğü yaklaşık %5 civarına kadar küçülür; %C miktarı arttırıldıkça jeldeki küçük gözeneklerin büyüklüklerinde artış olur. İkinci boyut jellerde bu oran genellikle: %12,5 T ve %3 C şeklinde kullanılmaktadır.

İyi bir polimerleşmenin gerçekleşebilmesi için tampon sistemi, hem jeldeki hem de tank içindeki pH korumada ve ortamda var olan akımın jel içersinden geçmesi için gerekli elektrolit oluşumunu meydana getirir. Jel elektroforezi sonuçlarının iyi olabilmesi için ortamda kullanılan tampon çözeltileri çok önemli yer tutar. Genel olarak Tris-klorür/tris-glisin sistemi kullanılır. Tris-klorür jeli içersinde (pH: 8,8), Tris-glisin ise yürütme tamponunda yer alır. Jel içinde bulunan klorür ve glisin iyonlarının düşük molekül ağırlıklarından dolayı hareketlilikleri çok yüksek olduğundan proteinlerden önce anoda doğru hareket ederler. Böylece proteinler jel içersinde molekül ağırlıklarına göre spotlar oluştururlar. Yürütme tamponu ve jel %0,1 oranında SDS içerir. Elektroforez süresince SDS, klorür ve glisin iyonları negatif yüklü olduklarından anoda doğru göç ederler, pozitif yüklü tris iyonları ise katoda doğru hareket ederler. Tampon görevini üstlenmiş olan iyonların tükenmesini engellemek için tampon konsantrasyonu yüksek tutulmalıdır.

Bir jel elektroforezini gerçekleştirebilmek için gerekli araçlar: güç kaynağı ve elektroforez aparat sistemidir. Camlar arasında boşluk oluşturacak spacerlar (jel kalınlığını oluşturmak için) kullanılır. İkinci boyutta kullanılmış olan camların uzunlukları, birinci boyutta kullanılmış olan kapiler tüplerin boyuna uygun olmalıdır. SDS-PAGE jelinin hazırlandığı sistem ve aşamaları Şekil 1.4.'de gösterilmiştir.



Şekil 1.4. Cam sandiviç ve SDS-PAGE jelinin hazırlanma aparatları

#### 1.2.4.4. Kütle spektrometrisi (MS)

Gaz fazındaki bileşenlerin (atom ve moleküller), vakumda iyonlarına ayrıştırılması ve bu iyonların elektriksel veya manyetik alanda kütle/yük (m/z) oranına göre ayrılmasını ve bu bileşenlerin teşhisini sağlayan yöntemle kütle spektrometrisi denir.

Bir proteini tanımlamada birçok etmen vardır, bunlardan biri de proteinin kütlesidir. Bir proteinin kütlesi ne kadar iyi analiz edilebilirse, o proteinin tanımlanması da o kadar iyi olur. Kütledeki değişimlere bağlı olarak, bağlı kofaktör veya metal iyonlarının varlığından, kovalent modifikasyonlara kadar pek çok konuda bilgi edinilebilir. Bu sebeplere bağlı olarak protein kütle spektrometrisi proteomik çalışmalarının temel analitik yöntemidir. Bu yöntem sayesinde; çok büyük hassasiyetle kütle analizi yapılabilir ve kısa bir zamanda proteinlerin yapısından kaynaklanan sınırlamalardan etkilenmeksizin bu işlemler gerçekleştirilebilir.

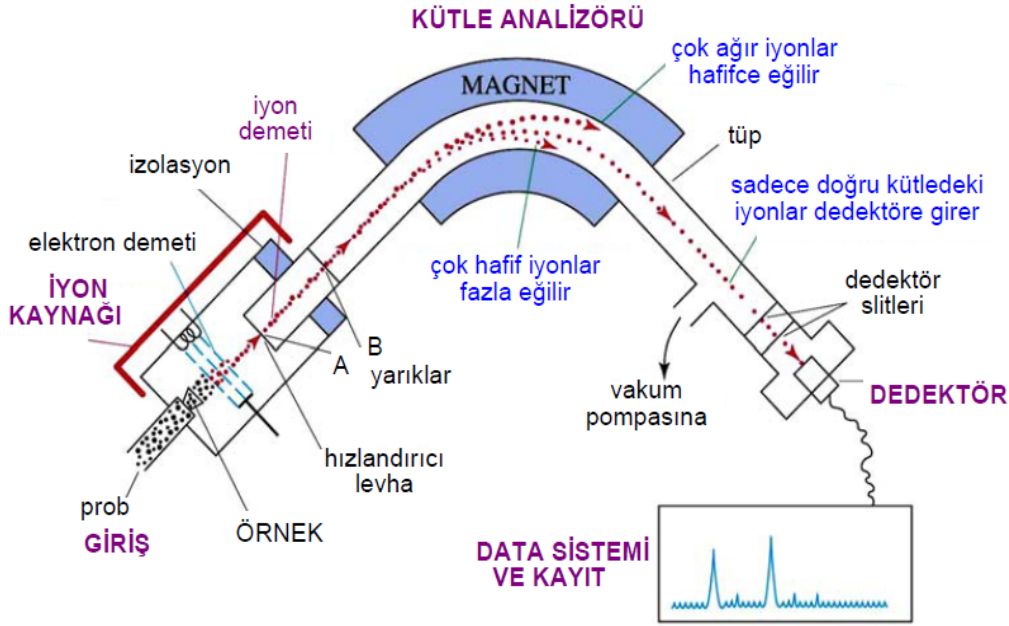
Kütle spektrometrisi, kütle ve dizi analizi yapmaya yarayan bir yöntem olmasının yanında, çok değerli protein etkileşimleri bilgisine ulaşılmasına yardımcı olan bir tekniktir. Protein etkileşimleri günümüzün ve yakın geleceğin muhtemel en güçlü süper bilgisayarları için bile büyük zorlukta birer sorun kaynağıdır. Küçük sayılabilecek boyutlardaki proteinler için bile  $10^{30}$ 'lar düzeyinde olan muhtemel konformasyonların tüm proteinler için bilgisayarlarca hesaplanmasını hayal etmek bile zorken, bunlar arasındaki tüm etkileşimleri yine bilgisayarlarla ve salt primer dizilere bakarak bulmayı hedeflemek bile zordur. İşte bu konuda da MS analizi çok önemli olanaklar sunmaktadır.

Günümüzde en çok kullanılan yöntem ardı ardına kütle spektrometrisi anlamına gelen "Tandem MS"dir. "MS/MS" veya "MS<sup>2</sup>" olarak da adlandırılır. Bunun nedeni aslında cihaz içinde arka arkaya iki spektrumun oluşturulmasıdır. İlki protein veya genelde peptidleri ayrıştırırken, ikincisi ise dizi analizinin yapıldığı iki farklı spektrumdur. Sistem yeterince iyi kalibre edilmişse çarpışma hücreesindeki her bir peptid türü için ortalama bir kırılma olayı yaşanır. İlk bölmedeki ayrışma nedeniyle belirli bir zaman diliminde çarpışma odasında etkilenen yalnızca bir tür peptid vardır. Yine sağlanan kalibrasyon sayesinde bu peptidler genel olarak +1 yüklüdür. Peptidde oluşan kırılmalar, ortamın vakum koşulları nedeniyle iyon değil serbest radikal oluşumu ile sonuçlanır. Böylece taşınan +1 yük, oluşan iki parçadan yalnızca birinin üzerinde kalır. Dedektörce belirlenen de bu parçadır.

MS analizi, özellikle çok az miktarlardaki proteinlere de uygulanabildiği için son derece düşük derişimdeki proteinlerin tespitinde önemli başarılar sağlayan bir tekniktir. Bazı durumlarda, klasik yöntemlerle tespit edilme sınırının altındaki proteinler bile belirgin bir MS spektrumu vermeleri nedeniyle henüz izole edilmeden önce tanımlanırlar. Bu, proteomiğin hedefleri açısından çok büyük bir gelişmedir. Fakat pek çok proteinin işlevi çoğu zaman derişimine bağlıdır ve bu da sadece nitel değil aynı zamanda nicel bir analizi de gerekli kılar.

Bir kütle spektrometrik analizin ilk basamağı, analitin gaz halinde iyonlarını elde etmektir ve kütle spektrometrik yönteminin yararı, iyonlaştırma basamağı tarafından

belirlenir. İyonlaştırma yöntemleri iki ana kısma ayrılmaktadır: gaz fazı kaynakları ve desorpsiyon kaynakları. Gaz fazı kaynaklarında öncelikle numune buharlaştırılır, daha sonra iyonlaştırılmasına dayanmaktadır. Gaz fazı kaynakları: Elektron impakt (EI), kimyasal iyonlaştırma (CI), alan iyonlaştırma (FI)'dir. Desorpsiyon yönteminde ise katı veya sıvı halde bulunan numune doğrudan gaz iyon haline dönüştürülür. Desorpsiyon kaynakları ise alan desorpsiyon (FD), elektrosprey iyonlaştırma (ESI), matriks yardımcı desorpsiyon (MALDI), plazma desorpsiyon (PD), hızlı atom bombardımanı (FAB), ikincil iyon kütle spektrometri (SIMS), termospray iyonlaştırma (TS).



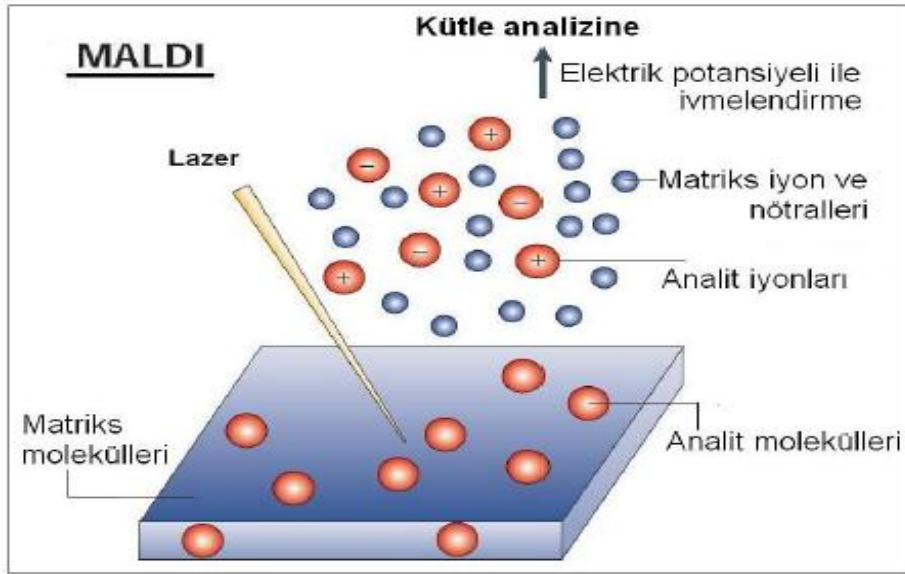
Şekil 1.5. Bir kütle spektrometresinin şematik gösterimi

Gaz fazı iyon kaynaklarının kullanımı kaynama noktaları  $500^{\circ}\text{C}$ 'dan küçük termal olarak kararlı maddelerle sınırlıdır. Genellikle gaz kaynaklarıyla mol kütleleri yaklaşık olarak  $10^3$  daltondan daha küçük bileşikler incelenirken, analitin uçucu olmasını gerektirmeyen desorpsiyon kaynaklarında, mol kütlesi  $10^5$  daltona kadar olan yüksek molekül ağırlıklı analitlere uygulanabilmektedir.

Buharlaştırma ve iyonizasyon basamaklarını bir arada bulunduran iki teknik vardır, bunlar ESI ve MALDI'dır.

**MALDI-MS:** Birkaç yüzden birkaç yüzbin daltona kadar olan biyopolimerlerin mol kütlelerini doğru tahlil etmede başarılı olan bu yöntemlerden biri Alman, diğeri Japon iki çalışma grubu tarafından 1988'de ortaya konulmuştur. Bu teknikte numuneye kıyasla aşırı miktarda olan ve morötesi soğurucu karakterde olan bir matriks içine gömülü olacak şekilde örnek hazırlanır. Matriks olarak genelde düşük molekül ağırlıklı aromatik yapıları organik asitler seçilir. Karışımın üzerine uygun dalgaboyunda lazer ışını gönderilir, matriks lazer enerjisini absorbe eder, enerji yüzeyden analite transfer olur, analit proton transferiyle iyonize hale geçer ve iyonlar kütle analiz birimine aktarılır. Bu aktarma bir ızgara sayesinde gerçekleştirilir ve dedektöre aynı zamanda ulaşmış olan

küçük kütleli moleküllerle büyük kütleli moleküller için oluşacak problemler engellenmiş olurlar.



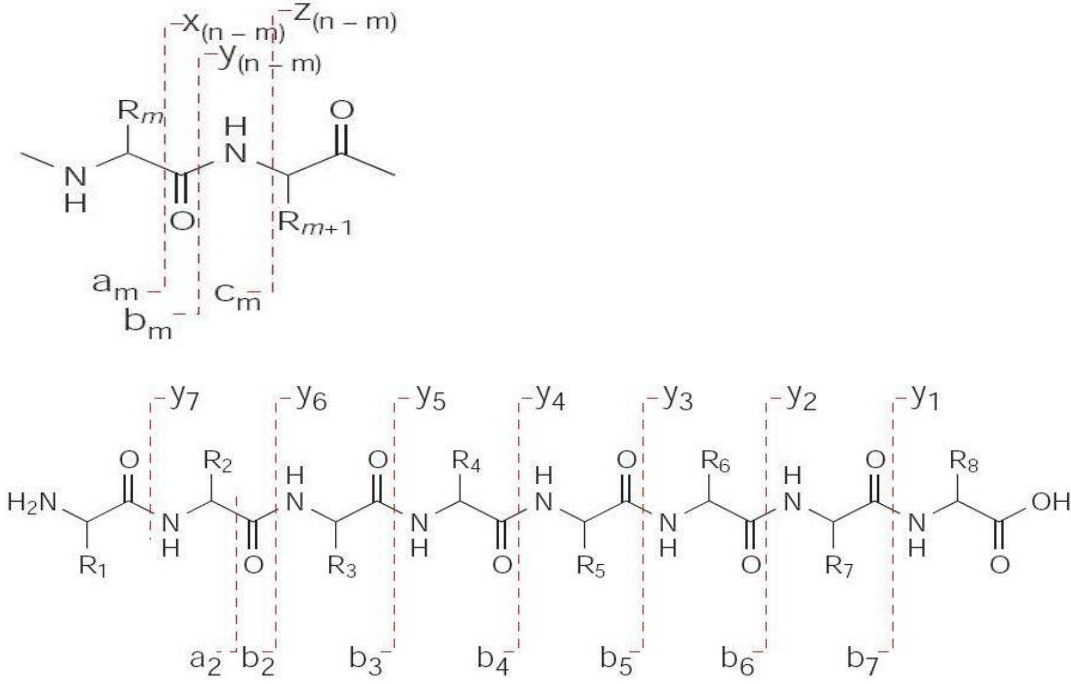
Şekil 1.6. MALDI'nin şematik gösterimi

ESI-MS: proteinler, polipeptidler ve mol kütlesi 100000 Da'dan büyük oligonükleotitler gibi biyomoleküllerin analizi için ilk kez 1984 yılında önemli bir teknik olarak ortaya çıkmıştır. Bu yöntem oda sıcaklığında gerçekleşir. Numune çözeltisi, paslanmaz çelikten iğne şeklinde bir kapiler ile, dakikada birkaç mikrolitre hız sağlanarak pompalanır. İğneye, etrafındaki silindirik elektroda göre birkaç kilovolt potansiyel uygulanır. Oluşan çok küçük ve elektrik yüklü damlacıklar, daha sonra bir çözücü giderme kapilerinden geçer. Burada çözücü buharlaşır ve elektrik yükleri analit moleküllerine tutunur. Çözücü buharlaşıp damlacıklar küçülürken yük yoğunlukları artar ve iyonlar, gaz fazına desorbe olur.

MS/MS veya MS<sup>2</sup> olarak anılan ikinci bir kütle spektrometresi (tandem MS) ise ilgili peptidlerin dizilerinin tespiti için kullanılacak olan spektrumu üretir (bazen yeterince ayrıntılı verilerin elde edilebilmesi için dizi analizinin yapılacağı spektrum birkaç parçalama basamağı sonucunda elde edilir – MS<sup>3</sup>, MS<sup>4</sup>... – ve bu durumda genel olarak MS<sup>n</sup> ifadesi kullanılır). Buradaki amaç, dizileme yapabilecek spektrum elde edebilmektir. Bunun için ilk spektrumdaki belirli piklere karşı gelen peptidler ikinci bir basamakta parçalara ayrılır. Bu işlem genelde çarpışma hücresine alınan moleküllerin üzerine yönlendirilmiş eylemsiz (inert) gazlar ile gerçekleştirilir. Bu amaçla azot molekülleri veya argon, helyum gibi atomlar kullanılır. Bu teknikte dikkat edilmesi gereken nokta, MS<sup>2</sup> spektrumunun tüm peptid iyonları içinden sadece birine ait parçalanma ürünü iyonlarından meydana gelmiş olmasıdır.

MS<sup>2</sup> spektrumlarında adlandırma da oldukça önemli bir yer almaktadır. Parçalanmış olan peptidlerin adlandırılması "Roepstorff – Fohlmann – Biemann Adlandırması" olarak bilinir. En yaygın ve bilgi verici iyonları aminoasitler arasındaki amit veya peptid bağının kırılması oluşturur. Yeni bir iyonlaşmanın olmadığı

parçalanma işlemi sırasında var olan yükün amino terminali tarafında kalması ile “b” türü iyonlar, karboksi terminali tarafında kalmasıyla da “y” türü iyonlar oluşur.



Şekil 1.7. Peptidlerin parçalanma şekilleri

### 1.3. İdrar Proteomiği

#### 1.3.1. İdrar oluşumu ve önemi

Dinlenme halinde kalbin pompaladığı kanın her dört litresinin üç litresi vücuda, bir litresi böbreğe gider, böbreğe giden kanın böbrek atardamarı karın aortundan ayrılır. İdrar oluşumunda sıvı akımının yönü, kanın damar duvarına yaptığı hidrostatik basıncına ve kan plazmasının ve doku sıvısının osmotik basıncıdır. İdrar oluşumu, süzme (filtrasyon), geri emilim (rezorpsiyon) ve salgılama (sekresyon) aşamalarından oluşur.

Vücut hücrelerinde meydana gelen metabolizma atıkları önce doku sıvısına, oradan da kılcıl damarlara geçerek dolaşım sistemiyle böbreklere taşınmaktadır. Süzülmenin gerçekleştiği yer malpigi cisimciğidir. Malpigi cisimciklerinde glomerulusa kadar gelen kandan; kan hücreleri, plazma proteinleri ve yağ gibi büyük moleküllerin dışındaki tüm küçük moleküller Bowman kapsülünden tüp içine geçerler. Bu moleküller su, glikoz, tuzlar, üre, ürik asit ve potasyum, fosfatlar gibi iyonlardır. Bunun yanı sıra demir ve vitamin gibi bazı küçük yapılar büyük moleküllere bağlı olarak kan içinde kalırlar.

Böbrek fonksiyonlarının en önemli kısmını geri emilim oluşturmaktadır. Eğer bu geri emilim kısmı olmasaydı, kan için gerekli olan su, glikoz veya diğer önemli organik moleküller idrar yoluyla doğrudan dışarı atılırdı ve kanın kimyasal yapısı değişmiş



olurdu. Geri emilim, ya pasif şekilde osmotik basınç esaslıdır, ya da ATP kullanımı ile aktif taşıma şeklindedir.

Geri emilim toplama kanallarında suyun geri emilimi ile sonlanır, böylece idrar oluşumu tamamlanmaktadır. Oluşan idrar böbreğin pelvis bölgesinde toplanarak üreterle idrar kesesine taşınır. İdrar kesesi dolunca uretra kanalı ile dış genital organlardan idrar halinde dışarı verilir. Uretranın idrar kesesine bağlandığı yerde bulunan kapakçıklar idrarın geri dönmesini engeller. İdrar kesesi duvarı kasılabilir kaslarla çevrilmiştir. Kese idrarla dolduğu zaman gerilen duvarın içinde bulunan serbest sinir uçları beyine uyarı göndererek kesenin kasılmasına ve uretranın başlangıç kısmında bulunan kapakçıkların gevşemesine neden olur.

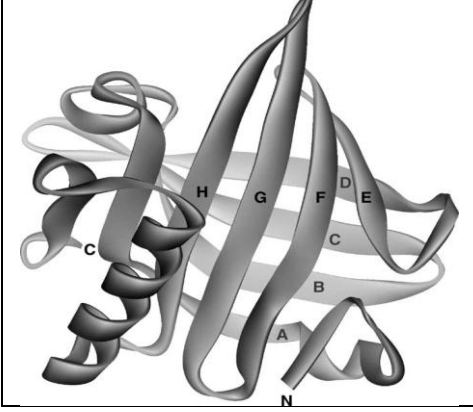
### 1.3.2. $\alpha$ 2u-globulin protein ailesi

1800'lü yıllarda insan idrarında çok fazla miktarlarda protein olabileceğiyle ilgili bilim insanları bazı araştırmalar yapmıştır. Bu araştırmalar sonucunda net bir bilgiye ulaşılamamıştır. Bunun yanı sıra 1930'lu yıllarda sağlıklı laboratuvar hayvanlarından fare, sıçan, köpek, hamster gibi hayvanların idrarında oldukça yoğun miktarlarda protein saptanmıştır.

Hayvanlarda, bunun yanı sıra idrar içinde bulunan uçucu moleküllerden dolayı, ortama yayılan koku sayesinde hayvanlar arasında iletişim sağlanır. Bu feromonal iletişimin başlıca kaynaklarıdır. Tür içinde iletişimde koku sinyallerinin önemi memeli ve böceklerde iyi bir şekilde korunmuştur. Memeli türlerinden kemirgenlerde kimyasal iletişimin rolü oldukça iyi anlaşılmıştır. İdrar ve özel koku bezlerinin feromonal iletişimin başlıca kaynakları olduğu öne sürülmüştür. Düşük molekül kütleli proteinlerdeki feromonların birikmesi, feromonal iletişimde önemli bir yeri vardır. Hatta, bu iletişim aynı cins olan hayvanlarda liderlik, konum belirleme, alan hakimiyeti gibi durumlarda da etkilidir. İdrar içinde en fazla bulunan proteine "Ana İdrar Proteinleri (Major Urinary Proteins-MUP) denir (Rajkumar vd 2010). Bu düşük molekül ağırlıklı proteinler submandibuler, tükürük ve gözyaşı salgıları gibi çeşitli biyolojik sıvılarda yüksek konsantrasyonda bulunurken; diğer vücut sıvıları, idrar, vajinal sıvısı içinde nispeten daha az bulunmaktadır. Düşük molekül ağırlıklı bu proteinlerin, tahmini olarak en çok sıçan ve farelerde olduğu düşünülmüştür. Bu proteinlerden biri olan  $\alpha$ 2u-globulin; hayvanlarda özellikle de kemirgen olan hayvanlarda daha çok bulunmaktadır. Erkek sıçan idrarında bu proteinin bulunma oranı %35 civarındayken, dişilerde bu miktar daha da düşüktür. Bu açıklama ilk kez Roy ve Neuhaus (1966a) tarafından yapılmıştır. Buna göre yapılmış çalışmalarda olgun sıçan idrarında bu protein fazlaca bulunurken, yeterli erginliğe erişmemiş erkek ve dişi sıçanların idrarında bu protein bulunamamıştır. Yeterli olgunluğa ulaşmış sıçanların, günlük atılan idrar proteinin yaklaşık yarısını  $\alpha$ 2u-globulin oluşturmaktadır (Roy 1979).

$\alpha$ 2u-globulin proteini ilk kez hamileliğin 15. gününde hamile dişinin meme bezinde tespit edilmiştir. 18-19. günlerde sayısal olarak azalmaya başlamış ve 21. günden itibaren tespit edilemez hale gelmiştir (MacInnes vd 1986). Daha sonra laktasyon sırasında da tespit edilememiştir (MacInnes vd 1986).  $\alpha$ 2u-globulin ilk defa 1966'da Roy vd. (1966 a, b) tarafından yetişkin erkek sıçan idrarında ve karaciğerinde tanımlanmıştır (MacInnes vd 1986).

$\alpha_2$ u-globulin ergin erkek sıçanları tarafından atılan ana idrar proteinlerindedir.  $\alpha_2$ u-globulinin kristal yapısının monoklinik kristal yapısında olduğu 1992 yılında rapor edilmiştir (Böcskei vd 1992).  $\alpha_2$ u-globulin çözeltide her iki ucunda alfa heliksleri ve anti paralel 8 adet beta tabakalı yapı ile bir  $\beta$  fiçisi şeklinde düzenlenmiştir.



Şekil 1.8.  $\alpha_2$ u-globulin proteininin tersiyer yapısı (Beynon 2004).

$\alpha_2$ u-globulin lipokalin olarak adlandırılan protein süper ailesinin bir üyesidir. Bunlar hidrofobik özellikteki aminoasitleri ve triptofan içermesinden dolayı hidrofob özelliktedirler (Cavaggioni ve Mucignat-Caretta 2000).  $\alpha_2$ u-globulin proteininin hidrofobik özelliği sayesinde kendisine apolar maddeleri büyük bir güçle bağlayabilmektedir.

$\alpha_2$ u-globulinin molekül ağırlığı 20 kDa'dan daha düşüktür, glomerulus tarafından bu protein kolaylıkla filtre edilir.  $\alpha_2$ u-globulin glomerulus filtresinden yaklaşık %60 böbreğin proksimal tübüllerinden geri emilirken, arta kalan %40'ı da idrarla atılır (Neuhaus vd 1981).

Farmakolojik ve cerrahi sonuçlara göre  $\alpha_2$ u-globulinin hepatik sentezinde en az 5 hormonun etkili olduğu öne sürülmüştür. Bu hormonlar androjen, glukokortikoid, tiroid, büyüme ve insülin hormonlarıdır. Bu hormonlar erkek sıçanlarda hepatik  $\alpha_2$ u-globulin elde edilmesinde gereklidir. Bunun yanı sıra hepatik  $\alpha_2$ u-globulin sentezi; cinsiyete özgü bir bulgudur, bazı diğer dokularda hem erkek hem de dişi hayvanlarda  $\alpha_2$ u-globulin gen ifadesi bulunmuştur.

$\alpha_2$ u-globulin 18 izoformu, erkek ve dişilerin üst deri bezinde tespit edilmiştir (Macinnes vd 1986). Bu açıklanmış olan  $\alpha_2$ u-globulin izoformlarının altkümelerine bakıldığında doğum sonrası 10. günle 25. gününde Western Blot tarafından tüm analizi yapılmıştır (Macinnes vd 1986). Yetişkinlerde 35-40. günlerde  $\alpha_2$ u-globulin piklerinin sentezi biraz düşmektedir (Macinnes vd 1986).  $\alpha_2$ u-globulin transkriptleri tüm üstderi bezi mRNA'sının %5-10'unu temsil eder ve yapılan araştırmalara göre bu, yetişkin erkek karaciğerinden 3-4 kat daha yüksek değere karşılık gelmektedir (Macinnes vd 1986).

$\alpha_2$ u-globulin proteinleri, sıçanlarda 5. kromozom üzerinde bulunan 20 ile 25 arasında değişen bir multi-gen ailesi tarafından ifade edilmektedir (Kurtz vd 1981). Bu

genler birbirlerinin yüksek oranda dizi homologudur ve bunlar farklı dokularda ifade edilmektedir.  $\alpha 2u$ -globulin mRNA'sı böbreklerde ifade edilememektedir. Bunun en büyük nedeni olarak karaciğerde salgılandıktan sonra  $\alpha 2u$ -globulinin böbreklerde parçalara ayrılmış olabileceği düşünülebilir. Sıçanlarda aktifliğini yitirmiş 13  $\alpha 2u$ -globulin geni bulunmuşken, farelerde 42 gen tespit edilmiştir ancak bunun sadece yarısı aktif halde bulunmaktadır. Buda sıçan ve farelerin protein formlarının birbirinden farklı olduğunu göstermektedir. Bunun yanı sıra insanlarda 1 tane aktifliğini yitirmiş  $\alpha 2u$ -globulin geni vardır, bu da bu proteinin insanlarda ifade edilmediğinin göstergesidir (Logan vd 2008).

Yapılan bu çalışmada  $\alpha 2u$ -globulin türlerinin belirlenmesi ve bunların aminoasit içerikleri ile sekans analizlerinin yapılması hedeflenmiştir. Bu proteinler sıçanın tükrük bezlerinden elde edilmiştir. Sıçan idrarındaki  $\alpha 2u$ -globulinin rolü anlaşılammıştır. Fakat bu proteinlerin karşı cinsi etkileyebilmek için koku verici maddeleri taşıma görevini üstlendikleri ve böbreklerde yağ asiti gibi hidrofobik molekülleri taşıyıcı görevi olduğu belirtilmiştir (Bayard 1995).

Bu çalışma farmakolojik ve toksikolojik veri tabanlarını genişletmek için, sıçanların biyolojik sıvıları, serum sıvıları, beyin-omirilik sıvıları ve idrarlarının incelenmesi ile gerçekleştirilmiştir. Spesifik olarak ana protein komponentlerinin idrar ve beyin-omirilik sıvıları içersinde tespit edilmiştir. Sonuçta bu çalışmada 7 adet  $\alpha 2u$ -globulin saflaştırılmış ve tespit edilmiştir (Wait 2001).

Wistar sıçan idrarında  $\alpha 2u$ -globulin protein ailesinin izoformlarının incelenmesi adlı yüksek lisans tez çalışmasında, proteinler iki boyutlu jel elektroforezi yöntemi ile saflaştırılmıştır. MALDI-TOF-MS-MS ile karakterize edilmiştir. Sonuçta  $\alpha 2u$ -globulinin 16 adet izoformu tespit edilmiştir (Eker 2010).

#### **1.4. Çalışmanın amacı**

Çalışmanın amacı, Wistar tipi erkek sıçan idrarında yüksek oranda bulunan düşük molekül ağırlıklı proteinlerin karakterizasyonlarının yapılması ve bu proteinlerin çeşitliliğinin araştırılmasıdır. Bu düşük molekül ağırlıklı proteinlerin izoformlarının birbirlerinden ayrılması, elektroforez yöntemleri kullanılarak gerçekleştirilecektir. İki boyutlu jel elektroforezi ile ayrımı gerçekleştirilmiş olan protein spotları MALDI-MS ve MALDI-MS/MS kullanılarak tanımlanmaya çalışılacaktır.

## 2. MATERYAL ve METOT

### 2.1. Materyal

İki boyutlu jel elektroforezi yönteminin birinci boyutunda proteinleri pH değerlerine göre ayırabilmek için özel yaptırılan cihaz kullanıldı, burada 9 ve 20 cm'lik cam kapiler borular kullanıldı, ikinci boyutunda BioRad marka cihaz ile proteinlerin molekül ağırlıklarına göre ayrımı gerçekleştirildi, burada 7 ve 8 cm'lik cam aparatlar kullanıldı. İki boyutlu jel elektroforezinin gerçekleştirilebilmesi için Thermo Electron marka güç kaynağı kullanıldı. Protein miktar tayini için Cary 100 Bio marka Cary WihUV model UV-Vis spektrofotometresi kullanıldı. İdrar örneklerini konsantre etmek için Kubota marka 5500 model santrifüj cihazı ve Kartell marka Art.84002 model, por büyüklüğü 30x115 mm olan, 50mL'lik santrifüj tüpü kullanıldı. Jelleri boyama aşamasında Edmund Bühler GmbH marka çalkalayıcı kullanıldı. Deneylerde kullanılan çözeltilerin hazırlanma aşamasında magnetik karıştırıcı ve Hotplate stirrer SB 162-3 marka elektronik karıştırıcıdan yararlanıldı. Tartımlar 0,1 mg hassasiyete sahip CHYO marka Chyo Balance Corp model hassas terazide gerçekleştirildi. Kütle ölçümleri için Bruker marka Autoflex III Smartbeam model kütle spektrometresi kullanıldı. Tüm deneysel çalışmalarda deiyonize su kullanıldı.

#### 2.1.1. İdrar örnekleri

12 haftalık sağlıklı Wistar tipi erkek sıçan idrarları Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi öğretim üyesi Doç. Dr. Firdevs Mor'un "Wistar erkek sıçanın yaş ve testise bağlı  $\alpha$ 2u-globulin protein düzeyinin belirlenmesi" adlı projesi kapsamında Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları Ünitesi'nde kontrol hayvanı olarak kullanılan sıçanlardan elde edildi.

Sıçanlardan toplanan idrar örnekleri öncelikle konsantre edildi. 1 nolu sıçan idrarı toplamda 4,5 mL; 2 nolu sıçan idrarı toplamda 9,5 mL idi. Her iki örnekten de 4,5 mL kullanılarak, örnekler konsantrasyon işlemine tabi tutuldu. Konsantrasyon tüplerine konulmuş 4,5 mL'lik 1 ve 2 nolu örnekler öncelikle 0,5 mL'ye indirilerek konsantre edildi, daha sonra örneklerin Tris-HCl tampon çözeltisiyle yıkama işlemi gerçekleştirildi.

#### 2.1.2. Kimyasallar

Agaroz (PEQLAB), 2. boyutta kullanıldı.

Akrilamid % 99.9 (AMRESCO), poliakrilamid jeli için monomer olarak kullanıldı.

Ampholyte (2.0-4.0) (FLUKA), 1. Boyutta taşıyıcı amfolit olarak kullanıldı.

Ampholyte (7.0-9.0) (FLUKA), 1. Boyutta taşıyıcı amfolit olarak kullanıldı.

Ampholyte (5.0-7.0) (FLUKA), 1. Boyutta taşıyıcı amfolit olarak kullanıldı.

APS (ALDRICH), jel polimerizasyonunda katalizör olarak kullanıldı.

Asetik Asit (İSOLAB), Gümüş boyamada kullanıldı.

Bisakrilamid (AMRESCO), 2. boyutta çapraz bağlayıcı olarak kullanıldı.

Sığır Serum Albumin (AMRESCO), protein miktar tayini için kullanıldı.

Deconex (MERCK), kapiler tüplerin temizlenmesinde kullanıldı.

Ditiyotreitöl (DTT) %99.4 (AMRESKO), örnek hazırlamada ve 1. boyutta inkübasyon çözeltisi için kullanıldı.  
EDTA TITRİPLEX %99.0-101.0 (MERCK), gümüş boyama için kullanıldı.  
Etanol, gümüş boyama için kullanıldı.  
Etilen Diamin %99.0 (MERCK), 1. boyut için kullanıldı.  
Formaldehid %37 (MERCK), gümüş boyama için kullanıldı.  
Fosforik Asit %85 (MERCK), 1. Boyut için kullanıldı.  
Gliserol %99.0-100.5 (MERCK), 1. ve 2. boyut için kullanıldı.  
Glisin %99.5 (AMRESKO), 2. boyut için kullanıldı.  
Glutaraldehit %25 (MERCK), gümüş boyama için kullanıldı.  
Gümüş Nitrat %99.8-100.5 (MERCK), gümüş boyama için kullanıldı.  
Metanol (ISOLAB), CBB boyamada kullanıldı.  
Sodyum Dodesil Sülfat (SERVA), 2. boyutta kullanıldı.  
Sodyum Asetat x3H<sub>2</sub>O %99 (MERCK), gümüş boyama için kullanıldı.  
Sodyum Azid, idrarların toplanması sırasında kullanıldı.  
Sodyumbikarbonat (MERCK), gümüş boyama için kullanıldı.  
Sodyum Karbonat susuz %99.9 (MERCK), gümüş boyama için kullanıldı.  
Sodyum Tiyosülfat pentahidrat %99 (FLUKA), gümüş boyama için kullanıldı.  
Temed (BİO-RAD), 1. ve 2. boyut için kullanıldı.  
Timerosal (MERCK), gümüş boyama için kullanıldı.  
Tripsin (PROMEGA), kütle analizi için kullanıldı.  
TRİS-BAZ %94 (SİGMA), 1. boyut için kullanıldı.  
TRİS-HCl %99.9 (AMRESKO), 2. boyut için kullanıldı.  
Üre granüllü %98 (SİGMA), örnek için kullanıldı.  
Üre %99 (MERCK), örnek hazırlamada, 1. ve 2. boyut için kullanıldı.

## **2.2. Metot**

### **2.2.1. İdrarların toplanması**

Sıçanların idrarları iki gece boyunca toplandı. Metabolik kafeslerin alt kısmına idrarları toplamak için 50 mL'lik plastik tüpler yerleştirildi. Bu tüpler, proteinlerin oda sıcaklığında bozunmaması için buz içinde tutuldu. İdrarlar içerisinde bakteri üremesini engellemek amaçlı tüplere 1 mL 1 mM sodyum azid (1 M'lık Tris içinde, pH: 6.8) eklendi. İki kez 16'şar saat boyunca (gece) toplanmış olan idrarlar, 5 000 g'de idrardaki katı partikülleri uzaklaştırmak için santrifüj edildi ve idrarlar kullanılabildiği kadar -20 °C'de saklandı.

Bu idrar örneklerini konsantre edebilmek için ön işleme tabi tutulması gerekmektedir. İdrarları konsantre edebilmek için konsantrasyon tüpleri kullanıldı (5 000 Da por büyüklüğüne sahip). Bunun için başlangıçta idrarlar, içindeki katı partikülleri uzaklaştırmak amacıyla 5 000 g de 10 dk kadar santrifüj edildi. Daha sonra idrarlar konsantrasyon tüplerine boşaltıldı ve her bir konsantrasyon işlemi sonrası 5 mL 20 mM'lık Tris-HCl (pH:7.4) eklenerek yıkama işlemi gerçekleştirildi.

## **2.2.2. Elektroforez işlemleri**

İki boyutlu jel elektroforezi için hazırlanmış olan idrar örnekleri kullanılarak, çalışmanın amacına uygun olarak tek boyutlu ve iki boyutlu jeller hazırlandı.

### **2.2.2.1. Örneklerin hazırlanması**

#### **2.2.2.1.1. İki boyutlu jel elektroforezi için örnek hazırlama**

Deneylerde iki boyutlu jel elektroforezi için 1995'te ilk kez yayınlanmış olan Klose ve Kobalz tarafından geliştirilen teknik kullanıldı (Klose ve Kobalz 1995). Sıçanlardan toplanan idrarlar 4,5 mL ve 9,5 mL idi. Daha sonra konsantre edilmiş idrarlara, hacimlerinin %108'i kadar üre, %10'u kadar 1,4 M'lık DTT, %10'u kadar %40'lık amfolit 2-4 ve %4'ü kadar da proteaz inhibitörü eklendi. Gerekli olan tüm kimyasal maddelerin eklenmesinden sonra idrar örnekleri 100 000 g'de yarım saat süreyle 4°C'de santrifüj edildi. Bu işlemler sonrasında örneklerin protein konsantrasyonları tespit edildi.

#### **2.2.2.2. Protein miktar tayini**

İdrarların protein konsantrasyonları, Bradford yöntemi (Bradford 1976) kullanılarak tespit edildi. Bu yöntem organik boyaların, proteinlerin asidik ve bazik gruplarıyla etkileşmesine dayanmaktadır. Boya bağlama temelli yöntemlerden en yaygını Bradford yöntemidir ve oldukça duyarlı bir tekniktir. Organik boya olarak Coomassie Brilliant Blue G-250 boyar maddesi kullanıldı. Örneklerin konsantrasyonları, proteinin aminoasit bileşimine bağlı olarak oluşan ve 595 nm'de absorbans veren mavi rengin ölçümü esasına göre belirlenmektedir.

Yöntemde öncelikle CBB G-250 boyar maddesini içeren tampon çözeltisi hazırlandı. 5 mg CBB G-250 ve 5'er mL etanol ve %85'lik fosforik asit alınarak örnek hazırlama sırasında da kullanılan 20 mM'lık Tris-HCl (pH: 7,4) tamponu ile son hacim 50 mL olacak şekilde tamamlandı. Çözeltinin ağzı ve etrafı alüminyum folyo ile sarılarak karanlıkta 2 saat karıştırıldı. Karıştırma sonunda çözelti süzgeç kağıdından geçirildi. Daha sonra belli standart derişimlerde hazırlanan Sığır Serum Albumin çözeltilerinden 100'er µL alınıp üzerine 1 mL CBB reaktifi eklenerek 595 nm'de absorbans ölçümleri alındı ve elde edilen verilere göre kalibrasyon eğrisi çizildi. Aynı şekilde idrar örneklerinin de absorbans değerleri UV-Vis spektrofotometrede ölçüldükten sonra, kalibrasyon eğrisinden örneklerin protein konsantrasyonları hesaplandı.

#### **2.2.2.3. Tek boyutlu jel elektroforezi**

SDS-PAGE için %30'luk Akrilamid/Bis Akrilamid stok solüsyonu kullanıldı. 29,2 g akrilamid ve 0,8 g bis akrilamid tartılıp deiyonize su ile 100 mL'ye tamamlandı ve 0,8 µL'lik disk filtre ile filtre edildi. Stok 4 °C'de karanlıkta saklandı.

Örnek yükleme tamponu:

200 mM Tris-HCl (pH:6,8)

Deiyonize su

Gliserol  
% 10 (w/v) SDS  
% 0,5 (w/v) Bromfenol Mavisi  
 $\beta$ -Merkaptoetanol

Toplam 10 mL'lik stok çözeltisi 500  $\mu$ L'lik bölümler halinde -20 °C'de saklandı. Tank içinde kullanılan yürütme tampon çözeltisi ise 250 mM'lık Tris baz, 250 mM'lık glisin ve %1'lik SDS'den oluşmaktadır. Belirtilen miktarlardaki kimyasallar alınarak deiyonize su ile 1 L'ye tamamlandı ve oda sıcaklığında saklandı. Stok olan bu tampon çözeltisi 10 kat seyreltilerek kullanıldı.

#### 2.2.2.3.1. % 15'lik SDS-PAGE jeli

Tek boyutlu jel elektroforezi için Laemmli (1970) metodu temel alınarak %15'lik SDS-PAGE jeli hazırlanmıştır.

Çizelge 2.1. % 15'lik SDS-PAGE jelin bileşimi

Ayrışma (Resolving) Jeli (%12)	Yükleme (Stacking) Jeli (%4)
Deiyonize su	Deiyonize su
Akrilamid/Bis (%30'luk)	Akrilamid/Bis (%30'luk)
1,5 M Tris-HCl (pH: 8,8)	1M Tris-HCl (pH: 6,8)
%10'luk SDS	%10'luk SDS
% 10'luk APS	% 10'luk APS
TEMED	TEMED

Yukarıdaki çizelgeye göre SDS jeli hazırlandı. Hazırlanan jeller, iyi bir şekilde % 70'lik etanol çözeltisi ile temizlenmiş iki cam plaka arasına hava kabarcığı kalmadan dikkatli bir şekilde döküldü. Jel polimerleşmeden kuyucukları meydana getirmek için ortama tarak (kuyucuk aparatı) konuldu. Hazırlanan jellerden öncelikle ayırma jeli döküldü, polimerleştikten sonra üzerine yükleme jeli döküldü. Jel tamamen polimerleştikten sonra sistem tank içine yerleştirildi ve bu tanka yürütme tamponu ilave edildi. SDS-PAGE jelinde yürütülecek örnekler, örneğin  $\frac{1}{4}$ 'ü oranında örnek yükleme tamponu ile karıştırılarak 5 dk kaynatıldıktan sonra örnekler kuyucuklara yüklendi ve 100 V 20 mA'de yaklaşık 3 saat boyunca yürütüldü.

#### 2.2.2.4. İki boyutlu jel elektroforezi

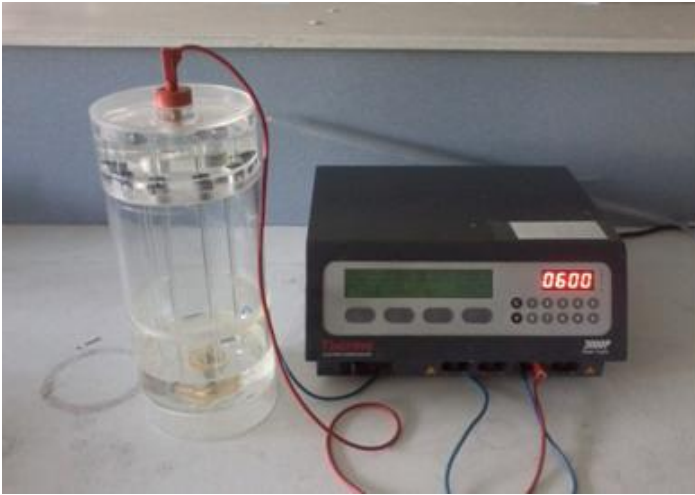
İki boyutlu jel elektroforezi, 1. boyut ve 2. boyut olmak üzere iki kısımdan oluşur. 1. boyutta proteinler izoelektrik noktalarına göre ayrılırken, 2. boyut kısmında ise proteinler sadece molekül kütlelerine göre ayrılır. Birinci boyuttan çıkarılmış 20 cm'lik jelin 3 parçaya bölünmesiyle 2. boyut işlemlerine tabi tutularak yapıldı (Klose ve Kobalz 1995).

##### 2.2.2.4.1. Birinci boyut-izoelektrik fokuslama

Küçük boyutlu jeller için 9 cm'lik cam kapiler borular kullanıldı. Aynı şekilde büyük boyutlu jeller için 20 cm'lik cam kapiler borular kullanıldı. Cam kapiler tüplere

ayırma jelinin (sep-jel) ve şapka jelinin (cap-jel) çekileceği kısımlar işaretlendi. Borulu şırıngalar örneğin yükleneceği uca takıldı. Yeterli miktarlarda önceden hazırlanmış olan sep-jel ve APS çözeltileri çözündürüldü. Çözünmüş olan sep-jel degaze edildi ve degaze işlemi yaklaşık 4 dk kadar sürdü. Degaze edilmiş jel çözeltisi içerisine gerekli miktarda %0,8'lik APS çözeltisi ilave edilerek polimerleşmeye hazır olan çözeltiler kapiler cam çubuklara çekildi. Cam kapiler bu şekilde yarım saat kadar bekletilerek polimerleşmesi sağlandı. Bu arada cap-jel çözeltisi degaze edildi üzerine gerekli miktarda %0,8'lik APS çözeltisi eklendi. Bu çözelti kapilerin alt kısmına hiç hava kabarcığı kalmadan şırınga ile eklendi ve 30 dakika polimerleşmesi için beklendi. Polimerleşme tamamlandıktan sonra cap-jel ucuna büyük bir su damlası damlatıldı ve parafilm ile kapatıldı. Kapilerin örneklerin yükleneceği kısımlarına da su dolduruldu ve parafilm ile kapatıldı. Alüminyum folyo içine sarılmış olan bu kapilerler oda sıcaklığında yatay bir şekilde karanlıkta; büyük kapilerler için en az üç gün, küçük kapilerler için en az bir gün jellerin polimerleşmesi için bekletildi.

Birinci boyut yürütmeden önce kapiler tüplerin iki ucundaki polimerleşme suyu alındı ve örnek yükleme aşamasına geçildi. Kapiler tüplerin içerisine örnek yüklemeye önce ayırma jelinin üst kısmına 5µL Sephadex çözeltisi konuldu. Bu çözelti için 20 g Sephadex G-200 5 saat boyunca 90 °C'de 500 mL destile suda bekletildi. Süpernatant dekante edilerek 1L % 25'lik gliserol çözeltisinde çözüldü. Prob kullanılarak 2 saat boyunca karıştırıldı ve süre sonunda süspansiyon filtre kağıdından geçirildi. Elde edilen jel kısım eşit hacimlere bölünerek -20 °C'de saklandı. Bu çözelti kullanılacağı zaman 0,272 g için üzerine 270 mg üre, 25 µL 1,4 M DTT ve 25 µL amfolit karışımı eklendi. Ayırma jelinin üst kısmına bu çözelti konulduktan sonra gerekli miktarlarda idrar örnekleri yüklendi.



Şekil 2.1. İzoelektrik fokuslama düzeneği

Kapiler tüpler izoelektrik fokuslama aparatına yerleştirildi. Cihazın üst haznesine bileşimi 3 M üre ve %7,27 fosforik asitten oluşan anot çözeltisi, alt haznesine ise bileşimi 9 M üre, %5 gliserin ve 0,5 M'lık NaOH'ten oluşan katot çözeltisi eklendi. Cihazın kapağı kapatıldı ve cihaz programlanabilir güç kaynağına bağlanarak, büyük ve küçük kapilerler için aşağıda verilmiş olan çizelgelerde gösterilen süre ve voltajlara göre örnekler yürütüldü.



Çizelge 2.2. Küçük kapiler için IEF koşulları

<b>Voltaj</b>	<b>Zaman</b>
100V	75 dk
200V	75 dk
400V	75 dk
600V	75 dk
800V	10 dk
1000V	5 dk

Çizelge 2.3. Büyük kapiler için IEF koşulları

<b>Voltaj</b>	<b>Zaman</b>
100V	1 saat
200V	1 saat
400V	17,5 saat
600V	1 saat
1000V	30 dk
1500V	10 dk
2000V	5 dk

1. boyut sonunda elektroforez sisteminde, çıkarılan kapiler tüplerden jeller çıkarıldı. Bunun için kapiler tüplerin ucundan şırınga yardımıyla yavaşça su basıldı. Çıkarılan jeller inkübasyon çözeltisine alındı. Bu çözeltiden büyük jeller her bir jel için 10 mL, küçük jeller için 5 mL kullanıldı. Buradaki inkübasyon çözeltisi %12,5 inkübasyon tamponu (fosforik asitle pH'ı 6,8'e ayarlanmış olan ve %12,11'lik tris baz), %40 gliserin ve %3 SDS'ten oluşmaktadır. Bu çözeltide gerekli sürede çalkalanan jeller, 2. boyut elektroforezi için kullanılmaya kadar -20 °C'de saklandı.

#### 2.2.2.4.2. İkinci boyut-SDS-PAGE

Tek tip jel kullanılarak yapıldı. Bu hazırlanmış olan SDS çözeltisinin bileşimi %15 akrilamid konsantrasyonuna ve %3 çapraz bağlama oranına sahipti. Ayrırma jeli çözeltisinin bileşimi; %15 akrilamid, %2 bisakrilamid, 0,375 M Tris/Tris-HCl, %0,1 SDS ve %0,03 TEMED'ten oluşmaktadır. Hazırlanmış olan bu SDS çözeltisi -20 °C'de saklandı, kullanılacağı zaman dolaptan çıkarıldı, çözündürüldü ve degaze edildi. İçine uygun miktarlarda %1,28'lik APS eklenerek, hazırlanan bu jel çözeltisi cam plakalar arasına döküldü ve 1 saat polimerleşmeye bırakıldı. Polimerleşme tamamlandıktan sonra 1. boyut jeli, 2. boyut jelinin üzerine hava kabarcığı kalmayacak şekilde yerleştirildi. Üzerine %12,5 inkübasyon tamponu, %0,1 SDS ve %1 agarozdan oluşan agaroz çözeltisi ilave edildi, yaklaşık 1 dakika içinde bu agaroz çözeltisi katılaştı ve jel aparatı elektroforez sistemine yerleştirildi. Kullanılan inkübasyon tamponunun bileşimi: fosforik asitle pH'ı 6,8'e ayarlanmış olan ve %12,11'lik Tris bazı içeren bir çözeltidir.

Küçük jeller, birinin boyutu 8x10 cm, diğeri 7x10 cm olan iki cam plaka arasında hazırlandı. Bu boyuttaki 2. boyut jelleri hem küçük hem de büyük boyuttaki 1.

boyut jelleri için kullanıldı. Küçük 1. boyut jelleri için 1, büyük 1. boyut jeller için 3 adet 7x8 cm'lik 2. boyut SDS-PAGE jelleri yapıldı. Hazırlanan 2. boyut jelleri, yürütme tamponu ile dolu olan tanka yerleştirildi. Yürütme tamponunun bileşimi, 0,025 M Tris bazı (Tris (hidroksimetil) amino metan), 0,192 M glisin ve %1 SDS'dir.



Şekil 2.2. SDS-PAGE düzeneği

Güç kaynağına bağlanmış olan jeller için ikinci boyut yürütme koşulları aşağıdaki çizelge de verildiği gibidir.

Çizelge 2.4. İkinci boyut için yürütme koşulları

<b>Voltaj</b>	<b>Zaman</b>
35 V	5 dk
55 V	10 dk
100 V	15 dk
150 V	60 dk

### 2.2.3. Jel boyama işlemleri

Elektroforez işleminden sonra jeldeki proteinlerin görünür hale gelebilmesi için, jeller boyama işlemine tabi tutuldu. Organik (Coomassie Brilliant Blue G-250) veya metal tabanlı (Gümüş nitrat) boyalar kullanıldı. Daha sonra yapılacak kütle analizi için CBB R-250 ile boyanmış jeller kullanıldı.

#### 2.2.3.1. Gümüş boyama

İki boyutlu jeller 1996'da Shevchenko'nun gümüş boyama tekniğine göre boyandı. Gümüş boyama tekniği, hazırlanmış olan beş çözelti ile gerçekleştirildi. Bu çözeltilerin bileşimleri aşağıdaki gibidir:

Fiksasyon çözeltisi: %50 etanol, %10 asetik asit, %40 su

İnkübasyon çözeltisi: %30 etanol, %0,50 glutaraldehit, %0,20 sodyum tiyosülfat,  
0,50 M sodyumasetat  
Gümüş çözeltisi: %0,1 gümüş nitrat ve %0,01 formaldehit  
Tab çözeltisi: %2,5 sodyum karbonat, 0,05 mM sodyum tiyosülfat ve  
%0,01 formaldehit  
Durdurma çözeltisi: 0,05 M EDTA ve %0,02 timerosal

İkinci boyut yürütme sisteminden çıkarılmış olan jeller ilk olarak fiksasyon çözeltisi içine konuldu. Bu çözelti içinde jeller en az 1 saat çalkalayıcıda bekletildi. Daha sonra jeller 2 saat çalkalayıcıda inkübasyon çözeltisi içinde bekletildi. İnkübasyon çözeltisinden alınmış olan jeller 2'şer kere saf suyla 20'şer dakika olmak üzere yıkama işlemine tabi tutuldu. Yıkama işleminden sonra jeller 30 dakika gümüş çözeltisinde bekletildikten sonra 5-10 sn'lik sürelerle yıkama yapıldı. Sonra tab çözeltisine alınmış jeller üzerindeki spotlar görünür hale gelene kadar bu çözeltide bekletildi ve en son jeller durdurma çözeltisine alınarak boyama işlemi sonlandırıldı.

### 2.2.3.2. Coomassie Brilliant Blue boyama

Bradford yöntemi Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB) organik boyar maddesinin, ortamdaki proteinlere bağlanmasıyla 595 nm'de maksimum absorpsiyon göstermesi temeline dayanmaktadır. Boyanın anyonik sülfonat grupları ile proteinlerin (+) yüklü yan gruplarının etkileşimiyle meydana gelen yapının ışık absorpsiyonunun temeline dayanan bu yöntem ile örneklerdeki total protein miktarı ölçülmektedir.

Coomassie Blue boyama tekniği, hazırlanmış dört çözelti ile gerçekleştirildi. Bu boyamadaki çözeltilerin bileşimleri aşağıdaki gibidir:

Fiksasyon çözeltisi: %50 metanol ve %2 fosforik asit (%85'lik)  
İnkübasyon çözeltisi: %34 metanol, %17 amonyumsülfat ve %2 fosforik asit (%85'lik)  
Boyama çözeltisi: %34 metanol, %17 amonyumsülfat, %2 fosforik asit (%85'lik)  
ve %0,066 Coomassie Blue G-250  
Boya çıkarma çözeltisi: %25 metanol

İkinci boyut yürütme sisteminden çıkarılan jeller ilk olarak fiksasyon çözeltisi içine konuldu, gece boyunca jeller çalkalayıcıda bekletildi. Daha sonra jeller 30'ar dakikalık olmak üzere 3'er kez yıkandı. Bu aşamadan sonra 1 saat inkübasyon çözeltisinde bekletilen jeller, boyama çözeltisine alındı ve bu şekilde 5 gün bekletildi. En son olarak boya çıkarma çözeltisine alınan jellerin boyama işlemi sonlandırıldı.

Gümüş ve CBB boyama ile tamamlanmış olan jellerin görüntüleri tarayıcı ile elektronik ortama alındı ve jel resimleri analiz edildi.

### 2.2.4. Kütle ölçümleri

Kütle analizi için Shevchenko ve arkadaşlarının tanımlamış oldukları bir yöntem kullanılarak çalışmalara yön verildi (Shevchenko vd 1996). Gerçekleştirilen bu analiz süreci için 3 basamaklı bir işlem şeması uygulandı.

#### 2.2.4.1. Spotların kesilmesi ve jellerdeki boyanın uzaklaştırılması

• İlk olarak bu basamaklarda kullanılması gereken çözeltiler hazırlandı. Daha sonra jellerden analiz edilecek spotlar kesildi. Her bir jel spotu 1,5 mL'lik plastik tüplerine ufak parçalara ayrılmış bir şekilde konuldu. Bu jel parçacıklarındaki boyayı uzaklaştırabilmek için, yaklaşık 200 µL yıkama çözeltisi her bir tüpe ilave edilerek gece boyunca bu çözelti içinde bekletildi.

Yıkama çözeltisi: %50 metanol ve %5 asetik asit

Ekstraksiyon tamponu: %50 asetonitril ve %5 formik asit

Tripsin çözeltisi: 20 µg tripsin alımp 100 µL %0,01 trifloroasetikasit'te çözülmüştür. Sonra 5 µL'lik miktarlara bölünerek -80°C'de saklanmıştır. Bu çözeltiler kullanılacağı zaman üzerlerine 50 mM'lık 75 µL NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> çözeltisi ilave edilmiştir. Bu elde edilmiş olan tripsin çözeltisinin konsantrasyonu 12,5 ng/µL'dir.

• Ayrıca diğer aşamalarda kullanılmak üzere 50 ve 100 mM'lık NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> çözeltileri de hazırlandı.

#### 2.2.4.2. İndirgeme, alkilleme ve tripsin ile proteinlerin kesilmesi

• Bu basamakta kullanılmak üzere taze olarak 10 mM DTT ve 100 mM iyodoasetamid çözeltileri hazırlandı.

• Birinci basamaktaki jeller içerisinde bulunan yıkama çözeltileri dikkatli bir şekilde pipet ile uzaklaştırıldı.

• Jeller üzerine, yaklaşık 5 dk kadar oda sıcaklığında jellerin suyunu uzaklaştırmak amacı ile 200 µL saf asetonitril eklendi. Jellerin görüntüsü beyaz ve küçük hale geldi.

• Jellerde bulunan asetonitril çözeltileri dikkatli bir şekilde ortamdan ayrıldı ve 2-3 dk 5 000 g'de vakum santrijüne tabi tutularak jeller kuru hale geldi.

• Kuru olan jeller üzerine 30 µL 10 mM DTT ilave edildi (jellerin üzerini tamamen örtecek şekilde), 30 dk oda sıcaklığında bekletilerek proteinler indirgeni.

• Dikkatli bir şekilde jellerden uzaklaştırılan DTT çözeltisinden sonra, jellere 30 µL 100 mM iyodoasetamid ilave edilerek 30 dk oda sıcaklığında bekletilerek proteinler alkilendi. Süre sonunda jellerden çözeltiler dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı.

• Jellerin üzerine 200 µL saf asetonitril ilave edilmiş, yaklaşık 5 dk oda sıcaklığında bekletilerek jellerin suyu ortamdan uzaklaştırıldı. Jelleri kurutmak için ise 2-3 dk vakum santrifüjüne tabi tutuldu.

• Jeller, 200 µL 100 mM'lık amonyum bikarbonat ile 10 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiş ve böylece yeniden hidratlandı. Daha sonra jellerden bu çözelti dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı.

- Jellerin üzerine, yaklaşık 5 dk kadar oda sıcaklığında jellerin suyunu uzaklaştırmak amacı ile 200 µL saf asetonitril eklendi. Süre sonunda jellerden dikkatli bir şekilde uzaklaştırılan asetonitril çözeltisinden sonra, jeller 2-3 dk vakum santrifüjüne tabi tutularak kurutuldu.

- 30 µL tripsin çözeltisi her bir jel örneğine ilave edildi ve 30 sn kadar vorteks sayesinde iyice karıştırılması sağlandı. Proteinlerin kesilmesi amacıyla gece boyunca jel tüpleri 37 °C’de bekletildi.

#### **2.2.4.3. Analiz için peptidlerin ekstraksiyonu**

- Örnekler için başka temiz santrifüj tüpleri alındı ve jellerdeki tripsin çözeltisi bu temiz tüplere ilave edildi.

- Jel parçacıklarının olduğu tüpler üzerine 30 µL 50 mM’lık amonyum bikarbonat ilave edildi ve 10 dk iyice karışmasını sağlamak amacıyla vortekslenildi. Daha sonra örnekler 30 dk santrifüj edilerek, süpernatant kısmı dikkatlice alındı ve diğer tüplerin üzerine ilave edildi.

- Jel tüplerine 50 µL ekstraksiyon çözeltisi ilave edilerek 10 dk vortekslenip, 30 sn santrifüj edildi ve daha sonra buradaki süpernatant dikkatlice alınarak diğer tüplerin üzerine ilave edildi.

- Jel tüplerine tekrardan 50 µL ekstraksiyon çözeltisi ilave edilerek işlem tekrar edildi.

- Toplamda elde edilen süpernatant karışımlarının hacimleri 20 µL olacak şekilde vakum santrifüjü kullanılarak indirildi ve son hacimler elde edilmesiyle 1 µL kadar formik asit ilavesi yapıldı.

#### **2.2.4.4. Zip-Tip işlemi**

Elde edilen peptid karışımlarını konsantre etmek için son olarak örnekler, zip-tip C<sub>18</sub> uçlu pipet uçları kullanılarak zip-tip işlemine tabi tutuldu. Bunun için gerekli 4 çözelti hazırlandı ve bu çözeltilerin bileşimleri şu şekildedir:

Islatma çözeltisi (Wetting Solution): %100 asetonitril.

Dengeleme (Equilibration Solution) ve Yıkama (Washing Solution) çözeltisi: %0,1 trifloroasetikasit (TFA)

Elüsyon çözeltisi (Elution Solution): %0,1 TFA içinde %50 asetonitrilden oluşur.

İşlemlerin ilerleyiş sırası şu şekildedir:

##### **1) Dengeleme**

- 3 defa uca ıslatma çözeltisinden 10 µL çekilip atıldı.
- 3 defa uca denkleştirme çözeltisinden 10 µL çekilip atıldı.

## 2) Bağlama

- Peptidleri bağlanmak istenen örnekten 2 µL çekilip bırakılarak, işlem 10 kez tekrarlandı.
- Bağlama işleminden sonra uca 10 µL yıkama çözeltisi çekildi ve atıldı.

## 3) Elüsyon

- Uca elüsyon çözeltisinden 2 µL çekildi ve temiz bir tüpe boşaltılarak, işlem 5 kez tekrarlandı.

### 2.2.4.5. Matriksin Hazırlanması

Örneklerin hazırlanmasından sonra, kütle analizi için gerekli olan matriksin hazırlanması işlemine geçildi. Burada matriks olarak alfa-siyano-4-hidroksisinnamik asit (CHCA) kullanıldı. Matriks birinci ve ikinci tabaka olmak üzere iki ayrı çözelti şeklinde hazırlandı.

- Birinci tabaka: 0,6 mg CHCA tartılarak 10 µL metanol içerisinde çözündürülerek üzerine 40 µL aseton eklenerek 50 µL'lik çözeltisi hazırlandı ve hazırlanan bu çözelti 8 dk santrifüjlendi (7 örnek için yeterlidir).
- İkinci tabaka: 0,6 mg CHCA tartılarak 24 µL metanol içerisinde çözündürüldü ve üzerine %0,1'lik 36 µL TFA çözeltisi eklenerek 60 µL'lik çözelti hazırlandı ve bu çözelti 8 dk santrifüjlendi (7 örnek için yeterli).

Altın kaplamalı plakadaki örnek yükleme bölgelerine öncelikle; hazırlanmış olan birinci tabaka çözeltisinden 1 damla kadar damlatıldı ve kuruyana kadar bekletildikten sonra ikinci tabaka çözeltisinden, aynı bölgeye 1 damla kadar konulduktan sonra aynı bölgeye 1 damlada örneklerden damlatıldı. Yarım saat kadar oda sıcaklığında kuruması beklendi.



Şekil 2.3. MALDI-TOF/MS'de kullanılan target

Kuruma süresi biten altın plaka target, kütle spektrometresinin giriş kısmına yerleştirildi ve cihazın kalibrasyonundan sonra örneklerin MS sonuçlarına göre spektrumları alındı ve spektrumlara bakılarak uygun görülen peptid kütleleri MASCOT adındaki arama motoruna gönderilerek protein tarama işlemleri gerçekleştirildi. Daha

sonra MS sonuçlarının daha kesin sonuçlara dayandırılabilmesi için MS/MS sonuçları da alındı.

### 3. BULGULAR ve TARTIŞMA

Bu çalışmada, 2 adet sağlıklı Wistar tipi erkek sıçandan 2 gece boyunca (16'şar saat) toplanmış idrar örnekleri ile çalışıldı. İki gün sonunda toplamda sıçanın birinden 4,5 mL, diğerinden 9,5 mL idrar örneği elde edildi. Bu iki örneğin toplam hacimleri birbirlerinden farklılık gösterdiği için, örneklere bu halleri ile Bradford yöntemi uygulanarak protein miktar tayini uygulandı ve sonuçta örneklerin seyreltik olduğu ortaya çıkarıldı.

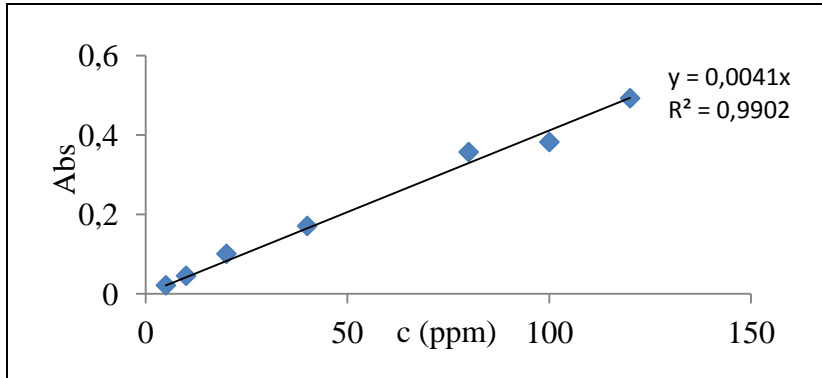
Seyreltik oldukları anlaşılan, ham idrar örnekleri Materyal-Metod 2.1.2. bölümünde anlatıldığı gibi konsantre edildi. Bu yöntem ile ayrıca idrar örnekleri içindeki tuzlar da uzaklaştırılmış oldu. Konsantrasyon sonrası ve örneklerin iki boyutlu jel elektroforezine hazırlama sonrası yine protein miktar tayini yapıldı. En son yapılmış olan protein miktar tayini sonuçları Çizelge 3.1.'de gösterildi.

Farklı konsantrasyonlarda, yeni hazırlanmış standart BSA (Sığır serum albumin) çözeltilerine göre kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. Bu değerler Çizelge 3.1'de gösterildi. İdrarlardaki protein miktarları bu oluşturulmuş kalibrasyon eğrisine göre hesaplandı. Bu hesaplama sonuçlarına göre IEF jeline yüklenecek örnek miktarları belirlendi.

Çizelge 3.1. İdrar örneklerinin kalibrasyon eğrisi için elde edilen veriler

Konsantrasyon (c) (µg/mL)	Absorbans	İdrar örneklerinin konsantrasyon(µg/mL)	Absorbans
5	0.0214	1 nolu (2)	0.2602
10	0.0454	1 nolu (3)	0.3903
20	0.1008	2 nolu (2)	0.3000
40	0.1710	2 nolu (3)	0.4501
80	0.3572		
100	0.3825		
120	0.4929		

Çizelge 3.1.'de görülen değerler sonucunda meydana gelen kalibrasyon eğrisi Şekil 3.1.'de gösterildi.



Şekil 3.1. Protein miktar tayini için kalibrasyon grafiği

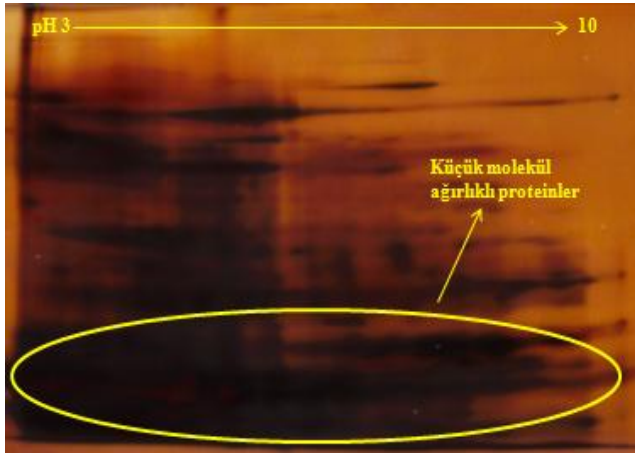


Kalibrasyon grafiğine göre hesaplanan protein miktarları: 1 nolu örnek için ortalama 4,31  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  iken, 2 nolu örnek için 4,97  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 'dir. Gümüş boyamada 1 nolu örnek için 194  $\mu\text{g}$ , 2 nolu örnek için 194  $\mu\text{g}$  total protein yüklenirken; CBB boyamada 1 nolu örnek için 388  $\mu\text{g}$ , 2 nolu örnek için 388  $\mu\text{g}$  total protein yüklemesi yapıldı.

### 3.1. İki Boyutlu Jel Elektroforezi Çalışmaları

#### 3.1.1. 1 nolu idrar örneğinin 2D jellerin eldesi

Her iki örnek ile çok sayıda farklı miktarlarda protein ile yüklenmiş iki boyutlu jeller hazırlandı. 9 cm'lik küçük kapiler tüplere az miktarlarda örnek yüklendiği zaman zayıf spotlar elde edildi, bu sebeple miktar artırıldı. Şekil 3.2.'deki küçük boyutlu jelde görüldüğü gibi çok sayıda proteinin var olduğu fakat bu ebatlardaki bir jel ile ayırımın iyi olmadığı görüldü. Şekil 3.2.'de 1 nolu idrar örneğinin 9 cm'lik IEF tüpü kullanılarak elde edilen 2D jel görüntüsü verildi. Şekil 3.2.'de görülen jele 138  $\mu\text{g}$  örnek yüklendi.

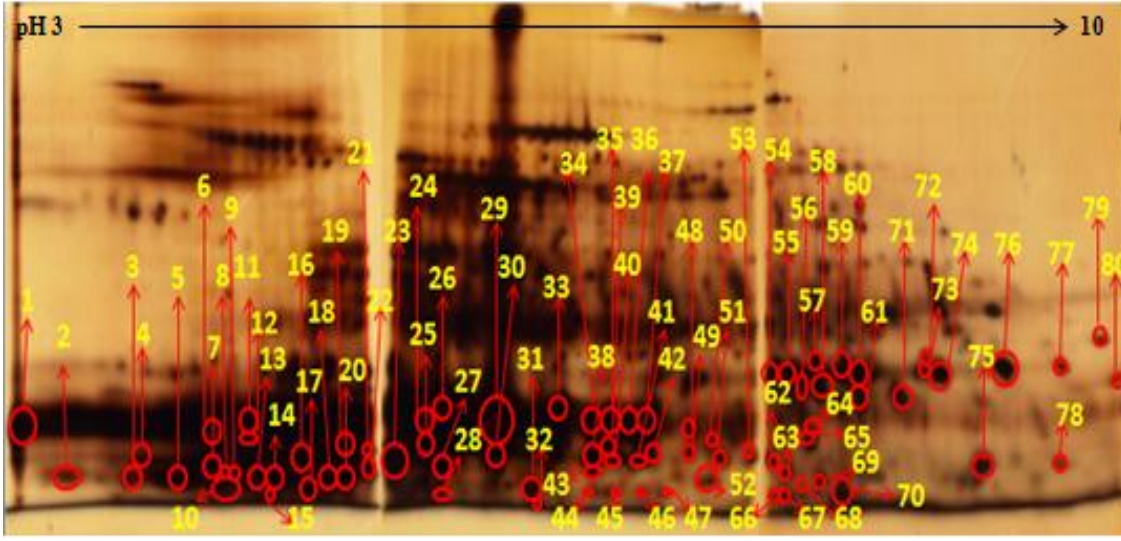


Şekil 3.2. 1 nolu sıçan idrarının gümüş boyalı 2D jel resmi (küçük kapiler) (138  $\mu\text{g}$  protein)

Jel resminde de görüldüğü gibi, spotlar arası ayırım iyi değildi. Çok sayıda yapılmış olan jeller için farklı miktarlarda örnek yüklemeleri yapıldı. Şekil 3.2.'de 138  $\mu\text{g}$  total protein içeren örnek yüklendi. Başka jellerde daha düşük miktarlarda örnekler de yüklendi fakat bu seferde görünür olan spotların sayısının daha az olduğu gözlemlendi. Bu nedenlerden dolayı küçük kapiler tüpler (9 cm) ile deneylere devam edilmedi. 20 cm'lik büyük cam kapiler tüplerle çalışmalara devam edildi.

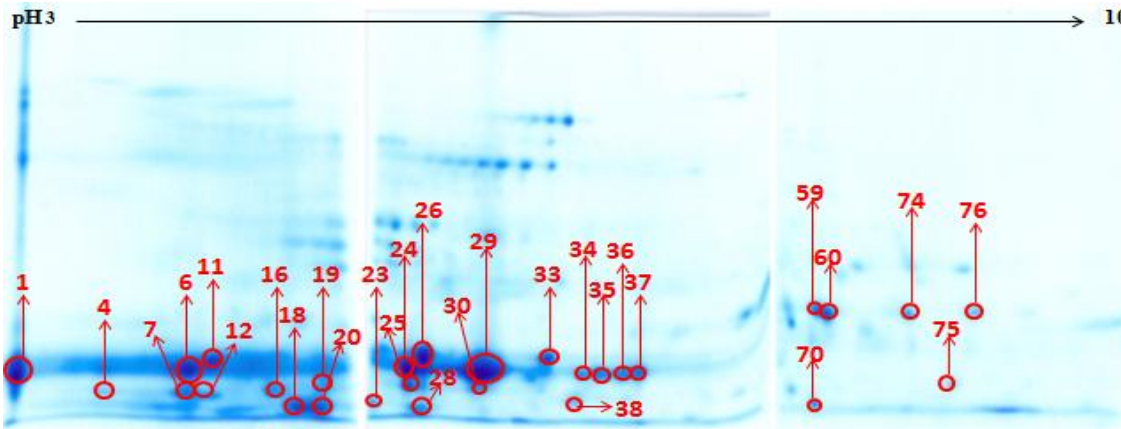
1 nolu sıçan idrarının 20 cm'lik uzun cam kapiler tüpler kullanılarak elde edilen gümüş boyalı jel resminin görüntüsü Şekil 3.3.'deki gibidir. Kapiler tüpe 194  $\mu\text{g}$  total protein içeren örnek yüklendi. 20 cm'lik büyük kapiler tüplerinden çıkan IEF jeli küçük 8 cm'lik ikinci boyut cam sisteminde yürütüleceği için üç parçaya ayrılarak, SDS-PAGE ile üç ayrı jel üzerinde yürütüldü. Şekil 3.3.'de gösterilen resim üç jelin birleştirilmiş halidir. Tayin edilmesi istenilen düşük molekül ağırlıklı proteinlerin bulunduğu bölgedeki spotlar numaralandırılarak gösterildi. Şekil 3.3.'deki gümüş jelinde 80 adet spot numaralandırıldı. Gümüş jeline karşılık gelen spotlar daha sonra

CBB jelinde de aynı numara ile etikenlendi. CBB jelinde görülebilen aynı spotlar aynı numaralar ile işaretlendi.



Şekil 3.3. 1 nolu sıçan idrarının gümüş boyalı 2D jel resmi (194 µg protein)

Şekil 3.4.'de CBB boyalı örnek bir jel resmi gösterildi. Bu jele 388 µg total protein içeren örnek yüklendi. CBB boyamada görünür hale gelen spotların bir kısmı kesildi ve daha sonra MALDI-TOF'tan PMF spektrumları alınarak tanımlanmaya çalışıldı.

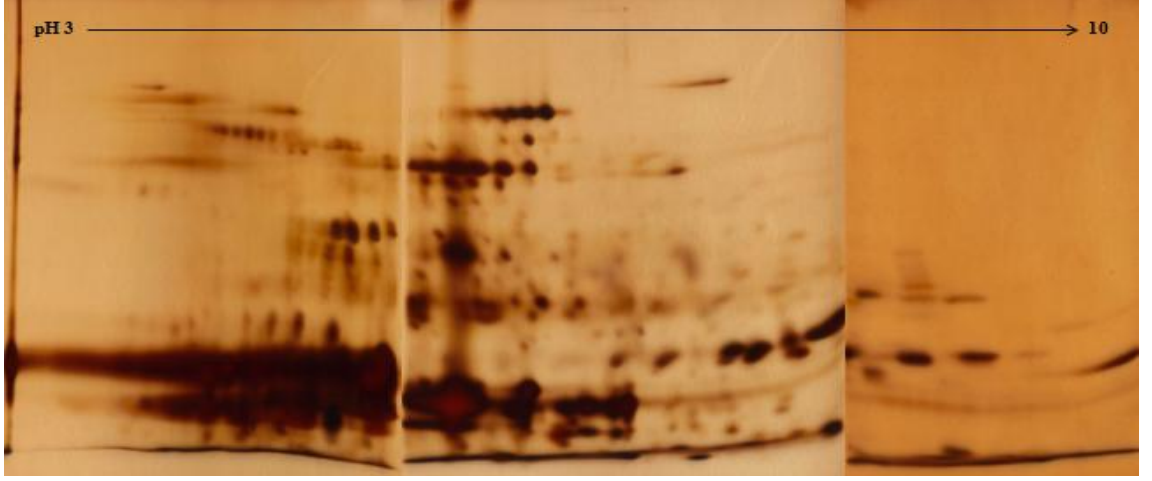


Şekil 3.4. 1 nolu sıçan idrarının CBB boyalı 2D jel resmi (388 µg protein)

Şekil 3.3.'deki gümüş jelinde görülen 80 spottan, bazıları Şekil 3.4.'deki CBB jelinde görünür hale geldi. Bu spotlardan 29'u jelden kesildi ve incelendi. Bu 29 spotun hangi protein veya proteinler olabileceği kütle spektrometresi ile tanımlanmaya çalışıldı.

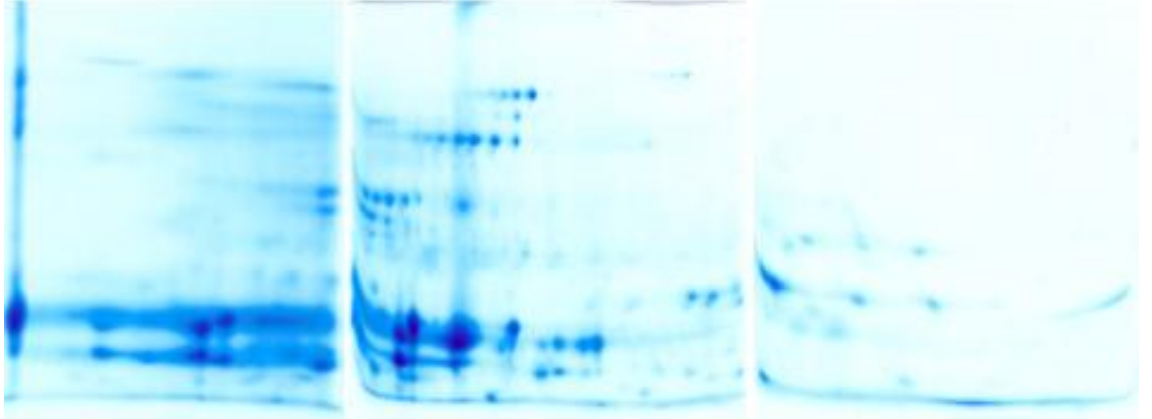
### 3.1.2. 2 nolu idrar örneğinin 2D jellerin eldesi

2 nolu sıçan idrarının büyük kapiler tüpler kullanılarak elde edilen gümüş boyalı jel resmi Şekil 3.5.'deki gibidir. Burada yüklenen total protein miktarı 184 µg'dır. Bu jel üzerinde herhangi bir numaralandırma ile gösterim yapılmadı. 2 nolu idrar örneğindeki spotlar, 1 nolu idrar örneğindeki spotlar ile uyumludur. İki örneğin jel görüntülerinin benzer olması nedeniyle tanımlama çalışmaları sadece 1 nolu idrar örneği için gerçekleştirildi. Aynı spotların varlığı büyük oranda görülmektedir.



Şekil 3.5. 2 nolu sıçan idrarının gümüş boyalı 2D jel resmi (194 µg protein)

Aynı örneğin, CBB jeline 388 µg total protein yüklemesi yapılan jel resmin görüntüsü Şekil 3.6.'da görüldüğü gibidir.



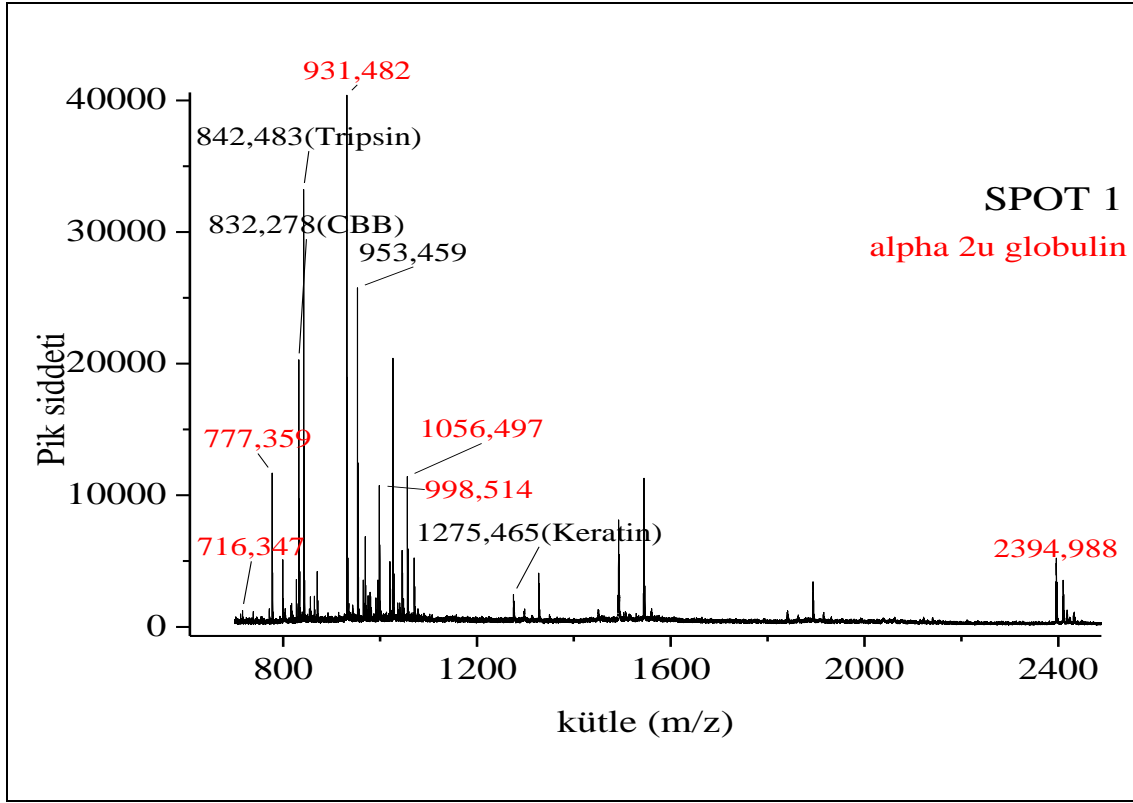
Şekil 3.6. 2 nolu sıçan idrarının CBB boyalı 2D jel resmi (388 µg protein örneği)

### 3.2. Kütle Analizleri

CBB boyamalı jellerde işaretlenen 29 spotun MALDI-TOF/MS ile spektrumları çizildi. Elde edilen peptid kütleleri arama motoru Mascot'a girildi ve tarama sonuçları incelenerek yorumlanmaya çalışıldı. Proteinlerin tanımlanabilmesi için sonuçlarda aranan şartlardan ilki protein ile eşleşen peptidlerin içerdiği aminoasit sayısının tüm

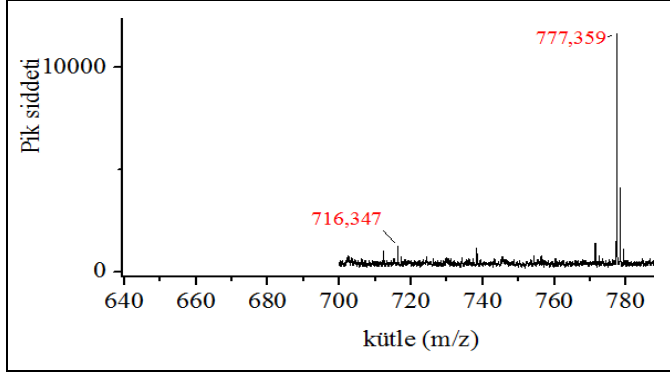
proteinin aminoasit sayısının en az %25'ine karşılık gelmesi gerekliliğidir. Diğer bir şart ise eşleşen peptidlerin kütle pikleri spektrumun güçlü piklerinden olması gerekliliğidir ve bu güçlü piklerden de en az üç adeti eşleştirme göstermesi gerekir.

### 3.2.1. Spot 1



Şekil 3.7. 1 no'lu spotun PMF spektrumu

1 nolu spotun spektrumuna bakılacak olursa, 716, 777, 931, 998, 1056 ve 2394 pikleri görülmektedir. Bu peptid kütleleri  $\alpha 2u$ -globulin proteini ile eşleşme göstermektedirler. Bu kütleler  $\alpha 2u$ -globulinin temel peptid pikleridir. Bu piklerle %33'lük dizi uyumu sağlanmaktadır. 842 piki tripsine aitken, 832 piki CBB'den gelmektedir. 1275 piki bir keratin peptidine aittir. 953 piki ise  $\alpha 2u$ -globulinin belirgin piklerinden olan 931'in sodyumla modifiye olmuş formunun piki olduğu düşünülmektedir. Bu spektrum için,  $\alpha 2u$ -globulin dışında başka bir sıçan proteiniyle eşleşme olmadı. Spot 1'in peptid kütle parmak izi spektrumunun Mascot tarama sonucu  $\alpha 2u$ -globulin proteininin GI: 22219450 giriş numaralı sekansı ile eşleşme gösterdiğinden bu sekans ve eşleştirilen peptidlerin sekansları Şekil 3.9.'da gösterilmiştir. Bu spektrumun verileri Mascot taraması sonucunda birçok  $\alpha 2u$ -globulin kaydı ile eşleşme gösterdi fakat en yüksek skorlu dizi uyumu %33 ile sağlanabildi.



Şekil 3.8. 1 no'lu spotun PMF spektrumunun bir bölgesi

Şekil 3.8.'de spot 1'in PMF spektrumunun bir bölümü görülmektedir. Bu kısmın gösterilmesinin nedeni birçok sekans dizisi arasından elemeler yapabilmektir. Bunun için öncelikle NCBI veri tabanında  $\alpha$ 2u-globulin ve sıçan üzerinden teorik bir araştırma yapıldı. Buradan elde edilen kayıt sayısı 38 idi. Bu 38 sekans dizisinin büyük bir çoğunluğu fragmentlere ait olduğundan, bu sayı 15'e indirildi. Üzerinde çalışılmış olan spotlardan  $\alpha$ 2u-globuline ait olanlar için bu 15 sekans dizisi ile karşılaştırma yapıldı. Hangi spotun hangi sekans dizisine ait olduğu araştırıldı. Bu araştırma sırasında bir spot çoğu zaman, bu 15 adet sekans dizisinin büyük birçoğu ile eşleşme gösterdi. Bu eşleşme sayısını daha fazla indirebilmek için, spotların hem spektrumlarına hem de dizi uyumlarına daha da ayrıntılı bakıldı. Bu araştırma ile spektrumlarda ki bazı peptid kütlelerinin, sekans dizisi üzerinde aynı sekans kısmına denk geldiği görüldü. Bu kütleler 716-760, 1026-1056 ve 1876-2120'dir. Bu kütlelerin sekansları 716: GNLDVAK, 760: GNLDVDK, 1026: LCVAHGTR, 1056: LCEAHGTR, 1876: VFMQHIDVLENSLGFK ve 2120: VFVQHIDVLENSLGFTFR şeklindedir. Şekil 3.7.'de görüldüğü gibi, burada 716 peptidi vardır.  $\alpha$ 2u-globulin proteinin sekansında ya 716 ya da 760 peptidi yer alabilir. Eğer her iki kütle spektrumda görülür ise, elemeler bu peptidler üzerinden yapılamaz ve tüm olası sekans dizileri göz önünde bulundurulur. Peptid 716: GNLDVAK aminoasit grubundan oluşurken, peptid 760: GNLDVDK aminoasit grubundan oluşmaktadır. İki peptid arasında sadece 1 aminoasit farkı vardır. Şekil 3.8.'de görüldüğü gibi 716 peptidi görülürken, 760 peptidi spektrumda yoktur. Olasılıklar arasında var olan sekanslar içinde eğer 760 peptidi içeren sekans dizileri varsa, bu diziler göz ardı edildi. Bu şekilde yapılmış olan eleme sonuçları ile Çizelge 3.3.'de görülen iki sekans dizisi olduğu görülmektedir.

**Protein sequence coverage: 33%**

Matched peptides shown in **bold red**.

```

1 MKLLLLLLCL GLTLVCGHAE EASSTRGNLD VAKLNGDWFS IVVASNKREK
51 IEENGSMRVF MQHIDVLENS LGFKFRIKEN GECREELYLVA YKTPEDGEYF
101 VEYDGGNTFT ILKTDYDRYV MFHLINFKNG ETFQLMVLYG RTKDLSSDIK
151 EKFAKLLCEAH GITRDNIIDL TKTDRCLQAR G

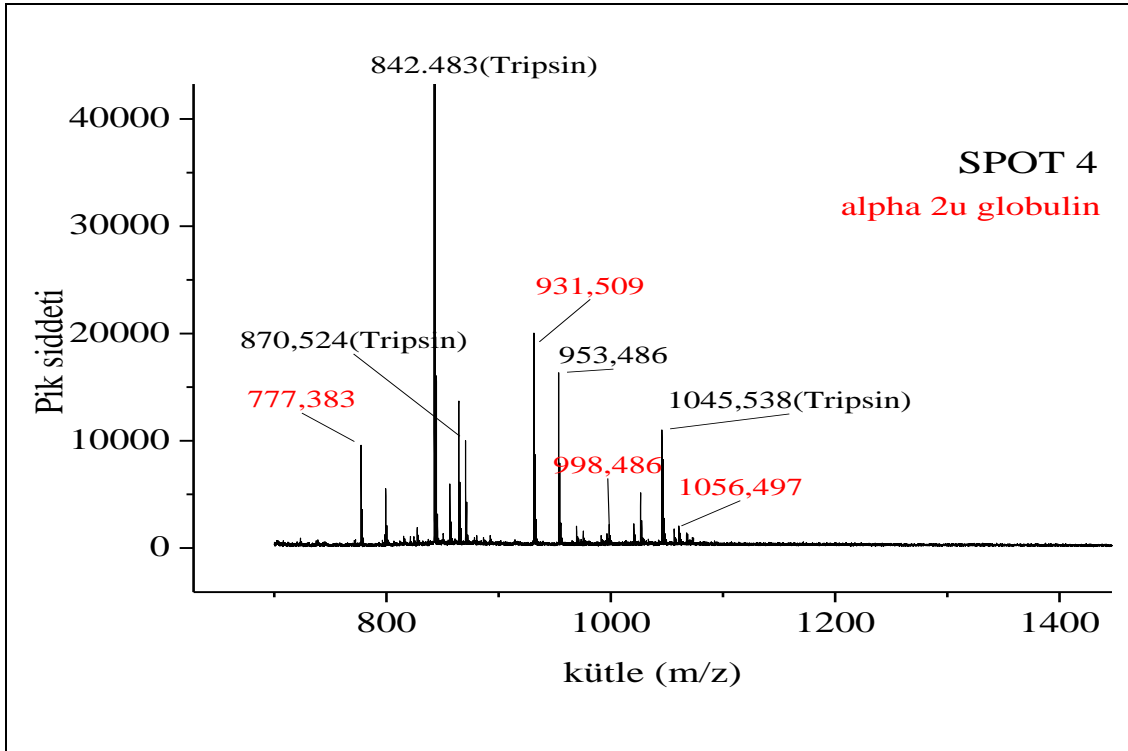
```

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	M	Peptide
27 - 33	716.0000	714.9927	715.3864	-550	0	<b>R.GNLDVAK.L</b>
85 - 92	998.0000	996.9927	997.5484	-557	0	<b>R.ELYLVAYK.T</b>
93 - 113	2394.0000	2392.9927	2394.0903	-458	0	<b>K.TPEDGEYFVEYDGGNTFTILK.T</b>
144 - 150	777.0000	775.9927	776.3916	-514	0	<b>K.DLSSDIK.E</b>
156 - 164	1056.0000	1054.9927	1055.5182	-498	0	<b>K.LCEAHGITR.D</b>
165 - 172	931.0000	929.9927	930.5022	-548	0	<b>R.DNIIDLTK.T</b>

Şekil 3.9. 1 no'lu spotun eşleşen dizisi

Şekil 3.9.'da Mascot tarama sonucu verildi. Buna göre  $\alpha$ 2u-globulin protein sekansında eşleşen peptidler kırmızı renkli gösterildi.

### 3.2.2. Spot 4



Şekil 3.10. 4 no'lu spotun PMF spektrumu

4 nolu spotun, PMF spektrumuna bakıldığında  $\alpha$ 2u-globulin proteini ile eşleşen 777, 931, 998 ve 1056 pikleri saptandı. Spektrumda bu pikler dışında 842, 870 ve 1045 kütle pikleri bulunmaktadır. Bu piklerin tripsinden kaynaklandığı bilinmektedir. Spektruma genel olarak bakıldığında aslında zayıf bir spektrum olduğu görülmektedir. 842 pikinin şiddetinin dışındaki piklerin şiddetleri relatif düşüktür. Bunun yanında yaklaşık 1100 m/z değerinde herhangi bir pik elde edilemedi. Zayıf spektrumlardan bir sonuç elde etmek her zaman mümkün değildir. Bu spotun spektrumu bize tripsin piklerin dışında  $\alpha$ 2u-globulinin ana piklerini verdiği için bu protein ile eşleşme elde edildi. Eşleşen dört peptid protein sekansının küçük bir kısmına karşılık geldiği için dizi uyumunun da düşük olması kaçınılmazdı. Spot 4 için %18'lik dizi uyumu elde edildi. Bu yüzde tanımlama kriterlerimizin altında olmasına rağmen  $\alpha$ 2u-globulinin ana pikleri ile eşleşme verdiğinden ve bu kütlelerin başka bir sıçan proteini ile eşleşmemesi, bu spotun sadece  $\alpha$ 2u-globulin proteini içerdiğini gösterir. Zayıf bir spektrum vermesi nedeniyle, bu spot  $\alpha$ 2u-globulin proteini olarak tanımlanmasına rağmen bu proteinin hangi izoformu olduğu bu spektrumdan çıkarılamamaktadır. Bu nedenle olası sekans dizileri bu spot için fazla olacaktır. Olabilecek sekans dizilerinden, dizi uyumu en yüksek olan GI: 204261 numarasına sahip sekans dizisi Şekil 3.11'de gösterilmektedir. Çizelge 3.3.'de ise olası tüm sekans sonuçları verildi.

Şekil 3.11.'de spot 4 için Mascot veri tabanı taraması sonucunda en yüksek skorlu sekans dizisi gösterildi.

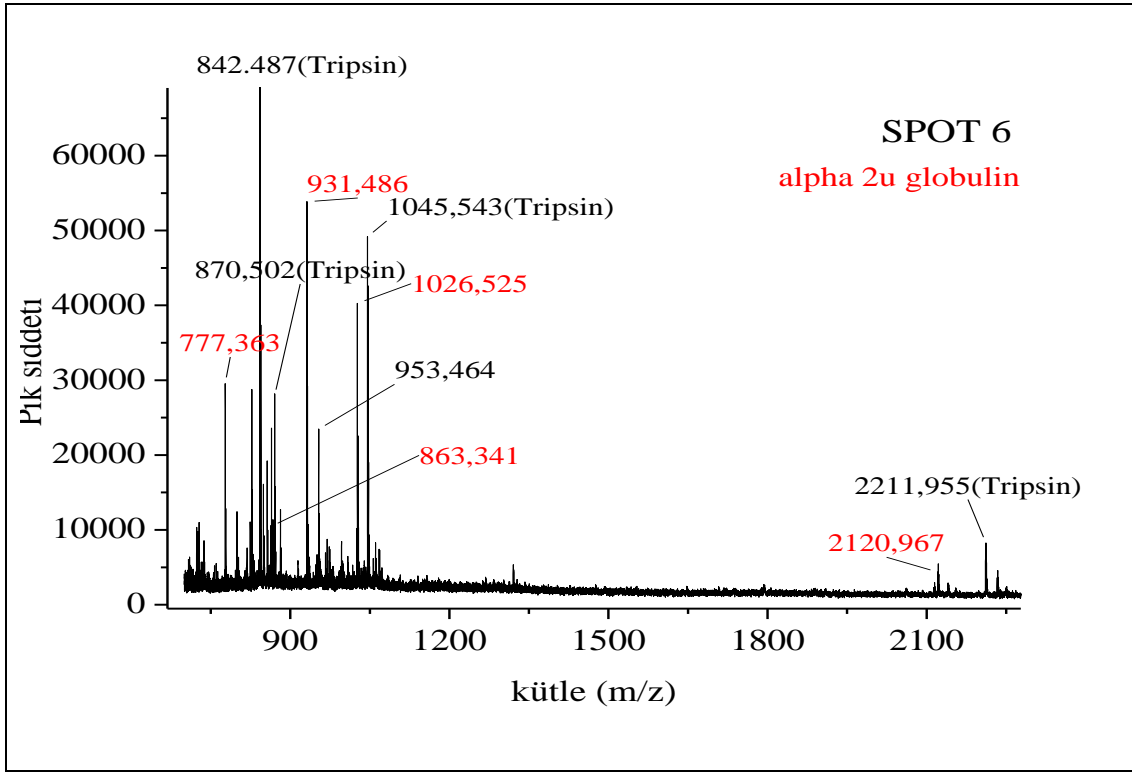
<b>Protein sequence coverage: 18%</b>						
Matched peptides shown in <b>bold red</b> .						
1	LLLLCLGLTL	VCGHAEAEASS	TSGNLDVAKL	NGDWFSIVVA	SNKREKIEEN	
51	GSMRVFMQHI	DVLENSLGFK	FRIKENGECR	<b>ELYLVAYKTP</b>	EDGEYFVEYD	
101	GGNTFTILKT	DYDRYVMFHL	INFKNGETFQ	LMVLYGRTKD	<b>LSSDIKEKFA</b>	
151	<b>KLCEAHGITR</b>	<b>DNIIDLTKTD</b>	RCLQARG			

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	M	Peptide
81 - 88	998.0000	996.9927	997.5484	-557	0	<b>R.ELYLVAYK.T</b>
140 - 146	777.0000	775.9927	776.3916	-514	0	<b>K.DLSSDIK.E</b>
152 - 160	1056.0000	1054.9927	1055.5182	-498	0	<b>K.LCEAHGITR.D</b>
161 - 168	931.0000	929.9927	930.5022	-548	0	<b>R.DNIIDLTK.T</b>

Şekil 3.11. 4 no'lu spotun eşleşen dizisi

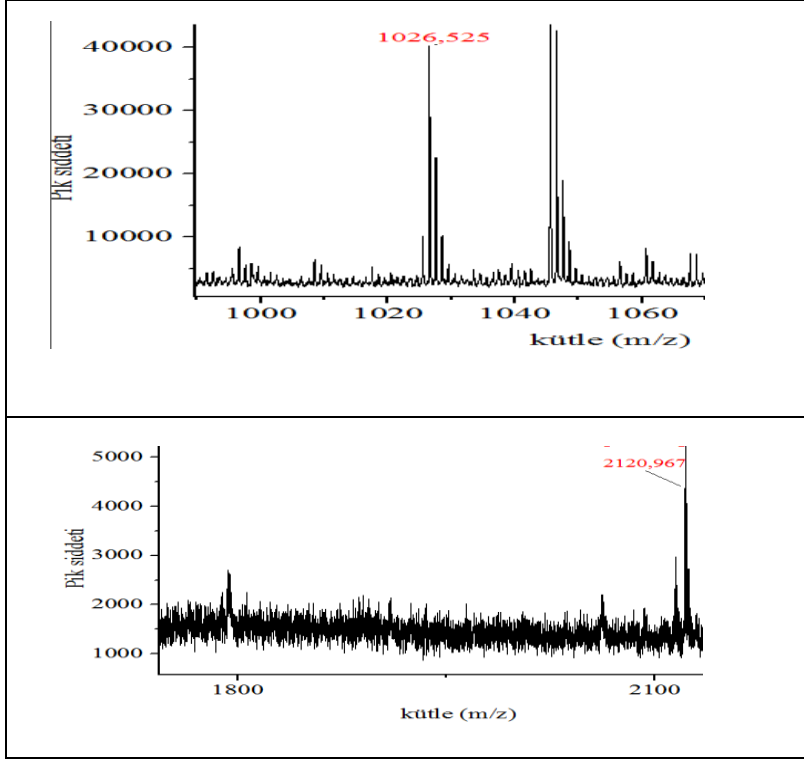
### 3.2.3. Spot 6



Şekil 3.12. 6 no'lu spotun PMF spektrumu

6 nolu spotun spektrumuna bakıldığında kuvvetli bir spektrum olduğu görülmektedir. 777, 863, 931, 1026 ve 2120 piklerinin  $\alpha 2u$ -globulinle eşleştiği saptandı. Mascot tarama sonucu, Şekil 3.12.'de de görüldüğü gibi, %27'lik dizi uyumu ile GI: 77695923  $\alpha 2u$ -globulin için en yüksek skorlu sonucu vermiştir. Spektrumda görülen diğer şiddetli pikler tripsin ile eşleştirildi.





Şekil 3.13. 6 no'lu spotun PMF spektrumlarının bazı bölgeleri

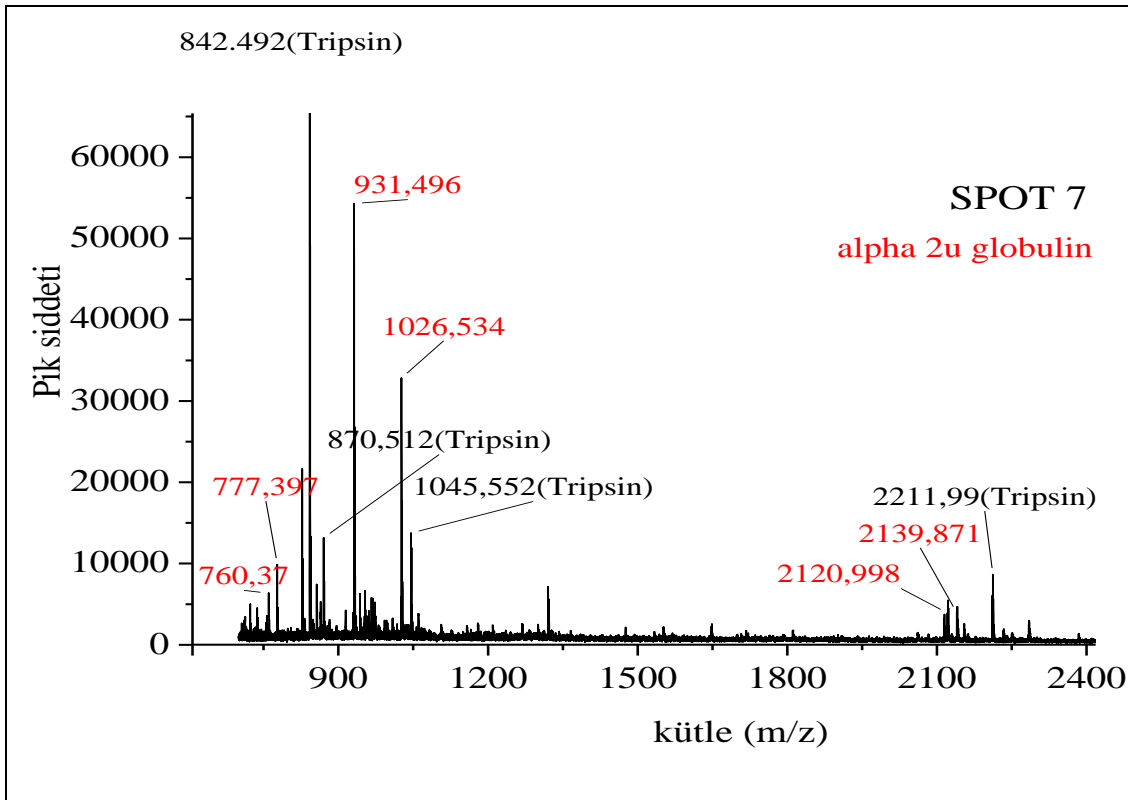
Şekil 3.13.'de görüldüğü gibi spot 6'nın spektrumu içerisinde iki farklı bölge büyütülmüş olarak gösterildi.  $\alpha$ 2u-globulin izoformları için bilinen bütün sekanslar arasından bir ayırım yapabilmek için farklılık gösteren peptidlerin saptanıp saptanmadığına bakmak gerekmektedir. Buna göre spot 6'nın spektrumunda 1026 piki  $\alpha$ 2u-globulinin LCVAHGITR peptidi ile eşleştirildi. İzoform sekanslarında bu peptidin LCEAHGITR formunda da bulunabileceği görülmektedir. Bu peptidin kütlesi ise 1056 m/z değerindedir. Spot 6'nın spektrumunda 1026 piki bulunduğundan dolayı bu spot için sadece ilgili peptidi içeren izoformlar söz konusu olabilmektedir. Buna ilaveten 2120 piki  $\alpha$ 2u-globulinin VFVQHIDVLENSLGFTFR peptidi ile eşleşmektedir. İzoform sekanslarında bu peptid için VFMQHIDVLENSLGFK sekansının da varlığı görülmektedir. İkinci peptidin kütlesi 1876 m/z'dir. Spot 6'nın spektrumunda bu bölgeye bakıldığında 2120'de bir pik görülürken 1876'da herhangi bir pik yoktur. Bu durum bize spot 6'da var olan  $\alpha$ 2u-globulin izoformunun 1026 ve 2120 kütlelerine karşılık gelen peptidlerine sahip olduğunu kanıtlamaktadır. Taradığımız sekanslar arasından bu iki peptidi birlikte içeren sekans ise tektir ve GI: 77695923 numarasına sahiptir. Çizelge 3.3.'de de görüldüğü gibi bu spot tek bir sekans dizisi ile eşleştirildi. 1026: LCVAHGITR, 1056: LCEAHGITR; 1876: VFMQHIDVLENSLGFK, 2120: VFVQHIDVLENSLGFTFR peptid gruplarına göre bu spot içinde spektrumda 1026'da bir pik varken, 1056 piki yoktur. Aynı şekilde 2120 piki varken, 1876 piki yoktur. Burada iki eleyici faktörün olması, spot 6'daki proteinin hangi sekansa sahip olduğu bize doğrudan verilmektedir.

Start - End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	ppm	M	Peptide
59 - 76	2120.0000	2118.9927	2120.1055	-525	0	R.VFVQHIDVLENSLGFTFR.I
144 - 150	777.0000	775.9927	776.3916	-514	0	K.DLSSDIK.E
156 - 164	1026.0000	1024.9927	1025.5440	-538	0	K.LCVAHGITR.D
165 - 172	931.0000	929.9927	930.5022	-548	0	R.DNIIDLTK.T
173 - 179	863.0000	861.9927	862.3967	-468	1	K.TDRCLQA.-

Şekil 3.14. 6 no'lu spotun eşleşen dizisi

Şekil 3.14.'de %27'lik dizi uyumu veren sekans dizisinde eşleşen peptidlerin buldukları bölgeler gösterildi.

### 3.2.4. Spot 7



Şekil 3.15. 7 no'lu spotun PMF spektrumu

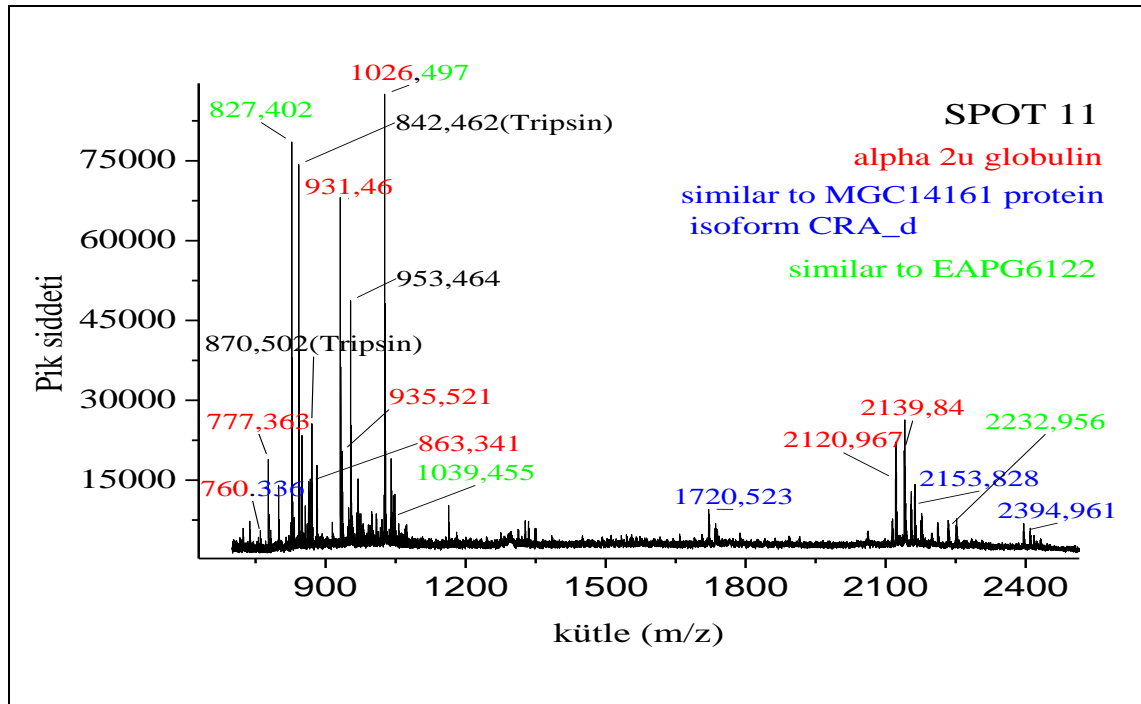
7 nolu spot 760, 777, 931, 1026, 2120 ve 2139 kütleleriyle  $\alpha$ 2u-globulin ile eşleşme gösterdi. Bu 6 peptid piki  $\alpha$ 2u-globulinin GI:77695923 kayıt nolu sekansı ile, Şekil 3.16'da görüldüğü gibi, %37'lik dizi uyumu verdi. Sonuçlar arasında yine %37'lik dizi uyumu ile başka bir  $\alpha$ 2u-globulin kaydı yer almaktaydı. Bunun nedeni sekans dizilerindeki farkın sadece sondaki 2 aminoasit ile ilgili olmasıdır. İkinci sekans sondaki

2 aminoasiti içermemekteydi. Şekil 3.16’da görüldüğü üzere bu sekanslardan sadece biri verildi. Mascot taraması sonucunda, spektrum pikleri ile örtüşen başka bir protein bulunamadı.

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	M	Peptide
27 - 33	760.0000	758.9927	759.3763	-505	0	R.GNLDVDK.L
59 - 76	2120.0000	2118.9927	2120.1055	-525	0	R.VFVQHIDVLENSLGPTFR.I
96 - 113	2139.0000	2137.9927	2138.9684	-456	0	K.DGEYFVEYDGEFTILK.T
144 - 150	777.0000	775.9927	776.3916	-514	0	K.DLSSDIK.E
156 - 164	1026.0000	1024.9927	1025.5440	-538	0	K.LCVAHGITR.D
165 - 172	931.0000	929.9927	930.5022	-548	0	R.DNIIDLTK.T

Şekil 3.16. 7 no’lu spotun eşleşen dizisi

### 3.2.5. Spot 11



Şekil 3.17. 11 no’lu spotun PMF spektrumu

Spot 11’in spektrumunda  $\alpha$ 2u-globulin ile eşleşen 8 tane peptidin kütle pikleri görülmektedir. Bunlar 760, 777, 863, 931, 935, 1026, 2120 ve 2139 m/z’kütleleridir. GI: 77695923 numaralı kayıt ile eşleştirilmiş olan bu spot %45’lik dizi uyumunu meydana getirdi. Bu Şekil 3.18.’de de görülmektedir. Diğer peptid pikleri ve  $\alpha$ 2u-

globulin ile ortak olan bazı pikler başka proteinlerle de eşleşme gösterdi. Spektrumda görüldüğü üzere 760 m/z kütleli pik hem  $\alpha$ 2u-globulinle hem de MGC14161 proteini ile eşleşirken, 1026 piki hem  $\alpha$ 2u-globulinle hem de EAPG6122 proteini ile eşleşti.

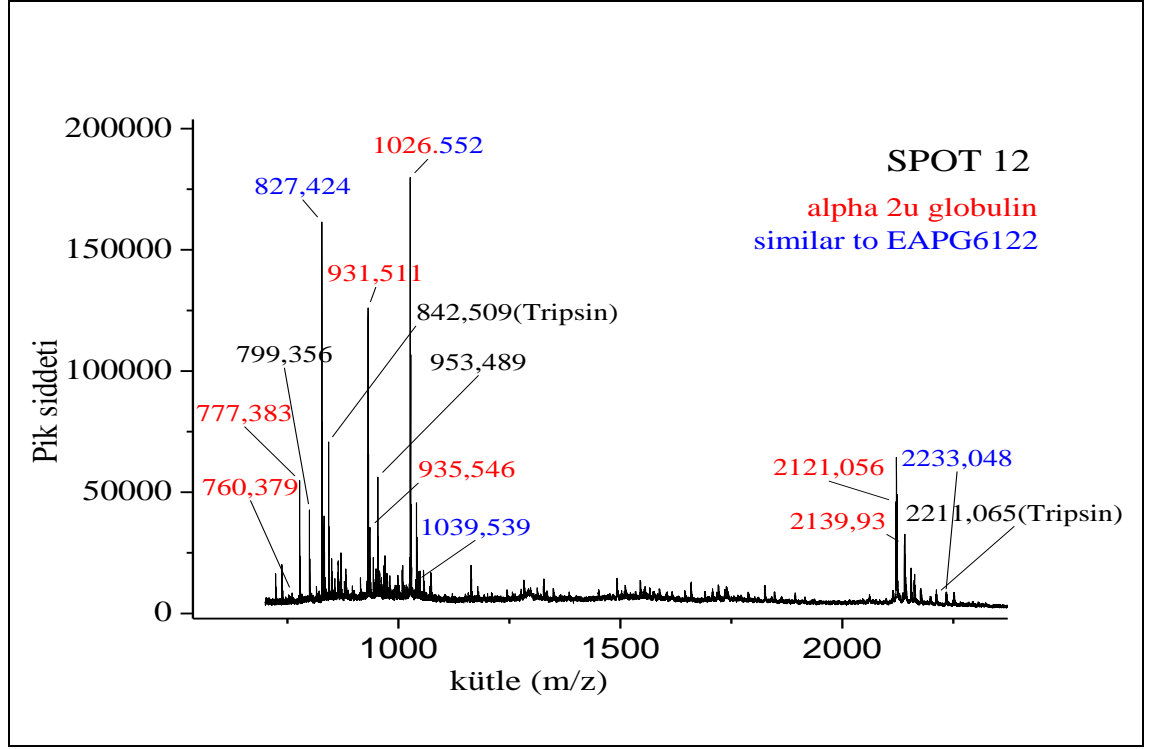
MGC14161 proteini %36'lık dizi uyumu ile FERM domain containing 5 olarak bilinmektedir. FERM (4,1 protein, ezrin, radixin and moesin) plazma membranındaki proteinlerin içerisinde geniş bir bölümü kapsar. FERM; sinyal ve iskelet proteinlerinin farklı yerlerinde bulunmaktadır. Ayrıca plazma membranında proteinler ile fosfolipidler arasında, moleküller arası düzenleyici görev üstlenmektedir. Literatürde, FERM proteini ile ilgili sıçanın sadece beyinde yapılmış çalışmalara yer verilmiştir (Madura 2003).

EAPG6122 proteini %23'lük dizi uyumu ile aday proteindir denilebilir. CD164 sialomicin-like 2 olarak bilinmektedir. Sialomisinler; membrana bağlı veya salgılanan musinlerin heterojen gruplarıdır. Hücre koruyucu ve yapışma reseptörleri gibi görevleri vardır. CD164, kemik iliğindeki kök hücre düzenleyicisi olarak reseptör görevini üstlenmektedir. CD164, ilik içerisine prostat kanseri hücrelerinin yerleşmesini gerçekleştirir, kanser hücrelerinden kemik iliğine süzülür ve burada kanser hücrelerinin yayılmasında önemli rol oynamaktadır. EAPG6122 proteini insan, fare ve sıçanda bulunan bir proteindir. Bu proteinle ilgili, sıçan idrarı üzerinde çalışmalar yapılmamıştır fakat insanda prostat kanseri ile ilgili çalışmaların olması, bu proteinin sıçan idrarında da bulunabileceğine dair ipuçları verdiğini söyleyebiliriz.

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	M	Peptide
27 - 33	760.0000	758.9927	759.3763	-505	0	R.GNLDVDK.L
51 - 58	935.0000	933.9927	934.4178	-455	0	K.IEENGSMR.V
59 - 76	2120.0000	2118.9927	2120.1055	-525	0	R.VFVQHIDVLENSLGFTFR.I
96 - 113	2139.0000	2137.9927	2138.9684	-456	0	K.DGEYFVEYDAGENTFTILK.T
144 - 150	777.0000	775.9927	776.3916	-514	0	K.DLSSDIK.E
156 - 164	1026.0000	1024.9927	1025.5440	-538	0	K.LCVAHGITR.D
165 - 172	931.0000	929.9927	930.5022	-548	0	R.DNIIDLTK.T
173 - 179	863.0000	861.9927	862.3967	-468	1	K.TDRCLQA.-

Şekil 3.18. 11 no'lu spotun eşleşen dizisi

### 3.2.6. Spot 12



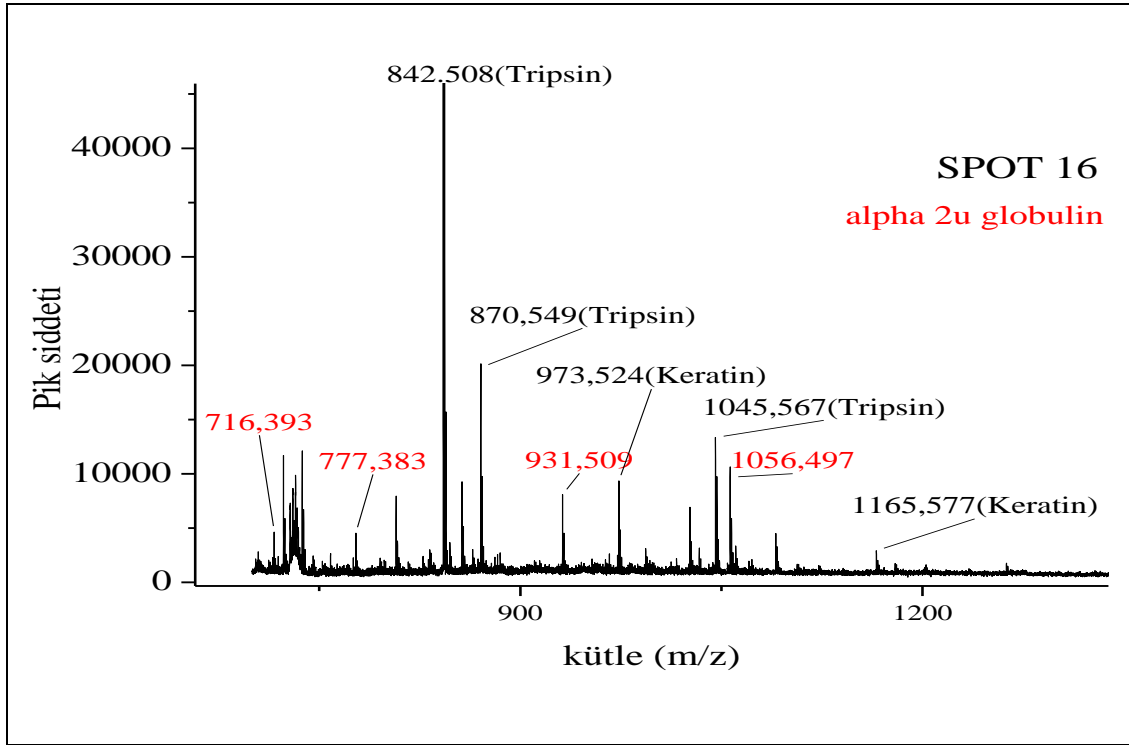
Şekil 3.19. 12 no'lu spotun PMF spektrumu

Spot 12'nin spektrumu, daha önceki spotlarda da gördüğümüz peptid kütlelerinden, 760, 777, 931, 935, 1026, 2121 ve 2139 m/z'nin  $\alpha$ 2u-globulin proteini ile eşleşme gösteren piklere sahiptir. Bu spektrum oldukça güçlü pikleri olan bir spektrumdur. Tripsine ait pikler ise ilk defa diğer piklerden daha zayıftır. Şekil 3.20.'de %41'lik bir dizi uyumunun elde edildiği görülmektedir. Spot 12 ile  $\alpha$ 2u-globulin proteininin birçok kaydı eşleşmektedir fakat en yüksek skoru sağlayan sekansın giriş nosu GI: 77695923'tür. Spot 11'deki EAPG6122 proteini burada yine %23'lük dizi uyumu ile yer almakta olduğundan, bu proteinin spot 12'de yer alması için adaydır denilebilir.

Start - End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	ppm	M	Peptide
27 - 33	760.0000	758.9927	759.3763	-505	0	R.GNLDVDK.L
51 - 58	935.0000	933.9927	934.4178	-455	0	K.IEENGSMR.V
59 - 76	2121.0000	2119.9927	2120.1055	-53.2	0	R.VFVQHIDVLENSLGFTFR.I
96 - 113	2139.0000	2137.9927	2138.9684	-456	0	K.DGEYFVEYDSENTFTILK.T
144 - 150	777.0000	775.9927	776.3916	-514	0	K.DLSSDIK.E
156 - 164	1026.0000	1024.9927	1025.5440	-538	0	K.LCVAHGITR.D
165 - 172	931.0000	929.9927	930.5022	-548	0	R.DNIIDLTK.T

Şekil 3.20. 12 no'lu spotun eşleşen dizisi

### 3.2.7. Spot 16



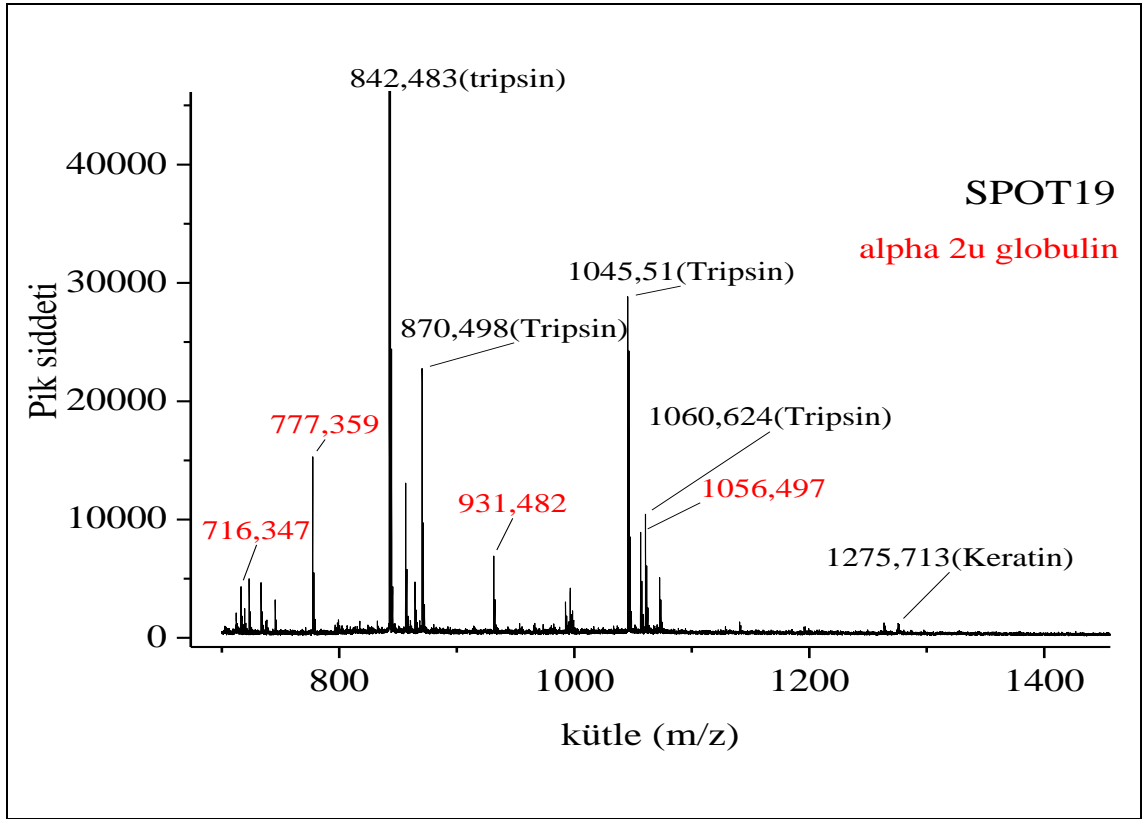
Şekil 3.21. 16 no'lu spotun PMF spektrumu

Spot 16'nın spektrumunda sadece  $\alpha 2u$ -globulin proteini ile eşleşme bulundu ve bunu 716, 777, 931 ve 1056 kütleleri sağladı. NCBI veri tabanında bu spot için eşleşme gösteren sekans dizilerinden en skorlu olan dizinin giriş numarası GI: 22219450'dir. Diğer eşleşen piklerin, tripsin ve keratine ait pikler olduğu görüldü. Şekil 3.22.'de de görüldüğü gibi spektrum %17'lik dizi uyumu vermektedir. Bu spotun bu kadar düşük bir dizi uyumu vermesinin nedeni, sekansla eşleşen peptid piklerinin sayısının az olmasıdır. Şekil 3.22.'de de görüldüğü gibi dört adet peptid piki ile eşleşme görüldü. Aslında 4 adet peptid ile daha yüksek dizi uyumu sonucu veren sonuçlar da elde edilebilirdi fakat bu 4 peptidin kısa peptidler olması nedeniyle bu spot düşük dizi uyumu ile sonuçlandı.

Start - End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	ppm	M	Peptide
27 - 33	716.0000	714.9927	715.3864	-550	0	R.GNLDVAK.L
144 - 150	777.0000	775.9927	776.3916	-514	0	K.DLSSDIK.E
156 - 164	1056.0000	1054.9927	1055.5182	-498	0	K.LCEAHGITR.D
165 - 172	931.0000	929.9927	930.5022	-548	0	R.DNIIDLTK.T

Şekil 3.22. 16 no'lu spotun eşleşen dizisi

### 3.2.8. Spot 19



Şekil 3.23. 19 no'lu spotun PMF spektrumu

Spot 16'ya benzer bir sonuç veren Spot 19'da da sadece  $\alpha 2u$ -globulin olduğu görüldü. 716, 777, 931 ve 1056 peptidleri ile sonuç verdi. Diğer pikler tripsin ve keratine aittir. Güçlü olmadığı görülen bu spektrum, Şekil 3.24.'de de görüldüğü gibi, %17'lik dizi uyumu verdi. NCBI veri tabanındaki en skorlu olan sekans dizisinin giriş numarası GI: 22219450'dir.

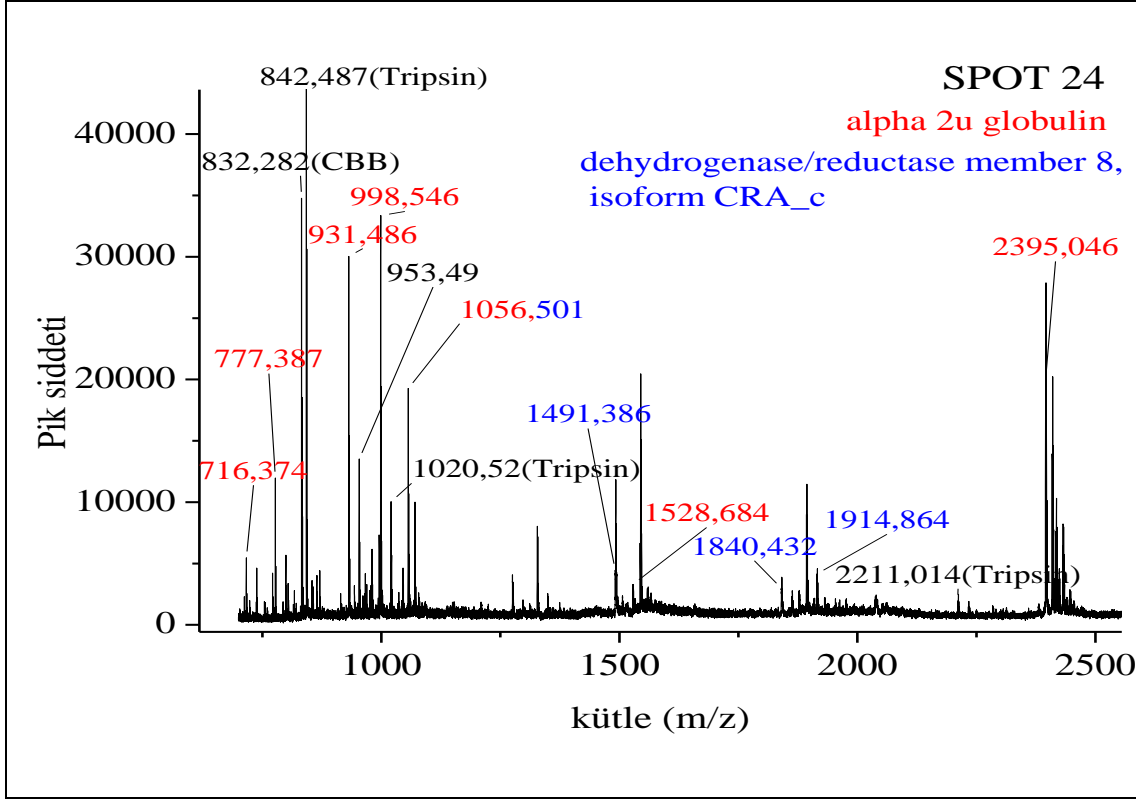
Protein sequence coverage: 17%					
Matched peptides shown in <b>bold red</b> .					
1	MKLLLLLLCL	GLTLVCGHAE	EASSTRGNLD	VAKLNGDWFS	IVVASNKREK
51	IEENGSMRVF	MQHIDVLENS	LGFKFRIKEN	GECRELYLVA	YKTPEDGEYF
101	VEYDGGNTFT	ILKIDYDRYV	MFHLINFKNG	ETFQLMVLVG	RTKDLSSDIK
151	EKFAKLCEAH	GITRDNIIDL	TKIDRCLQAR	G	

Start - End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	ppm	M	Peptide
27 - 33	716.0000	714.9927	715.3864	-550	0	R.GNLDVAK.L
144 - 150	777.0000	775.9927	776.3916	-514	0	K.DLSSDIK.E
156 - 164	1056.0000	1054.9927	1055.5182	-498	0	K.LCEAHGITR.D
165 - 172	931.0000	929.9927	930.5022	-548	0	R.DNIIDLTK.T

Şekil 3.24. 19 no'lu spotun eşleşen dizisi

### 3.2.9. Spot 24



Şekil 3.25. 24 no'lu spotun PMF spektrumu

Spot 24'ün yoğun bir spektrumu olduğu görüldü. 716, 777, 931, 998, 1056, 1528 ve 2395 kütleleriyle, Şekil 3.26'da görüldüğü gibi, %40'luk bir dizi uyumu veren bu spektrumda,  $\alpha$ 2u-globulinin yanı sıra dehidrogenaz/reduktaz üye 8 adlı bir protein daha bulundu. 1056 peptidinin her iki proteinde de yer aldığı görüldü.

%34'lük dizi uyumu veren Dehidrogenaz/reduktaz üye 8, kısa zincirli dehidrogenaz/reduktazlar olarak da bilinirler. Kısaca SDR olarak gösterilirler. SDR; oksidoredüktazların genel süper ailesi olarak bilinirler; steroidler, prostaglandinler, retinoidler, alifatik alkoller, ksenobiyotiklerin metabolizmalarına katılırlar (Keller vd 2006). SDR; insan genomunda, tıp alanında önemli etkileriyle geniş gen ailelerinden olan 60 genden biri olarak bilinir. Alzheimer, osteoporoz ve diabet hastalıklarının, metabolik ve dejenere bozuklukları gibi kanser (meme ve prostat) hastalıklarında da yer aldıkları bilinir. Bu enzim siçanın karaciğer ve böbreklerinde %15-20 oranında tespit edilmiştir. Farenin karaciğer dokusunda farklı mekanizmalar olmasına rağmen, prostatında androjen düzenleyicisi olarak yer almaktadır. Benzer şekilde siçanın prostat bezlerinin farklı bölgelerinde görülmektedir (Prins ve Woodham 1995). SDR enzimlerinin tanımlama ve fonksiyonel analizlerinin yeni çalışma amaçları ilaç geliştirmektir.



**Protein sequence coverage: 40%**

Matched peptides shown in **bold red**.

```

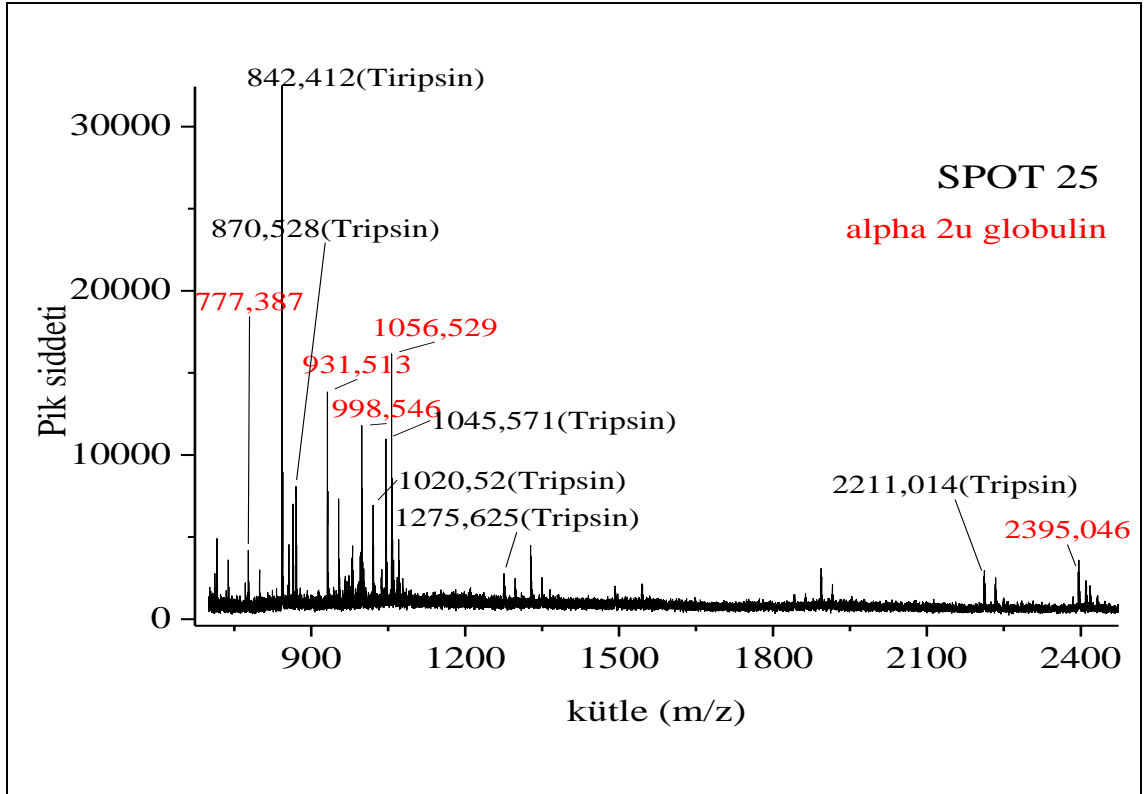
1 MKLLLLLLCL GLTLVCGHAE EASSTRGNLD VAKLNGDWFS IVVASNKREK
51 IEENGSMRVF MQHIDVLENS LGFKFRIKEN GECRELYLVA YKTPEDGEYF
101 VEYDGGNTFT ILKTDYDRYV MFHLINFKNG ETFQLMVLYG RTKDLSSDIK
151 EKFAKLCEAH GITRDNIIDL TKTDRCLQAR G

```

Start - End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	ppm	M	Peptide
27 - 33	716.0000	714.9927	715.3864	-550	0	R.GNLD <b>VAK</b> .L
85 - 92	998.0000	996.9927	997.5484	-557	0	R.ELYLVAY <b>K</b> .T
93 - 113	2395.0000	2393.9927	2394.0903	-40.8	0	K.T <b>PE</b> D <b>GEYF</b> VEYDGGNTFT <b>ILK</b> .T
129 - 141	1528.0000	1526.9927	1526.7551	156	0	K.N <b>GE</b> T <b>FQ</b> LMVLYGR.T
144 - 150	777.0000	775.9927	776.3916	-514	0	K.DLSS <b>DIK</b> .E
156 - 164	1056.0000	1054.9927	1055.5182	-498	0	K.L <b>CEA</b> H <b>G</b> ITR.D
165 - 172	931.0000	929.9927	930.5022	-548	0	R.DNI <b>IDL</b> T <b>K</b> .T

Şekil 3.26. 24 no'lu spotun eşleşen dizisi

### 3.2.10. Spot 25



Şekil 3.27. 25 no'lu spotun PMF spektrumu

Spot 25'in spektrumu sadece  $\alpha$ 2u-globulin proteini ile eşleşme gösterdi. Proteinin temel peptidleri 777, 931, 998, 1056 ve 2395 sayesinde, Şekil 3.28.'de de görüldüğü gibi, %29'luk dizi uyumu ile karşılaşıldı. Spektrumdaki altı pik ise tripsinden ileri geldiği görüldü. Spot 25 için NCBI veri tabanından elde edilen en skorlu sekansın giriş numarası GI:204261'dir. %29'luk dizi uyumunun yükselmesinde 2395 peptidinin etkili olduğu söylenebilir.

**Protein sequence coverage: 29%**

Matched peptides shown in **bold red**.

```

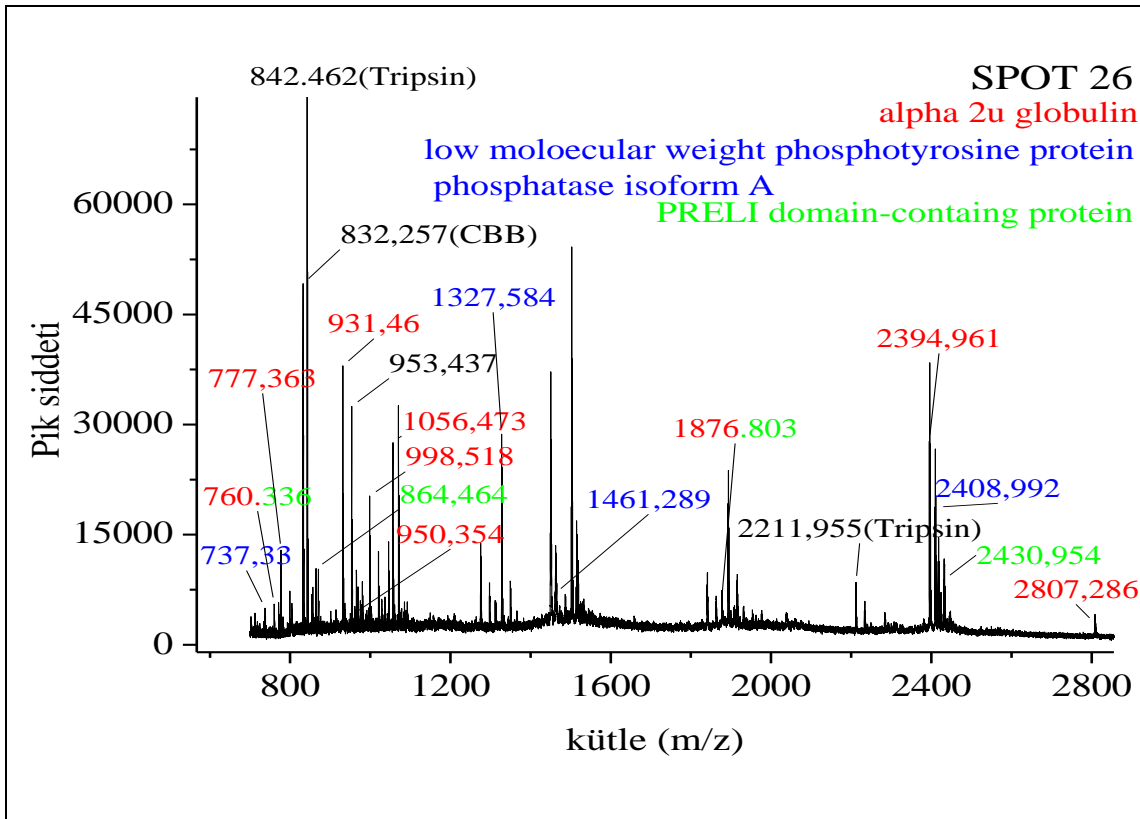
1 LLLLCLGLTL VCGHAEAEASS TSGNLDVAKL NGDWFSIVVA SNKREKIEEN
51 GSMRVFMQHI DVLENSLGFK FRIKENGECR ELYLVAYKTP EDGEYFVEYD
101 GGNTFTILKT DYDRYVMFHL INFKNGETFQ LMVLYGRTKD LSSDIKEKFA
151 KLCEAHGITR DNIIDLTKTD RCLQARG

```

Start - End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	ppm	M	Peptide
81 - 88	998.0000	996.9927	997.5484	-557.0	0	R.ELYLVAYK.T
89 - 109	2395.0000	2393.9927	2394.0903	-40.8	0	K.TPEDGEYFVEYDGGNTFTILK.T
140 - 146	777.0000	775.9927	776.3916	-514.0	0	K.DLSSDIK.E
152 - 160	1056.0000	1054.9927	1055.5182	-498.0	0	K.LCEAHGITR.D
161 - 168	931.0000	929.9927	930.5022	-548.0	0	R.DNIIDLTK.T

Şekil 3.28. 25 no'lu spotun eşleşen dizisi

### 3.2.11. Spot 26



Şekil 3.29. 26 no'lu spotun PMF spektrumu

Spot 26'nin spektrumunun değerlendirilmesi sonucu en az üç farklı protein içerdiği bulundu. 760, 777, 931, 950, 998, 1056, 1876, 2394 ve 2807 piklerinin  $\alpha$ 2u-globulin ile eşleşerek, Şekil 3.30'da görüldüğü gibi, %50'lik dizi uyumunu da beraberinde getirdi. Diğer tespit edilen iki protein ile eşleşen pikler mavi ve yeşil renkli gösterildi. Eşleştirilen bazı piklerin iki proteinde birden yer aldığını görüldü. Örneğin, bu spektrumda 760 ve 1876 pikleri hem  $\alpha$ 2u-globulin hem de PRELI proteini ile eşleştiği görüldü.

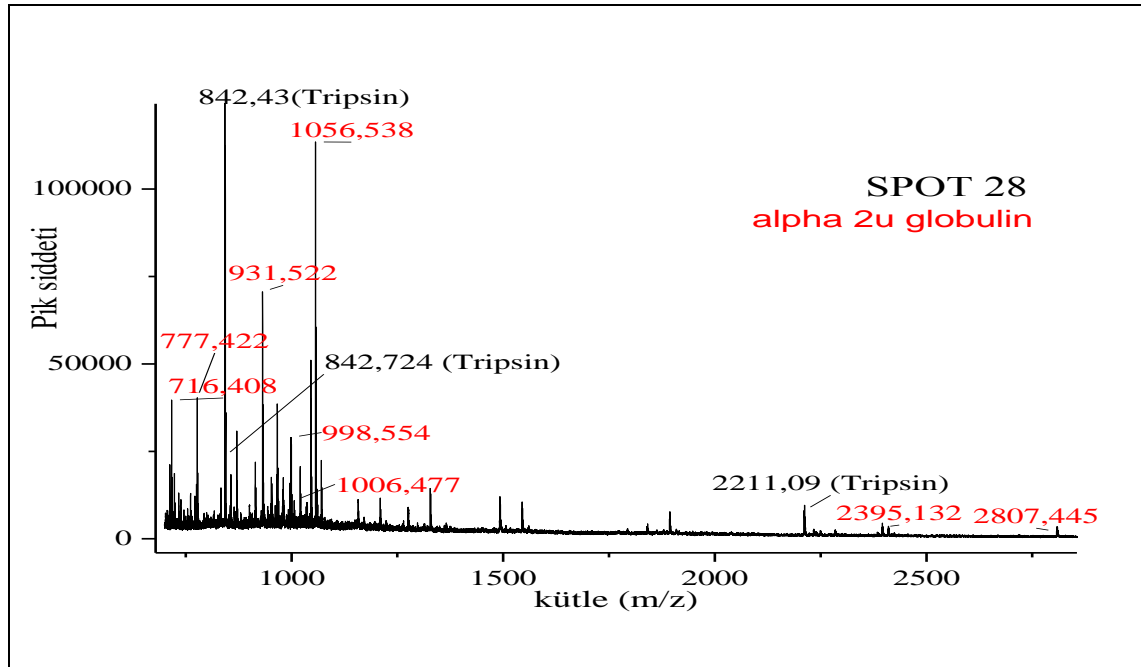
%32'lik dizi uyumu gösteren düşük molekül ağırlıklı fosfotirozin protein fosfatazlar; sıçan karaciğerinden ve insan eritrositlerinden izole edilmiştir. Protein tirozin fosforilasyon, hücre çoğalmasının düzenlenmesinde çok önemli rol oynamaktadır. Fosfotirozin protein fosfatazlar bir enzim ailesidir (Cirri vd 1994).

%28'lik dizi uyumu gösteren PRELI domain-containg protein, mitokondriyal proteinlerdendir. Normal hücresel fonksiyonlar ve mitokondriyal hastalıkların anlaşılabilmesi için önemlidir. Mitokondriyal hasarlar; nükleer kodlanmış mitokondriyal proteinlerde kalıtsal hastalıklara bağlanması ile dejeneratif hastalıkları, yaşlanma ve kanser hastalıklarını meydana getirmektedir (Fox vd 2004).

Protein sequence coverage: 50%						
Matched peptides shown in <b>bold red</b> .						
1	MKLLLLLLCL	GLTLVCGHAE	EASSTRGNLD	<b>VDK</b> LNQDWFS	IVVASDKREK	
51	<b>IEENASMRVF</b>	<b>MQHIDVLENS</b>	<b>LGFKFRIKEN</b>	<b>GECRELYLVA</b>	<b>YKTPEDGEYF</b>	
101	<b>VEYDGGNTFT</b>	<b>ILKTDYDRYV</b>	MFHLINFKNG	ETFQAMVLYG	RTKDLSSDIK	
151	EKFAKLCEAH	<b>GITRDNIIDL</b>	<b>TKTDHCLQAR</b>	G		
Start - End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	ppm	M	Peptide
27 - 33	761.0000	759.9927	759.3763	812	0	R.GNLDVDK.L
51 - 58	950.0000	948.9927	948.4334	590	0	K.IEENASMR.V
51 - 74	2807.0000	2805.9927	2806.3782	-137	1	K.IEENASMRVFMQHIDVLENSLGFK.F
77 - 84	1006.0000	1004.9927	1004.4709	520	1	R.IKENGECR.E
85 - 92	998.0000	996.9927	997.5484	-557	0	R.ELYLVAYK.T
93 - 113	2395.0000	2393.9927	2394.0903	-40.8	0	K.TPEDGEYFVEYDGGNTFTILK.T
144 - 150	777.0000	775.9927	776.3916	-514	0	K.DLSSDIK.E
156 - 164	1056.0000	1054.9927	1055.5182	-498	0	K.LCEAHGITR.D
165 - 172	931.0000	929.9927	930.5022	-548	0	R.DNIIDLTK.T

Şekil 3.30. 26 no'lu spotun eşleşen dizisi

### 3.2.12. Spot 28



Şekil 3.31. 28 no'lu spotun PMF spektrumu

Çok kuvvetli olan spot 28'in spektrumuna göre protein karışımı olmadığı görüldü. Sadece  $\alpha$ 2u-globulin tespit edildi.  $\alpha$ 2u-globulin proteinin temel peptidleri olan 716, 777, 931, 998, 1006, 1056, 2395 ve 2807 kütleleri ön plandadır. Şekil 3.32'de de görüldüğü gibi %37'lik dizi uyumu gösterdi. Bu spotun NCBI veri tabanında eşleştiği sekans dizilerinden en skorlu dizinin giriş numarası GI: 22219450'dir. Hemen hemen her spektrumda görülen tripsin peptid pikleri de spektrumda yer almaktadır.

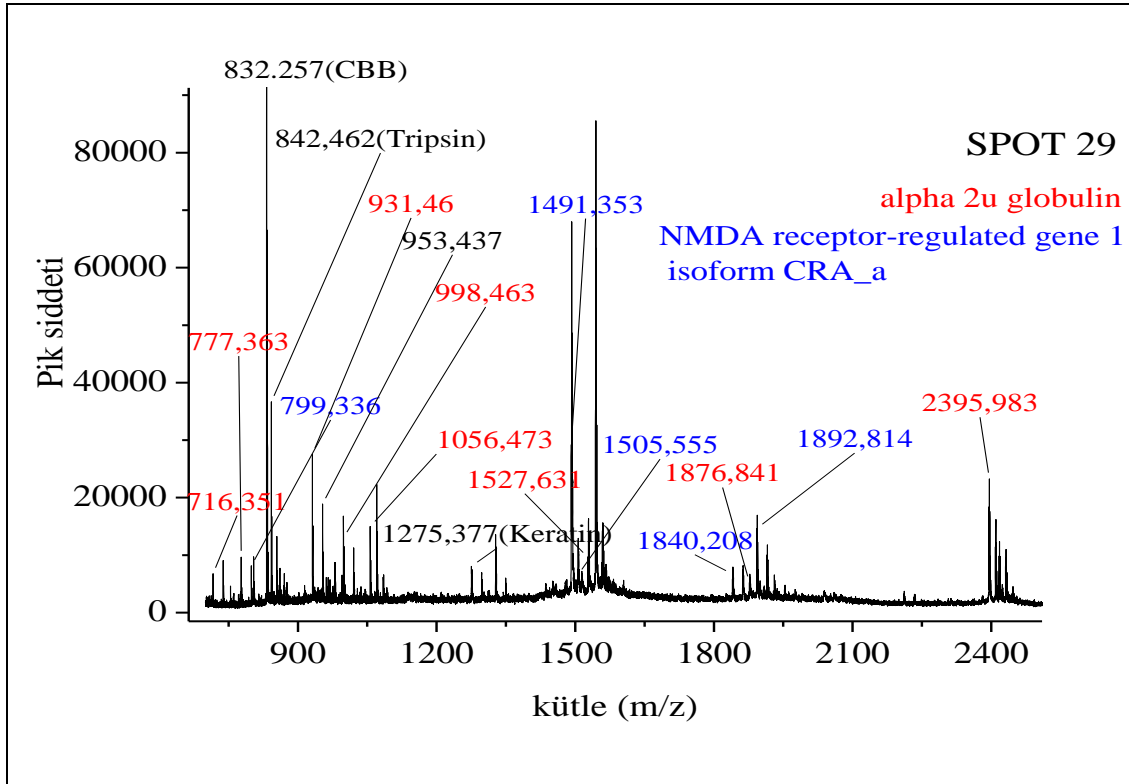
Protein sequence coverage: 37%						
Matched peptides shown in <b>bold red</b> .						
1	MKLLLLLLCL	GLTLVCGHAE	EASSTRGNLD	<b>VAK</b> LNQDWFS	IVVASNKREK	
51	IEENGSMRVF	MQHIDVLENS	LGFKFRIKEN	<b>GECRELYLVA</b>	<b>YKTPEDGEYF</b>	
101	<b>VEYDGGNTFT</b>	<b>ILKIDYDRYV</b>	MFHLINFKNG	ETFQLMVLVG	<b>RTKDLSSDIK</b>	
151	EKFAKLCEAH	<b>GITRDNIIDL</b>	<b>TKIDRCLQAR</b>	G		

Start - End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	ppm	M	Peptide
27 - 33	716.0000	714.9927	715.3864	-550	0	R.GNLDVAK.L
77 - 84	1006.0000	1004.9927	1004.4709	520	1	R.IKENGECR.E
85 - 92	998.0000	996.9927	997.5484	-557	0	R.ELYLVAYK.T
93 - 113	2395.0000	2393.9927	2394.0903	-40.8	0	K.TPEDGEYFVEYDGGNTFTILK.T
144 - 150	777.0000	775.9927	776.3916	-514	0	K.DLSSDIK.E
156 - 164	1056.0000	1054.9927	1055.5182	-498	0	K.LCEAHGITR.D
165 - 172	931.0000	929.9927	930.5022	-548	0	R.DNIIDLTK.T

Şekil 3.32. 28 no'lu spotun eşleşen dizisi

### 3.2.13. Spot 29



Şekil 3.33. 29 no'lu spotun PMF spektrumu

Spot 29 çok kuvvetli ve güzel bir spektrumdur. Bu spot içerisinde iki protein tespit edildi.  $\alpha$ 2u-globulin proteini için gerekli peptidlerden 716, 777, 931, 998, 1056, 1527, 1876 ve 2395 spektrumda bulundu. Ayrıca Şekil 3.34.'te görüldüğü gibi %49'luk dizi uyumu sonucunu veren bu spektrumda kuvvetli pikler göze çarpmaktadır. Bu spektrumun NCBI veri tabanı giriş numarası GI: 22219450'dir.

%33'lük dizi uyumuna sahip olan NMDA reseptör-regulated gene 1 proteini memelilerin beyin gelişiminde glutamat reseptörlerinin N-methyl-D-aspartate (NMDA) sınıfı vasıtasıyla nöronlar arasında elektrik sinyallerinin taşınması için gereklidir. Sıçanların hipokampusunda dentate gyrusun olgunlaşma süresince, hücre döngüsü kontrolünde NMDA reseptörlerinin rolünün çok büyük olduğu tahmin edilmektedir (Sugiura vd 2001). Bu protein sıçanların beyin kısımlarında; kortikal nöronlarında, striatum, hipokampuslarında bulunmaktadır. Yapılan literatür taramasına göre sıçanın idrarında bu proteinle ilgili yapılmış olan çalışmalar bulunamamıştır.

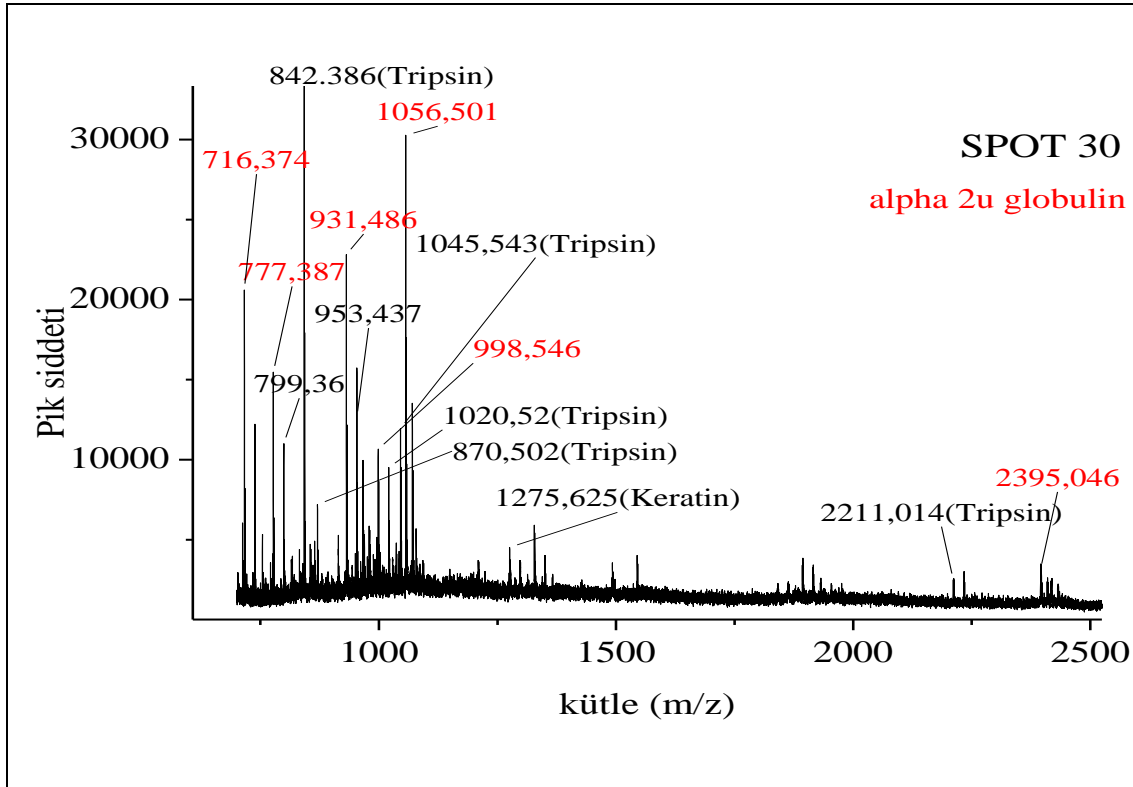
Protein sequence coverage: 49%						
Matched peptides shown in <b>bold red</b> .						
1	MKLLLLLLCL	GLTIVCGHAE	EASSTRGNLD	VAKLNGDWFS	IVVASNKREK	
51	IEENGSMRVF	<b>MQHIDVLENS</b>	<b>LGFKFRIKEN</b>	GECRELYLVA	<b>YKTPEDGEYF</b>	
101	<b>VEYDGGNTFT</b>	<b>ILKIDYDRYV</b>	MFHLINFKNG	<b>ETFQLMVLYG</b>	<b>RTKDLSSDIK</b>	
151	EKFAKLCEAH	GITRDNIIDL	<b>TKTDRCLQAR</b>	G		

Start - End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	ppm	M	Peptide
27 - 33	716.0000	714.9927	715.3864	-550	0	R.GNLDVAK.L
59 - 74	1876.0000	1874.9927	1875.9553	-513	0	R.VFMQHIDVLENSLGFK.F
85 - 92	998.0000	996.9927	997.5484	-557	0	R.ELYLVAYK.T
93 - 113	2394.0000	2392.9927	2394.0903	-458	0	K.TPEDGEYFVEYDGGNTFTILK.T
129 - 141	1527.0000	1525.9927	1526.7551	-499	0	K.NGETFQLMVLYGR.T
144 - 150	777.0000	775.9927	776.3916	-514	0	K.DLSSDIK.E
156 - 164	1056.0000	1054.9927	1055.5182	-498	0	K.LCEAHGITR.D
165 - 172	931.0000	929.9927	930.5022	-548	0	R.DNIIDLTK.T

Şekil 3.34. 29 no'lu spotun eşleşen dizisi

### 3.2.14. Spot 30



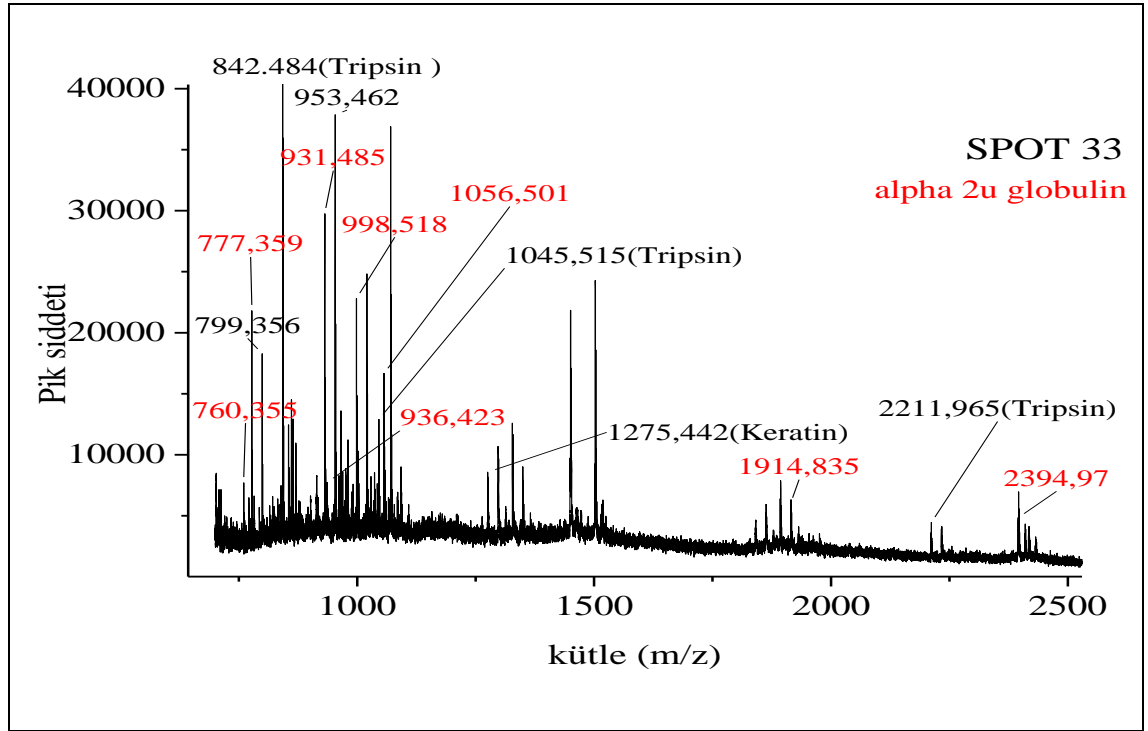
Şekil 3.35. 30 no'lu spotun PMF spektrumu

%33'lük dizi uyumu veren spot 30'da 716, 777, 931, 998, 1056 ve 2395 peptid kütleleri  $\alpha$ 2u-globulin proteini ile eşleştirdi. Bu spektrum için başka bir protein ile eşleşme gerçekleşmedi. Şekil 3.35.'de görülen 799 ile işaretlenmiş olan kütle 777 peptidinin sodyumlu formu, 953 ile işaretlenmiş olan kütle 931 peptidinin sodyumlu formu olduğu düşünülüyor. Spot 30'un spektrumunda tripsin ve keratine ait peptid kütleleri de görüldüğü gibidir.

Start - End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	ppm	M	Peptide
27 - 33	716.0000	714.9927	715.3864	-550	0	R.GNLDVAK.L
85 - 92	998.0000	996.9927	997.5484	-557	0	R.ELYLVAYK.T
93 - 113	2395.0000	2393.9927	2394.0903	-40.8	0	K.TPEDGEYFVEYDGGNTFTILK.T
144 - 150	777.0000	775.9927	776.3916	-514	0	K.DLSSDIK.E
156 - 164	1056.0000	1054.9927	1055.5182	-498	0	K.LCEAHGITR.D
165 - 172	931.0000	929.9927	930.5022	-548	0	R.DNIIDLTK.T

Şekil 3.36. 30 no'lu spotun eşleşen dizisi

### 3.2.15. Spot 33



Şekil 3.37. 33 no'lu spotun PMF spektrumu

Şekil 3.38'de görüldüğü gibi %41'lik dizi uyumu 760, 777, 931, 936, 998, 1056, 1914 ve 2394 peptidleri ile gerçekleşti. Şimdiye kadar verilen spektrumların hiçbirinde 936 ve 1914 peptid kütleleri ile eşleşme görülmedi. Bu peptidler ilk kez spot 33'de görüldü. NCBI veri tabanı giriş numarası GI: 202610'dur.

**Protein sequence coverage: 41%**

Matched peptides shown in **bold red**.

```

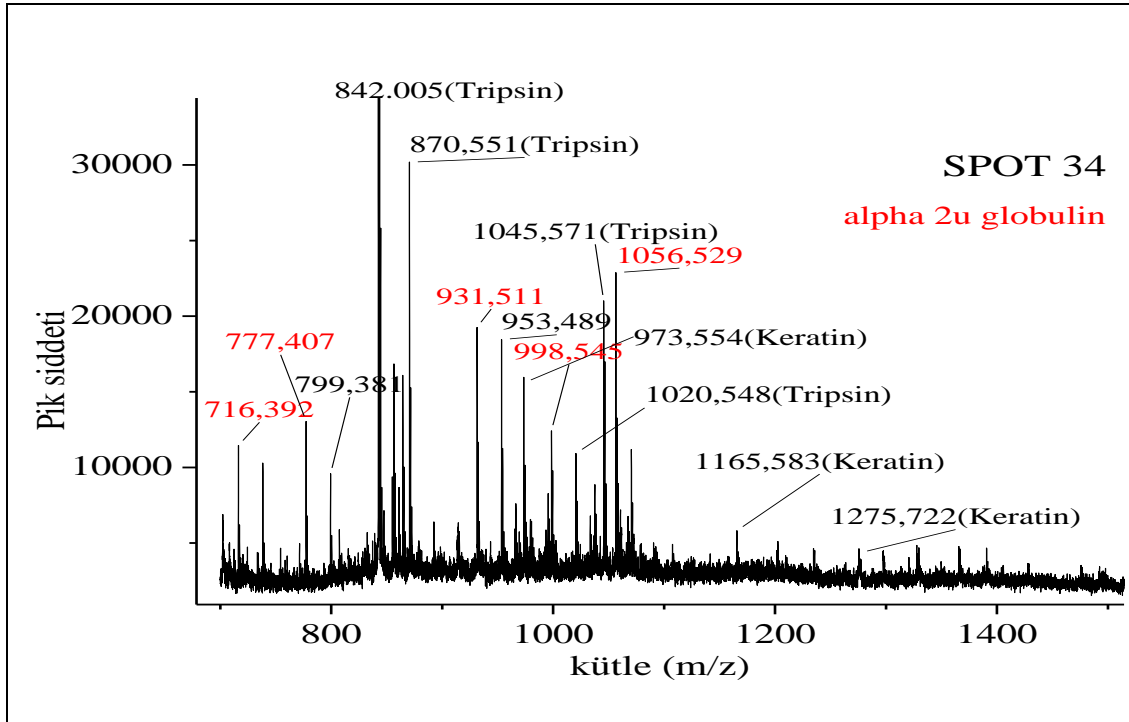
1 MKLLLLLLCL GLTLVCGHAE EASSTRGNLD VDKLNQDWFS IVVASDKREK
51 IEENGSMRVF MQHIDVLENS LGFKFRIKEN GECRELYLVA YKTPEDGEYF
101 VEYDGGNTFT ILKTDYDRYV MFHLINFKNG ETFQAMVLYG RTKDLSSDIK
151 EKFAKLCEAH GITRDNIIDL TKTDHCLQAR G

```

Start - End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	ppm	M	Peptide
27 - 33	760.0000	758.9927	759.3763	-505	0	<b>R.GNLDVDK.L</b>
51 - 58	936.0000	934.9927	934.4178	615	0	<b>K.IEENGSMR.V</b>
85 - 92	998.0000	996.9927	997.5484	-557	0	<b>R.ELYLVAYK.T</b>
93 - 113	2394.0000	2392.9927	2394.0903	-458	0	<b>K.TPEDGEYFVEYDGGNTFTILK.T</b>
144 - 150	777.0000	775.9927	776.3916	-514	0	<b>K.DLSSDIK.E</b>
156 - 164	1056.0000	1054.9927	1055.5182	-498	0	<b>K.LCEAHGITR.D</b>
165 - 172	931.0000	929.9927	930.5022	-548	0	<b>R.DNIIDLTK.T</b>
165 - 180	1914.0000	1912.9927	1911.9472	547	1	<b>R.DNIIDLTKTDHCLQAR.G</b>

Şekil 3.38. 33 no'lu spotun eşleşen dizisi

### 3.2.16. Spot 34



Şekil 3.39. 34 no'lu spotun PMF spektrumu

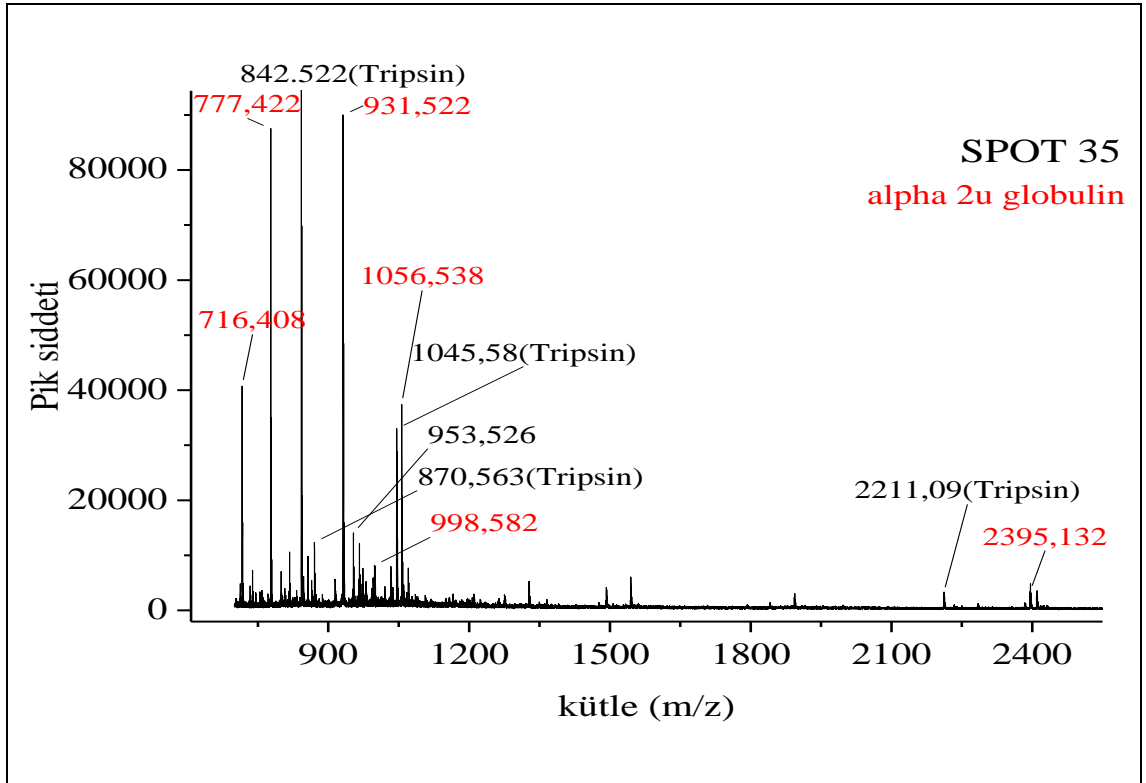
Komşu spotlarına göre %21'lik düşük dizi uyumu vermesine rağmen 716, 777, 931, 998 ve 1056 peptidlerini göstermesi nedeniyle, Spot 34'ün  $\alpha$ 2u-globulin içerdiğini söyleyebiliriz. Spektrumda oldukça yüksek tripsin ve keratin pikleride görüldüğü gibidir.

Protein sequence coverage: 21%						
Matched peptides shown in <b>bold red</b> .						
1	MKLLLLLLCL	GLTLVCGHAE	EASSTRGNLD	<b>VAK</b> LNGDWFS	IVVASNKREK	
51	IEENGSMRVF	MQHIDVLENS	LGFKFRIKEN	GE <b>CRELYLVA</b>	<b>YKTP</b> EDGEYF	
101	VEYDGGNTFT	ILKTDYDRYV	MFHLINFKNG	ETFQLMVLYG	<b>RTKDLSSDIK</b>	
151	EKFAK <b>LCEAH</b>	<b>GITR</b> DNIIDL	<b>TKTDR</b> CLQAR	G		
Start - End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	ppm	M	Peptide
27 - 33	716.0000	714.9927	715.3864	-550	0	<b>R.GNLDVAK.L</b>
85 - 92	998.0000	996.9927	997.5484	-557	0	<b>R.ELYLVAYK.T</b>
144 - 150	777.0000	775.9927	776.3916	-514	0	<b>K.DLSSDIK.E</b>
156 - 164	1056.0000	1054.9927	1055.5182	-498	0	<b>K.LCEAHGITR.D</b>
165 - 172	931.0000	929.9927	930.5022	-548	0	<b>R.DNIIDLTK.T</b>

Şekil 3.40. 34 no'lu spotun eşleşen dizisi



### 3.2.17. Spot 35



Şekil 3.41. 35 no'lu spotun PMF spektrumu

Spot 35'deki 716, 777, 931, 998, 1056 ve 2395 pikleri, Şekil 3.42'de de görülen, %33'lük dizi uyumunu sağladı. Bu spotun en skorlu eşleşmesinin NCBI veri tabanı giriş numarası GI: 22219450'dir.  $\alpha$ 2u-globulinin temel peptid piklerinin, Şekil 3.41.'deki spektrumunda görüldüğü gibi en yüksek pik şiddetleri verdiği görüldü.

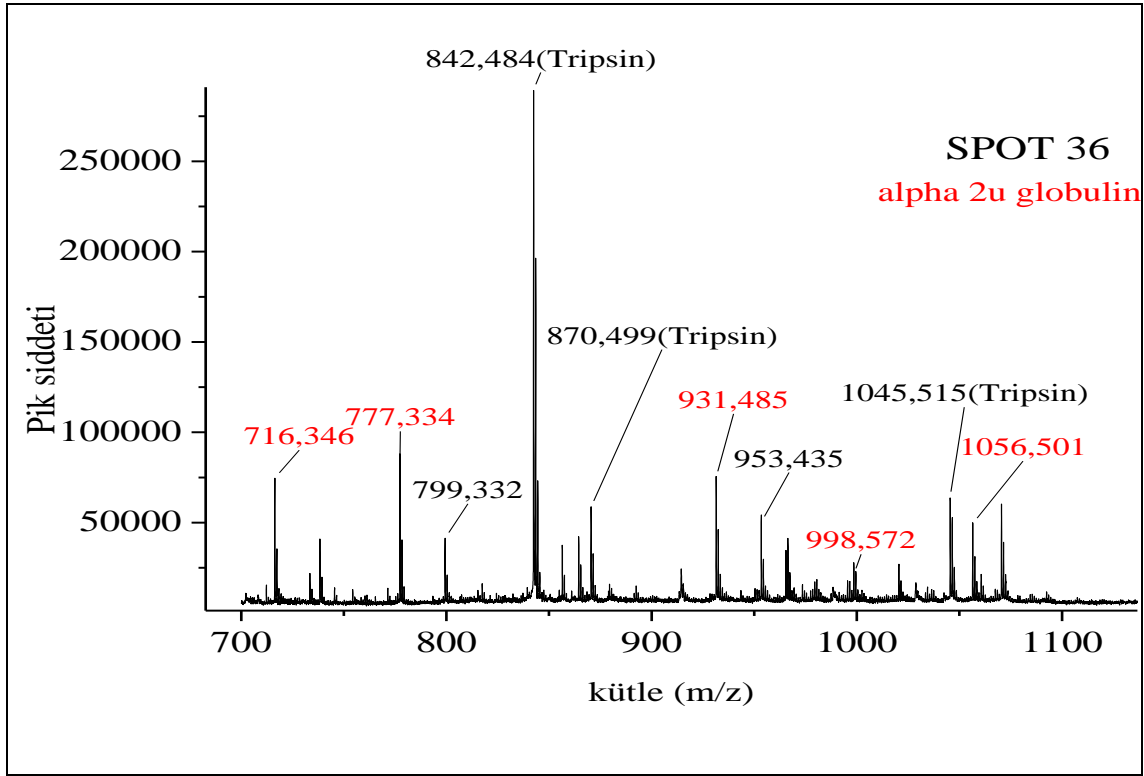
Protein sequence coverage: 33%						
Matched peptides shown in <b>bold red</b> .						
1	MKLLLLLLCL	GLTLVCGHAE	EASSTRGNLD	VAKLNGDWFS	IVVASNKREK	
51	IEENGSMRVF	MQHIDVLENS	LGFKFRIKEN	GECRELYLVA	YKTPEDGEYF	
101	<b>VEYDGGNTFT</b>	<b>ILKTDYDRYV</b>	MFHLINFKNG	ETFQLMVLVG	RTKDLSSDIK	
151	EKFAKLCEAH	GITRDNII DL	TKTDRCLQAR	G		

Start - End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	ppm	M	Peptide
27 - 33	716.0000	714.9927	715.3864	-550	0	R.GNLDVAK.L
85 - 92	998.0000	996.9927	997.5484	-557	0	R.ELYLVAYK.T
93 - 113	2395.0000	2393.9927	2394.0903	-40.8	0	K.TPEDGEYFVEYDGGNTFTILK.T
144 - 150	777.0000	775.9927	776.3916	-514	0	K.DLSSDIK.E
156 - 164	1056.0000	1054.9927	1055.5182	-498	0	K.LCEAHGITR.D
165 - 172	931.0000	929.9927	930.5022	-548	0	R.DNIIDLTK.T

Şekil 3.42. 35 no'lu spotun eşleşen dizisi

### 3.2.18. Spot 36



Şekil 3.43. 36 no'lu spotun PMF spektrumu

Spot 36'nin spektrumu  $\alpha$ 2u-globulinin başlıca peptid piklerinden 716, 777, 931, 998 ve 1056 peptidleri ile eşleşti. Bu peptid pikleri ile, Şekil 3.44.'te de görüldüğü gibi, %21'lik dizi uyumu gösterdi. Bu spotun eşleştiği birçok sekans dizisinden en skorlu sonucu veren dizinin NCBI veri tabanı giriş numarası GI: 22219450'dir.

**Protein sequence coverage: 21%**

Matched peptides shown in **bold red**.

```

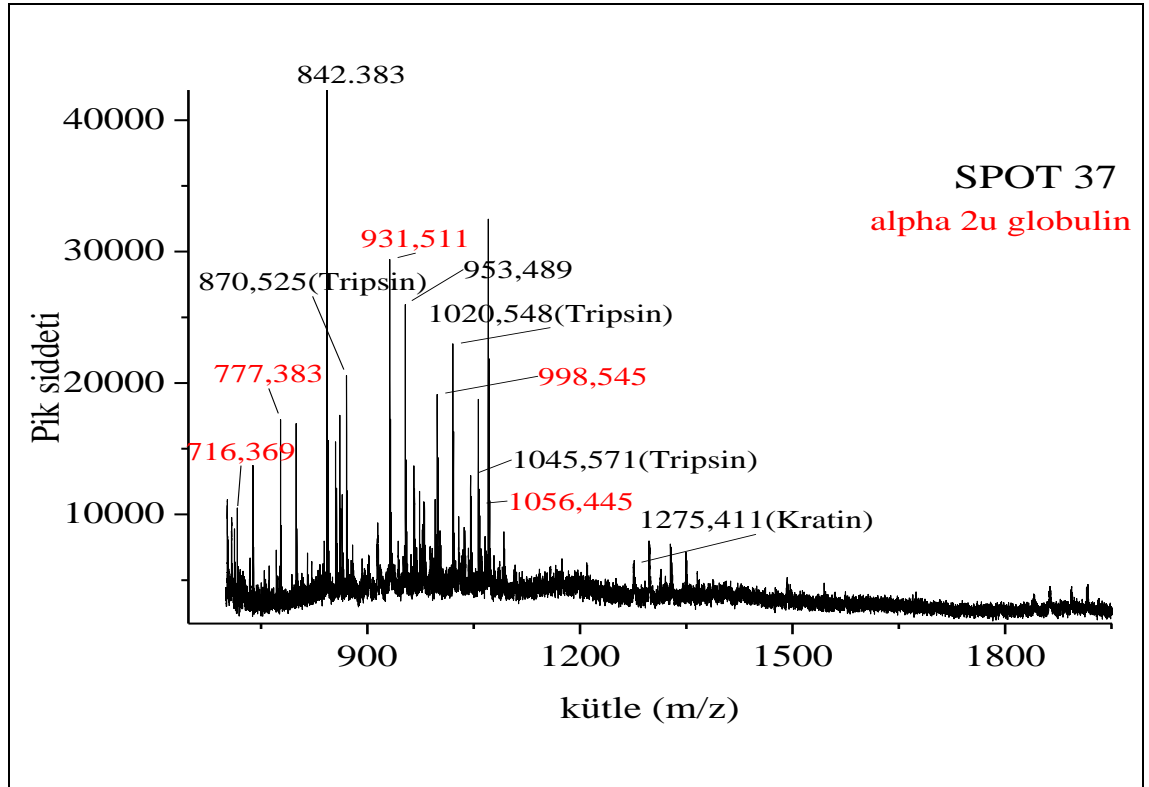
1 MKLLLLLLLCL GLTLVCGHAE EASSTRGNLD VAKLNGDWFS IVVASNKREK
51 IEENGSMRVF MQHIDVLENS LGFKFRIKEN GECREELYLVA YKTPEDGEYF
101 VEYDGGNTFT ILKTDYDRYV MFHLINFKNG ETFQLMVLYG RTKDLSSDIK
151 EKFAKLCEAH GITRDNIIDL TKTDRCLQAR G

```

Start - End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	ppm	M	Peptide
27 - 33	716.0000	714.9927	715.3864	-550	0	<b>R.GNLDVAK.L</b>
85 - 92	998.0000	996.9927	997.5484	-557	0	<b>R.ELYLVAYK.T</b>
144 - 150	777.0000	775.9927	776.3916	-514	0	<b>K.DLSSDIK.E</b>
156 - 164	1056.0000	1054.9927	1055.5182	-498	0	<b>K.LCEAHGITR.D</b>
165 - 172	931.0000	929.9927	930.5022	-548	0	<b>R.DNIIDLTK.T</b>

Şekil 3.44. 36 no'lu spotun eşleşen dizisi

### 3.2.19. Spot 37



Şekil 3.45. 37 no'lu spotun PMF spektrumu

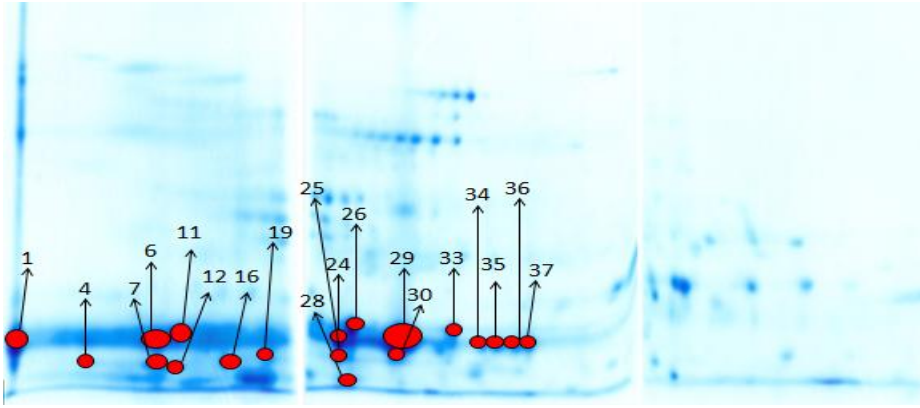
Spot 36'da olduğu gibi aynı sonuçları veren Spot 37 716, 777, 931, 998 ve 1056 peptidleri ile %21'lik dizi uyumu sağladı. Tespit edilen proteinin NCBI veri tabanı giriş numarası GI: 22219450'dir. Jel üzerinde spot 36 ve spot 37'nin konumlarına bakıldığında benzer şiddetlerde ve benzer dizi uyumuna sahip oldukları görüldü. Fakat spot 37'nin spektrumunda görülen pik şiddeti spot 36'nın pik şiddetinden oldukça düşük olduğu görüldü. Spot 37 için kütle spektrumunun az örnek içeren bir bölgeden çekildiği düşünülmektedir.

Protein sequence coverage: 21%						
Matched peptides shown in <b>bold red</b> .						
1	MKLLLLLLCL	GLTLVCGHAE	EASSTRGNLD	VAKLNGDWFS	IVVASNKREK	
51	IEENGSMRVF	MQHIDVLENS	LGFKFRIKEN	GECRELYLVA	YKTPEDGEYF	
101	VEYDGGNTFT	ILKTDYDRYV	MFHLINFKNG	ETFQLMVLVG	RTK <b>DLSSDIK</b>	
151	EKFAK <b>LCEAH</b>	<b>GITRDNII</b> DL	<b>TKTDRCLQAR</b>	G		
Start - End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	ppm	M	Peptide
27 - 33	716.0000	714.9927	715.3864	-550	0	<b>R.GNLDVAK.L</b>
85 - 92	998.0000	996.9927	997.5484	-557	0	<b>R.ELYLVAYK.T</b>
144 - 150	777.0000	775.9927	776.3916	-514	0	<b>K.DLSSDIK.E</b>
156 - 164	1056.0000	1054.9927	1055.5182	-498	0	<b>K.LCEAHGITR.D</b>
165 - 172	931.0000	929.9927	930.5022	-548	0	<b>R.DNIIDLTK.T</b>

Şekil 3.46. 37 no'lu spotun eşleşen dizisi

29 adet spot için PMF spektrumları çekildi. Yukarıdaki 19 adet spektrum için  $\alpha$ 2u-globulin proteini tanımlandı. Sonuçlar içerisinde en yüksek yüzde dizi uyumu gösteren sekans içerisinde eşleştirilen peptidler sekans üzerinde kırmızı renkli olarak gösterildi. Spektrumlara bakıldığı zaman bazı peptidlerin çok sık tespit edildiği görüldü. Bu peptidlerin kolay karşılaştırılması için tablo haline getirildi. Ortak peptidlerin, yani  $\alpha$ 2u-globulin için sık görülen kütlelerin varlığı bu peptidlerin kütle spektrometresi içerisinde daha kolay buharlaşan ve daha kolay uçan peptidler oldukları anlamına gelmektedir.

19 spotta  $\alpha$ 2u-globulin proteini tespit edildi. Şekil 3.47.'de  $\alpha$ 2u-globulin ile eşleşen spotlar işaretlendi. Literatürde idrar örnekleri ile yapılan iki boyutlu jel elektroforezi çalışmalarına göre bu bölgede 18 adet  $\alpha$ 2u-globulin spotu veya izoformu tespit edildi. Bu şekil üzerinde de görüldüğü gibi  $\alpha$ 2u-globulinlerin hem asidik hem de nötral bölgede oldukları söylenebilir. Jelin bazik kısmında ise bu proteinin hiç yer almadığı görüldü. Proteinlerin buldukları pH aralığı, Spot 1 başlangıç noktasında bulunması nedeniyle göz ardı edilirse, yaklaşık 3-7'dir.



Şekil 3.47.  $\alpha$ 2u-globulin olarak tanımlanmış spotların jeldeki konumları

Çizelge 3.2.  $\alpha$ 2u-globulin proteini olarak tanımlanan spotların spektrumlarındaki ortak kütleleri

SPOT	$\alpha$ 2u-globuline Karşılık Gelen Peptid Kütleleri
1	716, 777, 931, 998, 1056, 2394
4	777, 931, 998, 1026
6	777, 863, 931, 1026, 2120
7	760, 777, 931, 1026, 2120, 2139
11	760, 777, 863, 931, 1026, 2120, 2139
12	760, 777, 931, 1026, 2120, 2139
16	716, 777, 931, 1056
19	716, 777, 931, 1056
24	716, 777, 931, 998, 1056, 1528, 2395
25	777, 931, 998, 1056, 2395
26	760, 777, 931, 998, 1006, 1056, 1876, 2394, 2807

Devamı arkada

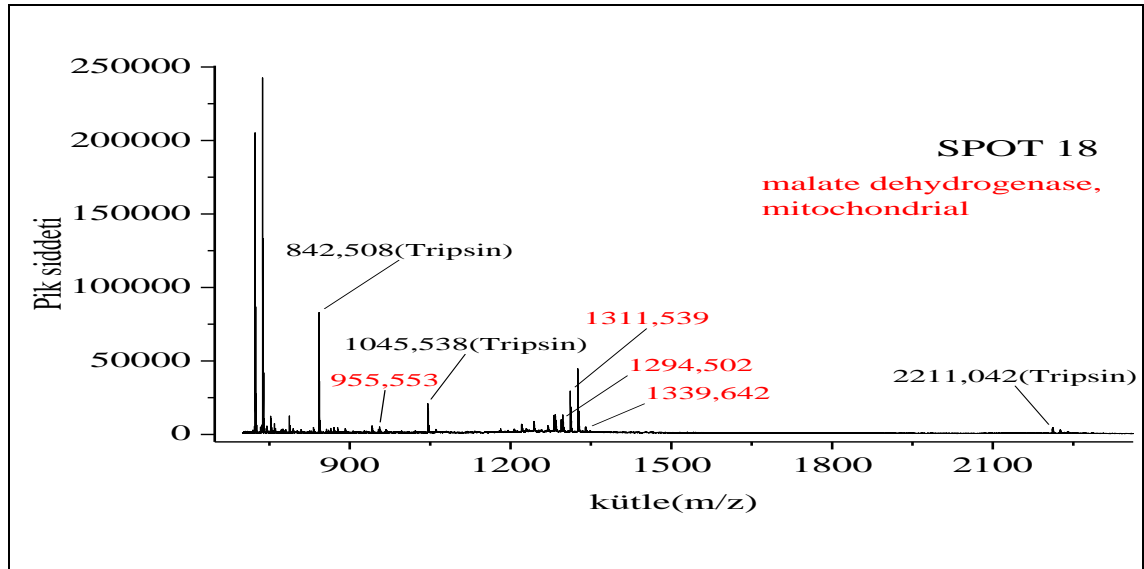
Çizelge 3.2'nin devamı

28	761, 777, 931, 998, 1006, 1056, 2395, 2807
29	716, 777, 931, 998, 1056, 1527, 1876, 2395
30	716, 777, 931, 998, 1056, 2395
33	760, 777, 931, 936, 998, 1056, 1914, 2394
34	716, 777, 931, 998, 1056
35	716, 777, 931, 998, 1056, 2395
36	716, 777, 931, 998, 1056
37	716, 777, 931, 998, 1056

Çizelge 3.2.'de 19 adet  $\alpha$ 2u-globulin ile eşleşmiş olan spotların ortak kütleleri görüldüğü gibidir. Çalışmanın başında bir spektrumun bir protein ile eşleştirme şartı olarak düşünülen 3 peptid piki sayısı Çizelge 3.2.'de de görüldüğü gibi sağlanabildi. 4, 16 ve 19 nolu spotların en az peptid grubu içeren spotlar olduğu görüldü. 4'er adet peptidle eşleşmiş olan bu spotlar  $\alpha$ 2u-globulinin temel peptidlerinin başlıca olanlarını içermekle beraber bu peptidler hemen her spotta yer alan peptidlerdi.

Daha önce anlatıldığı üzere öncelikle NCBI (National Center for Biotechnology Information) veri tabanında  $\alpha$ 2u-globulin ve sıçan üzerinden teorik bir araştırma yapıldı. Buradan elde edilen sekans dizi sayısı 38 idi. Bu 38 sekans dizisinin büyük bir çoğunluğu fragmentlere ait olduğundan, bu sayı 15'e indirildi. Bundan sonra yapılacak çalışmalara, bu 15 dizi üzerinden devam edildi. Üzerinde çalışılmış olan spotlardan  $\alpha$ 2u-globuline ait olanlar için bu 15 sekans dizisi kullanıldı. Sahip olunan spotlar Mascot'ta taraması yapılarak, hangi spotun hangi sekans dizisi veya dizilerine ait olduğu bulunmaya çalışıldı. Sekans dizisi veya dizileri, % uyumluluk değerleri Çizelge 3.4.'de verildi.

### 3.2.20. Spot 18



Şekil 3.48. 18 no'lu spotun PMF spektrumu

Spot 18'in spektrumuna bakıldığı zaman 700'lerde iki şiddetli pik görülmektedir. Fakat bu pikler malate dehidrogenase veya başka bir proteinle eşleşme göstermedi. Bu sebeple bu pikler adlandırılmadı. 955, 1294, 1311, 1339 piklerinin %31'lik dizi uyumu sayesinde malat dehidrogenaz mitokondriyal proteini ile eşleşme gösterdi. Spektruma bakıldığı zaman protein karışımı olmadığı görülmektedir. Ökaryotik hücrelerde bu enzimin en az iki formu bulunmaktadır. Malat dehidrogenaz mitokondriyal proteini, mitokondrideki sitrik asit döngüsünün temel enzimlerindenidir. NAD/NADH enzim sisteminde kullanılan okzalat ve malatın dönüşümünü katalize etmektedir (Minarik vd 2002). Sıçan karaciğerinden mitokondriyal malat dehidrogenaz enzimi poliakrilamid jelle, jel elektroforezi tarafından saf olarak izole edilmiştir (Bingham ve Campbell 1972).

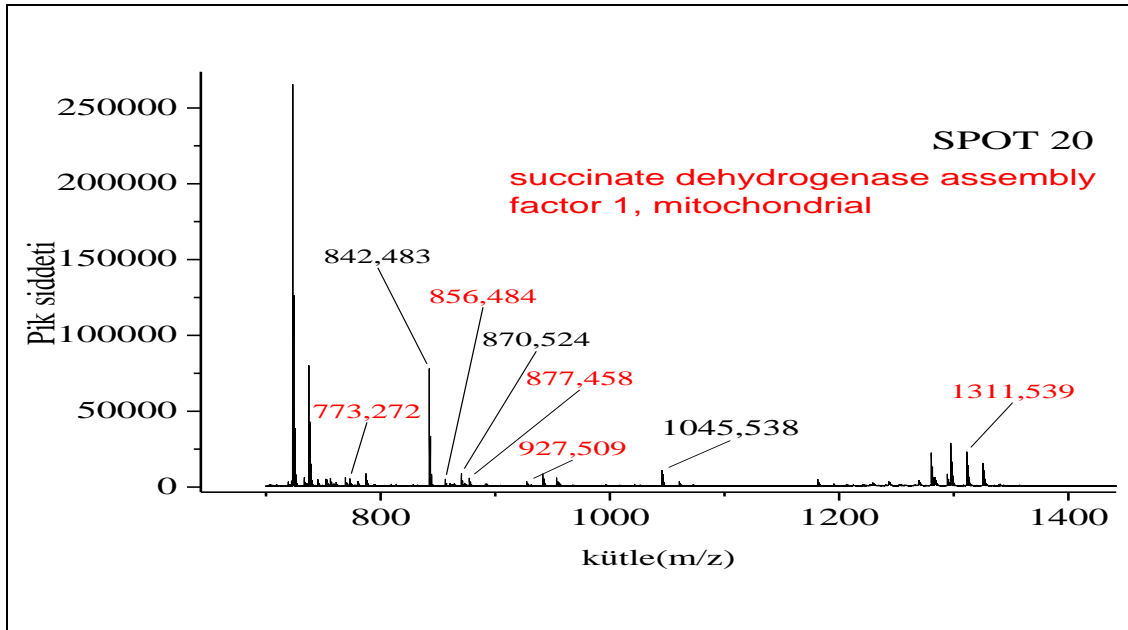
Protein sequence coverage: 31%						
Matched peptides shown in <b>bold red</b> .						
1	<b>MLSALARPVG</b>	<b>AALRRSFSTS</b>	<b>AQNNAK</b> VAVL	GASGGIGQPL	SLLLKNSPLV	
51	SRLTLYDIAH	TPGVAADLSH	IETRVNKG	LGPEQLPDCL	<b>KGCDVVVIPA</b>	
101	<b>GVPRK</b> PVLF	SVQRDRVHLF	LYTLAVGEKR	PGEEP <b>RHWQN</b>	<b>HSF</b>	

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	M	Peptide
2 - 14	1294.0000	1292.9927	1293.7881	-615	0	<b>M.LSALARPVG</b> AALR.R
15 - 26	1311.0000	1309.9927	1309.6375	271	1	R.RSFSTS <b>AQNNAK</b> .V
92 - 104	1339.0000	1337.9927	1337.7126	209	0	<b>K.GCDVVVIPA</b> GVPR.K
137 - 143	955.0000	953.9927	954.4097	-437	0	R.H <b>WQNH</b> SF.-

Şekil 3.49. 18 no'lu spotun eşleşen dizisi

### 3.2.21. Spot 20



Şekil 3.50. 20 no'lu spotun PMF spektrumu

Spot 20 için spektrum ve Mascot taramasına göre succinate dehidrogenase assembly factor 1 (SDHAF1), mitokondriyal proteini ile eşleşti. 773, 856, 877, 927 ve 1311 peptid piklerine göre Şekil 3.51’de %32’lik dizi uyumu sonucu elde edildi.

Çeşitli insan hastalıklarındaki nedenler gibi memelilerde de süksinit dehidrogenaz iki düzenleyici faktörü olarak SDHAF1 ve SDHAF2 olarak gruplandırılırlar. (Ghezzi vd 2009). SDHAF1’in fonksiyonel analizine bakıldığı zaman, SDH2 içine Fe-S yerleştirmesini sağlar (Ghezzi vd 2009). Bu protein, mitokondrideki elektron taşıma zinciri kompleks II de önemli rol oynar. Kompleks II için Fe-S merkezlerinin mitokondriyal biyosentezine katılma görevini yerine getirir. SDHAF1 proteini sıçanın beyin sapında (Phelka 2003), kalp perikardında (Pearce 2009) ve beyinde (Ajith 2009) bulunduğu dair çalışmalar yapılmıştır. Sıçanın idrarında bulunamamıştır.

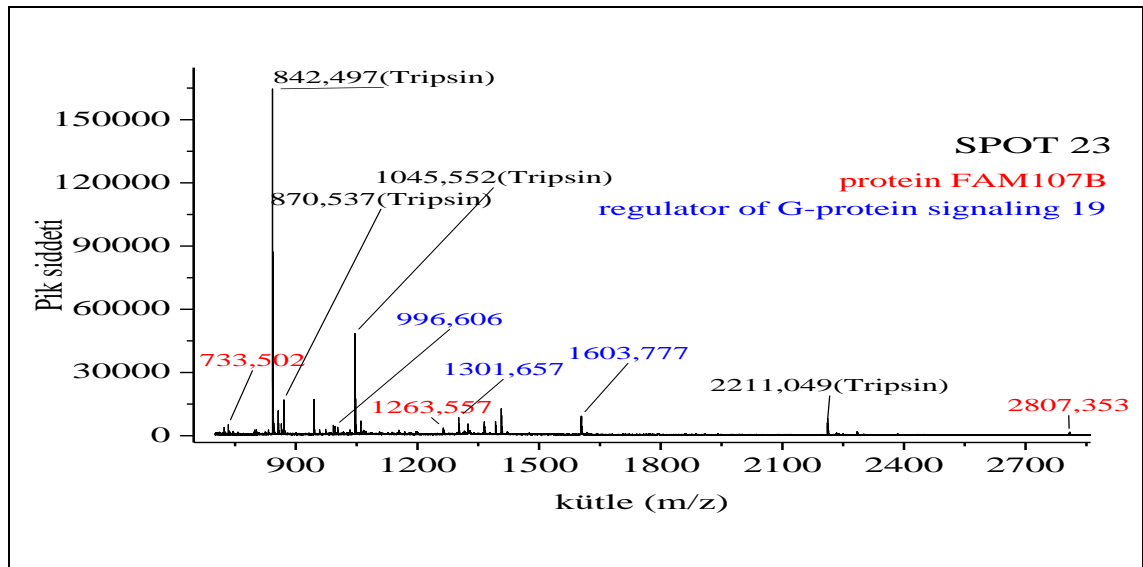
Protein sequence coverage: 32%						
Matched peptides shown in <b>bold red</b> .						
1	MSRLSRLQRQ	VLSLYRELLR	AGRGKPGAEA	RVRAEFRQHA	SLPRSDVLR	
51	EYLYRRGRQ	LQLLRSGHAT	AMGTFVRPRG	PTEEPVDATA	PGNRLDDSDA	
101	LKNPCEGTGA	RETRSDGR				

Start - End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	ppm	M	Peptide
4 - 9	773.0000	771.9927	771.4715	676	1	R.LSRLQR.Q
34 - 44	1311.0000	1309.9927	1310.6843	-528	1	R.AEFRQHASLPR.S
50 - 55	856.0000	854.9927	855.4490	-533	0	R.IEYLYR.R
59 - 65	927.0000	925.9927	925.5821	444	1	R.RQLQLLR.S
95 - 102	877.0000	875.9927	875.4236	650	0	R.LDDSDALK.N

Şekil 3.51. 20 no’lu spotun eşleşen dizisi

### 3.2.22. Spot 23



Şekil 3.52. 23 no’lu spotun PMF spektrumu

Spot 23 için ikili bir protein karışımı tespit edilmesine rağmen çok kuvvetli bir spektrum elde edilmedi.

%27'lik dizi uyumu veren Protein FAM107B (family with sequence similarity 107, member B), sıçan genom veritabanına göre (rgd.mcw.edu/) sıçan, insan ve farede bulunan bir protein olarak tespit edilmiştir. Dokularda geniş bir alan kaplayan bu protein, gastrointestinal kanserinde azaltıcı olduğu belirtilmiştir (Nakajima vd 2012).

Regulator of G-protein signaling 19, sıçan genom veritabanına göre sıçanda bulunan bir proteindir fakat literatürde, sıçanla ilgili çalışma yapılmamıştır. Bu protein farelerin kalbinde bulunmuştur. RGS19 negatif etkisiyle, kalbin gelişimi ve işlevinde önemli rol oynamaktadır (Ji 2010).

**Protein sequence coverage: 27%**

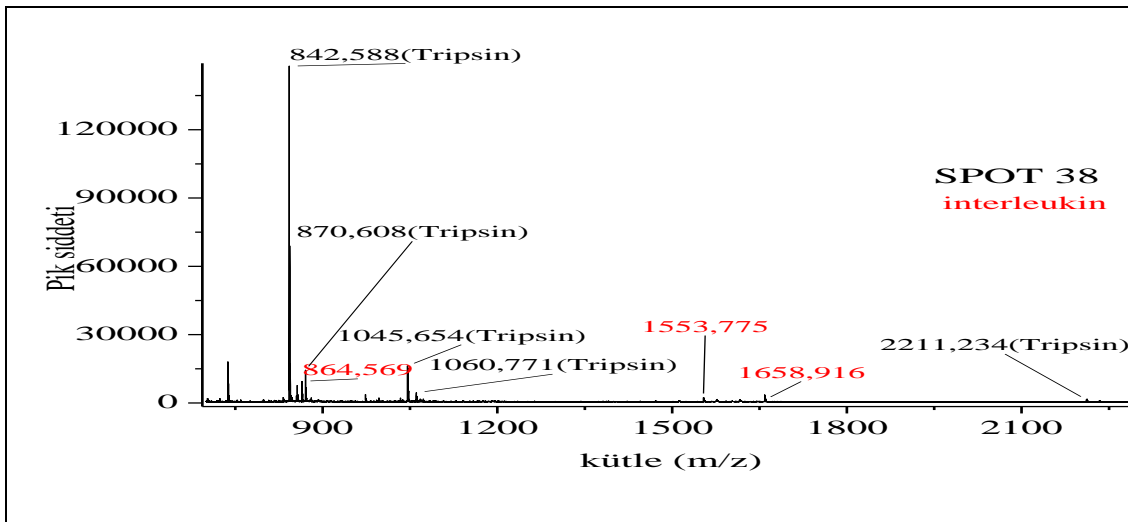
Matched peptides shown in **bold red**.

1 MHSPTGR**SVF RAFLR**TEYSE ENMLFWLACE ELKTEADRHV VDEKARLIYE  
51 DYVSILSPKE VSLDSRVREG INRKMQEPPS HTFDDAQLQI YTLMHR**DSYP**  
101 **RFLTSPTYRS LLLQGAPQSS EA**

Start - End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	ppm	M	Peptide
8 - 15	996.0000	994.9927	994.5712	424	1	<b>R.SVFRAFLR.T</b>
97 - 109	1603.0000	1601.9927	1601.7838	130	1	<b>R.DSYPRFLTSPTYR.S</b>
110 - 122	1301.0000	1299.9927	1299.6670	251	0	<b>R.SLLLQGAPQSSEA.-</b>

Şekil 3.53. 23 no'lu spotun eşleşen dizisi

### 3.2.23. Spot 38



Şekil 3.54. 38 no'lu spotun PMF spektrumu



Spot 38'in spektrumuna göre 864, 1553, 1658 pikleri %27'lik dizi uyumu ile interleukin protein sonucunu verdi. İnterleukin sitokinlerin bir grubudur, ilk kez beyaz kan hücrelerinde ifade edilmiştir (Brocker 2010). İnterleukinler 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7-9, 8, 10, 11, 12, 13, 15, 17, 18 şeklinde sınıflandırılırlar. İnterleukin-1 sıçanın mide fundusunda, beyinde ve sertoli hücrelerinde; interleukin-4 sıçanın glomerüler epitel hücrelerinde; interleukin-18 sıçanın hipokampüsünde bulunmaktadır. Bu proteinin eksikliği durumunda otoimmün hastalıkları ve bağışıklık yetersizlikleri kendini gösterir.

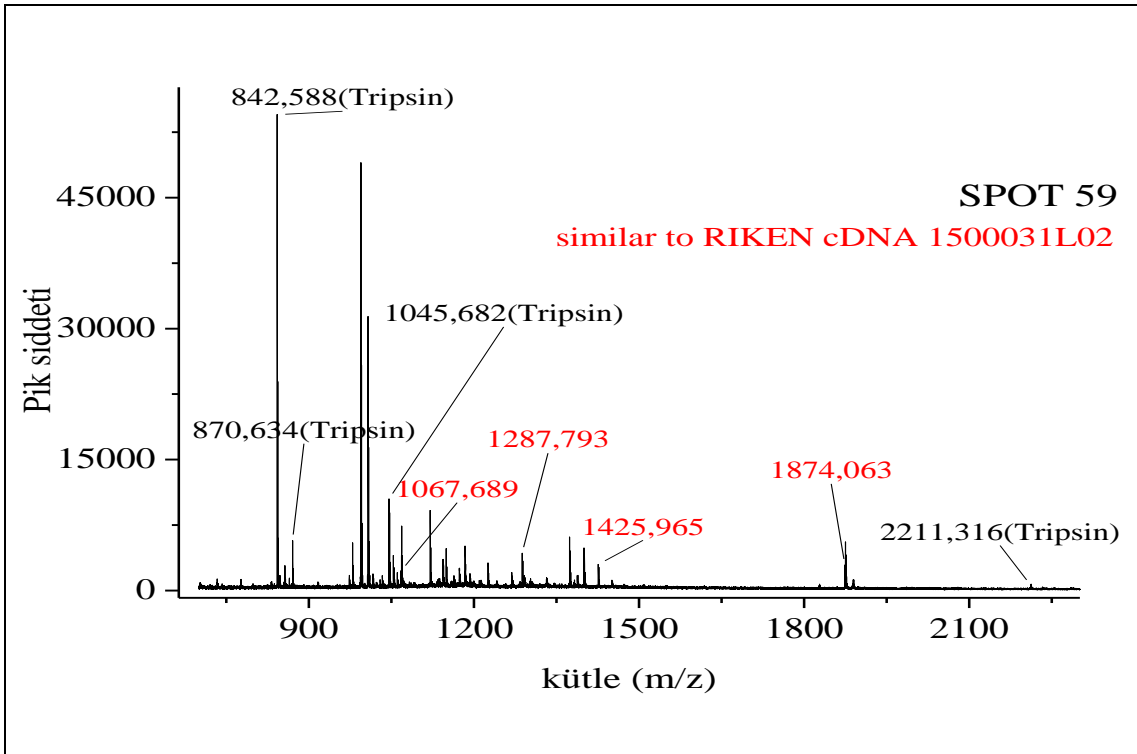
Protein sequence coverage: 27%						
Matched peptides shown in <b>bold red</b> .						
1	<b>MAAIPPEGSC</b>	<b>VNFKEMMFID</b>	<b>NTLYLIRKYI</b>	LGDLESDFHG	RLHCTTAVMR	
51	SINDQVLFVD	KRNPPVFEDM	PDIDRTANES	QTRLIIYMYK	DSEVRGLAVT	
101	LSVKDGRMST	L <del>SCKNK</del> <b>IISF</b>	<b>EVRF</b>			

Start - End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	ppm	M	Peptide
1 - 14	1553.0000	1551.9927	1551.7061	185	0	<b>-.MAAIPPEGSCVNFK.E</b>
15 - 27	1658.0000	1656.9927	1657.8208	-499	0	<b>K.EMMFIDNTLYLIR.K</b>
117 - 123	864.0000	862.9927	862.4912	581	0	<b>K.IISFEVR.F</b>

Şekil 3.55. 38 no'lu spotun eşleşen dizisi

### 3.2.24. Spot 59



Şekil 3.56. 59 no'lu spotun PMF spektrumu

Spot 59'un spektrumunda 1067, 1287, 1425 ve 1874 peptid pikleri ile eşleşmeler görüldü. Şekil 3.57.'de de görüldüğü gibi %24'lük dizi uyumu ile similar to RIKEN cDNA 1500031L02 proteini ile eşleşti ve bu Mascot tarama sonuçlarına göre belirlendi. Aslında Şekil 3.56.'da da görüldüğü gibi kırmızı ile işaretlenmiş peptidlerin kuvvetli olmayan pikler olduğu söylenebilir. Zayıf pikler nedeni ile Şekil 3.57.'de görüldüğü gibi %24'lük dizi uyumu ile aday proteindir denilebilir. Bu proteinin diğer bir adı sentrozomal protein 19 olarak bilinmektedir. Bu protein sıçanda bulunan bir proteindir fakat literatürde bu proteinle ilgili çalışmalar bulunamadı.

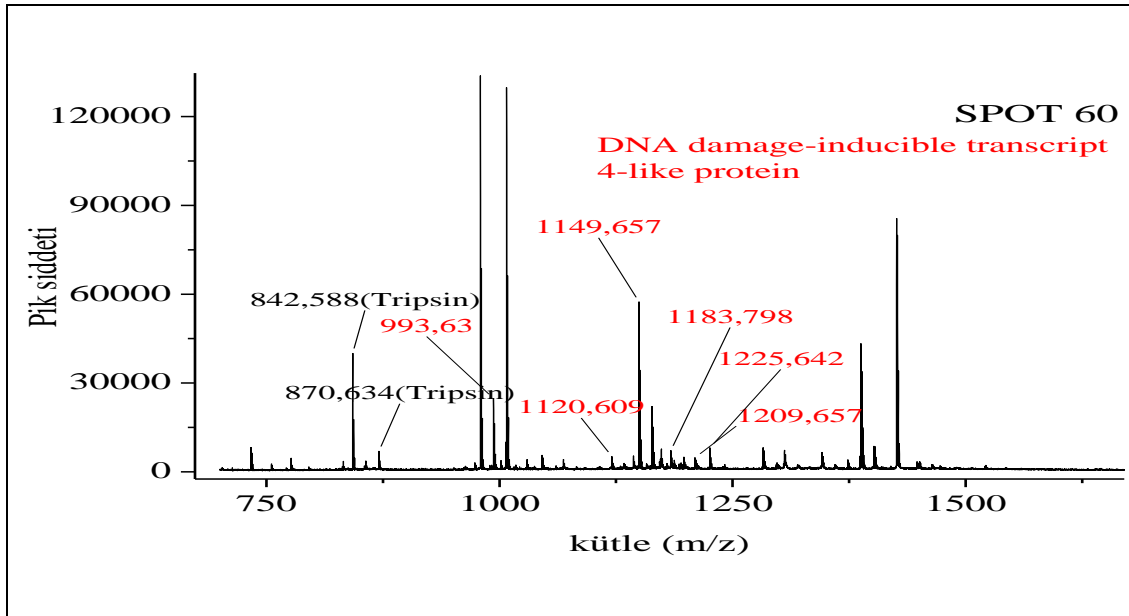
Protein sequence coverage: 24%					
Matched peptides shown in <b>bold red</b> .					
1	MWLTSLRKLL	<b>HSCPICMRSP</b>	VYPELHETMK	YIAKKCGVRF	QPPAMILIYE
51	NEAEGKSRQR	IMPVRNFSK <b>F</b>	<b>SDCTRAAEQL</b>	<b>KNNPRHKS</b> YL	<b>EQVSLK</b> QLEK
101	LFVFLRGSLQ	GQSLAETMEQ	<b>IQRETTIDPE</b>	<b>EDLNK</b> LDDKE	LAKRKSIMDE
151	LFEKNQKRKD	DPSFVYDVEV	EFQDEQLLS	CSWDTASVDE	F

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	M	Peptide
9 - 18	1287.0000	1285.9927	1285.6093	298	0	<b>K.LLHSCPICMR.S</b>
70 - 81	1425.0000	1423.9927	1424.6718	-477	1	<b>K.FSDCTRAAEQLK.N</b>
88 - 96	1067.0000	1065.9927	1065.5706	396	0	<b>K.SYLEQVSLK.Q</b>
124 - 139	1874.0000	1872.9927	1873.8793	-473	1	<b>R.ETTIDPEEDLNK</b> LDDK.E

Şekil 3.57. 59 no'lu spotun eşleşen dizisi

### 3.2.25. Spot 60



Şekil 3.58. 60 no'lu spotun PMF spektrumu

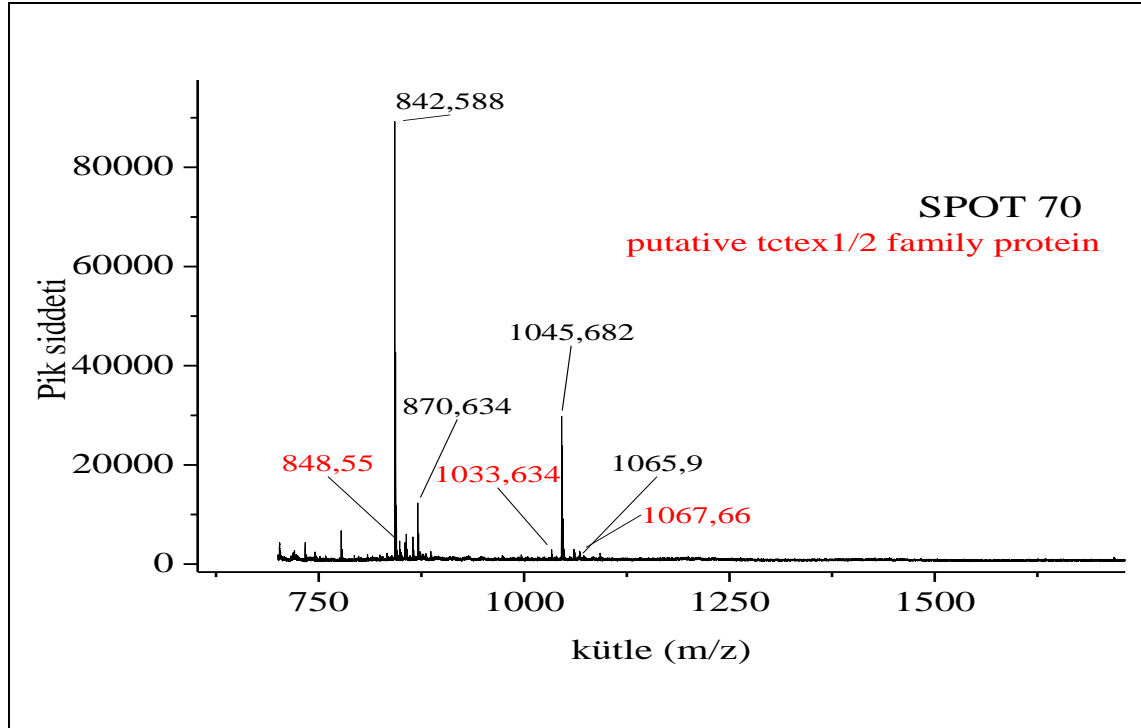
Spot 60'in spektrumu, Şekil 3.59.'da olduğu gibi, %25'lik dizi uyumu gösterdi. Spektrumda görülen 993, 1120, 1149, 1183, 1209 ve 1225 peptid piklerine göre DNA

damage-inducible transcript 4-like proteini ile eşleştirdi. Bu protein sıçanın beyininde (Zhu vd 1997) ve sıçanın karaciğerinde tespit edilmiştir (Suenaga vd 2013). Bu proteinin hücre içi membran taşımacılığında önemli rolü vardır. Bu protein hücre büyümesi, çoğalması gibi düzenlemeleri yapar. Memelilerdeki hedef bölgelerinin aktivitesini inhibe eder, hayatta kalmayı sağlar (Malagelada vd 2011).

Start – End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	ppm	M	Peptide
60 – 69	1209.0000	1207.9927	1208.5893	-494	1	<b>K.MLENCLSKSK.Q</b>
78 – 87	1183.0000	1181.9927	1181.7132	237	1	<b>K.VLVPEKLTQR.I</b>
95 – 104	1120.0000	1118.9927	1118.5390	406	0	<b>R.LSSTEPGLR.G</b>
142 – 151	1225.0000	1223.9927	1224.5445	-451	0	<b>K.QESCSWTSLK.D</b>
166 – 175	1149.0000	1147.9927	1148.6666	-587	1	<b>R.RTLILSSGFR.L</b>
167 – 175	993.0000	991.9927	992.5655	-577	0	<b>R.TLILSSGFR.L</b>

Şekil 3.59. 60 no'lu spotun eşleşen dizisi

### 3.2.26. Spot 70



Şekil 3.60. 70 no'lu spotun PMF spektrumu

Spot 70'in Şekil 3.60.'daki spektrumunda görülen 848, 1033 ve 1067 pikleri ile Şekil 3.61.'de görülen %19'luk dizi uyumu ile putative tctex 1/2 family proteini ile eşleştirdi. Çok zayıf olan bu spektrum için dizi uyumu %19 gibi düşük bir değer verdi. Bu

spektrum sonuçlarına göre olabilecek tek aday protein bu idi. Tctex-1 sinapsislerde endositoz tarafından sinir hücreleriyle mikrotübüllerin poliovirüs içeren veziküllerinin transferinde geriye taşımada çok önemli rol oynar. Bu protein sıçanın PC12 hücrelerinde bulunur. PC12 hücreleri Tctex-1 olarak ifade edilen sinir aksonlarıdır (King vd 1998).

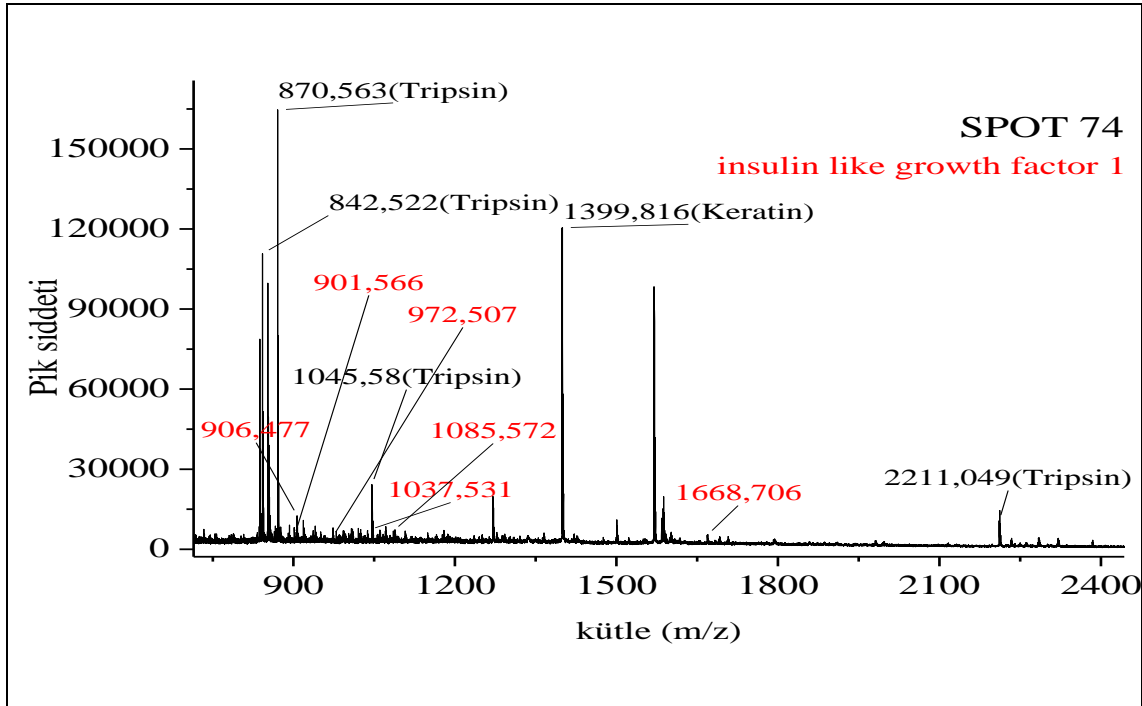
Protein sequence coverage: 19%						
Matched peptides shown in <b>bold red</b> .						
1	SFSGPLMPA	<b>RRVAPSYRIE</b>	PAPGEHWEEA	SAQRALKAAL	TAQLSDVCYS	
51	GTEAGKLVQA	LCEQIHVR	<b>ELNLPRYKLV</b>	CNVVLGPREG	<b>QGVHVSRAL</b>	
101	WDAHDGLAS	ATFTNPSLFA	VATVHAVYWE			

Start - End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	ppm	M	Peptide
12 - 18	848.0000	846.9927	847.4664	-559	1	<b>R.RVAPSYR.I</b>
71 - 78	1033.0000	1031.9927	1031.5763	404	1	<b>R.ELNLPRYK.L</b>
89 - 98	1067.0000	1065.9927	1066.5520	-524	0	<b>R.EGQGVHVSR.A</b>

Şekil 3.61. 70 no'lu spotun eşleşen dizisi

### 3.2.27. Spot 74



Şekil 3.62. 74 no'lu spotun PMF spektrumu

Spot 74'ün spektrumu, Şekil 3.63.'de de gösterilen pikler ile, insülin like growth factor 1 adlı protein ile eşleşti. Şekil 3.63.'de görüldüğü gibi %25'lik dizi uyumu 901, 906, 972, 1037, 1085 ve 1668 peptid pikleri ile sağlandı. Bu protein sıçanın beyinde

bulunur. Sinir sisteminin gelişmesinde ve fonksiyonlarında önemli rol oynamaktadır (Sonntag vd 1999). Sıçanın idrarında bulunduğu dair çalışmalar bulunamadı.

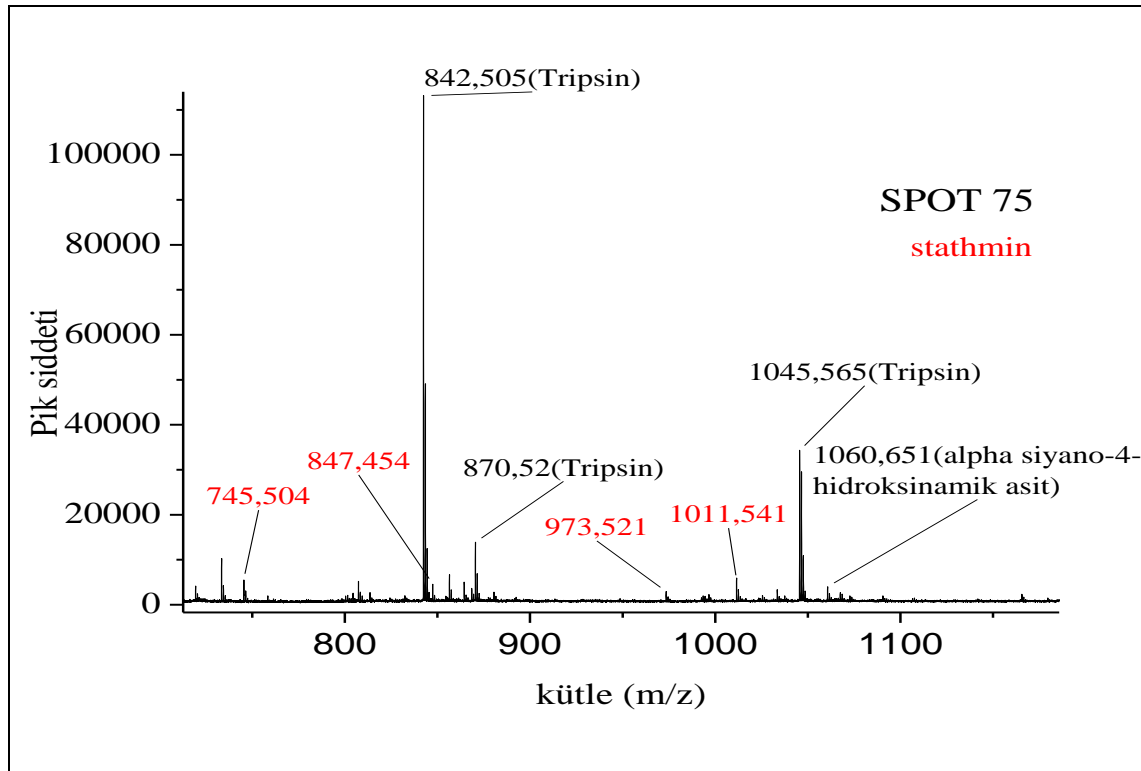
Protein sequence coverage: 25%						
Matched peptides shown in <b>bold red</b> .						
1	<b>M</b> CGSVGAVKK	<b>E</b> VREMNFAE	<b>M</b> SVRVETIAS	PGLCFHFGLI	IPTLTCCVND	
51	PGR <b>T</b> RMSAPP	<b>I</b> KIHIMSSSH	LFYLALCLLT	FTSSATAGPE	TLCGAELVDA	
101	LQFVCGPRGF	YFNKPTGYGS	SIRRAPQTGI	VDECCFRSCD	LRRLEMYCAP	
151	LKPTKSARSI	RAQR <b>H</b> TDMPK	<b>T</b> QKSQPLSTH	KRRKLQRRRK	<b>G</b> STLEEHK	

Start - End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	ppm	M	Peptide
1 - 10	1037.0000	1035.9927	1035.5205	456	1	<b>-.MCGSVGAVKK.E</b>
2 - 10	906.0000	904.9927	904.4800	567	1	<b>M.CGSVGAVKK.E</b>
11 - 24	1668.0000	1666.9927	1667.7759	-470	1	<b>K.EVREMNFAEMSVR.V</b>
54 - 62	972.0000	970.9927	971.5474	-571	1	<b>R.TRMSAPPIK.I</b>
165 - 173	1085.0000	1083.9927	1084.5335	-499	1	<b>R.HTDMPKTQK.S</b>
191 - 198	901.0000	899.9927	899.4348	620	0	<b>K.GSTLEEHK.-</b>

Şekil 3.63. 74 no'lu spotun eşleşen dizisi

### 3.2.28. Spot 75



Şekil 3.64. 75 no'lu spotun PMF spektrumu

Şekil 3.65.'e göre %20'lik düşük bir dizi uyumuna sahip Spot 75'in spektrumuna bakıldığı zaman tek bir proteinin spektrumu olduğu görüldü. 745, 847, 973 ve 1011 pikleri stathmin proteini ile eşleşti. Stathmin, hücre çoğalması ve farklılaşması gibi çeşitli hücresel süreçlerin üzerinde etkisi olduğu bilinen, hücre sitoplazmasının her yerinde bulunan bir proteindir (Guillaume vd 2001). Bu protein sıçanın

spermatogonia'sında, koku sistemlerinde, PC12 hücrelerinde (sıçan böbrek üstü medullasının feokromositoması) tespit edilmiştir. Stathmin, hücre sitoplazmasında hem fosforillenmiş hem de fosforillenmemiş iki ayrı formda bulunmaktadır. Alfa ve beta olmak üzere 19 kDa'luk iki bazik izoformu belirlenmiştir (Beretta vd 1989). Fosforillenmiş stathminler nörotransmitterler (Chneiweiss vd 1992), hormonlar (Beretta vd 1988), sitokinlerin (Le Gouvello vd 1991) veya büyüme ve farklılaşma faktörlerinin (Doye vd 1990) kontrolünü sağlar. Bu proteinin sıçanın idrarında bulunduğu dair çalışmalar yapılmamıştır.

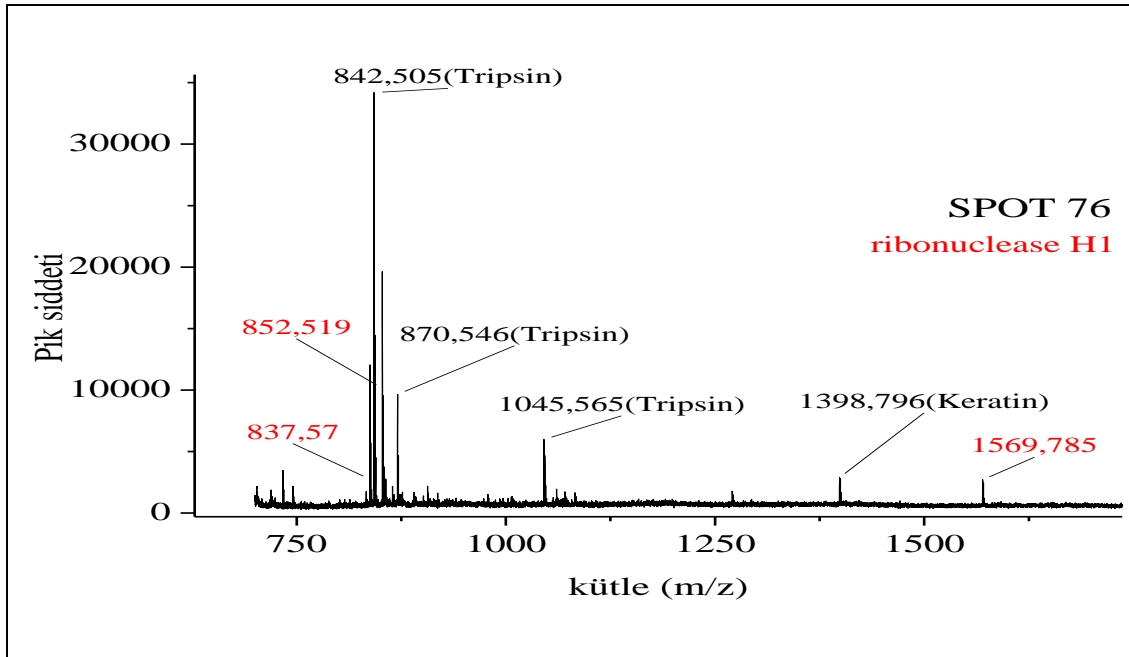
Protein sequence coverage: 20%						
Matched peptides shown in <b>bold red</b> .						
1	<b>MASSDIQVKE</b>	LEKRASGQAF	ELILSPRSKE	SVPEFPLSPP	KKKDLSELEI	
51	<b>QKKLEAAEER</b>	<b>RKSHEAEVLK</b>	<b>QLAEKREHEK</b>	EVLQKAIEEN	NNFSKMAEEK	
101	LTHKMEANKE	NREAQMAAKL	ERLREKDKHV	<b>EEVRKNKESK</b>	DPADETEAD	

Start - End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	ppm	M	Peptide
2 - 9	847.0000	845.9927	846.4447	-534	0	<b>M.ASSDIQVK.E</b>
54 - 61	973.0000	971.9927	972.4988	-520	1	<b>K.LEAAEERR.K</b>
71 - 76	745.0000	743.9927	743.4290	758	1	<b>K.QLAEKR.E</b>
127 - 134	1011.0000	1009.9927	1010.5145	-516	1	<b>K.DKHVEEVR.K</b>

Şekil 3.65. 75 no'lu spotun eşleşen dizisi

### 3.2.29. Spot 76



Şekil 3.66. 76 no'lu spotun PMF spektrumu

Şiddeti az olan bu spektrum Ribonükleaz H1 proteini ile eşleşti. 827, 852 ve 1569 pikleri ile, Şekil 3.67.'de de gösterildiği gibi, %14 ile düşük bir dizi uyumu gösterdi. Mascot taramasında başka bir sıçan proteiniyle eşleşme göstermeyen bu spektrum için en yüksek skorlu sonuç ribonükleaz H1 proteini idi. Sıçan karaciğerinde, fare miyelomunda, dana tümusunda, mayalarda, yavru hamsterlerin böbrek hattı hücreleri ve protozonları gibi ökaryotiklerde ribonükleaz H'in çoklu formlarının varlığı rapor edilmiştir (Tashiro ve Ueno 1978). Kültürlü bitki hücreleri kadar sıçan karaciğer nükleusunda, katalitik ve fiziksel özellikleri tarafından  $Mn^{+2}$ -bağlı ribonükleaz H ve  $Mg^{+2}$ -bağlı ribonükleaz H olmak üzere ribonükleaz H'in iki ayrı formunun varlığı belirlenmiştir. Ribonükleaz H, RNA-DNA hibrit yapılarında özellikle RNA'yı parçalayan enzimdir (Sawai vd 1979).

<b>Protein sequence coverage: 14%</b>						
Matched peptides shown in <b>bold red</b> .						
1	MRWLLPLFRT	VTLAVVRVRR	GVCGLGMFYA	VRRGRRITGVF	LSWSECKAQV	
51	DR <b>FPAARFKK</b>	<b>FATEDEAWAF</b>	<b>VRSSSPDGS</b>	<b>KGQESAHVQK</b>	LQVKTSKRPR	
101	EPLGEEEEPP	EPGAKHTRQD	TEPAALVSKD	AFSYMGESVV	VYTDGCCSSN	
151	GRKRARAGIG	VYWGPGHPLN	VGIRLEPGRQT	NQRAEIHVSS	QTNLSLPSRR	

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	M	Peptide
53 - 59	837.0000	835.9927	835.4704	625	1	<b>R.FPAARFK.K</b>
60 - 72	1569.0000	1567.9927	1568.7623	-491	1	<b>K.KFATEDEAWAFVR.S</b>
73 - 81	852.0000	850.9927	850.3668	736	0	<b>R.SSSSPDGSK.G</b>

Şekil 3.67. 76 no'lu spotun eşleşen dizisi

Çalışılmış olan 29 spot için, verilen spektrum ve Mascot veri tabanı sonuçlarına göre spotların eşleşen protein sonuçları Çizelge 3.3.'de verildi. Bu çizelgede görüldüğü gibi 1, 4, 6, 7, 16, 19, 28, 30, 33, 34, 35, 36, 37 ile etiketlenen spotlar sadece  $\alpha 2u$ -globulin ile, 11, 12, 24, 26, 29 ile etiketlenen spotlar  $\alpha 2u$ -globulin proteinin yanı sıra başka proteinler ile de eşleşti. 18, 20, 23, 38, 70, 59, 60, 74, 75, 76 ile etiketlenen spotlar ise  $\alpha 2u$ -globulin olmayan proteinlerdir.

Çizelge 3.3. Çalışılmış olan 29 spot için eşleşen protein sonuçları

SPOTLAR	SPOTLARIN EŞLEŞMİŞ OLAN PROTEİNLERİ	SPOTLAR	SPOTLARIN EŞLEŞMİŞ OLAN PROTEİNLERİ
1	Alpha 2u-globulin	33	Alpha 2u-globulin
4	Alpha 2u-globulin	34	Alpha 2u-globulin
6	Alpha 2u-globulin	35	Alpha 2u-globulin
7	Alpha 2u-globulin	36	Alpha 2u-globulin
11	Alpha 2u-globulin	37	Alpha 2u-globulin
	MGC14161 protein	18	Malate dehydrogenase, mitochondrial
12	EAPG6122 proteini	20	Succinate dehydrogenase assembly factor 1, mitochondrial
	Alpha 2u-globulin	23	Protein FAM107B
EAPG6122 proteini	Regulator of G-protein 19		
16	Alpha 2u-globulin	38	İnterleukin 18
19	Alpha 2u-globulin	70	Putative tctex1/2 family protein
24	Alpha 2u-globulin	59	Similar to RIKEN cDNA 1500031L02
25	Dehidrogenaz/ reduktaz	60	DNA damage-inducible transcript 4_like protein
	Alpha 2u-globulin	74	İnsulin_like growth factor 1
26	Alpha 2u-globulin	75	Stathmin
	Low molecular weight phosphotyrosine protein	76	Ribonuclease H1
28	PRELI domain-containing protein		
	Alpha 2u-globulin		
29	NMDA receptor-regulated gene 1		
30	Alpha 2u-globulin		

### 3.2.30. $\alpha$ 2u-globulin protein sekanslarının özellikleri

Çizelge 3.4.'de spotların eşleşmiş olduğu sekans dizilerinin giriş numaraları ve varsa bunların PGCL cinsinden kısaltmaları verildi. Mascot veri tabanı tarama sonuçlarından dizi uyumlulukları % değerleriyle, sekans dizisinin toplam aminoasit sayıları verildi. Bunların yanı sıra sekans dizilerinin teorik molekül kütleleri ve izoelektrik nokta değerleri gösterildi.

Çizelge 3.4. Spotların tanımlama sonuçları; dizi uyumu (sequence coverage), referans sekans numaraları, sekansların aminoasit sayıları, teorik MW ve pI değerleri

SPOTLAR	DİZİ UYUMU (%)	REFERANS SEKANS NUMARALARI	SEKANSLARDAKİ AMİNOASİT SAYISI	MW	pI
1	33	GI:22219450 (PGCL1)	181 aa	20992	5,41
	29	GI:204261	177 aa	20454	5,43
4	18	GI:204261	177 aa	20454	5,43
	17	GI:202610	181 aa	20992	5,41
	17	GI:51011131	181 aa	21007	5,41
	17	GI:54020747 (PGCL2)	181 aa	20997	5,62
	17	GI:22219450 (PGCL1)	181 aa	20992	5,41

Devamı arkada



Çizelge 3.4.'ün devamı

<b>6</b>	27	GI:76880469 (PGCL4)	179 aa	20621	4,86
	23	GI:1196815	181aa	20834	4,95
<b>7</b>	37	GI:76880469 (PGCL4)	179 aa	20621	4,86
	37	GI:1196815	181aa	20834	4,95
<b>11</b>	45	GI:76880469 (PGCL4)	179 aa	20621	4,86
	41	GI:1196815	181aa	20834	4,95
<b>12</b>	41	GI:76880469 (PGCL4)	179 aa	20621	4,86
	41	GI:1196815	181aa	20834	4,95
<b>16</b>	17	GI:22219450 (PGCL1)	181 aa	20992	5,41
	13	GI:204261	177 aa	20454	5,43
	13	GI:202610	181aa	20992	5,41
	13	GI:51011131	181aa	21007	5,41
	13	GI:54020747	181aa	20997	5,62
<b>19</b>	17	GI:22219450 (PGCL1)	181 aa	20992	5,41
	13	GI:204261	177 aa	20454	5,43
	13	GI:202610	181aa	20992	5,41
	13	GI:51011131	181aa	21007	5,41
	13	GI:54020747	181aa	20997	5,62
<b>24</b>	40	GI:204261	177 aa	20454	5,43
	29	GI:22219450 (PGCL1)	181 aa	20992	5,41
<b>25</b>	29	GI:204261	177 aa	20454	5,43
	29	GI:22219450 (PGCL1)	181 aa	20992	5,41
<b>26</b>	50	GI:51011131	181 aa	21007	5,41
	46	GI:202610	181aa	20992	5,41
	41	GI:54020747	181aa	20997	5,62
<b>28</b>	37	GI:22219450 (PGCL1)	181 aa	20992	5,41
	31	GI:204261	177 aa	20454	5,43
<b>29</b>	49	GI:22219450 (PGCL1)	181 aa	20992	5,41
	46	GI:204261	177 aa	20454	5,43
<b>30</b>	33	GI:22219450 (PGCL1)	181 aa	20992	5,41
	29	GI:204261	177 aa	20454	5,43
<b>33</b>	41	GI:202610	181 aa	20992	5,41
	33	GI:51011131	181 aa	21007	5,41
	33	GI:54020747 (PGCL2)	181 aa	20997	5,62
<b>34</b>	21	GI:22219450 (PGCL1)	181 aa	20992	5,41
	18	GI:204261	177 aa	20454	5,43
<b>35</b>	33	GI:22219450 (PGCL1)	181 aa	20992	5,41
	29	GI:204261	177 aa	20454	5,43
<b>36</b>	21	GI:22219450 (PGCL1)	181 aa	20992	5,41
	18	GI:204261	177 aa	20454	5,43
<b>37</b>	21	GI:22219450 (PGCL1)	181 aa	20992	5,41
	18	GI:204261	177 aa	20454	5,43

Teorik olarak, bir proteinin karakterizasyonunda dizi uyumunun en az %25 olması gerekli idi. Eğer bu değer altında, fakat %25'e yakın değerler var ise bu proteinler için aday denildi. Çizelge 3.4.'de 1, 6, 7, 11, 12, 24, 25, 26, 28, 29, 30, 33, 35 nolu spotların yüksek olan % dizi uyumu (sequence coverage) değerlerine göre  $\alpha$ 2u-globulindir denildi. 4, 16, 19, 34, 36, 37 nolu spotlar için de, eşleşen ortak peptidler doğrultusunda da  $\alpha$ 2u-globulin proteini için çok kuvvetli bir aday olarak gösterildi.

Genel olarak çizelgeye bakıldığında; en çok 13 tane spotla eşleşen PGCL1, yine 13 spot ile eşleşen GI: 204261 giriş numaralı AAA41198.1, bunu hemen arkasından 5 tane spotla eşleşen PGCL4 takip etti.

18, 20, 23, 38, 70, 59, 60, 74, 75 ve 76 nolu spotlar  $\alpha$ 2u-globulin proteini ile eşleşmeyen proteinler olup, Mascot ile yapılmış olan taramaya göre sonuçlar saptanmıştır. Bu spotların bazıları için oldukça iyi % dizi uyumu sonuçları elde edildi.

Gümüş ve CBB jellerinin sol üst kısmında 7'li bir spot serisi görülmektedir. Bu spotların da peptid kütle parmak izi spektrumları çekilmiştir. Mascot taraması sonucunda bu spotların soya fasülyesi proteini olan beta-conglycinin olduğu ortaya çıktı. Bu proteinin sığana verilen besinlerden idrara düşerek, idrarı kontamine ettiği düşünüldü. Tez içinde bu proteine ait spektrumlar verilmedi.

Çizelge 3.5. Spotların teorik  $\alpha$ 2u-globulin protein dizilerine göre eşleştirilmesi

SPOT 1	
GI:22219450 GI:204261	MKLLLLLLCGLTLVCGHAEASSTRGNLDVAKLNGDWFSIVVASNKREKIEENGSMRV 59 LLLLCGLTLVCGHAEASSTRGNLDVAKLNGDWFSIVVASNKREKIEENGSMRV 55 FMQHIDVLENSLGFKFRIKENGECRELYLVAYKTPEDGEYFVEYDGGNTFTILKTDYDR 118 FMQHIDVLENSLGFKFRIKENGECRELYLVAYKTPEDGEYFVEYDGGNTFTILKTDYDR 114 YVMFHILNFKNGETFQLMVLYGRTKDLSSDIKEKFAKLCEAHGITRDNIIDLTKTDRCLQARG 181 YVMFHILNFKNGETFQLMVLYGRTKDLSSDIKEKFAKLCEAHGITRDNIIDLTKTDRCLQARG 177
SPOT 4	
GI:204261 GI:202610 GI:51011131 GI:54020747 GI:22219450	LLLLCGLTLVCGHAEASSTRGNLDVAKLNGDWFSIVVASNKREKIEENGSMRV 55 MKLLLLLLCGLTLVCGHAEASSTRGNLDVAKLNGDWFSIVVASDKREKIEENGSMRV 59 MKLLLLLLCGLTLVCGHAEASSTRGNLDVAKLNGDWFSIVVASDKREKIEENGSMRV 59 MKLLLLLLCGLTLVCGHAEASSTRGNLDVAKLNGDWFSIVVASNKREKIEENGSMRV 59 MKLLLLLLCGLTLVCGHAEASSTRGNLDVAKLNGDWFSIVVASNKREKIEENGSMRV 59 FMQHIDVLENSLGFKFRIKENGECRELYLVAYKTPEDGEYFVEYDGGNTFTILKTDYDR 114 FMQHIDVLENSLGFKFRIKENGECRELYLVAYKTPEDGEYFVEYDGGNTFTILKTDYDR 118 FMQHIDVLENSLGFKFRIKENGECRELYLVAYKTPEDGEYFVEYDGGNTFTILKTDYDR 118 FMQHIDVLENSLGFKFRIKENGECRELYLVAYKTPEDGEYFVEYDGGNTFTILKTDYDR 118 FMQHIDVLENSLGFKFRIKENGECRELYLVAYKTPEDGEYFVEYDGGNTFTILKTDYDR 118 YVMFHILNFKNGETFQAMVLYGRTKDLSSDIKEKFAKLCEAHGITRDNIIDLTKTDRCLQARG 177 YVMFHILNFKNGETFQAMVLYGRTKDLSSDIKEKFAKLCEAHGITRDNIIDLTKTDHCLQARG 181 YVMFHILNFKNGETFQAMVLYGRTKDLSSDIKEKFAKLCEAHGITRDNIIDLTKTDHCLQARG 181 YVMFHILNFKNGETFQAMVLYGRTKDLSSDIKEKFAKLCEAHGITRDNIIDLTKTDRCLQARG 181 YVMFHILNFKNGETFQAMVLYGRTKDLSSDIKEKFAKLCEAHGITRDNIIDLTKTDRCLQARG 181
SPOT 6	
GI:77695923 GI:1196815	MKLLLLLLCGLTLVCGHAEASFERGNLDVAKLNGDWFSIVVASDKREKIEENGSMRV 59 MKLLLLLLCGLTLVCGHAEASFERGNLDVAKLNGDWFSIVVASDKREKIEENGSMRV 59 FVQHIDVLENSLGFTRIKENGVCTEFSLVADKTAKDGEYFVEYDGGNTFTILKTDYDN 118 FVQHIDVLENSLGFTRIKENGVCTEFSLVADKTAKDGEYFVEYDGGNTFTILKTDYDN 118 YVMFHILNFKNGETFQMLMELYGRTKDLSSDIKEKFAKLCEAHGITRDNIIDLTKTDRCLQA 179 YVMFHILNFKNGETFQMLMELYGRTKDLSSDIKEKFAKLCEAHGITRDNIIDLTKTDRCLQARG 181

Devamı arkada

Çizelge 3.5.'in devamı

<b>SPOT 7</b>	
GI:77695923 GI:8307690	MKLLLLLLCLGLTLVCGHAEASFERGNLDVDKLNWDWFSIVVASKREKIEENGSMRV 59 MKLLLLLLCLGLTLVCGHAEASFERGNLDVDKLNWDWFSIVVASKREKIEENGSMRV 59 FVQHIDVLENSLGFTFRIKENGVCTEFSLVADKTAKDGEYFVEYDAGENTFTILKTDYDN 118 FVQHIDVLENSLGFTFRIKENGVCTEFSLVADKTAKDGEYFVEYDAGENTFTILKTDYDN 118 YVMFHLVNVNNGETFQLMELYGRTKDLSSDIKEKFAKLCVAHGITRDNIIDLTKTDRCLQA 179 YVMFHLVNVNNGETFQLMELYGRTKDLSSDIKEKFAKLCVAHGITRDNIIDLTKTDRCLQARG 181
<b>SPOT 11</b>	
GI:77695923 GI:1196815	MKLLLLLLCLGLTLVCGHAEASFERGNLDVDKLNWDWFSIVVASKREKIEENGSMRV 59 MKLLLLLLCLGLTLVCGHAEASFERGNLDVDKLNWDWFSIVVASKREKIEENGSMRV 59 FVQHIDVLENSLGFTFRIKENGVCTEFSLVADKTAKDGEYFVEYDAGENTFTILKTDYDN 118 FVQHIDVLENSLGFTFRIKENGVCTEFSLVADKTAKDGEYFVEYDAGENTFTILKTDYDN 118 YVMFHLVNVNNGETFQLMELYGRTKDLSSDIKEKFAKLCVAHGITRDNIIDLTKTDRCLQA 179 YVMFHLVNVNNGETFQLMELYGRTKDLSSDIKEKFAKLCVAHGITRDNIIDLTKTDRCLQARG 181
<b>SPOT 12</b>	
GI:77695923 GI:8307690	MKLLLLLLCLGLTLVCGHAEASFERGNLDVDKLNWDWFSIVVASKREKIEENGSMRV 59 MKLLLLLLCLGLTLVCGHAEASFERGNLDVDKLNWDWFSIVVASKREKIEENGSMRV 59 FVQHIDVLENSLGFTFRIKENGVCTEFSLVADKTAKDGEYFVEYDAGENTFTILKTDYDN 118 FVQHIDVLENSLGFTFRIKENGVCTEFSLVADKTAKDGEYFVEYDAGENTFTILKTDYDN 118 YVMFHLVNVNNGETFQLMELYGRTKDLSSDIKEKFAKLCVAHGITRDNIIDLTKTDRCLQA 179 YVMFHLVNVNNGETFQLMELYGRTKDLSSDIKEKFAKLCVAHGITRDNIIDLTKTDRCLQARG 181
<b>SPOT 16</b>	
GI:22219450 GI:202610 GI:51011131 GI:54020747 GI:204261	MKLLLLLLCLGLTLVCGHAEASSTRGNLDVAKLNWDWFSIVVASNKREKIEENGSMRV 59 MKLLLLLLCLGLTLVCGHAEASSTRGNLDVAKLNWDWFSIVVASDKREKIEENGSMRV 59 MKLLLLLLCLGLTLVCGHAEASSTRGNLDVAKLNWDWFSIVVASDKREKIEENGSMRV 59 MKLLLLLLCLGLTLVCGHAEASSTRGNLDVAKLNWDWFSIVVASNKREKIEENGSMRV 59 LLLLCLGLTLVCGHAEASSTRGNLDVAKLNWDWFSIVVASNKREKIEENGSMRV 55 FMQHIDVLENSLGFKFRIKENGECRELYLVAYKTPEDGEYFVEYDGGNTFTILKTDYDR 118 FMQHIDVLENSLGFKFRIKENGECRELYLVAYKTPEDGEYFVEYDGGNTFTILKTDYDR 118 FMQHIDVLENSLGFKFRIKENGECRELYLVAYKTPEDGEYFVEYDGGNTFTILKTDYDR 118 FMQHIDVLENSLGFKFRIKENGECRELYLVAYKTPEDGEYFVEYDGGNTFTILKTDYDR 118 FMQHIDVLENSLGFKFRIKENGECRELYLVAYKTPEDGEYFVEYDGGNTFTILKTDYDR 114 YVMFHLINFKNGETFQLMVLYGRTKDLSSDIKEKFAKLCEAHGITRDNIIDLTKTDRCLQARG 181 YVMFHLINFKNGETFQAMVLYGRTKDLSSDIKEKFAKLCEAHGITRDNIIDLTKTDRCLQARG 181 YVMFHLINFKNGETFQAMVLYGRTKDLSSDIKEKFAKLCEAHGITRDNIIDLTKTDRCLQARG 181 YVMFHLINFKNGETFQAMVLYGRTKDLSSDIKEKFAKLCEAHGITRDNIIDLTKTDRCLQARG 181 YVMFHLINFKNGETFQAMVLYGRTKDLSSDIKEKFAKLCEAHGITRDNIIDLTKTDRCLQARG 177
<b>SPOT 19</b>	
GI:22219450 GI:202610 GI:51011131 GI:54020747 GI:204261	MKLLLLLLCLGLTLVCGHAEASSTRGNLDVAKLNWDWFSIVVASNKREKIEENGSMRV 59 MKLLLLLLCLGLTLVCGHAEASSTRGNLDVAKLNWDWFSIVVASDKREKIEENGSMRV 59 MKLLLLLLCLGLTLVCGHAEASSTRGNLDVAKLNWDWFSIVVASDKREKIEENGSMRV 59 MKLLLLLLCLGLTLVCGHAEASSTRGNLDVAKLNWDWFSIVVASNKREKIEENGSMRV 59 LLLLCLGLTLVCGHAEASSTRGNLDVAKLNWDWFSIVVASNKREKIEENGSMRV 55 FMQHIDVLENSLGFKFRIKENGECRELYLVAYKTPEDGEYFVEYDGGNTFTILKTDYDR 118 FMQHIDVLENSLGFKFRIKENGECRELYLVAYKTPEDGEYFVEYDGGNTFTILKTDYDR 118 FMQHIDVLENSLGFKFRIKENGECRELYLVAYKTPEDGEYFVEYDGGNTFTILKTDYDR 118 FMQHIDVLENSLGFKFRIKENGECRELYLVAYKTPEDGEYFVEYDGGNTFTILKTDYDR 118 FMQHIDVLENSLGFKFRIKENGECRELYLVAYKTPEDGEYFVEYDGGNTFTILKTDYDR 114 YVMFHLINFKNGETFQLMVLYGRTKDLSSDIKEKFAKLCEAHGITRDNIIDLTKTDRCLQARG 181 YVMFHLINFKNGETFQAMVLYGRTKDLSSDIKEKFAKLCEAHGITRDNIIDLTKTDRCLQARG 181 YVMFHLINFKNGETFQAMVLYGRTKDLSSDIKEKFAKLCEAHGITRDNIIDLTKTDRCLQARG 181 YVMFHLINFKNGETFQAMVLYGRTKDLSSDIKEKFAKLCEAHGITRDNIIDLTKTDRCLQARG 181 YVMFHLINFKNGETFQAMVLYGRTKDLSSDIKEKFAKLCEAHGITRDNIIDLTKTDRCLQARG 177
<b>SPOT 24</b>	
GI:22219450 GI:204261	MKLLLLLLCLGLTLVCGHAEASSTRGNLDVAKLNWDWFSIVVASNKREKIEENGSMRV 59 LLLLCLGLTLVCGHAEASSTRGNLDVAKLNWDWFSIVVASNKREKIEENGSMRV 55 FMQHIDVLENSLGFKFRIKENGECRELYLVAYKTPEDGEYFVEYDGGNTFTILKTDYDR 118 FMQHIDVLENSLGFKFRIKENGECRELYLVAYKTPEDGEYFVEYDGGNTFTILKTDYDR 114 YVMFHLINFKNGETFQLMVLYGRTKDLSSDIKEKFAKLCEAHGITRDNIIDLTKTDRCLQARG 181 YVMFHLINFKNGETFQAMVLYGRTKDLSSDIKEKFAKLCEAHGITRDNIIDLTKTDRCLQARG 177

Devamı arkada



### Çizelge 3.5.'in devamı

SPOT 36	
GI:22219450 GI:204261	MKLLLLLLCLGLTLVCGHAEASSTRGNLDVAKLNGDWFSIVVASNKREKIEENGSMRV 59 LLLLCLGLTLVCGHAEASSTRGNLDVAKLNGDWFSIVVASNKREKIEENGSMRV 55 FMQHIDVLENSLGFKFRIKENGECRELYLVAYKTPEDGEYFVEYDGGNTFTILKTDYDR 118 FMQHIDVLENSLGFKFRIKENGECRELYLVAYKTPEDGEYFVEYDGGNTFTILKTDYDR 114 YVMFHNLINFKNGETFQLMVLYGRTKDLSSDIKEKFAKLCEAHGITRDNIIDLTKTDRCLQARG 181 YVMFHNLINFKNGETFQLMVLYGRTKDLSSDIKEKFAKLCEAHGITRDNIIDLTKTDRCLQARG 177
SPOT 37	
GI:22219450 GI:204261	MKLLLLLLCLGLTLVCGHAEASSTRGNLDVAKLNGDWFSIVVASNKREKIEENGSMRV 59 LLLLCLGLTLVCGHAEASSTRGNLDVAKLNGDWFSIVVASNKREKIEENGSMRV 55 FMQHIDVLENSLGFKFRIKENGECRELYLVAYKTPEDGEYFVEYDGGNTFTILKTDYDR 118 FMQHIDVLENSLGFKFRIKENGECRELYLVAYKTPEDGEYFVEYDGGNTFTILKTDYDR 115 YVMFHNLINFKNGETFQLMVLYGRTKDLSSDIKEKFAKLCEAHGITRDNIIDLTKTDRCLQARG 181 YVMFHNLINFKNGETFQLMVLYGRTKDLSSDIKEKFAKLCEAHGITRDNIIDLTKTDRCLQARG 177

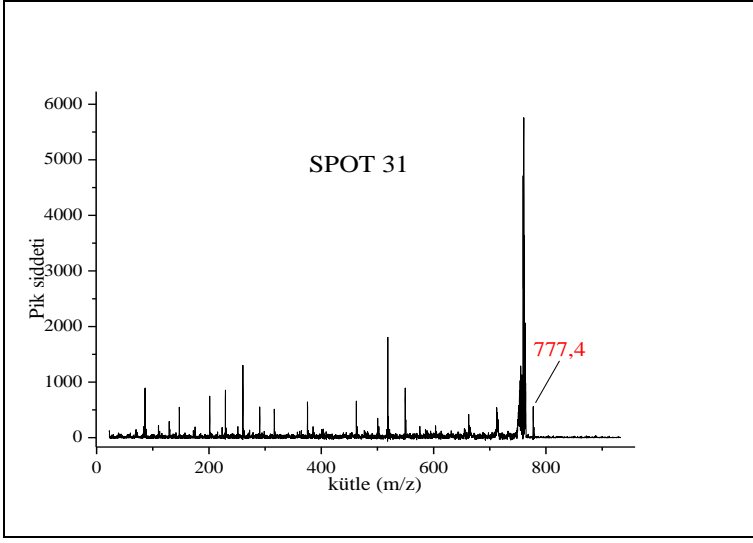
Karakterize edilen 29 spottan, 19 adeti  $\alpha$ 2u-globulin olarak belirlendi. NCBI veri tabanından elde edilen 15 adet teorik protein sekans dizisi spotların spektrumlarından eşleştirilen peptid kütleleri ile karşılaştırılmıştır. Çizelge 3.5.'de görüldüğü gibi  $\alpha$ 2u-globulin olarak tanımlanan spotların eşleştiği sekans dizilerinin NCBI veri tabanı giriş numaraları (GI) verildi. Her bir spot için yapılan tanımlamada, 19 adet spotun sekans dizisinde yer alan peptid kütleleri belirlendi. Belirlenen bu peptid kütleleri: 716, 760, 777, 863, 931, 998, 1006, 1026, 1056, 1527, 1876, 2139, 2395 ve 2807'dir.

Daha önceden de anlatıldığı gibi Çizelge 3.4.'ü oluşturabilmek için eleyici olarak belirlenen peptidler, 716: GNLDVAK; 760: GNLDVVK, 1026: LCVAHGTR; 1056: LCEAHGTR, 1876: VFMQHIDVLENSLGFK, 2120: VFMQHIDVLENSLGFTFR sayesinde bir spotun olabilecek tüm sekans dizi olasılıkları Çizelge 3.5.'te gösterildi. Bir sekans içinde eleyici peptidlerden ikisinin aynı anda bulunamayacağından, sekans dizisi elemeleri, bu eleyici peptidler bazında yapıldı. Burada 716 ile 760; 1026 ile 1056; 1876 ile 2120 peptidleri birbiri ile denk peptidler idi.

#### 3.2.31. MS-MS Sonuçları

PMF spektrumları çekilen spotların bazı pikleri için MS-MS sonuçları da elde edildi. Bunlardan bazı spotlar için seçilmiş MS-MS spektrumları aşağıda gösterildi. Spot 31 için, 777, 931, 1056 ve 2395; Spot 10 için, 931 ve 1026 peptid kütlelerinin MS-MS spektrum sonuçları gösterildi.

### 3.2.31.1. Spot 31: 777 peptidi



Şekil 3.68. Spot 31'in 777 peptidinin MS-MS spektrumu

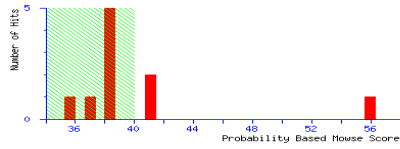
## Mascot Search Results

**User** : tyalcin  
**Email** : talatyalcin@iyte.edu.tr  
**Search title** :  
**MS data file** : DATA.TXT  
**Database** : SwissProt 51.6 (257964 sequences; 93947433 residues)  
**Timestamp** : 21 Jun 2013 at 13:00:36 GMT  
**Protein hits** : **MUP\_RAT** Major urinary protein precursor (MUP) (Alpha-2u-globulin) (Alpha(2)-euglobulin) (Allergen Rat n 1)  
**BUD9\_YEAST** Bud site selection protein 9 - Saccharomyces cerevisiae (Baker's yeast)  
**SYT\_CHLHU** Threonyl-tRNA synthetase (EC 6.1.1.3) (Threonine--tRNA ligase) (ThrRS) - Chlamydia muridarum  
**AG35\_VACCC** Envelope protein (Protein H5) - Vaccinia virus (strain Copenhagen) (VACV)  
**TRP37\_MOUSE** Tripartite motif-containing protein 37 - Mus musculus (Mouse)  
**YCF1\_AMBTC** Putative membrane protein ycf1 - Amborella trichopoda  
**RPOB\_CHLVU** DNA-directed RNA polymerase beta chain (EC 2.7.7.6) (PEP) (Plastid-encoded RNA polymerase subunit b)  
**RPOB\_DETRA** DNA-directed RNA polymerase beta chain (EC 2.7.7.6) (RNAP beta subunit) (Transcriptase beta chain)  
**COX2\_PARPR** Cytochrome c oxidase subunit 2 (EC 1.9.3.1) (Cytochrome c oxidase polypeptide II) - Paramecium prim  
**SSG2\_PEA** Granule-bound starch synthase 2, chloroplast precursor (EC 2.4.1.21) (Granule-bound starch synthase

	SwissProt	Decoy	False discovery rate
Peptide matches above identity threshold	1	1	100.00 %
Peptide matches above homology or identity threshold	1	1	100.00 %

### Probability Based Mowse Score

Ions score is  $-10 \cdot \log(P)$ , where P is the probability that the observed match is a random event. Individual ions scores  $> 40$  indicate identity or extensive homology ( $p < 0.05$ ). Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



## Mascot Search Results

### Protein View

Match to: **MUP\_RAT** Score: 56  
**Major urinary protein precursor (MUP) (Alpha-2u-globulin) (Alpha(2)-euglobulin) (Allergen Rat n 1) (Rat n I)**  
Found in search of DATA.TXT

Nominal mass ( $M_r$ ): 20723; Calculated pI value: 5.85  
NCBI BLAST search of **MUP\_RAT** against nr  
Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Taxonomy: [Rattus norvegicus](#)

Variable modifications: Carbamidomethyl (C)  
Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P  
Sequence Coverage: 3%

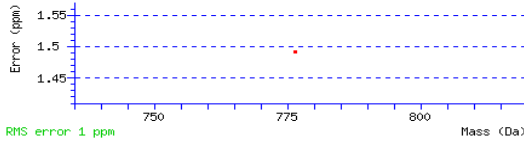
Matched peptides shown in **Bold Red**

1 MKLLLLLLCL GLTLVCGHAE EASSTRGNLD VARLNGDWFS IIVVSMKREK  
51 IEENGSHRVF HQHIDVLENS LGFKFRIKEN GECELYLVA YKTPEDGEYF  
101 VEYDGGNTFT ILKTDYDRYV HFHLINFKNG ETFQLMVLVG RTK**DLSSDIK**  
151 EKFAKLCEAH GITRDNIIID TKTDRLQAR G

Show predicted peptides also

Sort Peptides By  Residue Number  Increasing Mass  Decreasing Mass

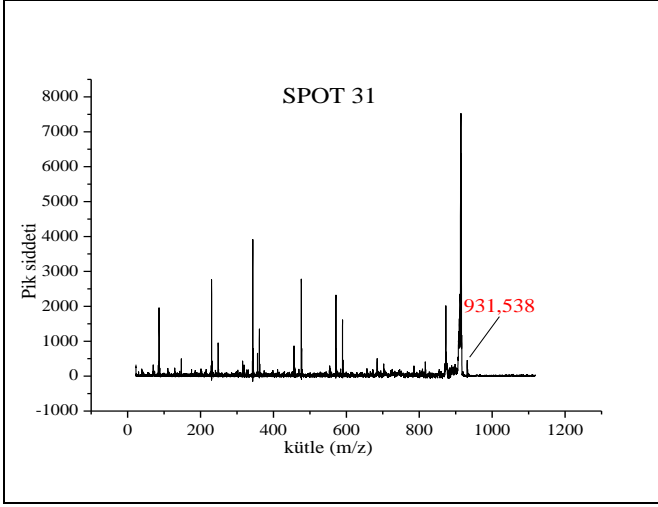
Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	Miss	Sequence
144 - 150	777.4000	776.3927	776.3916	1	0	K.DLSSDIK.E (Ions score 56)



Şekil 3.69. Spot 31'in 777 peptidinin MS-MS MASCOT tarama sonucu

Şekil 3.69'da görüldüğü gibi MS-MS Mascot tarama sonuçlarına göre en yüksek skorlu olarak görülen protein MUP\_RAT oldu. 777 peptidinin iyonlaşma skoru 56 olarak verildi. Sıralamada olan diğer proteinlerin ise sıçana ait proteinlerin olmadığı görüldü.

### 3.2.31.2. Spot 31: 931 peptidi



Şekil 3.70. Spot 31'in 931 peptidinin MS-MS spektrumu



**MASCOT Search Results**

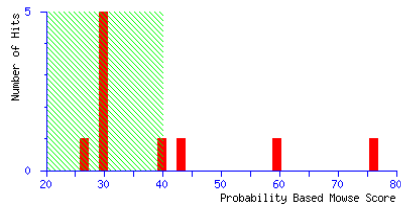
**User** : tyalcin  
**Email** : talatyalcin@iyte.edu.tr  
**Search title** :  
**MS data file** : DATA.TXT  
**Database** : SwissProt 51.6 (257964 sequences; 93947433 residues)  
**Timestamp** : 19 Jun 2013 at 13:32:31 GMT  
**Protein hits** :
 

- [MUP\\_RAT](#) Major urinary protein precursor (MUP) (Alpha-2u-globulin) (Alpha(2)-euglobulin) (Allergen Rat n 1)
- [RHH2\\_SULTO](#) Ribonuclease HII (EC 3.1.26.4) (RNase HII) - Sulfolobus tokodaii
- [UBP26\\_MOUSE](#) Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 26 (EC 3.1.2.15) (Ubiquitin thioesterase 26) (Ubiquitin-speci:
- [PI3K2\\_DICDI](#) Phosphatidylinositol 3-kinase 2 (EC 2.7.1.137) (PI3-kinase) (PtdIns-3-kinase) (PI3K) - Dictyostelium
- [TYSY\\_BPT4](#) Thymidylate synthase (EC 2.1.1.45) (TS) (TSase) - Bacteriophage T4
- [ZH294\\_HUMAN](#) Zinc finger protein 294 (RING finger protein 160) - Homo sapiens (Human)
- [QUEF\\_COLP3](#) NADPH-dependent 7-cyano-7-deazaguanine reductase (EC 1.7.1.-) (NADPH-dependent nitrile oxidoreducta:
- [YMI3\\_CAEEL](#) Uncharacterized protein F59A2.3, mitochondrial precursor - Caenorhabditis elegans
- [EX7L\\_SILST](#) Exodeoxyribonuclease 7 large subunit (EC 3.1.11.6) (Exodeoxyribonuclease VII large subunit) (Exonuc
- [YL684\\_MIMIV](#) Uncharacterized protein L684 - Mimivirus

	SwissProt	Decoy	False discovery rate
Peptide matches above identity threshold	1	1	100.00 %
Peptide matches above homology or identity threshold	1	1	100.00 %

**Probability Based Mowse Score**

Ions score is  $-10 \cdot \log(P)$ , where P is the probability that the observed match is a random event.  
 Individual ions scores > 40 indicate identity or extensive homology (p<0.05).  
 Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



**MASCOT Search Results**

**Protein View**

**Match to:** [MUP\\_RAT](#) Score: 76  
**Major urinary protein precursor (MUP) (Alpha-2u-globulin) (Alpha(2)-euglobulin) (Allergen Rat n 1) (Rat n I)**  
 Found in search of DATA.TXT

Nominal mass ( $M_r$ ): 20723; Calculated pI value: 5.85  
 NCBI BLAST search of [MUP\\_RAT](#) against nr  
 Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Taxonomy: [Rattus norvegicus](#)

Variable modifications: Carbamidomethyl (C)  
 Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P  
 Sequence Coverage: 4%

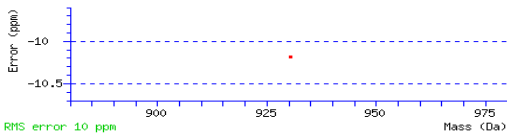
Matched peptides shown in **Bold Red**

**1** MKLLLLLLCL GLTLVCGHAE EASSTRGNLD VAKLNGDWFS IIVVSNKREK  
**51** IEENGSHRVF HQHIDVLENS LGFREFRIKEN GECRELYLVA YKTPEDGEYF  
**101** VEYDGGNTFT ILKTDYDRYV MFHLINFKNG ETFLQMLVLYG RTKDLSSDIK  
**151** EKFAKLCEAH GITR**DNIIDL** **TK**TRDRLQAR G

Show predicted peptides also

Sort Peptides By  Residue Number  Increasing Mass  Decreasing Mass

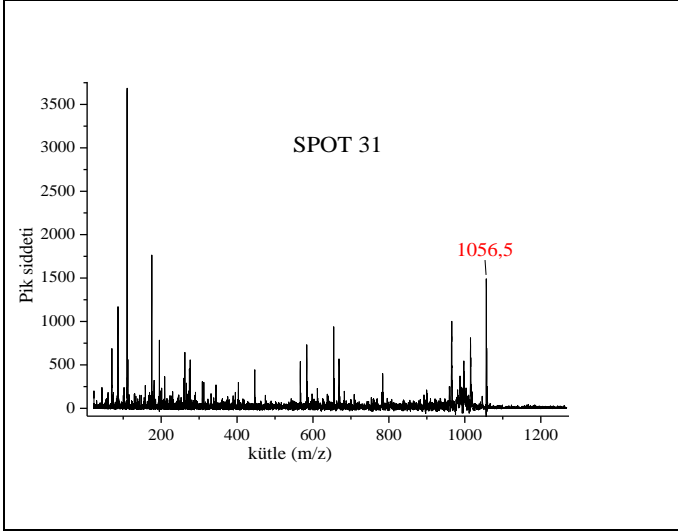
Start	End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	Miss Sequence
165	172	931.5000	930.4927	930.5022	-10	0 R.DNIIDLTK.T (Ions score 76)



Şekil 3.71. Spot 31'in 931 peptidinin MS-MS MASCOT tarama sonucu

Şekil 3.71’de görüldüğü gibi MS-MS Mascot tarama sonuçlarına göre en skorlu olarak görülen protein MUP\_RAT oldu. 931 peptidinin iyonlaşma skoru 76 çıktı. Sıralamada olan diğer proteinlerin ise sıçana ait proteinlerin olmadığı görüldü.

### 3.2.31.3. Spot 31: 1056 peptidi



Şekil 3.72. Spot 31’in 1056 peptidinin MS-MS spektrumu

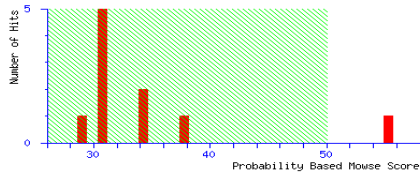
**Mascot Search Results**

**User** : tyalcin  
**Email** : talatyalcin@iyte.edu.tr  
**Search title** :  
**MS data file** : DATA.TXT  
**Database** : NCBI nr 20070216 (4626804 sequences; 1596079197 residues)  
**Timestamp** : 19 Jun 2013 at 13:54:27 GMT  
**Protein hits** : [gi|202610](#) alpha-2u-globulin  
[gi|32487401](#) OSJNBb0017I01.15 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]  
[gi|25143651](#) alpha-Catulin (catenin/vinculin related) family member (ctn-1) [Caenorhabditis elegans]  
[gi|115375794](#) O-demethylpuromycin-O-methyltransferase [Stigmatella aurantiaca DW4/3-1]  
[gi|113867969](#) uncharacterized conserved protein, putative adenylylsulphate kinase [Ralstonia eutropha H16]  
[gi|71020855](#) hypothetical protein UMO4511.1 [Ustilago maydis 521]  
[gi|115374758](#) conserved hypothetical protein [Stigmatella aurantiaca DW4/3-1]  
[gi|30955258](#) hypothetical protein Lxx16660 [Leifsonia xyli subsp. xyli str. CTCB07]  
[gi|118731887](#) transcriptional regulator, AraC family [Delftia acidovorans SPH-1]  
[gi|84363054](#) COG0412: Dienelactone hydrolase and related enzymes [Burkholderia dolosa AU0158]

	NCBI nr	Decoy	False discovery rate
Peptide matches above identity threshold	1	0	0.00 %
Peptide matches above homology or identity threshold	1	0	0.00 %

**Probability Based Mowse Score**

Ions score is  $-10 \cdot \log(P)$ , where P is the probability that the observed match is a random event.  
 Individual ions scores > 50 indicate identity or extensive homology ( $p < 0.05$ ).  
 Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



**Mascot Search Results**

**Protein View**

Match to: [gi|202610](#) Score: 55  
**alpha-2u-globulin**  
 Found in search of DATA.TXT

Nominal mass ( $M_r$ ): 20707; Calculated pI value: 5.41  
 NCBI BLAST search of [gi|202610](#) against nr  
 Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Variable modifications: Carbamidomethyl (C)  
 Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P  
 Sequence Coverage: 4%

Matched peptides shown in **Bold Red**

```

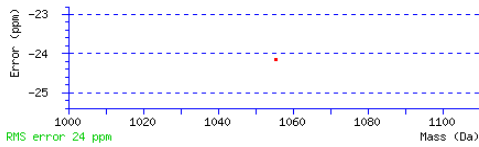
1 MKLLLLLLCL GLTLVCGHAE EASSTRGNLD VDKLNGDWFS IIVVSDKREK
51 IEENGSMRVF MQHIDVLENS LGFKFRIKEN GECRELYLVA YKTPEDGEYF
101 VEYDGGNTFT ILKTDYDRYV MFHLINFKNG ETFQAMVLYG RTRDLSSDIK
151 ERFAKLCEAH GITRDNIIDL TRKTDHCLQAR G
    
```

Show predicted peptides also

Sort Peptides By

Residue Number
  Increasing Mass
  Decreasing Mass

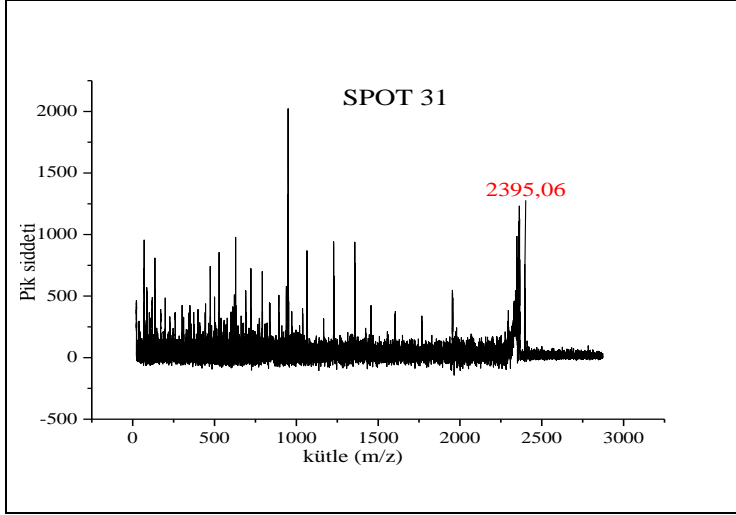
Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	Miss Sequence
156 - 164	1056.5000	1055.4927	1055.5182	-24	0 K.LCEAHGITR.D Carbamidomethyl (C) ( <a href="#">Ions score 55</a> )



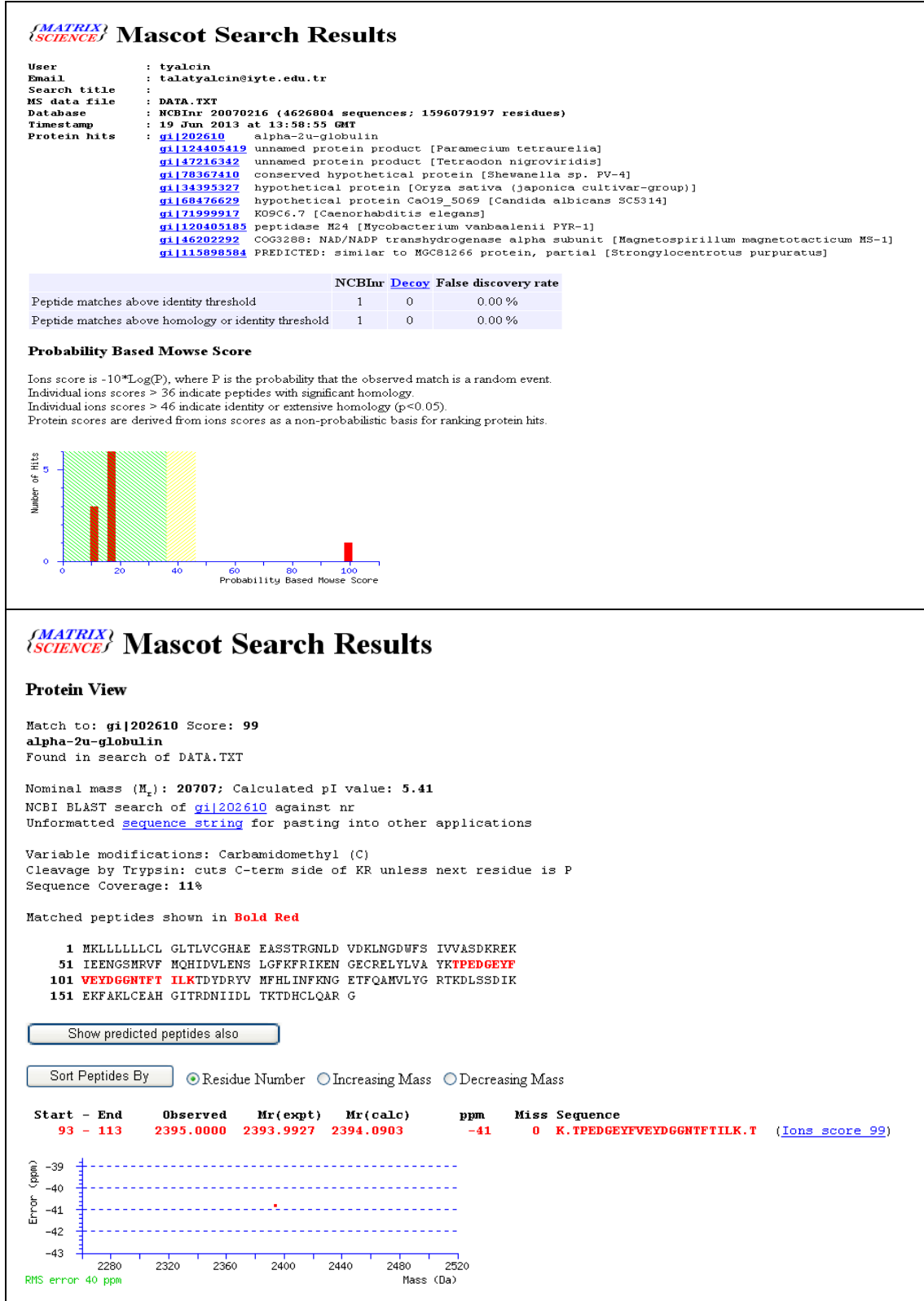
Şekil 3.73. Spot 31'in 1056 peptidinin MS-MS MASCOT tarama sonucu

Şekil 3.73’de görüldüğü gibi MS-MS Mascot tarama sonuçlarına göre en skorlu olarak görülen, NCBI veri tabanına göre GI: 202610 giriş numaralı  $\alpha$ 2u-globulin proteini idi. 1056 peptidinin iyonlaşma skoru 55 olduğu Şekil 3.73’de görüldüğü gibidir. Sıralamada olan diğer proteinlerin ise sıçana ait proteinlerin olmadığı görüldü.

#### 3.2.31.4. Spot 31: 2395 peptidi



Şekil 3.74. Spot 31’in 2395 peptidinin MS-MS spektrumu

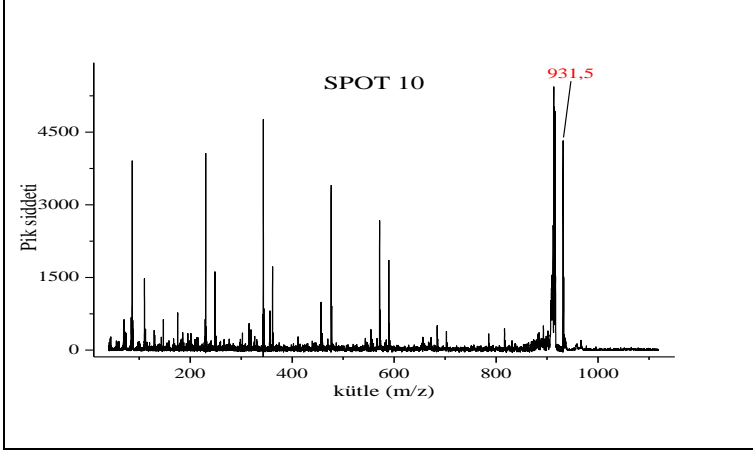


Şekil 3.75. Spot 31'in 2395 peptidinin MS-MS MASCOT tarama sonucu

Şekil 3.75'de görüldüğü gibi MS-MS Mascot tarama sonuçlarına göre en skorlu olarak görülen, NCBI veri tabanına göre GI: 202610 giriş numaralı  $\alpha$ 2u-globulin

proteini idi. 2395 peptidi 99 olan oldukça iyi iyonlaşma skoru verdi. Sıralamada olan diğer proteinlerin ise sıçana ait proteinlerin olmadığı görüldü.

### 3.2.31.5. Spot 10: 931 peptidi



Şekil 3.76. Spot 10'un 931 peptidinin MS-MS spektrumu

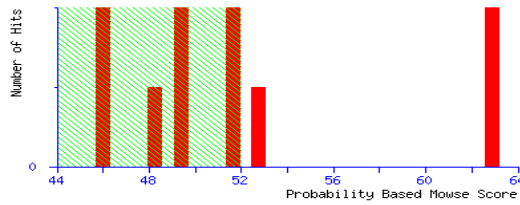
**MASCOT**  
**SCIENCE** Mascot Search Results

User : tyalcin  
 Email : talatyalcin@iyte.edu.tr  
 Search title :  
 MS data file : DATA.TXT  
 Database : NCBI nr 20070216 (4626804 sequences; 1596079197 residues)  
 Timestamp : 19 Jun 2013 at 14:06:58 GMT  
 Protein hits : [gi|202610](#) alpha-2u-globulin  
[gi|24373580](#) hypothetical thioredoxin-like protein [Shewanella oneidensis MR-1]  
[gi|30284863](#) hypothetical protein CAGLOA02189g [Candida glabrata CBS138]  
[gi|118349738](#) hypothetical protein THERM\_00008670 [Tetrahymena thermophila SB210]  
[gi|124406405](#) unnamed protein product [Paramecium tetraurelia]  
[gi|15920736](#) hypothetical ribonuclease HII [Sulfolobus tokodaii str. 7]  
[gi|66391263](#) ORF008 [Staphylococcus phage Twort]  
[gi|114769247](#) TPR repeat [alpha proteobacterium HTCC2255]  
[gi|124427473](#) unnamed protein product [Paramecium tetraurelia]  
[gi|28212032](#) spore germination protein B3/KC [Clostridium tetani E88]

	NCBI nr	Decoy	False discovery rate
Peptide matches above identity threshold	1	1	100.00 %
Peptide matches above homology or identity threshold	1	1	100.00 %

**Probability Based Mowse Score**

Ions score is  $-10 \cdot \log(P)$ , where P is the probability that the observed match is a random event. Individual ions scores  $> 52$  indicate identity or extensive homology ( $p < 0.05$ ). Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



**MASCOT**  
**SCIENCE** Mascot Search Results

**Protein View**

Match to: [gi|202610](#) Score: 63  
**alpha-2u-globulin**  
 Found in search of DATA.TXT

Nominal mass ( $M_r$ ): 20707; Calculated pI value: 5.41  
 NCBI BLAST search of [gi|202610](#) against nr  
 Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Variable modifications: Carbamidomethyl (C)  
 Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P  
 Sequence Coverage: 4%

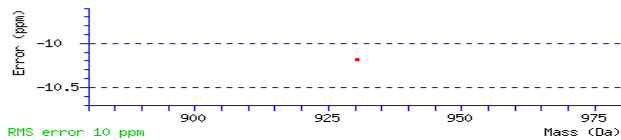
Matched peptides shown in **Bold Red**

1 MKLLLLLLCL GLTLVCGHAE EASSTRGNLD VDKLNGDWFS IIVASDKREK  
 51 IEENGSMRVF MQHIDVLENS LGFKFRIKEN GECRELYLVA YKTPEDGEYF  
 101 VEYDGGNTFT ILKTDYDRYV MFHLINFKNG ETFQAMVLYG RTKDLSSDIK  
 151 EKFAKLCEAH GITR**DNIIDL** **TKTDHCLQAR** G

Show predicted peptides also

Sort Peptides By  Residue Number  Increasing Mass  Decreasing Mass

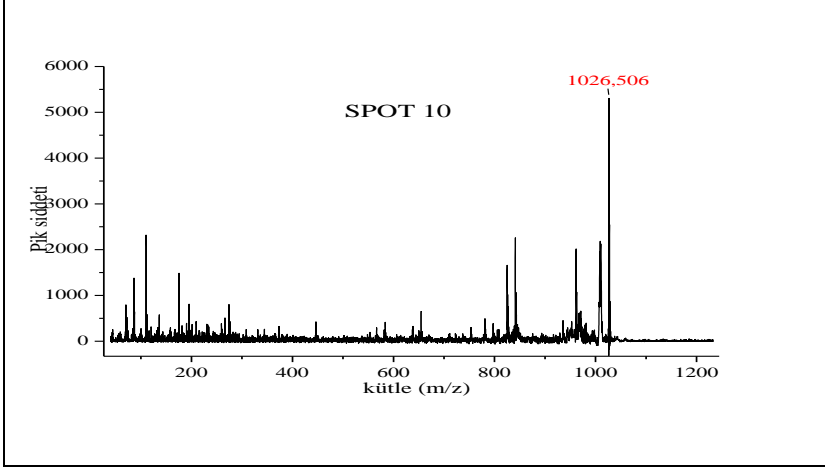
Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	Miss Sequence
165 - 172	931.5000	930.4927	930.5022	-10	0 R.DNIIDLTK.T (Ions score 63)



Şekil 3.77. Spot 10'un 931 peptidinin MS-MS MASCOT tarama sonucu

Şekil 3.77’de görüldüğü gibi MS-MS Mascot tarama sonuçlarına göre en skorlu olarak görülen, NCBI veri tabanına göre GI: 202610 giriş numaralı  $\alpha$ 2u-globulin proteini idi. 931 peptidi 63’lük iyonlaşma skoru verdi. Sıralamada olan diğer proteinlerin ise sıçana ait proteinlerin olmadığı görüldü.

### 3.2.31.6. Spot 10: 1026 peptidi



Şekil 3.78. Spot 10’un 1026 peptidinin MS-MS spektrumu



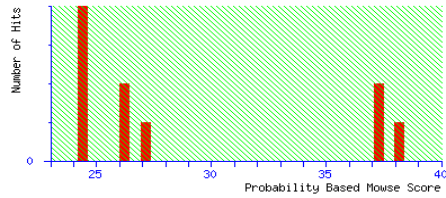
## {MATRIX} Mascot Search Results

User : tyalcin  
Email : talatyalcin@iyte.edu.tr  
Search title :  
MS data file : DATA.TXT  
Database : NCBI nr 20070216 (4626804 sequences; 1596079197 residues)  
Timestamp : 19 Jun 2013 at 14:12:58 GMT  
Protein hits : [gi|1196815](#) alpha-2u globulin  
[gi|116055101](#) Spliceosomal protein FBP11/Splicing factor PRP40 (ISS) [Ostreococcus tauri]  
[gi|116754048](#) protein of unknown function Met10 [Methanoseta thermophila PT]  
[gi|115487106](#) Os12g0124400 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]  
[gi|108802972](#) 4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol synthase [Rubrobacter xylanophilus DSM 9941]  
[gi|78045244](#) Dot&TraY family membrane protein [Xanthomonas campestris pv. vesicatoria str. 85-10]  
[gi|15596221](#) hypothetical protein PA1024 [Pseudomonas aeruginosa PAO1]  
[gi|88854977](#) putative peptide transport system ATP-binding protein [marine actinobacterium PHSC20C1]  
[gi|73538767](#) Peptidoglycan-binding LysM [Ralstonia eutropha JMP134]  
[gi|115397243](#) predicted protein [Aspergillus terreus NIH2624]

	NCBI nr	Decoy	False discovery rate
Peptide matches above identity threshold	0	0	
Peptide matches above homology or identity threshold	0	0	

### Probability Based Mowse Score

Ions score is  $-10 \cdot \log(P)$ , where P is the probability that the observed match is a random event.  
Individual ions scores  $> 50$  indicate identity or extensive homology ( $p < 0.05$ ).  
Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



## {MATRIX} Mascot Search Results

### Protein View

Match to: **MUP\_RATRT** Score: 38  
Major urinary protein (MUP) (Alpha-2u-globulin) (Alpha(2)-euglobulin) (Fragments) - Rattus rattus (Black rat)  
Found in search of DATA.TXT

Nominal mass ( $M_r$ ): 3426; Calculated pI value: 6.75  
NCBI BLAST search of **MUP\_RATRT** against nr  
Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Taxonomy: [Rattus rattus](#)

Variable modifications: Carbamidomethyl (C)  
Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P  
Sequence Coverage: 30%

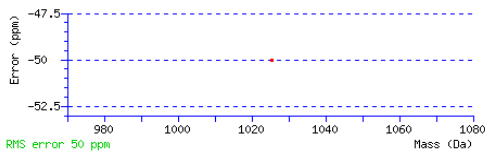
Matched peptides shown in **Bold Red**

1 **LCVANGITRE** KIEENGSMRE NIIDVTKTNR

Show predicted peptides also

Sort Peptides By  Residue Number  Increasing Mass  Decreasing Mass

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	Miss Sequence
1 - 9	<b>1026.5000</b>	<b>1025.4927</b>	<b>1025.5440</b>	-50	0 --LCVANGITR.E Carbamidomethyl (C) ( <a href="#">Ions score 38</a> )



Şekil 3.79. Spot 10'un 1026 peptidinin MS-MS MASCOT tarama sonucu

Şekil 3.79'da görüldüğü gibi MS-MS Mascot tarama sonuçlarına göre en skorlu olarak görülen, NCBI veri tabanına göre GI: 1196815 giriş numaralı  $\alpha$ 2u-globulin

proteini idi. 1026 peptidi 36'lık iyonlaşma skoru verdi. Sıralamada olan diğer proteinlerin ise sıçana ait proteinlerin olmadığı görüldü.

#### 4. SONUÇ

Canlıların çoğunda metabolizma atıkları vücuttan atılmaktadır. Bunun için kullanılan bir yol idrar çıkarmaktır. İdrarın incelenmesi ile canlının sağlık durumu hakkında birçok bilgi edinilmektedir. İdrar içerisinde farklı organizmalar için farklı olmak üzere birçok protein bulunmaktadır. İdrar proteomunun incelenmesiyle de idrarda doğal olarak bulunan proteinlerin türleri ve yapıları öğrenilebilmektedir. İdrar proteomundaki herhangi bir farklılık ise organizmanın sağlık durumu hakkında bilgi vermektedir. İdrarda bulunan proteinlerin çoğu düşük molekül ağırlıklı proteinlerdir.

Yapılan bu çalışmada sıçan idrar proteinleri proteomik yöntemleri ile incelendi. İki boyutlu jel elektroforezi yöntemiyle birbirlerinden ayrılan proteinlerden yaklaşık 10-30 kDa arasındaki kütleyle sahip olan düşük molekül ağırlıklı proteinler kütle spektrometrisi yöntemiyle incelendi. İdrarda bulunan proteinlerden miktarca en fazla bulunan protein  $\alpha$ 2u-globulindir. Bu proteinin tek bir formda değil de çok sayıda izoformda bulunduğu bilinmektedir. Bu izoformların yapıları hakkında literatürde ayrıntılı bilgi bulunmaması nedeniyle bu çalışmada  $\alpha$ 2u-globulin izoform yapıları da incelenmeye çalışıldı.

Wistar tipi erkek sıçan idrarının düşük molekül ağırlıklı proteinlerinden CBB boyamalı 2D jellerde görüntülenebilen 29 adet spot MALDI-TOF-MS ve MALDI-TOF-MS/MS ile incelendi. Bu spotların 19'u  $\alpha$ 2u-globulin olarak tanımlanırken, diğer 10 spot farklı proteinler olarak tanımlandı. İncelenen 19 spotun 2D jelinin üzerinde farklı konumlarda bulunmaları nedeniyle bu spotlarda odaklanan proteinlerin pI ve/veya kütle açısından farklılık göstermesi gerekmektedir. Bu farklılıklar nedeniyle farklı spotlarda farklı izoformların bulunması gerektiği aşikardır. Bu çalışmada  $\alpha$ 2u-globulin izoformları arasındaki farklılıklar tespit edilmeye çalışıldı.

$\alpha$ 2u-globulin proteininin yanında diğer spotlar Malate dehydrogenase, mitochondrial (Spot 18), Succinate dehydrogenase assembly factor 1, mitochondrial (Spot 20), Protein FAM107B, Regulator of G-protein 19 (Spot 23), Interleukin 18 (Spot 38), Similar to RIKEN cDNA 1500031L02 (Spot 59), DNA damage-inducible transcript 4\_like protein (Spot 60), Putative tctex 1 /2 family protein (Spot 70), Insulin\_like growth factor 1 (Spot 74), Stathmin (Spot 75) ve Ribonuclease H1 (Spot 76) olarak tanımlandı.

Proteinlerden elde edilen peptid kütle parmak izi verilerine dayanarak Mascot arama sonuçlarından tanımlama için kullanılan dizi uyumu değerleri bir çok protein için iyi bir yüzde vermesine rağmen bazı proteinler için kesin tanımlamada gerekli yüzdenin altında değerler verdi. Bu durumda bu spotlar için elde edilen protein tanımının sadece aday olduğu söylendi.

$\alpha$ 2u-globulin olarak tanımlanan spotlar içerisinde bu proteinin hangi izoformunda bulunduğu PMF spektrumları ile aydınlatılmaya çalışıldı. Elde edilen spektrumlarda bu proteine ait öne çıkan belli başlı peptid kütleleri neredeyse tüm spektrumlarda görüldü. Bunlar 777, 931, 998 ve 1056 kütleleri idi. Bu kütlelere ait peptidler için izoformlarda ortakdır denildi. Ayırd edici peptidlerin bulunması ile izoformlar arasındaki farklılıklar bulunabilmektedir. Spektrumların ayrıntılı incelenmesi

sonucunda bazı ayırd edici peptid kütlelerine rastlandı. Bu peptidler bir veya iki aminoasit farklılıkları içermektedirler. Bu kütleler ve onlara ait sekanslar şöyle idi, 716 peptidi GNLDVAK, 760 peptidi GNLDVDK; 1026 peptidi LCVAHGITR, 1056 peptidi LCEAHGITR; 1876 peptidi VFMQHIDVLENSLGFK, 2120 peptidi VFVQHIDVLENSLGFTFR sekanslarına ait kütlelerdir. Ayırd edici peptid piklerin birine veya ikisine sahip olan spektrumlar için teorik izoform sekansları arasından eleme yapılarak bir spot içerisinde bulunan  $\alpha$ 2u-globulin proteinin hangi izoform sekansında bulunabileceği hakkında yorumlar yapılmaya çalışıldı. Ondört spot (Spot 1, Spot 6, Spot 7, Spot 11, Spot 12, Spot 24, Spot 25, Spot 28, Spot 29, Spot 30, Spot 34, Spot 35, Spot 36, Spot 37) için izoform olasılığı ikiye indirilebildi. Spot 6, Spot 7, Spot 11, Spot 12'de giriş numaraları GI: 77695923 ve GI: 1196815 olan iki izoformun sekansı arasında sadece son iki aminoasitte farklılık vardır. Diğer spotlarda ayırd edici peptid piklerin azlığı nedeniyle izoform olasılığı iki spot (Spot 26, Spot 33) için üçe , üç spot (Spot 4, Spot 16, Spot 19) için en fazla 5'e indirilebildi.

Yukarıda anılan ayırd edici peptidler veya daha farklı ayırd edici özellikteki peptidler için MS/MS spektrumları çekilemediğinden izoform sekansları arasındaki eleme sadece PMF spektrumlarından elde edilen sonuçlara dayandırıldı. Bu çalışma da sadece aminoasit farklılıkları tespit edilebildi. Proteinler üzerinde bulunabilen posttranslasyonel modifikasyonlar hakkında, elde edilen spektrumlara dayanarak bir yorum yapılamadı.

## 5. KAYNAKLAR

- AJITH, T.A., SUDHEESH, N.P., ROSHNY, D., ABISHEK, G. and JANARDHANAN, K.K. 2009. Effect of *Ganoderma lucidum* on the activities of mitochondrial dehydrogenases and complex I and II of electron transport chain in the brain of aged rats. *Exp. Gerontol.*, 44: 219–223.
- ALDREDGE, D., An, H.J., TANG, N., WADDELL, K. and LEBRILLA, C.B. 2012. Annotation of a serum N-glycan library for rapid identification of structures. *J. Proteome Res.*, 11: 1958–1968.
- ANDERSON, J., H. and GARFINKEL, D. 1971. Calculated intracellular distributions of dicarboxylic acids in rat liver. *Comput. Biomed. Res.*, 4 (1): 43-64.
- ASI, T. 1999. Tablolarla Biyokimya Cilt II. Ankara Üniv. Ankara.
- BAŞARAN, E., ARAS, S. ve CANSARAN-DUMAN, D. 2010. Genomik, proteomik, metabolomik kavramlarına genel bakış ve uygulama alanları. *Türk. Hij. Den. Biyol. Derg.*, 67 (2): 85-96.
- BAYARD, C., HOLMQUIST, L. and VESTERBERG, O. 1996. Purification and identification of allargenic  $\alpha$ -2u-globulin species of rat urine. *Biochim. Biophys. Acta*, 1290: 129-134.
- BERETTA, L., BOUTTERIN, M.C. and SOBEL, A. 1988. Phosphorylation of intracellular proteins related to the multihormonal regulation of prolactin: comparison of normal anterior pituitary cells in culture with the tumor-derived GH cell lines. *Endocrinology*, 122: 40-51.
- BERETTA, L., HOUDOUIN, F. and SOBEL, A. 1989. Identification of two distinct isoforms of stathmin and characterization of their respective phosphorylated forms. *J. Biol. Chem.*, 264: 9932-9938.
- BINGHAM, R.W. and CAMPBELL, P.N. 1972. Studies on the Biosynthesis of Mitochondrial Malate Dehydrogenase and the Location of its Synthesis in the Liver Cell of the Rat. *Biochem. J.*, 126: 211-215.
- BROCKER, C., THOMPSON, D., MATSUMOTO, A., NEBERT, D.W. and VASILIOU, V. 2010. Evolutionary divergence and functions of the human interleukin gene family. *Hum. Genom.*, 5 (1): 30–55.
- BEYNON, R.J. and HURST, J.L. 2004. Urinary proteins and the modulation of chemical scents in mice and rats. *Peptides*, 25: 1553–1563.
- BOCSKEI, Z., GROOM, C.R., FLOWER, D.R., WRIGHT, C.E., PHILLIPS, S.E.V., CAVAGGIONI, A., FINDLAY, J.B.C. and NORTH, A.C.T. 1992. Pheromone binding to two rodent urinary proteins revealed by X-ray crystallography. *Nature*, 360: 186-188.

- CAVAGGIONI, A. and MUCIGNAT-CARETTA, C. 2000. Major urinary proteins,  $\alpha$ 2u-globulin and aphrodisin. *Biochim. Biophys. Acta*, 1482 (1-2): 218-228.
- CHNEIWEISS, H., CORDIER, J. and SOBEL, A. 1992. Stathmin phosphorylation is regulated in striatal neurons by vasoactive intestinal peptide and monoamines via multiple intracellular pathways. *J. Neurochem.*, 58: 282-289.
- CIRRI, P., CASELLI, A., MANAO, G., CAMICI, G., POLIDORI, R., CAPPUGI, G. and RAMPONI, G. 1994. Kinetic studies on rat liver low M, phosphotyrosine protein phosphatases. The activation mechanism of the isoenzyme AcP2 by cGMP. *Biochim. Biophys. Acta*, 1243: 129-135.
- ÇELEBİ, G. 2000. Biyofizik. Fakülteler Kitapevi. 2.Baskı. İzmir. 64-67.
- DAVED, E.G. 2003. Gel electrophoresis of proteins. In: DAVEY, J. and LORD, M. *Essential cell biology*, 1: 197-268.
- DAYANGAÇ, D. ve YURTER, H.E. 2005. RNA “splicing” hataları sonucu ortaya çıkan kalıtsal hastalıklar. *Hacettepe Tıp Dergisi*. 36: 9-12.
- DOYE, V., BOUTTERIN, M.C. and SOBEL, A. 1990. Phosphorylation of stathmin and other proteins related to nerve growth factor-induced regulation of PC12 cells. *J. Biol. Chem.*, 265: 11650-11655.
- EKER, İ. 2010. Wistar sıçan idrarında alfa2u-globulin protein ailesinin izoformlarının incelenmesi. Yüksek lisans tezi. Akdeniz üniversitesi. 78 sayfa.
- EKİCİ, K. ve ALIŞARLI, M. 2003. Poliakrilamid jel izoelektrik fokuslama tekniğinin (PAGIF) et türlerinin ayırımında kullanılması. YYÜ, *Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 14 (2): 102-106.
- FADYEN, M. and ANSON, D. 1997. Molecular and cytogenetic analysis of the rat alpha-2u-globulin locus. ProQuest Dissertations and Theses. 202 pp.
- FOX, E.J., STUBBS, S.A., KYAW TUN, J., LEEK, J.P., MARKHAM, A.F. and WRIGHT, S.C. 2004. PRELI (protein of relevant evolutionary and lymphoid interest) is located within an evolutionarily conserved gene cluster on chromosome 5q34–q35 and encodes a novel mitochondrial protein. *Biochem. Soc.*, 378: 817-825.
- GHEZZI, D., GOFFRINI, P., UZIEL, G., HORVATH, R., KLOPSTOCK, T., LOCHMULLER, H., D’ADAMO, P., GASPARINI, P., STROM, T.M., PROKISCH, H. et al. 2009. SDHAF1, Encoding A LYR Complex-II Specific Assembly Factor, Is Mutated In SDH-Defective Infantile Leukoencephalopathy. *Nat. Genet.*, 41: 654-656.
- GUO, Y., FU, Z. and VAN EYK J. 2007. A proteomic primer for the clinician. *Proc. Am. Thorac. Soc.*, 4: 9-17.

- GRABSKI, A. and BURGESS R. Preparation of protein samples for SDS-polyacrylamide gel electrophoresis: procedures and tips. Novagen, Inc. and McArdle Laboratory for Cancer Research, University of Wisconsin–Madison, Madison, WI 53706, pp. 10-13.
- GUBITS, R.M., LYNCH, K.R., KULKAMI, A.B., DOLAN, K.P., GRESIK, E.W., HOLLANDER, P. and FEIGELSON, P. 1984. Differential regulation of  $\alpha 2$  globulin gene expression in liver, lachrymal gland, and salivary gland. *J. Biol. Chem.*, 259: 12803-12809.
- GUILLAUME, E., EVRARD, B., COM, E., MOERTZ, E., JEGOU, B. and PINEAU, C. 2001. Proteome Analysis of Rat Spermatogonia: Reinvestigation of Stathmin Spatio Temporal Expression Within the Testis. *Mol. Reprod. Dev.*, 60: 439-445.
- GÜNER, Z. 1979. Fizik 1. Ankara Üniversitesi Basımevi, 2. Baskı, 271-274. Ankara.
- GÜRBÜZ, Ü. 2006. Sığır plazmasındaki K vitaminine bağımlı proteinlerin iki boyutlu elektroforezle ayrılması. Marmara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans tezi, İstanbul.
- HANASH, S., CELIS, J.E. 2002. The Human Proteome Organization: a mission to advance proteome knowledge. *Mol. Cell Proteomics*, 1: 413–414.
- HOFFMAN, K. und BLUCTEL, E. 1986. Bestimmung der Tierart von rohem Muskelfleisch anhand der Myoglobinnmuster im pH Gradienten Gel. *Fleischwirtschaft*, 66 (5): 916-921.
- HUPO - The Human Proteome Organization. 2010. A gene-centric human proteome project. *Mol. Cell Proteomics*, 9: 427–429.
- JAMES, P. 1997. Protein identification in the postgenome era: the rapid rise of proteomics. *Q. Rev. Biol.*, 30 (4): 279-331.
- JI, Y.R. et al. 2010. Effects of regulator of G protein signaling 19 (RGS19) on heart development and function. *J. Biol. Chem.*, 285 (37): 28627-28634.
- JUNGBLUT, P.R., HOLZHÜTTER, H.G., APWEILER, R. and SCHLÜTER, H. 2008. The speciation of the proteome. *Chem. Cent. J.*, 2: 16.
- JUNGBLUT, P., THIEDE, B., ZIMNY-ARNDT, U., MÜLLER, E.C., SCHELER, C., WITTMANN-LIEBOLD, B. and OTTO, A. 1996. Resolution power of two-dimensional electrophoresis and identification of proteins from gels. *Electrophoresis*, 17 (5): 839-847.
- KAYA, A. 2002. Elektroforez Yöntemleri, *Dicle Tıp Dergisi Journal of Medical School* 29: 3.

- KELLER, B., VOLKMANN, A., WILCKENS, T., MOELLER, G. and ADAMSKI, J. 2006. Bioinformatic identification and characterization of new members of short-chain dehydrogenase/reductase superfamily. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 248: 56–60.
- KING, S.M., BARBARESE, E., DILLMAN, J.F.III, BENASHKI, S.E., DO, K.T., PATEL-KING, R.S. and PFISTER, K.K. 1998. Cytoplasmic dynein contains a family of differentially expressed light chains. *Biochemistry*, 37: 15033–15041.
- KINTER, M. and SHERMAN, N.E. 2000. Protein sequencing and identification using tandem mass spectrometry. In: D., M. Desiderio and N., M., M. Nibbering, 301 p.
- KLOSE, J. 1975. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of Mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik*, 26 (3): 231-243.
- KLOSE, J. and KOBALZ, U. 1995. Two-dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome. *Electrophoresis*, 1: 1034-1059.
- KOCAGÖZ, T. 2009. Genomik ve proteomik in infeksiyon hastalıklarındaki yeri ve önemi. *Ankem Dergisi*, 23: 48-52.
- KURBAN, S. ve MEHMETOĞLU, İ. 2010. Proteomik. *Yeni Tıp Dergisi*, 27: 70-75.
- KUSKA, B. 1998. Beer, Bethesda, and biology: How “genomics” came into being. *J. Natl. Cancer. Inst.*, 90 (2): 93.
- LAPERCE, Y., LYNCH, K.R., DOLAN, K.P., and FEIGELSON, P. 1983. Tissue specific control of  $\alpha_2u$  globulin gene expressions: Constitutive synthesis in the submaxillary gland. *Cell*, 32: 453-460.
- LEGRAIN, P. et al. 2011. The Human Proteome Project: Current State and Future Direction. *Mol. Cell. Proteom.*, 10 (7): 1-5.
- LE GOUVELLO, S., CHNEIWEISS, H., TARANTINO, N., DEBRE, P. and SOBEL, A. 1991. Stathmin phosphorylation patterns discriminate between distinct transduction pathways of human T lymphocyte activation through CD2 triggering. *FEBS Lett*, 287: 80-84.
- LI, D. 2008. Differential expression analysis for proteomics data by two-dimensional gel electrophoresis. ProQuest Dissertations & Theses. University of California Davis.
- MACINNES, J.I., NOZIK, E.S. and KURTZ, D.T. 1986. Tissue-specific expression of the rat  $\alpha_2u$  globulin gene family. *Mol. Cell. Biol.*, 6: 3563-3567.



- MADURA, T., YAMASHITA, T., KUBO, T., TANIGUCHI, M., KAWAKITA, A., HOSOKAWA, K., TOHYAMA, M. 2003. Expression of FERM domain including guanine nucleotide exchange factor mRNA in adult rat brain. *Mol. Brain Res.*, 114: 163–167.
- MALAGELADA, C., LOPEZ-TOLEDANO, M.A., WILLETT, R.T., JIN, Z.H., SHELANSKI, M.L. and GREENE, L.A. 2011. RTP801/REDD1 Regulates the Timing of Cortical Neurogenesis and Neuron Migration. *J. Neurosci.*, 31 (9): 3186–3196.
- MANCINI, M., MAJUMDAR, D., CHATTERJEE, B., and ROY, A.K. 1986. A2u-globulin in modified sebaceous glands with pheromonal functions: Localization of the protein and its mRNA in preputial, meibomian, and perianal glands. *J. Histochem. Cytochem.*, 37: 149-157.
- MCFADYEN, D.A. 1997. Molecular and cytogenetic analysis of the rat alpha-2u-globulin locus. University of Alberta. 158 pp.
- MCFADYEN, D.A., ADDISON, W. and LOCKE, J. 1999. Genomic organization of the rat a2u-globulin gene cluster. *Mamm. Genome.*, 10: 463–470.
- MINARIK, P., TOMASKOVA, N., KOLLAROVA, M. and ANTALIK, M. 2002. Malate Dehydrogenases-Structure and Function. *Gen. Physiol. Biophys.*, 21: 257-265.
- NAKAJIMA, H., KOIZUMI, K., TANAKA, T., ISHIGAKI, Y., YOSHITAKE, Y., YONEKURA, H., SAKUMA, T., FUKUSHIMA, T., UMEHARA, H., UENO, S., MINAMOTO, T. and MOTOO, Y. 2012. Loss of HITS (FAM107B) expression in cancers of multiple organs: tissue microarray analysis. *J. Oncol.*, 41: 1347-1357.
- NEDELKOV, D., KIERNAN, U.A., NIEDERKOFER, E.E., TUBBS, K.A. and NELSON, R.W. 2006. Population proteomics: the concept, attributes, and potential for cancer biomarker research. *Mol. Cell. Proteom.*, 5: 1811-1819.
- ÖZCENGİZ, G. 2007. Proteomik. Post-genomik dönemin en güçlü teknolojisi. ODTÜ Haber Bülteni. 15: 13-9.
- RAJKUMAR, R., ILAYARAJA, R., LIAO, C., ARCHUNAN, G., ACHIRAMAN, S., PRAKASH, S., NG, W.V. and TSAY, Y.G. 2010. Detection of a2u-globulin and its bound putative pheromones in the preputial gland of the Indian commensal rat (*Rattus rattus*) using mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 24: 721-728.
- ROY, A.K. and NEUHAUS, O.W. 1966. Identification of rat urinary proteins by zone and immunoelectrophoresis. *Prog. Soc. Exp. Biol. Med.*, 121: 894-899.

- ROY, A.K., MCMINN, D.M. and BISWAS, N.M. 1975. Estrogenic inhibition of the hepatic synthesis of alpha 2u globulin in the rat. *Endocrinology*, 97: 1505-1508.
- PADGETT, R.A., GRABOWSKI, P.J., KONARSKA, M.M., et al. 1986. Splicing of messenger RNA precursors. *Annu. Rev. Biochem.* 55: 1119-50.
- PEHLİVAN, F. 1997. Biyofizik. Hacettepe- Taş Kitapçılık. 2. Baskı. Ankara. 365-366.
- PEARCE, L.L., MARTINEZ-BOSCH, S., MANZANO, E.L., WINNICA, D.E., EPPERLY, M.W. and PETERSON, J. 2009. The resistance of electron-transport chain Fe S clusters to oxidative damage during the reaction of peroxynitrite with mitochondrial complex II and rat-heart pericardium. *Nitric Oxide*, 20: 135–142.
- PHELKA, A.D., BECK, M.J. and PHILBERT, M.A. 2003. 1,3-Dinitrobenzene Inhibits Mitochondrial Complex II in Rat and Mouse Brainstem and Cortical Astrocytes. *NeuroToxicology*, 24: 403–415.
- PRINS, G.S. and WOODHAM, C., 1995. Autologous regulation of androgen receptor messenger ribonucleic acid in the separate lobes of the rat prostate gland. *Biol. Reprod.*, 53: 609–619.
- SANGER, F., AIR, G.M., BARRELL, B.G et al. 1977. Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature*, 265 (5596): 687-95.
- SAWAI, Y., YANOKURA, M. and TSUKADA, K. 1979. Multiple Forms of Ribonuclease H from Rat Liver Cytosol. *J. Biochem.*, 86: 757-764.
- SHEVCHENKO, A., WILM, M., VORM, O. and MANN, M. 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem*, 68: 850-858.
- SİDDİK, Y.B., GURKAN, H., GUZ, U. and AYGÜN, B. 2003. A new modeling method of the ECG signals based on the use of on optimized predefined functional database. *Acta Cardiologica. Int. J. Cardiol.*, 58 (3): 59-61.
- SMITH, C.W., PATTON, J.G., NADAL-GINARD, B. 1989. Alternative splicing in the control of gene expression. *Annu. Rev. Genet.*, 23: 527-77.
- SIMON, R. 2001. Protein purification techniques II. Edition s.38, Oxford University Press.
- SKOOG, D.A., HOLLER, F.J. and NIEMAN, T.A. 1998. Principles of Instrumental Analysis. 849 pp.
- SONNTAG, W.E., LYNCH, C.D., BENNETT, S.A., KHAN, A.S. THORNTON, P.L., COONEY, P.T., INGRAM, R.L., MCSHANE, T. and BRUNSO-BECHTOLD, J.K. 1999. Alterations In Insulin-Like Growth Factor-1 Gene And Protein

Expression And Type 1 Insulin-Like Growth Factor Receptors In The Brains Of Ageing Rats. *Neuroscience*, 88 (1): 269–279.

- SUENAGA, K., TAKASAWA, H., WATANABE, T., WAKO, Y., SUZUKI, T., HAMADA, S. and FURIHATA, C. 2013. Differential gene expression profiling between genotoxic and non-genotoxic hepatocarcinogens in young rat liver determined by quantitative real-time PCR and principal component analysis. *Mutat. Res.*, 751: 73–83.
- SUGIURA, N., PATEL, R.G. and CORRIVEAU, R.A. 2001. *N*-Methyl-D-aspartate receptors regulate a group of transiently expressed genes in the developing brain. *J. Biol. Chem.*, 276: 14257-14263.
- TASHIRO, F. and UENO, Y. 1978. Ribonuclease H from Rat Liver. I. Partial Purification and Characterization of Nuclear Ribonuclease H. *J. Biochem.*, 84: 385-393.
- TISELIUS, A. 1937. A new apparatus for electrophoretic analysis of colloidal mixtures *Trans. Faraday Soc.*, 33: 524.
- THOMAS, E. and EURELL, D.V.M. 1986. A comparative study regarding the association of alpha-2u globulin with the nephrotoxic mechanism of certain petroleum-based air force fuels. Annual Technical Report, 7/1/91-6/30/92.
- VENTER, D. 2003. A part of the human genome sequence. *Science*, 299: 1183–84.
- VESTERBERG, O. 1993. A short history of electrophoretic methods. *Electrophoresis*, 14: 1243-1249.
- WAIT, R., GIANAZZA, E., EBERINI, I., SIRONI, L., DUNN, M.J., GEMEINER, M. and MILLER, I. 2001. Proteins of rat serum, urine, and cerebrospinal fluid: VI. Further protein identifications and interstrain comparison. *Electrophoresis*, 22: 3043–3052.
- WILKINS, M.R., PASQUALI, C., APPEL, R.D., OU, K., GOLAZ, O., SANCHEZ, J.C., YAN, J.X., GOOLEY, A.A., HUGHES, G., HUMPHERY-SMITH, I., WILLIAMS, K.L. and HOCHSTRASSER, D.F. 1996. From proteins to proteomes: Large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Biotechnology*, 14: 61–65.
- YALÇINTEPE GÜNEŞTUTAR, L. and CANTÜRK RODOP, M. 2009. New Approaches In Electrophoresis. *J. Eng. Nat. Sci.*, 27: 151-160.
- YILDIRIM, H. 1985. Biyofizik. Anadolu Üniversitesi Basımevi, Eskişehir, 431-433.
- ZHU, R.L., GRAHAM, S.H., JIN, K., STETLER, R.A., SIMON, R.P. and CHEN, J. 1997. Kainate Induces The Expression Of The Dna Damage-Inducible Gene, Gadd45, In The Rat Brain. *Neuroscience*, 81 (3): 707-720.

[http://wps.prenhall.com/wps/media/objects/340/348272/Instructor\\_Resources/Chapter\\_12/Wade12.ppt](http://wps.prenhall.com/wps/media/objects/340/348272/Instructor_Resources/Chapter_12/Wade12.ppt)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

[http://www.matrixscience.com/search\\_form\\_select.html](http://www.matrixscience.com/search_form_select.html)

## **ÖZGEÇMİŞ**

Fatmagül TANRIKULU 1987 yılında Antalya'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Antalya'da tamamladı. 2006 yılında girdiği Celal Bayar Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nden 2010 yılında Kimyager olarak mezun oldu. 2011 yılı başında Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü bünyesinde Yüksek Lisans eğitimine başladı.