

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

**WİSTAR SIÇAN İDRARINDA ALFA2U-GLOBULİN PROTEİN AİLESİNİN  
İZOFORMLARININ İNCELENMESİ**

**İlknur EKER**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
KİMYA ANABİLİM DALI**

**2010**

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

**WİSTAR SIÇAN İDRARINDA ALFA2U-GLOBULİN PROTEİN AİLESİNİN  
İZOFORMLARININ İNCELENMESİ**

**İlknur EKER**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
KİMYA ANABİLİM DALI**

**Bu tez 2010.02.0121.022 numaralı BAP projesi tarafından desteklenmiştir.**

**2010**

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

**WİSTAR SIÇAN İDRARINDA ALFA2U-GLOBULİN PROTEİN AİLESİNİN**  
**İZOFORMLARININ İNCELENMESİ**

**İlknur EKER**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**Bu tez .././2010 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından (.....) not taktir edilerek  
oybirliği/oyçokluğu ile kabul edilmiştir.**

**Yrd. Doç. Dr. Sevil AKSU (Danışman)**

**Yrd. Doç. Dr. Mehmet Akif KILIÇ**

**Yrd. Doç. Dr. Ashhan GÜNEL**

## ÖZET

### WISTAR SIÇAN İDRARINDA ALFA2U-GLOBULİN PROTEİN AİLESİNİN İZOFORMLARININ İNCELENMESİ

**İlknur EKER**

**Yüksek Lisans Tezi, Kimya Anabilim Dalı**

**Danışman: Yrd. Doç. Dr. Sevil AKSU**

**Aralık 2010, 78 sayfa**

Bu çalışma, Wistar tipi erkek sıçan idrarında yoğun olarak bulunan  $\alpha$ 2u-globulin'in izoformlarının araştırılması amacıyla yapıldı. Bu amaçla 3 sıçanın idrarı kullanıldı. İdrarlarda bulunan proteinler iki boyutlu jel elektroforezi ile birbirinden ayrılarak  $\alpha$ 2u-globulin'in izoform çeşitliliğine bakıldı ve  $\alpha$ 2u-globulin olduğu düşünülen 16 spotun kütle analizleri ile peptit kütle parmak izi spektrumları elde edildi.

Yapılan bu çalışmaların sonuçlarına göre; sıçanların idrarlarıyla attıkları toplam protein miktarları birbirine eşittir, ancak idrarlarının protein profilleri birbirlerinden farklıdır. Buna rağmen spotların peptit kütle parmak izi spektrumları neredeyse aynıdır ve bu spotların  $\alpha$ 2u-globulin oldukları MASCOT'ta yapılan taramalarla kanıtlandı. Bu bağlamda  $\alpha$ 2u-globulin'in pek çok izoformdan oluştuğu anlaşılmıştır.

**ANAHTAR KELİMELELER:**  $\alpha$ 2u-globulin, iki boyutlu jel elektroforezi, sıçanlarda nefropati, feromon bağlayan protein, ana idrar proteini (MUP).

**JÜRİ:** Yrd. Doç. Dr. Sevil AKSU (Danışman)

Yrd. Doç. Dr. Mehmet Akif KILIÇ

Yrd. Doç. Dr. Aslıhan GÜNEL

## **ABSTRACT**

### **INVESTIGATION IZOFORMS OF ALPHA2U-GLOBULIN PROTEIN FAMILY IN WISTAR RAT URINE**

**İlknur EKER**

**M. Sc. Thesis in Chemistry**

**Adviser: Assistant Prof. Dr. Sevil AKSU**

**December 2010, 78 pages**

This study was revealed in order to examine the  $\alpha$ 2u-globulin's izoforms which densely exists on wistar male rat's urine. Three rats' urine was examined with this purpose. Izoform diversity was tested by separating proteins on urine with two-dimensional gel electrophoresis and mass analysis of 16 spots that thought to be  $\alpha$ 2u-globulin and peptide mass fingerprint spectrums were obtained.

According to the results of these studies, total protein amounts on rats' urine are equal, however urine's protein profiles are different from each other. In spite of this, spots' peptide mass fingerprint spectrums are nearly the same. Also it was proved with the searches done in MASCOT that these spots are  $\alpha$ 2u-globulin. It was comprehended that  $\alpha$ 2u-globulin consists of a great deal of izoforms.

**KEY WORDS:**  $\alpha$ 2u-globulin, two dimensional gel electrophoresis, nephropathia in rats, pheromon binding protein, major urinary protein (MUP).

**COMMITTEE:** Assist. Prof. Dr. Sevil AKSU (Adviser)

Assist. Prof. Dr. Mehmet Akif KILIÇ

Assist. Prof. Dr. Aslıhan GÜNEL

## ÖNSÖZ

Günümüzde proteomik çalışmaları oldukça yaygınlaşmıştır. Biyolojik markerler için yapılan idrar çalışmaları da gittikçe önem kazanmaktadır ve  $\alpha_2u$ -globulin de bu çalışmalar sırasında keşfedilen bir proteindir. İdrarda protein olması böbrek hastalıklarıyla doğrudan ilişkili olmasına rağmen bu durum hayvanlarda ve özellikle kemirgenlerde böyle değildir. Protein artışı hayvanlarda zorunlu doğal bir durumdur ve bu bağlamda sıçanlarda fazla miktarda bulunan  $\alpha_2u$ -globulinin özelliklerinin belirlenmesi hayvanlar arasındaki kemo-iletişimi de anlamaya olanak vermektedir. Ayrıca bu protein sıçanlardaki nefropati hastalıkları için de önemlidir. Bu çalışmada da bu proteinin hangi faktörlere nasıl bağlı olduğu, izoform çeşitliliği gibi özellikleri anlaşılmasına çalışılmıştır.

Bana çalışmalarında yardımcı olan danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Sevil AKSU'ya (A.Ü.F.F.), kendisini de her zaman danışmanım gibi gördüğüm Sayın Yrd. Doç. Dr. Mehmet Akif KILIÇ'a (A.Ü.F.F.), projesi kapsamında bana deneylerimde kullandığım örnekleri sağlayan Sayın Yrd. Doç. Dr. Firdevs MOR'a (MAKU V.F.), kütle çalışmalarına yardımcı olan Sayın Prof. Doç. Dr. Talat YALÇIN'a (IYTE F.F) ve Araştırma Görevlisi Sayın Ahmet Emin ATİK'e (IYTE F.F), manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen Araştırma Görevlisi Sayın Mesut YILMAZ'a (A.Ü.F.F.), maddi manevi desteklerini esirgemeyen canım halam Sayın Sultan EKER'e ve canım babam Sayın Ali EKER'e, tüm arkadaşlarıma ve her zaman yanımda olan, benden hiçbir desteğini esirgemeyen Sayın Safa BİRSEN'e teşekkürü bir borç bilirim.

## İÇİNDEKİLER

|                                                    |     |
|----------------------------------------------------|-----|
| ÖZET .....                                         | i   |
| ABSTRACT .....                                     | ii  |
| ÖNSÖZ .....                                        | iii |
| SİMGELER VE KISALTMALAR .....                      | vi  |
| ŞEKİLLER DİZİNİ .....                              | vii |
| ÇİZELGELER DİZİNİ .....                            | ix  |
| 1. GİRİŞ .....                                     | 1   |
| 1.1. Proteom ve Proteomik .....                    | 1   |
| 1.1.1. Tanımları .....                             | 1   |
| 1.1.2. Tarihsel gelişimleri .....                  | 1   |
| 1.2. Proteomik Çalışmaları .....                   | 2   |
| 1.2.1. Önemi ve amacı .....                        | 2   |
| 1.2.2. Kullanılan yöntemler .....                  | 4   |
| 1.2.2.1. Elektroforez .....                        | 5   |
| 1.2.2.2. Kromatografi .....                        | 14  |
| 1.2.2.3. Kütle spektrometrisi (MS) .....           | 17  |
| 1.3. İdrar Proteomiği .....                        | 20  |
| 1.3.1. İdrar oluşumu ve önemi .....                | 20  |
| 1.3.2. Yapılan çalışmalar .....                    | 21  |
| 1.3.2.1. $\alpha_2$ -globulin protein ailesi ..... | 23  |
| 1.4. Çalışmanın Amacı .....                        | 28  |
| 2. MATERYAL ve METOT .....                         | 29  |
| 2.1. Materyal .....                                | 29  |
| 2.1.1. İdrar örnekleri .....                       | 29  |
| 2.1.2. Kimyasallar .....                           | 29  |
| 2.2. Metot .....                                   | 30  |
| 2.2.1. İdrarların toplanması .....                 | 30  |

|                                                                                               |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.2.2. Kromatografi işlemleri .....                                                           | 31 |
| 2.2.2.1. Jel filtrasyon kromatografisi .....                                                  | 31 |
| 2.2.2.2. İyon değişim kromatografisi .....                                                    | 32 |
| 2.2.3. Elektroforez İşlemleri .....                                                           | 32 |
| 2.2.3.1. Örneklerin hazırlanması .....                                                        | 33 |
| 2.2.3.2. Tek boyutlu jel elektroforezi .....                                                  | 34 |
| 2.2.3.3. İki boyutlu jel elektroforezi .....                                                  | 36 |
| 2.2.3.4. Boyama işlemleri .....                                                               | 39 |
| 2.2.3.5. Kütle analizleri.....                                                                | 41 |
| 3. BULGULAR .....                                                                             | 45 |
| 3.1. Ön Çalışmalar .....                                                                      | 45 |
| 3.2. Kromatografi Çalışmaları .....                                                           | 48 |
| 3.3. İki Boyutlu Jel Elektroforezi Çalışmaları .....                                          | 52 |
| 3.3.1. Sıçan idrarlarının protein konsantrasyonları ve idrarla atılan protein miktarları..... | 54 |
| 3.3.2. S1 idrarının 2D jel profilleri .....                                                   | 57 |
| 3.3.3. S2 idrarının 2D jel profilleri .....                                                   | 58 |
| 3.3.4. S3 idrarının 2D jel profilleri .....                                                   | 59 |
| 3.4. Kütle Analizleri .....                                                                   | 60 |
| 4. TARTIŞMA.....                                                                              | 70 |
| 5. SONUÇ .....                                                                                | 74 |
| 6. KAYNAKLAR .....                                                                            | 75 |
| ÖZGEÇMİŞ                                                                                      |    |



## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Simgeler

|                    |                |
|--------------------|----------------|
| $\alpha$           | Alfa           |
| $^{\circ}\text{C}$ | Derece Celsius |

### Kisaltmalar

|            |                                                   |
|------------|---------------------------------------------------|
| mRNA       | Mesajcı Ribonükleik Asit                          |
| MS         | Kütle Spektrometrisi                              |
| 2DE        | 2 Boyutlu Elektroforez                            |
| 2D         | 2 Boyutlu                                         |
| PAGE       | Poliakrilamit Jel Elektroforezi                   |
| SDS        | Sodyumdodesil Sülfat                              |
| PMF        | Peptit Kütle Parmakizi (Peptide Mass Fingerprint) |
| pI         | İzoelektrik Nokta                                 |
| kDa        | Kilo Dalton                                       |
| mg         | Miligram                                          |
| MUP        | Ana İdrar Proteini (Major Urinary Protein)        |
| S1, S2, S3 | 1. Sıçan, 2. Sıçan, 3. Sıçan                      |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|                                                                                                 |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 1.1. Proteomik çalışmaların genel akış şeması.....                                        | 5  |
| Şekil 1.2. Poliakrilamid sentezinde gerekli kimyasal maddeler.....                              | 11 |
| Şekil 1.3. Poliakrilamidin sentezi .....                                                        | 12 |
| Şekil 1.4. Cam sandviç ve SDS-PAGE jelin hazırlanışı .....                                      | 14 |
| Şekil 1.5. Peptitlerin parçalanma şekilleri .....                                               | 20 |
| Şekil 1.6. Nefronun Yapısı .....                                                                | 21 |
| Şekil 1.7. Ana idrar proteinlerinin genel tersiyer yapısı .....                                 | 28 |
| Şekil 3.1. Erkek-dişi sıçan idrarlarının %15'lik SDS-PAGE ile karşılaştırması .....             | 45 |
| Şekil 3.2. Dişi idrarındaki $\alpha$ 2u-globulin yoğunluğunun haftalık değişimi .....           | 46 |
| Şekil 3.3. Erkek idrarındaki alfa2u-globulinin yoğunluğunun haftalık değişimi .....             | 46 |
| Şekil 3.4. A: kastrasyon öncesi toplanan idrarın 2D jel görünümü .....                          | 48 |
| B: kastrasyon sonrası toplanan idrarın 2D jel görünümü                                          |    |
| Şekil 3.5. Erkek sıçan idrarının jel filtrasyon kromatogramı .....                              | 50 |
| Şekil 3.6. Jel filtrasyon kromatografi fraksiyonlarının % 15'lik SDS-PAGE jel profili.          | 50 |
| Şekil 3.7. Jel filtrasyonundan elde edilen fraksiyonların iyon değişim kromatogramı ..          | 51 |
| Şekil 3.8. İyon değişim kromatografi fraksiyonlarının % 15'lik SDS-PAGE jel profili.            | 51 |
| Şekil 3.9. Sıçan idrar protein profili (küçük kapiler) A: 30 $\mu$ l ½ seyreltilmiş örnek ..... | 52 |
| B: 20 $\mu$ l ½ seyreltilmiş örnek                                                              |    |
| Şekil 3.10. Sıçan idrar protein profili (büyük kapiler) A: 30 $\mu$ l ½ seyreltilmiş örnek...53 |    |
| B: 20 $\mu$ l ½ seyreltilmiş örnek                                                              |    |
| Şekil 3.11. S1, S2 ve S3 idrarları için elde edilen kalibrasyon grafikleri.....                 | 55 |
| Şekil 3.12. S1 idrarının gümüş boyalı TipB 2D jel profili .....                                 | 57 |
| Şekil 3.13. S1 idrarının CBB boyalı TipB 2D jel profili .....                                   | 57 |
| Şekil 3.14. S2 idrarının gümüş boyalı TipA 2D jel profili .....                                 | 58 |
| Şekil 3.15. S2 idrarının gümüş boyalı TipB 2D jel profili .....                                 | 58 |
| Şekil 3.16. S2 idrarının CBB boyalı TipB 2D jel profili .....                                   | 59 |
| Şekil 3.17. S3 idrarının gümüş boyalı TipA 2D jel profili .....                                 | 59 |
| Şekil 3.18. S1 jelinin 1 ve 2 no'lu spotlarının PMF spektrumları.....                           | 60 |
| Şekil 3.19. S1 jelinin 3, 4, 5 ve 6 no'lu spotlarının PMF spektrumları .....                    | 61 |

|                                                                                  |    |
|----------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 3.20. S1 jelinin 7, 8 ve 9 no'lu spotlarının PMF spektrumları .....        | 62 |
| Şekil 3.21. S2 jelinin 10, 11 ve 12 no'lu spotlarının PMF spektrumları .....     | 63 |
| Şekil 3.22. S2 jelinin 13, 14, 15 ve 16 no'lu spotlarının PMF spektrumları ..... | 64 |

## ÇİZELGELER DİZİNİ

|                                                                                                                           |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Çizelge 1.1. Biyolojik uygulamalarda kullanılan deterjanlar .....                                                         | 7  |
| Çizelge 1.2. Biyolojik uygulamalarda kullanılan matrisler .....                                                           | 18 |
| Çizelge 2.1. % 15'lik SDS-PAGE jelin bileşimi.....                                                                        | 36 |
| Çizelge 2.2. Küçük kapiler için birinci boyut yürütme koşulları .....                                                     | 38 |
| Çizelge 2.3. Büyük kapiler için birinci boyut yürütme koşulları .....                                                     | 38 |
| Çizelge 2.4. Jeller için ikinci boyut yürütme koşulları .....                                                             | 39 |
| Çizelge 3.1. Konsantrasyon işlemine ait idrar verileri.....                                                               | 47 |
| Çizelge 3.2. Kalibrasyon grafikleri için hazırlanan standart BSA çözeltileri.....                                         | 54 |
| Çizelge 3.3. Sıçanların idrar hacimleri, protein konsantrasyonları ve dışarı attıkları protein miktarları.....            | 56 |
| Çizelge 3.4. S1 jelindeki spotların peptit kütleleri.....                                                                 | 65 |
| Çizelge 3.5. S2 jelindeki spotların peptit kütleleri.....                                                                 | 66 |
| Çizelge 3.6. Protein spotlarının MUP peptitlerine karşılık gelen kütleleri.....                                           | 67 |
| Çizelge 3.7. Sıçan ( <i>Rattus norvegicus</i> ) $\alpha$ 2u-globulin aminoasit dizilerinin karşılaştırılması.....         | 68 |
| Çizelge 3.8. $\alpha$ 2u-globulin'in referans numaralarına göre isimleri, aminoasit sayıları ve molekül ağırlıkları ..... | 69 |

# 1. GİRİŞ

## 1.1. Proteom ve Proteomik

### 1.1.1. Tanımları

“Proteom” sözcüğü ilk olarak 1994 yılında İtalya'nın Siena kentinde yapılan iki boyutlu jel elektroforezi toplantısında Avusturyalı araştırmacı Marc Wilkins tarafından önerilmiş ve bu sözcük 1995'te literatürde yer almaya başlamıştır. Proteom, belirli bir zaman ve ortamda bir organizmanın ifade ettiği ve sahip olduğu farklı proteinlerin tümüdür. Buradaki farklılık sadece proteinlerin aminoasit dizilimlerini değil, sentez sonrası değişimlerini de içermektedir.

Proteom kelimesinin kullanılması ile beraber moleküler biyolojide yeni bir adlandırma sistemi de benimsenmiştir. Bu adlandırma sisteminde tüm bileşenlerin kapsama alındığını belirtmek amacıyla kelimelerin sonuna –om (İngilizce –ome) takısı eklendi. Böylece önceleri küçük gruplar halinde incelenen biyomoleküllerin artık topluca incelenmesini sağlayan yeni bir dönem başladı ve topluca yapılan incelemeyi belirtmek için de –omik takısı kullanıldı. Bu yeni dönem “-omik” dönemi idi. Proteinler için Proteomik, genler için Genomik, şekerler için Glikomik, yağlar için Lipidomik gibi ifadeler kullanılmaya başlandı. Kısaca proteomun analiz edilmesi olarak da ifade edilebilen “Proteomik”, pratikte geniş çaplı protein ayırma ve tanımlama tekniklerinin kullanılması ile yapılan proteom çalışması olarak tanımlanır.

### 1.1.2. Tarihsel gelişimleri

Bilimde bilgi birikiminin belli bir düzeye ulaşması, aynı zamanda yeni bir çağın kapılarını da aralar. 1950'li yıllara kadar süren çalışmalar sonucunda DNA'nın yapısının aydınlatılması da yeni bir çağın başlangıcı olmuş, böylece bilim insanlarının canlılık konusundaki düşünceleri yeni bir boyut kazanmaya başlamıştır.

1945'te ABD Kongresi, Enerji Bakanlığı'nı yeni enerji kaynakları ve teknolojileri geliştirmekle ve bu yeni enerjilerin üretim ve kullanımlarının sağlık ve çevre açısından sakıncaları olup olmadığının derinlemesine araştırılmasıyla görevlendirdi. 1990'a kadar süren çalışmalar sonucunda, genetik materyalin moleküler yapısı ayrıntılarıyla ortaya konulmuş ve insan genom projesi için gerekli olan bilgi birikimi ve teknolojik alt yapı sağlanmıştır. Enerji Bakanlığı, belirtilen görev çerçevesinde insan genom dizisinin belirlenerek bir referans oluşturması için Ulusal Sağlık Enstitüleri'nin de işbirliğiyle 1990'da İnsan Genom Projesi'ni başlatmıştır. İnsan Genom Projesi'nin temel amacı, insanın bütün genlerini belirleyerek tüm insan genomunun dizisini ortaya koymaktır. Ayrıca diğer organizmaların da genom dizilerini belirleyerek insaninkiyle karşılaştırmak, bunun gerçekleştirilmesi için yeni teknikler geliştirmek ve elde edilecek bilgileri tarım, sağlık, enerji gibi alanlarda değerlendirmektir. 2003 yılında tamamlanan bu projenin sonucunda sanılanın aksine 100.000 değil, 25.000 civarında gen olduğu ortaya çıktı. Ancak protein sayısının çok daha fazla olduğu biliniyordu. Dolayısıyla '1 genin 1 proteini kodladığı' hipotezi çürütülmüş oldu. Bu nedenle bir organizmanın genetik kodlarının tamamen aydınlatılmış olması, o organizma hakkındaki tüm bilgilere ulaşıldığını göstermemektedir. Çok sayıda bilim insanı genetik şifrelerin çözülmesiyle tüm sorunların ortadan kaldırılabilceğini ve hatta moleküler biyoloji ve tıp alanında sona yaklaşılabileceğini düşünmekteydi. Ancak genom projesi sonucunda daha yolun başında bulunduğu ve karşımızda devasa bir protein dünyasının olduğu görüldü. Dolayısıyla 2003 yılından itibaren protein çalışmaları hız kazanmaya başladı.

## **1.2. Proteomik Çalışmalar**

### **1.2.1. Önemi ve amacı**

Proteinler, canlı organizmalarda en fazla bulunan moleküller olup aminoasitlerden meydana gelirler. Proteinlerin hangi aminoasitlerden ne şekilde meydana gelecekleri hücrenin çekirdeğinde bulunan genlerde saklıdır. Protein sentezi meydana geleceği zaman genlerdeki bilgi mesajcı RNA'lara (mRNA) aktarılır ve mesajı getiren mRNA'lardaki bilgilere göre, ribozomlarda aminoasitler belli dizilerde uç uca eklenerek protein sentezlenir. Sentezlenen proteinler hücrelerdeki ihtiyaca göre değişime

uğrayarak farklılık kazanabilirler. Bu farklılıklar, 150'den fazla değişik işlem sonucunda olabilir. Bu işlemler sırasında proteinlere lipitler, şekerler, metaller veya başka farklı moleküller eklenebilir. Sonuçta proteinlerin her biri, yapılarına bağlı olarak farklı 3 boyutlu yapı kazanırlar. Dolayısıyla yapı ve işlevleri birbirinden farklı çok sayıda protein meydana gelir. Bu nedenle bir gen sadece tek bir proteini değil, çok sayıda farklı proteini kodlamış olur.

Genler alternatif "splicing" mekanizmaları ile çok sayıda farklı fonksiyona sahip protein oluşturabilmektedir. Bu sayede bir gen içerisindeki farklı bölgeler değişik kombinasyonlar ile bir araya getirilmektedir. Bunun yanında hücrede gerçekleşen posttranslasyonel modifikasyonlar normal ve patolojik dokulardaki farklılıkların bazılarını belirler. Proteinlerde gerçekleşmesi gereken post-translasyonel modifikasyonları tek başına genlerdeki bilgi vermez. Bu nedenlerle, genomik çalışmalar her zaman nihai protein ekspresyonu hakkında doğru bilgiler sağlayamazken, yapılan proteom çalışmaları, genomik analizlerle belirlenemeyen ve pek çok farklı yoldan gerçekleşen hastalık patolojisini ve fenotipini ortaya koyabilmektedir.

Organizmaların genlerindeki tüm bilgiler her zaman kullanılmaz ve bu genetik bilgilerin hangi kısımlarının kullanılacağı koşullara ve zamana bağlı olarak değişim gösterir. Dolayısıyla organizmanın yaşamını sürdürebilmesi için gerekli olan tüm moleküller gerekli koşullarda sentezlenir. Bu nedenle organizmada sentezlenen biyomoleküllerin çeşitliliği, organizma hakkında önemli bilgiler vermektedir.

Sentezlenen proteinlerin tipi ve miktarı organizmanın yaşı, bulunduğu çevre koşulları, aldığı gıdalar, geçirdiği farklı hastalıklar gibi etkenlere bağlı olarak değişim göstermektedir. Hücrelerin protein bileşimi durağan olmadığından her hangi bir anda hücrede bulunan proteinlerin izlenebilmesi büyük önem taşımaktadır. Fakat bir organizmada yüz binlerce protein olduğu düşünülürse, bu proteinlerin her birinin yapı ve işlevini aydınlatmak oldukça emek ve zaman alacaktır. Bu noktada devreye proteom analizleri girmektedir. Bunun için proteom analizlerinde öncelikle organizmanın, daha sonra doku veya hücrelerin ve son olarak istenilen bölgenin seçilmesi, izlenen organizmadaki incelemeyi kolaylaştırır. Proteomik çalışmalarda organizmanın

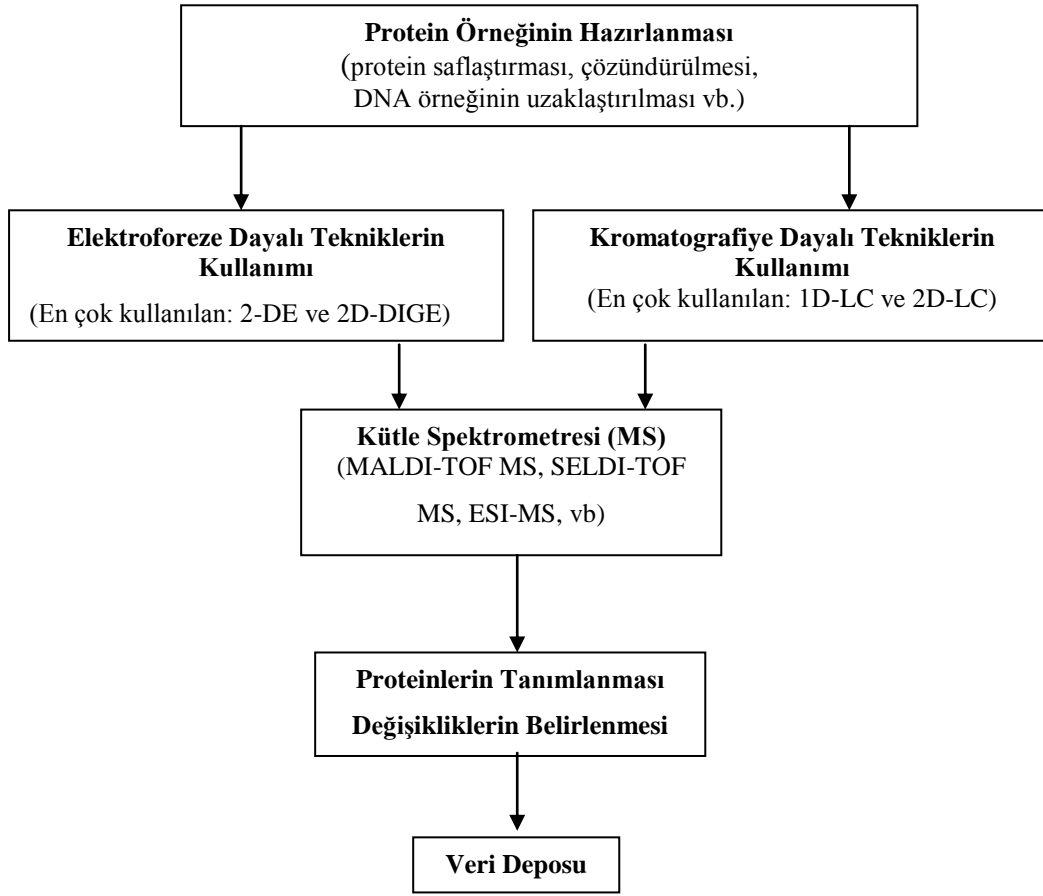
bulunduğu durum ve zaman dikkate alınarak araştırmalar yapıldığından, hastalıkların tanısı için uygun belirteçlerin bulunması, tedavi amaçlı hedeflerin iyi belirlenmesi ve hedeflenen yapılarla en uygun etkileşime girecek ilaçların geliştirilmesi gibi alanlarda eşsiz bilgiler elde edilebilmektedir. Günümüzde kullanılan ilaçların hedefi de çoğunlukla proteinlerden oluşmaktadır.

Proteom analizlerinin getirdiği yenilikçi bakış açısı sadece proteinler için değil, diğer tüm moleküller için de bir dönüm noktası olmuştur. Diğer tüm moleküllerle sürekli bir etkileşim içinde olan proteinler için yapılan proteomik çalışmaları, başta kanser olmak üzere çok sayıda hastalığın ayrıntılı olarak incelenebilmesinin yolunu açmıştır. İnsan proteom haritasının da çıkarıldığı gün çok sayıda hastalık da belki de ortadan kaldırılabilecektir.

### **1.2.2. Kullanılan yöntemler**

Proteomik teknolojisi, önce örnekteki proteinlerin ayırımı ve sonra bu proteinlerin tanımlanması prensibine dayanmaktadır. İlk aşamada örnekte bulunan proteinler aşağıda belirtilen ayırma metotlarına göre işlemlere tabi tutulurlar. Proteinlerin birbirlerinden ayrılmasından sonra son aşamada, kütle spektrometresi (MS) yöntemi ile bu proteinlerin kütleleri saptanır ve böylece kesin ve doğru olarak proteinlerin tek tek tanımlanması sağlanır.





Şekil 1.1. Proteomik çalışmaların genel akış şeması

### 1.2.2.1. Elektroforez

Sulu bir çözelti içinde, süspansiyon ya da çözünmüş bulunan yüklü parçacıkların, uygulanan bir elektrik alanının etkisi ile göç etmesi sürecine elektroforez denir. Bu parçacıklar; bakteri hücreleri, virüsler, protein molekülleri veya sentetik parçacıklar olabilir. Bu parçacıkların çoğu, doğal halde iyonik yükler taşırlar. Temelde protein tanımlama ve saflaştırma amacıyla kullanılan bu yöntem, doğal veya rekombinant bir protein sentezlenip sentezlenmediği hakkında bilgi verir. Genel olarak elektroforez; saflaştırma, saflık kontrolü, molekül ağırlığı saptama, kalıtsal veya kalıtsal olmayan hastalık saptama, enzim izozimlerinin saptanması (tanısal amaçlı, popülasyon çalışması için, adli tıpta), immünoloji ve moleküler biyolojide kullanılmaktadır.

Protein çalışmalarında kullanılan ilk elektroforez yöntemi Tiselius tarafından 1930'da tanımlanan serbest solüsyon elektroforezi, frontal elektroforez veya "moving boundary" elektroforezi olarak adlandırılan elektroforezdir. Tiselius bir elektrolit çözeltisinde çözülmüş olan proteinleri, protein-elektrolit çözeltisinin bulunduğu "U" şeklindeki kuartz bir borunun içinden elektrik akımı geçirerek ayırmıştır. pH 7.6'da kanın, albumin,  $\alpha$ ,  $\beta$  ve  $\gamma$ -globulin olarak isimlendirilen 4 serum protein fraksiyonu saptanmış ve bu bandların sınırları arasındaki absorbans değişikliği optik olarak ölçülmüştür.

Proteinlerin elektroforetik ayrımında nişasta, agaroz ve selüloz asetat gibi çeşitli jeller kullanılmaktadır. Bununla beraber, genelde en iyi ayrışma poliakrilamid jeli (PAGE) ile sağlanır. PAGE'de destek matriksi olan poliakrilamid, kısa poliakrilamid zincirlerinin çapraz bağlayıcı moleküller yardımıyla kovalent olarak bağlanmasından oluşan bir polimerdir. Bu polimerle, proteinler ya doğal hallerinde ya da çeşitli deterjanlarla denatüre halde birbirlerinden moleküler ağırlıklarına göre ayrılırlar. Yöntemde, poliakrilamid jeli izoelektrik fokuslama işlemi ile birleştirilir ve iki boyutlu jel elektroforezi denilen yöntemle proteinler molekül ağırlıklarının yanında, izoelektrik noktalarına göre de birbirlerinden ayrılabilirler.

İki boyutlu jel elektroforezi, sırasıyla izoelektrik odaklama ve SDS elektroforezin birlikte kullanımı iki-boyutlu elektroforez olarak adlandırılır ve kompleks protein karışımlarının ayrıştırılmasına olanak tanır. Bu yöntem, diğer elektroforetik yöntemlerin tek başlarına kullanılmasına göre çok daha hassas bir yöntemdir. İki boyutlu jel elektroforezi, molekül ağırlıkları aynı fakat izoelektrik noktaları (pI) ayrı, ya da pI değerleri aynı molekül ağırlıkları farklı proteinlerin ayrıştırılmasına olanak sağlar.

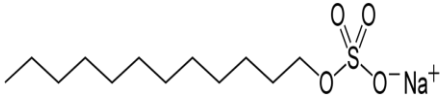
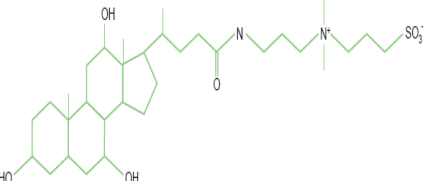
Elektroforez tekniğinde, örnek hazırlama süreci çok önemlidir. Çünkü iki boyutlu elektroforezde amaç, çalışılan dokuda veya hücrede o anda ve o koşullar altında ifade edilmiş olan tüm proteinleri görüntülemektir. Dolayısıyla protein kayıplarını ve modifikasyonlarını minimum seviyede tutacak, ayrıca sulu çözeltiye alınması zor olan proteinleri de büyük oranda çözeltiye alarak jel üzerinde görüntüleyebilmeye olanak sağlayacak örnek hazırlama tekniğinin kullanılması gerekmektedir. Bu nedenle örnek hazırlama aşamasında idrar örneklerinin % 108'i kadar üre, % 10'u kadar indirgeyici

ajan olan (1.4 M'lık ditiyotreitol), % 10'u kadar 2-4 amfolit karışımı ve % 4'ü kadar da proteaz inhibitör karışımı tampon olarak kullanılmıştır. Bu tamponun kullanılmasının amacı, proteinleri çözeltiyeye alarak çözünür hale getirmek, oluşabilecek oksidasyon basamaklarını ortadan kaldırmak, sülfid ve hidrojen bağlarını kırarak proteinleri tek bir konformasyona çevirmek, protein modifikasyonlarını engellemek ve en önemlisi proteazları inaktif hale getirmektir. Tamponda kullanılan kimyasalların özellikleri ve yapılan işlemlerin amacı şöyledir:

**Üre:** Örnek hazırlamada kullanılan ürenin oldukça yüksek konsantrasyonda kullanılmasının amacı, proteinlerin ikincil ve üçüncül yapılarını bozarak proteinleri tek bir konformasyon haline getirmektir. Böylece hidrofobik proteinler de çözünür hale getirilerek çözeltiyeye alınabilir. Ayrıca protein-protein etkileşimleri de minimuma indirilmiş olur. Ürenin yanında bazen tiyoüre de kullanılır. Bunun nedeni, tiyoüre özellikle membran proteinleri gibi oldukça hidrofobik proteinleri çözünür hale getirir.

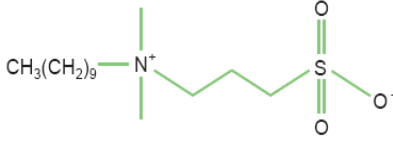
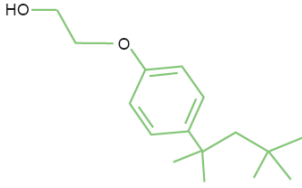
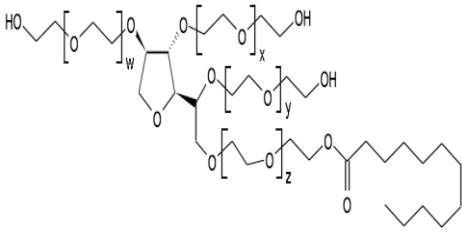
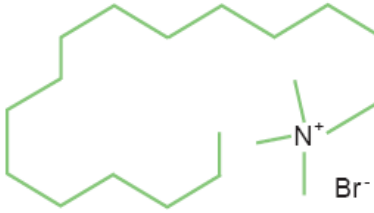
**Deterjan:** Deterjanlar, hidrofobik proteinlerin çözünürlüklerini arttırmak için kullanılır. Genellikle kimyasalın yapısında yük olup olmamasına ve var olan yükün cinsine göre isimlendirilirler. Aşağıda deterjan çeşitlerine birkaç örnek verilmiştir. Farklı özellikteki deterjanlar farklı örnekler için kullanılmaktadır.

Çizelge 1.1. Biyolojik uygulamalarda kullanılan deterjanlar

| Deterjan türü | Deterjan adı                                                   | Deterjan Yapısı                                                                      |
|---------------|----------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| Anyonik       | Sodyum dodesil sülfat (SDS)                                    |  |
| Zwitteriyonik | [3-(3-kolamidopropil) Dimetil-amonyo-1-propansülfonat] (CHAPS) |  |

Devamı arkada

Çizelge 1.1'in devamı

|                |                                                                                       |                                                                                       |
|----------------|---------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| Zwitteriyonik  | N-Desil-N,N-dimetil-3-amonyosülfonat (SB3-10)                                         |     |
| İyonik olmayan | Triton-X-100                                                                          |    |
|                | Tween 20<br>Polisorbat 20, (w + x + y + z = 16)<br>Polyoksietilen-sorbitan-monolaurat |    |
| Katyonik       | Setil trimetilamonyum bromür (CTAB)                                                   |  |

**İndirgeyici Ajanlar:** İndirgeyiciler, proteinlerin disülfid bağlarını kırarak tersiyer yapı oluşturmasını engeller. Ditiyotreitol (DTT) ve Triskarboksietilfosfin (TCEP) gibi maddeler indirgeyici ajanlara örnek verilebilir.

**Taşıyıcı amfolitler:** Küçük molekül ağırlıklı alifatik oligoamino-oligokarboksilik asitlerdir. Çözeltideki proteinlerin çözünürlüğünü, yapılarında bulunan tamponlayıcı gruplar sayesinde pH gradiyenti oluşturarak arttırırlar.

**Proteaz inhibitörleri:** Proteazlar, proteinleri parçalayan enzimlerdir. Dolayısıyla proteomik çalışmalarda proteinlerin sağlam olarak analiz edilebilmeleri için proteazların inhibe edilmeleri gerekmektedir. Bunu sağlamak için örnekler soğukta saklanır ve

yapılan işlemler oldukça kısa tutulmaya çalışılır. Ancak bu koşullarda bile proteazlar tam olarak inaktif olmayabilir. Bu durumda örnekler içerisine proteaz inhibitörleri de eklenir. Bu inhibitörler, proteazların aktivitesini bozarak proteinlerin parçalanmalarını engeller. Fenilmetilsülfonilflorür (PMSF) sıklıkla kullanılan proteaz inhibitörlerinden biridir. Proteazları inaktive etmenin bir başka yolu ise çöktürmedir. Proteinler -20°C' de aseton içindeki trikloroasetik asit (TCA) muamelesiyle çöktürülürler.

**Kontaminasyonların uzaklaştırılması:** Örnek hazırlama işlemi sırasında proteinlerle birlikte nükleik asitler, fosfolipidler ve özellikle de tuzlar çözeltiliye geçebilir ve jel üzerinde istenmeyen etkiler yaratabilirler. Nükleik asitler, DNaz ve RNaz enzimleriyle muamele edilerek parçalandıktan sonra santrifüjlenerek, lipidler % 2'den daha yüksek konsantrasyonda deterjanla çöktürülerek, tuzlar ise diyaliz işlemiyle, çöktürme ile ya da membranlı santrifüj tüpleri kullanılarak uzaklaştırılır.

Elektroforez yöntemleri içinde en çarpıcı ve etkili olanı H. Svensson tarafından İsveç'te geliştirilen, **izoelektrik odaklama** (electrofocusing) yöntemidir. Bu teknikte elektroforetik hareket, pH'ın fonksiyonu olarak ele alınır. Bir proteinin yükü pH'ya bağlıdır. Proteinler, elektroforez ortamının pH'ına bağlı olarak pozitif, negatif veya nötr net yüke sahip olabilir. Ortamın pH'ı, proteinin izoelektrik noktasına eşit ise protein net bir yük taşımaz. Bu durumda protein elektrik alan içinde hareketsizdir. Ortamın pH'ı, proteinin izoelektrik pH'ından düşük ise protein net bir pozitif yük taşır ve elektrik alanı yönünde yani; katoda hareket eder. Ortamın pH'ı proteinin izoelektrik noktasından yüksek olduğunda ise protein net bir negatif yük taşır ve elektrik alanına zıt yönde yani; anoda hareket eder. Teorik olarak, protein moleküllerini ayırmak ve bir proteinin pI değerini saptamak, ortamın pH'ının değişik olduğu farklı deney serilerindeki elektroforetik hareketlerin izlenmesiyle mümkündür.

İzoelektrik ayırma için pH gradiyentine sahip bir ortam ve elektriksel alana ihtiyaç vardır. pH gradiyentini sağlamak için ya serbest taşıyıcı amfolitler kullanılır ya da hareketsiz pH gradiyenti sağlanır. Taşıyıcı amfolitler akrilamid jel çözeltisi hazırlanırken eklenmektedir. Jel polimerleştikten sonra da amfolitler akım etkisiyle serbest dolaşabilmektedir. Amfolitlerin yüksek pI' lı olanları pozitif yüke, düşük pI' lı

olanları negatif yüke sahiptir. Fakat başlangıçta (akım başlatılmadan önce) taşıyıcı amfolitlerin bulunduğu jel tek bir ortalama pH değerine sahipken, jel üzerine elektrik alan uygulandığında, negatif yüklü amfolitler anoda doğru, pozitif yüklü olanlar ise katoda doğru hareket edeceklerdir. Sonuçta, amfolitler proteinlere göre daha küçük kütleyle sahip olduklarından proteinlerden daha hızlı hareket ederek anot ve katot arasında bir pH gradiyenti oluştururlar. Proteinler de bu gradiyente göre izoelektriksel noktalarına ulaştıkları noktada dururlar.

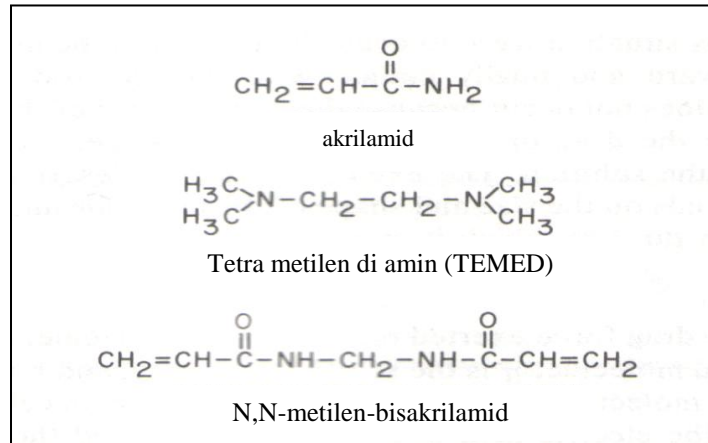
Taşıyıcı amfolitlerin olabildiğince kararlı bir gradiyent sağlayabilmesi için jel ve elektrotların iki ucuna elektrot çözeltileri uygulanır. Anoda bir asit çözeltisi, katoda ise bir baz çözeltisi konur. İyi çözünürlüklü bir ayırma için uzun bir süreye ve yüksek elektrik alan şiddetine ihtiyaç vardır. Örnekte bulunan yüke bakmaksızın bir kapilerdeki elektro-ozmotik akış, tüm iyonları katoda taşıyacak kadar güçlüdür. Örnekteki (+) iyonlar, elektro-ozmotik akış ve iyon hareketinin aynı yönde olması nedeniyle kapiler çıkışa daha erken gelirler. Örnekteki (-) iyonlar, aynı zamanda kapiler çıkışa hareket ederler, ama hızları daha yavaştır. Bu nedenle bu arada jeldeki pH gradiyenti kararlılığını kaybeder ve bazı bazik proteinler gradiyentin bazik kısmıyla jelden akıp gider.

pH gradiyenti oluşturmakta kullanılan ikinci yöntem ise hareketsiz pH gradiyentidir. Bu yöntem taşıyıcı amfolitlerle yaşanan problemleri ortadan kaldırmıştır. Burada kullanılan tamponlayıcı gruplar, jelin içerisinde polimerleştirilmiş akrilamid türevleridir. Tamponlayıcı gruplara sahip olan akrilamid türevleri immobilinler olarak adlandırılırlar. Bir immobilin zayıf bir asit veya zayıf bir bazdır. Kesin bir pH değerini tamponlamak için en az iki farklı immobilin kullanılır ve birisi baz, diğeri asittir. Ticari olarak satılan hareketsiz pH gradiyenti çubukları vardır. Dolayısıyla tekrarlanabilirlik arttırılabilir ve böylece bazik proteinleri de görüntülemek mümkün olur. Ticari olarak satılan çubukların eni 3 mm'dir ve proteom çalışmalarında sıklıkla uzunlukları 18 ve 24 cm olan çubuklar kullanılır.

Jel elektroforezinin ikinci boyutunda (sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi SDS-PAGE), polipeptidlerin ilerleme hızları, sadece iç elektriksel yükleri

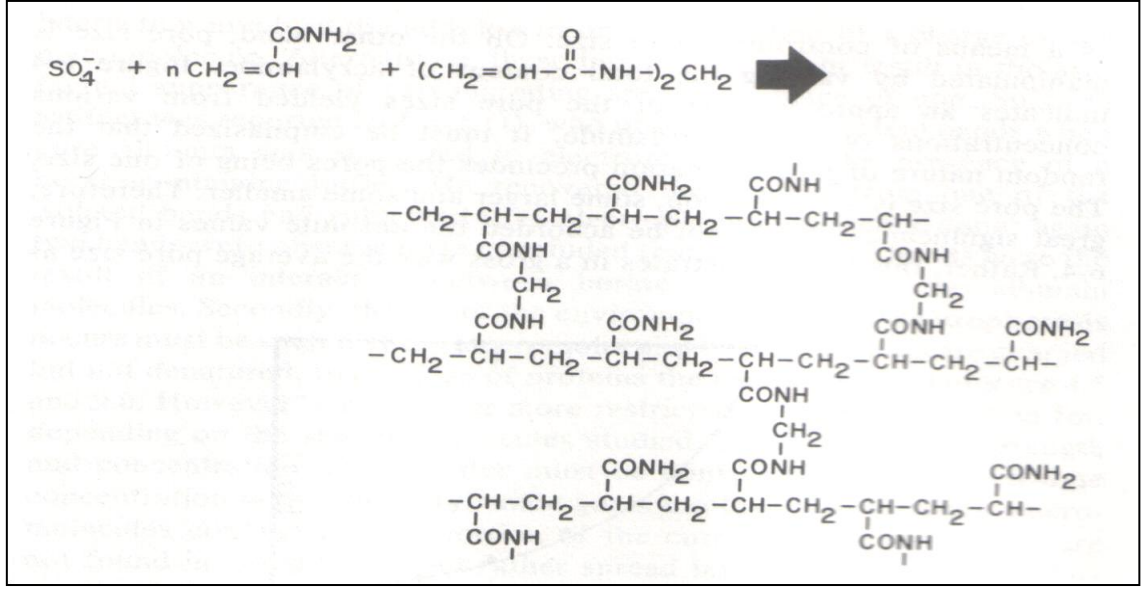
tarafından değil, aynı zamanda molekül ağırlıkları tarafından da belirlenmektedir. SDS, polipeptidlerin ana iskeletini çevreleyerek proteinleri denatüre eden anyonik bir deterjandır. SDS, çoğu proteine kabaca molekül ağırlığının belirlediği miktarda, iki amino asit kalıntısına bir molekül SDS olacak şekilde bağlanır (hidrofobik etkileşimlerle). Bağlı SDS net negatif yükü artırır, proteinin iç yükü maskelenir ve her proteinin yük/kütle oranı benzer olur. Denatüre olan proteinler benzer bir şekil de aldıklarından, elektroforezde proteinler tamamen molekül ağırlıklarına göre ayrılırlar.

Başarılı bir elektroforezin yapılabilmesi için analizi yapılacak örnek ile reaksiyon vermeyen ve örneğin elektrik alanda ilerlemesini engellemeyen bir zemin kullanmakla mümkündür. Poliakrilamid bu özelliklere sahip bir polimerdir. Poliakrilamid sentezinde akrilamid, N,N'-metilen-bisakrilamid, tetrametilendiamin (TEMED) ve amonyum persülfata ihtiyaç vardır.



Şekil 1.2. Poliakrilamid sentezinde gerekli kimyasal maddeler

Amonyum persülfat suda çözüldüğünde serbest radikal iyonları oluşturur. 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. Jel bu polimer parçalarının çapraz bağlanması ile oluşur. Bu işlem N,N'-metilen-bisakrilamid tarafından sağlanır.



Şekil 1.3. Poliakrilamidin sentezi

Oluşan ağın içerisindeki boşlukların büyüklüğünü iki parametre belirler: (1) Kullanılan akrilamid miktarı (T), (2) çapraz bağlanmanın derecesi (C). Toplam akrilamid miktarına ve bis akrilamid miktarına bağlı olarak jel üzerindeki boşlukların büyüklüğü ayarlanabilir.

$$T = \frac{(a + b) \times 100}{V} \%$$

$$C = \frac{b \times 100}{a + b} \%$$

a: akrilamidin gram cinsinden kütesidir.

b: çapraz bağlayıcının gram cinsinden kütesidir.

V: mililitre cinsinden çözeltinin hacimidir.

C sabit kalıp, T arttırılırsa, gözenek boyutu küçülür. T sabit tutulup, C arttırılırsa gözenek büyüklüğü parabolik bir şekilde değişir yani yüksek ve düşük C değerlerinde gözenekler büyüktür. İkinci boyut jellerinin bileşimi genellikle %12,5 T ve %3 C şeklindedir. TEMED'in jel karışımına eklenme nedeni, onun katalizör görevi

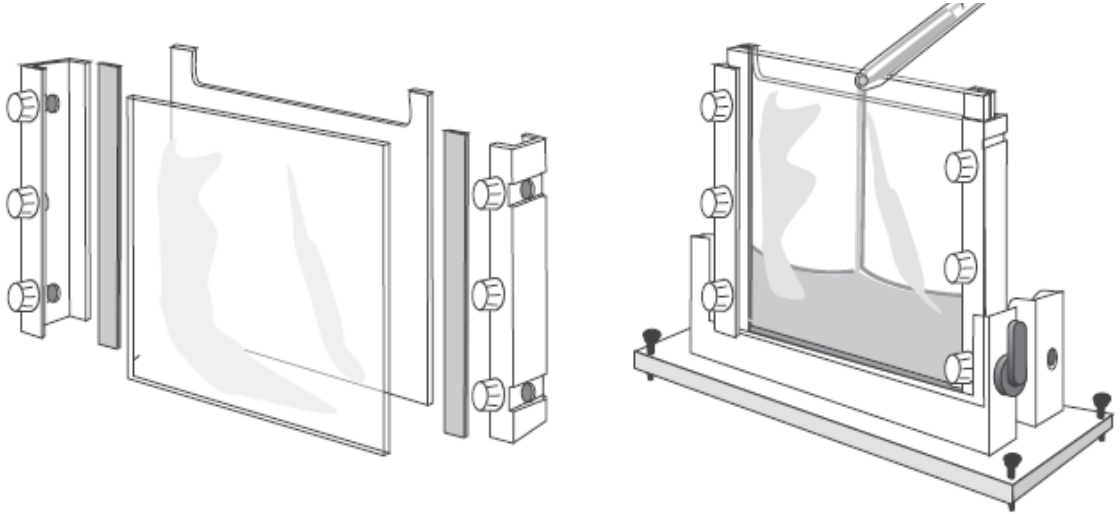


görmesinde dir. Genelde % 0,4 oranında eklenen TEMED polimerleşme reaksiyonunu hızlandırır.

Akrilamidi polimerleştirmenin bir başka yolu da riboflavin kullanmaktır. Oksijenin ve UV ışığın varlığında, riboflavinler fotokimyasal bozunum yaparak serbest radikaller oluşturur. Bu serbest radikaller aynen amonyum persülfat gibi davranma özelliğine sahiptir

Polimerleşmenin doğasını anlamada tartışılacak son bir konuda polimerleşmenin içerisinde gerçekleştiği tampon sistemidir. Tampon sistemi, hem jel üzerinde hem de jel yürütme sistemi içerisinde ortamın pH'sını korumada ve akımın jel içerisinden geçmesi için gerekli elektrolit miktarını sağlamada kullanılır. Bu yüzden uygun bir tampon seçilmesi, jel elektroforezinin sonuçları açısından önemlidir. Genelde Tris-klorür/Tris-glisin sistemi kullanılır. Tris-klorür jel içerisinde (pH:8,8), Tris-glisin ise yürütme tamponunda mevcuttur. Jel içerisindeki klorür ve glisin iyonlarının düşük molekül ağırlıklarından dolayı hareketlilikleri çok yüksek olduğundan proteinlerden önce anoda doğru hareket ederler. Böylece proteinler jel içerisinde 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. Tamponlayıcı iyonların tükenmesini engellemek için tampon konsantrasyonu yüksek tutulmalıdır.

Jel elektroforezi yapmak için sadece iki alete ihtiyaç vardır. Bunlardan ilki, elektroforez ünitesi ikincisinde güç kaynağıdır. SDS-PAGE yatay veya dikey elektroforez sistemleri kullanılarak gerçekleştirilebilir. Genellikle 1,0 mm veya 1,5 mm kalınlığında jeller kullanılır. Bu kalınlığı sağlamak için uygun kalınlıkta boşluk bırakıcılar (spacer) kullanılır. Jeller iki cam plaka arasında oluşturulurlar. Boyutları birinci boyutta kullanılan çubukların boyutlarına uygun olmalıdır. Şekil. 1.4 jel dökmek için gerekli bir sandviçi ve SDS-PAGE jelinin dökülüşünü göstermektedir.



Şekil 1.4. Cam sandviç ve SDS-PAGE jelinin hazırlanışı

### 1.2.2.2. Kromatografi

Proteomik çalışmalarda elektroforezden başka en çok kullanılan yöntemlerden biri de kromatografi yöntemidir. Proteinler; büyüklük ve şekil, net yük, yüzeyde bulunan hidrofobik gruplar, kullanılan durağan faza bağlanma kapasitesi gibi farklı özelliklere sahip olduklarından, bu karakteristik özelliklerden biri temel alınarak gerçekleştirilen kromatografik yöntemlerle saflaştırılabilirler. Bu yöntemlerde en çok uygulanan teknik kolon kromatografisidir.

**Kolon kromatografisi**, kolon dolgu maddesi (durağan faz, matriks) ile doldurulmuş, alttan musluklu basit bir cam boruda gerçekleştirilir. Protein karışımı uygun bir elüsyon çözeltisi yardımıyla kolondan geçirilir. Kolon dolgu maddesi ile etkileşim gösteren proteinler, hareketli faz ile etkileşimi olanlara göre daha yavaş hareket ederler. Durağan faz ile etkileşim (adsorpsiyon) ve kolondan ayrılma (desorpsiyon) özelliği bakımından farklı olan proteinler, belli zaman aralıklarında ve belli hacimlerde toplanarak çeşitli fraksiyonlara ayrılabilir. Bu amaçlar için kolondan çıkan fraksiyonların otomatik olarak belli hacimlerde toplandığı ve sonra ışık absorpsiyonlarının ölçüldüğü özel sistemler vardır. Böyle bir sistemde elüsyon çözeltisini kolona pompalayan bir peristaltik pompa, kolon, otomatik örnek toplayıcı (fraksiyon kolektörü), UV izleyici ve kaydedici gibi temel kısımlar mevcuttur.

Kolon kromatografisinin farklı temellere dayanan çeşitli tipleri vardır:

- Ayırmanın temelini, proteinler arasında bazı yapısal özellik (örneğin; taşıdığı elektrik yükü ya da hidrofobik grupların dağılımı) farklılıklarına dayandığı ve adsorpsiyon-desorpsiyon olaylarının bu özelliklere göre gerçekleştiği teknikler. Örneğin; iyon değişim kromatografisi ve hidrofobik etkileşim kromatografisi.
- Protein ile kolon dolgu maddesi arasındaki yapısal ve işlevsel uyumluluk ve etkileşim temeline dayanan metotlar. Örneğin; ilgi (afinite) kromatografisi.
- Ayırmanın prensibinin, molekül büyüklüğündeki farklılık nedeniyle değişik fazlarda dağılmaya dayandığı yöntem. Örneğin; jel geçirgenlik kromatografisi (jel filtrasyonu)

Kolon büyüklüğü ve şekli kolona uygulanacak karışımın tipine ve kromatografik ayırmanın temeline göre değişir. İyon değişimi ve afinite kromatografileri için genelde kısa ve kalın, jel filtrasyonu için ise uzun ve kalın kolonlar kullanılmaktadır. Kolon boyunca bir tampon gradiyenti oluşturulması gerekiyorsa gradiyent karıştırıcılarından yararlanır.

Kolon dolgu maddesi olarak piyasada mevcut iyon değiştiriciler ile diğer bazı matriks materyalleri, afinite adsorbanları ve jel filtrasyon maddeleri arasından amaca, ekipmana ve bütçeye uygun olanı seçilerek protein saflaştırma işlemi gerçekleştirilir.

### **İyon değişim kromatografisi:**

Her proteinin net yükü, yapısındaki iyonlaşabilen yan gruplara sahip aminoasitlerin miktarına ve bulunduğu çözeltinin pH'ına bağlı olarak değişir. Proteinlerin bu özelliklerinden yola çıkılarak iyon değişim kromatografisi bulunmuştur. İyon değişim kromatografisinin temeli, proteinin yüklü grupları ile katı destek materyali (matriks) arasındaki elektrostatik etkileşimler oluşturmaktadır. Matriks, ayrılacak proteinle ters yüke sahiptir ve protein kolona iyonik bağlarla bağlanır. Bağlanan proteinler kolondan ya kullanılan tampon çözeltisinin pH'ını ya da tuz konsantrasyonunu değiştirmek suretiyle ayrılırlar. Pozitif yüke sahip iyon değiştirici matriksler anyon değiştiriciler

olarak adlandırılır ve bunlar anyonik proteinleri adsorplarlar; katyonik proteinleri adsorplayan matriksler ise katyon değiştirciler olarak isimlendirilirler.

En yaygın olarak kullanılan anyon değiştircilerdeki pozitif yüklü gruplar, aminoetil  $C_2H_4N^+H_3$ , trietilaminoetil  $C_2H_4N^+(C_2H_5)_3$  ve dietilaminoetil  $C_2H_4NH^+(C_2H_5)_2$  gruplarıdır. Katyon değiştircilerde ise negatif yüklü gruplar olarak, genelde sülfonil  $SO_3^-$ , ve karboksimetil  $CH_2COO^-$  grupları kullanılır. En çok kullanılan adsorbanlar; selüloz, agaroz ve dekstranın karboksimetil (CM) ve dietilaminoetil (DEAE) türevleridir. Seçilecek matriksin por özelliği, bağlama kapasitesini etkilediği için göz önünde tutulmalıdır. Örneğin; moleköl ağırlığı 10 000 – 100 000 Da arasında olan proteinler için “DEAE – Sephacel” veya “Sephrose” uygundur.

İyonik etkileşimler pH’a bağlı olduğundan, iyon değişim kromatografisinde pH çok önemlidir. Bu nedenle kullanılan hareketli faz daima tamponlanır. Tamponlama yapılmazsa, çözeltiler proteinler yerine, anyon değiştircilerin üzerinde  $OH^-$  ve katyon değiştircilerin üzerinde  $H^+$  iyonlarının birikmesine yol açar. Bu da olumsuz iyon değişimlerine ve protein denatürasyonuna neden olur.

Proteinlerin kolondan ayrılmasında en çok kullanılan elüsyon tekniği tuz gradiyentinin oluşturduğu iyonik elüsyondur. Genellikle KCl veya NaCl’den oluşan lineer bir gradiyent oluşturulur. Tuz iyonları proteinle yer değiştirerek onun tekrar matrikse bağlanmasını engeller. Tuz konsantrasyonu arttıkça protein bandı daralarak aşağı doğru ilerler ve düzgün bir bant olarak kolondan çıkar.

### **Jel filtrasyon (geçirgenlik) kromatografisi:**

Yöntemin temeli, dekstran esaslı materyalleri kullanarak makromolekülleri, moleköl büyüklüklerindeki farklılıklara göre ayırmaktır. Kullanılan kolon matriksi, küresel yapılı ve belirli boyutta gözeneklere sahip inert jel taneciklerinden oluşur. Farklı boyutlu molekülleri içeren bir çözelti kolondan geçirildiğinde, büyük moleküller gözenekli taneciklerin aralarındaki boşluklardan geçerek kolondan hızla ilerlerler;

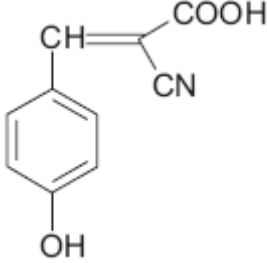
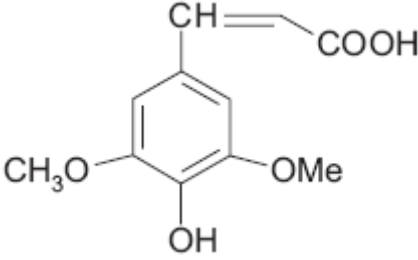
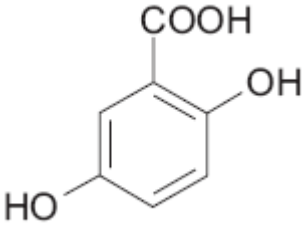
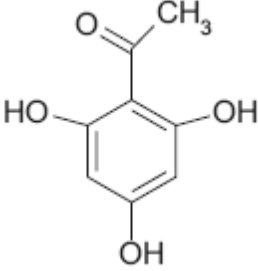
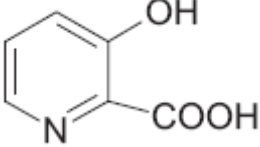
küçük moleküller ise gözeneklere girerler. Böylece moleküller küçüldükçe, artan bir alıkonma süresi ile kolondan çıkarlar.

Jel filtrasyonunda en geniş çapta kullanılan dolgu maddeleri; dekstran (sephadex), poliakrilamid (biogel P), dekstran-poliakrilamid (sephacryl), agaroz ve vinil türevleridir. Ayrılacak proteinlerin molekül ağırlıklarına bağlı olarak seçilecek matrikslerin türleri de değişir. Örneğin; ayrılacak proteinin ağırlığı 100 000 Da ise jel matriks sınırları 5 000 - 250 000 Da arasında seçilebilir. Bu yöntemde kullanılan tamponlar ise yüksek iyonik kuvvette olmamalıdır. Çünkü bazı proteinler iyonik etkileşimlerden dolayı belli koşullarda jel filtrasyonu materyaline adsorbe olabilmektedir. Ayrıca kullanılması gereken kolon boyu, çapının 20-40 katı olmalı ve uygulanacak örnek hacmi, kolon hacminin % 3'ünü geçmemelidir.

### **1.2.2.3. Kütle spektrometrisi (MS)**

Kütle spektrometrisi, manyetik veya elektriksel bir alanda hareket eden yüklü partikülleri kütle/yük ( $m/z$ ) oranlarına göre birbirlerinden ayırt ederek analizleme esasına göre çalışmaktadır. Son yıllarda MS ölçümleri köklü değişiklikler geçirdi. Yüksek duyarlılıkta ve robotlaşmada son noktaya ulaşmış bu yöntem; özellikle protein ve peptitlerin analizinde oldukça güvenilir bir yöntemdir ve 100 kDa veya daha üstü intak proteinlerin moleküler kütle ölçümlerini doğru olarak sağlayabilmektedir. MS, yıllardır yaygın olarak kullanılıyor olmasına karşın, proteinler ve nükleik asitler gibi makromoleküllerin analizinde uygulanamıyordu. Çünkü  $m/z$  ölçümleri, gaz fazındaki moleküllerde yapılır ve makromolekülün gaz fazına getirilmesi için yapılan gerekli ısıtma ve diğer işlemler molekülün hızla bozulmasına neden olurdu. 1988'de bu sorunu çözmek için iki farklı teknik geliştirildi. İlkinde, proteinler ışığı absorblayan bir matriks içine yerleştirildi. Kısa süreli lazer ışığı ile proteinler iyonize edildi ve sonra matriksten vakum sistemine emildi. Matriks destekli lazer desorpsiyon/iyonizasyon kütle spektrometrisi- MALDI-MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization- Mass Spectrometry) (Tanaka vd 1988, Karas ve Hillenkamp 1988) olarak bilinen bu uygulama düşük konsantrasyon ve düşük molekül ağırlıklı proteinlerin yüksek özgüllük ve duyarlılıkta ayrımını ve tayinini mümkün kılmaktadır.

Çizelge 1.2. Biyolojik uygulamalarda kullanılan matriksler

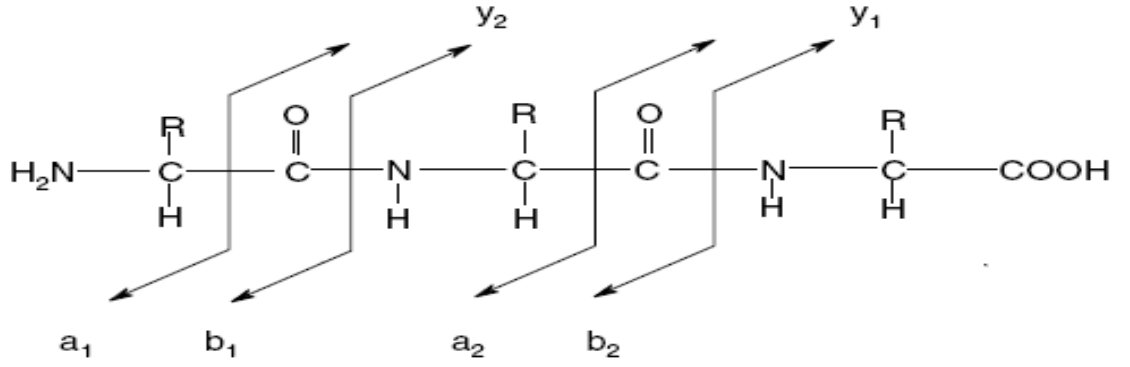
| Matriks                                                | Matriksin Yapısı                                                                     | Uygulama                                                                                       |
|--------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|
| $\alpha$ -siyano-4-hidroksi-sinamik asit               |    | UV lazer<br>Protein sindirilmesi ve peptid analizinde 10 kDa'dan küçük analitler için uygun.   |
| Sinapik asit<br>(4-hidroksi-3,5-dimetoksisinamik asit) |    | Büyük polipeptid ve proteinlerin analizinde kullanılır. 10 kDa'dan büyük analitler için uygun. |
| 2,5-Dihidroksibenzoik asit                             |   | UV lazer<br>Protein sindirilmesi ve glikoproteinlerden oligosakkaritlerin ayrılmasını sağlar.  |
| 2,4,6-trihidroksiasetofenon                            |  | UV lazer<br>Oligonükleotidler incelenebilir.<br>3 kDa'dan küçük olanlar için uygundur.         |
| 3-hidroksipikolinik asit                               |  | UV lazer<br>Oligonükleotidler incelenebilir.                                                   |

İkinci yöntemde ise, çözelti içindeki makromoleküllerin doğrudan sıvı fazdan gaz faza geçişi sağlanır. Analit çözeltisi yüksek bir elektriksel potansiyele sahip yüklü bir iğneden geçirilir. Böylece çözelti yüklü mikrodamları halinde ayırır.

Makromolekülleri çevreleyen çözelti hızla buharlaşır ve oluşan çok sayıda yüklü makromolekül iyonları bu şekilde zarar görmeden gaz faza geçmiş olur. Bu tekniğe, elektropüskürtme iyonizasyonu kütle spektrometresi – ESI-MS (Elektro Spray Ionization-MS) denir.

MS, çeşitli metotlar ile birbirinden ayrılan proteinlerin tanımlanması için kullanılmaktadır. Proteinlerin MS ile tanımlanması için iki temel yaklaşım vardır: Birinci yaklaşımda, saflaştırılmış bir protein enzimatik olarak parçalandıktan sonra, elde edilmiş olan peptit karışımı peptitlerine ayrılır ve sonra da kütleleri MS ile belirlenir. Daha sonra karışımdaki peptitlerin ölçülen kütleleri, bir proteinde bulunduğu düşünülen teorikçe türetilmiş peptit kütleleri ile kıyaslanarak protein tanımlanır. Bu yaklaşımda, başlangıçtaki örnekten çok fazla sayıda peptid türediğinden proteomiğin karmaşıklığını artırmaktadır. İkinci yaklaşımda ise önce protein MS ile belirlenir ve sonra eğer gerekli ise peptitler tanımlanır.

Peptitlerin sekansı yani dizi bilgileri, tandem MS veya MS/MS olarak bilinen bir teknik ile elde edilir. İlk analizatörde her peptidin moleküler ağırlıkları ölçülür ve bileşimleri belirlenir. İkinci analizatörde ise ilk ayırmada seçilen bir peptit aminoasitlerine ayrılır. Bu teknikte, iyonları özel m/z oranlarına göre seçebilmeyi sağlayan ve seçilen iyonu parçalamaya uygun donanımına sahip olan cihazlar kullanılır. İncelenecek proteini içeren çözelti önce bir proteazla veya kimyasal bir ajanla muamele edilir ve hidrolizle daha kısa peptitlerden oluşan bir karışım elde edilir. Bu karışım, tandemdeki iki kütle spektrometresinden oluşan bir cihaza enjekte edilir. İlkinde peptit karışımı ayrıştırılır ve iyonize fragmanlar, sadece ayrıştırmayla oluşturulan birkaç tip peptit diğer uçtan çıkacak şekilde yönlendirilir. Herhangi bir noktadan seçilmiş peptit örnekleri iki kütle spektrometresi arasındaki vakum bölmesi boyunca ilerler. Bu çarpışma hücrelerinde peptit bir 'çarpışma gazı' ile çarpışıp, yüksek enerjili çarpışma ile daha fazla fragmanlara ayrılır. Bu çarpışma gazı asal gazlardan oluşmaktadır. Bu işlem, örnekteki peptit moleküllerinin her birinin ortalama sadece bir alanda parçalanmasını sağlayacak şekilde tasarlanmıştır. Birçoğunun parçalanması peptit bağlarından olur ve ürünler karbonil radikalleri gibi moleküler iyon radikalleri içerir.



Şekil 1.5. Peptitlerin parçalanma şekilleri

İkinci kütle spektrometresinde tüm yüklü parçacıkların m/z oranı ölçülür ve sonuçta bir veya daha fazla tepe takımı oluşur. Bir tepe takımı aynı tip bağların kırılmasıyla ve aynı kırılan taraftan, karboksil veya amino terminal uçtan oluşan yüklü parçacıkları içerir. Bir takım içindeki her tepe kendinden bir önceki tepeden bir tane daha az sayıda aminoasit içerir. Tepeden tepeye kütlede oluşan farklılıklar her seferinde kaybolan aminoasidi tanımlar. Böylece peptid dizisi belirlenir.

### 1.3. İdrar Proteomiği

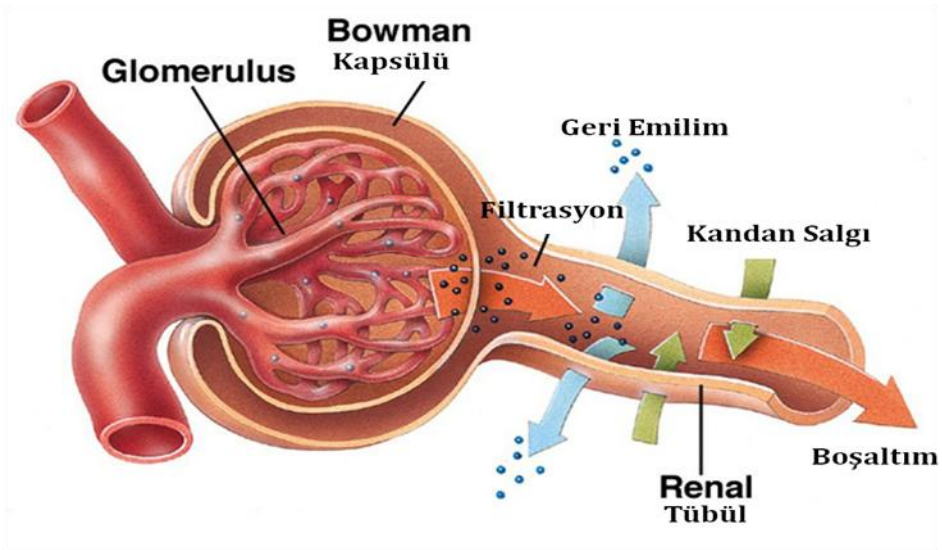
#### 1.3.1. İdrar oluşumu ve önemi

Böbreklerin görevi, hücrelerde oluşan ve kana verilen metabolizma artıklarını süzerek kandaki maddelerin belirli bir derişimde kalmasını sağlamaktır. Bunun için kan, böbreklerin idrarı oluşturan en küçük ünitesi olan nefronlarından geçerken süzülür. Nefronların glomerul yumağı, kanın filtre edildiğı (süzüldüğü), tübüller ise idrarın oluşturulduğı bölümdür. Nefronda; glomerüler filtrasyon, tübüler sekresyon ve tübüler geri emilim olayları gerçekleşir ve yararlı maddelerden geri kalan zararlı, faydasız ve artık maddelerin bulunduğu sıvı, idrar yolları ile dışarı atılır. Normal idrar bileşimi; % 95-96 oranında su, geri kalanı suda çözünmüş olarak bulunan inorganik katyon ve anyonlar ile organik maddelerden oluşur. Sonuç olarak; idrar son evrede çok fazla



protein, glikoz, lipit içermez. İnsanda günlük atılan protein miktarı yaklaşık 150 mg civarındadır.

İdrar, kanın süzülmesi sonucu meydana geldiğinden, kanın bileşiminde meydana gelebilecek herhangi bir değişim idrarı doğrudan etkiler. Dolayısıyla idrar, kolay bulunabilen ve vücut ile ilgili yararlı bilgiler içeren biyolojik bir sıvıdır. Özellikle idrarda oluşabilecek protein artışı; renal ve uregenital rahatsızlıklarla doğrudan ilişkilidir. İdrarda protein artışı; yani proteinüri, böbrek hastalıklarına eşlik eden en önemli patofizyolojik bozukluklardan birisidir. Proteinüriye en çok glomerüler geçirgenliğin artması ve tübüler reabsorpsiyonun azalması neden olur. Bunun dışında idrardaki protein çeşitliliği de nefropati hakkında önemli bilgiler verir. Bu nedenle idrarda proteomik çalışmaların yapılması, hastalıkların teşhisi için biyolojik işaretlerin (biyomarker) keşfedilmesinde de önemlidir.



Şekil 1.6. Nefronun Yapısı

### 1.3.2. Yapılan çalışmalar

Genetik bilgiler, genelde hastalıkların açıklanmasında başarılı bir şekilde kullanılabilmesine rağmen, normal fizyoloji ve doğrudan proteinlerle ilişkili hastalıkların mekanizmalarının açıklanmasında tam anlamıyla kullanılamaz. Ayrıca genomik analizler, translasyon sırasında ve sonrasında oluşan özellikle

posttranslasyonel modifikasyonlar gibi dinamik olayların açıklanmasında oldukça sınırlıdır. Bu nedenle proteomik teknolojisindeki son zamanlarda meydana gelen gelişmelere bağlı olarak; normal böbrek fizyolojisi, patofizyolojisi ve hastalıklar için biyomarker keşfi amacıyla yapılan çalışmalarda da ilerlemeler kaydedilmiştir.

Nefrolojide yapılan proteomik çalışmalar, dokuda ve biyolojik sıvıda olmak üzere, renal proteomik ve idrar proteomiği olarak sınıflandırılır. Bunlar, kullanılan yöntemler ve varılmak istenen amaçlar doğrultusunda farklılık gösterir. İdrar üzerine yapılan çalışmalarda da daha önce bahsedilen proteomik yöntemler kullanılmaktadır. Kütle spektrometrisindeki gelişmelerle beraber idrar proteomiğindeki gelişmeler de hız kazanmıştır. 2001'den bugüne kadar böbrek veya başka organlarla ilişkili biyomarker keşfi için yapılan 80'den fazla idrar proteomiği çalışması vardır. Bunların 1/3'lük gibi büyük bir kısmı 2006 yılı içerisinde yayınlanmıştır.

Normal idrar üzerine yapılan ilk proteomik çalışma 1979 yılındadır. Aynı yıl sağlıklı bir insanın idrar proteinleri 2 boyutlu jel elektroforezi ile birbirlerinden ayrılmış (Anderson vd 1979), 3 yıl sonra da aynı laboratuvar, bu proteinlerden bazı baskın idrar proteinlerinin birbirlerine göre duruş pozisyonlarını 2 boyutlu jel elektroforezi ile göstermiştir (Edwards JJ vd 1982). Fakat o yıllarda yöntemlerin tam olarak gelişmemiş olması, örnek hazırlama işlemlerinin standardizasyonunun düşük olması ve buna bağlı olarak analizlere, diğer moleküllerin girişim yapması gibi pek çok faktöre bağlı olarak yapılan jellerin tekrarlanabilirlikleri düşüktü. Bu nedenle 1979 – 2006 yılları arasında daha çok metod geliştirme ya da sağlıklı insanların idrar proteomlarının karakterizasyonu çalışmalarına ağırlık verilmiştir. Sonraki yıllardan itibaren ise böbrekle ilişkili olan veya olmayan çeşitli hastalıklar üzerine yapılan çalışmalar artmaya başlamıştır. Özellikle son zamanlarda biyomarker çalışmalarına ağırlık verilmiştir.

İnsan idrarı üzerine birçok çalışma yapılmasına rağmen, insanlar deneylerde kullanılamaz. Bu nedenle deneylerde hayvan modelleri kullanılır ve en çok kullanılan hayvan türlerinden biri sıçandır. Fakat sıçanlarda yapılan, özellikle proteomik yöntemlerin kullanıldığı çalışmalar oldukça sınırlıdır. Yapılan iki çalışmada; Cutler vd (1999) sıçan idrarında sadece 6 protein spotu bulmuştur, Wait vd (2001) ise 37 protein

gözlemleyebilmiştir. Bu çalışmalarda sıçan idrar proteinlerinin izolasyonları için, çöktürmede organik çözenler ve liyofilizasyon kullanılmıştır. Başka bir çalışmada ise Sprague-Dawley (SD) türü sıçanın idrar proteom haritasını belirlemek amacıyla proteinlerin izolasyonu için ultrasantrifüj kullanılmıştır (Thongboonkerd vd 2003). Asetonla çöktürme ile asidik ve hidrofobik proteinler izole edilebilirken, ultrasantrifüj ile tersine bazik ve hidrofobik proteinler izole edilir. Bu çalışmada elde edilen 350 protein spotundan 111 tanesi tanımlanmış ve bunlar şaperonlara, enzimlere, sinyal proteinlerine, feromon bağlayan proteinlere ve reseptörlere karşılık gelmiştir. Bu proteinlerden 4 tanesi ise bu projede de incelenen  $\alpha 2u$ -globulin olarak bulunmuştur.

Sıçan idrar çalışmalarında en fazla ön plana çıkan proteinlerden birisi  $\alpha 2u$ -globulin'dir. Çünkü sıçan idrarında diğer proteinlere oranla  $\alpha 2u$ -globulin, miktarda en fazladır ve idrardaki miktarı böbrek hastalıklarıyla doğrudan ilişkilidir.

#### **1.3.2.1. $\alpha 2u$ -globulin protein ailesi**

İnsan idrarında yüksek miktarda protein bulunması, her zaman uregenital organlarla ilişkili ciddi bir patolojik durumun göstergesi olarak düşünülmüştür. Bu nedenle 1827'den beri doktorlar ve bilim insanları proteinürinin tam olarak aydınlatılması ile ilgilenmişlerdir. Bu bağlamda 1932 ve 1933 yılları arasında, proteinürinin nedenleri üzerine yapılan bir araştırmada sağlıklı laboratuvar hayvanlarının idrarında protein olduğu görülmüştür (Addis 1932, Bell 1933, Parfentjev vd 1933). Bu nedenle 1960'lara kadar sıçanlarda ve farelerde normal durumlarda bulunan bu proteinlerin detaylı araştırması yapılmış ve yüksek oranda işlevleri anlaşılmıştır. Bu proteinlerin canlıda herhangi bir hastalık göstergesi olmadığı, hatta biyolojik bir zorunluluk olduğu ve sıçan, fare, hamster, köpek ve orangutan gibi hayvanların idrarında yüksek miktarda bulunduğu görülmüştür. Daha sonraları düşük molekül ağırlıklı bu proteinler genel anlamda 'Ana İdrar Proteinleri (Major Urinary Proteins-MUP) olarak isimlendirilmiştir (Cavaggioni ve Caretta 2000).

Bu proteinlerin türler arasındaki kimyasal iletişimde rol oynadığı yapılan araştırmalarla ortaya konmuştur (Dominic 1991). Ayrıca bu proteinlerin feromon üreten

hücrelerde de gözlenmesi, proteinlerin düşük molekül ağırlıklı feromonların bağlanmasından ve salınımlarından sorumlu olduğunu düşündürmektedir (Lehman-Mckeeman 1992). İdrar veya idrarın kokusu ile hayvanlar arasındaki iletişim sağlanarak sosyal davranışlar düzenlenmektedir. Aynı cinsiyetteki bireyler arasında hiyerarşideki konum, liderlik yarışı, bölgesel alan hakimiyeti gibi durumlar idrar ile atılan koku verici maddeler ile belirtilmektedir. Farklı cinsiyetteki bireyler arasında ise özellikle çiftleşme dönemlerinde idrar ve idrardaki kokular karşı cinsi etkilemek amacıyla kullanılmaktadır. Dolayısıyla bu protein koku işaretlerinin uçucu komponentlerinin yavaş salınımlarını sağlıyor olabilir. Feromonlar, aynı türlerin bireyleri arasında doğal davranışların tetiklenmesi için salınırlar. Bu nedenle bu proteinlere, kemirgenler arasındaki sosyal davranışların düzenlenmesi için kemo-iletişimde önemli bir rol oynadıkları düşünülerek ‘feromon taşıyıcı proteinler’ de denilmiştir (Hurst vd 1998).

Salınım amaçları yukarıdaki gibi olan bu proteinlerin isimlendirilmeleri, türden türe farklılık göstermektedir. Örneğin; domuzlarda bu proteinler feromaksin (Austin vd 2004) olarak isimlendirilirken, hamstırlarda afrodisin (Tegoni vd 2000) olarak, sıçanlarda ise  $\alpha$ 2u-globulin (Bocskei vd 1992, Saito vd 2000) olarak isimlendirilmektedir.

$\alpha$ 2u-globulin proteininin isminde bulunan ‘u’ harfi idrarda bulunmasından dolayı İngilizce ‘urinary’ kelimesinin baş harfinden gelmektedir. Bu protein, ilk olarak 1966’da olgun erkek sıçanların idrarında bulunduğu ve karaciğerde sentezlendiği bulunmuş ve kana geçen proteinin kandan idrara salındığı görülmüştür (Roy vd 1966).

Proteinin ifadesi; sıçanlarda başta cinsiyet olmak üzere; yaş, tür gibi faktörlere bağlıdır. Başlangıçta dişi sıçanlarda bu proteinin plazmada ve idrarda bulunmadığı öne sürülmüştür (Sippel vd 1975, Chan vd 1978). Fakat yapılan bir çalışmada erkek sıçan idrarında  $\alpha$ 2u-globulin derişimi yaklaşık 1 mg/ml, dişilerde ise yaklaşık 10  $\mu$ g/ml olarak bulunarak dişilerde de bu proteinin bulunduğu kanıtlanmıştır (Vandoren vd 1983). Aynı çalışmada,  $\alpha$ 2u-globulin’in baskın izoformunun pI değeri, erkek sıçan idrarında 5,3, dişilerde ise 4,6 olarak gözlenmiştir. Bu izoformların molekül ağırlıkları ise erkek sıçanlarda yaklaşık 20 kDa iken, dişi sıçanlarda yaklaşık 18,6 kDa olarak bulunmuştur.

Bir çalışmada (Roy vd 1983)  $\alpha$ 2u-globulin miktarının karaciğerde; ergenlik dönemine girmemiş erkek sıçanlarda, genç ergin sıçanlarda bulunan miktardan 100 kat daha az olduğu ve bu proteinin ifadesinin yaklaşık 6. haftada başlamakta olduğu, 12. haftada da maksimum seviyeye ulaştığı ifade edilmektedir. Yaşlanma ile beraber (5. aydan itibaren) bu proteinin seviyesinde büyük bir düşüş görülmektedir. Aynı çalışmada  $\alpha$ 2u-globulin mRNA'sının translasyonel ürünlerinin moleküler ağırlıklarının 18,8 ve 18,1 kDa olduğu görülmüştür. Ayrıca bu ürünlerin % 3'ü glikolizasyona uğramıştır. Dönemsel olarak izlenen erkek sıçan  $\alpha$ 2u-globulin mRNA'larının farklı izoformlar kodladıkları ve yaşlanmaya kadar olan süreçte bu izoformların sürekli değiştiği görülmüştür. Bu da  $\alpha$ 2u-globulin'in genlerinin ifadelerinin farklı zamanlarda gerçekleştiğini ve bunların ifadeleri için farklı regülatör maddelerin işlev gördüğünü düşündürmektedir.

Yetişkin sıçanların karaciğerinde, albumin mRNA'sından sonra en yüksek mRNA seviyesinin  $\alpha$ 2u-globulin'e ait olduğu (Sippel vd 1976) ve yetişkin bir sıçanın günde ortalama 50 mg  $\alpha$ 2u-globulin ürettiği bulunmuştur (Lehman-Mckeeman 1992). Günlük olarak üretilen bu miktarın tamamına yakını böbrekler tarafından filtre edilmekte ve % 60'luk bir kısmı geri emilmektedir. Atılan miktar, toplam üretilen  $\alpha$ 2u-globulin'in yaklaşık % 35'ine karşılık gelmektedir. Yani, yetişkin bir erkek sıçan, günde ortalama 20 mg  $\alpha$ 2u-globulin'i idrar ile dışarı atmaktadır.

Erkek sıçanlarda  $\alpha$ 2u-globulin, proteinlerinin kaynağı, karaciğer olmasına rağmen dişilerde karaciğerde sentezlenmemektedir ve az miktarda tükürük bezinde üretilmektedir. Bir çalışmada sıçanların çeşitli dokuları üzerine yapılan elektroforetik analizlerde; bu proteinin sadece idrarda değil farklı dokularda da hem izoelektriksel nokta olarak, hem de molekül ağırlık olarak pek çok farklı izoformdan meydana geldiği görülmüştür (Macinnnes vd 1986). İki boyutlu jel elektroforez metodu ile çeşitli sıçan dokularında multi  $\alpha$ 2u-globulin izoformları bulunmuştur. Tükürük bezi, gözyaşı bezi, meme süt bezi ve hipofiz bezleri ile hazırlanan örnekler kullanılarak yapılan jellerde, 7-18 arasında değişen izoformların pI değerleri 4,5 ile 7,9 arasında bulunmuştur. Ayrıca ergin olmayan erkek sıçanların ve dişilerin karaciğerinde  $\alpha$ 2u-globulin mRNA'sı bulunamamıştır. 35 günlük sıçanlarda düşük düzeyde  $\alpha$ 2u-globulin mRNA'sı

gözlenmişken, 60 günlüklerde maksimum düzeyde bulunmuştur. Buna karşın tükürük bezinde 10 günlük erkek ve dişi sıçanlarda bile  $\alpha 2u$ -globulin mRNA'sı bulunmuştur. Ayrıca tükürük bezinde 30 günde proteinin ifadesi maksimum seviyeye çıkmaktadır ve iki cinsiyette de  $\alpha 2u$ -globulin'in ifadesi benzer şekilde olmasına rağmen, ergenlikle beraber bu proteinin mRNA'sının ifadesinde beklenmedik bir şekilde düşme gözlenmiştir. Bu durum fare MUP'unda da aynı şekilde gözlenmektedir. Gözyaşı bezinde ise gözlenen izoformlar tükürük beziyle aynı olmasına rağmen proteinin ifadesinin düzenlenmesi oldukça farklıdır ve cinsel olgunluğa ulaşılmasıyla proteinin ifadesinde az miktarda artma olmaktadır.

$\alpha 2u$ -globulin protein ailesinin ifadesi, birçok farklı hormonun kontrolü altındadır. Androjen ve glukokortikoidler bu proteinin üretimini önemli derecede arttırmaktadır. Östrojen ise üretimini oldukça baskıladığı düşünülmektedir (Roy vd 1975, Kurtz vd. 1978, Feigelson vd 1978). Tiroid, insülin ve büyüme hormonları ise proteinin optimum ifadesi için gereklidir (Roy vd 1973, Kurtz vd. 1976, Roy vd 1980, Lynch vd 1982). Cinsiyet hormonlarının bu proteinin ifadesi üzerindeki etkilerinin araştırılması için yapılan bir çalışmada (Vandoren vd 1983), erkek sıçanlara östrojen uygulaması yapılmış ve  $\alpha 2u$ -globulin düzeyinde düşüş gözlenmiştir. Dişilere yapılan androjen uygulaması sonucunda ise  $\alpha 2u$ -globulin düzeyinde artış gözlenmiştir. Ayrıca ergin erkek sıçanlara östrojen uygulaması veya kastrasyon yapılması serumda  $\alpha 2u$ -globulin düzeyini önemli derecede düşürdüğü bilinmektedir (Kulkarni vd 1985). Buda gösterir ki, cinsiyet hormonları bu proteinin ifadesinde en önemli unsurlardır. Bu nedenle östrojenik kimyasalların aktivitelerinin araştırılmasında veya endokrin sistemin yıkımı üzerine yapılan araştırmalarda  $\alpha 2u$ -globulin önem kazanmaktadır.

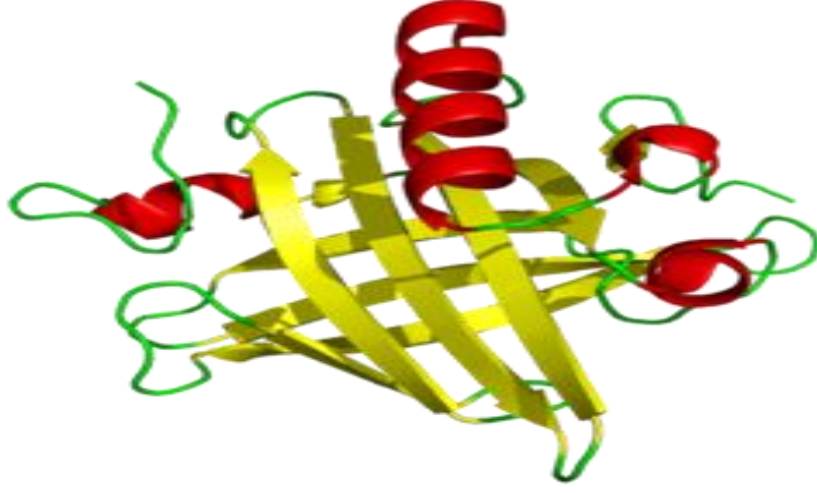
$\alpha 2u$ -globulin, ligand bağlayan düşük molekül ağırlığa sahip lipokalin olarak adlandırılmış protein süper ailesinin bir üyesidir. Bu proteinlerin yapısında, zincirin farklı bölgelerindeki 8  $\beta$ -tabakalı yapının bir araya gelmesiyle bir  $\beta$ -fiçisi meydana gelmektedir ve merkezde bulunan özellikle triptofan ve hidrofobik aminoasitler sayesinde hidrofobik karakterli bir cep oluşmaktadır (Cavaggioni ve Mucignat-Caretta 2000). Dolayısıyla  $\alpha 2u$ -globulinler, düşük molekül ağırlıklı apolar maddeleri yüksek bir afinite ile hidrofobik ceplerine bağlamaktadırlar. Bağladıkları maddeler arasında ( $10^4$ -

$10^5 \text{ M}^{-1}$  aralıkta bir afinite ile) uçucu feromonlar haricinde birçok bileşik de yer almaktadır.

Çeşitli çalışmalarda farklı bileşiklerin bu proteine bağlanması ile ortaya çıkabilecek sonuçlar araştırılmıştır. Endüstriyel ve çevresel kimyasallar diye adlandırılabilen bazı toksinlerin ve aslında tek başına zararlı olmayan küçük molekül ağırlıklı birçok farklı bileşiğin ergin erkek sıçanlara uygulanmasıyla böbreklerde ' $\alpha 2u$ -globulin nefropatisi' olarak adlandırılan toksik sendromun meydana geldiği gözlenmiştir. d-Limonen, 1,4-diklorobenzen, dietilasetil üre, araba yakıtları (benzin, dizel, vb) gibi kimyasalları bu proteinin bağlayabildiği gösterilmiştir (Borghoff vd 1990). Ayrıca metil izobutil keton (Borghoff vd 2009) ve Dekalin (dekahidronaftalin) (Jeffrey vd 2003) uygulaması yapılan erkek sıçanların böbreklerinde,  $\alpha 2u$ -globulin nefropatisi gözlenmiştir. Dişi sıçanlarda ve ergin olmayan erkek sıçanlarda ise  $\alpha 2u$ -globulin azlığından dolayı nefropati gözlenmemiştir. Yakın bir zaman önce de,  $\alpha 2u$ -globulinin bağlayabildiği maddeler arasına hayvan ve insan beslenmesinde kullanılan tahıl ürünleri ile alınabilen Okratoksin A da eklenmiştir ve bu toksinin erkek sıçanlarda vücuttan atılımının  $\alpha 2u$ -globulin ile gerçekleştiği gösterilmiştir (Mantle 2008).

$\alpha 2u$ -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 edilmektedirler. 1989'da (Kimura vd) ergin erkek sıçanın böbreklerinden alınan moleküler ağırlığı 15,5 kDa olan yağ asidi bağlayıcı bir proteinin dizisinin  $\alpha 2u$ -globulin'in modifiye olmuş bir formu olduğu bulunmuştur. Normalde böbreklerde  $\alpha 2u$ -globulin mRNA'sı ifade edilmemektedir. Bundan dolayı karaciğerde üretilen  $\alpha 2u$ -globulin'in salgılandıktan sonra kanda veya böbreklerde işlendiği veya parçalara ayrıldığı düşünülmektedir. Sıçanlar aynı zamanda 13 adet pseudo yani aktifliğini kaybetmiş  $\alpha 2u$ -globulin geni de bulundurmaktadır. Farelerde ise 4. kromozomda bulunan toplam 42 adet  $\alpha 2u$ -globulin geni vardır ve bunların yalnızca yarısı aktif şekildedir. Bu kemirgenlerde böbrek tümörlerine rastlanılmamaktadır. Çünkü fare ve sıçan proteinlerinin formları birbirlerinden farklıdır ve bu formların maddeleri farklı bağlama özellikleri vardır. Sıçan ve farelerden başka domuzda ve orangutanda aktif bir

adet  $\alpha$ 2u-globulin geni varken, atta 3 adet aktif gen bulunmaktadır. İnsanda ise 1 adet aktifliğini yitirmiş  $\alpha$ 2u-globulin geni vardır. Yani bu proteinin insanda ifadesi yoktur (Logan vd 2008).



Şekil 1.7. Ana idrar proteinlerinin genel tersiyer yapısı

#### 1.4. Çalışmanın Amacı

Bu çalışmanın amacı, sıçanların idrarında yüksek oranda bulunan  $\alpha$ 2u-globulin'in izoformlarının Wistar tipi erkek sıçan idrarındaki çeşitliliğinin araştırılmasıdır. İzoformların birbirlerinden ayrılmasında kromatografi ve elektroforez yöntemleri kullanılacaktır. 2 boyutlu jel elektroforezi ile birbirinden ayrılan protein spotlarının MALDI-MS kullanılarak kütle incelemeleri yapılacak ve  $\alpha$ 2u-globulin'in çeşitliliği anlaşılmasına çalışılacaktır.



## 2. MATERYAL ve METOD

### 2.1. Materyal

#### 2.1.2. İdrar örnekleri

Bu çalışmada kullanılan sıçan idrarları, Yrd.Doç. Dr. Firdevs Mor'un yürütücülüğünü üstlendiği; 'Wistar erkek sıçanın yaş ve testise bağlı  $\alpha_2$ -globulin protein düzeyinin belirlenmesi' adlı projesi kapsamında Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları Ünitesi'nden sağlanan sıçanlardan elde edilmiştir. Bu idrarlar, gece boyunca (yaklaşık 16 saat) metabolik kafeslerde tutulan 10 haftalık erkek sıçanlardan toplanmıştır.

#### 2.1.2. Kimyasallar

AGARUZ (PEQLAB), 2. boyutta kullanıldı.

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

AMPHOLYTE (2,0-4,0) (FLUKA), 1. boyutta taşıyıcı amfolit olarak kullanıldı.

AMPHOLYTE (3,0-10) (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 (ALDRİCH), jel polimerizasyonunda katalizör olarak kullanıldı.

ASETİK ASİT (İSOLAB), gümüş boyamada kullanıldı.

BİSAKRİLAMİD ultra pure grade (AMRESCO), ikinci boyutta çapraz bağlayıcı olarak kullanıldı.

BOVİN SERUM ALBUMİN (AMRESCO), protein miktar tayininde kullanıldı.

DECONEX (MERCK), kapiler tüplerin temizlenmesinde kullanıldı.

DTT %99.4 BIOTECHNOLOGY GRADE (AMRESCO), örnek hazırlamada ve 1. boyutta kullanıldı.

EDTA TITRİPLEX %99.0-101.0 (MERCK), gümüş boyamada kullanıldı.

ETANOL, gümüş boyamada kullanıldı.

ETİLEN DİAMİN %99.0 (MERCK), 1. boyutta kullanıldı.

FORMALDEHİD %37 (MERCK), gümüş boyamada kullanıldı.  
FOSFORİK ASİT %85 (MERCK), 1. boyutta kullanıldı.  
GLİSEROL anhydrous pure %99.0-100.5 (MERCK), 1. ve 2. boyutta kullanıldı.  
GLİSİN biotechnology grade %99.5 (AMRESCO), 2. boyutta kullanıldı.  
GLUTARALDEHİD %25 (MERCK), gümüş boyamada kullanıldı.  
GÜMÜŞ NİTRAT %99.8-100.5 (MERCK), gümüş boyamada kullanıldı.  
MARKER prestained SDS jel standart broad range (BİORAD), karşılaştırma yapılan jellerde kullanıldı.  
METANOL (ISOLAB), CBB boyamada kullanıldı.  
PİPERAZİN DİAKRİLAMİD %99.0 (BİO-RAD), 1. boyutta çapraz bağlayıcı olarak kullanıldı.  
SODYUM DODESİL SÜLFAT (SERVA), 2.boyutta kullanıldı.  
SODYUM ASETAT 3H<sub>2</sub>O %99 (MERCK), gümüş boyamada kullanıldı.  
SODYUM AZİD, idrarların toplanması sırasında kullanıldı.  
SODYUM HİDROJEN KARBONAT (MERCK), gümüş boyamada kullanıldı.  
SODYUM KARBONAT susuz %99.9 (MERCK), gümüş boyamada kullanıldı.  
SODYUM TİYOSÜLFAT 5H<sub>2</sub>O %99 (FLUKA), gümüş boyamada kullanıldı.  
TEMED (BİO-RAD), 1. ve 2. boyutta kullanıldı.  
TİMEROSAL (MERCK), gümüş boyamada kullanıldı.  
TRİPSİN proteomics grade (SİGMA), kütle analizlerinde kullanıldı.  
TRİS-BAZ %94 (SİGMA), 1. boyutta kullanıldı.  
TRİS-HCl %99.9 ultra pure grade (AMRESCO), 2.boyutta kullanıldı.  
ÜRE granüllü %98 (SİGMA), örnek hazırlamada kullanıldı.  
ÜRE %99 (MERCK), örnek hazırlamada, 1. ve 2. boyutta kullanıldı.

## **2.2. Metot**

### **2.2.1. İdrarların toplanması**

Sıçanların idrarlarını toplamak amacıyla metabolik kafesler kullanıldı. Bu amaçla 3 sıçan akşamüzeri, metabolik kafeslere koyuldu ve idrarlarda bakteri üremesini engellemek amacıyla idrarların toplanacağı tüplere 1 ml 1 mM'lık sodyum azid (1 M'lık

Tris içinde, pH: 6,8) eklendi. Yaklaşık 16 saat boyunca toplanan idrarlar, 5 000 g'de katı partikülleri çöktürmek amacıyla santrifüj edildi. Daha sonra kullanılıncaya kadar -40 °C'de saklandı.

### **2.2.2. Kromatografi işlemleri**

Sıçan idrarındaki  $\alpha$ 2u-globulin proteininin saflaştırılması için kromatografik yöntemler kullanılmıştır. Önce jel filtrasyon, ardından iyon değişim kromatografisi uygulanmıştır. Bu işlemler sonucunda elde edilen fraksiyonların SDS-PAGE jelleri yapılmış, görüntüler incelenmiş ve sonuçta uygulanan kromatografik metotlar sonucunda elde edilebilen protein izoformları belirlenmiştir.

#### **2.2.2.1. Jel filtrasyon kromatografisi**

Jel filtrasyon kromatografi kolonunun özellikleri ve yürütme koşulları aşağıdaki gibidir.

Kullanılan Cihaz: AKTAdesign sistem (Amersham Biosciences)

Kolon Dolgu Maddesi: Sephacryl (dekstran-poliakrilamid) 300 High Resolution (Amersham Biosciences)

Kolon: 100 cm x 2,5 cm (Amersham çift tarafı piston kol ayarlamalı cam kolon, reçine yüksekliği - 90cm)

Yüklenen Örnek Hacmi: Maksimum 1,5 ml

Yürütme Tamponu: 20 mM Tris - HCl (pH: 7,4)

Akış Hızı: 2ml/dk

Fraksiyon Hacmi: 4ml

2 adet erkek sıçanın idrarı alınarak birleştirildi. Konsantrasyon tüpleriyle yaklaşık 10 ml olan idrar hacmi 1,5 ml'ye indirildi. Kolon önce yürütme tamponuyla yıkandı ve aynı tampon ile şartlandırıldı. Pürifikasyon sisteminin UV okuyucuları 215, 280 ve 340 nm olarak üç dalga boyuna ayarlandı ve yukarıdaki koşullar kullanılarak örnek kolona yüklendi. Yürütme sonunda elde edilen protein spektrumuna göre proteince yoğun olan

fraksiyonlar belirlendi ve bu fraksiyonlardan 20 µl SDS-PAGE'de yürütüldü. Jel filtrasyon sonunda elde edilen proteince yoğun fraksiyonlar, iyon değişim kromatografisine yüklenmek üzere birleştirildi.

#### **2.2.2.2. İyon değişim kromatografisi**

İyon değişim kromatografi kolonunun özellikleri ve yürütme şartları aşağıda verildiği gibidir.

Kullanılan Cihaz: AKTAdesign sistem (Amersham Biosciences)

Kolon Matrisi: Q-Sepharose Fast Flow (Amersham Biosciences)

Kolon: 10 ml'lik kolonda, reçine yüksekliği -2 cm

Yürütme Tamponu A: 20 mM Tris-HCl (pH:7,4)

Ayrırma Gradiyenti Tamponu B: 800 mM NaCl içeren 20 mM Tris-HCl (pH:7,4)

Fraksiyon hacmi: 4 ml

Yükleme hızı: 2 ml/dk

İyon değişim matrisi kolon içine paketlenen sonra 200 ml yürütme tamponu ile yıkandı. Örnek kolona yüklendikten sonra dolgu maddesine bağlanan molekülleri geri almak amacıyla 0 mM'dan 800 mM'a tuz gradiyenti başlatıldı. Pürifikasyon sistemi 0 mM'dan 800 mM NaCl derişimine 60 dakikada gelmesi için programlandı. Tuz gradiyentine bağlı olarak kolondan çıkan moleküllerin fraksiyon tüpleri eş zamanlı olarak takip edildi ve otomatik fraksiyon kolektörü vasıtasıyla 4 ml'lik örnekler halinde toplandı. Örneklerin toplanmasından sonra fraksiyon örnekleri SDS-PAGE'de yürütülüp, α<sub>2</sub>u-globulin içeren fraksiyonlar tespit edilerek yorumlandı.

#### **2.2.3. Elektroforez işlemleri**

Hazırlanan örnekler kullanılarak, istenilen amaçlara göre örneklerin tek boyutlu ve iki boyutlu jelleri yapılmıştır.

### 2.2.3.1. Örneklerin hazırlanması

Bu çalışmada kaç haftalık sıçan idrarının kullanılacağı, dişi erkek sıçan arasındaki nitel  $\alpha$ 2u-globulin protein miktar farklılığının ne olduğu gibi sorulara cevap aramak amacıyla iki boyutlu jel elektroforezinden önce ön deneme amaçlı %15'lik SDS-PAGE jelleri yapılmıştır.

#### **Tek boyutlu jel elektroforezi için örnek hazırlama:**

Erkek sıçan idrarındaki  $\alpha$ 2u-globulin yoğunluğu fazla olduğundan (CBB boyamanın tayin limitinin çok üzerindedir), ön deneme çalışmalarında erkek sıçan idrarı herhangi bir işleme tabi tutulmadan doğrudan SDS-PAGE jeline uygulanmıştır. Dişi sıçan idrarı ise  $\alpha$ 2u-globulin yönünden oldukça seyreltiktir. Bu nedenle ön deneme çalışmalarında dişi idrarları, genelde 5 kat konsantre edilerek kullanılmıştır.

#### **İki boyutlu jel elektroforezi için örnek hazırlama:**

Sıçanlardan toplanan idrarlar yaklaşık 6-7 ml civarındadır. 1. boyutta kullanılan kapiler tüplere az miktarda örnek yüklenebildiğinden, idrarların konsantre olmaları gerekmektedir. İdrarları konsantre etmek için konsantrasyon tüpleri kullanılmıştır (5 000 Da por büyüklüğüne sahip). Bunun için başlangıçta idrarlar, içlerindeki 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. Daha sonra konsantre edilmiş idrarlara, hacimlerinin % 108'ü kadar üre, % 10'u kadar 1,4 M'lık DTT, % 10'u kadar % 40'luk 2-4 amfolit 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.

### **Protein miktar tayini:**

İdrarların protein konsantrasyonları, Bradford yöntemi (Bradford 1976) kullanılarak hesaplanmıştır. Bu yöntem organik boyaların, proteinlerin asidik ve bazik gruplarıyla etkileşerek renk oluşturmaya dayanır. Boya-bağlama temelli yöntemlerden en yaygını Bradford yöntemidir ve metot oldukça duyarlıdır (5-100 µg protein/ml). Organik boya olarak Comassie Brilliant Blue G-250 boyarmaddesi kullanılır. Örneklerin konsantrasyonları, proteinin aminoasit bileşimine bağlı olarak (özellikle arginin gibi bazik aminoasitler ile aromatik aminoasitler) oluşan ve 595 nm'de absorban veren mavi rengin ölçümü esasına göre belirlenir.

Yöntemde öncelikle CBB G-250 boyarmaddesini içeren tampon çözelti 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 kâğıdından geçirildi. Daha sonra belli standart derişimlerde hazırlanan Bovine Serum Albumin çözeltilerinden 100'er µl alınıp üzerlerine 1 ml CBB tamponu eklenerek 595 nm'de absorban ölçümleri alındı ve elde edilen verilere göre kalibrasyon grafiği çizildi. Aynı şekilde idrar örneklerinin de absorban değerleri UV-Vis spektrofotometresinde ölçüldükten sonra, kalibrasyon grafiğinden örneklerin protein konsantrasyonları hesaplandı.

### **2.2.3.2. Tek boyutlu jel elektroforezi**

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

### **Örnek yükleme tamponu**

|         |                              |
|---------|------------------------------|
| 1,25 ml | 200 mM Tris-HCl (pH: 6,8)    |
| 3,55 ml | Deiyonize su                 |
| 2,5 ml  | Gliserol                     |
| 2 ml    | % 10 (w/v) SDS               |
| 0,2 ml  | % 0,5 (w/v) Bromfenol Mavisi |
| 0,5 ml  | $\beta$ -Merkaptoetanol      |

Toplam 10 ml'lik stok 500  $\mu$ l'lik aligotlar halinde -20 °C'de saklandı.

### **Yürütme tamponu**

|         |                    |
|---------|--------------------|
| 30,3 gr | (250 mM) Tris Bazı |
| 144 gr  | (250 mM) Glisin    |
| 10 gr   | (% 1) SDS          |

Yukarıda belirtilen miktarlardaki kimyasallar alınarak deiyonize su ile 1 lt'ye tamamlandı ve oda sıcaklığında saklandı. Bu tampon 10x şeklinde hazırlanmıştır. % 10 seyreltilerek kullanılmıştır.

### **% 15'lik SDS-PAGE jeli**

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

İlk olarak aşağıda belirtildiği şekilde ayrıştırma jeli hazırlandı. Hazırlanan ayrıştırma jeli, % 70'lik alkol ile temizlenmiş iki cam plaka arasına hava kabarcığı oluşmamasına dikkat edilerek döküldü. Jel polimerleştikten sonra kuyucuk aparatı (tarak) yerleştirildi. Hazırlanan yükleme jeli, ayırma jelinin üzerine döküldü ve polimerleşmesi beklendi. Polimerleşme sonunda sistem yürütme tamponu varlığında yürütme tankına yerleştirildi. SDS-PAGE jeline yürütülecek örnekler, örneğin 1/4'ü oranında örnek yükleme

tamponu ile karıştırılarak 5 dk kaynatıldı. Süre sonunda örnekler kuyucuklara yüklenerek 20 mA 100 V'da yaklaşık 3 saat yürütüldü.

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

| Ayrıştırma (Resolving) Jeli (10 ml) |                          | Yükleme (Stacking) Jeli |                          |
|-------------------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|
| 3,4 ml                              | Deiyonize su             | 2,4 ml                  | Deiyonize su             |
| 5 ml                                | Akrilamid/Bis (%30'luk)  | 0,83 ml                 | Akrilamid/Bis (% 30'luk) |
| 2,5 ml                              | 1,5 M Tris-HCl (pH: 8,8) | 0,63 ml                 | 1M Tris-HCl (pH: 6,8)    |
| 100 µl                              | % 10'luk SDS             | 50 µl                   | % 10'luk SDS             |
| 150 µl                              | % 10'luk APS             | 75 µl                   | % 10'luk APS             |
| 5 µl                                | TEMED                    | 5 µl                    | TEMED                    |

### 2.2.3.3. İki boyutlu jel elektroforezi

İki boyutlu jel elektroforezinde izoelektrik odaklama için hem küçük (9 cm) hem de büyük kapiler tüpler (20 cm) kullanılmıştır. İzoelektrik odaklamasında büyük kapiler tüplerin kullanıldığı 1. boyut jelleri 3 adet küçük 2. boyut jeli olacak şekilde kesilerek 2. boyut işlemlerine tabi tutulmuştur (Klose and Kobalz, 1995)

**Birinci boyut-izoelektrik odaklama:** Cam kapiler tüplerde ayırma jelinin(seb-jel) ve şapka jelinin(cape-jel) çekileceği noktalar işaretlendi. Küçük jel yapımında kullanılan kapiler tüplerin boyu 9 cm iken, büyük jel yapımında kullanılanlar 20 cm'dir. Borulu şırıngalar örneğin konacağı uca takıldı. Gerekli miktarda ayırma jeli ve APS çözeltisi buzdolabından alındı ve çözündürüldü. Çözündürülen ayırma jeli degaze edildi. Ayırma jelinin bileşimi, 9 M üre, % 5 gliserin, % 4 akrilamid stok çözeltisi, % 4 taşıyıcı amfolit karışımı ve % 0,06 TEMED' den oluşur. Degaze işlemi yaklaşık 4 dak sürdü. Degaze edilmiş jel çözeltisine gerekli miktarda % 0,8'lik APS çözeltisi eklendi. Polimerleşmeye hazır olan çözelti kapiler çubuklara çekildi. Kapiler tüpler yaklaşık 30 dakika bu şekilde bekletilerek çözeltilerin polimerleşmeleri sağlandı. Polimerleşme tamamlandıktan sonra



kapiler tüplerin şapka çözeltisinin konulacağı uçta oluşan polimerizasyon suyu şırınga kullanılarak dikkatlice alındı. Ayırma jelinin alt kısmına polimerleştirilen şapka jelinin bileşimi ise, 9 M üre, % 5 gliserin, % 20 akrilamid stok çözeltisi, % 1 amfolit karışımı ve % 0,06 TEMED' den oluşur. Şapka jeli çözündürüldü ve degaze edildi. Uygun miktarda % 0,8'lik APS şapka jeline eklendi. Hazırlanan şapka jeli şırınga ile alındı ve hızlı bir şekilde ayırma jellerinin üzerine hava kabarcığı oluşturulmamasına dikkat edilerek kapiler tüplerin ucuna kadar dolduruldu. 30 dakika polimerleşmesi için beklendi. Polimerleşmeler tamamlandıktan sonra şapka jeli ucuna büyük bir su damlası damlatıldı ve parafilm ile kapatıldı. Kapillerlerin diğer ucuna da su dolduruldu. Bu uçlar da parafilm ile kapatıldı. Jelli kapiler tüpler yatay bir şekilde karanlıkta ve oda sıcaklığında saklandı. Kısa kapilerler jellerin çekilmesinden sonra ertesi gün IEF için kullanılabilirler ve en fazla üç gün saklanabilirler. Uzun kapiler tüpler ise içlerindeki jellerin tamamen polimerleşmesi için en az üç gün bekletilmeliler.

Kapiler tüplerin içerisine örnek yüklemeyen önce ayırma jelinin üst kısmına 5 µl Sephadex çözeltisi konuldu. Bu çözelti için 20 gr Sephadex G-200 5 saat boyunca 90 °C'de 500 ml destile suda bekletildi. Süpernatant dekante edilerek 1 L % 25'lik gliserol çözeltisinde çözüldü. Prob kullanılarak 2 saat boyunca karıştırıldı ve süre sonunda süspansiyon filtre kağıdından geçirildi. Elde edilen jel kısım alıgolanarak -40 °C'de saklandı. Bu çözelti kullanılacağı zaman her 0.272 gr için üzerine 270 mg üre, 25 µl 1,4 M'lık DTT ve 25 µl amfolit karışımı eklendi. Ayırma jelinin üst kısmına bu çözelti konulduktan sonra gerekli miktarlarda idrar örnekleri yüklendi.

Kapiler tüpler izoelektrik odaklama cihazına 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 % 5 etilendiaminden oluşan katot çözeltisi koyuldu. Cihazın kapağı kapatıldı ve cihaz programlanabilir bir güç kaynağına bağlanarak, küçük jeller için çizelge 2.2'de verilen süre ve voltaja göre; büyük jeller için ise çizelge 2.3'de verilen süre ve voltaja göre örnekler yürütüldü.

Çizelge 2.2. Küçük kapiler için  
birinci boyut yürütme koşulları

| <b>Voltaaj</b> | <b>Zaman</b> |
|----------------|--------------|
| 100V           | 75 dak       |
| 200 V          | 75 dak       |
| 400 V          | 75 dak       |
| 600 V          | 75 dak       |
| 800 V          | 10 dak       |
| 1000 V         | 5 dak        |

Çizelge 2.3. Büyük kapiler için  
birinci boyut yürütme koşulları

| <b>Voltaaj</b> | <b>Zaman</b> |
|----------------|--------------|
| 100V           | 1 h          |
| 200 V          | 1 h          |
| 400 V          | 17,5 h       |
| 600 V          | 1 h          |
| 1000 V         | 0,5 h        |
| 1500 V         | 10 dak       |
| 2000 V         | 5 dak        |

1. boyut sonunda elektroforez sisteminden çıkarılan kapiler tüplerden jeller çıkarıldı. Bunun için kapiler tüplerin ucundan şırınga yardımıyla yavaşça su basıldı. Çıkarılan jeller inkübasyon çözeltisine alındı. Bu çözeltiden büyük 1. boyut jelleri için 10 ml, küçükler için ise 5 ml kullanıldı. İnkübasyon çözeltisi % 12,5 inkübasyon tamponu, % 40 gliserin ve % 3 SDS'ten oluşur. Bu çözeltide gerekli sürede çalkalanan jeller, 2. boyut elektroforezi için kullanılabileceği kadar -20 °C'de saklandı.

**İkinci boyut-SDS-PAGE:** İkinci boyutta tek tip jel kullanıldı. Çözeltinin toplam akrilamid konsantrasyonu % 15, çapraz bağlanma oranı ise % 3' tür. Ayırma jeli çözeltisinin bileşimi, % 15 akrilamid, % 2 bisakrilamid, 0,375 M Tris/Tris-HCl, % 0,1 SDS ve % 0,03 TEMED' dir. Ayırma jeli karışımı -20 °C'den alınarak çözündürüldü ve degaze edildi. İçine uygun miktarda % 1,28' lik APS eklenerek hazırlanmış olan cam plakaların bulunduğu sistemde 1 saat boyunca polimerleşmeye bırakıldı. Polimerleşme sonunda jelin üst kısmı filtre kağıdıyla kurutuldu ve 1. boyut jeli 2. boyut jelinin üzerine arada hava kabarcığı kalmayacak şekilde yerleştirildi. 1. boyut jelinin yerleştirilmesinden jelin üzerine bileşimi % 12,5 inkübasyon tamponu, % 0,1 SDS ve % 1 agarozdan oluşan agaroz çözeltisi 1 ml kadar ilave edildi. Agoroz çözeltisi 2 dak içinde katılır. Süre sonunda jel aparatı elektroforez sistemine yerleştirildi. İnkübasyon tamponu, fosforik asitle pH'ı 6,8'e ayarlanmış olan ve bileşimi % 12,11 tris bazı içeren bir çözeltidir.

Küçük jellerin, birinin boyutları 8x10 cm, diğerinin 7x10 cm olan iki cam plaka arasında hazırlanır. 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 jelleri için ise 3 adet 8x10 cm'lik 2. boyut SDS-PAGE jelleri yapıldı. Hazırlanan 2. boyut jelleri, yürütme tamponu ile dolu olan tankın içine yerleştirildi. Yürütme tamponunun bileşimi, 0,025 M Tris bazı (Tris (hidroksimetil) amino metan), 0,192 M glisin ve % 1 SDS'dir. Çizelge 2.4' de gösterilen koşullarda jeller yürütüldü.

Çizelge 2.4. Jeller için ikinci boyut yürütme koşulları

| <b>Voltaj</b> | <b>Zaman</b> |
|---------------|--------------|
| 35 V          | 5 dak        |
| 55 V          | 10 dak       |
| 100 V         | 15 dak       |
| 150 V         | 60 dak       |

#### **2.2.3.4. Boyama işlemleri**

Tek boyutlu ve iki boyutlu jel elektroforezinden sonra sıra jellerin boyanmasına gelir. Tek boyutlu yapılan elektroforez işlemleri sonucunda elde edilen jeller sadece CBB R-250 ile boyandı. İki boyutlu jel elektroforez işlemleri sonucunda ise öncelikle daha az örnek miktarı gerektirdiğinden gümüş nitratla boyama yapılarak sıçanların genel idrar profillerine bakıldı. Daha sonra da kütle analizi için CBB R-250 ile boyanmış jeller yapıldı.

#### **Gümüş boyama:**

Bu teknikte aşağıda verilen altı çözelti kullanıldı. İkinci boyut tamamlandıktan sonra jeller fiksasyon çözeltisine alındı. Bu çözeltide en az bir saat tutulduktan sonra jeller inkübasyon çözeltisine aktarıldı. Bu çözeltide 2 saat boyunca çalkalandılar. Sonra boyama çözeltisine alınarak, bu çözeltide de yarım saat çalkalandılar. Süre sonunda sıra tab işlemine gelir. Bu işlemde önce jeller 5 sn kadar deiyonize suda tutulup tab çözeltisine alındılar ve proteinler görünür hale gelene kadar bu çözeltide çalkalandılar.

Jel üzerinde protein spotları görünür hale geldikten sonra jeller, durdurma çözeltisine alınarak boyama işlemi sonlandırıldı.

**Fiksasyon çözeltisi:** %50 etanol, %10 asetik asit ve %40 sudan oluşur.

**İnkübasyon çözeltisi:** %30 etanol, %0,50 glutardialdehit, %0,20 sodyum tiyosülfat ve 0,50 M sodyumasetattan oluşur.

**Gümüş çözeltisi:** %0,1 gümüş nitrat ve %0.01 formaldehitten oluşur.

**Tab çözeltisi:** %2,5 sodyum karbonat ve % 0,01 formaldehit içerir.

**Durdurma çözeltisi:** 0,05M EDTA ve %0,02 timerosaldan oluşur.

Boyama işlemi tamamlandıktan sonra örneklerin protein profilleri incelendi.

#### **Coomassie Blue boyama:**

Tek boyutlu elektroforez yapılarak elde edilen jelleri boyamada kullanılan boya çözeltisinin bileşimi % 0,1 CBB R-250, % 10 metanol, % 10 asetik asit ve geri kalanı da sudan oluşur. Jeller boyama çözeltisinde 1 gece boyunca bekletildi ve bileşimi % 10 metanol, % 10 asetik asit olan sulu çözeltide (destain çözeltisi) boya uzaklaşana kadar çalkalandı.

İki boyutlu elektroforezle elde edilen jeller ise öncelikle fiksasyon çözeltisinde en az 1 saat çalkalandı. Daha sonra en az 5 saat boya çözeltisinde çalkalandı ve süre sonunda destain çözeltisinde boya uzaklaşınca kadar çalkalandı. Son olarak da jeller saklama çözeltisinde saklandı.

**Fiksasyon çözeltisi:** % 50 etanol ve % 10 asetik asitten oluşur.

**Boya çözeltisi:** % 50 metanol, % 10 asetik asit ve % 0,05 CBB R-250'den oluşur.

**Destain çözeltisi:** % 5 metanol ve % 12,5 asetik asitten oluşur.

**Saklama çözeltisi:** % 7 asetik asitten oluşur.

Gümüş ve CBB boyamaları sonucunda elde edilen jellerin protein profilleri jel görüntüleme sistemi ile veya fotoğraf makinesi ile fotoğrafları çekilerek incelendi.

İncelemeler sonucunda kütle analizi yapılacak spotlar belirlendi ve bunlar kesilerek kütle analiz için gerekli işlemlere tabi tutuldu.

### **2.2.3.5. Kütle analizleri**

Kütle analizi için Shevchenko ve arkadaşlarının tanımlamış oldukları bir protokol kullanılmıştır (Shevchenko vd 1996). Bu protokol, jellerdeki protein spotlarının tripsin ile muamelesini içeren 3 aşamalı işlemler dizisinden oluşur.

#### **1. Aşama: Spotların kesilmesi ve jel parçalarından boya çözeltisinin uzaklaştırılması**

İlk gün birkaç çözelti hazırlandı ve jellerden analiz edilecek spotlar kesildi. Bu spotlar ufak parçalara bölünerek 1,5 ml'lik plastik santrifüj tüplerine koyuldular ve içlerinde bulunan boyayı uzaklaştırmak amacıyla gece boyunca 200 µl civarında yıkama çözeltisinde bekletildiler.

**Yıkama çözeltisi:** % 50 metanol ve % 5 asetik asitten oluşur.

**Ekstraksiyon tamponu:** % 50 asetonitril ve % 5 formik asitten oluşur.

**Tripsin çözeltisi:** 20 µg tripsin alınıp 100 µl % 0,01 TFA'da çözüldü. Sonra 5 µl'lik miktarlara bölünerek -80 °C'de saklandı. Kullanılacağı zaman üzerlerine 75 µl 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> eklendi. Elde edilen tripsin konsantrasyonu 12,5 ng / µl dir.

Bu çözeltilerden başka ayrıca 100 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> ve 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> çözeltileri hazırlandı.

#### **2. Aşama: İndirgeme, alkilleme ve tripsinle proteinlerin kesilmesi**

İşlemlere başlamadan önce taze olarak 10 mM DTT ve 100 mM iyodoasetamid çözeltileri hazırlandı.

- Jellerin içinde buldukları yıkama çözeltisi, boya uzaklaşması tamamlandıktan sonra dikkatlice jel parçalarından ayrılarak atıldı.

- 200 µl saf asetonitril eklenerek jel parçaları ~5 dk oda sıcaklığında suyu uzaklaştırıldı. Jellerin suyu uzaklaştırılınca jeller beyazlaştı ve küçüldü.
- Asetonitril dikkatlice jellerden ayrılarak atıldı ve vakum santrifüjü (5 000 g) kullanılarak 2-3 dk jel parçaları kurutuldu.
- 30 µl 10 mM DTT eklenerek ( jel yüzeyleri tamamen kapanacak şekilde), 30 dk oda sıcaklığında jellerdeki proteinler indirgendi. Süre sonunda DTT solüsyonu dikkatlice ayrılarak atıldı.
- 30 µl 100 mM iyodoasetamid eklendi ve 30 dk proteinler oda sıcaklığında alkiletiler. Süre sonunda iyodoasetamid çözeltisi örneklerden ayrıldı ve atıldı.
- 200 µl saf asetonitril eklenerek jel parçalarının ~5 dk oda sıcaklığında suyu uzaklaştırıldı. Sonra, asetonitril dikkatlice jellerden ayrılarak atıldı ve vakum santrifüjü kullanılarak 2-3 dk jel parçaları kurutuldu.
- Jel parçaları, 200 µl 100 mM amonyum bikarbonat ile 10 dk oda sıcaklığında inkübe edilerek yeniden hidratlandı ve süre sonunda amonyum bi karbonat dikkatlice ayrılarak atıldı.
- 200 µl asetonitril eklenerek jel parçalarının ~5 dk oda sıcaklığında suları uzaklaştırıldı. Sonra, asetonitril solüsyonu dikkatlice jellerden ayrılarak atıldı ve vakum santrifüjü kullanılarak 2-3 dk jel parçaları kurutuldu.
- 40 µl tripsin çözeltisi her bir jel örneğine eklendi ve vortekslenerek iyice karıştırıldı. 30 sn de santrifüj edildiler. Proteinlerin kesilmeleri amacıyla gece boyunca jel tüpleri 37 °C’de bekletildi.

### **3. Aşama: Analiz için peptitlerin ekstraksiyonu**

- Örnekler için başka santrifüj tüpleri alındı ve jel parçalarının içinde buldukları fazla tripsin çözeltileri bu tüplerin içine aktarıldı.
- 50 µl 50 mM amonyum bikarbonat jel parçalarının bulunduğu tüplere eklendi ve tüpler 10 dk vortekslendi. Bu örnekler 30 dk da santrifüjlenip elde edilen süpernatant jel parçalarından dikkatlice ayrılarak diğer tüplere aktarıldı.
- Örnek tüplerine 50 µl ekstraksiyon çözeltisi eklenerek 10 dk vortekslendiler ve 30 sn de santrifüjlendiler. Süre sonunda süpernatant dikkatlice ayrılıp diğer tüplere aktarıldı.

- Örnek tüplerine yeniden 50 µl ekstraksiyon çözeltisi eklenerek işlem bir kez daha tekrarlandı.
- Toplamda elde edilen süpernatant karışımlarının hacimleri, maksimum 20 µl olacak şekilde vakum santrifüjü kullanılarak indirildi ve son olarak tüplere 1 µl kadar formik asit eklemesi yapıldı.

### **Zip-Tip İşlemi**

İşlemler sonucunda elde edilen peptit karışımlarını saflaştırmak için son olarak örnekler, zip-tip işlemine tabi tutuldu. Bu işlem için 4 adet çözelti hazırlandı ve peptitlerin saflaştırılmasında zip-tipC<sub>18</sub> pipet uçları kullanıldı. İşlemler sırasında kullanılan çözeltilerin bileşimleri aşağıdaki gibidir:

**Islatma çözeltisi (Wetting Solution):** % 100 asetonitrilden oluşur.

**Dengeleme (Equilibration Solution) ve Yıkama (Washing Solution) çözeltisi:** % 0,1 trifloroasetikasitten (TFA) oluşur.

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

İşlemler şu şekildedir:

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

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

#### **2) Bağlama:**

- Peptitleri bağlanmak istenen örnekten 2 µl çekilip, bırakıldı. İşlem en az 10 kere tekrarlandı.
- Bağlama işleminden sonra uca 10 µl yıkama çözeltisi çekildi ve atıldı.

#### **3. Elüsyon:**

- Uca elüsyon çözeltisinden 2 µl çekildi ve temiz bir tüpe boşaltıldı. İşlem en az 5 kere gerçekleştirildi.

## **Matriksin Hazırlanması**

Kütle analizi için örneklerin hazırlanmasından sonra sıra matriksin hazırlanmasına gelir. Bu çalışmada matriks olarak alfa-siyano-4-hidroksisinamikasit kullanılmıştır.

Matriks iki tabaka halinde hazırlandı:

1. Tabaka: 3-6 mg matriks, 100 µl metanol içinde çözülerek üzerine 400 µl aseton eklendi. Karışım vortekslenip 8 dk santrifüj edildi.
2. Tabaka: Yaklaşık 5 mg matriks 200 µl metanolde çözülerek üzerine %0,1 TFA içeren 300 µl deiyonize su ilavesi yapıldı. Karışım vortekslenip 8 dk santrifüj edildi.

Matriks plakasındaki örnek yükleme bölgelerine öncelikle 1. tabaka olarak hazırlanan çözüldüden 0,8 µl kadar koyuldu ve kuruması beklendi. 2. tabaka olarak hazırlanan çözüldü ise 1:1 oranında örnek ile karıştırılarak 1'er µl halinde 1. tabakanın üzerine koyuldu. Yarım saat kadar kuruması beklendi.

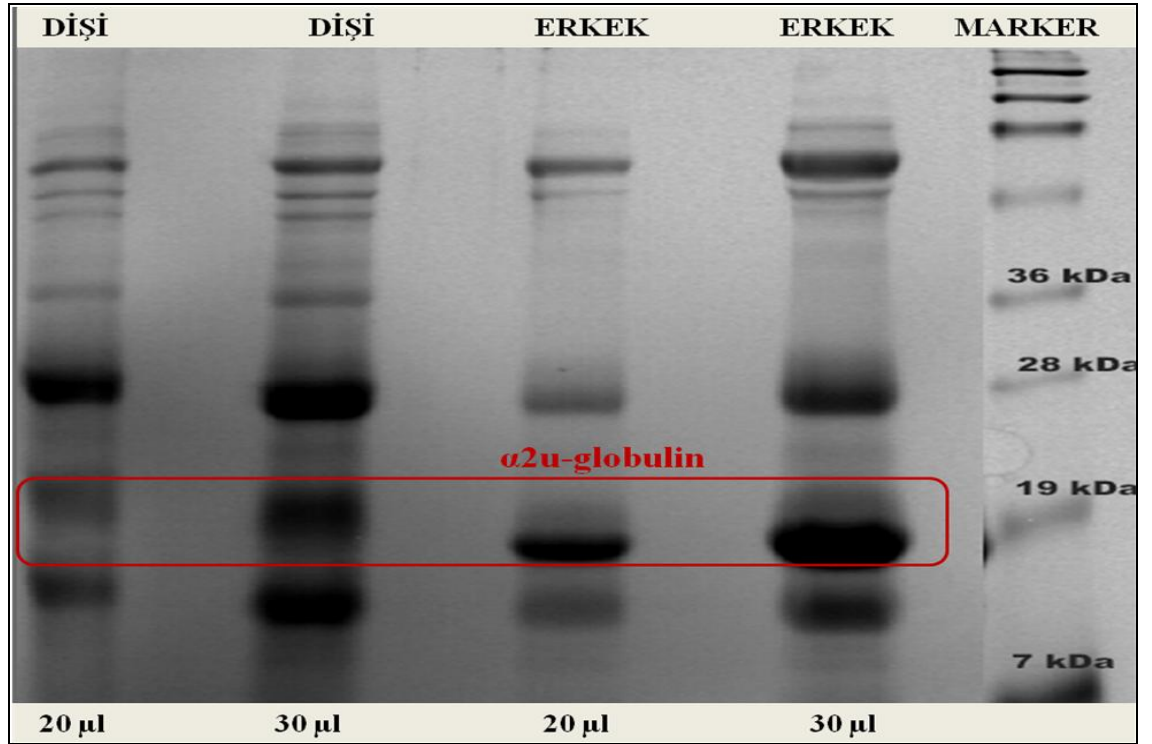
Matriks plakasının hazırlanmasından sonra kütle cihazında incelemeler yapıldı. Protein spotlarının uygun kütle parmak izi (Peptide mass fingerprint-PMF) spektrumları alındıktan sonra MASCOT denilen bir arama motorunda (<http://www.matrixscience.com>), elde edilen peptit kütleleri kullanılarak protein taramaları yapıldı.



### 3. BULGULAR

#### 3.1. Ön Çalışmalar

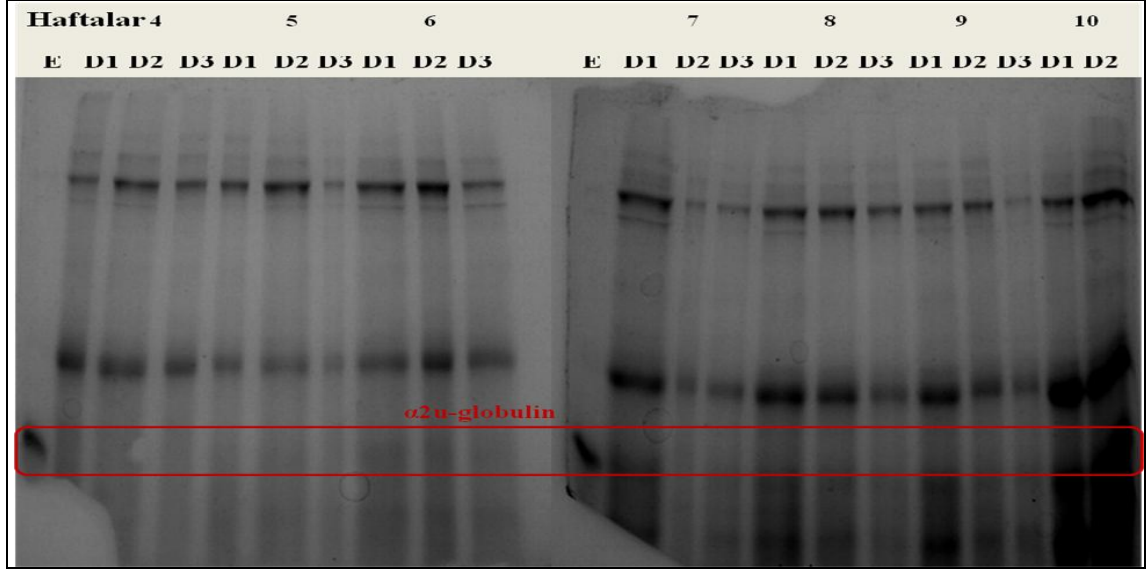
Bu çalışmada öncelikle, Wistar tipi erkek ve dişi sıçanların idrarlarındaki  $\alpha 2u$ -globulin proteininin molekül ağırlık farklılığına bakmak amacıyla 1'er adet dişi ve erkek sıçan idrarı alınarak her birinden 20  $\mu$ l ve 30  $\mu$ l olacak şekilde SDS-PAGE jelinde yürütülmüş ve elde edilen jel CBB ile boyanmıştır. Jeldeki görüntüye göre dişide bulunan  $\alpha 2u$ -globulin proteininin molekül ağırlığının, erkek sıçan idrarında bulunandan daha fazla olduğu görülmektedir.



Şekil 3.1 Erkek-dişi sıçan idrarlarının %15'lik SDS-PAGE ile karşılaştırılması

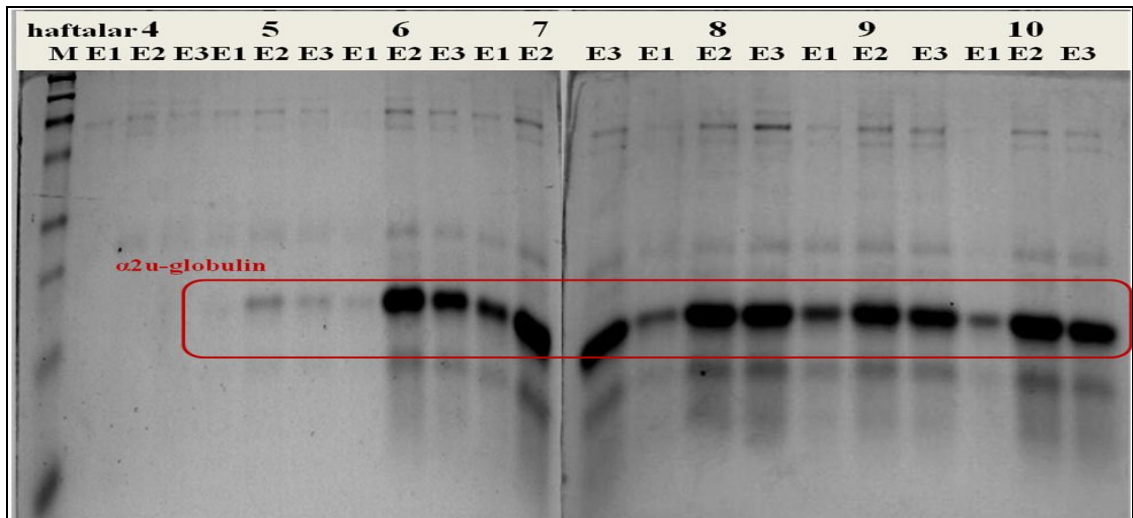
$\alpha 2u$ -globulin proteininin miktarı, sıçanlarda yaşa bağlı olarak değişmektedir.  $\alpha 2u$ -globulin'in elektroforez yöntemi ile incelenebilmesi ve iki boyutlu jeller için yeterince protein elde edilebilmesi için hangi haftalık sıçan idrarının kullanılması gerektiğinin bilinmesi gerekmektedir. Bu amaca yönelik olarak hem dişi hem de erkek sıçanların

haftalık nitel  $\alpha 2u$ -globulin protein değişimlerine, CBB boyalı SDS-PAGE jelleri yapılarak bakılmıştır. (3'er adet sıçan kullanılmıştır.)



Şekil 3.2 Dişi idrarındaki  $\alpha 2u$ -globulin yoğunluğunun haftalık değişimi

Burada dişi idrarları 5 kat konsantre edilmiş ve 20  $\mu$ l olacak şekilde %15'lik SDS jeline yüklenmiştir. Jel resminde de görüldüğü gibi dişilerde 10. haftadan itibaren  $\alpha 2u$ -globulin SDS jelinde görünür hale getirilebilmektedir. Jelde dişi idrarından başka,  $\alpha 2u$ -globulin proteininin bulunması gereken yeri belirlemek amacıyla referans olarak 1 tane de erkek sıçan idrarı yürütülmüştür. (E: erkek sıçan idrarı; D1, D2, D3: dişi sıçan idrarı)



Şekil 3.3. Erkek idrarındaki  $\alpha 2u$ -globulin yoğunluğunun haftalık değişimi

Şekil 3.3 erkek sıçan idrarlarının doğrudan kullanılmalarıyla yapılan SDS-PAGE jelini göstermektedir. Kullanılan örnek miktarı 20 µl'dir. Elde edilen jelde de görüldüğü gibi 6. haftadan itibaren α<sub>2</sub>u-globulin düzeyi artış göstermiştir. Erkeklerin 6. haftadan itibaren yüksek oranda α<sub>2</sub>u-globulin üretmesi bu bireylerin cinsel olgunluğa ulaştığını göstermektedir. Erkek sıçanların 10. haftalarında protein seviyesi oldukça yüksektir ve bu nedenle iki boyutlu jel elektroforezi deneylerinde 10 haftalık erkek sıçan idrarı kullanılmıştır (E1, E2, E3: erkek sıçan idrarı).

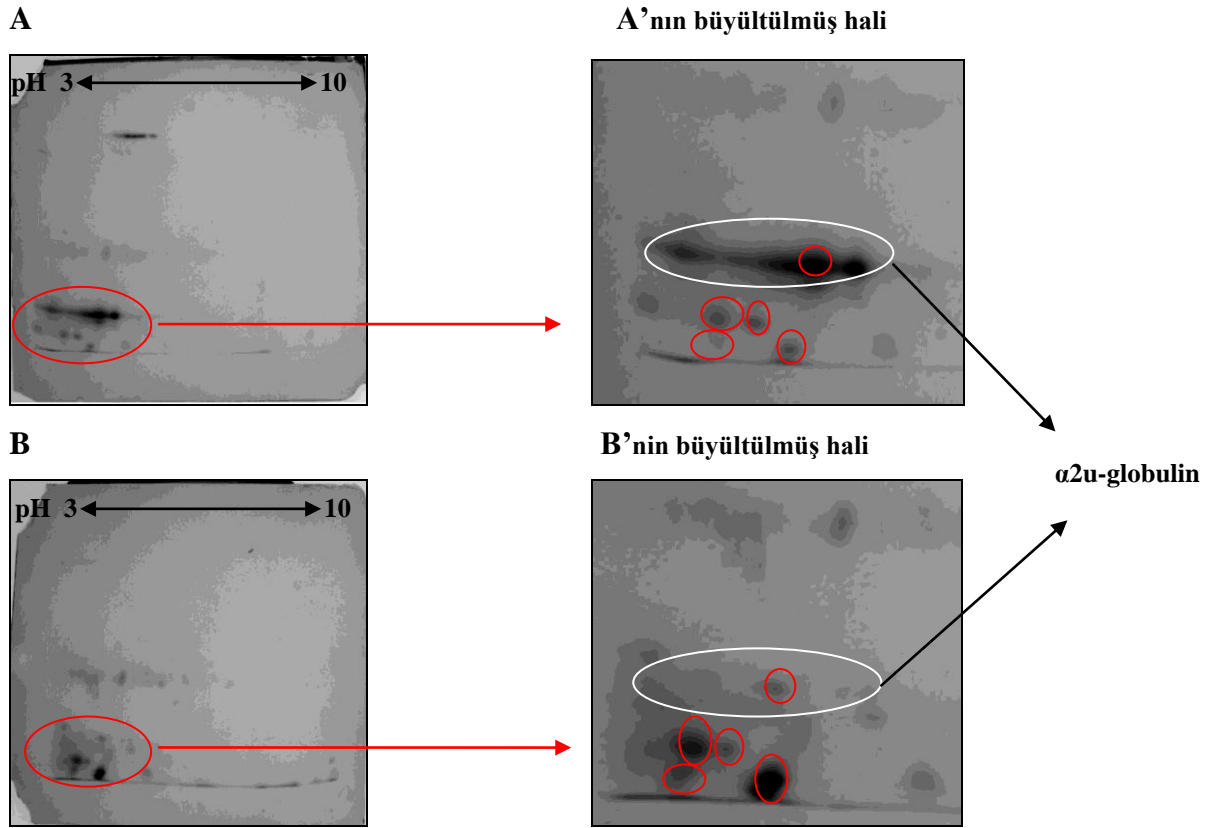
Sıçanlarda α<sub>2</sub>u-globulin'in üretiminin hormonlar tarafından düzenlendiği literatürde belirtilmiştir. Özellikle testosteron hormonunun bu proteinin üretimini oldukça arttırdığı, yani; cinsel olgunluğa erişilmesiyle beraber bu proteinin üretiminin ve idrarla dışarıya atılımının da maksimum seviyeye ulaştığı öne sürülmektedir. Bu çalışmada da bu amaçla Yrd. Doç. Dr. Firdevs Mor'un 'Wistar erkek sıçanın yaş ve testise bağlı α<sub>2</sub>u-globulin protein düzeyinin belirlenmesi' adlı projesi kapsamında kastre edilen sıçanlardan birinin kastrasyon öncesine ve sonrasında ait idrarları alınarak iki boyutlu jel elektroforezi ile proteinlerine ayrılmıştır. Kastrasyon işleminin amacı, erkek sıçanların testislerini uzaklaştırmak ve böylece testosteron seviyesini düşürmektir.

Çizelge 3.1'de kastrasyon öncesi ve sonrasında sıçanlardan toplanan, konsantre etme işleminden ve gerekli kimyasal maddelerin eklenmesinden sonra elde edilen idrar örneklerinin hacimleri, protein derişimleri ve buna bağlı olarak da dışarı atılan toplam protein miktarları verilmiştir.

Çizelge 3.1. Kastrasyon işlemine ait idrar verileri

|                    | Başlangıç idrar hacmi | Kullanılan idrar hacmi | Konsantrasyon sonrası idrar hacmi | İdrardaki protein derişimi | Dışarı atılan toplam protein miktarı |
|--------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------------------|----------------------------|--------------------------------------|
| Kastrasyon öncesi  | 5,5 ml                | 1,5 ml                 | 0,5 ml                            | 1,42 mg/ml                 | 2,60 mg                              |
| Kastrasyon sonrası | 3 ml                  | 1,5 ml                 | 0,5 ml                            | 1,37 mg/ml                 | 1,37 mg                              |

Şekil 3.4'te de görüldüğü gibi kastrasyon öncesindeki ve sonrasındaki idrar profilleri birbirlerinden farklıdır. Jellerde yaklaşık aynı miktarda protein olmasına rağmen bazı proteinlerde azalma, bazılarında ise artış gözlenmiştir. Özellikle  $\alpha 2u$ -globulin'in bulunduğu kısımdaki proteinler yok olurken, diğer işaretli proteinlerde artış olmuştur. Ayrıca dışarıya atılan toplam protein miktarı da kastrasyondan sonra neredeyse yarıya inmiştir. Bu da  $\alpha 2u$ -globulin'in ifadesinin cinsiyet hormonlarına bağımlı olduğunu kanıtlar.



Şekil 3.4 A: kastrasyon öncesi toplanan idrarın 2D jel görünümü

B: kastrasyon sonrası toplanan idrarın 2D jel görünümü

### 3.2. Kromatografi Çalışmaları

Şekil 3.1'de gösterilmiş olan sıçan idrarlarının SDS-PAGE profillerinde de görüldüğü gibi sıçan idrarında miktarda en fazla olan protein  $\alpha 2u$ -globulin'dir. İdrardaki diğer pek çok proteinin ise yoğunlukları düşüktür.  $\alpha 2u$ -globulin'in izoformlarını belirlemek amacıyla, kromatografi yöntemleriyle bu proteinin saflaştırılmasına başvurulmuştur. Öncelikle jel filtrasyon kromatografisi yapılmış, elde edilen fraksiyonlardan proteince

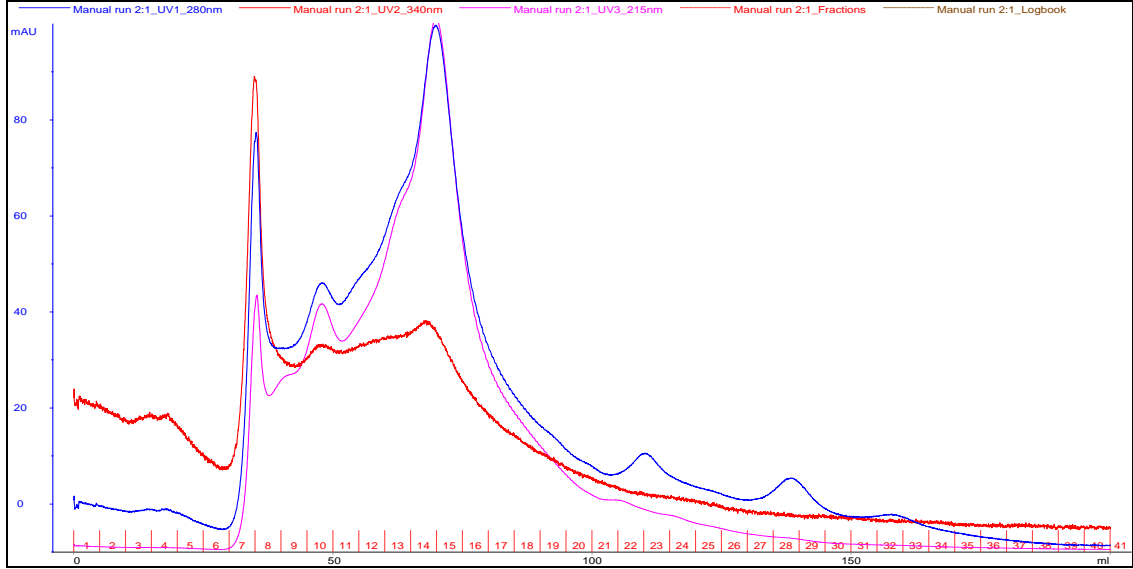
yoğun olanlarının CBB ile boyanmış SDS-PAGE jeli yapılarak fraksiyon profili incelenmiştir. SDS-PAGE jeli ile  $\alpha$ 2u-globulin proteininin bulunduğu fraksiyonlar belirlenmiş ve bu fraksiyonlar birleştirilerek iyon değişim kromatografisine yüklenmiştir. Son olarak iyon değişim kromatografisi sonucunda elde edilen yoğun proteinli fraksiyonların da, CBB ile boyanmış SDS-PAGE jeli yapılmıştır.

Jel filtrasyon kromatografisi için yeterli düzeyde protein kullanılmasını sağlamak amacıyla 2 adet 10 haftalık erkek sıçanın idrarı alınmış ve 1,5 ml'ye kadar konsantre edilerek kolona yüklenmiştir. Pürifikasyon sisteminin UV okuyucuları 215, 280 ve 340 nm'de üç dalga boyuna ayarlanmıştır.

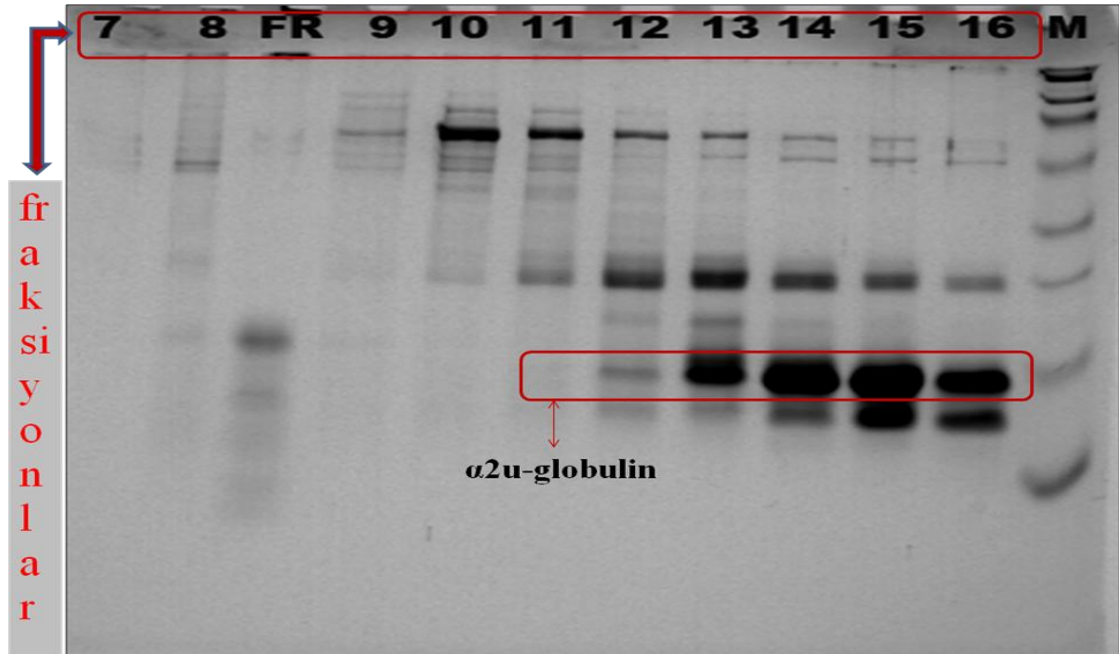
Jel filtrasyon kromatogramına göre (Şekil 3.5) proteince zengin bölge, 7 ile 16 numaralı fraksiyonlar arasındadır. Şekil 3.6'da gösterilen SDS-PAGE jeline göre  $\alpha$ 2u-globulin proteini, 13 ile 16 numaralı fraksiyonlar arasında daha yoğundur. Bu nedenle  $\alpha$ 2u-globulince yoğun olan bu 4 fraksiyon alınarak birleştirilmiş ve bu fraksiyonlar iyon değişim kromatografi kolonundan geçirilmiştir. Elde edilen spektruma göre yeniden SDS jeli yapılmış ve bu şekilde elde edilebilecek  $\alpha$ 2u-globulin izoformlarına bakılmıştır.

Elde edilen iyon değişim kromatogramına göre protein miktarı en fazla 4-13 numaralı fraksiyonlar arasındadır. Bu fraksiyonlardan 20  $\mu$ l kullanılarak yapılan % 15'lik SDS-PAGE jeli Şekil 3.8'de verilmiştir. Bu jele göre  $\alpha$ 2u-globulin sıçan idrarında bulunan diğer proteinlerden yüksek oranda saflaştırılabilmektedir.  $\alpha$ 2u-globulin en fazla 5 numaralı fraksiyonda bulunmaktadır. 4. ve 6. fraksiyonlarında da daha az oranda bu protein bulunmaktadır. Diğer fraksiyonlara doğru proteinin miktarında azalma gerçekleşirken 9 numaralı fraksiyonda protein miktarı birden artış göstermektedir. Daha fazla tuz konsantrasyonu kullanılarak elde edilen bu fraksiyondaki proteinler,  $\alpha$ 2u-globulin ile aynı molekül ağırlığına sahiptir. Tuz derişimine bağlı olarak değişen özellik, sadece iyonik özelliktir. Bu nedenle iki protein arasında sadece net yük farklılığı vardır. Dolayısıyla bu protein  $\alpha$ 2u-globulin'in farklı bir izoformudur. Bu spotların  $\alpha$ 2u-globulin oldukları MS analizleri ile onaylatılmıştır (Peter Mantle, Imperial College, Londra, sözlü bilgi alış verişi).

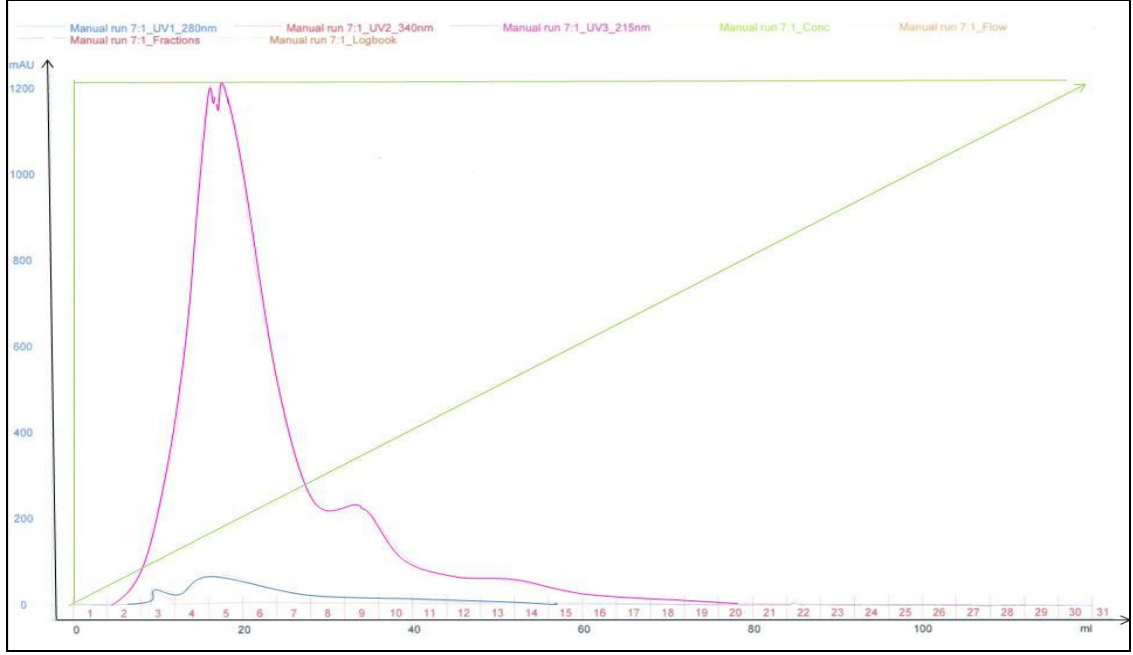
Kromatografik yöntemler sonucunda  $\alpha$ 2u-globulin, yüksek oranda saflaştırılabilmektedir. Çok miktarda izoformdan oluştuğu söylenen  $\alpha$ 2u-globulin'in kromatografik yöntemler kullanılarak saflaştırılmasıyla sadece 2 izoformunun elde edilebildiği SDS-PAGE jeli ile görülmüştür.



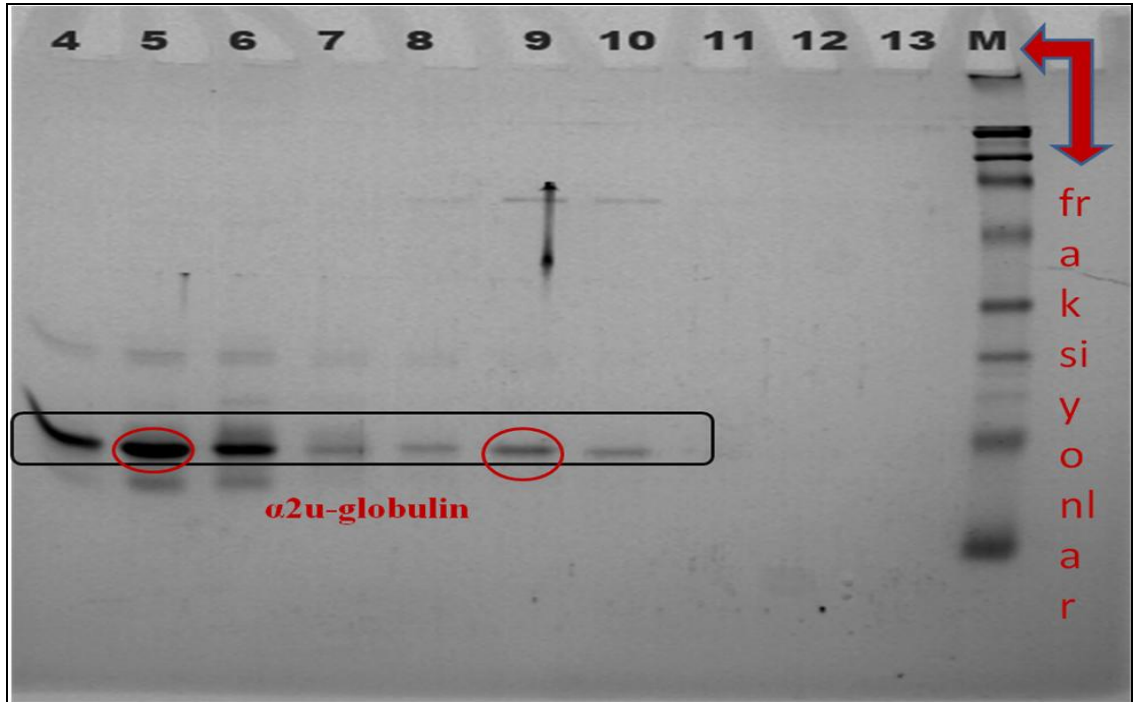
Şekil 3.5. Erkek sıçan idrarının jel filtrasyon kromatogramı



Şekil 3.6. Jel filtrasyon kromatografi fraksiyonlarının % 15'lik SDS-PAGE jel profili



Şekil 3.7. Jel filtrasyonundan elde edilen fraksiyonların iyon değişim kromatogramı

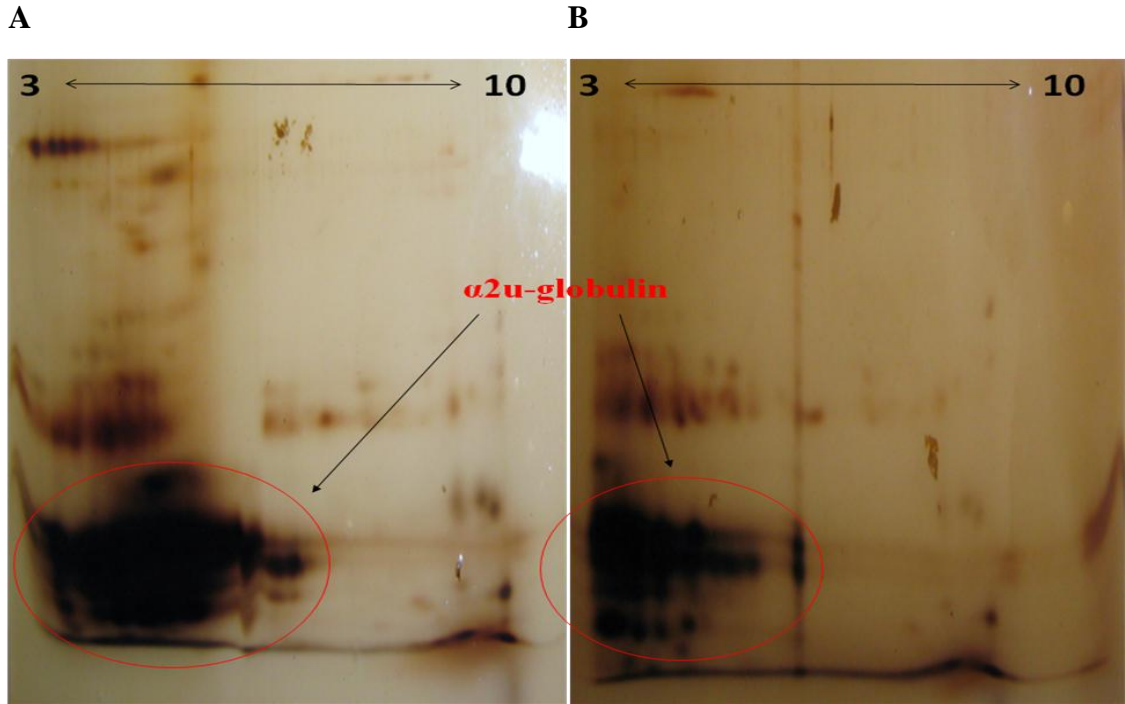


Şekil 3.8. İyon değişim kromatografi fraksiyonlarının % 15'lik SDS-PAGE jel profili

### 3.3. İki Boyutlu Jel Elektrofrez Çalışmaları

Kromatografik yöntemler sonucunda  $\alpha_2u$ -globulin'in sadece 2 izoformu elde edilebilmiştir. Bu nedenle bu aşamadan sonra bu proteinin izoformlarının belirlenmesinde iki boyutlu jel elektrofrezine başvurulmuştur.

Genel erkek sıçan idrar profilini görmek amacıyla, ilk olarak bir sıçanın idrarı  $\frac{1}{2}$  oranında distile su ile seyreltilerek iki boyutlu jel elektrofrezinde yürütülmüştür. Cam kapiler olarak küçük boy kapiler kullanılmıştır (9 cm). Aşağıda 30  $\mu$ l ve 20  $\mu$ l idrar örneği kullanılarak yapılan gümüş boyalı 2D jelleri görülmektedir.



Şekil 3.9. Sıçan idrar protein profili (küçük kapiler) A: 30 $\mu$ l  $\frac{1}{2}$  seyreltilmiş örnek

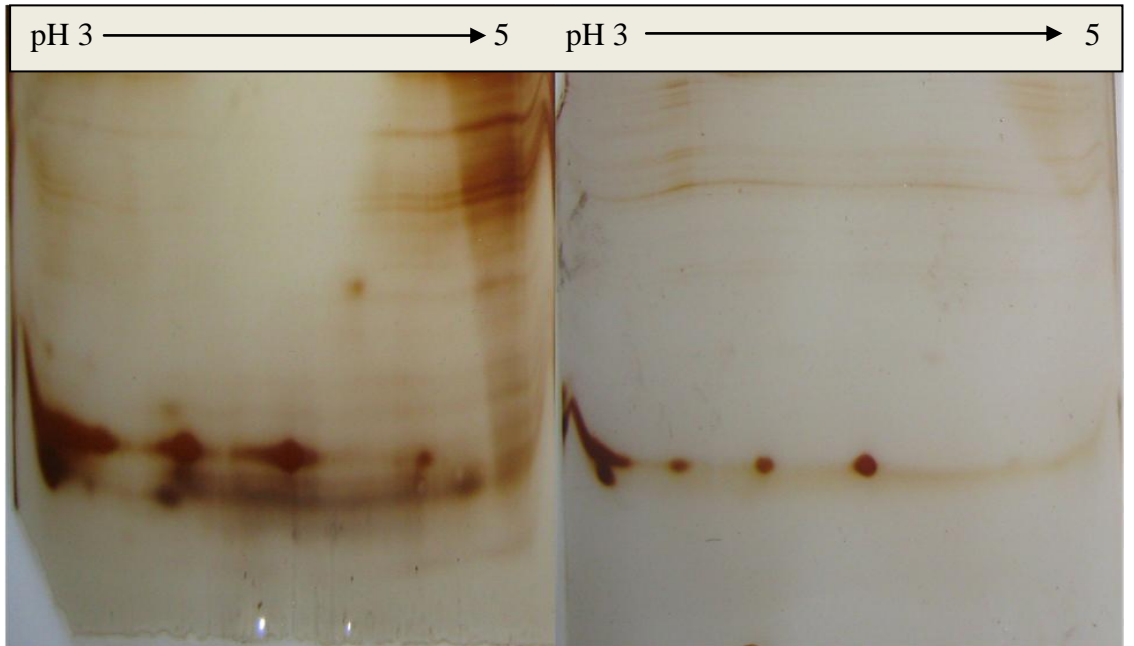
B: 20 $\mu$ l  $\frac{1}{2}$  seyreltilmiş örnek

Jellere göre, sıçan idrarı seyreltilmiş olmasına rağmen yüksek oranda protein konsantrasyonuna sahiptir.  $\alpha_2u$ -globulin idrarda en yoğun olarak bulunan ve 20 k Da ağırlığında bir protein olduğundan, jelde işaretli bölgede olduğu düşünülmektedir. Bu durumda idrarda bulunan  $\alpha_2u$ -globulin'i izoformlarına ayırmak oldukça zordur. Bu



nedenle aynı koşullarda ayrıca büyük kapiler tüpler de kullanılarak (20 cm) idrar örnekleri yürütülmüştür.

Büyük boyut kapiler tüpler kullanılarak yapılan jellerle  $\alpha_2u$ -globulin proteinini izoformlarına ayırmak çok daha kolay olmuştur. Ayrıca büyük kapiler tüplerde, küçük kapiler tüplerde yürütülenle aynı miktarda idrar örneği yürütülmesine rağmen, büyük kapiler tüplerin kullanılmasıyla idrarda bulunan diğer proteinler  $\alpha_2u$ -globulin'e girişim yapmamıştır. Hem elde bulunan idrar örneğinin kısıtlı olmasından hem de büyük kapiler tüplere maksimum 80  $\mu$ l gibi yüksek miktarda örnek yüklenebilmesinden dolayı sıçandaki  $\alpha_2u$ -globulin proteinini izoformlarına ayırmada büyük kapiler tüplerinin kullanılması bir avantajdır. Ayrıca jel resimlerinde de görüldüğü gibi diğer proteinlerin  $\alpha_2u$ -globulin'e girişim yapmadığı düşünüldüğünden, bu proteinin başlangıçta yapıldığı gibi kromatografi yöntemleri kullanılarak saflaştırılmasına gerek kalmamıştır.



Şekil 3.10. Sıçan idrar protein profili (büyük kapiler) A: 30 $\mu$ l  $\frac{1}{2}$  seyreltilmiş örnek  
B: 20 $\mu$ l  $\frac{1}{2}$  seyreltilmiş örnek

Bu çalışmada  $\alpha_2u$ -globulin proteinini izoformlarına ayırma işlemlerinde, Wistar tipi 3 erkek sıçanın idrarı kullanılmıştır. İdrar hacimleri konsantre tüpleri kullanılarak önce 1-1,5 ml'ye kadar indirilmiş, daha sonra örnekler iki boyutlu jel elektroforezi için uygun

duruma getirilmek amacıyla gerekli işlemlere tabi tutulmuştur. İdrarların jelleri yapılmadan önce içlerindeki protein konsantrasyonları, Bradford yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır.

### **3.3.1. Sıçan idrarlarının protein konsantrasyonları ve idrarla atılan protein miktarları**

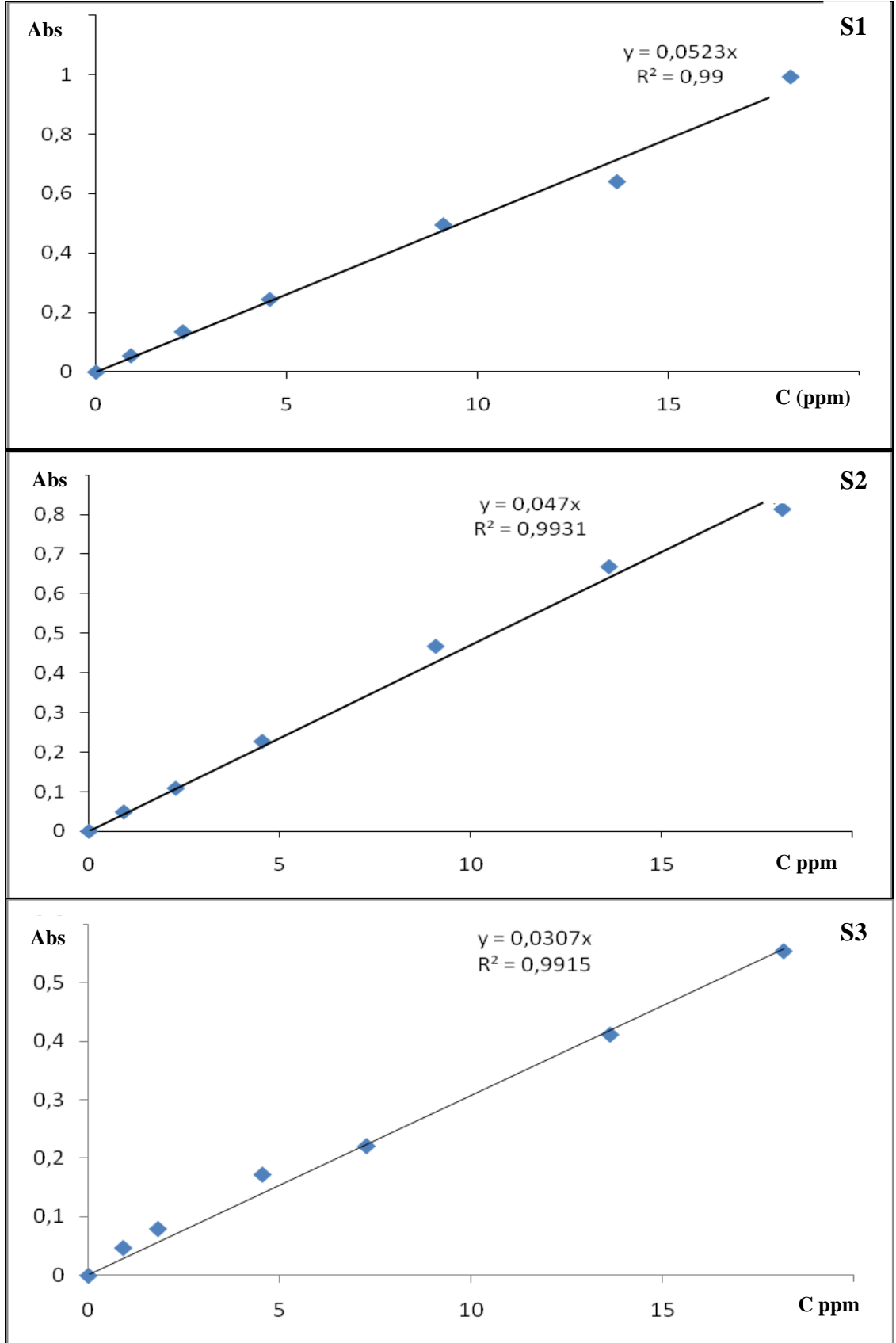
Analiz edilen idrarlar, aynı koşullarda bakılan 10 haftalık Wistar türü sıçanlardan alınmıştır ve sıçanlardan toplanan idrarların hacimleri birbirlerinden farklıdır. Buna rağmen sıçanların idrarla dışarı attıkları toplam protein miktarlarının birbirlerine oldukça benzer oldukları yapılan Bradford yöntemiyle görülmüştür. İdrarların konsantrasyon işlemlerinden önceki ve sonraki hacimleri de birbirlerinden farklıdır. Dolayısıyla hazırlanan her idrar örneğinin protein konsantrasyonu farklı olduğundan, örneklerdeki protein tayini, uygun jel görüntüsü elde etmek için kullanılması gereken örnek miktarını belirlemede oldukça önem kazanmaktadır.

Yapılan ön deneme çalışmalarında, kullanılan kapiler tüplerin uzunluğuna ve boyama çeşidine göre uygun protein miktarının da değiştiği görülmüştür. Küçük kapiler tüpler kullanıldığında eğer gümüş boyama yapılacak ise ortalama 30 µg protein yüklemesi ideal sonuç vermektedir. Büyük kapiler kullanıldığında ise gümüş boyama için ortalama 60 µg, CBB boyama için ise 135 µg protein yüklemesi yapılmalıdır.

Bu çalışmada kullanılan 3 sıçanın idrarlarının her birindeki protein konsantrasyonları ayrı ayrı hesaplanmıştır. İdrar örneklerindeki protein derişimleri, Çizelge 3.2.'de gösterilmiş konsantrasyonlarda hazırlanan standart Bovin Serum Albumin (BSA) çözeltilerine göre tayin edilmiştir. (S1: 1. Sıçanın idrarı, S2: 2. Sıçanın idrarı, S3: 3. Sıçanın idrarı)

Çizelge 3.2. Kalibrasyon grafikleri için hazırlanan standart BSA çözeltileri

|                            |   |       |       |       |       |        |        |
|----------------------------|---|-------|-------|-------|-------|--------|--------|
| <b>Konsantrasyon (ppm)</b> | 0 | 0,909 | 2,273 | 4,545 | 9,091 | 13,636 | 18,182 |
|----------------------------|---|-------|-------|-------|-------|--------|--------|



Şekil 3.11. S1, S2 ve S3 idrarları için elde edilen kalibrasyon grafikleri

Çizelge 3.3. Sıçanların idrar hacimleri, protein konsantrasyonları ve dışarı attıkları protein miktarları

| Sıçanlar<br>(10haftalık) | İlk<br>hacim | Kullanılan<br>hacim | Son<br>hacim | Konsantrasyon | Atılan<br>protein |
|--------------------------|--------------|---------------------|--------------|---------------|-------------------|
| S1                       | 8 ml         | 5,0 ml              | 0,5 ml       | 5,43 mg/ml    | 8,68 mg           |
| S2                       | 8 ml         | 5,5 ml              | 1,5 ml       | 2,00 mg/ml    | 8,55 mg           |
| S3                       | 6 ml         | 5.0 ml              | 0,5 ml       | 3,10 mg/ml    | 8,06 mg           |

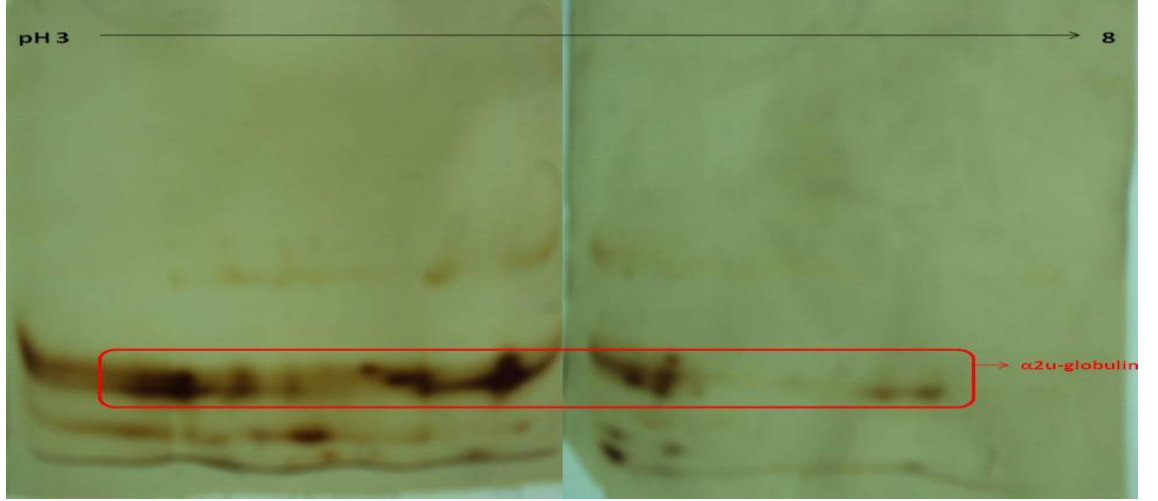
Şekil 3.11'deki kalibrasyon grafiklerine göre sıçanların idrarlarının protein konsantrasyonları hesaplanmıştır. Çizelge 3.3'de ise sıçan idrarlarının başlangıçta toplanan, konsantrasyon işlemi için kullanılan ve bu işlemden sonraki hacimleri ile idrarların üzerlerine gerekli kimyasalların eklenmesinden sonra hesaplanan protein konsantrasyonları ve bu konsantrasyonlara bağlı olarak sıçanların idrarları ile dışarı attıkları toplam protein miktarları gösterilmiştir. Örneğin, S1'den toplanan toplam idrar hacmi 8 ml'dir ve bunun 5 ml'si alınmış, 0,5 ml'ye indirilerek konsantre edilmiş ve gerekli kimyasalların eklenmesinden sonra konsantrasyon 5,43 mg/ml olarak bulunmuştur. Bu nedenle bu sıçan toplam 8,68 mg protein dışarı atmıştır. İki boyutlu jeller için kullanılması gereken örnek miktarı da bu derişime göre hesaplanmıştır. Diğer sıçan idrarları için de hesaplamalar bu şekilde yapılmıştır.

Yapılan protein miktar tayini sonucunda,  $\alpha$ 2u-globulin proteinini izoformlarına ayırmada kullanılan aynı haftalık sıçanların günlük dışarı attıkları toplam idrar hacmi birbirlerinden farklı olmasına rağmen, attıkları protein miktarının benzer olduğu görülmüştür. İdrar ile bir gecede (16 saatlik sürede) atılan toplam protein miktarı yaklaşık 8 mg'dır.

Büyük kapiler kullanılarak yapılan 1. boyut jelleri, 2. boyutlarının yapılabilmesi için 3'e bölündüler. Yapılan jellerin 3. kısımlarında spot gözlenmediğinden bu jeller şekillerde gösterilmemiştir. Küçük kapiler kullanılarak yapılan jeller, TipA olarak; büyük kapiler kullanılarak yapılanlar ise TipB olarak isimlendirilmiştir.

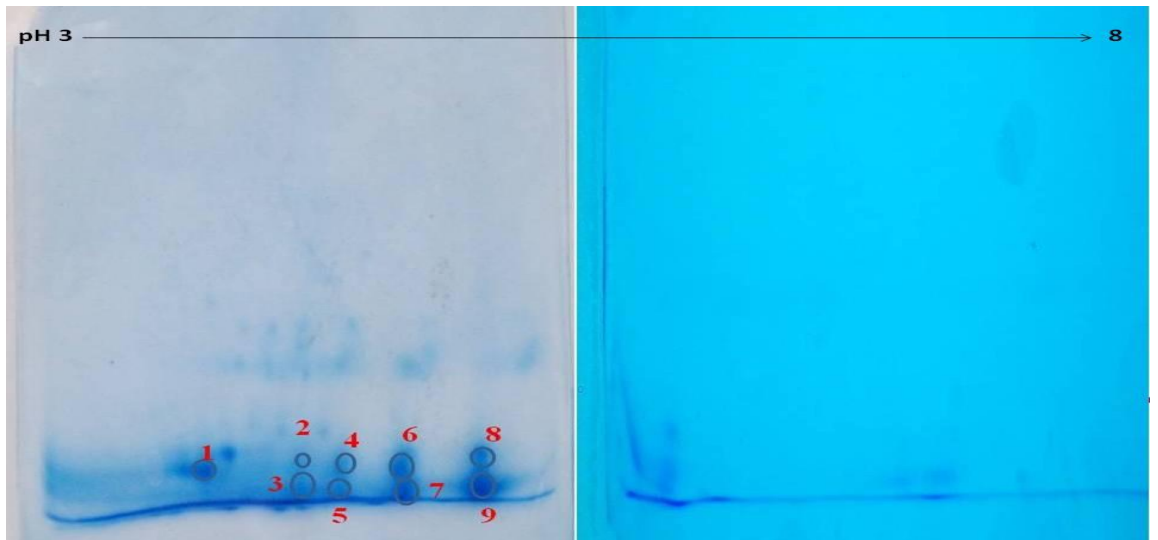
### 3.3.2. S1 idrarının 2D jel profilleri

Bu sıçanın idrarının büyük kapiler tüpler kullanılarak öncelikle gümüş boyalı jeli yapılmıştır. Jele yüklenen örnekteki protein miktarı 54  $\mu\text{g}$ 'dır İlk iki jel birleştirilmiş şekilde aşağıda gösterilmiştir. Kırmızı ile işaretlenmiş bölgede  $\alpha 2\text{u}$ -globulin'in izoformlarının bulunduğu düşünülmektedir.



Şekil 3.12. S1 idrarının gümüş boyalı TipB 2D jel profili

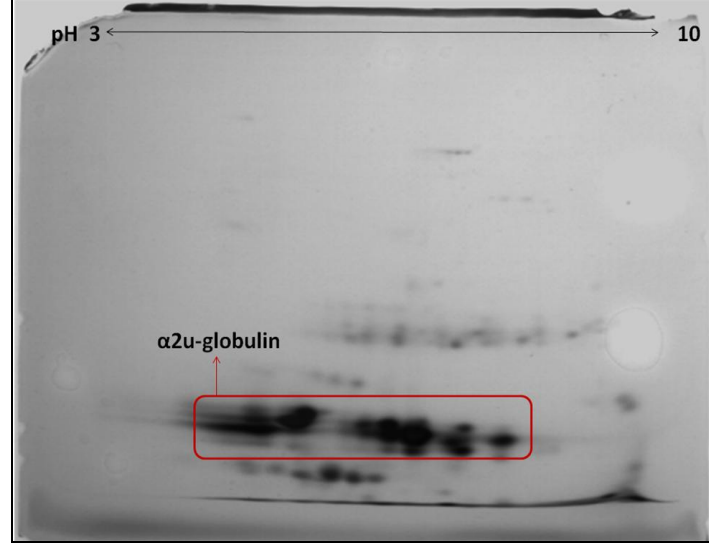
S1'in yapılan gümüş boyalı jelinden sonra CBB boyalı jeli yapılmıştır. Kullanılan örnek miktarı 135  $\mu\text{g}$ 'dır. İlk iki jel birleştirilmiş şekilde aşağıda gösterilmiştir. Numaralandırılmış spotların PMF spektrumları alınmıştır.



Şekil 3.13. S1 idrarının CBB boyalı TipB 2D jel profili

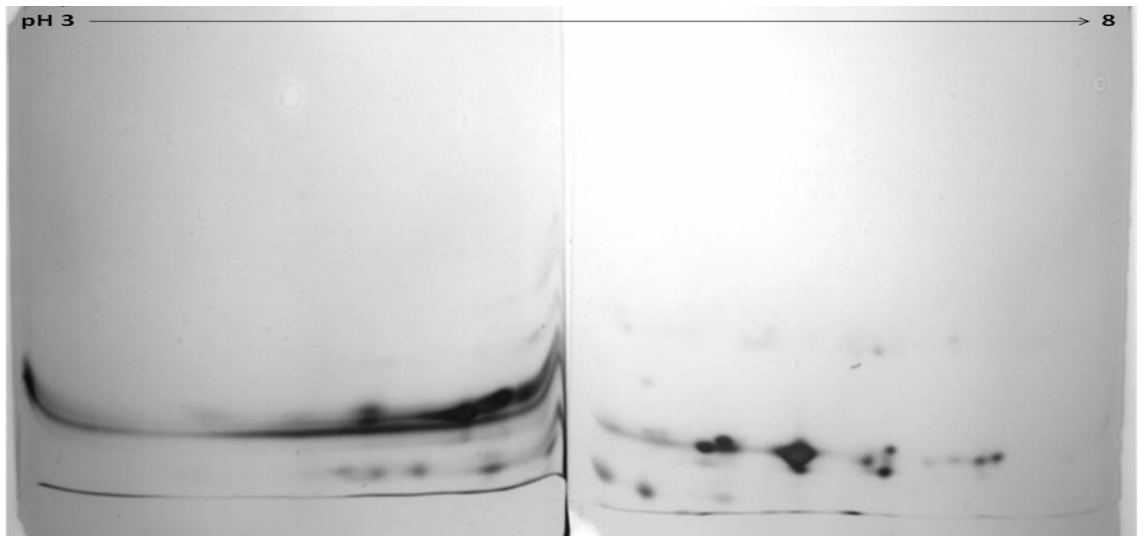
### 3.3.3. S2 idrarının 2D jel profilleri

Bu sıçanın idrarının küçük kapiler tüpler kullanılarak öncelikle gümüş boyalı jeli yapılmıştır. Kullanılan örnek miktarı 30 µg'dır

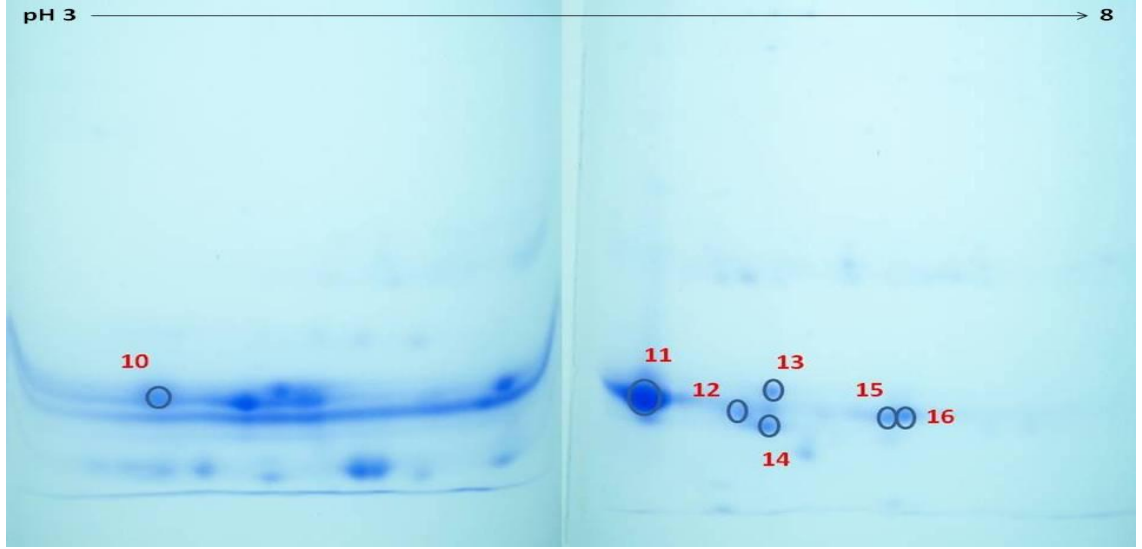


Şekil 3.14. S2 idrarının gümüş boyalı TipA 2D jel profili

Küçük kapiler ile protein spotları birbirlerinden tam olarak ayıramadığından başlangıçta gümüş boyalı büyük jel yapılmıştır. Daha sonra CBB boyalı jel yapılmıştır. Gümüş boyalı jelde protein miktarı 60 µg iken, CBB boyalı jelde 140 µg'dır.



Şekil 3.15. S2 idrarının gümüş boyalı TipB 2D jel profili

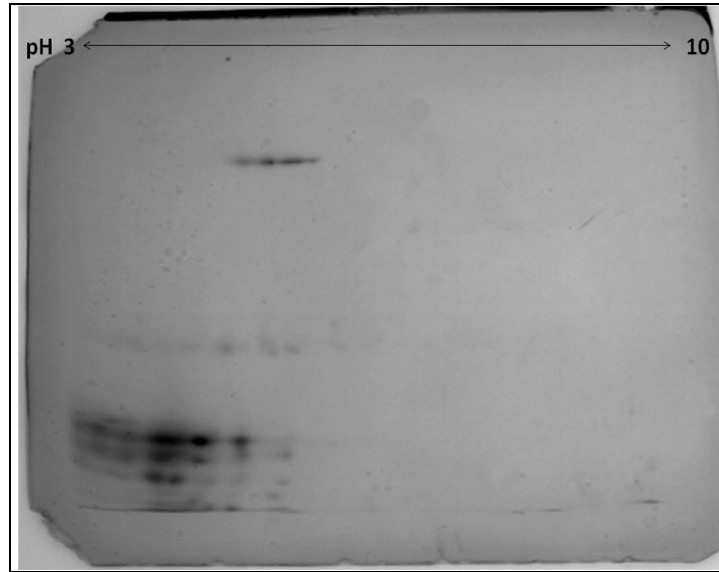


Şekil 3.16. S2 idrarının CBB boyalı TipB 2D jel profili

Numaralandırılmış spotların  $\alpha 2u$ -globulin olduğu düşünülerek PMF spektrumları alınmıştır.

### 3.3.4. S3 idrarının 2D jel profilleri

Bu sıçanın idrarının küçük kapiler tüpler kullanılarak öncelikle gümüş boyalı jeli yapılmıştır. Kullanılan örnek miktarı 31  $\mu\text{g}$ 'dır

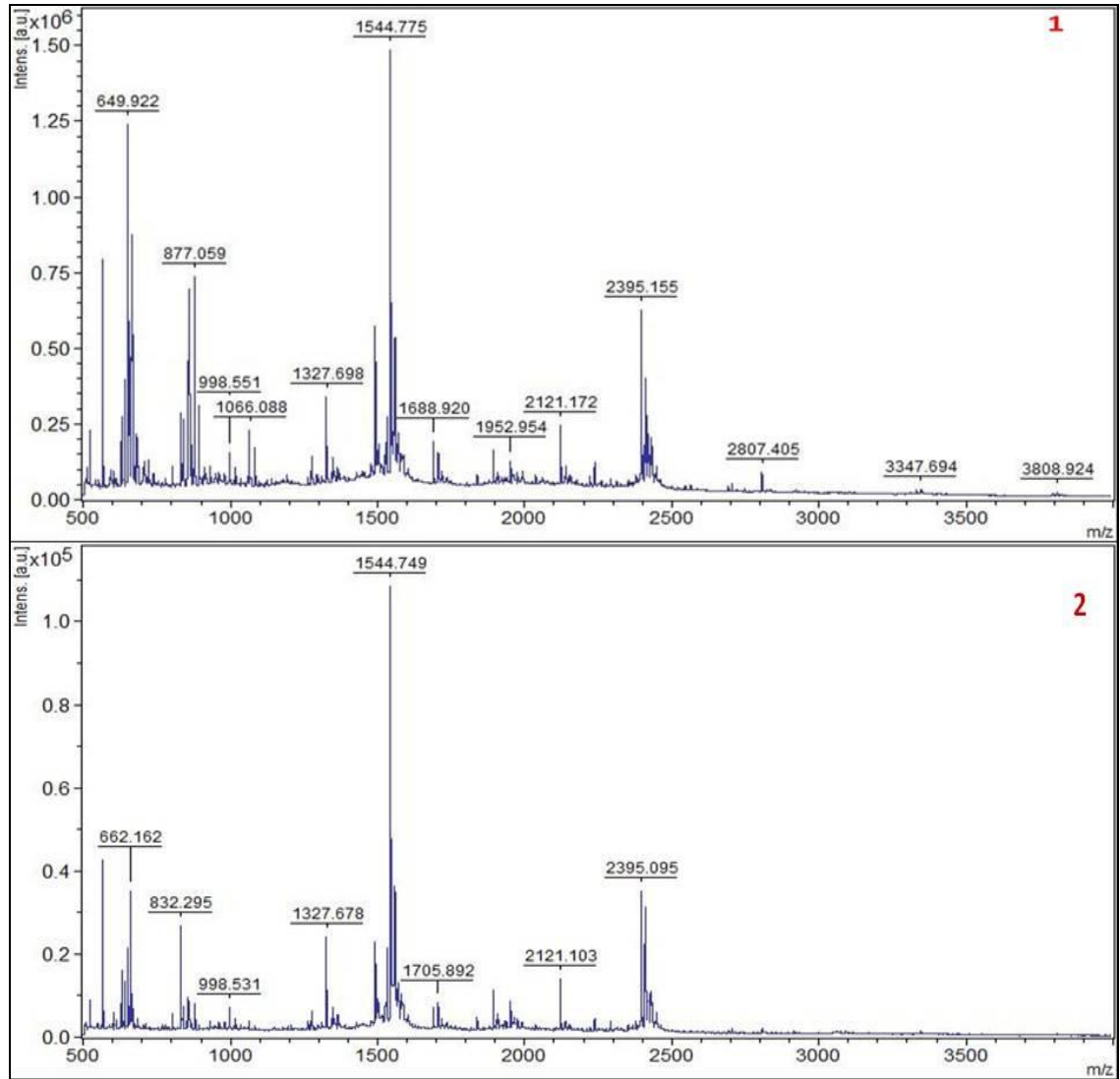


Şekil 3.17. S3 idrarının gümüş boyalı TipA 2D jel profili

Yapılan 2D jelleri sonucunda benzer miktarda örnek kullanılmasına rağmen, 3 şıçanın  $\alpha$ 2u-globulin profillerinin birbirinden farklı olduğu görülmüştür. S1 ve S2'nin jellerinden  $\alpha$ 2u-globulin olduğu düşünölen birkaç spot kesilerek kütle analizleri yapılmıştır.

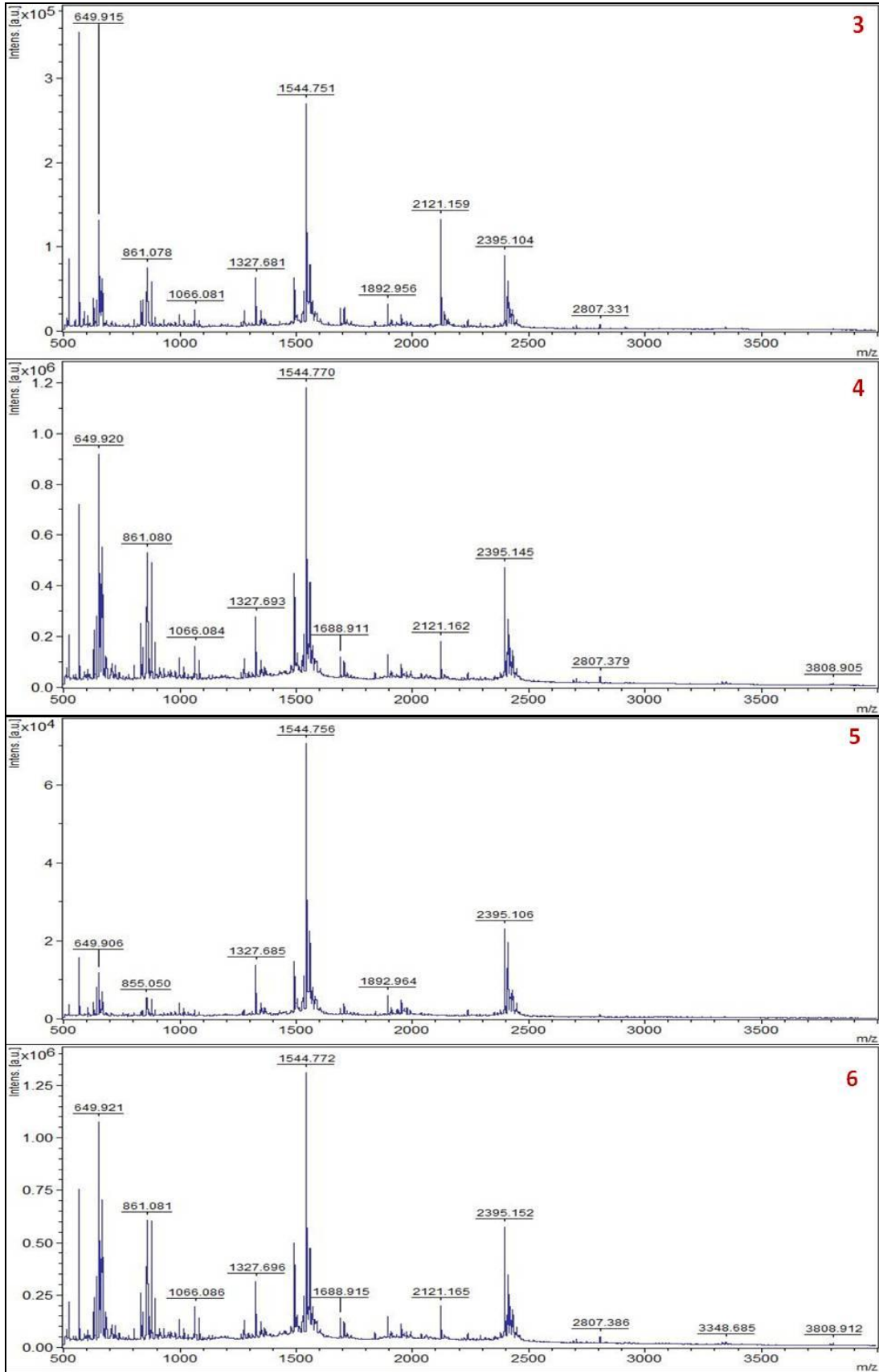
### 3.4. Kütle Analizleri

Jel resimlerinde gösterilen 16 spotun PMF spektrumları ve peptit dizileri aşağıdaki gibidir.

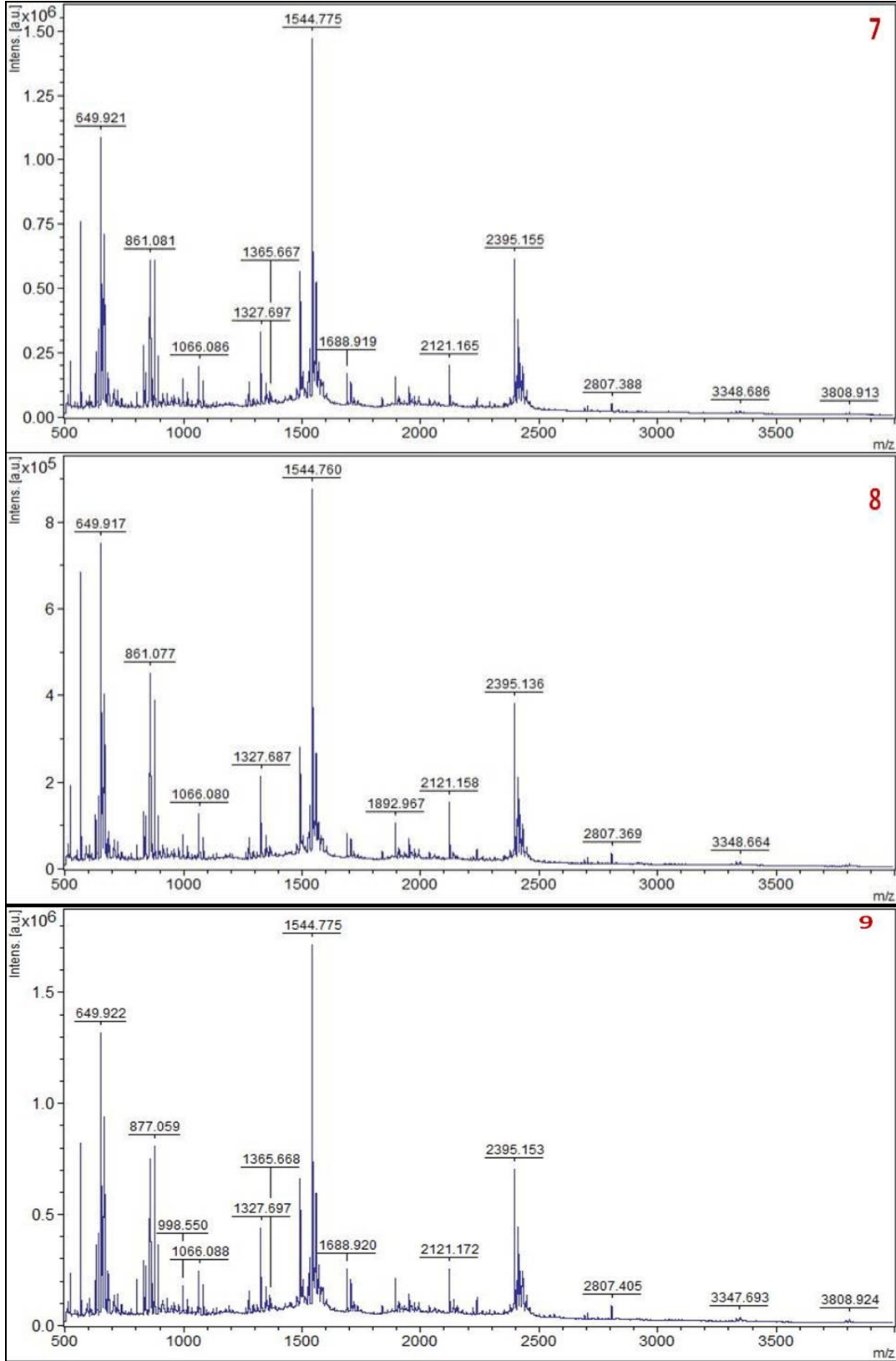


Şekil 3.18. S1 jelinin 1 ve 2 no'lu spotlarının PMF spektrumları

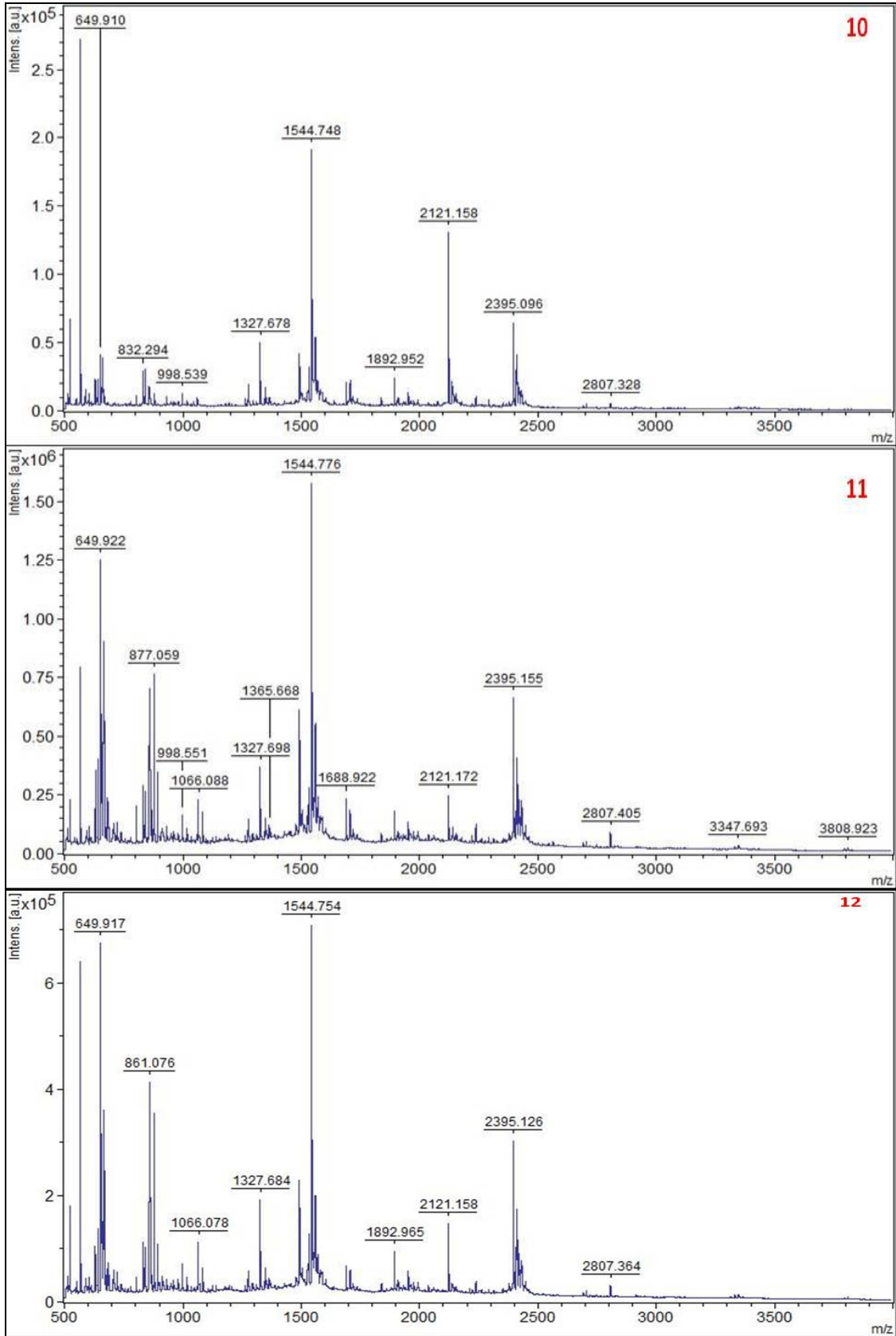




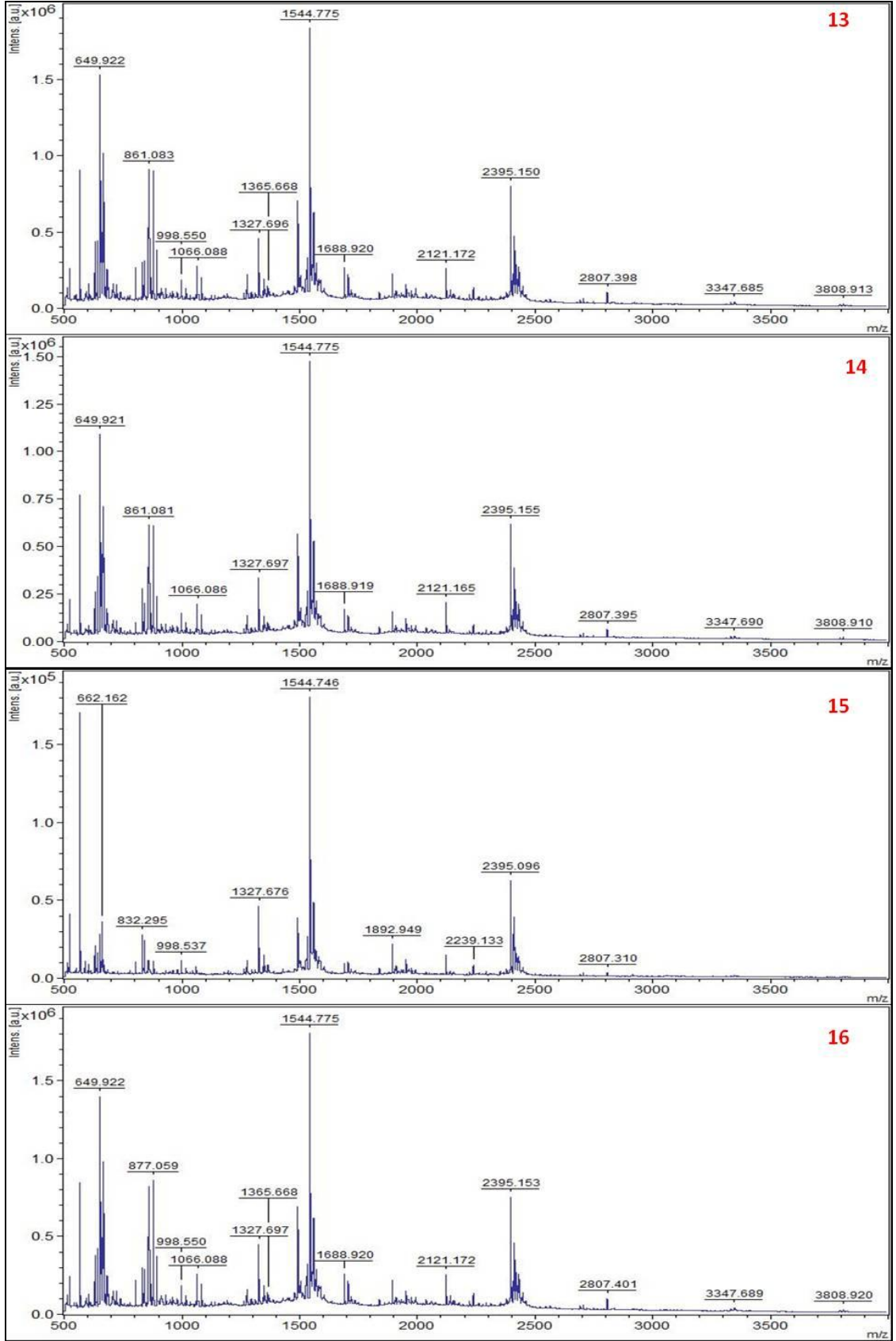
Şekil 3.19. S1 jelinin 3, 4, 5 ve 6 no'lu spotlarının PMF spektrumları



Şekil 3.20. S1 jelinin 7, 8 ve 9 no'lu spotlarının PMF spektrumları



Şekil 3.21. S2 jelinin 10, 11 ve 12 no'lu spotlarının PMF spektrumları



Şekil 3.22. S2 jelinin 13, 14, 15 ve 16 no'lu spotlarının PMF spektrumları

Çizelge 3.4. S1 jelindeki spotların peptit kütleleri

| 1           | 2           | 3           | 4            | 5           | 6           | 7           | 8           | 9           |
|-------------|-------------|-------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 523,923857  | 523,907526  | 523,922899  | 523,924014   | 523,910779  | 523,923825  | 523,923779  | 523,924646  | 523,923491  |
| 567,949842  | 567,937365  | 525,939394  | 567,949039   | 567,941455  | 567,949347  | 567,949463  | 567,948542  | 567,949929  |
| 627,917504  | 605,896277  | 567,946943  | 627,915675   | 627,915675  | 570,093022  | 627,916953  | 627,916959  | 627,915978  |
| 634,142473  | 627,902375  | 589,941580  | 634,141988   | 605,905835  | 634,141994  | 634,142233  | 627,914768  | 634,14105   |
| 643,906922  | 634,113541  | 605,910885  | 643,904787   | 627,909851  | 643,905699  | 643,905749  | 634,130511  | 643,906177  |
| 649,922335  | 643,889240  | 627,914055  | 649,919654   | 643,890285  | 649,920806  | 649,920817  | 643,899759  | 649,922018  |
| 655,938414  | 649,902868  | 634,119209  | 655,936231   | 649,906367  | 655,937246  | 655,937087  | 649,917206  | 655,937893  |
| 662,186515  | 655,923177  | 643,897480  | 662,186601   | 655,928704  | 662,186407  | 662,186511  | 655,934669  | 662,185570  |
| 665,908929  | 662,161839  | 649,914777  | 665,905962   | 665,894430  | 665,907387  | 665,907392  | 662,177838  | 665,908596  |
| 671,922615  | 665,888233  | 655,932959  | 671,919528   | 671,909727  | 671,920678  | 671,920645  | 665,901412  | 671,921311  |
| 681,897027  | 671,906588  | 659,160927  | 681,895394   | 855,050165  | 681,895955  | 681,896143  | 671,916468  | 681,896748  |
| 687,908476  | 804,256754  | 662,166293  | 687,905647   | 861,068815  | 687,906784  | 687,906897  | 681,889365  | 687,908023  |
| 832,326980  | 832,295199  | 665,898632  | 804,292106   | 877,048206  | 832,326594  | 832,327514  | 687,901506  | 804,290871  |
| 839,089542  | 842,502574  | 671,916076  | 832,326721   | 998,535240  | 842,521911  | 839,090478  | 832,311361  | 832,326368  |
| 842,525626  | 855,035691  | 832,297015  | 839,089219   | 1327,684650 | 855,064539  | 842,522126  | 839,085697  | 839,088999  |
| 855,066559  | 877,032434  | 839,086175  | 842,521327   | 1349,664715 | 861,081119  | 855,064528  | 842,516991  | 842,525558  |
| 861,082866  | 881,255962  | 842,509741  | 855,062644   | 1492,454251 | 871,042503  | 861,081140  | 855,058825  | 855,066275  |
| 871,044910  | 998,531489  | 855,055978  | 861,079507   | 1526,749111 | 877,056623  | 871,042908  | 861,076846  | 861,082694  |
| 877,059126  | 1277,701122 | 861,077600  | 871,041098   | 1528,731220 | 881,272652  | 877,056594  | 871,034286  | 871,044908  |
| 881,269892  | 1327,678131 | 877,050709  | 877,054423   | 1532,776705 | 893,029919  | 881,272663  | 877,051482  | 877,059009  |
| 893,033870  | 1349,658225 | 881,248829  | 881,270799   | 1543,756265 | 998,549786  | 893,029842  | 881,254960  | 893,034106  |
| 998,550678  | 1492,443802 | 893,026037  | 893,026103   | 893,026103  | 1066,085760 | 998,549874  | 893,022256  | 998,549993  |
| 1066,088136 | 1502,698007 | 998,542494  | 998,549976   | 1549,793931 | 1082,063290 | 1066,085804 | 998,547157  | 1066,087760 |
| 1082,065994 | 1506,471865 | 1066,081156 | 1066,083542  | 1554,769213 | 1277,742944 | 1082,063327 | 1066,079841 | 1082,065795 |
| 1277,722390 | 1526,734614 | 1277,714647 | 1082,061227  | 1557,761350 | 1327,695747 | 1277,743619 | 1082,055368 | 1277,744211 |
| 1327,697601 | 1532,766428 | 1327,681117 | 1277,740989  | 1558,769260 | 1349,679508 | 1327,697453 | 1277,731920 | 1327,696736 |
| 1349,681296 | 1543,750123 | 1349,661071 | 1327,693010  | 1560,755848 | 1490,432335 | 1349,682022 | 1327,686730 | 1349,681390 |
| 1492,443347 | 1544,748667 | 1365,641222 | 1349,676226  | 1566,748579 | 1492,440805 | 1365,666828 | 1349,669008 | 1365,667587 |
| 1502,710796 | 1549,782817 | 1492,439331 | 1490,457298  | 1571,773814 | 1502,715236 | 1490,458875 | 1492,422933 | 1490,460459 |
| 1506,453667 | 1554,763307 | 1526,747641 | 1492,439418  | 1573,762012 | 1506,452975 | 1492,443059 | 1506,406151 | 1492,444364 |
| 1527,747288 | 1557,748306 | 1528,732273 | 1506,449955  | 1581,747044 | 1527,766524 | 1502,725440 | 1526,752947 | 1502,725910 |
| 1532,789102 | 1558,760758 | 1532,773368 | 1527,762968  | 1705,908925 | 1532,787797 | 1506,438946 | 1528,749466 | 1506,452946 |
| 1543,777895 | 1560,748413 | 1543,749770 | 1532,785040  | 1892,964009 | 1543,774468 | 1527,761853 | 1532,778148 | 1527,776222 |
| 1544,775164 | 1566,740349 | 1544,750923 | 1543,772155  | 1952,922299 | 1544,772073 | 1529,780077 | 1543,763691 | 1532,788670 |
| 1549,808609 | 1571,767327 | 1549,788571 | 1544,769734  | 1747,089463 | 1549,807675 | 1532,785081 | 1544,760431 | 1543,778977 |
| 1554,795919 | 1573,741519 | 1554,768780 | 1549,802597  | 2395,105665 | 1554,794033 | 1543,775540 | 1554,778610 | 1544,774899 |
| 1557,795288 | 1581,744970 | 1557,750074 | 1554,791497  | 2409,121825 | 1557,791965 | 1544,774692 | 1557,775722 | 1549,807797 |
| 1558,782795 | 1586,753239 | 1558,763815 | 1557,789041  | 2417,089463 | 1558,780089 | 1549,806646 | 1558,761946 | 1554,795021 |
| 1559,790683 | 1688,867056 | 1560,753477 | 1558,778013  | 2423,130256 | 1559,788369 | 1554,795160 | 1559,726866 | 1557,794792 |
| 1561,786352 | 1705,891669 | 1566,743385 | 1559,786137  | 2431,094947 | 1561,788031 | 1557,793521 | 1561,765586 | 1558,783089 |
| 1566,768938 | 1892,946840 | 1571,774595 | 1561,786381  | 2434,074335 | 1566,766379 | 1558,781633 | 1566,754964 | 1559,790123 |
| 1570,787678 | 1906,951066 | 1573,776438 | 1566,763371  | 2447,073609 | 1570,786705 | 1559,789929 | 1571,781427 | 1561,785885 |
| 1571,799341 | 1952,905520 | 1581,735781 | 1570,784525  |             | 1571,797633 | 1561,785554 | 1574,781644 | 1564,784670 |
| 1574,802185 | 2121,103157 | 1586,759782 | 1571,794588  |             | 1574,800329 | 1566,768100 | 1581,757091 | 1566,767918 |
| 1582,771006 | 2239,131579 | 1689,887766 | 1574,798258  |             | 1582,769914 | 1570,788319 | 1586,772046 | 1569,788483 |
| 1587,789332 | 2395,094916 | 1705,904707 | 1582,764315  |             | 1587,788514 | 1571,799313 | 1688,896701 | 1571,797049 |
| 1688,920210 | 2409,108843 | 1707,882319 | 1587,783314  |             | 1688,914521 | 1574,802024 | 1705,910890 | 1573,803772 |
| 1705,934087 | 2417,077944 | 1892,955816 | 1688,911090  |             | 1705,930068 | 1582,769475 | 1892,967425 | 1576,791593 |
| 1892,983108 | 2423,117808 | 1952,919255 | 1705,9250311 |             | 1892,980790 | 1587,789771 | 1952,939681 | 1582,772197 |
| 1952,954342 | 2431,086832 | 2121,158534 | 1892,974824  |             | 1952,953039 | 1688,919233 | 2121,158494 | 1587,788782 |
| 2121,171819 | 2434,074588 | 2136,163370 | 1952,946074  |             | 2121,164944 | 1705,934008 | 2239,157681 | 1688,920335 |
| 2140,051162 | 2447,064845 | 2140,005099 | 2121,161991  |             | 2239,171339 | 1892,982942 | 2377,106655 | 1704,927253 |
| 2239,193606 |             | 2239,146391 | 2239,165544  |             | 2377,125251 | 1952,954700 | 2395,135887 | 1706,935831 |
| 2395,155229 |             | 2395,103956 | 2377,117237  |             | 2395,152269 | 2121,164980 | 2409,145574 | 1892,983335 |
| 2409,173252 |             | 2409,118878 | 2395,145104  |             | 2409,171093 | 2239,171740 | 2417,127373 | 1952,953357 |
| 2417,149128 |             | 2417,089471 | 2409,161342  |             | 2417,146167 | 2377,128282 | 2423,144924 | 2037,444260 |
| 2423,175753 |             | 2423,124580 | 2417,138921  |             | 2423,172597 | 2395,154935 | 2431,130707 | 2121,171933 |
| 2431,161640 |             | 2431,100558 | 2423,162065  |             | 2431,158431 | 2409,174670 | 2434,107114 | 2140,051606 |
| 2434,129904 |             | 2434,069129 | 2431,149095  |             | 2434,128579 | 2417,148933 | 2439,108764 | 2239,193034 |
| 2438,149415 |             | 2445,101144 | 2434,121023  |             | 2438,145582 | 2423,176852 | 2445,131714 | 2395,153343 |
| 2445,163024 |             | 2807,331230 | 2438,137503  |             | 2445,160597 | 2431,161888 | 2447,113496 | 2409,170521 |
| 2448,163565 |             |             | 2445,150928  |             | 2447,151281 | 2434,130593 | 2705,226666 | 2417,146656 |
| 2705,255229 |             |             | 2447,145126  |             | 2807,385722 | 2438,148727 | 2807,369435 | 2423,169268 |
| 2807,404947 |             |             | 2807,378609  |             | 3348,684799 | 2445,163982 | 3331,616709 | 2431,156377 |
| 3331,644179 |             |             | 3808,905350  |             | 3808,911698 | 2448,161634 | 3348,664252 | 2434,129142 |
| 3347,694019 |             |             |              |             |             | 2807,387561 |             | 2438,145175 |
| 3808,924347 |             |             |              |             |             | 3348,685889 |             | 2445,155871 |
|             |             |             |              |             |             |             |             | 2447,150398 |
|             |             |             |              |             |             |             |             | 2705,255447 |
|             |             |             |              |             |             |             |             | 2807,404542 |
|             |             |             |              |             |             |             |             | 3331,642754 |
|             |             |             |              |             |             |             |             | 3347,692527 |
|             |             |             |              |             |             |             |             | 3808,924263 |

Çizelge 3.5. S2 jelindeki spotların peptit kütleleri

| 10          | 11          | 12          | 13          | 14          | 15          | 16          |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 515,099415  | 523,923769  | 523,924495  | 523,923214  | 523,923729  | 515,098782  | 523,923675  |
| 523,922548  | 567,949903  | 567,948356  | 567,949934  | 567,949583  | 523,915271  | 567,950162  |
| 525,938583  | 627,916060  | 627,913121  | 627,915606  | 627,916944  | 525,931156  | 627,916170  |
| 567,945925  | 634,141220  | 634,128078  | 634,140161  | 634,142288  | 567,940068  | 634,141175  |
| 589,942039  | 643,906260  | 643,898506  | 643,905863  | 643,905781  | 570,088596  | 643,906247  |
| 605,911395  | 649,922296  | 649,916683  | 649,921692  | 649,920815  | 589,934815  | 649,922197  |
| 627,911327  | 655,937919  | 655,934074  | 655,937234  | 655,937095  | 605,890586  | 655,938503  |
| 634,116765  | 662,186317  | 662,176656  | 662,185619  | 662,186525  | 627,905754  | 662,185637  |
| 643,894193  | 665,908935  | 665,900870  | 665,908270  | 665,907404  | 634,115838  | 665,908575  |
| 649,909898  | 671,921393  | 671,916080  | 671,921101  | 671,920662  | 643,890458  | 671,921629  |
| 655,926897  | 681,896937  | 681,889303  | 681,897056  | 681,896118  | 649,903549  | 681,896862  |
| 659,160233  | 687,908171  | 687,899429  | 687,908717  | 687,906999  | 655,922737  | 687,908030  |
| 662,162647  | 804,291058  | 708,207949  | 804,290297  | 832,327429  | 662,162325  | 804,290992  |
| 665,891425  | 649,922296  | 832,308617  | 832,325700  | 839,090163  | 665,887428  | 832,326318  |
| 804,264535  | 842,525666  | 839,082920  | 839,088983  | 842,522923  | 671,904913  | 839,089951  |
| 832,294065  | 855,066612  | 842,514325  | 842,525018  | 855,064564  | 804,265868  | 842,525812  |
| 842,509046  | 861,082989  | 855,057777  | 855,066295  | 861,081138  | 832,294825  | 855,066532  |
| 855,050184  | 871,045171  | 861,076148  | 861,082670  | 871,043044  | 842,505821  | 861,083260  |
| 861,072842  | 877,059231  | 871,032693  | 871,045002  | 877,056595  | 855,035427  | 871,045050  |
| 877,043805  | 881,266604  | 877,050746  | 877,059052  | 881,269063  | 861,065319  | 877,059361  |
| 881,250742  | 893,034303  | 893,021131  | 893,034244  | 893,029941  | 877,037849  | 893,034323  |
| 931,508344  | 998,550828  | 998,46415   | 998,549999  | 998,549937  | 881,253629  | 998,550195  |
| 998,538585  | 1066,088280 | 1066,078418 | 1066,087768 | 1066,085849 | 998,537441  | 1066,088058 |
| 1277,723426 | 1082,066216 | 1082,054878 | 1082,065895 | 1082,063459 | 1060,552918 | 1082,065943 |
| 1327,677766 | 1277,744643 | 1277,724968 | 1277,21709  | 1277,743558 | 1277,708037 | 1277,744258 |
| 1349,657097 | 1327,697986 | 1327,683633 | 1327,696371 | 1327,697388 | 1327,676106 | 1327,696995 |
| 1492,438710 | 1349,682564 | 1349,664624 | 1349,680875 | 1349,681595 | 1349,656829 | 1349,681666 |
| 1526,743202 | 1365,668280 | 1492,413054 | 1365,667609 | 1490,458399 | 1365,634545 | 1365,667881 |
| 1528,725027 | 1492,444411 | 1532,775038 | 1490,460681 | 1492,443003 | 1492,434904 | 1490,460264 |
| 1532,770251 | 1502,712818 | 1543,758299 | 1492,446508 | 1502,725603 | 1502,698761 | 1492,446442 |
| 1543,747307 | 1506,452873 | 1544,754103 | 1502,708399 | 1506,438459 | 1506,456640 | 1502,725113 |
| 1544,747550 | 1527,775640 | 1554,772931 | 1506,452864 | 1527,762129 | 1526,737320 | 1506,453399 |
| 1549,784750 | 1532,788873 | 1558,766934 | 1527,775635 | 1529,780252 | 1532,765839 | 1527,776641 |
| 1554,760385 | 1543,778859 | 1560,758907 | 1532,788322 | 1532,785496 | 1543,752712 | 1532,789340 |
| 1557,742675 | 1544,775521 | 1566,748684 | 1543,777876 | 1543,775248 | 1544,746415 | 1543,778994 |
| 1558,759783 | 1549,808523 | 1571,775158 | 1544,774603 | 1544,774711 | 1549,783272 | 1544,774946 |
| 1560,749073 | 1554,795962 | 1574,772951 | 1549,807832 | 1549,806990 | 1554,758833 | 1549,807848 |
| 1571,770730 | 1557,795277 | 1581,754188 | 1554,794967 | 1554,795287 | 1557,755043 | 1554,795306 |
| 1573,739717 | 1558,782817 | 1586,767601 | 1557,794192 | 1557,793563 | 1558,759332 | 1557,794879 |
| 1689,887560 | 1559,790749 | 1688,889432 | 1558,781990 | 1558,780646 | 1560,745987 | 1558,782446 |
| 1705,902280 | 1561,786914 | 1705,906003 | 1559,789597 | 1559,789978 | 1565,743541 | 1559,790109 |
| 1707,876532 | 1566,768838 | 1892,964519 | 1561,784577 | 1561,783579 | 1571,766549 | 1561,786156 |
| 1892,951853 | 1570,786845 | 1952,933495 | 1566,767381 | 1566,768218 | 1574,760313 | 1564,784755 |
| 1952,910729 | 1571,798973 | 2121,158242 | 1570,785942 | 1570,788480 | 1581,746104 | 1566,767806 |
| 2121,158428 | 1574,802088 | 2136,164609 | 1571,797015 | 1571,799295 | 1587,750245 | 1569,788507 |
| 2136,164617 | 1582,771066 | 2239,149451 | 1574,800063 | 1574,802002 | 1688,865276 | 1571,797158 |
| 2140,010362 | 1587,790035 | 2377,099087 | 1582,771005 | 1582,769169 | 1705,887878 | 1573,803577 |
| 2143,117973 | 1688,921565 | 2395,125763 | 1587,788416 | 1587,789784 | 1892,949313 | 1576,791381 |
| 2154,029130 | 1705,937188 | 2409,137554 | 1688,919957 | 1688,919244 | 1906,953261 | 1582,771414 |
| 2239,144163 | 1892,984794 | 2417,114519 | 1704,926339 | 1705,933919 | 1914,927524 | 1587,788788 |
| 2292,154643 | 1952,953826 | 2423,137084 | 1706,934611 | 1892,982365 | 1952,906924 | 1688,920260 |
| 2309,096337 | 2121,171879 | 2431,118980 | 1892,982784 | 1952,954587 | 2121,103028 | 1704,927213 |
| 2409,109074 | 2140,051301 | 2434,097402 | 1952,951277 | 2121,164931 | 2239,132846 | 1706,935539 |
| 2417,080016 | 2239,193791 | 2445,120830 | 1994,003601 | 2239,183345 | 2380,085135 | 1892,983421 |
| 2423,116878 | 2395,154987 | 2807,364109 | 2121,171644 | 2377,128693 | 2395,095652 | 1952,953619 |
| 2431,084790 | 2409,172916 |             | 2140,051466 | 2395,154946 | 2409,108892 | 2121,172055 |
| 2807,328201 | 2417,148958 |             | 2239,192061 | 2409,173845 | 2417,079037 | 2140,051751 |
|             | 2423,173653 |             | 2395,150375 | 2417,148895 | 2423,116705 | 2239,193079 |
|             | 2431,159467 |             | 2409,168480 | 2423,175890 | 2431,086767 | 2395,152512 |
|             | 2434,131342 |             | 2417,142618 | 2431,161624 | 2434,074822 | 2409,196960 |
|             | 2438,149941 |             | 2423,167191 | 2434,129977 | 2445,090881 | 2417,145485 |
|             | 2445,160427 |             | 2431,153467 | 2438,148261 | 2807,310362 | 2423,168390 |
|             | 2448,161774 |             | 2434,126878 | 2445,163864 |             | 2431,155041 |
|             | 2705,254855 |             | 2438,141312 | 2448,162017 |             | 2434,128172 |
|             | 2807,404845 |             | 2445,153433 | 2807,395179 |             | 2438,142776 |
|             | 3331,642987 |             | 2448,155455 | 3347,690338 |             | 2445,154371 |
|             | 3347,692723 |             | 2705,248183 | 3808,910349 |             | 2447,148633 |
|             | 3808,923198 |             | 2807,398263 |             |             | 2705,255368 |
|             |             |             | 3331,634161 |             |             | 2807,400988 |
|             |             |             | 3347,685368 |             |             | 3331,635818 |
|             |             |             | 3808,913342 |             |             | 3347,689029 |
|             |             |             |             |             |             | 3808,920005 |

Kütle analizleri yapılan spotların PMF spektrumları incelendiğinde, spektrumların neredeyse hepsinin birbirinin aynı olduğu gözlenir. Peptit listelerinde kırmızı ile

işaretlenmiş tüm peptitler, 16 proteinde de ortaktır. Bu peptitler kullanılarak MASCOT'ta yapılan taramalar sonucunda tüm protein spotlarının 'major urinary protein'e karşılık geldiği görülmüştür ve bu spotların peptit kütlelerinden maksimum 5 tanesi (mavi ile işaretlenmiş peptitler)  $\alpha$ 2u-globulin'in de peptitlerine karşılık gelmektedir. Çizelge 3.6'da MASCOT taramaları sonuçlarına göre spotların MUP ile ortak olan peptitleri ve % dizi uyumları (sequence coverage) gösterilmiştir.

Çizelge 3.6. Protein spotlarının MUP peptitlerine karşılık gelen kütleleri

| <b>SPOT</b> | <b>% DİZİ UYUMU</b> | <b>MUP İLE ORTAK PEPTİTLER</b> |
|-------------|---------------------|--------------------------------|
| 1           | 31                  | 998, 1527, 1549, 1705, 2395    |
| 2           | 24                  | 998, 1549, 1705, 2395          |
| 3           | 24                  | 998, 1549, 1705, 2395          |
| 4           | 31                  | 998, 1527, 1549, 1705, 2395    |
| 5           | 24                  | 998, 1549, 1705, 2395          |
| 6           | 31                  | 998, 1527, 1549, 1705, 2395    |
| 7           | 31                  | 998, 1527, 1549, 1705, 2395    |
| 8           | -                   | 998, 1705, 2395                |
| 9           | 30                  | 998, 1527, 1549, 2395          |
| 10          | 28                  | 931, 998, 1549, 1705, 2395     |
| 11          | 31                  | 998, 1527, 1549, 1705, 2395    |
| 12          | 24                  | 998, 1705, 2395                |
| 13          | 30                  | 998, 1527, 1549, 2395          |
| 14          | 31                  | 998, 1527, 1549, 1705, 2395    |
| 15          | 24                  | 998, 1549, 1705, 2395          |
| 16          | 30                  | 998, 1527, 1549, 2395          |

Çizelge 3.7'de protein veri bankasında bulunan  $\alpha$ 2u-globulin proteininin aminoasit dizileri ve bu dizilerin ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) programı kullanılarak birbirleriyle yapılan aminoasit karşılaştırması gösterilmektedir.

Çizelge 3.7. Sıçan (*Rattus norvegicus*)  $\alpha$ 2u-globulin aminoasit dizilerinin karşılaştırılması

| NCBI Protein Referans No                                                                                                                                                                                                            | $\alpha$ 2u-globulin Aminoasit Dizileri                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| NP_671747<br>NP_988843<br>NP_001003409<br>XP_001067036<br>XP_001061142<br>XP_001062671<br>NP_001019419<br>NP_001029131<br>XP_001056737<br>NP_671745<br>NP_942079<br>NP_671746<br>NP_976070<br>XP_345540                             | <pre> MKLLLLLLCGLTLVCGHAEASSTRGNLDVAKLN<b>GDWFSIVVASNK</b>REKIEENGSMRVF 60 MKLLLLLLCGLTLVCGHAEDASSTRGNLDVDKLN<b>GDWFSIVVASNK</b>REKIEENGSMRVF 60 MKLLLLLLCGLTLVCGHAEASSTRGNLDVDKLN<b>GDWFSIVVASDK</b>REKIEENASMRVF 60 MKLLLLLLCGLTLVCGHAEASFERGNLDVDKLN<b>GDWFSIVVASNK</b>REKIEENGSMRVF 60 MKLFLLLLCGLTLVCGHAEANSESGNLDVDKLN<b>GDWFSIVVASDK</b>REKIEQNGSMRFF 60 MKLFLLLLCGLTLVCGHAEANSESGNLDVDKLN<b>GDWFSIVVASDK</b>REKIEQNGSMRFF 60 MKLLLLLLCGLTLVCGHAEANSESGNLDVDKLN<b>GDWFSIVVASNK</b>REKIEENGSMRVF 60 MKLLLLLLCGLTLVCGHAEASFERGNLDVDKLN<b>GDWFSIVVASDK</b>REKIEENGSMRVF 60 MKVLLLVLCGLTLVCGHAEASSTRGNLDVDKLN<b>GDWFSIVVASNK</b>REKIEENGSMRVF 60 MKLLLLLLCGLTLVCGHAEASSTRGNLDVDKLN<b>GDWFSIVVASDK</b>REKIEENGSMRVF 60 MKLLLLLLCGLTLVCGHAEASSTRGNLDVDKLN<b>GDWFSIVLASDK</b>REKIEENGSMRVF 60 MKLLLLLLCGLTLVCGHEEASFERGNVDVDKLN<b>GDWFSIVMASDK</b>REKIEENGSMRVF 60 MKLLLLLLCGLTLVCGHEEASFERGNLDVDKLN<b>GDWFSIVMASDK</b>REKIEENGSMRVF 60 MKLLLLLLRGLNLVCGHAEASFERGNLDVDKLN<b>GDWFSIVVASNK</b>REKIEENGSMRVF 60 *::*:*: * * * . * * * * * * * * * . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *                     </pre>                                                                                                                  |
| NP_671747.1<br>NP_988843.2<br>NP_001003409.1<br>XP_001067036.1<br>XP_001061142.1<br>XP_001062671.1<br>NP_001019419.1<br>NP_001029131.1<br>XP_001056737.1<br>NP_671745.1<br>NP_942079.1<br>NP_671746.1<br>NP_976070.1<br>XP_345540.2 | <pre> MQHIDVLENSLGFKFRIKENGECR<b>ELYLVAYKTP</b>EDGGEYFVEYDGGNTFTILKTDYDRYV 120 MQHIDVLENSLGFKFRIKENGECR<b>ELYLVAYKTP</b>EDGGEYFVEYDGGNTFTILKTDYDRYV 120 MQHIDVLENSLGFKFRIKENGECR<b>ELYLVAYKTP</b>EDGGEYFVEYDGGNTFTILKTDYDRYV 120 MQHIDVLENSLGFKFRIKENGECR<b>ELYLVAYKTP</b>EDGGEYFVEYDGGNTFTILKTDYDRYV 120 VQHIDVLENSLGFKFCIKENGECR<b>KLYSVAYKTP</b>KDGEYFLEYDGGNIFTILKTDYDRYV 120 VQHIDVLENSLGFKFCIKENGECR<b>KLYSVAYKTP</b>KDGEYFLEYDGGNIFTILKTDYDRYV 120 VQHIDVLENSLGFKCIKENGECR<b>KLYSVAYKTP</b>KIGGEYFLEYDGGNTFTILKTDYERYV 120 VQHIDVLENSLGFTRIKENGVC<b>TEFSLVADK</b>TAKDGEYFVEYDGGNTFTILKTDYDNYV 120 VQHIDVLENSLGFTRIKENGVC<b>TEFSLVADK</b>TAKDGEYFVEYDGGNTFTILKTDYDNYV 120 VQHIDVLENSLGFKFKIKENGVC<b>TEFSLVAYKTP</b>KDGEYFVEYDGGNTFTILKTDYDRYV 120 VQHIDVLENSLGFKFKIKENGVC<b>TEFSLVAYKTP</b>KDGEYFVEYDGGNTFTILKTDYDRYV 120 VQHIDVLENSLGFKFKIKKNGECR<b>EVYLVAYKTP</b>KDGEYFVEYDGGNTFTILKTDYDRYV 120 VQHIDVLENSLGFKFKIKVNGKCR<b>ELYLVAYKTP</b>KDGEYFVEYDGGNTFNILKTDYDRYV 120 VQHIDVLENSLGFKFKIKVNGKCR<b>ELYLVAYKTP</b>KDGEYFVEYDGGNTFNILKTDYDRYV 120 VQHIDVLENSLGFKFKIKVNGECR<b>ELYMVAYKTP</b>KDGEYFVEYDGGNTFNILKTDYKYKL 120 :*** ** * . * . : * * * * * : . * * : * . : * * * * * : * * * * * * * * :                     </pre> |
| NP_671747.1<br>NP_988843.2<br>NP_001003409.1<br>XP_001067036.1<br>XP_001061142.1<br>XP_001062671.1<br>NP_001019419.1<br>NP_001029131.1<br>XP_001056737.1<br>NP_671745.1<br>NP_942079.1<br>NP_671746.1<br>NP_976070.1<br>XP_345540.2 | <pre> MFHLINFKNGETFQLMVLYGR<b>TKDLSSDIKEKFAKLCEAHG</b>ITRDNIIDLTKTDRCLQAR 180 MFHLINFKNGETFQAMVLYGR<b>TKDLSSDIKEKFAKLCEAHG</b>ITRDNIIDLTKTDRCLQAR 180 MFHLINFKNGETFQAMVLYGR<b>TKDLSSDIKEKFAKLCEAHG</b>ITRDNIIDLTKTDRCLQAR 180 MFHLVNFNGETFQLMELYGR<b>TKDLSSDFKKKFAKLCEAHG</b>ITRDNIIDLTKTDRCLQAR 180 MFHLVNVNNGEAFQLMELYGR<b>TKDLSSDIKEKFAKLCEAHG</b>ITRDNIIDLTKTDRCLQAR 180 MFHLVNVNNGEAFQLMELYGR<b>TKDLSSDIKEKFAKLCEAHG</b>ITRDNIIDLTKTE-CLSVQ 179 MFHLVNVNNGEAFQLMELYGR<b>TKDLSSDIKEKFAKLCEAHG</b>ITRDNIIDLTKTDRCLQAR 180 MFHLVNVNNGETFQLMELYGR<b>TKDLSSDIKEKFAKLCEAHG</b>ITRDNIIDLTKTDRCLQA- 179 MFHLVNVNNGETFQLMELYGR<b>TKDLSSDIKEKFAKLCEAHG</b>ITRDNIIDLTKTDRCLQA- 179 MFHLVNFNGETFQLMELYGR<b>TKDLSSDIKEKFAKLCEAHG</b>ITRDNIIDLTKTDRCLQAR 180 MIHLVNVNNGETFQLMMLYGR<b>TKDLSSDIKEKFAKLCEAHG</b>ITRDNIIDLTKTDRCLKAR 180 MFHLVNFKDGETFQLMNLLGR<b>TKDLSSDIKEKFAKLCEAHG</b>ITRDNIIDVTKTRNRCQAQ 180 MFHLVNFKDGETFQLMNLLGR<b>TKDLSSDIKEKFAKLCEAHG</b>ITRDNIIDVTKTRNRCQAQ 180 ILQIINYKNGRTYLVTKLWG<b>TKYLS</b>SDIKEKFAKLCEAHGITRDNIIDLTNADRCLQA- 179 : : : : * * : * : : * * . * : * * * * * : * * * * * * * * * * * * * * :                     </pre>                                                                                |
| NP_671747.1<br>NP_988843.2<br>NP_001003409.1<br>XP_001067036.1<br>XP_001061142.1<br>XP_001062671.1<br>NP_001019419.1<br>NP_001029131.1<br>XP_001056737.1<br>NP_671745.1<br>NP_942079.1<br>NP_671746.1<br>NP_976070.1<br>XP_345540.2 | <pre> G----- 181 G----- 181 G----- 181 G----- 181 G----- 181 KSIQEVNLNGFLYPPFLDYSVLSGDFSPGLQHFFLSMEHPETNSAI 225 G----- 181 ----- 181 ----- 181 G----- 181 G----- 181 G----- 181 G----- 181 G----- 181                     </pre>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |



$\alpha$ 2u-globulin'in aminoasit dizilerinde sarı boyalı sekans bölgeleri 1549 Da, kırmızı çerçeveli sekans bölgeleri 1705 Da, yeşil ile boyalı sekans bölgeleri 998 Da, mavi ile boyalı sekans bölgeleri 2395 Da ve gri ile boyalı sekans bölgeleri de 1527 Da molekül ağırlıklı peptidlere karşılık gelmektedir.

NCBI referans numaraları ile isimlendirilmeleri değişen  $\alpha$ 2u-globulin'in molekül ağırlıkları ile proteinlerin içerdiği aminoasit sayıları Çizelge 3.8'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.8.  $\alpha$ 2u-globulin'in referans numaralarına göre isimleri, aminoasit sayıları ve molekül ağırlıkları

| NCBI referans No | İsim      | Aminoasit Sayısı | Molekül Ağırlığı (Da) |
|------------------|-----------|------------------|-----------------------|
| NP_671747        | PGCL1     | 181              | 20736,7676            |
| NP_988843        | PGCL2     | 181              | 20724,6699            |
| NP_001003409     | L type    | 181              | 20734,6621            |
| XP_001067036     | Rat n I   | 181              | 20917,9219            |
| XP_001061142     | S-a2u-g 1 | 181              | 20754,6992            |
| XP_001062671     | S-a2u-g 2 | 225              | 25747,2754            |
| NP_001019419     | a2u-g     | 181              | 20670,7246            |
| NP_001029131     | PGCL4     | 179              | 20349,1328            |
| XP_001056737     | PGCL4-1   | 179              | 23422,6992            |
| NP_671745        | PGCL3     | 181              | 20650,6602            |
| NP_942079        | MUP 4     | 181              | 20678,8633            |
| NP_671746        | PGCL5     | 181              | 20821,9199            |
| NP_976070        | MUP 5     | 181              | 20811,9258            |
| XP_345540        | S-PGCL2   | 179              | 20803,0176            |

Spot peptitleri ile MASCOT'ta yapılan taramalar sonucunda bu proteinlerin PGCL2 isimli protein oldukları görülmüştür ve Çizelge 3.7'de boyalı olarak gösterilen sadece birkaç sekans bölgesi, kütlesi analiz edilen proteinlerde bulunmaktadır. Diğer peptitler ise  $\alpha$ 2u-globulin peptit dizilerine karşılık gelmemektedir. Çünkü tarama yapılan veritabanlarına araştırma grupları birbirlerinden bağımsız olarak veri kaydedebilmektedir. Dolayısıyla tüm bu verilerin kontrol edilebilmesi çok zordur ve bu nedenle bulunan veriler çokta güvenilir değildir. Bundan dolayı bu verilere 'non-redundant' denmektedir.

#### 4. TARTIŞMA

Organizmanın sağlıklı olarak yaşamını sürdürebilmesi için kanın içinde bulunan maddelerin belli bir derişimde kalması gerekmektedir. Bunun için kan, nefronlardan geçerken süzölür ve yararlı maddelerden geri kalan artık maddelerin bulunduğu sıvı, idrar yolları ile dışarı atılır.

İdrar, kanın süzölmesi sonucu meydana geldiğinden, kanın bileşiminde meydana gelebilecek herhangi bir değışim idrarı doğrudan etkiler. Dolayısıyla idrar, vücut ile ilgili yararlı bilgiler içeren önemli bir biyolojik sıvıdır. Özellikle idrarda oluşabilecek protein artışı; renal ve uregenital rahatsızlıklarla doğrudan ilişkilidir. İdrarda protein artışı; yani proteinüri, böbrek hastalıklarına eşlik eden en önemli patofizyolojik bozukluklardan birisidir. Bunun dışında idrardaki protein çeşitliliği de nefropati hakkında önemli bilgiler verir. Bu nedenle idrarda proteomik çalışmaların yapılması, hastalıkların teşhisi için biyolojik işaretlerin (biyomarker) keşfedilmesinde de önemlidir.

Geçmişten beri doktorlar ve bilim insanları proteinürinin tam olarak aydınlatılması ile ilgilenmişlerdir. Bu bağlamda 1932 ve 1933 yılları arasında, proteinürinin nedenleri üzerine yapılan bir araştırmada sağlıklı laboratuvar hayvanlarının idrarında protein olduğu görölmüştür (Addis 1932, Bell 1933, Parfentjev vd 1933). Bu nedenle 1960'lara kadar sıçanlarda ve farelerde normal durumlarda bulunan bu proteinlerin detaylı araştırması yapılmış ve bu proteinlerin canlıda herhangi bir hastalık göstergesi olmadığı, hatta biyolojik bir zorunluluk olduğu ve diğere hamstır, köpek ve orangutan gibi hayvanların idrarında da yüksek miktarda bulunduğu görölmüştür.

Bu noktadan yola çıkılarak yapılan bu çalışmada da, bol miktarda bulunan, düşük moleköl ağırlığına sahip ve sıçanlarda  $\alpha 2u$ -globulinler olarak isimlendirilen bu proteinlerin izoform çeşitliliği iki boyutlu jelleri yapılarak araştırıldı. Bu proteinin incelenmesi, bir taraftan feromon taşıyıcısı olması, diğere taraftan da sıçanlarda nefropati ile ilişkili olması bağlamında önemlidir.

Çalışmada ilk olarak SDS-PAGE jeli ile Wistar tipi erkek ile dişi sıçan idrarlarında bulunan  $\alpha 2u$ -globulin'in molekül ağırlıklarının karşılaştırması yapıldı. Elde edilen jel görüntüsüne göre,  $\alpha 2u$ -globulin'in molekül ağırlığının dişi sıçanlarda erkek sıçanlara göre daha büyük olduğu düşünülmektedir.

Erkek sıçan idrarında bulunan  $\alpha 2u$ -globulin protein çeşitliliğinin 2D jelleri ile incelenebilmesi için hangi haftaya ait idrarın kullanılması gerektiğini bulmak amacıyla erkek sıçanların 4 ile 10 haftaları arasında idrarları toplandı. Dişi idrarlarının  $\alpha 2u$ -globulince düşük konsantrasyonda olduğu literatürden bilindiğinden bu idrarlar 5 kat konsantre edilerek, erkek sıçan idrarları ise herhangi bir işleme tabi tutulmadan % 15'lik SDS-PAGE jelinde yürütüldü. Sonuçta dişi sıçan idrarındaki  $\alpha 2u$ -globulin 10. haftadan itibaren SDS-PAGE jelinde görünür hale gelirken, erkek sıçan idrarındaki  $\alpha 2u$ -globulin, 6. haftadan itibaren bariz şekilde görünür hale geldi. Bu da erkek sıçanların 6. haftadan itibaren testosteron üretimine bağlı olarak cinsel olgunluğa ulaşmaya başladığını göstermektedir. Literatürde bu proteinin ifadesinin yaklaşık 6. haftada başlamakta olduğu ve 12. haftada da maksimum seviyeye ulaştığı ifade edilmektedir (Roy vd 1983). Bu nedenle 2D çalışmaları için 10 haftalık sıçanların idrarlarının kullanılmasına karar verilmiştir. Çünkü  $\alpha 2u$ -globulinin izoformlarının izoelektrik noktaları birbirlerine çok yakındır. Dolayısıyla kullanılan idrarlardaki protein konsantrasyonu, 2D jellerinde görünür olabilmesi için hem belli bir limitin üstünde olmalıdır hem de izoformların birbirlerine girişim yapmaması için çok yüksek konsantrasyonda da olmamalıdır.

$\alpha 2u$ -globulin'in ifadesinin testosteron hormonuna bağlı olduğunu göstermek amacıyla bir erkek sıçanın kastrasyonundan (testisleri uzaklaştırma işlemi) önce ve sonrasında idrarı alınarak 2D jelleri yapıldı. Testosteronun  $\alpha 2u$ -globulin'in ifadesini artırdığı söylenmektedir (Vandoren vd 1983). Fakat bu durum, 2D elektroforez kullanılarak yapılan idrar jel profilleri ile gösterilmemiştir. Bu bağlamda, idrarlardan yaklaşık 30 mg protein olacak şekilde alınarak 2D jelleri yapıldı. Elde edilen jel profillerine göre kastrasyondan sonra  $\alpha 2u$ -globulin'in izoformlarının neredeyse tamamı yok olurken, idrarda bulunan diğer proteinlerin miktarında artış gözlemlendi. Bu da gösterir ki kastrasyonla beraber testosteron seviyesi düşmüş, bu durum da  $\alpha 2u$ -globulin'in ifadesini durdurmuştur.

İdrarların 2D jelleri yapılmadan önce kromatografi yöntemleri ile saflaştırılmasına başvuruldu. İdrar örneği sırasıyla jel filtrasyon ve iyon değişim kolonlarından geçirildikten sonra, elde edilen fraksiyonların SDS-PAGE jeli yapılmış,  $\alpha 2u$ -globulin belli fraksiyonlarda yoğunlaşmış ve yüksek oranda saflaştırılabilmektedir. Sonuçta kromatografi metotlarıyla  $\alpha 2u$ -globulin'in sadece 2 izoformu elde edilmiştir. Bu spotların  $\alpha 2u$ -globulin oldukları MS analizleri ile onaylatılmıştır (Mantle, sözlü bilgi alış veriş).  $\alpha 2u$ -globulin'in birçok izoformdan oluştuğu bilinmektedir. Bu nedenle idrar örneklerinin 2D jelleri yapıldı.

Bu çalışmada  $\alpha 2u$ -globulini izoformlarına ayırmada Wistar tipi 3 adet erkek sıçan idrarı kullanıldı. Sıçanların idrar hacimleri birbirlerinden farklı olmasına rağmen yapılan Bradford yöntemiyle içlerinde bulunan toplam protein miktarları hepsinde yaklaşık 8 mg olarak hesaplandı.

Yapılan ön deneme çalışmalarında, kullanılan kapiler tüplerin uzunluğuna ve boyama çeşidine göre uygun protein miktarının da değiştiği görüldü. Küçük kapiler tüpler kullanıldığında eğer gümüş boyama yapılacak ise ortalama 30  $\mu g$  protein yüklemesi ideal sonuç verdi. Büyük kapiler kullanıldığında ise gümüş boyama için ortalama 60  $\mu g$ , CBB boyama için ise 135  $\mu g$  protein yüklemesi yapıldı.

Yapılan 2D jellerde  $\alpha 2u$ -globulin'in birçok izoformdan oluştuğu görüldü. Fakat yapılan tüm jellerde yaklaşık aynı miktarda örnek yüklemesi yapılmasına rağmen sıçanların idrar profillerinin birbirlerinden farklı olduğu gözlemlendi. Literatürde de  $\alpha 2u$ -globulin'in birçok izoformunun olduğu ve bu izoformların dönemsel olarak sürekli değiştiği söylenmektedir (Roy vd. 1983). Fakat sıçanların tümünde izoformların dönemsel olarak aynı olduklarına dair herhangi bir genelleme de yapılmamıştır.

Yapılan 2D jellerinden kesilen ve  $\alpha 2u$ -globulin olduğu düşünülüp MS yapılmış spotların peptid kütle parmak izi spektrumlarına göre 16 protein de  $\alpha 2u$ -globulin'e karşılık gelmiştir. Fakat protein spotlarında bulunan yalnızca 5 peptidin  $\alpha 2u$ -globulin peptitleri arasında da bulunduğu görülmüştür. Diğer peptitler de ise modifikasyon olduğu düşünülmektedir. Bu modifikasyonlar; glikolizasyon, fosforilasyon veya

metilasyon olabilir. Bu konuda literatürde herhangi bir bilgi bulunmamaktadır. Modifikasyonlardan hangisinin veya hangilerinin kütle analizi yapılan proteinlerde olduğu tek başına PMF spektrumlarından bulunamaz. Wistar tipi erkek sıçan idrarında iki sıra halinde farklı moleküler ağırlıklı ve izoelektrik noktalı 10-15 arasında  $\alpha$ 2u-globulin'in izoformu bulunmaktadır. Bu izoformlar arasındaki farklılıkların tam olarak aydınlatılabilmesi için elde edilen peptitlerin sekanslamaları yapılmalıdır veya 2D jelleri yapıldıktan sonra jeller CBB yerine sadece glikoproteinlere veya fosfoproteinlere bağlanan özel boyarmaddelerle boyanıp kütle analiz işlemlerine tabi tutulabilirler. Ayrıca protein veritabanlarında  $\alpha$ 2u-globulin'in 19 aminoasitlik bir sinyal sekansına sahip olduğu belirtilmektedir. Bu protein üretildiği hücreden dışarıya salındığından sinyal sekansını kaybetmiş olması gerekmektedir. Dolayısıyla  $\alpha$ 2u-globulin'in taramalarda çıkan 20,724 kDa'dan daha küçük bir molekül ağırlığa sahip olması gerekmektedir. Bu da yapılacak sekanlama işlemiyle bulunabilir.

## 5. SONUÇ

Wistar erkek sıçan idrarında yoğun olarak bulunan  $\alpha_2$ u-globulin'in izoform çeşitliliğinin araştırılması amacıyla yapılan bu çalışmada,  $\alpha_2$ u-globulin'in hem molekül ağırlık olarak hem de izoelektrik nokta olarak birbirlerinden farklılık gösteren 10-15 arasında izoformlarının olduğu görülmüştür. 2D jellerinde  $\alpha_2$ u-globulin olduğu düşünülen spotların PMF spektrumları çekilmiş ve bunların hepsinin NP\_988843 referans numarasına sahip PGCL2 isimli proteine karşılık geldiği görülmüştür. İzoformlar arasındaki farklılıkların belirlenmesinde elde edilen peptit kütleleri tek başına yeterli değildir. Bunun için bu aşamadan sonra uygun olarak seçilen peptitlerin sekanslamaları yapılmalıdır. Dolayısıyla  $\alpha_2$ u-globulin'in tek bir gen kaynaklı mı, yoksa birden fazla genden mi üretildiği bulunup, neden çok fazla izoformun var olduğu anlaşılabilir.

## 6. KAYNAKLAR

- ADDIS, T. 1932. Proteinuria and cylinduria. *Proceedings of the California Academy of Sciences*, 2, 38–52.
- ANDERSON, N.G., ANDERSON, N.L. and TOLLAKSEN, S.L. 1979. Proteins of human urine: I. Concentration and analysis by two-dimensional electrophoresis. *Clin Chem.*, 25:1199–210.
- AUSTIN, J.C., EMBERSON, L. and NICHOLLS, P. 2004. Purification and characterization of pheromaxein, the porcine steroid-binding protein. *European Journal of Biochemistry*, 271 (13), 2593–2606.
- BELL, M.E. 1933. Albuminuria in the normal male rat. *Journal of Physiology*, 79 (2), 191–93.
- BRADFORD, M.M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- 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.
- BORGHOFF, S.J., SHORT, B.G. ve SWENBERG, J.A. 1990. Biochemical mechanisms and pathobiology of alpha<sub>2</sub>u-globulin nephropathy. *Annu. Rev. Pharmacol Toxicol.* 30, 349-367.
- BORGHOFF, S.J., HARD, G.C., BERDASCO, N.M., GINGELL, R., GREEN, S.M. and GULLEDGE, W. 2009. Methyl isobutyl ketone (MIBK) induction of  $\alpha$ <sub>2</sub>u-globulin nephropathy in male, but not female rats. *Toxicology*, 258(2-3), 131-138.
- CAVAGGIONI, A. and MUCIGNAT-CARETTA, C. 2000. Major urinary proteins, alpha<sub>2</sub>u-globulins and aphrodisin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1482(1–2), 218–228.
- CHAN, K.M., KURTZ, D.T. and FIGELSON, P.H. 1978. Transcription of the alpha<sub>2</sub>u-globulin gene in male rat liver nuclei in vitro. *Biochemistry*, 17(15), 3092-3096.
- CUTLER, P., BELL, D.J., BIRRELL, H.C., CONNELLY, J.C., CONNOR S.C., HOLMES, E., MITCHELL, B.C., MONTE, S.Y., NEVILLE, B.A., PICKFORD, R., POLLEY, S., SCHNEIDER, K. and SKEHEL, J.M. 1999. An integrated proteomic approach to studying glomerular nephrotoxicity. *Electrophoresis*. 20, 3647–3658.

- DILL, A.D., LEE, K.M., RENNE, R.A., MILLER, R.A., FUCIARELLI, A.F., GIDEON, K.M., CHAN, P.C., BURKA, L.T. and ROYCROFT, J.H. 2003.  $\alpha_2$ u-Globulin Nephropathy and Carcinogenicity following Exposure to Decalin (Decahydronaphthalene) in F344/N Rats. *Toxicological Sciences*, 72, 223–234.
- EDWARDS, J.J., TOLLAKSEN, S.D. and ANDERSON, N.G. 1982. Proteins of human urine. III. Identification and two-dimensional electrophoretic map positions of some major urinary proteins. *Clin. Chem.*, 28/4, 941-948.
- FEIGELSON, P. and KURTZ, D.T. 1978. Hormonal modulation of specific messenger RNA species in normal and neoplastic rat liver. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.*, 47, 275-312.
- HURST, J.L., ROBERTSON, D.H.L., TOLLADAY, U. and BEYNON, R.J. 1998. Proteins in urine scent marks of male house mice extend the longevity of olfactory signals. *Animal Behaviour*, 55(5), 1289–97.
- 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, 839-47.
- KIMURA, H., ODANI, S., SUZUKI, J., ARAWAKA, M. and ONO, T. 1989. Kidney Fatty Acid-Binding Protein: identification as  $\alpha_2$ u-globulin. *FEBS letters*, 246(1-2), 101-104.
- KLOSE, J. 1975. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik*, 26:231-243.
- KLOSE, J. and KOBALZ, U. 1995. Two-dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome. *Electrophoresis*, 16(6):1034-59.
- KULKARNI, A.B., GUBITS, R.M. and FEIGELSON P. 1985. Developmental and hormonal regulation of  $\alpha_2$ u-globulin gene transcription. *Biochemistry*, 82, 2579-2582.
- KURTZ, D.T., SIPPEL, A.E. and FEIGELSON, P. 1976. Effect of thyroid hormones on the level of the hepatic mRNA for  $\alpha_2$ u-globulin. *Biochemistry*, 15(5), 1031–1036.
- KURTZ, D.T., CHAN, K.M. and FEIGELSON, P.H. 1978. Glucocorticoid Induction of Hepatic  $\alpha_2$ u-Globulin Synthesis and Messenger RNA Level in Castrated Male Rats in Vivo. *The Journal of Biological Chemistry*, 253(21), 7886-7890.



- LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- LEHMAN-MCKEEMAN, L.D. and CAUDILL, D. 1992. Biochemical basis for mouse resistance to hyaline droplet nephropathy: Lack of relevance of the  $\alpha_{2u}$ -globulin protein superfamily in this male rat-specific syndrome. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 112(2), 214-221.
- LOGAN, D.W., MARTON, T.F. and STOWERS, L. 2008. Species Specificity in Major Urinary Proteins by Parallel Evolution. *Plos One*, 3, 9, e3280.
- LYNCH, K.R., DOLAN, K.P., NAKHASI, H.L., UNTERMAN, R. and FEIGELSON, P. 1982. The role of growth hormone in  $\alpha_{2u}$ -globulin synthesis: a reexamination. *Cell*, 28, 185-189.
- MACINNES, J.I., NOZIK, E.S. and KURTZ D.T. 1986. Tissue-Specific Expression of the Rat Alpha<sub>2u</sub>-Globulin Gene Family. *Molecular and Cellular Biology*, 6(10), 3563-3567.
- MANTLE, P.G. and NAGY, J. 2008. Binding of Ochratoxin A to a Urinary Globulin: A New Concept to Account for Gender Difference in Rat Nephrocarcinogenic Responses. *Int. J. Mol. Sci.*, 9(5), 719-735.
- PARFENTJEV, I.A. and PERLZWEIG, W.A. 1933. The Composition of the Urine of White Mice. *The Journal of Biological Chemistry*, 100, 551-55.
- RAJKUMAR, R., ILAYARAJA, R., MUCIGNAT, C., CAVAGGIONI, A. and ARCHUNAN, G. 2009. Identification of alpha<sub>2u</sub>-globulin and bound volatiles in the Indian common house rat (*Rattus rattus*). *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, 46, 319-324.
- ROY, A.K. and NEUHAUS, O.W. 1966 *Proc. 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<sub>2u</sub>-globulin in the rat. *Endocrinology*, 97, 1505-1508.
- ROY, A.K., CHATTERJEE, B., PRASAD, M.S. and UNAKAI N.J. 1980. Role of insulin in the regulation of the hepatic messenger RNA for alpha<sub>2u</sub>-globulin in diabetic rats. *J. Biol. Chem.*, 255, 11614-11618.
- ROY, A.K., NATH, T.S., MOTWANIS, N.M. and CHATTERJEE, B. 1983. Age-dependent Regulation of the Polymorphic Forms of  $\alpha_{2u}$ -Globulin. *The Journal of Biological Chemistry*, 258(16), 10123-10127.
- SAITO, K., NISHIKAWA, J.I., IMAGAWA, M., NISHIHARA, T. and MATSUO, M. 2000. Molecular Evidence of Complex Tissue- and Sex-Specific mRNA

- Expression of the Rat  $\alpha_{2u}$ -Globulin Multigene Family. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 272(2), 337-344.
- SHEVCHENKO, A.M., WILM, O.V. and MANN, M. 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Analytical Chemistry*, 68:850-858.
- SIPPEL, A.E., FEIGELSON, P.H. and ROY, A.K. 1975. Hormonal regulation of the hepatic messenger RNA levels for alpha<sub>2u</sub>-globulin. *Biochemistry*, 14, 825-829.
- SIPPEL, A.E., KURTZ, D.T., MORRIS, H.P. and FEIGELSON, P. 1976. Comparison of in vivo translational rates and messenger RNA levels of alpha<sub>2u</sub> globulin in rat liver and Morris hepatoma. *Cancer Res.*, 36, 3588-3593.
- TANAKA, K., WAKI, H., IDO, Y., AKITA, S., YOSHIDA, Y. and YOSHIDA, T. 1988. Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time of flight mass spectrometry. *Rapid Comm. Mass Spect.* 2:151-153.
- TEGONI, M., PELOSI, P., VINCENT, F., SPINELLI, S., CAMPANACCI, V., GROLLI, S., RAMONI, R. and CABBILLAU, C. 2000. Mammalian Odorant Binding Proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1482, 229-240.
- THONGBOONKERD, V., KLEIN, J.B. and ARTHUR, J.M. 2003. Proteomic identification of a rat urinary proteins. *Nephron Exp. Nephrol*, 95, e69-e78.
- TISELIUS, A. 1930. The moving-boundary method of studying the electrophoresis of proteins. *Nova Acta Regiae Societatis Scientiarum Upsaliensis*, Ser. IV, Vol. 7 (4).
- VANDOREN, G., MERTENS, B., HEYNS W., BAELEN, H.V., ROMBAUTS, W. and VERHOEVEN G. 1983. Different Forms of  $\alpha_{2u}$ -Globulin in Male and Female Rat Urine. *Eur. J. Biochem.* 134, 175-181.
- 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.

## ÖZGEÇMİŞ

İlknur EKER, 1986 yılında İstanbul'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini İstanbul'da tamamladı. 2004 yılında girdiği Akdeniz Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nden 2008 yılında mezun oldu ve aynı yıl Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı.