

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Onur BALTACI

**NIEMANN-PICK C2 PROTEİNİNİN (bNPC2) SIĞIR SÜTÜNDEN
SAFLAŞTIRILMASI VE KOLESTEROLÜN TAŞINMASINDAKİ ROLÜNÜN
ARAŞTIRILMASI**

KİMYA ANABİLİM DALI

ADANA, 2009

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**NIEMANN-PICK C2 PROTEİNİNİN (bNPC2) SIĞIR SÜTÜNDEN
SAFLAŞTIRILMASI VE KOLESTEROLÜN TAŞINMASINDAKİ ROLÜNÜN
ARAŞTIRILMASI**

Onur BALTACI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

Bu tez//..... Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oy Birliği/Oy Çokluğu İle Kabul Edilmiştir.

İmza..... İmza..... İmza.....
Prof.Dr.S.Seyhan TÜKEL Prof.Dr.Mustafa CANLI Yrd.Doç.Dr.Ramazan BİLGİN
Danışman Üye Üye

Bu tez Enstitümüz Kimya Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Kod No:.....

Prof. Dr. Aziz ERTUNÇ
Enstitü Müdürü
İmza ve Mühür

**Bu Çalışma Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Birimi
Tarafından Desteklenmiştir.**

Proje No: FEF.2007.YL.20

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

NIEMANN-PICK C2 PROTEİNİNİN (bNPC2) SIĞIR SÜTÜNDEN
SAFLAŞTIRILMASI VE KOLESTEROLÜN TAŞINMASINDAKİ ROLÜNÜN
ARAŞTIRILMASI

Onur BALTACI

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

Danışman : Prof. Dr. S. Seyhan TÜKEL

Yıl : 2009, **Sayfa**: 48

Jüri : Prof. Dr. S. Seyhan TÜKEL

: Prof. Dr. Mustafa CANLI

: Yrd. Doç. Dr. Ramazan BİLGİN

Bu çalışmada sığır Niemann-Pick C2 proteini (bNPC2) tuzla çöktürme, diyaliz, DEAE-Sefadex A-50 anyon değiştirici kromatografisi, CM-Sefaroz ve SP-Sefaroz katyon değiştirici kromatografileri kullanılarak sığır sütünden saflaştırılmıştır. bNPC2'nin varlığı SDS-PAGE ve Western-Blot teknikleri ile belirlenmiştir. Bis(monomiristoilgliserol)fosfat (% 20 mol), 4-[¹⁴C]-kolesterol (% 1 mol), kolesterol (% 10 mol), *N*-[6-(biotinoil)amino]heksanoil-1,2-diheksadekanoil-sn-gliserol-3-fosfoetanolamin trietil amonyum tuzu (% 4 mol), fosfatidilkolin (% 65 mol) içeren verici veziküller ve bis(monomiristoilgliserol)fosfat (% 20 mol), kolesterol (% 10 mol), fosfatidilkolin (% 66 mol), *N*-(7-nitrobenz-2-okza-1,3-diazol-4-yl)-1,2-diheksadekanoil-sn-gliserol-3-fosfoetanolamin trietil amonyum tuzu (% 4 mol) içeren alıcı veziküller oluşturularak in vitro koşullarda bNPC2'nin kolesterol taşınmasındaki rolü incelenmiştir. bNPC2'nin verici veziküllerde bulunan 4-[¹⁴C]-kolesterolün % 52,3±5,2'ünün alıcı veziküllere taşınmasında rol oynadığı bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Niemann-Pick C2 protein, Kolesterol Transferi, Sığır sütü

ABSTRACT

MSc THESIS

<p style="text-align: center;">PURIFICATION OF NIEMANN-PICK C2 PROTEIN (bNPC2) FROM BOVINE MILK AND INVESTIGATION OF CHOLESTEROL TRANSFER ROLE</p>

Onur BALTACI

**DEPARTMENT OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
UNIVERSITY OF ÇUKUROVA**

Supervisor : Prof. Dr. S. Seyhan TÜKEL
Year : 2009, **Pages:** 48
Jury : Prof. Dr. S. Seyhan TÜKEL
: Prof. Dr. Mustafa CANLI
: Asist. Prof. Ramazan BİLGİN

In the present study, bovine Niemann-Pick C2 protein (bNPC2) is isolated from bovine milk by sequentially using salt precipitation, dialysis, DEAE-Sephadex A-50 anion exchange chromatography, CM-Sephadex and SP-Sephadex cation exchange chromatographies. bNPC2 is defined by using SDS-PAGE and Western-Blotting techniques. Donor vesicles composed of bis(monomyristoylglycerol)-phosphate (20 mol %), 4-[¹⁴C]-cholesterol (1 mol %), cholesterol (10 mol %), *N*-[6-(biotinoyl)amino]hexanoyl-1,2-dihexadecanoyl-sn-glycerol-3-phosphoethanolamine triethylammonium salt (4 mol %), phosphatidylcholine (65 mol %), and acceptor vesicles composed of bis(monomyristoylglycerol)phosphate (20 mol %), cholesterol (10 mol %), phosphatidylcholine (66 mol %), *N*-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-1,2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine triethylammonium salt (4 mol %) were used in experiments to investigate the role and efficiency of bNPC2 in cholesterol transfer. It was determined that bNPC2 has an effective role in 4-[¹⁴C]-cholesterol transfer from donor to acceptor vesicles with a transfer efficiency of 52.3±5.2 %.

Key Words: Niemann-Pick C2 protein, Cholesterol Transfer, Bovine milk

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimin ve tez çalışmam boyunca engin bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren, sabrını ve hoşgörüsünü esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. S. Seyhan TÜKEL'e, sayın hocalarım Doç. Dr. Güzide YÜCEBİLGİÇ ve Yrd. Doç. Dr. Ramazan BİLGİN'e şükranlarımı sunarım.

Ayrıca, Almanya'nın Rheinische Friedrich-Wilhems Universität Bonn, Bonn Üniversitesi Kimya bölümü öğretim üyelerinden Prof. Dr. Konrad Sandhoff'a ve Biyokimya çalışma grubu üyelerine teşekkürlerimi borç bilirim.

Maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen annem Şükran BALTACI, babam Kenan BALTACI ve kardeşim Alper BALTACI'ya sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER	SAYFA
ÖZ	I
ABSTRACT	II
TEŞEKKÜR	III
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	IV
ÇİZELGELER DİZİNİ	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ	VII
SİMGE VE KISALTMALAR	IX
1. GİRİŞ	1
1.1. Hücrenin Kolesterol Kaynakları.....	4
1.1.1. <i>De novo</i> Kolesterol Sentezi.....	5
1.1.2. Düşük Yoğunluklu Lipoproteinlerin (LDL) Reseptöre Bağlı Endositozu.....	5
1.2. Lipid Bağlayıcı Proteinler.....	7
1.2.1. Niemann-Pick C1 Proteini (NPC1)	8
1.2.2. Niemann-Pick C2 Proteini (NPC2).....	9
1.2.3. ATP-Bağlayıcı Kaset Taşıyıcı Protein (ABCA1).....	11
1.3. Niemann-Pick Hastalığı.....	12
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	14
3. MATERYAL VE METOD	19
3.1. Materyal.....	19
3.2. Metod.....	20
3.2.1. Niemann-Pick C2 Proteininin (bNPC2) Sığır Sütünden Saflaştırılması.....	20
3.2.1.1. Amonyum Sülfat ile Çöktürme.....	20
3.2.1.2. Diyaliz.....	21
3.2.1.3. DEAE-Sefadeks A-50 Anyon Değiştirici Kromatoğrafisi.....	21
3.2.1.4. CM-Sefaroz Katyon Değiştirici Kromatoğrafisi.....	21

3.2.1.5. SP-Sefaroz Katyon Değiştirici Kromatoğrafisi.....	22
3.2.1.6. Protein Tayini.....	22
3.2.1.7. Sodyum Dodesil Sulfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE).....	23
3.2.1.8. Western-Blot Analizi.....	25
3.2.2. Veziküllerin Hazırlanması.....	26
3.2.2.1. Verici Veziküllerin Hazırlanması.....	26
3.2.2.2. Alıcı Veziküllerin Hazırlanması.....	26
3.2.2.3. Kolesterol Transfer Deneyleri.....	27
4. BULGULAR VE TARTIşMA.....	29
4.1. Bulgular.....	29
4.1.1. Niemann-Pick C2 Proteininin Saflaştırılmasına Ait Bulgular.....	29
4.1.1.1. Diyaliz ve DEAE-Sefadeks A-50 Anyon Değiştirici Kromatoğrafisi işlemleri Sonrasında Alınan Örneklere Ait Bulgular.....	29
4.1.1.2. CM-Sefaroz Katyon Değiştirici Kromatoğrafisi Sonuçları.....	30
4.1.1.3. SP-Sefaroz Katyon Değiştirici Kromatoğrafisi Sonuçları..	32
4.1.2. Kolesterol Transfer Deneylerine Ait Bulgular.....	36
4.1.2.1. Kolesterol Transfer Deneyi Sonuçları.....	36
4.2. Tartışma.....	38
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	42
5.1. Sonuçlar.....	42
5.2. Öneriler.....	42
KAYNAKLAR.....	43
ÖZGEÇMİş.....	48

ÇİZELGELER DİZİNİ	SAYFA
Çizelge 3.1. SDS-PAGE için alt jelin bileşimi.....	23
Çizelge 3.2. SDS-PAGE için üst jelin bileşimi.....	23
Çizelge 3.3. Gümüş boyama için kullanılan çözeltiler.....	24
Çizelge 3.4. Kolesterol transfer deneylerinde kullanılacak tüplerin içerikleri.....	27
Çizelge 4.1. Diyaliz (D), DEAE-Sefadeks A-50 anyon değiştirici kromatografisi işlemleri sonrasında alınan örnek (A), ultrafiltrasyon ile deriştirilmiş örneğe (U) ve bNPC2'yi içeren örneğe (+bNPC2) ait protein derişimleri.....	29
Çizelge 4.2. 1-9 olarak numaralandırılmış örneklere ait protein derişimleri.....	35
Çizelge 4.3. Veziküller arası kolesterol transfer deneyi sonuçları.....	37

ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 1.1.	Membran, membran lipid ve protein bileşenlerinin endositozu ve hücre içinde parçalanması.....	4
Şekil 1.2.	LDL'nin endositozu.....	7
Şekil 1.3.	NPC1'in yapısı.....	9
Şekil 1.4.	bNPC2'nin üç boyutlu yapısı.....	10
Şekil 1.5.	Geç endozomlarda sfingomiyelinin asit sfingomiyelinaz ve glukozilseramidin glukozilseramid- β -glukosidaz tarafından yıkımı sonucu oluşan seramid'in iç membranlarda yer alan kolesterol ile yer değiştirmesi ve kolesterolün NPC2 ve NPC1 taşıma sistemi ile lizozom dışına taşınması.....	11
Şekil 3.1.	Biomag streptavidin manyetik nanopartiküllerinin tüpün çeperlerine tutunması.....	28
Şekil 4.1.	Diyaliz sonrası aynı diyalizattan alınan örneklerle (D), DEAE-Sefadex A-50 anyon değiştirici kromatografisi sonrası örnek (A), ultrafiltrasyon hücresi ile deriştirme sonrası örnek (U), bNPC2'yi içeren örnek (+bNPC2) ve molekül ağırlıkları bilinen standart protein karışımını içeren örneğe (S) ait SDS-PAGE sonuçlarını gösteren elektroferogram.....	30
Şekil 4.2.	CM-Sefaroz katyon değiştirici kromatografisi kullanılarak elde edilen bNPC2'yi içeren 10-18 olarak numaralandırılmış fraksiyonlara ve moleküler ağırlıkları bilinen standart protein karışımını içeren örneğe (S) ait SDS-PAGE sonuçlarını gösteren elektroferogram.....	31
Şekil 4.3.	CM-Sefaroz katyon değiştirici kromatografisi kullanılarak elde edilen bNPC2'yi içeren 14-18 olarak numaralandırılmış fraksiyonlara, bNPC2'yi içeren örnek (+bNPC2) ve molekül ağırlıkları bilinen standart protein karışımını içeren örneğe (S) ait SDS-PAGE sonuçlarını gösteren elektroferogram.....	31

Şekil 4.4.	CM-Sefaroz katyon değiştirici kromatoğrafisi kullanılarak elde edilen 14-18 olarak numaralandırılmış fraksiyonlara ve bNPC2'yi içeren örneğe (+bNPC2) ait Western-Blot sonuçları.....	32
Şekil 4.5.	SP-Sefaroz katyon değiştirici kromatoğrafisi kullanılarak toplanmış protein içeren 1-6 olarak numaralandırılmış olan eluatlara ve molekl ağırlıkları bilinen standart protein karışımını içeren örneğe (S) ait SDS-PAGE sonuçlarını gösteren elektroferogram.....	33
Şekil 4.6.	SP-Sefaroz katyon değiştirici kromatoğrafisi kullanılarak temizlenip bir araya toplanan 1-9 olarak numaralandırılmış örneklere ve molekl ağırlıkları bilinen standart protein karışımını içeren örneğe (S) ait SDS-PAGE sonuçlarını gösteren elektroferogram.....	34
Şekil 4.7.	SP-Sefaroz katyon değiştirici kromatoğrafisi kullanılarak temizlenip bir araya toplanan 1-9 olarak numaralandırılmış örneklere ait Western-Blot sonuçları.....	35
Şekil 4.8.	Veziküller arası kolesterol transferinin zamana bağlı olarak değişimi.....	38

SİMGELER VE KISALTMALAR

APS	: Amonyum persülfat
BMP	: Bis(monomiristoilgliserol)fosfat
Biotin-X-DHPE	: N-[6-(biotinoil)amino]heksanoil-1,2-diheksadekanoil-sn-gliserol-3-fosfoetanolamin trietil amonyum tuzu
BSA	: Sığır serum albümini
BCA	: Bikinkoninik asit
CM	: Karboksimetil
DEAE	: Dietilaminoetil
EDTA	: Etilen diamin tetraasetik asit
FKS	: Fetal sığır serumu
NBD-PE	: N-(7-nitrobenz-2-okza-1,3-diazol-4-yl)-1,2-diheksadekanoil-sn-gliserol-3-fosfoetanolamin trietil amonyum tuzu
PBS	: Tamponlanmış fosfat tuzu
PVDF	: Poliviniliden diflorür
PC	: Fosfatidilkolin
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
SP	: Sülfopropil
TEMED	: Tetra metil etilen diamin

1. GİRİŞ

Memelilere ait hücresel membranların esansiyel bir bileşeni olan kolesterol, membran yapısının oluşumunda ve düzenlenmesinde önemli bir yere sahiptir. Kolesterolün miktarı ve hücre içerisindeki dağılımı *de novo* sentez, esterifikasyon ve hücre içi taşınım ile sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir. Endositoz yolu kolesterol metabolizmasında anahtar rolü oynamaktadır ve bu yoldaki kalıtsal bozukluklar sonucunda Niemann-Pick tip C (NPC), hiperkolesterolemia ve Wolman sendromu gibi çeşitli metabolik hastalıklar oluşmaktadır. Hücre içerisindeki kompartmanların membranlarındaki kolesterolün dağılımı büyük oranda farklılık göstermektedir. Kolesterolün konsantrasyonu sentezlendiği yer olan endoplazmik retikulumda çok düşük olmakla beraber Golgi aygıtından trans-golgi ağına ve plazma membranına doğru gidildikçe kolesterolün düzeyi artmaktadır. Kolesterol membranın akışkanlığını düzenlemekte, Na⁺,K⁺-ATPaz'ın maksimum düzeyde aktivite göstermesini ve düşük Na⁺ iyonu geçirimsizliğini sağlamaktadır. Ayrıca kolesterolün sfingomiyeline olan yüksek ilgisi sinyal iletiminde önemli olduğuna inanılan ve lipid yığını (lipid rafts) olarak adlandırılan sıvı-düzenli hal membran bölümlerinin oluşumuna katkıda bulunmaktadır (Babalola ve ark., 2007). Bunlara ek olarak hücre büyümesi, lipoproteinlerin, steroid hormonların ve safra asitlerinin sentezlenmesi için de kolesterol gereklidir (Liscum ve Munn, 1999). Ökaryotik hücrelerde membranların, membran lipid bileşenlerinin ve bazı diğer hücre dışı moleküllerin yıkımı endozomal ve lizozomal kompartmanlarda gerçekleşmektedir. Bu yıkıma uğrayacak bileşenlerin hücre membranlarından oluşturulan veziküller aracılığı ile hücre içerisine alınmasına endositoz denir (Kolter ve Sandhoff, 2005; Özgüneş, 2004). Endositoza örnek olarak düşük yoğunluklu lipoproteinlerin (LDL), transferrinin, α₂-mikroglobülinin, sialoglikoproteinlerin, insülinin, epidermal büyüme faktörünün ve polimerik immünoglobülin A (IgA)'nın hücre içine alınması verilebilir (Özgüneş, 2004). Hücre membranı endositozla kaybettiği materyali egzositozla karşılar. Egzositoz, hücre içi membranlardan oluşan veziküllerin hücre içinden yükledikleri moleküllerin plazma membranı ile kaynaşarak dışarı verilmesidir.

Membranların temel bileşenleri olan amfilik lipidler, proteinler ve yıkımı gerçekleştirilecek moleküller lizozomlarda kendilerini oluşturan aminoasitlere, monosakkaritlere, sialik asitlere, gliserole, yağ asitlerine, sfingozin ve benzeri yapıtaşlarına ayrıştırılırlar (Kolter ve Sandhoff, 2005). Diğer membran lipidlerinden farklı olarak kolesterol lizozomlarda yıkılmamakta ancak endozomlarla (recycling endosomes) hızlı bir şekilde plazma membranına geri döndürülmektedirler (Lange ve ark., 2002; Babalola ve ark., 2007). Bu olay egzozitoza örnek olarak verilebilir.

Hücre içinde organeller arasında hızlı bir vezikül trafiği vardır. Ancak bu trafiğin çoğu endositoz ve egzozitoz ile bağlantılıdır. Egzozitozu gerçekleştirecek veziküller endoplazmik retikulum (ER)'de oluşur, Golgi kompleksi ile kaynaşır, Golgi boyunca taşınır ve Golgiden oluşan salgın vezikülleri ile plazma membranına taşınır. Aynı şekilde endositoz sırasında oluşan veziküller endozom kompleksi ile kaynaşır, buradan tomurcuklanan veziküller Golgiye ve lizozomlara taşınır. Endozom-Golgi-ER yönünde bir geri taşınım da yine veziküller aracılığı ile gerçekleştirilir.

Egzozitoz ve endositozda veziküllerin oluşması aynı temel mekanizma sayesinde gerçekleşmektedir. Bu mekanizma aşağıdaki gibi özetlenebilir. Şekil 1.1'de membran, membran lipid (örneğin: Glikosfingolipid (GSL)) ve protein (örneğin: Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü) bileşenlerinin endositozu ve hücre içinde parçalanması örnek olarak verilmiştir (Schulze ve ark., 2008).

Plazma membranı üzerinde endositozun meydana geleceği bölgelere, sitoplazmada çözünür halde bulunan kılıf proteinleri bağlanır. Membrana bağlanan kılıf proteinleri bir araya toplanarak sepet gibi bir yapı oluşturur ve membranın bu bölgedeki yapısını bozar. Bu sayede kılıflı çukurcuklar oluşur. Bu bölgede ligand bağlayıcı reseptörler ve bazı transmembran proteinleri toplanır. Reseptörleri ve bazı proteinleri de içine alarak membranın bu bölgesinin sitoplazmaya doğru kıvrılması ile vezikül tomurcuklanır. Vezikül membrandan kopar ve hemen kılıfından sıyrılır. Kılıfından sıyrılmış olan vezikül içerisindeki reseptör ve ligandlar, önce endozom kompleksinin 'erken endozom' olarak adlandırılan bölümüne alınır. Endozom kompleksinin yapısı hücre tiplerinden kaynaklanan bazı farklılıklara rağmen genel hatları ile aynıdır. Bu kompleks, Golgi kompleksine benzemekle beraber

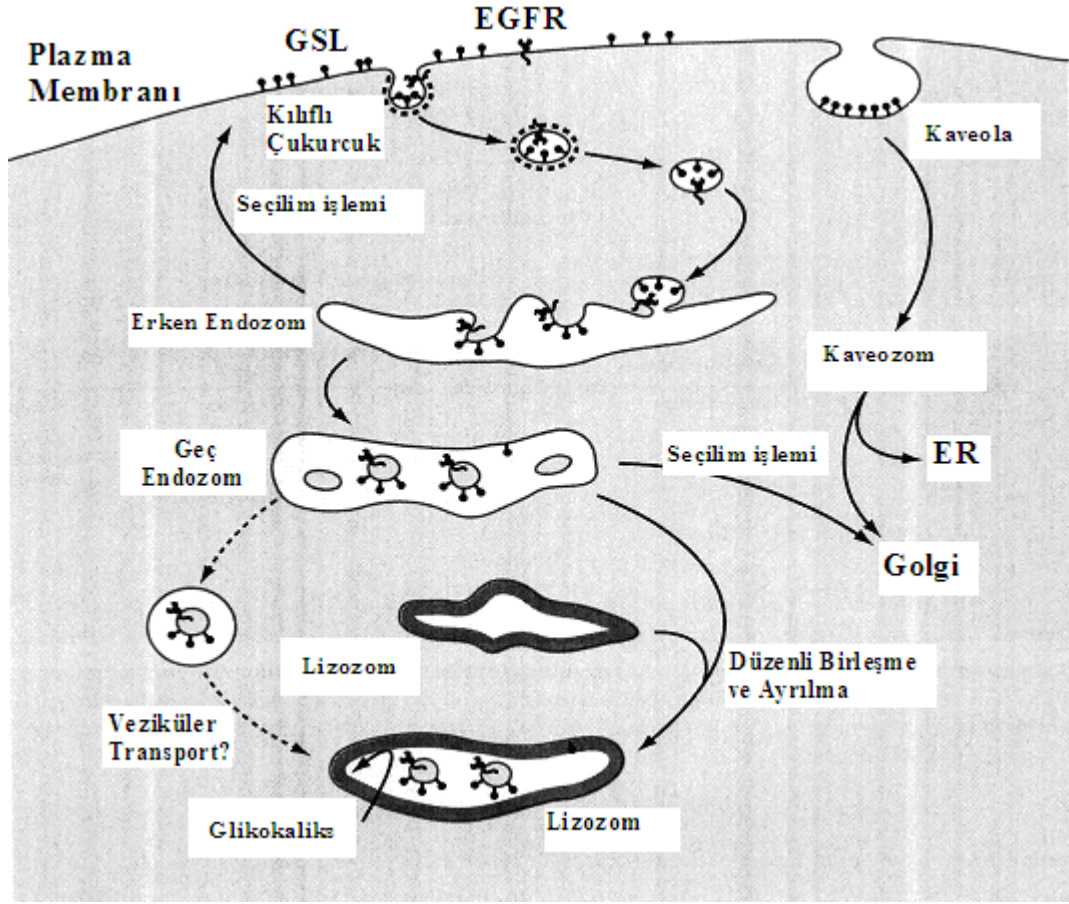
transgolgiden tamamen farklı olan ve küremsi vakuoller, vezikül-tübül biçiminde uzantılar içeren bir sistemdir. Bu sistemin erken endozom ve geç endozom gibi parçalardan oluştuğu düşünülmektedir. Endozom kompleksine giren moleküller (genellikle reseptör + ligand) hedeflerine göre dört ayrı yola yönelirler:

a) Membrana Dönüş (membrane recycling): Endositozla gerçekleşen membran kaybı egzositoz ve membrana dönüşle dengelenir. Geri dönüş yolu ile membranlardan ayrılan reseptörlerden bazıları da tekrar membrana döner. Yapılan çalışmalar geri dönüşün veziküllerle sağlandığını, bu veziküllerin çok küçük, şekillerinin ise yuvarlak veya boru biçiminde olabildiğini göstermiştir. LDL ve transferrin reseptörleri membrana dönüş vezikülleri ile geri dönen reseptörlerin iki örneğidir.

b) Hücre Geçme (transsitoz): Bu olay polarize hücrelerde gerçekleşir. Hücrenin bir yüzünden endositoz ile alınan molekül, bir başka yüzünden egzositozla dışarı verilir. Örnek olarak, sinir büyüme faktörünün ileumdan geçişini verebiliriz.

c) Golgiye Taşınım: Transgolgi ağı ile endozom kompleksi arasında vezikül alışverişinin gerçekleştiği deneysel olarak belirlenmiştir. LDL'nin yıkımından veya plazma membranının endositozu ile elde edilen kolesterol plazma membranına doğrudan veya transgolgi ağı sayesinde membrana geri dönmektedir (Ikonen, 2006).

d) Lizozoma Giriş: Membranın içerisine endositozla alınan moleküller bir dakika içinde plazma membranı altındaki erken endozoma, 5-15 dakika içerisinde geç endozoma ve en sonunda da yukarıda bahsedilen üç yola girmemişlerse parçalanmak üzere hidrolitik enzimleri içeren lizozomlara alınırlar.



Şekil 1.1. Membran, membran lipid ve protein bileşenlerinin endositozu ve hücre içinde parçalanması (endoplazmik retikulum (ER), glikosfingolipid (GSL) epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR)) (Sandhoff ve Kolter, 2005)

1.1. Hücrenin Kolesterol Kaynakları

Memeli hücreleri steroid hormonların, safra asitlerinin, lipoproteinlerin ve membranların sentezi için gerekli olan kolesterolü düşük yoğunluklu lipoproteinlerin (LDL) reseptöre bağlı endositozu, plazma membranının endositozu (Şekil 1.1) ve endoplazmik retikulumde gerçekleşen *de novo* sentez sonucu elde ederler (Liscum ve Munn, 1999; Lange ve ark., 2002).

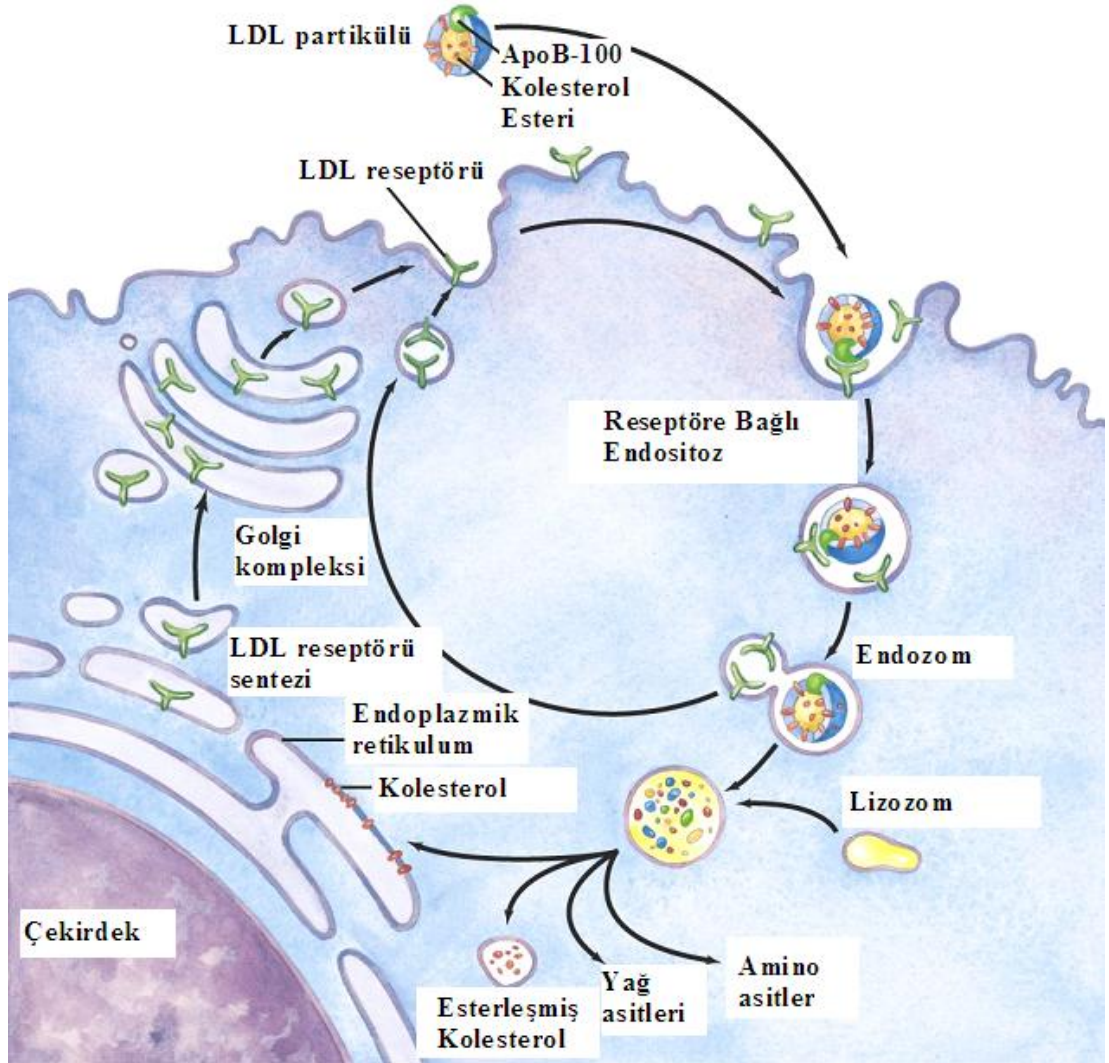
1.1.1. De novo Kolesterol Sentezi

Başta karaciğer olmak üzere, deri, adrenal korteks, beyin, ince barsaklar, testis gibi organların hücrelerinde yer alan endoplazmik retikulumlarda, Asetil-koenzim A (Asetil-CoA) moleküllerinden kompleks bir yapı olan kolesterol sentezlenmektedir. Kolesterol sentezinde kullanılan Asetil-CoA molekülleri yağ asitlerinin oksidasyonundan, pürivattan, aminoasitlerden ve keton cisimlerinden sağlanmaktadır. Kolesterol sentezinde ara ürün olarak oluşan izopentil pirofosfattan A vitamini, E vitamini, K vitamini, karotenler, dolikoller ve elektron taşıyan kinonlar (ubikinon, plastokinon) sentezlenmektedir. Kolesterol sentezinin dört ana basamağı bulunmaktadır. Üç molekül Asetil-CoA molekülü birleşerek altı karbonlu bir ara ürün olan mevalonatı oluşturmaktadır. Bu reaksiyonu hidrosimetilglutaril CoA redüktaz (HMG-CoAR) enzimi katalizlemektedir. Mevalonattan beş karbonlu aktif izopren birimi olan izopentil pirofosfat sentez edilmektedir. Beş karbonlu izoprenin polimerizasyonu ile elde edilen 30 karbonlu lineer yapıdaki skualenin halkalaşarak steroid çekirdeğini oluşturması ve daha ileri seviyedeki değişikliklerle (oksidasyonlar, metil gruplarının yer değiştirmesi) kolesterol sentezi tamamlanmaktadır (İkonen, 2006; Onat ve ark., 2002).

1.1.2. Düşük Yoğunluklu Lipoproteinlerin (LDL) Reseptöre Bağlı Endositozu

Kolesterol vücut sıvılarında çözünmez, bu nedenle diyetle alındıktan veya karaciğerde sentezlendikten sonra ancak bir taşıyıcı yardımıyla taşınır. LDL kan yoluyla kolesterol taşıyan bir komplekstir ve birçok hücrede özel olarak LDL'yi tanıyıp hücreye bağlayan reseptörler bulunur. LDL partikülü 20-25 nm çapında olup küre şeklindedir (Akın, 2005). LDL kolesterol ve trigliseritlerin oluşturduğu hidrofobik bir çekirdek etrafında tek tabakalı fosfolipid tabakası ve apoB-100 içerir (Wang ve ark., 2005). Bu LDL partikülleri birçok hücre için önemli bir kolesterol kaynağıdır. Şekil 1.2'de LDL'nin reseptöre bağlı endositozu gösterilmiştir. LDL partiküllerini tanıyan LDL reseptörleri kılıflı çukurcuklara yerleşmiş (-) yüklü glikoprotein molekülleridir (Akın, 2005; Güneş, 2003). Reseptörlere bağlanan LDL

partikülleri bu çukurcukların üzerinde gruplaşmış olarak görülürler. Diğer ligand reseptör sistemlerinde olduğu gibi LDL partiküllerinin de yüzey reseptörlerine bağlanıp, reseptör içeren vezikülün hücre içine alınmış evresinde enerjiye ihtiyaç duyulur. Vezikülün hücre içine girişi, partikülün reseptöre bağlanmasından 2-5 dakika sonra meydana gelir. Hücreye girdikten sonra bu kılıflı veziküller önce klatriin kılıflarını kaybederler. Kılıflarını kaybetmiş, düzgün yüzeyli bu veziküllere endozom veya reseptozom adı verilir. Kılıflarını kaybetmiş olan veziküller erken endozomlarla kaynaşır ve erken endozomların sahip olduğu düşük pH LDL'nin reseptöründen ayrılmasını sağlar (Soccio ve Breslow, 2004). Yeni oluşan bu iri vezikülün içindeki LDL partikülünden ayrılmış olan reseptörler bir tomurcuk oluşturarak vezikülden atılır ve hücre zarına geri dönerler. Geç endozomlarda ve lizozomlarda LDL partikülünde yer alan kolesterol esterleri asit lipazlar tarafından serbest kolesterole dönüştürülürler ve bununla birlikte apoB-100 de kendisini oluşturan amino asitlerine yıkılıp sitozole verilir. Lizozomlarda yıkılamayan LDL kaynaklı olan kolesterolün tam olarak açıklanamamış bir mekanizma ile plazma membranına veya tekrar esterleşme işleminin gerçekleştirildiği endoplazmik retikülüne taşındığı bildirilmektedir (Xu ve ark., 2008; Güneş, 2003; Hölltä-Vuori ve ark., 2000). Bu mekanizmada NPC1/NPC2 taşıma sisteminin rol oynadığı bildirilmektedir (Schulze ve ark., 2008).



Şekil 1.2. LDL'nin endositozu (Nelson ve Cox, 2005)

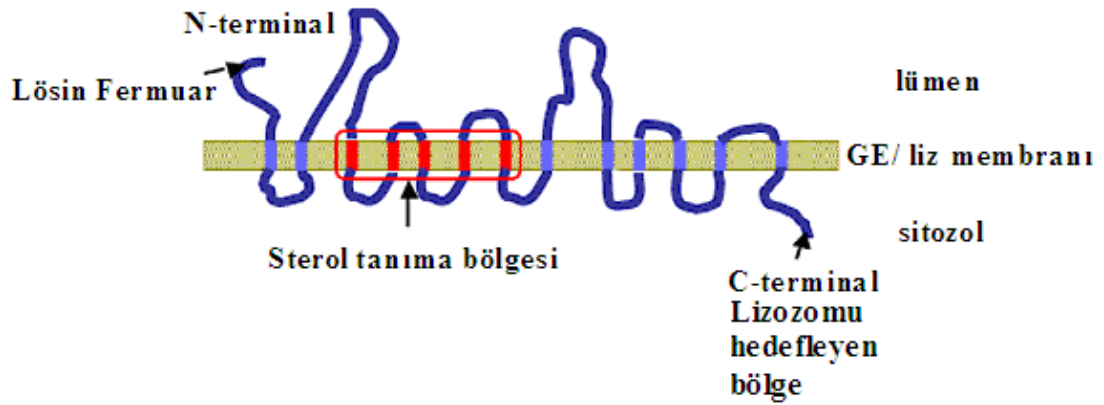
1.2. Lipid Bağlayıcı Proteinler

Kolesterolün yıkımı ve taşınması için veziküle bağımlı taşınma, sulu difüzyon ve birlikte veya ayrı bir şekilde çalışan çözünebilen taşıyıcılar ile taşınma olmak üzere 3 farklı mekanizma önerilmektedir (Babalola ve ark., 2007). Membran-aktif proteinler lipid moleküllerine bağlanabilir, lipidleri proteinlere veya hedef mambranlara taşıyabilir ve lipid tabakalarını seçilimli olarak yıkabilirler. Bunlar bağlanma özellikleri, hücrede buldukları bölge (sitoplazmik, sitoplazma dışı ve

hücre içi özellikleri), fonksiyonları açısından farklılık gösterirler. NPC1, NPC2 veya ABCA1 gibi kolesterol bağlayıcı proteinler lipid bağlayıcı proteinlerdendirler. Aşağıda NPC1, NPC2 ve ABCA1'nin yapı ve görevleri kısaca açıklanacaktır (Sandhoff ve ark., 2005).

1.2.1. Niemann-Pick C1 Proteini (NPC1)

NPC1 1247-amino asitten oluşan, membranı bir baştan bir başa kat eden 13 bölge, üç geniş hidrofilik ilmek, küçük bir sitoplazmik kuyruk içeren, geç endozomların membranlarında bulunan bir glikoproteindir (Prinz, 2002; Dixit ve ark., 2007; Subramanian ve Balch, 2008; Ioannou, 2005). Üç hidrofilik ilmekte geç endozomların lümenlerinde yerleşmiştir. Bu 13 bölgeden 5'i sterol tanıma bölgesini oluşturur. NPC1'in içerdiği sterol tanıma bölgesinin sterol metabolizmasında görev alan SCAP (Sterol Düzenleyici Element Bağlayıcı Protein (SREBP)) ayırıcı-aktive edici protein) ve 3-hidroksi-3-metil-glutaril CoA redüktaz (HMG-CoA redüktaz)'ın sterol tanıma bölgesi ile yapı bakımından benzer olduğu belirlenmiştir (Vance ve ark., 2005). NPC1'in NH₂ terminalinin yanında 73-94 amino asit kalıntısından oluşan lösin fermuar motifi bulunur (Şekil1.3). Protein COOH terminalinde ise potansiyel 19 tane N-glikozilasyon bölgesi ve iki lösin motifi içerir ve bu yapıların NPC1'i endositotik yolda yönlendirdiği düşünülmektedir (Ory, 2000). NPC1'in biyolojik fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir fakat NPC1'in plazma membranı gibi hedef membranlarla ve endoplazmik retikulumla birleşme yeteneğine sahip olan kolesterolce zengin veziküllerin oluşumunu sağlamak için geç endozomlarda yer alan kolesterolü topladığı ve lizozomlardan dışarı taşıdığı düşünülmektedir (Sayre ve Liscum, 2007; Ioannou, 2000). Davies ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalar sonucunda NPC1'in permeaz aktivitesine sahip bir transmembran akış pompası olduğunu ortaya koymuştur (Davies ve ark., 2000).

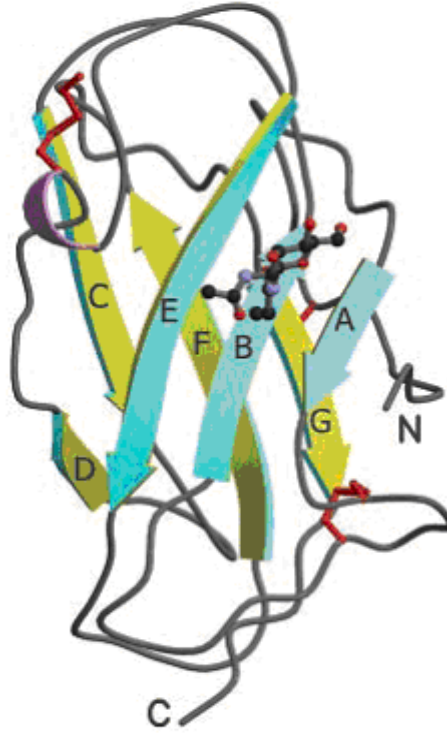


Şekil 1.3. NPC1'in yapısı (Vance, 2006)

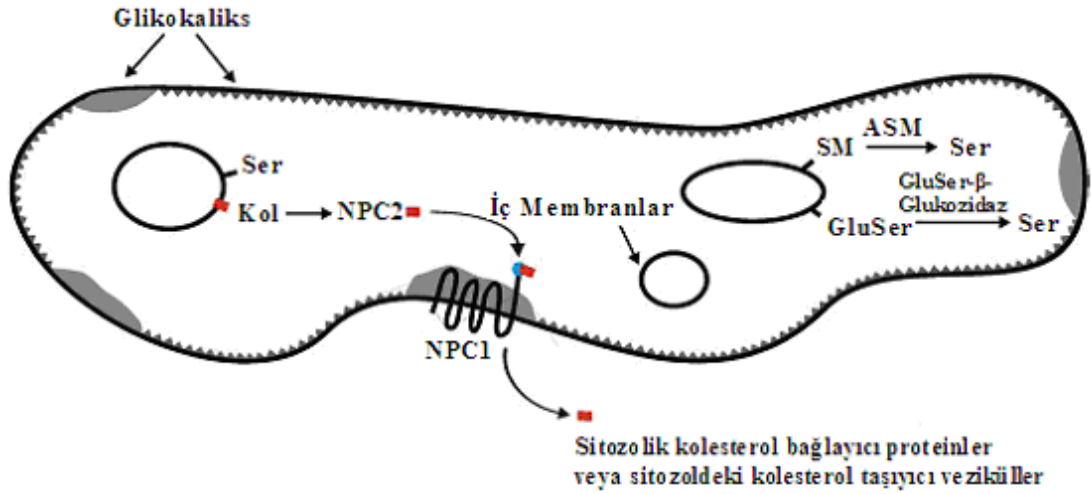
1.2.2. Niemann-Pick C2 Proteini (NPC2)

NPC2 küçük çözünebilir 151-amino asit içeren 19-amino asitten oluşan sinyal peptide sahip olan bir glikoproteindir (Vanier ve Millat, 2004). İlk olarak insan epididimislerinde büyük oranda salgılanan protein olarak belirlenen NPC2'nin sütte ve safrada da bulunduğu gösterilmiştir (Vanier ve Millat, 2004; Dixit ve ark., 2007). Köpek, sığır, fare, şempanze, makak ve domuz gibi bir çok memelide bulunan NPC2'nin polipeptid dizilimlerinde benzerlikler olduğu belirlenmiştir. Bütün polipeptid dizileri altı sistein kalıntısı, prolince zengin bir bölge (PVPFPIP) ve çeşitli sayıda (1-3) Asparagin (Asn)'e bağlı olan glikolizasyon bölgesi içermektedir. İnsanda bulunan Niemann-Pick C2 proteini (hNPC2) ile bNPC2'nin % 80 oranında benzerliğe sahip olduğu belirlenmiştir. Sütte bulunan bNPC2 saflaştırılıp kristal yapısı aydınlatılmıştır (Vanier ve Millat, 2004). Buna göre bNPC2 30°'lik dönüşe sahip iki β yaprağı içerisinde düzenlenmiş 7 β katlanmış yapının oluşturduğu immüoglobüline (Ig) benzeyen bir β sandviç katmanıdır. Birinci β yaprağı 3 β katlanmış yapı (β A, β B ve β E) ve ikinci β yaprağı ise dört β katlanmış yapıya sahiptir (β C, β D, β F ve β G). Dördüncü ve beşinci β katlanmış yapılar ise yarım bir dönüşe sahip α -heliks ile β yaprağına bağlanmışlardır (Friedland ve ark., 2003), (Şekil 1.4). Larsen ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalar sayesinde EPV20 olarak adlandırılan bNPC2'nin yapısında Cys-8-Cys-121, Cys-23-Cys-28 ve Cys-74-Cys-

802'ten oluşan üç disülfid bağına, Asn-19 ve Asn-39 olmak üzere iki glikozilasyon bölgesine ve 20 kDa'luk bir moleküler ağırlığa sahip olduğu bildirilmiştir (Larsen ve ark., 1997). Elisitin, sterol esteraz, kolesterol oksidaz, StAR gibi sterol bağlayıcı proteinlerde sterollerin bağlanması için büyük bir hidrofobik boşluk bulunmasına rağmen bNPC2'de böyle bir boşluğun bulunmadığını bunun yerine bNPC2'nin hidrofobik olan iç kısmında kolesterolün bağlı olmadığı durumda herhangi bir hidrofobik boşluğa sahip olmadığı buna karşın proteinin hidrofobik olan iç kısmında kolesterolün bağlandığı bir bölgenin bulunduğu kristal yapı analizi sayesinde belirlenmiştir (Friedland ve ark., 2003). Dixit ve arkadaşlarının yaptıkları in vitro çalışmalarda NPC2'nin sadece kolesterole değil bunun yanında öteki sterollere de bağlanabildiğini ve kolesterolü fosfolipid membranlara taşıyabildiğini ortaya koymuştur. NPC2'nin kolesterolü lümen içerisinde yer alan membranlardan veya agregatlardan NPC1'e doğrudan ya da lizozomal membranların sayesinde transfer ettiği ve NPC1'in kolesterolü endozomal/lizozomal sistemden dışarıya taşıdığı düşünülmektedir (Dixit ve ark., 2007), (Şekil 1.5).



Şekil 1.4. bNPC2'nin üç boyutlu yapısı (Friedland ve ark., 2003)



Şekil 1.5. Geç endozomlarda sfingomiyelinin asit sfingomiyelinaz ve glukozilseramidin glukozilseramid-β-glukosidaz tarafından yıkımı sonucu oluşan seramid'in iç membranlarda yer alan kolesterol ile yerdeğiştirmesi ve kolesterolün NPC2 ve NPC1 taşıma sistemi ile lizozom dışına taşınması (Glukozilseramid (GluSer), Glukozilseramid-β-Glukosidaz (GluSer-β-glukosidaz), Sfingomiyelin (SM), Asit Sfingomiyelinaz (ASM)) (Schulze ve ark., 2008)

1.2.3. ATP-Bağlayıcı Kaset Taşıyıcı Protein (ABCA1)

ABCA1 2261 amino asitten oluşan, yapı bakımından kıyaslandığında birbirinin benzeri olan iki bölümden oluşan bir integral membran proteindir. Her bir bölüm ATP'yi enerji kaynağı olarak kullanan 1 nükleotid bağlanma bölgesi ve 6 tane transmembran heliksi içerir. Membranların veya lipoproteinlerin endozomal/lizozomal yıkımı sonucu kolesterol açığa çıkmaktadır. Bu açığa çıkan kolesterol daha sonra endoplazmik retikulumlerde bulunan asetil CoA kolesterol açıltransferazlar (ACAT) tarafından esterleştirilirler. ABCA1'nin esterleşmiş olan bu kolesterolün hücre dışına taşınmasında görev aldığı düşünülmektedir (Oram, 2002; Hölltä-Vuori ve ark., 2000; Lange ve ark., 2002).

1.3. Niemann-Pick Hastalığı

Niemann-Pick hastalığı, otozomal resesif olarak aktarılan, sfingomiyelin ve sekonder olarak kolesterolün merkezi sinir sistemi ve diğer organlarda birikmesiyle karakterize edilen lizozomal bir lipid depo hastalığıdır (Atık ve ark., 2006). Bu hastalık ilk olarak 1914 yılında Albert Niemann tarafından çocuklarda sinir hücrelerinin (nöron) bozunmasına neden olan bir hastalık olarak belirlenmiştir. Hastalığın bulunmasından sonraki 34 yıl boyunca Ludwick Pick hastalığının yeni klinik özelliklerinin belirlenmesini sağlamıştır (Atık ve ark., 2006; Ioannou, 2005). 1958 yılında Crocker ve Farber hastalığı tip A,B,C,D olmak üzere sınıflandırmıştır (Ioannou, 2005; Ory, 2000). Niemann-Pick Tip C (NPC) otozomal resesif olarak aktarılan çeşitli etnik grupları etkileyen çocukluk döneminde ölüme neden olan ender rastlanan bir hastalıktır (Cheruku ve ark., 2006; Davies ve Ioannou, 2000). Düşük yoğunluklu lipoprotein kaynaklı esterleşmemiş kolesterol geç endozom/lizozomlarda ve Golgi aygıtında birikmektedir (Boadu ve Francis, 2006; Somers ve ark., 2001; Watari ve ark., 1999). Hastaların % 95'inde NPC1 proteinini kodlayan gende (18q11) geri kalan % 5'inde ise NPC2 / HE1 proteinini kodlayan gende (14q24.3) mutasyon olduğu gösterilmiştir (Demir ve ark., 2005). NPC geniş bir klinik spektruma sahiptir ve bulgular perinatal dönemden erişkin yaşa kadar değişik dönemlerde ortaya çıkabilmektedir (Boadu ve Francis, 2006). Karaciğerde ve dalakta esterleşmemiş durumdaki kolesterol, sfingomiyelin, bis(monoağılglicerol)fosfat, nötral ve asidik glikosfingolipidler, fosfolipidler birikmektedir (Ory, 2000). Beyincikteki purkinje hücrelerinin kaybı ve şişkinleşmiş aksonlar NPC'nin karakteristik histolojik bir belirtisidir (Vance, 2006). Hastalığın henüz kesin bir tedavisi olmamakla birlikte çeşitli tedavi yöntemleri denenmektedir. N-Bütidildeoksinojirimisin (NB-DNJ) gibi glikosfingolipid biyosentez inhibitörlerinin hayvan modellerinde sinir hücrelerinde (nöronlar) glikosfingolipid birikimini önlemede etkili olduğu gösterilmiştir. Gaucher hastalarında halen kullanılmakta olan NB-DNJ NPC tedavisinde umut verici olarak görülmektedir. Kemik iliği ve karaciğer transplantasyon tedavileri ile periferik dokularda lipid depo anormallikleri kısmen azaltılmış fakat sinir hücrelerinin bozunması

engellenememiştir. Gelecekte hastalığa neden olan genetik bozukluğun gen terapisi sayesinde düzeltileceği umut edilmektedir (Ünay ve ark., 2003).

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Larsen ve ark., 1997 İlk olarak Niemann-Pick C2 proteinini (bNPC2) sığır sütünden saflaştırmışlardır. bNPC2, sığır aspartik proteinaz enziminin öncüsü olan prokatepsin D'yi süttten saflaştırma işleminin ilgi kromatoğrafisi basamağında moleküler ağırlığı 20 kDa olan bir protein olarak SDS-PAGE ve Western-Blot teknikleri ile tesadüfen belirlemişlerdir. bNPC2'ye N-terminalinde sahip olduğu aminoasit dizilimi (EPVKFKDXGSGWVGVIKEVNVSPXPTQ) ve moleküler ağırlığından ötürü EPV20 adı verilmiştir. Yapılan bu çalışma sonucunda bNPC2'nin aminoasit diziliş sırası, cDNA'sının nükleotid dizilişi belirlenmiştir. bNPC2'nin cDNA nükleotid dizilişinin insan Niemann-Pick C2 (hNPC2) cDNA'sının nükleotid dizilişi ile % 79 oranında bir benzerliğe sahip olduğu ve Asn-19, Asn-39 olmak üzere iki glikozilasyon bölgesine sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca bNPC2'nin sığırın böbrek, dalak, karaciğer ve süt bezlerinde de sentezlendiğini fakat testislerinde sentezlenmediğini Northern-Blot analizi ile göstermişlerdir.

Okamura ve ark., 1999 Domuzun (*Porcine Cauda*) epididimislerindeki 8 ayı bölgeden toplanan epididimal sıvıdan NPC2'yi saflaştırmışlardır. Saflaştırdıkları NPC2'nin epididimal sıvıda moleküler ağırlığı 19 kDa olan bir glikoprotein olduğunu fakat epididimisten geçiş sırasında yapısında bulunan şeker kalıntısında meydana gelen bir takım işlemler sonucunda moleküler ağırlığının 16 kDa olduğunu SDS-PAGE ile belirlemiş ve N-terminalindeki aminoasit dizilişini (EPVHFRDCGSGVGVKEVNV) belirlemişlerdir. NPC2'nin kolesterole bağlanma ilgisinin 1 mol/mol yerine 0,94 mol/mol olduğunu tiryum işaretli kolesterolü ($[^3\text{H}]$ -kolesterol) kullanarak belirlemişlerdir.

Friedland ve ark., 2003 bNPC2'yi Larsen ve ark. (1997) önerdikleri metodu çok az modifiye ederek süttten saflaştırmışlardır. Bu modifiye etme işlemini DEAE-Sefaroz kromatoğrafisi basamağında kullanılan amonyum asetat pH 5.5 tamponu yerine amonyum asetat pH 7.0 tamponu kullanarak ve bNPC2'yi EndoH_f glikosidaz enzimi yardımıyla deglikozilleyerek gerçekleştirmişlerdir. Kristal yapı analizi

sayesinde bNPC2'nin 30°'lik dönüşü sahip iki β yaprağı içerisinde düzenlenmiş 7 β katlanmış yapının oluşturduğu immünooglobülin (Ig)'e benzeyen bir β sandviç katmanı olduğunu kanıtlamışlardır. Elisitin, sterol esteraz, kolesterol oksidaz, StAR gibi sterol bağlayıcı proteinlerde sterollerin bağlanması için büyük bir hidrofobik boşluk bulunmasına rağmen bNPC2'de böyle bir boşluğun bulunmadığını bunun yerine bNPC2'nin hidrofobik olan iç kısmında kolesterolün bağlandığı bir bölgenin bulunduğunu belirlemişlerdir. Deney faresinin (çin hamsteri) yumurtalık hücrelerini kullanarak hNPC2'yi üretmişlerdir. Elde ettikleri hNPC2'nin kolesterolün bir analogu olan dehidroergosterol (DHE) ile asidik ve nötral pH'da mikromolar düzeyin altındaki bir ilgi ile bağlandığını bildirmişlerdir.

Ko ve ark., 2003 Fareye ait NPC2'nin cDNA'sını taşıyan pNPC2myc-his-puro adlı ekspresyon vektörünü çin hamsteri'nin yumurtalık hücrelerine (CHO-KI) aktararak ürettikleri NPC2'nin moleküler ağırlığının 27-29 kDa olduğunu SDS-PAGE tekniği ile belirlemişlerdir. Tiryum işaretli kolesterol (³H]-kolesterol) ile yapılan bağlanma deneyleri sonucunda NPC2'ye kolesterolün Okamura ve ark. (1999) bildirdiklerinden daha yüksek bir ilgi ile bağlandığını belirlemişlerdir.

Frolov ve ark., 2003 Niemann-Pick C2 (NPC2) ve Niemann-Pick C1 (NPC1) proteinlerinde mutasyona sahip insan derisinden elde edilmiş fibroblastlarda 25-hidroksikolesterol ve 27-hidroksikolesterol gibi sterollerin hücre dışı kaynaklı kolesterolü taşıyan düşük yoğunluklu lipoproteinlerin (LDL) hücre içine alınmasında görev alan LDL reseptörlerinin sentezlenmesini ve hücre içi kolesterol biyosentezini baskıladıklarını bu sayede hücrel kolesterol birikiminin azaldığını bulmuşlardır.

Ong ve ark., 2004 Fare beyninden saflaştırdıkları NPC2'nin moleküler ağırlığının 23 kDa olduğunu Western-Blot analizi ile belirlemişlerdir. Buna ek olarak NPC2'nin başlıca beyin serebral korteksindeki piramidal veya görmeden sorumlu nöronlarda ve beyincikteki (serebellum) amigdala, purkinje hücrelerinde bulunduğunu, talamus, hipotalamus ve globus pallidusta yer alan nöronlarda ise çok

az miktarda bulunduğunu fareler üzerinde yaptıkları immünohistokimyasal çalışmalar sayesinde belirlemişlerdir.

Sleat ve ark., 2004 NPC2’de, NPC1’de ve her iki proteinde de mutasyona sahip farelerde Niemann-Pick C (NPC) hastalığının oluşumu, hastalığın patolojisi, nöronlardaki (sinir hücresi) lipid birikiminin biyokimyası gibi durumların aynı ya da benzer olduğunu, NPC2 ve NPC1’in lipidlerin lizozomlardan hücrenin diğer bölgelerine taşınmasını kolaylaştırdığını bulmuşlardır.

Chikh ve ark., 2004 İnsana ait NPC2’yi (hNPC2) içermeyen bir hastadan aldıkları deri fibroblastlarını ve üç farklı N-glikozilasyon bölgesinde mutasyona sahip NPC2’yi kodlayan 3 farklı cDNA’yı (NPC2-N38Q, NPC2-N58Q, NPC2-N135Q) kullanarak ürettikleri hNPC2’lerin moleküler ağırlıklarının sırasıyla 19-23, 21 ve 19 kDa olduğunu Western-Blot analizi ile belirlemişlerdir. hNPC2’nin lizozomlarda yer aldığını, üç N-glikozilasyon bölgesine sahip olduğunu, mutasyona sahip fibroblastlarda sadece iki bölgenin bulunduğunu göstermişlerdir. hNPC2’nin Asn-58’e bağlı tek bir oligosakkarit zinciri veya Asn-58 ve Asn-135’e bağlı olan iki oligosakkarit zinciri olmak üzere iki farklı N-glikozilasyona sahip formunun fibroblastlarda bulunduğunu belirlemiş, Asn-58 ve Asn-135’te mutasyona sahip hNPC2’lerle yapılan çalışmalar sonucunda tek bir oligosakkarit zinciri bağlı olan Asn-58’in hNPC2’nin aktivite göstermesinden sorumlu olduğunu belirlemişlerdir.

Cheruku ve ark., 2006 İnsana ait HE1(epididimal sekresyon protein E1 öncüsü) ekspresyon faktörünü taşıyan vektörü (HE-800#7) deney faresinden alınmış olan yumurtalık hücrelerine aktararak hNPC2’yi üretmişlerdir. hNPC2 (5 µM) ve kolesterolü (5 µM) 25°C, pH 5’de inkübe etmişler, inkübasyon öncesinde ve sonrasında endojen triptofanın absorbansını 280 nm’de ölçmüşlerdir. hNPC2’ye kolesterolün bağlandığı durumda endojen triptofan absorbansının azaldığını belirlemişlerdir. hNPC2 (5 µM) ve kolesterolü (5 µM) inkübe ettikten sonra ortama fosfatidilkolinden (1000 µM) oluşan yüksüz veziküller eklendiğinde endojen

triptofan absorbansının yükseldiğini belirlemişlerdir. Böylece hNPC2'nin kolesterolü veziküle taşıdığını bulmuşlardır.

Liou ve ark., 2006 hNPC2'nin cDNA'sını pMSXND adlı ekspresyon vektörü yardımıyla deney faresinin yumurtalıklarından alınan hücrelere aktarmış ve bu sayede hNPC2'nin 4 farklı izoformunu üretmişlerdir. Elde edilen hNPC2'lerin moleküler ağırlıklarının 18.9, 18.5, 17.7 ve 16.3 kDa olduğunu Western-Blot analizi ile belirlemişlerdir. hNPC2'nin sterollere (kolesterol, latosterol), bitki sterollerine (stigmasterol, β -sitosterol), kolesterol esterlerine (kolesterol asetat, kolesterol palmitat, kolesterol bütirat), oksisterollere (25-hidroksikolesterol, 27-hidroksikolesterol, 7-hidroksikolesterol) bağlandığını belirlemişlerdir. NPC2'de mutasyona sahip olan farelerin (NPC2-) ve NPC2'de mutasyona sahip olmayan farelerin (NPC2+) karaciğerlerini incelemiş, NPC2'de mutasyona sahip olan farelerin karaciğerlerinde 25-hidroksikolesterol, 27-hidroksikolesterol ve 7-hidroksikolesterol gibi oksisterollerin biriktiğini GC-MS kullanarak göstermişlerdir.

Xu ve ark., 2007 bNPC2'yi sığır sütünden Friedland ve ark. (2003) önerdiği metodu kullanarak saflaştırmışlardır. bNPC2'nin kolesterol-3-O-sülfata kolesterolden daha fazla bir ilgi ve seçicilikle bağlandığını kristal yapı analizleri sayesinde belirlemişlerdir. Kolesterol-3-O-sülfata bağlı olan ve bağlı olmayan bNPC2'nin aynı kafes yapısına sahip olduğunu, bağlı olduğu durumda kafes yapısının iki asimetrik birim, bağlı olmadığı durumda ise tek bir asimetrik birim içerdiğini belirlemişlerdir.

Babalola ve ark., 2007 Farklı bir çalışma grubundan aldıkları bNPC2'nin membranlar arasında kolesterol taşınmasında görev aldığını belirlemek için in vitro koşullarda verici ve alıcı veziküllerin kullanıldığı bir yöntem geliştirmişlerdir. Anyonik olan standart ve yüksüz olan temel olmak üzere iki farklı lipid bileşimine sahip verici ve alıcı veziküller tasarlamışlardır. Kolesterolün verici ve alıcı veziküller arasında bNPC2 tarafından taşındığını belirlemek için 4-[¹⁴C]-kolesterol kullanmışlardır. Kolesterolün bNPC2 ile verici ve alıcı veziküller arasında

taşınmasında ortamın sıcaklığı, pH'ı, zaman, bNPC2'nin miktarı, verici ve alıcı veziküllerin miktarının ve lipid bileşiminin (sfingomiyelin ve seramid) önemli faktörler olduğunu belirlemişlerdir. Yüksüz vezikülleri kullandıklarında bNPC2'nin verici veziküllerde bulunan kolesterolün yaklaşık % 18'inin alıcı veziküllere, anyonik veziküller kullandıklarında verici veziküllerdeki kolesterolün % 59'unun alıcı veziküllere taşınmasında görev aldığını bulmuşlardır. Glikozillenmemiş sfingolipid aktivatör protein-D (Sap-D) ve GM2-aktivatör protein (GM2AP) gibi lizozom kaynaklı proteinlerin verici veziküllerde bulunan 4-[¹⁴C]-kolesterolün % 30'unun alıcı veziküllere taşınmasında rol aldığını, lizozom kaynaklı olmayan sitokrom-c ve sığır serum albümini (BSA) gibi proteinlerin 4-[¹⁴C]-kolesterolü verici ve alıcı veziküller arasında taşıma aktivitesine sahip olmadığını göstermişlerdir.

Xu ve ark., 2008 hNPC2'yi deney faresinin yumurtalık hücrelerini kullanarak Cheruku ve ark. (2006) önerdiği metodu kullanarak üretmişler ve bNPC2'yi ise sığır sütünden Friedland ve ark. (2003) önerdiği metodu kullanarak saflaştırmışlardır. Fosfatidilkolin (% 65 mol), kolesterol (% 25 mol), laktozilseramid (% 10 mol), tiryum işaretli kolesterol ([³H]-kolesterol)(% 5 mol) içeren verici veziküller ve fosfatidilkolin (% 100 mol) içeren alıcı veziküller oluşturularak in vitro koşullarda hNPC2'nin kolesterol taşınmasındaki rolünü incelemişlerdir. hNPC2'nin verici veziküllerde bulunan tiryum işaretli kolesterolün alıcı veziküllere taşınım hızının $0,031 \pm 0,014 \text{ s}^{-1}$ olduğunu bildirmişlerdir

3. MATERYAL VE METOD**3.1. Materyal**

Araştırmada kullanılan tüm reaktifler analitik saflıkta olup Fluka veya Sigma-Aldrich, Qiagen, Avanti Polar Lipids, Carl Roth, Mandel, GE Healthcare Life Sciences, Molecular Probes, Biotium, Amersham Biosciences, Pharmacia Biotech, Invitrogen firmalarından sağlanmıştır. Araştırmada kullanılan monoklonal α -NPC2 antikoru ve sığır Niemann-Pick C2 proteini içeren örnek (+bNPC2) Prof. Dr. Konrad Sandhoff'un çalışma grubundan temin edilmiştir. Araştırmada kullanılan kimyasallar, araç ve gereçler şunlardır:

Kimyasallar: Formaldehit, metanol, gliserin, sodyum karbonat, asetik asit, glisin, tris-HCl, sodyum klorür, potasyum klorür, potasyum dihidrojen fosfat, sodyum dihidrojen fosfat, sodyum dodesil sülfat, gümüş nitrat, nitrik asit, amonyum asetat, amonyum sülfat, bis-akrilamid, triton-X-100, fetal sığır serumu, sığır serum albümini, tetra metil etilen diamin, sülfürik asit, sitrik asit monohidrat, tri sodyum-2-sitrat, etilen diamin tetraasetik asit, amonyum persülfat, roti-load çözeltisi, lumiglo A ve B substrat çözeltileri, molekül ağırlıkları bilinen standart protein karışımı, kolesterol, 4-[¹⁴C]-kolesterol, bis(monomiristoilgliserol)fosfat (C14:0-BMP), fosfatidilkolin, bikinkoninik asit, trisin, N-[6-(biotinoil)amino]heksanoil-1,2-diheksadekanoil-sn-gliserol-3-fosfoetanolamin trietil amonyum tuzu, N-(7-nitrobenz-2-okza-1,3-diazol-4-yl)-1,2-diheksadekanoil-sn-gliserol-3-fosfoetanolamin trietil amonyum tuzu, Biomag streptavidin manyetik nanopartikül süspansiyonu, radyoaktivite ölçüm karışımı, sığır (Holstein) sütü, DEAE(Dietilaminoetil)-Sefadeks A-50, CM(Karboksimetil)-Sefaroz, SP(Sülfopropil)-Sefaroz, ultrafiltrasyon hücresi (MWCO 10.000 kDa), polikarbonat membran, poliviniliden diflorür (PVDF) membran, anti-fare immünoglobülini (attan) (protein G-HRP), monoklonal α -NPC2 antikoru, sığır Niemann-Pick C2 proteini içeren örnek (+bNPC2).

Araç ve gereçler: Mikroplaka okuyucu (Multiskan Ascent V1 23), 96 kuyucuklu mikroplaka (Corning Life Sciences), güç kaynağı (BIORAD), pH metre (METTLER TOLEDO MP 220), lipozofast, HPLC (SMART, Amersham Biosystems), manyetik karıştırıcı (IKA-COMBI MAG RCT), otomatik pipetler (Eppendorf), santrifüj (Sorvall RC5C), sonikatör, analitik terazi (Sartorius BP 610), diyaliz membranı (Serva, MWCO 7000 kDa), ultrafiltrasyon hücresi (Vivaflow 50, Sartorius Stedim Biotech), radyoaktivite ölçüm cihazı (TRI-CARB 2900 TR), elektroforez düzeneği (BIORAD, POWER PAC 300), peristaltik pompa, Western-Blot elektrotları.

3.2. Metod

3.2.1. Niemann-Pick C2 Proteininin (bNPC2) Sığır Sütünden Saflaştırılması

Niemann-Pick C2 proteininin (bNPC2) sığır sütünden saflaştırılması için Friedland ve ark. (2003) önerdiği metod kullanılmıştır. Saflaştırılmaya çalışılan bNPC2'nin kaybını azaltmak amacıyla işlemler 4°C'de gerçekleştirilmiştir. Saflaştırmada kullanılan basamaklar aşağıda kısaca açıklanmıştır.

3.2.1.1. Amonyum Sülfat ile Çöktürme

İşlenmemiş taze süt 6,500xg'de 10 dakika santrifüjlenir. Santrifüj sonrasında açığa çıkan kalın yağ tabakası atıldıktan sonra yağsız sütün pH'ı 1 M H₂SO₄ kullanılarak 3.5'e ayarlanır. Oda sıcaklığında 45 dakika bekletilip 6,500xg'de 10 dakika santrifüjlenir. Santrifüjleme sonrasında açığa çıkan çökelek atılır ve süpernatant ile işleme devam edilir. Elde edilen süpernatanta basamaklı amonyum sülfat çöktürmesi uygulanır. İlk olarak elde edilen süpernatantın litresi başına 208 g amonyum sülfat eklenir (% 35'lik amonyum sülfat çöktürmesi) ve 4°C'de bir gece boyunca manyetik karıştırıcı yardımıyla karışmaya bırakılır. Karışım 6,500xg'de 20 dakika santrifüj edilir. Çökelek uzaklaştırılır. Elde edilen süpernatanta süpernatantın litresi başına 199 g amonyum sülfat eklenir (% 65'lik amonyum sülfat çöktürmesi) ve 4°C'de bir gece boyunca manyetik karıştırıcı yardımıyla karışmaya bırakılır.

Karışım 6,500xg'de 20 dakika santrifüjlenir. Süpernatant uzaklaştırılır. Çökelek, atılan süpernatantın litresi başına 100 mL olacak şekilde 10 mM amonyum asetat pH 7.0 tamponu ile süspanse edilir.

3.2.1.2. Diyaliz

Diyaliz membranından parçalar kesilip, 1 M EDTA pH 7.0 tamponu içerisinde 30 dakika kaynatılır ve oda sıcaklığında soğumaya bırakılır. Soğuyan membranlar su ile yıkanır. Membranlar süspansiyon ile doldurulur ve 0,5 mM amonyum asetat pH 7.0 tamponuna karşı 4°C'de diyaliz yapılır. Diyaliz sonrasında çözelti 6,500xg'de 10 dakika santrifüjlenir. Çökelek atılır. Santrifüjlenmiş diyalizat bir araya toplanır.

3.2.1.3. DEAE-Sefadeks A-50 Anyon Değişirici Kromatografisi

DEAE-Sefadeks 10 mM amonyum asetat pH 7.0 tamponu ile Cl⁻ iyonları ortamdaki tamamen uzaklaşmaya kadar yıkanır. Cl⁻ iyonlarının ortamdaki uzaklaşma uzaklaşmadığı % 10 AgNO₃ ve % 35 HNO₃'ten oluşan çözelti ile kontrol edilir.

Santrifüjlenmiş diyalizat ile Cl⁻ iyonlarından arındırılmış DEAE-Sefadeks hacimce oranları 1:2 olacak şekilde karıştırılarak 4°C'de bir gece boyunca karışmaya bırakılır. Karışım daha sonra bir kolon içerisine dökülür ve süzüntü toplanır. Süzüntü ultrafiltrasyon hücresi yardımıyla deriştirilir.

3.2.1.4. CM-Sefaroz Katyon Değişirici Kromatografisi

CM-Sefaroz kolonu kolon hacmi yaklaşık 60 mL olacak şekilde peristaltik pompa yardımıyla doldurulur. Kolon doldurulduktan sonra 10 mM amonyum asetat pH 5.0 tamponu ile yıkanır. Deriştirilmiş olan süzüntünün pH'ı glasiyel asetik asit yardımıyla 5.0'a ayarlanır ve peristaltik pompa yardımıyla 4°C'de CM-Sefaroz kolonuna uygulanır.

CM-Sefaroz kolonu 1 mL/dakika akış hızında 2 kolon hacmi kadar tampon A (10 mM amonyum asetat pH 5.0) ile bağlanmayan proteinleri uzaklaştırmak için, 1 kolon hacmi kadar % 10 tampon B (0,5 M amonyum asetat pH 5.0) ve % 90 tampon A'nın karışımından hazırlanmış çözelti ile, 10 kolon hacmi kadar % 10-40 tampon B gradienti ile ve 5 kolon hacmi % 100 tampon B ile yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) kullanılarak yıkanır. Fraksiyonlar toplanır. bNPC2'yi içeren fraksiyonlar SDS-PAGE ve Western-Blot teknikleriyle belirlenir.

3.2.1.5. SP-Sefaroz Katyon Değiştirici Kromatografisi

CM-Sefaroz katyon değiştirici kromatografisi ile elde edilen bNPC2'yi içeren fraksiyonların daha ileri saflaştırılmaları için SP-Sefaroz katyon değiştirici kromatografisi kullanılmıştır. SP-Sefaroz katyon değiştirici kolonu kolon hacmi 1 mL olacak şekilde peristaltik pompa ile doldurulur. Kolona temizlenmek istenen fraksiyondan 2 mL uygulanır. Kolon önce tampon A, daha sonra tampon B kullanılarak yıkanır ve fraksiyonlar toplanır. Bu fraksiyonların bNPC2 içerikleri SDS-PAGE ve Western-Blot teknikleri ile yeniden incelenir.

3.2.1.6. Protein Tayini

Diyaliz, DEAE-Sefadeks A-50 anyon değiştirici kromatografisi, CM-Sefaroz ve SP-Sefaroz katyon değiştirici kromatografileri işlemlerinden sonra protein derişimleri Bradford (1976) yöntemine dayanan bikinkoninik asit (BCA) yöntemiyle belirlenmiştir. Protein tayinin'de protein standartı olarak sığır serum albümini (BSA) kullanılır. Standart BSA çözeltisinden (0,25 mg/mL) 96 kuyucuklu mikroplaka üzerindeki kuyucuklara 20-19-17-15-13-11-9-7 µL alınıp üzerlerine toplam hacimleri 20 µL olacak şekilde destile su eklenir. Diyaliz, DEAE-Sefadeks A-50 anyon değiştirici kromatografisi, CM-Sefaroz ve SP-Sefaroz katyon değiştirici kromatografileri işlemlerinden sonra alınan her bir örnekten kuyucuklara 1-3-5 µL alınıp destile su ile 20 µL'ye tamamlanır. Daha sonra % 4'lük CuSO₄ çözeltisi bikinkoninik asit (BCA) ile 50 kat seyreltilir.

Bu hazırlanan çözeltilerden her bir kuyucuğa 200 µL eklenir ve 60°C'de 30 dakika bekletilip kuyucukların içeriklerinin absorbanları mikropłaka okuyucu ile 565 nm'de okunur.

3.2.1.7. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)

SDS-PAGE elektroforezinde Jagow ve ark. (1987) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. SDS-PAGE için Çizelge 3.1'de bileşimi verilmiş olan alt jel ve Çizelge 3.2'de bileşimi verilmiş olan üst jel kullanılır.

Çizelge 3.1. SDS-PAGE için alt jelin bileşimi

Alt Jel (% 12,5)	Hacim (µL)
Saf su	2105
Gliserin	1400
Jel tamponu (3M Tris-HCl,% 0,3 SDS)	3340
Bis-akrilamid çözeltisi (% 29)	3125
Amonyum persülfat (% 10)	20
TEMED (Hazır çözelti)	10

Çizelge 3.2. SDS-PAGE için üst jelin bileşimi

Üst Jel (% 4)	Hacim (µL)
Saf su	2775
Jel tamponu (3M Tris-HCl,% 0,3 SDS)	1670
Bis-akrilamid çözeltisi (% 29)	500
Amonyum persülfat (% 10)	50
TEMED (Hazır çözelti)	5

Yürütücü tampon olarak 0,1 M Tris-HCl, 0,1 M Trisin, % 0,1 (w/v) SDS, % 0,01 (w/v) NaN_3 'ten oluşan çözelti kullanılır. Elde edilen fraksiyonların herbirinden 18 μL alınır üzerlerine 6 μL roti-load çözeltisi eklenir, vortekslenir ve 95°C 'de 5 dakika bekletilir. Hazırlanan örnekler (24 μL) ve molekül ağırlıkları bilinen standart protein karışımı (5 μL) kuyucuklara enjekte edilir. Güç kaynağı 70V'a ayarlanır. Örnekler 70V'ta 30 dakika yürütüldükten sonra güç kaynağı 110V'a ayarlanır, 1 saat yürütülür. Jeller Blum ve ark. (1987) bildirdiği metoda göre gümüş boyama tekniği ile boyanmıştır. Çizelge 3.3'de gümüş boyama için kullanılan çözeltiler verilmiştir.

Çizelge 3.3. Gümüş boyama için kullanılan çözeltiler

Çözeltiler	
Sabitleyici ve durdurucu	% 50 metanol, % 12 asetik asit
Karbonat Çözeltisi	60 g/L
Saklama çözeltisi	% 30 metanol, % 3 gliserin
Sodyum tiyosülfat çözeltisi	2 g/ 50 mL
Gümüş nitrat çözeltisi	10 g/ 50 mL

Jel, içerisine 25 μL formaldehit eklenen sabitleyici ve durdurucu çözeltisi içerisinde 1 saat bekletilir. Etanol çözeltisi (% 50) ile 3 kere 20 dakika arayla yıkanır. 50 mL su içerisine 250 μL sodyum tiyosülfat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) çözeltisi eklenir ve jel bu çözelti içerisinde 1 dakika bekletilir. Jel su ile 3 defa 20 saniye arayla yıkanır. 50 mL su içerisine 500 μL gümüş nitrat (AgNO_3) çözeltisi ve 37,5 μL formaldehit eklenir. Jel bu çözelti içerisinde 20 dakika bekletilir. Jel 2 defa su ile 20 saniye arayla yıkanır. 50 mL karbonat çözeltisi içine 25 μL formaldehit ve 5 μL sodyum tiyosülfat çözeltisi eklenir ve jeldeki protein bantları gözükünceye kadar bu karışım içerisinde bekletilir. Jel kısa bir süre su ile yıkandıktan sonra saklama çözeltisi içerisinde saklanır.

3.2.1.8. Western-Blot Analizi

Western-Blot analizleri Naureckiene ve ark. (2000) bildirdiği metoda göre yapılmıştır. Fiberden yapılmış pedler ve filtre kağıtları 25 mM Tris-HCl, 192 mM Glisin, % 0,04 SDS, % 20 Metanol içeren transfer tamponu ile nemlendirilir. PVDF membran önce metanol içerisinde daha sonra transfer tamponu içerisinde nemlendirilir. Plastik sandiviçin siyah kapağına ilk olarak fiberden yapılmış ped, pedin üzerine filtre kağıdı, filtre kağıdının üzerine elektroforez jeli yerleştirilir. Elektroforez jelinin üzerine tekrar filtre kağıdı ve filtre kağıdının üzerine fiber ped konulur ve sandiviçin beyaz kapağı kapatılır. Sandiviç, üzerinde anot ve katotun bulunduğu kutuya yerleştirilir ve kutunun içi transfer tamponu ile doldurulur. Güç kaynağı 400 mA, 100-200V'a ayarlanır. Transfer 35 dakikada tamamlanır. PVDF membran üzerine jelden aktarılan molekül ağırlıkları bilinen standart protein karışımına ait bantlar tükenmez bir kalem yardımıyla işaretlenir ve membranin hangi tarafına transfer işleminin gerçekleştirildiğini belirlemek için membranın bir ucu makasla kesilir ve immünoassay için kullanılır. İmmünoassay aşağıda anlatılan işlem basamaklarını içermektedir.

PVDF membran oda sıcaklığında 1 saat boyunca bloklama çözeltisinde (PBS (1 mM Na₂HPO₄, 140 mM NaCl, 40 mM KCl, 10,5 mM KH₂PO₄) + % 0,2 Triton-X-100 karışımı kullanılarak hazırlanan % 10'luk FKS) karıştırılarak bekletilir. Membran uygun oranda (1/1000) bloklama çözeltisi ile seyreltilmiş olan monoklonal α -NPC2 antikoruna içerisinde 1 saat boyunca karıştırılır. Daha sonra membran PBS/Triton-X-100 ile 3 kez 5 dakika arayla yıkanır. Membran uygun oranda (1/10.000) su ile seyreltilmiş protein G-HRP antikorunda 1 saat bekletilir ve karıştırılır. Daha sonra membran PBS/Triton-X-100 ile 3 kez 5 dakika arayla yıkanır. Film kaseti içerisine otoklavlanabilir bir poşet yerleştirilir. Membran iki kağıt havlu arasında kurutulur, hacimce 1:1 oranında lumiglo A : lumiglo B substrat çözeltileri karıştırılarak membran üzerine eklenir ve membran aydınlıkta 1 dakika bekletilir. Membran iki havlu arasında kurutulur. Kaset içerisindeki poşetin içine konulan membranın üzerine karanlık odada fotoğraf filmi konulur, kaset kapatılır, 5 dakika beklenir daha sonra film tab edilir ve bNPC2'ye ait protein bandı belirlenir.

3.2.2. Veziküllerin Hazırlanması**3.2.2.1. Verici Veziküllerin Hazırlanması**

BMP (% 20 mol), 4-[¹⁴C]-kolesterol (% 1 mol), kolesterol (% 10 mol), biotin-X-DHPE (% 4 mol), PC (% 65 mol) kullanılarak verici veziküller hazırlanır. Hacimce 1:1 oranında metanol : kloroform karışımı içinde yer alan lipidler belirtilen miktarlarda alınır. Karıştırılan bu lipidler azot gazı yardımıyla ortamda bulunan organik çözücüler uzaklaşmaya kadar kurutulur. Daha sonra 1 mL 20 mM Na-Sitrat pH 5.0 tamponu eklenerek hidratlanır. Hidratlanan lipid karışımı sıvı azotla dondurulur ve 37°C'ye ısıtarak çözülür. Bu dondurma ve çözme işlemi 8 kez tekrar edilir. Her çözme işleminden sonra lipid karışımı iyice vortekslenir. Elde edilen lipid karışımına 30 saniye süre ile tam güçte sonikasyon işlemi uygulanır. Sonikasyon işlemi sonrasında lipid karışımı lipozofast yardımıyla 100 nm gözenek büyüklüğüne sahip membrandan geçirilerek iki tabakalı 100 nm çapında veziküller elde edilir.

3.2.2.2. Alıcı Veziküllerin Hazırlanması

BMP (% 20 mol), NBD-PE (% 4 mol), PC (% 66 mol), kolesterol (% 10 mol) kullanılarak alıcı veziküller hazırlanır. Hacimce 1:1 oranında metanol : kloroform karışımı içinde yer alan lipidler belirtilen miktarlarda alınır. Karıştırılan bu lipidler azot gazı yardımıyla ortamda bulunan organik çözücüler uzaklaşmaya kadar kurutulur. Daha sonra 1 mL 20 mM Na-Sitrat pH 5.0 tamponu eklenerek hidratlanır. Hidratlanan lipid karışımı sıvı azotla dondurulur ve 37°C'ye ısıtarak çözülür. Bu dondurma ve çözme işlemi 8 kez tekrar edilir. Her çözme işleminden sonra lipid karışımı iyice vortekslenir. Elde edilen lipid karışımına 30 saniye süre ile tam güçte sonikasyon işlemi uygulanır. Sonikasyon işlemi sonrasında lipid karışımı lipozofast yardımıyla 100 nm gözenek büyüklüğüne sahip membrandan geçirilerek iki tabakalı 100 nm çapında veziküller elde edilir.

3.2.2.3. Kolesterol Transfer Deneyleri

Kolesterol transfer deneylerinde Babalola ve ark. (2007) önerdiği metod esas alınmıştır. Deneyde kullanılan 0,5 mL hacime sahip 14 eppendorf tüpü işaretlenerek buz üzerine yerleştirilir. Çizelge 3.4'te belirtilen miktarlarda verici veya alıcı veya verici+alıcı veziküllerin üzerine yine Çizelge 3.4'te belirtilen miktarlarda 20 mM Na-sitrat pH 4.2 tamponu eklenip tüpler vorteksle iyice karıştırılır.

Çizelge 3.4. Kolesterol transfer deneylerinde kullanılacak tüplerin içerikleri

Tüp No	Vezikül Türü	Vezikül hacmi (mL)	20 mM Na-Sitrat pH 4.2 Tamponu hacmi (mL)	bNPC2 (µg)	Biomag (mL)	1 M Tris-HCl pH 8 Tamponu hacmi (mL)
1	Verici vezikül	20	180	-	-	125
2	Alıcı vezikül	20	180	-	-	125
3	Verici vezikül+Alıcı vezikül	20+20	160	-	-	125
4	Verici vezikül	20	180	-	50	75
5	Alıcı vezikül	20+20	180	-	50	75
6	Verici vezikül+Alıcı vezikül	20+20	160	-	50	75
7	Verici vezikül+Alıcı vezikül	20+20	160	1,5	50	75

7 olarak numaralandırılmış tüpten 8 adet hazırlanır. Daha sonra bu tüplere 1,5 µg bNPC2 eklenir ve vortekslenir. Tüpler 25°C'de 2,3,5,10,20,30,40,60 dakika bekletilir. Belirtilen bekleme süreleri sonunda 1,2,3 numaralı tüpler hariç diğerlerine 75 µL 1 M Tris-HCl pH 8 tamponu ve 50 µL Biomag streptavidin manyetik nanopartikül süspansiyonu eklenir ve yavaşça vortekslenir. 1,2,3 numaralı tüplere de 125 µL 1 M Tris-HCl pH 8 tamponu eklenir ve tüm tüpler oda sıcaklığında 15 dakika bekletilir.

Bekleme süresi dolunca Biomag streptavidin manyetik nanopartikül süspansiyonu içeren tüpler mıknatıs içeren ayırma sehпасı üzerine yerleştirilir. Bu sayede Biomag streptavidin manyetik nanopartikülleri tüpün çeperlerine tutunur ve Biomag streptavidin manyetik nanopartiküllerinden arındırılmış olan süpernatant radyoaktivite ölçümü için kullanılır. Şekil 3.1 Biomag streptavidin manyetik nanopartiküllerinin tüpün çeperlerine tutunmasını göstermektedir.



Şekil 3.1. Biomag streptavidin manyetik nanopartiküllerinin tüpün çeperlerine tutunması

Biomag streptavidin manyetik nanopartiküllerinden arındırılmış olan her bir tüpteki süpernatanttan 100 µL alınır ve 20 mL'lik tüplere pipetlenir ve üzerlerine 10 mL radyoaktivite ölçümü için karışım eklenir. Radyoaktivite ölçümü için karışım eklenen tüpler numaralanır, ıslak bir kagıt havlu yardımıyla silinir ve radyoaktivite ölçüm cihazına (TRI-CARB 2900 TR) konulur.¹⁴C ölçümü için kullanılan protokol seçilir.

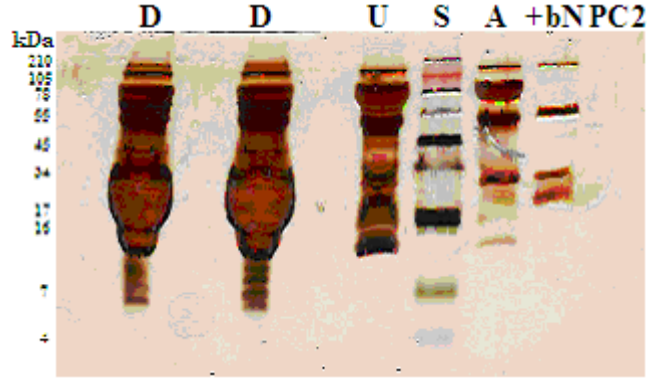
4. BULGULAR VE TARTIŞMA**4.1. Bulgular****4.1.1. Niemann-Pick C2 Proteininin Sığır Sütünden Saflaştırılmasına Ait Bulgular****4.1.1.1. Diyaliz ve DEAE-Sefadeks A-50 Anyon Değiştirici Kromatografisi İşlemleri Sonrasında Alınan Örnekler Ait Bulgular**

% 65'lik amonyum sülfat ile çöktürülüp 10 mM amonyum asetat pH 7.0 tamponunda çözülen örneğe: diyaliz, DEAE-Sefadeks A-50 anyon değiştirici kromatografisi ve ultrafiltrasyon ile deriştirme işlemleri uygulandı. Bu işlemlerin herbirinden sonra alınan örnekler, bNPC2 içeren örnek ve moleköl ağırlıkları bilinen standart protein karışımını içeren örnek kullanılarak SDS-PAGE yapıldı. Bu örnekler Ait protein derişimleri Çizelge 4.1'de elektroferogramları ise Şekil 4.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Diyaliz (D), DEAE-Sefadeks A-50 anyon değiştirici kromatografisi işlemleri sonrasında alınan örnek (A), ultrafiltrasyon ile deriştirilmiş örneğe (U) ve bNPC2'yi içeren örneğe (+bNPC2) ait protein derişimleri

Örnek	Protein Derişimi (mg/mL)
D	6,92
A	1,97
U	3,21
+bNPC2	0,519

Çizelge 4.1'den de görüldüğü gibi diyaliz sonrasında alınan örneğin protein derişimi 6,92 mg/mL, DEAE-Sefadeks A-50 anyon değiştirici kromatografisinden sonra bazı proteinlerin uzaklaştırılması nedeniyle alınan örneğin protein derişimi 1,97 mg/mL ve ultrafiltrasyon ile deriştirme işleminden sonra ise alınan örneğin protein derişimi 3,21 mg/mL'dir.

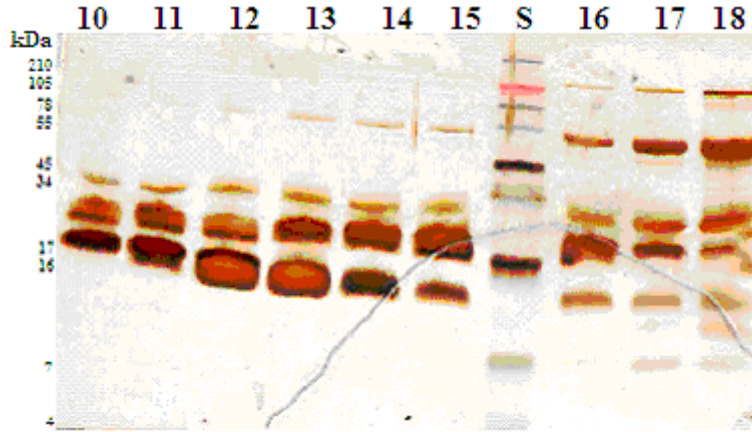


Şekil 4.1. Diyaliz sonrası aynı diyalizattan alınan örneklere (D), DEAE-Sefadeks A-50 anyon değiştirici kromatoğrafisi sonrası örnek (A), ultrafiltrasyon hücresi ile deriştirme sonrası örnek (U), bNPC2'yi içeren örnek (+bNPC2) ve moleköl ağırlıkları bilinen standart protein karışımını içeren örneğe (S) ait SDS-PAGE sonuçlarını gösteren elektroferogram

Şekil 4.1'den görüldüğü gibi diyaliz işlemi sonrasında mevcut olan birçok protein bandı DEAE-Sefadeks A-50 anyon değiştirici kromatoğrafisi kullanılarak uzaklaştırılmıştır. Ancak DEAE-Sefadeks A-50 anyon değiştirici kromatoğrafisinden sonra alınan örnekte (A), bNPC2 örneğinde (+bNPC2) var olması beklenen 17 kDa'luk bandın oldukça silik olduğu görülmektedir. Bu nedenle ultrafiltrasyon işlemi ile deriştirilmiştir. Deriştirilmiş örneğe ait elektroferogram (U)'dan da görüldüğü gibi protein bantlarının yoğunlukları artmıştır. Bu durum izelge 4.1'den de görülmektedir.

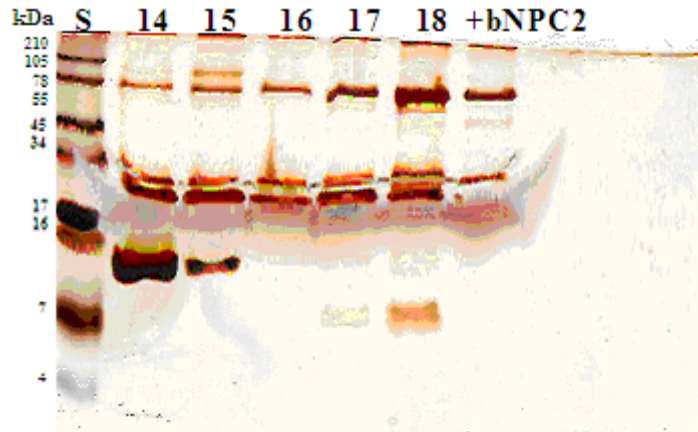
4.1.1.2. CM-Sefaroz Katyon Değiştirici Kromatoğrafisi Sonuçları

DEAE-Sefadeks A-50 anyon değiştirici kromatoğrafisinden sonra ultrafiltrasyon ile deriştirilmiş olan süzöntü CM-Sefaroz kolonuna uygulanmış ve HPLC kullanılarak 10 mL hacime sahip fraksiyonlar toplanmıştır. Toplanan fraksiyonlardan protein içeren fraksiyonlara SDS-PAGE'i yapılmıştır. SDS-PAGE sonuçları Şekil 4.2 ve Şekil 4.3'de gösterilmiştir. Bu fraksiyonlar içerisinden 20 kDa bölgesinde protein bandı içeren fraksiyonlar (10-18) daha ileri tespitler ve saflaştırmalar için kullanılmıştır.



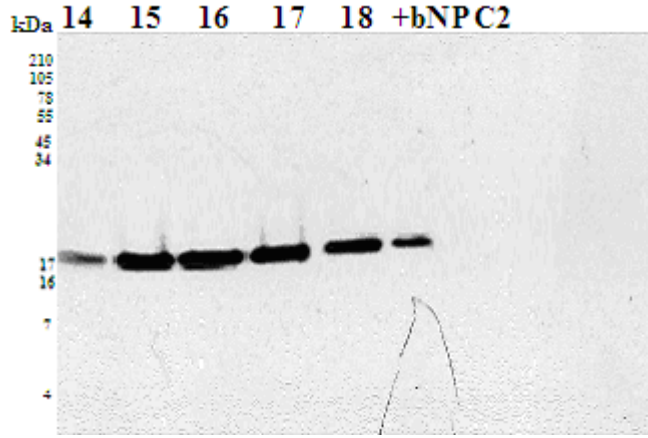
Şekil 4.2. CM-Sefaroz katyon değiştirici kromatoğrafisi kullanılarak elde edilen bNPC2'yi içeren 10-18 olarak numaralandırılmış fraksiyonlara ve moleküler ağırlıkları bilinen standart protein karışımını içeren örneğe (S) ait SDS-PAGE sonuçlarını gösteren elektroferogram

Şekil 4.2'den de görüldüğü gibi elde edilen fraksiyonlar saf olmayıp belirli miktarlarda yabancı proteinleri de içermektedirler. bNPC2'nin kolesterol transfer deneylerinde kullanılabilmesi için daha ileri derecede saf olması gerekmektedir.



Şekil 4.3. CM-Sefaroz katyon değiştirici kromatoğrafisi kullanılarak elde edilen bNPC2'yi içeren 14-18 olarak numaralandırılmış fraksiyonlara, bNPC2'yi içeren örnek (+bNPC2) ve molekl ağırlıkları bilinen standart protein karışımını içeren örneğe (S) ait SDS-PAGE sonuçlarını gösteren elektroferogram

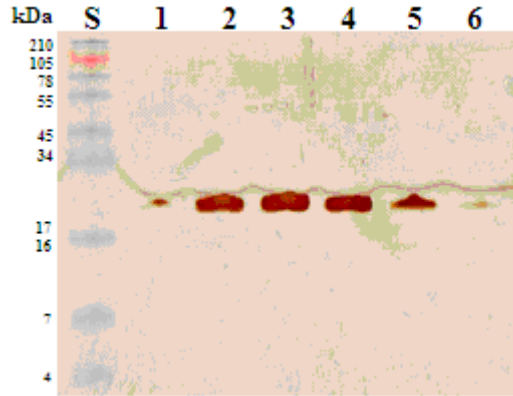
14-18 olarak numaralandırılmış fraksiyonlara ve bNPC2 içeren örneğe ait Western-Blot sonucu Şekil 4.4'de gösterilmiştir. Şekil 4.4'den de görüldüğü gibi 14-18 olarak numaralandırılmış fraksiyonlar bNPC2'yi içermektedir.



Şekil 4.4. CM-Sefaroz katyon değiştirici kromatoğrafisi kullanılarak elde edilen 14-18 olarak numaralandırılmış fraksiyonlara ve bNPC2'yi içeren örneğe (+bNPC2) ait Western-Blot sonuçları

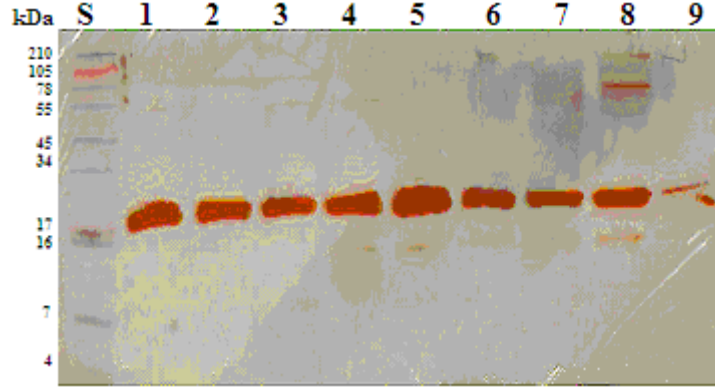
4.1.1.3. SP-Sefaroz Katyon Değiştirici Kromatoğrafisi Sonuçları

SP-Sefaroz katyon değiştirici kromatoğrafisi bNPC2'nin ileri derecede saflaştırılması için kullanıldı. Şekil 4.2'de elektroferogramda gösterilmiş olan 15 olarak numaralandırılmış fraksiyondan 2 mL alınıp ve HPLC kullanılarak bNPC2 ileri derecede saf olarak elde edilmeye çalışıldı. SP-Sefaroz katyon değiştirici kolon kullanılarak yapılan HPLC ile toplanmış olan fraksiyonlardan protein içeren 1-6 olarak numaralandırılmış eluatlara ve molekül ağırlıkları bilinen standart protein karışımını içeren örneğe (S) ait elektroferogram Şekil 4.5'de gösterilmiştir.



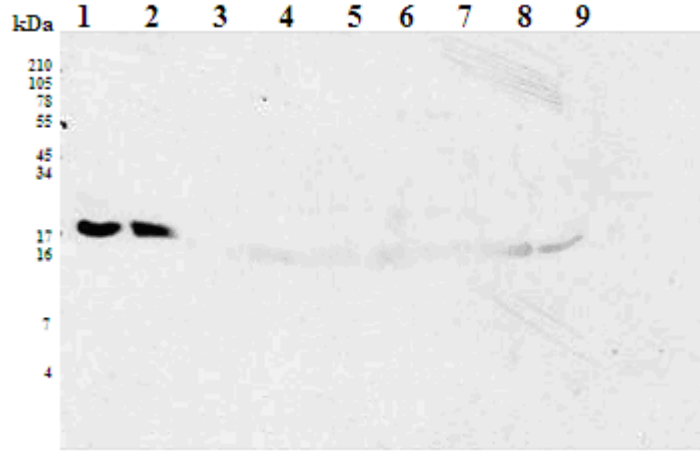
Şekil 4.5. SP-Sefaroz katyon değiştirici kromatoğrafisi kullanılarak toplanmış protein içeren 1-6 olarak numaralandırılmış olan eluatlara ve moleköl ağırlıkları bilinen standart protein karışımını içeren örneğe (S) ait SDS-PAGE sonuçlarını gösteren elektroferogram

Şekil 4.5'den de görüldüğü gibi toplanan fraksiyonlar ileri derecede saf bNPC2'yi içermektedir. Daha sonra 15 olarak numaralandırılmış fraksiyondan tekrar 2 mL alınarak temizlendi ve bu işlem 5 defa tekrar edildi. Elde edilen saf bNPC2'yi içeren fraksiyonlar bir araya toplandı. SP-Sefaroz katyon değiştirici kromatoğrafisi ile temizlenip bir araya toplanan 1-9 olarak numaralandırılmış örneklere ve moleköl ağırlıkları bilinen standart protein karışımını içeren örneğe (S) ait elektroferogram Şekil 4.6'da gösterilmiştir. Şekil 4.6.'dan da görüldüğü gibi 1,2,3,4,5,6,7,9 olarak numaralandırılmış örnekler ileri derecede saf bNPC2'yi içermekte, 8 olarak numaralandırılmış örnek ise bNPC2 ile birlikte bir miktar yabancı proteinleride içermektedir.



Şekil 4.6. SP-Sefaroz katyon değiştirici kromatoğrafisi kullanılarak temizlenip bir araya toplanan 1-9 olarak numaralandırılmış örneklere ve molekül ağırlıkları bilinen standart protein karışımını içeren örneğe (S) ait SDS-PAGE sonuçlarını gösteren elektroferogram

SP-Sefaroz katyon değiştirici kromatoğrafisi kullanılarak temizlenip bir araya toplanan 1-9 olarak numaralandırılmış örneklere ait Western-Blot sonucu Şekil 4.7 'de gösterilmiştir. Şekil 4.7'den de görüldüğü gibi 1-9 olarak numaralandırılmış örnekler bNPC2'yi içermektedir. Ancak 1 ve 2 olarak numaralandırılmış örnekler koyu renkli gözükürken 3-9 olarak numaralandırılmış örnekler silik gözükmektedir. 3-9 olarak numaralandırılmış örnekler silik görünmesinin nedeninin Western-Blot analizi sırasında elektforez jelinden protein bantlarının PVDF-membrana transfer işleminin tamamlanamamasından ileri geldiği düşünülmektedir.



Şekil 4.7. SP-Sefaroz katyon değiştirici kromatoğrafisi kullanılarak temizlenip bir araya toplanan 1-9 olarak numaralandırılmış örneklere ait Western-Blot sonuçları

SP-Sefaroz katyon değiştirici kromatoğrafisi kullanılarak temizlenip bir araya toplanan 1-9 olarak numaralandırılmış örneklere ait protein derişimleri Çizelge 4.2'de gösterilmiştir. Çizelge 4.2'den de görüldüğü gibi 1-9 olarak numaralandırılmış örneklerin protein derişimleri sırasıyla 0,196, 0,208, 0,210, 0,215, 0,267, 0,183, 0,185, 0,187, 0,047 mg/mL'dir. Protein derişimleri belirlenmiş olan örnekler kolesterol transfer deneylerinde kullanılmıştır.

Çizelge 4.2. 1-9 olarak numaralandırılmış örneklere ait protein derişimleri

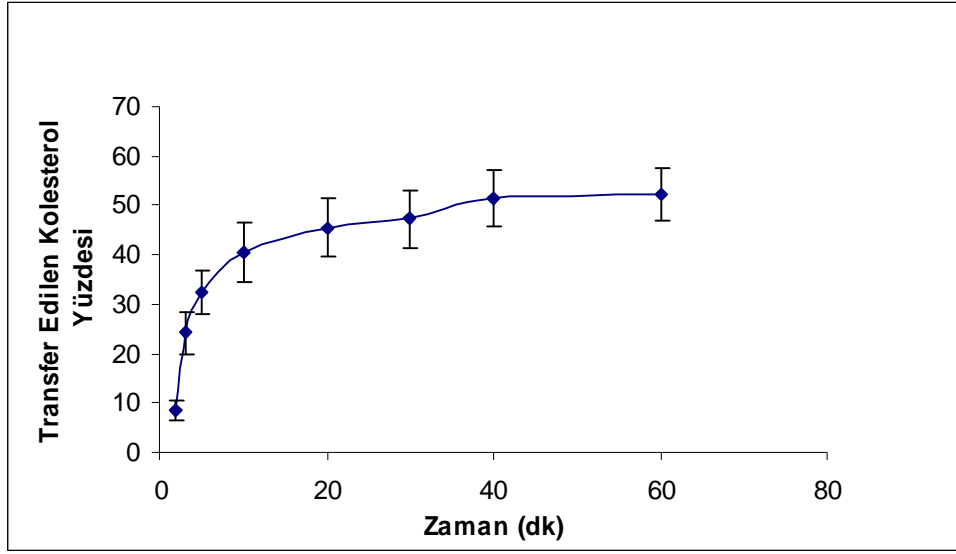
Örnek No	Protein Derişimi (mg/mL)
1	0,196
2	0,208
3	0,210
4	0,215
5	0,267
6	0,183
7	0,185
8	0,187
9	0,047

4.1.2. Kolesterol Transfer Deneylerine Ait Bulgular**4.1.2.1. Kolesterol Transfer Deneyi Sonuçları**

Kolesterol transfer deneyleri için Babalola ve ark. (2007) tarafından bildirilen yöntem esas alınmıştır. Materyal ve metod kısmında Çizelge 3.4'de verilmiş olan vezikül hacimleri ve çözeltiler kullanılarak hazırlanmış olan veziküller ve SP-Sefaroz katyon değiştirici kromatografisi kullanılarak ileri derecede temizlenen bNPC2 kullanılarak zaman bağlı olarak kolesterol transfer deneyleri yapılmıştır. Veziküller arası 17 farklı kolesterol transfer deneyine ait sonuçlar Çizelge 4.3'de gösterilmiştir. Çizelge 4.3'den de görüldüğü gibi sonuçlar ortalama \pm standart sapma şeklinde, dakikadaki radyoaktivite ölçümü cinsinden ifade edilmiştir.

Çizelge 4.3. Veziküller arası kolesterol transfer deneyi sonuçları

Deney No	% Transfer (dakikadaki radyoaktivite ölçümü sayısı)							
	Zaman (dk)							
	2	3	5	10	20	30	40	60
1	6,0	19,2	29,2	40,0	44,4	46,1	49,2	49,3
2	6,0	17,5	26,7	34,2	41,3	41,3	44,1	44,3
3	7,2	24,7	36,2	45,0	50,2	52,9	53,9	54,3
4	9,7	26,4	38,7	49,5	56,9	57,9	58,5	59,6
5	11,6	30,8	36,2	46,7	51,8	54,9	56,1	56,7
6	10,3	28,3	34,3	41,3	49,1	47,3	53,3	53,1
7	9,3	28,6	38,3	45,5	54,7	57,3	58,9	59,2
8	7,0	22,9	29,3	41,2	46,0	47,1	49,5	49,4
9	7,0	26,6	34,3	47,6	55,0	54,4	56,2	56,7
10	7,1	23,1	33,5	40,9	46,2	46,6	54,5	56,5
11	9,2	29,9	38,7	46,2	53,0	55,9	58,6	58,4
12	7,0	22,9	29,3	41,2	46,0	47,1	49,3	49,4
13	8,8	17,0	23,4	29,3	40,8	41,3	58,2	61,3
14	5,9	21,4	27,6	32,1	41,4	44,6	56,7	57,0
15	7,3	20,3	27,5	29,1	35,7	38,8	42,4	48,7
16	12,1	26,4	33,3	38,6	50,2	51,0	53,2	53,9
17	12,9	24,8	32,9	38,0	50,8	56,5	65,4	65,3
$\bar{x}_{ort} \pm SD$	8,5 \pm 2,2	24,1 \pm 4,2	32,3 \pm 4,5	40,4 \pm 6,1	45,5 \pm 5,7	47,2 \pm 5,9	51,4 \pm 5,6	52,3 \pm 5,2



Şekil 4.8. Veziküller arası kolesterol transferinin zamana bağlı olarak değişimi

Veziküllerarası kolesterol transferinin zamana bağlı olarak değişimi Şekil 4.8’de gösterilmiştir. Şekil 4.8’den de görüldüğü gibi zamana bağlı olarak kolesterolün bNPC2 tarafından verici veziküllerden alıcı veziküllere taşınma oranı artmaktadır.

4.2. Tartışma

Bu çalışmada Niemann-Pick C2 proteini (bNPC2) sığır sütünden amonyum sülfat ile çöktürme, diyaliz DEAE-Sefadex A-50 anyon değiştirici kromatografisi, CM-Sefaroz ve SP-Sefaroz katyon değiştirici kromatografileri kullanılarak saflaştırılmıştır. Bu proteinin membranlar arasında kolesterol transferinde rol oynayıp oynamadığını saptamak için sentetik verici ve alıcı veziküller oluşturulup in vitro koşullarda NPC2’nin kolesterolün taşınmasındaki rolü araştırılmıştır. bNPC2 kaynağı olarak, temin edilmesinin kolay oluşu nedeniyle sığır sütü seçilmiştir. bNPC2’nin sığır sütünden saflaştırılmasında Friedland ve ark. (2003) tarafından bildirilen ve bazı araştırmacılar (Larsen ve ark., 1997; Xu ve ark., 2007) tarafından da kullanılan standart yöntem kullanılmıştır. Kaymağı alınmış olan sütteki bNPC2 tuzla çöktürme ve diyalizden sonra DEAE-Sefadex A-50 anyon değiştirici

kromatoğrafisi kullanılarak birçok proteinden arındırılmıştır (Şekil 4.1). İkinci basamakta DEAE-Sefadex A-50 anyon değiştirici kromatoğrafisi ile elde edilen süzüntüde bulunan bNPC2 diğer proteinlerden CM-Sefaroz katyon değiştirici kromatoğrafisi kullanılarak ayrıştırılmıştır (Şekil 4.2). CM-Sefaroz katyon değiştirici kromatoğrafisi kullanılarak ayrılan ve bNPC2'yi içeren fraksiyonların hâla bazı yabancı proteinleri de içerdikleri gümüş boyama işlemi ile boyanmış olan SDS-PAGE jellerinde görölmektedir (Şekil 4.2). Saflaştırma işleminin son basamağında ise SP-Sefaroz katyon değiştirici kromatoğrafisi daha ileri bir saflaştırma işlemi için kullanılmıştır. Bu sayede saf bNPC2'yi içeren fraksiyonlar elde edilmiştir (Şekil 4.6. ve Şekil 4.7.). Saflaştırılmış olan bNPC2'nin moleküler ağırlığının yaklaşık 17 kDa olduğu SDS-PAGE ve Western-Blot teknikleri ile gösterilmiştir (Şekil 4.5. ve Şekil 4.6.). Literatürde değişik kaynaklardan saflaştırılan NPC2'lerin farklı moleküler ağırlığa sahip oldukları bildirilmiştir.

Larsen ve ark. (1997), sığır aspartik proteinaz enziminin öncüsü olan prokatepsin D'yi süttten saflaştırma işleminin ilgi kromatoğrafisi basamağında tesadüfen belirledikleri ve N-terminalinde sahip olduğu aminoasit dizilimi (EPVKFKDXGSWVGVIKEVNVSPXPTQ) ve moleküler ağırlığından ötürü EPV20 olarak adlandırdıkları, Northern-Blot analizi ile sığırın böbrek, dalak, karaciğer ve süt bezlerinde de sentezlendiğini fakat testislerinde sentezlenmediğini belirledikleri bNPC2'nin moleküler ağırlığının 20 kDa olduğunu SDS-PAGE ve Western-Blot teknikleri ile belirlemişlerdir.

Okamura ve ark. (1999), domuzun (*Porcine Cauda*) epididimislerindeki 8 ayrı bölgeden topladıkları epididimal sıvıdan saflaştırdıkları NPC2'nin epididimal sıvıdaki moleküler ağırlığının 19 kDa olduğunu fakat epididimisten geçiş sırasında NPC2'nin yapısında bulunan şeker kalıntısında meydana gelen işlemler sonucunda proteinin moleküler ağırlığının 16 kDa olduğunu SDS-PAGE ile belirlemişlerdir.

Ko ve ark. (2003), fareye ait NPC2'nin cDNA'sını taşıyan pNPC2myc-his-puro adlı ekspresyon vektörünü çin hamsteri'nin yumurtalık hücrelerine (CHO-KI) aktararak ürettikleri NPC2'nin moleküler ağırlığının 27-29 kDa olduğunu SDS-PAGE ile belirlemişlerdir.

Ong ve ark. (2004), fare beyninden saflaştırdıkları NPC2'nin moleküler ağırlığının 23 kDa olduğunu Western-Blot analizi ile belirlemişlerdir.

Chikh ve ark. (2004), insana ait NPC2'yi (hNPC2) içermeyen bir hastadan aldıkları deri fibroblastlarını ve üç farklı N-glikozilasyon bölgesinde mutasyona sahip NPC2'yi kodlayan 3 farklı cDNA'yı (NPC2-N38Q, NPC2-N58Q, NPC2-N135Q) kullanarak ürettikleri hNPC2'lerin moleküler ağırlıklarının sırasıyla 19-23, 21 ve 19 kDa olduğunu Western-Blot analizi ile belirlemişlerdir.

Liou ve ark. (2006), hNPC2'nin cDNA'sını pMSXND adlı ekspresyon vektörü yardımıyla deney faresinin yumurtalıklarından alınan hücrelere aktararak ürettikleri hNPC2'nin 4 farklı izoformunun olduğunu ve elde edilen hNPC2'lerin moleküler ağırlıklarının 18.9, 18.5, 17.7 ve 16.3 kDa olduğunu bildirmişlerdir.

bNPC2'nin sığır sütünden saflaştırılması işleminden sonra bNPC2 kolesterol transfer deneylerinde kullanılmıştır. Kolesterol transfer deneyleri için Babalola ve ark. (2007) tarafından bildirilen metod esas alınmıştır. BMP (% 20 mol), 4-[¹⁴C]-kolesterol (% 1 mol), kolesterol (% 10 mol), biotin-X-DHPE (% 4 mol), fosfatidilkolin (% 65 mol) içeren verici veziküller ve BMP (% 20 mol), kolesterol (% 10 mol), biotin-X-DHPE (% 4 mol), fosfatidilkolin (% 66 mol), NBD-PE (% 4 mol) içeren alıcı veziküller kullanılmıştır. Kolesterol transfer deneyleri sonucunda bNPC2'nin verici veziküllerde bulunan kolesterolün % 52,3±5,2'ünün alıcı veziküllere taşınmasında rol oynadığı bulunmuştur.

Babalola ve ark. (2007), fosfatidilkolin (% 80 mol), fosfatidiletanolamin (% 7 mol), kolesterol (% 8 mol), 4-[¹⁴C]-kolesterol (% 1 mol), biotin-X-DHPE (% 4 mol) içeren yüksüz temel (Basic) verici vezikülleri ve fosfatidilkolin (% 85 mol), NBD-PE (% 4 mol), kolesterol (% 2 mol), fosfatidilkolin (% 9 mol) içeren yüksüz temel (Basic) alıcı vezikülleri ve farklı bir çalışma grubundan aldıkları bNPC2'yi kullanarak 37°C'de gerçekleştirdikleri transfer deneyi sonucunda bNPC2'nin verici veziküllerde bulunan kolesterolün % 18'nin verici veziküllere taşınmasında görev aldığını, kolesterol (% 24 mol), 4-[¹⁴C]-kolesterol (% 1 mol), biotin-X-DHPE (% 4 mol), BMP (% 18 mol), seramid (% 6 mol), sfingomiyelin (% 5 mol), fosfatidilkolin (% 42 mol) içeren anyonik standart verici vezikülleri ve fosfatidilkolin (% 66 mol), BMP (% 18 mol), seramid (% 6 mol), sfingomiyelin (% 5 mol), kolesterol (% 1 mol

), NBD-PE (% 4 mol) içeren anyonik standart alıcı vezikülleri kullanarak 25°C’de gerçekleştirdikleri transfer deneyi sonucunda bNPC2’nin verici veziküllerde bulunan kolesterolün % 59’unun alıcı veziküllere taşınmasında görev aldığını bildirmişlerdir. Alıcı veziküllerin seramid (% 20 mol) içerdiği durumda bNPC2’nin verici ve alıcı veziküller arası kolesterol transferini düzenlendiğini ve sfingomiyelinin verici ve alıcı veziküllerin hazırlanmasında kullanıldığı durumda bNPC2’nin kolesterolü verici ve alıcı veziküller arasında taşıma oranının azaldığını bildirmişlerdir.

Yapılan bu çalışmada, verici ve alıcı veziküller sfingomiyelin ve seramid içermemesine rağmen kolesterol transfer deneyleri sonucu literatürde Babalola ve ark. (2007) tarafından bildirilen sonuca yakındır. Bu sonuca göre sfingomiyelin ve seramidin kolesterol deneyleri üzerinde büyük bir etkisinin olmadığı düşünülmektedir. Literatürde kolesterol transfer deneyleri için farklı metodların kullanıldığı rapor edilmiştir. Cheruku ve ark. (2006), NPC2’nin kolesterolün membranlara taşınmasında görev aldığını belirlemek için farklı bir metod olan endojen triptofan absorbansı ölçümünü kullanmışlardır. hNPC2 (5 µM) ve kolesterolü (5 µM) 25°C, pH 5’de inkübe etmişler, inkübasyon öncesinde ve sonrasında endojen triptofanın absorbansını 280 nm’de ölçmüşlerdir. hNPC2’ye kolesterolün bağlandığı durumda endojen triptofan absorbansının azaldığını belirlemişlerdir. hNPC2 (5 µM) ve kolesterolü (5 µM) inkübe ettikten sonra ortama fosfatidilkolinden (1000 µM) oluşan yüksüz veziküller eklendiğinde endojen triptofan absorbansının yükseldiğini belirlemişlerdir. Bu sayede kolesterolün hNPC2 tarafından veziküle taşındığını belirlemişlerdir.

Xu ve ark. (2008), fosfatidilkolin (% 65 mol), kolesterol (% 25 mol), laktozilseramid (% 10 mol), tiryum işaretli kolesterol (³H]-kolesterol)(% 5 mol) içeren verici veziküller ve fosfatidilkolin (% 100 mol) içeren alıcı veziküller oluşturularak in vitro koşullarda hNPC2’nin kolesterol taşınmasındaki rolünü incelemişlerdir. hNPC2’nin verici veziküllerde bulunan tiryum işaretli kolesterolün alıcı veziküllere taşınım hızının $0,031 \pm 0,014 \text{ s}^{-1}$ olduğunu bildirmişlerdir.

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER**5.1. Sonuçlar**

- 1) Niemann-Pick C2 proteini (bNPC2) sığır sütünden saflaştırılmıştır. Saflaştırılan bNPC2 proteininin saflığı SDS-PAGE ile belirlenmiştir. bNPC2'nin moleküler ağırlığının yaklaşık 17 kDa olduğu belirlenmiştir.
- 2) İn vitro koşullarda BMP (% 20 mol), 4-[¹⁴C]-kolesterol (% 1 mol), kolesterol (% 10 mol), biotin-X-DHPE (% 4 mol), fosfatidilkolin (% 65 mol)) içeren verici veziküller ve BMP (% 20 mol), NBD-PE (% 4 mol), fosfatidilkolin (% 66 mol), kolesterol (% 10 mol) içeren alıcı veziküller hazırlanarak, bNPC2'nin verici veziküllerde bulunan 4-[¹⁴C]-kolesterolün % 52,3±5,2'ünün alıcı veziküllere taşınmasında rol aldığı bulunmuştur.

5.2. Öneriler

- 1) Veziküllerin farklı lipid bileşimlerinin kolesterol transferini etkileyip etkilemediğinin araştırılması için farklı kolesterol ve lipid bileşimlerine sahip verici ve alıcı veziküller oluşturularak bNPC2'nin kolesterolü transfer aktivitesi kıyaslanabilir.
- 2) bNPC2'nin sığırın böbrek, dalak, karaciğerinde sentezlendiği bilinmektedir. bNPC2 sığırın böbrek, dalak veya karaciğerlerinden saflaştırılabilir. Saflaştırılan bu farklı kökenli NPC2'lerin kolesterol transfer aktiviteleri kıyaslanabilir.

KAYNAKLAR

- AKIN, O., 2002.** Tıpta Uzmanlık Sınavı Hazırlık Serisi Biyokimya, MedicoGraphics Matbaası, Ankara, 208s
- ATIK, F., KARA, M., ZORLU, P., 2006.** Niemann-Pick Hastalığı olan bir Olgu Yeni Tıp Dergisi 23: 238-239
- BABALOLA, J.O., WENDELER, M., BREIDEN, B., ARENZ, C., SCHWARZMANN, G., LOCATELLI-HOOPS, S. and SANDHOFF, K., 2007.** Development of an Assay for the Intermembrane Transfer of Cholesterol by Niemann-Pick C2 Protein, The Journal of Biological Chemistry 388: 617-626
- BOADU, E., FRANCIS, G.A., 2006.** The Role of Vesicular Transport in ABCA1-dependent Lipid Efflux and Connection with NPC Pathways, The Journal of Molecular Medicine 84: 266-275
- BRADFORD, M.M., 1976.** A Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye-Binding, Analytical Biochemistry 72: 248-254
- BLUM, H., BEIER, H. und GROSS, H.J., 1987.** Improved Silver Staining of Plant Proteins, RNA and DNA in Polyacrylamide Gels, Electrophoresis 8: 93-99
- CHIKH, K., VEY, S., SIMONOT, C., VANIER, M.T., MILLAT, G., 2004.** Niemann-Pick type C Disease: Importance of N-glycosylation Sites for Function and Cellular Location of the NPC2 Protein, Molecular Genetics and Metabolism 83: 220-230
- CHERUKU, S.R., XU, Z., DUTIA, R., LOBEL, P. and STORCH, J., 2006.** Mechanism of Cholesterol Transfer from the Niemann-Pick Type C2 Protein to Model Membranes Supports a Role in Lysosomal Cholesterol Transport, The Journal of Biological Chemistry 281 (42): 31594-31604
- DIXIT, S.S., SLEAT, D.E., STOCK, A.M. and LOBEL, P., 2007.** Do mammalian NPC1 and NPC2 play a role in intestinal cholesterol absorption? The Journal of Biological Chemistry 408: 1-5

- DEMİR, H., GÜRAKAN, F., VANIER, M.T., YÜCE, A., ÖZEN, H., SALTIK-TEMİZE, İ.N., 2005.** Niemann Pick Disease Type C: 5 Case Reports, *Journal of Pediatric Surgery* 1(10): 66-68
- DAVIES, J.P., CHEN, F.W., IOANNOU, Y.A., 2000.** Transmembrane Molecular Pump Activity of Niemann-Pick C1, *Science* 290: 2295-2298
- FRIEDLAND, N., LIOU, H-L., LOBEL, P., and STOCK, A. M., 2003.** Structure of a Cholesterol-Binding Protein Deficient in Niemann-Pick C2 Disease. *Proceeding of the National Academy of Sciences* 100: 2512–2517
- FROLOV, A., ZIELINSKI, S.E., CROWLEY, J.R., RUCKER, N.D., SCHAFFER, J.E. and ORY, D. S., 2003.** NPC1 and NPC2 Regulate Cellular Cholesterol Homeostasis through Generation of Low Density Lipoprotein Cholesterol-Derived Oxysterols, *The Journal of Biological Chemistry* 278 (28): 25517-25525
- GÜNEŞ, H.V., 2003.** Moleküler Hücre Biyolojisi, Kaan Kitabevi, Eskişehir, 346s
- HÖLTÄ-VUORI, M., MÄÄTTÄ, J., ULLRICH, O., KUISMANEN, E. and IKONEN, E., 2000.** Mobilization of Late-Endosomal Cholesterol is Inhibited by Rab Guanine Nucleotide Dissociation Inhibitor, *Current Biology* 10 (2): 95-98
- KO, D. C., BINKLEY, J., SIDOW, A., and SCOTT, M.P., 2003.** The Integrity of a Cholesterol-Binding Pocket is Necessary to Control Lysosome Cholesterol Levels, *Proceeding of the National Academy of Sciences* 100 (5): 2518-2525
- KOLTER, T. and SANDHOFF, K., 2005.** Principles of Lysosomal Membrane Digestion: Stimulation of Sphingolipid Degradation by Sphingolipid Aktivator Proteins and Anionic Lysosomal Lipids, *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 21: 81-103
- KOLTER, T., WINAU, F., SCHAIBLE, U.E., LEIPPE, M. and SANDHOFF, K., 2005.** Lipid-Binding Proteins in Membrane Digestion, Antigen Presentation, and Antimicrobial Defense, *The Journal of Biological Chemistry* 280 (50): 41125-41128

- LARSEN, L.B., RAVN, P., BOISEN, A., BERGLUND, L. and PETERSEN, T. E., 1997.** Primary Structure of EPV20, a Secretory Glycoprotein Containing a Previously Uncharacterized Type of Domain, *European Journal of Biochemistry* 243: 437-441
- LIU, H-L., DIXIT, S.S., XU, S., TINT, G.S., STOCK, A.M. and LOBEL, P., 2006.** NPC2, the Protein Deficient in Niemann-Pick C2 Disease, Consists of Multiple Glycoforms That Bind a Variety of Sterols, *The Journal of Biological Chemistry* 281 (48): 36710-36723
- LISCUM, L., MUNN, N.J., 1999.** Intracellular Cholesterol Transport, *Biochimica et Biophysica Acta* 1438: 19-37
- LANGE, Y., YE, J., RINGEY, M. and STECK, T.L., 2002.** Dynamics of Lysosomal Cholesterol in Niemann-Pick Type C and Normal Human Fibroblasts, *Journal of Lipid Research* 43: 198-204
- IOANNOU, Y.A., 2005.** Guilty until Proven Innocent: the case of NPC1 and Cholesterol, *TRENDS in Biochemical Sciences* 30 (9): 498-505
- NAURECKIENE, S., SLEAT, D.E., LACKLAND, H., FENSOM, A., VANIER, M.T., WATTIAUX, R., JADOT, M. and LOBEL, P., 2000.** Identification of HE1 as the second Gene of Niemann-Pick C Disease, *Science* 290: 2298-2301
- NELSON, D.L., COX, M.M., 2005.** *Lehninger Principles of Biochemistry*, W.H. Freeman and Company, New York, 1119s
- OKAMURA, N., KIUCHI, S., TAMBA, M., KASHIMA, T., HIRAMOTO, S., BABA, T., DACHEUX, F., DACHEUX, J-L., SUGITA, Y., JIN, Y-Z., 1999.** A Porcine Homolog of The Major Secretory Protein of Human Epididymis, HE1, Specifically Binds Cholesterol, *Biochimica et Biophysica Acta* 1438 (1999): 377-387
- ONG, W.Y., SUNDARAM, R.K., HUANG, E., GHOSHAL, S., KUMAR, U., PENTCHEV, P.G. and PATEL, S.C., 2004.** Neuronal Localization and Association of Niemann-Pick C2 Protein (HE1/NPC2) with the Postsynaptic Density, *Neuroscience* 128: 561-570

- ONAT, T., EMERK, K., SÖZMEN, E.Y., 2002.** İnsan Biyokimyası. Palme Yayıncılık, Ankara, 686s
- ORY, D.S., 2000.** Niemann-Pick Type C: A Disorder of Cellular Cholesterol Trafficking, *Biochimica et Biophysica Acta* 1529: 331-339
- ORAM, J.F., 2002.** Molecular Basis of Cholesterol Homeostasis: Lessons from Tangier Disease and ABCA1, *TRENDS in Molecular Medicine* 8 (4): 168-173
- ÖZGÜNEŞ, N., 2004.** Hücrede Yoğun Trafik: Vezikülle Taşıma, *Hacettepe Tıp Dergisi* 35: 216-221
- PRINZ, W.A., 2007.** Non-vesicular Sterol Transport in Cells, *Progress in Lipid Research* 46: 297-314
- PRINZ, W., 2002.** Cholesterol Trafficking in the Secretory and Endocytotic Systems *Cell & Developmental Biology* 13: 197-203
- SOCCIO, R.E., BRESLOW, J.L., 2004.** Intracellular Cholesterol Transport, *Arteriosclerosis, Trombosis and Vascular Biology* 24: 1150-1160
- SLEAT, D.E., WISEMAN, J.A., EL-BANNA, M., PRICE, S.M., VEROT, L., SHEN, M.M., TINT, G.S., VANIER, M.T., WALKLEY, S.U. and LOBEL, P., 2004.** Genetic Evidence for Nonredundant Functional Cooperativity Between NPC1 and NPC2 in Lipid Transport, *Proceeding of the National Academy of Sciences* 101 (16): 5886-5891
- SUBRAMANIAN, K. and BALCH, W.E., 2008.** NPC1/NPC2 Function as a Tag Team Duo to Mobilize Cholesterol, *Proceeding of the National Academy of Sciences* 105 (40): 15223-15224
- SCHULZE, H., KOLTER, T. AND SANDHOFF, K., (baskıda).** Principles of Lysosomal Membrane Degradation Cellular Topology and Biochemistry of Lysosomal Lipid Degradation *Biochimica et Biophysica Acta*
- SCHÄGGER, H. and VON JAGOW, G., 1987.** Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the Range from 1 to 100 kDa, *Analytical Biochemistry* 166: 368-379
- SAYRE, N., LISCUM, L., 2007.** Cholesterol Homeostasis in a Niemann-Pick C Variant, *Abstracts/ Chemistry and Physics of Lipids* 149 : 1-10

- ÜNAY, B., VURUCU, S., AKIN, R., KÜREKÇİ, E., GÜL, D., GÖKÇAY, E., 2003.** Niemann-Pick Tip C Hastalığı : Olgu Sunumu, *Gülhane Tıp Dergisi* 45 (3): 271-273
- WANG, Y., CASTORENO, A.B., STOCKINGER, W. and NOHTURFF, A., 2005.** Modulation of Endosomal Cholesteryl Ester Metabolism by Membrane Cholesterol, *The Journal of Biological Chemistry* 280 (12): 11876-11886
- XU, S., BENOFF, B., LIOU, H-L., LOBEL, P. and STOCK, A.M., 2007.** Structural Basis of Sterol Binding by NPC2, Lysosomal Protein Deficient in Niemann-Pick Type C2 Disease, *The Journal of Biological Chemistry* 282 (32): 23525-23531
- XU, Z., FARVER, W., KODUKULA, S. and STORCH, J., 2008.** Regulation of Sterol Transport between Membranes and NPC2, *Biochemistry* 47 (42): 11134-11143
- VANCE, J.E., HAYASHI, H., KARTEN, B., 2005.** Cholesterol Homeostasis in Neurons and Glial Cells, *Seminars in Cell & Developmental Biology* 16: 193-212
- VANCE, J.E., 2006.** Lipid Imbalance in the Neurological Disorder, Niemann-Pick C Disease, *Federation of the Societies of Biochemistry and Molecular Biology Letters* 580: 5518-5524
- VANIER, M.T., MILLAT, G., 2004.** Structure and Function of the NPC2 Protein, *Biochimica et Biophysica Acta* 1685: 14-21
- YU, H.Y., OH, J.E., PARK, J.S., KIM, M.H., KIM, S.D., JUNG, K.S., 2006.** A Case of Niemann-Pick Disease Type A, *Korean Journal of Pediatrics* 49 (12): 1358-1362

ÖZGEÇMİŞ

1982 yılında Adana'da doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi burada tamamladım. 2005 yılında Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya bölümünden mezun oldum. Aynı yıl Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında tezli yüksek lisans programına başladım. 2007-2008 akademik yılında, Almanya'nın Rheinische Friedrich-Wilhems Universität Bonn, Bonn Üniversitesinde Socrates-Erasmus öğrenci değişim programı kapsamında yüksek lisans tez çalışmamı yürüttüm.