

44809

T.C.  
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

ERİTROSİT MEMBRANI PROTEİNLERİNİN  
AMONYUM SÜLFAT İLE AYRILMASI

*Birgöl VANIZOR*

44809

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih :28/07/1995

Tezin Sözlü Savunma Tarihi :01/09/1995

Tez Danışmanı

: Prof.Dr. Edip KEHA

Jüri Üyesi

: Prof.Dr. Orhan DEĞER

Jüri Üyesi

: Prof.Dr. Ekin ÖNDER

Enstitü Müdürü

: Prof.Dr. Ethem ALHAN

Temmuz, 1995

TRABZON

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖNSÖZ	V
KISALTMALAR	VI
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Membranlar Hakkında Genel Bilgi	2
2.1.1. Membranların Yapısı	2
2.1.2. Membran Proteinlerinin Sınıflandırılması	3
2.2. Eritrosit Membranı	4
2.3. Eritrosit Membranı Proteinleri	6
2.3.1. Spektrin (Bant 1, Bant 2)	6
2.3.2. Ankirin (Bant 2.1)	9
2.3.3. Adüsin	10
2.3.4. Anyon Değiştirici Protein (Bant 3)	10
2.3.5. Bant 4 Serisi Proteinler	12
2.3.5.1. Bant 4.1	12
2.3.5.2. Bant 4.2	13
2.3.5.3. Bant 4.5	13
2.3.5.4. Bant 4.9	13
2.3.6. Aktin (Bant 5)	13
2.3.7. Gliseraldehit 3 fosfat Dehidrogenaz (Bant 6)	14
2.3.8. Tropomiyozin (Bant 7)	15
2.3.9. Glikoforin	16
2.4. Proteinleri Ayırma Yöntemleri	18
2.4.1. Molekül Büyüklükleri Esasına Dayanılarak Proteinlerin Ayrılması	18
2.4.2. Çözünürlük Farklılıkları Esasına Dayanılarak Proteinlerin Ayrılması	19
2.4.3. Spesifik Ligandları Esasına Dayanılarak Proteinlerin Ayrılması	20
2.4.4. Elektriksel Yük Esasına Dayanılarak Proteinlerin Ayrılması	20
2.4.4.1. İyon Değişim Kromatografisi	20
2.4.4.2. Elektroferez	20
2.4.4.3. Poliakrilamid Jel Elektroforezi	21

3. MATERYAL ve METOD	23
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler, Cihazlar, Aletler ve Malzemeler	23
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	23
3.1.2. Kullanılan Malzemeler	24
3.1.3. Kullanılan Cihazlar ve Aletler	24
3.2. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	25
3.3. Numunelerin Toplanması	27
3.4. Kullanılan Yöntemler	27
3.4.1. Ghost Elde Edilmesi	27
3.4.2. Proteinlerin Açığa Çıkarılması	29
3.4.3. Sodyum Dodesil Sülfatın Diyalizle Uzaklaştırılması	30
3.4.4. Proteinler Amonyum Sülfatla Çöktürülmesi	31
3.4.5. Amonyum Sülfatın Diyalizle Uzaklaştırılması	32
3.4.6. Lowry Metoduyla Protein Tayini	33
3.4.7. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi	33
3.4.7.1. Jellerin Hazırlanması	34
3.4.7.1.a. Ayırma Jelinin Hazırlanması	34
3.4.7.1.b. Yiğme Jelinin Hazırlanması	35
3.4.7.2. Numune Hazırlıkları ve Uygulanması	38
3.4.7.2.a. Slab Jelin Numune Uygulamaya Hazır Hale Getirilmesi	38
3.4.7.2.b. Numunenin Hazırlanması	38
3.4.7.2.c. Numunenin Kuyulara Yerleştirilmesi	39
3.4.7.3. Tank Tamponunun Doldurulması ve Elektrofrezin Başlatılması	40
3.4.7.4. Slab Jelinin Tezgahtan Çıkarılması	40
3.4.7.5. Boyama ve Boya Giderme İşlemi	40
3.4.8. Boya Giderme Çözeltisinden Boyanın Uzaklaştırılması	41
4. BULGULAR	42
4.1. Lowry Metoduyla Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik	42
4.2. Ghostlarda Tespit Edilen Protein Miktarlarının Değerlendirilmesi	43
4.3. Yöntem I ile Eritrosit Membranı Proteinleri	44
4.4. Yöntem II ile Eritrosit Membranı Proteinleri	50
4.5. Yöntem III ile Eritrosit Membranı Proteinleri	53
5. TARTIŞMA	56
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	60

7. ÖZET	61
8. SUMMARY	62
9. KAYNAKLAR	63
EKLER	68
EK-1. Membranların Bileşimi	68
EK-2. Eritrositlerin Bileşimi	69
EK-3. Eritrosit Membranı Proteinleri	70
EK-4. Amonyum Sülfat Doymunluęu Nomogramı	72
EK-5. Eritrosit Membran Proteinlerini Amonyum Sülfatla Ayırma Yöntemleri Arasındaki Farklılıklar	73
ÖZGEÇMİŞ	74

## ÖNSÖZ

Yüksek Lisans tezi olarak yapılan bu çalışma esnasında, hiç bir yardımını esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. E. Edip KEHA başta olmak üzere, bilgilerinden yararlandığım Sayın Prof. Dr.Orhan DEĞER'e, Sayın Prof. Dr. Ekin ÖNDER'e ve tüm bölüm arkadaşlarıma teşekkürler ederim.

Temmuz, 1995

Birgül VANIZOR



## **KISALTMALAR**

<b>Ank</b>	: Ankirin
<b>CPDA</b>	: Sitrat Fosfat Dekstroz Adenin
<b>E.C.</b>	: Enzim Kodu
<b>EDTA</b>	: Etilen Dinitrilo Tetra Asetik Asit
<b>GP</b>	: Glikoprotein
<b>G3PDH</b>	: Gliseraldehit 3-Fosfat Dehidrogenaz
<b>I</b>	: İntegral
<b>Kd</b>	: Ayrışma Sabiti
<b>kda</b>	: Kilo dalton
<b>M</b>	: Molarite
<b>MA</b>	: Moleküler Ağırlık
<b>P</b>	: Periferel
<b>PAGE</b>	: Poliakrilamid Jel Elektroforezi
<b>PAS</b>	: Periodik Asit-Schiff
<b>SDS</b>	: Sodyum Dodesil Sülfat
<b>TEMED</b>	: N,N,N',N'-Tetrametilen Diamin
<b><math>\mu</math></b>	: Mikro

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Eritrosit membranı proteinleri ile yapılan sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezinde (SDS-PAGE'de) yaklaşık 10-12 protein bandı gözlemlenmiştir. Bu protein bantlarının her biri eritrosit membranı için oldukça önemli fonksiyonlara sahiptir. Bunlardan anyon değiştirici protein (bant 3), protein 4.5, tropomyozin (bant 7) ve glikoforin integral, spektrin (bant 1 ve 2), ankirin (bant 2.1), protein 4.1, 4.2, 4.9, aktin (bant 5) ve gliseraldehit 3 fosfat dehidrogenaz (bant 6) periferel proteinlerdir (1,2).

Spektrin, aktin, protein 4.1 ve 4.9 membran iskeletinin özünü oluşturmaktadır (1,3). Spektrin, sitoplazmik yüzeyde bulunarak, membran iskeletinde ağımsı bir yapı meydana getirir, membranın şeklini ve dayanıklılığını sağlar (4,5). Ayrıca, protein 4.1, aktin, ankirin ve kendi kendini bağlama bölgesi olmak üzere dört bağlama bölgesi vardır (2). Anyon değiştirici protein, ankirin vasıtasıyla membran iskeletine takılı olup,  $Cl^-$  ve  $HCO_3^-$  anyonlarının antiport geçişinden sorumlu olan bir proteindir (1,6). Burada, anyon transportunun düzenlenmesinde, protein 4.2 önemli rol oynamaktadır (7). 4.1a ve 4.1b şeklinde iki altbirimden meydana gelen protein 4.1, glikoforinin sitoplazmik yüzeyini, spektrin-aktin kompleksine bağlamaktadır (8). Aktin, spektrin tetramerlerini bağlayarak iskelet ağının oluşumunda, aktin monomerlerinin içinde yer alarak integral protein sıfatı alan tropomyozin ise aktin moleküllerinin birarada tutulmasında rol oynar. Ayrıca protein 4.9 ve adüsin aktinle birarada yer alarak iskelet ağının stabilleşmesinde rol oynarlar. Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz (E.C. 1.2.1.9), anyon değiştirici proteinin amino ucuna yerleşmiş oksidasyondan sorumlu glikolitik bir enzimdir (2).

Biz çalışmamızda, eritrosit membran proteinlerini, farklı  $(NH_4)_2SO_4$  doygunluklarında ayırarak, hangi doygunlukta hangi protein bantlarının gözlemlendiğini ve tüm bantları verebilen doygunluğun hangisi olduğunu belirlemek, amonyum sülfatla protein çözeltileri uzun süre bekletmenin ve EDTA'nın eritrosit membranı proteini elektroforezi sonuçlarını nasıl etkilediğini gözlemlemek istedik. Bununla, eritrosit membranı proteinlerinin yapısını ve miktarını etkileyebilecek durumlarda bu proteinlerin kolayca belirlenebileceği bir metod geliştirmeyi amaçladık.

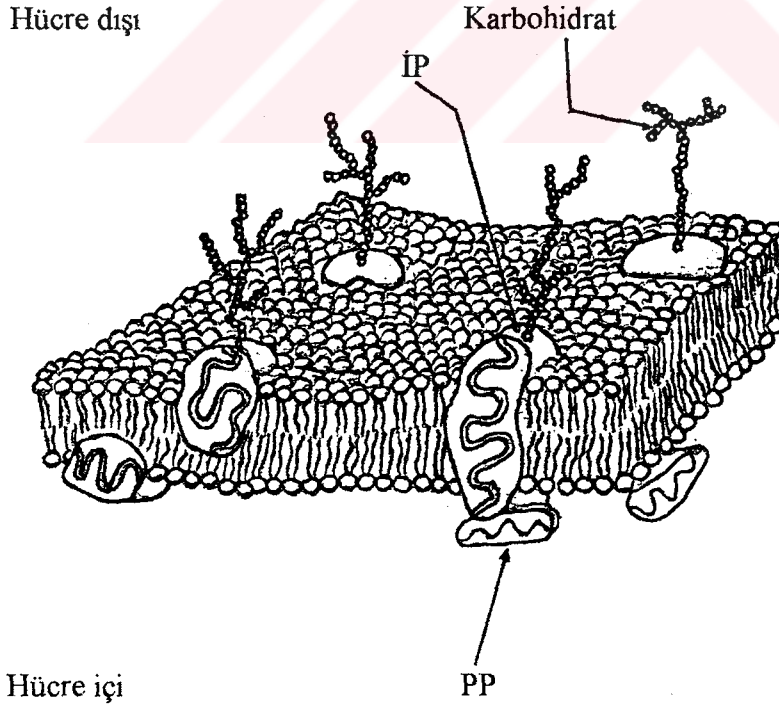
## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Membranlar Hakkında Genel Bilgi

#### 2.1.1. Membranların Yapısı

Plazma membranı, lipid ikili tabaka şeklinde hücrenin sitoplazmasını sarak hücreyi dış ortamdıan ayıran, pekçok fizyolojik olayın meydana geldiği, 60-100 Å kalınlığında, bileşenleri sürekli olarak membran düzleminde hareket eden kompleks ve dinamik bir yapıya sahiptir(4,9).

1972 yılında S. Jonathan Singer ve Garth Nicolson, kimyasal ve elektron mikroskobu ile çalışmalar yapmış, membran protein ve lipidlerinin difüzyon özelliklerinden faydalanmış ve her membranda rastlanan lipid ikili tabakası benzerliklerinden dolayı, biyolojik membranlar için "Akıcı Mozaik Modeli"ni ileri sürmüşlerdir. Bu modelin temelinde, membranların düzenlenmiş globuler proteinler ve lipidlerin iki boyutlu çözeltileri olduğu fikri yatar (Şekil 2.1) (10,11,12).



Şekil 2.1. Membran Yapısının "Akışkan Mozaik Modeli". İP, integral proteinleri ve PP de periferel proteinleri göstermektedir (4).



Modelin Özellikleri Şunlardır;

**a)** Pekçok fofolipid ve glikolipid molekülleri lipid ikili tabakada yer almaktadır. Bu ikili tabaka, proteinler için bir çözücüdür ve geçirgenlik bariyeridir.

**b)** Membran lipidlerinin çok az bir kısmı bazı membran proteinleriyle etkileşerek muhtemelen onların aktifleştirilmesinde rol oynarlar.

**c)** Membran proteinleri lipid matriksinde yanal olarak yayılırlar. Fakat membranın bir yüzeyinden diğer yüzeyine dönme serbestlikleri yoktur (9,12).

Polar lipid tabakalarının polar olan baş kısımları membranın dış yüzeyine dönük fakat doymuş ve doymamış yağ asitlerinden meydana gelmiş hidrofobik kuyruk kısımları membranın içine dönük olup, hücrenin normal sıcaklığında akıcı halde bulunmaktadır. Hidrofobik yan zincir ihtiva eden aminoasitleri yüzeyinde taşıyan integral membran proteinleri, lipid tabakasının ortasındaki hidrofobik bölgede yer alırken, hidrofilik yan zincir ihtiva eden amino asitleri yüzeyinde taşıyan periferel membran proteinleri, polar baş kısımlarıyla elektrostatik etkileştiği membranın dış yüzeyinde bulunur (6,9,13).

Biyolojik membranların en önemli lipid bileşenleri fosfolipidler (fosfogliseridler ve sfingomiyelin) glikolipidler ve kolesteroldür. Bu lipidler membranda yapısal rol oynarlar. Proteinler ise membran lipidleriyle kooperatif nonkovalent olarak etkileşerek dinamik rol oynamaktadırlar. Membran üzerindeki dinamik fonksiyonlar arttıkça protein oranıda artmaktadır (Tablo Ek-1) (1).

Hidrokarbon ve yağ asitleri enerji koruma gereğinden dolayı dış tarafa itilmiştir. Yine membranın dış kısmında yer alan glikoproteinler membrana antijenik bir özellik kazandırır. Çoğu enzimlerin aktivitelerini gerçekleştirdiği yer alan membranlar, mitokondride oksidatif fosforilasyon ve kloroplastlarda fotosentez olmak üzere iki önemli enerji dönüşümüne de ortam sağlarlar. Plazma membranları, endositoz ve eksositozla hücrenin içi ve dışı arasındaki madde alışverişini de sağlarlar. Dış ortamdan gelen tüm kimyasal ve elektriksel sinyalleri tanıyan reseptörlere de sahiptirler (12,14).

Hücre hayatiyetini devam ettirebilmesi için iç ortamdaki bazı maddelerin sabit konsantrasyonda tutulması dışarıdan içeriye veya içeriden dışarıya bazı maddelerin geçmesi gerekmektedir. Bu geçiş membranların yapısında yer alan kapı ve pompalarla gerçekleştirilir. Ayrıca membranın iki yüzeyindeki yüklü gruplar da, membran potansiyellerini meydana getirirler (1,9).

### 2.1.2. Membran Proteinlerinin Sınıflandırılması

Membranlar üzerinde proteinler iki türlü yerleşmiştir:

**a) Periferel proteinler:** Oldukça hidrofilik olan periferel proteinler, membranlara elektrostatik ve hidrojen bağı etkileşmeleriyle bağlandığından düşük iyonik şiddetle veya pH değişikliği ile ortadan kaldırılabilirler. Uygun kromotografik metodlarla ayrıştırılırlar.

**b) İntegral proteinler:** Hidrofilik bölgesi suya bakan kısmı ve hidrofobik bölgesinde lipid matriksine gömülü kısmı ile amfilik özellik taşır. Bu proteinler, farklı yük ve yapıdaki lipidlerle kaynaşır. Bu proteinleri membrandan ayırtmak, apolar etkileşimleri deterjan veya organik çözücülerle yenmek süretiyle mümkün olur (9,11).

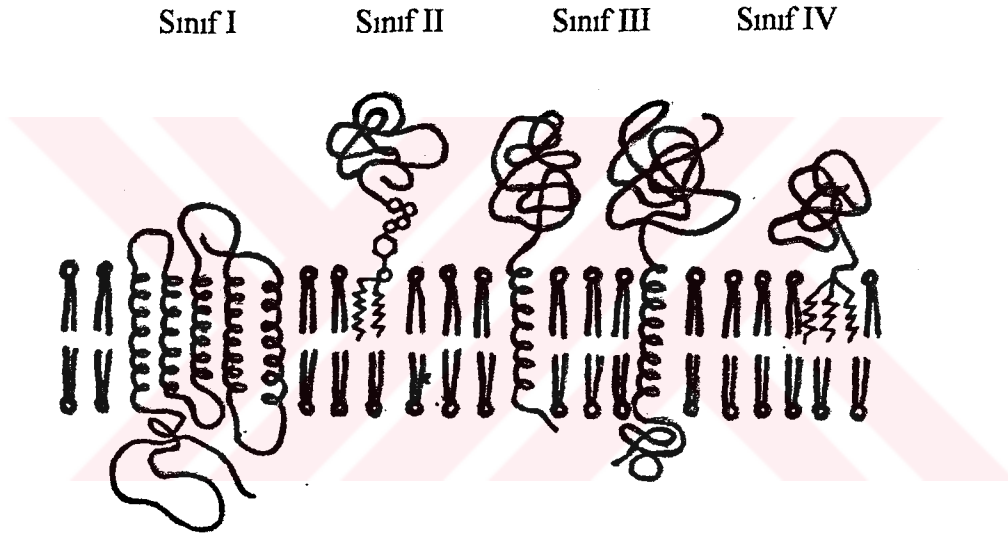
İntegral membran proteinleri 4 sınıfta toplanabilir (Şekil 2.2) (15-16).

Sınıf 1: Birden fazla  $\alpha$ -sarmal ile lipid ikili tabakaya gömülüdürler. Bu  $\alpha$ -sarmaller polar lipidlerle bağlanırlar.

Sınıf 2: Polipeptid zincirinin C-terminal ucu karbohidrat birimine takılıdır. Bu karbohidrat birimi de fosfatidil inositola takılmıştır.

Sınıf 3: Tek  $\alpha$ -sarmal ikili tabakayı katetmemektedir.

Sınıf 4: Polipeptid zincirinin N-terminal ucu, yağ açılı veya diaçil gliserol kısımlarına kovalent olarak takılmıştır.



Şekil 2.2. İntegral membran proteinlerinin yapısal tipleri (11).

## 2.2. Eritrosit Membranı

Eritrositler yapı ve fonksiyon bakımından diğer hücrelerden farklıdır. Kılcal arteriollere doğru gittikçe yüksek basınç ve hız altında şiddetli çalkantı ve sürtünme kuvvetine maruz kalan eritrositler, ömürleri olan 120 gün boyunca her 12 dakikada bir bu stres altında dalağa gelmek zorundadırlar. Eritrositler korunmak için öyle bir yapıya ihtiyaç duyarlar ki, bu da çift lipid tabakası altında bulunan ve çeşitli proteinler vasıtasıyla lipid ikili tabakasına bağlanan ve eritrositlere bikonkav şeklini veren membran iskeleti sitoskeletondur. Membran iskeleti vasıtasıyla, eritrositler esnek ve dayanıklı bir yapı kazanırlar. Eritrosit membranını diğer hücre membranlarından ayıran fark budur (1,9,17,18).

Eritrosit membranı, lipidler ve proteinlerden oluşur ve bu yapılar intraselüler oluşumların regülasyonu için yüksek derecede seçici ve geçirgen bir bariyer teşkil eder. Membranın yoğunluğu  $1.15 \text{ g/cm}^3$ , yüz alanı  $10 \mu\text{m}^2$  ve kalınlığı ise  $75 \text{ \AA}$ 'dır (19). Membranda yaklaşık %50 protein, %40 lipid ve %10 karbohidrat bulunmaktadır. Eritrositlerin su ve protein muhtevası Tablo EK 2.1'de ve eritrosit membranı lipid bileşimi ise Tablo EK 2.2'de verilmiştir.

Fosfolipidlerin  $\alpha$ -C'unda fosforik asitle esterleşmiş gliserol molekülü polar baş grubu ve iki uzun zincirli yağ asidide hidrofobik kuyrukları oluşturur. Lipid yapısı spesifik bir amaç için sabitleşmedikçe membranda rahatça hareket edebilir. Bu durum iç ve dış lipid tabakaları arasında asimetrik bir dağılım meydana getirir. Fosfoglisericit, fosfatidilkolin ve sfingomiyelin dış tarafta, fosfatidil etanolamin, fosfatidil inositol ve fosfatidil serin iç tarafta bulunma meylindeyler ve böylece iç yüzeyde fazladan pozitif yük doğar (16,20). Bu asimetri, lipidler ve içteki protein ağı arasındaki ilişkide rol oynar. Kolesterol, iç ve dış tabakada eşit olarak dağılmıştır ve membran rijititesinin sağlanmasında rol oynamaktadır (4).

Eritrosit membranı proteinlerinin elektroforetik hareketliliği, SDS-PAGE ile izlendiğinden yaklaşık 12 bant gözlenebilmektedir. Bunlardan 3, 4.5, 7 ve PAS bantları integral, diğerleri ise periferel proteinlerdir (Şekil 2.3) (12,18,21). Bu proteinlerin özellikleri ve fonksiyonları bölüm 2.3'de ayrıntılı olarak ve EK-3'de de özet olarak verilmiştir.

Moleküler düzeyde 2,3 bisfosfoglisericit ve ATP, spektrin-aktin etkileşmelerini dramatik olarak inhibe ederler. Tüm iskelet proteinlerinin hemen hepsi, bir veya birkaç protein kinazla fosforile olur (2,20).

#### Fosforilleyen mekanizma

cAMP-den bağımsız kinazlar

cAMP'ye bağımlı kinazlar

Tirozin kinaz

Protein kinaz C

#### Fosforillenen protein

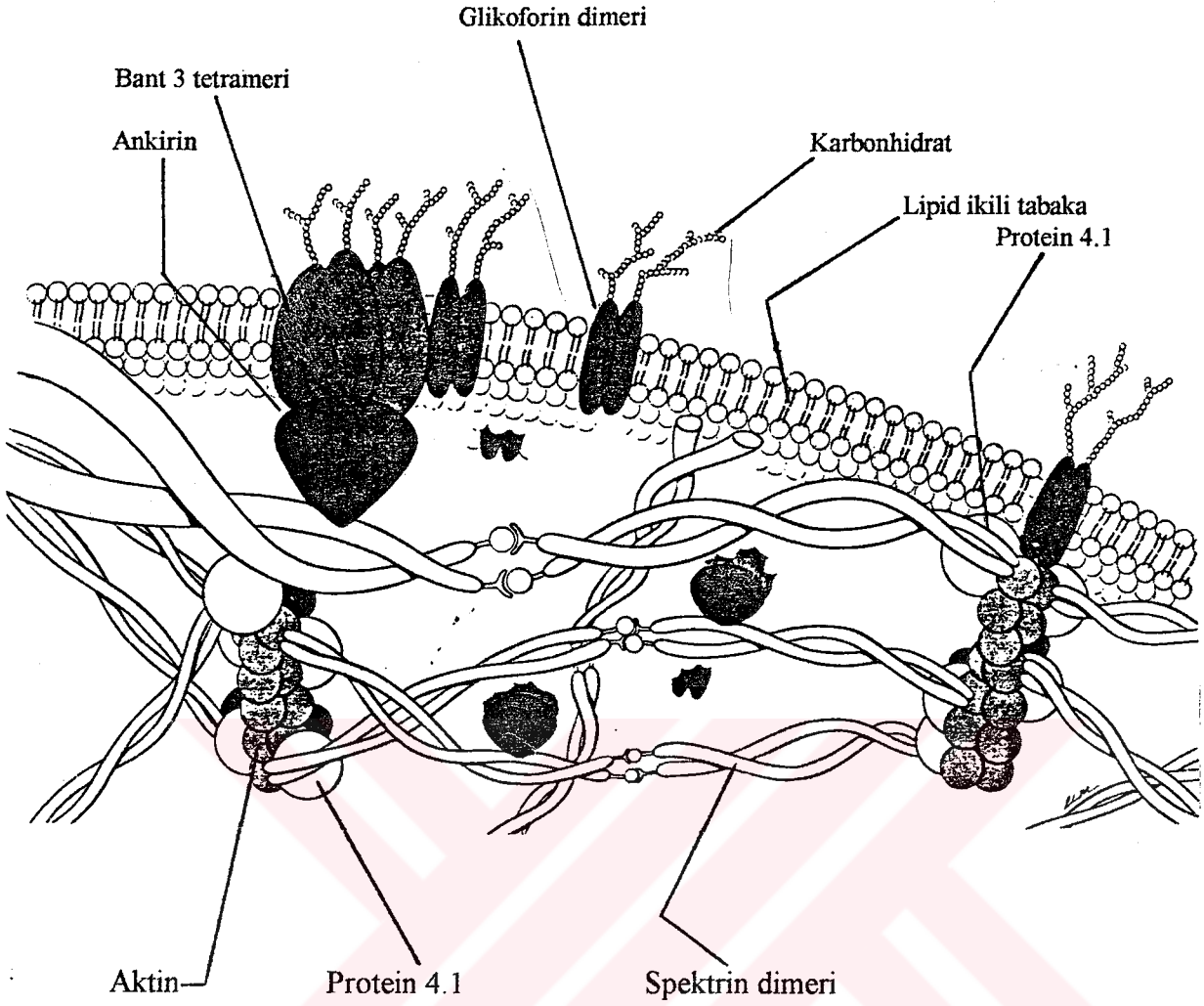
Spektrin, protein 3

Ankirin, protein 4.1 ve 4.9

Protein 3

Protein 4.1 ve 4.9

Protein 4.1'in fosforilasyonu spektrin bağlanmasını azaltır. Protein 3'ün amino ucundaki tirozinin fosforillenmesi ise glikolitik enzimlerin ve hemoglobinin parçalanmasını bloke eder. Kalmodulin spektrin  $\beta$  zincirini  $\text{Ca}^{+2}$  bağımlı tarzda bağlar ve protein 4.1 ile uyarılmış spektrin aktine bağlanmasını inhibe eder (2,22).



Şekil 2.3. Eritrosit membran proteinlerinin membrandaki yerleşimleri(21).

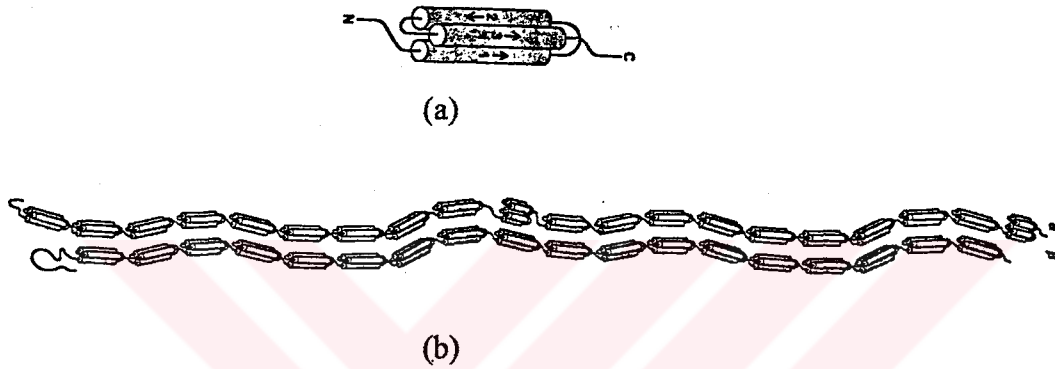
### 2.3. Eritrosit Membranı Proteinleri

#### 2.3.1. Spektrin (Bant 1, Bant 2)

Spektrin, eritrosit membranı iç yapısında bulunan ve yapısal olarak önemli fonksiyonu olan bir periferel proteindir. İskelet ağırlığının %50-75'inden sorumlu olup, membran iskeletindeki ağımsı yapıyı meydana getirerek, eritrosit membranının şeklini ve dayanıklılığını sağlar. Sitoplazmik yüzeyde bulunarak plazma membranını membran isteletine bağlar (2,23,24).

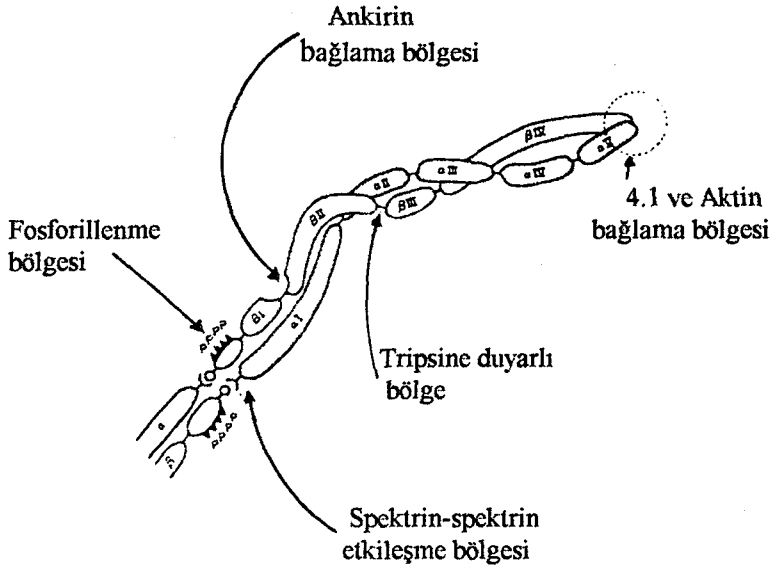
Spektrin, eritroid gelişiminin erken safhalarında sentezlenmektedir. Pronormoblastlarda bolca bulunmaktadır. Eritrosit stem hücrelerinde de bulunabilmektedir. Hem omurgalı ve hemde omurgasızların kırmızı hücrelerinde mevcuttur. İlkel organizmalarda immunokimyasal ve yapısal olarak benzeri proteinler bulunmaktadır (2).

Spektrin, yapıca birbirine benzeyen fakat fonksiyonları farklı olan iki büyük polipeptid zincirinden meydana gelmiştir. 240 kda'luk  $\alpha$ -zinciri SDS-elektroforezinde band 1 bölgesinde gözükürken, 220 kda'luk  $\beta$ -zinciri, bant 2 bölgesinde gözükmektedir (6).  $\alpha$ -zincirinde 2200 ve  $\beta$ -zincirinde ise 2000 amino asit rezidüsü vardır. Bu zincirlerin amino (-NH<sub>2</sub>) ve karboksil (-COOH) uçları birbirlerine göre antiparaleldir. Her iki spektrin zincirinde 38 homolog parça halinde 106 aminoasit vardır (18). Bir homolog parça ise üçlü sarmal yapıdan meydana gelir.  $\alpha$ -zincirinden farklı olarak 10. ve 20. sarmal parçasında farklılık vardır (Şekil 2.4) (2,9,20).



**Şekil 2.4.** Spektrin  $\alpha$  ve  $\beta$  zincirleri (b) ve üçlü sarmalı (a) (9).

Elektron mikroskobu ile yapılan çalışmalar, spektrin ince bir yapıda olduğunu ve solucan şeklinde kıvrımlardan meydana geldiğini göstermiştir.  $\alpha$  ve  $\beta$  zincirleri birbirlerinin etrafını sararak bir ip halini almıştır. Bir dimerin uzunluğu yaklaşık 100 nm kadardır.  $\alpha\beta$  altbirimlerinin ikisi ucuca bağlanarak 200 nm uzunluğunda bir tetramer meydana getirir (2,6,9,22). Spektrin sadece dimerler halinde değil, tetramer, heksamer, oktamer, dekamer ve dodekamerler halindedey bulunabilir. Tetramer ve oligomerlerin oranı sıcaklık ve iyonik güce bağlı olarak değişmektedir. Spektrin düşük iyonik güçte ve fizyolojik şartlarda (37°C) de dimerler halinde iken, fizyolojik iyonik güçte ve düşük sıcaklıkta (25°C) de tetramer ve oligomerler halinde bulunmaktadır. 0°C'de spektrin %60'ı tetramer ve %5'ide oligomer halindedir. 4°C'de aktivasyon enerjisi yüksek olacağından denge kinetik olarak donar. Bu sıcaklıkta, spektrini membrandan ekstrakte etmek mümkündür. Spektrin, normalde 49°C'de denature olur. Düşük iyonik güçte izole edildiğinde veya spektrin-aktin bağlanması, 2,3 DPG ile zayıflatıldığında veziküllenme meydana gelir (2,18).



**Şekil 2.5.** Spektrin dimerinin bölgeleri (2).

Spektrin dimerinde proteaza duyarlı dokuz bölge vardır (Şekil 2.5). Bunların beşi  $\alpha$  zincirinde ve dördü  $\beta$  zincirindedir.  $\alpha$  ve  $\beta$  zincirinde, tripsine duyarlı bir seri bölge vardır. Bu bölgeler molekülün baş kısmından başlayarak numaralandırılmıştır.

Spektrinin bağlanma bölgelerini şu şekilde sıralayabiliriz (2):

- 1 - Kendi kendine birleşme bölgesi
- 2 - Ankirin bağlama bölgesi (Bant 2.1...)
- 3 - Aktin bağlama bölgesi (Bant 5)
- 4 - Protein 4.1 bağlama bölgesi

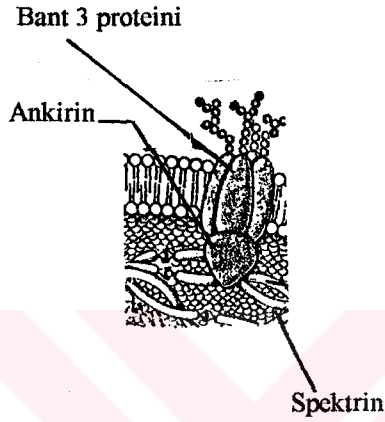
Ankirin bağlayan bölge  $\beta I$  ve  $\beta II$  arasında, zincirin başından 20 nm mesafede bulunurken, aktin ve protein 4.1 bağlama bölgesi  $\beta IV$  ve  $\alpha V$  arasında yani kuyruk kısımda bulunmaktadır. Spektrinde ankirin için iki bağlama bölgesi bulunmasına rağmen, genelde tetramer başına bir bağlanma gerçekleşir. Spektrinin cAMP bağımlı fosforilasyonu dimerin karboksi-terminal uçuna yakın kısımda meydana gelir.  $\alpha$ -zincirinin baş kısmındaki 80 kda'luk bölge,  $\beta$  zincirinin 10 kda'luk bölgesiyle birleştiğinde dimerler meydana gelir (18).  $\alpha I$  bölgeside bu kısımlardan biridir. Birçok spektrin molekülü kendi uzunluğunun üçte biri kadar kıvrılmaktadır (2,9).

İskelet kompleksinin lipid ikili tabakayla bağdaşması, spektrin ile glikoforin A veya C arasındaki bağla gerçekleşir. Spektrin molekülleri, protein 4.1, protein 4.9, adüsin ve tropomiyozin gibi kompleks aktin filamentleriyle etkileşerek iki boyutlu bir ağ halinde bağlanmıştır. Bu birleşmeler bifonksiyonel spektrin tetramerlerinin kuyruk kısmında meydana gelmektedir. Bu proteinler iskeletin inşa edilmesinde birleştirici rol oynamaktadır (2,25).



### 2.3.2. Ankirin (Bant 2.1)

Ankirin, spektrinin  $\beta$  zinciriyle, anyon kanalının sitoplazmik kısmında N-terminal ucu arasında yer alan piramid şeklinde bir proteindir.  $8.3 \times 10$  nm'lik boyutlara sahiptir (Şekil 2.6). Spektrinin ucundan 20 nm mesafede bağlanması için oldukça yüksek afinitesi vardır ( $K_d \sim 10^{-7}$  M) (Şekil 2.6) (2,22).



Şekil 2.6. Spektrin-ankirin-anyon kanalı kompleksi (21).

Sindein olarak adlandırılan ankirin, spektrini membranın iç yüzeyine bağlayan iki proteinden biridir (13,22). 200 kda ağırlığında olup, SDS jelinde Bant 2.1 bölgesinde yer almaktadır (6). Proteolize karşı oldukça duyarlı olduğundan elektroforezde 2.2, 2.3 ve 2.6 bantları şeklinde fragmentleride görülebilir. Bütün normal kırmızı hücrelerde aynı formları gözükmektedir. Fakat bunların normal ankirin proteolitik ürünü mü, yoksa ayrı bir gen ürünleri mi olduğu kesinlik kazanmış değildir (2,5).

Herbir spektrin tetrameri, muhtemelen bir ankirin molekülünü bağlar. Oysa spektrinin iki ankirin bağlama bölgesi vardır. Ankirin ise spektrin dimerine bağlandığından ( $10^{-6}$  M) 10 kat daha fazla güçle spektrin tetramerine ( $10^{-7}$  M) bağlanır. Ankirin, bant 3'ün transmembran bölgesinin bir modulatorüdür. Protein 3'ün sitoplazmik kısmına yüksek afinite ile bağlanır. Protein 2.2, tüm ankirinle olduğundan daha fazla afinite ile protein 3'e bağlanır. Bu bağlanma ankirin spektrine bağlanmasından 3 kat daha yüksek afinite ile gerçekleşir (2).

Ankirin molekülü, proteolizle birbirinden ayrılabilen iki farklı bağlanma bölgesi bulundurmaktadır. Spektrin bağlama bölgesi, 72 kda'luk fragmenttedir. Bu fragmentin fosforilasyonu, spektrin tetrameri ile ankirin etkileşmesini engeller. 90 kda'luk fragment protein 3'ün sitoplazmik bölgesine bağlanır. Ankirin, aynı zamanda, protein 4.2'yi bağlayan bir bölgeye sahiptir. Bir veya daha fazla sayıda yağ asidinde bağlanabilir (2,26).

### 2.3.3. Adüsin

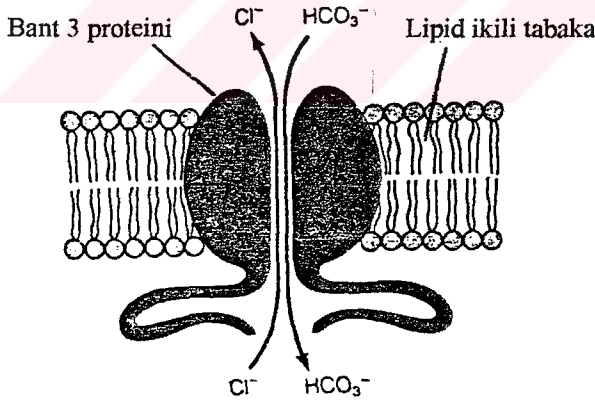
Bu protein  $\alpha$  (103 kda) ve  $\beta$  (97 kda) altbirimlerinden oluşan bir heterodimerdir. Hücre başına 30000 kopya ve aktin protofilamenti başına bir kopyası vardır. Protein aktine, protein 4.1 gibi bağlanmaktadır. Fonksiyonu, spektrin aktine bağlanmasını arttırmaktır. Fakat aktin eksikliğinde, protein 4.1 olmaksızın, spektrin ile direk reaksiyona giremez.

Adüsin-spektrin-aktin kompleksi, ikinci spektrin bağlanmasına katkıda bulunur. Bu etki kalmodulinle bloke olur. Adüsin proteini, protein kinaz C tarafından fosforillenmektedir. Fakat bu fosforillenmenin etkisi bilinmemektedir (2).

### 2.3.4. Anyon Kanalı (Bant 3)

Kırmızı hücre membranı,  $\text{CO}_2$ 'nin kanla taşınmasında ve hücre pH sınırın toplanmasında anahtar rol oynayan bir anyon kanalı ihtiva etmektedir. Doku kapillerinde hücreye giren  $\text{CO}_2$ , karbonik anhidraz etkisinde  $\text{H}_2\text{CO}_3$ 'e dönüşür. Buda  $\text{H}^+$  ve  $\text{HCO}_3^-$ 'e ayrışır. Açığa çıkan proton, Bohr etkisinin bir sonucu olarak deoksihemoglobin tarafından alınır. Bikarbonat, anyon kanalı sayesinde  $\text{Cl}^-$  iyonlarıyla yer değiştirerek kırmızı hücreden ayrılır (Şekil 2.7). Pulmoner dolaşımında bu işlem tersinedir (1,6).

Eritrosit dışı



Eritrosit içi

Şekil 2.7. Doku kapillerinde eritrosit membranı iyon transport proteini(1).

Elektroforezde bant-3 bölgesinde yer alan anyon kanalı, anyon değiştirici protein olarakta bilinmektedir (27). Diğer bir adıda Protein E olan bant 3 proteininde anyonların transportu kolaylaştırılmış difüzyonla olmaktadır (28). Herbir kırmızı hücrede bu integral

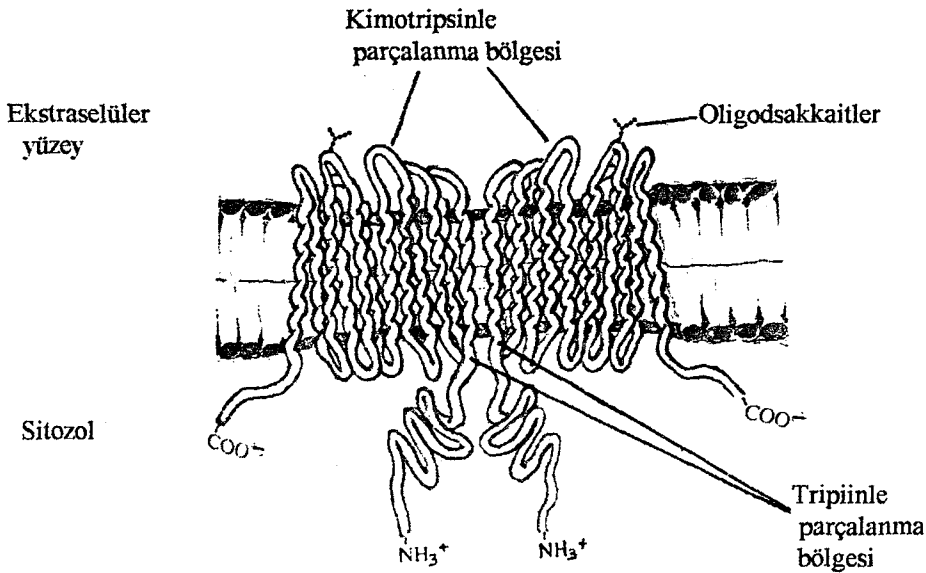


proteinin 106 kopyası bulunmaktadır. Toplam membran proteinin yaklaşık üçte birini teşkil eden 100 kda'luk bir integral membran glikoproteini olan protein 3'ün %7'si karbohidrat ve toplam membran proteinin %10'u şekerdir (19). Protein, yapısal olarak iki ve fonksiyonel olarak bir bölgeye sahip olup her bir bölgesinde 929 rezidülü tek bir zincir taşımaktadır. Bu bölgeler proteolitik parçalanmayla birbirinden ayrılır.

Bu zincirde tripsinle parçalanma, sitoplazmik amino uçlu bölgede meydana gelirken, kimotripsinle parçalanma ekstraselüler bölgede meydana gelir.

52 kda'luk karboksil uçlu bölge, fizyolojik olarak önemli bir anyon değiştirici kanaldır. Hidropati çizimleri, bu bölgenin membranı geçen 12  $\alpha$ -sarmal yapıdan oluştuğunu göstermiştir. 590 rezidülü karboksil ucu,  $\text{HCO}_3^-$  ve  $\text{Cl}^-$  iyonlarının yer değişimine aracılık eder. Lipid ikili tabakayı boydan boya geçer. Membranın dış yüzeyindeki karbohidrat zinciri, konkanavalin A'yı bağlar. Glikozillenme heterojeniktir ve asparajin rezidüsü üzerinde olmaktadır. SDS elektroforezinde proteinin elektroforetik hareketliliğinden sorumlu bölgedir. Ankirin transmembran bölgesinin konformasyonunda muhtemel bir modulatördür.

43 kda'luk sitoplazmik yani amino uçlu bölge, 420 rezidüden ibarettir. Bu amino ucu bölgesini uzaklaştırmak anyon değişimi aktivitesini etkilemez. Hemoglobin, protein 4.1, protein 4.2, ankirin ve glikolitik enzimler (G3PDH, fosfofruktokinaz, fosfogliserat kinaz ve aldolaz) gibi kırmızı hücre proteinleri sitoplazmik bölgede yer almaktadır. Hemoglobin ve glikolitik enzimler amino terminali ucuna yerleşmiş, oldukça asidik kısma bağlanır. Ankirin, protein 4.1 ve 4.2 bağlama bölgeleri tam belli değildir. Genelde her bir protein 3 tetramerine bir ankirin molekülü bağlanır ( $K_d \sim 10^{-8} \text{M}$ ). Protein 3'ün diğer proteinlerle hangi oranda etkileştiği ya da bu bağlanma reaksiyonlarının ne sebeple olduğu hakkında nispeten çok az



Şekil 2.8. Bant 3 proteininin yapısı(6).

bilgi vardır. Çeşitli glikolitik enzimlerin kinetikleri, bağlanmayla değişmektedir. Fakat bunun fizyolojik olarak önemli bir durum olduğu açıklık kazanmış değildir. Sitoplazmik bölgenin fosforillenmesi anyon transportunu arttırırken, 4.2 ile etkileşmesi, anyon transportunu azaltır (2,7).

Anyon kanalı, kan grubu antijenlerini de taşımaktadır. Kan grubu i olan eritrositlerin bant 3 glikoproteininde, kan grubu I olanlardan daha az oligosakkarit bulunmaktadır (28).

Elektromikroskopik çalışmalar, bant 3 proteininin tetramerik yapıda olduğunu göstermiştir. Ultrasantrifüjleme ile yapılan çalışmalarda, deterjanla çözünmüş bant 3'ün dimerik ve tetramerik yapısının karışımı halinde bulunduğu gözlenmiştir. Asetik asitle çözülmüş ve sonrada sulu çözeltiye aktarılmış bant 3'de monomer/dimer/tetramer yapısının dengede olduğu görülmüştür (30).

### 2.3.5. Bant 4 Serisi Proteinler

Bant 4 serisi proteinler, bant 4.1, 4.2, 4.5 ve 4.9 dur. Bunlar sırasıyla açıklanacaktır.

#### 2.3.5.1. Bant 4.1

MA 78-80 kda olan 5.7 nm'lik dairesel yapıdaki globuler proteindir. İskelet stabilliği için gerekli olan bu protein, spektrinin her iki zincirindeki C-terminalinin aktin filamentine bağlanmasını sağlar. Bu protein, spektrinle 1-1 stokiometri oranında bağlanıp, bağlanma Kd'si yaklaşık  $10^{-7}$  M civarındadır. Ayrıca aktinle de aynı oranda bağlanır. Sonuçta birleşme sabiti  $10^{-12}$  M olan bir kompleks meydana gelir.

Protein 4.1, bir veya birkaç transmembran proteininide bağlayabilir. Glikoforinin sitozole bakan yüzeyini spektrin-aktin kompleksine bağlar (25). Glikoforin A ve glikoforin C'nin sitoplazmik kısımlarıyla etkileşim halindedir. Glikoforin A ile etkileşimi, polifosfoinositidlerle düzenlenmektedir. Fosfatidil inositol 4,5 bisfosfat bu integral proteine takıldığında, protein 4.1 glikoforine bağlanır. İn vivo olarak glikoforin C'nin bağlanması daha baskın olabilir. Protein 4.1, protein 3 ile ve fosfatidilserinle de etkileşebilir. Bu nedenlerle, protein 4.1'in lipid ikili tabakada spektrinle birlikte iskeleti tutmakta görev aldığı söylenebilir (2).

Protein 4.1, her ikisinde fosforillenebilen ve saf olarak elde edilebilen 4.1a ve 4.1b şeklinde görülür. 4.1b bileşenine daha çok genç eritrositlerde rastlanır. Molekül, hem asidik ve hemde bazik uçlarıyla polarize olmuştur. 10 kda'luk merkezi bölgesi, spektrin-aktin bağlanmasından sorumlu bölgedir (2,8).

### 2.3.5.2. *Bant 4.2*

Monomer halinde 72 kda'luk periferel protein olan protein 4.2 toplam membran proteinin %5'i kadardır. Protein 3'ün sitoplazmik bölgesiyle etkileşerek protein 3'ün anyon transportunun düzenlenmesinde rol oynar. Protein 4.2'nin bant 3 ile fazla miktarda etkileşmeye girmesi bant 3'ün anyon transportunu azaltır (7). Ayrıca protein 4.2, ankirin ile etkileşerek, ankirinin membranda sabit kalmasını sağlar. Protein 4.2 eksikliğinde, eritrositlerin şekli bozulur ve membran stabilitesi azalır. Hemolitik anemili hastanın protein 4.2'si 72 kda ve 74 kda'luk protein çifti halinde gözükür (25).

### 2.3.5.3. *Bant 4.5*

MA 55 kda'luk bir integral membran proteini olup, hücre başına  $1.5 \times 10^6$  kopya taşır. Yapısı hakkında herhangi bir bilgi yoktur. Fakat glukoz taşınmasında rolü olabileceği tahmin edilmektedir (1). Bazı çalışmalarda, densitometrik okumalar sonucu bant 4.5 bölgesinde iki bant gözlenmiştir (19,31,32). İki boyutlu elektroforezle yapılan bir çalışmada, bant 4.5 bölgesinde 14 bant gözlenmiş fakat bunların protein bileşiminin aynı olmadığı, bazı polipeptidlerin değişik formları olduğu belirtilmektedir (33).

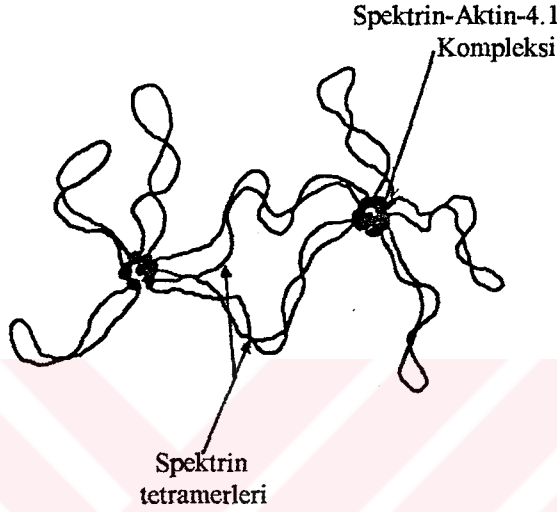
### 2.3.5.4. *Bant 4.9*

Yarıçapı  $50 \text{ \AA}$  olan 48 kda'luk bir periferel proteindir. Çözeltide 145 kda'luk trimer halinde bulunur. Spekrin, aktin ve protein 4.1 ile birlikte eritrosit membran iskeletinin stabilitesinde önemli rol oynamaktadır. Herbir spekrin tetrameri için bir tane ve her 5 aktin monomeri için yine bir tane bant 4.9 polipeptidi vardır. Diğer iskelet proteinlerinin aksine 4.9, cAMP-bağımlı ve membranda bulunan bir kinazla fosforile olmaktadır. İn vivo olarak bu proteinin nasıl fonksiyon gördüğü bilinmemektedir. Fakat in vitro olarak, aktine bağlanarak aktin filamentlerini kablo halinde paketlediği bilinmektedir. cAMP-bağımlı kısım fosforillendiğinde bu etki ortadan kalkar (2,3,34).

### 2.3.6. *Aktin (Bant 5)*

Eritrosit membranında yer alan 43 kda'luk aktin, diğer kas harici hücre çeşitlerinde bulunan  $\beta$  altbirimi tipindedir. Diğer hücrelerdeki aktinden farklı olarak, 12-16 monomer uzunluğunda çift sarmallı F-aktin filamentlerinden (protofilamentlerden) organize edilmiştir. Bu kısa filamentler, spekrin ve protein 4.1 ile etkileşerek stabilize edilirler. Herbir eritrositte  $5 \times 10^5$  tane aktin molekülü vardır. Aktin, ayrıca düz veya dolağanmış şekilde, iki boyutlu spekrin ağının teşekkülüne de imkan sağlar.

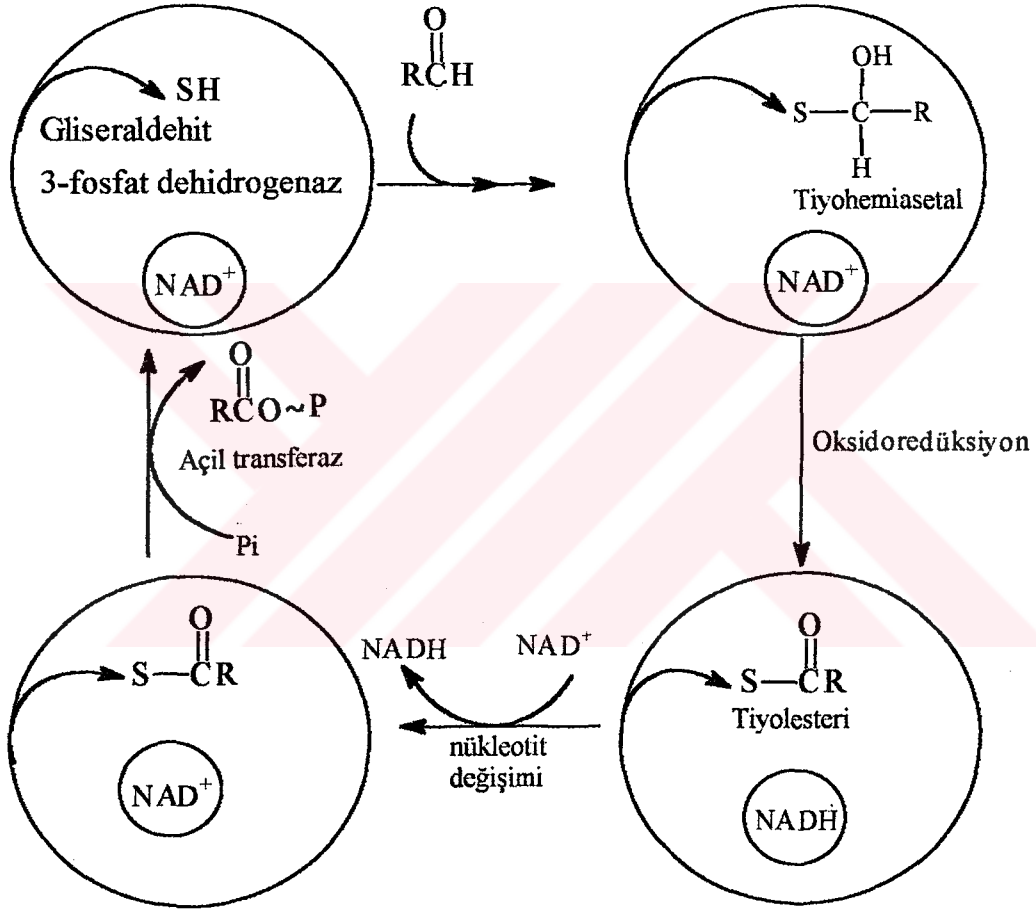
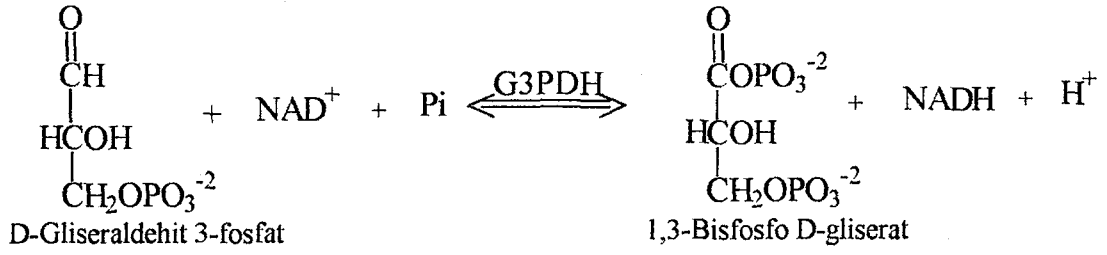
Aktin polimerizasyonu, kırmızı hücrelerde oldukça önemlidir. Çünkü aktin polimerizasyonunu engelleyen bileşikler membranın esnekliğini arttırırken, polimerizasyonu arttıranlar ise membranın sertliğini arttırır. Spekrinin aktinle bağlanması, membran iskeletinin oluşumunda esaslı bir mekanizmadır. Aktin filamentleri, spekrin molekülünün kuyruğuna yakın kısımda spekrinle etkileşir. Spekrinin hem  $\alpha$  ve hem de  $\beta$  zincirleri bu etkileşmeyi sağlar. Spekrin tetramerleri, bu nedenle iki değerlidir ve aktin filamentleriyle çapraz bağ yapabilir. Bu bağlanmanın  $K_d$ 'si  $10^{-3}$  M dir (2,3,18).



**Şekil 2.9.** Spekrin-aktin-4.1 kompleksinin meydana gelişi(18).

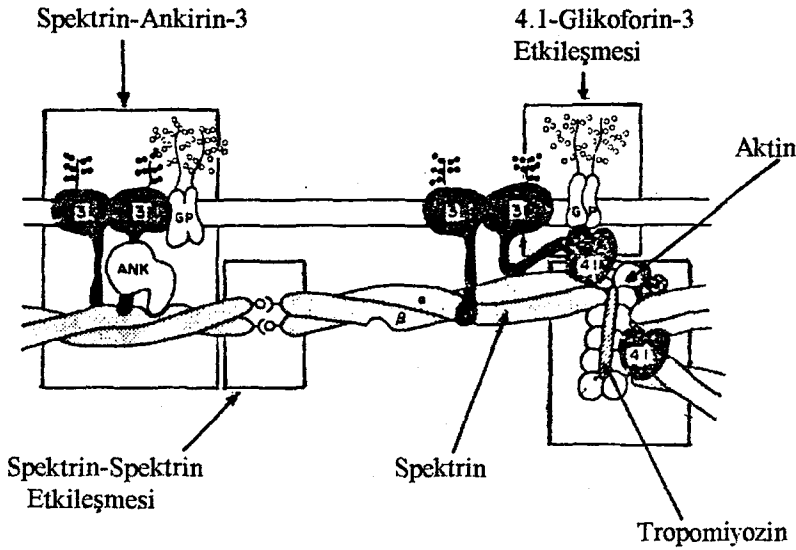
### 2.3.7 Gliseraldehit 3 Fosfat Dehidrogenaz (Bant 6)

MA 35 kda olan gliseraldehit 3 fosfat dehidrogenaz (E.C. 1.2.1.9) proteini, anyon kanalının amino ucuna kooperatif olarak bağlı oksidasyondan sorumlu glikolitik enzimdir (19). Yapısal olarak tetramer teşkil eden birbirinin tüpatıp aynı dört polipeptid (monomer)den oluşur. Herbir polipeptid üzerinde, muhtemelen polipeptid zinciri içindeki sistein rezidülerinden türemiş olan dört SH grubu vardır. Gliseraldehit 3-fosfatın okside olduğu reaksiyonlara katıldığı bilinen SH gruplarından sadece birisi bu enzimin aktif yerinde bulunur. Söz konusu substrat, başlangıçtaki dehidrogenaz üzerindeki bir sisteinil kısmı ile birleşerek tiyohemiasetal teşkil eder. Bu oksidasyonla ortadan kaldırılan hidrojenler, NADH teşkil etmek üzere,  $NAD^{+}$ e transfer olurlar. En son olarak fosforilaz yoluyla inorganik fosfat eklenir. 1,3 bisfosfogliserat teşekkül eder ve yinede SH gruplu serbest enzim açığa çıkar. Bu oksidasyon sırasında salıverilen enerji, bir yüksek enerjili kükürt bağı oluşturularak alıkonulur. Bu bağ, fosforilaz'den sonra 1,3 bisfosfo-gliseratın 1 nolu pozisyonunda bir yüksek enerjili fosfat bağı haline gelir (35,36).



### 2.3.8 Tropomiyozin (Bant 7)

Tropomiyozin, 27 ve 29 kda'luk altbirimler halinde bir heterodimerdir. SDS-PAGE'de bant 7 bölgesinde görülür. Kırmızı hücredeki tropomiyozin, diğer kas harici tropomiyozinlere benzemektedir. Herbir 6-8 aktin monomeri için bir kopyası vardır ki bu da kırmızı hücre aktin protofilamentlerinin hepsini örtmek için yeterlidir. Tropomiyozinin uzunluğu protofilamentlerin uzunluğu kadardır (2).



Şekil 2.10. Tropomiyozinin membran iskeletindeki yerleşimi (2).

### 2.3.9. Glikoforin

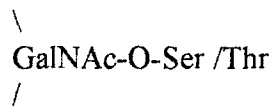
Eritrosit membranının en önemli integral membran glikoproteini, MA'lığı 31 kda olan glikoforin A dır. Herbir membranda 400000 glikoforin molekülü vardır. Membran ağırlığının %1.5 ini teşkil eden glikoforinin %60'ı karbohidrattır.

Viscent Marchei, glikoforin A nın amino asit dizilişini belirlemiş ve plazma membranını boydan boya geçtiğini ve tüm moleküllerin aynı doğrultuda olduğunu göstermiştir. Proteolitik hidrolizler ve kimyasal modifikasyonlar kullanılarak glikoforin A nın üç bölgeden ibaret olduğu tespit edilmiştir (Şekil 2.11) (9,13).

1. -NH<sub>2</sub> terminal bölgesi: Tüm karbohidrat birimlerini bulduran bu bölge, membranın dış kısmında bulunmaktadır. Onaltı oligosokkarit birimi, 100 şeker rezidüsünden meydana gelmiştir. Bu birimlerin onbeşi, serin ve treoninin -OH grubuyla O-glikozidik bağı yapmış iken, bir birim, 26. aminoasit olan asparajinin -NH<sub>2</sub> grubuyla N-glikozidik bağı yapmıştır (1). Tüm oligosakkasit birimleri ilk 50 amino aside kadar olan kısımda bulunmaktadır. Bu karbohidrat birimleri şekere negatiflik kazandıran sialik asit bakımından zengindir. Bu sayede, membran proteini hidrofildir. Glikoforinin ağırlığının %80'ı bu bölgededir.

Bütün O-glikozidik bağıyla bağlı oligosakkasitler, disialotetrasakkarit yapısındadır(13).

Sia -  $\alpha$  (2 --->6) - Gal -  $\beta$  (1 --->3)



Sia -  $\alpha$  (2 --->6)

Disialotetrasakkarit



Burada sia : Sialik asit, Gal : Galaktoz, Gal NAc : N-asetilgalaktoz ve Ser/Thr: Serin/Threonin'dir.

N-bağlı oligosaklaridler ise mannoz içermektedir.

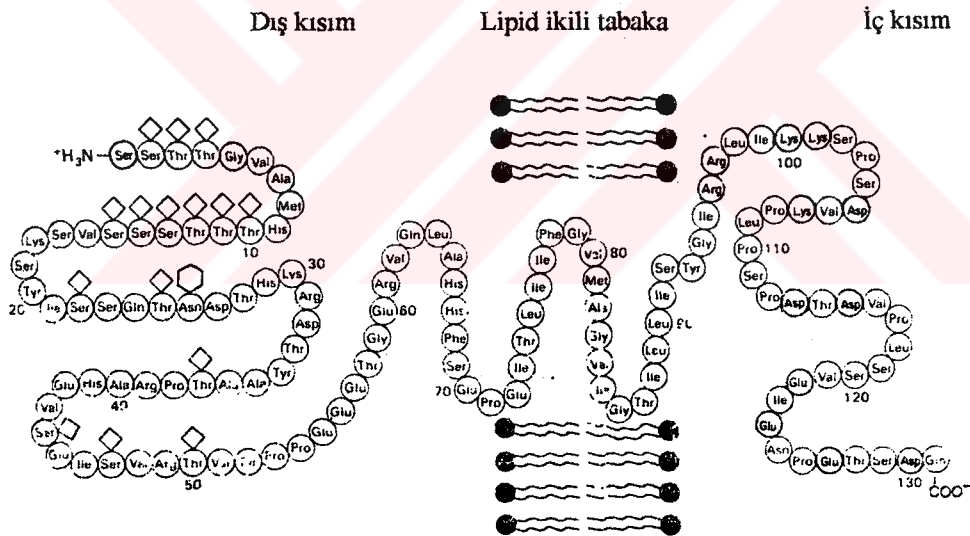
### 2. Hidrofobik orta bölge :

Nonpolar 19 amino asit ihtiva etmektedir.  $\alpha$ -sarmal şeklinde kıvrımlarla lipid ikili tabakayı boydan boya geçmektedir. Sentetik polipeptidlerle yapılan çalışmalar,  $\alpha$ -sarmalın nonpolar ortamda, sulu ortamda olduğundan daha kararlı olduğunu göstermiştir. Bu  $\alpha$ -sarmalın çapı 30 Å'dur.

### 3. -COOH terminal bölge :

Membranın sitozolik yüzeyindedir. Pozitif yüklü rezidüer, fosfolipid moleküllerinin negatif yüklü baş kısımlarıyla etkileşebilirler. Bu bölge, spektrin-aktin kompleksine protein 4.1 aracılığıyla bağlanmıştır.

Glikoforinin bu üç bölgesinde toplam 131 amino asit kalıntısı vardır.



**Şekil 2.11.** Glikoforinin membranda yerleşimi ve amino asit dizilişi (9,13).

Glikoforinler, Coomassie Blue ile boyanamazlar, ancak PAS boyasıyla boyanabilirler. M ve N olmak üzere iki kan grubu antijeni taşırlar. M antijeni glikoforin A'da bulunurken, N antijeni glikoforin B'de bulunur. Glikoforin A ve B nin antijenin farklılıklarının yanı sıra, ayrıca birinci ve beşinci aminoasitler arasında da farklılık vardır.

1	5	
H <sub>2</sub> N-Ser-Ser-Thr-Thr-Gly-		Glikoforin A
H <sub>2</sub> N-Leu-Ser-Thr-Thr-Glu-		Glikoforin B
1	5	

Glikoforinlerin moleküler ağırlıkları arasında da farklılık vardır. Glikoforin A 31 kda, Glikoforin B 23 kda ve Glikoforin C ise 29 kda'dur. Glikoforin C, glikokonneksin olarakta bilinmektedir (13).

#### **2.4. Proteinleri Ayırma Yöntemleri**

Bir biyolojik sıvıda bulunan proteinleri, ortamdaki diğer bileşenlerden ve diğer proteinlerden ayırma işlemi, proteinlerin bazı özelliklerine dayanmaktadır. Bu özelliklerine bağımlı ayırım, dört grupta toplanabilir (12).

##### **2.4.1. Molekül Büyüklükleri Esasına Dayanılarak Proteinlerin Ayrılması**

Bu grupta yer alan ayırma yöntemleri, diyaliz, ultrasantrifüjleme, yoğunluk gradienti santrifüjlemesi ve jel filtrasyon kromatografisidir.

Proteinleri daha küçük molekül ağırlığına sahip moleküllerden ayırmak için selofan, selüloz gibi yarı geçirgen zarlar kullanılarak diyaliz işlemi yapılmaktadır. Prensipte diyalize benzeyen ultrasantrifüjlemede, basınç ve santrifüjleme kuvveti vasıtasıyla sulu çözelti ve küçük çözünen moleküller yarı geçirgen zardan geçerken büyük moleküllü olan proteinler zarı geçemeyerek tüp içinde kalırlar (14,37,38).

Bir protein karışımını, farklı yoğunlukta sukroz çözeltileri yardımıyla, yoğunluk gradienti santrifüjlemesi ile de ayırmak mümkündür. Protein çözeltisi sukroz çözeltilerine ilave edilip yüksek devirde santrifüj edilecek olursa her bir protein kendi yoğunluğu ile aynı olan sukroz bölgesinde toplanacaktır. Sonuçta protein molekülleri, büyüklükleri, şekilleri ve konsantrasyonlarına göre ayrılmış olacaktır (12,14).

Molekül büyüklüklerine göre proteinleri ayırmada kullanılan en etkili metod olan jel filtrasyon kromatografisinde kolon, sefadesks, sefaroze, bio-jel ve agaroz gibi materyallerle doldurulup tamponla kararlı hale getirildikten sonra protein çözeltisi yavaşça ilave edilir. Küçük protein molekülleri, kolon dolgu maddesinin küçük oyuklarına girerken, büyük moleküller eluatta toplanmaktadır. Eluatta ilk toplanan protein molekülü en büyük molekül olurken, en son toplanan en küçük molekül olacaktır (39,40).

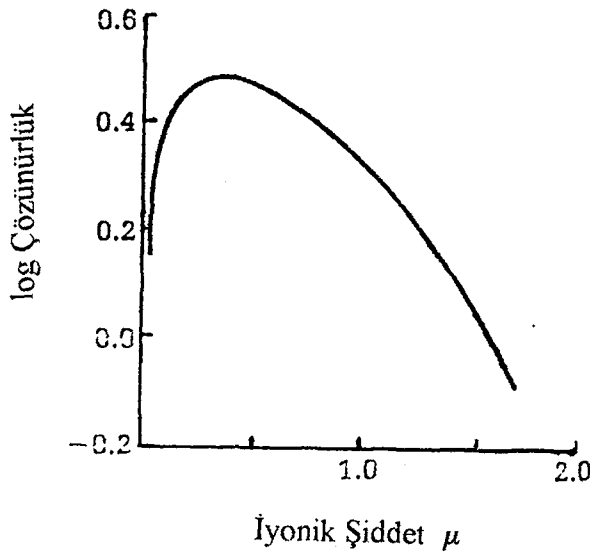


### 2.4.2. Çözünürlük Farklılıkları Esasına Dayanılarak Proteinlerin Ayrılması

Çözünürlük, başlıca pH, iyonik şiddet, çözücünün dielektrik özelliği ve sıcaklığa bağlıdır. Proteinlerin iyonlaşabilir yan grupları farklı olduğundan, izoelektrik pH'larında farklıdır. Ortamın pH'sını değiştirerek, izoelektrik noktasına rastlayan proteinlerin çökmesi sağlanır. Bu şekilde, izoelektrik çökeltme işlemi ile proteinler yüklerine göre ayrılmış olur (12).

Etanol sudan daha küçük bir dielektrik sabitine sahip olduğundan, sulu protein çözeltilisine ilave edildiğinde zıt yüklerin çekimi artar ve proteinler kümelenerek çöker. Etanol ve asetonun değişik oranlarda ilavesi proteinlerin ayrı ayrı çökmesine neden olur. Denaturasyondan sakınmak için düşük ısıda çalışılmalıdır (14).

Tuz ilavesi ile çöktürme işleminde ortama ilave edilen tuzun konsantrasyonunu ayarlayarak, proteinlerin çökmesi ve böylece ayrılması sağlanır. Düşük yoğunluktaki tuz çözeltileri pek çok proteinin çözünürlüğünü arttırmaktadır. Bu olay, *salting-in* olarak adlandırılmaktadır. Salting-in olayında,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  gibi iki değerlikli iyonların tuzları, KCl gibi bir değerlikli bir değerlikli iyonların tuzlarından daha etkilidir. Nötral tuzların bu özelliği, tuzu meydana getiren katyon ve anyonların elektrik yüküne bağlı olduğu gibi tuzun konsantrasyonuna da bağlıdır. İyonik şiddet artırıldığında proteinlerin çözünürlüğünde azalmaktadır (Şekil 2.12) ve bu nedenle proteinlerin çökme oranı artmaktadır. Bu olaya *salting out* denir. Çok yüksek  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  konsantrasyonları, protein moleküllerinden suyu almakta ve proteinlerin çözünürlüğünü azaltarak onların çökmesini sağlamaktadır. Salting-out olayı ile çökelen proteinler doğal konformasyonunu korumaktadırlar (39,40).



Şekil 2.12. Potasyum sülfatın ( $\text{K}_2\text{SO}_4$ ), hemoglobin-CO kompleksinde ve izoelektrik pH'da çözürlüğüne etkisi (12,14).

Amonyum sülfat suda çok fazla çözüldüğünden ve gayet yüksek iyonik kuvvetle elde etmek mümkün olduğundan, proteinlerin çöktürülmesinde en çok kullanılan bileşektir. Amonyum sülfatın doygunluğu 0-30°C arasında değişmektedir. 20°C'de amonyum sülfat doygunluğu, 4.05 M veya 533 g/L olarak kabul edilmektedir(40).

#### **2.4.3. Spesifik Ligandları Esasına Dayanılarak Proteinlerin Ayrılması**

Afinite kromatografisi, saflaştırılması istenen molekülün matriks adı verilen bir kolon maddesine (sefadeks, sefaroze, bio-jel vs.) kovalent olarak immobilize edilmiş bir komplementer bağlanma bileşiğine (ligand) spesifik olarak bağlandığı bir tekniktir (12).

#### **2.4.4. Elektriksel Yük Esasına Dayanılarak Proteinlerin Ayrılması**

Bir protein çözeltisi izoelektrik noktasının dışında bulunan pH'larda yüklü durumda bulunur. Proteinleri asit-baz özelliklerine dayalı ayırmada iki metod vardır.

##### **2.4.4.1. İyon Değişim Kromatografisi**

Bu yöntemde kolon, pH 7.0'da pozitif veya negatif yüklü gruplar ihtiva eden maddelerle doldurulur. Proteinler, yüklerine göre iyon tutan bu bileşikler üzerine adsorblanır. Katyon ve anyonların yer değişimi olur. Kolon, iyon değiştiricinin elektrik yükünü değiştiren çözeltilerle yıkanır, farklı zamanlarda kolondan çıkış esasına göre proteinlerin ayırım işlemi tamamlanır (10).

##### **2.4.4.2. Elektroforez**

Elektroforez, bir elektriksel alanda yüklü moleküllerin hareketi esasına dayanmaktadır. Yüklü biyolojik polimerlerin analizleri ve belirlenmesi, farklı iyonların veya bir karışımdaki farklı bileşenlerin belirlenmesi, kolloid ve makromoleküllerin ayrılması gibi bir çok yöntemde de kullanılır. DNA, RNA, polimerler ve kompleks karbohidratlar elektriksel alanada hareket ettirilir.

Bir elektriksel alanda moleküllerin göçünü etkileyen faktörler şunlardır;

1. Molekülün kimyasal bileşimi, net yükü ve işareti, büyüklüğü, sürtünme katsayısı gibi moleküler parametreler,
2. Tamponun pH'sı, iyonik gücü ve viskozitesi,
3. Elektriksel alanın şiddeti, göç alanı ve akımın cinsi.

Elektroforezde molekülün yapısına uygun destek ortamına ihtiyaç vardır. Modern elektroforetik tekniklerde destek ortamı olarak tamponla doymuş jel tipi matriks kullanılır.

Amino asitler ve karbohidratlar gibi düşük moleküler ağırlıklı biyokimyasallar için destek ortamı olarak selüloz kullanılırken, büyük moleküller için poliakrilamid ve agaroz jeller kullanılır (2,39,41).

#### 2.4.4.3. Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Poliakrilamid jeller ile yapılan elektroforez, numune bileşenlerinin çözünürlüğünün artmasını sağlar. Çünkü ayırma,

1. Moleküler elekleme ve

2. Elektroforetik hareketlilik esasına dayanmaktadır. Jel elektroforezinde küçük moleküller büyük moleküllerden daha hızlı hareket ederler. Akrlamid polimerizasyonu ile yapılan jelin ve elektroforezin avantajları şöyle sıralanabilir (42).

1. Proteinler ve nükleik asitler ( $1 \times 10^6$  daltona kadar) için yüksek ayırma gücü,
2. Gözenekleri sayesinde moleküler elekleme özelliği,
3. Büyük hacimli moleküllerin kabulü,
4. Göç eden moleküllerin matriks ile minimum etkileşmesi yani kimyasal inertliği,
5. Matriksin fiziksel kararlılığı,
6. Geniş bir pH, sıcaklık ve iyonik güç bölgesinde stabilite,
7. Jelin transparan (şeffaf) olması.

Akrlamid, N,N'-metilen bisakrlamid, N,N,N',N'-tetrametilendiamin (TEMED) ve amonyum persülfat jelin meydana gelmesi için gerekli olan maddelerdir. Poliakrilamid jelinin meydana getirilişi bölüm 3.4.5.'de anlatılacaktır. Jelin gözenek büyüklüğünü etkileyen faktörler;

1. Kullanılan akrilamid miktarı ve
2. Çapraz bağların sayısıdır (39,42).

Hem disk ve hem de slab jel elektroforezi yapılabilmektedir. Fakat slab jelin bazı avantajları vardır;

1. Birçok numune aynı anda uygulanabilmektedir,
2. Dikdörtgen yüzeyiyle kolayca fotoğraf çekilebilmekte ve densitometre ile okunabilmektedir,

3. Elektroforez esnasında meydana gelen ısı, slab jellerde dağılır. Böylece ısı etkisiyle protein bantlarının bozulması azalmış olur.

Kesiksiz tampon sistemi, jellerde ve elektrodalarda aynı tamponun kullanıldığı, saf proteinlerin tayını için tek jel gerektiren ve kurulmasında kolay olan bir sistemdir. En önemli dezavantajı numunenin konsantre halde olması gerektiğidir. Kesikli tampon sisteminde, tüm kısımlarda farklı tampon kullanılır. Üst kısımda gözenekleri büyük, pH 6.8 olan numunenin uygulandığı yığılma jeli, alt kısımda ise gözenek hacmi daha küçük ve proteinlerin

büyükliğüne göre bantları meydana getiren pH sı 8.8 olan ayırma jeli vardır. Kullanılan tank tamponununun pH sıda 8.3'dür (39,42,43).

Proteinler, bir deterjan maddesi olan SDS ve disulfür bağlarını indirgeyici madde olan merkaptolanol varlığında elektroforeze tabi tutulursa, moleküler ağırlıkları belirlenebilir. Protein molekülleri SDS ile muamele edildiğinde, ikincil, üçüncül ve dördüncül yapıları bozulur ve SDS molekülleri ile kaplı lineer bir polipeptid zinciri meydana gelir. SDS-PAGE'de proteinler, moleküler ağırlıklarına göre göç ederler (15,37,39).



### 3 - MATERYAL VE METOD

#### 3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler, Cihazlar, Aletler ve Malzemeler

##### 3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Madde Adı	Moleküler Formül	Mol. Ağırlık (g/mol)	Alınan Firma
Akrilamid	$C_3H_5NO$	71.08	Sigma
Aktif Karbon	C	12.01	Sigma
Albümin (Sığır albümin)			Sigma
Amonyum Persülfat	$(NH_4)_2S_2O_8$	228.20	Sigma
Amonyum Sülfat	$(NH_4)_2SO_4$	132.10	Sigma
Asetik Asit, glasial	$CH_3COOH$	60.05	Merck
Bakır Sülfat Pentahidrat	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	249.68	Merck
Bromfenol Mavisi	$C_{19}H_9Br_4O_5SNa$	691.90	Sigma
Coomassie Brilliant Blue G-250	$C_{47}H_{48}N_3O_7S_2Na$	854.00	Serva
Etilendinitrilotetraasetikası(Titriplex®III)	$C_{10}H_{14}N_2Na_2O_2 \cdot 2H_2O$	372.24	Merck
Folin ve Ciocalteu fenol reaktifi			Sigma
Gliserol (Gliserol)	$C_3H_8O_3$	92.09	Sigma
Glisin	$H_2NCH_2COOH$	75.07	Merck
Hidroklorik asit	HCl	36.46	Merck
İzopropanol	$C_3H_8O$	68.15	Sigma
2-Merkaptoetanol	$C_2H_6OS$	78.13	Sigma
N,N'-Metilen bis-akrilamid	$C_7H_{10}N_2O_2$	154.20	Sigma
Potasyum-Sodyum Tartarat	$C_4H_4KNaO_6 \cdot 4H_2O$	282.23	Merck
Sodyum Dodesil Sülfat	$C_{12}H_{25}NaO_4S$	288.38	Merck
Sodyum Hidroksit	NaOH	40.00	Merck
Sodyum Karbonat	$Na_2CO_3$	105.99	Horosan Kimya
N,N,N',N'-Tetrametilendiamin (TEMED)	$C_6H_{16}N_2$	116.20	Sigma
Tris(hidroksimetil)-aminometan	$C_4H_{11}NO_3$	121.14	Merck

### 3.1.2. Kullanılan Malzemeler

Malzeme Adı	Firması
Diyaliz Tüpü	Sigma
Miropipetler 0.5-10 $\mu$ L 10-100 $\mu$ L 200-1000 $\mu$ L 1000 $\mu$ L	Brohit Proline Socorex Biohit Proline Socorex
Şiringa 1 $\mu$ L 20 $\mu$ L	Hayat Şiringa Henke-Sass Walf

### 3.1.3. Kullanılan Cihazlar ve Aletler

Cihaz Adı	Firması
Güç Kaynağı	Titan Plus
Hassas Terazı	Cyha MP-300
Magnetik Karıştırıcı	IKA-Labortechnik
pH-Metre	Hanna Instruments 8416
Santrifüj	Centra 4
Soğutmalı Santrifüj	Heraus Sepatech Suprafuge 22
Spektrofotometre	LKB Ultraspec K-4053
Vorteks Karıştırıcı	Autovortex Mixer SA2

### 3.2. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanmaları

#### 1. Ghost elde etmede

1.1. %0.9 NaCl - 5 mM Tris HCl (pH 7.4) : 9 g NaCl, 1000 mL deiyonize suda çözüldü. Böylece izotonik çözelti hazırlanmış oldu. 0.606 g Tris, 750 mL izotonik çözeltide çözüldü. Hidroklorik asit ile pH' sı 7.4 'e ayarlandı. Son hacim yine izotonik çözeltiyle 1000 mL'ye tamamlandı. Bu hazırlanan , çözelti eritrosit paketlerini elde etmede kullanıldı.

1.2. 10 mM Tris-0.1 mM EDTA - HCl (pH 7.4) : 1.211g Tris ve 0.037g EDTA (Titriplex®-III, 750 mL kadar deiyonize suda çözüldü. HCl ile pH sı 7.4'e ayarlandı. Son hacim 1000 mL'ye tamamlandı. Eritrosit paketlerinden ghost elde etme aşamasına kadar bu çözelti kullanılarak yıkama işlemi yapıldı.

#### 2. Protein çözeltisinin hazırlanmasında ve diyalizde

2.1. 10 mM EDTA-HCl (pH 7.4) : 1.2'de anlatıldığı gibi hazırlandı. Bu çözelti protein suspansiyonunun hazırlanmasında ve diyaliz tamponu olarak kullanıldı.

2.2. %10'luk SDS : 10 g sodyum dodesil sülfat (SDS) deiyonize suyla 100 mL'ye tamamlanarak çözüldü. SDS nin çözünebilmesi için su banyosundan faydalanıldı. 37°C'de çözünmesi beklendi. SDS, soğukta kristalleşir. Bu nedenle, soğuk koşullarda çahşıldığında ilk önce ısı yardımıyla iyice çözünmesi sağlandı. Ghostlardan proteinleri açığa çıkarmada kullanıldı.

#### 3. Lowry metodu'nda

3.1. 2xLowry Reaktifi : 20 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 260 mL suda, 0.4g CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O 20 mL suda, 0.2 g sodyum potasyum tartarat 20 mL deiyonize suda çözüldü ve daha sonra bu üç çözelti karıştırılarak bakır reaktifi elde edildi. 10 g SDS 100 mL ve 4 g NaOH ise yine 100 mL deiyonize suda çözüldü. Kullanmadan hemen önce 3:1:1 oranında hacimlerde bakır reaktifi: SDS: NaOH karıştırılarak Lowry reatifi elde edildi. Bu çözelti 2-3 hafta saklanabilir. Eğer çözeltide beyaz bir çökelek oluşursa 37°C'de ısıtılır. Fakat siyah çökelek gözlenirse çözelti atılır.

3.2. 0.2 N Folin Reaktifi : 2 mL 2 N Folin reaktifi 20 mL deiyonize suyla karıştırıldı. Bu çözelti, karanlıkta ve oda sıcaklığında birkaç ay saklanabilir.

3.3. Albümin standartları : 10 mg albümin 100 mL 1 deiyonize suda çözülerek 0.1 mg/mL'lik albümin standardı hazırlandı. 0.1 mg/mL'lik albümin standardından 0.1 mg/mL 'lik standard sırasıyla 10 mL, 5 mL ve 2.5 mL alınıp deiyonize suyla 20 mL ye tamamlandı. Bu işlemler sonucunda 0.1 mg/mL, 0.05 mg/mL, 0.025 mg/mL ve %0.0125 mg/mL'lik albümin standartları hazırlanmış oldu.



#### 4. Elektroforez'de

4.1. Akrilamid-bisakrilamid (30 : 0.8) : 30 g akrilamid ve 0.8 g bisakrilamid, deiyonize suyla son hacim 100 mL'ye tamamlanarak çözüldü. Süzgeç kağıdıyla süzüldü. +4°C'de saklandı. Uzun süre saklanırsa, akrilamid monomeri, akrilasit ve amonyağa hidrolizlenir. Akrilamid-bisakrilamid en fazla 1-2 ay saklanabilir.

4.2. %10'luk SDS : 3.2.2.2'deki gibi hazırlandı.

4.3. Amonyum Persülfat (%1.5 w/v): 0.030 g amonyum persülfat, 2 mL suda çözüldü. Bu çözelti dayanıksızdır. Bu nedenle kullanmadan hem önce hazırlandı.

4.4. Ayırma Jeli tamponu: 3.0 M Tris-HCl pH 8.8): 36.3 g Tris bir miktar deiyonize suda çözüldü. HCl kullanılarak pH sı 8.8'e ayarlandı. Son hacim deiyonize suyla 100 mL' ye tamamlandı. Süzgeç kağıdıyla süzüldü ve +4°C'de saklandı.

4.5. Yığıma jeli tamponu (0.5 M Tris-HCl pH 6.8): 6.0 g Tris 75 mL'kadar deiyonize suda çözüldü. HCl ile pH 6.8'e titre edildi. Son hacim deiyonize suyla 100 mL'ye tamamlandı. Çözelti süzgeç kağıdı ile süzüldü. +4°C'de saklandı.

4.6. Tank tamponu :

4.6.1. Tank tamponu I: pH~8.3 (0.025 M tris, 0.192 M Glisin, %0.1 SDS): 3 g Tris, 14.4 g Glisin, 1 g SDS, 1L deiyonize suda çözüldü. +4°C'de saklandı.

4.6.2. Tank tamponu II: pH 8.3 (0.025 M tris, 0.152 M Glisin, %0.1 SDS, %0.05 EDTA) : 4.6.1'deki gibi hazırlandı. Yalnız ek olarak 0.500 g EDTA ilave edildi.

4.7. Boyama ve boya gidermede

1. %25 izopropil alkol, %10 asetik asit, %0.05 Coomassie Brilliant Blue G-250: 75 mL izopropil alkol, 30 mL asetik asit ve 0.15 g Coomassie Brilliant Blue G-250 karıştırılarak son hacim deiyonize su ile 300 mL'ye tamamlandı.

2. %10 izopropil alkol, %10 asetik asit, %0.005 Coomassie Brilliant Blue G-250: 30 mL izopropil alkol, 30 mL asetik asit, 0.015 g Coomassie Brilliant G-250 karıştırılarak son hacim deiyonize su ile 300 mL'ye tamamlandı.

3. %10 asetik asit, %0.0025 Coomassie Brilliant G-250: 100 mL asetik asit, 0.025 g Coomassie Brilliant G-250 karıştırılıp son hacim deiyonize su ile 1000 mL'ye tamamlandı.

4. %10 asetik asit: 100 mL asetik asit deiyonize suyla 1000 mL' ye tamamlanarak çözüldü.

4.8. İz bırakıcı boya (%0.08 Bromfenol mavisi): 80 mg bromfenol mavisi 100 mL deiyonize suda çözüldü.



### 3.3. Numunelerin Toplanması

K.T.Ü. Farabi Hastanesi kan bankasından temin edilen sağlıklı kişilerin kanlarıyla çalışma yapıldı. 400 mL kanda 63 mL sitrat-fosfat-dekstroz-adenin (CPDA) antikoagulant olarak kullanıldı. Antikoagulantın içeriği şöyledir;

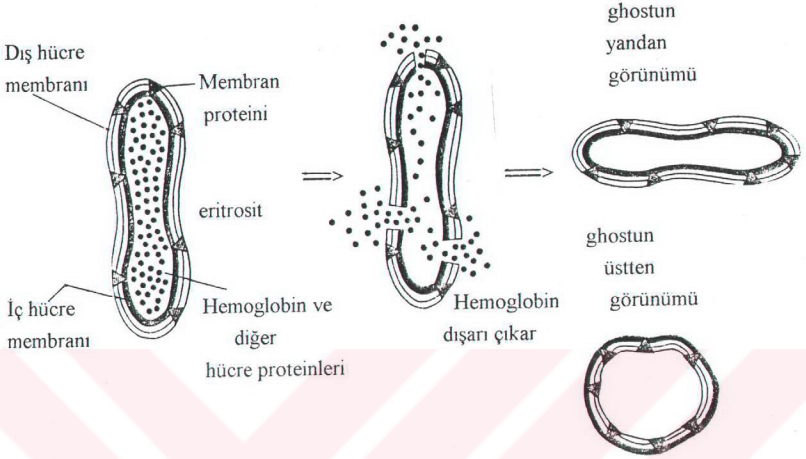
2	g	dekstroz,
1.66	g	sodyum sitrat,
206	mg	sitrik asit,
140	mg	monobazik sodyum fosfat,
17.3	mg	adenin.

### 3.4. Kullanılan Yöntemler

#### 3.4.1. Ghost'un Elde Edilmesi

H.Hamaguchi ve H.Cleve'in eritrosit ghost'u elde etme yöntemi modifiye edildi (44). 120 mL CPDA'lı kan 3000 rpm'de 10 dakika ve 4°C'de yüksek devirli soğutmalı santrifüjle santrifüjlendi. Üst kısımda kalan plazma ve lökosit tabakası su trombu ile alındı. Daha sonra eritrositler, %0.9 NaCl-5 mM Tris-HCl (pH 7.4) tamponu kullanılarak üç kez süspansiyon yapıldı. Her süspansiyon 3000 rpm'de 5 dk santrifüjlendi. Bu yıkama işlemi sonucunda yaklaşık 30-40 mL eritrosit paketi elde edildi. Eritrosit paketleri yaklaşık 5 hacim 10 mM Tris-0.1 mM EDTA-HCl (pH 7.4) ile süspanse edildi. İlk süspansiyon 13000 rpm'de 20 dk santrifüjlendi. Bu şekilde eritrositler hemoliz edilmiş oldu. Daha sonra yine aynı tampon kullanılarak yapılan süspansiyonlar, 20000 rpm'de 10'ar dakika santrifüjlendi. Bu şekilde 5-7 kez yıkama işlemi yapılarak hemoglobinin uzaklaştırılmış oldu. Sonuçta yaklaşık 5mL kadar beyaz ghost elde edildi. Bu ghostun 1 mL'si elektroforezde, 4 mL'si de protein çözeltisi hazırlanmasında kullanıldı. Eritrosit ghostunun hazırlanması Şekil 3.1'de gösterilmiştir.

## Hücre lizisi



Şekil 3.1. Eritrosit ghostunun elde edilmesi (1).

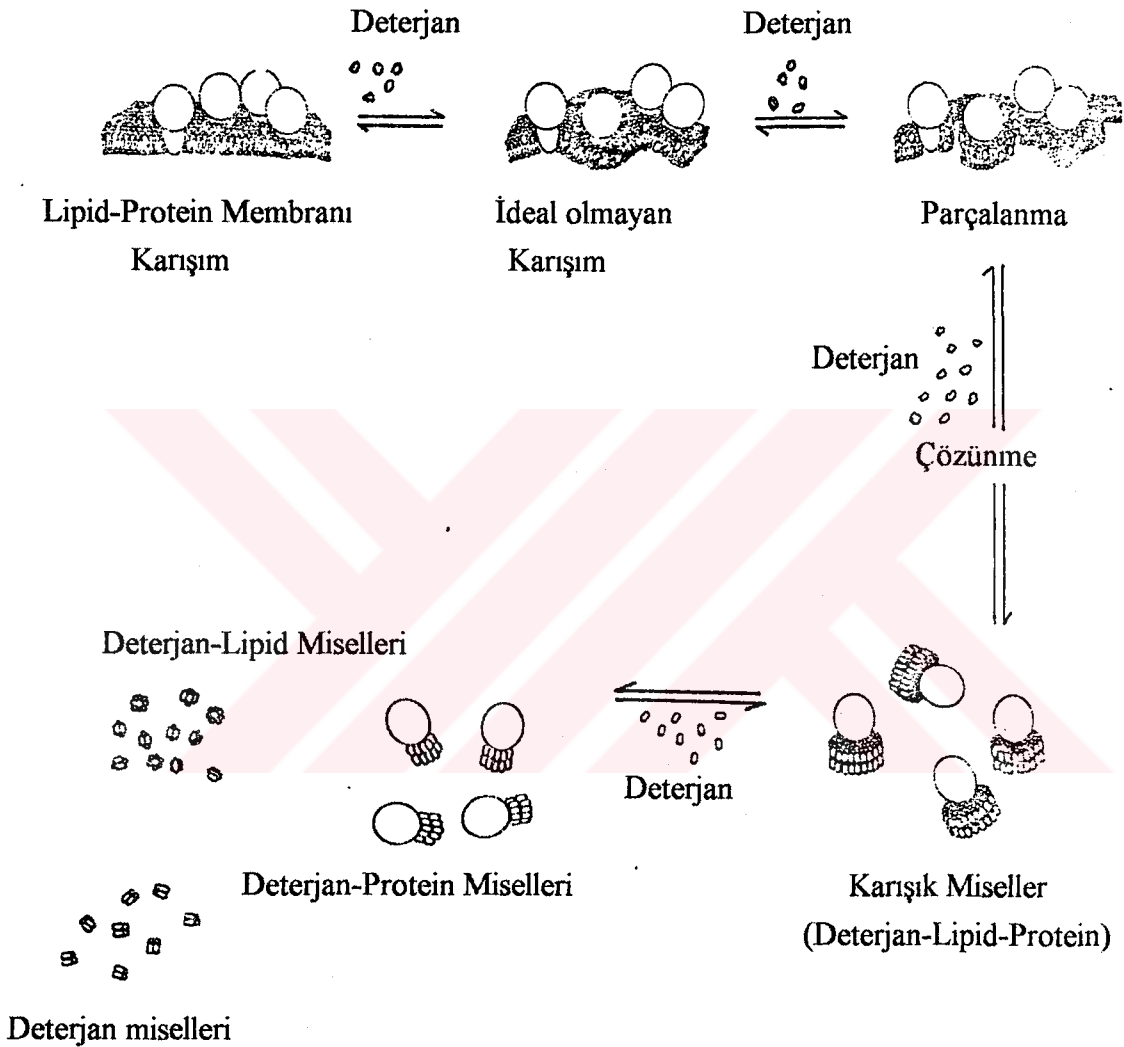
Hücre lizisi esnasında zararlı proteazlar saliverilir. EDTA, membran proteinlerinin proteolizini azaltmada etkili bir bileşiktir. Bu nedenle EDTA'lı tampon tercih edildi (38).



Şekil 3.2. Ghost elde etmek amacıyla santrifüjün kullanılması aşaması.

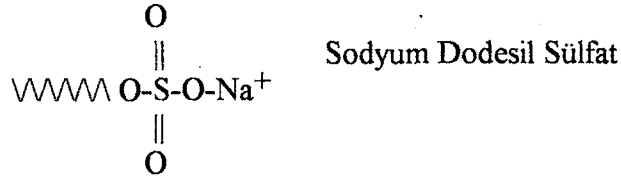
### 3.4.2. Proteinlerin Açığa Çıkarılması

Periferel proteinler, düşük iyonik güçteki tamponlar yardımıyla çözünebilmesine rağmen, integral proteinleri çözebilmek için deterjanlara ihtiyaç vardır (45). Deterjanların biyolojik membranlarla etkileşmesi şematik olarak Şekil 3.3'de gösterilmiştir.



**Şekil 3.3.** Eritrosit membranında deterjan-protein misellerinin elde edilmesi (45).

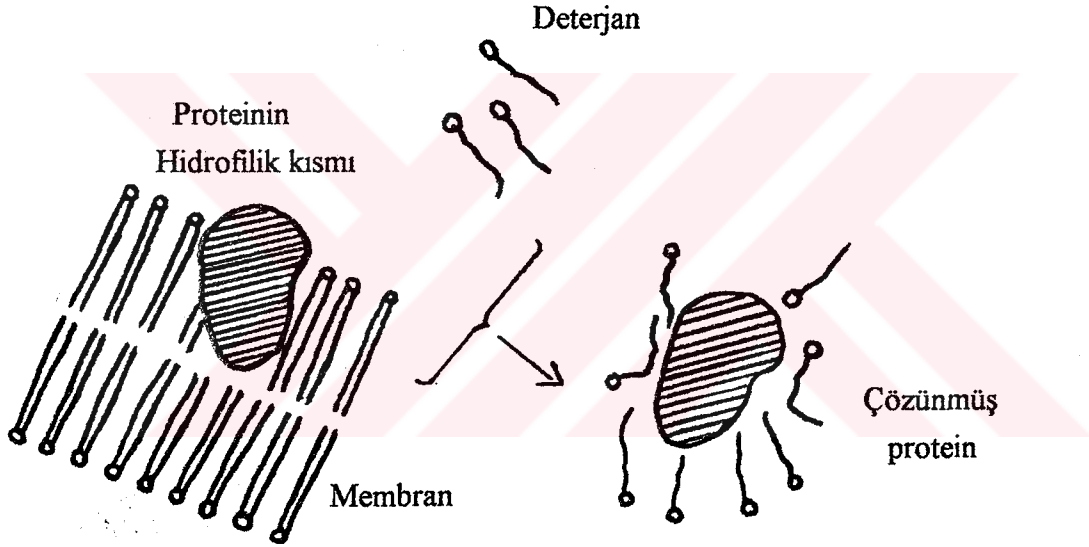
Termodinamik kurallarına göre membran yapısındaki lipidleri proteinlerden ayırabilmek için amfilik yapılar ihtiyaç vardır. Bu yapılarda deterjanlardır. Bizim çalışmamızda amfilik deterjan olarak sodyum dodesil sülfat kullanıldı. Bu deterjan anyonik bir deterjandır (15).



SDS, hem polar, hem de nonpolar özelliklere sahiptir. Proteinin nonpolar bölümlerine gömülü nonpolar hidrofobik kısımları ile bağlanır (Şekil 3.4). Negatif yüklü sülfat çözücüye maruz kalır. SDS bağlanması iki etkiye yol açar (37);

1. Hidrofobik ve iyonik etkileşimlerle interferans meydana getirir. Birçok oligomerik protein, monomer altbirimlerine ayrışır ve ikincil yapısı bozulur.

2. Proteinler, negatif yüklü SDS molekülleri ile doygun hale gelirler. 1.4g SDS, 1g protein bağlayabilir.



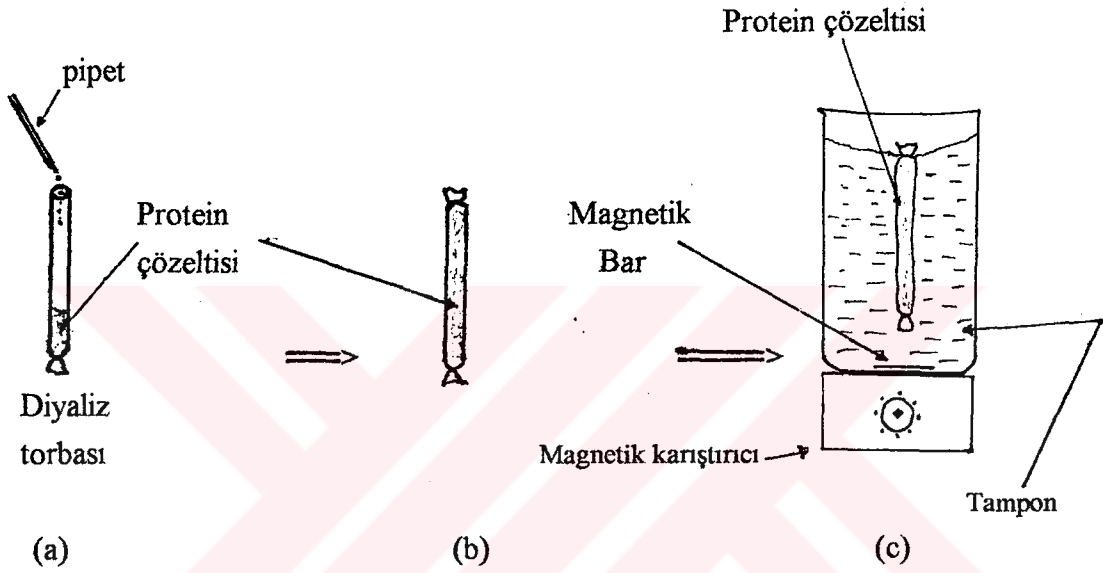
Şekil 3.4. Membrana yerleşik proteinlerin çözünmesine deterjanın etkisi (40).

4 mL ghosta %10'luk SDS çözeltisinden 2.5 mL ilave edilerek son hacim 10 mM Tris-0.1 mM EDTA-HCl (pH 7.4) ile 25 mL ye tamamlandı. Böylece proteinlerin %1'lik SDS'de çözünmesi sağlandı. Bir gece bu şekilde oda sıcaklığında bekletildi.

### 3.4.3. Sodyum Dodesil Sülfatın Diyalizle Uzaklaştırılması

Diyaliz işleminde, selüloz membrandan yapılmış diyaliz torbası kullanıldı. Bu torba yarı geçirgen bir zar olduğundan dolayı, SDS ve küçük moleküller dışarı çıkarken tampon içeriye girmektedir. Bu yüzden, diyaliz esnasında membranın yüzey alanı artmaktadır. Denge konsantrasyonuna erişildiğinde, çözünenlerin dağılımı her iki yönde de aynıdır (11,40).

Bir gece bekletilmiş olan 25 mL SDS-protein çözeltisini diyaliz işlemine tabi tutabilmek için 15 cm civarında diyaliz torbası kesilip deiyonize suda şişirildi. Bir ucu düğümlendi. Protein çözeltisinin tamamı, bir pipet yardımıyla damlalar halinde diyaliz torbasına aktarıldı (Şekil 4.3.a). Torbanın diğer ucuda iyice düğümlendi (Şekil 4.3.b) ve bir beher içindeki 500 mL 10 mM Tris- 0.1 mM EDTA-HCl (pH=7.4) tamponuna konuldu. Diyaliz esnasında torbanın dik durmasını sağlamak amacıyla magnetik karıştırıcıdaki tampon, bar yardımıyla karıştırıldı. Barın torbaya değmemesi için uzun bir beher seçildi (Şekil 3.5.c.). Her iki saatte bir tampon değiştirildi. Bu şekilde 10 saat süreyle diyaliz işlemi yapıldı.



Şekil 3.5. SDS'nin diyalizle uzaklaştırılması.

Diyaliz işlemi sonunda çözeltinin hacmi tekrar ölçüldü ve hacmin 25mL'den yaklaşık 27-28 mL ye çıktığı tespit edildi.

#### 3.4.4. Proteinlerin Amonyum Sülfatla Çöktürülmesi

Amonyum sülfat protein çözeltisine ilave edildiğinde, su molekülleriyle etkileşir ve böylece suyun protein ile etkileşmesini önler. Bu nedenle, çözeltide amonyum sülfat molekülü sayısı arttıkça, suyun proteinle etkileşmesi azalacaktır (37,38).

Çalışmada, bu şekilde, amonyum sülfatla dehidrasyon işlemi yapılarak proteinlerin çökmesi sağlandı. İstenilen doygunlukta proteinlerin çökmesini sağlamak amacıyla aşağıdaki formülden yararlanıldı (46);

$$\text{İlave edilmesi gereken amonyum sülfat miktarı (g)} = \frac{1.77 \times V \times (S_2 - S_1)}{3.54 - S_2}$$

Burada  $V$  : Doygunluğa getirilecek çözeltinin hacmi (mL)

$S_1$  : Başlangıçtaki amonyum sülfat doygunluğu (%)

$S_2$  : İstenilen amonyum sülfat doygunluğu (%) dur.

Proteinlerin amonyum sülfatla çöktürülmesinde farklı yöntemler denendi. Fakat tüm yöntemlerde istenilen doygunluktaki protein çözeltileri 4 °C'de ve 12490 rpm'de (19000 g'de) 10 dakika santrifüjlendi.

**Yöntem I:** Protein çözeltisi %10, %20, %30, %40 ve %50 doygunluğa getirilerek proteinler elde edildi.

Diyaliz torbasından çıkarılan protein çözeltisinin hacmi ölçüldü. Bir behere aktarılıp, %10 doygunluğa getirebilmek için gerekli amonyum sülfat miktarı ilave edildi. Magnetik karıştırıcı ve bar yardımıyla iki dakika karıştırılarak amonyum sülfatın iyice çözünmesi sağlandı. Bu çözelti 24 saat 4 °C'de muhafaza edildi ve ertesi gün santrifüjlendi. Süpernatantın tekrar hacmi ölçülerek %20, %30, %40 ve %50 doygunluktaki protein çökelekleride birer gün arayla elde edildi. Elde edilen protein çökelekleri protein çözeltisinin hazırlanmasında kullanılan tampon ilave edilerek bir mikropipet yardımıyla alındı. Tüplere konulan protein çözeltileri -18°C'de saklandı.

**Yöntem II:** Protein çözeltisi %5, %10, %15, %20, %25, %30, %40, %50, %70 ve %80 doygunluğa getirilerek proteinler elde edildi.

Protein çözeltisini, istenilen doygunluğa getirebilmek için gerekli amonyum sülfat miktarı ilave edilerek, magnetik karıştırıcı ile 2 dakika amonyum sülfatın protein çözeltisi içinde çözünmesi sağlandı. Fakat birinci yöntemde olduğu gibi herhangi bir bekleme yapılmadı. Direkt olarak santrifülemeye tabi tutuldu. Her bir doygunlukta elde edilen proteinler tampon yardımıyla alınarak tüplere konuldu ve -18°C'de muhafaza edildi. %90 ve %100'lük doygunlukta hiç bir çökeltme gözlenemedi.

**Yöntem III:** Protein çözeltisi, %5, %15, %25, %35, %45, %55, %65, %75, %85 doygunluğa getirilerek proteinler elde edildi. Bu yöntemin ikinci yöntemden tek farkı, istenilen doygunluklar arasındaki farklılıktı.

### 3.4.5. Amonyum Sülfatın Diyalizle Uzaklaştırılması

İstenilen doygunluğa getirilerek çöktürülen proteinlerle birlikte bir miktar amonyum sülfatında çökeceği düşünülerek, amonyum sülfatın proteinden uzaklaştırılması amacıyla sadece birinci yöntem için ikinci bir diyaliz işlemi yapıldı.

Diyaliz torbaları sadece tüpün ağzını kapatabilecek boyutta kesildi. Deiyonize suda şişirildi. Herbir tüpün ağzı selüloz membranı ile kapatıldı. Tüpler tersine çevrilerek deiyonize suya batırıldı. Bu şekilde 2 saat süreyle deiyonize suya karşı diyaliz yapıldı.

### 3.4.6. Lowry Metodu'yla Protein Tayini

Bu metotta protein önce alkali bakır çözeltisi ile muamele edildi. Alkali ortamdaki  $\text{Cu}^{+2}$ , proteinin peptid bağlarıyla kompleks oluşturarak  $\text{Cu}^{+1}$ e indirgendi. Daha sonra, Folin ve Ciocolteu'nun fenol reaktifi ilave edildi. Fosfotungstik ve fosfomolibdik asitlerin indirgenmesiyle molibdenyum mavisi ve tungsten mavisi renkleri meydana geldi (38).

Bu metodun hassasiyeti 2-100 mg arasındadır. Bu nedenle tüm numuneler 1:20 oranında dilue edildi ve aşağıdaki açıklanan sırayla metod uygulandı.

1. 400 şer  $\mu\text{L}$  kör, standartlar ve numuneler ayrı ayrı 400  $\mu\text{L}$  2xLowry reaktifine ilave edildi ve oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi.

2. 200 mL 0.2 N folin reaktifi ilave edilerek hemen vortekslendi. Folin reaktifi asidik pH'da stabildir. Oysa indirginme alkali pH'da yapılmaktadır. Bu nedenle Folin reaktifi alkali bakır-protein çözeltisine ilave edildiğinde, hemen karıştırılması yapıldı. Böylece fosfomolibdik-fosfotungstat reaktifleri parçalanmadan indirgenmenin meydana gelmesi sağlanmış oldu. Vorteksleme bittikten sonra 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi.

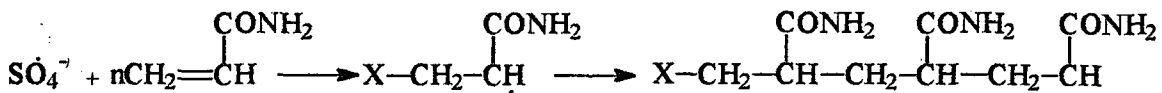
3. 750 nm'de absorbansları okundu.

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

SDS-PAGE, moleküler elekleme ve elektroforetik hareketlilik esasına dayanmaktadır (41,47). Moleküllerin büyüklüğü ise elektroforetik hareketliliği etkilemektedir. Küçük, moleküller, büyük moleküllerden daha hızlı hareket etmektedirler. Poliakrilamid jellerinde numune bileşenlerinin çözünürlüğü artmaktadır (39,42).

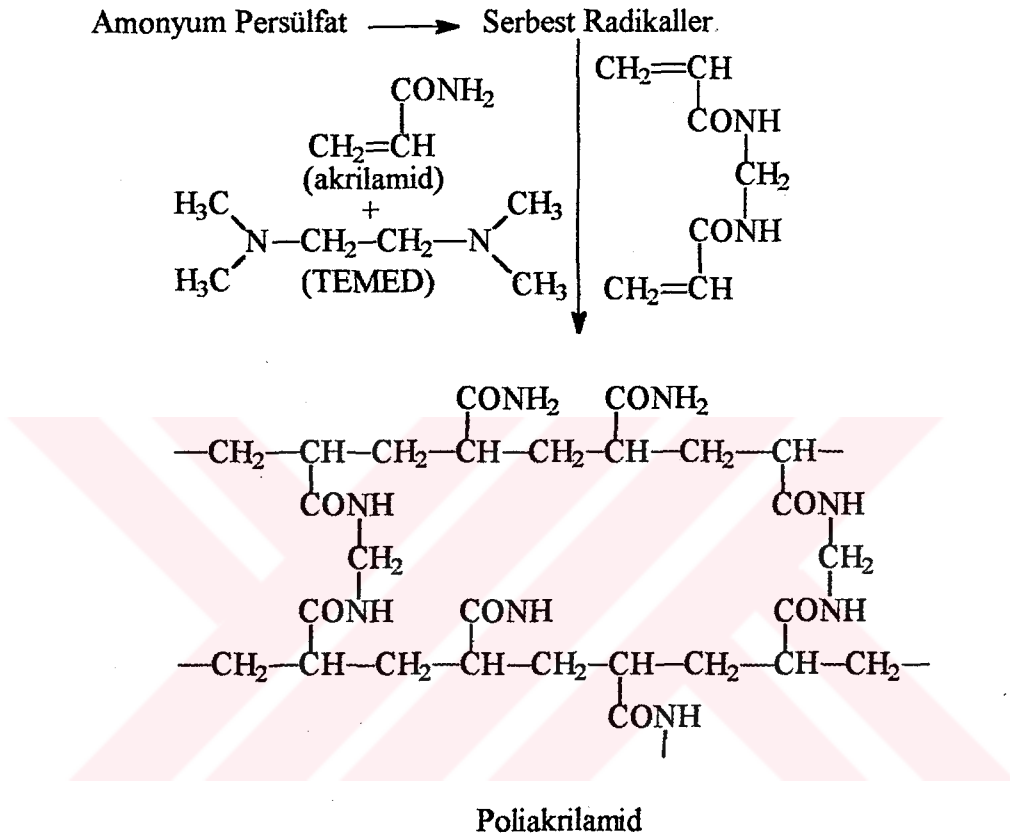
Jelin meydana gelme mekanizması şöyledir (39);

Amonyum persülfat suda çözündüğünde serbest radikalleri meydana getirir.





Bu radikaller, akrilamid ile reaksiyon meydana getirirler. Aktifleşmiş akrilamid, poliakrilamid molekülleri ile uzun bir polimer zinciri meydana getirmek üzere bir araya gelirler. Jel yapısını meydana getirmek için çapraz bağlara ihtiyaç vardır. Bunu da sağlayan N,N'-metilenbisakrilamid, iki akrilamidin bir metilen köprüsü ile biraraya gelmesiyle meydana gelmiştir.



**Şekil 3.6.** Jel meydana getirme mekanizmasının kimyasal reaksiyonlarla gösterimi(39)

SDS-PAGE, Laemmli kesiki tampon sistemi ile yapıldı (41,43,48).

### 3.4.7.1. Jellerin Hazırlanması

#### 3.4.7.1.a. Ayırma Jelinin Hazırlanması

Yöntem I için %10 akrilamid konsantrasyonunda ve diğer yöntemler için %8'lik akrilamid konsantrasyonundaki ayırma jelleri hazırlandı. Bu jellerin hazırlanmasında kullanılan çözeltilerin miktarları aşağıdaki tabloda verilmiştir.



<u>Çözelti</u>	<u>Yöntem I</u>	<u>Yöntem II-III</u>
	<u>Hacmi (mL)</u>	<u>Hacmi (mL)</u>
Akrilamid-bisakrilamid (30:08)	10.0	8
Ayırma jeli tamponu (pH 8.8)	3.75	3.75
%10'luk SDS	0.3	0.3
%1.5'lik amonyum persülfat	1.5	1.5
Su	14.5	16.5
TEMED	0.015	0.015
Toplam	30	30

1. Yukarıda verilen ölçülerde çözeltiler alınıp jeller hazırlandı. Yalnız TEMED hemen ilave edilmedi. Zehirli gazları uzaklaştırmak için karışım, kauçuk kapağı delinmiş bir şişeye alındı. Su trombu kauçuğa takıldı ve böylece bir dakika süreyle gazlar uzaklaştırılmış oldu.

2. TEMED ilave edildikten sonra, 20 mL'lik enjektör yardımıyla plakalar arasına döküldü. Yığma jeli için 3.5-4 cm'lik bir yer bırakıldı. Enjektör, herhangi bir hava kabarcığının meydana gelmemesi için yavaşça bir köşeye tatbik edildi.

3. Polimerleşme yaklaşık 10-30 dakika sürdü. Jelin yüzeyini ince bir tabaka halinde düz olması için, ayırma jeli tamponu jel yüzeyine eklendi ve bir gece böyle bekletildi.

#### 3.4.7.1.b. Yığma Jelinin Hazırlanması

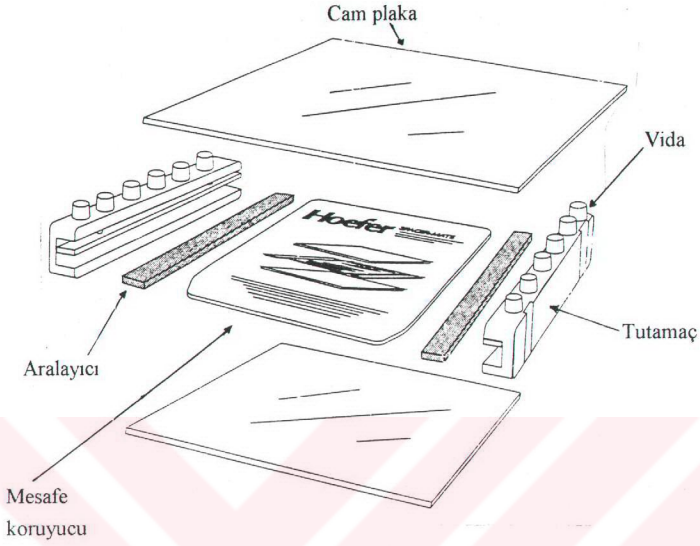
Yığma jelleri, her üç yöntem için aynı şekilde hazırlandı. Jelin hazırlanmasında kullanılan çözeltilerin miktarları tabloda verilmiştir.

<u>Çözeltiler</u>	<u>Katılan miktarı (mL)</u>
Akrilamid-bisakrilamid (30:0,8)	2.5
Yığma jeli tamponu	5.0
%10'luk SDS	0.2
%1.5'lik amonyum persülfat	1.0
Su	11.3
TEMED	0.015
Toplam	20

1. 3.4.7.1.a'daki birinci yol izlenerek yığma jeli hazırlandı.

2. Bir gece bekletilen ayırma jeli üzerindeki tampon lavaboya döküldü ve ayırma jelinin üst kısmı, bir kez yığma jeli çözeltisiyle yıkandı ve daha sonra bu çözelti de lavaboya boşaltıldı. Yığma jeli, bu sefer yine enjektör yardımıyla hava kabarcığı oluşmayacak şekilde ayırma jelinin üzerine döküldü.

3. Numune kuyularını oluşturabilmek için tarak batırıldı. Bu esnadada hava kabarcığının oluşmaması için yavaş ve dikkatlice hareket edildi.



Şekil 3.7. Cam plakalarla sandviç elde edilmesi.



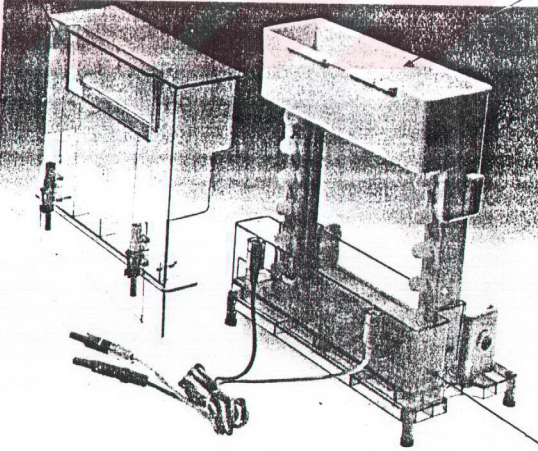
Şekil 3.8. Ayırma jelinin plakalar arasına enjektörle doldurulması.



*Şekil 3.9.* Yığılma jeline tarağın batırılarak numune kuyuları elde etmek amacıyla polimerizasyonun beklenmesi aşaması.

Güvenlik kapağı

Üst tampon tankı



Alt tampon tankı

*Şekil 3.10.* Dikey slab jel elektroforez tezgahı.



*Şekil 3.11.* SDS-PAG elektroforezinde numunelerin 30 mA'de yürütülmesi.

### *3.4.7.2. Numune Hazırlıkları ve Uygulanması*

#### *3.4.7.2.a. Slab Jelin Numune Uygulamaya Hazır Hale Getirilmesi*

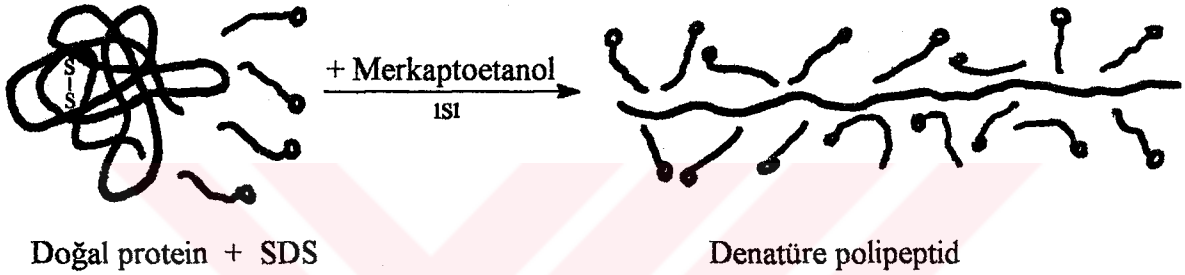
- 1.* Yiğme jelin de polimerleşme olduktan sonra, tarak yavaşça çıkarıldı.
- 2.* Numune kuyularına, enjektörle tank tamponu dolduruldu.
- 3.* Kalıp tezgahtan çıkarılır ve ters çevirilerek tampon boşaltıldı. Böylece numune uygulamadan önce kuyular temizlenmiş oldu.
- 4.* Kalıp alt tampon tankının dar bölgesine yerleştirildi.

#### *3.4.7.2.b. Numunenin Hazırlanması*

Lowry metoduyla tayin edilen protein miktarlarına göre numunelerin dilusyonu yapıldı. Numunelerin konsantrasyonları 2 mg/mL'ye getirmek için gerekli miktarlarda deiyonize su ilave edildi. Protein konsantrasyonu 2 mg/mL'nin altında olan numuneler direk işleme tabi tutuldu. Herbir tüpe 100 µL protein çözeltisi pipetlendi ve daha sonra aşağıdaki maddeler sırasıyla ilave edildi.

<u>Çözelti adı</u>	<u>İlave edilen miktar(<math>\mu</math>L)</u>
%10'luk SDS	40
2-merkaptoetanol	10
Ayrırma jeli tamponu (pH 6.8)	25
Gliserol	20
Bromfenol Mavisi	5
<b>Toplam</b>	<b>100 <math>\mu</math>L</b>

İlk önce SDS ve 2-merkaptoetanol ilave edilerek proteinlerin denatürasyonu ve disülfür bağlarının indirgenmesi sağlandı (Şekil 3.12). Bu karışım 100°C'de 5 dakika ısıtıldı.



**Şekil 3.12.** Eritrosit membran proteininin denatüre edilmesi

Soğutulduktan sonra tablodaki diğer maddeler ilave edildi. Karışımın homojen bir çözelti haline gelmesi sağlandı. Böylece 1 mg/mL protein, %2 SDS, %5 2-merkaptoetanol, %10 gliserol, 0.0625 M Tris-HCl (pH 6.8) ve %0.002 bromfenol mavisi bir araya getirilerek denatüre protein numuneleri hazırlanmış oldu. Numuneye gliserol ilave etmenin amacı, numunenin kuyuların dibine çökmesini sağlamak ve böylece tank tamponunda dağılmasını önlemektir. pH sı 6.8 olan tampon ilave etmenin amacı ise numunenin pH'sını yığma jelinin pH sına göre ayarlamaktır. Numune oldukça asidik olduğu zaman normalde bromfenol mavisi ilave edildiğinde mavi olması gerekirken numunenin rengi sarı olacaktır. Bromfenol mavisi ilave etmenin amacı ise numunenin yürüdüğü yeri tespit etmektir.

Numunede olabilecek çökelekleri uzaklaştırmak için denatüre numuneler 12000 rpm'de 15 dakika santrifüjlendi.

#### 3.4.7.2.c. Numunelerin Kuyuların Yerleştirilmesi

1. Temizlenmiş numune kuyuları tank tamponuyla dolduruldu.
2. 1 mL'lik enjektörle her bir kuyuya 25  $\mu$ L denatüre numune ilave edildi.

### 3.4.7.3. Tank Tamponunun Doldurulması ve Elektroforezin Başlatılması

1. Üst tampon tankına numune ilave edilmeden önce, sandviçin üzeri, tamponun köşelerden sızmasını önlemek amacıyla şeritle kapatıldı ve üst tampon tankı kamlarla sıkıştırıldı.

2. Alt ve üst tampon tankı 350'şer mL tampon ile dolduruldu.

3. Güvenlik kapağı takıldı. Katod(-) üst tampon tankına, anot(+) ise alt tampon tankına takıldı.

4. 30 mA'lık sabit akımda iz bırakıcı boya (bromfenol mavisi) alt tampon bölgesine ulaşıncaya kadar elektroforez işlemi sürdürüldü. Birinci tank tamponu ile yaklaşık 5 saatlik elektroforez işlem sürerken, ikinci tank tamponu (EDTA'lı) ile yaklaşık 7 saatlik işlem sürdü.

### 3.4.7.4. Slab Jelin Tezgahtan Çıkarılması

1. Elektroforez işlemi bittikten sonra güç kaynağı kapatılıp, güvenlik kapağı çıkartıldı ve üst tampon döküldü.

2. Sandviç, düz bir zemine koyularak plastik takoz yardımıyla üstteki cam plaka alındı.

3. Yığıma jeli kısmı atılarak sadece ayırma jeli, iki elle dikkatli bir şekilde alınarak boyanın içine konuldu.

### 3.4.7.5 Boyama ve Boya Giderme İşlemi

Eritrosit ghostu protein bantlarını gözlemleyebilmek için boya maddesi olarak Coomassie Brilliant Blue G-250 kullanıldı.

Protein bantları dört aşamalı boyama ve boya giderme işleminden sonra net bir şekilde gözlemlendi.

1. Jel, %25 izopropil alkol, %10 asetik asit ve %0.05 Coomassie Brilliant Blue G-250 ihtiva eden boya çözeltisinde bir gece,

2. %10 izopropil alkol, %10 asetik asit ve %0.005 boya ihtiva eden çözeltide 8 saat,

3. %10 asetik asit, %0.0025 boya bulunan çözeltide bir gece ve

4. %10 asetik asit, ihtiva eden çözeltide jel tamamıyla beyazlaşıp bantlar iyice belirginleşinceye kadar bekletildi (48,49).

Daha sonra meydana gelen bantlar arasında karşılaştırma yapılarak değerlendirme yapıldı.

### **3.4.8. Boya Giderme Çözeltisinden Boyanın Uzaklaştırılması**

Boya giderme işlemi sonunda %10'luk asetik asit çözeltisi mavi rengi almıştı. Bu mavi rengi ve dolayısıyla boyayı uzaklaştırmak için aktif karbon kullanıldı (50).

1. Bir huni etrafında, süzme kâğıtları yardımıyla aktif karbon yatağı oluşturuldu.
2. Boya giderme çözeltisi bu yataktan geçirildi ve sonunda beyaz %10'luk asetik asit çözeltisi elde edildi.





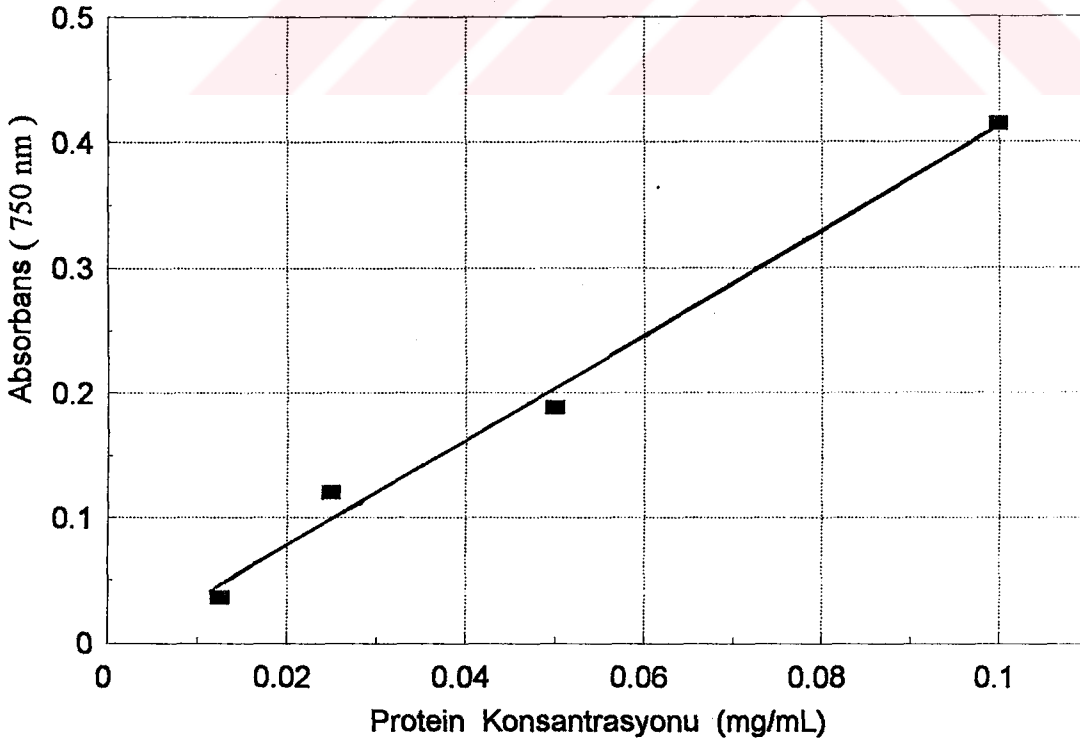
## 4. BULGULAR

### 4.1. Lowry Metoduyla Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik

Meydana gelen ghostun ve amonyum sülfat çökeltmesi sonucu elde edilen proteinin kantitatif olarak tayinini yapabilmek ve kuyulara konulacak protein miktarını tespit etmek amacıyla Lowry metoduyla protein tayininin yapılması Bölüm 3.4.6.'da anlatılmıştı. 750 nm'de yapılan ölçümler sonucu bulunan absorbans değerleri şöyle idi;

<u>Standart (mg/mL)</u>	<u>Absorbans</u>
0.0125	0.037
0.0250	0.107
0.0500	0.189
0.1000	0.415

Bu veriler doğrultusunda çizilen standart grafik (Şekil 4.1) kullanılarak, ghostun ve herbir amonyum sülfat doygunluğunda elde edilen proteinin ölçülen absorbans değerine karşılık kantitatif miktarı tespit edildi.



Şekil 4.1. Lowry yöntemiyle protein tayininde kullanılan standart grafik.

#### 4.2. Ghostlarda Tespit Edilen Protein Miktarlarının Değerlendirilmesi

Yöntem I, II ve III için sırasıyla 30, 10 ve 10 olmak üzere toplam 50 numune kullanıldı. Hamaguchi ve Cleve metodu modifiye edilerek yapılan çalışma neticesinde elde edilen ghostun protein miktarları 1.89 mg/mL ile 2.39 mg/mL arasında bir dağılım göstermiştir. Ortalama eritrosit ghostu protein değeri  $2.15 \pm 0.06$  olarak bulundu.

Tablo 4.2' de No 1-30 arası yöntem I, 31-40 arası yöntem II ve 41-50 arası yöntem III için kullanılan ghostların protein değerleri gösterilmiştir.

**Tablo 4.2. Eritrosit Ghostları Protein Değerleri**

No	Protein Değeri (mg/mL)	No	Protein Değeri (mg/mL)
1	2.15	26	1.98
2	2.28	27	2.21
3	2.03	28	2.16
4	2.36	29	2.14
5	2.17	30	2.01
6	2.12	31	2.08
7	2.25	32	1.98
8	2.08	33	2.34
9	2.01	34	2.22
10	2.16	35	2.07
11	1.97	36	2.12
12	2.00	37	2.32
13	2.11	38	2.01
14	2.35	39	1.96
15	2.39	40	2.16
16	2.18	41	2.11
17	2.25	42	2.09
18	2.33	43	2.35
19	2.01	44	2.27
20	2.17	45	2.29
21	2.24	46	2.18
22	2.25	47	2.34
23	2.02	48	1.94
24	1.89	49	2.27
25	2.39	50	2.02

### 4.3. Yöntem I ile Eritrosit Membranı Proteinleri

Yöntem I'de %10, %20, %30, %40 ve %50 amonyum sülfat doygunluklarında, 24 saat bekletilerek elde edilen ve ghost'da bulunan eritrosit membranı proteinleri, 30 numune kullanılarak karşılaştırılmıştır. Bantların isimlendirilmesinde literatürlerden faydalanılmıştır (1,2,6,19). Şekil 4.3.1'de EDTA'sız tank tamponu ve Şekil 4.3.2 ve 4.3.3'de EDTA'lı tank tamponu kullanılarak yapılan elektroforez sonuçlarında, bantların görünümü açısından EDTA'lı tamponun daha iyi sonuç verdiği gözlenmiştir. Ayrıca, amonyum sülfat çöktürmesiyle, bant 4.2 dimerik yapıda, bant 4.5 çoğu zaman dimer ve bazanda trimer yapıda görülmüştür. Tablo 4.3.2'de, herbir doygunlukta tüm bantların görülebildiği verilmiştir. %10'luk amonyum sülfat doygunluğu için görülebilme oranı şöyle hesaplanmıştır;

$$\text{Tüm bantların görülebilme oranı} = \frac{\text{Tüm bantların görülebildiği numune sayısı}}{\text{Toplam numune sayısı}} \times 100$$

$$= \frac{315}{330} \times 100 = 95.5$$

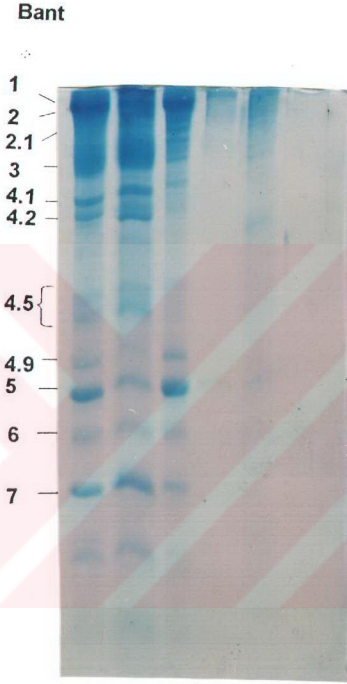
Toplam 11 bant ve herbir bant 30 numune üzerinden değerlendirildiğinden, toplam numune sayısı 330 (11x30) olarak alınmıştır ve tüm bantların görülebildiği numune, sayısında 330 üzerinden değerlendirilmiştir.

Şekil 4.3.5'de eritrosit membranı proteinlerinin herbir doygunlukta elde edilebilme oranları verilmiştir. Burada tüm bantların herbir doygunluğa nasıl dağıldığı gösterilmek istenmiştir. Tüm bantların en fazla görülebildiği %10'luk amonyum sülfat doygunluğu için bu oranın nasıl bulunduğu aşağıda gösterilmiştir;

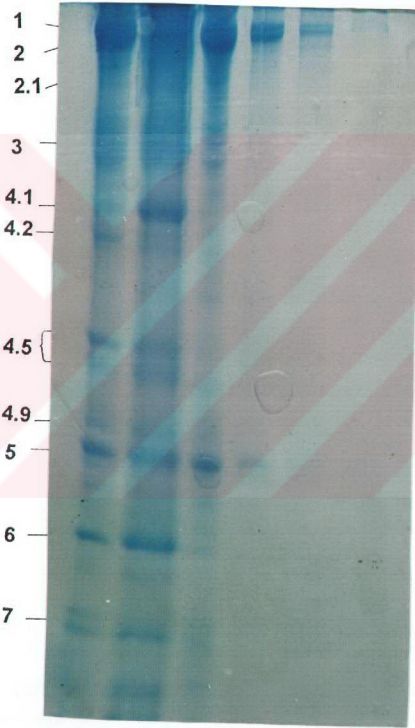
$$\text{Proteinlerin \%10 (NH}_4\text{)}_2\text{SO}_4 \text{ doygunluğunda bulunabilme oranı} = \frac{\text{Tüm bantların görülebilme oranı}}{\text{Tüm bantların görülebilme oranları toplamı}}$$

$$= \frac{95.5}{249.5} \times 100 = 38.3$$

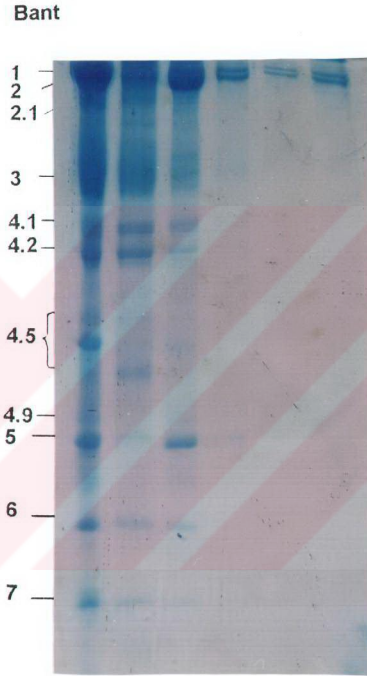
Buna göre eritrosit membran proteinlerinin % 38.3'ü % 10'luk amonyum sülfat doygunluğunda toplanmıştır.



**Şekil 4.3.1.** EDTA'sız tank tamponu kullanılarak sırasıyla ghost (Gh), %10, %20, %30, %40 ve %50'lik  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  doygunluklarında elde edilen eritrosit membranı protein bantlarının görünümü.

**Bant**

**Şekil 4.3.2.** EDTA'lı tank tamponu kullanılarak, ghost (Gh) ve %10, %20, %30, %40 ve %50'lik  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  doygunluğunda elde edilen eritrosit membranı protein bantlarının görünümü.



*Şekil 4.3.3.* EDTA'lı tank tamponu kullanılarak, ghost (Gh) ve %10, %20, %30, %40 ve %50'lik  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  doyumluklarında elde edilen eritrosit membranı protein bantlarının görünümü.

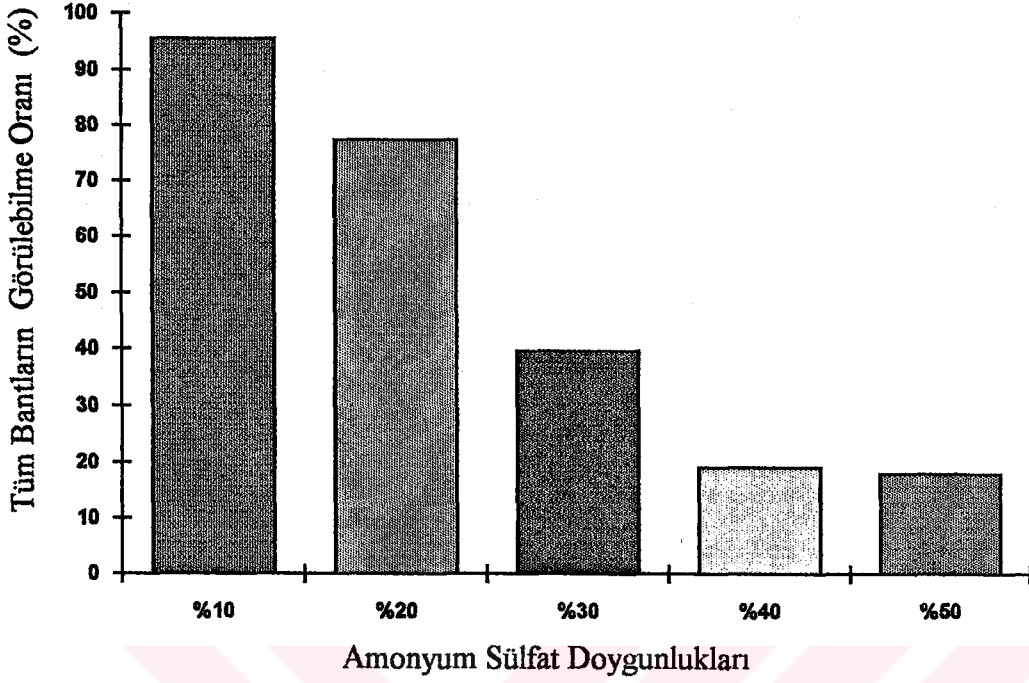
**Tablo 4.3.1.** Birinci yöntem için %10, %20, %30, %40 ve %50'lik amonyum sülfat doygunluklarında elde edilen herbir eritrosit membranı proteini bandının 30 numune üzerinde görülebilme sıklığı.

<i>Bant</i>	<i>Ghost</i>	<i>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> Doygunluğu</i>				
		<i>%10</i>	<i>%20</i>	<i>%30</i>	<i>%40</i>	<i>%50</i>
<i>1</i>	30	30	30	30	29	28
<i>2</i>	30	30	30	30	29	28
<i>2.1</i>	30	30	30	25	4	3
<i>3</i>	30	30	30	13	1	0
<i>4.1</i>	30	30	7	3	0	0
<i>4.2</i>	30	28	4	0	0	0
<i>4.5</i>	30	26	16	1	0	0
<i>4.9</i>	30	21	28	1	0	0
<i>5</i>	30	30	30	22	0	0
<i>6</i>	30	30	28	3	0	0
<i>7</i>	30	30	22	0	0	0

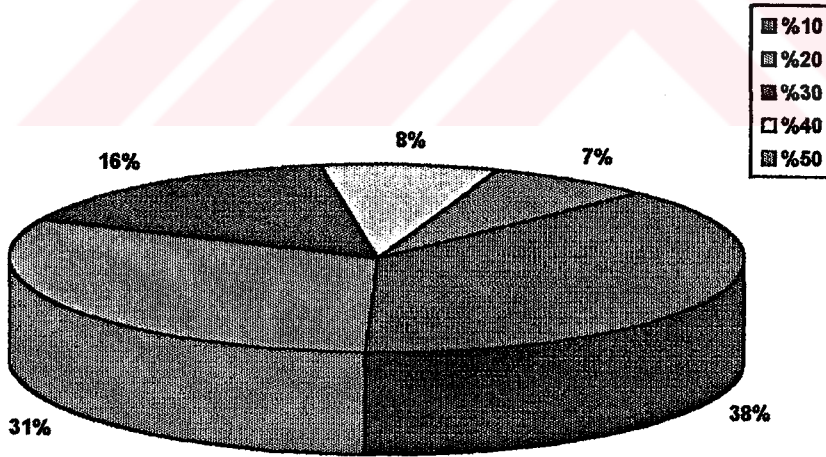
**Tablo 4.3.2.** %10, %20, %30, %40 ve %50 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> doygunluklarında tüm bantların görülebilme oranları.

	<i>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> Doygunluğu</i>				
	<i>%10</i>	<i>%20</i>	<i>%30</i>	<i>%40</i>	<i>%50</i>
% Tüm bantların görülebilme oranı	95.5	77.3	39.7	19.1	17.9





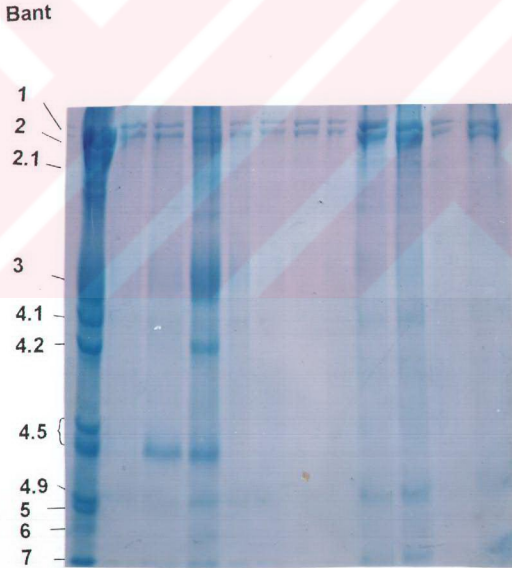
**Şekil 4.3.4.** Yöntem I'de her bir doygunlukta tüm bantların görülebilme oranlarının karşılaştırılması.



**Şekil 4.3.5.** Eritrosit membranı proteinlerinin %10, %20, %30, %40 ve %50 amonyum sülfat doygunluklarında elde edilebilme oranları.

#### 4.4. Yöntem II ile Eritrosit Membranı Proteinleri

Yöntem II'de %5, %10, %15, %20, %25, %30, %40, %50, %60, %70 ve %80  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  doyunluklarında herhangi bir bekleme yapılmadan elde edilen ve ghostta bulunan eritrosit membranı proteinleri 10 numunede karşılaştırılmıştır. Şekil 4.4.1.'de EDTA'lı tank tamponu kullanılarak yapılan elektroforez sonucu, tablo 4.4.1.'de ise herbir doyunlukta ve ghostaki eritrosit membranı bantlarının 10 numune üzerinden görülebilme oranları değerlendirilmiştir. Tablo 4.4.2.'ye göre bantların en fazla görülebildiği amonyum sülfat doyunluğu %88.2 görülebilme oranıyla %15'lik doyunluk olduğu tespit edilmiştir. Bu oranının hesaplanması 4.3.'de anlatıldığı gibi yapılmış fakat toplam numune sayısı 110 üzerinden değerlendirilmiştir. Şekil 4.4.3.'de ise herbir amonyum sülfat doyunluğunda eritrosit membranı proteinlerini ne kadarının çöktürülebildiği gösterilmiştir. Buna göre bantların %17.9'u %15'lik, %15.2'i ise %10'luk amonyum sülfat doyunluklarında yer almaktadır.



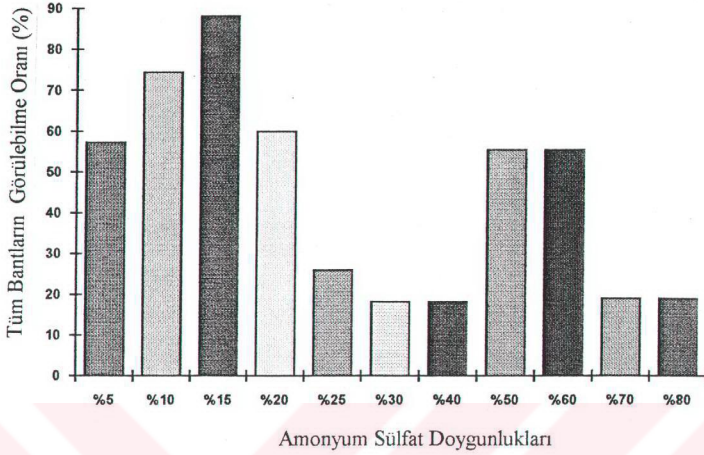
Şekil 4.4.1. Sırasıyla ghost, %5, %10, %15, %20, %25, %30, %40, %50, %60, %70 ve %80'lik  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  doyunluklarında elde edilen eritrosit membranı protein bantlarının görünümü.

**Tablo 4.4.1.** İkinci yöntem için %5, %10, %15, %20, %25, %30, %40, %50, %60, %70, %80 amonyum sülfat doygunluklarında elde edilen herbir eritrosit membran proteini bandının 10 numunede görülebilme sıklığı.

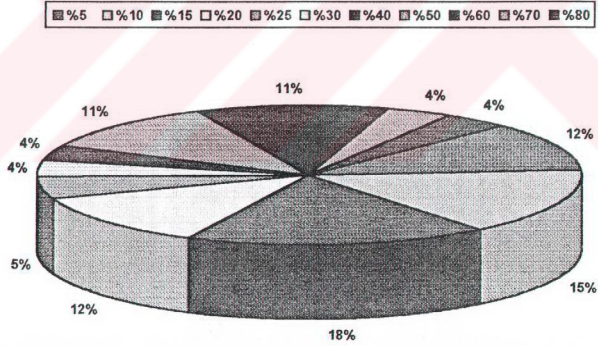
Bant	Ghost	$(NH_4)_2SO_4$ Doygunluğu										
		%5	%10	%15	%20	%25	%30	%40	%50	%60	%70	%80
1	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
2	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
2.1	10	9	10	10	9	1	0	0	10	10	1	0
3	10	7	10	10	9	1	0	0	10	9	0	0
4.1	10	6	6	9	9	0	0	0	8	8	0	0
4.2	10	4	6	9	2	0	0	0	0	1	0	0
4.5	9	0	8	8	0	0	0	0	0	0	0	0
4.9	10	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
5	10	6	8	10	7	3	0	0	5	5	0	1
6	10	5	5	9	3	1	0	0	3	3	0	0
7	10	6	9	10	7	3	0	0	5	5	0	0

**Tablo 4.4.2.** %5, %10, %15, %20, %25, %30, %40, %50, %60, %70 ve %80  $(NH_4)_2SO_4$  doygunluklarında tüm bantların görülebilme oranları.

	$(NH_4)_2SO_4$ Doygunluğu										
	%5	%10	%15	%20	%25	%30	%40	%50	%60	%70	%80
% Tüm bantların görülebilme oranı	57.3	74.5	88.2	60.0	26.0	18.2	18.2	55.5	55.5	19.0	19.0



Şekil 4.4.2. Yöntem II'de her bir doygunlukta tüm bantların görülebilme oranlarının karşılaştırılması.



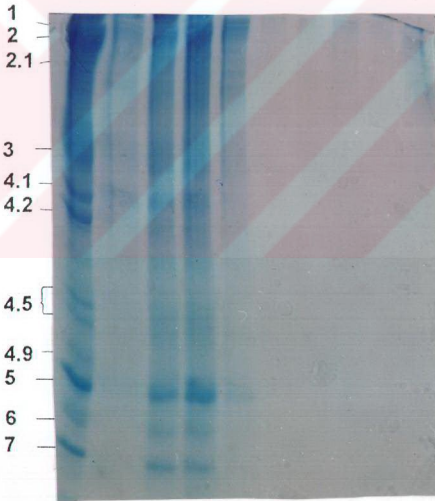
Şekil 4.4.3. Eritrosit membranı proteinlerinin %5, %10, %15, %20, %25, %30, %40, %50, %60, %70 ve %80 amonyum sülfat doygunluklarında elde edilebilme oranları.



#### 4.5. Yöntem III ile Eritrosit Membranı Proteinleri

Yöntem III'de %5, %15, %25, %35, %45, %55, %65, %75 ve %85 amonyum sülfat doygunluklarında bekletilmeden elde edilen ve ghostta bulunan eritrosit membranı proteinleri 10 numune'de karşılaştırılmıştır. Şekil 4.5.1'de EDTA'lı tank tamponu kullanılarak yapılan elektroforez sonucu, Tablo 4.5.1'de ise herbir doygunluktaki ve ghosttaki eritrosit membranı bantlarının 10 numune üzerinde görülebileme oranları gösterilmiştir. Tablo 4.5.2 ve Şekil 4.5.2'ye göre bantların en fazla görülebildiği amonyum sülfat doygunluğu, %92.7 görülebileme oranıyla %15'lik doygunluk olduğu tespit edilmiştir. Şekil 4.5.3'de ise herbir amonyum sülfat doygunluğunda eritrosit membranı proteinlerinin ne kadarının çöktürülebildiği gösterilmiştir. Buna göre proteinlerinin %23.3'ü tüm bantlarının en fazla gözlenebildiği %15'lik amonyum sülfat doygunluğunda toplanmıştır.

Bant



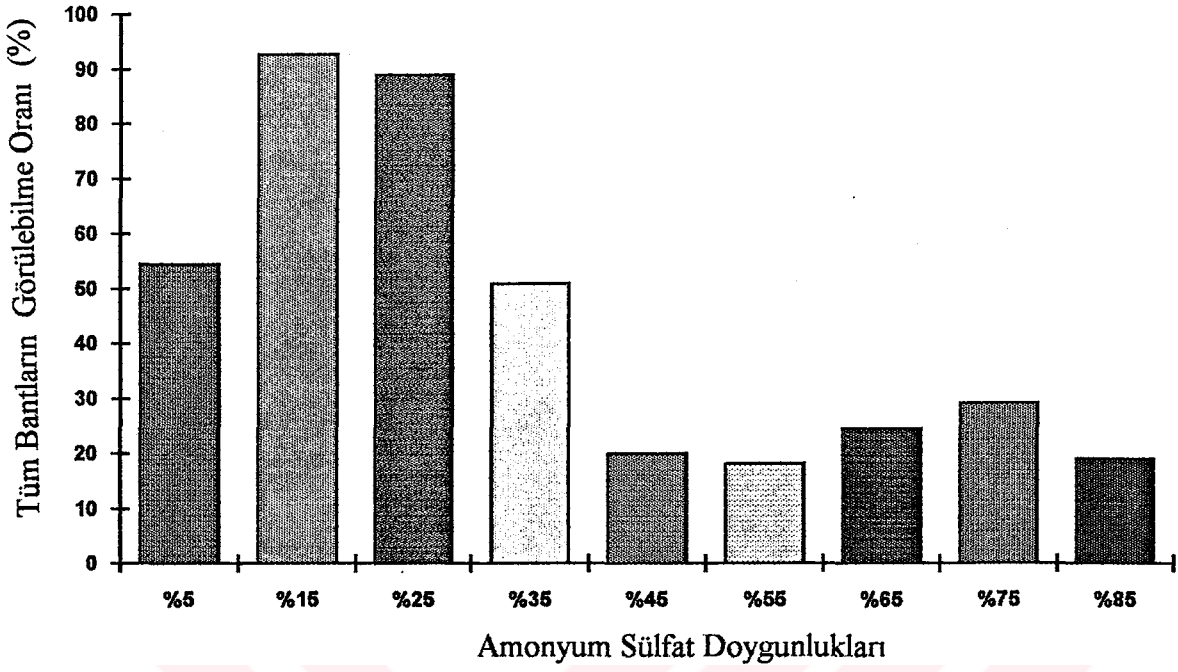
Şekil 4.5.1. Sırasıyla Ghost, %5, %15, %25, %35, %45, %55, %65, %75 ve %85'lik  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  doygunluklarında çökelen eritrosit membranı proteinlerinin görünümü.

**Tablo 4.5.1.** Üçüncü yöntem için %5, %15, %25, %35, %45, %55, %65, %75 ve %85'lik amonyum sülfat doygunluklarında elde edilen herbir eritrosit membranı proteini bandının 10 numune üzerinden görülebilme sıklığı.

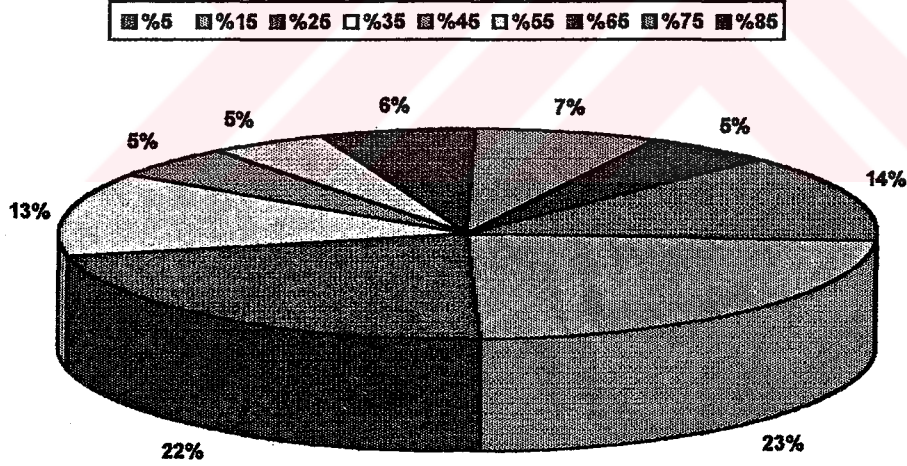
Bant	Ghost	$(NH_4)_2SO_4$ Doygunluğu								
		%5	%15	%25	%35	%45	%55	%65	%75	%85
1	10	10	10	10	10	10	10	9	9	9
2	10	10	10	10	10	10	10	9	9	9
2.1	10	10	10	10	9	2	0	0	3	3
3	10	8	10	10	7	0	0	0	0	0
4.1	10	7	10	10	6	0	0	0	0	0
4.2	10	4	8	8	0	0	0	0	0	0
4.5	10	0	8	6	0	0	0	0	0	0
4.9	10	0	6	6	0	0	0	0	0	0
5	10	4	10	10	8	0	0	3	4	0
6	10	3	10	10	3	0	0	3	3	0
7	10	4	10	10	3	0	0	3	4	0

**Tablo 4.5.2.** %5, %15, %25, %35, %45, %55, %65, %75 ve %85'lik  $(NH_4)_2SO_4$  doygunluklarında tüm bantların görülebilme oranları.

	$(NH_4)_2SO_4$ Doygunluğu								
	%5	%15	%25	%35	%45	%55	%65	%75	%85
% Tüm bantların görülebilme oranı	54.5	92.7	89.1	50.9	20.0	18.2	24.5	29.1	19.1



**Şekil 4.5.2.** Yöntem III'de her bir doygunlukta tüm bantların görülebilme oranlarının karşılaştırılması.



**Şekil 4.5.3.** Eritrosit membranı proteinlerinin %5, %15, %25, %35, %45, %55, %65, %75 ve %85 amonyum sülfat doygunluklarında elde edilebilme oranları.



## 5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, eritrosit membranı proteinlerinin farklı amonyum sülfat doygunluklarında elde edilebilirliği, sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile incelenmiştir. SDS-PAGE, proteinlere spesifik Coomassie Brilliant Blue ile boyandığında, normalde 11 eritrosit protein bandı gözlenebilmiştir. Bu bantlar, elektroforezde göç ediş sırasına göre, bant 1,2 (spektrin), bant 2.1 (ankirin), bant 3 (anyon değiştirici protein), bant 4.1, 4.2, 4.5, 4.9, bant 5 (aktin), bant 6 (gliseraldehid 3-fosfat dehidrogenaz) ve bant 7 (tropomiyozin) dir (1,2). Bütün bu bantlar bölüm 2.3'de ayrı ayrı anlatılmış, ayrıca özellikleri ve fonksiyonları EK-3'de özetlenmiştir.

Bu tartışmada, aşağıdaki sıralamaya göre tüm denemeler ve çalışmalar ayrı ayrı değerlendirilmiş ve en sonunda da genel bir değerlendirme yapılmıştır;

1. Eritrosit ghostlarının elde edilmesi,
2. SDS ile proteinlerin açığa çıkarılması,
3. SDS'nin uzaklaştırılmasında diyaliz işlemleri,
4. Eritrosit membranı proteinlerinin amonyum sülfatla ayrılması yöntemleri,
5. Lowry metodu,
6. Denatüre protein numunelerinin hazırlanması,
7. SDS-PAGE,
8. Herbir yöntem için elektroforez sonuçları,
9. Genel değerlendirme,
10. Öneri.

Eritrosit membranı proteinlerini elde etmek amacıyla toplam 50 normal şahıs kanı, K.T.Ü. Farabi Hastanesi kan bankasından temin edildi. EDTA'nın membran proteolizini azaltmada etkili ve hücre lizisi esnasında zararlı proteazlara karşı dirençli olmasından dolayı (38), EDTA'lı tampon kullanan H.Hamaguchi ve H.Cleve'nin metodu (44) modifiye edilerek eritrosit ghostları elde edildi (44). Başlangıçta, Dodge yöntemi (49) yapıldı fakat ghostların daha uzun sürede elde edilmesi, EDTA'lı tamponun seçiminin ikinci nedeni oldu. H.Hamaguchi ve H.Cleve, eritrosit paketlerini 10 mM Tris-0.1 mM EDTA-HCl (pH 7.4) ile yıkayarak 20000 g'de (yaklaşık 13000 rpm'de) 20 dakika santrifüjlemişti. Oysa bizim çalışmada zamandan kazanabilmek maksadıyla deviri arttırarak, 20000 rpm'de 10'ar dakika aynı tamponla yıkayarak santrifüjleme yapıldı. 5-6 kez yıkama işlemleriyle yaklaşık 120 mL kandan yaklaşık 5 mL beyaz eritrosit ghostu elde edildi.

Ghosttaki proteinleri açığa çıkarmak maksadıyla, hem polar hemde nonpolar özelliklere sahip bir anyonik deterjan olan SDS kullanıldı (15). 4 mL ghost, 10 mM Tris-0.1

mM EDTA-HCl (pH 7.4) ile 25 mL'ye tamamlanarak %1 SDS ihtiva eden protein çözeltisi hazırlandı. Bu aşamada SDS, proteinin nonpolar kısımlarına gömülü nonpolar hidrofobik kısımları ile bağlanarak, eritrosit ghostu proteinlerini açığa çıkarmış oldu (37).

SDS'yi proteinlerden uzaklaştırmak için 10 mM Tris-0.1 mM EDTA-HCl (pH 7.4) tamponu ile 2 saatte bir tampon değiştirilerek 10 saat süreyle diyaliz işlemi yapıldı. İşlem sonunda protein çözeltisinin hacminin arttığı gözlemlendi (11,40). Bu diyaliz işlemi, eritrosit membran proteinlerinden SDS'yi uzaklaştırarak proteinleri amonyum sülfatla çöktürmeye hazır hale getirmek ve elektroforezde numunenin fazla SDS ihtiva eden numune olarak kaba bantlar meydana getirmesini önlemek bakımından önemliydi.

Farklı amonyum sülfat doygunluklarının, yani amonyum sülfatın eritrosit membran proteinlerini nasıl ayırdığını gözlemek amacıyla farklı yöntemler denendi. Diyaliz sonucu elde edilen protein çözeltileri, birinci yöntemde; %10, %20, %30, %40 ve %50 doygunluğa, ikinci yöntemde; %5, %10, %15, %20, %25, %30, %40, %50, %60, %70 ve %80 doygunluğa ve üçüncü yöntemde; %5, %15, %25, %35, %45, %55, %65, %75 ve %85 doygunluğa getirildi. Her üç yöntemde de, her seferinde süpernatant istenilen doygunluğa getirilerek 12490 rpm'de (19000 g'de) 10 dakika santrifüjlendi. Yöntemler arasında doygunluk farklılıklarının yanı sıra, uygulama farklılıkları da vardı. Birinci yöntemde istenilen amonyum sülfat doygunluğuna getirilen süpernatant protein çözeltileri 24 saat +4°C'de bekletildikten sonra santrifüjlenerek, her bir doygunluktaki protein çökelekleri alındı. Diğer yöntemlerde ise istenilen doygunluğa getirilen çözeltiler hemen santrifüjlenip protein çökelekleri alındı. Proteinlerin  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ile çöktürülmesi yönteminin esasları, dehidratasyon ve hidrofobik etkileşimleridir (37,38). Burada  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , protein çözeltisindeki su molekülleriyle etkileşerek, proteinlerden suyu almakta ve proteinler arası hidrofobik etkileşimler meydana getirerek proteinlerin çökmesini sağlamaktadır. Birinci yöntemde protein çözeltisi uzun süre amonyum sülfatta bekletildiği için tüm protein moleküllerinin daha az amonyum sülfat doygunluklarında çöktüğü gözlemlendi. Yine bu yöntemde %30'luk  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  doygunluğundan sonraki doygunluklarda çökelen proteinlerde spektrin dimeri hakim iken, beklemesiz yapılan diğer yöntemlerde, başka protein bantlarında gözükmesi, bu sonuca varmamıza neden olmuştur. Ayrıca, bir miktar  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  'ın proteinlerle birlikte çökebileceği düşünülerek, sadece birinci yöntem için ikinci bir diyaliz işlemi yapıldı. Burada amaç, amonyum sülfatın proteinlerin yürütmesine ve bantların görünümüne etkisini tespit etmektir. Nitekim, ikinci bir diyaliz işlemi yapılan birinci yöntemde, protein bantlarının diğer yöntemlere göre daha net çıkması,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  çöktürmesinden sonrada diyaliz işleminin tercih edilmesi gerektiği sonucunu çıkarmıştır.

Ghostlardaki ve herbir doygunluk çökeleğindeki protein miktarını tayin etmek ve elektroforeze gereğinden fazla protein koyarak bozuk bantlar elde etmemek için Lowry metodu kullanıldı (38). Bu metod, alkali ortamdaki  $\text{Cu}^{+2}$  metalinin, proteinin peptid

bağlarıyla kompleks oluşturarak  $Cu^{+2}$ 'e indirgenmesi esasına dayanmaktadır. Amonyum sülfat, Lowry metodunu interfere eder. Bu nedenle, ikinci bir diyaliz işlemi, interferans etkiyi ortadan kaldırmak açısından da avantajlıdır. Fosfomolibdik-fosfotungstat reaktifleri parçalanmadan indirgenmenin meydana gelmesini sağlamak için Folin reaktifi alkali bakır protein çözeltisine ilave edilir edilmez hemen vorteksleme yapıldı. Her bir numunenin ve standartların absorbansı, meydana gelen tungsten mavisi rengine karşı 750 nm'de okundu. Sığır albumini standart olarak kullanılıp hazırlanan grafik (Şekil 4.1) yardımıyla protein miktarları belirlendi. Ghosttaki protein miktarı ortalama olarak  $2.15 \pm 0.06$  bulundu. Bu protein değerleri tablo 4.2.'de verilmiştir.

Ghosttaki ve herbir doyunluktaki protein çökelekleri deiyonize suyla dilue edilerek protein konsantrasyonları 2 mg/mL'ye ayarlandı. Protein miktarı 2 mg/mL'nin altında olan numuneler ise direkt işleme tabi tutuldu. Protein çözeltilerine, ilk önce SDS ve 2-merkaptetanol ilave edilerek kaynar su banyosunda 5 dakika bekletildi (48). Bu aşamada SDS, proteinin ikincil, üçüncül ve dördüncül yapısını bozarken, 2-merkaptetanol disülfür bağlarını indirgeyerek proteinlerin denatürasyonuna katkıda bulunmuş oldu. Denatüre numuneye, numune yoğunluğunu artırarak, numune kuyularındaki tamponda dağılmasını önlemek için gliserol, pH'yı 6.8'de tutmak için tampon ve proteinin elektroforezde yürüdüğü yeri izleyebilmek için bromfenol mavisi ilave edildi (39, 41, 43). Böylece, numune kuyularına en fazla 25 µg numune konmuş oldu.

SDS-PAGE'de proteinler moleküler ağırlıkları esasına göre göç etmektedirler (41). Bizim çalışmamızda da moleküler ağırlığı en fazla olan spektrin çok az yürürken, moleküler ağırlığı çok daha az olan tropomiyozin daha hızlı yürüyerek jelin alt kısımlarında olduğu gözlemlendi. Eritrosit membranı proteinlerinin elektroforetik hareketliliğini izleyebilmek için, Laemmli SDS-PAGE kesikli tampon sistemi ile dikey slab jel elektroforez aleti kullanıldı (43). Bu sistemde, tankta, ayırma ve yığıma jellerinde farklı tamponlar kullanıldı. Burada amaç voltaj ve pH gradienti meydana getirmektir. Jelleri hazırlanmasında, akrilamid, bisakrilamid, TEMED, amonyum persülfat, SDS ve jellere uygun tampon kullanıldı. pH'sı 6.8 olan yığıma jelinde bir plastik tarak yardımıyla onbeş numune kuyusu meydana getirilerek, daha önceden hazırlanmış pH'sı 6.8 olan denatüre proteinlerin aplikasyonları yapıldı. Slab jellerde böyle fazla numunenin aynı anda uygulanabilmesi önemli bir avantajdır. pH'sı 8.8 olan ayırma jelinde protein bantlarının ayrıldığı gözlemlendi.

Yöntem I için %10'luk ve diğer yöntemler için %8'lik akrilamid konsantrasyonlu ayırma jelleri hazırlandı. %8'lik akrilamid konsantrasyonlu jellerde protein bantlarının daha iyi ayrıştığı gözlemlendi. Jellerin iyi bir şekilde olması ve dolayısıyla bantların iyi gözlenebilmesi için, jel hazırlama esnasında oldukça dikkatli olundu ve özellikle jelde hava kabarcıklarının meydana gelmemesine özen gösterildi. Jeldeki zehirli gazları uzaklaştırabilmek ve hava

kabarcığını önlemek için TEMED ilave edilmeden önce, hazırlanan jel çözeltisinin gazları, bir dakika süreyle su trombu kullanılarak uzaklaştırıldı (41).

30 mA'lık sabit akımda yapılan elektroforez sonucu, 0.025 M Tris, 0.192 M glisin ve %0.1 SDS ihtiva eden tank tamponuna çözeltideki konsantrasyonu %0.05 olacak şekilde EDTA ilave edildiğinde bantların nasıl etkileneceği gözlemlenmek istendi. EDTA'sız tank tamponunun pH'sı yaklaşık 8.3 olup elektroforez süresi 4.5-5 saat sürerken (43), EDTA'lı tank tamponunun pH'sı tam 8.3 olup işlem 6-7 saat sürdü. Bu tampon değişimiyle yapılan işlem sonucunda, EDTA'nın hem proetinlerin çözünürlüğünü artırarak hem de tampon pH'sını azaltıp zamanı uzatarak protein bantlarının daha iyi ayrışmasına neden olduğu tespit edildi (Şekil 4.3.1 ile Şekil 4.3.2 ve 4.3.3 karşılaştırıldı).

Elektroforez sonucu proteinlerin boyanmasında Coomassie Brilliant Blue G-250 boyası kullanıldı. Alkol proteinlerin jellerin jellerde sabitleşmesini sağlamada etkili olan bir organik bileşik olduğundan, izopropil alkol ihtiva eden boya çözeltisi hazırlandı (49). Boya giderme çözeltisini tekrar kullanabilmek için, jel yıkandıktan sonra Coomassie Brilliant Blue G-250'nin rengini almış çözelti, aktif karbon yatağından geçirilir. Burada aktif karbon boyayı adsorblayarak tutmakta geriye renksiz boya giderme çözeltisini vermektedir (50).

Elektroforez sonucu eritrosit membranı protein bantlarının değerlendirilmesinde, elimizde moleküler ağırlık markörü olmadığı için literatürlerde elde edilen bantlar göz önüne alındı (1,2,6,19). Bu nedenle, bantlar hakkında %100 doğruluk verilemeyebilir. Fakat daha önceki çalışmalardaki bantların yeri, şekli, kalınlığı ve koyuluğuna çok dikkat edilerek bir değerlendirme yapıldığından, bantlar hakkındaki kararlarımızda oldukça büyük doğruluk olduğuna karar verildi. Çalışmada proteinlere spesifik Coomassie Brilliant Blue G-250 boyası kullanıldığından, ancak pas boyası ile gözlenebilen glikoforinler, jellerde gözlenemedi.

Yöntem I'de 30 numune ile çalışıldı. Bu numunelerin ghostlarında tüm bantlar hemen izlenebildi (Şekil 4.3.1, 4.3.2, 4.3.3.). Yalnız iki numunede bant 4.9 oldukça silik çıkmıştır. Oldukça silik çıkan bantların hiçbiri değerlendirilmeye alınmadı. %10'luk amonyum sülfat doygunluğunda, bant 1, 2, 2.1, 3, 4.1, 5, 6 ve 7 %20'lik doygunlukta bant 1, 2, 2.1, 3 ve 5 tüm numunelerde gözlemlendi. %30, %40 ve %50'lik doygunluklarda spektrin bantları 1, 2 hakimdi. Fakat %30 ve %40'lik doygunluklarda spektrin bantları belirgin bir şekilde gözlenebilirken, %50'lik doygunlukta ya silik olarak gözlenmiş ya da hiç gözlenemedi. Bantların 30 numune üzerinden görülebilme oranlar Tablo 4.3.1'de verildi. Bantların en fazla görünebildiği amonyum sülfat doygunluğunun %95.5 görülebilme oranıyla %10 doygunluk olduğu tespit edildi (Tablo 4.3.2, Şekil 4.3.4). Ayrıca bu görünebilme oranı, göz önüne alınmış değerlendirildiğinde, proteinlerin %38.3'ünün %10 doygunlukta bulunduğu kanaatine varıldı (Şekil 4.3.5).



Yöntem II'de 10 numune ile çalışıldı. EDTA'lı tank tamponu kullanılarak yapılan çalışmada, %5'lik amonyum sülfat doygunluğunda bant 1 ve 2 belirli bir şekilde gözlenebilirken, diğer bantlarda ise önemli bir belirginlik gözlenemedi (Şekil 4.4.1). %10'luk doygunlukta, bant 1, 2, 2.1, 4.5, 5 ve 7 %15'lik doygunlukta ise bant 4.9 hariç diğer bantların görülebildiği söylenebilir. %20, %50 ve %60'lık doygunluklarda bant 1, 2, 3 ve 4.1 hakim iken diğer doygunluklarda özellikle spektrin dimerlerinin görüldüğü aşıkardır (Tablo 4.4.1). Bu yöntemde bantların en fazla görülebildiği amonyum sülfat doygunluğunun, %88.2 görülebilme oranıyla %15'lik doygunluk olduğu tespit edildi (Tablo 4.4.2 ve Şekil 4.4.2). Bu görülebilme oranı gözönüne alındığında, proteinlerin %17.9'unun %15'lik %15.2'sinin %10'luk doygunlukta çökeldiği belirlendi (Şekil 4.4.3).

Yöntem III'de de yöntem II gibi yine 10 numune ve EDTA'lı tank tamponu ile çalışma yapıldı (Şekil 4.5.1 ve Tablo 4.5.1). Burada protein bantlarının en fazla gözlenebildiği amonyum sülfat doygunluğu, %92.7 görülebilme oranıyla %15 olmuştur (Tablo 4.5.2 ve Şekil 4.5.2). Eritrosit membranı proteinlerinin %23.3'ü bu doygunlukta yer almaktadır (Şekil 4.5.3).

Eritrosit membranı proteinlerinin amonyum sülfatla ayırma yöntemleri arasındaki farklılıklar EK-5'de özetlenmiştir. Bütün bu işlemler neticesinde, herbir doygunlukta elde edilen protein bantlarının sadece doygunlukla değil, aynı zamanda çöktürme sayısı ile amonyum sülfatta bekletme süresiyle de değiştiği gözlemlendi. Tüm yöntemlerde ortak olarak gözlenebilen bir şey var ki o da, spektrin bantlarının bütün doygunluklarda gözlenebildiği idi. Ayrıca birden fazla altbirimden meydana gelen proteinlerin tüm doygunluklarda görülebilme oranının daha yüksek olduğu ve farklı doygunlukların anyon değiştirici alt birimlerinin ve ankirin fragmentlerinin gözlenebilmesine imkan verdiği belirlendi.

Literatürlerde gösterilen densitometrik okumalarda bant 4.5 bölgesinde iki pik görülmektedir (19,31,32). Yani bant 4.5'in iki altbirimden meydana geldiği belirtilmektedir. İki boyutlu elektroforezle yapılan çalışmada, bant 4.5 bölgesinde bazı polipeptidlerin değişik formları halinde 14 bant gözlenebildiği belirtilmektedir (33). Oysa bizim çalışmamızda, özellikle birinci yöntemde %10 amonyum sülfat doygunluğunda bant 4.5 bölgesinde 3. bir bant daha görüldü. (Şekil 4.3.3). Bu da bizde, bant 4.5'in trimer yapıda olabileceği fikrini uyandırdı. Yine birinci yöntemde %10'luk doygunlukta bant 4.2, iki bant halinde görüldü. Literatürde ise hemolilik anemide iki bant halinde görüldüğü beyan edilmişti (25). Bu nedenle bant 4.2'nin sadece anemide değil, aynı zamanda amonyum sülfatla proteinlerin ayrılması yöntemi ile de iki bant halinde görülebileceği kanaatine varıldı.

Bütün bu çalışmalarımız neticesinde, eritrosit membranı proteinlerinin farklı amonyum sülfat yöntemlerinden nasıl etkilendiğini gözlemlendi. Çeşitli hastalık gruplarında, protein alt birimlerinin nasıl etkilenebileceğini gözlemlemede, proteinleri amonyum sülfatla ayırmanın faydalı olabileceği düşünülmektedir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

### Sonuçlar:

1. H.Hamaguchi ve H.Cleve'in metodu modifiye edilerek elde edilen ghostun protein muhtevası, Lowry metoduyla tayin edilmiş olup ortalama  $2.15 \pm 0.06$  olarak bulundu.

2. 0.025 M tris, 0.192 M glisin, %0.1 SDS ve %0.05 EDTA ihtiva eden tank tamponu kullanıldığında eritrosit membranı proteini bantlarının daha iyi gözleendiği tespit edildi.

3. Protein çözeltileri, amonyum sülfatta uzun süre bekletildiğinde daha çok proteinin çöktüğü gözleendi.

4. Spektrinin, ankirinin ve anyon değiştirici proteinin alt birimlerini, amonyum sülfatla ayırma metoduyla iyi gözlenebildi.

5. %10, %20, %30, %40 ve %50'lik  $(NH_4)_2SO_4$  doyunluklarında bir gece bekletme ile yapılan 1. yöntemde tüm bantların en iyi gözlenebildiği doyunluk, %95.5 görülebilme oranı ile %10 olarak bulundu.

6. %5, %10, %15, %20, %25, %30, %40, %50, %60, %70 ve %80'lik  $(NH_4)_2SO_4$  doyunluklarında beklemeden yapılan 2.yöntemde tüm bantların en iyi gözlenebildiği doyunluk, %88.2 görülebilme oranı ile %15 olarak bulundu.

7. %5, %15, %25, %35, %45, %55, %65, %75 ve %85'lik  $(NH_4)_2SO_4$  doyunluklarında beklemeden yapılan 3.yöntemde tüm bantların en iyi gözlenebildiği doyunluk, %92.7 görülebilme oranı ile %15 oldu.

8. Protein 4.5, amonyum sülfat çökeleklerinde bazen dimer bazende trimer yapıda gözükte.

9. Protein 4.2, özellikle 1.yöntemle ve %10'luk amonyum sülfat doyunluğunda, 30 numunenin 28'inde dimer yapıda gözükte.

10. %8'lik akrilamid konsantrasyonunda bantlar daha iyi ayrıştı.

### Öneriler:

1. Bir hastalık grubunda proteinlerin altbirimlerinin nasıl etkilendiğini izlemede, amonyum sülfatla ayırma yöntemi kullanılabilir.

2. Amonyum sülfatla proteinlerin ayrılması işleminde, 1.yöntem tavsiye edilir.

3. Protein 4.5'in trimer ve protein 4.2'nin dimer yapıda olup olmadığı tespit etmek için yeni çalışmalar yapılabilir.

## 7. ÖZET

Bu çalışmada, eritrosit membran proteinleri amonyum sülfatla ayrılarak, sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforeziyle elektroforetik hareketlilikleri izlendi. Bu amaçla farklı yöntemler denendi. Birinci yöntem için 30, ikinci ve üçüncü yöntemler için 10'ar normal numune kullanıldı. %10, %20, %30, %40 ve %50'lik amonyum sülfat doygunlukları ve %10'luk akrilamid konsantrasyonda hazırlanmış jeli kullanan birinci yöntemde, tüm bantların en iyi gözlenebildiği doygunluk %10 oldu. %5, %10, %15, %20, %25, %30, %40, %50, %60, %70, %80 doygunluklarıyla yapılan ikinci yöntemde %15'lik doygunluk ve %5, %15, %25, %35, %45, %55, %65, %75 ve %85 doygunlukları ile yapılan üçüncü yöntemde yine %15'lik doygunluk tüm bantların en iyi gözlenebildiği amonyum sülfat doygunlukları olarak bulundu. İkinci ve üçüncü yöntem için %8'lik akrilamid konsantrasyonlu jeller kullanıldı. Her üç yöntemde de, hemen hemen tüm doygunluklarda spektrin dimerlerine rastlanmıştır. Ayrıca ankirin, protein 4.1, protein 4.2 ve protein 4.5'in alt birimlerde gözlenebilmiştir. Protein 4.2 birinci yöntemde ve özellikle %10'luk doygunlukta dimer halinde görülürken protein 4.5 bazı numunelerde dimer bazılarında ise trimer yapıda görülmüştür.

Ayrıca EDTA'nın proteinlerin ayrışmasına etkisini belirlemek amacıyla EDTA'lı ve EDTA'sız tank tamponu ile yapılan elektroforez neticesinde EDTA'lı tank tamponunun bantlarının iyi gözlenebilmesi açısından daha olumlu sonuç verdiği tespit edilmiştir.



## **8. SUMMARY**

In the present study, erythrocyte membrane proteins were precipitated by ammonium sulfate and then their electrophoretic mobilities were analysed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) using Laemmli slab gel discontinuous buffer system. For this reason, different methods were examined. 30, 10 and 10 normal samples were used for the first, second and third methods respectively. In the first method, ammonium sulfate saturation of 10%, 20%, 30%, 40% and 50%, and gel with 10% acrylamide concentration were used. The saturation of 10% was the best in which 95.5% of the all bands were observed. For the second method, 5%, 10%, 15%, 20%, 35%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% and 80% saturation, and for the third method, 5%, 15%, 25%, 35%, 45%, 55%, 65%, 75% and 85% saturation were used to obtain erythrocyte membrane polypeptides. Both of the later methods were analysed by gels with 8% acrylamid concentration and 15% saturations were the best for both. However, abundances of their protein bands were different such that while 88.2% of all bands were observed with 15% saturation in second method, 92.7% of all bands were observed with again 15% saturation but in third method. In all of three methods, it was observed spectrin dimer in almost all saturations. Moreover, the subunits of ankirin, protein 4.1, 4.2, and 4.5 could be seen. Protein 4.2 was seen as dimer especially with 10% saturation in the first method. In addition, protein 4.5 was sometimes seen as trimer.

To determine the effect of EDTA on protein separation, reservoir buffers with EDTA and without EDTA were used. In the result of electrophoresis, reservoir buffer with EDTA was better than the other due to the observations of bands.

## 9.KAYNAKLAR

1. Mathews C K and Holde K E V : Biochemistry. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., 1990, pp.308-317, 334.
2. Lux S E and Backer P S : Disorders of the Cell Membrane Skeleton. In the Metabolic Basis of Inherited Disease, J L Goldstein and M S Brown (Eds), Mc Graw Hill Book Co., 1983, pp. 2367-2398.
3. Siegel D L and Branton D : Partial purification and characterization of an actin-binding protein, band 4.9, from human erythrocytes. J. Cell Biol., 100: 775-785, 1985.
4. Sodeman W A and Sodeman T M : Fiziopatoloji (Çev. Hekimler Birliği Vakfı). İkinci Baskı, Türkiye Klinikleri Yayınevi, Ankara, 1991, s.54, 712-715.
5. Murray R K, Granner D K, Mayes P A, and Rodwell V W : Harper's Biochemistry. Twenty-third ed., Prentice-Hall International Inc., London , 1993, pp. 467-474.
6. Rawn J D : Biochemistry. Neil Peterson Publisher, Burlington, 1989, pp 555-572.
7. Malik S, Sami M and Watts A : A role for band 4.2 in human erythrocyte band 3 mediated anion transport. Biochemistry, 32: 10078-10084, 1993.
8. Ideguchi H, Yamada Y, Kanda S, Tamura K and Makino S : Abnormal erythrocyte band 4.1 protein in myelodysplastic syndrome with elliptocytosis. Br. J. Haematol., 85: 387-392, 1993.
9. Styer L : Biochemistry. Third Ed., W H Freeman Company, New York, 1988, pp 283-310, 963.
10. Leninger A L : Principles of Biochemistry. W Orth Publisher, New York, 1982, pp.303-327.
11. Zihnioğlu F : Membran Proteinlerinin Deterjanlar ile Çözünürleştirilmesi. Membran Proteinlerinde, A Tefloncu (der.), Ege Üniv., Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu, 1995, s. 19-34.
12. Keha E K ve Küfrevioğlu İ : Biyokimya I. Atatürk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Yayınları, Erzurum, 1990, s.178-185.
13. Bhagavan N V : Medical Biochemistry. Jones and Bartlet Publishers, 1992, pp 161-174.
14. Gözükara E : Biyokimya I. 2.baskı, Evin Matbaası, Malatya, 1994, s.42-46.

15. Harris E L V and Angal S : Protein Purification Applications, A Practical Approach. First Ed., Oxford University Press, Oxford, 1989, pp 17-24.
16. Evans W H and Graham J M : Membrane Structure and Function. First Ed., Oxford University Press, Oxford, 1989, pp 17-24.
17. Guyton A C : Tıbbi Fizyoloji (Çev. N.Güenalp ve H.Çavuşoğlu). Nobel Tıp Kitabevi, 3.baskı, 1989, s.59.
18. Lux S and Shonet S B : The erythrocyte membrane skeleton. *Biochemistry, Hospital Practice*, October: 77-83, 1984.
19. Steck T L : The organization of proteins in the human red blood cell membrane. *The Journal of Cell Biology*, 62:1-19, 1974.
20. Shanet S B, Beuther E, The Red Cell Membrane. In *Hematology*, W J Williams, E Beuther, A J Erlev, and A A Lictman (Eds.), 4th Ed., Mc Graw Hill Publishing Company, San Fransisco, London, pp 368-377.
21. Shonet S B and Lux S E : The erythrocyte membrane skeleton: Pathophysiology. *Hospital Practice*, Nowember: 89-94, 1984.
22. Tyler J M, Reinhart B N and Branton D : Associations of erythrocyte membrane proteins, binding of purified bands 2.1 and 4.1 to spectrin. *J. Biol. Chem.*, 225(14): 7034-7039, 1980.
23. Ralston G B : Proteins of camel erythrocyte membrane. *Biochim. Biophys. Acta*, 401: 83-94, 1975.
24. Deas J E, Lee L T and Howe C : Periferal proteins of human erythrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 82(1): 296-304, 1978.
25. Rybicki A C , Heath R, Wolf J L, Lubin B and Schwartz R S : Deficiency of protein 4.2 in erythrocytes from a patient with a coombs negative hemolytic anemia. Evidence for a role of protein 4.2 in stabilizing ankirin on the membrane. *J.Clin.Invest.*, 81: 893-901, 1988.
26. Bennett V and Stenbuck P J : The membrane attachment protein for spectrin is associated with band 3 in human erythrocyte membranes. *Nature*, 280: 468-475, 1980.
27. Mueller T J, and Morrison M : The transmembrane proteins in the plasma membrane of normal human erythrocytes. *J. Biol. Chem.*, 249(23): 7568-7573, 1974.
28. Tsuji T, Irimura T and Osawa T : The carbohydrate moiety of band-3 glycoprotein of human erythrocyte membranes. *Biochem. J.*, 187: 677-686, 1980.
29. Wells E and Findlay B C : The isolation of human erythrocyte band-3 polypeptide labelled with a photosensitive hydrophobic probe. *Biochem. J.*, 187: 719-725, 1980.

30. Pappert G and Schubert D : The state of associations of band 3 protein of the human erythrocyte membrane in solutions of nonionic detergents. *Biochim. Biophys. Acta*, 730: 32-40, 1983.
31. Riggs M G and Ingram V M : Differences in erythrocyte membrane proteins and glycoproteins in sickle cell disease. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 74(1): 191-197, 1977.
32. Gohen S C , Gilman T H , Kauffman J W and Garwin J E : The effect on raman spectra of extraction of peripheral proteins from human erythrocyte membranes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 79(3): 805-814, 1977.
33. Whitfield C F, Coleman D B, Kay M M , Shiffer K A , Miller J and Goodman S R : Human erythrocyte membrane proteins of zone 4.5 exist as families of related proteins. *Am. J. Physical.*, 248(1): 70-79, 1985.
34. Horne W C, Miettinen H, Marchesi V T : Erythrocyte membrane skeleton phosphoproteins identification of two unrelated phosphoproteins in band 4.9. *Biochim. Acta*, 944(2): 135-43, 1988.
35. Haris R A : Carbohydrate Metabolism I, Major Metabolic Pathways and Their Control. In *Textbook of Biochemistry with clinical Correlations*, T M Delvin (Ed.), Second Ed., A. Wiley Medical Publication, New York, 1986, pp 270-272.
36. Harper H A : Fiziyojik Kimyaya Bakış. (Çev. Namık Kemal Menteş ve Gülriz Menteş), 14. Baskı, Ege Üniv., Tıp Fakültesi Yayınları, İzmir, 1976, s.317-320.
37. Robyt J F and White B J : *Biochemical Techniques, Theory and Practice*. Waveland Press, Inc., Waveland, 1987, pp 129-144.
38. Deutscher M P : Guide to Protein Purification. In *Methods in Enzymology*, J N Abelson and M I Simon (Eds.), Volume 182, Academic Press, California, 1990, pp 57-59, 72-75.
39. Boyer R F : *Modern Experimental Biochemistry*. Second Ed., The Benjamin/Cummings Publishing Company Inc., Redwood City, 1990, pp 42-44, 75, 81, 82, 115-145.
40. Scopes R K : *Protein Purification Principles and Practice*. Second Ed., New York, 1982, pp 17-19, 39-54.
41. Hames B D : One-Dimensional Polycrylamid Gel Electrophoresis. In *Gel Electrophoresis of Protein. A Practical Approach*, B D , Hames and D Rickwood (Eds.), Second Ed., Oxford University Press, New York, 1990, pp 1-59.
42. Cooper T G : *The Tools of Biochemistry*. John Wiley and Sons, New York, 1977, pp 194-211, 368-374.

43. Hoefer Slab Gel Electrophoresis Instructions Manual. Hoefer Scientific Instruments, California, 1992.
44. Hamaguchi H and Cleve H : Solubilization of human erythrocyte membrane glycoproteins and separation of the MN glycoprotein from a glycoprotein with I, S, and A activity. *Biochim. Biophys. Acta*, 278: 271-280, 1972.
45. Jones O T , Earnest J P and McNamee M G : Solubilization and Reconstitution of Membrane Proteins. In *Biological Membranes a Practical Approach*, J B C Findlay and W H Evans (Eds.), Oxford University Press , New York, 1990, pp 139-145.
46. Küfrevioğlu Ö İ, Şakiroğlu H ve Demir N : *Biyokimya Laboratuvar Ders Notları*. Atatürk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Yayınları, Erzurum, 1993, s.10, 11.
47. Knüfermann H, Bhakdı S and Wallach D F H : Rapid preparative isolation of major erythrocyte membrane proteins using polyacrylamid gel electrophoresis in sodium dodecyl sulfate. *Biochim. Biophys. Acta*, 389: 464-476, 1975.
48. Smith B J : SDS Polyacrylamid Gel Electrophoresis of Proteins. In *Methods in Molecular Biology, Proteins*, J M Walker (Ed.), Humana Press Inc., New Jersey, 1984, pp 41-55.
49. Fairbanks G, Steck T L and Wallach D F H : Electrophoretic analysis of the major polipeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry*, 10(13): 2606-2617, 1977.
50. Austin G T : *Shreve's Chemical Process Industries*. Fifth Ed., Mc Graw Hill International Editions, New York, 1984, pp 133-138.

## **EKLER**

### ***EK-1. Membranların Bileşimi***

***Tablo EK-1. Bazı Membranların Lipid, protein ve karbohidrat muhtevası(1).***

Membran	Protein (%)	Lipid (%)	Karbohidrat (%)
Miyelin	18	79	3
İnsan Eritrositi Plazma membranı	49	43	8
Sığır Retinal Çubuğu	51	49	0
Mitokondi Dış membranı	52	48	0
Amip plazma membranı	54	42	4
Sarkoplazmik retikulum	67	33	0
Kloroplast lameli	70	30	0
Gram pozitif bakteri	75	25	0
Mitokondri iç membranı	76	24	0

**EK-2. Eritrositlerin Bileşimi****Tablo EK-2.1. Eritrositlerin su ve protein muhtevası(20).**

Bileşen	RBC (mg/mL)
Su	721 ± 17.3
Toplam protein	371
Hemoglobin harici protein	9.2
Çözünmeyen stroma proteini	6.3
Enzim Proteinleri	2.9

**Tablo EK-2.2. Eritrosit membranı lipid muhtevası(4).**

Lipid	(%)
Kolesterol	25
Glikolipid	15
Fosfolipid	60 (%)
Fosfatidilkolin	30
Fosfatidilserin	14
Fosfatidiletanolamin	28
Sfingomiyelin	25



### Ek 3. Eritrosit Membranı Proteinleri

Tablo Ek 3.1. Eritrosit Membranı Proteinlerinin Fonksiyonları (1,2).

<i>Protein Adı</i>	<i>Fonksiyonu</i>
Spektrin	Membran iskeletindeki ağimsı yapıyı meydana getirir. Diğer proteinlerle etkileşerek kırmızı hücre membranının şeklini düzenler.
Ankirin	Spektrin ağını anyon kanalına bağlar. Bant 3'ün transmembran bölgesinin modulatörüdür.
Adüsin	Spektrinin aktine bağlanmasını artırır.
Anyon Kanalı	Cl <sup>-</sup> ve HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> iyonlarının membrandan geçişlerini sağlayarak, elektrolit dengesine katkıda bulunur.
Protein 4.1	Glikofirinin sitozole bakan yüzeyini spektrin-aktin kompleksine bağlar.
Protein 4.2	Protein 3'ün sitoplazmik bölgesi ile etkileşerek anyon transportunun düzenlenmesinde rol oynar. Ayrıca ankirin ile etkileşerek, ankirinin membranda sabit kalmasını sağlar.
Protein 4.9	Eritrosit membranı iskeletinin stabilliğini sağlar. In vitro olarak, aktine bağlanarak aktin filamentlerini kablo halinde paketler.
Aktin	Spektrinleri birbirine bağlayarak iskelet ağının oluşumuna katkıda bulunulur.
G3PDH	Oksidasyondan sorumlu glikolitik enzimdir.
Tropomiyozin	Aktin moleküllerini birarada tutar.
Glikofirin	Hücre tanınmasında rolleri vardır. Spektrin-aktin kompleksine protein 4.1 aracılığıyla bağlanır.

G3PDH: Gliseraldehit 3 Fosfat Dehidrogenaz

Tablo EK-3.2. Tablo Eritrosit Membranın Proteinlerinin Genel Özellikleri (1,2).

Protein Bandı	Adı	Moleküler Ağırlığı	Yerleşimi	Hücre başına kopya sayısı	% Ağırlık oranı
1	$\alpha$ -Spektrin	240000	P	100000	27
2	$\beta$ -Spektrin	220000	P		
2.1	Ankirin	210000	P	100000	6
2.2		195000	P		
2.3		175000	P		
2.6		145000	P		
-	Adüsin	103000	P	30000	1
-		97000	P		
3	Anyon değiştirici protein	100000	I	1100000	30
4.1	---	80000/78000	P	200000	5
4.2	---	72000	P	250000	5
4.5	---	55000	I	1500000	
4.9	---	45000	P	30000	0.5
5	Aktin	43000	P	400000	5
6	G3PDH	35000	P	500000	5
7	Tropomiyozin	29000/27000	I	500000	4
8	---	23000	P	200000	1-2
GPA		31000	I	500000	1.6
GPB		23000	I	100000	0.3
GPC		29000	I	50000	0.1

GP : Glikoforin

G3PDH : Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz

I : İntegral

P : Periferal

**EK - 4. Amonyum Sülfat Doymuluk Nomogramı.**

		Son Amonyum Sülfat Konsantrasyonu, % doymuluk																
		10	20	25	30	33	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	90	100
İlk Amonyum Sülfat Konsantrasyonu, % doymuluk		1 L çözeltiye ilave edilecek amonyum sülfat (g)																
		0	56	114	144	176	196	209	243	277	313	351	390	430	472	516	561	662
10		57	86	118	137	150	183	216	251	288	326	365	406	449	494	592	694	
20			29	59	78	91	123	155	189	225	262	300	340	382	424	520	619	
25				30	49	61	93	125	158	193	230	267	307	348	390	485	583	
30					19	30	62	94	127	162	198	235	273	314	356	449	546	
33						12	43	74	107	142	177	214	252	292	333	426	522	
35							31	63	94	129	164	200	238	278	319	411	506	
40								31	63	97	132	168	205	245	285	375	469	
45									32	65	99	134	171	210	250	339	431	
50										33	66	101	137	176	214	302	392	
55											33	67	103	141	179	264	353	
60												34	69	105	143	227	314	
65													34	70	107	190	275	
70														35	72	153	237	
75															36	115	198	
80																77	157	
90																		79

**Şekil EK-4.** Farklı amonyum sülfat doymulukları için 1 L çözeltiye ilave edilmesi gereken amonyum sülfat miktarlarını gösteren nomogram (42).

**Ek 5. Eritrosit Membran Proteinlerini Amonyum Sülfatla Ayırma Yöntemleri Arasındaki Farklılıklar**

	<i>Yöntem I</i>	<i>Yöntem II</i>	<i>Yöntem III</i>
%Amonyum sülfat doygunlukları	10, 20, 30, 40, 50	5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80	5, 15, 25, 35, 45, 55, 65, 75, 85
Amonyum sülfatla bekleme süresi	24 saat	-----	-----
Amonyum sülfatın diyalizle uzaklaştırılması	Yapıldı	Yapılmadı	Yapılmadı
Ayırma jelinin akrilamid %'si	10	8	8
Tüm bantların görülebildiği doygunluk	10	15	15
Tüm bantların en fazla görülebilme oranı (%)	95.5	88.2	92.7
Toplam proteinin, en fazla bandın görüldüğü doygunluktaki dağılımı (%)	38.3	17.9	23.3

## **ÖZGEÇMİŞ**

1970 yılında Artvin'in Hopa ilçesinde dünyaya geldi. İlkokula Ankara'da başladı. İlk, orta ve lise tahsilini Trabzon'da tamamladı. 1987 yılında, Orta Doğu Teknik Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya Mühendisliği Bölümü'ne girdi. 1993 Haziran'ında bu bölümden Kimya Mühendisi ünvanı ile mezun oldu. 1993 Eylül'ünde K.T.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisansa başladı. 1994 Nisan'ından itibaren K.T.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nde Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır.

