

**NEO-NATAL Fc RESEPTÖR (FcRn) SAFLAŞTIRILMASI İÇİN
KOLON GELİŞTİRİLMESİ**

Gölnur DÖNMEZ
Yüksek Lisans Tezi

Biyokimya Ananbilim Dalı
Temmuz 2012

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Gölnur Dönmez'in “ Neo-natal Fc Reseptör (FcRn) Saflaştırması İçin Kolon Geliştirilmesi” başlıklı **Biyokimya** Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans Tezi 17.07.2012 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı):	Prof. Dr. Arzu ERSÖZ	
Üye	: Prof. Dr. Rıdvan SAY	
Üye	: Doç. Dr.Sinan AKGÖL	

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
.....tarihinde vesayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

NEO-NATAL Fc Reseptör (FcRn) SAFLAŞTIRILMASI İÇİN KOLON GELİŞTİRİLMESİ

Gülnur DÖNMEZ
Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyokimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Arzu ERSÖZ
2012, 78 Sayfa

Neo-natal FcRn reseptör, insanda FCGRT geni tarafından kodlanan ve molekül kütlesi 46 kDa olan bir proteindir. IgG-Fc reseptörü olarak da bilinmektedir ve majör histokompatibilite kompleksi (MHC) sınıf I yapısına benzemektedir. FcRn reseptörü, anne-çocuk arasında gerçekleşen IgG döngüsünün gözlenmesinde etkin rol oynayan tek reseptördür ve IgG antikoruna Fc bölgesinden bağlanmaktadır. Ayrıca; asidik pH (6.0-6.5)'da bağlanma gözlenirken fizyolojik pH ya da daha yüksek pH'larda etkinlik gözlenmemektedir. Bu nedenle; Fc reseptörlerinin ayırımı ve saflaştırılması, immunoglobulin yapısında olan ilaç taşıyıcı, ayırma ve diagnostik platformların geliştirilmesinde önemli rol oynayacaktır. Bu çalışma kapsamında; neonata IFCRn reseptörünün insan plasentasından ayırımı ve saflaştırılması için IgG yapısının bir monomer ligand olarak kullanıldığı ve fotosensitif polimerizasyon yoluyla sentezlendiği P(IgG-co-HEMA) kriyojel kolon hazırlanmıştır. Bu doğrultuda; ilk olarak plasenta epitelyum dokusundan özellikle sinsitiyotrofoblastların bulunduğu bölümlerden alınan kesitler Triton X 100 ile homojenize edilmiştir. Daha sonra; IgG-FcRn etkileşiminin asidik pH'larda gerçekleşip fizyolojik pH'larda gerçekleşmemesinden yararlanılarak ve P(IgG-co-HEMA) kriyojelinin kolon malzemesi olarak kullanıldığı Hızlı Protein Sıvı Kromatografisi (FPLC) ile FcRn reseptörünün ayırımı sağlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: FcRn, IgG, Fotosensitif Kriyojel, FPLC

ABSTRACT

Master of Science Thesis

DEVELOPMENT COLUMN PURIFICATION OF NEO-NATAL Fc Receptor (FcRn)

Gölnur DÖNMEZ

**Anadolu University
Graduate School of Sciences
Biochemistry Program**

Supervisor: Prof. Dr. Arzu ERSÖZ

2012, 78 pages

The neo-natal FcRn receptor is a protein that in humans is encoded by FcGRT gene and has 46 kDa molecular weight. It is also known as IgG-Fc receptor and is similar to major histocompatibility complex (MHC) class I. In early studies, FcRn is the only receptor which plays an active role in IgG circulation realized between mother and fetus. Moreover, FcRn receptor binds to Fc domain of IgG with high affinity to FcRn at acidic pH (<6.5) but not at physiological pH (7.4). For this reason, separation and purification of FcRn, the development of drug delivery, separation and diagnostic platforms which are structure immunoglobulin and alternative technological researches.

In this study, P(IgG-co-HEMA) cryogel column has been prepared for the separation and purification of neonatal FcRn receptor from the human placenta. In this direction, the sections that have, extracted from epithelium cells of placenta, especially from syncytiotrophoblasts, have homogenized by Triton X 100. Then, these paration of FcRn receptor has carried out by Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) using P(IgG-co-HEMA) cryogel column starting point that the interaction of IgG-FcRn receptor realizes at acidic pH but not at physiological pH.

Keywords: FcRnreceptor, IgG, cryogel, FPLC

TEŞEKKÜRLER

Tez çalışmamın her aşamasında engin bilgilerinden yararlandığım, her konuda benden yardımını ve desteğini hiç esirgemeyen, daima örnek aldığım, çok kıymetli ve sevgili danışman hocam Prof. Dr. Arzu ERSÖZ'e; tezimin gerçekleştirilmesindeki bilimsel, maddi ve manevi destekleri, sonsuz özveri ve anlayışından dolayı, saygı ve şükranlarımı sunarım.

Hayata ve bilime olan sevgisiyle bana örnek olan, çok sevgili Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü Prof. Dr. Rıdvan SAY'a; tezimin konu seçiminden yürütülmesine kadar her aşamada büyük bir içtenlikle gösterdiği emek ve desteğinden dolayı, sonsuz teşekkürü borç bilirim.

Laboratuvar çalışmalarında ve deneylerimde Fen Fakültesi Kimya Bölümü laboratuvarları olanaklarından yararlanmamızı sağlayan Kimya Bölüm Başkanı Prof. Dr. Adnan ÖZCAN' a teşekkür ederim.

Tezimin her aşamasında bilgilerini ve tecrübelerini benimle paylaşan, güler yüzlerini benden esirgemeyen Sayın Yard. Doç. Dr. Ayça ÖZCAN' a, Yrd. Doç. Dr. Sibel EMİR DİLTEMİZ' e, Yrd. Doç. Dr. Serpil ÖZKARA YAVUZ' a, Sayın Araş. Gör. Özlem BİÇEN ÜNLÜER, Elif Mine ÖNCÜ, Rasime DEMİREL' e, katkılarından dolayı minnet duyduğumu belirtmek isterim.

Yüksek lisans öğrenimim boyunca destekleriyle hep yanımda olan ve yardımlarını esirgemeyen Özlem YALÇINKAYA, Okan USLU, Almila ŞENAT, Ender KÖSE, Nilgün ŞİDE, Gülden TERZİCİ, Gürkan YILMAZ ve tüm arkadaşlarıma,

Bu süreçte yanımda olan, desteğini ve sevgisini hiç esirgemeyen, hoşgörü, sabır ve tüm içtenliğiyle her zaman beni destekleyen Doruk ONSOY' a,

Tüm hayatım boyunca maddi ve manevi yardımlarıyla hep yanımda olan, her zaman hoşgörü, sabır ve içtenlikle beni destekleyen çok değerli ANNEM, BABAM ve KARDEŞİM'e,

Sonsuz teşekkürler ve sevgilerimi sunarım.

Temmuz 2012

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜRLER.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALARI DİZİNİ.....	xii
1.GİRİŞ	1
1.1. Proteinler.....	3
1.1.1. Proteinlerin Yapısındaki Bağlar.....	3
1.1.2. Protein Moleküllerinin Yapısı.....	5
1.1.3. Proteinlerin Özellikleri.....	9
1.1.4. Proteinlerin Biyolojik Rollerine Göre veya Fonksiyonel Olarak Sınıflandırılması.....	10
1.1.5. Proteinlerin Yapılarına Göre Sınıflandırılması.....	12
1.2. İmmunoglobulinler.....	14
1.2.1. IgG.....	16
1.3. Reseptör Proteinler.....	17
1.3.1. Sitoplazmik Reseptörler.....	18
1.3.2. Hücre Yüzey Reseptörleri.....	18
1.3.3. Çekirdek Reseptörleri.....	22
1.4. FcRn Reseptörü.....	24
1.5. Protein Saflaştırma Yöntemleri.....	26
1.5.1. Kromatografik Yöntemler.....	27
1.5.2. Elektroforez Yöntemleri.....	29
1.5.3. Kütle Spektroskopisi.....	32
1.5.4. Enzyme- linked İmmunosorbent Assay (ELISA).....	32
1.5.5. Santrüfugasyon Yöntemleri.....	33
1.6. Kriyojel.....	33
1.6.1. Jel ve Kriyojel Arasındaki Farklılıklar.....	35

1.6.2.Kriyojellerin Uygulama Alanları.....	37
1.6.3. Kriyojel Karakterizasyonu.....	38
2.MATERYAL VEYÖNTEM	40
2.1. Materyal.....	40
2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	40
2.1.2. Kullanılan Cihazlar.....	40
2.1.3. Hızlı Protein Sıvı Kromatografisi (FPLC).....	41
2.1.4. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM).....	42
2.2. Yöntem.....	46
2.2.1. P(IgG- co- HEMA) Kriyojel Kolon Hazırlanması.....	46
2.2.1.1.P(IgG-co-HEMA) Kriyojel Kolon Karakterizasyon.....	
İşlemleri.....	47
2.2.2. İnsan Plasentasından FcRn Reseptörlerin Saflaştırılması.....	48
2.2.2.1.İnsan Plasentasının Homojenizasyon İşlemi.....	48
2.2.2.2. İnsan Plasentasından FcRn Reseptörlerinin Kromatogra- fik Ayrımı.....	49
2.2.2.3. Saflaştırılan FcRn Reseptörlerinin Karakterizas- yon İşlemi.....	50
2.2.3.Adsorpsiyon- Desorpsiyon Çalışmaları.....	53
2.2.3.1.IgG Tutturulmuş Kriyojellerin FcRn Adsorpsiyonuna pH Etkisi.....	54
2.2.3.2. P(IgG-co-HEMA) kriyojellerinFcRnAdsorpsiyonuna Akış Hızının Etkisi.....	54
2.2.3.3.IgG Tuturulmuş Kriyojellerden FcRn Reseptörleri Desorpsiyon.....	54
3. SONUÇLAR, TARTIŞMA VE ÖNERİLER	55
3.1. P(IgG-co-HEMA) Kriyojel Kolon Karakterizasyonu.....	55
3.1.1. Şişme Testi.....	55
3.1.2. Yüzey Morfolojisi Analizi.....	56
3.1.3. BET Yöntemi ile Yüzey Alanı Ölçümü.....	58

3.1.4. FT-IR Analizi.....	59
3.2. IgG İmmobilize Kriyojellerde Adsorpsiyon Çalışmaları.....	61
3.2.1. FcRn Reseptörlerin Başlangıç Derişiminin Etkisi.....	61
3.2.2. pH Etkisi.....	62
3.2.3. Akış Hızı Etkisi.....	63
3.2.4. Adsorpsiyon İzotermi.....	63
3.2.5. Kriyojel Gözeneklerine Tutturulmuş IgG moleküllerinin FcRn Reseptörü Bağlanma Etkinliğinin Ölçülmesi.....	67
3.2.6. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik.....	69
3.3. İnsan Plasentasından FcRn Reseptörlerinin Saflaştırılması.....	70
3.3.1 İnsan Plasentasından FcRn reseptörlerin Kromatografik Ayırımı....	70
3.3.2 Saflaştırılan FcRn reseptörlerin Karakterizasyonu.....	73

KAYNAKLAR

75

ŞEKİLLER DİZİNİ

1.1. Proteinlerdeki peptit bağlarının gösterimi.....	4
1.2. Proteinlerdeki di-sülfid bağlarının gösterimi.....	4
1.3. Proteiblerdeki hidrojen bağlarının gösterimi.....	5
1.4. Proteinlerin primer yapısı.....	6
1.5. Proteinlerin Sekonder Yapısı.....	7
1.6. Proteinlerin Tersiyer Yapısı.....	8
1.7. Proteinlerin Kuarterner Yapısı.....	9
1.8. IgG molekülünün yapısının şematik olarak gösterimi.....	17
1.9. Hücre yüzey reseptörlerinin şematik olarak gösterilmesi; a) iyon kanallı bağlanmış reseptörler b) G protein bağlanmış reseptörler c) enzim bağlanmış reseptörle.....	19
1.10. İyon kanallı reseptörlerin şematik gösterimi.....	20
1.11. G-protein bağlanmış reseptörlerin şematik gösterimi.....	21
1.12. Enzim bağlanmış reseptörlerin şematik gösterimi.....	22
1.13. Çekirdek reseptörlerinin şematik gösterimi.....	23
1.14. Plasenta epitelyum dokusunda IgG-FcRn etkileşimi.....	24
1.15. Yetişkin insan bağırsağında IgG-FcRn etkileşimi.....	25
1.16. Merkezi sinir sistemi kan beyin bariyeri epitelyum dokusunda IgG-FcRn etkileşimi.....	26
1.17. AfiniteKromatografisi.....	29
1.18. Elektroforezde kullanılan materyaller.....	30
1.19. Kriyojel oluşum Süreci.....	35
1.20. Farklı şekillerde üretilen kriyojeller.....	36
1.21. Kriyojellerin süngerimsi gözenek şekli.....	37
1.22. Kan hücrelerinin kromatografik olarak kriyojel kolondan geçirilmesi.....	38
2.1. Taramalı elektron mikroskobu optik kolonun çalışma mekanizmasının şematize edilmesi.....	44
2.2. Taramalı elektron mikroskobunda görüntü oluşumunu sağlayan elektron tabancalarının şematik gösterimi.....	45
2.3. SEM cihazında elektron ışık demeti çeşitlerinin şematik gösterimi.....	45
2.4. Fotosensitif P(IgG-co-HEMA) kriyojel sentezinin şematik gösterimi.....	47

2.5. İnsan Placentasından FcRn reseptörlerinin FPLC cihazı ile ayırımının şematik gösterimi.....	50
3.1. Farklı büyütme oranlarında P(HEMA) kriyojel SEM görüntüleri A) 100X; B)200X; C)500X; D)1007 X.....	56-58
3.2. Gözeneklerine IgG tuturulmamış ve tuturulmuş P(HEMA) kriyojelin FTIR spektrumu.....	60
3.3. P(IgG-co-HEMA) kriyojel kolon gözeneklerine tuturulan IgG moleküllerinin FcRn başlangıç derişimi ile değişimi.....	62
3.4. FcRn adsorpsiyonuna pH etkisi.....	63
3.5. FcRn molekölü için Langmuir Adsorpsiyon Modeli.....	65
3.6. FcRn reseptörleri için Freundlich Adsorpsiyon Modeli.....	66
3.7. FcRn bağlamasına ilişkin Scatchard grafiği.....	68
3.8. Kriyojel gözeneklerine adsorplanan IgG moleküllerin rejenerasyonu.....	69
3.9. FPLC cihazında P(IgG-co-HEMA) kriyojel kolon kullanılarak FcRn reseptörlerinin ayırım kromatogramı.....	71
3.10. SDS-PAGE yöntemi ile saflaştırılan FcRn karakterizasyonu.....	74

ÇİZELGELER DİZİNİ

3.1. Kriyojel gözeneklerine tutturulmuş IgG moleküllerinin FcRn adsorpsiyonunu gösteren Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon izotermlerinin karşılaştırılması.....	66
3.2. FcRn reseptörlerinin kromatografik ayırma verileri.....	72

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

IgA:	İmmunoglobulin A
IgD:	İmmunoglobulin D
IgE:	İmmunoglobulin E
IgG:	İmmunoglobulin G
IgM:	İmmunoglobulin M
SEM:	Taramalı Elektron Mikroskopu
FPLC:	Hızlı Protein Sıvı Kromatografisi
p(HEMA):	PoliHidroksi Etil Metakrilat
HEMA:	Hidroksi Etil Metakrilat
MBDDM:	Metilen Bisakrilamid
APS:	Amonyum Persülfat
TEMED:	Tetrametilen Etilen Diamin
MHC:	MajörHistokompatibite Kompleksi
CNS:	Merkezi Sinir Sistemi
ELISA:	Enzyme- linkedİmmunosorbentAssay
BET:	Gözenek Alanı Tayin Yönyemi

1.GİRİŞ

Biyolojik zenginliklerin biyoteknolojik ürünlere dönüştürülmesi 1990'lı yıllarda ivme kazanmıştır. Günümüzde ise, sağlık sektöründe katma değeri yüksek ürünlere dönüşebilecek teknolojik araştırmalar arasında yerini almaktadır. Biyoteknoloji, yapılan bilimsel çalışmaların kısa sürede sağlık ürünlerine dönüştürülmesiyle birlikte bir anlamda kendi talebini kendi yaratır hale gelmiştir. Enzim, antikor, protein gibi biyolojik materyallerin canlı dokulardan ayırımı ve saflaştırılması sonucunda vücut döngüsünün işleyişi daha iyi anlaşılmış ve hastalıkların tanı ve tedavilerinde yeni nesil biyolojik materyaller kullanılmaya başlanmıştır. Biyoteknoloji ve nanoteknolojinin biyomedikal arenaya uygulanması yeni teşhis ve tedavi edici sistemlerin geliştirilmesinde oldukça büyük potansiyele sahiptir. Bu teknolojinin gelişmesiyle hastalık ve risk şartlarının erken tanımlanması, daha az zarar ve daha kısa sürede iyileşme zamanının sağlanması ve daha düşük fiyatla daha kabul edilebilir sağlık-bakım sağlanması mümkün olacaktır.

Bağışıklık sağlayıcı proteinlerden olan immunoglobulin ailesine, yüksek seçicilik gösteren protein A molekülü, *Staphylococcus aureus* (S. aureus) bakterisinin hücre duvarından saflaştırılmaktadır. S. aureus gram pozitif bakterisi olup hastanelerde çokça görülmekte ve üremesini engellemek için katı önlemler alınmaktadır. Bu nedenle; immunoglobulin G (IgG) molekülüne afinite gösteren ve hiçbir toksik etkisi olmayan Fc reseptörlerin memeli dokusundan izole edilmesi büyük önem taşımaktadır. Ayrıca ticari olarak temin edilebilen protein A molekülünün maliyeti çok yüksektir. Tüm bunlara ek olarak Fc reseptörleri merkezi sinir sisteminde kan-beyin bariyerinin endotel hücrelerinde bulunurlar. Beyinde bulunan amiloid plakların beyin bariyerindeki girişlerin tıkanması sonucu ortaya çıkan Alzheimer, Parkinson gibi merkezi sinir sistemi hastalıklarının tedavisinde kullanılabilirlikleri araştırılmaktadır. Fc reseptörler, devam etmekte olan çalışmalara ciddi bir alternatif oluşturarak merkezi sinir sistemi hastalıklarının engellenmesi ve Alzheimer hastalarının tedavisinde çığır açacak niteliktedir.

Fc reseptörleri, bazı ilaçlarla konjuge olarak kan dolaşımına katılır ve ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılırlar. Bu nedenle, Fc reseptörlerin nano boyuta getirilerek ilaç taşıma sistemi olarak kullanılmasının sağladığı yararlar bakıldığında: 1) Çözünürlüğü düşük etkin maddeleri çözünür hale getirmekte ve böylece biyoyararlanımlarını arttırmaktadırlar, 2) Gerekli bölgede etkin maddenin toplanabilmesini sağlamak için vücutta yeterli derecede uzun bir süre kalabilmektedirler, 3) Nanometre boyutlarında büyüklüğe sahip olmaları, onların zayıf damarlanmanın olduğu bölgelerde birikmelerine olanak sağlamaktadır, 4) Spesifik ligandlar bağlanarak hedeflendirilebilmektedirler, 5) Büyük miktarlarda, kolaylıkla ve tekrarlanabilir bir şekilde üretilmektedirler, 6) İçlerindeki etken maddeyi biyolojik ortamda inaktivasyondan koruyabilmektedirler ve istenmeyen yan etkiler gözlenmemektedir.

Tez kapsamında yapılan çalışmada, ilk aşamada insan plasentasının epitelyum dokusunda bulunan sinsitiyotrofoblastlardan kesitler alınarak, Triton X 100'de homojenizasyonu sağlanmıştır. Daha sonra; makro gözeneklerine IgG tutturulmuş fotosensitif kriyojel kolon hazırlanmıştır. Hazırlanan bu kriyojel kolonun içerisine gömülen IgG proteinin yapısında bulunan Fc bölgesi ile plasentadan homojenize edilen FcRn reseptörlerinin etkileşimi ile ayırımı ve saflaştırılması hedeflenmiştir. FcRn reseptörlerinin hamilelik sırasında anneden fetüse bağışıklık sağlayıcı IgG moleküllerinin geçmesine aracılık etmeleri, kan beyin bariyerini kolaylıkla aşabilmeleri, yetişkinlerde ise bağırsak lumenlerinden immunoglobulinlerin geçişini sağlamaları nedeniyle ayırım ve saflaştırılması son derece önemlidir. Bu amaçla; fotosensitif yolla sentezlenmiş IgG kriyojel kolonlar katı destek materyali olarak kullanılarak hızlı protein sıvı kromatografisi (FPLC) cihazı ile FcRn reseptörlerinin insan plasentasından ayırımı gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın sonunda; elde edilen verilere göre FPLC cihazı ile IgG kriyojel kolon kullanılarak insan plasentasından ayırımı sağlanan FcRn reseptörlerinin standart FcRn reseptörler ile kıyaslandığında daha az maliyetle ve yüksek saflıkta elde edildiği gözlemlenmiştir.

1.1 Proteinler

Proteinler, aminoasitlerin belirli türde, belirli sayıda ve belirli diziliş sırasında karakteristik düz zincirde birbirlerine kovalent bağlanmasıyla oluşmuş polipeptitler ve aminoasitlerin polimerleridirler. 20 standart aminoasit, protein yapısının dilinin yazıldığı bir alfabe gibi düşünülebilir; böylece tür olarak çok sayıda protein olduğu anlaşılır ki yeryüzünde bütün canlılardaki protein türlerinin bir milyon kadar olduğu tahmin edilmektedir [1, 2].

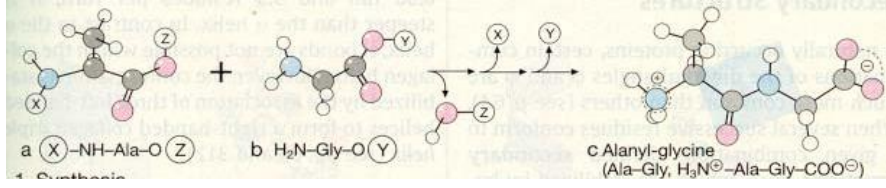
Proteinler, bütün hücrelerde ve hücrelerin bütün kısımlarında bulunurlar; bir bakteri hücresinde yaklaşık 4000 tür protein bulunmaktadır. Proteinler, inanılmaz derecede birçok işlev görürler; yaşamsal bütün işlevler proteinlere bağlıdır. Enzimler ve polipeptit hormonlar, metabolizmanın düzenlenmesinde önemlidirler. Kastaki kontraktıl proteinler hareketi, kemikteki kollajen ise kalsiyum fosfat kristallerinin depolanmasını sağlar. Kanda albümin ve hemoglobin taşıma görevi alırken; immünoglobülinler bakteri ve virüslerin yıkılmasında görev alırlar [1].

1.1.1. Proteinlerin yapısındaki bağlar

Proteinlerin yapılarında kovalent bağlar ve kovalent olmayan bağlar bulunmaktadır. Proteinlerin yapılarında bulunan **A.kovalent bağlar**, peptit bağları ve disülfid bağları; **B.kovalent olmayan bağlar** ise hidrojen bağları, iyon bağları ve hidrofob bağlar (apolar bağlar)'dır[2].

A) Kovalent Bağlar,proteinlerin yapısında bulunan kovalent bağların alt grubu olan peptit bağları ve disülfid bağlarına aşağıda kısaca değinilmektedir.

- Peptit bağları (Şekil 1.1), bir amino asidin α -karboksil karbonu ile bir başka amino asidin α -amino azotu arasında oluşan **C-N** bağlarıdır:

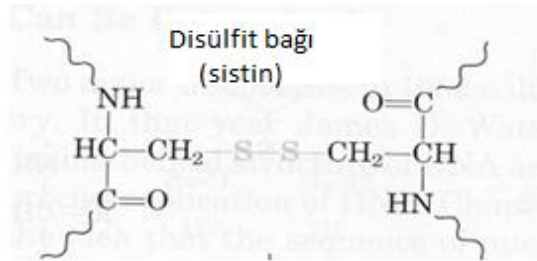


Şekil 1.1. Proteinlerdeki peptit bağlarının gösterimi[2]

Peptit bağının uzunluğunun C=N çift bağının uzunluğundan büyük, C-N tek bağının uzunluğundan küçük olması nedeniyle bu bağın kısmen çift bağ olduğu kabul edilir[3].

- Disülfid bağları(Şekil 1.2), iki sistein kalıntısı arasında, sülfhidril (tiyol, -SH) gruplarının H kaybetmeleri sonucu oluşan S-S bağlarıdır.

Disülfid bağlarının bir protein molekülünün şeklinin oluşmasında ve korunmasında önemli etkisi vardır. Disülfid bağları, bir polipeptit zinciri içerisinde kurulabilir veya çeşitli polipeptit zincirlerinin birbirine bağlanmasını sağlayabilir. Disülfid bağları, ribonükleaz, oksitosin ve vazopressinde aynı polipeptit zincirinde bulunur; insülinde ise iki ayrı polipeptit zincirini birbirine bağlar [2,3].

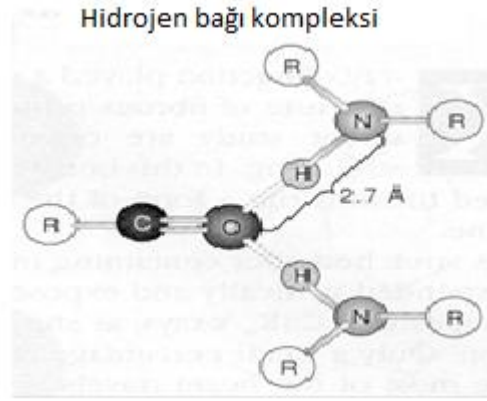


Şekil 1.2. Proteinlerdeki disülfid bağlarının gösterimi [3]

B) Kovalent Olmayan Bağlar, proteinlerin yapısında bulunan kovalent olmayan bağların alt grupları aşağıda kısaca açıklanmıştır;

- Hidrojen bağları (Şekil 1.3), polipeptit zinciri oluşturan peptit bağlarındaki rezonans veya mezomeri durumu nedeniyle, oksijenlerin bilinen keto gruplarından daha negatif, azotların ise pozitif özellik taşımasının sonucu olarak, bir polipeptit zincirdeki bir peptit düzleminde bulunan oksijen atomu ile bir başka peptit bağı

veya düzlemindeki azot atomu arasında aradaki uzaklık yaklaşık $2,7 \text{ \AA}$ olduğunda, hidrojen köprüsü şeklinde ($\text{C}=\text{O}\cdots\text{H}\cdots\text{N}$) oluşan bağlardır:



Şekil 1.3. Proteinlerdeki hidrojen bağlarının gösterimi [2]

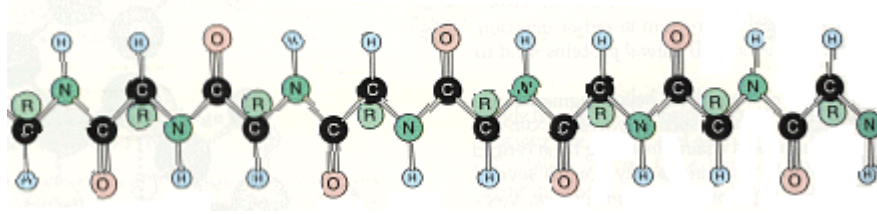
- **İyon bağları**, polipeptit zincirlerindeki asidik ve bazik aminoasit kalıntılarının fonksiyonel gruplarının fizyolojik pH'da tamamen veya kısmen iyonlaşmış halde bulunmalarının sonucu olarak, elektronegatif ve elektropozitif gruplar arasında gelişen **elektrostatik çekim kuvveti** ile ($\text{COO}^- \cdots \text{H}_3\text{N}^+$) oluşan bağlardır [4].
- **Apolar bağlar (hidrofob bağlar)**, polipeptit zincirindeki amino asit kalıntılarının metil grubu, alifatik grup, siklik grup gibi apolar kısımlarının birbirlerine yeter derecede yakın olmaları halinde geçici bir polarite göstermelerinin sonucu ortaya çıkan ve **Van der Waals-London çekme kuvveti** diye bilinen zayıf çekme kuvveti ile ($\text{CH}_3 \cdots \text{CH}_3$) oluşan bağlardır. Hidrofobik etkileşimler gerçek bağ değildirler. Elektron paylaşımı yoktur. Hidrofobik etkileşimler, proteinlerin iç kısımlarının kararlı olarak devamlılığının sağlanmasında rol oynar [3-5].

1.1.2. Protein moleküllerinin yapısı

Proteinlerin molekül yapıları incelendiğinde dört alt birimde toplandığı bulunmuştur. Bunlar primer (birinci), sekonder (ikinci), tersiyer (üçüncü) ve

kvarterner (Dördüncü) yapılarıdır. Bu dört yapı aşağıda ayrıntı bir şekilde incelenmiştir:

- **Primer (Birinci) Yapısı**, bir proteinin primer (birinci) yapısı (Şekil 1.4), bir protein için karakteristik ve genetik olarak tespit edilmiş olan amino asit dizilişidir; belirli türde, belirli sayıda, belirli diziliş sırasında amino asitlerin birbirlerine peptit bağlarıyla bağlanarak oluşturdukları bir polipeptit zinciri biçimindeki yapısıdır:



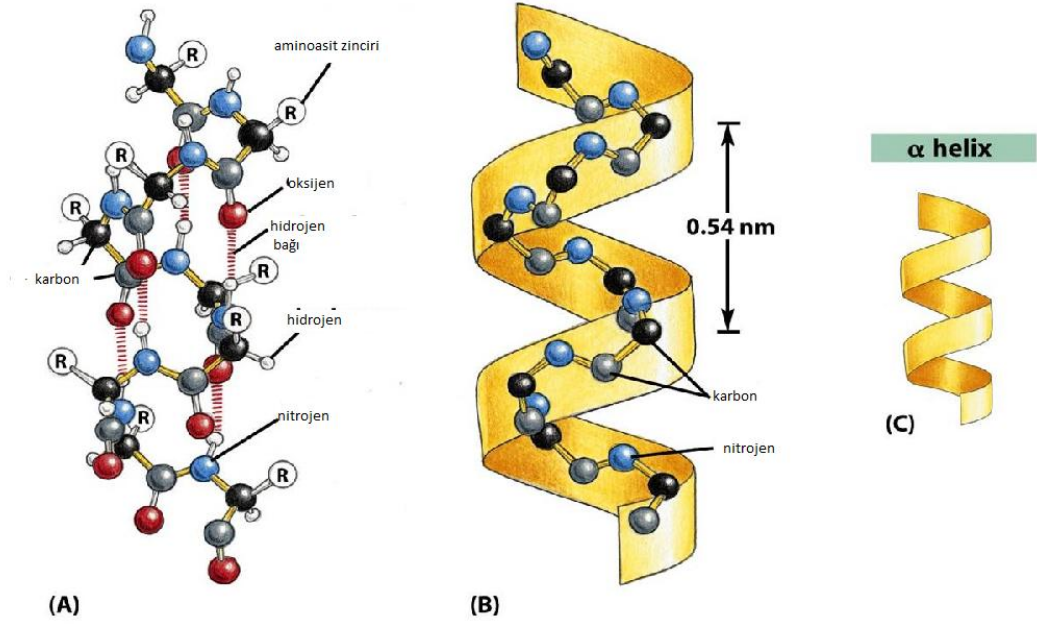
Şekil 1.4. Proteinlerin primer yapısı [2]

Bir proteinin primer yapısının oluşmasını ve sürdürülmesini sağlayan, peptit bağlarıdır. Bir proteinin primer yapısında, peptit bağları ile birbirine tek bağlarla bağlı bir atomlar zinciri oluşmuştur; diğer atom ve kalıntılar bu atomlar zincirinin dışında ve değişik yönlerde bulunurlar [2].

- **Sekonder (İkinci) Yapısı**, bir proteinin sekonder (ikinci) yapısı (Şekil 1.5), yarı sertleşmiş polipeptit zincirlerinin bükülmeler ve katlanmalarla oluşturdukları özgün kangallar biçimindeki yapısıdır.

Bir proteinin sekonder yapısının oluşmasını ve sürdürülmesini sağlayan, primer yapı ile meydana gelen polipeptit omurgasının özelliği ve yan bağlardan özellikle hidrojen bağlarıdır.

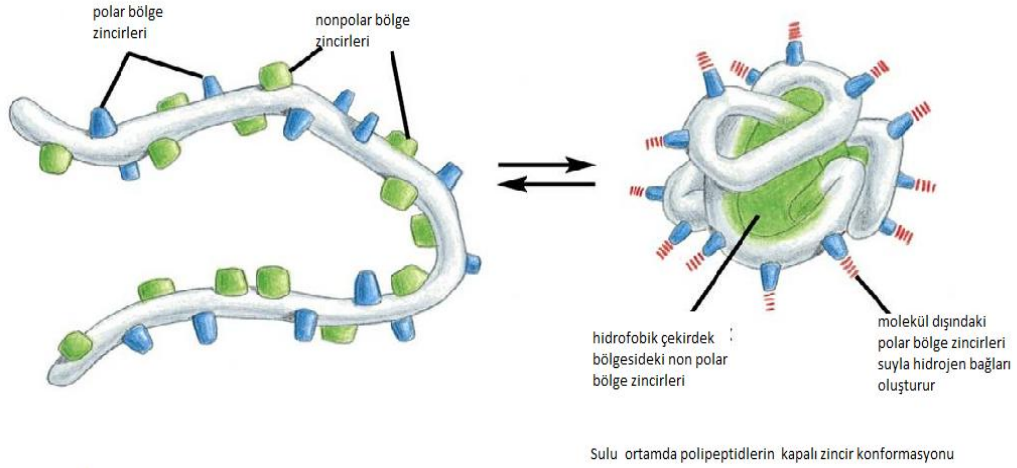
Bir proteinin primer yapısı, yani polipeptit zinciri omurgası oluşur oluşmaz, özgün diziliş sırasındaki aminoasit kalıntılarının R- yan gruplarından uzanan özel kimyasal gruplar, özgün olarak yönelim göstermektedirler. Proteinler için, **gelişi güzel kangallanım**, **α -heliks yapısı** ve **β -konformasyonu** veya **kırmalı tabaka yapısı** olmak üzere üç değişik sekonder yapı tanımlanmaktadır [2,4,6].



Şekil 1.5. Proteinlerin Sekonder Yapısı[6]

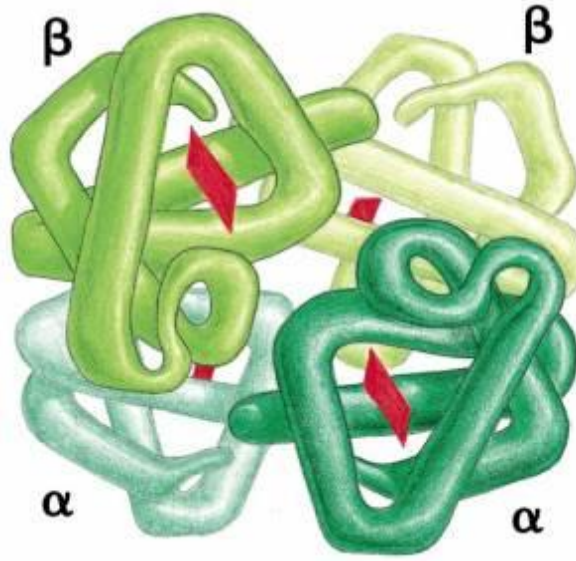
- **Tersiyer (Üçüncü) Yapısı**, bir proteinin tersiyer (üçüncü) yapısı (Şekil 1.6), polipeptit zincirinin, sekonder yapı oluşumundan sonra, daha önce açıklanan bağlayıcı güçlerin hepsinin toplamı ile uzayda daha ileri yönelimler veya lifler halinde düzenlenme sonucu oluşan globüler veya fibriler yapısıdır.

Bir proteinin tersiyer yapısının oluşmasına ve bu yapının sürdürülmesine, primer ve sekonder yapının oluşmasına katılan bağlardan başka Van der Waals çekimleri ve iyon bağları da katılır. Böylece, üç boyutlu, tam konformasyonlu ve yoğunlaşmış protein molekülü meydana gelir [7,8].



Şekil 1.6. Proteinlerin Tersiyer Yapısı[7]

- **Kuartern (Dördüncü) Yapısı**, bir proteinin kuartern (dördüncü) yapısı, primer (Şekil 1.7), sekonder ve tersiyer yapıya sahip polipeptit zincirlerinin daha büyük yapıları agregatlar halinde bir araya gelmesiyle oluşan yapıdır. Her proteinin kuartern yapısı olmayabilir, fakat molekül ağırlığı 100.000'nin üzerinde olan bir protein genellikle kuartern yapıya sahiptir. Bir proteinin kuartern yapısını oluşturan polipeptit zincirlerinin her birine alt birim veya **monomer** denir; bu monomerler, hidrojen bağları, Van der Waals çekmeleri ve iyon bağları etkisiyle polimerize olmuşlardır. Bir proteinin kuartern yapısını oluşturan monomerlerin tersinir düzleşmeleri veya ayrılmaları, konformasyon değişikliğine yol açar. Proteinlerin spesifik biyolojik fonksiyonları bunların konformasyonlarına bağlı olduğundan, konformasyonda meydana gelen değişiklik, proteinin biyolojik aktivitesinin kaybolmasına neden olabilir [8].



Şekil 1.7. Proteinlerin Kuarterner Yapısı[8]

1.1.3. Proteinlerin özellikleri

Proteinlerin genel özellikleri aşağıda verildiği şekilde sıralanabilir:

- 1) Proteinler, çeşitli etkilerle denatüre olurlar.
- 2) Proteinler, amfoter maddeler yani amfoter elektrolit veya amfolittirler. Proteinler, amfolit olma özellikleriyle ilgili olarak da çeşitli özelliklere sahiptirler. Proteinlerin;
 - a) Hem baz hem asit bağlama,
 - b) Hem negatif iyon hem pozitif iyon bağlama,
 - c) Su bağlama ve bağlı suyu verme,
 - d) Elektriksel alanda farklı hızlarda göç etme özelliği bulunmaktadır.
- 3) Proteinler, polipeptit zincirindeki peptit bağlarının su girişi ile yıkılması sonucu hidroliz olurlar [1].

1.1.4. Proteinlerin biyolojik rollerine göre veya fonksiyonel olarak sınıflandırılmaları

Proteinler biyolojik rollerine göre veya fonksiyonel olarak katalitik proteinler, taşıyıcı proteinler, besleyici proteinler, kontraktil proteinler, yapısal proteinler, savunma proteinleri, düzenleyici proteinler ve diğer proteinler olmak üzere sekiz gruba ayrılmaktadırlar. Bu sekiz grup aşağıda kısaca incelenmektedir:

- **Katalitik proteinler**, biyokimyasal reaksiyonları katalize eden enzimler, yüksek derecede spesyalize proteinlerdir. Amilaz, pepsin, lipaz önemli katalitik protein veya enzim örnekleridirler[1,5].
- **Taşıyıcı proteinler (transport proteinleri)**, spesifik molekülleri veya iyonları bağlayıp bir organdan bir başka organa veya hücre membranının bir tarafından diğer tarafına transport eden proteinlerdir. Serum albümin, en iyi bilinen taşıyıcı proteindir; bilirubin, kalsiyum, yağ asitleri ve birçok ilaç serum albümine bağlanarak taşınır. Hemoglobin, oksijen taşıyan; lipoproteinler, lipid taşıyan; transferrin, demir taşıyan önemli taşıyıcı protein örnekleridirler. Bütün organizmaların plazma membranlarında ve intrasellüler membranlarında bulunan taşıyıcı proteinler, glukoz, aminoasitler ve diğer maddeleri bağlarlar; bunları membranın bir tarafından diğer tarafına taşırlar[5].
- **Besleyici ve depo proteinler**, yumurta akının esas proteini ovalbümin, sütün esas proteini kazein besleyici proteinlerdir; birçok bitki tohumu da çimlenen tohumun büyümesi için gerekli besleyici proteinleri depolamıştır. Ferritin, demir depolayan proteindir.
- **Kontraktil proteinler**, kasılabilen veya kendiliğinden hareket edebilen proteinlerdir. Miyozin ve aktin, iskelet kaslarının kontraktil sisteminde ve aynı zamanda birçok kas olmayan hücrede işlev görmektedir. Tubulin, mikrotubilleri oluşturan proteindir. Hücrelerde bulunan mikrotubuller, hücreleri yürütmek için kamçı ve kirpiklerdeki dynein proteini ile birlikte hareket eder[6].
- **Yapısal proteinler**, tendonların ve kıkırdığın temel yapı taşıdır ve çok yüksek gerilme gücüne sahip kollajen oluşturmaktadırlar. Örneğin; kösele, hemen hemen saf kollajendir. Ligamentler, iki boyutta gerilme yeteneğinde bir yapısal

protein olan elastin içerirler. Saç, tırnak ve tüyler, keratin içerirler. İpek liflerinin ve örümcek ağlarının esas komponenti fibroindir. Bazı böceklerin kanat eksenleri, resilinden yapılmıştır[5].

- **Savunma (defans) proteinleri**, organizmaları diğer türler tarafından istilaya karşı savunan ve hasardan koruyan proteinlerdir. İmmüoglobülinler, omurgalıların lenfositleri tarafından yapılan, spesialize (özüğüleşmiş) proteinlerdir; organizmayı istila eden bakterileri, virüsleri veya başka türe ait yabancı proteinleri (antijenler) tanıyabilirler ve presipite edebilirler (çöktürebilirler) veya nötralize edebilirler. Fibrinojen ve trombin gibi kan pıhtılaşma proteinleri, vasküler sistem yaralandığında yaralanan yerin kan pıhtısı ile kapatılarak kan kaybının önlenmesini sağlarlar. Yılan zehirleri, bakteriyel toksinler ve risin gibi toksik bitki proteinleri, aynı zamanda savunucu fonksiyonlara sahip gibi görünmektedirler [5,6].

Savunma proteinlerinin fibrinojen, trombin ve bazı zehirler dahil bazıları, aynı zamanda enzimdirler.

- **Düzenleyici proteinler**, sellüler düzenleme veya fizyolojik aktiviteye yardım eden proteinlerdir. İnsülin, büyüme hormonu gibi bazı hormonlar, düzenleyici proteinlerdir; insülin, şeker metabolizmasının düzenlenmesinde etkilidir; büyüme hormonu ise büyümenin düzenlenmesinde etkilidir. Birçok hormonal sinyal için sellüler yanıt, sıklıkla G proteinler denen, GTP-bağlayan proteinler sınıfı aracı olur. Bazı düzenleyici proteinler, DNA'yı sarar; enzimlerin ve RNA moleküllerinin biyosentezini düzenlerler.
- **Diğer proteinler**, fonksiyonları henüz daha fazla bilinmeyen ve kolayca sınıflandırılmayan çok sayıda proteindir [4, 5].

1.1.5. Proteinlerin yapılarına göre sınıflandırılması

Proteinler yapılarına göre üç temel grupta sınıflandırılmaktadırlar. Bunlar basit, bileşik ve türev proteinlerdir. Aşağıda bu üç grup hakkında temel bilgiler verilmektedir:

A) Basit Proteinler, yalnızca aminoasitlerden oluşmuştur; hidroliz olduklarında sadece amino asitleri veren, polipeptit zincirleri yapısındaki proteinlerdir. Basit proteinler, değişik niteliklerine göre alt gruplara ayrılarak incelenirler. Bunlar globüler proteinler, skleroproteinler, fibrinojenler ve miyozinlerdir.

- **Globüler Proteinler**, molekülünün üç boyutlu şekli rotasyon elipsoid biçiminde olan proteinlerdir. Globüler proteinler de albüminler, globülinler, globinler, glutelinler, prolaminler, protaminler, histonlar gibi alt gruplara ayrılırlar [5].
- **Skleroproteinler (Albüminoidler)**, suda, nötral tuz çözeltilerinde, seyreltik asit ve alkalilerde ve saf alkolde çözünmezler; pepsin ve tripsin gibi enzimlere dirençlidirler; hayvansal kaynaklıdır. Boynuz, kıl, yün, saç ve tırnaklarda bulunan keratin; bağ doku, kemik, kıkırdak ve tendomlarda bulunan, organizma proteinlerinin yarısından çoğunu oluşturan kollajen; ligament ve diğer destek dokularda bulunan elastin; ipek fibrini, önemli skleroproteinlerdir[9].
- **Fibrinojen**, kan plazması içinde çözünmüş olarak bulunur; kanın pıhtılaşması sırasında görev alır [10].
- **Miyozin**, kasta bulunur; kasın kasılmasında görev alır [11].

B) Bileşik Proteinler (Konjuge Proteinler), amino asitlerden oluşmuş polipeptit zincirlerinin prostetik grup denen yapılara bağlanmasıyla oluşmuş; hidroliz edildiklerinde amino asitlerden başka değişik nitelikte kimyasal maddelerde veren proteinlerdir. Bu proteinler glikoproteinler, proteoglikanlar, lipoproteinler, fosfoproteinler, nükleoproteinler, metalloproteinler ve kromoproteinler olmak üzere gruplara ayrılmaktadırlar. Bu yedi grup hakkındaki temel bilgilerden aşağıda söz edilmektedir:

- **Glikoproteinler**, prostetik grubu karbonhidrat olan bileşik proteinlerdir; % 1-80 arasında değişen oranda karbonhidrat içerirler. Glikoproteinlerin genellikle karbonhidrat oranı % 4'ten az olanlarına glikoprotein; % 10-20 arasında

değişenlere mukoprotein, karbonhidrat oranı proteinden fazla olanlarına mukoid adı verilir [1, 3, 8]

Tez çalışmasında kolon materyali olarak kullanılan IgG molekülü glikoprotein ailesinin bir alt sınıfı olan immunoglobulinlerin bir çeşitidir. İmmunoglobulinler ve IgG hakkında ayrıntılı bilgi Bölüm 1.2 immunoglobulinler başlığı altında verilecektir.

• **Proteoglikanlar**, %80-95 gibi çok yüksek oranda karbonhidrat içeren bileşik proteinlerdir [12].

• **Lipoproteinler**, proteinlerin lipidlerle oluşturdukları bileşik proteinlerdir; değişik oranlarda trigliserid, kolesterol ve fosfolipid içerirler. Lipoproteinler, önemli oranlarda lipid içermelerine karşın suda çözünürler, böylece kandaki lipidleri taşırlar. Lipoprotein protein kısmına apolipoprotein veya apoprotein denir. Proteinler fosfolipidlerle oluşturdukları suda çözünmeyen bileşik proteinler, proteolipidlerdir; özellikle miyelinin yapısında bulunurlar [13].

• **Fosfoproteinler**, prostetik grup olarak fosfat içeren bileşik proteinlerdir. Fosfoproteinlerde, proteinin yapısındaki serin, tirozin ve treonin gibi aminoasidi kalıntılarının hidroksil grupları fosforik asitle esterleşmiştir. Sütte kazein; yumurtada vitellin, livetin ve fosvitin; balık yumurtasında ihtulin önemli fosfoprotein örnekleridirler [14].

• **Nükleoproteinler**, protaminler, histonlar ve diğer basit proteinlerin nükleik asitlerle bağlanması sonucu oluşmuş bileşik proteinlerdir. Nükleoprotaminler, en basit nükleoproteinlerdir; nükleik asit ile proteinler, arjinin- fosfat bağı ile bağlanmıştır, balık spermalarında boldurlar. Nükleohistonlarda da nükleik asit ile proteinler, arjinin-fosfat bağı ile bağlanmıştır; balık spermalarında ve kuş eritrositlerinde boldur. Yüksek nükleoproteinler, ribozomlar, kovalent bağlı RNA-protein, DNA- protein bileşiminde sitoplazma ve mitokondrilerde bulunurlar [5].

• **Metalloproteinler**, prostetik grup olarak Fe, Cu, Zn gibi ağır metalleri içeren bileşik proteinlerdir. Demirli metalloproteinlerden ferritin ve transferin, bakırlı metalloproteinlerden seruloplazmin, önemli metalloprotein örnekleridir [5,15].

• **Kromoproteinler**, metal-porfirin kompleks sistemleri ile oluşmuş bileşik proteinlerdir. Hemoglobin, miyoglobin, sitokromlar, peroksidaz, demir içeren önemli kromoprotein örnekleridirler. [5].

C) Türev Proteinler, ilk iki protein grubunda yer alan proteinlerin belirli etkilerle değişimleri sonucu oluşan proteinlerdir; primer türev proteinler ve sekonder türev proteinler olmak üzere iki alt grupta incelenirler.

- **Primer türev proteinler**, peptit bağlarına dokunmadan, asit, baz ve ısı gibi etkilerle protein moleküllerinin değişmesi sonucu oluşmuş türev proteinlerdir; denatüre tip proteinler olarak da adlandırılırlar. Suda çözünmeyen bu proteinlerin seyreltik asitler ve enzim etkisiyle oluşanlarına protean denir; asit ve alkalilerin sürekli etkisiyle oluşanlarına metaprotein denir; kaynatma, çalkalama, UV ışınları ve etanol etkisiyle oluşanlarına pıhtılaşma protein veya koagule proteinler denir [6, 8, 15].
- **Sekonder türev proteinler**, peptit bağlarını kısmen yıkan asit veya enzimlerin etkisiyle oluşan türev proteinlerdir. Peptit bağlarının bu şekilde parçalanmasıyla protein molekülleri, gitgide daha küçük parçalara bölünürler. Böyle bir parçalanmada büyük parçalara proteoz (albüminoz) denir; küçük parçalara pepton denir; daha küçük zincirler de polipeptitler ve peptitlerdir. Sekonder türev proteinler, kaynatmakla çökelmez veya ısı ile pıhtılaşmazlar [5,15].

1.2. İmmüoglobülinler

İmmüoglobülinlerin tümü antikor değildir. Protein elektroforezinde immüoglobülinlerin çoğu γ -globulin, pek azı da γ - β arasında veya β -globulin zonunda yer alır [16]. İmmüoglobülinlerin temel yapısı Y harfine benzetilmektedir. Yapısal olarak iki ağır zincir (H) ve iki hafif zincir (L)'den oluşmaktadır. Ağır zincirler glikozil yapıdadır. Bir proteinaz olan papain ile immüoglobülinler, L zinciri ve H zincirinin N-terminal ucundan oluşan Fab ve H zincirin C-terminal kısmını oluşturan kristalleşebilen Fc kısımlarına ayrılır. Fab parçası antijenle birleşir, Fc parçası ise non-spesifik olarak Fc reseptörü taşıyan hücrelere bağlanabilir ve kompleman aktivasyonundan sorumludur. Ağır zincirler, birbirlerine ve hafif zincirlere disülfid bağları ile bağlıdırlar. IgG, IgD ve IgE tetramer yapıya sahip iken IgM ve IgA disülfid bağlarına ilaveten J peptidleri ile

de bağı multimer yapıya sahiptir. Merkezinde menteşe olarak ifade edilen bölgesi immünglobülinlere yüksek hareket imkanı sağlanmaktadır [16, 17].

H ve L zincirlerinde değişkenlik gösterebilen amino termal bir uç (V bölgesi) ile sabit bölge (C bölgesi) olan karboksi terminal kısmı bulunur. H zinciri dört alt gruba (VH, CH1, CH2, CH3) ve L zinciri iki alt gruba (CL and VL) ayrılır. Ayrıca H zincirlerinin C bölgesindeki antijenik farklılıklarına göre 5 ayrı izotipe ayrılır; (γ , α , μ , δ ve ϵ olmak üzere, L zincirleri ise kappa (κ) veya lambda (λ) olmak üzere iki tipte bulunurlar. Antikorlar IgG(γ), IgM(μ), IgA(α), IgE(ϵ) ve IgD(δ) olmak üzere 5 izotip olarak ayrılan immünglobülinlerden oluşmuştur [16-20].

İmmünoglobülinlerin çeşitleri ve biyolojik aktiviteleri incelendiğinde IgA, IgM, IgD, IgE, IgG moleküllerinden söz etmek gerekir. Bu beş immunoglobulin sırasıyla incelendiğinde;

- **IgA**, Peyer plakların submukozası, tonsil ve submukozal lenfoid dokudaki B hücrelerinden üretilmektedir. Mol ağırlığı monomer için 160 kilo dalton (kD), dimer için 400 kD olan, plazmada % 90 monomer formunda ve vücut sekresyonlarında hemen tamamen dimer olarak bulunan bir immünglobülinidir. Çok az bir kısmı da polimer olarak bulunabilir. Plazmadaki total immünglobülinlerin % 10–15 kadarını IgA oluşturur. IgA'nın antijenik farklılık gösteren IgA1 ve IgA2 olmak üzere 2 alt sınıfı bulunduğu saptanmıştır [21-23]. IgA antikorları hem dolaşımda, hem de dokularda bulunur. IgA, esas itibarıyla mukoza sekresyonlarının major immünglobülinidir ve bu nedenle; sekresyon (mukus) ile örtülü dış yüzeylerde organizmanın lokal immun savunmasından sorumludur. Gözyaşı, tükürük, trakea, bronş, burun, vajen, barsak sekresyonları, safra ve sütte en yüksek düzeyde IgA bulunur.
- **IgM**, normal serum immünglobülinlerinin % 10'unu oluşturur. İnsanda IgM'nin, IgM1 ve IgM2 olmak üzere iki alt sınıfı vardır. Molekül ağırlığı 900 kD kadar olan pentamerdir. J zinciri taşıyan polimerler oluşturarak poliimmünglobülin reseptörler aracılığı ile epitelyumal yüzeylere geçebilirler. Diğer antikorlar gibi, oligomerik bir proteindir; ya membrana bağlı olarak eksprese edilir veya sekrete edilen formlar şeklinde bulunur [19, 20].

- **IgD**, molekül ağırlığı yaklaşık 180 kD bir monomerdir. Plazmadaki immünglobülinlerin % 0,2–1 kadarını oluşturur. IgM ile birlikte B lenfosit yüzeyinde yer alır. IgD proteolitik enzimlere ve ısıya karşı dayanıklı değildir ve plasenta yolu ile anneden çocuğa geçmez. Asıl fonksiyonun ne olduğu iyi anlaşılamamıştır. Ancak; bazı antijenlere (insülin, penisilin, süt proteinleri, difteri toksoidi, nükleer antijenler ve tiroid antijenleri) karşı antikor aktivitesi IgD tarafından sağlandığı ve immun sistemin gelişmesinde IgD nin rolü olduğu düşünülmektedir [21-23].
- **IgE**, molekül ağırlığı 190 kD olan bir monomerdir. Total serum immünglobülinlerinin %0,004'ü IgE dir. Solunum ve sindirim mukozası IgE yapan hücrelerden zengindir ve bu mukozaların dış salgılarında IgE antikorlar bulunur. IgE sınıfı antikorlar mast hücrelerine ve bazofillere bağlanarak onları duyarlandırırlar. Alerjik hastalıkların major immünglobülinidir [22-23].

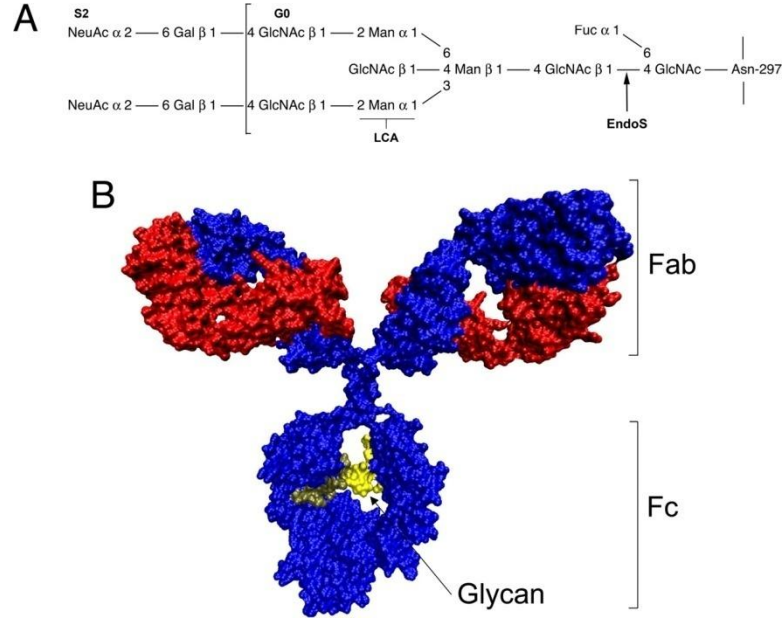
1.2.1. IgG

Tez çalışmasında IgG molekülü, Fc reseptörlerin kromatografik ayırımında kolon dolgu maddesi olarak kullanıldığı daha ayrıntılı bilgi vermesi gerekir.

IgG molekülü (Şekil 1.8), mol ağırlığı 150 kD olan bazik ünitte yapılmış monomerdir. Bu moleküller kanda dolaşan antikor moleküllerinin % 75'ini oluşturur. IgG1, IgG2, IgG3 ve IgG4 olmak üzere, antijenik farklılık gösteren 4 alt sınıf bulunduğu gösterilmiştir. Alt sınıflar arasındaki antijenik farklılıklar, disülfid bağlarının pozisyon ve sayısındaki farklılıklardan kaynaklanmaktadır. IgG1 total IgG miktarının % 60-70'ini, IgG2 % 14-20'sini, IgG3 % 4- 8'ini ve IG4 %2–6'sını oluşturur [20, 21].

IgG molekülü tripsin, papain ve pepsin ile protolitik olarak parçalanabilir. Papain ve tripsin molekülün ağır zincirini etkiler ve bir Fc parçası iki Fab parçası ortaya çıkar. Birçok hücre yüzeyinde IgG için Fc reseptörleri bulunduğu belirlenmiştir. Bu reseptörler aracılığı ile IgG molekülleri, immun kompleksin ve partiküler antijenlerin opsonizasyonunu güçlendirirler. IgG antikorları antiviral, antitoksik aktiviteye sahiptir, etkili birer opsonindirler ve işlev için komplemana

gereksinimleri yoktur. IgG yarılanma süresi plazma proteinleri arasında en uzun olanıdır ve 23 gün kadardır [22].



Şekil 1.8. IgG molekülünün yapısının şematik olarak gösterimi [21]

IgG, plasentadan geçebilen tek immünglobülinidir ve yenidoğanın ilk haftasında koruyucu etkilerini gösterir. İntrauterin yaşamda, anneden fetusa geçen IgG antikorları, doğumdan sonraki birkaç ay süresince, titreleri giderek azalmakla beraber, bebekte kalırlar. Plazmada bulunan IgG, ransüdasyon (sızma) ile eksternal sıvılara da geçebilir. Annenin emzirdiği ilk sütten (kolostrum), serumdan sızmış IgG, bebeğin bağırsak mukozasından geçerek doğumu izleyen ilk günlerde pasif bağışıklığı güçlendirir. IgG, beyin-omurilik sıvısına (BOS) enflamasyon durumunda bile, çok az miktarda geçebilir. IgG'nin enflamasyonda bile BOS'a geçişinin çok zayıf oluşu nedeniyle, ansefalit ve menenjitlerde pasif immünoterapinin yararı tartışmalıdır [23].

1.3. Reseptör Proteinler

Biyokimyada reseptör veya almaç, birbiriyle kısmen örtüşen iki anlama karşılık gelir. Birinci anlamıyla reseptör, sinyal transdüksiyonunda yer alan bir proteindir, hücre dışındaki bir sinyali hücre içine taşır. Sinyalin bir biçimden

başka bir biçime dönüşmesini sağlayan protein hücre dışında olabileceği gibi hücre içinde de olabilir. Reseptöre bağlanan moleküle ligand denir, bu bir peptit (örneğin bir nörotransmitter), bir hormon, bir ilaç, veya bir toksin olabilir. Bu bağlanma olunca reseptör biçimini değiştirir ve hücrel bir tepki meydana gelir.

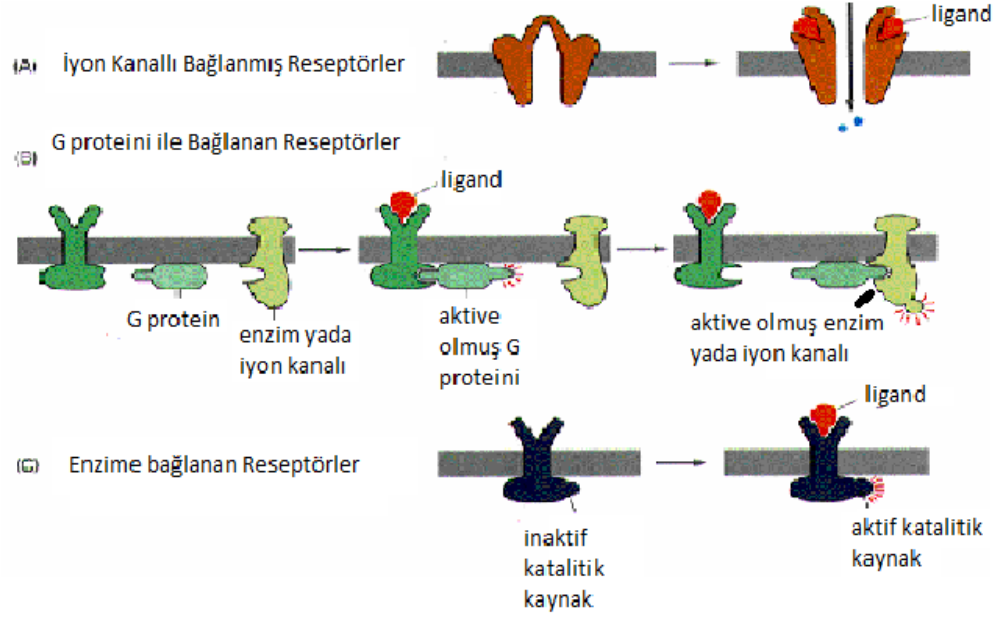
Reseptörler bir hücrenin ya plazma membranı (hücre yüzey reseptörleri) ya sitoplazmada ya da çekirdekte (çekirdek reseptörü) gömülü olan ve seçici molekülün bir ya da daha çok spesifik moleküle etkileşebildiği protein molekülüdür. Reseptör proteinler sitoplazmada, hücre membranlarında ve çekirdek membranında bulunmaktadır [24].

1.3.1.Sitoplazmik reseptörleri

Sitoplazmik reseptör proteinler, steroid hormonlarına hassasiyet göstermektedirler. Reseptörleri aktive eden ligandlar, gen ekspresyonunu ayarlandığı hücre çekirdeğine girebilirler.

1.3.2. Hücre yüzey reseptörleri

Hücre yüzey reseptörleri, membran reseptörleri ya da transmembran reseptörleri olarak bilinmektedirler. Hücre ve dış dünya arasındaki iletişimi sağlayan integral membran proteinleri olarak özelleşmektedirler. Hücre dışı sinyal molekülleri (genellikle hormonlar, nörotransmitterlar, sitokinler, büyüme faktörleri ya da hücre tanıma molekülleri) hücre membranında spesifik reseptörü aktive ederler ve ikinci bir mesajcı, fizyolojik bir tepkinin uyarılmasında, hücreye sinyal gönderir [25]. Bu işlem, sinyal iletimi olarak adlandırılmaktadır. Bağlanma, hücre içindeki kimyasal bir yükü başlatılmaktadır. Bu yolla reseptörler hücreler arası iletişim ve sinyal iletiminde eşsiz ve önemli bir yere sahiptir [26]. Yapısal ve fonksiyonel benzerlikleri baz alındığında membran reseptörleri üç gruba ayrılmaktadırlar: A) İyon kanallıyla bağlanan reseptörler, B) G protein ile bağlanan reseptörler, C) Enzime bağlanan reseptörler (Şekil 1.9)

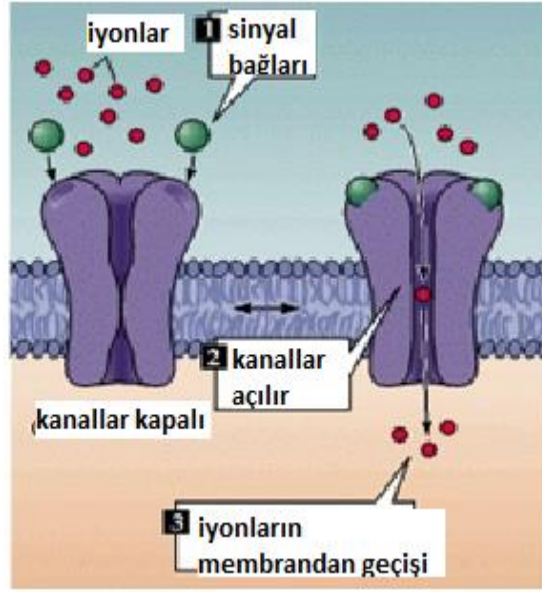


Şekil 1.9. Hücre yüzey reseptörlerinin şematik olarak gösterilmesi; A) iyon kanallı bağlanmış reseptörler; B) G protein bağlanmış reseptörler; C) enzim bağlanmış reseptörler [25]

A) İyon kanalıyla bağlanan reseptörler

Bazı kimyasal sinyaller ligandla açılan iyon kanallarına (Şekil 1.10) bağlanırlar. Bunlar spesifik iyonların akışına (Ca^{2+} , Na^{2+} gibi) izin veren ya da engelleyen kanallardır ve bağlanan liganda göre açık ya da kapalı olarak konumlanırlar. Böylece istenilen ligand bağlanırken diğerleri bağlanmazlar. İyon kapılı kanallar nörona bir nörotransmitter aracılığıyla bağlanabilir ve komşu hücrelere bir sinir impulsunun yayılması ve nöronun depolarizasyonuna sebep olan Na^{2+} iç akışına izin verebilir [27].

Bazı iyon kanalları, kimyasal sinyalden çok elektiriksel sinyale tepki gösterirler. Kalp kasındaki kalsiyum kanalları önemli bir örnektir ve onları engelleme yetenekleri boğaz anjini, hipertansiyon ve bazı kardiyak aritmilerine tedavi geliştirilmesinde rol alır [28].



Şekil 1.10. İyon kanallı reseptörlerin şematik gösterimi [28]

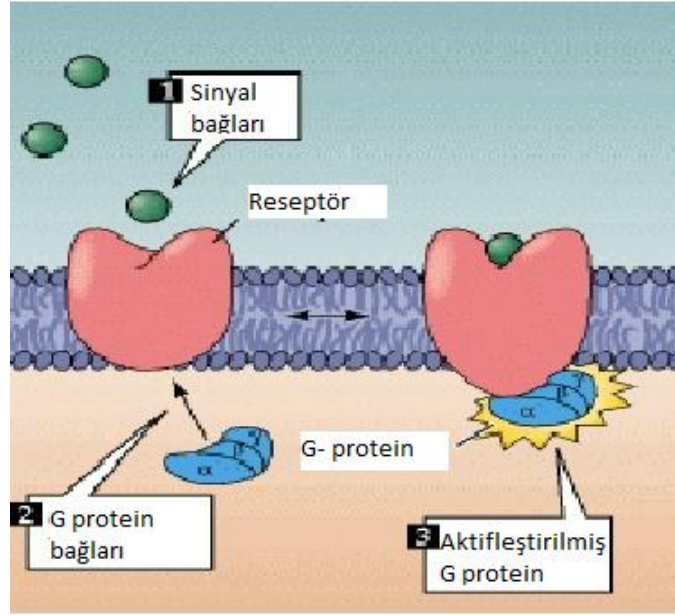
Bu reseptörler elektriksel olarak uyarılabilen hücreler arasında hızlı sinaptik sinyalleri oluştururlar. İyon kanallı ile bağlanan reseptörler glikoprotein alt birimlerinden oluşmaktadırlar. Her bir alt birim, hücre dışı bir hidrofilik alanın yanı sıra dört hidrofobik alandan oluşmaktadır [29].

B) G proteini ile birleştirilmiş reseptörler

G proteini ile birleştirilmiş reseptörlerin (GPCRs) (Şekil 1.11) temel fonksiyonu, hücre içi sinyaller ile hücre dışı uyarıların uyumlu olmasını sağlamaktır. Bu reseptörler, büyük ve farklı bir protein ailesini oluşturmaktadır. Memeli genomlarındaki en büyük ve en kapsamlı protein aileleri arasındadır [30].

Birçok farklı memeli hücre yüzey reseptörleri, trimetrik bir sinyal uyumlaştırıcısı olan G protein ile birleşir. Bu reseptörlere ligand bağlanması G proteinlerin bağlanmasıyla aktive edilir ki bu hücre içinde ikincil bir mesajın oluşması için efektör enzimi işlevsel hale getirir. Bütün GPCR'ler plazma membranının sitosolik yüzü üzerindeki C-terminal segmenti ve ekzoplazmik yüzündeki N-terminal segmenti ile yedi membran yüzeyini kapsayan bilgeden oluşmaktadır. Bu büyük reseptör ailesi gözdeki ışık aktivite edici reseptörleri (rodopsinleri) ve genel olarak memeli burundaki 200 kadar koku reseptörlerini

içermektedir. Aynı zamanda çeşitli hormonları ve nörotransmitterlar için çok sayıda reseptörden oluşmaktadır. Bu reseptörler, farklı ligandlar tarafından aktive edilmelerine ve farklı hücresel cevaplar oluşturmalarına rağmen, hepsinin aynı sinyal yolunu izledikleri düşünülmektedir [31, 32]

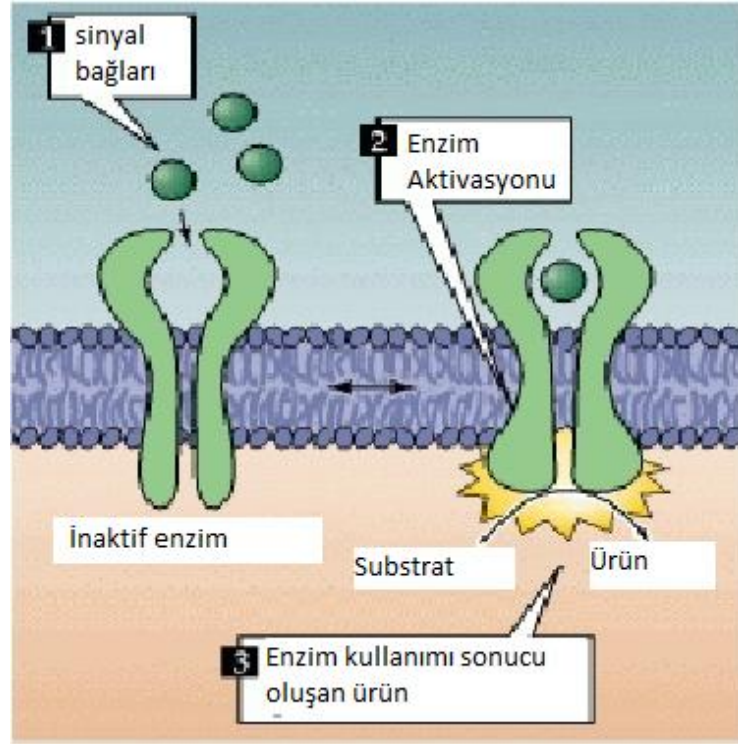


Şekil 1.11. G-protein bağlanmış reseptörlerin şematik gösterimi [32]

C)Enzim bağlanmış reseptörler,

Hücre yüzey reseptörlerinin ikinci olarak en bilinen türüdür (Şekil 1.12). Büyüme, üreme, farklılaşma ya da hayvan hastalıklarında hücrelerin kurtarılmasını destekleyen hücre dışı sinyal proteinlerindeki rollerine göre tanımlanırlar [33]. Bu sinyal proteinler, topluca büyüme faktörleri olarak adlandırılırlar ve genellikle çok küçük derişimlerde yerel alıcılar olarak rol alırlar. Sinyallere verilen cevaplar genellikle yavaştır ve gen ekspresyonunda sonuç olarak değişikliğe sebep olan birçok hücre içi sinyallere gerek duyarlar. Enzim bağlanmış reseptörlerin hücre iskeleti üzerindeki hızlı etkilerinin şekil değişikliği ve hücrelerin yer değiştirmesiyle kontrol edildiği bulunmuştur. Bu hızlı cevaplara sebep olan hücre dışı sinyaller genellikle yayılamazlar fakat hücrenin sürüklendir yüzey üzerine etki edebilirler. Hücre yenilenmesi, farklılaşma, göç ve hayati hastalıklar kansere neden olabilen temel olaylardır ve enzim bağlanmış reseptörler

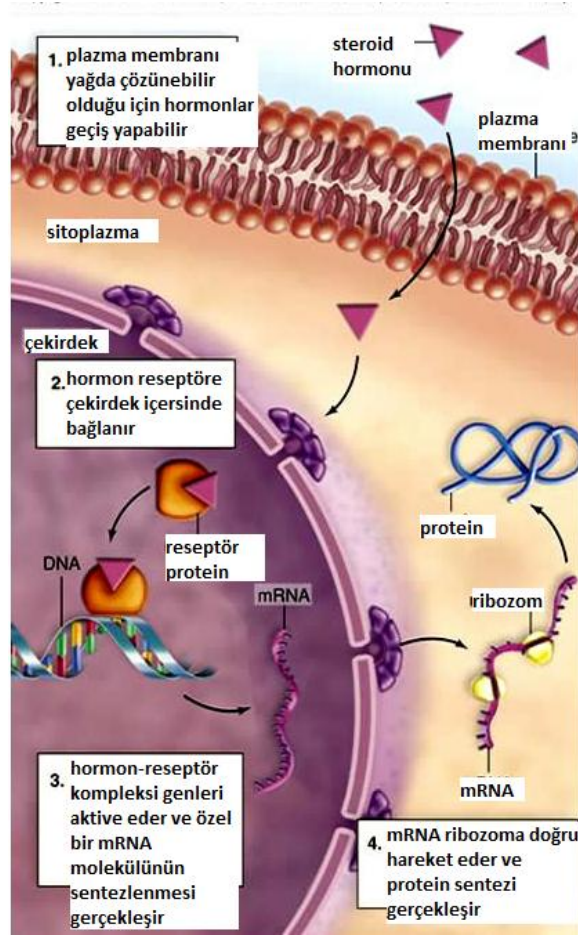
doğrultusunda sinyalin anormalliğı bu hastalık sınıfında önemli rol oynamaktadır [33].



Şekil 1.12. Enzim bağlanmış reseptörlerin şematik gösterimi [33]

1.3.3. Çekirdek reseptörleri

Çekirdek reseptörleri (Şekil 1.13), embriyonik gelişim, organ fizyolojisi, hücre farklılaşması ve homeostazi kontrolleri gibi önemli fizyolojik fonksiyonları içeren büyük bir transkripsiyon faktörlerinin süper ailesidir [34]. Normal fizyolojisi dışında çekirdek reseptörleri kanser, diyabet, romatoid artrit, astım ya da hormon dirençli sendromlar gibi birçok patolojik koşullarda önemli rol aldığı tanımlanmaktadır [35]. Bu yüzden, zaten büyük tarihlerine rağmen, transkripsiyonel düzenleyici modern biyomedikal araştırmalar ve ilaç keşiflerinde hala büyük ilgi görmektedirler [35-37].

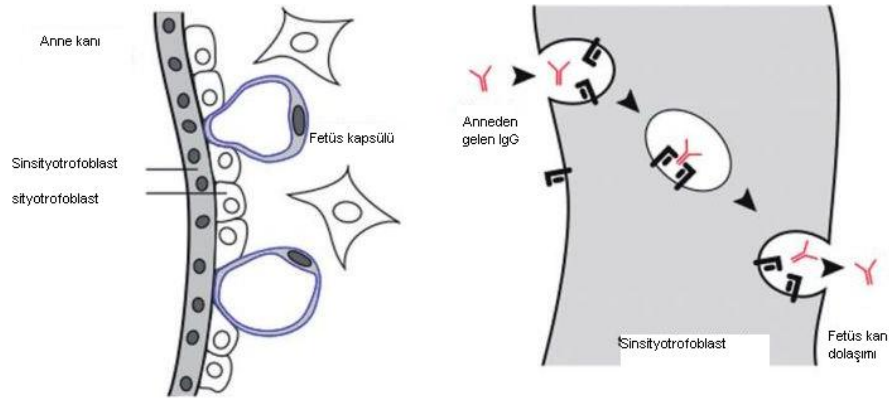


Şekil 1.13. Çekirdek reseptörlerinin şematik gösterimi [36]

Çekirdek reseptörleri, spesifik DNA düzenleyici elementlerin bağlanabilirler ve transkripsiyonun spesifik düzenleyicisi olarak rol alan çözünebilir proteinlerdir. Diğer transkripsiyon faktörlerine karşı, çekirdek reseptörlerinin aktivitesi, biyolojik membranlara kolayca nüfuz edebilen ilgili liganlar-küçük lipofilik moleküllere bağlanmasıyla ayarlanabilirler. Son yıllarda tanımlanan birkaç çekirdek reseptörü bilinen herhangi bir liganda sahip değildir. Yeni endokrin düzenleyici sistemlerin keşfedilmesine sebep olabilecekleri düşüncesi, ailesiz reseptörler olarak adlandırılan bu reseptörler büyük ilgi toplanmasına neden olmaktadır [38].

1.4. FcRn Reseptör

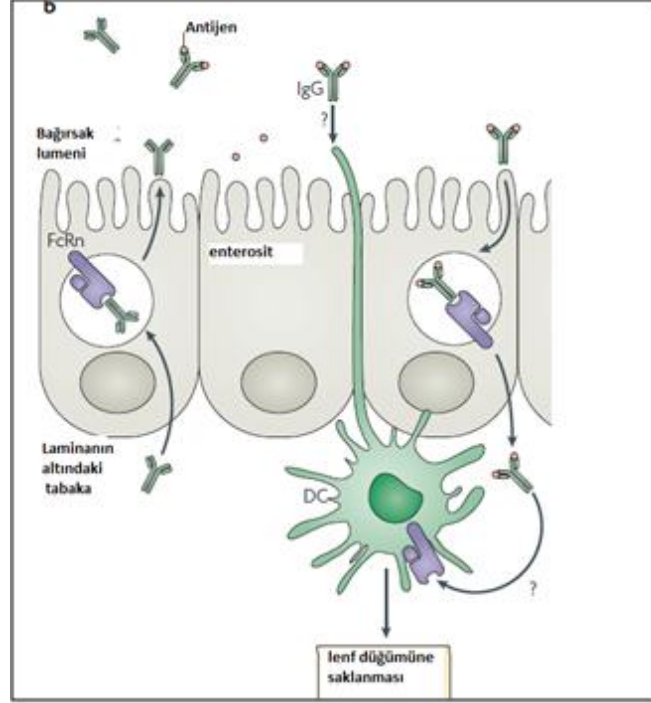
Neo-natal FcRn reseptörü, eşsiz bir α -zinciri ve β_2 -mikroglobulin (β_2M)'den oluşan majör histokompatibilite sınıf 1 homologudur ve bu sayede birçok antikora kolaylıkla bağlanabilir [39, 40]. FcRn, anneden fetüse ya da yeni doğana pasif bağışıklık transferinde kullanılan IgG-Fc reseptörleridir. Bu reseptör, anneye ait kan dolaşımından plasental sinsityotrofoblastlar aracılığıyla IgG'lerin fetüse taşınmasında ve süttten kesilmemiş yeni doğanların ince bağırsaklarından kolostrumda ve sütte transitozla taşınan IgG'lerin emilimini sağlayarak bebeğin kan dolaşımına geçmesini sağlar (Şekil 1.14). Buna ek olarak FcRn, bağlanan IgG'nin sıvı fazda özümsemesi ve kan dolaşımına tekrar geri aktarılmasıyla IgG serum derişiminin ayarlanmasına etki etmektedir [39-41]. FcRn'nin transsitotik ve koruyucu fonksiyonları, pH'a bağlıdır ve bu etki IgG ile bağlama özelliği ile doğrudan ilgilidir. FcRn, bağırsaklarda ya da endozomlarda IgG ile hafif asidik pH'da bağlanırken fizyolojik pH'larda bağlanmazlar [42, 43].



Şekil 1.14. Plasenta epitelyum dokusunda IgG-FcRn etkileşimi [42]

FcRn reseptörleri, plasental yolla anneden fetüse IgG molekölü geçişini sağlamasının yanı sıra yetişkinlerin bağırsaklarında, merkezi sinir sistemi kan beyin bariyerinde ve böbreklerde IgG taşınması ve lizozomal bozunmanın engellenmesinde etkin rol oynamaktadır. Yetişkin bağırsaklarında, IgG-antijen kompleksi bağırsak lumeninden epitelyum doku içersine alınır ve burada FcRn-IgG etkileşimi gerçekleştikten sonra laminal propiyadan geçer. Daha sonra lenf düğümünde antijen yok edilerek IgG tekrar kan dolaşımına katılmak üzere

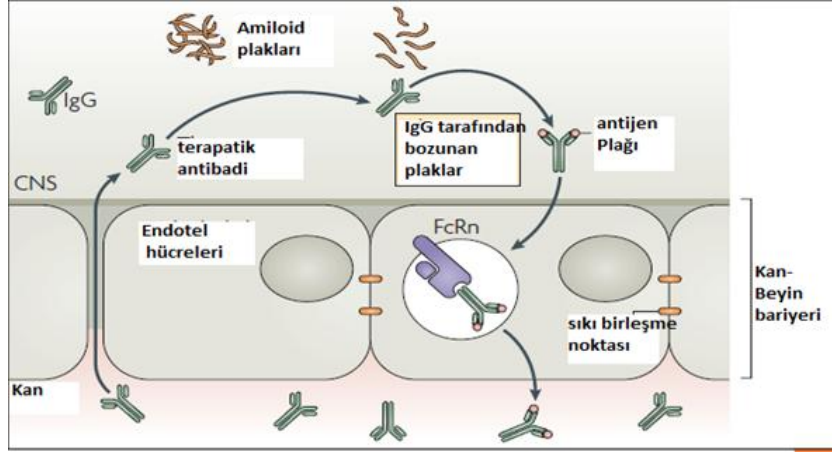
döngüyü tekrarlar [42,44]. Şekil 1.15 'de yetişkinlerin bağırsak lumeninde gerçekleşen IgG-FcRn etkileşimi gösterilmiştir.



Şekil 1.15.Yetişkin insan bağırsağında IgG-FcRn etkileşimi [44]

Merkezi sinir sisteminde (CNS), kan beyin bariyeri, beyinin patojenlere ve toksinlere karşı geliştirdiği homeostatik bir savunma mekanizmasıdır. Kompleks ve oldukça düzenli yapıdaki kan beyin engeli, periferindeki maddelerin biyokimyasal, fizikokimyasal ve yapısal özelliklerini koruyarak beyin parankiması içine istenen moleküllerin geçişinde bariyer seçiciliğini oluşturmaktadır [50]. Bu nedenle; FcRn'nin CNS endotelyum ve koroid damar ağında yüksek seviye bulunması sürprizdir. Bununla birlikte, FcRn reseptörleri bakteremi gibi patojenik durumlarda CNS iltihaplanmasının engellenmesinde önemli role sahip olabilir. Kan beyin bariyeri, bakteremi süresince üretilen Tümör-nekroz faktörü (TNF) gibi birçok iltihaplanmanın arabulucularına karşılık geçici olarak açılabilir. Bu durumlarda, IgG merkezi sinir sistemine akın eder ve FcRn reseptörleri, CNS'de biriken IgG moleküllerinin yeniden kan dolaşımındaki IgG transsitotik rezervlerine geri dönmesine aracılık ederler (Şekil 1.15). Ayrıca; CNS'de amiloid plaklarının birikmesi sonucu ortaya çıkan Alzheimer hastalığı

Fc-IgG bağlanma mekanizmasıyla engellenmektedir. Nihai hedefler arasında Alzheimer hastalığının erken tanı ve tedavisine aracılık etmek ve yeni nesil diagnostik sistemler geliştirmek yer almaktadır [44].



Şekil 1.16. Merkezi sinir sistemi kan beyin bariyeri epitelyum dokusunda IgG-FcRn etkileşimi [44]

FcRn reseptörlerinin insan böbreği glomerular epitel hücrelerinde ve proksimal tubuler hücrelerin fırçamsı kenarlarında bulunduğunu ifade edilmiştir. Glomerül seviyesi ve nefronların yakın bölümlerindeki epitelyum dokular bir çeşit bariyer görevi üstlenirler ve epitel dokuda bulunan Fc reseptörler, IgG ve albümin serum proteinlerine bağlanarak kan dolaşımına tekrar katılmalarını sağlar. FcRn'nin, böbrek epitel hücrelerinde IgG antikorunu çift yönlü taşıdığı için idrar yollarının mukozal bağışıklığında ve tübüler sıvıdan IgG'nin tekrar adsorpsiyonuna olanak sağladığı düşünülmektedir [43].

1.5. Protein Saflaştırma Yöntemleri

Bir hücre ve dokudan istenilen bir proteinin saf halde izole edilmesi oldukça güç bir olaydır. Proteinin derişimi düşük ise binlerce farklı protein arasından ayırmak ve saf halde elde etmek için bu proteine uygun olan saflaştırma tekniklerinin seçilmesi gerekir. Proteinlerin saflaştırılmasında bugün kullanılan yöntemler oldukça gelişmiştir. Saflaştırmada kullanılan yöntemlerden bir veya birkaçı arka arkaya kullanılarak protein saf halde veya safa yakın bir şekilde elde

edilmektedir. Bugün pekçok enzim ve enzim olmayan proteinin saf ve kristal halde izole edilmesi başarılmıştır [45, 46].

Bir proteinin amino asit kompozisyonunu ve dizilişini, moleküler ağırlığını ve diğer fiziksel özelliklerini çalışmak için öncelikle proteinlerin saflaştırılması gerekir.

Proteinlerin saflaştırılma yöntemlerini beş temel başlık altında toplayabiliriz. Bunlar; kromatografik yöntemler, elektroforez yöntemleri, kütle spektroskopisi, ELISA ve santrifüj yöntemleridir.

Bu tez çalışmasında, insan plasentasından Fc reseptörlerin ayırımında ilk olarak kromatografik yöntemlerden afinite kromatografisi kullanılmıştır. Daha sonra; ayırımı sağlanan Fc reseptörler elektroforez yöntemlerinin alt grubunda yer alan SDS-PAGE yöntemi ile saflaştırılmıştır.

1.5.1. Kromatografik yöntemler

Kromatografi: Farklı fazdaki denge esasına dayanarak, bir hareketli faz ile bir sabit faz yardımıyla karışımın bileşenlerine ayrılması işlemidir. Hareketli faz, sabit faz ve bileşenlerine ayrılacak karışım ile kimyasal tepkimeye girmeyen uygun bir çözelti olabilir; sabit faz olarakta genellikle farklı çaplarda tanecik büyüklükleri olan kristal veya amorf yapıdaki maddeler kullanılır. İşlem sırasında, bileşenlerine ayrılacak derişik haldeki karışım, sabit fazın başlangıç bölgesine konur; sonra sabit fazın başlangıç bölgesinden ileriye doğru hareketli faz ilerletilir. Hareketli faz, ilerleyişi sırasında çözdüğü karışımındaki maddeleri de sabit faz üzerinde değişik hızlarda ilerletir; bileşenler, sabit fazın farklı bölgelerinde tutulurlar ve böylece birbirlerinden ayrılırlar. Ayrılma mekanizmalarına göre ve ayırıcı materyale göre çeşitli kromatografi teknikleri vardır [47, 48].

Ayırma mekanizmalarına göre kromatografi çeşitleri şunlardır:

- İyon değişim kromatografisi,
- Jel filtrasyon kromatografisi,
- Adsorpsiyon kromatografisi,
- Partisyon kromatografisi,
- Affinite kromatografisi

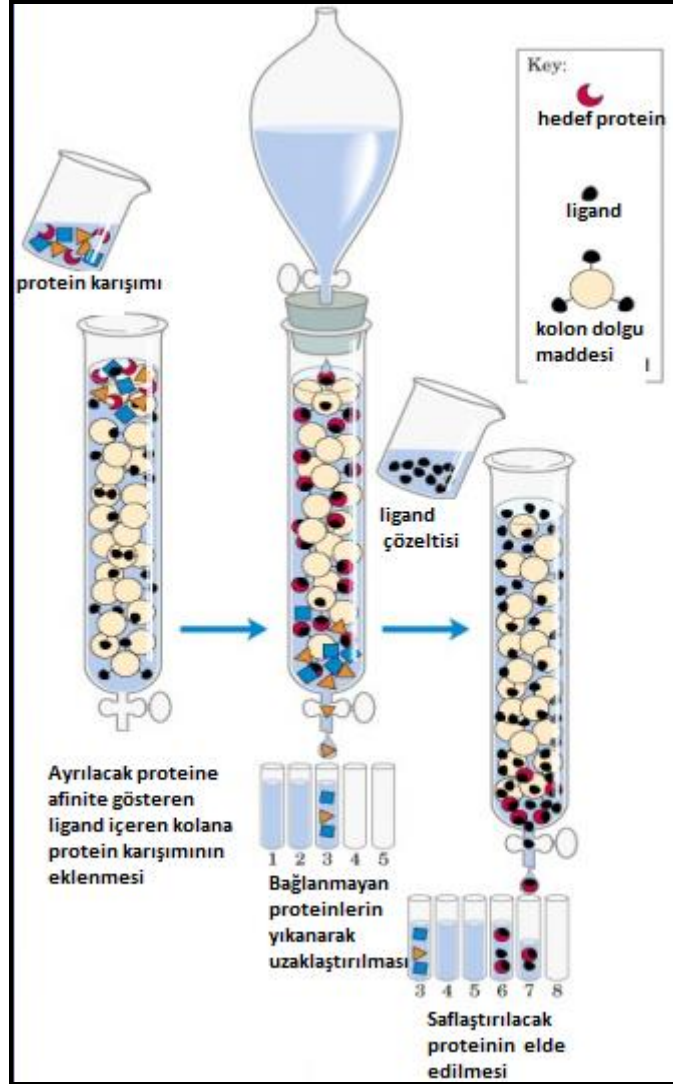
Ayırıcı materyale göre kromatografi çeşitleri şunlardır:

- a) Düzeyssel kromatografi
 - İnce tabaka kromatografisi
 - Kağıt kromatografisi
- b) Kolon kromatografisi
 - Gaz kromatografisi (GC)
 - Sıvı kromatografisi (LC)
 - Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC)

Tez çalışmamız kapsamında ayırım yöntemi olarak afinite kromatografi kullanılırken ayırıcı materyale göre sıvı kromatografisinin alt grubu olan hızlı protein sıvı kromatografisi (FPLC) kullanımıştır. Afinite kromatografisi aşağıda ayrıntılı olarak açıklanmaktadır (FPLC yöntemi ise Bölüm 2.2.1’de ayrıntılı olarak ele alınmıştır).

Afinite Kromatografisi (Şekil 1.17), çok kompleks bir karışım içinde bulunan bazı proteinler afinite kromatografisi sayesinde tek basamakta oldukça saf halde elde edilirler. Afinite kromatografisinde polisakkarit yapısındaki agaroz taneciklerine kimyasal bir reaksiyon ile bir enzim in koenzimi bağlanır. Üzerine koenzim bağlanmış olan agaroz tanecikleri, kolon dolgu maddesi olarak kullanılır. Protein karışımı, bu kolona uygulandığı zaman yalnız ilgilendiğimiz enzim proteinleri koenzimin serbest ucuna spesifik olarak bağlanmaktadır. Bu bağlanma kovalent bir bağlanma değildir. Diğer proteinler koenzimin serbest ucuna bağlanma özelliğine sahip olmadıkları için kolondan ayrılırlar. Daha sonra serbest koenzim içeren çözelti kolona ilave edildiğinde, agaroz taneciklerine bağlı koenzime bağlanmış olan enzim molekülleri bu defa rekabetten dolayı çözelti ile birlikte gelen serbest koenzime bağlanarak kolondan çıkar. Böylece koenzime

spesifik olarak enzim proteini, diğer yüzlerce proteinden afinite kromatografisi yardımıyla tek basamakta saflaştırılmış olmaktadır [47].



Şekil 1.17. Afinite Kromatografisi

1.5.2. Elektroforetik yöntemler

Elektroforez, proteinler izoelektrik noktalarından farklı bir pH değerine sahip elektriksel bir alanda farklı göçme hızlarına dayanarak ayırma yöntemidir. Elektriksel alan içerisindeki göç; elektrik akımının şiddetine, net yüke, molekülün şekline, solüsyonun iyonik gücüne, viskozitesine ve sıcaklığına bağlıdır. Göç hızı, protein molekülü üzerindeki yükün büyüklüğü ile doğru orantılıdır. İyonik

bileşiklerin iyonlaşması, elektroforezin temelini oluşturur. Zıt yükteki elektrotlara doğru farklı hızlarda hareket eden değişik yükteki iyonlar elektriksel alanda birbirinden ayrılırlar. Protein üzerindeki yüklerin birbirini dengelediği pH'ya o proteinin izoelektrik noktası (pI) adı verilir. Bu pH'da proteinler hem anot, hem katottan aynı kuvvetle çekildikleri için proteinlerin bu pH'daki hareketleri sıfır olur [48, 49].

Elektroforezde bir hareketli bir de hareketsiz faz vardır. Sabit faz olarak kağıt, asetat, selüloz, poliakrilamid, agaroz gibi dolgu maddeleri kullanılır. Sabit ortamdaki en önemli özellik moleküllerin porlardan kolaylıkla geçmesine dayanır. Hareketli faz olarak genellikle tamponlar kullanılır. Elektroforezin diğer yöntemlerden farkı, bir elektriksel alan yaratılmasıdır. Protein çözeltisi bu elektriksel alanda farklı hızlara bir elektrotndan diğerine hareket ederek molekül ağırlıklarına ve taşıdıkları elektrik yüklerine göre birbirlerinden ayrılırlar. Daha sonra boyama yaparak protein bantları görünür hale getirilir.



Şekil 1.18. Elektroforezde kullanılan materyaller [49]

Elektroforez çeşitleri, kullanılan ayırma ortamlarının cinsine göre çeşitli elektroforez teknikleri kullanılmaktadır. Kağıt elektroforezi, selüloz asetat elektrodorezi, agar jel elektroforezi, nişasta jel elektroforezi, poliakrilamid

elektroforezi (Native ve SDS'li), izoelektrik odaklama (IEF) ve 2D elektroforez bunların arasında sayılmaktadır.

Bu çalışma kapsamında; ayırımı sağlanan Fc reseptörlerin saflık derecesinin tayin edilmesinde elektroforez çeşitlerinden poliakrilamid jel elektroforezi kullanılmıştır. Bu doğrultuda poliakrilamid jel elektroforezi ayrıntılı olarak aşağıda ele alınmaktadır:

- **Poliakrilamid jel elektroforezi**, poliakrilamidin bir bağlayıcı (genellikle bis akrilamid) ile polimerize edilmesi sonucu oluşturulur. Böylece rastgele büyüyen poliakrilamid ve bis akrilamid derişimleri oluşacak jelin yoğunluğunu, vizkozitesini, elastikiyetini ve mekanik dayanıklılığını belirler. Bu derişimlerin arttırılmasıyla oluşan ağın sıklığı da artmakta, buna bağlı olarak gözenek çapı azalmaktadır. Böylece içinden yürüyecek makromoleküllerin hareketi, büyüklüklerine (molekül ağırlıklarına) göre sınıflandırılmış olmaktadır.

Poliakrilamid jel elektroforezi doğal poli akrilamid jel elektroforezi (ND-PAGE), sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Bu çalışmada SDS-PAGE yöntemi kullanılarak Fc reseptörlerin saflık derecesi kontrol edilmiştir.

A) ND PAGE, proteinlerin doğal yapılarını bozucu ajanlar kullanılmadan yapılan poliakrilamid jel yöntemidir. Saflık derecesinin tayini için kullanıldığı gibi direk olarak saflaştırma işlemi olarak da kullanılabilir.

B) SDSPAGE, sodyum dodesil sülfat (SDS), anyonik bir deterjan olup iki aminoasitte bir peptit zincirine bağlanarak protein moleküllerini oluşturan alt birimleri birbirinden ayırır. Ayrıca (-) yük taşıdığından peptitlere de yüksek oranda (-) yük kazandırır. Böylece elektrik yükü açısından karışım içersindeki bütün protein molekülleri eşit duruma getirilir. Jel derişimi arttırılarak protein moleküllerinin molekül ağırlıklarına göre ayrışmaları sağlanır. SDS-PAGE yöntemi proteinlerin saflığının kontrolü, molekül ağırlıklarının saptanması ve derişim çeşitliliğinin belirlenmesi amacıyla kullanılmaktadır [5, 49, 50].

SDS- PAGE'in kullanım amaçları aşağıdaki gibi sıralanabilir;

- Molekül ağırlığı tayini,
- Protein saflığının kontrolü,
- Proteinlerin alt birimlerinin belirlenmesi,

- Aminoasit dizisinin tespiti,
- Bir proteinin izo enzimlerinin belirlenmesinde,
- Türler arası benzerlik ve farklılıkların belirlenmesinde.
- Genetik hastalıkların teşhisinde kullanılmaktadır.

Bölüm 2.5.1.'de SDS-PAGE ile ilgili jel hazırlanması, yürütme tamponun hazırlanması gibi daha ayrıntılı bilgi verilmektedir.

1.5.3. Kütle spektrometresi

Kütle spektrometreleri manyetik veya elektriksel bir alanda hareket eden yüklü partikülleri kütle/ yük (m/z) oranlarına göre diğer yüklü partiküllerden ayırarak analizleme esasına göre çalışmaktadır. Moleküller normalde yüklü partiküller değildir ve kütle spektrometreleri iyonizasyon işlemi ile molekülleri uyararak yüklü iyonize moleküller haline dönüştürürler. Yüklü moleküller stabil değildir ve diğer moleküllerle veya bir yüzey ile temas ettikleri zaman fragmentlerine parçalanır ve yüklerini kaybederler. Oluşan her bir iyon spesifik bir moleküler kütle ve yüke sahiptir ve m/z değerlerinin yoğunluğu (intensite) karşı gösterdiği bir spektrum ile bileşik tanımlanmaktadır. Her bir iyonun yoğunluğu detektöre ulaşan miktarı ile orantılıdır ve her bileşiğin spektrumu kendine özeldir. Bilinmeyen bir örneğin analizi sonucu elde edilen spektrum referans spektrumu ile karşılaştırılarak tanımlanır. Proteinlerin kütle spektrometresi ile tanımlanması karışımdaki bireysel peptidlerin kütleleri ile kıyaslama vasıtası ile gerçekleştirilir. Proteinlerin ve peptidlerin kütle spektrometrelerinde; genelde peptid dizi analizleri, protein tanımlanması (identifikasyonu) ve haritalama, moleküler kütle ve özellikle post translasyonel modifikasyonların belirlenmesi esasır [51].

1.5.4.Enzyme- linked immunosorbent assay (ELISA)

ELISA yöntemi özgül antijen-antikor bağlanmasını, antikorlara alaklen fosfataz veya horseradish peroksidaz gibi bir enzim bağlayarak bu enzim

substratını renkli ürünlere dönüştürülmesi suretiyle gösterilmesi esasına dayalı bir immünokimyasal ölçüm tekniğidir. ELISA yönteminde özgül antikor kullanılarak örnekteki antijenin miktarını, özgül antijen kullanılarak örnekteki antikorun miktarını ölçebiliriz [5,52].

1.5.5. Santrifügasyon yöntemleri

Protein saflaştırmada kullanılan santrifügasyon yöntemleri densite gradient (zonal) ve diferansiyel santrifügasyon olmak üzere iki grupta toplanmaktadır.

A) Densite Gradient (Zonal) Santrifügasyon, bir protein karışımını santrifügasyon yöntemi ile ayırmak için tüp içerside sükröz gibi bileşiklerle bir derişim gradienti yaratılır. Bunun için plastik tüp içersinde en yoğun dan en az yoğun a doğru bir sükröz gradienti meydana getirildikten sonra tüpün en üzerine protein karışımı ilave edilir. Bu şekilde hazırlanmış olan tüp yüksek devirde santrifüj edilecek olursa her bir protein kendi dansitesi ile aynı olan sükröz bölgesine toplanacaktır. Tüp içersinde farklı bantlar halinde ayrılmış olan proteinler daha sonra tüpün altı iğne ile delinip toplanarak veya tüp doldurulduktan sonra bu bantlar buz halinde kesilerek çözündürölür ve bu şekilde proteinler birbirlerinden ayrılmış olur.

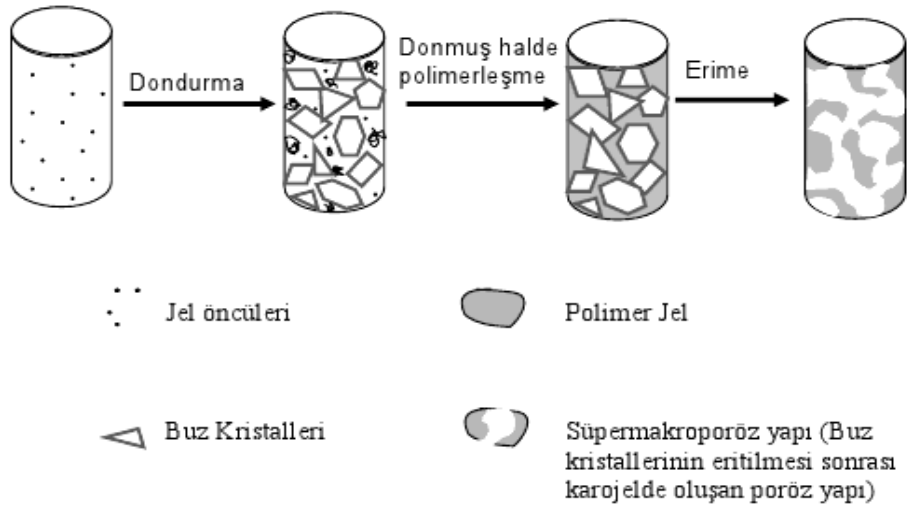
B) Diferansiyel Santrifügasyon, diferansiyel santrifügasyon ile bir karışım da bulunan partiköller boyutlarındaki farklılıklara bağılı olarak ayrılmaktadır. Homojenat relatif santifügal kuvvet (RCF) arttırıldıkça fraksiyonlarına ayrılmaktadır.

1.6. Kriyojel

Kriyojel, monomerik ve polimerik öncülerin uygun çözöcülerdeki çözeltilerinin dondurulması sırasında şekillenen jel matrisidir. Kriyojel sözcüğü Yunanca kökenli olup, -kryos- (buz, soğuk) ve -jel- (jel)sözcüklerinin bir araya getirilmesinden meydana gelmiştir. Dolayısıyla; soğukta yapılan jel anlamını taşımaktadır. Kriyojeller birbirine bağlantılı büyük gözeneklere sahiptir. Bu gözenekler, pratik olarak, herhangi bir büyüklükteki çözünenin difüzyonuna, aynı

zamanda nano partüküllerin ve mikropartiküllerin kütle geçişlerine izin verirler. Kriyojellerin yapı iskeletine bakıldığında sünger morfolojisine sahip olduğu görülmektedir. Yani; birbirine bağlantılı gözenekli sürekli bir yapı kriyojellerin temel yapısını oluşturur. Bu sünger şeklindeki gözenek sistemi, çözünenlerin kriyojellerin içinden madde kaybı olmadan geçişlerini sağlar. Kriyojellerin temel yapısı, osmotik basınçları, kimyasal ve mekanik dayanıklılığıyla birleştirildiğinde, biyolojik nanopartiküllerin, mikropartiküllerin (plazmidler, virüsler, hücre organelleri) ve hatta bütün hücrelerin kromatografisi için bu yapıları ilgi çekici parçacıklar haline getirir.

Kriyojeller, karyotropik jelasyon işlemiyle üretilirler. Karyotropik jelasyon işlemi, daha çok dondurma-eritme şeklinde gerçekleştirilen bir işlemdir. Kriyojel hazırlama sürecinin temel basamaklarından bahsetmek gerekirse, kriyojel oluşturmak için ilk önce monomer, monomer karışımları veya polimer uygun bir çözücüde çözülerek homojen çözeltisi şeklinde hazırlanır. Bu çözelti içerisine uygun çapraz bağlayıcı ve gerekli tepkime başlatıcı da eklenir, hazırlanan homojen karışım belirli bir süre dondurucuda bekletilerek, karışımın donması sağlanır. Daha sonra; buz halindeki karışım oda sıcaklığına alınarak polimer içinde oluşan buz kristallerinin erimesi ve bir yandan da kriyojel oluşumu başlar. Polimer içerisindeki buz kristalleri iyice eridiğinde, madde oda sıcaklığına geldiğinde, elde edilen birbirine bağlantılı gözeneklerden oluşan ürün, kriyojeldir (Şekil 1.19). Kriyojel hazırlama sırasında öncü olacak maddeler seçilirken önemli bir nokta; termotropik jellerin kriyojel hazırlanmasında öncü olarak kullanılamayacağıdır.



Şekil 1.19. Kriyojel oluşum Süreci [53]

1.6.1. Jel ve kriyojel arasındaki farklılıklar

Jel adı altına birleşen polimerik materyaller, makromolekülleri geniş mesafeli bağ yolu ile bağlanmış ve zaman içinde değişime uğramayan polimer-çözücü sistemleridir. Polimer ağlarının bağlantı intermoleküler bağların yapısına göre jeller iki gruba ayrılabilir: Kimyasal ve fiziksel jeller.

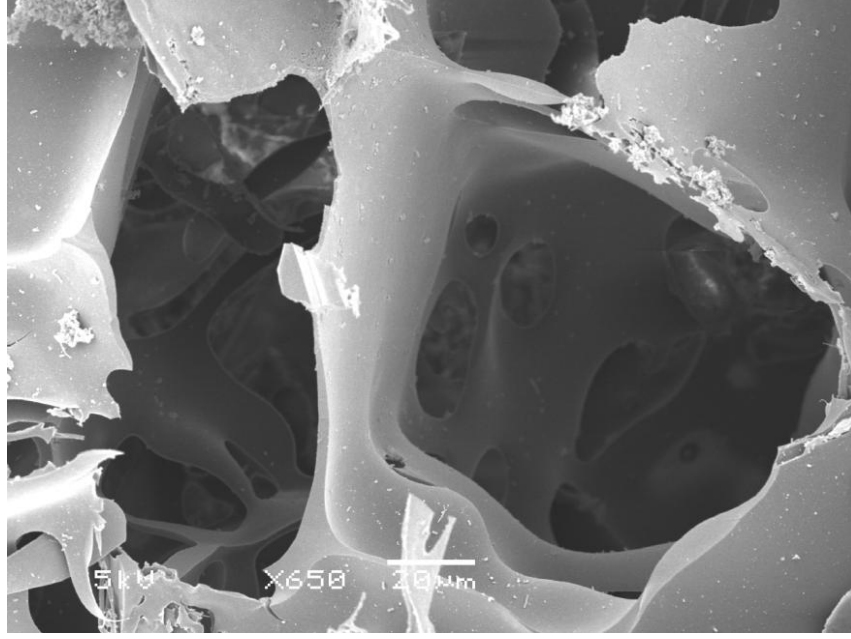
Kriyojeller herhangi bir kimyasal şekilde olabilirler: Kovalent, iyonik ya da kovalent olmayan kriyojeller. Dondurma–kurutma polimerik materyalleri şeklinde düşünülerek hazırlanan jeller de kriyojellere benzer olarak makro ve mikro yapıda gözenekler içerirler. Çözücü kristallerinin (genellikle sulu sistemler için buz) süblimleşmesi sonucu elde edilen dondurulmuş çözücü, polimerik materyalde yani oluşan jelde birbirine bağlı gözenekler sistemi oluşturur. Fakat; bunlar sadece ince objeler (filmler, ince tabakalar) şeklinde üretilebilirler. Bu jellerin silindirler halinde üretilmesi teknik açıdan pek pratik değildir. Diğer taraftan kriyojeller, bloklar, silindirler, tüpler, granüller ve diskler olmak üzere istenilen her şekilde üretilebilirler (Şekil 22).



Şekil 1.20. Farklı şekillerde üretilen kriyojeller [53]

Ayrıca bunlara ek olarak, kriyojellerin üretimi diğer dondurma-kurutma ile üretilen jellerin üretiminden daha basittir. Çünkü; çözücü hareketi için kriyojel üretiminde indirgenmiş basınç gerekli değil iken, diğer jel üretiminde çözücü hareketi için indirgenmiş basınç gereklidir.

Birbirine bağlı geniş gözeneklerden oluşan bir sistem, kriyojellerin temel karakteristik özelliğidir. Çözünenlerin bilinen homo faz jellerin içindeki difüzyonunun aksine, sünger şeklindeki gözenek yapısına sahip kriyojeller (Şekil 1.20), çözünenlerin kriyojel içinden madde kaybı olmadan geçişlerine olanak verir. Diğer tür jellerde, çözünen, jel içerisinden geçerken madde kaybına uğrar [53]

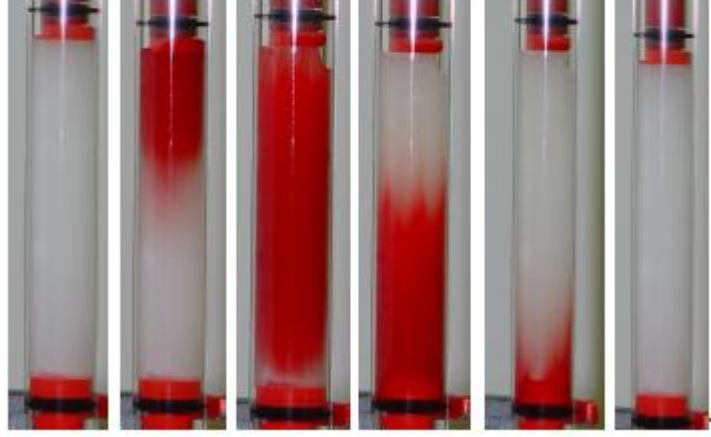


Şekil 1.21. Kriyojellerin süngerimsi gözenek şekli

1.6.2. Kriyojellerin uygulama alanları

Kriyojeller, sahip oldukları eşsiz yapısıyla kan hücrelerinin ayırımında afinite matriksi olarak, memeli hücrelerinin kültür ortamı olarak, doku mühendisliğinde ve günlük hayatta filtre ve membran olarak kullanımlarıyla karşımıza çıkmaktadır. Ayrıca; kromatografik alanda kolon dolgu maddesi olarak kullanıldıklarında kolonda geri basınç oluşturmadıklarından verimli ayırımlar elde etmede kromatografi malzemesi olarak kullanılmaktadırlar [53]

Kan hücrelerinin ayırımında afinite matriksi olarak kullanımlarına bakıldığında; dimetil akrilamit, N-izopropil akrilamitten sentezlenen kriyojellere protein-A, antibody yada metal ligandlar gibi spesifik ligandlar immobilize edildiğinde seçici bağlanmayla ayrılması istenen hedef hücrelerin (kök hücre, kanser hücreleri, makrofajlar) kromatografisi için kullanım alanının olduğu görülmektedir (Şekil 1.22).



Şekil 1.22. Kan hücrelerinin kromatografik olarak kriyojel kolondan geçirilmesi [53]

1.6.3. Kriyojellerin karakterizasyonu

Farklı monomerler kullanılarak sentezlenen kriyojellerin, taramalı elektron mikroskopuyla (SEM), Fourier dönüşümlü infrared spektroskopisi (FT-IR)'nin azaltılmış toplam yansıma (ATR) moduyla, azot adsorpsiyon porozimetri (BET) yöntemiyle ve şişme testlerinin uygulanmasıyla karakterizasyonları gerçekleştirilmektedir.

SEM cihazı ile analiz sonucu elde edilen görüntülerle kriyojel yapısındaki gözenek dağılımı, gözenek boyutları, yapıyı meydana getiren gözenek örgüsü gibi bilgiler elde edilmektedir. SEM ile görüntüleme yapmak için ilk önce örnekler kurutulur ve ardından altın ile kaplama yapılmaktadır.

FT-IR analizi ile sentezlenen kriyojeldeki fonksiyonel gruplar aydınlatılır ve buna göre, kriyojel gözeneklerinin amaca yönelik bir madde için modifikasyonunun gerçekleştirilip gerçekleştirilemeyeceği belirlenmektedir. Kriyojellerin FT-IR spektrumları katı halde, IR spektroskopi cihazının ATR modunda çalışılarak alınmaktadır. Bu yöntemde kuru haldeki kriyojeller kristal üzerine konulur ve üzerine infrared ışığı gönderilerek maddenin spektrumu alınmaktadır.

Azot adsorpsiyon porozimetri yöntemiyle, kriyojelin yüzey alanı, gözenek boyutu, gözenek hacmi, parçacık boyutu ve gözenek dağılımı gibi özellikleri belirlenmektedir. BET metoduna göre yapılan analizlerle -198 °C'deki sıvı azot

ortamında azot (N₂) gazı adsorpsiyonu tekniğine dayalı olarak katıların m²g⁻¹ olarak yüzey alanları ölçülebilmektedir.

Şişme testiyle, kriyojellerin hidrofilik karakter göstermeleri nedeniyle hacimlerinin % 150 sine kadar su tutma kapasiteleri bulunduğu, sentezlenen kriyojele özgü bünyesinde su tutma kapasitesi ve su tuttuğunda hacmindeki esneme miktarı belirlenebilmektedir. Bir kriyojel kolonda su tutma kapasitesinin fazla olması kolonun istenilen süngerimsi gözenek yapısına sahip olduğunu göstermektedir. Esneme oranı fazla olduğunda ise kriyojel kolonun gözenek boyutu kolondan geçecek her molekülün boyutuna uyum sağlayabileceği ve hedef molekül kolondan geçerken gözenekli yapının herhangi bir zarar görmeyeceği anlamına gelmektedir. Böylece; kriyojel kolonlar tekrar tekrar kullanılarak düşük maliyette ve yüksek saflıkta ürünler elde edilmiş olacaktır.

2. MATERİYAL ve YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Standart FcRn reseptör (mouse monoclonal B-8), Santa Cruz Bioteknoloji firmasından temin edilmiştir. Doku örnekleri Eskişehir Kadın Doğum Devlet Hastanesi'nden temin edilmiştir. Akrilamit (AAm, %99) Sigma–Aldrich'ten temin edilmiştir. Amonyum Persülfat (APS), N, N'- Metilen bisakrilamit (MBAAm) Fluka, Chemica ve N, N, N', N'- Tetrametiletilendiamin (TEMED) Fluka, BioChemica firmalarından elde edilmiştir. 2-hidroksietil metakrilat (HEMA), tris hidroksimetil aminomethan (Tris) Merck firmasından elde edilmiştir. Sodyum dihidrojen fosfat dihidrat ve potasyum dihidrojen fosfat Riedel-Haen ve sodyum dodesil sülfat Alfa Aesar firmasından temin edilmiştir.

Tüm cam malzemeler kullanılmadan önce seyreltilmiş nitrik asitle yıkanmıştır. Deneylerde kullanılan su; yüksek akışlı selüloz membranlı Barnstead (Dubuque, IA) Ropure LP®ters ozmoz ünitesinde işleme tabi tutulduktan sonra Barnstead D3804 NANOpure® organik/kolloidal uzaklaştırma ve dolgu iyon değişim sistemi kullanılarak saflaştırılmıştır. Tampon ve örnek çözeltileri 0.2 µm membran'dan (Sartorius, Göttingen, Germany) geçirilerek filtre edilmiştir.

2.1.2. Kullanılan cihazlar

Adsorpsiyon-desorpsiyon çalışmaları için hazırlanan standart FcRn reseptör çözeltilerinin absorbansları, Biotek marka Synergy Hybrid Reader (H1) model mikropate okuyucu kullanılarak ölçülmüştür. Çözeltilerin homojenizasyonu için Bandelin Sonorex ultrasonik banyo kullanılmıştır. Çözeltilerin pH değerleri WTW Series pH 730 Inolab- pH-metresi ile ayarlanmıştır. Kriyojel karakterizasyon işlemi için Zeiss Ultra Plus SEM, Bruker IFS 66 v/S marka FTIR ve Quantachrome Nova 2200e marka BET cihazı kullanılmıştır. Ayırma ve saflaştırma basamağında Amersham Biosciences Akta FPLC model hızlı protein sıvı kromatografisi cihazı kullanılmıştır. Saflaştırılan Fc

reseptörlerin karakterizasyonunda Thermo Scientific EC 250-90 SDS-PAGE elektroforez güç kaynağı ve Cleaver Scientific Ltd. SDS- PAGE küveti kullanılmıştır.

2.1.3. Hızlı protein sıvı kromatografisi (FPLC)

Proteinler, bütün canlı varlıkların en önemli ve hücrelerinde en bol bulunan organik bileşiklerdir. Bütün biyolojik olaylarda önemli görevler üstlenmişlerdir: Enzimatik katalizleme, mekanik hareket, koruma, taşıma ve depolama gibi. Proteinlerin yapı-fonksiyon ilişkisini belirleyip yaşamsal alanda kullanmak birincil amaçtır ve insan vücuduna verilecek protein çok saf olmalıdır, aksi takdirde birçok yan etkiye yol açabilir. Bu nedenle proteinlerin saflaştırılması önemlidir.

Hızlı protein sıvı kromatografisi (FPLC), sıvı kromatografisinin bir formu olup yüksek performans sıvı kromatografi gibi kompleks karışımlardan proteinlerin ayrılması ve saflaştırılmasında, proteinlerin ve diğer biyomoleküllerin ayrılmasında tamamlayıcı sistem olarak kullanılmaktadır. Sıvı kromatografisinde ayırma etki eden bütün mekanizmalar (iyon değişim, jel filtrasyon, jel geçirgenlik, hidrofobik etkileşim, adsorbsiyon vb.) FPLC 'de de geçerlidir [54]. Sıvı kromatografisi' nin çeşidi olan FPLC'nin çözücü hızı, çözücülerin sabit akış oranını kontrol eden pompa tarafından ayarlanmaktadır. FPLC'de kullanılan kolon tipi ayırma çeşidine göre belirlenmektedir.

Yüksek basınçlı sıvı kromatografisinden farklı olarak daha düşük basınçlarda çalışır ve genellikle cam veya teflon bileşenlerden oluşur. Cihaz genellikle biyokimya ve enzimoloji alanlarında kullanılır. FPLC ile kullanılan kolonlar; makromolekülleri, yük, boyut, hidrofobidite veya biyotanıma esaslarına göre ayrılabilirler. Bu nedenle; amaca yönelik uygun bir kolon seçmek gereklidir. Sistem, protein, peptid vb. ayırımlarını kısa sürede gerçekleştirebilen bir hızlı performans sıvı kromatografi sistemidir. Aynı zamanda mikro düzeyde saflaştırma ve preparatif bazda HPLC analizleri yapmak için uygundur. Cihaz, ayrılan türlerin UV absorbansını ölçmekle birlikte; ortamın iletkenlik ve pH ölçümünü de yapabilmektedir [55].

FPLC cihazı dört bileşenden oluşmaktadır. Bunlar; pompa, UV-Vis dedektör, kolon, enjektör birimi ve fraksiyon toplama parçalarından oluşmuştur

FPLC cihazında aşağıda belirtilen türden dedektörler kullanılabilir;

UV-Vis dedektör; Ksenon flaş lambası hem UV hem görünür bölge aralığında çalışır (190-700 nm). Çift yöllü akış hücresi dinamik absorbans aralığını 10⁻⁵'den 40 AU'nin üzerine kadar genişletir. Floresans dedektörüyle luminesans, fosforesans, kemilüminesans ve bioluminesans ölçümleri mümkündür. Kırılma İndisi Dedektörü; polimer, hidrokarbonlar, karbonhidratlar, alkoller ve yağ asitleri gibi absorbans yapamayan bileşiklerin analizi için idealdir.

FPLC cihazında kullanılan pompa, güçlü mekanik motoru sayesinde 4000 psi (275 bar) geri-basınçlarına kadar dakikada 50 mL sıvı pompalayabilir.

FPLC cihazındaki fraksiyon toplayıcısında 18 mm çapındaki tüpler için 144 parça kapasitesi vardır.

FPLC cihazında farklı analiz metotları için farklı kolonlar kullanılabilir.

İyon- değişirme metodu için; Hiprep 16/10 sefaroze XL ve Hiprep 16/10 SP sefaroze XL kolonları bulunur. Sefarozla önceden paketlenmiş Q XL ya da SP XL ortamı, 20 mL preparatif anyon ve katyon- değişim kolonları yüksek yükleme kapasitesi ve hızlı elüsyon sağlar. Jel filtrasyon metodu için; Hiload 16/60 superdex 200 pg ve Hiload 26/60 superdex 75 pg kolonları bulunur. Sephadex /% kolonu prep peptidler, daha büyük proteinler, oligosakkaritler yani Mr 3000-70000, için uygundur; Superdex 200 kolonu ise prep antikorlar ve Mr 10000-600000 için uygundur.

FPLC' de hazırlanan örneklerin özelliklerine bakıldığında, 100 µL-5mL arasında berrak ve safsızlıklardan arındırılmış sıvı örneğin FPLC sistemine enjeksiyonu yapılabilir. Biliniyorsa örnek içerisindeki protein miktarı veya derişimi de verilmelidir. Analizi yapılacak örnek, FPLC cihazına enjeksiyon ile verilir ve hareketli faz sayesinde ayırımın yapılacağı kolona taşınır [55].

2.1.4. Taramalı elektron mikroskopu (SEM)

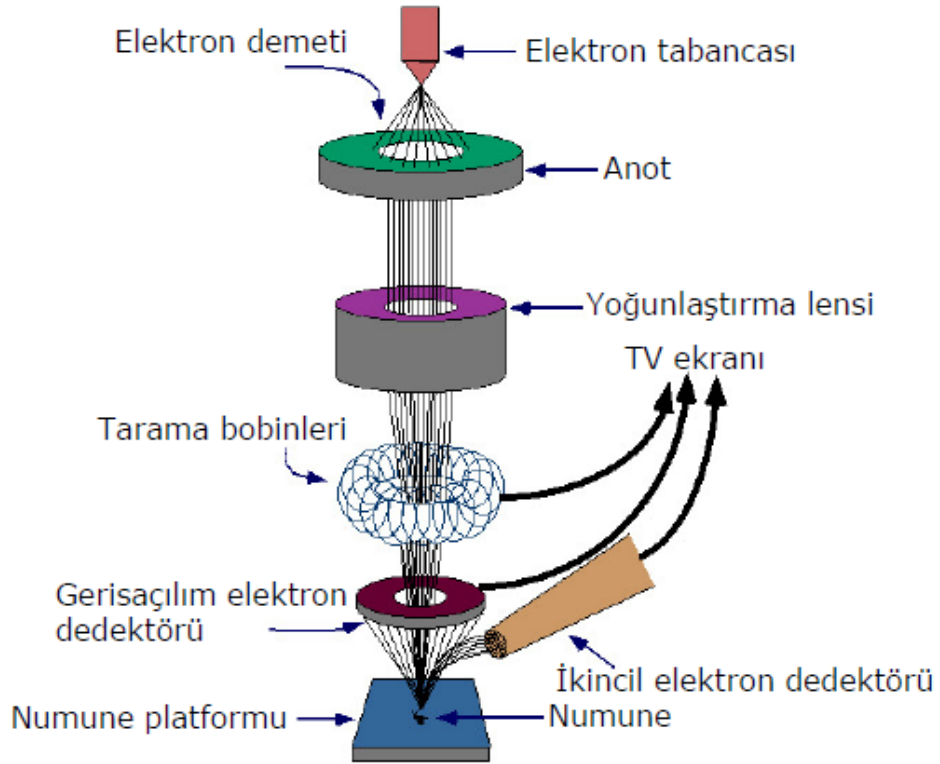
Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM), birçok dalda araştırma-geliştirme çalışmalarında kullanımı yanında, mikro elektronikte yonga üretiminde, sanayinin değişik kollarında hata analizlerinde, biyolojik bilimlerde, tıp ve kriminal

uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. İlk ticari taramalı elektron mikroskobu 1965'de kullanılmaya başlanmış, bundan sonra teknik gelişmeler birbirini izlemiştir. SEM görüntü, yüksek voltaj ile hızlandırılmış elektronların numune üzerine odaklanması, bu elektron demetinin numune yüzeyinde taratılması sırasında elektron ve numune atomları arasında oluşan çeşitli girişimler sonucunda meydana gelen etkilerin uygun algılayıcılarda toplanması ve sinyal güçlendiricilerinden geçirildikten sonra bir katot ışınları tüpünün ekranına aktarılmasıyla elde edilir [56].

Malzeme araştırmalarında en çok kullanılan cihazlardan bir tanesi SEM' dir. Bunun en büyük nedeni, numune hazırlama işleminin çok kolay oluşu ve hatta bazı durumlarda numune hazırlama işleminin gerekmeiştir. Modern taramalı elektron mikroskoplarında boyutları birkaç cm'ye ulaşan numuneler rahatlıkla incelenebilir. Ayrıca; SEM hem parlatılmış hem de pürüzlü yüzeylerden net görüntüler verebilir. SEM ile birlikte enerji-dispersif-x ışınları dedektörü kullanmak suretiyle, numune üzerindeki küçük parçacıkların (fazların) kimyasal analizleri yapılabilir. Sınırlayıcı bir takım faktörlerine rağmen, SEM analiz yöntemleri malzemeler hakkında pratik olarak değerli bilgiler vermektedir [57].

SEM cihazı çalışma prensibi incelendiğinde optik kolon, numune hücresi ve görüntüleme sistemi olarak üç temel kısımdan oluşmaktadır.

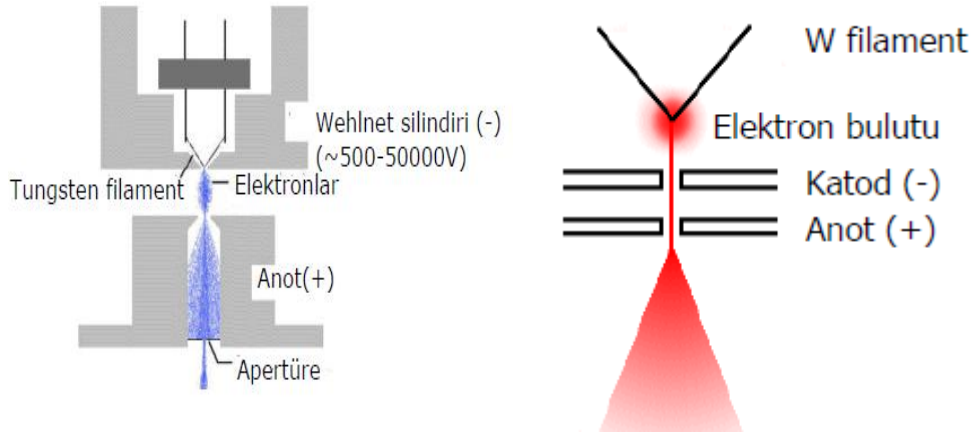
- **Optik Kolon**(Şekil 2.2), Elektron demetinin kaynağı olan elektron tabancası, elektronları numuneye doğru hızlandırmak için yüksek gerilimin uygulandığı anot tabakası, ince elektron demeti elde etmek için kondenser mercekleri, demet numune üzerinde odaklamak için objektif merceği, bu merceğe bağlı çeşitli çapta aparatürler ve elektron demetinin numune yüzeyini taraması için tarama bobinlerinden oluşmaktadır.



Şekil 2.2. Taramalı elektron mikroskobu optik kolunun çalışma mekanizmasının şematize edilmesi [58].

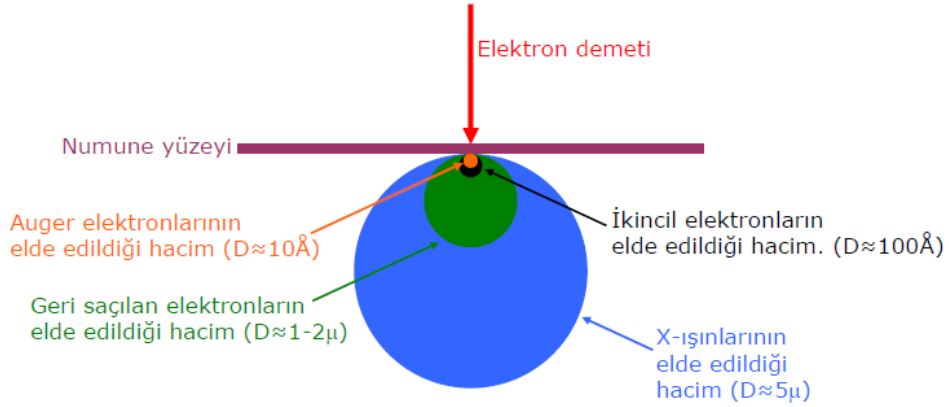
- **Görüntü Sistemi** (Şekil 2.3), elektron demeti ile numune girişimi sonucunda oluşan çeşitli elektron ve ışınları toplayan dedektörler, bunların sinyal çoğaltıcıları ve numune yüzeyinde elektron demetini görüntü ekranıyla senkronize tarayan manteyik bobinler bulunmaktadır.

SEM cihazında görüntü oluşturmak için elektron tabancası ısıtılmış bir katot, tek delikli bir kuşun levha ve anot gereklidir. Elektron tabancasından çıkan elektronlar anoda yönlendirilirler ve SEM kolonuna girerler. Elektronca oluşturulan ışık demeti elektromanyetik bobinlerce odaklandırılır. Bu işlem sırasında genellikle, mercekler kullanılır ve daha sonra hızlı bir şekilde numunenin içinde ileri ve geri incelenir. İnceleme diğer bobinlerce kontrol edilir. Işık demetinin tüm yolu vakım altında tutulur ve böylece elektronlar hava molekülleri ile etkileşmezler [57].



Şekil 2.3.Taramalı elektron mikroskopunda görüntü oluşumunu sağlayan elektron tabancalarının şematik gösterimi [57].

- **Elektron Işık Demeti**(Şekil 2.4), numuneye çarptığında üç çeşit durum meydana gelir. Bunlar;
 - Geri dağılım elektronları
 - İkincil elektronlar
 - X-ışınları



Şekil 2.4. SEM cihazında elektron ışık demeti çeşitlerinin şematik gösterimi [58].

Geri dağılım elektronları, yüzey atomlarının çekirdekleri ile saptırılırlar. Gelen elektronlar ile incelenen numunedeki atomların çekirdekleri ile arasındaki elastik (enerji transferi olamayan) çarpışmalar nedeniyle oluşurlar. İkincil elektronlar, gelen elektronlar ile iletkenlik bandındaki zayıf bağlı elektronlar veya valans elektronları arasındaki, elastik olmayan (enerji transferine yol açan) çarpışmadan dolayı meydana gelir [57]. X-ışınları, her element ve kabuk için

spesifik, kendine özgün enerjiye ve dalga boyuna sahiptir. X-ışınlarını tanımlamak için kullanılan iki teknik; enerji yayan ışıını analizi (EDX) ve dalga boyu yayan ışıını analizidir (WOX).

2.2. Yöntem

Sunulan tez kapsamında gerçekleştirilen deneysel çalışmalar genel olarak üç başlık altında toplanabilir:

1.P(IgG- co- HEMA) Kriyojel Kolon Hazırlanması

- P(IgG-co-HEMA) Kriyojel Kolon Karakterizasyon İşlemleri

2.İnsan Plasentasından FcRn reseptörlerinin Saflaştırması

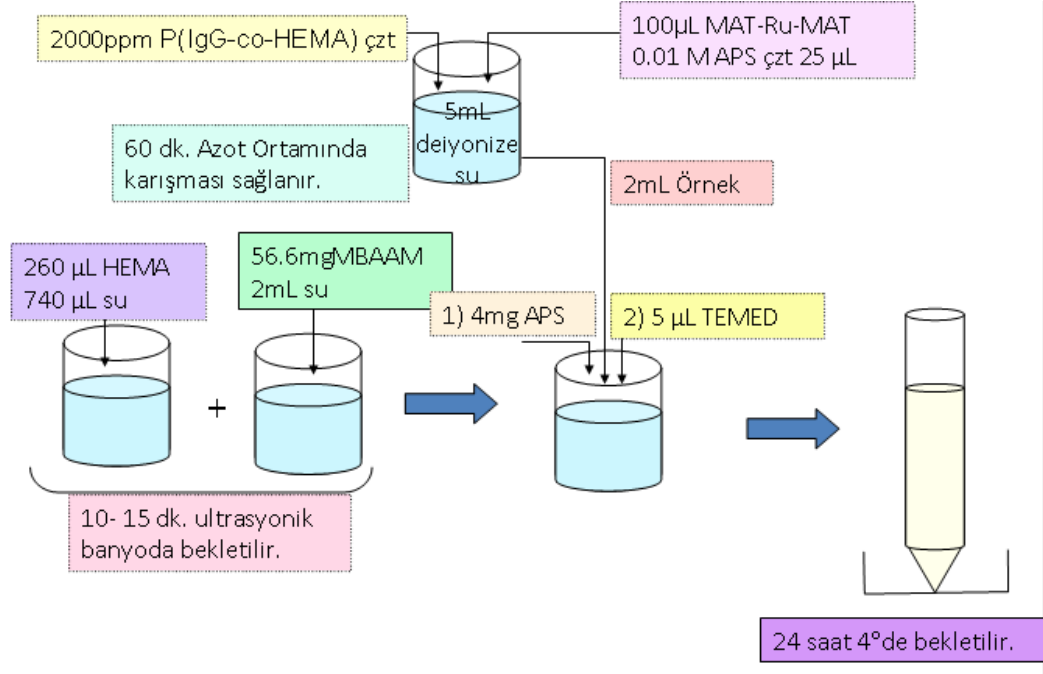
- İnsan Plasentasının Homojenizasyon İşlemi
- İnsan Plasentasından FcRn Reseptörlerinin Kromatografik Ayırımı
- Saflaştırılan FcRn Reseptörlerinin Karakterizasyon İşlemi

3.Adsorbsiyon–Desorpsiyon Çalışmaları

2.2.1.P(IgG- co- HEMA) kriyojel kolon hazırlanması

FcRn reseptörlerinin kromatografik ayırımında kullanılmak üzere biyoyumlu, büyük gözenekli ve geri basınç üretmeksizin ayırım sağlayan p(IgG-co-HEMA) kriyojel sentezlenmiştir. İlk aşamada, 260 µL HEMA'ya, 740 µL deiyonize su eklenerek ilk faz oluşturulmuştur. Oluşan karışım, ultrasonik karıştırıcıya konularak homojenizasyon sağlanmış ve daha sonra 56,6 mg MBDDM'e 2 mL deiyonize su eklenerek ikinci faz elde edilmiştir. Oluşan karışımın homojenizasyonu sağlandıktan sonra iki faz birleştirilmiş ve üzerine 2 mL 2000 ppm IgG eklenerek çoklu karıştırıcıda homojenizasyon sağlanmıştır. Daha sonra, buz banyosunda bir süre beklenerek üzerine soğukta polimerleşmenin başlamasına yardımcı olan 5 mg APS eklenmiş ve çoklu karıştırıcı 10 dak. bekletilmiştir. -18 °C'de bekletilen kolon hazneleri içerisine homojenize olmuş karışım konulmuş ve soğukta polimerleşmeyi sağlayan 4 µL TEMED eklenerek -12 °C'de buz banyosunda 2 saat bekletildikten sonra -18 °C'de 24 saat

bekletilmiştir. Elde edilen kolon materyali, fotosensitif P(IgG-co-HEMA) kriyojelidir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Fotosensitif P(IgG-co-HEMA) kriyojel sentezinin şematik gösterimi

2.2.1.1. P(IgG-co-HEMA) kriyojel kolon karakterizasyon işlemleri

Bu tez kapsamında P(IgG-co-HEMA) kriyojel kolonun karakterizasyonu nedeniyle yapılan deneysel çalışmalar şişme testi, yüzey morfolojisi analizi, BET yöntemi ile yüzey analizi, FTIR analizi olmak üzere dört alt başlık olarak incelenmiştir.

- **Şişme Testi**

Fotosensitif yöntemle gözeneklerine IgG gömülü kriyojellerin su tutma oranı şişme testleriyle belirlenmiştir. Bu işlem için kriyojel alınarak etüvde 60 °C 'de 3 saat süreyle kurutulmuştur. Kuru kriyojel tartılarak içersinde 10 mL deiyonize su bulunan behere atılmış ve bir gün süreyle bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda şişmiş kriyojel tartılarak şişme oranı bulunmuştur. Kriyojellerin şişme oranı eşitlik 2.1'e göre hesaplanmıştır.

$$\text{Şişme oranı}(\%) = \left[\frac{(m_{\text{işmiş}} - m_{\text{kuru}})}{m_{\text{kuru}}} \right] \times 100 \quad (2.1)$$

- **Yüzey Morfolojisi Analizi**

Gözeneklerine IgG gömülü kriyojellerin yüzey morfolojisi, Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) (Zeiss Ultra Plus) kullanılarak belirlenmiştir. Örnekler analiz edilmeden önce kurutulmuştur. Kuru kriyojeller örnek haznesine yerleştirilmiş ve altın ile kaplandıktan sonra SEM ile görüntüleri alınmıştır.

- **BET Yöntemi ile Yüzey Analizi**

1 g kriyojel tartılarak BET yöntemiyle yüzey analizi yapan Quantachrome Nova 2200e marka cihaza yerleştirilmiştir. Sıvı azot ile muamele edilerek ilk önce kriyojellerin gözeneklerinde bulunabilecek su uzaklaştırıldıktan sonra yapının fiksasyonu yapılmıştır. 10 noktaya analiz yapılarak kriyojelin 1 gramının yüzey alanı bulunmuştur.

- **FTIR- ATR Analizi**

Kolon içersinde FcRn hapsedilmiş ve hapsedilmemiş kriyojellerin FTIR spektrumları, FTIR spektrometresinde ATR modu kullanılarak elde edilmiştir. Kriyojeller oda sıcaklığında kurutulmuş ve FTIR spektrumları çekilmiştir.

2.2.2. İnsan plasentasından FcRn reseptörlerin saflaştırılması

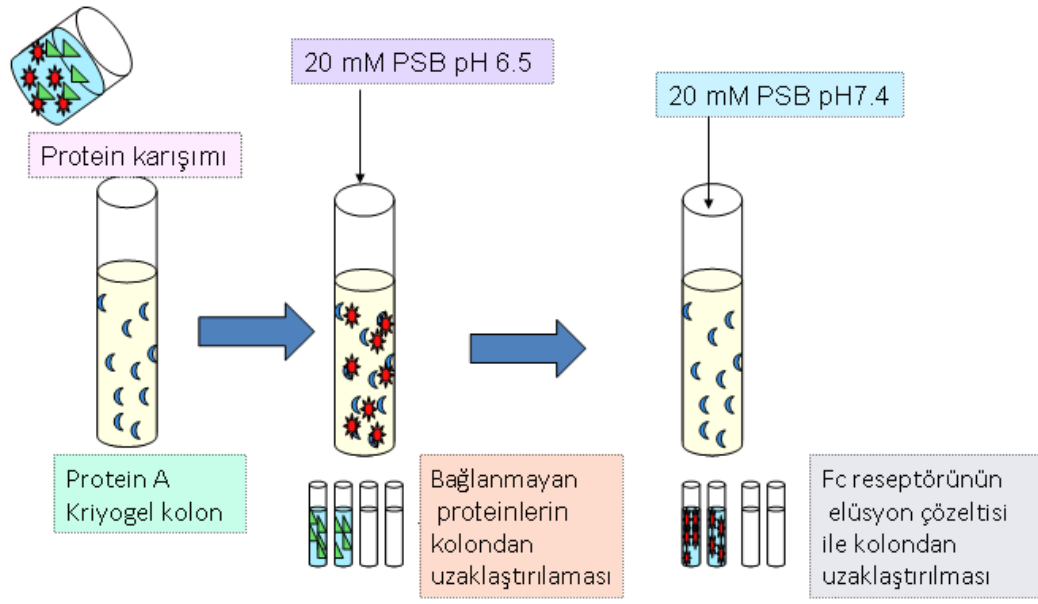
Sunulan tez kapsamından İnsan Plasentasından FcRn reseptörlerinin saflaştırılması amacıyla gerçekleştirilen deneysel çalışmalar; insan plasentasının homojenizasyon işlemi, FcRn reseptörlerin kromatografik ayrımı, saflaştırılan FcRn reseptörlerin karakterizasyonu olmak üzere üç alt başlık altında toplanabilmektedir.

2.2.2.1. İnsan plasentasının homojenizasyon işlemi

Eskişehir Kadın Doğum Devlet Hastanesinden sağlanan insan plasentası epitel dokusunda bulunan sinsitotroblastlarından kesitler alınmıştır. Bu işlemden sonra epitel doku kesitleri daha küçük parçalar haline getirilerek 100 mL Triton X 100 çözeltisi içerisinde 48 saat bekletilmiştir. Böylece; epitel dokuda bulunan FcRn reseptörleri ve diğer proteinler homojenize olarak Triton X 100 çözeltisine geçmiş olur.

2.2.2.2. İnsan plasentasından FcRn reseptörlerinin kromatografik ayırımı

Homojenize protein karışımından FcRn reseptörlerinin ayırımını sağlamak için FPLCcihazı ve kolon dolgu maddesi olarak gözeneklerine IgG gömülmüş P(IgG-co-HEMA) kriyojel kullanılmıştır. Yapılan testler sonucunda optimum akış hızı 1.5 mLdk^{-1} olarak belirlenmiştir. Tutma çözeltisi olarak 20 mM sodyum fosfat (pH 6.5) tamponu kullanılmıştır. FcRn reseptörleri tutma çözeltisi yardımıyla P(IgG-co-HEMA) kriyojel kolona taşınmıştır. Asidik pH'larda IgG molekülünün Fc kolu ile FcRn reseptörlerinin birbirlerine yüksek seçicilik gösterdiği bilinmektedir. Bu özellikten yararlanılarak hazırlanan P(IgG-co-HEMA) kriyojel kolonda FcRn reseptörleri hapsedilirken protein karışımında bulunan diğer biyolojik materyaller kolona tutunmadan sistemi terk etmiştir. FcRn reseptörleri, IgG molekülüne fizyolojik ve bazik pH'larda afinite göstermemektedir. Bu özellikten yararlanılarak 20 mM sodyum fosfat (pH 7.4) tamponu elüsyon çözeltisi olarak kullanılmıştır. Böylece; IgG-FcRn reseptörlerinin etkileşimi inhibe edilerek P(IgG-co-HEMA) kriyojel kolonda tutulan FcRn reseptörlerinin kolondan uzaklaştırılması sağlanmış olur (Şekil 2.6). Kolondan çıkan FcRn reseptörleri toplama kabına aktarıldıktan sonra liyofilizasyon işlemine tabi tutularak elüsyon çözeltisinin uzaklaştırılması sağlanmıştır.



Şekil 2.6. İnsan Plasentasından FcRn reseptörlerinin FPLC cihazı ile ayrımının şematik gösterimi

2.2.2.3.Saflaştırılan FcRn reseptörlerinin karakterizasyon işlemi

İnsan plasentasından kromatografik ayrımı gerçekleştirilen FcRn reseptörlerinin karakterizasyonu sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel (SDS-PAGE) elektroforezi ile gerçekleştirilmiştir.

- **Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS- PAGE)**

SDS-PAGE, denatüre edici maddeler (örneğin; sodyum dodesilsülfat, β merkaptotanol) kullanılarak proteinlerin poliakrilamid jelde ayrılmasını sağlayan bir tekniktir. Polipeptidlerin ilerleme hızları, sadece iç elektriksel yükleri tarafından değil, aynı zamanda molekül ağırlıkları tarafından da belirlenmektedir. Bu teknikte, proteinler denatürasyona uğrayarak üç boyutlu yapıdan linear yapıya dönüşerek poliakrilamid jelde ayrılırlar. SDS-PAGE'nin en önemli yararı, polipeptidlerin molekül ağırlıklarının belirlenmesine olanak vermesidir. Molekül ağırlığı bilinmeyen protein örnek, molekül ağırlığı bilinen standart proteinlerle birlikte, aynı jel üzerinde yanyana ceplere uygulanır ve ayrı hatlarda elektroforetik olarak ayrılır. Boyama sırasında jelde gözlenen bantların karşılaştırılması ile proteinin molekül ağırlığı hakkında bir fikir edinilebilir.

Çalışmanın amacına uygun olarak dikey jel elektroforezi hazırlanmıştır. Cam plaklar arasına 1.5 mm'lik aralık bırakılarak, jelin dökülmesi için döküm ayağına cam plaklar monte edildi. Ayırıştırma ve yürütme jeli olarak % 10'luk poliakrilamid jel hazırlanmış ve cam plaklar arasına jel çözeltisi dökülmüştür. Daha sonra örneklerin jel üzerinde ilerleyebileceği kuyucukların oluşmasını sağlayan tarak dikkatlice yerleştirildi ve jel polimerleşmeye bırakıldı. Jel polimerleştikten sonra, tarak dikkatlice çıkarılmış ve örnekler uygulanmadan önce kuyucuklara rezervuar tamponu ile doldurulmuştur.

Polimer matriksi hazırlamak için, akrilamid, N, N'-metilen bis akrilamid jel monomerleri, TEMED ve APS ise polimerizasyon başlatıcıları olarak kullanılmıştır.

Kullanılan çözeltilerin içerikleri ve hazırlanış şekli aşağıda verilmiştir;:

A) Rezervuar Tamponu (0.025 M Tris, % 0.1 SDS, pH 8.3)

Tris 2.5 g

Glisin 72 g

SDS (% 10) 50 mL, H₂O 5 L'ye tamamlanmıştır.

B) Poliakrilamid Jel Tamponu (pH 8.8)

3 M Tris-HCl; 9.075 g Tris, 12 mL 1 M HCl ile karıştırılıp pH 8.8'e ayarlandıktan sonra, bidistile su ile 25 mL'ye tamamlanmıştır.

C) Akrilamid- Bisakrilamid Stoğu (30/0.8)

9 g akrilamid, 0.24 g bisakrilamid tartılmış ve bidistile su ile 30 mL' ye tamamlanmıştır.

D) % 1.5 Amonyum Persülfat (APS)

0.045 g APS tartılıp, bidistile su ile 3 mL'ye tamamlanmıştır (taze olarak hazırlanmıştır).

E) 5xSDS-PAGE yükleme çözeltisi;

% 20 SDS..... 2.5 mL

Sukroz5 g

1 M Tris.....	0.5 mL
0.1 M EDTA.....	0.5 mL
0.8 M β -Merkaptoetanol.....	5 mL
1 mgmL ⁻¹ Bromfenol mavisi.....	1 mL

Yukarıda belirtilen maddeler karıştırıldıktan sonra karışımın pH' sı 8.0'e ayarlanmış ve su ile 10 mL'ye tamamlanmıştır.

F) % 10' luk poliakrilamid jel (40 mL);

Akrilamid-bisakrilamid çözeltisi.....	13.3 mL
Jel tamponu.....	5.0 mL
% 10 'luk SDS.....	0.4 mL
% 1.5 APS.....	2.0 mL
TEMED.....	0.015 mL
H ₂ O.....	19,285 mL

SDS-PAGE için molekül ağırlığı standardı olarak bovin serum albumin (BSA), lizozim ve ticari FcRn receptörleri kullanılmıştır. 20 μ L örnek, 6 μ L 5 x SDS-PAGE yükleme çözeltisi ile karıştırılmıştır. Örnekler 90 sn, standartlar ise 60 sn kaynar su banyosunda bekletilerek denatüre edildi ve soğumaya bırakılmıştır. Örnekler 4 μ L olacak şekilde, kuyucuklara otomatik pipet ile uygulanmıştır. Kuyucuk başı 20 mA akım verilerek elektroforez başlatılmış ve işaret boya bandı jelden çıkmadan elektroforez işlemi durdurulmuştur.

Jel elektroforez kabininden çıkarıldıktan sonra boyama çözeltisi içine konulmuş ve 48 saat süre ile boya içerisinde bırakıldıktan sonra, boyama çözeltisinden çıkarılarak distile su ile yıkanmıştır. Daha sonra, boya çıkarma 1 çözeltisinde 3-4 saat süre ile karıştırıcı ile çalkalanarak bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda boya çıkarma çözeltisi II'ye alınmış ve böylece jel yüzeyindeki boya tamamen uzaklaştığında sadece protein bantları boyalı kalmıştır.

A) Kullanılan boya çözeltileri aşağıda verildiği şekilde hazırlanmıştır. Boyama çözeltisi (% 0.025 CBBR, % 40 Metanol, % 7 Asetik asit) 0.5 Coomassie brilliant

blue R-250, 800 mL metanol içinde çözülünceye kadar karıştırılmış ve 140 mL asetik asit ilave edilip hacim, su ile 2 litreye tamamlanmıştır.

- Boya çıkarma çözeltisi I (% 50 metanol, % 10 asetik asit)
500 mL metanol üzerine 100 mL asetik asit ilave edildikten sonra toplam hacim su ile 1 litreye tamamlanmıştır.
- Boya çıkarma çözeltisi II, (% 5 metanol, % 7 asetik asit)
100 mL metanol üzerine 140 mL asetik asit (glasial) ilave edildikten sonra toplam hacim su ile 2 lt 'ye tamamlanmıştır.

2.2.3. Adsorbsiyon–Desorpsiyon çalışmaları

Sulu çözeltilerden, FcRn reseptörlerin adsorpsiyonu kesikli sistemde çalışılmıştır. Adsorpsiyon-desorpsiyon çalışmaları için başlangıç derişimi etkisi, pH etkisi ve akış hızı çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Başlangıç derişimi etkisini incelemek üzere bir seri FcRn reseptör standart çözeltisi pH 6.5 fosfat tamponunda mikropate okuyucuda okutulmuş ve kalibrasyon grafiğı elde edilmiştir. Daha sonra 4 mg IgG tutturulmuş kriyojellerden standart çözeltiler geçirilerek tekrar mikropate okuyucuda (Biotek marka Synergy Hydrid Reader (H1)) okutulmuş ve FcRn reseptörlerinin derişimi spektrofotometrik olarak 280 nm’de tayin edilmiştir. Cihazın cevabı bilinen derişimdeki FcRn standart çözeltileri ile periyodik olarak kontrol edilmiştir. Birim kütle başına, gözeneklerine IgG tutturulmuş kriyojellere adsorplanan FcRn reseptörlerinin miktarlarının hesaplanmasında 2.2 eşitliğı kullanılmıştır.

$$Q = [(C_o - C) \times V] / m \quad (2.2)$$

Bu eşitlikte Q, birim polimer kriyojel başına adsorplanan FcRn miktarını (mg g^{-1}), C_o ve C sulu çözeltideki HA’nın başlangıç ve son derişim değerlerini (mg L^{-1}), V sulu çözelti hacmini (mL) ve m ise kullanılan kriyojellerin kütlesini (g) vermektedir.

2.2.3.1. IgG tutturulmuş kriyojellerin FcRn adsorpsiyonuna pH etkisi

IgG tutturulmuş P(IgG-co-HEMA) kriyojellerin, FcRn reseptör adsorpsiyonuna pH etkisini incelemek için pH 4, 5, 6, 7, 8 ve 9 da adsorpsiyon çalışmaları spektrofotometrik yöntemle izlenerek yapılmıştır. Her bir pH'ta gram polimer başına adsorbe olan FcRn miktarları belirlenerek, FcRn adsorpsiyonu için en uygun pH değeri belirlenmiştir.

2.2.3.2.P(IgG-co-HEMA) kriyojellerin FcRn adsorpsiyonuna akış hızının etkisi

P(IgG-co-HEMA) kriyojellerinin FcRn reseptörleri adsorpsiyonuna akış hızının etkisi FPLC'de çalışılarak incelenmiştir. Hazırlanan P(IgG-co-HEMA) kriyojel FPLC de kolon dolgu maddesi olarak kullanılmış ve 0.7; 0.8; 0.9; 1; 1.1; 1.2; 1.3; 1.4; 1.5 mLdk⁻¹ akış hızlarında çalışılarak HA'nın ayrımı için optimum akış hızı belirlenmiştir.

2.2.3.3. IgG tutturulmuş kriyojellerden FcRn reseptörleri desorpsiyon

Kriyojel gözeneklerine adsorbe olan FcRn reseptörleri, 20 mmol pH 7.4 fosfat tampon kullanılarak desorbe edilmiştir. Desorpsiyon çalışmalarında desorpsiyon reaktifi, kriyojelden periyodik olarak geçirilmiştir. Kolondan çıkan çözelti içerisine alınan FcRn spektrofotometrik yöntemle tayin edilmiştir. Kriyojel kolonlardan FcRn reseptörlerin desorpsiyon yüzdelerinin hesaplanmasında 2.3 eşitliğine kullanılmıştır.

$$\text{Desorpsiyon (\%)} = \frac{\text{Desorpsiyon ortamına salınan FcRn}}{\text{Adsorplanan FcRn}} \times 100 \quad (2.3)$$

FcRn adsorpsiyonu için hazırlanan kriyojellerin tekrar kullanılabilirliğinin test edilmesi amacıyla FcRn adsorpsiyon ve desorpsiyon çalışmaları 10 kez aynı kriyojel kolonda gerçekleştirilmiştir.

3. SONUÇLAR, TARTIŞMA ve ÖNERİLER

3.1. P(IgG-co-HEMA) Kriyojel Kolon Karakterizasyonu

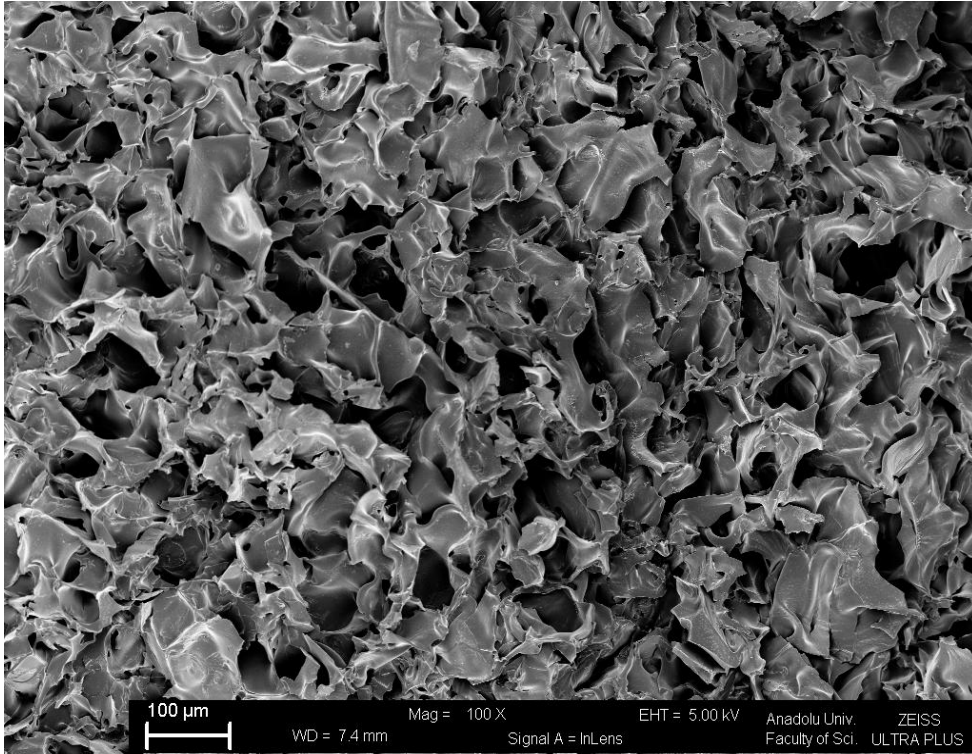
3.1.1. Şişme testi

P(IgG-co-HEMA) kriyojellerhidrojeller gibi çapraz bağlanmış hidrofobik matrikslerden oluşurlar. Bu yüzden çapraz bağlayıcı oranına ve matriksin hidrofobisitesine bağlı olarak şişebilirler, fakat sulu ortamda çözünmezler. Gözeneklerinde IgG içeren P(IgG-co-HEMA) kriyojelin denge şişme değeri 14,44 g H₂O/g kriyojelolarak bulunmuştur. P(IgG-co-HEMA) kriyojel opak, elastik ve süngerimsi yapıya sahiptir. Bu kriyojel, gözeneklerinde bulunan suyu elle basınç uygulanarak kolaylıkla dışarıya verebilir. Basınç uygulanmış kriyojel parçası su içersine bırakıldığında birkaç saniye içersinde suyu gözeneklerinde depolayarak normal şeklini ve boyutunu alır. Alkan ve arkadaşlarının süpermakroporlu p(HEMA) kriyojele tututulmuş protein A molekülü ile antibadi saflaştırması yaptıkları çalışmada, p(HEMA) kriyojellerin şişme testi sonuçlarında 1g polimer başına 8,56 g H₂O g⁻¹ hapsedildiği hesaplanmıştır [59]. Özgür E. ve ark.'nın SLE plazmadan anti-dsDNA'nın in vitro taşınması için P(HEMA) kriyojeller üzerinde yaptıkları çalışmada ise şişme testi sonuçları 6,86g H₂O/g kriyojel olarak tayin etmişlerdir [60]. Son olarak Bereli N ve ark.'nın, anti LDL antibadi baskılanmış P(HEMA) kriyojellerle ilgili çalışmalarında kullanılan kriyojellerin şişme oranları 8.89 g H₂O/g kriyojel olarak tayin edilmiştir. Literatürde yer alan çalışmalardan yola çıkarak çalışmamızda kullanılan kriyojellerin şişme oranlarının daha önce yapılan çalışmalara göre oldukça yüksek olduğu görülmektedir [61]. Bu avantaj doğrultusunda P(IgG-co-HEMA) kriyojellerin daha çok gözeneklere sahip olmasının yanı sıra gözenek boyutunun da diğer kriyojellere göre daha büyük olduğu yorumu yapılabilmektedir.

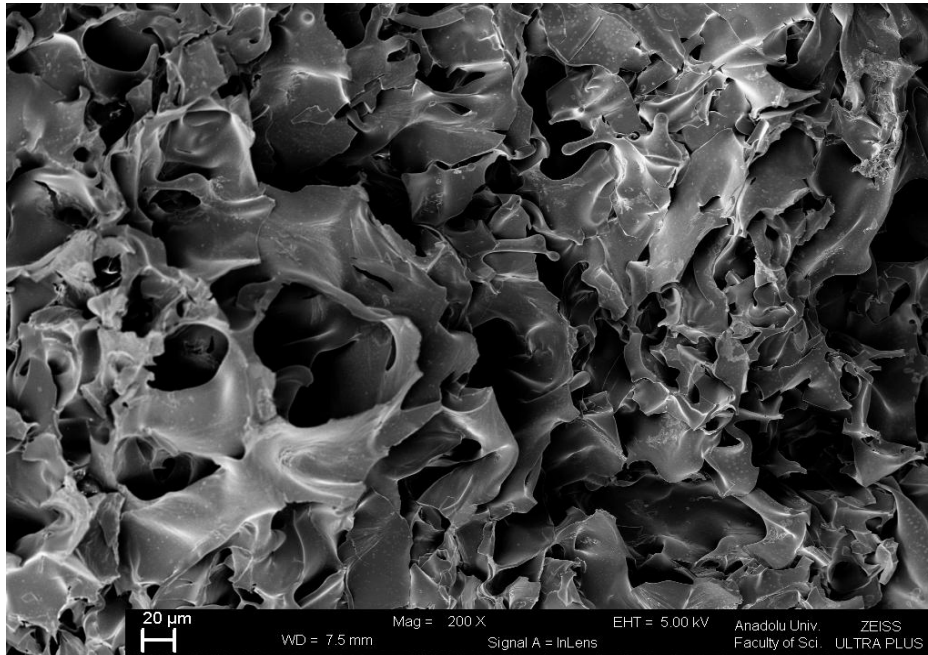
3.1.2. Yüzey morfolojisi analizi

Şırınga tüpünde sentezlenen kriyojelik kolonların, SEM ile yüzey morfolojisi incelenmiştir. Elde edilen ilk görüntüler (Şekil 3.1) kriyojelik materyallerin tipik yapısını göstermektedir. P(IgG-co-HEMA) kriyojeller, mobil fazın kriyojel kolondan geçmesini sağlayan birbirleriyle bağlantılı büyük porlara sahiptirler. Matriksin gözenek büyüklüğü FcRn reseptörlerinin boyutundan daha büyük olup kolondan FcRn reseptörlerinin geçişi kolaylıkla gerçekleşmektedir. Kriyojel gözenekleri boyunca çözeltinin konvektif akışı neticesinde kütle transfer direnci göz ardı edilebilir. Bu gözenekli yapı kromatografik prosesler için uygun akış hızları kullanılarak polimer basıncına maruz kalınmaksızın mobil faz akışına izin vermektedir [62]. Böylece geri basınç olmaksızın düşük basınçlarda kromatografik ayırım gerçekleştirilebilmektedir.

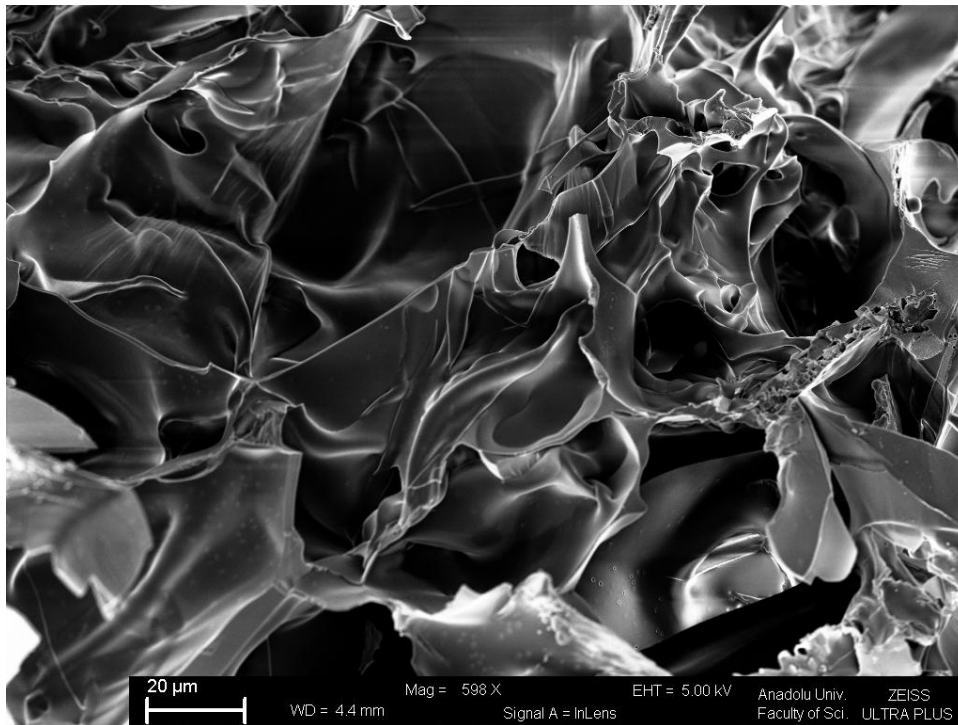
A)



B)



C)



D)



Şekil 3.1. Farklı büyütme oranlarında P(HEMA) kriyojel SEM görüntüleri A) 100X; B)200X; C)500X; D)1007 X

3.1.3. BET yöntemi ile yüzey alanı ölçümü

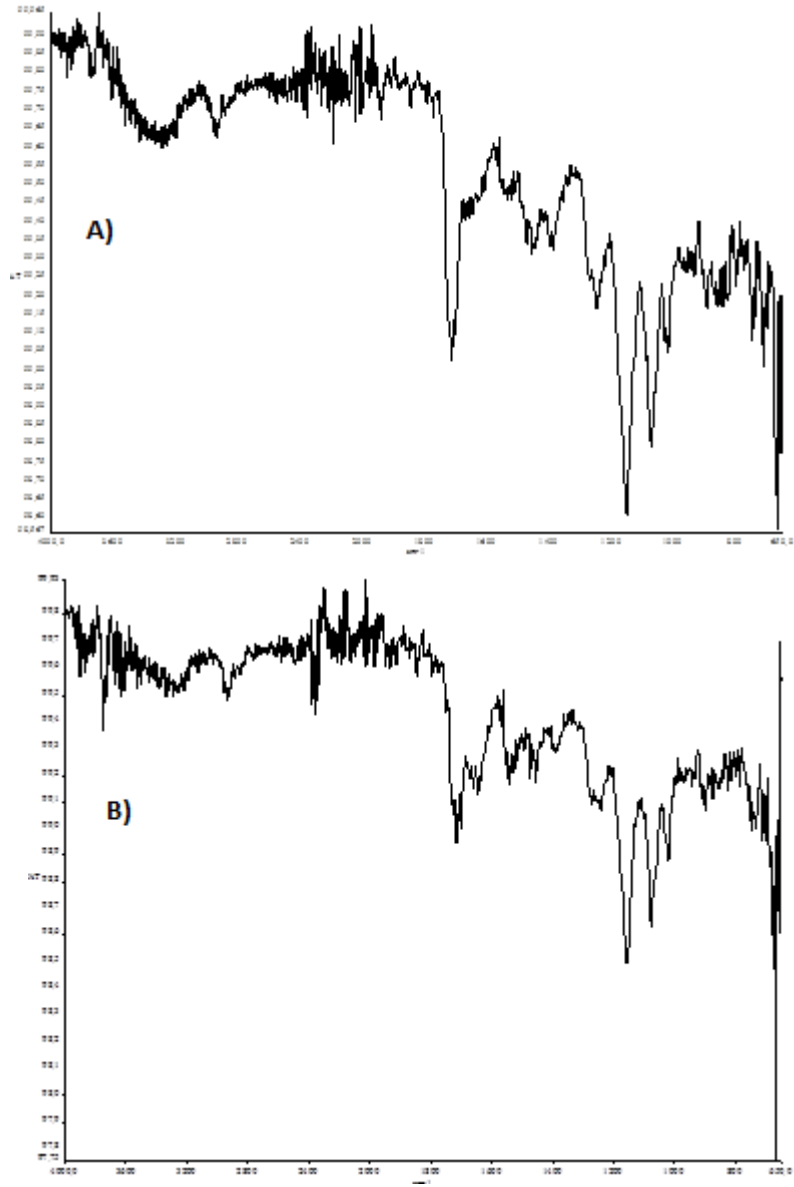
1938 yılında geliştirilen bu adsorpsiyon izotermine göre moleküller adsorbanın yüzeyine birden fazla tabaka halinde adsorbe olur. BET denklemi, Langmuir denkleminin bir genelleştirilmesi olarak kabul edilir. Bir adsorpsiyon alanındaki adsorpsiyon, komşu alandaki adsorpsiyona etki etmez. Buna ilaveten adsorpsiyon enerjisinin birinci tabakayı tuttuğu kabul edilmiştir. Fakat adsorpsiyon enerjisi, birinci tabakaya ilave yeni tabakaların oluşmasına olanak tanımaktadır.

P(HEMA) kriyojellerin spesifik yüzey alanı BET yöntemi ile $25.92 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$ bulunmuştur. Baydemir ve ark.'nın [63], “Süpermakroporlu P(HEMA) tabanlı kriyojeller bilirubin baskılı partükül gömülmesi” adlı çalışmasında PHEMA kriyojellerin yüzey alanı $14.2 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$ bulunmuştur. Bereli ve ark.'nın [64], “ UO_2 uzaklaştırılması için glutamik asit içeren PHEMA kriyojel diskler” adlı çalışmasında ise BET analiz sonuçları $20.2 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Sunulan tez

kapsamında elde edilen yüzey alanı verileri ile diğer iki çalışmanın verileri karşılaştırıldığında bu tezde elde edilen verilerin daha yüksek olduğu görülmüştür. Buradan yola çıkarak sentezlenen PHEMA kriyojellerin yüzey alanlarının daha yüksek olduğu ve gözeneklerine daha fazla IgG molekülü tutunabileceği anlaşılmaktadır. Göze çarpan bir diğer avantaj olarak ise PHEMA kriyojel gözeneklerine daha fazla IgG tutunması sonucunda saflaştırılması amaçlanan FcRn reseptörlerinin ayırımının diğer çalışmalarda kullanılan kriyojellere göre daha yüksek oranlarda gerçekleştireceği düşünülmektedir.

3.1.4. FT-IR analizi

Gözeneklerine IgG tutturulmuş ve IgG tutturulmamış metakrilamit temelli kriyojellerin FTIR spektrumları (Şekil 3.2) alınarak, kriyojelin gözeneklerine IgG partiküllerinin bağlanıp bağlanmadığı tespit edilmiştir.



Şekil 3.2. A) Gözeneklerine IgG tuturulmamış P(HEMA) kriyojelin FTIR spektrumu; B) Gözeneklerine IgG tutturulmuş P(HEMA) kriyojelin FTIR spektrumu

Hafifletilmiş toplam yansıtma (ATR; Attenuated Total Reflectance) yöntemi kullanılarak analiz gerçekleştirilmiştir. Bu yöntem; absorpsiyon bantlarının dalga boyunda azalma meydana getirerek daha az emekle ve örnek kalınlığından bağımsız olarak soğurganlığı çok fazla olabilen farklı maddelerin spektrum analizlerine olanak sağlayabilmektedir.

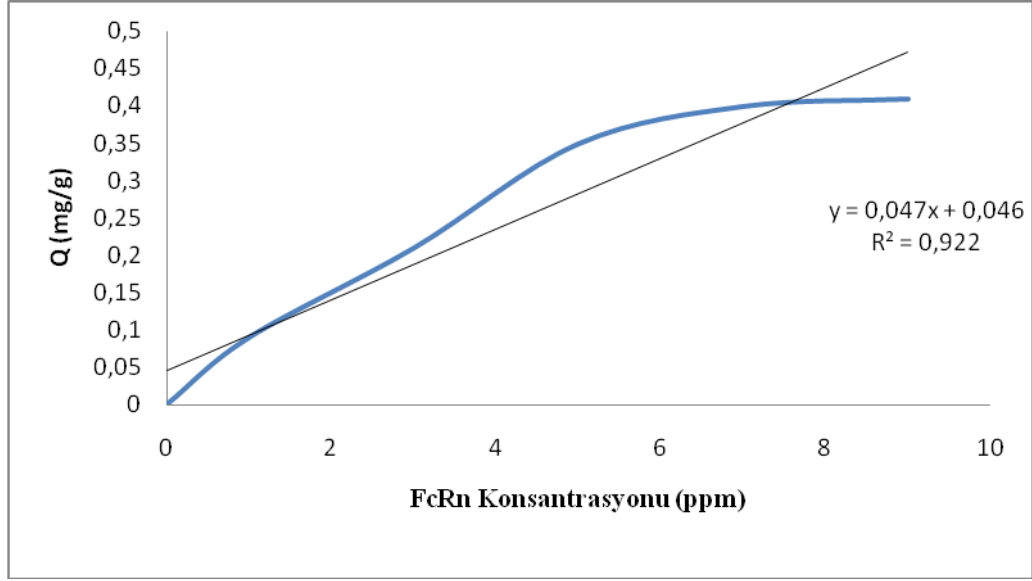
Gözeneklerine IgG molekülü tuturulmamış ve gözeneklerine IgG molekülü tuturulmuş P(HEMA) kriyojel kolonların, ATR modunda çekilen FTIR

spektrumları karşılaştırıldığında ilk spektrumda gözlenen 3600-3200 cm^{-1} arasında gözlenen pik OH- bandına ait pik olup ikinci spektrumda modifikasyondan dolayı şiddetinde azalma gözlenmiştir. 2960-2870 cm^{-1} gözlenen pik ise C-H gerilme titreşimi olup ikinci spektrumda şiddetini kaybettiği görülmektedir. 1860- 1760 cm^{-1} arasında her iki spektrumda gözlenen pik ise C=O gerilme titreşiminde olup ikinci spektrumda pikin daha keskin ve belirgin olduğu gözlenmektedir. Her iki spektrumda da gözlenen 750-700 cm^{-1} arasındaki pikler ise C-H düzlem içi eğilme ve düzlem dışı eğilme pikleridir. İki spektrum karşılaştırıldığında OH-, C-H ve parmak izi bölgesindeki C-H piklerinde gözlenen pik şiddetindeki azalma ve kaymalar ve C=O pik şiddetindeki artış P(HEMA) kriyojel kolona IgG modifikasyonun başarı ile gerçekleştirildiğini düşünmemizi sağlamaktadır.

3.2. IgG İmmobilize Kriyojellerde Adsorpsiyon Çalışmaları

3.2.1. FcRn reseptörlerin başlangıç derişiminin etkisi

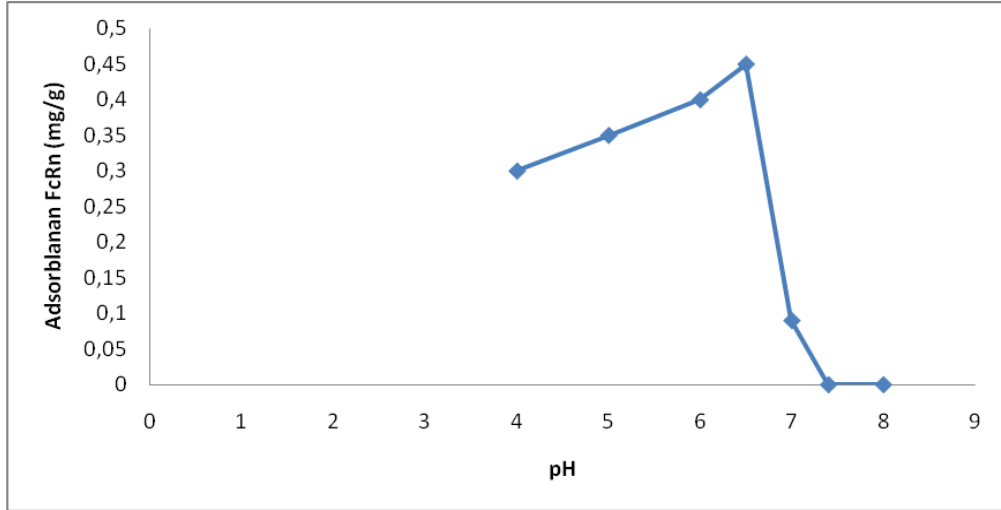
Şekil 3.3'te P(IgG-co-HEMA) kriyojel gözeneklerine adsorplanan IgG moleküllerinin FcRn başlangıç derişimine etkisi verilmiştir. P(IgG-co-HEMA) kriyojelde birim kütlesi başına adsorplanan IgG miktarı, FcRn başlangıç derişiminin artırılmasıyla artış göstermektedir. Kriyojel kolonun, etkin bağlanma boşluklarının doygunluğa ulaşması, FcRn derişiminin 9 mgL^{-1} değerine yükseltilmesine kadar devam etmektedir. pH 6.5'te fosfat tamponu kullanılarak P(IgG-co-HEMA) kriyojellerin içerisinde tutunan maksimum FcRn reseptörü miktarı 0.4 mgg^{-1} olarak bulunmuştur.



Şekil 3.3. P(IgG-co-HEMA) kriyojel kolon gözeneklerine tuturulan IgG moleküllerinin FcRn başlangıç derişimi ile değışimi

3.2.2. pH etkisi

Şekil 3.4'te P(IgG-co-HEMA) kriyojelin, FcRn adsorpsiyonu farklı pH aralıklarında incelenmiştir. Kriyojel kolonda FcRn'nin adsorplandığı optimum pH değeri olarak pH=6.5 değeri bulunmuştur. Bu pH da adsorplanan FcRn miktarı 0.4 mgg^{-1} olarak bulunmuştur. Literatürde yer alan çalışmalarda IgG-FcRn etkileşiminin asidik pH'larda birbirlerine seçicilik gösterdiklerini ileri sürerken fizyolojik ve bazik pH'larda ise herhangi bir etkileşim gerçekleşmediği görülmektedir [65,66]. Elde edilen pH grafiği doğrultusunda kriyojel gözeneklerine tuturulmuş IgG molekülleri ile FcRn reseptörleri arasındaki gerçekleşen en kuvvetli etkileşim pH6.5'te gerçekleşmektedir.



Şekil 3.4. FcRn adsorpsiyonuna pH etkisi

3.2.3. Akış hızı etkisi

FcRn adsorpsiyonu ile ilgili akış hızı çalışmaları, porlarına IgG tuturulmuş kriyojelin FPLC cihazında kolon olarak kullanılması ve hazırlanan $0,04 \text{ mgg}^{-1}$ FcRn 'nın farklı akış hızlarında geçirilmesiyle elde edilen pik alanının karşılaştırılması ile yapılmıştır. Akış hızı tespit edilirken ayırım için belirlenen optimum pH değerinde adsorplanan maksimum FcRn miktarı olan 0.04 mgg^{-1} kullanılmıştır. FPLC cihazında 0.5; 0.8; 1.0; 1.5; 2.0; 2.5; 3 mLdk^{-1} de akış hızlarında çalışılmış ve maksimum adsorpsiyonun 1.5 mLdk^{-1} da olduğu saplanmıştır.

3.2.4. Adsorpsiyon izotermi

Adsorpsiyon izotermi, adsorbent ile her bir protein molekülünün etkileşiminin karakterize edilmesinde kullanılmaktadır. Eşitlikte iki faz olduğu zaman adsorpsiyon izotermi katı faz üzerinde adsorplanan protein miktarı ve sıvı fazdaki protein derişimi arasında ilişki kurulmasını sağlar.

FcRn adsorpsiyonunu incelemek amacıyla yapıla deneyler doğrultusunda elde edilen veriler Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon izotermlerine uygulanmıştır. Langmuir adsorpsiyon modeli, her biri yalnız bir molekülü tutmaya elverişli belirli sayıda tanımlanmış bölümlere moleküllerin adsorbe

olduğunu düşündürmektedir. Bu bölümlerin eş enerjiye sahip olduğu ve yakın bölümlerdeki adsorbe olmuş moleküller arasında hiçbir ilişki olmadığı varsayılmaktadır.

Adsorpsiyon izotermi, adsorpsiyon özelliklerinin değerlendirilmesinde kullanılmaktadır. Langmuir adsorpsiyon izotermi Eşitlik 3.1 de ifade edilmektedir.

Langmuir denklemi, eşitlik 3.1 'de verilmiştir.

$$Q = Q_{\max} b C_{eq} / (1 + b C_{eq}) \quad (3.1)$$

Bu eşitlikte;

Q = Adsorbana adsorplanmış FcRn derişimi (mmol g^{-1})

C_{eq} = Çözeltideki FcRn denge derişimi (mg L^{-1})

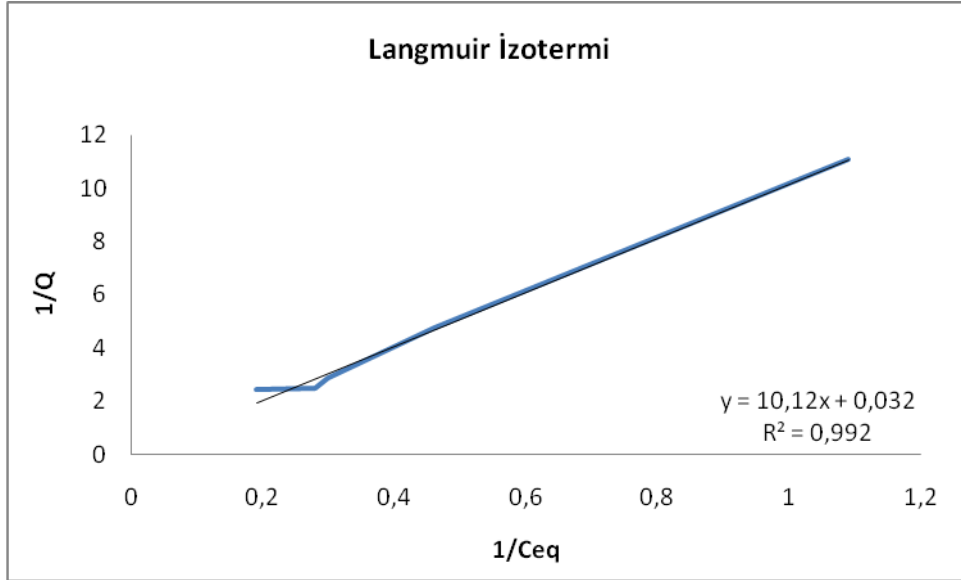
b = Langmuir sabiti (L mg^{-1})

$Q_{\max}$ = Maksimum adsorpsiyon kapasitesi (mmol g^{-1})'ni ifade etmektedir.

Bu denklem eşitlik 3.2 ile aşağıdaki gibi lineerleştirilebilir.

$$1/Q = [1/ Q_{\max} b][1/ C_{eq}] + [1/ Q_{\max}] \quad (3.2)$$

$1/Q$ ' ya karşı $1/C_{eq}$ grafiğe geçirildiğinde; kesim $1/Q_{\max}$, eğim ise $1/Q_{\max} b$ 'yi vermektedir. Şekil 3.5'te FcRn molekülünün adsorpsiyonu için Langmuir adsorpsiyon modelinin grafiği verilmiştir.



Şekil 3.5. FcRn molekülü için Langmuir Adsorpsiyon Modeli

FcRn reseptörünün Langmuir adsorpsiyon özelliklerini değerlendirmek amacıyla kesikli sistemde bir seri deneyler yapılmıştır. Deneysel veriler sonucunda, Kriyojel gözeneklerine tuturulmuş IgG molekülleri için korelasyon katsayısı (R^2) 0,992 gibi yüksek bir değer, maksimum adsorpsiyon kapasitesi $30,76 \text{ mgg}^{-1}$ ve Langmuir sabiti ise $312,469 \text{ mg}^{-1}$ olarak bulunmuştur.

Adsorpsiyon çalışmalarında sisteme uygulanan bir diğer adsorpsiyon modeli ise Freundlich izotermidir. Freundlich denklemi ideal olarak temiz ve homojen olmayan katı yüzeylerdeki adsorpsiyonlar için Alman Fizikokimyacı Herbert Max Finlay Freundlich (Eşitlik 3.3) tarafından deneysel çalışmalara bağlı olarak türetilmiştir [62].

$$\ln Q = \ln K_f + n \cdot \ln C_{eq} \quad (3.3)$$

Bu eşitlikte;

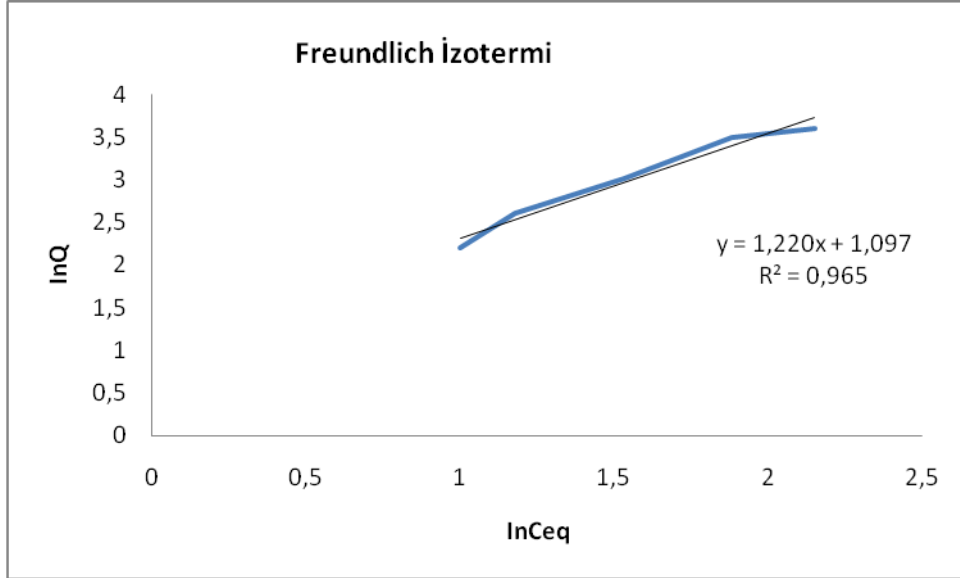
Q = Adsorbana adsorplanmış FcRn derişimi (mgg^{-1})

C_{eq} = Çözeltideki FcRn denge derişimi (mgL^{-1})

n = Freundlich adsorplanma yoğunluğu

K_f = Freundlich adsorplanma kapasitesi olarak ifade edilmektedir.

Freundlich adsorpsiyon izoterminde $\ln Q$ 'ya karşı $\ln C_{eq}$ grafiğe geçirilmektedir. Grafik incelediğinde y eksenini kestiği noktadan K_f değeri ve denklemin eğiminden ise n sabiti bulunabilir. Şekil 3.6'da P(IgG-co-HEMA) kriyojel kolonda FcRn adsorpsiyonunu ifade eden Freundlich adsorpsiyon modelinin grafiği verilmiştir.



Şekil 3.6.FcRn reseptörleri için Freundlich Adsorpsiyon Modeli

Çizelge 3.1'de P(IgG-co-HEMA) kriyojelin, Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon izotermelerinin sonuçları karşılaştırılmalı olarak verilmiştir. Elde edilen grafiklerin regresyon sabitlerine (R^2) bakıldığında Langmuir için hesaplanan değerin (0,992), Freundlich için hesaplanan değerden (0,965) daha yüksek olduğu bulunmuştur. Bu da FcRn adsorpsiyonunun Langmuir izoterminde uygun olduğunu göstermektedir. Bu verilerden yola çıkarak bağlanma bölgesi içeren bir yüzey üzerine tek tabakalı bir adsorpsiyon gerçekleştiği düşünülebilir.

Çizelge 3.1.Kriyojel gözeneklerine tutturulmuş IgG moleküllerinin FcRn adsorpsiyonunu gösteren Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon izotermlerinin karşılaştırılması

	Deneyse l	Langmuir			Freundlich		
	Q (mgg ⁻¹)	Q _m (mgg ⁻¹)	B (Lmg ⁻¹)	R ²	K _f (Lg ⁻¹)	N	R ²
Kriyo jelde FcRn	28,54	30,76	312,469	0,995	2,9954	1,2202	0,965

3.2.5. Kriyojel gözeneklerine tutturulmuş IgG moleküllerinin FcRn reseptörü bağlanma etkinliğinin ölçülmesi

Scatchard analizi, proteine afinite gösteren ligandla arasındaki ilişkinin hesaplanması için 1949 yılında George Scatchard tarafından geliştirilmiştir. Scatchard analizi, adsorplanan maddenin karakteristik özelliklerinin ve çeşitli parametrelerin incelenmesi açısından Langmuir ve Freundlich izotermine göre daha güvenilir sonuçlar verebilen doğrusal bir grafikdir. Scatchart grafiğinde gözlenen eğrilerin doğrusallıktan sapmaması, söz konusu adsorpsiyon işleminin Langmuir izotermine daha çok uyduğunu gösterir [48]. Başka bir deyişle, bir adsorpsiyon izotermi için türetilmiş Scatchart eğrisinden, Langmuir ve Freundlich modellerinin uygunluğu hakkında yorum yapılabilir. Scatchart denklemi eşitlik 3.4’de verilmiştir.

$$B/C = B_{\max}/K_D - B/K_D \dots \dots \dots (3.4)$$

Bu eşitlikte;

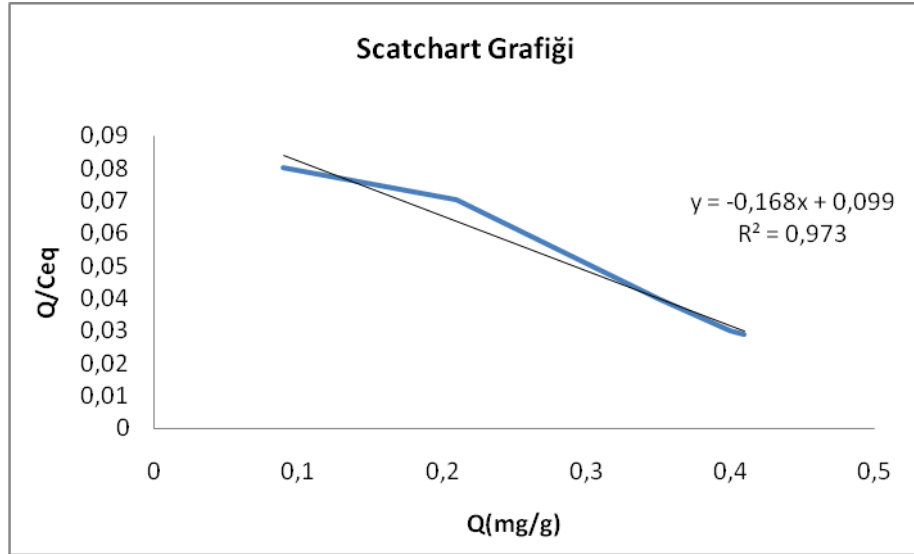
B = Polimere bağlanan IgG miktarını (mmolg⁻¹adsorban),

C = Serbest FcRnderişimini (mmolL⁻¹),

$B_{\max}$ = Maksimum bağlanma kapasitesini (mmol g^{-1} adsorban),

K_D = Ligandın ayrışma sabitini ifade etmektedir.

Bu çalışmada Scatchart analizi (Şekil 3.7) gerçekleştirilmiştir. Elde edilen grafikten K_a değeri 16890 M^{-1} ve R^2 değeri 0,973 olarak hesaplanmıştır. Maksimum ligand-değişim etkileşme sayısı olan $Q_{\max}$ ise elde edilen grafik denkleminde yola çıkılarak yapılan hesaplamalar sonucunda $5,8 \mu\text{mol g}^{-1}$ olarak bulunmuştur. M. Basu ve ark.'nın immunoafinite kromatografisi ile IgE molekülünün alt birimi olan Fc bölgesinin ayrımını gerçekleştirmişlerdir. Yapılan çalışmada, ayırım sonrasında Scatchart grafiği doğrultusunda bağlanma sabitleri $0,67 \times 10^{10}$ ve $0,24 \times 10^{10}$ olarak bulunmuştur. Bu çalışmadaki bağlanma sabitlerinin, ayrımını sağladığımız Fc reseptörlerin bağlanma sabitlerine göre daha yüksek çıkmasının sebebinin, ayırım sırasında maliyeti yüksek ticari kolon kullanılmış olmasından ve doku farklılığından olduğu kaynaklandığı düşünülmektedir [67].

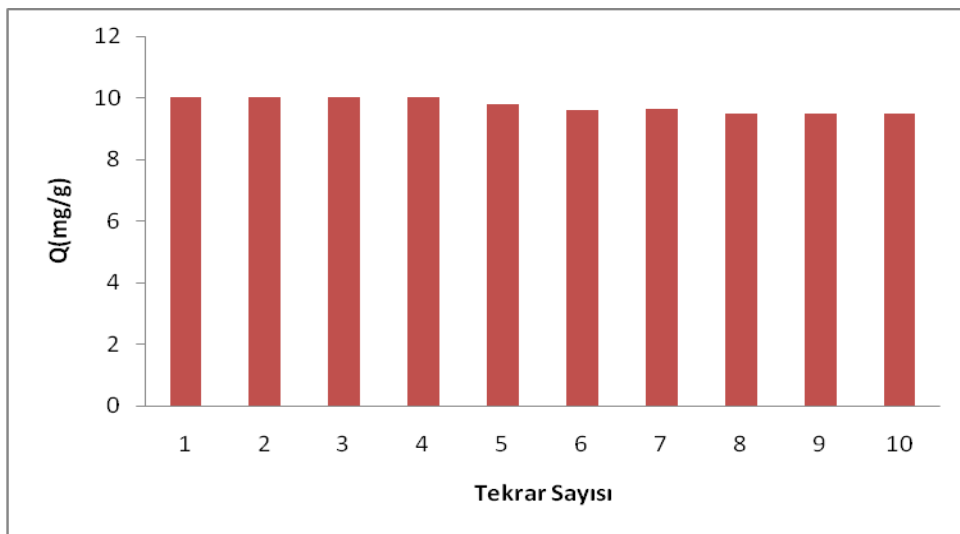


Şekil3.7. FcRn bağlamasına ilişkin Scatchard grafiği

3.2.6. Desorpsiyon ve tekrar kullanılabilirlik

Kriyojel gözeneklerine tuturulmuş IgG moleküllerine pH' a bağlı afinite gösteren FcRn reseptörlerinin sabit fazdan desorbe edilmesinde 0,1 M fosfat tamponu pH=7.4 kullanılmıştır. Desorpsiyon çalışmaları gerçekleştirilirken 25 mL desorpsiyon çözeltisi kriyojel kolondan periyodik olarak geçirilmiştir. Kolondan geçen elüsyon çözeltisi yardımıyla elde edilen FcRn reseptörleri, spektrofotometrik yöntemle tayin edilmiştir. 1 saat sonunda adsorplanan FcRn reseptörlerinin % 35'i, 10 saat sonunda ise %96 'sı matritiksten çözelti ortamına geri alınmıştır.

Gözeneklerine IgG tuturulmuş P(HEMA) kriyojel kolonun, FcRn ayırımı için tekrar tekrar kullanılabilirdiği Şekil 3.8'de gözlemlenmektedir. On kez tekrarlanan adsorpsiyon-desorpsiyon çalışması sonucunda elde edilen grafik doğrultusunda ilk altı çalışmada adsorplanan FcRn reseptörlerin geri kazanımı % 100 olarak elde edilmiştir. Onuncu çalışmanın sonrasında ise FcRn molekülünün % 96'sı geri kazanılmıştır. Bu sonuçtan yola çıkarak sentezlenen P(IgG-co-HEMA) kriyojel kolonun tekrar kullanılabilirliği oldukça yüksek olduğu söylenebilir. Bu avantajdan yararlanılarak daha uzun süre kullanılabilen, daha düşük maliyetlerde kolon sentezlenmesi gerçekleştirilebilmektedir.



Şekil 3.8. Kriyojel gözeneklerine adsorplanan IgG moleküllerin rejenerasyonu

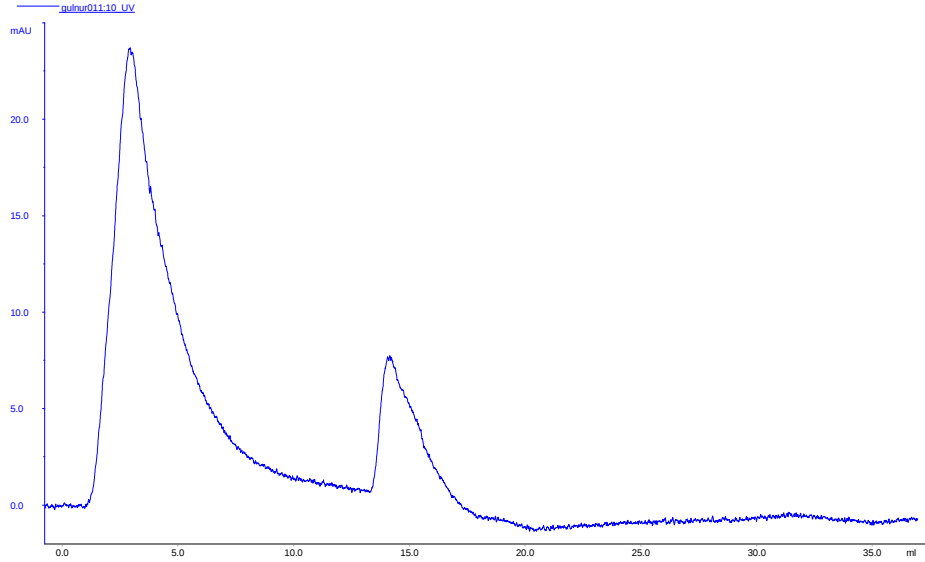
Alkan H. ve ark.'nın 2009 yılında yaptıkları protein A immobilize edilmiş süpermakroporlu poli(hidroksietilmetakrilat) kriyojel ile antibadi saflaştırılması adlı çalışmada, P(HEMA) protein A kriyojel kolon sentezlenmiştir. Kriyojel kolonda tutulan maddenin desorbe olma gücünü ölçmek amacıyla gerçekleştirdikleri çalışma sonucunda ayırımı sağlanan maddenin % 95'i geri kazanılmıştır [60]. Elde ettikleri sonuçlar bu çalışmadan elde ettiğimiz sonuçlara hemen hemen paralellik göstererek her iki çalışmada da kriyojel kolondan ayırımı sağlanan maddenin desorbe edilme oranının yüksek olduğu tespit edilmiştir.

3.3. İnsan Plasentasından FcRn Reseptörlerin Saflaştırılması

3.3.1. İnsan plasentasından FcRn reseptörlerinin kromatografik ayırımı

FcRn reseptörlerinin insan plasentasından kromatografik ayırımı, FPLC cihazı kullanılarak yapılmıştır. FPLC cihazında, kolon dolgu maddesi olarak, gözeneklerine IgG tuturulmuş kriyojel kullanılmıştır. Ayırım işleminin gerçekleştirilmeside, IgG ve FcRn reseptörlerin pH 'a bağlı olarak gösterdikleri afiniteden yararlanılmıştır. FcRn reseptörlerinin, asidik pH'larda ($\text{pH} < 6.5$) P(IgG-co-HEMA) kriyojel kolonda adsorplanırken, fizyolojik ve bazik pH'larda ($\text{pH} > 7.4$) IgG ile etkileşim göstermeyip kolondan ayrılması sağlanmıştır. Desorpsiyon sonucunda elde edilen FcRn molekülleri FPLC cihazı fraksiyon kaplarında toplanmıştır. Kromatografik ayırım işleminde hareketli faz olarak 0.1 M fosfat tamponu ($\text{pH} = 6$ ve $\text{pH} = 7.4$) kullanılmış ve akış hızı 1.5 mL dak^{-1} olarak ayarlanmıştır. İnsan plasentasından izole edilen FcRn reseptörlerinin kromatogramı (Şekil 3.9) incelendiğinde 1,69 dakikada gelen pik, kriyojel kolona tutunmadan geçen insan plasentasındaki diğer proteinlerdir. Alıkonma zamanı 12,05 dak. olan 2. pikin ise FcR reseptörüne ait pik olduğu bulunmuş ve bu dakikada kolondan çıkan sıvı fraksiyon kabında toplanarak 48 saat süre ile liyofilizasyonu yapılmıştır. Liyofilizasyon işlemiyle kolondan çıkan ve FcRn reseptörlerini içeren çözeltinin çözücüsü azot atmosferinde uçurularak katı partiküller elde edilmiştir. Elde elden bu partiküllerin FcRn olup olmadığını

anlamak için SDS-PAGE elektroforezi ile analiz yapılarak sonuçlar ticari FcRn reseptörleri ile karşılaştırılmıştır.



Şekil 3.9. FPLC cihazında P(IgG-co-HEMA) kriyojel kolon kullanılarak FcRn reseptörlerinin ayırım kromatogramı

Şekil 3.9 'da elde edilen kromatogramın alıkonma zamanlarından yararlanılarak, kromatogramlara ait ayırıcık sabitleri (R_s), kapasite faktörleri (k'), seçicilik faktörleri (α) ve teorik plaka sayıları (N) aşağıda verilen denklemler kullanılarak hesaplanmıştır.

$$R_s = \frac{2(t_2 - t_1)}{w_2 + w_1} \quad (3.5)$$

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (3.6)$$

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} \quad (3.7)$$

$$N = 5.54 \left(\frac{t_R}{w_{0.5}} \right)^2 \quad (3.8)$$

Bu eşitliklerde t_2 , FcRn reseptörleri için alıkonma zamanı, t_1 kolona tutunmadan geçen protein karışımı, t_0 kolonda tutunmayan tür için ölü zaman, w_2 , ikinci pikin taban genişliği, w_1 ise ilk pikin taban genişliğidir. Tabaka sayısını

hesaplarken kullanılan $w_{0.5}$ değeri ise ilk pik maksimum yüksekliğinin yarı yüksekliğindeki pik genişliğine karşılık gelmektedir [62].

Bu eşitliklerden yola çıkılarak protein ayırımı için bulunan R_s , k' , α ve N değerleri Çizelge 3.2’de verilmiştir. Bu çizelgede görüldüğü gibi protein ayırımı için bulunan R_s ve α değerlerinin (2,313 ve 5,01) birden büyük olması, hazırlanan kolonun iyi bir seçicilik faktörüne ve iyi bir ayırıcılığa sahip olduğunu göstermektedir. Ertürk ve ark.’nın [68] gerçekleştirdikleri “Hitrap_r protein A kolon içeren hızlı protein sıvı kromatografisi ile IgG alt birimlerinin afinite ayrılması ve karakterizasyonu” adlı çalışmada IgG molekülü Fab ve Fc olmak üzere alt birimlerine ayrılmıştır. Ayırım sonucunda FPLC kromatogramından elde edilen Fc alt biriminin ayırımının gerçekleştiği pike ait t_R , N , k' , R_s sırasıyla incelendiğinde 11.64, 1089.60, 7.31 ve 4.7 olarak bulunmuştur. Veriler karşılaştırıldığında teorik tabaka sayısının sunulan bu çalışmada daha yüksek olduğu görülmüştür. N değeri kolonun en önemli parametresidir. Kolondan çıkan pikin sivri ve dar olması ve piklerin birbirlerinden iyi ayrılması ile ilgilidir. İyi bir ayırım için tavsiye edilen N değerinin ise 2000 ‘den büyük olmasıdır. Bu teorik bilgi doğrultusunda yapılan çalışma değerlendirildiğinde sentezlenen P(IgG-co-HEMA) kriyojel kolonun amacına uygun olarak yüksek ayırım ve saflaştırma gücüne sahip olduğu yorumu yapılabilir.

Çizelge 3.2. FcRn reseptörlerinin kromatografik ayırma verileri

	t_R	N	k'	α	R_s
FcRn	8,63	2640,6	7,63	5,01	2,313
Tutunmayan protein karışımı	1,69	48,45	1,52		

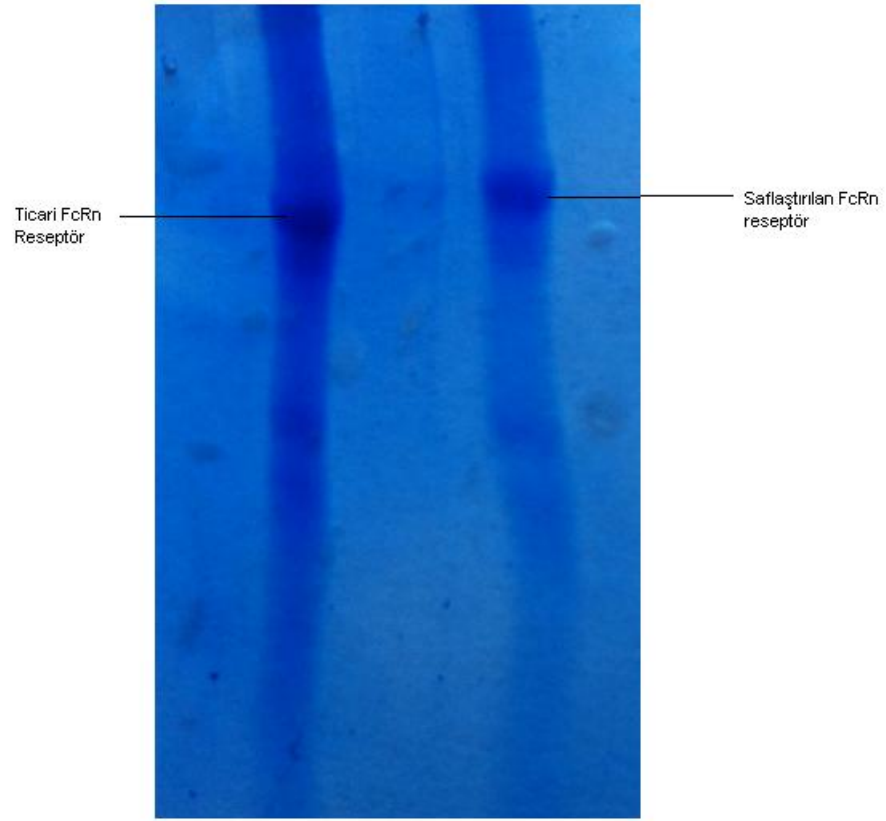
3.3.2.Saflaştırılan FcRn reseptörlerin karakterizasyonu

Bu tez kapsamında saflaştırılan FcRn reseptörleri poliakrilamid jel elektroforezin bir çeşiti olan SDS-PAGE yöntemi kullanılarak karakterizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

- **Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS- PAGE)**

SDS-PAGE, protein yapılarını molekül büyüklüklerine göre ayıran bir ayırıştırma tekniğidir. Deneylerde Amersham Pharmacia marka mini elektroforez cihazı kullanılmıştır. Hazırlanan % 10'luk akrilamid jel iki cam arasına 70 mm³ hacminde dökülmüştür. Jel içine kuyucuk açıcı tarak yerleştirilerek her bir kuyucuğa sırasıyla ticari ve saflaştırılan FcRn reseptörleri 10 µL olacak şekilde enjekte edilmiştir. Yürütme tamponu tankın içine döküldükten sonra güç kaynağı çalıştırılmış ve jel başına 10 mA akım sabit kalmak üzere elektrik verilmiştir. Numunelerin yürümesi 6 saat 15 dk sürmüştür. Daha sonra jel 24 saat boyunca boya çözeltisinde bekletildikten sonra 5;7;100 oranında metanol, asetik asit ve distile sudan oluşan yıkama çözeltisi ile jel yüzeyindeki boya uzaklaştırılmıştır.

Şekil 3.10'da SDS-PAGE elektroforez yöntemi kullanılarak %10'luk akrilamid jel üzerinde yürütülen ticari ve saflaştırılan FcRn reseptörlerinin spotları görülmektedir. FcRn reseptörün molekül kütlesi 46 kDa'dur. Jelin sağ tarafında görülmekte olan spot ticari FcRn molekülüne ait olup sol tarafta görülen spot ise insan plasentasında kromatografik ayırımı gerçekleştirilen FcRn reseptörleridir. SDS-PAGE sonucunda elde edilen jel görüntüsünden yararlanılarak ticari ve saflaştırılan FcRn reseptörlerinin spotlarının 46 kDa'da ve aynı hizada olduğu görülmektedir. Ayrıca; ticari FcRn'nin, SDS-PAGE'te tek spot verdiği görülmektedir. Ayırımı yapılan FcRn molekülünün yürüdüğü alana bakıldığında da ticari FcRn gibi tek spot verdiği gözlemlenmektedir. Bu veriden yola çıkarak kromatografik ayırımı gerçekleştirilen FcRn molekülünün saflık derecesinin oldukça yüksek olduğu yorumu yapılabilmektedir.



şekil 3.10. SDS-PAGE yöntemi ile saflaştırılan FcRn karakterizasyonu

KAYNAKLAR

- [1] T. Ası, “*Biyokimya*”, Cilt 1,1996
- [2] W. C Brown, ”Principles of biochemistry: Energy, Proteins and Catalysis”,
352 1995
- [3] E. Faraggi, T. Zhang, Y. Yang, L. Kurgan and Y. Zhou, "SPINE X: Improving protein secondary structure prediction by multi-step learning coupled with prediction of solvent accessible surface area and backbone torsion angles", *J. Comput. Chem.* 33, **259-267**,2012
- [4] Gazanfer Bingöl, ”*Proteinler*”, Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, 1972
- [5] E. Tanbay, “*Protein ayırma ve saflaştırma yöntemleri, elektroforez ve iki yönlü elektroforez* “,Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Erciyes,2007
- [6] C. A Nelson.,” Secondary Protein Structure”, *Journal of Biological Chemistry*, Volume246 ,**389**, 1980
- [7] Smith C., Marks A. D., Lieberman M., “*Temel Tıbbi Biyokimyası*”, Güneş Tıp Kitabevleri, 2007
- [8] Gökalp H., Nas S., Certel M., “*Biyokimya I*”,Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Matbaası , 2002
- [9] Miroshnikov K.A, Marusich E. I, Cerritelli M. E., "Engineering trimeric fibrous proteins based on bacteriophage T4 adhesins", *Protein Eng.*, 11(4): **329–32**, 1998
- [10] Everse S. J., Spraggon G., Veerapandian L., Riley M., Doolittle R.F., "Crystal structure of fragment double-D from human fibrin with two different bound ligands", *Journal of Biochemistry*, 37(24), **8637–42**,1998.
- [11] Tyska M. J., Warshaw, D. M., "The myosin power stroke",*Cell Motility and the Cytoskeleton*, 51(1): **1–15**, 2002
- [12] Meisenberg G., Simmons W. H., “Principles of medical biochemistry”,
Elsevier Health Sciences, pp.**243**, 2006
- [13] Daniels T.F., Killinger K. M., Michal J. J., Wright R. W., Jiang Z., “Lipoproteins, Cholesterol Homeostasis and Cardiac Health”, *International Journal of Biological Sciences*,**474- 488**, 2009

- [14] Puente L.G., Megeney L.A., “Isolation Of phosphoproteins”, *Method in Molecular Biology*,424;**365-372**, 2008
- [15] Cox, Michael; Nelson, David R.; Lehninger, Albert L,”*Lehninger Principles of Biochemistry*”, San Francisco: W.H. Freeman., ISBN0-7167-4339-62005
- [16] Burmester GR, Pezzutto A., “*Color atlas of immunology*”, New York: Thieme;p.**26-9**,2003.
- [17] Kolar GR, Capra JD.,“*Immunoglobulins: Structure and Function*”, In: Paul WE (Ed.).Fundamental Immunology. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins;. p.**47-68**,2003.
- [18] Aydoğdu B., “*Deneysel Nekrotizan Enterokolit Modelinde Oral Yoldan Verilen İmmunoglobulin A’nın Etkisi*”, Uzmanlık Tezi, Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı, 2007
- [19] Parslow T. G., Stites D. P., Terr A. I., Imboden J. B., “*Immunoglobulins & Immunoglobulin Genes*”, Medical Immunology, a Lange medical book, Tenth edition , Chapter 7, PP: **95–114**, 2001
- [20] Olcay N., Türkan E., “*İmmunoglobülinler*”, İmmunoloji ve Alerji Bölüm 9; Nobel Tıp,: **497–501**, 1993
- [21] Kılıçturgay K., “*İmmünoloji*”, 3.baskı, Nobel & Güneş kitabevi, İstanbul, Bölüm 8,: **81–95**, 2003
- [22] Ersoy B., “*Febril Konvülziyonun Serum İmmünglobülin Düzeyleri, Demir Eksikliği Anemisi ve Gluten Duyarlı Enteropati ile İlişkisi*”, Uzmanlık Tezi, Trakya Üniversitesi Tıp fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı,2008
- [23] Collin M. , Shannon O., Bjorck L., “*IgG glycan hydrolysis by a bacterial enzyme as a therapy against autoimmune conditions*”, Division of Infection Medicine, Department of Clinical Sciences, Lund University, SE-22184 Lund, Sweden, 2008
- [24] Furuta N., fujita N. Noda T., Yoshimori T., Amano A., “*Combinational Soluble N-Ethylmaleimide- sensitive Factor Attachment Protein VAMP8 and Vti1b Mediate Fusion of Antimicrobial and Canonical Autophagosomes with Lysosomes*”, *Molecular Biology of the Cell*, Vol.21,**1000-1010**, 2010
- [25] SilverthornD.U., “*Human Physiology*”, Integrated Approach, 4th ed. , 2007

- [26] Reece J., Campbell, N., “*Biology*”, San Francisco: Benjamin Cummings, ISBN0-8053-6624-5.) , 2002
- [27] Alberts, Bray B. D., Lewis J., Raff M., Roberts K., and Watson J., “*Molecular Biology of the Cell*”, New York Garland, 3rd 3edition, **230-5**,1994
- [28] The Principal Targets for Drug Action, 2008
<http://www.radcliffe-oxford.com/books/samplechapter/4784/09-3eChap9-6700a900rdz.pdf>
- [29] Connolly C.N., Wafford K.A., "The Cys-loop superfamily of ligand-gated ion channels: the impact of receptor structure on function",*Biochem. Soc. Trans.*, 32(Pt3): **529–34**, 2004
- [30] Kroeze W.K., Sheffler D.J., Roth B. L., “G- protein- coupled receptors at a glance”, *Journal of Cell Science*, vol.116;**4867- 4869**, 2003
- [31] Lodish H., Berk A., Zipursky S. L., “*Molecular Cell Biology*”, W.H. Freeman , 4 th edition, 2000
- [32] King N., Hittinger C.T., Carroll S.B., "Evolution of key cell signaling and adhesion protein families predates animal origins", *Journal of Science*, 301(5631): **361–3** ,2003
- [33] Alexander S.P., Mathie A., Peters J.A., "Catalytic Receptors",*British Journal and Pharmacology*,vol.150; **S122–7**, 2007
- [34] Albert B., Johnson A. Lweis J., “*Molecular Biology of the Cell*”, Garland Science, 4 th edition, 2002
- [35] Olefsky J. M., ”Nuclear Receptor Minireview Series”, *J. Biol. Chem.*, 276(40):**36863–4**, 2001.
- [36] Robinson- Rechavi M., Garcia H. E., Laudet V., “The Nuclear Receptor Superfamily”, *Journal of Cell Science*, 116; **585-586**, 2003
- [37] Bhasin M., Raghava G. P.S., “Classification of Nuclear Receptors Baseb on amino Acid Composition and Dipeptide Composition”, *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 279; **23262- 23266**, 2004
- [38] Di Croce, L., Okret, S., Kersten, S., Gustafsson, J.A., Parker, M., Wahli, W. and Beato, M., “Steroid and nuclear receptors”, *EMBO Journal*, 18, **6201–6210**, 1999.

- [39] G. Vidarsson, A. M. Stemerding, N. M. Stapleton., “FcRn: an IgG Receptor on Phagocytes with a Novel Role in Phagocytosis”, *American Society of Hematology*, **108 - 10**, 2012.
- [40] W. Acqua, R. Woods, E. Ward, “Increasing the Affinity of a Human IgG1 for the Neonatal Fc Receptor: Biological Consequences”, *The Journal of Immunology*, 169: **5171–5180**, 2002.
- [41] R. Ober, C. Radu, V. Ghetie and E. Ward, “Differences in Promiscuity for Antibody- FcRn Interactions Across Species: Implications for Therapeutic Antibodies”, *International Immunology*, vol. 13, **1551- 1559**, 2001.
- [42] A. Praetor and W. Hunziker, “b2-microglobulin is important for cell surface expression and pH-dependent IgG binding of human FcRn”, *Journal of Cell Science*, 115, **2389-2397**, 2002
- [43] N. Kobayashi, Y. Suzuki, T. Tsuge ve ark., ”FcRn-mediated Transcytosis of Immunoglobulin G in Human Renal Proximal Tubular Epithelial Cells”, *The American Physiological Society*, 282: **F358–F365**, 2002
- [44] D. Roopenian and S. Akilesh, “FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age”, *Nature Reviews*, Vol.7, , 2007
- [45] Şengel Türk, C. Hasçıçek, N.Gönül, “Beyne İlaç Hedeflendirilmesinde Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemler”, *Journal of Neurological Sciences*, 12;**254-263**, 2007
- [46] Temizkan G.,Arda N., “*Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler*”, Nobel Tıp Kitabevleri, 2004
- [47] Bollag D. M., “Gel- Filtration Chromotography”, *Methods in Molecular Biology*, 36, **1-9**, 1995
- [48] Skoog D. A., Holler F. J., Crouch S. R., “*Principles of Instrumental Analysis*”, 6 th edition
- [49] Poole C. F.,”The Essence of Chromatography”, *Elsevier*, Amsterdam, 44,**450-453**, 2003
- [50] Andrew A. T., “*Electrophoresis*”, Oxford Science Publiction, **93-110**, 1995
- [51] Kondo T., Seike M., Mori Y., “Application of sensitive Fluorescent dyes in linkage of laser microdissection and two-dimentional gel electrophoresis as a cancer proteomic study tool”, *Proteomics*, 3, **1758-66**, 2003

- [52] Biberoglu G., “Kütle Spektroskopometresi ve Tıp Alanında Kullanımı”, *T. Klin. J. Med Sci.*, 23, **491-498**, 2003
- [53] Biçen Ö., “*Moleküler Baskılanmış Polimer Tabanlı Kriyojel Ayırma Sistemleri ve Biyo-ayırma Uygulamaları*”, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim dalı, Eskişehir, 2009
- [54] Haupt, K., Cormack, P.A.G. ve Mosbach, K., “Biochromatography”, *Chrom. Journal*, 419, **419-431**, 2002.
- [55] Türkiye Atom Enerji Kurumu, Taramalı Elektron Mikroskobu, 2009
<http://www.taek.gov.tr/component/content/article/130malzemeteknolojisi/486-taramali-elektron-mikroskobu-sem>
- [56] Elieyioğlu S., “*Çeliklerin ısıtılma işlemi altında gösterdiği yapısal değişikliklerin taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve mössbauer spektroskopisi ile incelenmesi*”, Yüksek lisans tezi, Kırıkkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Fizik Anabilim Dalı, Kırıkkale
- [57] Karabacak M., Taramalı Elektron Mikroskobu, 2010
[http://www2.aku.edu.tr/~hitit/DERSLER/BAHAR/MALZEME%20KARAKTERIZASYON%20TEKNIKLERI/TARAMALI%20ELEKTRON%20MIKROSKOBU\[6\].pdf](http://www2.aku.edu.tr/~hitit/DERSLER/BAHAR/MALZEME%20KARAKTERIZASYON%20TEKNIKLERI/TARAMALI%20ELEKTRON%20MIKROSKOBU[6].pdf)
- [58] Schweitzer J., Scanning Electron Microscope, 2010,
<http://www.purdue.edu/rem/rs/sem.htm>
- [59] Alkan H., Bereli N., Baysal Z., Denizli A., “Antibody purification with protein A attached supermacroporous poly(hydroxyethylmethacrylate) cryogel”, *Biochemical Engineering Journal*, 45, **201-208**, 2009
- [60] Özgür E., Bereli N., Türkmen D., Ünal S., Denizli A., “PHEMA cryogel for in-vitro removal of anti- dsDNA antibodies from SLE plasma”, *Materials Science and Engineering*, C 31, **1078-1083.**, 2011
- [61] Bereli N., Şener G., Yavuz H., Denizli A., “Oriented immobilized anti-LDL antibody carrying poly(hydroxyethylmethacrylate) cryogel for cholesterol removal from human plasma”, *Materials Science and Engineering*, C 31 **1078-1083**, 2011
- [62] Y. Sarıkaya, “*Fizikokimya*”, Gazi Büro Kitapevi, Ankara: 1993

- [63] G. Baydemir, N. Bereli, M. Andaç, R. Say, I. Y. Galaev, A. Denizli, "Supermacroporous poly(hydroxyethylmethacrylate) based cryogel with embedded bilirubin imprinted particles", *Elsevier*, Volume 69, Issue 1, Pages **36–42**, 2009
- [64] D. Çimen, A. Denizli, "Immobilized metal affinity monolithic cryogels for cytochrome c purification", *Elsevier*, Volume 93, Pages **29–35**, 2012
- [65] M. Raghavan, V. R. Bonagura, S.L. Morrison, P. J. Bjorkman, "Analysis of the pH Dependence of the Neonatal FcReceptor/Immunoglobulin G Interaction Using Antibody and Receptor Variants", *Biochemistry*, 34, **14649-14657**, 1995
- [66] C. Chaudhury, C. L. Brooks, D. C. Carter, J. M. Robinson, C. L. Anderson, "Albumin Binding to FcRn: Distinct from the FcRn-IgG Interaction", *Biochemistry*, 45, **4983-4990**, 2006
- [67] Basu M., Hakimi j., Dharm E., Kondas J., Tsien W., Pilson R., Lin P., Gilfillan A., Haring P., Braswell E., Nettleton M., Kochan J, "Purification and Characterization of Human Recombinant IgE-Fc Fragment That Bind to the Human High Affinity IgE Receptor", *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 268, No. 18, pp. **13118-13127**, 1993
- [68] Ertürk G., Bereli N., Uzun L., Tümer M., "HiTrap_r Protein A Kolon İçeren Hızlı Protein Sıvı Kromatografisi ile IgG Alt birimlerinin Afinite Ayrılması ve Karakterizasyonu", *Hacettepe J. Biol. & Chem.*, 39 (2), **133–138**, 2011