

T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ANNE SÜTÜNDE İNSÜLİN BENZERİ BÜYÜME
FAKTÖRÜ İN BAĞLAYICI PROTEİNLERİNİN BLOTTING
METODU İLE ANALİZİ

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

Mehtap YELDAN

141100519980032

105229

YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI
BİYOKİMYA PROGRAMI

DANIŞMAN
Doç. Dr. Ayşe OGAN

İSTANBUL 2001

T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KABUL VE ONAY BELGESİ

ANNE SÜTÜNDE İNSÜLİN BENZERİ BÜYÜME FAKTÖRÜ PİN BAĞLAYICI PROTEİNLERİNİN BLOTTING METODU İLE ANALİZİ

Mehtap Yeldan'ın Anne Sütünde İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü P'in Bağlayıcı Proteinlerinin Blotting Metodu ile Analizi isimli Lisansüstü tez çalışması, M.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun tarih ve sayılı kararı ile oluşturulan jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Programında YÜKSEK LİSANS Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. Ayşe OGAN, Marmara Üni.
Üye : Prof. Dr. Ayşen YARAT, Marmara Üni.
Üye : Uz. Dr. Nezih HEKİM
Tezin Savunulduğu Tarih : 02.05.2001

ONAY

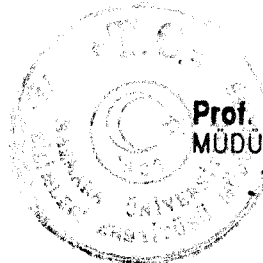
M.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun tarih ve sayılı kararı ile Mehtap Yeldan'ın Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Programında Y. Lisans (MSc.) derecesi alması onaylanmıştır.

Marmara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İMZA

MÜHÜR

Prof. Dr. Adnan AYDIN
MÜDÜR



ÖNSÖZ

Tez çalışmalarım boyunca büyük ilgi ve yardımlarıyla bana destek olan Tez Danışmanım Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Hocam Doç. Dr. Ayşe OGAN'a teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım boyunca yardımlarını esirgemeyen M.Ü. Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölüm Başkanı Sayın Hocam Prof. Dr. Kemal YELEKÇİ'ye ve maddi desteklerinden dolayı M.Ü. Araştırma Fonuna teşekkür ederim.

Ağustos,2001

Mehtap YELDAN

İÇİNDEKİLER

| | SAYFA |
|---|----------|
| SEMBOL LİSTESİ..... | I |
| KISALTMA LİSTESİ..... | II |
| ŞEKİL LİSTESİ..... | III |
| TABLO LİSTESİ..... | IV |
| ÖZET..... | V |
| SUMMARY..... | VI |
| YENİLİK BEYANI..... | VII |
| BÖLÜM I. GENEL BÖLÜM..... | 1 |
| I.1 ANNE SÜTÜ..... | 1 |
| I.1.1 Anne Sütü ve Meme Ucu Akıntısının Özellikleri..... | 1 |
| I.1.1.a Kolostrum..... | 1 |
| I.1.1.b Geçiş Sütü..... | 1 |
| I.1.1.c Olgunlaşmış Süt..... | 1 |
| I.1.2 Anne Sütü Protein İçeriği..... | 2 |
| I.2 ANNE SÜTÜNDE BULUNAN HORMONLAR, BÜYÜME | |
| FAKTÖRLERİ VE DİĞER HORMON OLMAYAN MADDELER | 3 |
| I.2.1 Hormonlar..... | 3 |
| I.2.2 Büyüme Faktörleri..... | 3 |
| I.2.3 Hormon Olmayan Maddeler..... | 4 |
| I.3 İNSÜLİN BENZERİ BÜYÜME FAKTÖRLERİ..... | 4 |
| I.4 İNSÜLİN BENZERİ BÜYÜME FAKTÖRÜ BAĞLAYICI | |
| PROTEİNLER..... | 6 |
| I.4.1 IGFBP'lerin Yapıları..... | 7 |
| I.4.2 IGFBP'lerin Fonksiyonları..... | 7 |
| I.4.3 IGFBP'lerin Tayin Metotları..... | 8 |
| I.4.4 Sekresyon Materyalinin Kaynağı..... | 8 |
| I.4.5 Hücre Yapılarına Bağlanma..... | 9 |
| I.4.6 IGFBP'lerin Klinikteki Önemi..... | 9 |

| | |
|--|----|
| BÖLÜM II. DENEYSEL BÖLÜM | 11 |
| II.1 BİYOLOJİK MATERYAL | 11 |
| II.2 KULLANILAN KİMYASAL MADDELER | 11 |
| II.3 KULLANILAN CİHAZLAR | 11 |
| II.4 HAZIRLANAN ÇÖZELTİLER | 12 |
| II.5 KULLANILANYÖNTEMLER | 13 |
| II.5.1 Modifiye Lowry Peterson Metodu (Anne Sütünde Protein Tayini) | 13 |
| II.5.2 SDS PAGE | 15 |
| II.5.3 Nitroselüloz Membrana Blotting | 18 |
| II.5.4 İyot-125 ile İşaretli IGF-I ile Proteinlerin İşaretlenmesi ... | 19 |
| II.5.5 Otoradyografi | 19 |
| II.5.6 Standartların Yerlerinin Belirlenmesi | 19 |
| BÖLÜM III. SONUÇLAR | 21 |
| III.1 SÜTTE TOTAL PROTEİN MİKTARI | 21 |
| III.2 SÜT ÖRNEKLERİNİN SDS-PAGE LİNEER GRADİENT JEL ELEKTROFOREZİ | 21 |
| III.3 ANNE SÜTÜNDE OTORADYOGRAFİ İLE BELİRLENEN IGFBP'LER | 22 |
| III.4 IGFBP'LERİN SAPTANMASI | 22 |
| BÖLÜM IV. TARTIŞMA | 23 |
| KAYNAKLAR | 25 |
| ÖZGEÇMİŞ | 28 |

SEMBOL LİSTESİ

| | |
|-----------|---------------------------|
| I | : İyot |
| N | : Azot |
| O | : Oksijen |
| Na | : Sodyum |
| Cl | : Klor |
| P | : Fosfor |
| H | : Hidrojen |
| Cu | : Bakır |
| S | : Kükürt |
| M | : Molarite (mol/litre) |
| N | : Normalite (mol/litre) |
| V | : Hacim (litre) |

KISALTMA LİSTESİ

| | |
|--------------------------------|---|
| GH | : Growth Hormon |
| PRL | : Prolaktin |
| EGF | : Epidermal Growth Factor |
| TGF-α | : Transforming Growth Factor- α |
| TGF-β | : Transforming Growth Factor- β |
| IGF | : İnsülin Like Growth Factor |
| IGFBP | : İnsülin Like Growth Factor Binding Proteins |
| NGF | : Nöral Growth Factor |
| m-RNA | : Messenger-Ribonücleic Acid |
| RIA | : Radyoimmünoassay |
| MA | : Molekül Ağırlık |

ŞEKİL LİSTESİ

| | <u>SAYFA NO</u> |
|--|-----------------|
| Şekil I.1 IGFBP'nin Hücre Yüzeylerine Bağlanmasının Etkisi ve IGF'nin IGFBP'ye ve Onun Reseptörlerine Bağlanması..... | 6 |
| Şekil I.2 IGF'ler ve IGFBP'lerin Sütteki Varlığı ve Hareketi İçin Düşünülen Mekanizma..... | 9 |
| Şekil II.1 Modifiye Lowry Protein Standart Grafiği..... | 14 |
| Şekil II.2 Düşük M.A.'lı St. Proteinlerin InMA'ları ve Rf'leri Arasında Çizilen Doğrusal Grafik..... | 20 |
| Şekil III.1 Süt Örneğinin ve Düşük M.A.'lı St.'ların % 4-14 Lineer Akrlamid SlabJel Elektroferez..... | 21 |
| Şekil III.2 Otoradyografi ile çıkan IGFBP Bantları..... | 22 |

TABLO LİSTESİ

| | <u>SAYFA NO</u> |
|---|-----------------|
| Tablo I.1 Bilinen 6 IGFBP'nin, M.A.'ları, Kaynakları ve Bazı Öz. | 7 |
| Tablo II.1 Düşük M.A.'lı Standart Proteinleri | 17 |
| Tablo II.2 Düşük M.A.'lı St. Proteinlerin M.A.'ları ve Elektrophorez Sonucu Hesaplanan Rf Değerleri | 19 |



ÖZET

ANNE SÜTÜNDE İNSÜLİN BENZERİ BÜYÜME FAKTÖRÜ İN BAĞLAYICI PROTEİNLERİNİN BLOTTING METODU İLE ANALİZİ

Anne sütünde insülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı proteinlerinin belirlenmesi için öncelikle yağsız anne sütü SDS-PAGE elektroforezine tabi tutuldu ve bunu takiben Western Blotting yöntemi uygulandı. Blotting sonucu nitroselüloz membran ¹²⁵I ile işaretli IGF-I ile bir gece inkübe edildi. Daha sonra Kodak BioMax MS-1 X-Ray filmi ile dört gün boyunca -70°C'de inkübasyona bırakıldı.

Elde edilen filmin özel filtre kullanılarak fotoğrafı çekildi. Bu şekilde IGF-I ile bağlanan IGFBP-2 ve IGFBP-3'ün varlığı kanıtlanmış oldu.

Ağustos, 2001

Mehtap YELDAN

SUMMARY

ANALYSIS OF INSULIN LIKE GROWTH FACTOR-I BINDING PROTEINS IN HUMAN MILK USING WESTERN BLOTTING METHOD

Defatted breast milk proteins were identified by SDS-Polyacryamide gel electrophosis and the protein bands were blotted by Western Blotting method. To idedntify the insulin like growth factor-I binding proteins, the blot was incubated overnight with ¹²⁵I-labeled IGF-I. The blot was then exposed to Kodak BioMax MS-1 X-Ray film for four days at -70°C to screen the proteins. The film was developed and was shown that IGFBP-2 and IGFBP-3 were bounded by labeled IGF-I.

August, 2001

Mehtap YELDAN

YENİLİK BEYANI

ANNE SÜTÜNDE İNSÜLİN BENZERİ BÜYÜME FAKTÖRÜ'NİN BAĞLAYICI PROTEİNLERİNİN BLOTTİNG METODU İLE ANALİZİ

Anne sütünde IGFBP'lerin varlığı ¹²⁵Iyot ile işaretli IGF-I ve çeşitli yöntemler kullanılarak kanıtlanmıştır.

Bu çalışma; bundan sonra yapılacak anne sütündeki IGFBP'ler ile ilgili araştırmalara metot açısından çok yardımcı olacaktır. Ayrıca anne sütündeki IGFBP'lerin varlığı hakkındaki sorularıda cevaplandıracaktır.

Ağustos, 2001

Doç. Dr. Ayşe OGAN

Mehtap YELDAN

BÖLÜM I. GENEL BÖLÜM

I.1 ANNE SÜTÜ

I.1.1 Anne Sütü ve Meme Ucu Akıntısının Özellikleri

Anne sütü, yeni doğan bebek için en iyi besindir, kompozisyonu bebek için gerekli tüm besinleri sağlayabilecek özelliktedir [1,2,3]. Gebeliğin son aylarında, çoğunlukla memelerden küçük miktar süt salgısı olur. Doğumdan sonra bebek emmeye başlayınca, süt hızla artar. Normal şartlarda, laktasyonun ikinci gününde süt miktarı 100 ml civarındadır, ikinci hafta 500 ml'ye yükselir. Etkili ve yeterli süt oluşumu, normal olarak doğumdan sonra 10-14 gün arasında olur ve sonraki aylarda, sağlıklı bir bebek 24 saatte 700-800 ml süt tüketir[4,5]. Buna rağmen, anne ve bebek grupları üzerinde yapılan çalışmalar, bu miktarlarda büyük değişimler olabileceğini göstermektedir[2]. Anne sütü oluşmaya başladıktan sonra kolostrum, geçiş sütü ve olgunlaşmış süt olmak üzere üç aşama geçirir:

a. Kolostrum

Doğumdan hemen sonra salgılanan sarı ve yapışkan bir süt görünümündeki sıvı, kolostrum olarak isimlendirilir. Laktasyonun ilk haftası boyunca salgılanır, kompozisyonu ve içindeki maddelerin miktarları olgunlaşmış süte göre oldukça farklılıklar gösterir. Yağ oranı düşük olduğu için kalorisi, daha sonra gelen sütlere göre biraz daha düşüktür. Sarı renk, A vitamininin öncül maddesi, beta-karotenden ileri gelir. Kolostrum, yüksek protein ve düşük yağ miktarı ile yeni doğanın gereksinimlerini en iyi şekilde karşılayacak şekilde ayarlanmıştır, ayrıca antimikrobiyal proteinler; IgA, IgG ve laktoferrin, albumin ve laktalbuminler, olgunlaşmış süte göre oldukça fazla miktarlardadır[6,7,8,9].

b. Geçiş Sütü

Geçiş sütü, doğumdan sonra 7-14 gün arasında salgılanır. Protein miktarı düşerken, laktoz miktarı artar[9].

c. Olgunlaşmış Süt

Genellikle doğumdan 15 gün sonra gelmeye başlar. Protein miktarı azalırken, yağ oranı oldukça artmıştır. Buna bağlı olarak enerji miktarı da artar,

elektrolit miktarları ise düşüş gösterir. Yapılan çalışmalar, sadece anneler arasında değil, aynı anneden değişik zamanlarda alınan süt örneklerinde bile, sütün içeriğinin oldukça değiştiğini göstermektedir[1,5].

İnek sütü ile anne sütü arasında, çok az benzerlik vardır. İnek sütü ağırlıklı beslenen altı aydan küçük bebeklerde görülen hipernatreminin en önemli nedeni, inek sütünün yüksek oranda sodyum içermesidir. İnek sütündeki sodyum ve potasyum miktarı, insan sütündekinin üç katıdır, kompozisyonu da oldukça farklıdır. İnsan sütündeki "whey" proteinlerinin, kazeine oranı 65:35 iken, inek sütünün proteinlerinin % 80'i kazeindir[10]. Bu da inek sütünün, yenidoğan tarafından tolere edilmemesinin en önemli nedenidir. İnek sütü kazeininin midede oluşturduğu çökelek, insan sütünün oluşturduğundan daha kalın ve lastiksidir[11].

I.1.2 Anne Sütü Protein İçeriği

Süt proteinlerinin önemli bir bölümü meme bezlerinde, büyük öncül moleküller halinde sentezlenir, daha sonra mikrozomal proteazlar tarafından uygun yerlerinden parçalanır postsentetik olarak Golgi Aparatında birikir, fosfat ve sialik asit eklenerek glikoproteinler halinde ortama salınırlar[12]. Sütteki protein miktarı, beslenmedeki değişiklikten etkilenmez, protein miktarı doğumdan hemen sonra, kolostrumda çok yüksek iken, laktasyonun ilk haftasında hızla düşmeye başlar[13].

Sütteki proteinler iki grupta incelenir. Çöken proteinler "Kazeinler" ve çökmeyen proteinler "Whey" proteinler olarak isimlendirilir. Kazeinler, izoelektrik noktaları pH:4.6'dan çöken fosfoproteinlerdir, beslenmede çok önemli olan, kalsiyumu bağlarlar. Bebeğin midesinde, ortamda çökelek oluştururlar. Laktasyonun erken döneminde kazeinler, total süt proteinlerinin ~ % 20'sini oluştururken, daha geç dönemlerde ~ % 45'ini oluşturduğu saptanmıştır[14].

I.2 ANNE SÜTÜNDE BULUNAN HORMONLAR, BÜYÜME FAKTÖRLERİ VE HORMON OLMAYAN MADDELER

Süt ve kolostrum biyolojik aktiviteye sahip pek çok protein, peptid ve steroid içerir. Bu maddeler hormon (örneğin; laktoferrin, transferrin), büyüme faktörleri veya hormon dışı etkileri olan maddelerdir. Sütte bulunan pek çok biyoaktif maddenin fonksiyonlarının çoğu bilinmemektedir ve araştırılacaktır[15].

I.2.1 Hormonlar

- A) Adrenal Bezi hormonları
- B) Gonadal hormonlar (Östrojenler ve progesteron)
- C) Beyin-gut hormonları (GnRH, Somostatin, GH, TRH)
- D) Büyüme hormonları (İnsulin, Relaksin, Büyüme Hormonu (GH), Prolaktin (PRL))
- E) Diğer hormonlar; Kalsitonin, PTH-related peptid, Eritropoetin, TSH, Tiroid bezi hormonları, prostoglandinler

Sütte bulunan hormonların içinde en çok bulunanları tiroid bezi hormonları, relaksin, gonodotropin serbestleştirici faktör, prolaktin ve östrojendir.

Yukarıda saydığımız bu hormonların metabolik düzenlemeye katkıları vardır. Örneğin adrenal bezi hormonlarından kortikosteroidler meme bezinde sentez kapasitesini artırır, eritropoetin yenidoğanda eritroporezi uyarırken, TSH yenidoğanda T_3/T_4 seviyesini düzenlemeye yardımcı olur. Büyüme hormonu (GH), IGF-I'in hücresele seviyedeki miktarını ayarlar ve büyümeye yardımcı olur, PRL meme bezinde laktasyonu sağlar [15].

I.2.2 Büyüme Faktörleri

Sütte bulunan büyüme faktörleri Epidermal Büyüme Faktörü (EGF), Transforming Büyüme Faktörü α (TGF- α), Transforming Büyüme Faktörü β (TGF- β), İnsulin Benzeri Büyüme Faktörleri; IGF-I ve IGF-II, Nöral Büyüme

Faktörü (NGF), İnsulin Benzeri Büyüme Faktörü Bağlayıcı Proteinleri (IGFBP'ler) dir.

Yüksek konsantrasyonda büyüme faktörlerinin olması üç açıdan önemlidir.

- 1- Süt anne organizmasının biyolojik klirensinin yapıldığı uygun bir ortam olabilir.
- 2- Biyoaktif süt faktörleri meme bezinin büyüme fonksiyonunu etkileyebilir. Örneğin; IGF'lerin meme bezinde yüksek miktarda bulunması gebelik sırasında çok aktif meme büyümesi ve gelişmesinin olduğu period ile uygun düşmektedir. Aynı zamanda laktasyonun devam etmesi ve kesilmesi meme bezinde bulunan pek çok büyüme ve büyümeyi engelleyici faktörler tarafından sağlanmaktadır.
- 3- Sütte bulunan bu biyoaktif maddeler, besinlerin transferinde rol oynayabilir ve pek çok cenin dokuların büyümesini ve farklılaşmasının düzenler [15].

I.2.3 Hormon Olmayan Maddeler

Hormon dışı etkisi olan, örneğin immunoglobulinler, allerjinler, opiyatlar, enzimler, kasomorfınler ve siklik nükleotidler gibi maddeler de anne sütünde bulunmaktadır ve bunların bebeğin gelişimi üzerinde önemli etkileri olduğu ileri sürülmektedir[15].

I.3 İNSÜLİN BENZERİ BÜYÜME FAKTÖRLERİ (IGF-I VE IGF-II)

İnsan plazmasında IGF'lerin varlığı insüline karşı oluşturulan anti-serumun insülin benzeri aktiviteyi engelleyemediğinin gösterilmesi ile öne sürüldü[15]. IGF'ler bugün insülin, IGF-I, IGF-II ve relaksinden oluşan insülin ailesinin bir kısmıdır. Bu ailenin farklı faktörlerinin arasındaki homoloji diğer aile bireyleri reseptörleriyle çapraz reaksiyon verebileceği ve biyolojik cevapları başlatabileceği düşüncesini uyandırmaktadır. İnsülin benzeri büyüme faktörleri (IGF-I ve IGF-II) hücre bölünmesinde ve farklılaşmasında önem taşırlar. IGF-I ve IGF-II polipeptid yapıdadırlar ve molekül ağırlıkları 7.5 kD civarındadır. Proinsülinin homologlarıdır. *In vitro* ve *in vivo* deneylerde hem metabolik hem de büyüme üzerine etkileri olduğu saptanmıştır. Serum, süt ve diğer biyolojik

sıvılarda bulunurlar ve kendilerine özgü olan sayıları bugün için 6 olan bağlayıcı proteinlerle sıkıca bağlanırlar. IGF'ler endokrin etkilerinin yanısıra onları bağlayan proteinler olan IGFBP'lerin düzenlemesi altında oto/parakrin etkilerde gösterirler. IGF'ler bugün en geniş büyüme düzenleyicisi, geliştiricisi ve farklılaştırıcısı olarak geniş bir şekilde dağılmışlardır[15].

Sütte bulunan büyüme faktörleri, büyümenin ve meme dokusunun salınım fonksiyonlarının düzenlenmesinde önemli olduğu kadar yeni doğanın büyümesinin düzenlenmesinde, gelişim ve bağırsak sisteminin, gut, immün sistem ve diğer nöroendokrin sistemlerin olgunlaşmasında da önemli rol oynarlar[15]. Klaksbrun [16], insan sütünde tıpkı inek sütünde olduğu gibi büyüme faktörlerinin bulunduğunu ve kültür edilmiş hücrelerin büyümesini saptayan ilk araştırmacıdır. Baxter ve ark.[17] IGF'lerin insan sütünde varlığını Radyoimmünoassay (RIA) ile göstermişlerdir ve en yüksek konsantrasyonların geçiş ve olgunlaşmış süte göre kolostrumda bulunduğunu saptamışlardır. Malven ve ark.[18] ineklerin doğum öncesi sekresyonlarında IGF'lerin bulunduğunu tespit etmişlerdir. Diğer araştırma grupları da sütte büyümeyi uyarıcı veya engelleyici etkisi olan bir takım protein yapılı faktörlerin varlığını saptamışlardır[15].

IGF-I'in temel kaynağının karaciğer olduğu sanılmaktadır. Fakat IGF-I'in m-RNA' sının meme bezlerinde eksprese edilmesi IGF-I'in lokal olarak da üretiminin önemli olabileceğini akla getirmektedir[15].

IGF reseptörleri insulin reseptörlerine çok benzemekle birlikte bir çok yönden farklılıklar gösterir. İnsülin reseptörü gibi molekül ağırlığı 300-350.000 dalton arasında değişen bir membran glikoproteinidir. İki tane α alt ünitesi ve iki tane de β alt ünitesi içerir (90.000 dalton).Örneğin IGF-I reseptöre bağlandığında intrasellüler tirozine özgü protein kinaz aktivitesini uyarır ve β alt ünitesinin fosforillenmesini sağlar. Bu fosforillenmeyi takiben sinyal başlar[15].

Yukarıda saydığımız bu hormon ve büyüme faktörlerinin bir kısmı anne kanından yapısı ve aktivitesi değişmeden süte derhal taşınırken bazıları glikozilasyon, fosforilasyon ve proteoliz gibi işlemlerle meme bezinde ve ya sütün içinde bir takım değişikliklere uğramaktadır[15].

I.4 (IGFBP) İNSÜLİN BENZERİ BÜYÜME FAKTÖRÜ BAĞLAYICI PROTEİNLER

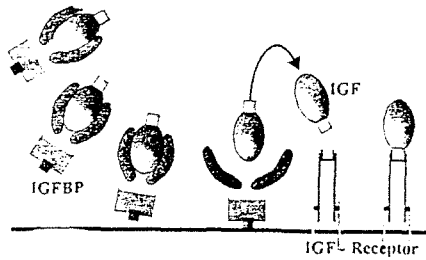
IGF'ler serbest halde IGFBP'ler ile kompleks oluştururlar(Şekil-I.1). Bunlardan 6 tanesi karakterize edilmiştir. IGF-I ve IGF-II'yi bağlamaları farklıdır. IGFBP'ler IGF etkisini düzenleyen en önemli düzenleyicidirler ve aynı zamanda IGF transport proteinlerini de kontrol ederler. IGF'den bağımsız hareket eden IGFBP'lerde keşfedilmiştir. Örneğin; büyüme hormonunun seviyelerinin tespitinde önemli indikatörler haline gelmişlerdir[15].

IGFBP'lerin kandaki varlığı Hintz ve Liu [19] tarafından gösterilmiştir. Fakat önemlerini o zaman çok iyi kavranılmamıştır. Yakın zamanda yapılan bir konferansta 6 tane bağlayıcı protein olduğu açıklanmıştır ve bunların herbirinin tanımlanması için uluslar arası bir isimlendirme kabul edilmiştir [15].

Bilinen IGFBP'lerden dört tanesi(IGFBP-1-4) çeşitli türlerin sütünde saptanmıştır. Fakat anne sütünde IGFBP-4 saptanmamıştır. IGFBP-1 ve IGFBP-3'ün IGF-I ve IGF-II'ye ilgisi eşit iken, IGFBP-2'nin ilgisi IGF-II'ye IGF-I'den daha fazladır[20].

IGFBP'lere ilaveten IGFBP-3'ü bağlayan bir protein varlığı keşfedildi. Fakat IGFBP'lere doğrudan bağlanmayan bu proteinin kan dolaşımında aside dayanıklı bir kompleks olduğu saptanmıştır[15].

Diğer IGFBP türlerindeki muhtemelen sütte buldukları, sütün işlenmesi sırasında veya proteolitik olarak diğer IGFBP'lerden kopan parçalar oldukları tahmin edilmektedir. Fakat şimdiye kadar yapılan çalışmalarda sütte tespit edilememişlerdir[15].



Şekil-L1 IGFBP'nin Hücre Yüzeylerine Bağlanmasının Etkisi ve IGF'nin IGFBP'ye ve Onun Reseptörlerine Bağlanması

I.4.1 IGFBP'lerin Yapıları

Altı farklı IGFBP Tablo-I.1 deki gibi tanımlanır. Yaklaşık 260'a yakın amino asit uzunluğunda proteindirler. N ve C terminal bölgeleri, disülfid bağlarla konformasyon yapacak şekilde çok sayıda sistein kalıntıları ile homoloji gösterir. Birincil yapının orta bölgesinde heterojenlik vardır, sırası herbir IGFBP'ler için karakteristiktir. Altı çeşit bağlayıcı protein büyük oranda değişkendir. Farklı kaynaklardan saflaştırılırlar. Reseptörlerden çok daha fazla IGF'lere ilgileri vardır; tercihli olarak IGF-I ya da IGF-II'ye bağlı olabilirler; ayrıca glikolizlenebilirler ya da fosforlanabilirler. Hücre yüzeyleri matriks yapılarla ilişkiye izin verecek şekilde olabilir. Belirli gen yapılarına sahip olabilirler ve genleri farklı kromozomlarda yerleşiktir[21].

Tablo-I.1 Bilinen 6 IGFBP'nin, Molekül Ağırlıkları, Kaynakları ve Bazı Özellikleri(21)

| IGFBP | SDS-PAGE yön. ile bul. M.A. (kDa) | Kaynak | Tercihli bağlanma | Glikozilasyon | Proteoliz |
|-------|-----------------------------------|-----------------------------------|-------------------|---------------|-----------|
| 1 | 25 | İnsan, koyun ve inek sütü . | IGF-I = IGF-II | - | - |
| 2 | 31 | İnsan, sıçan, inek ve koyun sütü. | IGF-II | - | + |
| 3 | 42/38 | İnek, koyun, sıçan ve insan sütü. | IGF-I= IGF-II | N-bağlı | + |
| 4 | 26 | İnek, koyun ve sıçan sütü. | IGF-I = IGF-II | N-bağlı | + |
| 5 | 29 | Tespit edilememiştir. | IGF-II | - | + |
| 6 | 23 | Tespit edilememiştir. | IGF-II | O-bağlı | - |

I.4.2 IGFBP'lerin Fonksiyonları

- IGF'leri plazmanın içine taşırlar, damar yüzeyinden akımını kontrol eder ve metabolik klirensini düzenlerler.
- IGF'lerin dokuya yerleşmesine imkan sağlarlar.
- IGF'lerin reseptörler ile etkileşimini düzenlerler.
- IGF den bağımsız direkt fonksiyonları vardır.

IGFBP'lerin belli deneysel koşullar altında IGF'lerin etkilerini arttırdıkları keşfedilmiştir. Hücre yüzeyine bağlı bir IGFBP'nin biyolojik rolü; IGF'lerin bağlanma ilgilerini azaltmaktır, böylece reseptörler ile etkileşime girmek için serbest kalırlar.

I.4.3 IGFBP'lerin Tayin Metotları

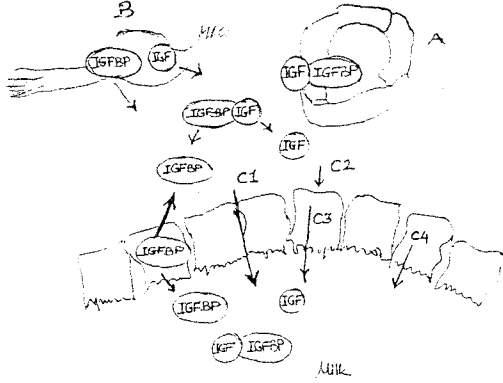
IGFBP'ler immünoassay veya ligant-blot yöntemiyle tayin edilmektedirler. Ligant tekniği kullanıldığı zaman elektroforez ile ayrılan IGFBP'ler veya onların fregmanları ¹²⁵I ile işaretli IGF veya işaretli poliantiklonal antikor ilave edilerek tespit edilirler. Ligant-blot ile IGFBP yapılarının IGF'lere bağlanması görünür hale gelir.

I.4.4 Sekresyon Materyalinin Kaynağı

Büyüme faktörlerinin kaynağı ve süte transferi için üç yol düşünülmektedir. Şekil-I.2'de kaynaklar ve büyüme faktörlerinin transfer mekanizmaları gösterilmektedir. Ekstrasellüler sıvıdan transfer edilebildikleri gibi *de nova* sentez ile meme bezi hücrelerinde sentezlenmektedirler. Meme dokusunda ise epitel hücreler ve epitel olmayan hücrelerde örneğin fibroblastlarda sentezlenmektedirler[15].

IGF sentez ve akısına spesifik IGFBP'ler ile eşlik etmektedir.. Kandaki IGF'ler IGFBP'ler ile sınırlandırılmıştır ve çoğu hallerde IGFBP'ler IGF'lerin biyolojik etkilerini engeller. Bütün hücreler IGFBP'lerin sentezine katkıda bulunabilirler. Fakat sentez yöntemleri doku ve hücreler arasında farklılık gösterir. Meme sekretör epitel hücreleri IGFBP'leri sentezler ve salgılar. Şekil-I.2 IGFBP'lerin meme hücrelerinden, diğer meme hücrelerinden (v.b. fibroblastlar) ve kandan meydana geldiğini göstermektedir. Meme hücreleri tarafından IGFBP'lerin sentezlenmesi ve salgılanması IGF'lerin pozitif kontrolü altında iken, EGF'ler ile negatif kontrolü altındadır. Diğer faktörlerin de bu düzenlemeye katkısı olması muhtemeldir. Ayrıca meme salgılarında IGFBP'ler kolosturumda ve doğum öncesi süt sürecinde değişir. Bu yüzden IGF'lerin akı mekanizmaları

IGFBP'lerin örneklerindeki değişiklikleri ve meydana gelişlerini tamamlamalıdır (15).



Şekil-I.2 IGF'ler ve IGFBP'lerin Sütteki Varlığı ve Hareketi İçin Düşünülen Mekanizma
A: Kapiler Yatak, B: Epitel Olmayan Hücreler(Fibroblastlar), C: Geçiş Yolları

I.4.5 Hücre Yapılarına Bağlanma

IGFBP ler IGF aktivitesini hücre yüzeylerine bağlanarak da düzenlerler. Mekanizma çok iyi anlaşılacakla birlikte IGFBP ler integrin ailesine ait spesifik reseptörlere veya heparin bağlayıcı domainlere bağlanırlar (Şekil-I.2). Hücre yüzeylerine bağlanarak IGF ler ile hem fazla temas önlenmiş hem de IGF ler reseptörleri ile etkileşmede serbest kalmış olur. Hücre yüzeylerine bağlanan IGFBP'ler IGF den bağımsız olan etkilerini de göstermiş olur. Örneğin endotel hücrelerinden glukoz alınımını arttırmak gibi. IGFBP'nin proteolitik yıkım ürünü IGF'ye bağlanamazken hücre büyümesini engelleyebilmektedir[15].

I.4.6 IGFBP'lerin Klinikteki Önemi

IGFBP'ler birçok metabolik olayda klinik önemi olan proteinlerdir. IGF-IGFBP-İnsülin sisteminde olan değişiklikler büyüme hormonu (GH) sekresyonu ve etkisiyle doğrudan ilgilidir. Örneğin, büyüme hormonu yetersizliği , akromegali ve büyüme hormonu direnci gibi. Özellikle IGFBP-3 miktarının seviyesinin 24 saatte salınan toplam büyüme hormonu miktarıyla çok yakından ilgili olduğu

saptanmıştır. Büyüme hormonu yetersizliği olan çocuklarda serum IGF-I ve IGFBP-3 seviyelerinin, büyüme hormonu yetersizliğine bağlı olmayan boy kısalığı olan çocuklara göre daha az olduğu saptanmıştır. IGFBP-3 seviyesindeki farklılık çok daha büyüktür. Bunun bir sebebi IGFBP-3 seviyelerinin daha az değişken olmasıdır. Akromegali olan hastalarda ise IGFBP-3 seviyeleri çok yüksektir. Büyüme hormonu hassasiyetinin olmadığı durumlarda IGFBP-3 seviyesi çok düşüktür ve dışarıdan IGFBP verilse de seviyeleri artmaz. Bu durum IGFBP-3'ün ölçümünü büyüme hormonu yetersizliği veya direnci olan çocuklarda çok değerli bir teşhis parametresi haline getirir. Aynı şekilde akromegalide de rutin bir laboratuvar testi haline gelmiştir [21].

IGFBPlerin Renal yetmezlikte hormon dengelerinin bozulmasına bağlı olarak IGFBP 3 düşük molekül ağırlıklı fregmanın aşırı miktarda olduğu IGF ile bağlanmanın da aşırı olduğu ve bu durumun büyüme üzerinde olumsuz etkisi olduğu saptanmıştır[21].

Tümör hipoglisemisinde ve kanserde IGFBP ölçümü önem kazanmıştır. Bazı kanserli hastalarda serum IGFBP-2 seviyesi artarken IGFB-3 seviyesinin azaldığı saptanmıştır[21].

Katabolik durumlarda örneğin ameliyat sonrası, diabet ve gebelik gibi durumlarda IGFBP miktarlarını arttığı saptanmıştır[21].

Biz bu çalışmamızda IGF-I'i bağlayan proteinlerin sütteki varlığını Western Blotting Metodunu kullanarak gösterdik. Bu çalışma IGF-I izolasyonu ile ilgili kapsamlı projenin bir kısmını gerçekleştirmek amacı ile yapılmıştır. Çalışmamız klinik çalışma yapmak isteyen araştırmacıların katılımı ile devam edecektir. Çalışmamızın bundan sonraki bölümünde beslenmesi tam olduğu halde gelişim bozukluğu gösteren yeni doğanların anne sütlerinde IGFBP yönünden eksiklikleri olup olmadığının araştırılmasıdır.

BÖLÜM II. DENEYSEL BÖLÜM

II.1 BİYOLOJİK MATERYAL (ANNE SÜTÜ TEMİNİ)

Anne sütü Pakize Tarzi Kliniği'nden temin edildi. Süt önce 3700 rpm'de santrifüjlendi. Santrifüj sonucu üstte toplanan krema uzaklaştırıldı. Toplam hacim 3 ayrı kısma bölünerek gerekli çalışmalar için -40°C 'de saklandı.

II.2 KULLANILAN KİMYASAL MADDELER

- Çalışmamızda kullanılan Tris-HCl (Tris [hidroksimetil] aminometan hidroklorik), Tris-baz (Tris [hidroksimetil] aminometan), Bisakrilamid (N,N'-Metilen-bis-Akrlamid), TEMED (N,N,N',N'-Tetrametil etilendiamin) ve BSA(Bovine serum albumin), **Sigma, St. Louis, MO,USA**. ; Comassie brillant blue R-250, Metanol, Glasial asetik asit, Borik asit, SDS (Sodyum dodesil sülfat), Amonyum persülfat, Gliserin ve Brom fenol blue, **Merck Co. Darmstadt**; Akrlamid (Akrilik asit amid) ve Glisin, **Fluka Co.**; ^{125}I ile işaretli IGF-I, **Research Reagents** firmalarından temin edildi. Kullanılan bütün reaktifler analitik saflıktadır. Film: **Sigma**, KODAK, Biomax MS-1 (13*18), Kaset: **Sigma**, Exposure Cassette, Stainless Steel (13*18 Film), Nitroselluloz membran: **Sigma, St. Louis, MO,USA**.

II.3 KULLANILAN CİHAZLAR

- Spektrofotometre SCHIMADZU UV-VISIBLE RECORDING SPECTROPHOTOMETER UV-240
- Otomatik Mikropipet TRANSFERPETTE(GERMANY)
- Hamilton Pipetler 50ml'lik, 25ml'lik
- pH metre ELEKTRO-MAG
- Etüv GENLABMIDI /2/ AL (100 derece)
- Hassas Terazı SATORIOS ANALYTIC
- Vorteks FISIONS Whırlı Mixer
- Derin Dondurucu SANYO Medical Freezer
- Distile Su Cihazı FISTREEM CYCLON
- Elektroforez Cihazı (SDS-PAGE) SCHLEICHER&SCHUELL, Pofile System
- Elektroforez Güç Kaynağı SIGMA-ALDRICH, TECHWARE PS 250-2

- Blotting Cihazı SAMMY, SCHLEICHER&SCHUELL,
Semi-dry blotter

II.4 HAZIRLANAN ÇÖZELTİLER

Modifiye Lowry Metodu ile Protein Tayini için Hazırlanan Çözeltiler

- PBS (150 mM NaCl + 5 mM Na₃PO₄ pH=8.0)
- % 15 DOC (Sodyum deoksi kolat)
- % 72 TCA (Trikloroasetik asit)
- 2.0 mg/ml BSA (Bovine serum albumin)
- A Reaktifi (CTC+SDS+NaOH+Su)
- B Reaktifi (1:5 Folin-Ciocalteau :Distile Su)

SDS-PAGE Metodu için Hazırlanan Çözeltiler

- % 10 SDS (Sodyum dodesil sülfat)
- % 10 APS (Amonyum persülfat)
- Akrilamid/Bisakrilamid çözeltisi ((30 g/0.9g)/ dL)
- Tris Çözeltisi (1.5 M, pH:8.8)
- Tris-HCL Çözeltisi (1.0 M, pH:6.8)
- Boyama çözeltisi (2.5g Comassie Brilliant Blue / 454mL Distile Su / 454mL Metanol / 92mL Glacial Asetik asit)
- Boya çıkarma çözeltisi (%10(V/V) Asetik asit)
- PAGE Tamponu (3g Tris-baz / 15g Glisin / 1g SDS / 1000mL Distile su)
- PAGE Yükleme Tamponu (1mL Tris-HCl / 1.6mL Gliserin / 2mL %10 SDS / 0.2mL %0.1 Brom fenol blue / 8mL Distile su)

Western-Blotting için Hazırlanan Çözeltiler

- Blotting Tamponu(50mM Borat / %20 Metanol pH:9.0)
(3.09g Borik Asit, 250mL Metanol, 18.6mL 1N NaOH, 750mL Distile su)

¹²⁵I'li IGF- I ile İşaretleme için Hazırlanan Çözeltiler

- Salin(0.15M NaCl, 0.01M Tris-HCl, 0.5mg/mL Sodyum Azid, pH:7.4)

- %3 NP 40
- %1 BSA
- %0.1 Tween 20

Otoradyografi Metodu İçin Hazırlanan özeltiler

- Developer özeltisi
- Fixer özeltisi

II.5 KULLANILAN YÖNTEMLER

II.5.1 Modifiye Lowry-Peterson Metodu (Anne Sütünde Protein Tayini) [23]

Kullanılan Stok özeltiler

- 1- %20'lik Sodyum Karbonat özeltisi hazırlandı ve bu çözeltiye Bakır Sülfat Tartarat özeltisi eklenerek son konsantrasyon'u %0.1 olan $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ elde edildi. %0.2 Potasyum Tartarat ve %10 Sodyum Karbonat eklendi.
- 2- %10 SDS
- 3- 0.8N NaOH
- 4- Folin-Ciocalteu reaktifi 2N. Asidik özeltide Sodyum Tungstat ve Sodyum Molibdat içerir.

Kullanılan alışma çözeltileri

- 1- PBS (Fosfat tuz tamponu) 150mM NaCl, 5mM Na_3PO_4 , pH=8.0
- 2- % 0.15 Sodyum Deoksi Kolat(DOC)
- 3- % 72Triklora Asetik Asit(TCA)
- 4- Sığır Serum Albumin(BSA)
- 5- A Reaktifi: CTC, SDS, NaOH stok özeltileriyle suyun eşit miktarlardaki karışımı alışmanın büyüklüğüne göre hazırlandı.
- 6- B Reaktifi: 1:5 oranında Folin Ciocalteu ile distile su karışımı hazırlandı.

Deneyin Yapılışı

| | | | | | |
|-----------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| BSA | 0 μ L | 10 μ L | 20 μ L | 40 μ L | 80 μ L |
| Distile su | 1000 μ L | 990 μ L | 980 μ L | 960 μ L | 920 μ L |
| %15 DOC | 100 μ L | 100 μ L | 100 μ L | 100 μ L | 100 μ L |
| %72 TCA | 100 μ L | 100 μ L | 100 μ L | 100 μ L | 100 μ L |
| A reaktifi(1:1) | 1000 μ L | 1000 μ L | 1000 μ L | 1000 μ L | 1000 μ L |
| A reaktifi | 1000 μ L | 1000 μ L | 1000 μ L | 1000 μ L | 1000 μ L |
| B reaktifi | 500 μ L | 500 μ L | 500 μ L | 500 μ L | 500 μ L |

%15'lik DOC ilavesinden sonra 10 dakika beklendi.

%72'lik TCA ilavesinden sonra karıştırma işlemi uygulanarak tüpler 10 dakika 10000*g'de santrifüjlendi. Süpernatantlar dekante edilerek tüpler ters çevrildi ve uçları iyice kurulanıp o halde tutuldu.

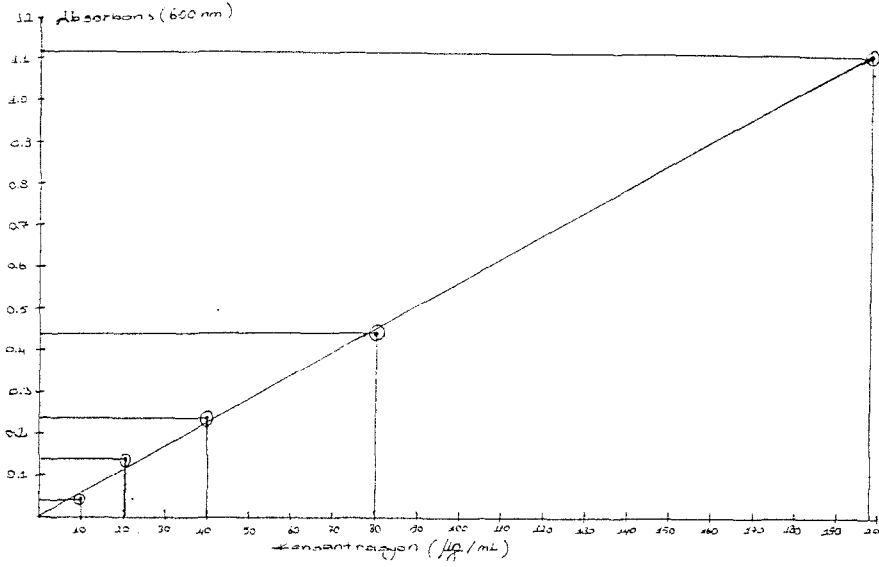
1. A Reaktifi eklenmesinden sonra tekrar karıştırma işlemi uygulandı.

2. kez A Reaktifi eklenip tüpler karıştırıldı ve 5 dakika beklendi.

B Reaktifi ilavesinden sonra karıştırma uygulandı ve 30 dakika beklendi.

| 600nm'de Abs.ölçümü | 1.TÜP | 2.TÜP | 3.TÜP | ORTALAMA |
|------------------------|-------------|-------|-------|----------|
| 10 μ L BSA | 0.033 | 0.048 | --- | 0.040 |
| 20 μ L BSA | 0.131 | 0.138 | 0.123 | 0.131 |
| 40 μ L BSA | --- | 0.208 | 0.200 | 0.204 |
| 80 μ L BSA | 0.446 | 0.452 | 0.434 | 0.444 |
| 100 μ L ÖRNEK | 1.184 (1:1) | 1.056 | --- | 1.120 |

ÖRNEK : 100 μ L Yağsız süt, 900 μ L Distile su



Şekil-II.1 Modifiye Lowry Protein Standart Grafiği

II.5.2 SDS-PAGE Yöntemi[25]

Bu yöntem proteinleri denatüre ederek, molekül ağırlıklarına göre peptidlerine ayırır.

Kullanılan Çözeltiler

- 1- Tris-baz çözeltisi(1.5M, pH=8.8)
- 2- Tris-HCl çözeltisi(1.0M,pH=6.8)
- 3- SDS çözeltisi (%10W/V)
- 4- Akrilamid/Bisakrilamid çözeltisi ((30g/0.8g)/dL)
- 5- APS çözeltisi (%10W/V, hazırlandıktan sonra hemen kullanılmalıdır).
- 6- TEMED
- 7- Glisin
- 8- Gliserin
- 9- Bromfenol blue çözeltisi (%1W/V)
- 10- Boyama çözeltisi
- 11-Boya çıkarma çözeltisi
- 12- PAGE tamponu
- 13- PAGE yükleme tamponu

Deneyin Yapılışı

1. SDS-PAGE için Slab Jelin Hazırlanması

a. %12.5'luk Jelin Hazırlanması

| | |
|---------------------------------------|-----------|
| Bidistile su | : 10 ml |
| Tris-baz(1.5M, pH=8.8) | : 7 ml |
| Akrilamid/Bisakrilamid((30g/0.8g)/dl) | : 12.5 ml |
| %10 APS | : 0.1 ml |
| %10 SDS | : 0.3 ml |
| TEMED | : 20 µL |

Bu reaktifler sırası ile bir erlene devamlı karıştırılarak konuldu. Hemen gradient oluşturucunun 2. kolonuna konuldu. En son TEMED koyularak karıştırmaya devam edildi.

b. %4.5'luk Jelin Hazırlanması

| | |
|---------------------------------------|-----------|
| Bidistile su | : 7.5 ml |
| Tris-HCl(1.0M,pH=6.8) | : 1.25 ml |
| Akrilamid/Bisakrilamid((30g/0.8g)/dl) | : 1.5 ml |
| % 10 APS | : 0.1 ml |
| % 10 SDS | : 0.1 ml |
| TEMED | : 10 µL |

Bu reaktifler sırası ile bir erlene devamlı karıştırılarak konuldu. Hemen gradient oluşturucunun 1. Kolonuna konuldu. En son TEMED konularak karıştırmaya devam edildi.

Peristaltik pompa ve gradient oluşturucu yardımıyla hazırlanan jellerin bulunduğu kolonların musluğu açılarak jellerin farklı konsantrasyonlarda karışması sağlandı. Dikey olarak tutulan 2 cam levhanın arasına enjektör yardımıyla jel döküldü. Hava kabarcığı kalmayacak şekilde jel içine tarak yerleştirildi. Jelin gün ışığında tamamen polimerize olması beklendi.

2. SDS-PAGE için Örneklerin Hazırlanması

Total protein tayini yapılmış protein örneklerinin herbirinden 100 µL alındı ve 100 µL PAGE-Yükleme tamponu ile karıştırıldı. 1 dakika kaynar su banyosunda ısıtıldı ve soğuması için beklendi. Bu şekilde denatüre edilen protein karışımlarının 25 µg protein içeren hacimleri (µL) kuyulara tatbik edildi.

3. SDS-PAGE için Standart Protein Karışımının Hazırlanması

Bu çalışmamızda Sigma'nın düşük molekül ağırlıklı standart protein karışımı kullanılmıştır. Liyofilize karışım 7 protein içerir. Bu proteinler aşağıda belirtilmiştir.

Tablo-II.1 Düşük Molekül Ağırlıklı Standart Proteinler

| Standart | Molekül Ağırlığı |
|---------------------------------|------------------|
| Sığır Albumin | 66.000 |
| Yumurta Albumin | 45.000 |
| Gliseraldehit-3-P-Dehidrogenaz | 36.000 |
| Sığır Karbonik Anhidraz | 29.000 |
| Tripsinojen, (Sığır pankreası) | 24.000 |
| Tripsin İnhibitör, (Sığır sütü) | 20.000 |
| α-Laktalbumin, (Sığır sütü) | 14.200 |

Yaklaşık 3.5 mg olan liyofilize karışım 1.5 mL PAGE Yükleme Tamponunda çözüldü. 1 dakika kaynar su banyosunda ısıtıldı.. Bu karışımdan kuyu başına 10µL konuldu.

4. Elektroforez İşlemi

Çalışma yapılacağı zaman tarak üst jeli bozmayacak şekilde dikkatlice çıkarılır. Denatüre edilmiş anne süt örneği ve standart protein karışımı hesaplanan miktarda kuyulara Hamilton pipeti yardımıyla tatbik edildi.

Jel başına 30 mA'lik akım uygulandı. Marker çözeltisinin jelin alt kısmına 0,5-1 cm yaklaşıncaya kadar yaklaşık 2-2,5 saat elektroforeze devam edildi. Jel

kasetten bir spatül yardımı ile alınarak boyama çözeltisi içerisine konuldu. 30 dakika bekletildi. Sonra boya çıkarma çözeltisine alındı. Bir gece ve ya daha fazla boya çıkarma çözeltisinde tutularak protein bantlarının iyi bir şekilde görünmesi sağlandı.

Anne sütündeki protein bantlarının Rf değerleri hesaplandı. Molekül ağırlıkları, standart proteinlerin molekül ağırlıkları ile Rf leri arasında çizilen grafikten yararlanılarak hesaplandı.

II.5.3 Nitroselüloz Membrana Blotting[26]

Kullanılan Çözeltiler

- 1- Borik Asit (50 mM)
- 2- Metanol (%20)
- 3- NaOH (1N)
- 4- Borat tamponu (3.09g Borik Asit, 750mL Deiyonize su, 200mL Metanol, 18.6mL 1N NaOH hepsi 1L'ye tamamlanır (pH=9.0)).
- 5- Salin çözeltisi (0.15M NaCl, 0.01M Tris-HCl, 0.5mg/ml Sodyum azid (pH=7.4))

Deneyin Yapılışı

Membran elektroforez işleminin sona ermesine 30 dakika kala hazırlandı. 3 kat kalın filtre kağıdı birkaç dakika Blotting tamponunda çalkalandıktan sonra Western Blotting aletine yerleştirildi ve hava kabarcığı kalmaması için bir bagetle üzerlerinden geçildi. Bu üç kat üzerine Nitroselüloz Membran yerleştirildi. Membranın blot edilecek jelin etrafından 3 mm taşmasına dikkat edildi. Elektroforez işleminden çıkarılan jel membranın üzerine yayıldı ve üzerine blot tamponunda ıslatılmış 3 kat filtre kağıdı teker teker yayıldı ve hiç hava kabarcığı ve sıvı kalmaması sağlandı. Blot çemberi kapatıldı ve oda sıcaklığında 400 miliamper sabit akım verildi. Bu işlem yaklaşık 3 saat sürdü. Böylece elektroforez jelindeki protein bantlarının tamamen nitroselüloz kağıdımıza geçmesi sağlandı. Sonra membran 37°C'de 5 dakika kurutuldu. Daha sonra membran ilk olarak %3'lük NP40 içeren Salin çözeltisinde 4°C'de 30 dakika bekletildi, ikinci olarak

%1'lik BSA içeren Salin çözeltisinde 4°C'de 2 saat bekletildi ve son olarakta %0.1'lik Tween 20 içeren Salin çözeltisinde 4°C'de 10 dakika bekletildi.

II.5.4 ¹²⁵I ile işaretli IGF-I ile Nitrosellüloz Blotun İnkübasyonu

Blotting işleminden sonra membran %1'lik BSA ve %0.1'lik Tween 20 içeren 3 ml'lik Salin çözeltisi içindeki İyot-125'li IGF-I (400.000 cpm) ile bir gece boyunca 4°C'de inkübe edildi. Bu işlem hava kabarcığı bulundurmeyen ve membrandan çok büyük olmayan plastik bir torbada gerçekleştirildi. Daha sonra nitrosellüloz membranımız 2 kez 4°C'de 15 dakika boyunca %0.1'lik Tween 20 içeren Salin çözeltisinde bekletildi. Daha sonrada 3 kez 4°C'de 15 dakika Salin çözeltisinde bekletildi ve oda sıcaklığında kurutuldu [25].

II.5.5 Otoradyografi

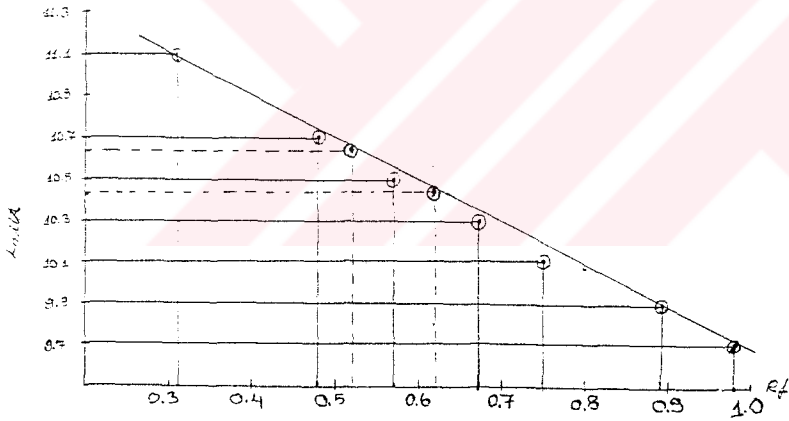
¹²⁵I ile işaretli IGF-I ile inkübasyon işleminden sonra membran kasete yerleştirildi ve karanlık odada üzerine 1 adet Kodak Biomax MS-1 X-ray film yerleştirildi. Kaset -70°C'de 4 gün boyunca saklandı. Karanlık odada plastik cımbız yardımıyla film çıkarılarak 3 dakika developer çözeltisinde çalkalandı, sonra saf su çözeltisinde 3-4 dakika bekletildi, son olarak fixer çözeltisinde 3 dakika çalkalandı. Film bir yere asılarak oda ısısında kurutuldu[26].

II.5.6 Standartların Yerlerinin Belirlenmesi

Çalışmamız sırasında otoradyografide protein standartlarını görüntüleyebilmek için gerekli ¹⁴C işaretli standart karışımı firma temsilcisinin değişmesinden ötürü temin edemedik. Nitrosellüloz blotun Kodak Biomax MS-1 X-ray film ile temasından hemen sonra blotu Pounce-S boyası ile boyayarak örneklerin yerlerini Şekil-III.2'de saptadık ve film üzerinde işaretledik.

Tablo-II.2 Düşük Molekül Ağırlıklı Standart Proteinlerin Molekül Ağırlıkları ve Elektroforez Sonucu Hesaplanan Rf Değerleri

| St. prot. mol. ağırlığı | LnMA | Rf |
|-------------------------|------|------|
| 66000 | 11.1 | 0.31 |
| 45000 | 10.7 | 0.48 |
| 36000 | 10.5 | 0.57 |
| 29000 | 10.3 | 0.67 |
| 24000 | 10.1 | 0.75 |
| 20000 | 9.9 | 0.89 |
| 14200 | 9.6 | 0.98 |



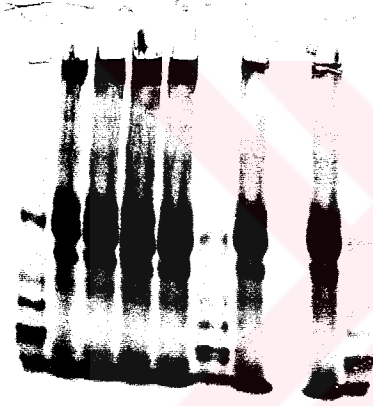
Şekil-II.2 Düşük Molekül Ağırlıklı Standart Proteinlerin LnMA'ları ve Rf 'leri Arasında Çizilen Doğrusal Grafik

BÖLÜM III. SONUÇLAR

III.1 SÜTTE TOTAL PROTEİN MİKTARI

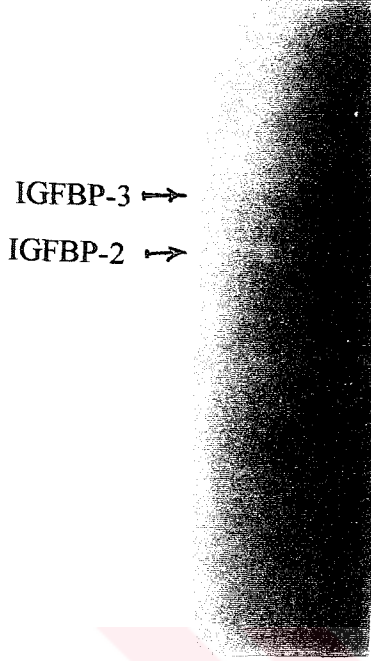
Anne sütünde Modifiye Lowry-Peterson metodu ile bulunan total protein miktarı 3960 µg/ml'dir. Her bir elektroforez kuyusuna farklı konsantrasyonlarda süt örnekleri uygulandı ve süt örneklerine % 4.5-12.5 lineer gradient akrilamid slab jel elektroforezi uygulanması sonucu çıkan protein bantları Şekil-III.1'de gösterilmiştir.

III.2 SÜT ÖRNEKLERİNİN SDS-PAGE LİNEER GRADİENT JEL ELEKTROFOREZİ



Şekil-III.1 Süt Örneğimizin ve Düşük Molekül Ağırlıklı Standartların % 4-14 Linceer Akrilamid Slab Jel Elektroforezi. Sağdan Sola Doğru Sıra 1,5,10;Düşük Molekül Ağırlıklı Standart Proteinler, 2,6,8;15 µg Protein İçeren Süt Örneği, 3-Örnek Tatbik Edilmedi, 4,7;12.5 µg Protein İçeren Süt Örneği , 9;10 µg Protein İçeren Süt Örneği.

III.3 ANNE SÜTÜNDE OTORADYOGRAFİ İLE BELİRLENEN IGFBP'LER



Şekil-III.2 Otoradyografi ile Çıkan IGFBP Bantları

III.4 IGFBP'LERİN SAPTANMASI

Otoradyografi sonucunda Şekil-III.2 den de görüldüğü gibi iki adet ^{125}I ile işaretli IGF-I ile etkileşen IGFBP bandı saptandı. Şekil-II.2 yardımı ile bu bantların molekül ağırlıklarının 33.500 dalton ve 41.000 dalton olduğu ve literatürle [21] karşılaştırıldığında bu bantların yukarıdan itibaren birincisinin IGFBP-3 ve ikincisinin IGFBP-2 olduğu saptandı.

BÖLÜM IV.TARTIŞMA

IGF-I ve IGF-II, bağlayıcı proteinler adı verilen bir protein ailesi ile ilişkili bir şekilde bulunmaktadır. IGF'lerin bu proteinlere reseptörlerden daha fazla ilgili olması, bu proteinlerin meme bezinde hücresele seviyede IGF-I'in biyoaktivitesini düzenlediğini göstermektedir. Meme epitel hücreleri IGF bağlayıcı proteinleri sentezlerler. Bunlardan özellikle IGFBP-3, IGF-I tarafından kontrol edilmektedirler. Fazla miktarda IGFBP-3 yaptığı gösterilmiştir. Bu bilgiler IGF'in bağlayıcı proteinlerin yapımını uyardığını açıklamaktadır[21].

IGFBP'lerin pek çok fonksiyonu vardır. Meme epitel hücrelerinin potansiyel bir mitojeni olmasının yanı sıra IGF'lerin yarı ömrünü arttırmak, IGF'yi kandan dokulara götürmek ve IGF'yi spesifik hücre tiplerine ve dokulara bağlamak ve meme epitel hücrelerinin apoptozunu önleyebilmek gibi özellikleri de vardır. Hücresele seviyede IGF'lerin aktivitesini arttırmak veya azaltmak gibi etkileri de vardır[21].

Beslenme durumunun da dolaşımdaki IGF-I ve IGFBP konsantrasyonunun önemli bir düzenleyicisidir. Laktasyondaki ineklerin yemleri azaltıldığında IGF-I miktarı düşerken IGFBP-2 konsantrasyonunun arttığı saptanmıştır. IGF-I ve IGF-II nin arteryel infüzyonu hem süt miktarını hem de meme kan akışını arttırdığı saptanmıştır. Etki hızlı olduğundan doğrudan etkisi olduğu sonucuna varılmıştır[21].

Transjenik farelerde hangi IGF ve IGFBP'nin laktasyondaki meme bezini etkilediği konusunda yapılan çalışmalarda IGF-I ve IGFBP-3'un en çok yapıldığı ve daha az sayıda apoptotik hücrelerin olduğu gözlenmiştir. Meme kanseri hücrelerine sadece IGFBP-3 ilave edildiğinde doza bağımlı olarak DNA sentezinin önlendiği görülmüştür. IGFBP-1 verildiğinde ise böyle bir etki görülmemiştir. Östrojene pozitif meme kanseri hücrelerine IGFBP-3 katıldığında hücre çoğalmasının engellendiği saptanmıştır. Bu mekanizmaların normal meme epitel hücre büyümesinin kontrolü ile ilgisi halen araştırma konusudur[21].

Bu çalışmada IGF-I bağlayıcı proteinlerin tanımlanmaları için elektroforezden faydalandık. Elektroforez işleminde, bağlayıcı proteinlerin yapısını bozduğu için S-S bağlarını kırmadık, bu yüzden alt ünitelerini tanımlayamadık, bizim burada yapmak istediğimiz; IGF-I'i bağlayabilme özelliği olan temel elemanları ortaya koymaktır.

IGFBP sistemi hayli karışık ve yüksek derecede düzenlemelere maruzdur. Bu düzenlemeler ve proteazlar ile modifikasyonlar IGF'nin hücre fonksiyonu ve metabolizma üzerine etkilerini önemli hale getirmektedir[21].

Çalışmamızda otoradyografi sonucunda molekül ağırlıkları yaklaşık 33.500 ve 41.000 Dalton olan iki tane IGFBP bantı elde ettik . Bu molekül ağırlıklarını literatürle [21] kıyasladığımızda bu bantların; IGFBP-2 ve IGFBP-3 'ye karşılık geldiğini saptadık. IGF-I'e spesifik olan bizim saptamak istediğimiz en önemli fraksiyon IGFBP-3 idi.

IGF-I özellikle IGFBP-3 erken doğan bebeklerin gelişimi için önemlidir. IGFBP-3 en önemli IGF taşıyıcısıdır. IGF-I ve IGFBP-3'ün her ikisinde enerji ve protein alımı ile doğrudan ilgileri vardır ve yeni doğanın beslenme durumu hakkında önemli ipuçları verirler.

IGF-I, IGF-II ve IGFBP-2 insan sütünde inek sütüne göre bir hayli yüksek oranda bulunmaktadır. İnek sütü orjinli mamalarda bu faktörler tespit edilememiştir. İnsan sütündeki IGF'lerin kaynağı henüz netlik kazanmamıştır, meme bezinden mi yoksa annenin kanından mı ileri geldikleri henüz bilinmemektedir. Sütlerine insan rekombinant IGF-I katılarak beslenen inek yavrularının dolaşımdaki IGF-I miktarlarında artış olduğu gözlenmiştir. Buda IGF-I'in süttten emildiğini ve anne sütü ile beslenen erken doğan bebeklerin kanında daha fazla bulunmasını açıklamaktadır[24].

Erken doğan bebeklerin IGF-I seviyeleri ve bağlayıcı proteinlerin bebeğin gelişimi üzerine etkileri ve uzun vadeli biyolojik sonuçları üzerinde daha çok çalışılması gerekli konulardır. Biz çalışmamızda kolostrumda IGFBP'lerin varlığını göstererek metodu yerleştirdik. Bundan sonra klinik olarak bu çalışmalarımıza devam etmeyi planlıyoruz.

KAYNAKLAR

1. Pierse, P.; Aerde, Van J.; Clandinin, M.T. : “Nutritional value of human milk”, *Prog. in food and Nutr. Scien.*, 12(1998)421-447
2. Read, W.W.C.; Lutz, P.; Tashjian, A.: “Human milk lipids”, *Am. J. Clint. Nutr.*, 17(1965)180-183
3. Brink, M.; Kritchewsky, D.: “Dairy lipids and lipid metabolism, Symposium, 29-97, Westport, Connecticut”, *The Air Publishing Company Inc.*, (1968)
4. Tanzer, F.: “Anne sütünün önemi, süt ve erken çocukluk döneminde beslenme”, *Türkiye Klinikleri*, 5(1985)262-265
5. Jensen, R.G.; Hagerty, M.M.; Mc Mahan, K.E.: “Lipids of human milk and infant formulas”, *A Review. Am. J. Clin. Nutr.*, 31(1978)990-1015
6. White, A.; Handler, P.: “Principles of biochemistry”, 1051069, *Mc Graw Hill Inc. New York*, (1978)
7. Hall, B.: “Uniformity of human milk”, *Am. J. Clin. Nutr.*, 32(1979) 304-313
8. Lemons, J. A.; Meye, L.; Hall, D.; Simmons, M.: “Differences in the composition of preterm and term human milk during early lactation”, *Pediatr. Res.*, 16(1982)113-117
9. Read, W.W.; Lutz, P.; Tashjian, A.: “Human milk lipids. Short-term effects of dietary carbohydrate and fat”, *Am. J. Clin. Nutr.*, 17(1965)184-187
10. Petrakis, N.: “Physiologic, biochemical and cytologic aspects of nipple aspirate fluid”, *Breast Can. Res. And Treat.*, 8(1986)7-19
11. Jensen, R.G.; Ferris, A. M.; Lammi-Keefe, C.; Henderson, R.A.: “Lipids of bovine and human milks”, *A comparison. J. Dairy Sci.*, 73(1990)223-240
12. Anderson, N.G.; Powers, M.T.; Tollaksen, S.: “Proteins of human milk. Identification of major components”, *Clin. Chem.*, 28(1982)1041055

13. "Committee on Nutrition", *Nutrition and lactation Pediatrics*, 68(1981)435-442
14. Kunz, C.; Lönnerdal, B.: "Human milk proteins: Analysis of casein and casein subunits by anion-exchange chromatography, gel electrophoresis and specific staining methods", *Am. J. Clin. Nutr.*, 51(1990)37-46
15. Clark E. Grasvenor; Mary Frances Picciano; Craig R. Baumrucker: "Hormones and growth factors in milk", *The Endocrine Society*, Vol.14, No.6.
16. Klagsbrun M.: "Human milk stimulates DNA synthesis and cellular proliferation in cultured fibroblasts", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75(1978)5057-5061
17. Baxter R.C.; Zaltsman Z.; Turtle J.R.: "Immunoreactive somatomedin-C / insulin-like growth factor-I and its binding protein in human milk", *J. Clin. Endocrinol Metab.*, 58(1984)955-959
18. Malven P.V.; Head H.H.; Collier R.J.; Buonomo F.C.: "Periparturient changes in secretion and mammary uptake of insulin and in concentrations of insulin and insulin-like growth factors in milk of dairy cows", *J. Dairy Sci.*, 70(1987)2254-2265
19. Donovan Sharon M.; Hintz Raymond L.; Rosenfeld Ron G.: "Insulin-like growth factors I and II and their binding proteins in human milk: Effect of heat treatment on IGF and IGF binding proteins stability", *Journal of Pediatric Gastroen. and Nut.*, 13(1991)242-253
20. Donovan S.M.; Odle J.: "Growth factors in milk as mediators of infant Develop.", *Annu. Rev. Nutr.*, 14(1994)147-167
21. Ranke M.B.; Elmlinger M.: "Functional role of insulin-like growth factor binding proteins", *Hormone Research*, 48(suppl.4) (1997)9-15

22. Baumrucker C.R.; Campana W.M.; Gibson C.A.; Kerr D.E.: "Insulin like growth factors (IGF) and IGF binding proteins in milk", *Sources and functions, Endoc. Regua.*, 27(1993)157-172
23. Peterson G.L.: "Modified Lowry Method", *Analytical Biochemistry*, 83(1977)346-356
24. Diaz-Gomez N.M.; Domenech E.; Barroso F.: "Breast-feeding and growth factors in preterm newborn infants", *Jour. of Pediatric Gast. and Nutr.*, 24(1997)322-327
25. Jungblut P.; Kamp R.M.; Choli-Papadopoulou T.; Witman-Liebold B.: "Protein sturcture analysis", *Springer-Verlag Berlin, Heidelberg*, 214(1997)
26. Hossenlopp P.; Seurin D.; Segovia-Quinson B.; Hardouin S.; Binoux M.: "Analysis of serum insulin-like growth factor binding proteins using Western Blotting: Use of the method for titration of the binding proteins and competitive binding studies", 154(1986)138-143

ÖZGEÇMİŞ

1977 yılında İstanbul'da doğdum. İlköğrenimimi Cemal Artüz İlkokulun'da, orta öğrenimimi Çapa Ortaokulun'da, lise öğrenimimi Pertevniyal Lisesi'nde tamamladım. M.Ü. Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nden 1998 yılında mezun oldum. Ekim 1998 tarihinde M.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim dalı Biyokimya yüksek lisans programına kayıt oldum.

