

Analitik Poliakrilamid Jel Elektrofrezinde E - Apolipoprotein Bandlarının Belirlenmesi İçin Basit Bir Yöntem

Yavuz TAGA*

ÖZET

Lipoprotein metabolizmasının incelenmesinde, apolipoproteinlerin analitik poliakrilamid jel elektroforezi giderek daha kullanışlı bir yaklaşım olmaktadır. Bu çalışmada, antiaterojenik etkisi nedeniyle dikkat çekici hale gelen E-apolipoproteinlerinin (yüksek dansiteli lipoproteinler "HDL", arasındaki) tanımlanması için basit bir yöntem önerilmektedir.

SUMMARY

A Simple Method for the Identification of E-apolipoprotein Band on the Analytical Polyacrylamid Gel Electrophoresis

Analytical polyacrylamid gel electrophoresis of apolipoproteins is becoming a useful approach in the investigation of lipoprotein metabolism. In this study, a simple method is proposed for the identification of E-apolipoprotein (among the high density lipoproteins, HDL) which is becoming more significant because of its antiatherogenic effect.

Plazma lipoprotein düzeyleri ve lipoproteinlerin metabolizmaları, çok önemli bir olayla, arteriosklerozis ve onun klinik bir belirtisi olan koroner aterosklerozis ile çok yakından ilişkilidir. Yapılan epidemiyolojik çalışmalar yüksek dansiteli lipoproteinler (HDL) düzeyi ile koroner arter hastalığı arasında negatif bir korelasyon gös-

* Yard. Doç. Dr.; Biyokimya Doktoru, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Uzmanı, Uludağ Univ. Tıp Fak. Biyokimya Ana Bilim Dalı Öğretim Üyesi

termektedir¹. Yüksek kolesterolü diet alınmasını takiben görülen VLDL (beta-çok düşük dansiteli lipoproteinler) yani elektroforetik olarak beta bandında yürüyen kolesterol yüklü çok düşük dansiteli lipoproteinlerin mevcudiyeti ise koroner arter hastalığı ile pozitif korelasyon göstermektedir².

Son onbeş senedir lipoproteinler üzerine biyokimyasal, biyofiziksel, farmakolojik ve fizyolojik yönlerden hemen hemen sayısız çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalar içinde, apolipoproteinlerin veya kısaca apoproteinlerin metabolizması ve değişik fizyopatolojik durumlarda katkılarının incelenmesi ise daha yeni bir çalışma sahasıdır³.

Nisbeten heterojen bir grup olan yüksek dansiteli lipoproteinler (HDL), "heparin-sepharose affinite kromatografisi" yöntemiyle apoprotein-E içeren HDL ve apoprotein-E içermeyen HDL diye ikiye ayrılabilirler^{3,4}. Yağ ve kolesterolden zengin bir dieti takiben yüksek dansiteli lipoproteinler (HDL) de bir değişim görülür. Apoprotein-E içermeyen tipik HDL (HDL₂ ve HDL₃ fraksiyonları) azalır, apoprotein-E'li HDL artar (HDL₁ veya HDL_C)⁵. Yapılan deneysel çalışmalar sonucunda apoprotein-E'li HDL veya HDL_C'nin, HDL'nin antiaterojenik etkisinden asıl sorumlu olan fraksiyon olduğu ortaya konmuştur^{6,7}.

Apoprotein-E, HDL_C'nin üzerinde olduğu gibi aynı şekilde çok düşük dansiteli lipoproteinlerin (VLDL) de üzerinde bulunur. Hatta oran olarak VLDL'de apoprotein-E oranı HDL'den daha yüksektir. VLDL proteinlerinin % 5-10'unu apoprotein-E teşkil eder. Apoprotein-E, amino asit içeriği olarak yüksek derecede arjinin ihtiva eder (Total amino asitlerinin % 10'u kadar). Protein % 70 heliks özelliği gösteren polimorfik bir yapıdadır⁸.

Bu çalışmada, lipoproteinlerin apoproteinlerini incelemek için kullanılan bir yöntem olan analitik poliakrilamid jel elektroforezinde³, jeller üzerinde apoprotein-E'lerin dağılımını görüntüleyebilmek için bir araştırma yaptık.

GEREÇ ve YÖNTEM

Numunelerin toplanması:

Kontrol grubu olarak herhangi bir belirgin hastalığı olmayan 20-50 yaşları arasında her iki cinsten 30 gönüllü kullanıldı. Antikoagülan olarak 1ml kanda 1 mg olacak şekilde disodyum EDTA kullanıldı. Kan alınmasını takiben 2 st içinde 1500 x g'de 30 dakikalık bir santifüj ile hücreler ayrıldı. Plazmalar taze olarak çalışıldı.

HDL'nin ayrılması:

2 ml plazmaya 0,2 ml heparin-MnCl₂ çözeltisi konup iyice karıştırıldı (Neticede sodyum-heparin 1.4 mg/ml, MnCl₂ ise 0,092 M oldu). Numuneler 10 dakika oda sıcaklığında bekletilip sonra 1500xg'de 30 dakika santrifüj edildiler⁹. Bulanık olanlar 0,45µm pore açıklığı olan Millipore filtreden süzülüler.

Delipidasyon:

HLD çözeltisinden 250µl alınıp 0°C'daki 5 ml dietil etere konulup karıştırıldı. 4°C'da 30 dakika bekletildi. Santrifüj edildi. 2 kez daha soğuk eterle yıkandı. Eter alınıp, çökelti 5 ml 3/1 oranında ethanol/dietileter ile karıştırılıp 16st buzdolabında bırakıldı. Çökelti son kez soğuk eterle yıkandı¹⁰. Eter kurutuldu ve protein-

ler 5 ml 0,5 M NaCl'li pH = 8,5 0,2 M Tris-HCl tamponu içinde çözüldüler. Koriyucu olarak PMSF (fenil metil sulfonil florid) ve sodyum asid katılarak buzdolabında saklandılar.

Analitık poliakrilamid jel elektroforezi:

Jellerin hazırlanmasında % 10 Akriamid, % 0,1 Bis, % 0,14 amonyum persulfat (pH = 8,9) kullanıldı^{1 1}. Proteinler jel başına 50 µg protein olarak 6 M üre ve % 5 sukroz olacak şekilde 200 µl içinde uygulandılar. Protein bandları % 25 isopropil alkol, % 10 asetik asit, % 0,054 "Coomassie brilliant blue" ile tespit edilip boyandılar.

E-apoprotein bandlarının belirlenmesinde sırayla şu yöntemler denendi:

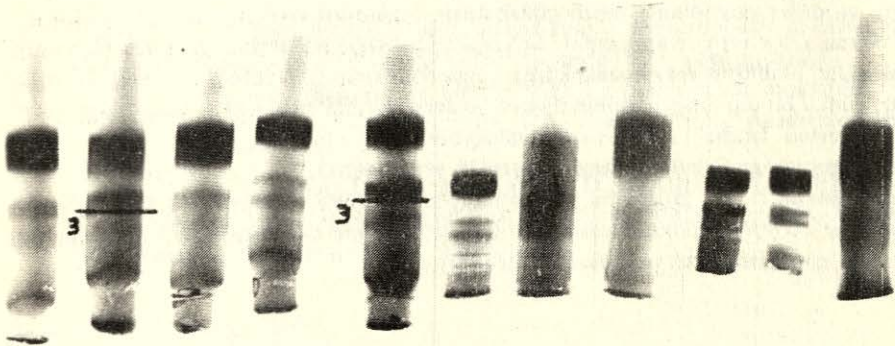
I) Coomassie mavisi ile boyanmış jeller önce, a) 0,2 ml % 40 NaOH, 0,2 ml % 40 üre ve 0,2 ml etanol içinde % 1'lik α-naphtol'un 10 ml'ye suyla tamamlanmasıyla elde edilen çözeltiye sokulup yarım saat bekletildi. Sonra oda sıcaklığında kurutma kağıdı üzerinde kurutuldu; ve b) 7 ml su ve 3 ml "Nahypobromite" (100 ml % 10 NaOH içinde 0,9 ml Bromine) çözeltisine batırıldı^{1 2}.

II) Coomassie mavisi ile boyanmış jeller a) 0,5 N NaOH çözeltisi içindeki % 0,2'lik α-naphtol çözeltisine atıldılar, 30 dakika sonra kurutma kağıdı üzerinde kurutulup, b) % 5'lik sulu sodyum "hypochlorite" çözeltisine atıldılar^{1 3}.

III) Coomassie mavisi ile boyanmış jeller a) aseton içinde % 0,1'lik α-naphtol çözeltisine batırıldı. 30 dakika beklendi. Kurutma kağıdı üzerinde kurutuldu. Sonra b) 0,2 ml Bromine ile karıştırılan 100 ml'lik etanol içinde % 2'lik NaOH w/v çözeltisine batırıldılar^{1 4}.

BULGULAR

HDL'lerin analitik poliakrilamid jel elektroforezine uygulandıktan sonraki bazı bantların görüntüsü Resim 1 de görülmektedir.



Resim: 1
Coomassie mavisi ile boyanmış HDL apolipoprotein bantları (50 µg protein/jel)

Bu şekilde belirlenen protein bantları içinde arjininden zengin E-apoproteininin ne şekilde dağıldığını incelemek için denenen 3 yöntem sonucu bulgular Tablo I de özetlendi.

Tablo: I
Poliakrilamid Jelleri Üzerinde, E-apoprotein Bantlarının Belirlenmesi İçin Denenen Yöntemlerin Sonuçları

BULGULAR	
Yöntem I	Jellerde çok hafif, silik, pembe renkte boyanma gözlemlendi.
Yöntem II	Jellerde hiç boyanma gözlenmedi.
Yöntem III	Jellerdeki bantlarda çok belirgin, parlak pembe renkte boyanma görüldü.

Tablo I'den de görüldüğü gibi E-apoprotein bantlarının jeller üzerinde belirlenmesi yönünden en çok III'cü yöntem başarılı oldu.

TARTIŞMA

E-apolipoproteini diğer apolipoprotein bantlarından, poliakrilamid jelleri üzerinde ayırtmak veya protein bantları içinde E-apolipoproteininin nasıl bir dağılım meydana getirdiğini gösterme yönünde, literatürde bir çalışmaya rastlamadık. E-apolipoproteinli HDL'nin antiaterojenik niteliği dolayısıyla, E-apoproteini üzerine yapılmış birçok araştırma mevcut olmakla beraber, bu araştırmalar da E-apoproteini HDL veya VLDL'den saflaştırılmakta ve daha sonra E-apoproteini üzerinde çeşitli çalışmalar yapılmaktadır^{3,8}.

E-apoproteinini poliakrilamid jeller üzerinde belirleyebilmek için onun en belirgin ayırtedici özelliğinden yani arjininden zengin olmasından yararlandık⁸. Arjininin tayini için kullanılan Sakaguchi reaksiyonu adı verilen bir reaksiyonda, arjinin ve diğer guanidinler, alkali çözeltilerde α -naphthol ve sodyum "hypochlorite" ile kırmızı bir renk oluştururlar. Sakaguchi reaksiyonu amino asitlerin tayininde kullanılan ninhidrin reaksiyonu kadar hassas olmamakla beraber, son derece özgüldür, çünkü bu tepkimeye arjinin dışında sadece proteinlerde nadiren rastlanan guanidin türevleri katılır^{1,3}. Sakaguchi reaksiyonu veya modifikasyonları, daha ziyade kağıt kromatografisinde arjinini göstermek veya fosfo arjinini tayin etmek için kullanılmaktadır^{1,2,14}. Bizim bu yöntemlerden modifiye ettiğimiz III nolu yöntem apolipoproteinlerin poliakrilamid jel elektroforezinde E-apoprotein dağılımını göstermesi yönünden basit ve kullanışlı bir yöntemdir.

KAYNAKLAR

1. HEISS, G., JOHNSON, N.J., REILAND, S.: The epidemiology of plazma high density lipoprotein cholesterol levels. *Circulation*, 62: 116-136, 1980.

2. MISTR, P., NICOLL, A., NIEHAUS, C.: Cholesterol feeding revisited. *Circulation*, 54: 11-178, 1976.
3. MAHLEY, R.W., WEISGRABER, K.H.: Subfractionation of High Density Lipoproteins into Two Metabolically Distinct Subclasses by Heparin Affinity Chromatography and Geon-Pevikon Electrophoresis. In: Report of the High Density Lipoprotein Methodology Workshop (Ed. Lippel, K.L.) NIH Publication No 79-1661, Washington, 1979, p. 356-366.
4. WEISGRABER, K.H., MAHLEY, R.W.: Subfractionation of human high density lipoproteins by heparin-Sepharose affinity chromatography. *J Lipid Res*, 21: 316-325, 1980.
5. MAHLEY, R.W.: Alterations in Plasma Lipoproteins Induced by Cholesterol Feeding in Animals Including Man. In: Disturbances in Lipid and Lipoprotein Metabolism (Ed. Dietschy, I.M., Gotto, A.M., Ontko, I.A.). American Physiological Society, 1978, p. 181-197.
6. MAHLEY, R.W.: Cellular and molecular biology of lipoprotein metabolism in atherosclerosis. *Diabetes*, 30 (suppl): 60-65, 1981.
7. MAHLEY, R.W., INNERARITY, T.L., BERSOT, T.P.: Alterations in human high density lipoproteins, with or without increased plasma-cholesterol, induced by diets high in cholesterol. *Lancet*, 2: 807-809, 1978.
8. EISENBERG, S.: Lipoprotein Metabolism. In: *Advances in Lipid Research* (ed. Paoletti, R., Kritchevsky, D.). Academic Press, New York, vol 13, 1975, p. 15.
9. WARNICK, G.R., ALBERS, I.I.: A comprehensive evaluation of the heparin-manganese precipitation procedure for estimating high density lipoprotein cholesterol. *J lipid Res*, 19: 66-76, 1978.
10. MAHLEY, R.W., WEISGRABER, K.H.: Canine lipoproteins and atherosclerosis. I. Isolation and characterization of plasma lipoproteins from control dogs. *Circulation Res*, 35: 713-721, 1974.
11. GABRIEL, O.: Analytical Disc Gel Electrophoresis. In: *Methods in Enzymology* (ed. Jakoby, W.B.). Academic Press, New York, vol XXII, 1971, p. 565-578.
12. ENNOR, A.H.: Determination and preparation of N-phosphates of biological origin. In: *Methods in Enzymology* (ed. Colowick, S.P., Kaplan, N.O.).
13. STEPKA, W.: Identification of amino acids by paper chromatography. In: *Methods in Enzymology* (ed. Colowick, S.P., Kaplan, N.O.). Academic Press, New York, vol III, 1957, p. 522.
14. LYNCH, M.J., RAPHAEL, S.S., MELLOR, L.D., SPARE, P.D., INWOOD, M. J. H.: *Medical Laboratory Technology and Clinical Pathology*. Sec. Edition, W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1969, p. 520.

Yard. Doç. Dr. Yavuz TAGA
 Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi
 Biyokimya Ana Bilim Dalı Öğretim Üyesi
 BURSA