

Transferrin İzofomlarının Analizinde İki Elektroforez Sisteminin Karşılaştırılması

Comparison of Two Different Electrophoresis Systems in Transferrin Isoform Analysis

Öznur Bilen* Özlem Gürsoy Çalan** Zekiye Sultan Altun***
Pınar Akan** Canan Çoker**

* Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Eğitim Araştırma Hastanesi, Tıbbi Biyokimya, MUĞLA, Türkiye

** Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, İZMİR, Türkiye

*** Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı, İZMİR, Türkiye

Başvuru Tarihi: 07 Nisan 2016

Kabul Tarihi: 18 Nisan 2016

ÖZET

Amaç: Proteinlerin glikozilasyonunun konjenital veya edinsel olarak bozulduğu durumlarda, tanı amaçlı olarak transferrin izofomlarının analizi gerçekleştirilir. Transferrin izofomlarının analizi için referans yöntem izoelektrik odaklama elektroforezidir. Biz de bu çalışma ile laboratuvarımızda iki farklı sistem kullanarak izoelektrik odaklama ile transferrin izofomlarının elektroforetik ayırımını yapmayı ve kullanılan sistemleri karşılaştırmayı amaçladık.

Gereç ve Yöntem: Transferrin izofomlarının analizi, "Multiphor II" ve "PhastSystem" sistemleri ile gerçekleştirildi. İki farklı düzey ticari kontrol materyali kullanılarak analitik performanslar değerlendirildi. Ayrıca, toplam 40 olgudan alınan örnekler her iki cihazda da çalışılarak sonuçlar regresyon analizi ile karşılaştırıldı.

Bulgular: "Multiphor II" ve "PhastSystem" ile di- ve tetrasiyalotransferrin izofomlarının için jel içi tekrarlanabilirlik sırasıyla < % 3,5 (n=7) ve < % 7 (n=8); jeller arası tekrarlanabilirlik ise sırasıyla < % 7 (n=20) ve < % 6 (n=10) olarak bulundu. İki düzeyli kalite kontrol materyalinde "PhastSystem" ile disiyalo izofomları için % 9,69 ve %9,27 oranında daha yüksek, tetrasiyalo izofomları için % 1,33 ve %2,15 oranında daha yüksek sonuçlar bulundu. İki sistem arasındaki korelasyonun değerlendirilmesinde (n=40); di- ve tetrasiyalotransferrin izofomları için korelasyon katsayıları sırasıyla 0,85 ve 0,64 olarak saptandı.

Sonuç: Transferrin izofomlarının izoelektrik odaklama elektroforezi ile analizinde "Multiphor II" ve "PhastSystem" cihazları ile benzer doğruluk ve kesinlik değerleri elde edilmektedir. İki sistem arasındaki korelasyonun da tüm izofomlar açısından anlamlı bulunduğu göz önüne alınarak daha hızlı sonuç vermesi nedeniyle "PhastSystem" cihazının tercih edilebileceği belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Transferrin; izoelektrik odaklama; glikozilasyon

ABSTRACT

Objective: Transferrin isoform analysis is performed for diagnosis of congenital or acquired defects in protein glycosylation. The reference method for transferrin isoform analysis is isoelectric focusing electrophoresis. The objective of this study has been to perform transferrin isoform analysis using two different electrophoresis systems in our laboratory and to compare the two systems.

Materials and Methods: The isoelectric focusing electrophoresis of transferrin isoforms was performed by "Multiphor II" ve "PhastSystem". The analytical performance was evaluated using a commercially available quality control material at two different levels. The two systems were compared with regression analysis with blood samples obtained from 40 patients.

Results: In isoelectric focusing method by "Multiphor II" system the coefficients of variation (CV) were determined to be < 3.5 % for within run (n=7) and < 7 % for between run (n=20) imprecision considering di- and tetrasialotransferrin isoforms in two levels of control material. The same values for "PhastSystem" were < 7% (n=8) and < 6% (n=10) respectively. In IEF with "PhastSystem", disialotransferrin isoforms were determined to be 9.69% and 9.27% higher while tetrasialotransferrin isoforms were determined to be 1.33% and 2.15% higher compared to "Multiphor II" at low and high levels of control material respectively. In the regression analysis (n=40) coefficients of correlation for di- ve tetrasialotransferrin isoforms were determined to be 0,85 ve 0,64 respectively.

Conclusion: Transferrin isoform analysis with isoelectric focusing electrophoresis can be performed precisely with similar accuracy with both "Multiphor II" and "PhastSystem". In routine laboratory practice "PhastSystem" may be preferred due to its speed.

Key words: transferrin; isoelectric focusing ; glycosylation.

GİRİŞ

Glikozilasyon en sık görülen post-translasyonel modifikasyon reaksiyonlarından biridir ve ökaryotlardaki bilinen proteinlerin yaklaşık yarısı glikoziledir (1). Glikoproteinlerin oligosakkarit yapısı (glikan); hücre adezyonu, migrasyonu, hücre büyümesi (1-3), hücre yüzeyinin tanınması (hormonlar, viruslar ve başka hücreler tarafından), hücre yüzey antijenitesi (örneğin kan grubu antijenleri) (4) gibi birçok fizyolojik durumla yakından ilişkilidir. Glukokonjugatların biyosentezindeki enzimleri kodlayan genlerdeki mutasyonlar sonucu ortaya çıkan doğumsal metabolik hastalıklar Konjenital Glikozilasyon Bozuklukları (CDG) olarak tanımlanır (5-7). CDG'lerin çoğu heterojen klinik tablolar ile ortaya çıkabilen multisistemik hastalıklardır (8). Ayrıca, glikozilasyon süreci; inflamasyon, romatoid artrit, kanser (3), gebelik, karaciğer hastalığı (9), herediter früktoz intoleransı ve galaktozemi (10, 11), sepsis (12, 13) ve kronik alkol alımı (14, 15) gibi sekonder nedenlere bağlı olarak da bozulabilir. Son zamanlarda anoreksiya nervoza ya da malnutrisyon gibi katabolik durumla seyreden hastalıklar

larda da protein glikozilasyonunun etkilenmesine dair yayınlar bulunmaktadır (16-18).

Glikozilasyonun karmaşık mekanizmasının anlaşılabilmesi ve bozukluklarının aydınlatılabilmesi için şimdiye kadar birçok glikoprotein üzerinde çalışma yapılmıştır. Bu glikoproteinlerin içinde tanı amaçlı kullanıma en uygun olan ve en sık analiz edilen ise transferrin (TRF) dir (7, 8). Çünkü TRF'nin glikan yapıları tanımlanmış ve glikozilasyon bölgelerinin sayısı belirlenmiştir. Glikozilasyon mekanizması ise göreceli olarak daha basittir (7). TRF, tek polipeptid zinciri, iki ayrı metal iyonu bağlama bölgesi (biri N-terminal, biri C-terminal bölgede olmak üzere) ve iki N-bağlı kompleks glikan zinciri olmak üzere üç ayrı yapısal bölümden oluşur. TRF molekülü 3 ayrı yapısal bölümden oluşmasının bir sonucu olarak; farklı kişilerde çeşitli TRF varyantları (polipeptid zincirinde farklılıklar) görülebilir, farklı sayıda demir iyonu bağlayabilir veya farklı sayıda SA içerebilir. Bu durum TRF mikroheterojenitesinden sorumludur (14). Her iki glikan zincirinin dallanma dereceleri "bi-, tri- ve tetraantennary" olmak üzere farklılık gösterebilir ve her biri negatif (-) yüklü bir SA molekülü ile

sonlanır. Böylece serumda asiyalotransferrin (SA içermeyen) ve siyalotransferrin (monosiyalotransferrinden oktasiyalotransferrine kadar) izoformları oluşur. Sağlıklı kişilerde en çok olan izoform tetrasiyalotransferrindir (14).

Glikan zincirlerinden birinin veya ikisinin birden yokluğuyla oluşan; a-, mono- ve disiyalotransferrin içeren gruba ise "karbohidratı eksik transferrin" (CDT) denir (19). CDT bilimsel literatürde ilk kez 1976 yılında Stibler ve Kjellin tarafından, alkoliklerin serum ve BOS' larında rapor edilmiştir (20). Son 10 yıl içinde, CDT alkol kullanımını gösteren önemli bir belirleyici olmuştur (21). CDT düzeyleri alkol alımının yanı sıra cinsiyet, yaş, sigara kullanımı, obezite, serum demir ve insülin düzeyi gibi birçok faktörden etkilenir.

TRF izoform analizinde kullanılan yöntemlerin çoğu kromatografi ve elektroforez esasına dayanır (22, 23). TRF izoformlarının analizinde, yüksek selektivitesi nedeniyle izoelektrik fokuslama elektroforezi (İEF) referans yöntem olarak kullanılır (19). İEF yöntemi ile serum ve plazmadaki normal patern; CDG'li hastalarda ortaya çıkan paternler ve yanı sıra TRF varyantlarının olduğu durumlardaki paternler birbirinden ayırt edilebilir (24, 25).

İEF yönteminin prensibi, moleküllerin uygun pH gradiyenti içinde izoelektrik noktalarına (pI) eş değer bölgeye ulaşmaya kadar göç etmeleri ve o noktada keskin bir bant oluşturmaları bir başka deyişle kendi pI'larında odaklanmalarıdır (26). İzoelektrik fokuslama elektroforezinin kullanımı proteinler, enzimler ve peptidler gibi yüklü moleküllerle sınırlıdır. Proteinin net yükünü belirlemede, aminoasit yan zincirlerinin pozitif ve negatif yüklerinin toplamı ve üç boyutlu konfigürasyonları önemlidir. Gliko ve nükleoproteinler gibi kompleks proteinlerin yükleri ise yapılarındaki şeker ya da nükleik asitlerden etkilenir. İki proteinin İEF'de ayrılabilmesi için izoelektrik noktaları arasında en az 0.02 pH ünitesi fark olması gerekir (26). Transferrin izoformlarının pI değerleri arasındaki farkın 0.1 pH ünitesi olduğu bildirilmiştir. Örneğin: asiyalotransferrin için pI: 5.9, mo-

nosiyalotransferrin için pI: 5.8, disiyalotransferrin için pI: 5.7 dir. İEF yöntemi bir "end-point" metottür. Protein izoelektrik noktasına ulaştığında zamandan bağımsız olarak o noktada sabit kalır. Bu odaklanma etkisi sayesinde keskin protein zonları ve yüksek rezolüsyon elde edilir (27).

Bu çalışmada transferrin izoformlarının analizi için İEF yönteminin kurulması, yöntem performansının ortaya konması ve İEF yöntemine dayalı iki sistemin birbiri ile karşılaştırılması hedeflenmiştir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Transferrin izoformlarının analizi, "Multiphor II" elektroforez cihazı (GE Healthcare, 18-1018-06) ile ve daha hızlı ve otomatize bir sistem olan "PhastSystem" cihazı (GE Healthcare, 18-1018-24) ile gerçekleştirildi.

Kontrol materyali olarak % CDT-TİA Kontrol Seti (Recipe 21082) kullanıldı. Hasta örnek bazlı yöntem karşılaştırma için pediatrik yaş grubundaki (6 ay- 5 yaş) 40 olgudan elde edilen serum örnekleri kullanıldı. Bu örneklerin 9'u CDG şüphesi olan ve transferrin izoform paterninde anormallikler saptanan, 10'u malnutrisyon tanısı konmuş ve dolayısıyla katabolik süreçte bulunan ve kalan 21'i sağlıklı çocuklardan elde edilmiştir. Olguların periferik venlerinden 10 mL'lik kırmızı kapaklı tüplere kan örneği alındıktan sonra yarım saat içinde 1500 g'de 10 dk santrifüj edilerek serumları ayrıldı ve çalışılacakları güne kadar -70 °C'de saklandı.

İEF Yöntemi ile "Multiphor II" Elektroforez Cihazında Transferrin İzoformlarının Analizi

Örnek hazırlığı: 50 µL serum, 3 µL 0,5 M NaHCO₃, 3 µL 10 mM Fe+3 sitrat ve 444 µL hidrasyon çözeltisi karıştırıldı. Hazırlanan örnekler ekim yapmadan önce 2 dakika 1500 g'de santrifüj edildi.

Bu yöntemde pH değeri 4.0-7.0 olan immobilize poliakrilamid kuru plak jeller (GE Healthcare, 80-1128-28) kullanıldı. Jel, rehidrasyonun ardından, ısısı 15°C'ye kadar düşürülen seramik tablanın üzerine yerleş-

tilererek, prefokuslama ve ardından örnek ekimi (3 µL) gerçekleştirildi. Örnek ekim hatları arasında negatif kontrol olarak "bovine" serum albumini kullanıldı. Prefokuslama için 3500Vh (volt saat) güç uygulandı, bu işlem bir saat 15 dakika sürdü.

Daha sonra 100 Vh den başlayarak 9000 Vh e ulaşan bir program ile 3 saat 15 dakika boyunca yüksek voltaj altında İEF işlemi tamamlandıktan sonra poliklonal tavşan anti-human TRF antikoru (Dako A0061) ile bantların immunopresipitasyonu sağlandı. Boyama işlemi CBB G250 protein boyası (Amresco 6104-58-1) ile manuel olarak gerçekleştirildi (28-32).

İEF Yöntemi ile "PhastSystem" Elektroforez Cihazında Transferrin İzofomlarının Analizi

Örnek hazırlığı: 10 µL serum, 10 µL 200 µM Fe⁺³ sitrat ve 30 µL saf su ile karıştırıldı. Oda ısısında 10 dakika inkübe edildi. Daha sonra tekrar saf su ile 1:25 oranında dilüe edildi.

Bu yöntemde pH değeri 4-6.5 olan poliakrilamid jeller (GE Healthcare, 17-0544-01) kullanıldı. "PhastSystem" cihazının "separation" ünitesinde prefokuslama ve ardından örnek ekimi (0,5 µL) gerçekleştirildi. Prefokuslama için 73 Vh güç uygulandı. Daha sonra 185 Vh e ulaşan bir program ile yaklaşık bir saatte İEF işlemi tamamlandıktan sonra poliklonal tavşan anti-human TRF antikoru ile bantların immunopresipitasyonu sağlandı. Boyama işlemi, cihazın "development" ünitesinde gümüş nitrat (Fluka 85228) ile gerçekleştirildi (33, 34).

Transferrin İzofomlarının Kantitasyonu

Jeller "Image Scanner 2, 100-240 V" görüntü tarayıcı ile tarandı. Bu işlem "Phast" jeller için gümüş boyamaya uygun, red filtre kullanılarak ve 600 dpi (dot per inch) çözünürlükte, "ImmobilineTM Dry Plate" jeller için ise CBB

G250 boyamaya uygun, blue filtre kullanılarak ve 600 dpi çözünürlükte gerçekleştirildi. TRF izofomlarının kantitasyonu için görüntü analiz programı olan "ImageMaster 1D Elite Software" kullanıldı. Arka plan etkisini en aza indirmek amacıyla, band seçiminden önce "manual background subtraction" işlemi yapıldı. "Phast" jellerde her hatta asiyalotransferrinden heksasiyalotransferrine kadar 7 bant, "ImmobilineTM Dry Plate" jellerde ise asiyalotransferrinden heptasiyalotransferrine kadar 8 bant saptandı. Bant seçimi de "manual" olarak yapıldı. Sonuçlar "TRF izoform yüzdesi" olarak verildi.

Her iki cihazda jel içi ("PhastSystem" ile n=8, "Multiphor II" cihazı ile n=7) ve jeller arası tekrarlanabilirlik deneyi ("PhastSystem" ile n=10, "Multiphor II" cihazı ile n=20) iki farklı düzey kontrol materyali kullanılarak gerçekleştirildi.

Transferrin varyantlarından kaynaklanabilecek interferansları ortaya koymak için iki farklı düzeydeki kontrol ve iki şüpheli örnek nöraminidaz ile muamele edildikten sonra İEF uygulandı.

Total transferrin ile disiyalo ve tetrasiyotransferrin arasındaki ilişki ve iki farklı elektroforez sistemi arasındaki ilişki Pearson korelasyon analizi ile değerlendirildi. Yöntem karşılaştırma ortalamaları arasındaki farkı değerlendirmek için bağımlı gruplarda t testi gerçekleştirildi.

BULGULAR

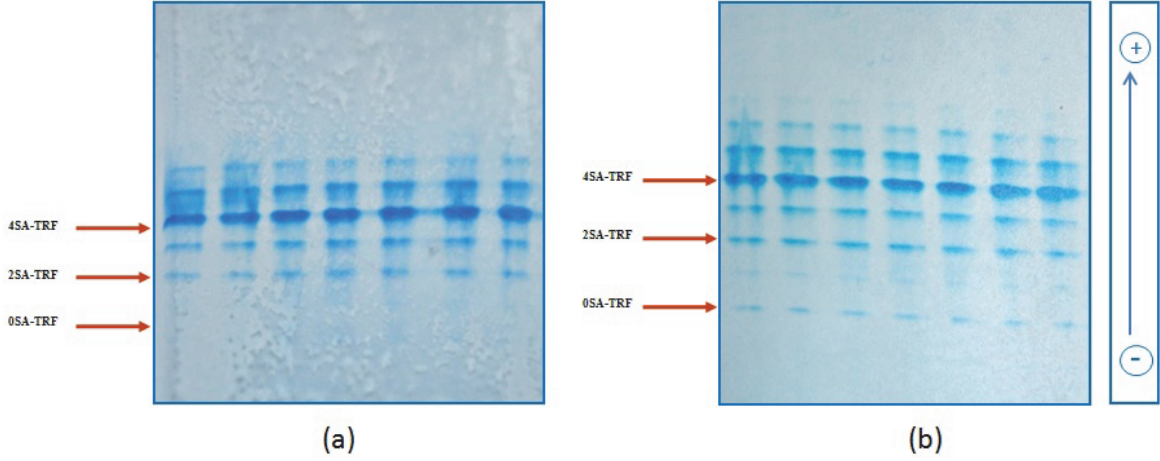
"Multiphor II" ve "PhastSystem" cihazlarında kontrol materyali ile yapılan jel içi ve jeller arası tekrarlanabilirlik değerleri (%CV) Tablo 1 ve 2'de verilmiş olup jellere ait görüntüler Şekil 1 ve 2' de görülmektedir.

Tablo 1. "Multiphor II" cihazında yapılan jel içi ve jeller arası tekrarlanabilirlik.

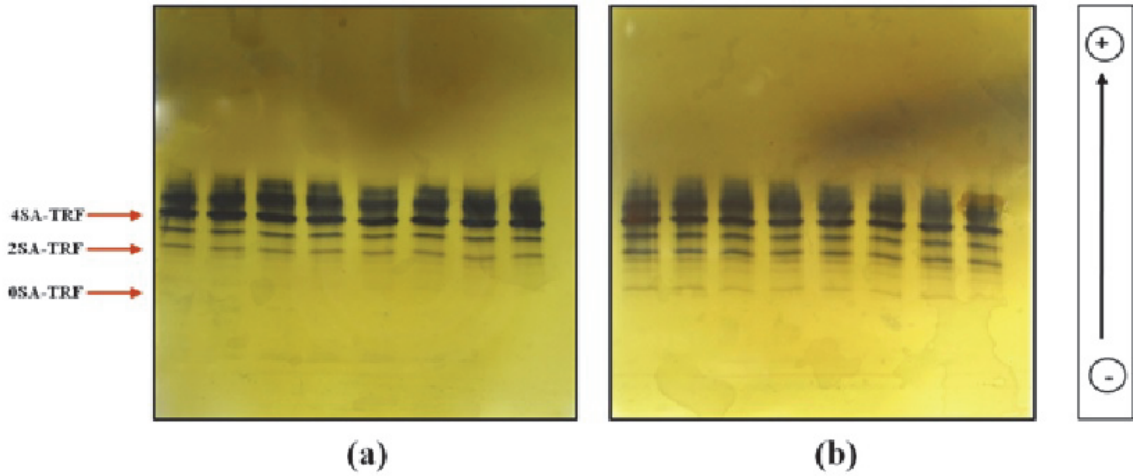
Jel içi Tekrarlanabilirlik (% CV)			Jeller arası Tekrarlanabilirlik (% CV)		
Seviye	2SA-TRF	4SA-TRF	Seviye	2SA-TRF	4SA-TRF
1 (n=7)	3,47	1,88	1 (n=20)	6,44	3,88
2 (n=7)	3,10	1,92	2 (n=20)	7,04	3,21

Tablo 2. "PhastSystem" cihazında yapılan jel içi ve jeller arası tekrarlanabilirlik

Jel içi Tekrarlanabilirlik (% CV)			Jeller arası Tekrarlanabilirlik (% CV)		
Seviye	2SA-TRF	4SA-TRF	Seviye	2SA-TRF	4SA-TRF
1 (n=8)	4,49	1,19	1 (n=10)	5,27	3,15
2 (n=8)	6,96	0,99	2 (n=10)	6,05	2,89



Şekil 1. "Multiphor II" sisteminde yapılan jel içi tekrarlanabilirlik analizleri: (a) 1.seviye kontrol (b) 2. seviye kontrol



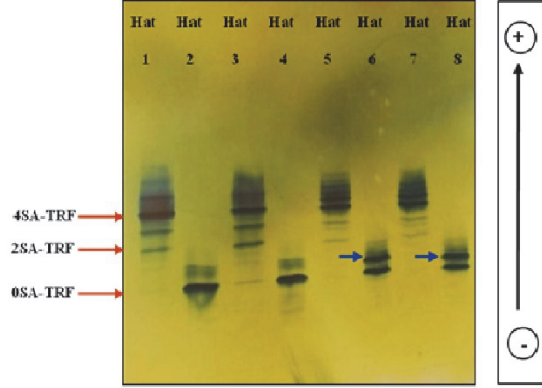
Şekil 2. "PhastSystem" cihazı ile yapılan jel içi tekrarlanabilirlik analizleri: (a) 1.seviye kontrol (b) 2. seviye kontrol

"PhastSystem" ve "Multiphor II" cihazları için aynı kontrol materyalinin ardışık analizi ile bantların ortalama değerleri belirlendi. Bu değerler kıyaslandığında "PhastSystem" cihazının "Multiphor II" sistemine göre disiyalotransferrin ve tetrasiyalotransferrin için gösterdiği farklar Tablo 3'te verilmektedir.

Transferrin varyantlarından kaynaklanabilecek interferansları ortaya koymak için iki farklı düzeydeki kontrol ve iki şüpheli örnek nöraminidaz ile muamele edilerek tekrar transferrin izoformları belirlendi. TRF varyantından kaynaklandığı düşünülen ekstra bant görüntüleri Şekil 3'te görülmektedir.

Total transferrin ile disiyalotransferrin arasında anlamlı pozitif ($p=0,022$, $r=0,283$); total transferrin ile tetrasiyalotransferrin arasında anlamlı negatif ($p=0,025$, $r= -0,278$) korelasyon bulundu.

Hasta örnek bazlı yöntem karşılaştırma için 40 olgunun serumları "Multiphor II" ve "PhastSystem" ile İEF yapılarak regresyon analizi yapıldı ve her izoform için grafikler oluşturularak iki sistem arasındaki korelasyon dereceleri belirlendi. En yüksek korelasyonu 2-SA ve 3-SA izoformları (sırasıyla $r = 0,84$ ve $0,77$) gösterdi. Tüm izoformlar için korelasyon anlamlı idi ($p<0,05$). Her bir izoform için iki cihazda bulunan sonuçların ortalamaları arasında anlamlı fark yoktu ($p>0,05$). (Tablo 4 ve Şekil 4).



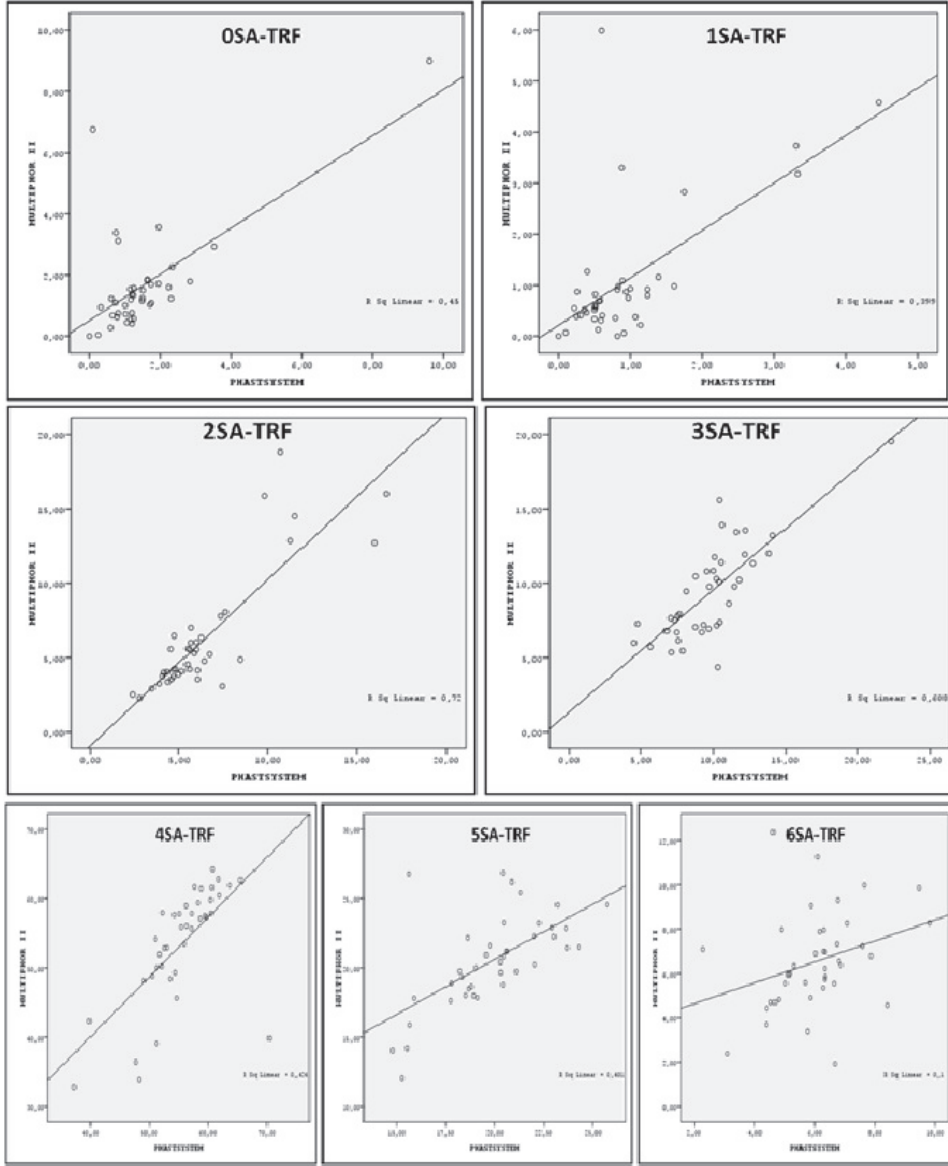
Şekil 3. Nöraminidaz ile işleme ardından elde edilen İEF jel görünümü. Hat 1: 1.seviye kontrol, Hat 2: 1.seviye kontrol+nöraminidaz, Hat 3: 2.seviye kontrol, Hat 4: 2.seviye kontrol+ nöraminidaz, Hat 5: TRF varyant (?) olgu 1, Hat 6: TRF varyant (?) olgu 1+ nöraminidaz, Hat 7: TRF varyant (?) olgu 2, Hat 8: TRF varyant (?) olgu 2+ nöraminidaz. Mavi ok ile işaretli bölgeler, asiyalotransferrin bantının üzerinde TRF varyantından kaynaklandığı düşünülen ekstra bantı gösterir.

Tablo 3. "Multiphor II" cihazı ile "PhastSystem" cihazında belirlenen kontrol materyalinin hedef değerleri ve iki cihaz arasındaki % bias sonuçları.

Seviye	İzoform	Birim	"Phast" Sistem ile belirlenen hedef değer (n=10)	"Multiphor II" ile belirlenen hedef değer (n=20)	% Fark
1	2SA-TRF	%	4,64	4,19	9,69
	4SA-TRF	%	59,93	59,13	1,33
2	2SA-TRF	%	9,16	8,31	9,27
	4SA-TRF	%	54,85	56,03	2,15

Tablo 4. "Multiphor II" ve "PhastSystem" ile yapılan yöntem karşılaştırma sonuçları

İzoform	"Phast" Sistem (%) (n=40)		"Multiphor II" (%) (n=40)		r	p*
	Ortalama	s	Ortalama	s		
0SA-TRF	1,50	1,49	1,64	1,68	0,67	0,48
1SA-TRF	0,94	0,89	1,09	1,31	0,63	0,36
2SA-TRF	6,42	3,09	6,25	4,07	0,84	0,61
3SA-TRF	9,78	3,04	9,37	3,20	0,77	0,22
4SA-TRF	55,57	6,20	53,82	7,73	0,65	0,08
5SA-TRF	19,89	2,65	20,52	3,33	0,63	0,14
6SA-TRF	6,06	1,47	6,54	2,21	0,31	0,18



Şekil 4. Asiyalotransferrin (OSA-TRF), Monosiyalotransferrin (1SA-TRF), Disiyalotransferrin (2SA-TRF), Trisiyalotransferrin (3SA-TRF), Tetrasiyalotransferrin (4SA-TRF), Pentasiyalotransferrin (5SA-TRF), Hekzasiyalotransferrin (6SA-TRF) ölçümü için iki cihaz arasındaki korelasyon.

TARTIŞMA

TRF izoformlarının analizinde, yüksek selektivitesi nedeniyle izoelektrik odaklama elektroforezi (İEF) referans yöntem olarak kullanılır. Bu yöntem moleküllerin uygun pH gradiyenti içinde izoelektrik noktalarına (pI) kadar göç etmeleri ve kendi pI'larında odaklanmaları dolayısıyla o noktada keskin bir bant oluşturmaları prensibine dayanır. İEF'de hem poliakrilamid jel hem de agaroz jel kullanılabilir. Poliakrilamid jel, agaroz jele

oranla daha iyi ayırım sağlar; çünkü ayrılma hem moleküler ekleme hem de elektroforetik harekete dayanır (35). Poliakrilamid jelin dezavantajı ise akrilamid monomerinin nörotoksin oluşu ve jellerin uygun kalınlık ve içerikte hazırlanmasının güçlüğüdür (27). Agaroz jelin kullanımının avantajları; porlarının poliakrilamid jelden daha geniş olması ve dolayısıyla 500 kDa'dan daha büyük makromoleküllerin bile ayrılabilmesi, ayırım ve boyanma zamanının kısa olması ve bileşenlerinin toksik olmamasıdır (36). Ago-

roz jelin dezavantajı ise poliakrilamid jelden daha güçlü elektroendozmosis etkisinin olmasıdır (27). Çalışmamızda daha iyi bir ayırım sağlayabilmek için her iki sistemde de poliakrilamid jeller tercih edilmiştir.

İEF elektroforezinde, protein göçünü sağlayan temel koşul jeldeki pH gradyentidir. Bu pH gradyenti, jele sonradan ilave edilen serbest taşıyıcı amfolitlerle oluşturulabileceği gibi pH gradyentli olarak hazırlanmış jeller (immobilize pH gradyenti) doğrudan da kullanılabilir. Serbest taşıyıcı amfolitlerle oluşturulan pH gradyentinde, bir grup amfoterik poliaminokarboksilik asit olan taşıyıcı amfolitler kullanılır (26). Bu bileşikler kendi pI değerlerinde; yüksek tamponlama kapasitesi ve çözünürlüğe, aynı zamanda iyi ve düzenli bir iletkenliğe sahiptirler (27). pKa değerleri arasında ise çok az fark vardır. Farklı sayıda (50 ila 100) amfolit karışımı ortama eklendiğinde, her bir amfolit, elektroforez esnasında kendi pI değerine ulaşıncaya kadar göç eder ve böylece pH gradyenti oluşur (26). Çalışmada kullanılacak amfolit karışımı seçilirken, ayrılması istenen proteinlerin pI'ları göz önünde bulundurulur. Ayrım geniş bir pH aralığında (örneğin pH 3-10) yapılabileceği gibi, daha dar bir alanda da (örneğin pH 4-5) gerçekleştirilebilir (35). Dar pH aralığı genellikle yüksek rezolüsyon istendiğinde tercih edilmelidir. Immobilize pH gradyenti, taşıyıcı amfolitlerin bir takım kısıtlılıklarından dolayı, rezolüsyonu ve iletkenliği arttırmak için alternatif bir teknik olarak geliştirilmiştir (26, 27). Gradyent tamponlanmış akrilamid türevleri ile oluşturulur; immobilinler poliakrilamid jelde akrilamid monomerlerinin ko-polimerizasyonu ile oluşur. Immobilinler, pKa değerleriyle tanımlanan zayıf asit ve bazlardır. İstenilen pH değerinde tamponlamanın olabilmesi için biri asit diğeri baz olmak üzere en az iki immobilin gereklidir. Jelin immobilinlerle polimerizasyonu esnasında istenilen pH değeri, karışımdaki immobilin oranlarıyla ayarlanır. Immobilin oranlarının sürekli değiştirilmesiyle pH gradyenti elde edilir (27). Immobilize pH gradyenti, taşıyıcı amfolitlerle oluşturulan gradyente göre; yüksek rezolüsyon, katodik kaymanın olmayışı, değişmeyen düzenli iletkenlik ve tamponlama

kapasitesi, kontrollü iyonik güç gibi birçok avantaja sahiptir (37). Bu avantajları nedeniyle çalışmamızda immobilize pH gradyentli jeller tercih edilmiştir.

İEF için ısı kontrolünün sağlanması ve etkin soğutma yapılması önemlidir. İEF işleminde keskin bantlar elde edilebilmesi için elektriksel alan gücünün yüksek olması gerekir. Bu nedenle yeterli voltajı sağlayabilen ve çok fazlı bir İEF protokolünü otomatik olarak programlayabilen bir güç kaynağı kullanılır (38). Çalışmamızda denenen her iki cihaz da bu gereklilikleri karşılamaktadır. Bununla birlikte "PhastSystem" programlanan elektroforetik güce ulaştığında kendiliğinden alarm verebilen hızlı ve daha otomatize bir cihazdır.

Analitik sebepler dışında, genetik TRF varyantlarının serumdaki varlığının da CDT düzeylerini etkileyerek yanlış yüksek ya da düşük sonuçlara yol açtığı gösterilmiştir (39). Yanlış yüksek CDT düzeylerinin nedeni, transferrin D varyantının CDT olmayan izofomlarının, kromatografik yöntemlerde transferrin C varyantının CDT izofomları ile beraber elüe olması ya da İEF'de bu izofomlarla beraber aynı izoelektrik noktada odaklanmasıdır (14, 40, 41). TRF B varyantının CDT izofomları ise TRF C'ye kıyasla artmış elektroforetik mobiliteleri nedeni ile, TRF C varyantının CDT olmayan izofomları ile beraber elüe olurlar ve yanlış negatif sonuçlara yol açarlar (14). İEF yönteminde; izofomlardan herhangi birinde, alışılmış paternlerin dışında bir yükseklikle karşılaşıldığında, bu durumun TRF varyantından kaynaklandığı şüphesine düşülürse örnek nöraminidaz ile muamele edilerek sonuç kesinleştirilir (42). Nöraminidaz TRF'deki terminal siyalik asit rezidülerini yıkan enzimdir. Kişi TRF varyantları açısından homozigot ise nöraminidazla muameleden sonra asiyalotransferrin bölgesinde tek bir bant, heterozigot ise bu banta ilave olarak asiyalotransferrin bölgesinin altında ya da üstünde bir bant daha (Şekil 5) görülür (43). Böylece İEF yönteminde varyantların ölçüm üzerindeki interferansı ortadan kaldırılmış olur. Biz de çalışmamızda iki örneğin transferrin izoform paternlerinin normalden farklı oluşu nedeni ile bu örneklerde TRF varyantı olabileceğini

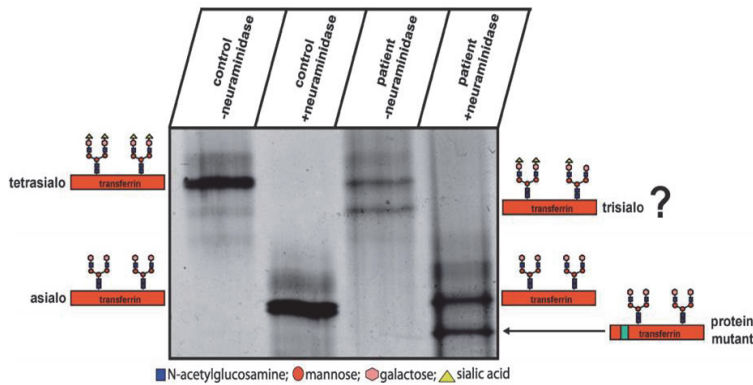
düşündük. Bu örnekleri nöraminidazla muamele ettiğimizde asialotransferrin bölgesindeki bant dışında ilave bir bant daha gördük (Şekil 3). Bu durum bize olgularımızdaki anormal paternin büyük olasılıkla TRF varyantından kaynaklandığını gösterdi.

TRF molekülünün çeşitli varyantlarının olması kadar farklı sayılarda demir iyonu bağlayabilmesi de izoformların pI'larına etki ederek ölçümü interfere edebilir (14). Bu nedenle yöntemimizin örnek hazırlığı aşamasında serum örnekleri demir ile doyurulup tüm izoformlar Fe₂-TRF haline getirilerek bu etki ortadan kaldırılmıştır.

Bu çalışmada tekrarlanabilirlik ve doğruluk, serumda en çok bulunan TRF izoformu olan tetrasialotransferrin ve gerek katabolik süreçlerde gerekse alkolizmde bir belirteç olarak tanımlanan CDT'nin en büyük kısmını oluşturan disialotransferrin izoformlarını kullanılarak hesaplandı. Jel içi ve jeller arası tekrarlanabilirlik sonuçları değerlendirildiğinde her iki cihazda da yöntem kesinliğinin tatmin edici düzeylerde olduğunu söylemek mümkündür (Tablo 1 ve 2).

Ticari olarak bulunabilen kontrol materyalinin hedef değerleri HPLC yöntemine göre tanımlanmıştır. Transferrin izoformlarının oransal dağılımının kullanılan yöntemle ilgili olarak değişkenlik gösterdiği ve TRF izoformlarının analizinde HPLC'nin İEF elektroforezine kıyasla daha kesin ancak duyarlılığı daha düşük bir yöntem olduğu bilinmektedir (14, 44). Bu çalışmada İEF elektroforezi ile saptanan değerlerin kontrol materyalinin belirtilen hedef değerlerine kıyasla a-, mono-

ve disialotransferrin izoformları için daha yüksek, tetrasialotransferrin izoformu için ise daha düşük olmasının iki yöntemin duyarlılıkları arasındaki farktan kaynaklanabileceği düşünüldü. Buna ek olarak, tüm TRF izoformlarının saptanabilmesine olanak sağlayan serum miktarı jelle uygulandığında tetrasialotransferrin açısından aşırı bir yüklenme olup tetrasialotransferrin bant intensitelerinin değerlendirilmesinde linearite kaybı ortaya çıkabilir ve dolayısıyla bu ana izoforma ait bantın intensitesi bu bantı oluşturan transferrin miktarı ile korele olamayabilir. Transferrin izoformları ile toplam transferrin düzeyi arasındaki ilişki incelendiğinde transferrinin disialotransferrin ile pozitif buna karşın tetrasialotransferrin ile negatif korelasyon göstermesi de açıklanan analitik koşullara bağlı olabilir. Tüm izoformlara yönelik bir referans materyali mevcut olmadığı gibi CDT analizi için sadece disialotransferrine yönelik olarak sertifikeli referans materyal geliştirilmesi çalışmaları sürmektedir (44, 45). Bu durumda, HPLC yöntemi için tanımlanmış olan hedef değerleri kullanmak yerine benzer elektroforetik yöntemler için önerilen ve kalitatif yöntemler için de geçerli olan bir kavramdan yola çıkarak pik alanlarının tekrarlanabilirliğinin bir doğruluk göstergesi olabileceğini (46) kabul ettik ve "PhastSystem" ve "Multiphor II" için aynı kontrol materyalinin ard arda analiz ederek ortalama değerleri bulduk. Bu değerleri kıyasladığımızda "Multiphor II" sisteminin "PhastSystem" cihazına göre disialotransferrin ve tetrasialotransferrin için gösterdiği sapmanın (Tablo 3) kabul edilir olduğu düşünüldü.



Şekil 5. Transferrin proteinindeki mutasyonların nöraminidaz ile saptanması (33)

40 örnek ile yapılan iki cihaz arasındaki korelasyon analizinde her bir izoform için anlamlı korelasyonun varlığı gösterilmiştir. CDT'nin komponentleri olan OSA, 1SA ve 2SA'da ayrıca en fazla miktarda bulunan 4SA'da oldukça yüksek korelasyon saptanmış, buna karşın 6SA'da anlamlı olsa da korelasyonun düşük olduğu gözlenmiştir (Tablo 4, Şekil 4). Bu durum, gümüş boyadan kaynaklanan koyu renk arka planın etkisiyle, "PhastSystem" cihazında çalışılan jellerde altı siyalik asitli izoformların iyi değerlendirilememesinden kaynaklanabilir. "Phast" Sistem'de gümüş boyadan kaynaklanan koyu renk arka planın etkisiyle 7 SA-TRF değerlendirilememiştir ve bu nedenle bu bant için yöntem karşılaştırma yapılamamıştır.

Sonuç olarak, transferrin izoformlarının izoelektrik odaklama elektroforezi "Multiphor II" ve "PhastSystem" cihazları ile gerçekleştirildiğinde uyumlu sonuçlar elde edilmekte olup her iki sistemde de transferrin izoform analizi gerçekleştirilebilir. Rutin laboratuvar uygulamalarında hızı nedeniyle "PhastSystem" tercih edilebilir.

KAYNAKLAR

- Gu J, Taniguchi N. Potential of N-glycan in cell adhesion and migration as either a positive or negative regulator. *Cell adhesion & migration*. 2008 Oct-Dec;2(4):243-5. PubMed PMID: 19262156. Pubmed Central PMCID: 2633684.
- Grunewald S. Congenital disorders of glycosylation: rapidly enlarging group of (neuro)metabolic disorders. *Early human development*. 2007 Dec;83(12):825-30. PubMed PMID: 17959325.
- Taniguchi N, Korekane H. Branched N-glycans and their implications for cell adhesion, signaling and clinical applications for cancer biomarkers and in therapeutics. *BMB reports*. 2011 Dec;44(12):772-81. PubMed PMID: 22189679.
- Pamela C. Champe RAH, Denise R. Ferrier. Glycosaminoglycans and Glycoproteins. *Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry Vol.*, 2007:155-71
- O'Brien JF. Methods for detection of carbohydrate-deficient glycoprotein syndromes. *Seminars in pediatric neurology*. 2005 Sep;12(3):159-62. PubMed PMID: 16584075.
- Jaeken J, Carchon H. Congenital disorders of glycosylation: a booming chapter of pediatrics. *Current opinion in pediatrics*. 2004 Aug;16(4):434-9. PubMed PMID: 15273506.
- Marklova E, Albahri Z. Screening and diagnosis of congenital disorders of glycosylation. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2007 Oct;385(1-2):6-20. PubMed PMID: 17716641.
- Freeze HH. Understanding human glycosylation disorders: biochemistry leads the charge. *The Journal of biological chemistry*. 2013 Mar 8;288(10):6936-45. PubMed PMID: 23329837. Pubmed Central PMCID: 3591604.
- van Eijk HG, van Noort WL, de Jong G, Koster JF. Human serum sialo transferrins in diseases. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 1987 Jun 15;165(2-3):141-5. PubMed PMID: 3652443.
- Pronicka E, Adamowicz M, Kowalik A, Ploski R, Radomska B, Rogaszewska M, et al. Elevated carbohydrate-deficient transferrin (CDT) and its normalization on dietary treatment as a useful biochemical test for hereditary fructose intolerance and galactosemia. *Pediatric research*. 2007 Jul;62(1):101-5. PubMed PMID: 17515832.
- Quintana E, Sturiale L, Montero R, Andrade F, Fernandez C, Couce ML, et al. Secondary disorders of glycosylation in inborn errors of fructose metabolism. *Journal of inherited metabolic disease*. 2009 Dec;32 Suppl 1:S273-8. PubMed PMID: 19768653.
- Piagnerelli M, Boudjeltia KZ, Nuyens V, De Backer D, Su F, Wang Z, et al. Rapid alterations in transferrin sialylation during sepsis. *Shock*. 2005 Jul;24(1):48-52. PubMed PMID: 15988320.
- Gornik O, Gornik I, Kolednjak IZ, Lauc G. Change of transferrin sialylation differs between mild sepsis and severe sepsis and septic shock. *Internal medicine*. 2011;50(8):861-9. PubMed PMID: 21498934.
- Arndt T. Carbohydrate-deficient transferrin as a marker of chronic alcohol abuse: a critical review of preanalysis, analysis, and interpretation. *Clinical chemistry*. 2001 Jan;47(1):13-27. PubMed PMID: 11148172.
- Stibler H, Borg S. Carbohydrate composition of serum transferrin in alcoholic patients. *Alcoholism, clinical and experimental research*. 1986 Jan-Feb;10(1):61-4. PubMed PMID: 3515994.
- Arndt T, Erkens M, Holtkamp K, Keller T, Gressner AM. High prevalence of increased trisialotransferrin concentrations in patients with anorexia nervosa: implications for determination of carbohydrate-deficient transferrin. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2007 Apr;379(1-2):150-3. PubMed PMID: 17291470.
- Reif A, Fallgatter AJ, Schmidtke A. Carbohydrate-deficient transferrin parallels disease severity in anorexia nervosa. *Psychiatry research*. 2005 Nov 15;137(1-2):143-6. PubMed PMID: 16243401.
- Reif A, Keller H, Schneider M, Kamolz S, Schmidtke A, Fallgatter AJ. Carbohydrate-deficient transferrin is elevated in catabolic female patients. *Alcohol and alcoholism*. 2001 Nov-Dec;36(6):603-7. PubMed PMID: 11704629.

19. Hackler R, Arndt T, Helwig-Rolig A, Kropf J, Steinmetz A, Schaefer JR. Investigation by isoelectric focusing of the initial carbohydrate-deficient transferrin (CDT) and non-CDT transferrin isoform fractionation step involved in determination of CDT by the ChronAlcol.D. assay. *Clinical chemistry*. 2000 Apr;46(4):483-92. PubMed PMID: 10759472.
20. Stibler H, Kjellin KG. Isoelectric focusing and electrophoresis of the CSF proteins in tremor of different origins. *Journal of the neurological sciences*. 1976 Dec;30(2-3):269-85. PubMed PMID: 63543.
21. Fagan KJ, Irvine KM, McWhinney BC, Fletcher LM, Horsfall LU, Johnson L, et al. Diagnostic sensitivity of carbohydrate deficient transferrin in heavy drinkers. *BMC gastroenterology*. 2014;14:97. PubMed PMID: 24885510. Pubmed Central PMCID: 4042141.
22. Stibler H, Borg S, Joustra M. Micro anion exchange chromatography of carbohydrate-deficient transferrin in serum in relation to alcohol consumption (Swedish Patent 8400587-5). *Alcoholism, clinical and experimental research*. 1986 Oct;10(5):535-44. PubMed PMID: 3099592.
23. Quintana E, Navarro-Sastre A, Hernandez-Perez JM, Garcia-Villoria J, Montero R, Artuch R, et al. Screening for congenital disorders of glycosylation (CDG): transferrin HPLC versus isoelectric focusing (IEF). *Clinical biochemistry*. 2009 Mar;42(4-5):408-15. PubMed PMID: 19146845.
24. Jaeken J, Matthijs G. Congenital disorders of glycosylation: a rapidly expanding disease family. *Annual review of genomics and human genetics*. 2007;8:261-78. PubMed PMID: 17506657.
25. Van Scherpenzeel M, Willems E, Lefeber DJ. Clinical diagnostics and therapy monitoring in the congenital disorders of glycosylation. *Glycoconjugate journal*. 2016 Jan 7. PubMed PMID: 26739145.
26. Raymond Karcher JPL. Electrophoresis. In: Carl A. Burtis ERA DEB, ed. *Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics*, Vol. 4th ed: Elsevier Saunders Press, 2006:121-41.
27. Westermeier R. Isoelectric focusing electrophoresis in practice Vol. 4th ed: Wiley VCH Verlag mbH & Co. KGaA, 2005:51-67.
28. D'Alessandro AM, D'Andrea G, Oratore A. Different patterns of human serum transferrin on isoelectric focusing using synthetic carrier ampholytes or immobilized pH gradients. *Electrophoresis*. 1988 Feb;9(2):80-3. PubMed PMID: 3234341.
29. de Jong G, van Eijk HG. Microheterogeneity of human serum transferrin: a biological phenomenon studied by isoelectric focusing in immobilized pH gradients. *Electrophoresis*. 1988 Sep;9(9):589-98. PubMed PMID: 3243256.
30. Pascali VL, Dobosz M, Destro-Bisol G, D'Aloja E. Characterization of genetic variants of human serum transferrin by isoelectric focusing: comparison between conventional and immobilized pH gradients, and application to a protocol for paternity testing. *Electrophoresis*. 1988 Aug;9(8):411-7. PubMed PMID: 3234383.
31. Strahler JR, Hanash SM, Somerlot L, Bjellqvist B, Gorg A. Effect of salt on the performance of immobilized pH gradient isoelectric focusing gels. *Electrophoresis*. 1988 Feb;9(2):74-80. PubMed PMID: 3234340.
32. Petren S, Vesterberg O. Separation of different forms of transferrin by isoelectric focusing to detect effects on the liver caused by xenobiotics. *Electrophoresis*. 1989 Aug-Sep;10(8-9):600-4. PubMed PMID: 2806210.
33. Nenad Blau MD, K. Michael Gibson. *Congenital Disorders of Glycosylation. Laboratory Guide to the Methods in Biochemical Genetics*, Vol. 2008:379-417
34. van Eijk HG, van Noort WL. The analysis of human serum transferrins with the PhastSystem: quantitation of microheterogeneity. *Electrophoresis*. 1992 Jun;13(6):354-8. PubMed PMID: 1505496.
35. G. T. Protein izolasyonu AvSITGA, ed. *Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler*, Vol. 3th ed. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri Ltd.Şti, 2008:161-273.
36. Anani WQ, Ojerholm E, Shurin MR. Resolving Transferrin Isoforms via Agarose Gel Electrophoresis. *Laboratory medicine*. 2015 Winter;46(1):26-33. PubMed PMID: 25617389.
37. Bjellqvist B, Ek K, Righetti PG, Gianazza E, Gorg A, Westermeier R, et al. Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *Journal of biochemical and biophysical methods*. 1982 Sep;6(4):317-39. PubMed PMID: 7142660.
38. <http://www.gelifesciences.com> (GE Healthcare Life Sciences)
39. Zuhlsdorf A, Said M, Seger C, Park JH, Reunert J, Rust S, et al. It Is Not Always Alcohol Abuse-A Transferrin Variant Impairing the CDT Test. *Alcohol and alcoholism*. 2016 Mar;51(2):148-53. PubMed PMID: 26333807.
40. Stibler H. Carbohydrate-deficient transferrin in serum: a new marker of potentially harmful alcohol consumption reviewed. *Clinical chemistry*. 1991 Dec;37(12):2029-37. PubMed PMID: 1764777.
41. Arndt T, Keller T. Carbohydrate-deficient transferrin and anorexia nervosa. *Psychiatry research*. 2006 Nov 15;144(2-3):245-6; author reply 7-8. PubMed PMID: 16945425.
42. Zuhlsdorf A, Park JH, Wada Y, Rust S, Reunert J, DuChesne I, et al. Transferrin variants: pitfalls in the diagnostics of Congenital disorders of glycosylation. *Clinical biochemistry*. 2015 Jan;48(1-2):11-3. PubMed PMID: 25305627.
43. Perez-Cerda C, Quelhas D, Vega AI, Ecay J, Vilarinho L, Ugarte M. Screening using serum percentage of carbohydrate-deficient transferrin for congenital disorders of glycosylation in children with suspected metabolic disease. *Clinical chemistry*. 2008 Jan;54(1):93-100. PubMed PMID: 18024528.

44. Jeppsson JO, Arndt T, Schellenberg F, Wienders JP, Anton RF, Whitfield JB, et al. Toward standardization of carbohydrate-deficient transferrin (CDT) measurements: I. Analyte definition and proposal of a candidate reference method. *Clinical chemistry and laboratory medicine: CCLM / FESCC*. 2007; 45(4):558-62. PubMed PMID: 17439340.
45. Weykamp C, Wienders JP, Helander A, Anton RF, Bianchi V, Jeppsson JO, et al. Toward standardization of carbohydrate-deficient transferrin (CDT) measurements: III. Performance of native serum and serum spiked with disialotransferrin proves that harmonization of CDT assays is possible. *Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC*. 2013 May;51(5):991-6. PubMed PMID: 23241602.
46. Ross GA. Instrumental validation in capillary electrophoresis and checkpoints for method validation. *Accred Qual Assur*. 1997;2:275-84.

Yazışma adresi:

Özlem Gürsoy Çalan
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, İZMİR
E-mail: ozlemgursoy2008@gmail.com
