

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PROTEİNLERİN DİNAMİĞİNİN
İNCELENMESİ

Figen SEKİN
YÜKSEK LİSANS TEZİ
FİZİK ANABİLİM DALI

GEBZE

2010

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PROTEİNLERİN DİNAMİĞİNİN
İNCELENMESİ

Figen SEKİN
YÜKSEK LİSANS TEZİ
TEZ DANIŞMANI
Prof.Dr. Zafer Ziya ÖZTÜRK
FİZİK ANABİLİM DALI

GEBZE

2010



YÜKSEK LİSANS TEZİ JÜRİ ONAY SAYFASI



G.Y.T.E. Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 15.01.2010 tarih ve 2010/03 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 04/02/2010 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Figen SEYİN'in tez çalışması Farklı Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE
(TEZ DANIŞMANI) : Prof. Dr. Zafer Ziya ÖZTÜRK

ÜYE : Doç. Dr. Muhammet Bektaş M.

ÜYE : Doç. Dr. S. İren San

ONAY

G.Y.T.E. Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/...../20... tarih ve/..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

TEZİN BAŞLIĞI : PROTEİNLERİN DİNAMİĞİNİN İNCELENMESİ

YAZAR ADI : FİGEN SEKİN

Yapısal proteinler akışkan biyolojik yapılara bükülmezlik ve peklik sağlarlar. Çoğu yapısal protein fibröz proteindir, örneğin aktin ve tübülün monomerleri globüler ve çözümlen proteinler olmalarına rağmen polimerleştikleri zaman hücre iskeletinin parçası olan, uzun ve bükülmez lifler oluştururlar. Hücre iskeleti hücrenin şeklini ve büyüklüğünü korumasını sağlar.

Aktin hücrede globüler (G) ve filamentöz (F) yapıda bulunmaktadır. Hücre içi aktin filamentleri yapısal görevi yanında hareket, kemotaksi, sekresyon ve hücre bölünmesi gibi pek çok hücrel işlevde ilgilidir. Monomerik G-aktin moleküllerinin ardışık sıralanarak polimerleşmesi sonucu ortaya çıkan zincir (heliks) F-aktin ismini almaktadır.

Çalışmada kullanılan aktin tavşan çizgili kas dokusundan saflaştırıldı. Elde edilen aktinin miktarı spektroskopik yöntemle, saflığı ise gel filtrasyon kromatografi ve sodyum dodesil sülfat gel elektroforez (SDS-PAGE) ile test edildi. Aktin polimerleşme ve depolimerleşmesi viskozimetrik yöntemle, aktine bağlanan proteinlerden Alexa Fluor 595 kullanılarak floresan işaretleme yapıldı ve ölçümler gerçekleştirildi.

SUMMARY

TEZİN BAŞLIĞI : PROTEİNLERİN DİNAMİĞİNİN İNCELENMESİ

YAZAR ADI : FİGEN SEKİN

Structural proteins in biological fluids provide rigidity and constipation. Most structural proteins are fibrous proteins, such as actin and proteins even though they are soluble tubules monomers and polymers globular cytoskeleton time as part of the long and rigid fibers form. The cell cytoskeleton provides protection of shape and size of the cells. Globular actin in the cell (G) and filaments (F) is located in a building. Intracellular actin filaments by structural movement task, kemotax such as secretion and cell division is related to many cellular functions. Monomeric G-actin molecules as a result of the sequential polymerization ranked emerging chain (helix) is the name of F actin.

Used in the study actin, purified from rabbit skeletal muscle tissue. The resulting amount of actin spectroscopic method, the purity come filtration chromatography and sodium dodesil come electrophoresis (SDS-PAGE) and were tested. Actin polymerization and depolymerization viskosimetric methods, binding AEDANS and Alexa Fluor 595 by using the flouresans mark was made and measurements were performed.

TEŞEKKÜR

Bu tezin yönetiminde ve yürütülmesinde değerli bilgileri ile bana destek olan ikinci tez danışmanım İstanbul Üniversitesi Çapa Tıp Fakültesi Biyofizik Bölümü öğretim görevlisi sayın hocam Doç. Dr. Muhammet BEKTAŞ' a, desteğini hiç esirgemeyen birlikte çalıştığım arkadaşım Dr. Bilge ÖZERMAN' a ve Biyofizik Bölümünün diğer tüm çalışanlarına şükranlarımı sunarım. Ayrıca canım anneme bana sonuna kadar inandığı ve desteğini esirgemediği için teşekkür ediyorum; aileme ve çalışmalarım sırasında kaybettiğim babama ithaf ediyorum.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZET	IV
SUMMARY	V
TEŞEKKÜR	VI
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ	X
TABLolar DİZİNİ	XII
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Aktin	3
2.1.1 Aktinin Biyolojik Yapısı	4
2.1.2 Aktin Filamentinin Oluşumu	15
2.2 Aktin Bağlayan Proteinler	21
2.3 Özgün Drogların Aktin Plimerleşmesine Etkisi	21
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	22
3.1 Kimyaal Maddeler	22
3.1.1 Florofor İşaretli Maddeler	23
3.1.2 Kromatografik Maddeler	23
3.1.3 Cihazlar	23
3.2 Çözeltiler	24
3.2.1 Fosfat Tamponu	24
3.2.2 Aktin Saflaştırma	24
3.2.3 SDS-PAGE (Poliakrilamid Gel Elektroforez) için kullanılan Eriyikler	25
3.2.4 Bağışık Emdrim (Western Emdrim) için Kullanılan Eriyikler	27
3.2.5 Floresan Boyama için Kullanılan Eriyikler	28

3.3 Yöntemler	29
3.3.1 Tavşan Çizgili Kas Dokusundan Aktin Saflaştırılması	29
3.3.2 Gel Filtrasyon Analizi	31
3.3.3 Elektroforetik Analiz SDS-PAGE	31
3.3.4 Viskozimetrik Analiz	31
3.3.5 G Aktinin Floresan İşaretlenmesi ve Polimerleşmenin İzlenmesi	32
3.3.6 Hücre Kültürü	33
3.3.7 Floresan Mikroskopla İnceleme Hazırlığı	33
3.3.8 Floresan Mikroskopisi	34
4.BULGULAR	35
4.1 Tavşan Çizgili Kas Dokusundan Aktin Saflaştırılması	35
4.2 Gel Filtrasyon Analizi	35
4.3 Elektroforetik Analiz	37
4.4 Aktin Western Emdrim Yöntemiyle Görüntülenmesi	38
4.5 G Aktinin Floresan İşaretlemesi	39
4.6 Aktin Polimerleşme ve Depolimerleşme Kinetiği	40
4.7 Hücrelerin Çoğaltılması	43
4.8 Hücre İçi Aktin İskeletinin Görüntülenmesi	43
5. TARTIŞMA	45
6. KAYNAKLAR	47
7.ÖZGEÇMİŞ	51

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ADP	Adenozin difosfat
ADPR	Adenozin difosfat riboz
ATP	Adenozin trifosfat
cpm	Sayım/dak (counts per minute)
dak	dakika
DAPI	4'-6-Diamidino-2-fenil indol
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
FA	Fragment A
F-aktin	İpliksi aktin (Filamentöz aktin)
FB	Fragment B
FITC	Floreseinizotiyosiyanat
g	Yerçekimi ivmesi / gram
G-aktin	Küresel aktin
GDP	Guanozin difosfat
GF	Büyüme faktörü
GTP	Guanozin trifosfat
HB-EGF	Heparin bağlayan epidermal büyüme faktörü benzeri GF
HUVEC	İnsan göbek kordonu damar endotel hücresi
IgG	İmmunglobulin G
kDa	Kilo Dalton
NAD	Nikotinamid adenin dinükleotit
PAS	Periyodik asit-Schiff
PMSF	Fenilmetilsulfonil florit
PPO	2,5-difenil oksazol
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Gel Elektroforezi
TCA	Triklorasetik asit
TEM	İletim elektron mikroskobu
TEMED	Tetrametilendiamin
TRICH	Tetra metil rodamin izotiyosiyanat
Tris	Tris (hidroksimetil) aminometan
F-actin	Filamentöz aktin
G-aktin	Monomerik aktin
kDa	Kilo Dalton
nm	Nano metre
cAMP	Siklik adenozin mono fosfat

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Aktinin Görünümü	4
2.2 Ökayotik Hücrelerin Filament Yapıları	6
2.3 Aktin Aminoasit Dizisi	8
2.4.a . Kristalografi Çalışmaları ile Elde Edilen G-aktin Üç Boyutlu Yapısı	9
b. F-aktin molekülünün X ışını kırınımı Yöntemi ve Elektron mikroskop ile Oluşturulan Üç Boyutlu Atom Modeli	10
2.5. <i>In Vitro</i> Aktin Polimerleşme Eğrisi	11
2.6. Aktin filamentin uzamasının ATP ile ilgisi	17
2.7 Aktin filamentlerinin uzama yönü	17
2.8 Omurgalı hücrelerinde bulunan aktin bağlayan proteinler	20
3.1 Aktin Eldesi	30
4.1.a . Sefakril S 200 kolonunun kalibrasyonu	36
4.1.b Sefakril S 200 kolonunda Aktin 42.000 kDa	36
4.2. Aktin saflığının SDS-PAGE elektroforezi ile analizi	37
4.3. Bağışık Emdrim Yöntemiyle Belirlenen Aktin.	38
4.4. G aktin emisyon spektrumu	39
4.5 Aktin Polimerleşmesine FA'nın etkisi	40
4.6. G-aktin polimerleşmesinin viskometrik analizi	41
4.7. F aktin depolimerleşmesinin viskozimetrik analizi	42

- 4.8. HUVEC Hücresinde aktin iskeletinin floresan mikroskopunda görüntülenmesi 43**
- 4.9. HUVEC Hücresinde aktin iskeletinin ve çekirdeğin (mavi) floresan mikroskopunda görüntülenmesi 44**

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Kovalent Değerleri olmayan Aktin Bağlı Ligandlar	12
3.1. Floroforların Uyarılma Salınım Değerleri	34

1. GİRİŞ

Proteinler, aminoasitlerin zincir halinde birbirlerine bağlanmasından oluşan büyük organik bileşiklerdir. Açlık anında en son tüketilir. Kimyasal sindirimi midede başlar.

Proteinler, amino asit yapıtaşlarından oluşan polimerlerdir. Her proteinin kendisine has özelliklerinin olmasını sağlayan özel amino asit dizilimleri vardır. Proteinlerin işlevlerinin çoğu, kendisini oluşturan amino asitlerin özelliklerinin tayin edilmesiyle anlaşılabilir. İnsandan virüse proteinlerin oluşumunda en çok kullanılan 22 çeşit amino asit vardır.

Yapısal proteinler akışkan biyolojik yapılara bükülmezlik ve peklik sağlarlar. Çoğu yapısal protein fibröz proteindir, örneğin aktin ve tübülün monomerleri globüler ve çözümlen proteinler olmalarına rağmen polimerleştikleri zaman hücre iskeletinin parçası olan, uzun ve bükülmez lifler oluştururlar. Hücre iskeleti hücrenin şeklini ve büyüklüğünü korumasını sağlar.

Aktin hücrede globüler (G) ve filamentöz (F) yapıda bulunmaktadır. Hücre içi aktin filamentleri yapısal görevi yanında hareket, kemotaksi, sekresyon ve hücre bölünmesi gibi pek çok hücresel işlevde ilgilidir. Monomerik G-aktin moleküllerinin ardışık sıralanarak polimerleşmesi sonucu ortaya çıkan zincir (heliks) F-aktin ismini almaktadır.

G-aktin molekülü N-terminalden asitlenme, fosforillenme ve ADP ribozillenme gibi sentez sonrası modifikasyonlara uğrayabilir ve Mg^{+2} , Cu^{+2} ve ATP bağlayabilir. Fizyolojik ortamda, magnezyum ve ATP varlığında, G-aktin çözümlülüğü olmayan F-aktin olarak adlandırılan, bir çift zincir filamenti oluşturacak biçimde polimerleşir, yine bazı proteinler F-aktine bağlanıp depolimerleşmeyi engelleyebilir.

Organizmada önemli işlevleri olan aktin bu işlevleri yerine getirebilmek için hücre iskeleti ve bazı membranların oluşumunda büyük rol oynamaktadır. Aktin filamentlerinin üç boyutlu yapısı ve bu yapıya etkili koşul ve faktörler yaygın biçimde incelenmektedir.

Hücre iskeleti ya da plazma membranı ile doğrudan ilişkisi olmayan bazı proteinlerin de aktin monomer ve filamentlerine bağlandığı bildirilmiştir.

Bu veriler ışığında aktin proteinin yapısı spektrometrik, Viskozimetrik, Elektroforetik yöntemlerle incelenerek aktine bağlanan AEDANS ve falloidin (Alexa Fluor 595) kullanılarak floresan işaretleme yapıldı ve ölçümler gerçekleştirildi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Aktin

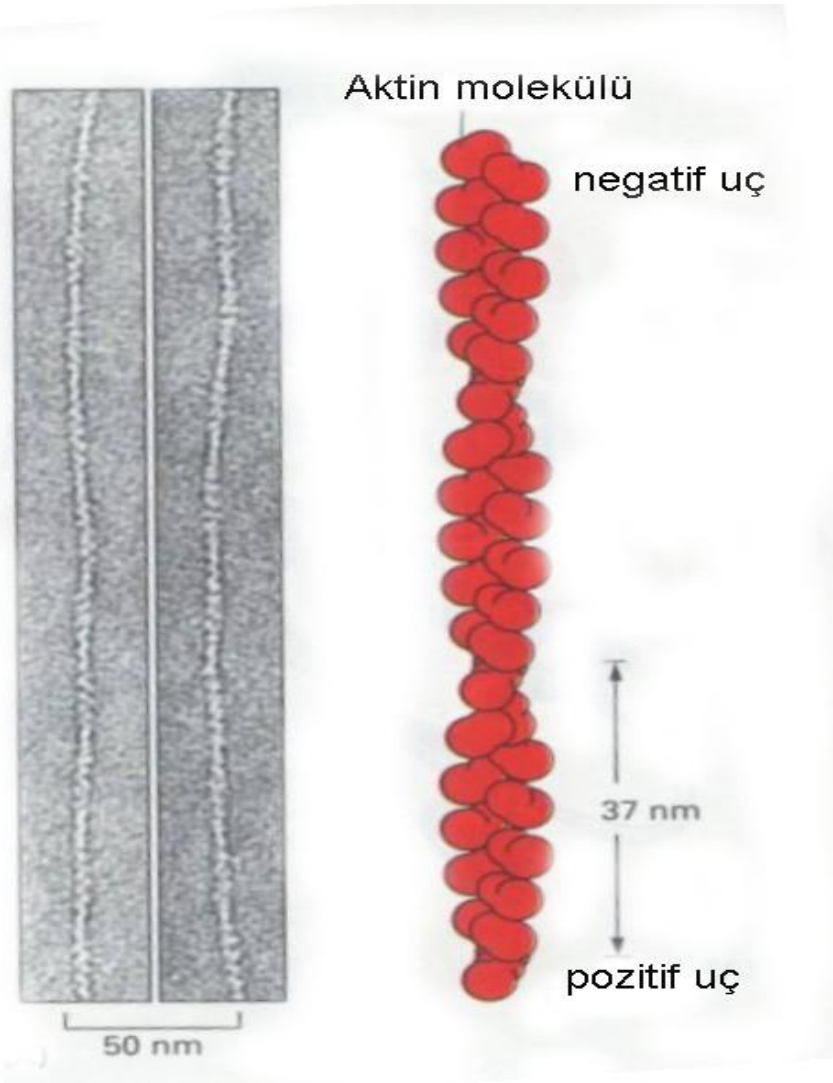
Aktin, küresel şekilli yapısal bir proteindir. Heliks şeklinde polimerize olarak mikrofilament olarak da bilinen aktin filamentlerini oluşturur. Ökaryotik hücrelerde, hücreyi boydan boya saran ağ; aktin filamentleridir. Aktin filamentleri hücreye mekanik destek sağlar, hücrenin şeklini belirler, hücrenin hareket etmesine olanak sağlar (aktinden oluşan lamellipodia, filopodia ve pseudopodia gibi yapılar aracılığıyla); bazı tip hücrelerarası bariyerlerin oluşumunda sitoplazma akıntısında ve hücre bölünmesi sırasında hücrenin ekvatorunda boğum oluşmasında rol alırlar. Kas hücrelerinde myosin adlı proteinle birlikte, kasılma eyleminin gerçekleştirilmesinde asli bir rol alırlar (1).

Hücre sitoplazmasında aktin genellikle ATP' ye bağlı olarak bulunur, ama ADP' ye bağlanması da mümkündür. ATP-aktin kompleksleri aktin filamenti oluşumunda daha hızlı polimerize olurken daha yavaş depolimerize olurlar. ADP-aktin kompleksleri için durum tam tersidir.

Aktin ökaryotik hücrelerdeki en yaygın olarak bulunan proteinlerden biridir ve hücre içi konsantrasyonu genelde 100 μ M'dan fazladır. Aktin, evrimsel olarak, türler arasında en iyi korunmuş proteinlerden biridir Alg ve insan hücresindeki aktin proteinler aminoasit içeriği ve dizilimi açısından birbirlerinden % 5' ten daha az farklılık göstermektedir (1).

2.1.1. Aktinin Biyolojik Yapısı

Özelleşmiş kas hücrelerinde kas liflerinin kasılmasında aktif olarak görev üstlenen çok miktarda aktin filamentleri bulunmaktadır. Yapılan çalışmalar, kas hücreleri dışındaki ökaryotik hücrelerin hemen hepsinde çok miktarda aktin filamentinin varlığını ortaya çıkarmıştır. Bu hücrelerdeki aktin filamentleri, kas liflerindeki aktin filamentlerine benzer iki aktin ipliğinin sarmala benzer şekilde birbiri üzerine sarılmasıyla oluşur (Şekil 2.1).

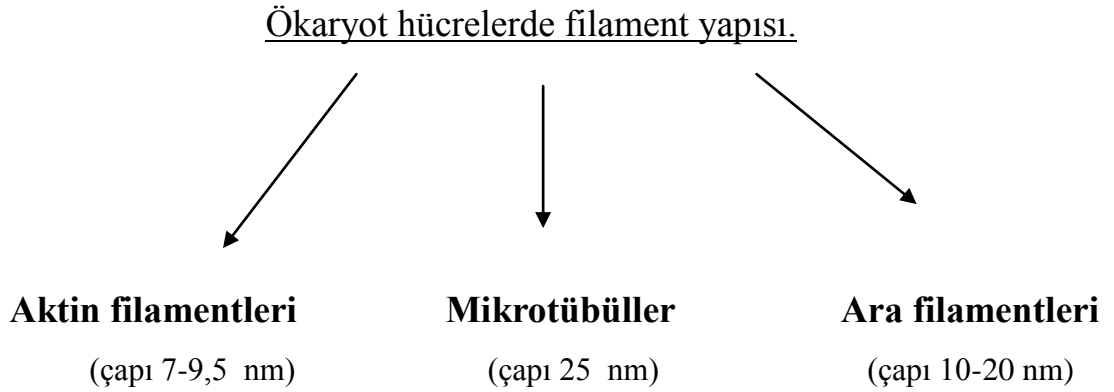
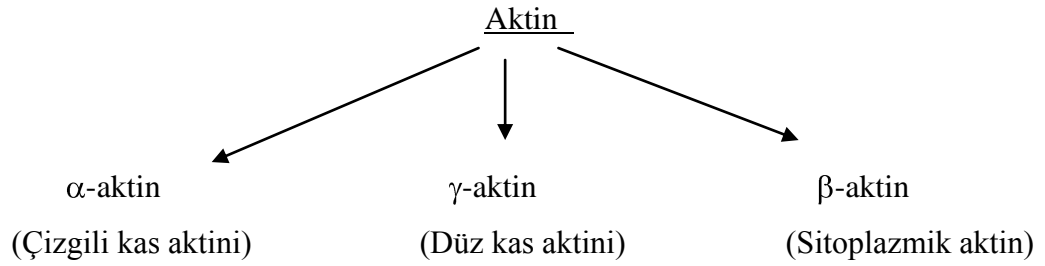


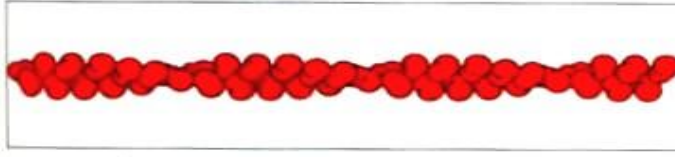
Şekil 2.1. Aktinin görünümü;

A: Elektron mikroskopunda negatif işaretli aktin filamenti

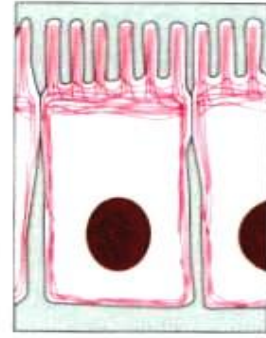
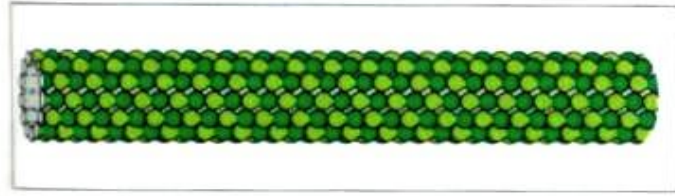
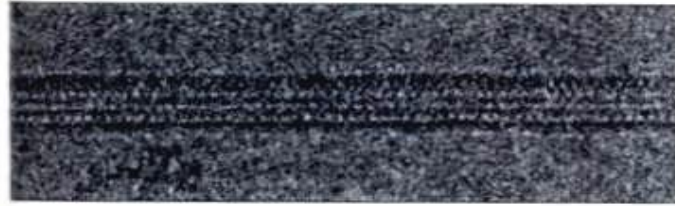
B: Aktin monomerlerinin üst üste sarılarak oluşturduğu heliks yapısı (2)

Kas lifleri haricindeki diğer hücrelerde aktin filamentleri daha dinamik bir yapıya sahiptir (2). Omurgalıların kas dışı hücrelerinde en az altı çeşit aktin sentezlenir, fakat bunlar benzer olduklarından dolayı laboratuvar çalışmalarında birbirinin yerine geçebilirler. Tüm ökaryotik hücreler aşağıda belirtildiği gibi üç tip filament yapısı taşırlar.

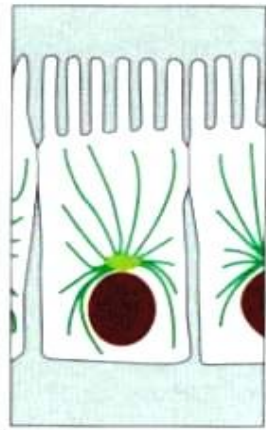
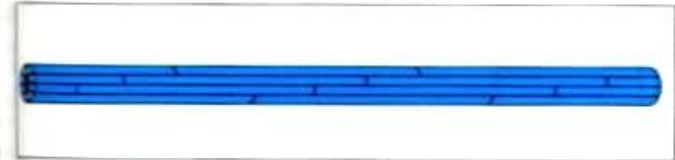
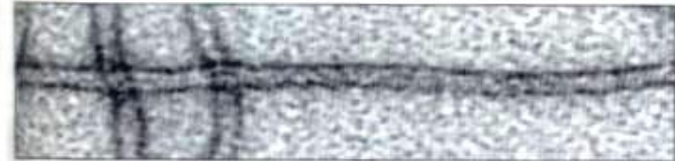


Aktin Filamentleri

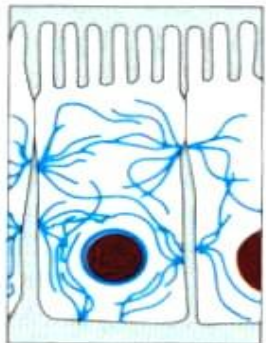
25 nm

25 μ m**Mikrotübüller**

25 nm

25 μ m**Ara Filamentleri**

25 nm

25 μ m

Şekil 2.2: Ökaryotik Hücrelerin Filament Yapıları (3).

Aktin, ökaryot hücrelerde tüm proteinlerin % 5` ini kas proteinlerin de % 20-25 kadarını oluşturmaktadır (4).

Tüm ökaryotlarda bulunan konvansiyonel aktinler çok korunumlu stoplazmik protein ailesini oluşturur. Morfolojik bir karaktere sahip filamentlerde kendi yeteneklerini ekleyen aktinleri tanımlamak (magnezyum iyonları ve fizyolojik tuz konsantrasyonu varlığında) ve bu filament yeteneği ile myozinin ATPaz aktivitesini uyarmak için aktinin fonksiyonel özellikleri kullanılır (1).

Canlı organizmada aktin, yapısal bir protein olmanın dışında hücre hareketi, kas kasılması, hücre göçü gibi işleyişlerle hücrede mekanik süreçleri düzenler. Hücrede ayrıca aktin, hücre içi sinyal iletimi ve çeşitli maddelerin taşınması ile enzimatik etkinliğin düzenlenmesi gibi çok temel görevler üstlenir. Hücredeki işleyişe göre aktin molekülü sitoplazmadaki çeşitli proteinlerle etkileşime geçerek filament ağı, filament demetleri ya da filament iskeleti oluşturur (5). Aktinin tümü olmasada çoğu sitokalasine, falloidine ve DNaz I' e bağlanabilir. Konvansiyonel aktinlerin çoğunluğu bu kriteri tamamlasada sınırlı fonksiyonel benzerlik haricinde homoloji zincirini ortak kullanan aktinin büyük ölçüde farklı bir alt ailesi ortaya çıkmaktadır. Buna ek olarak ortaya çıkan ATP hidrolizi ve bağlamada aktinle yapısal eşitliğe sahip ve üç boyutlu yapısı benzer olan ancak homoloji zincirini sınırlı kullanan (şeker kinazlar ve ATPaz proteinleri içeren) büyük bir grup protein vardır. Bu son grup aynı zamanda prokaryotlarda da ifade edildiğinden aktinler bazı ATP bağlayan soylardan gelen çeşitli gruplardan sadece birini temsil ediyor olabilir. Prokaryotlarda filament yapısındaki proteinlerin bilinen son bilgileri ATP miyozin aktivasyonu, DNaz bağlanması, falloidin bağlanması ve antijenik benzerlik paylaşımıdır (1).

Aktin ağırlıkla hücrenin stoplazma bölümünde bulunur. Aktin izoformları; izoelektrik noktası 5,4 olan α -aktin, β -aktin ve γ -aktindir. Aktin, hücrede aynı anda hem globüler aktin (G-aktin) olarak monomerik yapıda, hem de ipliksi aktin (F-aktin) olarak polimerik yapıda bulunabilen tek proteindir (6). Hücrede biyolojik etkinliğe sahip olan aktin ipliksi aktindir (1).

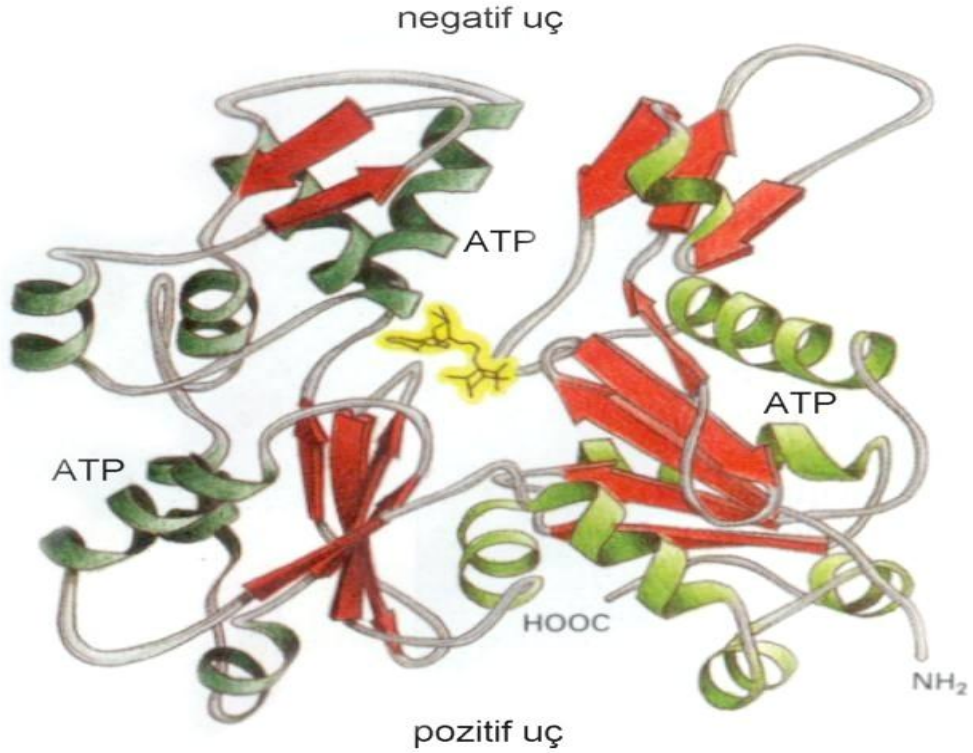
Monomer (globuler) aktin (G-aktin) 42.500 dalton ağırlığında küresel bir proteindir. Birincil yapısı 375 aminoasit içermektedir (Şekil1.3) ve türler arasında büyük benzerlik (homoloji) göstermektedir (4). Aktin birincil yapısı dört ayrı *subdomain*'den oluşmaktadır (7).

Ac-
D E T E D T A L V C
D O G S D G L A V A G
F A P I M D D P R R P
Q G S V M V Y G V R Q
K R S Y V I G L V A R Q
I E M N P P I M L V N P
D Y N P P I M L V N P
H N P P I M L V N P
Q A S I H L A K V O L A
L N F A I D G R P P G F Y
H E E H E E E E E E E
E E E E E E E E E E E
S S S S S S S S S S S
D I M V I W K L A F V A
D D V Y G L I R L N E A
T L A G G D T I W V T R
A V P R M E L I H A E F
L K R P G A K T H P A K
V A A R Q Q Y N T E P M
C G V H K S P D F F E L
T P L G T A L M F R A A
E G L S S K G O A A I T
E H

Şekil 2.3. Aktin aminoasit dizisi. (4)

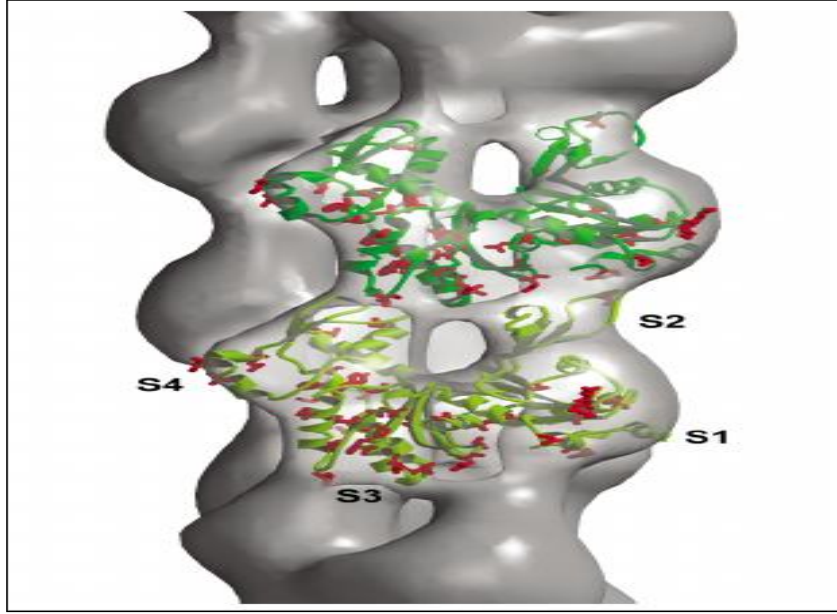
Birincil *subdomain* G-aktinin, 1-32, 70-144, 338-375, ikincisi 33-69, üçüncüsü 145-180, 270-333 ve dördüncüsü 181-269 amino asit kalıntılarını içermektedir (Şekil 2.4).

Her G-aktin molekülü bir ATP molekülü bağlayabilir. Filament içindeki aktinler ise F-aktin olarak isimlendirilir. G-aktin iki alandan oluşur. Bir alan “domain” iki altbirim içerir. Aynı topolojiye sahip beş beta tabaka şeridi geniş olan 2. ve 3. altbirimlerde uzanır. Dört altbirim ortasındaki oyuğa, adenin nükleotidi ve çift değerlikli katyonlar (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+}) yerleşir. Aktin bağlayan proteinlerin aktin ile olan etkileşiminde alt birimler özgün hedef bölgelerini oluşturur. Örneğin DNaz I ile aktinin 2. alt birimi etkileşir (8). Alt birim 3 ve altbirim 1 filament üzerinde pozitif ucu işaret eder. İki aktin molekülü arasındaki etkileşimi Şekil 2.4 -b’de görüldüğü gibi 4 alt birim sağlar (6,9).



Şekil 2.4.a Kristalografi çalışmaları ile elde edilen G-aktinin üç boyutlu yapısı (2).

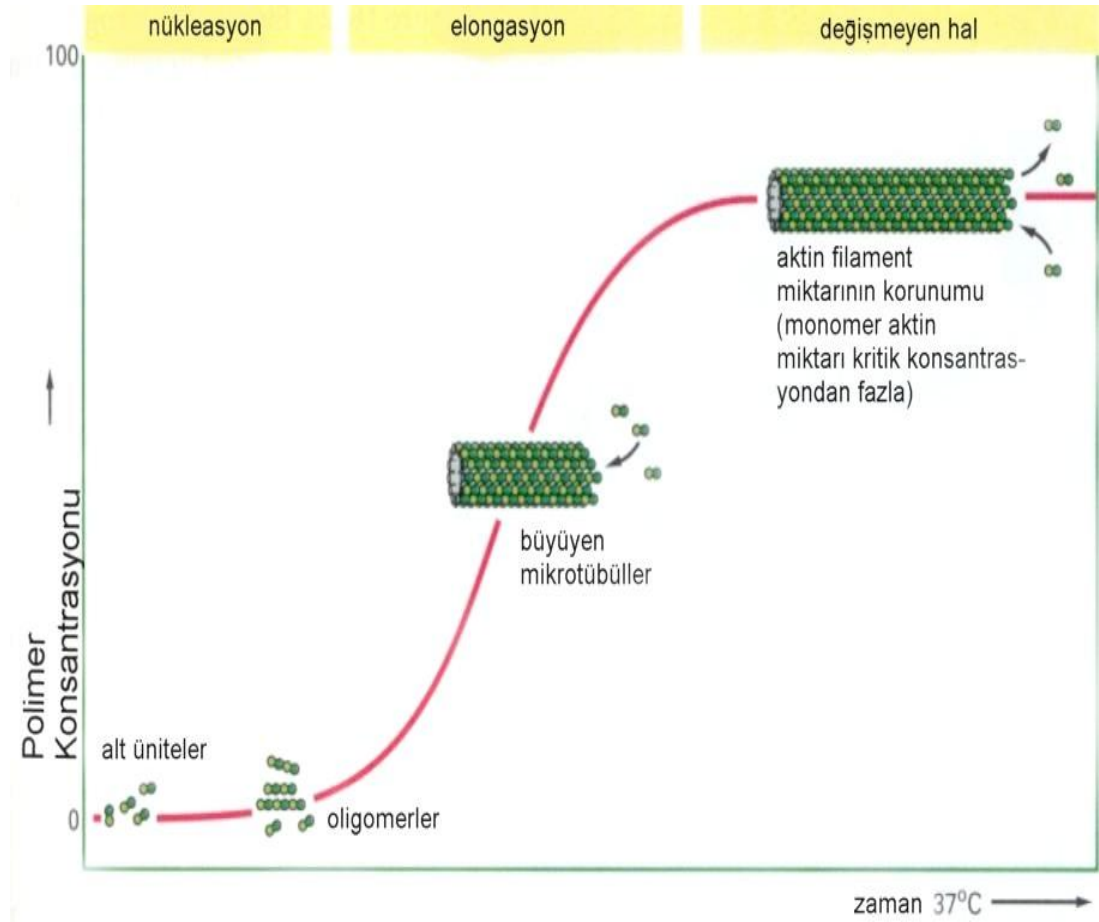
G-aktin molekülleri N-terminalden asitlenme, ve ADP-ribozillenme gibi sentez sonrası modifikasyonlara uğrayabilir (10).



Şekil.2.4 b F-aktin molekülünün X-ışını kırınımı yöntemi ve elektron mikroskobu ile oluşturulan üç boyutlu atom modeli (8).

G-aktin molekülleri ATP, Ca^{+2} ve Mg^{+2} bağlayabilir (7,11). Fizyolojik iyonik şartlarda, magnezyum ve ATP varlığında G-aktin, çözünürlüğü olmayan F-aktine bir çift heliks filamenti oluşturmak üzere kovalent olmayan bir şekilde polimerleşir. F-aktin, fibril yapıda, 6.7 nm kalınlığında, 35.5 nm boyundadır. Hayvan hücrelerinde mevcut aktin moleküllerinin yaklaşık % 50'si polimerleşmemiş şekilde bulunur. Polimerleşmemiş bu aktinler, ya serbest monomer halinde ya da bazı proteinlerle küçük kompleksler halindedir. Polimerleşmiş aktin filamentleri polimerleşmemiş aktin molekülleri arasında dinamik bir denge vardır. Bu dinamizm hücre yüzey hareketinde dahil pek çok hücresel işlevin gerçekleşmesine yardım eder (12-13).

Aktin monomerlerinin, birleşerek aktin filamentlerini oluşturması ve G-aktinlerin, F-aktinlere dönüşümü basamaklı bir olaydır. İlk olarak, üç aktin molekülünün *nükleus* olarak bilinen üçlü oligomer oluşturması gerekmektedir. Bu basamak **nükleasyon** olarak isimlendirilir ve aktin polimerizasyon grafiğinde bir gecikme fazı olarak görülür (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. *In vitro* aktin polimerleşme eğrisi. (Elongasyon;uzama)

Nükleasyon süreci termodinamik olarak geri dönüşümsüz bir olaydır ve aktin polimerleşmesinin hızını sınırlayıcı basamaktır. Bu basamaktan sonra, aktin *nukleus* ya da filamentlerinin uçları hızla G-aktin bağlanması gerçekleşir. Ortamdaki G-aktin konsantrasyonu belirli bir değerin altına düştüğünde artık polimerde net bir büyüme görülmez. "Kritik konsantrasyon" denilen bu konsantrasyonda birim zamanda filamentte eklenen ve filamentten ayrılan monomer miktarı yaklaşık olarak eşittir. Eğer monomer konsantrasyonu, kritik konsantrasyonun altına düşerse aktin filamentlerinin depolimerleşmesi başlar ve filament boyu kısalmır (12,14-15).

Aktin monomerleri (G-aktin veya Globüler aktin) hücrelerde aktin polimerlerine (aktin filamentleri, F aktin veya mikrofilamentler) şekline çevrilir. Bu çevirmenin zamanlaması, kutupluluğu, konumu ve boyutu sinyal iletim kanallarınca

düzenlenerek hücre yüzeyinde yerleşmiş büyük miktarda aktin bağlayan proteinlerce düzenlenir (Tablo 2.1).

Tablo 2.1. Kovalent olmayan aktin bağlı ligandlar (5).

Ligand

Aktin bağlı küçük ligandlar;

Katyonlar (Ca^{+2} , Mg^{+2})

Adenin Nükleotidler (ATP, ADP)

İnorganik Fosfat $AlCl_3$

Aktin bağlı Proteinler

Gelsolin Ailesi, Gelsolin Brevin

Adseverin

Fragmin; Cap12; severin DS151

Mbh 1; Makrofaj Capping faktör; gCap 39; Seinderin

Villin,

Elongasyon Faktör 1 (EF-1), Elongasyon Faktör 2 (EF-2)

Capping Proteinler

β aktin, Acumentin

Aginaktin, Hsc70

Band 4A, Ezrin, Radixin, EM10

β Cap73 (β aktin sadece), Cap 100

Ca G; gCap39; Macrofaj capping protein

Cap Z; β aktin; Cap 32; Cap34; Cap37; Capping Protein β_2

DNaz I, Schwannomin, Merlin, Tropomoxlalin

Monomer bağlı proteinler

Actobiadin

Aktoforin; ADF; Aktin Depolimerize Faktörü, Kofilin, Depaktin; COFI, ABP1p

ASP56

Timozin β 4, Timozin β 9; Timozin β 10; Fx

Profilin, PFY1

Vitamin D Bağlı Protein (VDBP); Özel Grup Bileşik; Ge globulin, Ge

Spektrin ailesi

X aktinin; Aktinogelin, Gelaktin

ABP-120

ABP-240

Distonin; ACF7

Distrofin; DMDR Protein; Distrofin bağlantılı protein(DRP)

Filamin; ABP 280, Aktin Bağlı Protein (ABP), Fimbrin, L plastin, T plastin,

ABP -67, Makrofaj 70 kDa Protein

İyon taşıyıcılar

ATP hassas K^+ kanal

CTFR

Na^+ kanal

Na^+ , K^+ , ATPaz

Reseptörler

Adenil siklaz birleşik Proteinleri, CAPSrv2p

EGF resptör

İnositol 1,4,5, trifosfat reseptör

İntegrin x2

Mineralokortikoid reseptör

Aktin bağlayan Motifler

BTS/POZ motif

Kalpolin homoloji domain (CH)

Kofolin homoloji domain

I/LWEQ modül (F aktin)

SH2 domain

SH3 domain

Özel izoform bağlanma

Kalponin

β Cap 73 (sadece β aktin)

Falloidin

Plastin (β aktin sadece)

Timosin

Aktoforin

Aktin bağlayan toksinler, ilaçlar ve diğer organikler

9 AC (Hidrofobik prop)

Aplitonin A

Otamin O (Katyon analog)

Cisplatin:transplatin

Sitokalsin

DCQ (moleküler rotor)

Diaminokloro platinyum(II) (aktine DNA için bağlanır)

Yağlar

Doksozobisin

Gonyodomin A

Latrankulin, Misakinolid A

Pentoksifilin

SaytofizinerTolitoxin

Swinholid A

MANS (hidrofobik prob)

Fallotoksinler

Virotoksinler, Fallotoksinler, Difteri Toksini

Sırasıyla filamentler farklı düzenlenir fakat aktin bağlayan proteinlerin daha ileri bir grubu tarafından cap ve paket aktin filamentleri çapraz bağlanabilir ve aynı zamanda transmembranda çözünen sinyal reseptörleri veya adhezyon taşıyıcılar üzerinden filamentler mebrana bağlanır. Dakikadaki filament popülasyonu için ölçülen yarı ömrüyle aktin iskeleti çoğu hücrede çok dinamiktir. Her aktin monomeri tutunma ve sökölme döngüsü boyunca bir molekül ATP hidrolizini katalizler. Böylece; özellikle sürekli hücre türlerinde aktin filament yapıda iken karakteristik

deseni (immunositokimya tarafından incelen sabit hücrelerde) bu yapıları oluşturan bireysel filamentler sürekli değişir. Aktin filamentlerinin yeni yapısal birimlerinin gelişimi eskilerin eskilerin sökülüp yeni yapıların tutunduğu bir döngü sonucunda gerçekleşir. Aktin filamentlerinin devri ve aktin iskeletinin organizasyonunu belirleyen aktin bağlayan proteinlerin belirli özellikleri, hormon, büyüme faktörü ve extra hücrel matrix reseptörler üzerinden çevresel sinyaller tarafından ve aynı zamanda farklılaşmış iç sinyaller tarafından modüle edilir.

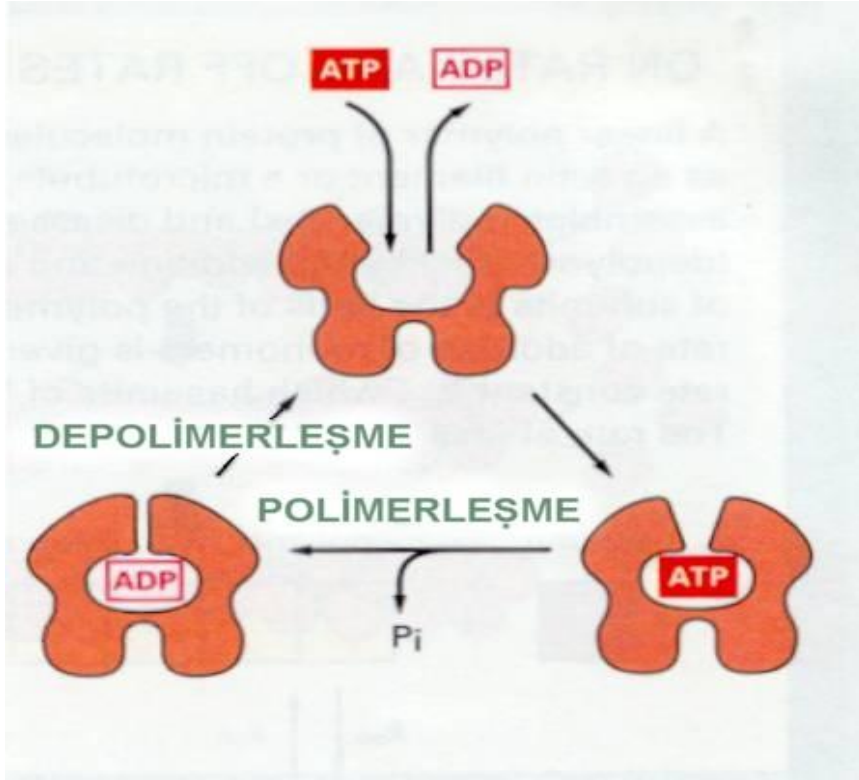
Hücre iskeleti mimarisinin bilinen modülatörleri kalsiyum iyonları, pH, inositol lipidleri ve fosforilasyon içerir. Bu sinyal kanallarının hedefleri aktin bağlı proteinler olabilir. Ancak aktin, ATPaz döngüsünde nükleotid değişimini engelleyen veya katalizleyen monomer bağlı proteinlerce ve pH'daki veya inorganik fosfat konsantrasyonunda ki değişim tarafından modüle edilir ya da aktinin ADP ribolizasyonu, yerinde fosforillenmesi için bir kanıttır (5).

2.1.2. Aktin Filamentinin Oluşumu

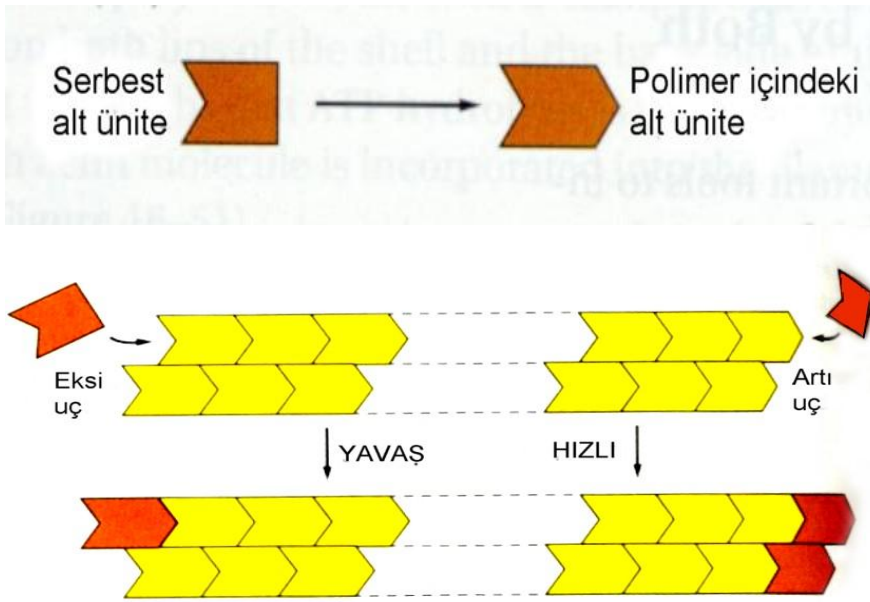
Aktin monomerleri kendi aralarında etkileşip polimerleşerek çift sarmal aktin filamentini oluşturur. Filament iki aşamada oluşur ve aktin monomerleri, önce gecikme fazında çekirdek yapıyı oluşturmak üzere bir araya gelir. Çekirdek olarak tarif edilen kalımlı bileşik, ancak üç G-aktin molekülünün bir araya gelmesi ile oluşur. Aktin polimerleşmenin önemli bir özelliğide filament uzamasının yönelim göstermesidir. Aktin filamentleri yapısal kutuplara sahiptir. Bu kutuplaşmanın önemli bir sonucu, filamentin iki ucunun farklı polimerleşme kinetiği göstermesidir. Yapılan çalışmalarda filamentlerin bir ucunun diğerine göre daha hızlı uzadığı görülmüş ve uzama hızının yüksek olduğu uca pozitif uç, düşük olduğu uca da negatif uç adı verilmiştir (Şekil 2.7). Polimerleşme ile başlayan uzama aşamasında filamentin bir ucunda monomerlerin birleşmesinin yanı sıra diğer uçta da ayrışma gözlenir. Bu sürekli birleşme ve ayrışma sürecinde filament yoğunluğu ile dengede bulunan serbest aktin monomerlerinin derişimi, kritik derişim olarak tanımlanır. Sivri uçta bulunan kritik derişim, sakallı uçtaki aktin monomer derişiminden 12 -15 kat daha fazla olmasının yanı sıra bu oran aktine bağlanan proteinlerin çeşidine göre ya da

hücre içi koşullara (pH, iki değerlikli tuz derişimi, sıcaklık değişimi gibi) bağlı olarak değişir (16). *İn vivo* aktin filamentlerinin uzaması her zaman pozitif uçlardan gerçekleşir. Böylece, filamentlerin pozitif uçlarından spesifik yönelim sağlanır ve bu yönelim de özellikle hareket için gereklidir (12,14,17). Aktin filamentlerinin uzama ve kısalması da çeşitli aktin bağlayan proteinler tarafından düzenlenir.

Yapılan araştırmaya göre polimerleşme için gerek duyulan serbest enerji değerinin 20,5 kcal/mol olduğu bildirilmiştir (18). Bu enerji ATP hidrolizi sonucu ortaya çıkar. Aktin filamentinin uzama aşamasında, ATP bağlı serbest G-aktin monomerleri filamente eklendikten sonra F-aktin-ATP bileşiği filamentin hızlı polimerleşen ucunda koruyucu kapak görevi görür. ATP'nin hidrolizinin hızla tamamlanması ile F-aktin-ADP-P_i bileşiği oluşur ve bundan 10 kat daha yavaş olarak P_i açığa çıkar (Şekil 1.-6). Böylece, aktin molekülündeki yarıktaki oluşun biçim değişikliğinden dolayı ADP, F-aktin-ADP olarak filamentin depolimerleşen ucunda kalır. Sitozolda ATP derişimi, ADP derişiminden daha fazla bulunduğundan dolayı aktin filamentinin depolimerleşmesi sırasında, G-aktin-ADP, ADP/ATP değişimi sonucu G-aktin-ATP' ye dönüşür. Aktin filamentindeki bu dinamik kararsızlık, filamentin sakallı ucuna bağlanan kapak proteinler ile durdurulur böylece enerji tüketimi azalır (16, 19).



Şekil 2. 6. Aktin filamentin uzamasının ATP ile ilgisi (14).



Şekil 2. 7. Aktin filamentlerinin uzama yönü (14).

Ayak değirmesi “*Treadmilling*”: açıklandığı gibi, bir aktin filamenti pozitif ve negatif uçlarının uzama hızları farklıdır. *İn-vitro* şartlarda, hızlı aktin polimerizasyon basamağından sonra, pozitif uca eklenen ve negatif uçtan ayrılan aktin monomerinin eşit olduğu sabit faz gelir. Bu fazda pozitif uca eklenen (polimerleşme) ve negatif uçtan (depolimerleşme) ayrılan monomer hızı eşittir. Net polimer uzunluğunun değişmemesi ve aktin monomer konsantrasyonunun korunmasına rağmen, aktin molekülleri sürekli olarak filamentin bir ucundan diğerine aktarılırlar. Bu süreç, ayak değirmesi olarak adlandırılır (12). Ayak değirmesi polimerleşmesin eşlik eden ATP hidrolizi ile mümkündür.


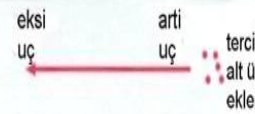









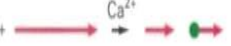

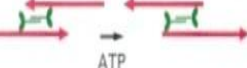


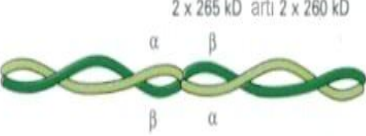



2.2 Aktin Bağlayan Proteinler

Aktin bağlayan proteinlerin Şekil 1.8’ de verilmesine rağmen bu liste tam değildir. Belirtilen işlevsel gruplar, her biri birbirinden çok az farkla ayrılan en az birkaç üye içermekle birlikte, listede sadece birer örnek verilmiştir. Ayrıca, bazı aktin bağlayan proteinlerin görevleri tam olarak bilinmediğinden bu listeye alınmamıştır. Henüz tanımlanmayan aktin bağlayan proteinlerin var olduğu da kesindir (11, 20). Bu proteinler sitoplazmada aktin filamentlerinin özellikle yönelim ve konumlarını düzenleyen proteinlerdir.

Aktin filamentleri ile etkileşen proteinler kasılma proteinleri, sarkomeri oluşturan iskelet proteinleri, interkalar disk proteinleri, hücre iskeleti proteinleri ve membrana bağlı proteinler olarak sınıflandırılabilir. Kasılma proteinleri olarak anılanlar aktin, miyozin, tropomiyozin ve troponin moleküllerinin etkileşimi, çizgili kasta kimyasal enerjinin mekanik enerjiye dönüşmesine neden olur. Aktin ve tropomiyozinin, yapılarındaki yüklü amino asitlerden dolayı moleküller arası elektrostatik etkileşim içinde olduğu böylece tropomiyozinin, aktine yapısal destek vererek işleyişini düzenlediği düşünülmektedir.

Kasılma işlevinde düzenleyici rol oynadığı düşünülen nebulin'in (500 - 900 kDa) in vitro çalışmaları sonucunda aktin filamentinin uzanacağı yer için kalıp oluşturduğu ve aktin filamentinin boyunu sabit tuttuğu, sinyal iletiminde görevli olabileceği ve miyofilamentleri arafilamentlere bağlayabileceği öne sürülmektedir.

Bu proteinlerden bir kısmı aktin filamentlerini birbirine ve hücre iskeletinin diğer birimlerine bağlayarak yapısal görevleri yerine getirir. Diğer bir kısmı ise, aktin filamentlerinin yönelimini dolayısıyla hücre hareketlerini düzenler. Yönelim mekanizmalarında aktin filamentlerinin pozitif uçları önemlidir, proteinler genelde bu uca tutunur ve aktin monomerlerinin eklenmesini ayarlarlar. Aktin filamentlerinin negatif uçları polimerleşme ve depolimerleşme süreçlerinde kısmen inaktif olduğundan bu uçların serbest bırakıldığı düşünülmektedir (12, 14, 21, 22).

PROTEİNİN İSLEVI	PROTEİNE ÖRNEK	SEKİL, BÜYÜKLÜK VE MOLEKÜLLER AĞIRLIĞIN KARSILASTIRILMASI	SEMATİK OLARAK AKTİN İLE ETKİLEŞİMİ
Filament oluşturm	Aktin		
Filamentleri güçlendirir	Tropomyozin		
Filamentleri demetler	Fibrin		
	α-Aktinin		
Filamentleri çapraz bağlar	Filamin		
Filamentleri parçalar	Gelsolin		
Filamentleri kaydırır	Miyozin		
Filamentler üzerinde vezikülleri hareket ettirir	Minimiyozin		
Palzma membranına filamentleri yanlardan bağlar	Spektrin		
Aktin monomerlerini ayırır	Timozin		

Şekil 2.8. Omurgalı hücrelerinde bulunan aktin bağlayan proteinler (3).

2.3. Özgün Drogların Aktin Polimerleşmesine Etkileri

Pek çok aktinin monomer ve filamentleri arasındaki dengeyle ilgili olduğu bilinmektedir. Aktin polimerleşmesinde meydana gelen değişimler genellikle küçük boyutlu ve geçici nitelikli olmaları nedeniyle kolayca belirlenmektedir. Bu hareketlerin oluşumunda aktin polimerleşme ve depolimerleşmenin oynadığı rol, bu süreçleri belirli basamaklarda durduran, böylece hücre hareketliliğini bozan drogların etkisiyle anlaşılabilir (12, 14).

Çeşitli küf matarlarından elde edilen bir metabolit ailesi olan sitokalsinler (*cytochalasin*), omurgalı hücrelerin, fagositoz, Sitokinez, hücre yüzeyindeki uzantıların oluşumu ve epitel hücrelerinin yapışması gibi pek çok hareketini engeller (10, 12). Fakat bu droglar, özellikle mikrotubullere bağlı kormozomların mitoz sırasında kutuplara çekilmesi ya da kas kasılması gibi aktin filamentlerinin kalımlı olduğu hareketleri etkilemez. Çünkü, sitokalsinler aktin filamentinin hızla uzayan pozitif ucuna, aktin monomerlerinin bağlanmasını engeller ve bu yüzden sadece aktin polimerleşmenin gerekli olduğu hareketleri durdurur (12, 14, 23).

Phalloidin, *Amanita phalloides* mantarının ürettiği çok zehirli bir alkaloyittir. Sitokalsinlerin tersine, aktin filamentinin kalımlılığını artırır ve depolimerleşmeyi engeller. Yine sitokalsinlere oranla hücre membranından kolayca geçemez, bu yüzden etkisini görebilmek için hücre içine enjekte edilmelidir. Bu gerçekleştirildiği zaman hem *amoeba* hem de kültürdeki omurgalı hücrelerinde hareketi engellediği görülür (12). Bu da hareket için polimerleşmenin yanında depolimerleşmenin de gerekli olduğunu ve bu işteki dinamik dengenin önemini göstermektedir (14, 15).

Buna ilaveten, *phalloidin* aktin filamentlerine spesifik olarak bağlandığından, onun floresan işaretli konjugatları hücrelerdeki aktin filamentlerini görüntülemek için sıklıkla kullanılmaktadır (25-27). Ayrıca Clostridyum C2 ve Ayota toksini aktin monomerlerini ADP ribozilleriyle F -aktin oluşumunu engeller (28). Difteri Toksini ise F-aktin iskeletini yıkmaktadır (29).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Kimyasal Maddeler

Adenin Tri Fosfat (ATP) (Sigma)
ADP-riboz (Sigma)
Akrilamid (Sigma)
Amonyum Sülfat (Sigma)
Bis-Akrilamid (N,N'-Metilen-bis -akrilamid)(Sigma)
Brom Fenol Mavisı (Sigma)
Bromokloroindolfosfat (BCIP) (Sigma)
Blue dextran (Sigma)
Bovine serum albumin (BSA) (Sigma)
Ditiyotireitol (DTT) (Sigma)
Deoksiribonükleaz I (Boehringer Mannheim)
4',6-diamidino-2-fenillindo (DAPI) (Invitrogen)
DMEM F-12 (Dubelco's medium F-12) (Sigma)
Etilendiamin tetraasidik asit (EDTA) (Merck)
Fenilmetilsülfonilflorid (PMSF) (Sigma)
Ferritin (Sigma)
Glisin (Sigma)
Karbonik Anhidraz
Konalbumin
2-Merkaptoetanol (MET) (Sigma)
Nitrobluetetrazolium(NBT) (Sigma)
Rhodamin-phalloidin (Santa Cruz)
Sığır serum albumini (BSA) (Sigma)
N, N, N, N'-Tetrametiletildiamin (TEMED) (Sigma)
Sodyum dodesil sülfat (SDS) (Sigma)
Toluen (Merck)
Tripsin (Boehringer Mannheim)
Triton-X 100 (Merck)
Tween -20 (Sigma), Ovalbumin

Amonyumpersulfat (APS), Tris, Sukroz, Methanol, Asetik asit, Triklore asetik asit (TCA), Aseton, CaCl₂, NaN₃, KCl, NaOH, KH₂PO₄, K₂HPO₄, NaHCO₃, HCl, MgCl₂ ve diğerk kimyasallar Sigma ve Merck firmalarından alındı. Göbek kordonu damar endotel hücreleri (HUVEC, human umbilical vein endothelial cells) ATTC'den alındı.

3.1.1. Florofor İşaretli Maddeler

Alexa Flour 594-falloidin (Sigma)

Falloidin TRICH (Sigma)

FITC.Izomer1 (Sigma)

N-(iodoacetaminoethyl)-I-naphthylamine-5-sulfonic acid (1,5 AEDANS)
(Sigma)

3.1.2. Kromatografik Maddeler:

Sephacril S-100 (Phamacia)

Sephacril S-200 (Phamacia)

3.1.3. Cihazlar

Mini gel elektroforez tankı (Biometra)

Floresan Mikroskopu (Olympus BX51)

Ultrasantrifüj (Sorval)

Santrifüj (Hettich)

Laminar hava akım cihazı ELB 2472 (Heraus)

Etüv (Sanyo)

Gel kurutucusu (Model 543) (Biometra)

Sıvı sintilasyon cihazı (Tri carb1000 tr, Packard)

Su banyosu (37° C) (Heidolph)

Spektrofotometre (UV 1601 Schimadzu)

Sıvı azot tankı (34 XT Taylor -Wharton)

Floresanspektrofotometre (Perkin Elmer LS 45)

Transfer cihazı (BioRad)
Kromatografi cihazı (AktaPrem plus)
Homojenizatör.

3.2 Çözeltiler

3.2.1 Fosfat Tamponu (PBS):

4,3 mM Na_2HPO_4
137 mM NaCl
2,7 mM KCl
1,8 mM KH_2PO_4

3.2.2 Aktin Saflaştırma

Fosfat-KCl Çözeltisi:

1000 mM KH_2PO_4
320 mM KOH
300 mM KCl

G-Aktin Tamponu:

5 mM K-Fosfat, pH:7,5
0,5 mM ATP
0,1 mM CaCl_2
0,5 mM DTT
1 mM NaN_3

F-Aktin Tamponu:

5 mM K-Fosfat. pH:7,5
10 mM NaCl
0,5 mM ATP
0,1 mM CaCl_2

0,5 mM DTT
1 mM NaN_3
3 mM MgCl_2

Depolimerleşme Tamponu:

2 mM K-Fosfat, pH:7,5
0,5 mM ATP
0,1 mM CaCl_2
0,5 mM DTT
1 mM NaN_3
1 μM K-EDTA

**3.2.3. SDS-PAGE (Poliakrilamid Gel Elektroforez) için
Kullanılan Eriyikler**

Ayırma Jeli (PAGE Alt Jeli):

3 ml 1,5 M Tris-HCl, pH:6,8
112,5 μl % 10 SDS
4,83 ml Akrlamid/bisakrlamid (30/0,8 w/w)
30 μl % 10 Amonyum persülfat
15 μl 6,56 M TEMED
4,08 ml d H_2O

Yığınlama Jeli (PAGE Üst Jeli):

1,25 ml 1 M Tris-HCl, pH:6,8
50 μl % 10 SDS
0,84 ml Akrlamid/bisakrlamid (30/0,8 w/w)
40 μl % 10 Amonyum persülfat
20 μl 6,56 M TEMED
3,92 ml d H_2O

PAGE Yürütme Tamponu:

3 g Tris

15 g Glisin

1 g SDS

dH₂O ile 1000 ml'ye tamamlanır.

PAGE Yükleme Tamponu:

3 ml 1 M Tris-HCL, pH:6,8

1,6 ml % 99 Gliserin

2 ml % 10 SDS

0,4 ml 14 M MET

0,2 ml % 0,1 Bromfenol mavisi

0,8 ml dH₂O

Jel Boyama Çözeltilisi:

% 0,2 Coomassie parlak mavisi

% 50 Metanol

% 10 Asetik asit

Boya Çıkarma Çözeltilisi:

% 7 Asetik asit

% 30 Metanol

SDS PAGE'de Kullanılan Molekül Ağırlık Standartları

Sığır Serum Albumini 66 kDa

ovalbumin 45 kDa

Karbonil Anhidraz 29 kDa

3.2.4 Bağışık Emdrim (Western Blot) için Kullanılan Eriyikler

TBST (Tris Eriyikli Tuz) Tamponu:

10 mM Tris-HCl, pH: 8,0

150 mM NaCl

% 0,05 Tween-20

Alkalen Fosfataz Substrat Tamponu:

100 mM Tris-HCl, pH: 9,5

100 mM NaCl

5 mM MgCl₂

% 0,4 NBT

% 0,4 BCIP

BSA (Sığır Serum Albumini) Tamponu

TBST içinde % 0,05 BSA eritilerek hazırlanır.

Durdurma Tamponu

20 mM Tris-HCl, pH: 8,0

5 mM EDTA

Aktarım Tamponu

50 mM Tris-HCl, pH: 8,0

380 mM EDTA

% 0,1 SDS

% 20 Methanol

Liziz Tamponu

1 mM PMSF

1 mM EDTA

% 0,5 Triton-X 100

10 mM Tris-HCl, pH: 7,5

3.2.5. Floresan Boyama için Kullanılan Eriyikler

PBS (Tuz İçeren Yıkama Eriyiđi)

1.44 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

0,2 g/l KH_2PO_4

8,0 g/l NaCl

0,2 g/l KCl

800 ml bd su ile çözümlerek pH HCl 7,4 olacak şekilde ayarlanarak son hacim 1 lt 'ye tamamlanır.

Sabitleme Tamponu

% 2 Parafomaldehit PBS eriysi içinde çözümlür

Membran Geçirgenliğini Artıran Eriyik

% 0,1 Triton PBS eriysi içinde çözümlür.

Floresan Sinyalin Kalınlığını Artıran Eriyik

% 50 Gliserol

% 50 PBS

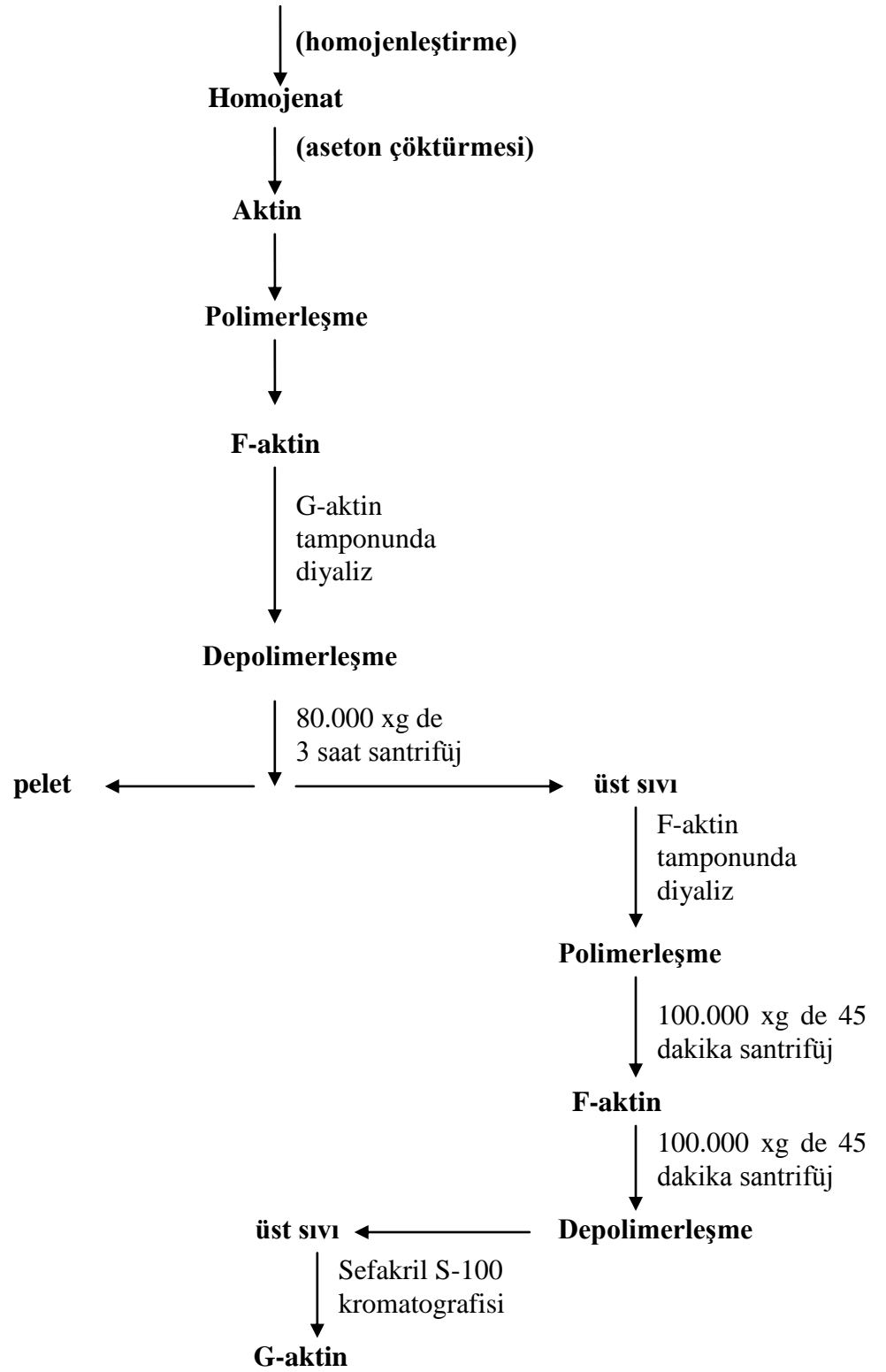
3.3 YÖNTEMLER

3.3.1 Tavşan çizgili kas dokusundan aktin saflaştırılması:

Tavşan çizgili kas dokusu çıkartıldıktan sonra homojenize edilerek ağırlığının 3 katı kadar fosfat-KCl çözeltisi ile karıştırıldı. 12 katı hacminde distile su ile yıkandıktan sonra çözülmüş proteinlerden ayrıştırıldı. 5 hacim (0.5 M NaHCO₃ ve 0.1 mM CaCl₂) içerisinde 30 dakika karıştırılarak filtre edildi. Üzerine 10 hacim 0 °C su eklenerek yeniden filtreden süzdürülen kas lifçikleri 2 hacim soğuk aseton içerisinde 30 dakika karıştırılarak tekrar filtreden geçirildikten sonra büyük çoğunluğu aktin içeren bu karışımdan aseton uçurularak blendırda parçalandı. Böylece toz aktin “aseton dried powder” elde edildi. Bu aşamadan sonra G-aktin ve F-aktin saflaştırılmasına geçilerek 1 gr toz aktin 20-25 ml G-aktin tamponunda (5 mM K-Fosfat pH:7.5, 0.5 mM ATP, 0.1 mM CaCl₂, 0.5 mM DTT, 1 mM NaN₃) çözüldü. 0.2 µm’lik filtreden geçirilen G-aktin içerisine 3 mM MgCl₂ ve 10 mM NaCl ilave edilerek 30 dakika oda ısısında ve gece boyu 4 °C de polimerleşmesi sağlandıktan sonra 14 °C’de 80.000 x g’de santrifüjlenerek F-aktinler çöktürüldü. F-aktin peleti depolimerleştirme tamponuna (2 mM K-Fosfat pH:7.5, 0.5 mM ATP, 0.1 mM CaCl₂ 0.5 mM DTT, 1mM NaN₃, 50 mM Tris-HCl pH:7.4) alınarak cam homojenleştiricide parçalandıktan sonra 100.000 xg’de 45 dakika santrifüjlenerek üst sıvıdan G-aktin alındı ve bu kesim 1.6 x 60 cm gel filtrasyon (Sefakril S-100) kolonundan geçirilerek saflaştırıldı. Aktin miktarı $A_{280}^{1\%} = 1.25$ eşitliğinden hesaplandı (29-30).

Saflaştırma aşamaları için akış şeması (Şekil 3.1) izlendi. Aktin miktarı spektroskopik yöntemle (29), saflığı gel filtrasyon kromatografi ve sodyum dodesil sülfat gel elektroforezi (SDS-PAGE) ile test edildi (30).

AKTİN ELDESİ
Tavşan İskelet Kas Dokusu



Şekil 3.1 Aktin Eldesi

3.3.2. Gel Filtrasyon Analizi:

Çalışmada Sefakril S-100, S-200 (1.6 x 60 cm) (GE Healthcare) kolonlar kullanılarak kromatografi cihazında (AKTA prime plus) saflaştırılan aktinin analizi yapıldı. Kolonun kalibrasyonu konalbumin (75 kDa), ovalbumin (43 kDa), karbonik anhidraz (29 kDa), ribonükleaz (13.7 kDa), aprotinin (6.5 kDa) varlığında gerçekleştirildi. Kolondan örnekler 0.25 ml ve 0.5 ml olarak toplandı. Çalışma G-aktin ortamında (5 mM K-Fosfat pH: 7.5, 0.5 mM ATP, 0.1 mM CaCl₂, 0.5 mM DTT, 1 mM NaN₃) gerçekleştirildi.

3.3.3. Elektroforetik Analiz SDS-PAGE

Saflaştırılan aktin, Laemmli yöntemine göre sodyum dodesil sülfat (SDS) poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) ile test edildi (29). Western Blot yöntemi için çift taraflı jel ile çalışıldı. Cam plakalar arasına silikon ayraç yerleştirilerek % 12'lik ayırma jeli döküldü. Düzgün bir jel yüzeyi oluşturmak üzere 1 cm'lik su tabakası oluşturulup 30 dakika polimerleşme için beklendi. Jelin üzerindeki su tabakası dökülerek % 5'lik yığınlama jeli eklendi. Zaman kaybetmeden, örneklerin yükleneceği kuyuları oluşturacak tarak cam plakalar arasına yerleştirildi ve polimerleşme için beklendi. Elektroforeze verilecek örnekler, denatüre edici (yükleme) tamponla 1:1 oranında karıştırılıp 3 dakika kaynatıldı. Elektroforez aletinin (BioRad) anot ve katot hazneleri yürütme tamponu ile dolduruldu. Örnek yükleme sırasında bir kuyuya da moleküler ağırlık standartları olarak, Fosforilaz b (M_r 97 kDa), BSA (M_r 66 kDa), ovalbumin (M_r 45 kDa) ve karbonik anhidraz (M_r 29 kDa) kullanıldı ve bu standartlardan oluşan karışım yüklendi. Yığınlama jeli için 80 Volt, ayırma jeli için 100 Volt gerilim uygulandı. Elektroforez sırasında kullanılan işaret boyası (Brom fenol mavisi) jelin sonuna geldiğinde akım kesildi. Jel, elektroforez aletinden ve iki cam arasından çıkartılarak Coomassie parlak mavisi ile boyanmaya bırakıldı. Daha sonra jel, % 7 asetik asit ve % 30 metanol varlığında fazla boya uzaklaştırıldı. Paralel olarak aktin Western Blot yöntemi kullanılarak da tespit edilmeye çalışıldı. SDS-PAGE ile ayrılmış proteinlerin TBS (Tris-buffered saline) –Tween (TBST) and % 0.5 BSA ile 1 saat işlem görmüş nitroselüloz (Millipore) membranlara aktarılmasından sonra aktin-spesifik poliklonal antikor

(Santa Cruz) ile inkübe edilerek anti-antikör IgG eklenmesini takiben 3-amino-etil- karbonat substrat solusyonu ile durduruldu (31).

3.3.4. Viskozimetrik Analiz

Aktin polimerleşme ve depolimerleşmesi Well-Brookfield model LVTDCP-40 cone/plate dijital viskozimetrede 24 °C' ta 1-12 saat aralığında viskoziteleri ölçülerek belirlendi (27). İçersinde 12 µM G-aktin olan örnekler 0.5 ml, içersine 10 mM NaCl ve 3 mM MgCl₂ ilave edilen polimerleşme tamponunda (60 rpm de kayma gerilimi 450 s⁻¹) santipoise (cp) olarak ölçüldü. Depolimerleşme ise (2 mM K-Fosfat pH:7.5, 0.5 mM ATP, 0.1 mM CaCl₂, 0.5 mM DTT, 0.001 mM EDTA, 1 mM NaN₃) varlığında çalışıldı.

3.3.5 G-Aktinin Floresan İşaretlenmesi ve Polimerleşmenin İzlenmesi

G-aktinin işaretlenmesinde substrat olarak N-(iodoacetaminoethyl)-I-naphthylamine-5-sulfonic-acid(1,5 AEDANS) (Sigma) kullanıldı. Tepkime, 60 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 20 mM Tris-Asetat pH:7,0 içersine, 0,5/1 mol/mol oranında (1,5) AEDANS ve G-aktin 4 °C ta 50 saat karanlıkta inkübasyon sonrası, 60 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 20 mM Tris-Asetat pH: 7,0 içeren diyaliz tamponu içersinde 2 x 2 saat 4 °C ta karanlıkta diyalizlenerek bağlanamayan AEDANS uzaklaştırıldı. Diyaliz sonrası uyarma dalgaboyu 353 nm, salınım dalga boyu ise 490 nm olarak ayarlanarak örneğin floresans spektrometre (Perkin Elmer LS 45) ölçümü gerçekleştirildi.

3.3.6 Hücre Kültürü

Çalışmada kullanılan HUVEC hücrelerinde aktin ikeletini görütülemek için floresan mikroskobu kullanıldı. Bunun için hücreler % 10 PBS ve antibiyotik (100 µg/ml streptomisin ve 100 U/ml penisilin) içeren DMEM F-12 içinde 37 ° C 'de % 5 CO₂ 'lik kültür ortamında yetiştirildi (32). Kültür şişeleri (Flask) ters mikroskola 3-4 günde bir kontrol edildi. Belli bir yoğunluğa ulaşan hücrelerden HUVEC hücreleri, hücre kazıyıcısı (cell scraper) ardımı ile yüzeyden kaldırıldı. Hücreler, 15 ml'lik ucu konik, steril " falcon " tüplerine aktarıldı. 2000 devir/dakika 5 dakika santrifüjlendi. Satrifüj sonrası üst fazdaki medyum uzaklaştırılarak hücrelerin üzerine taze medyum eklendi. Hücre sayısına göre her bir yeni pasajda yaklaşık 1-2 x 10⁵ hücre olacak şekilde hücreler yeni kültür şişelerine bölündü. 25 cm² ' lik flasklar için 5 ml, 75 cm² ' lik flasklar için 1 ml medyum eklenerek hücreler kültür ortamına alındı. Bu şekilde 3-4 günde bir kontrol edilen hücrelerden belirli aralıklarla yeni pasajlar yapıldı.

3.3.7. Floresan Mikroskobu ile İnceleme Hazırlığı.

Kullanılacak olan lamalar poli-L-izin ile kaplandı. Temizlenen lamalar 5 dakika distile su ile % 10 oranında seyreltilen poli-L-lizinde bekletildi ve 12 saat etüvde (60 ° C) kurutuldu.

Boyama işleminin sonunda floresan boyanın kalınlığını artırmak amacı ile gliserol-PBS karışımı (% 1) , polifenol diamin; PBS ;Gliserol (10 mg, 1 ml, 9 ml) karışımı ya da çekirdek boyası olan DAPI 'nin içinde bulunduğu ,solmaya karşı çözelti (invitrogen) kullanıldı (5).

Florofofor	Uyarılma(nm)	Salınım (nm)	Sönme Katsayısı (x 10 ³ M ⁻¹ cm ⁻¹)
DAPI	345	458	27
FITCH	494	518	67
TRICH	554	576	67
Alexa Fluor 594	581	609	90

Tablo 3-1 : Floroforların uyarılma salınım değerleri.

3.3.8. Floresans Mikroskopisi

Floresans mikroskobunda hücre iskelet yapısının (aktin filamentlerinin) görüntülenmesi, F-aktine bağlanan Alexa fluor 595 phalloidin kullanılarak yapıldı. Bu deneyde kullanılacak hücreler içinde yuvarlak lamel bulunan 6 kuyulu hücre plaklarına ekildi. Lameller kuyulardan çıkarılarak PBS ile yıkandı ve membran geçirgenliğini arttırmak amacı ile % 0.1 Triton X-100 / PBS çözeltisinde 30 dakika bekletildi. Tespit için % 2 paraformaldehit / PBS ortamında 1 saat inkübe edildi ve sonra boyama işlemine geçildi. % 1 PBS-BSA içinde bulunan floresan işaretli phalloidin varlığında bir saat boyanan hücreler üzerine boyanın kalımlılığını arttırmak amacı ile % 1 lik gliserol-PBS (mounting” solusyonu) ilave edildi ve lam ile kapatıldı. Olympus BX51 floresan mikroskobunda hücrelerin F-aktin iskeleti uygun filtreler kullanılarak görüntülendi (33).

4. BULGULAR

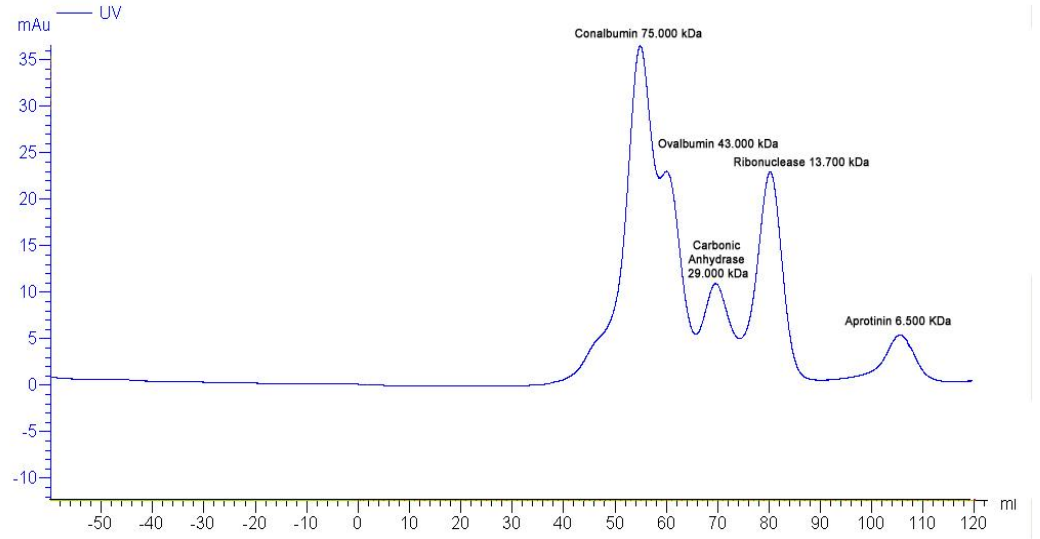
4.1 Tavşan Çizgili Kas Dokusundan Aktin Saflaştırılması

Tavşan çizgili kas dokusu çıkartıldıktan sonra homojenize edilerek ağırlığının 3 katı kadar fosfat-KCL çözeltisi ile karıştırıldı. 12 katı hacminde distile su ile yıkandıktan sonra çözülmüş proteinlerden ayrıştırıldı. 5 hacim (0.5 M NaHCO₃ ve 0.1 mM CaCl₂) içersinde 30 dakika karıştırılarak filtre edildi. Üzerine 10 hacim 0 °C su eklenerek yeniden filtreden süzdürülen kas lifçikleri 2 hacim soğuk aseton içersinde 30 dakika karıştırılarak tekrar filtreden geçirildikten sonra büyük çoğunluğu aktin içeren bu karışımdan aseton uçurularak blendırda parçalandı. Böylece toz aktin “aseton dried powder” elde edildi. Bu aşamadan sonra G-aktin ve F-aktin saflaştırılmasına geçilerek 1 gr toz aktin 20-25 ml G-aktin tamponunda (5 mM K-Fosfat pH:7.5, 0.5 mM ATP, 0.1 mM CaCl₂, 0.5 mM DTT, 1 mM NaN₃) çözüldü. 0.2 µm lik filtreden geçirilen G-aktin içersine 3 mM MgCl₂ ve 10 mM NaCl ilave edilerek 30 dakika oda ısısında ve gece boyu 4 °C de polimerleşmesi sağlandıktan sonra 14 °C’de 80.000 x g’de santrifüjlenerek F-aktinler çöktürüldü. F-aktin peleti depolimerleştirme tamponuna (2 mM K-fosfat pH:7.5, 0.5 mM ATP, 0.1 mM CaCl₂, 0.5 mM DTT, 1 mM NaN₃, 50 mM Tris-HCl pH:7.4) alınarak cam homojenleştiricide parçalandıktan sonra 100.000 x g’de 45 dakika santrifüjlendi. Üst sıvıdaki G-aktin 1 x 80 cm gel filtrasyon (Sefakril S-100) kolonundan geçirilerek saflaştırıldı. Aktin miktarı $A_{280}^{1\%} = 1.25$ eşitliğinden hesaplandı.

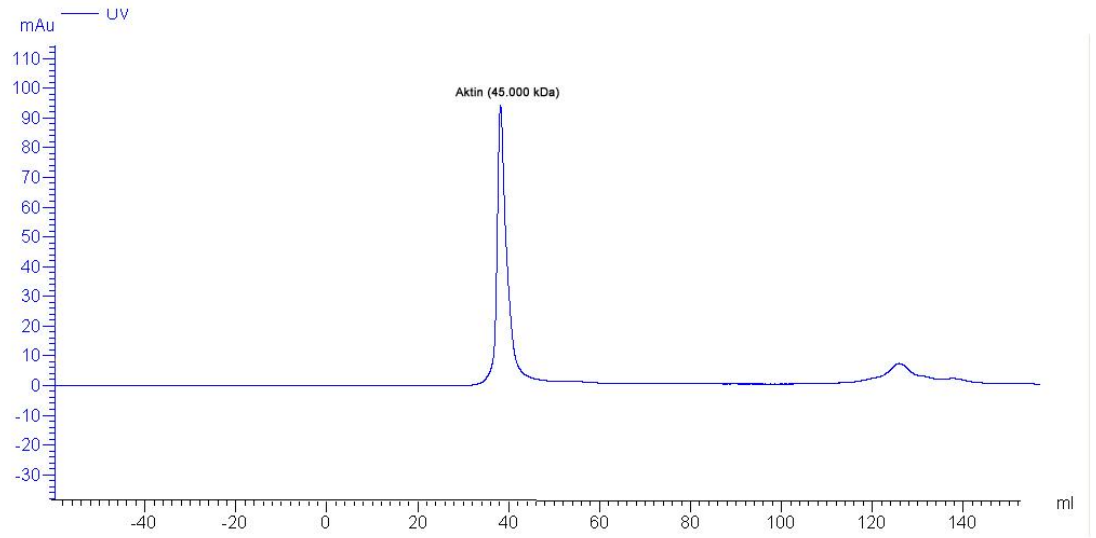
4.2. Gel Filtrasyon Analizi

Çalışmada Sefakril S-100 (1.6 x 60 cm) (GE Healthcare) kolon kullanılarak kromatografi cihazında (AKTAprime plus) daha önce saflaştırılan G-aktinin analizi yapıldı. Kolonun kalibrasyonu konalbumin (75 kDa), ovalbumin (43 kDa), karbonik anhidraz (29 kDa), ribonükleaz (13.7 kDa) varlığında gerçekleştirildi. Kolondan

örnekler 0.5 ml olarak toplandı. Çalışma G-aktin ortamında gerçekleştirildi. Saflaştırılan G-aktinin oldukça saf olduğu gözlemlendi. (Şekil 4.1)



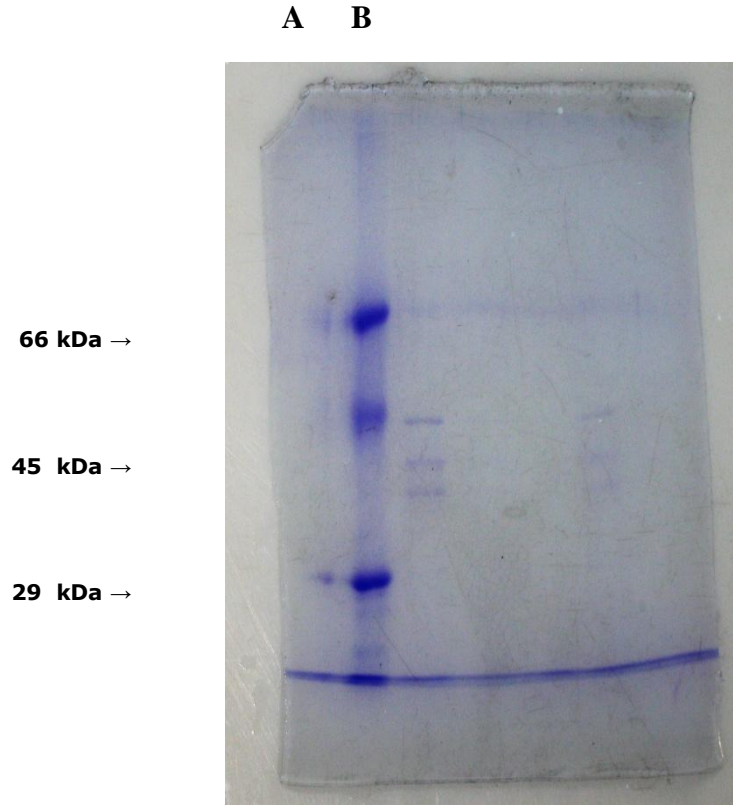
Şekil 4.1.a . Sefakril S 200 kolonunun kalibrasyonu



Şekil 4.1.b Sefakril S 100 kolonunda aktin (42.000 kDa). Akış hızı 0.6 ml/dak. Örnek hacmi 1 ml.

4.3.Elektroforetik Analiz

Elde edilen aktinin saflık analizi Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamit gel elektroforezi Laemmli yöntemi kullanılarak yapıldı. Western Blot yöntemi için çift taraflı jel ile çalışıldı. BSA (M_r 66 kDa), ovalbumin (M_r 45 kDa) ve karbonik anhidraz (M_r 29 kDa) moleküler ağırlık standartları olarak kullanıldı. Proteinler Coomassie Brilliant Blue ile boyandı. % 7 asetik asit ve % 30 metanol varlığında boya çıkarılarak proteinler görüntüledi. (Şekil 4.2)



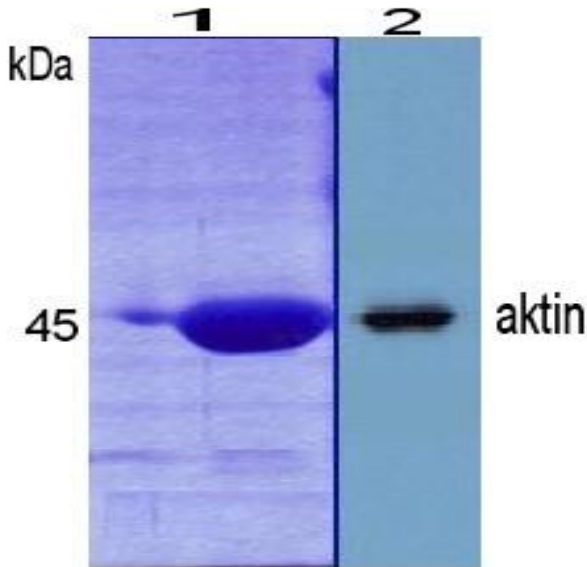
Şekil 4.2. Aktin saflığının SDS-PAGE elektroforezi ile analizi

A. Markırlar (5 ug),

B. Aktin (1 ug)

4.4 Aktinin Western Emdrim Yöntemiyle Görüntülenmesi

Elektroforez işlemi sonrası, diğer taraftaki boyanmamış gel; nitroselüloz membran ve 3MM Whatman filtre kâğıtları arasına yerleştirildi. Oluşturulan sandviç; aktarım tamponu ile doldurulmuş tanka (transblot) yerleştirildi. 63 volt gerilimde 16 saat gerçekleştirilen aktarım işleminden sonra nitroselüloz membran; özgün olmayan bağlanmaları önlemek için % 0,5 BSA içeren Tris tamponlu tuz çözeltisi (TBST) ile oda sıcaklığında 2 saat çalkalanarak doyuruldu. Membran; TBST çözeltisi ile iki kez yıkandıktan sonra monoklonal anti-diphtheria toxin (FA) antikoru içeren üst sıvı ile oda sıcaklığında bir saat çalkalandı. Membran TBST çözeltisi ile 3 kez yıkandı. Alkalin fosfatazla birleşik fare karşıtı immunglobulin 500 kez sulandırılarak ortama ilave edilerek membran 1 saat oda sıcaklığında çalkalanarak bekletildi. Tekrar TBST çözeltisi ile 3 kez yıkandı. Alkalin fosfataz substratı BCIP (150 µg/ml) ve NBT (300 µg/ml) substrat tamponu içinde çözüldükten sonra membran bu ortama alınarak oda sıcaklığında, karanlıkta çalkalanarak bantların oluşması sağlandı. Membran 20 mM EDTA içine alınarak tepkime durduruldu (Şekil 4.3).

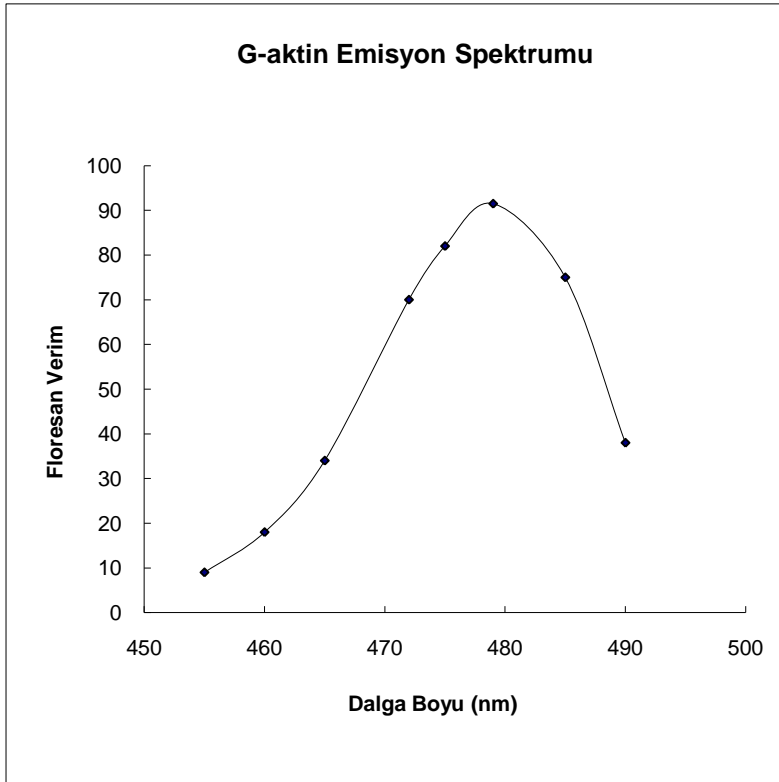


Şekil 4.3 Bağışık Emdrim Yöntemiyle Belirlenen Aktin. 1. Sütun SDS-PAGE G-aktin (5 ug), 2. sütun membana aktarım sonrası anti-aktin varlığında bağışık emdrim analizi.

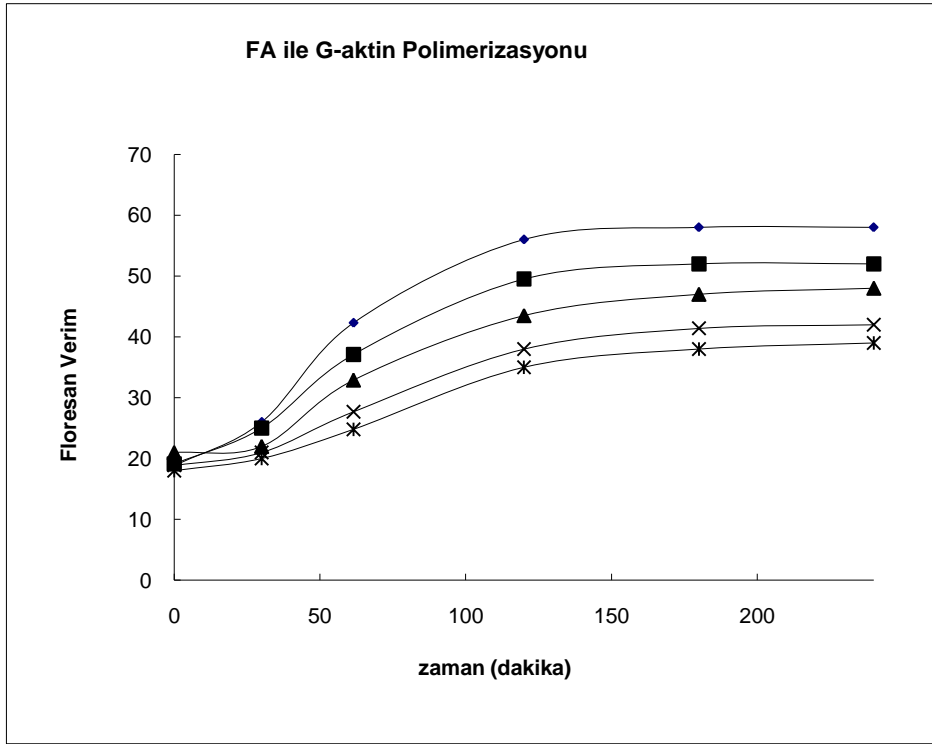
4.5. G-aktinin Floresan İşaretlenmesi

G-aktinin işaretlenmesinde substrat olarak *N-(iodoacetaminoethyl)-l-Naphthylamine -5-sulfonic acid* (1,5 AEDANS) (Sigma) kullanıldı. Tepkime, 60 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 20 mM Tris-Asetat pH: 7,0 içerisinde, 0.5 /1 mol/mol oranında (1,5) AEDANS ve G-aktin 4 °C'ta 50 saat karanlıkta inkübasyon sonrası, 1 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 20 mM Tris-asetat pH: 7,0 içeren diyaliz tamponu içerisinde 2 x 2 saat 4 °C'de karanlıkta diyalizlenerek bağlanmayan AEDANS uzaklaştırıldı.

Diyaliz sonrası uyarma dalgaboyu 353 nm, salınım dalga boyu ise 479 nm olarak ayarlanarak örneğin floresans spektrofotometre (Perkin Elmer LS 45) ölçümü gerçekleştirildi (Şekil 4.4). Çözeltideki aktin miktarının artışına bağlı olarak floresan veriminin üç kat arttığı buna bağlı olarak polimerleşmede artış olduğu saptandı. (Şekil 4.5)



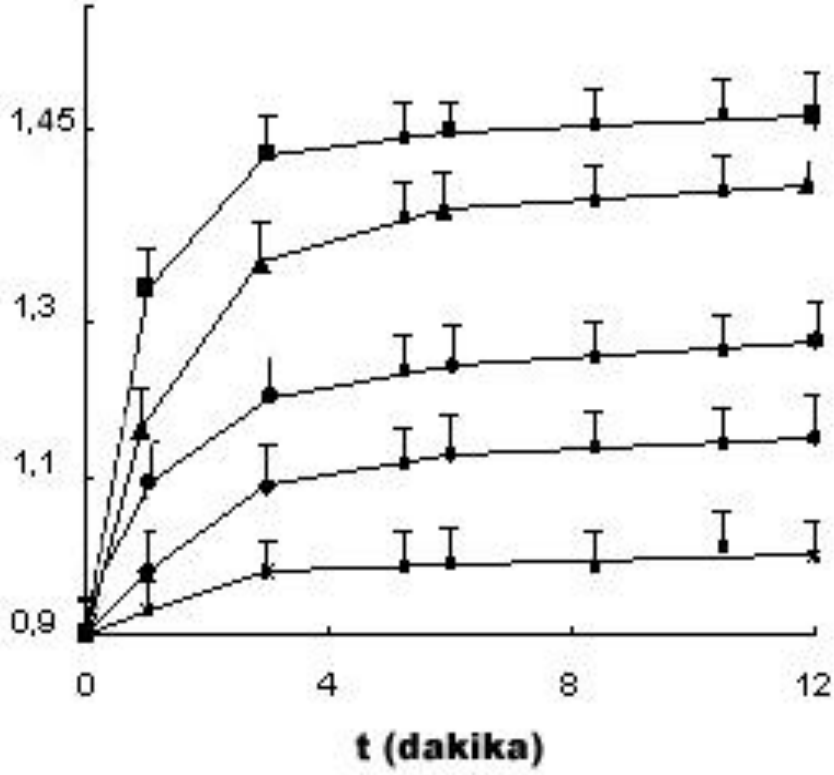
Şekil 4.4. G-aktin emisyon spektrumu
Eksitasyon 353 nm, emisyon 479 nm.



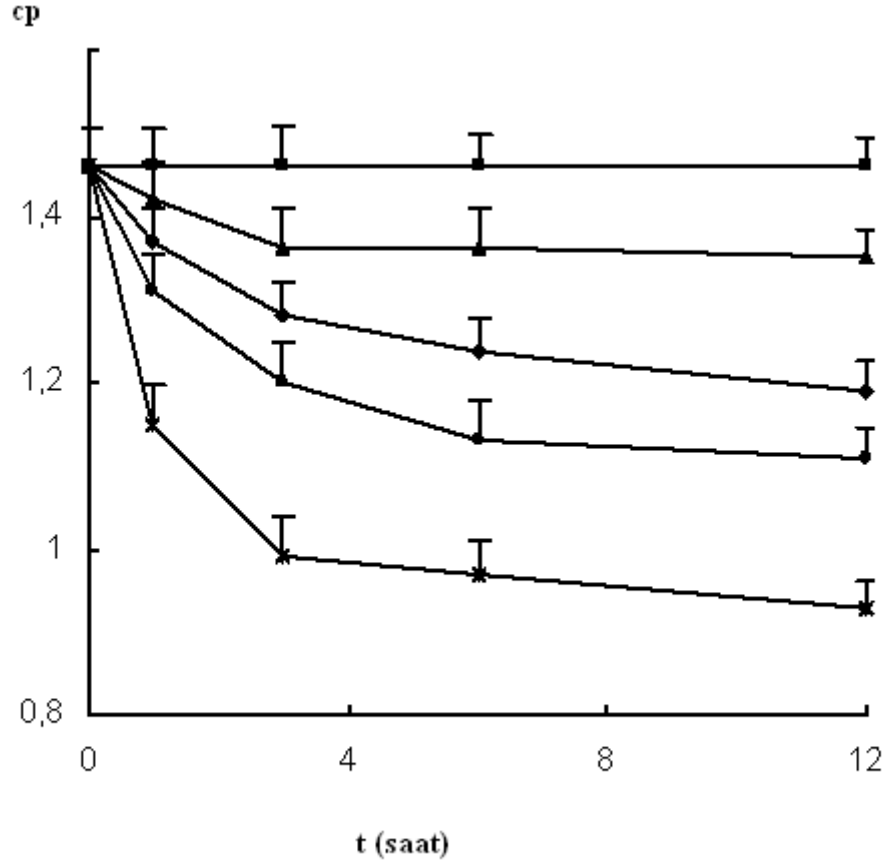
Şekil 4.5. Aktin polimerleşmesine FA'nın etkisi. (◆-◆), G-aktin (5 μM); (■-■), G-aktin (2 μM); (▲-▲), G-aktin (1 μM); (x-x), G-aktin (0.5 μM); (*-*), G-aktin (0.1 μM).

4.6 Aktin Polimerleşme ve Depolimerleşme Kinetiği

G-aktin polimerleşmesi ve depolimerleşmesi viskozite ölçümleri ile araştırıldı. G-aktin derişimi 5 mg/ml olarak belirlendi. G-aktin polimerleşme koşullarında viskozite (η) 12 saat süre sonunda 0.9' dan yaklaşık 1.45 santipozeye (cp) kadar yükseldi (Şekil 4.6). Aynı şekilde 12 μM F-aktinin zaman içerisindeki parçalanması viskozite ölçümleriyle saptandı viskozitede zaman içerisinde 1.3 ten 0.7 düzeyine kadar indi. (Şekil 4.7)



Şekil 4.6. G-aktin polimerleşmesinin viskometrik analizi. Inkübasyonlar polimerleşme ortamında belirli zamanlarda gerçekleştirildi. (▲-▲), G-aktin (250 µg); (■-■), G-aktin (200 µg); (●-●), G-aktin (150 µg); (□-□), G-aktin (100 µg); (**), G-aktin (50 µg). 0.9 cp G- aktin için ölçülen viskozite değerine karşılık gelmektedir.



Şekil 4.7. F-aktin depolimerleşmesinin viskozimetrik analizi F-aktin kalımlığının viskozite ölçümleri ile araştırıldı. Grafik viskozite (santipoze) cinsinden zamana karşı çizildi. Inkübasyonlar depolimerleşme tamponunda belirli zamanlarda gerçekleştirildi. (■-■), Polimerleşme ortamında F-aktin (20 pmol), (◆-◆), F-aktin (20 µg); (▲-▲), F- aktin (100 µg); (●-●), F- aktin (200 µg); (*-*), F- aktin (300 µg). 0,8 G- aktin için ölçülen viskozite değerine karşılık gelmektedir.

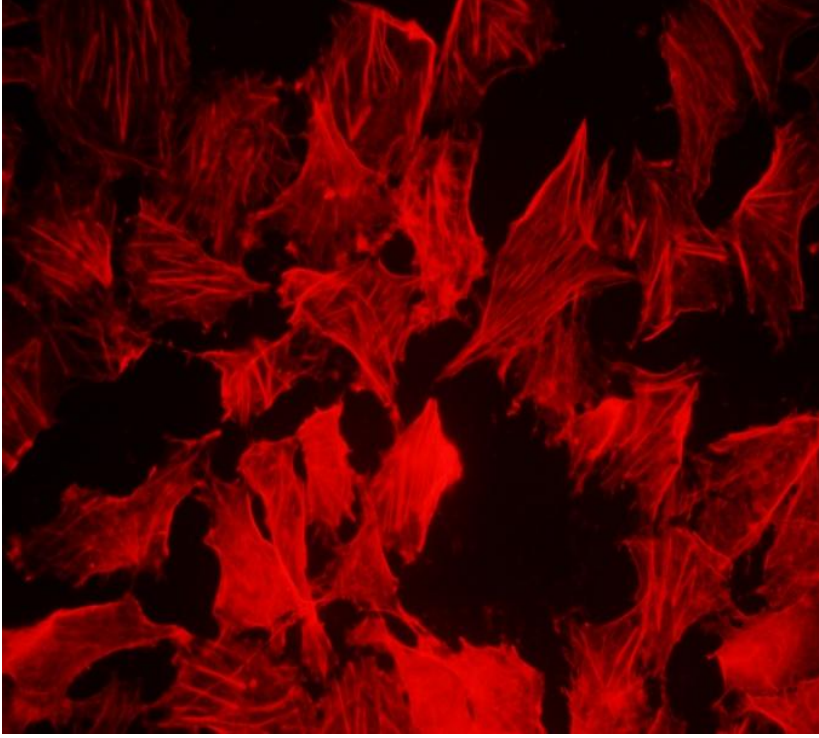
4.7. Hücrelerin Çoğaltılması:

Çalışmada kullanılan HUVEC ve 3T-3 hücreleri % 10 FBS ve antibiyotik (100µg/ml streptomisin ve 100 U/ml penisilin) içeren DMEM F-12 içinde 37 C° da ve % 5 CO2 'li kültür ortamında yetiştirildi.

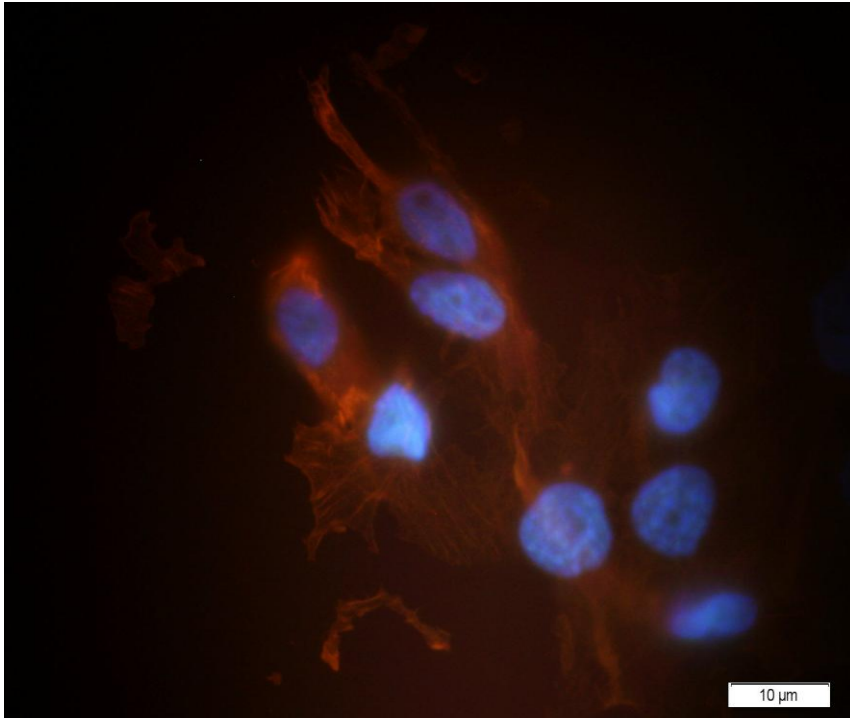
4.8. Hücre İçi Aktin İskeletinin Görüntülenmesi

Hücrelerde aktin iskeletini görüntülemek için HUVEC'ler (insan göbek kordonu endotel hücreleri) ile çalışılması uygun görüldü. 2 ml DMEM F-12 ortamında 6' lık kuyulardaki lameller üzerine 1 gün önceden ekilen hücrelerin yapışması sağlandı.

Hücreler F-aktine bağlanan "Alexa fluor 595 phalloidin" (Afp) ile işaretlendi. Hücre iskeletinin boyanmasına yönelik yapılan bu çalışmada ilk olarak PBS tamponu ile yıkama işlemi sonrası membran geçirgenliğini arttırmak amacı ile 30 dakika % 0,1 Triton-X-100 PBS ortamında bekledildi. Tespit çözeltisi (% 2 paraformaldehit – PBS) ile 1 saat bekletmeden sonra hücreler % 1 PBS-BSA içeren Afp ile oda sıcaklığında 1 saat süre ile boyandı. Boyama işleminin bitiminde floresan boyanın kalımlılığını artırmak amacıyla lamellerin üzerine % 1 lik gliserol-PBS çözeltisi uygulanarak lam üzerine yapıştırıldı. Olympus BX51 floresan mikroskobu ile yapılan incelemelerde uygun büyütme imersiyon ortamında ve uygun filtre kullanılarak aktin iskeleti görüntüledi. (Şekil 4.8). Ayrıca hücre çekirdeğide DAPI ile boyanarak görüntüledi (Şekil 4.9).



Şekil 4.8. HUVEC hücrelerinde aktin iskeletinin floresan mikroskopunda görüntülenmesi.



Şekil 4.9. HUVEC hücrelerinde aktin iskeletinin ve çekirdeğin (mavi) floresan mikroskopunda görüntülenmesi.

5.TARTIŞMA

Bu çalışmada tavşan çizgili kas dokusundan aktin saflaştırıldı. Miktar analizi spektrofotometrik ve ELISA yöntemiyle belirlendi. Kalitesi, elektroforez, kromatografi ve immün-blot teknikleriyle saptandı. ATP varlığında F-aktine dönüşüm (polimerleşme) floresan işaretleme, vizkozite ve ultrasantrüfüjleme gibi teknikler kullanılarak yapıldı. *Amanitia phalloides* mantarından elde edilen falloidin aktin filamentlerine bağlanmaktadır. Falloidin floresan konjugatları hücre içi aktin filamentlerinin görüntülenmesinde sıkça kullanılmaktadır (25-27). Benzer yöntemle HUVEC hücrelerinde F-aktin iskeleti floresan mikroskopta gösterildi.

Aktin ökaryotik hücrelerdeki en yaygın olarak bulunan proteinlerden biridir. Kas hücrelerinde total proteinin % 20 si normal hücrede % 5'i aktin proteindir (4). Aktin, evrimsel olarak, türler arasında en iyi korunmuş proteinlerden biridir Alg ve insan hücresindeki aktin proteinler aminoasit içeriği ve dizilimi açısından birbirlerinden % 5'ten daha az farklılık göstermektedir (1). Fizyolojik ortamda, magnezyum ve ATP varlığında, G-aktin çözünürlüğü olmayan F-aktin olarak adlandırılan, bir çift zincir filamenti oluşturacak biçimde polimerleşir. yine bazı proteinler F-aktine bağlanıp depolimerleşmeyi engelleyebilir. Aktin, hücrede aynı anda hem globüler aktin (G-aktin) olarak monomerik yapıda, hem de ipliksi aktin (F-aktin) olarak polimerik yapıda bulunabilen tek proteindir (6). Hücrede biyolojik etkinliğe sahip olan aktin ipliksi aktindir (1). Ökaryotik hücrelerinde mevcut aktin moleküllerinin yaklaşık % 50'si F-aktin şekilde bulunur. Polimerleşmemiş bu aktinler, ya serbest monomer halinde ya da bazı proteinlerle küçük kompleksler halindedir. F-aktin/G-aktin molekülleri arasında dinamik bir denge vardır. Bu dinamizm hücre yüzey hareketide dahil pek çok hücresel işlevin gerçekleşmesine yardım eder (12,13). Aktin polimerleşmenin önemli bir özelliği de filament uzamasının yönelim göstermesidir. Aktin filamentleri yapısal kutuplara sahiptir. Bu kutuplaşmanın önemli bir sonucu, filamentin iki ucunun farklı polimerleşme kinetiği göstermesidir. Yapılan çalışmalarda filamentlerin bir ucunun diğerine göre daha hızlı uzadığı görülmüş ve uzama hızının yüksek olduğu uca pozitif uç, düşük olduğu uca

da negatif uç adı verilmiştir (14). Aktin filamentlerinin negatif uçları kısmen inaktif olduğundan bu uçların serbest bırakıldığı düşünülmektedir (12, 14, 21, 22).

Organizmada önemli işlevleri olan aktin bu işlevleri yerine getirebilmek için hücre iskeleti ve bazı membranların oluşumunda büyük rol oynamaktadır. Aktin filamentlerinin üç boyutlu yapısı ve bu yapıya etkili koşul ve faktörler yaygın biçimde incelenmektedir. Hücre iskeleti ya da plazma membranı ile doğrudan ilişkisi olmayan bazı proteinlerin de aktin monomer ve filamentlerine bağlandığı bildirilmiştir (11,20). Bu etkileşimler aktin organizasyonunda düzenleyici rol almaktadır. Canlı organizmada aktin, yapısal bir protein olmanın dışında hücre hareketi, kas kasılması, hücre göçü gibi işleyişlerle hücrede mekanik süreçleri düzenler. Hücrede ayrıca aktin, hücre içi sinyal iletimi ve çeşitli maddelerin taşınması ile enzimatik etkinliğin düzenlenmesi gibi çok temel görevler üstlenir. Hücredeki işleyişe göre aktin molekülü sitoplazmada ki çeşitli proteinlerle etkileşime geçerek filament ağı, filament demetleri ya da filament iskeleti oluşturur. Hücre içi bazı proteinlerin trafiğinin düzenlenmesinde özellikle hücre iskeleti proteini (F-aktinin) rol aldığı bilinmektedir. Yapısal proteinlerden aktin filamentinin yoğun olarak bulunduğu kalp kasında da infeksiyonu izleyen süreçte, miyotoksik etkinin ortaya çıktığı belirtilmiştir (34).

Polipeptid uzaması sırasında ribozomal translokasyondan sorumlu olan eEF-2'nin aktin ile etkileşime girdiği gösterilmiştir (BEKTAŞ, 1994., 1998., 2004). Bazı toksinler ve droglar (sitokalsinler, *phalloidin* ve difteri toksini) aktin filamentlerine spesifik olarak bağlanırlar. Sitokalsin D aktin iskeletini kırar (10,12), falloidin ise sabitler. Difteri Toksini ise F-aktin iskeletini yıkmaktadır (29). Ayrıca Clostridium C2 ve Ayota toksini aktin monomerlerini ADP ribozilleyerek F-aktin oluşumunu engeller (28). Tüm bu etkileşimlerin analizi ve aktin dinamiğindeki değişimlerin gösterilebilmesi için ön deneyler bu çalışmayla yapılarak oturtulmuş bulunmaktadır.

KAYNAKLAR

- 1- Sheterline, P, Clayton J, Sparrow, J.C.: Actin-1998-272;
- 2-Nygard O., Nilson, L.: Kinetic Determination of Effects of ADP-ribosylation on the Interaction of Eukaryotic Elongation Factor 2 with Ribosomes, Eur. J. Biochem., 265: 6030-6034, (1990).
- 3- Eichinger, L., Schleicher, M.: Characterization of Actin and lipid Binding Domains in Seuerin, a Calcium Dependent F-actin Fragmenting Protein, Biochemistry, 31:4979-4987, (1992).
- 4- Hennessey, E. S., Drummond, D. R., Sparrow, J. C.: Molecular Genetics of Actin Function, Biochem., 282:657-671, (1993).
- 5- Özerman, B.: Aktin filamentlerinin difteri toksini alt yapıları ile etkileşimi - bu etkileşimde elongasyon faktörü 2'nin rolü, Doktora Tezi 2009
- 6- Janmey, P. A., shah JV.Tang JX,Stossel TP. Actin filaments, Biophysics TextbookOnline 2004.
Erişim 18.012007.<http://www.biophysics.org/education/janmey.pdf>
- 7- Mclaughlin, P. J., Gooch, J. T., Mannherz, H. G., Weeds, A. G.: Structure of Gelsolin Segment 1- Actin Complex and the Mechanism of Filament Severing, Nature, 364:685-692, (1993).
- 8- Egelman E. H., Actin allostery again? Nat Struct Biol. 2001 Sep;8(9):735-6
- 9- Geeves M. A., Fedorov R., Manstein D.J., Molecular mechanism of actomyosin-based motility. Cell Mol Life Sci. 2005 Jul;62(13):1462-77.
- 10- Thomas, M.: Devlin Textbook of Biochemistry with Clinical Correlation, Third Edition,New York: 959, (1992).
- 11- Eichinger, L., Schleicher, M.: Characterization of Actin and Lipid Binding Domains in Severin, a Calcium Dependent F-actin Fragmenting Protein, Biochem., 31:4979-4987, (1992).
- 12- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. D.: Molecular Biology of the Cell (Second Edition) Garland Publishing , Inc., New York & London, 629-641, (1989).

- 13- Cao, L., Fishkind, D., Wang, Y.: Localization and Dynamics of Nonfilamentous Actin in Cultured Cells, *The Journal of Cell Biology*, 123(1):173-181, (1993).
- 14- Rawn, J. D.: *Biochemistry (International Edition)*, Neil Patterson Publisher, Burlington of North Carolina, 1087-1108, (1989).
- 15- Sayers, Z., Koch, M. H. J., Bordas, J., Lindberg, U.: Time-resolved X-ray Scattering Study of Actin Polymerization form Profilactin, *Eur. Biophys.J.*, 13:99-108, (1985).
- 16- Dos Remedios CG, Chhabra D, Kekic M, Dedova IV, Tsubakihara M, Berry DA, Nosworthy NJ. Actin Binding Proteins: Regulation of Cytoskeletal Microfilaments *Physiol Rev.* 2003 Apr;83(2):433 -73.
- 17- Liana, H.: *Methods in Molecular Biology*, 34:261-268, (1994).
- 18- Sept D., McCammon, J. A., Thermodynamics and kinetics of actin filament nucleation. *Biophys J.* 2001 Aug;81(2):667 -74
- 19- Carrier, M. F., Actin: protein structure and filament dynamics. *J Biol Chem.* 1991 Jan 5;266(1):1-4.
- 20- Way, M.; Weeds, A.: Cytoskeletal Ups and Downs, *Nature*, 344:292-293, (1990).
- 21- Demma, M., Warren, V., Hock, R., Dharmawardhone, S. Condeelis, J.: Isolation of an Abundant 50.000- Dalton Actin Filament Bundling Protein from *Dictyostelium Amoebae*, *The Journal of Biological Chemistry*, 265(4):2286-2291, (1990).
- 22- Tyler, M., Anderson, M., Branton, D.: Structural Comparison of Several Actin-Binding Macromolecules, *J. of Biology*, 85:489-495, (1980)
- 23- Franki, N., Ding, G., Gao, Y., Hays, M.: Effect of Cytochalasin D on the Actin Cytochalasin of the Toad Bladder Epithelial Cell, *Am. Phys.*, 263 (5): C995-1000, (1992).

- 24- Hinshaw, B., Burger, M., Miller, T., Adams, A., Theodore, F., Omann, M.: ATP Depletion Induces an Increase in Endothelial Cells, *Am.J. Phys.*, 264(5):C1171-1179, (1993).
- 25- Kuhne, W., Besseman, T., Noll, T., Mush, A. Watanabe, H., Piper, M.: Disintegration of Cytoskeletal Structure of Actin Filaments in Energy-depleted Endothelial Cells, *Am. J. phys.*, 264 (5): H1559-1607, (1993).
- 26- Reuner, H., Schlegel, K., Just, I., Aktories, K., Katz, N.: Autoregulatory Control of Actin Synthesis in Cultured Rat Hepatocytes, *FEBS Letters*, 286 (1,2): 100-104, (1991).
- 27- Cooper, J.: Effects of Cytochalasin and Phalloidin on Actin, *The Journal of Biology*, 105: 1473-1478, (1987).
- 28- Bektaş, M.: Elongation Factor-2 (EF-2)-Aktin Etkileşimi, Doktora Tezi. İstanbul (1997).
- 29- Bektaş, M., Nurten, R., Sayers, Z., Bermek, E.: Interactions of Elongation Factor 2 with the Cytoskeleton and Interference with Dnase1 Binding to Actin, *Eur. J. Biochem.*, 15:256(1), 142-147, (1998)
- 30- Bektaş, M., Nurten, R., Gurel, Z., Sayers, Z., Bermek, E.: Interactions of eukaryotic elongation factor 2 with actin: a possible link between protein synthetic machinery and cytoskeleton. *FEBS Lett.* 1994 Dec 12;356(1): 89-93.
- 31- Bektaş, M., Guncer, B., Guven, C., Nurten, R., Bermek, E.: Actin--an inhibitor of eukaryotic elongation factor activities. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 May 14;317(4):1061-6.
- 32- Bektaş, M., Akçakaya, H., Aroymak, A., Nurten, R., Bermek, E.: Effect of oxidative stress on in vivo ADP-ribosylation of eukaryotic elongation factor 2. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005 Jan; 37(1): 91 -9.
- 33- Varol, B.: Difteri toksini alt birimlerinin eldesi ve farklı hücre soyları üzerine etkisi, Doktora Tezi 2009

34- Collier R.J.: Effect of diphtheria toxin on protein synthesis: Inactivation of one of the transfer factors , Journal of Molecular Biology, Volume 25, Issue 1, 14 April 1967, Pages 83-98

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Figen	Soyadı	Sekin
Doğ.Yeri	Erzincan	Doğ.Tar.	18/02/77
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	18874911728
Email	fsekin@gyte.edu.tr	Tel	0505 7737195

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Lisans	Atatürk Üniversitesi Fen Edebiyat Fak. Fizik Bölümü	2000
Lise	Erzincan Anadolu Lisesi	1996

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Müdür Yardımcısı	Ahi Evran Ticaret Meslek Lisesi	2006-....
2.	Fzik Öğretmeni	İsov Yapı Meslek Lisesi	2004-2006
3.	Sınıf Öğretmeni	Ata İ.Ö.O	2002-2004

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜD S Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	İyi	Orta	İyi	63	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı	73,873	69,37	63,37
(Diğer) Puanı			

