

Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte** Adınızı soyadınızı giriniz
sırt yazısı bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır
olacak

Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte**
sırt yazısı bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır
olacak

Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
Tez, Yüksek Lisans'sa, **YÜKSEK LİSANS** (sol yandaki gibi) olacak .

TEZİ;

Doktora ise **DOKTORA TEZİ** ifadesi

Tez, Yüksek Lisans'sa, **YÜKSEK LİSANS**

Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız **TEZİ;**

Doktora ise **DOKTORA TEZİ** ifadesi

←

Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**DİFTERİ TOKSİNİNİN KLONLANMASI VE TOKSİNİN
ENDOZOMAL SÜREÇTE AKTİNLE İLİŞKİSİ**

EBRU HACIOSMANOĞLU

**DANIŞMAN
DOÇ. DR. MUHAMMET BEKTAŞ**

**BİYOFİZİK ANABİLİMDALI
BİYOFİZİK PROGRAMI**

İSTANBUL-2010

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Anabilim Dalı
Biyofizik Programında Ebru Hacıosmanoğlu tarafından hazırlanan Difteri Toksininin
Klonlanması ve Toksinin Endozomal Süreçte Aktinle İlişkisi başlıklı Yüksek Lisans
tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

03 / 12 / 2010

Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı) _____ İmzası _____

1.Prof. Dr. Rüstem Nurten, İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı

2.Prof. Dr. Bora Barutçu, İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı

3.Doç. Dr. Işıl Albeniz, İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı

4.Doç. Dr. Muhammet Bektaş, İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı

5.Doç. Dr. Derviş Özçelik, İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Ebru Hacıosmanoğlu



İTHAF

*Annem, babam ve kardeşim başta olmak üzere anneannem ve bana destek olan
tüm dostlarıma ithaf ediyorum.*

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının yürütülmesinde teorik ve deneysel anlamda bana destek olan tez danışmanım sayın Doç. Dr. Muhammet Bektaş'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek Lisans eğitimim boyunca beni destekleyen başta İstanbul Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Rüstem Nurten olmak üzere tüm öğretim üye ve yardımcılarına;

Ayrıca deneyler sırasındaki yardımlarından dolayı Doç. Dr. Duran Üstek ve Hülya Azaklı 'ya teşekkürü bir borç bilirim.

Bu çalışma TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir. Proje No: 107S032

İÇİNDEKİLER

BEYAN	ii
İTHAF	iv
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar LİSTESİ	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ	x
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	xi
ÖZET	xiii
ABSTRACT	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Difteri Toksini	2
2.2. Aktin Filamentleri (Mikrofilamentler)	4
2.2.1. Aktinin Yapısal Özellikleri	4
2.2.2. Aktin Filamentinin Oluşumu	5
2.2.3. Aktin Bağlayan Proteinler	7
2.2.4. Özgün Drogların Aktin Polimerleşmesine Etkileri	8
2.3. Endozomlar ve Endozomal Trafik	8
2.4. Patojen ve Toksinlerin, Hücre İçi Trafiği	9
2.5. Rekobinant DNA Teknolojisi ve Klonlama	10
2.5.1. Rekombinant DNA Üretimi	10
2.5.2. DNA Saflaştırılması	10
2.5.3. DNA'nın Kesilmesi ve Restriksiyon Enzimleri	11
2.5.4. DNA'nın Birleştirilmesi ve DNA Ligazlar	12
2.5.5. Klonlama Vektörleri	12
2.5.5.1. Plazmidler ve Gen Klonlama	13
3. GEREÇ VE YÖNTEM	14
3.1. GEREÇLER	14
3.1.1. Kimyasal maddeler	14
3.1.2. Kitler	15

3.1.3. Antikorlar.....	15
3.1.4. Kromatografik Maddeler	16
3.1.5. Radyoaktif Malzemeler	16
3.1.6. Cihazlar.....	16
3.1.7. Çalışmada Kullanılan Eriyikler.....	17
3.1.7.1. PAGE (Poliakrilamid Gel Elektroforezi) İçin Gerekli Eriyikler	17
3.1.7.2. Bağışık (Western) Emdirim İçin Gerekli Eriyikler	18
3.1.7.3. Klonlamada Kullanılan Eriyikler	19
3.1.7.4. Floresan Boyamada Kullanılan Eriyikler	20
3.1.7.5. Hücre Praçalama (Lizis) Eriyiği.....	21
3.1.7.6. Endozom Homojenleştirme Eriyiği.....	21
3.1.7.7. TBS (Tuzlu Yıkama Eriyiği).....	22
3.2. YÖNTEMLER.....	22
3.2.1. Klonlama Çalışmaları.....	22
3.2.1.1. PZR ile (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Fragment B (FB)'yi Kodlayan Genin Çoğaltılması	22
3.2.1.2. PZR Saflaştırma	23
3.2.1.3. pGEM-T Easy Vektörüne Klonlama	23
3.2.1.4. Ligasyon	24
3.2.1.5. Aktarım (Transformasyon)	24
3.2.1.6. Mini-Prep Protokolüyle Plasmid DNA Eldesi	25
3.2.1.7. pGEX4 -T-1 ve pGEM-T-easy Vektörlerine Enzim Kesimi Uygulanması	25
3.2.1.8. Jelden DNA Saflaştırma	27
3.2.1.9. pGEX4 -T-1 Vektörüne Klonlama.....	27
3.2.1.10. Protein Ekspresyonu	29
3.2.1.11. Rekombinant Proteinlerin Saflaştırılması.....	30
3.2.2. Hücre Kültürü Çalışmaları.....	31
3.2.2.1. Hücre Çoğaltma.....	31
3.2.2.2. Hücrelerin Dondurulması	31
3.2.2.3. Hücrelerde Canlılık Tayini	32
3.2.2.4. Hücrelere Toksin Uygulanması.....	32
3.2.2.5. Poliakrilamid Gel Elektroforezi (SDS-PAGE)	32

3.2.2.6. Bağışık Emdirim Yöntemi	33
3.2.2.7. İmmünfloresan Çalışmalar	33
3.2.2.8. Hücreden endozom kesimlenmesi	34
3.2.2.9. ADP Ribozillenme	35
3.2.2.10. Protein Sentezi (poli-Phe Sentezi)	35
3.2.2.11. Toksini Floreseinotiyosiyanat (FITC) ile etiketleme	36
4. BULGULAR	37
4.1. FB'nin Klonlanması	37
4.2. HUVEC Hücre Soyunda Difteri Toksininin Etkisi	39
4.3. Aktin İskeleti, Erken Endozomlar ve Difteri Toksininin Floresan Görüntülenmesi	40
4.4. Sitokalesin D ve Amonyumklorür Etkisinde FA Dağılımı	41
4.5. Endozomlardan FA Salınımına CD ve Amonyumklorür Etkisi	42
4.6. Hücre İçi FA Etkinliği	42
4.7. Endozomlarda FA Etkinliği (<i>in vitro</i>)	46
4.8. Endozomlarda FA Salınımı (<i>in vitro</i>)	48
5. TARTIŞMA	49
KAYNAKLAR	52
ÖZGEÇMİŞ	59

TABLolar LİSTESİ

Tablo 2-1: Rekombinant DNA teknolojisinde yaygın olarak kullanılan bazı restriksiyon enzimleri.....	11
Tablo 3-1: DT fragman B için hazırlanan primerler	22
Tablo 3-2: Ligasyon koşulları.	24
Tablo 3-3: Enzim kesimi için gerekli koşullar.	26
Tablo 3-4: Kullanılan enzimler için ideal koşulları sağlayan çözelti için tablo..	26
Tablo 3-5: Ligasyon koşulları.	28
Tablo 3-6: Kullanılan IPTG miktarları.	30
Tablo 3-7: Floresan boyaların uyarılma - salım değerleri.....	36
Tablo 4-1: Erken endozomlardan in vitro FA salınımı.....	48

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Toksinin hücre içine girişi	3
Şekil 2-2: Difteri toksininin 3 boyutlu yapısı	3
Şekil 2-3: Aktin filamentleri	4
Şekil 2-4: Aktin molekülü.....	5
Şekil 2-5: Aktin filamentinde ayak değirme- ("treadmilling")	6
Şekil 2-6: Aktin bağlayan proteinlere örnekler	7
Şekil 2-7: Restriksiyon enzimlerinin oluşturduğu küt ve yapışkan uç	12
Şekil 3-1: Uluslararası A-T klonlama yöntemi	23
Şekil 3-2: p-GEX-4T-1 vektörünün enzim kesim ve promotör bölgeleri	29
Şekil 3-3: Endozom kesimlenmesinin şematik görüntüsü.	35
Şekil 4-1: GST-FB kimerik protein.	37
Şekil 4-2: GST-FB kimerik proteininin affinite kromatografisi ile saflaştırılması.	38
Şekil 4-3: FB'nin elektroforetik analizi.	39
Şekil 4-4: Difteri toksininin hücre içi kalımlılığı.	40
Şekil 4-5: Aktin, endozom ve FA'nın hücre içi görüntüsü.	41
Şekil 4-6: Hücrelerde DT (FA) dağılımı ve morfolojisi.	43
Şekil 4-7: Erken endozomların hücre içi morfolojileri ve dağılımları.....	44
Şekil 4-8: CD etkisindeki hücelere DT uygulaması sonrası sitozolik FA etkinliği.....	45
Şekil 4-9: Sitosolik (S5) kesimde FA etkinliği.	46
Şekil 4-10: Toksin ve CD uygulanmış hücelerden yoğunluk gradiyenti denge santrifüjü sonrası endozom kesimleme ve FA'nın ADP-riboziltransferaz etkinliği.....	47

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ADP	Adenozin difosfat
ATP	Adenozin trifosfat
BCIP	Bromo kloro indol fosfat
bd	Bidistile su
BSA	Sığır serum albumini
CD	Sitokalesin D
Dak.	dakika
DAPI 4'-6-Diamidino-2-fenil indol	
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DT	Difteri toksini
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asitik
EEA1	Erken endozom antikoru
eEF2	Ökaryotik elongasyon faktör 2
eEF1	Ökaryotik elongasyon faktörü 1
ELISA	enzim ilintili bağışık test
FA	Fragment A
F-aktin	İpliksi aktin (filamentöz aktin)
FB	Fragment B
FBS	Fetal sığır serumu
FITC	Floreseinizotiyosiyanat
g	Yerçekimi ivmesi / gram
G-aktin	küresel aktin
GST	Glutasyon-S-Transferaz
HUVEC	İnsan göbek kordonu damar endotel hücresi

kDa Kilo Dalton

LB Luria Bertani

MET Merkapto etanol

Mr Moleküler ağırlık

NAD Nikotinamid adenin dinükleotit

NBT Nitro blue tetrazolium

ng Nanogram

PMSF Fenilmetilsulfonil florit

PZR Polimeraz zincir reaksiyonu

SDS-PAGE Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamit jel elektroforezi

TAE Tris- asetat etilendiamintetraasetik asit

TBST Tris tuz çözeltisi

TCA Triklorasetik asit

TEM Geçirimli elektron mikroskobu

TEMED Tetrametilendiamin

TRICH Tetra metil rodamin izotiyosiyanat

Tris Tris (hidroksimetil) aminometan

tRNA Transfer ribonükleik asit

ÖZET

Hacıosmanoğlu, E. Difteri Toksininin Klonlanması ve Toksinin Endozomal Süreçte Aktinle İlişkisi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyofizik Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul. 2010.

Difteri toksini gerek yapısı gerekse etkisi açısından iyi tanımlanmış bakteri toksinlerinden biridir. Sınırlı proteolitik sindirim sonrası toksin iki parçaya ayrılmaktadır. Toksin, N-terminal ucuna karşılık gelen, enzimatik işlevi olan (ADP-riboziltransferaz) A fragmenti (FA) ve holotoksinin hücreye bağlanmasını sağlayan B fragmentinden (FB) oluşur. Toksinin enzimatik parçası (FA), endositik süreçte sitoplazmaya ulaşmaktadır. Hücre içine giren FA protein sentez inhibisyonuna, DNA kırılmasına, aktin iskeletinin yıkımına ve apoptoza neden olmaktadır. Aktin iskeleti, endositik vesiküllerin oluşmasına ve bu vesiküllerin hücre içinde erken endozomlara yönelmesine dinamik destek verir.

Bu bilgilerin ışığında, toksinin FB parçasının ileriye yönelik çalışmalarda kullanılmak üzere antikorununun eldesi için rekombinant teknikler kullanılarak FB'nin klonlanması gerçekleştirildi. *Corynebacterium diphtheria* suşundan DNA izolasyonu yapılarak FB'nin bulunduğu bölge PZR yöntemiyle çoğaltıldı. Plasmide aktarılacak *E.coli* suşunda proteinin ekspresyonu sağlandı ve GST-Trap yöntemi ile kimerik protein saflaştırıldı. Kimerik FB, (GST-FB) trombin varlığında kırılarak gel filtrasyon kromatografisi (Sephacryl S-100) ile ayrıştırıldı.

Hücre içersindeki FA'nın hücre içi kalımlılığı elektroforez ve bağışık emdirim yöntemiyle farklı zaman dilimlerinde gösterildi. Hücredeki FA'nın enzimatik (ADP-riboziltransferaz, ADP-ribazilhidrolaz, polyPhe) etkinliğinin sitokalesin D etkisinde azaldığı görüldü. Toksine duyarlı HUVEC hücrelerinde toksin sonrası endozomlarda şişme görüldü. Ayrıca bu hücrelere CD ve amonyumklorür ile muamele edilerek hücre içi endozom yerleşimi ve boyutlarındaki değişiklikler karşılaştırıldı. Toksin ve Sitokalesin D varlığında endozomlar saflaştırılarak içersindeki FA etkinliği saptandı. Saflaştırılan endozomlar üzerine F-aktin ve ökaryotik Elongasyon faktör 2 ilave edildiğinde FA'nın endozomlardan dışarı salındığı gösterildi.

Anahtar Kelimeler: Difteri toksini, endozom, aktin, ökaryotik elongasyon faktör 2, ADP-ribozilasyon.

Bu çalışma TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir. Proje No: 107S032

ABSTRACT

Hacıosmanoğlu, E. Cloning of Diphtheria Toxin and Relationship Between Toxin and Actin in Endosomal Process. Istanbul University, Institute of Health Science, Biophysics. Master of Science Thesis. Istanbul. 2010.

Diphtheria toxin is one of the well-characterised bacterial toxins, both in terms of its structure and mode of action. After limited proteolytic digestion, toxin is separated into two fragments. Toxin comprises of Fragment A (FA) has enzymatic activity (ADP-ribosyltransferase) at the end of the N-terminal end and Fragment B that is providing connection between the cell and holotoxin. FA in the cell leads to protein synthesis inhibition, DNA fragmentation, actin degradation and apoptosis. Actin supports endosome vesicles to early endosomes in the cell.

FB was cloned with the recombinant techniques in order to obtain the FB antibody for the future studies. DNA isolation from the *Corynebacterium diphtheria* the FB site was amplified with PCR and integrated to plasmid in *E. coli*. Then protein expression was performed and chimeric protein was purified by GST-Trap. In the presence of thrombin, chimeric FB (GST-FB) was digested and fractionated with gel filtration chromatography (Sephacryl S-100).

FA in the cell was established both with electrophoresis and bağışık blotting in various time periods. It was determined that FA enzymatic activity ADP-ribosyl transferase, ADP-ribosyl hydrolyse, poy-Phe) in the cell was decreased in the presence of Cytochalasin D (CD). In toxin sensible HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) following DT incubation endosome enlargement was observed. Besides HUVECs were incubated with CD and ammonium chloride thus, the endosome localization as well as the changes in the endosome size was compared. In the presence of diphtheria toxin and CD endosomes were purified and the FA activity was identified. FA release from the endosomes was observed by adding F-actin (filamentous actin) and eukaryotic elongation factor 2.

Key Words: Diphtheria toxin, endosome, actin, eEF2, ADP-ribosylation.

The present work was supported by TÜBİTAK Project No: 107S032

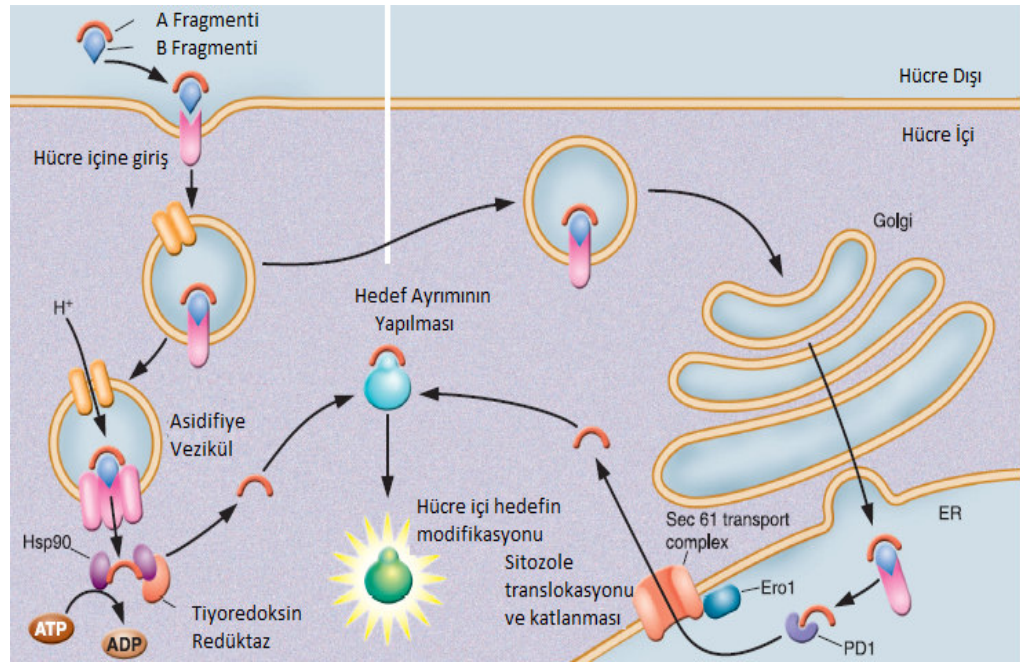
1. GİRİŞ VE AMAÇ

Difteri toksini (DT), NAD'yi ADP-riboz ve nikotinamide ayrıştırır. Sonra ADP-riboz'u ökaryotik Elongasyon faktör 2 (eEF2) üzerine transfer ederek protein sentezinin inhibisyonuna neden olur (1). DT'nin, amino ucundaki 21 kDa'luk A fragmenti (FA) 149. glutamik asit üzerinden ADP-riboz'un aktarımını gerçekleştirir. DT'nin B fragmenti (FB) holotoksinin hücreye yüzeyine bağlanmasını sağlar. Endositoz ile hücre içine alınan FA ise ADP-riboziltransferaz etkinliğiyle protein sentezini inhibe eder. Diğer yandan, K562 ve Vero gibi bazı hücre soylarında, difteri toksini protein sentezi etkin biçimde durdurmasına karşın, sitotoksik (hücreleri öldürücü) bir etki göstermemektedir. ADP-riboziltransferaz etkinliğinden yoksun mutant toksin (CRM 197) protein sentezinde inhibisyon yapmazken sitotoksik etki göstermektedir. Toksinin aktin ile etkileştiği, aktin iskeletini yıktığı ve DNA kırılmasına yol açtığı, dolaylı yoldan apoptotik süreçte rol aldığı bilinmektedir. Ayrıca aktinin protein sentez öğelerinden ribozomlar, mRNA, ökaryotik elongasyon faktör 1 (eEF1) ve eEF2 ile etkileştiği ve eEF2'nin aktivitesini düzenlediği bilinmektedir. Aktinin bir motor protein olarak toksin ve protein sentez öğeleri ile etkileşimi dikkate alındığında endositik süreçteki kargo rolü önem kazanmaktadır. Bu bulgular difteri toksininin sitotoksik etkisinin yalnızca protein sentezinin durmasıyla açıklanamayacağını, protein sentezinin durmasının sitotoksik süreçteki önemli ancak tek aşama olmadığını düşündürmektedir (2). Bu bilgilere ek olarak, FB ile yapılan çalışmalar sınırlı olduğundan, bu çalışmada toksinin hücre yüzeyine bağlanmada etkin rolü olan FB'nin ileriye yönelik çalışmalarda, hücre reseptörünü tanıma ve hücreye bağlanmasını daha iyi anlayabilme ve FA'nın hücre içerisine girmesindeki ve optimizasyonundaki etkisini inceleyebilmek amacı ile ilk olarak FB'nin klonlaması gerektiği öngörülmüştür. Ayrıca, aktin difteri toksini etkileşiminin fizyolojik anlamı sorgulanarak, toksinin hücre içi trafiğinde F-aktinin kargo görevi ve endozom-toksin-aktin arasındaki ilişki immünfloresan yöntemlerle gösterilmesi ve burada Sitokalsin D yardımıyla aktin iskeleti çökertilen HUVEC hücrelerinde toksinin hücreiçi trafiği, endositik sürecin erken evrelerinde ortaya konularak, enzimatik etkinliğinin (ADP-ribozil transferaz, protein sentez etkinliği) incelenmesi düşünülmüştür.

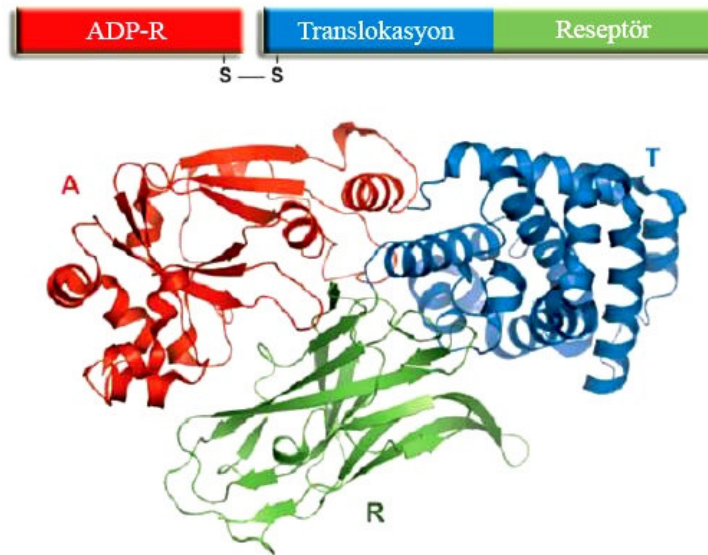
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Difteri Toksini

Difteri Toksini ilk olarak *Corynebacterium diphtheria* kültüründe keşfedilmiştir ve doğal olarak, corynebakteriofajlarla yakından akraba olan, toksin yapısını kodlayıp *tox* genini içeren lizojenik suşundan elde edilir (3,4). Toksin, hem yapı hem de fonksiyonel açıdan iyi tanımlanmış bakteri toksinlerinden biridir (1). Erken biyokimyasal çalışmalarda gözlenmiştir ki, toksin serin proteazlara karşı (örneğin; tripsin) aşırı hassasiyet gösterir ve kendisini oluşturan kovalent disülfid bağlarıyla birbirine bağlı A ve B olmak üzere iki fragmente ayrılır (5). Toksik olmayan serolojik mutantlardaki çalışmalarda, fragment B (FB)'nin C terminal uçta 37.1 kDa ağırlığında bir peptit olmasına rağmen, toksinin hücre yüzeyine bağlanmasını sağladığı ve fragment A (FA)'nın sitozole ulaşmasını kolaylaştırdığı, FA'nın ise 21.1 kDa ağırlığında olup enzimatik aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir (6-9). FA, NAD'in ADP-riboz kısmının ökaryotik elongasyon faktör 2 (eEF2)'ye transferini katalizleyerek hücre içi protein sentezinin durmasına neden olur (10). Bu etkinin yanı sıra FA'nın aktin ile etkileştiği polimer yıkımına neden olduğu gösterilmiştir (11). Ancak, protein sentezinin inhibisyonu ile toksine bağlı hücre ölümü arasındaki ilişki tam açıklığa kavuşmuş değildir. Çalışmalar difteri toksininin protein sentezinin inhibisyonunun yanı sıra hücre iskeletinin yıkımına nükleozomlar arası DNA kırılmasına yol açtığını da göstermektedir (12). FB enzimatik olarak, inaktif görünse de, toksinin hücre yüzeyine bağlanmasından ve endositozla içeri alınmasından sorumludur (Şekil 2-1) (10). Toksinin 2.5°A'luk çözünürlükteki X-ışını kristalografik analizleri sonucunda 3 yapısal bileşenden oluştuğu görülür (Şekil 2-2). Bunlar; amino terminal katalitik (C) altbirim, FA'yı oluşturur, transmembran (T) ve karboksi-terminal reseptör bağlama (R) altbirimleri de FB'yi oluşturur (13).



Şekil 2-1: Toksinin hücre içine girişi (14).



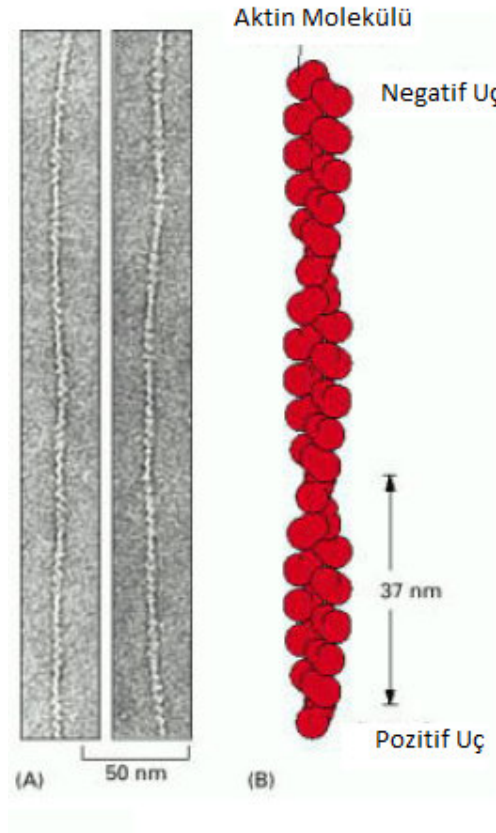
Şekil 2-2: Difteri toksininin 3 boyutlu yapısı (15).

(A) Katalitik bölge, (R) reseptör bağlanma bölgesi, (T) transmembran bölge.

2.2. Aktin Filamentleri (Mikrofilamentler)

2.2.1. Aktinin Yapısal Özellikleri

Ökaryotik hücre sitoplazması birbirinden tamamen farklı ama aynı zamanda birbiriyle bütünleşmiş üç ayrı fibrin polimerini (F-aktin; mikrofilament olarak da bilinir, mikrotübül ve ara filamentler) de kapsayan ve hücre iskeleti adı verilen karmaşık bir ipliksi protein ağ örgüsü içerir (16). F-aktin hücre iskeletinin ana bileşenlerinden biridir ve birçok hücrel işlemler için globüler protein (G-aktin) olan aktinin F-aktine polimerleşmesinden oluşur (Şekil 2-3). Ökaryotlarda toplam hücre proteinin %5-10'unu, kas hücrelerinde ise %20'sini oluşturarak hücre iskeleti ve sinyal yollarında hem yapısal hem de düzenleyici bir grup proteinle etkileşmekte ve bundan dolayı kavşak rolü üstlenmektedir (17).

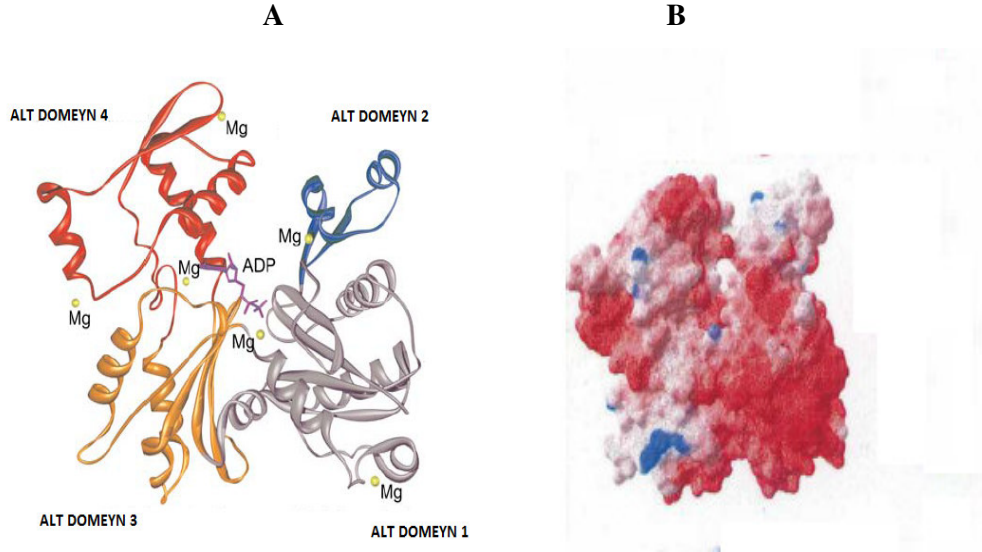


Şekil 2-3: Aktin filamentleri (18).

(A) TEM'de (Transmisyon Elektron Mikroskobu) aktin filamentlerinin görüntüsü.

(B) Aktin molekülünün aktin filamenti içinde heliks şeklindeki düzenlenmesi.

Aktin, hücrede hem monomer yapıda globüler aktin (G-aktin) hem de polimer yapısında (F-Aktin) bulunabilir (19,20). G-aktin molekülü 375 aminoasit uzunluğunda ve 42.5 kDa ağırlığında bir polipeptit zincirinden oluşur. Aktinin birincil yapısı dört ayrı alt birimden oluşmaktadır (Şekil 2-4) (21). Birinci alt brim G-aktinin 1-32, 70-144, 338-375, ikincisi 33-69, üçüncüsü, 145-180, 270-333 ve dördüncüsü 181-269 amino asitleri kapsayan dizileri içermektedir (22). G-aktin molekülleri, ATP, Ca^{+2} ve Mg^{+2} bağlayabilir (23,24). 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, filament yapıda, 6.7 nm kalınlığında, 35.5 nm boyundadır (25).



Şekil 2-4: Aktin molekülü.

(A) G-aktin molekülünün ADP ve Mg^{+2} iyonları ile beraber gösterilmiş atomik modeli (26). (B) Aktinin elektrostatik potansiyel yüzeylerinin görüntüsü (27).

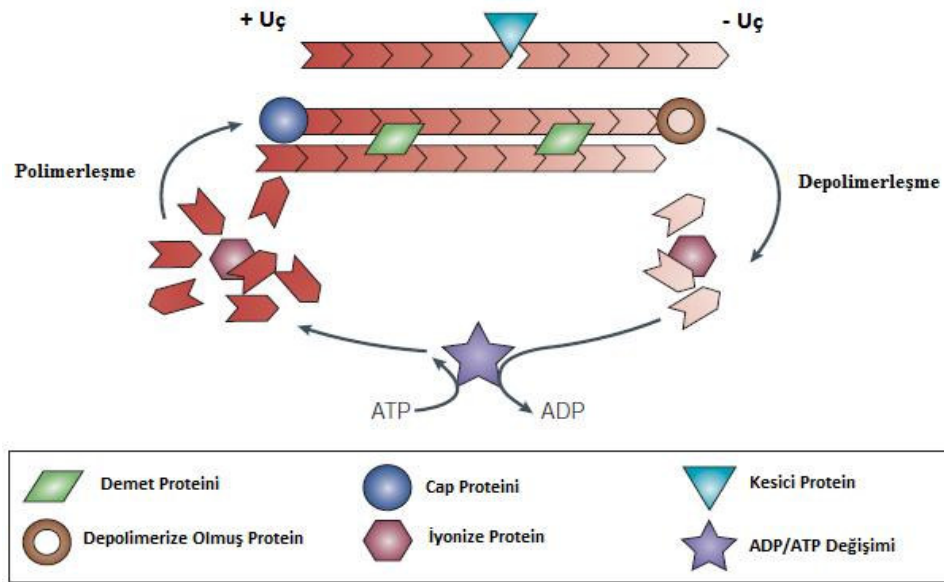
2.2.2. Aktin Filamentinin Oluşumu

Aktin polimerleşmesi hücre hareketinin gerçekleşmesinde önemli bir rol oynar. Aktinin çözülmesi /yeniden birleşmesinin kontrolü ve filament geri dönüşümün hücre hareketinin iki önemli özelliğini oluşturur (28). G-aktin monomerleri miktarı F-aktin yapısının oluşumuyla ilişkilendirilir. Filamentler oluşurken, serbest monomerlerin derişimi kritik miktara (Birim zamanda filamentte eklenen ve filamentten ayrılan monomer miktarın eşit olması) gelinceye kadar düşer. Bu miktarın altına düştüğünde,

artık polimerleşme gerçekleşmez, depolimerleşme başlar. Aktin monomerlerinin bir araya gelmesi, pozitif (+) uçta ("Barbed end", ok şekilli uç), negatif (-) ("Pointed end", sivri uç) uca göre daha hızlı gerçekleşir. Bu isim miyozin başlarının aktine bağlandığında ok şeklini almasından kaynaklanır (29). G-aktin monomerinin bağlanma bölgesinde ATP bulunur ve polimerleşme sırasında bu ATP hidrolize uğrar. Ancak ATP-G-aktinin filamentte bağlanması ile hidrolizi arasında bir gecikme meydana geldiği görülmüştür. Yeni eklenen aktin monomerinde ATP'nin hidrolizi iki aşamada gerçekleşmektedir.



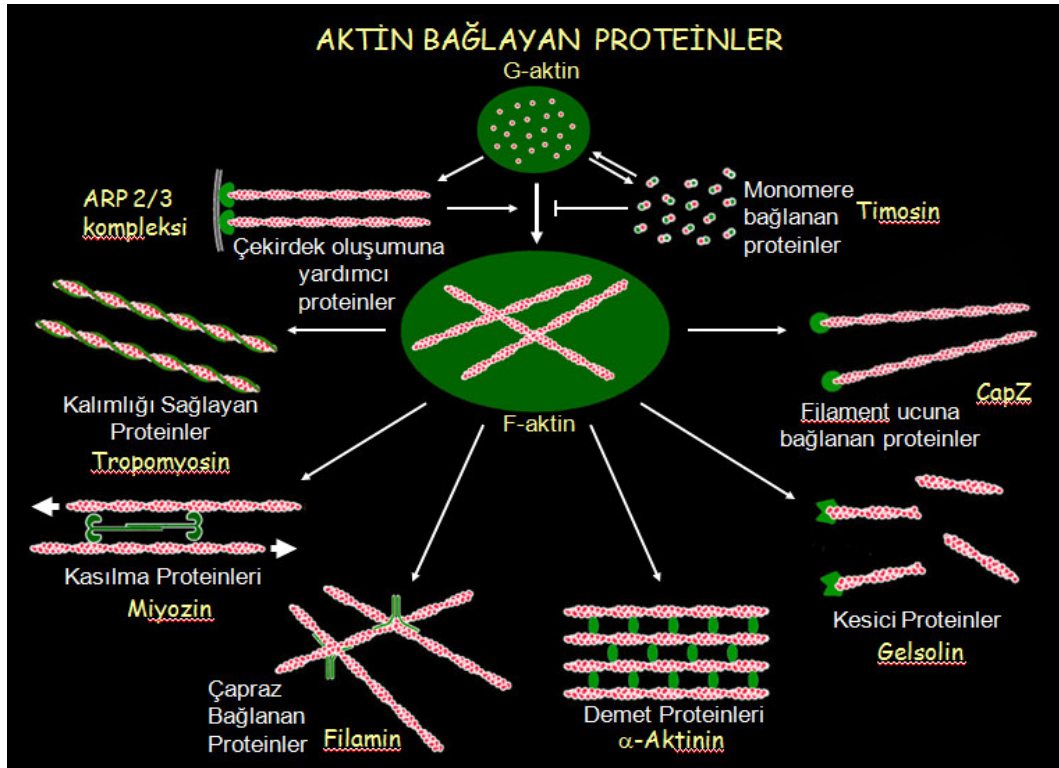
ATP'nin hidroliz hızının Pi ayrışım hızından 10 kat daha fazla olduğu görülmüştür. Bu şekilde hidroliz daha çok büyüyen filamentin pozitif ucunda görülür (30). F-aktin ve G-aktin miktarı dengede olduğunda, zincirde uzalma ve kısalma olmaz. Bu yüzden, negatif uçtaki artış kadar pozitif uca azalma vardır (29). Polimerleşmeden sonra, sabit faz gelir. Bu fazda net polimer uzunluğu korunur. Serbest aktin monomeri derişimi, aktin filamentlerinin artı ve eksi uçlarının polimerleşmesi için gerekli kritik derişimde olmalıdır. Aktin molekülleri filamentin bir ucundan diğerine aktarılır. Bu süreç ayak değirmesi "Treadmilling" olarak tanımlanır (18) (Şekil 2-5).



Şekil 2-5: Aktin filamentinde ayak değirme- ("treadmilling") (29).

2.2.3. Aktin Bağlayan Proteinler

Aktine bağlanan birçok protein onun durumunu ve dinamiğini etkiler. Aktin bağlayan proteinler (ABPs) bunlara örnektir (29). En çok bilinen ABP'lerin sınıflandırılması yapılmıştır. Monomere bağlanan proteinler, G-aktini tutuklayarak polimerleşmesini engeller (DNaz I, timosin). Filament ucuna bağlanan proteinler, filament uçlarını kapatarak negatif uçtan monomer değişimini engeller (CapZ). F-aktine bağlanarak filamenti iki parça ayıran proteinler, filamenti keserek, boyunun kısalmasını sağlarlar (gelsolin). Çapraz bağlanan proteinler, demetlerinin oluşumunu, dallanmalarını ve hücre içinde üç boyutlu ağısı yapının oluşumunu sağlarlar (filamin). Kalımlılığı sağlayan proteinler, aktin filamentlerine bağlanarak depolimerleşmeyi engeller (tropomiyozin). Motor proteinler (miyozin), kasılmaya da yardımcı olarak hareket de rol oynarlar. F-aktin üzerinde hareket ederler (18) (Şekil 2-6). Bunların dışında hücre iskeletiyle direk ilişkisi olmayıp, eEF1 ve eEF2 gibi protein sentezinde işlevi olan proteinlerle de etkileşim gösterir. Ayrıca aktinin eEF2 etkinliğini düzenlediği ve eEF2'nin ADP-ribozillenmesine sebep olan DT'nin FA parçası ile etkileştiği de bilinmektedir (11).



Şekil 2-6: Aktin bağlayan proteinlere örnekler (31).

2.2.4. Özgün Drogların Aktin Polimerleşmesine Etkileri

Çeşitli küf matarlarından elde edilen bir metabolit ailesi olan sitokalsinler (*cytochalasin*), omurgalı hücrelerin, fagositoz, sitokinez ve hücre yüzeyindeki uzantıların oluşumu ve epitel hücrelerinin yapışması gibi pek çok hareketini engeller (32). Fakat bu droglar, özellikle mikrotubullere bağlı kormozomların mitoz sırasında kutuplara çekilmesi yada 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 (33,34).

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. Bu da hareket için polimerleşmenin yanında depolimerleşmenin de gerekli olduğunu ve bu işteki dinamik dengenin önemini göstermektedir (35).

Buna ilaveten, *phalloidin* aktin filamentlerine özgün olarak bağlandığından, onun floresan işaretli konjugatları hücrelerdeki aktin filamentlerini görüntülemek için sıklıkla kullanılmaktadır (35). Ayrıca Clostridium C2 ve Ayota toksini aktin monomerlerini ADP ribozilleyerek F-aktin oluşumunu engeller (33). Difteri Toksini ise F-aktin iskeletini yıkmaktadır (11).

2.3. Endozomlar ve Endozomal Trafik

Hücre içine endositoz ile giren biyomoleküller kargo olarak endozomların lojistik desteğini alır. Kargoyu taşıyacak olan endositik vesiküller erken endozomlar ile birleşirler. Endositik vesiküllerin oluşmasına ve hücre içinde erken endozomlara yönelmesine dinamik aktin iskeleti destek verir. Endositik vesiküller, erken endozomlar ile füzyona uğradıktan sonra vesikül içeriğini aktrarırlar. Erken endozomların taşıdıkları proteolitik enzimler, pH artışına bağlı olarak etkinlik kazanır ve taşınan biyomoleküllerin enzimatik olarak parçalanmasına neden olur. Erken endozomların kısmen parçaladıkları atık moleküller önce geç endozomlara taşınır ardından ulaştırıldıkları lizozomlarda parçalanma işlemi son bulur. Bazı patojen ve toksinler,

ökaryotik hücreye girişte ve hedef bölgeye ilerlemede, endositozdan ve moleküllerin organeller arası taşınma sisteminden yararlanırlar.

Endositoz'un reseptör aracılı formunda (sıvı faz alım, reseptör aracılı alım), reseptöre bağlanmanın gerçekleşebilmesi için, membran üzerinde, sitabileyi sağlayan ve transporta görevli kltrinle kaplanmış özel çukur alanlar bulunmaktadır. Daha sonra bu çukurlardan oluşan veziküller, kltrin kabını kaybeder (36). Reseptör aracılı endositoz yoluyla, toksinler, lektinler, hormonlar ve büyüme faktörleri hücre içine alınmaktadır (37). Ligand, kendisine özgü reseptörüne bağlanarak, ligand–reseptör kompleksini oluşturur. Yamalar tarzında hücre membranının bir bölgesinde kutuplaşarak cepler, bu ceplerden ise veziküller oluşur. Boyun bölgesine bulunan dinamin'in (GTPaz) etkisi ile GDP oluşur ve bu durum kontraksiyon oluşturarak, vezikülün membrandan ayrılmasını sağlar (38). Sitoplazma içerisine giren endositik vezikül, kltrin örtüsünü kaybeder ve benzer veziküllerle hızlı bir birleşim aşamasına girer. Her bir vezikül, v–SNARE (vezikül - NSF bağlı protein reseptörü) ve t–SNARE (hedef - NSF bağlı protein reseptörü) olmak üzere iki adet SNARE (NSF bağlı protein reseptörü) molekülü taşımaktadır. Benzer füzyonun gerçekleşmesi için, SNARE moleküllerinin birbirlerinden ayrılması gerekir. Veziküllerin yakınlaşmasını sağlayan bazı faktörlerden yüzeyde bulunan rab–5, GTP'yi kullanarak bu görevi yerine getirir. Bu faktörlere bir başka örnek ise, EEA1 (erken endozom ilişkili protein) dir (38). Bu protein, endozom zarı üzerindeki fosfatidilinozitol–3–fosfata bağlanarak, veziküllerin sadece yakınlaşmasını sağlamakla kalmaz, aynı zamanda füzyonlarını da etkinleştirir. Erken endozomlarda ayırt edici yapılar (EEA1, rab5–GDP) proteinleridir ve pH'sı 6.0'dır (39). Bütün endozomların membranları, ATP bağımlı H–pompaı içerir. Aktif transportla, endozomun içine H pompalanması sonucu, düşük pH sağlanmış olur. Erken endozom, geç endozoma dönüşür. Geç endozomun belirteçleri [rab7–GDP, LBPA (Lizobifosfatitik asit), MPR+ (Mannoz–6–fosfat reseptörü)] pH'nın 5–6.0'ya düşmesi ve transgolgi ağından gelen kltrin kaplı veziküllerdeki sindirim enzimlerinin de içeriye eklenmesiyle oluşur (40).

2.4. Patojen ve Toksinlerin, Hücre İçi Trafiki

Patojen ve toksinlerin, hücre içi trafiki nasıl kullandığının belirlenmesi, terapötik özellikteki biyomoleküllerin geliştirilmesine zemin hazırlamaktadır. Hücre içine endositoz ile giren biyomoleküller kargo olarak endozomların lojistik desteğini

alır. Kargoyu taşıyacak olan endositik vesiküller erken endozomlar ile birleşirler. Endositik vesiküllerin oluşmasına ve hücre içinde erken endozomlara yönelmesine dinamik aktin iskeleti destek verir (41). Bu biyomoleküllere verilebilecek en çarpıcı örnek bakteri toksinleri ile geliştirilen immüntoksinlerdir. Bunlardan en sık kullanılan protein toksinleri DT ve psödomonas ekzotoksindir. DT'den türetilen, mutant toksinlerde enzimatik özelliğin ortadan kalkması kanser tedavisi için yeni genetik yaklaşımlar sağlar (42). Bunlardan CRM197: drogların, bakteriyel enfeksiyonlara karşı geliştirilen aşıların, peptidlerin ve immünolojik adjuvanların *in vivo* ve *in vitro* taşıyıcısı olarak kullanılabilecek bir adaydır. Kanser olgularının yanında proHB-EGF (büyüme hormonu öncü yapısı, toksin reseptörü ile aynı) anlatımının arttığı belirlenen inme, lizozomal depo hastalıkları, epilepsi, Parkinson, Alzheimer gibi hastalıklarının tedavisi için CRM197'nin kan beyin bariyerini geçme özelliğinden dolayı önemli bir molekül olduğu belirtilmiştir (43,44). Toksinin lizozomal yıkıma uğramadan, erken endozomları terk edip sitoplazmaya geçme özelliği sayesinde, *in vivo* ve *in vitro* drog taşıyıcısı olarak kullanılabilecektir (45).

2.5. Rekobinant DNA Teknolojisi ve Klonlama

2.5.1. Rekombinant DNA Üretimi

Rekombinant DNA teknolojisinin esası çalışan organizmadan izole edilen DNA'nın ilgili parçasının restriksiyon enzimleri ile kesildikten sonra bakteri plazmidleri gibi, kendisi çoğalabilen bir taşıyıcı DNA (vektör) molekülüne eklenmesidir. Vektör DNA'sı ve içine eklenen DNA parçasının oluşturduğu yeni DNA molekülüne rekombinant DNA adı verilir. Daha sonra bu molekül bakteri hücrelerine aktararak çok fazla miktarda üretimi sağlanır.

2.5.2. DNA Saflaştırılması

Rekombinant DNA üretiminin ilk aşaması çalışılan organizma DNA'sı ve vektör DNA'sının saflaştırılmasıdır. Temelde DNA izolasyonu hücre duvarı ve/veya hücre zarının SDS (sodyum dodesil sülfat) gibi deterjanlarla zayıflatılıp parçalanarak DNA'nın açığa çıkarılma, protein ve polisakkarit gibi kirleticilerin fenol, kloroform gibi organik çözücülerle RNA'nın da RNaz enzimi ile ortamdan uzaklaştırılması ve sonrasında DNA'nın tuz ortamında alkol ile çöktürülmesi basamaklarından oluşmaktadır. Fakat çalışılan organizmaya göre bazı değişiklikler söz konusu olabilir. En yaygın vektör olan plazmidlerden DNA izolasyonunda kullanılan yöntem genomik

DNA'da da kullanılan yöntemle aynıdır. Fakat burada dikkat edilmesi gereken konu plazmit DNA'sının bakteri kromozom DNA'sından ayrılmasının gerekliliğidir. Bu nedenle plazmit DNA'sı izole edilirken kromozomal DNA uzaklaştırılmalıdır. Bunun için ise en çok kullanılan yöntemler alkali denatürasyonu ve etdiyum-bromid-sezyum klorür yoğunluk gradienti santrifüjlemesidir.

2.5.3. DNA'nın Kesilmesi ve Restriksiyon Enzimleri

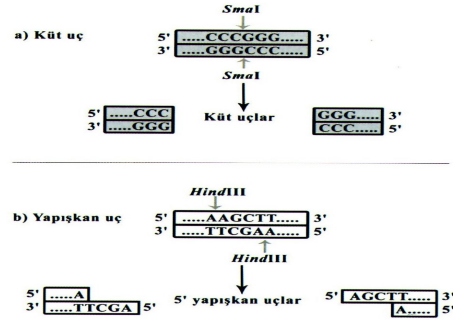
Restriksiyon enzimleri adı verilen ve bakteriden izole edilen bu enzimlerin asıl görevi bakteri içine giren viral kaynaklı DNA'ları parçalamaktır. Bu işlem sırasında bakterinin kendi DNA'sı zarar görmez, çünkü başka bir enzim, metillenme enzimi, tarafından metillenmiştir. Metillenme, DNA'yı restriksiyon enzimlerinden korur ve hücrenin kendi DNA'sının parçalanmasını önler. Sayıları 1200 civarında bulunan bu enzimler 3 grupta toplanmıştır. Bu enzimlerin tümü özgün bir DNA dizisini tanırlar. Yalnız Tip II DNA'yı tanıma bölgesinin içinden keser ve bu yüzden rekombinant DNA teknolojisinde en çok kullanılan enzim tipidir. Tip II restriksiyon enzimlerinin tanıma bölgeleri yaklaşık 4-8 baz uzunluğundadır. Genellikle tanıma bölgeleri palindromiktir (Tablo 2-1).

Tablo 2-1: Rekombinant DNA teknolojisinde yaygın olarak kullanılan bazı restriksiyon enzimleri.

Enzim	İzole Edildiği Organizma	Özgün Tanıma Dizisi
<i>Bam</i> HI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H	5' G*GATCC 3' 3' CCTAG*G 5'
<i>Eco</i> RI	<i>E.coli</i> RY13	5' G*AATTC 3' 3' CTAA*G 5'
<i>Hae</i> III	<i>Haemophilus</i> <i>egyptius</i>	5' GG*CC 3' 3' CC*GG 5'
<i>Hind</i> III	<i>Haemophilus</i> <i>influenza</i> R	5' A*AGCTT 3' 3' TTCGA*A 5'
<i>Not</i> I	<i>Nocardia</i> <i>otitidis-caviarum</i>	5' GC*GGCCGC 3' 3' CGCCGG*CG 5'
<i>Sma</i> I	<i>Serratia marcescens</i>	5' CCC*GGG 3' 3' GGG*CCC 5'
(*) Enzim kesim noktaları.		

Bazı restriksiyon enzimleri çift kollu DNA'yı tanıma bölgelerinin orta kısımlarından keserek küt uçlar oluştururken, bazı enzimler de enzimleri DNA'yı

tanıma bölgelerinde 2-4 nükleotitlik zincirli uçlar oluşturacak şekilde keserler. Bu uçlara da yapışkan uç denir (Şekil 2-7).



Şekil 2-7: Restriksiyon enzimlerinin oluşturduğu küt (a) ve yapışkan uç (b).

2.5.4. DNA'nın Birleştirilmesi ve DNA Ligazlar

Restriksiyon enzimleri ile oluşturulmuş aynı yapışkan uç dizisini taşıyan DNA parçaları birbirleri ya da aynı restriksiyon enzimi ile kesilmiş başka DNA parçaları ile *in vitro* şartlarda birleştirilebilir. Bu işlem DNA ligaz ile gerçekleştirilir ve ligasyon adını alır. DNA ligaz enzimi ATP varlığında birbirine geçici olarak hidrojen bağları ile tutunmuş yapışkan uç taşıyan DNA parçalarından birinin 3' hidroksil ucuyla, vektörün 5' fosfat ucu arasında 3'-5' fosfodiester bağı oluşumunu katalizler.

2.5.5. Klonlama Vektörleri

Normalde restriksiyon enzimleri ile oluşturulmuş DNA parçaları doğrudan bakteri hücrelerine giremez. Dolayısıyla vektör adı verilen bakteri içinde bağımsız çoğalabilecek başka bir DNA molekülüne eklenmesi gerekir. Vektör molekülü küçük olmalı ve bakteriden izolasyonu kolay olmalıdır. Bakteri içinde çoğalabilmesi için konakçıya uygun bir replikasyon orijini taşımalıdır. Vektör DNA'sı üzerinde pek çok enzimin sadece bir tanıma bölgesi olmalıdır ve ayrıca vektörü taşıyan ya da taşımayan konakçı hücreleri birbirinden ayırt etmeye yarayan bir seçici belirteç gen (genelde antibiyotiğe direnç geni ya da konakçıda bulunmayan bir enzim geni) olmalıdır. Çalışma amacına bağlı olarak çok farklı tiplerde klonlama vektörleri kullanılmaktadır.

1 – Plazmidler

2 - Viral vektörler

3 - Kozmid vektörleri

4 - BAC (yapay bakteri kromozomu) vektörleri

5 - YAC (yapay maya kromozomu) vektörleri

2.5.5.1. Plazmidler ve Gen Klonlama

Plazmidler bakteri içerisinde kromozom DNA'sından bağımsız olarak çoğalabilen, çift zincirli, halkasal ekstra DNA molekülleridir. Plazmitler doğal olarak tüm bakterilerde bulunur ve taşıdığı genlerle bakteriye genom dışı bazı ekstra özellikler kazandırır.

Gen klonlama, rekombinant DNA ya da rekombinant vektör oluşturulduktan sonra bu molekülün çok sayıda kopyasının elde edilmesi gerektirir. Bu da rekombinant vektörün konakçı bir hücre içine aktarılmasıyla sağlanır. Bu işlem, hücre içine aktarılan vektör plazmit ise transformasyon, bir virüs ise transfeksiyon adını alır. Konakçı hücre prokaryotik olabildiği gibi ökaryotik hücre de olabilir. Klonlama deneylerinde en yaygın olarak kullanılan prokaryotik konakçı genelde *E.coli* hatlarıdır.

Bakteri plazma membranları normalde DNA gibi büyük moleküllerin geçişine izin vermez. Fakat yüksek iyonik tuz derişimlerine ya da kısa elektrik şoklarına maruz bırakıldıklarında membran geçirgenliği değiştirilebilmekte, çok az da olsa bazı hücrelerin ortamdan yabancı DNA almaları sağlanabilmektedir. Bu tip hücrelere kompetan (yetenekli) hücre denir. *E.coli* hücreleri CaCl_2 solüsyonuyla muamele edildiğinde 10000 ya da daha çok hücreden sadece bir tanesi yabancı DNA'yı almak için yetenekli hale gelmektedir. Ancak CaCl_2 muamelesi DNA'nın hücre duvarına yapışmasına neden olur, DNA'nın hücre için hareketi ise 1-2 dakikalık ısı şoku (42°C) ile sağlanır. Rekombinant vektör molekülünü taşıyan bakterilerin bir süre 37°C 'de bekletilerek toparlanmalarına izin verildikten sonra petride katı besiyerine yayılarak inkübasyona devam edilir. Eğer aktarılan vektör bir plazmit ise her bir bakteriden çok sayıda bölünmeyle koloni oluşturması beklenir. Koloniyi oluşturan hücreler başlangıçtaki ata hücre ile aynı genetik yapıya sahiptir. Her bir bakteri hücresinin bir plazmit vektörü olarak koloni oluşturduğu varsayılırsa, plazmitler hücre bölünmesinden bağımsız olarak da kendilerini çoğalttıklarından, tek bir bakteri kolonisinden birkaç mikrogram rekombinant DNA elde edilebilir. Bu miktar transformasyon sırasında ortama konulan rekombinant DNA miktarının yaklaşık bin katıdır. Hatta bu koloniden sıvı kültürüne inokülasyon yapılarak izole edilen plazmit DNA'sı gen yapısı ve anlatımına yönelik çalışmalar için gerekli miktarın da üzerinde olacaktır (46).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇLER

3.1.1. Kimyasal maddeler

Agar (Sigma)
Akrilamit (Sigma)
Amonyum persülfat (Sigma)
Aproteinin (Sigma)
BCIP (bromokloroindolfosfat) (Sigma)
Bis-Akrilamit (N,N'-metilen-bis-akrilamit) (Sigma)
Brom fenol mavisi (Sigma)
BSA (sığır serum albumini) (Sigma)
Commasie parlak mavisi (Sigma)
DAPI (4',6-diamidino-2-fenillindo) (Invitrogen)
Difteri toksini (Sigma)
DMEM F-12 (Dubelco's medium F-12) (Gibco)
EDTA (etilen diamin tetra asetik asit) (Sigma)
FBS (fetal sığır serumu) (Gibco)
Fikol (Sigma)
IPTG (izopropil β -D-1- tiogalaktopiranosit) (Bioron)
Karbonik anhidraz (Sigma)
Luepeptin (Sigma)
Maya özütü (DIFCON)
MET (2-Merkaptoetanol) (Sigma)
Nitrobluetetrazolium (NBT) (Sigma)
Penicillin - streptomycin solution (Sigma)
pGEM-T vektör (Promega)
PMSF (fenilmetanesülfonilflorid) (Sigma)
Primerler (IDT-Integrated DNA Technology)
RNaz İnhibitörü (Fermantas)
Sitokalsin D (Sigma)
Sodyum dodesil sülfat (SDS) (Sigma)

Sukroz (Sigma)

TEMED (N,N, N' N' tetrametilendiamin) (Sigma)

T4 Ligaz (Fermantas)

Terz transkriptaz (Fermantas)

Triton X-100 (Merck)

Tween-20 (Riedel de Haen)

Yumurta albumini (Sigma)

Tris, gliserin, glisin, metanol, etanol, izopropil alkol, etilen glikol, asetik asit, HCl, NaCl, KCl, NaH₂PO₄, Na₂HPO₄, KH₂PO₄, K₂H PO₄ ve diğ er tüm kimyasal malzemeler Sigma ve Merck firmasından sağ landı.

Aktin, ökaryotik elongasyon faktör 1 (eEF1), ökaryotik elongasyon faktör 2 (eEF2), ribozom, *E.coli* tRNA, tRNA sentatazlar (İstanbul Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı'ndan), pGEM-T, pGEX-4T-1 vektörler, DH5 α , BL21-Gold (İ.Ü. DETAE-Genetik Anabilim Dalı'ndan), *C. Diphtheria* (Refik Saydam Hıfıssıha Enstitüsü'den) sağ landı.

3.1.2. Kitler

Jelden DNA saflaştırma kiti (Qiagen)

MagNA Pure compact DNA saflaştırma kiti (Roche)

Mini-Prep kiti (Qiagen)

Plazmid saflaştırma kiti (Mini Prep)

Proteaz kiti (Sigma)

PZR saflaştırma kiti (Qiagen)

3.1.3. Antikorlar

Anti- difteri toksini FA özgün fare kökenli monoklonal antikor (Santa-Cruz, Abcam)

Anti-IgG tavşan kökenli FITC işaretli 2. Antikor (Sigma)

Anti-IgG fare kökenli TRICH işaretli 2. Antikor (sigma)

Anti-IgG fare alkalen fosfotaz (Sigma)

Erken endozom antikor 1 (EEA1) (abcam)

Falloidin-Tetrametilrodamin B izotiyosiyanat (Sigma)

3.1.4. Kromatografik Maddeler

Hi Prep 16/60 Sefakril S-200 (GE Healthcare)

GST-Tag (GE Healthcare)

3.1.5. Radyoaktif Malzemeler

[adenozin - ^{14}C]NAD⁺

[U- ^{14}C]fenilalenin ([^{14}C]Phe)

3.1.6. Cihazlar

Buz makinası (Hoshizaki)

Çalkalamalı inkübatör (Shaker) (Thermo)

Derin dorundurucu (-80 °C) (NUAIRE)

Distile su cihazı (GFL)

Diyaliz sistemi (Milipor)

Etüv (Sanyo)

Floresan mikroskopu (Olympus BX51)

Görüntüleme sistemi (DP2-BSW)

Jel kurutucusu (Model 543) (Biometra)

Laminar hava akım cihazı ELB 2472 (Heraus)

Likit kromatografi cihazı (Akta)

Likit sintilasyon sayacı (Packard Tri-Carb 1000 Tr)

Masaüstü mini santrifüj (Hettich-Eppendorf)

Mini gel elektroforez tankı (Biometra)

Otoklav (HIRAYAMA)

PZR aleti (Thermo-Cycler) (Eppendorf, Techne)

pH metre (Hanna)

Santrifüj (Hettich)

Sıvı azot tankı (34 XT Taylor-Wharton)

Spektrofotometre (UV 1601 Shimadzu)

Floresan spektrofotometre (Perkin Elmer LS-5)

Su banyosu (37 °C) (Heidolph)

Ultrasantrifüj (Sorwel)

UV-transluminatör (Fotodyne)

Vivaspin (Sartorius)

3.1.7. Çalışmada Kullanılan Eriyikler

3.1.7.1. PAGE (Poliakrilamit Gel Elektroforezi) İçin Gerekli Eriyikler

PAGE Alt Jeli: (%12)

1,5 M Tris HCl pH:8,8	2000 µl
Akrilamit/bisakrilamit (30:0,8)	3220 µl
% 10 SDS	75 µl
%10 Amonyumpersülfat	30 µl
6.56 M TEMED	15 µl
bd H ₂ O	2720 µl

PAGE Üst Jeli: (%5)

1 M Tris HCl pH:6,8	625 µl
Akrilamit/bisakrilamit (30:0,8)	420 µl
% 10 Sodyumdodesilsülfat	25 µl
% 10 Amonyumpersülfat	10 µl
6.56 M TEMED	5 µl
bd H ₂ O	1460 µl

PAGE Eriyiği:

Tris bazı	3 g
Glisin	15 g
SDS	1 g
bd H ₂ O ile 1000 ml'ye tamamlanır.	

PAGE Yükleme Eriyiği (2x):

1 M Tris HCl pH:6,8	1 ml
% 99 Gliserin	1,6 ml
% 10 Sodyumdodesilsülfat	2 ml
14 M MET	0,4 ml
% 0,1 Bromfenol mavisi	0,2 ml
bd H ₂ O	3,8 ml

SDS-PAGE’de Kullanılan Molekül Ağırlık Belirteçleri

Fosforilaz b	97 kDa
Sığır serum albumini	66 kDa
Yumurta albumini	45 kDa
Karbonik anhidraz	29 kDa

“Coomassie” Parlak Mavisi ile Jel Boyama Eriyiği

% 0,2 “ Coomassie “ parlak mavisi
 % 50 Metanol
 % 10 Asetik asit

Jelden Boya Çıkarma Eriyiği

% 25 İzopropil alkol
 % 10 Asetik asit

3.1.7.2. Bağışık (Western) Emdirim İçin Gerekli Eriyikler

TBST (Tris Eriyikli Tuz) Eriyiği

10 mM Tris HCl pH: 8,0
 150 mM NaCl
 % 0,05 Tween 20

BSA (Sığır Serum Albumini) Eriyiği

TBST içinde % 0,05 BSA eritilerek hazırlanır.

Aktarım (Transfer) Eriyiği

17,4 g Tris
 87 g Glisin
 3 g SDS
 600 ml Metanol bd H₂O ile 3000 ml’ye tamamlanır.

Alkalen Fosfataz Substrat Eriyiği

100 mM NaCl
 100 mM Tris HCl pH: 9,5
 5 mM MgCl₂

Durdurma Eriyiği:

20 mM Tris HCl pH: 8,0
 5 mM EDTA

Aktarım Eriyiği

50 mM Tris HCl pH: 8,0
 380 mM EDTA
 % 0.1 SDS
 % 20 Methanol

3.1.7.3. Klonlamada Kullanılan Eriyikler**LB Besi Yeri (Medyum)**

10 g/l Tripton (Bacto-tryptone)
 5 g/l Maya Özütü (Bacto-Yeast Extract)
 5 g/l NaCl

LB Agar Besi yeri (Medyum)

%1.5 lik olacak şekilde agar LB içinde çözülür.

Tryptone	1 g / l
Yeast Extract	0.5 g / l
NaCl	1 g / l
Agar	1.5g / l

Süper Optimal Sıvı Besiyeri (SOC Medium)

Trypton (Bacto-tryptone)	2.0 g
Maya Özütü (Bacto-Yeast Extract)	0.5 g
1 M NaCl	1 ml
1 M KCl	0.25 ml
2 M Mg ⁺² Stok (filtre ile steril edilmiş)	1.0 ml
2 M Glukoz (filtre ile steril edilmiş)	1.0 ml

Trypton, Maya özütü, NaCl, KCl 10 ml bd H₂O' da çözülür, otoklavlanır ve oda sıcaklığına gelene kadar beklenir ve 2 M Mg⁺², 2 M Glukoz eklenir. pH:7.0'ye ayarlanır.

Agaroz,Jel Yükleme Eriyiği (10 ml)

% 0.25 Bromfenol mavisi
 % 30 gliserol
 10 ml steril bd H₂O içinde hazırlanır.

Tris-asetat EDTA-TAE (500 ml, 50X)

121 g Tris baz
 28.5 ml glasiyal asetik asit
 50 ml 0.5 M EDTA

bd H₂O ile 500 ml'ye tamamlanarak otoklavlanır, oda ısısında saklanır.

3.1.7.4. Floresan Boyamada Kullanılan Eriyikler**PBS (Tuz İçeren Yıkama Eriyiği)**

1,44 g/l Na₂HPO₄.2 H₂O
 0,2 g/l KH₂HPO₄
 8,0 g/l NaCl
 0,2 g/l KCl

800 ml dH₂O ile çözülerek pH HCl ile 7,4 olacak şekilde ayarlanarak son hacim 1 lt'ye tamamlanır.

Sabitleme Eriyiği

% 2 Paraformaldehit PBS eriyiği içinde çözülür.

Membran Geçirgenliğini Artıran Eriyik

% 0,1 Triton PBS eriyiği içinde çözülür.

3.1.7.5. Hücre Parçalama (Lizis) Eriyiği

10 mM MOPS, pH: 7,0

% 1 tritonX-100

% 10 gliserol

0.5 mM EDTA

10 mM sodyum pirofosfat

50 mM sodyum florür

1 mM sodyum ortovanadat

Proteaz İnhibitör Kiti

3.1.7.6. Endozom Homojenleştirme Eriyiği

0.25 M sukroz

78 mM KCl

4 mM MgCl₂

8.4 mM CaCl₂

10 mM EGTA

50 mM HEPES–NaOH pH 7.0

10 µg/ml aprotinin

1 µM/ml pepstatin A

0.5 µg/ml leupeptin

3.1.7.7. TBS (Tuzlu Yıkama Eriyiği)

50 mM Tris

150 mM NaCl

3.2. YÖNTEMLER

3.2.1. Klonlama Çalışmaları

Rekombinant FB için öncelikle Refik Saydam Hıfıssıha Enstitüsü'nden *Corynebacterium diphtheria* suşu (RSKK 922-634) temin edildi.

3.2.1.1. PZR ile (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Fragment B (FB)'yi Kodlayan Genin Çoğaltılması

In vitro koşullarda FB'nin klonlanması için PZR yönteminden yararlanıldı. İlk olarak PZR'da kullanılacak primerler (Tablo 3-1) belirlendi. Bu primer, Domain T, SCIN aminoasitleri ile başlayan kısmı ve bu altbirimden önce gelen 4 adet aminoasit daha alınarak dizayn edildi. (VDSSL). Bu primer pGEX-4T-1'na EcoRI-XhoI enzim kesim bölgeleri için hazırlandı.

Tablo 3-1: DT fragman B için hazırlanan Primerler (47).

pDT-F	5-GAATTCGTAGGTAGCTCATTGTCATGC-3
pDT-R	5-AAACTCGAGTCAGCTTTTGATTTCAAA-3
A1-	TGTGCAGGAAATCGTGTGAGGCGATCCCCGGAATTCGTAAT
A2-	CATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCA
A3-	CAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAA
Middle1-	gcgcaagttatcgatgctgcagcatgtagtag
B1-	AATTCGTATAATCGTCGATCC GTCGATCGA CCTGCA GCATGTTAGTAG

Alternatif primer:

p293DT-R2 5- CTCGAGCCGGCACACGACCCCACTACC-3

p306-F 5-GTGCTTCGCGTGTAGTGCTC-3

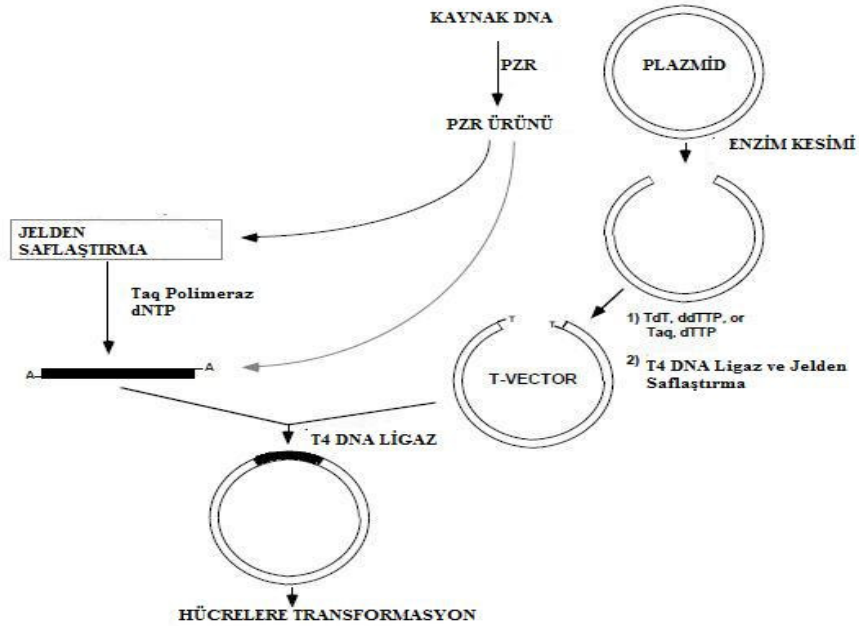
95°C’de 2 dakika bekletildikten sonra, 95 °C’de 30 saniye, 57 °C’de 30 saniye, 72 °C ‘de 1dakika olan PZR koşullarında 35 çevrim uygulandı. Son olarak 72°C’de 5 dakika beklenerek PZR işlemi tamamlandı.

3.2.1.2. PZR Safılaştırma

PZR ürününün 5 katı kadar PBI tamponu (DNA’ nın kolona bağlanmasını sağlar), PZR ürünü ile karıştırılarak spin kolonlara aktarıldı. Daha sonra bu karışım 1 dak. 13000 devri/dakika’ da santrifüj edildi. 750 µl PE (yıkama tamponu) tamponu eklenerek 1dak. 13000 devir/dakika’da tekrar santrifüj edildi. Etanolü uzaklaştırmak için fazladan 1 dak. santrifüj yapıldı. Kolonlar 1.5 ml’ lik tüplere yerleştirilerek üzerine 35 µl bdH₂O eklendi ve 1dak. bekleme süresinin ardından 13000 devir/dakika’ da 1 dak. santrifüjlendi.

3.2.1.3. pGEM-T Easy Vektörüne Klonlama

PGEM-T-easy vektörüne direkt PZR ürününden T-A klonlama yapıldı. Bunun için DNA T4 Ligaz enzimi ile uygun koşullarda bir ligasyon işlemi gerçekleştirildikten sonra, ligasyon ürünü, DH5α kompetan hücresi kullanılarak ısı şoku ile bakteriye transforme edildi.



Şekil 3-1: Uluslararası A-T klonlama yöntemi (48).

3.2.1.4. Ligasyon

Önceden hazırladığımız cDNA, pGEM T-easy vektörüne klonlanırken aşağıdaki koşullar hazırlandı (Tablo 3-2). Reaksiyon oda sıcaklığında 1 saat inkübasyona bırakıldı.

Tablo 3-2: Ligasyon koşulları.

İçerik	cDNA için	Negatif Kontrol
2 X Ligasyon Buffer	5 µl	5 µl
pGEM-T-easy Vektör	1 µl	1 µl
c-DNA	1µl	-
T4 DNA Ligaz Enzimi	1 µl	1 µl
bd H₂O	2 µl	3 µl
Total Hacim	10 µl	10 µl

3.2.1.5. Aktarım (Transformasyon)

Bakteriyel transformasyon için, önceden hazırlanmış olan kompetan hücrelere (DH5α) aktarım, “heat shock” metodu ile gerçekleştirildi. Kompetan hücrelerin -80°C’den alınarak buz üzerinde erimesi sağlandı. Ligasyon ürünü (10 µl) ile kompetan hücreler (90 µl) karıştırılarak 30 dakika buz sonra 1.5-2 dakika kadar 42°C’de bekletildi ve hemen ardından tekrar 2 dakika buzda bekletildi. Bakteri hücreleri ile transforme olmuş ligasyon ürünlerini içeren tüpler oda sıcaklığında 900 µl’ lik SOC medium ile karıştırılarak 45 dakika 37°C’de inkübatörde (220 devir/dakika) çalkalandı. 45 dakika sonunda hücreleri dibe çöktürmek amacıyla 5000 devir/dakika’da 1 dakika santrifüjlendi. LB-agar (ampisilinli) 100 µl’lik önceden hazırlanmış olan petrilere yayma yapıldı. Petriler 37°C’de geceboyu bekletildi ve ertesi sabah oluşan kolonilerden bir adet seçilerek 5 ml LB’ ye ekildi. Yaklaşık 10-12 saat sonra **Bug** için 1 ml gliserol

içine 1 ml bakteri konup, pipetaj yapmadan alt üst edilip sallanarak karışması sağlandı ve örnekler -80°C saklandı. Geri kalanlara Mini-Prep protokolü uygulandı.

3.2.1.6. Mini-Prep Protokolüyle Plasmid DNA Eldesi

Petrilerden seçmiş olduğumuz bir koloni 5 ml'lik ampisilinli LB içine eklendi ve yaklaşık 10 saat çalkalamalı inkübatörde (220 devir/dakika) fermentasyon için bekletildi. İnkübasyon sonrası bakteriler 10 dakika 3500 devri/dakika'da santrifüjlendi ve çöken hücreler 250 µl'lik P1 (RNase) çözeltisi ile karıştırılıp ependorfa alındı. Üzerine 250 µl P2 (lisis) çözeltisi eklendi ve iyice karıştırılarak mavi renk oluşumu sağlandıktan sonra üzerine 350 µl N₃ (SDS) çözeltisi ilave edilerek iyice karıştırılarak beyaz renk oluşumu sağlandı. Örnekler, 10 dak. 13 000 devir/dakika'da santrifülenerek üst sıvılar spin kolonlara aktarıldıktan sonra 1 dakika 13 000 devir/dakika'da santrifüj edildi. Kolonların altı boşaltılıp filtrenin üzerine 0.75 ml PE (yıkama çözeltisi) tamponu eklenerek 1 dak. 13 000 devir/dakika'da santrifüjlendi ve plazmit DNA'sı temizlendi. PE yıkama tamponu içersinde bulunan etanolü uzaklaştırmak için fazladan 1 dakika santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrası kolonlar 1,5 ml'lik ependorf tüplere yerleştirilerek üzerine 50 µl EB ("Elution Buffer", yıkama çözeltisi) (10 mM Tris.Cl, pH 8.5) çözeltisi eklendi 1 dak. bekleme süresinin ardından 1 dak. santrifüj edildi ve plazmit ayrıştırıldı.

3.2.1.7. pGEX4 -T-1 ve pGEM-T-easy Vektörlerine Enzim Kesimi Uygulanması

pGEM-T-easy'e klonlanmış olan cDNA (klonladığımız difteri toksininin FB parçası) ve bir ekspresyon vektörü olan pGEX-4T-1 iki vektörde de ortak olan XhoI EcoR1 ortak restriksiyon enzim kesim bölgelerinden kesildikten sonra genimiz pGEX-4T-1' a aktarıldı. Enzim kesimi yaparken 1 µg DNA' yı 1 ünite enzim kesecek şekilde hesaplandı. Kullandığımız enzim kesim ortamı seçtiğimiz enzimlerin en iyi çalıştıkları çözelti olarak aşağıdaki tablodan seçildi (Tablo 3-3). Bunun "turuncu çözelti" (orange buffer) olduğuna karar verildi. Bir saat sonunda ayrı ayrı ependorflarda kestiğimiz vektörlerden pGEX-4T-1' a tekrar kendi üzerine birleşmesin diye 5' bölgedeki fosfatları koparmak için ortama 1 µl CIAP (dana bağırsak alkalin fosfataz) eklendi ve 30 dak. 37°C'de inkübe edildi. Bu işlem ikinci kez tekrarlandıktan sonra enzim kesim ürünleri % 0.5'lik düşük sıcaklıkta eriyen ("low melting") agaroz jele 1 x TAE (Tris-asetat etilendiamintetraasetik asit) yükleme tamponu kullanılarak yüklendi ve 50 voltta 45-60 dakika yürütüldü.

Tablo 3-3: Enzim kesimi için gerekli koşullar.

İçerik	PGEM-T-Easy	pGEX-4T-1
turuncu çözelti	3.0 µl	
XhoI	1.0 µl	1.0 µl
EcORI	1.0 µl	1.0 µl
bdH ₂ O	5 µl	4.0 µl
DNA	20 µl	3.0 µl
Total	30 µl	30 µl

Enzim kesim için hazırlanan karışımda 37°C’de 1 saat inkübe edildi (Tablo 3-4).

Tablo 3-4: Kullanılan enzimler için ideal koşulları sağlayan çözelti için tablo.

Önerilen Tampon	İnkübasyon Sıcaklığı	Geceboyu inkübasyon için gerekli miktar (u/µg DNA)	20 dakika içindeki termal inaktivasyon	Enzim Aktivitesi (%)						
				EcoRI (tek)	B (mavi)	G (yeşil)	O (turuncu)	R (kırmızı)	Tango™ (sarı)	
				1X	1X	1X	1X	1X	1X	2X
Tampon EcoRI	37°C	0.2	65°C	100	0-20	NR	100	100*	NR	100

A

Önerilen Tampon	İnkübasyon Sıcaklığı	Geceboyu inkübasyon için gerekli miktar (u/µg DNA)	20 dakika içindeki termal inaktivasyonu	Enzim Aktivitesi %					
				B (mavi)	G (yeşil)	O (turuncu)	R (kır mızı)	Tango™ (sarı)	
				1X	1X	1X	1X	1X	2X
Tampon XhoI	37°C	0.1	80°C	0-20	50- 100	50-100	100	20 - 50	100

B

(A) EcoRI için Çalışma Koşulları, (B) XhoI için Çalışma Koşulları

*5’ ten fazla kesimde “star” (yıldız) aktivitesi gözlemlenir (5 unite x 1 saat).
NR (Önerilmeyen): Yüksek yıldız aktivitesi gözlemlendiğinden bu çözelti önerilmemektedir (49).

3.2.1.8. Jelden DNA Saflaştırma

İstenilen DNA bölgesi neşter ile UV ışıktaki (380 nm) jelden kesilerek alındı. pGEM-T-Easy'den klonlanan FB, pGEX-4T-1'dan aynı enzimlerle kesilmiş (vektör) DNA parçaları 1.5 ml'lik tüpler içerisinde hassas terazide tartılarak ağırlıkları belirlendi. Üzerine 1 µl jel birimine 3 birim (1/3) olacak şekilde QG (pH: 7.5'dan küçük olduğu zaman renk veren çözelti) çözeltisi ilave edilerek 50°C'de 10 dakika süresince jelin erimesi sağlandı. Karışıma bir hacim kadar isopropanol eklendi ve DNA'yı bağlamak için karışım 2 ml'lik toplama tüplerinin üstüne yerleştirilmiş kolonlara aktarıldı. Kolonlar 13 000 devir/dakika'da 1 dakika santrifüjlendikten sonra, üzerine 0.75 ml PE tamponu eklendi ve 13 000 devir/dakika'da tekrar 1 dakika santrifüj işlemiyle DNA yıkandı. Kolonlardan etanolü uzaklaştırmak için bir kez boş olarak santrifüj edildi. Kolonlar 1.5 ml'lik temiz bir tüpe aktarıldı ve üzerine 30 µl steril H_2O eklenerek 13 000 devir/dakika'da 1 dakika santrifüj edildi. Elde ettiğimiz örneklerin DNA miktarını belirlemek amacıyla optik yoğunluklarına (A_{260}) bakıldı.

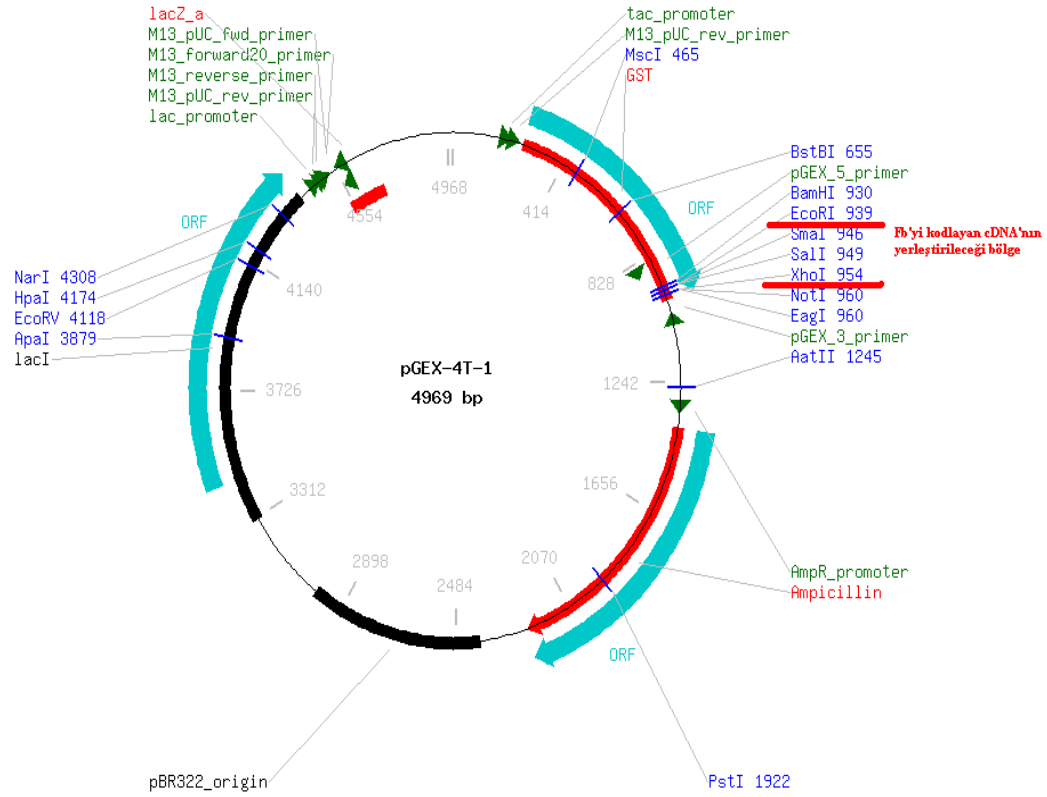
3.2.1.9. pGEX4 -T-1 Vektörüne Klonlama

Jelden izole edilen aynı enzim bölgeleriyle kesilmiş parçalar vektörün ağırlığı (ng) X insert'in boyu (kb) / vektörün boyu (kb) formülü kullanılarak cDNA ve komplementer vektörün (insert) hangi oranlarda karıştırılarak ligasyonun sağlanacağı belirlendikten sonra jelden izole edilen DNA örnekleri ligasyon koşullarında (Tablo 3-5) klonlama için 6 saat oda sıcaklığında ligasyona bırakıldı.

Tablo 3-5: Ligasyon koşulları.

İçerik	Ligasyon ürünü 1:1	Ligasyon ürünü 1:2	Ligasyon ürünü 1:6	Negatif Kontrol
10 X Ligasyon Çözerltisi	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
pGEX-4T-1 Vektörü	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
cDNA(Insert)	1 µl	2 µl	6 µl	-
T4 DNA Ligaz Enzimi	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
bd H ₂ O	15 µl	14 µl	10 µl	16 µl
Total Hacim	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl

Yukarıda anlatıldığı gibi oluşturulan ligasyon ürünlerinden transformasyon yapıldı, transforme bakteriler (Bug) -80°C’de saklandı, Transformasyon sonrası bakterilerden mini-prep protokolüyle plazmid izolasyonu yapıldı ve enzim kesimi ile klonlama kontrol edildi. Böylece 1:1 oranında ligasyon ürünü ile hazırladığımız örnekte doğru bağlanma gerçekleşti ve bu plazmid daha sonraki aşamalarda protein ekspresyonu için kullanılmak ve Genetik Anabilim Dalı’nın veri tabanında bulunmak üzere 80°C’de “Plazmid No:41-pGEX-4T-1-DT Fragman B” (Şekil 3-2) şeklinde saklandı.



Şekil 3-2: p-GEX-4T-1 vektörünün enzim kesim ve promotör bölgeleri (50).

3.2.1.10. Protein Ekspresyonu

Transformasyon için protein ekspresyonuna uygun olan “Rosetta” kompetan hücreler (99 µl) -80°C’den alınarak buzda çözüldükten sonra plazmid (1 µl) ile karıştırılarak 30 dakika buz üzerinde tutuldu. Hücreler 1.5-2 dakika kadar 42°C’de bekletildikten sonra hemen ardından tekrar 2 dak. buzda bekletildi. Bakteri hücreleri ile transforme olmuş ligasyon ürünlerini içeren tüpler oda sıcaklığında 900 µl’lik SOC medium ile karıştırılarak 45 dakika 37°C’deki inkübatörde (220 devir/dakika) çalkalandı. Hücreleri dibe çöktürmek amacıyla 5000 devir/dakika’da 1 dakika santrifüjlendi. LB agar (ampisilinli) 100 µl’lik önceden hazırlanmış olan petrilere yayma yapıldı. Petrilere 37°C’de geceboyu inkübe edilerek koloni oluşması sağlandı.

Ertesi sabah katı besi yerinden 2 koloni alınıp sıvı LB besi yerine ekildi ve 200 devir/dakika'da çalkalanarak bir gün çoğalması sağlandı. Çoğalan hücrelerden 500 µl alınarak 250 ml'lik LB sıvı besi yerine ekildi. Bir saat inkübasyondan sonra yarım saat aralıklarla spektrofotometre'de optik yoğunluk ölçümü (590 nm) yapıldı. Optik yoğunluk 0.6'ya ulaşınca kadar bu işlem devam etti. Bu değere ulaşıldığında hücrelerden 10 ml alarak falkon tüplere aktarıldı ve üzerlerine artan miktarlarda IPTG ilave edildi (Tablo 3-6).

Tablo 3-6: Kullanılan IPTG miktarları.

	Kontrol	1.Örnek	2. Örnek	3. Örnek	4. Örnek	5. Örnek
IPTG Miktarı	-	0.1 mM	0.3 mM	0.5 mM	0.8 mM	1 M

IPTG içermeyen tüp 0. Saat olarak kabul edildi ve bundan sonra her 30 dak. da bir (180 dak. süresince) örneklerden 1.5 ml ayrıldı. Farklı IPTG derişimleri ve farklı sürelerde indüklenen hücreler 14.000 devir/dakika'da 8 dak. santrifüjlenerek üst sıvıları atıldı ve peletlere 400 µl yükleme tamponu eklendi. SDS-PAGE hazırlanarak örnekler jele yüklendi ve 100 mA'lık akımda yaklaşık 2 saat yürütüldükten sonra "Commasie" parlak mavisi ile boyanarak görüntülendi.

3.2.1.11. Rekombinant Proteinlerin Saflaştırılması

Protein ekspresyonun gerçekleştiğini gördükten sonra jeldeki görüntüden en uygun IPTG derişimi seçildi ve o derişimde protein ekspresyonu işlemi tekrarlandı. Bu işlem yapılırken de rekombinant proteinlerin saflaştırılması işleminde yararlı olabileceği düşünülen Glutasyon -S-Ttransferaz (GST), kimerik gen fragmanların elde edilmesi için BL21-Gold adlı *E. coli* protein ekspresyon hücre soyuna transfeke edildi. Transfeksiyon için "heat shock" yöntemi kullanıldı. Rekombinant proteini, pGEX-GST-FB Fragmanı plazmidini taşıyan tu-hibrid sistemle, AKTA prime plus kromatografi cihazında, afinite kromatografisiyle GSTrap 4B (GE Healthcare), afinite klonu kullanılarak saflaştırıldı. Elde edilen 67 kDa'luk kimerik protein, trombin (trombin kit-

Novogen) ile kırılarak moleküler elek kromatografisinden (Hi Prep 16/60 Sefakril S-200) ayrıştırıldı. Kolonun kalibrasyonu, fosforilaz b (M_r 97 kDa), (BSA) (M_r 66 kDa), ovalbumin (M_r 45 kDa), karbonik anhidraz (M_r 29 kDa) ve GST (M_r 21 kDa) ile yapıldı. Yaklaşık 37 kDa ağırlığındaki FB, elektroforez ve bağışık emdirim yöntemiyle gösterildi.

3.2.2. Hücre Kültürü Çalışmaları

3.2.2.1. Hücre Çoğaltma

Çalışmada kullanılan hücre soyu HUVEC (İnsan Göbek Kordonu Ven Endotel Hücresi) standart kültür koşullarında, % 10 FBS ve antibiyotik (100 µg/ml streptomisin ve 100 U/ml penisilin) içeren DMEM F-12 içinde 37°C’de ve % 5 CO₂’li kültür ortamında üretildi. Üretilen hücrelerin canlılık tespiti tripan mavisi ayırma yöntemi ile yapıldı. Kültüre edilen hücreler hücre kazıyıcısı ile kaldırılarak santrifüjlendi. Hücre peleti PBS ile çözüldükten sonra % 0.4’lük tripan mavisi ile 1:10 oranında karıştırılıp, oda sıcaklığında 15 dakika bekletildikten sonra karışımdan alınan örnek Thoma lamı üzerinde ışık mikroskopunda sayılarak saptandı.

Kültür şişeleri (flask) ters mikroskopa 3-4 günde bir kontrol edildi. Belli bir yoğunluğa ulaşan hücreler, hücre kazıyıcısı ile yüzeyden kaldırılarak 15 ml’lik steril “falcon” tüplere aktarıldı. Hücreler 700 x g. 5 dak. santrifüjlenerek üst sıvı uzaklaştırıldı ve üzerine taze medyum eklendi. Hücre sayısına göre her bir yeni pasajda kültür şişelerinde yaklaşık 1-2 x 10⁵ hücre olacak şekilde hücreler bölündü. 25 cm²’lik flasklar için 5 ml, 75 cm²’lik flasklar için 10 ml medyum eklenerek hücreler kültür ortamına çoğalmaya bırakıldı. Bu şekilde 3-4 günde bir kontrol edilen hücrelerin, belirli aralıklarla yeni pasajları yapıldı..

3.2.2.2. Hücrelerin Dondurulması

Hücreler, hücre kazıyıcısı ile kazınarak 15’lik falkon tüplerde 700 x g 5 dak. santrifüj edilerek üst sıvı atıldı. Her bir tüpteki hücre sayısı 3 x 10⁶ olacak şekilde ayarlandı. Hücreler 1/9 oranında DMSO-FBS varlığında yüksek derecede soğuğa karşı dayanıklı olan kryotüplere alındı. Tüpler 24 saat -80°C’ de bekletildikten sonra ~200 °C’lik sıvı azot tankına alındı. Bu sayede HUVEC hücre soyunun devamlılığı sağlandı.

3.2.2.3. Hücrelerde Canlılık Tayini

Hücre sayımı, 0.1 mm³ hacimde sayım yapılma esasına göre, Thoma lamının çukur kısmına konulan örnek üstüne lamel konulduktan sonra (0.1 mm yüksekliğinde sıvı ile) sayım yapıldı. Lam da 16 büyük kare, her büyük karede 25 küçük kare olmak üzere toplam 400 küçük kare bulunduğu için hücre sayısı,

$$\text{hücre sayısı/ml} = 16 \times 10^4 \times \text{seyreltme faktörü}$$

formülünden hesaplandı.

10⁴ = 0.1 mm³ hacimdeki sayım sonucunu 1 ml'deki sayıya dönüştürmek için sabit olarak kullanıldı.

$$\text{toplam hücre sayısı} = \text{toplam hacim} \times \text{hücre sayısı/ml}$$

formülünden hesaplandı.

Santrifüj sonrası, süspansiyon halindeki hücreler ile % 4'lük tripan mavisi çözeltisi 1:1 oranında karıştırıldı. 5 dakika bekletme sonrası Thoma lamına alınarak sayıldı. Canlı hücrelerin membran bütünlükleri ve geçirgenlikleri bozulmadığı için boyayı hücre içine almazlar. Bu özelliğe dayanarak boyanmış ve boyanmamış hücre oranı ile canlılık (% olarak) hesaplandı .

$$\text{Hücre canlılığı (\%)} = \text{Canlı hücre sayısı (x100)} / \text{Toplam hücre sayısı}$$

3.2.2.4. Hücrelere Toksin Uygulanması

HUVEC hücreleri kuyu başına 1 x 10⁶ hücre olacak şekilde 6 kuyuluk kültür flasklarına bir gün önceden ekildi. Ertesi gün kuyu başına 1 µg /ml olacak şekilde difteri toksini uygulandı. Belirli zamanlardaki inkübasyonu sonrası hücreler kaldırılarak 700 x g 5 dak. süre ile santrifüjlendi. Hücre peletleri, % 0.5 Triton X-100, 1 mM PMSF, 10 mM Tris-HCl, pH:7.4 varlığında lize edildi. Lizatlar 15 000 x g. 15 dak. santrifüj edildi. Üst sıvılar alınıp -80 °C' de saklandı.

3.2.2.5. Poliakrilamid Gel Elektroföresi (SDS-PAGE)

Difteri toksini ile farklı zaman dilimlerinde bekletilen hücre lizatları ve çalışmanın diğer aşamalarındaki protein örneklerinin SDS-PAGE analizleri Laemli yöntemine göre yapıldı (51). Sonrasında bağışık emdirim analizleri yapılacak olan

örnekler için çift taraflı jel çalışıldı. 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. Elektroforez sonrası, proteinler Coomassie parlak mavisi ile oda sıcaklığında bir saat süre ile boyandı. Bağışık emdirim ile analizi yapılacak olan jel örneği boyanmadı. Boyama sonrası jel 45 dakika boya çıkarma eriyiği içinde bekletildi. Bu sayede, fazla boya jelden atılarak proteinlerin görüntülenmesi sağlandı. Daha sonra boyanan jel, altta 3MM Whatman kağıdı, üstte saran streç film olmak üzere jel kurutucuda vakum uygulanarak 80° C’de 1 saat süre ile kurutuldu.

3.2.2.6. Bağışık Emdirim Yöntemi

SDS-PAGE sonrası bağışık emdirim analizi (52) yapılacak olan boyanmamış jel büyüklüğünde nitroselüloz membran kesilerek 30 saniye süre ile aktarım tamponunda bekletildi. 3MM Whatman filtre kağıtları da aktarım tamponu içinde ıslatıldı. Jel; nitroselüloz membran ve 3MM Whatman filtre kağıtları arasına yerleştirilerek sandviç modeli şeklinde aktarım tamponu ile yüzeyi ıslatılmış olanyarı kuru emdirim(semi-dry blotting) cihazına yerleştirildi. Oluşurulan düzenek, 45 dakika süreyle 200 mA şiddetinde akıma tabi tutularak aktarım işlemi gerçekleştirildi. Aktarımdan 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 üç kez yıkandıktan sonra çalışmanın amacı için uygun olan olan 1.antikor 1:500 TBST-BSA ile seyreltilerek oda sıcaklığında iki saat çalkalandı. Membran TBST çözeltisi ile üç kez yıkandı. Alkalen fosfatazla birleşik, 2.antikor olan immunglobulin G, 1:1000 oranında TBST-BSA ile seyreltilerek ortama eklendikten sonra membran bir saat oda sıcaklığında çalkalanarak bekletildi. Tekrar TBST çözeltisi ile üç kez yıkandı. Alkalen fosfataz substratı BCIP (150 µg/ml) ve NBT (300 µg/ml) substrat tamponu içinde çözüldükten sonra ,membrana bu eriyik ile muamele edildi. Karanlıkta çalkalanarak bantların oluşması sağlandı. Membran, durdurma çözeltisi içine alınarak tepkime durduruldu. Alkalen fosfataz yerine HRP sistemi de benzer biçimde kullanıldı.

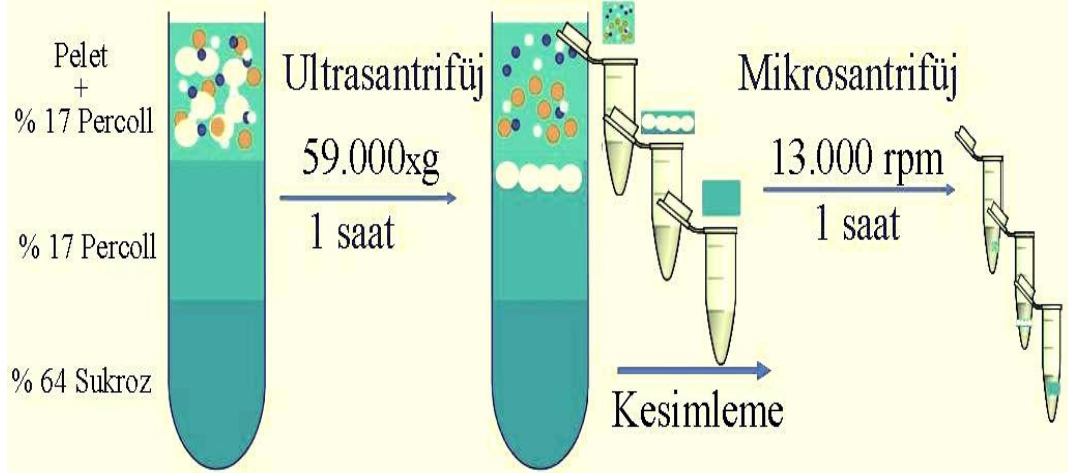
3.2.2.7. İmmünfloresan Çalışmalar

HUVEC hücreleri 6 kuyuluk kültür flasklarına kuyu başına 1×10^6 hücre olacak şekilde 1 ml DMEM F-12 medyum içinde yuvarlak “coverslip” lameller üzerine önceden ekildi. Böylece lameller üzerine yapışıp yayılması sağlandı. Ertesi gün,

kuyulara CD (2 μ M), NH_4Cl (10 mM) , DT (0.8 μ M), farklı ve aynı kuyuda beraber olacak şekilde belirli inkübasyon süreleri ile hücrelere uygulandı. Hücreler, membran geçirgenliğini arttırmak amacı ile 30 dak. % 0.1'lik Triton X-100-PBS içerisinde bekletildi. Ardından PBS ile 3 kez yıkama yapıldı ve bu işlem her bir aşamanın sonunda tekrarlandı. Hücreleri sabitlemek amacı ile hücreler % 2'lik paraformaldehit-PBS (Sabitleme Eriyiği) içinde 4°C' de 1 saat bekletildikten sonra, hücre içi FA ve endozom konumunu belirlemek amacıyla özgün antikorlar (anti-FA ve EEA1), 1:1000 oranında PBS-BSA içinde seyreltilerek 1 saat süre ile uygulandı. Erken endozom için, (anti-fare FITC işaretli IgG), FA için, (anti-tavşan FITC işaretli IgG) 2. antikor 1:2000 oranında seyreltilerek kullanıldı. Hücreler 1 saat inkübasyon sonrası, DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) damlatılan lam üzerine kapatılarak floresan mikroskopta (Olympus BX51) incelendi. Görüntüler, Olympus DP-72 kamera sistemi ve DP2-TWAIN yazılım programı ile fotoğraflandı. Çalışmada kullanılan floroforların uyarılma-salım değerlerine göre floresan mikroskopta Olympus U-25ND25 ve U-25ND6 filtreleri kullanıldı. Bu değerler DAPI için uyarılma 345 nm salım 458 nm, FITC için uyarılma 494 nm, salım 518 nm, TRICH için uyarılma 554 nm, salım 576 nm, olarak belirlendi. Aynı işlemler HUVEC hücrelerine toksin verilmeden önce aktin iskeletini yıkmak amacı ile kuyu başına 2 μ M sitokalesin D verilip 15 dak. inkübe edilerek tekrarlandı.

3.2.2.8. Hücreden endozom kesimlenmesi

Endozomların kesimlenmesi (53) için HUVEC hücreleri (5×10^6) homojenleştirme çözeltisi (0.25 M sukroz, 78 mM KCl, 4 mM MgCl_2 , 8.4 mM CaCl_2 , 10 mM EGTA, 50 mM HEPES–NaOH pH 7.0, 10 μ g/ml aprotinin, 1 μ M/ml pepstatin A, 0.5 μ g/ml leupeptin) içinde teflon uçlu homojenizatör ile parçalandı. Homojenat 5 dak. 1000 x g'de santrifüjlenerek çekirdeklerin çöktürülmesinin ardından üst sıvı 5–20 % Optiprep (Axis-Shield) kesintisiz gradiyenti üzerine yayıldı ve 19 saat 90.000 x g'de santrifüjlendi. Gradyent hazırlanması sırasında üretici firmanın S23 numaralı protokolü takip edildi. Gradyent kesimleri tüp üzerinden aspire edilerek (0.5 ml) toplandı. En düşük yoğunluk gradiyenti (1.064–1.04 g/ml iyodiksanol) bölgesinden elde edilen kesimdeki erken endozomların varlığı EEA1 antikorunun varlığında bağışık emdirim yöntemi ile analiz edildi.



Şekil 3-3: Endozom kesimlenmesinin şematik görüntüsü.

3.2.2.9. ADP Ribozillenme

ADP-ribozillenme 25 µl'lik (50 mM Tris-HCl, pH: 7,4, 7 mM ME, 5 µM [adenozin-14C]NAD ve 120 µg/ml DT içeren) tepkime ortamında 10 dakika 20°C'de gerçekleştirildi. İnkübasyon sonrasında 5 µl'lik örnekler GF/A Whatman filtrelerine uygulanarak soğuk TCA ile yıkandı. Kurutma işlemi sonrası filtreler, 5 ml 2,5-difeniloksaloz (PPO) içeren toluol cam şişelere yerleştirildi. TCA çöktürülmüş radyoaktivite sıvı sintilasyon sayacında (Packard TriCarb1000 TR) belirlendi.

ADP-ribozillenme gerçekleştirilerek eEF-2 miktarı aşağıdaki eşitlik ile hesaplandı:

$$\text{pmol} = \text{cpm} \times 100 / [(2.22 \times (\text{özgün etkinlik}) (\%) \times \text{sayım verimi (Ci/mol)})]$$

3.2.2.10. Protein Sentezi (poli-Phe Sentezi)

In vitro protein sentezi (poli-Phe), 19 pmol ribozom, 30 µg/ml eEF1 proteini, 40 µg eEF2 proteini, 100 µg/ml polyU, tRNA (*E.coli*) (300 µg/ml) toplam tepkime hacmi 50 µl olacak şekilde gerçekleştirildi (54). Tepkime sırasında DE52 kullanılarak kesimlenmiş (*E.coli*) S-130 proteini aa-tRNA sentetazların kaynağı olarak kullanılarak 2 µM [¹⁴C]Phe, 6 mg/ml kreatin kinaz, 6 mM kreatin fosfat, 1.5 mM GTP ve 1.5 mM ATP içerir. İnkübasyonlar 3 dakika 37°C'de gerçekleştirildikten sonra örnekler 5 dak. 90°C'de TCA yıkaması yapılarak radyoaktif ölçümden gerçekleşen sentez miktarı hesaplandı.

3.2.2.11. Toksini Floreseinizotiyosiyanat (FITC) ile etiketleme

Difteri toksininin hücre ve dokuda aktin iskeleti ile olan etkileşimini göstermek üzere toksin, FITC floroforu ile etiketlendi. FITC 2 mg/ml anhidroz dimetil sülfoksitte (DMSO) içersinde çözüldü. Karbonat tamponunda FITC'nin uyarılma-salım (eksitasyon-emisyon) değerleri floresan spektrofotometresi (Perkin Elmer, LS -5) ile test edildi. DT-FITC konjüгатı, 5 µM FITC, 20 µg DT, 500 mM karbonat tamponu; pH: 9, içersinde oda sıcaklığında 1 saat bekletilerek hazırlandı. Konjüгатın bulunduğu karbonat tamponu, DT'ne bağlanmayan FITC moleküllerini uzaklaştırmak amacı ile saklama tamponuna karşı, gece boyu GEBAflex marka 250 µl'lik tüpte diyalizlendi. Diyaliz öncesinde ve sonrasında toksin-FITC etkileşimi, floresan spektroskopisinde uygun dalga boyunda (496 nm - 520 nm) uyarılarak FLWINLAB bilgisayar programı aracılığı ile gösterildi.

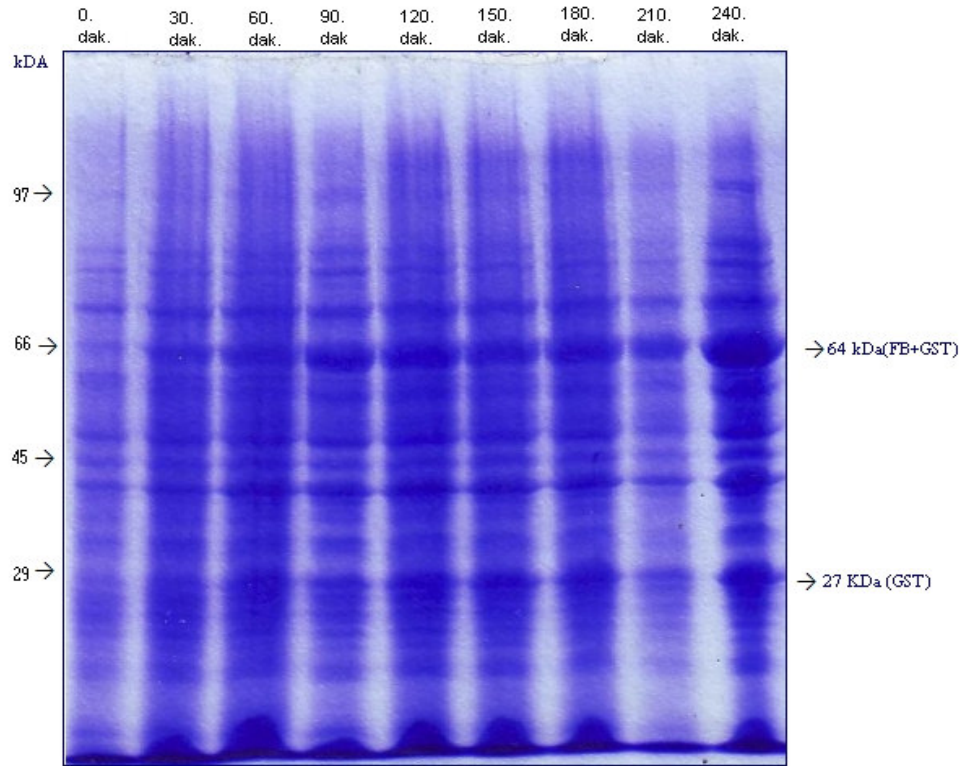
Tablo 3-7: Floresan boyaların uyarılma - salım değerleri.

<u>Florofor</u>	<u>Uyarılma</u> (nm)	<u>Salım</u> (nm)	<u>Sönme kats</u> ($\times 10^3 M^{-1} c$)
DAPI	345	458	27
FITC	494	518	67
TRICH	554	576	67
Alexa Fluor 594	581	609	90

4. BULGULAR

4.1. FB'nin Klonlanması

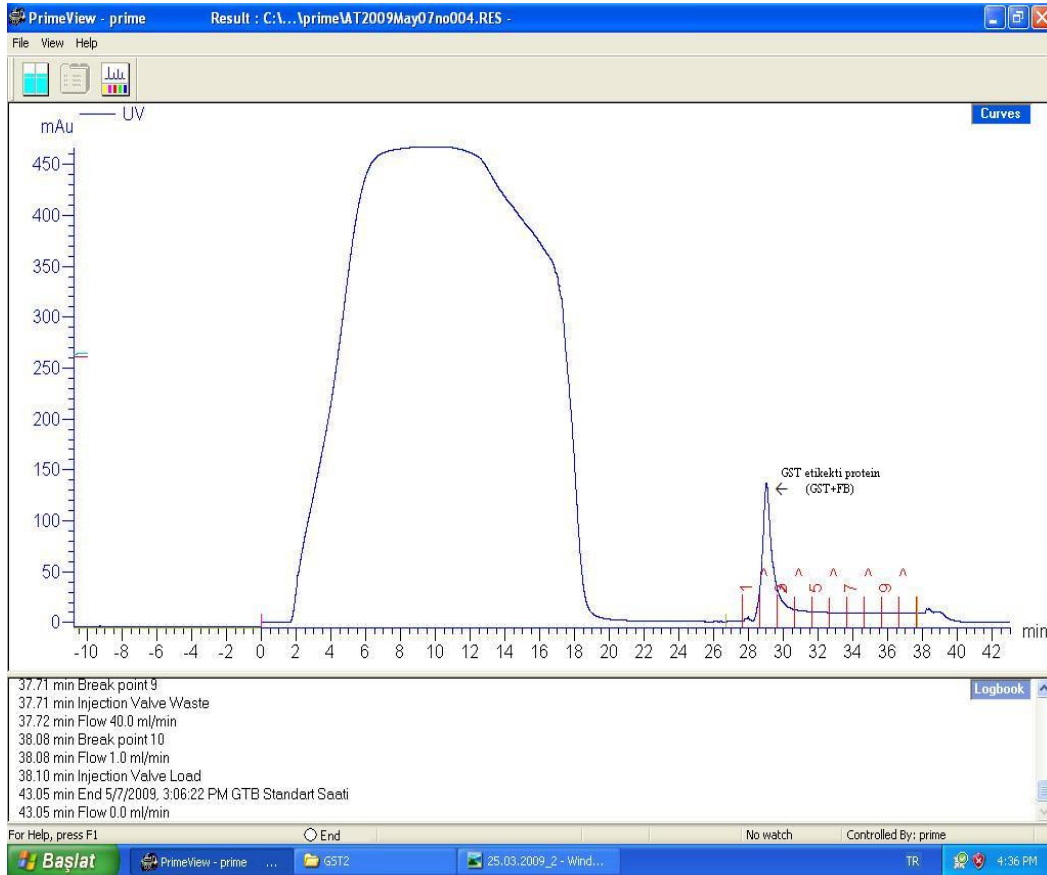
Difteri toksinin FB parçası Gereç ve Yöntemler bölümünde anlatıldığı şekilde klonlandı. Kimerik protein (FB+GST) sentezi için IPTG derişimi (1 mM) kullanılarak gerçekleştirildi. Her yarım saatte bir örnekler % 12'lik SDS-PAGE jel elektroforezinde standart belirteçler ((fosforilaz b (97 kDa), BSA (66 kDa), yumurta albumini (45 kDa) ve karbonik anhidraz (29 kDa)) varlığında boyama sonrası gösterildi (Şekil 4-1). İki ve üç saatlik bakteri üst sıvılarından protein saflaştırılmasına geçildi.



Şekil 4-1: GST-FB kimerik protein.

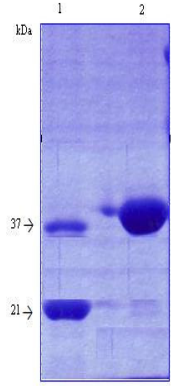
Kimerik FB proteininin bulunduğu 64 kD'luk bölge, zamana bağlı IPTG derişimin protein sentezine etkisi. (20 µl bakteri özütü jele yüklendi).

Rekombinant proteinlerin saflaştırılmasında yararlı olabileceği düşünülen Glutatyon-S-Transferaz (GST), kimerik gen ürünlerini elde edebilmek için BL21-Gold adlı *E-coli* protein ekspresyon hücre soyuna transfekte edildi. Transfeksiyon için ısı şoku “heat shock” yöntemi kullanıldı. Rekombinant protein, AKTA prime plus kromatografi cihazında, afinite kromatografisiyle (GSTrap 4B) saflaştırıldı (Şekil 4-2). Elde edilen 67 kDa’luk kemirik protein, trombin (trombin kit-Novogen) ile kesilerek moleküler elek (jel filtrasyon) kromatografisinden (Hi Prep 16/60 Sephacryl S-200) ayrıştırıldı. Kromatografik işlem, fosforilaz b (M_r 97 kDa), BSA (M_r 66 kDa), ovalbumin (M_r 45 kDa), karbonik anhidraz (M_r 29 kDa) ve GST (M_r 21 kDa) gibi moleküler ağırlık belirteçleri varlığında gerçekleştirildi. Yaklaşık 37 kDa ağırlığındaki FB, elektroforez ve bağışık emdirim yöntemiyle gösterildi (Şekil 4-3).



Şekil 4-2: GST-FB kimerik proteininin affinite kromatografisi ile saflaştırılması.

GSTrap 4B (1ml). Kolona yüklenen özüt (1 ml).



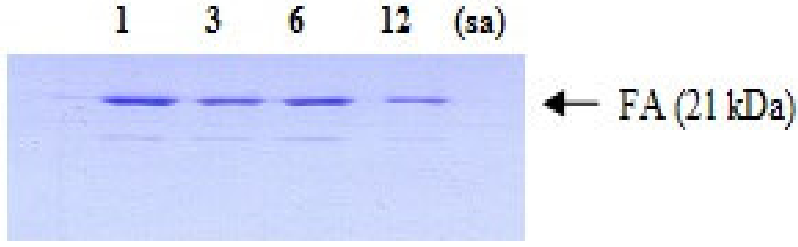
Şekil 4-3: FB'nin elektroforetik analizi.

1. Trombin ile kırılan kimerik protein (2 µg). 2. Jel filtrasyon sonrası FB (5 µg).

Ticari olarak FB antikorı bulunmadığından, FB ile immünolojik çalışmalar yapılamamaktadır. Saflaştırılan FB kullanılarak tavşanlarda anti-FB geliştirilmesi ve bu antikorlar kullanılarak her türlü immünolojik yöntem (WB, IH, IF, ELISA) kullanılarak *in vivo* çalışmalar yapılabilir. Yeni nesil sentetik peptit aşı üretimi, anti-kanser ilaçların endositik yolla hücre içersine taşınmasında modifiye toksin model sistem olarak kullanılabilir.

4.2. HUVEC Hücre Soyunda Difteri Toksininin Etkisi

Difteri toksinine duyarlı HUVEC hücreleri, farklı zaman dilimlerinde (1, 3, 6, 12 saat) toksin etkisini incelemek amacı ile standart kültür koşullarında yetiştirildi. Toksine etkisinde kalan hücreden daha önce Gereç ve Yöntemler bölümünde anlatıldığı şekilde lizatlar hazırlandı. SDS-PAGE ve sonrası bağışık emdirim yöntemi kullanılarak toksin enzimatik parçası FA'nın hücre içi dayanıklılığına bakıldı (Şekil 4-4). FA'nın hücre içerisinde oldukça dirençli olduğu gözlemlendi. 12. saatteki azalma, serbest FA'nın F aktinle etkileşime girdiğini düşündürmektedir (19).

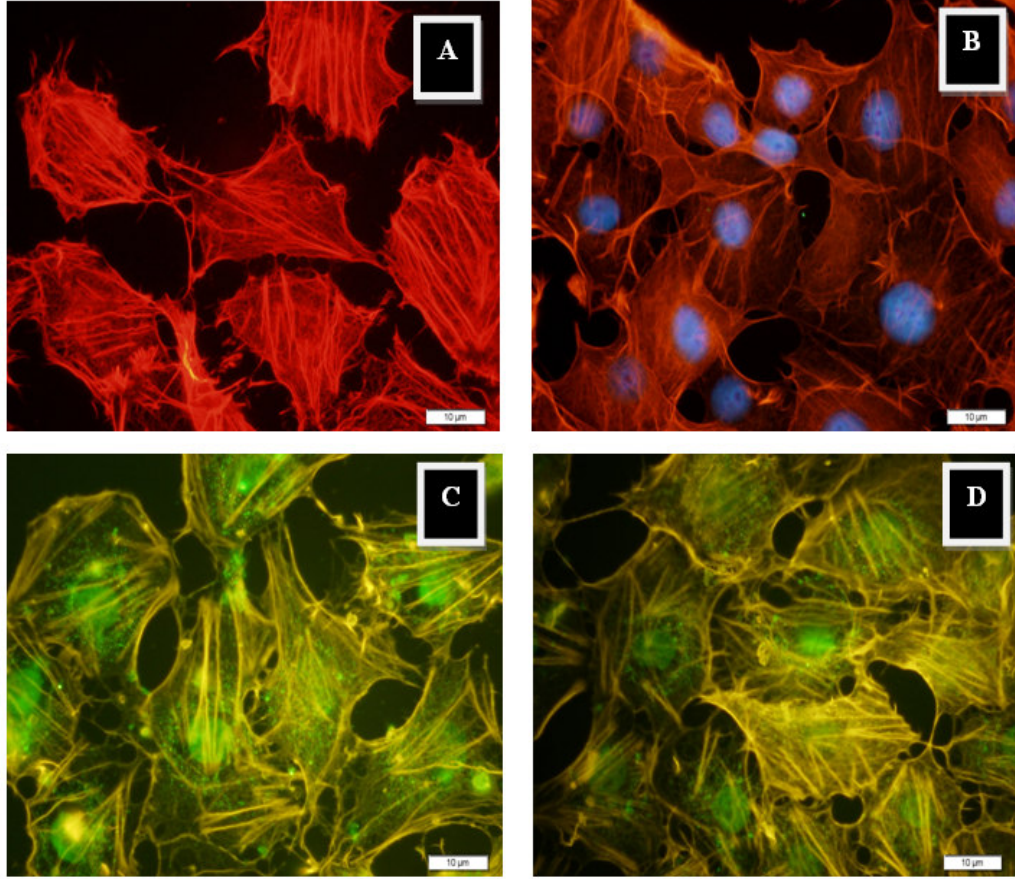


Şekil 4-4: Difteri toksininin hücre içi kalımlılığı.

1 µg /ml DT varlığında hücreler 400 µl liziz çözeltisinde parçalandı ve 5 dak. 700 xg. santrüfuj sonrası üst sıvı (S07) alındı. Üste, SDS/PAGE (5 µl özüt). Altta, anti-FA varlığında bağışık emdirim.

4.3. Aktin İskeleti, Erken Endozomlar ve Difteri Toksininin Floresan Görüntülenmesi

Görüntüleme çalışmaları için toksine duyarlı ve yüzeye yapışan HUVEC hücreleri kullanıldı. Hücrelere (10^6) DT 0.8 nM, sitokalesin D (2 µM) ve NH_4Cl (10 mM) Gereç ve Yöntemler bölümünde anlatıldığı biçimde uygulandı ve hücre içinde görüntülemek üzere aktin (falloidin-TRICH), endozom (EEA1)-FITC ve toksin (anti-FA)-FITC ile boyanarak uygun filtrelerle floresan mikroskopta görüntülendi (Şekil 4-5). Erken endozom ve FA'nın görüntülerinin perinükleer bölgede çakıştıkları görüldü. Bu bulgu, yarım saat sonunda FA moleküllerinin büyük oranda endozomların içersinde olduklarını gösterdi.



Şekil 4-5: Aktin, endozom ve FA'nın hücre içi görüntüsü.

Toksin 0.8 μ M 30 dak. inkübasyon. (A). Aktin boyama falloidin-TRICH. (B). Aktin boyama falloidin-TRICH, çekirdek boyama DAPI. (C). Endozom boyama anti-tavşan IgG-FITC ve aktin boyama falloidin-TRICH. (D). Toksin (anti-FA)-FITC ile boyama, (büyütme x100).

4.4. Sitokalesin D ve Amonyumklorür Etkisinde FA Dağılımı

CD'nin hücre içindeki FA dağılımına etkisini floresan mikroskopunda araştırıldı. DT fragment A'nın kontrol hücrelerinde düzgün dağılıma sahip olduğu gözlenirken FA(DT) yüklü erken endozomların, hücre sınırları içinde difüze olmuş FA işaretli sitoplazmik sis tabakasıyla beraber nükleus çevresinde yayıldıkları görüldü (Şekil 4-6A). Sitokalesin ilavesi FA (DT) pozitif erken endozomların yayılım şeklinde radikal bir değişikliğe yol açarak, onların genişlemesine (şişmesine) ve ağırlıklı olarak nükleusun tek bir kutbuna agregasyonuna neden olduğu görüldü (Şekil 4-6B). Bunun

sonucunda ayrıca sitoplazmik FA'nın azaldığı gözlemlendi. Bu bulgular daha sonra erken endozomların morfoloji ve hücre içi yayılımları ile serbest FA ile karşılaştırıldı. Sonuçta endozomların içine alınmış DT lizozomotropik amin, (amonyumklorür) varlığında erken endozomların içinde hapsedilerek taşınmasına neden olmaktadır (55,56). CD varlığında ve yokluğu FA (DT) pozitif erken endozomlarda genişleme ve perinükleer yığılmanın çok belirginleştiği görüldü (Şekil 4-6 C,D).

4.5. Endozomlardan FA Salınımına CD ve Amonyumklorür Etkisi

DT, amonyumklorür ve CD'nin erken endozomların, morfoloji ve hücre içi dağılımına etkileri özgün antikor, EEA1 (erken endozom antijeni) kullanılarak araştırıldı. Erken endozomal veziküllerin şişmesi, DT'nin erken endozomlardan salınımını artırdığı bulundu. Bu daha önceki farklı grupların çalışmaları ile uyumluydu (57) (Şekil 4-7 A,B).

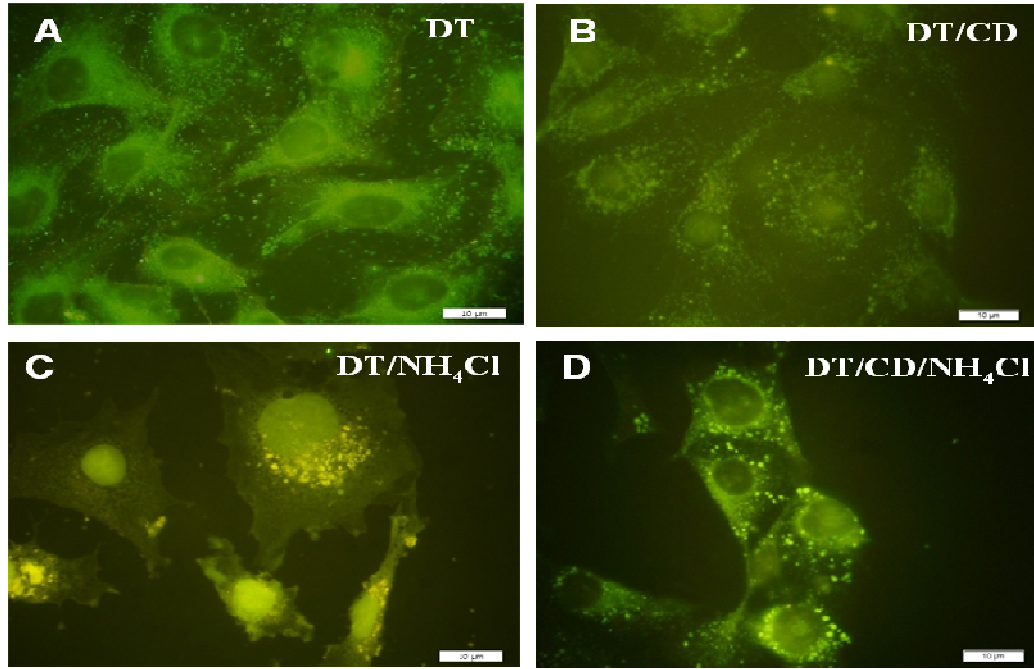
Ayrıca DT, erken endozomların perinükleer alana lokalize olmalarına neden oldu. CD ve amonyumklorür ilavesi ile hücrelerde DT verilmiş hücrelerin ortalama boyutlarının arttığı ve buna ek olarak erken endozomların perinükleer kutba birikimini teşvik ettiği gözlemlendi. Bu değişiklikler bu üç ajanın birlikte uygulanması ile daha belirgin hale geldi. (Şekil 4-7 C,D,E,F,G)

4.6. Hücre İçi FA Etkinliği

Başlangıçta yüksek DT varlığında (≥ 1 nM), CD uygulamasının sitozolik kesimlerde (S120), FA'ya özgü ADP-riboziltransferaz etkinliğine büyük bir etki yapmadığı belirlendi. Bununla beraber, hücre içinde çok az miktarda DT bile protein sentezinde inhibisyona sebep oldu. Endozomal kargo trafiğindeki küçük bir sızıntı CD'nin FA etkinliği üzerinde de muhtemelen inhibitör etki gösterebilir (58,59). CD uygulanmasından dolayı ölümcül dozda toksinin hücre içinde oluşan etkisini, düşük toksin düzeyinde de (ADP-riboziltransferaz etkinliğinde inhibisyon oluşturup oluşturmadığını) görmek istedik. Deneyler 10^6 hücrede 15 pM and 150 pM DT varlığında tekrarlandı. Bu deneylerde, fazla miktarda eEF2 varlığında direk ADP-riboziltransferaz (FA) etkinliği, serbest eEF2 üzerinde ADP-riboz alıcı bölge ya da ADP-Ribozillenmeden kalan eEF2'nin sentez aktivitesi (poli-phe) ile saptandı. FA

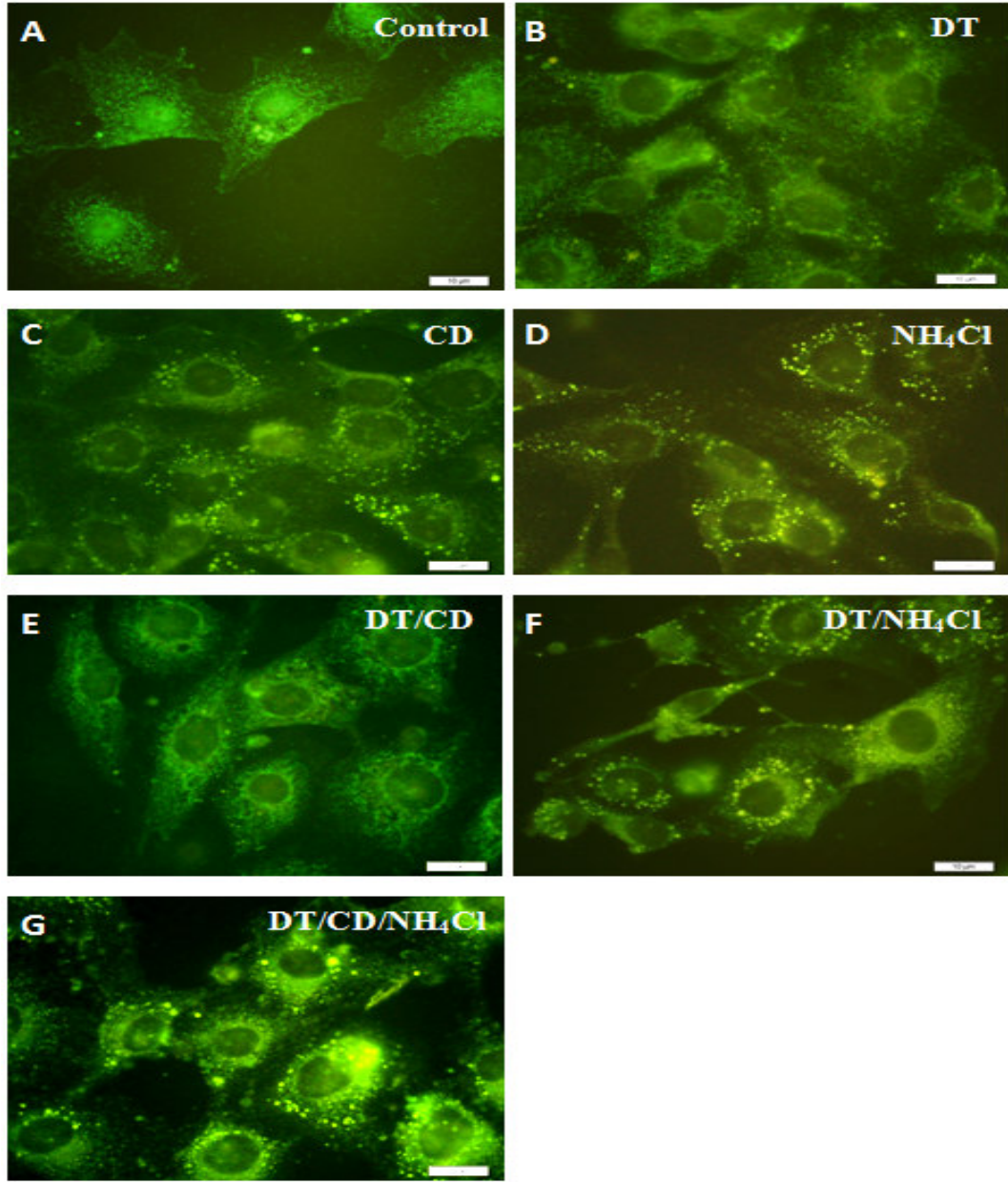
aktivitesi tersine olarak eEF2 üzerinde serbest ADP-Ribozil alıcı bölge ya da poli-phe sentez sisteminde sınılandı (Şekil 4-8 B,C). ADP-ribosyltransferase reaksiyonda olduğu gibi, FA etkinliği de, toksinli ve kontrol hücrelerin sitozolik kesimlerinde (S120) doyuma ulaştı (Şekil 4-8 A). CD'den dolayı iskeleti yıkılmış ve 15 pM DT'ye maruz kalmış hücrelerin sitosolik kesimlerinde FA etkinliği yaklaşık % 65 düzeyinde saptandı. Öte yandan, sırasıyla 15 ve 150 pM DT varlığında hücrelerin sitozolik kesimlerinin üç saat inkübasyondan sonra ADP-riboz alıcı (akseptör) bölgelerin % 35 ve % 75 oranında azaldığı görüldü (Şekil 4-8 B). CD etkisinde etkinlikte sırasıyla yaklaşık % 15 ve % 60 azalma gözlemlendi. Bu sonuçlarla CD'nin FA üzerindeki etkinliği düşük toksin derişimlerinde de kanıtlanmış oldu. Benzer sonuçlar poli-phe sentezinde (eEF2 protein sentez etkinliği) de elde edildi (Şekil 4-8C).

Sitozoldeki (S5) FA etkinliği CD varlığında % 20 düzeyindeyken NH_4Cl ile % 70 seviyesine çıktığı belirlendi (Şekil 4-9).



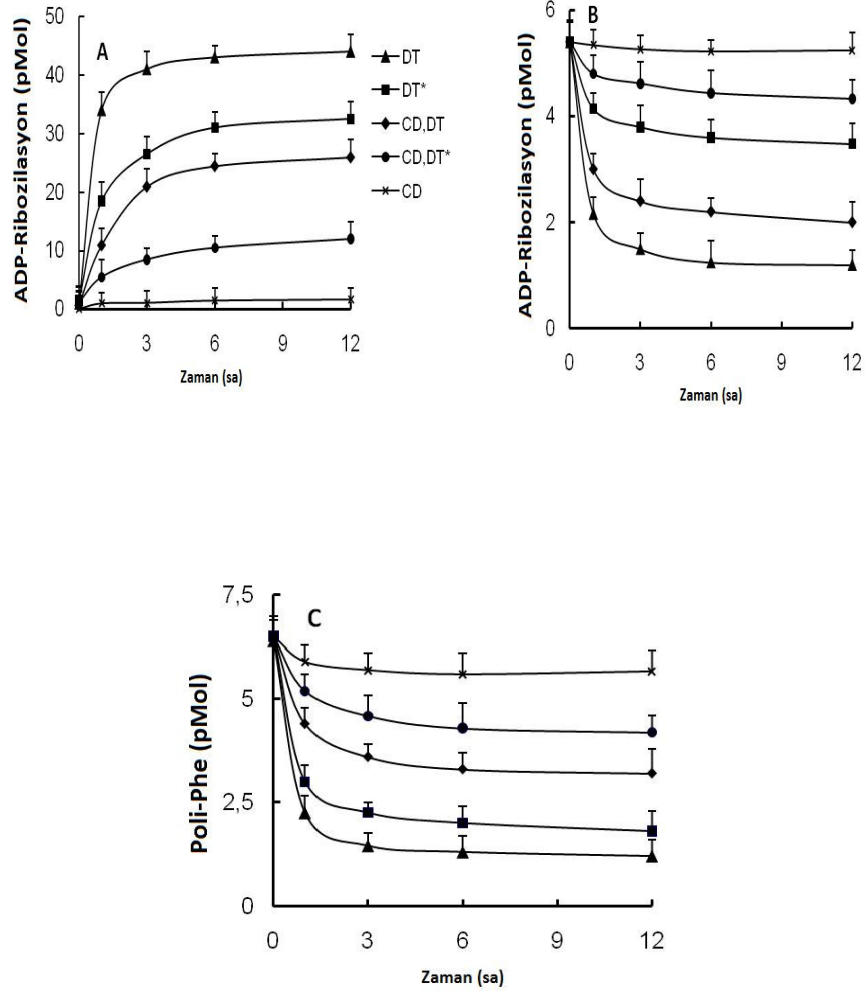
Şekil 4-6: Hücrelerde DT (FA) dağılımı ve morfolojisi.

Toksin (0.8 μM), CD (2 μM), amonyumklorür (10 mM) ve 20 dak. inkübasyon. (A). DT ile muamele edilmiş hücreler (kontrol). (B). DT, CD. (C). DT, amonyumklorür. (D). DT, CD, amonyumklorür varlığında hücre içi FA dağılımı. Erken endozomların ölçülen çap değerleri (200 ölçüm ortalaması): (A), $0.68 \pm 0.29 \mu\text{m}$; (B), $0.89 \pm 0.35 \mu\text{m}$; (C), $1.92 \pm 1.2 \mu\text{m}$; (D), $1.4 \pm 0.95 \mu\text{m}$. (büyütme x100).



Şekil 4-7: Erken endozomların hücre içi morfolojileri ve dağılımları.

Toksin (0.8 μ M), CD (2 μ M), amonyumklorür (10 mM) ve 20 dak. inkübasyon. (A). DT yokluğunda. (B). DT varlığında, (C). CD varlığında, (D). amonyumklorür varlığında, (E). DT ve CD varlığında, (F). DT ve amonyumklorür varlığında, (G). DT, CD ve amonyumklorür varlığında. Erken endozomların ölçülen çap değerleri (en az 200 ölçüm): $0.48 \pm 0.25 \mu$ m (A); $0.83 \pm 0.39 \mu$ m (B); $1.17 \pm 0.82 \mu$ m (C); $1.4 \pm 0.75 \mu$ m (D); $0.87 \pm 0.52 \mu$ m (E); $1.51 \pm 0.80 \mu$ m (F); $1.66 \pm 1.1 \mu$ m (G). Ölçüm aralığı: 10 μ m.

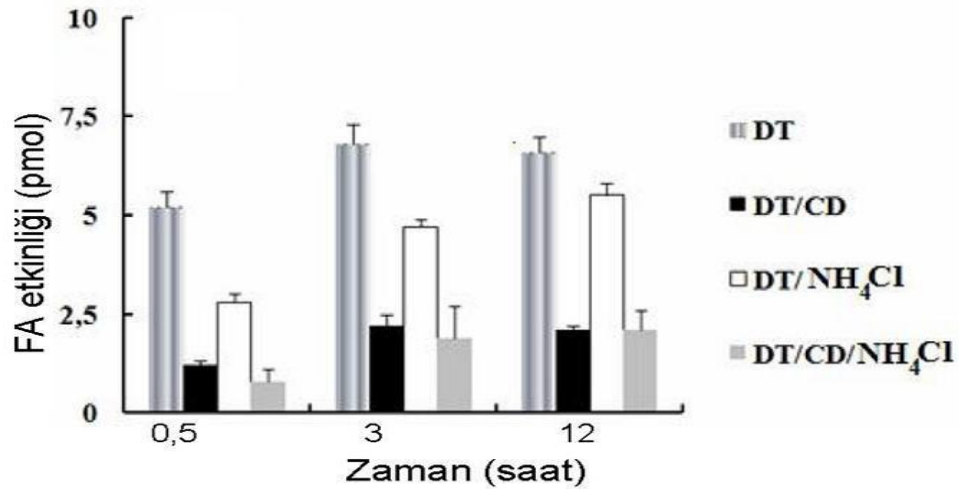


Şekil 4-8: CD etkisindeki hücrelere DT uygulaması sonrası sitozolik FA etkinliği.

HUVEC hücreleri öncesinde 2 μ M CD verildikten yarım saat sonra sırasıyla, 15 pM ve 150 pM DT varlığında 20 dak. inkübe edildi. (A). FA (ADP-riboziltransferaz) etkinliği. (B). serbest ADP-ribozun bağlandığı bölge. (C). poli-Phe sentezinde protein sentez aktivitesi (eEF2 aktivitesi). (×-×), CD (2 μ M); (▲-▲), DT (150 pM); (■-■), DT* (15 pM); (◆-◆), CD, DT (150 pM); (●-●), CD, DT* (15 pM).

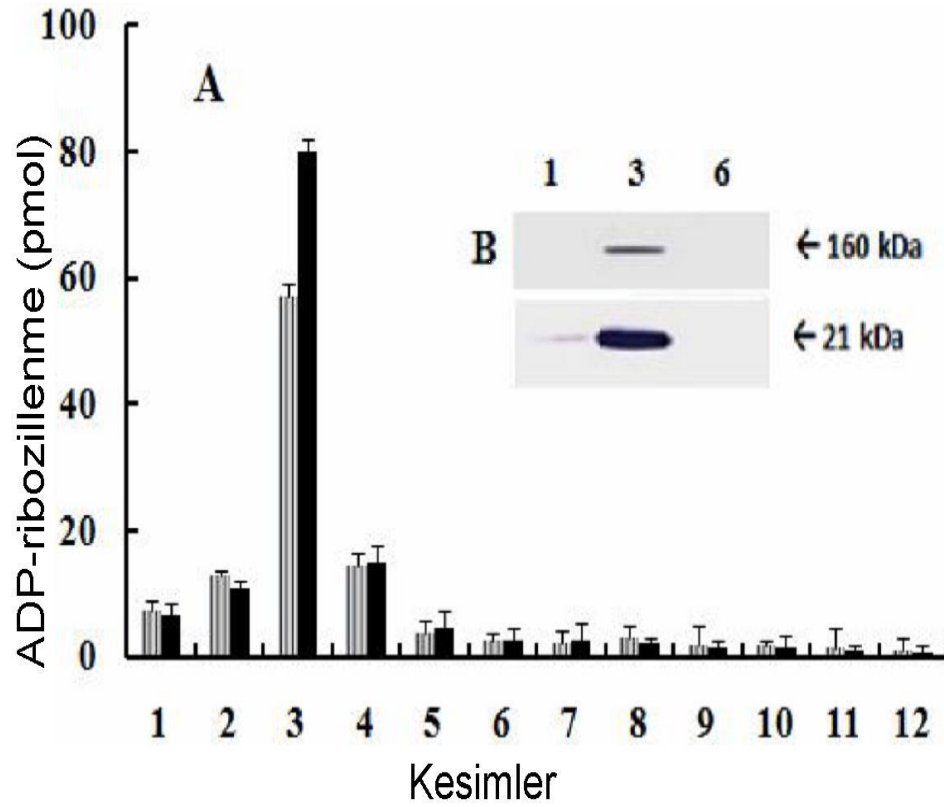
4.7. Endozomlarda FA Etkinliği (*in vitro*)

DT yüklü erken endozomlar P07 başlama kesimi izolasyon prosedürü (yoğunluk gradienti denge santrifüjü) ile saflaştırıldı (53). Bunun yanı sıra, aktin iskeleti sağlıklı ya da hasarlanmış, aynı zamanda DT ile infekte edilmiş hücrelerdeki endozomlar saflaştırılarak *in vitro* FA etkinliği saptandı. İskeleti yıkılmış hücrelerde, endozomal FA etkinliğinin % 20 kadar yüksek olduğu belirlendi (şekil 4-10 A). Endozomlar ve ierlerindeki FA bağışık emdirim yöntemi ile belirlendi (şekil 4-10 B).



şekil 4-9: Sitosolik (S5) kesimde FA etkinliği.

DT (750 pM) toksine ek olarak 2 μ M CD, 10 mM NH₄Cl ayrı ayrı ve birarada belirtilen sreler boyunca bekletilen hücreler homojenize (400 μ l) edildikten sonra 5 dak. 5000 x g'de santrifüjlenerek üst sıvı (S5) ayrıştırıldı ve FA etkinliği (20 μ l özüt) belirlendi.



Şekil 4-10: Toksin ve CD uygulanmış hücrelerden yoğunluk gradiyenti denge santrifüjü sonrası endozom kesimleme ve FA'nın ADP-riboziltransferaz etkinliği.

(A). Gri sütunlar yalnız difteri toksini uygulanmış, siyah sütunlar sitokalsin D ilave edilen hücrelere ait endozomlardaki ADP-ribozillenme. (B). Bağışık emdirim ile toksin uygulanan erken endozomların ve içersindeki FA'nın gösterimi. (1, 3 ve 6 kesim no) EEA1 (160 kDa) ve FA'nın (21 kDa) tespiti. Endozomlar % 1 Triton X-100 varlığında parcalandı (400 µl). ADP-ribozilasyon için 20 µl, elektroforez için 10 µl (20 µg endozomal protein karışımı) örnek kullanıldı.

4.8. Endozomlarda FA Salınımı (*in vitro*)

DT (0.8 nM) etkisindeki hücrelerden elde edilen erken endozom kesimindeki ve dışarı salınan FA etkinliğini test etmek için ADP-ribozilleme etkinliği bakıldı. Endozomlar, FA ile etkileşen ve salınımını yönlendiren bileşenler (Triton X-100, asidik ortam, sitokalesin D) ile 10 dak. bekletildikten sonra 20 dakika 15.000 xg'de santrifüj edilip ortamdan uzaklatırıldı. Üst sıvılardaki FA etkinliği, doygun miktardaki eEF2 (20 pmol) ve [¹⁴C]NAD eklenen ortamda saptandı. Endozomlardan FA salınımı eEF2 ve F-aktin varlığında kontrole göre %300 artış göstermektedir (Tablo 4-1).

Tablo 4-1: Erken endozomlardan *in vitro* FA salınımı. Toksin etkisinde kalan hücrelerden saflaştırılan endozom kesiminden 20 µl alınarak, farklı parametrelerin (Triton X-100, % 1; asidik ortam, pH 5.5; sitozol, 20 µl; F-aktin, 2 µM; G-aktin, 2 µM; eEF2, 0.8 µM) varlığında, 30 dak. inküasyon sonrası 15 000 x g. 20 dak. santrifüj ve 20 µl örneğin ADP-ribozilleme yeteneği test edililerek endozom dışına salınan FA saptandı.

Eklenen bileşenler/Uygulamalar	ADP-ribozillenme (pmol /20 pmol eEF2)
Sadece erken endozomlar (Kontrol)	2.8 ± 0.6
+ Triton X-100	12.7 ± 0.7
+ Düşük pH	10.4 ± 0.4
+ HUVEC sitosol (S15)	4.7 ± 0.3
+ HUVEC-Sitokalesin D sitosol (S15)	3.6 ± 0.3
+ F-aktin	5.9 ± 0.2
+ G-aktin	4.6 ± 0.4
+ eEF2	6.8 ± 0.5
+ eEF2, + F-aktin	9.6 ± 0.6
+ eEF2, + G-aktin	6.7 ± 0.4

5. TARTIŞMA

Sınırlı bir proteolitik sindirim ve S-S bağının indirgenmesiyle difteri toksini iki parçaya ayrılmaktadır. Toksinin N-terminal bölümüne karşılık gelen (FA) olarak adlandırılan parça kesim A ADP-riboziltransferaz etkinliğine sahiptir. Buna karşın, kesim B (FB) holotoksinin hücreye bağlanmasını sağlamaktadır. Toksinin ikinci aşamada endositik bir süreçte iki parçaya ayrılmasından sonra FA sitoplazmaya ulaşmaktadır (57,60). Uzun süredir FA'nın eEF2'ye özgü ADP-riboziltransferaz etkinliğinin ve FA'nın neden olduğu sitotoksitenin öncelikli ve hatta tek sebebinin protein sentezini durdurma olduğu kabul edilmektedir. Buna karşılık, FA'nın yönlendirmesi ile protein sentezinin durduğu fakat hücre ölümü ile sonuçlanmayan hücre soylarının olduğu bilinmektedir. Bu bulgular difteri toksininin sitotoksik etkisinin yalnızca protein sentezinin durmasıyla açıklanamayacağını, protein sentezinin durmasının sitotoksik süreçteki önemli ancak tek aşama olmadığını düşündürmüştür. DT'nin protein sentezini durdurmanın yanı sıra, hücre iskeletinin yıkılmasına (11) ve internükleozomal DNA'nın kırılmasına da neden olduğu bilinmektedir (61).

Bu çalışmada toksinin B fragmenti (FB) klonlanmış olup poliklonal antikor elde edilmesi düşünülmektedir. Bunun için ön çalışmalar başlatılmıştır. Henüz ticari üretimi olmayan anti-FB üretildiğinde tanı kiti yapımında kullanılabilir. FB antikorları varlığında *in vivo* çalışmalar sonrası FB'nin hücre içi dağılımı görüntülenebilir. Hem FA hem de FB insekdiside klonlanarak aç-kapa sistemleri oluşturulabilir. Toksin parçaları hücre içersinde istendiği zaman, istenilen miktarda oluşturularak etkileri araştırılabilir.

Çalışmanın ikinci bölümünde, FA ile aktin arasındaki yakın etkileşim incelendi. Aktin iskeletinin yıkılmasının FA etkinliği üzerine etkisi ve CD uygulanmış hücrelerde FA dağılımı araştırıldı. Hücre içi FA dağılımının ve enzimatik aktivitesinin CD varlığında azaldığını gözlemlendi. Bu bulgular aktin filamentlerinin, erken endozmlardan sitozole FA salınımıyla ilişkisi olduğunu gösterdi. Fazla DT'nin endositik kompartmanlarda tutulduğu, ayrıca önceki çalışmalar doğrultusunda sitozoldeki FA salınımının bir adımı olduğu ortaya konuldu (62,63). Düşük DT varlığında CD'nin özellikle ölümcül etkisi kanıtlandı. F-aktinin iskeleti CD varlığında yıkılan hücrelerde sitozole FA salınımı önemli ölçüde baskılandığı belirlendi. Aktin

filamentin vesiküler trafikle ilişkisi iyi bilinmektedir (64-66) ve son zamanlardaki fotonik güç (force) mikroskobu sonuçları salgı vesiküllerinin aktin filamentlerine bağlı olduğunu göstermiştir (67). Bu bağ salgı vesiküllerinin transportu ve lokalizasyonun uygunluğunu sağlamaktadır. Aktin filamentlerinin yıkılması bu çalışmada sunulan verilere göre, bağda meydana gelen bozulmayla endozomal membranda FA translokasyonunda ve sonrasında katlanmada olabilecek bozulmaları da beraberinde getirir. Aktin filamentleri için böyle bir açıklama varsayarsak, sadece vesiküler trafik için değil aynı zamanda translokasyon işleminde de desteğinin olduğu görülür. Sunulan bu bilgiler bir yana diğer bulgulara göre (64,68,69) aktin ve Hsp90 etkileşimi belirli bazı hücrel reaksiyonların düzenlenmesinin kanıtıdır. Böylece aktin filamentleri erken endozomlarla beraber hücre içi bileşenleri de içeren etkileşimlere yapısal destek oluşturur. Hsp90 ve tiyoredoksin redüktaz (70) ve ayrıca ADP-ribozilltransferaz reaksiyonun substratı olan EF2 bu bileşenlere örnektir. F-aktinin, eEF2 ve FA ile etkileşim göstermesi (54) daha da önem kazanmaktadır. Endozomal etkileşimlerle ve/veya hücrel olaylara bağlı olarak değişim gösterebilen aktin molekülleri diğer hücrel olayların gerçekleşmesi için gerekli platformu oluşturur. Böylece, farklı filogenik alt yapılardan gelen patojenler farklı hücre bileşenlerini kendi sitotoksik etkilerini iletmek için bir araya getirebilir (71).

Sitozoldeki düşük FA derişiminin bugüne kadar gösterdiği yüksek patojenite önem arz etmektedir. Bu, negatif geri dönüşüm düzenlenmesinin sitozele çok az bir FA molekülünün salınımına izin veren yüksek etkisinin bir sonucudur. Bu FA molekülleri sitotoksik etki için yeterli değildir (58,59,71). Diğer yandan, ilk FA moleküllerinin salınımından kısa bir süre sonra, bir bileşen tüm DT yüklü erken endozomlarda daha çok FA molekülünün girişini durdurur. FA'nın enzimatik reaksiyonunun ürünü olan ADP-ribozillenen eEF2 düzenleyici etkiyi gösterir. Aslında ADP-ribozillenme *in vitro* FA salınımı azaltığı görünmektedir. Bu kısmi inhibitör etkisi henüz aydınlatılmamıştır. Bu nedenle biyolojik ilişkisi daha fazla aydınlatılmalıdır.

FA'nın sitozole girişi, DT dışında A-B tip toksinlerde görülen sitotoksik yol için tipik bir örnektir (71). Bu toksinlerin büyük bir kısmı tarafından kullanılan kaçamak yan yolak hücrenin içinde makromoleküllerin ana endozomal yolunu takip eder (64,71-75). Bu toksinler için, erken endozom bölümleri, geri dönüşümün gerçekleştiği ve ayrımın yapıldığı yerdir. Bu nedenle etraflarında kümelenmektedirler. Daha sonra parçalayıcı kargo olarak geç endozom ve ya lizozomal süreci başlatırlar. Bu işlemi sitozoldeki ER

yolu kullanmadan uygun bir şekilde gerçekleştirir (71). Böylece CD uygulaması bazı toksin molekülleri tarafından kullanılan bu kaçamak yolu bloke edilerek, bir şekilde gerçekte takip edilmesi gereken ana endozomal yolağa geri yönlendirebilir. CD uygulamasının erken endozomlarda perinükleer bölgede DT birikimine hangi mekanizmayla yol açtığı bilinmemektedir. Transferrin ve α 2-makroglobülin benzeri ligandlar bu bölgede örnek alınabilir (64,76,77). Endositozun bu kümelenmeyi inhibisyonundan önce hücrelere verilen CD bu ligandların hücre içinde dağılımına neden olmaktadır (64,78). DT ve bu ligandlar arasındaki biyolojik ve yapısal farklar nedeniyle hücre içinde farklı yolları takip edilebilir. Bu düşünce bizim veriler ile yayınlanmış bulgular arasındaki çeşitliliğe bir açıklama sağlayabilir.

Hücre içersindeki FA'nın hücre içi kalımlılığı elektroforez ve bağışık emdirim yöntemiyle farklı zaman dilimlerinde gösterildi. Hücredeki FA'nın enzimatik (ADP-riboziltransferaz, ADP-ribazilhidrolaz, polyPhe) etkinliğinin sitokalesin D etkisinde azaldığı görüldü. Toksine duyarlı HUVEC hücrelerinde toksin sonrası endozomlarda şişme görüldü. Ayrıca bu hücrelere CD ve amonyumklorür ile muamele edilerek hücre içi endozom yerleşimi ve boyutlarındaki değişiklikler karşılaştırıldı. Toksin ve Sitokalesin D varlığında endozomlar saflaştırılarak içersindeki FA etkinliği saptandı. Saflaştırılan endozomlar üzerine F-aktin ve ökaryotik Elongasyon faktör 2 ilave edildiğinde FA'nın endozomlardan dışarı salındığı gösterildi.

KAYNAKLAR

1. Collier R.J. Understanding the mode of action of diphtheria toxin: a perspective on progress during the 20th century", *Toxicon* 39 2001; 1793-03.
2. Bektaş M, Akcakaya 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; 37: 91-99.
3. Roux E, Yersin, A. Contribution a l'etude de la diphtheriae. *Ann Inst Pasteur* 1888; 2: 629- 661.
4. Smith WP. Cotranslational secretion of diphtheria toxin and alkaline phosphatase *in vitro*: involvement of membrane protein(s). *J Bacteriol.* 1980; 141:1142-47.
5. Gill DM, Pappenheimer AM Jr. Structure-activity relationships in diphtheria toxin. *J. Biol Chem.* 1971; 246: 1492-95.
6. Collier RJ, Kandel J. Structure and activity of diphtheria toxin. I. Thiol-dependent dissociation of a fraction of toxin into enzymatically active and inactive fragments. *J. Biol Chem.* 1971; 246: 1496-1503.
7. Gill DM, Dinius LL. Observations of the structure of diphtheria toxin. *J Biol Chem.* 1971; 246: 1492-95
8. Drazin R, Kandel J, Collier RJ. Structure and activity of diphtheria toxin. II. Attack by trypsin at a specific site within the intact toxin molecule. *J Biol Chem.* 1971; 246: 1504-10.
9. Uchida T, Gill DM, Pappenheimer AM Jr, Greany R. Mutation in the structural gene for diphtheria toxin carried by temperate phage β . *Nature* 1971; 233: 8-11.
10. Johnson W, Kuchler RJ, Solotorovsky M. Site in cell-free protein synthesis sensitive to diphtheria toxin. *Bacteriology* 1968; 96, 1089-98.
11. Bektaş M, Varol B, Nurten R, Bermek E. Interaction of diphtheria toxin (fragment A) with actin. *Cell Biochem Funct* 2009; 27: 430–439.

12. Nakamura LT and Wisnieski BJ. Characterization of the deoxyribonuclease activity of diphtheria toxin. *J. Biol. Chem.* 1990; 265: 5237- 41.
13. Choe S, Bennett MJ, Fujii G, Curmi PM, Kantardjieff KA, Collier RJ, Eisenberg D. The crystal structure of diphtheria toxin. *Nature* 1992; 357: 216-222.
14. Steven R. Blanke. Portals and Pathways: Principles of Bacterial Toxin Entry into Host Cells. *Microbe*. 2006 Volume 1, Number 1.
15. Deng Q, Barbieri JT. Molecular mechanisms of the cytotoxicity of ADP ribosylating toxins. *Annu Rev Microbiol.* 2008; 62: 271-88.
16. Kim S and Coulombe PA. Emerging role for the cytoskeleton as an organizer and regulator of translation. *Nature Reviews Mol. Cell Bio.* 2010; 11: 75-81.
17. Hennessey ES, Drummond DR, and Sparrow JC. Molecular genetics of actin function. *Biochem. J.* 1993; 282: 657-671.
18. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the cell*. 4th ed. USA: Garland Science: 2002.
19. Cooper GM, Hausmann RE. Hücre-Moleküler Yaklaşım. Üçüncü Baskı. İzmir: İzmir Tıp Kitapevi: 2006.
20. Bektaş M. Elangasyon faktör 2 (EF-2)'nin aktin ile etkileşimi. 1997; İstanbul Doktora Tezi.
21. Vartiainen MK. Nuclear actin dynamics- from form to function. *FEBS Letters* 2008; 582: 2033-2040.
22. McLaughlin PJ, Gooch JT, Mannherz HG, Weeds AG. Structure of gelsolin segment 1- actin complex and the mechanism of filament severing. *Nature* 1993; 364: 685-692.
23. Mitchison TJ. Compare and contrast actin filaments and microtubules. *Mol. Biol. of The Cell*. 1992; 3: 1309-1315.
24. Carlier MF, Pantaloni D. Control of actin assembly dynamics in cell motility. *Journal of Biol. Chem.* 2007; 282: 23005-09.
25. Sayers Z, Koch MH, Bordas J, Linderberg U. Time- resolved X- ray scattering study of actin polymerisation from proliferation. *Eur Biophysics* 1985; 13: 99-108.

26. Geeves MA, Fedorov R, Manstein DJ. Molecular mechanism of actomyosinbased motility. *Cell Mol Life Sci.* 2005; 62: 1462-77.
27. Amisha Kamal JK and Chance MR. Modeling of protein binary complexes using structural mass spectrometry data. *Protein Science* 2008; 17: 79–94.
28. Carlier MF and Pantaloni D. Control of Actin Dynamics in Cell Motility. *J. Mol. Biol.* 1997; 269: 459-467.
29. Revenu C, Athman R, Robine S, Louvard D. The co-workers of actin filaments: from cell structure to signals. *Nature Reviews Mol. Cell Biol.* 2004; 5: 635-646.
30. Hinshaw B, Burger M, Miller T, Adams A, Theodore F, Omann M. ATP depletion induces an increase in endothelial cells. *Am J Phys* 1993; 264: 1171-79.
31. Principles of Cell Biology, Department of Biology, Utah University. Lecture 21.
http://courses.biology.utah.edu/gard/cell/html/public/schedule_framset.htm
Erişim 01.10.2010
32. Rawn JD. Biochemistry (International Edition), Neil Patterson Publisher, Burlington of North Carolina: 1989; 1087-08.
33. Aktories K, Barmann M, Ohishi I, Tsuyama S, Jakobs H, Habermann E. Botulinum C2 toxin ADP-ribosylates actin. *Nature* 1986; 322: 390 -392.
34. Goddette DW, Frieden C. Actin polymerization. The mechanism of action of cytochalasin D. *J Biol Chem.* 1986; 261:15974-80.
35. Cooper J. Effects of Cytochalasin and Phalloidin on Actin, *The Journal of Biol.* 1987; 105: 1473-78.
36. Kaksonen M, Toret CP, Drubin DG. Harnessing actin dynamics for clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006; 7: 404-14.
37. Burke P, Schooler K, Wiley HS. Regulation of epidermal growth factor receptor signaling by endocytosis and intracellular trafficking. *Mol. Biol. Cell.* 2001; 12: 1897-910.
38. Zerial M, McBride H. Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001; 2: 107-17.
39. Mattera R, Arighi CN, Lodge R, Zerial M, Bonifacino JS. Divalent interaction

- of the GGAs with the Rabaptin-5-Rabex-5 complex. *EMBO J* 2003; 22: 78-88
40. Authier F, Posner BI, Bergeron JJ. Endosomal proteolysis of internalized proteins. *FEBS Lett.* 1996; 389: 55-60.
 41. Uchida T, Pappenheimer Jr AM, Greany R. Diphtheria toxin and related proteins. I. Isolation and properties of mutant proteins serologically related to diphtheria toxin. *J Biol. Chem.* 1973; 248: 3838-44.
 42. Fogar P, Navaglia F, Basso D, Zambon CF, Moserle L, Indraccolo S ve ark. Heat-induced transcription of diphtheria toxin A or its variants, CRM176 and CRM197: implications for pancreatic cancer gene therapy. *Cancer Gene Ther.* 2010; 17: 58-68.
 43. Gaillard PJ, de Boer AG. 2B-Trans technology: targeted drug delivery across the blood–brain barrier. *Methods Mol. Biol.* 2008; 437: 161-75.
 44. Kageyama T, Ohishi M, Miyamoto S, Mizushima H, Iwamoto R, Mekada E. Diphtheria toxin mutant CRM197 possesses weak EF2-ADP-ribosyl activity that potentiates its anti-tumorigenic activity. *J Biochem.* 2007; 142: 95-104.
 45. Rip J, Schenk GJ, de Boer AG. Differential receptor-mediated drug targeting to the diseased brain. *Expert Opin Drug Deliv.* 2009; 6: 227-37.
 46. Yıldırım A, Bardakçı F, Karataş M, Tanyolaç B, editörler. *Moleküler Biyoloji-Protein Sentezi ve Yıkımı*. Birinci Baskı: İstanbul: Nobel Yayın Dağıtım: 2007.
 47. Bishai WR, Miyanochara A and Murphy JR. Cloning and expression in *Escherichia coli* of three fragments of diphtheria toxin truncated within fragment B. *J Bacteriol.* 1987; 169: 1554-63.
 48. Yi Zhou M and Gomez-Sanchez CE. Universal TA Cloning. *Curr. Issues Mol. Biol.* 2000; 2: 1-7.
 49. Fermentas Conventional Restriction Enzymes Buffer Activity Chart. http://www.fermentas.com/templates/files/tiny_mce/media_pdf/fivebuffer2008.pdf. Erişim 02.03.2010.
 50. Add Gene Vector Database. http://www.lablife.org/p?a=vdb_view&id=g2.Qy_txyuMZYCjZiJScd8B18EyhYU-. Erişim 10.02.2010.
 51. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685.

52. Gersoni JM and Palade GE. Binding of alpha-bungarotoxin to isolated alpha subunit of acetylcholin receptor from *Torpedo californica*: quantitative analysis with protein blots. *Anal. Biochem.* 1983; 131: 1-15.
53. Tjelle TE, Brech A, Juvet LK, Griffiths G and Berg T. Isolation and characterization of early endosomes, late endosomes and terminal lysosomes: their role in protein degradation. *J. Cell Sci.* 1996; 109: 2905-14.
54. Bektaş M, Nurten R, Ergen K and Bermek E. Endogenous ADP-ribosylation of eukaryotic elongation factor 2: evidence for two different sites and reactions. *Cell Biochem. Funct.* 2006; 24: 369-380.
55. Kim K and Grohman NB. Mode of inhibition of diphtheria toxin by ammonium chloride. *J. Bact.* 1965; 90: 1557-62.
56. Sandvig K and Olsnes S. Diphtheria toxin entry into cells is facilitated by low pH. *J Cell Biol.* 1980; 87: 828-832.
57. Antigiani A and Youle RJ. Endosome fusion induced by diphtheria toxin translocation domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008; 105: 8020-25.
58. Yamaizumi M, Mekada E, Uchida T and Okada Y. One molecule of diphtheria toxin fragment A introduced into a cell can kill the cell. *Cell.* 1978; 15: 245-250.
59. Falnes PO, Ariansen S, Sandvig K and Olsnes S. Requirement for prolonged action in the cytosol for optimal protein synthesis inhibition by diphtheria toxin. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 4363-68.
60. Draper RK, Simon MI. The entry of diphtheria toxin into the mammalian cell cytoplasm:evidence for lysosomal involvement. *J Cell Biol.* 1980; 87: 849-54.
61. Nakamura LT and Wisnieski BJ. Characterization of the deoxyribonuclease activity of diphtheria toxin. *J. Biol. Chem.* 1990; 265: 5237-41.
62. Lemichez E, Bomsel M, Devilliers G, Vander Spek J, Murphy JR, Lukianov EV, Olsnes S, Bouquet P. Membrane translocation of diphtheria toxin fragment A exploits early to late endosome trafficking machinery. *Mol. Microbiol.* 1997; 23: 445-457.
63. Hudson TH and Neville Jr DM. Quantal release of diphtheria toxin to the cytosol. *J. Biol. Chem.* 1985; 260: 2675-80.
64. Durrbach A, Louvard D and Coudrier E. Actin filaments facilitates two steps of endocytosis. *J. Cell Sci.* 1996; 109: 457-465.

65. Lanzetti L. Actin in membrane trafficking. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2007; 19: 453-458.
66. Smythe E and Ayscough KR. Actin regulation in endocytosis. *J. Cell Biol.* 2006; 119: 4589-98.
67. Abu-Hamdah R, Cho WJ, Hörber JKH and Jena BP. Secretory vesicles in live cells are not floating but tethered to filamentous structures: A study using photonic force microscopy. *Ultramicroscopy* 2006; 106: 670-673.
68. Su Y, Kondrikov D, Block ER. Beta-actin: a regulator of NOS-3. *Sci. STKE.* 2007; 404: pe52.
69. Ji Y, Ferracci G, Warley A, Ward M, Leung KY, Samsuddin S, Lévêque C, Queen L, Reebye V, Pal P, Gkalagkousi E, Seager M and Ferro A. beta-Actin regulates platelet nitric oxide synthase 3 activity through interaction with heat shock protein 90. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007; 104: 8839-8844.
70. Ratts R, Zeng JR, Berg EA, Blue C, McComb ME, Costello CE, Vanderspek JC and Murphy JR. The cytosolic entry of diphtheria toxin catalytic domain requires a host cell cytosolic translocation factor complex. *J. Cell Biol.* 2003; 160: 1139-50.
71. Falnes PO and Sandvig K. Penetration of protein toxins into cells. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 2000; 12: 407-413
72. Deng Q and Barbieri JT. Molecular mechanisms of the cytotoxicity of ADP-ribosylating toxins. *Ann. Rev. Microbiol.* 2008; 62: 271-288.
73. Hopkins CR, Gibson A, Shipman M and Miller K. Movement of internalised ligand-receptor complexes along a continuous endosomal reticulum. *Nature.* 1990; 346: 335-339
74. Dunn KW and Maxfield FR. Delivery of ligands from sorting endosomes to late endosomes occurs by maturation of sorting endosomes. *J. Cell. Biol.* 1992; 117: 301-310.
75. Ghosh RN, Gelman DL and Maxfield FR. Quantification of low density lipoprotein and transferrin endocytic sorting in Hep2 cells using confocal microscopy. *J. Cell. Sci.* 1994; 107: 2177-89.
76. Hopkins CR. Intracellular routing of transferrin and transferrin receptors in epidermal carcinoma A431 cells. *Cell.* 1983; 35, 321-330.

77. Hopkins CK, Gibson A, Shipman M, Strickland DK and Trowbridge IS. In migrating fibroblasts, recycling receptors are concentrated in narrow tubules in the pericentriolar area, and then routed to the plasma membrane of the leading lamella. *J. Cell. Biol.* 1994; 125: 1265-74.
78. De Figueiredo P, Doody A, Polizetto RS, Drecktrah D, Wood S, Banta M, Strang MS and Brown WJ. Inhibition of transferrin recycling and endosome tubulation by phospholipase A₂ antagonists. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 47361-70.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Ebru	Soyadı	Hacıosmanoğlu
Doğ.Yeri	İstanbul	Doğ.Tar.	27.10.1986
Uyruğu	T:C	TCKim No	43567327524
Email	ebruhoglu@hotmail.com	Tel	5353562109

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Lisans	Marmara Üniversitesi-Biyoloji	2008
Lise	Sakıp Sabancı Anadolu Lisesi	2004

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜD S Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	İyi	Orta	İyi	58.250	

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	79.034	77.586	75.216
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Office 2007	İyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Poster Bildirileri

1- M. Bektaş, B. Özerman, E. Hacıosmanoğlu, B. Varol, R. Nurten. Aktin, Elongasyon Faktör-2 ve Difteri Toksini Etkileşimlerinin Endositik Süreçteki Rolü. 22. Ulusal Biyofizik Kongresi. Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, Cilt 11, Özel Sayı. P-22. Aydın, 28 Eylül-1 Ekim, 2010.

2- B. Özerman, E. Hacıosmanoğlu, E. Karabulut, M. Bektaş, R. Nurten. Difteri Toksininin Taşınmasında Aktin İskeleti İle Endozom Etkileşiminin Desteği. 22. Ulusal Biyofizik Kongresi. Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, Cilt 11, Özel Sayı. P-53. Aydın, 28 Eylül-1 Ekim, 2010.

3- Haciosmanoglu E, Ünlü A, Azaklı H, Üstek D , Bektas M. FB Cloning From Toxin Fragments And Obtaining Antibody. 2nd Internatinonal Biophysics Congress and Biotechnology at GAP & 21st National Biophysics Congress October, 2009.

Özel İlgi Alanları (Hobileri):

Tiyatro