

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

**( DOKTORA TEZİ )**

**AKTİN FİLAMENTLERİNİN DİFTERİ TOKSİNİ ALT  
YAPILARI İLE ETKİLEŞİMİ - BU ETKİLEŞİMDE  
ELONGASYON FAKTÖRÜ 2'NİN ROLÜ**

**BİLGE ÖZERMAN**

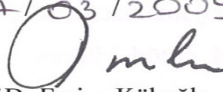
**DANIŞMAN  
PROF. DR. RÜSTEM NURTEN**

**BİYOFİZİK ANABİLİM DALI  
BİYOFİZİK PROGRAMI**

**İSTANBUL-2009**

## TEZ ONAYI

Aşağıda tanıtımı yapılan tez, jüri tarafından başarılı bulunarak Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

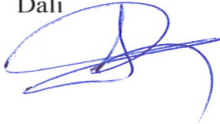
17/03/2009  
  
 Prof. Dr. Emine Kökoğlu  
 Enstitü Müdürü

Kurum : İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
 Program Adı : Biyofizik Programı  
 Programın seviyesi : Yüksek Lisans  Doktora   
 Anabilim Dalı : Biyofizik  
 Tez Sahibi : Bilge Özerman  
 Tez Başlığı : Aktin filamentlerinin difteri toksini alt yapıları ile etkileşimi - bu etkileşimde elongasyon faktörü 2'nin rolü  
 Sınav Yeri : İstanbul Tıp Fakültesi/Biyofizik Anabilim Dalı  
 Sınav Tarihi : 11 / 03 / 2009

### Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı \_\_\_\_\_

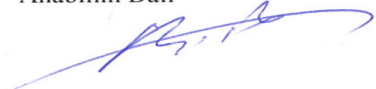
1. Prof. Dr. Rüstem Nurten (Tez Danışmanı) İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı



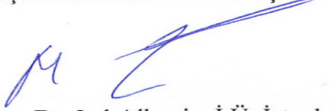
2. Prof. Dr. Beki Kan (Tez İzleme Komitesi Üyesi) Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı



3. Prof. Dr. Bora Barutçu (Tez İzleme Komitesi Üyesi) İ.Ü. Cerrahpaşa Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı



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



5. Doç. Dr. Işıl Albeniz İ.Ü. İstanbul 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.

**Bilge ÖZERMAN**

## İTHAF

Aileme ithaf ediyorum.

## TEŞEKKÜR

Bu tezin yönetiminde ve yürütülmesinde bana destek olan tez danışmanım sayın Prof. Dr. Rüstem Nurten'e, önerileri ile beni yönlendiren Doç. Dr. Muhammet Bektaş'a ve İstanbul Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı öğretim üyeleri ile çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Doktora süreci boyunca Biyofizik Anabilim Dalındaki laboratuvar çalışmalarında deneyimlerini paylaşan Özlem Coşkun'a ve gerek eğitim gerek ise deneysel çalışmalarda her türlü bilgisini paylaşan arkadaşım Başak Varol'a teşekkür ederim.

Deneysel çalışmalarda bana yardımcı olan Celal Güven'e, İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalından Prof. Dr. Seyhun Solakoğlu'na, Ebru Karabulut'a ve Fadime Aktar'a; İstanbul Üniversitesi DETAE Sinirbilim Anabilim Dalından Prof. Dr. Asiye Nurten'e, Prof. Dr. İhsan Kara'ya ve İmmunoloji Anabilim Dalından Sema Bilgiç'e; Nöromusküler Hastalıklar laboratuvarından Hatice Taşlı'ya ve Tıbbi Genetik Bilim Dalından Prof. Dr. Şükrü Öztürk'e teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından Proje No: T-53/15122006 ve TÜBİTAK Proje No: 107S032 ile desteklenmiştir.

## İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI .....	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER .....	VI
TABLolar LİSTESİ.....	Vİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	İX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ.....	Xİ
ÖZET .....	Xİİİ
ABSTRACT.....	XİV
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. Aktin Filamentleri .....	3
2.1.1. Aktinin yapısal özellikleri.....	3
2.1.2. Aktinin kovalan değişiklikleri.....	4
2.1.3. Aktin filamentinin oluşumu .....	5
2.1.4. Kalp kası lif yapısı.....	6
2.1.5. Aktin filamentleri ile etkileşen proteinler .....	8
2.2. Difteri Toksini .....	11
2.2.1. Difteri konusundaki çalışmaların tarihçesi.....	11
2.2.2. Difteri toksininin yapısı .....	12
2.2.3. Difteri toksininin etkinlik kazanma aşamaları.....	13
2.2.4. Difteri toksini reseptörü.....	14
2.2.5. Difteri toksininin etki mekanizmaları .....	14
2.2.6. Difteri toksini patolojisi .....	15
2.2.7. Kalp kası ve difteri toksini.....	15
2.3. Ökaryotik Elongasyon Faktörü 2.....	16
2.3.1. eEF-2'nin yapısal özellikleri ve etkinliği .....	16
2.3.2. eEF-2'nin kovalan etkileşimleri.....	17
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER .....	19

3.1. Kullanılan Maddeler .....	19
3.2. Çözeltiler .....	20
3.3. Difteri toksininin <i>in vitro</i> uygulanması .....	25
3.4. Işık mikroskobu ile inceleme hazırlığı .....	25
3.4.1. PAS boyaması .....	26
3.5. Floreseinizotiyosiyanat (FITC) ile etiketleme.....	26
3.6. Floresan mikroskobu ile inceleme hazırlığı .....	27
3.6.1. DT-FITC konjüгатının hücreye uygulanması .....	27
3.6.2. HUVEC ile DT-FITC etkileşiminin floresan ölçüm ile belirlenmesi .....	28
3.6.3. Kalp kası dokusunun immünfloresan yöntem ile işaretlenmesi.....	28
3.7. İletim elektron mikroskobu (TEM) ile inceleme hazırlığı.....	29
3.8. İskelet kasından aktin saflaştırılması .....	30
3.9. Aktinin elektroforez ile analizi .....	33
3.9.1. Aşağı çekme “ <i>Pull-down</i> ” yöntemi ile protein etkileşimlerinin belirlenmesi .	33
3.9.2. Biotin ile aktinin etiketlenmesi .....	34
3.10. eEF-2'nin ADP-ribozillenmesi .....	34
3.11. Radyoaktivitenin belirlenmesi .....	34
4. BULGULAR.....	36
4.1. Kalp Kasında Difteri Toksininin Etkisinin Belirlenmesi .....	36
4.1.1. Işık mikroskop bulguları.....	36
4.1.2. İletim elektron mikroskop (TEM) bulguları.....	39
4.2. DT-FITC konjüгат analizi .....	41
4.3. <i>in vivo</i> DT, F-aktin, eEF-2 ve FA-aktin etkileşiminin immünfloresan incelenmesi	48
4.4. Kasta DT dağılımı ve aktin etkileşimi ile eEF-2 dağılımı.....	54
4.5. İletim elektron mikroskobu (TEM) bulguları .....	56
4.6. Saflaştırılan aktinin görüntülenmesi .....	62
4.7. Aktinin Western emdirim yöntemi ile görüntülenmesi .....	62
5. TARTIŞMA .....	65
KAYNAKLAR .....	69
HAM VERİLER .....	75
ÖZGEÇMİŞ .....	76

**TABLULAR LİSTESİ**

Tablo 3-1: Difteri toksini uygulama şeması.....	25
Tablo 3-2: Floroforların uyarılma-salım değerleri.....	27
Tablo 3-3: Elektron mikroskop incelemesi için yürütülen rutin takip.....	30



## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Aktin molekülü ve filament yapısı. ....	4
Şekil 2-2: Aktin filamentinin oluşumu. ....	6
Şekil 2-3: Domuz kalp kası lifindeki bir sarkomerin ince yapısı. ....	7
Şekil 2-4: Sarkomeri oluşturan yapısal proteinlerin şematik çizimi.....	10
Şekil 2-5: Difteri toksinin yapısı ve etkinleşmesi. ....	13
Şekil 2-6: Ökaryotik elongasyon faktör 2 molekülü. ....	16
Şekil 2-7: eEF-2'nin ADP-ribozillenme tepkimesi.....	17
Şekil 3-1: Domuz kas dokusundan G- ve F-aktin saflaştırılması. ....	32
Şekil 4-1: PAS boyaması ile kontrol kalp kas görüntüsü.....	36
Şekil 4-2: DT (250 ng/ml) ile 6 saat bekletilen kalp kası görüntüsü. ....	37
Şekil 4-3: DT (250 ng/ml) ile 12 saat bekletilen kalp kası görüntüsü. ....	38
Şekil 4-4: DT (250 ng/ml) ile 24 saat bekletilen kalp kası görüntüsü. ....	39
Şekil 4-5: Kontrol kalp kası miyofibrillerinin TEM ile görüntüsü.....	40
Şekil 4-6: DT (250 ng/ml) ile 24 saat bekletilen kasta miyofibrillerin TEM görüntüsü.41	
Şekil 4-7: FITC'nin uyarılma-salım tayfı. ....	42
Şekil 4-8: Saklama tamponunun floresan şiddet ölçümü. ....	42
Şekil 4-9: DT-FITC konjüгатının uyarılma-salım tayfı. ....	43
Şekil 4-10: DT-FITC uygulanan HUVEC özütünün uyarılma-salım tayfı.....	45
Şekil 4-11: Diyaliz öncesi Anti-eEF-2-FITC konjüгатının uyarılma-salım tayfı. ....	46
Şekil 4-12: Diyaliz sonrası Anti-eEF-2-FITC konjüгатının uyarılma-salım tayfı. ....	46
Şekil 4-13: Anti-eEF-2-FITC için floresan şiddeti ölçümü.....	47
Şekil 4-14: HUVEC hücrelerinde DT-FITC'nin dağılımı. ....	49
Şekil 4-15: HUVEC hücrelerinde DT-FITC'nin dağılımı ve aktin iskeleti.....	50
Şekil 4-16: DT ile aktin iskeleti etkileşimi. ....	51
Şekil 4-17: Fibroblastlarda DT-FITC'nin dağılımı.....	52
Şekil 4-18: HUVEC hücrelerinde eEF-2 dağılımı. ....	53
Şekil 4-19: DT-FITC'nin domuz kalp kasındaki dağılımı. ....	54
Şekil 4-20: DT'nin domuz kalp kasındaki dağılımı. ....	55
Şekil 4-21: Anti-eEF-2-FITC ve falloidin-TIRCH ile işaretli sıçan kalp kası.....	56
Şekil 4-22: Kalp kasında süreye bağlı DT etkisi.....	57
Şekil 4-23: DT uygulamasının 4. saatinde kalp kası yapısındaki bozunma. ....	59

Şekil 4-24: DT (10µg/ml) ile 4 saat bekletmede kalp kası yapısındaki bozunma. ....	60
Şekil 4-25: DT (10µg/ml) ile 4 saat bekletmede miyofibriller arası vakuoller.....	61
Şekil 4-26: Aktin saflığının SDS-PAGE elektroforezi ile analizi. ....	62
Şekil 4-27: Western emdirim ile belirlenen aktin. ....	63
Şekil 4-28: Aktin-fragment A etkileşimi. ....	64

## SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ADP	Adenozin difosfat
ADPR	Adenozin difosfat riboz
ATP	Adenozin trifosfat
cpm	Sayım/dak (counts per minute)
dak	dakika
DAPI	4'-6-Diamidino-2-fenil indol
DT	Difteri toksini
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
eEF-2	Ökaryotik elongasyon faktör 2
EF-1 $\alpha$	Elongasyon Faktörü 1 $\alpha$
FA	Fragment A
F-aktin	İpliksi aktin (Filamentöz aktin)
FB	Fragment B
FITC	Floreseinizotiyosiyanat
g	Yerçekimi ivmesi / gram
G-aktin	Küresel aktin
GDP	Guanozin difosfat
GF	Büyüme faktörü
GTP	Guanozin trifosfat
HB-EGF	Heparin bağlayan epidermal büyüme faktörü benzeri GF
HUVEC	İnsan göbek kordonu damar endotel hücresi
IgG	İmmunglobulin G
kDa	Kilo Dalton
NAD	Nikotinamid adenin dinükleotit
PAS	Periyodik asit-Schiff
PMSF	Fenilmetilsulfonyl florit
PPO	2,5-difenil oksazol
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Gel Elektroforezi
TCA	Triklorasetik asit
TEM	İletim elektron mikroskobu
TEMED	Tetrametilendiamin

TRICH	Tetra metil rodamin izotiyosiyanat
Tris	Tris (hidroksimetil) aminometan
tRNA	Transfer ribonükleik asit

## ÖZET

Özerman, B. Aktin Filamentlerinin Difteri Toksini Alt Yapıları İle Etkileşimi-Bu Etkileşimde Elongasyon Faktörü-2'nin Rolü. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyofizik ABD. Doktora Tezi. İstanbul. 2009

Difteri hastalığı süresince kalpte miyotoksik etki oluşmaktadır. Miyotoksik etki, protein sentezinin durması ile açıklanmaktadır. Ancak protein sentezinin baskılanması ile difteri toksinine bağlı hücre ölümü arasındaki ilişki tam olarak aydınlatılamamıştır. Difteri toksininin (DT) varlığında, ökaryotik elongasyon faktörü 2'nin (eEF-2) ADP-ribozillenmesi sonucu protein sentezinin baskılandığı bilinmektedir. DT'nin protein sentezini durdurmasının yanı sıra hücre iskeletinin yıkılmasına da sebep olduğu ve hücre iskeleti yapıtaşı olan aktinin eEF-2 ile etkileştiği öne sürülmüştür. Bu çalışmada, DT alt yapıları olan, A ve B kesimleri (FA, FB) ile aktin filamentleri arasındaki olası etkileşimin araştırılması amaçlandı. Bu doğrultuda toksine duyarlı ve dirençli hücreler ile fibriler aktinin çok yoğun olduğu kalp kası dokusu kullanıldı. Değişen DT derişimleri ile farklı süreler boyunca bekletilen hücre ve dokularda, immünfloresan görüntüleme sonucu DT ile aktin filamentlerinin etkileştiği saptandı. Hücre içinde, DT ile eEF-2 dağılımının benzerliği gösterildi. DT ile bekletilen kalp kası dokusunun ince yapı düzeyinde iletim elektron mikroskobu ile görüntülenmesi sonucunda miyobriloliz, şişme, mitokondriyal hasar ve çekirdekte kromatin kümelenmesi gözlemlendi. Moleküler düzeyde yapılan inceleme ile DT'nin A kesimi ile aktinin kompleks proteini oluşturduğu sonucuna varıldı. Bu bulgular DT'nin, hücre iskeleti üzerinden etkili olabilecek bir sitotoksik yolağın yanında, programlanmış hücre ölümü ile ilişkili yolakları da etkinleştirebileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler : Aktin, Hücre iskeleti, Difteri toksini, Ökaryotik elongasyon faktör 2 (eEF-2), Floresein izotiyosiyanat (FITC)

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından Proje No: T-53/15122006 ve TÜBİTAK Proje No: 107S032 ile desteklenmiştir.

## ABSTRACT

Özerman B. The interaction of actin filaments with diphtheria toxin fragments and the role of the elongation factor 2 in this interaction. Istanbul University, Institute of Health Science, Department of Biophysics. Doktora Tezi. İstanbul. 2009

The myotoxicity, which occurs during the diphtheria disease, is explained by the inhibition of the protein synthesis. However the relationship between the protein synthesis inhibition and the cell death could not be fully revealed. It is known that the protein synthesis is inhibited as a result of the ADP-ribosylation of eukaryotic elongation factor 2 (eEF-2) in the presence of diphtheria toxin (DT). It has been put in front that DT lead also to the fall of the cell skeleton as a result of the interaction of eEF-2 and the actin. In this study, it is aimed to investigate the possible interaction between the actin filaments and the fragments (FA, FB) of DT. In this context, it is used DT sensitive and resistant cells and heart muscle tissue where the filamentous actin is abundant. The interaction of DT between actin filaments has been shown on cells and tissue by the immunofluorescent techniques with varying concentration of the toxin and incubation time. The distribution of either DT or eEF-2 has been exposed as similar. It was observed by transmission electron microscope myofibrilolysis, dilatation, mitochondrial damage and the clump of chromatin in the nucleus of myofibril under the effect of DT. The result of the molecular analysis was concluded that the fragment A and actin could form a protein complex. Those findings gave rise to thought that apoptotic pathways could become triggered besides the cytotoxic pathways that DT could act via the actin cytoskeleton.

**Key Words:** Actin, Cytoskeleton, Diphtheria toxin, Eukaryotic elongation factor 2 (eEF-2), Fluorescein isothiocyanate (FITC)

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University, Project No. T-53/15122006 and TÜBİTAK Project No: 107S032

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Aktin filamentleri, hücre şeklinin düzenlenmesi, hücre içi vesiküllerin hareketi, organellerin konumu, hücrenin göç etme ya da kas hücrelerindeki kasılma hareketi gibi birçok biyolojik süreçte rol oynar. Aşağı organizasyonlu canlılardan yüksek ökaryotlara kadar aktin filamentlerine bağlanabilen en az elli protein tanımlanmıştır (1). Protein sentez mekanizmasında rol oynayan ökaryotik elongasyon faktörü 2'nin (eEF-2) de aktin ile etkileşime girdiği, aktinin eEF-2'ye bağlandığı gösterilmiştir (2-5). Ayrıca NAD varlığında endojen yolla, enzimatik bir tepkime olmaksızın ADP-riboz eEF-2'ye bağlanır. eEF-2'nin ADP-ribozillenmesi sonucunda protein sentezi durur (4,5). eEF-2'nin ADPR-EF-2 formunun hücrede, hücre yaşlanması, hücre hasarı, diyabet ve oksidatif strese arttığı gösterilmiştir (3,4).

eEF-2'nin ADP-ribozillendiği diğer bir durum ise organizmanın difteri toksini ile infekte olmasıdır. Difteri toksini (DT) güçlü bir toksindir ve hücre yüzeyindeki reseptörüne B kesimi "fragmenti"(FB) aracılığı ile bağlanır. Toksindeki bir S-S bağının indirgenmesi sonucu etkinleşen DT, iki parçaya ayrılır (6,7). Endositoz ile sitoplazmaya taşınan kısım, A kesimi "fragmenti" (FA) ADP-riboziltransferaz etkinliği ile eEF-2'nin geri dönüşümsüz olarak etkinliğini durdurur (2-4,8-10). İnsan vücudunda DT, bütün hücrelere toksik etkili olmakla birlikte; kalp dokusunda miyokardite neden olur ve kalp yetmezliği ile hastalık ölümle sonuçlanır (11).

Miyotoksik etki günümüzde protein sentezinin durması ile açıklanmaktadır. Ancak protein sentezinin engellenmesi (inhibisyonu) ile toksine bağlı hücre ölümü arasındaki ilişki tam olarak açıklığa kavuşmuş değildir. Ayrıca DT, protein sentezini durdurmasının yanı sıra DNA kırılmasına ve hücre iskeleti yıkımına da sebep olmaktadır. Buna karşılık DT'ne dirençli olan insan miyeloid lösemi (K562) hücre soyunda DT, hücrelerde protein sentezinin durmasına neden olurken sitotoksik etki oluşturmamaktadır (12).

Bu bilgiler, sitotoksik süreçte difteri toksini etkisinin, hücredeki protein sentezini durdurma ile sınırlı olmadığını düşündürmektedir.

Protein-protein etkileşimlerinin, hücre işleyişini yönlendirmede önemli olmasından yola çıkarak DT altyapıları olan A ve B kesimleri ile aktin filamentleri

arasındaki etkileşimin sitotoksik etki üzerindeki rolünü kavramak amacı ile görüntüleme tekniklerinden yararlanılması öngörülmüştür. Aktin filamentleri-difteri toksini-eEF-2 arasındaki olası etkileşimlerin hücredeki yerini belirlemek üzere immünfloresan yöntemler ile endotel hücrelerinin incelenmesi amaçlanmıştır. İpliği aktinin çok yoğun olduğu kalp kası dokusunun, iletim (transmisyon) elektron mikroskobu (TEM) ile süreye bağlı olarak, *in vitro* koşullar altında difteri toksininden nasıl etkilendiğinin araştırılması hedeflenmiştir.



## 2. GENEL BİLGİLER

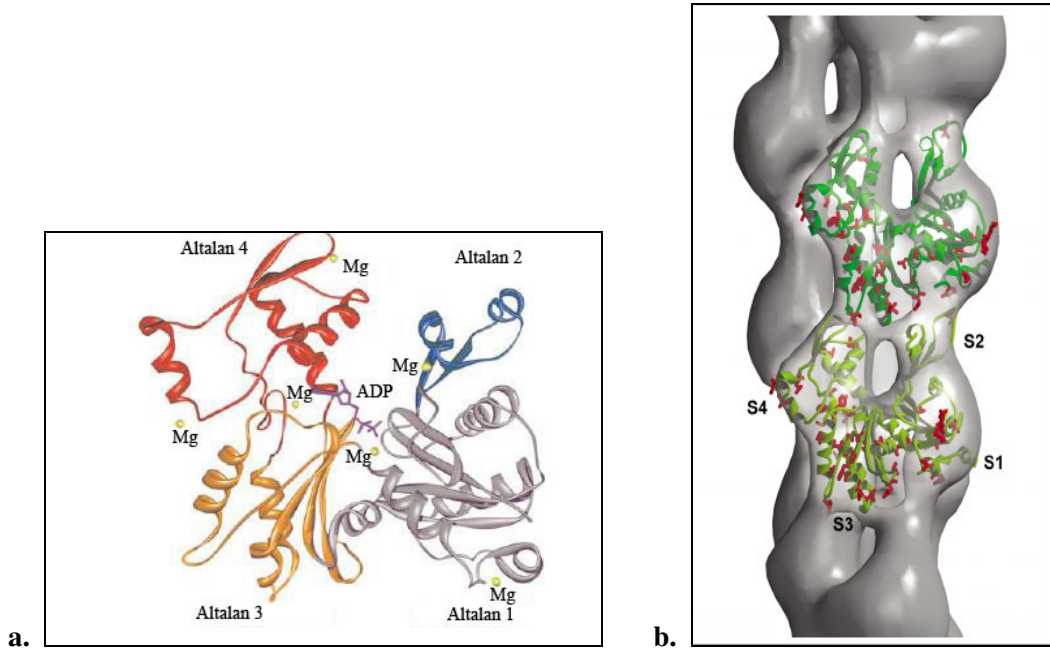
### 2.1. Aktin Filamentleri

#### 2.1.1. Aktinin yapısal özellikleri

Canlı organizmada aktin, yapısal bir protein olmanın dışında hücre hareketi, kas kasılması, hücre göçü gibi işleyişlerle hücrede mekanik süreçleri düzenler. Hücrede ayrıca aktin, hücre içi sinyal iletimi ve çeşitli maddelerin taşınması ile enzimatik etkinliğin düzenlenmesi gibi çok temel görevler üstlenir. Hücredeki işleyişe göre aktin molekülü sitoplazmadaki çeşitli proteinlerle etkileşime geçerek filament ağı, filament demetleri ya da filament iskeleti oluşturur.

Hemen hemen her ökaryotik hücrede çok yaygın olarak sentezlenen aktin, 42 kDa ağırlığında bir polipeptid zincirdir. N-terminal ucu asidik aminoasitlerden oluşur. N-terminalde taşıdıkları negatif yük sayısının izoelektrik noktalarını belirlediği aktin izoformları; izoelektrik noktası 5,4 olan  $\alpha$ -aktin,  $\beta$ -aktin ve  $\gamma$ -aktindir. Aktin, hücrede aynı anda hem globüler aktin (G-aktin) olarak monomerik yapıda, hem de ipliksi aktin (F-aktin) olarak polimerik yapıda bulunabilen tek proteindir (13). Hücrede biyolojik etkinliğe sahip olan aktin ipliksi aktindir.

Aktinin X-ışını kristallografi yöntemi ile atomik yapısı çözümlenmiştir (Şekil 2-1a). G-aktin iki alandan oluşur. Bir alan “domain” iki altbirim içerir. Aynı topolojiye sahip beş beta tabaka şeridi geniş olan 2. ve 3. altbirimlerde uzanır. Dört altbirim ortasındaki oyuğa, adenin nükleotidi ve çift değerlikli katyonlar ( $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$ ) yerleşir. Aktin bağlayan proteinlerin aktin ile olan etkileşiminde alt birimler özgün hedef bölgelerini oluşturur. Örneğin DNaz I ile aktinin 2. alt birimi etkileşir (15). Alt birim 3 ve altbirim 1 filament üzerinde pozitif ucu işaret eder. İki aktin molekülü arasındaki etkileşimi Şekil 2-1b’de görüldüğü gibi 4. alt birim sağlar (13,14).



**Şekil 2-1: Aktin molekülü ve filament yapısı.**

a). G-aktin molekülünün atomik modelinde ADP ve  $Mg^{2+}$  iyonlarının konumları görülmektedir (14). b). F-aktin molekülünün X-ışını kırınımı yöntemi ve elektron mikroskobu ile oluşturulan üç boyutlu atom modeli (15).

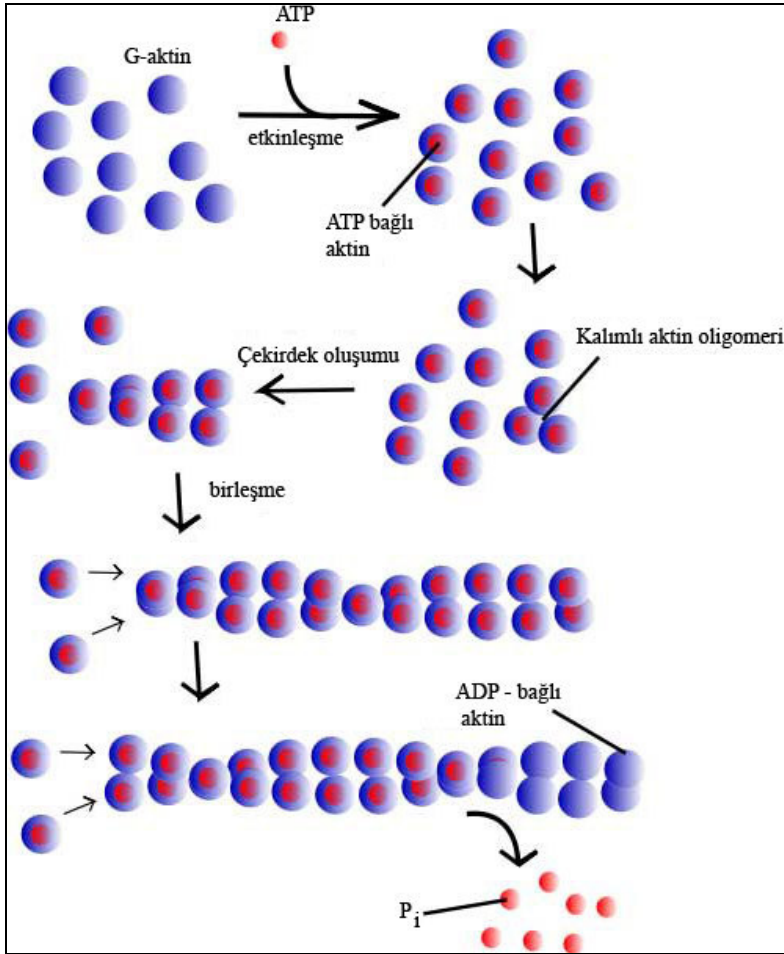
### 2.1.2. Aktinin kovalan değişiklikleri

En yaygın değişiklik, aktinin çevirim sonrası olgunlaşma aşamasında, N-terminal bölgesinden asetillenmesidir (16). Aktinin, His 73 amino asidi üzerinden metillendiği bildirilmiştir (17). Epidermal büyüme faktörü uyarısı altında aktinin, serin kalıntılarından fosforillendiği gösterilmiş bunun insan epidermoid karsinoma hücrelerinde (A431) hücrelerinin kortikal hücre iskeletinde hızlı polimerleşmeye neden olduğu bulunmuştur (18). Epidermal büyüme faktörü ile yine A431 hücrelerinde oluşturulan oksidatif stres ile aktin polimerleşmesinde geri dönüşümlü glutatyonlanmanın rolü olduğu gösterilmiştir (19). Hücrenin redoks durumunun değiştiği, oksidatif stresin yanı sıra hipoksi ve besin kıtlığı gibi koşullar altında da aktinin glutatyonlanma için hedef bir protein olduğu belirtilmiştir (20). Aktinin *Clostridium perfringens iota*, *Clostridium botulinum C-2* ve *Clostridium spirotermi* toksini ile Arg 177 amino asidi üzerinden ADP-ribozillendiği böylece F-aktin oluşumunun engellendiği belirtilmiştir (21). Ayrıca nitrik oksit ile uyarılan nötrofillerde da aktinin ADP ribozillenmesi sonucu polimerleşmenin durduğu gözlenmiştir (22).

### 2.1.3. Aktin filamentinin oluşumu

Aktin monomerleri kendi aralarında kovalan olmayan biçimde etkileşip polimerleşerek çift sarmal aktin filamentini oluşturur. İki aşamada oluşan filament için aktin monomerleri, önce gecikme fazında çekirdek yapıyı oluşturmak üzere bir araya gelir. Çekirdek olarak tarif edilen kalımlı bileşik, ancak üç G-aktin molekülünün bir araya gelmesi ile oluşur. Çekirdek yapının her iki yönüne doğru polimerleşen aktin filamentinde, polimerleşmenin yavaş olduğu kutup, negatif uç ya da sivri uç olarak tanımlanırken polimerleşmenin daha hızlı olduğu kutup, pozitif uç ya da sakallı uç olarak isimlendirilir (23). Polimerleşme ile başlayan uzama aşamasında filamentin bir ucunda monomerlerin birleşmesinin yanı sıra diğer uçta da ayrışma gözlenir. Bu sürekli birleşme ve ayrışma sürecinde filament yoğunluğu ile dengede bulunan serbest aktin monomerlerinin derişimi, kritik derişim olarak tanımlanır. Sivri uçta bulunan kritik derişim, sakallı uçtaki aktin monomer derişiminden 12 -15 kat daha fazla olmasının yanı sıra bu oran aktine bağlanan proteinlerin çeşidine göre ya da hücre içi koşullara (pH, iki değerlikli tuz derişimi, sıcaklık değişimi gibi) bağlı olarak değişir (24).

Polimerleşme konusunda yapılan kinetik araştırmaların sonuçları ile bilgisayar benzetim sonuçlarının tutarlı olduğu ve polimerleşme için gerek duyulan serbest enerji değerinin 20,5 kcal/mol olduğu bildirilmiştir (25). Bu enerji ATP hidrolizi sonucu ortaya çıkar. Aktin filamentinin uzama aşamasında, ATP bağlı serbest G-aktin monomerleri filamente eklendikten sonra F-aktin-ATP bileşiği filamentin hızlı polimerleşen ucunda koruyucu kapak görevi görür. ATP'nin hidrolizinin hızlı tamamlanması ile F-aktin-ADP-P<sub>i</sub> bileşiği oluşur ve bundan 10 kat daha yavaş olarak P<sub>i</sub> açığa çıkar (Şekil 2-2). Böylece, aktin molekülündeki yarıktaki oluşan biçim değişikliğinden dolayı ADP, F-aktin-ADP olarak filamentin depolimerleşen ucunda kalır. Sitosolde ATP derişimi, ADP derişiminden daha fazla bulunduğundan dolayı aktin filamentinin depolimerleşmesi sırasında, G-aktin-ADP, ADP/ATP değişimi sonucu G-aktin-ATP'ye dönüşür. Aktin filamentindeki bu dinamik kararsızlık, filamentin sakallı ucuna bağlanan kapak proteinler ile durdurulur böylece enerji tüketimi azalır (26,24).



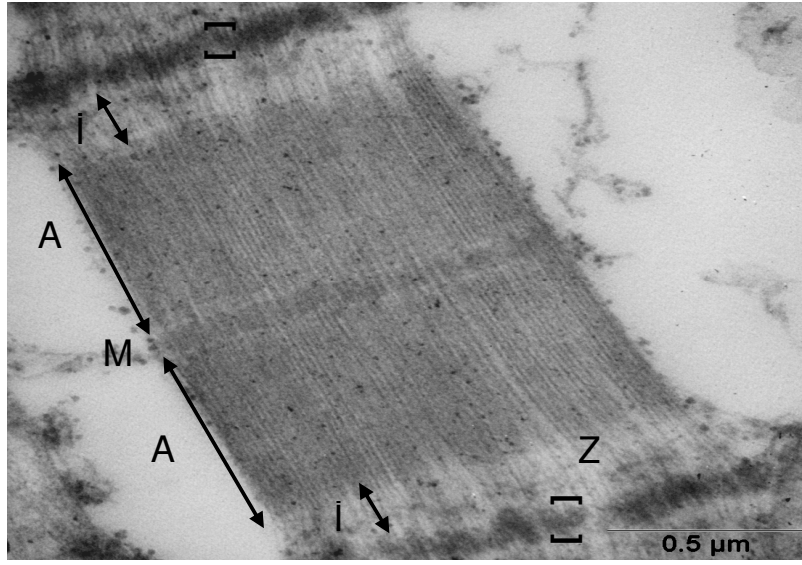
**Şekil 2-2: Aktin filamentinin oluşumu.**

Hayvan hücrelerinde bulunan aktin moleküllerinin yaklaşık % 50'si F-aktin, diğer % 50'si serbest G-aktin şeklinde bulunur (23). İnsanda farklı genler tarafından kodlanan aktinin, altı izoformundan biri olan kardiyak  $\alpha$ -aktin geni tarafından kodlanır ve liflerdeki ince filamentlerin ana bileşenini oluşturur (27). Nükleotid bağlı aktinin, sıçan kalp kasındaki dönüşümü ile ilgili olarak yapılan çalışmada, sarkoplazmadaki tüm aktinin % 30 kadarının G-aktin şeklinde bulunduğu tespit edilmiştir. Aktin polimerleşme hızının kalpteki kasılmalara bağlı olduğu, G-aktin miktarının, kasılmaların olduğu kalpte, durdurulmuş diastolik kalptekine oranla daha düşük oranda bulunduğu belirtilmiştir (28).

#### **2.1.4. Kalp kası lif yapısı**

Kalp kası lifleri, enine çizgili görünümlerinden dolayı iskelet kasına benzer. Bu lifler istemsiz çalışmalarından dolayı, miyositlerin tek çekirdek içermesinden ve

çekirdeğin hücrenin ortasında olmasından ötürü de düz kaslara benzer. Hücre gövdesi kalın dallanmalar gösterir. Kalp kasında sarkoplazmanın içerdiği miyofibril sayısı iskelet kasından ve düz kastan daha azdır. Miyositler iskelet kası hücrelerinden daha dar (0,02 mm genişlik) ve daha kısadır (0,1 mm uzunluk). Çigili kas lifinin uzamına geçen kesitinde kasılma birimi olan sarkomer, ışık mikroskopundaki görünüşüne göre bantlarla tarif edilir. Polarize ışığa duyarlı kısımlar izotrop bölgeleri (İ bantları) duysuz kısımlar da anizotrop bölgeleri (A bantları) oluştururlar. İ bantlarını sınırlandıran Z diskleri arasında kalan kısım bir sarkomeri oluşturur (Şekil 2-3).



**Şekil 2-3: Domuz kalp kası lifindeki bir sarkomerin ince yapısı.**

Açık renkteki İ bantları ile koyu renkteki A bantlarının sınırları oklar ile belirlenmiştir. M ve Z çizgisi parantezler ile işaretlenmiştir. Fotoğraf, İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı bünyesindeki transmisyon elektron mikroskobu (JEOL JEM 1011) ile görüntülenmiştir (Ölçek: 0,5 µm).

Sarkomer, başlıca aktin ve miyozin filamentlerinden ve bu filamentleri Z disklerine bağlayan sırası ile nebulin ve titin moleküllerinden oluşur. İnce aktin filamentleri İ bantlarında açık renkte, kalın miyozin filamentleri de A bantlarında koyu renkte görünürler. M bandı, başlıca miyomesinden oluşan protein matriksine tutunan miyozin kuyruklarının oluşturduğu bölgeyi simgeler. Z diskleri, miyofilametlerde oluşan gücün aktarılmasında görev aldıkları gibi moleküler yapısının gereği sinyal iletiminde de rol alırlar. Z disklerinde paralel olarak bir araya gelen bu moleküller arasında, diskin belkemiğini oluşturan alfa aktinin aktin filamentleri ve sinyal iletim proteinleri ile etkileşim içindedir. Komşu Z disklerini desmin, sinemin ve vimentin gibi

proteinler bir araya getirir. Komşu hücelere ait Z çizgilerinin hizasında bulunan, miyositler arasındaki bağ, interkalar disk ya da “discus interkalaris” adını alır. Bu yapı aracılığı ile iki kas hücresi dezmozomlarla birbirine tutunur. İnterkalar disk, aksiyon potansiyelinin bir hücreden diğerine geçmesini sağlayan aralıklı kavşak “*gap junction*” adlı bağlantı noktalarını da içerdiği için kalp kasındaki kasılmaların eşzamanlı olarak yayılmasına zemin hazırlar (29).

### 2.1.5. Aktin filamentleri ile etkileşen proteinler

Aktin filamentleri ile etkileşen proteinler kasılma proteinleri, sarkomeri oluşturan iskelet proteinleri, interkalar disk proteinleri, hücre iskeleti proteinleri ve membrana bağlı proteinler olarak sınıflandırılabilir.

Kasılma proteinleri olarak anılan aktin, miyozin, tropomiyozin ve troponin moleküllerinin etkileşimi, çizgili kasta kimyasal enerjinin mekanik enerjiye dönüşmesine neden olur. Sarkomerdeki F-aktini takip eden tropomiyozin molekülü, 35 kDa ağırlığındaki iki zincirin  $\alpha$ -sarmal yapıda birleşmesi ile oluşur. Yaklaşık 40 nm olan tropomiyozin aktin filamentinin iki çukuruna yerleşecek şekilde filamente dolanır. Aktin ve tropomiyozinin, yapılarındaki yüklü amino asitlerden dolayı moleküller arası elektrostatik etkileşim içinde olduğu böylece tropomiyozinin, aktine yapısal destek vererek işleyişini düzenlediği düşünülmektedir. Aktin filamenti üzerindeki bir diğer molekül troponindir. Troponin I altbirimi F-aktine, troponin T altbirimi ile tropomiyozine bağlıdır. Bu moleküllerin stoikiometresi 1 troponin: 1 tropomiyozin: 7 aktin monomeri şeklindedir (30). Kasın dinlenim durumunda troponin-tropomiyozin kompleksi miyozin bağlanma bölgelerini örter. Kas lifinin uyarılması sonucu serbest bırakılan kalsiyumu troponin C bağlar. Kalsiyumun bağlanması aktin sarmalında biçimsel değişime neden olur. Troponin-tropomiyozin karmaşımı aktin sarmalı arasındaki oyuğa gömülür. Bu şekilde aktin üzerindeki serbestleşen aktif bölgeye miyozinin S1 başı bağlanır. Miyozin, çapraz köprü oluşumu için gerek duyduğu ATP yi, kalsiyum varlığında S1 alt birimindeki ATPaz etkinliğine bağlı olarak hidrolize eder. ATP'nin yıkımı ile miyozin başının aktin filamentine olan afinitesi artar ve üzerinde taşıdığı ADP+P<sub>i</sub> sayesinde S1 yüksek enerjili hale geçer. S1 90° lik bir açıyla aktindeki aktif bölgeye bağlanır. S1'den ADP+P<sub>i</sub>'in ayrılması sonucu bükülebilen S1 aktin ile arasındaki açığı 45° ye indirir ve miyozinin S2 kısmı uzayarak bir gerilim oluşturur. Bu sırada aktin filamenti harekete geçerek miyozin filamentine üzerinde kayar. Kasılma

sırasında oluşan aktin miyozin çapraz köprüleri sayesinde sarkomerde; miyozinin esnek titin molekülleri ile bağlı olduğu ve aktinin nebulin proteinleri ile bağlandığı Z çizgileri, aralarında 1  $\mu\text{m}$  uzaklık kalana dek birbirine yaklaşır (31-33).

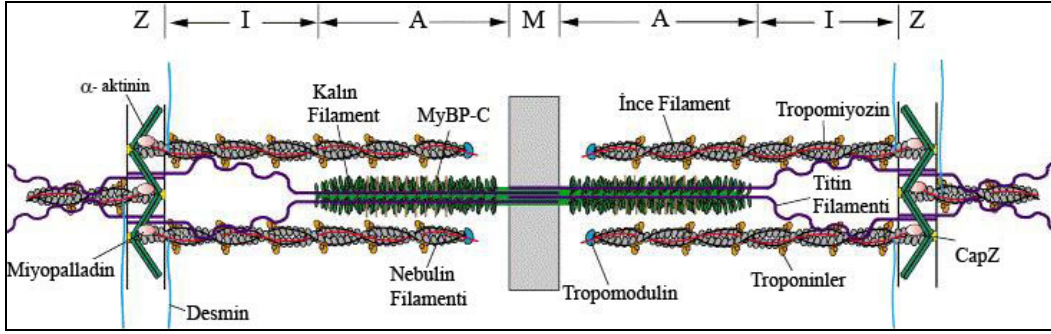
Kasılma işlevinde düzenleyici rol oynadığı düşünülen nebulin'in (500 -900 kDa) in vitro çalışmalar sonucunda aktin filamentinin uzanacağı yer için kalıp oluşturduğu ve aktin filamentinin boyunu sabit tuttuğu, sinyal iletiminde görevli olabileceği ve miyofilamentleri arafilamentlere bağlayabileceği öne sürülmektedir. Nebuline benzeyen nebulin (107 kDa) proteini sadece kardiyak miyofibrillerin Z çizgisinde bulunur ve aktin filamentine tutunur (34). Nebulin, N-terminal ucu ile etkileştiği tropomodulinden Z çizgisindeki *Cap Z*'e kadar uzanır (24).

Sarkomerin yapısındaki ince filamentler, Z çizgisine sakallı uçtan bağlanırlar. Aktin filamentindeki F-aktinin polimerleşmesi Z çizgisinde *Cap Z* proteini ile sınırlandırılır. *Cap Z*,  $\alpha$  ve  $\beta$  alt birimlerinden oluşan dimerik bir proteindir. Kalp kası liflerindeki Z disklerinde  $\beta_1$  alt birimi içeren *Cap Z* izoformu, interkalar diskte ve hücre yüzeyinde  $\beta_2$  altbirimini içeren diğer bir *Cap Z* izoformu şeklinde bulunur. *Cap Z*,  $\alpha$ -aktinin ile etkileşerek aktin filamentinin Z diski iskeletine tutunmasını sağlar (29,24).

F-aktinin sivri ucu ile tropomodulin etkileşir. Tropomodulinin saf F-aktine olan ilgisi düşüktür ( $K_d \sim 0,1 \mu\text{M}$ ). Diğer taraftan tropomodulin, tropomyozin eşliğindeki aktin filamentine olan ilgisi 3 kat daha yüksektir. Böylece tropomodulin, N-terminal bölgesinden F-aktine, C-terminal bölgesinden tropomyozine bağlanarak aktin filamentinin sarkomerdeki uzunluğunu düzenler (24).

Sarkomerde bulunan bir diğer iskelet proteini titindir. Konnektin olarak da isimlendirilen titin esnek yapıdadır. İnsan proteinlerinin en büyüğü olarak bilinen titin ( $\approx 3000$  kDa.) sarkomerde M bandından Z diskinde dek uzanır. Titin iki yönlü zembek gibi işler ve miyofibrilde gevşeme sırasında Z disklerinin yerini almasında, mekanik olarak gerilen lifin yeniden düzenlenmesinde pasif kuvvet oluşturur. Buna karşılık Z diskinin yakınında aktin filamentlerine bağlandığı bölgelerde esnek değildir ve sıkıştırıcı kuvvet uygular (29).

Şekil 2-4'te sarkomeri oluşturan iskelet proteinleri ile kasılma proteinleri şematik olarak resmedilmiştir.



**Şekil 2-4: Sarkomeri oluşturan yapısal proteinlerin şematik çizimi.**

Z çizgileri arasında kalan bantların altında sarkomeri oluşturan filamentler ve filamentlerle ilişkili proteinler görülmektedir (34).

Z çizgisine yakın bölgelerdeki kostamerlerin yapısında bulunan vinkulin, talin,  $\alpha$ -aktinin, paksilin gibi aktin bağlayan proteinler, miyofibrillerin ara filamentlere bağlanmasını, mikrofilamentlerin sarkolemma ile ilişki kurmasını ve filament boylarının kontrol edilmesini sağlar. Kostamer dışında kalan bölgede aktin, membrana bağlı proteinlerden beta distroglukan ve distrofin ile etkileşir (35).

Çizgili kasın dışındaki hücrelerde aktin filamentine bağlanan proteinlerden filaminler, aktin filamentlerinin “ V ” şeklinde birleşmelerini sağlar böylece sitosol jelimsi bir özellik kazanır. Fodrin, fimbrin ve  $\alpha$ -aktinin aktin filamentlerini bir demet olarak biraraya getirirler (36).

Aktin filamentinin parçalanmasında rol oynayan kofilin, filamentten monomer ayrışmasına neden olarak özellikle göç eden hücrelerde membranın hareketini düzenler. Kofilinin, yapısında ADP taşıyan aktine olan ilgisi yüksektir. Kofilin hem F-aktine hem de G-aktine bağlanabilir. Aktin filamentinde yeni sakallı ucun oluşmasında kofilin dışında gelsolin benzeri proteinler de görev alır. Profilin G-aktin ile etkileşerek G-aktin seviyesini düzenler. Aktin monomerlerinin biraraya gelerek çekirdek oluşturmasında formin ya da Arp2/3 kompleks proteinleri öncülük eder (37).

Hücrede, hücre iskeleti protein sentezi için sabit bir zemin hazırlar ve mRNA'nın hareketine yön verir. Ribozomun iskelete bağlanmasının yanı sıra protein sentezinde görev alan EF1 $\alpha$  ve eEF-2 moleküllerinin de F-aktin ile etkileştiği gösterilmiştir (3,30,38).



Hücre iskeleti ile ilgili yapılan çalışmalarda, aktin filamentine bağlanan özgün organik droglar kullanılmaktadır. Küflerden elde edilen sitokalsin-D aktin filamentinin sakallı ucuna bağlanarak filamentin uzamasını sonlandırır. “*Amanita phalloides*” mantarından elde edilen falloidin yalnızca F-aktine bağlanır. Güçlü bir zehir olan falloidin, aktin filamentin kalımlı hale geçmesine neden olur. Falloidin aktin filamentinin depolimerleşmesini engellediği için hücredeki G-aktin seviyesi 30 kat azalır. Falloidinin aktine olan ilgini çok yüksektir ( $K_d$   $3,6 \times 10^{-8}$  M). İmmünfloresan tekniklerde sıkça kullanılan floresan işaretli falloidin, aktine olan ilgini gözlendi düşmenin ( $K_d$   $2,7 \times 10^{-7}$  M) aktin filamentlerine özgün olarak bağlanmasını engellemediği bildirilmiştir (39).

## 2.2. Difteri Toksini

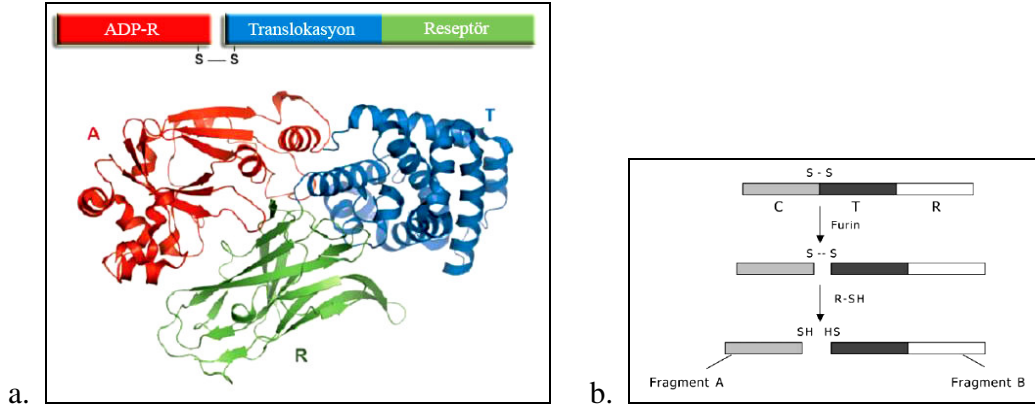
### 2.2.1. Difteri konusundaki çalışmaların tarihçesi

“*Corynebacterium diphtheriae*” bakterisinin 1883’te Klebs tarafından tanımlanmasının ardından 1884 yılında Loeffler, difteri hastalığına (kuşpalazı) bu basil tipi, aerobik bakterinin neden olduğunu açıkladı (40). Böylece modern tıbbın öncülerinden olan Pierre Bretonneau’nun 1855’te difterinin, bakteri kaynaklı bir hastalık olduğuna dair öne sürdüğü hipotezi doğrulandı (41). Bakteriden salınan toksin ancak 1888’de Roux ve Yersin tarafından keşfedildi (40). Bu buluşları, toksinin neden olduğu difteri hastalığının önüne geçme çalışmaları izledi. Difteriye karşı aşı geliştirme çalışmaları, Ramon tarafından formaldehitte oluşturulan toksoid ile ancak 1929’da son buldu. Toksini kodlayan genin, bakteri genomunun dışında, bakteriyi enfekte eden beta faj DNA’sında bulunduğunu gösteren çalışmayı Freeman yayınladı. Böylece 1951’de virülant olan suşun lizojenik *Corynebacterium diphtheriae* olduğu gösterildi (42). Toksinin, HeLa hücrelerinde protein sentezinin durmasına neden olduğunu Strauss 1959’da yayınladı. Bu tarihi izleyen yirmi sene içinde difteri toksininin etki biçimi; Pappenheimer, Collier, Gill, Olsnes, Honjo gibi araştırmacıların katkıları ile belirlendi (43,44). Difteri toksinin ancak nikotin amid dinükleotid (NAD) varlığında eEF-2’nin ADP-ribozillenme tepkimesini hızlandırdığı ve bu sebepten protein sentezi sırasında peptid uzamasının durduğu sonucuna varıldı (8,42,44). Toksinin hücre yüzeyi ile etkileşimini sağlayan reseptörlerin varlığı ise 1970’lerde Boquet tarafından gösterildi (42). Ayrıca difteri toksini reseptörünün yapısı, büyüme faktörlerinden “*heparin-binding EGF-like growth factor*” öncü yapısı (proHB-EGF) ile aynı olduğu Naglich

tarafından 1992'de kanıtlandı (45). Aynı yıl, difteri toksinin yapısı X-ışını kristallografisi ile aydınlatıldı (Şekil 2-5.a) (44). Günümüzde difteri toksininin; üç boyutlu yapısı, hücre içinde nasıl etkinlik kazandığı, hangi hücre bileşenleri ile ilişki kurduğu ve hücrenin ölümüne neden olan yolaklardan hangilerini tetiklediği araştırma konusu olarak yerini aldı.

### **2.2.2. Difteri toksininin yapısı**

Difteri toksini 535 amino asitten oluşan bir polipeptid zincirdir. Yapısal organizasyonuna göre difteri toksini, risin gibi bitki toksini, antraks toksin, psödomonas ekzotoksin A, Şıga benzeri toksin, kolera toksini gibi bazı bakteri toksinleri ile birlikte AB-toksin gurubu içindedir. Bu guruptaki toksinler ancak bir endoproteaz ile iki kısma ayrıldıktan sonra etkinlik kazanır (46). Toksinin kırılmasının ardından katalitik etkinliği olan polipeptid kısım fragment A, geriye kalan polipeptid kısım ise fragment B olarak isimlendirilir (Şekil 2-5.b) (6,7). Toksin, bakteriden salınır salınmaz yapısındaki katalitik bölge, reseptöre bağlanan bölge ve transmembran kısım kendi üstüne katlanır. Toksinin N-terminal ucundaki katalitik bölgeyi (C domeyni) 1.-185. amino asit kalıntıları, transmembran kısmı (T domeyni) 202.-378. amino asit kalıntıları ve toksinin reseptöre bağlanan karboksi ucunu (R domeyni) 386.-535. amino asit kalıntıları oluşturur (47). Fragment A, Cis 186 ile Cis 201 arasındaki disülfid bağı ve arjininden zengin bir ilmek ile transmembran bölgeye bağlanır (47,48). Arjinin amino asitleri, Arj 190, 192 ve 193 olarak toksinin yüzeyinde yer alır. Tripsin uygulaması sırasında bu arjinin kalıntıları toksinin, N-terminal fragment A ile karboksi-terminal fragment B olarak kırılma hedefini oluşturur. Toksinin yapısındaki diğer kovalan bağlı disülfid köprüsü, T ve R domeynlerini içeren fragment B'nin Cis 461 ile Cis 471 konumlu amino asitleri arasında yer alır (44).



### Şekil 2-5: Difteri toksinin yapısı ve etkinleşmesi.

- a). Difteri toksinin 3 boyutlu görüntüsünde, toksinin A bölgesi ADP-ribozilleme etkinliğine sahip katalitik kısmı (kırmızı), T bölgesi transmembran (mavi) ve R bölgesi (yeşil) reseptöre bağlanan kısmı temsil etmektedir (49).
- b). AB-toksin gurubuna dahil olan difteri toksininin etkinleşmesi (50). Difteri toksini furin çentiğinden ikiye bölündüğünde, toksinin C harfi ile isimlendirilen katalitik kısmının etkinleşme sonucu fragment A olarak ayrılışı resmedilmektedir.

### 2.2.3. Difteri toksininin etkinlik kazanma aşamaları

Toksinin bağlanacağı reseptörü hücre yüzeyinde taşıyan dolayısı ile toksine duyarlı ökaryotik hücreler, toksini oluşturan kısımların belirli bir sırada çalışması sonucu enfekte olur. Toksin hedef hücredeki reseptörüne R kısmı ile bağlanır bağlanmaz bir endositik vesikül oluşur. DT, vesikül içinde düşük endozomal pH ile konformasyonel değişime uğrar böylece hidrofobik bölgeleri açığa çıkacak şekilde çözülür. Böylece membran lipidleri ile etkileşime girer. Toksin, T kısmı ile membrana tutunur ve proteolitik yıkıma uğrar. Proteolitik kesim, arjininden zengin olan ilmeyi hedef alır (47). Kesilme bölgesi dışa dönük ilmekteki karbon iskeletinin Arg 193 amino asitine denk gelen noktada bulunur. Difteri toksini, hedef hücrenin ürettiği furin tarafından, furin “nicking” çentiği ile transmembran bölgeden kesilerek fragment A ve fragment B olarak iki polipeptid zincire ayrılır. Fragment A, büyük olasılıkla, fragmentler arası disülfid bağının vesikül içindeki düşük pH ile karşılaşmasından sonra hücre içine girer ve sitosolde tekrar katlanarak yumak halini alır (46). Difteri toksinin katalitik kısmının sitosole geçişi ile ilgili olarak öne sürülen moleküler mekanizmalar üzerine, günümüze kadar yapılan çalışmalardan iki hipotez öne çıkmıştır. Endositozla hücre içine alınan toksinin, translokasyonu kolaylaştıracak yapıda olup, şaperona benzer özellik gösterdiği böylece kendi kendine katalitik bölgeyi sitosole aktardığı öne sürülmüştür. Diğer hipoteze göre katalitik bölgenin sitosole geçişi için bazı molekülerin

aracılığı gerekmektedir. Toksinin hücre yüzeyindeki reseptöre bağlanmasını takiben oluşan endozomal vesikül lümeni hücre içine göre asidik bir ortam oluşturur. Bu ortamda transmembran bölgenin vesikül membranına tutunması kolaylaşır. Katalitik bölgenin sitosole geçmesi için hem ATP hem de hedef hücredeki sitosolik translokasyon faktörü gerekmektedir (48).

#### **2.2.4. Difteri toksini reseptörü**

Difteri toksini reseptörlerinin, hücre membran yüzeyindeki anlatım oranı düşük olan hücreler, difteri toksinine duyarsızdır. İnsan ve maymundan elde edilen hücre soyları toksine duyarlı fakat fare ve sıçanlardan elde edilen hücre soyları toksine duyarsızdır (51,52). DT reseptörü ilk olarak toksine duyarlı maymundan elde edilen Vero hücrelerinde gösterilmiş ve pro-HB-EGF molekülünün amino asit dizisi ile aynı olduğu belirlenmiştir (53). Forbol ester uygulanan hücrelerde, transmembran yapıdaki pro-HB-EGF'in, olgun HB-EGF olarak salındığı, böylece hücrelerin difteri toksinine duyarlılığını yitirdiği belirlenmiştir. DT, pro-HB-EGF molekülünün "*EGF-like domain*" (Asp<sub>106</sub>–Pro<sub>149</sub>) adlı bölgesine bağlanır. Hücrelerde DT'ne olan duyarsızlığın olası sebeplerden biri de HB-EGF üzerindeki DT bağlanma bölgesinin amino asit dizilerindeki çeşitliliğidir (54).

Akciğer, kalp, beyin ve iskelet kasında heparin bağlayan epidermal büyüme faktörü benzeri büyüme faktörünün (HB-EGF) anlatımı diğer dokulara oranla baskındır (55). HB-EGF, tirozin kinaz ailesi reseptörlerine bağlanarak, kalp gelişimi ve sürekliliği, derideki yaraların iyileşmesi, ateroskleroz ve tümör oluşumu gibi bazı biyolojik süreçleri yönlendirir.

#### **2.2.5. Difteri toksininin etki mekanizmaları**

Difteri toksininin katalitik kısmı olan FA, çevirim (tanslasyon) aşamasında eEF-2 proteininin ADP-ribozillenmesine böylece protein sentezinin durmasına neden olur (42,50). Ayrıca FA'nın, DNaz I tipindeki bir endonükleaz gibi etkinlik gösterdiği saptanmıştır (55,56). DT, nükleozomlar arası DNA kırılmasına yol açmanın yanı sıra aktin filamentleri ile etkileşime girerek hücre iskeletinin yıkılmasına da neden olduğu öne sürülmüştür (5,12).

### 2.2.6. Difteri toksini patolojisi

Difteri toksini, difteri basillerinin duyarlı bireylere solunum yolu ile bulaşmasının ve nazofarenksteki epitel hücreleri arasında çoğalmasının ardından sistemik dolaşıma salgılanır. Güçlü bir toksin olan difteri toksini tüm dokuları hedef almasına karşın öncelikle kalpte miyokardite, böbreklerde tübüler nekroza ve sinir sisteminde demiyelinizasyona neden olur (11,41,46). İnfeksiyon, tedavi edilmeyen vakalarda genellikle ikinci haftanın sonunda, kalp krizinin neden olduğu ölümlerle sonuçlanır (11).

### 2.2.7. Kalp kası ve difteri toksini

Difteri infeksiyonu ardından kalp dokusunun postmortem incelenmesi sonucu patolojik hasarın toksin derişimine bağılı olarak farklılık gösterdiği saptanmıştır. Kalp odacıkları düşük toksin derişimi etkisi altında dilate olurken yapısal bozukluk geçirmez. Kalp kapakçıkları, koroner arterler, epikardiyum ve endokardiyum normaldir. Miyokardiyum ise yaygın granüler bozulma ve çizgilenme kaybı gösterir. Nötral yağ damlaları ölümcül vakaların % 50'sinde, sarkoplazmanın içinde saptanmıştır. Miyokarditisin iki aşamada geliştiğinin gösterildiği 102 hasta ile yürütülen çalışmada, miyokardiyosklerozun son evrede oluştuğu belirtilmiştir. Nötrofillerin hemorajiye bağılı olarak en çok hasar gören bölgelerin dışında olmadığı saptanmıştır. Genel olarak miyokardiyum mat, şişmiş, gevşek ve çizgilenmiş olarak görünür. Böyle görünen kalp kesitlerinde miyofibriloz sonucu oluşan hiyalin bozulması ve intrestisiyal bölgelerde nekroza bağılı inflamasyona rastlandığı belirtilmiştir (41).

Difteri teşhisi konan 3 yaşındaki bir hastanın postmortem bağışikhistokimyasal bulgularına göre difteri toksininin, miyokardiyal liflerde düzensiz, kimi yerde yığılmış bir dağılım gösterdiği saptanmıştır. Elektron mikroskopik inceleme ile kesitlerin ince yapısında mitokondrilerin şiştiği, matriksin boşaldığı, krista yapılarının düzensizleştiği belirlenmiştir. Hasar gören miyofibrillerin yapısında ileri düzeyde boşlukların oluştuğu gösterilmiştir. Kromatin materyalinin çekirdek membranına yakın olarak kümelendiği bildirilmiştir (57).

Deneysel çalışmalar ile difteri toksini uygulanan kobaylarda, yağ asitlerinin mitokondriye taşınmasında kofaktör görevi gören karnitinin yıkıldığı gösterilmiştir (58). Karnitin düzeyindeki azalma, yağ asidi oksidasyonunda yetersizliğe neden olur böylece

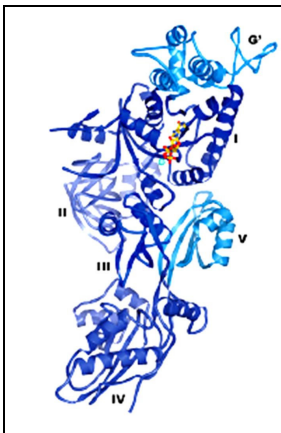
yağ asitleri miyofibrillerin arasında birikir ve ATP üretimi azalır. Difteritik kobaylarda karnitin seviyesindeki azalmanın, mitokondriyal hasarın artmasına neden olduğu öne sürülmüş ve bu kobaylara karnitin uygulandığında hayatta kalma sürelerinin uzadığı bulunmuştur. Diğer taraftan difteri toksini enjekte edilen kobayların kalp kasında, protein sentezindeki baskılanma oranının % 42 olduğu saptanmıştır (59).

Kalpte, difteri toksin reseptörü anlatımı olan gen aktarımlı (transjenik) fareler ile yapılan çalışmada, programlı hücre ölümünün kardiyomiyosit kaybının kalp krizine neden olup olmadığı araştırılmıştır. Total kardiyomiyositlerin % 17'si olan gen aktarımlı kardiyomiyositlerin tümünün difteri toksini uygulamasının ardından 7 gün içinde ileri düzeyde bozulduğu gözlenmiştir. Hasar gören kardiyomiyositler incelendiğinde vakuoller, lizozomal yapılar ve otofagozomlara rastlanmıştır (60).

### 2.3. Ökaryotik Elongasyon Faktörü 2

#### 2.3.1. eEF-2'nin yapısal özellikleri ve etkinliği

İnsanda ökaryotik elongasyon faktörü 2 (eEF-2), 97 kDa ağırlığında, 857 aminoasitlik tek bir polipeptid zincirinden oluşur. eEF-2'yi kodlayan gen 19. kromozomda yerleşmiştir (19p34). İzoelektrik noktası 6,4–6,6 arasında değişir (61,62). eEF-2 GTPaz etkinliğine sahiptir. Yapısında, N terminale yakın bulunan GDP/GTP'nin bağlanabildiği G' bölgesi, ribozom ve toksinler ile etkileşen özgün bölgeler vardır (Şekil 2-6). eEF-2'nin RNA'ya olan ilginliği ve guanin nükleotitleri ile kalımlı bir şekilde etkileşebildiği bildirilmiştir (2,63).



**Şekil 2-6: Ökaryotik elongasyon faktör 2 molekülü.**

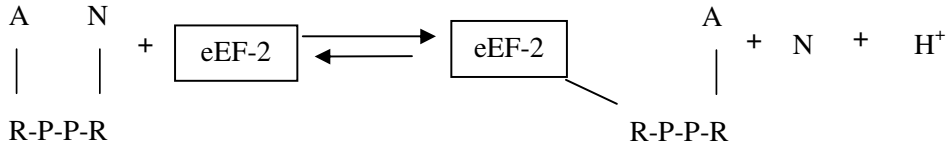
Molekülün atomik modelinde G' ve dört özgün bölge görünmektedir (53)

Türler arası yüksek homoloji gösteren eEF-2 protein sentezindeki uzama aşamasından sorumlu element olup peptidil tRNA'nın translokasyonunu katalizler.

Protein sentezi sürecinde uzamakta olan peptid zinciri, ribozomdaki P yerine peptidil-t-RNA olarak bağlı bulunmaktadır. Peptidil-t-RNA'nın karboksil gurubu, ribozomun A yerine yerleşmiş olan aminoaçil tRNA'nın amino gurubu ile etkileşir. eEF-2, GTP varlığında ribozoma bağlanarak etkinlik enerji engelini azaltıp, peptid zincirinin P yerinden A yerine aktarılmasını ve ribozom içinde mRNA'nın bir kodon boyunca kaydırılmasını katalizler. Böylece ribozomun A yeri, yeni bir aminoaçil tRNA için serbestleşmiş olur. Diğer taraftan taşıdığı amino asidi, uzamakta olan polipeptid zincire aktaran tRNA, translokasyon sonunda ribozomdaki E yerinden ayrılır.

### 2.3.2. eEF-2'nin kovalan etkileşimleri

eEF-2'nin ADP ribozillenme ve fosforillenme gibi sentez sonrası değişikliklere uğrar. ADP ribozillenme NAD varlığında enzim aracılığı ile ya da enzim etkisi olmaksızın gerçekleşir (Şekil 2-7). Tek bir eEF-2 molekülüne bir tane ADP riboz gurubu bağlanır (64). Bu bire bir etkileşim, radyoaktif işaretleme ile eEF-2'nin izlenmesinde ve eEF-2 miktarının belirlenmesinde önemli bir avantaj sağlar.



**Şekil 2-7: eEF-2'nin ADP-ribozillenme tepkimesi.**

A, adenin; R, riboz; P, fosfat; N, nikotinamid; H, hidrojeni temsil etmektedir.

Difteri toksininin katalitik parçası, FA, nikotinamid adenin dinükleotidi (NAD) ADP-riboz kaynağı olarak kullanır. FA endositozla hücreye geçtikten sonra ADP-ribozil transferaz etkinliği ile hedef proteinleri olan  $G_{\alpha}$ , Rac/Rho, aktin ve eEF-2'ye ADP ribozili aktarır (53). Çevirim sonrası değişiklik sonucu eEF-2'nin yapısındaki histidin, diftamide dönüşür. Yapısında taşıdığı diftamid ile eEF-2, difteri toksini gibi ADP riboziltransferaz etkinliğine sahip toksinlerin substratı haline gelir. Nikotinamidin ayrılması sonucu diftamid ortaya çıkan oksakarboniyum iyonu arasında elektrostatik bir çekim oluşur ve toksinin katalizlediği geri dönüşümsüz olan ADP-ribozillenme tepkimesi tamamlanır. Böylece eEF-2 ADP-ribozillenerek etkinliğini yitirir ve protein

sentezinin polipeptid uzama aşaması durur (2-4, 8-10).

Oksidatif stres, hipoksi ve besin kıtlığı gibi koşullar altında hücrenin redoks durumunun değiştiği ve eEF-2'nin etkinliğini yitirdiği bildirilmiştir (65). Oksidatif stres altında eEF-2 enzimatik olmayan yollar ile ADP-ribozillenir (17). Sitosolde, eEF-2, G-aktin ve F-aktin ile etkileşim içindedir (3). Redoks durumundaki değişiklikler sonucu aktin gultasyonlanır. Hücre iskeletinin ana bileşeni olan aktinin modifikasyonu, aktin bağlayan proteinler için bir sinyal niteliği taşır (65). Oksidatif stres altında hücre iskeletinin cevabı ve eEF-2'nin endojen enzimatik ya da ADP-riboz varlığında endojen enzimatik olmayan biçimde ADP-ribozillenmesi, aktinin, hücre içi redoks durumu, protein sentezi ve hücre iskeleti arasındaki bağlantı noktası konumunda olduğunu düşündürmektedir (10,66,67).

eEF-2'nin etkinliğini kaybettiği diğer bir değişiklik fosforillenmedir. Protein kinaz III,  $Ca^{++}$ /kalmmodulin bağımlı EF-2 kinaz aracılığı ile eEF-2'nin Thr53, Thr56, Thr58 üzerinden fosforillenmesine neden olur. Etkinliğini yitiren eEF-2, Tip 2A protein fosfataz ile defosforillenerek işlevini sürdürür. Hücre döngüsündeki protein sentez oranı ile ilgili değişimler ile eEF-2 fosforillenme oranının uyumlu olduğu belirlenmiştir (68). Hücredeki serbest radikallerin artışına bağlı olarak eEF-2'nin fosforillendiği böylece yarı ömrü kısa olan anti-apoptotik proteinlerin sentezinin durduğu bildirilmiştir (65).



### 3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

#### 3.1. Kullanılan Maddeler

##### Kimyasal Maddeler

- 2,5-Difeniloksazol (PPO) (Sigma)
- 2-Metilbütan (Sigma)
- Akrilamid (Sigma)
- Biyotin (Pierce)
- Bovin serum albumin (BSA) (Sigma)
- Bromo kloro indol fosfat (BCIP) (Sigma)
- DAPI'li ışımaya koruyucu (invitrogen)
- Difteri toksini (Sigma)
- Dimetil sülfoksit (DMSO) (Merck)
- Ditiyotireitol (DTT) (Sigma)
- Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Sigma)
- Epoksi Gömme Kiti (Fluka)
- Etanol (Riedel-de-Haen)
- Etilendiamin tetraasidik asit (EDTA) (Merck)
- Fenilmetilsülfonilflorid (PMSF) (Sigma)
- Glisin (Sigma)
- K-EDTA (Sigma)
- Kriyomatriks (Sigma)
- Lauril sülfat (SDS) (Sigma)
- Metanol (Riedel-de-Haen)
- Monoklonal anti-alfa sarkomerik aktin (Sigma)
- N<sup>^</sup>, N<sup>^</sup>, N<sup>^</sup>, N<sup>^</sup>-Tetrametiletilediamin (TEMED) (Sigma)
- Na-Difosfat (Sigma)
- NA-EDTA (Sigma)
- Na-Mono fosfat (Sigma)
- Nitro Blue Tetrazolium (NBT) (Sigma)
- Ozmik asit, Osmium VIII Oksit (Sigma)
- Parafin (Kimetsan)

Paraformaldehit (Sigma)

Poli-L-Lizin (Sigma)

Pull-down protein etkileşim kiti (Pierce)

Sodyum dodesil sülfat (SDS) (Sigma)

Toluen (Merck)

Tragakant (Sigma)

Triton-X 100 (Merck)

Trizma (Sigma)

Uranil Asetat (Sigma)

Amonyumpersülfat (APS), Asetik asit, Triklor asetik asit (TCA), Aseton, CaCl<sub>2</sub>, NaN<sub>3</sub>, KCl, NaOH, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> HCl ve diğer kimyasallar Sigma, Merck ve Fluka firmalarından alınmıştır.

### **Florofor işaretli maddeler**

Alexa Fluor 594-falloidin

Anti-mouse IgG-FITC (Sigma)

Anti-rabbit IgG TRICH (Sigma)

Falloidin-TRICH (Sigma)

FITC, İzomer1 (Sigma)

### **Radyoaktif madde**

Nicotinamide adenine dinucleotide [NAD- <sup>14</sup>C(U)], 242 ve 534.70 Ci/mol ( Du Pont –NEM)

## **3.2. Çözeltiler**

### Fosfat Tamponu (PBS):

4,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Aktin SaflaştırmaFosfat-KCl Çözeltisi:

1000 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

320 mM KOH

300 mM KCl

G-Aktin Tamponu:

5 mM K-Fosfat, pH:7,5

0,5 mM ATP

0,1 mM  $\text{CaCl}_2$

0,5 mM DTT

1 mM  $\text{NaN}_3$

F-Aktin Tamponu:

5 mM K-Fosfat. pH:7,5

10 mM NaCl

0,5 mM ATP

0,1 mM  $\text{CaCl}_2$

0,5 mM DTT

1 mM  $\text{NaN}_3$

3 mM  $\text{MgCl}_2$

Depolimerleşme Tamponu:

2 mM K-Fosfat, pH:7,5

0,5 mM ATP

0,1 mM  $\text{CaCl}_2$

0,5 mM DTT

1 mM  $\text{NaN}_3$

1  $\mu\text{M}$  K-EDTA

SDS-PAGEAyrırma Jeli (PAGE Alt Jeli):

3 ml 1,5 M Tris-HCl, pH:6,8  
112,5 µl % 10 SDS  
4,83 ml Akrlamid/bisakrlamid (30/0,8 w/w)  
30 µl % 10 Amonyum persülfat  
15 µl 6,56 M TEMED  
4,08 ml d H<sub>2</sub>O

Yığınlama Jeli (PAGE Üst Jeli):

1,25 ml 1 M Tris-HCl, pH:6,8  
50 µl % 10 SDS  
0,84 ml Akrlamid/bisakrlamid (30/0,8 w/w)  
40 µl % 10 Amonyum persülfat  
20 µl 6,56 M TEMED  
3,92 ml d H<sub>2</sub>O

PAGE Yürütme Tamponu:

3 g Tris  
15 g Glisin  
1 g SDS  
dH<sub>2</sub>O ile 1000 ml'ye tamamlanır.

PAGE Yükleme Tamponu:

3 ml 1 M Tris-HCL, pH:6,8  
1,6 ml % 99 Gliserin  
2 ml % 10 SDS  
0,4 ml 14 M MET  
0,2 ml % 0,1 Bromfenol mavisi  
0,8 ml dH<sub>2</sub>O

Jel Boyama Çözeltisi:

% 0,2 Coomassie parlak mavisi

% 50 Metanol

% 10 Asetik asit

Boya Çıkarma Çözeltisi:

% 7 Asetik asit

% 30 Metanol

Gridlerin negatif boyanmasıReynold's çözeltisi:

26,6 g/l Kurşun nitrat

35,2 g/l Sodyum sitrat

160 mM NaOH

Western EmdirimTBST Tamponu:

10 mM Tris-HCl, pH: 8,0

150 mM NaCl

% 0,05 Tween-20

Alkalen Fosfataz Substrat Tamponu:

100 mM Tris-HCl, pH: 9,5

100 mM NaCl

5 mM MgCl<sub>2</sub>

% 0,4 NBT

% 0,4 BCIP

Karbonat Tamponu, pH: 9,5

1,6 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

3,3 mM NaHCO<sub>3</sub>

Konjüгат Saklama Tamponu; pH: 8.2

150 mM NaCl  
10 mM Trizma

Liziz Tamponu:

1 mM PMSF  
1 mM EDTA  
% 0,5 Triton -X 100  
10 mM Tris-HCl, pH; 7,5

Gümüş Boyama ile BoyamaSabitleyici Tampon:

% 50 Metanol  
% 12 Asetik asit

Hızlandırıcı Basamak Tamponu:

0,2 g/l Na tiyosülfat

Boyama Tamponu:

2 g/l AgNO<sub>3</sub>  
0,75 ml/l Formaldehit

Görüntü oluşturma (“developing”) tamponu:

60 g/l NaCO<sub>3</sub>  
40 mg/l Na-tiyosülfat  
0,5 ml/l Formaldehit

Durdurma tamponu:

% 25 Etanol  
% 12 Asetik asit

### 3.3. Difteri toksininin *in vitro* uygulanması

DT, canlı sistemlere *in vitro* koşullar altında uygulandı. Hücre soyları arasından DT'ne duyarlı olan, insan göbek kordonu damar endotel hücreleri (HUVEC, *human umbilical vein endothelial cells*) ve toksine drençli olan 3T3 tipi fibroblastlar kullanıldı. Toksine duyarlı olan doku örneği olarak dana ve domuzdan kalp kası izole edildi ve ventrikülün uç kısmı ile çalışma yürütüldü.

Hücre ve dokular *in vitro* kültür koşullarında, % 5 karbondioksit ile havalandırılan inkübatörde, DMEM besleyici sıvısı içinde tutuldu. DT miktarı ve bekletme süreleri tablo 1'de belirtildiği gibi uygulandı. Toksin uygulanmayan dokular kontrol gurubu olarak değerlendirildi.

**Tablo 3-1: Difteri toksini uygulama şeması.**

<u>BEKLETME</u>	<u>DİFTERİ TOKSİNİ MİKTARI</u>			
	<u>Kalp kası (2 g)</u>		<u>Hücre (10<sup>6</sup>)</u>	
	<u>Dana</u>	<u>Domuz</u>	<u>HUVEC</u>	<u>Fibroblast</u>
10 dak			50 ng/ml	
30 dak			50 ng/ml	
1s		1 µg/ml	50 ng/ml	
1,5 s			1 µg/ml	1 µg/ml
2s		1 µg/ml, 10 µg/ml		
3s		1 µg/ml		
4s		1 µg/ml		
6 s	250 ng/ml			
12 s	250 ng/ml			
18 s			100 ng/ml	
24 s	250 ng/ml			

### 3.4. Işık mikroskobu ile inceleme hazırlığı

Dana kalp kası doku parçalarının takibi, 6, 12 ve 24 saat boyuca 250 ng difteri toksini ile bekletildikten sonra temel histolojik yöntemler kullanılarak yürütüldü. Bekletmenin ardından dokular % 10'luk tamponlu formaldehit içinde 18 saat tespit edildi. Dokunun içindeki suyun alınması için (dehidratasyon) kas parçaları sıra ile % 70, % 80, % 90, % 96, % 100 alkol serilerinden geçirildi ve toluol ile saydamlaştırıldı. Kesit

alınması için doku parçaları 56 °C'lık etüvde (Herdeus) 2 saat sıvı parafinde (Kimetsan KIM-PNB/OICP/040220) bekletildi ve parafin blok içine gömüldü. Mikrotom (Leica RM 2255) ile 4 mikronluk kesitler alındı. Kesitler Peryodik asit-Schiff (PAS) boyası kullanılarak (Leitz Wetzlar) ışık mikroskobunda görüntülendi ve histolojik olarak değerlendirildi.

#### **3.4.1. PAS boyaması**

Difteri toksini etkisi altındaki kalp kası dokusunda, inflamatuvar yanıt ile ilişkili olan polimorf nükleer ve mononükleer hücrelerin yerlerini saptamak üzere, Periyodik asit-Schiff (PAS) boyası kullanıldı.

Parafin kesitler 30 dakika toluolde bekletilip parafinden arındırıldı. Kesitler yüzdeleri azalan alkol serilerinden geçirilerek (% 100, % 96, % 90, % 70) distile suya indirildi. İki dakika periyodik asitte tutuldu. 10 dakika distile su ile yıkandı. Preparatlar kurulandı. Kesitler 10 dakika Schiff reaktifi ile muamele edildikten sonra 10 dakika akansu altında tutuldu. Hemalun boyası ile 10 dakika muamele edilen preparatlar 10 dakika akansuda tutuldu ve 2 kere saf alkolden geçirildi. Preparatlar toluole kondu ve Kanada balzamu ile kapatıldı. Boyama sonucunda kalp kası kesitlerinde glikoprotein, glikojen ve diğer karbonhidratlar mor-menekşe rengine, çekirdek mavi renge boyandı.

#### **3.5. 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) içerisinde 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, içerisinde oda sıcaklığında 1 saat bekletilerek hazırlandı. Konjüгатın bulunduğu karbonat tamponu, DT'ne bağlanmayan FITC moleküllerini uzaklaştırmak amacı ile saklama tamponuna karşı, gece boyu 250 µl'lik tüpte (GEBAflex) diyalizlendi. Diyaliz öncesinde ve sonrasında toksin-FITC etkileşimi, floresan spektroskopisinde uygun dalga boyunda (496 nm - 520 nm) uyarılarak FLWINLAB bilgisayar programı aracılığı ile gösterildi.



Aynı şekilde eEF-2'ye karşı geliştirilmiş olan poliklonal anti-eEF-2 antikoruna da FITC ile etiketlendi (69).

### 3.6. Floresan mikroskopu ile inceleme hazırlığı

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

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

Fluoroforların uyarılma-salım değerlerine göre (Tablo 3-2) floresan mikroskopta Olympus U-25ND25 ve U-25ND6 filtreleri kullanıldı.

**Tablo 3-2: Fluoroforların uyarılma-salım değerleri.**

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

#### 3.6.1. DT-FITC konjüгатının hücreye uygulanması

HUVEC ve 3T3 tipi fibroblastlar DMEM içinde çoğaltıldıktan sonra 6'lık kuyulara yerleştirilen lameller üzerine ekildi. Hücrelerin kültür ortamında 1 gün boyunca bekletilerek lamalara yapışması sağlandı. Ortama 1 µg/ml DT-FITC ilave edildikten sonra kültür ortamında 1,5 saat bekletildi. Floresan işaretli toksinin dağılımı, lamel üzerine tespit edilen hücrelerde, uygun filtreler kullanılarak floresan mikroskopta (Olympus BX51) immersiyon (dalma) objektifi ile x100 büyütmede incelendi. Görüntüler fotoğraf makinesi (Olympus C-7070) ile elde edildi.

DT'nin hücre iskeleti ile olan ilişkisini görüntülemek amacı ile yalnızca aktin filamentlerine bağlanan fluorofor etiketli falloidin kullanıldı. Alexa fluor-594 falloidin

% 1 PBS-BSA ile 1:500 oranında seyreltildi. Lamel üzerindeki HUVEC hücreleri, 100 ng DT-FITC ile 18 saat bekletildikten sonra lameller PBS tamponu ile yıkandı. Boyamanın her aşamasının ardından PBS ile yıkama tekrarlandı. Yıkamanın ardından hücreler 30 dakika tespit çözeltisi (% 2 paraformaldehit-PBS) ile bekletildi. Hücre membranının geçirgenliğini arttırmak üzere 30 dakika % 0.1 Triton-X-100 PBS ortamına alındı. Hücreler falloidin ile oda sıcaklığında 1 saat süre ile boyandı. Boyama işleminin bitiminde floresan boyanın kalımlılığını arttırmak amacı ile lamellere % 1 lik gliserol-PBS karışımı uygulanarak lam üzerine yapıştırıldı. Tokisin hücre içinde yeşil, aktin iskeleti kırmızı renkte görüntülendi.

### **3.6.2. HUVEC ile DT-FITC etkileşiminin floresan ölçüm ile belirlenmesi**

HUVEC hücreleri 1 µg DT-FITC ile 1,5 saat bekletildi. Hücreler tripsin ile çözüldü ve 3000 xg'de 5 dakika santrifüj ile çöktürüldü. DMEM'den arındırmak üzere PBS ile yıkanan hücreler tekrar çöktürüldü. Pelet halindeki hücreler "lysis buffer" ile buzda 10 dakika bekletildi ve insülin enjektörü ile hücreler patlatıldı. Hücre içeriği ile floresan ölçüm yapıldı. Parçalanmış hücreler 3000 xg'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra üst sıvıda kalan çekirdekler DAPI ile işaretlenerek floresan mikroskopunda mavi renkte görüntülendi.

### **3.6.3. Kalp kası dokusunun immünfluoresan yöntem ile işaretlenmesi**

Kalp kası miyofibrillerinde DT etkisini görüntüleyebilmek amacı ile domuz kalp kası parçaları 2-metil-bütan (izopentan) içinde sıvı nitrojen ile donduruldu. Kriyo kesitler için dokular iki şekilde saklandı. Kriyomatriks ile sabitlenecek dokular, doğrudan kültür tüplerine aktarıldı ve -70 °C'ta saklandı. Mantar üzerine sabitlenecek dokular için önce gömme hamuru hazırlandı. Bunun için 10 gram tragakant, 60 °C'lık etüvde 2 saat boyunca eritilen timol parçaları ve 100 ml distile su içinde, çeker ocak altında bulamaç haline gelene dek karıştırıldı. Dokular bekletme süresinin sonunda mantar üzerine gömme hamurunun içine yerleştirildikten sonra izopentan ile sıvı nitrojende donduruldu. Katılaştıran doku daha sonra -70 °C'ta saklandı.

Kriyo kesitler 4 µm kalınlığında, poli-L-lizin kaplı lamlara alındı. Preparatlar önce 30 dakika soğuk hava ile kurutuldu, asetonda 5 dakika bekletilerek tespit edildi. Asetonun uçması beklendikten sonra preparatlar takibe alındı. Saklanacak preparatlar

derin dondurucuya (-20 °C) yerleştirildi. Dokudaki geçirgenliği arttırmak üzere % 1 Triton-X-100, zemin boyanmasını engellemek üzere % 1 PBS-BSA ve ara yıkamalar için PBS kullanıldı.

Aktin filamentleri aktine özgü floresan etiketli Alexa fluor 594-falloidin ve falloidin-TRICH 1:100 oranında PBS ile sulandırılarak 1 saat süre ile işaretlendi. Aktin filamentleri floresan mikroskopta kırmızı renkte görüntülendi. Domuz kas dokusunun 1 µg DT ile 2 saat bekletildikten sonra alınan kesitlerde aktin filamentlerinin işaretlenmesinin yanı sıra toksinin yerini belirlemek üzere 1. antikor olarak “*DT fragment A mouse monoklonal.*” (1:500), Santa Cruze ve 2. antikor olarak *anti-mouse IgG –FITC* (1:1000) kullanıldı.

FITC ile etiketlenen anti-EF-2 antikoruna da eEF-2'nin kas dokusundaki dağılımını görüntülemek üzere sıçan kalp kasına uygulandı. Kriyokesitlerde aktin filamentleri falloidin-TRICH ile kırmızı, EF-2 yeşil olarak görüntülendi.

### **3.7. İletim elektron mikroskobu (TEM) ile inceleme hazırlığı**

Kalp kası doku parçaları, öngörülen bekleme sürelerinin sonunda 1 mm<sup>3</sup>lük parçalar halinde 0,1 M'lık fosfat tamponu ile (pH 7,4) hazırlanmış olan % 2,5 luk glutaraldehit içinde tespit edildi ve ince yapı düzeyinde incelenmek üzere rutin takibe alındı (Tablo 3-3). PBS ile yıkanan doku parçaları 1 saat süre ile ikinci tespit sıvısı olan % 1'lik osmik asit ortamına alındı. Tekrar PBS ile yıkanan dokular % 1 uranil asetatla 1 saat 4 °C'ta bekletildi. PBS ile yıkama sonrasında dokular aseton serisinden geçirildi. Aseton serilerinin son basamağı olan % 100 asetonun ardından 1:1 oranında ve 1:3 oranında aseton: epon karışımında birer saat bekletildi.

**Tablo 3-3: Elektron mikroskop incelemesi için yürütülen rutin takip**

Fosfat tamponu (PBS)	2x10 dakika
Osmik Asit (İkinci fiksatif)	1 saat
PBS	10 dakika
Uranil Asetat (%1)	1 saat
PBS	10 dakika
% 30 Aseton	10 dakika
% 50 Aseton	10 dakika
% 70 Aseton	10 dakika
% 90 Aseton	10 dakika
% 96 Aseton	10 dakika
% 100 Aseton	10 dakika
% 100 Aseton	10 dakika
1:1 (Aseton: Epon)	1 saat
1:3 (Aseton: Epon)	1 saat
Saf epon	1 saat

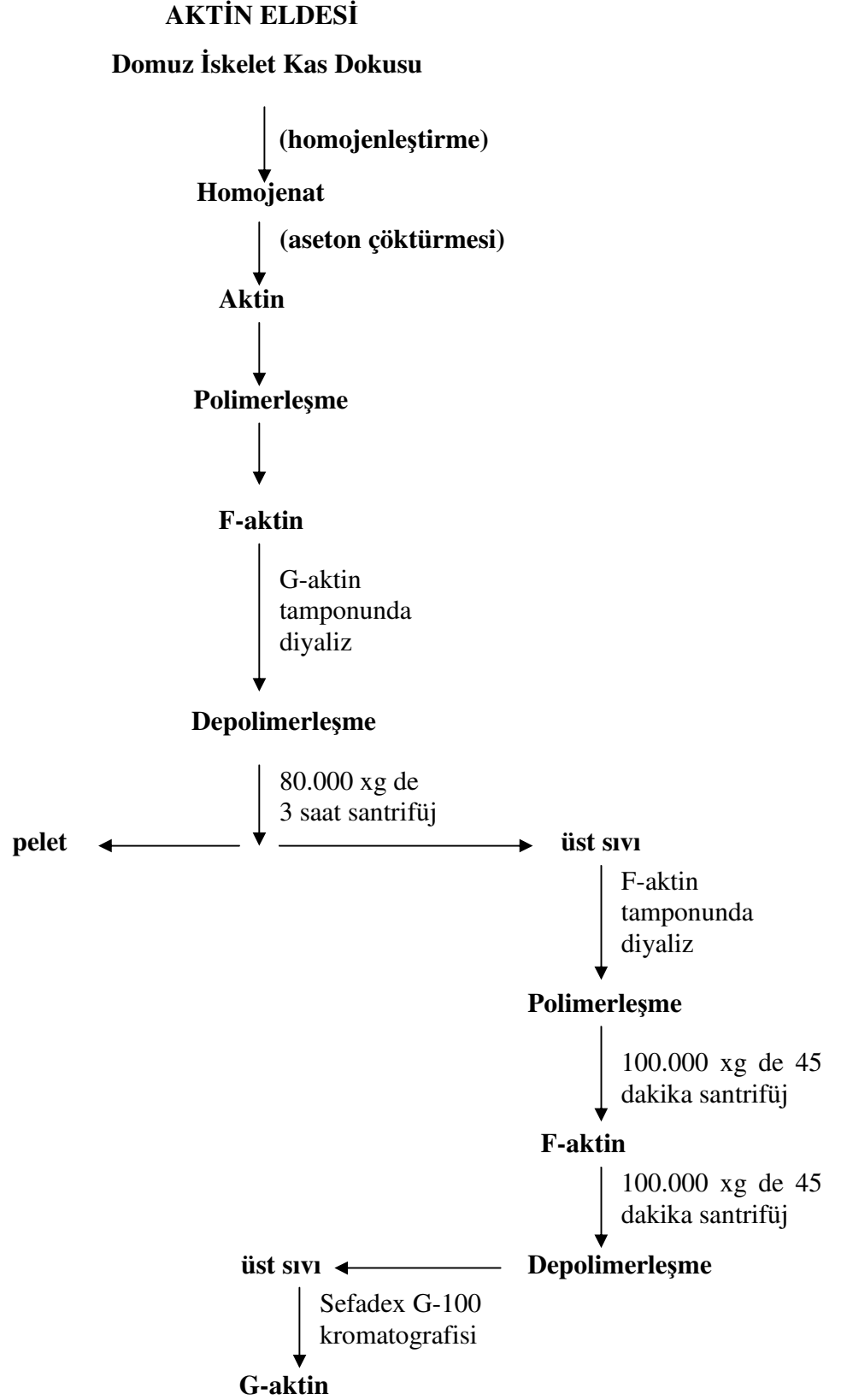
Takibin son aşamasında 1 saat süre ile saf eponda bekletilen kalp kası parçaları kapsüller içine doldurulmuş epona gömüldü. Kapsüller, polimerleşme için 60 °C etüvde 18 saat bekletildi. Doku bloklarından C:Reichert OM U3 marka ultramikrotom ile alınan 0,5 µm kalınlığındaki ince kesitler 100 pencereci gridler üzerine alındı. Bu işlemden önce dokunun gride kolay tutunmasını sağlamak ve yüzey gerilimini azaltmak için gridler, karbon kaplandı. Kontrast arttırmak için negatif boyama tekniği kullanıldı. Gridler, oda ısısında 30 dakika, distile su ile doyurulup filtre edilmiş (% 2) uranil asetat ile boyandı. Distile su ile yıkanan gridler 10 dakika kurşun nitrat (Reynold's çözeltisi) damlaları üzerinde bekletildi. Kalp kas dokusundan alınan ince kesitler transmisyon elektron mikroskopunda (JEOL JEM 1011) incelendi ve görüntüleri bilgisayar ortamına aktarıldı.

### 3.8. İskelet kasından aktin saflaştırılması

Domuz bacak kasından yaklaşık 2 kg ağırlığında çizgili kas dokusu çıkartıldı. Kas dokusu 30 dakika 0 °C'ta bekletildikten sonra kıyım makinesinden geçirildi böylece kas lifleri 1-2 mm'lik parçalara ayrıldı. Kıyılmış kas dokusu, ağırlığının 3 katı kadar fosfat-KCl çözeltisi ile homojenleştirildikten sonra çözülmüş proteinlerin ayrışması için homojenatın 12 kat hacminde distile su ile 3-4 kez yıkandı. Filtre edilen homojenat 5 kat hacim (0,5 M NaHCO<sub>3</sub> ve 0,1 mM CaCl<sub>2</sub>) içerisinde 30 dakika

karıştırılarak tekrar filtre edildi. Süzütünün üzerine 10 hacim 0 °C'de su eklenerek yeniden filtreden geçirildi. Son aşamada süzöntü 2 hacim soğuk aseton içersinde 30 dakika karıştırılarak filtre edildi. Bu aşama 4 kez tekrar edildi ve büyük bir kısmını aktinin oluşturduğu süzöntüden aseton uçuruldu.

G-aktin ve F-aktin saflaştırılması için kurutulmuş lif iskeletinden 1 gr tartılarak 20–25 ml G-aktin tamponunda (5 mM K-Fosfat pH 7,5; 0,5 mM ATP; 0,1 mM CaCl<sub>2</sub>; 0,5 mM DTT; 1 mM NaN<sub>3</sub>) çözüldü. Çözelti 0,2 µm'lik filtreden geçirildi. G-aktin çözeltisi içersine 3 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,5 mM DTT, 1 mM NaCl ilave edilerek 30 dakika oda ısısında bekletildi ve G-aktinin polimerleşmesi için gece boyu 4 °C'de bekletildi. Çözelti, F-aktinlerin çöktürülmesi için, 14 °C'de 2,5 saat 80.000 x g'de santrifüjlendi. Pelet tekrar, polimerleşme (depolimerizasyon) tamponuna (2 mM K-Fosfat pH 7,5; 0,5 mM ATP; 0,1 mM CaCl<sub>2</sub>; 0,5 mM DTT; 1 mM NaN<sub>3</sub>; 50 mM Tris-HCl pH:7,4) alınarak F-aktin homojenleştirildi. Homojenat 100.000 x g'de 45 dakika santrifüjlendi ve G-aktinin bulunduğu üst sıvı alındı. Saflaştırma aşamaları için akış şeması (Şekil 3-1) izlendi.



Şekil 3-1: Domuz kas dokusundan G- ve F-aktin saflaştırılması.

### 3.9. Aktinin elektroforez ile analizi

Saflaştırılan aktin, Laemmli yöntemine göre sodyum dodesil sülfat (SDS) poliakrilamit jel elektroforezi (PAGE) ile test edildi (70). Cam plakalar arasına silikon ayıraç yerleştirilerek % 12'lik ayırma jeli döküldü. Düzgün bir jel yüzeyi oluşturmak üzere 1 cm'lik su tabakası oluşturulup 30 dakika polimerleşme için beklendi. Jelin üzerindeki su tabakası dökülerek % 5'lik yığınlama jeli eklendi. Zaman kaybetmeden, örneklerin yükleneceği kuyuları oluşturacak tarak cam plakalar arasına yerleştirildi ve polimerleşme için beklendi. Elektroforeze verilecek örnekler, denatüre edici (yükleme) tamponla 1:1 oranında karıştırılıp 3 dakika kaynatıldı. Elektroforez aletinin (BioRad) anot ve katot hazneleri yürütme tamponu ile dolduruldu. Örnek yükleme sırasında bir kuyuya da moleküler ağırlık standartları olarak, BSA ( $M_r$  66 kDa ), ovalbumin ( $M_r$  45 kDa ) ve karbonik anhidraz ( $M_r$  29 kDa) proteinlerinden oluşan karışım yüklendi. Yığınlama jeli için 80 Volt, ayırma jeli için 100 Volt gerilim uygulandı. Elektroforez sırasında kullanılan işaret boyası (Brom fenol mavisi) jelin sonuna geldiğinde akım kesildi. Jel, elektroforez aletinden ve iki cam arasından çıkartılarak Coomassie parlak mavsi ile boyanmaya bırakıldı. Daha sonra jel, boya çıkartma çözeltisinde tutularak fazla boya uzaklaştırıldı.

Elde edilen G-aktinin tekrar polimerleşmesi sağlandı. F-aktinin depolimerleştirme ve çöktürme aşamaları tekrar edildi ve üst sıvıda kalan G-aktinin SDS-PAGE ile yürütülüp gümüş boyama ile saflığı test edildi.

Aktinin DT ile etkileşimi, aşağı çöktürme yöntemi ile belirlendi ve SDS-PAGE jel elektroforezinde proteinler ayrıştırıldı. Western emdirim yöntemi ile jelde yürütülen proteinler, TBS (Tris-buffered saline)-Tween (TBST) ve % 0,5 BSA ile 1 saat işlem görmüş nitroselüloz (Milipore) membranlara yarı-kuru emdirim kasasında (*semi-dry blot*) aktarıldı. Aktine özgü antikorlar ve alkalin fosfataz etiketli ikinci antikorlar ile membran, alkalin fosfataz substrat tamponuna alındı. Kromojenik tepkime oluşmasının ardından 3-amino-etil- karbonat substrat çözeltisi ile tepkime durduruldu. Membranda oluşan sinyal jeldeki protein profili ile karşılaştırıldı.

#### 3.9.1. Aşağı çekme “Pull-down” yöntemi ile protein etkileşimlerinin belirlenmesi

Difteri toksini ile aktinin etkileştiğini göstermek üzere *pull-down* protein etkileşim kiti kullanıldı. Kit içerisindeki streptavidin etiketli boncuklu karışım, özel yapılmış santrifüj tüplerine kondu. Biotinlenmiş olan G-aktinin streptavidine

bağlanması sağlandı. “Avcı” protein olan G-aktin, HUVEC hücrelerinden elde edilen hücre özütü içindeki “yem” proteinler ile etkileşime bırakıldı. Kite belirtilen yıkama ve santrifüj aşamaları ile bağlanmayan proteinler uzaklaştırıldı. Yıkama aşamasından sonra ayrıştırılan kısım SDS-PAGE jel elektroforezinde yürütüldü. Jel, Coomassie parlak mavisi ile boyandı. Aşağı çekme yönteminin son aşamasında elde edilen ayrıştırma kısmında, difteri toksininin “fragment” A bölümü, Western emdirim yöntemi ile görüntülendi.

### 3.9.2. Biotin ile aktinin etiketlenmesi

Saflaştırılan G-aktinin biyotin ile etiketlenmesi için *sulfo-NHS-LC biotin* (Pierce) kullanıldı. G-aktin ile biyotin oda ısısında, 1:50 molar orantıda 200 µl PBS’te, 1 saat bekletildi. Etiketlenen G-aktin gece boyu 4 °C’ta 250 µl’lik tüpte (GEBAflex) diyalizlendi ve bağlanmayan biyotin uzaklaştırıldı.

### 3.10. eEF-2’nin ADP-ribozillenmesi

DT toksinin bir saat içindeki etkisini gözlemlemek üzere 50 ng/ml DT HUVEC hücrelerine 10, 30 ve 60 dakika boyunca uygulandı. Hücreler liziz tamponu ile patlatıldıktan sonra eEF-2’nin ADP-ribozillenme tepkimesine dayanarak zaman içindeki DT etkinliği ölçüldü. Hücre özütü (10 µl), 12 µg/ml DT ve 2 µM <sup>14</sup>[C] NAD (242 Ci/mol) tepkime hacminde 10 dakika bekletildi. Hücrelerdeki 50 ng DT ile ADP-ribozillenmeyen eEF-2 moleküllerinin, radyoaktif işaretli NAD ile ADP-ribozillenme miktarını ölçmek üzere tepkime hacmi Whatman GF/C filtreleri üzerine yayılarak soğuk % 10 TCA içerisinde çöktürüldü. Filtrelere daha sonra iki kez birer dakika 20 °C’ta % 5 TCA ve yine iki kez birer dakika alkol içinde çalkalanarak kurutuldu.

### 3.11. Radyoaktivitenin belirlenmesi

Sıvı sintilasyon sayacının (Packard Tri-Carb 1000 Tr) sayım verimi % 99 olarak ölçüldü. Radyoaktif örnekleri taşıyan kurutulmuş GF/C filtreler % 0,4 2,5-difeniloksaloz (PPO) içeren toluol cam şişelere yerleştirildi. Şişeler sıvı sintilasyon sayacına konup elde edilen sayım (cpm) değerleri belirlendi.

Sayaçta belirlenen cpm’in (dakikadaki sayım) pmol’e çevrilmesi için radyoaktif miktar tayininde kullanılan eşitlikten yararlanıldı.



**Radyoaktif miktar tayininde kullanılan eşitlik.** Hücrelerdeki 50 ng/ml DT ile ADP-ribozillenmeden kalan eEF-2 molekülleri, Gereç ve Yöntemler Bölümü 3.6. kısmında açıklandığı gibi hazırlanan lizatlar içersine 12 µg/ml DT, 2 µM <sup>14</sup>[C] NAD varlığında 10 dakika süre ile ADP-ribozillenme gerçekleştirilerek eEF-2 miktarı aşağıdaki eşitlik ile hesaplandı (3-1).

$$\text{pmol} = \frac{\text{cpm} \times 100}{2,22 \times \text{sayım verimi (\%)} \times \text{özgün etkinlik (Ci/mol)}} \quad (3-1)$$

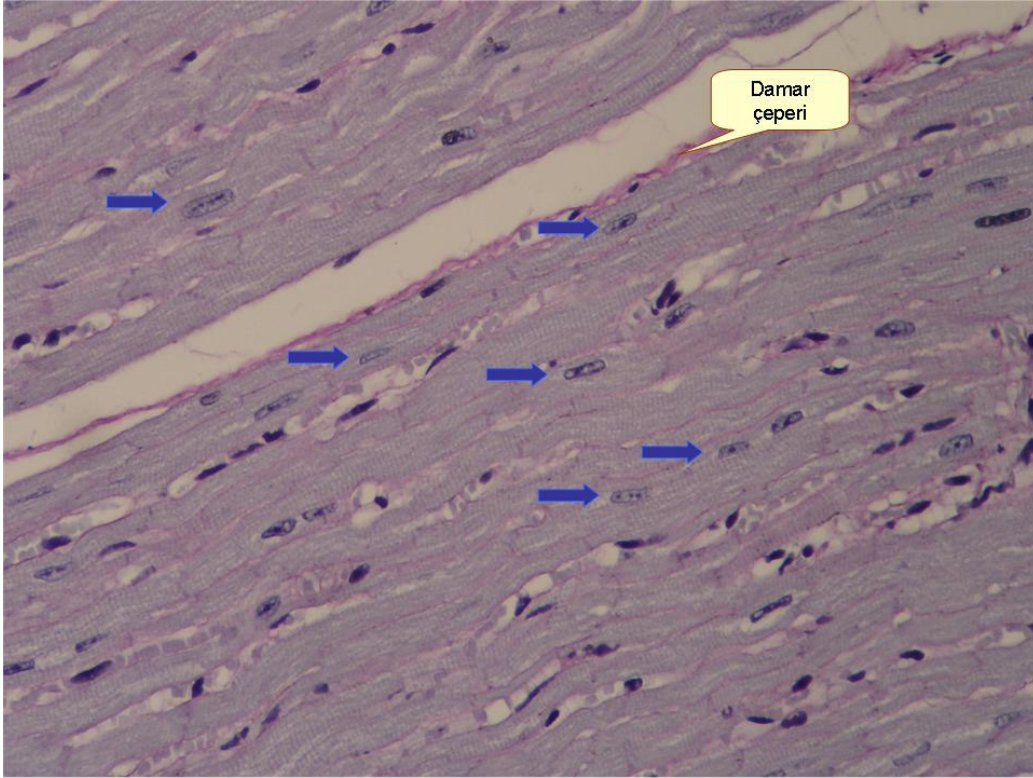
**Radyoaktif miktar tayininde kullanılan eşitlik.**

## 4. BULGULAR

### 4.1. Kalp Kasında Difteri Toksininin Etkisinin Belirlenmesi

#### 4.1.1. Işık mikroskop bulguları

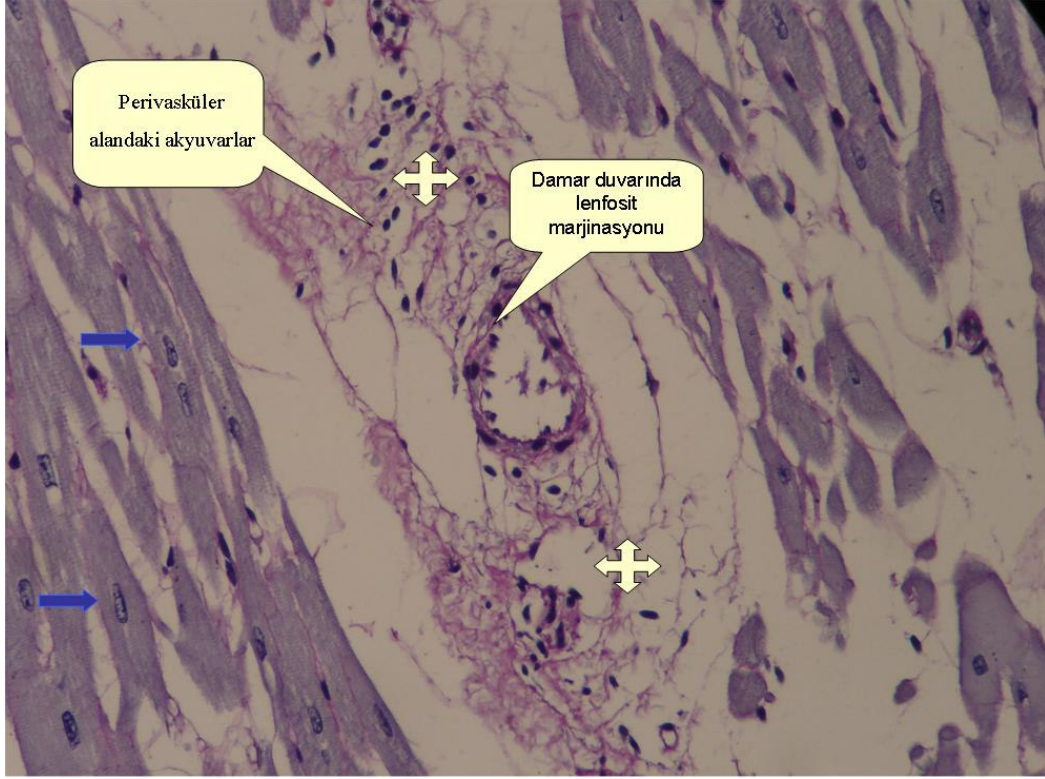
Işık mikroskobu kullanılarak difteri toksini etkisi zamana bağlı olarak kalp kası dokusunda incelendi. Gereç ve Yöntemler Bölümü'nde açıklandığı şekilde PAS boyası ile elde edilen görüntüler Şekil 4-1, Şekil 4-2, Şekil 4-3 ve Şekil 4-4 de görülmektedir. Işık mikroskobu ile incelenen histolojik bulguların gösterildiği şekillerde, çekirdekler mavi oklar ile işaretlendi. Bu görüntülerde inflamatuvar yanıt ile ilişkili olan hücrelerin yerleri saptandı. Difteri toksini uygulanmayan doku kontrol gurubu olarak kabul edildi (Şekil 4-1).



**Şekil 4-1: PAS boyaması ile kontrol kalp kas görüntüsü.**

Görüntüler Gereç ve Yöntemler Bölümü'nde açıklandığı şekilde elde edildi. Çekirdekler mavi oklar ile gösterilmektedir (Büyütme; x40).

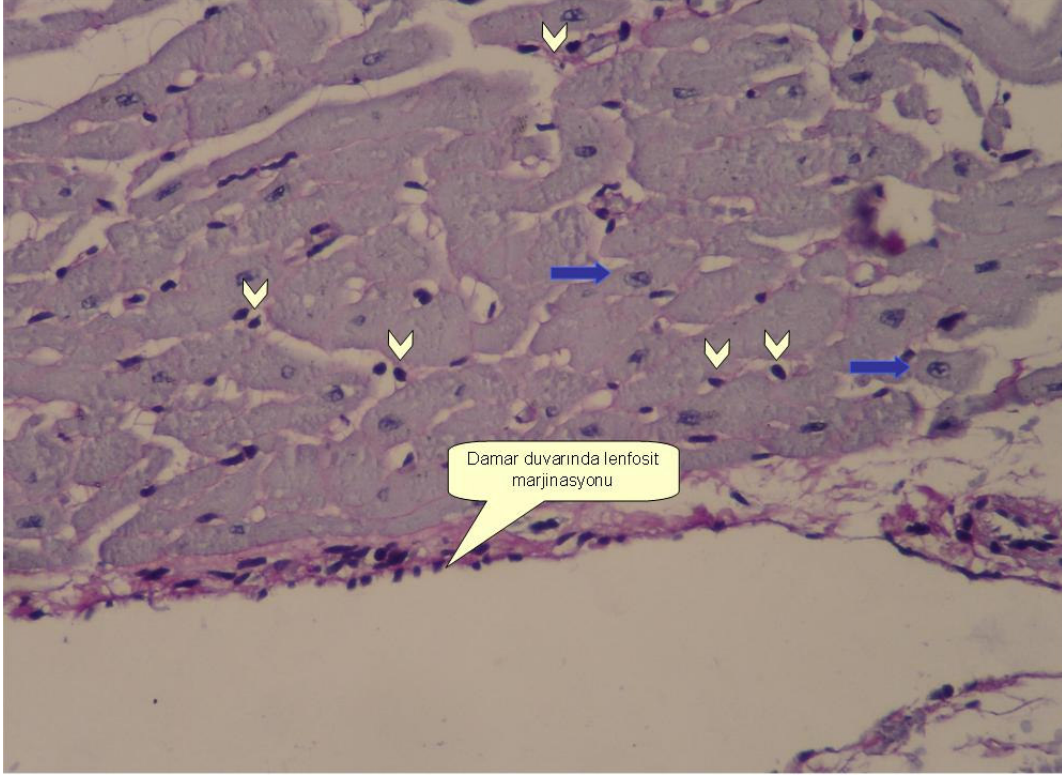
250 ng/ml DT ile 6 saat bekletilen dokular Şekil 4-2'de görülmektedir. Bu süre sonunda kas içi venlerde akyuvar marjinasyonu gözlemlendi. Ayrıca perivasküler alanlarda akyuvarların yayıldığı belirlendi.



**Şekil 4-2: DT (250 ng/ml) ile 6 saat bekletilen kalp kası görüntüsü.**

Görüntüler kalp kası Gereç ve Yöntemler Bölümü'nde açıklandığı şekilde 250 ng/ml DT ile bekletildikten sonra alındı. Mavi oklar çekirdekleri göstermektedir. Akyuvarların yayıldığı alanlar ise sarı oklar ile gösterilmektedir (Büyütme; x40).

Aynı miktar (250 ng/ml) DT ile 12 saat bekletilen kalp kas dokusunda ise daha çok perivasküler alanda olmak üzere damar dışında da akyuvarların bulunduğu saptandı. Ayrıca damar duvarlarında akyuvar marjinasyonu görüntülendi (Şekil 4-3).



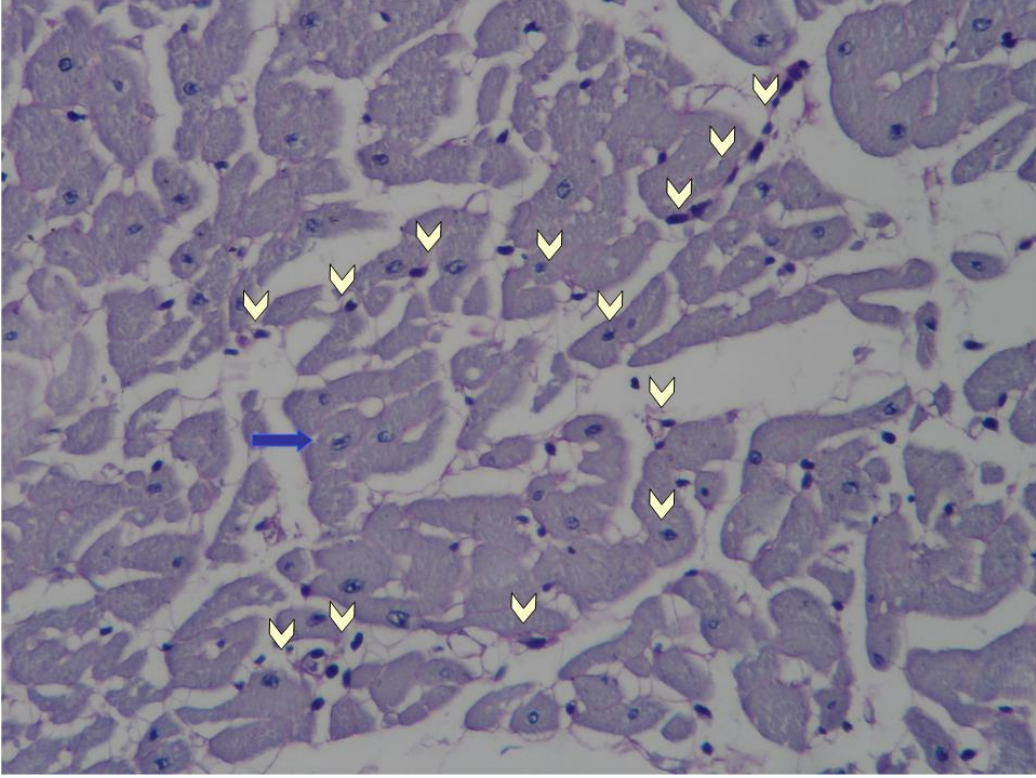
**Şekil 4-3: DT (250 ng/ml) ile 12 saat bekletilen kalp kası görüntüsü.**

Görüntüler kalp kası Gereç ve Yöntemler Bölümü'nde açıklandığı şekilde 250 ng DT ile bekletildikten sonra alındı. Mavi oklar çekirdekleri göstermektedir. Sarı oklar lenfositleri göstermektedir (Büyütme; x40).

DT (250 ng/ml) ile 24 saat bekletilen kas dokusunda akyuvarların miyofibrillerin çevresinde ve perimisyum bölgesinde dağılmış durumda olduğu belirlendi (Şekil 4-4).

Işık mikroskobu kullanılarak difteri toksini etkisinin zamana bağlı olarak kalp kası dokusunda incelenmesi sonucunda, yangısal yanıtın damar çevresinde sınırlı kalarak başlangıç aşamasında olduğu saptandı. DT'nin 24 saatlik uygulamasında akyuvar infiltrasyon düzeyinin çok düşük seviyede kaldığı belirlendi.

Kas liflerinde, bekletme ortamı ile temas eden kısımlarda görece daha fazla olan bozulmalar saptandı. DT (250 ng/ml) ile 24 saat bekletilen kas dokusunda oluşan bozulmaların düzeyi elektron mikroskobu ile incelendi.

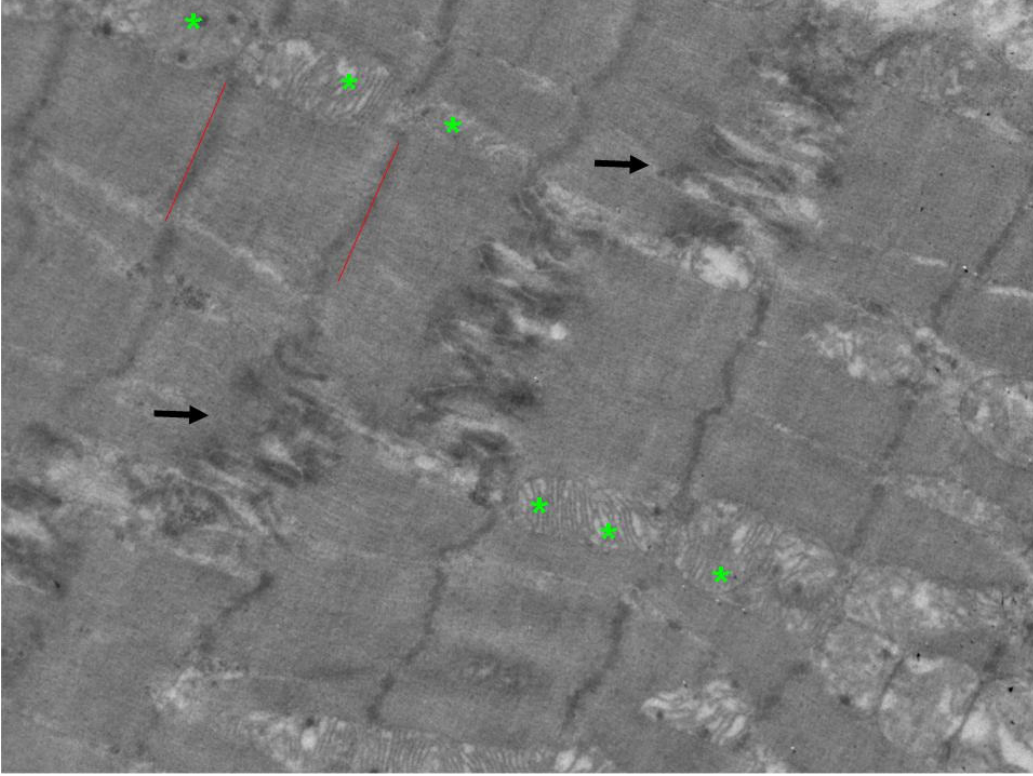


**Şekil 4-4: DT (250 ng/ml) ile 24 saat bekletilen kalp kası görüntüsü.**

Görüntüler kalp kası Gereç ve Yöntemler Bölümü'nde açıklandığı şekilde 250 ng DT ile bekletildikten sonra alındı. Mavi ok çekirdekleri göstermektedir. Sarı oklar lenfositleri göstermektedir (Büyütme; x40).

#### **4.1.2. İletim elektron mikroskop (TEM) bulguları**

DT uygulamasının 24 saat sonunda miyofibrillere olan etkisi ince yapı düzeyinde incelendi. TEM görüntüleri Gereç ve Yöntemler Bölümü'nde açıklandığı şekilde elde edildi. Kontrol dana kalp kası miyofibrillerinin sağlam ve düzgün olduğu görüntülendi. Liflerdeki bant görüntüsünün belirgin, interkalar disklerin düzenli, çekirdeklerin miyofibrillerin merkezinde ve mitokondrilerde belirgin kristalların olduğu gözlemlendi. Elektronmikrografta büyütme; x15.000 olarak alınmıştır. Kırmızı çizgiler bir sarkomerin Z bandı hattını, yeşil yıldızlar mitokondrileri, siyah oklar interkalar diski işaret etmektedir (Şekil 4-5).

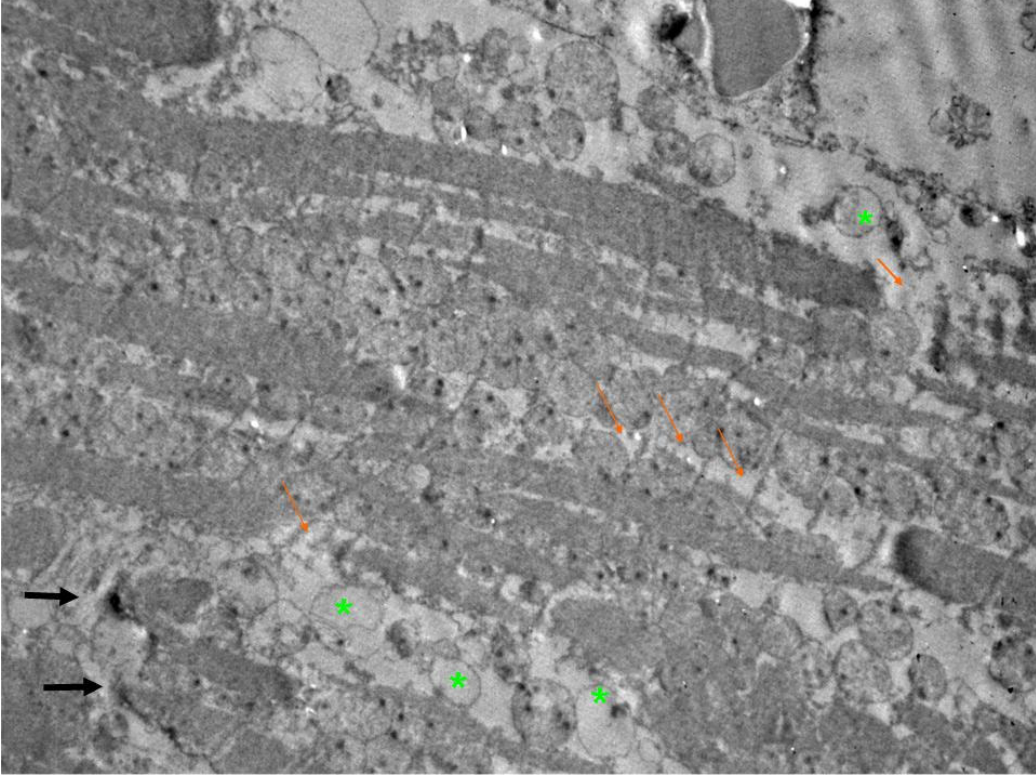


**Şekil 4-5: Kontrol kalp kası miyofibrillerinin TEM ile görüntüsü**

Görüntüler Gereç ve Yöntemler Bölümü'nde açıklandığı şekilde elde edildi. Elektronmikrografta kırmızı çizgiler bir sarkomerin Z bandı hattını, yeşil yıldızlar mitokondrileri, siyah oklar ise interkalar diski işaret etmektedir (Büyütme; x15.000).

Yirmi dört saatlik 250 ng/ml DT uygulamasında, belirgin olarak interkalar disk yapısında yer alan desmozomlarda ayrışma olduğu, bant görüntüsünde düzensizliklerin ve yer yer miyofibriloliz bölgelerinin bulunduğu, mitokondrilerin kristalarında silinme ve bazı kas liflerinin çekirdeklerinde kromatoliz bulunduğu gözlemlendi. Elektronmikrografta büyütme; x5000 olarak alınmıştır. Turuncu oklar bozulmuş sarkomerleri göstermektedir (Şekil 4-6).

Bu uygulama sonunda DT bekletme sürelerinin kısaltılması ve *in vitro* uygulanan DT miktarının artırılması öngörüldü.



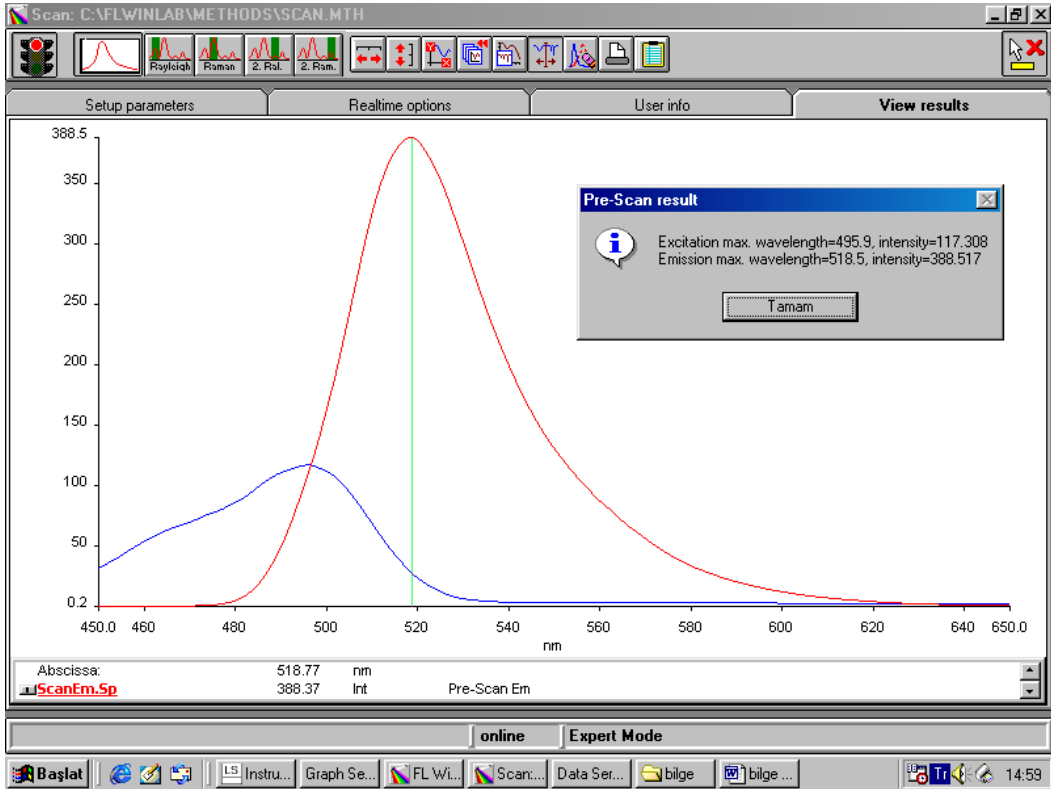
**Şekil 4-6: DT (250 ng/ml) ile 24 saat bekletilen kasta miyofibrillerin TEM görüntüsü.**

Görüntüler Gereç ve Yöntemler Bölümü'nde açıklandığı şekilde elde edildi. Elektronmikrografta turuncu oklar bozulmuş sarkomerleri yeşil yıldızlar mitokondrilerleri göstermektedir (Büyütme; x15.000).

#### **4.2. DT-FITC konjüгат analizi**

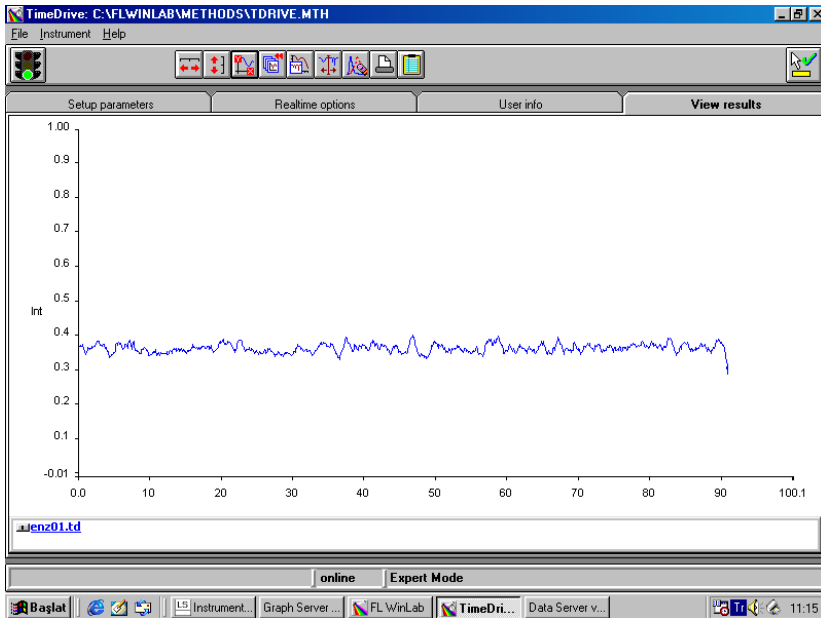
DT'nin hücre ve dokuda aktin iskeleti ile olan etkileşimini floresan mikroskop aracılığı ile görüntülemek için DT, FITC floroforu ile etiklendi. FITC floroforunun etkinliği floresan spektrofotometresinde yapılan ölçümler ile incelendi.

Gereç ve Yöntemler Bölümü'nde açıklandığı şekilde, floresan spektrofotometresi ile yapılan ölçümlerde konjüгат için hazırlanan FITC'nin en yüksek uyarılma-salım değerlerinin 496 nm-520 nm dalga boyu aralığında olduğu saptandı (Şekil 4-7). FITC'nin seyreltildiği saklama tamponunun en yüksek uyarılma-salım dalga boylarında (493 nm-518 nm) floresan şiddeti ölçüldü. Saklama tamponunun, protein etiketlemenin ardından yapılan diyaliz ortamı için uygun olduğu saptandı (Şekil 4-8).



**Şekil 4-7: FITC'nin uyarılma-salım tayfı.**

Görüntü floresan spektrofotometresi ile Gereç ve Yöntemler Bölümü'nde açıklandığı şekilde yapılan ölçümlerde alındı.



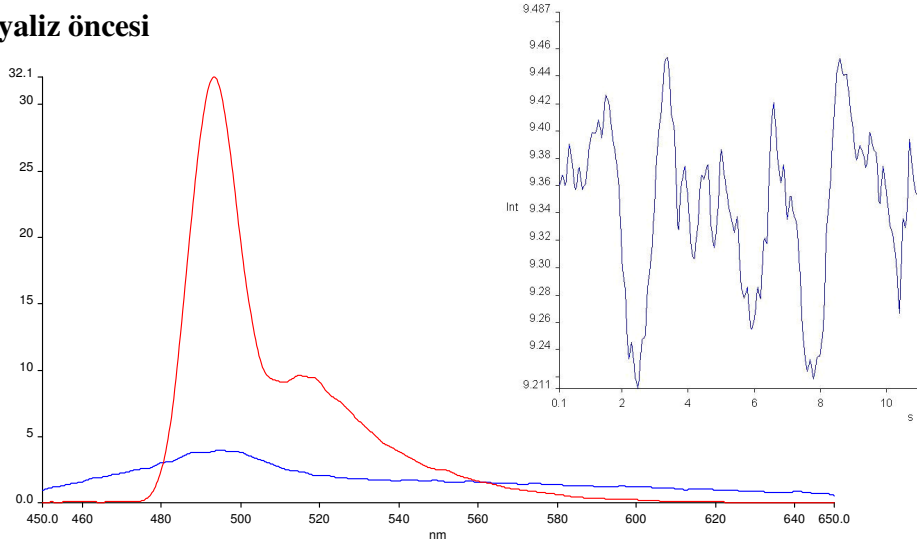
**Şekil 4-8: Saklama tamponunun floresan şiddet ölçümü.**

Görüntü floresan spektrofotometresi ile Gereç ve Yöntemler Bölümü'nde açıklandığı şekilde yapılan ölçümlerde alındı.

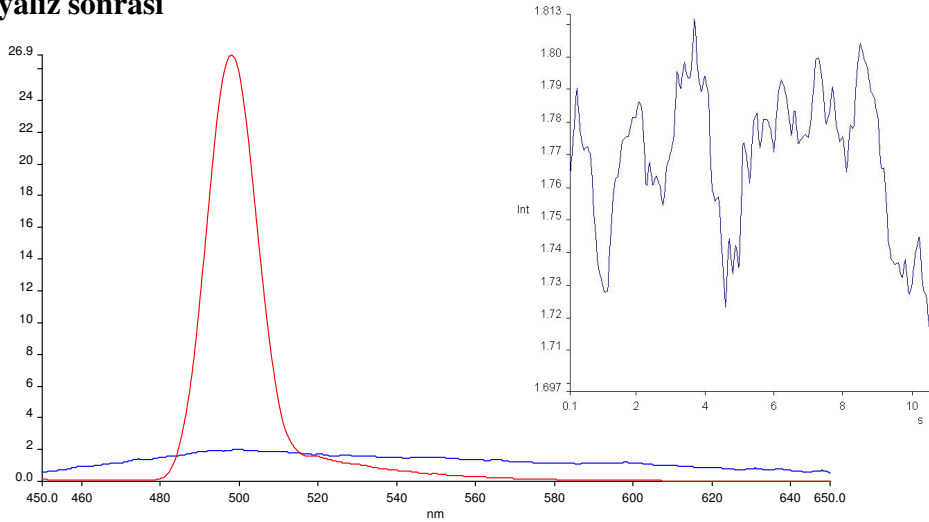


DT-FITC konjüгатı için etiketlemenin Gereç ve Yöntemler Bölümü'nde ayrıntılı olarak açıklandığı şekilde, floresan spektrofotometresi ile yapılan ölçümlerin ardından diyaliz öncesi ve diyaliz sonrasında en yüksek uyarılma-salım değerleri belirlendi. Konjüгатın floresan şiddeti, uyarılma için 493 nm, salım için 518 nm dalga boylarında ölçüldü. Diyalizi izleyen ölçümlerde FITC etiketli toksinin en yüksek salım dalga boyunun 500 nm'de tek tepe oluşturduğu belirlendi (Şekil4-9). Böylece serbest FITC moleküllerinin konjüгатtan diyaliz ile uzaklaştırıldığı sonucuna varıldı.

### Diyaliz öncesi



### Diyaliz sonrası



### Şekil 4-9: DT-FITC konjüгатının uyarılma-salım tayfı.

Floresan spektrofotometresi ile diyaliz öncesi ve sonrasında DT-FITC konjüгатının uyarılma-salım tayfı belirlendi. Diyalizden önce ve sonra floresan şiddeti 518 nm'de ölçüldü.

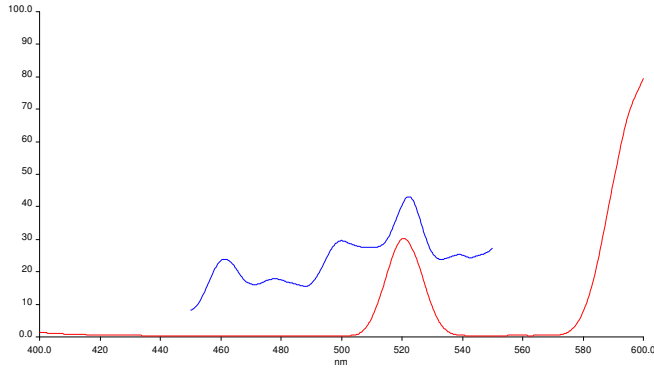
DT-FITC uygulananan HUVEC hücrelerinin, toksin ile olan etkileşimi floresan spektrofotometresi ile Gereç ve Yöntemler Bölümü'nde açıklandığı şekilde incelendi. Hücre özütünün hazırlığında kullanılan "lysis buffer"(liziz tamponu) için uyarılma-salım tayfı belirlendi. Tampona DT-FITC eklenerek analiz tekrarlandı. Hücre özütünün uyarılma-salım tayf analizi diğer grafikler ile karşılaştırıldı. Hücre özütü ile yapılan ölçümde en yüksek salım değerinin 520 nm'ye kaydığı belirlendi. Hücre özütünün floresan şiddeti, liziz tamponunun floresan şiddeti ile oranlandığı zaman 3 kat daha yüksek olduğu bulundu. Uyarılma-salım tayf analiz sonuçları karşılaştırıldığında, hücre yapıları ile DT'nin etkileştiği saptandı. HUVEC hücre özütündeki çekirdekler uygulama sonunda DAPI ile mavi renge boyanarak floresan mikroskobu (A x ioscop plus) ile (büyüteme; x 20) görüntüldü (Şekil 4-10).

DT ve HUVEC hücre özütü yapıları arasındaki etkileşimden yola çıkarak DT-FITC kongüatı uygulanan hücrelerin floresan mikroskop ile görüntülenebileceği böylece DT'nin hücre içindeki yerinin saptanabileceği sonucuna varıldı.

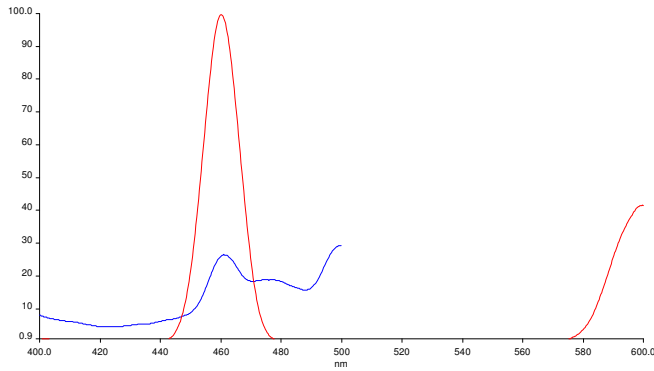
DT, F-aktin, eEF-2, ve FA-aktin etkileşiminin immünfloresan incelenmesi düşünüldü. Bu doğrultuda DT-FITC kongüatının yanı sıra anti-eEF-2-FITC konjüatı da hazırlandı.

FITC ile etiketlenen anti-eEF-2 poliklonal antikorunun, floresan spektrofotometresinde diyaliz öncesi ve sonrası, en yüksek uyarılma-salım değerleri sırası ile 493 nm ve 516 nm olarak belirlendi (Şekil 4-11). Anti-eEF-2-FITC konjüatının salım dalga boyunun 504 nm'de tek tepe oluşturduğu saptandı. Diyaliz öncesi ve sonrası için anti-eEF-2-FITC konjüatının floresan şiddeti ölçüldü (Şekil 4-12). Saklama tamponu için aynı dalga boylarında yapılan şiddet ölçümü ile karşılaştırıldı (Şekil 4-13). Serbest FITC moleküllerinin konjüattan diyaliz ile uzaklaştırıldığı sonucuna varıldı.

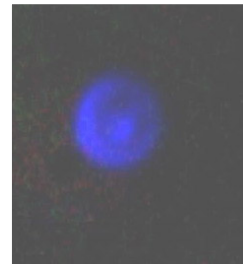
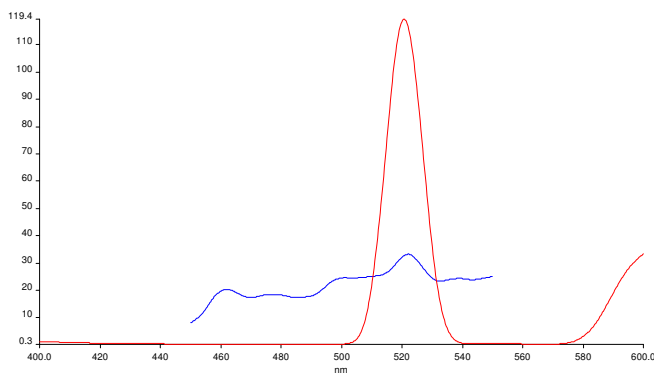
### Lizis Tamponu



### Lizis Tamponu + DT-FITC

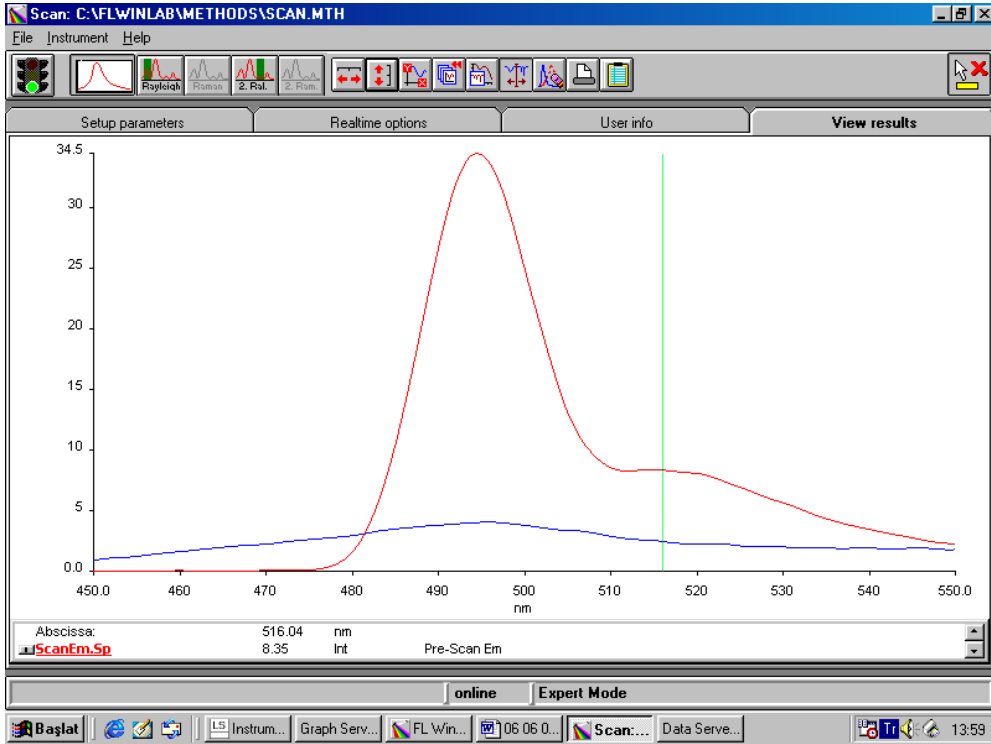


### HUVEC<sup>DT-FITC</sup> Özütü



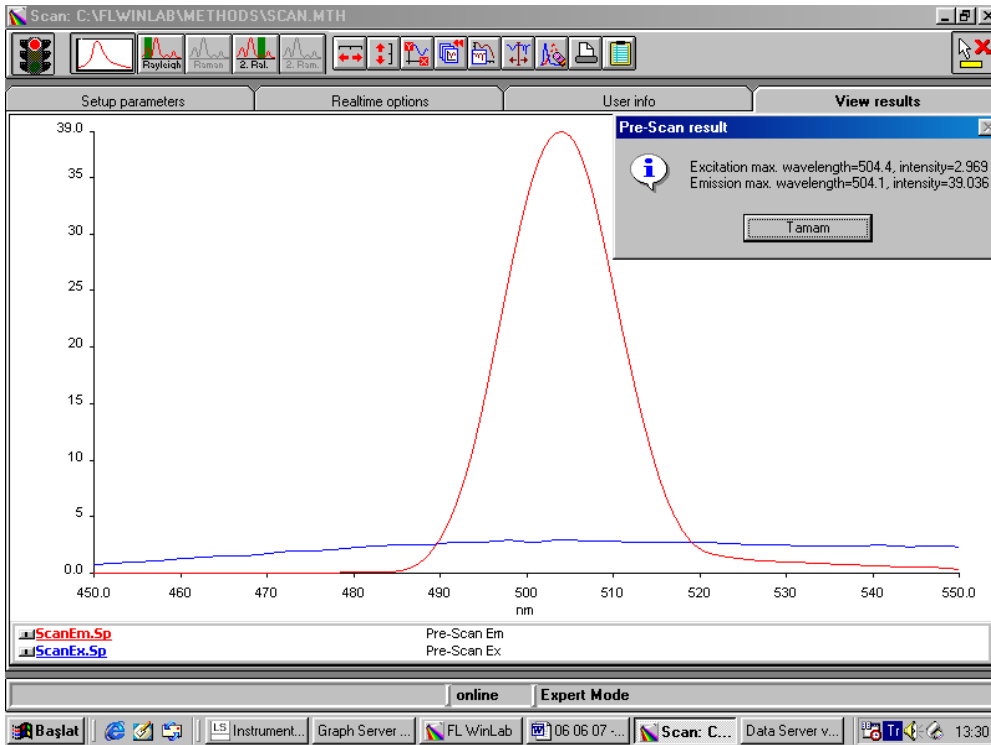
### Şekil 4-10: DT-FITC uygulanan HUVEC özütünün uyarılma-salım tayfı.

Lizis tamponu, Lizis ve DT-FITC ve DT-FITC uygulanmış HUVEC özütü için floresan spektrofotometre analizi ile HUVEC çekirdek görüntüsü. Görüntü floresan spektrofotometresi ve floresan mikroskobu ile Gereç ve Yöntemler Bölümü'nde açıklandığı şekilde alındı.



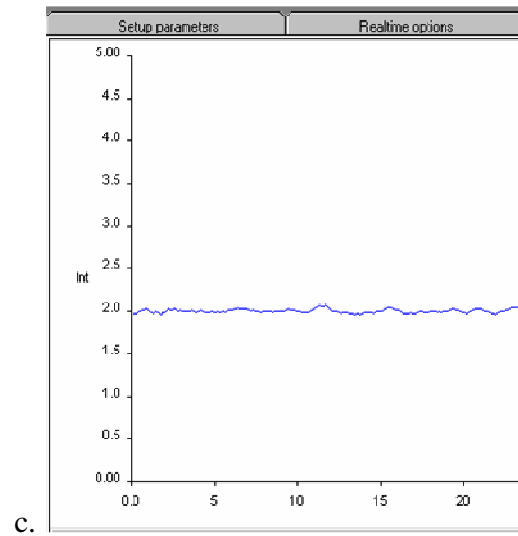
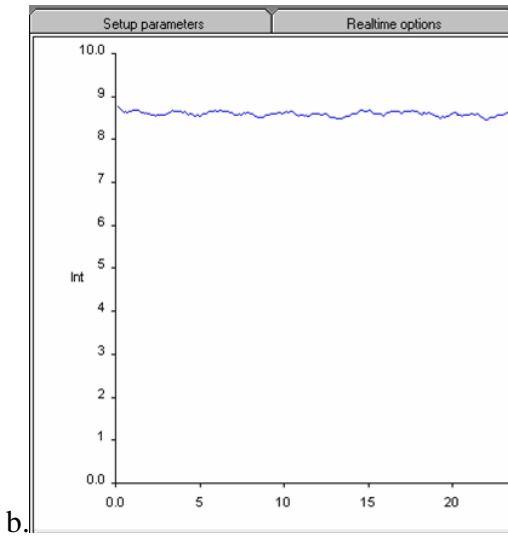
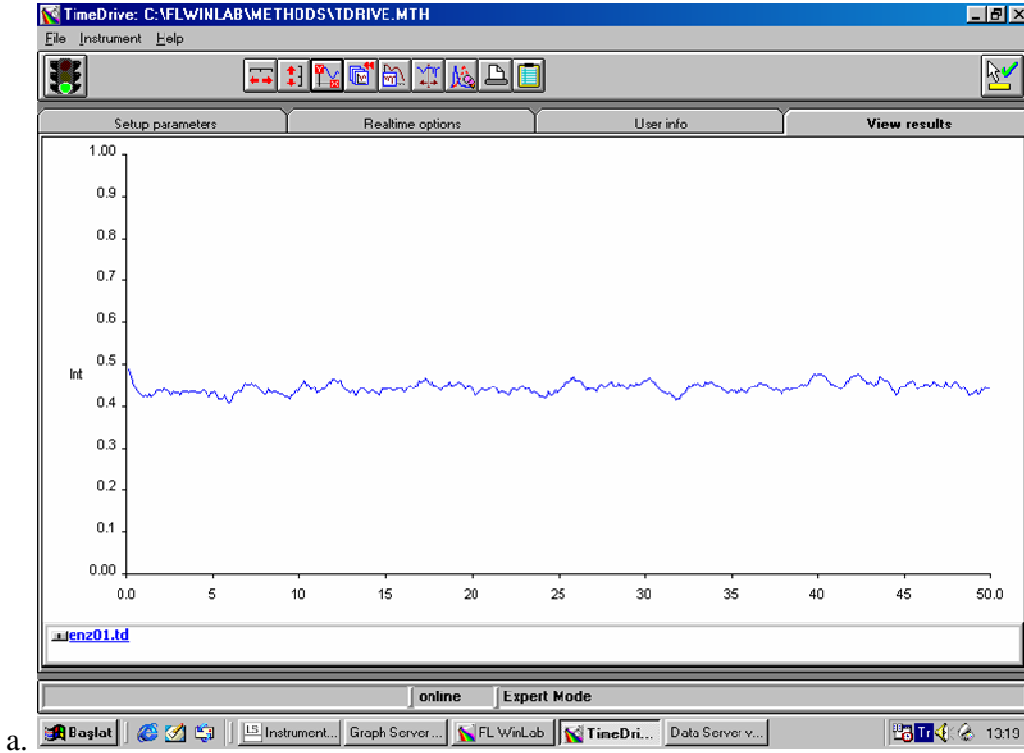
**Şekil 4-11: Diyaliz öncesi Anti-eEF-2-FITC konjüгатının uyarılma-salım tayfı.**

Görüntü floresan spektrofotometresi ile Gereç ve Yöntemler Bölümü'nde açıklandığı şekilde yapılan ölçümlerde alındı.



**Şekil 4-12: Diyaliz sonrası Anti-eEF-2-FITC konjüгатının uyarılma-salım tayfı.**

Görüntü floresan spektrofotometresi ile Gereç ve Yöntemler Bölümü'nde açıklandığı şekilde yapılan ölçümlerde alındı.



**Şekil 4-13: Anti-eEF-2-FITC için floresan şiddeti ölçümü.**

a). Saklama tamponu b).Diyaliz öncesi Anti-eEF-2-FITC konjüğü c). Diyaliz sonrası Anti-eEF-2-FITC konjüğü. Görüntü floresan spektrofotometresi ile Gereç ve Yöntemler Bölümü'nde açıklandığı şekilde yapılan ölçümlerde alındı. Serbest FITC moleküllerinin diyaliz ile uzaklaştırıldığı saptandı.

### 4.3. *in vivo* DT, F-aktin, eEF-2 ve FA-aktin etkileşiminin immünfloresan incelenmesi

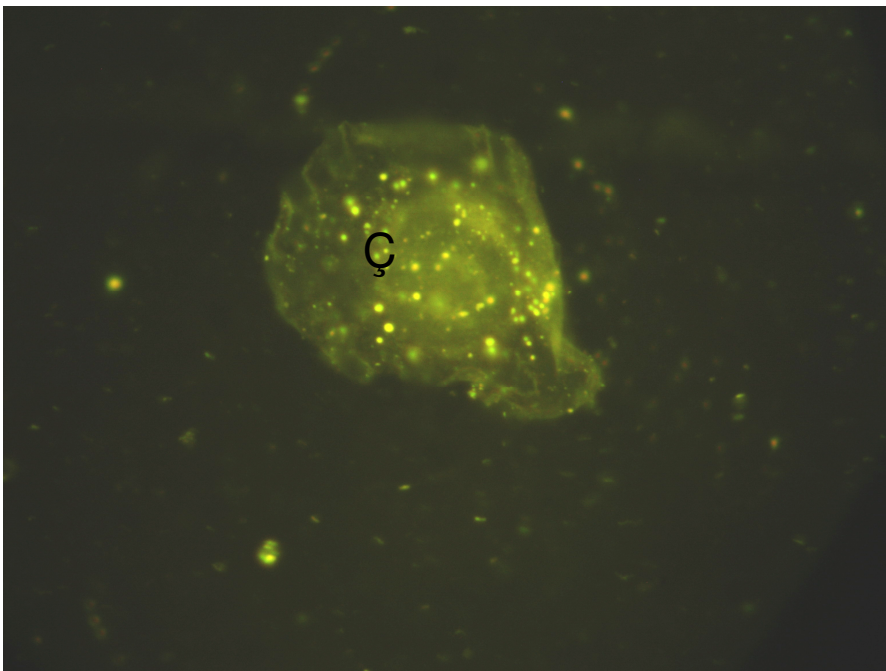
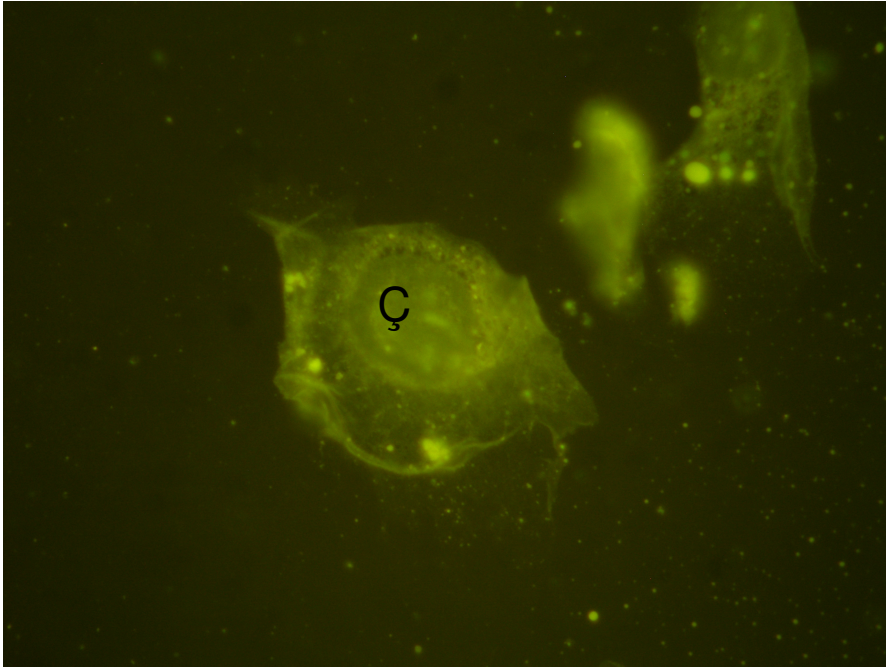
Floresan mikroskop ile Gereç ve Yöntemler Bölümü'nde açıklandığı şekilde HUVEC hücrelerinde DT, F-aktin, FA-aktin etkileşimi ve eEF-2 dağılımı görüntülendi. FITC etiketli toksinin parlak yeşil noktalar olarak sinyal verdiği tespit edildi. Toksinin, HUVEC hücre çekirdeği çevresindeki sitoplazmik alanda ve çekirdek üzerinde yoğunlaştığı gözlemlendi (Şekil 4-14).

DT-FITC (100 ng/ml) ile 18 saat bekletilen HUVEC hücrelerinde ise aktin iskeletinin bozulduğu saptandı (Şekil 4-15).

Toksinin aktin ile olan etkileşimi, floresan mikroskobu ile alınan görüntülerin ISIS bütünleştirme programı ile belirlendi. Yeşil ve kırmızı renklerinin bütünleştirilmesi sonucu toksinin aktin filamentlerini izlediği saptandı (Şekil 4-16).

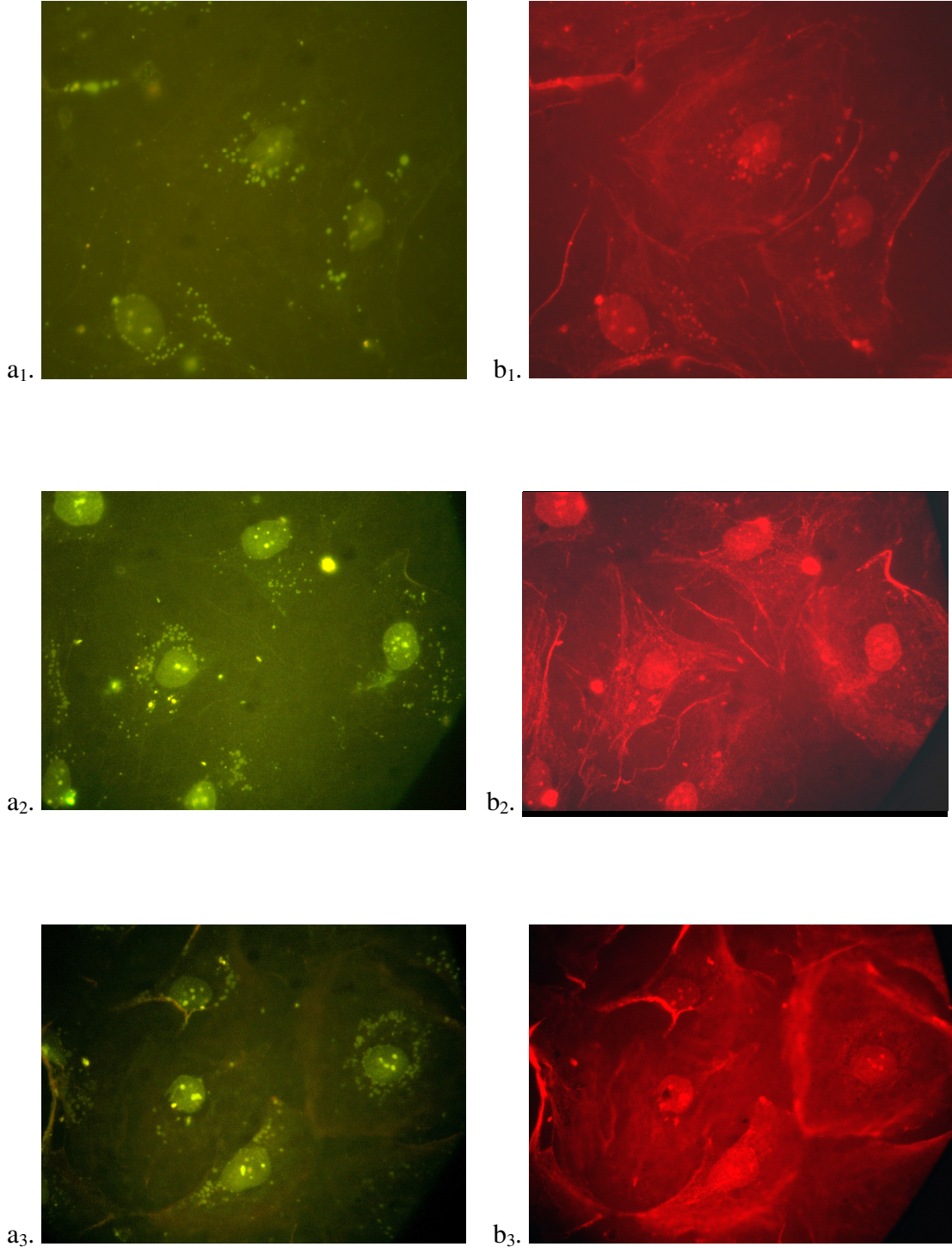
Difteri toksinine dirençli olan 3T3 tipi fibroblastlarda DT-FITC'nin tüm hücre sitoplazmasında dağıldığı çekirdek üzerinde bulunmadığı gözlemlendi (Şekil 4-17).

Aktin iskeleti ve eEF-2'nin hücre içindeki konumu, sağlıklı HUVEC hücrelerinde görüntülendi. Çekirdeğin DAPI ile mavi, aktin iskeletinin fallodin-Alexa fluor-594 ile kırmızı ve eEF-2'nin anti-eEF-2-FITC ile yeşil renkte oluşturduğu sinyaller elde edildi. A x ioskop plus floresan mikroskobu ile "metasystem" bütünleştirme programında sinyallerin çakışması sağlandı. Sağlıklı HUVEC hücreleri x40 büyütmede görüntülendi (Şekil 4-18 a). eEF-2'nin çekirdek çevresinde sıralandığı ve sitoplazmada aktin iskeleti ile etkileşim içinde olduğu x100 büyütmede belirlendi (Şekil 4-18 b).



**Şekil 4-14: HUVEC hücrelerinde DT-FITC'nin dağılımı.**

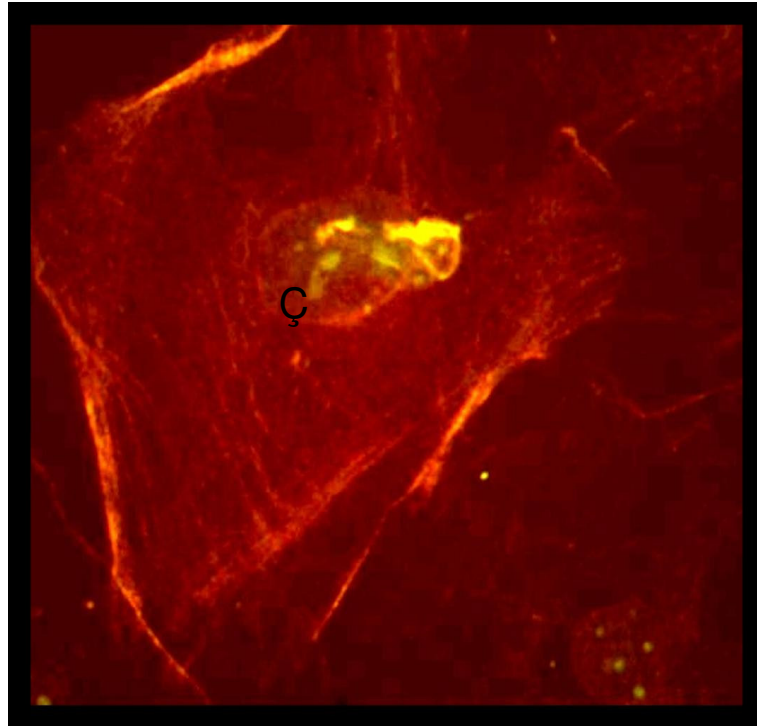
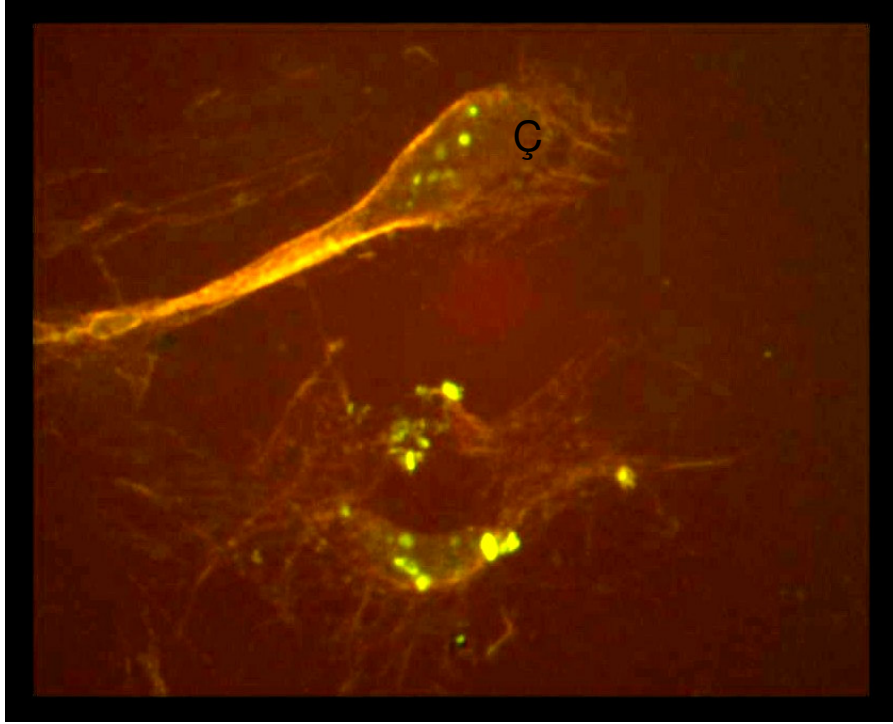
DT-FITC konjüğü (1 µg/ml ) ile 1,5 saat bekletilen HUVEC hücreleri Gereç ve Yöntemler Bölümü'nde açıklandığı şekilde Olympus BX51 floresan mikroskobu ve dalma objektifi ile görüntülendi (Ç; çekirdek). Parlak yeşil noktalar FITC işaretli toksin sinyali olarak görülmektedir (Büyütme; x100).



**Şekil 4-15: HUVEC hücrelerinde DT-FITC'nin dağılımı ve aktin iskeleti.**

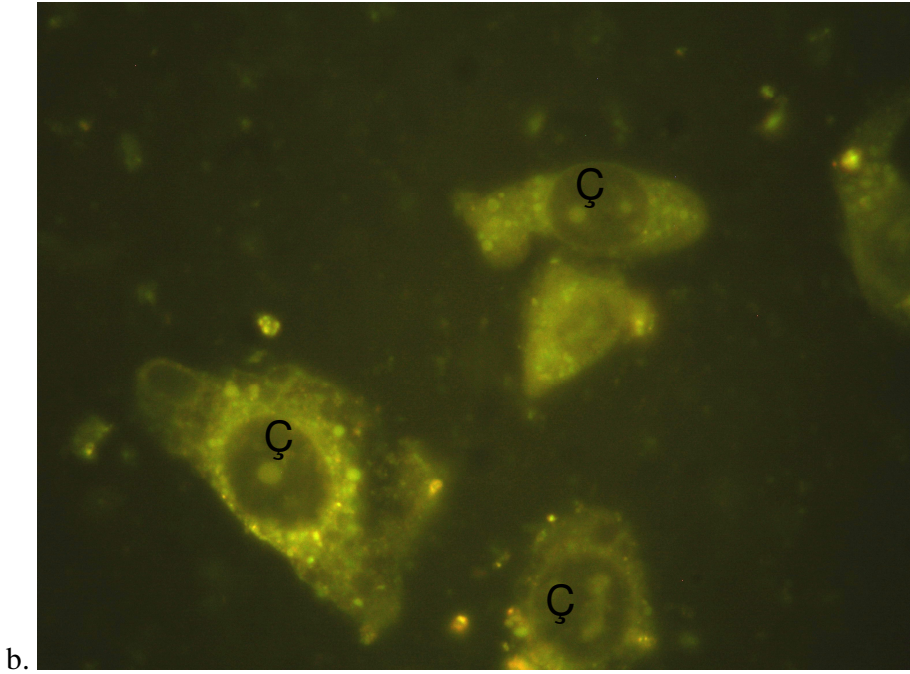
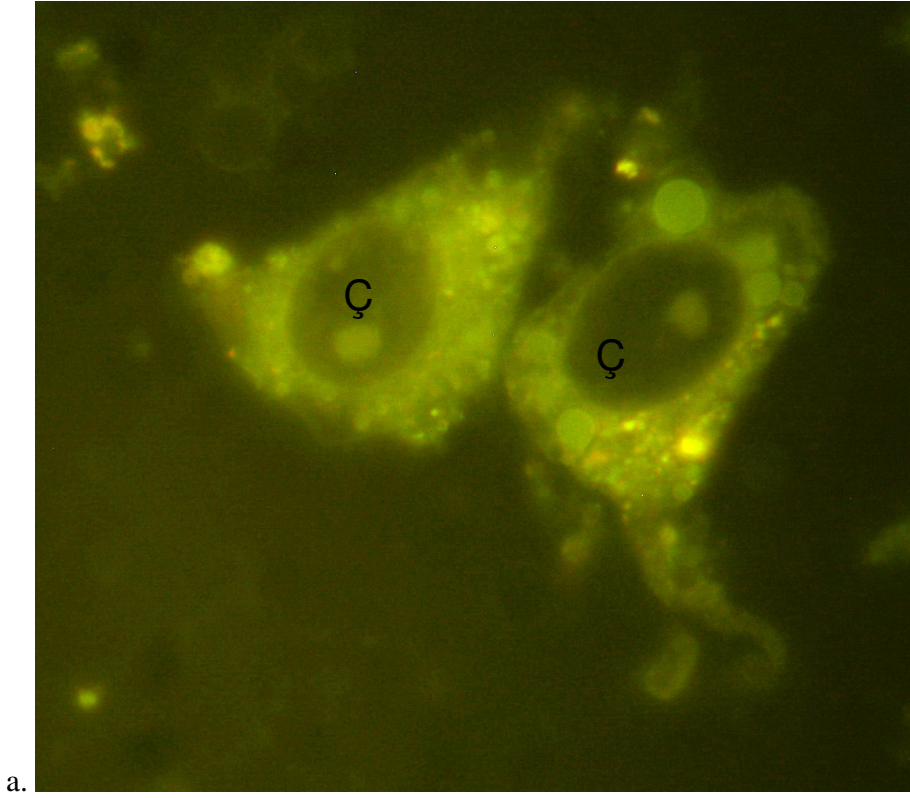
DT-FITC konjüгатı (100 ng/ml ) ile 18 saat bekletilen HUVEC hücreleri Olympus BX51 foresan mikroskopunda farklı filtreler ile görüntülenmiştir. Hücrelerdeki DT dağılımı FITC sinyali ile a<sub>1</sub>,a<sub>2</sub>,a<sub>3</sub>'te; aktin iskeleti falloidin Alexa-fluor 594 sinyali ile b<sub>1</sub>,b<sub>2</sub>,b<sub>3</sub>'te görünmektedir (Büyütme; x40).





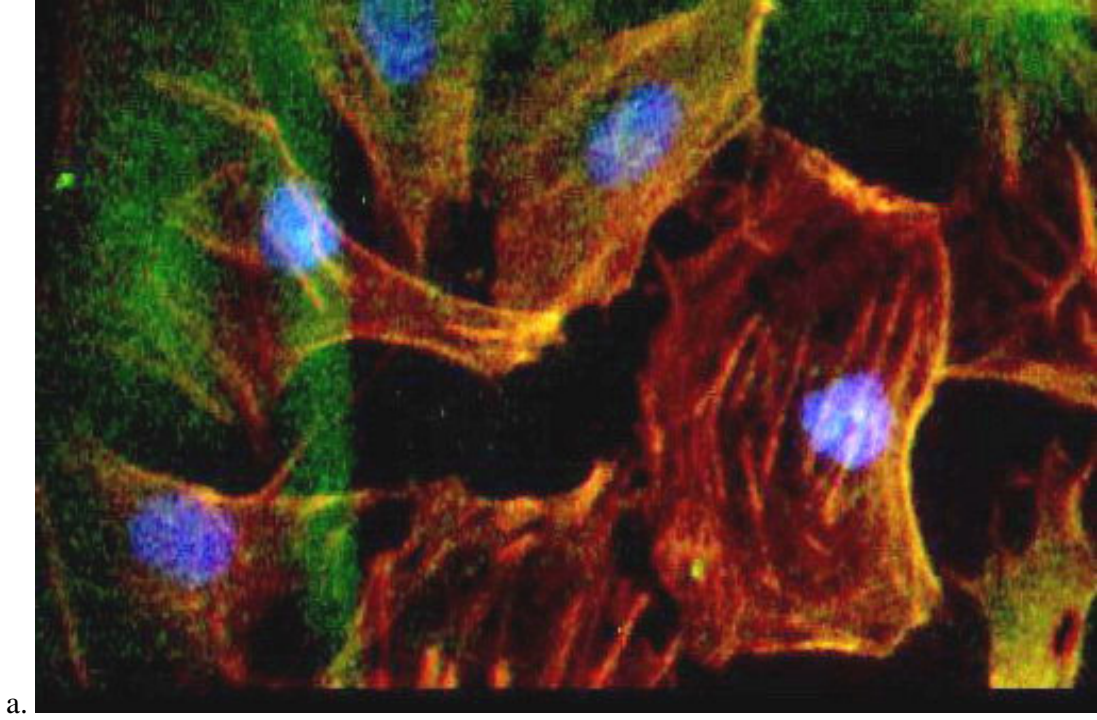
**Şekil 4-16: DT ile aktin iskeleti etkileşimi.**

HUVEC hücrelerinde DT-FITC'nin (100 ng/ml, 18 saat) aktin filamentleri ile olan etkileşimi Gereç ve Yöntemler Bölümü'nde açıklandığı şekilde Olympus BX51 floresan mikroskobu ile görüntüledi (Ç; çekirdek). Görüntü analizinde ISIS programı kullanıldı (Büyütme; x100).

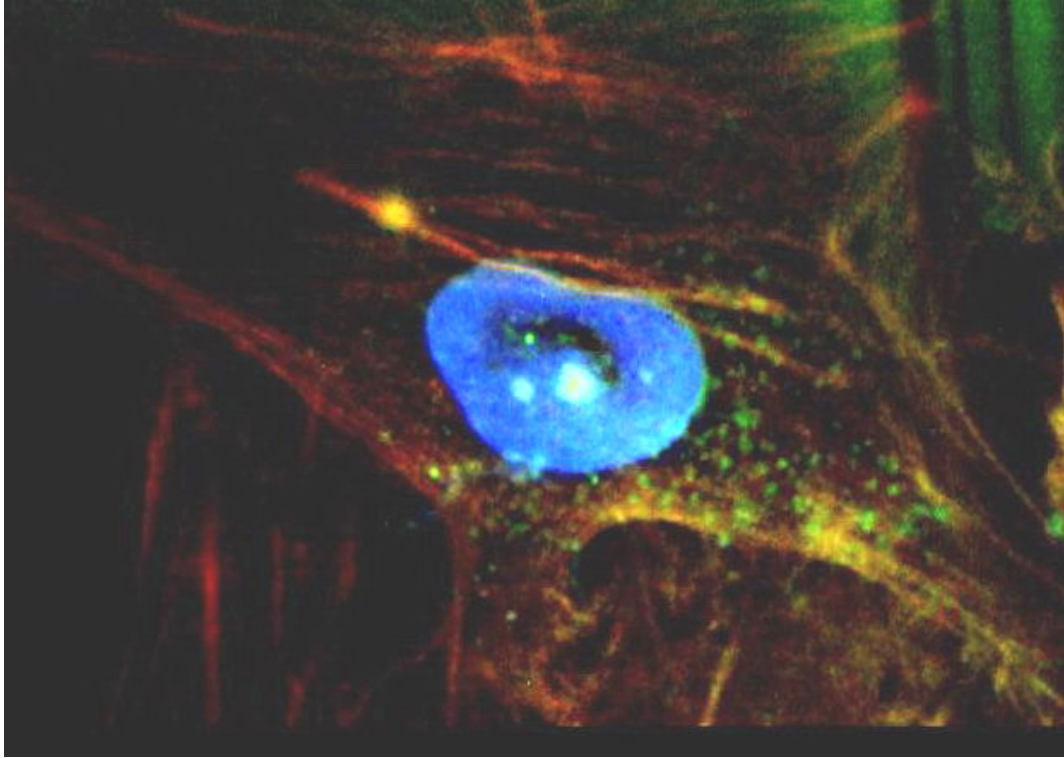


**Şekil 4-17: Fibroblastlarda DT-FITC'nin dağılımı.**

DT-FITC ( 1µg/ml) ile 1,5 saat bekletilen fibroblastlar Gereç ve Yöntemler Bölümü'nde açıklandığı şekilde Olympus BX51 foresan mikroskobu görüntülendi. Ç; çekirdek (Büyütme; a. x100, b. x40).



a.



b.

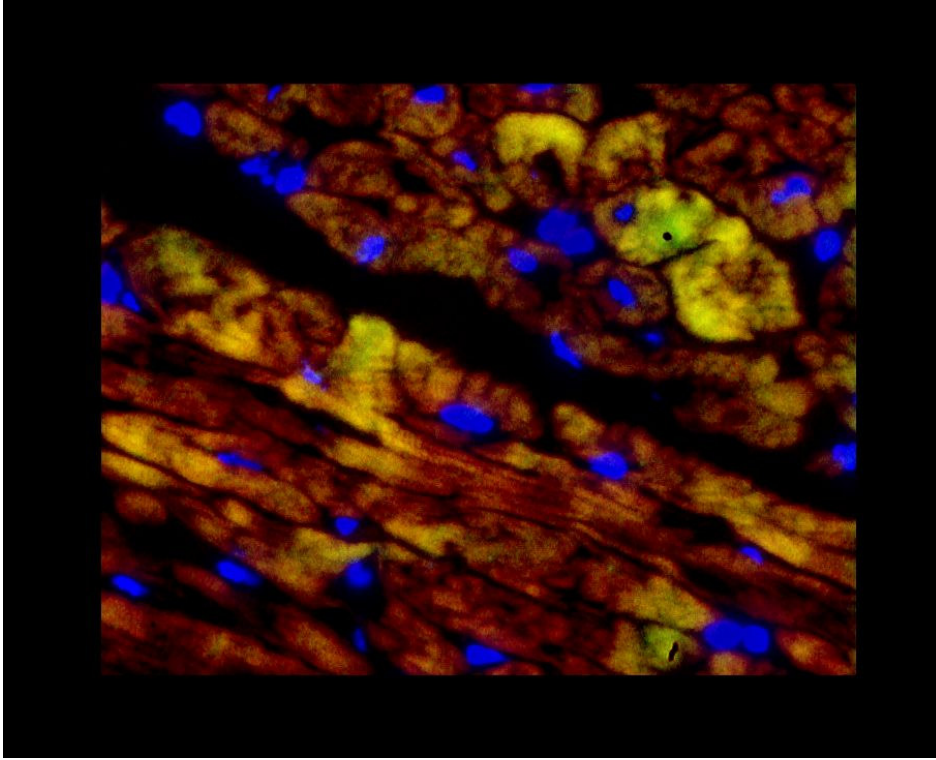
**Şekil 4-18: HUVEC hücrelerinde eEF-2 dağılımı.**

A ioscop plus foresan mikroskobu ve metasystem programı ile elde edilen görüntüde çekirdek mavi, aktin iskeleti kırmızı renkte sinyal oluşturmaktadır.a.) Sağlıklı HUVEC hücrelerinde aktin iskeleti. b.) Anti-eEF-2-FITC ile oluşan yeşil renkteki sinyal eEF-2'nin yerini işaret etmektedir (Büyütme; a. x40, b. x100).

#### 4.4. Kasta DT dağılımı ve aktin etkileşimi ile eEF-2 dağılımı

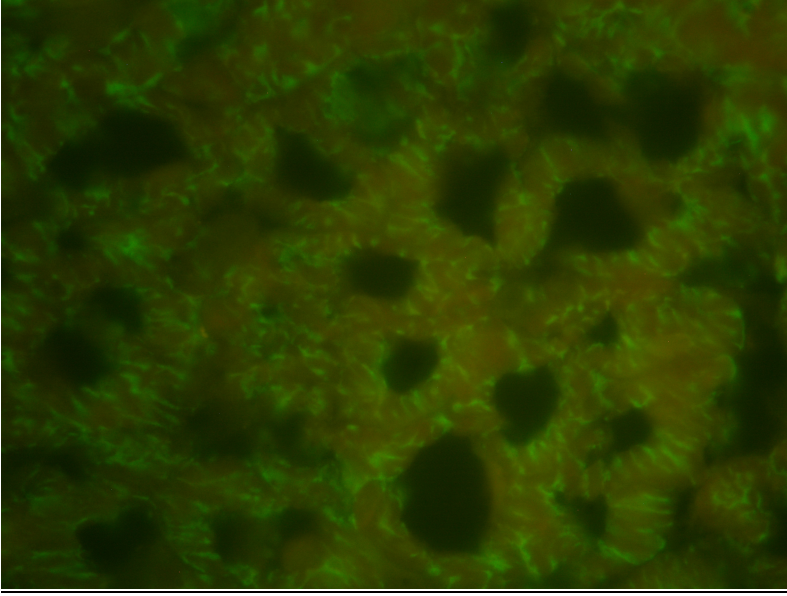
DT-FITC uygulanan domuz kalp parçasından alınan kriyokesitte çekirdekler mavi, kas lifleri kırmızı ve DT-FITC dağılımı yeşil olarak bütünleştirme A ioskop plus mikroskobu ile “metasystem” programında görüntülendi. Toksinin kas liflerinde dağınık olarak öbeklendiği tespit edildi (Şekil 4-19).

Domuz kalp kası dokusunun flofor ile etiketlenmeyen toksin (1µg/ml) ile 2 saat bekletilmesinin ardından alınan enine kesitlerde, toksinin miyofibrillerin çevresinde bulunduğu gözlemlendi (Şekil 4-20).



**Şekil 4-19: DT-FITC'nin domuz kalp kasındaki dağılımı.**

DT-FITC (1µg/ml) ile 2 saat bekletilen domuz kalp kası Gereç ve Yöntemler Bölümü'nde açıklandığı şekilde görüntülendi (Büyütme; x40).

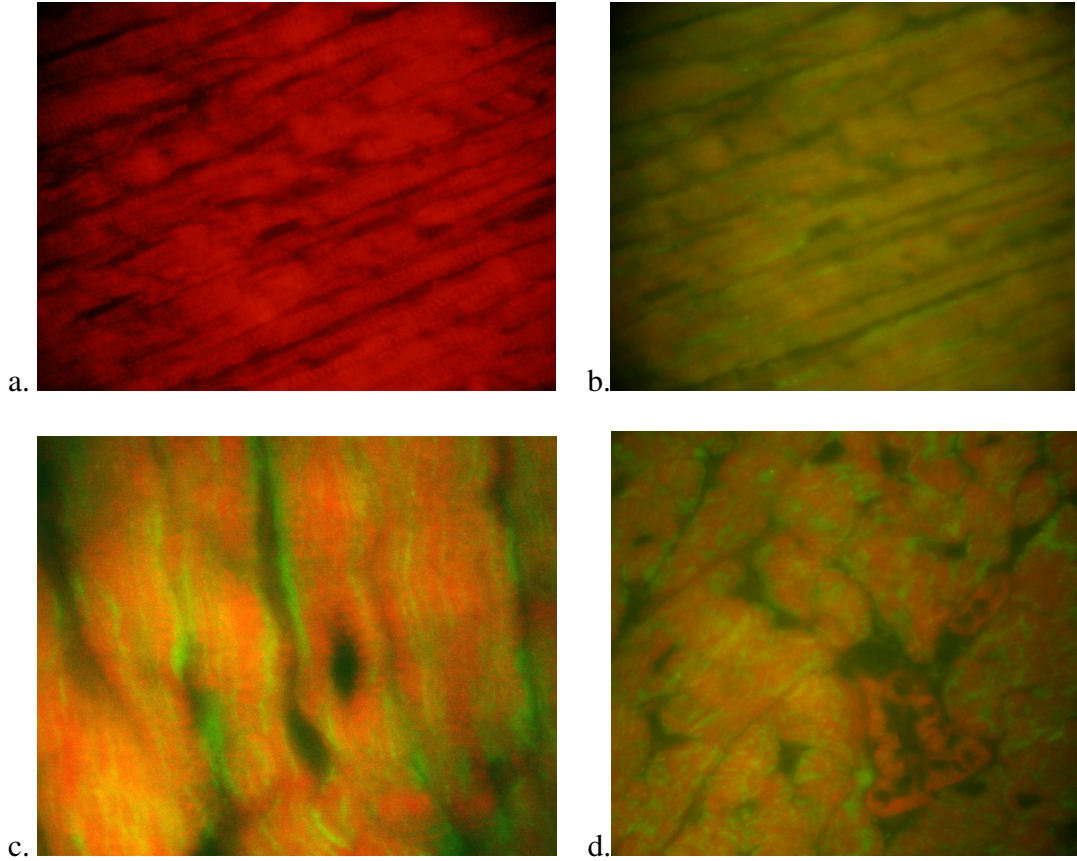


**Şekil 4-20: DT'nin domuz kalp kasındaki dağılımı.**

*DT fragment A mouse monoklonal* (1. antikor) ve *anti-mouse IgG -FITC* (2.antikor) ile işaretlenen domuz kalp kası enine kesiti Gereç ve Yöntemler Bölümü'nde açıklandığı şekilde Olympus BX51 foresan mikroskobu ile görüntülendi (Büyütme x40).

Sıçan kalp kasından alınan kriyokesitlerde (4  $\mu$ m) falloidin Alexa fluor-594 işaretlemesi ile miyofibriller kırmızı renge, anti-eEF-2-FITC konjügatı ile eEF-2 yeşil renge boyandı. Miyofibrillerin yapısı x40 büyütmede Olympus BX51 ile görüntülendi. (Şekil 4-21 a,b). eEF-2 dağılımının x100 büyütme ile miyofibrillerde sarkolemmayı izleyen hat üzerinde olduğu belirlendi (Şekil 4-21 c). Enine geçen kesitlerde de eEF-2'nin dağılımı görüntülendi (Şekil 4-21 d).

Miyofibrillerdeki eEF-2 ve DT dağılımının benzer olduğu sonucuna varıldı.

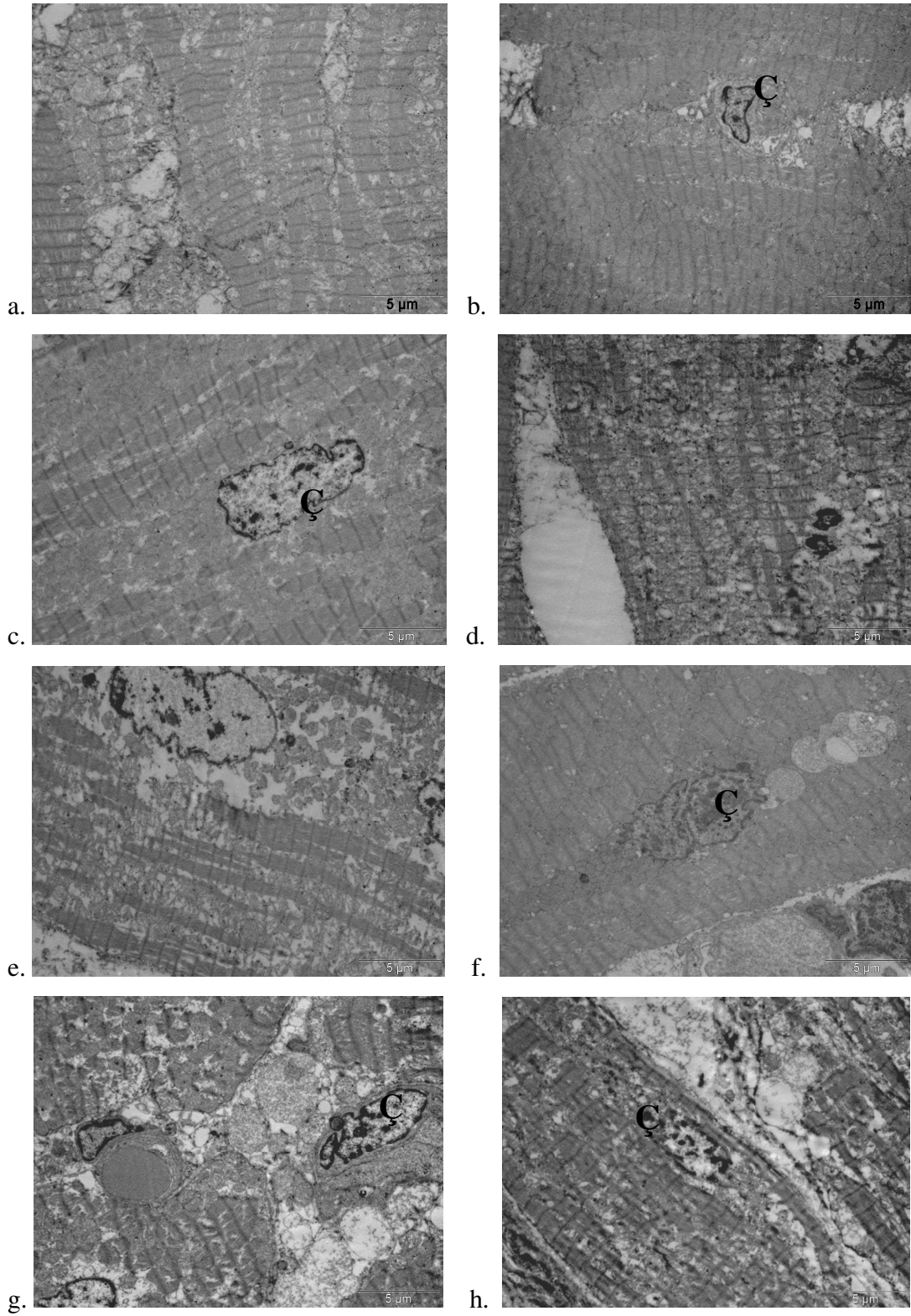


**Şekil 4-21: Anti-eEF-2-FITC ve falloidin-TRICH ile işaretli sıçan kalp kası.**

Gereç ve Yöntemler Bölümü'nde açıklandığı şekilde Olympus BX51 foresan mikroskobu ile kalp kası dokusunun boyuna (a,b,c) ve enine kesitleri (d) görüntülendi. Anti-eEF-2-FITC konjüгатının, miyobrillerin çevresinde yeşil, falloidin-TRICH ile aktin filamentlerinin kırmızı sinyal oluşturduğu görünmektedir (Büyütme; x40 (a,b,d) , x100(c)).

#### 4.5. İletim elektron mikroskobu (TEM) bulguları

Domuz kalp kası dokusu 4 saat boyunca *in vitro* olarak DT (1 µg/ml) ile bekletildi. Gereç ve Yöntemler Bölümü'nde açıklandığı gibi elektron mikroskop görüntüleri elde edildi. Elektronmikrograflar 1. saatten 4. saate kadar sırası ile difteri toksin uygulanan (a,c,e,g) ve uygulanmayan (b,d,f,h) domuz kalp kası doku örnekleri olarak gruplandırıldı (Şekil 4-22).



**Şekil 4-22: Kalp kasında süreye bağlı DT etkisi.**

Gereç ve Yöntemler Bölümü'nde açıklandığı gibi elektron mikroskop görüntüleri elde edildi. Elektronmikrograflar 1.saatten 4. saate kadar sırası ile difteri toksin uygulanan (a,c,e,g) ve uygulanmayan (b,d,f,h) domuz kalp kası doku örneklerini göstermektedir (Ç; çekirdek).

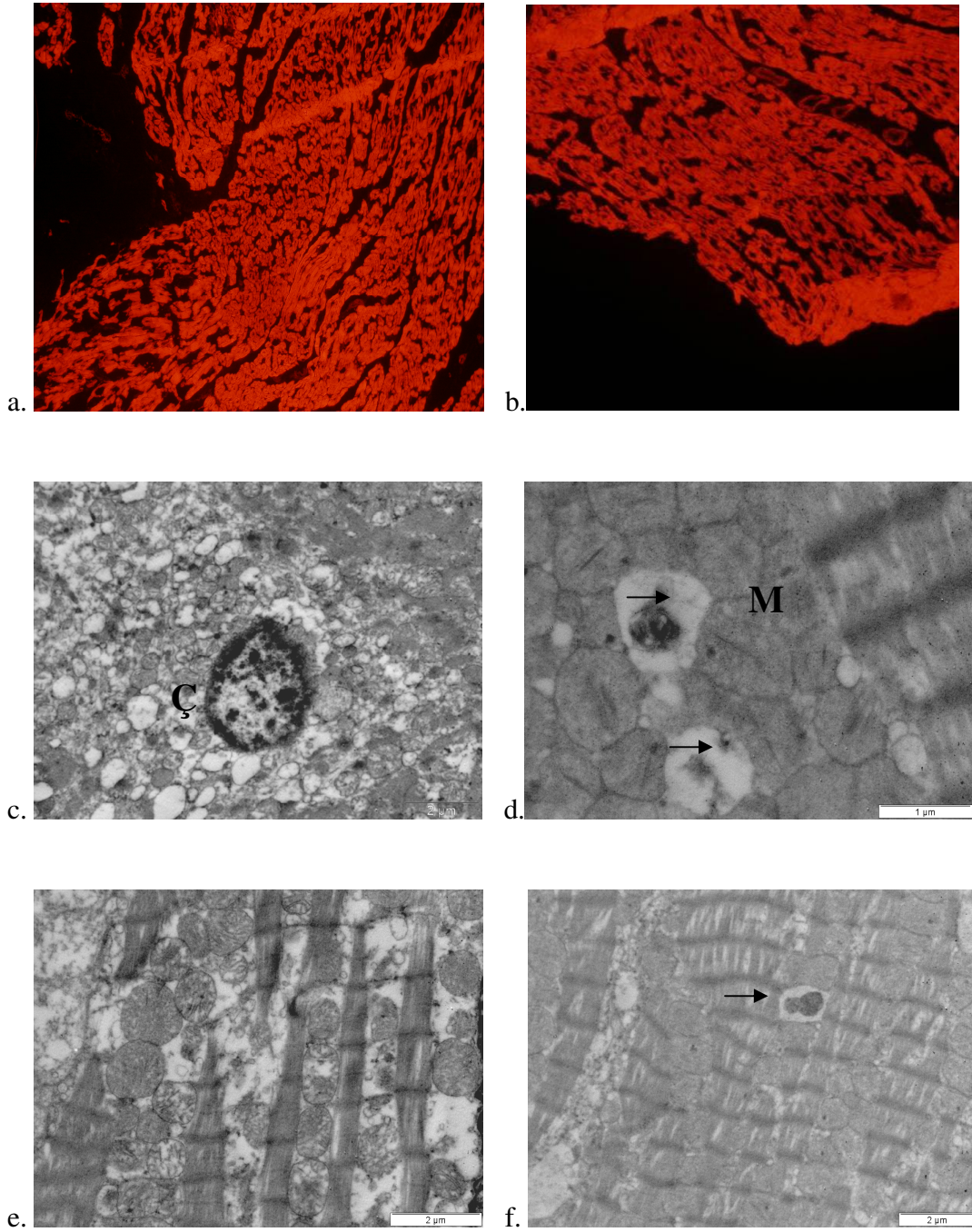
DT uygulamasının, 1. saatten itibaren kas dokusunda gevşemeye (dilatasyona) neden olduğu saptandı. Gevşemenin 4. saatte perinükleer sitoplazmayı da kapsayacak şekilde ilerlediği gözlemlendi (Şekil 4-23 c). Toksin ile dokuları bekletme süresi uzadıkça sitoplazmada mitokondri bozunmasına bağlı inklüzyonların sayısında artış olduğu belirlendi (Şekil 4-23).

Dört saatlik bekletme süresi sonunda kalp dokusu miyofibril yapısı, kontrol doku ile birlikte falloidin-TRICH boyaması ile görüntülendi (Şekil 4-23 a,b). Miyofibrillerde sarkomer yapısının bütünlüğünün ortadan kalktığı ve miyofilamanların parakristalin düzeninin bozulduğu TEM bulgularında gözlemlendi (Şekil 4-23 e,f).

Yüksek derişimdeki DT (10 µg/ml) ile 2 saat boyunca bekletilen kas dokusunun ince yapı görüntülemesi sonucunda yağ damlalarının bozulan miyofibriller arasında arttığı, kromatinin çekirdek içinde kümelenildiği saptandı (Şekil 4-24).

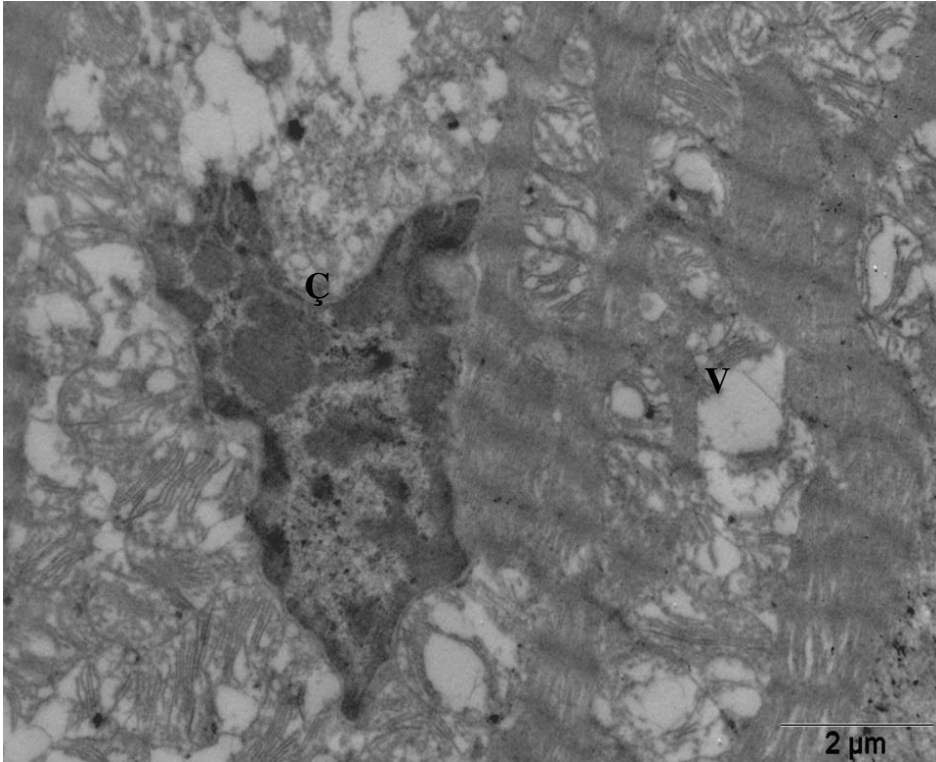
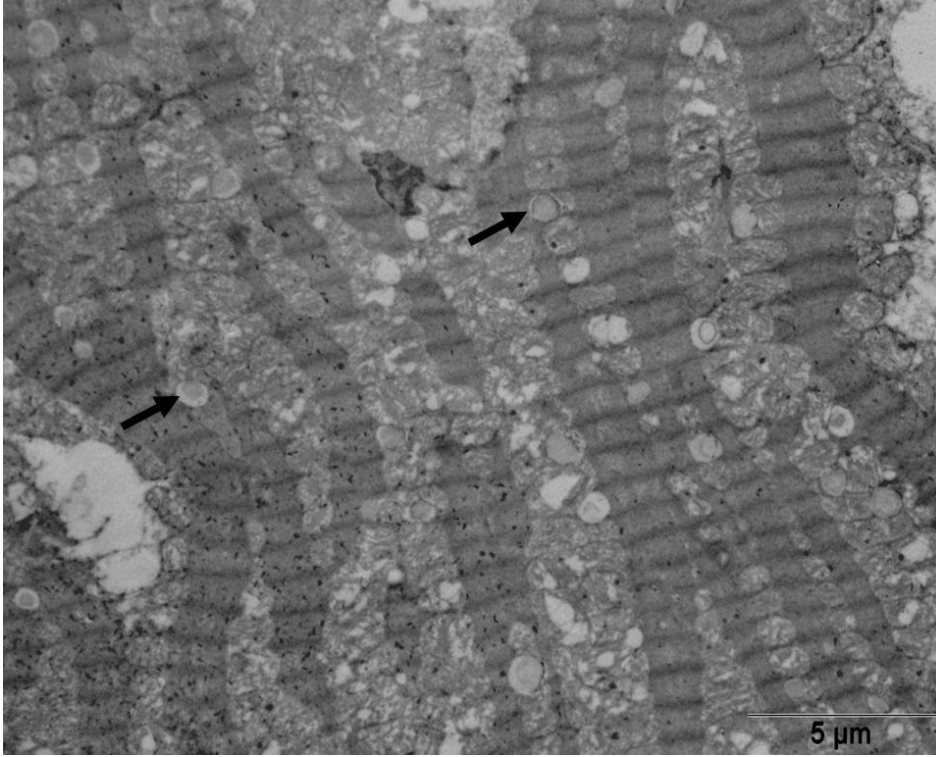
Ayrıca vakuolleşmenin ve organellerdeki bozulmanın ileri düzeyde olduğu bulundu (Şekil 4-25).





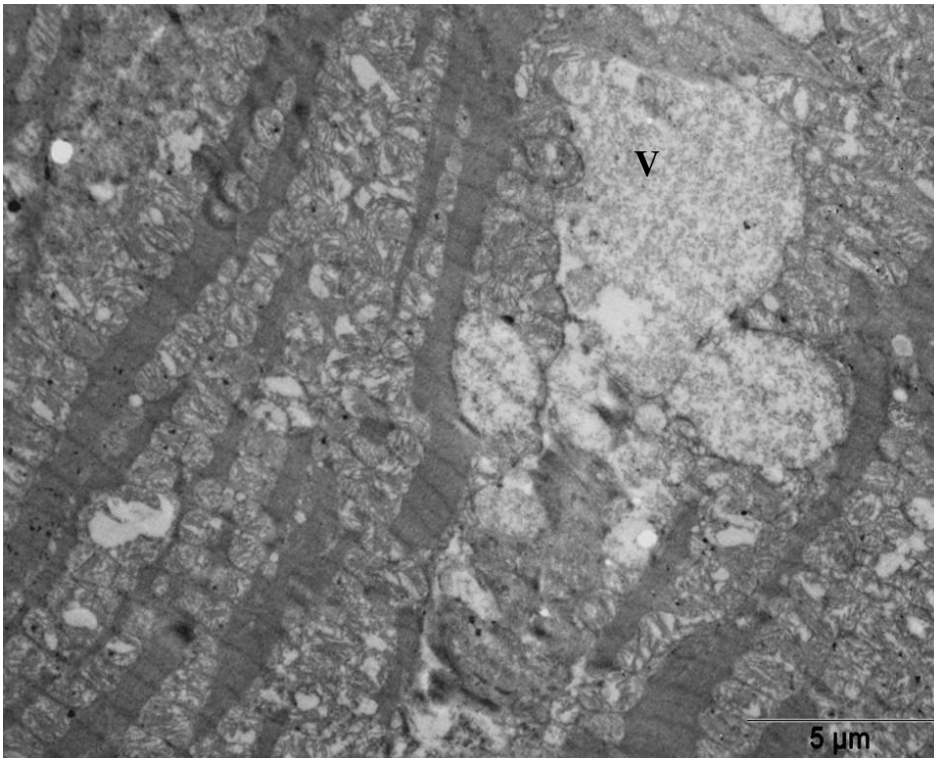
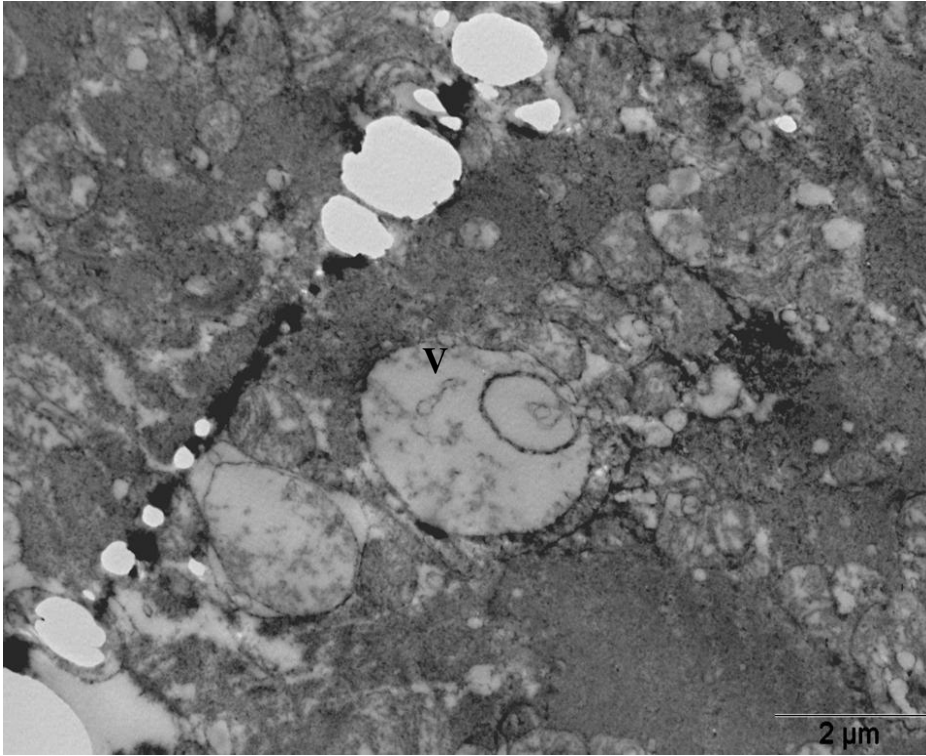
**Şekil 4-23: DT uygulamasının 4. saatinde kalp kası yapısındaki bozunma.**

Kontrol (a) ve DT uygulanan (b) kas dokusu miyofibril yapısı (Büyütme x20). c.,d.Mitokondri bozunması. e,f. Miyofibriloliz .(→), İnklüzyon cisimleri; (M), Mitokondri; (Ç) Çekirdek olarak gösterilmektedir.



**Şekil 4-24: DT (10µg/ml) ile 4 saat bekletmede kalp kası yapısındaki bozunma.**

Bozulan miyofibriller arasında biriken yağ damlaları (→), vakuoller (V) ve çekirdekte (Ç) kromatin materyalinin kümeleştiği gösterilmektedir.

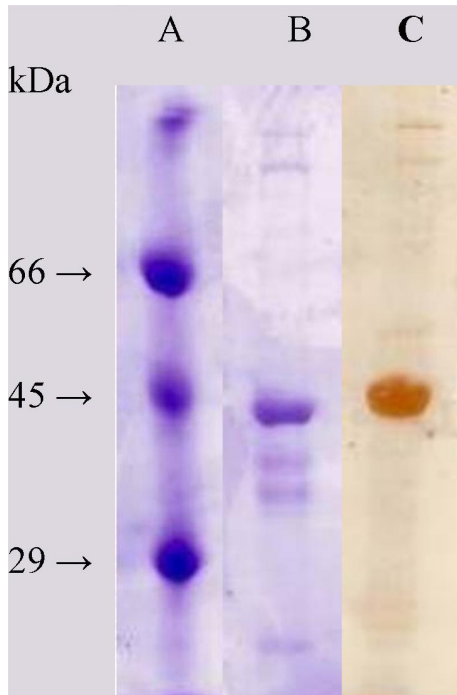


**Şekil 4-25: DT (10µg/ml) ile 4 saat bekletmede miyofibriller arası vakuoller.**

Organellerdeki bozulmalar görülmektedir.

#### 4.6. Saflaştırılan aktinin görüntülenmesi

Gereç ve Yöntemler Bölümü'nde anlatıldığı biçimde iskelet kasından saflaştırılan aktin SDS-PAGE elektroforezi ile analiz edildi (Şekil 4-26). Elde edilen aktin Coomassie parlak mavisi ile boyandı (Şekil 4-26 B). Aktinin saflaştırılmasına devam edildi. Tekrar polimerleşme ve depolimerleşme aşamalarından geçirildi. Üst sıvıda kalan G-aktinin saflık derecesi gümüş boyama ile görüntüldü (Şekil 4-26 C). Molekül ağırlık standartları olarak BSA (66 kDa), ovalbumin (45 kDa) ve karbonik anhidraz (29 kDa) kullanıldı.



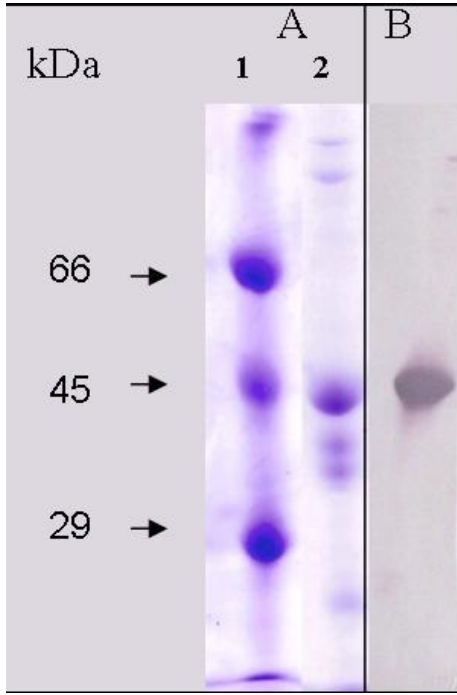
**Şekil 4-26: Aktin saflığının SDS-PAGE elektroforezi ile analizi.**

A,B) Coomassie parlak mavisi ile boyama. A sütunu standartlar. B sütunu G-aktin (2µg).  
C) Gümüş boyama; G-aktin (2µg).

#### 4.7. Aktinin Western emdirim yöntemi ile görüntülenmesi

SDS-PAGE jel elektroforezinde yürütülen aktinin, bağışık emdirim analizi yapıldı (Şekil 4-27 A). Saflaştırılmış G-aktinin aktarıldığı nitroselüloz membrandan kromojenik sinyal almak üzere tavşanda geliştirilmiş olan anti-aktin (Sigma) kullanıldı. Antikorun seyreltme oranı 1:500 olarak saptandı. Membran 1. antikor ile 2 saat bekletildi. Alkalen fosfataz etiketli, keçide geliştirilmiş olan 2. antikorun (anti-tavşan

IgG, Sigma) seyreltme oranı 1:000 olarak belirlendi ve membrana 1 saat süre ile uygulandı. Alkalin fosfataz substrat tamponun eklenmesi ile membranda sinyal görüntülendi (Şekil 4-27 B).

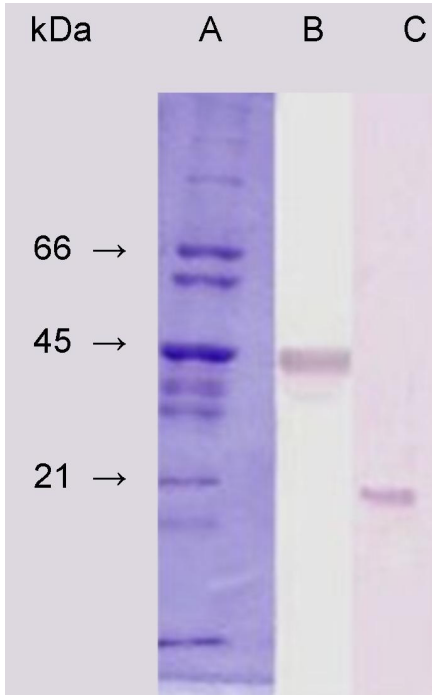


**Şekil 4-27: Western emdirim ile belirlenen aktin.**

A, SDS-PAGE; 1.sütun standartlar. 2.sütun G-aktin (2µg) B, Sütun 2'nin membrana aktarımı sonrası anti-aktin varlığında bağışık-emdirim analizi.

#### 4.8. Hücre içi (*in vivo*) aktin-difteri toksini etkileşiminin gösterilmesi

Aşağı çekme, “pull-down”, protein etkileşim tayini ile difteri toksini alt birimi olan fragment A'nın, hücre içinde oluşturduğu karmaşımlarda aktinin varlığı saptandı HUVEC hücrelerinin, DT (50 ng/ml) ile 12 saat bekletilmesinin ardından hücre lizatı elde edildi. Aşağı çekme protein etkileşim kiti (Pierce) kullanılarak, avcı protein olan biyotinlenmiş G-aktinin, lizat proteinleri ile etkileşmesi sağlandı. Gereç ve Yöntemler Bölümü'nde açıklandığı gibi biyotinlenmiş G-aktin ile etkileşerek karmaşım oluşturan bazı lizat proteinlerin, streptavidin kaplı boncuklara biyotin ile bağlanması sağlandı. Santrifüjlenerek bağlanmayan proteinler uzaklaştırıldıktan sonra elektroforez ve bağışık emdirim analizleri yapıldı (Şekil 4-28)



**Şekil 4-28: Aktin-fragment A etkileşimi.**

Aşağı çekme protein etkileşim yöntemi aracılığı ile G-aktin ile etkileşen proteinlerin SDS-PAGE jel elektroforez analizi. A sütununda Coomassie parlak mavisi ile boyanan proteinler. B sütununda anti-Aktin (1:500) sinyal oluşturmuştur. C sütununda fragment A, farede üretilmiş monoklonal antikor olan anti-FA (1:500) (Santa Cruze) ile gösterilmiştir.

## 5. TARTIŞMA

Bu çalışmada difteri toksini alt yapılarının, hücre iskeletine ve kalp kası miyofibrillerine olan etkisi incelenerek aktin filamentleri ile difteri toksini alt yapılarının etkileştiği saptandı.

DT çok güçlü bir toksindir. DT'ne duyarlı olan hücrelerde, toksinin gösterdiği sitotoksik etki, protein sentezinin durması ile açıklanmaktadır. Ancak protein sentezinin baskılanması ile toksine bağlı hücre ölümü arasındaki ilişki tam olarak açıklığa kavuşmuş değildir. DT, polipeptid zincirin uzamasında görev alan eEF-2'nin ADP ribozillenmesine neden olarak eEF-2'nin protein sentezindeki işlevini durdurur (42,50). Buna bağlı olarak hücrede kısa ömürlü proteinlerden, yapısal proteinlere kadar hiçbir proteinin sentezi gerçekleşemez. Polipeptid uzaması sırasında ribozomal translokasyondan sorumlu olan eEF-2'nin aktin ile etkileşime girdiği gösterilmiştir (3,30,38). Aktin, hücre şeklinin düzenlenmesi, hücre içi vesiküllerin hareketi, organellerin konumu, hücrenin göç etme ya da kas hücrelerindeki kasılma hareketi gibi birçok biyolojik sürece ipliksi ve küresel yapıdaki iki biçimi ile katılır. Aktinin hücre iskeleti ve sinyal yollarında görev alan, hem yapısal hem de düzenleyici birçok protein ile etkileşmesi, hücrede üstlendiği rolün önemini arttırmaktadır. Aktin filamentlerinin, DT'ne duyarlı olan hücrelerde, toksin alt yapıları ile etkileşime girerek, hücre iskeletinin yıkılmasına neden olduğu öne sürülmüştür (5,12). Yapısal proteinlerden aktin filamentinin yoğun olarak bulunduğu kalp kasında da enfeksiyonu izleyen süreçte, miyotoksik etkinin ortaya çıktığı belirtilmiştir (10). Kalp krizi ile sonuçlanan DT enfeksiyonunda, miyobrillerde gelişen hasar, miyotoksisite sebebinin, protein sentezinin durması ile sınırlı olmadığını düşündürmektedir (57,59,60).

Bu bilgilerden yola çıkarak *in vitro* koşullarda süreye bağlı olarak DT'nin aktin filamentleri üzerindeki etkisinin araştırılması amaçlandı. Çalışmada ipliksi aktinin çok yoğun olarak bulunduğu kalp kası dokusu ile DT'ne duyarlı olan HUVEC hücreleri kullanıldı.

Standart kültür koşulları altında DT ile bekletilen kas dokusunda, inflamatuvar yanıtın damar çevresinde kaldığı PAS boyaması ile saptandı. Bekletme süresinin 24 saat olduğu dokuda bu sonuç ince yapı düzeyinde iletim elektron mikroskobu ile

görüntülenerek desteklendi. Bu bulgu, klinik çalışmalarla uyumlu olarak yangı cevabının, miyotoksik etkiye neden olmadığına işaret etmektedir (30).

İnce yapı düzeyindeki görüntüleme ile DT varlığında kalp kası liflerinde, parakristalin yapının bozulduğu saptandı. Gelişen hasarın, postmortem klinik bulgular ve DT reseptör anlatımı oluşturulmuş gen aktarımlı fare kalp dokusundaki hasar ile benzeştiği tespit edildi (57,60). Toksin etkisi altında miyofibrilolizin gelişmesi, aktin iskeletinin zarar gördüğünü ortaya koymaktadır. Sarkomer bütünlüğünün bozulması, yağ damlaları ile vakuollerin artışı, mitokondri hasarı ve çekirdekte kromatin materyalinin kümelenmesi gibi hücre içi yapısal düzenin bozulması, DT'nin, programlı hücre ölümünün tetiklenmesine zemin oluşturduğunu düşündürmektedir.

Aktin filamentlerinin, hücredeki redoks durumundan etkilenerek kovalan değişikliklere uğradığı belirtilmiştir (10,66). DT etkisi altındaki miyofibrillerde, ince yapı düzeyindeki inceleme sonucu, DT derişimine ve bekletme süresine bağılı olarak mitokondriyal hasarın ilerlediği gözlenmiştir. Mitokondriyal hasarın oluşması liflerin redoks durumunda olası değışimlere uğrayabileceğine işaret etmektedir.

DT'nin aktin filamentleri ile etkileşimini saptamak üzere toksin, FITC floroforu ile etiketlendi. Floresan spektrofotometresi aracılığı ile FITC'nin uyarılma-salım tayfı belirlendi. Toksinin FITC ile etiketlendiği ve ortamdaki bağlanmayan FITC'nin diyaliz ile uzaklaştırıldığı, en yüksek salım dalga boyunda yapılan floresan şiddet ölçümleri ile saptandı. FITC etiketli DT (DT-FITC konjüгатı) uygulanan HUVEC hücre içeriğinin toksin ile etkileştiği floresan spektrofotometresi ile yapılan ölçümlerde gösterildi. Böylece DT-FITC konjüгатının hücre ve dokuya uygulanarak, floresan mikroskobu ile DT dağılımının görüntülenebileceği belirlendi.

DT-FITC'nin sitoplazmadaki dağılımı toksine duyarlı olan HUVEC hücreleri ile toksine dirençli olan 3T3 tipi fibroblast hücrelerinde görüntülendi. HUVEC hücrelerinde toksinin, çekirdek üzerindeki yoğunlaştığı saptandı. Toksinin A kesiminin DNaz I tipindeki bir endonükleaz gibi etkinlik gösterdiği ve nükleozomlar arası DNA kırılmasına yol açtığı gösterilmiştir (31-32). Bu bulgu fibroblastlardan farklı olarak, HUVEC hücrelerindeki DT-FITC'nin çekirdek üzerindeki dağılımı, DNA kırılmalarını açıklamak için anlamlı bir veri olarak değerlendirilebilir.

DT alt yapılarının aktin iskeleti ile olan etkileşimi, DT-FITC uygulanan kas dokusu ve hücrelerde immünfloresan yöntemi ile gösterildi. DT ile bekletme süresinin



uzamasına ve derişimin artışına bağlı olarak aktin filamentlerinin yıkıldığı gözlemlendi. Aktin filamentleri ile DT'nin etkileşiminin görüntülenebildiği en uygun uygulama süresinin 2 saat, toksin derişiminin 1 µg/ml olduğu tespit edildi. Aktin iskeleti ile DT-FITC'nin bir arada görüntülendiği floresan mikroskop bulgularında, çekirdek çevresinde biriken toksinin, bozulmuş aktin iskeletini takip ettiği saptandı. Floresan sinyallerin çakışması, aktin filamentleri ile toksinin bulunduğu yerlerin birbiri ile örtüştüğünü, buna bağlı olarak DT alt yapıları ile aktin filamentlerinin etkileştiiğini düşündürmektedir.

Aktinin hücre içi derişimini düzenleyen proteinlerden biri olan DNaz I aktin ile bire bir oranda etkileşir. Böylece nükleaz etkinliği durur. Programlanmış hücre ölümünde görev alan enzimlerden biri olan, proapoptotik sistein proteinaz sınıfı üyesi, interlökin 1,8 dönüştürücü enziminin, aktini substrat olarak kullandığı gösterilmiştir. Bu enzim etkisi altında G-aktinin bozulduğu, polimerleşmediği ve DNaz I etkinliğini baskılayamadığı belirtilmiş, serbest kalan DNaz I'in DNA parçalanmasına neden olduğu gösterilmiştir (71). DT etkisi altındaki hücrede, protein sentezinin durmasının yanı sıra, aktin iskeletinin bozulması, DNaz I gibi nüklezların etkinleşmesine sebep olarak ölüm sürecinin başlamasına katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca DT'nin nükleaz etkisinin de olduğu bildirilmiştir (55,56). Çalışmada DT etkisi altındaki kas miyofibril çekirdeklerinde oluşan kromatin yığılması bu açıdan önemlidir. Bu bulgu, kromatin kümelenmesinin gösterildiği ve programlı hücre ölümünün saptandığı iskemik kardiyomiyositlerdeki bulgular ile uyumludur (72).

DT'nin hücrede birincil olarak ADP-ribozillediği hedef protein olan eEF-2'nin bulunduğu yerler, HUVEC hücrelerinde ve kas dokusunda FITC ile etiketlenen anti-eEF-2 ile görüntülendi. DT-FITC konjüгатının hazırlandığı biçimde poliklonal eEF-2 antikoru immünfloresan uygulama için FITC floroforu ile etiketlendi. Çekirdek çevresinde aktin iskeletini izleyen eEF-2 dağılımı ile DT'nin hücre içi dağılımındaki benzerlik, ipliksi aktinin toksin alt yapılarının hareketine yön verebileceği izlenimini uyandırdı. eEF-2'nin kas liflerindeki dağılımının miyofibrilleri saran sarkoplazmik retikulum sarnıcınının konumu ile uyumlu olduğu gözlemlendi.

Aktin filamentlerinin DT alt yapıları ile olan etkileşimini moleküler düzeyde araştırmak üzere, aşığı çekme yöntemi kullanıldı. DT ile bekletilen HUVEC hücre

lizatından, karmaşık proteinleri elde edilerek bu proteinler arasında aktinin ve difteri toksini A kesiminin (FA) bulunduğu bağışkendirim yöntemi ile gösterildi.

Sonuç olarak aktin filamentlerinin, difteri toksini alt yapıları ile etkileştiği gösterilen çalışmada, toksine bağlı gelişen sitotoksik etki sebebinin, protein sentez baskılanması ile sınırlı olmadığına dair önemli bulgular elde edildi.

Çalışma bundan sonraki süreçte programlı hücre ölümü ile ilgili etkin alt yapılar ile difteri toksini ya da toksin alt yapıları arasındaki etkileşimin ayrıntılı incelenmesi yönünde olacaktır.

## KAYNAKLAR

1. Van Troys M, Vandekerckhove J, Ampe C. Structural modules in actin-binding proteins: towards a new classification. *Biochim Biophys Acta*.1999 Jan 11;1448(3):323-48.
2. Nurten R, Bermek E. Interactions of elongation factor 2 (EF-2) with guanine nucleotides and ribosomes. Binding of periodate-oxidized guanine nucleotides to EF-2. *Eur J Biochem*. 1980 Feb;103(3):551-5.
3. Bektas M, Nurten R, Gurel Z, Sayers Z, Bermek E. Interactions of eukaryotic elongation factor 2 with actin: a possible link between protein synthetic machinery and cytoskeleton. *FEBS Lett*. 1994 Dec 12;356(1):89-93.
4. Bektas M, Nurten R, Sayers Z, Bermek E. Interactions of elongation factor 2 with the cytoskeleton and interference with DNase I binding to actin. *Eur J Biochem*. 1998 Aug 15;256(1):142-7.
5. Bektas M, Guncer B, Guven C, Nurten R, Bermek E. Actin--an inhibitor of eukaryotic elongation factor activities. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 May 14;317(4):1061-6.
6. Sandvig K, Olsnes S. Diphtheria toxin entry into cells is facilitated by low pH. *J Cell Biol*. 1980 Dec; 87(3 Pt 1):828-32.
7. Draper RK, Simon MI. The entry of diphtheria toxin into the mammalian cell cytoplasm: evidence for lysosomal involvement. *J Cell Biol*. 1980 Dec; 87 (3 Pt 1):849-54.
8. Honjo T, Nishizuka Y, Hayaishi O. Diphtheria toxin-dependent adenosine diphosphate ribosylation of aminoacyl transferase II and inhibition of protein synthesis. *J Biol Chem*. 1968 Jun 25;243(12):3553-5.
9. Gill DM, Pappenheimer AM Jr, Brown R, Kurnick JT. Studies on the mode of action of diphtheria toxin. VII. Toxin-stimulated hydrolysis of nicotinamide adenine dinucleotide in mammalian cell extracts. *J Exp Med*. 1969 Jan 1;129(1):1-21.
10. Collier RJ. Effect of diphtheria toxin on protein synthesis: inactivation of one of the transfer factors. *J Mol Biol*. 1967 Apr 14;25(1):83-98.
11. Paul D. Hoeplich, M. Colin Jordan, Allan R. Ronald. *Infectious Diseases: a treatise of infectious processes*. JB Lippincott Company. 1994.

12. Lee JW, Nakamura LT, Chang MP, Wisnieski BJ. Mechanistic aspects of the deoxyribonuclease activity of diphtheria toxin. *Biochim Biophys Acta*. 2005 Feb 14;1747(1):121-31.
13. Janmey PA, Shah JV, Tang JX, Stossel TP. Actin filaments. *Biophysics Textbook Online 2004*. Erişim 18.01.2007. <http://www.biophysics.org/education/janmey.pdf>
14. Geeves MA, Fedorov R, Manstein DJ. Molecular mechanism of actomyosin-based motility. *Cell Mol Life Sci*. 2005 Jul;62(13):1462-77.
15. Egelman EH. Actin allostery again? *Nat Struct Biol*. 2001 Sep;8(9):735-6.
16. Rubenstein PA, Martin DJ. NH<sub>2</sub>-terminal processing of *Drosophila melanogaster* actin. Sequential removal of two amino acids. *J Biol Chem*. 1983 Sep 25; 258(18):11354 -60.
17. Hennessey ES, Drummond DR, Sparrow JC. Molecular genetics of actin function. *Biochem J*. 1993 May 1;291 ( Pt 3):657-71.
18. van Delft S, Verkleij AJ, Boonstra J, van Bergen en Henegouwen PM. Epidermal growth factor induces serine phosphorylation of actin. *FEBS Lett*. 1995 Jan 9;357(3):251 -4.
19. Wang J, Boja ES, Tan W, Tekle E, Fales HM, English S, Mieyal JJ, Chock PB. Reversible Glutathionylation Regulates Actin Polymerization in A431 Cells. *J Biol Chem*. 2001 Dec 21;276(51):47763 -6.
20. Dalle-Donne I, Rossi R, Milzani A, Di Simplicio P, Colombo R. The actin cytoskeleton response to oxidants: from small heat shock protein phosphorylation to changes in the redox state of actin itself. *Free Radic Biol Med*. 2001 Dec 15;31(12):1624-32.
21. Wegner, A. , and K. Aktories. ADP-ribosylated actin caps the barbed ends of actin filaments. *J Biol Chem*. 1988. 263:13739 -42.
22. Clancy RM, Leszczynska-Piziak J, Abramson SB. Nitric oxide stimulates the ADP-ribosylation of actin in human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993 Mar 31;191(3):847 -52.
23. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology Of The Cell*. 4 th ed. New York, NY: Garland Science; 2002.
24. Dos Remedios CG, Chhabra D, Kekic M, Dedova IV, Tsubakihara M, Berry DA, Nosworthy NJ. Actin Binding Proteins: Regulation of Cytoskeletal

- Microfilaments *Physiol Rev.* 2003 Apr;83(2):433 -73.
25. Sept D, McCammon JA. Thermodynamics and kinetics of actin filament nucleation. *Biophys J.* 2001 Aug;81(2):667 -74.
  26. Carlier MF. Actin: protein structure and filament dynamics. *J Biol Chem.* 1991 Jan 5;266(1):1-4.
  27. Gunning P, Ponte P, Kedes L, Eddy R, Shows T. Chromosomal location of the co-expressed human skeletal and cardiac actin genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984 Mar;81(6):1813 -7.
  28. Bárány M, de Tombe PP. Rapid exchange of actin-bound nucleotide in perfused rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004 Apr;286(4):H1394 -401.
  29. Frank D, Kuhn C, Katus HA, Frey N. The sarcomeric Z-disc: a nodal point in signalling and disease. *J Mol Med.* 2006 Jun;84(6):446 -68.
  30. Jansen RP. RNA–cytoskeletal associations *FASEB J.* 1999 Mar;13(3):455 -66.
  31. Guyton&Hall. *Tıbbi Fizyoloji.* Dokuzuncu edisyon, Nobel Tıp Kitapevleri; İstanbul,1996.
  32. Keynes RD, Aidley DJ. *Nerve and Muscle.* Third edition. Cambridge, UK: Cambridge University Pres; 2001.
  33. The Biochemical Society. *Essays in Biochemistry.* Colchester, UK: Portland Press Ltd; 2000.
  34. McElhinny AS, Kazmierski ST, Labeit S, Gregorio CC. Nebulin: the nebulous, multifunctional giant of striated muscle. *Trends Cardiovasc Med.* 2003 Jul;13(5):195-201.
  35. Kostin S, Hein S, Arnon E, Scholz D, Schaper J. The cytoskeleton and related proteins in the human failing heart. *Heart Fail Rev.* 2000 Oct;5(3):271 -80.
  36. Winder SJ, Ayscough KR. Actin-binding proteins. *J Cell Sci.* 2005 Feb 15;118(Pt 4):651 -4.
  37. DesMarais V, Ghosh M, Eddy R, Condeelis J. Cofilin takes the lead. *J Cell Sci.* 2005 Jan 1;118(Pt 1): 9 -26.
  38. Shestakova EA, Motuz LP, Minin AA, Gelfand VI, Gavrilova LP. Some of eukaryotic elongation factor 2 is colocalized with actin microfilament bundles in mouse embryo fibroblasts. *Cell Biol Int Rep.* 1991 Jan;15(1):75-84.
  39. Wulf E, Deboen A, Bautz FA, Faulstich H, Wieland T. Fluorescent phallotoxin, a tool for the visualization of cellular actin. *Proc Natl Acad Sci U S*

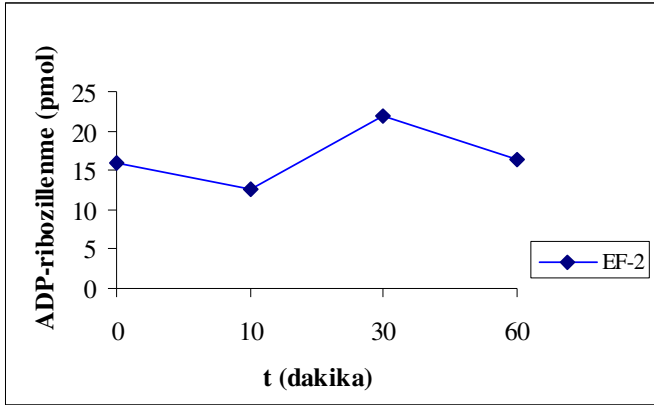
- A. 1979 Sep;76(9): 4498 -502.
40. Barksdale L. *Corynebacterium diphtheriae* and Its Relatives Microbiol Mol Biol Rev. Dec 1970; 34: 378 - 422.
  41. Hadfield TL, McEvoy P, Polotsky Y, Tzinslering VA, Yaklovlev AA. The pathology of diphtheria. J Infect Dis. 2000 Feb;181 Suppl 1:S116 -20.
  42. Pappenheimer AM Jr. The story of a toxic protein, 1888-1992. Protein Sci. 1993 Feb;2(2):292 -8
  43. Strauss N, Hendee ED. The effect of diphtheria toxin on the metabolism of HeLa cells. J Exp Med. 1959 Feb 1;109(2):145 -63.
  44. Holmes RK. Biology and molecular epidemiology of diphtheria toxin and the tox gene. J Infect Dis. 2000 Feb;181 Suppl 1:S156 -67.
  45. Naglish JG, Metherall JE, Russell DW, Eidels L. Expression cloning of a diphtheria toxin receptor: identity with a heparin-binding EGF-like growth factor precursor. Cell. 1992 Jun 12;69(6):1051-61.
  46. Falnes PO, Sandvig K. Penetration of protein toxins into cells. Curr Opin Cell Biol. 2000 Aug;12(4):407 -13.
  47. Oh KJ, Senzel L, Collier RJ, Finkelstein A. Translocation of the catalytic domain of diphtheria toxin across planar phospholipid bilayers by its own T domain. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Jul 20;96(15):8467-70.
  48. Trujillo C, Ratts R, Tamayo A, Harrison R, Murphy JR. Trojan horse or proton force: finding the right partner(s) for toxin translocation. Neurotox Res. 2006 Apr;9(2-3):63-71.
  49. Deng Q, Barbieri JT. Molecular mechanisms of the cytotoxicity of ADP-ribosylating toxins. Annu Rev Microbiol. 2008;62:271-88
  50. Collier RJ. Toxicon. Understanding the mode of action of diphtheria toxin: a perspective on progress during the 20th century. 2001 Nov; 39(11):1793-803
  51. Iwamoto R, Higashiyama S, Mitamura T, Taniguchi N, Klagsbrun M, Mekada E. Heparin-binding EGF-like growth factor, which acts as the diphtheria toxin receptor, forms a complex with membrane protein DRAP27/CD9, which up-regulates functional receptors and diphtheria toxin sensitivity. EMBO J. 1994 May 15;13(10):2322-30.
  52. Mitamura T, Umata T, Nakano F, Shishdo Y, Toyoda T, Itai A, Kimura H, Mekada E. Structure-function analysis of the diphtheria toxin receptor toxin

- binding site by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem.* 1997 Oct 24;272(43):27084 -90.
53. Jørgensen R, Merrill AR, Andersen GR. The life and death of translation elongation factor 2. *Biochem Soc Trans.* 2006 Feb;34(Pt 1):1-6.
  54. Raab G, Klagsbrun M. Heparin-binding EGF-like growth factor. *Biochim Biophys Acta.* 1997 Dec 9;1333(3):F179 -99.
  55. Kusano I, Kageyama A, Tamura T, Oda T, Muramatsu T. Enhancement of diphtheria toxin-induced apoptosis in Vero cells by combination treatment with brefeldin A and okadaic acid. *Cell Struct Funct.* 2001 Oct;26(5):279 -88.
  56. Lessnick SL, Lyczak JB, Bruce C, Lewis DG, Kim PS, Stolowitz ML, Hood L, Wisnieski BJ. Localization of diphtheria toxin nuclease activity to fragment A. *J Bacteriol.* 1992 Mar;174(6):2032 -8.
  57. Burch GE, Sun SC, Sohal RS, Chu KC, Colcolough HL. Diphtheritic myocarditis. A histochemical and electron microscopic study. *Am J Cardiol.* 1968 Feb;21(2):261 -8.
  58. Wittels B, Bressler R. Biochemical lesion of diphtheria toxin in the heart. *J Clin Invest.* 1964 April; 43(4): 630-637.
  59. Bowman CG, Imhoff JG, Bonventre PF. Specificity of Diphtheria Toxin Action on Heart and Muscle Tissues of Guinea Pigs. *Infect Immun.* 1970 November; 2(5): 686-688.
  60. Akazawa H, Komazaki S, Shimomura H, Terasaki F, Zou Y, Takano H, Nagai T, Komuro I. Diphtheria toxin-induced autophagic cardiomyocyte death plays a pathogenic role in mouse model of heart failure. *J Biol Chem.* 2004 Sep 24;279(39):41095 -103.
  61. Riis B, Rattan SI, Clark BF, Merrick WC. Eukaryotic protein elongation factors. *Trends Biochem Sci.* 1990 Nov;15(11):420 -4.
  62. Bermek E. Mechanisms in polypeptide chain elongation on ribosomes. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 1978;21:63-100.
  63. Nurten R, Aktar NB, Bermek E. Functional groups of elongation factor 2 involved in interactions with guanosine nucleotides and ribosomes. *FEBS Lett.* 1983 Apr 18;154(2):391 -4.
  64. Oppenheimer NJ, Bodley JW. Diphtheria toxin. Site and configuration of ADP-ribosylation of diphthamide in elongation factor 2. *Biol Chem.* 1981 Aug

25;256(16):8579 -81.

65. White-Gilbertson S, Rubinchik S, Voelkel-Johnson C. Transformation, translation and TRAIL: an unexpected intersection. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2008 Apr;19(2):167 -72.
66. Bektaş M, Akçakaya H, Aroymak A, Nurten R, Bermek E. Effect of oxidative stress on in vivo ADP-ribosylation of eukaryotic elongation factor 2. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005 Jan;37(1):91 -9.
67. Bektaş M, Nurten R, Ergen K, Bermek E. Endogenous ADP-ribosylation for eukaryotic elongation factor 2: evidence of two different sites and reactions. *Cell Biochem Funct.* 2006 Jul-Aug;24(4):369 -80.
68. Ovchinnikov LP, Motuz LP, Natapov PG, Averbuch LJ, Wettenhall RE, Szyszka R, Kramer G, Hardesty B. Three phosphorylation sites in elongation factor 2. *FEBS Lett.* 1990 Nov 26;275(1-2):209-12.
69. Üstek D, Oku B, Çakiris A, Güven C, Bektaş M. İnsan EF2 geninin klonlanması, karakterizasyonu ve poliklonal antikor eldesi. 17. Ulusal Biyofizik Kongresi, Özet kitabı, P15. İzmir, 7-9 Eylül 2005.
70. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970 Aug 15;227(5259):680 -5.
71. Kayalar C, Ord T, Testa MP, Zhong LT, Bredesen DE. Cleavage of actin by interleukin 1 beta-converting enzyme to reverse DNase I inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Mar 5;93(5):2234 -8.
72. Abbate A, De Falco M, Morales C, Gelpi RJ, Prisco M, De Luca A, Palleiro J, Fedele V, Feroce F, Baldi F, Vetrovec GW, Baldi A. Electron microscopy characterization of cardiomyocyte apoptosis in ischemic heart disease. *Int J Cardiol.* 2007 Jan 2;114(1):118 -20.



**HAM VERİLER****eEF-2'nin süreye bağlı *in vivo* ADP-ribozillenmesi.**

Belirtilen sürelerde, 50 ng/ml DT varlığında hazırlanan HUVEC hücre lizatlarındaki ADP-ribozillenmeyen eEF-2 miktarı.

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

<b>Adı</b>	Bilge	<b>Soyadı</b>	Özerman
<b>Doğ.Yeri</b>	İstanbul	<b>Doğ.Tar.</b>	25.06.1975
<b>Uyruğu</b>	T.C.	<b>TC Kim No</b>	49717084088
<b>Email</b>	bilgeozerman@hotmail.com	<b>Tel</b>	0 212 286 54 16

### Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
<b>Doktora</b>	Sağlık Bilimleri Enstitüsü / İstanbul Tıp Fak./ Biyofizik	2009
<b>Yük.Lis.</b>	Sağlık Bilimleri Enstitüsü / DETAE/ Sinirbilim	2002
<b>Lisans</b>	İstanbul Fen Fakültesi/ Biyoloji Bölümü	1999
<b>Lise</b>	Özel Fransız Saint Benoit Lisesi	1994

### İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Araştırma Görevlisi	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	2002-2002
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜD S Puanı	(Diğer) Puanı
<b>İngilizce</b>	İyi	İyi	İyi	78	
<b>Fransızca</b>	İyi	İyi	İyi		

\*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
<b>LES Puanı</b>	53,847	53,058	53,453
<b>(Diğer) Puanı</b>			

### Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Ofis programları	İyi

### Uluslararası Yayınlar

1. Nurten A, Ozerman B, Ozen I, Kara I. The role of solid food intake on antimuscarinic-induced convulsions in fasted mice. *Epilepsy Behav.* 2009 [accepted].
2. Sanli O, Armagan A, Kandirali E, Ozerman B, Ahmedov I, Solakoglu S, Nurten A, Tunc M, Uysal V, Kadioglu A. TGF-beta(1) neutralizing antibodies decrease the fibrotic effects of ischemic priapism. *Int J Impot Res.* 2004 Dec;16(6):492 -7.
3. Koyuncuoğlu H, Nurten A, Enginar N, Ozerman B, Kara I. The effects of different 4-aminopyridine and morphine combinations on the intensity of morphine abstinence. *Pharmacol Res.* 2001 Mar;43(3):245 -50.

### Sözlü Bildiri

B. Özerman, B. Oku, B.Varol, D.Üstek, H.Akçakaya, LT. Şener, M. Bektaş, R.Nurten: İmmunfloresan yöntem ile ökaryotik elongasyon faktör 2 (eEF2)'nin hücre içi dağılımının görüntülenmesi. XIX. Ulusal Biyofizik Kongresi. Özet Kitabı, S12. Konya, 5-7 Eylül, 2007.

### Poster Bildirileri

1. B.Özerman, M.Bektaş, E.Karabulut, F.Aktar, S.Solakoğlu, R.Nurten. Difteri Toksini'nin Kalp Kası Lifleri Üzerine Etkisinin İnce Yapı Düzeyinde İncelenmesi. XX. Ulusal Biyofizik Kongresi. Sağlık Bilimleri Dergisi, P-41. Mersin, 22-25 Ekim, 2008.
2. B.Varol, B.Özerman, M.Bektaş, R.Nurten. Hücre İçi Aktin-Difteri Toksini Katalitik Alt Birimi (FA) Etkileşiminin Gösterilmesi. XX. Ulusal Biyofizik Kongresi. Sağlık Bilimleri Dergisi, P-62. Mersin, 22-25 Ekim, 2008.
3. A.Nurten, İ.Özen, B.Özerman, S.Karamürsel, İ.Kara. Serebral İskemi Reperfüzyon Uygulanan Sıçanlarda Enoantin Etkilerinin 16 Kanallı Kortikal EEG ile İncelenmesi. XX. Ulusal Biyofizik Kongresi. Sağlık Bilimleri Dergisi, S-10. Mersin, 22-25 Ekim, 2008.

4. Özerman B, Nurten A, Dalanay U, Özen İ, Karamürsel S, Kara İ. Effects of paroxetine administration on cortical EEG of elderly rats. X<sup>th</sup> International Conference on Cognitive Neuroscience, P012. Bodrum September 1<sup>st</sup>-5<sup>th</sup> 2008.
5. Özerman B, Varol B, Üstek D, Akçakaya H, Şener LT, Bektaş M, Nurten R Floresein izotiyosiyanat (FITC) ile işaretlenen difteri toksininin hücre içindeki dağılımının protein sentezi ile ilişkisi. XIX. Ulusal Biyofizik Kongresi. Özet Kitabı, P-13. Konya, 5-7 Eylül, 2007.
6. Özerman B, Nurten A, Dalanay U, Özen İ, Kara İ. Paroksetin uygulanan genç ve yaşlı sıçanların kortikal EEG özelliklerinin karşılaştırılması. XIX. Ulusal Biyofizik Kongresi. Özet Kitabı, P-14. Konya, 5-7 Eylül, 2007.
7. NurtenA, Özerman B, Özen İ, Karamürsel S, Kara İ. Doğal bir polifenolik bileşik olan enoantın serebral iskemi reperfüzyon uygulanan sıçanların kortikal EEG frekans dağılımının topografik haritalanmasına etkisi. XIX. Ulusal Biyofizik Kongresi. Özet Kitabı, P-04. Konya, 5-7 Eylül, 2007.
8. Orhan N, Zengin A, Ozkok E, Aydın M, Ozbek Z, Nurten A, Ozerman B, C.I. Kucukali, Kara I. Changes In Complex I Activity In Hippocampus Region of Brain After Ischemia. Joint World Congress on Stroke. International Journal of Stroke. Vol. 1, Suppl. 1, 111-174. November 2006.
9. Özerman B, Bektaş M, Solakoğlu S, Nurten R. Difteri Toksinin Dana Kalp Kası Üzerine Etkisi. 18. Ulusal Biyofizik Kongresi. Özet Kitabı, P41. Beypazarı-Ankara, 6-9 Eylül, 2006.
10. Özerman B, Nurten A, Dalanay U, Özen İ, Kara İ. Paroksetin Uygulanan Yaşlı Sıçanların Kortikal EEG Özellikleri. 18. Ulusal Biyofizik Kongresi. Özet Kitabı, P42. Beypazarı-Ankara, 6-9 Eylül, 2006.
11. Özerman B, Nurten A, Özen İ, Kara İ. Wistar Albino Sıçanların Kortikal EEG Özelliklerine Yaşın Etkisi. 17. Ulusal Biyofizik Kongresi. Özet Kitabı, P14. İzmir, 7-9 Eylül, 2005.
12. Özerman B, Nurten A, Özen I, Kara I. Electroencephalographic properties of a rat during long term cerebral ischemia/reperfusion. 4<sup>th</sup>National Congress of Neuroscience, Mersin. Neuroanatomy. 2005 Apr; Vol 4 Suppl 1: P.46.
13. Özerman B, Nurten A, Özen I, Kara I. The effect of long term cerebral ischemia/reperfusion on event related potentials of rat. 4<sup>th</sup>National Congress of Neuroscience, Mersin. Neuroanatomy. 2005 Apr; Vol 4 Suppl 1: P.47.

14. Özerman B, Nurten A, Kara İ. The effect of gabapentin on isometric muscle contractions of rat phrenic nerve-hemidiaphragm preparations. 3<sup>th</sup> National Congress of Neuroscience, Denizli. Neuroanatomy. 2004 Apr; Vol 3 Suppl 1: P.11.
15. Şanlı Ö, Armağan A, Erol B, Özerman B, Nurten A, Kendirici M, Tunç M, Kadioğlu A. Effects of TGF- $\beta$ 1 antibodies on hemodynamics of erection in an ischemic priapism model. The Journal of Urology. 2003 Vol 169, Suppl P1196.
16. Nurten A, Özerman B, Kara İ. The effect of food deprivation and scopolamine on cortical electroencephalography in rats preliminary results. 2<sup>nd</sup> National Congress of Neuroscience, Bursa. Neuroanatomy. 2003 Apr; Vol 2 Suppl 1: P.119.
17. Özerman B., Nurten A., Kara İ. The effect of pentylentetrazole on isometric muscle contractions of rat phrenic nerve-hemidiaphragm preparations. 2<sup>nd</sup> National Congress of Neuroscience, Neuroanatomy. 2003 Apr; Vol 2 Suppl 1: P.74.
18. Özerman B, Nurten A, Kara İ. Sıçan frenik sinir-hemidiyafram preparatına  $\gamma$ -Aminobütirik asid uygulamasının izometrik kas kasılmaları üzerindeki etkisi. Türk Fizyolojik Bilimler Derneği 28.Ulusal Fizyoloji Kongresi. Özet Kitabı, P-038. İzmir, 24-27 Eylül, 2002.
19. Özerman B, Nurten A, Kara İ. The effect of ethosuximide on neuromuscular junction. 7th ECNP Regional Meeting. European Neuropsychopharmacol. 2002 Apr; 12 Suppl 2:S29-S71.
20. Özerman B, Nurten A, Kara İ. Sinir kas kavşağında lamotrijinin etkisi. 1.Ulusal Sinirbilimleri Kongresi. Bildiri Özetler Kitabı, P-77. Eskişehir, 16-20 Mart, 2002.
21. Nurten A, Kara İ, Özerman B, Koyuncuoğlu H. The effects of the L-type VDCC blockers at the neuromuscular junction. European Neuropsychopharmacology The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology. Vol 11, Supp 3, Oct 2001, page S363.
22. Nurten A, Özerman B, Kara İ, Koyuncuoğlu H. Sinir kas kavşağında kalsiyum kanal blokerlerinin etkisi. Türk Fizyolojik Bilimler Derneği 26. Ulusal Kongresi, Bildiri Özetler Kitabı, S.144, Eskişehir, 4-8 Eylül, 2000.
23. A.Nurten, B.Özerman, İ.Kara, H.Koyuncuoğlu. Sıçan frenik sinir-hemidiyafram preparatında çözücü olarak kullanılan tween 80 ve etil asetatın etkileri. XII.Ulusal Biyofizik Kongresi. Bildiri Özetleri Kitabı, S.15. Silivri-İstanbul, 7-9 Eylül, 2000.

## Ödüller

1. 19. Ulusal Biyofizik Kongresi, 5-7 Eylül 2007 üçüncülük poster ödülü.

B.Özerman, B.Varol, D.Üstek, H.Akçakaya, L.T. Şener, M.Bektas, R.Nurten tarafından hazırlanan “Floresein izotiyosiyanat (FİTC) ile işaretlenen difteri toksininin hücre içindeki dağılımının protein sentezi ile ilişkisi” adlı poster.

2. 19. Ulusal Biyofizik Kongresi, 5-7 Eylül 2007 ikincilik poster ödülü.

A.Nurten, B.Özerman, İ.Özen, S.Karamürsel, İ.Kara tarafından hazırlanan “Doğal bir polifenolik bileşik olan enoantın serebral iskemi reperfüzyon uygulanan sıçanların kortikal EEG frekans dağılımının topografik haritalanmasına etkisi” adlı poster.

## Katıldığı kurslar

1. Microscopy and Spectroscopy for Solving Problems in Biophysics at the Nanoscale, Mersin Üniversitesi, Mersin. Ekim, 2008.
2. Optofizyoloji ve Konfokal Mikroskopi Kursu, Hacettepe Üniversitesi, Ankara. Şubat, 2007.
3. Workshop on Protein Mass Spectrometry and Proteomics, Marmara Üniversitesi, İstanbul. Ağustos, 2004.
4. IBRO Course in Neuroscience, Ege Üniversitesi, İzmir. Eylül, 2003.
5. International Summer School on Neural Plasticity, Ege Üniversitesi, İzmir. Haziran, 2001.
6. Mikroelektrod Teknikleri, Hacettepe Üniversitesi, Ankara. Şubat, 2000.

**Özel İlgi Alanları (Hobileri):** Yüzme sporu