

→ Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .

→ Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak

→ Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

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

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**AKTİN MODELİNDE PROTEİN-LİGAND
ETKİLEŞİMLERİNİN YENİ YAKLAŞIMLAR
ÇERÇEVESİDE İNCELENMESİ**

KEMAL ALPER ÖNSÜ

**DANIŞMAN
PROF. DR. MUHAMMET BEKTAŞ**

**BİYOFİZİK ANABİLİM DALI
BİYOFİZİK PROGRAMI**

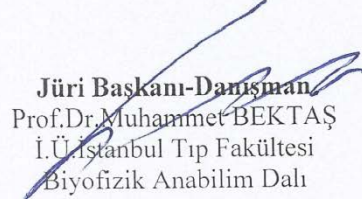
İSTANBUL-2019

TEZ ONAYI**YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAYI**

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Programında Yüksek Lisans öğrencisi Kemal Alper Önsü tarafından Prof.Dr.Muhammet Bektaş 'ın danışmanlığında hazırlanan "Aktin Modelinde Protein-Ligand Etkileşimlerinin Yeni Yaklaşımlar Çerçevesinde İncelenmesi" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 06/08/2019 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

**Jüri**

Prof.Dr.İşıl ALBENİZ
İ.Ü.İstanbul Tıp Fakültesi
Biyofizik Anabilim Dalı



Jüri Başkanı-Danışman
Prof.Dr.Muhammet BEKTAŞ
İ.Ü.İstanbul Tıp Fakültesi
Biyofizik Anabilim Dalı

Jüri

Prof.Dr.Ali Sarper DİLER
İ.Ü.İstanbul Tıp Fakültesi
Fizyoloji Anabilim Dalı

**Jüri**

Dr.Öğr.Üyesi Ebru HACIOSMANOĞLU
Bezmialem V.Tıp Fakültesi
Biyofizik Anabilim Dalı



Dr.Öğr.Üyesi Ayhan ÜNLÜ
Trakya Üniversitesi Tıp Fak.
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 çalışmasıyla 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.



Kemal Alper ÖNSÜ

İTHAF

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

TEŞEKKÜR

Çalışmam boyunca teorik birikiyle destek olan, mezuniyetime giden süreçte manevi desteğini asla esirgemeyen tez danışmanım, İ.Ü İstanbul Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı Bölüm Başkanı sayın Prof. Dr. Muhammet Bektaş'a teşekkür ederim.

Araştırmaların sırasında kapısı her zaman açık olan, akademik gelişimimde bana yol gösteren Doçent Dr. Başak Varol'a teşekkür ederim.

Deneylerimle alakalı her konuda maddi ve manevi olarak her zaman yanımda olan, bölümde geçirdiğim zaman boyunca pratik yöntemleri öğrenmem için sabırla destek sunan Dr. Öğr. Üyesi Ebru Hacıosmanoğlu'na teşekkürü borç bilirim.

Deney sürecimde sorularımı asla yanıtsız bırakmayan Uzm. Dr. Bilge Özerman Edis'e ve İstanbul Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalındaki tüm öğretim üyelerine eğitimim boyunca kişisel ve akademik gelişimimdeki katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TYL-2018-30522

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	ii
BEYAN.....	iii
İTHAF.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xi
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	xii
ÖZET	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Aktin	3
2.1.1. F-Aktin.....	4
2.2. Protein Ligand Etkileşimleri.....	5
2.2.1. Protein Bağlanma Denklemleri.....	5
2.2.2. Protein Bağlanmaya Etki Eden Faktörler	6
2.3. Protein-Protein Etkileşimleri	7
2.4. Aktin Bağlanma	8
2.4.1. Aktin Bağlayan Proteinler	9
2.4.1.1. B-Timosin/WH2 Domain	10
2.4.1.2. WH2 Domaini ve İplikçik Uzaması.....	11
2.4.1.3. FH2 Domain	11
2.4.1.4. DNaz I.....	11
2.4.1.5. Gelsolin.....	11

2.4.1.6. Profilin	12
2.4.1.7. ADF/Kofilin.....	13
2.4.1.8. RPEL Domain.....	13
2.4.2. Aktine Bağlanan Doğal Moleküller ve Draglar	14
2.4.2.1. Makrolidler	14
2.4.2.2. Patojenler	14
2.4.2.3. Cucurbitacin.....	14
2.4.2.4. Cucurbitacin I	15
2.4.2.5. Deksametazon.....	16
2.4.2.6. Sitokalsin.....	17
2.4.2.7. Falloidin	17
2.4.2.8. Jasplakinolid	18
2.4.2.9. Falloinid-Jasplakinolid Karşılaştırması	19
2.4.2.10. Strausporine	20
2.4.3. Protein-Ligand Araştırmalarındaki Başlıca Yöntemler	21
2.4.3.1. Atomik Güç Mikroskobu	21
2.4.3.2. Manyetik Rezonans.....	21
2.4.3.3. Floresan Spektrofotometrik Yöntemler	21
2.4.3.4. Termal Kayma Deneyi.....	22
2.4.3.5. Yüzey Plazmon Rezonans	23
2.4.3.6. İzotermal Titrasyon Kalorimetresi	23
2.4.3.7. MALDI-TOF Kütle Spektrografisi	23
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	24
3.1. Gereçler.....	24
3.1.1. Kimyasal Maddeler.....	24
3.1.2. Diyaliz Malzemeleri	24
3.1.3. Hücre Kültürü Malzemeleri	24

3.1.4. Drag Molekülleri.....	25
3.1.5. Floroforlar.....	25
3.1.6. Tamponlar ve Solüsyonlar	25
3.1.6.1. Aktin Saflaştırma	25
3.1.6.2. SDS-PAGE	26
3.1.6.3. Western Blot	27
3.1.6.4. Floresan Boyama	27
3.1.7. Cihazlar	28
3.2. Yöntemler	29
3.2.1. Tavşan İskelet Kasından G-Aktin saflaştırması.....	29
3.2.2. SDS-Poliakrilamid Jel Elektrophorezi	30
3.2.3. Western Blot	30
3.2.4. Hücre Kültürü	30
3.2.4.1. Hücrelerin Çoğaltılması.....	31
3.2.4.2. Hücrelerin Dondurulması	31
3.2.4.3. Hücrelerin Sayılması ve Canlılık Tayini	31
3.2.4.4. Hücrelere Drag Uygulanması	31
3.2.5. Floresan Görüntülenmesi.....	32
3.2.6. Termal Kayma Deneyi.....	32
3.2.7. Veri Analizi.....	32
4. BULGULAR.....	34
4.1. G-Aktin Saflığının Belirlenmesi.....	34
4.2. Termal Kayma Deneyi ile Drag Aktivitesi Belirlenmesi.....	34
4.2.1. G-aktin Nükleotit Etkileşimleri	35
4.2.2. Falloidin	38
4.2.3. Aktin Bağlayan Draglar	39
4.3. Cucurbitacin I molekülünün K_d Değerinin Hesaplanması.....	40

4.4. Floresan Mikroskobu Görüntüleri	42
5. TARTIŞMA	44
KAYNAKLAR	48
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	55
ÖZEĞEÇMİŞ.....	56



TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1: ATP, ADP ve GTP'nin G-aktin etkileşimlerinin termal dengeye etkisi	35
Tablo 2: Falloidin ile G-Aktin etkileşiminin termal dengesine etkisi	38
Tablo 3: Aktin bağlayan dragların (Deksametazon, Jasplakinolid, Strausporine) termal dengeye etkisi	39
Tablo 4: Cucurbitacin I etkisinde G-aktin termal kalımlılığı	40



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: G-aktin molekülünün üç boyutlu atom modeli.....	3
Şekil 2: Aktin filamentinin uzaması, “Treadmilling” işlemi	5
Şekil 3: Aktin bağlayan proteinler ve etkileri.....	9
Şekil 4: Tavşan çizgili kasından saflaştırılan aktinin elektroforez ve WB analizi.	34
Şekil 5: Aktin-ATP etkileşiminin TSA yöntemiyle gösterimi.....	36
Şekil 6: Aktin-ADP ve GTP etkileşimlerinin TSA yöntemiyle gösterimi	37
Şekil 7: Aktin-Falloidin etkileşiminin TSA yöntemiyle gösterilmesi	38
Şekil 8: Aktin-Drag etkileşimlerinin TSA yöntemiyle gösterilmesi	39
Şekil 9: Aktin-Cucurbitacin I etkileşiminin TSA yöntemiyle gösterilmesi.....	41
Şekil 10: Cucurbitacin ile G-aktin bağlanmasında K_d değerinin hesaplanması.....	41
Şekil 11: Cucurbitacin I etkisinde HUVEC’lerin hücre iskeleti görüntüsü.....	42

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ABP	Aktin bağlayan proteinler
ATP	Adenozin trifosfat
ADP	Adenozin difosfat
BSA	Sığır serum albümini
CLAN	Çapraz bağlı aktin iskeleti
G-aktin	Globüler aktin
DAPI	4'-6-Diamidino-2-fenil indol
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asitik
F-aktin	Filametöz aktin
FBS	Fetal sığır serumu
FITC	Floreseinizotiyosiyanat
g	Yerçekimi ivmesi / gram
GTP	Guanozin trifosfat
HUVEC	İnsan göbek bağı damar endotel hücresi
K_d	Bağlanma sabiti
kDa	Kilo Dalton
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
PBS	Tuzlu Fosfat Tamponu
RT-PCR	Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
PPI	Protein protein etkileşimleri
PMSF	Fenilmetilsulfonil florit
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamit jel elektroforezi
TBST	Tris tuz çözeltisi
TEMED	Tetrametilendiamin
T_m	Erime sıcaklığı
TSA	Termal kayma deneyi

ÖZET

ÖNSÜ K.A. (2019). İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Aktin Modelinde Protein-Ligand Etkileşimlerinin Yeni Yaklaşımlar Çerçevesinde İncelenmesi. Biyofizik Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul.

Ökaryotik hücrelerde en çok bulunan protein olan aktin; globular (G-monomer) ve filamentöz (F-zincir) olmak üzere iki farklı formda bulunmaktadır. Monomer aktin 43 kDa ağırlığında olup, birincil yapısı 375 aminoasit ve dört ayrı alt ünite (subdomain) içermektedir. G-aktin sentez sonrası; asitillenme, ADP-ribozillenme ve fosforillenme gibi modifikasyonlara uğrayabilir. Aktin draglarla (falloidin, cucurbitacin, kolşisin), membran, sitoskelet ve plazma proteinleriyle ve protein sentez faktörlerinden elongasyon faktörü 1 ve 2, ribozomlar, tRNA ve apoptoz ile bağlantılı DNaz I ile etkileşime girdiği bilinmektedir. Aktin bu etkileşimler sonrası birçok hücresel fonksiyonda (hücre iskeleti, hareket, bölünme, taşıma, sinyalizasyon, apoptoz ve protein sentezi) işlev görmektedir.

Protein-ligand etkileşimlerinin incelenmesi; ilaç moleküllerinin hücresel hedeflerle etkileşimi, süresi ve dışarı atılımı süreçlerinin belirlenmesi amacıyla hücresel termal kayma (CETSA ve TSA) yöntemleri kullanılmaktadır. Bu yöntemler hedef ve kişiye yönelik ilaç tasarımı ve protein-ligand bağlanma afiniteleri konusunda kullanılabilir. Proteinlerin termal stabilitesi, ligand ve drag bağlanmasıyla artmakta ve denatürasyon eğrileri (erime ısısı; T_m) sağa kaymaktadır.

Cucurbitacin kabakgiller ailesinden saflaştırılan triterpenoid formu bir moleküldür. F-aktin ve G-aktin ile etkileştiği gösterilmiş fakat bağlanma bölgesi ve afinitesi saptanamamıştır. Ayrıca doğal veya sentetik cucurbitacinin kanser tedavisinde kullanılabilecektir. Bu çalışmada, protein-ligand etkileşimleri yeni bir yaklaşım olan TSA, aktin modelinde incelenmiştir. Cucurbitacin I-aktin arasındaki ilişki immüno floresan tekniklerle de gösterildi; hücre iskeletinde bozulduğu, aktin kümelenmelerinin olduğu görüldü. Cucurbitacin I üzerine yoğunlaşan çalışmanın TSA sonuçları G-aktinin termal kalımlılığının (T_m) artması ve toplam floresan şiddetindeki azalmayla aralarındaki etkileşimi göstermektedir.

İn vitro ve *in vivo* etkileşimler ilaç tasarlanmasında veya ilaç etkileşim mekanizmalarının anlaşılmasında önemli bir husus teşkil ettiğinden çalışmalarımızın klinik öncesi çalışmalarda fayda sağlaması mümkündür.

Anahtar Kelimeler: Aktin, bağlanma kinetiği, protein-ligand etkileşimleri, termal kayma deneyi, cucurbitacin I.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TYL-2018-30522

ABSTRACT

ÖNSÜ K. A. Investigation of Protein-Ligand Interactions Using New Approaches on Actin Model. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Biophysics. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul 2019.

Actin, the most abundant protein in eukaryotic cells, can be found in two forms; globular (G-monomer) or filamentous (F-chain). Monomer actin with molecular weight 43 kDa consists of 375 aminoacids and four subunits (subdomain). Post-synthesis, G-actin undergoes modifications like ADP-ribosilation, acetylation and phosphorylation. Actin interacts with; drug molecules (phalloidin, cucurbitacin, colchicines), many proteins of membrane, cytoskeleton and plasma and protein synthesis factors (elongation factors 1 and 2, ribosomes, tRNA and apoptose related DNase I). Globular and filamentous actin takes part in many cellular functions (cytoskeleton, mobility, division, transportation, signalization, apoptosis and protein synthesis) after such interactions.

Cellular thermal shift assay (CETSA and TSA) are methods used for researching protein-ligand interactions. They can be utilized to determine intracellular interactions, time of effect and disposal periods of drugs, to design drugs and reveal data on protein-ligand binding affinities. Protein thermal stability increases with ligand/drug binding and a high shift in denaturation curves (melting point; T_m).

Cucurbitacins are triterpenoid formed molecules extracted from family *cucurbitaceae*. Actin is shown to interact with cucurbitacins however the binding sites are mostly unknown. Natural or synthetic cucurbitacins can be used in cancer treatment. This study examines protein-ligand interactions with TSA, a novel approach, in actin model, specifically G-actin with cucurbitacin. immunofluorescence techniques revealed that cytoskeleton degrades and aggregates with cucurbitacin I. TSA results show increase in T_m and decrease in fluorescence intensity showing interactions between actin and cucurbitacin I.

In vivo and *in vitro* interactions are used for drug design and to research drug activity mechanisms so the results can be used for potential pre-clinic research.

Keywords: Actin, binding kinetics, protein-ligand interactions, thermal shift assay, cucurbitacin I.

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. TYL-2018-30522

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Aktin hücre içinde en çok bulunan protein olup, hücrede hareket, taşıma ve bölünme gibi önemli görevlerde rol almaktadır (Cooper 1987, Wehland ve ark. 1997). Aktinle etkileşime geçen moleküller aktin iskeletinin görüntülenmesinde, hücre içi yapıların aydınlatılmasında ve çeşitli ilaçların üretiminde kullanılmaktadır. Bu amaçla kullanılan çeşitli moleküller mevcuttur, örneğin falloidin, filamentoz aktine (F-Aktin) yüksek ilginlikle bağlanarak filament kırılımını durdurmaktadır. Ayrıca falloidin çeşitli florofor boyalarla işaretlenerek hücre iskeletinin görüntülenmesinde kullanılmaktadır (De La Cruz ve ark. 1994). Jasplakinolid ise aktin bağlayan başka bir molekül olup, benzer şekilde aktin filamentine bağlanır ancak polimerleşmeyi engellememektedir (Bubb ve ark. 1994). Deksametazon ise aktinle etkileşen başka moleküller ile aktin üzerinde dolaylı etki yapmaktadır (Steeley ve ark. 1992).

Termal Kayma Deneyi floresan spektrofotometrik bir yöntemdir. Bu yöntem çok sayıda protein-ligand karışımının hızlı, düşük maliyetli ve yüksek çıktılı sonuçlarını elde etmek için kullanılmaktadır (Molina ve ark. 2013). Son dönemde çok sayıda protein-ligand çalışmalarında kullanılmaktadır. Bu yöntemle taranabilen drag kütüphaneleri protein çalışmalarında hedef seçimi açısından kolaylık sağlamaktadır. Literatürde termal kayma çalışmaları daha çok F-aktin üzerinde gerçekleştirilirken monomer aktinle yapılan çalışmalar sınırlıdır. Aktinin bağ kurduğu çok sayıda molekül (DNAz I, Gelsolin, Profilin, ADF/Cofilin) ve bu moleküllerle bağlanma kurabildiği çok sayıda bağlanma bölgesi (FH2, RPEL, WH2) mevcuttur. Bu bağlanma bölgelerine birden fazla molekül bağlanabildiği gibi birden fazla bölgeye bağlanabilen moleküller de bulunmaktadır.

Aktin ile *in vivo* yapılan çalışmalarda dolaylı yollarla bağlanan moleküllerin *in vitro* çalışmalarda aktin bağlanma bölgeleriyle etkileşmemesi beklenmektedir. *In vitro* TSA deneyinde aktinin yanında başka bir protein bulundurmamaya konulan dragların doğrudan etki edip etmediği belirlenecektir. Ortaya çıkarılacak doğrudan etkileşimler söz konusu moleküllerin aktine bağlanma bölgelerinin araştırılmasını mümkün kılacaktır. G-aktin çalışmasının TSA protokolüne uygulanabilirliği, F-aktin üzerinde etkileşimi bilinen moleküllerle monomer aktin deneyi yapılarak literatürle uyumu test edilecektir. Literatürde çeşitli hücre hatlarının aktin iskeleti ile cucurbitacin I etkileşimi

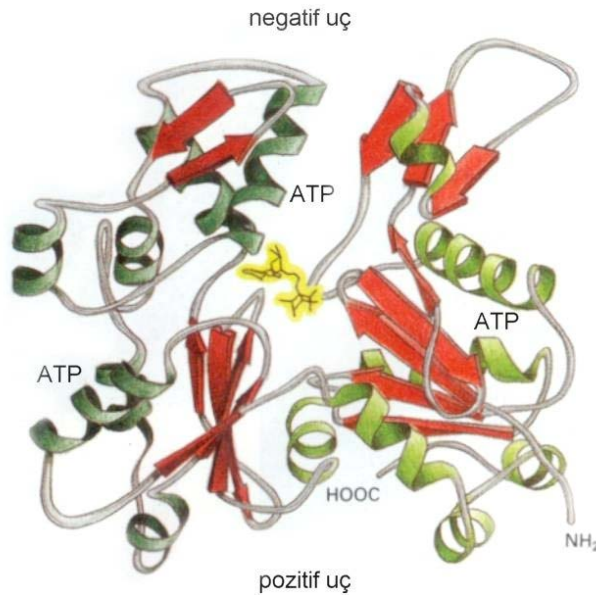
floresan boyama ile gösterilmiştir, çalışmamızda literatürle kontrollü olarak farklı hücre hattında farklı zaman dilimlerinde floresan görüntüleme yapılacaktır.

Çalışmamızda, aktin ile ilişkisi daha az bilinen strausporine ve yakın dönemde ön plana çıkan cucurbitacin I ile monomer aktin etkileşimleri araştırıldı. Strausporine molekülü yukarıda belirtildiği üzere TSA protokolünde incelendi. Cucurbitacin I üzerine odaklanan çalışma, aktin monomeri ile doğrudan etkileşimi *in vitro* termal kayma deneyiyle, ligandın aktin iskeletindeki etkisi floresan mikroskobu yöntemiyle HUVEC hücreleriyle *in vivo* çalışıldı. Çalışma sonucunda TSA protokolü ile aktin monomerinde uygulanabilirliği test edildi ve potansiyel ilaçlardan biri olan cucurbitacin I ile alakalı literatür zenginleştirildi. Sonuçlardan yola çıkarak monomer aktin bağlanma çalışmalarında ve ilaç araştırmalarında ön açıcı bulgular elde edilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Aktin

Ökaryot hücrelerdeki toplam proteinin % 5-10'unu, kas hücrelerinin ise % 20'sini aktin oluşturmaktadır. Aktin; kas kasılması, hücre göçü ve hücrenin şeklinin belirlenmesi gibi mekanik süreçlerde rol almakta, yapısal proteinlerle etkileşmektedir. Ayrıca düzenleyici proteinlerle etkileşerek; hücre içi sinyal iletimi, hücre içi taşıma ve çeşitli enzim etkinliklerinin düzenlenmesini de içeren temel görevleri yerine getirmektedir (Henessey ve ark. 1993). Polimerize aktin stres lifleri oluşturmaktadır, bu durumda miyozin, topomiyozin, alfa-aktinin ve filamin gibi yardımcı proteinlerle etkileşmektedir (Wehland ve ark. 1997). Hücre hareketliliğinde (Cooper 1987) ve hücre büyümesinde (Wehland ve ark. 1997) aktin proteininin etkili olduğu gösterilmiştir. Aktin, memelilerde her biri farklı genlerle kodlanan 6 adet izoforma sahiptir. Tüm izoformların aminoasit izoformları farklıdır. İki izoform; γ ve β neredeyse tüm hücrelerde mevcuttur, α -SM ise sadece düz kas hücrelerinde gözükmemektedir ve kas kasılmalarında yer almaktadır (Tsai 2003).



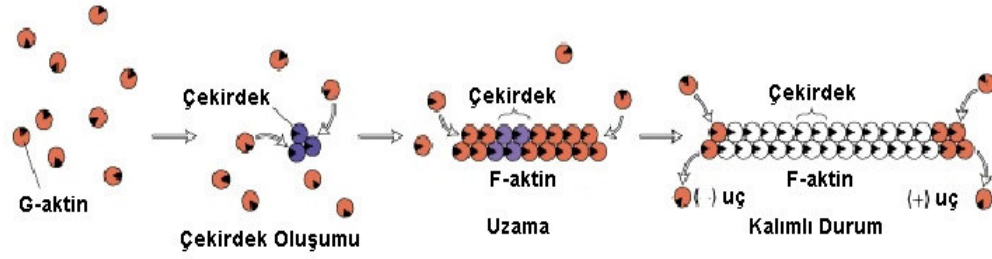
Şekil 1: G-aktin molekülünün üç boyutlu atom modeli

(Alberts ve ark. 1994)

Hücre iskeletini oluşturan ve hücresel döngüdeki pek çok görevde rol alan aktin; globular (G) (Şekil 1) ve filamentoz (F) olmak üzere iki farklı yapıda bulunmaktadır. Hayvan hücrelerinde normal şartlardaki (G:F) oranı 1:1 olarak belirlenmiştir (Alberts ve ark. 2002). Filament aktinin yapıtaşları olan monomer aktin (G-aktin) yapısal olarak türler arası korunmuştur. Monomer aktin 43 kDa ağırlığında olup 375 aminoasitten oluşmaktadır, birincil yapısında 4 alt birim gözlenmektedir (Vartiainen 2008). İki domain ve dört altbirimden oluşan aktin; domainleri arasında oyuk kısmı bulunmaktadır. Bu oyuğa iki değerlikli katyonlar (Ca^{+2} , Mg^{+2}) ve adenin nükleotidi yerleşmektedir (Mictyson 1992, Carlier ve Pantaloni 2007). Aktine bağlanan proteinler altbirimlerdeki özgün hedef bölgeleri ile etkileşir. İki aktin molekülü arasındaki etkileşim 4. Altbirimde gerçekleşir (Janmey ve ark. 2007, Geeves ve ark. 2005). Hücre ölümü ve doku zedelenmesinde aktin kana karışabilir. Aktin-toplama sistemi dolaşımdaki aktinin depolimerizasyonu ve ortadan kaldırılmasından sorumludur

2.1.1. F-Aktin

Fizyolojik koşullarda magnezyum ve ATP ile etkileşen aktin, kovalent olmayan bir bağlanma ile polimerleşir ve F-aktin yapısına bir çift heliks filamenti olarak eklenir. Bu polimerleşme birden fazla basamak içermektedir; ilk basamak, nükleasyon aşaması, üç aktin molekülü bir araya gelerek nükleus olarak adlandırılan üçlü oligameri oluşturmaktadır; ikinci aşamada ATP bağlı G-aktin ATP hidrolizi ile filamente eklenir. Filamente bağlanan ve ayrılan monomer miktarı normal şartlar altında dengededir. Serbest aktin monomer miktarının düşmesi durumunda depolimerleşme ve filament boyu kısalmaya başlar (Sayers ve ark. 1985). F-aktin oluşumundaki aktin; yüksek bağlanma ilginliğiyle artı (sakallı) uca, daha düşük ilginlikle eksi (sivri) uca bağlanmaktadır. Artı ucun daha hızlı uzaması yönelim hareketlerinde kullanılmaktadır. Aktin monomerinin çok düşük derişimde bulunması durumunda eksi uçtan depolimerleşen aktin artı uca eklenilerek “Treadmilling” olarak adlandırılan işlemi gerçekleştirir (Alberts ve ark. 2002).



Şekil 2: Aktin filamentinin uzaması, “Treadmilling” işlemi

Ökaryotik hücrelerde aktin filamentleri hücre hareketliliği, fagositoz ve doku invazyonu benzeri görevlerde yer alırlar (Mizuno ve ark. 2002). Lamellipodium protrusyonu, hücrenin kol uzatarak hareketliliğinin sağlanması, yara iyileşmesi ve immün hücrelerinin aktifleşmesinde oluşmaktadır. Protrusyonda kullanılan aktin monomerlerinin dışarıdan alınmadığı, treadmilling işlemiyle gerçekleştiği gösterilmiştir (Cramer 1999).

Aktin işleyişinde değişikliklere yol açan sitokalsin, falloidin ve jasplakinolid benzeri ajanlar mikrofilamentin görevlerinin aydınlatılması için kullanılmıştır; sitokalsinler aktin polimerizasyonunu baskımlarken, phalloidin ve jasplakinolid aktin polimerizasyonunu indüklemekte ve filamentlerin stabilitesini arttırmaktadır (Mizuno ve ark. 2002).

2.2. Protein Ligand Etkileşimleri

2.2.1. Protein Bağlanma Denklemleri

Substratların kimyasal değişim ile bir formlarını değiştirip ürün olarak adlandırılan yapıya ulaşmaları için biyolojik katalizörler olan enzimlerin molekülün aktif bölgesiyle ikili yapı oluşturup reaksiyonun başlaması için gerekli olan formasyona geçirmesi gerekir. Moleküler etkileşimlerde bağlanmayı gösteren küçük molekül ligand, büyük molekülün bağlanılan bölgesi aktif bölge veya reseptör olarak adlandırılır. Moleküllerin birden fazla bağlanma bölgesi bulur; bu bölgelere ligand özel olarak bağlanabilir veya ligandlar bağlanmak için yarışabilir. Reseptör-ligandların ilişkisinin kinetik hesaplanması; aktif bölge için oluşacak yarışa veya bir ligandın bağlanacağı birden fazla aktif bölgenin varlığına göre değişiklik gösterir (Copeland 2004). Tek ligandın tek aktif bölgeye bağlanması durumunda kullanılacak en basit hesap;

$$K_d = \frac{[R]_f[L]_f}{[RL]}$$

Denklemine göre yapılır, Burada K_d ayrışım katsayısını $[RL]$ reseptör-ligand bileşiğinin konsantrasyonunu, $[R]_f$ ve $[L]_f$ ise serbest konsantrasyonlarını göstermektedir. K_d ile sistemin doyma noktası tespit edilir ve Gibbs serbest enerjisinin aşağıdaki denklemle hesaplanabilir:

$$\Delta G_{Bağlanma} = -RT \ln \left(\frac{[RL]}{[R]_f[L]_f} \right)$$

$$\Delta G_{Bağlanma} = -RT \ln(K_a)$$

$$K_d = \frac{1}{K_a}$$

Biyokimyasal deneylerde K_d hesaplanarak molarite üzerinden spesifik ligand konsantrasyonlarının reseptör ile yarı doymuluk seviyeleri ölçülebilir.

2.2.2. Protein Bağlanmaya Etki Eden Faktörler

Protein-ligand bileşikleri işlevsel olarak iki sınıfa ayrılabilir; spesifik bağlanmalar yüksek ilginlikte ve düşük bağlanma kapasitesinde, spesifik olmayan bağlanmalar düşük ilginlikte ve yüksek kapasitededir. Spesifik olmayan bağlanmalar; inhibitörler veya ısıyla gerçekleşen denatürasyona bağlı olarak ortamın ve molekülün kimyasal yapısıyla değişebilmektedir. Bu özellikleriyle; bağlanılan ortamın sıcaklık, pH, protein konsantrasyonu ve bağlanma süresi optimize edilerek bağlanmanın ideal koşulları bulunabilir (Blondeau ve Robel 1975).

Bağlanmanın araştırılması ilaç tasarımında kullanılmaktadır. Canlı sistemlerde ilacın hedef bölgeye ulaşması; lifofilik (lipid ve su arasındaki geçiş), iyonik (suda çözünürlüğü), elektronik (yüzeysel yük dağılımı) ve sterik (şekil) özelliklerine bağlıdır. Bağlanma kinetiğinin difüzyon ile araştırılması, dinamik doyumluluğa ulaştığı koşulların bulunması ilaç geliştirilmesinde önem taşımaktadır (Bligh 1988). Medikal kimya sektöründe protein-ligand etkileşimlerinde bağlanma sırasındaki pozisyon (docking) ilaç geliştirmesi amacıyla araştırılmaktadır. Aktif ligandın bağlanması, yeni ligandların taranması ve bağlanma ilginlikleri tahmini bilgisayar programı ve simülasyonları kullanılarak incelenmektedir (Leach ve ark. 2006). Medikal cihaz

sektöründe materyal yüzeylerin biyo-molekü tutunmasıyla değiştiği kabul edilmektedir. Partikül seviyesine inildikçe ve partikül boyu küçüldükçe ilgili proteinin kompozisyonu ve organizasyonu önemli derecelerde değişmektedir. Nanopartiküllerle modifiye edilen yüzeylerin protein tutunmasını seçici şekillerde değiştirebildiği bilinmektedir. Yüksek konsantrasyon ve bağlanma ilginliğine sahip proteinler öncelikle partikül yüzeyine bağlanmakta ancak aynı kolaylıkla yüzeyden ayrılıp, düşük konsantrasyonda düşük ilginlikli proteinlerle değişebilmektedir. Burada protein biyomühendislik çalışmaları protein dengesini değiştirecek koşulların bulunması işi devreye girmektedir (Lynch ve Dawson 2008). Bu sebeple protein yüzeyinde gerçekleşen değişikliklerin proteinin biyolojik yapısını fazlasıyla etkilediği bilinmektedir.

2.3. Protein-Protein Etkileşimleri

Protein-protein etkileşimleri (PPI) bağlanma ilginliği ve bağlanma kalıcılığına göre çeşitli biyolojik işlevlerde rol alır. Proteinler işlevsel dördüncü yapıya ulaşmak için protein-promoter bağlanmasına ihtiyaç duyar. Yapıda oluşacak değişiklikler bu bağlanmada oluşturacakları kayma sebebiyle ciddi farklılıklara yol açabilir (Lynch ve Dawson 2008). *In vivo* çalışmalarda protein promoter bağlanma kinetiği; hücrenin bölgesi, molekül konsantrasyonları ve ortam koşullarıyla değişmektedir. Bağlanma ilginliğinin gerçekleştiği koşulların protein-protein etkileşimi çerçevesinde çözülmesi biyolojik işlevlerinin çözülmesi için gereklidir (Nooren ve Thomson. 2003). İlaç taşıma araştırmaları ve protein karakterizasyonu deneylerinde protein etkileşimleri kullanılmaktadır. Materyaller fizyolojik ortama girdikten sonra proteinlerle etkileşir. Bu etkileşim, yüzey alanı, protein konsantrasyonu ve ortam koşullarına bağlıdır ayrıca proteinin üç boyutlu yapısındaki farklılaşmayla kontrol edilebilmektedir (Lynch ve Dawson 2008).

PPI'lar özdeş (homo-oligomer) ve özdeş olamayan (hetero-oligomer) zincirlerle oluşabilmektedir. Homolog proteinlerden oluşan oligomerler yapısal simetri içerisinde (Goodsell ve Olson 2000) izolog veya heterolog olarak organize olabilirler (Monod ve ark. 1965). İzolog düzendeki monomerler aynı yüzey yapısına sahip çift-katlanma simetriye sahiptir, heterolog düzende farklı arayüzlere bağlanarak sonsuz aggregasyona ulaşabilirler.

Yapısal olarak bileşikler zorunlu veya zorunlu olmayan şekillerde oluşurlar. Zorunlu PPI'larda transkripsiyon başlatıcılar çoğunlukla dengeli yapıda bulunmazlar.

Daha fazla gözlemlenen zorunlu olmayan etkileşimler reseptör-ligand, antikor-antijen, enzim-inhibitör gibi yapılardır. Bu tarz protein-protein yapıları bozunum-yapılma dengesinde bulunan zayıf bağlanmalar oluşturlar ve bu dengedeki yapısal birleşik halinde bulunma sürelerine göre birbirlerinde ayrılırlar. Genellikle yapısal veya işlevsel olarak zorunlu etkileşimler kalıcı, sinyal iletimi gibi düzenli olarak gerçekleşen etkileşimler geçici bağlanmalar oluşturur. Geçici yapıların kuvveti çevresel faktörlere bağlı olarak değişebilir; *in vitro* PPI dengesi, oluşturulacak ortamın koşulları dolayısıyla, *in vivo*'ya göre büyük farklılıklar gösterebilir (Nooren ve Thomson. 2003).

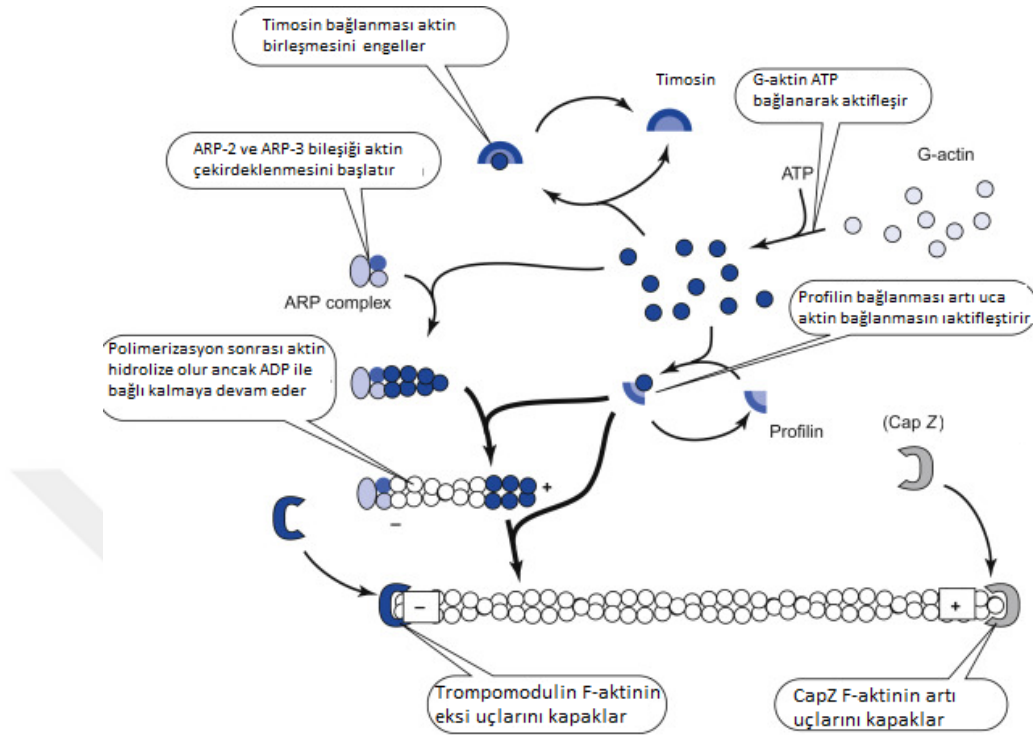
Oligamer yapıların oluşumu; konsantrasyon ve Gibbs serbest enerjisi ayarlanarak optimize edilebilir. Proteinlerin karşılaştığı koşullar (yüzeysel erişilebilirlik); bölgesel konsantrasyonlar ve bölgesel fizyolojik ortama (Efektör molekül varlığı, pH, sıcaklık) göre farklılık gösterebilir. Deney ortamı düzenlenerek molekül etkileşimleri *in vivo* koşullardan çok daha güçlü oluşabilir. Geçici protein bileşikleri ilaçlarla veya doğal toksinlerle bölgesel koşulların değiştirilmesiyle kalıcı hale getirilip hücresel işlevler sekteye uğratılabilir (Noreen ve Thomson 2003).

Proteinler aminoasit zincirlerinden oluşur. Aminoasitlerin dizilimi; yapıyı, şekli ve işlevi belirler. Aminoasitlerin ikincil yapıları β -yaprak ve α -sarmal oluşumlarıdır. İkincil yapıların oluşturduğu üçüncül dizilimler proteinin aktif olduğu dördüncül yapıyı belirler. Dördüncül yapı hidrofobik etkileşimlere kontrol edilir ve çekirdek kısmı sıkıca korunur. Ayrıca doğal yapıdaki yararlı etkileşimlerin elektrostatik etkileşimlerden kaynaklanan entropi kaybını dengelediğinden proteinler sıra dışı kararlılıktadır (Lynch ve Dawson 2008).

2.4. Aktin Bağlanma

Aktin bağlayan çok sayıda protein bilinmektedir ve yenileri yapılan araştırmalarla keşfedilmektedir. Aktin bağlayan proteinler (ABP) temelde yedi gruba ayrılır: (1) G-aktini tutuklayarak polimerleşmenin engellenmesinde rol alan proteinler (DNAz I), (2) kalımlılığı arttırıp depolimerleşmeyi engelleyen proteinler (tropomiyozin), (3) filamenti depolimerleştirip F-aktin G-aktin geçişini hızlandıran proteinler (kofilin), (4) filament ucuna bağlanıp negatif uçtaki monomer değişimini engelleyen proteinler (CapZ, falloidin), (5) filament demetlerini oluşturup ve üç boyutlu iskeletin kurulmasında rol alan çapraz bağlanan proteinler (Arp 2, Arp 3), (6) F-aktini

iki parçaya ayırıp boyunun kısalmasını sağlayan proteinler (gelsolin), (7) F-aktin üzerinde hareket eden motor proteinleri (miyozin ailesindeki proteinler).



Şekil 3: Aktin bağlayan proteinler ve etkileri

(Feher 2017)

Aktin, plazma membran proteinlerinden bazıları ve protein sentez faktörleri olan; elongasyon faktörü 1 (eEF1) ve elongasyon faktörü 2 (eEF2) ile etkileşime girdiği bilinmektedir (Bektaş ve ark. 1998). Ayrıca aktin; falloidin, deksametazon, sitokalsin, jasplakinolid, cucurbitacin ve kolşisin gibi draglarla etkileştiği de bilinmektedir.

2.4.1. Aktin Bağlayan Proteinler

F-aktin tarafından gerçekleşen nükleotit hidrolizi G-aktin ile F-aktin arasındaki geçişin düzenlenmesindeki ana etkenlerdendir. ATP durumu ADP durumuna göre daha karardır. Aktin monomerleri *in vitro* olarak ATP durumunda sakallı uca eklenir, filamentte hidroliz olur ve ADP durumunda sivri uçtan hızlıca ayrılır. Bu istikrarlı durum mekanizmasını polimerizasyon ve depolimerizasyon olayı filament treadmilling olarak adlandırılır (Wegner ve Isenberg 1983). Bununla birlikte treadmilling, hücrelerde gözlenen filament oluşum dinamiğini açıklamaz. Çok sayıda ABP hücre iskeleti

dinamiğinde rol oynamaktadır. Bu proteinler; monomer dizilimi, sakallı ve sivri uçların kapatılması, filament kırılması ve çapraz-bağlanması gibi çok sayıda farklı görev üstlenir. G-aktin ile ABP etkileşimleri X-ray kristalografisi ile ortaya çıkarılmıştır. Sayısız F-aktin bağlayan protein elektron mikroskobu ile sınırlı çözünürlükte incelenmiştir.

Aktin bağlayan proteinler içinde önemli bir grup filamentlerin *de novo* oluşumunu düzenler (Popp ve ark. 2003). Çekirdeklenmeyi sağlayan Arp2/3 kompleksinin ailesinde çekirdeklenme arttıran faktörler, bulunmaktadır. Bu moleküller polimerizasyonun zamanını ve yerini kontrol ederek aktin ağlarının yapılarını denetler. Çekirdeklendirme molekülleri (formin dışında) WASP-homology 2 (WH2) domaini üzerinden aktin ile ilişkilendirilir. Forminler ise formin homology 2 (FH2) domaini ile ilişkilendirmeleri ve çekirdeklenme ötesinde sakallı uç uzamasında yer almaları sebebiyle özel bir konumdadır (Goode ve Eck 2007).

G-aktin bağlayan proteinler geniş yelpazede işleve sahiptir, farklı yapısal ailelerde bulunur ve değişik nükleotitleri tercih eder. Bu çeşitliliğe rağmen, proteinlerin çoğu aktin yarığına bağlanır ve tipik olarak bu yarık içine amfifilik helezon olarak yerleşir (Dominiguez 2004). Sarmalların genel konumu iyi korunmuşken, polipeptit zincirlerinin yönsellikleri korunmamıştır. Toksofilin, FH2 ve WH2 domainlerinde sarmallarının yönselliği arkadan öne doğrudur, gelsolin, ADF/kofilin ve RPEL domainleri ters yönde bağlanmaktadır.

2.4.1.1. B-Timosin/WH2 Domain

WH2 domaini; aktin monomer dizilenmesinde, sitoiskelet oluşumunda, aktin çekirdeklenmesinde rol alan proteinler barındırmaktadır (Dominiguez 2010). WH2 domaini 17-27 aminoasit uzunluğunda kısa bir birimdir. N-ucu aktinin hedef bağlayan yarığına bağlanacak bir sarmal yapı oluşturmaktadır. Bu sarmal sonrası WH2 domainin korunan dört-yapılı uzatılmış bölgesi bulunmaktadır, bu bölgede gelsolin bağlanmakta, G1 ve G2 arasındaki bağlantı kurulmaktadır. β -timosin ailesinin en iyi bilinen üyesi T β 4, 43 aminoasitlik kısa bir polipeptittir ve WH2 domaini ile yapısal ilişkisinden bulunmaktadır (Paunlona ve ark. 2002). T β 4, G-aktin uçlarına monomer ilavesini engellemekte, etkili bir aktin-monomer-dizileme proteini olarak kullanılmaktadır. T β 4-aktin kompleksleri, çekirdeklenme veya uzamasına katılamazlar. T β 4'ün profilinle

rekabetçi olarak aktin tamponu olarak işlev gördüğü düşünülmektedir (Pollard ve ark. 2003).

2.4.1.2. WH2 Domaini ve İplikçik Uzaması

WH2-temelli çekirdeklendirici proteinler uzamayı arttırmamaktadır. Ancak, WH2-içeren Ena/VASP ise çekirdeklenmede önemli bir rol almayıp uzamayı arttırmaktadır (Drees ve Gertler 2008). Ena/VASP proteinleri merkezinde ön-zengin bölge ve WH2 alakalı G-aktin ve F-aktin bağlayan (GAB ve FAB) alanlara sahiptir. Profilin tarafından üretilen formin aracılı uzatmanın uyarılmasıyla benzer şekilde (Holmes 2003), profilin-aktininin Ena / VASP'ye bağlı uzamayı uyarabileceğini ortaya koynmuştur (Dominiguez 2010). Profilin-aktin, ön-zengin ve GAB bölgeleri barındıran VASP ile oluşan üçlü kompleks göstermektedir ki ön-zengin bölgeye katılan profilin-aktin kompleksleri uzayan filamentlerin sakallı ucuna doğrudan yerleşebilir. Bu özelliği sayesinde hem aktin hem profilini aynı anda bağlayabilmektedir.

2.4.1.3. FH2 Domain

Forminler; hücre hareketleri, morfogenez ve sitokinez gibi hücreysel süreçlerde aktin ağlarının toplanmasına aracılık eder (Galkin ve ark. 2002). Polipeptit zincirinin ortasındaki FH1 domaini profilin bağlayıcı ön-zengin bölge içerir. Profilin-aktin yapısının FH1 domaini vasıtasıyla oluşumu, formin aracılı filament uzamasını hızlandırır (Kovar ve ark. 2006). FH2 domaini, iki filamentli montaj işlevi, çekirdeklenme ve uzamadan sorumludur (Xu ve ark. 2004).

2.4.1.4. DNAz I

Aktin ve DNAz I yüksek ilişkili yapı oluşturlar (Mannherz ve ark. 1980). Aktinin kristal yapısının ilk kez belirlenmesinde kullanılan yapı aktin-DNAz I kompleksi olmuştur. DNAz I programlanmış hücre ölümü (apoptoz) ile bağlantılıdır ancak yapının tüm fizyolojik işlevi tam olarak çözülmemiştir.

2.4.1.5. Gelsolin

Gelsolin; aktini kesen ve kapatan, içerisinde adseverin, villin, capG, advillin ve supervillin buduran protein ailesindendir. Altı homolog domainden oluşmakta, düzenlemesi Ca^{+2} , fosfoinositidler ve tirozin fosforilasyonu ile sağlanır. Ca^{+2} olmayan

inaktif gelsolin kompakt biçimde molekül içi etkileşimlere stabilize halde, aktin-bağlayan bölgeleri kapalı şekilde bulunur. G1 ve G4 domainleri, iki önemli aktin bağlama bölgesini içerir. Gelsolin ile aktin filamentinin yan tarafına bağlandığı durum aktin bağlayan bölgelerini ortaya çıkarır, G1 ve G4 domainlerinin aktin promoterleri ile iki yerden bağlanıp kordineli bir kısaç hareketiyle filamenti keser. Gelsolin birincil olarak sitoplazmiktir ancak biraz daha uzun olan izoformu plazmada bulunur ve homeostatik mekanizmadaki aktin-toplayan sistemde yer alır (Lee ve Galbraith 1992). Gelsolin aktin filamentlerini kesip monomerik aktin ile ABP arasında yüksek ilişkili bir formasyon oluşur. Bu yapı dolaşımdan karaciğer yardımı ile hızlıca temizlenir.

2.4.1.6. Profilin

Profilin ve T β 4 hücrel aktinin büyük kısmının (yaklaşık % 50) sakallı uç polimerizasyonun kritik konsantrasyonunun ($\sim 0.1 \mu\text{M}$) 200 ile 1000 katı arasındaki durumda ($\sim 20-100 \mu\text{M}$) polimerize olmamış halde muhafazasını sağlar. ATP-aktin düşük miktarlarda mevcuttur ($0.1-1 \mu\text{M}$) ve T β 4-aktin polimerizasyonu yetersizdir. Profilin-aktin ($5-40 \mu\text{M}$ 'lik hücre içi konsantrasyonda mevcuttur, polimerizasyon için aktin monomerlerinin ana kaynağını oluşturur (Pollard ve Borisy 2003). Birden fazla özellik, profilin'in filament montajında merkezi bir rol oynamasını sağlar (dosRemedios ve ark. 2003): (1) Profilin, aktin üzerindeki ADP'nin ATP ile değiştirilmesini katalize eder ve polimerizasyona hazır ATP-aktin monomer havuzunu yeniler. (2) filament çekirdeklenmesini engeller (3) profilin bağlı monomerlerin sivri uçları yönünde uzayamaz, ancak filament sakallı uçları serbest monomerleri ile uzatabilir, (4) aktin ile güçlü ilgisi nedeniyle profilin, aktin'e bağlanmak için T β 4 ile etkili bir şekilde rekabet eder ve (5) profilin aynı zamanda hem öncül-zengin sekanslara hem de aktinle bağlanıp ikisiyle üçlü kompleks oluşturulmasındaki ilginç yapılarla bireysel bağlanmasından yüksektir (Ferron ve ark. 2007). Öncül-zengin sekansları hücre iskelet proteinlerinde bol miktarda bulunur ve profilin-aktin yapısını hücrel havuzdan filamentte düzenlenmiş bir şekilde kanalize eder. Dolayısıyla profilin-aktin yapılarının formilinin öncül-zengin FH1 domaininden alınması uzama oranını artırır (Kovar ve ark. 2006). Çoğu ABP gibi profilin de aktinin hedef bağlayan yarığına bağlanır.

2.4.1.7. ADF/Kofilin

Bu ailenin üyeleri tüm ökaryotlarda mevcuttur, filament depolimerizasyonu yoluyla aktin monomerlerinin geri dönüşümünde rol alırlar, bu işlem sırasında, membran büzülmesi ve sitokinez gibi, sitoiskeletin hızlı devinimleri de gerçekleşir (Bernstein ve Bamburg 2010). Bu ailede aktin-depolimerizasyon faktörü (ADF), kofilin-1 (kas olmayan hücreler), kofilin-2 (kas hücreleri) ve iki ADF domaini içeren twinfilin bulunmaktadır. Bu ailenin önemine rağmen, aktin ile oluşturdukları yapıların ilk olarak twifilinin C-ucundaki ADF domaini üzerinden belirlenmesi yakın zamanda gerçekleşmiştir (Dominiguez 2010). Nükleotit değişim faktörü olarak ATP-aktini net bir şekilde tercih eden profilinin aksine, ADF/kofilin ADP-aktine daha yüksek ilginlikle bağlanır (Carlier ve ark. 1997). Buna rağmen twifilin-aktin yapısı ATP durumunda belirlenmiştir ve twifilinin diğer üyelere göre farklı işleve sahiptir; aktin monomerlerini kilitleyerek filamentin sakallı ucunu kapatır.

2.4.1.8. RPEL Domain

Aktinin; sitoplazmik işlevi çoğunlukla ortaya çıkarılmışken çekirdekteki rolü hakkında daha az bilgi mevcuttur. Bu rollerden bir tanesi myocardin transkripsiyonel ko-aktivatörü (MAL) düzenlenmesidir (Lorrenz ve ark. 1997). MAL sitoplazma ile nükleus arasında gidip gelerek serum cevap transkripsiyon faktörü (SRF) aktivitesini düzenler. MAL N-ucu peşpeşe 3 G-aktin bağlayan RPEL domaini içerir (bu motif RpxxxEL olarak adlandırılmaktadır). Aktin, RPEL domainlerine bağlanması sonucunda MAL aktivitesi çekirdekteki birikmesinin engelleyerek inhibe edilir, sonuç olarak Mal-SPF kompleksinin oluşması sonucu transkripsiyon aktivitesi baskılanır. Sistem RhoA'nın G-aktin/F-aktin oranındaki değişiklikleri yoluyla düzenlenir; Artan miktarda sitoplazmik G-aktin, inaktif aktin-MAL kompleksinin oluşumuna neden olurken, polimerizasyon sonucu oluşan G-aktin seviyeleri, nükleer birikim için MAL'ı serbest bırakır (Miralles ve Visa 2006). RPEL motifi aktin-bağlayan yarığa bağlanır ve içeriye bir sarmal yerleştirir, ama bu sarmalın oryantasyonu WH2 domaininin tersi durumundadır.

2.4.2. Aktine Bağlanan Doğal Moleküller ve Draglar

Aktin iskeletiyle etkileştiği bilinen ve doğal yollarla oluşan küçük moleküller izole edilerek hücre döngüsü ve sitoskeletonin çalışma prensiplerinin incelenmesi yapılmaktadır (Maloney 2008).

2.4.2.1. Makrolidler

Marin organizmalardan izole edilen bir grup makrolidin aktin ile etkileşip polimerizasyonu bozmaktadır. Güçlü anti-tümör aktiviteleri sebebiyle moleküler sonda olarak aktinin hücresel işlevlerini aydınlatmada ve antikanser ilaçlarında kullanılabilirler. Latrunculin A ve B, süngerler ve deniz tavşanları tarafından üretilen deniz makrolidleridir (Yarmola ve ark. 2000). Nükleotid bağlayan yarık bölgesinde bağlanıp ancak aktin polimerizasyonunu inhibe ederler. Her iki toksin de aktin yapısının belirlenmesinde kullanılmıştır deniz makrolidleri ile aktin yapılarının çok sayıda türevi belirlenmiştir ve stereokimyasal çeşitliliklerine rağmen, bu moleküllerin çoğunun aktin hedef bağlayıcı yarığına bağlandığı görülmüştür.

2.4.2.2. Patojenler

Salmonella, *Shigella* ve *Listeria* benzeri insan patojenlerinin bazıları konak hücrenin sitoskeletonini enfeksiyon sırasında bozar veya ele geçirir (pasif işgal mekanizması). *Toksoplazmagondii* gibi bazılarında ise kendilerine özgü aktin iskeleti bulunur (aktif işgal mekanizması) (Gouin ve ark. 2005). *T. gondii*'de en fazla ifade edilen protein işgal sırasında konağa salgılanan ve G-aktin bağlayan toksofilindir. Toksofilin, anti-paralel bir aktin dimeri ile yüksek ilginlikli yapı oluşturur ve bağlı aktinin hedef bağlayan yarığına bir sarmal ekler. Diğer patojenik bakteriler aktini ADP-ribozilleyerek hücre iskelet organizasyonun bozulması sonucu hücre ölümüne yol açan toksinler salgırlar (Wegner ve Isenberg 1983). *Clostridium botulinum* C2 toksini ve *Clostridium perfringens* Arg177 modifikasyonu yapan iota-toksini bu duruma bir örnektir.

2.4.2.3. Cucurbitacin

Cucurbitacin kabakgiller ailesinden izole edilmiş triterpenoid formu bir proteindir. Daha sonra farklı bitkilerde de bulunan bu organik molekülün farklı çeşitleri ortaya çıkarılmıştır. Cucurbitacin molekülü bir çalışmada *Gonysylus Keithii* (*Thymelaecacae*) türünden izole edilmiş (Fuller 1994) başka bir çalışmada ise

cucurbitacin B, D ve F türleri *Cayaponia* ailesinde izole edilmiştir (Jacobs 1990). Aktin ile doğrudan veya dolaylı olarak etkileştiği bilinmektedir, aktin ile ilişkisinin çözülmesi, hücresel mekanizmaların araştırılmasında ön açıcı olabileceği için, önem taşımaktadır (Maloney 2008). Doğal ilaç olarak görev yapması üzerine çalışmalar yürütülen sentetik veya sentezlenmiş cucurbitacinin farklı türlerinin kanser tedavisinde kullanılma potansiyelini ortaya koymuştur, bazı cucurbitacin türlerinin lösemi kanser hücrelerinde F-aktin (Zhang ve ark 2011) ve melanom hücrelerinde G-aktin (Haritunians ve ark. 2008) ile etkileştiği gösterilmiştir.

Cucurbitacin ailesinin üyelerinin STAT3 yolağı üzerindeki etkileri çokça çalışılmıştır. Sezary sendromu deride, lenf bezlerinde ve periferel kanda lokalize tümör hücreleriyle agresif kutanöz CD4+ T hücreleri kaynaklı bir lenfomadır. Yapılan çalışmada 30 mM Cucurbitacin I ile tümör hücrelerinin çoğunun (% 73-91) öldürüldüğü gösterilmiştir ve bunun sebebinin STAT3 yolaklarının baskılanması olduğu belirtilmiştir (Van Kester ve ark. 2008). STAT 3 yolaklarını baskıladığını bilerek STAT3 sinyalizasyonu yoğunluğuyla bilinen baş ve boyun skuamöz karsinoma hücrelerinde apoptoz oluşturulmuştur (Chen ve ark. 2010). STAT yolaklarının bastırılması tümör hücrelerinde doğrudan ölüme değil ancak tümörjenik kapasitenin azalttığına ayrıca kanserli dokuların oluşturduğu küresel formasyonu kırarak radyo- ve kemo-dayanıklılığın düşürüp tedavilerin etkisini cucurbitacin I varlığında artabileceği belirtilmektedir (Hsu ve ark. 2011).

2.4.2.4. Cucurbitacin I

Cucurbitacin I ve E, diğer türlerinden farklı olarak asetillenebilmektedir. Aktin iskeleti organizasyonunda hücre lizatlarıyla yapılan çalışmada G-aktin/F-aktin oranı cucurbitacin I ile 2 saat müdehale sonrası 0,2'den 2,5'e çıkarmıştır (Knetch ve ark. 2010). Aynı çalışmada saflaştırılmış aktin üzerinde cucurbitacin I ile ayırt edilebilir bir gözlem yapılamamıştır. F-aktin stabilitesini arttıran jasplakinolid aynı deneyde beklenen sonuçlar vermiştir. Bu durum göstermektedir ki cucurbitacin I molekülü aktin organizasyonu üzerindeki etkisini dolaylı yollardan yapmaktadır (Knetch ve ark. 2010). Çalışmada 200 nM cucurbitacin I ile B16-F1 hücreleri 4 saat muamele edilmiş ve falloidin-FITC ile floresan boyama yapılmış, aktin iskeletinde parçalanmalar ve kümelenmeler gözlemlenmiştir (Knetch ve ark. 2010).

2.4.2.5. Deksametazon

Deksametazon, bağışıklık sistemi üzerindeki etkisi sebebiyle inflamatuvar hastalıkların tedavisinde kullanılan glukokortikosteroid ailesine dahildir (Xing 2006). Deksametazon, yüzeyel monolayer hücrelerin multipotent kök hücrelerine farklılaşmasında askorbik asit ve β -glycerophosphatla beraber standart protokolde kokteyl olarak uygulanarak doku mühendisliğinde kullanılır (Langenbach 2013). Deksametazon aktin ilişkisi araştırmacılarla incelenmiştir. İnsan trabeküler hücre (TM) hattında hücre dışı matris (ECM) proteinleri üzerinde deksametazon etkisi test edilmiştir (Steeley ve ark. 1992). Deksametazon uygulanan TM hücrelerinde migrasyon ve çoğalma hızı azalmış, kolajen ekspresyonu baskılanmış ve dolayısıyla trabeküler ağ oluşumunu sınırlandırmıştır. Bu mikrofilament değişikliği deksametazon ile integrin gibi membran reseptörlerinin ve α -aktinin, vinculin, talin gibi bağlantı proteinleri arasındaki bağlanma ilişkisi bilindiğinden beklenen bir sonuçtur, deneyin sonucunda ECM ile hücre iskeleti arasında bağlantı kurulması önemlidir. Aynı deneyde deksametazon kullanarak glikoprotein salgılanması değiştirilip glaucoma başlatılabileceği gösterilmiş, steroidler ile başlatılan glukomanın klinik glukomayla paralellik taşıması göz önüne alınarak model yaratılabileceği belirtilmiştir.

Çapraz bağlı aktin iskeleti (CLAN) ile $\alpha\beta3$ sinyalizasyonu içeren $\beta3$ integrin aktifleşmesiyle oluşan yapılarla bağlantısı incelenmiştir (Filla ve ark. 2011). Deksametazon bağlantılı yapıların oluşumu sırasında $\alpha\beta3$ integrinlerinin hem aktifleştiği hem de üretiminin çoğaldığı gözlemlenmiş glukokordiosit sayesinde oluşan CLAN yapılarının $\beta3$ integrin sinyalizasyonu ile içeriden-dışa sinyalizasyon mekanizmasına bağlı olabileceği belirtilmiştir.

İlaç olarak kullanılan deksametazon IL-6 ve IL-8 ile etkileşerek sitokin üretimini baskıladığı ancak çocuklukta rastlanan nefrotik steroid duyarlı böbrek inflamasyonu hücreleri üzerinde normal şartlarda gösterdiği apoptoz etkisini göstermediği belirtilmiştir (Xing 2006).

Düz kaslarda bulunan aktin izoformu α -SM ile deksametazonun etkileşmesini gözlemlemek için tendon iyileştirmesi deneyi yapılmıştır (Tsai ve ark. 2003). Sonuçlar mRNA ekspresyonunun baskılanmasını ve dolayısıyla α -SM seviyelerinin düşüp migrasyonda azalmaya yol açtığını göstermektedir. Başka bir deneyde deksametazon RNA düzeyinde etki göstererek hücre iskeletinde tubulin- α üretimini arttırmıştır (Xing 2006).

Deksametazon bazı deneylerde aktinden ziyade mRNA üzerinde etki gösterip, bazı deneylerde ise aktinde dolaylı yollarla başkalaşıma yol açması doğrudan aktinle etkileşimde olmayabileceğini göstermektedir. Apoptoz üzerindeki farklı etkileri deksametazonun hala aydınlatılması gereken mekanizmaları olduğunu göstermektedir.

2.4.2.6. Sitokalasin

Sitokalasinler küf mantarlarından elde edilen metabolit ailesidir. Omurgalı hücrelerde; sitokinez, fagositoz, hücre yüzeyinde uzantı oluşumu ve epitel hücrelerin yapışması benzeri pek çok hücreysel hareket ve faaliyeti engeller (Rawd, 1989). Bu olayı sadece aktin polimerleşmesinin gerçekleşeceği durumlarda F-aktinin sakallı ucuna bağlanarak polimerleşmenin durdurulması sayesinde gerçekleştirir ve kalımlı F-aktin yapısında bir değişikliğe yol açmaz (Aktories ve ark. 1986, Goddette ve Frieden 1986). Sitokalazin D, aktinin hedef bağlayıcı yarığına bağlanır.

Küçük ve doğal moleküllerden sitokalasin 1970'lerde yapılan çalışmalarda aktininsitokinez aşamasındaki rolünün açıklanmasında yardımcı olmuştur, çalışmaların sonucunda çekirdek bölünmesi durdurularak sitoplazma bölünmesi ve çekirdek bölünmesinin ayrı işlemler olduğu gösterilmiştir (Maloney 2008).

2.4.2.7. Falloidin

Fallotoksinler zehirli mantarlardan izole edilmiş çift devirsel hepta peptitlerdir (Cooper 1987). Bu ailenin temel temsilcisi sayılan falloidin, *Amantiaphalloides* mantarından elde edilen bir toksindir ve aktine özgü bir molekül olarak kullanılır (Wehland ve ark. 1977). Sitokalasinler gibi falloidin de aktine bağlanıp polimerizasyonu etkileyen doğal ve organik bir moleküldür. Falloidin etkili bir F-aktin stabilizatörüdür ve aktin bağlayan protein modeli olarak, aktin polimerizasyonu dahil, çok sayıda biyolojik işlevin ortaya çıkarılmasında kullanılmıştır (Cooper 1987). Aynı zamanda çeşitli boyalarla bağlanarak hücre içerisinde aktin görüntülenmesinde kullanılmaktadır (De La Cruz ve ark. 1994). Filament-falloidin bağlanma kinetiği analizini yapılarak rodamin bağlı falloidin ve işaretsiz falloidin üzerinde benzer sonuçlara ulaşılmıştır (De La Cruz ve ark. 1994). Falloidin-filament bağlanma ilgisi monomere kıyasla çok yüksektir. Bağlanma sonucu polimerizasyon kritik konsantrasyonu 10 ile 30 kat arasında artıp F-aktin oranını arttırır. Filamente bağlanma

oranı falloidin başına iki monomerdir (Cooper 1987). Falloidin hücre membranından serbestçe geçemez ve içeriye fagositoz yoluyla alınır (Cooper 1987).

Fare hepatositi üzerindeki çalışmalar falloidin aktin mikrofilament dengesini arttırdığı, sitoksalasin D'nin ise bu dengeyi zayıflattığını göstermiştir. Elektron mikroskobu ve floresan mikroskobu sonuçları; iki molekülünde mikrofilament organizasyona etki edip, özellikle dışa uzanan kollarla, hücre şeklini değiştirmiş ancak organel diziliminde değişikliğe yol açmamıştır (Prentki ve ark. 1979). Elektron mikroskobuyla; sitoksalasin, falloidin ve pH etkisinin filamentlerin uçlarıyla etkileşimi araştırılmıştır. Sitoksalasin sivri uçta ATP ve ADP filamentleriyle daha sıkı etkileşime geçmiş, uçlara monomer eklemesini baskılamıştır. Ancak en yüksek konsantrasyonda bile sivri uçtaki uzama yavaş olsa da gerçekleşmiştir. Falloidin iki uçta da çözülme baskılamış ve bunun sebebi yapısal değişikliklere bağlanmıştır (Sampath ve ark. 1991). Kültür hücrelerine falloidin enjekte edip hücre içi aktin dağılımını floresan boyama yöntemiyle incelenmiştir (Wehland ve ark. 1997). Denge polymerize aktin tarafına kayıp ve filament stabilitesinin arttırmıştır. Çok düşük konsantrasyonlarda mevcut filament değişikliğine yol açmayıp sitoplazmik G-aktini küçük adacıklar şeklinde polimerleştirmiştir. Hücre hareketi ve aktin bağlantısı başka araştırmacılar tarafından da gösterilmiştir (Cooper 1987). Hücre ortamına falloidin verilmesi durumunda membrana yakın tarafta aktin yoğunluğunu artmış, hücre içerisine doğrudan verildiğinde ise tüm hücrede aktin dağılımını etkileyip hareketliliği kısıtlamıştır.

2.4.2.8. Jasplakinolid

Jaspin sp. deniz süngerinden izole edilen jasplakinolid F-aktin dengeleyici role sahip (Mizuno ve ark. 2002) doğal siklik bir peptittir (Holzinger ve Meindl 1997). Aktin dengeleyici özelliğine rağmen falloidinden hücre membranından geçebilmesi özelliğiyle ayrılmaktadır (Mizuno ve ark. 2002). Jasplakinolid; sitotoksik özelliği, antelmintik, antifungal, böcek öldürücü ve seçici antimikrobal aktivitesiyle geniş biyolojik işlev yelpazesinde görev alır (Holzinger ve Meindl 1997). Ayrıca antitümör aktivitesi de bulunduran kemoterapik bir ajan olarak öne çıkmaktadır (Mizuno ve ark. 2002). Jasplakinolid önceki çalışmalarında; meme kanseri tedavisinde kullanılabileceği, prostat kanser hücre hatlarında antiproliferasyon özellik gösterdiği, karsinoma hücre hatlarında sitoskelet değişikliği oluşturduğu gösterilmiştir (Holzinger ve Meindl 1997). Jasplakinolidin çalışma mekanizmasının seçici olarak aktin hedeflediği; mikrotübül,

DNA, RNA veya protein sentezi üzerinden doğrudan veya dolaylı etki gösterdiği belirtilmiştir (Cramer 1999).

Jasplakinolid, kritik konsantrasyonu düşürerek polimerizasyonun uygun olmayan koşullarda dahi gerçekleşebilmesini ve F-aktin miktarının artmasını sağlamaktadır (Visegrády ve ark. 2004). Jasplakinolid kalsiyum-aktin yerine magnezyum-aktin ile bağlama ilginliğine sahiptir (Bubb ve ark 1994). Jasplakinolid üç monomer arasında bağlanıp çekirdekleşme sırasında ihtiyaç duyulan monomer sayısını 4'ten 3'e düşürür. Bu durum ihtiyaç duyulan monomer konsantrasyonunu azaltarak filamentleşmenin başlama hızını artırır, monomer ayırıcı moleküllerin varlığı da bu durumu güçlendirir. Ancak orantısız çekirdekleşme her zaman filament uzamasına dönüşmez ve dağınık polimerleşmeye yol açıp yetersiz monomeraktin stresi oluşturarak düzensiz iplikçik adalarının oluşmasına sebep olabilir (Bubb ve ark. 2000). Floresan işaretli jasplakinolid ile muamele edilen *plasmodium falciparum* parazitinin sitoiskeletinde F-aktin çekirdekleşmesi artışı gözlemlenmiştir (Mizuno ve ark. 2002). Araştırmacılar *Gondii* *E.histolyrica*/*E.invadens* üzerinde yapılan deney sonucuyla tutarlı olarak jasplakinolidin aktin polimerizasyonunu kolaylaştırdığını göstermiştir. Jasplakinolidin prostursyon üzerindeki etkisi aktin odaklı incelemiştir. F-aktin dengesini arttırıp depolimerleşmeyi azaltıp treadmilling işlemini durdurması sebebiyle jasplakinolidi hücre iskeleti inhibitörü küçük moleküller listesine dahil etmiştir (Cramer 1999). Jasplakinolid ile hücre büyümesi ve aktinin sitoplazmadaki formasyonunun *Micrasterias* yeşil algini model olarak incelemiştir (Holzinger ve Meindl 1997). Önceki çalışmalarla uyumlu olarak, polimerizasyon artışı ve filament çözülümünün durmasından kaynaklı olduğu belirtilmiştir (Bubb ve ark. 1994). Falloidin hücre içerisindeki geri döndürülemez aktin kümelenmesine sebep olmuş, organel dağılımının bozup hücresel temel ihtiyaçları zarara uğratmış, hücre büyümesini durdurmuş ve yapı oluşumunu bozmuştur.

2.4.2.9. Falloidin-Jasplakinolid Karşılaştırması

Jasplakinolid-aktin ilişki falloidinden daha az bilinmektedir. Çalışmalar bu iki küçük molekülün rekabetçi şekilde F-aktine bağlandığını göstermiştir (Visegrády ve ark. 2004). Yüksek konsantrasyonda (200 nM) jasplakinolid uygulandığında, rodamin-falloidin bağlanmasının azaldığını gösterilmiştir (Bubb ve ark. 2000). Yapılan DSC çalışmasında, filamentlerdaha düşük jasplakinolid konsantrasyonunda (15 nM

jasplakinolid, 26 nM falloidin) daha yüksek T_m değişimi (20,4 °C jasplakinolid, 12 °C falloidin) göstermiş, falloidinin filament üzerinde daha az dengeleyici özellik gösterdiği (Visegrády ve ark. 2004) eski literatüre uygun olarak gösterlmiştir (Bubb ve ark 1994). Jasplakinolid, falloidinin aksine hücre membranından geçebildiğinden (Visegrády ve ark. 2004) ilaç olarak falloidinden yüksek potansiyel göstermektedir (Bubb ve ark 1994).

2.4.2.10. Strausporine

Strausporine protein kinaz inhibitörü olarak kullanılan (Moblely ve ark. 1994) mikrobiyal bir alkaloidtir (Verme ve ark. 1989). Nöralepitel hücrelerde hızlı, düzenli ve sürdürülebilir epitelden mezakimale geçiş (EMT) indüklediği bilinmektedir (Hugo ve ark 2009). İnsan kanser türlerinin çoğu sinyal iletim mekanizmalarındaki özgün parçalar ile karakterize edilir (Courage ve ark. 1996). Kadınlarda kanser ölümlerinin % 18'ini oluşturan meme kanseri ölümcüllüğünü metastaza ulaştığında sağlar, metastazın önemli bir ayağı ise EMT'dir (Hugo ve ark. 2009). Klinik çalışmalar protein kinaz baskılanmasının tümör oluşumundaki önemini ortaya koymuştur (Corage ve ark. 1996). Protein kinazın önemli baskılayıcılarında strausporine hem bu özelliğiyle hem de EMT indükleyici etkisiyle potansiyel bir kanser ilacıdır. (Courage ve ark. 1996).

A549 hücreleri strausporine ve 5 analoguyla muamele edilmiş; strausporinenin hücre büyümesi üzerinde analoglarından çok daha baskılayıcı olmuş, sitotoksisite testlerinde IC_{50} değeri 0,65 nM çıkmıştır (Courage ve ark. 1996). Kobay fareleri üzerinde protein kinaz C etkisinin 1 μ M strausporine ile baskılanmıştır (Verme ve ark. 1989). Strausporine kullanılarak protein kinaz C aktivitesinin sayısal değerlerinin ortaya çıkarılması, geçici aldığı rollerin tespiti ve pankreatik hücrelerde kalsiyum yolakları incelenmesi mümkündür. Strausporine kullanarak hücre morfolojisindeki değişiklikleri aktin iskeletindeki kaymalar ve protein fosforilasyonu çerçevesinde fare astrosit hücrelerinde incelemiştir (Moblely ve ark. 1994). 100 nM strausporine 20 dakikada aktin mikro filamentlerinin demet kalınlığını ve uzamasını azaltmış ve 60 dakikada bütün mikrofilament demetlerinin kırılarak hücre boyunca kasılmalara yol açmıştır. EMT indüklemesi çalışması yapan Hugo ve arkadaşları (2009) strausporinenin F-aktin demetlerini hızlı depolimerleştirerek hücre-hücre tutunmalarında dengesizlik oluşturduğunu göstermiştir. Strausporine aktin ile dolaylı yollarla; integrin sinyalizasyonu ve Kofilin fosforilasyonu bağlı kaderin delokalizasyonuna,

polimerizasyon dengesinin bozulmasına, mezakimal göç ekspresyonuna ve F-aktin/G-aktin oranının G monomere kaymasına sebep olmuştur. Strausporine; E-kaderin transkripsiyonunu baskılayan snail ailesinin hedef alınmakta, bu aileden Snail1 proteini ile meme kanseri PMC42 hücre hattında *in vivo* EMT oluşturmaktadır (Hugo ve ark 2009).

2.4.3. Protein-Ligand Araştırmalarındaki Başlıca Yöntemler

2.4.3.1. Atomik Güç Mikroskobu

Moleküler teşhis süreci, biyolojiye bilimine özel olarak, bağlanan partnerlerin arasında oluşan kovalent bağlanmalar incelenip bulunur. Bu şekilde protein-protein, protein-küçük moleküller, protein-DNA yapıları ortaya çıkarılabilir. Biyofiziksel bir yöntem olan atomik güç mikroskobu bu bağlanmaların ortaya çıkarılmasında kullanılır. Fizyolojik ortamda inceleme yapabilmesi moleküller arasında ilişkilerin biyolojik incelenmesini olanaklı kılmaktadır. Bu yöntem ile protein-ligand etkileşimlerinin termodinamiği açığa çıkarılabilmektedir (Chilkoti ve ark. 1995).

2.4.3.2. Manyetik Rezonans

Protein-ligand etkileşimlerinin incelenebildiği bir başka biyofiziksel yöntem ise nükleer manyetik rezonanstır. Normal şartlarda küçük moleküllerin karışımlardaki yapısının incelenmesinde kullanılan NMR yöntemi protein veri bankalarının taranması ve protein-ligand etkileşimlerinin araştırılması için kullanılır. Oluşan üç boyutlu yapının incelenebilmesini olanaklı kılması bu yöntemin önemli bir avantajıdır. NMR, oluşan yapıyı serbest ve bağlı durumların yarattığı kimyasal kaymalardan ve dipol-dipol etkileşimlerinden yararlanarak görselleştirir. Küçük moleküllerin protein üzerindeki etkisi ilaç keşfi amacıyla farmasötik alanda popülerleşen bir konudur ve bu yöntemle sayısı 10'a kadar çıkabilen küçük molekül tek bir protein üzerinde incelenebilmektedir (Clarkson ve Campbell 2003).

2.4.3.3. Floresan Spektrofotometrik Yöntemler

Doğal formlarında proteinler tedavide veya endüstride kullanım için çoğunlukla fazla dengesiz bulunur. Çoğu protein ortam koşulları düzenlenmeden kristalizasyon gibi biyofiziksel yöntemlerde kullanılamaz. Yukarıda bahsedilen protein tarama yöntemleri detaylı araştırmalara izin vermesinin yanında geniş çaplı taramalara izin vermeyecek

derecelerde verimsizdir. Bu sebeple proteinlerin hızlı ve ucuz şekilde taranması için yöntemler geliştirilmiştir. Lavinder ve arkadaşları (2009) makalesinde termal tarama (HTTS) olarak adlandırdıkları yöntem, SYPRO orange boyasıyla ve RT-PCR cihazıyla TSA deneyleri ile paralel protokol kullanmaktadır. HTTS; TSA ve DSC isimleriyle anılabilen termoflor yöntemleri çoğunlukla ilaç tespiti veya protein dengesini arttıracak tampon geliştirilmesi amaçlarıyla kullanılırlar (Lavinder ve ark. 2009).

2.4.3.4. Termal Kayma Deneyi

TSA (termal kayma deneyi-thermal shift assay) ve CETSA (hücresel termal kayma deneyi-cellular thermal shift assay) zaman, sıcaklık ve derişim değerlerine bağlı protein bağlanma noktaları, ayrışım sabitleri, mobilite ve bağlanma ilginliği tespit eder. Çeşitli proteinlerin ve dragların kendilerine özgü erime eğrileri ölçüp oluşan belirgin değişimler üzerinden dragların ortamdaki proteinlerle bağlanma ilişkilerinin tespit edilebilir. Termal kayma metodu ve hücresel ortamda ölçüm yapan hücresel termal kayma methodu saflaştırılmış proteinin bağlanma analizini yapan metodlardır (Molina ve ark. 2013).

Termal kayma deneyi geniş kütüphanelerin hızlı taramasının yapılması kullanılır, ancak protein saflaştırılmasındaki zorluklar ve seçici antikorların sayısının azlığı bazı problemlere yol açabilmektedir. Dart ve arkadaşları yaptığı çalışmada küçük lusiferazlar (Nanoluc) kullanılarak termal kayma deneyinin geçirgen zarlı hücreler gibi kompleks yapı ve ortamlarda da kullanımının mümkün olduğunu göstermiştir. NanoLuc termal dengesinin memeli proteinlerden çok daha yüksek olmasından dolayı deneydeki hedef proteinin vereceği sonuç değiştirmemektedir. Hedef protein işaretlenerek normalde deneyin izin vermeyeceği ortamlarda büyük ve saflaştırılmamış proteinlerin incelenebileceği belirtilmi, bu metoda NaLTSA ismi verilmiştir (Dart, 2018). Kemoreseptörler kimyasal sinyallere bağlanarak flagellar motorun çalışmasını yani bakteri kemotaksisini başlatacak canlının daha uygun koşullara yönelmesinde rol alırlar. Bu yapıların üç fonksiyonel bölgesi mevcuttur. Ligand bağlanan, bağlayıcı ve sinyal domainleri. LBD bölgelerinin çözülmesi proteinlerin nasıl çalıştığını anlamak için gereklidir. Bu bölgeler FRET bazlı deneyler ile bulunabilmiştir, makalede termal kayma deneyi kullanılarak da bulunabileceği savunulmaktadır (Manson, 2018). Termal kayma protokolünün prokaryot canlılarda da protein-ligand etkileşimlerinin belirlenmesinde kullanılabileceğini göstermiştir (Manson, 2018).

2.4.3.5. Yüzey Plazmon Rezonans

Yüzey plazmon rezonans (SPR) biyolojik sistemlerin gerçek zamanlı incelenmesi için biyokimya, biyoloji ve medikal sektörlerinde kullanılan optik temelli biyosensor teknolojisidir. Yüzey plazmon yüzeysel elektromanyetik bir dalga olarak yayılması metal-dielektrik yüzeyle etkileşimine bağlıdır. Metal yüzey genliği azalan bir dalga ile uyarılması durumuna yüzey plazmon rezonansı denir. SPR Teknolojisi biyosensör temelli çalışmalarda sıkça kullanılmaktadır. Bağlanma durumunda metal yüzeyin etkileşim açısında değişikliklere yol açarak alınan değerleri değiştirir, bu veriler üzerinden bağlanma kinetikleri tespit edilebilir (Tang ve ark. 2010)

2.4.3.6. İzotermal Titrasyon Kalorimetresi

İzotermal titrasyon kalorimetresi (ITC) iki kimyasalın karıştırılması sırasında oluşan kimyasal reaksiyonun enerjisinin ölçülmesi işlemidir. Bu ölçüm üzerinden bağlanma ilginliği, entropi ve entalpi gibi değerle hesaplanabilir. Sistem kimyasallardan birini içeren sensörlü hücreye şırınga kullanılarak diğer kimyasalın titrasyon yapılması ve bu sırada açığa çıkan ölçümlerin bir referans kuyusuyla karşılaştırılarak hesaplanmasına dayanır. ITC araştırmacılara sağladığı kinetik veriler üzerinden bağlanma ve dolayısıyla yapısal çıkarımların yapılabileceği bir yöntem olarak molekül dizaynında kullanılabilen bir yöntemdir (Leavitt ve Freire 2001).

2.4.3.7. MALDI-TOF Kütle Spektrografisi

Kütle spektrofotometresi örneklerin yüklü moleküllere iyonize ederek kütle/yük oranının hesaplanmasında kullanılan analitik bir yöntemdir. Yöntemde MALDI (matris destekli lazer desorpsiyonu/iyonizasyon) iyon yöntemini belirtirken, TOF (Uçuş süresi) kütle analizini belirtir. MALDI-TOF yönteminde moleküller lazer ile iyonize edilerek analit moleküllerini fragmentasyon veya dekompozisyon olmadan gaz formuna geçişinin sağlanması üzerinden hesaplamalar yapılmasını içerir. Çok büyük moleküller normal şartlarda parçalanmaya açıkken bu yöntemle incelenebilir. MALDI-TOS yöntemiyle çok sayıda biyomolekülün aynı zamanda kinetik analizlerinin yapılmasını sağlayacak görüntüleme protokolüne sahiptir (Medzihradszky ve ark. 2000).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Kimyasal Maddeler

Aktin (Sigma)

Adenozin 5'-trifosfat (ATP) (Glenthams, Sigma)

Amonyum persülfat (APS) (Sigma)

Anti-Aktin (Sigma)

Bis-akrilamit (N, N'-metilen-bis-akrilamit) (Sigma)

Dimetilsülfoksit (DMSO) (Sigma)

Etilen diamintetraasetik asit (EDTA) (Sigma)

Moleküler ağırlık belirteci (BlueRey prestained protein belirteci-Jena Bioscience)

Nitrobluetetrazolium- Bromokloroindolfosfat (NBT-BCIP) (Invitrogen)

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

Proteaz inhibitör kokteyli (Sigma)

Protein fosfataz (PP2A) (Sigma)

Sığırsu serum albümini (BSA) (Sigma)

Sodyum dodesil sülfat (SDS) (Sigma)

Triton X-100 (Merck)

4-(2-hidroksimetil)-1-piperazineetansülfonik asit (HEPES) (Sigma)

Tris, asetik asit, metanol, etanol, etilen glikol, izopropil alkol, CaCl₂, TCA, NaCl, KCl, MgCl₂, NaN₃, HCl, Na₂HPO₄, NaHCO₃, KH₂PO₄, , Na₄O₇P₂, NaF, NaH₂PO₄, K₂HPO₄, Na₃VO₄ ve diğer kimyasal malzemeler "Sigma" ve "Merck" firmasından alındı.

Çalışmada kullanılan toz aktin (aseton powder), İ.Ü İstanbul Tıp Fakültesi Biyofizik ABD'deki stoktan temin edildi.

3.1.2. Diyaliz Malzemeleri

Selüloz diyaliz membranı (Sigma)

3.1.3. Hücre Kültürü Malzemeleri

Dubelco's Medium F-12 (DMEM F-12) (Biosera)

Fetal Sığırsu Serum (FBS) (Gibco)

Penisilin-streptomisin (Gibco)

3.1.4. Drag Molekülleri

Cucurbitacin I (Sigma)

Deksametazon (Sigma)

Falloidin (Sigma)

Japlakinolid (AdipoGen)

Strausporine (CALBIOCHEM)

3.1.5. Floroforlar

DAPI (4',6-diamino-2-fenillindo) (Invitrogen)

Falloidin-TRIC (Sigma)

SYPRO Orange (Molecular Probes)

3.1.6. Tamponlar ve Solüsyonlar

3.1.6.1. Aktin Saflaştırma

Fosfat-KCl Çözeltisi:

320 mM KOH

1000 mM KH_2PO_4

300 mM KCl

G-Aktin Tamponu:

5 mM K-Fosfat, pH:7,5

0,5 mM DTT

0,1 mM CaCl_2

1 mM NaN_3

0,5 mM ATP

F-Aktin Tamponu:

5 mM K-Fosfat. pH:7,5

0,5 mM DTT

10 mM NaCl

0,1 mM CaCl_2

1 mM NaN_3

3 mM MgCl_2

0,5 mM ATP

Depolimerlesme Tamponu:

2 mM K-Fosfat, pH:7,5

0,5 mM DTT

0,1 mM CaCl₂

1 mM NaN₃

1 µM K-EDTA

0,5 mM ATP

3.1.6.2. SDS-PAGE**Ayırma Jeli (PAGE Alt Jeli):**

3 ml 1,5 M Tris-HCl, pH:6,8

4,08 ml dH₂O

30 µl % 10 Amonyum persülfat

4,83 ml Akrilamid/bisakrilamid (AA/BA) (30/0,8 w/w)

112,5 µl % 10 SDS

15 µl 6,56 M TEMED

Yükleme Jeli (PAGE Üst Jeli):

1,25 ml 1 M Tris-HCl, pH:6,8

3,92 ml dH₂O

40 µl % 10 Amonyum persülfat

0,84 ml Akrilamid/bisakrilamid (AA/BA) (30/0,8 w/w)

50 µl % 10 SDS

20 µl 6,56 M TEMED

PAGE Yürütme Tamponu:

3 g Tris

1 g SDS

15 g Glisin

dH₂O kullanılarak 1 litreye tamamlanır.

PAGE Yükleme Tamponu:

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

0,8 ml dH₂O

1,6 ml % 99 Gliserin

0,4 ml 14 M MET

0,2 ml % 0,1 Bromfenol mavisi

2 ml % 10 SDS

TBST Tamponu:

10 mM Tris-HCl, pH: 8,0

% 0,05 Tween-20

150 mM NaCl

3.1.6.3. Western Blot

Transfer Tamponu

3.03 g Tris-baz

% 0.01 SDS

14.41 g Glisin

dH₂O kullanılarak 1 litreye tamamlanır.

Alkalen Fosfataz Substrat Tamponu:

100 mM Tris-HCl, pH: 9,5

5 mM MgCl₂

100 mM NaCl

% 0,4 NBT

% 0,4 BCIP

Liziz Tamponu:

10 mM Tris-HCl, pH: 7,5

1 mM EDTA

1 mM PMSF

% 0,5 Triton -X 100

3.1.6.4. Floresan Boyama

PBS

8,0 g/l NaCl

1,44 g/l Na₂HPO₄.2H₂O

0,2 g/l KCl

0,2 g/l KH₂HPO₄

800 ml dH₂O'da çözülüp HCl ile pH: 7,4'e ayarlanır. dH₂O kullanılarak 1 litreye tamamlanır.

3.1.7. Cihazlar

Derin dondurucu (-80 °C) (NUAIRE)

Distile su cihazı (GFL)

Diyaliz cihazı (Milipor)

Etüv (Sanyo)

Floresan mikroskop (Olympus BX51)

Jel kurutucusu (Model 543) (Biometra)

Laminar hava akım cihazı ELB 2472 (Heraus)

Masaüstü minisantrifüj (Hettich-Eppendorf)

Mini gel elektroforez tankı (BioRad)

Mikroskop görüntüleme sistemi (DP2-BSW)

Otoklav cihazı (HIRAYAMA)

Real-time PCR cihazı (BioRad)

pH metre cihazı (Hanna)

Sanrifüj (Hettich)

Sıvı azot tankı (hücre kültürü) (34 XT Taylor-Wharton)

Su banyosu (Heidolph)

Ultrasantrifüj (Sorvall, Beckman)

3.2. Yöntemler

3.2.1. Tavşan İskelet Kasından G-Aktin saflaştırması

Tavşandan elde edilmiş çizgili (iskelet) kas dokusu kıyma makinasından geçirilerek 1-2 mm'lik liflere dönüştürüldü. Tartılarak ağırlığının 3 katı kadar fosfat-KCL çözeltisi içerisine homojenizasyonu sağlandı. Çözelti içerisindeki proteinlerin ayrıştırılması için hacminin 12 katı distile su (dH_2O) ile filtrelenerek 4 seferde yıkandı. Elde edilen filtrelenmiş doku kalıntısı 5 kat hacimdeki 0,1 mM CaCl_2 ve 0,5 M NaHCO_3 çözeltisinde 30 dakika karıştırılıp filtreden geçirildi. Hacminin 10 katı kadar 0°C 'ye ayarlanmış buzlu su ile yıkanarak filtrelendi. Son olarak 30 dakika boyunca soğuk asetonda karıştırılıp süzüldü, bu işlem 4 kere tekrarlanıp aseton uçuruldu. Blender ile parçalanarak "aseton dried powder" elde edildi.

Toz aktin, F-aktin/G-aktin saflaştırılması için gram başına 20 ml G-aktin tamponunda (5 mM K-fosfat, 0,5 mM DTT, 0,1 mM CaCl_2 , 1 mM NaN_3 , 0,5 mM ATP, pH: 7,5) 4°C 'de 1 saat boyunca yavaşça karıştırılarak çözüldü. Çözelti 0,2 μm 'lik filtrelerden geçirilip içerisine 0,5 mM DTT, 3 mM CaCl_2 , 1 mM NaCl eklenmiş G-aktin tamponunda 30 dakika oda ısısında bekletilip 4°C 'de gece boyu inkübe edilerek G-aktin polimerleşmesi sağlandı.

Çözelti, F-aktin çöktürülmesi amacıyla, 14°C 'de 80.000 x g'de (20.000 rpm) 2,5 saat santrifüjlendi. Pelet üzerine polimerleşme (depolymerizasyon) tamponu (2 mM K-Fosfat (pH: 7,5), 0,5 mM DTT, 0,1 mM CaCl_2 , 1 mM NaN_3 , 0,5 mM ATP, 50 mM Tris-HCl (pH: 7,4)) eklendi ve F-aktin cam homojenizatör ile parçalandı. 45 dakika 100.000 x g'de (26.000 rpm) Bekman ultrasantrifüj cihazında santrifüjlendi. Süpernatant son derişimi 50 mM KCl, 2 mM MgCl_2 ve 1 mM ATP'ye ayarlanıp 4°C 'de polimerleşmeye bırakıldı. Devamında KCL konsantrasyonu 0.6 M'ye çıkarılıp aktin bağlayan proteinler uzaklaştırıldı. 4°C 'de 1 saat karıştırılıp 100.000 x g'de (45.000 rpm) 2 saat 4°C 'de santrifüjlendi. Pellet üzerine 3 ml G-tamponu eklenerek homojenize edildi, F-aktinden G-aktine dönüşüm sağlandı. Çözelti 1 litre G-tamponunda sırasıyla 1-3-6 saat ve gece boyu diyalizlendi. Diyalizden alınan homojenat 4°C 'de 100.000 x g'de (45.000 rpm) santrifüjlendi. Alternatif olarak jel filtrasyon kromatografisi uygulanarak saflık arttırıldı. G-aktin miktarı aşağıdaki şekilde hesaplandı;

$$\text{G-aktin (mg/ml)} = \text{OD}_{280} / 1.1 \times \text{dilüsyon faktörü}$$

Aktin miktarı $A_{280} 1\% = 1.25$ (Bektaş ve ark. 1994).

Saflık analizi SDS poliakrilamid jel elektroforezi ve Western Blot kullanılarak yapıldı.

G-aktin sıvı nitrojende dondurularak -80°C 'de, F-aktin 4°C 'de muhafazaya alındı.

3.2.2. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi

G-aktine SDS-PAGE protokolüyle (Laemmli 1970) saflık tayini yapıldı. Çift katmanlı jel dikey olarak hazırlanıp polimerleştirildi. Jel elektroforez tankına yürütme tamponu doldurulup; yükleme çözeltisiyle karıştırılan örnekler belirteç (Blue Rey Presitained Protein Belirteci) denatürlendikten sonra jele yüklenip yürütüldü.

Elektroforez işlemi bromfenol mavisini jelin en alt kısmına ulaştığında durdurularak jel taktan alındı. Jel dikkatlice protein ve marker içerecek boyutlarda kesilip coomassie parlak mavisini kullanılarak oda sıcaklığında bir saat süreyle boyanmaya bırakıldı. Boyama sonrası jel % 10 asetik asit içerikli boya çıkarma solüsyonu ile 45 dakika yıkanarak bağlanmayan boya uzaklaştırıldı. Yalnızca protein ve marker işaretlenerek görselleşme sağlandı.

3.2.3. Western Blot

Boyanmamış jeller transfer tamponunda ıslatılmış nitroselüloz membran ve 3MM Whatmann filtre kağıtlarının arasına yerleştirildi, transfer tankının süngerleri arasında aktarım kasetlerinin içerisine sandviçlendi, soğuk aktarım tamponu dolu tanka yerleştirildi. 4°C 'de 90 dakika 90 Voltta aktarım tamamlandı. Nitroselüloz membran özgün olmayan bağlanmaların engellenmesi için % 5 BSA-TBST eklenerek 2 saat çalkalandı. TBST'yle üç sefer yıkanıp proteine uygun birincil antikor (anti-aktin) eklenerek gece boyunca 4°C 'de bırakıldı. TBST çözeltisi ile üç sefer yıkanıp ikincil antikorda bir saat oda sıcaklığında çalkalandı. Membran üç sefer TBST'yle yıkanıp karanlık ortamda NBT/BCIP (Alkalenfosfataz substratı) uygulandı. Bantlar oluşuktan sonra distile su içerisinde tepkime durduruldu.

3.2.4. Hücre Kültürü

Aktin iskeletinin cucurbitacin I varlığındaki değişiminin floresan mikroskopıyla gözlemlenmesi amacıyla insandan izole edilmiş, endotel, yapışan, embryo göbek bağı hücresi (HUVEC, ATCC® CRTL-1720™) kullanıldı.

3.2.4.1. Hücrelerin Çoğaltılması

HUVEC hücreleri % 10 FBS ve % 1 penisilin/streptomisin DMEM F-12 içerisinde 37°C % 5 karbondioksitli etüvde çoğaltıldı. Hücreler 75 cm²'lik flasklarda büyütüldü, yüzey kaplama oranı ters mikroskopla gün aşırı kontrol edildi, % 80'e ulaştığında hücre kazıyıcıyla kaldırılıp 15 ml'lik streil falkon tüplere alındı. Falkon tüp 4 dakika 700 x g'de santrifüjlenip, süprenatant atıldı. Pelet besiyerinde çözöldü. Hücreler sayılıp ihtiyaç duyulan miktarda flaska 13 ml besiyeri ve 2 x 10⁵ hücre olacak şekilde ekildi. Kalan hücreler dondurularak depolandı. Bu işlem deney bitene kadar devam ettirildi, sonra tüm hücreler dondurularak depolandı.

3.2.4.2. Hücrelerin Dondurulması

Hücreler cryotüplere 3 x 10⁶ olacak şekilde 1,8 ml besiyeri, 200 µl hücre kültürü düzeyi DMSO eklenip 24 saat -80 °C'de donduruldu. -196 °C'lik sıvı azot tankına konularak depolandı.

3.2.4.3. Hücrelerin Sayılması ve Canlılık Tayini

Pelet halindeki hücreler seyreltme faktörü olarak adlandırılacak (ml) miktarda besiyerinde çözöldü. 10 µl çekilip Thoma lamı ile lamel arasına yerleştirildi, ters ışık mikroskobunda sayıldı. Tüm kareler sayılıp aşağıdaki formülle hesap yapıldı.

$$\text{Hücre Sayısı} = \frac{(\text{Sayılan Hücre})}{4} \times 10^4 \times \text{seyreltme faktörü}$$

Falkon tüplerden 100 µl hücre çekilerek aynı miktarda % 4'lük tripan mavisi ile karıştırıldı. 5 dakika inkübasyon sonrası Thoma lamı yardımıyla boyanmamış hücreler sayıldı. Hücre canlılığı aşağıdaki formülle hesaplandı.

$$\text{Hücre canlılığı(\%)} = \frac{(\text{Sayılan Hücre}) \times 100}{(\text{Toplam hücre})}$$

3.2.4.4. Hücrelere Drag Uygulanması

Hücreleri çoğaltılmak için 6 kuyulu kültür plakaları kullanılarak kuyulara ateşten geçirilerek sterilize edilmiş lameller yerleştirildi. Kuyulara 3 x 10⁵ hücre, 2 ml besiyeri içerisine ekildi. Bir gece çoğaltılıp üst sıvıları çekilerek steril PBS ile yıkandı.

Toplam 1 ml olacak şekilde besiyeri-madde karışımları uygun konsantrasyonlarda eklendi. Bir kuyu kontrol amacıyla besiyeri ile hazırlandı.

3.2.5. Floresan Görüntülenmesi

Drag uygulanan hücreler 12 saat bekletilip, aktin iskeletinin floresan boyanma işlemi başlatıldı. Aksi belirtilmediği sürece her basamakta üst sıvılar çekilip PBS ile üç kere yıkama yapıldı. Besiyeri uzaklaştırılıp 1 ml PBS-Tritonx100 (% 0,1) eklenerek oda sıcaklığında 15 dakika bekletildi. 1 ml PBS-paraformaldehit (% 2) içerisinde 1 saat +4 °C’de bekletildi. PBS-BSA (% 1) çözeltisi eklenip etüvde 1 saat bekletildi. Bu aşama üst sıvı çekilip PBS ile yıkama yapılmadan 750 µl PBS-BSA/phalloidin-FITC (1:1500) eklenip folyoya sarıldı, etüvde 1 saat bekletilerek hücre iskeletinin boyanması sağlandı (F-aktin). Üst sıvı çekilerek PBS ile yıkanan kuyulardan alınan lameller DAPI kullanılarak, hücre çekirdeğinin boyanması amacıyla, lam üzerine kapatıldı, oje yardımıyla sabitlendi. Alüminyum folyoya sarılan lam gece boyu bekletilip Olympus DP-72 kamera sistemi ile DP2-TWAIN yazılım programında görüntülendi. DAPI uyarılması 345 nm, salımı 458 nm, FITC ise 554 nm uyarım ve 576 nm salınım ile floresan mikroskopta (Olympus BX51) görüntülendi.

3.2.6. Termal Kayma Deneyi

Termal kayma deneyi BioRad CFX96 gerçek zamanlı PCR cihazında yapıldı, görüntüleme amacıyla SYPRO orange floresan boya kullanıldı. 96 lık ELISA kuyularında 3 tekrar olarak çalışıldı. Kuyulara 10 µg aktin, 1,25 µl HEPES, 2,5 µl SYPRO Orange (50x), drag konsantrasyonu eklendi son hacim 25 µl’ye su ile tamamlandı. Rt-PCR cihazında 35-90 °C sıcaklık aralığında 0,5 °C’lik periyotlarla floresan yoğunluğu; 450-490 nm uyarım, 560-580 nm salınım dalga boylarında ölçüldü.

3.2.7. Veri Analizi

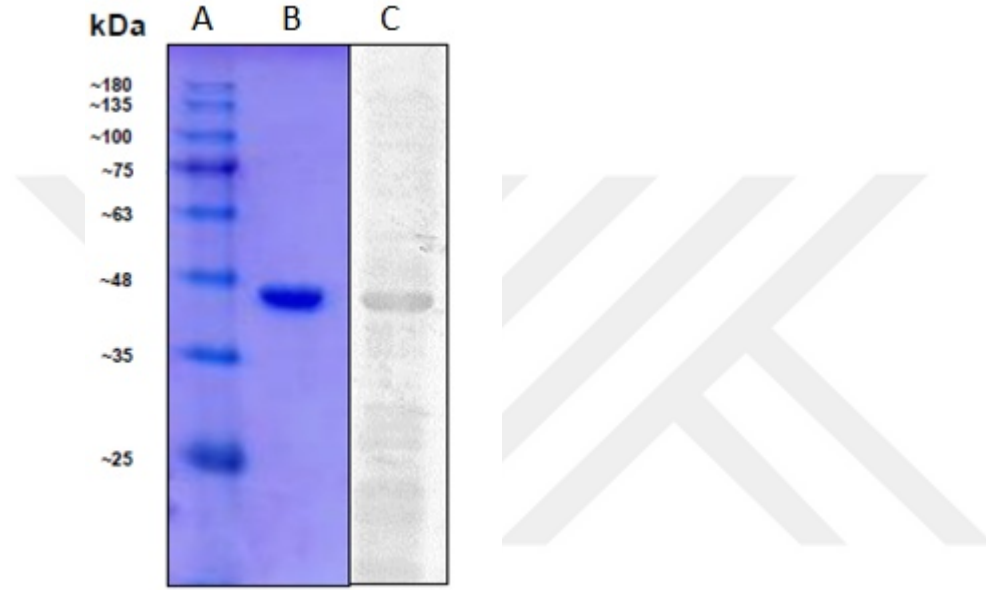
Termal Kayma Deneyi verileri CFX manager ve Graphpad programları kullanılarak gerçekleştirildi. Sonuçlar floresan yoğunluk ve sıcaklık verileriyle çizilerek 2 aşamalı geçiş (two state transition) sigmoidal eğrisi oluşturuldu. Boltzmann eşitliği kullanılarak veriler üzerinden geçiş eğrisinin dönüm noktası yani T_m değeri hesaplandı. Western Blot ve floresan mikroskopi görüntüleri ise ImageJ program kullanılarak veri haline getirildi.



4. BULGULAR

4.1. G-Aktin Saflığının Belirlenmesi

Saflaştırılann aktin Gereç ve Yöntemlerde anlatıldığı şekilde toz aktinden (aseton powder) elde edildi. Aktin SDS-PAGE ve anti-aktin varlığında western blot yöntemiyle görselleştirildi (Şekil 4).



Şekil 4: Tavşan çizgili kasından saflaştırılan aktinin elektroforez ve WB analizi.

A) Moleküler ağırlık belirteci (5 μ g), B) Moleküler elik kromatografisi ile saflaştırılan G-aktinin SDS/PAGE görüntüsü (2 μ g), C) G-aktinin (B'nin) WB analizi

Polimerleşme/depolimerleşme basamakları sonrası ultra-santrifüjlenme ve moleküler elik kromatografisinden ayrıştırılan 42,5 kDa civarındaki proteinin iyi saflaştırılmış (% 95) aktin olduğu görülmektedir.

4.2. Termal Kayma Deneyi ile Drag Aktivitesi Belirlenmesi

Aktin monomeri ile ligandların bağlanma kinetiklerinin tespit edilmesi için termal kayma deneyi yapıldı. Aktin miktarı sabit tutuldu ve ligandların farklı konsantrasyon kullanıldı. RT-PCR cihazından alınan verilerden Excel ve Graphpad kullanılarak Boltzmann denklemi üzerinden ligand varlığındaki G-aktinin yarı yarıya denatüre olduğu (T_m) değerleri hesaplandı. Kontrol kuyusuna aktin ve boya, negatif kontrole sadece boya, pozitif kontrole ise sadece aktin konuldu. Kontrollden alınan okumalar (floresan verim) drag varlığındaki kuyulardaki okumalarla karşılaştırıldı.

Negatif kontrol boyanın protein olmadan ışıma yapmadığını, pozitif kontrol ise boya eksikliğinde proteinin ışıma yapmadığını gösterdi. 3 tekrar çalışılıp kuyuların değerlerinin ortalaması alındı. Sonuçlar termal denge T_m değişiklikleri üzerinden gözlemlendi. Floresan verim denatürasyon esnasında aktin üzerinde açığa çıkan hidrofobik bölgelere bağlanan floresan boyanın polarizasyonu sonrasında belirlendi. Yoğunluğunun azalmış olması proteinin hidrofobik bölgesine bağlanan boyanın, bağlanacağı bölgelere erişimin kısıtlandığı şeklinde yorumlandı.

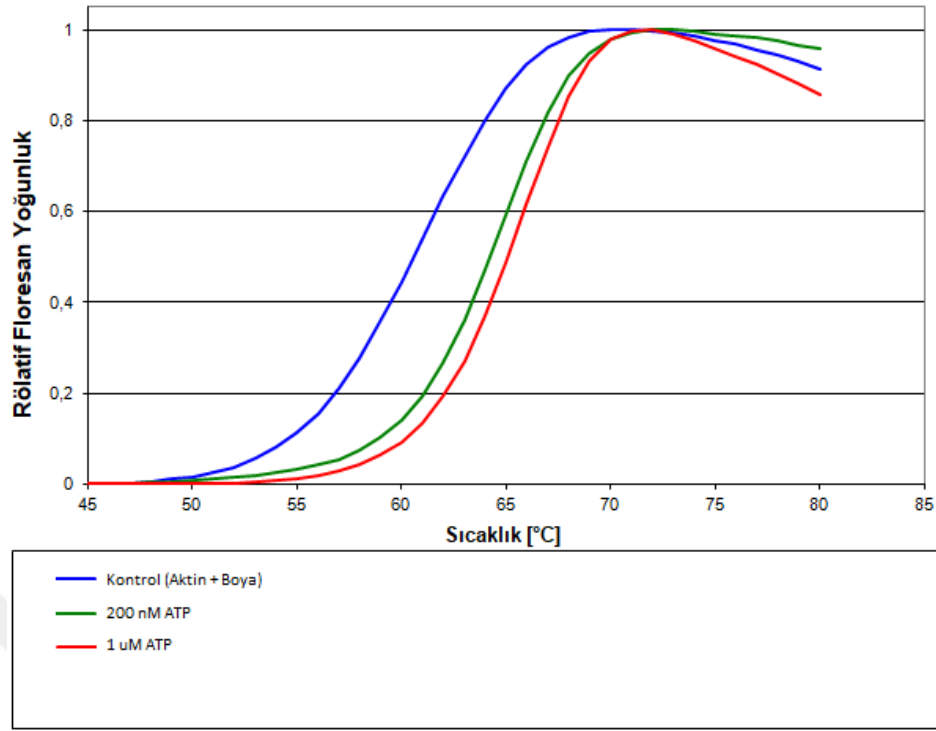
4.2.1. G-aktin Nükleotit Etkileşimleri

Termal kayma deneyi protokolünde iki konsantrasyon (200 nM ve 1 μ M) çalışılan ATP, ADP ve GTP nükleotitlerinin 3 kuyuda tekrarlarının ortalama T_m değerleri ve kontrole (sadece G-aktin (10 μ M) ve boya) kıyasla konsantrasyona bağlı değişimi gösterilmiştir (Tablo 1). Sonuçlar G-aktin polimerleşmenin başlaması için bağlanmaya ihtiyaç duyduğu ATP molekülünün termal dengeyi 7, 7,4 $^{\circ}$ C arttırmıştır. ADP ve GTP ise termal dengede değişim 4-5 $^{\circ}$ C düzeyinde olmuştur.

Tablo 1: ATP, ADP ve GTP'nin G-aktin etkileşimlerinin termal dengeye etkisi

Ligand	Ortalama T_m ($^{\circ}$ C)	T_m Farkı ($^{\circ}$ C)	Maksimum Genlik [A.U]	Genlik Farkı [A.U.]
Kontrol	58,1		766,3	
200 nM ATP	65,1	7,0	729,5	-36,8
1 μ M ATP	65,5	7,4	719,5	-46,8
200 nM ADP	62,6	4,5	761,4	-4,9
1 μ M ADP	62,9	4,8	798,4	32,1
200 nM GTP	62,3	4,2	844,4	67,1
1 μ M GTP	62,9	4,8	705,5	-50,8

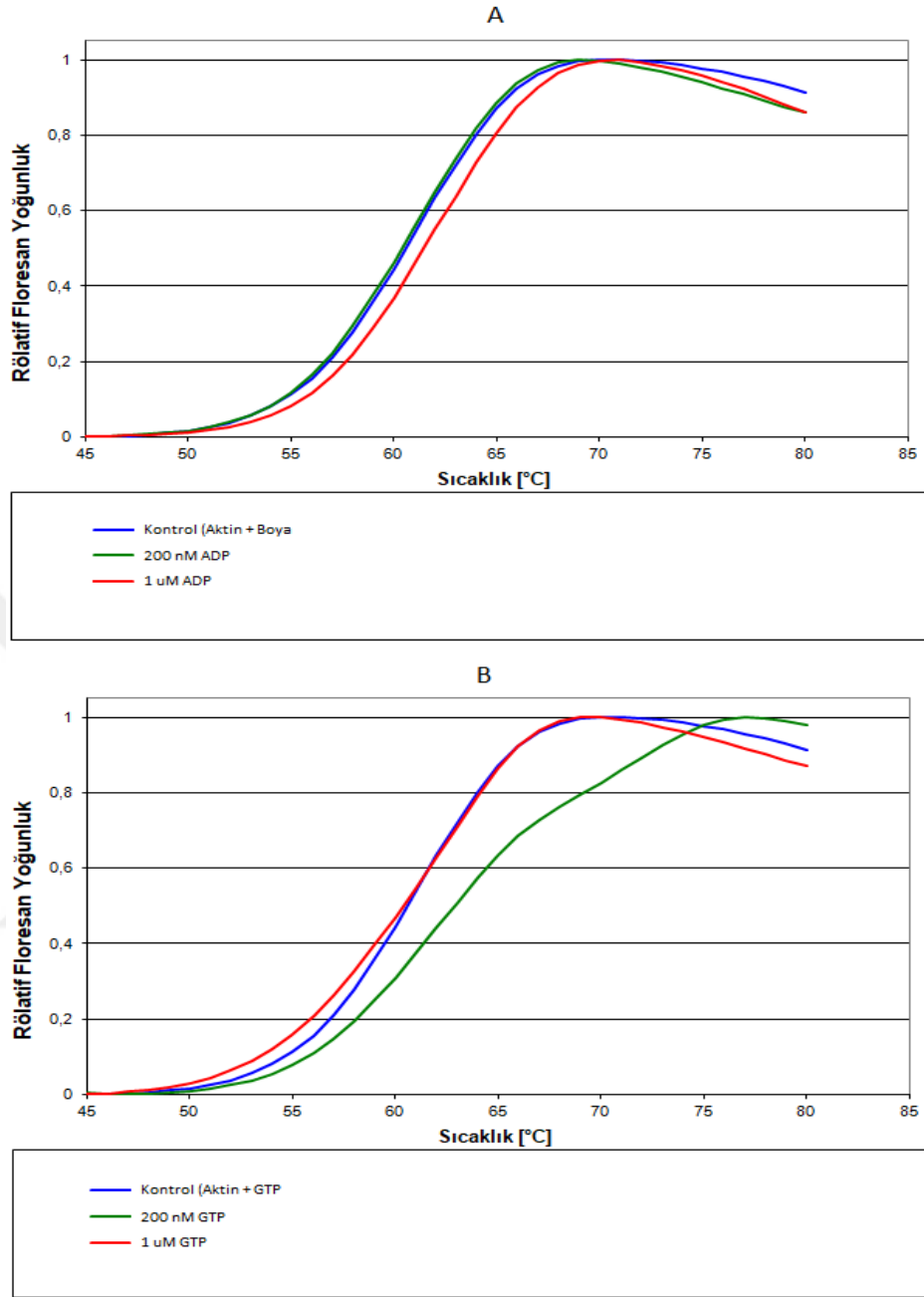
Ligand içermeyen G-aktin kuyularında yapılan ışıma daha yüksek floresan değerlere ulaşırken tabloda (Şekil 5) görüldüğü üzere eğimi düşük olarak daha düşük floresan değerler veren ATP'li kuyulardan düşük T_m değeri göstermiştir. ATP konsantrasyonunun artmasıyla eğimin artışının ATP nükleotitinin G-aktin termal dengesini konsantrasyon arttıkça kuvvetlendirdiğine işaret etmektedir.



Şekil 5: Aktin-ATP etkileşiminin TSA yöntemiyle gösterimi.

Kontrol (mavi), 0,2 μ M ATP (yeşil), 1 μ M ATP (kırmızı), aktin 10 μ M.

GTP ve ADP ile kontrol değerleri karşılaştırıldığında floresan verim ve eğim/ T_m değerleri benzer seviyelerde çıkmıştır. T_m değerleri benzer çıkan iki nükleotit genlik seviyelerindeki farklılıklar grafiğe yansımıştır (Şekil 6). Yaklaşık T_m değişimi 4,5-5 °C civarında görülmüştür.



Şekil 6: Aktin-ADP ve GTP etkileşimlerinin TSA yöntemiyle gösterimi

A) Kontrol (mavi), 0,2 μ M ADP (yeşil), 1 μ M ADP (kırmızı). B) Kontrol (mavi), 0,2 μ M GTP (yeşil), 1 μ M GTP (kırmızı), aktin 10 μ M.

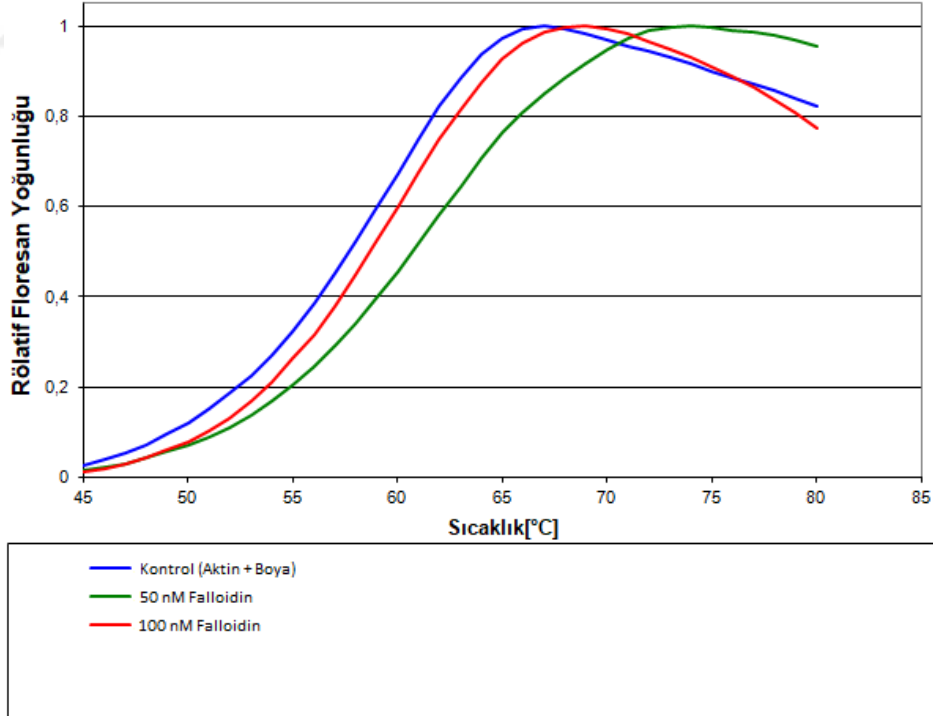
4.2.2. Falloidin

Falloidin distile su içerisinde mg/ml olarak çözüldü. 1,2 mM ana stok ve 1,2 μ M ara stok hazırlandı. Ara stoktan 50 nM ve 100 nM falloidin konsantrasyonu hesaplanarak 10 μ g aktin içeren kuyulara eklendi. Ortalama T_m ve Maksimum genlik değerleri bulunup kontrol ile karşılaştırıldı (Tablo 2).

Tablo 2: Falloidin ile G-Aktin etkileşiminin termal dengesine etkisi

Ligand	Ortalama T_m ($^{\circ}$ C)	T_m Farkı ($^{\circ}$ C)	Maksimum Genlik [A.U.]	Genlik Farkı [A.U.]
Kontrol	57,95		617,08	
50 nM Falloidin	68,02	9,96	663,35	-433,27
100 nM Falloidin	61,06	3,00	594,995	-616,4

Falloidin ile yapılan deneylerde farklı sonuçlar elde edilmiştir. 50 nM falloidin varlığında termal dengede yaklaşık 10 derecelik artış gösterilen deneyin sonuçları bu yöntemin G-aktin incelenmesinde kullanılabileceğini ortaya koymaktadır. RT-PCR sonuçlarından elde edilen rölatif floresan yoğunluk grafiği çıkarıldı (Şekil 7).



Şekil 7: Aktin-Falloidin etkileşiminin TSA yöntemiyle gösterilmesi

Kontrol (mavi), 50 nM falloidin (yeşil), 100 nM falloidin (kırmızı), aktin 10 μ M.

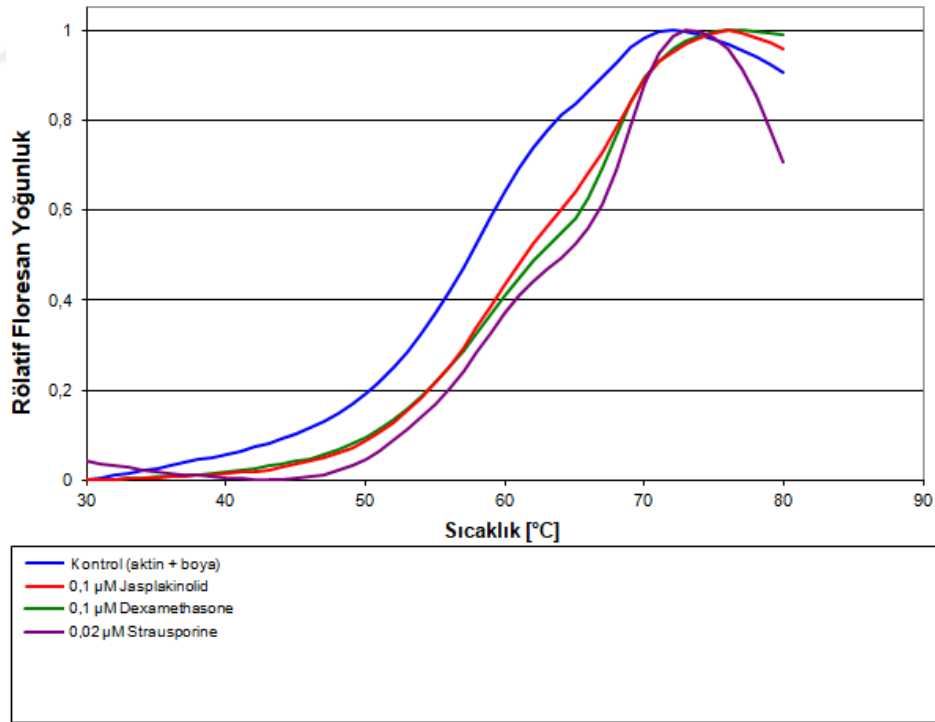
4.2.3. Aktin Bağlayan Draglar

Deksametazon etanol içerisinde mg/ml olarak çözüldü. 2,5 mM ve 2,5 μ M ara stok hazırlandı. Jasplakinolid DMSO içerisinde mg/ml olarak çözüldü. 0,1 mM ana stok ve 1 μ M ara stok hazırlandı. Strausporine DMSO içerisinde mg/ml olarak çözüldü. 10 mM ana stok ve 200 nM ara stok hazırlandı. Ara stoklardan tablo 4'te verilen son konsantrasyonlar hazırlanarak TSA deneyi yapıldı. Ortalama T_m ve maksimum genlik değerleri bulunup kontrol ile karşılaştırıldı (Tablo 3).

Tablo 3: Aktin bağlayan dragların (Deksametazon, Jasplakinolid, Strausporine) termal dengeye etkisi

Ligand	Ortalama T_m ($^{\circ}$ C)	T_m Farkı ($^{\circ}$ C)	Maksimum Genlik [A.U.]	Genlik Farkı [A.U.]
Kontrol	58,06		930,70	
100 nM Deksametazon	63,36	5,30	928,46	-2,24
100 nM Jasplakinolid	62,19	4,13	1434,92	504,22
20 nM Strausporine	65,48	7,42	371,50	-559,2

RT-PCR cihazından elde edilen rölatif floresan yoğunluğunun sıcaklığa bağlı değişiminin draglar üzerindeki etkisi grafikte gösterildi (Şekil 8).



Şekil 8: Aktin-Drag etkileşimlerinin TSA yöntemiyle gösterilmesi

Kontrol (mavi), 100 nM Jasplakinolid (kırmızı), 100 nM Dexamethasone (yeşil), 20 nM Strausporine (mor), 10 μ M aktin.

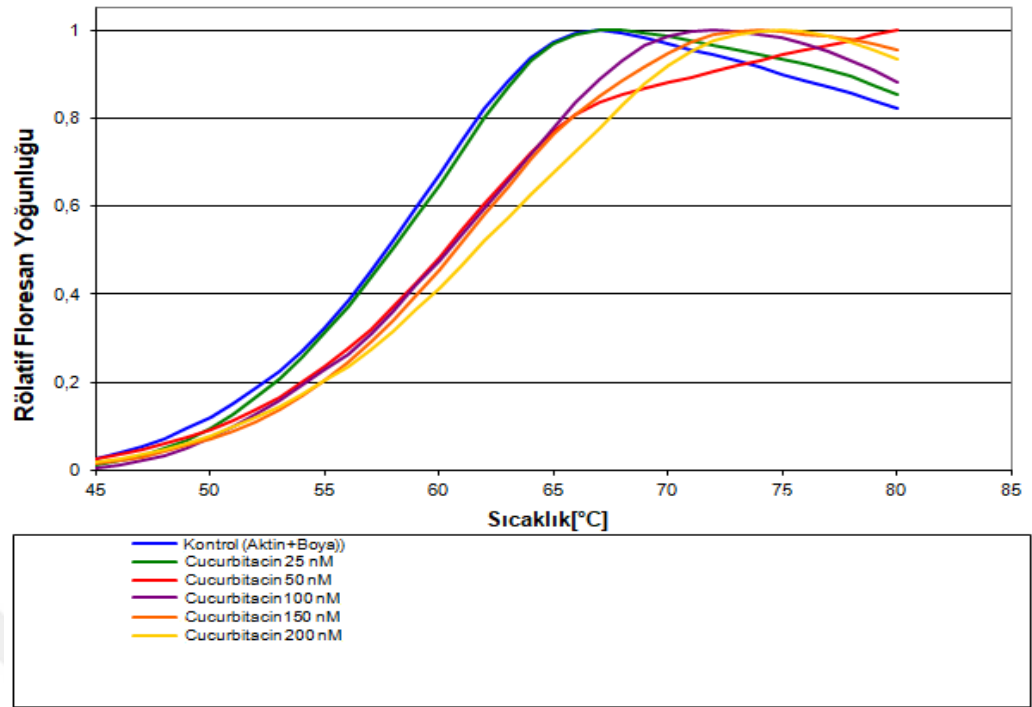
4.3. Cucurbitacin I molekülünün K_d Değerinin Hesaplanması

Cucurbitacin I DMSO içerisinde mg/ml çözöldü. 2 mM hazırlanan ana stok üzerinde yapılan ara stoklar üzerinden farklı konsantrasyonlarda 10 μM aktin varlığında TSA deneyi yapılarak ortalama T_m değerleri ve maksimum genlik tespit edilerek kontrol değeri ile karşılaştırıldı (Tablo 4). Cucurbitacin I 100 nM konsantrasyona ulaşana kadar T_m değerinde düzenli yükseliş göstermektedir. Önceki deneylerin sonuçlarıyla da uyumlu olarak 100 nM sonrası konsantrasyonlarda T_m değerleri azalmaktadır (Tablo 4).

Tablo 4: Cucurbitacin I etkisinde G-aktin termal kalımlılığı

Ligand	Ortalama T_m ($^{\circ}\text{C}$)	T_m Farkı ($^{\circ}\text{C}$)	Maksimum Genlik [A.U.]	Genlik Farkı [A.U.]
Kontrol	57,80		303,47	
1 nM Cucurbitacin I	55,78	-2,02	229,61	-73,86
2 nM Cucurbitacin I	55,80	-2,00	234,11	-69,36
5 nM Cucurbitacin I	57,23	-0,57	294,00	-9,47
10 nM Cucurbitacin I	58,52	0,72	320,72	17,26
20 nM Cucurbitacin I	58,97	1,17	351,42	47,95
25 nM Cucurbitacin I	61,05	3,25	491,88	188,41
50 nM Cucurbitacin I	63,10	4,11	540,03	236,56
100 nM Cucurbitacin I	64,10	5,38	530,20	226,73
150 nM Cucurbitacin I	65,48	7,49	515,17	211,70
200 nM Cucurbitacin I	63,40	5,60	499,75	196,28
500 nM Cucurbitacin I	59,69	1,87	444,36	140,89
1 μM Cucurbitacin I	58,54	0,74	408,88	105,41
5 μM Cucurbitacin I	58,28	0,48	314,25	10,78

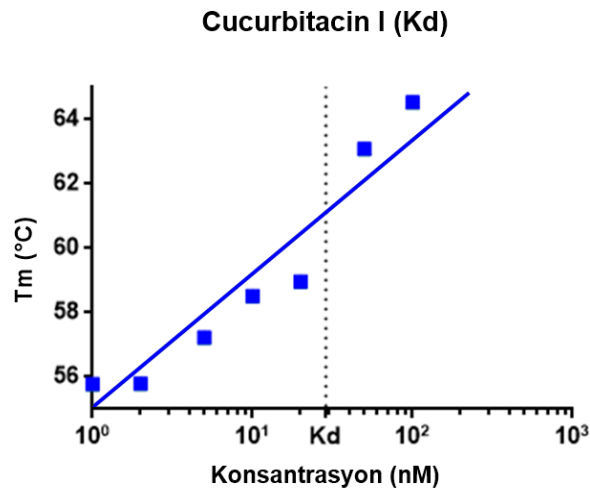
Artan derişimlerde (25-200 nM) cucurbitacin I'nın aktin moleküllerine bağlanma ilginliğinde ve dolayısıyla T_m değerlerinde artış gözlemlenmiştir. 200 nM konsantrasyonda daha düşük T_m değerleri gözlemlenmiştir. Rölatif floresan yoğunluğu grafiğı çizilmiştir (Şekil 9).



Şekil 9: Aktin-Cucurbitacin I etkileşiminin TSA yöntemiyle gösterilmesi.

Kontrol (mavi), Cucurbitacin I sırayla; 25 nM (yeşil), 50 nM (kırmızı), 100 nM (mor), 150 nM (turuncu), 200 nM (sarı), aktin 10 μ M.

K_d ölçümü 100 nM konsantrasyona kadar elde edilen T_m değerleri kullanılarak yapıldı. Sonuçlar lineer yükseliş olarak tablolandırılıp K_d değeri bulundu (Şekil 10).

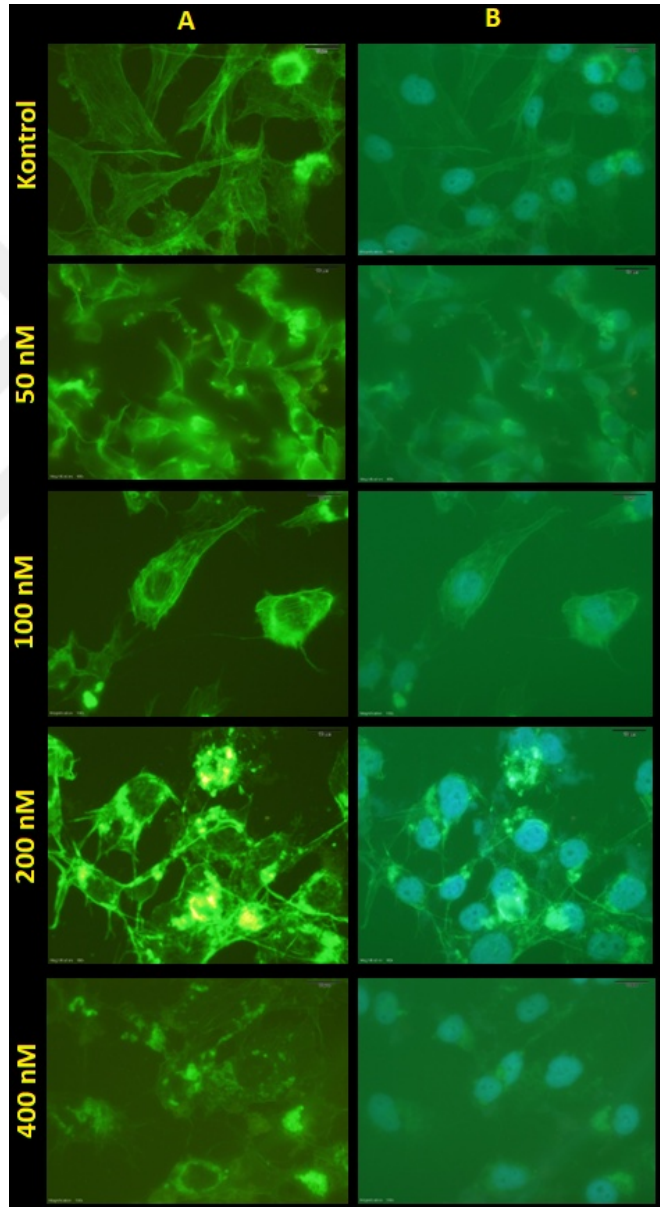


Şekil 10: Cucurbitacin ile G-aktin bağlanmasında K_d değerinin hesaplanması.

Deney sonucunda yarı logaritmik tablo üzerinden yapılan ölçümler K_d değerinin 1-100nM arasında (yaklaşık) 30 nM olduğu belirlendi.

4.4. Floresan Mikroskobu Görüntüleri

Floresan mikroskobunda 12 saat sürede 4 konsantrasyonda Cucurbitacin I ile aktin iskeleti değişimin görüntülendi.. Protokol Gereç ve Yöntemlerde belirtildiği şekilde falloidin-FITC ve DAPI kullanılarak görsellik sağlandı. Floresan mikroskobunda sadece FITC üzerinden detaylı aktin görüntülenmesi alındı DAPI boyanmasıyla çekirdeğin durumu ve aktindeki değişikliklerin lokalizasyonu gözlemlendi (Şekil 11).



Şekil 11: Cucurbitacin I etkisinde HUVEC’lerin hücre iskeleti görüntüsü.

Yukarıdan aşağıya; Cucurbitacin I: kontrol, 50 nM, 100 nM, 200 nM, 400 nM. Sütun; A) Falloidin-FITC, B) Falloidin-FITC ve DAPI.

Floresan sonuçları yükselen konsantrasyonlarda F-aktin kırılmasına sebep olduğu ve hücre içerisinde G-aktin çöküntüleri oluşturduğunu göstermektedir. DAPI ile boyanan çekirdekte bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Denenen en yüksek konsantrasyonda hücre içerisindeki F-aktin miktarındaki kırılma toksisiteye işaret etmektedir. Kontrolde DAPI hücre içerisine tam anlamıyla ulaşmış ve boyama az miktarda gözlemlenmiştir, bunun sebebi F-aktin fazlalığından dolayı çekirdeğe ulaşamaması olabilir, bu durum en düşük konsantrasyonda tamamen boyanmış hücre çekirdeğinin gözlemlenmesinin F-aktinin bu noktadan itibaren miktarının azaldığına yorumlanabilir.



5. TARTIŞMA

G-aktin, aktin proteininin monomer formudur, hücre içerisinde çok sayıda görevi olan aktin filament oluşumunda yapıtaşı olarak rol alır. Proteinler başka moleküllerle etkileşerek dördüncül yapılarına ulaşır ve biyolojik işlevlerini yerine getirir (Lynch ve Davson 2008). Proteinlere bağlanan ufak moleküller yapılarında değişikliklere, dolayısıyla işlevlerini yerine getirebilme özelliklerinde farklılıklara yol açabilir. Proteinin bağlanma bölgelerine oluşacak en ufak değişiklik proteinin tamamen işlevsiz kılabilir veya işlevini yapacağı bağlanmanın oluşmasında rol alabilir. Bu yöntemle müdahale edilen aktin molekülleri üzerinden hücre döngüsü ve iskeleti çalışılmaktadır (Maloney 2008). İlaç çalışmaları bu prensip üzerinden yapılır ve hedef protein ile arasındaki kinetik bağlanmanın bulunması bu araştırmalarda önemli bir aşamadır (Noreen ve Thomson 2003). Termal kayma deneyi (TSA) bir araya konulan protein ve moleküllerin bağlanma ilginliklerinin zamanı sıcaklık ve derişim değerlerine bağlı olarak tespit edilmesini sağlayan hızlı ve yüksek çıktılı bir yöntemdir (Molina ve ark. 2013). Termal kayma deneyleri SYPRO orange varlığında RT-PCR cihazı kullanılarak yapılmaktadır (Lavinder ve ark. 2009).

Aktin hücredeki rolü nedeniyle ilaç çalışmalarında hedeflenen bir proteindir. Aktin filament ile etkileştiği bilinen çok sayıda molekül mevcuttur, örnek olarak elongasyon faktörü 1 ve elongasyon faktörü 2 verilebilir (Bektaş ve ark. 1998). Bu moleküller arasında özellikle falloidin, F-aktin ile bağlanma açısından son derece yüksek ilgiğe sahiptir. Aktin filamentini hedefleyen pek çok molekül gibi monomer ile arasındaki ilişki daha az bilinmektedir. F-aktin ve G-aktin etkileşimi diferansiyel kalorimetrik tarama yöntemiyle (DSC) falloidin varlığında incelemiştir (Le Bihan ve Gicquaud, 1991). F-aktine doygunluk seviyesinde uygulanan falloidin; T_m değerini 69,5 °C'den 83,5 °C'ye çıkarmış ancak bu kalorimetrikentalpi değışmemiştir. Burada önceki deneylerin aksine falloidin ile G-aktin arasında ilişki gözlemlenmiş, T_m değeri 59,5 °C'den 75 °C'ye çıkmıştır, ısı dolayısıyla polimerleşmenin başlaması sebebiyle bu farklılığın oluşabileceği belirtilmiştir. Geçiş entalpisi kalorimetrik ölçümü Van der Waals etkileşimleri ve hidrojen bağları üzerinden oluştuğundan, değışim gözlemlenmemesinin falloidin kaynaklı yapısal değışikliklerin bu bağlanmalarla alakasız olduğu sonucu çıkarılmıştır.

Aktin etkileşimi iyi bilinen bir başka küçük molekül jasplakinoliddir. Jasplakinolid *in vitro* deneylerde filament stabilitesini kuvvetlendirirken *in vivo* aktinin şekilsiz kümelenmesine sebep olmasındaki sebebi incelemek için hücre içerisinde falloidin varlığında polimerizasyon kinetiğinin incelenmiştir (Bubb ve ark. 2000). 24 saatte *in vivo* filamentinin yüksek oranda oluşması için 50-200 nM jasplakinolid yeterli olmuştur. Jasplakinolid; hücre içerisinde serum cevap faktörü ve aktin düzenleyici proteinlerin etkisine bağlı olarak farklı biyokimyasal sonuçlar verebilmekte ve F-aktin ile birden fazla bağlanma bölgesinde etkileşebilmektedir. Jasplakinolidin, aktin depolimerizasyonu engelleyen farmasotik bir ajan olabileceği belirtilmiştir (Bubb ve ark. 1994). Kısa zaman dilimlerinde aktin-filament çözülümünün, uzun zaman dilimlerinde ise iplikçik kümelenmesini ve aktin organizasyonunu temel dağılımının incelenmesi amacıyla kullanılabileceği belirtilmiştir (Cramer 1999). Jasplakinolid mevcut olarak hücre zarından serbestçe geçerek aktin iskeletiyle etkileşebilen en bilinen moleküldür, cucurbitacin molekülüleri boyut olarak küçük olmaları sebebiyle bu alandaki çalışmaların önünü açabileceği belirtilmiştir (Sörensen ve ark. 2012). Çalışma cucurbitacin E üzerine odaklanmış ve bu molekülün F-aktine Csy257 aminoasitinde bağlandığı ancak G-aktine bağlanmanın gerçekleşmediği belirtilmiştir (Sörensen ve ark. 2012).

Termal kayma deneyimizde nükleotitler ile yapılan ön çalışmalar monomer ile etkileşimi çok daha iyi bilinen ATP ve ADP moleküllerinde beklenen sonuçlar alınmıştır. ATP molekülü aktin filamentleşmesinde enerji olarak kullanılmakta ve filamente eklenecek G-aktine bağlanmaktadır. TSA sonuçları bu bağlanmayı açıkça göstermekte ve yükselen konsantrasyonlarda yükselen T_m değerleri ile uyumlu sonuçlar vermiştir. Aynı şekilde filamentten çözünme sırasında ortaya çıkan G-aktin/ADP yapısındaki bağlanma ilginliğinin düşük olması filamentleşmenin devamı için ADP'yi bırakıp ATP bağlanmaya meyilli aktin monomerinin yapması beklenen bir davranıştır.

F-aktin ile etkileşimi bilinen moleküllerin G-aktin ile etkileşimlerinin araştırıldığı deney düzeneğinde literatürden farklı sonuçlar elde edilmiştir. Falloidin üzerinden yapılan çalışma literatürdeki kadar yüksek T_m değerlerine işaret etmese de G-aktin ile bağlanma ilginliğinin araştırılmasının TSA deneyiyle yapılabileceğine işaret etmektedir. Cucurbitacin I molekülü ile yapılan deneylerde monomer aktin ile bağlantısı oluşturulan rölatif floresan eğrilerinde ve elde edilen değerlerde görülmektedir. Ancak

in vitro TSA deneyinde 200 nM konsantrasyon sonrasında düzgün sonuçlar elde edilememiştir. Cucurbitacin I ile birden fazla monomerin etkileşerek floresan mikroskopta oluşturduğu kümelenmelere benzer çökmelere sebep olup SYPRO orange boyasının bağlandığı hidrofobik bölgelere ulaşamamasından kaynaklandığı şeklinde yorumlanabilir, bu sebeple deneyin bir kısmında istenilen sonuçlara ulaşılamamıştır. Deney sonuçlarında uygun alınan veriler (<200 nM) kullanılarak hesaplanan K_d değeri bulunmuştur bu ölçüm, yüksek konsantrasyonlarda düzgün veri elde edilememesi sebebiyle düşük konsantrasyonlar üzerinde hesaplanıp yorumlanmıştır. Ancak düşük konsantrasyonlardaki veriler üzerinden cucurbitacin I ile G-aktin etkileşiminin olduğu görülmektedir, yüksek konsantrasyonlarda oluşan bozulmalar sadece TSA yönteminin bu moleküler etkileşimde kullanılabilirliğini ve bu deneyde hesaplanan K_d değerini tartışmaya açık bırakmaktadır. Benzer şekilde F-aktin ile etkileştiği bilinen diğer küçük moleküllerle yapılan çalışma düşük konsantrasyonda bağlanmayı gösterebilecek T_m değerler vermiştir.

Cucurbitacin I, 4 saat boyunca B16-F1 hücrelerine 200 nM konsantrasyonda uygulanmış ve görselleştirilmiştir (Knetch ve ark. 2010) ve çalışmamız 200 nM konsantrasyonu da içerecek şekilde yapılmıştır. Yapılan çalışmalar cucurbitacin I molekülünün IC_{50} değerinin Hela hücrelerinde IC_{50} değerinin yaklaşık 45 nM, MCF 7 hücrelerinde yaklaşık 65 nM U2OS hücrelerinde ise yaklaşık 24 nM olduğunu göstermektedir (Wang ve ark. 2017), bu durum cucurbitacin I molekülünün farklı hücre hatlarında düşük konsantrasyonlarda da toksik etki gösterttiğine işaret etmektedir. Aynı çalışmada (Wang ve ark. 2017) floresan çalışmaları yapılarak hücre iskeleti görüntülenmiş, cucurbitacin I'nın cucurbitacin B'ye ve E'ye kıyasla daha uzun sürede (4 saat) etki gösterdiği belirtilmiştir. Cucurbitacin I molekülünün farklı konsantrasyonlarının varlığında büyütülen HUVEC hücreleri üzerinde yapılmış olan floresan mikroskobu deneyinin sonuçları ise bu molekülün doğrudan veya dolaylı etkileşime geçtiğini kanıtlamaktadır. Kullanılan konsantrasyonlarda TSA deneyinde elde edilen düşük konsantrasyonlarda bile hücre iskeletinde bozulmaya yol açtığında etkileşimin gerçekleştiğine kanıt olarak sunulabilir. Ancak aktin iskeletinin yüksek konsantrasyonlarda çok daha fazla kırılma ve kümelenme gösteriyor olması TSA verilerinde oluşan hataların bahsedildiği üzere kümelenme sebebiyle oluşmuş olabileceği yorumunu desteklemektedir. Hücre çekirdeğine etkisi gözlenmeyen cucurbitacin I'nın yüksek konsantrasyonlarda aktin filamenti yapısında ciddi

bozulmalara yol açması hücre içerisine alındıktan sonra yüksek konsantrasyonlarda hücre yapısını geri dönülemeyecek derecelerde bozulmaya yol açması literatürle uyumlu olarak apoptoz yolağını aktive etmesine yol açabileceğine işaret etmektedir. Aynı zamanda cucurbitacin B üzerine yapılan çalışmada molekülün, RNA ile etkileşmesi sebebiyle pankreas kanserinde tümör oluşumunun engellendiği gösterilmiştir (Zhou ve ark. 2019). Bu sonuç cucurbitacin I ile alakalı çalışmaların genetik düzeyde de araştırılmasının molekülün çalışma mekanizmasını anlamak için gerekli olduğuna işaret etmektedir.

Sonuç olarak TSA ile aktin monomer üzerinde yapılan çalışmanın önünde çeşitli engeller bulunmaktadır. Çalışmada aktin ile etkileştiği bilinen moleküllerin en az bir konsantrasyonda etkileşimi kanıtlayacak değerler vermesi hızlı ilaç taramaları için kullanılabileceğini göstermektedir. Ancak yükselen konsantrasyonlarda alınan verilerin tutarlı çıkmıyor olması bu protokol kullanılarak aktin monomeri ile moleküllerin etkileşiminin kinetik tablosunu çıkarmanın yoruma açık sonuçlar vereceğini göstermektedir. Deneyde araştırılmak istenen molekül olan cucurbitacin I hem *iv vivo* hem *in vitro* koşullarda aktin ile etkileşime geçtiği gösterilmiştir. Bu çalışma cucurbitacin I ile aktinin etkileştiği ve hücre içerisinde ciddi sonuçlara yol açtığı gösterilmiş ancak bağlanma kinetiklerinin bulunması başka yöntemlerden alınacak verilerle desteklenmesi gerektiğini ortaya koymuştur. Ancak sonuç olarak cucurbitacin I hücre içerisine girerek hücre iskeletinde bozulmalara yol açtığından aktin çalışmalarında kullanılabileceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

- Aktories, K., Bärmann, M., Ohishi, I., Tsuyama, S., Jakobs, K. H., & Habermann, E. (1986). Botulinum C2 toxin ADP-ribosylates actin. *Nature*, 322(6077), 390.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Watson, J. D. (1994). Molecular biology of the cell. Garland science. *New York*, 18-19.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2007). Molecular biology of the cell. Garland science. *New York*, 1227-1242.
- Bernstein, B. W., & Bamburg, J. R. (2010). ADF/cofilin: a functional node in cell biology. *Trends in cellbiology*, 20(4), 187-195.
- Bektas, M., Nurten, R., Sayers, Z., & Bermek, E. (1998). Interactions of elongation factor 2 with the cytoskeleton and interference with DNase I binding to actin. *European journal of biochemistry*, 256(1), 142-147.
- Bligh, P. H. (1988). Ligand binding—A primer. *Biochemical Education*, 16(4), 186-195.
- Blondeau, J. P., & Robel, P. (1975). Determination of protein-ligand binding constants at equilibrium in biological samples. *European journal of biochemistry*, 55(2), 375-384.
- Bubb, M. R., Senderowicz, A. M., Sausville, E. A., Duncan, K. L., & Korn, E. D. (1994). Jasplakinolide, a cytotoxic naturalproduct, induces actin polymerization and competitively inhibits the binding of phalloid into F-actin. *Journal of Biological Chemistry*, 269(21), 14869-14871.
- Bubb, M. R., Spector, I., Beyer, B. B., & Fosen, K. M. (2000). Effects of jasplakinolide on the kinetics of actin polymerization an explanation for certain in vivo observations. *Journal of Biological Chemistry*, 275(7), 5163-5170.
- Carlier, M. F., & Pantaloni, D. (2007). Control of actin assembly dynamics in cell motility. *Journal of Biological Chemistry*, 282(32), 23005-23009.
- Carlier, M. F., Laurent, V., Santolini, J., Melki, R., Didry, D., Xia, G. X., & Pantaloni, D. (1997). Actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) enhances the rate of filament turnover: implication in actin-based motility. *The Journal of cell biology*, 136(6), 1307-1322.

- Chen, Y. W., Chen, K. H., Huang, P. I., Chen, Y. C., Chiou, G. Y., Lo, W. L., & Chiou, S. H. (2010). Cucurbitacin I suppressed stem-like property and enhanced radiation-induced apoptosis in head and neck squamous carcinoma-derived CD44⁺ ALDH1⁺ cells. *Molecular cancer therapeutics*, 9(11), 2879-2892.
- Chilkoti, A., Boland, T., Ratner, B. D., & Stayton, P. S. (1995). The relationship between ligand-binding thermo dynamics and protein-ligand interaction forces measured by atomic force microscopy. *Biophysical journal*, 69(5), 2125-2130.
- Clarkson, J., & Campbell, I. D. (2003). Studies of protein–ligand interactions by NMR.
- Cooper, J. A. (1987). Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *The Journal of cell biology*, 105(4), 1473-1478.
- Copeland, R. A. (2004). Enzymes: a practical introduction to structure, mechanism, and data analysis. *John Wiley&Sons*. 76-95
- Courage, C., Snowden, R., & Gescher, A. (1996). Differential effects of staurosporine analogues on cell cycle, growth and viability in A549 cells. *British journal of cancer*, 74(8), 1199.
- Cramer, L. P. (1999). Role of actin-filamentdisassembly in lamellipodiumprotrusion in motilecellsrevealedusingthedrugjasplakinolide. *Current biology*, 9(19), 1095-1105.
- De La Cruz, E. M., & Pollard, T. D. (1994). Transient kinetic analysis of rhodamine phalloidin binding to actin filaments. *Biochemistry*, 33(48), 14387-14392.
- Dominguez, R. (2004). Actin-binding proteins—a unifying hypothesis. *Trends in biochemical sciences*, 29(11), 572-578.
- Dominguez, R. (2010). Structural insights into *de novo* actin polymerization. *Currentopinion in structuralbiology*, 20(2), 217-225.
- DosRemedios, C. G., Chhabra, D., Kekic, M., Dedova, I. V., Tsubakihara, M., Berry, D. A., & Nosworthy, N. J. (2003). Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiological reviews*, 83(2), 433-473.
- Drees, F., & Gertler, F. B. (2008). Ena/VASP: proteins at the tip of the nervous system. *Current opinion in neurobiology*, 18(1), 53-59.
- Feher, J. J. (2017). *Quantitative human physiology: an introduction*. Academic press.
- Ferron, F., Rebowski, G., Lee, S. H., & Dominguez, R. (2007). Structural basis for the recruitment of profilin–actin complexes during filament elongation by Ena/VASP. *The EMBO journal*, 26(21), 4597-4606.

- Filla, M. S., Schwinn, M. K., Nosie, A. K., Clark, R. W., & Peters, D. M. (2011). Dexamethasone-associated cross-linked actin network formation in human trabecular meshwork cells involves $\beta 3$ integrin signaling. *Investigative ophthalmology & visual science*, 52(6), 2952-2959.
- Fuller, R. W., Cardellina, J. H., Cragg, G. M., & Boyd, M. R. (1994). Cucurbitacins: differential cytotoxicity, dereplication and first isolation from *Gonystyluskeithii*. *Journal of natural products*, 57(10), 1442-1445.
- Galkin, V. E., VanLoock, M. S., Orlova, A., & Egelman, E. H. (2002). A new internal mode in F-actin helps explain the remarkable evolutionary conservation of actin's sequence and structure. *Current biology*, 12(7), 570-575.
- Geeves, M. A., Fedorov, R., & Manstein, D. J. (2005). Molecular mechanism of actomyosin-based motility. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 62(13), 1462-1477.
- Goddette, D. W., & Frieden, C. (1986). Actin polymerization. The mechanism of action of cytochalasin D. *Journal of Biological Chemistry*, 261(34), 15974-15980.
- Goode, B. L., & Eck, M. J. (2007). Mechanism and function of formins in the control of actin assembly. *Annu. Rev. Biochem.*, 76, 593-627.
- Gouin, E., Welch, M. D., & Cossart, P. (2005). Actin-based motility of intracellular pathogens. *Current opinion in microbiology*, 8(1), 35-45.
- Haritunians, T., Gueller, S., Zhang, L., Badr, R., Yin, D., Xing, H., & Koeffler, H. P. (2008). Cucurbitacin B induces differentiation, cell cycle arrest, and actin cytoskeletal alterations in myeloid leukemia cells. *Leukemia research*, 32(9), 1366-1373.
- Hennessey, E. S., Drummond, D. R., & Sparrow, J. C. (1993). Molecular genetics of actin function. *Biochemical journal*, 291(Pt 3), 657.
- Holmes, K. C., Angert, I., Kull, F. J., Jahn, W., & Schröder, R. R. (2003). Electron cryo-microscopy shows how strong binding of myosin to actin releases nucleotide. *Nature*, 425(6956), 423.
- Holzinger, A., & Meindl, U. (1997). Jasplakinolide, a novel actin targeting peptide, inhibits cell growth and induces actin filament polymerization in the green alga *Micrasterias*. *Cell motility and the cytoskeleton*, 38(4), 365-372.
- Hsu, H. S., Huang, P. I., Chang, Y. L., Tzao, C., Chen, Y. W., Shih, H. C., & Chiou, S. H. (2011). Cucurbitacin I inhibits tumorigenic ability and enhances radio chemo

- sensitivity in non small cell lung cancer -derived CD133- positive cells. *Cancer*, 117(13), 2970-2985.
- Hugo, H. J., Wafai, R., Blick, T., Thompson, E. W., & Newgreen, D. F. (2009). Staurosporine augments EGF-mediated EMT in PMC 42-LA cells through actin depolymerisation, focal contact size reduction and Snail1 induction—A model for cross-modulation. *BMC cancer*, 9(1), 235.
- Jacobs, H., Singh, T., Reynolds, W. F., & McLean, S. (1990). Isolation and ¹³C-nmr Assignments of Cucurbitacins from *Cayaponia Angustiloba*, *Cayaponiaracemosa*, and *Gurania subumbellata*. *Journal of natural products*, 53(6), 1600-1605.
- Janmey P. A., Shah J. V., Tang J. X., Stossel T. P. (2004). Actin filaments. *Biophysics Textbook Online*.
- Jordan, M. A., & Wilson, L. (1998). Microtubules and actin filaments: dynamic targets for cancer chemotherapy. *Current opinion in cell biology*, 10(1), 123-130.
- Knecht, D. A., LaFleur, R. A., Kahsai, A. W., Argueta, C. E., Beshir, A. B., & Fenteany, G. (2010). Cucurbitacin I inhibits cell motility by indirectly interfering with actin dynamics. *PLoS One*, 5(11), e14039.
- Langenbach, F., & Handschel, J. (2013). Effects of dexamethasone, ascorbic acid and β -glycerophosphate on the osteogenic differentiation of stem cells in vitro. *Stem cell research & therapy*, 4(5), 117.
- Lavinder, J. J., Hari, S. B., Sullivan, B. J., & Magliery, T. J. (2009). High-throughput thermal scanning: a general, rapid dye-binding thermal shift screen for protein engineering. *Journal of the American Chemical Society*, 131(11), 3794-3795.
- Leach, A. R., Shoichet, B. K., & Peishoff, C. E. (2006). Prediction of protein– ligand interactions. Docking and scoring: Successes and gaps. *Journal of medicinal chemistry*, 49(20), 5851-5855.
- Laemmli, U. K. (1970). SDS-page Laemmli method. *Nature*, 227, 680-5.
- Leavitt, S., & Freire, E. (2001). Direct measurement of protein binding energetics by isothermal titration calorimetry. *Current opinion in structural biology*, 11(5), 560-566.
- Le Bihan, T., & Gicquaud, C. (1991). Stabilization of actin by phalloidin: a differential scanning calorimetric study. *Biochemical and biophysical research communications*, 181(2), 542-547.

- Lee, W. M., & Galbraith, R. M. (1992). The extracellular actin-scavenger system and actin toxicity. *New England Journal of Medicine*, 326(20), 1335-1341.
- Lynch, I., & Dawson, K. A. (2008). Protein-nano particle interactions. *Nano today*, 3(1-2), 40-47.
- Mannherz, H. G., Goody, R. S., Konrad, M., & Nowak, E. (1980). The interaction of bovine pancreatic deoxyribonuclease I and skeletal muscle actin. *European journal of biochemistry*, 104(2), 367-379.
- Medzihradszky, K. F., Campbell, J. M., Baldwin, M. A., Falick, A. M., Juhasz, P., Vestal, M. L., & Burlingame, A. L. (2000). The characteristics of peptide collision-induced dissociation using a high-performance MALDI-TOF/TOF tandem mass spectrometer. *Analytical chemistry*, 72(3), 552-558.
- Miralles, F., & Visa, N. (2006). Actin in transcription and transcription regulation. *Current opinion in cell biology*, 18(3), 261-266.
- Mitchison, T. J. (1992). Compare and contrast actin filaments and microtubules. *Molecular biology of the cell*, 3(12), 1309-1315.
- Mizuno, Y., Makioka, A., Kawazu, S. I., Kano, S., Kawai, S., Akaki, M., & Ohtomo, H. (2002). Effect of jasplakinolide on the growth, invasion, and actin cytoskeleton of *Plasmodium falciparum*. *Parasitology research*, 88(9), 844-848.
- Mobley, P. L., Hedberg, K., Bonin, L., Chen, B., & Griffith, O. H. (1994). Decreased phosphorylation of four 20-kDa proteins precedes staurosporine-induced disruption of the actin/myosin cytoskeleton in rat astrocytes. *Experimental cell research*, 214(1), 55-66.
- Molina, D. M., Jafari, R., Ignatushchenko, M., Seki, T., Larsson, E. A., Dan, C., ... & Nordlund, P. (2013). Monitoring drug target engagement in cells and tissues using the cellular thermal shift assay. *Science*, 341(6141), 84-87.
- Nooren, I. M., & Thornton, J. M. (2003). Diversity of protein–protein interactions. *The EMBO journal*, 22(14), 3486-3492.
- Paunola, E., Mattila, P. K., & Lappalainen, P. (2002). WH2 domain: a small, versatile adapter for actin monomers. *FEBS letters*, 513(1), 92-97.
- Pollard, T. D., & Borisy, G. G. (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*, 112(4), 453-465.
- Pollard, T. D. (2007). Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 36, 451-477.

- Prentki, M., Chaponnier, C., Jeanrenaud, B., & Gabbiani, G. (1979). Actin microfilaments, cell shape, and secretory processes in isolated rat hepatocytes. Effect of phalloidin and cytochalasin D. *The Journal of cell biology*, 81(3), 592-607.
- Rawns JD. (1989)*Biochemistry (International Edition)*: 1087-1108.
- Sampath, P., & Pollard, T. D. (1991). Effects of cytochalasin, phalloidin and pH on the elongation of actin filaments. *Biochemistry*, 30(7), 1973-1980.
- Sayers, Z., Koch, M. H. J., Bordas, J., & Lindberg, U. (1985). Time-resolved X-ray scattering study of actin polymerization from profilin. *European Biophysics Journal*, 13(2), 99-108.
- Sörensen, P. M., Iacob, R. E., Fritzsche, M., Engen, J. R., Briher, W. M., Charras, G., & Eggert, U. S. (2012). The natural product cucurbitacin E inhibits depolymerization of actin filaments. *ACS chemical biology*, 7(9), 1502-1508.
- Steely, H. T., Browder, S. L., Julian, M. B., Miggans, S. T., Wilson, K. L., & Clark, A. F. (1992). The effects of dexamethasone on fibronectin expression in cultured human trabecular meshwork cells. *Investigative ophthalmology & visual science*, 33(7), 2242-2250.
- Tang, Y., Zeng, X., & Liang, J. (2010). Surface plasmon resonance: an introduction to a surface spectroscopy technique. *Journal of chemical education*, 87(7), 742-746.
- Tsai, W. C., Tang, F. T., Wong, M. K., & Pang, J. H. S. (2003). Inhibition of tendon cell migration by dexamethasone is correlated with reduced α -~~smooth~~actin gene expression: A potential mechanism of delayed tendon healing. *Journal of Orthopaedic Research*, 21(2), 265-271.
- Van Kester, M. S., Out-Luiting, J. J., Peter, A., Willemze, R., Tensen, C. P., & Vermeer, M. H. (2008). Cucurbitacin I inhibits Stat3 and induces apoptosis in Sezary cells. *Journal of Investigative Dermatology*, 128(7), 1691-1695.
- Vartiainen MK. (2008) Nuclear actin dynamics-from form to function. *FEBS Letters*.582:2033-2040.
- Verme, T. B., Velarde, R. T., Cunningham, R. M., & Hootman, S. R. (1989). Effects of staurosporine on protein kinase C and amylase secretion from pancreatic acini. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 257(4), G548-G553

- Visegrády, B., Lőrinczy, D., Hild, G., Somogyi, B., & Nyitrai, M. (2004). The effect of phalloidin and jasplakinolide on the flexibility and thermal stability of actin filaments. *FEBS letters*, 565(1-3), 163-166.
- Wang, X., Tanaka, M., Peixoto, H. S., & Wink, M. (2017). Cucurbitacins: elucidation of their interactions with the cytoskeleton. *PeerJ*, 5, e3357.
- Wegner, A., & Isenberg, G. (1983). 12-fold difference between the critical monomer concentrations of the two ends of actin filaments in physiological salt conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 80(16), 4922-4925.
- Wehland, J., Osborn, M., & Weber, K. (1977). Phalloidin-induced actin polymerization in the cytoplasm of cultured cells interferes with cell locomotion and growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(12), 5613-5617.
- Xing, C. Y., Saleem, M. A., Coward, R. J., Ni, L., Witherden, I. R., & Mathieson, P. W. (2006). Direct effects of dexamethasone on human podocytes. *Kidney international*, 70(6), 1038-1045.
- Xu, Y., Moseley, J. B., Sagot, I., Poy, F., Pellman, D., Goode, B. L., & Eck, M. J. (2004). Crystal structures of a Formin Homology-2 domain reveal a tethered dimer architecture. *Cell*, 116(5), 711-723.
- Zhang, Y., Ouyang, D., Xu, L., Ji, Y., Zha, Q., Cai, J., & He, X. (2011). Cucurbitacin B induces rapid depletion of the G-actin pool through reactive oxygen species-dependent actin aggregation in melanoma cells. *Acta Biochim Biophys Sin*, 43(7), 556-567.
- Zhou, J., Liu, M., Chen, Y., Xu, S., Guo, Y., & Zhao, L. (2019). Cucurbitacin B suppresses proliferation of pancreatic cancer cells by ceRNA: Effect of miR-146b-5p and lncRNA *NEAT1* on cellular physiology. *Journal of Cellular Physiology*, 234(4), 4655-4667.

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI
AKTİN MODELİNDE PROTEİN-LİGAND ETKİLEŞİMLERİNİN
YENİ YAKLAŞIMLAR ÇERÇEVESİDE İNCELENMESİ

ORIJINALLIK RAPORU

%6

BENZERLİK ENDEKSİ

%2

İNT ERNET
KAYNAKLARI

%2

YAYINLAR

%6

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Kemal Alper	Soyadı	ÖNSÜ
Doğ.Yeri	Kadıköy/İstanbul	Doğ.Tar.	01.09.1993
Email	alperonsu@gmail.com	Uyruğu	TC

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Lisans	Sabancı Üniversitesi	2015
Lise	Sakıp Sabancı Anadolu Lisesi	2011

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Ar-Ge Sorumlusu	YUTEG Biyoteknoloji	2018-2019

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi		(TOEFL) 104

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	88,89283	89,21063	75,10476
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Office Programları	İyi
Graphpad	İyi
Image J	iyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

30th Annual Biophysics Congress (International), ÖNSÜ K.A. Hacıosmanoğlu E. Varol B. Bektaş M. *Development of thermal shift assay via nucleotide binding on actin cytoskeleton*. 10-13 Ekim 2018, Bodrum.

Özel İlgi Alanları (Hobileri):

Felsefe