

SOĞAN TOHUMU KÖKLERİ VE SIÇAN (RAT) KARACİĞERİNDEN
HİSTON PROTEİNLERİN SAFLAŞTIRILMASI
VE
ELEKTROFORETİK ÖZELLİKLERİ

Hikmet Geçkil

İnönü Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav
Yönergesinin

Biyoloji Anabilim Dalı İçin Öngördüğü
BİLİM UZMANLIĞI TEZİ
olarak Hazırlanmıştır.

MALATYA

Nisan-1988

İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
GENEL KÜTÜPHANESİ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne

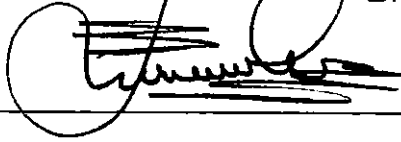
İş bu çalışma, jürimiz tarafından BİYOLOJİ
Anabilim Dalında BİLİM UZMANLIĞI TEZİ olarak
kabul edilmiştir.

Başkan




Prof. Dr. A. Nihat BOZCUK

Üye



Prof. Dr. Engin M. GÖZÜKARA

Üye


Yrd. Doç. Dr. Kayahan FIŞKIN

ONAY

Yukardaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait
olduğunu onaylarım.

...../...../ 1988

Prof. Dr. A. Nihat BOZCUK
Enstitü Müdürü



Anneme ve Babama

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, İnönü Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji Anabilim Dalında Yapılmıştır.

Çalışmamın planlanmasında, yürütülmesinde ve değerlendirilmesinde yapıcı eleştirileriyle katkılarını esirgemeyen tez hocam İnönü Üniversitesi Rektörü Sayın Prof. Dr. Engin M. GÖZÜKARA'ya teşekkür ederim.

Ayrıca bu tezin hazırlanmasında öneri ve eleştirileriyle yardımını gördüğüm Biyoloji Bölümü Başkanı Sayın Prof. Dr. A. Nihat BOZCUK'a ve tezin bir kısmının hazırlanmasında her türlü laboratuvar imkanlarını ve yardımlarını esirgemeyen Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Doç. Dr. Erol AKSÖZ'e teşekkür etmeyi borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
TEŞEKKÜR	V
TABLolar DİZİNİ	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ	IX
1. GİRİŞ ve GENEL BİLGİ	1
1.1. Giriş	1
1.2. Genel Bilgi	2
1.2.1. Önceki Çalışmalar	5
1.2.2. Histonların İzolasyon Çalışmaları	8
1.2.3. Kromatin ve Nukleozomal Yapının Oluşumunda "Histonlar"	12
1.2.4. Histon Proteinlerin Amino Asit Kompozisyonları ve Moleküler Özellikleri	16
1.2.5. Histon Biyosentezi	20
1.2.6. Histonların Fonksiyonları	21
1.2.6.1. RNA Sentezi Üzerine Histonların Etkisi	22
1.2.6.2. DNA Sentezi Üzerine Histonların Etkisi	24
1.2.6.3. Hücre Fonksiyonu Üzerine Diğer Etkileri ...	24
1.2.7. Histonların Enzimatik Modifikasyonları	26
1.2.7.1. Histonların Metilasyonu	26
1.2.7.2. Histonların Asetilasyonu	27
1.2.7.3. Histonların Fosforilasyonu	29
1.2.7.4. H3 Histonunda tiol/disülfid Değişimleri ...	30
2. MATERYAL ve METOD	32
2.1. Materyal	32
2.2. Metod	32
2.2.1. Soğan Tohumu Köklerinden Total Histon İzolasyonu	32

	<u>Sayfa</u>
2.2.2. Sıçan (rat) Karaciğerinden Histonların İzolasyonu	35
2.3. Elektroforetik Metod	38
2.3.1. Histon Proteinlerin Disk Jel Elektroforezi .	38
2.3.2. Histon Proteinlerin Slab Jel Elektroforezi .	41
2.4. Kullanılan Kimyasal Maddeler	42
3. BULGULAR	43
4. TARTIŞMA ve SONUÇ	48
ÖZET	50
SUMMARY	51
BİBLİYOGRAFYA	52

TABLOLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
1.1. Nuklear proteinlerin sınıflandırılması	3
1.2. Histon proteinlerin farklı sınıflandırma şekilleri	4
1.3. Dana timusu histon fraksiyonlarının amino asit kompozisyonu	17

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
1.1. H3-H4 tetrameri ile 2 adet H2A-H2B dimerinin oluşturduğu muhtemel nukleozomal kor modeli ...	13
1.2. Histon proteinlerin nukleozomal yapılarla DNA'yı paketlemeleri	15
2.1. Soğan tohumu köklerinden histon proteinlerin ekstraksiyonunun şematik özeti	34
2.2. Sıçan karaciğerinden histon proteinlerin ekstraksiyonunun şematik özeti	36
3.1. Soğan tohum kökü, sıçan karaciğeri ve dana timusu histon proteinlerinin % 15 poliakrilamid slab jel elektroforezleri	44
3.2. Sıçan karaciğeri histon proteinlerinin poliakrilamid disk jel elektroforezleri	45
3.3. Sıçan karaciğeri histon proteinlerinin % 7.5 poliakrilamid disk jeldeki ayrılımları ..	46
3.4. Sıçan karaciğeri histon proteinlerinin % 7.5 jel konsantrasyonlu poliakrilamid jel sistemindeki elektroforetik görünüşleri	47

1. GİRİŞ ve GENEL BİLGİ

1.1. Giriş

Nükleer proteinlerin önemli bir grubunu oluşturan histonlar, bütün yüksek organizmaların hücre nükleuslarında deoksiribonükleik asit (DNA) ile assosye durumda bulunurlar (Fambrough and Bonner, 1966; Thomas and Butler, 1983).

Bugün, bu proteinlerin daha çok yapısal görevler üstlendikleri kabul edilmektedir. Ayrıca genetik materyal (DNA)' in paketlenmesi ve kararlılığında, gen ifadesinin kontrolünde, ve daha bir çok hücre sel fonksiyonda bu proteinlerin önemli rolleri vardır (D'Anna and Isenberg, 1973; Padilla and McCarty, 1982).

Histon proteinlerin bu yapısal ve işlevsel özelliklerinin araştırılabilmesi için, öncelikle bu proteinlerin saflaştırılması gerekir.

Son yıllarda geliştirilen teknikler sayesinde, çok hücrelilerden tek hücrelilere kadar bir çok eukaryot organizmadan oldukça saf halde elde edilebilen histonlar, geniş bir şekilde araştırılmaktadırlar (Van der Westhuyzen, and Von Holt, 1971; Kornberg and Thomas, 1974; Jordano et al., 1984).

Hücre için oldukça önemli fonksiyonları olan bu proteinlerin farklı materyallerden değişik metodlarla saflaştırılıp elektroforetik özelliklerinin araştırılması bu tezin başlıca amacını oluşturmuştur.

Bu çalışmada histonların saflaştırılması için, materyal olarak soğan tohumu genç kök uçları ve siyan karaciğeri alınmıştır. Mitotik aktivitesi yüksek böyle doku ve sistem-

lerde histon, DNA ve RNA gibi nuklear elementlerin sentezinin de aktif olacağı düşüncesiyle bu materyaller seçilmiştir.

Soğan tohumu kökleri için bütün dokudan total histon ekstraksiyonu, sıçan (rat) karaciğerinde ise kimyasal fraksiyonlama yöntemi ile histon proteinler saflaştırılmıştır.

Saflaştırılmış olan histonlar, farklı konsantrasyonlardaki değişik jel sistemlerinde vermiş oldukları elektroforetik bantların elektroforetogramları yapılarak analiz edilmişlerdir.

1.2. Genel Bilgi

Nuklear proteinlerin önemli bir grubunu oluşturan histonların keşfinden bu yana, bir asırdan daha fazla bir süre geçmesine rağmen, bu proteinlerin kesin biyolojik fonksiyonları hâla tam olarak bilinmemektedir (Hnilica, 1972).

Kromatin ve nukleuslar üzerinde yapılan biyokimyasal çalışmalar, bu yapılarda farklı özellik ve fonksiyonlara sahip bir çok protein ve enzimin varlığını ortaya koymuştur (Tablo 1.1.). Kromatin kuru ağırlığının % 60-70'ini oluşturan bu proteinlerin büyük kısmı deoksiribonukleoprotein (DNP) şeklinde bulunur. Nuklear proteinler esas olarak üç ana grup altında toplanabilirler. Bunlar; protamin ve histonları içeren bazik nuklear proteinler, asidik nuklear proteinler ve nuklear enzimlerdir (Busch, 1965).

Protaminler, pek çok balık sperminde bulunan bazik proteinler olup, kapsamlarının % 50'den fazlasını arginin

amino asidi oluşturmaktadır. Protaminlerin, spermada bulunan DNA'yı dayanıklı kılıp sıkıca paketlediği ve taşınabilir yapıda tuttuğu kabul edilmektedir (Gözükara, 1978).

Asidik proteinler, en çok nuklear komponentler arasında dağılım gösterirler (Busch, 1965).

Tablo 1.1. Nuklear proteinlerin sınıflandırılması (Busch, 1965).

BAZİK NUKLEAR PROTEİNLER

Protaminler

Histonlar

Lizince çok zengin histonlar

lizince zengin histonlar

Arginince zengin histonlar

ASİDİK NUKLEAR PROTEİNLER

Nuklear öz proteinleri

Çözünebilir proteinler

Ribozomal proteinler

Nuklear globulinler

Kromatinin asidik proteinleri

Asidik nukleolar proteinler

Glutamik asitce zengin nuklear proteinler

NUKLEAR ENZİMLER

Nukleik asit sentez enzimleri

DNA polimeraz

RNA polimeraz

Glikolitik enzimler

Oksidatif enzimler

Hidrolik enzimler

Protein sentez enzimleri

Nuklear enzimlerin çoğu, hücrede nukleik asitlerin biyosentezi ile ilgilidir. Nuklear enzimlerden DNA po-

limeraz ve RNA polimeraz, hücrenin duplikasyon ve transkripsiyon aktivitesinde anahtar rol oynarlar. Yapılan çalışmalar, histonların bu her iki enzimatik reaksiyonu baskıladıklarını ortaya çıkarmıştır (Busch, 1965).

Histon olmayan proteinler, organizmadaki hücrelerin metabolizma durumlarına ve gen faaliyetine göre değiştikleri halde, DNA ile histon miktarı bütün hücrelerde aynı kalmaktadır (Deniz, 1985).

Yüksek derecede katyonik olan histonlar, bazik karakterli lizin ve arginin amino asitleri bakımından zengin (total amino asitlerinin yaklaşık % 25'ini bu iki amino asit kapsar), molekül ağırlıkları nisbeten düşük (11.000-21.000) proteinlerdir. Çoğu zaman, yapıya giren bu iki amino aside göre (lizin/arginin oranı) biribirinden ayrılan bu proteinler, presipitasyon, elektroforetik, kromatografik özellikleri gibi başka parametrelere göre de sınıflandırılırlar (Tablo 1.2.). Ancak, bugüne kadar yapılan hemen tüm çalışmalarda histon proteinler beş büyük grup içerisinde toplanmışlardır (Hnilica, 1972; Bonner, 1980).

Tablo 1.2. Histon proteinlerin farklı sınıflandırma şekilleri (Phillips, 1971'den değiştirilerek).

					Referanslar
H1	H2B	H2A	H4	H3	Bonner, 1980
F1	F2b	F2a2	F2a1	F3	Phillips, 1971
KAP	KAS	LAK	GRK	ARE	D'Anna et al, 1974*
I	I Ib2	I Ib1	IV	III	Hnilica, 1972
lizinince-zengin			arginince-zengin		
histonlar			histonlar		

*Bu sınıflamada histonlar, yapılarında en fazla bulunan üç

amino aside göre (K=lizin, A=alanin, S=serin, L=lösin, G=glisin, R=arginin, E=glutamik asit, P=prolin) karakterize edilmişlerdir (Hnilica, 1972).

Son yıllarda bilim dünyasında en çok kullanılan terminoloji, özellikle "H" ile yapılan sınıflamadır (Bonner, 1980). Bundan dolayı, bu çalışmada da histon protinler bu terminolojiye göre karakterize edilmişlerdir.

1.2.1. Önceki Çalışmalar

Histonlar ve nukleustaki diğer substanslar üzerine ilk çalışmalar, Strasbourg Üniversitesinde Hoppe-Seyler tarafından yapılmıştır. Ancak, histon, DNA ve protaminler üzerine ilk başarılı çalışmalar aynı zamanda Hoppe-Seyler'in öğrencileri olan, Friedrich Miescher (1874) ve Albrecht Kossel (1884) tarafından yapılmıştır (Hnilica, 1972).

Kossel(1884), kümes hayvanlarından (kaz, tavuk gibi) almış olduğu kırmızı kan hücrelerini suya koyduğunda, hücre membranının eriyip geriye sadece erimeyen nukleusların kaldığını görmüştür. Bu tarihten önce Miescher (1869) irin hücre nukleuslarından izole ettiği fosforca zengin maddeleri eriyebilen ve erimeyen "nüklein" olarak adlandırmıştır (Busch, 1965; Hnilica, 1972). Miescher daha sonra alabalık (salmon) spermasından izole ettiği nüklein (DNA) maddesinden azotca zengin başka maddeler ayırarak bunlara "protamin" adını vermiştir. Ancak, protaminlerin arginin amino asidi bakımından zengin, basit yapılı bazik proteinler oldukları Kossel tarafından saptanmıştır. Bununla ber-

aber Miescher, bu alandaki çalışmalara nüklein olarak adlandırdığı DNA'yı ve protaminleri keşfederek büyük katkıda bulunmuştur (Hnilica, 1972).

Hücre nukleusları ve özellikle de nukleus proteinleri üzerine önemli çalışmalar yapan, bu proteinlerin yapılarını, özelliklerini, fonksiyonlarını ve DNA ile ilişkelerini araştırmış olan Kossel, bugün nuklear proteinler alanının en büyük öncüsü olarak kabul edilmektedir. Kossel, protaminlerden daha kompleks yapıda olan ve nukleik asitle assosye durumdaki maddelere "histon" adını vermiştir. Buldukları yere göre pek kullanışlı olmayan bu isim, Kossel tarafından doku (hist-) ve pepton (-one) isimlerinden türetilmiştir (Busch, 1965).

İlk defa, seyreltik (dile) hidroklorik asitle ekstrakte edilen nukleuslardan Kossel (1884) tarafından izole edilmiş olan histon proteinler, bugün bile bir çok çalışmada onun geliştirmiş olduğu temel tekniklerle izole edilmektedir (Phillips, 1971; Hnilica, 1972).

Bütün bu çalışmalarından dolayı 1910 yılında Nobel dl verilen Kossel'in, 1927 yılında ölümünden sonra histon proteinler üzerine yapılan çalışmalar bir duraklama devresine girmiştir. Ancak, 1940'larda Edgar ve Ellen Stedman tarafından yapılan çalışmalar, bu konuya yeniden ilgi duyulmasını sağlamıştır. Bu araştırmacılar, histonların gen inhibitörleri olarak fonksiyon gösterdiklerini ileri sürdüler. Gerçekten de daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalar, histonların gen aktivitesini (RNA sentezi) durduran proteinler olduklarını ortaya koymuştur (Hnilica, 1972).

E. ve E. Stedman'ın, farklılaşma ve gelişmede histonların gen represörleri olarak rol oynadıkları yolundaki görüşleri, daha sonra Bonner ve Allfrey tarafından da desteklenmiştir (Lehninger, 1976).

Allfrey ve ark. (1963), izole edilmiş nukleuslardan tripsinle histonların bertaraf edilmesi halinde, RNA sentezinin önemli miktarda artış gösterdiğini kaydetmişlerdir. Aynı şekilde Bonner ve ark. yine 1960'larda biyokimyasal tekniklerle hücresiz bir sistem (in vitro) içinde yapay olarak RNA sentezini başarmışlardır. Araştırmacılar bir test tüpü içerisine DNA solüsyonu, RNA polimeraz ve mRNA sentezi için gerekli nukleotidleri koymuşlar ve histonların yokluğu halinde RNA sentezinin oldukça artış gösterdiğini gözlemişlerdir. Histonların ortama ilavesi halinde ise, RNA sentezinde tekrar azalma görülmüştür (Hnilica, 1972).

Bir çok çalışmada, kromatindeki histon/DNA oranının eşit olduğu kaydedilmiştir. Bu oran, aynı zamanda gen aktivitesi (RNA sentezi) üzerinde maksimum inhibisyon yaratır (Busch, 1965). Kromatindeki histon olmayan proteinlerin (non-histon proteinler), DNA'ya oranı ise 0.5-2.0 arasında değişmektedir. Kromatindeki RNA miktarı daha çok DNA'nın % 10'u kadar olmakla beraber, DNA'nın % 30'u kadar oranlara çıkabileceği bulunmuştur (Phillips, 1971; Günalp ve ark., 1986).

Yapılan çalışmaların hemen hepsinde, histon proteinlerin daha çok eukaryot organizmaların kromatin ve nukleuslarında buldukları belirlenmiştir. Özel amino asit kompozisyonlarından dolayı (amino asit kompozisyonlarının

yaklaşık % 25'i bazik karakterlidir) seyreltik asit ve tuz çözeltilerinde eriyebilen histonlar, son yıllarda geliştirilen özel teknikler sayesinde oldukça saf halde elde edilebilmekte, yapı ve fonksiyonları daha iyi bir şekilde araştırılabilmektedir (Hnilica, 1972).

1.2.2. Histonların İzolasyon Çalışmaları

Histonların ilk izolasyonlarının çoğu Kossel ve ark.(1884) tarafından keşfedilen ve hâla bir çok çalışmada kullanılan HCl veya H_2SO_4 gibi kuvvetli asitlerin seyreltik çözeltilerinde bu proteinlerin erime özelliklerinden yararlanılarak yapılmaktadır. Histon proteinlerin izolasyonunda kontaminasyonu önlemek için çoğu kez hücre sel sitoplazmanın ortadan kaldırılması gerekir. Çünkü, ribozomal orijinli, seyreltik asitlerde eriyebilen ve nuklear histonlardan daha büyük miktarlarda bulunan sitoplazmik proteinleri ortadan kaldırmadan, iyi bir histon preparasyonu yapmak mümkün değildir (Hnilica, 1972).

Birçok bitki ve hayvan hücresi nuklear kütleyle kıyasla, büyük miktarda sitoplazma içermektedir. Bu tür hücrelerde (karaciğer, böbrek, embriyonal hücreler, çeşitli bitki fideleri, vb.) nukleuslar, bazı özel tekniklerle (izotonik veya hipertonic şükrozla santrifügasyon, seyreltik organik asitler veya konsantre tuz çözeltileri ile muamele gibi) doku homojenatından (sitoplazma bertaraf edilerek) izole edilebilirler. Çoğu zaman, belli bir hücre türü için uygun bir izolasyon tekniği, diğer tür hücreler için tamamen uygunsuz olabilir. Bu nedenle, belli bir hücre tipi i-

çin nukleus izolasyonu yöntemi seçilirken temkinli olunmalıdır (Hnilica, 1972).

Histonların izolasyonunda en çok kullanılan yöntem, nukleusların izolasyonu ile deoksiribonukleoproteinden bu proteinleri ayırma yöntemidir (Phillips, 1971). Histonların izolasyonu için bu yöntemin (nukleus izolasyonu) tercih edilmesi, daha çok bu proteinleri sitoplazmik kontaminantlardan korumak içindir (Gözükara, 1978). Genellikle 0.14 M NaCl ile bir çok kez yıkanıp toplanan DNP (deoksiribonukleoprotein) kompleksinden ribozomal orijinli proteinler, nötral pH'daki "tris" tamponu ile bertaraf edilirler. 0.14 M NaCl ile yapılan muameleden sonra, 0.35 M NaCl ile yapılacak bir yıkama ekstra non-histon proteinleri uzaklaştırmak için uygun bir yöntemdir. Ancak, 0.4-0.5 M NaCl gibi daha yüksek konsantrasyonlarla yapılacak bir muamele, lizince zengin histonların da ortamdan uzaklaştırılmasına neden olur. Bir çok histon preparasyonunda 0.14 M NaCl gibi bir konsantrasyonun tercih edilmesinin nedeni, bu değer in onlar için minimum erime noktası olmasıdır (Phillips, 1971).

Bazı nuklear preparasyonlarda verimin yüksek olması için, çoğu zaman sitrik asit veya asetik asit gibi daha zayıf organik asitlerle beraber Nonidet, Triton X-100 vb. non-iyonik deterjanlar kullanılır. Histon fraksiyonlarının ayırımında kullanılabilen böyle organik asitler, nukleus izolasyonu için pek tavsiye edilmemişlerdir. Ayrıca nukleusların yukardaki gibi deterjanlara maruz kalması halinde, hem bazik ve hem de asidik proteinlerde kısmi bir azalma-

nın olduğu saptanmıştır (Hnilica, 1972; Hames and Rickwood, 1983).

Histon proteinlerin izolasyonu için nukleuslar kullanılacaksa, bu yöntemde ilk olarak genellikle 0.01 M sodyum sitratla tamponlanmış izotonik tuz (0.14M) ile, daha sonra Tris-HCl tamponu (0.1 M, pH 7.4) ile homojenizasyon ve ekstraksiyon tavsiye edilmektedir. Tuz-sitrat solusyonu, daha sonra Widholm ve Bonner (1966) tarafından modifiye (0.15 M NaCl, 0.015 M sodyum sitrat, pH 7.4) edilerek kullanılmıştır. Hla, histon proteinler üzerine yapılan bir çok çalışmada bu solusyona SSC (standart saline citrat) adı altında başvurulmaktadır (Hnilica, 1972).

Standart tuz-sitrat solusyonu ve Tris-HCl ile homojenizasyonu ve ekstraksiyonu yapılan nukleuslardan önemli miktarda "nuklear öz" proteini uzaklaştırılırken, asit içinde eriyebilen bir kısım proteinler, histonların izolasyonu esnasında bu proteinlerin kontaminasyonuna sebep olurlar (Johns and Forrester, 1969).

Histonların bu asit solubl kontaminantlarını bertaraf etmek için, çoğu zaman kuvvetli tuz (0.3-0.35 M) solusyonları tavsiye edilmektedir. Ancak bu konsantrasyonun 0.4 M yapılması durumunda, histon ekstraksiyonunda önemli kayıplar olduğu görülmüştür (Hnilica, 1972).

Johns (1960), tuz solusyonu ve tamponla yıkanmış nuklear kütleye % 80'lik etanol ilavesi halinde, asit solubl proteinlerin histonları kontaminasyonunda önemli ölçüde azalma yarattığını kaydetmiştir. Nisbeten basit konfor-

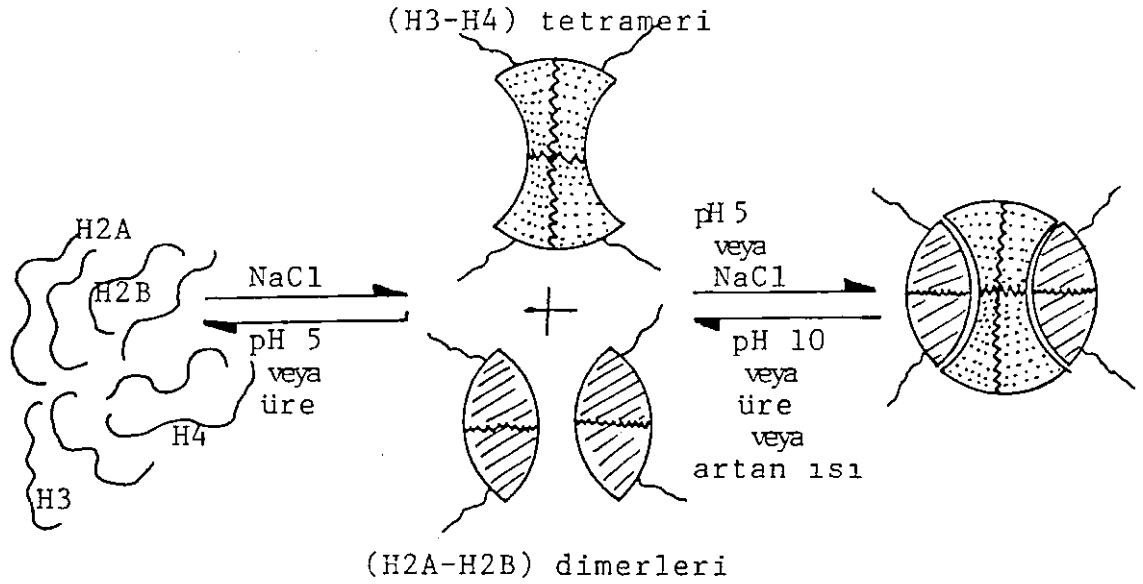
masyonlarından dolayı histonlar, proteolitik enzimlerden kolayca etkilenirler. Bu nedenle izolasyonları esnasında, önemli ölçüde bozunmaya ve kayba uğrarlar. Histonlar, bu etkilerden DNA ile yaptıkları birleşmeler sayesinde kısmen korunurlarsa da, nötral veya az alkali pH'larda kromatin komplekslerinden ayrılımları esnasında hızlı bir biçimde bozunabilirler. Ancak, biraz asidik pH'lara doğru olan bir değişim (pH 5.0-6.0), histonlar üzerinde bu etkiyi önemli ölçüde azaltır. Proteolitik bozunmayı hemen hemen ortadan kaldırdığı için, histonların verimli bir ekstraksiyonunu yapmakta HCl veya H₂SO₄ gibi kuvvetli asitlere mutlaka ihtiyaç vardır. Daha zayıf asitlerin (sitrik asit, asetik asit, perklorik asit, H₃PO₄, HCOOH, vb.) kullanılması, bu proteinlerde kısmi kayba neden olur (Hnilica, 1972).

Bu güne kadar dana timusu (Johns, 1964; 1967), tavuk eritrositleri (Johns, 1964), bezelye bitkisinin çeşitli kısımları (Fambrough and Bonner, 1966; 1968), soğan tohumu kökleri (Moreno et al., 1985), çeşitli sıçan dokuları (Hnilica, 1972; Branson et al., 1975), çekirge (Berdinkov and Gorel, 1975), doku kültürü hücreleri (Hohmann, 1980), Myxomycetes'lerden *Physarum polycephalum* (Mende et al., 1983), tek hücreli Afrika uyku hastalığı etmeni *Trypanosoma* sp. (Hecker and Gander, 1985), deniz süngeri *Geodia cydonium* (Dawes et al., 1983), nematod (Vanfleteren, 1987) vb. biribirinden oldukça farklı bir çok eukaryot organizmadan histon proteinlerin izolasyonu yapılmıştır.

1.2.3. Kromatin ve Nukleozomal Yapının Oluşumunda "Histonlar"

Histon proteinlerin bugün bilinen en önemli fonksiyonlarından birisi DNA'yı paketleme özellikleridir. Bunu da kromatinde meydana getirdikleri, "nukleozom" adı verilen oluşumlarla başarırlar. Kromatinin bu bazik alt birimleri, yüksek orgnizmaların hücre nukleuslarında kromatin fibrillerini düzenli bir şekilde paketlemiş durumdadır. Her alt ünite (nukleozom) DNA'nın 200 baz çiftlik bir parçası ile, "kor histonları" olarak bilinen H2A, H2B, H3 ve H4 histonların her birinin ikişer monomerini (oktamer yapı) ve bir adet H1 monomerini ihtiva eder (Kornberg, 1974; Thomas and Butler, 1977; Bonner, 1980). Bununla beraber, bu bazik alt birimlerdeki 200 baz çifti sabit değildir. Örneğin, Physarum polycephalum'da 170-190 arasında baz çifti bulunurken, bu sayı deniz kestanesi sperminde 260 baz çiftlik DNA'ya kadar çıkabilmektedir. Ancak, genelde komple nukleozom yapısına katılan DNA, 180-200 baz çifti arasındadır (Mende, 1983; Lewin, 1983).

D'Anna ve Isenberg (1974), dört büyük histon türünün (kor histonları), hidrofobik C-terminal peptidleri sayesinde biribirleriyle sıkı bir ilişkide olduklarını göstermişlerdir. Burada, histonların interaksiyonunda belli bir hiyerarşi söz konusudur. Kor histonları olan, H2A ile H2B arasında bir dimer (H2A-H2B) form, H3 ve H4 arasında da daha kuvvetli bir tetramer (H3-H4)₄ form oluşur. Ayrıca, nukleozom yapısı oluşturulurken bu formlar arasında da kuvvetli veya zayıf interaksiyonlar ortaya çıkar (Şekil 1.1.).



Şekil 1.1. H3-H4 tetrameri ile 2 adet H2A-H2B dimerinin oluşturduğu muhtemel nukleozomal kor modeli (Bonner, 1980).

H1 histonu bir kor histonu olmayıp, daha çok iki nukleozom arasında "bağlayıcı" (linker) veya "ara" (spacer) DNA adı verilen, yaklaşık 50-55 baz çiftlik DNA ile assosye durumda bulunur. Nukleozomun temel yapısını oluşturan kor histonları (H2A, H2B, H3 ve H4) ise, yaklaşık olarak 145 baz çiftine karşılık gelirler. Böylece, kromatinin alt birimleri olan nukleozomların yapısına kor histonlarından ikişer monomer ve bir adet H1 molekülü katılır. Yani, kromatindeki histonlar arasında 1:2:2:2:2 şeklinde bir oran vardır (Camerini et al., 1976; Bonner, 1980; King, 1985).

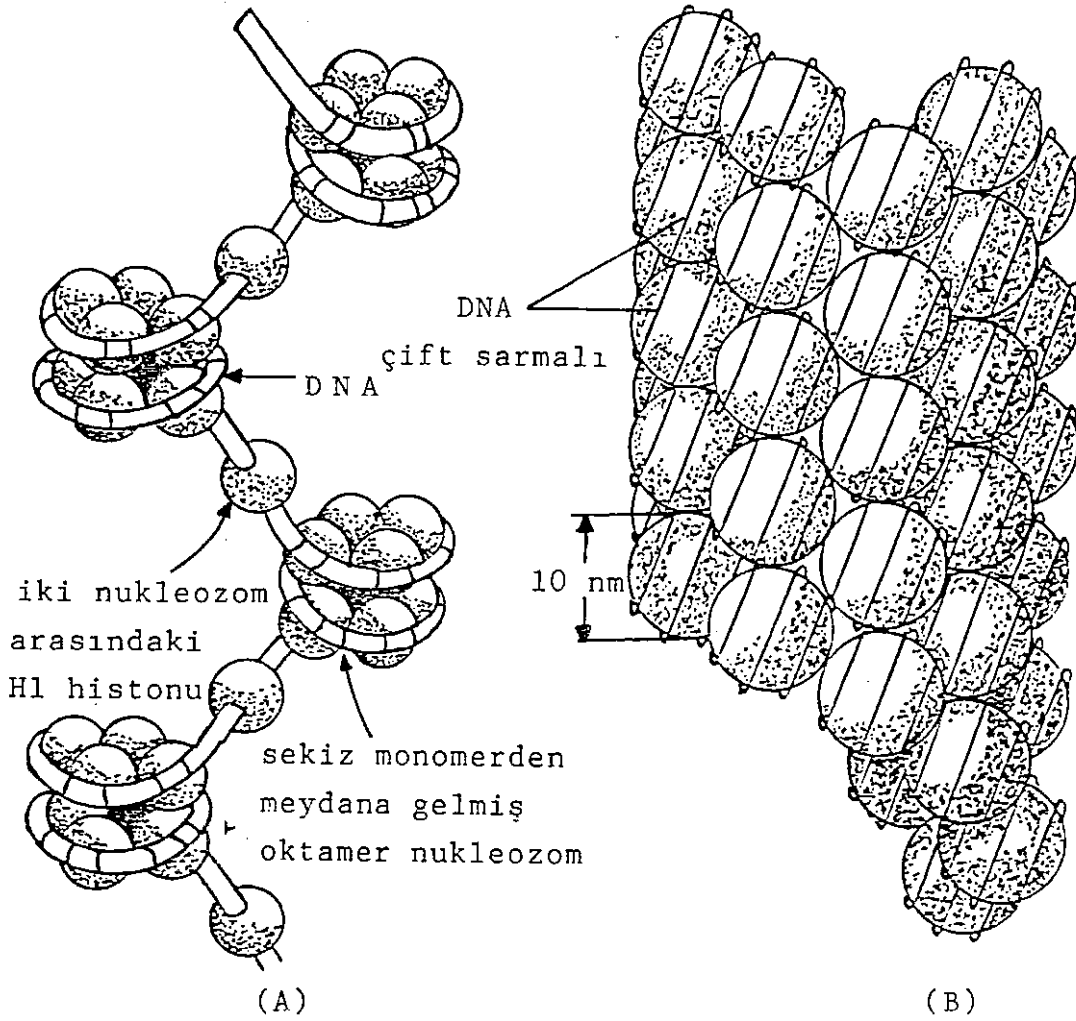
Kornberg ve Noll (1977), nukleazlarla kromatinin 200 baz çiftine sahip düzenli parçalara bölündüğünü gösterdiler. Kromatin yapısının temelini oluşturan bu parçaların birbirine, H1 molekülünün assosye olduğu bağlayıcı DNA'lar vasıtası ile "inci dizisi" gibi bağlı oldukları, Griffith (1975)'in başarılı elektron mikroskobu çalışmaları ile ortaya konmuştur (Camerini et al., 1976; Bonner, 1980; Kumar, 1984).

İki nukleozom arasındaki bağlayıcı DNA üzerinde bulunan histon H1'in asıl rolünün, düzenli kromatin yapısını korumak olduğu gösterilmiştir. Yüksek derecede düzenli bir yapı, aynı zamanda kromatinin transkripsiyonal aktivitesinde de önemli rol oynar. Şöyle ki, histon H1 moleküllerinin kromatinden uzaklaştırıldıkları zaman, aktif kromatinin kıvrımlarının açılması sonucu transkripsiyonal aktivitenin düştüğü görülmüştür (Hannon et al., 1984).

Yapılmış olan X-ışını kırılım ve elektron mikroskopu çalışmaları, uzun kromatin fibrilleri boyunca dışarıya doğru çıkıntı yapmış (inci dizisi gibi) tekrarlanan yapıların bulunduğunu ortaya koymuştur. Bu boncuksu yapılar, bir adet H4-H3 tetrameri ve biribirinden bağımsız iki adet H2a-H2b dimeri içerirler. Yaklaşık olarak 146 baz çifti içeren DNA, bu histonlar (kor histonları) etrafında iki tam dönüşle sarılı durumdadır (Şekil 1.2.). H1 histon molekülü ise, iki nukleozom arasındaki "bağlayıcı DNA" bölgesinde bulunur.

(Kornberg and Thomas, 1974; Caron and Thomas 1981).

Artık şimdi çok iyi bilinmektedir ki, ilk defa Kornberg (1974) tarafından ileri sürülmüş olan model, kromatindeki unit organizasyonun temelini teşkil etmektedir. Bu unit organizasyon, yaklaşık 200 baz çiftinden oluşan bir DNA parçası tarafından çevrilen, oktamerik kor histonu ile beraber bir adet H1 molekülü içeren bir nukleoprotein partikülüdür. Nukleozom olarak adlandırılan bu partiküller, biribirine bitişik dizilerle kromatin fibrillerini kompakt bir yapıda tutarlar (Thomas and Butler, 1977).



Şekil 1.2. Histon proteinlerin nukleozomal yapılarla DNA'yı paketlemeleri (Gözükara, 1988'in izniyle).

(A) H2A, H2B, H3 ve H4 histonlarının ikişer monomerinden meydana gelmiş olan oktamerin etrafında iki sefer sarılarak nukleozomu meydana getirmektedir. H1 histonu ise iki nukleozom arasındaki DNA ile beraber bulunmaktadır. (B). Nukleozomlar heliks yaparak DNA'nın daha iyi bir şekilde paketlenmesini sağlamaktadır.

Nukleozomların görevi sadece uzun kromatin fibrillerini bir arada tutmak değildir. Gen aktivitesinde de bu yapıların önemli roller oynadıkları bilinmektedir (King, 1985).

1.2.4. Histon Proteinlerin Amino Asit Kompozisyonları ve Moleküler Özellikleri

Histonların amino asit kompozisyonlarının yaklaşık % 25'i bazik karakterli amino asitler olan lizin, arginin ve histidinden (Tablo 1.3.) oluşur (Phillips, 1971; Hnilica, 1972; Orten, 1982).

H1 histonu hariç, diğer histon türlerinde bazik amino asitlerin çoğu, polipeptid zincirinin amino terminalinde (ilk 30-40 amino asit) yoğunlaşmışlardır. Hidrofobik amino asitler daha çok diğer uçta (C-terminal) bulunurlar. H1 histonunda ise tam tersi bir durum söz konusudur. Kor histonları biribirleriyle C-terminal uçları ile etkileşimler kurarken, H1 histonunda bu ilişki N-terminal uçlardadır (Bonner, 1980; Orten;1982).

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda histonlarda triptofan amino asidi bulunamamıştır. Ayrıca bu proteinler, F3 (H3) histonu hariç sistin veya sistein amino asidini de içermezler (Hnilica, 1972; Bonner, 1980).

Histon proteinlerin amino asit dizileri evrim boyunca çok iyi korunmuştur. Biribirinden oldukça farklı bir çok canlı sistemden elde edilip amino asit dizileri ortaya çıkarılan histonların ya biribirinin aynı veya çok benzer oldukları saptanmıştır. Örneğin, milyonlarca yıllık evrim süresince başta F2a1 (H4) ve F3 (H3) olmak üzere, ancak bir kaç amino asidin yeri değişikliğe uğramıştır. Birçok araştırmacı tarafından, her biri 102 amino asitten oluşan dana ve bezelye F2a1 (H4) histonunun aynı oldukları, sadece birinde bir lizin yerine bir arginin amino a-

sidinin, diğesinde bir izolösün yerine bir valin amino asidinin girdiği saptanmıştır. Böylece, bir bazik için bir bazik, bir hidrofobik yerine başka bir hidrofobik amino asit yapıya girmiştir (Bonner, 1980).

Tablo 1.3. Dana timusu histon fraksiyonlarının amino asit kompozisyonu (Phillips*, 1971; Hnilica, 1972).

Amino asit	H1(F1) [†]	H2B(F2b)*	H2A(F2a2)*	H4(F2a1)*	H3(F3) [†]
Lizin	†28.7(27.9)	16.7(16.6)	12.5(12.9)	9.8(9.8)	10.1(10.1)
Histidin	0.0(-)	2.3(2.2)	2.8(2.7)	1.9(2.0)	2.4(2.5)
Arginin	B 1.7(1.7)	6.4(6.2)	9.3(9.4)	13.9(14.1)	13.6(13.8)
N-metillizin	0.0(-)	0.0(-)	0.7(-)	1.1(-)	0.6(-)
Aspartik asit A	2.0(2.0)	4.9(4.9)	5.5(5.6)	5.0(5.0)	4.4(4.5)
Treonin	5.4(5.5)	6.2(6.1)	4.9(5.0)	6.6(6.6)	6.5(6.4)
Serin	6.7(6.9)	10.9(10.7)	5.0(5.0)	2.5(2.5)	3.8(3.8)
Glutamik asit A	3.4(3.4)	7.6(7.6)	8.7(9.0)	6.2(6.2)	10.2(10.3)
Prolin	10.1(10.2)	4.8(4.8)	4.1(4.0)	1.3(1.3)	4.4(4.3)
Glisin	6.9(6.9)	5.6(5.5)	9.0(9.1)	15.9(16.0)	5.8(5.9)
Alanin	25.1(25.3)	10.2(10.1)	13.2(13.2)	7.5(7.4)	13.5(13.8)
Sistin/2	0.0(-)	0.0(-)	0.0(-)	0.0(-)	0.3(0.4)
Valin	4.1(4.3)	7.1(7.0)	6.0(6.0)	7.8(8.0)	4.6(4.6)
Metionin	0.0(-)	1.6(1.5)	0.3(0.2)	1.0(1.1)	1.5(1.5)
İzolösün	0.8(0.8)	4.9(4.9)	4.2(4.3)	5.6(5.5)	4.8(4.8)
Lösün	4.1(4.3)	4.9(4.9)	10.1(10.2)	8.0(8.0)	9.0(9.1)
Tirozin	0.5(0.5)	3.8(3.8)	2.3(2.3)	3.5(3.5)	2.1(2.0)
Fenilalanin	0.5(0.5)	1.6(1.6)	1.0(1.0)	2.2(2.2)	2.1(2.0)
Lys/Arg oranı	16.9(16.4)	2.6(2.7)	1.4(1.4)	0.8(0.7)	0.8(0.7)
Asidikler A	5.4(5.4)	12.5(12.5)	14.2(14.6)	11.2(11.2)	14.6(14.8)
Bazikler B	30.4(29.6)	25.4(25.4)	25.3(25.3)	26.7(25.9)	26.7(26.4)
B/A oranı	5.6(5.5)	2.0(2.0)	1.8(1.7)	2.4(2.3)	1.8(1.8)
N-terminal grup	asetil	prolin	asetil	asetil	alanin
C-terminal grup	lizin	lizin	lizin	glisin	alanin

* Parantez içindeki veriler Phillips (1971)'den alınmıştır.

†Tüm veriler, amino asitlerin yüzde mol olarak ifadesidir.

Diğer histon proteinlere göre molekül ağırlığı en büyük olan (19.500-21.000 dalton) F1(H1) molekülü, özellikle yüksek derecede lizin, alanin ve prolin içeriği ve histidin amino asidi bulundurmaması ile diğer fraksiyonlardan ayrılır. Keza, evrimsel süreç boyunca en çok değişikliğe uğrayan histon fraksiyonudur. Hatta, bazı araştırmacılar, bu fraksiyonun diğer fraksiyonların bir karışımı görünümünde olduğu ve çok daha küçük olan F3(H3) fraksiyonunun, belkide bu proteinin değişime uğramış bir bölümü olabileceği görüşündedirler (Phillips, 1971; Walker, 1982).

Amino asit kompozisyonu (yapıya giren amino asitlerin % 50 kadarı lizin ve alanindir) ve hidrofilik özelliğinden dolayı ilk defa iyi bir şekilde tanımlanmış olan histon proteini de yine F1(H1) dir. Bu histon fraksiyonu oldukça heterojen olup farklı türlerde, hatta bir türün farklı dokularında çeşitli sub-fraksiyonlara sahiptir. Örneğin, tavşan timusunda 4-5, karaciğerinde 3, dana timusunda 3-4, tavuk karaciğerinde bu proteinin 2 sub-fraksiyonu saptanmıştır (Hnilica, 1972).

212-216 amino asitlik bir zincir uzunluğu ile F1 (H1) histonu daha başka bir çok özelliği ile diğerlerinden ayrılmaktadır. Yapılan çalışmalar, bu proteinlerin nisbeten daha fazla doku ve tür spesifitesi gösterdiklerini ortaya koymuştur. Örneğin, sıçan F1(H1) histonu bir tane metionin amino asidi içerirken, diğer canlı sistemlerde bu amino asit bulunamamıştır (Phillips, 1971; Hnilica, 1972).

Histon proteinlerin lizin amino asidi bakımından zengin başka bir grubu F2b(H2B) histonudur. Hernekadar F1

(H1) fraksiyonu tüm histonlar içinde ayrımı ve tanımı yapılmış ilk histon proteini ise de, uygun bir şekilde saflaştırılıp amino asit dizisi üzerinde doku ve tür spesifitesi çalışmalarının yapıldığı ilk histon proteini F2b(H2B) olmuştur. 13.774 daltonluk moleküler ağırlığı ve 125 amino asit içeren yapısı ile F2b(H2B) belli bir yük asimetriği gösterir. Bunun nedeni, molekülde bazik karakterli amino asitlerin COOH-terminal bölgesinden çok, NH₂-terminal bölgesinde toplanmış olmalarıdır (Phillips, 1971; Hnilica, 1972). Esasen bu durum, diğer kor histonlarında da görülür (Bonner, 1980).

F2b(H2B) fraksiyonu diğerlerinden yüksek serin içeriği ve bir N-terminal prolin içeren yegane grup olmakla da ayrılır. Yapılan çalışmalar, bu fraksiyonun çeşitli canlı türlerinde küçük farklılıklarla aynı olduğunu ortaya çıkarmıştır (Phillips, 1971; Hnilica, 1972).

Lizin içeriği bakımından az zengin veya diğer bir deyimle, arginin-lizin amino asitleri bakımından zengin F2a2(H2A) fraksiyonu, 136-140 amino asit ve 15.000 daltonluk moleküler ağırlığı ile karakteristik bir histon proteindir. İlk defa Phillips (1968) tarafından dana timusundan izole edilerek tanımlanmıştır. Aynı zamanda yüksek lösin içeriği ile de diğerlerinden ayrılan bu proteinin doku ve tür spesifitesi üzerine çok az bilgi mevcuttur. Amino asit kompozisyonlarına ilaveten, bir çok değişik tür ve dokudan elde edilen bu proteinin elektroforetik yürümesi de hemen hemen aynı bulunmuştur. Bir çok ekstraksiyon ve saflaştırma işlemlerinde F2a2(H2A) histonu, F2a1(H4) his-

tonu ile beraber F2a olarak bildirilmiştir (Phillips, 1971; Hnilica, 1972).

Lizince zengin bu histon proteinlerden başka, diğer iki büyük grubu arginince zengin histonlar olan F2a1 (H4) ve F3 (H3) fraksiyonlarıdır (Hnilica, 1972).

Daha çok glisin ve arginince zengin F2a1 (H4) histonu, 102 amino asitten oluşan kısa polipeptid zinciri ve 11.300 daltonluk moleküler ağırlığı ile nisbeten en küçük histon fraksiyonudur. Bu fraksiyonun, bezelye fidelerinden dana timusuna kadar bir çok sistemde aynı olduğu, dolayısı ile evrim boyunca amino asit dizisinin yüksek derecede korunmuş olduğu saptanmıştır (Phillips, 1971; Hnilica, 1972).

F3 (H3) fraksiyonu, evrimsel süreçte amino asit dizisi en çok korunmuş olan ikinci histondur. Esasen, arginin ve alanince zengin bu fraksiyonun diğerlerinden en önemli farkı, % 1 dolayında sistin veya sistein amino asidi içermesidir. Diğer bir fark ise, hem C- ve hem de N- terminal amino asitlerinin alanin olmasıdır (Phillips, 1971). 135 adet amino asit uzunluğunda polipeptid zinciri ve 16.000 dalton moleküler ağırlığı ile bu molekül, ilginç olarak 84. ve 112. amino asitleri arasında büyük bir "non-bazik" bölgeye sahiptir ki, sistin amino asidi de bu bölgede bulunur (Hnilica, 1972).

1.2.5. Histon Biyosentezi

Bugün genel histon fraksiyonlarının hemen hepsinin hücre siklusunun S fazında (DNA sentez fazı) maksimum sentezlendikleri bilinmektedir. İzole edilmiş nukleuslar üzerinde ^{14}C ve ^3H ile işaretli amino asitlerle yapılan sitokimyasal

ve otoradyografik çalışmalar, histonların asıl biyosentez yerinin nukleuslar olduğunu göstermiştir. Nukleusların, protein biyosentezi için gerekli tüm elementlere sahip olduğu ortaya çıkarılmıştır. Son yapılan çalışmalar, histonların hücrelerde sitoplazmik proteinlere benzer şekilde sentezlendikleri yolundadır. Nuklear proteinlerin % 77-95'i profaz esnasında mitoz bitinceye kadar sitoplazmaya verilir. Daha sonra bu proteinler nukleusa geri dönerler. Ayrıca, nukleustan başka nukleoluslarda da histon proteinlerin ve ribozom benzeri partiküllerin olduğu saptanmıştır (Hnilica, 1972).

1.2.6. Histonların Fonksiyonları

Bugüne kadar yapılan çalışmalar sonucu histonların genetik kontrolünden, kromatindeki uzun DNA zincirlerinin paketlenmesine kadar, hücre organelleri üzerine olan etkilerinden bir çok enzim sistemine kadar çok geniş bir fonksiyon sahasına sahip olduklarını ortaya koymuştur (Allfrey, 1970; Phillips, 1971).

Histon proteinlerin gen faaliyetinin düzenlenmesinde ödev yaptıkları kabul edilmektedir. Histonların gen aktivasyonuna etki ettikleri ilk defa Stedman ve Stedman (1943) tarafından önerilmiştir. Kromozomal proteinler üzerine yapılan en son çalışmalardan elde edilen bir başka kanıya göre, histonların DNA-bağımlı RNA sentezini inhibe eden non-spesifik repressörler olduğu, non-histon kromozomal proteinlerin ise spesifik gen bölgelerini kontrol ettiği (Gözükara, 1978).

Kromozomal proteinlerin bilinen en önemli görevlerinden biri, kromozom zincirlerine sağlamlık ve biçim kazandırmak, ikincisi ise kalıtsal bilginin aktarılmasında seçicilik sağlamaktır. Histon bağlı bölgelerde DNA'dan RNA

sentez edilmemesi, hücre farklılaşması olgusuna da bir açıklık getirir. Farklılaşan hücrelerde histonlar sürekli (ya da uzun süreli) repressörler olarak görev yapabilirler (Menevşe ve Menevşe, (1982)).

Hücre nukleuslarında, histon proteinlerin biyosentetik reaksiyonlara etki ettiği uzun zamandan beri bilinmektedir. Örneğin, izole edilmiş dana timusu nukleuslarına histonların ilavesi halinde RNA sentezinin baskılanabileceği daha 1961'de Allfrey tarafından gösterilmiştir. Histonlar, transkripsiyonla direkt ilgili olmayan enzim sistemleri için geniş bir toksisiteye sahiptirler. Örneğin, sitokrom c oksidaz aktivitesini inhibe ederler. Benzer şekilde, yüksek konsantrasyonlarda etkili bir şekilde mitokondriyal solunumu ve fosforilasyonu bloke ederler. Düşük konsantrasyonlarda ise etkileri daha karmaşıktır: solunumu ve mitokondriyal ATPaz aktivitesini stimüle ettikleri halde, ADP-ATP dönüşüm reaksiyonunu inhibe ederler (Phillips, 1971).

1.2.6.1. RNA Sentezi Üzerine Histonların Etkisi

Birçok araştırmacı tarafından bugüne kadar yapılmış olan araştırmalarla bitki, hayvan ve bakteriyel orijinli polimerazlar tarafından katalizlenen RNA sentezinin, histonlarla inhibe edildiği gösterilmiştir (Johns and Forrester, 1969; Phillips, 1971). Araştırmacılar farklı histon fraksiyonları ile yaptıkları çalışmalarda birbirine zıt sonuçlar elde etmişlerdir. Örneğin, bazı sistemlerde lizince çok zengin Fl(H1) histon proteinleri yüksek derecede inhibitör etkisine sahip iken, diğer bazı sistemlerde bu histonlar ya inaktif veya argininince zengin histonlara göre daha az inhibitör etkiye

sahip oldukları bulunmuştur. Bu durum hernekadar tam aydınlatılamamışsa da, bunun farklı sistemlerde farklı test durumlarından kaynaklandığı sanılmaktadır. Ancak, yapılan çalışmalar lizince zengin histonların nisbeten daha fazla bir inhibitör etkiye sahip oldukları yolundadır. *in vitro* RNA sentezi üzerine yapılan çalışmalar, tüm histon proteinlerin nukleozid trifosfataz'ın inkorporasyonunu baskılayabileceğini ortaya çıkarmıştır (Phillips, 1971; Hnilica, 1972).

Allfrey ve ark. (1963) RNA-polimerazı parçalama-
dan, tripsinle dana timusundan izole edilen nukleuslardan % 70 oranında histon proteinleri, % 5 oranında ise non-histon proteinleri saf halde ayırmayı başarmışlardır. Bu işlemde sonra RNA öncül moleküllerinin RNA yapısına girişinin % 300-400 oranında arttığını, ortama histon ilavesi ile bu artışın tekrar inhibe olduğunu saptamışlardır (Phillips, 1971; Hnilica, 1972; Gözükara, 1978).

İlk olarak 1960'larda biyokimyasal tekniklerle hücresiz (*in vitro*) bir sistem içinde RNA sentezi yapay olarak başarılmıştır. Bu sentez, bir test tüpü içerisine DNA solüsyonu, RNA-polimeraz ve mRNA için gerekli nukleotitler konarak gerçekleştirilmiştir. Huang ve Bonner(1962) bu sistemde histon proteinlerin yokluğunda, RNA sentezinin önemli derecede artış gösterdiğini, ancak histon ilavesi halinde RNA sentezinin oldukça azaldığını gözlemişlerdir. Araştırmacılar aynı zamanda, maksimum inhibisyonun DNA/histon oranı 1 olduğu zaman ortaya çıktığını saptamışlardır (Hnilica, 1972).

1.2.6.2. DNA Sentezi Üzerine Histonların Etkisi

DNA replikasyonunda histonların fonksiyonu konusunda bir çok gözlemler vardır. Yapılan çalışmalar, histonlarla DNA sentezi arasında yakın bir ilişkinin olduğunu ortaya çıkarmıştır. Bir çok enzimatik reaksiyonu kapsayan DNA sentezi üzerine, histonların direkt etkide buldukları konusundagörüşler vardır. Rejenere olan sıçan karaciğerine histonlar dışardan verildikleri zaman, DNA sentezinin inhibe olduğu görülmüştür. Aynı şekilde, dana timus DNA-polimerazının histonlarla inhibisyonu bir çok araştırmacı tarafından gösterilmiştir. E. coli DNA-polimerazının da histonlar tarafından inhibe edildiği saptanmıştır (Phillips, 1971).

Son yıllarda yapılan araştırmalar, histonların gen aktivitesini (gen faaliyetini) ayarladıkları, DNA'nın stabil kalmasını etkilediği, yani gen aktivitesini (RNA sentezini) durdurdukları, histon olmayan proteinlerin ise genlerin fonksiyon göstermelerini sağladıkları bilinmektedir. Non-histonlar, fosforilasyonla histonları DNA'dan ayırarak serbest bırakır, RNA sentezi başlar ve cAMP belli enzimlerin sentezini stimüle eder (Deniz, 1985).

1.2.6.3. Hücre Fonksiyonu Üzerine Diğer Etkileri

Histonlar, hücre fonksiyonunu çok değişik şekillerde etkilerler. Bir takım etkileri de, hücre yüzeyinde veya sitoplazmik reaksiyonlarla ilgilidir. Hücre membranı fonksiyonu ile histonların ilişkisini gösteren bir çok gözlemler vardır. Histonların, protaminlerin veya bazik poliaminoasit-

lerin varlığında, membran permeabilitesi değişmektedir. Örneğin, hücre kültürü ortamına protamin ilavesi ile Na^+/K^+ oranı tersine dönmektedir. Tümör hücrelerine düşük konsantrasyonlarda histon verilmesi protein moleküllerinin inkorporasyonunu stimüle eder. Bunu, pinositoz olayını arttırarak yaptıkları zannedilmektedir. Kobaylara histonların enjeksiyonu, serum proteinlere karşı vasküler permeabiliteyi arttırır. Histonlar, aglutinasyon ve hemolizi de inhibe ederler (Phillips, 1971).

Histonların değişik bir etkileri de, antiyenden önce verildiklerinde antikor sentezini baskılamalarıdır. Bu olayın, gerekli mRNA'ların sentezinin inhibisyonu yolu ile başarıldığı sanılmaktadır. Aynı şekilde, histon proteinlerin RNA içeren virüslerin çoğalmalarını da inhibe ettikleri saptanmıştır. Diğer ilginç bir etkileri de, bitki veya hayvan histonu olsun dışardan verildiklerinde, bitki köklerinin büyümesini inhibe ederken, tümör glişimini de baskılamalarıdır. Ancak, histonların bu etkilerinin bitki hormonlarına karşı değiştiği görülmüştür. Örneğin, histonlar gibereellik aside bağlanarak kök oluşumunu inhibe ederlerken, kök büyümesini etkilemedikleri görülmüştür. Bununla beraber, kinetine bağlandıklarında her iki olayı da inhibe ederler. Histonların bu olaylardaki aktif inhibisyonları, asetilasyon veya oksidasyonla azaltılabilir veya ortadan kaldırılabilir (Phillips, 1971).

Nuklear fonksiyonların çoğu histonlar tarafından inhibe edildikleri halde, asidik nuklear proteinlerin fos-

forilasyonu, test sistemlerine histonların ilavesi halinde 10 kat stimüle olmaktadır. Enzimoloji ve biyokimyadaki yeni bir takım gelişmeler sayesinde histonların, hücre ve hücre dışı sistemler üzerindeki etkileri geniş bir şekilde çalışılmaktadır (Phillips, 1971).

1.2.7. Histonların Enzimatik Modifikasyonları

Son yıllarda in vivo sistemlerde de tüm histon proteinlerin sentez sonrası (postsynthetic) enzimatik modifikasyonlara maruz kaldıkları tesbit edilmiştir (Hnilica, 1972).

Fonksiyonları hâla tam olarak bilinmeyen bu modifikasyonlar, amino asitlerin (genellikle lizin, serin, arginin ve histidin) epsilon (ϵ) amino grupları üzerinde oluşurlar (Hnilica, 1972; Lewin, 1983).

DNA ile assosye proteinlerin yapısal modifikasyonları, değişen gen ifadesi mekanizmasına da bir açıklık getirir. Son yıllarda, polipeptid zincirleri oluştuktan sonra, histonların yapılarında metilasyon, asetilasyon ve fosforilasyon gibi modifikasyonlar belirlenmiştir. Bu modifikasyonlar özellikle yapıdaki bazı belirli amino asitlerin yük ve yapılarındaki değişmelerle ortaya çıkarlar (Phillips, 1971).

1.2.7.1. Histonların Metilasyonu

Histonlarda ϵ -N-metillizinin bulunduğu ilk kez 1960 yılında Murray tarafından dana ve tavşan timusunda belirlenmiştir. Araştırmalarla, daha sonra bu amino asidin dana, tavşan ve sıçanların diğer dokularında da bulunduğu kaydedilmiştir. İlginç olarak, lizince zengin histonlarda bu amino asit bulunmadığından F1 ve F2b fraksiyonlarında metilasyon saptanamamış-

tır. Oysa arginine zengin histonlarda ϵ -N-metillizine ilaveten, ϵ -N-di ve ϵ -N-trimetillizinin de varlığı saptanmıştır (Allfrey, 1970; Phillips, 1971; Hnilica, 1972).

Metilasyon olayında, metil grubu vericisinin metionin olduğu gösterilmiştir. Sentez sonrası lizinin epsilon amino grubuna doğrudan metil grubu vericisi, S-adenozilmetionin olup, reaksiyon enzimatik olarak katalizlenir. Histon metilasyonunun, mitoz öncesi nukleusta oluşup, yapısal ve fonksiyonel değişimler özellikle de kromatin kondensasyonunda etkili olduğu belirlenmiştir (Phillips, 1971).

1.2.7.2. Histonların Asetilasyonu

Histonlarda asetil gruplarının varlığı ilk kez Phillips (1963) tarafından belirlenmiştir. Hem lizince zengin F2a2 (H2A) ve hem de arginine zengin F2a1 (H4) fraksiyonlarının N-terminal amino asidinin N-asetilserin olduğu gösterilmiştir. Toplam histonların yaklaşık % 40'ını oluşturan bu histonlardan başka, lizince çok zengin F1 (H1) fraksiyonunun da asetillenmiş olduğu kaydedilmiştir. **Değişik araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalar, asetilasyonun sadece N-terminal amino asitlerinde sınırlı olmadığını, bazen aynı histon molekülü üzerinde bir çok yerde ortaya çıkabileceğini göstermiştir.** Örneğin, arginine zengin histon fraksiyonları F3 (H3) ve F2a1 (H4)'in polipeptid zincirindeki lizin amino asitlerinin N-asetillizine değişimleri ile asetillenebilirler. Histonların hem asetilasyonu ve hem de deasetilasyonu enzimatik olarak katalizlenir (Phillips, 1971).

Asetilasyonda asetil grubu vericisinin asetil Co-A olduğu belirlenmiştir. Dokularda, hücre süspansiyonlarında, izole edilmiş nukleuslarda ve de özellikle saflaştırılmış enzim preparasyonlarında histonlar üzerine yapılan in vivo çalışmalar, asetil gruplarının daha çok arginine zengin histonlarla ilgili olduklarını ortaya koymuştur. Lizin amino asitlerinin asetilasyonu ile, kromatin yapı ve fonksiyonunda bir takım değişmeler olduğu yönünde görüşler vardır. Gerçekten de lizin amino asitlerinin asetilasyonu sonucu, bazik proteinlerin net pozitif yükünde bir azalma görülür. Bu durum, histonlarla negatif yüklü DNA arasında bir etkileşim zayıflığı ile kendini belli ederken, kromatinin ince yapısında da bazı değişmelere neden olur. Bu nedenle değişen kromatin yapı ve fonksiyonu ile histon asetilasyonu arasında bir takım korelasyonlar vardır. Örneğin, histonların düşük derecede kimyasal asetilasyonları, RNA-polimeraz reaksiyonunu inhibe ederken, artan asetilasyona paralel olarak inhibisyon etkisi azalmaktadır (Phillips, 1971; Hnilica, 1972).

Histonlarda lizin amino asitlerinin enzimatik asetilasyonu, kromatinin ince yapısı ile beraber RNA sentez fonksiyonunu da etkilemektedir. Nuklear DNA'nın bulunduğu "kondanse kromatin" bölgesinde (DNA'nın % 80'i bu bölgelerde bulunur), histon asetilasyonu ve RNA sentezi nisbeten yavaştır. "Diffüz kromatin" bölgesinde ise, hem arginine zengin histonların asetilasyonu ve hem de RNA sentezi çok daha aktif durumdadır (Phillips, 1971).

RNA sentezinin hormonal stimülasyonu ile histon asetilasyonu arasında da bir ilişki mevcuttur. Bugün, hedef dokularda histon metabolizması üzerine hormonal bir etkinin olduğu çok iyi bilinmektedir. Bazı durumlarda hormonlar, farklı şekillerde histon sentezini etkilerler. Hem arginine zengin histonların asetilasyonu ve hem de lizince zengin histonların fosforilasyonu uygun uyarıcılarla modifiye edilebilir. Örneğin, sıçanlara kortizonun verilmesi halinde, karaciğerde RNA sentezi stimüle edilirken histon asetilasyon oranının arttığı gözlenmiştir. Yani, histonların inhibitör aktivitesindeki azalma, onların asetilasyon derecesiyle ters orantılıdır. Asetillenmiş grupların sayısı arttıkça, bu proteinlerin inhibisyon etkisi azalmaktadır. Böyle modifikasyonların, kromatinin transkripsiyonal aktivitesinin kontrolünde önemli rollerinin olduğu bilinmektedir (Allfrey, 1970; Phillips, 1971).

1.2.7.3. Histonların Fosforilasyonu

Fosforilasyon, histon proteinlerin diğer bir enzimatik modifikasyon şekli olup, daha çok serin ve histidin amino asitlerinin hidroksil gruplarının fosforilasyonu ile ortaya çıkar (Lewin, 1983).

Bu olayda fosforil grupları vericisinin ATP olduğu belirlenmiştir. Bu reaksiyon reversibl olup, fosfat grupları geçici olarak histonların yapısına girmişlerdir. Histon fosforilasyonunun biyolojik fonksiyonu kesin olarak bilinmemekte ise de, gen aktivitesi ile ilgileri olduğu konusunda bir takım deliller vardır. Örneğin, sıçanlarda

karaciğer rejenerasyonu esnasında histonların fosforilasyonu değişmektedir. Burada, F1 (H1) fraksiyonunun hem fosforilasyon oranı ve hem de fosfor içeriğinde artış görülür. F3 (H3) histonu fosforilasyon oranında da benzer durum görülürken, fosfor içeriğinin değişmediği görülmüştür (Allfrey, 1970; Phillips, 1971).

Hedef dokularda histon fosforilasyonu, hormonal sistem tarafından etkilenir. Örneğin, karaciğerde RNA sentezini stimüle eden hidrokortizon, lizince zengin ve ve arginine zengin histonların fosforilasyonunu arttırır. Karaciğerde ve diğer dokularda histonların fosforilasyonu, spesifik protein kinazlarla katalizlenir. Bu enzimin aktivitesi hem in vivo hem de in vitro olarak cAMP tarafından stimüle edilir. cAMP ile histon kinaz (protein kinaz) aktivitesinin benzer stimülasyonu çeşitli canlı sistemlerde farklı dokularda belirlenmiştir. Ayrıca, belirli dozajlarda sıçanlara glukagon verilmesi, RNA ve enzim sentezini teşvik edici bir etki yaratırken, kısa süre içinde F1 (H1) histonunun fosforilasyonunu da 15-25 kat arttırır. İnsülin de glukagona benzer bir etki gösterir. Normal ve rejenere olan sıçan karaciğerinde, sıçan dalak ve pankreasında, insan lenfositlerinde, deniz kestanesi yumurtalarında ve daha bir çok sistemde bu modifikasyonun in vivo olarak meydana geldiği saptanmıştır (Phillips, 1971).

1.2.7.4. F3 (H3) Histonunda tiol/disülfid Değişimleri

Tiol gruplarının Yaklaşık % 70'i hücre nukleuslarında F3 (H3) histonu ile beraber bulunmuştur. Fambroug ve Bonner (1968), F3 (H3) histonunun bezelye fidelerinde bir monome-

rik ve dimerik, dana timusunda ise oligomerik formlarının oluştuğunu belirlemişlerdir. Araştırmacılar, aynı zamanda bezelye fidesi F3(H3) monomerlerinde 1, dana timusunda 2 sistein amino asidi saptamışlardır. Bazı bitkiler, daha aşağı hayvanlar ve kemiricileri de içeren bazı omurgalılarda F3 (H3), molekül başına bir adet sistein amino asidi içerirken, yüksek omurgalı türlerinde, molekül başına iki sistein bulunmuştur (Hnilica, 1972).

F3 (H3) histonunda tiol gruplarının oksidasyonu ve redüksiyonu, bu proteinin fiziksel durumunu ve diğer protein molekülleri ile olan ilişkisini etkiler. Ord ve Stocken (1966; 1968), kromatinin farklı yerlerinde çeşitli oksidasyon alanları olduğunu belirlemişlerdir. Araştırmacılar, tiol formun daha çok diffüz kromatide, disülfit formun ise daha çok kondanse kromatinin yapısında bulunduğunu saptamışlardır (Allfrey, 1970; Hnilica, 1972).

Hücre siklusu esnasında değişen tiol/disülfit oranının ne gibi biyolojik sonuçlar doğurduğu konusunda bugünkü bilgiler pek yeterli değildir. Genellikle, mitoz esnasında kromozom kondensasyonuna bağlı olarak F3 (H3) histonunun oksidasyonunun (disülfit içeriği) arttığı görülür (Hnilica, 1972).

Esasen, buraya kadar bahsedilen tüm enzimatik modifikasyonlar geçici olup, modifiye olan histon proteini belli bir süre sonra tekrar (reversibl) eski yapısını kazanmaktadır (Phillips, 1971; Hnilica, 1972; Lewin, 1980).

2. MATERYAL ve METOD

2.1.. Materyal

Bu çalışmada histon proteinlerin izolasyonu için materyal olarak soğan tohumu büyümekte olan genç kök uçları ve sıçan (rat) karaciğeri kullanılmıştır. Mitoz bölünmenin oldukça aktif olduğu bu ve benzeri doku ve sistemlerde DNA, RNA ve dolayısı ile histon sentezinin de aktif olacağı düşünüülerek, bu materyaller özellikle seçilmişlerdir.

2.2. Metod

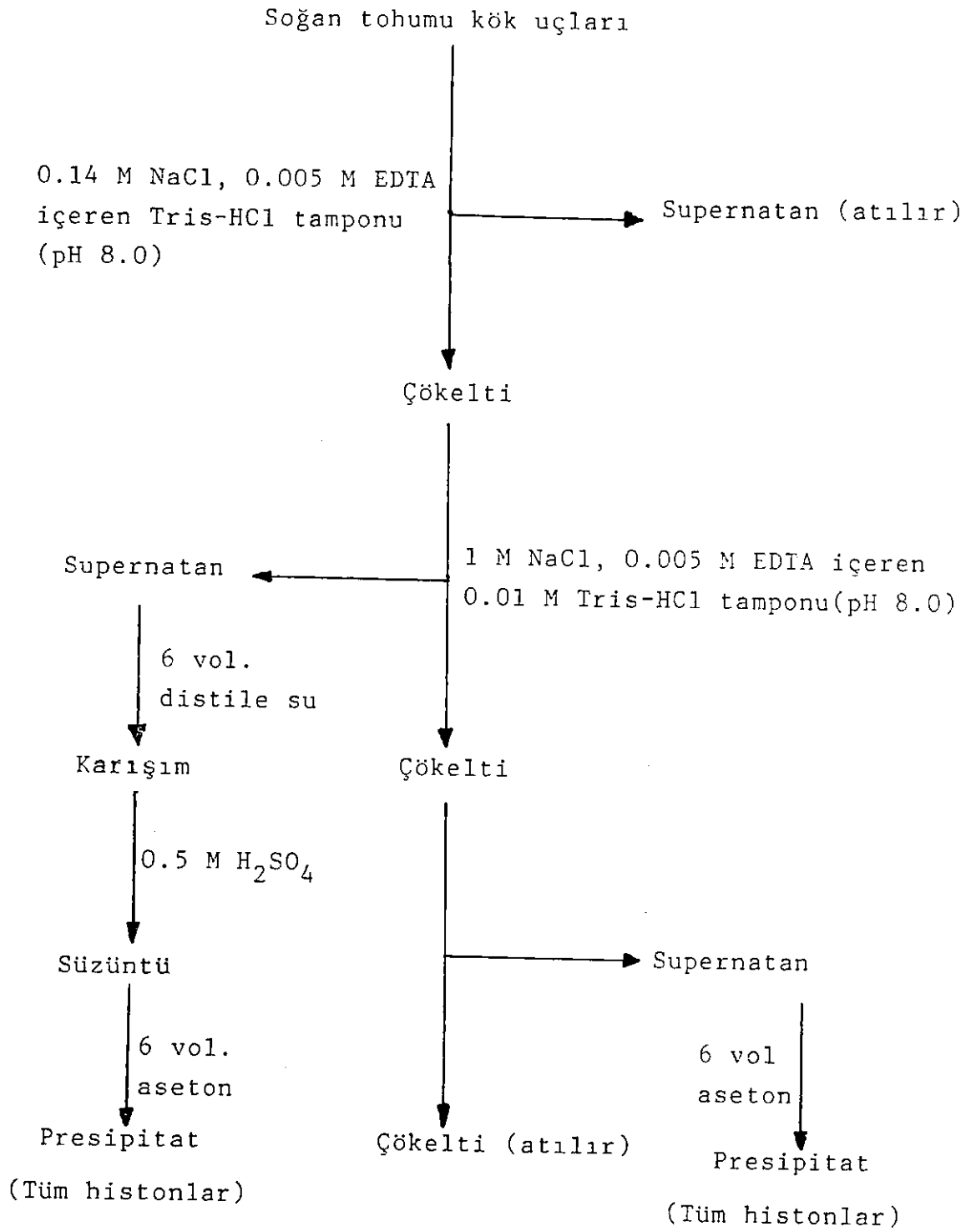
Soğan tohumundan kök eldesi için, tohumlar bir gece suda suda tutulduktan sonra, dikdörtgen şeklindeki (40x60 cm) naylon elekler üzerine tek sıra halinde yayılıp üzerleri hidrofilye pamukla kapatılıp sürekli olarak 25-30°C'de 8-10 gün sulanmışlardır. Bu süre sonunda elek deliklerinden çıkıp 2,5-3 cm uzayan kökler alttan jiletle kesilerek toplanmıştır.

Sıçan karaciğeri, boyun kemiği kırılarak hemen öldürülmüş olan ergin sıçanlardan alınmıştır. Hemen kullanılmayan karaciğerler -80 °C'de deep-freeze'de saklanmıştır.

Soğan tohumu kökleri için toplam dokudan total histon ekstraksiyonu, sıçan karaciğeri için kimyasal fraksiyonlama metodu ile histon proteinler iki farklı şekilde saflaştırılmışlardır.

2.2.1. Soğan Tohumu Köklerinden Total Histon İzolasyonu

Soğan tohumu köklerinden histon izolasyonu için, Gözüfara (1978) tarafından kullanılan yöntem bazı değişikliklerle



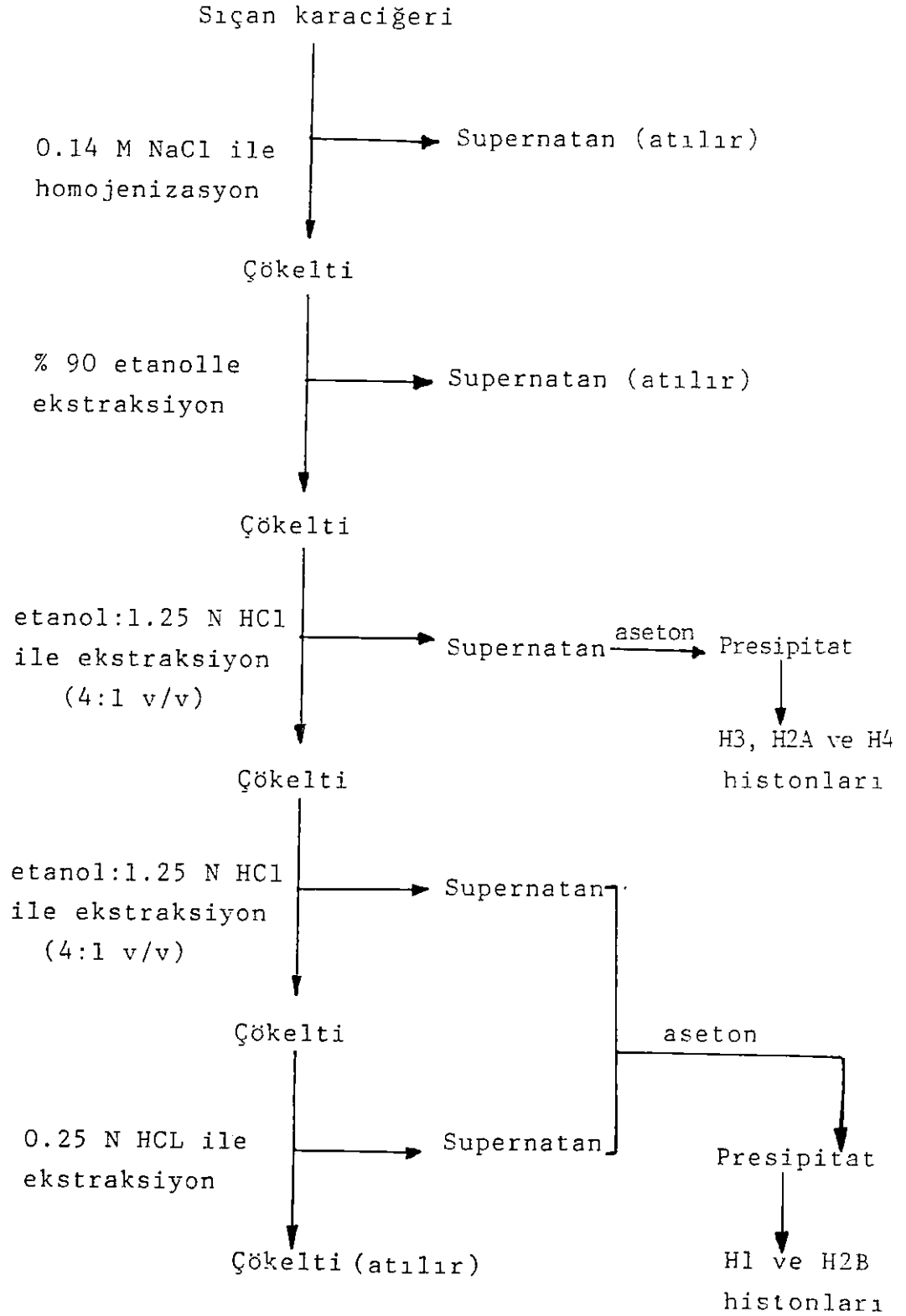
Şekil 2.1 Soğan tohumu köklerinden histon proteinlerinin ekstraksiyonunun şematik özeti.

laştırılmıştır. Süzüntüye 6 volüm aseton ilave edilerek 20-22 °C de 1 saat kadar tutulduktan sonra presipite olan histon proteinler pastör pipetiyle toplanarak santrifügasyonla peletleştirilmiş ve asetonla 3 defa yıkanarak havada kuruması beklenmiştir. Bu şekilde elde edilmiş histon proteinler numaralanarak -80 °C de derin dondurucuda (deep freeze) muhafaza edilmişlerdir.

2.2.2. Sıçan (rat) Karaciğerinden Histonların İzolasyonu

Sıçan karaciğerinden histon izolasyonu için Johns (1964; 1967) tarafından geliştirilen metod (Phillips, et al., 1983), bazı değişikliklerle uygulanmıştır. Bütün işlemler (Şekil 2.2.) +4 °C de yürütülmüştür.

50 g karaciger dokusu önce makasla iyice kıyılıp bağ doku ayrıldıktan sonra, 700 ml 0.14 M NaCl (pH 5.0) içinde parçalayıcıda (Waring blender) max. hızda 2 dak. homojenize edilmiştir. Homojenatın üzerinde toplanmış olan köpük pastör pipetiyle toplanıp uzaklaştırılarak homojenatın pH'ı tekrar 5.0'e ayarlanmış ve 5.250 rpm (1.500 g)'de 30 dak. santrifüj edilerek supernatan atılmıştır. Pelet, benzer şekilde yine 700 ml 0.14 M NaCl (pH 5.0) içinde süspanse edilerek orta hızda 1 dak. homojenize edilmiş ve 5.250 rpm'de 20 dak. santrifüj edilerek supernatan atılmıştır. Pelet, yukardaki solüsyonun 700 ml'sinde 4 defadaha (4 x 700ml) orta hızda 30'ar saniye homojenize ve 5.250 rpm'de 15'er dak. santrifüj edilerek supernatanlar atılmıştır. Pelet, % 90 etanolün 700 ml'sinde süspanse edilerek orta hızda 30 san. homojenize ve 5.250 rpm'de 15 dak. santrifüj edilerek supernatan atılmıştır. Pelet, etanol:1.25 N HCl (4/1 v/v)'in



Şekil 2.2. Sıçan karaciğerinden histon proteinlerin ekstraksiyonunun şematik özeti.

400 ml'si ile karıştırılarak, 15-20 adet 4 mm çapında cam boncukla beraber litrelik geniş ağızlı polietilen bir şişeye aktarılmış ve sallamalı çalkalayıcıda ~~————~~ gece boyunca (17 saat) +4 °C de ekstrakte edilmiştir. Ekstrakt, 5.250 rpm'de 15 dak. santrifüj edilerek H3, H2A ve H4 histonlarını içeren supernatan toplanarak muhafaza edilmiştir. Pelet, yine yukarda olduğu gibi etanol:1.25 N HCl'in 200 ml'sinde (4:1 v/v) iki defa (2 x 200 ml) ikişer saat çalkalayıcıda ekstrakte edilmiştir. Ekstrakt, her defasında 5.250 rpm'de iki defa santrifüj edilerek supernatanlar toplanmış ve yukarda muhafaza edilen supernatanla birleştirilmiştir (yaklaşık 800 ml supernatan). H1 ve H2B histonlarını içeren pelet de bu basamakta muhafaza edilmiştir. Toplanmış olan supernatan Whatman no:1 filtre kağıdından süzülerek berraklaştırılmıştır. Süzüntüye önce 2 volüm , sonra 3 volüm aseton ilave edilerek 22 °C de 1 saat kadar tutulmuştur. Dibe çöken H3, H2A ve H4 histon presipitatu santrifügasyonla peletleştirilerek, 3 defa asetonla yıkanmış ve vakum altında kurutulularak *deep freeze*'de saklanmıştır. Bu şekilde elde edilen histon proteini yaklaşık 550 mg kaddır. Yukarda muhafaza edilmiş olan pelet, etanol:1.25 N HCl'in (4/1 v/v) 200 ml'sinde +4 °C de gece boyunca (17 saat) çalkalayıcıda ekstrakte edilmiştir. Ekstrakt 5.250 rpm'de 15 dak. santrifüj edilerek supernatan toplanmıştır. Pelet, benzer şekilde bu defa 0.25 N HCl'in 100 ml'sinde iki defa (2 x 100 ml) ikişer saat ekstrakte edilerek 15 dak. 5.250 rpm'de santrifüj edilip supernatanlar toplanmıştır. Toplanan supernatanlar (yaklaşık 400 ml) birleş-

tirilerek Whatman no:1 filtre kağıdından süzülüp berraklaştırılmıştır. Süzüntüye önce 3 volüm, sonra iki volüm aseton ilave edilerek toplanan H1 ve H2B histon presipitasyonu santrifügasyonla peletleştirilip asetonla 3 defa yıkanmış ve vakum altında kurutularak etiketlenip dip frizde saklamıştır. Bu şekilde 170 mg kadar H1+H2B histon proteinini saflaştırılmıştır.

2.3 Elektroforetik Metod

Histon proteinlerin elektroforetik özellikleri nişasta jel (Johns et al., 1961) ve daha çok olarak da çeşitli kompozisyonlarda hazırlanabilen poliakrilamid jeller üzerinde (Phillips et al., 1983; Gurley and Shepherd, 1966; Panyim and Chalkley, 1969; Kerese, 1984) araştırılmıştır.

Bu çalışmada da saflaştırılmış olan histon proteinlerin elektroforetik özellikleri, değişik poliakrilamid jel elektroforezi metodları kullanılarak araştırılmıştır.

2.3.1. Histon Proteinlerin Disk Jel Elektroforezi

Disk jel elektroforezi metodu olarak Gözükara (1978) tarafından modifiye edilerek kullanılmış olan **histonlar için**

spesifik asit-üre-poliakrilamid jel sistemi uygulanmıştır. Bunun için, aşağıdaki solüsyonlar hazırlanarak kullanılmıştır.

TEMED Solüsyonu: 48 ml 1 N KOH, 17.2 ml glasiyel asetik asit, 4 ml temed (tetrametiletildiamin) karışımı distile su ile 100 ml'ye tamamlanır.

Akrilamid Solüsyonu: 7,5 g akrilamid, 0.2 g N',N'-metilenbisakrilamid, bir miktar distile suda eritilerek 25 ml'ye tamamlanmıştır (% 30 akrilamid).

Ammonyum Persulfat Solüsyonu: 10 M üre içinde % 0.2'lik ammonyum persulfat (w/v) her deneyden hemen önce hazırlanıp kullanılmıştır.

Elektroforez Tamponu: 62.4 g β -alanin , 8 ml glasiyel asetik asit 'e 1 lt distile su ilave edilip pH 4.0'e ayarlanmıştır.

Elektroforez tüplerinin (0.5 x 12 cm) alt kısmı parafilmle kapatılarak dik duracak şekilde tüplüğe yerleştirilmiş ve üstttten 1 cm boşluk kalacak şekilde jel karışımı ile doldurulmuşlardır. Jel karışımı, temed:akrila- mid:ammonyum persulfat (1:2:5 v/v) solüsyonlarını içerir (% 7.5 jel konsantrasyonlu). Tüplerin üst kısmına 3 M üreden pastör pipetiyle tabaka oluşacak kadar yavaşça ilave edilerek gece boyunca anaerobik polimerizasyona bırakılmışlardır. Burada, esasen 1 saate kalmadan polimerize olan jelin daha iyi polimerleşmesi amaçlanmıştır. Tüplerin üst kısmındaki üre dökülerek, elektroforez tankındaki özel yerlerine yerleştirilmişlerdir. Bu defa, tüplerin üzerine 1 gün önceden 10 M ürenin 1 ml'sinde çözündürülmüş histon proteini (1 mg/ml), değişik miktarlarda numaralı tüplere ilave edilmiştir. Elektroforez cihazının alt ve üst kısmı elektroforez tamponu ile doldurularak, güç kaynağının negatif ucu alttaki tanka, pozitif ucu üstteki tanka bağlanarak, sabit akımda tüp başına 4-5 mA akım uygulanmıştır.

Tüm elektroforetik çalışmalarda izleme boyası olarak metil yeşili kullanılmıştır. Bu boya elektroforetik alanda tüm histon türlerinden daha hızlı bir mobiliteye sahip olduğundan, ne kadar süre ile elektroforeze devam

edileceği, boyanın jeldeki **yürütmesi** ile saptanılmıştır. Boya komponenti tüplerin alt ucuna yaklaşınca, elektroforeze son verilerek, uzun bir hipodermik iğne ile tüplerin alt ve üst kenarlarından yavaşça girilip jeller gevşetilerek çıkarılmıştır. Çıkarılan jeller deney tüplerinde bulunan önceden hazırlanmış, boya solüsyonları içine(elektroforetik göçüm yönlerine göre) konup belli bir süre boyanmaya bırakılmışlardır. Boyama işlemi için iki temel boya kullanılmıştır. Bunlardan biri % 7'lik asetik asit içinde % 0.4'lük çözeltisi hazırlanan Amido Black(Naphtol Blue Black), diğerisi ise yine % 7'lik asetik asit içinde hazırlanmış olan % 0.1'lik Commassie Blue boyalarındır. Boyama işleminden sonra, jellerin fazla boyaları alınmış (destaining) olup, jeller stok solüsyonlarında aylarca bozulmadan muhafaza edilmişlerdir. Bantların daha kesin ve net biçimde görünmeleri için, Amido Black boya solüsyonu ile boyanan jellerin fazla boyaları, metanol:asetik asit:distile su (40:10:50 v/v) solüsyonu ile alınarak, jeller yine aynı solüsyonda muhafaza edilmişlerdir. Metanol, aynı zamanda jellerin su alıp şişmesini de engellemektedir. Commassie Blue ile boyanan jellerin fazla boyası ise, % 7'lik asetik asit içinde alınarak aynı solüsyonda muhafaza edilmişlerdir.

Bütün bu işlemlerden sonra net pozitif yükleriyle doğru orantılı, molekül büyüklükleriyle ters orantılı olarak yer değiştiren histon fraksiyonlarının elektroforetoqramları yapılarak incelenmişlerdir.

2.3.2. Histon Proteinlerinin Slab Gel Elektroforezi

Bu metodla histon proteinlerin elektroforezi için baslıca iki jel sistemi kullanılmıştır. Bunlardan birincisi, disk elektroforezinde de kullanılmış olan asit-üre-poliakrilamid jel sisteminin bu metoda uygulanmış olanıdır. İkin-cisi ise, Kerese (1984) tarafından histon proteinler için bildirilmış olan poliakrilamid slab gel elektroforezidir. Bu metod için, aşağıdaki solüsyonlar hazırlanarak kullanılmıştır.

Akrilamid Solüsyonu (pH 4.3): 60 g akrilamid, 1.4 g N,N'-metilenbisakrilamid bir miktar distile suda eritilerek 100 ml'ye tamamlanır.

Jel Tamponu (pH 4.3): 48 ml 1 N KOH, 17.3 ml glasiyel a-setik asit, 4 ml Temed ile beraber 100 ml'ye tamamlanır.

Ammonyum Persulfat: 0.28 g ammonyum persulfat 100 ml distile suda eritilir (% 0.28 persulfat).

Alt ve kenar kısımları vazelinlenmiş pleksiglas çubuklarla (20 x 1 x 0.3 cm) kapatılarak sıkıştırılmış iki cam tabaka (20 x 18 cm) arasına jel karışımından dökülmüştür. Jel karışımı (pH 4.3), akrilamid solüsyonu: jel tamponu: distile su: ammonyum persulfat (2:1:1:4 v/v) solüsyonlarını içerir (% 15 jel konsantrasyonlu). Jel döküldükten sonra, üstteki açık kısım için özel olarak yapılmış tarak zaman geçirilmeden jelin içine oturtularak tarakla jel arasında kalmış olan boşluklar pastör pipetiyle yavaşça distile su ile tabaka oluşacak şekilde kapatılmıştır. Jel yaklaşık 2 saat içinde iyi bir şekilde polimerize olur. Cam tabakaların alt kısmındaki pleksiglas çubuğu

yavaşça çekilerek alınır ve alt tabakadaki çukur bırakılmış kısım üstteki tamponla jelin temasını sağlayacak şekilde cihaza sıkıca kelepçelenir. Jel tarağı yavaşça çekilerek alınır. Elektroforez cihazının alt ve üst kısmı tamponla doldurulur. Burada da bir gün önceden 10 M ürede çözüldürülmüş (1 mg/ml) olan histon proteininden belli miktarlarda tarağın jelde bırakmış olduğu aralıklara uygulanarak elektroforezleri yapılmıştır. Bu sistemde kullanılan elektroforez tamponu daha önce disk jel elektroforezinde de kullanılmış olan beta-alanin tamponudur. Ancak, burada bu tampon pH 5.0'e ayarlanarak kullanılmıştır. Genelde, jelin cm^2 'sine 0.2-0.3 mA akım uygulanarak 6-7 saat elektroforeze devam edilmiştir.

2.4. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Akrilamid, N,N'-metilenbisakrilamid, beta-alanin ve coomassie blue BDH Chemical Ltd.'den; metil yeşili (methyl green), metanol, sülfürik asit, aseton ve glasiyel asetik asit MERCK'den; dana timusu (calf thymus) histonu SIGMA Chemical Co.'dan; temed (tetrametilendiamin), EDTA (etilendiamintetraasetik asit= titriplex III), Amido.Black 10B (Naphtol Blue Black), etanol, HCl, NaCl ve KOH laboratuvarımızdan sağlanmıştır.

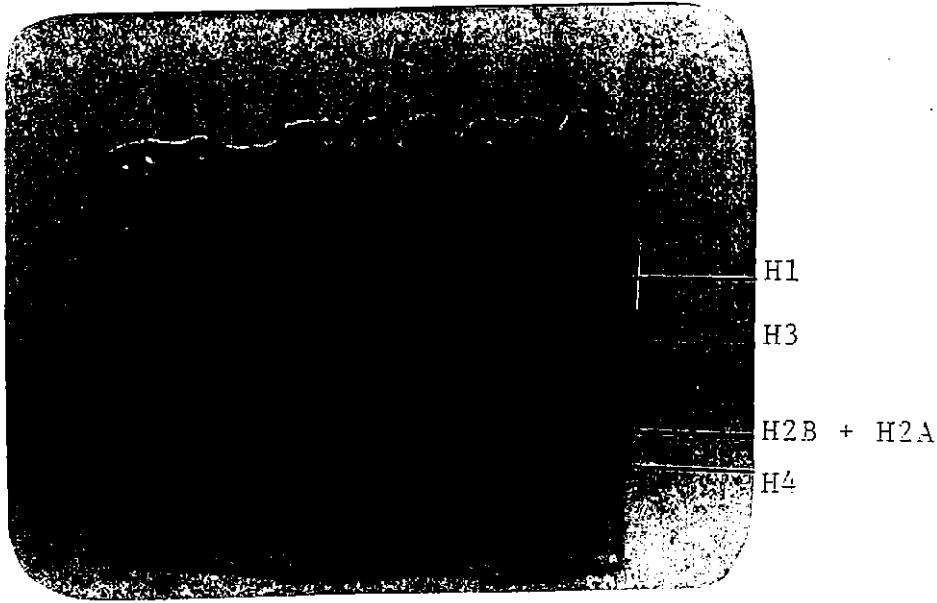
3. BULGULAR

Soğan tohumu kökleri ve sıçan karaciğerinden saflaştırılan histon proteinlerle hazır olarak saf halde sağlanmış olan dana timusu histon proteinlerinin elektroforetik özelliklerinin oldukça benzer olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.1.). Tüm elektroforetik çalışmalarda H2B ve H2A histon fraksiyonları nisbeten bir arada yoğun bir bant oluştururlarken, diğer fraksiyonların birbirinden bariz bir şekilde ayrıldıkları saptanmıştır.

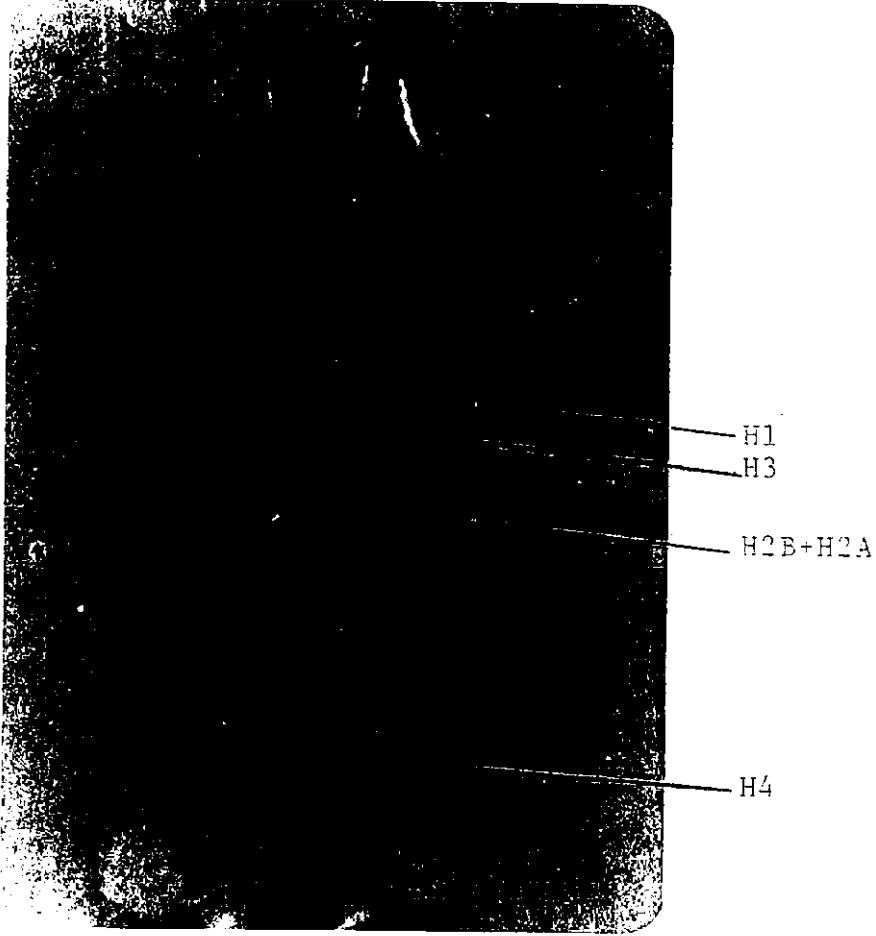
Soğan tohumu köklerinden saflaştırılan histon proteini fraksiyonlarının birbirinden iyi bir şekilde ayrılmaları için, jel konsantrasyonunun biraz yüksek (% 15) ve elektroforez süresinin daha uzun (7 saat kadar) tutulması gerektiği kanısına varılmıştır.

Benzer şekilde değişik jel konsantrasyonlarında elektroforezleri yapılmış olan sıçan karaciğeri histon proteinlerinin ise özellikle % 7,5'lük asit-üre-poliakrilamid jel sisteminde 6-7 saatlik süre içinde iyi bir şekilde ayrıldıkları gözlenmiştir (Şekil 3.2; 3.3 ve 3.4).

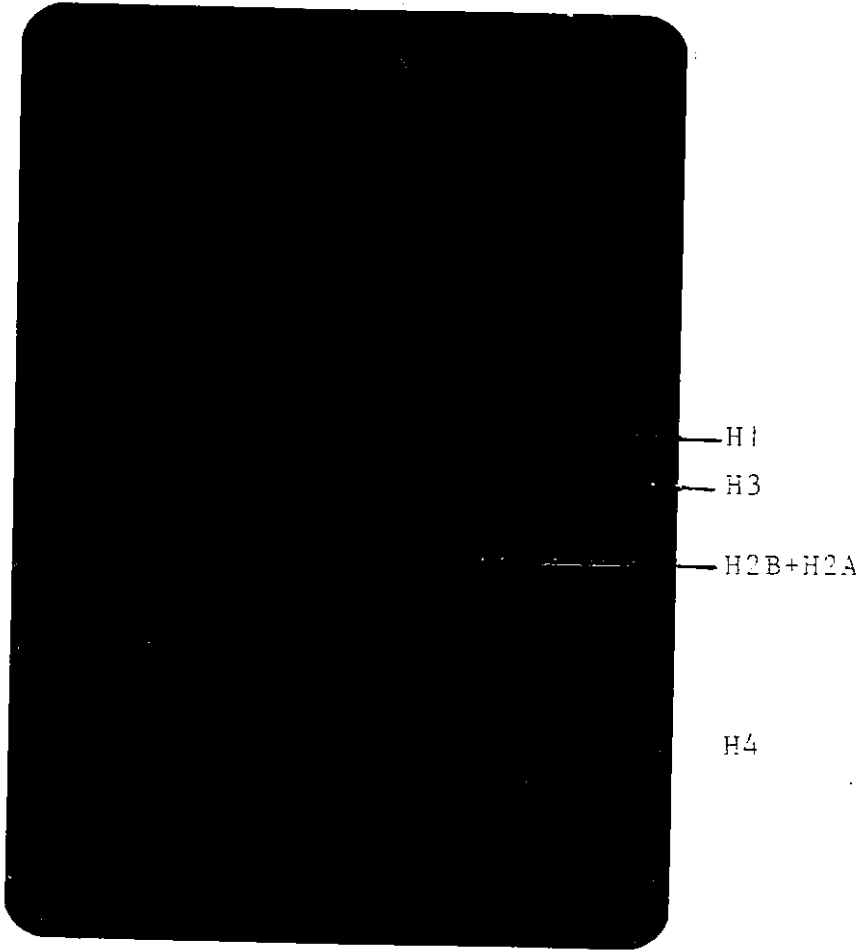
Birkaç deneyde, üretici bir firmadan hazır olarak sağlanmış olan dana timusu (calf thymus) histon proteinleri kullanılmış ve bu proteinlerin de benzer şekilde fraksiyonlar verdikleri gözlenmiştir (Şekil 3.1c).



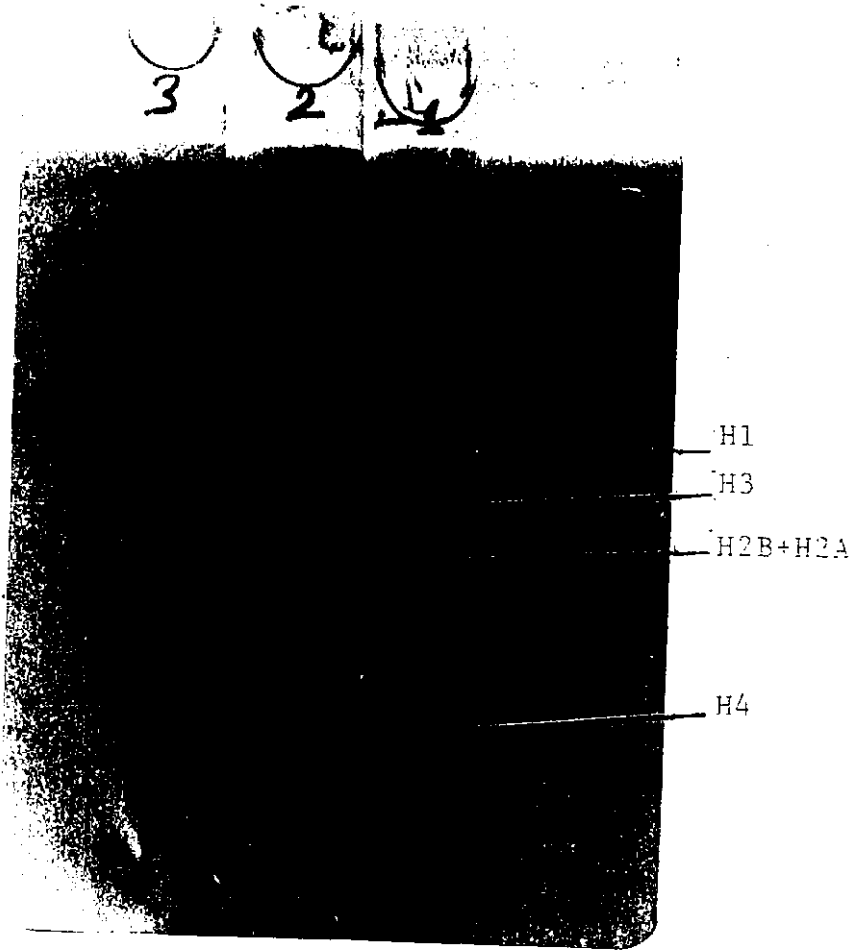
Şekil 3.1. (a) soğan tohumu kökü, (b) sıçan karaciğeri,
(c) dana timusu histon proteinlerinin % 15
poliakrilamid slab gel elektroforezleri. Elek-
troforez işlemi 60 mA'de 7 saatte yapılmıştır.



Şekil 3.2. Sıçan karaciğeri histon proteinlerinin poli-
akrilamid disk jel elektroforezleri. %7.5
jel konsantrasyonlu asit-üre-poliakrilamid
sisteminde 7 saat tüp başına 4 mA sabit akım
uygulanarak birbirinden ayrılmış olan histon
fraksiyonları. Her tüpte histon örneğinden
(1 mg/ml) 60 mikrolitre bulunmaktadır.



ekil 3.3. Sıçan karaciğeri histon proteinlerinin % 7.5 poliakrilamid disk jeldeki ayrılımları. Her tüpe 50 mikrolitre histon çözeltisi uygulanarak elektroforez sürese 6 saat tutulmuştur.



Şekil 3.4. Sıçan karaciğeri histon proteinlerinin % 7.5 jel konsantrasyonlu poliakrilamid jel sistemindeki elektroforetik görünüşleri. Her tüpe 100 mikrolitre (0.1 ml) histon çözeltisi uygulanarak elektroforez süresi 7 saat tutulmuştur.

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Soğan tohumu kökleri için bütün dokudan total histon ekstraksiyonu, hem basitliği ve hem de izolasyon işleminin kısa sürede yapılabilirliği nedeniyle oldukça pratik bulunmuştur. Kimyasal fraksiyonlama metodu ile sıçan karaciğerinden histon proteinlerinin saflaştırılması ise hem de nisbeten daha karmaşık işlemlere gerek duymaktadır. Ancak, bu metodla yaş dokunun gramı başına yaklaşık 15 mg histon proteininin saflaştırılmış olması, bu metodun verimliliğini gösterir.

Soğan tohumu köklerinde ise bu oran yaş dokunun gramı başına yaklaşık 0,45 mg kadar bulunmuştur. Bu değer sıçan karaciğerinden elde edilmiş olan değere göre çok küçük olmakla beraber, bitkisel dokular için yüksek kabul edilebilir.

Soğan tohumu kökleri ve sıçan karaciğeri gibi birbirinden oldukça farklı iki kaynaktan saflaştırılmış olan histonların, değişik jel sistemlerinde yapılmış olan elektroforezlerinde dikkati çeken en önemli nokta, bu proteinlerin oldukça benzer elektroforetik özellikler göstermeleri olmuştur.

Tüm elektroforetik çalışmalarda, histon proteinlerinin moleküler özelliklerine bağlı olarak H4>H2A>H2B>H3>H1 şeklinde bir elektroforetik mobiliteye sahip oldukları gözlenmiştir.

Elektroforetik özellikleri biribirene yakın bulunmuş olan değişik orijinli histon proteinlerinin, özellikle

asit-üre-poliakrilamid jel sistemlerinde iyi bir şekilde fraksiyonlarına ayrıldıkları görülmüştür. Bu sistemde, %7,5 akrilamid konsantrasyonlu jellerin histon fraksiyonlarının birbirinden belirgin bir şekilde ayrılmaları için yeterli olduğu kanısına varılmıştır. Ancak, poliakrilamid jellerde de akrilamid konsantrasyonunun % 15' e çıkarılıp elektroforez süresinin 6 saatin biraz üzerine çıkarılması durumunda fraksiyonların benzer şekilde birbirinden iyice ayrıldıkları saptanmıştır.

Özel moleküler yapısından dolayı tüm elektroforetik çalışmalarda H4 histon proteini en yüksek mobiliteye sahip histon fraksiyonu olarak belirlenmiştir. En düşük elektroforetik mobiliteye sahip protein olarak da H1 saptanmıştır.

Panyim ve Chalkley (1969), Bolund ve Johns (1973), Branson ve ark. (1975), Weintraub ve ark. (1975), Bonner (1980) ve Moreno ve ark. (1985) tarafından yapılan elektroforetik çalışmaların sonuçları bulgularımızı destekleyici niteliktedir.

Sonuç olarak, birbirinden oldukça farklı doku ve canlı sistemler olmakla beraber soğan tohumu kökleri, sıçan karciğeri ve dana timusu histon proteinlerinin benzer elektroforetik özellikler göstermeleri, bu proteinlerin aynı veya benzer moleküler özelliklere sahip olmaları ile açıklanabilir.

ÖZET

Histon proteinlerin saflaştırılması için bu çalışmada materyal olarak, soğan tohumu genç kök uçları ve sıçan (rat) karaciğeri kullanılmıştır. Büyümekte olan genç kök uçlarında ve yüksek derecede rejenere olabilen sıçan karaciğesinde mitotik faaliyet çok hızlı devam etmekte, dolayısı ile nuklear materyal de oldukça fazla bulunmaktadır.

Böyle dokularda DNA, RNA ve dolayısı ile histon proteini sentezinin de çok hızlı olacağı düşüncesiyle bu materyaller seçilmişlerdir.

Her iki dokudan, histon proteinlerin saflaştırılması iki farklı metodla gerçekleştirilmiştir. Soğan tohumu kökleri için bütün dokudan total histon ekstraksiyonu sıçan karaciğeri içinse kimyasal fraksiyonlama metodu ile histon proteinler saflaştırılmıştır.

Saflaştırılmış histon proteinlerin değişik jel sistemlerinde elektroforetik özellikleri araştırılmıştır. Özellikle % 7.5 jel konsantrasyonlu asit-üre-poliakrilamid sistemlerde nisbeten H2B ve H2A histon fraksiyonları hariç diğer histon fraksiyonlarının iyi bir şekilde birbirlerinden ayrıldıkları gözlenmiştir.

Her iki dokudan elde edilen histonların elektroforetik özelliklerinin oldukça benzer olduğu kaydedilmiştir.

SUMMARY

Growing young root tips of onion seeds and rat liver were used in this study for isolation of histones. The amount of nuclear material and mitotic activity are very high in the growing root tips and rat liver which have higher regenerating capacity.

The synthesis of DNA, RNA and histone proteins are very rapid in this tissues. Therefore, it was thought that these tissues were good sources for the extraction of histones.

Histone extraction in these tissues were accomplished in two different methods. The whole tissue was used for total histone extraction for growing root tips of onion and chemical fractination method for rat liver.

Extraction of histone were obtained by utilizing two different methods and used in electrophoresis for analysis of electrophoretic properties of the histone proteins. It was noticed that, histones in the 7.5% gel concentration of the acid-urea-polyacrilamide system were relatively separated from each other and gave good resolution, except H2B and H2A protein fractions.

The electrophoretic properties of histones in both growing ^oot tips of onion and rat liver are found to be quite similar.

INON
GENL

51
51

BİBLİYOGRAFYA

Kitaplar

- Allfrey, V. G., "Biosynthetic Reactions in the Cell Nucleus", in Aspects of Protein Synthesis, C. B. Anfinsen (ed.), New York, Academic Press, 1970.
- Bonner, J., "Chromosome Biology and Chemistry", in the Evolution of Protein Structure and Function, New York, Academic Press, 1980.
- Busch, H., Histones and Other Nuclear Proteins, New York, Academic Press, 1965.
- Deniz, E., Tıbbi Biyoloji (Biologia Medica), Ankara, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, 1985.
- Gözükara, E. M., Biyokimya (baskıda), 1988.
- Günalp, A., Ayter, Ş., Lüleci, G., Kart, A., ve Sakızlı, M., Tıbbi Biyoloji, Ankara, Meteksan Yayınları, No:17, 1986.
- Hames, B. D., and Rickwood, D., Gel Electrophoresis of Proteins, Oxford-Washington DC., IRL Press, 1972.
- Hnilica, L. S., The Structure and Biological Function of Histones, Cleveland-Ohio, CRC Press, 1972.
- Kerese, I., Methods of Protein Analysis, Chichester, Ellis Horwood Publishing, 1984.
- King, J., Protein and Nucleic Acid Structure and Dynamics, California, The Benjamin/Cummings Publishing Co., 1985.
- Kumar, A., Eukaryotic Gene Expression, New York, Plenum Press, 1984.
- Lehninger, A. L., Biochemistry, New York, Worth Publishers, 1976.

- Lewin, B., Gene Expression ,New York,Willey Publication, 1980.
- Lewin, B., Genes, New York, Willey Publication, 1983.
- Menevşe, A. ve Menevşe, S., Temel Biyokimya, Ankara, Ankara İktisadi ve Ticari İlimler Akademisi Tıp Fakültesi Yayınları, No:12, 1982.
- Orten, J. M., and Neuhaus, O. W., Human Biochemistry, London, The C. V. Mosby Co., 1982.
- Padilla, G. M., and McCarty, K. S., Genetic Expression in the Cell Cycle, New York, Academic Press, 1982.
- Phillips, D. M. P., Histones and Nucleohistones, London, Plenum Press, 1971.
- Philips, I., Shephard, A., Stein, J. L., and Stein, G., Altered Protein and Aging, R. C. Adelman and G. S. Roth (eds.), Florida, CRC Press, 1983.
- Makaleler
- Berdinkov, V. A., and Gorel, F. L., "Ratios between Histone Fraktions", Molecular Biology, 9(5), 1975, 559-564.
- Bolund, L. A., and Johns, E. W., "The Selective Extraction of Histones Fraktions from Deoxyribonucleoprotein", Eur. J. Biochem., 35, 1973, 546-553.
- Branson, R. E., Grimes, S. R., Yonuschot, G., and Irvin, J.L., "The Histones Rat Testis", Archives of Biochemistry and Biophysics, 168, 1975, 403-412.
- Camerini, R. D., Webb, B. S., and Felsenfeld. G., "The Organization of Histones and DNA in Chromatin", Cell, 8, 1976, 333-347.
- Caron, F., and Thomas, J. O., "Exchange of Histone H1 between Segments of Chromatin", J. Mol. Biol., 146, 1981, 513-537.

- D'Anna, J. A., and Isenberg, I., "A Complex of Histones IIb2 and IV", Biochemistry, 12(6), 1973, 1035-1042.
- D'Anna, J. A., and Isenberg, I., "Conformational Changes of Histone ARE (F3, III)", Biochemistry, 13(24), 1974, 4987-4991.
- D'Anna, J. A., and Isenberg, I., "A Histone Cross-Complexing Pattern" Biochemistry, 13(24), 1974, 4992-4997.
- Dewes, K. W., Bachmann, M., Zahn, R. K., and Müller, W. E. G., "Chromatin Structure from the Marine Sponge *Geodia cydonium*", Comp. Biochem. Physiol., 76 (4), 1983, 769-775.
- Fambrough, D. M., and Bonner, J., "On the Similarity of Plant and Animal Histones", Biochemistry, 5(8), 1966, 2563-2569.
- Fambrough, D. M. and Bonner, J., "Sequence Homology and Role of Cystine in Plant and Animal Arginine-Rich Histones" 213(17), 1968, 4434-4439, The Journal of Biological Chem.,
- Fambrough, D. M., Fujimara, F., and Bonner, J., "Quantitative Distribution of Histone Components in the Pea Plant", Biochemistry, 7(2), 1968, 575-584.
- Gözükara, E. M., "Histon Proteinlerin Saflaştırılması ve Elektroforetik Özellikleri", Biyokimya Dergisi, 3 (1-2), 1978, 251-264.
- Gurley, L. R., and Shepherd, G. R., "High Resolution Disc Electrophoresis of Histones", Analytical Biochemistry, 14, 1966, 364-375.
- Hannon, R., Bateman, E., Allan, J., Harborne, N., and Gould, H., "Control of RNA Polymerase Binding to Chromatin by Variations in Linker Histone Composition", J. Mol. Biol.

- Hecker, H., and Gander, E. S., "The Compaction Pattern of the Chromatin of Trypanosomes", Biol. Cell, 53, 1985, 199-208. 199-208.
- Hohmann, P., "Species- and Cell-Specific Expression of H1 Histones in Tissue Culture Cells", Archives of Biophysics, 205(1), 1980, 198-209.
- Johns, E. W., Phillips, D. M. P., Simson, P., and Butler, J. A. V., "The Electrophoresis of Histones and Histone Fractions on Starch Gel", Biochem. J., 80, 1961, 189-193.
- Johns, E. W., "Studies on Histones", Biochem. J., 92, 1964, 55-59.
- Johns, E. W. "The Electrophoresis of Histones in Polyacrylamide Gel and Quantitative Determination", Biochem. J., 104, 1967, 78-82.
- Johns, E. W., "A Method for the Selective Extraction of Histone Fractions F2(a)1 and F2(a)2 from Calf Thymus Deoxyribonucleoprotein at pH 7.0", Biochem. J., 105, 1967, 611-614.
- Johns, E. W., and Forrester, S., "Interactions between the Lysine-Rich Histone F1 and Deoxyribonucleic Acid", Biochem. J., 111, 1969, 371-374.
- Jordano, J., Nieto, M. A., and Palacian, E., "Dissociation of Nucleosomal Particles by Chemical Modification", The Journal of Biological Chemistry, 260(16), 1985, 9382-9384.

- King, D., and Cole, R. D., "Chemical Cross-linking of H1 Histone to the Nucleosomal Histones", The Journal of Biological Chemistry, 254(22), 1979, 11688-11695.
- Kornberg, R. D., and Thomas, J. O., "Chromatin Structure: oligomers of the histones", Science, 184, 1974, 865-868.
- Kornberg, R. D., "Chromatin Structure: a repeating unit of histones and DNA", Science, 184, 1974, 868-871.
- Mende, L., M., Waterborg, J. H., Mueller, R. D., and Matthews, H. R., "Isolation, Identification, and Characterization of Histones from Plasmodia of the True Slime Mold *Physarum polycephalum* Using Extraction with Guanidine Hydrochloride", Biochemistry, 22, 1983, 38-51.
- Moreno, M. L., Puigdomenech, P., and Palau, J., "Structural Studies on *Allium cepa* L. Chromatin", Biochemical and Biophysical Research Communications, 129(3), 1985, 645-650
- Panyim, S., and Chalkley, R., "The Heterogeneity of Histones", Biochemistry, 8(10), 1969, 3972-3979.
- Panyim, S., and Chalkley, R., "A New Histone Found Only in Mammalian Tissue with Little Cell Division", Biochemical and Biophysical Communications, 37(6), 1969, 1042-1049.
- Thomas, J. O., and Butler, P. J. G., "Characterization of the Octamer of Histones Free in Solution", J. Mol. Biol., 116, 1983, 768-781.

- Van der Westhuyzen, D. R., and Von Holt, "A New Procedure for the Isolation and Fractination of Histones", Febs Letters, 14(5), 1971, 333-337.
- Vanfleteren, J. R., Van Bun, S. M., and Van Beeumen, J. J., "The Primary Structure of Histone H2A from the Nematode *Caenorhabditis elegans*", Biochem. J., 243, 1987, 297-300.
- Weintraub, H., Palter, K., and Van Lente, F., "Histones H2A, H2B, H3 and Form a Tetrameric Complex in Solutions of High Salt", Cell, 6, 1975, 85-110.
- Walker, R., *The Molecular Biology of Enzyme Synthesis*, New York, Willey Publications, 1982.