

**Model bir G-Proteine Kenetli Reseptör olan
Maya Ste2p Feromon Reseptörünün
Üçlü ve Dörtlü Etkileşimlerinin
Çift Moleküllü Floresan Birleşme (BiFC) ve
Förster Rezonans Enerji Transferi (FRET)
Metotları ile Gösterilmesi**

Program Kodu: 1002

Proje No: 215Z063

Proje Yürütücüsü:
Doç. Dr. Çağdaş D. Son

Bursiyer(ler):
Orkun Cevheroğlu

1 Önsöz

Bu projenin kapsamında, model bir G-proteine kenetli reseptör olan maya feromon reseptörü Ste2p'nin, hücre içerisinde daha önceden gösterilen ikili eşleşmeden fazla olarak üçlü ve dördü eşleşmesi çift moleküllü floresan eşleşme (BiFC) ve Förster rezonans enerji transferi (FRET) kullanılarak gösterilmesi amaçlanmaktadır. Proje TÜBİTAK 1002 programı dahilinde 215Z063 proje numarasıyla desteklenmiştir.

2 İçindekiler

1	Önsöz	2
2	İçindekiler	2
3	Tablo ve şekil listeleri	3
3.1	Tablo listesi	3
3.2	Şekil listesi	3
4	Özet ve “Abstract”	5
4.1	Özet	5
4.2	Abstract	7
5	Sonuç Raporu Ana Metni	9
5.1	Giriş	9
5.2	Gereç ve Yöntem	14
5.3	Bulgular ve tartışma	19
5.3.1	Üçlü kolokalizasyon deneyleri:	26
5.3.2	Dördü FRET deneyleri:	27
5.4	Sonuç	29
5.5	Literatür Özeti	30

3 Tablo ve şekil listeleri

3.1 Tablo listesi

Tablo 5-1 PZR ile N-mCherry (1-159) ve C-mCherry (160-237) protein parçalarının 304. pozisyonundan Ste2p dizileri içerecek şekilde çoğaltılması için tasarlanmış primer dizileri:	14
Table 5-2 mCherry çoğaltılmasında kullanılan PZR koşulları:	14
Tablo 5-3 Ste2p reseptörünün FP ya da FP parçası ile işaretlenmesinde kullanılan PZR koşulları:	15
Tablo 5-4 DpnI reaksiyon koşulları:	16
Tablo 5-5 Ste2p konstraktlarının çift promotörlü plazmide klonlanması için kullanılan primerler:	16
Tablo 5-6 Çift promotörlü reseptörlere Ste2p konstraktlarının klonlanmasında kullanılan PZR koşulu:	17
Tablo 5-7 PZR ürünleri için restriksiyon enzimleri ile reaksiyon koşulu:	17
Tablo 5-8 Çift promotörlü plazmidler için restriksiyon enzimleri ile reaksiyon koşulu:	18
Tablo 5-9 Ligasyon reaksiyon koşulları:	19

3.2 Şekil listesi

Şekil 5-1 STE2 cDNAsı taşıyan pBEC1 ya da pCL01 plazmidlerinin FP ya da FP parçacıklarıyla işaretlenmesi.	15
Şekil 5-2 pESC-TRP and pESC-URA (Agilent Technologies, CA, USA) temelli çift promotörlü plazmidlerin çoklu klonlama bölgesi haritaları.	18
Şekil 5-3 EGFP ile işaretlenmiş Ste2p BiFC konstraktlarının biyolojik fonksiyon analizi.	19
Şekil 5-4 EGFP veya mCherry ile işaretlenmiş C kuyruğu kesik Ste2p BiFC konstraktlarının biyolojik fonksiyon analizi.	20
Şekil 5-5 Tam uzunluktaki floresan protein ile işaretlenmiş Ste2p konstraktlarının fonksiyonel analizi.	20
Şekil 5-6 Tam uzunluktaki floresan protein ile işaretlenmiş C kuyruğu kesik Ste2p konstraktlarının fonksiyonel analizi.	21
Şekil 5-7 Ste2p konstraktlarını ekspres eden BJS21 maya hücrelerinin western blot görüntüsü.	22
Şekil 5-8 Ste2p konstraktlarını ekspres eden BJS21 maya hücrelerinin western blot görüntüsü.	23
Şekil 5-9 Ste2p[N-EGFP] ve Ste2p[C-EGFP] taşıyan U12 plazmidinin DK102 hücrelerinde ekspresyonu	24

Şekil 5-10 Ste2p[N-EGFP]305-431ve Ste2p[C-EGFP]305-431 taşıyan U34 plazmidinin DK102 hücrelerinde ekspresyonu.	24
Şekil 5-11 Ste2p[N-mCherry] ve Ste2p[C-mCherry] taşıyan T67 plazmidinin DK102 hücrelerinde ekspresyonu	25
Şekil 5-12 DK102 maya hücrelerinde Ste2p konstraktlarının üçlü koekspresyonu.....	26
Şekil 5-13 Sadece Ste2p-EGFP (donör) veya Ste2p-mCherry (akseptör) ekspres eden hücrelerin görüntüleri.	27
Şekil 5-14 DK102 hücrelerinde Ste2p EGFP BiFC çifti ve Ste2p mCherry BiFC 4'lü ekspresyonunun FRET görüntüleri.....	28

4 Özet ve “Abstract”

4.1 Özet

Bu projenin amacı, model bir G-proteine kenetli reseptör olan maya feromon reseptörü Ste2p'nin, üçlü ve dördü eşleşmesinin çift molekülflü floresan eşleşme (BiFC) ve Förster rezonans enerji transferi kullanılarak gösterilmesi, reseptör agonisti olan maya α -faktör feromonunun, Ste2p oligomerleşmesi üzerindeki olası etkilerinin araştırılmasıdır.

GPKRler, ökaryotlardaki en geniş hücre zarı reseptör ailesini oluşturmaktadırlar. Hücre dışı kimyasal (hormonlar, nörotransmitterler, kalsiyum iyonları v.b.) ve duysal (ışık, koku ve tat molekülleri) gibi çok çeşitli uyarının algılanmasındaki rolleri göz önünde bulundurulduğunda, GPKR ailesi en önemli duyu sistemlerinden biridir ¹. Konunun seçilmesindeki nedenler üç başlık altında özetlenebilir. İlk olarak, birçok hücre dışı uyarın, hücrenin içine bu reseptörlerle iletilmektedir ². İkinci neden, bu reseptörlerdeki mutasyonlar ve fonksiyonel problemler diyabet, hiperkalsemi, hipertansiyon, hipotiroid, retinitis pigmentosa, obezite, kanser ve birçok psikolojik hastalıklara neden olmaktadır ³. Üçüncü olarak, reçeteli ilaçların yaklaşık %50'si bu reseptörleri hedeflemektedir, dolayısıyla GPKRler moleküler farmakoloji araştırmalarının odak noktasında yer almaktadırlar ⁴. GPKR eşleşmesi kabul görmüş bir olgudur, ancak GPKRlerin ne amaçla eşleştikleri henüz bilinmemekle birlikte; bu eşleşmenin reseptör intöernalizasyonu, olgunlaşması, işlev ve farmakolojisi üzerinde önemli rolleri olduğu düşünülmektedir.

Daha önceki araştırmamızda yeşil protein (EGFP) ve BiFC tekniğini kullanarak Ste2p proteinin kendisi ile etkileşimini tayin edilmiştir. Bölünmüş EGFP parçaları, N-EGFP ve C-EGFP ile yedinci transmembran bölgeden hemen sonra işaretlenen Ste2p reseptörleri maya hücrelerinde aynı anda üretildikten edildikten sonra, ikili reseptör eşleşmesi BiFC metodu ile gösterilmiştir. Bu projede ise Ste2p reseptörünün üçlü ve dördü etkileşimleri incelenmiştir. Bu amaç doğrultusunda reseptör yedinci transmembranı takip eden bölgeden hem tam uzunluktaki mCherry floresan proteini hem de biri N-mCherry diğeri C-mCherry protein parçaları ile işaretlenmiştir. Proje kapsamında, EGFP ve mCherry floresan proteinleriyle ve bu proteinlerin parçalarıyla işaretlenmiş Ste2p reseptörlerinin, konfokal mikroskop, BiFC ve FRET yöntemleri kullanılarak çoklu etkileşimleri incelenmiştir.

Bu proje neticesinde model GPKR olan Ste2p maya feromon reseptör eşleşmesinin yalnızca ikili bir etkileşimden ibaret olmadığı, üçlü ve dördü bir etkileşimin varlığı gösterilmiştir. Ste2p ikili etkileşimi ile ilgili yapılmış araştırmalar bu model GPKR'nin agonistinin, eşleşmeye herhangi bir etkisinin olmadığını göstermiş; ancak α -faktörün çoklu reseptör etkileşimini etkileyebileceği yönünde bir hipotez sunmuştur. Bu projede ligandın çoklu reseptör

etkileşimine etkileri de araştırılmıştır. Proje sonucunda elde edilen bulgular, GPKR tetramer etkileşmesinin mevcut literatüre önemli katkılarda bulunacağı öngörüsündeyiz.

Anahtar Kelimeler: G proteine kenetli reseptörler, konfokal floresan mikroskopi, iki moleküllü floresan birleşme (BiFC), Förster enerji transferi (FRET).

4.2 Abstract

Aim of this study is to investigate the three and four receptor oligomerization of a model GPCR; yeast pheromone receptor Ste2p, using bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assay and Förster resonance energy transfer (FRET); and the effect of receptor agonist, yeast α -factor pheromone on Ste2p oligomerization.

G protein-coupled receptors (GPCRs) belong to the largest cell surface receptor family in eukaryotic cells. Considering the role of these receptors in sensing a wide variety of extracellular signals such as chemicals (hormones, neurotransmitters, chemoattractants, calcium ions) and sensory signals (light, odorants and taste molecules); the GPCRs constitute one of the most important sensory system. The reason of this study can be summarized under three main points. Firstly, many of the extracellular signals are detected by cell surface receptors and transmitted inside the cell by G proteins that serve as molecular switches ². Second, mutations and functional problems of these receptors are linked to many human diseases such as diabetes insipidus and mellitus, hypercalcaemia, obesity, hypertension, cancer, hypothyroidism, retinitis pigmentosa and many psychotic disorders ³. Third, GPCRs are the targets of ~50% of pharmaceuticals on the market hence a major focus of molecular pharmacology research ⁴. GPCR dimerization is a well-accepted phenomenon yet the reason for this dimerization is not clearly known. This interaction could have important roles in internalization, maturation, function and/or pharmacology of these receptors.

In our previous studies, BiFC and split enhanced green fluorescent protein (EGFP) was used to determine the interaction between various Ste2p constructs. Co-expression of two constructs, one with the N-terminus of EGFP at the end of the 7th transmembrane domain and the other with the C-terminus of EGFP inserted at the same position, led to the discovery of dimers. In this study, we showed the three and four receptor oligomerization. For this, we tagged Ste2p receptors with full-length mCherry and with N-terminus of mCherry or the C-terminus of mCherry attached to the 7th transmembrane domain. These Ste2p constructs, tagged with fluorescent proteins or their fragments was used for the investigation of receptor oligomerization using confocal microscope, BiFC and FRET.

As a result of the study we showed that, the model GPCR, Ste2p does not exist only as dimers but as three or four receptor oligomers. Previous studies on the dimerization of Ste2p showed that the agonist of this model GPCR has no effect on the dimerization; but proposed that α -factor may have an effect on the oligomerization state of these receptors. In this project, using

the methods developed to show receptor oligomerization, we investigated receptor oligomerization. As a result, we showed the higher oligomerization of a model GPCR.

Keywords: G protein-coupled receptor (GPCR), confocal fluorescence microscopy, bimolecular fluorescence complementation (BiFC), Förster resonance energy transfer (FRET).

5 Sonuç Raporu Ana Metni

5.1 Giriş

GPCR'ler, ökaryotlardaki en geniş hücre zarı reseptör ailesini oluşturmaktadırlar. Hücre dışı kimyasal (hormonlar, nörotransmitterler, kalsiyum iyonları, analjezikler v.b.) ve duyuşsal (ışık, koku ve tat molekülleri) çok çeşitli uyarının algılanmasındaki rolleri göz önünde bulundurulduğunda, GPCR ailesi en önemli reseptör sistemlerinden biridir ¹. GPCRler ilk keşfedildikleri zaman hücrede tekil reseptörler olarak çalışıldıkları ve hücre dışı uyarınları bir reseptör bir G-protein kompleksi şeklinde ilettikleri düşünülse de ¹, son 15 yıldır yapılan araştırmalar neticesinde reseptör eşleşmesi (*ing.* dimerization) birçok hücre zarı reseptörü için kabul görmüş bir olgu halini almıştır. İkili ve çoklu eşleşme reseptörlere, artan ligand seçiciliği, reseptör intörnalizasyonu ve trafiği, çok yönlü etkileşim ve afinite, hücre zarı hareketliliği gibi tekli reseptörün sahip olamayacağı birçok özellik yüklediği düşünülmektedir ⁵.

GPCR yapı ve işlevi, memeli sistemlerinin karmaşıklığından kaynaklanan zorluklar nedeniyle birçok model organizmada çalışılmıştır. İnsan genomundaki yaklaşık 1000 adet GPCR'e ⁶ karşın mayada (*Saccharomyces cerevisiae*) toplam üç adet GPCR bulunmaktadır. Maya hücrelerinde birleşme, *MatA* türü hücrelerde Ste2p reseptörünün α -faktör; *Mat α* türü hücrelerde ise Ste3p reseptörlerinin α -faktör feromonunu tanıması neticesinde oluşur; üçüncü GPCR olan Gpr1p reseptörü ise glikozu algılamaktan sorumludur. G-protein sinyal ve yönetimi temel prensipleri ilk kez genetik ve biyokimyasal metotlar kullanılarak maya feromon reseptörünün (Ste2p), feromon peptidine (α -faktör) karşı tepkisi incelenerek gösterilmiştir. G-protein ve MAPK ile ilgili birçok önemli sinyal mekanizması ilk olarak *Saccharomyces cerevisiae*'de gösterilmiştir ⁷. $G_{\beta\gamma}$ alt-ünitesinin (*ing.* subunit) sinyal mekanizmasındaki pozitif rolü yine ilk defa maya hücrelerinde ispatlanmıştır ⁸. MAP kinaz modülünün üç katmanlı yapısı ⁹ ve kinaz yapı destek (*ing.* scaffold) proteinlerinin ¹⁰ varlığı ilk defa maya hücreleri kullanılarak gösterilmiştir. Reseptörlerin desensitizasyonun hedefi oldukları bilinmektedir; G-proteinlerin, G-protein sinyal regülatör (RGS) proteinleri ile desensitizasyonu yine maya hücrelerinde SST2 geninde yapılan mutasyonlar neticesinde gösterilmiştir ¹¹. Sst2 homologları diğer ökaryotlarda daha sonraları RGS proteinleri olarak isimlendirilmiştir ve G-protein GTPaz aktivitesini hızlandırarak G_{α} - $G_{\beta\gamma}$ alt-ünite birleşmesine neden olduğu gösterilmiştir ⁷. Monoübiküitinlenmenin reseptör endositozundaki rolü de yine ilk defa maya hücrelerinde gösterilmiştir ^{12 13}. Memeli hücrelerindeki GPCR aracılığıyla gerçekleşen sinyal yollarının çoğu işlevsel ve yapısal olarak maya feromon sinyal yolağına benzemektedir ¹⁴, özellikle G-protein ve kinaz komponentleri dizinsel olarak memeli sistemlerindeki karşıtlarıyla yüksek benzerlikler göstermektedir ¹⁵. Tüm bu bilgiler ve bulgular ışığında maya gerek GPCR-GPCR, GPCR-G-protein gerekse GPCR-ligand etkileşimlerinin ve mekanizmalarının anlaşılması ve

çalışılması konusunda son derece ideal ve değerli bir model organizmadır ^{14, 16}. Ek olarak, maya genomunda hemen hemen her açık çerçeve (*ing. open frame*) sistematik olarak silinmiş ¹⁷, mikroereyler (*ing. microarray*) şeklinde organize edilmiş ¹⁸; her bir gen floresan proteinlerle global protein lokalizasyonu için işaretlenmiş ¹⁹; yine genomdaki her açık çerçeve yüksek afiniteli epitop işaretleyicilerle işaretlenmiş ve kromozomlardaki doğal lokasyonlarından üretilerek, hemen hemen her protein immünoteksiyon ile belirlenmiş ²⁰, saflaştırılarak proteomik ölçekte analiz edilmiştir ²¹. Bu bilgi veri tabanı, gen işlevi ve transkripsiyonu, protein lokalizasyonu ve moleküller arası ilişkiler konusunda sistematik şekilde ve tüm genom ölçeğinde yapılacak araştırmalarda son derece önemli ve ideal bir model organizma konumuna getirmektedir ¹⁵.

Reseptör eşleşmesinin birçok farklı teknikle, çeşitli reseptörlerde gösterilmiştir. 5-HT1B reseptör eşleşmesi Sf9 sinek hücrelerinde immunoblot analizi ile saptanmıştır ²². Bir başka çalışmada D2 ve A1 reseptör eşleşmesi, kovalent çapraz bağlayıcılar kullanılarak *in situ* olarak beyin dokusunda gösterilmiştir ^{22, 23}. Farklı bir çalışmada ise satürasyon ve rekabetli bağlanma (*ing. competition binding*) deneyleri ile glutamat ve adenosin reseptörleri arasında güçlü bir eşleşme gösterilmiştir. Son yıllarda BRET (Biyoluminesan RET), FRET (Floresan RET) ve BiFC gibi floresan mikroskopi tekniklerinin gelişmesi GPCR etkileşimlerinin canlı hücrelerde incelenmesini mümkün kılmıştır. 2000 senesinde Overton ve Blumer Ste2p reseptörü ve FRET tekniğini kullanarak, bu reseptörün ikili eşleşmesini ilk defa göstermişlerdir ²⁴. Bir başka çalışmada ise Angers ve ekibi β 2-adrenergic reseptör eşleşmesini memeli HEK-293 hücrelerinde göstermiştir ²⁵. Daha yakın tarihli bir başka çalışmada ise meme bezinde oksitosin reseptör eşleşmesi zaman-çözümlemeli (*ing. time resolved*) FRET tekniği ile ortaya konmuştur ²⁶.

SDS-PAGE'de kovalent çapraz bağlama (*ing. covalent cross-linking*), koimmünopresipitasyon (*ing. coimmunoprecipitation*), FRET, BRET, fonksiyonel birleştirme gibi çok çeşitli biyokimyasal ve biyofiziksel teknikler kullanılarak GPKRler eşleşmesinin sadece *in vitro* değil, aynı zamanda dokularda da gerçekleştiği gösterilmiştir. GPKRler canlı hücrelerde, ER ve Golgi'de modifikasyon, hücre zarına trafik, reseptörün ligandıyla aktivasyonu ve intörnizasyonu gibi birçok aşamada bulunurlar ²⁷. Ancak, GPKR ikili ve çoklu eşleşme mekanizmaları ve bu eşleşmenin reseptör biyokimyası üzerindeki etkilerinin anlaşılması için halen cevaplanması gereken birçok soru bulunmaktadır. Reseptör eşleşmesinin, biyosentez, reseptör trafiği ve sinyal yollarında ne tür etkileri olduğu henüz tam olarak anlaşılması değildir.

Reseptör eşleşmesinde bir diğer önemli kavram ise GPKR'lerin ligand bağlanmamış pasif hallerinde eşleşmiş halde buldukları ya da bu eşleşmenin dinamik bir halde ligand bağlanmasıyla modüle edilip edilmediğinin gösterilmesidir. Şimdiye kadar toplanmış bulgular üç olasılığı işaret etmektedir. Reseptörler bazal koşullarında dimer olarak bulunurlar ve ligand ile uyarıldıklarında bu eşleşme herhangi bir değişiklik göstermez, dolayısıyla bu önceden eşleşmiş kompleks kararlı halde hücrede bulunmaktadır. İkinci olası senaryo ise, ikili eşleşmiş kompleks (*ing.* dimer) bazal koşullarda bulunabilir; ancak reseptör çifti ligand ile uyarıldığında eşleşmenin kapsamında bir modülasyon olur. Üçüncü senaryo ise reseptör eşleşmesinin gerçekleşmesi için ligand ile uyarılma şartı vardır ²⁸. Ligandın çoklu reseptör eşleşmesindeki modüle edici ya da bu çoklu eşleşmeyi artırıcı gerçek rolünün anlaşılması, bu olgunun reseptör işlevi üzerindeki rolü açısından önemli bir katkı sağlayacaktır. Tirozin kinaz, sitokin reseptörleri ve TNF- α reseptör ailesi gibi birçok reseptör ailesinde yapılan çalışmalarda agonist bağlanması ile reseptörlerin kendileri ve diğer reseptörlerle eşleşmesinin arttığı gösterilmiştir; tekli reseptör ile ikili reseptör kompleksi arasındaki dengenin reseptörün aktifleşme sürecinin bir parçası olduğu gösterilmiştir ^{29 30}. Ancak, son kristalografik ve protein-protein etkileşimi çalışmaları erithropoietin reseptörünün ligand ile aktifleşmeden önce ikili olarak bulunduğunu, agonist bağlanması sonucunda ise reseptör aktivasyonunun bir modülasyondan ziyade konformasyonel bir değişim neticesinde gerçekleştiği gösterilmiştir ³¹ ³². Metabotropik glutamat reseptörüyle yapılan benzer bir çalışmada, amino terminal bölgesinin kristal yapısı, ikili eşleşmiş reseptörlerin aktifleşmeden önce oluştukları ve ligand bağlanmasının sadece bu ikili reseptör kompleksinde konformasyonel bir değişiklik oluşturduğunu göstermiştir ³³. Bu reseptörün, geniş N-terminal altyapısında ligand bağlanma bölgesi bulunmaktadır ve bu kısım gerek kristal yapısında, gerekse glutamat ile beraber kristalize (*ing.* cocrystallized) edildiğinde ikili eşleşme halinde tespit edilmiştir. Bu ikili eşleşmiş yapı, ligand bağlı hal ve ligandan serbest hal olmak üzere iki belirgin konformasyonda bulunmaktadır. Bu bulgular glutamatın bağlanması neticesinde, reseptör çiftinin konformasyonel bir değişikliğe neden olarak daha kararlı bir yapının oluştuğuna işaret etmektedir.

Maya feromon reseptörünün (Ste2p), ikili eşleşmesi de yukarıda bahsi geçen metotlarla araştırılmıştır. İkili eşleşmeyi gösteren ilk çalışmalardan biri, influenza HA epitopu ile işaretlenmiş reseptörler ve GFP ile işaretlenmiş reseptörlerle ko-immünopresipitasyonu (*ing.* coimmunoprecipitation) sonucunda, anti-HA antikoru ile analiz edildiğinde hem GFP hem de HA ile işaretlenmiş reseptörlerin SDS-PAGE'de çözümlendiği çalışmadır ³⁴. Bir başka çalışmada, Overton ve Blumer ilk defa Ste2p ikili etkileşimini canlı hücrelerde FRET tekniği kullanarak göstermiştir, bu eşleşmenin de agonist ya da antagonistten bağımsız olduğu vurgulanmıştır ²⁴. 2007 senesinde, başka bir çalışmada ise BRET tekniği kullanılarak benzer

sonuçlar elde edilmiştir ³⁵. Bu alışma ayrıca sinyal kusurlu reseptörlerin dominant negatif bir etkiyle normal reseptörlerle etkileşerek, sinyal yolaklarını engellediğini, dolayısıyla iki fonksiyonel reseptörün doğru sinyalizasyon için gerekli olduğunu ortaya koymuştur. Ste2p reseptörü kullanılarak yapılan bir diğer çalışmada ise ligand aracılığıyla oluşan reseptör intörnalizasyonu atomik güç mikroskobu (AFM), dinamik ışık saçılması (DLS) ve kimyasal çapraz bağlanma teknikleri kullanılarak *in vitro* olarak incelenmiştir ³⁶. Bu alışma neticesinde reseptörün aktif olmadığı koşullarda da ikili eşleşmiş halde buldukları ancak ikili eşleşmenin feromon varlığında arttığı gösterilmiştir. Bu araştırmalar neticesinde, GPKR ikili eşleşmesinin esas olduğu, ligand bağlanmasının ise ikili eşleşmenin kararlılığını arttırdığı ve hatta çoklu etkileşimi de etkileyebileceği ileri sürülmüştür ²⁷. Ancak belirtmek gerekir ki, mayada şimdiye kadar yapılmış reseptör eşleme çalışmaları, bu model organizmada reseptörlerin *in vivo* koşullarda gerçek zamanlı görüntülenmesini ve ikiden fazla reseptör etkileşimini içermemektedir. Bu çalışmalara ek olarak Ste2p reseptör eşlerinin temas yüzeyleri de araştırılmıştır, TM1 ve TM7'nin eşleşmeye etkili olduğu gösterilmiştir ³⁶, bu bulgular teorik hesaplamalarla da uyum halindedir ³⁷. Tüm bu sonuçlar göz önünde bulundurulduğunda, reseptör eşleşmesinin ikili bir kompleksten ziyade daha çok proteinin oluşturduğu oligomerik bir yapı olduğuna işaret etmektedir. Yukarıda bahsi geçen metotlar reseptörlerin ikili etkileşimlerini gösterebilmiştir, çoklu etkileşimlerin araştırılması için yeni metotların geliştirilmesi ya da mevcut metotların birleştirilmesi ile mümkün olabilir.

Protein tamamlanma deneyleri, protein-protein etkileşimlerinin incelenmesinde kullanılan görece yeni bir tekniktir. Bu deneylerde raportör protein parçaları etkileşimi incelenen protein yapısına entegre edilmişlerdir ve bu halde kendi başlarına işlevsel değillerdir. Bağlı oldukları proteinlerin etkileşmesi neticesinde bu raportör protein parçaları da bir araya gelerek işlevlerini geri kazanırlar ³⁸. Bu metot ilk kez 1994 senesinde yayınlanmış bir çalışmada ubiküitin kullanılarak gösterilmiştir ³⁹, daha sonraları β -lactamaz, β -galaktosidaz, floresan proteinler ve çeşitli lusiferazlar yardımıyla protein-protein etkileşmeleri, bakteri, maya, memeli ve bitki hücrelerinde çalışılmıştır ⁴⁰. Floresan proteinlerin kullanıldığı durumlarda bu teknik iki moleküllü floresan birleşme (BiFC) şeklinde isimlendirilmektedir. Bu metotla proteinlerin etkileşimleri *in vivo* şekilde görüntülenebilmektedir; ek olarak bu protein kompleksleri üzerinde ilaçların, agonist, antagonistler gibi diş uyaranların etkilerini de ölçülmesi mümkündür ⁴¹. Protein birleştirme metotları arasında, protein-protein etkileşimlerinin gösterilmesinde en çok kullanılan metot BiFC'dir ^{42 43}. Proteinlerin eşleşmelerinin çalışılmasında, floresan proteinlerle işaretlemenin en büyük avantajı, bu etkileşimlerin *in vivo* halde, normal hücre ortamında, fizyolojik şartlarda ve çok hücreli organizmalarda dahi kullanılabilir oluşudur ⁴⁴. Diğer birleştirme metotları ile kıyaslandığında, BiFC tekniğinin önemli bir avantajı da herhangi bir

harici maddeye ihtiyaç duymaması ve oluşan raportör proteinin kendi floresan özelliğinin kullanılmasıdır.

Maya hücrelerinde çeşitli protein etkileşimleri BiFC metodu kullanılarak saptanmıştır. Bir çalışmada ayırık-GFP ve ikili maya hibrit sistemi uygulanarak Gal4p ve Gal11p arasındaki etkileşim gösterilmiştir ⁴⁵. Diğer bir çalışmada ise hedef proteinler homolog olarak kromozom düzeyinde işaretlenmiştir. *MATa* maya hücrelerindeki Sis1p, *MATa* hücrelerindeki Ssa1p YFP parçalarıyla işaretlenerek diploit hücrelerde bu iki proteinin etkileşmesi gösterilmiştir ⁴⁶. Son olarak, bir başka çalışmada ise hedef proteinlerin üretilmesinde plasmid temelli bir sistem kullanılarak, bu proteinlerin etkileşimleri mitokondri ve hücre çekirdeği gibi çeşitli hücre-altı bölgelerde gösterilmiştir ⁴⁰.

Proje kapsamında kullanılan olan ikinci metot Förster rezonans enerji transferi ya da kısa adıyla FRET'dir. FRET özet olarak uyarılmış donör bir floroforun enerjisini ışınımsız olarak yakınında bulunan alıcı (*ing.* acceptor) moleküllere aktarmasıdır. Bu tür bir enerji aktarmasının gerçekleşmesi için donör ile akseptör arasındaki mesafenin 10 nm'den kısa olması gerekmektedir. Bir diğer önemli faktör ise donör floroforun emisyon spektrumunun, akseptör floroforun eksitasyon spektrumu ile örtüşüyor olmasıdır. Birçok biyokimyasal etkileşim bu RET mesafesi ve altında gerçekleştiği için protein-protein etkileşimleri bu metot kullanılarak gösterilebilmektedir.

Hücre biyolojisinde birçok floresan protein spektroskopik özellikleri göz önünde bulundurulduğunda, FRET donörü ve FRET akseptörü olarak kullanılabilir. Bu floresan proteinler genetik olarak hedef proteinlerin yapısına katılarak, canlı hücrede konfokal mikroskop yardımıyla görüntülenmekte ve elde edilen veriler yüksek spatio-temporal çözünürlükler sunmaktadır. Bu sistemlerde hedef proteinlerin etkileşimleri neticesinde floresan işaretleyiciler bir araya gelerek donör florofordan akseptöre ışınımsız enerji transferine (RET) sebep olurlar.

Daha önceki 110T414 numaralı projemizde Ste2p reseptörünü EGFP (yeşil) parçalarıyla işaretleyerek ikili eşleşmeyi göstermiştik. Bu projede ise aynı reseptör mCherry (kırmızı) floresan protein parçalarıyla işaretlenmiştir. Maya hücrelerinde EGFP parçalarıyla işaretli Ste2p reseptörünün etkileşiminden oluşan EGFP donörü ile yine mCherry parçalarıyla işaretli Ste2p reseptörlerinin etkileşimi neticesinde oluşan mCherry akseptörünü kullanarak, FRET metodu ile dördü reseptör etkileşimi gösterilmiştir.

Proje kapsamında geliştirilen BiFC-FRET-BiFC metoduyla, Ste2p reseptörünün üçlü ve dörtlü protein kompleksi halindeki çoklu eşleşmesi gösterilmiştir.

5.2 Gereç ve Yöntem

Ste2p reseptörünün 304. Pozisyondan, 159-160. amino asitlerinden bölünmüş mCherry parçaları ile işaretlenmesi için tasarlanmış primerler aşağıda Tablo 1.1'de sunulmuştur.

Tablo 5-1 PZR ile N-mCherry (1-159) ve C-mCherry (160-237) protein parçalarının 304. pozisyondan Ste2p dizileri içerecek şekilde çoğaltılması için tasarlanmış primer dizileri:

Primer	Sekans
N-mCherry (1-159) For	GCCACGGCTGCTAATAATGCATCCAAAtggtgagcaagggcgaggag
N-mCherry (1-159) Rev	GTCTGAAGTAATTGTGTTTGT TTA gtcctcggggtacatccgctcggaggaggc
C-mCherry (160-237) For	GCCACGGCTGCTAATAATGCATCCAAAggcgcctgaagggcgagatcaag
C-mCherry (160-237) Rev	GTAAAGTCTGAAGTAATTGTGTTTGT TTA ctgtacagctcgtccatgcc

Ste2p proteininin işaretlenmesinde kullanılacak mCherry parçalarının çoğaltılması için kullanılan PZR koşulları aşağıda verilmiştir:

Table 5-2 mCherry çoğaltılmasında kullanılan PZR koşulları:

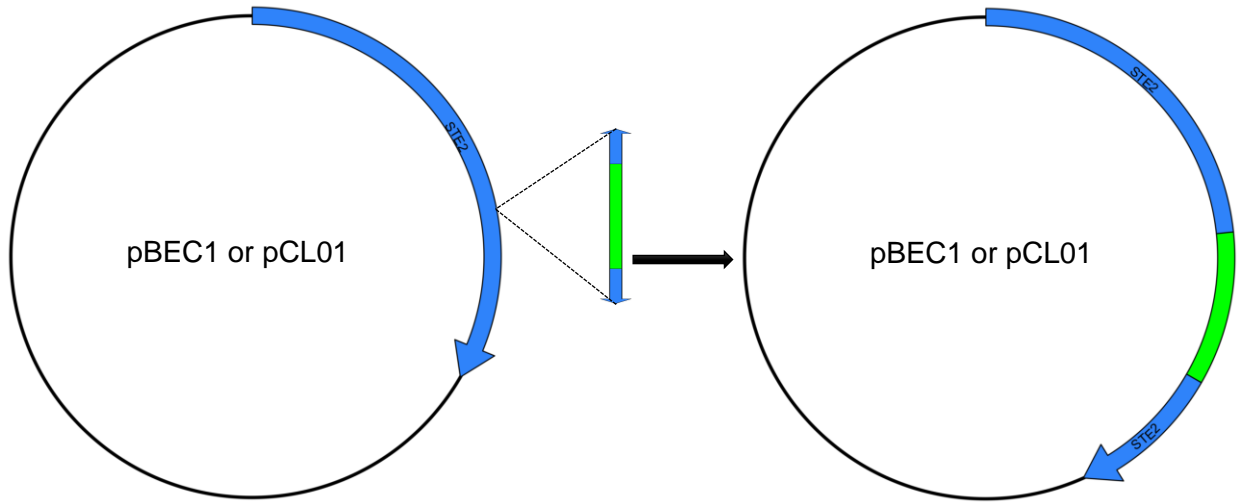
	50 µL rxn	Final conc.
Nükleazsız su	30.5	
5X Phusion HF Buffer	10	1X
10 mM dNTPs	5	200 µM ea.
Primer forward	1.25	0.5 µM
Primer reverse	1.25	0.5 µM
pmCherry-N1	1.5	150 ng
Phusion Hot Start II DNA Polymerase	0.5	0.02 U/µL

98°C 30s
98°C 10s
54.1°C 30s
72°C 2 dk
 72°C 10 dk

} **35 döngü**

PZR ürünleri %1 agarose jelde yürütülerek ilgili DNA bandı QIAquick gel extraction kit (Qiagen, MD, USA) kullanılarak saflaştırılmıştır.

İlk PZR'den elde edilen ürünler kullanılarak ikinci bir PZR'de tandem primer olarak, pCL01 ya da pBEC1 vektörleri şablon olarak kullanılarak çoğaltılmıştır. Böylelikle arzu edilen FP ve/veya FP parçaları Ste2p reseptöründe hedeflenen yere yerleştirilmesi planlanmaktadır. Tasarlanan deneyin şematik gösterimi aşağıdaki figürde sunulmuştur.



Şekil 5-1 STE2 cDNAsı taşıyan pBEC1 ya da pCL01 plazmidlerinin FP ya da FP parçacıklarıyla işaretlenmesi.

Bahsedilen ikinci PZR'de tüm plazmid birinci PZR ürünü ile çoğaltılarak Ste2p reseptörünün 304. pozisyonundan FP ve/veya FP parçacıklarıyla işaretlenmesini sağlayan reaksiyon koşulları aşağıda sunulmuştur:

Tablo 5-3 Ste2p reseptörünün FP ya da FP parçası ile işaretlenmesinde kullanılan PZR koşulları:

	20 µL rxn	Son konsantrasyon
Su	13-X	
5X Phusion HF tamponu	4	1X
10 mM dNTPs	2	200 µM
pBEC1 or pCL01	0.6	60-100 ng
Insert	X	10:1 insert:plazmid
Phusion Hot Start II DNA Polimeraz	0.4	0.04 U/µL

98°C	30s	} 35 döngü
98°C	10s	
50-60°C	30s	
72°C	8 dk	
72°C	10 dk	

PZR sonucunda halen reaksiyon ortamında bulunan "şablon DNA"dan kurtulmak için reaksiyon karışımı DpnI enzimi (Thermo Scientific, MA, USA) kullanılarak 1 saat süreyle sindirilmiştir. Bu reaksiyonda, DpnI bakteride çoğalması sonucunda metillenmiş G_m/ATC DNA sekansını tanıyarak parçalamakta dolayısıyla şablon DNA parçalanmakta ve PZR ile çoğaltılan DNA sirküler olarak kalmaktadır. DpnI enzim reaksiyon koşulları aşağıdaki gibidir:

Tablo 5-4 DpnI reaksiyon koşulları:

20 µL reaksiyon	
PZR karışımı	12
Nükleazsız su	5
Buffer Tango	2
DpnI (Fermentas)	1

1-3 saat, 37°C

Yukardaki enzim sindirim reaksiyonu sonucunda elde edilen karışım direk olarak *E.coli* hücrelerinin transformasyonunda kullanılmakta, takibinde işe plazmidler MiniPrep kit (Fermentas GeneJET™ Plasmid MiniPrep Kit) kullanılarak izole edilmektedir. Tüm bu aşamalar sonucunda elde edilen plazmidler sekanslanarak Ste2p proteinin doğru şekilde işaretlendiği tespit edilmektedir.

Yukarıda anlatıldığı şekilde EGFP, mCherry, N-EGFP, C-EGFP, N-mCherry ve C-mCherry proteinleri ile işaretlenen STE2 cDNA'sı 5' EcoRI – 3' NotI veya 5' BamHI – 3' NheI restriksiyon dizileri arasına klonlanmasını sağlamak için tasarlanan primerler aşağıdaki tabloda sunulmuştur.

Tablo 5-5 Ste2p konstraktlarının çift promotörlü plazmide klonlanması için kullanılan primerler:

Primer	Sekans
Ste2-EcoRI-F	GAGAGAGAGGAATTCATGTCTGATGCGGCTCCTTCATTGAGC
Ste2-NotI-R	GAGAGAGAGGCGGCCGCTtagccgctgctatgatgatgatgatg
Ste2-BamHI-F	GAGAGAGAGGGATCCATGTCTGATGCGGCTCCTTCATTGAGC
Ste2-NheI-R	GAGAGAGAGGCTAGCtagccgctgctatgatgatgatgatg

5' – 3' restriksiyon enzim bölgeleri taşıyacak şekilde Ste2p cDNA'larının çoğaltılmasında kullanılan PZR koşulları aşağıdaki gibidir.

Tablo 5-6 Çift promotörlü reseptörlere Ste2p konstraktlarının klonlanmasında kullanılan PZR koşulu:

	50 µL reaksiyon	Son konsantrasyon
Nükleazsız su	30.5	
5X Phusion HF tamponu	10	1X
10 mM dNTPs	5	200 µM
Forward primer	1.25	0.5 µM
Reverse primer	1.25	0.5 µM
Template DNA	1.5	150 ng
Phusion Hot Start II DNA Polimeraz	0.5	3%

98°C 30s
98°C 10s
54.1°C 30s
72°C 2 min
72°C 10m

} **35cycles**

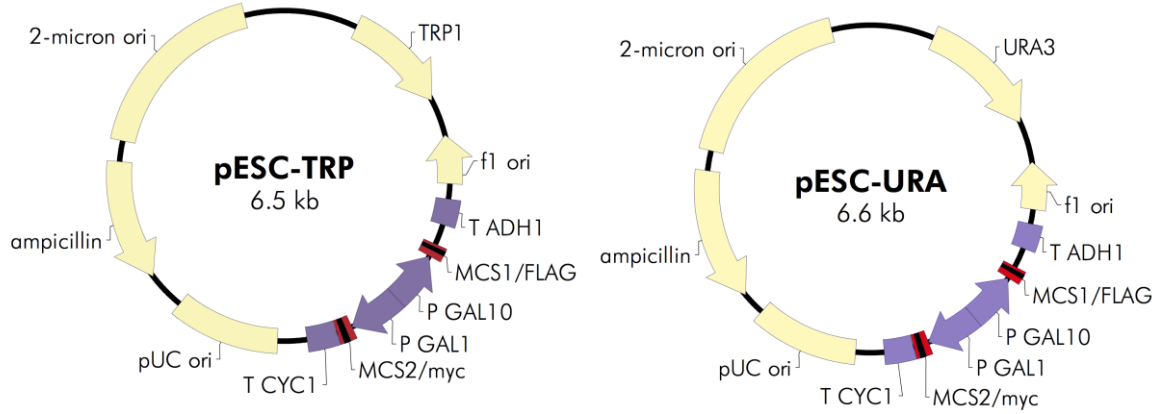
İlgili restriksiyon sekansları içeren PZR ürünleri PCR purification kit (Fermentas GeneJET™ PCR Purification Kit) kullanılarak saflaştırılmıştır. Saflaştırma sonunda elde edilen Ste2p cDNA'ları ve klonlamada kullanılacak plazmid ilgili restriksiyon enzimleri kullanılarak kesilmiştir. PZR ürünleri için reaksiyon koşulları aşağıda verilmiştir:

Tablo 5-7 PZR ürünleri için restriksiyon enzimleri ile reaksiyon koşulu:

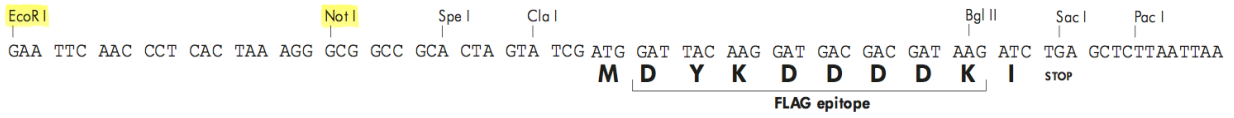
40 µL reaksiyon	
PZR ürünü	34
FD green buffer	4
E1	1
E2	1

1-3 saat, 37°C

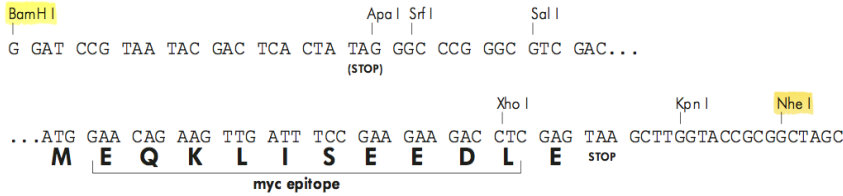
Klonlamada kullanılacak çift promotörlü plazmidlerin pESC-TRP ve pESC-URA (Agilent Technologies) temelli plazmidlerdir. Ticari olarak satın alınan bu plazmidlerin GAL1-GAL10 promotör bölgeleri, sürekli aktif PGK1-TEF1 promotör bölgesi ile değiştirilmiştir. İnşa edilen sürekli aktif plazmidlerin geri kalan tüm özellikleri aşağıda verilmiş pESC-TRP ve pESC-URA plazmidleri haritaları ile tamamen aynıdır.



pESC-TRP Multiple Cloning Site 1 Region
(sequence shown 2071–2154, bottom strand)



pESC-TRP Multiple Cloning Site 2 Region
(sequence shown 2827–2924, top strand)



Şekil 5-2 pESC-TRP and pESC-URA (Agilent Technologies, CA, USA) temelli çift promotörlü plazmidlerin çoklu klonlama bölgesi haritaları.

Klonlamada kullanılacak plazmid için reaksiyon koşulları aşağıda sunulmuştur:

Tablo 5-8 Çift promotörlü plazmidler için restriksiyon enzimleri ile reaksiyon koşulu:

30 µL reaksiyon	
Vector	23
FD green buffer	3
E1	2
E2	2

1-3 saat, 37°C

Kesim reaksiyonu % 1 agaroz jelde yürütülmüş ve ilgili büyüklükteki bantlar QIAquick gel extraction kit (Qiagen, MD, USA) kullanılarak saflaştırılmıştır.

Ligasyon reaksiyon koşulları 1:3 (vector:insert), molar oranda ve 100 ng linear vektör kullanılarak yapılmıştır. Ligasyon reaksiyonunun koşulları aşağıda verilmiştir:

Tablo 5-9 Ligasyon reaksiyon koşulları:

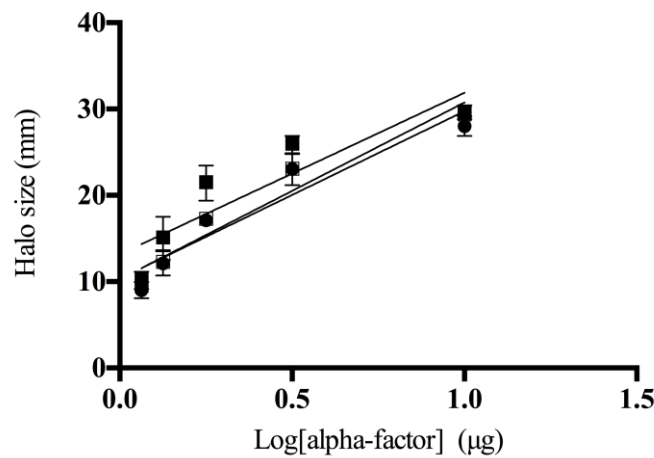
20 µL reaksiyon karışımı	
Vektör	100 ng
Insert DNA	3x molar oran
Nükleazsız su	20-X µL
Buffer Tango (Thermo Fisher Scientific, MA, USA)	2 µL
T4 DNA Ligase (Thermo Fisher Scientific, MA, USA)	1 µL

1 saat, oda sıcaklığında

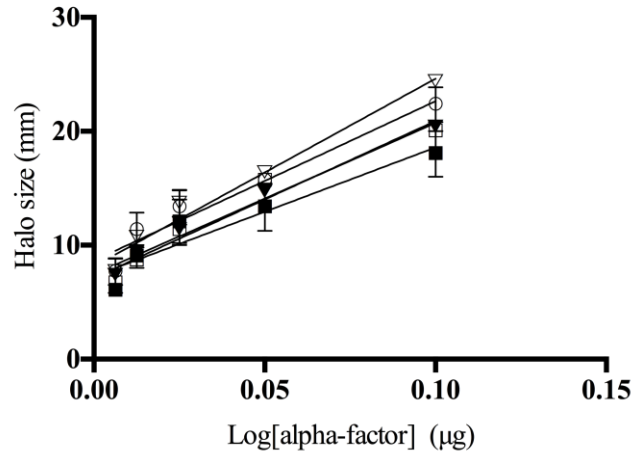
Ligasyon reaksiyon karışımından 1,5 µL alınarak *E.coli* hücrelerinin transformasyonunda kullanılmıştır. Takip eden gün LB/Amp petrielerde büyüyen kolonilerden 3 adet seçilerek, 5 mL LB/Amp sıvıda gece boyu büyütülmüş ve Fermentas GeneJET™ Plasmid MiniPrep Kit (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) kullanılarak plazmidler izole edilmiştir. Elde edilen plazmidler, Ste2p konstraktlarının cDNA'larının doğru klonlanıp klonlanmadığının kontrolü için tekrar ilgili enzimlerle kesilmiş ve agaroz jelde yürütülerek kontrol edilmiştir. Tespit edilen doğru insertlerin DNA dizileri sekanslatılarak onaylanmıştır.

5.3 Bulgular ve tartışma

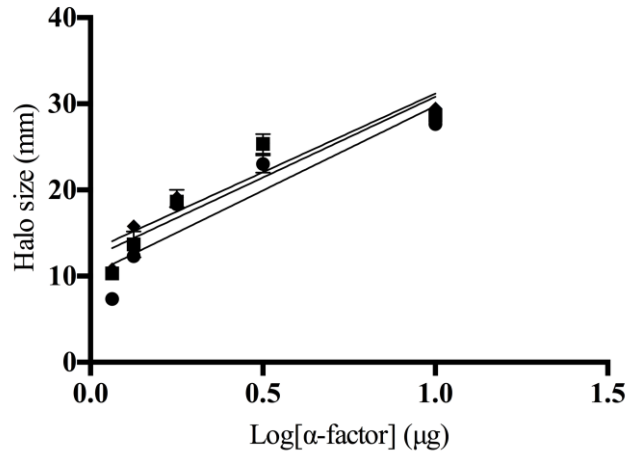
Ste2p konstraktlarının kopyalandığı çift promotörlü plazmidler kullanılarak DK102 maya hücreleri transforme edilmiş ve bu yolla FP ya da FP parçaları ile işaretlenmiş Ste2p reseptörlerinin hücrelerde ekspres ettirilmesi sağlanmıştır. Bu füzyon proteinlerinin fonksiyonel olduklarının gösterilmesi için Halo Assay tekniği kullanılmıştır. Bu teknikte basitçe, reseptörlerin çeşitli konsantrasyonlardaki agoniste karşı tepki sonucu hücrelerin büyümelerinin durması ölçülerek yabanıl tür Ste2p ile karşılaştırılmaktadır. Halo Assay tekniği sonuçları aşağıda sunulmuştur.



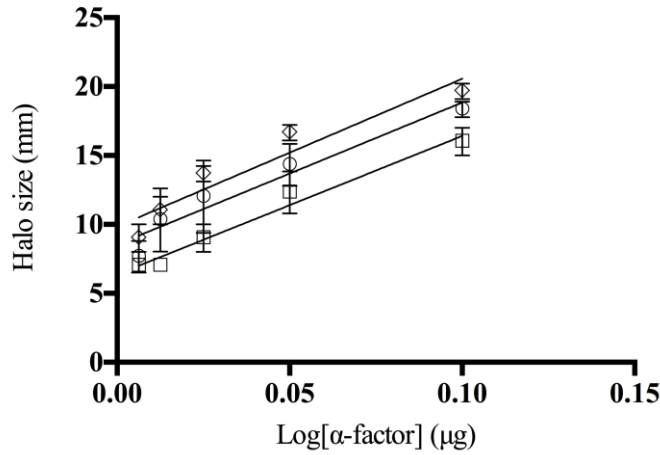
Şekil 5-3 EGFP ile işaretlenmiş Ste2p BiFC konstraktlarının biyolojik fonksiyon analizi. Ste2p yabanıl tür (●); Ste2p[N-EGFP], 304-305 pozisyonlar arasından N-EGFP (1-158) ile işaretlenmiş Ste2p (□), Ste2p[N-EGFP], 304-305 pozisyonlar arasından C-EGFP (159-238) ile işaretlenmiş Ste2p (□).



Şekil 5-4 EGFP veya mCherry ile işaretlenmiş C kuyruğu kesik Ste2p BiFC konstraktlarının biyolojik fonksiyon analizi. Ste2p-Δ305 (O); Ste2p-Δ305[N-EGFP], 304. pozisyondan N-EGFP (1-158) ile işaretlenmiş C kuyruğu kesik Ste2p (□); Ste2p-Δ305[C-EGFP], 304. pozisyondan C-EGFP (159-238) ile işaretlenmiş C kuyruğu kesik Ste2p (□). Ste2p-Δ305[N-mCherry], 304. pozisyondan N-mCherry (1-159) ile işaretlenmiş C kuyruğu kesik Ste2p (▼); Ste2p-Δ305[C-mCherry], 304. pozisyondan C-EGFP (159-160) ile işaretlenmiş C kuyruğu kesik Ste2p (▽).



Şekil 5-5 Tam uzunluktaki floresan protein ile işaretlenmiş Ste2p konstraktlarının fonksiyonel analizi. Ste2p yabanıl tür (●); Ste2p[EGFP], 304-305 pozisyonlar arasından EGFP (1-238) ile işaretlenmiş Ste2p (●), Ste2p[mCherry], 304-305 pozisyonlar arasından mCherry (1-237) ile işaretlenmiş Ste2p (◆).



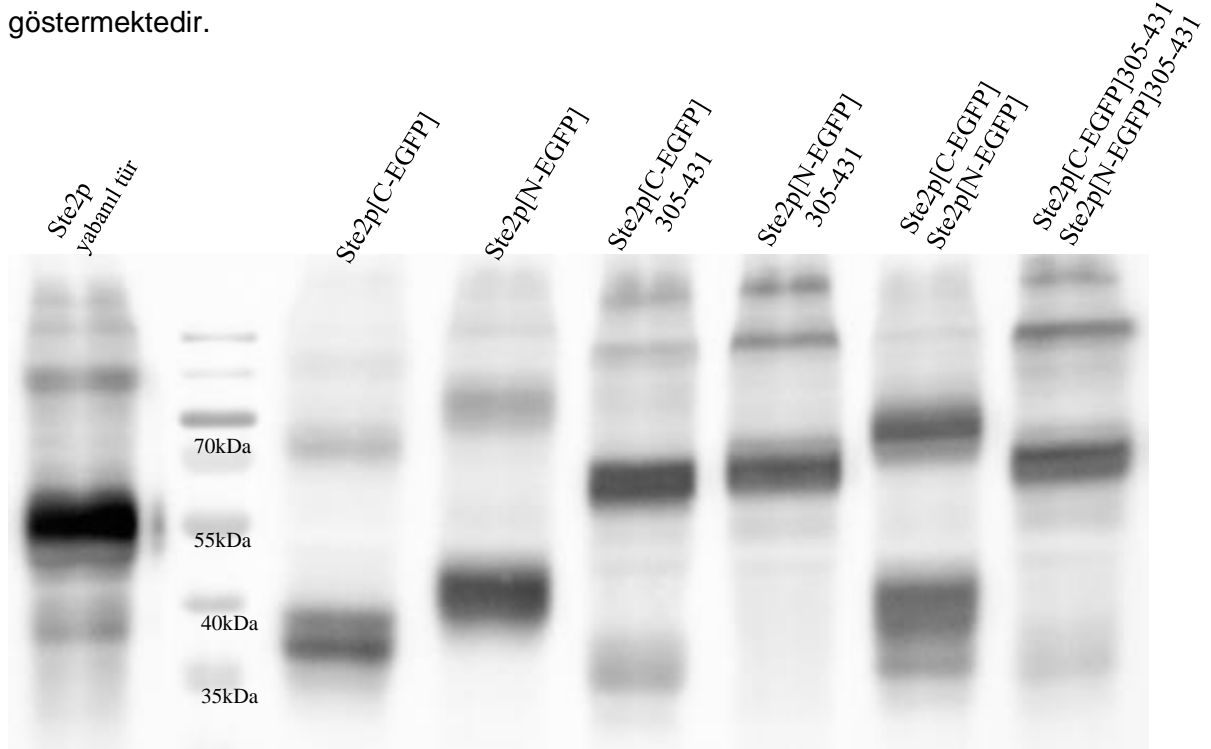
Şekil 5-6 Tam uzunluktaki floresan protein ile işaretlenmiş C kuyruğu kesik Ste2p konstraktlarının fonksiyonel analizi. Ste2p-Δ305 (O); Ste2p-Δ305[EGFP], 304. pozisyonundan EGFP (1-238) ile işaretlenmiş C kuyruğu kesik Ste2p (□); Ste2p-Δ305[mCherry], 304. pozisyonundan mCherry (1-237) ile işaretlenmiş C kuyruğu kesik Ste2p (◇).

Yukarıda verilen Halo Assay grafiklerinden de anlaşılacağı üzere, tüm Ste2p konstraktları yabancı türe benzer bir doğru vermiştir ve dolayısıyla biyolojik olarak fonksiyoneldirler. Literatüre uygun olarak C-kuyruğu kesik reseptörler, bu proteinlerin C-kuyruklarında bulunan SINDAKKS endositoz sinyal dizisinden yoksun olmalarından ötürü yabancı tür reseptöre göre maya feromon peptidine daha duyarlıdır; bu gözlemin sebebi C-kuyruğu kesik reseptörlerin hücre membranında daha uzun süre kalmaları, dolayısı ile daha çok sayıda bulunmalarıdır.

Fonksiyonel olduğu Halo Assay kullanılarak gösterilen Ste2p reseptörlerinin, hücrelerde doğru olarak üretildiğinin de gösterilmesi için Western Blotlama tekniği kullanılmıştır. İnşa edilmiş olan plazmidlerle transforme edilmiş BJS21 maya hücre suşu Western Blotlama için 50 mL seçici ortamda (MLT/MLU) 30 °C'de gece boyu büyütülmüştür. Hücreler iki kere su ile yıkandıktan sonra HEPES (10 mM HEPES and 4 mM EDTA, pH 7.0) solüsyonunda çözülmüş, cam küreciklerle homojenize edilmiştir. Elde edilen karışım hücre debris ve parçalanmamış hücrelerden arındırılmak 5 dakika boyunca 2000 rpm'de santrifüjlenmiştir. Karışım 4 °C'de 15,000 g'de 30 dakika süreyle santrifüjlenmiştir, tüplerin dibine çöken membran pellet HEPES solüsyonunda çözülmüştür ve protein konsantrasyonu BioRad Protein Assay (BioRad, CA, USA) ile ölçülmüştür. Yukarıda anlatıldığı şekliyle elde edilen membran proteinleri SDS örnek tampon çözeltisinde çözülerek, SDS-PAGE ile ayrıştırılarak imünoblot analiz için Immobilon-P membranlara (Millipore Corporation, Bedford, MA) aktarılmıştır. İmünoblotlama anti-FLAG antikor, anti-GFP Tavşan Serum Polyklonal antikor (Molecular Probes, USA), anti-mCherry antikor (16D7, Life Technologies, NY, USA) ve afinite yoluyla saflaştırılmış Ste2p N-terminali için geliştirilen antireseptör serumu antikor ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen protein bantları

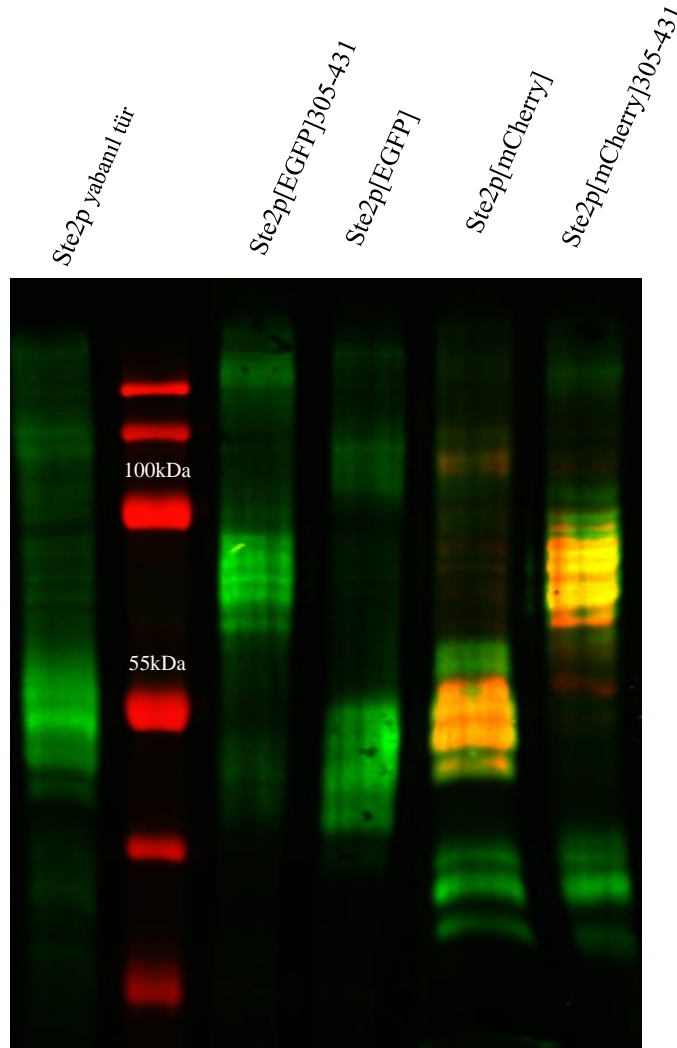
West Pico Chemiluminescent Detection System (Pierce) and Odyssey CLx Infrared Imaging System (LI-COR) kullanılarak görüntülenmiştir.

Aşağıda sunulmuş olan şekil 5-7'de ilk bant yabancı tür Ste2p ekspres eden hücreleri göstermektedir, 52kDa boyutunda görülen çoklu bant paterni reseptörün çeşitli glikolizasyon formlarını göstermektedir^{47 48}. 3 – 6 arası bantlar sırasıyla, Ste2p[C-EGFP] (hesaplanan ağırlık 42 kDa), Ste2p[N-EGFP] (hesaplanan ağırlık 51 kDa), Ste2p[C-EGFP]305-431 (hesaplanan ağırlık 57 kDa) ve Ste2p[N-EGFP]305-431 (1-158) (hesaplanan ağırlık 66 kDa) göstermektedir. C-kuyruğu kesik olan Ste2p konstraktları, Ste2p[C-EGFP] ve Ste2p[N-EGFP], beklendiği gibi yabancı tür Ste2p bandının altında görülmektedir. Tam uzunluktaki Ste2p reseptör konstraktlarına, Ste2p[C-EGFP]305-431 ve Ste2p[N-EGFP]305-431, karşılık gelen 5. Ve 6. bantlar işe yabancı tür Ste2p bandına göre daha yukarda ve moleküler ağırlıklarına uygun şekilde çözülmüşlerdir. Tüm protein bantlarında görülen çoklu bant paterni benzer şekilde Ste2p reseptörünün farklı glikolizasyon formlarından kaynaklanmaktadır. Ayrıca, her sırada görülen yüksek bantlar ise Ste2p reseptörünün dimer/oligomerlerini göstermektedir. Yedinci sıra Ste2p[N-EGFP]/Ste2p[C-EGFP] eşzamanlı ifade eden hücreleri, sekizinci sıra ise Ste2p[C-EGFP]305-431/Ste2p[N-EGFP]305-431 eşzamanlı ifade eden hücreleri göstermektedir.



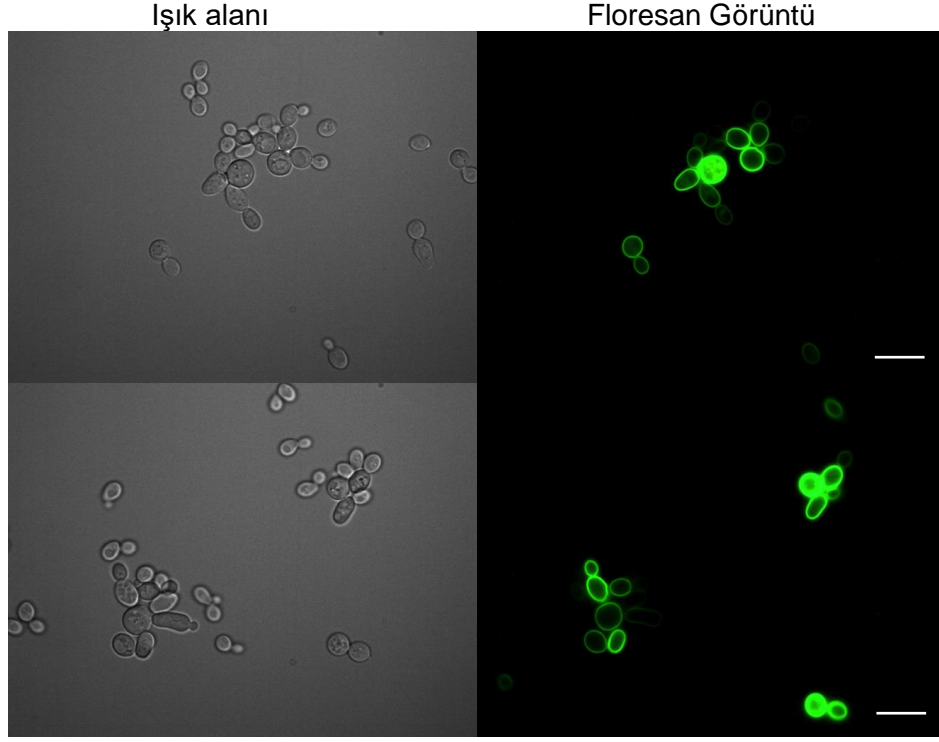
Şekil 5-7 Ste2p konstraktlarını ifade eden BJS21 maya hücrelerinin western blot görüntüsü. Sırasıyla, ilk bant Ste2Δ hücrelerde yabancı tür Ste2p reseptörü (52 kDa), üçten altıya kadar bantlar Ste2p[C-EGFP] (hesaplanan ≈42 kDa), Ste2p[N-EGFP] (hesaplanan ≈51 kDa), Ste2p[C-EGFP]305-431 (hesaplanan ≈57 kDa) and Ste2p[N-EGFP]305-431 (hesaplanan ≈66 kDa). Bant 7 Ste2p[C-EGFP] ve Ste2p[N-EGFP] eşzamanlı üreten hücreler; Bant 8 Ste2p[C-EGFP]305-431 ve Ste2p[N-EGFP]305-431 eşzamanlı üreten hücreleri göstermektedir. 1 – 8 batlar afinite yoluyla saflaştırılmış Ste2p N-terminali için geliştirilen antireseptör serumu antikoru kullanılarak görüntülenmiştir.

Şekil 5.8’de sunulmuş olan Western blot’da Ste2p konstraktları iki antikor kullanarak tespit edilmiştir. Yeşil bantlar afinite yoluyla saflaştırılmış Ste2p N-terminali için geliştirilen antireseptör serumu antikoruna ile tespit edilmiş Ste2p konstraktlarının, kırmızı bantlar anti-mCherry antikor (16D7, Life Technologies, NY, USA) ile tespit edilmiş Ste2p konstraktlarını göstermektedir. Bunun için iki adet sekonder antikor kullanılmıştır; 680nm’de IRDye 680CW Goat anti-rabbit IgG sekonder antikor (LI-COR, NE, USA) ve 800nm’de görüntülenen IRDye 800CW Goat anti-rat IgG sekonder antikor kullanılmıştır.

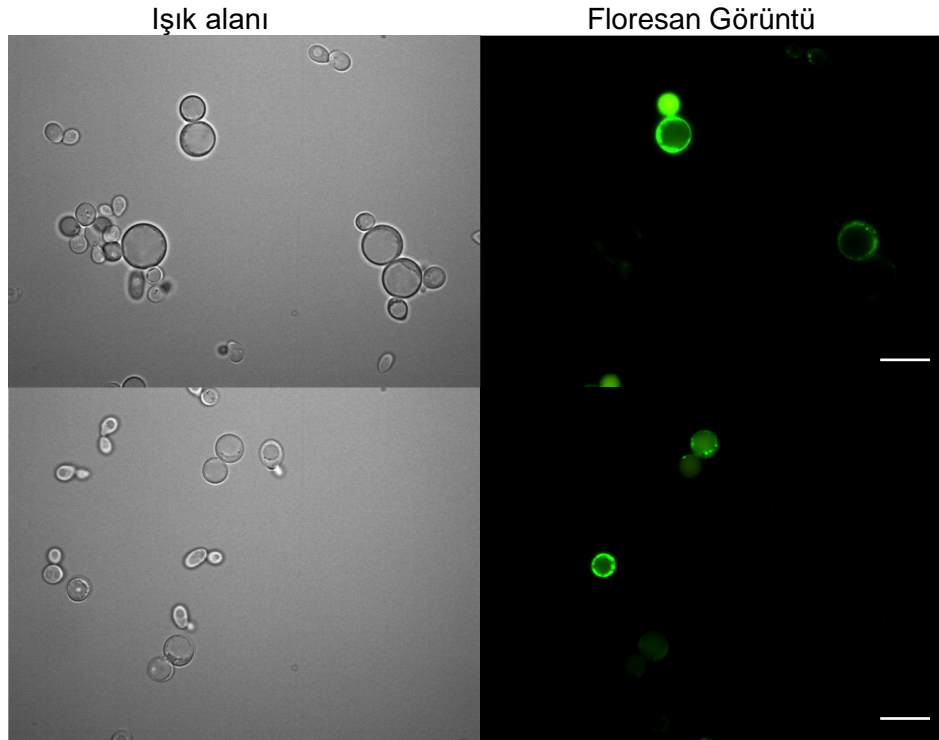


Şekil 5-8 Ste2p konstraktlarını ifade eden BJS21 maya hücrelerinin western blot görüntüsü. İlk bant Ste2Δ hücrelerde yabancı tür Ste2p reseptörü (52 kDa), 3-6 bantlar sırasıyla Ste2p[EGFP]305-431 (hesaplanan ≈75 kDa), Ste2p[EGFP] (hesaplanan ≈60 kDa), Ste2p[mCherry] (hesaplanan ≈60 kDa) and Ste2p[mCherry]305-431 (hesaplanan ≈75 kDa) üreten hücrelerden ekstakt edilen proteinleri göstermektedir. 1-6 bantlar afinite yoluyla saflaştırılmış Ste2p N-terminali için geliştirilen antireseptör serumu antikoruna (yeşil kanal) ile 5-6 bantlar anti-mCherry antikor (kırmızı kanal) ile LI-COR Odyssey CLx Infrared Imaging System kullanılarak görüntülenmiştir.

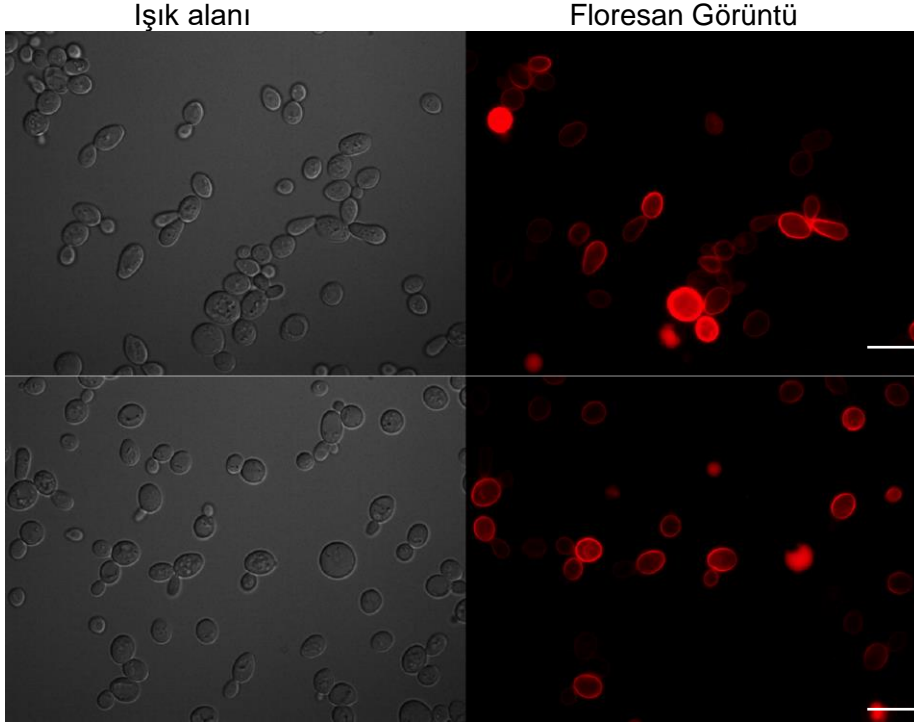
Çift promotörlü vektörlere klonlanan, fonksiyonel olduğu ve doğru şekilde ifade edildiği gösterilen Ste2p mCherry ve EGFP konstraktları DK102 maya hücrelerinde transforme edilerek FRET analizleri için görüntülenmiştir (Şekil 5-9, 5-10, 5-11).



Şekil 5-9 Ste2p[N-EGFP] ve Ste2p[C-EGFP] taşıyan U12 plazmidinin DK102 hücrelerinde ekspresyonu, ölçek 5 μm .



Şekil 5-10 Ste2p[N-EGFP]305-431 ve Ste2p[C-EGFP]305-431 taşıyan U34 plazmidinin DK102 hücrelerinde ekspresyonu, ölçek 5 μm .

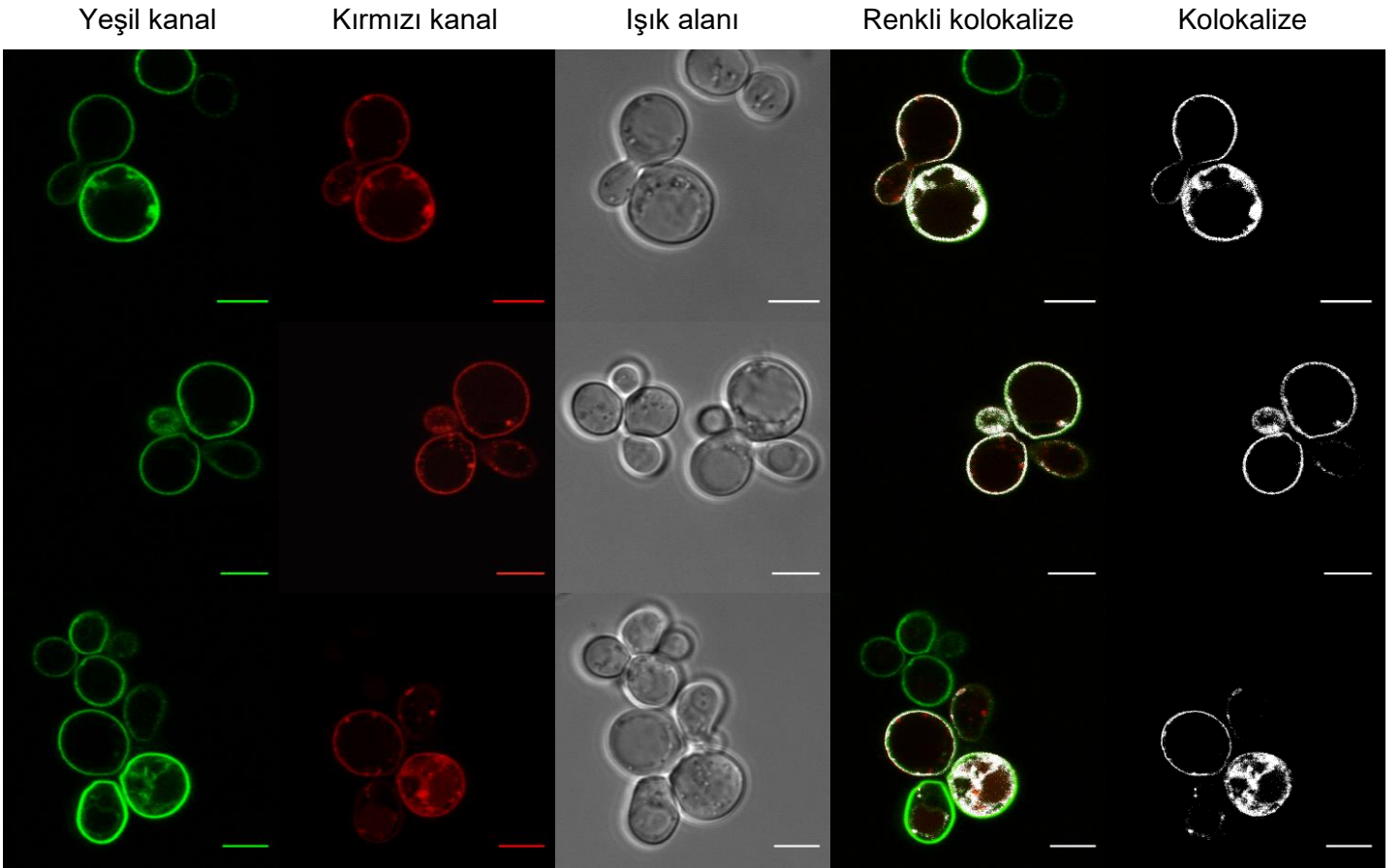


Şekil 5-11 Ste2p[N-mCherry] ve Ste2p[C-mCherry] taşıyan T67 plazmidinin DK102 hücrelerinde ekspresyonu, ölçek 5 μ m.

Bu örnek görüntülerden de anlaşıldığı gibi ikili reseptör etkileşimleri çift promotorlu vektörler kullanılarak başarılı bir şekilde maya hücrelerinde ifade edilmişlerdir. Denen tüm reseptör çiftlerinde beklenen floresan sinyal alınmış ve çoğunlukla hücre zarında reseptör dimerleşmesi görülmüştür.

5.3.1 Üçlü kolokalizasyon deneyleri:

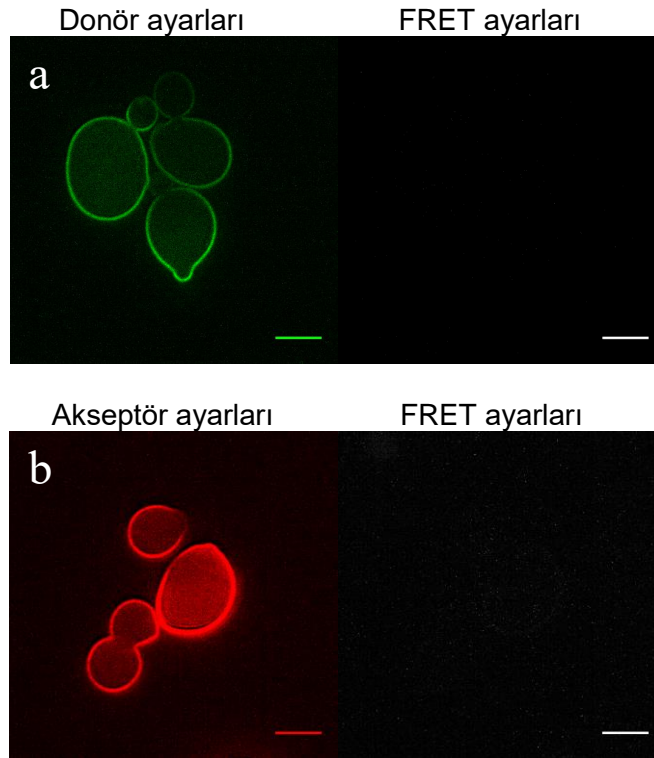
İkili etkileşimleri başarılı bir şekilde tespit edilen reseptörler ile tam uzunlukta floresan proteinlerin üçlü şekilde transfer edildiği maya hücrelerinde kolokalizasyon yöntemi ile reseptörlerin birlikte hücre zarında görüldüğü tespit edilmiştir (Şekil 5-12). Bu bulgular reseptörlerin en az üç reseptörün bir araya gelmesiyle oluşan kompleksler halinde hücre zarında buldukları yönünde ipuçları vermektedir.



Şekil 5-12 DK102 maya hücrelerinde Ste2p konstraktlarının üçlü koekspresyonu; Ste2p[mCherry]305-431 ve C-kuyruğu kesik BiFC çifti; Ste2p[N-EGFP] / Ste2p[C-EGFP]. Soldan sağa 488 nm laser (yeşil kanal) ile uyarılan hücreler, 543 nm laser (kırmızı kanal) ile uyarılan hücreler, Işık alanı görüntüsü, kanalların birleştirilerek elde edilen kolokalize görüntü (RGB) ve yeşil ve kırmızı kanalların kolokalizasyonu ile elde edilen görüntü (ölçek 5 μ m).

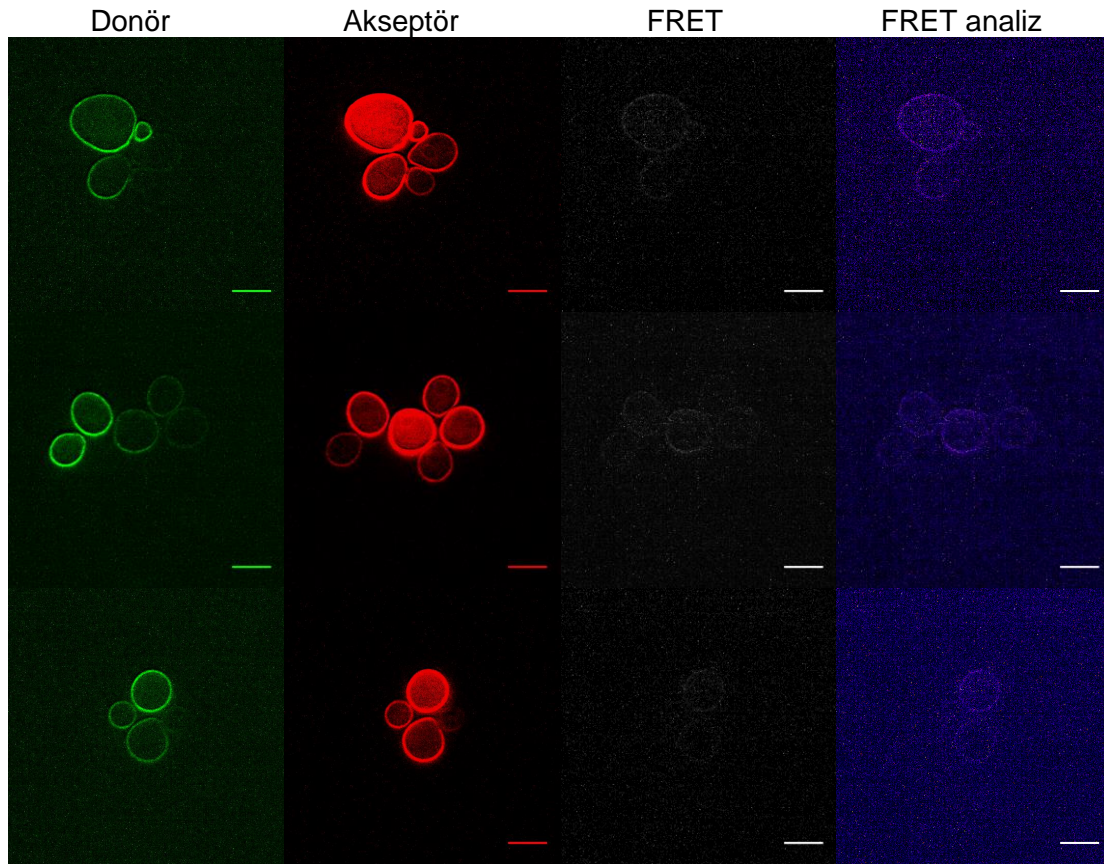
5.3.2 Dörtlü FRET deneyleri:

İkili etkileşimi BiFC ve üçlü etkileşimi BiFC-floresan kolakalizasyon deneyleriyle gösterilen Ste2p reseptörlerinin hücre zarında dörtlü etkileşim içinde olup olmadıklarını araştırmak için BiFC ve FRET yöntemlerinin birlikte kullanıldığı bir deney düzeneği kurulmuştur. Bu görüntüleme çalışmalarında birbirleri ile etkileşen reseptör dimerleri yeşil ve kırmızı floresan proteinlerin birleşme ve ışınmasını sağlayacaklardır. Yeşil floresan proteinin donör, kırmızı floresan proteininin de akseptör olarak görev aldığı FRET deneylerinde sinyal alınması dört reseptörün birbirleri ile etkileşecek kadar yakın bir mesafede (<10 nm) olduğunu göstermektedir. Bu deneyler için ilk önce Donör karışımı ve Akseptör karışımı denen, donör ve akseptörün FRET kanalında ışınma verip vermediği kontrol edilmelidir. Şekil 5-13 de görülen ve bu çalışmada optimizasyonu yapılan mikroskop ayarlarında alınmış görüntülerde yalnızca donör ya da yalnızca akseptör ifade eden hücrelerin FRET kanalında görüntüleri tespit edilmemektedir.



Şekil 5-13 Sadece Ste2p-EGFP (donör) veya Ste2p-mCherry (akseptör) ifade eden hücrelerin görüntüleri. (a) EGFP donör görüntüsü, ilk görüntü yeşil kanal, ikinci görüntü FRET kanalı siyah beyaz (b) mCherry akseptör görüntüsü, ilk görüntü kırmızı kanal, ikinci görüntü FRET kanalı siyah beyaz (ölçek 5 µm).

Donör ve akseptör floroforlarını oluşturabilecek dört reseptörün birlikte ifade edildiği maya hücrelerinde ise FRET kanalında belirgin bir sinyal alınmaktadır (Şekil 5-14). Bu sinyalin düşük seviyelerde olmasının birçok sebebi olabilir. Dört floresan parçasının uygun açılarda birbirleri ile etkileşme olasılığı bu parçaların reseptör proteinler üzerindeki pozisyonuna çok bağlıdır. İlerleyen çalışmalarda bu umutverici sonuçlar ışığında floresan protein parçalarının pozisyonları değiştirilerek ya da maya hücreleri reseptör oligomerizasyonunu teşvik edebilecek ortamlarda büyütülerek bu dörtlü etkileşimler daha nicel bir şekilde tespit edilebilecek, reseptörlerin birbirleri ile etkileşimleri daha detaylı bir şekilde çalışılabilir.



Şekil 5-14 DK102 hücrelerinde Ste2p EGFP BiFC çifti ve Ste2p mCherry BiFC 4'lü ekspresyonunun FRET görüntüleri. İlk kolon donör görüntüsü, ikinci kolon akseptör görüntüsü, üçüncü kolon FRET görüntüsü, dördüncü görüntü FRET analiz verisi (ölçek 5 μ m).

Bu çalışmada ilk defa Ste2p reseptörlerinin (BiFC ve kolokalizasyon kullanılarak) en az 3'lü gruplar oluşturarak birbirleri ile etkileştikleri Şekil 5-12'de gösterilmiştir. Şekil 5-13 ve 5-14'te ise DK102 hücrelerinde eşzamanlı olarak ifade edildiğinde Ste2p[N-EGFP], Ste2p[C-EGFP], Ste2p[N-mCherry] ve Ste2p[C-mCherry] proteinlerinin 4'lü etkileşimleri FRET metodu kullanılarak gösterilmiştir.

5.4 Sonuç

G-protein sinyal ve yönetimi temel prensiplerini oluşturan: G-protein ve MAPK ile ilgili birçok önemli sinyal mekanizması ⁷; MAP kinaz modülünün üç katmanlı yapısı ⁹ ve kinaz yapı destek (*ing. scaffold*) proteinlerinin ¹⁰ varlığı; G_{βγ} alt-ünitesinin (*ing. subunit*) sinyal mekanizmasındaki pozitif rolü ⁸; G-proteinlerin, G-protein sinyal regülatör (RGS) proteinleri ile desensitizasyonu ¹¹; monoübiküitinlenmenin reseptör endositozundaki rolü ^{12 13} ilk kez maya hücrelerinde, feromon reseptörünün (Ste2p) model alınarak gösterilmiştir. Memeli hücrelerindeki GPKR aracılığıyla gerçekleşen sinyal yollarının çoğu işlevsel ve yapısal olarak maya feromon sinyal yolağına benzemektedir ¹⁴; G-protein ve kinaz komponentleri dizinsel olarak memeli sistemlerindeki karşıtlarıyla yüksek benzerlikler göstermektedir ¹⁵.

Proje dahilinde, yukarıdaki illere yol açan maya hücreleri ve Ste2p reseptörü model alınarak, GPKR etkileşiminin yalnızca ikili bir eşleşmeden ibaret olmadığı, üçlü ve dördü eşleşmenin varlığı ile gösterilmiştir. Bu doğrultuda, EGFP parçalarıyla işaretlenmiş Ste2p dimeri (BiFC) ile mCherry parçalarıyla işaretli Ste2p dimeri (BiFC) arasındaki etkileşim; bir başka deyişle dördü protein projede geliştirilen BiFC-BiFC-FRET tekniğı ile gösterilmiştir. Şekil 5-13'te sadece EGFP veya mCherry parçaları ile işaretlenmiş reseptörlerin bir araya gelmesiyle oluşan Ste2p-Ste2p dimerinin FRET sinyali vermediğı görülmektedir. Şekil 5-14'te ise Ste2p-EGFP-Ste2p dimeri ile Ste2p-mCherry-Ste2p dimerini yani 4 Ste2p konstraktını: Ste2p-N-EGFP, Ste2p-C-EGFP, Ste2p-N-mCherry, Ste2p-C-mCherry üreten hücrelerin FRET sinyali görülmektedir. Dördü protein etkileşiminde FRET kanalında tespit edilen sinyalde artış, reseptörlerin dördü etkileşimini göstermektedir.

Bu çalışmada nitel olarak sunulan üçlü kolokalizasyon ve dördü FRET verileri laboratuvarımızda geliştirilmekte olan görüntü analiz yöntemleri ile ve bir imageJ uygulaması (PixFRET) ile nicel olarak değerlendirilmektedir. İlerleyen aylar içerisinde yayınlanmasını planladığımız ve temellerini bu çalışmaya dayandırdığımız bir makalede nicel verilerin sunulması planlanmaktadır.

5.5 Literatür Özeti

- [1] Gurevich, V. V., and Gurevich, E. V. (2008) GPCR monomers and oligomers: it takes all kinds, *Trends in neurosciences* 31, 74-81.
- [2] McCudden, C. R., Hains, M. D., Kimple, R. J., Siderovski, D. P., and Willard, F. S. (2005) G-protein signaling: back to the future, *Cell Mol Life Sci* 62, 551-577.
- [3] Vilardaga, J. P., Agnati, L. F., Fuxe, K., and Ciruela, F. (2010) G-protein-coupled receptor heteromer dynamics, *J Cell Sci* 123, 4215-4220.
- [4] Gonzalez-Maeso, J. (2011) GPCR oligomers in pharmacology and signaling, *Molecular brain* 4, 20.
- [5] Lohse, M. J. (2010) Dimerization in GPCR mobility and signaling, *Current opinion in pharmacology* 10, 53-58.
- [6] Fredriksson, R., and Schiöth, H. B. (2005) The repertoire of G-protein-coupled receptors in fully sequenced genomes, *Molecular pharmacology* 67, 1414-1425.
- [7] Dohlman, H. G., and Thorner, J. W. (2001) Regulation of G protein-initiated signal transduction in yeast: paradigms and principles, *Annual review of biochemistry* 70, 703-754.
- [8] Whiteway, M., Hougan, L., Dignard, D., Thomas, D. Y., Bell, L., Saari, G. C., Grant, F. J., O'Hara, P., and MacKay, V. L. (1989) The STE4 and STE18 genes of yeast encode potential beta and gamma subunits of the mating factor receptor-coupled G protein, *Cell* 56, 467-477.
- [9] Zhou, Z., Gartner, A., Cade, R., Ammerer, G., and Errede, B. (1993) Pheromone-induced signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae* requires the sequential function of three protein kinases, *Molecular and cellular biology* 13, 2069-2080.
- [10] Choi, K. Y., Satterberg, B., Lyons, D. M., and Elion, E. A. (1994) Ste5 tethers multiple protein kinases in the MAP kinase cascade required for mating in *S. cerevisiae*, *Cell* 78, 499-512.
- [11] Dohlman, H. G., Apaniesk, D., Chen, Y., Song, J., and Nusskern, D. (1995) Inhibition of G-protein signaling by dominant gain-of-function mutations in Sst2p, a pheromone desensitization factor in *Saccharomyces cerevisiae*, *Molecular and cellular biology* 15, 3635-3643.
- [12] Hicke, L., and Riezman, H. (1996) Ubiquitination of a yeast plasma membrane receptor signals its ligand-stimulated endocytosis, *Cell* 84, 277-287.
- [13] Roth, A. F., and Davis, N. G. (1996) Ubiquitination of the yeast a-factor receptor, *The Journal of cell biology* 134, 661-674.
- [14] Pausch, M. H. (1997) G-protein-coupled receptors in *Saccharomyces cerevisiae*: high-throughput screening assays for drug discovery, *Trends in biotechnology* 15, 487-494.

- [15] Wang, Y., and Dohlman, H. G. (2004) Pheromone signaling mechanisms in yeast: a prototypical sex machine, *Science* 306, 1508-1509.
- [16] Ozawa, A., Lindberg, I., Roth, B., and Kroeze, W. K. (2010) Deorphanization of novel peptides and their receptors, *The AAPS journal* 12, 378-384.
- [17] Winzeler, E. A., Shoemaker, D. D., Astromoff, A., Liang, H., Anderson, K., Andre, B., Bangham, R., Benito, R., Boeke, J. D., Bussey, H., Chu, A. M., Connelly, C., Davis, K., Dietrich, F., Dow, S. W., El Bakkoury, M., Foury, F., Friend, S. H., Gentalen, E., Giaever, G., Hegemann, J. H., Jones, T., Laub, M., Liao, H., Liebundguth, N., Lockhart, D. J., Lucau-Danila, A., Lussier, M., M'Rabet, N., Menard, P., Mittmann, M., Pai, C., Rebischung, C., Revuelta, J. L., Riles, L., Roberts, C. J., Ross-MacDonald, P., Scherens, B., Snyder, M., Sookhai-Mahadeo, S., Storms, R. K., Veronneau, S., Voet, M., Volckaert, G., Ward, T. R., Wysocki, R., Yen, G. S., Yu, K., Zimmermann, K., Philippsen, P., Johnston, M., and Davis, R. W. (1999) Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis, *Science* 285, 901-906.
- [18] Giaever, G., Chu, A. M., Ni, L., Connelly, C., Riles, L., Veronneau, S., Dow, S., Lucau-Danila, A., Anderson, K., Andre, B., Arkin, A. P., Astromoff, A., El-Bakkoury, M., Bangham, R., Benito, R., Brachat, S., Campanaro, S., Curtiss, M., Davis, K., Deutschbauer, A., Entian, K. D., Flaherty, P., Foury, F., Garfinkel, D. J., Gerstein, M., Gotte, D., Guldener, U., Hegemann, J. H., Hempel, S., Herman, Z., Jaramillo, D. F., Kelly, D. E., Kelly, S. L., Kotter, P., LaBonte, D., Lamb, D. C., Lan, N., Liang, H., Liao, H., Liu, L., Luo, C., Lussier, M., Mao, R., Menard, P., Ooi, S. L., Revuelta, J. L., Roberts, C. J., Rose, M., Ross-Macdonald, P., Scherens, B., Schimmack, G., Shafer, B., Shoemaker, D. D., Sookhai-Mahadeo, S., Storms, R. K., Strathern, J. N., Valle, G., Voet, M., Volckaert, G., Wang, C. Y., Ward, T. R., Wilhelmy, J., Winzeler, E. A., Yang, Y., Yen, G., Youngman, E., Yu, K., Bussey, H., Boeke, J. D., Snyder, M., Philippsen, P., Davis, R. W., and Johnston, M. (2002) Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome, *Nature* 418, 387-391.
- [19] Huh, W. K., Falvo, J. V., Gerke, L. C., Carroll, A. S., Howson, R. W., Weissman, J. S., and O'Shea, E. K. (2003) Global analysis of protein localization in budding yeast, *Nature* 425, 686-691.
- [20] Ghaemmaghami, S., Huh, W. K., Bower, K., Howson, R. W., Belle, A., Dephoure, N., O'Shea, E. K., and Weissman, J. S. (2003) Global analysis of protein expression in yeast, *Nature* 425, 737-741.
- [21] Phizicky, E., Bastiaens, P. I., Zhu, H., Snyder, M., and Fields, S. (2003) Protein analysis on a proteomic scale, *Nature* 422, 208-215.

- [22] Ng, G. Y., O'Dowd, B. F., Lee, S. P., Chung, H. T., Brann, M. R., Seeman, P., and George, S. R. (1996) Dopamine D2 receptor dimers and receptor-blocking peptides, *Biochemical and biophysical research communications* 227, 200-204.
- [23] Ciruela, F., Casado, V., Mallol, J., Canela, E. I., Lluís, C., and Franco, R. (1995) Immunological identification of A1 adenosine receptors in brain cortex, *Journal of neuroscience research* 42, 818-828.
- [24] Overton, M. C., and Blumer, K. J. (2000) G-protein-coupled receptors function as oligomers in vivo, *Current biology : CB* 10, 341-344.
- [25] Angers, S., Salahpour, A., and Bouvier, M. (2001) Biochemical and biophysical demonstration of GPCR oligomerization in mammalian cells, *Life sciences* 68, 2243-2250.
- [26] Albizu, L., Cottet, M., Kralikova, M., Stoev, S., Seyer, R., Brabet, I., Roux, T., Bazin, H., Bourrier, E., Lamarque, L., Breton, C., Rives, M. L., Newman, A., Javitch, J., Trinquet, E., Manning, M., Pin, J. P., Mouillac, B., and Durroux, T. (2010) Time-resolved FRET between GPCR ligands reveals oligomers in native tissues, *Nature chemical biology* 6, 587-594.
- [27] Shi, C., Paige, M. F., Maley, J., and Loewen, M. C. (2009) In vitro characterization of ligand-induced oligomerization of the *S. cerevisiae* G-protein coupled receptor, Ste2p, *Biochimica et biophysica acta* 1790, 1-7.
- [28] Angers, S., Salahpour, A., and Bouvier, M. (2002) Dimerization: an emerging concept for G protein-coupled receptor ontogeny and function, *Annual review of pharmacology and toxicology* 42, 409-435.
- [29] Lemmon, M. A., and Schlessinger, J. (2010) Cell signaling by receptor tyrosine kinases, *Cell* 141, 1117-1134.
- [30] Weiss, A., and Schlessinger, J. (1998) Switching signals on or off by receptor dimerization, *Cell* 94, 277-280.
- [31] Livnah, O., Stura, E. A., Middleton, S. A., Johnson, D. L., Jolliffe, L. K., and Wilson, I. A. (1999) Crystallographic evidence for preformed dimers of erythropoietin receptor before ligand activation, *Science* 283, 987-990.
- [32] Remy, I., Wilson, I. A., and Michnick, S. W. (1999) Erythropoietin receptor activation by a ligand-induced conformation change, *Science* 283, 990-993.
- [33] Tsuji, Y., Shimada, Y., Takeshita, T., Kajimura, N., Nomura, S., Sekiyama, N., Otomo, J., Usukura, J., Nakanishi, S., and Jingami, H. (2000) Cryptic dimer interface and domain organization of the extracellular region of metabotropic glutamate receptor subtype 1, *The Journal of biological chemistry* 275, 28144-28151.

- [34] Yesilaltay, A., and Jenness, D. D. (2000) Homo-oligomeric complexes of the yeast alpha-factor pheromone receptor are functional units of endocytosis, *Molecular biology of the cell* 11, 2873-2884.
- [35] Gehret, A. U., Bajaj, A., Naider, F., and Dumont, M. E. (2006) Oligomerization of the yeast alpha-factor receptor: implications for dominant negative effects of mutant receptors, *The Journal of biological chemistry* 281, 20698-20714.
- [36] Kim, H., Lee, B. K., Naider, F., and Becker, J. M. (2009) Identification of specific transmembrane residues and ligand-induced interface changes involved in homo-dimer formation of a yeast G protein-coupled receptor, *Biochemistry* 48, 10976-10987.
- [37] Gouldson, P. R., Higgs, C., Smith, R. E., Dean, M. K., Gkoutos, G. V., and Reynolds, C. A. (2000) Dimerization and domain swapping in G-protein-coupled receptors: a computational study, *Neuropsychopharmacology* 23, S60-77.
- [38] Shekhawat, S. S., and Ghosh, I. (2011) Split-protein systems: beyond binary protein-protein interactions, *Current opinion in chemical biology* 15, 789-797.
- [39] Johnsson, N., and Varshavsky, A. (1994) Split ubiquitin as a sensor of protein interactions in vivo, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 10340-10344.
- [40] Barnard, E., McFerran, N. V., Trudgett, A., Nelson, J., and Timson, D. J. (2008) Detection and localisation of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae* using a split-GFP method, *Fungal genetics and biology : FG & B* 45, 597-604.
- [41] Morell, M., Ventura, S., and Aviles, F. X. (2009) Protein complementation assays: approaches for the in vivo analysis of protein interactions, *FEBS Lett* 583, 1684-1691.
- [42] Kerppola, T. K. (2006) Complementary methods for studies of protein interactions in living cells, *Nature methods* 3, 969-971.
- [43] Kerppola, T. K. (2008) Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis as a probe of protein interactions in living cells, *Annu Rev Biophys* 37, 465-487.
- [44] Kerppola, T. K. (2009) Visualization of molecular interactions using bimolecular fluorescence complementation analysis: characteristics of protein fragment complementation, *Chemical Society reviews* 38, 2876-2886.
- [45] Park, K., Yi, S. Y., Lee, C. S., Kim, K. E., Pai, H. S., Seol, D. W., Chung, B. H., and Kim, M. (2007) A split enhanced green fluorescent protein-based reporter in yeast two-hybrid system, *The protein journal* 26, 107-116.
- [46] Sung, M. K., and Huh, W. K. (2007) Bimolecular fluorescence complementation analysis system for in vivo detection of protein-protein interaction in *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast* 24, 767-775.

- [47] Hirschman, J. E., De Zutter, G. S., Simonds, W. F., and Jenness, D. D. (1997) The G beta gamma complex of the yeast pheromone response pathway. Subcellular fractionation and protein-protein interactions, *The Journal of biological chemistry* 272, 240-248.
- [48] Montesana, P. E., and Konopka, J. B. (2001) Mutational analysis of the role of N-glycosylation in alpha-factor receptor function, *Biochemistry* 40, 9685-9694.

**TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU**

Proje Yürütücüsü:	Doç. Dr. ÇAĞDAŞ DEVRİM SON
Proje No:	215Z063
Proje Başlığı:	Model Bir G-Proteine Kenetli Reseptör Olan Maya Ste2p Feromon Reseptörünün Üçlü ve Dörtlü Etkileşimlerinin Çift Moleküllü Floresan Birleşme (BiFC) ve Förster Rezonans Enerji Transferi (FRET) Metotları ile Gösterilmesi
Proje Türü:	1002 - Hızlı Destek
Proje Süresi:	12
Araştırmacılar:	
Danışmanlar:	
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	ORTA DOĞU TEKNİK Ü. FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ BIYOLOJİ B.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	15/02/2016 - 15/02/2017
Onaylanan Bütçe:	30000.0
Harcanan Bütçe:	28820.16
Öz:	<p>Bu projenin amacı, model bir G-proteine kenetli reseptör olan maya feromon reseptörü Ste2p'nin, üçlü ve dörtlü eşleşmesinin çift moleküllü floresan eşleşme (BiFC) ve Förster rezonans enerji transferi kullanılarak gösterilmesi, reseptör agonisti olan maya γ-faktör feromonunun, Ste2p oligomerleşmesi üzerindeki olası etkilerinin araştırılmasıdır.</p> <p>GPKRler, ökaryotlardaki en geniş hücre zarı reseptör ailesini oluşturmaktadırlar. Hücre dışı kimyasal (hormonlar, nörotransmitterler, kalsiyum iyonları v.b.) ve duyuşsal (ışık, koku ve tat molekülleri) gibi çok çeşitli uyarının algılanmasındaki rolleri göz önünde bulundurulduğunda, GPKR ailesi en önemli duyu sistemlerinden biridir 1. Konunun seçilmesindeki nedenler üç başlık altında özetlenebilir. İlk olarak, birçok hücre dışı uyarın, hücrenin içine bu reseptörlerle iletilmektedir 2. İkinci neden, bu reseptörlerdeki mutasyonlar ve fonksiyonel problemler diyabet, hiperkalsemi, hipertansiyon, hipotiroid, retinitis pigmentosa, obezite, kanser ve birçok psikolojik hastalıklara neden olmaktadır 3. Üçüncü olarak, reçeteli ilaçların yaklaşık %50'si bu reseptörleri hedeflemektedir, dolayısıyla GPKRler moleküler farmakoloji araştırmalarının odak noktasında yer almaktadırlar 4. GPKR eşleşmesi kabul görmüş bir olgudur, ancak GPKRlerin ne amaçla eşleştikleri henüz bilinmemekle birlikte; bu eşleşmenin reseptör intörmalizasyonu, olgunlaşması, işlev ve farmakolojisi üzerinde önemli rolleri olduğu düşünülmektedir.</p> <p>Daha önceki araştırmalarımızda yeşil protein (EGFP) ve BiFC tekniğini kullanarak Ste2p proteinin kendisi ile etkileşimini tayin edilmiştir. Bölünmüş EGFP parçaları, N-EGFP, ve C-EGFP ile yedinci transmembran bölgeden hemen sonra işaretlenen Ste2p reseptörleri maya hücrelerinde aynı anda üretildikten edildikten sonra, ikili reseptör eşleşmesi BiFC metodu ile gösterilmiştir. Bu projede ise Ste2p reseptörünün üçlü ve dörtlü etkileşimleri incelenmiştir. Bu amaç doğrultusunda reseptör yedinci transmembranı takip eden bölgeden hem tam uzunluktaki mCherry floresan proteini hem de biri N-mCherry diğeri C-mCherry protein parçaları ile işaretlenmiştir. Proje kapsamında, EGFP ve mCherry floresan proteinleriyle ve bu proteinlerin parçalarıyla işaretlenmiş Ste2p reseptörlerinin, konfokal mikroskop, BiFC ve FRET yöntemleri kullanılarak çoklu etkileşimleri incelenmiştir.</p> <p>Bu proje neticesinde model GPKR olan Ste2p maya feromon reseptör eşleşmesinin yalnızca ikili bir etkileşimden ibaret olmadığı, üçlü ve dörtlü bir etkileşimin varlığı gösterilmiştir. Ste2p ikili etkileşimi ile ilgili yapılmış araştırmalar bu model GPKR'nin agonistinin, eşleşmeye herhangi bir etkisinin olmadığını göstermiş; ancak γ-faktörün çoklu reseptör etkileşimini etkileyebileceği yönünde bir hipotez sunmuştur. Bu projede ligandın çoklu reseptör etkileşimine etkileri de araştırılmıştır. Proje sonucunda elde edilen bulgular, GPKR tetramer etkileşmesinin mevcut literatüre önemli katkılarda bulunacağı öngörülmüştür.</p>
Anahtar Kelimeler:	GPKR, konfokal mikroskop, iki moleküllü floresan birleşme (BiFC), Förster enerji transferi (FRET)

Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu
Mu?:

Hayır

TÜBİTAK