



# **G Proteine Kenetli Reseptörlerin Eşleşmesi: Yapı-işlev Analizi ve Moleküler Mekanizmalar**

**Proje No: 110T414**

Doç.Dr. Çağdaş Devrim SON  
Orkun CEVHEROĞLU  
Gözde KUMAŞ  
İlke SUDER  
Giray BULUT

Kasım 2013  
ANKARA



## 1.ÖNSÖZ

G proteine kenetli reseptörler (GPKR) uzun yıllar boyunca hücre zarında tek reseptör olarak buldukları ve sinyal iletiminde tekbaşlarına yeterli oldukları varsayımı ile çalışılmışlardır. Ancak son yıllardaki deneysel sonuçlar bu reseptörlerin birbirleri ile eşleşerek iki ya da daha fazla reseptörden oluşan gruplar halinde bulunabilecekleri fikrini ortaya koymuştur [1, 2]. Bunun yanısıra reseptör eşleşmesinin bu reseptörlerin işlevinde de etkili olabileceği fikri yapılan çalışmalar ile değer kazanmıştır. Literatürdeki birçok çalışmada; ligand bağlanma analizi, GPKRlerin SDS-poliakrilamid jellerde bile çift ya da ikiden fazla reseptörün birlikte hareket ettiklerine ilişkin moleküler ağırlık tespitleri, birden farklı antijen ile işaretlendiklerinde değişik antikolar kullanılarak kooperatif immunopresipitasyon yapılabilmesi, farklı işlevsel bozukluklar taşıyan bir GPKRnin iki mutant varyantının birlikte sentezlendiği koşullarda işlevin tekrar kazanılması, gibi değişik deneysel yaklaşımlarla GPKRlerin kendileri ile (İng. homodimers) eşleştikleri görüşü vurgulanmıştır. Ancak bu çalışmaların hiçbiri GPKRlerin, canlı hücrelerde, nerede ve nasıl eşleştikleri konusunda yeterli bilgi verememektedir.

Bu projede amacımız, bölünmüş yeşil floresan protein (İng. split GFP) ve floresan rezonans enerji transferi (FRET) gibi günümüzde hızla gelişmekte olan ışık mikroskopu tekniklerini kullanarak GPKRlerin eşleşmesinde önemli olan mekanizmaları daha iyi anlayabilmek ve bu eşleşmenin hücre içinde nerede gerçekleştiğini ortaya çıkarmaktır. Bu amaca ulaşabilmek için planımız model bir GPKR olan maya  $\alpha$ -faktör feromon reseptörünü yeşil floresan protein (GFP) varyantları ve bölünmüş EGFP parçaları ile işaretlemek (Hedef Ia) ve konfokal mikroskopi yöntemleri kullanarak bu proteinlerin canlı maya hücreleri içerisinde nerede ve nasıl eşleştiklerini gerçek zamanlı olarak tespit etmek (Hedef Ib), son olarak bu yöntemler kullanılarak transkripsiyon sonrası reseptörlerde gerçekleşen glikozilasyon ve fosforilasyonun reseptör eşleşmesine olan etkilerini (Hedef II) araştırmaktır.

Bu çalışma kapsamında Ste2p molekülleri EGFP ve mCherry isimli, sırasıyla yeşil ve kırmızı renkli, floresan proteinlerle işaretlenmiştir. İşaretleme işleminden sonra plazmidler maya hücresine teker teker transfekte edilmiştir. İşaretleme reseptörlerin fonksiyonel olduklarını test etmek amacıyla HALO analizi yapılmıştır. Bu analizde feromon yüklenmiş diskler agar üzerine yerleştirilmiş ve disk çevresinde feromon konsantrasyonuna bağlı olarak gerçekleşen büyüme durması, koloniden temiz bölgeler olarak gözlemlenmiştir. FRET yöntemi sayesinde hücrelere herhangi bir zarar vermeden canlı hücre içerisinde gözlem yapılabilir.



Başarı ile tamamlanan bu proje sonucunda örnek GPKR olarak seçilen maya feromon reseptörü Ste2p'nin hücre zarında dimerleştiği, ve dimerlerin hücre içerisine dimer olarak alındıkları gösterilmiştir. Bunun yanısıra agonist etkileşimi sonucunda reseptörlerin 7. Heliksinin C-terminali ile bağlandığı bölgede dimerlerin birbirinden uzaklaştığı gözlemlenmiştir.

Bu çalışma TÜBİTAK (proje numarası: 110T414) ve ODTÜ Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP-08.11.2010.0014) tarafından desteklenmiştir.

## 2. İÇİNDEKİLER

1. Önsöz.....	ii
2. İçindekiler.....	iv
3. TABLO ve ŞEKİL LİSTELERİ.....	v
4. ÖZET ve “Abstract”	
a. Özet	
b. Abstract	
5. SONUÇ RAPORU ANA METİN.....	1
5.1 Giriş.....	1
5.2 Yöntemler ve Materyaller.....	3
5.2.1 Özgün Hedefler.....	3
5.2.2 Materyaller.....	9
5.2.2.1 Besi Yerleri.....	9
5.2.2.2 Diğer Solüsyonlar.....	9
5.2.2.3 Plazmidlerin maya hücrelerine transformasyonunda kullanılan LiAc TRAFO [12] metodu için gerekli çözeltiler.....	10
5.2.2.4 Maya suşları ve plazmidler.....	10
5.2.3 Yöntemler.....	13
5.2.3.1 Bölünmüş-EGFP tekniği.....	13
5.2.3.2 Föster Resonance Energy Transfer (FRET) tekniği.....	15
5.2.3.3 Hücre zarının hazırlanması.....	20
5.2.3.4 Bradford Analizi.....	20
5.2.3.5 Western Blot.....	20
5.2.3.6 Organel Markörler.....	20
5.2.3.7 Transkripsiyon sonrası modifikasyonlardan mahrum reseptör sentezlenmesi için primer tasarımı.....	21
5.2.3.8 Dimerleşmeden yoksun reseptör sentezlenmesi.....	22
5.2.3.9 Çift promotörlü vektör kullanımı.....	23
5.3 Sonuçlar.....	26
5.3.1 Özgün Hedef Ia: Maya $\alpha$ -faktör feromon reseptörünün yeşil floresan protein variantları (EGFP ve mCherry) ve bölünmüş EGFP parçaları ile işaretlenmesi.....	26
5.3.2 Özgün Hedef Ib: Feromon reseptörlerinin hücre içinde nerede ve nasıl eşleştiklerinin gerçek zamanlı tespit edilmesi.....	40
5.3.3 Özgün Hedef II: Reseptör dimerleşmesi üzerinde etkili olan modifikasyonların incelenmesi.....	51
Referanslar.....	53
6. EKLER.....	54

### 3. TABLO ve ŞEKİL LİSTELERİ

#### TABLolar:

<b>Tablo 1</b> : Maya suşları ve plazmidler.....	<b>10</b>
<b>Tablo 2</b> : Organel spesifik proteinler; gen sembolü ve lokalizasyonları.....	<b>12</b>
<b>Tablo 3</b> : Projede bölünmüş-EGFP tekniği için inşa edilen geliştirilmiş yeşil floresan parçaları ile işaretli Ste2p plazmidleri.....	<b>14</b>
<b>Tablo 4</b> : EGFP parçalarının amplifikasyonu için dizayn edilmiş primerler.....	<b>15</b>
<b>Tablo 5</b> : EGFP ve mCherry proteinlerinin amplifikasyonu için dizayn edilmiş Primerler.....	<b>16</b>
<b>Tablo 6</b> : Projede inşa edilen floresan işaretli Ste2p plazmidleri.....	<b>16</b>
<b>Tablo 7</b> : FRET çalışmalarında alınan görüntü şeması.....	<b>17</b>
<b>Tablo 8</b> : Ste2p reseptörü üzerinde glikozilasyona uğrayan Asn 25 ve Asn 32 amino asitlerini Gln amino asidine değiştirmek için kullanılan primerler.....	<b>21</b>
<b>Tablo 9</b> . Ste2p reseptör üzerinde dimerleşmeyi bozan 56Gly→Ala, 60Gly→Ala; 56Gly→Leu, 60Gly→Leu ve 56,60Gly→Ala ve 56,60Gly→Leu modifikasyonları için tasarlanmış primerler.....	<b>22</b>
<b>Tablo 10</b> : Çift promotörlü vektörler için tasarlanan primerler.....	<b>25</b>
<b>Tablo 11</b> : DK102 hücrelerinde eş zamanlı ifadeleri sağlanan plazmid çiftleri.....	<b>33</b>
<b>Tablo 12</b> : 158. pozisyondan bölünmüş EGFP parçalarının çoğaltılması için tasarlanmış primer sekansları.....	<b>36</b>
<b>Tablo 13</b> : Optimizasyon çalışmaları için inşa edilen yeşil floresan proteini parçalarını içeren Ste2p plazmidleri.....	<b>38</b>
<b>Tablo 14</b> : Bölünmüş EGFP tekniği ile kullanılan ve bu çalışmada yapımı tamamlanan vektörler ve özellikleri.....	<b>41</b>
<b>Tablo 15</b> : FRET tekniği ile kullanılan ve bu çalışmada yapımı tamamlanan vektörler ve özellikleri.....	<b>45</b>
<b>Tablo 16</b> : Proje döneminde inşa edilmesi tamamlanmış ve görüntülenmiş 25 ve 32 pozisyonlarda mutasyonları taşıyan, glikozilasyondan yoksun reseptörleri taşıyan plazmidler.....	<b>51</b>
<b>Tablo 17</b> : Proje döneminde inşa edilmiş ve görüntülenmiş 56 ve 60. pozisyonlarda ilgili mutasyonları taşıyan eşleşme yoksunu Ste2p plazmidleri.....	<b>52</b>

#### ŞEKİLLER:

<b>Şekil 1</b> : Bölünmüş floresan protein parçalarının ya da floresan proteinleri homolog (genel) rekombinasyon yöntemi ile hedef (Ste2p) gen içine eklenmesi.....	<b>5</b>
<b>Şekil 2</b> : pBY011-D123 vektör haritası.....	<b>11</b>
<b>Şekil 3</b> : Maya $\alpha$ -faktör feromon reseptör (Ste2p) diyagramı.....	<b>13</b>
<b>Şekil 4</b> : FRET çalışmaları için konfokal mikroskop ayarları lazer ve filtre seçimleri.....	<b>18</b>
<b>Şekil 5</b> : EGFP ve mCherry moleküllerinin akzitasyon ve emisyon grafikleri.....	<b>19</b>
<b>Şekil 6</b> : pESC-TRP ve pESC-URA çift promotörlü ekspresyon vektörlerinin haritaları.....	<b>24</b>
<b>Şekil 7</b> : Transformasyon sonrası seçilen E.coli kolonilerinden elde edilen plazmid DNA'larının restriksiyon enzimleri ile gerçekleştirilen kesim sonucu oluşan fragmentlerin boyut kontrolü.....	<b>27</b>
<b>Şekil 8</b> : Tam uzunluktaki EGFP ve mCherry floresan proteinlerin amplifikasyonu için yapılan PZR sonuçları.....	<b>28</b>
<b>Şekil 9</b> : Transformasyon sonrası seçilen E.coli kolonilerinden elde edilen plazmid DNA'larının restriksiyon enzimleri ile gerçekleştirilen kesim sonucu oluşan fragmentlerin boyut kontrolü.....	<b>29</b>
<b>Şekil 10a</b> : Halo analiz sonuçları petri örnekleri.....	<b>31</b>
<b>Şekil 10b</b> : Halo analizleri grafik sonuçları.....	<b>31</b>
<b>Şekil 11</b> : Anti-FLAG immunoblotlama ile total membran proteinlerin SDS-PAGE analizleri....	<b>32</b>
<b>Şekil 12</b> : Konfokal mikroskop konfigürasyon seçenekleri.....	<b>33</b>

<b>Şekil 13:</b> 458 nm laser hattı (Ar/ML) ile uyarılmış floresan işaretli Ste2p ifade eden hücrelerin floresan ve beyaz ışık koşulları altında alınmış konfokal mikroskop görüntüleri.....	<b>34</b>
<b>Şekil 14:</b> EGFP parçalarının çoğaltılması için yapılan PZR reaksiyonu agaroz jel elektroforezi sonuçları.....	<b>37</b>
<b>Şekil 15 :</b> Yeşil floresan protein parçalarını içeren plazmid DNA'larının restriksiyon enzimleri ile gerçekleştirilen kesim sonucu oluşan fragmentlerin boyut kontrolü.....	<b>39</b>
<b>Şekil 16:</b> Halo analizleri grafik sonuçları.....	<b>40</b>
<b>Şekil 17:</b> EGFP molekülünü görüntülemek için optimize edilen konfokal ayarları.....	<b>42</b>
<b>Şekil 18:</b> EGFP sinyalini görüntülemek için ayarlanmış konfokal mikroskop ile alınan N-EGFP (1-158) ve C-EGFP (159-239) ile işaretli C-kuyruğu kesik Ste2p görüntüleri.....	<b>43</b>
<b>Şekil 19:</b> EGFP sinyalini görüntülemek için ayarlanmış konfokal mikroskop ile alınan N-EGFP (1-158) ve C-EGFP (159-239) ile işaretli tam uzunluktaki Ste2p görüntüleri.....	<b>44</b>
<b>Şekil 20:</b> EGFP ve mCherry ile ayrı ayrı işaretlenmiş Ste2p reseptörlerinin Konfokal mikroskop yardımı ile uygun eksitasyon dalga boyu ile uyarıldıktan sonra görüntülenmesi.....	<b>46</b>
<b>Şekil 21:</b> Hücre görüntüleri üzerinde hesaplanmış FRET değerlerinin tüm pikseller için gösterilmesi.....	<b>47</b>
<b>Şekil 22:</b> Dört değişik koşul altında 4 grupta analiz edilen FRET değerleri karşılaştırılması.....	<b>48</b>
<b>Şekil 23:</b> Test edilen 4 koşul altında FRET değerlerinin kapsadığı piksel yüzdesinin karşılaştırması.....	<b>49</b>
<b>Şekil 24:</b> 4 guruba ayrılan FRET değerlerinin piksel bazında ortalama hücrede dağılımı.....	<b>50</b>

#### 4. ÖZET ve “Abstract”

##### Özet

G proteine kenetli reseptör proteinleri (GPKR) hücre zarını yedi defa geçen integral zar proteinleridir. Sayısız önemli biyolojik sistemde rol oynayan GPKRler günümüzde satılan ilaçların yaklaşık %40'ının hedefi durumundadır. GPKRlerin yıllardır geleneksel olarak tek bir reseptör olarak çalıştıkları, ligand bağlanması sonucu bağlı oldukları heteromerik G proteini aktif hale getirerek ikincil mesajlar yolu ile hücre içi faaliyetleri kontrol ettikleri varsayılmıştır. Ancak son zamanlarda yapılan çalışmalar bu reseptörlerin birbirleriyle eşleştikleri ve bu eşleşmenin gerek işlev, gerek hücre içindeki hareketler yönünden önemli olduğunu ortaya koymuştur.

Bu projenin amacı bir *Saccharomyces cerevisiae* (maya) GPKR'ü olan Ste2p proteininin kendisi ile bir dimer oluşturup oluşturmadığı, eğer dimer oluşturuyor ise bu dimerlerin hücre içerisinde nerede bulunduğu ve agonist bağlanması, protein modifikasyonları gibi reseptör dinamiiklerinde önemli rol oynayan etkenlerden nasıl etkilendiğini araştırmaktır. Proje süresince bu amaçlarımızı bölünmüş yeşil protein (İng. split EGFP) ve floresan rezonans enerji transferi (FRET) gibi hızla gelişmekte olan floresan teknikler ile konfokal mikroskopi kullanarak canlı maya hücrelerinde test ettik.

Proje kapsamında Ste2p molekülleri EGFP ve mCherry isimli, sırasıyla yeşil ve kırmızı renkli, floresan proteinler ve EGFP parçaları ile işaretlenmiştir. İşaretleme işleminden sonra plazmidler maya hücresine teker teker transfekte edilmiştir. İşaretleme reseptörlerin fonksiyonel olduklarını test etmek amacıyla HALO analizi yapılmıştır. Bu analizde feromon yüklenmiş diskler agar üzerine yerleştirilmiş ve disk çevresinde feromon konsantrasyonuna bağlı olarak gerçekleşen büyüme durması, koloniden temiz bölgeler olarak gözlemlenmiştir. FRET ve bölünmüş EGFP yöntemleri sayesinde hücrelere herhangi bir zarar vermeden canlı hücre içerisinde gözlem yapılabilir. FRET ve bölünmüş EGFP yöntemleri sayesinde hücrelere herhangi bir zarar vermeden canlı hücre içerisinde gözlem yapılabilir.

Başarı ile tamamlanan bu proje sonucunda örnek GPKR olarak seçilen maya feromon reseptörü Ste2p'nin hücre zarında dimerleştiği, ve dimerlerin hücre içerisine dimer olarak alındıkları gösterilmiştir. Bunun yanısıra agonist etkileşimi sonucunda reseptörlerin 7. Heliksinin C-terminali ile bağlandığı bölgede dimerlerin birbirinden uzaklaştığı gözlemlenmiştir.

##### Anahtar Kelimeler:

GPKR, FRET, Bölünmüş GFP, Protein-Protein Etkileşimleri, Hücre Zarı Proteinleri, Konfokal Mikroskopi, Maya Feromon Reseptörü, Reseptör Eşleşmesi

## Abstract

G protein-coupled receptors (GPCRs) are seven trans-membrane domain containing membrane proteins that mediate physiological response to a diverse array of stimuli. GPCRs are targets for ~40% of all currently marketed pharmaceuticals. These receptors have traditionally been thought to act as monomeric units that, upon agonist occupation, activated a heterotrimeric G protein to alter the concentration of specific secondary messengers. However, recent evidence suggests that GPCRs may form dimers (or higher-order oligomers) as part of their normal trafficking and function. While the formation of GPCR dimers/oligomers has been reported to play important roles in regulating receptor expression, ligand binding, and second messenger activation, less is known about how and where GPCR dimerization occurs.

Our aim in this project is to use *Saccharomyces cerevisiae* (yeast)  $\alpha$ -factor pheromone receptor Ste2p as a model GPCR and study its homodimerization. Where in live cells this homodimerization occurs, and effects of post translational modifications, interactions with the pheromone on receptor dimerization will be analyzed. We will address this issue using confocal microscopy and split green fluorescence protein (GFP) to monitor GPCR interactions within discrete intracellular compartments of intact living cells. Time-lapse confocal imaging will be used to determine the ability of two fragments of enhanced GFP (EGFP) to reassemble and fluoresce when fused to interacting GPCRs. We also will take advantage of the real-time monitoring of fluorescence resonance energy transfer between monomeric (m)-EGFP and mCherry tagged full length G-protein coupled  $\alpha$ -factor receptor (Ste2p) within discrete regions of the endoplasmic reticulum, Golgi and plasma membrane to understand the molecular mechanisms important in receptor dimerization.

Successful completion of this project revealed that the model GPCR Ste2p dimerize on the cell membrane. The dimers will be internalized as dimers. Upon interaction with agonist the 7<sup>th</sup> helix of the receptor change conformation such that the dimers separate from each other at this region.

## Keywords:

GPCR, FRET, Split GFP, Receptor Dimerization, Protein-Protein Interactions, Membrane Proteins, Confocal Microscopy, Yeast Pheromone Receptor





## 5. SONUÇ RAPORU ANA METİN

### 5.1 Giriş:

G proteine kenetli reseptörler (GPKR) uzun yıllar boyunca hücre zarında tek reseptör olarak buldukları ve sinyal iletiminde tekbaşlarına yeterli oldukları varsayımı ile çalışılmışlardır. Ancak son yıllardaki deneysel sonuçlar bu reseptörlerin birbirleri ile eşleşerek iki ya da daha fazla reseptörden oluşan gruplar halinde bulunabilecekleri fikrini ortaya koymuştur [1, 2]. Bunun yanısıra reseptör eşleşmesinin bu reseptörlerin işlevinde de etkili olabileceği fikri yapılan çalışmalar ile değer kazanmıştır. Literatürdeki birçok çalışmada; ligand bağlanma analizi, GPKRlerin SDS-poliakrilamid jellerde bile çift ya da ikiden fazla reseptörün birlikte hareket ettiklerine ilişkin moleküler ağırlık tespitleri, birden farklı antijen ile işaretlendiklerinde değişik antikolar kullanılarak kooperatif immunopresipitasyon yapılabilmesi, farklı işlevsel bozukluklar taşıyan bir GPKRnin iki mutant varyantının birlikte sentezlendiği koşullarda işlevin tekrar kazanılması, gibi değişik deneysel yaklaşımlarla GPKRlerin kendileri ile (İng. homodimers) eşleştikleri görüşü vurgulanmıştır. Ancak bu çalışmaların hiçbiri GPKRlerin, canlı hücrelerde, nerede ve nasıl eşleştikleri konusunda yeterli bilgi verememektedir.

Bu projede amacımız, bölünmüş yeşil floresan protein (İng. split GFP) ve floresan rezonans enerji transferi (FRET) gibi günümüzde hızla gelişmekte olan ışık mikroskopu tekniklerini kullanarak GPKRlerin eşleşmesinde önemli olan mekanizmaları daha iyi anlayabilmek ve bu eşleşmenin hücre içinde nerede gerçekleştiğini ortaya çıkarmaktır. Bu amaca ulaşabilmek için planımız model bir GPKR olan maya  $\alpha$ -faktör feromon reseptörünü yeşil floresan protein (GFP) varyantları ve bölünmüş EGFP parçaları ile işaretlemek (Hedef Ia) ve konfokal mikroskopi yöntemleri kullanarak bu proteinlerin canlı maya hücreleri içerisinde nerede ve nasıl eşleştiklerini gerçek zamanlı olarak tespit etmek (Hedef Ib), son olarak bu yöntemler kullanılarak transkripsiyon sonrası reseptörlerde gerçekleşen glikozilasyon ve fosforilasyonun reseptör eşleşmesine olan etkilerini (Hedef II) araştırmaktır.

GPKRlerin hücre zarında çift olarak işlev gördüğü hipotezi son on yıl içerisinde yapılan çalışmaların sonucuna dayanılarak hızla kabul görmektedir. GPKR eşleşmesinin işlevsel etkileri yanısıra bu eşleşmelerin protein sentezi sırasında kalite kontrol mekanizmaları tarafından aranan bir özellik olduğu fikri önem kazanmaya başlamıştır. Bu fikir günümüzde sadece birkaç çalışmada farklı GPKRlerin (İng. hetero-dimerization) birbirleri ile eşleşmelerinin hücre zarında işlevsel reseptör bulunması için gerekli olduğu gösterilerek desteklenmiştir [3]. Bunun yanı sıra, bazı GPKRlerin kendileri ile (İng. homodimerization) eşleşmesinin reseptör gelişiminde önemli rol oynadığı son yıllarda öne sürülmüştür [4].

Bilinen en büyük reseptör ailesi olan GPKRlerin günümüzde tamamlanmış genomların yaklaşık %1'ini oluşturdukları, yalnız insan genomunda 1000'in üzerinde genin GPKRlere ait olduğu tespit edilmiştir. Bu denli geniş bir aileye ait olan reseptörlerin tamamının tek tek analizi mümkün değildir. İşlevsel ve protein dizinleri yönünden birbirlerinden çok farklı olan bu sayısız reseptör yapısal olarak, hücre zarını 7 defa geçmeleri, amino terminallerinin hücre dışında, ve karboksi terminallerinin hücre içinde bulunması gibi birçok ortak özelliğe sahiptir. Yapısal olarak benzerlikler taşıyan bu reseptörlerin gerek ligandlarla olan, gerekse heterotrimerik G-proteinler ile olan etkileşimleri benzerlikler göstermektedir. GPKRlerin birbirleri ile (İng. homo-) ya da diğer GPKRler ile (İng. hetero-dimerization) eşleşmeleri sırasında da benzerlikler gösterdikleri hipotezi son yıllarda değer kazanmıştır [5]. Ancak eşleşmeleri doğru olarak modellemek ve tüm GPKRlere genellemek mevcut algoritmalar ile mümkün değildir. Yeni algoritmaların geliştirilmesi ve GPKR eşleşmelerini tahmin etmek için hücre zarına bağlı proteinlerin birbirleriyle olan etkileşimleri ve birbirleri ile eşleştikleri biyokimyasal yöntemler ile gösterilmiş olan reseptörlerin nasıl ve nerede eşleştikleri hücre içinde tespit edilmelidir. Bu eşleşmeler üzerinde rol oynayan, reseptör üzerindeki modifikasyonlar, motifler, ve önemli amino asitler saptanmalı ve hücre içindeki yardımcı proteinler, reseptörlere bağlanan ligandlar, G-proteinler ve diğer efektör proteinlerin reseptör eşleşmesi üzerindeki etkileri incelenmelidir.

Günümüzde protein etkileşimlerini incelemek için maya iki hibrit sistemi (İng. yeast two-hybrid), ve ardışık afinite saflaştırması (İng. tandem affinity purification) gibi birçok sistem ve teknik geliştirilmiştir, ancak bu yöntemlerin çoğu hücre sitoplazmasında çözülmüş halde bulunan proteinler için geliştirildikleri, normal seviyenin üzerinde bir ekspresyona ihtiyaç duydukları ve uzun süren saflaştırma yöntemleri içerdikleri için zar proteinlerinin etkileşimlerini araştırmakta ve anlamakta yetersiz kalmaktadırlar. Ayrıca bu teknikler, proteinler arasındaki etkileşimlerin canlı hücre içinde nerede gerçekleştiğini tespit etmek için de uygun değildir. Bu nedenle zar proteinlerinin birbirleri ile olan etkileşimlerini canlı hücreler içerisinde gerçek zamanlı çalışmak için yeni teknikler geliştirmek ve mevcut sistemleri zar proteinlerine uyarlamak gerekmektedir. Bu amaç doğrultusunda, yeşil floresan protein (GFP) ve türevlerinin keşfinden sonra hızla gelişen ışık mikroskopisi ve floresan teknikler, uzun yıllar birçok çalışmada model bir GPKR olarak kullanılan maya  $\alpha$ -faktör feromon reseptörünün kendi ve diğer benzer GPKRler ile eşleşmelerini detaylı bir şekilde incelemek için kullanılacaktır.

Proje kapsamında kullanılması öngörülen floresan tekniklerin başında temelleri 1990'lı yıllara dayanan [6] ve prensipte bir bölünmüş protein komplementasyon tekniği (PCA, İng. protein-fragment complementation assay) olan bölünmüş yeşil floresan protein (İng. Split-EGFP) gelmektedir. Biyolojik floresan komplementasyon (BiFC, İng. biomolecular fluorescence complementation) tekniği olarak da literatürde tanımlanan bölünmüş-EGFP tekniği 238 amino

asitlik yeşil floresan proteinin floresan özellik göstermeyen iki parçaya ayrılması ve bu parçaların birbirleri ile etkileştikleri test edilen proteinlere klonlama yöntemi ile eklenmesi yolu ile yapılır [7]. Test edilen proteinlerin birbirleri ile etkileşmeleri durumunda yeşil floresan parçaları birleşerek floresan işlevini geri kazanırlar, bu sayede test edilen proteinlerin etkileştikleri bilgisinin yanı sıra bu etkileşimin hücre içinde nerede ve ne şartlar altında gerçekleştiği bilgisi gerçek zamanlı olarak test edilebilir. Benzer şekilde yine yeşil floresan protein türevleri kullanılarak (EGFP ve mCherry) floresan rezonans enerji transferi tekniği ile GPKRlerin etkileşimleri hakkında detaylı sayısal veriler elde edilecektir. Bu floresan tekniklerin GPKRlere ve maya hücrelerine uyarlanması sırasında edinecek deneyimler projenin ilerleyen aşamalarında transkripsiyon sonrası reseptörlerde gerçekleşen glikozilasyon ve fosforilasyonun reseptör eşleşmesine olan etkilerinin araştırılmasının yanı sıra ileride çalışılacak diğer GPKRlerin bu tekniklerle incelenmesini mümkün kılacaktır. Proje sonucunda geliştireceğimiz floresan tekniklerin ve elde edeceğimiz sonuçların, ilerideki çalışmalarda birçok GPKRnin eşleşmelerini, bu eşleşmelerin yapı-işlev ilişkilerini ve eşleşme için gerekli olan moleküler mekanizmaları anlamak için yararlı olacağını düşünüyoruz.

## **5.2 Yöntemler ve Materyaller:**

### 5.2.1 Özgün Hedefler

*Özgün Hedef 1a:* Maya  $\alpha$ -faktör feromon reseptörünün yeşil floresan protein variantları (EGFP ve mCherry) ve bölünmüş EGFP parçaları ile işaretlenmesi.

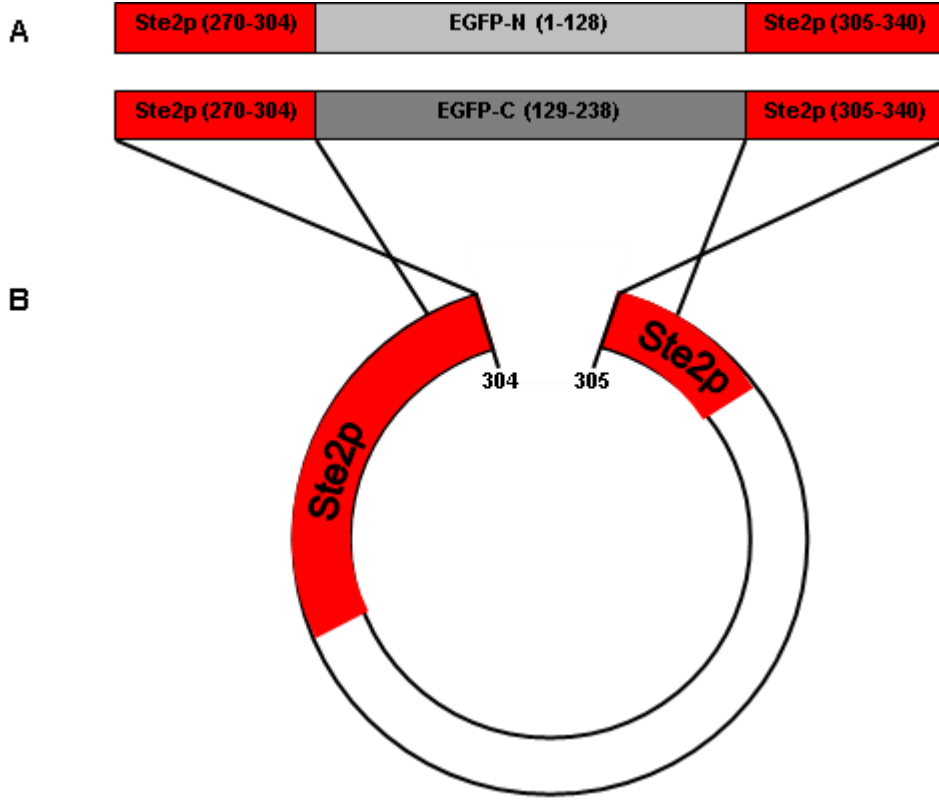
GPKRlerin, canlı hücrelerde, nerede ve nasıl eşleştikleri konusunda araştırma yapabilmek için çalışmalarımızda kullandığımız maya feromon reseptörünün (Ste2p) işaretlenmesi gerekmektedir. Literatürde bulunan farklı GPKRler üzerine yapılmış çalışmalarda bu reseptörler genellikle daha önceden işaretlenmiş antikolar ile ya da reseptörlerin amino veya karboksi terminallerine takılan antijenik dizinler ile tespit ve takip edilirler. Yeşil floresan protein (GFP) ve türevlerinin bulunması ile hedef proteinlerin canlı hücreler içerisinde gözlenmesi mümkün olmuştur. Ste2p ile yapılan ön çalışmalarda bu reseptörün amino ve karboksi terminallerine takılan antijenik dizinlerin reseptör sentezi ve hücre içi hareketlerde önemli sorunlar yarattığı gözlemlenmiştir. Özellikle amino terminaline yapılan değişikliklerin reseptör yapısını olumsuz yönde etkilediği bulunmuştur [8]. Yine Overton ve Blumer tarafından yapılan floresan işaretleme çalışmalarında tam uzunluktaki bir reseptörün karboksi terminaline takılan bir GFP'nin Ste2p sentezlenmesini azalttığı, ancak karboksi terminali 304'üncü amino asitten sonra kesilmiş bir reseptörün işaretlenmesinin mümkün olduğu rapor edilmiştir. Bunun yanısıra Ste2p ile yapılan birçok çalışmada, karboksi terminal üzerinde gerçekleşen fosforilasyon gibi transkripsiyon sonrası modifikasyonların endositozda önemli rol oynadıkları

gösterilmiştir. Bu çalışmalar, GPKRlerin işaretlenmeleri sırasında işaretin dizin üzerindeki yerinin ne denli önemli olduğunu bir kez daha vurgulamaktadır. Bu bulgular doğrultusunda çalışmamızın ilk özgün hedefi iki ayrı floresan teknikte kullanmak için Ste2p resptörünü bölünmüş yeşil floresan protein parçaları (1. Bölünmüş-EGFP tekniği için) ve mEGFP/mCherry floresan proteinleri (2. FRET çalışmaları için) ile işaretlemek ve reseptörün işlevlerini muhafaza etmektir. Bu amaç için kullanılan metotlar şöyle özetlenebilir:

**1.Bölünmüş-EGFP:** İlk kez 1995 yılında Ole Thastrup tarafından rapor edilen EGFP molekülü protein dizini yönünden GFP molekülünden yalnızca iki amino asit farklılık göstermektedir (F64L ve S65T). Bu iki değişiklik sayesinde EGFP daha parlak, daha hızlı olgunlaşan ve emisyon özellikleri daha uyumlu bir floresan molekülü haline gelmiştir. Daha önceden GFP kullanılarak tespit edilemeyen birçok protein EGFP sayesinde hücre içerisinde tespit edilebilmiştir.

Bölünmüş EGFP tekniği için bu floresan molekül kendi başına floresan özellik taşımayan iki parçaya bölünür ve bu parçalar hedef proteini işaretlemek için kullanılır. Projenin birinci aşamasında EGFP molekülünün iki parçası (EGFP-N ve EGFP-C) PZR yöntemi ile çoğaltılmıştır. Bu işlem sırasında EGFP-N ve EGFP-C parçaları Ste2p reseptörü üzerinde yer alacakları pozisyona göre 30-35 bazlık reseptöre eş dizinler ile sınırlandırılmıştır (Ste2p üzerindeki her eklenme noktası için yeni primer setleri hazırlanarak EGFP-N ve EGFP-C ekleri Ste2p nin ilgili dizinleri ile sınırlandırılmıştır) (Şekil 1A). EGFP-C parçasının reseptör proteinin sonuna gelmediği ve EGFP-N parçasının reseptör proteinin sonuna geldiği durumlarda bitiş kodonunun gerektiği şekilde değiştirilmesine dikkat edilmiştir. PZR ürünü olarak elde edilen Ste2p parçaları ile sınırlı EGFP parçaları homolog (genel) rekombinasyon yöntemi kullanarak maya hücrelerinde Ste2p taşıyan plazmidler ile birleştirilmiştir (Şekil 1B). Elde edilen plazmidler maya hücrelerinden izole edildikten sonra boyut yönünden doğru oldukları onaylanarak dizin analizine gönderilmiştir. Dizin analizi ile hatasız oldukları belirlenen işaretli reseptörler Ste2p taşımayan maya hücrelerine aktarılmış ve işlevsel testler ile sınanmıştır. Özellikle feromon etkisi ile büyümenin G1 aşamasında durması özelliğine dayana zon çapı ölçümü deneyi ile işlevsel olarak sınanan işaretli reseptörler biyolojik yeterlilik göstermeleri durumunda görüntüleme deneylerinde kullanılmıştır.

Projenin ilk aşamasında bölünmüş EGFP parçaları Ste2p reseptörünün 304 ve 305'inci amino asitleri arasına yerleştirilmiştir. Literatürdeki ön çalışmalar 304'üncü amino asitten sonrasının kesilerek işaretleme yapılan reseptörlerin işlevlerini korudukları yönündedir. Bu çalışmada tam uzunluktaki reseptörler ile çalışmak istememizden dolayı işaret proteininden sonra kesilen reseptör terminali geri eklenmiştir.



**Şekil 1:** Bölünmüş floresan protein parçalarının ya da floresan proteinleri homolog (genel) rekombinasyon yöntemi ile hedef (Ste2p) gen içine eklenmesi. A) PZR yöntemi ile hedef proteine eklenmek istenen dizin eklenecek bölgeyi sınırlandıran 30-35 amino asitlik eş bölgelerle birlikte çoğaltılır. B) Hedef protein enzimatik yöntemlerle kesilerek işaretin eklenmesi için bir boşluk yaratılır, PZR ürünü ve hedef geni taşıyan plazmid maya hücresine aktarılır, homolog rekombinasyon yöntemi ile plazmid üzerindeki boşluk PZR ürünü ile tamamlanır.

**2.FRET:** Floresan rezonans enerji transferi ya da Förster rezonans enerji transferi (FRET) olarak adlandırılan floresan teknik, uyarılmış bir donör kromoforun enerjisini radyoaktif olmayan dipol eşleşme ile akseptör kromofora aktarması olayıdır. Donör ve akseptör moleküller arasındaki bu enerji transferi ancak moleküller fiziksel olarak birbirine 10 nm'den yakın olduklarında gerçekleşir. Bu nedenle FRET protein-protein etkileşimlerinde uzaklık tespiti için kullanılabilir. FRET tekniğinin kullanılabilmesi için önemli olan diğer bir husus da hedef proteinlerin işaretlenmesi sırasında kullanılacak olan kromoforların birbirleri ile uyumlu seçilmesidir. Bu çalışmada yeşil floresan türeviden olan EGFP ve mCherry donör ve akseptör olarak kullanılmıştır. Laboratuvarımızda ve doktora sonrası yaptığım çalışmalarda bu iki kromoforun birbirleri ile eşleşme, parlaklık ve fotostabilite gibi özelliklerinin hücre içinde gerçek zamanlı yapılacak çalışmalar için uyumlu olduğu yönündedir. Seçilen bu biyolojik floresan proteinleri bölünmüş EGFP tekniğinde olduğu gibi homolog rekombinasyon yöntemi kullanılarak Ste2p reseptörüne klonlanmıştır. Overton ve Blumer tarafından 2000-2005 yılları arasında yapılan çalışmaların aksine tam uzunluktaki reseptör proteinleri karboksi terminali üzerinde seçilen uygun noktalara (transkripsiyon sonrası modifikasyon motifleri taşımayan,

protein sentezlenmesini ve hücre içi reseptör hareketlerini etkilemeyecek bölgeler) floresan moleküller eklenerek işaretlenmiştir. İşaretlenen reseptörler işlevsel testler yapıldıktan sonra  $\alpha$ -faktör feromonuna normal tepki göstermeleri halinde eşleşme deneylerinde kullanılmıştır.

Bölünmüş EGFP tekniğinin kullanılması için hem EGFP-N hemde EGFP-C ile işaretlenmiş reseptörlerin aynı maya hücresi içinde sentezlenmesi gerekmektedir. Benzer şekilde FRET tekniği için hem donör hemde akseptör floresan protein ile işaretlenmiş reseptörlere ihtiyaç bulunmaktadır. Bu nedenle iki değişik floresan parçası ile ya da donör ve akseptör ile işaretlenmiş reseptörler değişik etiket taşıyan plazmidlere klonlanmıştır, örneğin: EGFP ile işaretlenmiş reseptör TRP (triptofan) etiketi taşıyan bir plazmide klonlanmış ise mCherry ile işaretlenmiş reseptör HIS (histidin) ya da URA (urasil) gibi değişik bir etiket taşıyan plazmide klonlanmıştır. Bu etiketlerin her ikisinde yapamayan maya suşunda plazmidlerin ikisinin aynı anda bulundurulması ve reseptörlerin sentezlenmesi mümkün olmuştur.

*Özgün Hedef 1b:* Feromon reseptörlerinin hücre içinde nerede ve nasıl eşleştiklerinin gerçek zamanlı tespit edilmesi.

Projenin bu kısmında özgün hedef 1a de geliştirilmiş ve test edilmiş floresan işaretli  $\alpha$ -faktör feromon reseptörleri kullanılarak GPKR eşleşme olayları canlı maya hücreleri içerisinde gerçek zamanlı olarak takip edilmiştir. Bu amaç doğrultusunda bölünmüş EGFP ve FRET teknikleri kullanılmıştır. Model organizma olarak seçtiğimiz *S. cerevisiae* tüm genomunun bilinmesi ve genetik modifikasyonların kolaylığı yüzünden birçok araştırmada proteinlerin hücre içerisindeki hareketlerini tespit etmekte kullanılmıştır. Genomunda toplam 4156 protein kodu taşıyan bu tek hücreli ökaryotun sentezlediği proteinlerin %87'sinin hücre içerisinde hangi organelde ya da kompartmanda olduğu bilinmektedir [9]. Bu bilgiler ışığında maya hücresinde farklı organelleri tespit etmek ve protein-protein etkileşimlerinin (GPKR eşleşmelerinin) hangi organellerde gerçekleştiğini araştırmak mümkündür.

EGFP-N ve EGFP-C parçaları ile işaretlenmiş Ste2p reseptörü kodlayan plazmidler çeşitli organelleri kırmızı floresan protein (DsRed ya da mCherry) ile işaretlenmiş maya suşlarına transformasyon yöntemi ile aktarılmıştır. Transformasyondan sonra maya hücreleri değişik zaman aralıklarında konfokal mikroskop ile görüntülenmiştir. Görüntüleme sırasında kullanılan laser ve filtre setleri sayesinde yeşil ve kırmızı floresan sinyallerini ayrı ayrı kaydetmek, ve bu sinyallerin hücre içinde eş-lokasyonlu (İng. colocalization) olup olmadıklarını araştırmak bize GPKR eşleşmesinin nerede gerçekleştiği konusunda bilgi vermektedir. Bölünmüş EGFP tekniğinde yeşil floresan özelliği yalnızca floresan protein parçaları ile işaretli reseptörler birbirleri ile etkileştikleri zaman geri-kazanılacağı için yeşil floresan protein sinyali GPKR eşleşmesinin gerçekleştiği organellerde belirgin olmaktadır. Bu çalışmada GPKR



eşleşmesinin muhtemel olduğu ER, golgi, endosome ve bu organeller arasındaki geçiş aşamaları yalnızca bu bölgelerde bulunan işaretli proteinler yardımı ile incelenmiştir. Örneğin: ER organelini işaretlemek için Sec63p, Golgi aygıtı için Anp1p, endosome için Snf7p ve ER golgi geçişi için de Sec13p kullanılmıştır.

Özgün hedef lb kapsamında niteliksel olarak değerlendirilen bölünmüş EGFP çalışmaları, yeşil floresan protein intensitesinin ölçümü ile nicel olarak da değerlendirilebilmesine rağmen lokal protein konsantrasyonundan etkilenebilen bir tekniktir. Bu nedenle GPKR eşleşmelerinin niceliksel analizini yapabilmek için FRET tekniği uygun görülmüştür. Bölünmüş EGFP tekniği ile hücre içinde nerede ve hangi zaman aralığında eşleştiği tespit edilen reseptörler, FRET tekniği kullanılarak nasıl bir eşleşme gerçekleştirdikleri konusunda incelenmiştir. Donör ve akseptör (EGFP ve mCherry) floresan moleküller ile işaretlenen Ste2p reseptörleri eş zamanlı sentezlenmek üzere transformasyon yöntemi ile maya hücrelerine aktarılmıştır. Reseptör eşleşmesinin gerçekleştiği ve eşleşmenin devam ettiği tüm bölgelerde reseptör proteinlere klonlanmış olan donör ve akseptör molekülleri fiziksel bir yakınlığa göstermişlerdir. Donör molekülünün akseptör molekülüne 10 nm ve daha yakın bir uzaklıkta bulunduğu durumlarda enerji transferi :  $E = 1/[1 + (r/R_0)^6]$  formülü ile hesaplanabilir. Bu formülde r iki floresan molekül arasındaki uzaklığı R<sub>0</sub> ise kullanılan donör akseptör ikilisi için belirlenmiş bir sabiti ifade etmektedir. Çalışmalarımızda kullanılan EGFP-mCherry ikilisi için R<sub>0</sub> 52 Å olarak belirlenmiştir. FRET, literatürde birçok protein-protein etkileşimini nicelik ve niteliksel yönden incelemek için kullanılmıştır, GPKR eşleşmelerinin niteliksel analizi için bölünmüş EGFP tekniğini tercih etmemiz, eşleşmenin yerini tespit etmek için kullanmayı planladığımız organel işaretlemesinin kırmızı floresan molekül ile yapılmış olmasından dolayıdır. FRET çalışmaları sırasında organel işaretlemesi için mavi floresan protein gibi üçüncü bir işaretleme kullanmak mümkün olmasına rağmen üç değişik rengin görüntülenmesi kullandığımız konfokal mikroskop ve filtre setleri göz önünde bulundurulduğunda bazı teknik sorunlar yaratmaktadır.

FRET değişik çalışmalarda farklı deneysel yöntemlerle tespit edilebilir, bu yöntemlerin başında: Donör molekülünün akseptör molekülünün foto-silikleştirilmesinden (İng. photobleaching) sonra floresan sinyalindeki artış ve hassaslaşmış akseptör emisyonu (İng. sensitized emission) gelmektedir. Akseptör molekülünün uzun süre yüksek enerjili laser ile uyarılarak floresan özelliğini kaybetmesi özelliğine dayanan ilk metot, canlı hücrelere verdiği zarar ve hücre içi hareketler ile uyumsuz olan veri toplama yöntemi yüzünden canlı hücrelerde tercih edilmemektedir. Bu nedenle donör ve akseptör molekülleri arasındaki uzaklığa göre değişim gösteren akseptör emisyonunun piksel-piksel incelenmesi ile gerçekleştirilen ikinci yöntem tercih edilmiştir. Özetle; yalnızca donör, yalnızca akseptör ve donör ile akseptör moleküller ile işaretlenmiş hedef proteinlerin sentezlendiği üç hücre grubu ayrı ayrı

incelenmiştir. Donör sızması (İng. donor bleed-through) olarak adlandırılan, donör molekülünün akseptör molekülün emisyon sınırları içinde ne kadar ışıdığı hesaplanması için sadece EGFP işaretli Ste2p reseptörlerinin sentezlendiği maya suşları görüntülenmiştir. Benzer şekilde akseptör sızması (İng. acceptor bleed-through) olarak adlandırılan, akseptör molekülünün direkt olarak donör molekülü uyarmak için kullanılan laser ile ne kadar uyarıldığı hesaplanması için sadece mCherry ile işaretlenmiş Ste2p reseptörlerin sentezlendiği hücreler görüntülenmiştir. Her iki floresan protein ile işaretli reseptörlerin bulunduğu hücrelerin görüntüleri “National Institutes of Health” (NIH) tarafından ücretsiz sunulan ImageJ adlı program aracılığı ile Pix-FRET uygulaması kullanılarak analiz edilmiştir [10]. Bu uygulama, deneysel koşullar altında hesaplanan donör ve akseptör sızmalarını göz önünde bulundurarak, akseptör molekülünün hücre içerisinde nerelerde FRET olayından dolayı yüksek floresan sinyali verdiğini, kaydedilen deneysel görüntülerde piksel çözünürlüğünde tespit etmeyi sağlamaktadır.

Özgün Hedef II: Reseptör dimerleşmesi üzerinde etkili olan modifikasyonların incelenmesi.

Hücre içerisindeki sinyallerin iletilmesinde rol oynayan proteinlerin birçoğu, reseptör proteinleri başta olmak üzere transkripsiyon sonrası protein dizini üzerinde gerçekleşen modifikasyonlarla kontrol edilirler. GPKRler de sayısız reseptör proteini gibi sentezlendikten sonra glikozilasyon ve fosforilasyon gibi modifikasyonlara maruz kalırlar. Bu modifikasyonlar proteinlerin sentez aşamasından sonra geçmeleri gereken kontrol noktalarında, hücre içinde organeller arası geçişlerde ve hücre zarından -aktivasyon sonrası ya da kendiliğinden- geri çekilim sırasında önemli rol oynamaktadır. Proje kapsamında model GPKR olarak seçilen Ste2p, bilinen iki glikozilasyon, üç fosforilasyon ve bir ubikuitinlenme pozisyonu içermektedir.

Ste2p reseptörünün 1. transmembran kısmında, Glycophorin A-benzeri bir dimerleşme motifi “G<sup>56</sup>XXXG<sup>60</sup>” taşıdığı bilinmektedir [5]. Overton’un yapmış olduğu çalışmada 56 ve 60. Pozisyonlarda yer alan glisinlerin, alenin ile değiştirmesi sonucunda reseptör eşleşmesinin azaldığı, leucine ile değiştirildiğinde ise dimerleşmenin %90 oranında azalttığı belirtilmiştir. Gerek BiFC tekniğine, gerekse de FRET tekniğimize bir kontrol olması açısından 56 ve 60. pozisyonlardaki bu amino asitlere, ilgili mutasyonlar yapılmıştır. Bu reseptörlerin kendi başlarına ve normal reseptörler ile birlikte ifade edildiklerinde nerede ve nasıl eşleştikleri tespit edilmiştir.

Fosforilasyon birçok zar proteininde olduğu gibi Ste2p için de hücre zarından içeri alınmayı uyaran bir sinyaldir. 1998 yılında Riezman *et al.* tarafından yapılan çalışmalarda Ste2p karboksi terminalindeki SINNDKSS bölgesinin bu reseptörün aktivasyon sonrası ve aktivasyon harici endositoz olayında önemli rol oynadığı ortaya konmuştur [11]. Bu bölgede



bulunan üç Serin'in fosforilasyona uğraması yine bu bölgedeki Lizin'in ubikuitinlenmesini ve dolayısı ile reseptör molekülünün hücre içine alınımını uyarmaktadır.

Floresan protein ve protein parçaları ile işaretlenmiş tam uzunluktaki Ste2p reseptörleri, fosforilasyon ve ubikuitinlenme den yoksun olan 304. amino asitden sonrası kesilmiş reseptörler ile karşılaştırılmıştır.

### 5.2.2 Materyaller:

#### 5.2.2.1 Besi Yerleri:

**MLT**, triptofan işareti taşıyan plazmidlerin maya hücrelerine transforme edilmesinin ardından bu hücrelerin seçimleri için kullanılan triptofan aminoasiti bakımından eksik maya besiyeri. Amonyum sülfat ve amino asit bakımından eksik nitrojen bazlı maya besiyeri içerisine amonyum sülfat, amino asit karışımı, casamino acid ve glukoz eklenerek hazırlanmıştır. Katı besi yeri için karışıma agar eklenmiştir.

**MLU**, urasil işareti taşıyan plazmidlerin maya hücrelerine transforme edilmesinin ardından bu hücrelerin seçimleri için kullanılan urasil aminoasiti bakımından eksik maya besiyeri. Amonyum sülfat ve amino asit bakımından eksik nitrojen bazlı maya besiyeri içerisine amonyum sülfat, amino asit karışımı, casamino acid ve glukoz eklenerek hazırlanmıştır. Katı besi yeri için karışıma 2% agar eklenmiştir.

**LB**, plazmidlerin çoğaltılması için kullanılan E.coli hücrelerinin büyümesi için kullanılan besiyeri. 1% Tryptone, 0.5% Yeast extract, 1% NaCl karıştırılarak elde edilmiştir. Katı besiyeri için karışıma 2% agar eklenmiştir. Hücrelerin seçimleri için ampisilin dirençlilik özelliğinden yararlanılacağı için sterilizasyonun ardından son derişim 100 µg/ml olacak şekilde ampisilin eklenmiştir.

**YEPD**, plazmidlerin mayaya transformasyonu için gerekli olan maya hücrelerinin büyütülmesin de kullanılmıştır. 1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose/dextrose karıştırılarak elde edilmiştir. Katı besi yeri için karışıma 2% agar eklenmiştir.

#### 5.2.2.2 Diğer Solüsyonlar:

$\alpha$ -Faktör Feromonu, biyolojik aktivite testlerinde kullanılmak üzere hazırlanan solüsyonlardır. Silikonize ependorf tüpü içerisine proje önerisinde belirtildiği gibi yurtdışından temin edilen onüç amino asitten oluşan bir polipeptid olan  $\alpha$ -faktör eklenir, üzerine 500 µl steril su eklendikten sonra nanodropta yapılan ölçüm ile derişimi hesaplanan feromon 0.4, 0.2, 0.1, 0.05 ve 0.025 µg/µl derişimlerini elde edecek şekilde su ile seyreltilir.

5.2.2.3 Plazmidlerin maya hücrelerine transformasyonunda kullanılan LiAc TRAFÖ [12] metodu için gerekli çözeltiler:

100mM ve 1.0M Lityum Asetat Solusyonu, uygun miktardaki lityum asetat deiyonize su içerisinde çözülmüş, ardından filtre yöntemi ile sterilize edilmiştir.

Polietilen glikol (PEG 50% w/v), belirtildiği oranlarda tartılan PEG deiyonize su içerisinde manyetik karıştırıcı yardımı ile çözülmüş ve filtreleme yöntemi ile sterilize edilmiştir.

Tek zincirli taşıyıcı DNA (2mg/ml), ticari olarak satılan somon sperm DNA'sı sodyum tuzu Tris-EDTA tampon solusyonu ile soğuk oda'da (4 °C) manyetik karıştırıcı yardımıyla geceboyu karıştırıldıktan sonra hazırlanan solüsyon 1ml'lik stoklar şeklinde -20 °C'de muhafaza edilmektedir.

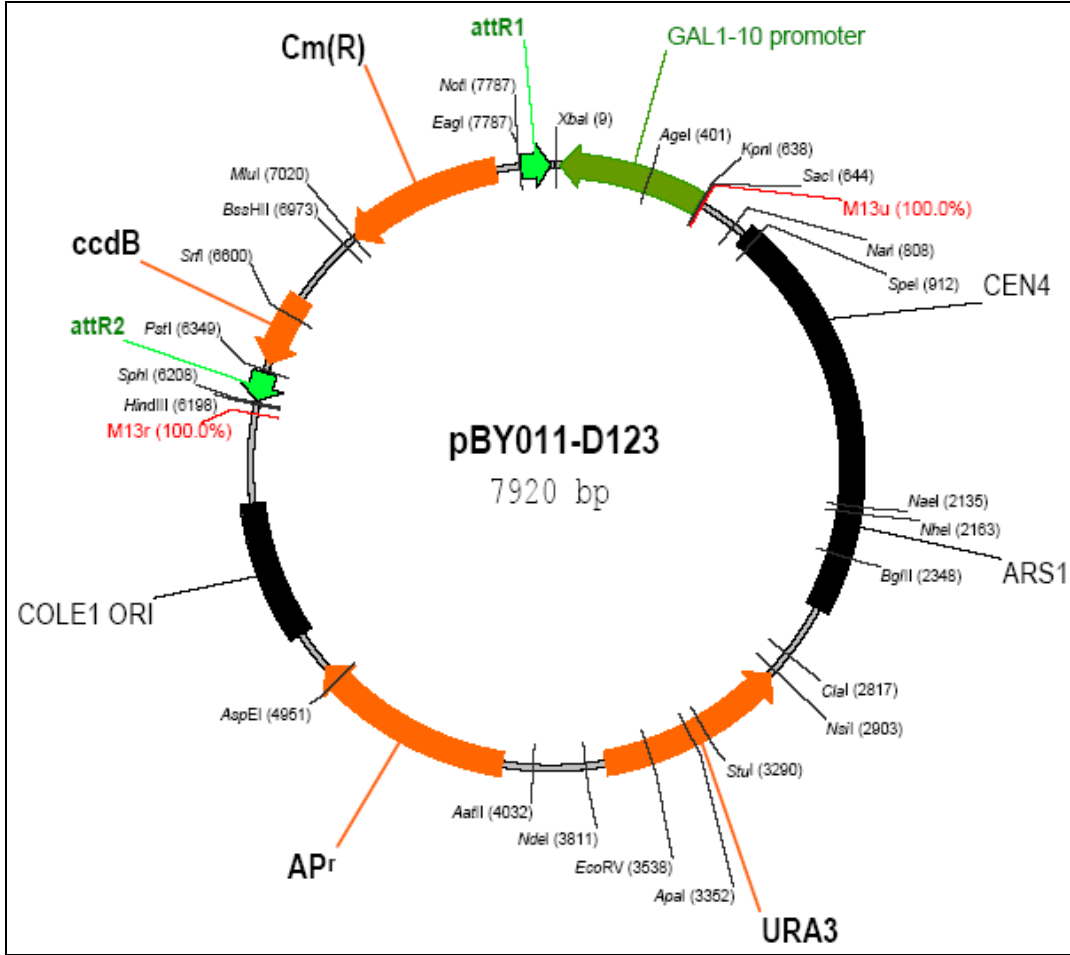
5.2.2.4 Maya suşları ve plazmidler :

Proje planında belirtildiği üzere University of Tennessee'deki bilimsel partnerimiz olan Prof. Dr. Jeff Becker tarafından sağlanan genetik değişikliklere uğratılmış maya suşları ve bu suşlar için hazırlanmış plazmidler Tablo1'de gösterilmiştir.

**Tablo1 : Maya suşları ve plazmidler**

<b>Maya Suşları</b>	<b>Genotip</b>
LM102	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>MATa</i> , <i>bar1</i> , <i>his4</i> , <i>leu2</i> , <i>trp1</i> , <i>met1</i> , <i>ura3</i> , <i>FUS1-lacZ::URA3</i> , <i>ste2-dl</i> .
BJS21	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>MATa ste2::KanR</i> , <i>prc1-407</i> , <i>prb 1-1122</i> , <i>pep4-3</i> , <i>Leu2</i> , <i>trp1</i> , <i>ura 3-52</i> , <i>ste2-dl</i> .
K102	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>MATa ste2Δ::HIS3 bar1 leu2 ura3 lys2 ade2 his3 trp1</i> , <i>ste2-dl</i> .
<b>Plazmidler</b>	<b>Özellikleri</b>
pCL01	GPD promoter, <i>CYC1</i> terminatör, karboksi terminalinde FLAG ve HIS tag bulunan STE2 sekansı ve mayada seçilim için urasil (URA) işaretine sahip 2-µm taşıyıcı vektör
pBEC1	GPD promoter, <i>CYC1</i> terminatör ve karboksi terminalinde HIS ve FLAG tag bulunan STE2 içeren, mayada seçilim için triptofan (TRP) işaretine sahip bir 2-µm taşıyıcı vektör
p423	GPD promoter, <i>CYC1</i> terminatör ve mayada seçilim için histidin (HIS) işaretine sahip bir 2-µm taşıyıcı vektör

Bu plazmidlerin yanı sıra lokalizasyon belirlemede kullanılan organel spesifik proteinlerin bulunduğu, mayada ve *E.coli*'de eksprese edilebilen plazmidler temin edilmiştir. Şekil2'de haritası bulunan pBY011-D123 vektörü mayada seçilim için urasil, *E.coli*'de seçilim için ise de ampisilin dirençlilik geni taşımaktadır. Bu vektör içerisinde temin edilen, 6 ayrı organel spesifik proteinin hedefleri Tablo 2'de belirtilmiştir.



Şekil 2: pBY011-D123 vektör haritası

**Tablo 2: Organel spesifik proteinler; gen sembolü ve lokalizasyonları**

Gen sembolü	Lokalizasyonu
ANP1	Cis-Golgi
SNF7	Endozom
SEC13	ER membranı
CHC1	Vezikul membranı (stoplazmik yüzü)
PEX3	Peroksizom
COP1	Trans-Golgi

İleri floresan mikroskopu tekniklerinde kullanılacak olan floresan proteinleri (EGFP, mCherry) Prof. Dr. Henry Lester, California Institute of Technology, tarafından laboratuvarımıza hediye edilmiştir.

Temin edilen plazmidlerin amplifikasyonu için, *E.coli* hücrelerine transformasyon gerçekleştirilmiştir. Transformasyonun ardından uygun hücrelerin seçilimi için ampisilin dirençlilik özelliğinden yararlanılmıştır. Bunun için *E.coli* (Top10) hücreleri CaCl<sub>2</sub> ile kompetan hale getirilmiş ardından hücreler, uygun miktarda (1pg-100ng) plazmid solüsyonu ile karıştırılmış, buz üzerinde 30 dk bekletildikten sonra, 30 sn ısı-şoku uygulanmıştır. LB sıvı besi yeri içinde 60 dk inkübe edilen karışım LB katı besi yeri ve ampisilin içeren petri kutuları üzerine yayılmış ve bir gece 37 °C 'de inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından elde edilen kolonilerden DNA saflaştırma kiti (SV Minipreps) kullanılarak plazmidler izole edilmiş ve bölümümüz bünyesinde bulunan nanodrop1000 kullanılarak konsantrasyon ölçümleri yapılmıştır.

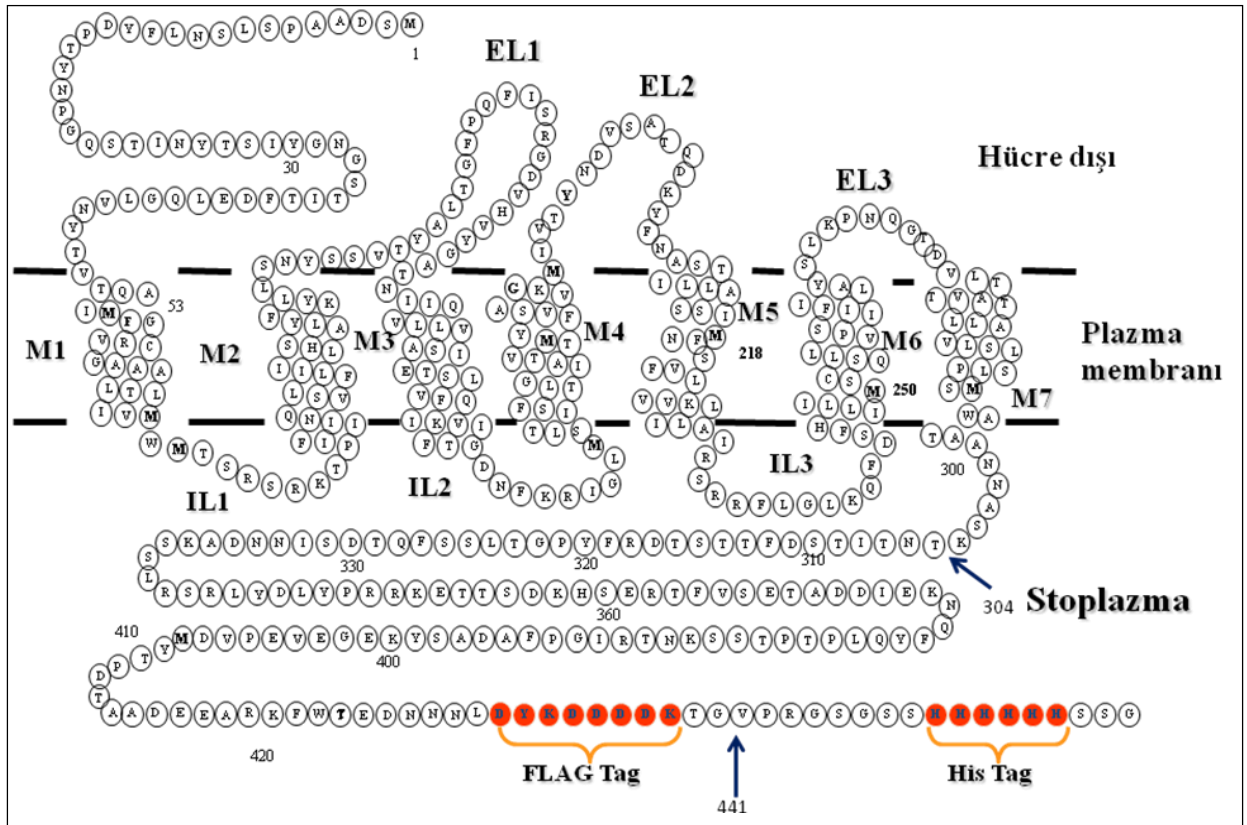
Bilimsel partnerimiz tarafından temin edilen maya suşları, uygun besi yerlerinde (YEPA) büyütülmüş ve projenin kısa vadedeki aşamalarında kullanılmak üzere +4 °C'de stokları yapılmıştır. Uzun vadedeki aşamalar için ise, bölümümüzde bulunan -80 °C dolabında saklanmaları için gliserol ile stokları yapılmıştır.

Projenin biyoenformatik analizler kısmında, bölünmüş-EGFP ve FRET tekniklerinde maya  $\alpha$ -faktör feromon reseptörünün (Ste2p) floresan protein variantları olan EGFP ve mCherry ile işaretlenmesi için kullanılacak olan primer setleri dizayn edilmiştir. Bu işlemlerin ardından klonlama çalışmalarına başlanmıştır.

### 5.2.3 Yöntemler:

#### 5.2.3.1 Bölünmüş-EGFP tekniği:

Araştırmamızda homo-dimerizasyonu test edilen Ste2p reseptörü, karboksi terminalinde antijenik FLAG tag ve HIS tag dizinleri bulunan 458 aminoasit uzunluğunda bir proteindir (Şekil 3). Proje planında bahsedildiği üzere Ste2p reseptörünün karboksi terminali içerisine genetik düzeyde yerleştirilecek EGFP parçaları için iki ayrı bölge literatürdeki önçalışmalar ve bu projede gerçekleştirilen bioformatik çalışmalar göz önünde bulundurularak seçilmiştir. Birinci pozisyon olarak 304 ve 305. amino asit rezidüleri arası, ikinci pozisyon olarak 441 ila 442. aminoasit rezidüleri arası çalışmamız için uygun bulunmuştur. Bu amaçla için yapılan EGFP parçaları ile işaretlenmiş plazmidler Tablo 3’de gösterilmiştir.



Şekil 3 : Maya  $\alpha$ -faktör feromon reseptör (Ste2p) diyagramı

**Tablo 3: Projede bölünmüş-EGFP tekniği için inşa edilen geliştirilmiş yeşil floresan parçaları ile işaretli Ste2p plazmidleri.**

<b>Plazmid</b>	<b>Tanımı</b>
<b>pGNU304</b>	Geliştirilmiş yeşil floresan proteinin N terminal kısmı Ste2 proteinin 304-305'nci amino asitleri arasına yerleştirilmiştir. Plazmid mayada seçilim için urasil işareti taşımaktadır.
<b>pGCU304</b>	Geliştirilmiş yeşil floresan proteinin C terminal kısmı Ste2 proteinin 304-305'nci amino asitleri arasına yerleştirilmiştir. Plazmid mayada seçilim için urasil işareti taşımaktadır.
<b>pGNT304</b>	Geliştirilmiş yeşil floresan proteinin N terminal kısmı Ste2 proteinin 304-305'nci amino asitleri arasına yerleştirilmiştir. Plazmid mayada seçilim için triptofan işareti taşımaktadır.
<b>pGCT304</b>	Geliştirilmiş yeşil floresan proteinin C terminal kısmı Ste2 proteinin 304-305'nci amino asitleri arasına yerleştirilmiştir. Plazmid mayada seçilim için triptofan işareti taşımaktadır.
<b>PGNU441</b>	Geliştirilmiş yeşil floresan proteinin N terminal kısmı Ste2 proteinin 441-442'nci amino asitleri arasına yerleştirilmiştir. Plazmid mayada seçilim için urasil işareti taşımaktadır.
<b>PGCU441</b>	Geliştirilmiş yeşil floresan proteinin C terminal kısmı Ste2 proteinin 441-442'nci amino asitleri arasına yerleştirilmiştir. Plazmid mayada seçilim için urasil işareti taşımaktadır.
<b>PGNT441</b>	Geliştirilmiş yeşil floresan proteinin N terminal kısmı Ste2 proteinin 441-442'nci amino asitleri arasına yerleştirilmiştir. Plazmid mayada seçilim için triptofan işareti taşımaktadır.
<b>PGCT441</b>	Geliştirilmiş yeşil floresan proteinin C terminal kısmı Ste2 proteinin 441-442'nci amino asitleri arasına yerleştirilmiştir. Plazmid mayada seçilim için triptofan işareti taşımaktadır.

### **Floresan protein parçalarının maya feromon reseptörüne klonlanması**

EGFP parçalarının sentezi için PZR yöntemi kullanılmıştır. Geliştirilmiş yeşil floresan proteininin (EGFP) ilk 128 amino asitten meydana gelen amino ve 129-238 inci amino asitlerini içeren karboksi terminali şeklinde iki parçaya bölünmesi ve Ste2p reseptörü içerisinde istenilen pozisyona (304 ve 441. amino asit rezidülerinden sonra) yerleştirilmesi için forward ve reverse primerlerden oluşan 4 adet primer seti dizayn edilmiştir. Bu işlem sırasında N-EGFP ve C-

EGFP parçaları Ste2p reseptörü üzerinde yer alacakları pozisyona göre yaklaşık 25 baz uzunluğunda, reseptöre eş dizinler ile sınırlandırılmıştır. Primerlerin sekansları Tablo 4'de gösterilmiştir.

**Tablo 4 : EGFP parçalarının amplifikasyonu için dizayn edilmiş primerler**

Position	Primer	Sekans
304	N-EGFP Forward	CACGGCTGCTAATAATGCATCCAAAATGGTGAGCAAGGGC GAGGAGCTGT
	N-EGFP Reverse	GTAAAGTCTGAAGTAATTGTGTTTGTGCCCTTCAGCTCGAT GCGGTTACCA
	C-EGFP Forward	CACGGCTGCTAATAATGCATCCAAAATCGACTTCAAGGAGG ACGGCAACA
	C-EGFP Reverse	GTAAAGTCTGAAGTAATTGTGTTTGTCTTGTACAGCTCGTCC ATGCCGAGA
441	N-EGFP Forward	CAAGGACGACGATGACAAGACCGGTATGGTGAGCAAGGGC GAGGAGCTGT
	N-EGFP Reverse	GGCTGCTGCCGCTGCCGCGCGGCACGCCCTTCAGCTCGAT GCGGTTACCA
	C-EGFP Forward	CAAGGACGACGATGACAAGACCGGTATCGACTTCAAGGAG GACGGCAACA
	C-EGFP Reverse	GGCTGCTGCCGCTGCCGCGCGGCACCTTGTACAGCTCGTC CATGCCGAGA

PZR reaksiyonunda pEGFP-N1'den istenilen bölgenin çoğaltılması için Taq polimeraz enzimi ve solüsyonu kullanılmıştır. PZR reaksiyonu her bir pozisyon için amino terminal ve karboksi terminal olmak üzere 2 reaksiyon içermektedir. Her bir reaksiyonun son miktarı 50µl olup, reaksiyonlarda dNTP, Taq polimeraz ve solüsyonu, pEGFP-N1 plazmidi, primer forward, primer reverse ve su kullanılmıştır. Ayrıca primerleri içermeyen bir kontrol grubu eklenmiştir.

**PZR programı :**

98 °C de 4 dk

98 °C 45 sn

58 °C 30 sn

68 °C 60 sn

68°C 20 dk

} 20 döngü

basamaklarından oluşmaktadır.

**5.2.3.2 Förster Resonance Energy Transfer (FRET) tekniği:**

FRET analizlerinde maya  $\alpha$ -faktör feromon reseptörünün (Ste2p) floresan protein variantları olan EGFP ve mCherry ile işaretlenmesi için gerekli PZR reaksiyonlarında kullanılacak olan primer setleri dizayn edilmiştir, bu primerler bölünmüş EGFP tekniğinden farklı olarak tam

uzunlukta floresan proteinlerinin Ste2p reseptörüne klonlanması için uygun olarak tasarlanmıştır.

**Tablo 5 : EGFP ve mCherry proteinlerinin amplifikasyonu için dizayn edilmiş primerler**

Position	Primer	Sekans
304	mCherry Forward	CACGGCTGCT AATAATGCAT CCAAAATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG
	mCherry Reverse	GTAAAGTCTGAAGTAATTGTGTTTGTCTTGTACAGCTCGTCC ATGCC
441	mCherry Forward	CAAGGACGACGATGACAAGACCGGTATGGTGAGCAAGGGC GAGGAG
	mCherry Reverse	GGCTGCTGCCGCTGCCGCGCGGCACCTTGTACAGCTCGTC CATGCC

FRET analizleri için inşa edilen plazmidler ve özellikleri, Tablo 6'da özetlendiği gibidir.

**Tablo 6: Projede inşa edilen floresan işaretli Ste2p plazmidleri**

Plazmid	Tanımı
<b>pGGU304</b>	Geliştirilmiş yeşil floresan protein, Ste2 proteinin 304-305'nci amino asitleri arasına yerleştirilmiştir. Plazmid mayada seçilim için urasil işareti taşımaktadır.
<b>pGCU304</b>	Geliştirilmiş kırmızı floresan protein, Ste2 proteinin 304-305'nci amino asitleri arasına yerleştirilmiştir. Plazmid mayada seçilim için urasil işareti taşımaktadır.
<b>pGGT441</b>	Geliştirilmiş yeşil floresan protein, Ste2 proteinin 441-442'nci amino asitleri arasına yerleştirilmiştir. Plazmid mayada seçilim için triptofan işareti taşımaktadır.
<b>pGCT441</b>	Geliştirilmiş kırmızı floresan protein, Ste2 proteinin 441-442'nci amino asitleri arasına yerleştirilmiştir. Plazmid mayada seçilim için triptofan işareti taşımaktadır.

Reseptör dimerleşmelerinin FRET yöntemi ile çalışılması için aynı hücre içerisinde ikili ifadeleri gerçekleştiren FRET çiftleri bulunması gerekmektedir. Konfokal mikroskop ile görüntüleri alınmış ve tek bir floresan markörle işaretlenmiş maya  $\alpha$ -faktör feromon reseptörlerini ifade eden hücrelerin, FRET çiftlerinin ikili ifadeleri için, Gietz vd. Metoduyla [12] ikinci kez



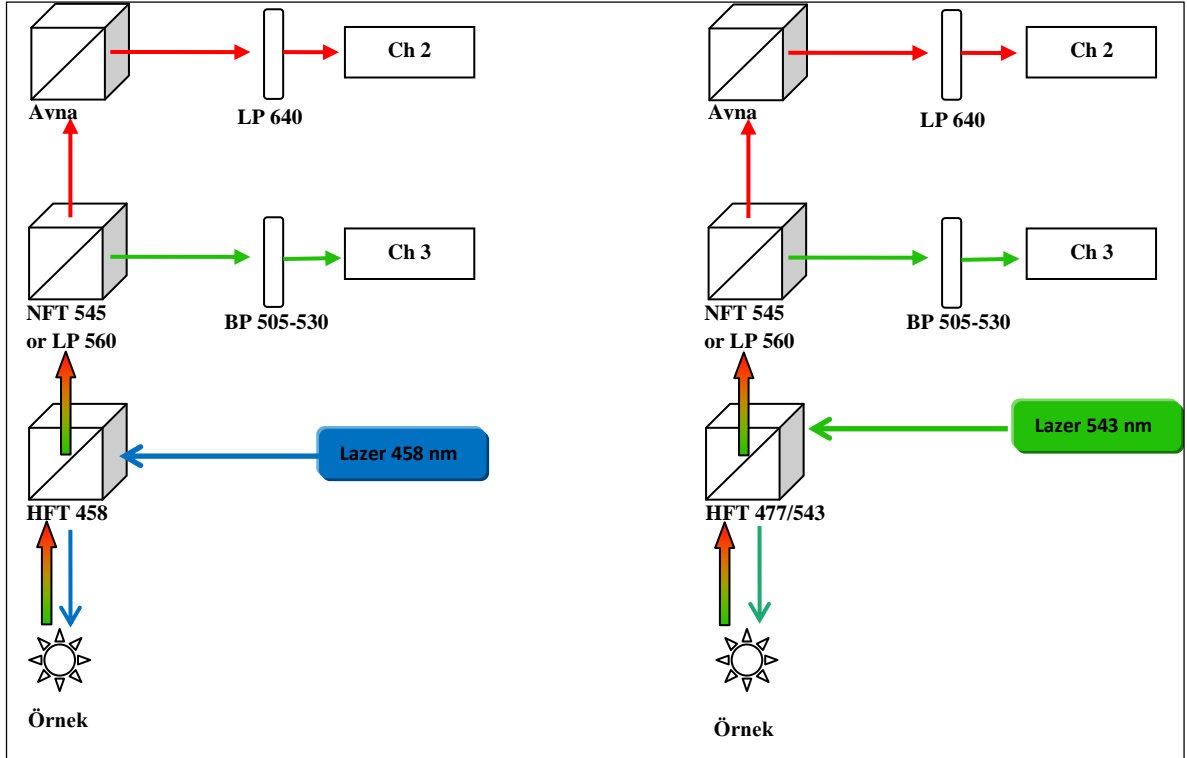
transformasyonları gerçekleştirilmiştir. İkili ifade için gece boyunca YEPD sıvı besi yerinde (5 mL) büyütülen DK102 maya hücreleri ertesi gün hemasaytometre ile sayılmış ve hücre derişimleri  $5 \times 10^6$  olacak şekilde 50 mL YEPD içerisinde inoküle edilmiştir. Hücre yoğunluğu  $2 \times 10^7$  olana kadar  $30^\circ\text{C}$ 'de inkübe edilen hücreler toplandıktan sonra su ve 100 mM LiAc ile yıkanmıştır. Yıkanan hücrelere sırası ile %50 PEG, 1.0 M LiAc, Salmon Sperm DNA (5 dk kaynatılmış ve takiben buzda tutulmuş), su ve plazmid DNA eklenmiştir. Vorteksle karıştırılan karışım daha sonra  $30^\circ\text{C}$ 'de 30 dk inkübe edilmiş ve takiben 25 dakika boyunca  $42^\circ\text{C}$ 'de ısı şokuna maruz bırakılmıştır. Santrifüj edildikten sonra transformasyon solüsyonundan arındırılan hücreler su içerisinde yeniden çözülerek elde edilen hücre çözeltileri 200  $\mu\text{L}$ , seçici besi yeri bulunan (MLTU) petri kapları üzerine yayılmıştır.

Transforme edilen hücreler görüntüleme analizlerinde kullanılmak üzere bir gece boyunca uygun besiyerlerinde (MLTU) büyütülmüş, ardından konfokal mikroskop ile görüntülemek için lam-lamel üzerine uygun oranlarda seyreltilerek uygulanmış ve birkaç dakika yerleşmeleri beklenmiştir. Maya hücreleri konfokal mikroskopta aşağıda gösterilen uygun konfigürasyon seçenekleri ayarlanarak uyarılmıştır (Şekil 4).

FRET hesaplamaları için alınması gereken görüntüler sırası ile tablo 7'eki gibi alınmıştır:

**Tablo 7:** FRET çalışmalarında alınan görüntü şeması.

<p>A) Analiz Örneği: (EGFP + mCherry) 457 nm dalga boyunda lazer ile uyarılır ve 2. kanal (Ch2) detektörü aracılığıyla <i>FRET</i> görüntüsü alınır. 3. Kanal (Ch3) detektörü ile <i>Donör</i> görüntüsü alınır.</p> <p>B) Donör karışması (yalnızca EGFP) 457 nm dalga boyunda lazer ile uyarılır ve 2. kanal (Ch2) detektörü aracılığıyla <i>FRET</i> görüntüsü alınır. 3. Kanal (Ch3) detektörü ile <i>Donör</i> görüntüsü alınır.</p> <p>C) Akseptör karışması (yalnızca mCherry) 457 nm dalga boyunda lazer ile uyarılır ve 2. kanal (Ch2) detektörü aracılığıyla <i>FRET</i> görüntüsü alınır.</p>	<p>A) Analiz Örneği (EGFP + mCherry) 543 nm dalga boyunda lazer ile uyarılır ve 2. kanal (Ch2) detektörü aracılığıyla <i>Akseptör</i> görüntüsü alınır.</p> <p>C) Akseptör karışması (yalnızca mCherry) 543 nm dalga boyunda lazer ile uyarılır ve 2. kanal (Ch2) detektörü aracılığıyla <i>Akseptör</i> görüntüsü alınır.</p>
--	--



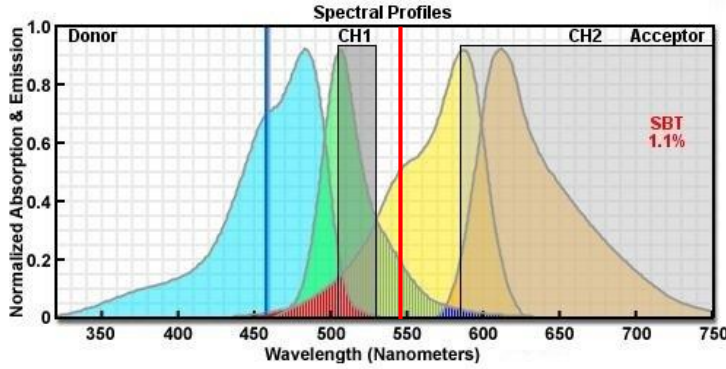
**Şekil 4:** FRET çalışmaları için konfokal mikroskop ayarları lazer ve filtre seçimleri.

Bu ayarlar kullanılarak FRET çalışmaları için veri toplaması aşağıdaki sıra ile yapılmaktadır:

- A) Analiz örneği (EGFP + mCherry)
  1. 457 nm dalga boyunda lazer ile uyarılır ve 2. kanal (Ch2) detektörü aracılığıyla FRET görüntüsü alınır. 3. kanal (Ch3) detektörü ile Donör görüntüsü alınır.
  2. 543 nm dalga boyunda lazer ile uyarılır ve 2. kanal (Ch2) detektörü aracılığıyla Akseptör görüntüsü alınır.
- B) Donör Karışması (sadece EGFP)
  1. 457 nm dalga boyunda lazer ile uyarılır ve 2. kanal (Ch2) detektörü aracılığıyla FRET görüntüsü alınır. 3. Kanal (Ch3) detektörü ile Donör görüntüsü alınır.
- C) Akseptör Karışması (mCherry için)
  1. 457 nm dalga boyunda lazer ile uyarılır ve 2. kanal (Ch2) detektörü aracılığıyla FRET görüntüsü alınır.
  2. 543 nm dalga boyunda lazer ile uyarılır ve 2. kanal (Ch2) detektörü aracılığıyla Akseptör görüntüsü alınır.

Proje önerimizde belirtildiği gibi FRET çalışmalarında kullanmaya karar verdiğimiz floresan protein çifti EGFP (donör) ve mCherry (akseptör) molekülleri olarak seçilmiştir (Şekil 5). Bu çiftin seçilmesi proje önerisinde detaylandırılmıştır. Kısaca belirtmek gerekirse bu çift FRET çalışmaları için oldukça uygun özellikler taşımaktadır; donör ve akseptör karışmaları oldukça

az gözlemlenmekte olan bu çift aynı zamanda deneylerimizi yapabileceğimiz mikroskoplar ve bu mikroskoplarda bulunan donanım ile uyumludur.



**Şekil 5: EGFP ve mCherry moleküllerinin akzıtasyon ve emisyon grafikleri.** Kullanılan konfokal mikroskoplarda bulunan lazerler (458 nm ve 543 nm) mavi ve kırmızı çizgiler ile belirtilmiştir.

Yukarda belirtilen ayarlarda toplanan görüntüler, ImageJ yazılımında bulunan PixFRET uygulaması ile analiz edilmektedir. Bu amaçla 3 farklı görüntü grubu oluşturulmuştur. Birinci grup içinde 3 görüntü yer almaktadır: ilk görüntü FRET ayarlarında donörü uyarma, akseptör sinyalini saptama; ikinci görüntü donör ayarlarında, donörü uyarma, donör sinyalini saptama ve son grup görüntü ise akseptör ayarlarında, akseptörü uyarma ve akseptör sinyalini saptamadır. Bu 3 grup görüntünün hepsi EGFP/mCherry FRET çiftini taşıyan, ikili transformant maya hücrelerinden alınmaktadır. Donör karışmasının hesaplanması için, sadece donör yani; EGFP ile işaretlenmiş maya  $\alpha$ -feromon reseptörü ifadesi yapan hücrelerden 2 görüntü içeren görüntü grubu oluşturulmuştur: ilk görüntü FRET ayarlarımızda alınmıştır, gruptaki ikinci görüntü ise donör ayarlarında alınmıştır. Akseptör karışmasının hesaplaması için de paralel bir yöntemle sadece akseptör yani; mCherry ile işaretlenmiş maya  $\alpha$ -feromon reseptörü ifadesi yapan hücrelerden 2 görüntü içeren görüntü grubu oluşturulmuştur.

Konfokal mikroskop ile alınan görüntüler, imageJ programının pixFRET eki kullanılarak analiz edilmiştir. Bu program sayesinde elimizdeki hücre görüntülerini oluşturan herbir piksel için FRET hesaplaması yapılmış ve bu pikseller FRET değerine göre renklendirilmiştir. Proje kapsamında iki değişik bölgeden işaretlenmiş reseptör ve bu reseptörlerin olumlu uyarını olan  $\alpha$ -faktör feromonu kullanılarak dört değişik koşul denenmiştir. Bu çalışmada kullanılan floresan markör işaretli reseptörler 304'üncü amino asitinden sonra işaretlenmiş ve 441'inci amino asitinden sonra işaretlenmiş reseptörler olarak iki gruba ayrılmıştır. Bu reseptörler  $\alpha$ -faktör feromonu ile uyarılmadan önce ve uyarıldıktan sonra görüntülenerek FRET hesaplamaları yapılmıştır.

### **5.2.3.3 Hücre zarının hazırlanması:**

BJS21 maya hücreleri, urasil işareti taşıyan plazmidler için MLU, triptofan işareti taşıyanlar için MLT besiyerinde 30 °C'de 16-18 saat (gece boyu) büyütülmüştür. Büyütülen hücreler su ile iki kez yıkandıktan sonra HEPES solüsyonu (10 nM HEPES ve 4 mM EDTA, pH = 7.0) ile çözülmüştür. Hücreler cam bilyeler yardımı ile homojenize edildikten sonra hücre organelleri ve parçalanmamış hücrelerden arındırılmak amacı ile 5 dakika 4 °C'de 2000 g ye maruz kalacak şekilde santrifuj edilmiştir. Üst faz yeni bir tüpe alınarak yine 4 °C'de 30 dakika 15,000 g ye maruz bırakılmıştır. Üst fazından ayrılan hücre zarı çökeltisi HEPES solüsyonu içerisinde resuspanse edilmiştir.

### **5.2.3.4 Bradford Analizi:**

Hazırlanan hücre zarı preparatının protein konsantrasyonun ölçülmesi için yapılan analizde örnekler su ile 1/10 oranında seyreltilmiştir. BSA ile hazırlanmış farklı konsantrasyonlardaki protein standartları ile birlikte örneklere de Bradford ayırıcı eklenmiş ve örneklerin 595 nm'de absorbanları ölçülmüştür. Protein oranı bilinmeyen örnekler için elde edilen veriler, standartların 595 nm'deki absorbanları kullanılarak oluşturulan doğrusal denklem yardımı ile analiz edilmiş ve bu örneklerin protein konsantrasyonları hesaplanmıştır.

### **5.2.3.5 Western Blot:**

Hücre zarı proteinleri ile birlikte izole edilen reseptörler SDS-PAGE ile ayrıştırılmış, elde edilen jel western blot için, Immobilon-P membrana (Milipore Corporation, Bedford, MA) transfer edilmiştir. Bu çalışmada kullanılan Ste2 proteinleri C terminallerinde FLAG işareti taşıdığından dolayı, blotlar anti-FLAG antikoru kullanılarak işaretlenmiş ve bantlar West Pico kemiluminesant tespit sistemi (Pierce) ile gözlemlenmiştir.

Ayrıca yapılan seyreltmenin kontrolü ve jele yüklenen örneklerin protein miktarlarının aynı olup olmadığını kontrol etmek amacı ile aynı örneklerle yüklenmiş ikinci bir jel daha yürütülmüş ve ardından "comassie blue" yöntemi ile boyanan protein bantları değişik örnekler için birbirleri ile karşılaştırılarak analiz edilmiştir.

### **5.2.3.6 Organel Markörler:**

Ste2p reseptörünün hücre içerisinde dimerleşme yerinin tespiti için işaretli organel markörlerin oluşturulması ve markörlerin işaretli reseptörlerle ko-lokalizasyonunun incelenmesi planlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda, gateway ekspresyon vektöründe temin edilen endozom, cis-golgi, trans-golgi, golgi, ER, peroksizom ve salgı veziküllerini (ER-golgi geçişi) işaretleyen markör genleri C terminallerinden mCherry flüoresan gen dizisiyle birleştirilmiş,

Bundan sonraki aşamada, bu markörler ve işaretli reseptörlerle transforme edilmiş maya hücrelerinde markörler ve reseptör dimerleşme olaylarının ko-lokalizasyonu incelenmiştir.

### 5.2.3.7 Transkripsiyon sonrası modifikasyonlardan mahrum reseptör sentezlenmesi için primer tasarımı

Projenin bu aşamasında, Ste2p üzerinde 2 pozisyonun hedefi belli nokta mutasyon metodu ile değiştirilmesi planlanmış ve başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. İlk kez 2001 yılında Montesana ve Konopka tarafından rapor edilen Ste2p üzerindeki iki glikozilasyon bölgesi (Asn 25 ve Asn 32) hücre içindeki hareketleri ve reseptör işlevlerini etkilemediği halde yanlış katlanmış reseptörlerin hücre zarına ulaşmalarını engellemektedir [13]. ER’de gerçekleşen bu modifikasyonlardan yoksun reseptör molekülleri yanlış katlanmış olsalar dahi hücre zarına ulaşmaktadırlar. Üçüncü özgün hedefimiz çerçevesinde Asn 25 ve Asn 32 de gerçekleşen glikozilasyondan yoksun reseptörlerin GPKR dimerleşmesi üzerindeki etkileri araştırmak için Asn25Gln ve Asn32Gln nokta mutasyonlarını taşıyan Ste2p reseptörleri özgün hedef lb de geliştirilen floresan yöntemler kullanılarak normal reseptörler ile karşılaştırılmıştır. Bu reseptörlerin kendi başlarına ve normal reseptörler ile birlikte ifade edildiklerinde nerede ve nasıl eşleştikleri tespit edilmiştir. Bu bilgiler ışığında, reseptör diziliminde her iki kodonun aynı reaksiyonda mutasyona uğratılması aralarındaki mesafe de göz önünde bulundurulduğunda çok düşük verimle gerçekleşeceğinden, 25 ve 32. pozisyonlarındaki asparajinlerin iki adımlı reaksiyonla glutamine dönüştürülmeleri sağlanmıştır. Bu dönüşüm için kullandığımız metot “Çift Primer Metodu”dur [14]. Bu metod çerçevesinde, arzu edilen noktasal mutasyonu taşıyan ileri ve geri primerler tasarlanmıştır. Böylelikle birbirinden bağımsız iki PZR ile Asn25Gln ve Asn32Gln mutantları ayrı ayrı oluşturulmuştur. Daha sonra, Asn32Gln mutantı taşıdığı tespit edilen plazmidler, ikinci bir PZR ile 25. Pozisyondan da dönüştürülerek, Gln25-Gln32 mutant dizisi elde edilmiştir. Yukarıda anlatılan bu amaçlar için tasarlanan ve kullanılan primerler tablo 8’de sunulmaktadır.

**Tablo 8:** Ste2p reseptörü üzerinde glikozilasyona uğrayan Asn 25 ve Asn 32 amino asitlerini Gln amino asidine değiştirmek için kullanılan primerler. Değiştirilen kodonlar sarı ve yeşil ile değiştirilen bazlar kırmızı ile işaretlenmiştir.

Primer	Primer sekansı
N25Q-F	GCACCATTCAAATACACTTCCATATATGGGAATGGATCTACC
N25Q-R	GGAAGTGTAATGGAATGGTGCTTTGACCAGGATTATACGTTGG
N32Q-F	CATATATGGGCAAGGATCTACCATCACTTTTCGATGAGTTGCAAGG
N32Q-R	GGTAGATCCATGCCCCATATATGGAAGTGTAGTTAATGGTGCTTTG
N32Q-R	GGTAGATCCATGCCCCATATATGGAAGTGTAATGGAATGGTGCTTTG

### 5.2.3.8 Dimerleşmeden yoksun reseptör sentezlenmesi:

Ste2p reseptörünün 1. transmembran kısmında, Glycophorin A-benzeri bir dimerleşme motifi “G<sup>56</sup>XXXG<sup>60</sup>” taşıdığı bilinmektedir [5]. Overton ve arkadaşları tarafından yapılmış olan çalışmada 56 ve 60. Pozisyonlarda yer alan glisinlerin, alenin ile değiştirilmesi sonucunda reseptör eşleşmesinin azaldığı, leucine ile değiştirildiğinde ise dimerleşmenin %90 oranında azalttığı belirtilmiştir. Gerek BiFC tekniğine, gerekse de FRET tekniğimize bir kontrol olması açısından 56 ve 60. pozisyonlardaki bu amino asitlere, ilgili mutasyonlar yapılmıştır.

Hedefe yönelik bu mutasyonların gerçekleştirilmesi için yukarıda belirtilen “çift primer metodu” kullanılmıştır. Bu metot dahilinde 56. ve 60. pozisyonlardaki mutasyonları taşıyan primerler tasarlanmış ve temin edilmiştir. Bu primerler Tablo 9’da verilmiştir:

**Tablo 9.** Ste2p reseptör üzerinde dimerleşmeyi bozan 56<sup>Gly→Ala</sup>, 60<sup>Gly→Ala</sup>; 56<sup>Gly→Leu</sup>, 60<sup>Gly→Leu</sup> ve 56,60<sup>Gly→Ala</sup> ve 56,60<sup>Gly→Leu</sup> modifikasyonları için tasarlanmış primerler.

Primer	Primer sekansı
G56A-F	GCCATTATGTTTGCTGTCAGATGTGGTGCAGCTGCTTTGACTTTG
G56A-R	CATCTGACAGCAAACATATGGCCTGAGTAACAGTACTGTTAAC
G60A-F	GTCAGATGTGCGCAGCTGCTTTGACTTTGATTGTCATGTGG
G60A-R	GCAGCTGCAGCACATCTGACACCAAACATAATGGCCTGAGTAAC
G60/56A-R	GCAGCTGCAGCACATCTGACAAGAAACATAATGGCCTGAGTAAC
G56L-F	GCCATTATGTTTCTTGTCAGATGTGGTGCAGCTGCTTTGACTTTG
G56L-R	CATCTGACAAGAAACATAATGGCCTGAGTAACAGTACTGTTAAC
G60L-F	GTCAGATGTCTTGAGCTGCTTTGACTTTGATTGTCATGTGG
G60L-R	GCAGCTGCAAGACATCTGACACCAAACATAATGGCCTGAGTAAC
G60/56L-R	GCAGCTGCAAGACATCTGACAAGAAACATAATGGCCTGAGTAAC

Hedeflenen nokta mutasyonları gerçekleştirmek için metot gereği birbirinden bağımsız iki PZR ile 56<sup>Gly→Ala</sup> ve 60<sup>Gly→Ala</sup> ayrıca; 56<sup>Gly→Leu</sup> ve 60<sup>Gly→Leu</sup> mutantları ayrı ayrı oluşturulmuştur. Daha sonra, 60<sup>Gly→Ala</sup> ve 60<sup>Gly→Leu</sup> mutantları taşıdığı sekanslama ile tespit edilen plazmidler, ikinci bir PZR ile 56. pozisyondan da dönüştürülerek, 56, 60<sup>Gly→Ala</sup> ve/veya 56, 60<sup>Gly→Leu</sup> mutant dizisi elde edilmiştir. Hedeflenen mutasyonun yapılması için PZR koşulları aşağıdaki gibidir:

İçerik	Miktar (µL)
dH <sub>2</sub> O	35
DNA Polimeraz tampon çözeltisi	10
Plazmid	1
İleri primer	1

Geri primer	1
dNTP	1
DNA Polimeraz	1

PZR koşulu:

98°C 30 s  
98°C 30 s }  
51°C 1 d } 18 döngü  
68°C 23 d }  
4°C ∞

Aynı şekilde, tamamlanan PZR sonunda, *E.Coli* kökenli metile kalıp plazmidten kurtulmak, karışımda sadece PZR'nin çoğalttığı plazmidi bırakmak amacıyla karışıma DpnI enzimi eklenmektedir. DpnI kesme koşulları önceki protokoldeki gibidir:

İçerik	Miktar (µL)
PZR karışımı	17
dPNI (NEB)	1
Tampon çözelti (NEB Buffer4 )	2

37°C'de 3 saat.

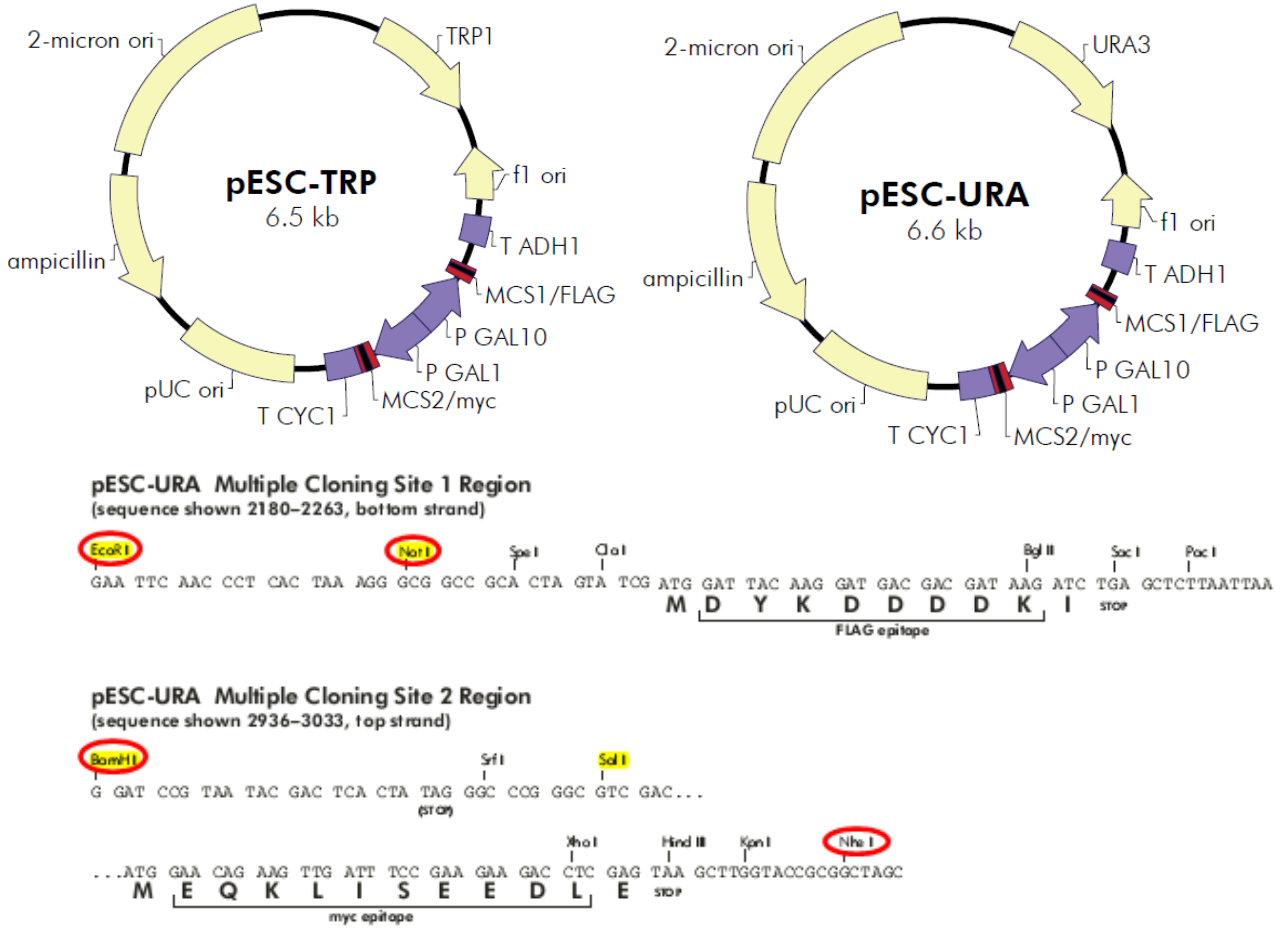
Enzimin kesmesi için yeterli süre bekledikten sonra karışım PZR saflaştırma kiti kullanılarak enzim ve tuzlardan arındırılarak, *E.Coli* transformasyonunda kullanılmaktadır.

*E.Coli* transformasyonu neticesinde elde edilen kolonilerden 4'er adet seçilmekte, seçilen koloniler 37°C'de gece boyu LB'de büyütülerek, transformant *E.Coli*'lerden plazmid izolasyonu kit kullanılarak yapılmaktadır. İzole edilen plazmidlerden hedeflenen mutasyonları taşıyanların tespit edilmesi için sekans analizine gönderilmektedir.

### 5.3.3.9 Çift promotörlü vektör kullanımı:

Projemizde araştırmakta olduğumuz Ste2p dimerleşmesi ve mekanizmaları metot temelinde Ste2Δ maya suşunda iki farklı floresan markörle işaretlenmiş Ste2p geninin, *in-vivo* eşzamanlı ifadesi ve maya hücrelerinin konfokal floresan mikroskop ile görüntülenmesi üzerine dayanmaktadır. Dolayısıyla projemizde mayada farklı auxotrophic marköre sahip pBEC1 ve pCL01 vektörlerini kullanmaktayız. Gerek eşleşmenin lokasyonunu gerekse de gün geçtikçe artan GPCR oligomerleşme literatürünü göz önünde bulundurduğumuzda üçüncü ve hatta dördüncü bir proteinin eş zamanlı ifadesi gerekmektedir. Bu amaçla temin edilen çift promotörlü maya ekspresyon vektörleri olan pESC-TRP, pESC-URA kullanılarak her bir

klonlama bölgesinde N-EGFP ve C-EGFP taşıyan Ste2p genleri yerleştirilmiştir. Bu plazmidlerin vektör haritaları Şekil 6'da verilmiştir:



Şekil 6: pESC-TRP ve pESC-URA çift promotörlü ekspresyon vektörlerinin haritaları.

Yukarıdaki vektör haritalardan hareketle, mayada ifadesi planlanan genler, birinci çoklu klonlama bölgesinde EcoRI – NotI dizileri arasında, ikinci çoklu klonlama bölgesinde ise BamHI–NheI restriksiyon dizileri arasında yerleştirilmiştir. Bu doğrultuda, daha önceden laboratuvarımızda hazırlanmış plazmidlerdeki floresan markör taşıyan füzyon Ste2p genlerini, 5' ve 3' uçlarına ilgili restriksiyon dizileri koyarak PZR ile çoğaltılıp, çoklu klonlama bölgelerine yerleştirilmiştir. Bu reaksiyonlarda kullanılan primerler çoğaltılacak Ste2p geninin 5' ve 3' uçlarındaki homolog diziler, ilgili restriksiyon enzim dizisi ve son olarak, kesme işleminde enzimin tutunmasına yardımcı olacak 9 bazlık (GAGAGAGAG) uç bölgeden oluşmaktadır. Bahsi geçen primerler aşağıdaki tabloda verilmiştir:



**Tablo 10:** Çift promotörlü vektörler için tasarlanan primerler.

Primer	Primer Sekansı
Ste2EcoRIF	GAGAGAGAGGAATTCATGTCTGATGCGGCTCCTTCATTGAGC
Ste2NotIR	CTCTCTCTCGCGGCCGcttagccgctgctatgatgatgatg
Ste2BamHIF	GAGAGAGAGGGATCCATGTCTGATGCGGCTCCTTCATTGAGC
Ste2NheIR	CTCTCTCTCGCTAGCcttagccgctgctatgatgatgatg

Temin edilen primerler kullanılarak PZR reaksiyonun optimizasyonu gradient PZR tekniği ile yapılmıştır, koşullar aşağıdaki haliyledir:

Birinci PZR (Gradient) T (°C) 50-60

	µL	MM
dH <sub>2</sub> O	14,5	87
DNA Polimeraz tampon çözeltisi	4	24
dNTP	0,2	1,2
İleri Primer - Ste2EcoRIF	0,4	2,4
Geri Primer - Ste2NotIR	0,4	2,4
DNA	0,1	0,6
Phire Hot Start II DNA Polymerase	0,4	2,4

98°C	30 s	
98°C	<b>5 s</b>	} <b>35 döngü</b>
50-60°C (50, 52, 54, 56, 58, 60)	<b>5 s</b>	
72°C	<b>30 s</b>	
72°C	1 d	
4°C	∞	

### 5.3 Sonuçlar:

**5.3.1 Özgün Hedef Ia:** Maya  $\alpha$ -faktör feromon reseptörünün yeşil floresan protein variantları (EGFP ve mCherry) ve bölünmüş EGFP parçaları ile işaretlenmesi:

Birinci PZR reaksiyonu sonucu çoğaltılan EGFP parçalarını Ste2p reseptöründeki istenilen pozisyonlara yerleştirmek için projede öngörülen homolog rekombinasyon yöntemi için, Ste2p reseptörü üzerinde restriksiyon enzim kesim bölgelerine ihtiyaç duyulduğundan ve ek olarak mayadan plazmid izolasyonu gerektirdiğinden, amaca daha hızlı ulaşmamızı sağlayacak olan, ikinci bir PZR reaksiyonu gerektiren yeni bir rekombinasyon yöntemi tercih edilmiştir. Bu yöntem için gereken ikinci PZR reaksiyonundan önce, işlem sırasında kullanılacak olan ilk PZR ürünlerinin enzim ve tuzlar gibi maddelerden arındırılması gerekmektedir. Bu amaçla PZR temizleme kitleri kullanılmıştır, ve ardından nanodrop ile konsantrasyon ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

Bir önceki PZR ürünlerinin her biri pBEC1 ve pCL01 içerisine yerleştirilmek istendiğinden PZR ürünlerini içermeyen 2 kontrol grubu ile birlikte 8 adet reaksiyon kurulmuştur. Her bir reaksiyonun toplam hacmi 50  $\mu$ l olup reaksiyon karışımına: dNTP, Taq polimeraz enzimi ve solüsyonu, su ve primer olarak 5:1 oranında kullanılmak istenen ilk PZR ürünü ve hedef vektör eklenmiştir.

PZR programı :

95 °C de 30 sn

95 °C 30 sn }  
51 °C 60 sn } 18 döngü

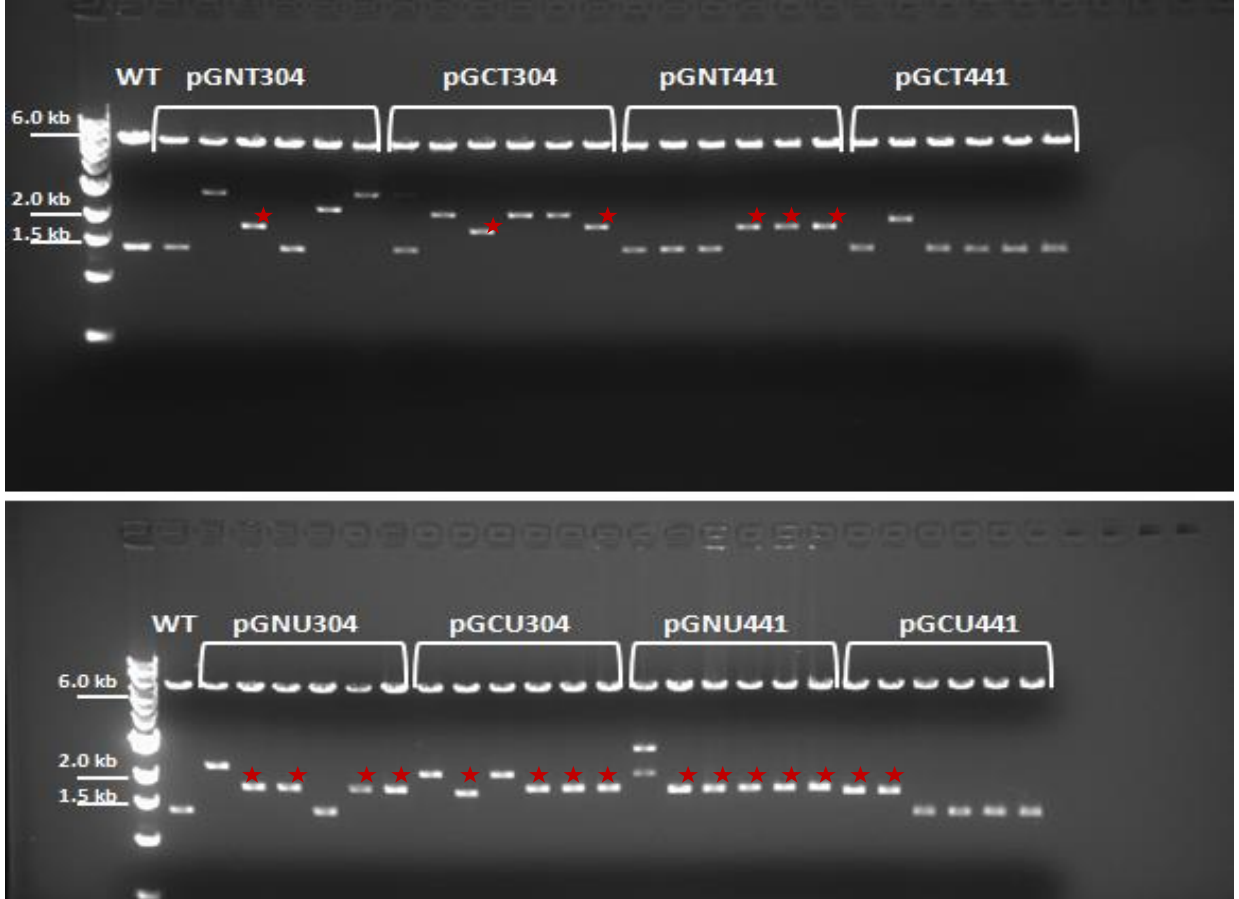
68 °C 18 dk

basamaklarından oluşmaktadır.

İkinci PZR reaksiyonunun ardından ürünler çoğaltılmak için *E.coli*'ye transforme edilmeden önce, parental vektör molekülünün parçalanması için Dpn1 enzimi ve uygun solüsyonu (NEB-buffer-4) PZR ürünleri ile karıştırılmış ve bir gece 37 °C'de bekletilmiştir. Bu işlem PZR yöntemi ile çoğaltılan plazmidlerin dışında kalan hedef vektörün kesilmesine ve dolayısı ile *E.coli* hücrelerine aktarılmasını engellemektedir. Bu işlemleri takip eden gün, PZR ürünleri *E.coli* hücrelerine transforme edilmiştir. Transformasyon sonrası elde edilen kolonilerden her bir plazmid için 6'şar adet koloni seçilmiş, DNA izolasyonu ve nanodrop1000 ölçümleri yapılmıştır.

Bu PZR'ler sonucu elde edilen plazmidlerdeki Ste2p reseptörlerinin istenilen EGFP parçalarını içerip içermediğini anlamak için insert boyutları karşılaştırılmıştır. Bunun için, EcoRI ve BamHI

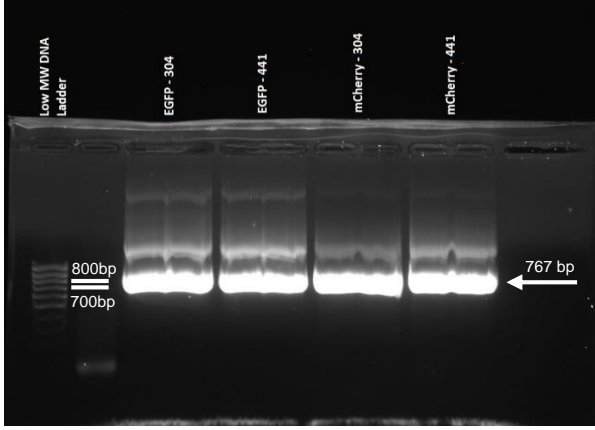
enzimleri kullanılarak Ste2p kısmı vektörden kesilmiş ve yabancı tür Ste2p ile agaroz jel elektroforezi kullanılarak boyut karşılaştırması yapılmıştır (Şekil 7).



**Şekil 7 :** Transformasyon sonrası seçilen *E.coli* kolonilerinden elde edilen plazmid DNA'larının restriksiyon enzimleri ile gerçekleştirilen kesim sonucu oluşan fragmentlerin boyut kontrolü. Ste2p genine yapılan eklenmeyi doğrulayan bantlar "☆" ile işaretlenmiştir. Seçilen kolonilerin çoğunda beklenen işaretleme gerçekleşmiştir.

Ek olarak doğru boyutlara sahip olan PZR ürünlerinin sekanslarının doğruluğu DNA sekans analizi ile tespit edilmiştir.

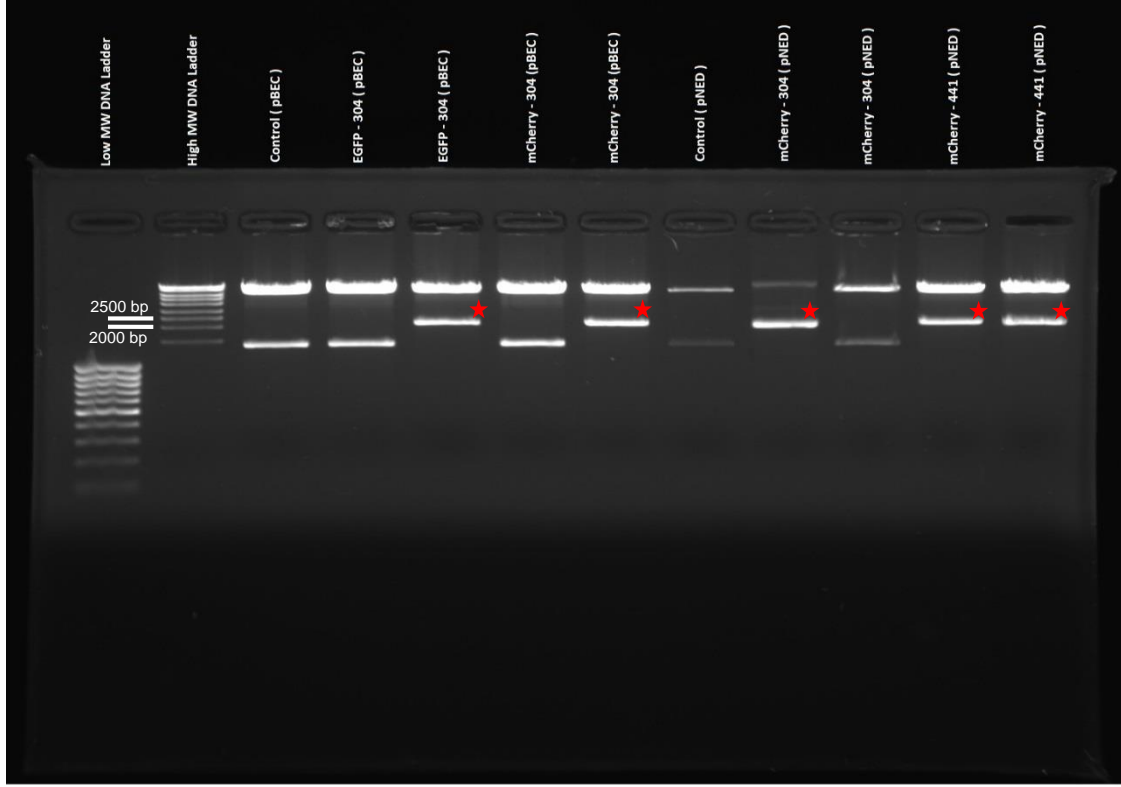
FRET çalışmaları için hazırlanan tam uzunluktaki floresan proteinlerin çoğaltılması için başarıyla gerçekleştirilen birinci PZR reaksiyonu sonuçları Şekil 8'de gösterilmektedir.



**Şekil 8: Tam uzunluktaki EGFP ve mCherry floresan proteinlerin amplifikasyonu için yapılan PZR sonuçları.** Tam uzunluktaki EGFP ve mCherry floresan proteinleri Ste2p içerisinde yerleştirilecekleri yerlere göre N ve C terminallerinde Ste2p sekansları birinci PZR reaksiyonu ile eklenmiş ve çoğaltılan genler boyut kontrolü için agaroz jel de yürütülüp görüntülenmiştir. Oluşturulan dört gen de beklendiği gibi 700 ile 800 bp'e denk gelen markör bantları arasında sonuçlar vermiştir (beklenen boyutlar EGFP için 767 bp ve mCherry için 758 bp'dir).

Projenin bu kısmında da Bölünmüş EGFP kısmında olduğu gibi, floresan proteinlerin maya alfa-faktör reseptörü içerisine yerleştirilmesinde ikinci bir PZR reaksiyonu kullanılmıştır. Fakat bölünmüş-EGFP tekniğindeki farklı olarak, ikinci PZR reaksiyonundan önce tuz ve enzimlerden arındırmak amacı için PZR temizleme kitleri yerine, hedef PZR ürününün direkt elde edilmesini mümkün kılan jelden ekstraksiyon kitleri kullanılmıştır. Böylece daha önce görülen ve istenmeyen çoklu yerleşmelerin önüne geçilmiştir.

İkinci PZR reaksiyonunun ardından çoğaltılmak için *E.coli*'ye transforme edilen plazmidlerin, miniprep kitleri ile izolasyonları gerçekleştirilmiştir. Maya hücrelerine transforme edilmeden önce EcoRI ve BamHI restriksiyon enzimleri ile boyut kontrolleri gerçekleştirilen örneklerin içinden uygun plazmidler seçilmiştir (Beklenen boyutlar EGFP işaretli Ste2p için 2144 bp, mCherry işaretli Ste2p için 2135 bp ve işaretli Ste2p için 1377 bp'dir) (Şekil 9).



**Şekil 9:** Transformasyon sonrası seçilen *E.coli* kolonilerinden elde edilen plazmid DNA'larının restriksiyon enzimleri ile gerçekleştirilen kesim sonucu oluşan fragmentlerin boyut kontrolü. Ste2p genine yapılan eklenmeyi doğrulayan bantlar “☆” ile işaretlenmiştir.

Proje planında belirtilen klonlama çalışmaları başarı ile zamanında tamamlanmış olup, hedeflenen tüm plazmidler elde edilmiştir. İnşa edilen bu floresan işaretli reseptörlerin biyolojik aktivitelerinin test edilmesi için gerekli analizler yapılmıştır. Bunun için öncelikle hazırlanan plazmidler uygun maya suşlarına transforme edilmiştir.

### Plazmidlerin Maya Hücrelerine Transformasyonu

Doğru sekansa sahip olduğu belirlenen pGNT304, pGCT304, pGNT441, pGCT441 pGNU304, pGCU304, pGNU441 ve pGCU441 plazmidlerinin gerekli biyolojik aktivitelerinin belirlenmesi için maya hücrelerine transformasyonları Gietz vd. [12] metoduyla gerçekleştirilmiştir. Bunun için bir gece YEPD sıvı besi yerinde (5 ml) inokule edilen DK102 maya hücreleri ertesi gün hemacytometer ile sayılmış ve hücre konsantrasyonu  $5 \times 10^6$  olacak şekilde 50 ml YEPD içerisinde inokule edilmiştir. Hücre yoğunluğu  $2 \times 10^7$  olana kadar 30 °C'de inkübe edilen hücreler toplandıktan sonra su ve 100mM LiAc ile yıkanmıştır. Yıkanan hücrelere sırası ile %50 PEG, 1.0 M LiAc, Salmon sperm DNA (5 dk kaynatılmış), su ve plazmid DNA eklenmiştir. Vorteksle karıştırılan karışım daha sonra 30 °C'de 30 dk inkübe edildikten sonra 25 dk ısı

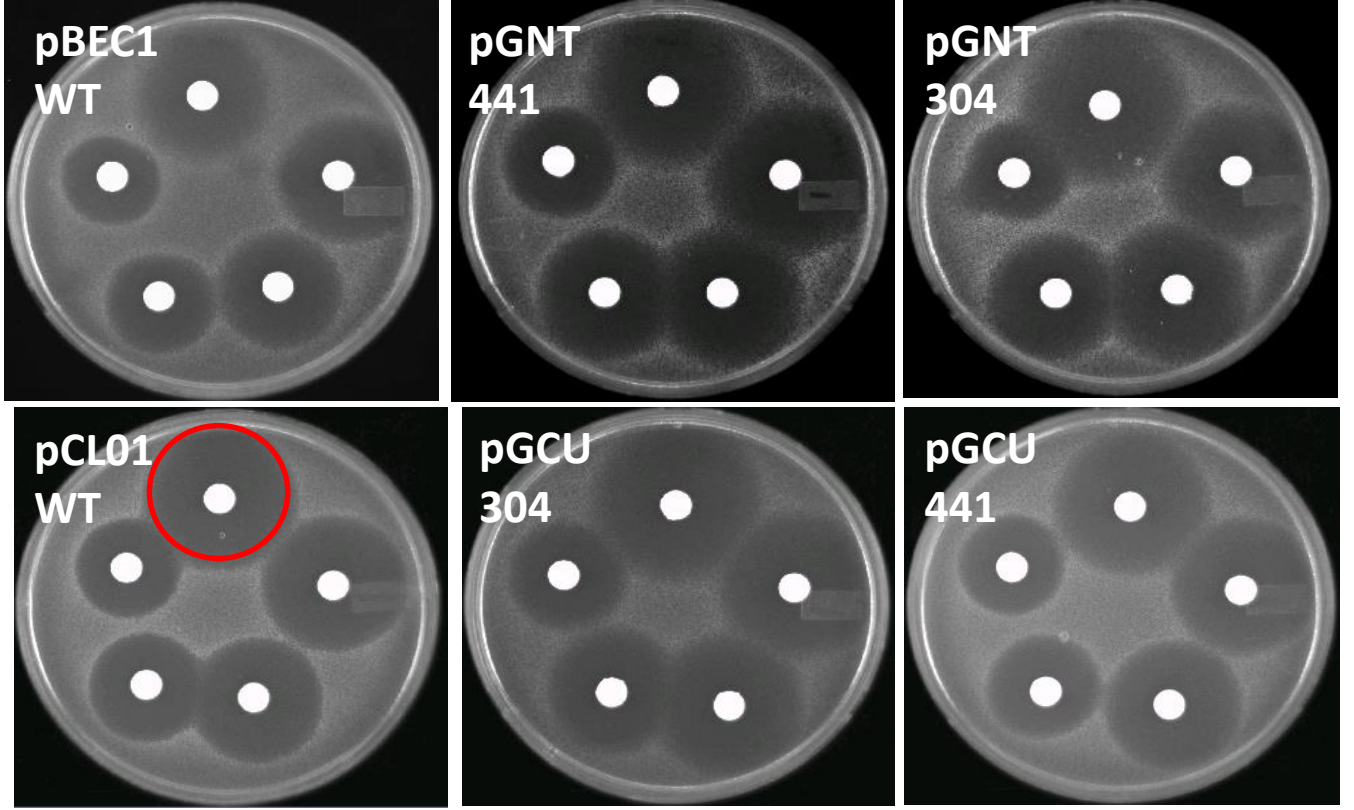


şokuna maruz bırakılmıştır. Santrifüj edildikten sonra transformasyon solüsyonundan arındırılan hücreler su içerisinde çözündürülerek elde edilen solüsyondan 200 µl, seçici besi yeri bulunan (MLT/MLU) petri kapları üzerine yayılmıştır.

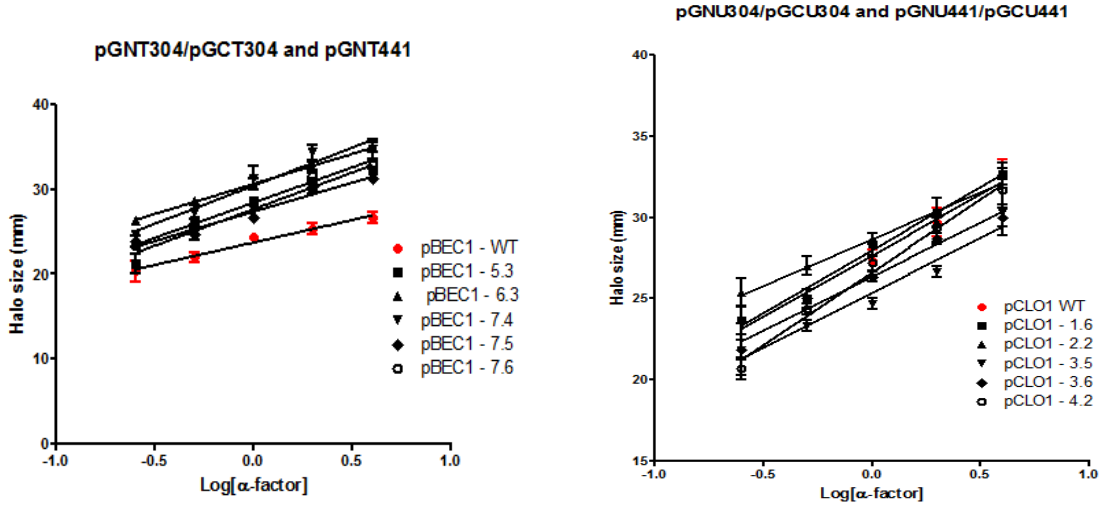
### **Biyolojik aktivite testi: Halo assay**

DK102 maya hücreleri, urasil işareti taşıyan plazmidler için MLU, triptofan işareti taşıyan plazmidler için MLT besi yerinde 30 °C'de 16-18 saat büyütülmüştür. Büyütülen hücreler toplanmış, su ile 3 kere yıkandıktan sonra son konsantrasyonu  $5 \times 10^6$  hücre/ml olacak şekilde resüspanse edilmiştir. 1 ml hücre solüsyonu ( $5 \times 10^6$  cells/ml) 3,5 ml Nobel agar ile karıştırılarak, MLT/MLU bulunan petri kaplarına yayılmıştır. Değişik konsantrasyonlardaki  $\alpha$ -faktör solüsyonlarından 10 µl emdirilmiş 7 mm çapındaki filtre diskleri (BD, Franklin Lakes, NJ) petri kutuları üzerine yerleştirilmiştir. Petri kutuları 30 °C'de 18 saat inkübe edilmiş ve ardından disklerin etrafında feromon etkisi ile büyümenin  $G_1$  aşamasında durması nedeni ile belirgin zonlar (halo) gözlenmiştir. Bütün halo analizleri 3 kez tekrar edilmiştir. Oluşan zonların çapları ölçülerek ifade edilen dotalar zonun çapına karşı peptid miktarı şeklinde grafiğe aktarılmıştır. Elde edilen grafikler regresyon analizi ile linearize edilmiştir, bu amaçla Prism yazılımı kullanılmıştır (GraphPad, San Diego, CA.).

Biyolojik aktivite testlerinde öncelikli olarak bölünmüş-EGFP tekniği için klonlama çalışmaları tamamlanmış olan plazmidler test edilmiştir (Şekil 10a ve 10b)



**Şekil 10a:** Halo analiz sonuçları petri örnekleri



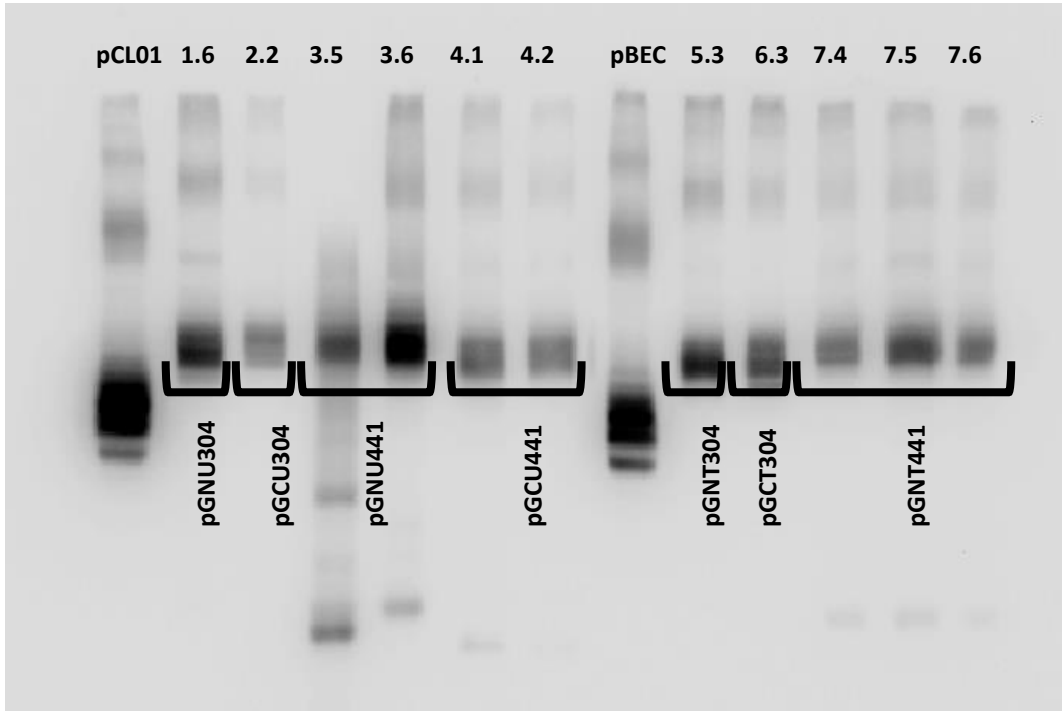
**Şekil 10b :** Halo analizleri grafik sonuçları. Halo çapları ölçüldükten sonra grafik olarak ifade edilmiş doğrusal regresyon analizi yapılmıştır.

Halo analizleri sonucu elde edilen grafiklerde görülmüştür ki; transformantların tümü biyolojik bakımdan aktif reseptörler sentezlemekte ve yabancı tür ile karşılaştırıldığında yaklaşık aynı

çapta zonlar oluşturmaktadırlar. Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar reseptörlerin biyolojik olarak sorunsuz olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar ışığında proje önerisinde öngörülen ek biyolojik aktivite testi olan Fus1-LacZ testinin uygulanmasına ihtiyaç kalmamıştır.

### Western Blot Analizleri:

Yapılan testlerde görülmüştür ki, fonksiyonel olarak sorunsuz çalışan reseptörleri taşıyan maya hücrelerinde reseptörlerin hücre zarındaki ifadeleri sorunsuz olarak gerçekleşmektedir (Şekil 11).



**Şekil 11:** Anti-FLAG immunoblotlama ile total membran proteinlerin SDS-PAGE analizleri. Mayada seçim için urasil işareti taşıyan ve feromon reseptörünün 304-305. aminoasitleri arasından N-EGFP (1.6) ve C-EGFP (2.2) ile, 441-442. aminoasitleri arasından N-EGFP (3.5, 3.6) ve C-EGFP (4.1, 4.2) ile işaretlenmiş reseptörlerin parental plazmidten elde edilmiş Ste2p (pCL01) ile karşılaştırılması. Mayada seçim için triptofan işareti taşıyan ve feromon reseptörünün 304-305. aminoasitleri arasından N-EGFP (5.3) ve C-EGFP (6.3) ile, 441-442. aminoasitleri arasından N-EGFP (7.4, 7.5, 7.6) ile işaretlenmiş reseptörlerin parental plazmidten elde edilmiş Ste2p (pBEC) ile karşılaştırılması.

EGFP molekülünün N ve C terminal fragmentlerini taşıyan ve fonksiyonel bakımdan test edilmiş olan reseptörlerin görüntüleme öncesinde aynı hücrelerde eş-zamanlı ekspresyonlarını sağlamak için maya hücrelerine ikili transformasyon yapılmıştır. Bunun için daha önce belirtilen Gietz vd. metodu kullanılmıştır [12].



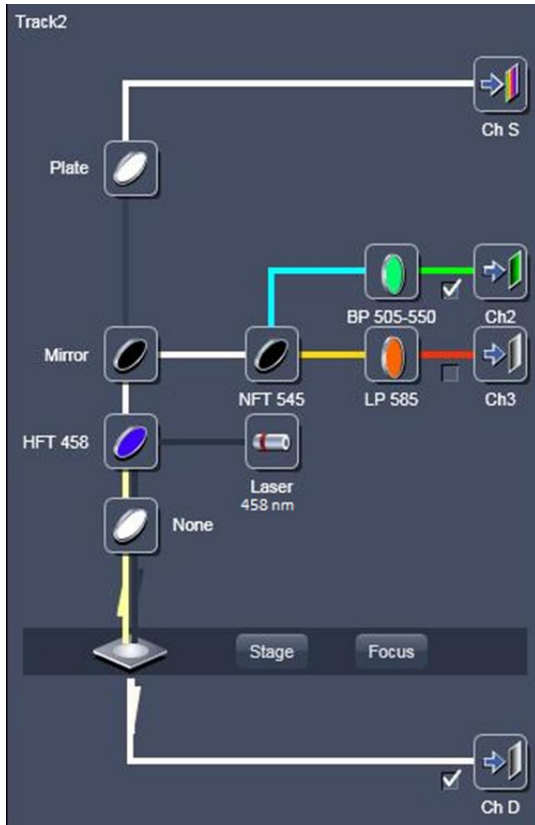
### Konfokal Mikroskop ile Görüntüleme:

Görüntüleme analizleri sırasında DK102 hücrelerinde eş zamanlı ifadeleri sağlanan işaretli reseptör eşleri Tablo 11’de belirtildiği gibidir. Tüm görüntüleme deneyleri işaretlenmemiş reseptörleri taşıyan (-) kontrol grupları ile beraber gerçekleştirilmiştir.

**Tablo 11 : DK102 hücrelerinde eş zamanlı ifadeleri sağlanan plazmid çiftleri**

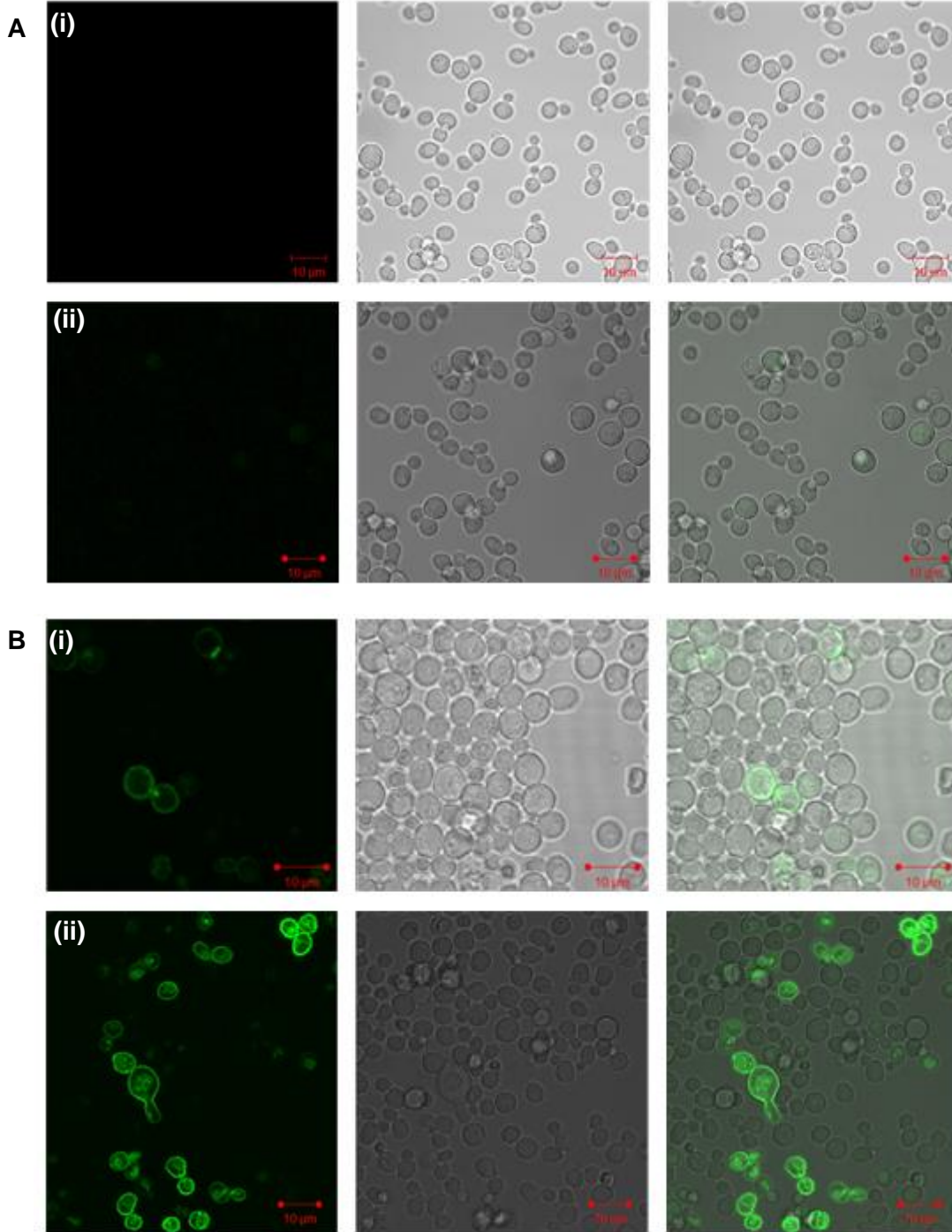
Maya Hücre Tipi	Reseptör üzerinde floresan işaretin bulunduğu pozisyon	N-EGFP (1-128) işaretli plazmid	C-EGFP (128-239) işaretli plazmid
DK102	304	pGNU304	pGCT304
DK102	441	pGNU441	pGCT441
DK102	Kontrol	pCL01	pBEC1

Görüntüleme analizlerinde kullanılmak üzere hücreler bir gece boyunca uygun besiyerlerinde (MLTU) büyütülmüş, ardından konfokal mikroskop ile görüntü yapmaya müsait cam tabanlı petri kaplarına uygun oranlarda seyreltilerek bir kaç dakika yerleşmeleri beklenmiştir. Ardından petri kaplarındaki hücreler konfokal mikroskopta Şekil 12’de gösterilen uygun konfigürasyon seçenekleri ayarlanarak 458 nm’de uyarılmıştır (Şekil 13).



**Şekil 12:** Konfokal mikroskop konfigürasyon seçenekleri.

Çalışmalarımızda kullandığımız Zeiss LSM 510 meta konfokal mikroskopun kullandığı Zen programında yaratılan görüntüleme ayarları kullanılan lazer ve filtre setleri gösterilmektedir.



**Şekil 13:** 458 nm laser hattı (Ar/ML) ile uyarılmış floresan işaretli Ste2p ifade eden hücrelerin floresan ve beyaz ışık koşulları altında alınmış konfokal mikroskop görüntüleri. A. (i) Yabancıl Tür (WT) DK102 maya hücreleri; boş vektörler ile, (ii) DK102 maya hücreleri; N-EGFP ve C-EGFP işaretli tam uzunluktaki maya feromon reseptörü ile transform edilmiş. B. (i) DK102 maya hücreleri; EGFP işaretli tam uzunluktaki maya feromon reseptörü kodlayan plazmid ile, (ii) DK102 maya hücreleri; EGFP işaretli C-terminal kuyruğu kesilmiş maya feromon reseptörü kodlayan plazmid ile transform edilmiştir.

128. aminoasitten bölünmüş olan EGFP parçalarını 304. ve 441. pozisyonda taşıyan reseptörlerden sekans analizlerinin, biyolojik fonksiyon ve hücre zarı ifadelerinde sorun

olmamasına rağmen yabani tür ile karşılaştırıldığında yüksek bir floresan sinyal alınamamıştır (Bu özellikleri sağlayan birçok klondan maya hücrelerinde ifade edildikten sonra çok düşük sinyal alınmıştır). Bu gözlemler sonucunda proje önerisinde belirtildiği gibi optimizasyon çalışmaları başlatılmıştır.

### **Optimizasyon çalışmaları:**

Optimizasyon çalışmalarında ilk olarak, daha önce proje önerisinde belirtildiği üzere yeşil floresan proteinini (EGFP) farklı bir bölgeden bölme yöntemi denenmiştir. Literatür taraması sonucu elde edilen veriler doğrultusunda yeşil floresan proteininin (EGFP) 158-159. aminoasitleri arasından bölünmesi uygun bulunmuştur.

Ayrıca yine sinyal seviyesini artırmaya yönelik diğer bir yöntem olarak da, bu yeni pozisyondan bölünmüş EGFP parçalarını tam uzunluktaki maya feromon reseptörleri yanısıra, C-terminal kuyruğundan (304. pozisyondan) kesilmiş reseptörlere eklenmesine karar verilmiştir. İlk altı aylık dönemde yapmış olduğumuz çalışmalar tam uzunlukta olan EGFP molekülü ile işaretlenmiş Ste2p ve kuyuksuz Ste2p arasında gözle görünür bir sinyal farkı olduğunu ortaya koymuştur (Şekil 13B). Bu sonuçlar göz önüne alınarak bölünmüş-EGFP tekniği için işaretlenecek olan reseptörlerin tam ve kesik olmak üzere iki ayrı grup olarak hazırlanmıştır.

Bu amaca yönelik ilk olarak, yeni bölgeden bölünmüş EGFP parçalarının sentezi için gerekli olan ve Tablo 12'de belirtilen primer setleri tasarlanmış ve siparişleri verilmiştir. Tasarlanan bu primerler ile elde edilen EGFP parçaları yine Ste2p reseptörü üzerinde yer alacakları pozisyona göre yaklaşık 25 baz uzunluğunda, reseptöre eş dizinler ile sınırlandırılmıştır. Ayrıca C-terminal'den kesik (kuyuksuz) reseptörler elde edebilmek için, yeni primerlere stop kodonları eklenmiştir.

Yeni primer setleri ile EGFP parçalarının çoğaltılması için daha önceden optimizasyonu gerçekleştirilmiş olan PZR reaksiyonu kurulmuştur. PZR reaksiyonu her bir pozisyon için amino terminal ve karboksi terminal olmak üzere 2 reaksiyon içermektedir. Her bir reaksiyonun hacmi 50 µl olup, reaksiyonlarda dNTP, Taq polimeraz ve solüsyonu, pEGFP-N1 plazmidi, primer forward, primer reverse ve su kullanılmıştır. Ayrıca primerleri içermeyen bir kontrol grubu eklenmiştir.

**Tablo 12: 158. pozisyonundan bölünmüş EGFP parçalarının çoğaltılması için tasarlanmış primer sekansları**

Pozisyon	Primer	Sekans
<b>304 Full</b>	N-EGFP Forward	CACGGCTGCTAATAATGCATCCAAAATGGTGAGCAAG GGCGAGGAGCTGT
	N-EGFP Reverse	GTAAAGTCTGAAGTAATTGTGTTTGTCTGCTTGTCCGGC CATGATATAGAC
	C-EGFP Forward	CACGGCTGCTAATAATGCATCCAAAAGAACGGCATC AAGGTGAACTTC
	C-EGFP Reverse	GTAAAGTCTGAAGTAATTGTGTTTGTCTTGTACAGCTC GTCCATGCCGAGA
Pozisyon	Primer	Sekans
<b>304 den Kesik</b>	N-EGFP Forward	CACGGCTGCTAATAATGCATCCAAAATGGTGAGCAAG GGCGAGGAGCTGT
	N-EGFP Reverse	GTAAAGTCTGAAGTAATTGTGTTTGT <u>TTT</u> ACTGCTTGTGTC GGCCATGATATAGAC
	C-EGFP Forward	CACGGCTGCTAATAATGCATCCAAAAGAACGGCATC AAGGTGAACTTC
	C-EGFP Reverse	GTAAAGTCTGAAGTAATTGTGTTTGT <u>TTT</u> ACTTGTACAG CTCGTCCATGCCGAGA

**PZR programı:**

98 °C de 4 dk

98 °C 45 sn

58 °C 30 sn

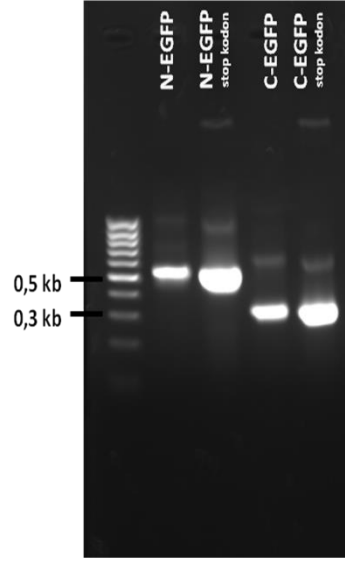
68 °C 60 sn

68 °C 20 dk

} 35 döngü

basamaklarından oluşmaktadır.

PZR ürünlerinin boyutlarının kontrolü için agaroz jel elektroforez tekniği kullanılmıştır. 0.5 mg agaroz 50 ml TAE solüsyonu ısıtılarak karıştırılmış, bütün agaroz çözüldükten sonra ve solüsyonun soğumasının ardından EtBr eklenmiş ve karıştırılmıştır. Bu karışım uygun kuyucuk sayısını içeren kalıba dökülmüş polimerize olması için beklenmiştir. Polimerize olduktan sonra TAE tamponu içerisine alınıp örnekler yüklenmiştir. Uygun akım sağlanarak yürütüldükten sonra UV ışığı altında farklı bantlar gözlemlenmiştir (Şekil 14).



**Şekil 14: EGFP parçalarının çoğaltılması için yapılan PZR reaksiyonu agaroz jel elektroforezi sonuçları.** Elde edilen PZR sonuçları beklenen boyutlar ile uyum göstermektedir.

Birinci PZR sonucu elde edilen EGFP ürünleri bir önceki dönemde kullandığımız PZR bazlı rekombinasyon yöntemi ile maya feromon reseptörü içerisinde istenilen pozisyona (304-305. aminoasitler arasında) yerleştirilmiştir. Bu amaçla yapılan ikinci PZR reaksiyonundan önce birinci PZR ürünleri kalıntı tuz, enzim ve dNTP lerden arındırmak için PZR temizleme kitleri kullanılarak temizlenmiş ve bu ürünlerin nanodropda konsantrasyon ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

İlk PZR ürünleri olan stop kodonlu/kodonsuz N-EGFP (1-158) ve C-EGFP (159-239) parçalarını pCL01 ve PBEC vektörleri üzerinde bulunan Ste2p reseptörü içerisine yerleştirmek için yapılan ikinci PZR reaksiyonlarının her birinin toplam hacmi 50 µl olup reaksiyon karışımına: dNTP, Pfu polimeraz enzimi ve solüsyonu, su ve primer olarak 5:1 oranında kullanılmak istenen ilk PZR ürünü ve hedef vektör eklenmiştir.

PZR programı:

95 °C de 30 sn

95 °C 30 sn

51 °C 60 sn

68 °C 18 dk

} 18 döngü

68 °C 20 dk basamaklarından oluşmaktadır.

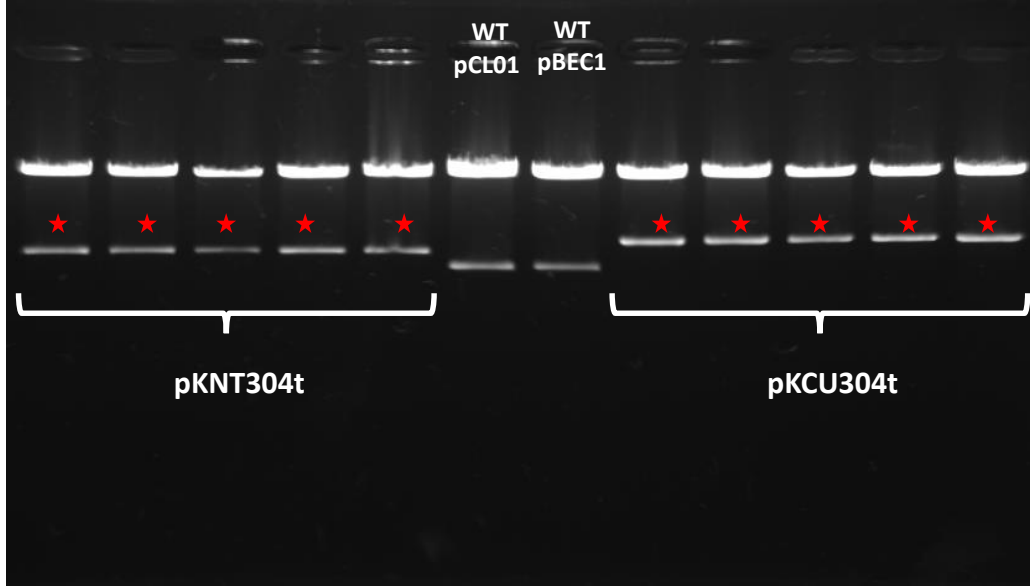
Bu reaksiyonun ardından ürünler çoğaltılmak için *E.coli*'ye transform edilmeden önce, parental vektör molekülünün parçalanması için Dpn1 enzimi ve uygun solüsyonu (NEB-buffer-4) PZR

ürünleri ile karıştırılmış ve bir gece 37 °C'de bekletilmiştir. Bu işlem PZR yöntemi ile çoğaltılan plazmidlerin dışında kalan hedef vektörün kesilmesine ve dolayısı ile *E.coli* hücrelerine aktarılmasını engellemektedir. Dpn1 kesimini takip eden gün, PZR ürünleri *E.coli* hücrelerine aktarılmıştır. Transformasyon sonrası elde edilen kolonilerden her bir plazmid için 5'şer adet koloni seçilmiş, DNA izolasyonu ve nanodrop1000 ölçümleri yapılmıştır. İkinci PZR reaksiyonu sonucu elde edilen plazmidler ve özellikleri Tablo 13'de belirtilmiştir.

**Tablo 13: Optimizasyon çalışmaları için inşa edilen yeşil floresan proteini parçalarını içeren Ste2p plazmidleri**

Plazmid	Tanımı
<b>pKNT304</b>	Geliştirilmiş yeşil floresan proteinin ilk 158 aminoasitinden oluşan N terminal kısmı Ste2 proteinin 304-305'nci aminoasitleri arasına yerleştirilmiştir. Plazmid mayada seçim için triptofan işareti taşımaktadır.
<b>pKCU304</b>	Geliştirilmiş yeşil floresan proteinin 159-239. aminoasitlerinden oluşan C terminal kısmı Ste2 proteinin 304-305'nci aminoasitleri arasına yerleştirilmiştir. Plazmid mayada seçim için urasil işareti taşımaktadır.
<b>pKNT304t</b>	Geliştirilmiş yeşil floresan proteinin ilk 158 aminoasitinden oluşan ve stop kodonu içeren N terminal kısmı Ste2 proteinin 304'ncü aminoasitinden sonraki kısmına yerleştirilmiştir. Plazmid mayada seçim için triptofan işareti taşımaktadır.
<b>pKCU304t</b>	Geliştirilmiş yeşil floresan proteinin 159-239. aminoasitlerinden oluşan ve stop kodonu içeren C terminal kısmı Ste2 proteinin 304'ncü aminoasitinden sonra yerleştirilmiştir. Plazmid mayada seçim için urasil işareti taşımaktadır.

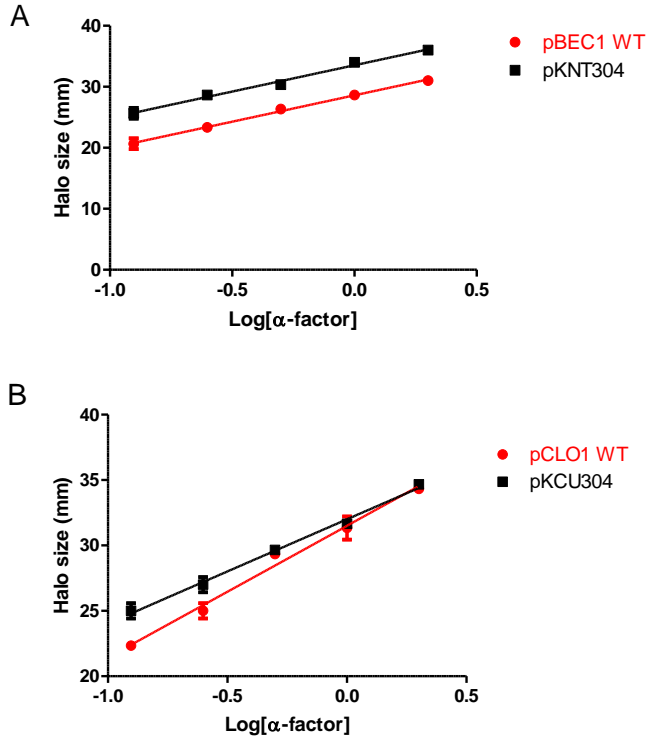
Elde edilen plazmidlerin ilk kontrolleri plazmid ve plazmid+insert boyut farkları karşılaştırılarak yapılmıştır. Bunun için, hazırlanan vektörden Ste2p kısmı EcoRI ve BamHI restriksiyon enzimleri kullanılarak kesilmiştir, kesim sonucu oluşan parçalar agaroz jel elektroforezi ile analiz edilmiştir (Şekil 15).



**Şekil 15 : Yeşil floresan protein parçalarını içeren plazmid DNA'larının restriksiyon enzimleri ile gerçekleştirilen kesim sonucu oluşan fragmentlerin boyut kontrolü. Ste2p genine yapılan eklenmeyi doğrulayan bantlar “☆” ile işaretlenmiştir.**

Optimizasyon çalışmaları kapsamında inşa edilmesi planlanan tüm plazmidler başarı ile tamamlanmış olup, biyolojik aktivite testleri için maya hücrelerine transformasyonları daha önce belirtilen Gietz vd.[12] metoduyla gerçekleştirilmiştir.

Transformasyonun ardından uygun besiyerlerinde (MLT/MLU) büyütülen hücreler reseptörlerin işlevsel bakımdan aktivite gösterip göstermediğinin kontrolü için “halo assay” testine tabi tutulmuştur. DK102 maya hücreleri 30 °C’de 16-18 saat büyütüldükten sonra, su ile 3 kere yıkanıp ardından son konsantrasyonu  $5 \times 10^6$  hücre/ml olacak şekilde çözülmüştür. 1 ml hücre solüsyonu ( $5 \times 10^6$  hücre/ml) 3.5 ml Nobel agar ile karıştırılarak, MLT/MLU bulunan petri kaplarına yayılmıştır. Farklı konsantrasyonlardaki  $\alpha$ -faktör solüsyonlarından 10  $\mu$ l emdirilmiş 7 mm çapındaki filtre diskleri (BD, Franklin Lakes, NJ) agar yüzeyine yerleştirilmiştir. Petri kutuları 30 °C’de 18 saat inkübe edilmiş ve ardından disklerin etrafında feromon etkisi ile büyümenin  $G_1$  aşamasında durması nedeni ile oluşan belirgin zonlar (halo) gözlenmiştir. Bütün halo analizleri 3 kez tekrar edilmiştir. Oluşan zonların çapları ölçülerek elde edilen veriler zonun çapına karşı log(peptid miktarı) şeklinde grafiksel olarak ifade edilmiştir. Elde edilen grafiklerin regresyon analizi ile linearize olup, olmadıkları Prism yazılımı kullanılarak (GraphPad, San Diego, CA.) incelenmiştir (Şekil 16).



**Şekil 16: Halo analizleri grafik sonuçları. A)** Yabanıl (pBEC1 WT) ve NEGFP ile işaretlenmiş tam uzunluktaki (pKNT304) Ste2p reseptörleri için Halo testi. **B)** Yabanıl (pCLO1 WT) ve CEGFP ile işaretlenmiş tam uzunluktaki (pKCU304) Ste2p reseptörleri için Halo testi.

Halo analiz sonuçları göstermektedir ki; yeni bölgeden (158. aminoasit) bölünmüş EGFP parçalarını taşıyan, C-terminal kuyruğu tam ve C-terminal kuyruğu kesilmiş tüm reseptörler biyolojik aktivite bakımından sorunsuz fonksiyon göstermektedir. Literatür çalışmaları sonucu öngörüldüğü üzere, C-terminal kuyruğu kesilmiş reseptörler hücre içi trafiğin değişmesi sebebi ile hücre zarında daha fazla lokalize olmaktadır bu sebeple halo analizlerinde, yabanıl türe oranla daha büyük çapta zonlar gözlenmektedir.

**5.3.2 Özgün Hedef 1b:** Feromon reseptörlerinin hücre içinde nerede ve nasıl eşleştiklerinin gerçek zamanlı tespit edilmesi:

#### **Bölünmüş EGFP Tekniği:**

#### **Konfokal Mikroskop ile Görüntüleme:**

Görüntülemeye işaretlenmiş, tam uzunlukta α-faktör feromon reseptörleri ile birlikte 304. pozisyonundan sonrası kesik reseptörler kullanılmıştır. Bunun nedeni, α-faktör feromon reseptörünün C-kuyruğunda (392-431 pozisyonları) taşıdığı fosforilasyon bölgelerinin bulunması ve bu bölgelerin fosforilasyonunun reseptör duyarlılığı ve reseptörlerin hücre zarında geçirdikleri zaman üzerinde etkili olmasıdır. C-kuyruğundan yoksun reseptörler sentezlenme aşamasında normal ancak fosforilasyon sonrası kırılım aşamalarında yabanıl

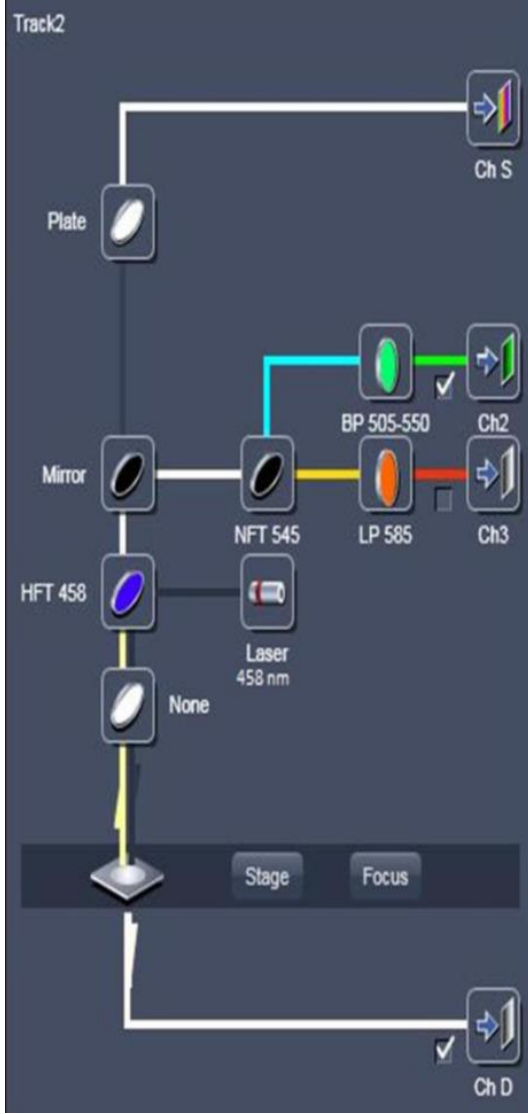


reseptörlerden farklı davranışlar sergilemektedirler. Bu reseptörler hücre zarında daha uzun süre kalmakta ve parçalanma yollarına girmemektedirler. Böylelikle  $\alpha$ -faktör feromon reseptörlerinin hücre zarında yerleşim oranları ve dolayısıyla da konfokal mikroskopta gözlenecek floresans sinyal yoğunluğu artmaktadır. Görüntülemesi gerçekleştirilen reseptörler aşağıdaki tabloda sunulmuştur (Tablo 14):

**Tablo 14:** Bölünmüş EGFP tekniği ile kullanılan ve bu çalışmada yapımı tamamlanan vektörler ve özellikleri.

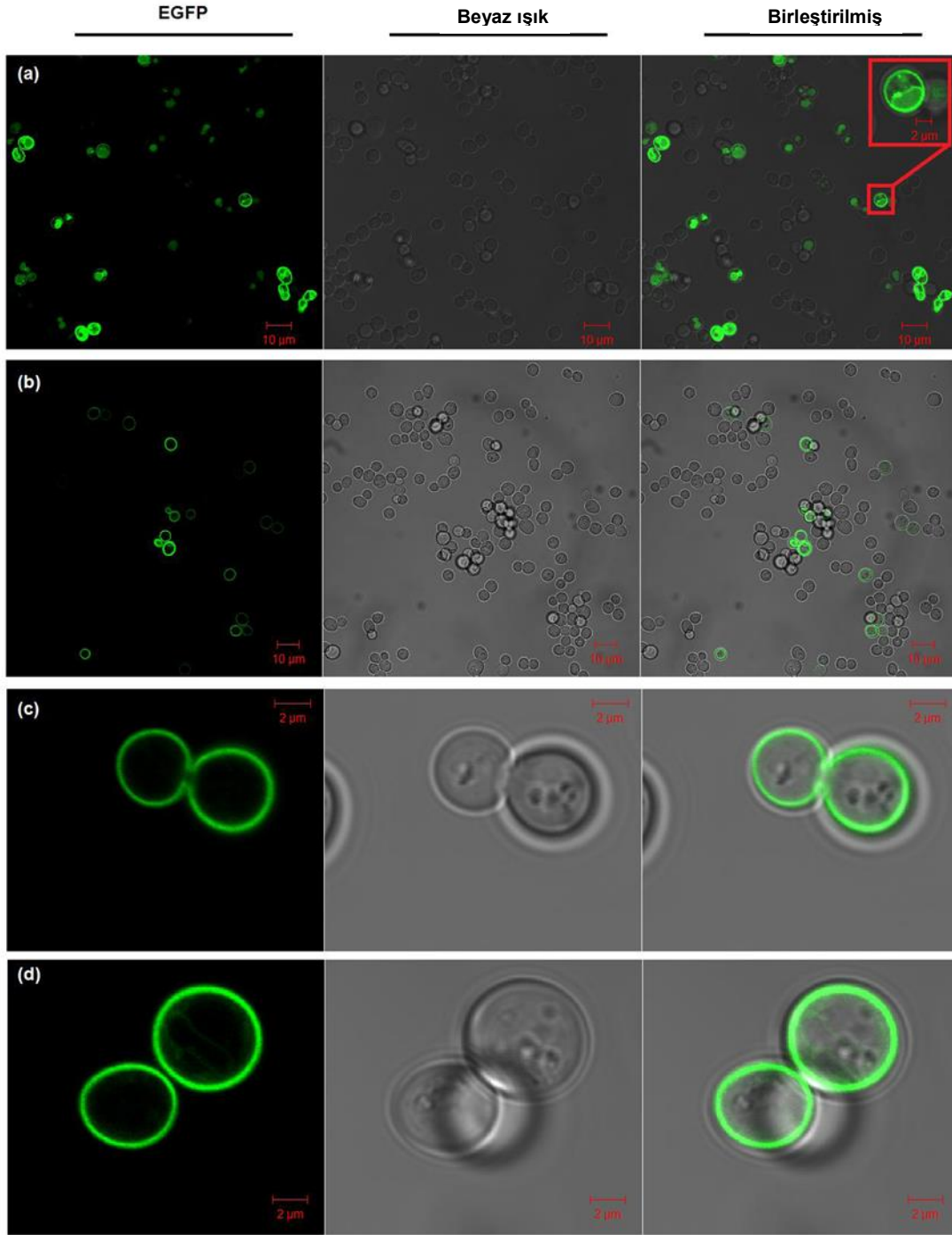
Plazmid	Açıklama
pKNT304f	Tam uzunluktaki Ste2 geninin 304 ve 305. pozisyonları arasında, 158-159 pozisyonlarından bölünmüş N-EGFP sekansı taşıyan pBEC1 kökenli plazmid
pKCU304f	Tam uzunluktaki Ste2 geninin 304 ve 305. pozisyonları arasında, 158-159 pozisyonlarından bölünmüş C-EGFP sekansı taşıyan pCL01 kökenli plazmid
pKNT304t	C-kuyruğu kesik Ste2 geninin 304. pozisyonu takiben, 158-159 pozisyonlarından bölünmüş N-EGFP sekansı taşıyan pBEC1 kökenli plazmid
pKCU304t	C-kuyruğu kesik Ste2 geninin 304. pozisyonu takiben, 158-159 pozisyonlarından bölünmüş C-EGFP sekansı taşıyan pCL01 kökenli plazmid

Reseptör dimerleşmelerinin Bölünmüş-EGFP yöntemi ile çalışılması için, aynı hücre içerisinde ikili ifadeleri gerçekleştiren N-EGFP ve C-EGFP çiftleri bulunması gerekmektedir. Bu nedenle, maya hücrelerinin, Gietz vd. metoduyla ikinci kez transformasyonları gerçekleştirilmiştir. Gece boyunca YEPD sıvı besi yerinde (5 mL) inoküle edilen DK102 maya hücreleri ertesi gün hemasaytometre ile sayılmış ve hücre derişimleri  $5 \times 10^6$  olacak şekilde 50 mL YEPD içerisinde inoküle edilmiştir. Hücre yoğunluğu  $2 \times 10^7$  olana kadar  $30^\circ\text{C}$ 'de inkübe edilen hücreler toplandıktan sonra su ve 100 mM LiAc ile yıkanmıştır. Yıkanan hücrelere sırası ile %50 PEG, 1.0 M LiAc, Salmon Sperm DNA (5 dk kaynatılmış ve takiben buzda tutulmuş), su ve plazmid DNA eklenmiştir. Vorteksle karıştırılan karışım daha sonra  $30^\circ\text{C}$ 'de 30 dk inkübe edilmiş ve takiben 25 dakika boyunca  $42^\circ\text{C}$ 'de ısı şokuna maruz bırakılmıştır. Santrifüj edildikten sonra transformasyon solüsyonundan arındırılan hücreler su içerisinde yeniden çözülerek elde edilen hücre çözeltileri 200  $\mu\text{L}$ , seçici besi yeri bulunan (MLTU) petri kapları üzerine yayılmıştır. Transforme edilen hücreler görüntüleme analizlerinde kullanılmak üzere bir gece boyunca uygun besi yerlerinde (MLTU) büyütülmüş, ardından konfokal mikroskop ile görüntülemek için cam tabanlı petri kaplarına uygun oranlarda seyreltilerek uygulanmış ve birkaç dakika yerleşmeleri beklenmiştir. Maya hücreleri konfokal mikroskopta aşağıda gösterilen uygun konfigürasyon seçenekleri ayarlanarak uyarılmıştır (Şekil 17).



**Şekil 17: EGFP molekülünü görüntülemek için optimize edilen konfokal ayarları.** Konfokal mikroskopta EGFP moleküllerini gözlemek için 458 nm de ışık veren bir Lazer, 458 nm de kesim yapan bir dikroik ayna, ve 505-550 nm arası toplayan bir emisyon filtre kombinasyonu kullanılmıştır.

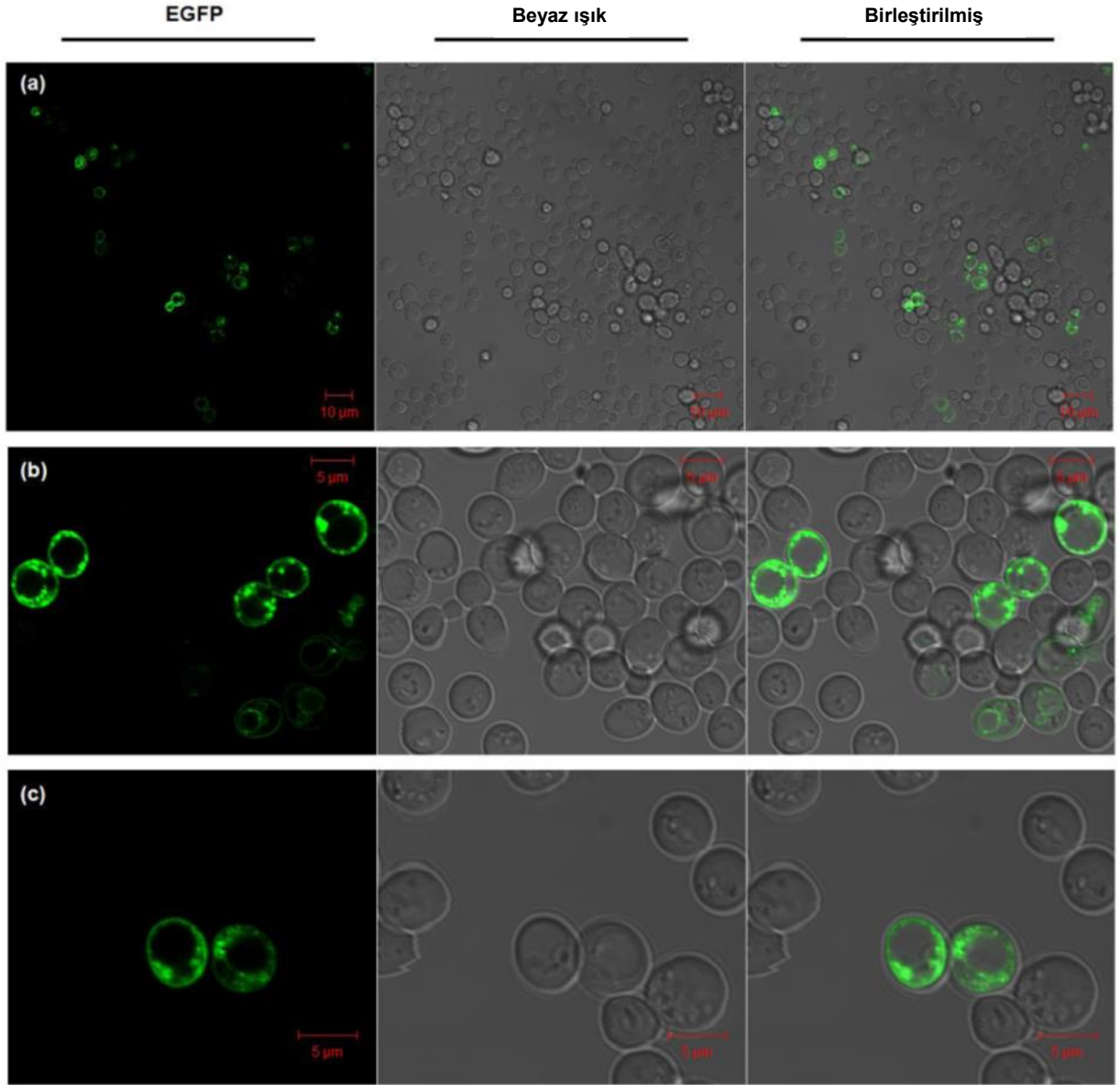
Yukarıda belirtilen ayarlarla görüntülemesi gerçekleştirilen EGFP ya da EGFP parçaları ile işaretlenmiş C-kuyruğu kesik Ste2 geni ifade eden maya hücrelerinin görüntüleri aşağıdaki gibidir (Şekil 18):



**Şekil 18: EGFP sinyalini görüntülemek için ayarlanmış konfokal mikroskop ile alınan N-EGFP (1-158) ve C-EGFP (159-239) ile işaretli C-kuyruğu kesik Ste2p görüntüleri. (a) tam uzunluktaki EGFP ile işaretlenmiş kesik Ste2p reseptörleri (304. pozisyondan) (b), (c) ve (d) N-EGFP (1-158) ve C-EGFP(159-239) ile işaretlenmiş kesik Ste2p reseptörleri (304. pozisyondan).**

Aynı konfokal mikroskop ayarları kullanılarak EGFP ya da EGFP parçaları ile işaretlenmiş tam uzunluktaki Ste2p genini ifade eden maya hücreleri de görüntülenmiştir (Şekil 19). Görüntüler C-kuyruğu kesik Ste2 genini ifade eden maya hücrelerinin görüntüleri ile karşılaştırıldığında hücre içerisinde birçok bölgede yeşil floresan sinyalin tespit edildiği görülmüştür. Tam

uzunluktaki Ste2p reseptörü ile C-kuyruğu kesik Ste2p reseptörü arasındaki belirgin fark C-kuyruğundan yoksun reseptörlerin parçalanma yollarına girmemeleridir. Bu durumda gözlemlenen sinyal farkı reseptörlerin sentezlenme aşamasında dimerleşmediğine, dimerleşmenin hücre zarında gerçekleştiğine ve bu dimerlerin parçalanma yollarında dimer olarak kaldıklarına işaret etmektedir.



**Şekil 19: EGFP sinyalini görüntülemek için ayarlanmış konfokal mikroskop ile alınan N-EGFP (1-158) ve C-EGFP (159-239) ile işaretli tam uzunluktaki Ste2p görüntüleri. (a), (b) ve (c) N-EGFP (1-158) ve C-EGFP (159-239) ile işaretlenmiş tam uzunluktaki Ste2p reseptörlerinin eşzamanlı ifadeleri.**

Yukarıdaki görüntüleme çalışmalarından da anlaşılacağı üzere, 158. pozisyondan bölünmüş EGFP floresan proteini ile işaretlenmiş Ste2p reseptörünün dimerleşmesi hem C-kuyruğu kesik

hem de tam uzunluktaki reseptörlerde gösterilmiştir. Floresan sinyal, birbiriyle etkileşen maya  $\alpha$ -feromon reseptörlerinin N- ve C-EGFP protein parçalarını bir araya getirmesi sonucu oluşmuştur.

Maya  $\alpha$ -feromon reseptörlerinin C-kuyruğundan 304. pozisyondan kesilmesinin, bu reseptörün hücre zarına hedeflenmelerinde herhangi bir etkisi olmadığı daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir. Yine bu araştırmalar ışığında, reseptörlerin daha yüksek oranda hücre zarındaki birikimlerine işaret eden yüksek floresan sinyalleri gözlenmiştir. Bu çalışmada ilk kez tam uzunluktaki Ste2p reseptörünün C-kuyruğu kesik Ste2p reseptöründen farklı yerlerde dimer olarak bulunduğu gösterilmiştir. İki reseptör arasındaki rapor edilen en belirgin fark C-kuyruğu olmayan reseptörlerin fosforlanma ve daha sonra parçalanma yollarına girme aşamalarında tam uzunluktaki reseptörlere göre çok yavaş olmasıdır. Her iki reseptörde sentezlenme aşamalarında aynı yollardan geçmektedir. Bölünmüş EGFP ile işaretlenmiş C-kuyruğu kesik reseptör ifade eden maya hücreleriyle, tam uzunluktaki reseptörü içeren hücreler karşılaştırıldığı zaman, kesik reseptörün daha güçlü bir floresan sinyalini yalnızca hücre zarında verdiği görülmektedir. Buna karşılık tam uzunluktaki reseptörleri ifade eden hücrelerde ise hücre içinde de yüksek floresan yoğunluklu nokta sinyaller mevcuttur. Bu bilgiler bize Ste2p reseptörlerinin hücre zarında dimerleştiği, tam uzunluktaki reseptörlerde gözlenen noktacıkların reseptör biyosentezinden ziyade endositoz sonucu oluşan vesiküller olduğu yönünde kuvvetli ipuçları vermektedir.

### ***FRET tekniği:***

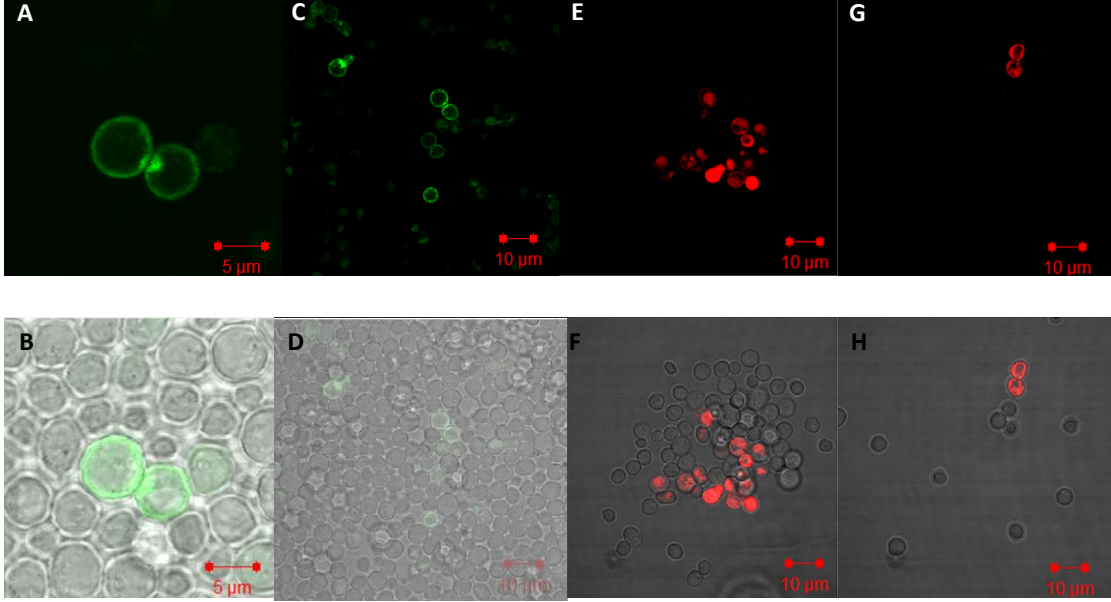
Proje takvimimizin ilk iki döneminde inşa edilmiş, biyolojik aktivite kontrolleri halo testi ile, floresan markör sinyallerinin kontrolleri ise konfokal mikroskop ile tamamlanmış floresan markörle işaretlenmiş maya  $\alpha$ -faktör feromon reseptörü taşıyan plazmidler aşağıdaki listede sunulmuştur (Tablo 15).

**Tablo 15:** FRET tekniği ile kullanılan ve bu çalışmada yapımı tamamlanan vektörler ve özellikleri.

<b>Plazmid</b>	<b>Açıklama</b>
<b>pCEU304</b>	Ste2 geninin 304 ve 305. pozisyonları arasında EGFP sekansı taşıyan pCL01 kökenli plazmid
<b>pBmCT304</b>	Ste2 geninin 304 ve 305. pozisyonları arasında mCherry sekansı taşıyan pBEC kökenli plazmid
<b>pBET441</b>	Ste2 geninin 441 ve 442. pozisyonları arasında EGFP sekansı taşıyan pBEC kökenli plazmid
<b>pCmCU441</b>	Ste2 geninin 441 ve 442. pozisyonları arasında mCherry sekansı taşıyan pCL01 kökenli plazmid

### **Konfokal Mikroskop ile Görüntüleme:**

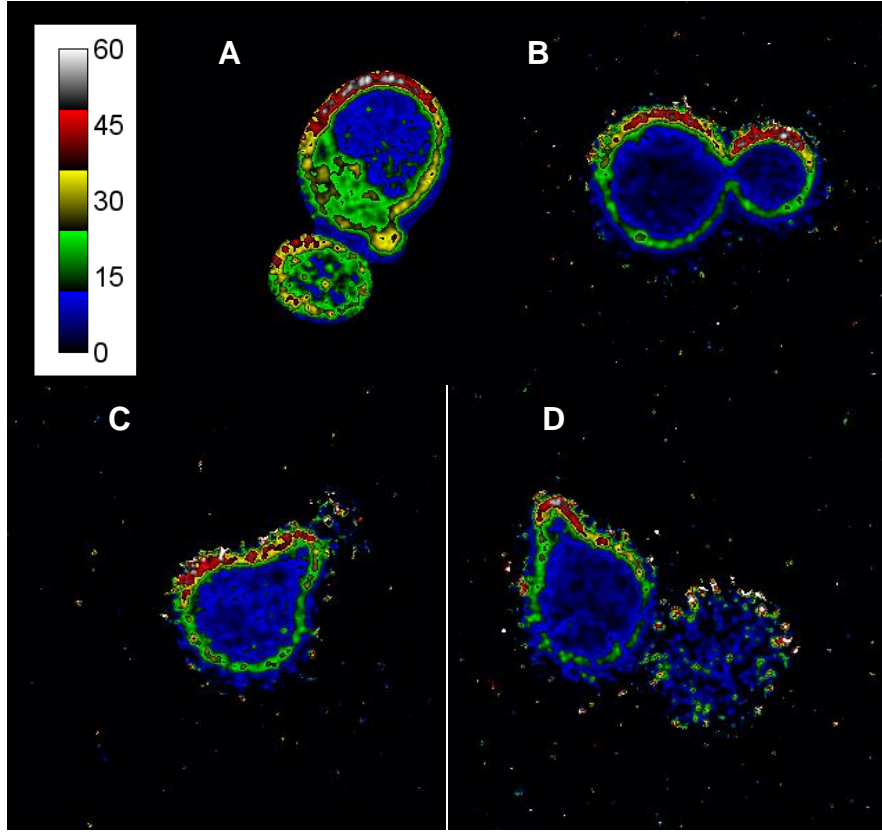
Halo analizleri yapılan maya hücreleri; FRET çalışmalarından önce; içerdikleri EGFP veya mCherry floresan proteinlerinin ifade edilip edilmediğinin kontrol edilmesi amacıyla, proteinlerin sinyalleri Konfokal mikroskop ile (Bilkent, UNAM) görüntülenmiştir. Halo analizi yapılan tüm hücrelerden sinyal alınabilmıştır, alınan görüntüler aşağıda sunulmuştur (Şekil 20).



**Şekil 20: EGFP ve mCherry ile ayrı ayrı işaretlenmiş Ste2p reseptörlerinin Konfokal mikroskop yardımı ile uygun eksitasyon dalga boyu ile uyarıldıktan sonra görüntülenmesi.** A) Ste2p reseptörünün 441. aminoasitinden sonra EGFP proteini ile işaretlenmesinden meydana gelen işaretli reseptör (458 nm ile uyarılmıştır), B) Floresan görüntünün ışık mikroskobu ile alınan görüntü üzerine eklenmesi ile yeşil sinyalin yoğunlukla hücre zarında bulunduğu gözlenmiştir C) EGFP 304. aminoasitten sonra eklenmiştir (458 nm ile uyarılmıştır), D) Floresan görüntünün ışık mikroskobu ile alınan görüntü üzerine eklenmesi, E) Ste2p reseptörünün 441. aminoasitinden sonra mCherry proteini ile işaretlenmesinden meydana gelen işaretli reseptör (547 nm ile uyarılmıştır), F) Floresan görüntünün ışık mikroskobu ile alınan görüntü üzerine eklenmesi, G) mCherry 304. aminoasitten sonra eklenmiştir (547 nm ile uyarılmıştır), H) Floresan görüntünün ışık mikroskobu ile alınan görüntü üzerine eklenmesi.

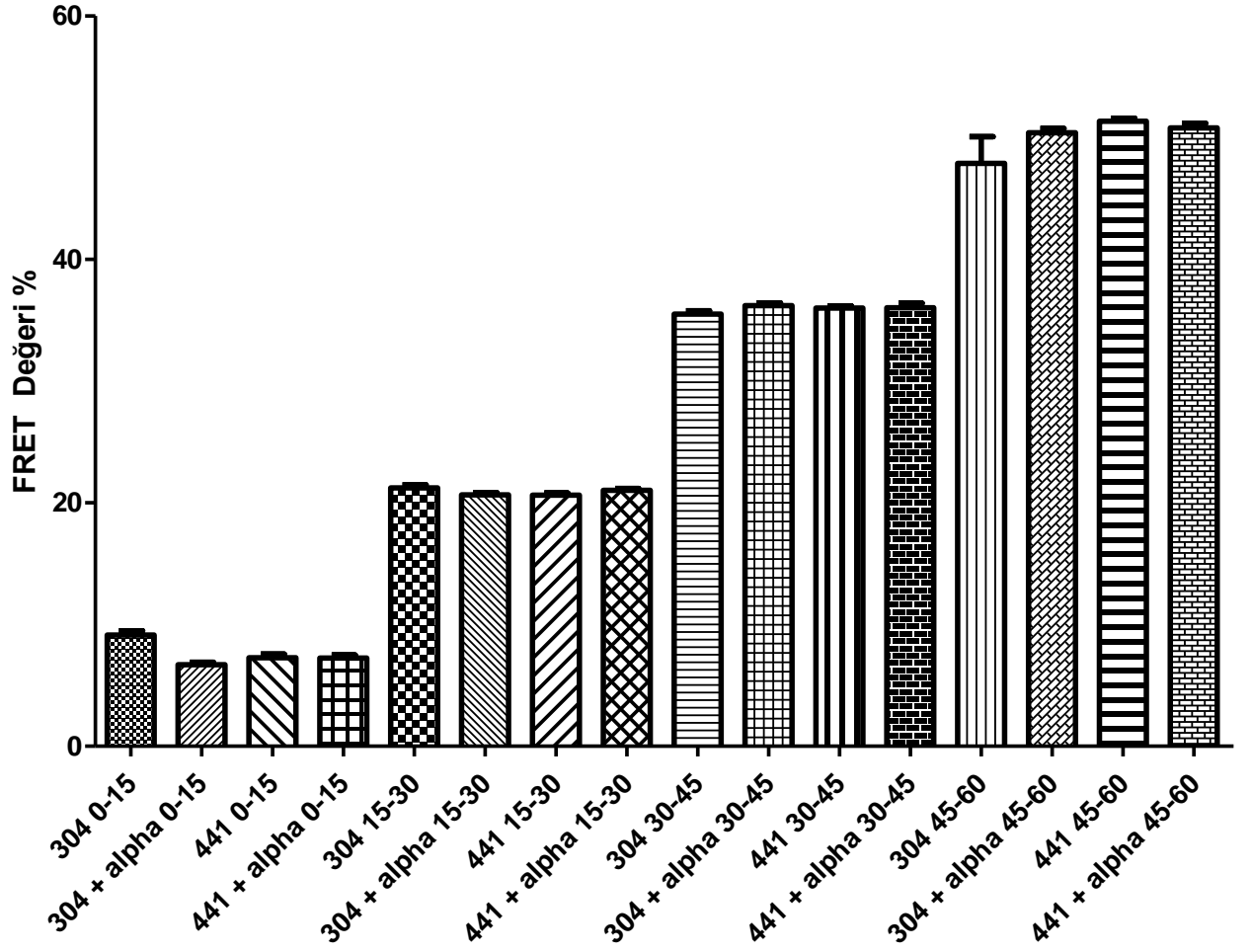
Floresan proteinlerle iki ayrı bölgeden işaretlenmiş alfa faktör feromon reseptörleri dinlenme durumunda ve alfa faktör ile uyarıldıktan sonra FRET yöntemi ile analiz edilmiştir. Konfokal mikroskop ile alınan görüntüler için FRET analizi her piksel için yapıldıktan sonra renk kodu verilerek resimlerin üzerine eklenmiştir. Şekil 21’de örnekleri verilen bu görüntüler analiz edilen her hücrede FRET değerinin nerede ve ne değerler arasında olduğunu göstermektedir. FRET değerleri ve  $E = 1/1+(r/R_0)^6$  formülü kullanılarak bu bölgelerde floresan proteinler arasındaki uzaklık tespit edilebilmektedir. mCherry ve EGFP çifti için  $R_0$  değeri 52 Å’dur. Bu hesaplamalara göre, donör ve akseptör floresan proteinler arasındaki mesafe mavi bölgelerde 73-68 Å arası, yeşil bölgelerde 68-59 Å arası, sarı bölgelerde 59-53 Å arası, kırmızı bölgelerde

53-48 Å arasındadır. FRET değerlerinin hücre içerisindeki dağılımı incelendiğinde en yüksek FRET değerlerinin daima hücre zarında, düşük FRET değerlerinin ise hücre içerisinde olduğu bu çalışmada test ettiğimiz tüm koşullarda gözlemlenmiştir.



**Şekil 21:** Hücre görüntüleri üzerinde hesaplanmış FRET değerlerinin tüm pikseller için gösterilmesi. Renk kodu olarak sıfır FRET olan bölgeler siyah, 0 ile 15 arası FRET değerleri mavi ve mavi tonları, 15 ile 30 arası FRET değerleri yeşil ve yeşil tonları, 30 ile 45 arasında FRET değerleri sarı ve tonları ve 45 ile 60 arası FRET değerleri kırmızı ve tonları ile belirlenmiştir. A) Ste2p reseptörleri 304'üncü amino asitten sonra floresan proteinler ile işaretlenmiştir, B) Ste2p reseptörleri 441'inci amino asitten sonra işaretlenmiştir, C) 304'üncü amino asitten sonra işaretlenmiş ve alfa faktör ile inkübe edilen hücreler, D) 441'inci amino asitten sonra işaretlenmiş ve alfa faktör ile inkübe edilen hücreler.

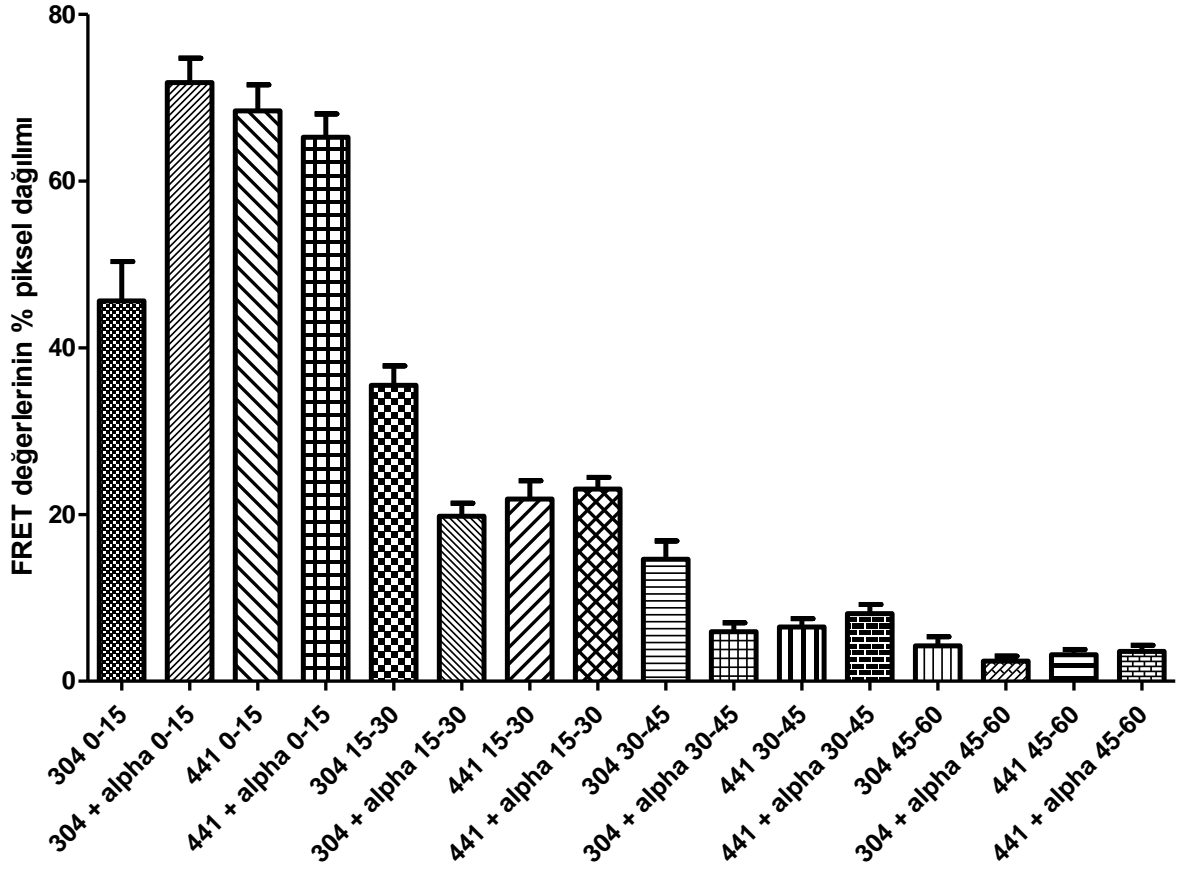
FRET hesaplamaları tamamlandıktan sonra test edilen dört koşulda görüntülenen hücrelerde belirlenen FRET bölgelerinin farklılık gösterip göstermediği araştırılmıştır. Bu amaç doğrultusunda her hücre için tespit edilen FRET bölgelerindeki FRET değerlerinin dağılımı analiz edilmiş ve karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırma sonucunda farklı koşullar altında ya da değişik hücrelerde FRET bölgelerindeki FRET değerlerinin birbirinden farklı olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 22). FRET değerlerinin analiz edilen tüm hücrelerde ve koşullarda homojen dağılımı, test edilen koşulların FRET değerine yani floresan proteinler arasındaki mesafeye direk bir etkisi olmadığı yönünde yorumlanabilir.



**Şekil 22:** Dört değişik koşul altında 4 grupta analiz edilen FRET değerleri karşılaştırılması. 0-15 grubu ortalama 7,5 FRET değerinde, 15-30 grubu 21 FRET değerinde, 30-45 grubu 37,5 FRET değerinde ve 45-60 grubu 50 FRET değerinde bulunmuştur.

FRET değerlerinin bu dört grupta homojen dağılmasına rağmen değişik koşullar altında bu grupların hücreler içerisinde nasıl dağıldığı ve ne oranda gözlemlendiği araştırılmıştır. Görüntülenen her hücrede tespit edilen grupların kapsadığı piksel sayıları hesaplanmış, FRET gözlenen toplam piksel sayıları kullanılarak her grubun hücre içerisinde yüzde kaçlık bir alan kapladığı bulunmuştur. Değişik koşullardaki hücreler kendi içlerinde karşılaştırılıp, bar grafik ile sonuçlar Şekil 23'de özetlenmiştir.



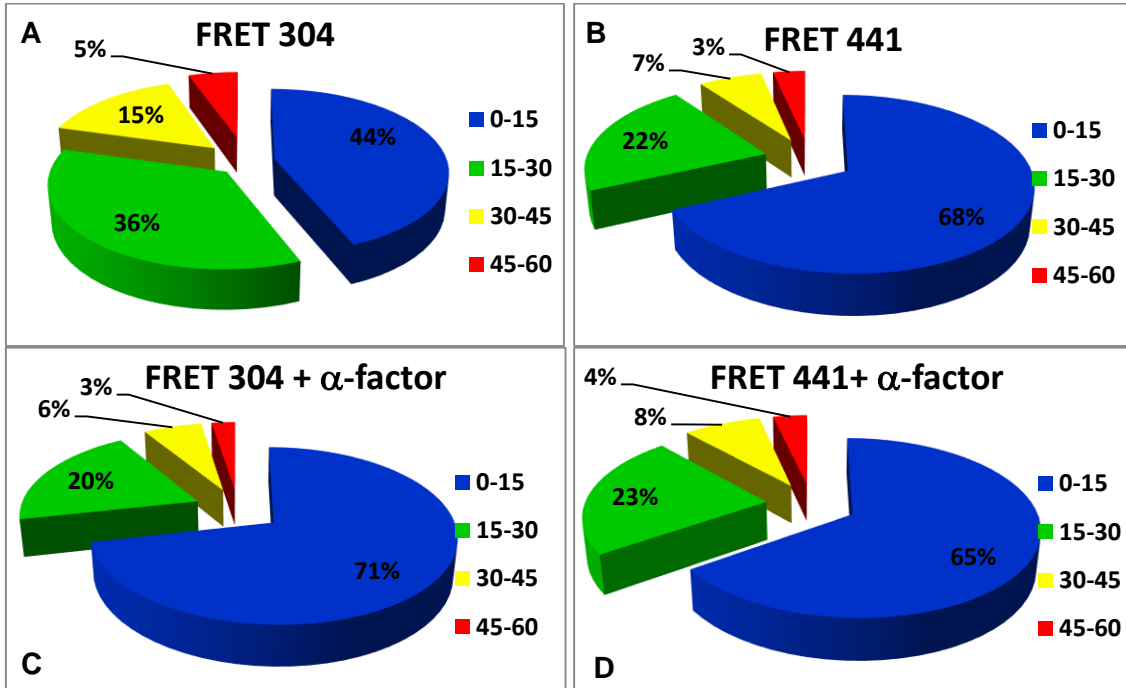


**Şekil 23:** Test edilen 4 koşul altında FRET değerlerinin kapsadığı piksel yüzdesinin karşılaştırması. FRET değerleri her hücre için hesaplanmış ve grupların ortalaması alınmıştır. Gruplar içindeki farklılıklar ortalamanın standart hatası (SEM) olarak bar grafikte verilmiştir.

Bu sonuçlar analiz edildiğinde 304'üncü amino asitten sonra işaretlenen reseptörlerin 441'inci amino asitten sonra işaretlenen reseptörlerden belirgin farklılıklar gösterdiği görülmüştür. 304 FRET olarak adlandırdığımız bu koşuldaki hücrelerde hücrelerin yüzde 44 ünde 0-15 arası FRET gözlenirken 441 FRET olarak adlandırılan koşulda bu grubun % 68'lik bir orana çıktığı görülmektedir. Bunun yanısıra 15-30, 30-45 ve 45-60 FRET grupları 304 FRET koşulunda belirgin bir şekilde 441 FRET koşulundan yüksek bulunmuştur (Şekil 24 A ve B). Bu veriler 304 FRET koşulundaki reseptörlerin daha başarılı bir şekilde dimerleştiğini ve yüksek FRET değerli dimerlerin sayıca daha çok olduğunu göstermektedir. Dolayısı ile işaretlemenin 304'üncü amino asitten sonra yapılmasının dimerleşmeyi teşvik etmesi ya da 441'inci amino asitten sonra yapılan işaretlemenin dimerleşmeyi olumsuz etkilediği yorumu yapılabilir. Bunun yanısıra dimer oluştuğunda 304. amino asit çevresindeki bölgelerin 441. amino asit çevresindeki bölgelerden birbirine daha yakın olduğu hipotezi daha kuvvetli bir hipotezdir.

FRET değerine ve reseptör dimerleşme oranına alfa faktör feromonunun etkisini araştırmak üzere 304 ve 441 FRET koşulları feromon ile inkübe edildikten sonra analiz edilmiştir. Bu

şartlar altında feromona maruz kalan 304 FRET koşulunda yüksek FRET guruplarındaki reseptör dimerlerinin sayısal olarak azaldığı gözlemlenmiştir (Şekil 24 C). 441 FRET koşulunda ise feromonun reseptör dimerleşmesine bir etkisi olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 24 D). 304 FRET koşulunda gözlemlenen feromon etkisinin fonksiyonel bir temeli olup olmadığının araştırılması için ilave deneyler yapılması gerekmektedir. Bu sonuçlar doğrultusunda hipotezimiz; 304 FRET koşulunda donör ve akseptör proteinlerin, reseptör üzerinde feromon etkisi ile gerçekleşen konformasyonel değişiklikler sonucunda birbirinden uzaklaşmasıdır. Düşük FRET gurubunun hücre içerisinde gözlemlenmesi, feromon uygulaması sonucu reseptör dimerlerinin hücre içerisine alınımının hızlanması bulgusu ile de uyumaktadır. 441 FRET koşulunda bu etkinin gözlemlenmemesi floresan proteinlerin bu pozisyonda normal koşullarda da birbirinden göreceli olarak uzak olması ve/veya feromon etkisi sonucu oluşan konformasyonel değişikliklerin bu pozisyondaki floresan proteinleri birbirinden uzaklaştırmamasından dolayı olabilir.



**Şekil 24:** 4 guruba ayrılan FRET değerlerinin piksel bazında ortalama hücrede dağılımı. A) 304 FRET koşulunda B) 441 FRET koşulunda, C) 304 FRET koşulunda feromon eşliğinde, ve D) 441 FRET koşulunda feromon eşliğinde gözlemlenen hücrelerin piksel bazında FRET dağılımı. Hücre görüntülerinde FRET değerleri için kullanılan renk kodu bu grafiklerde de kullanılmıştır.

### 5.3.3 Özgün Hedef II: Reseptör dimerleşmesi üzerinde etkili olan modifikasyonların incelenmesi

Transkripsiyon sonrası modifikasyonlardan mahrum reseptörlerin dimerleşme üzerine etkilerini analiz etmek için proje kapsamında yapılması tamamlanan plazmidler tablo 16 da verilmiştir.

**Tablo 16:** Proje döneminde inşa edilmesi tamamlanmış ve görüntülenmiş 25 ve 32 pozisyonlarda mutasyonları taşıyan, glikozilasyondan yoksun reseptörleri taşıyan plazmidler.

Plazmid	Açıklama	Tamamlanmış mutasyonlar		
		25 <sup>Asn→Gln</sup>	32 <sup>Asn→Gln</sup>	25,32 <sup>Asn→Gln</sup>
Ste2f304C-EGFP	304. pozisyonda C-EGFP taşıyan tam uzunluktaki reseptör	×	×	×
Ste2f304N-EGFP	304. pozisyonda N-EGFP taşıyan tam uzunluktaki reseptör	×	×	×
Ste2t304C-EGFP	304. pozisyonda C-EGFP taşıyan kesik reseptör	×	×	×
Stet304N-EGFP	304. pozisyonda C-EGFP taşıyan kesik reseptör	×	×	×
Ste2f304EGFP	304. pozisyonda EGFP taşıyan tam uzunluktaki reseptör	×	×	×
Ste2f304mCherry	304. pozisyonda mCherry taşıyan tam uzunluktaki reseptör	×	×	×

Konfokal görüntülemeler sonucunda glikozilasyondan mahrum reseptörlerin yabancı reseptörlerden farklı bir sinyale sahip olmadıkları dolayısı ile bu modifikasyonun dimerleşme üzerine etkisi olmadığı tespit edilmiştir.

Ste2p reseptörünün 1. transmembran kısmında bulunan, Glycophorin A-benzeri dimerleşme motifinde (G<sup>56</sup>XXXG<sup>60</sup>) yapılan değişiklikler sonucu elde edilen reseptörler tablo 17'de özetlenmiştir.

**Tablo 17:** Proje döneminde inşa edilmiş ve görüntülenmiş 56 ve 60. pozisyonlarda ilgili mutasyonları taşıyan eşleşme yoksunu Ste2p plazmidleri.

Plazmid	Açıklama	Tamamlanmış mutasyonlar		
		56 <sup>Gly→Ala</sup>	60 <sup>Gly→Ala</sup>	56,60 <sup>Gly→Ala</sup>
Ste2f304C-EGFP	304. pozisyonda C-EGFP taşıyan tam uzunluktaki reseptör	×	×	×
Ste2f304N-EGFP	304. pozisyonda N-EGFP taşıyan tam uzunluktaki reseptör	×	×	×
Ste2t304C-EGFP	304. pozisyonda C-EGFP taşıyan kesik reseptör	×	×	×
Ste2t304N-EGFP	304. pozisyonda C-EGFP taşıyan kesik reseptör	×	×	×
Ste2f304EGFP	304. pozisyonda EGFP taşıyan tam uzunluktaki reseptör	×	×	×
Ste2f304mCherry	304. pozisyonda mCherry taşıyan tam uzunluktaki reseptör	×	×	×
Plazmid	Açıklama	Tamamlanmış mutasyonlar		
		56 <sup>Gly→Leu</sup>	60 <sup>Gly→Leu</sup>	56,60 <sup>Gly→Leu</sup>
Ste2f304C-EGFP	304. pozisyonda C-EGFP taşıyan tam uzunluktaki reseptör	×	×	×
Ste2f304N-EGFP	304. pozisyonda N-EGFP taşıyan tam uzunluktaki reseptör	×	×	×
Ste2t304C-EGFP	304. pozisyonda C-EGFP taşıyan kesik reseptör	×	×	×
Ste2t304N-EGF	304. pozisyonda C-EGFP taşıyan kesik reseptör	×	×	×
Ste2f304EGFP	304. pozisyonda EGFP taşıyan tam uzunluktaki reseptör	×	×	×
Ste2f304mCherry	304. pozisyonda mCherry taşıyan tam uzunluktaki reseptör	×	×	×

Görüntüleme sonucunda gerek G56L, gerek G60L gerekse de G56/60L mutasyonlarını taşıyan reseptörlerin kendileri gibi yabancı reseptörlerle de eşleşmedikleri gösterilmiştir.

## Referanslar:

1. Prinster, S.C., C. Hague, and R.A. Hall, Heterodimerization of G protein-coupled receptors: specificity and functional significance. *Pharmacol Rev*, 2005. 57(3): p. 289-98.
2. Milligan, G., G protein-coupled receptor hetero-dimerization: contribution to pharmacology and function. *Br J Pharmacol*, 2009.
3. Margeta-Mitrovic, M., Y.N. Jan, and L.Y. Jan, A trafficking checkpoint controls GABA(B) receptor heterodimerization. *Neuron*, 2000. 27(1): p. 97-106.
4. Bulenger, S., S. Marullo, and M. Bouvier, Emerging role of homo- and heterodimerization in G-protein-coupled receptor biosynthesis and maturation. *Trends Pharmacol Sci*, 2005. 26(3): p. 131-7.
5. Overton, M.C., S.L. Chinault, and K.J. Blumer, Oligomerization, biogenesis, and signaling is promoted by a glycoporphin A-like dimerization motif in transmembrane domain 1 of a yeast G protein-coupled receptor. *J Biol Chem*, 2003. 278(49): p. 49369-77.
6. Johnsson, N. and A. Varshavsky, Split ubiquitin as a sensor of protein interactions in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. 91(22): p. 10340-4.
7. Barnard, E., et al., Detection and localisation of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae* using a split-GFP method. *Fungal Genet Biol*, 2008. 45(5): p. 597-604.
8. Naider, F. and J.M. Becker, The alpha-factor mating pheromone of *Saccharomyces cerevisiae*: a model for studying the interaction of peptide hormones and G protein-coupled receptors. *Peptides*, 2004. 25(9): p. 1441-63.
9. Huh, W.K., et al., Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature*, 2003. 425(6959): p. 686-91.
10. Son, C.D., et al., Nicotine normalizes intracellular subunit stoichiometry of nicotinic receptors carrying mutations linked to autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Mol Pharmacol*, 2009. 75(5): p. 1137-48
11. Hicke, L., B. Zanolari, and H. Riezman, Cytoplasmic tail phosphorylation of the alpha-factor receptor is required for its ubiquitination and internalization. *J Cell Biol*, 1998. 141(2): p. 349-58.
12. Gietz, R.D. and R.A. Woods. (2002) Transformation of yeast by the Liac/SS carrier DNA/PEG method. *Methods in Enzymology* 350: 87-96.
13. Montesana, P.E. and J.B. Konopka, Mutational analysis of the role of N-glycosylation in alpha-factor receptor function. *Biochemistry*, 2001. 40(32): p. 9685-94.
14. Zheng, L., U. Baumann, and Jean-Louis Reymond. (2004) An efficient one-step site-directed and site-saturation mutagenesis protocol. *Nucleic Acids Res*. 2004; 32(14): e115.

## 6. EKLER

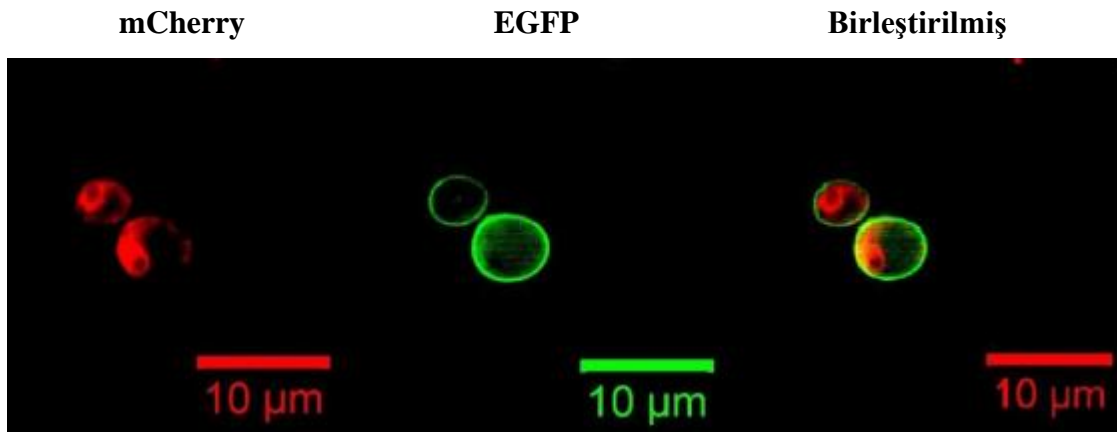
### Proje Çıktıları:

3 yıl süren proje kapsamında biri doktora olmak üzere 4 yüksek lisans öğrencisi yetiştirilmiştir. Bu öğrencilerden ikisi master tezlerini savunmuş ve mezun olmuşlardır; bir master ve bir doktora öğrencisi tezleri kapsamındaki deneylerin büyük kısmını tamamlamış ve tez yazım aşamasına gelmişlerdir.

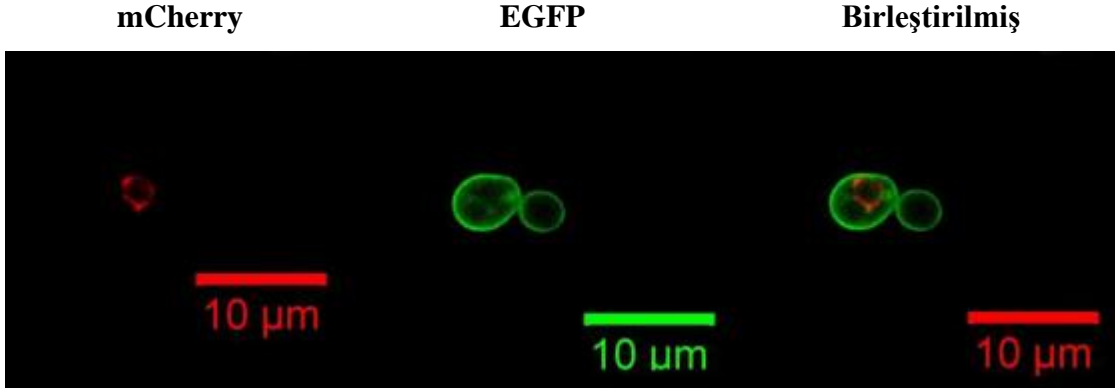
Çalışmalarımızda elde edilen sonuçların özetlendiği 2 makale yazılmış bu makaleler Transactions on Computational Biology and Bioinformatics, ve Journal of biological Chemistry dergilerine gönderilmiştir. Her iki makalede hakemler tarafından kontrol edilme aşamasındadır. Proje sonunda optimizasyonu tamamlanan FRET ve bölünmüş EGFP teknikleri laboratuvarımızda yürütülen diğer projelerde de başarı ile kullanılmakta ve yeni projelerde sonuca ulaşmayı sağlayacak yöntemler olarak kullanılmaktadırlar.

Yine proje kapsamında geliştirilen kırmızı floresan protein ile işaretli maya organel markörleri kolokalizasyon deneylerinde başarı ile kullanılmaktadır. Bu markörler sayesinde maya hücreleri içerisine gerçekleşen birçok biyolojik olayın hangi organellerde gerçekleştiği ileride yapılacak projelerde tespit edilebilecektir. Bu çalışmalara öncül olacak kolokalizasyon çalışmaları aşağıda özetlenmiştir.

Gpr1p ve Ste2p mono ve dimerlerinin hücre zarına taşınmasını karşılaştırabilmek için flüoresan proteinle işaretli reseptör barındıran hücreler markör barındıran plazmidlerle transforme edilmiştir. Hücreler MLTU katı seçici besi ortamında 2-3 gün 30°C'de büyütülmüştür. Daha sonra, koloniler MLTU besi ortamlarına çizilerek büyütülmüş ve 2 günün sonunda gece boyunca sıvı MLT ortamından büyütülerek floresan ve konfokal mikroskop altında görüntülenmiştir (Şekil 25).

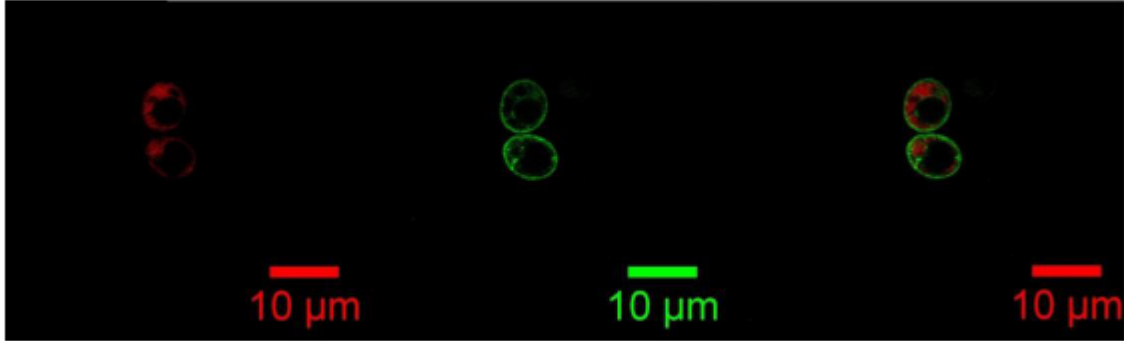


**Şekil 25:** Endoplazmik retikulumu kırmızı flüoresan proteinle (mCherry) ve glükoz algı reseptörleri yeşil flüoresan proteinle (EGFP) işaretli hücrelerin flüoresan mikroskop altındaki görüntüleri.

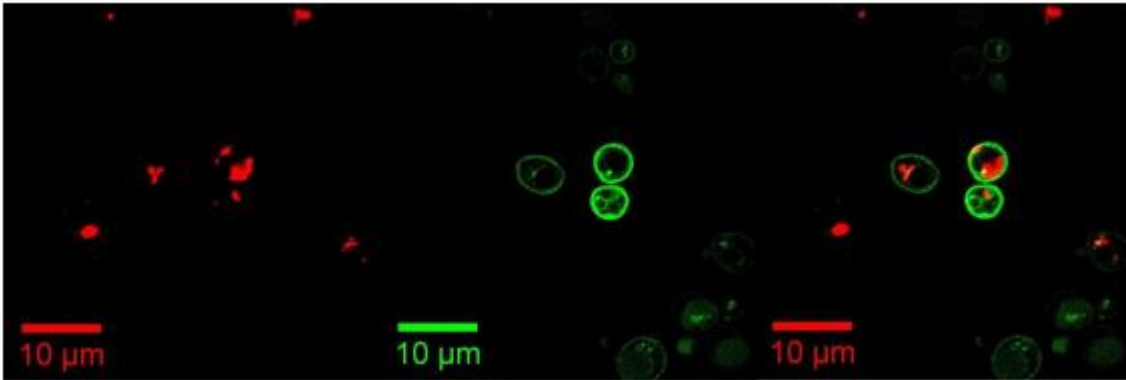


**Şekil 26:** Endozomları kırmızı floresan proteinle (mCherry) ve glukoz algı reseptörleri yeşil floresan proteinle (EGFP) işaretli hücrelerin flüoresan mikroskop altındaki görüntüleri.

GPKR'ler veziküllerle hücre zarından alınıp proses edilmek için Golgi'ye ya da parçalanmak için kofula taşınır. Şekildeki işaretli endozomlar da proteinleri hücre zarından kofula taşır ve reseptörlerle kolokelize olması beklenmektedir. Şekildeki reseptörlerin endozomlarda bulunduğuna işaret eden sarı noktasal sinyaller JaCoP eklentisi ile doğrulanmıştır.



**Şekil 27:** COPII vezikülleri kırmızı floresan proteinle (mCherry) ve C terminali kesilmiş  $\alpha$ -faktör reseptörleri yeşil flüoresan proteinle (EGFP) işaretli hücrelerin floresan mikroskop altındaki görüntüleri.



**Şekil 28:** Endozomları kırmızı floresan proteinle (mCherry) ve C terminali kesilmiş  $\alpha$ -faktör reseptörleri yeşil flüoresan proteinle (EGFP) işaretli hücrelerin floresan mikroskop altındaki görüntüleri.



Ste2 reseptörü de Gpr1p gibi hücre zarından kofula yıkılmak için taşınır. Şekil 28'de görülen sarı noktasal sinyaller beklendiği gibi bu reseptörün endozomla kofula taşındığını göstermektedir. Bu veri ImageJ programı eklentisi JaCoP ile istatistiksel veriler incelenerek doğrulanmıştır.

Bu sonuçlar doğrultusunda, markörlerin maya hücrelerinde kolokalizasyon belirlenmesi için kullanılabileceği gösterilmiştir.



**TÜBİTAK**  
**PROJE ÖZET BİLGİ FORMU**

Proje Yürütücüsü:	Yrd. Doç. Dr. ÇAĞDAŞ DEVRİM SON
Proje No:	110T414
Proje Başlığı:	G Proteine Kenetli Reseptörlerin Eşleşmesi: Yapı-İşlev Analizi ve Moleküler Mekanizmalar
Proje Türü:	Araştırma
Proje Süresi:	36
Araştırmacılar:	
Danışmanlar:	
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	ORTA DOĞU TEKNİK Ü. FEN EDEBİYAT F. BİYOLOJİ B.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	01/11/2010 - 01/11/2013
Onaylanan Bütçe:	238780.0
Harcanan Bütçe:	206758.27

TÜBİTAK

<p>Öz:</p>	<p>G proteine kenetli reseptör proteinleri (GPKR) hücre zarını yedi defa geçen integral zar proteinleridir. Bu reseptörler birçok değişik uyarıya karşı hücre içindeki fizyolojik olayları tetikler ve kontrol ederler. Tek hücreli ökaryot organizmalarda hücre büyümesi, gelişmesi, yapısal değişiklikler, hareket ve yaşam süresi gibi temel fonksiyonlar yine bu reseptörler tarafından kontrol edilir. İnsanlarda ise yüzlerce peptid hormon, duyu uyarıları, kokular, ışık, nörotransmitterler, kemokinler, ve benzeri uyarılar GPKRler tarafından tespit edilir ve ikincil mesajlar yolu ile hücre içi uyarılar kontrol edilir. Sayısız önemli biyolojik sistemde rol oynayan GPKRler günümüzde satılan ilaçların yaklaşık %40'ının hedefi durumundadır. GPKRlerin yıllardır geleneksel olarak tek bir reseptör olarak çalıştıkları, ligand bağlanması sonucu bağlı oldukları heteromerik G proteini aktif hale getirerek ikincil mesajlar yolu ile hücre içi faaliyetleri kontrol ettikleri varsayılmıştır. Ancak son zamanlarda yapılan çalışmalar bu reseptörlerin birbirleriyle eşleştikleri ve bu eşleşmenin gerek işlev, gerek hücre içindeki hareketler yönünden önemli olduğunu ortaya koymuştur.</p> <p>2010 yılında sunduğumuz ve TÜBİTAK tarafından kabul edilen 110T414 nolu projemizin amacı bir maya GPKR'ü olan Ste2p proteininin kendisi ile bir dimer oluşturup oluşturmadığı, eğer dimer oluşturuyor ise bu dimerlerin hücre içerisinde nerede bulunduğu ve agonist bağlanması, protein modifikasyonları gibi reseptör dinamiklerinde önemli rol oynayan etkenlerden nasıl etkilendiğini araştırmaktır. Proje süresince bu amaçlarımızı bölünmüş yeşil protein (İng. split EGFP) ve floresan rezonans enerji transferi (FRET) gibi hızla gelişmekte olan floresan teknikler ile konfokal mikroskopi kullanarak canlı maya hücrelerinde test ettik. Biyomoleküler floresan tamamlama tekniği ; protein parçalarının tekrar bir araya gelmesine dayanarak moleküller arası etkileşimleri doğrudan gösteren yenilikçi bir yaklaşımdır. Çalışmamızda bu teknik , maya hücrelerinde GPKR etkileşimlerini belirlemek ve görüntülemek için kullanılmıştır. Geliştirilmiş yeşil floresan proteini floresan özelliği olmayan iki parçaya bölünerek test edilecek olan proteinlere eklenmiştir. İki hedef reseptör arasındaki etkileşim, bu çalışma için <i>Saccharomyces cerevisiae</i>'da alfa feromon reseptörü olan Ste2p, floresan protein parçalarının birbirine yaklaşarak yeniden bir araya gelmelerini sağlar. Geliştirilmiş yeşil floresan proteininin birleşmesiyle kazanılan floresan özellik, etkileşimin doğrudan belirlenmesini mümkün kılmıştır. Reseptör dimerizasyonunun hücre içi lokalizasyonunu belirlemek için proteinlerin hücre zarına teşinirken geçtikleri organeller floresan işaretli organel markörleri ile işaretlenmiştir. Bölünmüş EGFP ile tespit edilen reseptör dimerizasyonu bu markörler ile yapılan kolokalizasyon çalışmaları sonucunda canlı hücrelerde noninvaziv bir yöntemle incelenmiş ve dimerizasyonun nerede gerçekleştiği tespit edilebilmiştir.</p> <p>Proje kapsamında Ste2p molekülleri EGFP ve mCherry isimli, sırasıyla yeşil ve kırmızı renkli, floresan proteinler ve EGFP parçaları ile işaretlenmiştir. İşaretleme işleminden sonra plazmidler maya hücresine teker teker transfekte edilmiştir. İşaretili reseptörlerin fonksiyonel olduklarını test etmek amacıyla HALO analizi yapılmıştır. Bu analizde feromon yüklenmiş diskler agar üzerine yerleştirilmiş ve disk çevresinde feromon konsantrasyonuna bağlı olarak gerçekleşen büyüme durması, koloniden temiz bölgeler olarak gözlemlenmiştir. FRET ve bölünmüş EGFP yöntemleri sayesinde hücrelere herhangi bir zarar vermeden canlı hücre içerisinde gözlem yapılabilir. Başarı ile tamamlanan bu proje sonucunda örnek GPKR olarak seçilen maya feromon reseptörü Ste2p'nin hücre zarında dimerleştiği, ve dimerlerin hücre içerisine dimer olarak alındıkları gösterilmiştir. Bunun yanısıra agonist etkileşimi sonucunda reseptörlerin 7. Heliksinin C-terminali ile bağlandığı bölgede dimerlerin birbirinden uzaklaştığı gözlemlenmiştir.</p>
<p>Anahtar Kelimeler:</p>	<p>GPKR, FRET, Bölünmüş GFP, dimerleşme, Konfokal Mikroskopi, Ste2p, Reseptör Eşleşmesi</p>
<p>Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:</p>	<p>Hayır</p>