

Histon Asetil Transferaz Komplekslerinin Bileşenleri Olan ADA Proteinlerinin Moleküler Etkileşimlerinin Biyolojik Karakterizasyonu

Program Kodu: 3501

Proje No: 112T429

**Proje Yürütücüsü:
Dr. Sevil ZENCİR**

Danışman(lar):

Prof. Dr. Zeki TOPÇU

Bursiyer(ler):

İ. Cansu BARIŞ, M. Sc.

NİSAN 2015

ANKARA

ÖNSÖZ

Günümüzde genomda protein kodlayan genlerin çoğu aydınlatılmış olsa da, bu proteinler arasındaki moleküler etkileşimler henüz tam olarak tanımlanamamıştır. Hücrelerdeki protein-protein etkileşimleri oldukça kompleks bir yapılanma göstermekte ve memeli hücrelerinde gözlenen patolojik durumların çoğu esasen bu etkileşimlerin bozulması veya değişiminden kaynaklanmaktadır. Bu nedenle protein-protein, protein-DNA, protein-RNA, reseptör-ligand gibi moleküler etkileşimlerin kapsamlı bir şekilde aydınlatılması hücredeki moleküler organizasyonun anlaşılması bakımından son derece önemlidir.

Projemizin hareket noktası, gen ekspresyonunun DNA-bağlanma proteinleri, temel transkripsiyon faktörleri ve regülatör fonksiyona sahip olan adaptör/ko-aktivatör proteinleri gibi çok sayıda moleküler etkileşimleri gerektirmesidir. Bu nedenle, transkripsiyonel regülasyon sürecinde DNA-protein etkileşimlerinin yanında çok-altbirimli protein komplekslerinin kendi bileşenleri ve diğer kompleksler arasındaki protein-protein etkileşimlerinin de yer alması beklenir. Bu bulgular doğrultusunda; insan ADA3 (hADA3) ile etkileşimleri daha önce ekibimizce rapor edilen dört yeni etkileşim partnerinin, yine hADA3 ile aynı kompleks içerisinde yer alan ve hADA3 ile etkileşimleri daha önceden rapor edilen insan ADA2 (hADA2) ve insan GCN5 (hGCN5) proteinleri ile fonksiyonları gereği etkileşebilecekleri hipotezimize temel olmuştur. Bu çok alt-birimli protein komplekslerinin bileşenleri, potansiyel olarak diğer transkripsiyonel regülatörler ile etkileşebildiğinden, bu etkileşimlerin belirlenmesi ve karakterize edilmesi oldukça önemlidir. Tanımladığımız yeni protein etkileşimlerini, ADA-içeren protein komplekslerinin düzenlediği yeni mekanizmaların tanımlanmasına yardımcı olacağı gibi RNA polimeraz II (RNA polymerase II)-aracılı transkripsiyon mekanizmasında görev alan transkripsiyon komplekslerinin karakterizasyonu konusunda yeni bilgiler kazandırabilecek niteliktedir. TÜBİTAK tarafından desteklenen projemiz sonuçlarının etki değeri yüksek dergilerde yayınlanması ile ülkemizde protein-protein ve DNA-protein etkileşimlerine ilgi duyan diğer birimlerin maya hibrit teknolojisi yaklaşımına özendirileceği inancındayız.

İÇİNDEKİLER

ŞEKİL DİZİNİ.....	v
TABLO DİZİNİ	vii
ÖZET	viii
ABSTRACT	x
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	4
2.1 Ökaryotik Organizmalarda Kromatinin Yapısı ve Gen Ekspresyonunun Regülasyonundaki Önemi.....	4
2.2 Histon Modifikasyonlarının Kromatin Yeniden Düzenlenmelerindeki Fonksiyonu	4
2.3 HAT Komplekslerinin Bir Bileşeni Olarak ADA Proteinlerinin Transkripsiyonel Regülasyondaki Önemi.....	5
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	7
3.1 Projemizin Gerçekleştirilmesi için Seçtiğimiz Metodolojinin Tanıtımı	7
3.2 hADA2A, hADA2B ve hGCN5 Proteinlerini Kodlayan Gen Bölgelerinin Maya Plazmidine Klonlanması	8
3.3 Mayada hADA2A, hADA2B ve hGCN5 Proteinlerinin Ekspresyonu	9
3.4 Mayada hADA2A, hADA2B ve hGCN5 Proteinlerinin Toksikite Testleri	9
3.5 Mayada hADA2A, hADA2B ve hGCN5 Proteinlerinin Oto-aktivasyon Testleri.....	9
3.6 Protein-Protein Etkileşimlerinin Y2H Yöntemi ile Belirlenmesi.....	10
3.7 Etkileşimlerin ve Etkileşimlerin Özgünlüğünün Test Edilmesi	11
3.8 Etkileşimlerin Mayada Beta-Galaktosidaz Aktivitesi Ölçümleri ile Kantitatif Olarak Belirlenmesi	12
3.9 Etkileşim Bölgelerinin Haritalanması	12
3.10 Mayada Belirlenen Etkileşimlerin Memeli Sistemlerde Verifikasyonları	13
3.10.1 hADA2A, hADA2B ve hGCN5 protein kodlayan gen bölgelerinin memeli ekspresyon plazmidine klonlanması	13
3.10.2 Raportör gen ekspresyonu analizleri (Luciferase Assay)	13
3.10.3 Konfokal mikroskopi analizleri.....	14
4. BULGULAR	15

4.1 ADA2A, ADA2B ve GCN5 Proteinlerini Kodlayan Gen Bölgelerinin PCR ile Çoğaltılması	15
4.1.1 hADA2A proteinini kodlayan gen bölgesinin PCR ile çoğaltılması	15
4.1.2 hADA2B proteinini kodlayan gen bölgesinin PCR ile çoğaltılması	16
4.1.3 hGCN5 proteinini kodlayan gen bölgesinin PCR ile çoğaltılması	17
4.2 hADA2A, hADA2B ve hGCN5 Proteinlerini Kodlayan Gen Bölgelerinin Maya Plazmidine Klonlanması	18
4.2.1 hADA2A proteinini kodlayan gen bölgesinin maya BD plazmidine klonlanması	18
4.2.2 hADA2B proteinini kodlayan gen bölgesinin maya BD plazmidine klonlanması	18
4.2.3 hGCN5 proteinini kodlayan gen bölgesinin maya BD plazmidine klonlanması	19
4.2.4 Hedef DNA ve vektör DNA'ların ligasyonu	19
4.3 AH109 Maya Suşunun pGBKT7-hADA2A, hADA2B ve hGCN5 Rekombinant Plazmidleri ile Transformasyonu	20
4.4 Maya Hücrelerinde hADA2A, hADA2B ve hGCN5 Proteinlerinin Kontrol Testleri	21
4.4.1 Mayada protein ekspresyon analizleri	21
4.4.2 Mayada hADA2A, hADA2B ve hGCN5 proteinlerinin toksisite testleri	22
4.4.3 hADA2A, hADA2B ve hGCN5 proteinlerinin oto-aktivasyon testleri	23
4.5 Etkileşimlerin ve Etkileşimlerin Özgünlüğünün Test Edilmesi	26
4.6 Etkileşimlerin Mayada Beta-Galaktosidaz Aktivitesi Ölçümleri ile Kantitatif Olarak Belirlenmesi	28
4.7 hADA2A, hADA2B ve hGCN5 Proteinlerinin Etkileşim Bölgelerinin Haritalanması	29
4.7.1 Delesyonlu hADA2A, hADA2B ve hGCN5 klonlarının eldesi	29
4.7.1.1 N-terminal delesyonu taşıyan hADA2A, hADA2B ve hGCN5 klonların eldesi	30
4.7.1.2 C-Terminal delesyonu taşıyan hADA2A, hADA2B ve hGCN5 klonların eldesi	33
4.7.2 Delesyonlu hADA2A, hADA2B ve hGCN5 proteinlerinin mayada ekspresyon analizleri	35
4.7.3 Delesyonlu hADA2A, hADA2B ve hGCN5 proteinlerinin mayada toksisite ve oto-aktivasyon testleri	36
4.7.4 AH109 Maya hücrelerinin aday etkileşim partnerleri ile eş-transformasyonu ve hADA2A, hADA2B, hGCN5 proteinlerinin etkileşimden sorumlu bölgelerinin haritalanması	38

4.8 Mayada Belirlenen Protein-Protein Etkileşimlerinin Memeli Hücrelerde Verifikasyonları ..	40
4.8.1 hADA2A, hADA2B ve hGCN5 protein kodlayan gen bölgelerinin memeli ekspresyon vektörlerine klonlanması.....	41
4.8.2 Raportör gen ekspresyonu analizleri (Luciferase Aassay)	42
4.8.3 Konfokal mikroskopi analizleri	45
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	50
KAYNAKLAR.....	56

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1. Maya İki Hibrid yönteminin prensibi.....	10
Şekil 2. Y2H deneylerinde kullanılan maya plazmidlerinin haritaları	10
Şekil 3. hADA2A proteinini kodlayan gen bölgesinin PCR amplifikasyonu	16
Şekil 4. hADA2B ve hGCN5 proteinlerini kodlayan gen bölgelerinin PCR yöntemi ile amplifikasyonu.	17
Şekil 5. pGBKT7-hADA2A/ -hADA2B ve -hGCN5 klonlarının restriksiyonel kesim analizleri	20
Şekil 6. hADA2A, hADA2B ve hGCN5 proteinlerinin maya içerisinde ekspresyonu.	21
Şekil 7. Mayada hADA2A, hADA2B ve hGCN5 proteinlerinin toksisite testlerine ait örnek plate görüntüleri.	23
Şekil 8. hADA2A ve hGCN5 için mayada oto-aktivasyon deneyleri sonuçlarına ait örnek plate görüntüleri.	24
Şekil 9. hADA2B proteini için mayada oto-aktivasyon deneyleri sonuçlarına ait örnek plate görüntüleri..	25
Şekil 10. hADA2B proteininin mayada oto-aktivasyon özelliğinin ikinci bir raportör gen içeren seçici besi ortamında analizine ilişkin örnek plate görüntüleri	26
Şekil 11. Maya hücrelerinde hADA2A, hADA2B ve hGCN5 proteinlerinin aday partnerler (PPP1R7, PPP2R5D, PHF21A, AATF) ile etkileşimlerinin Y2H ile test edilmesi sonucunda elde edilen örnek plate görüntüleri..	27
Şekil 12. Etkileşimlerin mayada β -Gal enzim aktivitesi ölçümleri ile kantitatif olarak değerlendirilmesi sonucu elde edilen aktivite grafikleri.	29
Şekil 13. hADA2A, hADA2B ve hGCN5 protein kodlayan gen dizilerinin N- terminallerinde delesyonel analizler için yapılan PCR amplifikasyonlarına ait reaksiyon ürünlerinin agaroz jel elektrofozeri görüntüleri.	30
Şekil 14. N-Terminal bölgesinde farklı delesyonlar içeren klonlarının restriksiyonel analizlerine ait temsili agaroz jel görüntüleri	32
Şekil 15. C-terminal bölgelerinde farklı delesyonlar taşıyan hADA2A, hADA2B ve hGCN5 klonlarının restriksiyonel kesim analizlerine ait temsili agaroz jel görüntüleri..	34

Şekil 16. Delesyonlu hADA2A, hADA2B ve hGCN5 proteinlerinin mayada ekspresyon analizlerine ilişkin temsili western blot görüntüleri.....	35
Şekil 17. Delesyolu hADA2A, hADA2B ve hGCN5 proteinlerinin mayada oto-aktivasyon testlerine ait örnek plate görüntüleri.....	37
Şekil 18. hADA2A proteininin, partner proteinler ile etkileşimlerinde önemli olan gen bölgeleri.	39
Şekil 19. hADA2B proteininin, partner proteinler ile etkileşimlerinde önemli olan gen bölgeleri.	39
Şekil 20. hGCN5 proteininin, partner proteinler ile etkileşimlerinde önemli olan gen bölgeleri ..	39
Şekil 21. pECFP-C2/ hADA2A, /hADA2B ve hGCN5 rekombinant plazmidlerinin eldesi ve kontrolleri için uygulanan restriksiyonel kesim analizlerine ait örnek agaroz jel görüntüsü.	42
Şekil 22. Aday partnerların hADA2A, hADA2B ve hGCN5 proteinlerinin transkripsiyonel aktivasyonları üzerindeki etkileri.....	43
Şekil 23. hADA2A, hADA2B ve hGCN5'in aday partnerların proteinlerin transkripsiyonel aktivasyonları üzerindeki etkileri.....	45
Şekil 24. U2OS hücrelerinde hADA2A, hADA2B ve hGCN5 proteinleri ile etkileşim partnerlerinin hücresel lokalizasyonları.....	46
Şekil 25. U2OS hücrelerinde hADA2A'nın aday etkileşim partnerleri ile eş-lokalizasyonları.....	47
Şekil 26. U2OS hücrelerinde hADA2B'nin aday etkileşim partnerleri ile eş-lokalizasyonları.....	48
Şekil 27. U2OS hücrelerinde hGCN5'in aday etkileşim partnerleri ile eş-lokalizasyonları.....	49

TABLO DİZİNİ

Tablo 1. Mayada toksisite testleri.	22
Tablo 2. Mayada oto-aktivasyon testleri.	24

ÖZET

Protein kodlayan genlerin çoğu aydınlatılmış olsa da proteinler arasındaki etkileşimler henüz bütünüyle tanımlanamamıştır. Moleküler etkileşimler oldukça kompleks bir yapılanma göstermekte ve memeli hücrelerinde gözlenen patolojik durumların çoğu bu etkileşimlerin bozulması veya değişiminden kaynaklanmaktadır. Bu nedenle protein-protein, protein-DNA, protein-RNA, reseptör-ligand gibi etkileşimlerin analizi hücredeki moleküler organizasyonun anlaşılması bakımından önemlidir.

Ökaryotik DNA histon proteinleri ile etkileşerek kromatin yapısı şeklinde sıkıca paketlenmiş olarak depolanmaktadır. Bu yapı, genetik bilginin ekspresyonu ve transkripsiyonel regülasyonu üzerinde genellikle baskılayıcı etkidir. Adaptör proteinler adı verilen bir grup protein, kromatinin bu yapısını modifiye ederek transkripsiyon faktörlerinin promotora bağlanmalarına ve/veya dizi-spesifik aktivatörler ile transkripsiyon mekanizması arasında fiziksel bir etkileşim sağlanmasına yardımcı olarak transkripsiyonun regülasyonunda önemli rol oynamaktadırlar. Bu mekanizma içerisinde yer alan Alteration/Deficiency in Activation (ADA) transkripsiyonel ko-aktivatör kompleksleri temel olarak Alteration/Deficiency in ADA3, ADA2 ve General Control Non-derepressed 5 (GCN5) proteinlerinden oluşmakta ve aktivasyon bölgeleri ile transkripsiyonel aktivatörler arasında etkileşim köprüleri kurarak gen ekspresyonunun düzenlenmesinde önemli fonksiyonlar üstlenmektedirler. Ekibimizin daha önceki çalışmalarında maya 2 hibrit (Yeast 2 Hybrid; Y2H) yöntemi ile insan fetal beyin cDNA kütüphanesini taranarak, insan ADA3 (hADA3) proteininin etkileşim gösterdiği dört yeni protein partneri rapor edilmiştir. Bu partnerlerin iki tanesi, iki farklı Serin-Treonin (Ser-Thr) fosfataz sınıfı regülatörlerden PPP1R7 ve PPP2R5D, diğer ikisi ise transkripsiyonel regülatörler olan PHF21A ve AATF proteinleridir. Bu projemizde ise tanımlanan bu yeni etkileşim partnerlerinin, hADA3 ile aynı Histon Asetil Transferaz (Histone Acetyl Transferase; HAT) komplekslerinde yer alan ve hADA3 ile etkileşimleri bilinen hADA2 ve hGCN5 proteinleri ile etkileşimlerinin aydınlatılması hedeflenmiştir. Konvansiyonel yöntemlerden farklı olarak *in vivo* sonuçlar vermesi ile öne çıkan bir yöntem olan Y2H yöntemi ile gerçekleştirdiğimiz bu çalışmamız kapsamında hADA2 ve hGCN5 proteinlerinin etkileşim bölgeleri belirlenmiş ve aday proteinler ile etkileşimleri biyolojik/biyokimyasal deneylerle verifiye edilmiştir.

Bulgularımız, ADA-içeren protein komplekslerinin düzenlediği yeni mekanizmaların tanımlanması ve RNA polimeraz II-aracılı transkripsiyon mekanizmasında görev alan transkripsiyon komplekslerinin karakterizasyonu konusunda yeni bilgiler kazandırabilecek

niteliktedir.

Anahtar Kelimeler: ADA3, ADA2, GCN5, transkripsiyonel regülasyon, maya hibrit teknolojisi, protein-protein etkileşimleri.

ABSTRACT

Although majority of the genes encoding proteins are already identified, molecular interactions between the proteins are yet to be characterized. Protein-protein interactions display a complex network and most of the pathological conditions of mammalian cells are resulted from dis-functioning or variations of these interactions. Therefore, a comprehensive analysis of protein-protein, protein-RNA, receptor-ligand interactions is important for understanding of molecular organization in the cells.

Eukaryotic DNAs are stored in the form of chromatin packages through extensive interactions with histone proteins. This structure is generally suppressive on gene expression and regulation. A group of proteins, called adaptors, contribute to transcriptional regulation by modifying chromatin structure to mediate access of transcriptional factors to promoter regions and/or providing physical interactions between sequence-specific activators and transcription machinery. Alteration/Deficiency in Activation (ADA), a transcriptional co-activator complex within this mechanism, is comprised of ADA3, ADA2 and General Control Non-depressed 5 (GCN5) proteins have important roles in regulation of gene expression through bridges between their activation regions and transcriptional activators. We recently reported four new partners of hADA3 by screening a human fetal brain cDNA library using yeast 2 hybrid (Y2H) technology. Two of these partners were Serine-Threonine (Ser-Thr) phosphatases, PPP1R7 and PPP2R5D while the other two were transcriptional regulators, PHF21A and AATF. Our proposal aims to identify whether the other components of hADA3 containing-Histon Acetyl Transferase (HAT) complexes, hADA2 and hGCN5 known to associate with hADA3 also interact with these proteins. Our study covered the interaction regions of hADA2 and hGCN5 and biological/biochemical verification of their interactions with the candidates through Y2H that is superior to the conventional methods due to its *in vivo* nature.

Completion of our project will provide new informations about new pathways regulated by ADA-containing protein complexes as well as characterization of transcriptional complexes in RNA polymerase II (RNA pol II)-mediated transcription mechanisms. .

Keywords: ADA3, ADA2, GCN5, transcriptional regulation, yeast hybrid technology, protein-protein interactions.

1. GİRİŞ

Memelilerde transkripsiyonel mekanizmanın kompleksliği bilinen bir gerçektir. Bu komplekslik büyük ölçüde ökaryotik organizmalarda DNA moleküllerinin histon proteinleri ile etkileşerek kromatin yapısı şeklinde paketlenmiş olmasından kaynaklanır. Paketlenmiş bu yapı genetik bilginin ekspresyonu üzerinde genellikle baskılayıcı bir etkiye sahiptir. Hücre içerisinde, kromatin yeniden düzenlenmeleri ve kromatin modifikasyon aktiviteleri ile kromatinin bu baskılanmış yapısı değiştirilerek, RNA Polimeraz II (RNA Pol II) transkripsiyonel mekanizmasının bileşenleri tarafından erişilebilir ve tanımlanabilir bir konformasyon kazanabilmektedir. *In vivo* ve *in vitro* çalışmalar kromatinin temel blokları olan nükleozom bileşenlerinin, DNA bağlanma bölgeleri için transkripsiyon faktörleri ile rekabet ederek transkripsiyonu düzenledikleri ve bu işlemin DNA-protein etkileşimleri dışında çok sayıda protein-protein etkileşimleri de gerektirdiğini göstermiştir.

Transkripsiyonel aktivasyon için genellikle adaptör proteinlere gereksinim vardır; bu proteinlerin nükleozomları asetilleyerek ve destabilize ederek promotor bölgede kromatin yapısının açılmasına yardımcı oldukları düşünülmektedir. Projemizin konusu olan hADA3, hADA2A, hADA2B proteinleri transkripsiyonel adaptör proteinleri olup nükleozomal histon asetilasyonu için gerekli, farklı büyüklüklerde (0.2, 0.9 ve 1.9 MDa) HAT komplekslerinin bir bileşenidirler. Bu komplekslerin ADA proteinleri dışında çok sayıda farklı fonksiyona sahip olan diğer proteinleri ve histon asetil transferaz aktivitesine sahip olan GCN5 proteinlerini içeren çok altbirimli protein kompleksleridirler. Bazı komplekslerde farklı TATA-Bağlanma Proteini (TBP)-ilgili Faktörleri (TBP Associated Factors; TAFs) ve Spt proteinleri de yer almaktadır. *In vivo* ve *in vitro* çalışmalar ADA2, ADA3 ve GCN5'in transkripsiyonel aktivasyon bölgeleri ile doğrudan etkileşebilen protein komplekslerinin birer alt birimi olduklarını göstermiştir. ADA proteinlerinin, potansiyel olarak farklı transkripsiyonel regülatörler ile etkileşebildikleri için kromatin modifikasyonlarında etkili olan kompleksler içerisinde fonksiyon göstererek gen ekspresyonu üzerinde etkili oldukları öngörülmektedir.

Mayada GCN5 proteininin ADA2 ve ADA3 adaptör proteinleri ile birlikte heterotrimer yapıları halinde birçok HAT kompleksinin (SAGA, ADA, SALSA, SLIK) asetil transferaz katalitik domainini oluşturdukları bilinmektedir. Son yıllardaki bulgular, memeli HAT komplekslerinde de benzer bir organizasyonun olduğunu göstermiştir. Ancak metazoalarda iki farklı ADA2 adaptör proteinlerinin (ADA2A ve ADA2B) birbirlerinden fonksiyon olarak çok farklı olan iki farklı HAT kompleksinin, sırasıyla ADA Two A Containing (ATAC) ve Spt-Ada-Gcn5-Acetyltransferase

(SAGA) komplekslerinin, alt birimleri olduğu rapor edilmiştir. hADA2A'nın hGCN5 ile etkileşerek aktivitesini düzenlediği, hADA2B'nin ise nükleozomal histonların hGCN5 tarafından asetilasyonunu üzerinde etkili olduğu belirlenmiştir. Ayrıca hADA2B'nin, UV hasarı durumunda p53-bağımlı promotorların aktivasyonu için gerekli olduğu rapor edilmiş, ancak hADA2A'nın benzer aktivitesinin olmadığı belirlenmiştir. Bu bulgular, esasen projemize iki farklı ADA2 adaptör proteinin de dahil edilmesinin temel nedenidir.

Projemize temel olan hareket noktamız, gen ekspresyonunun DNA-bağlanma proteinleri, temel transkripsiyon faktörleri ve regülatör fonksiyona sahip olan adaptör/ko-aktivatör proteinleri gibi çok sayıda moleküler etkileşimleri gerektirmesidir. Bu nedenle, transkripsiyonel regülasyon sürecinde DNA-protein etkileşimlerinin yanında çok-altbirimli protein komplekslerinin kendi bileşenleri ve diğer kompleksler arasındaki protein-protein etkileşimlerinin de yer alması beklenir. Hipotezimiz; ekibimiz daha önce hADA3 ile etkileşimlerini belirlediği yeni partnerlerin, hADA3 ile aynı kompleks içerisinde yer alan ve hADA3 ile etkileşimleri daha önceden rapor edilen hADA2 ve insan GCN5 (human GCN5; hGCN5) proteinleri ile fonksiyonları gereği etkileşebilecekleri olmuştur. Bu amaçla aday etkileşimler ilk olarak, memeli sistemlerinin araştırılmasında ideal model organizmalar olan maya hücrelerini kullanarak *in vivo* protein-protein etkileşimlerini belirleme özelliği ile klasik yöntemlerden üstünlüğü olan Y2H teknolojisi ile test edilmiştir. Sonuçlarımız hADA2A, hADA2B ve hGCN5 proteinlerinin aday partnerler PPP1R7, PPP2R5D, PHF21A ve AATF ile farklı derecelerde etkileştiklerini göstermektedir. Y2H bulgularımız, özellikle hADA2B ve hGCN5'in dört aday proteinler ile etkileşimlerinin daha önce ekibimizce rapor edilen hADA3 etkileşimlerine benzer karakterde olduğunu göstermiştir. hADA2A'nın ise aday proteinler ile etkileşimlerin 3-aminotriazole (3-AT) içeren plâtelere elimine edildiği, dolayısıyla hADA2A etkileşimlerinin nispeten daha zayıf olduğu belirlenmiştir. Etkileşimlerin hADA2A ve hADA2B proteinleri için farklı olmaları bu proteinlerin içinde yer aldıkları multiprotein komplekslerinin birbirlerinden fonksiyon olarak farklı oldukları bulgularını doğrular niteliktedir. Mayada belirlenen etkileşimler memeli sistemlerde farklı biyolojik/biyokimyasal deneyler ile de verifiye edilmiştir. Ayrıca yine projemiz kapsamında etkileşimlere aracılık eden özgün protein domainlerinin ve motiflerinin aydınlatılması da bu etkileşimlerin aktivitelerinin kontrolü ve regülasyonun açısından da önemli bulgulardır.

Bulgularımız literatürde önemli bir eksiklikliği doldurmaya aday niteliktedir. Çünkü transkripsiyonel regülatörlerin açık veya kapalı kromatin yapısına bağlı mekanizmaları henüz yeterince aydınlatılamamıştır. Son yıllarda `Interactomics` çalışmalarının vazgeçilmez bir aracı olan bu yaklaşım yeni etkileşimlerin tanımlanmasına olanak sağlayacağı gibi, bu yeni

etkileşimler epigenetik regülasyonda oldukça önemli olan ADA proteinlerinin ve de bu proteinlerin içerisinde yer aldıkları fonksiyonel olarak farklı HAT komplekslerinin hücresel süreçlerin regülasyonundaki özgün rollerinin aydınlatılmasına önemli katkılar sağlayacaktır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Ökaryotik Organizmalarda Kromatinin Yapısı ve Gen Ekspresyonunun Regülasyonundaki Önemi

Genetik materyali DNA olan bütün canlılar bu molekülü hücre içerisinde küçük bir yüzey/hacim oranında koruma zorunluluğu ile karşı karşıyadırlar. DNA'nın hücrede paketlenme işlemi oldukça komplekstir, çünkü öncelikle DNA molekülünün fonksiyonel olması, her hücre döngüsünde sadece bir kez ve bütün olarak replike edilmesi, oluşan iki DNA kopyasının kardeş hücrelere doğru bir şekilde ayrılması, DNA tarafından kodlanan genetik bilginin özgün bir hücrede ve gelişimin belirli bir evresinde eksprese edilmesi gerekmektedir. Ökaryotik organizmalarda DNA, histon proteinleri ile etkileşerek kromatin yapısı şeklinde paketlenmiştir. Hücre içerisinde bu kromatin yapısı; 'kromatin yeniden modellenmesi' (Chromatin Remodelling) ve 'kromatin modifikasyonu' (Chromatin Modifying) aktiviteleri sonucunda, DNA'nın paketlenmesinde değişiklikler meydana getirebilen proteinler ile düzenlenmektedir (Brownell ve Allis, 1996; Lee ve Workman, 2007). Bu modifikasyonlar sonucunda kromatin yapısı değişmekte ve bu dinamik denge transkripsiyon, replikasyon, DNA tamiri ve diğer DNA-bağımlı hücresel süreçlerde proteinlerin nükleozom yapısında paketlenmiş olan DNA ile etkileşimlerini kolaylaştırmaktadır.

2.2 Histon Modifikasyonlarının Kromatin Yeniden Düzenlenmelerindeki Fonksiyonu

Kromatinin yapısal özellikleri kısmen nükleozomal histon proteinlerindeki post-translasyonel modifikasyonlar aracılığıyla kontrol edilebilmektedir. Bu kovalent modifikasyonlar genellikle 'ko-regülatör kompleksler' olarak tanımlanan, multi-protein komplekslerinin bir parçası olan enzimler tarafından düzenlenmektedir (Wang vd., 2008). Bu kompleksler, DNA-bağlanma düzenleyicileri aracılığıyla ve/veya genetik belirteçler yardımıyla hedeflenmektedirler (Kouzarides, 2007; Wang vd., 2008). Nükleozomal histon proteinlerinde gerçekleşen post-translasyonel modifikasyonların en önemlilerinden birisi asetilasyondur (Kouzarides, 2007). Histonların asetilasyon oranı birbirleri ile koordine olarak çalışan ancak birbirinin tersi fonksiyona sahip olan HAT ve Histon Deasetilaz Kompleksleri (Histone Deacetylase Complexes; HDAC) multi-protein kompleksleri tarafından kontrol edilmektedir. Bu kompleksler DNA replikasyonu, transkripsiyon ve/veya hücre bölünmesi gibi önemli hücresel işlemlerin regülasyonunda rol almaktadırlar (Orpinell vd., 2010).

Bir genin transkripsiyonel olarak aktif hale gelebilmesi süreci oldukça kompleks ve dinamik bir süreçtir. Bu süreç yine DNA-bağlanma proteinleri, temel transkripsiyon faktörleri ve regülatör fonksiyona sahip olan adaptör/ko-aktivatör proteinleri gibi çok sayıda proteine bağımlıdır. Adaptör proteinlerin fonksiyonuna ilişkin iki model mekanizma bulunmaktadır; bu model mekanizmalara göre adaptör proteinler, kromatinin baskılanmış yapısını enzimatik olarak değiştirerek temel transkripsiyon faktörlerinin promotor bölgeye bağlanmalarını sağlamakta ve/veya dizi-spesifik aktivatörler ile temel transkripsiyon mekanizması arasında fiziksel bir etkileşim sağlanmasına yardımcı olmaktadır (Barlev vd., 2003).

2.3 HAT Komplekslerinin Bir Bileşeni Olarak ADA Proteinlerinin Transkripsiyonel Regülasyondaki Önemi

GCN5 N-asetiltransferaz (GCN5 N-acetyltransferase; GNAT) protein ailesinin temel elemanlarından birisi olan GCN5, transkripsiyon ile ilişkili olduğu tanımlanan ilk HAT olması özelliği ile öne çıkan, birçok transkripsiyonel ko-aktivatör komplekslerinin temel alt-birimidir (Brownell vd., 1996; Lee ve Workman, 2007). GCN5'in transkripsiyonel regülasyonun dışında, hücre döngüsünün düzenlenmesinde de görev aldığı belirlenmiştir (Vernarecci vd., 2008; Paolinelli vd., 2009). Metazoolarda en az iki GCN5 içeren HAT kompleksi tanımlanmıştır; bu kompleksler SAGA ve ATAC multi-protein kompleksleridir (Nagy vd., 2010). Mayalarda ise ADA ve SAGA komplekslerinin yer aldığı bilinmektedir (Candau ve Berger, 1996; Lee ve Workman, 2007). Bu kompleksler çok sayıda ortak protein içermekte ancak molekül büyüklükleri, alt-birim kompozisyonları ve substrat özgünlükleri bakımından farklılıklar göstermektedirler (Lee ve Workman, 2007; Ciurciu vd., 2008; Suganuma vd., 2008; Nagy vd., 2010). SAGA ve ATAC komplekslerinde, GCN5 ve iki adaptör protein ADA2B/ADA3 (SAGA) veya ADA2A/ADA3 (ATAC) bu komplekslerin katalitik merkezini oluşturmaktadır (Grant vd., 1998; Nagy ve Tora, 2007; Suganuma vd., 2008; Wang vd., 2008; Gamper vd., 2009; Guelman vd., 2009). Bu moleküler yapılardan mayalarda bulunan SAGA kompleksinin moleküler büyüklüğü 1.8 MDa'dur ve çoğunlukla nükleozomal histonlardan histon H3 ve H2B'nin asetilasyonunda, kromatin yeniden düzenlenmeleri, transkripsiyon, mRNA'nın çekirdekten sitoplazmaya taşınmasında ve nükleotid eksizyon tamir mekanizmasında rol alan ko-aktivatörler olarak bilinmektedir (Candau ve Berger, 1996; Baker ve Grant, 2007).

ADA kompleksi ve ADA-proteinlerini içeren kompleksler ile günümüze kadar elde edilen bulgular sınırlıdır ve hücrede rol aldıkları moleküler süreçler tam olarak aydınlatılamamıştır. Projemizdeki yaklaşımımız hADA3, hADA2 ve hGCN5 proteinlerinin aynı regülatör kompleksler içerisinde yer almaları bulgularından yola çıkılarak şekillenmiştir. Bu üç proteinin birbirleri ile etkileşim gösterdikleri literatürde rapor edilmiştir (Horiuchi vd., 1995). hADA3 proteininin, iki tanesi transkripsiyonel regülatör ve iki tanesi Ser-Thr fosfataz olmak üzere dört yeni protein partneri ile etkileştiği ise ekibimiz tarafından belirlenmiştir (Zencir vd., 2013a). Ancak bulgularımızın ADA3 içeren komplekslere özgünlüğünü aydınlatmak amacıyla, bu etkileşim ağında yer alan diğer proteinlerden hADA2 ve hGCN5 proteinlerinin gerekliliğine dair henüz bir çalışma yapılmamıştır. Yapılan ilk çalışmalar maya ADA2'nin (Ada2), maya GCN5 (Gcn5) ve maya ADA3 (Ada3) proteinleri ile etkileşim içerisinde olduklarını, ADA2'nin GCN5 proteininin HAT aktivitesinin regülasyonunda rol alırken ADA3'ün ise nükleozomal HAT aktivitesi ve lizin özgünlüğü için önemli olduğunu göstermiştir (Horiuchi vd., 1995; Candau ve Berger, 1996; Pollard ve Peterson, 1997; Saleh vd., 1997; Grau vd., 2008). ADA2 geni evrimsel olarak korunmuş olup, fare ve insan homologları dikkate değer bir homoloji göstermektedir. Bazı komplekslerde ADA2 adaptör proteininin doğrudan GCN5 proteininin HAT aktivitesinin etkili hale getirilmesinden sorumlu olduğu tartışılmaktadır. ADA2, ADA3 ve GCN5 proteinlerinin transkripsiyonel aktivasyon bölgeleri ile doğrudan etkileşebilen protein komplekslerinin birer alt birimi olduklarından hareketle, ADA-benzeri proteinlerin moleküler etkileşimlerinin belirlenmesi kromatin düzenleyici komplekslerin fonksiyonları ve mekanizmalarının aydınlatılmasında anahtar role sahip olabilecektir. Bu etkileşim ağının aydınlatılması ayrıca, ADA-içeren protein komplekslerinin düzenlediği yeni yolların tanımlanmasına da yardımcı olacaktır. Şu halde projemiz, günümüzde henüz aydınlatılamamış olan HAT ve HDAC kompleksleri arasındaki dinamik ilişkilerin belirlenmesi ve hedeflenmesi kapsamında ele alındığında gen ekspresyonunun düzenlenmesi, epigenetik regülasyon ve tümör oluşumu konuları için önem taşımaktadır.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1 Projemizin Gerçekleştirilmesi için Seçtiğimiz Metodolojinin Tanıtımı

Çalışma yöntemimiz Y2H teknolojisi olarak seçilmiştir. Çünkü mayalar memeli sistemlerinin araştırılmasında ideal model organizmalardır. Moleküler biyolojide mayaların kullanılmasının en önemli avantajları; kolay elde edilebilmeleri, maliyetlerinin düşük, transformasyon verimliliklerinin yüksek olması ve ayrıntılı karakterizasyonları yapılmış besin belirteçleri ve raportör genlerinin bulunmasıdır (Topcu ve Borden, 2000; Topcu vd., 2005; Zencir vd., 2011). Bu metodoloji protein-protein etkileşimlerinin *in vivo* olarak belirlenmesine olanak sağlaması bakımından konvansiyonel biyokimyasal yöntemlere göre önemli avantajlara sahiptir. Dahası bu yaklaşım protein-protein etkileşimlerinin yanında maya 1 hibrit (Yeast 1 Hybrid; Y1H), maya 3 hibrit (Yeast 3 Hybrid; Y3H) gibi farklı uygulamalar sayesinde sırasıyla DNA-protein ve reseptör-ligand etkileşimleri gibi çok bileşenli komplekslerin aydınlatılmasına da olanak sağlamaktadır (Topcu ve Borden, 2000).

Y2H metodunun temeli, birçok transkripsiyon faktörünün birbirlerinden fiziksel olarak ayrılabilen iki bölgeden oluşması özelliğine dayanmaktadır; bunlar bölge-spesifik DNA-Bağlanma bölgesi (Binding Domain; BD) ve transkripsiyon aktivasyon bölgesidir (Activation Domain; AD) (Fields ve Song, 1989; Gietz ve Woods, 1994; Topcu vd., 1999; Topcu ve Borden, 2000). Bu bölgelerden BD, spesifik promotor dizilerinde (Upstream Activating Sequences; UAS) transkripsiyon faktörlerinin hedeflenmesinde görev alırken, AD transkripsiyon kompleksinin oluşumuna yardımcı olmaktadır. Bu bölgelerden herhangi birisi, diğerinden bağımsız olarak transkripsiyon mekanizmasını aktive edebilme özelliğine sahip değildir ancak füzyon proteinlerinin etkileşimleri ile yeniden yapılandırılan aktif transkripsiyon faktörü bir veya daha fazla raportör genin ekspresyonunu başlatabilir. Bu iki bölgenin transkripsiyonu aktive edebilmeleri için aynı polipeptid içerisinde olmaları zorunlu değildir. Bu özellikten yararlanarak projemizde hADA2A, hADA2B ve hGCN5 proteinlerini kodlayan cDNA dizisine sahip olan BD plazmidleri oluşturularak ("bait" füzyon), AD plazmidine klonlanmış olan aday etkileşim partnerlerinin etkileşimleri Y2H yöntemi ile analiz edilmiştir.

İnsanlarda ADA2 proteininin ADA2A ve ADA2B olarak adlandırılan iki farklı izoformu bulunmaktadır. Bu izoformlardan hADA2A'nın protein kodlayan gen dizisi 1332 baz çifti (base pair; bp) ve hADA2B proteinini kodlayan gen dizisi ise 1263 bp uzunluğundadır. hGCN5 proteinini kodlayan dizi ise 2514 bp'dir. hADA2'nin bu farklı varyantlarının farklı multi-protein

komplekslerinde yer aldığı bilinmektedir. Buradan hareketle yaklaşımımız, her iki varyantın etkileşimlerinin belirlenmesinin, bu varyantların yer aldığı farklı protein komplekslerinin düzenledikleri yeni yolların aydınlatılmasına da katkıda bulunacağı şeklindedir.

Rekombinant plazmidlerin eldesini takiben, *S. cerevisiae* AH109 maya suşu bait-içeren pGBKT7 BD plazmidi ve prey- içeren pGADT7-Rec AD plazmidleri ile sıralı olarak transforme edilerek ve etkileşimler transformantların konak maya hücresinin taşıdığı raportör genler bakımından seçici besi ortamlarına transfer edilmiş ve bu seçici besi ortamındaki büyüme özelliklerine göre değerlendirilmiştir. Etkileşimler mayada Y2H yöntemi dışında β -galaktosidaz (β -galactosidase; β -gal) enzim aktivitesi ölçümleri ile kantitatif olarak da test edilmiştir.

Etkileşimlerin belirlenmesinin ardından etkileşimlerden sorumlu bölge/bölgelerin tanımlanması amacıyla delesyonel analizler ile hADA2 ve hGCN5 proteinlerini kodlayan cDNA dizilerinde anlamlı modifikasyonlar oluşturularak yeni cDNA dizileri aynı maya BD plazmidine klonlanılmış, delesyonlu bait-içeren BD ile aday etkileşimlerin testiyle protein-protein etkileşimlerinde önemli olan gen bölgeleri tanımlanmıştır.

Çalışmalarımızın son aşamasında mayada belirlenen protein-protein etkileşimleri raportör gen analizleri ve konfokal mikroskopisi analizleri ile memeli sistemlerde de verifiye edilmiştir. Projemizde takip ettiğimiz deneysel aşamaların detayları aşağıda sunulmuştur;

3.2 hADA2A, hADA2B ve hGCN5 Proteinlerini Kodlayan Gen Bölgelerinin Maya Plazmidine Klonlanması

hADA2A, *hADA2B* ve *hGCN5* genleri nükleotid dizileri bilinen genler olup protein kodlayan gen bölgeleri (Open Reading Frame; ORF) sırasıyla 1332 bp, 1263 bp ve 2514 bp büyüklüğündedir. Uluslararası Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (National Center for Biotechnology Information; NCBI) veri tabanı yardımıyla yaptığımız biyoinformatik analizler ile *hADA2A*, *hADA2B* ve *hGCN5* proteinlerini kodlayan gen bölgelerine ait diziler belirlenerek bu gen bölgelerine özgün primerler tasarlanmış ve ilgilendiğimiz gen bölgeleri Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction; PCR) ile çoğaltılmıştır. PCR ürünlerinin kontrolünün ardından gerekli restriksiyonel kesimleri takiben *hADA2A*, *hADA2B* ve *hGCN5* genlerinin protein kodlayan nükleotid dizilerinin Y2H yönteminin gereği olarak maya BD plazmidi olan pGBKT7 plazmidine klonlanmıştır. Sonrasında *Escherichia coli* (*E. coli*) DH5- α kimyasal kompetan hücrelerin aday klonlar ile transforme edilmiş, antibiyotik içeren seçici besi ortamında büyüyen kolonilerden üç farklı koloni seçilerek plazmid DNA izolasyonu yapılmış ve plazmid DNA'lar

restriksiyonel analizler ile kontrol edilmiştir. İlgilenilen hedef DNA molekülünü içerdiği belirlenen plazmid DNA'larının, herhangi bir mutasyon içerip içermediklerini belirlemek amacıyla DNA'lar dizi analizine gönderilmiştir. Dizi analizi sonuçları analiz edilerek mutasyon içermediği belirlenen klonlar seçilmiş ve daha sonraki deneylere bu klonlar ile devam edilmiştir.

3.3 Mayada hADA2A, hADA2B ve hGCN5 Proteinlerinin Ekspresyonu

Y2H yöntemi plazmidin konakçı maya hücre içerisinde ekspresyonunu gerektirmektedir. Bu nedenle *S. cerevisiae* AH109 maya suşu pGBKT7- hADA2A, -hADA2B ve -hGCN5 klonları ile transforme edilmiş ve TCA çöktürmesi yöntemi ile proteinler ekstrakte edilmiştir. Elde edilen protein örnekleri SDS-PAGE jelinde kontrol edilmiştir. Ardından proteinler PVDF membrana transfer edilerek western blot yöntemi ile anti-Myc mouse monoklonal antikor kullanılarak proteinlerin ekspresyonları analiz edilmiştir (Sambrook vd., 1989; Topcu vd., 1999).

3.4 Mayada hADA2A, hADA2B ve hGCN5 Proteinlerinin Toksikite Testleri

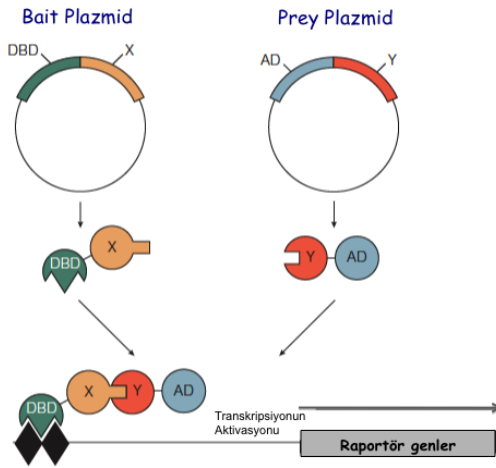
Mayada hADA2A, hADA2B ve hGCN5 proteinlerinin ekspresyon analizlerini takiben *hADA2A*, *hADA2B* ve *hGCN5* genlerinin maya içerisinde ekspresyonu sonucu sentezlenen proteinlerin mayada toksik etkisi olup olmadığını belirlemek amacıyla toksisite testleri yapılmıştır. Bu amaçla AH109 maya suşu boş vektör (pGBKT7) ve mayada eksprese edildikleri doğrulanmış pGBKT7-hADA2A, -hADA2B ve -hGCN5 rekombinant plazmidleri ile ayrı ayrı transforme edilmiştir. pGBKT7 plazmidini Triptofan (*TRP*) besin belirteci içerdiği için transformantlar SD/-Trp seçici besi ortamına transfer edilerek 30°C'de 2-3 gün inkübasyonu takiben koloni sayıları ve koloni morfolojileri bakımından fenotipik olarak karşılaştırılmıştır.

3.5 Mayada hADA2A, hADA2B ve hGCN5 Proteinlerinin Oto-aktivasyon Testleri

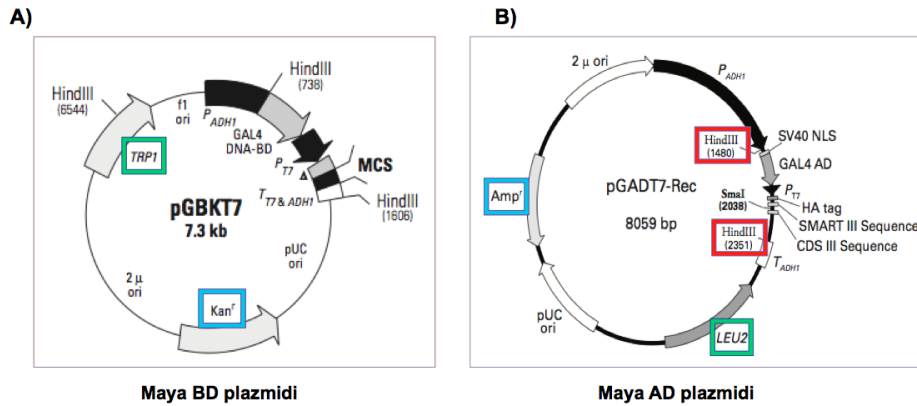
Y2H ile etkileşimlerin analizi öncesinde hADA2A, hADA2B ve hGCN5 proteinlerinin herhangi bir etkileşim partnerine gerek duymaksızın AH109 maya suşundaki raportör genleri kendiliğinden aktive edebilme (oto-aktivasyon) özelliğinin bulunup bulunmadığını belirlemek üzere bait vektörü içeren AH109 suşu SD/-Ade/-His/-Trp/X- α -Gal ve SD/-Trp/X- α -Gal seçici besi ortamlarına transfer edilmiş ve bu seçici besi ortamlarındaki koloni gelişimleri karşılaştırılarak değerlendirilmeler yapılmıştır.

3.6 Protein-Protein Etkileşimlerinin Y2H Yöntemi ile Belirlenmesi

Projemizin gerçekleştirilmesi için seçtiğimiz Y2H yönteminin ayrıntılı tanıtımı Bölüm 3.1’de, yöntemin ilkesi ise Şekil 1’de verilmiştir. Çalışmamızda hADA2A, hADA2B ve hGCN5 proteinlerini kodlayan cDNA dizisine sahip olan BD plazmidlerinin oluşturularak, AD plazmidine klonlanmış olan aday etkileşim partnerleri ile etkileşimleri analiz edilmiştir. Y2H yönteminde kullanılan BD ve AD plazmidlerinin haritaları, içerdikleri antibiyotik direnç genleri ve besin belirteçleri sırasıyla Şekil 2. A ve Şekil 2. B’de sunulduğu gibidir.



Şekil 1. Maya İki Hibrid yönteminin prensibi; iki farklı proteinden birisi Gal4 DNA-BD ve diğeri Gal4 transkripsiyonel AD vektörlerinde ayrı ayrı eksprese edilmektedir. Sadece bu iki proteinin etkileşim göstermesi durumunda konak mayadaki raportör genler transkripsiyonel olarak aktif olurlar.



Şekil 2. Y2H deneylerinde kullanılan maya plazmidlerinin haritaları; (A) Maya pGBKT7-BD ve (B) Maya pGADT7-Rec AD plazmidlerinin haritaları.

Y2H ile etkileşimlerin analizi amacıyla AH109 maya suşu pGBKT7-hADA2A, -hADA2B, -hGCN5 BD plazmidleri ve aday protein partnerlerini taşıyan pGADT7-Rec plazmidleri ile eş-transforme edilmiştir. Etkileşimlerin değerlendirmeleri AH109 maya suşunun taşıdığı raportör genlerden yoksun, seçici besi ortamlarında koloni gelişimlerinin takibi ile gerçekleştirilmiştir. Maya AH109 suşu farklı GAL4 sorumluluğunda olan UAS ve TATA kutularının kontrolü altında olan 4 farklı raportör gen içermektedir. Bu genler;

HIS3: AH109 histidin (*HIS*) sentezini gerçekleştirememektedir ve bu nedenle temel aminoasitleri içermeyen seçici besi ortamında büyüyemezler. Ancak bait ve prey proteinleri etkileştiği durumda GAL4 sorumluluğunda olan *His3* ekspresyonu gerçekleşebileceği için hücreler His sentezleyebilecek ve His içermeyen seçici besi ortamında büyüyebileceklerdir.

ADE2: AH109 ayrıca adenin (*ADE*) içermeyen seçici besi ortamında büyüyebilme yeteneğinde değildirler. Ancak iki protein etkileştiği durumda *Ade2* geninin ekspresyonu aktive edileceği için hücreler Ade içermeyen besi ortamında büyüyebilirler.

MEL1: *MEL1*, birçok maya suşunda doğal olarak sentezlenen bir enzim olan α -galaktosidaz enzimini kodlayan bir gendir. İki hibrit etkileşiminin bir sonucu olarak mayada α -galaktosidaz geni eksprese olur ve salgılanır. *MEL1* geninin eksprese edildiği maya kolonileri ortamda X- α -Gal kromojenik substratı varlığında mavi renkli fenotipe büyüme gösterirler.

LacZ: *LacZ*, β -gal enzimini kodlamaktadır. β -gal, *E. coli*'de bulunan bir enzim olup AH109 kromozomuna eklenmiştir. İki hibrit etkileşimlerinin sonucunda bu enzim eksprese edilmeye başlar ancak salgılanmaz.

3.7 Etkileşimlerin ve Etkileşimlerin Özgünlüğünün Test Edilmesi

Y2H ile etkileşimler test edilirken, pozitif etkileşimlerin hedef proteinler hADA2A, hADA2B ve hGCN5 proteinlerine özgün olup olmadıklarını belirlemek amacıyla negatif kontrol olarak bu proteinler ile hem hücresel lokalizasyonları hem de fonksiyonları bakımından tamamen farklı özellikte bir protein olan insan Glutaminaz ile etkileşen protein (Glutaminase Interacting Protein; hGIP) kullanılmıştır (Zencir vd., 2011; Zencir vd., 2013a; Zencir vd., 2013b). Bu amaçla AH109 maya hücreleri, GIP kodlayan cDNA dizisini içeren DNA BD plazmidleri aynı koşullarda fakat birbirinden bağımsız olarak aday etkileşim partnerlerini içeren maya AD plazmidleri ile eş-transforme edilmiş ve raportör genler bakımından seçici besi ortamlarında (SD/-Ade/-His/-Trp/-

Leu/X- α -Gal) kolonilerin gelişimleri gözlenmiştir. hADA2A, hADA2B ve hGCN5 proteinleri ile etkileşimleri pozitif iken hGIP proteini etkileşimi negatif olan protein-protein etkileşimleri dikkate alınmıştır.

3.8 Etkileşimlerin Mayada Beta-Galaktosidaz Aktivitesi Ölçümleri ile Kantitatif Olarak Belirlenmesi

Y2H sistemi, etkileşimlerin fonksiyonel transkripsiyon faktörlerinin aktive edilmesi ve buna bağlı olarak gerçekleşen raportör genlerin aktivasyonu ile belirlendiği bir sistemdir. Birçok Y2H sisteminde *lacZ* geninin kodladığı β -gal enzimi kolorimetrik analizlere olanak sağlaması bakımından etkileşimlerin kalitatif ve kantitatif olarak analizleri için sıklıkla tercih edilen bir yöntemdir (Topcu vd., 1999, Serebriiskii vd., 2000). Projemiz kapsamında etkileşimlerin mayada kantitatif olarak analizi amacıyla maya AH109 konak hücresi Y2H yöntemi ile etkileşimlerin belirlenmesinde kullandığımız BD ve AD plazmidleri ile eş-transforme edilmiş, O-nitrofenil β -D-galaktopiranozid (O-nitrophenyl β -D-galactopyranoside; ONPG) kromojenik substratı kullanılarak β -gal enzim aktivite ölçümleri yapılmış ve β -gal enzim aktiviteleri hesaplanarak etkileşimler kantitatif olarak analiz edilmiştir.

3.9 Etkileşim Bölgelerinin Haritalanması

hADA2A, *hADA2B* ve *hGCN5* genleri nükleotid dizileri bilinen genlerdir. hADA2A, hADA2B ve hGCN5'in partnerleri ile etkileşimlerinde önemli olabilecek gen bölge/bölgelerin belirlenmesi amacıyla öncelikle NCBI veri tabanı yardımıyla elde ettiğimiz gen dizilerinin biyoinformatik analizleri yapılmış, farklı organizmalarda korunan bölgeleri belirlenerek daha önce rapor edilen veriler yardımıyla *hADA2A*, *hADA2B* ve *hGCN5* gen dizilerinin kodladıkları proteinlerin fonksiyonları bakımından önemli olması beklenen olası bölgeleri belirlenmiştir. Ardından bu gen bölgelerinde delesyonlar oluşturularak delesyonlu yeni pGBKT7-hADA2A, -hADA2B ve -hGCN5 rekombinant plazmidleri elde edilmiştir. Delesyonlu hADA2A, hADA2B ve hGCN5 proteinlerinin mayada ekspresyon analizleri ile toksisite ve oto-aktivasyon testleri hazırladığımız yeni rekombinant plazmidlerle tekrarlanmış ve Y2H ile belirlenen etkileşimler ayrıca delesyonlu proteinler ile de test edilmiştir.

3.10 Mayada Belirlenen Etkileşimlerin Memeli Sistemlerde Verifikasyonları

3.10.1 hADA2A, hADA2B ve hGCN5 protein kodlayan gen bölgelerinin memeli ekspresyon plazmidine klonlanması

Projemizde etkileşim partnerlerini belirlemeyi amaçladığımız hedef proteinin insanlarda eksprese edilen proteinler olması nedeniyle etkileşimlerini Y2H yöntemi ile mayada gösterdiğimiz dört aday partner ile etkileşimlerini memeli hücrelerinde de göstermek amacıyla hADA2A, hADA2B ve hGCN5 protein kodlayan cDNA dizileri memeli ekspresyon plazmidlerine klonlanmıştır. Raportör gen analizleri için kullanılan plazmidlerden pcDNA3-Flag-hADA2A ve pcDNA3-Flag-hADA2B plazmidleri işbirliği içerisinde olduğumuz Macar Bilimler Akademisi'nden Dr. Boros'un laboratuvarından temin edilmiş, pcDNA3-Flag-hGCN5 ise proje yürütücüsü Dr. Zencir'in daha önce Dr. Boros'un danışmanlığında yer aldığı Avrupa Birliği projesi kapsamında işbirliği içinde oldunan IGBMC'den Dr. Tora'nın laboratuvarından sağlanmıştır.

Konfokal mikroskopi analizlerinde kullanılan plazmidlerin klonlamaları ekibimizce tamamlanmıştır. Eş-lokalizasyon deneylerinin bir gereği olarak hADA2A, hADA2B ve hGCN5 protein kodlayan gen bölgeleri CFP floresan işaret (cyan-fluorescent protein) taşıyan pECFP-C2 plazmidine ve aday partner proteinler PPP1R7, PPP2R5D, PHF21A ve AATF ise pEYFP-C3 plazmidine (yellow-fluorescent protein plasmid) klonlanmıştır. Klonlar restriksiyonel kesim analizleri ile kontrolün ardından ilgili deneyler için kullanılmıştır.

3.10.2 Raportör gen ekspresyonu analizleri (Luciferase Assay)

Genetik raportör sistemler, hücre biyolojisi ile ilgili çalışmalarda gen ekspresyonu ve reseptör aktivitesi, hücre içi sinyal iletimi, mRNA işlenmesi, protein katlanması ve protein-protein etkileşimleri gibi gen ekspresyonu ile ilişkili olan hücresel fonksiyonların çalışılmasında yaygın olarak kullanılan sistemlerdir. Bu sistemlerden birisi olan Lusiferaz, post-translasyonal modifikasyonlar gerektirmemesi nedeniyle hücrede hızlı ve kolay translasyona girmesi, reaksiyon sonucu oluşan kemiluminesans ışımının çok yüksek duyarlı bir yöntem olması ve reziduel luminesans oluşturmaması, hızlı olması nedeniyle en yaygın kullanılan raportör sistemlerden birisidir.

Bu bölüm deneylerimizde U2OS hücreleri hADA2A, hADA2B ve hGCN5 proteinlerini taşıyan rekombinant memeli ekspresyon plazmidleri aday proteinleri taşıyan memeli ekspresyon plazmidleri ile birlikte eş-transfekte edilmiş ve luminometre aracılığıyla lusiferaz aktivitesi ölçülmüştür. Lusiferaz aktivitesi ölçümleri için U2OS hücreleri transfeksiyon işleminin 24 saat

öncesinde 2.0×10^5 hücre yoğunluğunda olacak şekilde 6-well platalere transfer edilmiş ve %70-80 konfluent olan hücreler farklı plazmidler ile Turbofect transfeksiyon ajanı (Thermo) kullanılarak transfekte/eş-transfekte edilmiştir (2 µg DNA/well). Transfeksiyon işlemi sonrasında hücreler 37°C'de %5 CO₂ ortamında 24 saat inkübasyonu takiben lusiferaz aktivitesi ölçümleri yapılmıştır.

3.10.3 Konfokal mikroskopi analizleri

Mayada belirlenen etkileşimlerin verifikasyonları için potansiyel protein partnerlerinin eş-lokalizasyonlarının analizleri konfokal mikroskopi analizleri ile gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla öncelikle boş vektörlerin beklenen floresan ışımayı verip vermedikleri kontrol edilmiş, ardından hedef proteinlerin ve aday partnerlerinin hem tekli hem de eş-transfeksiyonları yapılmıştır. Eş-lokalizasyonların belirlenebilmesi için U2OS hücreleri transfeksiyon işleminin 24 saat öncesinde 2.0×10^4 hücre yoğunluğunda olacak şekilde 8-well chamber slide'lara transfer edilmiş, hücreler %70-80 konfluent olduktan sonra pCFP ve pYFP plazmidleri ile Turbofect transfeksiyon ajanı kullanılarak transfekte edilmiştir (0.4 µg total DNA/well). Transfeksiyon işlemi takiben hücreler 37°C'de %5 CO₂ ortamında 24 saat inkübe edilmiş ve ardından konfokal mikroskopi analizleri ile görüntülenmiştir.

4. BULGULAR

4.1 ADA2A, ADA2B ve GCN5 Proteinlerini Kodlayan Gen Bölgelerinin PCR ile Çoğaltılması

hADA2 proteininin hADA2A ve hADA2B olarak adlandırılan iki farklı izoformu bulunmaktadır. hADA2'nin bu farklı varyantlarının farklı multi-protein komplekslerinde yer aldığı bilinmektedir. Buradan hareketle yaklaşımımız, her iki varyantın etkileşimlerinin belirlenmesi ile bu varyantların yer aldığı farklı protein komplekslerinin düzenledikleri farklı yolların aydınlatılmasına katkıda bulunacağı şeklindedir.

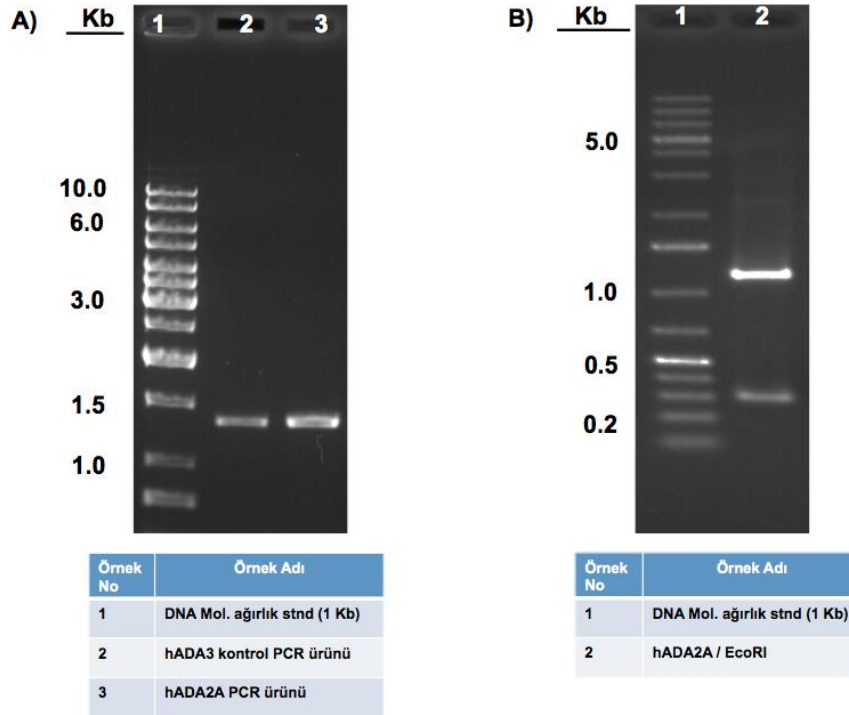
hADA2A, *hADA2B* ve *hGCN5* genleri nükleotid dizileri bilinen genler olup protein kodlayan gen bölgeleri sırasıyla 1332 bp, 1263 bp ve 2514 bp büyüklüğündedir. NCBI veri tabanı yardımıyla yaptığımız biyoinformatik analizler ile hADA2A, hADA2B ve hGCN5 proteinlerini kodlayan gen bölgelerine ait diziler belirlenerek bu gen bölgelerine özgün primerler tasarlanmış ve PCR ile çoğaltılmıştır. Sözü edilen özgün nükleotid dizilerinin PCR yöntemi ile çoğaltılması için takip edilen stratejiler aşağıda detaylı olarak belirtilmiştir.

4.1.1 hADA2A proteinini kodlayan gen bölgesinin PCR ile çoğaltılması

Amacımız proteini kodlayan özgün gen bölgelerini çoğaltmak olduğundan ve gen dizisindeki tek bir baz değişiminin bile proteinin yapısının, kararlılığının ve fonksiyonunun değiştirebilmesine neden olabileceği göz önüne alınarak PCR amplifikasyonu aşamasında hata oranını minimuma indirmek amacıyla 'proofreading' özellikte *Taq* polimeraz enzimi seçilmiştir.

Bu aşamada PCR için kalıp DNA olarak, proje yürütücüsü Dr. Zencir'in daha önce araştırma ziyaretlerinde bulunduğu Dr. Boros'un Macar Bilimler Akademisi, Szeged Üniversitesi, Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Bölümü'ndeki laboratuvarından temin edilen ve hADA2A proteinini eksprese ettiği daha önceden tarafımızdan test edilmiş olan pcDNA3-Flag-hADA2A rekombinant plazmidi kullanılmış ve tasarladığımız primer çifti ile hedef DNA fragmanı amplifiye edilmiştir. PCR işlemi için moleküler büyüklüğü hADA2A ile çok benzer olan ve daha önce amplifiye ettiğimiz hADA3 kontrol amacıyla kullanılmıştır. PCR sonrasında elde edilen özgün hADA2A DNA fragmanı Şekil 3'te verilmiştir (Şekil 3. A). PCR amplifikasyon ürünü olan DNA fragmanı agaroz jelde moleküler büyüklüğü bakımından analiz edildiği gibi hADA2A'nın ORF bölgesinde bir adet tanıma dizisi olduğu bilinen *EcoRI* restriksiyon enzimi ile kesim analizi yapılarak özgünlüğü test edilmiş (Şekil 3. B) ve hedeflenen gen bölgesinin beklenildiği şekilde

amplifiye edildiği gözlenmiştir.



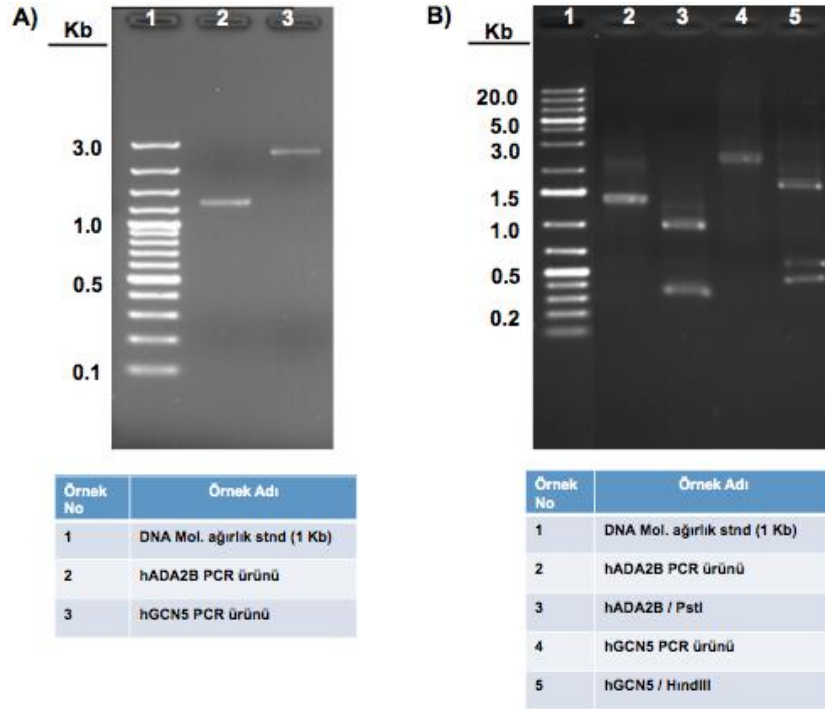
Şekil 3. hADA2A proteinini kodlayan gen bölgesinin PCR amplifikasyonu; (A) hADA2A PCR ürününe ait agaroz jel görüntüsü. (B) hADA2A PCR ürününün restriksiyonel kesim analizine ait agaroz jel görüntüsü.

4.1.2 hADA2B proteinini kodlayan gen bölgesinin PCR ile çoğaltılması

hADA2B geninin ORF bölgesini PCR ile amplifiye etmek amacıyla yukarıda belirtildiği gibi Dr. Boros'un laboratuvarından temin edilen ve *hADA2B* proteinini eksprese ettiği daha önceden tarafımızdan test edilmiş olan pcDNA3-Falg-*hADA2B* rekombinant plazmidi kalıp DNA olarak kullanılmış ve hedef DNA fragmanı NCBI veri tabanına göre tasarladığımız primer çifti kullanılarak amplifiye edilmiştir. PCR sonrasında elde edilen özgün *hADA2B* fragmanı (Şekil 4. A, uygulama 2) ve bu fragman içerisinde tanıma dizisi olduğu bilinen *Pst*I restriksiyon enzimi ile kesim analizi sonuçlarından (Şekil 4. B, uygulamalar 2 ve 3) görüldüğü gibi hedeflenen gen bölgesi beklenildiği şekilde amplifiye edilmiştir.

4.1.3 hGCN5 proteinini kodlayan gen bölgesinin PCR ile çoğaltılması

hGCN5 proteinini kodlayan ORF bölgesi; tarafımızdan tasarlanan gen dizisine özgün primerler yardımıyla, proje yürütücüsü Dr. Zencir'in, Dr. Boros'un laboratuvarında araştırmacı olarak görev aldığı dönemde işbirliği içerisinde olduğu Dr. Tora'nın laboratuvarından temin edilen pcDNA3-Flag-hGCN5 kalıp DNA'sı kullanılarak amplifiye edilmiştir (Şekil 4. A, uygulama 3). Hedef DNA fragmanının özgünlüğü, PCR ürününün moleküler büyüklüğü ve *Hind*III restriksiyonel kesim analizi sonuçları ile doğrulanmıştır (Şekil 4. B, uygulamalar sırasıyla 4 ve 5).



Şekil 4. hADA2B ve hGCN5 proteinlerini kodlayan gen bölgelerinin PCR yöntemi ile amplifikasyonu (A) hADA2B ve hGCN5 PCR ürünlerine ait agaroz jel görüntüsü. (B) hADA2B ve hGCN5 PCR ürünlerinin restriksiyonel kesim analizi.

4.2 hADA2A, hADA2B ve hGCN5 Proteinlerini Kodlayan Gen Bölgelerinin Maya Plazmidine Klonlanması

Projemiz kapsamında daha önce Y2H taraması ile hADA3 proteini ile etkileşimleri ilk kez tarafımızdan rapor edilen (Zencir vd., 2013a) fosfataz grubu proteinlerden PPP1R7 ve PPP2R5D ile transkripsiyon faktörleri olan PHF21A ve AATF proteinlerinin hADA3 ile aynı komplekste yer alan hADA2 ve hGCN5 proteinleri ile etkileşimlerinin karakterize edilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla *hADA2A*, *hADA2B* ve *hGCN5* genlerinin protein kodlayan nükleotid dizilerinin maya BD plazmidi olan pGBKT7 plazmidine (Şekil 2. A) klonlanarak, AD plazmidi pGADT7-Rec (Şekil 2. B) içerisinde klonlanmış olan aday proteinler ile etkileşimlerinin maya hücrelerinde test edilmesi planlanmıştır.

4.2.1 hADA2A proteinini kodlayan gen bölgesinin maya BD plazmidine klonlanması

Bir önceki bölümde ayrıntılı olarak belirtilen hADA2A PCR ürünü, PCR işleminde kullanılan özgün primerlerin taşıdığı *Bam*HI/*Pst*I restriksiyon tanıma dizileri kullanılarak aynı restriksiyon enzimleri ile kesilmiş olan maya pGBKT7 BD vektörüne klonlanmıştır. Bu işlem için ilk olarak kullanılan restriksiyon enzimlerinin aktiviteleri teyid edilmiş sonrasında gerçekleştirilen kesim reaksiyonları agaroz jelde kontrol edilmiştir. Bu işlemler aynı şekilde pGBKT7 BD vektörü için de uygulanmıştır. Kesim reaksiyonları ile elde edilen fragmanlar klonlamada kullanılmak üzere uygun konsantrasyonda hazırlanmış olan agaroz jelde ayrıştırılmış, hedef gen ve vektör için beklenen fragmanlar agaroz jelden ekstrakte edilmiştir. Ekstraksiyonun ardından elde edilen DNA fragmanları agaroz jelde tekrar kontrol edilmiştir.

4.2.2 hADA2B proteinini kodlayan gen bölgesinin maya BD plazmidine klonlanması

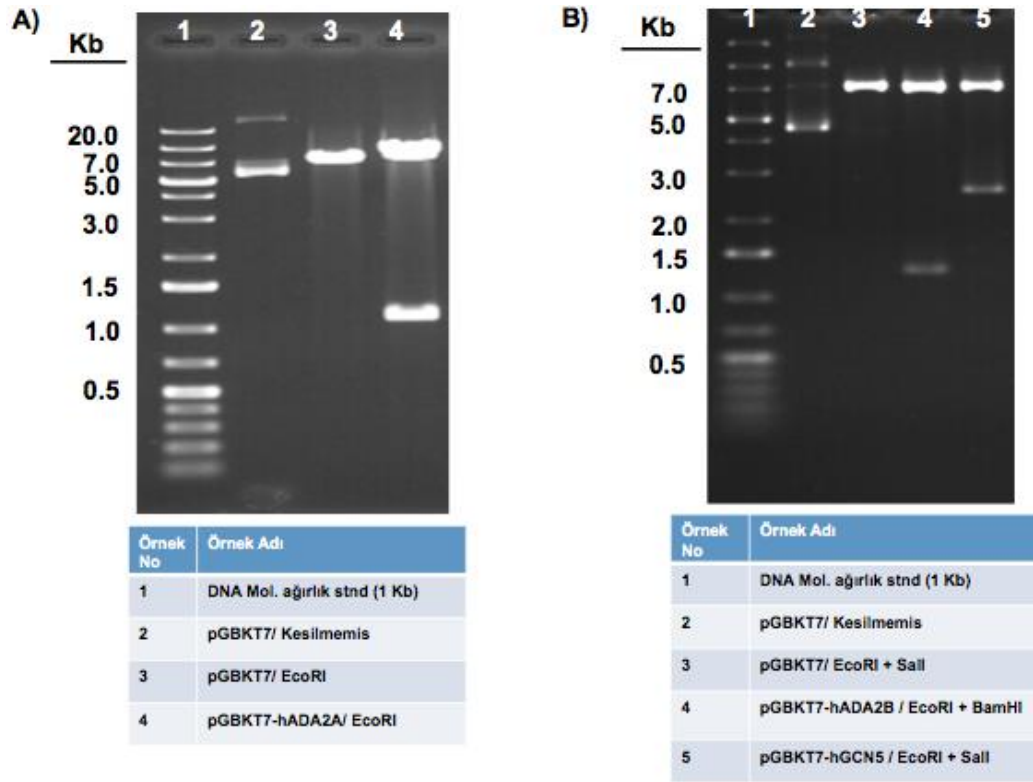
PCR yöntemi ile çoğaltılan hADA2B proteininin kodlayan gen bölgesi, amplifikasyonda kullanılan özgün primerlerin taşıdığı *Eco*RI/*Bam*HI restriksiyon tanıma dizileri kullanılarak aynı restriksiyon enzimleri ile kesilmiş olan maya pGBKT7 BD vektörüne klonlanmıştır. Daha önce belirtildiği şekilde öncelikle restriksiyon enzimlerinin aktiviteleri teyid edilmiş ve gerçekleştirilen kesim reaksiyonları agaroz jelde kontrol edilmiştir. Bu işlemler aynı şekilde vektör (pGBKT7) DNA'sı için de uygulanmıştır. Kesim reaksiyonları ile elde edilen fragmanlar klonlamada kullanılmak üzere agaroz jelde ayrıştırılmış, hedef gen ve vektör için beklenen fragmanlar klonlamada kullanılmak üzere agaroz jelden ekstrakte edilmiştir. Ekstraksiyon sonrası elde edilen DNA fragmanlarının kontrolü örneklerin agaroz jelde ayrıştırılmasıyla gerçekleştirilmiştir.

4.2.3 hGCN5 proteinini kodlayan gen bölgesinin maya BD plazmidine klonlanması

Maya BD plazmidine klonlamak üzere hGCN5 proteinine ait ORF bölgesi PCR yöntemi ile elde edildikten sonra PCR işleminde kullanılan özgün primerlerin içerdiği *EcoRI/SalI* restriksiyon tanıma dizileri kullanılarak aynı restriksiyon enzimleri ile kesilmiş olan maya pGBKT7 BD vektörüne klonlanmıştır. Bu deneysel prosedürde yukarıda hADA2A ve hADA2B ORF bölgelerinin klonlanmasında izlenen basamaklar takip edilmiştir.

4.2.4 Hedef DNA ve vektör DNA'ların ligasyonu

Restriksiyonel kesim analizleri ve agaroz jel ekstraksiyonlarını takiben BD vektörü ile hADA2A, hADA2B ve hGCN5 fragmanları T4 DNA Ligaz enzimi ile enzimin aktivitesi için uygun tampon koşullarında, 16°C'de gece boyu ligasyon reaksiyonuna bırakılmıştır. Ligasyon sonrası, kimyasal olarak kompetan hale getirilmiş olan *E. coli* DH5- α bakteri hücreleri ligasyon reaksiyon ürünleri ile transforme edilmiştir. BD vektörü *Kanamisin* (*Kanamycin*; *Kan*) antibiyotik direnç geni içerdiğinden transformantlar doğru klonu alabilen bakteri hücrelerini belirleyebilmek amacıyla *Kan* içeren (40 μ g/mL) Luria-Bertani (LB) agar besi ortamlarına transfer edilmiş ve kültürler 37°C'de ~16 saat inkübe edilmiştir. Agar ortamında büyüyen koloniler yine *Kan* içeren (40 μ g/mL) sıvı LB besi ortamına transfer edilerek 37°C'de ~16 saat inkübe edilmiş, büyüyen kolonilerden plazmid DNA izolasyonları yapılmıştır. İzole edilen plazmid DNA'ları her bir gen ürününe spesifik olan restriksiyon enzimleri ile kontrol edilmiştir. Kesim reaksiyonları uygun konsantrasyondaki agaroz jelde ayrıştırılarak kontrol edilmiş, her klonlama ve kesim reaksiyonu için beklenen fragmanlar analiz edildiğinde klonlamaların başarılı oldukları teyid edilmiştir (Şekil 5. A ve B).



Şekil 5. pGBKT7-hADA2A/ -hADA2B ve -hGCN5 klonlarının restriksiyonel kesim analizleri. (A) pGBKT7-hADA2A klonunun *EcoRI* enzimi ile restriksiyonel kesim analizi. (B) pGBKT7-hADA2B ve -hGCN5 klonlarının sırasıyla *EcoRI/BamHI* ve *EcoRI/SalI* restriksiyonel kesimlerine ait agaroz jel görüntüsü.

Her klonlama için restriksiyonel analizler ile doğru hedef geni içerdiğinden emin olduğumuz birbirinden bağımsız 3 farklı koloni seçilerek plazmid DNA izolasyonu yapılmış ve plazmid DNA'ların herhangi bir mutasyon içerip içermediklerini belirlemek amacıyla DNA'lar dizi analizine gönderilmiştir. Dizi analizi sonuçları analiz edilerek mutasyon içermediği gözlenen klonlar ile daha ileri analizlere devam edilmiştir.

4.3 AH109 Maya Suşunun pGBKT7-hADA2A, hADA2B ve hGCN5 Rekombinant Plazmidleri ile Transformasyonu

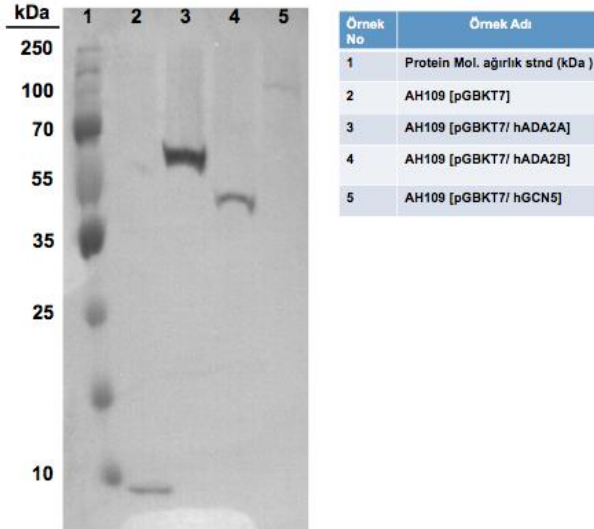
Bu amaçla kimyasal olarak kompetan hale getirilen *S. cerevisiae* AH109 suşu pGBKT7-hADA2A, -hADA2B ve -hGCN5 rekombinant plazmidleri ile transforme edilmiştir. pGBKT7 vektörü *TRP* prototrof bir vektör olduğundan pGBKT7-hADA2A, -hADA2B ve -hGCN5 klonları ile transforme edilmiş olan maya hücrelerinin *TRP* içermeyen seçici besi ortamında (SD/-Trp) büyümesi beklenmektedir. Bu nedenle AH109 maya transformantları doğru klonu alabilen

hücreleri belirleyebilmek amacıyla SD/-Trp seçici besi ortamlarına transfer edilmiş ve kültürler 30°C'de ~2-3 gün inkübe edilmiştir. Bu ortamda büyüeyebilen dolayısıyla rekombinant plazmid ile transforme olduğundan emin olduğumuz koloniler ile mayada ileri analizlere devam edilmiştir.

4.4 Maya Hücrelerinde hADA2A, hADA2B ve hGCN5 Proteinlerinin Kontrol Testleri

4.4.1 Mayada protein ekspresyon analizleri

Y2H yöntemi hedef proteinlerin konakçı maya hücresi içerisinde ekspresyonunu gerektirmektedir. Bu nedenle *S. cerevisiae* AH109 maya şusu pGBKT7-hADA2A, -hADA2B ve -hGCN5 klonları ile transforme edilmiş ve western blot yöntemi ile anti-Myc mouse monoklonal antikor kullanılarak sözü edilen proteinlerin ekspresyonları analiz edilmiştir. hADA2A, hADA2B ve hGCN5 proteinleri için gözlenen bandların beklenen büyüklükte (sırasıyla ~51, 49 ve 97 kDa) olduğu belirlenmiş ve proteinlerin maya içerisinde eksprese edildiği teyid edilmiştir (Şekil 6, sırasıyla uygulamalar 3, 4 ve 5).



Şekil 6. hADA2A, hADA2B ve hGCN5 proteinlerinin maya içerisinde ekspresyonu.

4.4.2 Mayada hADA2A, hADA2B ve hGCN5 proteinlerinin toksisite testleri

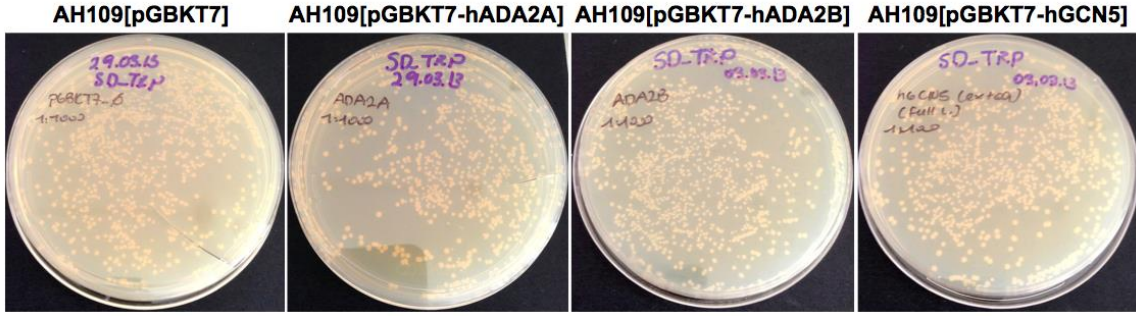
Hedef *hADA2A*, *hADA2B* ve *hGCN5* genlerinin maya içerisinde ekspresyonu sonucu sentezlenen proteinlerin mayada toksik etkisi olup olmadığını belirlemek amacıyla test edilmiştir. Bu amaçla AH109 maya suşu, mayada eksprese edildikleri tarafımızdan doğrulanan pGBKT7-*hADA2A*, -*hADA2B* ve -*hGCN5* rekombinant plazmidleri ile transforme edilmiştir. Transformantlar SD/-Trp seçici besi ortamına transfer edilmiştir. Kontrol amaçlı olarak AH109 maya suşu boş vektör (pGBKT7) ile de transforme edilmiştir. Transformantlar 30°C'de 2-3 gün inkübasyonu takiben boş vektör (pGBKT7) ve de rekombinat plazmidleri içeren (pGBKT7-*hADA2A*, -*hADA2B* ve -*hGCN5*) maya hücreleri, transfer edildikleri platelerdeki koloni sayıları ve koloni morfolojileri bakımından fenotipik olarak karşılaştırılmıştır.

Toksisite testlerinde örnekler Tablo 1'de verildiği şekilde ve şu esaslar dikkate alınarak değerlendirilmiştir; eğer bait protein (*hADA2A*, *hADA2B* ve *hGCN5*) maya hücrelerinde toksik bir etkiye sahip ise bait vektörü içeren maya hücreleri, boş vektörü içeren maya hücreleri ile kıyaslandığında daha az sayıda koloni içermesi beklenir. Ayrıca her iki suş karşılaştırıldığında platelerde gözlenen koloni morfolojilerinin de toksik etki nedeniyle daha küçük ve değişken olması beklenmektedir. Toksikite testi sonuçlarımız *hADA2A*, *hADA2B* ve *hGCN5* proteinlerini içeren maya hücrelerinin boş vektör ile transforme edilen maya hücreleri ile koloni sayıları ve de koloni morfolojileri bakımından fenotipik olarak karşılaştırılabilir benzerlik gösterdiğini ortaya koymuştur (Şekil 7). Bu sonuçlarımız *hADA2A*, *hADA2B* ve *hGCN5* genlerinin ekspresyon ürünlerinin mayada herhangi bir toksik etkiye neden olmadığı şeklinde yorumlanmıştır.

Tablo 1. Mayada toksisite testleri.

Örnek	Seçici Besi Ortamı	2mm Büyüklüğünde/Belirgin Koloni Gelişimi
AH109[pGBKT7]	SD/-Trp	Var
AH109[pGBKT7- <i>hADA2A</i>]	SD/-Trp	Var
AH109[pGBKT7- <i>hADA2B</i>]	SD/-Trp	Var
AH109[pGBKT7- <i>hGCN5</i>]	SD/-Trp	Var

SD/-Trp Seçici Besi Ortamı



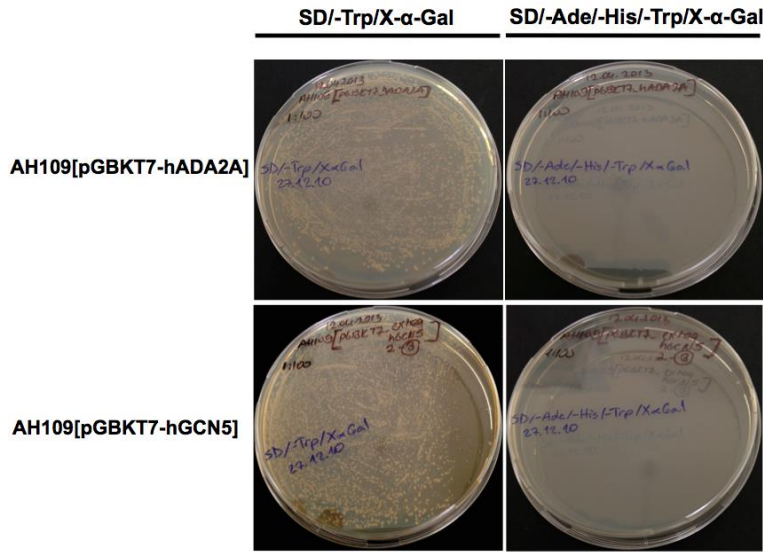
Şekil 7. Mayada hADA2A, hADA2B ve hGCN5 proteinlerinin toksisite testlerine ait örnek plate görüntüleri. AH109 maya suşu boş pGBKT7 plazmidi ve pGBKT7-hADA2A, -hADA2B, -hGCN5 rekombinant plazmidleri ile transforme edilmiş ve transformantlar SD/-Trp seçici besi ortamına 30°C'de 2-3 gün inkübe edilerek koloni gelişimleri değerlendirilmiştir.

4.4.3 hADA2A, hADA2B ve hGCN5 proteinlerinin oto-aktivasyon testleri

Y2H yöntemi ile aday etkileşimlerin testi, olası yanlış pozitif sonuçların eliminasyonu için vektörün maya konak hücre içerisinde prey vektör yokluğunda raportör genleri kendiliğinden aktive edebilme (oto-aktivasyon) özelliğinin bulunmamasını gerektirmektedir. Sonuçlarımızı değerlendirirken bu olasılığı elimine etmek amacıyla hADA2A, hADA2B ve hGCN5 proteinlerinin herhangi bir etkileşim partneri olmaksızın AH109 maya suşundaki raportör genleri kendiliğinden aktive edip etmediği test edilmiştir. Bu amaçla bait vektörler ile transforme edilen AH109 maya hücreleri transformasyonu takiben belirli dilüsyonlarda SD/-Trp/X- α -Gal ve SD/-Ade/-His/-Trp/X- α -Gal seçici besi ortamlarına transfer edilmiştir (Tablo 2). Deneylerimizde bu seçici besi ortamlarının kullanılmasının nedeni AH109 maya suşunun *Adenin (ADE2)* ve *Histidin (HIS3)* raportör genlerini içermesi ve ayrıca hADA2A, hADA2B ve hGCN5 ORF bölgelerini taşıyan BD vektörün *Trp* besin belirtecini taşımasıdır. Oto-aktivasyon deneyi sonuçlarımızın analizinde şu esaslar dikkate alınmıştır; bait vektör ile transforme edilmiş AH109 hücrelerinin SD/-Trp/X- α -Gal seçici besi ortamında beyaz renkli koloniler oluşturması beklenirken, bait vektör, herhangi bir etkileşim partnerine gerek duymaksızın raportör genleri kendiliğinden aktive edebildiği takdirde SD/-Ade/-His/-Trp/X- α -Gal seçici besi ortamında çok sayıda mavi renkli belirgin kolonilerin gözlenmesi beklenmektedir. Yaptığımız oto-aktivasyon testleri sonucunda pGBKT7-hADA2A ve -hGCN5 rekombinant plazmidleri ile transforme edilmiş maya hücrelerinin SD/-Ade/-His/-Trp/X- α -Gal seçici besi ortamında belirgin koloniler oluşturamadıkları gözlenmiştir (Şekil 8).

Tablo 2. Mayada oto-aktivasyon testleri.

Örnek	Seçici Besi Ortamı	Belirgin Koloniler	Koloni Rengi
AH109[pGBKT7-hADA2A]	SD/-Trp/ X- α -Gal	Var	Beyaz
AH109[pGBKT7-hADA2A]	SD/-Ade/-His// -Trp/X- α -Gal	Yok	Beyaz/Açık mavi
AH109[pGBKT7-hADA2B]	SD/-Trp/ X- α -Gal	Var	Beyaz
AH109[pGBKT7-hADA2B]	SD/-Ade/-His// -Trp/X- α -Gal	Az sayıda	Beyaz/Açık mavi
AH109[pGBKT7-hGCN5]	SD/-Trp/ X- α -Gal	Var	Beyaz
AH109[pGBKT7-hGCN5]	SD/-Ade/-His// -Trp/X- α -Gal	Yok	Beyaz/Açık mavi

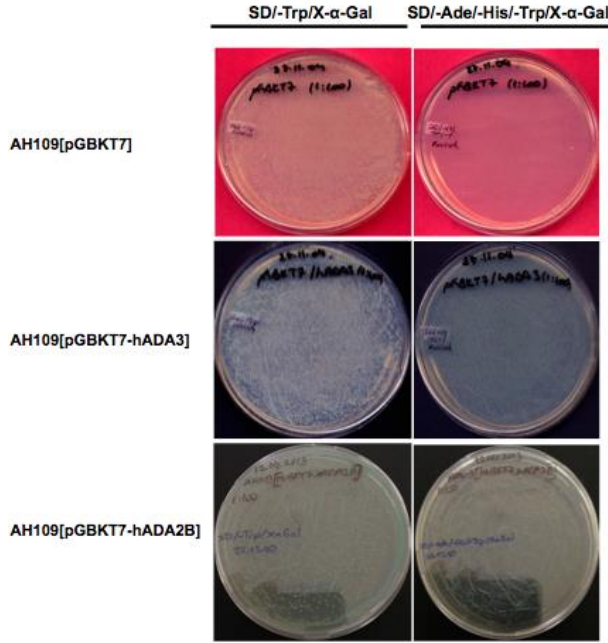


Şekil 8. hADA2A ve hGCN5 için mayada oto-aktivasyon deneyleri sonuçlarına ait örnek plate görüntüleri. AH109 maya hücreleri pGBKT7-hADA2A ve -hGCN5 rekombinat plazmidleri ile transformasyonu takiben belirli dilüsyonlarda SD/-Trp/X- α -Gal ve SD/-Ade/-His/-Trp/X- α -Gal seçici besi ortamlarına transfer edilmiş ve 30°C'de 2-3 gün süresince inkübe edilmiştir.

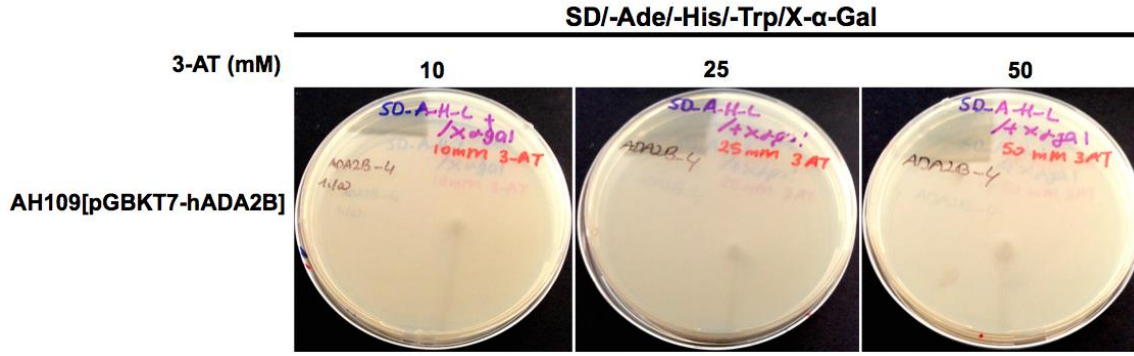
Aynı deney pGBKT7-hADA2B ile transforme edilmiş maya hücreleri için de uygulanmış, bu hücrelerin SD/-Ade/-His/-Trp/X- α -Gal seçici besi ortamına transfer edilmesi ve inkübasyonu sonrasında az sayıda koloni oluşumu belirlenmiştir. Şekil 9'da görüldüğü gibi bu koloni oluşumunun ekibimizin daha önceki çalışmalarında hADA3 proteini için gözlenen ve boş vektör

ile transforme edilmiş maya hücrelerine benzer karakterde olduğu (Zencir vd., 2013a) tespit edilmiştir. Esasen boş maya BD ve/veya AD vektörlerinin ihmal edilebilir düzeyde oto-aktivasyon gösterebilme özellikleri bulunduğu bilinen bir gerçektir. Bu nedenle hADA2B proteini için potansiyel etkileşimlerin Y2H yöntemi ile test edilmesinde olası 'yanlış pozitif' sonuçların eliminasyonu amacıyla bu oto-aktivasyon testlerinde ikinci bir raportör olarak *HIS3* ile ikili seçim de yapmak amacıyla *HIS3* gen ürününün rekabetsel (kompetitif) inhibitörü olan 3-AT kullanılmıştır. Bu işlemin öncesinde farklı konsantrasyonlarda (10 mM, 25 mM ve 50 mM) 3-AT içeren seçici besi ortamları hazırlanmış ve hADA2B oto-aktivasyon özelliğinin 3-AT'nin en düşük konsantrasyonunda (10 mM) dahi elimine edildiği gözlenmiştir (Şekil 10). Deneylerimizde hADA2B etkileşimlerinin analizinde kullanılacak uygun 3-AT konsantrasyonu 10 mM olarak belirlenmiş ve ileri analizlere devam edilmiştir.

Alınan bu sonuçlar hADA2A, hADA2B ve hGCN5 proteinlerinin maya hücrelerinde raportör genlerin transkripsiyonunu kendiliğinden aktive edebilme özelliğine sahip olmadıklarını göstermiştir.



Şekil 9. hADA2B proteini için mayada oto-aktivasyon deneyleri sonuçlarına ait örnek plate görüntüleri. AH109 hücreleri pGBKT7, pGBKT7-hADA3 ve pGBKT7-hADA2B plazmidleri ile transformasyonu takiben belirli dilüsyonlarda SD/-Trp/X-α-Gal ve SD/-Ade/-His/-Trp/X-α-Gal seçici besiyerlerine transfer edilmiş ve 30°C'de 2-3 gün süresince inkübe edilmiştir.



Şekil 10. hADA2B proteininin mayada oto-aktivasyon özelliğinin ikinci bir raportör gen içeren seçici besi ortamında analizine ilişkin örnek plate görüntüleri. AH109 maya hücreleri pGBKT7-hADA2B rekombinat plazmidi ile transforme edilmiş ve transformantlar farklı konsantrasyonlarda 3-AT (10, 25, 50 mM) içeren SD/-Ade/-His/-Trp/X-α-Gal/3-AT seçici besi ortamlarında 30°C'de 2-3 gün süresince inkübe edilmiştir.

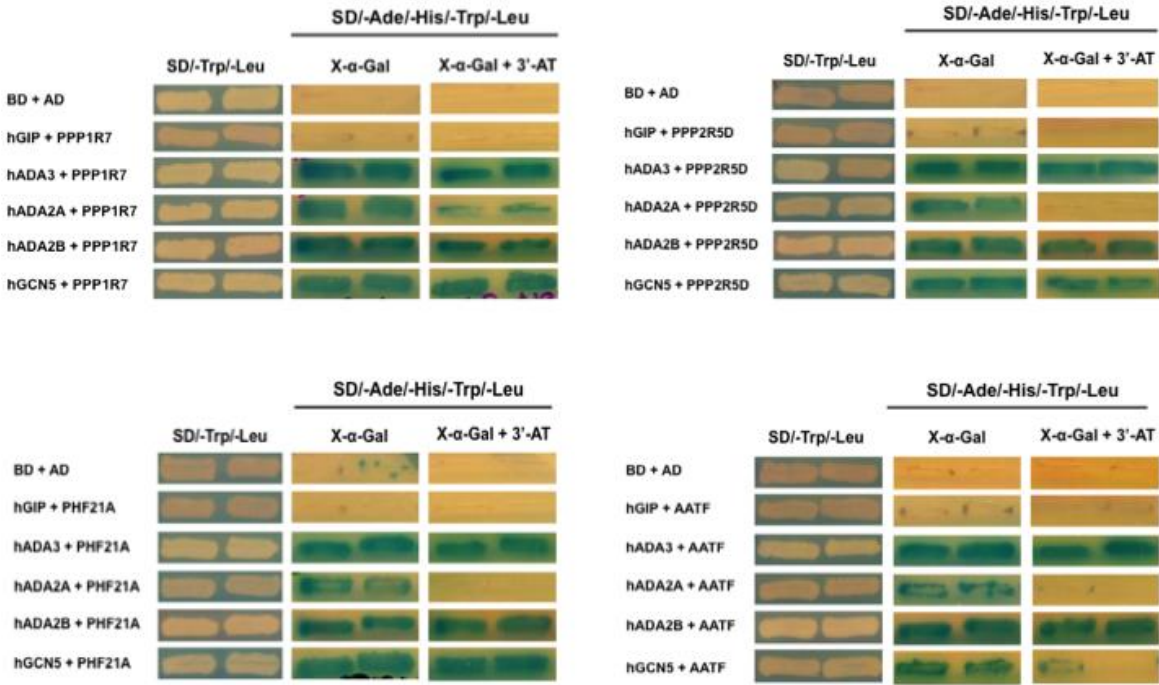
4.5 Etkileşimlerin ve Etkileşimlerin Özgünlüğünün Test Edilmesi

Mayada etkileşimlerin Y2H yöntemi ile analiz edilebilmesi amacıyla 'Gereç ve Yöntem' bölümünde ayrıntılı olarak verildiği üzere yöntemin gereği olarak hADA2A, hADA2B ve hGCN5 proteinlerini kodlayan cDNA dizisine sahip olan BD plazmidleri elde edilmiş ("bait" füzyon; pGBKT7-hADA2A, -hADA2B ve -hGCN5), AD plazmidine klonlanmış olan aday partnerler ile ("prey" füzyon; pGADT7-Rec-PPP1R7, -PPP2R5D, -PHF21A ve -AATF) etkileşimler test edilmiştir (Şekil 11). Maya AH109 suşu *GAL4* sorumluluğunda UAS ve TATA kutularının kontrolü altında olan birbirinden farklı 4 raportör gen içermektedir. Bu nedenle bait proteinler ve prey proteinlerin etkileşim göstermesi durumunda AH109 maya suşunda bulunan bu dört raportör gen (*ADE2*, *HIS3*, *MEL1* ve *LacZ*) transkripsiyonel olarak aktive edilmiş olur.

Etkileşimlerin Y2H yöntemi ile test edilmesi amacıyla AH109 maya suşu bait-içeren pGBKT7 BD plazmidi ve prey- içeren pGADT7-Rec AD plazmidi ile eş-zamanlı olarak transforme edilmiş ve etkileşimler transformantların konak maya hücresinde yer alan raportör genler bakımından seçici besi ortamlarına transfer edilerek, bu seçici besi ortamındaki büyüme özelliklerine göre değerlendirilmiştir. Protein-protein etkileşimlerinin gözlenmesi durumunda AH109 maya hücresindeki dört farklı raportör genler (*HIS3*, *ADE2*, *MEL1* ve *LacZ*) transkripsiyonel olarak aktive edileceğinden ve transformantların hem BD hem de AD vektörlerinde bulunan sırasıyla *TRP* ve *Lösin* (*Leucine*; *LEU*) besin belirteçlerini taşımaları beklendiğinden etkileşimlerin gözlemlendiği hücrelerin, seçiciliği oldukça yüksek olan SD/-Ade/-His/-Trp/-Leu/X-α-Gal besi ortamında mavi renkte kolonilerin büyüebilme özelliğine sahip olması

beklenmektedir. Etkileşimler test edilirken pozitif etkileşimlerin test edilmek istenen hADA2A, hADA2B ve hGCN5 proteinlerine özgün olup olmadıklarını belirlemek amacıyla negatif kontrol olarak bu proteinler ile hem hücresel lokalizasyonları hem de fonksiyonları bakımından tamamen farklı özellikte bir protein olan hGIP kullanılmıştır (Zencir vd., 2011; Zencir vd., 2013b).

Y2H deneylerimiz, hADA2B ve hGCN5'in dört aday proteinler ile eş-transformasyonu sonucunda 10 mM 3-AT içeren platelerde bile oldukça güçlü mavi renkte koloni gelişimleri gözlenmiş ve özellikle hADA2B etkileşimlerinin aday partnerlerin daha önce belirlediğimiz hADA3 etkileşimlerine benzer karakterde olduğunu göstermiştir. hADA2A'nın ise aday proteinler ile eş-transformasyonu sonucunda X- α -Gal platelerinde gözlenen etkileşimlerin 3-AT (10 mM) içeren platelerde elimine edildiği, dolayısıyla hADA2A etkileşimlerinin nispeten daha zayıf olduğu belirlenmiştir (Şekil 11).



Şekil 11. Maya hücrelerinde hADA2A, hADA2B ve hGCN5 proteinlerinin aday partnerler (PPP1R7, PPP2R5D, PHF21A, AATF) ile etkileşimlerinin Y2H ile test edilmesi sonucunda elde edilen örnek plate görüntüleri. AH109 hücreleri aday etkileşim partnerlerini taşıyan BD ve AD plamidleri ile eş-transform edilmiş ve transformantlar hem konak maya hücrelerinin taşıdığı raportör genler bakımından seçici olan SD/-Ade/-His/-Trp/-Leu/X- α -Gal besi ortamına hem de ikincil bir raportör gen ürününün aktivasyonunun seçimi için SD/-Ade/-His/-Trp/-Leu/X- α -Gal/3-AT seçici besi ortamına transfer edilerek bu besi ortamlarındaki büyümelerin değerlendirilmesi ile analiz edilmiştir.

4.6 Etkileşimlerin Mayada Beta-Galaktosidaz Aktivitesi Ölçümleri ile Kantitatif Olarak Belirlenmesi

Y2H sistemi, etkileşimlerin fonksiyonel transkripsiyon faktörlerinin aktive edilmesi ve buna bağlı olarak gerçekleşen raportör genlerin aktivasyonu ile belirlendiği bir sistemdir. Birçok Y2H sisteminde *lacZ* geninin kodladığı β -gal enzimi kolorimetrik analizlere olanak sağlaması bakımından etkileşimlerin kalitatif ve kantitatif olarak analizleri için sıklıkla tercih edilen bir yöntemdir (Topçu vd., 1999; Serebriiskii vd., 2000). β -Gal aktivite ölçümleri için farklı yaklaşımlar kullanılmakla birlikte en yaygın kullanılan ölçüm yöntemlerinden birisi enzimin aktivitesi sonucu ONPG kromojenik substratını parçalayarak açığa çıkan sarı rengin spektrofotometrik ölçümüne dayanmaktadır (Möckli ve Auerbach, 2004).

Projemiz kapsamında etkileşimlerin mayada kantitatif olarak analizi amacıyla β -gal enzim aktivite ölçümleri yapılmış ve β -gal enzim aktiviteleri aşağıdaki formülasyon ile hesaplanarak analiz edilmiştir.

$$\beta\text{-Galaktosidaz Aktivitesi} = 1000 \times A_{420} / (t \times V \times OD_{600})$$

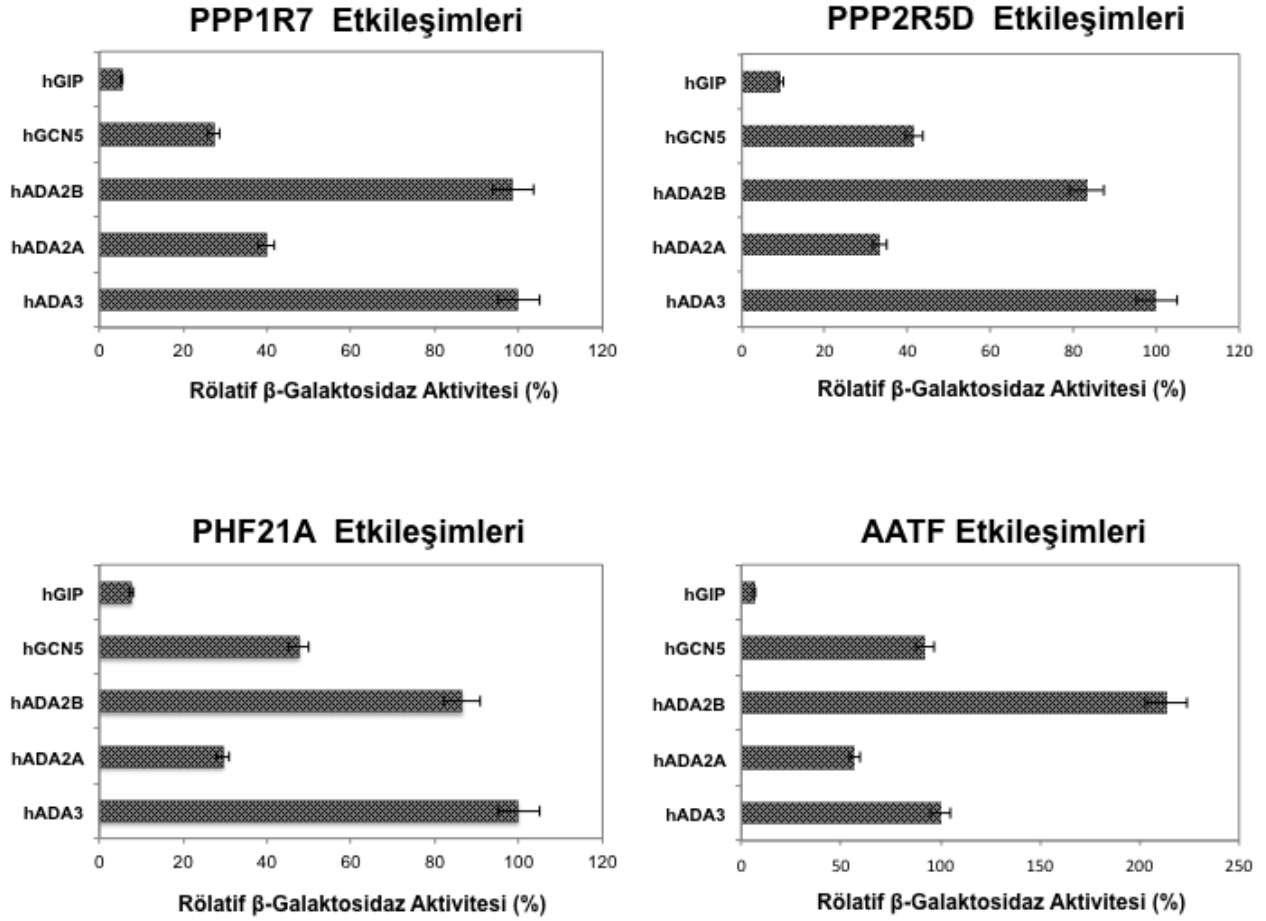
t = İnkübasyon zamanı (dakika)

V = Kullanılan hücre miktarı

A420 = 420 nm'de ölçülen absorbans değeri

OD600 = 600 nm'deki optik dansite değeri (1 ml kültürün A600 değeri)

Elde edilen β -gal enzim aktivitesi değerleri grafiğe aktarıldığında bulgularımızın Y2H ile elde ettiğimiz bulguları destekler nitelikte olduğu belirlenmiştir (Şekil 12).



Şekil 12. Etkileşimlerin mayada β -gal enzim aktivitesi ölçümleri ile kantitatif olarak değerlendirilmesi sonucu elde edilen aktivite grafikleri.

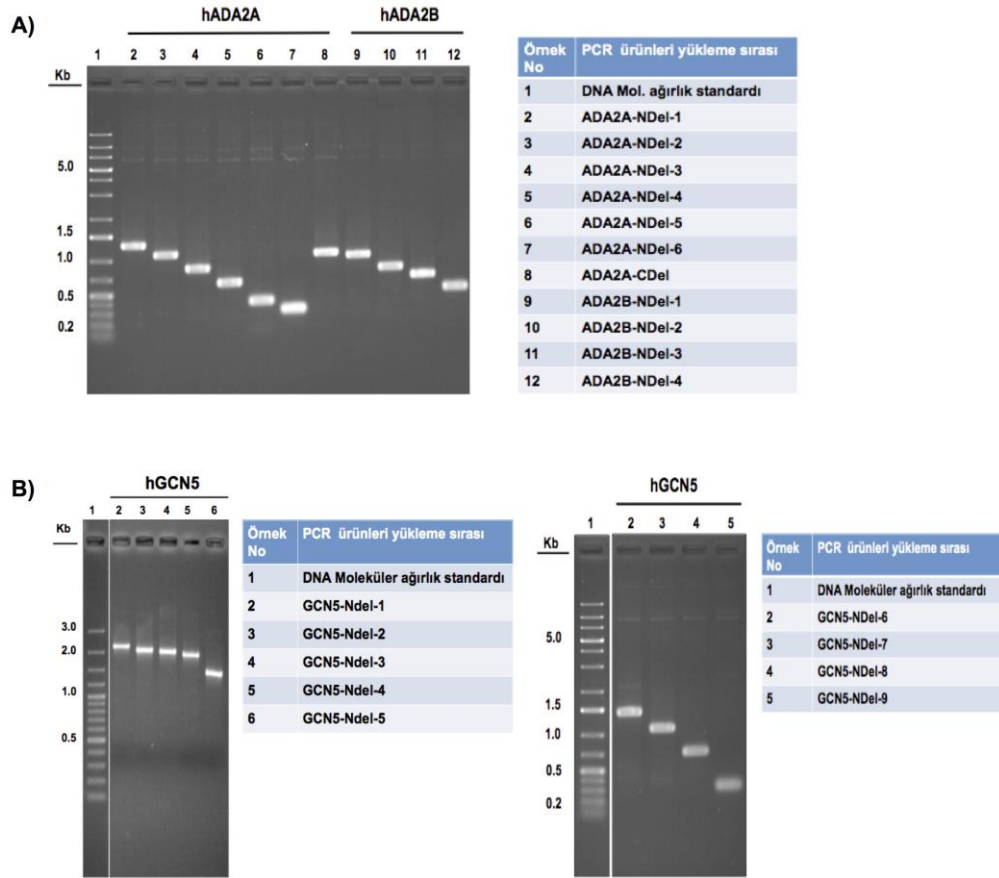
4.7 hADA2A, hADA2B ve hGCN5 Proteinlerinin Etkileşim Bölgelerinin Haritalanması

4.7.1 Delesyonlu hADA2A, hADA2B ve hGCN5 klonlarının eldesi

hADA2A, *hADA2B* ve *hGCN5* genleri nükleotid dizileri bilinen genlerdir. Bu grup deneylerimiz; *hADA2A*, *hADA2B* ve *hGCN5*'in partnerleri ile etkileşimlerinde önemli olabilecek gen bölge/bölgelerin belirlenmesi amacıyla öncelikle NCBI veri tabanı yardımıyla elde ettiğimiz gen dizilerinin biyoinformatik analizleri ve daha önce rapor edilen veriler yardımıyla *hADA2A*, *hADA2B* ve *hGCN5* gen dizilerinin kodladıkları proteinlerin fonksiyonları bakımından önemli olması beklenen bölgelerin belirlenmesi ile başlamıştır. Bu bağlamda adı geçen genlerin farklı bölgelerinde delesyonlar taşıyan klonların eldesinde farklı stratejiler uygulanmış olup takip edilen deneysel basamaklar aşağıda özetlenmiştir.

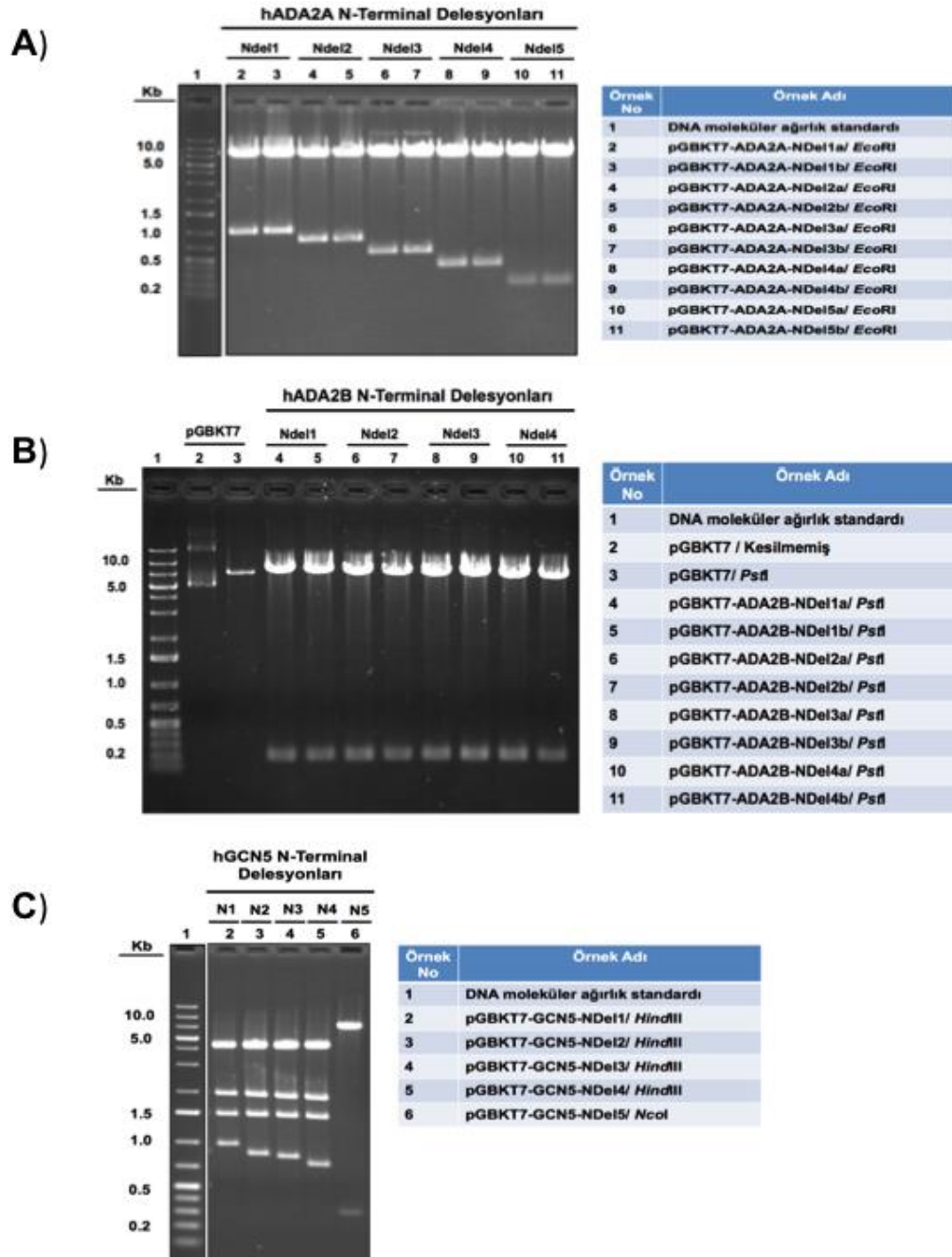
4.7.1.1 N-terminal delesyonu taşıyan hADA2A, hADA2B ve hGCN5 klonlarının eldesi

N-terminal bölgesinde delesyon taşıyan hADA2A, hADA2B ve hGCN5 klonlarının eldesi için stratejimiz; hedef bölgelere özgün yeni primer çiftleri tasarlayarak PCR ile hedef gen dizilerinin amplifiye edilmesi ve ardından aynı BD plazmidine (pGBKT7) klonlanması temeline dayanmaktadır. PCR ürünlerinin moleküler büyüklükleri reaksiyon ürünlerinin uygun konsantrasyondaki agaroz jelde analizi ile elde edilen fragmanların kontrolü ile gerçekleştirilmiş ve beklenen fragmanlar elde edilmiştir (Şekil 13. A ve B).



Şekil 13. hADA2A, hADA2B ve hGCN5 protein kodlayan gen dizilerinin N- terminallerinde delesyonel analizler için yapılan PCR amplifikasyonlarına ait reaksiyon ürünlerinin agaroz jel elektrofozleri görüntüleri. N-Terminal delesyonlu hADA2A, hADA2B (A) ve hGCN5 (B) klonlarının oluşturulmasında kullanılmak üzere tasarlanan özgün primerler yardımıyla PCR amplifikasyonu ile elde edilen DNA fragmanlarının agaroz jel elektrofozleri görüntüleri.

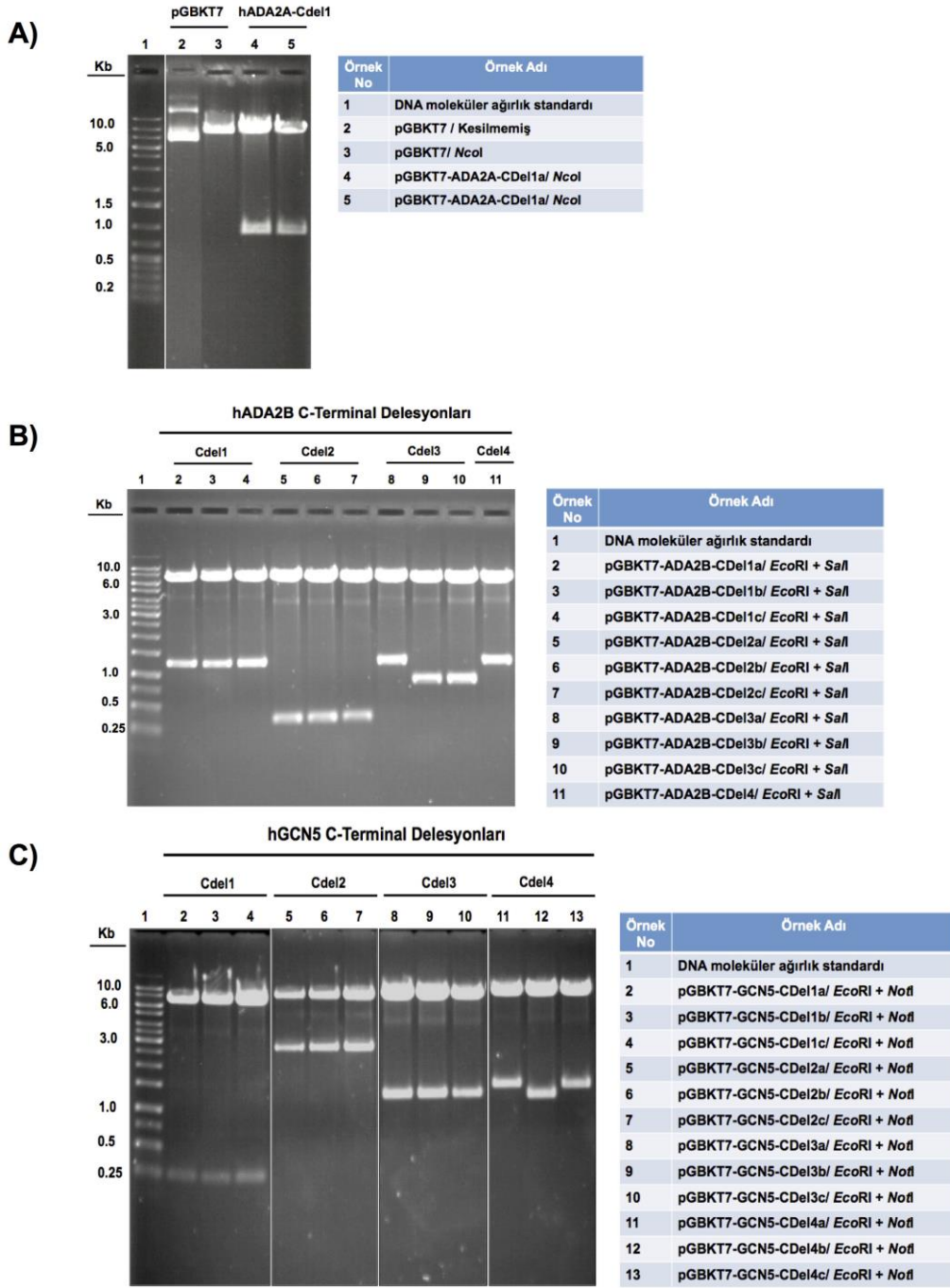
Elde edilen PCR ürünleri hedef gen bölgesinde yer aldığı bilinen özgün restriksiyon enzimleri ile de kontrol edilmiştir. Fragmanların özgünlüğü test edildikten sonra hADA2A N-terminal delesyonları için elde edilen fragmanlar *Bam*HI + *Pst*I, hADA2B N-terminal delesyonları için elde edilen fragmanlar *Eco*RI + *Bam*HI ve hGCN5 N-terminal delesyonları için elde edilen fragmanlar ise *Eco*RI + *Sal*I enzim çiftleri kullanılarak kesim yapılmış ve agaroz jel ekstraksiyonu ile kesim ürünleri purifiye edilmiştir. Elde edilen saf DNA fragmanları paralel olarak hazırlanan yine aynı enzimlerle kesilmiş olan sırasıyla pGBKT7/*Bam*HI + *Pst*I, pGBKT7/*Eco*RI + *Bam*HI ve pGBKT7/*Eco*RI + *Sal*I plazmidleri ile 'T4 DNA Ligaz' enzimi varlığında, enzimin aktivitesi için uygun tampon ve sıcaklık koşullarında ligasyon reaksiyonuna bırakılmıştır. Ligasyon reaksiyonunu takiben, kimyasal olarak kompetan hale getirilmiş *E. coli* DH5-α bakteri hücreleri ligasyon ürünleri ile transforme edilmiştir. Transformantlar doğru klonu alabilen bakteri hücrelerini belirleyebilmek amacıyla *Kan* içeren (40 µg/mL) LB agar besi ortamlarına transfer edilmiş ve kültürler 37°C'de ~16 saat inkübe edilmiştir. Agar ortamında büyüyen koloniler yine *Kan* içeren (40 µg/mL) sıvı LB besi ortamına transfer edilerek 37°C'de ~16 saat inkübe edilmiş, büyüyen kolonilerden plazmid DNA izolasyonları yapılmıştır. İzole edilen rekombinant plazmid DNA'lar taşıdıkları gen bölgelerine özgün olduğu bilinen restriksiyon enzimleri ile kesilmiş ve yine aynı enzim ile kesilen boş plazmid ile karşılaştırılarak elde edilen fragmanların analizleri yapılmıştır. Kesim reaksiyonları uygun konsantrasyondaki agaroz jelde ayrıştırılarak kontrol edilmiş, her klonlama ve kesim reaksiyonu için beklenen fragmanlar analiz edildiğinde klonlamaların başarılı olduğu gözlenmiştir. Örnek agaroz jel görüntüleri Şekil 14'te verilmiştir. Her klonlama için beklenen fragmanların gözlendiği aday klonlar ile ileri analizlere devam edilmiştir.



Şekil 14. N-Terminal bölgesinde farklı delesyonlar içeren klonlarının restriksiyonel analizlerine ait temsili agaroz jel görüntüleri (A) pGBKT7-hADA2A-NdeI klonlarının içerdikleri insertlerde yer aldığı bilinen *EcoRI* enzimi ile kesimi sonrasında agaroz jelde ayrıştırılması sonucu elde edilen fragmanlar, (B) pGBKT7-hADA2B-NdeI klonlarının içerdikleri insertlerde yer aldığı bilinen *PstI* enzimi ile kesimi sonrasında agaroz jelde ayrıştırılması sonucu elde edilen fragmanlar, (C) pGBKT7-hGCN5-NdeI klonlarının içerdikleri insertlerde yer aldığı bilinen *HindIII* ve *NcoI* enzimi ile kesimi sonrasında agaroz jelde ayrıştırılması sonucu elde edilen fragmanlar.

4.7.1.2 C-Terminal delesyonu taşıyan hADA2A, hADA2B ve hGCN5 klonların eldesi

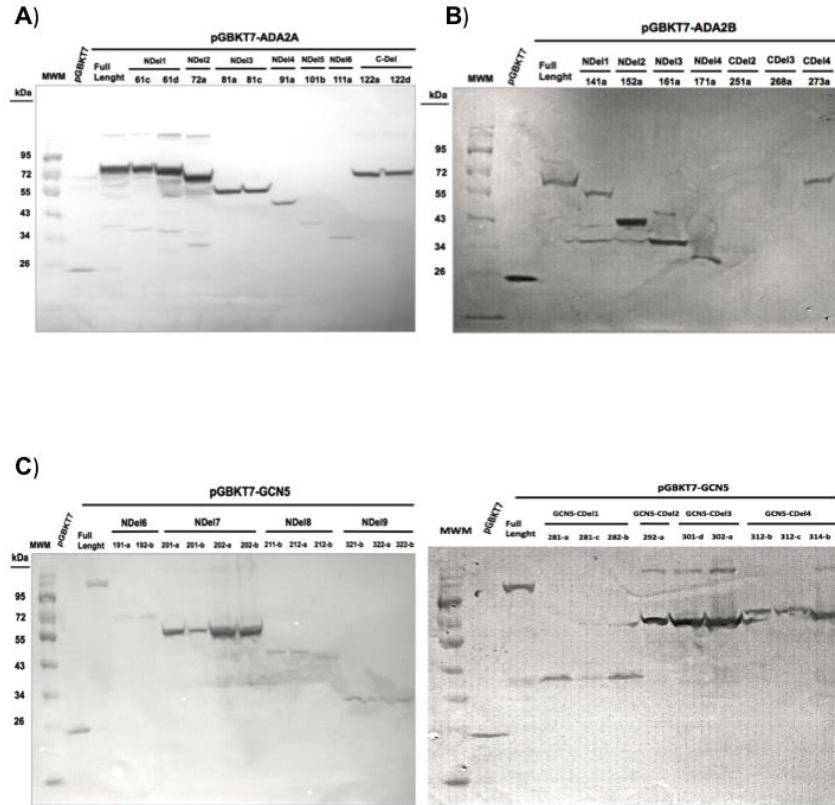
hADA2B ve hGCN5 proteinlerinin C-terminal delesyonlu klonlarının eldesinde daha önce ekibimizce oluşturulan tam uzunluklu (full length) *hADA2B* ve *hGCN5* genlerinin ORF bölgelerini içeren sırasıyla pGBKT7-hADA2B ve pGBKT7-hGCN5 rekombinat plazmidlerinde adı geçen genlerin protein kodlayan dizilerinde farklı uzunlukta amino asit (aa) dizilerini içerecek şekilde restriksiyonel kesimler yapılarak C-terminal bölgelerinde belirli diziler uzaklaştırılmıştır. Bu şekilde oluşturan yapışkan uçlar 'Klenow' enzimi kullanılarak küt uçlu hale getirilmiş ve rekombinant plazmid yeniden ligasyon reaksiyonuna bırakılmıştır. Ligasyon reaksiyonu ve bakteriyel transformasyon işlemleri daha önceki bölümlerde belirtilmiş şekilde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen rekombinant plazmidler çoklu restriksiyonel enzim kesimleri ile kontrol edilmiştir. hADA2A'nın C-terminal delesyonlu klonunu oluşturmak için ise hedef bölgeye özgün yeni primer çiftleri tasarlanarak PCR ile hedef gen dizilerinin eldesinin ardından pGBKT7 plazmidine klonlanmıştır. Elde edilen PCR ürünleri gen bölgesinde yer aldığı bilinen özgün restriksiyon enzimleri ile kontrol edilmiştir. hADA2A C-Terminal delesyonu için PCR ile çoğaltılan fragman *Bam*HI + *Pst*I enzim çifti ile kesilerek yine aynı enzim çifti ile kesilmiş olan pGBKT7/*Bam*HI + *Pst*I plazmidi ile ligasyon reaksiyonuna bırakılmıştır. Boş pGBKT7 plazmidi ve elde edilen C-Terminal delesyonlu aday klonlar restriksiyonel kesim analizleri ile kontrol edilmiş ve beklenen fragmanların gözleendiği klonlar ile ileri analizlere devam edilmiştir (Şekil 15).



Şekil 15. C-terminal bölgelerinde farklı delesyonlar taşıyan hADA2A, hADA2B ve hGCN5 klonlarının restriksiyonel kesim analizlerine ait temsili agaroz jel görüntüleri. (A) pGBKT7/hADA2A-Cdel klonunun kontrolü için *NcoI* enzimi ile yapılan restriksiyonel kesim analizine ait agaroz jel görüntüsü, (B) pGBKT7/hADA2B-Cdel klonlarının *EcoRI* + *SaI* enzim çifti ile kesimi ve sonrasında agaroz jelde ayrıştırılması sonucu gözlenen fragmanlara ilişkin agaroz jel görüntüsü, (C) pGBKT7/hGCN5-Cdel klonlarının *EcoRI* + *NotI* enzim çifti ile kesimi ve sonrasında agaroz jelde gözlenen fragmanlar.

4.7.2 Delesyonlu hADA2A, hADA2B ve hGCN5 proteinlerinin mayada ekspresyon analizleri

Y2H yöntemi aday proteinlerin konakçı maya hücre içerisinde ekspresyonunu gerektirmektedir. Bu nedenle *S. cerevisiae* AH109 maya suşu etkileşim bölgelerinin belirlenmesi amacıyla oluşturulan N-terminal ve C-terminal delesyonlu hADA2A, hADA2B ve hGCN5 klonları ile transforme edilmiş, maya hücrelerinde TCA çöktürmesi ile protein örnekleri elde edilmiş ve uygun konsantrasyonda SDS-PAGE jelinde ayrıştırılan örnekler PVDF membrana transfer edilerek anti-Myc fare monoklonal antikoru kullanılarak ile western blot analizi ile değerlendirilmiştir. Delesyonlu hADA2A, hADA2B ve hGCN5 proteinlerinin ekspresyon analizlerine ilişkin temsili western blot görüntüleri Şekil 16'da verilmiştir. Her bir örnek için beklenen büyüklükte proteinlerin gözlemlendiği ve ekspresyonun başarılı olduğu düşünülen aday klonlar seçilerek ileri analizlere devam edilmiştir.



Şekil 16. Delesyonlu hADA2A, hADA2B ve hGCN5 proteinlerinin mayada ekspresyon analizlerine ilişkin temsili western blot görüntüleri. (A), (B) ve (C) sırasıyla farklı delesyonlar içeren hADA2A, hADA2B ve hGCN5 proteinlerinin maya hücrelerindeki ekspresyonlarına ait western blot görüntülerine aittir.

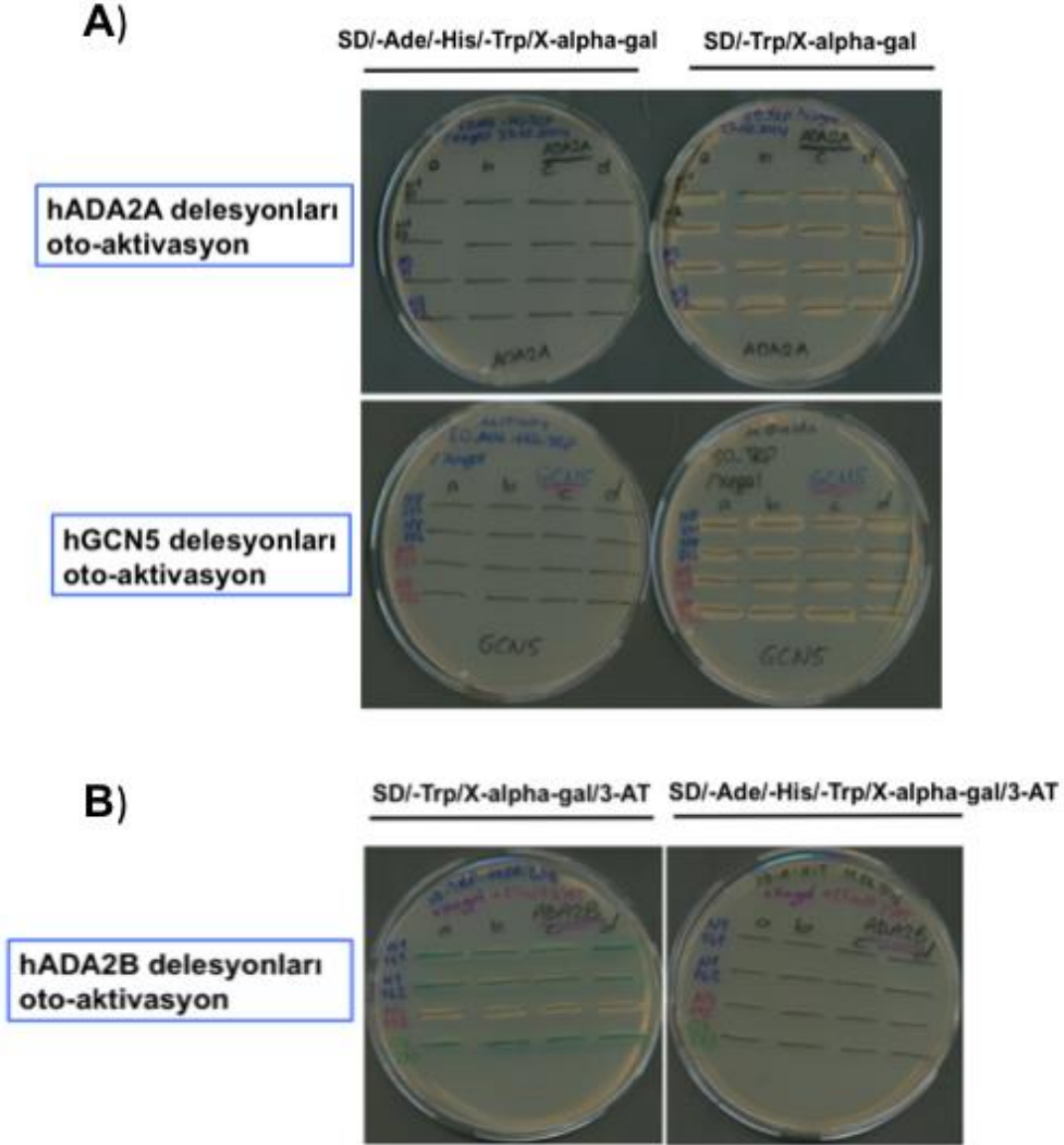
4.7.3 Delesyonlu hADA2A, hADA2B ve hGCN5 proteinlerinin mayada toksisite ve oto-aktivasyon testleri

Projemiz kapsamında hADA2A, hADA2B ve hGCN5 proteinleri için yaptığımız toksisite testleri, etkileşim bölgelerinin haritalanması amacıyla elde ettiğimiz delesyonlu hADA2A, hADA2B ve hGCN5 proteinleri için de tekrarlanmıştır. Delesyonlu hADA2A, hADA2B ve hGCN5 proteinlerinin ekspresyonları sonucunda maya hücrelerinde herhangi bir toksik etki yaratıp yaratmadıklarını belirlemek amacıyla AH109 maya suşu hem boş pGBKT7 plazmidi ile hem de delesyonlu hADA2A, hADA2B ve hGCN5 proteinlerini içeren BD plazmidleri ile ayrı ayrı transforme edilmiş ve transformantlar SD/-Trp seçici besi ortamına transfer edilmiştir. Transformantlar 30 °C'de 2-3 gün inkübasyonu takiben koloni sayıları ve morfolojileri bakımından fenotipik olarak karşılaştırılmıştır. Toksisite testleri delesyonlu hADA2A, hADA2B ve hGCN5 proteinlerini içeren maya hücrelerinin boş vektör ile transforme edilen maya hücreleri ile koloni sayıları ve koloni morfolojileri bakımından fenotipik olarak karşılaştırılabilir benzerlik gösterdiğini yani elde edilen delesyonlu proteinlerin ekspresyonlarının mayada herhangi bir toksik etkiye neden olmadıklarını göstermiştir.

Buna ek olarak Y2H ile etkileşimlerin analizi öncesinde hADA2A, hADA2B ve hGCN5 proteinleri için yapmış olduğumuz oto-aktivasyon testleri de elde ettiğimiz delesyonlu hADA2A, hADA2B ve hGCN5 proteinleri için tekrarlanmıştır. Bu amaçla delesyonlu hADA2A ve hGCN5 proteinlerini taşıyan bait vektörler ile transforme edilen AH109 maya hücreleri transformasyonu takiben belirli dilüsyonlarda SD/-Trp/X- α -Gal ve SD/-Ade/-His/-Trp/X- α -Gal seçici besi ortamlarına transfer edilmiştir. Yaptığımız oto-aktivasyon testleri sonucunda, delesyonlu hADA2A ve hGCN5 proteinlerini taşıyan rekombinant plazmidler ile transforme edilmiş maya hücrelerinin SD/-Ade/-His/-Trp/X- α -Gal seçici besi ortamında belirgin koloniler oluşturmadıkları yani oto-aktivasyon özelliklerinin bulunmadığı gözlenmiştir. Bu bölüm deneylere ait örnek plate görüntüleri Şekil 17. A'da verilmiştir.

Aynı deney kapsamında yine ADA2B protein kodlayan gen bölgesini taşıyan bait vektör ile transforme edilmiş maya hücrelerinde ihmal edilebilir bir oto-aktivasyon özelliği gözlenmiş ve bu oto-aktivasyon ADA2B proteini için potansiyel etkileşimlerin Y2H yöntemi ile test edilmesinde olası 'yanlış pozitif' sonuçların eliminasyonu amacıyla bu oto-aktivasyon özelliği ikinci bir raportör olarak *HIS3* ile ikili seçim yapılarak ve *HIS3* gen ürününün rekabetsel (kompetitif)-inhibitörü olan 3-AT kullanılarak elimine edilmiştir. Bu nedenle elde ettiğimiz delesyonlu hADA2B içeren bait vektörlerin oto-aktivasyon testleri de yine 3-AT varlığında gerçekleştirilmiş ve SD/-Ade/-His/-

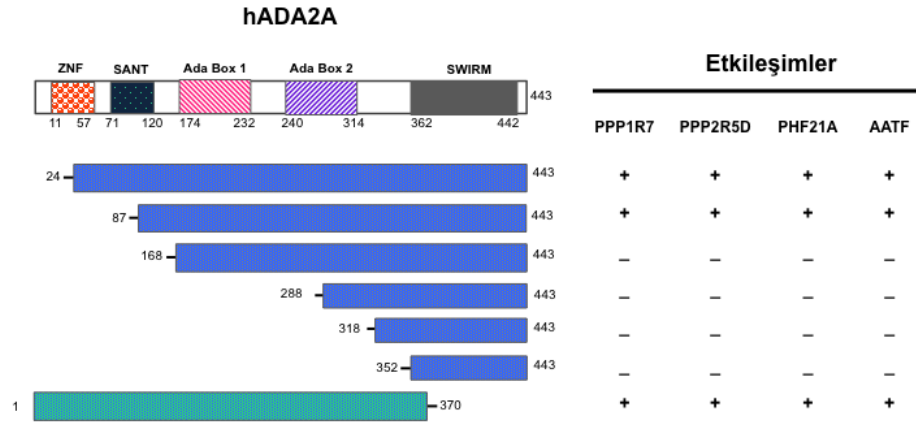
Trp/X- α -Gal/3-AT koloni gelişimin gözlenmediği yani delesyonlu hADA2B proteinlerinin mayada raportör genleri kendiliğinden aktive edebilme özelliklerinin bulunmadığı belirlenmiştir. Örnek plate görüntüleri Şekil 17. B’de verilmiştir.



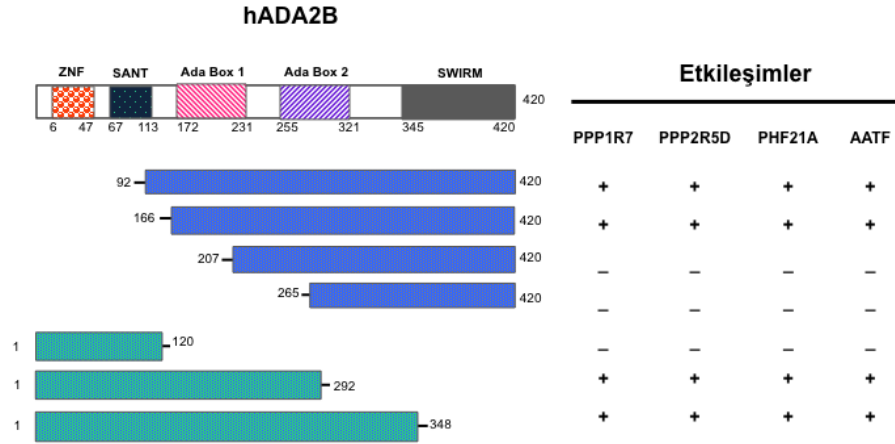
Şekil 17. Delesyolu hADA2A, hADA2B ve hGCN5 proteinlerinin mayada oto-aktivasyon testlerine ait örnek plate görüntüleri. (A) AH109 maya hücreleri delesyonlu pGBKT7/hADA2A ve /hGCN5 rekombinat plazmidleri ile transformasyonu takiben belirli dilüsyonlarda SD/-Trp/X- α -Gal ve SD/-Ade/-His/-Trp/X- α -Gal ve seçici besi ortamlarında 30°C’de 2-3 gün süresince inkübe edilmiştir, (B) Delesyonlu pGBKT7/hADA2B rekombinat plazmidlerini içeren AH109 hücreleri ise SD/-Trp/X- α -Gal/3-AT ve SD/-Ade/-His/-Trp/X- α -Gal/3-AT seçici besi ortamlarında değerlendirilmiştir.

4.7.4 AH109 Maya hücrelerinin aday etkileşim partnerleri ile eş-transformasyonu ve hADA2A, hADA2B, hGCN5 proteinlerinin etkileşimden sorumlu bölgelerinin haritalanması

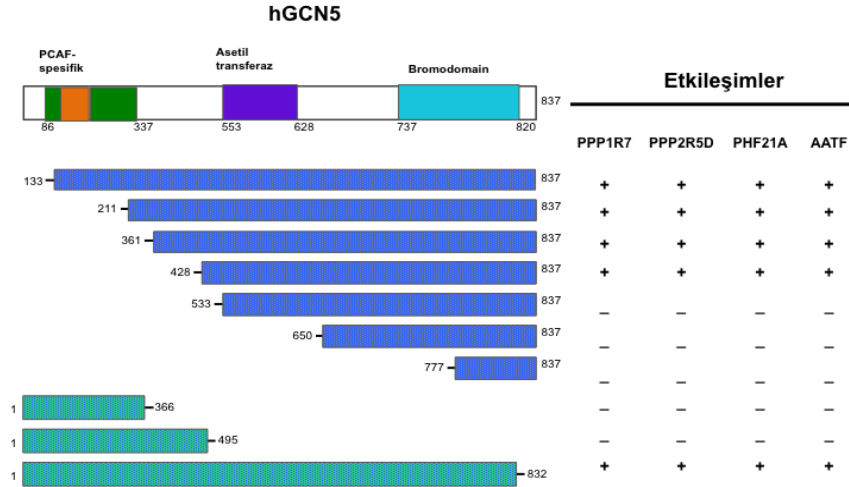
Etkileşimden sorumlu protein bölgelerinin belirlenmesi amacıyla mayada eksprese edilen, ekspresyonu sonucu herhangi bir toksik etki oluşturmayan ve oto-aktivasyon özelliği bulunmayan delesyonlu proteinleri taşıyan pGBKT7 plazmidlerinin seçimi gerçekleştirilmiştir. Ardından, AH109 maya hücreleri hem tam uzunluklu hem de delesyonlu proteinleri içeren pGBKT7-BD vektörleri kullanılarak, pGADT7-Rec AD plazmidinde klonlanmış olan aday etkileşim partnerleri ile birlikte eş-transforme edilmiştir. Mutasyonların etkileşimlerde meydana getirebileceği olası değişiklikler, eş-transformantların raportör genler bakımından seçici besi ortamına transfer edilmesi ile analiz edilmiştir. Bu analizlerimiz sonucunda hADA2A proteininde yer alan 'Ada Box 1' ve 'Ada Box 2' domainlerini içeren gen bölgelerinin protein-protein etkileşimlerinde önemli olduğu belirlenmiştir (Şekil 18). Benzer şekilde ADA2 proteininin diğer izoformu olan hADA2B için N-Terminal ve C-Terminal bölgelerinde yapılan delesyonel analizler 'Ada Box 1' ve 'Ada Box 2' bölgelerinin protein-protein etkileşimleri için gerekli olduğunu göstermiştir (Şekil 19). Her iki izoformda da yer alan ve proteinlerin N-Terminal bölgesinde bulunan SANT domaini ile C-Terminalinde bulunan evrimsel olarak korunmuş SWIRM domainlerinin ise protein etkileşimlerinde önemli bir rolü olmadığı belirlenmiştir. hGCN5 proteini ile yaptığımız delesyonel analizler sonucunda proteinin 553 ve 820. aa bölgeleri içerisinde yer alan 'Asetil Transferaz' ve C-Terminalinde bulunan 'Bromodomain' bölgelerini içeren protein domainlerinin etkileşimlerden sorumlu bölgeler olduğu belirlenmiştir (Şekil 20).



Şekil 18. hADA2A proteininin, partner proteinler ile etkileşimlerinde önemli olan gen bölgeleri.



Şekil 19. hADA2B proteininin, partner proteinler ile etkileşimlerinde önemli olan gen bölgeleri.



Şekil 20. hGCN5 proteininin, partner proteinler ile etkileşimlerinde önemli olan gen bölgeleri.

Yapılan alışmalar ADA2A ve ADA2B proteinlerinin N-Terminal bölgeleri aracılığıyla GCN5' a bağlanabildiklerini, N-Terminal bölgelerine yakın merkezi protein domainlerinin ise GCN5'in HAT domain ile etkileşimlerinde önemli olduğunu göstermiştir (Mao vd., 2006). Yine ADA2 proteinlerinde bulunan SWIRM domaininin ise nukleozomal ve çift zincirli DNA'ya bağlanmalarında önemli olduğunu, nukleozomal histon H3 ve linker histon H1'in nukleozom yapısına erişimlerinde rol aldığını göstermektedir (Qian vd., 2005). Dolayısıyla bu domain, protein-protein etkileşimlerinden ziyade protein-DNA etkileşimleri için gerekli olup ve kromatin yeniden dzenlenmelerinde önemlidir.

GCN5'in etkileşimlerinde önemli olduğunu belirlediğimiz 'Asetil Transferaz' domaini proteinin fonksiyonu açısından esas olan domaindir. Bu domain, histon ve histon olmayan proteinlerin N-Terminallerindeki zgn lizin rezidülerinin asetilasyonu yolu ile transkripsiyonel aktivasyonun kontrolünde görev alır (Dyda vd., 2000; Vetting vd., 2005). Bromodomain ise kromatin-lişkili ve histon asetil transferaz aktivitesine sahip olan proteinlerin yapısında bulunan bir domain yapısı olup, özgün olarak asetillenmiş lizin rezidüleri ile etkileşimde yer almaktadır. Bu domainin fonksiyonu tam olarak aydınlatılamamış olmakla birlikte protein-protein etkileşimlerinde önemli olabileceği, transkripsiyonel aktivasyonda rol alan çok-alt birimli protein komplekslerinin oluşumu ve fonksiyonu için gerekli olabileceği öne sürülmüştür (Zeng ve Zhou, 2002). şu halde bulgularımız, ADA2A, ADA2B ve GCN5'in etkileşimlerinde önemli olduğunu belirlediğimiz protein domainlerinin literatür raporları ile desteklendiğini göstermektedir.

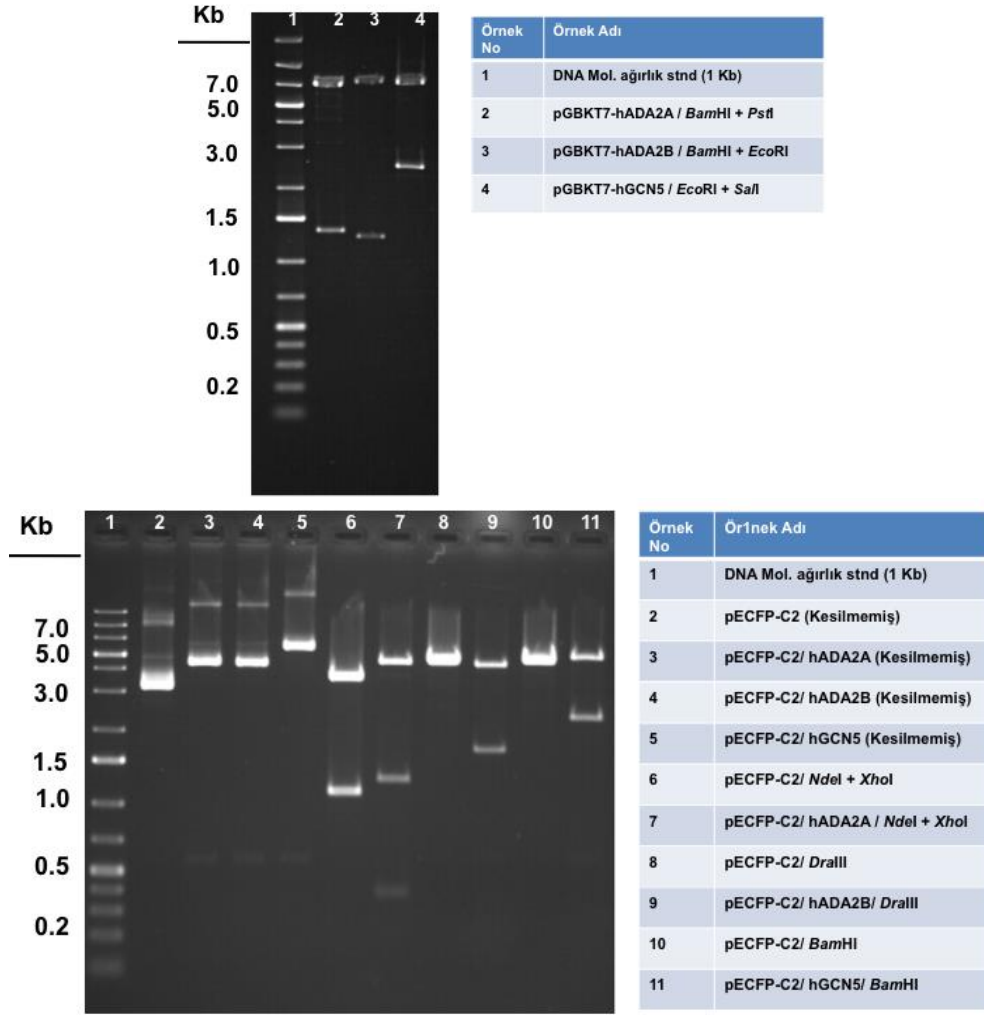
4.8 Mayada Belirlenen Protein-Protein Etkileşimlerinin Memeli Hücrelerde Verifikasyonları

Projemizde aday proteinler ile etkileşimlerini analiz etmeyi amaçladığımız hedef proteinler hADA2A, hADA2B ve hGCN5 insanlarda ifade edilen proteinler olmaları nedeniyle, Y2H yöntemi ile mayada göstermiş olduğumuz etkileşimlerin verifikasyonları memeli hücrelerinde gerçekleştirilmiştir. Memeli sistemlerde etkileşimlerin verifikasyonları raportör gen ekspresyonu analizleri ve proteinlerin eş-lokalizasyonlarının konfokal mikroskopu ile analizleri olmak üzere iki farklı yöntemle gerçekleştirilmiştir.

4.8.1 hADA2A, hADA2B ve hGCN5 protein kodlayan gen bölgelerinin memeli ekspresyon vektörlerine klonlanması

Memeli sistemlerde verifikasyonların öncesinde ilgili proteinleri kodlayan gen bölgeleri memeli ekspresyon vektörlerine klonlanmıştır. Raportör gen ekspresyonu analizleri için kullanılan rekombinant plazmidlerin bir bölümü projemize hipotez teşkil eden bir önceki çalışmamızda ekibimizde elde edilen pCMV-PPP1R7, pCMV-PPP2R5D, pCMV-PHF21A ve pCMV-AATF rekombinant plazmidleridir (Zencir vd., 2013b). Deneylerimizde kullandığımız diğer rekombinant plazmidlerden pcDNA3-Flag-hADA2A ve pcDNA3-Flag-hADA2B plazmidleri işbirliği içerisinde olduğumuz Macar Bilimler Akademisi'nden Dr. Boros'un laboratuvarından temin edilmiş, pcDNA3-Flag-hGCN5 ise proje yürütücüsü Dr. Zencir'in daha önce Dr. Boros'un danışmanlığında yer aldığı Avrupa Birliği projesi kapsamında işbirliği içinde bulunan Dr. Tora'nın laboratuvarından sağlanmıştır.

Konfokal mikroskopi analizlerinde kullanılan plazmidlerin klonlamaları ekibimizce tamamlanmıştır. Bu amaçla hADA2A, hADA2B ve hGCN5 protein kodlayan gen bölgeleri maya deneylerinde kullanılan ve başarılı bir şekilde eksprese edildikleri bilinen pGBKT7-hADA2A, pGBKT7-hADA2B ve pGBKT7-hGCN5 rekombinant plazmidlerinden hedef DNA'lar sırasıyla *Bgl*II + *Pst*I, *Eco*RI + *Bam*HI ve *Eco*RI + *Sal*I restriksiyonel kesim enzimleri kesimiyle çıkarılarak (Şekil 21, üst panel), *Bam*HI+*Pst*I, *Eco*RI+*Bam*HI ve *Eco*RI+*Sal*I enzimleri ile kesilen ve CFP fluoressan işaret taşıyan pECFP-C2 plazmidine klonlanmıştır. Klonlar restriksiyonel kesim analizleri ile kontroller sonrası ilgili deneyler için kullanılmıştır (Şekil 21, alt panel). Aday proteinler PPP1R7, PPP2R5D, PHF21A ve AATF ise yöntemin gerektirdiği üzere pEYFP-C3 plazmidine klonlanmıştır (Zencir vd., 2013a).

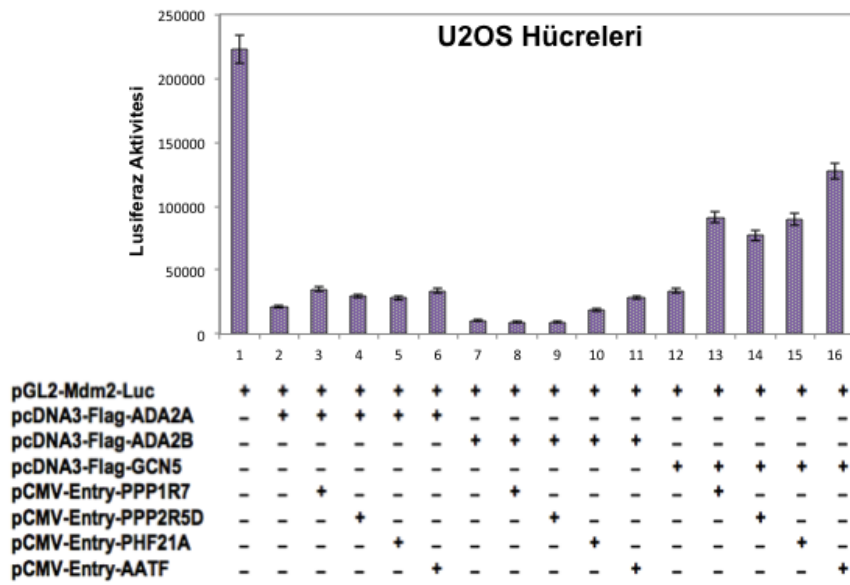


Şekil 21. pECFP-C2/ hADA2A, /hADA2B ve hGCN5 rekombinant plazmidlerinin eldesi ve kontrolleri için uygulanan restriksiyonel kesim analizlerine ait örnek agaroz jel görüntüsü.

4.8.2 Raportör gen ekspresyonu analizleri (Luciferase Assay)

Y2H taraması sonucu elde ettiğimiz potansiyel etkileşim partnerlerinin raportör gen aktivitesi üzerindeki etkilerini belirlemek üzere Lusiferaz testleri kullanılmıştır. Bu amaçla U2OS hücreleri hADA2A, hADA2B ve hGCN5 proteinlerini taşıyan rekombinant memeli ekspresyon plazmidleri ve aday proteinleri taşıyan memeli ekspresyon plazmidleri ile birlikte eş-transfekte edilmiş ve luminometre aracılığıyla lusiferaz aktivitesi ölçülmüştür. Lusiferaz aktivitesi ölçümleri için U2OS hücreleri transfeksiyon işleminin 24 saat öncesinde 2.0×10^5 hücre yoğunluğunda olacak şekilde 6-well plakelere transfer edilmiş ve %70-80 konfluent olan hücreler farklı plazmidler ile Turbofect transfeksiyon ajanı (Thermo) kullanılarak transfekte/eş-transfekte

edilmiştir (2 µg DNA/well). Transfeksiyon işlemi sonrasında hücreler 37°C'de %5 CO₂ ortamında 24 saat inkübasyonu takiben lusiferaz aktivitesi ölçümleri yapılmıştır. Lusiferaz aktivitesi ölçümleri en az 3 kez tekrar edilmiştir. Bulgularımız, dört aday partnerin hADA2A'nın transkripsiyonel aktivasyonunu arttırdığını ve hGCN5 etkileşimlerinde ise bu aktivasyonun önemli oranda olduğunu göstermiştir (Şekil 22). Aday partnerlerden fosfataz regülatörleri olan PPP1R7 ve PPP2R5D'nin hADA2B'nin lusiferaz aktivitesinde anlamlı bir artışa neden olmazken hADA2B'nin transkripsiyon faktörlerinden PHF21A ve AATF ile eş-transfeksiyonu sonucunda transaktivasyonu üzerinde artışa neden oldukları belirlenmiştir (Şekil 22).

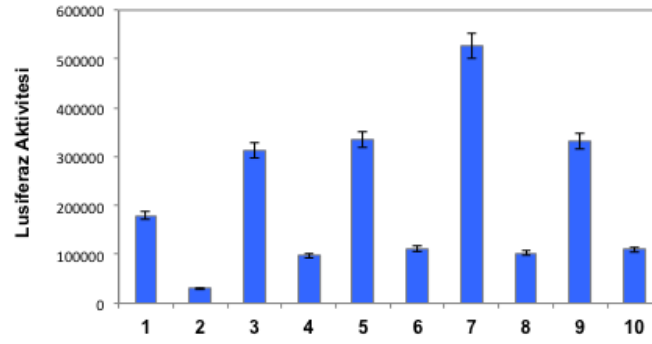


Şekil 22. Aday partnerlerin hADA2A, hADA2B ve hGCN5 proteinlerinin transkripsiyonel aktivasyonları üzerindeki etkileri. U2OS hücreleri lusiferaz raportör plazmidinin varlığında hADA2A, hADA2B, hGCN5 ve aday partnerler ile eş-transfekte edilmiş ve lusiferaz aktiviteleri ölçülmüştür.

Aday partnerlerin hADA2A, hADA2B ve hGCN5 proteinlerinin transaktivasyonu üzerindeki etkileri de projemiz kapsamına dahil edilmiştir. Bu amaçla yukarıda belirtildiği şekilde U2OS hücreleri hADA2A, hADA2B ve hGCN5'in aday protein partnerleri PPP1R7, PPP2R5D, PHF21A ve AATF ile eş-transfekte edilmiştir. Transfeksiyon işlemi sonrasında hücreler 37°C'de %5 CO₂ ortamında 24 saat inkübasyonu takiben lusiferaz aktivitesi ölçümleri yapılmıştır. Lusiferaz aktivitesi ölçümleri en az 3 kez tekrar edilmiştir. Bu deneyler sonucunda hADA2A, hADA2B ve hGCN5'in dört aday proteinin de transaktivasyonunu down-regüle ettiği belirlenmiş, bu baskılanmanın hADA2A ve hADA2B proteinleri varlığında daha dramatik olduğu gözlenmiştir (Şekil 23).

A)

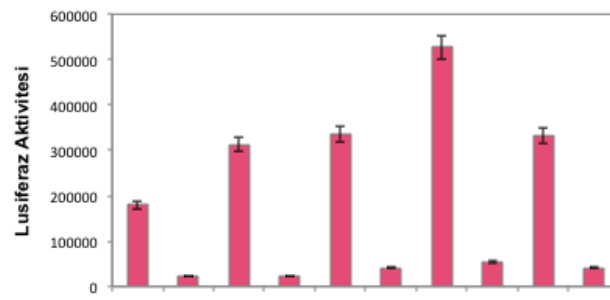
U2OS Hücrelerinde hADA2A Etkileşimleri



pGL2-Mdm2-Luc	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pcDNA3-Flag-hADA2A	-	+	-	+	-	+	-	+	-
pCMV-Entry-PPP1R7	-	-	+	+	-	-	-	-	-
pCMV-Entry-PPP2R5D	-	-	-	-	+	+	-	-	-
pCMV-Entry-PHF21A	-	-	-	-	-	-	+	+	-
pCMV-Entry-AATF	-	-	-	-	-	-	-	-	+

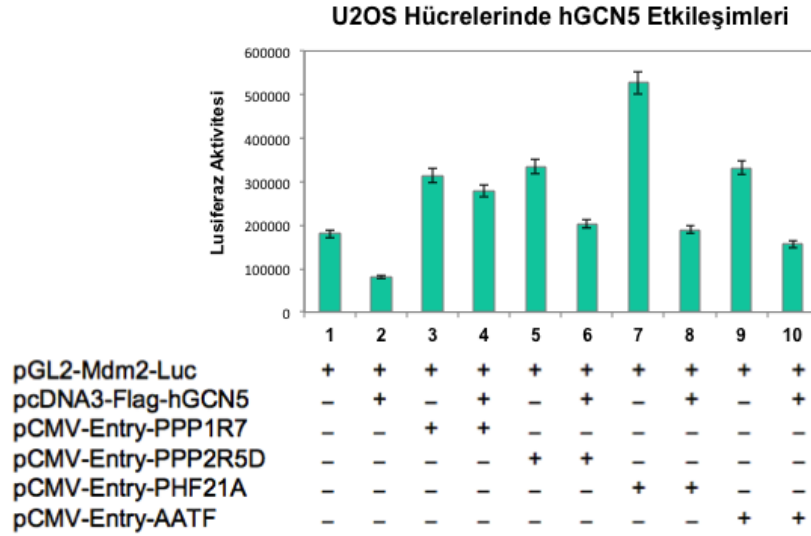
B)

U2OS Hücrelerinde hADA2B Etkileşimleri



pGL2-Mdm2-Luc	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pcDNA3-Flag-hADA2B	-	+	-	+	-	+	-	+	-
pCMV-Entry-PPP1R7	-	-	+	+	-	-	-	-	-
pCMV-Entry-PPP2R5D	-	-	-	-	+	+	-	-	-
pCMV-Entry-PHF21A	-	-	-	-	-	-	+	+	-
pCMV-Entry-AATF	-	-	-	-	-	-	-	-	+

C)



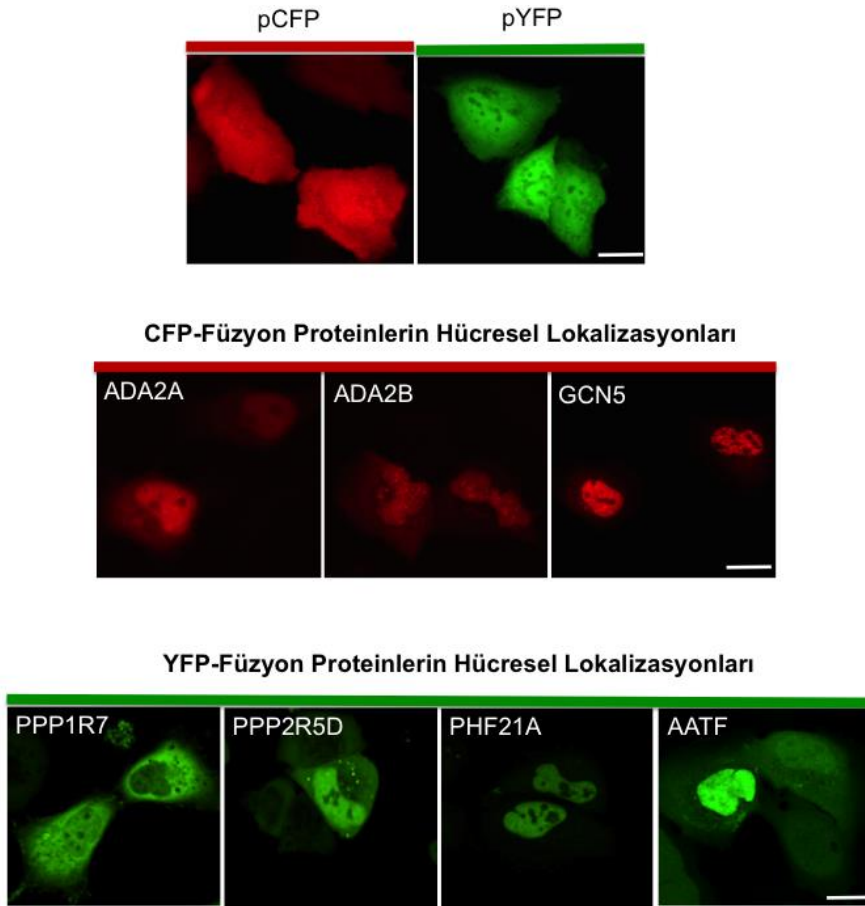
Şekil 23. hADA2A, hADA2B ve hGCN5'in aday partnerların proteinlerin transkripsiyonel aktivasyonları üzerindeki etkileri.U2OS hücreleri lusiferaz raportör plazmidinin varlığında (A) hADA2A, (B) hADA2B, (C) hGCN5 ve aday partnerler ile eş-transfekte edilmiş ve lusiferaz aktiviteleri ölçülmüştür.

4.8.3 Konfokal mikroskopi analizleri

Çalışmamızda hADA2A, hADA2B ve hGCN5 proteinlerinin etkileşimlerinin memeli sistemlerde verifikasyonu verilerimizi desteklemek amacıyla aday partnerler ile eş-lokalizasyonları konfokal mikroskopi analizleri değerlendirilmiştir. Konfokal mikroskopi çalışmalarında en yaygın olarak kullanılan vektörlerden birisi CFP ve YFP vektör çiftidir. Bu vektörlerin her ikisi de yeşil floresan protein (Green Fluorescent Protein; GFP) türevleridirler. Çalışmamızın bu bölümü için yapılan klonlamalar 'Gereç ve Yöntem' bölümünde ayrıntılı olarak verilmiştir. Elde edilen rekombinant pECFP ve pEYFP vektörleri çoklu restriksiyonel kesim analizleri ve dizi analizleri ile doğrulanmıştır (sunulmayan veriler). Konfokal mikroskopi analizlerimiz ilk olarak boş vektörlerin beklenen floresan ışığı verip vermediklerinin kontrolü ile başlamıştır; pECFP ve pEYFP vektörleri ile transforme edilen U2OS hücrelerinin konfokal mikroskopi analizleri sonucu elde edilen temsili hücre görüntüleri Şekil 24'te verilmiştir. Boş pECFP ve pEYFP vektörlerinin U2OS hücrelerinde ekspresyonları sonucu beklenen floresan görüntü teyid edildikten sonra, U2OS hücreleri hADA2A, hADA2B, hGCN5 proteinlerini taşıyan pECFP-C2 ve potansiyel etkileşim partnerlerini taşıyan pEYFP rekombinant plazmidleri aynı

koşullarda eş-transfekte edilmiş ve 24 saat inkübasyonun sonrası hücreler konfokal mikroskopisi ile analiz edilmiştir.

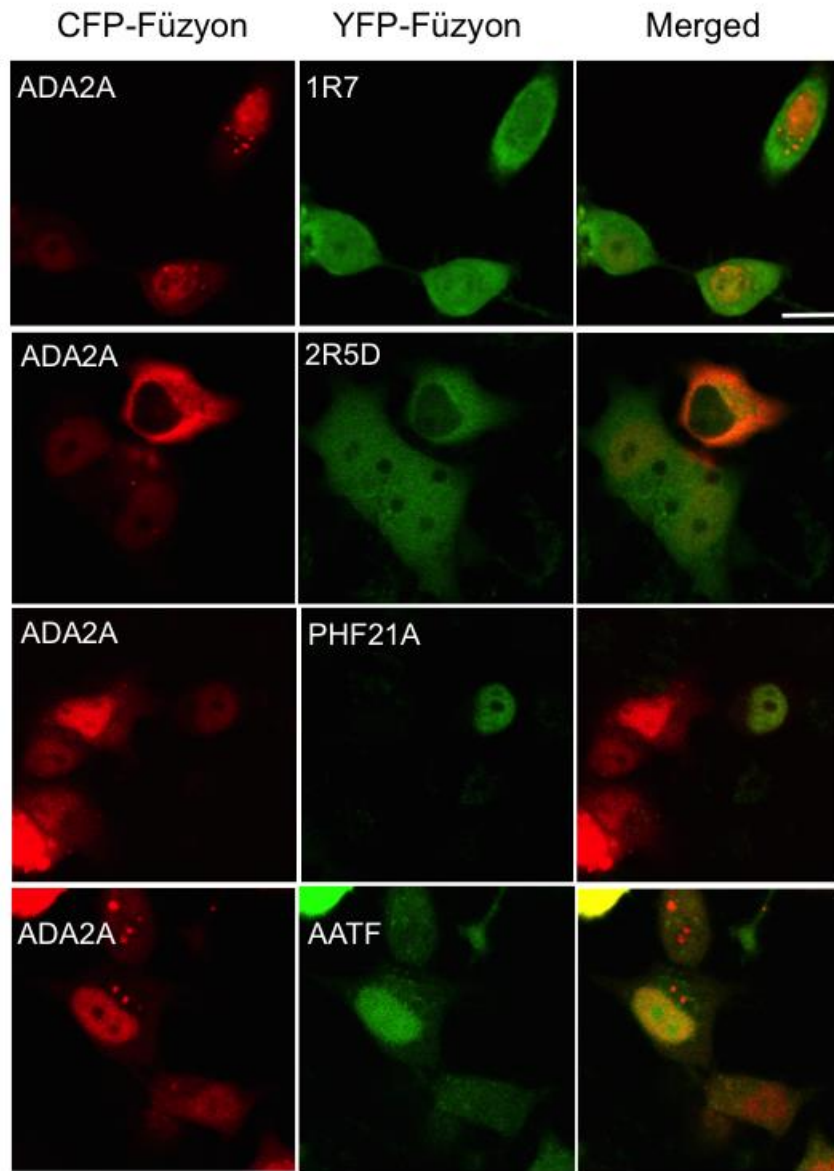
Daha sağlıklı bir değerlendirme yapabilmek için eş-lokalizasyonların öncesinde U2OS hücreleri bütün partnerler ile ayrı ayrı transfekte edilerek her bir proteinin hücredeki lokalizasyonları belirlenmiştir. Hedef proteinler hADA2B ve hGAC5'in beklenildiği üzere yoğun olarak nukleusta lokalize oldukları gözlenirken, hADA2A'nın yoğun nuklear lokalizasyonunun yanı sıra sitoplazmada da bulunduğu ve bu durumun hücrenin içinde bulunduğu hücre döngüsü aşamaları ve proteinin hücresel fonksiyonu ile ilişkili olabileceği şeklinde yorumlanmıştır (Şekil 24). Projemize temel teşkil eden hADA3 ile yaptığımız çalışmalarda PPP1R7'nin tek başına transfekte edildiği hücrelerde bu proteinin yoğunlukla sitoplazmada lokalize olduğu diğer etkileşim partnerleri olan PPP2R5D, PHF21A ve AATF'nin ise nukleusta lokalize olduğu daha önceki çalışmalarımızda rapor edilmiştir (Zencir vd., 2013a).



Şekil 24. U2OS hücrelerinde hADA2A, hADA2B ve hGCN5 proteinleri ile etkileşim partnerlerinin hücresel lokalizasyonları.

Kontrol denemelerini takiben pECFP-hADA2A, -hADA2B, hGCN5 klonları ve potansiyel etkileşim partnerlerini taşıyan pEYFP vektörleri ile eş-transfekte edilerek U2OS hücrelerinde eş-lokalizasyonları analiz edilmiştir. Konfokal analizlerimiz sonucunda hADA2A proteininin aday etkileşim partnerleri ile eş-lokalize olduğu ancak lokalizasyonların bazı hücrelerde sitoplazmik ve bazı hücrelerde nuklear olduğu belirlenmiştir (Şekil 25). Bu durum hADA2A etkileşimlerinin proteinin fonksiyonuna bağlı olarak geçici etkileşimler olabileceği şeklinde yorumlanmıştır.

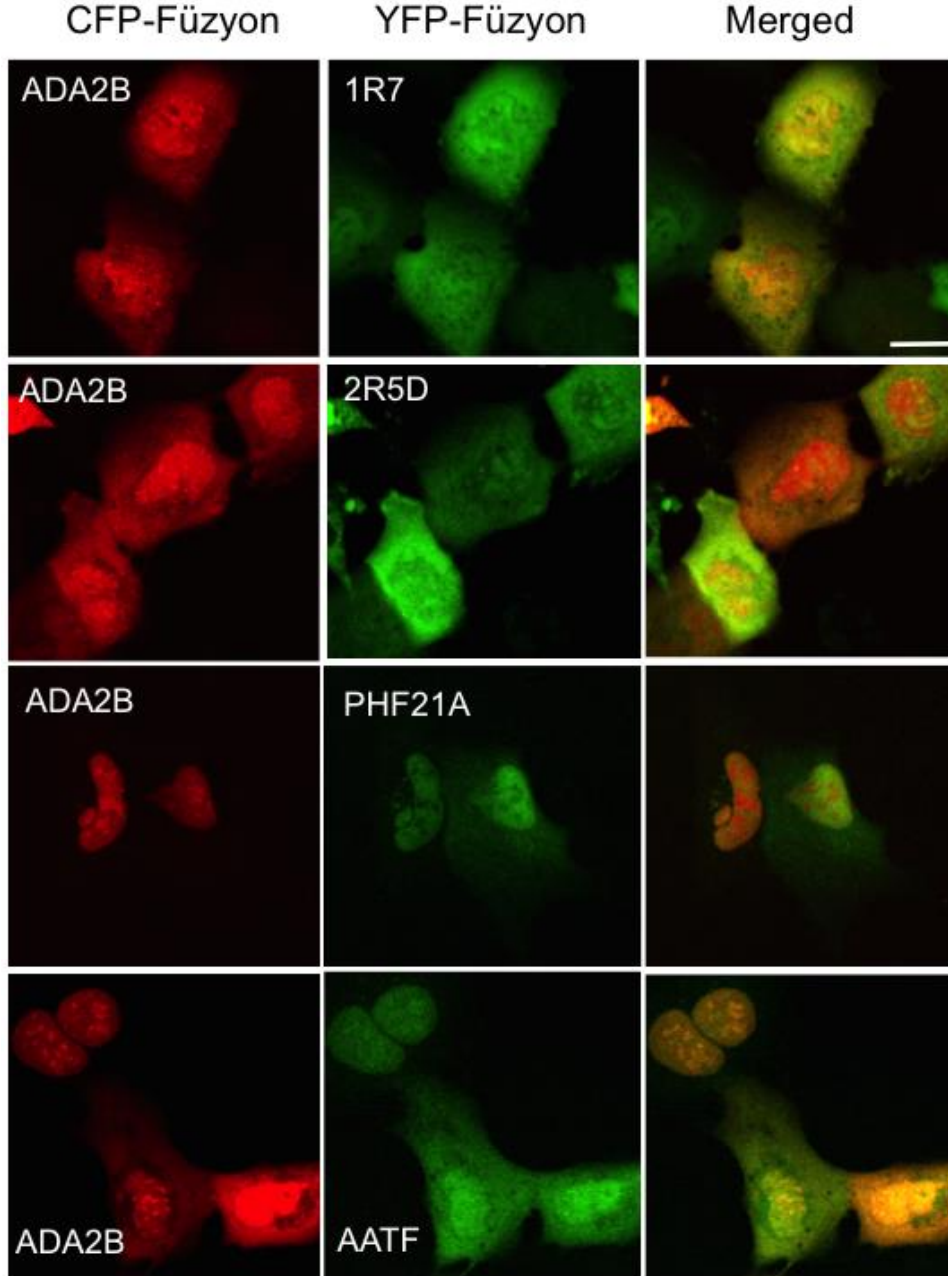
ADA2A ve Partnerlerin Eş-Lokalizasyonları



Şekil 25. U2OS hücrelerinde hADA2A'nın aday etkileşim partnerleri ile eş-lokalizasyonları.

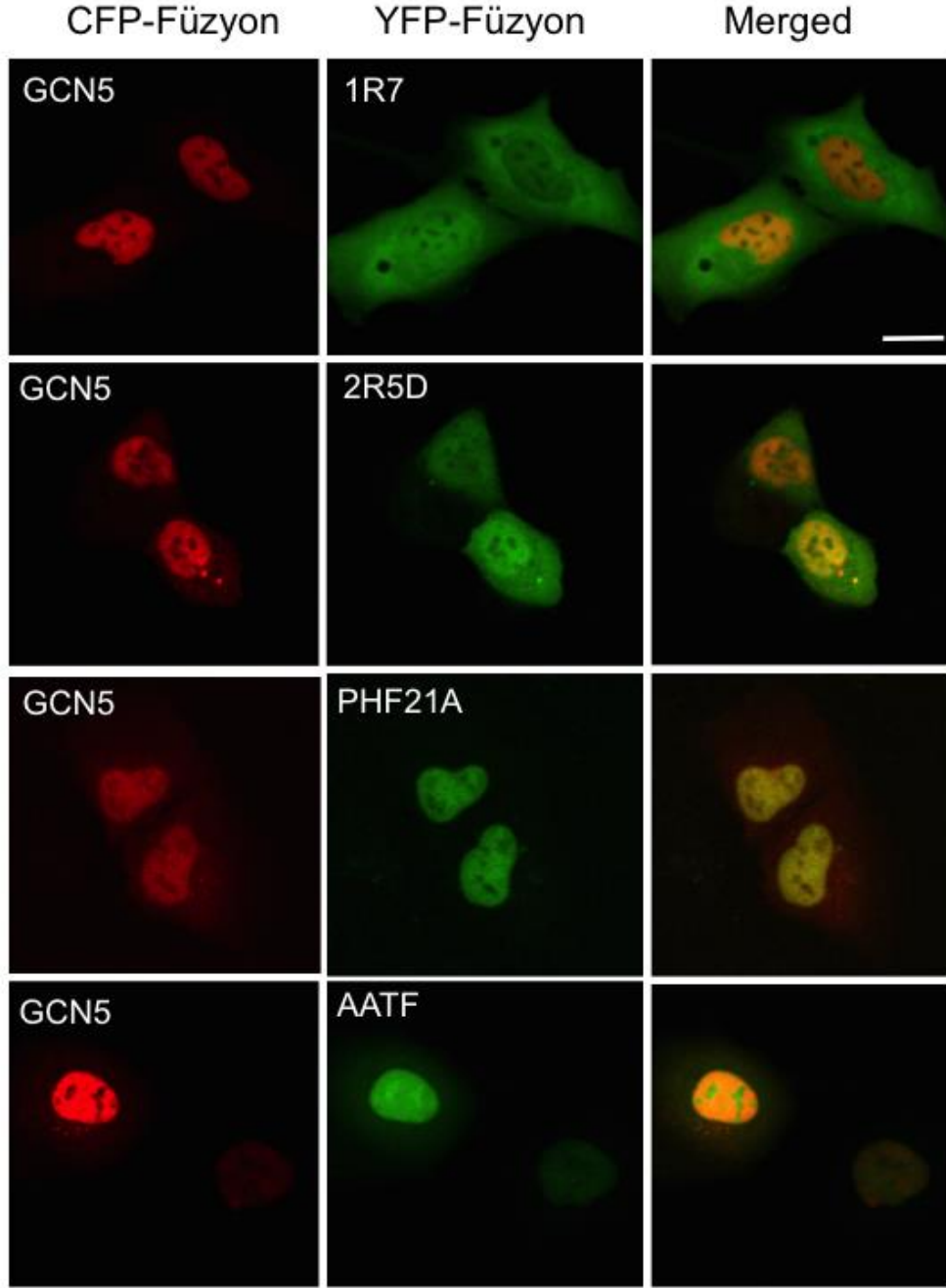
Öte yandan U2OS hücrelerinde hADA2B ve hGCN5'in aday partnerler ile etkileşimlerinin oldukça kararlı olduğu belirlenmiştir (sırasıyla Şekil 26 ve 27)

ADA2B ve Partnerlerin Eş-Lokalizasyonları



Şekil 26. U2OS hücrelerinde hADA2B'nin aday etkileşim partnerleri ile eş-lokalizasyonları.

GCN5 ve Partnerlerinin Eş-Lokalizasyonları



Şekil 27. U2OS hücrelerinde hGCN5'in aday etkileşim partnerleri ile eş-lokalizasyonları.

Sonuç olarak memeli hücrelerinde yaptığımız gerek raporör gen analizleri gerekse konfokal mikroskopisi analizleri mayada Y2H ile belirlemiş olduğumuz etkileşimleri destekler niteliktedir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Projemizde farklı hücresel süreçlerin regülasyonunda rol alan HAT komplekslerinin içerisinde yer almaları nedeniyle gen ekspresyonunun ve transkripsiyonunun regülasyonunda oldukça önemli fonksiyona sahip olan hADA2 ve hGCN5 proteinlerinin daha önce ekibimiz tarafından rapor edilen dört yeni hADA3 etkileşim partnerleri ile etkileşimlerinin tanımlanması hedeflenmiştir. Bu proje kapsamında ekibimiz hADA2A, hADA2B ve hGCN5 proteinlerini kodlayan cDNA'ların klonlanmasını ve maya hücrelerinde ekspresyonunun takiben, Y2H yöntemiyle dört yeni aday protein partnerleri ile etkileşimlerini tanımlamıştır. Bulgularımız memeli hücre kültüründe yapılan raportör gen aktivitesi takibi ve konfokal mikroskopi analizleri ile biyolojik olarak da verifiye edilmiştir.

Projemizde ADA2 ve GCN5 ile etkileşimlerini araştırdığımız proteinlerden birisi olan AATF, transkripsiyon faktörlerinin karakteristik özelliği olarak lösin-fermuar domaini içeren, evrimsel olarak korunmuş bir RNA Polimeraz-bağlanma proteini olup transkripsiyonun ve hücre bölünmesinin regülasyonu, fizyolojik ve patolojik durumlarda hücrenin canlılığının sağlanması gibi çok geniş metabolik yollarda rol aldığı, ayrıca DNA hasar mekanizması (DNA damage response; DDR), genom bütünlüğünün sağlanması ve tumor oluşumunu engelleyen kompleks sinyal yollarının elemanlarından birisi olduğu bilinmektedir (Sorino vd., 2013; De Nicola vd., 2014; Iezzi ve Fanciulli, 2015). AATF'nin birçok fonksiyonu post-translasyonel olarak düzenlenir ki bu modifikasyonlar ayrıca proteinin etkileşim özgünlüğü belirlerken, DNA hasarı durumunda kararlılığının sağlanmasında da önemlidir. AATF'nin retinoblastoma proteini ile etkileşerek Histon Deasetilaz 1 (HDAC1)'in RB1/EF2 kompleksinden ayrılmasına neden olduğu, böylelikle E2F hedefli genlerin transkripsiyonel olarak aktive edilmesine ve hücre döngüsünün ilerlemesine yardımcı olduğu rapor edilmiştir (Fanciulli vd., 2000; Bruno vd., 2006; Sorino vd., 2013). AATF'nin over-eksprese edilmesi durumunda MAP3K12 aracılı apoptozu inhibe ettiği bilinmektedir. Daha önemlisi AATF'nin etkileşim gösterdiği rapor edilen MAP3K12'nin fizyolojik partneri olarak bilinen MAP3K12-Binding Inhibitory Protein 1 (MBIP) Histon 3 (H3) ve Histon 4 (H4) proteinlerinin asetilasyonunda önemli olan ve ADA2A içeren HAT kompleksinin (ATAC) bir bileşenidir (Guelman vd., 2009). Bu bulgular projemizde, AATF'nin hADA3 ile etkileşimlerinin yanı sıra ADA içeren HAT komplekslerine özgün olarak belirlemiş olduğumuz ADA2 ve GCN5 protein-protein etkileşim verilerimizi destekler niteliktedir.

Ökaryotik hücreler DNA hasarına yanıt (DNA damage response; DDR) durumunda hücre döngüsünü durdurmak ve DNA hasarını onarmak ya da apoptozu uyarmak amacıyla kontrol

noktalarını aktive ederler. Bilindiği gibi p53 tümör baskılayıcı bir gen olup temel olarak büyümenin durdurulması ve apoptoz ile ilgili genlerin transkripsiyonel olarak regülasyonunda rol alan bir proteindir. Genotoksik bir hasar durumunda p53 farklı mekanizmalar aracılığı ile hücre döngüsünün G1/S ve/veya G2/M kontrol noktalarında durdurulmasına yardımcı olur. Proliferatif fonksiyonunun yanı sıra AATF'nin, çeşitli hücrel stresle yanıt sırasında güçlü bir anti-apoptotik aktivite göstererek apoptozun regülasyonunda fonksiyon gösterdiği rapor edilmiştir. Ayrıca, farklı genotoksik ajanların neden olduğu DNA hasarı durumunda, ATM/ATR ve Chk2 tarafından AATF'nin post-translasyonel olarak modifikasyonu uyarılır ve AATF özgün rezidülerinden fosforile edilir. Bu aktivasyon fonksiyonel olarak G₂/M kontrol noktasını uyararak DNA hasarı ile ilişkilidir. AATF'nin DNA hasarına yanıt sürecinde ATM-Chk2 tarafından fosforillenmesi proteinin nuklear translokasyonuna neden olarak, p53 promotoruna bağlanması ve buna bağlı olarak p53'ün hedef genleri olan PUMA, BAX ve BAK gibi apoptotik genlerin ekspresyonunun baskılanmasına neden olur (Jackson ve Lozano, 2012; Höpker vd., 2012a; Höpker vd., 2012b). AATF'nin inhibe edildiği hücrelerde antikanser ilaçların sitotoksitesinin arttığı ve buna bağlı olarak tümör hücrelerindeki kemoresistansın geri dönüştürüldüğü gösterilmiştir. Yine bu bulgu ile ilişkili olarak, AATF'nin delesyon ile çıkarıldığı insan kanser hücrelerinde p53 ekspresyonunun dramatik bir şekilde azaldığı, DNA hasarı kontrol noktalarının uyarıldığı ve p73'ün ve apoptozun indüklendiği belirlenmiştir (Jackson ve Lozano, 2012; Höpker vd., 2012a; Höpker vd., 2012b). hADA3 proteini de hp53 ile etkileşim gösterdiği bilinen önemli bir proteindir. Memeli hücrelerinde hADA3'ün over-ekspresyonunun, p53'ün hücredeki seviyesinin ve p53-hedefli genlerin transkripsiyonel aktivitelerinin artmasına neden olduğu rapor edilmiştir. ADA3'ün p53 ile etkileşerek p53'ün asetilasyonu, stabilizasyonu ve aktivitesinin regülasyonunda anahtar rol oynayabileceği ileri sürülmektedir (Nag vd., 2007).

p53 birçok hücrel sürecin kontrolünde yer alan önemli bir proteindir, p53 tarafından kontrol edilen bu süreçlerde hücrenin kaderinin belirlenmesi oldukça kompleks bir mekanizmadır. p53'ün aktivitesini düzenleyen yollar hala tam olarak aydınlatılamamış olup çok sayıda cevap bekleyen sorular bulunmaktadır. Özellikle son yıllarda yapılan çalışmalar AATF'nin, p53 yanıtının oluşmasındaki önemli rolü nedeniyle gündeme gelmesine olanak sağlamıştır. AATF'nin, pro-apoptotik p53 hedef genleri PUMA, BAX ve BAK proteinlerinin uyarılmasını engelleyerek p53 aracılı apoptozun seçici olarak baskılanmasında rol almasının dışında, p38/MK2/AATF sinyal yolağı tumor hücrelerinde p53 aracılı apoptozun baskılanmasında kritik öneme sahip olduğundan bulgularımız bu yolağın regülasyonunun aydınlatılması ve bu yolağı hedefleyen terapötiklerin geliştirilmesi bakımından son derece

önemlidir. Şu halde bulgularımız, hücredeki fonksiyonları nedeniyle son yıllarda kanser tedavisinin yeni hedeflerinden birisi olarak gündeme gelen AATF'nin hem hADA2A'nın da içinde yer aldığı ATAC kompleksi ile dolaylı olarak etkileşim göstermesi, hem de hADA3'ünde etkileşim gösterdiği bilinen p53'ün transkripsiyonel olarak aktivasyonunun regülasyonunda rol alması bakımından önem kazanmaktadır.

Transkripsiyonun regülasyonunda görev alan diğer etkileşim partneri PHF21A, BRAF35/HDAC kompleksi (BHC) olarak bilinen kompleksin bir elemanı olup ayrıca BHC80 olarak da adlandırılmaktadır. Bu kompleks sinapsin ve sodyum-kanal genleri gibi bir takım genlerin promotorlarına bağlanarak nöron-spesifik genlerin baskılanmasında rol almaktadır. PHF21'nin özgün olarak H3K4 histon proteinine bağlanması, komplekste yer alan ve histon metiltransferaz aktivitesine sahip olan LSD1-aracılı gen baskılanmasında fonksiyona sahip olduğu bilinmektedir (Lan vd., 2007). Daha önemlisi PHF21A'nın Potocki-Shaffer syndrome (PSS) adı verilen bir gen hastalığı ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Kim vd., 2012; Montgomery vd., 2013). Bu proteinin PSS bölgesine translokasyonu ile hasar gördüğü veya ekspresyonunun azaldığı durumlarda Intellectual Disability (ID) adı verilen zeka geriliği bulgusu ile karşılaşılmış, dolayısıyla normal beyin gelişimi için de transkripsiyonel kontrol ve kromatin yeniden düzenlenmelerinin önemi vurgulanmıştır (Kim vd., 2012; Montgomery vd., 2013). Nöron-spesifik genlerin baskılanması, hem nöronal hem de nöronal olmayan dokuların gelişiminde temel öneme sahiptir. Bu nedenle histon modifiye edici komplekslerin düzenleyici veya enzimatik öneme sahip bileşenlerinde meydana gelebilecek mutasyonlar nörolojik gelişim sırasında gerekli kromatin düzenlenmeleri için oldukça kritiktir. Sonuç olarak transkripsiyonun regülasyonunda kromatin yapısındaki düzenlemelerin oldukça önemli olduğu bilinmektedir. Kromatin yapısındaki modifikasyonlar HAT ve HDAC kompleksleri arasındaki dinamik ilişkiler ile düzenlenmektedir. Dolayısıyla HAT kompleksinin üyeleri olan ADA proteinleri ve GCN5 ile etkileşim partneri olarak belirlediğimiz HDAC kompleksinin önemli bir üyesi PHF21A'nın etkileşimi verilerimizi doğrular niteliktedir.

Hücresel proseslerin düzenlenmesinde geri dönüşümlü protein fosforilasyonu en yaygın düzenleme mekanizması olarak bilinmektedir. Hücrede birçok proteinin aktivitesi net protein fosforilasyonu ve de-fosforilasyonu ile dolayısıyla spesifik kinazlar ve fosfatazlar arasındaki dengeye bağlı olarak belirlenebilmektedir. Projemizde hücresel proseslerde önemli olan fosfataz ailesine ait iki farklı proteinin ADA2 ve GCN5 ile etkileşimleri belirlenmiştir. Bu proteinlerden birisi PPP2R5D, fosfataz 2A (PP2A) regülatör altbirim B ailesine aittir. PP2A, Serin/Treonin fosfatazların temel bir üyesi olup transkripsiyon, translasyon, iyonların iletimi, gelişim, hücre

büyümesi ve farklılaşması, apoptoz gibi çok sayıda hücrel prosesin kontrolünde görevlidir (Yu vd., 2014). Heterotrimerik PP2A haloenzimleri temel yapısal bir A alt birimi, regülatör bir B altbirimi ve katalitik aktiviteye sahip C alt biriminden oluşmaktadır. Bu regülatör alt birimin hücre döngüsünün regülasyonunda, DNA replikasyonunda, hücrenin büyümesi ve apoptozda, çeşitli sinyal iletim yollarının düzenlenmesinde önemli role sahip olduğu rapor edilmiştir. PP2A haloenzimlerinin fonksiyonlarını aydınlatmak üzere yapılan çalışmalarda B alt birimi taşıyan PP2A proteinlerinin Raf1 kinaz ile etkileşimleri ile bu proteinlerdeki fosfat gruplarını uzaklaştırarak ERK1/2 aktivasyonunu kontrol ettikleri belirlenmiştir. Bu aktivasyon ise MEK1/2 ve ERK1/2 proteinlerinin fosforilasyonunu ve aktivasyonunu indüklemektedir (Adams vd., 2005). Ayrıca son yıllarda yapılan çalışmalar PPP2R5D'nin klinik önemini de ortaya koymuştur. Nörofibriler yapıların önemli bir bileşeni olan Tau proteinlerinin izoformlarının hiperfosforilasyonu Alzheimer hastalığının ayırıcı özelliklerindedir. PP2A, Tau proteinin fosforilasyonunda rol oynamaktadır (Yu vd., 2014). PPP2R5D'nin down-regülasyonu, Tau'nun Ser-202/Thr-205, Thr-231 ve Ser-422 rezidülerinden fosforilasyonunun azalmasına neden olmaktadır. Ancak elde edilen bulgular henüz bu mekanizmanın nasıl çalıştığını açıklayabilecek nitelikte değildir. Dolayısıyla PPP2R5D'nin fonksiyonunun ve moleküler etkileşimlerinin aydınlatılması Tau proteininin bölge-spesifik fosforilasyonun nasıl gerçekleştiğinin anlaşılması bakımından önemli olduğu gibi Alzheimer hastalığının tedavisi için de yeni yolların bulunmasında anahtar role sahiptir.

Son etkileşim partnerimiz yine fosfataz sınıfı protein olan PPP1R7 (SDS22) olup tip 1 Serin/Treonin fosfatazların (PP-1) regülatör alt birimi olarak bilinmektedir (Ceulemans vd., 2002; Peggie vd., 2002). PP-1 metabolizma ve protein sentezi gibi önemli hücrel proseslerin yanı sıra ayrıca mitozda ve bazı anahtar proteinlerin defosforilasyonunun düzenlenmesinde de önemli olan bir proteindir. PP1'in etkileşim gösterdiği regülatör altbirimler henüz bütünüyle aydınlatılmamış olmakla birlikte günümüze kadar yapılan çalışmalar SDS22 metafaz/anafaz geçişinde kromozomların ayrılmasında rol alan temel proteinlerden birisi olduğunu göstermiştir (Ceulemans vd., 1999; Peggie vd., 2002). SDS22'nin kinetokorlar ve mikrotübüller arasındaki etkileşimin regülasyonunda önemli olduğu bilinen Aurora B proteini ile etkileşim gösterdiği bilinmektedir. Mitoz sırasında kromozomların ayrılması AuroraB kinaz ve PP1 aktiviteleri tarafından düzenlenmektedir. PP1'in kinetokorlardaki fonksiyonu PPP1R7 ile ilişki olup PPP1R7'in kesin hücrel lokalizasyonu ve PP1 fonksiyonunu nasıl düzenlediği halen netlik kazanmamıştır (Wurzenberger vd., 2012). Aurora B'nin Transforming Acidic Coiled-coil-Containing protein 1 (TACC1) ile etkileşim gösterdiği de bilinmektedir-ki TACC1 proteininin

onkojenik transkripsiyon faktörlerinden YEATS domain-containing protein 4 (YEATS4) ile etkileşim gösterdiği rapor edilmiştir (Delaval vd., 2004). YEATS4, özellikle nükleozomal histonlardan H4 ve H2A'in asetilasyonu olmak üzere spesifik genlerin transkripsiyonel aktivasyonunda görev alan NuA4 HAT kompleksinin bir bileşenidir (Doyon vd., 2004). Bu kompleks onkogen ve proto-onkogen aracılı büyümenin indüksiyonu, tümör baskılayıcı aracılı büyümenin durdurulması ve replikatif yaşlanma, apoptoz ve DNA tamiri gibi transkripsiyonel proseslerin aktivasyonunda gerekli olabilmektedir. NuA4 ayrıca DNA hasarının olduğu durumlarda DNA'nın tamirinde doğrudan görev alabilen bir proteindir (Doyon vd., 2004; Doyon ve Cote, 2004). Projemiz bakımından daha da önemlisi TACC1'nin GCN5L2 ve PCAF kompleksleri ile etkileşim gösterdiğinin rapor edilmiş olmasıdır (Gangisetty vd., 2004). Transforming Acidic Coiled-coil-Containing protein 3 (TACC3) de yine Aurora B'nin etkileşim gösterdiği proteinlerden birisidir. Bu proteinin hücre büyümesi ve farklılaşmasının kontrolünde gerekli olabileceği düşünülmekte ve TACC1'e benzer olarak GCN5L2 ve PCAF kompleksleri ile etkileşim gösterdiği bilinmektedir (Gangisetty vd., 2004). Hücre bölünmesi esnasında kromozomların yanlış ayrılması potansiyel karsinojenik etkiye sahip olan aneuplodilere neden olabilmektedir. Dolayısıyla PPP1R7 aracılı kromozom ayrılması mekanizmasının ve bu yolakta yer alan protein etkileşimlerinin aydınlatılması oldukça önemlidir. HAT / HDAC aktivitelerinin düzenlenmesinde görev alan ve hücre bölünmesinde kritik öneme sahip olan fosfatase ailesi proteinlerinden iki tanesinin ADA içeren kompleksler ile etkileşimleri bu proteinlerin düzenledikleri yolların düzenlenmesine ve yeni yolların aydınlatılmasına önemli katkılar sağlayabilecek niteliktedir.

Sonuç olarak yukarıda ayrıntılı olarak sunulan AATF, PHF21A, PPP2R5D ve PPP1R7 proteinlerinin fizyolojik özellikleri göz önüne alındığında bulgularımızın anlamlı ve güvenilir olduğu görülmektedir. ADA içeren protein kompleksleri için belirlediğimiz bu yeni etkileşim partnerlerinin mekanistik karakterizasyonu uzun vadede gen ekspresyonunun ve transkripsiyonel regülasyonunun düzenlenmesinde, HAT ve HDAC komplekslerinin dinamik ilişkilerinin aydınlatılmasında önemli bulgular sağlayacağı kanısındayız.

ADA ve GCN5 içeren komplekslerin epigenetik regülasyondaki fonksiyonlarının anlaşılması, bunun yanı sıra genom kararlılığının korunması ve yaşlanma süreçlerindeki fonksiyonlarının aydınlatılması önemlidir. Şu halde bulgularımız daha önce hADA3 için belirlediğimiz dört yeni etkileşim partnerlerinin etkileşimlerinin hADA3 içeren komplekslere özgün olabileceğini destekler niteliktedir. Özellikle hADA2A ve hADA2B etkileşimlerinde gözlemlediğimiz farklanmalar dikkat çekicidir. Çünkü, son yıllarda yapılan çalışmalar SAGA ve

ATAC HAT komplekslerinin farklı yapısal ve fonksiyonel alt-birimlerden oluştuğunu ve bu komplekslerin bağlanma özelliklerinin, her ne kadar küçük benzerlikler gösterse de, komplekse özgün olduğunu göstermiştir (Nagy vd., 2010; Krebs vd., 2011). ATAC 'enhancer' ve 'promotor' bölgelere bağlanma eğiliminde iken SAGA temel olarak 'promotor' bölgelere bağlanma özgünlüğü göstermektedir. Dahası, SAGA ve ATAC komplekslerinin birbirinden farklı gen ailelerinin regülasyonunda görev aldıkları rapor edilmiştir (Nagy vd., 2010; Krebs vd., 2011). Bu bulgular bu iki kompleksin fonksiyonel olarak önemli farklılıklar gösterdiğini ortaya koymaktadır. Projemiz kapsamına dahil ettiğimiz ve bu iki farklı komplekse özgün oldukları bilinen ADA2A ile ADA2B proteinlerinin etkileşim ağının aydınlatılması ATAC ve SAGA komplekslerinin bağlanma özgünlüklerinin ayrıtılandırılması, yine bu farklı komplekslerin düzenlediği yeni gen ailelerinin tanımlanması ve hedeflenmesinde anahtar role sahiptir.

KAYNAKLAR

Adams, D. G., Coffee, Jr., R. L., Zhang, H., Pelech, S., Strack, S., Wadzinski, B. E. 2005. "Positive Regulation of Raf1-MEK1/2- ERK1/2 Signaling by protein serine/threonine phosphatase 2A holoenzymes", *Journal of Biological Chemistry*, 280, 42644-54.

Baker, S. P., Grant P. A. 2007. "The SAGA continues: expanding the cellular role of a transcriptional co-activator complex", *Oncogene*, 26, 5329-40.

Barlev, N. A., Emelyanov, A. V., Castagnino, P., Zegerman, P., Bannister, A. J., Sepulveda, M. A., Robert, F., Tora, L., Kouzarides, T., Birshtein, B. K., Berger, S. L. 2003. "A novel human Ada2 homologue functions with Gcn5 or Brg1 to coactivate transcription", *Molecular Cell Biology*, 231, 6944-57.

Brownell, J. E., Allis, C. D. 1996. "Special HATs for special occasions: linking histone acetylation to chromatin assembly and gene activation", *Current Opinion in Genetics & Development*, 6, 176-84.

Brownell, J. E., Zhou, J., Ranalli, T., Kobayashi, R., Edmondson, D. G., Roth, S. Y., Allis, C. D. 1996. "Tetrahymena histone acetyltransferase A: a homologue to yeast GCN5p linking histone acetylation to gene activation", *Cell*, 84, 843-51.

Bruno, T., De Nicola, F., Iezzi, S., Lecis, D., D'Angelo, C., Di Padova, M., Corbi, N., Dimiziani, L., Zannini, L., Jekimovs, C., Scarsella, M., Porrello, A., Chersi, A., Crescenzi, M., Leonetti, C., Khanna, K. K., Soddu, S., Floridi, A., Passananti, C., Delia, D., Fanciulli, M. 2006. "Che-1 phosphorylation by ATM/ATR and Chk2 kinases activates p53 transcription and the G2/M checkpoint", *Cancer Cell*, 6, 473-86.

Candau, R., Berger, S. L. 1996. "Structural and functional analysis of yeast putative adaptors. Evidence for an adaptor complex in vivo", *Journal of Biological Chemistry*, 271, 5237-45.

Ceulemans, H., Vulsteke, V., De Maeyer, M., Tatchell, K., Stalmans, W. 2002. "Binding of the concave surface of the Sds22 superhelix to the $\alpha 4/\alpha 5/\alpha 6$ -triangle of protein phosphatase-1", *Journal of Biological Chemistry*, 277, 47331-7.

Ciurciu, A., Komonyi, O., Boros, I. M. 2008. "Loss of ATAC-specific acetylation of histone H4 at Lys12 reduces binding of JIL-1 to chromatin and phosphorylation of histone H3 at Ser10", *Journal of Cell Science*, 121, 3366-72.

De Nicola, F., Catena, V., Rinaldo, C., Bruno, T., Iezzi, S., Sorino, C., Desantis, A., Camerini, S., Crescenzi, M., Floridi, A., Passananti, C., Soddu, S., Fanciulli, M. 2014. "HIPK2 sustains apoptotic response by phosphorylating Che-1/AATF and promoting its degradation", *Cell Death Disease*, 5, 1414.

Delaval, B., Ferrand, A., Conte, N., Larroque, C., Hernandez-Verdun, D., Prigent, C., Birnbaum, D. 2004. "Aurora B -TACC1 protein complex in cytokinesis", *Oncogene*, 23, 4516-22.

Doyon, Y., Cote, J. 2004. "The highly conserved and multifunctional NuA4 HAT complex", *Current Opinion in Genetics & Development*, 14, 147-54.

Doyon, Y., Selleck, W., Lane, W. S., Tan, S., Cote, J. 2004. "Structural and functional conservation of the NuA4 histone acetyltransferase complex from yeast to humans", *Molecular Cell Biology*, 24, 1884-96.

Dyda, F., Klein, D. C., Hickman, A. B. 2000. "GCN5-related N-acetyltransferases: a structural overview", *Annual Review of Biophysics Biomolecular Structure*, 29:81-103.

Fields, S., Song, O. 1989. "A Novel Genetic System to Detect Protein-Protein Interactions", *Nature*, 340, 245-6.

Fanciulli, M., Bruno, T., Di Padova, M., De Angelis, R., Iezzi, S., Iacobini, C., Floridi, A., Passananti, C. 2000. "Identification of a novel partner of RNA polymerase II subunit 11, Che-1, which interacts with and affects the growth suppression function of Rb", *FASEB Journal*, 14, 904-12.

Gangisetty, O., Lauffart, B., Sondarva, G. V., Chelsea, D. M., Still, I. H. 2004. "The transforming acidic coiled coil proteins interact with nuclear histone acetyltransferases", *Oncogene*, 23, 2559-63.

Gamper, A. M., Kim, J., Roeder, R. G. 2009. "The STAGA subunit ADA2b is an important regulator of human GCN5 catalysis", *Mol Cell Biol*, 29, 266-80.

Gietz, R. D., Woods, R. A. 1994. *Molecular Genetics of Yeast: A Practical Approach*. Oxford: Oxford University Press.

Grant, P. A., Sterner, D. E., Duggan, L. J., Workman, J. L., Berger, S. L. 1998. "The SAGA unfolds: convergence of transcription regulators in chromatin-modifying complexes", *Trends in Cell Biology*, 8, 193-7.

Grau, B., Popescu, C., Torroja, L., Ortuno-Sahagun, D., Boros, I., Ferrus, A. 2008. "Transcriptional adaptor ADA3 of drosophila melanogaster is required for histone modification position effect variegation and transcription", *Molecular Cell Biology*, 28, 376-85.

Guelman, S., Kozuka, K., Mao, Y., Pham, V., Solloway, M. J., Wang, J., Wu, J., Lill, J.R., Zha, J. 2009. "The double-histone- acetyltransferase complex ATAC is essential for mammalian development", *Molecular Cell Biology*, 29, 1176-88.

Horiuchi, J., Silverman, N., Marcus, G. A., Guarente, L. 1995. "ADA3, a putative transcriptional adaptor, consists of two separable domains and interacts with ADA2 and GCN5 in a trimeric complex", *Molecular Cell Biology*, 15, 1203-9.

Höpker, K., Hagmann, H., Khurshid, S., Chen, S., Hasskamp, P., Seeger-Nukpezah, T., Schilberg, K., Heukamp, L., Lamkemeyer, T., Sos, M. L., Thomas, R. K., Lowery, D., Roels, F., Fischer, M., Liebau, M. C., Resch, U., Kisner, T., Röther, F., Bartram, M. P., Müller, R. U., Fabretti, F., Kurschat, P., Schumacher, B., Gaestel, M., Medema, R. H., Yaffe, M. B., Schermer, B., Reinhardt, H. C., Benzing, T. 2012a. "ATF/Che-1 acts as a phosphorylation-dependent molecular modulator to repress p53-driven apoptosis", *EMBO Journal*, 31, 3961-75.

Höpker, K., Hagmann, H., Khurshid, S., Chen, S., Schermer, B., Benzing, T., Reinhardt, H. C. 2012b. "Putting the brakes on p53-driven apoptosis", *Cell Cycle*, 15, 4122-8.

Iezzi, S., Fanciulli, M. 2015. "Discovering Che-1/AATF: a new attractive target for cancer therapy", *Frontiers in Genetics*, 6: 141.

Jackson, J. G., Lozano, G. 2012. "Che-ating death: CHE1/AATF protects from p53-mediated apoptosis", *EMBO Journal*, 31, 3951-3.

Kim, H. G., Kim, H. T., Leach, N. T., Lan, F., Ullmann, R., Silaharoglu, A., Kurth, I., Nowka, A., Seong, I. S., Shen, Y., Talkowski, M. E., Ruderfer, D., Lee, J. H., Glotzbach, C., Ha, K., Kjaergaard, S., Levin, A.V., Romeike, B. F., Kleefstra, T., Bartsch, O., Elsea, S. H., Jabs, E. W., MacDonald, M. E., Harris, D. J., Quade, B. J., Ropers, H. H., Shaffer, L. G., Kutsche, K., Layman, L. C., Tommerup, N., Kalscheuer, V. M., Shi, Y., Morton, C. C., Kim, C. H., Gusella, J. F. 2012. "Translocations disrupting PHF21A in the Potocki-Shaffer-syndrome region are associated with intellectual disability and craniofacial anomalies", *The American Journal of Human Genetics*, 13, 56-72.

Kouzarides, T. 2007. "Chromatin modifications and their function", *Cell*, 128, 693-705.

Krebs, A. R., Karmodiya, K., Lindahl-Allen, M., Struhl, K., Tora, L. 2011. "SAGA and ATAC histone acetyl transferase complexes regulate distinct sets of genes and ATAC defines a class of p300-independent enhancers", *Molecular Cell*, 44, 410-23.

Lan, F., Collins, R. E., De Cegli, R., Alpatov, R., Horton, J. R., Shi, X., Gozani, O., Cheng, X., Shi, Y. 2007. "Recognition of unmethylated histone H3 lysine 4 links BHC80 to LSD1-mediated gene repression", *Nature*, 448, 718-22.

Lee, K. K., Workman, J. L. 2007. "Histone acetyltransferase complexes: One Size Doesn't Fit All", *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8, 284-95.

Mao, Y., Pavangadkar, K. A., Thomashow, M. F., Triezenberg, S. J. 2006. "Physical and functional interactions of Arabidopsis ADA2 transcriptional coactivator proteins with the acetyltransferase GCN5 and with the cold-induced transcription factor CBF1", *Biochimica et Biophysica Acta*, 1759:69-79.

Montgomery, N. D., Turcott, C. M., Tepperberg, J. H., McDonald, M. T., Aylsworth, A. S. 2013. "A 137-kb deletion within the Potocki-Shaffer syndrome interval on chromosome 11p11.2 associated with developmental delay and hypotonia", *American Journal of Medicine Genetics A*, 61, 198-202.

Möckli, N., Auerbach, D. 2004. "Quantitative β -galactosidase assay suitable for high-throughput applications in the yeast two- hybrid system", *Biotechniques*, 36, 872-6.

Nag, A., Germaniuk-Kurowska, A., Dimri, M., Sassack, M. A., Gurumurthy, C. B., Gao, Q., Dimri, G., Band, H., Band, V. 2007. "An essential role of human Ada3 in p53 acetylation", *Journal of Biological Chemistry*, 282, 8812-20.

Nagy, Z., Tora, L. 2007. "Distinct GCN5/PCAF-containing complexes function as co-activators and are involved in transcription factor and global histone acetylation", *Oncogene*, 26, 5341-57.

Nagy, Z., Riss, A., Fujiyama, S., Krebs, A., Orpinell, M., Jansen, P., Cohen, A., Stunnenberg, H. G., Kato, S., Tora, L. 2010. "The metazoan ATAC and SAGA coactivator HAT complexes regulate different sets of inducible target genes", *Cellular and Molecular Life Science*, 67, 611-28.

Orpinell, M., Fournier, M., Riss, A., Nagy, Z., Krebs, A. R., Frontini, M., Tora, L. 2010. "The ATAC acetyl transferase complex controls mitotic progression by targeting non-histone substrates", *EMBO Journal*, 29, 2381-94.

Qian, C., Zhang, Q., Li, S., Zeng, L., Walsh, M. J., Zhou, M. M. 2005. "Structure and chromosomal DNA binding of the SWIRM domain", *Nature Structural & Molecular Biology*, 12:1078-85.

Paolinelli, R., Mendoza-Maldonado, R., Cereseto, A., Giacca, M. 2009. "Acetylation by GCN5 regulates CDC6 phosphorylation in the S phase of the cell cycle", *Nature Structural & Molecular Biology*, 16, 412-20.

Peggie, M. W., MacKelvie, S. H., Bloecher, A., Knatko, E. V., Tatchell, K., Stark, M. J. R. 2002. "Essential functions of Sds22p in chromosome stability and nuclear localization of PP1", *Journal of Cell Science*, 115, 195-206.

Pollard, K. J., Peterson, C. L. 1997. "Role for ADA/GCN5 products in antagonizing chromatin-mediated transcriptional repression", *Molecular Cell Biology*, 17, 6212-22.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., *Molecular Cloning*, ed:Nolan C., Vol:3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y. (1989). Pp:18.47-75.

Saleh, A., Lang, V., Cook, R., Brandl, C. J. 1997. "Identification of native complexes containing the yeast coactivator/repressor proteins NGG1/ADA3 and ADA2", *The Journal of Biological Chemistry*, 272, 5571-8.

Serebriiskii, I. G., Golemis, E. 2000. "Uses of *lacZ* to study gene function: evaluation of β -galactosidase assays employed in the yeast two-hybrid system", *Analytical Biochemistry*, 285,1-15.

Sorino, C., Bruno, T., Desantis, A., Di Certo, M. G., Iezzi, S., De Nicola, F., Catena, V., Floridi, A., Chessa, L., Passananti, C., Cundari, E., Fanciulli, M. 2013. "Centrosomal Che-1 protein is involved in the regulation of mitosis and DNA damage response by mediating pericentrin (PCNT)-dependent Chk1 protein localization", *The Journal Of Biological Chemistry*, 288, 23348–57.

Suganuma, T., Gutiérrez, J. L., Li, B., Florens, L., Swanson, S. K., Washburn, M. P., Abmayr, S. M., Workman, J. L. 2008. "ATAC is a double histone acetyltransferase complex that stimulates nucleosome sliding", *Nature Structural & Molecular Biology*, 15, 364-72.

Topcu, Z., Mack, D. L., Hromas, R. A., Borden, K. L. 1999. "The promyelocytic leukemia protein PML interacts with the proline-rich homeodomain protein PRH: a RING may link hematopoiesis and growth control", *Oncogene*, 18, 7091-100.

Topcu, Z., Borden, K. L. 2000. "The Yeast Two-Hybrid System and Its Pharmaceutical Significance", *Pharmaceutical Research*,17, 1049-55.

Topcu, Z., Nickles, K., Davis, C., McEachern, M. J. 2005. "Abrupt disruption of capping and a single source for recombinationally elongated telomeres in *Kluyveromyces lactis*", *Proceeding of the National Academy of Science*, 102, 3348-53.

Vernarecci, S., Ornaghi, P., Bâgu, A., Cundari, E., Ballario, P., Filetici, P. 2008. "Gcn5p plays an important role in centromere kinetochore function in budding yeast", *Molecular Cell Biology*, 28, 988-96.

Vetting, M. W., S de Carvalho, L. P., Yu, M., Hegde, S. S., Magnet, S., Roderick, S. L., Blanchard, J. S. 2005. "Structure and functions of the GNAT superfamily of acetyltransferases", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 433:212-26.

Wang, Y. L., Faiola, F., Xu, M., Pan, S., Martinez, E. 2008. "Human ATAC Is a GCN5/PCAF-containing acetylase complex with a novel NC2-like histone fold module that interacts with the TATA-binding protein", *Journal of Biological Chemistry*, 283, 33808-15.

Wurzenberger, C., Held, M., Lampson, M. A., Poser, I., Hyman, A. A., Gerlich, D. W. 2012. "Sds22 and Repo-Man stabilize chromosome segregation by counteracting Aurora B on anaphase kinetochores", *The Journal of Cell Biology*, 198, 173-83.

Yu, U. Y., Yoo, B. C., Ahn, J. H. 2014. "Regulatory B subunits of protein phosphatase 2A are involved in site-specific regulation of Tau protein phosphorylation", *Korean Journal of Physiology & Pharmacology*, 18, 155-61.

Zencir, S., Ovee, M., Dobson, M., Mohanty, S., Topcu, Z. 2011. "Identification of brain-specific angiogenesis inhibitor 2 as an interaction partner of glutaminase interacting protein", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 411, 792-7.

Zencir, S., Sike, A., Dobson, M. J., Ayaydin, F., Boros, I., Topcu Z. 2013a. "Identification of transcriptional and phosphatase regulators as interaction partners of human ADA3, a component of histone acetyltransferase complexes", *Biochemical Journal*. 450, 311-20.

Zencir, S., Banerjee, M., Dobson, M. J., Ayaydin, F., Fodor, E. A., Topcu, Z., Mohanty, S. 2013b. "New partner proteins containing novel internal recognition motif for human glutaminase interacting protein (hGIP)", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 432, 10-5.

Zeng, L., Zhou, M. M. 2002. "Bromodomain: an acetyl-lysine binding domain", *FEBS Letters*, 513:124-8.

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Yürütücüsü:	Dr. SEVİL ZENCİR
Proje No:	112T429
Proje Başlığı:	Histon Asetil Transferaz Komplekslerinin Bileşenleri Olan Ada Proteinlerinin Moleküler Etkileşimlerinin Biyolojik Karakterizasyonu
Proje Türü:	3501 - Kariyer
Proje Süresi:	24
Araştırmacılar:	
Danışmanlar:	ZEKİ TOPÇU
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	PAMUKKALE Ü. TIP F. TEMEL TIP BİLİMLERİ B. TIBBİ BİYOLOJİ ABD.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	01/04/2013 - 01/04/2015
Onaylanan Bütçe:	196988.0
Harcanan Bütçe:	170306.59
Öz:	<p>Günümüzde genomda protein kodlayan genlerin çoğu aydınlatılmış olsa da, bu proteinler arasındaki moleküler etkileşimler henüz tam olarak tanımlanamamıştır. Hücrelerdeki protein-protein etkileşimleri oldukça kompleks bir yapılanma göstermekte ve memeli hücrelerinde gözlenen patolojik durumların çoğu esasen bu etkileşimlerin bozulması veya değişiminden kaynaklanmaktadır. Bu nedenle protein-protein, protein-DNA, protein-RNA, reseptör-ligand gibi moleküler etkileşimlerin kapsamlı bir şekilde aydınlatılması hücredeki moleküler organizasyonun anlaşılması bakımından son derece önemlidir.</p> <p>Projemizin hareket noktası, gen ekspresyonunun DNA-bağlanma proteinleri, temel transkripsiyon faktörleri ve regülatör fonksiyona sahip olan adaptör/ko-aktivatör proteinleri gibi çok sayıda moleküler etkileşimleri gerektirmesidir. Bu nedenle, transkripsiyonel regülasyon sürecinde DNA-protein etkileşimlerinin yanında çok-altbirimli protein komplekslerinin kendi bileşenleri ve diğer kompleksler arasındaki protein-protein etkileşimlerinin de yer alması beklenir. Bu bulgular doğrultusunda; insan ADA3 (hADA3) ile etkileşimleri daha önce ekibimizce rapor edilen dört yeni etkileşim partnerinin, yine hADA3 ile aynı kompleks içerisinde yer alan ve hADA3 ile etkileşimleri daha önceden rapor edilen insan ADA2 (hADA2) ve insan GCN5 (hGCN5) proteinleri ile fonksiyonları gereği etkileşebilecekleri hipotezimize temel olmuştur. Çalışmamızda takip ettiğimiz metodoloji in vivo protein-protein etkileşimlerini belirleme özelliği ile klasik yöntemlerden üstünlüğü olan maya iki hibrit teknolojisi (Yeast 2 Hybrid; Y2H) olarak seçilmiştir. Y2H analizleri sonucunda hADA2B ve hGCN5'in dört aday partner ile de etkileşimlerinin olduğu gözlenmiş, özellikle hADA2B etkileşimlerinin aday partnerlerin daha önce belirlediğimiz hADA3 etkileşimlerine benzer karakterde olduğu belirlenmiştir. hADA2A etkileşimlerinin ise nispeten daha zayıf olduğu gözlenmiştir. Bu kapsamda yaptığımız haritalama deneyleri sonucunda hADA2A ve hADA2B proteinlerinde yer alan 'Ada Box 1' ve 'Ada Box 2' domainlerini içeren gen bölgelerinin etkileşimlerde önemli olduğu, hGCN5 proteinin 553 ve 820. aa bölgeleri içerisinde yer alan 'Asetil Transferaz' ve C-terminalinde bulunan 'Bromodomain' bölgelerini içeren protein domainlerinin etkileşimlerden sorumlu bölgeler olduğu belirlenmiştir. Raportör gen analizleri ile hADA2A, hADA2B ve hGCN5'in, dört aday proteinin de transkripsiyonel olarak aktivasyonlarını baskıladıkları, bu baskılanmanın hADA2A ve hADA2B proteinleri varlığında daha dramatik olduğu gözlenmiştir. Son olarak, konfokal mikroskopi analizlerimiz hADA2A, hADA2B ve hGCN5 proteinlerinin aday etkileşim partnerleri ile eş-lokalizasyonlarını destekler niteliktedir.</p> <p>Tanımladığımız yeni protein etkileşimleri, ADA-içeren protein komplekslerinin düzenlediği yeni mekanizmaların tanımlanmasına yardımcı olacağı gibi RNA polimeraz II (RNA polymerase II)-aracılı transkripsiyon mekanizmasında görev alan transkripsiyon komplekslerinin karakterizasyonu konusunda yeni bilgiler kazandırmıştır. TÜBİTAK tarafından desteklenen projemiz sonuçlarının etki değeri yüksek dergilerde yayınlanması ile ülkemizde protein-protein ve DNA-protein etkileşimlerine ilgi duyan diğer birimlerin maya hibrit teknolojisi yaklaşımına özendirileceği inancındayız.</p>
Anahtar Kelimeler:	ADA3, ADA2, GCN5, transkripsiyonel regülasyon, Y2H teknolojisi, protein-protein etkileşimleri

Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır
Projeden Yapılan Yayınlar:	1- Molecular Interactions of ADA2 Proteins as the components of Histone Acetyl Transferrase Complexes. Gene Transcription in Yeast: From Regulatory Networks to Mechanisms (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Poster Sunum), 2- HİSTON ASETİL TRANSFERAZ KOMPLEKSLERİNİN BİLEŞENLERİ OLAN ADA PROTEİNLERİNİN MOLEKÜLER ETKİLEŞİMLERİNİN İNCELENMESİ (Tez (Araştırmacı Yetiştirilmesi) - Yüksek Lisans Tezi),

TÜBİTAK