

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

**GALAKTOZİLTRANSFERAZ-I ETKİLEŞİM YÜZEYİNİN
YÖNLENDİRİLMİŞ MUTAGENEZ VE *İN VİVO* FRET
(FÖRSTER REZONANS ENERJİ TRANSFER) ANALİZİ
YÖNTEMİYLE KARAKTERİZASYONU**

BATUHAN YEŞİLYURT

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Gökhan CESUR**

AYDIN-2016

KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalı Tezli yüksek lisans programı çerçevesinde Batuhan YEŞİLYURT tarafından hazırlanan “Galaktoziltransferaz-1 etkileşim yüzeyinin yönlendirilmiş mutagenez ve *in vivo* FRET (föster rezonans enerji transfer) analizi yöntemiyle karakterizasyonu” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından ~~Doktora~~/Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 18/01/2016

Üye (Tez Danışmanı): Doç. Dr. Gökhan CESUR Adnan Menderes Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Rauf Onur EK Adnan Menderes Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Remziye DEVECİ Ege Üniversitesi

ONAY:

Bu tez Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsünün tarih ve sayılı oturumunda alınan nolu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ahmet CEYLAN
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince gerek akademik, gerek manevi desteğini her zaman hissettiren, bu konunun Oulu Üniversitesi Biyokimya ve Moleküler Tıp Fakültesi / Finlandiya 'da çalışılmasına olanak tanıyan tez danışmanım sayın Doç. Dr. Gökhan CESUR hocama; gösterdiği sabır, özveri, iyi niyet ve katkıları için sonsuz teşekkür ederim.

Yüksek lisans tez çalışmam süresince her türlü teknik desteği sağlayan ve yöntemlerini cömertçe paylaşıp öğreten Oulu Üniversitesi Biyokimya ve Moleküler Tıp Fakültesi öğretim üyelerinden Dr. Antti HASSİNEN' e, Bu konunun teorik ve deneysel tasarımı yapan Adj. Prof. Dr. Tuomo GLUMOFF ve Adj. Prof. Dr. Sakari KELLOKUMPU' ya, biyoinformatik verileri sağlayan doktora öğrencisi Outi LAMPELA' ya çok teşekkür ederim.

Finlandiya' da bulunduğum süre içinde maddi destek sağlayan Erasmus+ programına, cihaz alt yapı desteği, kimyasal malzeme ve her türlü biyolojik materyali sunan Oulu Üniversitesi' ne, desteklerini her zaman hissettiren Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. R. Onur EK, Doç. Dr. Yüksel YILDIZ' a, öğretim elemanlarına ve değerli dostum Araş. Gör. Ferhat ŞİRİNYILDIZ' a, glikobiyoloji alanında bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen Ege Üniversitesi Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Remziye DEVECİ, Doç. Dr. Savaş İZZETOĞLU ve çalışma arkadaşlarıma desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Maddi ve manevi desteklerini bir an olsun esirgemeyen anne ve babama, sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

KABUL ONAY	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
RESİMLER DİZİNİ.....	viii
TABLolar DİZİNİ.....	ix
ÖZET	x
ABSTRACT	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Glikozilasyon.....	2
2.1.1. N- Bağlı Glikozilasyon Süreci	3
2.2. β 1-4 Galaktoziltransferaz I (EC 2.4.1. 38) Enziminin Yapısı ve İşlevi.....	5
2.3. Glikoziltransferaz Enzimleri Arasında Protein – Protein Temelli Etkileşimler.....	6
2.4. Protein – Protein Temelli Etkileşimlerin Biyoinformatik Yaklaşımlar Kullanarak Tahmin Edilmesi	7
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	9
3.1. β 1-4 Galaktoziltransferaz Enzimine Ait Sentetik DNA Dizisinin Mutasyona Uğrıtılacak Bölgelerinin Biyoinformatik Olarak Belirlenmesi ve 3 Boyutlu Modellenmesi	9
3.2. β 1-4 Galaktoziltransferaz Enzimine Ait cDNA Dizisinin Mutasyona Uğrıtılması	10
3.2.1. Mutasyona Uğrıtılacak Bölgeye Özgü Primer Tasarım.....	10
3.3. Mutant β 1-4 Galaktoziltransferaz Enzimine Ait Plazmid Yapılarının <i>E. coli</i> Bakteri Hücrelerine Transformasyonu	14
3.4. Mutant β 1-4 Galaktoziltransferaz Enzim Tiplerinin Cos-7 Hücre Hattına Transfeksiyonu ve Lokalizasyonunun Konfokal Mikroskop Yöntemiyle Belirlenmesi	15
3.4.1. Hücre Kültürü Teknikleri	15
3.4.2. Transfeksiyon İşlemi	16
3.4.3. Transfekte edilen hücrelerin konfokal mikroskopta incelenmek üzere hazırlanması	16
3.5. Förster Rezonans Enerji Transfer (FRET) Analizi.....	17

4. BULGULAR	19
4.1. Konfokal Mikroskopî Yöntemi ile Mutant Enzimlerin Hücre İçindeki Yerlerinin Belirlenmesi.....	19
4.2. FRET Analizi ile Yaban Tip ve Tek Amino asit Yönünden Mutant proteinlerin FRET Oranlarının Belirlenmesi	19
4.2.1. 282 Numaralı Bölgenin Homomerik Etkileşim Bakımından Test Edilmesi	19
4.2.2. 283 Numaralı Bölgenin Homomerik Etkileşim Bakımından Test Edilmesi	25
4.2.3. 284 Numaralı Bölgenin Homomerik Etkileşim Bakımından Test Edilmesi	25
4.2.4. 359 Numaralı Bölgenin Homomerik Etkileşim Bakımından Test Edilmesi	25
4.3. FRET Analizi ile Yaban Tip ve İki Amino asit Yönünden Mutant Proteinlerin FRET Oranlarının Belirlenmesi	28
4.4. Yaban Tipe Göre Yaban Tip – Mutant, Etkileşimine Ait Tüm FRET Oranlarının Toplu Karşılaştırması.....	28
4.5. Yaban Tipe Göre Mutant – Mutant Etkileşimine Ait Tüm FRET Oranlarının Toplu Karşılaştırması.....	28
5. TARTIŞMA.....	32
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	36
KAYNAKLAR.....	37
ÖZGEÇMİŞ.....	41

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Asn	: Asparajin
Asp	: Aspartik asit
BiFC	: Bi-moleküler Floresans Tamamlama
cDNA	: Komplementer Deoksi Rübönükleik Asit
CO₂	: Karbon Dioksit
ddH₂O	: Bi-distile su
dsDNA	: Çift sarmal Deoksi Rübönükleik Asit
EtBr	: Etidyum Bromür
FBS	: Fötal Dana Serumu
FRET	: Förster Rezonans Enerji Transferi
FucT	: Fukoziltransferaz
Gal	: Galaktoz
GalT	: Galaktoziltransferaz
GDP	: Guanozin difosfat
GER	: Granüllü Endoplazmik Retikulum
Glc	: Glukoz
Glcase	: Glikaz
GlcNAcT	: N-asetilglukozamintransferaz
Glu	: Glutamat
Gly	: Glisin
Ile	: İzolösin
LA	: α -laktalbümin
LB	: Sıvı Besiyeri
Man	: Mannoza
mChe	: Monoklonal Cherry
mVen	: Monoklonal Venus
OST	: Oligosakkaril transferaz
PDB	: Protein veri bankası
PFA	: Paraformaldehit
Pro	: Prolin
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Ser	: Serin

ST : Sialiltransferaz
Thr : Threonin
Try : Tirozin
UDP-GlcNAc : Uridin difosfat N-asetilglukozamin
Val : Valin
YT : Yaban Tip



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. :Temel şeker birimleri (sol üst) ile N- ve O- Glikozilasyon tipleri https://www.neb.com/ 'dan Türkçeleştirilmiştir.....	4
Şekil 2.2. : Glikozilasyon sürecinde glikan trimlenmesi ve dallanması (Taylor ve Drickamer, 2011) Türkçeleştirilmiştir.....	4
Şekil 2.3. :Tüm bölgelerin amino asit temelli karşılıklı ilişkileri 282. bölge (a), 283. Bölge (b), 359. Bölge (c), 284. Bölge (d)	8
Şekil 2.4. :GalT-1 enzimine ait amino asit dizisi ve seçilen bölgeler. Y :Tirozin, V: Valin Q: Glutamat, I: İzolösin.....	8
Şekil 3.1. :Monomerik bir Galaktoziltransferaz enzimi, PyMol programı ile görüntülenen eşleşmede olası iş gören bölgeler; 282 (kırmızı), 283 (yeşil), 284 (mavi), 359 (açık mavi).....	9
Şekil 3.2. : FRET vektörü, kırmızı ile işaretlenen bölgeler restriksiyon kesim bölgeleridir	13
Şekil 3.3. : FRET tekniği çalışma mekanizması ve oransal gösterimi	17
Şekil 4.2. : Olası homomerik etkileşim bölgelerinin homodimerik yapısının uzaklıklarıyla birlikte 3 boyutlu görüntüsü	24
Şekil 4.3. : Olası homomerik etkileşim bölgelerinin monomerik yapı üzerinde yüzeysel 3 boyutlu görüntüsü.....	24
Şekil 4.4. : 282. bölgenin glisin mutasyonu sonrası FRET oranları.....	26
Şekil 4.5. : 282.bölgenin asp mutasyonu sonrası FRET oranları.....	26
Şekil 4.6. : 283. bölgenin glisin mutasyonu sonrası FRET oranları.....	26
Şekil 4.7. : 283. bölgenin asp mutasyonu sonrası FRET oranları.....	26
Şekil 4.8. : 284. bölgenin glisin mutasyonu sonrası FRET oranları	27
Şekil 4.9. : 359. bölgenin glisin mutasyonu sonrası FRET oranları.....	27
Şekil 4.10. : 359. bölgenin asp mutasyonu sonrası FRET oranları.....	27
Şekil 4.11. : 282. ve 283. bölgelerinin glisin mutasyonu sonrası FRET oranları	29
Şekil 4.12. : 283. ve 284. bölgelerinin glisin mutasyonu sonrası FRET oranları	29
Şekil 4.13. : 282. ve 284. bölgelerinin glisin mutasyonu sonrası FRET oranları	29
Şekil 4.14. : Yaban tip ile diğer tüm yaban tip – mutant FRET oranlarının karşılaştırılması	30
Şekil 4.15. : Yaban tip ile diğer tüm mutant – mutant FRET oranlarının karşılaştırılması....	31

RESİMLER DİZİNİ

Resim 4.1a. : Konfokal mikroskopi yöntemiyle yerleri doğrulanan mutant enzimler	20
Resim 4.1b. : Konfokal mikroskopi yöntemiyle yerleri doğrulanan mutant enzimler	21
Resim 4.1c. : Konfokal mikroskopi yöntemiyle yerleri doğrulanan mutant enzimler	22
Resim 4.1d. : Konfokal mikroskopi yöntemiyle yerleri doğrulanan mutant enzimler	23



TABLULAR DİZİNİ

Tablo 3.1 : Amino asit değişim tablosu, kırmızı ile işaretlenen nükleotidler yeni nükleotidlerdir	10
Tablo 3.2 : Nükleotid değişimi içeren 5' ve 3' primerler	11
Tablo 3.3 : PZR odaklı yönlendirilmiş mutagenез kit elemanları.....	13



ÖZET

GALAKTOZİLTRANSFERAZ-I ETKİLEŞİM YÜZEYİNİN YÖNLENDİRİLMİŞ MUTAGENEZ VE *IN VIVO* FRET (FÖRSTER REZONANS ENERJİ TRANSFER) ANALİZİ YÖNTEMİYLE KARAKTERİZASYONU

**YEŞİLYURT B. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji
programı, yüksek lisans tezi, AYDIN 2016**

Glikozilasyon, protein ve lipidlerin geçirdiği en iyi bilinen sentez sonrası modifikasyonlardan biridir. Doğru bir glikozilasyon, hücresel tanıma, immünolojik aktivite, hücre sinyalizasyonu ve biyolojik çeşitlilik için son derece önemlidir. Glikan dallanması ve bu süreçte şeker eklenmesi glikozilasyonun temelidir ve şekerleri transfer eden glikoziltransferaz enzimleri tarafından kontrol edilen bir olaydır. Bu enzimlerde oluşan bozukluklar tüm organizma tipleri için hayati sorunlara yol açmaktadır. Fakat henüz glikoziltransferaz enzimlerinin patolojik koşullarda ve sağlıkta nasıl çalıştıkları detaylı olarak belirlenememiştir. 1960' lardan günümüze, çok sayıda glikoziltransferaz enzimlerinin homomerik ve heteromerik çalışma biçimlerine dair araştırmalar yapılmıştır. Biyoinformatik, moleküler biyoloji, ve hücre fizyolojisi alanındaki yeni gelişmeler, protein – protein etkileşimi ile ilgili daha çok veri elde etmemizi sağlamıştır. Tüm bunların ışığında çalışmanın amacı, Beta 1 - 4 Galaktoziltransferaz enziminin etkileşim yüzeyini yönlendirilmiş mutagenез ve FRET analizi ile belirlemektir. Bu doğrultuda, aday amino asitleri belirlemek için bir web sunucusu olan ClusPro kullanılmıştır. Belirlenen aday amino asitler (282 Try, 283 Val, 284 Glu, 359 Ile) Agilent mutagenез kiti kullanılarak teker teker glisin ve aspartik asite çevrilmek üzere mutasyona uğratılmıştır. Mutant cDNA lar mCherry ve mVenus FRET vektörlerine yerleştirilmiştir. Cos-7 hücre hattına transfekte edilen plazmidlerin ürettiği mutant proteinlerin hücre içi yerleşimi LSM konfokal mikroskop kullanılarak doğrulanmıştır. FRET analizi Operetta PerkinElmer cihazında gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak; elde edilen FRET analiz verilerine göre; 282. , 283. ve 359. bölgeler etkileşim yüzeyinden sorumlu olması muhtemel bölgelerdir. Özellikle 283. bölgede yer alan valin amino asidi, homomerik etkileşimde önemli rol oynuyor olabilir.

Anahtar Kelimeler: Beta 1 - 4 Galaktoziltransferaz-I , ClusPro, Protein – protein etkileşimi, FRET, Konfokal Mikroskopi

ABSTRACT

IDENTIFICATION OF GALACTOSYLTRANSFERASE-I INTERACTION SURFACE BY SITE DIRECTED MUTAGENESIS AND *IN VIVO* FRET (FÖRSTER RESONANCE ENERGY TRANSFER) ANALYSIS

**YEŞİLYURT B. Adnan Menderes University Institute of Health Science, Physiology
(Medicine) program, Master thesis, AYDIN 2016**

Glycosylation is one of the most known post translational modification of proteins and lipids. Proper glycosylation is essential for many biological events such as cell recognition, immunological activity, cell signalling and biological diversity. Glycan branching and sugar addition are the backbone of glycosylation. The regulation of glycan branching is under control of glycosyltransferase enzymes. It is known that any defects of these enzymes leads to severe consequences for all organisms. Yet, the working mechanism and details of glycosyltransferases in both health and diseases remain unclear. Since 1960s, many of articles has been published that glycosyltransferases may form homomeric and heteromeric complexes with each other. The recent developments in bioinformatics, molecular biology and cell physiology, let us to know much more information about protein – protein interactions. The aim of this study is, to find out Beta 1-4 Galactosyltransferase-I enzyme interacting surface by using site directed mutagenesis and FRET technique. Therefore, we used ClusPro web server to predict protein – protein docking positions and relevant amino acids. After that, candidate amino acids (282 Try, 283 Val, 284 Glu, 359 Ile) which they have potentially responsible for homomeric interaction have been mutated into glycine and aspartic acid via using Agilent Site-Directed Mutagenesis Kit. The mutant cDNAs are inserted mCherry and mVenus FRET plasmid constructs then transfected to Cos-7 mammalian cell line. The localization of mutant enzymes confirmed by LSM confocal microscopy. FRET measurements performed in Operetta, PerkinElmer. As result, 282nd, 283rd and 359th regions might be possibly responsible for interacting surface. According to FRET ratios, particularly 283rd region valine could be a good interaction point between two GalT-1 homomers.

Key words: Beta 1-4 Galactosyltransferase-I , ClusPro, Protein – protein interaction, FRET, Confocal Microscopy

1.GİRİŞ

Tipik bir memeli hücrelerinde 1 milyara yakın protein bulunduğu bilinmektedir (Good ve ark, 2011). Bu proteinlerin yaklaşık yarısı **glikozilasyon** sürecinden gemiş olup N- veya O-bağlı glikan dalları taşımaktadır (Hart, 1992; Varki ve ark, 2008). Üç farklı bölmeye ayrılan Golgi organelinin içerisinde gerçekleşen glikozilasyon sürecini, her bir kısmına özđü olmak üzere, monomerik şeker birimlerini uç uca ekleyen özelleşmiş **glikoziltransferaz** enzimleri yönetir.

Glikan dallarının patolojik ve sağlıklı durumlarda farklı olduğu, sinyal iletiminde, kanserin oluşum süreci ve metastazı gibi kritik süreçlerde kilit taşı olduğu keşfedildikten sonra glikoziltransferaz enzimlerinin bu denli basit monomerik birimlerden nasıl karmaşık glikan dalları oluşturduğu araştırma konularına yansımıştır. Her bir Golgi bölümünde bulunan glikoziltransferaz enzimlerinin kendi içerisinde **homomer** veya **heteromer** oluşturduklarının keşfi ile birlikte (Nilsson ve ark, 1996) bu kompleks yapıların ne şekilde olduğu çözümlenmeye başlanmıştır.

Homomerik veya heteromerik yapıların glikan dallarının oluşumu sırasında farklı monomerik birim kombinasyonlarını taşıyacak şekilde özelleştiği, bazı enzimlerin konformasyonel olarak açılıp kapanabilme özelliklerinin olduğu saptanmıştır (Lo ve ark, 1998; Guo ve ark, 2001). Birçok farklı tipi bulunan transferaz enzimlerinin içerisinden glikan dallarının ucunda bulunan galaktoz şekerini taşıyıp glikan zincirine ekleyen galaktoziltransferaz enziminin eksikliğinde ölüme kadar giden kanser, immünolojik yanıt yoksunluğu gibi ağır tablolar oluşacağı mutasyona uğratılmış hayvan deneylerinde rapor edilmiştir (Evans ve ark, 1993). Buna ek olarak birçok patolojik tabloya GalT-1 enziminin çalışma biçim bozukluklarının neden olduğu bilinmektedir. Kellokumpu ve ark, (2015) te Galaktoziltransferaz-1 (GalT-1) enziminin homodimer şeklinde çalıştığını belirlemişlerdir. Fakat hangi amino asit pozisyonlarını kullanarak homodimer oluşturduğu henüz keşfedilmemiştir. Bu nedenle çalışmanın amacı; GalT-1 Golgi galaktoziltransferaz enziminin kompleks homodimer oluşturabilecek pozisyonel amino asitleri biyoinformatik yöntemlerle belirlemek ve belirlenen aday bölgeleri yönlendirilmış mutasyona uğratarak *in vivo* ortamda homomerik etkileşim oranlarını FRET tekniği ile ölçmektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Glikozilasyon

Canlılığın temelini oluşturan temelde beş adet makromolekül bulunmaktadır. Bunlar lipidler, nükleik asitler, proteinler, enerji veren fosfatlı bileşikler ve karbohidratlardır. 20. yüzyılın son çeyreğine kadar hakkında pek az bilgi sahibi olduğumuz karbohidratları sadece enerji veren makromoleküller olarak sınıflandırma yoluna gidilse de, yakın zamanda karbohidratların enerji verme işlevinin yanı sıra, canlılığın mimarisini oluşturan temel moleküller oldukları keşfedilmiştir (Sharon ve Lis, 1993; Reuter ve ark, 1988; Lehninger ve ark, 1993). Akışkan mozaik zar yapısında ve sitosolde farklı birimlerden oluşan ve farklı işlevlere sahip birçok farklı glikan tipi mevcuttur. Glikan yapıları; hücre - hücre tanıma tutunmasında, hücre - matriks ilişkilerinde, yangı gibi en temel biyolojik ve biyokimyasal reaksiyonlara aracılık ederler (Dube ve Bertozzi 2005).

Glikanların pek azı tek başına işlevsel olsa da, hemen hepsi protein, lipidler gibi farklı makromoleküllerle birleşerek glikoprotein ve glikolipidleri oluştururlar. Bu oluşumlardan glikoproteinler, protein sentezi sonrası bir modifikasyon olan glikozilasyon işlem basamakları sonucu protein üzerine eklenir. Proteinin işlevini değiştirdiği gibi, hücre içerisinde nereye yönlendirileceğini ve parçalanıp parçalanmayacağına da aracılık ederler (Helenius ve ark, 1997; Kleene ve Berger, 1993).

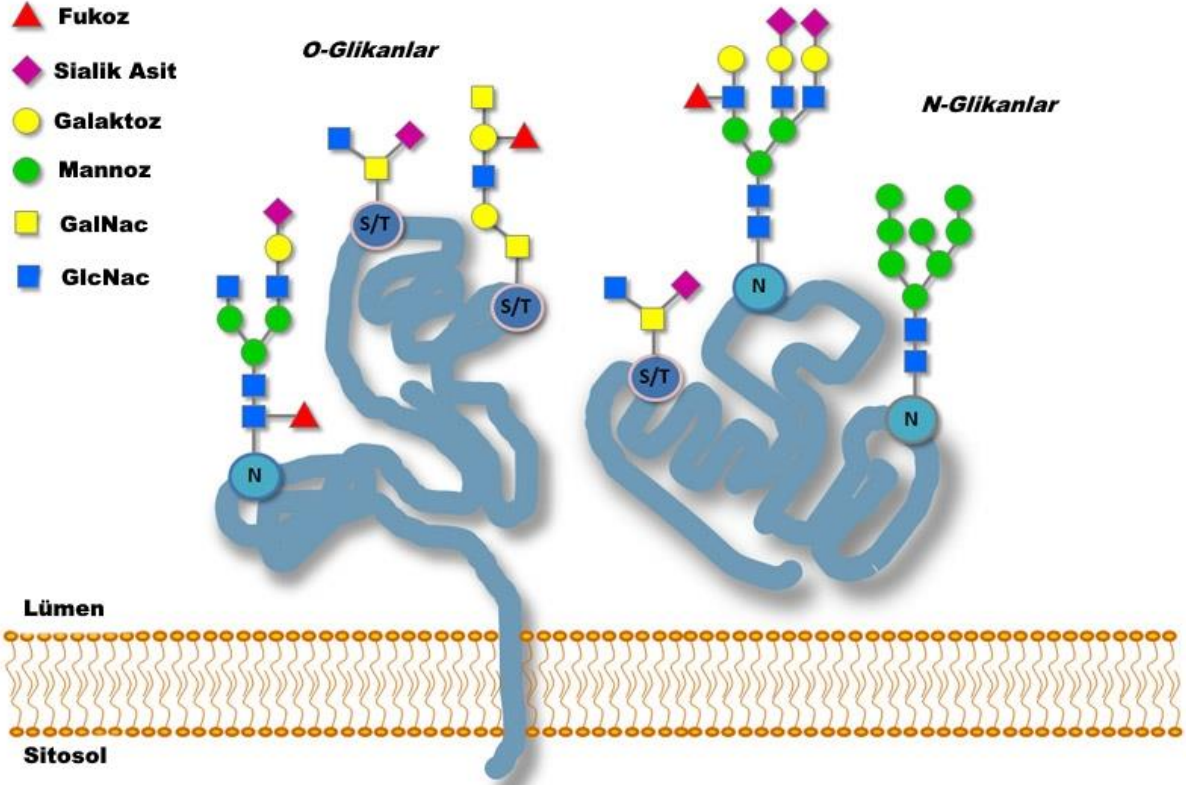
Glikanlar, protein ile kimyasal bağ kurmadan önce hücre içerisinde monomerik birimlerinin bir araya gelip organize olmasıyla farklı kombinasyonlarda dallanmalar oluştururlar. Oluşan glikan zincirleri iki farklı şekilde protein üzerine eklenebilir. Bunlardan ilki ve iyi anlaşılmış olanı protein üzerindeki Asn-X-Ser/Thr-Y (X ve Y prolin dışında herhangi bir amino asit olabilir) amino asit dizisindeki asparajin amino asidine bağlanabilen N-bağlı glikozilasyondur (Gavel ve Heijne, 1990). Diğer glikozilasyon tipi O-bağlı glikozilasyondur. Bu tip glikozilasyonda her bir O-glikozillenmiş protein için bir ortak dizi bulunmasa da yaygın biçimde Ser/Thr/Pro amino asit dizisi ile bağ kurarlar (Brockhausen, 2006). Temel monomerik şeker birimleri ve glikozilasyon tipleri N- ile O- olmak üzere Şekil 2.1. 'de gösterilmiştir. Her iki glikozilasyonda monomerik şeker birimlerini transfer eden çeşitli glikoziltransferaz enzimleri bulunur. Bu enzimlerin çalışma biçimi, aktivitesi, genetik kontrolü ve ortam şartları glikan dallarının yapısını, dağılımını ve etkinliğini değiştirmektedir (Breton ve ark, 2006).

2.1.1. N- Bağlı Glikozilasyon Süreci

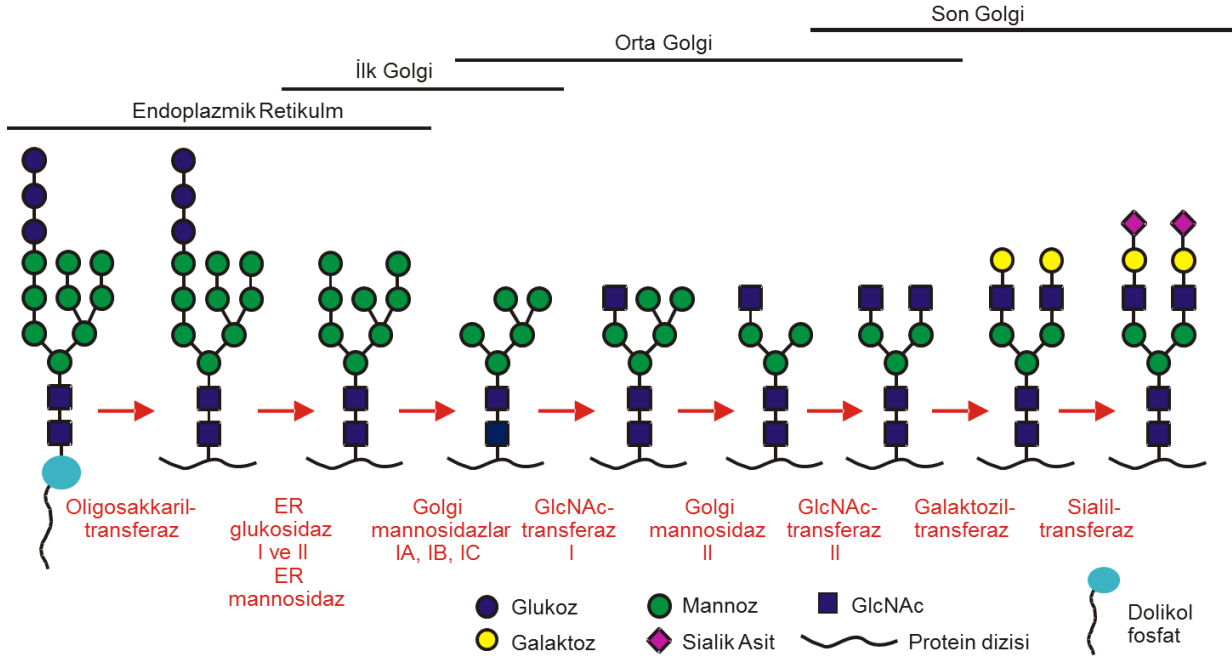
Taylor ve Drickamer (2011) 'e göre, N- Bağlı glikanlar temel olarak üç basamakta sentezlenir. İlk basamak granüllü endoplazmik retikulum (GER) lümeninde lipide bağlı öncü oligosakkarit oluşturulması ile başlar. UDP-GlcNAc ve GDP-Man, şeker verici nükleotidlerden 2 GlcNAc ve 5 Man eklenmesini katalizler. Glikan dalı daha sonra GER lümenine taşınır. Bu sürecin temel elemanlardan biri olan Dolikole ilk olarak iki GlcNAc ve beş Man ER zarının sitosole bakan tarafına eklenir. Oluşan ara ürün bir taşıyıcı ile ER lümenine flip hareketi ile geçer. Daha sonraki monosakkaritler ER lümeninde eklenir. GER lümenine taşınmasından sonra 4 Mannoze ve 3 Glukoz eklenir. Glikozidik bağların oluşumu için gerekli enerji, şeker-fosfat bağlarından elde edilir. İlk GlcNAc, lipit dolikol-P'a UDP-GlcNAc vericisinden **GlcNAc-I fosfotransferaz** enzimiyle eklenir. İkinci GlcNAc **GlcNAc-Transferaz** enzimiyle eklenir. Beş Man GDP-Man vericisinden **Man-transferaz** enzimiyle eklenir. Dört Man daha Man Vericisinden (Dol-P ve GDP-Man 'dan yapı) Man-transferaz enzimiyle eklenir. Üç Glc Glc Vericisinden (Dol-P ve UDP-Glc 'dan yapı) Glc-transferaz enzimiyle eklenir. Bu aşama Dolikol-Oligosakkarit öncüsünün şekillenmesi tamamlanır

İkinci aşama oligosakkaritlerin blok halinde polipeptide taşınmasıdır. Bu basamak, birinci basamak gibi GER'de gerçekleşir. GlcNAc-Asn bağı Oligosakkariltransferaz ile kurulur. OST, GER lümeninde riboforin proteinlerine yakın yer alır. Uzayan polipeptitte Asn-X-Ser/Thr dizisini tanıyarak katlanmamış polipeptide öncü oligosakkaritleri taşır. Asn-X-Ser/Thr dizisi polipeptidlerin yüzeyindedir. Enerji, glikan-fosfat bağının kırılmasından sağlanır. Fosfataz Dolikol-fosfat oluşturmak için gereklidir, Asn-X-Thr/Ser sırasını taşır. X, prolin dışında herhangi bir amino asit olabilir.

Üçüncü aşama oligosakkaritlerin olgunlaşmasıdır. Bu basamak için, ilk trimler GER lümeninde, izleyen trimler Golgi'de devam eder. Ekzoglikosidazlar H₂O katılımıyla glikozidik bağı kırarlar. Üç glukoz kalıntısının uzaklaştırılması GER lümeninde meydana gelir. Glikosidaz I en uç glukoz monosakkaridini, Glikosidaz II diğer iki glukoz kalıntısını koparır. 3. glukozun uzaklaştırılması GER'dan taşınma sinyali oluşturur. Üç glukoz sıralı olarak uzaklaştırılır. Glcase I uç Glc' u ayırır, Glcase II uçtaki ikinci Glc' u ve uçtaki üçüncü Glc' u ayırır. Bu aşama son Golgi kısmında gerçekleşir ve **galaktoziltransferaz (GalT-1)**, sialiltransferaz (ST) gibi özel enzimler şeker dallarının uçlarına galaktoz, sonrasında sialik asit ekler (Şekil 2.2).



Şekil 2.1. : Temel şeker birimleri (sol üst) ile N- ve O- Glikozilasyon tipleri <https://www.neb.com/> 'dan Türkçeleştirilmiştir.



Şekil 2.2. : Glikozilasyon sürecinde glikan trimlenmesi ve dallanması (Taylor ve Drickamer, 2011) Türkçeleştirilmiştir.

2.2. β 1-4 Galaktoziltransferaz I (EC 2.4.1. 38) Enziminin Yapısı ve İşlevi

Qasba ve ark (2008)' a göre, β 1-4 Galaktoziltransferaz I (GalT-1), (EC 2.4.1. 38) *orta/son* Golgi' de UDP-Gal bileşiminden galaktozu, N-asetilglukozamin' in ucuna özgü β 1-4 bağımlı kullanarak ekleyen bir **glikoziltransferaz enzimidir**. Golgi' nin yanı sıra hücre yüzeyinde de bulunabilirler. GalT-1 enziminin Golgi' nin hangi bölgesinde bulunduğu dair birçok çalışma yapılmıştır. Edinilen bilgilere göre tip II zarı kat eden enzimler sınıfına dâhil edilmiştir (Berger ve ark, 1981; Roth ve Berger, 1982; Rabouille ve ark, 1995). Kısa bir N-terminal sitoplazmik domaini, membranı kat eden bir bölge ve *son*-Golgi lümeni ile yüzleşen bir C-terminal domaini bulunmaktadır. Katalitik kısmı iki adet uzun ve kısa olmak üzere bölgeden oluşur. Temel metal bağlanma bölgesi N-terminal uçta bulunmaktadır. Oldukça ilginç olmakla birlikte GalT-1 enziminin şeker ile yüzleşen kısmı konformasyonel değişim geçirerek açık ya da kapalı hal alabilir. Aynı zamanda α -laktalbümin (LA) için de bir bağlanma bölgesi bulunmaktadır. Sadece meme bezlerinde bulunan bu protein ile galaktoziltransferaz enzimi laktasyon döneminde reaksiyona girerek laktoz sentezler. Galaktoziltransferaz enzimlerinin alt tipi ve çeşitleri bulunmaktadır. Bunlardan başlıcaları β 1-3, β 1-6, α 1-3 , α 1-4. olmak üzere en az 7 tipi olduğu bilinmektedir (Lo ve ark, 1998; Guo ve ark, 2001).

GalT-1 enziminin çalışma biçimi ve biyolojik özelliklerini karakterize etmek için birçok çalışma yapılmıştır. Araştırmalar sonucunda hücre yüzeyinde de bulunabilmesinden dolayı hücre – hücre ve hücre – matriks arasında tutunmayı sağladığı keşfedilmiştir (Evans ve ark, 1993). Embriyonik süreçlerde bu enzimin mutasyonu sonucu yeni doğan canlılarda ölüm ve fenotipik anomaliler gözlemlenmiştir. GalT-1 enzim domainlerinden uzun olan kısmı mutasyon ile elemine edildiğinde ise hücre etkileşimleri yönünden tutunma sorunları görülmüştür (Rodeheffer ve ark, 2002). GalT-1 enziminin çok ifade edilmesi ise hücre – hücre tutunma kapasitesini arttırarak murin melanomasında normalden daha çok invazyon gerçekleşmesine sebep olmuştur (Johnson ve ark, 1999). Zhu ve ark, (2005) ' in araştırmasına göre, yüksek derecede metastatik özellik kazanan akciğer kanseri hücrelerde GalT-1 ifadesi hücre yüzeyinde ciddi oranda artış göstermiştir GalT-1 enzimi aynı zamanda hücre yüzeyinde β 1 integrin gibi “davranarak” ekstraselüler matriks elemanlarından laminin ve fibronektin proteinleriyle etkileşime geçebilmektedir. Bu etkileşimler fokal adezyonda tirozin fosforilasyonunu uyararak tümör hücrelerin invazyonunu başlatabilirler.

2.3. Glikoziltransferaz Enzimleri Arasında Protein – Protein Temelli Etkileşimler

Glikozilasyon sürecinin keşfiyle birlikte enzimlerin çalışma biçimleri de merak konusu haline gelmiştir. Öyle ki, her bir glikoziltransferaz enzim kinetiği ve substrat tanımlamasıyla ilgili oldukça zengin bir literatür geçmişi bulunmaktadır. 21. yüzyılda geliştirilen ileri moleküler biyolojik teknikler yardımıyla klasik enzimolojiye dayalı glikoziltransferaz enzim mekanizması üzerinde yapılan çalışmalar, yerini daha hassas ölçümler yapabilen tekniklere bırakmıştır. Bunların içinden BiFC ve FRET teknikleri protein – protein etkileşimi ölçümlerinde yüksek hassasiyete dayalı olmaları sebebiyle tercih edilmeye başlanmıştır.

İlk olarak glikoziltransferaz enzimlerinin diğer enzimlerle kompleksler oluşturdukları 1970'lerin başlarında keşfedilmiştir. Laktoz sentaz (EC 2.4.1.22) adı verilen bu enzim α -laktalbümin ile GalT-1 in birleşmesinden oluşan bir komplekstir ve süt bezlerinde laktoz üretiminde işlev görür (Brodbeck ve Ebner, 1966; Klea ve Klee, 1972). Daha sonra, ksiloztransferaz enzimi ile GalT enzim komplekslerinin kondroitin sülfat'ın sentezini başlattığı belirlenmiştir. Nöral glikolipidlerin biyolojik görevlerinin keşfinden sonra bu molekülleri katalizleyen enzimlerin keşfi gerçekleştirilmiştir. Bu sırada N-asetilgalaktozaminil transferaz ile GalT in birarada kompleks oluşturarak nöral glikolipidleri sentezledikleri ortaya konulmuştur (Fishman, 1974). Nillson ve ark (1996) tarafından *Orta*-Golgi enzimlerinden olan GlcNAcT1 ve mannozidaz II arasındaki etkileşim özel bir metot geliştirilerek saptanmıştır. Fakat bu komplekslerin GalT enzimi ile olmuyor olması araştırmaları sonucunda, *orta*-Golgi enzimlerinin kendi aralarında kompleks oluşturduğu sonucunu yaratmıştır.

Enzimlerin heteromerik kompleksler oluşturabildiklerinin yanında homomerik bağlantılar da kurabildikleri çok geçmeden keşfedilmiştir. Bunun ilk örneği GalT-1 enziminin yüksek moleküler ağırlıklı oligomer / homodimerlerinin memeli hücrelerinden izole edilmesidir (Teasdale ve ark, 1994) . Benzer oligomerler ST6Gal-I, FucT-I, FucT-III, FucT-VI, GlcNAcT-V enzimleri için belirlenmiştir (Opat ve ark, 2000). Belirlenen enzim tiplerine ek olarak, bu tez çalışmasını birlikte yürüttüğümüz ekip tarafından geçmişte homodimer oldukları öne sürülen tüm bu örneklerin homomer oluşturdukları doğrulanmakla birlikte GlcNAT-I, II, GalT-I, ST6Gal-I, ST3Gal-II gibi enzimlerinin de canlı hücrelerde homomer oluşturdukları belirlenmiştir (Hassinen ve ark, 2010; Hassinen ve ark, 2011).

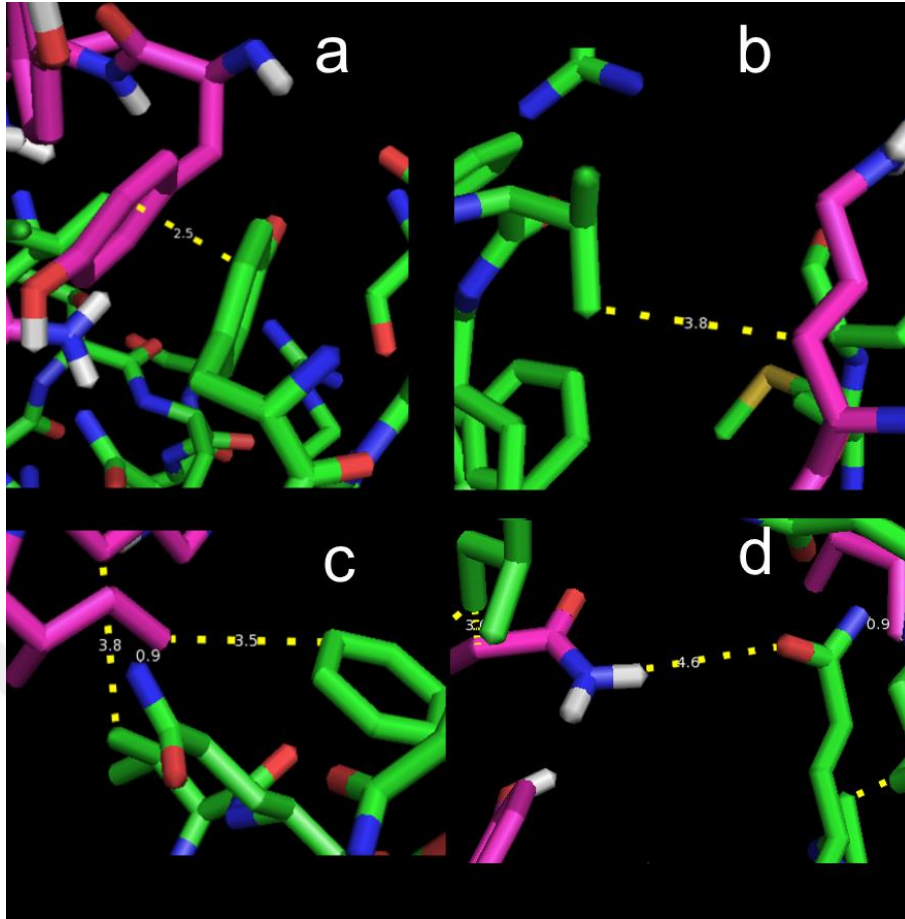
2.4. Protein – Protein Temelli Etkileşimlerin Biyoinformatik Yaklaşımlar Kullanarak Tahmin Edilmesi

İki proteinin etkileşip etkileşmediğinin çeşitli klasik biyokimyasal teknikler kullanılarak keşfedilmesinin ardından bu proteinlerin *in vivo* ortamda 3 boyutlu olarak nasıl etkileştikleri üzerine çalışmalar hız kazanmıştır. İzole edilen enzimlere ait *in vivo* ortamda elde edilen tüm biyokimyasal ve fizikokimyasal verilerin yüklenebildiği global protein veri bankası (PDB) (www.pdb.org) oluşturulmuştur. Protein etkileşimi üzerine araştırmalar yapan araştırmacılar, moleküller arası etkileşimleri bilgisayar ortamında hesaplayıp karşılaştırabilen sanal sistemler oluşturmuşlardır. Bu sistemlerin ilk örneklerinden biri, Boston Üniversitesi'ne ait ClusPro sunucusudur (www.nrc.bu.edu/cluster).

ClusPro tam anlamıyla otomatize edilmiş, protein – protein homolojisinin hangi pozisyonel amino asitler aracılığı ile oluştuğunu bulabilmek için bir çok algoritma kullanarak hesaplamalar yapabilen web tabanlı bir bilgisayar sunucusudur (Comeau ve ark, 2004). ClusPro sunucusuna PDB' den seçilen proteinler yüklenerek sistemin iki protein arasında olası etkileşimleri hesaplamaktadır. Program her geçen gün geliştirilen algoritmalar aracılığıyla iki protein üzerinde serbest enerjiye sahip eşleşmeye uygun olabilecek amino asitler milyarlarca kombinasyon arasından hesaplanarak belirlenmektedir (Camacho ve ark, 2002; Smith ve Sternberg, 2002).

Bu çalışmada β 1 - 4 Galaktoziltransferaz I (EC 2.4.1. 38) enziminin homomer oluşturup oluşturmadığını test etmek için ClusPro kullanılmıştır. Milyarlarca kombinasyon arasından birinci GalT-1 için 37, ikinci GalT-1 için 27 adet bölge belirlenmiştir. 37 bölge içerisinde PyMol molekül görüntüleme programı kullanarak en iyileri seçilmiştir. FRET tabanlı homoloji deneyleri için seçilen aday bölgelere ait moleküler görüntülemeler Şekil 2.3. 'te gösterilmiştir.

Şekil 2.3. ' te gösterildiği üzere PyMol programında ClusPro sunucusu sonucu elde edilen homoloji verileri ve amino asitler arası uzaklıklar gösterilmiştir. GalT-1 enzimi hakkında halihazırda bilinen veriler biyoinformatik yaklaşımla homoloji açısından değerlendirilmiştir. GalT-1 enzimi amino asit dizisi ve seçilen amino asitler Şekil 2.4. ' te gösterilmiştir.



Şekil 2.3. : Tüm bölgelerin amino asit temelli karşılıklı ilişkileri 282. bölge (a), 283. Bölge (b), 359. Bölge (c), 284. Bölge (d)

10	20	30	40	50
MRLREPLLSG	SAAMPGASLQ	RACRLLVAVC	ALHLGVTLVY	YLAGRDL SRL
60	70	80	90	100
PQLVGVSTPL	QGGNSA AAI	GQSSGELRTG	GARPPPPLGA	SSQPRPGGDS
110	120	130	140	150
SPVVD SGPGP	ASNLTSVPVP	HTTALS LPAC	PEESPLL VGP	MLIEFNMPVD
160	170	180	190	200
L ELVAKQNP N	VKMGGRYAPR	DCVSPHKVAI	IIPFRNRQEH	LKYWLYYLHP
210	220	230	240	250
VLQRQQLDYG	IYVINQAGDT	IFNRAKLLNV	GFQEALKDYD	YTCFVFSQVD
260	270	280	290	300
LIPMNDHNAY	RCFSQPRHIS	VAMDKFGFSL	P LVQ YFGGVS	ALSKQQFLTI
310	320	330	340	350
NGFPNNYWG W	GGEDDDIFNR	LVFRGMSISR	PNAVVGRCRM	IRHSRDKKNE
360	370	380	390	
PNPQRFD R A	HTKETMLSDG	LNSLTYQVLD	VQRYPLYTQI	TVDIGTPS

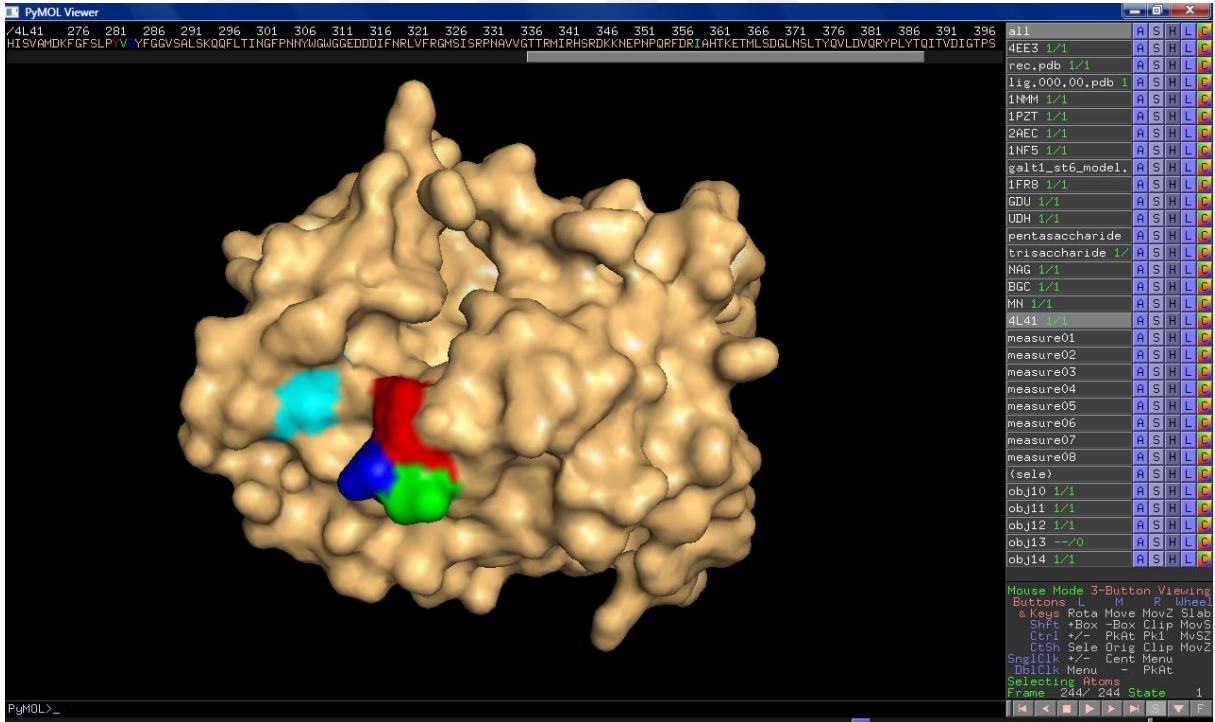
Şekil 2.4. : GalT-1 enzimine ait amino asit dizisi ve seçilen bölgeler. Y :Tirozin, V: Valin Q: Glutamat, I: İzolösin

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. β 1-4 Galaktoziltransferaz Enzimine Ait Sentetik DNA Dizisinin Mutasyona Uğratılacak Bölgelerinin Biyoinformatik Olarak Belirlenmesi ve 3 Boyutlu Modellenmesi

Galaktoziltransferaz enzimi protein sekansı üzerinde olası homomerik etkileşimi sağlayan bölgelerin belirlenmesi için ClusPro protein eşleştirme programı ve bu programın modülleri olan DOT ve ZDOCK kullanılmıştır. Galaktoziltransferaz enzimine ait olan dijital Protein Data Base dosyası (4L41) programa yüklenmiştir. Yüklenen monomerik BGalT1 enzimi üzerinde belirli bir düzeyde serbest enerjiye sahip amino asit rezidülerinden protein - protein etkileşiminde iş görmesi muhtemel bölgeler belirlenmiştir.

Tüm bu işlemlerin yapılabilmesi için milyarlarca kombinasyonu hesaplayabilen süper-bilgisayarlar kullanılmıştır. Neticede 282, 283, 284 ve 359 numaralı amino asitler seçilmiştir. En iyi homodimer kompleksi belirlendikten sonra 3 boyutlu görüntüleme için PyMol yapı biyokimyası programı (versiyon 1.4.1. Schrödinger, Inc.) kullanılmıştır (Şekil 3.1.) .



Şekil 3.1. : Monomerik bir Galaktoziltransferaz enzimi, PyMol programı ile görüntülenen eşleşmede olası iş gören bölgeler; 282 (kırmızı), 283 (yeşil), 284 (mavi), 359 (açık mavi).

3.2. β 1-4 Galaktoziltransferaz Enzimine Ait cDNA Dizisinin Mutasyona Uğratılması

3.2.1. Mutasyona Uğratılacak Bölgeye Özgü Primer Tasarımı

Galaktoziltransferaz enzimine ait nükleotid dizisi (NM_001497.3), QuikChange Lightning (Agilent) yönlendirilmiş mutasyon kiti kullanılarak mutasyona uğratılmak üzere <http://www.genomics.agilent.com/primerDesignProgram.jsp> web sunucusuna yüklenmiştir. Bu program aracılığıyla 282, 283, 284 ve 359 numaralı bölgelerdeki amino asitleri değiştirmeye yönelik Tablo 3.1. 'de belirtildiği üzere, değiştirilecek nükleotidler seçilerek 3' ve 5' bölgelerine özel forward ve reverse primerler tasarlanmıştır (Tablo 3.2.). Amino asitler için değişim tablosu (Tablo 3.1) aşağıdadır. Bu tabloya göre web sunucusu tarafından tasarlanan primerler, sentezlenip ve satın alınmıştır (Sigma Aldrich).

Tablo 3.1. : Amino asit değişim tablosu, kırmızı ile işaretlenen nükleotidler yeni nükleotidlerdir.

Amino asit Bölgesi	Kodon	Sentezlenen amino asit	Yeni kodon	Yeni amino asit
282	TAT	Tirozin	GGT	Glisin
			GAT	Aspartik Asit
283	GTT	Valin	GGT	Glisin
			GAT	Aspartik Asit
284	CAG	Glutamin	GGG	Glisin
359	ATT	İzolösin	GGT	Glisin
			GAT	Aspartik Asit

Tablo 3.2 : Nükleotid değişimi içeren 5' ve 3' primerler

Primer Adı (Sense ve antisense)	Primer Sekansı (5' ve 3')
282 Gly sense 282 Gly as	5'-acacctccaaaataactgaacaccaggtaggctgaatccaaacttacc-3' 5'-gataagtttgattcagcctacctggtgttcagatattttggaggtg-3'
282 Asp Sense 282 Asp as	5'-cctccaaaataactgaacatcaggtaggctgaatccaaac-3' 5'-gtttggattcagcctacctgatgttcagatattttggagg-3'
359 Gly Sense 359 Gly as	5'-ctttgtgtgacacctcggcacaacctctgaggattggg-3' 5'-cccaatcctcagaggtttgaccgaggtgcacacacaaag-3'
359 Asp Sense 359 Asp as	5'-ctttgtgtgacatcctcggcacaacctctgaggattggg-3' 5'-cccaatcctcagaggtttgaccgagatgcacacacaaag-3'
283 Gly Sense 283 Gly as	5'-gacacctccaaaataactgaccataaggtaggctgaatcc-3' 5'-ggattcagcctaccttatggtcagatattttggaggtg-3'
283 Asp Sense 283 Asp as	5'-gacacctccaaaataactgatcataaggtaggctgaatcc-3' 5'-ggattcagcctaccttatgatcagatattttggaggtg-3'
284 Gly Sense 284 Gly as	5'-cagagacacctccaaaatacccaacataaggtaggctgaatc-3' 5'-gattcagcctaccttatggtgggtattttggaggtgtctctg-3'
282 Gly 283 Gly sense 282 Gly 283 Gly as	5'-cacctccaaaataactgaccaccaggtaggctgaat-3' 5'-attcagcctacctggtggtcagatattttggaggtg-3'
282 Gly 283 Gly 284 Gly sense 282 Gly 283 Gly 284 Gly as	5'-gagacacctccaaaatacccaccaccaggtaggctgaa-3' 5'-ttcagcctacctggtggtgggtattttggaggtgtctc-3'
282 Gly 284 Gly sense 282 Gly 284 Gly as	5'-agagacacctccaaaatacccaacaccaggtaggctgaat-3' 5'-attcagcctacctggtgtgggtattttggaggtgtctct-3'
283 Gly 284 Gly sense 283 Gly 284 Gly as	5'-cagagacacctccaaaatacccaccataaggtaggctgaatc-3' 5'-gattcagcctaccttatggtgggtattttggaggtgtctctg-3'

3.2.2. Yönlendirilmiş Mutagenез ve FRET Vektörü Özelliği Taşıyan Plazmid Yapılarının Oluşturulması

Tasarlanan primerler “Agilent QuikChange Site Directed Mutagenesis Kit” protokolüne göre kullanılmıştır. Bu işlem için kullanılacak bileşenler ve miktarları Tablo 3.3 ‘deki gibidir. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) bileşenleri olarak kullanılan kalıp dsDNA, monomerik mVenus (mVen) FRET işareti taşıyanlar (Nagai ve ark, 2002), monomerik mCherry (mChe) (Shaner ve ark, 2004) FRET vektörü taşıyan mVenus (Addgene Cambridge, MA, USA) satın

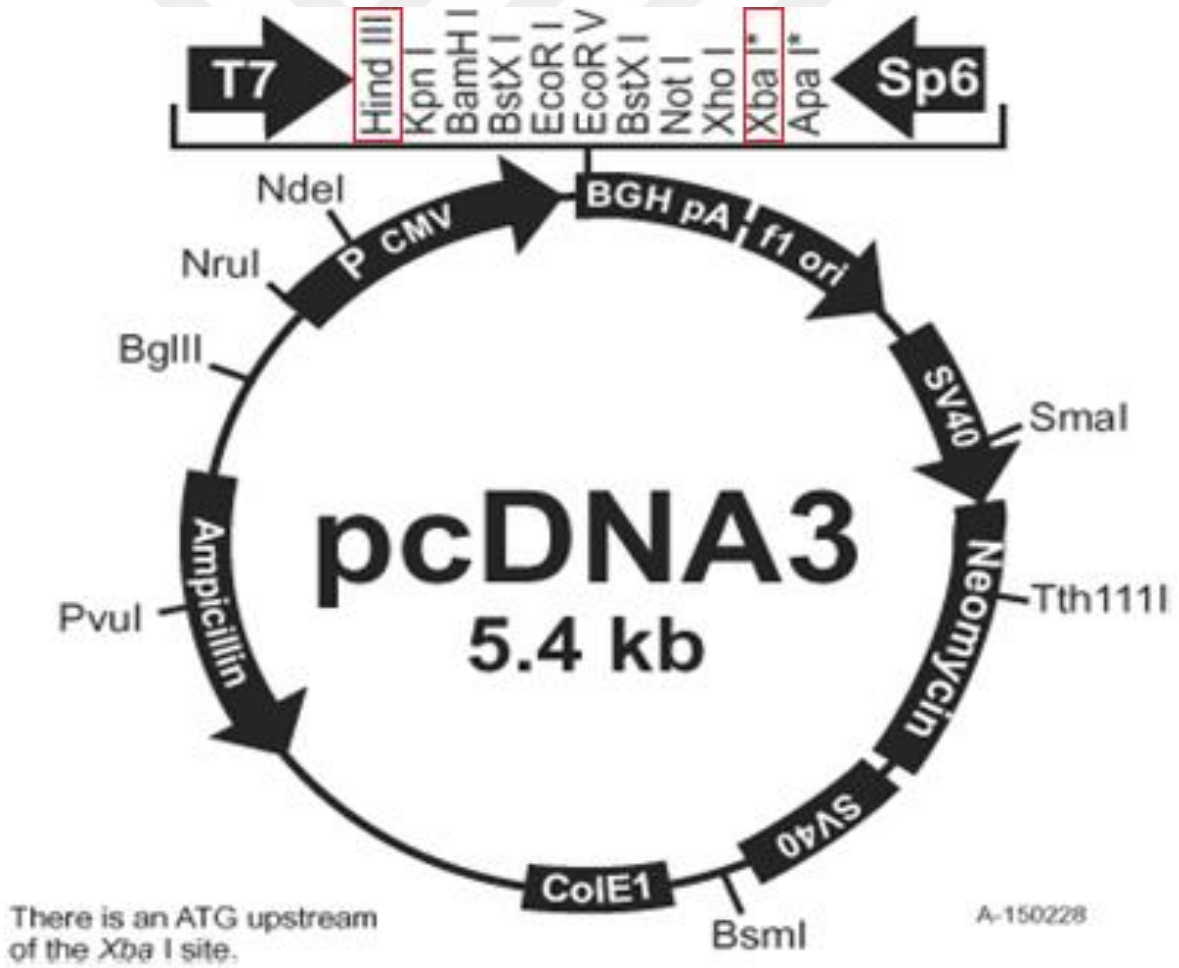
alınmış, mCherry ise Dr. Vesa OLKONEN (Helsinki Üniversitesi, Finlandiya) tarafından bağışlanmıştır. 5' ve 3' primerler yukarıda belirtildiği gibi Agilent web sunucusu tarafından tasarlanıp, sentetik olarak Sigma-Aldrich şirketine kimyasal olarak sentezletilmiş ve satın alınmıştır. Diğer bileşenler 200518 numaralı kit içerisinde kullanılmıştır. Thermal Cycle cihazı program olarak sırasıyla 95 °C 30 saniye, 95 °C 30 saniye, 55 °C 1 dakika, 68 °C 5 er dakika olacak şekilde 18 döngüye programlanmıştır. Reaksiyon bittikten sonra 1 µl Dpn I (10 U/µl) restriksiyon enzimi eklenmiştir ve yaban tip dsDNA nın degradasyonu 37 °C 'de 1 saat ependorf inkübatöründe bekletilerek gerçekleştirilmiştir.

Her bir farklı mutant zincir oluşturmak için aynı işlem prosedür basamakları izlenmiştir. Yönlendirilmiş mutagenез odaklı PZR basamakları mVenus FRET dsDNA sı üzerinde yapılmış, sonrasında subklonlama yöntemi ile her bir mutant GalT-I nükleotid dizisi mCherry FRET vektörüne bağlanmıştır. Klasik subklonlama yöntemi kullanılan bu aşamada, mVenus dsDNA bulunan HindIII ve XbaI restriksiyon kesim enzimlerine özgü bölgeler kesilerek, mutant zincirin gen kaseti şeklinde yerleştirilmesi sağlanmıştır (Şekil 3.2.). Bu aşamada klasik subklonlama prosedürü kullanılmıştır. Enzimatik kesim için reaksiyon, 1 µg vektör dsDNA, 3 µl (Thermo FastDigest) tampon, 1 µl Hind III enzim, 1 µl Xba I enzim ve 25 µl' ye kadar ddH₂O kullanılarak 1 saat 37 °C de gerçekleştirilmiştir.

Özgün bölgelerin kesiminden sonra reaksiyon içeriği insert ve vektörü ayırmak üzere %1' lik agaroz jelde (5 µl EtBr) 22 dakika 400 mili amper güç ile yürütülmüştür. Enzimatik kesim işlemi mCherry dsDNA sı için de yapıldıktan sonra mVenus plazmidinden ayrılan mutant GalT-I insert DNA ve mCherry vektör DNA sı UV ışık altında bistüri yardımıyla agaroz jelden kesilerek çıkartılmıştır. Çıkartılan insert dsDNA bölgeleri, kesilmiş mCherry vektörüne bağlanmak üzere agaroz jelden QIAquick (Cat. No. 28704) kiti kullanılarak izole edilmiştir. İzole edilen vektör DNA, nanodrop (Thermo NanoDrop 1000) kullanılarak 100 ng olacak şekilde miktarı hesaplanmış, sonucunda 5 µl vektör DNA sına yaklaşık 7 µl insert DNA, 2 µl ligasyon tamponu (Thermo T4 ligation Buffer), 1 µl T4 DNA ligaz enzimi (Thermo T4), 5 µl ddH₂O eklenmiştir. Reaksiyon 22 °C inkübatörde 1 gece bırakılmıştır.

Tablo 3.3 : PZR odaklı yönlendirilmiş mutagenез kit elemanları

Bileşen	Miktar
Kalıp dsDNA	5µl (5-50 ng)
5' primer	125 ng
3' primer	125 ng
dNTP karışımı	1 µl
ddH ₂ O	Son hacim 50 µl olacak şekilde
<i>PfuTurbo</i> DNA Polimeraz	1 µl (2.5 U/ µl)



Şekil 3.2 : FRET vektörü, kırmızı ile işaretlenen bölgeler restiriksiyon kesim bölgeleridir

3.3. Mutant β 1-4 Galaktoziltransferaz Enzimine Ait Plazmid Yapılarının *E. coli* Bakteri Hücrelerine Transformasyonu

İki farklı FRET vektöründe oluşturulan çeşitli mutant nükleotid değişimi içeren plazmid yapıları, yeterli miktarda üretilmek üzere, bakteri hücrelerine Agilent protokolü kullanılarak (Cat. No. 200249) transforme edilmiştir. Bu işlem için klasik sıvı besi yeri (LB) 37 °C de hazır tutulmuştur. Uygun koşullarda (-70 °C) alikotlanmış şekilde saklanan XL1 Blue Competent Cells (Agilent) *E. coli* bakteri hücrelerinden her bir plazmid yapısı için 100 μ l alınarak ile 4 μ l plazmid DNA pipet ucuyla karıştırıldıktan sonra 30 dakika buz üzerinde bekletilmiştir. Soğutma işleminden sonra 45 saniye olacak biçimde 42 °C lik ısı şoku uygulandı. 2 dakika tekrar buz üzerinde tutulduktan sonra 37 °C 300 μ l LB eklendi ve 350-400 rpm 1 saat inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon sonrası reaksiyon, ampisilin antibiyotiği içeren katı besi yerlerine ekilmiş ve 1 gece 37 °C inkübasyona bırakılmıştır. Oluşan koloniler, içerisinde mutant yapı plazmidi (ampisilin dirençlilik geni içermektedir) taşıyan hücreler olup uygun miktarda çoğalmayı başarabilenlerdir. Bu koloniler içerisinde yeterli boyutlara ulaşan 3 farklı koloni seçilerek zig-zag ekim tekniği ile tek bir katı besi yerine ekim yapılmıştır. Bunun yanı sıra, her bir koloni ayrı ayrı 4 μ l LB ve 40 μ l amp içeren 3 farklı 15 ml lik steril tüp içerisine inoküle edilmiş ve 300 rpm çalkalamalı inkübatörde 37 °C de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında miniprep DNA izolasyon protokolü (Omega Plasmid DNA mini kit I, D6942-02) kullanılarak plazmid DNA her bir mutant tip için izole edilmiştir. Elde edilen mutant tipte DNA örnekleri gerekli mutasyonu içerip içermediği bakımından Oulu Biocenter 'da sekans analiz hizmeti satın alınarak kontrolü sağlanmıştır. Her bir mutantın istenilen nükleotid değişimi içerdiği belirlendikten sonra, miniprep izolasyon için seçilen ve +4 °C de bekletilen zig-zag ekimlerden bir uygun koloni seçilmiş ve her bir mutant çeşitidinden 1 μ g DNA üretmek üzere koloniler, 100 ml sıvı besi yerine (10 mg/ml 1 ml ampisilin içeren) öze ile inoküle edilmiştir. 300 rpm çalkalamalı inkübatörde 37 °C de bir gece inkübasyondan sonra midiprep DNA izolasyon protokolü (NucleoBond Xtra Midi, Macherey-Nagel) kullanılarak plazmid DNA her bir mutant tip için ayrı ayrı izole edilmiş ve DNA kütüphanesi tamamlanmıştır.

Tüm çalışmada kullanılacak mutant DNA tipleri bağlı oldukları plazmidlerle görsel olarak; mVenus plazmidine bağlı olanlar; 282Gly mVen, 282Asp mVen, 283Gly mVen, 283Asp mVen, 284Gly mVen, 359Gly mVen, 359Asp mVen, 282+283Gly mVen, 283+284Gly mVen, 282+284Gly mVen, 282+283+284Gly mVen. mCherry plazmidine bağlı olanlar, 282Gly mChe, 282Asp mChe, 283Gly mChe, 283Asp mChe, 284Gly mChe, 359Gly mChe, 359Asp mChe, 282+283Gly mChe, 283+284Gly mChe, 282+284Gly mChe, 282+283+284Gly mChe.

Üretilen mVenus ve mCherry plazmidleri içerisinde B4GalT1 enzimine ait mutant DNA dizisi her bir tip için Oulu Üniversitesi Sekans Biyomerkezi'nde ikinci kez sekans analizine tâbi tutularak kodların doğru yerde doğru nükleotid içerdiği onaylanmıştır. Nükleotid dizilerde sorun olduğu durumlar için tüm protokol PZR reaksiyonundan itibaren tekrarlanmış ve doğru sekansa sahip enzim yapıları seçilmiştir.

3.4. Mutant β 1-4 Galaktoziltransferaz Enzim Tiplerinin Cos-7 Hücre Hattına Trasfeksiyonu ve Lokalizasyonunun Konfokal Mikroskop Yöntemiyle Belirlenmesi

3.4.1. Hücre Kültürü Teknikleri

Tüm çalışma sırasında Oulu Üniversitesi, Biyokimya ve Moleküler Tıp Fakültesi bünyesinde sıvı azot içerisinde muhafaza edilmiş Cos-7 (Afrika yeşil maymun böbrek hücresi, American Type Culture Collection, ATCC, Manassas, VA) hücre hattı kullanılmıştır. %5 CO₂, 37 °C İnkübasyon şartlarında hücreler DMEM (Dulbecco's modified Eagle's Medium), Glutamax 2 (Gibco BRL, Grand Island, NY), %10 FBS (HyClone, Cramlington, UK) ve penisilin-streptomisin (Sigma–Aldrich) karışımı olan kültür ortamında tutulmuştur. Hücrelerin devamlılığını sağlamak için her iki günde bir kez eski ortam taze ortamla değiştirilmiştir. 10 cm lik kültür kaplarında inkübatör içerisinde muhafaza edilen hücreler, tamamen steril koşullarda, laminar akış kabin içerisinde olmak üzere 2X Tripsin-EDTA (Sigma- Aldrich) kullanılarak kaldırılıp, 1300 G, 4 °C de santrifüj edildikten sonra taze ortam solüsyonu içerisinde inkübasyona bırakılmıştır. Tüm canlı atık materyal Deconex (Borer AG, Espoo, Finland) solüsyon ile öldürülmüştür.

3.4.2. Transfeksiyon İşlemi

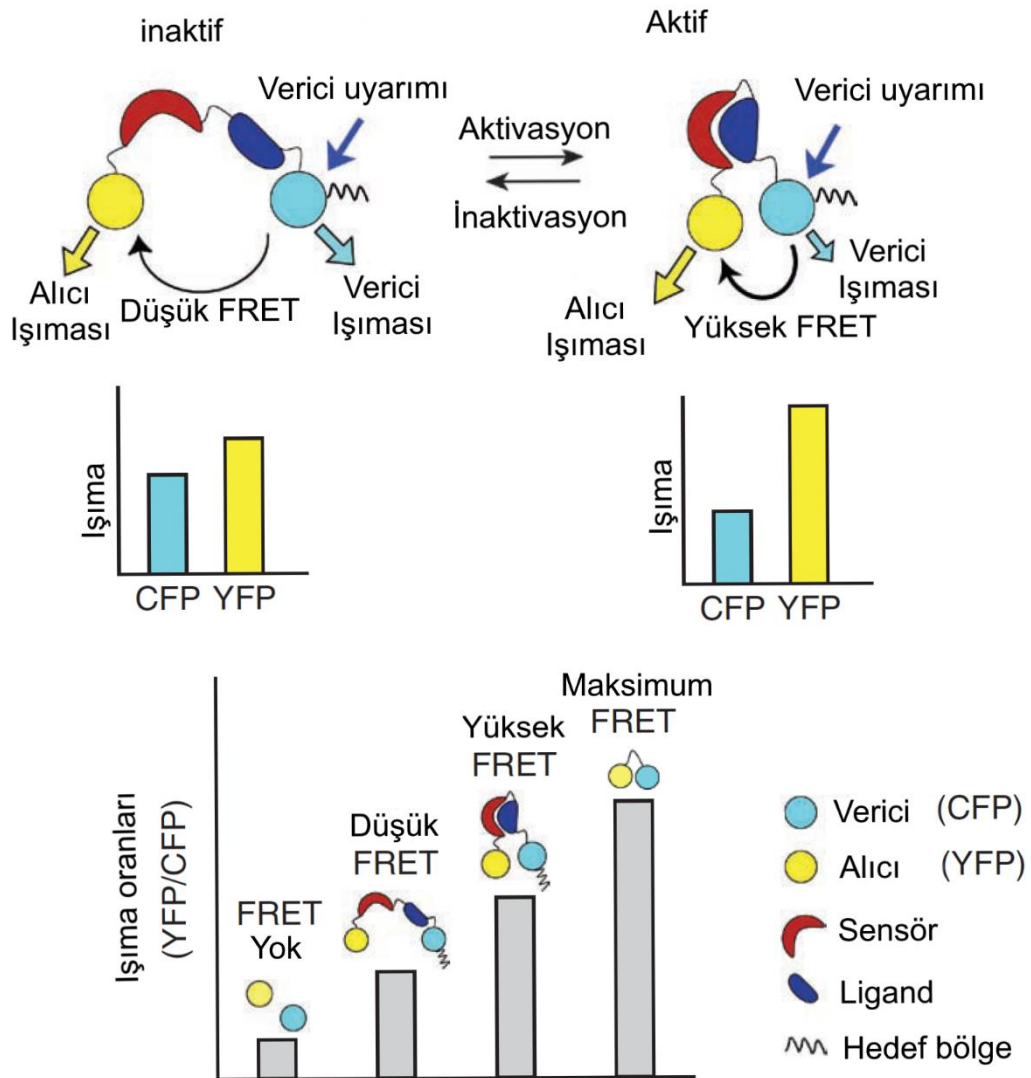
Oluşturulan 11 mVenus, 11 mCherry plazmidi envanterdeki tüm mutasyonları taşımaktadır. Her bir plazmid yapısının ifade edildikten sonra, hücre içinde olması gereken yere ulaşım ulaşılmayacağını kontrol etmek için Cos-7 hücre hattına FuGENE®6 (Roche Applied Science) katyonik lipid ajan kullanılarak transfeksiyon gerçekleştirilmiştir. Bu işlem için 100 ml FBS içermeyen DMEM içerisine, 5 µl FuGENE® 6 katyonik lipid ajan eklendikten sonra 5 dakika beklendi ve 500 ng derişimde plazmid eklendi. 15 dakika beklendikten sonra karışım hücre hattına eklendi. Transfeksiyon işleminin bitmesiyle birlikte 37 °C karbondioksitli etüv içerisinde uygun hücre kültürü şartlarında inkübasyon gerçekleştirildi. Bu işlem her bir mutant DNA için tekrarlandı. Transfekte edilmiş hücreler konfokal mikroskopta incelenmek üzere hazırlandı. Ko-transfeksiyon işlemi için de her iki DNA dan 500 ng karışım oluşturmak dışında tüm basamaklar aynı şekilde ilerletilmiştir.

3.4.3. Transfekte edilen hücrelerin konfokal mikroskopta incelenmek üzere hazırlanması

Transfekte edilmiş hücreler, 35 mm lik hücre kültürü kaplarında bir gece bekledikten sonra üzerlerindeki ortam solüsyonu vakumlu pipet yardımıyla çekildi, 2 kere PBS 1x (Thermo Scientific) ile yıkandı. 1 ml %4 Lük Paraformaldehit kullanılarak fiske edildikten sonra 1 saat %1 PBS + %1 BSA ile bloke edildi. Blokağdan sonra blok solüsyonu çekildi. 1:250 oranında BSA ile seyreltilmiş primer Golgi matriks antikoru olan 100 µl GM130 (monoclonal, BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ) ile 1 saat inkübasyona bırakıldı. Ardından kullanılan plazmidin taşıdığı renge bağlı olarak, mVenus ile transfekte edilenler konfokal mikroskop altında yeşil ışığa yapacağından zıt bir renk taşıyan kırmızı Alexa Fluor 359 ile, mCherry ile transfekte edilen hücreler kırmızı ışığa yapacağından yeşil Alexa Fluor 488 ile sekonder işaretlenmiştir. Her iki Alexa Fluor (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) antikoru 1:500 oranında BSA ile seyreltilerek kullanılmıştır. 1 saat sekonder antikorlar inkübe edildikten sonra 1000 µl %1 BSA ve %1 PBS ile, 1000 µl 1x PBS ile yıkanmıştır. Hücrelerin nükleuslarını boyamak için 10 µl / 1 ml PBS içinde Hoechst (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) kullanılmıştır. 10 dakika karanlıkta inkübe edildikten sonra örnekler LSM 700, Zeiss Zen 2009 Konfokal mikroskopta incelenmeye hazır hale getirilmiştir. Çekilen görüntülerden yola çıkarak hücre içinde üretilen mutant proteinlerin *trans*-Golgi sahasında olup olmadığı gözlemlenmiştir.

3.5. Förster Rezonans Enerji Transfer (FRET) Analizi

FRET analizi, verici ve alıcı moleküllerin ölçüm yapılmak istenen protein üzerine rekombinant olarak yerleştirilmesinden sonra otomatize biçimde kültür plaklarını okuyabilen konfokal mikroskopi temelli bir cihaz olan Operetta (PerkinElmer, Monza, IT) ile iki molekülün bir biri ile etkileşimde olup olmadıkları ölçülür. Verici molekül olarak mVenus kullanılırken, alıcı floresans protein olarak mCherry kullanılmıştır. Proteinler arasındaki yaklaşımları rapor eden bu floresans moleküllerin etkileşmesi sonucu oluşan FRET oranları hesaplanarak moleküllerin etkileşimde olup olmadıklarını anlamamızı sağlamıştır (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. : FRET tekniği çalışma mekanizması ve oransal gösterimi (Kardash ve ark, 2011)

FRET analizi için, 35 mm' lik hücre kültürü kaplarına eşit sayıda hücre ekimi yapılmıştır. Örneğin; 96' lı hücre kültürü plakalarından A, B ve C satırlarında sırasıyla YT/ YT, YT / mutant, mutant / mutant etkileşimlerini test etmek için 3 ayrı 35 mm' lik hücre kültürü kaplarında ko-transfeksiyon işlemi gerçekleştirilmiş ve hücre kültürü şartlarında bir gece inkübasyona bırakılmıştır. Yaklaşık 18 saat sonra rutin hücre kültürü işlemleri yapılarak hücreler, 96' lı plaklara her bir satırda eşit sayıda hücre olacak şekilde birim hacim sayımları yapılarak dilüe edilmiştir. Çok kanallı pipet yardımıyla kuyulara yerleştirilen hücrelerin tutunması için 96' lı plakalar yaklaşık 5 saat tutunmalarını sağlamak için inkübasyona bırakılmıştır. Tutunmanın gerçekleşmesi invert mikroskopta gözlemlendikten sonra, yine çok kanallı pipet kullanılarak medya çekilmiş ve sırasıyla %1 PBS ile 3 kez yıkama, %4 PFA ile tespit, %1 PBS ile 3 kez yıkama, Hoechst (10 µl / 1 ml PBS) ile 10 dakika inkübasyonun ardından 96' lı plaka cihaz içerisine yerleştirilmiştir. mVenus, mCherry, Hoechst ışıkları için gerekli ayarlar yapılmıştır. Bu aşamada yaklaşık 8 saat süren FRET testi otomatize biçimde her bir hücre içerisinde mVenus ve mCherry floresans işaretleri taşıyan galaktoziltransferaz enzimleri için etkileşim ölçümü yapmak üzere gerçekleştirilmiştir. 3 kez tekrarları yapılan ölçüm sonucunda ulaşılan değerler ham sayısal veri olarak alınıp Excel programı kullanılarak grafik haline getirilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Konfokal Mikroskopi Yöntemi ile Mutant Enzimlerin Hücre İçindeki Yerlerinin Belirlenmesi

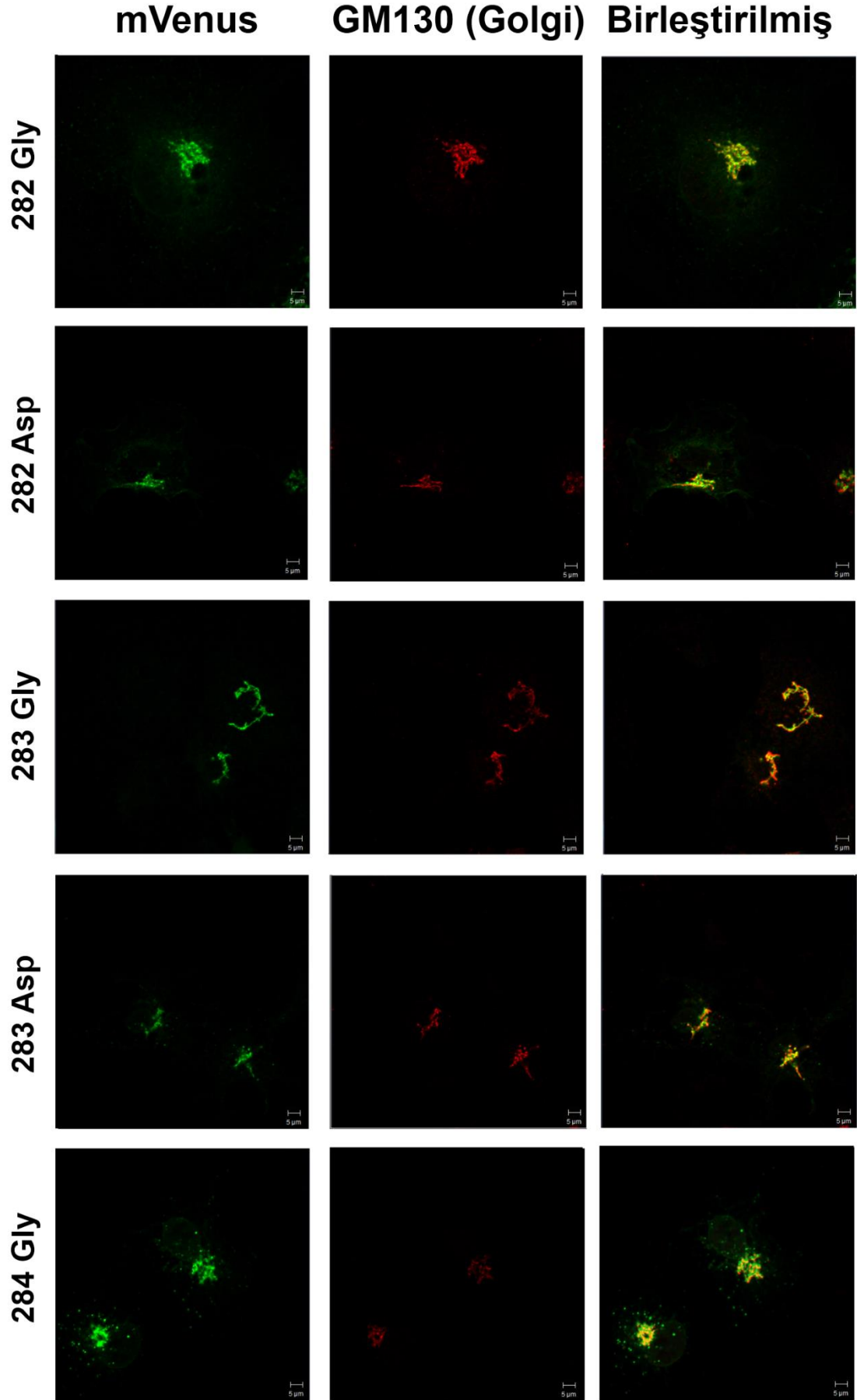
Rekombinant teknoloji ve transfeksiyon yöntemleri kullanılarak Cos-7 Hücre hattında üretilen 11 mVenus 11 mCherry olmak üzere 22 tip mutant galaktoziltransferaz enzim tiplerinin Golgi içerisinde bulunup bulunmadığını belirlemek için konfokal mikroskopi tekniği kullanılmıştır. Çekilen mikroskobik fotoğraflarda, mutant tiplerin tümüyle Golgi içerisinde istenilen şekilde üretildiği sonucuna varılmıştır. Zıt renklerde ışımaya yapacak biçimde işaretlenen Golgi ve kendiliğinden ışımaya yapabilen mutant proteinlerin (mVenus yeşil ışımaya yapacağı için Golgi kırmızı, mCherry kırmızı ışımaya yapacağı için Golgi yeşil renkte işaretlenmiştir) birleştirilmiş görüntülerinde kırmızı ve yeşil rengin birleşimi olan sarı renk belirgin biçimde gözlemlenmektedir.

Mutant proteinlerin uygun şekilde üretildiği, çekilen konfokal mikroskopi fotoğrafları ile (Resim 4.1a, b, c, d.) gösterilmiştir. Bu bulgu çalışmanın sonraki aşaması olan FRET analizi için önemli bir kontrol noktası olup, enzimlerin hücre içerisinde parçalanmadan doğal protein sentezi sürecine uygun biçimde üretildiklerini göstermektedir.

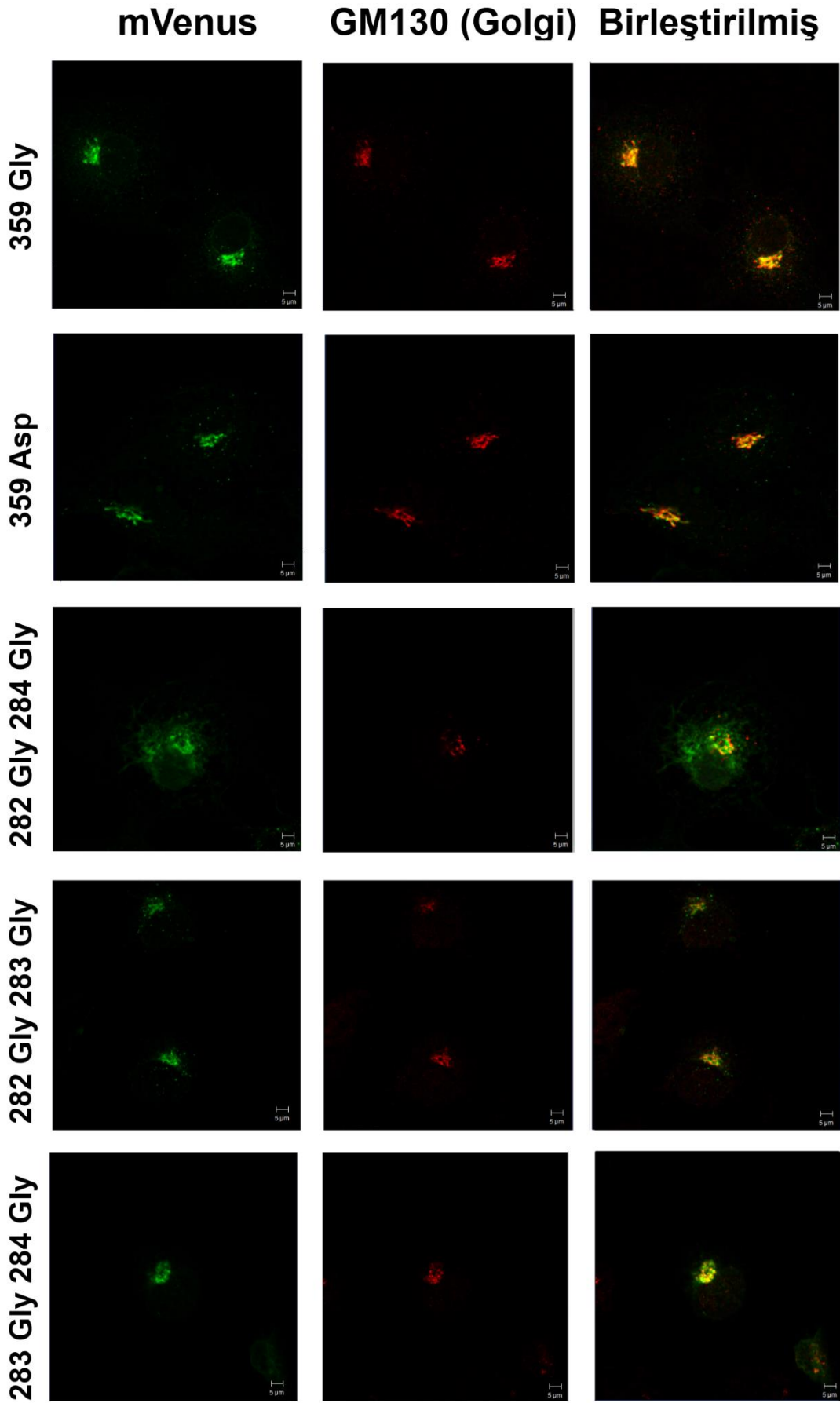
4.2. FRET Analizi ile Yaban Tip ve Tek Amino asit Yönünden Mutant proteinlerin FRET Oranlarının Belirlenmesi

4.2.1. 282 Numaralı Bölgenin Homomerik Etkileşim Bakımından Test Edilmesi

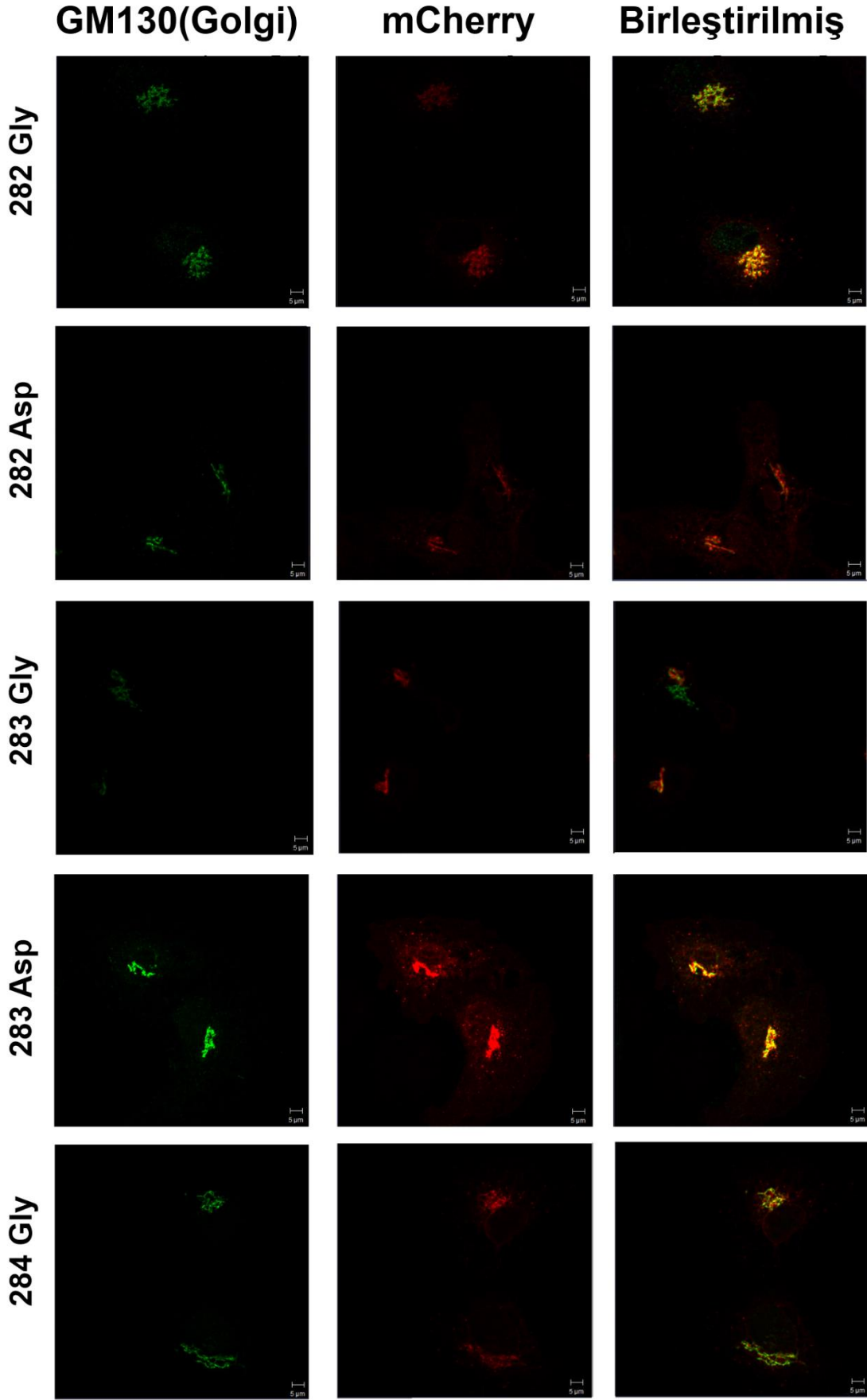
Bu bölgede bulunan tirozin amino asidi ClusPro biyoinformatik programıyla yapılan hesaplamalar sonucu 1. aday bölge olarak belirlenmiştir. Bölge üzerinde iki farklı biçimde mutasyon yapılması planmış ve uygulanmıştır. Glisin ve aspartik asit amino asitlerine çevrilen tirozin amino asidine ait kısım enzim yapısında kırmızı renk ile gösterilmiştir (Şekil 4.2. ve 4.3). Yaban tipe göre sadece glisin mutasyonuna ait FRET oranlarında düşüş saptanmıştır (Şekil 4.4. ve 4.5.).



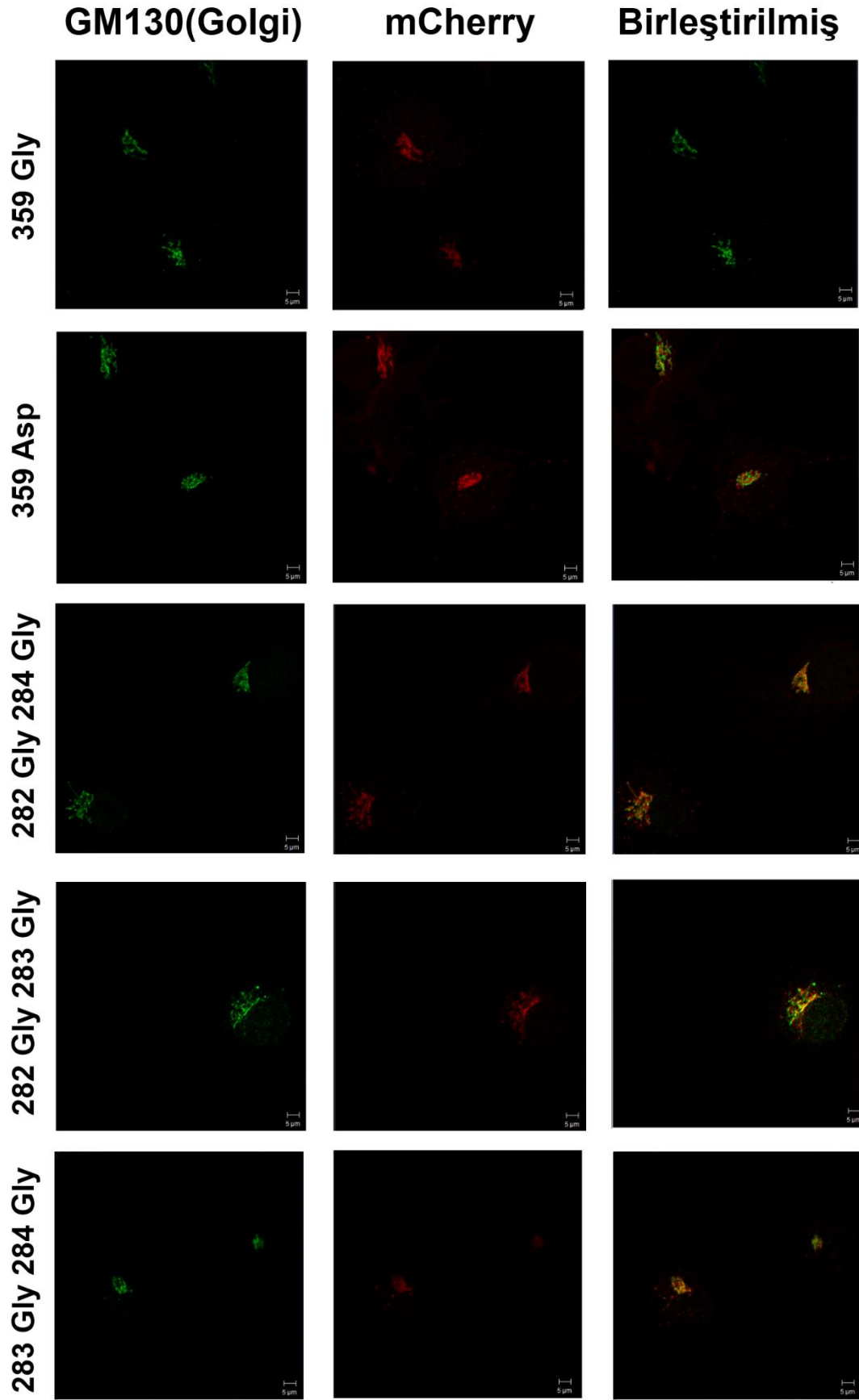
Resim 4.1a. : Konfokal mikroskopi yontemiyle yerleri doğrulananan mutant enzimler (bar 5 μ m)



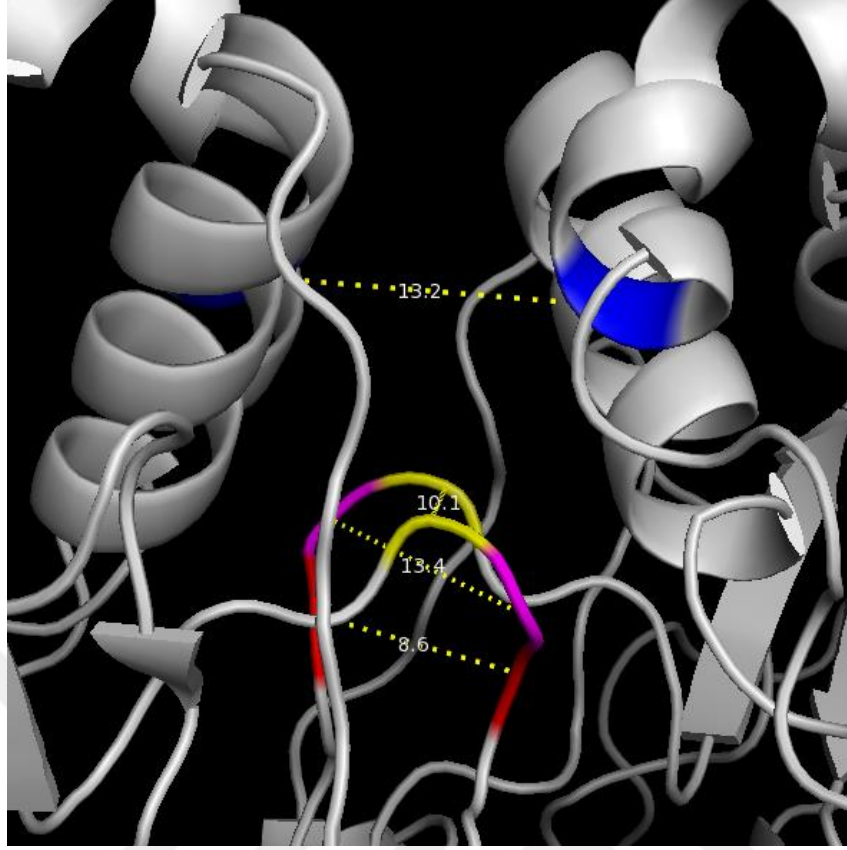
Resim 4.1b. : Konfokal mikroskopi yöntemiyle yerleri doğrulan mutant enzimler (bar 5µm)



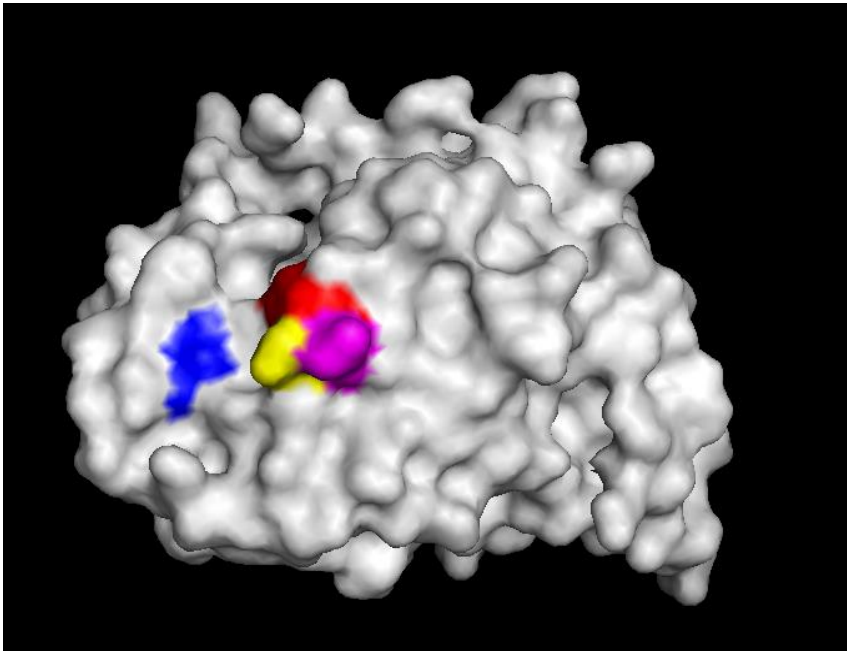
Resim 4.1c. : Konfokal mikroskopu yöntemiyle yerleri doğrulanan mutant enzimler (bar 5 μm)



Resim 4.1d. : Konfokal mikroskopi yöntemiyle yerleri doğrulananan mutant enzimler (bar 5μm)



Şekil 4.2. : Olası homomerik etkileşim bölgelerinin homodimerik yapısının uzaklıklarıyla birlikte 3 boyutlu görüntüsü.



Şekil 4.3. : Olası homomerik etkileşim bölgelerinin monomerik yapı üzerinde yüzeysel 3 boyutlu görüntüsü.

4.2.2. 283 Numaralı Bölgenin Homomerik Etkileşim Bakımından Test Edilmesi

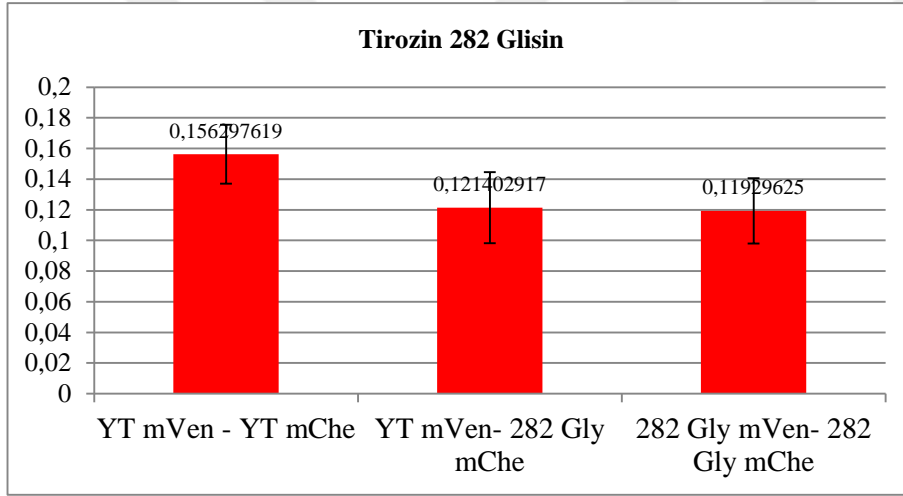
Bu bölgede bulunan valin amino asidi ClusPro biyoinformatik programıyla yapılan hesaplamalar sonucu ikinci aday bölge olarak belirlenmiştir. Bu bölge üzerinde iki farklı biçimde mutasyon yapılması planmış ve uygulanmıştır. Glisin ve aspartik asit amino asitlerine çevrilen valin amino asidine ait kısım enzim yapısında mor renk ile gösterilmiştir (Şekil 4.2. ve 4.3.). Yaban tipe göre sadece aspartik asit mutasyonuna ait FRET oranlarında düşüş saptanmıştır (Şekil 4.6. ve 4.7.).

4.2.3. 284 Numaralı Bölgenin Homomerik Etkileşim Bakımından Test Edilmesi

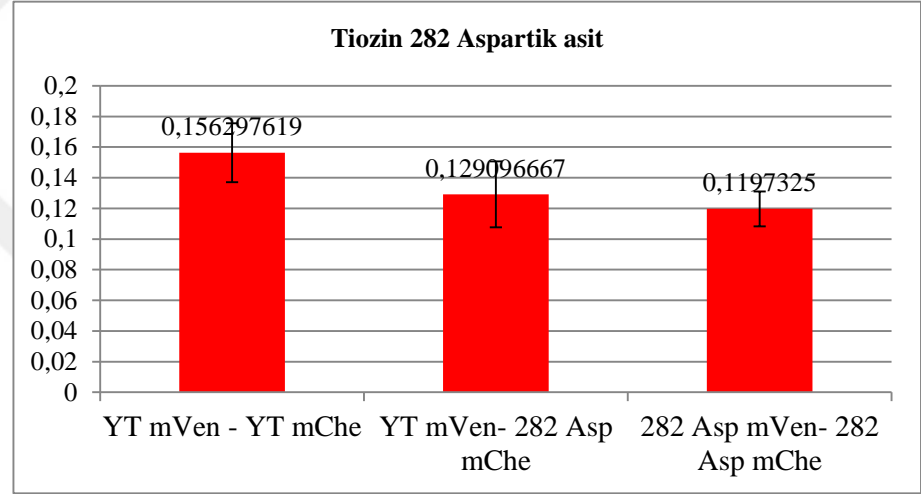
Bu bölgede bulunan glutamin amino asidi ClusPro biyoinformatik programıyla yapılan hesaplamalar sonucu üçüncü aday bölge olarak belirlenmiştir. Bölge üzerinde bir mutasyon yapılması planmış ve uygulanmıştır. Glisin amino asidine çevrilen glutamin amino asidine ait kısım enzim yapısında sarı renk ile gösterilmiştir (Şekil 4.2. ve 4.3.). Yaban tipe göre sadece bu bölgeye ait glisin mutasyonu karşılaştırıldığında FRET oranlarında herhangi bir düşüş saptanmamıştır (Şekil 4.8.).

4.2.4. 359 Numaralı Bölgenin Homomerik Etkileşim Bakımından Test Edilmesi

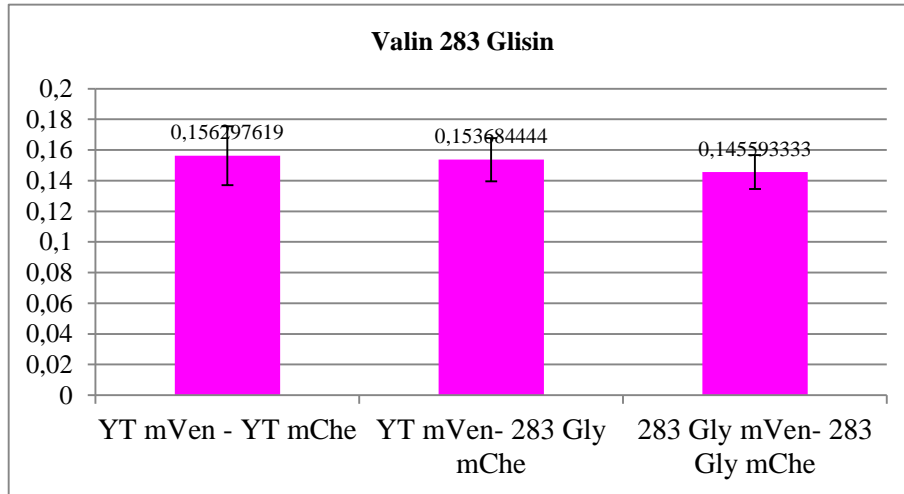
Bu bölgede bulunan izölösün amino asidi ClusPro biyoinformatik programıyla yapılan hesaplamalar sonucu dördüncü aday bölge olarak belirlenmiştir. Bölge üzerinde iki biçimde mutasyon yapılması planmış ve uygulanmıştır. Glisin ve aspartik asit amino asitlerine çevrilen izölösün amino asidine ait kısım enzim yapısında mavi renk ile gösterilmiştir (Şekil 4.2. ve 4.3.). Yaban tipe göre sadece glisin mutasyonuna sahip mutant- mutant, FRET oranlarında düşüş saptanmıştır (Şekil 4.9. ve 4.10.).



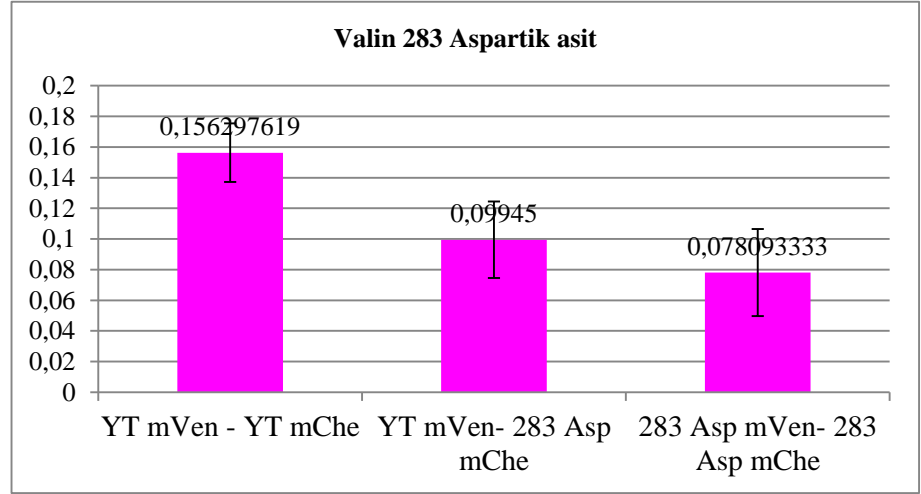
Şekil 4.4. : 282. bölgenin glisin mutasyonu sonrası FRET oranları [*]



Şekil 4.5. : 282.bölgenin asp mutasyonu sonrası FRET oranları[*]

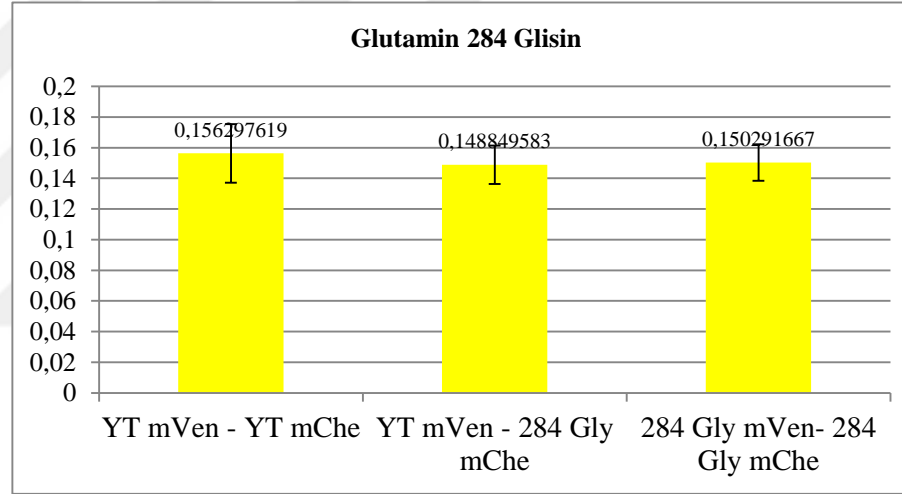


Şekil 4.6. : 283. bölgenin glisin mutasyonu sonrası FRET oranları [*]

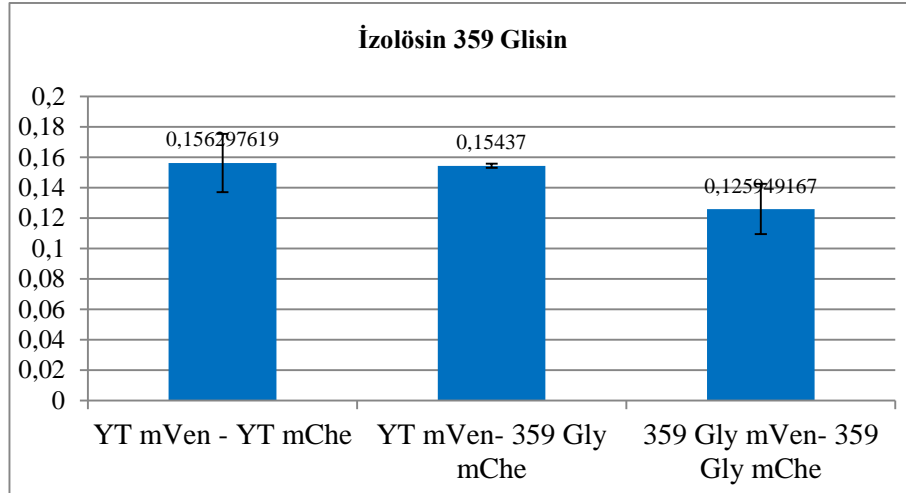


Şekil 4.7. : 283. bölgenin asp mutasyonu sonrası FRET oranları [*]

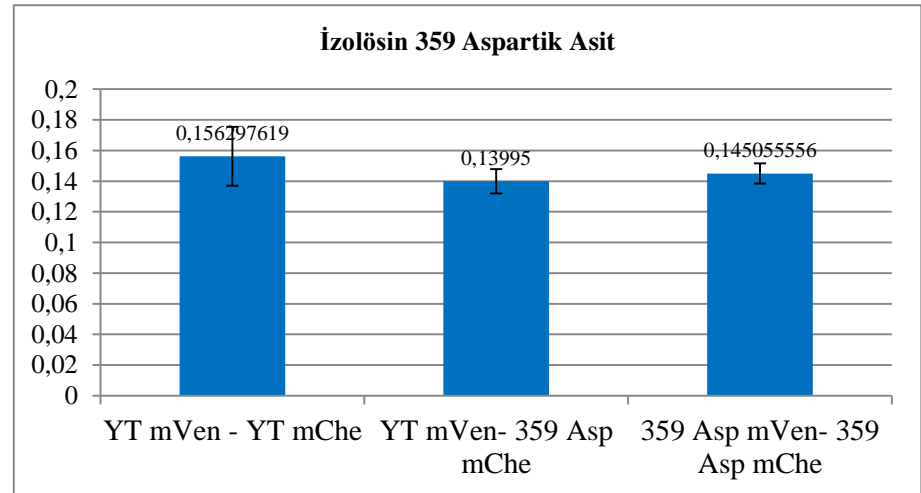
[*] : Grafiklerde belirtilen veri değerleri için hassasiyet virgülden sonra ortalama 9 basamak olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.8. : 284. bölgenin glisin mutasyonu sonrası FRET oranları [*]



Şekil 4.9. : 359. bölgenin glisin mutasyonu sonrası FRET oranları [*]



Şekil 4.10. : 359. bölgenin asp mutasyonu sonrası FRET oranları [*]

[*] : Grafiklerde belirtilen veri değerleri için hassasiyet virgülden sonra ortalama 9 basamak olarak hesaplanmıştır.

4.3. FRET Analizi ile Yaban Tip ve İki Amino asit Yönünden Mutant Proteinlerin FRET Oranlarının Belirlenmesi

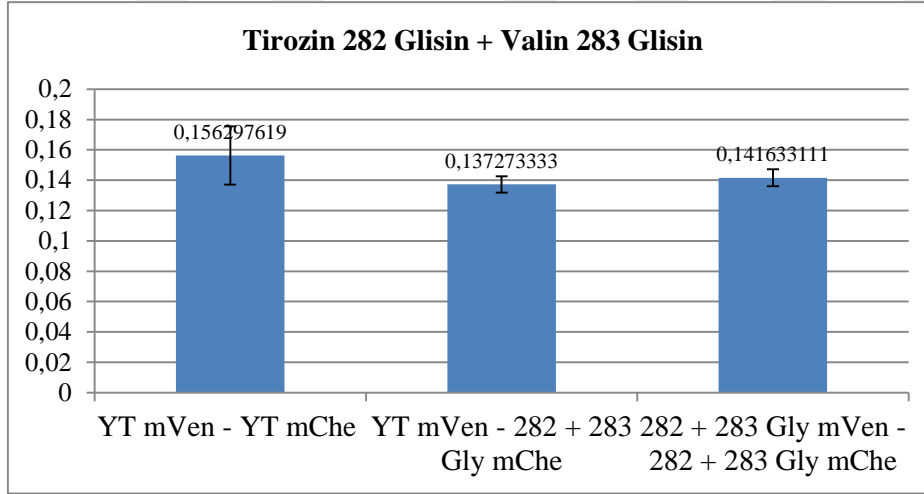
Dört aday bölgenin her birinin tek tek etkileşimdeki önem düzeyini test etmek için yapılan analizlere ek olarak 282, 283, 284 bölgelerinin kombinasyonundan oluşan sırasıyla çift mutasyonların birbirleri ile ve yaban tip enzimle olan homomerik etkileşimlerine ait FRET oranları Şekil 4.11. , 4.12. , 4.13. ' te gösterilmiştir. Yaban tipe göre, yaban tip – mutant arasındaki etkileşime ait FRET oranlarında düşüş saptanmıştır ($p < 0,05$).

4.4. Yaban Tipe Göre Yaban Tip – Mutant, Etkileşimine Ait Tüm FRET Oranlarının Toplu Karşılaştırması

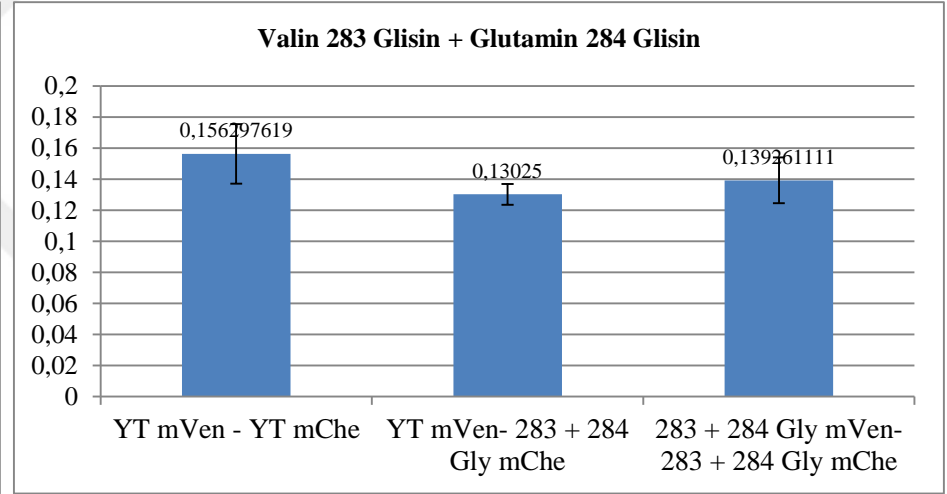
Tüm bulguları karşılaştırmak gerekirse, grafiğin başında yaban tip başta olmak üzere tüm yaban tip – mutant etkileşimleri Şekil 4.14.'te gösterilmiştir. Bütün aday bölgeler arasında yapılan karşılaştırmaya göre 283 bölgesinde oluşturan aspartik asit mutasyonu, tüm diğer yaban tip mutant etkileşimine göre homomerik etkileşim bakımından ($p < 0,05$ ve $p < 0,01$ ' e göre) en çok negatif etkilenen grup olmuştur. Yaban tipe göre, yaban tip – mutant arasındaki etkileşime ait FRET oranlarında düşüş saptanmıştır ($p < 0,05$).

4.5. Yaban Tipe Göre Mutant – Mutant Etkileşimine Ait Tüm FRET Oranlarının Toplu Karşılaştırması

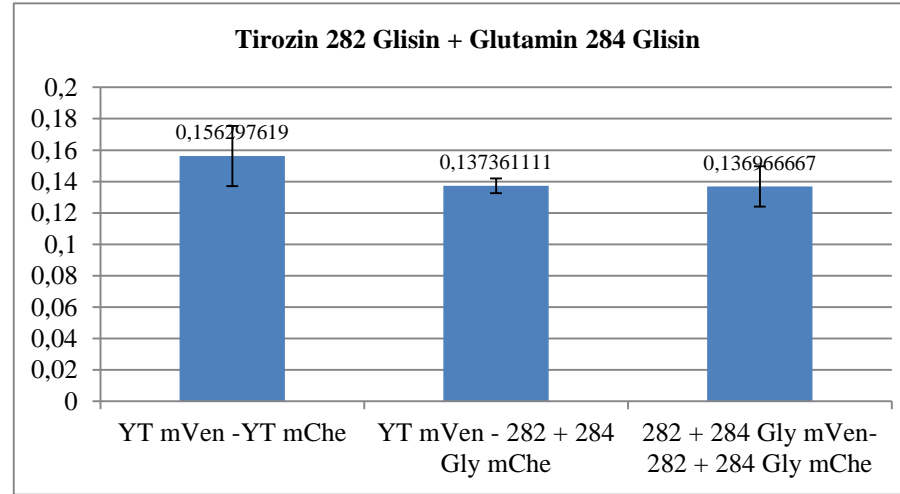
Edinilen tüm bulguların yine yaban tip başta olmak üzere tüm mutant – mutant etkileşim karşılaştırmaları Şekil 4. 15.'te gösterilmiştir. Bütün aday bölgeler arasında yapılan karşılaştırmaya göre 283 bölgesinde oluşturan aspartik asit mutasyonu, tüm diğer mutant - mutant homomerik etkileşime göre ($p < 0,05$ ve $p < 0,01$ ' e göre) en çok negatif etkilenen grup olmuştur. Yaban tipe göre, yaban tip – mutant arasındaki etkileşime ait FRET oranlarında düşüş saptanmıştır ($p < 0,05$).



Şekil 4.11. :282. ve 283. bölgelerinin glisin mutasyonu sonrası FRET oranları [*]



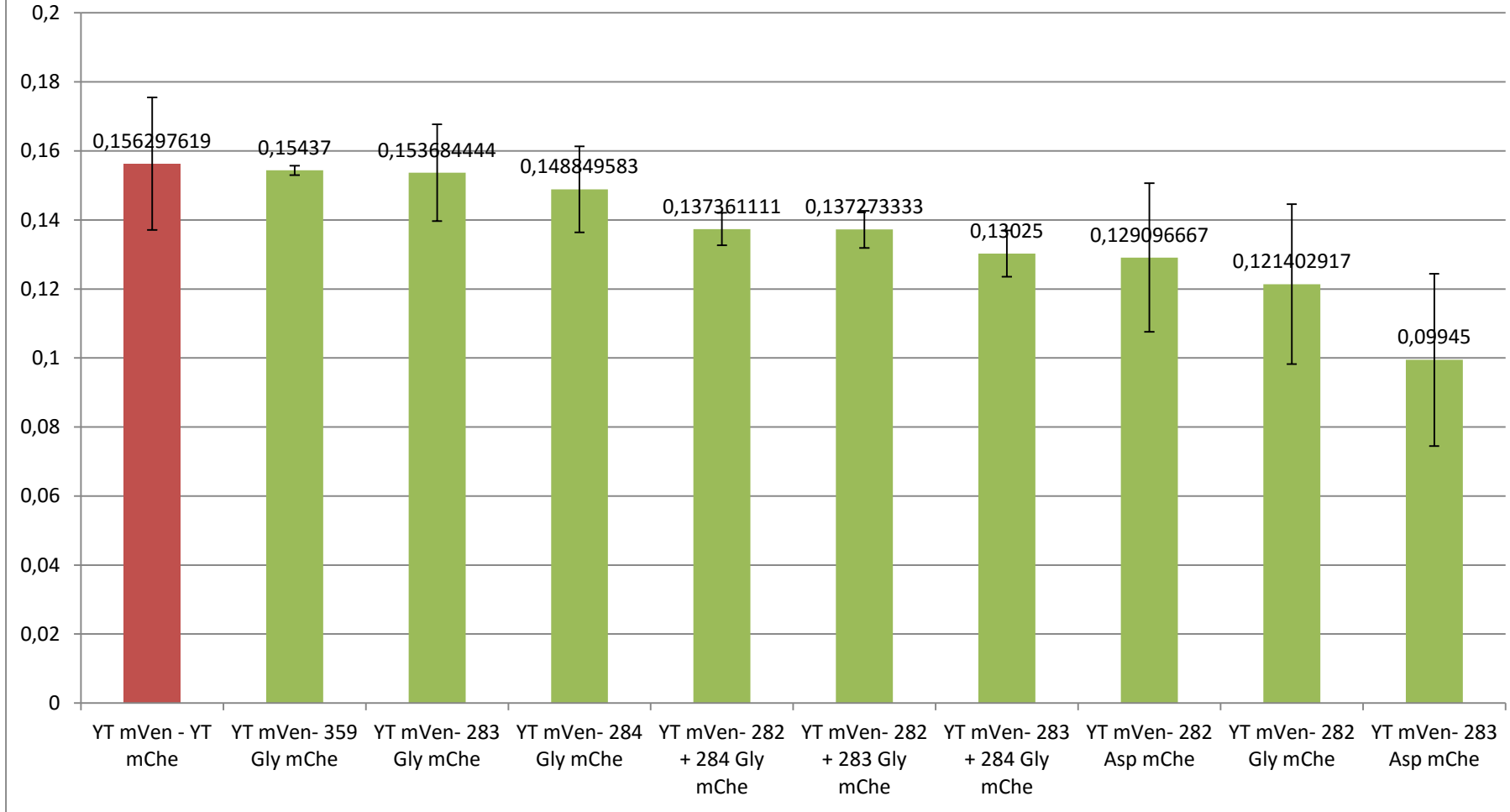
Şekil 4.12. : 283. ve 284. bölgelerinin glisin mutasyonu sonrası FRET oranları [*]



Şekil 4.13. : 282. ve 284. bölgelerinin glisin mutasyonu sonrası FRET oranları [*]

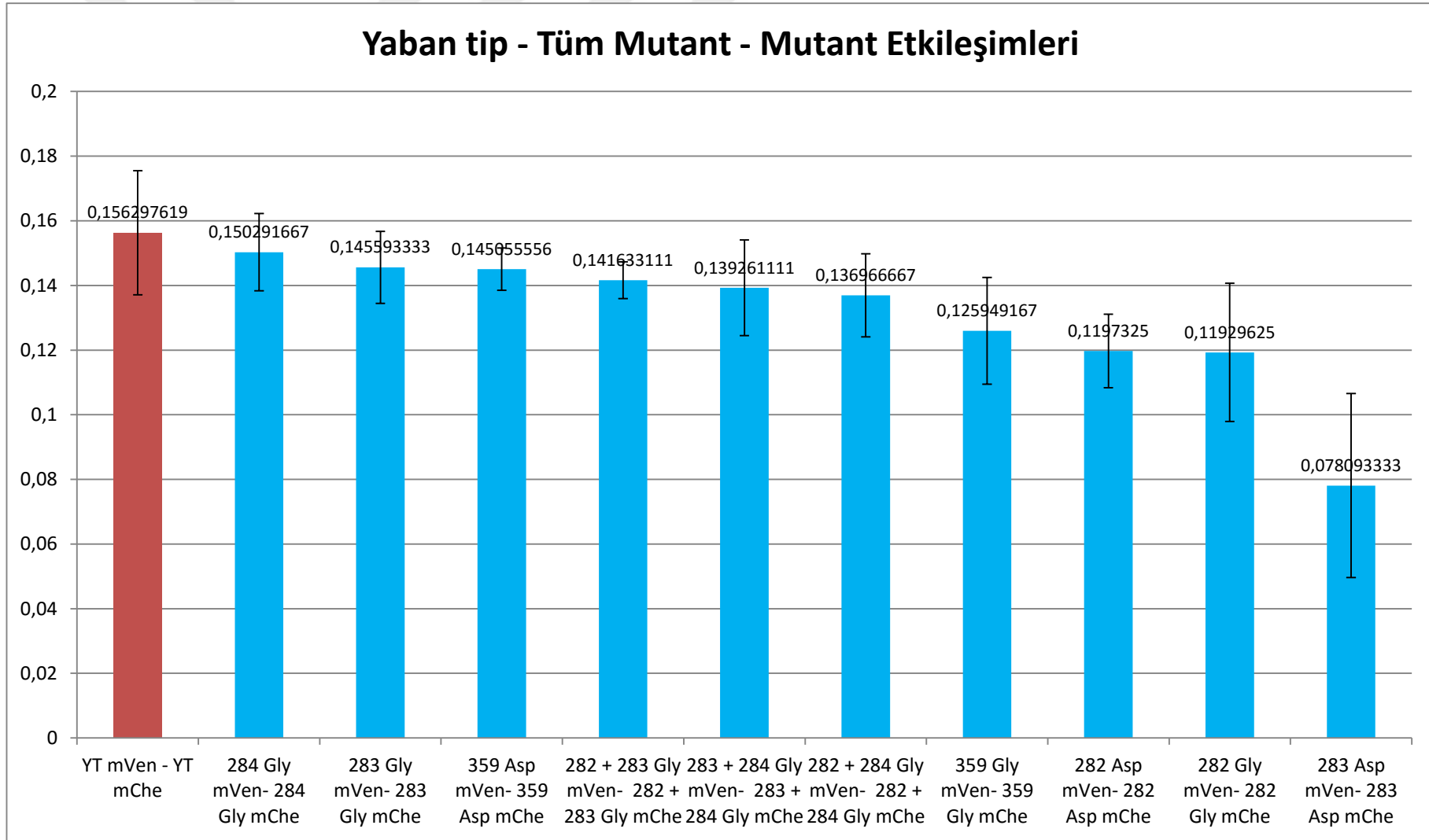
[*] : Grafiklerde belirtilen veri değerleri için hassasiyet virgülden sonra ortalama 9 basamak olarak hesaplanmıştır.

Yaban Tip - Tüm Yaban Tip -Mutant Etkileşimleri



Şekil 4.14. : Yaban tip ile diğer tüm yaban tip – mutant FRET oranlarının karşılaştırılması [*]

[*] : Grafiklerde belirtilen veri değerleri için hassasiyet virgülden sonra ortalama 9 basamak olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.15. :Yaban tip ile diğer tüm mutant – mutant FRET oranlarının karşılaştırılması [*]

[*] : Grafiklerde belirtilen veri değerleri için hassasiyet virgülden sonra ortalama 9 basamak olarak hesaplanmıştır.

5. TARTIŞMA

Canlılığın temel biyokimyasal olayı olan protein sentezi, ana hatları ve bir çok detaylarıyla keşfedilmiş olmakla birlikte, sentez sonrası moleküler düzeyde gerçekleşen modifikasyonlar her geçen gün yeni ulaşılan verilerle ışığında henüz gelişmektedir. Geçmiş çalışmalarda önemi ortaya koyulmuş olan en önemli modifikasyonlardan biri, şüphesiz proteinlerin glikozilasyonudur (Hart, 1992; Apweiler ve ark, 1999). Eksikliğinde oluşan sayısız patolojik problem, sağlık alanında bilimsel araştırma yapan araştırmacıları glikozilasyonun temellerini keşfetmeye yönlendirmiştir. Geçen zaman içinde glikozilasyon mekanizmasında işlev gören ve ilgili genlerce sentezlenen glikoziltransferaz enzimlerinin, çeşitli formlara ve farklı mikro çevrelerde değişken özelliklere sahip oldukları saptanmıştır. Tüm bunların yanı sıra bu enzim ailelerinin organize biçimde farklı enzim monomerleriyle etkileşerek kompleksler oluşturdukları keşfedilmiştir (Yamaguchi ve ark, 1995; Giraudo ve Maccioni, 2003). Bu bağlamda araştırılması uygun görülen glikoziltransferaz enzimlerinden Beta 1-4 Galaktoziltransferaz-I enziminin etkileşim yüzeyinin hangi amino asit veya amino asitlerce oluşturulduğunu kapsayan tez çalışması kademeli olarak gerçekleştirilmiştir.

İlk aşaması olan **biyoinformatik** algoritmalarla çalışan internet sunucuları ve 3 boyutlu moleküler görüntüleme programları kullanılmıştır. Araştırmamızda, deney aşamasına geçmeden önce, bu güne kadar GalT-1 hakkında elde edilen tüm biyokimyasal, yapı fizikokimyası gibi verilerin yayınlandığı global veri bankalarından yararlanılmıştır. Tüm bu araçlar deney aşamasının doğru ve uygulanabilir biçimde tasarlanabilmesine olanak sağlamıştır. Bu amaçla, GalT-1 enzimine ait protein verileri ClusPro internet sunucusuna aktarılmıştır. Birçok bilimsel araştırmada kullanılmakta olan Boston Üniversitesi sunucusu ClusPro, iki adet monomerik GalT-1 enzimini sanal ortamda eşleştirmek üzere çeşitli formüller kullanarak “denemeler” yapmıştır. Amino asitlerin biyokimyasal ve fizikokimyasal karakterini hesaplayarak hangi amino asitin karşısına diğer GalT-1 enziminin hangi amino asidi karşılık gelirse homomerik birleşme oluşabilir ? sorusuna cevap olacak biçimde olası etkileşimin gerçekleşebileceği bölgeleri rapor şeklinde sunmuştur. Bu aşamada elde edilen bölgeler arasından serbest enerjisi en düşük olan, tuz köprüsü, vander vaals bağı gibi kimyasal etkileşime müsait bölgeler seçilerek 4 farklı amino asit adayı belirlenmiştir. Belirlenen amino asitler sırasıyla tirozin, valin, glutamat, izolösin; hepsi teker teker / kombinatif olarak glisin ve/veya aspartik asit olacak biçimde değiştirilmiştir. Daha önceki çalışmalarda

Rekombinant yöntemler kullanılarak değiştirilen amino asitler, seçilen aday bölgelerin etkinliğini yok edecek biçimde seçilmiştir. Bu aşamada seçilen yöntem yönlendirilmiş mutagenездir. Güncel yöntemler arasında bir proteinin mutasyona uğratılmasını sağlayacak en güvenilir araçlardan biri olan yönlendirilmiş mutagenез işlemi basit, hızlı ve ekonomik olması nedeniyle tercih edilmiştir.

Bir sonraki aşamada üretilen mutant enzimlere ait cDNA' lar evrensel olarak kullanılan bakteriyel transformasyon ve izolasyon protokollerine uygun biçimde çoğaltılmıştır. Oldukça etkili ve kesin sonuç veren yönlendirilmiş mutagenез sonucunda iki aşamada genetik kontroller yapılmıştır. Birincisi, mutasyona uğratılan dizinin nükleotid sekanslaması ile uygun nükleotid kompozisyonu taşıyıp taşımadığının kontrolü; ikincisi ise mutant dizinin FRET gen kaseti taşıyan plazmide yerleşiminin olup olmadığını test etmek için kullanılan restriksiyon enzimleri ile kesip agaroz jelde görüntüleme işlemidir ve gerekli nükleotid dizi analizleri yapılmıştır. Her iki işlem tüm örnekler için uygulanmıştır ve oluşturulan mutasyonların uygun yerlerde doğru biçimde olduğu belirlenmiştir.

Hücre içi *in vivo* görüntülüne aşamasında, Cos-7 memeli hücre hattına transfeksiyon lipozomları kullanılarak aktarılan mutant cDNA dizilerinin uygun biçimde doğru organelde (Golgi veya ER) olup olmadığı konfokal mikroskop teknikleri ve görüntüleme sistemleri kullanılarak onaylanmıştır. Hücre içinde üretilen enzimlerin Golgi organelinde doğal biçimde sentezlendiği konfokal mikroskop ile çekilen fotoğraflarda açıkça görülmektedir. Böylece tüm aşamaların deneysel ve teknik kontrolü yapılmıştır. FRET prensibine dayalı etkileşim oranlarının ölçülmesi aşamasına gelmeden önce tüm metotların optimizasyonu gerçekleştirilmiştir ve analizler başarılı şekilde tamamlanmıştır. Elde edilen FRET temelli etkileşim oranlarını gösteren grafiklerde görüldüğü biçimde her bölgenin mutasyon sonrası etkileşime gösterdiği geri bildirim farklı olmuştur.

282. Bölgede gerçekleştirilen glisin ve aspartik asit mutasyonu, yaban tip iki galaktoziltransferaz enziminin etkileşimine ait FRET oranlarıyla karşılaştırıldığında, gerek yaban tip – mutant, gerek mutant – mutant etkileşimlerde zayıf eşleşme sinyali vermiştir (Şekil 4.4. ve 4.5.). Bu grafikteki düşüş, 282. Bölgenin homomer oluşum bakımından kritik bir amino asit olduğunu göstermektedir.

283. Bölgede gerçekleştirilen glisin mutasyonu yaban tip etkileşimle aynı oranda FRET oranlarına sahipken, aspartik asit mutasyonu hem yaban tip-mutant hem de mutant – mutant protein etkileşiminde dramatik bir düşüşe neden olmuştur (Şekil 4.6. ve 4.7.). Bunun sebebi Şekil 2.3. 'de gösterildiği üzere 283 numaralı bölgenin diğer amino asitlerle güçlü hidrofobik bağlantı kurma özelliğinin olması, serbest enerjisinin diğer bölgelere göre daha düşük olmasıdır.

284. Bölge üzerinde yapılan mutasyonların yaban tip etkileşiminden alınan FRET oranları bakımından bir farkı yoktur (Şekil 4.8.). FRET sinyalleri bölge üzerindeki mutasyonun homomerik etkileşimi bozmadığı yönündedir. Bu bölgede düşüş yaşanmamasının sebebi Şekil 2.3. 'de gösterildiği üzere diğer glutamat amino asidi ile 4.6 Å gibi uzun bir tuz köprüsü oluşturmasıdır. İki amino asit arasındaki uzaklık ne kadar artarsa etkileşimleri o denli azalacaktır. Deney tasarımı sırasında kaynakları korumak adına 284 numaralı bölgenin diğer bölgelerden farklı olarak sadece glisin amino asidine çevrilmiştir.

359. Bölgede oluşturulan aspartik asit mutasyonu hem yaban tip - mutant, hem de mutant – mutant etkileşimi bozarken, glisin mutasyonu sadece mutant – mutant etkileşimi bozmuştur (Şekil 4.9. ve 4.10.). Bu farkın nedeni, Şekil 2.3. 'de gösterildiği üzere 359 numaralı bölgenin 3 farklı bölgeyle potansiyel etkileşim noktası olma ihtimalidir.

282 – 283, 282 – 284, 283 – 284 bölgelerinde gerçekleştirilen çift mutasyonların (**283-284 mutant – mutant hariç**) tümünde FRET oranlarında düşüş saptanmıştır. 283 – 284 çift mutantındaki mutant – mutant etkileşimlerinde düşüş saptanmamasının, 284 numaralı bölgenin etkileşime katkı sağlamayan bir bölge olması sebebiyle gerçekleştiği düşünülmektedir (Şekil 4.11., 4.12., 4.13.).

Ramakrishnan ve Qasba, (2001) ve (2003) 'ya göre, 280, 286, 288 ve 289 numaralı bölgeler ile 359-363 arasında kalan bölgeler GalT-1 enziminin daha önceki bölümlerde bahsedilen kısa ve uzun bölgelerinin açılıp kapanan kısımlarını oluşturmaktadır. Bu nedenle bölgeler arasında kalan amino asitlerin bazıları, özellikle hidrofobik karakterde olanlar etkileşimde işlev görebilirler.

Daha önceki çalışmalarda transferaz enzimlerinin özellikleri (Ma ve Coley, 1996; Munro, 1995; Nilsson ve ark, 1993) sadece *in vitro* teknikler kullanılarak belirlenmiştir. Canlı hücre içerisinde fizyolojik şartlarda nasıl çalıştıkları konusuna netlik sağlamamıştır. Hassinen ve ark, (2010, 2011, 2014) çalışmalarında GalT-1 enziminin ve birçok enzimin kompleksler şeklinde bulunabileceğini, farklı Golgi pH değerlerinde ve patolojik koşullarda enzimlerin homodimer veya heterodimer şeklinde değişim gösterdiğini ve etkileştiğini keşfetmiştir. Tüm bu verileri kullanarak GalT1 e ait homomerik etkileşim yüzeyi olamaya aday amino asitler ilk kez bu çalışma kapsamında *in vivo* olarak araştırılmıştır.



6.SONUÇ VE ÖNERİLER

Edilen tüm verilerin karşılaştırıldığı Şekil 4.14. ve 4.15.'te görüleceği üzere 283 numaralı Valin amino asitinin homomerik etkileşimde diğer aday bölgelere göre daha kritik bir nokta olabileceği kanısına varmak mümkündür.

Sonuç olarak; Her geçen gün gelişmekte olan ilaç endüstrisi, enzimlerin inhibitör, aktivatör bölgelerini karakterize edebilmek için oldukça büyük araştırma geliştirme faaliyetleri içindedir. Bu bağlamda aktivatör/inhibitör bölgeye ek olarak homomerik veya heteromerik etkileşim bölgeleri için tasarlanabilecek kimyasal ajanlar glikoziltransferaz enzimlerini hedef alabilir ve birçok patolojik durumun tedavisinde kullanılabilir. Bu bağlamda galaktoziltransferaz ve diğer glikoziltransferaz enzimleri hakkında elde edilecek bulgular “akıllı ilaç” tasarımlarına fayda sağlayabilir.

Bundan sonra yapılacak çalışmalarda, farklı bölgelerin birbirleriyle (örneğin 282 Gly – 359 Gly, vb. gibi) karşılaştırılması sağlanabilir. Bu karşılaştırmalara yeni aday amino asitler eklenebilir. Günümüzün son teknolojisi kullanılarak yapılan bu çalışmadan sonra, daha ileri teknoloji kullanılarak yapılacak homomerik etkileşim hesaplama denemeleri enzimlerin çalışma biçimine bakış açımızı değiştirme ihtimali taşımaktadır.

KAYNAKLAR

- Apweiler R, Hermjakob H, Sharon N.** On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1999, 1473(1), 4-8.
- Berger EG, Mandel T, Schilt U.** Immunohistochemical localization of galactosyltransferase in human fibroblasts and HeLa cells. *Journal of Histochemistry Cytochemistry*, 1981, 29(3), 364-370.
- Breton C, Šnajdrová L, Jeanneau C, Koča J, Imberty A.** Structures and mechanisms of glycosyltransferases. *Glycobiology*, 2006,16(2), 29R-37R
- Brockhausen I.** Mucin-type O-glycans in human colon and breast cancer: glycodynamics and functions. *EMBO reports*, 2006 7(6), 599-604.
- Brodbeck U, Ebner KE.** Resolution of a soluble lactose synthetase into two protein components and solubilization of microsomal lactose synthetase. *Journal of Biological Chemistry*, 1966, 241(3), 762-764.
- Camacho CJ, Vajda S.** Protein–protein association kinetics and protein docking. *Current opinion in structural biology*, 2002, 12(1), 36-40.
- Comeau SR, Gatchell DW, Vajda S, Camacho CJ.** ClusPro: an automated docking and discrimination method for the prediction of protein complexes. *Bioinformatics*, 2004, 20(1), 45-50.
- Dube DH, Bertozzi CR.** Glycans in cancer and inflammation—potential for therapeutics and diagnostics. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2005, 4(6), 477-488.
- Evans SC, Lopez LC, Shur BD.** Dominant negative mutation in cell surface beta 1, 4-galactosyltransferase inhibits cell-cell and cell-matrix interactions. *The Journal of cell biology*, 1993, 120(4), 1045-1057.
- Fishman PH.** Normal and abnormal biosynthesis of gangliosides. *Chemistry and physics of lipids*, 1974, 13(4), 305-326.
- Gavel Y, Heijne G.** Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X-Thr/Ser acceptor sites: implications for protein engineering. *Protein engineering*, 1990, 3(5), 433-442.
- Giraud CG, Maccioni HJ.** Ganglioside glycosyltransferases organize in distinct multienzyme complexes in CHO-K1 cells. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(41), 40262-40271.

- Good, MC, Zalatan JG, Lim WA.** Scaffold proteins: hubs for controlling the flow of cellular information. *Science*, 2011, 332(6030), 680-686.
- Guo S, Sato T, Shirane K, Furukawa K.** Galactosylation of N-linked oligosaccharides by human β -1, 4-galactosyltransferases I, II, III, IV, V, and VI expressed in Sf-9 cells. *Glycobiology*, 2001, 11(10), 813-820.
- Hart GW.** Glycosylation. *Current opinion in cell biology*, 1992, 4(6), 1017-1023.
- Hassinen A, Kellokumpu S.** Organizational interplay of Golgi N-glycosyltransferases involves organelle microenvironment-dependent transitions between enzyme homo- and heteromers. *Journal of Biological Chemistry*, 2014, 289(39), 26937-26948.
- Hassinen A, Pujol FM, Kokkonen N, Pieters C, Kihlström M, Korhonen K, Kellokumpu S.** Functional organization of Golgi N- and O-glycosylation pathways involves pH-dependent complex formation that is impaired in cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(44), 38329-38340.
- Hassinen A, Rivinoja A, Kauppila A, Kellokumpu S.** Golgi N-glycosyltransferases form both homo- and heterodimeric enzyme complexes in live cells. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(23), 17771-17777.
- Helenius A, Trombetta ES, Hebert DN, Simons JF.** Calnexin, calreticulin and the folding of glycoproteins. *Trends in cell biology*, 1997, 7(5), 193-200.
- Johnson FM, Shur BD.** The level of cell surface β 1, 4-galactosyltransferase I influences the invasive potential of murine melanoma cells. *Journal of cell science*, 1999, 112(16), 2785-2795.
- Kardash E, Bandemer J, Raz E.** Imaging protein activity in live embryos using fluorescence resonance energy transfer biosensors. *Nature protocols*, 2011, 6(12), 1835-1846.
- Kellokumpu S, Hassinen A, Glumoff T.** Glycosyltransferase complexes in eukaryotes: long-known, prevalent but still unrecognized. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2015, 1-21.
- Klee WA, Klee CB.** The interaction of α -lactalbumin and the A protein of lactose synthetase. *Journal of Biological Chemistry*, 1972, 247(8), 2336-2344.
- Kleene R, Berger EG.** The molecular and cell biology of glycosyltransferases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes*, 1993, 1154(3), 283-325.
- Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM.** : Principles of Biochemistry. New York: Worth Publishers, 1993; 1013p.
- Lo NW, Shaper JH, Pevsner J, Shaper NL.** The expanding β 4-galactosyltransferase gene family: messages from the databanks. *Glycobiology*, 1998, 8(5), 517-526.

- Ma J, Colley KJ.** A Disulfide-bonded Dimer of the Golgi-Galactoside 2, 6-Sialyltransferase Is Catalytically Inactive yet Still Retains the Ability to Bind Galactose. *Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271(13), 7758-7766.
- Munro S.** An investigation of the role of transmembrane domains in Golgi protein retention. *The EMBO journal*, 1995, 14(19), 4695.
- Nagai T, Ibata K, Park ES, Kubota M, Mikoshiba K, Miyawaki, A.** A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nature biotechnology*, 2002, 20(1), 87-90.
- Nilsson T, Rabouille C, Hui N, Watson R, Warren G.** The role of the membrane-spanning domain and stalk region of N-acetylglucosaminyltransferase I in retention, kin recognition and structural maintenance of the Golgi apparatus in HeLa cells. *Journal of Cell Science*, 1996, 109(7), 1975-1989.
- Nilsson T, Slusarewicz P, Hoe MH, Warren G.** Kin recognition: a model for the retention of Golgi enzymes. 1993, *FEBS letters*, 330(1), 1-4.
- Opat AS, Houghton F, Gleeson PA.** Medial Golgi but Not Late Golgi Glycosyltransferases Exist as High Molecular Weight Complexes role of luminal domain in complex formation and localization. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(16), 11836-11845.
- Qasba PK, Ramakrishnan B, Boeggeman E.** Structure and function of β -1, 4-galactosyltransferase. *Current drug targets*, 2008, 9(4), 292.
- Rabouille C, Hui N, Hunte F, Kieckbusch R, Berger EG, Warren G, Nilsson, T.** Mapping the distribution of Golgi enzymes involved in the construction of complex oligosaccharides. *Journal of cell science*, 1995, 8(4), 1617-1627.
- Ramakrishnan B, Qasba PK.** Crystal structure of lactose synthase reveals a large conformational change in its catalytic component, the β 1, 4-galactosyltransferase-I. *Journal of molecular biology*, 2001, 310(1), 205-218.
- Ramakrishnan B, Qasba PK.** Comparison of the Closed Conformation of the β 1, 4-galactosyltransferase-1 (β 4Gal-T1) in the Presence and Absence of α -lactalbumin (LA). *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 2003, 21(1), 1-8.
- Reuter G, Kelm S, Schauer R.:** Chemistry and biology of cell surface glycoconjugates. *Acta Histochemica*, Suppl. Band 1988; 36: 51-79.
- Rodeheffer C, Shur BD.** Targeted mutations in β 1, 4-galactosyltransferase I reveal its multiple cellular functions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 2002, 1573(3), 258-270.

- Roth JURGEN, Berger EG.** Immunocytochemical localization of galactosyltransferase in HeLa cells: codistribution with thiamine pyrophosphatase in trans-Golgi cisternae. *The Journal of cell biology*, 1982, 93(1), 223-229.
- Shaner NC, Campbell RE, Steinbach PA, Giepmans BN, Palmer AE, Tsien RY.** Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nature biotechnology*, 2004, 22(12), 1567-1572.
- Sharon N, Lis H.:** Carbohydrates in cell recognition. *Sci. Am*, 1993; 268: 82-89.
- Smith GR, Sternberg MJ.** Prediction of protein–protein interactions by docking methods. *Current opinion in structural biology*, 2002, 12(1), 28-35.
- Taylor ME, Drickamer K.** Introduction to glycobiology. 2nd edition, Oxford university press. 2011, 1 (7-26)
- Teasdale RD, Matheson F, Gleeson PA.** Post-translational modifications distinguish cell surface from Golgi-retained β 1, 4 galactosyltransferase molecules. Golgi localization involves active retention. *Glycobiology*, 1994, 4(6), 917-928.
- Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hart GW, Etzler ME.** Essentials of Glycobiology. 2nd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009.
- Yamaguchi N, Fukuda MN.** Golgi Retention Mechanism of-1, 4-Galactosyltransferase membrane-spanning domain-dependent homodimerization and association with α -and β -tubulins. *Journal of Biological Chemistry*, 1995, 270(20), 12170-12176.
- Zhu X, Jiang J, Shen H, Wang H, Zong H, Li Z, Hu Y.** Elevated β 1, 4-galactosyltransferase I in highly metastatic human lung cancer cells identification of E1AF as important transcription activator. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(13), 12503-12516.

ÖZGEÇMİŞ

Soyadı, Adı : Yeşilyurt, Batuhan
Uyruk : Türk
Doğum yeri ve tarihi : 22/05/1990 Üsküdar/İstanbul
Telefon : +905066904474
E-mail : yesilyurt.batuhan@gmail.com
Yabancı Dil : İngilizce

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet tarihi
Doktora	Ege Üniversitesi-Moleküler Biyoloji	Devam ediyor
Y. Lisans	Ege Üniversitesi-Moleküler Biyoloji	22/01/2015
Lisans	Ege Üniversitesi-Biyoloji /MBG ağırlıklı	20/062012

BURSLAR ve ÖDÜLLER:

Onur Derecesi 5 dönem Ege Üniversitesi Lisans

Yüksek Onur Derecesi 5 dönem Ege Üniversitesi Yüksek Lisans

İŞ DENEYİMİ

Yıl	Yer/Kurum	Ünvan
2015-devam ediyor	Medex SMO	Klinik araştırma saha koordinatörü

AKADEMİK YAYINLAR

1. MAKALELER

Yeşilyurt, B., Şahar, U., & Deveci, R. (2014). Determination of the type and quantity of sialic acid in the egg jelly coat of the sea urchin *Paracentrotus lividus* using capillary LC-ESI-MS/MS. *Molecular reproduction and development*. DOI: 10.1002/mrd.22448

2. PROJELER

Denizkestanesi Sperm – Yumurta İnteraksiyonunda Yüzey Sialik Asitlerinin Öneminin Deneysel Olarak Araştırılması **(Proje Yürütücüsü) TÜBİTAK 2011-2012**

Reelin Glikoproteininin Olası N- ve O- Glikozilasyon Bölgelerinin Farklı Tür ve Dokularda Biyoinformatik Yöntemlerle Belirlenmesi ve Lektin Blotlama ile Glikan Profilinin Çıkarılması (Araştırmacı) TÜBİTAK 2014-2015

β 1,4 Galaktoziltransferaz-I Enzim Yüzeyinde Yer Alan Homomerik Ve Heteromerik Etkileşimden Sorumlu Bölgelerin; 3Dd Biyoinformatik Modelleme, Yönlendirilmiş Mutagenез, Konfokal Mikroskopisi ve İn Vivo Fret (Förster Rezonans Enerji Transfer) Kullanılarak Karakterizasyonu (Araştırmacı) Oulu Üniversitesi / Finlandiya 2015

3. BİLDİRİLER

A) Uluslararası Kongrelerde Yapılan Bildiriler

B) Ulusal Kongrelerde Yapılan Bildiriler

Yesilyurt B., Deveci R., Şahar U., (2012) *Denizkestanesi (Paracentrotus lividus) Jel kılıfında sialik asitlerin ve bağ tiplerinin, Mikroskopik ve analitik yöntemlerle belirlenmesi* Uluslararası Katılımlı 21. Ulusal Biyoloji Kongresi 07.09.2012, İzmir, Bildiri özet kitabı s.79.

Yesilyurt B., Deveci R., Şahar U., (2013) *Denizkestanesi (Paracentrotus lividus) Jel kılıfındaki sialik asitlerin döllemedeki rolü* II. Ulusal Glikobiyoloji Kongresi 11- 14 haziran İzmir, Bildiri özet kitabı s.13