

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HİSTON ASETİL TRANSFERAZ KOMPLEKSLERİNİN BİLEŞENLERİ
OLAN ADA PROTEİNLERİNİN MOLEKÜLER ETKİLEŞİMLERİNİN
İNCELENMESİ**

Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi

Gizem YAYLI

Danışman
Prof. Dr. Zeki TOPÇU

İZMİR

2015

DEĞERLENDİRME KURULU ÜYELERİ

(Adı Soyadı)

(İmza)

Başkan : Prof. Dr. Zeki TOPÇU

.....

(Danışman)

Üye : Prof. Dr. A.Gülten KANTARCI

.....

Üye : Yrd. Doç. Dr. Pakize CANTÜRK KILIÇKAYA

.....

Yüksek Lisans Tezinin Kabul Edildiği Tarih: 09/01/2015

ÖZET

HİSTON ASETİL TRANSFERAZ KOMPLEKSLERİNİN BİLEŞENLERİ OLAN ADA PROTEİNLERİNİN MOLEKÜLER ETKİLEŞİMLERİNİN İNCELENMESİ*

YAYLI, Gizem

Ökaryotlarda kromatinin baskılanmış doğası, kromatin yeniden düzenlenmeleri ve histon modifikasyon aktiviteleri tarafından serbest hale geçirebilir ve bunun için bileşenler arasında yoğun protein–protein etkileşimleri gerekir. Bu aktiviteler kromatin yapısını RNA polimeraz II aracılı transkripsiyon mekanizmasının bileşenleri tarafından ulaşılabilir ve tanınabilir hale getirir. Bu sebeple, kromatin yapısının modifikasyonunda bulunan moleküler etkileşimler transkripsiyonun kontrolünde önemli bir rol oynarlar. ADA proteinleri, genel transkripsiyon faktörleri ile etkileşerek, transkripsiyon başlangıcında fonksiyon gösterir ve ADA/GCN5 histon asetil transferaz (HAT) komplekslerinin bir bileşeni olarak nükleozomal histonların asetillenmesini kolaylaştırır. Laboratuvarımız önceki çalışmaları ile maya 2 hibrid kütüphane taraması kullanarak insan ADA3 (hADA3) proteinin dört yeni etkileşim partnerlerini, AATF, PHF21A ve protein fosfataz ailesinin düzenleyici alt birimleri PP1 ve PP2A (PPP1R7 VE PPP2R5D sırasıyla), tanımlamıştır. Bu bulgular doğrultusunda hipotezimiz; hADA3 ile etkileşimlerini belirlediğimiz bu partnerlerin, yine hADA3 ile aynı kompleks içerisinde yer alan ve hADA3 ile etkileşimleri daha önceden rapor edilen insan ADA2 (hADA2) proteini ile fonksiyonları gereği etkileşebilecekleri şeklindedir. Bu nedenle çalışmamızda, hADA3 proteinini içeren komplekslerin fonksiyonel önemini belirtmek için hADA3 partnerleri maya 2 hibrid (Y2H) sistemi kullanarak hADA2 proteini ile test edilmiştir. Sonuçlarımız hADA2'nin, hADA3 etkileşim ağına katıldığı hipotezimizi destekler niteliktedir. Bu seçilen etkileşimler, ADA/GCN5 HAT kompleksleri tarafından düzenlenen olası yeni yolların potansiyel önemine dikkat çekmektedir.

Anahtar Kelimeler; İnsan -ADA3; -ADA2; maya 2 hibrid; kromatin yeniden düzenlenmeleri; transkripsiyonel regülasyon.

*Bu çalışma TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir (112T429).

ABSTRACT

MOLECULAR INTERACTIONS OF ADA PROTEINS, AS A COMPONENT OF HISTONE ACETYL TRANSFERASE COMPLEXES*

YAYLI, Gizem

In eukaryotes, the repressive nature of chromatin can be relieved by chromatin remodeling and histone-modifying activities, which require intensive protein-protein interactions among its components. These activities alter chromatin structure making it accessible to, and recognized by the components of the RNA polymerase II-mediated transcriptional machinery. Therefore, molecular interactions involved in modulating the structure of chromatin play an important role in transcriptional regulation. Alteration/Deficiency in Activation (ADA) proteins function in transcriptional initiation site selection, interacting with basal transcription factors, and facilitating acetylation of the nucleosomal histones as the components of ADA/GCN5 histone acetyltransferase (HAT) complexes. Our laboratory previously, identified four new novel interacting partners of human ADA3 (hADA3), namely AATF, PHF21A, and regulatory subunits of the protein phosphatases PP1 and PP2A (PPP1R7 and PPP2R5D, respectively) via yeast 2 hybrid (Y2H) library screening. Based on these findings, our hypothesis is a prospective interaction potential of these partners with human ADA2 (hADA2) that was involved in the same complex with known interaction with hADA3 due to its functions. We, therefore, tested these interactions with hADA2 with Y2H technology to address their functional significance in hADA3 containing complexes in this study. Our results supported our hypothesis that hADA2 participate in hADA3 interaction network. The pulled interactions are discussed in relation to the potential significance of the new possible pathways regulated by ADA/GCN5 HAT complexes.

Key Words; Human-ADA3; -ADA2; yeast 2 hybrid; chromatin remodeling, transcriptional regulation

*This study was supported by TUBITAK (112T429).

TEŞEKKÜRLER

Tez çalışmam sürecinde değerli bilgilerini benimle paylaşarak beni yönlendiren, emeği ve desteklerini esirgemeyen değerli danışman hocam, Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Zeki Topçu'ya teşekkürlerimi sunarım.

Deneyisel çalışmalarım sırasında bilgilerini ve deneyimlerini benimle paylaşan Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Bölümü Arş. Gör. Dr. Sevil Zencir'e teşekkür ederim. Çalışmalarım sırasında tecrübelerini benimle paylaşan, desteğinin bende çok önemli yeri olan Cumhuriyet Üniversitesi Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı Başkanı Yrd. Doç. Dr. Pakize Cantürk Kılıçkaya'ya teşekkür ederim. Tez çalışmamın bir bölümünde laboratuvarını kullanmama izin veren Biyokimya Bölümü Öğretim Üyesi Doç. Dr. Serap Evran'a teşekkürleri bir borç bilirim.

Çok sevgili arkadaşlarım, Arş. Gör. Esra Öztürk ve Uzm. Biyolog Müge Şenarisoy'a tüm çalışma sürecimin en başından en sonuna kadar bana her anımda destek olduklarını hissettirdikleri, tecrübe ve bilgilerini benimle paylaştıkları için teşekkür ederim.

Yardımları ve destekleri için çalışma arkadaşlarım Arş. Gör. Dr. Mustafa Kotmakçı, Arş. Gör. Kerem Yılmaz, Arş. Gör. Yamaç Tekintaş, Arş. Gör. Hasan Akbaba, Arş. Gör. Gülşah Erel ve Biyokimyager Uğur Karagöz'e teşekkür ederim.

Arş. Gör. Çağrı Çalışkan'a bana olan sonsuz inancı için çok teşekkür ederim.

Manevi desteklerinden dolayı üzerimde en çok emeği olan aileme sonsuz teşekkürler.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜRLER	iv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 Histon Proteinleri ve Türevleri	3
2.1.1 Histon Modifikasyonları	5
2.2 Histon Asetil Transferazlar	7
2.3 ADA Protein Kompleksinin Önemi	13
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	16
3.1 Kullanılan Kimyasallar ve Kitler.....	16
3.2 Kullanılan Enzimler ve Antikorlar.....	17
3.3 Kullanılan Cihazlar ve Araç-Gereçler	18
3.4 Tamponlar ve Çözeltiler	18
3.5 Protokoller	22
3.5.1 Büyüme ortamları.....	22
3.5.1.1 Bakteri (<i>E.coli</i>) Büyüme Ortamları.....	22
3.5.1.2 Maya (<i>S. cerevisiae</i>) Büyüme Ortamları.....	22
3.5.2 Mikrobiyolojik Metodlar	23
3.5.2.1 Sterilizasyon.....	23
3.5.2.2 Bakteri ve Maya Hücrelerinin İnkübasyon ve Saklama Koşulları	23
3.5.2.3 Kimyasal Kompetent <i>E.coli</i> Hücrelerinin Hazırlanması	24
3.5.2.4. Kimyasal Kompetent <i>E. coli</i> Hücrelerine Transformasyon.....	25
3.5.2.5 Bakteriden Plazmid DNA İzolasyonu (Mini-prep)	25

3.5.2.6 Maya Hücrelerinin Transformasyonu ve Ko-Transformasyonu	25
3.5.2.7 Mayadan Protein Ekstraksiyonu (Alkali Lizis/TCA Çöktürmesi)	26
3.5.3 Moleküler Biyoloji Teknikleri	27
3.5.3.1 DNA Fragmentlerinin Standart Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction; PCR) ile Çoğaltılması	27
3.5.3.2 Çift İplikli DNA'nın Restriksiyon Endonükleazlarla Kesimi....	28
3.5.3.3 Agaroz Jel Elektrophorezi.....	28
3.5.3.4 DNA Fragmentlerinin Agaroz Jelden Ekstraksiyonu	29
3.5.3.5 Ligasyon	29
3.5.3.6 Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrophorezi (SDS PAGE)	30
3.5.4 Maya 2 Hibrit Deneyleri	30
3.5.4.1 hADA2A ve hADA2B Proteinlerini Kodlayan Gen Bölgelerinin Maya Plazmidine Klonlanması	30
3.5.4.2 AH109 Maya Suşunun pGBKT7-hADA2A ve hADA2B Rekombinant Plazmidleri ile Transformasyonu ve Proteinlerin Ekspresyonları.....	32
3.5.4.3 hADA2A ve hADA2B Proteinlerinin Mayada Toksikite Testleri	32
3.5.4.4 hADA2A ve hADA2B Genlerinin Mayada Oto-aktivasyon Testleri	33
3.5.4.5 Protein-Protein Etkileşimlerinin Maya 2 Hibrit Yöntemi İle Belirlenmesi	33
3.5.4.6 Etkileşimlerin hADA2A ve hADA2B' ye Spesifik Olduğunun Kontrolü.....	36
4. BULGULAR.....	37

4.1 hADA2A ve hADA2B Proteinlerini Kodlayan Gen Bölgelerinin PCR ile Çoğaltılması	37
4.2 hADA2A ve hADA2B Proteinlerini Kodlayan Gen Bölgelerinin Maya Plazmidine Klonlanması	39
4.3 AH109 Maya Suşunun pGBKT7-hADA2A ve -hADA2B Rekombinant Plazmidleri ile Transformasyonu ve Proteinlerin Ekspresyon Analizleri	41
4.4 hADA2A ve hADA2B Proteinlerinin Toksisite Testleri	42
4.5 hADA2A ve hADA2B Proteinlerinin Oto-aktivasyon Testleri.....	44
4.6 Protein-Protein Etkileşimlerinin Testi	47
5. TARTIŞMA	50
6. SONUÇ.....	56
7. KAYNAKLAR	57
ÖZGEÇMİŞ.....	65

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Nükleozom çekirdek yapısı.....	4
Şekil 2. pGBKT7 vektörünün gen haritası.	31
Şekil 3. Y2H yönteminin prensibi.....	34
Şekil 4. AH109 maya suşunun rekombinant plazmidler ile ko-transformasyonu	35
Şekil 5. AH109 maya suşlarında izlenen raportör genler	36
Şekil 6. hADA2A proteinini kodlayan gen bölgesinin PCR amplifikasyonu.	38
Şekil 7. hADA2B proteinini kodlayan gen bölgelerinin amplifikasyonu.	39
Şekil 8. pGBKT7-hADA2A/ -hADA2B klonlarının restriksiyonel kesim analizler.	40
Şekil 9. hADA2A ve hADA2B proteinlerinin maya içerisinde ekspresyonu.	42
Şekil 10. Mayada hADA2A ve hADA2B proteinlerinin toksisite testlerine ait örnek plate görüntüleri.	44
Şekil 11. hADA2A ve hADA2B için mayada oto-aktivasyon deneyleri sonuçlarına ait örnek plate görüntüleri.	46
Şekil 12. hADA2B proteininin mayada oto-aktivasyon özelliğinin ikinci bir raportör gen içeren seçici besi ortamında analizine ilişkin örnek plate görüntüleri.	47
Şekil 13. hADA2A ve hADA2B proteinlerinin maya hücrelerinde PP1 ve PP2A fosfataz protein ailesinin regülatör alt birimleri olan PPP1R7 ve PPP2R5D ile etkileşimlerinin Y2H ile test edilmesi sonucunda elde edilen örnek plate görüntüleri	48
Şekil 14. hADA2A ve hADA2B proteinlerinin maya hücrelerinde AATF ve PHF21A proteinleri ile etkileşimlerinin Y2H ile test edilmesi sonucunda elde edilen örnek plate görüntüleri.	49

TABLÖLER DİZİNİ

Tablo 1. Substrat tanıma motiflerine göre gruplandırılan histon HAT kompleksleri	12
Tablo 2. SAGA kompleksinin maya, insan ve <i>Drosophila</i> ’daki alt birimleri.	15
Tablo 3. Deneylerde kullanılan kimyasal maddeler ve temin edildikleri firmalar. ...	16
Tablo 4. Deneyler süresince kullanılan enzimler ve antikorlar.....	17
Tablo 5. Deneyler süresince kullanılan cihazlar ve araç-gereçler.....	18
Tablo 6. Mikroorganizmaların büyütülmesinde kullanılan besi ortamlarının içerikleri.	23
Tablo 7. DNA amplifikasyonu için kullanılan PCR reaksiyonu koşulları.....	27
Tablo 8. %12 SDS-PAGE jel hazırlanmasında kullanılan çözeltiler.	30
Tablo 9. Mayada toksisite testleri.	43
Tablo 10. Mayada oto-aktivasyon testleri.....	45

1. GİRİŞ

Ökaryotik organizmalarda DNA molekülleri oldukça yoğun bir kromatin yapısı oluşturmak üzere histon proteinleri tarafından sarılı şekilde bulunur. Transkripsiyon, replikasyon, DNA tamiri, apoptoz, genetik bilginin ekspresyonu, kromozom kondensasyonu ve segregasyonu gibi DNA ilişkili biyolojik prosesler bu yoğun kromatin yapısının değişmesine bağlıdır. Kromatin yapısındaki bu gerekli değişiklik çeşitli kromatin modifiye edici proteinlerin bağlanmaları ile farklı mekanizmalar üzerinden gerçekleşir ve oldukça yoğun durumdaki kromatin yapısının açılarak transkripsiyonel mekanizmanın bileşenler tarafından ulaşılabilir ve tanınabilir hale gelmesi sağlanır. Bu mekanizmalardan biri kovalent histon modifikasyonlarıdır. Çeşitli histon post-translasyonel modifikasyonlarının en önemlilerinden olan asetilasyon bir genin transkripsiyonel aktivasyonunda büyük bir rol oynar. Bir genin transkripsiyonel aktivasyonu kromatin yapısı içindeki histon proteinlerinin amino terminal kuyruklarının hiperasetillenmesi ile güçlü bir şekilde ilişkilidir ve bunun için genellikle adaptör proteinlere ihtiyaç vardır. Adaptör proteinler nükleozomal histonların amino terminal kuyruklarının asetillenmesi ve promotor bölgedeki kromatin yapısının açılmasına yardımcı olmaktadır. Histon asetil transferaz (HAT) ve histon deasetilaz (HDAC), çoklu alt grup içeren, kompleksleri hücrelerdeki bu özel post-translasyonel modifikasyonların seviyesinin denge durumunda sürdürülmesinde önem teşkil eder.

HAT komplekslerinin korunmuş bir üyesi olan ADA kompleksi ilk olarak mayalarda bulunmuş ve memeli hücrelerde de daha büyük HAT kompleksleri içerisinde yer aldığı bilinmektedir. Tez çalışmasının konusu olan hADA kompleksinin bileşenlerinden hADA2 (hADA2A ve hADA2B) nükleozomal histon asetilasyonu için gerekli olan bir transkripsiyonel adaptör proteindir (1-4). Oldukça karmaşık olan transkripsiyonel regülasyon sürecinde aracı olarak rol alan ADA-benzeri adaptör proteinlerin, protein-protein etkileşimlerinde oldukça önemli bir yeri vardır. Ancak transkripsiyon faktörlerinin, kromatin yapısının kısıtlayıcı etkisi ile nasıl mücadele ettikleri gen regülasyonunun anlaşılması bakımından hala cevaplanmayı bekleyen önemli bir sorudur.

ADA proteinleri, genel transkripsiyon faktörleri ile etkileşerek, transkripsiyon başlangıcında fonksiyon gösterir ve ADA/GCN5 histon asetil transferaz

komplekslerinin bir bileşeni olarak nükleozomal histonların asetillenmesini kolaylaştırır. Daha önceki çalışmalarımızda Y2H kütüphane taraması üzerinden hADA3 proteininin dört yeni etkileşim partneri, AATF, PHF21A ve protein fosfataz ailesinin düzenleyici alt birimleri PP1ve PP2A, tanımlanmıştır (5). Bu çalışmamızda, hADA3 proteinini içeren komplekslerin fonksiyonel önemini belirtmek için belirlediğimiz etkileşimler Y2H ile hADA2 proteini ile test edilmiştir. Sonuçlarımız hADA2'nin, hADA3 etkileşim ağına katıldığı hipotezimizi destekler niteliktedir. Bu seçilen etkileşimler, ADA/GCN5 HAT kompleksleri tarafından regüle edilen yeni olası yolların potansiyel önemine dikkat çekmektedir.

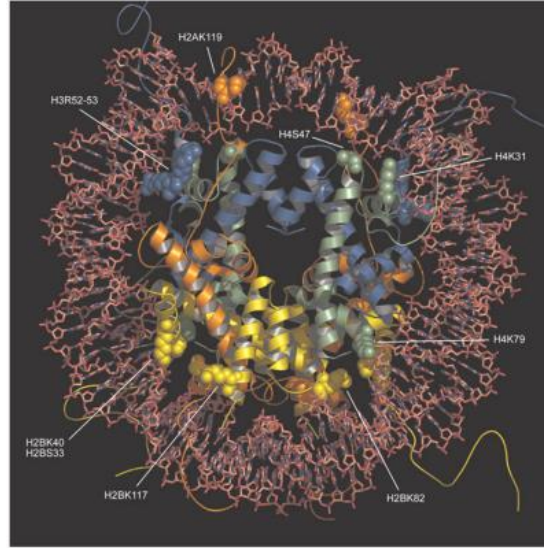
Deneylerimizde protein-protein etkileşimlerinin belirlenmesinde kullanılan kromatografik eş-saflaştırma, filtre bağlanma, afinite kromatografisi gibi konvansiyonel biyokimyasal yöntemler yerine maya hibrit teknolojisi kullanılmıştır. Çünkü mayalar kolay elde edilebilmeleri, maliyetinin düşük olması, transformasyon verimliliklerinin yüksek olması ve ayrıntılı karakterizasyonları yapılmış besin belirteçleri ve raportör genleri bulundurmaları nedenleriyle memeli sistemlerinin araştırılmasında ideal organizmalardır. hADA2 etkileşimlerinin testi *in vivo* bir yaklaşım olan Y2H ile gerçekleştirilmesi nedeniyle güvenilir sonuçlar vermiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Histon Proteinleri ve Türevleri

Ökaryotik organizmalar genetik bilgilerinin kodlanmış olduğu DNA moleküllerini, histon proteinlerine sarılı şekilde kromatin yapısını oluşturarak nükleus adı verilen özel bir organel içerisinde depolamaktadır. Ökaryotik kromatinin bu organizasyonu DNA'nın substrat olduğu tüm nükleer proseslerde oldukça önemli bir etkiye sahiptir (6). DNA molekülünün hücre içerisinde paketlenmesi oldukça kompleks bir işlemdir. Çünkü DNA moleküllerinde kodlu olan genetik bilginin hücrenin yaşam süresinde belirli evrelerde eksprese olması gerekmektedir. Bunun için DNA molekülünün transkripsiyon mekanizmaları tarafından ulaşılabilir olması son derece önemlidir. Sonuç olarak histon proteinleri kromatinin aktif ve inaktif formları arasındaki geçişte yapısal ve fonksiyonel olarak esansiyel bir rol oynar ve kromatinin bu formları da hem DNA'nın replikasyonunu hem de genlerin ekspresyonunu kontrol etmektedir.

Kromatinin yapısal bileşenlerinden olan nükleozom yapısı, histon proteinlerinin (H2A, H2B, H3, H4) her birinden iki kopya halinde oluşturdukları oktamere yapıya DNA moleküllerinin sarılması ile oluşur. H1 bağlayıcı histon proteinleri DNA ile etkileşerek nükleozomlar arasındaki bölgeleri oluşturur. Histonlar H1 bağlayıcı histon ve H2A, H2B, H3, H4 olmak üzere 5 çeşittir. Çekirdek histon yapısı ikişer adet H2A-H2B dimeri, bir adet (H3)₂(H4)₂ tetramerinden oluşur ve yaklaşık 146 bp'lik DNA molekülü bu oktamere yapı etrafında 1.7 süpersarmallık bir dönüş yapar (Şekil 1) (7-10). Histon proteinlerinden H1 türlere göre çeşitli ve farklılaşmış, H2A-H2B çifti değişken bir yapıdayken H3-H4 çifti evrimsel açıdan oldukça korunmuştur. Pozitif yüklü ve bazik aminoasitler lizin (Lys) ve arjinine (Arg) zengin 10-12 kDa büyüklüğündeki proteinlerdir. Histonlar pozitif yükleri sayesinde DNA'nın negatif yüklü fosfodiester iskeleti ile elektrostatik olarak etkileşim halindedir (11).



Şekil 1. Nükleozom çekirdek yapısı. Temsili renkler; H3 (mavi), H4 (açık yeşil), H2A (turuncu), H2B (sarı) (8, 10).

Ökaryotik hücrelerin çoğu histon genlerinin çoklu kopyalarına sahiptir. Histon protein genleri hücrenin yaşam döngüsünün S-fazı boyunca eksprese edilir ve bu histonlar yeni sentezlenen DNA'nın paketlenip nükleozom yapısının oluşturulmasında kullanılır. Bazı histon türevi proteinlerin ekspresyonları S-fazı ile kısıtlı değildir ve hücre döngüsünün tüm fazlarında sentezlenebilirler. H2A ve H2B histonlarının çok sayıda türevleri vardır. H2A'nın türevleri olan H2AZ ve H2AX birçok ökaryotik hücrede bulunur. H2A histon proteini türevleri genom lokalizasyonları ve farklı C-terminal sekansları bakımından karakterize edilir. Histon H2B türevlerinin ise özellikle gametogenez sırasında kromatin yoğunlaşması sürecinde role sahip oldukları rapor edilmiştir (10). H3 histon proteini H3.3, CenHS ve H3.4 türevlerine sahiptir. H3.1 ve H3.2 diğer histon proteinleri gibi hücre döngüsünün S-fazında en yüksek düzeyde eksprese edilmelerine karşılık, H3.3 hücre döngüsü süresince sentezlenmesi bu türevlerin her anlamda birbirleri ile aynı özellik göstermediğini ortaya koymaktadır. Histon H3.3'ün, hücre bölünmesinin S-evresinde regüle edilmediği ve transkripsiyonel olarak aktif kromatin yapısında yer aldığı bilinmektedir. CenH3 ise sentromerik kromatin bölgesinde lokalize olan histon H3 türevi olup N-terminal bölgesinin diğer H3 türevlerinden farklı olduğu bilinmektedir (12). H4 histon proteini ise en korunmuş histondur ve bilinen bir türevi yoktur. H4 nükleozom ana yapısını oluşturan diğer histon proteinleri ile yoğun etkileşimler içerisindedir ve dizi değişkenliği bu nedenle sınırlıdır (10).

Çekirdek histon proteinleri kromatin yapısı ve fonksiyonu ile ilişkileri sebebiyle bilinen en korunmuş protein ailesidir. Histon türevleri post-translasyonel modifikasyonlar ve kromatin yeniden düzenleyici komplekslerle olan etkileşimleri sayesinde kromatinin yapısal ve fonksiyonel değişikliklerine yardım ederler. Histon türevleri gen ekspresyonunun kontrolü, epigenetik kontrol ve sentromer bütünlüğü gibi farklı kromatin fonksiyonlarındaki özel rolleri üstlenmek üzere evrimleşmişlerdir.

2.1.1 Histon Modifikasyonları

1960'ların başında Vincent Allfrey'in öncülük ettiği çalışmalar histonların post-translasyonel modifikasyonlara uğradığını göstermiştir (13). 1997'de nükleozom yapısının yüksek çözünürlüklü X-ray görüntüsü bu modifikasyonların kromatin yapısını nasıl etkilediğini ortaya çıkarmıştır (7). Kromatin yapısında nükleozomlardan histonların N-terminal bölgesinde yer alan yaklaşık 20 aa uzunluğundaki spesifik bölge histon kuyukları olarak adlandırılır ve post-translasyonel modifikasyonlara açık olan bölgedir ayrıca bu bölgelerin komşu nükleozomlar ile bağlantı kurduğu bilinmektedir (14, 15). Böylece histon kuyuklarının modifikasyonları nükleozomlar arası etkileşimi etkileyerek tüm kromatin yapısını etkilemektedir (16-19). Histon kuyukları evrimsel olarak korunmuş bölgeler olmalarına karşı taşıdıkları post-translasyonel modifikasyonlar açısından oldukça çeşitlilik göstermektedirler ve dolayısıyla bu modifikasyonlar epigenetik bilgi açısından büyük bir kaynak olarak nitelendirilmektedirler (20).

Allfrey ve arkadaşları histonların post-translasyonel modifikasyonlara uğradıklarını ortaya koyduktan sonra 1964'te ilk defa histon asetilasyonunu rapor etmişlerdir (13). Histonların N-terminal kuyuklarındaki spesifik lizin rezidülerinin asetilasyonu, birbirinin tersi fonksiyon gösteren iki enzim ailesi histon asetiltransferazlar ve histon deasetiltransferazlar tarafından regüle edilen oldukça dinamik bir prosestir. HAT enzim ailesi asetil-CoA'yı kofaktör olarak kullanır ve ondan aldığı asetil grubunu spesifik lizin yan zincirinin ϵ -amino grubuna transfer ederek lizinin pozitif yükünü nötralize eder. Bu nötralizasyon histonlar ile DNA arasındaki elektrostatik etkileşimin zayıflamasına sebep olur. Böylece kromatin üzerindeki spesifik bölgede asetilasyon transkripsiyonun aktivasyonuna yol açarken tam tersi olarak asetil grubunun histonlardan uzaklaştırılması yani deasetilasyonu

transkripsiyonun baskılanmasına yol açar (15). Transkripsiyonel kontrol HAT ve HDAC'ların kromatin üzerindeki spesifik bölgeleri hedef almasını içermektedir. Lokal histon asetilasyonu promotor ve enhancer bölgelerde gözlenirken kromozomun sınır bölgelerinde de gerçekleşmektedir (21) ve bu iddiayı destekler biçimde histon asetilasyonu genel kromatin yapısı boyunca DNA-protein etkileşimlerine olanak sağlamaktadır.

Memelilerde nükleozomal histon proteinlerinin bilinen asetillenme bölgeleri; H2A için Lys5-9, H2B için Lys5-9-12-15-20, H3 için Lys9-14-18-23 ve H4 için ise Lys5-8-12-16 şeklindedir (22). Hangi spesifik Lys'nin asetilleneceği net yük bakımından bir değişiklik yaratmasa da fonksiyonel anlamda önemli olabilmektedir. Örneğin memeli hücrelerinde histon H4 proteinine tek bir asetil grubu eklendiğinde asetilasyon sadece Lys16 pozisyonunda gerçekleşirken daha sonra eklenecek olan asetil gruplarının ise sırasıyla Lys8, Lys12, Lys16 olarak bilinmektedir.

Histon modifikasyonlarından bir diğeri fosforilasyondur. Asetilasyon gibi fosforilasyonda oldukça dinamik bir süreçtir. Fosforilasyon sadece histonların N-terminal kuyruklarında değil fakat genelde proteinlerdeki serin (Ser), treonin (Thr) ve tirozin (Tyr) aminoasitlerinin yan zincirlerinde gerçekleşir. Modifikasyonun seviyesi kinaz ve fosfataz spesifik enzim aileleri tarafından kontrol edilir. Aydınlatılmış olan histon kinazların tümü ATP'den aldıkları fosfat grubunu hedef aminoasit yan zincirine transfer eder. Böylece histonlar negatif yüklenmiş olur ve bu da kromatin yapısını etkiler (19). En yaygın olarak fosforile edilen histon proteinin bağlayıcı histon proteini olduğu bilinmektedir. Histon H1'in N-terminal ve C-terminal uzantılarında bulunan Ser ve Thr rezidüleri fosforillenebilmektedir (23, 24). Histon H1'in hem bağlayıcı DNA hem de temel nükleozom yapısı ile etkileşebilme özelliği, bu proteinin ileri derecede düzenlenmiş kromatin yapısının oluşumunda önemli rol oynayabileceği düşüncesini uyandırır da, histon H1'in bu fonksiyonunun kesin niteliği henüz tam olarak aydınlatılmamıştır. Nükleozom yapısındaki temel histonlardan H3 sadece Ser10 pozisyonundan fosforillenmektedir (22).

Histon modifikasyonlarından metilasyon ana olarak lizin ve arjinin yan zincirlerinde meydana gelir. Asetilasyon ve fosforilasyonun tersine metilasyon histonların yükünü değiştirmez (19). Metilasyon en sık olarak H3 ve H4 histonlarında görülmektedir. Histon H3 Lys 4, 9, 27 ve histon H4 Lys 20 pozisyonlarında ϵ -amino gruplarının metillendiği bilinmektedir (25, 26). Ayrıca her

bir ϵ -amino grubuna 1,2 veya 3 metil grubu eklenebilmekte ve bu anlamda daha komplike bir modifikasyon olarak nitelendirilmektedir. Metilasyon ve asetilasyonun transkripsiyonel olarak aktif kromatin yapısının formasyonunda önemli role sahip oldukları bilinmektedir (22, 25-27).

Histon proteinlerinin glutamat ve arjinin rezidülerinden mono- ve poli- ADP-riboz molekülünün eklenmesi ile modifiye edildiği bilinmektedir. Histonların poli-ADP ribozilasyonu poli-ADP riboz polimeraz enzim ailesi tarafından gerçekleştirilir ki bu enzim ailesi DNA zincir kırıkları ile yakından ilişkilidir ve poli-ADP riboz glikohidrolazlar tarafından reaksiyon geri katalizlenebilir. Bu enzimler beraber histonların poli-ADP-ribozilasyon seviyelerini kontrol eder ve bu durum relaks kromatin durumu ile ilişkilidir (19). Histon mono-ADP ribozilasyonu ise mono-ADP-riboziltransferaz enzim ailesi tarafından çekirdek histon proteinlerini ve bağlayıcı histon proteini H1'i modifiye eder. Bu modifikasyon DNA hasar tamir mekanizma yolları ile ilişkili olması bakımından önemlidir (19).

Yukarıda bahsedilen histon modifikasyonlarında genel olarak aminoasit yan zincirlerinde küçük moleküler değişiklikler olurken bir diğer histon modifikasyonu olan ubikitinasyon daha büyük bir kovalent modifikasyondur. Modifikasyon substrat spesifikliğı ve ubikitinasyon derecesini belirleyen 3 enzimin histonların lizin rezidülerine 76 aa'lık ubikitin polipeptidini bağlaması ile gerçekleşir (19, 28). Genel olarak ubikitinasyon H2A ve H2B histonlarında gerçekleşir ve ubikitinlenen H2A ve H2B'nin transkripsiyon sürecinin devamlılığında önemli oldukları belirlenmiştir (26).

2.2 Histon Asetil Transferazlar

In vivo ve *in vitro* yapılan analizlerin gösterdiği üzere asetilasyon çekirdek histonların N-terminallerinin fonksiyonları üzerinde regülatör bir etkiye sahip olması açısından oldukça önemli bir histon modifikasyonudur ve bu süreç histon asetil transferaz enzim ailesi tarafından katalizlenmektedir. HAT enzim ailesi kromatin bileşenlerinden histonların N-terminal bölgelerindeki spesifik lizin rezidülerini asetilleyen böylece gen aktivasyonunu destekleyen çok alt birimli protein komplekslerinin katalitik alt birimleridir (29).

Protein-DNA etkileşimlerini kolaylaştırarak transkripsiyonel aktivasyonu sağlayan HAT'lar birçok durumda spesifik promotor bölgelerde HAT içeren ko-aktivatörler olarak transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu sağlarlar (30). Maya HAT kompleksleri, adaptör proteinleri gerektirmesine rağmen VP16, Gcn4, Gal4 ve Hap4 gibi aktivatörlerin transkripsiyon aktivasyon domainleri ile ilişki kurabilirler (31).

Tanımlanmış olan üç tip asetilasyon vardır. Birinci tip HAT aktivitesi bazı histonların sentezi sırasında ko-translasyonel modifikasyonları içerirler. Bu modifikasyonlar polipeptidin ilk rezidülerindeki α -amino gruplarını modifiye eder ve geri dönüşümlü değildir (32). Diğer iki tip HAT aktivitesi *in vivo* geri dönüşümlüdür ve histonların amino terminal domainlerindeki spesifik lizin rezidülerinin β -amino grupları ile direkt olarak ilişkilidir. Asetilasyonun bu iki tipi sitozolik B-tip ve nükleer A-tip olmak üzere ikiye ayrılır (33).

Sitoplazmik veya B-tip HAT'lar kromatin replikasyonu sırasında yeni sentezlenmiş H3 ve H4 histonlarını asetillerler. Çoğu organizmada yeni sentezlenmiş H4 histonu K5 ve K12 pozisyonlarından asetillenir. H3 asetilasyon pozisyonları ise daha değişkendir. Genel olarak H3 ve H4 nükleozom içine katıldıktan sonra deasetillenerek asetil grupları uzaklaştırılır. *HAT1* gen ürünü maya HATB enziminin 2 alt grubu vardır. HAT1p katalitik aktiviteden sorumlu iken HAT2p H4 histonuna yüksek afiniteli bağlanmadan sorumludur (34, 35). Bu kompleks serbest, nükleozomal olmayan H4'ü asetiller. İnsanlarda HAT2p'nin homoloğu p48'dir ve DNA replikasyon bağımlı kromatin düzenlenmesinde rol alan bir kompleks içinde yer alır. p48 histon deasetil transferaz 1 kompleksinin de alt birimidir. Depozisyon ile alakalı asetilasyon sadece H3 ve H4 histonlarında gerçekleşirken, transkripsiyon ile alakalı asetilasyon tüm çekirdek histonlarda gerçekleşir.

Nükleer veya A-tip HAT'lar transkripsiyonel asetilasyonda yer alır ve nükleozomal histonları asetillerler. *Tetrahymena thermophila*'nın A tip HAT katalitik alt birimi p55 maya GCN5 (yGCN5) ile benzerlik göstermektedir ve yGCN5, fonksiyonları bazı transkripsiyonel aktivatörler tarafından transkripsiyonel aktivasyon için gerekli olan bir proteindir. yGCN5 *in vitro* HAT aktivitesine sahiptir. Mayalar ve insanlar dahil olmak üzere birçok farklı organizmada GCN5 homologlarının olduğu bilinmektedir. GCN5 ilişkili histon asetiltransferazlarda insan GCN5'ı (hGCN5), yGCN5, *T.thermophila* GCN5'ı (tGCN5) sekansları oldukça

benzerdir. Hepsinde C-terminal bölgelerinde bromo domaini vardır ve bu domain protein etkileşim motiflerinden oluşur fakat GCN5 ve ADA2 etkileşimden sorumlu değildir. ADA protein kompleksi ile transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasında veya aktivasyon domaini ile DNA bağlanmasından sorumlu olabilir ya da transkripsiyon faktörlerinin daha genel bir aktivitesi için gerekli olabilir. hGCN5 ve yGCN5, ADA2 etkileşim domainlerini içerirler ve bu etkileşim GCN5'in *in vivo* fonksiyon göstermesi için gereklidir (36). Memelilerde GCN5 ve p300/CREB-binding protein-associated factor (PCAF) olarak adlandırılan birbiriyle ilişkili iki GCN5 asetiltransferaz alt sınıfı tanımlanmıştır (37, 38). İnsan GCN5'in fonksiyonunu belirlemek üzere yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar bu proteinin spesifik olarak H3 ve daha düşük derecede H4'ün asetilasyonunda gereksinim duyulan transkripsiyonel adaptörler olarak görev aldığını göstermiştir (39). PCAF de benzer şekilde miyogenez, nükleer-reseptör aracılı aktivasyon, büyüme-faktörü-sinyalli aktivasyon gibi çeşitli hücresel proseslerde HAT ve ko-aktivatör olarak rol almaktadır (40-42). GCN5-ilişkili enzimlerin tamamı sadece nükleer HAT komplekslerine ait değildir. HAT kompleksleri transkripsiyon prosesine, özgün olarak promotor bölgedeki aktivatörler tarafından gereksinim duyulan ko-aktivaörler olarak katılmaktadırlar (43). Bu hedeflenmiş ko-aktivatör fonksiyonunun yanı sıra GCN5 ayrıca genom çapında histon proteinlerinin asetilasyonunda da rol almaktadır (44-46). GCN5 HAT aktivitesi transkripsiyonun düzenlenmesinde ko-aktivatör fonksiyonundan bağımsız olarak rol almaktadır. Global asetilasyon etkisi, bir veya daha fazla transkripsiyon faktörünün promotor bölgeye afinitesini arttırarak veya erişilebilir kromatin yapısının oluşturulmasına katkıda bulunarak protomor bölgede pre-initiation-complex (PIC)'nin oluşumuna yardımcı olmaktadır (46). Global asetilasyonun gen ekspresyonunun düzenlenmesinde önemli rol oynadığı ve birçok promotorda transkripsiyonun aktivasyonunun sadece nükleozomal histonların artan asetilasyon oranı ile sınırlı olmadığı bilinmektedir (47).

HAT'lar ve transkripsiyon arasında bir bağlantının olduğu hipotezi HAT aktivitesine sahip olan ancak GCN5'den bağımsız diğer transkripsiyonel regülatörlerin tanımlanması ile daha da güçlenmiştir. Bu regülatörler arasında, transkripsiyonun yanı sıra hücre döngüsünün ilerlemesinde ve hücre-sinyal molekülü olan siklik AMP (cyclic AMP; cAMP)'ye yanıt oluşumunda rol alan genlerin aktivasyonu gibi farklı hücresel proseslerde gereksinim duyulan ve birbirlerine çok

benzer olan p300 ve CBP bulunmaktadır (38, 48-50). CBP ve p300 fonksiyonel olarak benzer özellikte olmaları nedeniyle çoğunlukla CBP/p300 olarak birlikte anılmaktadır (38). Bu proteinler de transkripsiyonel ko-aktivatörler olarak bilinen protein sınıfına aittirler. Bu proteinler kendi başlarına transkripsiyon faktörleri gibi dizi spesifik olarak DNA'ya bağlanma özelliği göstermezler fakat dizi spesifik olarak DNA-bağlanma proteinleri ile özgün olarak etkileşerek bunları spesifik genlere veya genomik bölgelere yönlendirebilmektedirler (38). CBP/p300 2400'den fazla aa içeren büyük bir proteindir, bu yapısı diğer farklı proteinler ile de etkileşimleri gerektiren multi-fonksiyonel role sahip olma özelliğini desteklemektedir (48, 49). N-terminal ve C-terminal bölgelerindeki domainleri TBP aracılığı ile transkripsiyon başlama kompleksine bağlanabilmesini sağlamaktadır ancak bu bağlanmanın mekanizması ve transkripsiyonun başlaması ile olan ilişkisi hala tam olarak aydınlatılamamıştır. CBP/p300'ün kromatin yapısı halinde paketlenen DNA dizileri ile ilişkisi sonucu büyük olasılıkla nükleozomal histonların asetilasyonu artmakta ve nükleozomlar-arası etkileşimler ve/veya histon kuyrukları ile kromatinin kondenzasyonunda rol alan histon olmayan proteinler arasındaki komplekslerin bozulmasına neden olarak kromatin yapısının açılmasına aracılık etmektedir (48, 49). Böylelikle transkripsiyon başlama kompleksinin DNA dizilerine erişebilme şansı ve dolayısıyla transkripsiyon oranı artmaktadır. HAT aktivitesine sahip olan diğer bazı proteinler, PCAF, SRC-1 ve ACTR gibi, CBP/p300'e bağlanabilmektedir. Birçok HAT gibi CBP/p300 de aktivitelerinin düzenlenmesinde protein kinazlara gereksinim göstermektedir, CBP/p300'ün HAT aktivitesi fosforilasyon durumuna bağlı olarak değişebilmektedir.

Farklı HAT aktivitesi için farklı aktivatörler gerekmektedir (11, 38). HAT'ın kendi katalitik aktivitelerinin ötesinde fonksiyonlara sahip olabilirler; farklı HAT'ın farklı histonları veya histon olmayan proteinleri asetillemeleri özellikleri farklı HAT katalitik alt birimlerinin birbirinden farklı özelliklere sahip olduğu düşüncesini desteklemektedir (43, 47). Asetilasyon profilinin bu şekilde farklılaşması farklı gen setlerinin optimal aktivasyonları açısından gerekli olabilmektedir. Ayrıca, gelişimin aşamalarına ve farklılaşmaya bağlı olarak aynı genin optimal aktivite için farklı HAT'lara ihtiyaç duyması da olasılıklar içerisindedir. Belirli bir genin aktivasyon için aynı HAT aktivitesine sahip olması gibi bir gereklilik durumu da söz konusu değildir.

Nükleer HAT'ların çeşitli biyokimyasal metodlarla yapılan analizleri sonucunda birçok nükleer HAT'ın genellikle 20 veya daha fazla proteinden oluşan ve moleküler ağırlıkları 2 MDa olan çok alt-birimli protein kompleksler olduklarını ortaya koymuştur (11, 22, 38). Bazal transkripsiyon kompleksinde en azından bir bileşenin HAT aktivitesine sahip olduğu bilinmekle birlikte bu bulgunun önemi henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Yapılan *in vivo* araştırmalar her ne kadar histonlar ile karşılaştırıldığında daha düşük düzeyde olsa da komplekste yer alan diğer proteinlerin de asetile edildiğini göstermiştir (11, 22). Bu bulgu HAT aktivitesi için nükleozomal histon proteinlerinin uygun substratlar olmakla birlikte belki de bazı HAT'ların özgün substratlarının histon olmayan proteinler olabileceği düşüncesini yaratmıştır. GCN5, SAGA ve ATAC gibi büyük komplekslerin katalitik alt birimidir. SAGA kompleksi Ada1–5, Spt3, Spt7, Spt8, çeşitli TBP-associating factors (TAFs) ve Tra1'den oluşmaktadır (30). Bu faktörler arasında Ahc1'i özgün olarak sadece ADA kompleksinde yer almaktadır (2). ADA2 ve ADA3 gibi bazı adaptör proteinler ise her iki komplekste de yer alan ortak proteinlerdir (51). Substrat tanıma motiflerine göre gruplandırılan GNAT ve MYST HAT komplekslerinin spesifik substratları, komplekste yer alan diğer ilgili proteinler ve asetilledikleri histon proteinleri Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. Substrat tanıma motiflerine göre gruplandırılan HAT kompleksleri. Farklı organizmalardan saflaştırılan HAT ailelerinin asetilledikleri histon proteinleri ve kompleks içerisinde yer alan diğer ilgili proteinler (11).

HAT complexes of the GNAT family											
SAGA (Sc)	SLIK (Sc)	ADA (Sc)	HAT-A2 (Sc)	SAGA (Dm)	ATAC (Dm)	PCAF (Hs)	STAGA (Hs)	TFTC (Hs)	HATB (Sc)	Elongator (Sc)	Hpa2 (Sc)
<i>Catalytic subunit</i>											
Gcn5	Gcn5	Gcn5	Gcn5	GCN5	GCN5	PCAF	GCN5L	GCN5L	Hat1	Elp3	Hpa2
<i>Histones modified</i>											
H2B/ H3/H4	H2B/ H3/H4	H3	H3	H3	H3/H4	H3/H4	H3/H4	H3/H4	H2A/H4	H3	H3/H4
<i>Associated complex subunits</i>											
Tra1	Tra1			TRA1		PAF400	TRRAP	TRRAP	Hat2	Elp1	Hpa2
Spt7	Spt7*			SPT7			STAF65γ		Hif1	Elp2	
Spt8										Elp4	
Spt3	Spt3			SPT3		SPT3	SPT3	SPT3		Elp5	
Spt20	Spt20									Elp6	
Ada1	Ada1			ADA1			STAF42				
Ada2	Ada2	Ada2	Ada2	ADA2B	ADA2A	ADA2					
Ada3	Ada3	Ada3	Ada3	ADA3	ADA3	ADA3	STAF54	ADA3			
Sgf29	Sgf29	Sgf29	Sgf29	SGF29							
Sgf73	Sgf73						SCA7	SCA7			
Ubp8	Ubp8					TAF5L	TAF5L	TAF5L			
Sgf11	Sgf11					TAF6L	TAF6L	TAF6L			
Taf5	Taf5			TAF5		TAF9	TAF9	TAF9			
Taf6	Taf6			TAF6		TAF10	TAF10	TAF10			
Taf9	Taf9			TAF9		TAF12	TAF12	TAF12			
Taf10	Taf10			TAF10B				TAF2			
Taf12	Taf12			TAF12			STAF36	TAF4			
	Rtg2						STAF46	TAF5			
Chd1	Chd1							TAF6			
		Ahc1		WDA	ATAC1						
		Ahc2			HCF1						

HAT complexes of the MYST family							
NuA4 (Sc)	Pic. NuA4 (Sc)	NuA3 (Sc)	SAS (Sc)	TIP60 (Dm/Hs)	HBO1 (Hs)	MOZ/MORF (Hs)	MSL (Dm)
Catalytic subunit							
Esa1	Esa1	Sas3	Sas2	TIP60	HBO1	MOZ/MORF	MOF
Histones modified							
H2A/H4	H2A/H4	H3	H4	H2A/H4	H3/H4	H3	H4
Associated complex subunits							
Tra1		Yng1	Sas4	TRRAP	ING5	ING5	MSL1
Yng2	Yng2	Taf14	Sas5	ING3	ING4	BRPF1	MSL2
Yaf9		Nto1		p400	JADE1		MSL3
Eaf1				BRD8			MLE
Eaf2				EPC1			roX RNA
Eaf3				EPC2			
Eaf5				DMAP1			
Eaf6				RUVBL1	EAf6	EAf6	
Eaf7				MRG15			
Epl1	Epl1			BAF53a			
Act1				Actin			
Arp4				GAS41			
				MRGX			
				MRGBP			
				FLJ11730			
				YL1			
				TIP49a			
				TIP49b			
				TRCp120			

2.3 ADA Protein Kompleksinin Önemi

Ökaryotik organizmalarda DNA, histon proteinleri ile etkileşerek kromatin yapısı şeklinde paketlenmiştir. Paketlenmiş bu yapı genetik bilginin ekspresyonu üzerinde genellikle baskılayıcı bir etkiye sahiptir. Hücre içerisinde kromatin-yeniden düzenlenmeleri (chromatin-remodelling) ve kromatin modifikasyon (chromatin-modifications) 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 yarışarak transkripsiyonu baskıladıklarını göstermiştir (11). Ancak transkripsiyon faktörlerinin, kromatin yapısının kısıtlayıcı etkisi ile nasıl mücadele ettikleri, gen ekspresyonunun regülasyonunun anlaşılması bakımından hala cevaplanmayı bekleyen bir sorudur.

Transkripsiyonel aktivatörler fonksiyon gösterebilmek için DNA-bağlanma ve aktivasyon bölgelerine ihtiyaç duyarlar. Aktivasyon bölgeleri, nükleozomların

yıkımı/bozulması sürecini başlatabilmek için histon proteinleri ile etkileşirler. Aktivatörlerin histon proteinleri ile etkileşim kurabilmeleri için potansiyel hedefleri ise histonların amino-terminal (N-terminal) bölgeleridir -ki bu bölgeler nükleozom yapısı ve stabilitesi için çok önemli bir role sahip olmamalarına rağmen ileri derecede düzenlenmiş kromatin yapısının oluşumu ve nükleozomların histonlar dışındaki proteinler ile etkileşimleri için gereklidirler. Histonların N-terminal bölgeleri ayrıca asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon, ADP-ribozilasyonu gibi çeşitli post-translasyonel modifikasyonların ve kromatinin transkripsiyonel olarak inaktif formdan aktif forma geçmesi ile ilişkili olan modifikasyonların gerçekleştiği bölgelerdir. DNA'ya bağlanabilen transkripsiyonel aktivatörler, promotor bölgede bulunan genel transkripsiyon mekanizmaları ile etkileşerek, RNA Pol II aracılığıyla transkripsiyonunun başlamasını uyarmaktadırlar (52). Transkripsiyonun başlaması için genellikle adaptör proteinlere gereksinim vardır; bu proteinlerin nükleozomları asetilleyerek ve destabilize ederek promotor bölgede kromatin yapısının açılmasına yardımcı oldukları düşünülmektedir (53).

Bu tez projesi kapsamında çalışılan hADA2 bir transkripsiyonel adaptör protein olup nükleozomal histonların asetilasyonu için gerekli birçok HAT kompleksinin bileşenidir. HAT komplekslerinin her biri en az üç veya dört adaptör protein içermektedir; ADA1, ADA2, ADA3 ve HAT aktivitesine sahip GCN5 proteinleri ADA kompleksinin temel bileşenleridir. Bazı komplekslerde, ayrıca farklı olarak TAF'lar ve Spt proteinleri de bulunmaktadır. *In vivo* karakterizasyonu yapılan HAT proteinlerinden her birinin büyük protein kompleksleri ile ilişkileri bulunmuştur. Örneğin GCN5 ve ADA proteinleri SAGA ve PCAF gibi SAGA benzeri çoklu protein komplekslerinin bir parçasıdır. *In vitro* ADA2 proteininin fiziksel olarak GCN5 hatta transkripsiyonel faktörler ve TATA-bağlanma proteini (TBP) ile direkt etkileşim içinde olduğu gösterilmiştir (36, 53, 54). Daha ileri çalışmalarda *SPT* gen grupları üyelerinin TBP fonksiyonundan etkilendiği gösterilmiştir (36, 55). Tüm bu verileri toplayacak olursak ortaya şöyle bir sonuç çıkmaktadır; GCN5, ADA ve SPT proteinlerini içeren protein kompleksleri transkripsiyonel aktivatörler ve transkripsiyon mekanizması bileşenleri arasında fiziksel bir köprü kurmaktadır. Bu kompleks asetil transferaz aktivitesine sahiptir ve SAGA olarak adlandırılmaktadır (53, 56). Tablo 2'de SAGA kompleksinin maya, insan ve *Drosophila*'daki alt birimleri listelenmiştir.

Tablo 2. SAGA kompleksinin maya, insan ve *Drosophila*'daki alt birimleri.

SAGA	Yeast	Human	<i>Drosophila</i>
	Gcn5 (<i>ada4</i>)	GCN5/PCAF	Gcn5
Ada	Ada1	ADA1/STAF42	Ada1
	Ada2	ADA2b	Ada2b
	Ada3	ADA3	Ada3
Spt	Spt8	ND	ND
	Spt20 (<i>ada5</i>)	SPT20/FAM48A/p38IP	ND
	Spt7	SPT7/STAF65y	CG6506
	Spt3	SPT3	Spt3
Taf	Taf5	TAF5L	Wda
	Taf6	TAF6L	ND
	Taf9	TAF9/TAF9b	Taf9
	Taf10	TAF10	Taf10
	Taf12	TAF12	Taf12
	Tra1	TRRAP	Tra1
	Sgf29	SGF29 (STAF36)	CG30390
DUBm	Ubp8	USP22	Nonstop
	Sgf11	ATXN7L3	Sgf11 (CG13379)
	Sus1	ENY2	e(y)2
	Sgf73	ATXN7	ND
	Chd1	ND	ND
	Rtg2	ND	ND

Bu kompleksle yapılan *in vitro* çalışmalarda rekombinant proteinlerin serbest histonları asetilleyebilmesine rağmen nükleozomal histonların asetilasyonunun *in vivo* HAT kompleksleri tarafından gerçekleştirilebiliyor olması, HAT proteinlerinin genel bir özelliğidir ve HAT aktivitesine sahip protein kompleksleri üye proteinlerinin kompleks içerisindeki etkileşimlerine dikkat çekmektedir. Örneğin, rekombinant yGCN5 ve hGCN5, nükleozomal substratları H3 ve H4'ü asetilleyememekte fakat serbest H3 ve H4'ü asetilleyebilmektedir. Bu rekombinant proteinlerin substratları olan nükleozomal histonları asetilleyememesi, kompleksin diğer üyeleri olan ADA ve SPT proteinlerinin yokluğundan kaynaklanmaktadır. Çünkü mayadan izole edilen SAGA ve ADA-GCN5 komplekslerinin ikisi de nükleozomal histonları asetilleyebilmektedir. Bu durum ADA proteinlerinin transkripsiyonel regülasyondaki önemini ortaya koymaktadır ve ADA proteinlerini içeren komplekslerin yapı ve fonksiyonlarının aydınlatılması, gen ekspresyonunun düzenlenmesi konusunda önemli veriler sağlayacaktır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Kullanılan Kimyasallar ve Kitler

Aşağıda Tablo 3'te deneylerde kullanılan kimyasal maddeler ve nereden alındıkları listelenmiştir.

Tablo 3. Deneylerde kullanılan kimyasal maddeler ve temin edildikleri firmalar.

Kimyasal	Firma-Adres
Adenin	AppliChem, Darmstadt, Almanya
Agar	AppliChem, Darmstadt, Almanya
Agaroz	Basica LE, Prona, AB
Agaroz Gel-Ekstraksiyon Kiti	Invitrogen, Carlsbad, CA, ABD
3-Amino-1,2,4- triazole	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Almanya
Amonyum Asetat	AppliChem, Darmstadt, Almanya
Asetik Asit	Merck, KgaA Darmstadt, Almanya
Dekstroz	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Almanya
Diaminobenzidin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Almanya
DNA moleküler ağırlık standartları (100 bp, 1000 bp)	Fermantas, Waltham, Massachusetts, USA
Drop-out Mix	Clontech, USA
EDTA	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Almanya
Etanol	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Almanya
Etidyum Bromür	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Almanya
HCl	Merck, KgaA Darmstadt, Almanya
Histidin	AppliChem, Darmstadt, Almanya
Lösin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Almanya
Maya ekstresi (Yeast extract)	AppliChem, Darmstadt, Almanya
Maya Nitrojen Bazı (Yeast Nitrogen Base) (Amonyum Sülfatlı, Aminoasitsiz)	BD Difco, New Jersey, ABD
β -Merkapto Etanol	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Almanya
Metanol	Merck, KgaA Darmstadt, Almanya
NaCl	Sigma Aldrich Chemie GmbH,

	Steinheim, Almanya
NaOH	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Almanya
NaOAc	Merck, KgaA Darmstadt, Almanya
Pepton	Merck, KgaA Darmstadt, Almanya
Potasyum asetat	AppliChem, Darmstadt, Almanya
Plazmid DNA izolasyon kiti	Fermantas, Waltham, Massachusetts, USA - QiaGen
Protein moleküler ağırlık standardı	Fermantas, Waltham, Massachusetts, USA
PVDF	Biorad, Hercules, CA, Amerika Birleşik Devletleri
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Almanya
Sukroz	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Almanya
Taşıyıcı DNA (sonicated salmon sperm DNA)	Clontech ,USA
Triptofan	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Almanya
Tripton	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Almanya
Trizma baz	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Almanya
Urasil	AppliChem, Darmstadt, Almanya
X-alpha gal	Clontech, USA

3.2 Kullanılan Enzimler ve Antikorlar

Aşağıda verilen Tablo 4'te deneylerde kullanılan enzim ve antikorlar listelenmiştir.

Tablo 4. Deneyler süresince kullanılan enzimler ve antikorlar.

Enzim/Antikor	Firma
Anti-Myc mouse monoclonal ab	Cell signalling
Large fragment DNA polimeraz	İnvitrogen, Carlsbad, CA, ABD
Restriksiyon enzimleri	İnvitrogen - NEB, New England, ABD - Fermentas
Taq polimeraz	İnvitrogen, Carlsbad, CA, ABD - Fermentas
T4 DNA ligaz	İnvitrogen, Carlsbad, CA, ABD

3.3 Kullanılan Cihazlar ve Araç-Gereçler

Aşağıda verilen Tablo 5'te deneylerde kullanılan cihazlar ve ait oldukları firmalar listelenmiştir.

Tablo 5. Deneyler süresince kullanılan cihazlar ve araç-gereçler.

Cihazın Adı-Modeli	Firma-Adres
Derin Dondurucu (-80°C)	New Brunswick, İngiltere
Derin Dondurucu (-20°C) - Biomedical Freezer	Sanyo, San Diego, ABD
Digital Su Banyosu	Vwr, Pennsylvania, ABD
Evaporator-DNA 120	Thermo, Massachusetts, ABD
Hassas Terazi – BP121S ve BL600	Sartorius Biotech GmbH, Goettingen, Almanya
İnkübatör	New Brunswick, İngiltere
İnkübatör-GERHARDT	Gerhardt GmbH & Co. KG, Königswinter, Almanya
Laminar air flow - Sınıf II	Thermo, Massachusetts, ABD
0.22 µm steril filtre Sartorius ministar single	Sartorius Biotech GmbH, Goettingen, Almanya
Mikropipet	Eppendorf, Finn timer, Thermo, Massachusetts, ABD
Orbital Çalkalayıcı - KS501 D	Ika - Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Almanya
Otoklav - Hiclave HV-50L	Hirayama, Saitama, Japonya
PH metre - Level 1	Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim, Almanya
Santrifüj - EBA 12	Hettich, Kirchlingern, Almanya
Soğutmalı Santrifüj-Micro 200R	Hettich, Kirchlingern, Almanya
SDS-PAGE sistemi	Biorad, Hercules, CA, ABD
Soğutmalı Santrifüj- Micro 200R	Hettich, Kirchlingern, Almanya
Thermal cyler	Thermo, Massachusetts, ABD
UV Görüntüleme sistemi	Vilber Lourmat, Cedex, Fransa
Vorteks - MS1 Minishaker	Ika - Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Almanya

3.4 Tamponlar ve Çözeltiler

Aksi belirtilmediği takdirde kullanılan tüm çözeltiler 0.22 µm steril filtreden geçirilerek sterilize edildi ve oda sıcaklığında saklandı. Çözeltilerin hazırlanmasında steril ultrasaf (UP) veya bidistile H₂O kullanıldı.

3-Amino-1,2,4- triazole (3-AT)

1 M 3-AT steril dH₂O içerisinde çözöldü, steril filtreden geçirildi ve stok çözölti porsiyonlanarak koyu renkli cam şişe içerisinde -20 °C’de saklandı.

Agaroz

Aksi belirtilmediğı takdirde %1 agaroz 0.5XTAE tamponunda ısıtılarak çözöldü ve agaroz jel elektroforezi deneylerinde kullanılmak üzere uygun jel tanklarına dököldü.

Amonyum Persölfat (APS) Stok Çözöltisi (%10) (0.5 mL)

0.05 gr APS steril dH₂O içerisinde çözöldü. +4°C’de saklandı.

Ampisilin Stok Çözöltisi (100 mg/mL)

100 mg/ml final konsantrasyonda olacak şekilde ampisilin steril dH₂O içerisinde çözöldü ve steril filtreden geçirilerek sterilize edildi ve stok çözölti porsiyonlanarak -20°C’de saklandı.

CaCl₂ (1M)

11.1 gr CaCl₂ steril 1 lt dH₂O içerisinde çözöldü. Daha sonra istenilen dilösyonlarda kullanıldı. +4°C’de saklandı.

CoCl₂(%2)

1 lt için 2 gr CoCl₂ steril UP H₂O içerisinde çözöldü, steril filtreden geçirildi ve stok çözölti oda sıcaklığında saklandı.

Coomassie Boyama Çözöltisi (1L)

2,5 ml Coomassie Brilliant Blue G250, 500 ml metanol, 100 ml asetik asit içerisinde çözöldükten sonra filtre edildi ve oda sıcaklığında saklandı.

Etidyum Bromide Stok Çözöltisi

10 mg/ml stok Etidyum bromide (Et-Br) hazırlandı. +4°C’de saklandı.

Glukoz (100 mL)

20 gr glukoz steril dH₂O içerisinde çözöldü ve maya besi ortamlarına ilave edilmek üzere besi ortamlarından ayrı olacak şekilde otoklavlanarak steril edildi.

Kanamisin Stok Çözeltisi (50 mg/mL)

50 mg/ml final konsantrasyonda olacak şekilde kanamisin suda çözüldü ve steril filtreden geçirilerek sterilize edildi ve stok çözelti porsiyonlanarak -20°C’de saklandı.

Lizis Solüsyonu (Mayadan protein ekstraksiyonu amacıyla kullanılmıştır)

1.85 M NaOH, 7.4 % β -mercaptoethanol

SDS-PAGE Resolving (Ayırma) Jel Tamponu

% 1 (w/v) SDS, 1.5 M Tris/HCl (pH 8,8)

SDS-PAGE Stacking (Yükleme) Jel Tamponu

% 1 (w/v) SDS, 1.0 M Tris/HCl (pH 6,8)

SDS-PAGE Yürütme Tamponu (Tris-Glisin Elektroforez Tamponu) (1L)

25 mM Tris, 250 mM Glisin (Elektroforezde kullanım amaçlı, pH 8.3), 1 gr SDS

2XSDS-PAGE Örnek Yükleme Tamponu (1L)

100 mM Tris.HCl (pH 6.8), 200 mM dithiothreitol, 40 gr SDS (Elektroforezde kullanım amaçlı), 2 gr bromfenol mavisi, 20 ml gliserol. Tampon hazırlandıktan sonra porsiyonlanarak -20°C’de saklandı.

Western Transfer Tamponu (pH 8.3) (1L)

25 mM Tris, 192 mM glisin, % 0.037 (w/v) SDS (Elektroforezde kullanım amaçlı), 200 ml metanol (pH 8.3). +4°C’de saklandı.

Western Bloklama Tamponu (50 mL)

2,5 gr yağsız süt tozu TBST tamponu içerisinde kullanımdan hemen önce taze olarak hazırlandı.

10XTAE (1L)

48.5 gr Tris, 11.4 ml Glasiyal asetik asit, 20 ml 0.5 mM EDTA pH 8.0

1XTBS

50 mM Tris.HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl

%50 TCA (100 mL)

50 gr TCA steril dH₂O içerisinde çözöldü ve stok çözölti 4°C’de saklandı.

10XTE

100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA ve stok çözölti oda sıcaklığında saklandı.

10XLiOAc (1.0 M)

1.0 M LiOAc steril dH₂O içerisinde çözöldü, steril filtreden geçirildi ve stok çözölti oda sıcaklığında saklandı.

% 50 Polyethylene glycol (PEG) (100 mL)

50 ml polyethylene glycol steril UP H₂O içerisinde hazırlandı ve stok çözölti oda sıcaklığında saklandı.

TE/LiOAc (1mL)

Çözölti kullanımın hemen öncesinde taze olarak hazırlanmıştır.

100 µL 10x TE

100 µL 10x LiOAc

800 µL steril UP H₂O

PEG/TE/LiOAc (1 mL)

Çözölti kullanımın hemen öncesinde taze olarak hazırlanmıştır.

100 µL 10x TE

100 µL 10x LiOAc

800 µL 50% PEG

1XTBST (1L)

50 mM Tris.HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 ml Tween 20

X-alfa Gal (20 mg/mL)

20 mg/mL X-alfa gal N, N-dimetilformamid içerisinde çözöldü ve stok çözölti koyu renkli cam şişe içerisinde -20°C’de saklandı.

3.5 Protokoller

3.5.1 Büyüme ortamları

Hazırlanan büyüme ortamlarının sterilizasyonu otoklavda (121 °C, 2 bar, 20 dakika) gerçekleştirildi. Seçici agar besi ortamların hazırlanması için ortamların sıcaklığı yaklaşık 50-55 °C'ye getirildi ve uygun konsantrasyonda hazırlanmış ve steril filtreden geçirilmiş antibiyotik çözeltisi eklendi. Yine maya besi ortamları hazırlanırken % 20 dekstroz ortamların sıcaklığı yaklaşık 50-55 °C'ye getirildikten sonra eklenmiştir. Besi ortamları hazırlandıktan sonra +4°C'de saklandı. Kullanılan büyüme ortamları ve içerikleri aşağıda listelenmiştir (57).

3.5.1.1 Bakteri (*E.coli*) Büyüme Ortamları

Bakteri hücrelerinin büyütülmesinde rekombinant *E.coli* suşlarının büyütülmesinde ve kültivasyonunda en yaygın olarak kullanılan zengin besi ortamı olan Luria-Bertani (LB) besi ortamı kullanıldı.

3.5.1.2 Maya (*S. cerevisiae*) Büyüme Ortamları

YPD ve YPDA;

YPD, ayrıca YEPD olarak bilinen *S. cerevisiae* maya suşlarının büyütülmesinde en yaygın olarak kullanılan zengin besi ortamıdır. İçeriğinde optimum büyüme koşullarını sağlanmasına yardımcı olan aminoasitler, nükleotidler, vitaminler ve temel metabolitler bulunmaktadır. Bazı maya suşları *Adenin* geninde (*ADE2*) mutasyon taşırlar ve bu hücrelerde kırmızı pigment birikimi gerçekleştiğinden agar besi ortamında büyüyen bu hücreler fenotipik olarak kırmızı renkli koloniler şeklinde gözlenirler. Kırmızı pigmentlerin birikimi büyümeyi yavaşlatır ve besi ortamına adeninin eklenmesi bu pigment birikimini yavaşlatarak büyüme oranının artmasını sağlar. YPDA besi ortamına eklenen adeninin konsantrasyonu maya suşlarına göre farklılık göstermektedir (58).

Minimal (Synthetic Dropout, SD) besi ortamı;

SD, mayada spesifik besin belirteçleri taşıyan maya vektörleri ile transforme edilen maya hücrelerinin ve spesifik fenotiplerin seçimi amacıyla kullanılmaktadır. İçeriğinde tuzlar, vitaminler, azot (Yeast Nitrogen Base; YNB) ve karbon (dekstroz) kaynağı, temel nükleotidler ve gerekli aminoasitler bulunmaktadır. X-alfa gal ve

3'AT kimyasalları minimal besi ortamları steril edildikten sonra sıcaklığı 50-55°C'ye ulaştırıldı eklenmiştir. Besi yerlerinin içerikleri Tablo 6'da verilmiştir.

Tablo 6. Mikroorganizmaların büyütülmesinde kullanılan besi ortamlarının içerikleri.

Besi Ortamı	Organizma	Besi Ortamı İçeriği
LB (1L)	Bakteri	5 gr Bacto yeast ekstrakt, 10 gr NaCl, 10 gr Tripton (pH 7.0)
LB-Agar (1L)	Bakteri	LB besi ortamına 15 gr Bacto-Agar eklenerek hazırlandı.
SD Besi Ortamı (1L)	Maya	10 g süksinik asit, 6.0 g NaOH, 6.7 g YNB, 1.1 g Aminoasit karışımı (Synthetic dropout mix)* 100 mL %20 dekstroz (5 gr)
SD Agar (1L)	Maya	SD besi ortamına 15 gr Bacto-Agar eklendi.
YPDA (1L)	Maya	10 gr maya ekstraktı, 20 gr pepton, 20 gr dekstroz (D-Glukoz), 100 ml Adenin (3 mg/ml)
YPDA-Agar (1L)	Maya	YPDA besi ortamına 15 gr Bacto-Agar eklenerek hazırlandı.

*Aminoasit karışımının içeriği hazırlanması planlanan besi ortamına bağlı olarak belirlenmektedir.

3.5.2 Mikrobiyolojik Metodlar

3.5.2.1 Sterilizasyon

Isıya dayanıklı çözeltiler ve büyüme ortamları kullanılmadan önce otoklavlandı (20 dakika, 121 °C ve 2 bar). Pipet uçları (40 dakika, 121 °C ve 2 bar) otoklavlanarak steril edildikten sonra kullanıldı. Sıcaklığa dayanıklı olmayan çözeltiler stok çözelti olarak hazırlandı ve 0.2 µm membran filtreden geçirilerek steril edildi.

3.5.2.2 Bakteri ve Maya Hücrelerinin İnkübasyon ve Saklama Koşulları

E. coli hücreleri 37 °C'de sıvı LB besi ortamında inkübe edildi. Karıştırma hızı 250 rpm olarak belirlendi. Plazmid taşıyan hücreler için büyüme ortamına ilgili antibiyotikler, son konsantrasyonları 75 µg/ml ampisilin, 30 µg/ml kanamisin olacak şekilde eklendi. Hücre süspansiyonu ilgili antibiyotiği içeren LB agar petrilere transfer edildi, gece boyunca (yaklaşık 16 saat) 37 °C'de inkübe edildi ve plate ortamında tek düşen koloniler seçildi. Kısa süreli saklama amacıyla petrilere veya hücre süspansiyonları 4°C'de buzdolabında bekletildi. Uzun süreli depolama için sıvı

kültür ortamında büyütülen hücreler ile % 25 gliserol içerecek şekilde stoklar hazırlanarak -86 °C’de saklandı.

S.cerevisiae hücreleri ise 30°C’de YPDA veya SD sıvı/plate besisi ortamında büyütüldü. Bakteri hücrelerinde olduğu gibi kısa süreli saklama amacıyla petriler veya hücre süspansiyonları +4°C’de buzdolabında saklanırken, uzun süreli depolama için sıvı kültür ortamında büyütülen hücreler ile % 25 gliserol içerecek şekilde stoklar hazırlanarak -80 °C’de saklandı.

3.5.2.3 Kimyasal Kompetent *E.coli* Hücrelerinin Hazırlanması

Bakterilerin çoğu yabancı DNA moleküllerini büyüme ortamından hücre içine alabilir. Ancak bu yolla alınan DNA hücre tarafından parçalanır. Eğer DNA molekülü bir plazmid ise ve plazmidin replikasyon orijini konakçı tarafından tanınıyorsa, plazmid parçalanmaz ve hücrede çoğalabilir. Laboratuvar koşullarında *E.coli* ve diğer birçok bakteri türünün ise normal şartlarda hücre içine alabileceği DNA miktarı sınırlıdır. Transformasyon etkinliğinin artırılması için fiziksel ve/veya kimyasal işlemlere maruz kalmış hücreler kompetent olarak isimlendirilmektedir. Kimyasal kompetent hücre hazırlanmasında kullanılan CaCl_2 ’ün, DNA’nın negatif yükünü maskeleyiği ve hücre duvarında porların açılmasını sağladığı düşünülmektedir. Bu işlem sırasında DNA’nın hücreye girişini sağlayan 42°C’de gerçekleştirilen ısı şokudur. Kimyasal kompetent hücre hazırlanmasında şu işlemler uygulandı (57).

E.coli hücreleri -86°C’deki stoktan LB agar besisi yerine transfer edildi ve 37°C’de ~16 saat inkübasyona bırakıldı. Inkübasyonun ardından plate ortamında tek düşen bir koloni seçilerek 10 mL’lik steril cam tüp içerisinde 2 mL sıvı LB besisi ortamına inoküle edildi ve çalkalayıcı inkübatörde 37°C’de ~16 saat inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sonucu çoğalmış bakteri süspansiyonu 1:100 seyreltme oranında 100 mL sıvı LB besisi ortamına transfer edildi ve çalkalayıcı inkübatörde 37°C’de O.D₆₀₀ değeri 0,3-0,5 ulaşınca kadar, yaklaşık 2-2,5 saat, inkübasyon devam edildi. Inkübasyon süresinin bitiminde bakteri süspansiyonu 4000 rpm’de 5 dk santrifüjlendi ve bakteri pelleti elde edildi. Pellet, buz üzerinde soğutulmuş ve taze hazırlanmış olan 0.1 mM CaCl_2 çözeltisinden 20 mL eklenerek resüspande edildi ve 1 saat buz üzerinde bekletildi. Buz üzerinde inkübasyonu takiben bakteri süspansiyonu 4000 rpm’de 5 dk santrifüjlendi ve supernatant uzaklaştırıldı. Pellet üzerine 2 mL, %15 gliserol içeren önceden soğutulan

0.1 mM CaCl₂ çözeltisi konularak, yeniden süspande edildi. Hücreler, daha sonra 100 µl olacak şekilde önceden soğutulmuş ependorf tüplerine porsiyonlanarak -86°C’de saklandı.

3.5.2.4. Kimyasal Kompetent *E. coli* Hücrelerine Transformasyon

-86°C’de depolanan 100 µl hacmindeki kimyasal kompetent hücreler buz üzerine alındı ve buz üzerinde yaklaşık olarak 15 dakika kendiliğinden erimeleri için inkübasyona bırakıldı. Hücreler buz üzerinde eritildikten sonra kompetent hücre içeren her bir tüpe 20-100 ng plazmid DNA ilave edildi. Örnekler buz üzerinde 30 dk, 42°C’de 75 saniye ve buz üzerinde 5 dk inkübasyon adımları sırasıyla uygulandı. Hücrelere 800 µL LB sıvı besi ortamı eklendi ve 37°C’de 1 saat karıştırılmadan inkübe edildi. Inkübasyonun ardından örnekler 8000 rpm’de 2 dk santrifüjlendi ve besi ortamının bir kısmı yaklaşık 600 µL hacmi uzaklaştırıldı. 100 µL hücre süspansiyonu seçici antibiyotik içeren LB agar besi ortamına ekildi. Hücreleri içeren LB plateleri 37°C’de ~16 saat inkübasyona bırakıldı.

3.5.2.5 Bakteriden Plazmid DNA İzolasyonu (Mini-prep)

E. coli’den plazmid DNA izolasyonu için Fermentas marka GeneJET™ Plazmid Miniprep kit kullanıldı. ~16 saat inkübe edilen sıvı LB besi yerinde 1.5 ml hacmindeki hücre süspansiyonu 8000 rpm’de 2 dk santrifüjlendi. Plazmid DNA izolasyonları kitte verilen protokole uygun olarak yapıldı. İzole edilen plazmid DNA’ları -20°C’de saklandı.

3.5.2.6 Maya Hücrelerinin Transformasyonu ve Ko-Transformasyonu

Transforme edilecek *S. Cerevisiae* maya suşu AH109 -86°C’deki stoktan YPDA agar besi yerine transfer edildi ve 30°C’de yaklaşık 16 saat inkübasyona bırakıldı. Gece boyu inkübasyonun ardından plate ortamında tek düşen bir koloni seçilerek 1.5 mL’lik sıvı YPDA besi yerine inoküle edildi. Maya hücreleri 30°C’de gece boyu 250 rpm’de karıştırılarak büyütüldü. Ertesi gün büyüyen maya hücrelerinden 200 µl alınıp 1:100 oranında seyreltme yapılarak 2ml hacmindeki sıvı YPDA besi yerine inokülasyon yapıldı ve hücreler 30°C’de 4-6 saat çalkalanarak inkübasyona devam edildi. Inkübasyon süresinin bitiminde hücreler steril ependorf tüplerine transfer edilerek 7000 rpm’de 20 sn santrifüj edildi. Santrifüj işlemini takiben süpernatant uzaklaştırıldı ve hücre pelleti önce 1 ml distile su ardından ile 1ml 1XLIÖAC/1XTE

ile yıkandı. Aynı koşullarda santrifüj işlemi yapılarak süpernatant uzaklaştırıldı ve ardından hücre pelleti 100 µL hacimde 1XLIÖAC/1XTE içerisinde resuspende edildi hücre süspansiyonu bir transformasyon için 50 µl'lik hacimlerde iki ependorf tüpe paylaştırıldı. 1 µl transforme edilmek istenen plazmid DNA'sı, 10 mg/mL taşıyıcı DNA (sonicated salmon sperm DNA) ve 400 ul %40 PEG4000X1XLIÖAC/1XTE eklendi örnekler yavaşça alt-üst edilerek karıştırıldı ve ilk olarak 30°C'de 30 dk ve ardından 42°C'de 20 dk inkübe edildi. İnkübasyon süresinin bitiminde örnekler 5000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. 200 µl sıvı YPDA eklenerek hücre pelleti resuspende edildi ve 30°C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin dolmasından sonra 100 µl hacminde hücre süspansiyonu seçici besi ortamına ekildi ve 30°C'de 3-5 gün inkübe edilerek transformantların büyümesi takip edildi.

3.5.2.7 Mayadan Protein Ekstraksiyonu (Alkali Lizis/TCA Çöktürmesi)

Maya hücrelerinden protein ekstraksiyonu için alkali lizis/TCA çöktürmesi kullanılmıştır. Bu amaçla seçici besi ortamında büyütölen ilgili maya hücresine ait tek düşen bir koloni 1.5 ml uygun seçici költür ortamına transfer edildi ve 30°C'de ~16 saat 250 rpm'de karıştırılarak büyütöldü. Ertesi gün büyüyen maya hücreleri steril ependorf tüplerine transfer edildi ve 4000 rpm'de 1 dk santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı. Hücre pelleti buz üzerinde soğutulmuş 200 µL lizis tamponu içerisinde vortekslenerek tamamen resüspanse edildi ve buz üzerinde 10 dk inkübe edildi. İnkübasyon sırasında örnekler belirli aralıklarla vortekslenerek karıştırıldı. Ardından hücre süspansiyonu üzerine soğutulmuş olan %50 TCA çözeltisinden 200 µL eklendi ve örnekler hafifçe vortekslenerek buz üzerinde 10 dk inkübe edildi. İnkübasyon süresinin bitiminde örnekler 14000 rpm'de 1 dk santrifüjlendi ve supernatant uzaklaştırıldı. Pelet üzerine buz üzerinde soğutulmuş aseton eklendi ve vortekslenerek resuspende edildi. Örnekler 14000 rpm'de 1 dk santrifüjlendi. Aseton ile yıkama işlemi iki kez tekrar edildi. Son santrifüj işleminin ardından supernatant uzaklaştırıldı, pellet tamamen kurutulmalarının ardından daha sonra kullanılmak üzere herhangi bir tampon eklemekten -20 °C'de saklandı.

3.5.3 Moleküler Biyoloji Teknikleri

3.5.3.1 DNA Fragmentlerinin Standart Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction; PCR) ile Çoğaltılması

PCR, hedef bir DNA molekülünün *in vitro* koşullarda enzimatik olarak amplifikasyonu esasına dayanır (59). DNA'nın denatürasyonu, primerlerin bağlanması ve enzimatik DNA sentezi (uzama) adımlarının tekrarlanmasıyla DNA fragmentleri üssel olarak çoğaltılır. DNA molekülü denatüre edildikten sonra, primerler tek iplikli DNA molekülleri üzerinden kendilerine tamamlayıcı olan bölgelere bağlanır. DNA polimeraz enzimi, uygun tampon ve dört çeşit deoksiriboz nükleozid trifosfat (dNTP) varlığında, primerin 3' hidroksil ucundan başlayarak zincirin uzamasını sağlar.

PCR 25 µl hacimde, termal cycler'da gerçekleştirildi. PCR için kullanılan reaksiyon kompozisyonları şu şekildedir; reaksiyon 50-100 ng kalıp DNA, 2.0 U Taq DNA polimeraz, 1 U ID ProofDNA polimeraz, 1X reaksiyon tamponu, 2.0 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP karışımı ve her bir primerden 0.4 µM olacak şekilde uygulandı. Amplifikasyon için uygulanan reaksiyon koşulları Tablo 7'de verilmiştir.

Standart PCR reaksiyonu şu şekilde uygulandı:

Tablo 7. DNA amplifikasyonu için kullanılan PCR reaksiyonu koşulları.

PCR Basamağı	Sıcaklık-Süre
Başlangıç Denatürasyonu (Initial Denaturation)	94°C-4 dak
Denatürasyon (Denaturation)	94°C-30 sn
Primer bağlanması (Annealing)	64°C-40 sn
Uzama (Extention)	72°C-2dk
Son uzama (Final Extention)	72 °C-10 dk

PCR reaksiyonunda denatürasyon-uzama basamakları 35 döngü olarak uygulandı.

Primerlerin optimum bağlanma sıcaklığı (TB) GC-içeriği ve primer uzunluğu dikkate alınarak aşağıdaki formül yardımıyla hesaplandı (Chester and Mars-hook, 1993).

$$T_M = 69,3 + 0,41 \cdot (\%GC) - 650/n$$

(T_M Primer erime sıcaklığı (°C), % GC Primerlerin GC-içeriği (%), n Primerin içerdiği nükleotid sayısına karşılık gelmektedir)

$$T_B = (T_{B1} + T_{B2})/2 - 3^\circ C$$

(T_B Bağlanma sıcaklığı (°C), T_{B1} ve T_{B2} 5' ve 3' primerlerin erime sıcaklıklarına karşılık gelmektedir)

3.5.3.2 Çift İplikli DNA'nın Restriksiyon Endonükleazlarla Kesimi

Restriksiyon enzimleri (RE) (EC 3.1.2.1.4) ilk kez Bertani ve Weigle tarafından bakteriyofaj λ ile infekte edilen *E. coli* bakterisinde yapılan çalışmalarda gözlenmiştir (60). Bu enzimler, çift sarmallı DNA moleküllerini özgün nükleotid tanıma dizilerinden kesen endonükleazlardır. Bu enzimler etki özellikleri bakımından Tip I, Tip II ve Tip III olarak sınıflandırılırlar, ancak substrat DNA'larına özgün olmaları nedeniyle gen mühendisliğinde yalnızca Tip II enzimleri kullanılmaktadır.

Restriksiyon enzimleri deoksiriboz ile fosfat grupları arasındaki fosfodiester bağlarına etki etmektedir ve bu nedenle kesim sonucu 5'-fosfat ve 3'-hidroksil uçları oluşmaktadır (57). Deneylerimizde restriksiyonel kesim reaksiyonları; toplam reaksiyon hacmi 15-20 μ l olacak şekilde en fazla 2 μ g plazmid DNA'sı, ilgili restriksiyon enzimi/enzimleri ile uygun reaksiyon tamponu varlığında 1-2 saat enzimin aktivite gösterdiği sıcaklık derecesinde (genellikle 37 °C) muamele edildi. İki restriksiyon enziminin birlikte kullanıldığı durumlarda enzimlerin tampon içerikleri ve aktivite gösterdikleri sıcaklıklar göz önüne alınarak uygun kesim reaksiyonu koşulları sağlanmıştır. Kullanılan restriksiyon enzimlerinin toplam hacmi, reaksiyon hacminin %10'unu aşmayacak şekilde hesaplandı. Bu şekilde restriksiyon enzimlerinin depolanması için kullanılan gliserinin aktiviteyi etkilemesi engellendi. Restriksiyon enzimleri ile muamele edilen örnekler uygun konsantrasyonda agaroz jel elektroforezine uygulandı ve kesim ürünleri UV ışık altında görüntülenerek analiz edildi.

3.5.3.3 Agaroz Jel Elektroforezi

DNA moleküllerinin ayrıştırılmasında, tanımlanmasında ve saflaştırılmasında yaygın olarak kullanılan metodlar poliakrilamid (PAGE) ve agaroz jel

elektroforezleridir (57). Bu metodların ilkesi; yapısındaki fosfat grubu nedeniyle negatif yüke sahip olan DNA moleküllerinin elektriksel alanda pozitif elektroda doğru hareket etmesidir. Bu işlemde jel porları nedeniyle küçük DNA molekülleri daha hızlı hareket ederler. DNA'nın jelde görünür hale gelebilmesi Et-Br'ün interkalasyon özelliği ile DNA bağları arasına bağlanarak 300 veya 360 nm'de ışığı absorbe etmesi sonucu fluoresan etki göstermesi ile gerçekleşmektedir. Bu etki DNA konsantrasyonuna bağlı olarak kuvvetli veya zayıf olabilir. Deneylerimizde DNA moleküllerinin görüntülenmesinde aksi belirtilmediği takdirde 1XTAE tamponu içerisinde kaynatılarak çözüldü ve 50-60°C'ye kadar soğutulmasının ardından jel ünitesine yayılan agarozun katılaşması beklendi. DNA örnekleri uygun DNA moleküler ağırlık standardı ile birlikte yine uygun hacimde DNA jel yükleme tamponu eklenerek jele yüklendi. DNA örneklerinin jelde görüntülenmesi amacıyla 0.5 µg/ml Et-Br içeren boyama solüsyonu hazırlandı ve jel 20 dk Et-Br solüsyonu ile boyandıktan sonra destile su ile yıkanarak görüntüleme sistemi yardımıyla görüntülendi.

3.5.3.4 DNA Fragmentlerinin Agaroz Jelden Ekstraksiyonu

Uzun dalga boylu UV ışık altında görüntülenen DNA fragmentleri temiz bir bistüri yardımıyla jelden kesildi ve steril eppendorf tüplerine transfer edildi. DNA'nın agaroz jelden ekstraksiyonu Nucleospin®II kiti kullanılarak kitle verilen protokole uygun koşullarda yapıldı. Jelden ekstrakte edilen DNA'lar -20 °C'de saklandı.

3.5.3.5 Ligasyon

Ligasyon için restriksiyon enzimleri ile muamele edilmiş insert (hedef DNA bölgesi):vektör oranı 1:3 mol oranında olacak şekilde reaksiyon hazırlanmıştır. Reaksiyon 15 µl hacimde gerçekleştirildi. Reaksiyon karışımına 1 U T4 DNA ligaz ve 1X konsantrasyonda enzimin ticari olarak satın alındığı firmanın önerdiği tampon eklendi. Reaksiyon karışımı gece boyu 16 °C'de inkübe edildi. Kimyasal kompetent *E.coli* hücrelerinin transformasyonu için ligasyon karışımının 10 µl'si kullanıldı.

3.5.3.6 Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroföresi (SDS PAGE)

SDS-PAGE (Laemmli, 1970) için jel Tablo 8’de belirtildiği şekilde hazırlandı;

Tablo 8. %12 SDS-PAGE jel hazırlanmasında kullanılan çözeltiler.

	Resolving Jel (Ayrırma) (%12)	Stacking Jel (Yükleme) (%5)
Tampon	3.8 ml	0,63 ml
%30 (w/v) Akrilamid/Bisakrilamid Çözeltisi (19:1)	6 ml	0,83 ml
H₂O	4,9 ml	3,4 ml
Tetrametiletildiamin	0,006 ml	0,005
Amonyum Persülfat (%10)	0,15 ml	0,05
SDS (%10)	0.15 ml	0,05

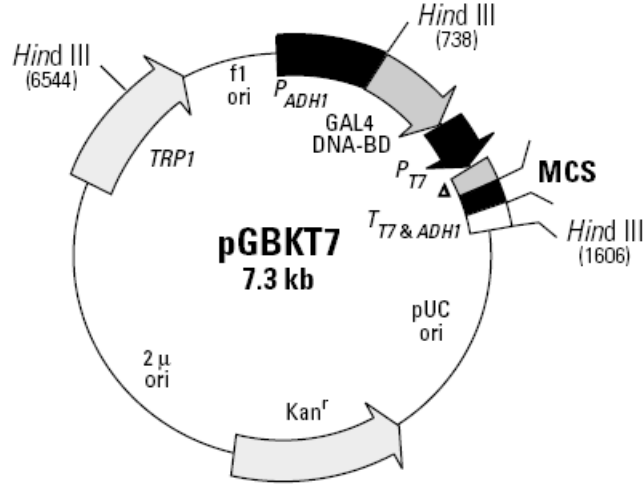
SDS-PAGE’e uygulanacak örnekler 1:1 oranında 2XSDS-PAGE örnek yükleme tamponu ile karıştırıldı ve 95 °C’de 5 dk inkübe edildi. SDS-PAGE’e 10 µl örnek uygulandı ve 30 mA, 100 V altında analiz edilen proteinin moleküler büyüklüğüne bağlı olarak 1.5-2 saat jelde yürütüldü.

3.5.4 Maya 2 Hibrit Deneyleri

3.5.4.1 hADA2A ve hADA2B Proteinlerini Kodlayan Gen Bölgelerinin Maya Plazmidine Klonlanması

Protein-protein etkileşimlerinin maya 2 hibrit yöntemi ile belirlenmesi planlanmıştır. Çalışma kapsamında daha önce Y2H taraması ile hADA3 proteini ile etkileşimleri ilk kez tarafımızdan rapor edilen (5) fosfataz grubu proteinlerden PPP1R7 ve PPP2R5D ile transkripsiyon faktörleri olan PHF21A ve AATF proteinlerinin hADA3 ile aynı komplekste yer alan hADA2A ve hADA2B proteinleri ile etkileşimlerinin karakterize edilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla *hADA2A* ve *hADA2B* genlerinin protein kodlayan nükleotid dizilerinin maya bağlanma domain (BD) plazmidi olan pGBKT7 plazmidine (Şekil 2) klonlanarak,

aktivasyon domain (AD) içerisinde klonlanmış olan aday proteinler ile etkileşimlerinin maya hücrelerinde test edilmesi planlanmıştır. Şekil 2’de görüldüğü gibi pGBKT7 vektörü triptofan (Trp) prototrof bir vektör olup kanamisin (KAN) direnç geni içermektedir.



Şekil 2. pGBKT7 vektörünün gen haritası.

hADA2A PCR ürünü, PCR işleminde kullanılan özgün primerlerin taşıdığı BamHI/PstI 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, insert ve vektör için beklenen spesifik fragmanlar agaroz jelden ekstrakte edilmiştir. Ekstraksiyon sonucu elde edilen DNA fragmanları agaroz jelde tekrar kontrol edilmiştir.

PCR yöntemi ile çoğaltılan *hADA2B* proteininin kodlayan gen bölgesi, PCR amplifikasyonu için kullanılan özgün primerlerin taşıdığı *EcoRI/BamHI* 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 ardından 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, insert ve vektör için beklenen spesifik fragmanlar klonlamada kullanılmak üzere agaroz jelden ekstrakte edilmiştir. Ekstraksiyon sonrası elde edilen DNA fragmanlarının kontrolü örneklerin agaroz jelde ayrıştırılmasıyla yapılmıştır.

Restriksiyonel kesim analizleri ve agaroz jel ekstraksiyonlarının ardından BD vektörü ile hADA2A, hADA2B fragmanları T4 DNA Ligaz enzimi ile 16°C'de gece boyu ligasyon reaksiyonuna bırakılmıştır. Ligasyon reaksiyonunu takiben, kimyasal olarak kompetent hale getirilmiş olan *E.coli* DH5- α bakteri hücreleri ligasyon reaksiyon ürünleri ile transforme edilmiştir. Transformantlar doğru klonu alabilen bakteri hücrelerini belirleyebilmek amacıyla 30 µg/mL konsantrasyonunda kanamisin antibiyotiği içeren LB agar besiyerlerine transfer edilmiş ve kültürler 37°C'de ~16 saat inkübe edilmiştir. Agar ortamında büyüyen koloniler yine aynı konsantrasyonda kanamisin antibiyotiği içeren sıvı LB besiyerine 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.

3.5.4.2 AH109 Maya Şuşunun pGBKT7-hADA2A ve hADA2B Rekombinant Plazmidleri ile Transformasyonu ve Proteinlerin Ekspresyonları

Y2H yöntemi plazmidin konakçı maya hücre içerisinde ekspresyonunu gerektirmektedir. Bu nedenle *S. cerevisiae* AH109 maya şuşu pGBKT7- hADA2A ve hADA2B klonları ile transforme edilmiş ve western blot yöntemi ile anti-Myc mouse monoklonal antikor kullanılarak sözü edilen proteinlerin ekspresyonları analiz edilmiştir. hADA2A, hADA2B proteinleri için gözlenen bandların beklenen büyüklükte (sırasıyla ~51, 49 kDa) olduğu belirlenmiş ve proteinlerin maya içerisinde başarılı bir şekilde eksprese edildiği verifiye edilmiştir.

3.5.4.3 hADA2A ve hADA2B Proteinlerinin Mayada Toksisite Testleri

hADA2A ve *hADA2B* genlerinin maya içerisinde ekspresyonu sonucu sentezlenen sırasıyla hADA2A ve hADA2B proteinlerinin mayada herhangi bir toksik etkisi olup olmadığını belirlemek amacıyla toksisite testi yapılmıştır. Bu amaçla

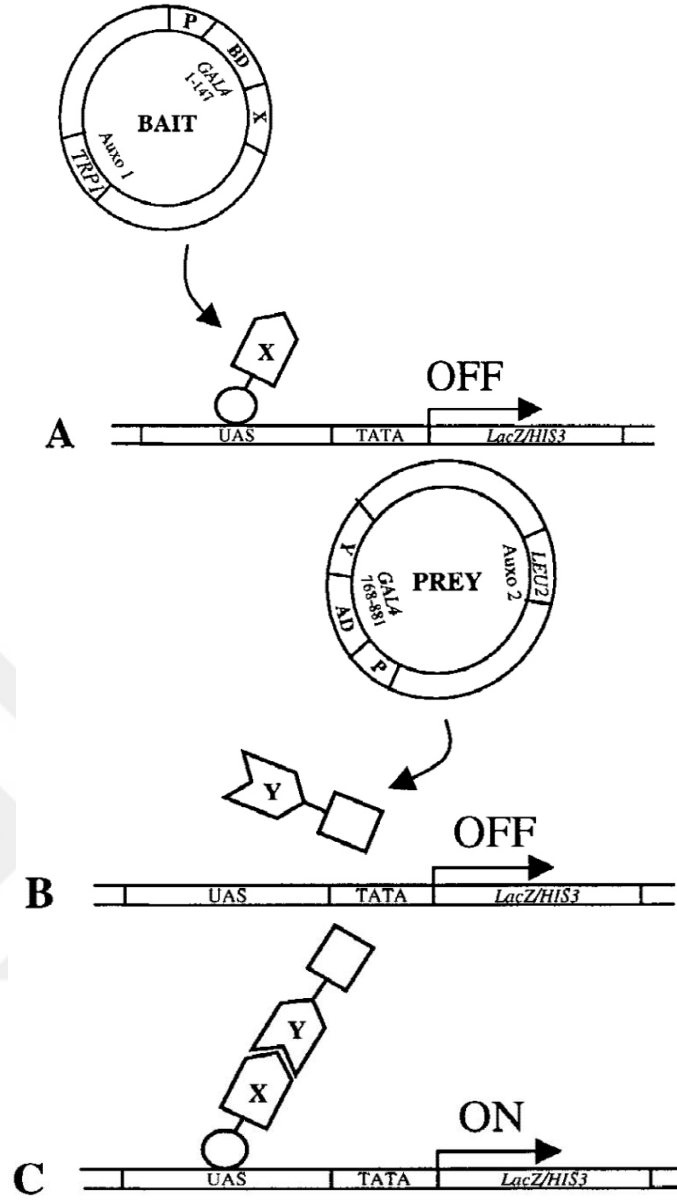
AH109 maya suşu boş vektör (pGBKT7) ve bait vektör (pGBKT7-hADA2A/ - hADA2B) ile ayrı ayrı transforme edildikten sonra transformantlar, klonlamada pGBKT7 vektörü triptofan prototrof bir vektör olduğu için SD/-Trp seçici besi ortamına transfer edilmiştir. Plateler 30°C’de 2-3 gün inkübasyonun ardından koloni sayıları ve koloni büyüklükleri bakımından karşılaştırılarak değerlendirmeler yapılmıştır.

3.5.4.4 *hADA2A* ve *hADA2B* Genlerinin Mayada Oto-aktivasyon Testleri

hADA2A ve *hADA2B* proteinlerinin herhangi bir etkileşim partneri olmaksızın AH109 maya suşundaki raportör genleri kendiliğinden aktive edip etmediğini belirlemek üzere bait (avcı) 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 platelerdeki koloni gelişimi izlenmiştir.

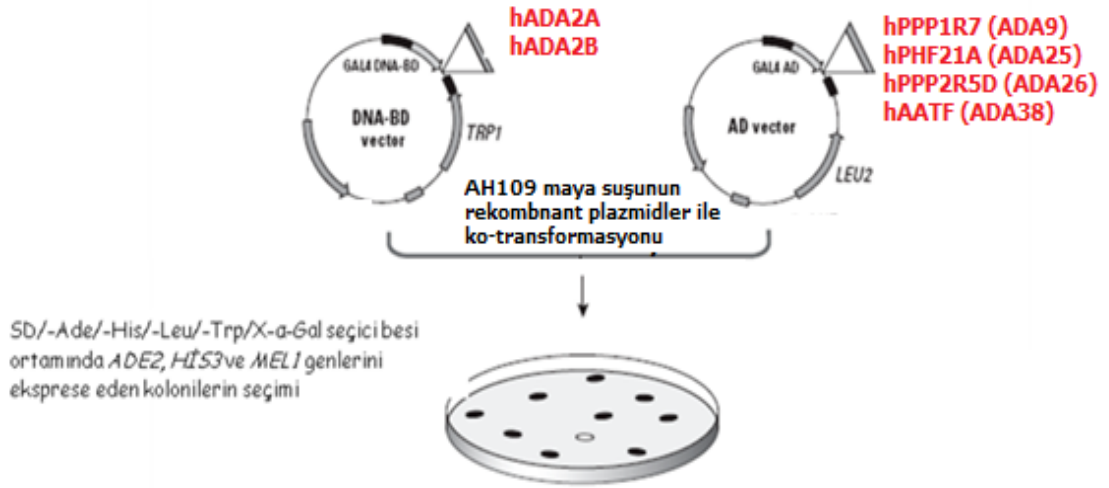
3.5.4.5 Protein-Protein Etkileşimlerinin Y2H Yöntemi Belirlenmesi

Metodun temeli, birçok transkripsiyon faktörünün birbirlerinden fiziksel olarak ayrılabilen iki bölgeden oluşması özelliğine dayanmaktadır. Bunlar, bölge-spesifik DNA-bağlanma bölgesi ve transkripsiyon aktivasyon bölgesidir (Şekil 3) (61, 62). Bu bölgelerden DNA-bağlanma bölgesi, (Upstream Activating Sequences: UAS) adı verilen spesifik promotor dizilerinde transkripsiyon faktörlerinin hedeflenmesinde görev alırken, transkripsiyon aktivasyon bölgesi ise transkripsiyon kompleksinin oluşumuna yardımcı olmaktadır. Ticari olarak satın alınan insan fetal beyin cDNA kütüphanesi insan cDNA’larının maya GAL4 AD plazmidi olan pGADT7-Rec plazmidine klonlanması yolu ile oluşturulmuştur. Bu nedenle ekibimiz tarafından Y2H yönteminin gerektirdiği şekilde etkileşimleri belirlemek üzere *hADA3* proteinini kodlayan gen bölgesi maya GAL4 BD plazmidi olan pGBKT7’ye (Şekil 3) klonlanmıştır.



Şekil 3. Y2H yönteminin prensibi (62).

Etkileşimlerin test aşaması için AH109 maya hücreleri pGBKT7-hADA2A ve pGBKT7-hADA2B rekombinant plazmidleri sırasıyla pGADT7-hADA9, -ADA25, -ADA26, -ADA38 rekombinant plazmidleri ile ko-transforme edilmiştir. Basamaklar Şekil 4’te verilmiştir.



Şekil 4. AH109 maya suşunun rekombinant plazmidler ile ko-transformasyonu

Maya AH109 suşu farklı GAL4 sorumluluğunda olan UAS ve TATA spesifik dizilerinin kontrolü altında olan dört farklı raportör gen içermektedir (Şekil 5). Bu genler;

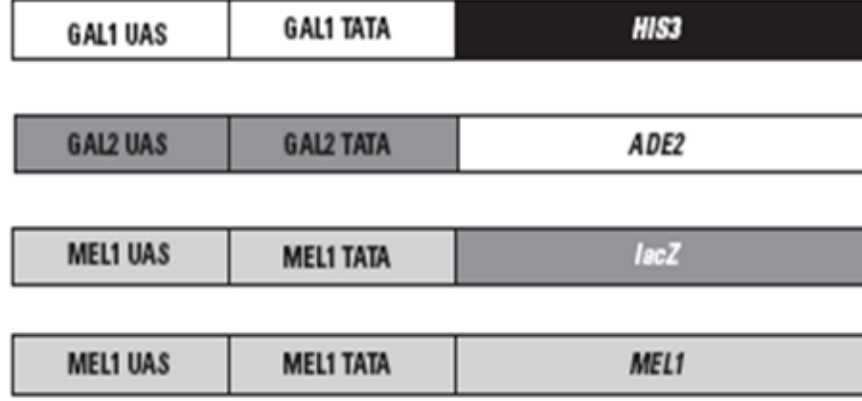
HIS3: AH109 histidin (His) sentezini gerçekleştirememektedir ve bu nedenle temel aminoasitleri içermeyen seçici besi ortamında büyüyemezler. Ancak bait (avcı) ve prey (av) proteinleri etkileştiği durumda GAL4 sorumluluğunda olan *His3* ekspresyonu gerçekleşebileceği için hücreler His sentezleyebilecek 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-galaktozidaz enzimini kodlayan bir gendir. İki hibrit etkileşiminin bir sonucu olarak mayada α-galaktozidaz geni eksprese olur ve salgılanır. *MEL1* geninin eksprese edildiği maya kolonileri ortamda X-α-gal kromojenik substratı varlığında mavi renkli fenotipte büyüme gösterirler.

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

AH109 (Mating Partner) - raportör



Şekil 5. AH109 maya suşlarında izlenen raportör genler

3.5.4.6 Etkileşimlerin hADA2A ve hADA2B' ye Spesifik Olduğunun Kontrolü

Y2H taraması sonucu elde edilen pozitif kolonilerin etkileşimlerinin hADA2A ve hADA2B'ye spesifik olduğunu doğrulamak amacıyla AH109 maya hücreleri, fonksiyonu ve hücresel lokalizasyonu hADA2'den farklı bir protein olan glutaminaz etkileşim proteini (Glutaminase Interacting Proteini: GIP) kodlayan cDNA dizisini içeren DNA BD plazmidleri aynı koşullarda fakat birbirinden bağımsız olarak aday etkileşim partnerlerini içeren maya AD plazmidleri ile ko-transforme edilmiştir (63). BD plazmidi Trp besin belirteci ve AD plazmidi Leu besin belirteci içerdiği için transformantlar öncelikle her iki plazmidi içeren hücrelerin seçimi amacıyla SD/-Trp/-Leu besin ortamına transfer edilmiştir. Etkileşimlerin test edilmesi için SD/-Ade/-His/-Trp/-Leu/X- α -Gal seçici besin ortamına yapılan ekimlerde bu hücrelerin de ekimi yapılmıştır.

4. BULGULAR

4.1 hADA2A ve hADA2B Proteinlerini Kodlayan Gen Bölgelerinin PCR ile Çoğaltılması

hADA2A proteinini eksprese ettiği daha önceden tarafımızdan test edilmiş olan pcDNA3-hADA2A rekombinant plazmidi PCR için kalıp olarak kullanılmış ve hedef DNA fragmanı özgün olarak tasarladığımız primer çifti ile amplifiye edilmiştir.

İnsan ADA2A gen bölgesi için spesifik primer çiftleri;

hADA2A (isoform A) Forward 1: 5'-cggc gg atc c ga atg gac cgt tt-3'

hADA2A (isoform A) Forward 2: 5'-cggc catatg atg gac cgt tt-3'

hADA2A (isoform A) Reverse: 5'-cata ctgcag gga gcc tta gcc ttt a-3'

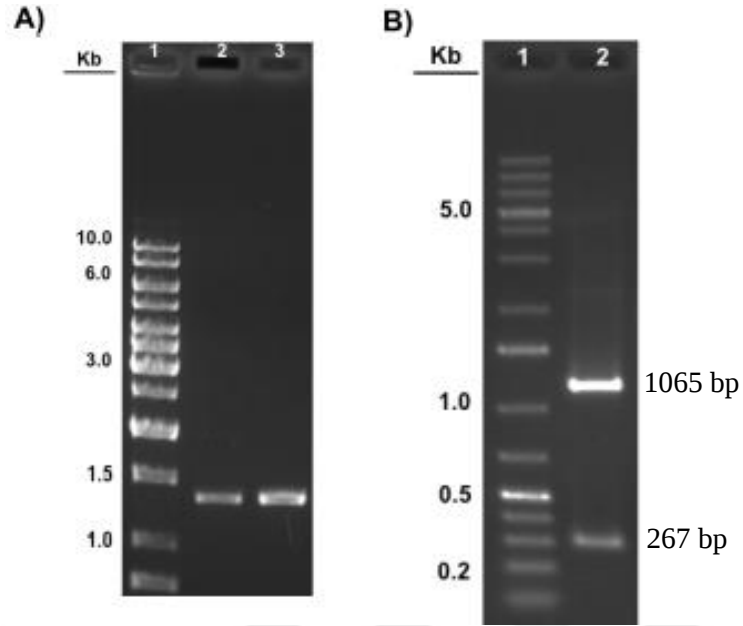
İnsan ADA2B gen bölgesi için spesifik primer çiftleri;

hADA2B Forward 1: 5'-cggc gaa ttc aag atg gcggagctggggaa-3'

hADA2B Forward 2: 5'-cggc gaa ttc atg gcggagctggggaa-3'

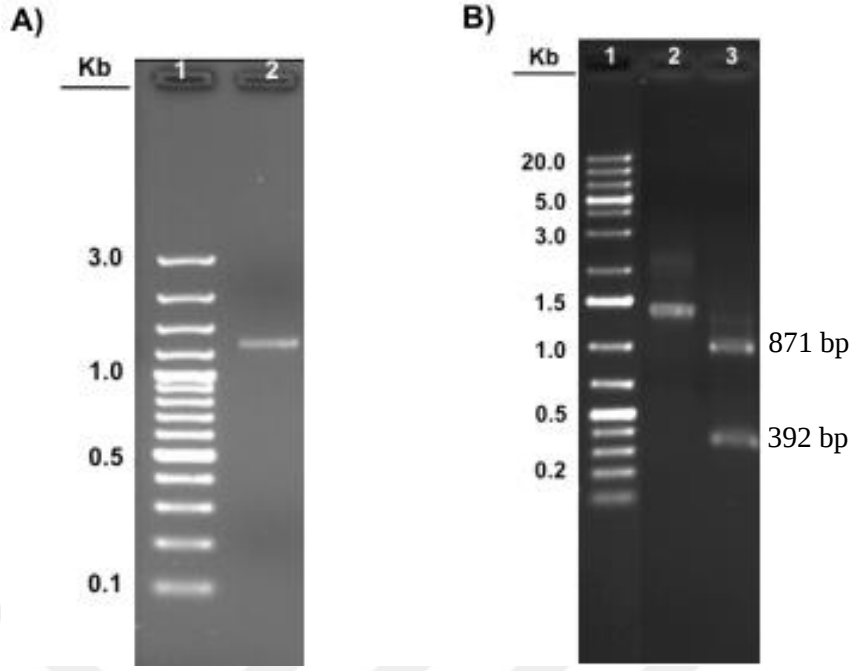
hADA2B Reverse: 5'-cata ggatcc agc ttc aag acg cgt-3' şeklindedir.

PCR işlemi için moleküler büyüklüğü hADA2A ile çok benzer olan ve daha önce amplifiye ettiğimiz hADA3A kontrol amacıyla kullanılmıştır. PCR sonrasında elde edilen özgün hADA2A DNA fragmanı Şekil 6'da verilmiştir (Şekil 6A). PCR amplifikasyon ürünü DNA fragmanı agaroz jelde moleküler büyüklüğü bakımından analiz edildiği gibi hADA2A'nın ORF bölgesinde bir adet tanıma dizisi olduğu bilinen *EcoRI* restriksiyon kesim analizi ile de özgünlüğü test edilmiş (Şekil 6B) ve hedeflenen gen bölgesinin başarılı bir şekilde amplifiye edildiği gözlenmiştir.



Şekil 6. hADA2A proteinini kodlayan gen bölgesinin PCR amplifikasyonu. A) 1. uygulama; DNA moleküler ağırlık standartı, 2. uygulama; hADA3 kontrol PCR ürünü, 3. uygulama; hADA2A PCR ürünü B) hADA2A PCR ürününün restriksiyonel kesim analizi. 1. uygulama; DNA moleküler ağırlık standartı, 2. uygulama; hADA2A/*EcoRI* restriksiyon kesim fragmanları.

hADA2B proteinini eksprese ettiği daha önceden tarafımızdan test edilmiş olan pcDNA3-hADA2B rekombinant plazmidi PCR için kalıp olarak kullanılmış ve hedef DNA fragmanı NCBI veri tabanına göre özgün olarak tasarladığımız primer çifti kullanılarak amplifiye edilmiştir. PCR sonrasında elde edilen özgün hADA2B fragmanı (Şekil 7A) ve bu fragman içerisinde tanıma dizisi olduğu bilinen *PstI* restriksiyon kesim analizi sonuçlarından (Şekil 7B) görüldüğü gibi hedeflenen gen bölgesi başarılı bir şekilde amplifiye edilmiştir.



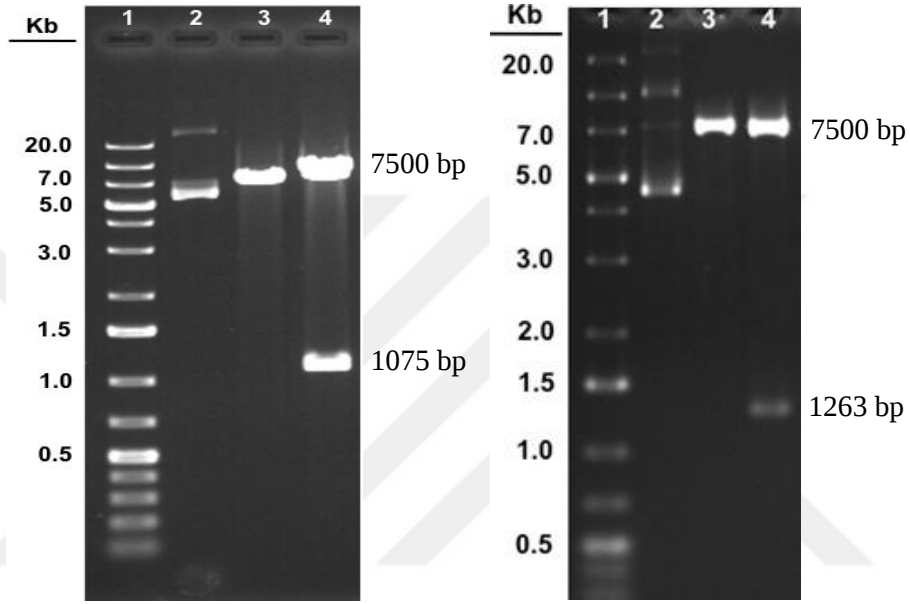
Şekil 7. hADA2B proteinini kodlayan gen bölgelerinin amplifikasyonu. A) 1. uygulama; DNA moleküler ağırlık standartı, 2. uygulama; hADA2B PCR ürünü B) hADA2B PCR ürününe ait restriksiyonel kesim analizi. 1. uygulama; DNA moleküler ağırlık standartı, 2. uygulama; hADA2B PCR ürünü, 3. uygulama; hADA2B/*Pst*I restriksiyon kesim fragmanları

4.2 hADA2A ve hADA2B Proteinlerini Kodlayan Gen Bölgelerinin Maya Plazmidine Klonlanması

hADA2A PCR ürünü, PCR işleminde kullanılan özgün primerlerin taşıdığı *Bam*HI/*Pst*I restriksiyon tanıma dizileri kullanılarak hADA2B proteinine kodlayan gen bölgesi ise, PCR amplifikasyonu için kullanılan özgün primerlerin taşıdığı *Eco*RI/*Bam*HI restriksiyon tanıma dizileri kullanılarak sırasıyla aynı restriksiyon enzimleri ile kesilmiş olan maya pGBKT7-BD vektörüne klonlanmıştır.

hADA2A, hADA2B fragmanları T4 DNA Ligaz enzimi ile enzimin aktivitesi için uygun tampon koşullarında 16°C’de yaklaşık 18 saat ligasyon reaksiyonuna bırakılmıştır. Ligasyon reaksiyonunu takiben, kimyasal olarak kompetent hale getirilmiş olan *E.coli* DH5- α bakteri hücreleri ligasyon reaksiyon ürünleri ile transforme edilmiştir. BD vektörü *KAN* direnç geni içerdiğinden transformantlar doğru klonu alabilen bakteri hücrelerini belirleyebilmek amacıyla kanamisin içeren (30 μ g/mL) LB agar besi ortamlarına transfer edilmiş ve kültürler 37°C’de ~16 saat inkübe edilmiştir. Agar ortamında büyüyen koloniler

yine kanamisin içeren (30 µg/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 bir klonlama ve kesim reaksiyonu için elde edilen fragmanlar analiz edildiğinde klonlamaların başarılı olduğu gözlenmiştir (8).



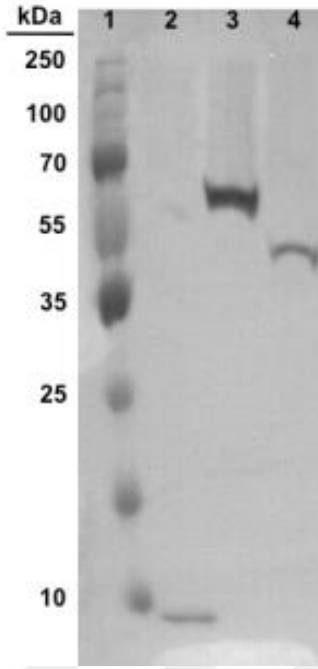
Şekil 8. pGBKT7-hADA2A/ -hADA2B klonlarının restriksiyonel kesim analizler. A) 1. uygulama; DNA moleküler ağırlık standartı, 2. uygulama; pGBKT7-boş kesilmemiş vektör. 3. uygulama; pGBKT7/*EcoRI* restriksiyon kesim fragmanları, 4.uygulama; pGBKT7-hADA2A/*EcoRI* restriksiyon kesim fragmanları B) 1. uygulama; DNA moleküler ağırlık standartı, 2. uygulama; pGBKT7-boş kesilmemiş vektör. 3. uygulama; pGBKT7-hADA2B/*EcoRI* + *BamHI* restriksiyon kesim fragmanları

Her klonlama için restriksiyonel analizler ile doğru inserti içerdiğinden emin olduğumuz birbirinden bağımsız üç 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 değerlendirerek mutasyon içermediği gözlenen klonlar ile daha ileri analizlere devam edilmiştir.

4.3 AH109 Maya Suşunun pGBKT7-hADA2A ve -hADA2B Rekombinant Plazmidleri ile Transformasyonu ve Proteinlerin Ekspresyon Analizleri

Protein-protein etkileşimlerinin Y2H yöntemi ile test edilmesinde kimyasal olarak kompetent hale getirilen *S. cerevisiae* AH109 suşu pGBKT7-hADA2A/ -hADA2B rekombinant plazmidleri ile transforme edilmiştir. pGBKT7-hADA2A/ -hADA2B klonları ile transforme edilmiş olan maya hücrelerinin Trp içermeyen seçici besi ortamında büyümesi beklenmektedir. Bu nedenle AH109 maya transformantları doğru klonu alabilen hücreleri belirleyebilmek amacıyla Trp içermeyen (SD/ -Trp) seçici besi ortamlarına transfer edilmiş ve kültürler 30°C’de ~2-3 gün inkübe edilmiştir. Agar ortamında büyüyen koloniler yine SD/ -Trp sıvı besi ortamına transfer edilerek 30°C’de gece boyu karıştırılarak inkübe edilmiş ve büyüyen kültürlerden plazmid DNA izolasyonları yapılmıştır. İzole edilen plazmid DNA’ları yukarıda ayrıntılı olarak belirtildiği şekilde her bir gen ürününe spesifik olan restriksiyon enzimleri ile kontrol edilmiştir.

Y2H yöntemi plazmidin konakçı maya hücre içerisinde ekspresyonunu gerektirmektedir. Bu nedenle western blot yöntemi ile anti-Myc mouse monoklonal antikor kullanılarak sözü edilen proteinlerin ekspresyonları analiz edilmiştir. hADA2A, hADA2B proteinleri için gözlenen bandların beklenen büyüklükte (sırasıyla ~51, 49 kDa) olduğu belirlenmiş ve proteinlerin maya içerisinde başarılı bir şekilde eksprese edildiği gösterilmiştir (Şekil 9).



Şekil 9. hADA2A ve hADA2B proteinlerinin maya içerisinde ekspresyonu. 1. uygulama; protein moleküler ağırlık standardı (kDa), 2. uygulama; pGBKT7, 3. Uygulama; pGBKT7-hADA2A, 4. uygulama; pGBKT7-hADA2B

4.4 hADA2A ve hADA2B Proteinlerinin Toksisite Testleri

Y2H yöntemi ile etkileşimlerinin test edilmesi amacıyla pGBKT7-hADA2A ve -hADA2B rekombinant plazmidleri oluşturulmuş ve maya *S. cerevisiae* hücrelerinde gen bölgelerinin ekspresyon analizleri yapılmıştır. Çalışmamız ilk olarak *hADA2A*, ve *hADA2B* genlerinin maya içerisinde ekspresyonu sonucu sentezlenen proteinlerin mayada toksik etkisi olup olmadığını belirlemek amacıyla toksisite testlerinin yapılması ile devam etmiştir. Bu amaçla AH109 maya suşu mayada eksprese edildikleri tarafımızca doğrulanan pGBKT7-hADA2A ve -hADA2B rekombinant plazmidleri ile transforme edilmiştir. Kontrol deneyleri için AH109 maya suşu boş vektör (pGBKT7) ve bait vektörler (pGBKT7-hADA2A/ -hADA2B) ile ayrı ayrı transforme edildikten sonra SD/-Trp seçici besiy ortamına transfer edilmiştir. Transformantlar 30°C’de 2-3 gün inkübasyonu takiben koloni sayıları ve koloni morfolojileri bakımından fenotipik olarak karşılaştırılmıştır.

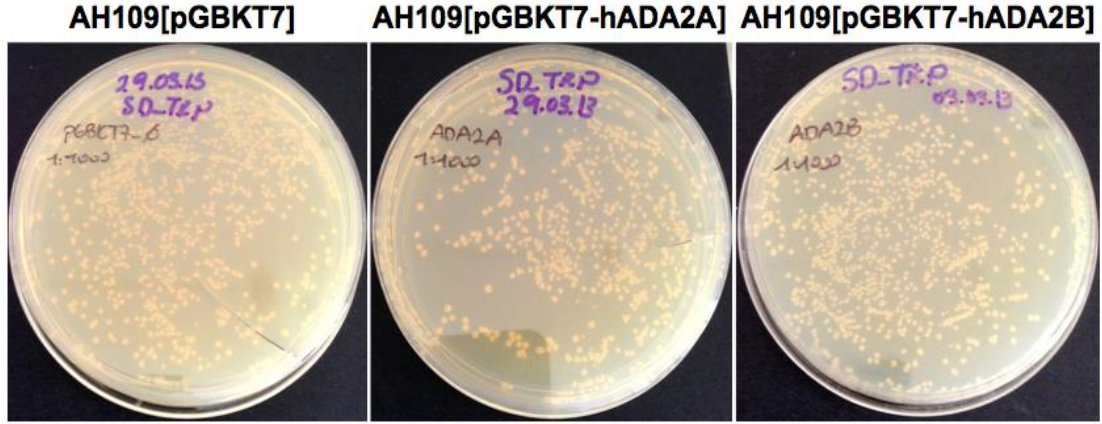
Toksisite testlerinde örnekler Tablo 9’da verildiği şekilde ve şu esaslar dikkate alınarak değerlendirilmiştir; eğer bait protein (hADA2A, hADA2B) maya

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. Toksisite testi sonuçları; hADA2A, hADA2B 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 10). Bu sonuçları *hADA2A* ve *hADA2B* genlerinin ekspresyon ürünlerinin mayada herhangi bir toksik etkiye sahip olmadığı şeklinde yorumlanmıştır.

Tablo 9. Mayada toksisite testleri.

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

SD/-Trp Seçici Besi Ortamı



Şekil 10. Mayada hADA2A ve hADA2B proteinlerinin toksisite testlerine ait örnek plate görüntüleri.

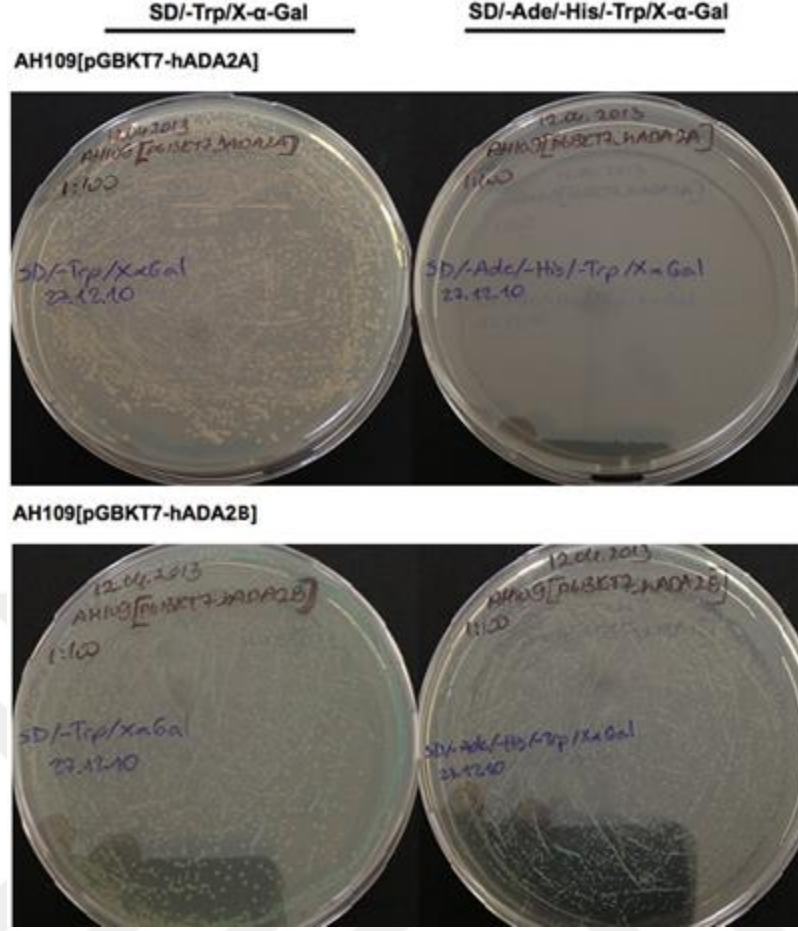
4.5 hADA2A ve hADA2B Proteinlerinin Oto-aktivasyon Testleri

Y2H yöntemi ile aday etkileşimlerin testi, olası yanlış pozitif sonuçların eliminasyonu için bait 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 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 10). Deneylerimizde bu seçici besi ortamlarının kullanılmasının nedeni AH109 maya suşunun *ADE2* ve *HIS3* raportör genlerini içermesi ve ayrıca *hADA2A*, *hADA2B* genlerinin açık okuma çerçevesi (Open Reading Frame: 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 rekombinant plazmidi ile transforme edilmiş maya hücrelerinin SD/-Ade/-His/-Trp/X- α -Gal seçici besi ortamında belirgin koloniler oluşturmadıkları gözlenmiştir. Aynı deney pGBKT7-hADA2B ile transforme edilmiş maya hücreleri için de tekrar edilmiş ancak bu hücrelerin SD/-Ade/-His/-Trp/X- α -Gal seçici besi ortamına transfer edilmesi ve inkübasyon sonrasında az sayıda koloni oluşumu belirlenmiştir (Şekil 11).

Tablo 10. Mayada oto-aktivasyon testleri.

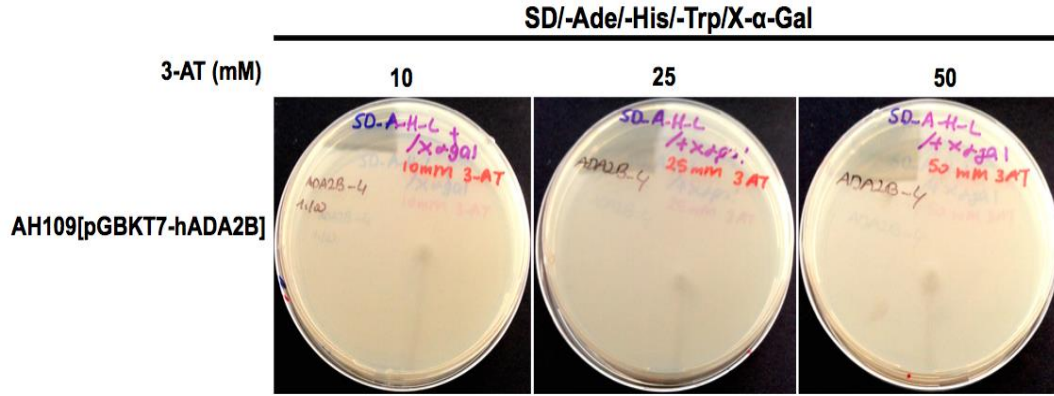
Örnek	Seçici Besi Ortamı	Belirgin Koloniler	Koloni Rengi
AH109[pGBKT7-hADA2A]	SD/-Trp/X- α -Gal	Var	Beyaz
AH109[pGBKT7-hADA2A]	SD/-Ade/-His/-Trp/X- α -Gal	Yok	Beyaz/Açık mavi
AH109[pGBKT7-hADA2B]	SD/-Trp/X- α -Gal	Var	Beyaz
AH109[pGBKT7-hADA2B]	SD/-Ade/-His/-Trp/X- α -Gal	Az sayıda	Beyaz/Açık mavi



Şekil 11. hADA2A ve hADA2B için mayada oto-aktivasyon deneyleri sonuçlarına ait örnek plate görüntüleri.

Boş maya BD ve/veya AD vektörlerinin ihmal edilebilir düzeyde oto-aktivasyon gösterebilme özellikleri bulunduğu için ADA2B proteini potansiyel etkileşimlerin Y2H yöntemi ile test edilmesinde olası ‘yanlış pozitif’ sonuçların eliminasyonu amacıyla bu oto-aktivasyon testleri ikinci bir raportör olarak *HIS3* ile ikili seçim yapılmış ve *HIS3* gen ürününün 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 12). Deneylerimizde hADA2B etkileşimlerinin analizinde uygun 3-AT konsantrasyonu 10 mM olarak belirlenmiş ve ileri analizlere devam edilmiştir.

Alınan bu sonuçlar hADA2A ve hADA2B proteinlerinin maya hücrelerinde transkripsiyonu kendiliğinden aktive edebilme özelliğine sahip olmadıklarını göstermiştir.

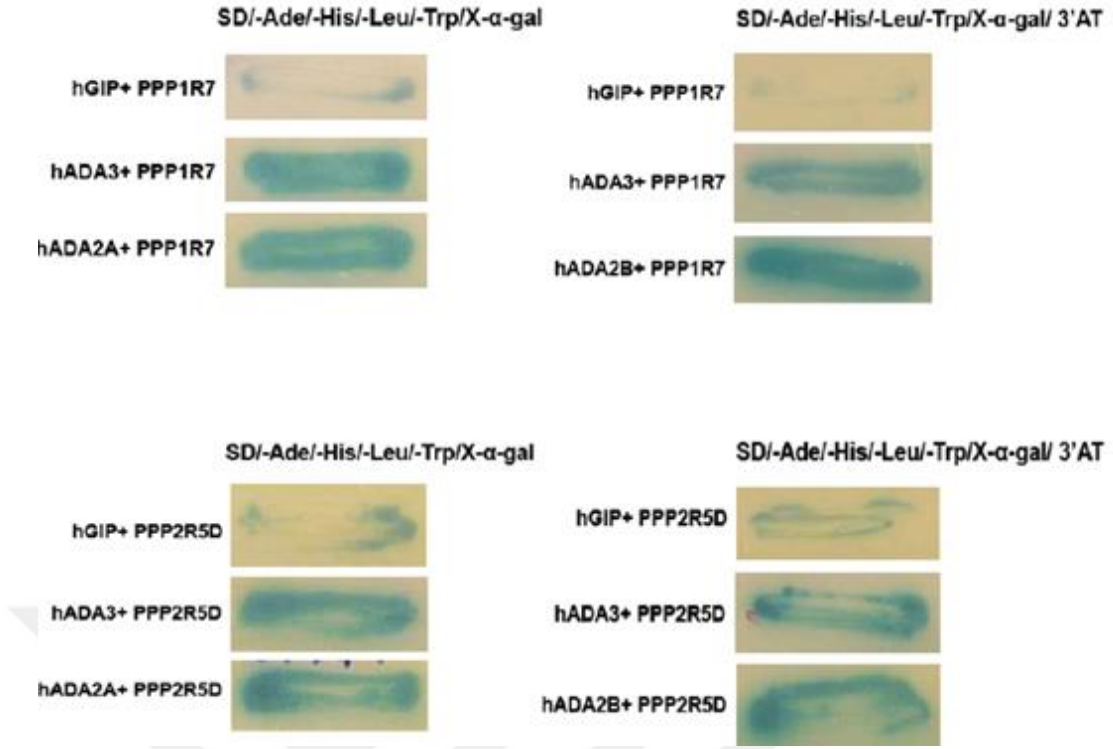


Şekil 12. hADA2B proteininin mayada oto-aktivasyon özelliğinin ikinci bir raportör gen içeren seçici besi ortamında analizine ilişkin örnek plate görüntüleri.

4.6 Protein-Protein Etkileşimlerinin Testi

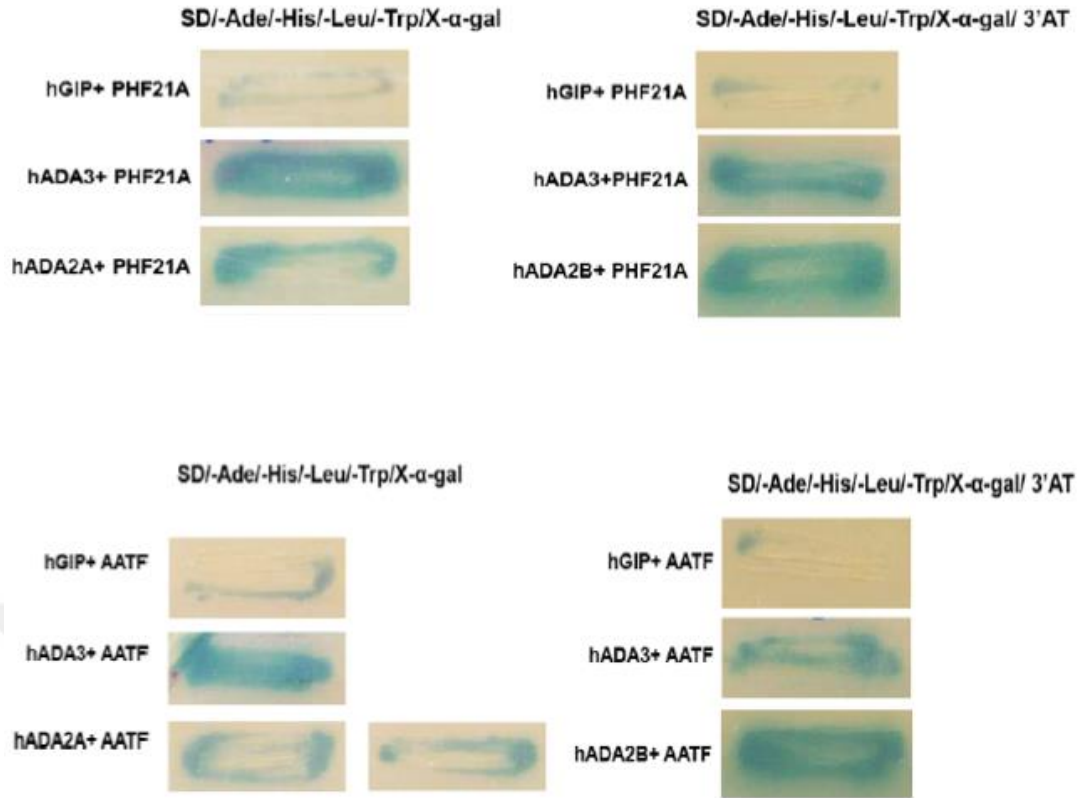
Etkileşimlerin Y2H yöntemi ile test edilmesi amacıyla AH109 maya suşu bait-içeren pGBKT7-BD plazmidi ve prey-içeren pGADT7-Rec-AD plazmidi ile eş-zamanlı olarak transforme edilmiş ve etkileşimler transformantların konak maya hücresinde yer alan raportör genler bakımından seçici besi ortamlarına transfer edilerek, bu seçici besi ortamındaki büyüme özelliklerine göre değerlendirilmiştir. Protein-protein etkileşimlerinin gözlenmesi durumunda AH109 maya hücresindeki dört farklı raportör gen (*HIS3*, *ADE2*, *MEL1* ve *LacZ*) transkripsiyonel olarak aktive edileceğinden ve transformantların hem BD hem de AD vektörlerinde bulunan sırasıyla Trp ve Leu besin belirteçlerini taşıması beklendiğinden etkileşimlerin gözlemlendiği hücrelerin seçiciliği oldukça yüksek olan SD/-Ade/-His/-Trp/-Leu/X-α-Gal besi ortamında mavi renkte büyüyebilme özelliğine sahip olması beklenmektedir. Etkileşimler test edilirken pozitif etkileşimlerin test edilmek istenen hADA2A ve hADA2B 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 hGIP kullanılmıştır (5, 63).

Yapılan Y2H analizi sonucunda hADA2A ve hADA2B proteinlerinin maya hücrelerinde hADA3 için daha önceden belirlediğimiz PP1 ve PP2A fosfataz protein ailesinin regülatör alt birimleri olan PPP1R7 and PPP2R5D proteinleri ile etkileşim gösterdikleri belirlenmiştir (Şekil 13).



Şekil 13. hADA2A ve hADA2B proteinlerinin maya hücrelerinde PP1 ve PP2A fosfataz protein ailesinin regülatör alt birimleri olan PPP1R7 ve PPP2R5D ile etkileşimlerinin Y2H ile test edilmesi sonucunda elde edilen örnek plate görüntüleri. Olası oto-aktivasyon özelliğinin eliminasyonu için hADA2B etkileşimleri ek olarak 10 mM 3-AT içeren seçici besi ortamında değerlendirilmiştir.

Daha önce yine ilk kez ekibimizce tanımlanmış olan diğer hADA3 etkileşim partnerleri ise transkripsiyonel regülatör olan AATF ve histon deasetilaz kompleksinin bir bileşeni olan PHF21A proteinleri de projemiz kapsamında hADA2A ve hADA2B proteinleri ile etkileşimleri bakımından değerlendirilmiştir. Yine mayada yapılan Y2H analizleri sonucunda hADA2B' nin AATF ve PHF21A proteinlerinin her ikisi ile de etkileşim gösterdiği gözlenirken hADA2A'nın bu proteinler ile etkileşimlerinin zayıf olduğu belirlenmiştir (Şekil 14).



Şekil 14. hADA2A ve hADA2B proteinlerinin maya hücrelerinde AATF ve PHF21A proteinleri ile etkileşimlerinin Y2H ile test edilmesi sonucunda elde edilen örnek plate görüntüleri. Olası oto-aktivasyon özelliğinin eliminasyonu için hADA2B etkileşimleri ek olarak 10 mM 3-AT içeren seçici besi ortamında değerlendirilmiştir.

5. TARTIŞMA

Ökaryotlarda transkripsiyonel aktivasyon, UAS veya enhancer denilen spesifik DNA dizilerine bağlanmış olan transkripsiyonel aktivatörler ile yine DNA üzerindeki TATA-box bölgesine bağlanmış genel transkripsiyon faktörlerinin fonksiyonel etkileşimini gerektirir. Kromatin yapısının modifikasyonunda bulunan moleküler etkileşimler transkripsiyonun kontrolünde önemli bir rol oynarlar. ADA proteinleri, genel transkripsiyon faktörleri ile etkileşerek, transkripsiyon başlangıcında fonksiyon gösterir ve ADA/GCN5 HAT komplekslerinin bir bileşeni olarak nükleozomal histonların asetillenmesini kolaylaştırırlar. Daha önceki çalışmalarımızda maya 2 hibrid kütüphane taraması üzerinden sözü geçen komplekslerin bir üyesi olan hADA3 proteininin dört yeni etkileşim partneri, AATF, PHF21A ve protein fosfataz ailesinin düzenleyici alt birimleri PP1 ve PP2A (PPP1R7 VE PPP2R5D sırasıyla), tanımlanmıştır (5). Tez çalışmamızda, insan ADA3 proteinini ile etkileşimlerini belirlediğimiz partnerlerin, yine hADA3 ile aynı kompleks içerisinde yer alan ve hADA3 ile etkileşimleri daha önceden rapor edilen hADA2A ve hADA2B proteinleri ile etkileşimleri Y2H yöntemi kullanarak test edilmiştir (4, 64, 65). Sonuçlarımız hADA2'nin, hADA3 etkileşim ağına katıldığı hipotezimizi destekler şekildedir.

ADA2, ADA3 ve GCN5 gen ürünlerinin oluşturdukları HAT kompleksleri transkripsiyonel aktivasyona aracılık etmeleri açısından gen regülasyonunda önemli bir yere sahiptir. Kompleks içerisindeki alt birimlerin kendi aralarındaki etkileşimleri incelendiğinde ADA3 aktivasyonunun *in vivo* olarak ADA2 seviyeleri tarafından kontrol edildiği görülmüştür. Aynı şekilde ADA2 ekspresyonu da ADA3 seviyeleri tarafından kontrol edilmektedir ki bu bulgular proteinlerin hücre içinde bir kompleks oluşturduklarını desteklemektedir (36). ADA3 proteini amino-terminal ve karboksi-terminal olmak üzere iki domaine ayrılır. *In vitro* heterotrimerik kompleksin oluşması ve *in vivo* ADA2 aktivasyonu için ADA3 karboksi-terminal domaini yeterli olmaktadır. ADA3 amino-terminal domaini ve aktivasyon domainleri üzerinden ADA ko-aktivatör kompleksinin etkileşimlerine aracılık etmektedir (36, 55). Kompleks içerisinde katalitik aktiviteye sahip olan GCN5 proteini ADA3 ile direkt olarak etkileşmemektedir. ADA3 yokluğunda ADA2 ve GCN5 proteinlerinin birbirleri ile kompleks oluşturabildiği görülmüş etkileşim *in vivo* ve *in vitro* olarak test edilmiştir. Bu testler ADA2'nin ADA3 ve GCN5 proteinlerinin etkileşimine

aracılık ettiğini göstermektedir (36, 51). Tez çalışmamızda etkileşimlerini test ettiğimiz ADA2A ve ADA2B proteinlerinin kompleks içerisindeki pozisyonlarına bakılarak ADA/GCN5 HAT kompleksleri tarafından regüle edilen yeni olası yolların ortaya çıkması açısından oldukça önemlidir.

Maya ADA2 proteininin insanlardaki homologları olan ve tez çalışmamızda etkileşimlerini test ettiğimiz hADA2A ve hADA2B proteinlerinden her biri *in vivo* ve *in vitro* olarak ADA3 ve GCN5 proteinleri ile etkileşerek kompleks oluşturabilmektedir. Bu iki homolog protein benzer büyüklükte olmakla birlikte %26 aynı ve %50 homolog aa sekanslarına sahiptirler. yADA2A gibi hADA2A ve hADA2B proteinleri de protein-protein etkileşimlerinden sorumlu SANT, SWIRM ve ZZ-finger domainlerine sahiptirler (66). Fakat bu iki protein yer aldıkları HAT kompleksleri ve fonksiyonları bakımından farklılık göstermektedir. Örneğin, *Drosophila* ADA2A (dADA2A), HAT aktivitesine sahip ATAC kompleksi içerisinde yer alırken *Drosophila* ADA2B (dADA2B), HAT aktivitesine sahip SAGA kompleksi içerisinde yer almaktadır (11, 66, 67). Bu komplekslerin alt birimlerinin farklı olması asetilleedikleri histon proteinlerinin de farklılık göstermesine sebep olmaktadır (68). hADA2B histon asetiltransferaz aktivitesine sahip insan çok alt birimli transkripsiyon ko-aktivatör kompleksi olan STAGA'nın bir üyesidir (66). STAGA kompleksinin katalitik alt birimi GCN5L'dir (11). hADA2A ise histon asetiltransferaz katalitik aktivitesine sahip PCAF kompleksinin bir üyesidir (69). ADA2B, GCN5L'nin nükleozomları asetillemesini uyarırken, ADA2A'nın GCN5 aktivitesine bir etkisi yoktur. ADA2B proteini SWIRM domaini üzerinden ADA3 ile etkileşirken, SANT domaini ise GCN5L ile etkileşimden sorumludur. Bu domainleri sayesinde ADA2B, ADA3 ve GCN5L proteinleri arasında köprü görevi kurarak etkileşimlerine olanak sağlarken, aynı zamanda SWIRM domaini üzerinden, STAGA kompleksinin HAT aktivitesi üzerinde etki göstermektedir (66). İnsan ADA2B alt birimli STAGA kompleksi, hADA2A içeren komplekslerin aksine H3 histonunu asetilleme yeteneğine sahiptir (70). Tüm bu veriler göstermektedir ki yADA2 protein homologları hADA2A ve hADA2B yer aldıkları kompleksler ve fonksiyonları bakımından önem teşkil etmektedir. Bu sebeple etkileşimlerinin test edilmesi transkripsiyonel regülasyon sürecinde rol alan mekanizmaların ve kullanılan yolların aydınlatılmasına katkıda bulunmaktadır.

hADA2A ve hADA2B proteinlerinin diğerk dikkat çeken bir özelliğı ise tümör baskılayıcı protein olan p53 ile olan ilişkileridir. Ökaryotik hücreler DNA hasarına yanıt (DDR) durumunda hücre döngüsünü durdurmak ve DNA hasarını onarmak ya da apoptozu uyarmak amacıyla kontrol noktalarını aktive ederler. Bilindiğı 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. Bu aktiviteyi gösterebilmesi için normalde hücrede çok düşük düzeyde eksprese edilen ve inaktif konformasyonda bulunan p53'ün uyarılması ve aktive edilmesi gerekmektedir. p53'ün bu aktiviteyi göstermesinde esas olarak post-translasyonel modifikasyonların önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Bu post-translasyonel modifikasyonlar p53'ün mdm2 tarafından degradasyonunun inhibe edilmesi ve p53'ün aktivasyonunda önemli olan diğerk post-translasyonel modifikasyonlara olanak sağlaması bakımından gereklidirler. Ancak p53'ün transkripsiyonel düzeydeki regülasyonunun da önemli olduğunu destekleyen çok sayıda çalışma yapılmıştır (1). Transkripsiyonel regülasyonda önemli rolü olan yeni nükleer protein CCDC134 (Coiled-Coil Domain Containing) ile insan transkripsiyonel adaptör protein ADA2A'nın etkileştiğı ve CCDC134'ün ADA2A'nın over-ekspresyonu durumunda p53 protein stabilitesini ve p53'ün PCAF-histon asetiltransferaz kompleksi bağımlı K320 pozisyonundan asetillenmesini arttırdığı gösterilmiştir (69, 71). PCAF/HAT ko-aktivatör kompleksinin alt birimi ADA2A direkt olarak p53 ile etkileşmektedir. ADA2A, Lys320 pozisyonundan p53'ü asetilleyerek aktivasyon ve stabilizasyonunu sağlamaktadır (69). ADA2B ve p53 proteinlerinin ilişkilerinde ise STAGA kompleksinin direkt olarak p53 ile etkileştiğı ve bu etkileşimin p53 gen aktivasyonunu etkilediğı bilinmektedir (66, 72). hADA3 proteini de hp53 ile etkileşim gösterdiği bilinen önemli bir proteindir (1). 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 oynayabileceğı ileri sürülmektedir (1)

Tez çalışmamızda hADA2A ve hADA2B'nin potansiyel etkileşim partnerlerinden ilki AATF geni tarafından kodlanan 63 kDa büyüklüğünde, temel

olarak nükleus ve nükleolusta lokalize olan bir proteindir (73-75). *AATF* geni insan beyin, kalp, böbrek, plasenta ve timus dokularında yüksek oranda eksprese edilmekte ve hücrede apoptozu indükleyen protein kinaz olarak bilinen MAP3K12 proteini ile etkileşim göstermektedir (74, 75). Daha önceki çalışmalarda hADA3'ün etkileşim partneri olarak belirlediğimiz *AATF* proteininin de transkripsiyon faktörlerinin karakteristik özelliği olarak lösin-fermuar domainini içerdiği bilinmektedir ve Lösin-fermuar motifleri protein-protein etkileşimlerinde oldukça önemlidir(76). Evrimsel olarak ileri derecede korunmuş özellikteki *AATF*'nin ayrıca RNA polimeraz II'ye bağlanarak gen ekspresyonunun regülasyonunda görev aldığı rapor edilmiştir (77). *AATF*'nin etkileşim gösterdiği rapor edilen MAP3K12'nin fizyolojik partneri olarak bilinen MAP3K12-Binding Inhibitory Protein 1 (MBIP) H3 ve H4 proteinlerinin asetilasyonunda önemli olan ADA2A içeren HAT kompleksi ATAC'ın bir bileşenidir (78). *AATF*'nin bir diğer önemli ilişkisi p53 ile olmaktadır. Yapılan çalışmalarda da p53'ün transkripsiyonunu aktive ettiği ve bu aktivasyon için *AATF*'nin fosforile edilmesi gerektiği belirlenmiştir. Ayrıca *AATF*'nin G2/M kontrol noktasının düzenlenmesine katkıda bulunduğu rapor edilmiştir (74).

Literatür verileri ve tez çalışmaları kapsamında elde ettiğimiz bulguları toplarsak, p53'ün ADA kompleksi proteinleri ile direkt etkileşimleri ve ADA2A, ADA2B proteinleri ile etkileşimlerini test ettiğimiz, ADA2A alt birimli ATAC histon asetiltransferaz kompleksi ile dolaylı yoldan etkileşim içinde bulunduğu bilinen *AATF*'nin, ADA2 proteinleri ile aday etkileşimi tez çalışmamızda elde ettiğimiz anlamlı sonuçlardandır.

Bir diğer etkileşim partneri PHF21A yaklaşık 78 kDa büyüklüğünde yine nükleusta lokalize olan ve beyinde yüksek oranda olmak üzere hemen bütün dokularda eksprese edilen bir proteindir (79-81). Bu protein BRAF35/HDAC kompleksi (BHC) adı verilen kompleksin bir elemanı olup ayrıca BHC80 olarak da adlandırılmaktadır. BHC histon deasetilaz kompleksi nöronal olmayan hücrelerde nöron-spesifik genlerin transkripsiyonunun baskılanmasında rol oynayan bir ko-represör kompleksidir. PHF21A proteininin H3'te Lys4'ün demetilasyonunu inhibe ettiği bilinmekte, bu nedenle gen ekspresyonunun düzenlenmesinde önemli role sahip olacağı düşünülmektedir.

Kromatin yapısındaki modifikasyonlar HAT ve HDAC kompleksleri arasındaki dinamik ilişkiler ile düzenlenmektedir. Dolayısıyla farklı HAT

kompleksinin üyeleri olan ve bu kompleksler içerisinde farklı fonksiyonlar gösteren hADA2A ve hADA2B proteinleri ile HDAC kompleksinin önemli bir üyesi olan PHF21A'nin aday etkileşimleri anlamlıdır.

Hücrel proselerin düzenlenmesinde geri dönüşümlü protein fosforilasyonu en yaygın düzenleme mekanizması olarak bilinmektedir. Hücrede birçok proteininin aktivitesi protein fosforilasyonu ve de-fosforilasyonu ile dolayısıyla spesifik kinazlar ve fosfatazlar arasındaki dengeye bağlı olarak belirlenmektedir. Hücrel proselerde önemli olan fosfataz ailesine ait iki farklı proteinden etkileşimini test ettiğimiz bir diğer protein PPP2R5D olup fosfataz 2A (PP2A) regülatör altbirim B ailesine aittir. Hem sitoplazmada hem de nükleusta lokalizasyon gösteren bu proteinin, hücre bölünmesinin interfaz aşamasında ve mitozda nükleusta lokalize olduğu bilinmektedir. 70 kDa büyüklüğündeki bu protein hemen hemen bütün dokularda eksprese edilmektedir (82). PP2A transkripsiyon, translasyon, iyonların iletimi, hücre büyümesi ve farklılaşması, apoptoz gibi çok sayıda hücrel prosenin kontrolünde görevlidir (83, 84). Diğer fosfataz sınıfı protein olan PPP1R7 (SDS22) olup tip 1 Serin/Treonin fosfatazların (PP-1) regülatör alt birimi olarak bilinmektedir (85, 86). Yapılan çalışmalarda PPP1R7'nin metafaz/anafaz geçişinde kromozomların ayrılmasında rol alan temel proteinlerden birisi olduğu, PPP1R7'nin kendi başına bir fosfotaz aktivitesi göstermemekte fakat PP-1c ile etkileşerek PP1 aracılı defosforilasyona aracılık ettiği belirlenmiştir (86, 87). PPP1R7, kinetokorlar ve mikrotübüller arasındaki etkileşim regülasyonunda önemli olduğu bilinen Aurora B proteini ile etkileşim göstermektedir (88). Aurora B proteini hücrede mitoz sürecinde yer almaktadır (88). PPP1R7/PP1 kompleksi fosforile olan Aurora B'deki fosfat gruplarını uzaklaştırarak kinetokor-mikrotübül etkileşiminin stabilizasyonunda dolaylı olarak rol alır. Aurora B, TACC1 (Transforming Acidic Coiled-Coil Containing Protein 1) ile etkileşmektedir. TACC1 proteini ise onkojenik transkripsiyon faktörlerinden YEATS4 (Yeats4 domain-containing protein 4) ile etkileşmektedir (89). YEATS4, özellikle nükleozomal histonlardan H4 ve H2A'nın asetilasyonu olmak üzere spesifik genlerin transkripsiyonel aktivasyonunda görev alan NuA4/HAT kompleksinin bir bileşenidir (90, 91). Bu kompleks onkogen ve protoonkogen aracılı büyümenin indüksiyonu, tümör baskılayıcı aracılı büyümenin durdurulması ve replikatif yaşlanma, apoptoz ve DNA tamiri gibi transkripsiyonel proselerin aktivasyonunda gerekli olabilmektedir. NuA4 ayrıca DNA hasarının

olduğu durumlarda DNA tamirinde doğrudan görev alabilen bir proteindir (91). Çalışmamız açısından daha da önemlisi TACC1'nin hADA2A ile etkileştiğı bilinen ve hADA3'ün içerisinde yer aldığı GCN5L2 ve PCAF kompleksleri ile etkileşim gösterdiğinin rapor edilmiş olmasıdır.

HAT ve HDAC aktivitelerinin düzenlenmesinde görev alan fosfataz ailesi proteinlerinden PPP2R5D ve PPP1R7 ile HAT komplekslerinin bileşenlerinden ADA2 proteinleri arasında elde ettiğimiz aday etkileşimler de anlamlı birer bulgudur.



6. SONUÇ

Daha önceki çalışmalarımızda Y2H kütüphane taraması üzerinden hADA3 proteinin dört yeni etkileşim partneri, AATF, PHF21A ve protein fosfataz ailesinin düzenleyici alt birimleri PP1 VE PP2A (PPP1R7 VE PPP2R5D sırasıyla), tanımlanmıştır (5). Bu çalışmamızda, hADA3 proteinini içeren komplekslerin fonksiyonel önemini belirtmek için belirlediğimiz etkileşimleri Y2H sistemi ile hADA2A ve hADA2B proteinleri ile test edilmiştir. Sonuçlarımız hADA2'nin, hADA3 etkileşim ağına katıldığı hipotezimizi destekler şeklindedir. Bu seçilen etkileşimler, ADA/GCN5 HAT komplekslerinin önemine ve bu kompleksler tarafından regüle edilen yeni olası yolların potansiyel önemine dikkat çekmektedir.



7. KAYNAKLAR

1. Nag A, Germaniuk-Kurowska A, Dimri M, Sassack MA, Gurumurthy CB, Gao QS, et al. An essential role of human Ada3 in p53 acetylation. *Journal of Biological Chemistry* 2007;282:8812-20.
2. Eberharter A, Sterner DE, Schieltz D, Hassan A, Yates JR, Berger SL, et al. The ADA complex is a distinct histone acetyltransferase complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* 1999;19:6621-31.
3. Wang YL, Faiola F, Xu MY, Pan SQ, Martinez E. 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* 2008;283:33808-15.
4. Balasubramanian R, Pray-Grant MG, Selleck W, Grant PA, Tan S. Role of the Ada2 and Ada3 transcriptional coactivators in histone acetylation. *Journal of Biological Chemistry* 2002;277:7989-95.
5. Zencir S, Sike A, Dobson MJ, Ayaydin F, Boros I, Topcu Z. Identification of transcriptional and phosphatase regulators as interaction partners of human ADA3, a component of histone acetyltransferase complexes. *Biochemical Journal* 2013;450:311-20.
6. Eberharter A, Becker PB. Histone acetylation: a switch between repressive and permissive chromatin - Second in review series on chromatin dynamics. *Embo Reports* 2002;3:224-9.
7. Luger K, Richmond TJ. The histone tails of the nucleosome. *Current Opinion in Genetics & Development* 1998;8:140-6.
8. Hayes JJ, Hansen JC. Nucleosomes and the chromatin fiber. *Current Opinion in Genetics & Development* 2001;11:124-9.
9. Woodcock CL, Dimitrov S. Higher-order structure of chromatin and chromosomes. *Current Opinion in Genetics & Development* 2001;11:130-5.
10. Marino-Ramirez L, Kann MG, Shoemaker BA, Landsman D. Histone structure and nucleosome stability. *Expert Review of Proteomics* 2005;2:719-29.
11. Lee KK, Workman JL. Histone acetyltransferase complexes: one size doesn't fit all. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2007;8:284-95.
12. Malik HS, Henikoff S. Phylogenomics of the nucleosome. *Nature Structural Biology* 2003;10:882-91.

13. Allfrey V, Faulkner R, Mirsky A. Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1964;51:786.
14. Tse C, Hansen JC. Hybrid trypsinized nucleosomal arrays: identification of multiple functional roles of the H2A/H2B and H3/H4 N-termini in chromatin fiber compaction. *Biochemistry* 1997;36:11381-8.
15. Eberharter A, Becker PB. Histone acetylation: a switch between repressive and permissive chromatin. *EMBO reports* 2002;3:224-9.
16. Berger SL. Histone modifications in transcriptional regulation. *Current opinion in genetics & development* 2002;12:142-8.
17. Howe L, Brown CE, Lechner T, Workman JL. Histone acetyltransferase complexes and their link to transcription. *Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression* 1999;9:3-4.
18. Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science* 2001;293:1074-80.
19. Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell research* 2011;21:381-95.
20. Davie JR, Spencer VA. Control of histone modifications. *Journal of cellular biochemistry* 1999;75:141-8.
21. Litt MD, Simpson M, Gaszner M, Allis CD, Felsenfeld G. Correlation between histone lysine methylation and developmental changes at the chicken β -globin locus. *Science* 2001;293:2453-5.
22. Turner BM. *Chromatin and gene regulation: molecular mechanisms in epigenetics*. USA: Iowa State University Press; 2008.
23. Hendzel MJ, Wei Y, Mancini MA, Van Hooser A, Ranalli T, Brinkley B, et al. Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma* 1997;106:348-60.
24. Thomson S, Mahadevan LC, Clayton AL, editors. *MAP kinase-mediated signalling to nucleosomes and immediate-early gene induction*. *Seminars in cell & developmental biology* 1999;10:205-14.
25. Chen D, Ma H, Hong H, Koh SS, Huang S-M, Schurter BT, et al. Regulation of transcription by a protein methyltransferase. *Science* 1999;284:2174-7.

26. Yun M, Wu J, Workman JL, Li B. Readers of histone modifications. *Cell research* 2011;21:564-78.
27. Annunziato AT, Eason MB, Perry CA. Relationship between methylation and acetylation of arginine-rich histones in cycling and arrested HeLa cells. *Biochemistry* 1995;34:2916-24.
28. Ciechanover A. The ubiquitin–proteasome pathway: on protein death and cell life. *The EMBO journal* 1998;17:7151-60.
29. Marmorstein R. Protein modules that manipulate histone tails for chromatin regulation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2001;2:422-32.
30. Brown CE, Lechner T, Howe L, Workman JL. The many HATs of transcription coactivators. *Trends in biochemical sciences* 2000;25:15-9.
31. Utley RT, Ikeda K, Grant PA, Côté J, Steger DJ, Eberharter A, et al. Transcriptional activators direct histone acetyltransferase complexes to nucleosomes. *Nature* 1998;394:498-502.
32. Csordas A. On the biological role of histone acetylation. *Biochemical journal* 1990;265:23.
33. Brownell JE, Allis CD. Special HATs for special occasions: linking histone acetylation to chromatin assembly and gene activation. *Current opinion in genetics & development* 1996;6:176-84.
34. Kleff S, Andrulis ED, Anderson CW, Sternglanz R. Identification of a gene encoding a yeast histone H4 acetyltransferase. *Journal of Biological Chemistry* 1995;270:24674-7.
35. Parthun MR, Widom J, Gottschling DE. The major cytoplasmic histone acetyltransferase in yeast: links to chromatin replication and histone metabolism. *Cell* 1996;87:85-94.
36. Marcus GA, Silverman N, Berger SL, Horiuchi J, Guarente L. Functional similarity and physical association between GCN5 and ADA2: putative transcriptional adaptors. *The EMBO journal* 1994;13:4807.
37. Xu W, Edmondson DG, Roth SY. Mammalian GCN5 and P/CAF acetyltransferases have homologous amino-terminal domains important for recognition of nucleosomal substrates. *Molecular and cellular biology* 1998;18:5659-69.
38. Verdone L, Caserta M, Di Mauro E. Histone acetylation in gene regulation. *Briefings in functional genomics & proteomics* 2006;5:209-21.

39. Georgakopoulos T, Thireos G. Two distinct yeast transcriptional activators require the function of the GCN5 protein to promote normal levels of transcription. *The EMBO journal* 1992;11:4145.
40. Puri PL, Sartorelli V, Yang X-J, Hamamori Y, Ogryzko VV, Howard BH, et al. Differential roles of p300 and PCAF acetyltransferases in muscle differentiation. *Molecular cell* 1997;1:35-45.
41. Blanco JC, Minucci S, Lu J, Yang X-J, Walker KK, Chen H, et al. The histone acetylase PCAF is a nuclear receptor coactivator. *Genes & development* 1998;12:1638-51.
42. Korzus E, Torchia J, Rose DW, Xu L, Kurokawa R, McInerney EM, et al. Transcription factor-specific requirements for coactivators and their acetyltransferase functions. *Science* 1998;279:703-7.
43. Roth SY, Denu JM, Allis CD. Histone acetyltransferases. *Annual review of biochemistry* 2001;70:81-120.
44. Vogelauer M, Rubbi L, Lucas I, Brewer BJ, Grunstein M. Histone acetylation regulates the time of replication origin firing. *Molecular cell* 2002;10:1223-33.
45. Waterborg JH. Steady-state levels of histone acetylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* 2000;275:13007-11.
46. Jamai A, Imoberdorf RM, Strubin M. Continuous histone H2B and transcription-dependent histone H3 exchange in yeast cells outside of replication. *Molecular cell* 2007;25:345-55.
47. Deckert J, Struhl K. Histone acetylation at promoters is differentially affected by specific activators and repressors. *Molecular and cellular biology* 2001;21:2726-35.
48. Bannister AJ, Kouzarides T. The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature* 1996;384:641-3.
49. Shiama N. The p300/CBP family: integrating signals with transcription factors and chromatin. *Trends in cell biology* 1997;7:230-6.
50. Sterner DE, Berger SL. Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2000;64:435-59.
51. Grant PA, Duggan L, Côté J, Roberts SM, Brownell JE, Candau R, et al. Yeast Gcn5 functions in two multisubunit complexes to acetylate nucleosomal histones: characterization of an Ada complex and the SAGA (Spt/Ada) complex. *Genes & development* 1997;11:1640-50.

52. Näär AM, Lemon BD, Tjian R. Transcriptional coactivator complexes. *Annual review of biochemistry* 2001;70:475-501.
53. Schiltz RL, Mizzen CA, Vassilev A, Cook RG, Allis CD, Nakatani Y. Overlapping but distinct patterns of histone acetylation by the human coactivators p300 and PCAF within nucleosomal substrates. *Journal of Biological Chemistry* 1999;274:1189-92.
54. Barlev NA, Candau R, Wang L, Darpino P, Silverman N, Berger SL. Characterization of physical interactions of the putative transcriptional adaptor, ADA2, with acidic activation domains and TATA-binding protein. *Journal of Biological Chemistry* 1995;270:19337-44.
55. Roberts SM, Winston F. Essential functional interactions of SAGA, a *Saccharomyces cerevisiae* complex of Spt, Ada, and Gcn5 proteins, with the Snf/Swi and Srb/mediator complexes. *Genetics* 1997;147:451-65.
56. Hampsey M. A SAGA of histone acetylation and gene expression. *Trends in Genetics* 1997;13:427-9.
57. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning*. New York: Cold spring harbor laboratory press; 1989.
58. MacDonald PN. *Two-Hybrid Systems*. New Jersey: Humana Press; 2003.
59. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in enzymology* 1987;155:335.
60. Bertani G, Weigle J. Host controlled variation in bacterial viruses. *Journal of bacteriology* 1953;65:113.
61. Fields S, Song O-k. A novel genetic system to detect protein protein interactions. *Nature* 1989;340:245-6.
62. Topcu Z, Borden KL. The yeast two-hybrid system and its pharmaceutical significance. *Pharmaceutical research* 2000;17:1049-55.
63. Zencir S, Ovee M, Dobson MJ, Banerjee M, Topcu Z, Mohanty S. Identification of brain-specific angiogenesis inhibitor 2 as an interaction partner of glutaminase interacting protein. *Biochemical and biophysical research communications* 2011;411:792-7.
64. Horiuchi J, Silverman N, Marcus GA, Guarente L. ADA3, a putative transcriptional adaptor, consists of two separable domains and interacts with ADA2 and GCN5 in a trimeric complex. *Molecular and cellular biology* 1995;15:1203-9.

65. Candau R, Zhou J, Allis CD, Berger SL. Histone acetyltransferase activity and interaction with ADA2 are critical for GCN5 function in vivo. *The EMBO Journal* 1997;16:555-65.
66. Gamper AM, Kim J, Roeder RG. The STAGA subunit ADA2b is an important regulator of human GCN5 catalysis. *Molecular and cellular biology* 2009;29:266-80.
67. Guelman S, Suganuma T, Florens L, Swanson SK, Kiesecker CL, Kusch T, et al. Host cell factor and an uncharacterized SANT domain protein are stable components of ATAC, a novel dAda2A/dGcn5-containing histone acetyltransferase complex in *Drosophila*. *Molecular and cellular biology* 2006;26:871-82.
68. Ciurciu A, Komonyi O, Pankotai T, Boros IM. The *Drosophila* histone acetyltransferase Gcn5 and transcriptional adaptor Ada2a are involved in nucleosomal histone H4 acetylation. *Molecular and cellular biology* 2006;26:9413-23.
69. Huang J, Zhang L, Xiao L, Xu L, Hu F, Shao W, et al. The role of human ADA2a in the regulation of p53 acetylation and stability. *Chinese Science Bulletin* 2011;56:397-405.
70. Liu X, Vorontchikhina M, Wang Y-L, Faiola F, Martinez E. STAGA recruits Mediator to the MYC oncoprotein to stimulate transcription and cell proliferation. *Molecular and cellular biology* 2008;28:108-21.
71. Huang J, Zhang L, Liu W, Liao Q, Shi T, Xiao L, et al. CCDC134 interacts with hADA2a and functions as a regulator of hADA2a in acetyltransferase activity, DNA damage-induced apoptosis and cell cycle arrest. *Histochemistry and cell biology* 2012;138:41-55.
72. Gamper AM, Roeder RG. Multivalent binding of p53 to the STAGA complex mediates coactivator recruitment after UV damage. *Molecular and cellular biology* 2008;28:2517-27.
73. Fanciulli M, Bruno T, Di Padova M, De Angelis R, Iezzi S, Iacobini C, et al. Identification of a novel partner of RNA polymerase II subunit 11, Che-1, which interacts with and affects the growth suppression function of Rb. *The FASEB Journal* 2000;14:904-12.
74. Bruno T, De Nicola F, Iezzi S, Lecis D, D'Angelo C, Di Padova M, et al. Che-1 phosphorylation by ATM/ATR and Chk2 kinases activates p53 transcription and the G₂/M checkpoint. *Cancer cell* 2006;10:473-86.

75. Bruno T, De Angelis R, De Nicola F, Barbato C, Di Padova M, Corbi N, et al. Che-1 affects cell growth by interfering with the recruitment of HDAC1 by Rb. *Cancer cell* 2002;2:387-99.
76. Topcu Z, Mack DL, Hromas RA, Borden K. The promyelocytic leukemia protein PML interacts with the proline-rich homeodomain protein PRH: a RING may link hematopoiesis and growth control. *Oncogene* 1999;18:7091-100.
77. Di Padova M, Bruno T, De Nicola F, Iezzi S, D'Angelo C, Gallo R, et al. Che-1 arrests human colon carcinoma cell proliferation by displacing HDAC1 from the p21WAF1/CIP1 promoter. *Journal of Biological Chemistry* 2003;278:36496-504.
78. Guelman S, Kozuka K, Mao Y, Pham V, Solloway MJ, Wang J, et al. The double-histone-acetyltransferase complex ATAC is essential for mammalian development. *Molecular and cellular biology* 2009;29:1176-88.
79. Hakimi M-A, Bochar DA, Chenoweth J, Lane WS, Mandel G, Shiekhattar R. A core-BRAF35 complex containing histone deacetylase mediates repression of neuronal-specific genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2002;99:7420-5.
80. Lan F, Collins RE, De Cegli R, Alpatov R, Horton JR, Shi X, et al. Recognition of unmethylated histone H3 lysine 4 links BHC80 to LSD1-mediated gene repression. *Nature* 2007;448:718-22.
81. Klajn A, Ferrai C, Stucchi L, Prada I, Podini P, Baba T, et al. The rest repression of the neurosecretory phenotype is negatively modulated by BHC80, a protein of the BRAF/HDAC complex. *The Journal of Neuroscience* 2009;29:6296-307.
82. Yu UY. Phosphorylation on the PPP2R5D B regulatory subunit modulates the biochemical properties of protein phosphatase 2A. *Biochemistry and Molecular Biology Reports* 2010;43:263-7.
83. McCright B, Virshup DM. Identification of a new family of protein phosphatase 2A regulatory subunits. *Journal of Biological Chemistry* 1995;270:26123-8.
84. McCright B, Rivers AM, Audlin S, Virshup DM. The B56 family of protein phosphatase 2A (PP2A) regulatory subunits encodes differentiation-induced phosphoproteins that target PP2A to both nucleus and cytoplasm. *Journal of Biological Chemistry* 1996;271:22081-9.

85. Renouf S, Beullens M, Wera S, Van Eynde A, Sikela J, Stalmans W, et al. Molecular cloning of a human polypeptide related to yeast sds22, a regulator of protein phosphatase-1. *FEBS letters* 1995;375:75-8.
86. Peggie MW, MacKelvie SH, Bloecher A, Knatko EV, Tatchell K, Stark MJ. Essential functions of Sds22p in chromosome stability and nuclear localization of PP1. *Journal of cell science* 2002;115:195-206.
87. Ceulemans H, Van Eynde A, Pérez-Callejón E, Beullens M, Stalmans W, Bollen M. Structure and splice products of the human gene encoding sds22, a putative mitotic regulator of protein phosphatase-1. *European Journal of Biochemistry* 1999;262:36-42.
88. Cheetham GM, Knegt RM, Coll JT, Renwick SB, Swenson L, Weber P, et al. Crystal structure of aurora-2, an oncogenic serine/threonine kinase. *Journal of Biological Chemistry* 2002;277:42419-22.
89. Delaval B, Ferrand A, Conte N, Larroque C, Hernandez-Verdun D, Prigent C, et al. Aurora B-TACC1 protein complex in cytokinesis. *Oncogene* 2004;23:4516-22.
90. Doyon Y, Côté J. The highly conserved and multifunctional NuA4 HAT complex. *Current opinion in genetics & development* 2004;14:147-54.
91. Doyon Y, Selleck W, Lane WS, Tan S, Côté J. Structural and functional conservation of the NuA4 histone acetyltransferase complex from yeast to humans. *Molecular and cellular biology* 2004;24:1884-96.

ÖZGEÇMİŞ

1. GENEL

DÜZENLEME TARİHİ	: 15/12/2014
T.C. KİMLİK NO	:
ADI SOYADI	: Gizem YAYLI
YAZIŞMA ADRESİ	:
DOĞUM TARİHİ ve YERİ	:
TEL : 0232 3115133	GSM:
E-POSTA :	FAKS : -

2. EĞİTİM

ÖĞRENİM DÖNEMİ	DERECE (*)	ÜNİVERSİTE	ÖĞRENİM ALANI
2013 – 2015	Yüksek Lisans	Ege Üniversitesi	Farmasötik Biyoteknoloji
2005 – 2012	Lisans	Ege Üniversitesi	Biyokimya Bölümü
2001 – 2005	Lise	Kırıkkale Anadolu Lisesi	Fen Bilimleri

(*) Diploma Türü (Lisans, Y.Lisans, vb.)

3. PROJE DENEYİMİ

TÜBİTAK 112S492 “Kemoterapi uygulamalarında hedeflenen insan topoizomeraz II enziminin moleküler etkileşimlerinin belirlenmesi ve protein partnerlerinin farmasötik önemlerinin değerlendirilmesi” (Bursiyer Olarak: 04/2013-11/2014)

4. ÇALIŞMA DENEYİMLERİ

Cumhuriyet Üniversitesi Araştırma Görevlisi 09/2013-05/2014 (ÖYP)

Ege Üniversitesi Araştırma Görevlisi 05/2014-devam etmekte (ÖYP)