

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**İNSAN b2-ADRENERJİK RESEPTÖRÜNDE OLUŞTURULAN BAZI
MUTASYONLARIN RESEPTÖR-YEŞİL FLORESAN PROTEİN
FÜZYONU İLE HÜCRE İÇİ DAĞILIMININ İNCELENMESİ**

Olga ALTUNTAŞ

**Danışman Öğretim Üyesi
Prof.Dr.Ongun ONARAN**

**ANKARA
2007**

İNSAN β_2 -ADRENERJİK RESEPTÖRÜNDE OLUŞTURULAN BAZI MUTASYONLARIN RESEPTÖR-YEŞİL FLORESAN PROTEİN FÜZYONU İLE HÜCRE İÇİ DAĞILIMININ İNCELENMESİ

ÖZET

Hücreler arasında nörotransmitterler, hormonlar, otakoidler gibi kimyasal mediyatörler ile iletilen sinyallerin büyük bir bölümü G proteinlerine kenetli reseptörlerle (GPCR) algılanır. Tıpta kullanılan ilaçların %70'inin hedefini oluşturan bu reseptörlerin sinyal iletim mekanizmalarının ayrıntıları güncelliğini koruyan sıcak araştırma alanlarından biridir. Bu çalışmada bu reseptörlerin moleküler aktivasyon mekanizmasının daha iyi anlaşılmasına katkısı olabilecek bir konstitütif aktivatör mutasyon (insan β_2 -reseptöründe F282L), yaban tip reseptör ve CAM mutanıyla karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Çalışmada, heterolog transfeksiyon için HEK 293 hücreleri ve bu reseptörlerin prototipik bir örneği olan insan β_2 -adrenoseptörü deneysel model olarak kullanılmıştır. F282L mutantının, ligand bağlama sinyal iletim gibi özelliklerinin yanı sıra hücre içi dağılımı ve trafiğini incelemek üzere yeşil floresan protein ve onun bir varyantı olan dendra proteini ile yaban tip ya da mutant reseptörlerin birleşik (füzyon) proteinleri elde edilmiş ve bu tür çalışmalara teknolojik altyapı oluşturmak üzere bu birleşik proteinleri ekspres eden kalıcı hücre klonları elde edilmiştir. Bu çalışma, fotokonversiyon özelliği gösteren dendra-reseptör füzyonunun elde edildiği, bu füzyon proteininin fonksiyonel olduğunun gösterildiği ve bu araç kullanılarak reseptörün hücre zarındaki tek yönlü hareketinin gözlenebildiği ilk çalışmadır.

Çalışmada elde edilen bulgular şöyle özetlenebilir: 1) Reseptörün ligand bağlanma bölgesine yakın bir noktada VI. transmembran heliks üzerinde bulunan F282L mutasyonu β_2 -adrenoseptörü (Gs ve adenilat siklaza kenetlenmek bakımından) konstitütif olarak aktive etmektedir. 2) F282L-mutantının konstitütif aktivite özellikleri ve ligand bağlama paterni agonist ile bağlı reseptörü taklit ettiği düşünülen CAM mutantından farklı bulunmuştur. 3) F282L- β_2 -adrenoseptör mutantının hücresel dağılımı yine CAM mutantınıninkinden (ya da yaban tipinkinden) farklı bulunmuştur. 4) Tüm reseptör türlerinin hücre zarında en az iki farklı difüzyon havuz oluşturdukları saptanmıştır. Bu bulgular β -adrenoseptörün farklı moleküler aktivasyon mekanizmalarının olabileceğine ve reseptörün birden fazla aktif durumunun varlığına işaret etmektedir. F282L mutantının gözlenen bu özellikleri tezin son bölümünde bir kuramsal denge modeli çerçevesinde açıklanmıştır.

Anahtar Kelimeler: β_2 -Adrenerjik Reseptör, Hücre içi Protein Trafiği, Mutasyon, Protein-Protein Füzyonu, Yeşil Floresan Protein.

Visualizing Intracellular Distribution of Wild Type and Mutant β 2-Adrenergic Receptor by Means of Green Fluorescent Protein Fusion.

ABSTRACT

A large part of the signals transferred between cells by neurotransmitters, hormones, autacoids are perceived by means of G protein coupled receptors (GPCR). One of the hottest areas of modern therapeutics is studying the signaling mechanisms of these receptors, which constitute the main target of drugs used in medicine (70% of all available therapeutics target the GPCR). In the present study, a relatively unknown constitutive activating mutation (F282L in human β 2-receptor) was investigated on a comparative basis (with wild type receptor and CAM mutant) to contribute a better understanding of the molecular activation mechanisms of GPCR. HEK 293 cells were used for heterologue transfection and human β 2-adrenoceptors (as a prototypical example of GPCR) were used as the experimental model. Ligand binding and signaling properties of F282L mutant, compared to wild type and CAM receptor were investigated in purified membrane preparations or in intact cells. In order to investigate intracellular distribution or trafficking of F282L mutant compared to wild type and CAM mutant, fluorescent protein (GFP or dendra) fusions with the relevant receptors types were obtained. Cell clones that stably express these fusion proteins were also obtained as a experimental tool. In this respect, the present study is the first one in the literature where a receptor-dendra fusion was constructed, expressed, and shown to be functional and photoconvertible. The latter property of the fusion protein allows one to investigate unidirectional motion of the receptor in plasmalemma.

Results of the present study can be summarized as follows: 1) F282L mutation in human β 2-adrenoceptor in transmembrane helix VI at a position close to the ligand binding site lead to the constitutive activity of β 2-adrenoceptor (in terms of activating Gs and adenylyl cyclase), 2) Constitutive activity and ligand binding patterns of the F282L mutant were different from that of CAM mutant, which has been considered to be imitating agonist-bound receptor. 3) Cellular distribution of F282L- β 2-adrenoceptor was found to be different from that of CAM mutant. 4) For all kinds of β 2-AR investigated here, two different diffusive pools (fast and slow) were observed in the cellular membrane. These findings indicate that the molecular activation mechanism of β 2-adrenoceptor may not be unique and that β 2-adrenoceptor may possess more than one active state. Such properties of F282L mutant were explained in the last part of this dissertation in a framework of an equilibrium model.

Key words: β 2-Adrenergic Receptor, Green Fluorescent Protein, Intracellular Protein Trafficking, Point Mutation, Protein-Protein Fusion

TEŞEKKÜR

Biyoteknoloji doktorası eğitimim süresince G proteine kenetli sinyal iletimi üzerine çalıştım. Bana araştırma olanağı sağlayan ve çalışmanın her aşamasında yakın ilgi ve önerileri ile beni yönlendiren danışman hocam, Sayın Prof. Dr. Ongun Onaran'a (Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi) ve çalışmalarım süresince yardım gördüğüm Sayın Prof. Dr. Özlem Uğur'a (Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi), Doktora öğrencisi Sayın Ali Kaya'ya (Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü), Moleküler Biyoloji ve Teknoloji Araştırma ve Geliştirme Birimi'nin bütün elemanlarına, konfokal mikroskopi için bize laboratuvarını açan ve yardımcı olan Prof. Dr. Nuhan Puralı'ya (Hacettepe Üniversitesi Biyofizik ABD) ve Doktora eğitimim süresince bütün Biyoteknoloji Enstitüsündeki hocalarıma teşekkürlerimi sunarım.

Olga ALTUNTAŞ

Ankara, Mayıs 2007.

Bu tez Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü tarafından desteklenen “G proteinine Kenetli Sinyal İletim Sistemlerinde Proteinler Arası Etkileşimlerin ve Protein Komponentlerin Hücre içi Trafikinin Yeşil Floresan Protein (YFP) Füzyon proteinleri Aracılığıyla İncelenmesi” proje kapsamında yapılmıştır.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER	2
3. MATERYAL VE YÖNTEM	9
3.1. Materyal	9
3.1.1. Hücre Kültürü	9
3.1.2. Kullanılan kimyasal maddeler ve materyal	10
3.2. Yöntem	10
3.2.1. cDNA konstraktlarının elde edilmesi	10
3.2.1.1. “Site-directed mutagenesis” yöntemi	11
3.2.1.2. β_2 -adrenoseptör-floresan protein füzyonları	11
3.2.1.3. DNA dizi analizi	12
3.2.2. Hücre transfeksyonu ve bakteri transformasyonu	12
3.2.3. Hücre membranı hazırlanması	13
3.2.4. Adenilat siklaz aktivitesinin ölçüldüğü deneyler	14
3.2.4.1. Canlı hücrede	14
3.2.4.2. Membranda	14
3.2.4.3. cAMP ölçümü	15
3.2.5. Bağlama deneyleri	15
3.2.6. Konfokal mikroskopi	15
3.2.7. İstatistiksel yöntem	16
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	17
4.1. Konstraktlar	17
4.2. β_2 -Adrenoseptör ve F282L mutantın ekspresyon özellikleri	19
4.3. β_2 -Adrenoseptör ve F282L mutantın subselüler dağılım özellikleri	20
4.4. β_2 -Adrenoseptör ve F282L mutantın sinyal iletime özellikleri	24
4.5. β_2 -Adrenoseptör ve F282L mutantın ligand bağlama özellikleri	26
4.6. Dendra- β_2 -adrenoseptör füzyon proteinlerinin fotokonversiyon ve mobilite özellikleri	29
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	33
KAYNAKLAR	39
Ek 1.	42
Ek 2.	45
ÖZGEÇMİŞ	50

SİMGELER DİZİNİ

ATP	Adenozin-5' - trifosfat
β_2 - AR	Beta 2 adrenerjik reseptör
°C	Celsius derecesi
CaCl ₂	Kalsyum klorit
CAM	Konstitütif aktif mutasuonu
cAMP	Adenozin 3'-5' - siklik monofosfat
cDNA	Komplamenter DNA
CO ₂	Karbondioksit
cpm	Dakikada sayma
CYP	Siyanopindolol
¹²⁵ I-cAMP	Radyoaktif iyotla işaretli adenozin 3'-5' - siklik monofosfat
¹²⁵ I-CYP	Radyoaktif iyotla işaretli siyanopindolol
Dk	Dakika
DNA	Deoksiribonukleik asit
dpm	Dakikada yarılanma
E. Coli	<i>Esherichia coli</i>
EDTA	Etilendiamin tetra asetik asit
fmol	Femtomol
FSS	Fötal sığır serum
g	gram
G _{α}	G proteinin α birimi
G _{$\beta\gamma$}	G proteinin $\beta\gamma$ birimi
GFP	Yeşil floresan protein
GTP	Guanozin – 5' - trifosfat
GDP	Guanozin – 5' - difosfat
GTPaz	GTP'yi yıkan enzim
HCl	Hidroklorik asit
HEK -293	İnsan embiyonel böbrek hücresi
HEK -293 β -AR	β_2 –AR eksprese eden HEK-293 hücre serisi
IBMX	3-izobutil-1 metilksantin

İSO	İzoproterenol
KCl	Potasyum Klorür
M	Molarite
Mg ²⁺	Magnezyum
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar
NaCl	Sodyum Klorür
nM	Nanomolar
PBS	Fosfatla tamponlanmış fizyolojik tuz çözeltisi
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
pmol	Pikomol
RIA	Radioimmuno assay
U	Ünite

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	G Proteinlerine kenetli reseptörlerin yapısının şematik gösterimi	3
Şekil 1.2.	Reseptör-G proteini aracılı sinyal iletimi ve aktivasyonun şematik gösterimi	5
Şekil 2.1.	β 2-adrenoseptörün klonladığı Dendra 2N plazmiti ve agaroz jelde elde edilen fragman paternleri	18
Şekil 2.2.	β 2-adrenoseptör mutantlarının ekspresyon özellikleri.....	19
Şekil 2.3.	Yaban tip ya da (F282L)- β 2-adrenoseptör-GFP füzyon proteinini geçici olarak eksprese eden HEK-293 hücrelerinde füzyon proteininin hücresel dağılımını gösteren konfokal mikroskopik görüntüler	21
Şekil 2.4.	Yaban tip, CAM- ya da (F282L)- β 2-adrenoseptörün-Dendra füzyon proteinini geçici olarak eksprese eden HEK-293 hücre klonlarda elde edilmiş konfokal mikroskopik görüntüler	22
Şekil 2.5.	Dendra proteini ile β 2-adrenoseptörün yaban tipini veya mutantlarını kalıcı olarak eksprese eden HEK hücre klonlarında elde edilmiş konfokal mikroskopik görüntülerin analizi	24
Şekil 2.6.	Yaban tip, CAM- ya da (F282L)- β 2-adrenoseptör ile transfekte edilmiş HEK hücrelerinde cAMP yanıtları	25
Şekil 2.7.	Yaban tip ya da (F282L)- β 2-adrenoseptör ile transfekte edilmiş HEK hücrelerinde kompetisyon bağlanma deneyleri	27
Şekil 2.8.	Ligandların mutant β 2-adrenoseptörlere guanin nükleotit varlığında gösterdikleri afinitelerin yaban tip reseptöre gösterdikleri afinitelere oranları	29
Şekil 2.9.	β 2-adrenoseptör-dendra füzyon proteinini kalıcı olarak eksprese eden HEK293 hücrelerde fotokonversiyon deneyi (10 dk)	30
Şekil 2.10.	β 2-adrenoseptör-dendra füzyon proteinini kalıcı olarak eksprese eden HEK293 hücrelerde fotokonversiyon deneyi (20 dk)	31
Şekil 2.11.	β 2-adrenoseptör-dendra füzyon proteinini kalıcı olarak eksprese eden HEK293 hücrelerde fotokonversiyon deneyi (15 dk, şiddetli laser ile	

	yeşil floresansda FRAP)	32
Şekil 3.1.	Mutasyonların lokalizasyonu	34
Şekil 3.2.	F282L- β 2-adrenoseptör-mutantın davranışını, yaban tip ve CAM reseptör ile birlikte açıklamak için kullanılan denge modeli	35
Şekil 3.3.	Belirtilen reseptör türlerinde belirtilen tür ligandların varlığında simüle edilen aktivasyon yanıtları	37
Şekil 3.4.	Mutasyonların ligand bağlama afinitesi üzerine etkisini gösteren simülasyon	38
Şekil 4.1.	G α klonladığı PCDNA 3.1.+ plazmiti	42
Şekil 4.2.	Transfekte edilmemiş ve G α - GFP füzyon proteini Western blot analizi	44

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1.	Elde edilen ve deneylerde kullanılan hücreler ve özellikleri	9
Çizelge 2.1.	Modelde kullanılan parametrelerin açıklaması ve parametre değerleri	36

1. GİRİŞ

Bu tez çalışmasının amacı, G proteinlerine kenetli reseptörlerin prototiplerinden biri olan β -adrenerjik reseptörün (β -adrenoseptörün) moleküler aktivasyon mekanizmasıyla ilgili bilgi birikimine katkıda bulmaktır. Bu amaçla, özellikleri çok az bilinen bir konstitütif aktif reseptör mutanı (F282L) elde edilmiş ve bu mutantın sinyal iletme, ligand bağlama ve hücre içi dağılım özellikleri yaban tip ve özellikleri daha iyi bilinen CAM mutanı ile karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Tezin Kuramsal Temeller bölümünde, çalışmanın amacı ve stratejisi bu konuyla ilgili bilgi birikimi bağlamında değerlendirilmiştir.

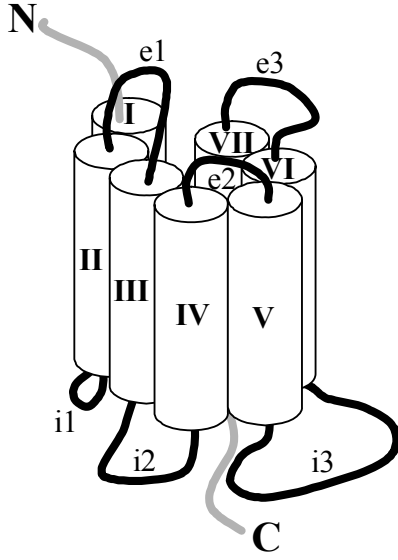
Bu amacın yanı sıra bu tezde, özelde β -adrenerjik reseptörlerin, genelde G proteinlerine kenetli reseptörlerin hücre içi trafiğini canlı hücrelerde tek yönlü olarak incelemeyi sağlayacak bir teknoloji geliştirilerek bu tür çalışmalara yöntemsel altyapı sağlamak amaçlanmıştır. Tezin yöntem, bulgular, sonuç ve tartışma bölümünde tüm bu araçlar, elde edilen sonuç ve ürünler bu amaçlar doğrultusunda sunulmuş ve tartışılmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

Organizmanın karmaşık dengesini sürdürmesindeki en önemli etkenlerden biri organizmayı oluşturan hücrelerin birbirleriyle iletişimidir. Bu iletişim, hücrelerin salgıladıkları nörotransmitterler, hormonlar, otakoidler gibi kimyasal mediyatörler aracılığıyla sağlanır. Bu kimyasal sinyaller genellikle hücre zarındaki reseptörler tarafından algılanır. Sinyal molekülünü özgün olarak bağlayan reseptör molekülünde oluşan konformasyon değişikliği, hücre içindeki çeşitli biyokimyasal kaskadları tetikleyerek sinyalin hücre içinde yayılmasına yol açar. Sonunda hücre içinde ilerleyen sinyaller hücrenin metabolik şebekesinde integre edilerek kas kasılması, salgılama, nöronal ateşlenmenin sağlanması ya da modülasyonu, gen ekspresyonlarının regülasyonu, hücre çoğalmasının ya da diferansiyasyonunun düzenlenmesi, özel metabolik aktivitelerin ortaya çıkması gibi çeşitli biyolojik yanıtlara dönüştürülürler. Kimyasal sinyalleri algılayan bu membran reseptörleri, G proteinlerine kenetli reseptörler (GPCR), iyon kanalı reseptörler, tirozin-kinaz reseptörler gibi çeşitli guruplarda toplanabilir (Donaldson *et al.* 1997). Bunlar içinde G proteinlerine kenetli reseptörler ve bu reseptörlerin sinyal iletilmesinde rol alan G proteinleri, bilinen en yaygın transmembran sinyal iletim sistemi ailesini oluşturur (Gilman 1987). Binden fazla üyesi bulunan bu reseptör ailesi doğada bilinen en büyük protein ailesidir (Dohlman *et al.* 1991, Neer 1995, Bourne 1997, Wess 1997, Marinissen and Gutkind 2001).

G proteinlerine kenetli reseptörler aracılı transmembran sinyal iletiminde başlıca üç bileşen yer alır: 1) Reseptör, 2) G proteini ve 3) efektör. Aşağıda bu bileşenlerle ilgili bilinenler ve sinyal iletim mekanizmasının nasıl çalıştığı kısaca özetlenmiştir.

Reseptör: G proteinlerine kenetli reseptörler, hücre zarını yedi kez geçen, yedi heliks yapıdan oluşan, amino terminali hücre dışında karboksi terminali ise hücre içinde olan tek zincirli integral membran proteinleridir (Strader *et al.* 1994). Bu yedi heliksli tek zincirli yapı hücre dışında ve içinde heliksleri birbirine bağlayan üçer halka oluşturur. Hücre içinde yer alan 2., 3. halkalar ve karboksi terminali reseptörün G proteinleriyle etkileşim G proteinini aktive etmesinde kritik rol oynamaktadır (Hedin *et al.* 1993, Tian *et al.* 1994). Bu yapı Şekilde 1.1. şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 1.1. G proteinlerine kenetli reseptörlerin yapısının şematik gösterimi. Hücre zarı düzlemine aşağı yukarı dik duran 7 tane heliks silindirlerle simgelenmiş, romen rakamlarıyla numaralandırılmıştır. Birinci ve 7. heliklerden kaynaklanan amino ve karboksi terminalleri gri renkle gösterilip N ve C harfleriyle belirtilmiştir. Heliksleri hücre dışında ve içinde birbirine bağlayan halkalar sırasıyla e ve i harfleriyle gösterilip arap rakamlarıyla numaralanmıştır.

Agonist uyarısıyla aktive olan reseptörün bu sinyali hücre içi efektörlere G proteinlerini aracılığıyla iletmesi tüm G proteinlerine kenetli reseptörlerin ortak işlevsel özelliğidir. Her reseptör türü başlıca 4 tip G proteini gurubundan birine kenetlidir: Gs-adenilat siklaz aktivasyonu, Gi/o-adenilat siklaz inhibisyonu, Gq-fosfolipaz C inhibisyonu, G₁₂, G₁₃-efektörleri bilinmiyor (Conklin and Bourne 1993, Rens-Domiano and Hamm 1995).

Reseptörler hücre dışı ortamda bulunan kimyasal sinyalleri (nörotransmitter, hormon, otakoid, koku ya da tat molekülleri, ya da bunlardan herhangi birini taklit eden ilaç moleküllerini) tersinir olarak bağladıklarında reseptörde oluşan konformasyon değişiklikleri reseptörün hücre içinde bulunan sinyal partnerleri tarafından algılanır ve sinyal böylece hücre içine iletilmiş olur. Doğal kimyasal sinyallerin neredeyse hepsi bu reseptörlerde agonistik etki yaparken, ilaç olarak kullanılan ya da kullanılmayan yapay ligandlar ya da bazı doğal kaynaklı maddeler bu reseptörlerde agonistik, antagonistik ya da invers agonistik etki gösterebilirler (Rossier *et al.* 1999). Genellikle bu reseptörler belirli doğal sinyal moleküllerine özgü olacak biçimde evrimleşmişlerdir ve böyle isimlendirilirler (Adrenerjik, kolinerjik, serotoninergik reseptörler ya da prostaglandin, GABA, TSH, reseptörleri gibi). Bugüne dek değişik ligandlar için değişik türlerden yüzlerce reseptör klonlanmıştır (Dingledine *et al.* 1990). Bunlar içinde ışık reseptörü olan rodopsinin üç boyutlu yapısı da kısa bir süre önce aydınlatılmıştır (Palczewski *et al.*

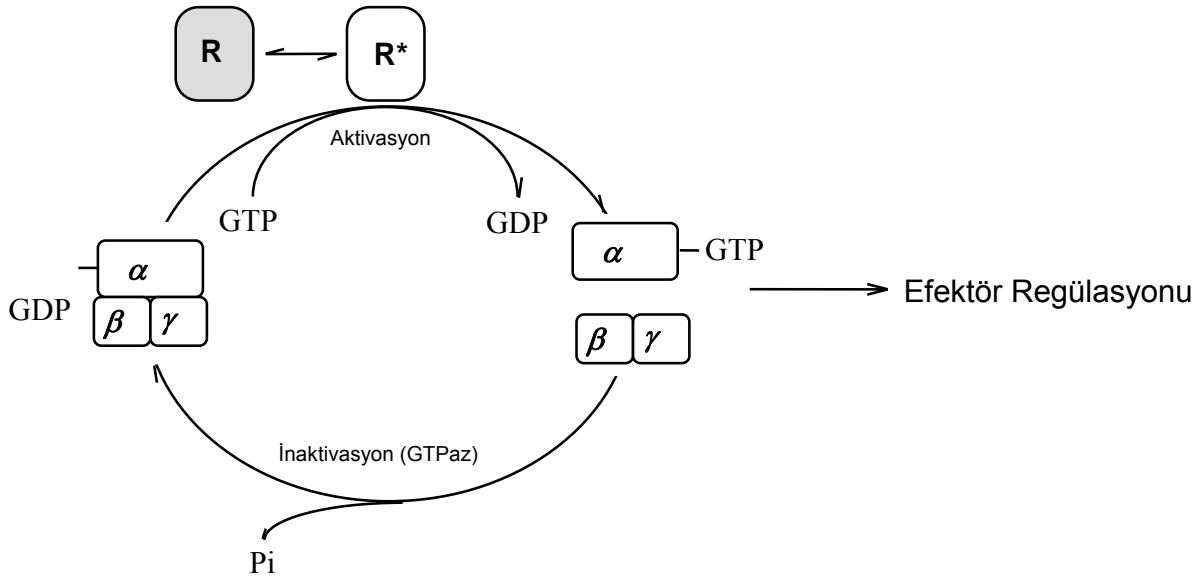
2000). Bu reseptörler aminoasit dizileri göz önüne alınarak üç gruba ayrılmıştır: 1) Rodopsin benzeri A grubu, 2) kalsitonin reseptörü benzeri B grubu, 3) metabotropik glutamat reseptörü benzeri C grubu (Gether and Kobilka 1998).

Bu reseptörlerin ligandla regülasyon mekanizması genellikle şu şematik modelle anlatılır: Reseptörün partnerleriyle etkileşebildiği aktif formu (R^*) ile bu yeteneğe sahip olmayan inaktif formu tersinir bir denge içindedir. Reseptöre ligand bağlanması bu dengeyi etkileyebilir ya da bu dengeyi aktif ya da inaktif form lehine değiştirebilir. Bu özelliklere sahip ligandlar sırasıyla nötral antagonist, agonist ya da invers agonist olarak adlandırılırlar (Lefkowitz *et al.* 1993, Samama *et al.* 1993). Ancak reseptörün bu aktif ya da inaktif formunu belirleyen moleküler ayrıntılar bugün bilinmediği gibi bu formların yukarıdaki basit şemada belirtildiği şekilde “tek” olup olmadıkları da bugün sıcak bir tartışma konusudur (Onaran ve Costa 2001). Agoniste özgü sinyal trafiği (McCune *et al.* 2000), liganda özgü konformasyon değişikliği (Gether *et al.* 1995, Kenakin 1997) gibi gözlemleri açıklamakta güçlük çıkaran bu nokta burada sunulan çalışmada ele alınan konulardan biridir.

Bu reseptörlerin membrandaki miktarları hücre dışındaki sinyallerin hücre tarafından algılanma verimini etkileyen önemli bir faktördür. Dolayısıyla, membrandaki reseptör ekspresyonu hücre tarafından dinamik bir biçimde kontrol edilmektedir (Milligan and Bond 1997). Bu düzenlemedeki önemli parametrelerden biri de hücre dışındaki sinyal genliğine bağlı olan reseptör desensitizasyonu ve internalizasyonudur (Von Zastrow and Kobilka 1994, Yu *et al.* 1997, Mhaoty-Kodja *et al.* 1999). Bu sürecin reseptörün aktif formuyla ilişkili olması da bu çalışmada ele alınacak konulardan biridir.

G proteini ve Efektörler: G proteinleri, hücre dışındaki sinyali algılayan reseptörlerden sinyali hücre içine ileten transdüserlerdir. Membranın hücre içine bakan yüzeyine bağlı olan bu proteinler α , β ve γ olarak adlandırılan alt birimlerden oluşan heterotrimerlerdir. Alfa alt birimi, Ras gibi küçük GTPazlarla benzerlik gösterir ve G proteininin reseptör ve efektör spesifitesini belirler. Diğer iki alt birim ise heterotrimerik G proteinlerine özgüdür (Gilman 1987). Şimdiye kadar 20 α , 6 β ve 12 γ gen ürünü bildirilmiştir (Hamm 1998). Alfa alt birimi,

guanin nükleotit bağlama ve bağlı GTP'yi GDP'ye hidroliz etme yeteneğine sahip bir GTPaz'dır. Bu özellik G proteinlerinin aktivasyon ve sinyal iletilme mekanizmasında önemli bir rol oynar (aşağıda açıklanıyor). G proteinleri etkileştikleri efektörlere göre gruplanırlar ve amino asit dizilerindeki farklılıklara ve benzerliklere göre sınıflandırılırlar. G proteinlerinin etkileştiği birkaç temel efektör gurubu vardır: 1) adenilat siklaz (ATP'den ikinci haberci cAMP sentezleyen enzim), 2) Fosfolipaz C (inozitol fosfolipitlerden, IP3 ve diaçilgliserol gibi ikinci habercileri sentezleyen enzim), ve 3) çeşitli iyon kanalları (Kukkonen *et al.* 2001). G proteinlerinin reseptör tarafından aktive edilmesi ve sinyalin iletilme mekanizması şöyle özetlenebilir: G proteinlerinin GDP-bağlı heterotrimerik formu inaktiftir. Aktive olmuş reseptör, $G\alpha$ altbirimine bağlı GDP'nin disosiyasyonunu hızlandırarak hücre içi ortamda bulunan GTP'nin $G\alpha$ üzerinde GDP ile yer değiştirmesini katalizler. GTP bağlamış heterotrimer $G\alpha$ -GTP ve $G\beta\gamma$ olarak ayrışır. Hem $G\alpha$ -GTP hem de $G\beta\gamma$ ayrı ayrı efektörlerin aktivitelerini modüle etme yeteneğine sahiptir. Böylece reseptör sinyali hücre içine iletilmiş olur. $G\alpha$ alt biriminin GTPaz aktivitesi, kendi üstünde bağlı bulunan GTP'nin GDP'ye dönüşmesini ve heterotrimerin reasosiyasyonunu, yani inaktivasyonu sağlar. Bu döngü reseptör aktif kaldığı sürece devam eder (Gilman 1987). Tüm bu senaryo Şekilde 1.2. şematik olarak özetlenmiştir.



Şekil 1.2. Reseptör-G proteini aracılı sinyal iletimi ve aktivasyonun şematik gösterimi. Aktif ve inaktif reseptör sırasıyla R^* ve R , G proteini alt birimleri ise α , β , γ olarak simgelenmiştir.

Reseptör proteininin yanı sıra G proteini aktivitesinin düzenlenmesinde RGS (G-protein sinyal regülatörleri (Dohlman and Thorner 1997)) ve AGS (G-protein sinyal aktivatörleri (Blumer *et al.* 2005)) gibi sinyal proteinlerinin de rol aldığı bilinmektedir.

Bugün tedavi amacıyla tıpta kullanılan ilaçların %70'inin G proteinlerine kenetli reseptörleri hedefliyor olması, bu sinyal ileti sisteminin iyi araştırılmış bir prototipik sinyal iletim sistemi olması, taşıdığı potansiyel önem gibi faktörler bu sisteme olan bilimsel ve teknolojik ilgiyi sıcak tutmaktadır. Güncel olarak en sıcak konulardan biri de bu reseptörlerin moleküler aktivasyon mekanizmalarının anlaşılmasıdır. Ancak yoğun çalışmalara rağmen bu konu günümüzde çok iyi anlaşılabilir değildir.

Son on yıl içinde keşfedilen ya da yapay olarak oluşturulan bazı reseptör mutasyonları bu konudaki çalışmalarda önemli bir çığır açmıştır. Bu mutasyonlar içinde reseptörde konstitütif aktiviteye yol açanlar özellikle ilgi çekmektedir çünkü konstitütif aktif mutant reseptörlerin birçok bakımdan agonist ile bağlı reseptörü taklit ettiği düşünülmektedir. Bu mutantlar, agonist yokluğunda G proteinini aktive edebilmekte, yaban tip reseptöre göre agonistlere, nötral antagonistlere ve invers agonistlere sırasıyla daha yüksek, aynı ya da daha düşük afinite göstermekte, ve yaban tip reseptöre göre daha hızlı duyarsızlaşmaktadırlar (Samama *et al.* 1993, Lefkowitz *et al.* 1993). Ancak yapılan çalışmalar her konstitütif aktif reseptörün aslında aynı fiziksel reseptör konformasyonuna yol açmadığına işaret etmektedir, bu da reseptörün birden fazla aktif durumu olabileceğini düşündürmektedir (Onaran ve Costa 2001). Doğal olarak oluşmuş konstitütif aktif reseptör mutantlarının insanda retinis pigmentosa (Spiegel 1996), otoimmün hastalıklar (de Ligt *et al.* 2000), puberta precox (Shenker *et al.* 1993) gibi patolojilere yol açmalarının yanı sıra yukarıda belirtilen nedenlerle bu mutantlar reseptör aktivasyon mekanizmalarının moleküler düzeyde anlaşılması konusunda yapılan çalışmalarda önemli birer araç olarak görünmektedir (bu konuda iyi bir derleme için (Milligan *et al.* 2003, Costa ve Cotecchia 2005)'e bakınız).

Konstitütif aktiviteye yol açan mutasyonların prototipleri adrenerjik reseptörlerde oluşturulmuştur; bunlar $\alpha 1b$ adrenoseptördeki A303E mutasyonu (Kjelsberg *et al.* 1992) ya da

β 2-adrenoseptörde VI transmembran heliksin sonunda oluşturulan CAM mutasyonudur (Samama *et al.* 1993, Lefkowitz *et al.* 1993). Bu prototipik mutasyonlara ve reseptörlerin DRY motifinde yapılan birçok başkalarına ek olarak son zamanlarda önce α sonra β -adrenoseptörlerde oluşturulan F282L mutasyonudur (Chen *et al.* 2002). Ballesteros numaralamasıyla 6.44 olarak bilinen bu pozisyon, 6. helikste ligand bağlanma bölgesine yakın ama bağlı ligantla doğrudan etkileşmeyen, rodopsin benzeri reseptörlerde korunmuş olarak fenilalanin rezidüsü taşımaktadır. Bu aminoasitin lösine çevrilmesi reseptörde konstitütif aktivite oluşturmaktadır. Bu pozisyonun ligand bağlanma bölgesine yakın olması, bu mutasyonun ligand bağlanmasıyla G proteini aktivasyonu arasındaki allosterik ilişkiyi incelemek bakımından iyi bir araç olabileceğini düşündürmektedir. Ancak literatürde bu mutantın konstitütif aktivasyon yeteneğine sahip olması dışında hiçbir özelliği incelenmemiştir.

Bu tezde yapılan çalışmaların başlıca iki amacı vardır: 1) Özellikleri neredeyse hiç bilinmeyen F282L mutasyonunu insan β 2-adrenoseptörlerinde oluşturmak ve bu mutantın sinyal iletim ve hücre içi dağılım özelliklerini yaban tip ve prototipik konstitütif aktif CAM reseptörleriyle karşılaştırmalı olarak incelemek, 2) Reseptörlerin hücresel dağılımını ve trafiğini canlı hücrede incelemeyi mümkün kılan reseptör-floresan protein (ya da G proteini-floresan protein) füzyonlarını elde etmek, bunları önce plazmit vektörlerde sonra heterolog memeli ekspresyon sistemlerinde eksprese ettirip klonlamak. Böylece hem burada sunulan çalışmalarda kullanılan, hem de benzeri çalışmalarda kullanılacak hazır bir teknolojik ürün sağlamak.

Bu amaçla insan β 2-adrenoseptörleri ve HEK-293 (Human Embrionic Kidney) hücreleri çalışma modeli olarak seçilmiştir. Bir deniz anası türünden (*Aequorea victoria*) klonlanıp geliştirilmiş yeşil floresan protein (GFP) (Rademarker 1985) ve bir mercan türünden çok yeni klonlanmış olan dendra proteini (Gurskaya *et al.* 2006), floresan füzyon protein partnerleri olarak kullanılmıştır. Spektral fotokonversiyon gösterebilen dendra proteini hücresel reseptör trafiğini sayısal olarak incelemek bakımından eşsiz bir araç gibi görünmektedir ve G proteini aracılı sinyal iletim sisteminin incelenmesinde daha önce hiç kullanılmamıştır. Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar hem reseptörün aktif konformasyon repertuarı ilgili

bilimsel sorulara yanıt vermek bakımından, hem de reseptör ve G proteinlerinin hücresel trafiğini (reseptör aktivasyonuna bağılı olarak) incelemek için kullanılacak teknolojiler bakımından ilgili bölümlerde ayrıntılarıyla tartışılmıştır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Hücre Kültürü

Bu çalışmada kullanılan hücre dizileri ve özellikleri aşağıda bir tablo halinde verilmiştir. Butün hücreler %10 fetal sığır serumu (FSS) ve 100 U/ml Penisilin, 100 µg/ml Streptomisin içeren DMEM (Dulbeco's Modified Eagle Medium) içinde, 37° C sıcaklık ve %5 CO₂'li ortamda çoğaltılmıştır.

Cizelge 1.1. Elde edilen ve deneylerde kullanılan hücreler ve özellikleri

	Köken	Ekspresyon özellikleri
HEK-293	İnsan embriyonel böbrek hücresi (bu çalışmada kullanılan heterolog konakçı)	Çok az miktarda endojen β_2 -AR ekspresyonu (200 fmol/mg membran proteini)
HEK (BAR)	HEK-293	β_2 -AR over-ekspresyonu (40 pmol/mg membran proteini)
HEK (BAR CAM)	HEK-293	Konstitütif aktif mutasyonu taşıyan β_2 -AR over-ekspresyonu (24 saat 100 nM alprenolol ile inkubasyondan sonra ~30 pmol/mg membran proteini)
HEK (BAR F282L)	HEK-293	F282L konstitütif aktif mutasyonu taşıyan β_2 -AR over-ekspresyonu (24 saat 100 nM alprenolol ile inkubasyondan sonra ~10 pmol/mg membran proteini)
HEK (BAR-GFP)	HEK-293	β_2 -AR-GFP füzyon proteini ekspresyonu
HEK (BAR F282L-GFP)	HEK-293	β_2 -AR-F282L-GFP füzyon proteini ekspresyonu
HEK (BAR-Dend)	HEK-293	β_2 -AR-Dendra füzyon proteini ekspresyonu
HEK (BAR CAM-Dend)	HEK-293	β_2 -AR-CAM-dendra füzyon proteini ekspresyonu
HEK (BAR F282L-Dend)	HEK-293	β_2 -AR-F282L-dendra füzyon proteini ekspresyonu

Bu hücrelerin elde edilmesi ve sınanmasıyla ilgili yöntemsel ayrıntılar (cDNA konstraktlarının hazırlanması, transfeksiyon ve klon seçimi) aşağıda verilmiştir.

3.1.2. Kullanılan kimyasal maddeler ve materyal

Proteaz inhibitör kokteyli (1 697 498), GTP (106 399) Roche'den, Izoproterenol (I-6504), Alprenolol (A-8676), Timolol (T-6394) Sigma'dan, ICI 118,551 (0821) Tocris'ten, ATP (519 987) Roche'den I-CYP ARS Ins.'ten, Lipofektamin Invitrogen'den, DMEM (A 1986-9010), EDTA (B4135) ApplyChem'den, Fötal Sığır Serum (04-007-1B) Biological Industries'den, Kanamisin Carlo Erba'dan, IBMX (I-7018), MTT kit (12k8412) Sigma'dan, agaroz (BP 1356-100), TRİS (BP-154-1), sukroz (BP220-212), Etidium bromid (BP 102-5) Fisher Biotech'ten, marker O'Range Ruler (SM 0653), Dpn I (ER 170) T4 DNA Ligaz (202L), T4 DNA Ligaz buffer (360L) Fermentas'tan, KpnI (142L), Hind III (104L), XhoI (146S), Alkalın Fosfotaz (290S) BioLabs'tan temin edilmiştir. Diğer tüm standart maddeler (tamponlar, tuzlar, alkoller, deterjanlar ve merkoaptoetanol gliserol gibi bir çok organik madde) mümkün olan en yüksek saflıkta Sigma ya da Fisher Scientific'den satın alınmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. cDNA konstraktlarının elde edilmesi

Burada sunulan bütün çalışmalarda pCDNA3 vektörü üzerinde klonlanmış insan β 2-adrenoseptörü cDNA'sı (T. Costa, ISS, Roma, İtalya tarafından gönderilmiştir), pEGFP-N1 vektöründe klonlanmış GFP cDNAsı (Clontech, USA), pDendra2-N vektöründe klonlanmış dendra floresan proteini cDNA'sı (Lukyanov, Moskova, Rusya, tarafından gönderilmiştir) ve pCDNA3.1+ vektöründe klonlanmış sıçan G α s proteini cDNA'sı (Prof. Dr. Özlem Uğur tarafından hazırlanmıştır) kalıp ya da kaynak olarak kullanılmıştır.

3.2.1.1. "Site-directed mutagenesis" yöntemi

İnsan β_2 -AR üzerinde konstitütif aktivasyona yol açan mutasyonlar, “site-directed mutagenesis” tekniği ile yapılmıştır. Kısaca, mutasyon yapılacak noktanın +/- 15 baz ilerisini ve gerisini kapsayan ve mutasyonu içeren iki tam komplementer primer kullanılarak ilgili cDNA’yı da içeren tüm sirküler vektör, PCR tepkimesiyle kopyalanmış, bakteri kökenli (nonmutant) plazmitler metilli DNA’yı seçici olarak yıkan *dpn1* enzimi ile parçalanarak kalan vektör plazmitler yeniden *E. coli*’de (*Dh5 α* suşu) klonlanmıştır. Klonların mutasyon içeren plazmit taşıyıp taşımadıkları DNA dizi analiziyle saptanmıştır. Reseptörde F282L mutasyonu için kullanılan iki primer dizisi şunlardır: 1) 5’-ATC ATG GGC ACT TTG ACC CTC TGC TGG CTG-3’, 2) 5’-CAG CCA GCA GAG GGT CAA AGT GCC CAT GAT-3’. CAM mutasyonu Prof. Dr. Özlem Uğur (A.Ü.T.F. Farmakoloji Ab.D.) tarafından bu çalışma başlamadan önce aynı yöntemle hazırlanıp klonlanmıştır.

3.2.1.2. β_2 -adrenoseptör-floresan protein füzyonları

İnsan β_2 -adrenoseptörü ve mutantları pCDNA 3.1 plazmitleri üzerinde PCR tepkimesi kullanılarak çoğatıldı. Bunun için iki primer kullanıldı: forward primer (5’ ucunda *XhoI* bölgesi içerecek şekilde), 5’-AGCCTCGAG-ATGGGGCAACCCGGGAA-3’ ve reverse primer (5’ ucunda *HindIII* bölgesi içerecek şekilde): 5’-AGCAAGCTTCAGC-AGTGAGTCATTTGTACTACAATTCC-3’. PCR tepkimesiyle çoğaltılan cDNA’lar agaroz jel elektroforezinden saflaştırıldı. Saflaştırılan β_2 -adrenoseptör cDNAsı, GFP cDNAsı taşıyan pEGFPN1 plazmitindeki çoklu klonlama bölgesinde bulunan *Xho I* ve *Hind III* enzim bölgeleri arasına yerleştirildi. Ligasyon ürünleri *Dh5 α* *E. coli* suşunda klonlanarak β -AR-GFP füzyon plazmitini taşıyan klonlar seçildi. CAM mutasyonu taşıyan β_2 -adrenoseptörde mutasyon nedeniyle oluşan ikinci *XhoI* bölgesi nedeniyle bu reseptörün cDNAsı ilgili vektöre iki ardışık ligasyonla taşındı. Önce, *XhoI*-*HindIII* enzimatik tepkimesiyle oluşan küçük parça saflaştırılıp, *XhoI*-*HindIII* enzimleriyle linearize edilmiş pEGFPN1 plazmiti üzerine yerleştirildi ve klonlandı. Sonra, iki ucu da *XhoI* bölgesi taşıyan büyük parça, bir önceki klondan elde edilen ve *XhoI* enzimi ile linearize edilmiş plazmite yerleştirilerek yeniden klonlandı. F282L mutasyonunun ise böyle bir özelliği olmadığından yaban tip reseptör gibi işlem gördü.

Dendra protein ile reseptör füzyonunun elde edilmesinde kullanılan taktik ve yöntem tüm ayrıntılarıyla GFP için uygulamanla aynıdır. Çünkü Dendra proteinin cDNAsı da GFP içeren plazmitte klonlamıştır ve bu plazmitinde “multiple cloning” bölgesi pEFGFP N1 ile aynıdır.

3.2.1.3. DNA dizi analizi

Bütün konstraktlar, tüm dizi analizleri yapılarak cDNA’larda PCR kopyalaması sırasında istenmeyen mutasyonların oluşma olasılığı bakımından kontrol edildi. Dizi analizleri florofor işaretli di-deoksi ve işaretli deoksi nükleotit karışımları ile PCR yöntemi kullanılarak yapıldı. Bu amaçla optimize edilmiş bir ticari kit kullanıldı (Applied Biosystems, BigDye Terminator v3.1, 4336917). PCR reaksiyonu için kitin talimatlarındaki parametreler değiştirilmeden kullanıldı. PCR ürünleri Sefadex G50 kolonunda (50mg kuru jel/kolon) saflaştırıldıktan sonra elektroforetik olarak değerlendirildi. Kapiller elektrofrez ve veri analizi için Applied Biosystems’in ABI Prism 310 Genetic Analyser sistemi kullanıldı. Bu çalışmada kullanılan cDNA konstraktlarının dizileri ekte verilmiştir.

3.2.2. Hücre Transfeksiyonu ve Bakteri Transformasyonu

HEK-293 hücreler lipofektamin yöntemi kullanılarak transfekte edildi. Hücreler %10 fetal sıgır serumu (FSS) ve 100 U/ml Penisilin, 100 µg/ml Streptomisin içeren DMEM (Dulbeco’s Modified Eagle Medium) içinde %70-80 konflüense kadar çoğaltıldı. Transfeksiyon sırasında 2 µg cDNA kullanıldı. Stabil transfeksiyonlarda istenen proteinleri stabil olarak eksprese eden klonlar Genetisin kullanılarak standart yöntemlerle seçildi ve çoğaltıldı. Bu amaçla transfeksiyon başına ortalama 90 klon tarandı. β2-adrenoseptor içeren proteinlerin ekspresyon düzeyleri ligand bağlama deneyleriyle belirlendi. Gs-GFP füzyon proteininin ekspresyonu Western Blot ile saptandı: Sıcakta (90 °C) β-merkaptoetanol varlığında indirgenip denatüre edilen örnekler poliakrilamid jel elektroforezinde ayrıştırıldıktan sonra (%5 “stacking”, pH 6.8, %10 “resolving”, pH 8.8), jelin içeriği elektroforetik olarak nitroselüloz membrana aktarıldı. Yağsız süt tozu çözeltisi (%0.1 tween20 PBS içinde %5 w/v olacak şekilde) ile bloke edilen membranlar sırasıyla primer ve sekonder antikorlarla inkübe edildi. Primer antikor

olarak tavşan anti-G α s poliklonal antikor (Santa Cruz, sc-823), sekonder antikor olarak da laboratuvarımızda geliştirilip hazırlanan HRP ile konjüge edilmiş keçi anti-tavşan IgG-Fc kullanıldı. Santa Cruz'un luminol substratı (sc-2048) ile geliştirilen membranlar standart röntgen filmi ile görüntülendi. Tüm jel görüntü analizleri için Raytest'in Bas-Diana sistemi kullanıldı.

Tüm E. coli transformasyonları BTX marka ECM399 model bir elektroporatör kullanılarak elektroporasyon yöntemi ile yapıldı (deiyonize su içinde 1 mm açıklıkla 1.5 kV altında 0.5 μ s ekspanansiyel puls). Bakteriden ya da agaroz jelden plazmit saflaştırmak için MiniPrep (Promega), PCR-gel saflaştırma (Promega) ve MaxiPrep (Qiagen) kitleri, üreticilerin talimatları değiştirilmeden kullanıldı.

3.2.3. Hücre Membranı Hazırlanması

Hücreler hipotonik tampon (5 mM Tris-HCl, pH 7.4 ve proteaz inhibitör kokteyli) içinde 26 numara enjektör ucundan 10-15 kez geçirilerek homojenize edildi. Homojenatın 400 x g'de 10 dakika santrifuj edilmesiyle elde edilen süpernatant 30.000 x g'de 30 dakika ultrasantrifuj edilerek hücre membranları çöktürüldü. Mg²⁺ içeren Tris tamponuyla bir kez yıkanan membranlar 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 10 mM MgCl₂, %50 sükröz ve proteaz inhibitör kokteyli içeren tampon içinde süspanse edildi. Bu preparatlar -70° C de saklandı. Preparatlardaki protein miktarı Bradford yöntemiyle, standart olarak BSA kullanılarak ölçüldü.

3.2.4. Adenilat siklaz aktivitesinin ölçüldüğü deneyler

Adenilat siklaz deneyleri 37°C' de. 96 kuyulu plaklarda, tersi belirtilmediği sürece toplam 100 μ l hacimde yapıldı.

3.2.4.1. Canlı Hücrede

Deneylerden bir gün önce hücreler alprenolol (10^{-7} M) içeren kültür vasatına alındı. Yirmidört saat sonra hücreler 1 ml PBS-EDTA ile kaldırıldı ve $2000\times g$ 'de 2 dakika santrifuj edilerek 2 kez PBS ile yıkandı. Serumsuz vasat içinde (100 μ l) 96 kuyulu plakalara dağıtılan bu hücreler (~10000 hücre/kuyu) üzerine 15 dakika sonra uyarılar (10 μ l hacim içinde) ve sonuç derişim 1 mM olacak şekilde IBMX (fosfodiesteraz inhibitörü) eklenerek deney başlatıldı ve 7 dk sonra 100 μ l HCl (0.2 N) eklenerek durduruldu. Bu süre içinde oluşan cAMP aşağıda belirtildiği şekilde ölçüldü.

3.2.4.2. Membranda

Deney, içlerinde membranların (0.5 μ g/ kuyu) ve belirtilen uyarıların bulunduğu kuyulara adenilat siklaz deney tamponu (50 mM TRİS-HCl, 100 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM IBMX, 0.5 mM ATP pH. 7.4) eklenmesiyle başlatıldı ve 37°C'de 5 dk sonra 100 μ l HCl (0.2N) eklenerek durduruldu. Bu koşullarda cAMP birikimi en az 5 dakika doğrusal olduğundan, deneylerin tümünde 5 dakikalık tepkime süresince biriken cAMP miktarı durağan adenilat siklaz aktivitesini değerlendirmek için kullanıldı. Durağan adenilat siklaz aktivitesi birim zamanda (1 dakika) belirli bir membran miktarı (1 mg membran proteini) başına cAMP birikimi (pmol) olarak verildi.

3.2.4.3. cAMP Ölçümü

cAMP derişimi radiyoimmünoesey yöntemiyle ölçüldü (Uğur *et al.* 1997). Adenilat siklaz deneylerden alınan örneklere (25 μ l veya 50 μ l) ve cAMP standartlarına (25 μ l) sodyum asetat tamponu (200 μ l, 100 mM, pH 6.2) eklendi. Bu şekilde tamponlanmış örnekler üzerine 10 μ l asetik anhidrit-trietilamin (1:2) eklenip cAMP'nin asetilasyonu sağlandı. Bu çözeltilerin herbirinden 50 μ l'lik örnekler, bu laboratuarda üretilmiş anti-cAMP antikor ile kaplanmış 96

kuyulu plakalara alındı ve üzerlerine 50 µl sodyum asetat tamponu (Na asetat 100 mM, CaCl₂ 2 mM pH 5.8), 20 µl ¹²⁵I-cAMP (10.000 cpm) eklenerek 24 saat 4°C bekletildi. Bu sürenin sonunda bağlamayan ¹²⁵I-cAMP yıkandı ve 25 µl sintilator eklenip kuyularda kalan radyoaktivite gama sayacıyla (Wallac, 1450 microbeta Trilux) okundu. Standart asetil-cAMP bağlanma eğrisi 4 parametrelili logistik modelin regresyonuyla saptandı. cAMP derişimleri, tahmin edilen modelin ters regresyonuyla belirlendi.

3.2.5. Bağlanma deneyleri

Membranlar (1 µg/ kuyu), tampon çözeltisi (50 mM TRIS-HCl, 100 mM KCl, 10 mM MgCl₂, pH. 7.4) işaretli ligand (¹²⁵I-siyonopindolol, 250.000 dpm) ve Şekil 2.7.'de belirtilen soğuk ligandlarla toplam 100 µl hacimde 37°C' de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda reaksiyonlar bir harvester yardımıyla (Skatron) suyla ıslatılmış cam elyaf filtreden (Whatman GF/B) vakuum altında filtre edilerek bağlı ve serbest ligand ayrıldı. İki kez 3 ml soğuk tampon çözeltisiyle yıkanan filtrede kalan aktivite bir sintilasyon sayacı (Wallac, 1450 microbeta Trilux) ile okundu.

3.2.6. Konfokal mikroskopi

Canlı hücrelerde konfokal mikroskopik görüntüler Zeis Axiovert 200M marka ve model mikroskop donanımı üzerinde LSM-Pascal kullanılarak elde edilmiştir. Floresan proteinlerin eksitasyonu için duruma göre argon- iyon ya da helyum-neon laserlerinin sırasıyla 488 ya da 543 nm çizgi kullanılmıştır. GFP ya da dendra proteinin yeşil spektrumundaki emisyonunu kaydetmek için 505-530 nm band-pass, dendra proteininin kırmızı spektrumundaki emisyonunu kaydetmek için ise 560 nm long-pass emisyon filtreleri kullanılmıştır. Bu konfigürasyonlardaki ölçümler için sistem üzerindeki uygun dikroik yansıtıcılar seçilmiştir. Dendra proteininin yeşil ve kırmızı bölgelerdeki emisyonlarının aynı anda değerlendirildiği deneylerde 488 ve 543 laserler ardışık olarak kullanılmıştır. Böylece fotokonversiyona uğramamış dendra proteinlerinin 488 nm laser ile uyarılarak kırmızı spektrumda verdiği floresansın (tüm yeşil floresansın yaklaşık %10'u bu bölgeye düşmektedir) fotokonversiyondan ayırt edilmesi sağlanmıştır. Kısacası, kırmızı kanalda ölçüm yapıldığı

sırada 488 nm laser kapatılmıştır. Görüntüler 40x 1.3 nümerik açıklığı olan yağ imersiyonlu bir objektifle 1024x1024 (nokta) uzaysal, 12 bit derinlik çözünürlüğü kullanılarak kaydedilmiştir. Görüntülerin sayısal değerlendirmesi MatLab platformunda laboratuvarımızda yazılmış rutinler kullanılarak yapılmıştır.

Hücreler lamel üzerinde kültür edildikten sonra lameller mikroskopa uygun bir banyoya yerleştirilmiş ve banyo serum içermeyen DMEM vasatıyla doldurulmuştur. Tüm deneyler bu koşullarda oda sıcaklığında yapılmıştır.

3.2.7. İstatistiksel yöntem

β 2-Adrenoseptör ve mutantların değişik koşullarda adenilat siklazı aktive etme özellikleri (ortalama siklaz aktivitesi) arasındaki istatistiksel fark Student-T testi kullanılarak değerlendirilmiştir.

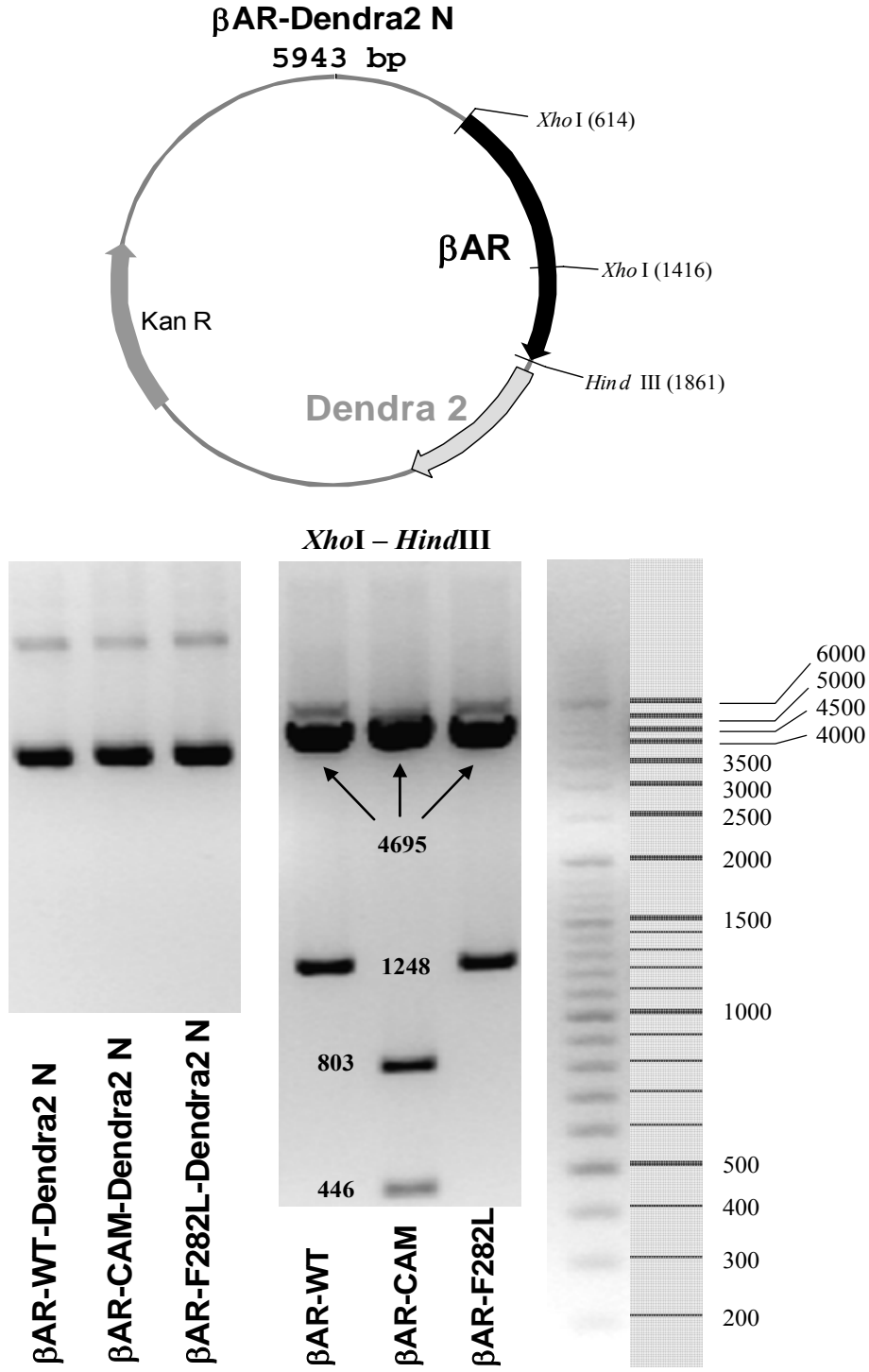
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Konstraktlar

İnsan β 2-adrenoseptör cDNA'sı yöntem bölümünde belirtildiği gibi reseptörün karboksi terminalinde GFP ya da dendra proteini bulunan füzyonları sentezleyecek şekilde plazmitlerde

klonlanmıştır. Elde edilen bu plazmitlerin restriksiyon fragman paternleri Şekil 2.1.'de plazmitlerin şematik konfigürasyonu ile birlikte örnek olarak gösterilmiştir. Fragman paternleri kuramsal olarak beklenen paterne uymaktadır. Daha önce de belirtildiği gibi β 2-adrenoseptördeki CAM mutasyonu reseptörün 1416. baz pozisyonunda yaban tip reseptörde olmayan bir XhoI enzim bölgesi oluşturmaktadır. Bu nedenle CAM mutasyonu taşıyan reseptör plazmite iki aşamada yerleştirilmiştir. Şekil 2.1.'de simetrik uçlar taşıyan 1. parçanın elde edilen klonda doğru oryantasyonda bulunduğu görülmektedir (XhoI-HindIII kesiminde doğru oryantasyonda beklenen 445 baz çiftlik fragman bandı CAM- β 2-AR şeridinde açıkça bellidir

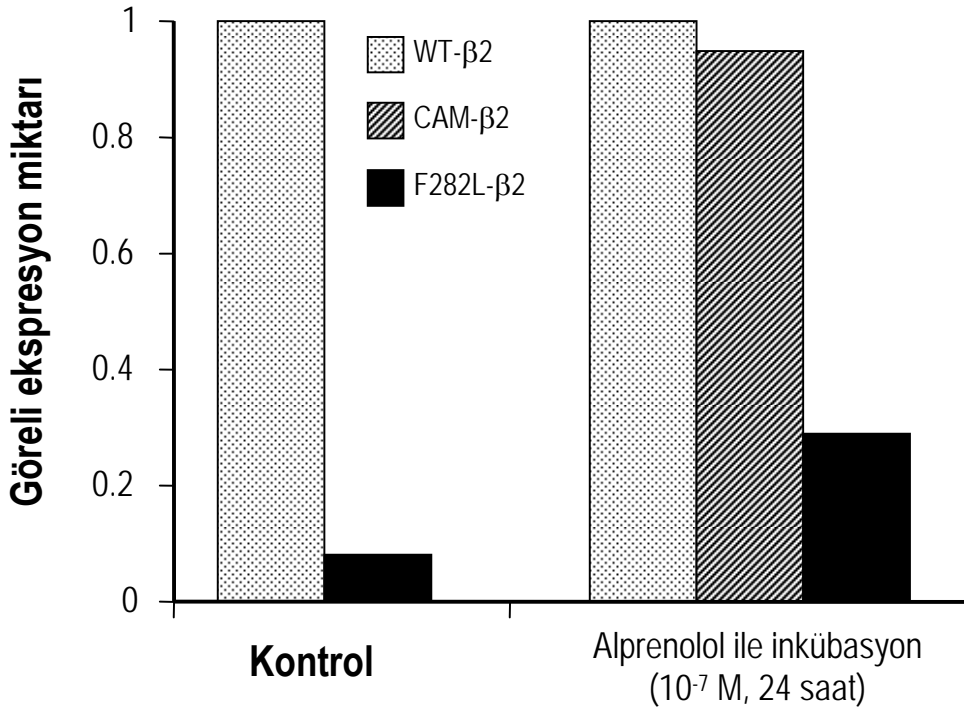
cDNA ların elde edilmesinde, mutasyonununda ya da başka amaçlarla PCR'nin kullanıldığı tüm durumlarda son ürün, PCR hatalarına karşı DNA dizi analizi yapılarak kontrol edilmiştir (tüm konstraktların dizileri Ek'de verilmiştir).



Şekil 2.1. Üst panelde β 2-adrenoseptörün klonlandığı Dendra2N plazmitte β 2-adrenoseptörün GFP ya da dendra cDNAları ile birlikte konumları görünmektedir. β 2-adrenoseptör-GFP füzyonunun konfigürasyonu (plazmitinki dahil) dendra ile aynı olduğundan burada gösterilmemiştir. Alt panelde *E. coli* de klonlanarak saflaştırılmış plazmitlerin kendilerinin ya da belirtilen restriksiyon enzimleriyle kesildikten sonra agaroz jelde elde edilen fragman paternleri görülmektedir. Alt panelin sağında baz çifti sayısı cinsinden fragman uzunlukları skalası verilmiştir.

4.2. β 2-Adrenoseptör ve F282L Mutantının Ekspresyon Özellikleri

Konstitütif olarak aktif reseptör mutantlarının hızlı duyarsızlaştıkları ve internalize oldukları, bunun sonucu olarak da hücre zarında yaban tip reseptöre göre daha az ifade edilebildikleri bilinmektedir (MacLean *et al.* 1999, Mhaouty-Kodja *et al.* 1999). Bu özellik, konstitütif olarak aktif mutantların agonistle bağlı reseptörü taklit ettiği varsayımıyla açıklanmaktadır (duyarsızlaşmada rol alan hücre bileşenleri agonist ile bağlı reseptöre daha duyarlıdır (Kallal *et al.* 1998)). Konstitütif aktivite gösteren F282L mutanı da (aşağıda gösteriliyor) bu bakımdan CAM mutanına benzer bulunmuştur. Şekil 2.2.'de, belirtilen reseptör cDNA'ları ile transfekte edilmiş HEK hücre membran preparatlarında bir β 2-adrenoseptör ligandı olan 125 I-iyodosiyanopindolol saturasyon bağlanmasıyla saptanan reseptör miktarları yaban tip reseptöre göre gösterilmiştir.



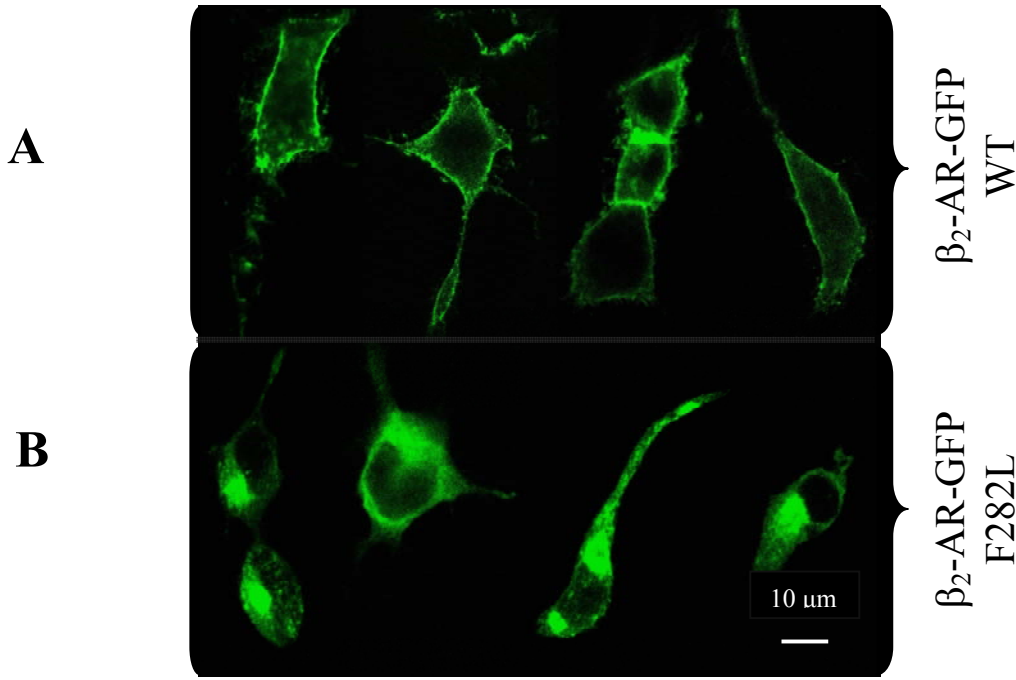
Şekil 2.2. Grafikte belirtilen reseptör cDNA ları ile geçici olarak transfekte edilmiş HEK293 hücrelerinden hazırlanmış membran preparatlarında görelî 125 I-iyodosiyanopindolol spesifik bağlanması. Transfekte edilen hücreler ya normal hücre vasatında (kontrol) ya da şekilde belirtildiği gibi hücrelerin toplanmasından 24 saat önce 100 nM alprenolol içeren kültür ortamında büyütülmüştür. Gösterilen değerler üç ölçümün ortalamasıdır. Standart hatalar çok küçük olduğundan grafikte gösterilmemiştir. Alprenolollü ya da alprenolosüz ortamlarda büyütülen hücrelerdeki yaban tip reseptör ekspresyonları arasında çok az fark bulunmaktadır (her iki durumda da reseptör ekspresyonu membran proteini başına yaklaşık 2 pmol olarak hesaplanmıştır).

Şekil 2.2.'de de görüldüğü gibi F282L mutanlığı yaban tipe göre %10 civarında eksprese olmaktadır (CAM ekspresyonunun yaban tipe göre %30 civarında olduğu bildirilmiştir (Samama *et al.* 1993)). Ancak F282L mutanlığının ekspresyonu CAM'dan farklı olarak, bir β -adrenoseptör ligandı olan alprenolol inkübasyonu ile kısmen artmaktadır (alprenolol varlığında F282L ekspresyonu yaban tipin %30'una çıkmıştır). Oysa CAM ekspresyonu alprenolol varlığında yaban tip ile aynı düzeye ulaşmıştır. Herhangi efikasiye sahip bir ligant varlığının konstitütif olarak aktif reseptörlerin ekspresyonunu arttırdığı ve bu mutanların bilinen düşük termal stabiliteilerinin reseptöre herhangi bir ligandın bağlanması ile arttığı gözlemleri (MacEwan ve Milligan, 1996), bu reseptörlerin düşük ekspresyon düzeylerinin, duyarsızlaşmaya ek olarak düşük stabiliteye de bağlı olabileceğini düşündürmüştür. Dolayısıyla, F282L mutanlığının, CAM mutanlığına göre farklı ekspresyon özellikleri göstermesi (Şekil 2.2.), F282L' nin stabilite ya da duyarsızlaşma özelliklerinin CAM'dan farklı olduğu ve iki mutan da konstitütif aktif olmalarına rağmen konformasyonlarının farklı olduğu şeklinde yorumlanabilir.

4.3. β 2-Adrenoseptör ve F282L Mutanlığının Subselüler Dağılım Özellikleri

Beta2-adrenoseptörün ve onun konstitütif olarak aktif mutanlarının hücresel dağılımını incelemek için HEK293 hücreleri β 2-adrenoseptör-GFP ya da β 2-adrenoseptör-dendra proteini füzyonunu kodlayan cDNA'ları içeren plazmitlerle transfekte edilmiştir. GFP ile birleştirilmiş insan β 2-adrenoseptör yaban tipini ya da F282L mutanlığını geçici olarak eksprese eden HEK hücrelerinden elde edilmiş konfokal mikroskopik görüntü örnekleri Şekil 2.3.'de gösterilmiştir. Bu görüntüler yaban tip reseptörün beklendiği (ve başka çalışmalarda da gözlemlendiği) gibi başlıca hücre zarında eksprese edildiğini göstermektedir. Buna karşılık F282L mutanlığı, gözlenemeyen ya da minimal bir membran ekspresyonunun yanı sıra başlıca hücre içinde (sitoplazmik ya da perinükleer olarak) eksprese olmaktadır. Perinükleer ekspresyonun paterni Golgi lokalizasyonunu düşündürecek tarzda olmakla birlikte bu çalışmada bu lokalizasyonu saptamak için Golgi markerleri kullanılmamıştır. Oysa CAM mutanlığının başlıca hücre zarı lokalizasyonu gösterdiği bilinmektedir (McLean *et al.* 1999, ayrıca aşağıya bakınız). Şekil 2.3'de yaban tip ile F282L mutanlığının aynı floresans parlaklığında görülüyor

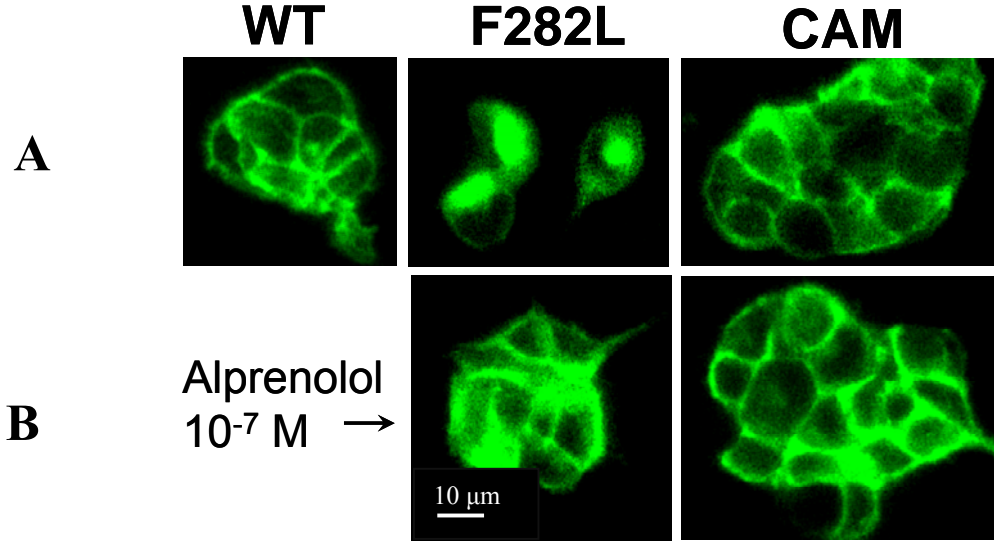
olması, bu türlerin görelî ekspresyonlarının aynı olduğu anlamına gelmemektedir çünkü bu görüntülerde hem sinyal normalize edilmiş hem de görüntüler farklı mikroskop konfigürasyonlarında (farklı laser gücü ve detektör duyarlılığı ile) elde edilmiştir (aşağıda açıklanıyor). GFP ile birleştirilmiş reseptör proteininin işlevsel olduğu bilindiği için (Milligan 1999, McLean *et al.* 1999, McLean *et al.* 2000) burada tekrar bu proteinler bu bakımdan sınanmamıştır.



Şekil 2.3. Yaban tip (WT) ya da F282L mutasyonu taşıyan β_2 -adrenoseptör-GFP füzyon proteinini geçici olarak eksprese eden HEK 293 hücrelerinde elde edilmiş konfokal mikroskopik görüntüler. Görüntülerde z-koordinatının konfokal çözünürlüğü 0.8 μ m'dir. Hücrelerin ortalama büyüklüğü 10-15 μ m'dir. Görsel algıyı kolaylaştırmak için floresans şiddetleri normalize edilmiştir dolayısıyla görüntüler görelî ekspresyon düzeyi hakkında bilgi vermemektedir.

GFP yerine dendra proteini ile birleştirilmiş insan β_2 -adrenoseptörlerini kalıcı olarak eksprese eden HEK hücre klonlarında elde edilmiş konfokal mikroskopik görüntü örnekleri Sekil 2.4.'de verilmiştir. Bu görüntüler (üst sıradakiler) GFP proteini ile elde edilen patern ile benzerdir: Yaban tip reseptör membran lokalizasyonu gösterirken F282L mutantı hücre içinde yine Golgi lokalizasyonunu andıran bir görüntü sergilemektedir. Buna karşılık CAM mutantının lokalizasyonu yaban tipe çok benzer bir patern göstermektedir. Alprenolol ile hücrelerin inkübe edilmesi CAM mutantında reseptörün hücresel dağılımını etkilemezken

F282L mutantı alprenolol inkübasyonundan sonra belirgin bir membran lokalizasyonu göstermektedir (Sekil 2.4 alt sıra).



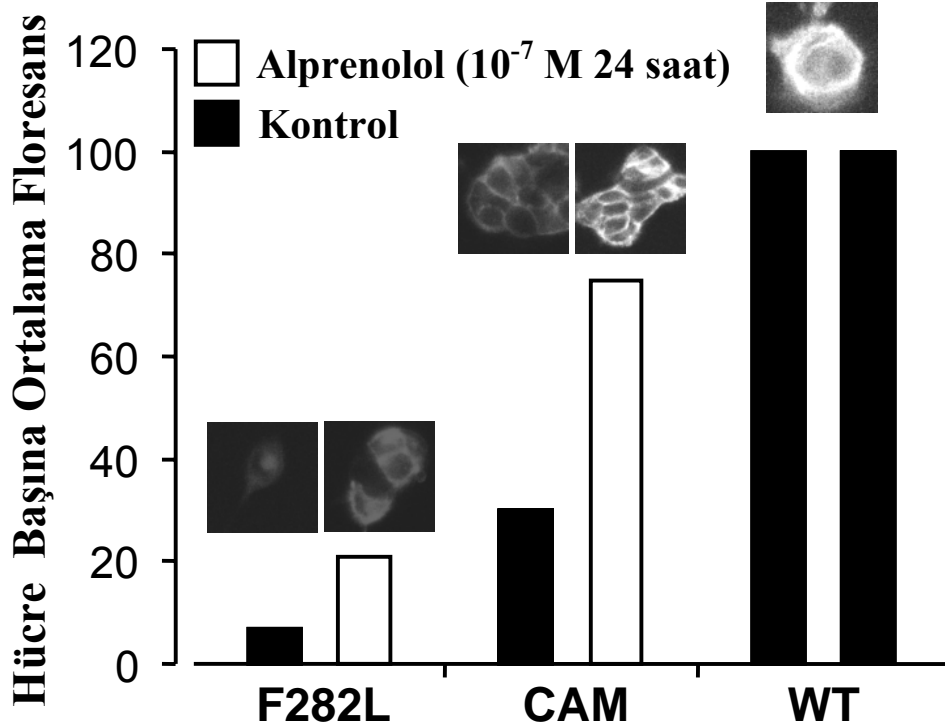
Şekil 2.4. Yaban tip (WT), CAM ya da F282L mutasyonu taşıyan β 2-adrenoseptör-dendra füzyon proteinini kalıcı olarak eksprese eden HEK 293 hücre klonlarında elde edilmiş konfokal mikroskopik görüntüler. Görüntülerde z-koordinatının konfokal çözünürlüğü $0.8 \mu\text{m}$ 'dir. Hücrelerin ortalama büyüklüğü $10\text{-}15 \mu\text{m}$ 'dir. Görsel algıyı kolaylaştırmak için floresans şiddetleri normalize edilmiştir dolayısıyla görüntüler görelî ekspresyon düzeyi hakkında bilgi vermemektedir.

Sekil 2.3.'de olduğu gibi Sekil 2.4.'de de lokalizasyon paterninin karşılaştırmalı olarak algılanmasını kolaylaştırmak için sinyal normalize edilmiş olduğundan görüntü parlaklığı ekspresyon düzeyi hakkında bilgi vermemektedir. Ekspresyon düzeyi hakkında bilgi veren görüntüler ve bu görüntülerden hesaplanan ortalama hücre başına düşen floresans değerleri Sekil 2.5.'de verilmiştir.

Sekil 2.3. ve Sekil 2.4.'deki veriler şöyle özetlenebilir: Yaban tip β 2-adrenoseptör ve CAM mutantı başlıca hücre zarında eksprese olurken F282L mutantı daha çok hücre içi lokalizasyonu göstermektedir. Bu durum hem GFP hem dendra füzyon proteinleri için geçerli olduğu gibi transfeksiyonun geçici ya da kalıcı olmasından etkilenmemektedir. Ekspresyon düzeyleri yaban tip>CAM>F282L sırasıylaadır. Bir β 2-adrenoseptör ligandı (antagonisti) olan

alprenolol, F282L mutantının membranda lokalize olmasını sağlamaktadır. Ayrıca alprenolol CAM'in daha fazla olmak üzere hem CAM'in hem de F282L mutantının ekspresyonunu arttırmaktadır. Bu veri Sekil 2.5'de (non-floresan reseptör ekspresyonu kullanılarak) ligand bağlama deneyleriyle elden edilen verilerle sayısal olarak tutarlıdır. Bu da Dendra ile birleştirilmiş reseptörler ile doğal reseptör formunun benzer hücre-içi trafik özelliklerine sahip olduğunu göstermektedir. Ayrıca alprenololün F282L mutantının (ekspresyon miktarının yanı sıra) membran lokalizasyonunu artırması, F282L mutantının membrana hedeflenmesinden çok membranda tutulmasıyla ilgili bir sorun olduğunu düşündürmektedir. Tüm bu veriler, yukarıda da söylendiği gibi reseptörü membranda tutan ya da oradan uzaklaştıran mekanizmaların gözünde, ikisi de konstitütif olarak aktif olmalarına rağmen CAM ve F282L mutantının farklı olduğunu bir kez daha göstermektedir.

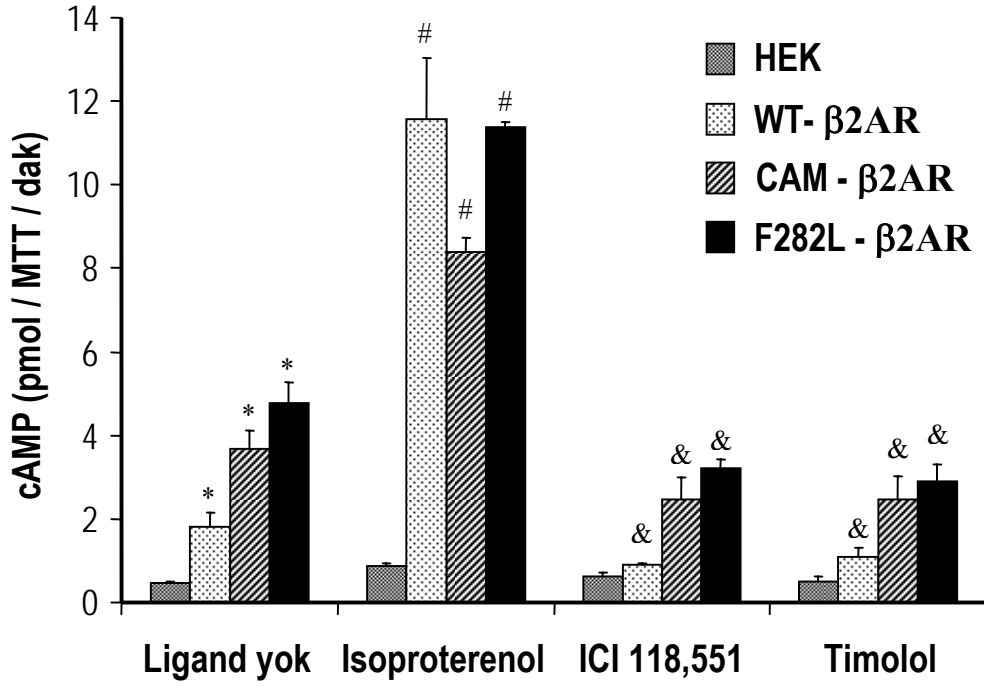
Yukarıda da belirtildiği gibi GFP ile birleştirilmiş reseptör proteini işlevsel gibi görünmektedir. Dendra proteini GFP proteinine çok benzediğinden (Gurskaya *et al* 2006), dendra ile birleştirilmiş reseptör proteinlerinin de işlevsel olması beklenir. Gerçekten de bu çalışmada yaptığımız kontroller dendra ile birleştirilmiş reseptörün hem ligand bağlayabildiğini hem de agonistle uyarılarak adenilat siklazı aktive ettiğini göstermiştir (bu kontraktla transfekte edilmiş hücrelerde isoproterenol uyarısı olmadığında cAMP birikimi 0.87 ± 0.19 pmol/dak/10000 hücre'iken 100 μ M isoproterenol varlığında 3.00 ± 0.42 pmol/dak/10000 hücre'ye çıkmaktadır. Bu da reseptörün bu şartlar altında hem ligand bağlayabildiğini hem de uyarı iletebildiğini göstermektedir.)



Şekil 2.5. Dendra proteini ile birleştirilmiş insan β 2-adrenoseptörünün yaban tipini (WT) ya da belirtilen mutantlarını kalıcı olarak eksprese eden HEK hücre klonlarında elde edilmiş konfokal mikroskopik görüntülerin analizi. Görüntüler, şekilde belirtildiği gibi ilgili klonların 24 saat alprenolol (100 nM) ile inkübe edilmesinden sonra ya da herhangi bir inkübasyon yapılmadan elde edilmiştir. Görüntüler ham (8 bit) veriler laser gücü ve detektör duyarlılığına göre düzeltildikten sonra oluşturulmuştur. Böylece parlaklık ekspresyon düzeyi hakkında fikir vermektedir. Ayrıca bu şekilde düzeltilmiş görüntülerden hesaplanan “hücre başına düşen ortalama floresans sinyali” şekilde belirtilen durumlar için kolon grafikleri olarak verilmiştir. Bu değerler bağlanma deneyleriyle saptanan paternle tutarlıdır (Şekil 2.6. ’e bakınız).

4.4. β 2-Adrenoseptör ve F282L Mutantının Sinyal İletime Özellikleri

Yaban tip ve konstitütif olarak aktif mutant β 2-adrenoseptörlerin Gs proteini aracılığıyla adenilat siklazın aktivitesini değiştirme özellikleri, bu reseptörlerin geçici olarak transfekte edildiği HEK 293 hücrelerinde incelendi (bu hücreler Gs proteininin her iki formunu da yeterli miktarda eksprese etmektedir). Bu deneylerin sonuçları Şekil 2.6.’de verilmiştir: Herhangi bir β 2-adrenoseptörle transfekte edilmemiş hücreler bir β 2-reseptör agonisti olan izoproterenole çok az cevap vermiştir. Yaban tip β 2-adrenoseptör transfeksiyonu bu yanıtı 10-15 kat arttırmıştır. Dolayısıyla tüm bu deneylerde gözlenen yanıtlar pratik olarak yalnız transfekte edilen reseptörlerin yanıtları olarak kabul edilebilir (bu çalışmada bu hücrelerin



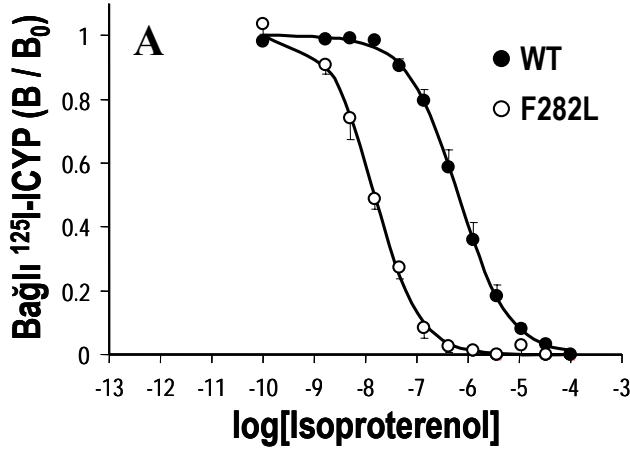
Şekil 2.6. Belirtilen reseptör cDNA'sı içeren plazmitlerle geçici olarak transfekte edilmiş (ya da transfekte edilmemiş) HEK hücrelerinde, belirtilen ligandların varlığında (ya da ligand yokluğunda) ölçülmüş hücre-içi cAMP birikimi. Hücre-içi cAMP yanıtı, canlı hücre sayısının bir göstergesi olan MTT sinyaline göre düzeltilerek 1 dakikada pmol cAMP birikimi cinsinden verilmiştir. Veriler 5 bağımsız kuadruplikat deneyin ortalamasıdır. Barların üstündeki çizgiler ortalamanın standart hatasını göstermektedir. Barların üstündeki simgeler ortalamaların istatistiksel olarak farklı olduğunu ($p < 0.05$) göstermektedir. Yapılan karşılaştırmalar şunlardır: *) transfekte edilmemiş hücrelerdeki yanıt ile ilgili transfeksiyonlardaki bazal aktiviteler, #) Bazal aktiviteler ile agonistle uyarılan yanıt ve &) bazal aktiviteler ile invers agonist yanıtları.

membran proteini başına yaklaşık 100 fmol/mg β 2-adrenoseptör eksprese ettiği, yaban tip reseptör transfeksiyonuyla bu miktarın birkaç pmol/mg düzeyine çıktığı ligand bağlama çalışmalarıyla doğrulanmıştır). Yaban tip reseptörle transfekte edilen hücrelerde yalnız agonistle stimüle edilen siklaz aktivitesi değil bazal siklaz aktivitesi de artmıştır. Bu da β 2-adrenoseptörün (bir çok diğer reseptör gibi) bir konstitütif aktivitesi olduğunu göstermektedir. Bu konstitütif aktivite timolol ya da ICI118,551 gibi invers agonistlerle neredeyse tümüyle inhibe olmaktadır (Şekil 2.6.). CAM ya da F282 ekspresyonuyla gözlenen konstitütif reseptör aktivitesi yaban tip reseptöre göre en az iki kat daha yüksek bulunmuştur. Bu deneylerde kullanılan hücreler transfeksiyondan sonra alprenolol ile inkübe edilmemiştir. Dolayısıyla, CAM ve F282L mutantının ekspresyon oranları yaban tip reseptörün %30'u ve %10'u kadardır (Şekil 2.2.'e bakınız). Dolayısıyla bu reseptörlerin gösterdiği konstitütif aktiviteler,

Sekil 2.6.'de gözlenen oranlardan birkaç kat daha yüksek olmalıdır (reseptörün konstitütif aktivitesinin gözlenebilirliği reseptör ekspresyonu ile doğru orantılıdır). Ayrıca aynı mantıkla F282L mutantının konstitütif aktivitesi de CAM'a göre çok daha yüksek olmalıdır (Sekil 2.2.'de kullanılan hücrelerde F282L ekspresyonu CAM'ın üçte biri olmasına rağmen bazal aktivitesi CAM'dan fazladır). Hem CAM hem de F282L mutantının konstitütif aktivitesi birer invers agonist olan timolol ve ICI118,551'e duyarlı bulunmuştur. Ancak bu ligandlar mutant reseptörlerin konstitütif aktivitesini tümüyle ortadan kaldırmamıştır. Yaban tip ve CAM gibi F282L mutanı da agonist uyarısına cevap vermiştir. Tüm bu veriler F282L mutantının birçok bakımdan tipik bir konstitütif aktif reseptör formu olduğunu göstermektedir.

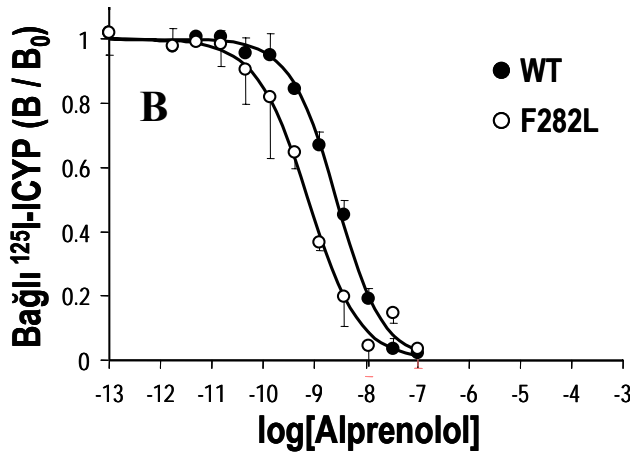
4.5. β 2-Adrenoseptör ve F282L Mutantının Ligand Bağlama Özellikleri

Konstitütif olarak aktif reseptör mutantlarının (β 2-CAM dahil) ligandlara olan afinitesinin ligandın efikasisine bağlı olarak değiştiği daha önce gözlenmiştir (Samama *et al* 1993, Lefkowitz *et al* 1993): agonistler, nötral ligandlar ve invers agonistler bu mutanlara sırasıyla daha yüksek, aynı ya da daha düşük afinite göstermektedir. Reseptör G proteini bağlanmasını zayıflattığı düşünülen guanin nükleotitlerin varlığında yapılan bu gözlem, konstitütif aktivasyona yol açan bu mutasyonların reseptörü aktif formda stabilize ettiği görüşüne yol açmıştır (Parnot *et al.* 2002). Dolayısıyla bu fenomen reseptörün aktif formu ile ilgili bilgi edinmek için kullanılabilir. Biz de CAM ve F282L mutantını bu açıdan karşılaştırmak amacıyla yaban tip ya da sözkonusu mutantları geçici olarak eksprese eden HEK293 hücrelerinden hazırlanmış membranlarda bir agonist, nötral antagonist ya da invers agonist olarak bilinen izoproterenol, alprenolol ve ICI118,551'in bu reseptörlere bağlanma özelliklerini radyoligand bağlama deneyleriyle değerlendirdik. ¹²⁵I-iyodosiyanopindololun işaretli radyoligand olarak kullanıldığı bu kompetisyon bağlanma deneylerinin sonuçları Sekil 2.7.'de özetlenmiştir. Bu deneylerde kullanılan ligandların yaban tip reseptöre (guanin nükleotit varlığında) gösterdikleri afiniteler literatürde ve veri tabanlarında verilen değerlerle tutarlı bulunmuştur.



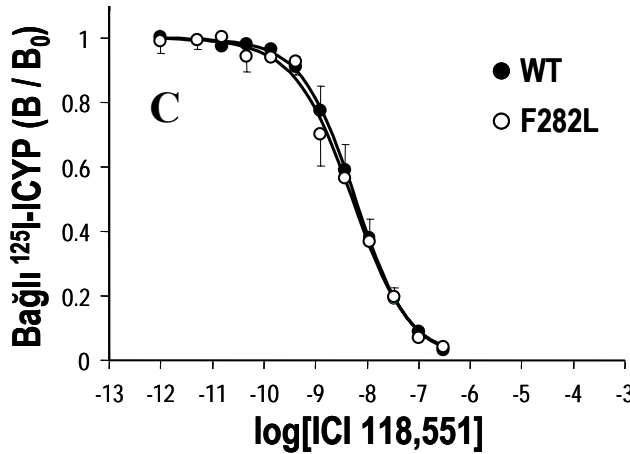
**Isoproterenol
(Ful agonist)**

$\log(K_{wt})$	6.2 ± 0.01
$\log(K_{mut})$	7.8 ± 0.02
K_{mut} / K_{wt}	42.2



**Alprenolol
(Nötral ya da zayıf agonist)**

$\log(K_{wt})$	8.6 ± 0.03
$\log(K_{mut})$	9.1 ± 0.05
K_{mut} / K_{wt}	3.6



**ICI 118,551
(Invers agonist)**

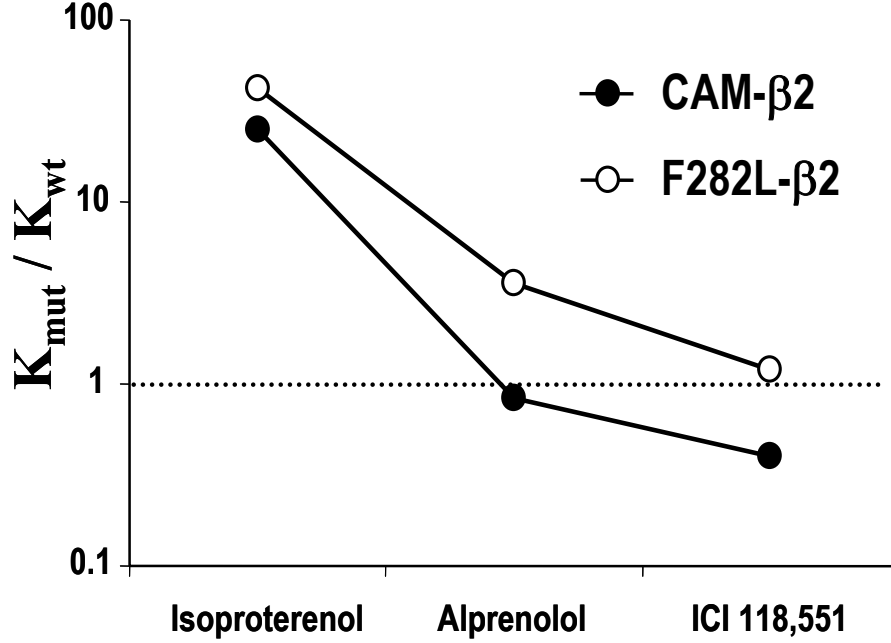
$\log(K_{wt})$	8.2 ± 0.01
$\log(K_{mut})$	8.3 ± 0.03
K_{mut} / K_{wt}	1.2

Şekil 2.7. Yaban tip β_2 -adrenoseptör (WT) ya da F282L mutantını geçici olarak eksprese eden HEK hücrelerinden hazırlanmış membran preparatlarında ^{125}I -iyodosiyanopindolol ile belirtilen ligandlar kullanılarak yapılmış kompetisyon bağlanma deneyleri. Bağlanma değerleri, kompetitör yokluğunda elde edilen (maksimum) bağlanmaya göre düzeltilerek verilmiştir. Tüm deneyler $1 \mu M$ $GTP\gamma S$ ya da $10 \mu M$ GTP varlığında yapılmıştır. Veriler 4 bağımsız triplikat deneyin ortalaması, barlar da ortalamaların standart hatasıdır. Eğriler 4-parametrelili logistik denklemin nonlinear regresyonunu göstermektedir. Yandaki tablolarda mutant ile yaban tip reseptör için bu regresyonlardan hesaplanmış ligand afinite değerleri ve mutant ile yaban tip reseptörün liganda gösterdiği afinitelerin oranları gösterilmiştir. Belirsizlikler asimptotik standart hata olarak verilmiştir.

Aynı koşullarda ve bu ölçümlere paralel olarak F282L mutantıyla yapılan deneylerde ise izoproterenol'un F282L mutantına yaban tipe göre yaklaşık 40 kat daha büyük afinite gösterdiği gözlenmiştir. Mutasyonun yol açtığı afinite değışikliği kullanılan ligandların bilinen efikasileriyle ilişkili bulunmuştur (Şekil 2.8.). Bu durum, konstitütif reseptör aktivasyonun bugünkü kuramsal temelleriyle açıklanabilmektedir (tartışma bölümüne bakınız), dolayısıyla F282L mutasyonu bu bakımdan da tipik bir konstitütif aktif reseptör olarak görünmektedir. Üstelik, F282L mutasyonunun yol açtığı izoproterenol afinitesi artışı CAM'inkine göre daha fazladır (aşağıda dokümanede ediliyor), bu da Sekil 2.6.'de verilen bazal cAMP birikimini karşılaştırmalı olarak gösteren deneylerin sonuçlarıyla tutarlıdır, yani F282L mutasyonunun reseptörde yol açtığı konstitütif aktivite CAM'a göre her bakımdan daha fazladır. Ancak burada bir nötral antagonist olarak bilinen alprenolölün afinitesi de CAM mutasyonu ile değişmez iken F282L mutasyonu ile artmıştır. Yani, CAM gözünde alprenolöl bir nötral antagonist olmayı sürdürürken F282L mutantı gözünde bu bakımdan bir parsiyel agonist gibi davranmaktadır. Aynı şekilde bir invers agonist olan ICI118,551'in afinitesi CAM karşısında beklendiği gibi azalırken F282L mutantının gözünde bir nötral ligand gibi davranmaktadır.

Mutasyonun yol açtığı ligand afinite değışiklikleri (burada kullanılan ligantlar için) Sekil 2.8.'de karşılaştırmalı olarak verilmiştir: CAM ile ilgili patern literatürden alınmış, F282L mutantı ile ilgili bilgi de bu çalışmada elde edilmiştir. Şekil 2.8.'de CAM ile F282L mutantının ayrıntılar bakımından farklı özellikler gösterdiği açıkça görünmektedir. Yaban tip reseptörün ve CAM'ın gözünde bir nötral antagonist iken alprenolölün F282L mutantı karşısında bir parsiyel agonist gibi davranması ya da ICI118,551'in F282L mutantı gözünde (ligand bağlanması açısından) bir nötral antagoniste dönüşmesi gibi nitel değışiklikler, bu fenomenleri açıklamak için kullanılan "iki durumlu reseptör" modeliyle açıklanamamaktadır. Ayrıca ICI118,551 F282L mutantı üzerinde fonksiyonel bakımdan bir invers agonist gibi davranırken (Sekil 2.6.) bağlanma özellikleri bakımından bir nötral ligand gibi davranmaktadır (Sekil 2.8.). Ligandın işlevsel ve bağlanma özelliklerinde konstitütif aktivasyon mutasyonunun yol açtığı değışikliklerin bu şekilde disosiyeye olması da "iki durumlu reseptör" modeliyle açıklanamamaktadır. Bu konunun kuramsal değerlendirmesi (ve bir alternatif açıklama önerisi) tartışma bölümüne bırakılmıştır. Ancak bu bölümde sunulan verilere dayanarak CAM

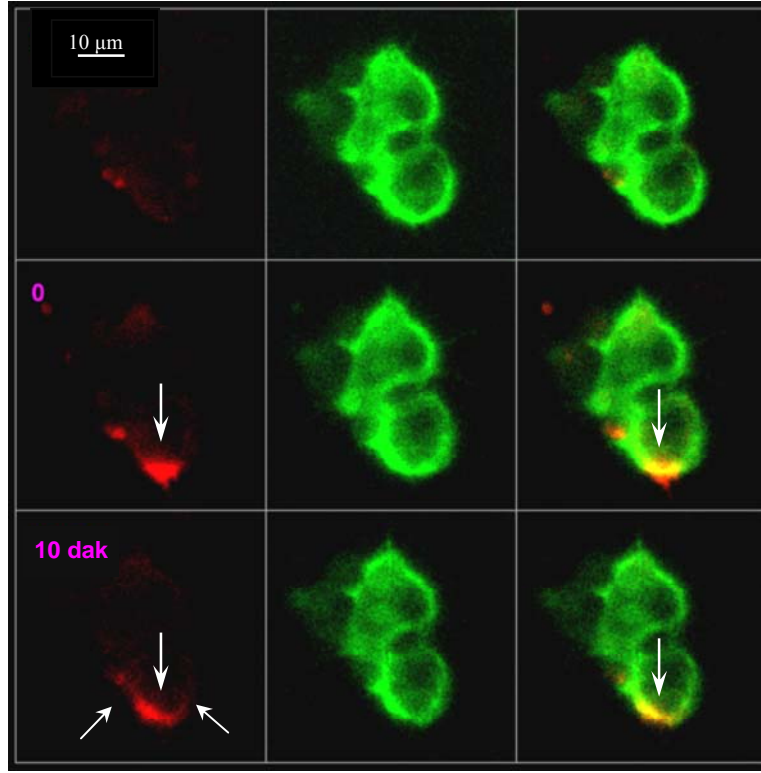
ve F282L mutasyonunun (ikisi de konstitütif aktivasyona yol açmalarına rağmen) reseptörü aynı aktif forma (yani agonistin indüklediği forma) yönlemedikleri söylenebilir.



Şekil 2.8. Belirtilen ligandların belirtilen mutant β 2-adrenoseptörlere guanin nükleotit varlığında gösterdikleri afinitelerin, aynı ligandların aynı koşullarda yaban tip reseptöre gösterdikleri afinitelere oranları. F282L mutanıyla ilgili değerler Şekil 2.7.'den, CAM ile ilgili değerler ise literatürden (Lefkowitz et al. 1993, Samama et al. 1993) alınmıştır. Afinite oranları logaritmik ekseninde gösterilmiştir.

4.6. Dendra- β 2-Adrenoseptör Füzyon Proteinlerinin Fotokonversiyon ve Mobilite Özellikleri

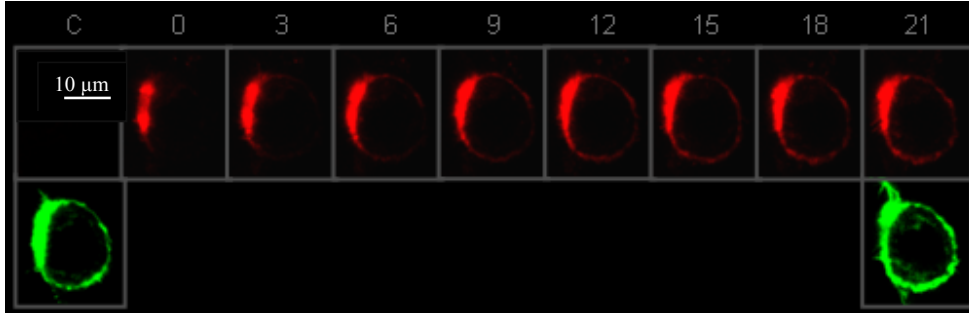
Dendra proteini ile birleştirilmiş insan β 2-adrenoseptörünü eksprese eden HEK hücre klonlarında yapılan fotokonversiyon deneylerinin sonuçlarına üç örnek Şekil 2.9.'de verilmiştir. Bu deneylerde hücreler konfokal mikroskopta düşük yoğunluklu 488 nm dalga boyundaki laser ile taranarak görüntüledikten sonra aynı laser belirli bir bölgeye odaklanarak yoğunluğu 8-10 kat arttırılmış ve o bölge yaklaşık 1 saniye ışına maruz bırakılmıştır. Konversiyondan hemen sonra aynı görüntü alanı (düşük yoğunluklu) 488 nm ve 543 nm dalga boyundaki laserlerle periodik olarak taranarak görüntüler kaydedilmiştir. Bu protokol ilgili proteini izlemek için yeterli bulunmuştur.



Şekil 2.9. Dendra proteini ile birleştirilmiş insan β 2-adrenoseptörünü kalıcı olarak ekspresyona eden HEK 293 hücre klonlarında yapılmış fotokonversiyon deneyi. Birinci kolonda kırmızı (ex:543 nm, em:560-nm) ikinci kolonda yeşil (ex:488 nm, em:505-530 nm) üçüncü kolonda ilk iki kolonun süperpozisyonu görünmektedir. İlk satır (C) fotokonversiyondan önce alınmış görüntüyü, ikinci satır (0) yüksek intansiteli 488 nm laser ile beyaz okla belirtilen bölgede fotokonversiyon yapıldıktan hemen sonra alınmış görüntüyü, üçüncü satır ise fotokonversiyondan 10 dakika sonra alınmış görüntüyü göstermektedir.

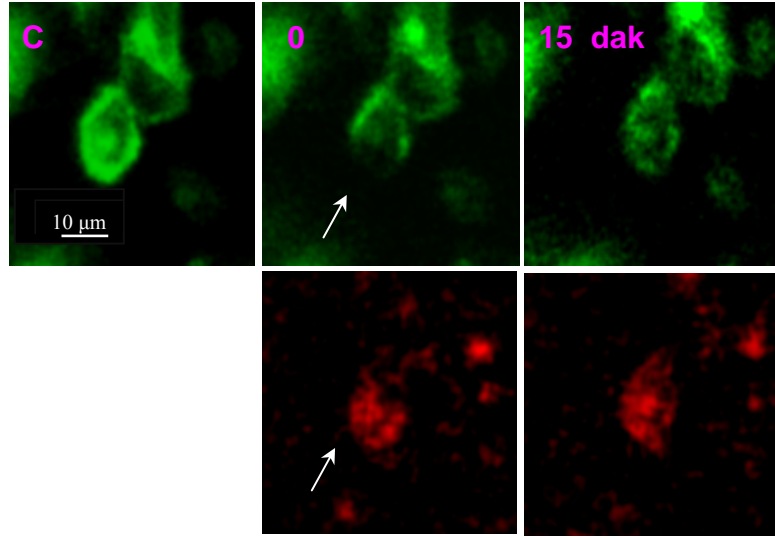
Şekil 2.9’de uygulanan bu protokolün β 2-adrenoseptör-dendra proteinini hücre zarına uyan lokalizasyonda yerel olarak konvert ettiği görülmektedir. Aynı şekilde kırmızı olarak gösterilen konversiyon bölgesinin 10 dakika içinde yine hücre zarına uyan bir yol boyunca yayılabildiği gözlenmektedir. Aynı protokolün uygulandığı ve hücrenin daha uzun süre izlendiği bir örnek Şekil 2.10’de verilmiştir. Bu örnekte belli bir bölgede anlık ve yerel olarak işaretlenmiş reseptör-dendra proteinlerinin hücrenin tüm membranına 20 dakika içinde yayılabildiği görülmektedir. Bu veri hücre zarının belli bir bölgesinde bulunan bir reseptör proteininin kısa zamanda tüm hücre zarını dolaşabileceğini ilk kez göstermektedir. Dolayısıyla reseptör ekspresyonu polarize ya da tekdüze olmayan epitel hücresi gibi hücrelerde, hücrenin belli bir membran bölgesine ekspresyonu hedeflemesinin bu heterojen dağılımı sağlamakta

yeterli olmayacağı, aynı zamanda yerel olarak eksprese ettiği reseptör proteinlerini o bölgede tutabilmek (membranın diğer kısımlarına dağılmasını engellemek) için çeşitli mekanizmaların var olması gerektiği sonucu bu veriden ilke olarak çıkarılabilir.



Şekil 2.10. Dendra proteini ile birleştirilmiş insan $\beta 2$ -adrenoseptörünü kalıcı olarak eksprese eden HEK 293 hücre klonlarında yapılmış fotokonversiyon deneyi. Üstteki satırda kırmızı (ex:543 nm, em:560-nm) ikinci satırda yeşil (ex:488 nm, em:505-530 nm) floresans kanalları görünmektedir. Konversiyondan önceki durum C ile gösterilmiştir. Görüntülerin üstündeki sayılar, görüntülerin konversiyondan itibaren (0) kaçınıcı dakikalarda alındığını göstermektedir. Mavi laser (488 nm) ile görüntülemenin yaratabileceği yaygın fotokonversiyonun oluşmadığından emin olabilmek için yerel fotokonversiyondan sonra yeşil floresans görüntüsü alınmamıştır. Yeşil floresans yalnızca deneyin başında ve sonunda kaydedilmiştir.

Zamanla fotokonversiyon bölgesindeki kırmızı floresansın azalmasının ve diğer membran bölgelerindeki artışın eksponansiyel-benzeri bir patern göstermesi (veriler gösterilmemiştir), yayılımın difüzyf bir süreçle olduğunu düşündürmektedir. Fotokonversiyondan sonra reseptörün hücre zarında serbestçe (muhtemelen difüzyon yoluyla) dolaşabildiğini gösteren bu veriler, yeşil floresansın “photobleaching” den sonra kırmızı sinyalin yayılımına benzer bir paternle geri dönebildiğini gösteren paralel bir deneyle doğrulanmıştır. Bu deneyin sonucu Şekil 2.11.’de verilmiştir: Bu deneyde fotokonversiyon için kullanılan laser o bölgede yeşil floresansı ortadan kaldırabilecek kadar şiddetli tutulmuştur. Böylece 15 dakika içinde “bleaching” bölgesine yeşil floresansın tekrar dolabildiği, o bölgede dönüşmüş proteinlerin de diğer bölgelere aynı süre içinde yayılabildiği gösterilmiştir.



Şekil 2.11. Dendra proteini ile birleştirilmiş insan β 2-adrenoseptörünü kalıcı olarak eksprese eden HEK 293 hücre klonlarında yapılmış fotokonversiyon deneyi. Birinci satırda yeşil floresans (ex:488 nm, em:505-530 nm) ikinci satırda kırmızı floresans (ex:543 nm, em:560-nm) görünmektedir. İlk kolon fotokonversiyondan önce alınmış (yeşil floresans) görüntüyü, ikinci kolon yüksek intansiteli 488 nm laser ile beyaz okla belirtilen bölgede fotokonversiyon yapıldıktan hemen sonra alınmış görüntüyü, üçüncü kolon ise fotokonversiyondan 15 dakika sonra alınmış görüntüyü göstermektedir. Bu deneyde Şekil 2.9'de ve 2.10'de gösterilenden farklı olarak fotokonversiyon için kullanılan laserin şiddeti daha fazladır ve yeşil floresans konversiyon bölgesinde tümüyle yok olmuştur. Yüksek şiddette laserin, dönüşen kırmızı floresansı da bir miktar ortadan kaldırması nedeniyle kırmızı kanaldaki intansite düşüktür ve düşük sinyal-gürültü oranı kırmızı görüntünün niteliğini düşürmektedir. Buna rağmen dağılımın 15 dakika içinde tamamlanabildiği izlenebilmektedir.

Beta adrenoseptörlerin membranda lokal difüzyon gösterdiğini kanıtlayan tek bir FRAP (Flourescence Recovery After Photobleaching) deneyi literatürde vardır (Barak *et al.* 1997). Ancak bu deney reseptörlerin membranın her yerine ulaşabildiğini göstermemektedir. Buradaki deneyler bunu ilk kez göstermiştir.

Burada kullanılan reseptör mutantlarının bu özellikler bakımından farklı olup olmadıkları bu tez çalışmasında incelenememiştir. Çalışmanın yürütüldüğü laboratuarda bir konfokal mikroskopun bulunmaması ve erişimimizin olduğu laboratuarlardaki mikroskop kullanım sürelerinin kısıtlı olması nedeniyle deneyler gerekli güvenilirlikte sayısal sonuçlar sağlayabilecek biçimde optimize edilememiştir. Ancak burada elde edilen hücre klonları yapılan pilot deneylerle birlikte ileride bu tekniğin hücrese reseptör trafiğini incelemeye kullanılabilmesi için gerekli teknolojik altyapıyı sağlamıştır.

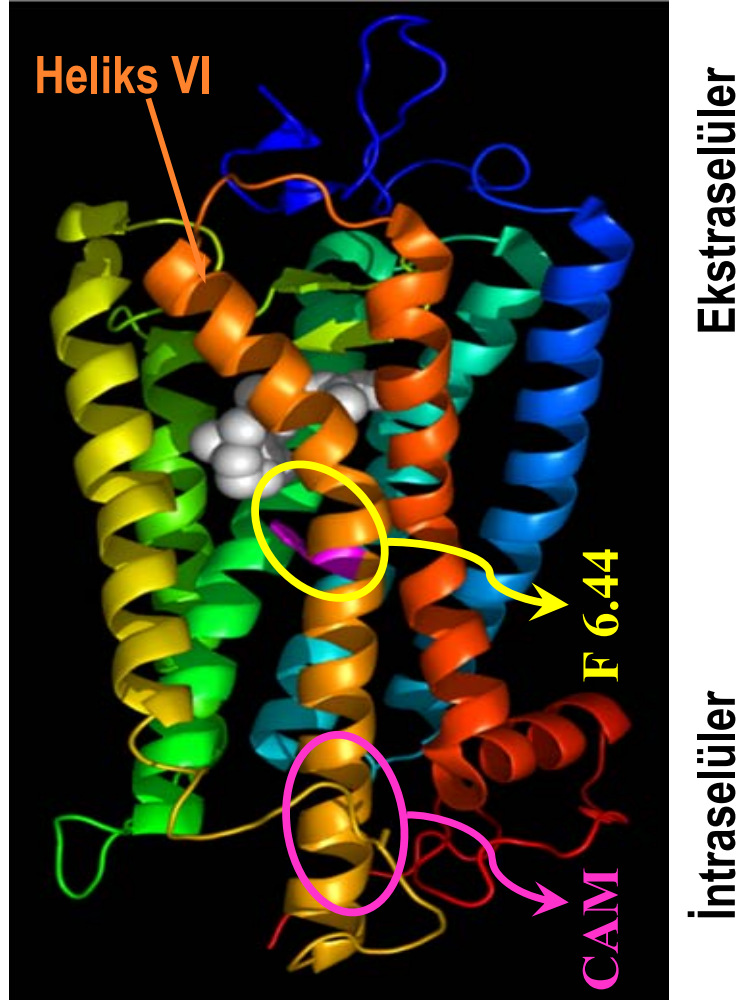
5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada insan β 2-adrenoseptörünün moleküler aktivasyon mekanizmasının daha iyi anlaşılmasına katkısı olabilecek bir konstitütif aktivatör mutasyon (F282L), β 2-AR cDNA'sı üzerinde oluşturulmuş ve bu mutantın ligand bağlama, sinyal ileme ve hücre içi dağılım özellikleri heterolog transfeksiyon sistemlerinde incelenmiştir. Ayrıca reseptör ve G proteinlerinin hücre içi trafiğinin incelenebilmesi için benzer çalışmalarda kullanılacak $G\alpha s$ -GFP, β 2-AR-GFP ve β 2-AR-dendra füzyon proteinlerinin cDNA' ları plazmitlerde klonlanmış ve bu füzyon proteinlerini fonksiyonel olarak eksprese eden hücre klonları elde edilmiştir. Bu çalışma, fotokonversiyon özelliği gösteren dendra-reseptör füzyonunun elde edildiği, bu füzyon proteininin fonksiyonel olduğunun gösterildiği ve bu araç kullanılarak reseptörün hücre zarındaki tek yönlü hareketinin gözlenebildiği ilk çalışmadır.

Bu çalışmada elde edilen bulgular şöyle özetlenebilir: 1) Reseptörün ligand bağlanma bölgesine yakın bir noktada VI. transmembran heliks üzerinde bulunan F282L mutasyonu (şekil 3.1.) β 2-adrenoseptörü (Gs ve adenilat siklaza kenetlenmek bakımından) konstitütif olarak aktive etmektedir. 2) F282L-mutantının konstitütif aktivite özellikleri ve ligand bağlama paterni agonist ile bağlı reseptörü taklit ettiği düşünülen CAM mutantından farklı bulunmuştur. 3) F282L- β 2-adrenoseptör mutantının hücresel dağılımı yine CAM mutantınıninkinden (ya da yaban tipinkinden) farklı bulunmuştur. 4) Tüm reseptör türlerinin hücre zarında en az iki farklı difüzyon havuz oluşturdukları saptanmıştır. Bu bulgular β -adrenoseptörün farklı moleküler aktivasyon mekanizmalarının olabileceğine ve reseptörün birden fazla aktif durumunun varlığına işaret etmektedir.

Literatürde CAM- β 2-AR'ün davranışı reseptörün aktif ve inaktif formu arasındaki dengenin (R-R*) mutasyon tarafından R* lehine kaydırılmasıyla açıklanmıştır (Samama *et al.* 1993). Reseptörün tek bir aktif konformasyonda bulunabildiğini varsayan bu model CAM- β 2-AR'ün neredeyse tüm davranış repertuarını açıklarken F282L mutantının burada belgelenen davranışı (CAM mutantı ile birlikte düşünüldüğünde) bu modele yerleşmemektedir. Bu çelişkiyi yaratan sonuçlar Şekil 2.6 ve 2.8'de gösterilen aktivasyon ve bağlanma deneylerinin verileridir: F282L mutantı üzerinde ICI118,551 fonksiyonel olarak bir invers agonist gibi davranırken ligand bağlanması açısından bir nötral ligand gibi, alprenolol fonksiyonel olarak bir nötral

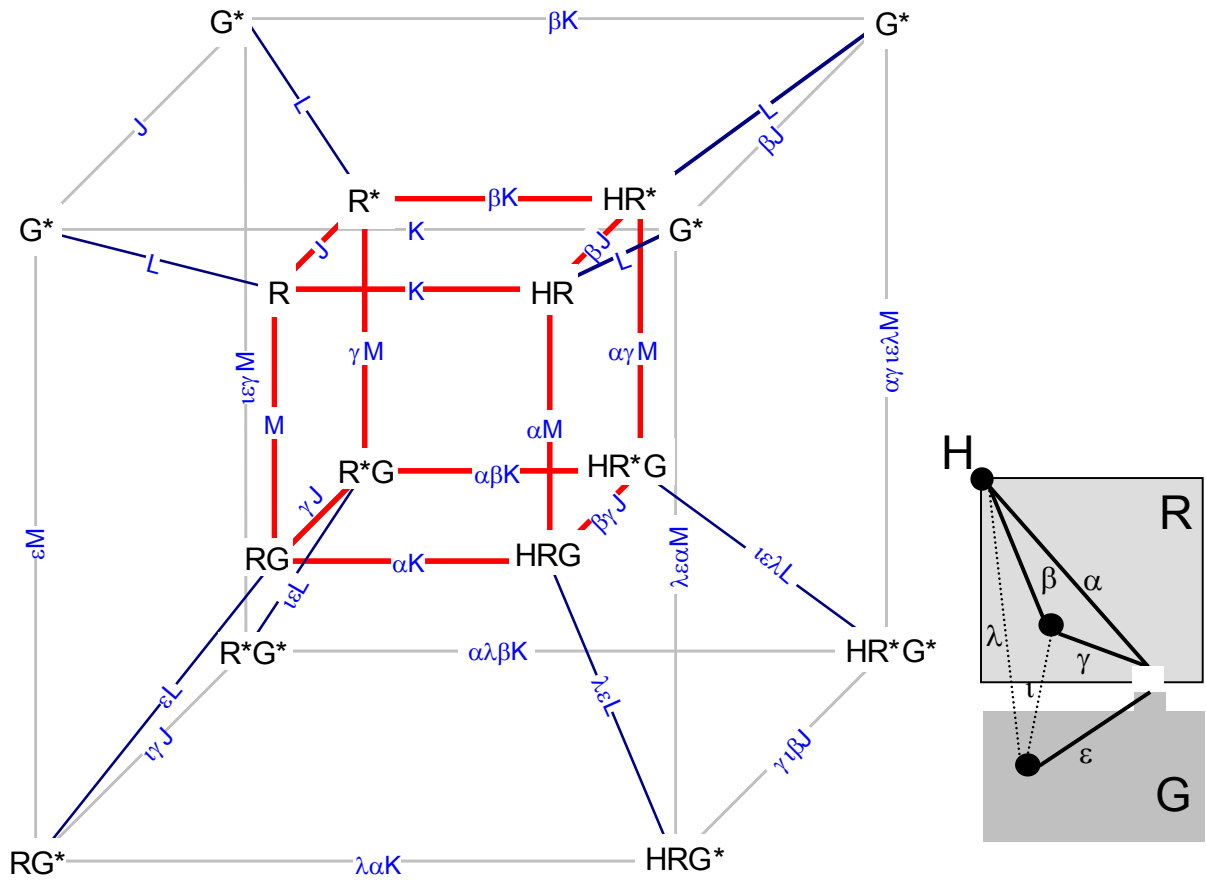
antagonist gibi davranırken ligand bağlanması açısından güçlü bir parsiyel agonist gibi davranmaktadır.



Şekil 3.1 Mutasyonların lokalizasyonu. β_2 -adrenerjik reseptörün konstitütif aktif mutantları CAM (6.28/6.29/6.31/6.34) ve F282(6.44) rodopsinin üç boyutlu yapısı üzerinde gösterilmiştir. Hem CAM hem de F282L mutasyonları altıncı heliks üzerinde yer almaktadır. Üç boyutlu yapı PDB veri tabanında yayınlanmış (1U19) atomik koordinatlar kullanılarak PyMol programıyla çizilmiştir.

Oysa CAM- β_2 -AR'ün yaban tip reseptöre göre fonksiyonel davranışı ve ligand bağlama özellikleri hem kendi içinde bir çelişki göstermemekte hem de iki durumlu reseptör modeliyle tutarlı bulunmaktadır. İki durumlu reseptör modeli şekil 2.8.'de CAM için bulunmuş olan bağlanma afinitesi paternini öngörebilmektedir. Oysa aynı şekilde F282L mutantı için CAM'e göre yukarı kaymış olan ilişki paterni bu modelle öngörülememektedir.

Bu durumu açıklayabilecek bir model önerisi Şekil 3.2.'de sunulmuştur. Bu modelde aktif reseptörün G proteinini aktive etmesi (G-G* dönüşümü) basit iki durumlu reseptör modeline açık olarak eklenmiştir. Böylece ligandlar ya da mutasyonlar tarafından oluşturulan aktif reseptör formlarının G proteinini aktive etmek bakımından farklar gösterebileceği bir model elde edilmiştir.



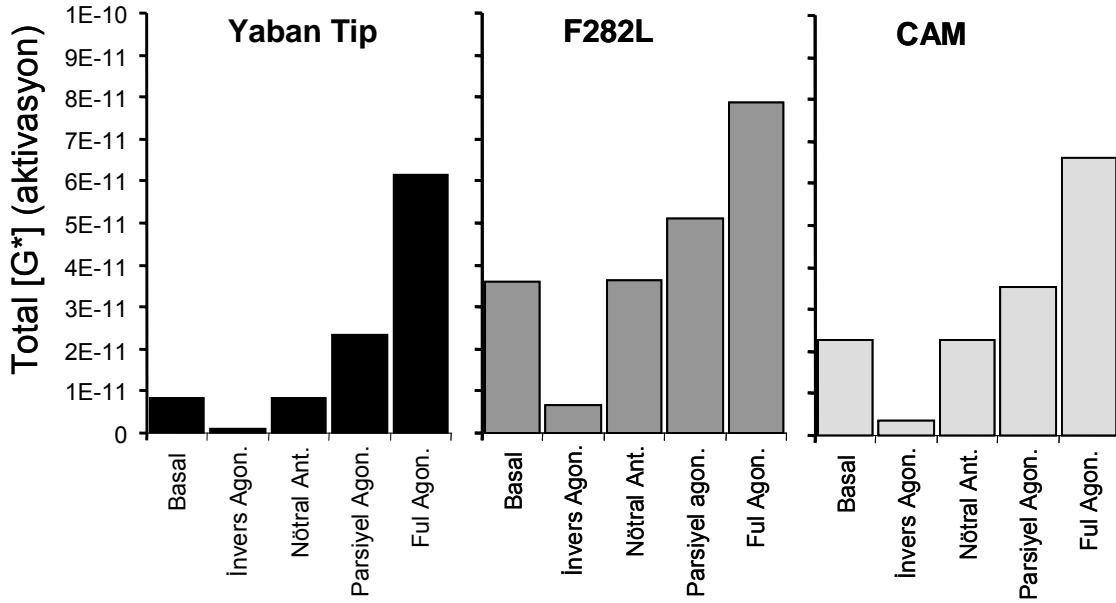
Şekil 3.2. F282L-β2-adrenoseptör mutantının davranışını, yaban tip ve CAM reseptör ile birlikte açıklamak için kullanılan denge modeli. **Sol panel:** Modelde kullanılan tüm denge reaksiyonları. Bu modelde temelde üç bileşen göz önüne alınmıştır: reseptör (R ya da R*), G proteini (G ya da G*) ve reseptör ligandı (H). Reseptörün ve G proteininin aktif formları * ile simgelenmiştir. Reseptör, ligand ve G proteinini tersinir olarak bağlayabilmektedir. Denge kollarında afinite sabitleri latin harfleriyle, allosterik kenet sabitleri ise yunan harfleriyle gösterilmiştir. Temel reaksiyon kollarındaki sabitler dışındaki kompozit sabitler termodinamik balans göz önüne alınarak oluşturulmuştur. **Sağ Panel:** Allosterik kenet sabitlerinin hangi bağlanma bölgeleri ya da izomerizasyon reaksiyonları arasında olduğunu gösteren şema. Bu şemada reseptör ve G proteini kutular şeklinde, bu proteinler üzerinde yer alan "izomerizasyon" noktaları siyah yuvarlaklarla ve reseptör üzerindeki ligand bağlanma bölgesi yine siyah yuvarlakla gösterilmiştir. Parametrelerin açıklaması ve simülasyonlarda kullanılan değerleri için çizelge 2.1.'e bakınız.

Bu modelde reseptörün G proteinini spontan olarak aktive etme yeteneği iki denge sabiti ve üç allosterik etkiden oluşmaktadır. Bunlar sırasıyla R-R* denge sabiti J, R-G afinitesi M, R-R* dönüşümü ile R-G bağlanması arasındaki allosterik kenet γ , G-G* dönüşümü ile R-G bağlanması arasındaki allosterik kenet ϵ , ve son olarak R-R* dönüşümü ile G-G* dönüşümü arasındaki allosterik kenet ι 'dır. Ligand efikasisi ise bu modelde α , β , λ ile gösterilen üç allosterik kenet sabitinden oluşmaktadır: Bunlar ligand bağlanmasıyla sırasıyla R-G bağlanması, R-R* dönüşümü ve RG kompleksi içinde G-G* dönüşümü arasındaki allosterik kenetleri göstermektedir. Bu model kullanılarak yapılan sayısal simülasyonlar yaban tip, CAM ve F282L mutant reseptörlerinin davranışını bir arada açıklayabilmektedir. Modelin tüm parametreleri tablo 4.1 de açıklanmış ve bu simülasyonlarda kullanılan parametre değerleri verilmiştir.

Çizelge 2.1. Modelde kullanılan parametrelerin açıklaması ve parametre değerleri.

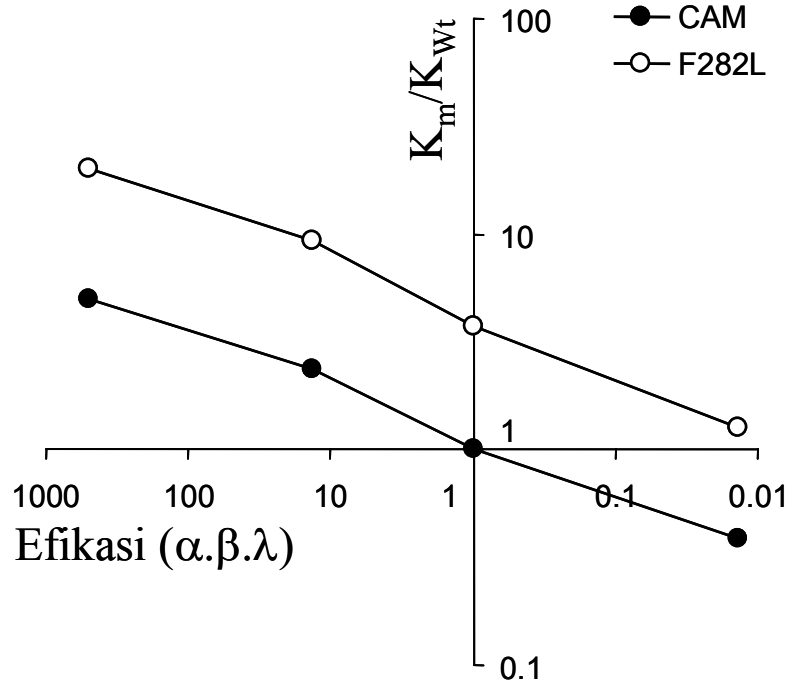
Simge	Açıklama	Kullanılan değer
H	Reseptör Ligandı	Değişken (10^{-9} - 10^{-3} M)
R	İnaktif Reseptör	Total reseptör derişimi : 10^{-10} M
R*	Aktif Reseptör	-
G	İnaktif G proteini	Total G proteini derişimi : 10^{-10} M
G*	Aktif G proteini	-
J	R - R* denge sabiti	Yaban tip: 0.1, Mutantlar: 10
K	Ligand-Reseptör afinite sabiti	10^6 M ⁻¹
L	G - G* denge sabiti	0.01
M	G protein-Reseptör afinite sabiti	10^{10} M ⁻¹
α	Allosterik kenet sabiti (H – G arasında)	0.3-40 (ligand efikasisine bağlı)
β	Allosterik kenet sabiti (H – R* arasında)	0.3-40 (ligand efikasisine bağlı)
γ	Allosterik kenet sabiti (R* – G arasında)	5
ι	Allosterik kenet sabiti (R* – G* arasında)	10 (Wt ve CAM), 20 (F282L)
ϵ	Allosterik kenet sabiti (R – G* arasında)	5
λ	Allosterik kenet sabiti (H – G* arasında)	0.15-5 (ligand efikasisine bağlı)

Şekil 3.3 de bu model kullanılarak yapılan simülasyon sonuçları görülmektedir. Burada yaban tip, F282L ve CAM reseptörü üzerinde şekilde belirtilen ligandların varlığında ve yokluğunda simüle edilen aktivasyonlar görülmektedir. Bu mutantları ilgili ligandların varlığında simüle etmek için kullanılan parametre değerleri şekil altında verilmiştir. CAM mutasyonu daha önceki çalışmalarda olduğu gibi yalnızca R-R* dengesini R* lehine arttırarak simüle edilmiştir. Yaban tip reseptörde $J=[R^*]/[R]=0.1$ seçilmişken CAM mutanti için bu değer daha önce olduğu gibi 10 seçilmiştir (Samama *et al.* 1993). F282L mutantında ise buna ek olarak ligandın R-R* dönüşümünü değiştirme özelliği olan β ve R* ile G* arasındaki kenet olan ι , şekil 4.3'ün açıklamasında belirtildiği gibi yaban tip ve CAM reseptör için kullanılan değerlerden farklı seçilmiştir. Bunun dışındaki tüm parametre değerleri her üç reseptör çeşidi için de aynı seçilmiştir.



Şekil 3.3. Belirtilen reseptör türlerinde belirtilen tür ligandların varlığında (ya da yokluğunda) simüle edilen aktivasyon yanıtları. Simülasyonlar şekil 4.2 de tanımlanan modelin öngördüğü denklemler nümerik olarak çözümlenerek yapılmıştır. Aktivasyon, ilgili koşullarda oluşan toplam G* miktarı olarak verilmiştir: $[G^*+RG^*+R^*G^*+HRG^*+HR^*G^*]$. Simülasyonlarda ligand derişimleri reseptörü doyuracak şekilde seçilmiştir. Farklı ligandlar için parametre değerleri şöyle ayarlanmıştır: Yaban tip ve CAM reseptör için $\beta=\alpha$, $\lambda=\alpha/2$ olarak seçilmiş ve invers agonist, nötral antagonist, parsiye ve ful agonistler için sırasıyla $\alpha=0.3,1,3$ ve 10 değerleri kullanılmıştır. F282L mutantında ise $\beta=5\alpha$ ilişkisi dışında aynı α ve λ değerleri kullanılmıştır. Kullanılan diğer parametre değerleri tablo 4.1'de verilmiştir. Bu parametre konfigürasyonu, mutant reseptörlerdeki bazal aktivite artışı ve F282' nin hem bazal hem de uyarılmış yanıtlarının CAM'inkilerden daha büyük olduğu şekilde görülmektedir.

Bu manipölasyon ve parametre değerleri yalnız fonksiyonel verileri değil, aynı zamanda ligand bağlama paterninde CAM ve F282L arasında gözlenen kritik farkı da açıklamaktadır (şekil 3.4'ü, şekil 2.8 ile karşılaştırın).



Şekil 3.4 Mutasyonların ligand bağlanma afinitesi üzerine etkisini gösteren simölasyon. Simölasyon, şekil 3.4.2 tanımlanan model kullanılarak yapılmıştır. Parametre değerleri Çizelge 2.1 ve şekil 3.3'de verilenlerin aynısıdır. Dolayısıyla, bu simölasyon şekil 3.3 de simüle edilen ligandların reseptöre bağlanma özelliklerini yansıtmaktadır. Bu simölasyonlarda tüm ligand bağlı türlerin toplam derişimleri $[HR+HR^*+HRG+HR^*G+HR^*G^*]$ ligand konsantrasyonuna bağımlı olarak hesaplanmış ve her ligand ve reseptör türü için bu şekilde saptanan bağlanma eyrileri deneysel bağlanma eğrileri gibi nonlineer regresyonla değerlendirilip ligand afiniteleri hesaplanmıştır. Tüm bu simölasyonlarda nükleotit varlığındaki bağlanma $M=0$ seçilerek simüle edilmiştir. Bu şartlarda hesaplanan afinite değerleri yaban tip reseptör için aynı şekilde hesaplanan afiniteye bölünerek ligand efikasisine karşı çizilmiştir. Ligand efikasisi olarak, metinde belirtildiği gibi, $\alpha\beta\lambda$ çarpımı kullanılmıştır. Hem x hem de y eksenleri grafikte logaritmik olarak gösterilmiştir. Bu simölasyonda bulunan patern şekil 2.8 de deneysel olarak gözlenen paterne uymaktadır.

Sonuç olarak F282L mutantını açıklamak için CAM reseptör için kullanılan farklı β ve λ değerlerinin kullanılması gereği, F282L mutasyonunun yarattığı reseptör formunun CAM'ın yarattığı reseptör konformasyonundan farklı olduğu anlamına gelmektedir.

KAYNAKLAR

- Barak, L.S., Ferguson, S.S.G., Zhang, J., Martenson, C., Meyer, T. and Caron, M.G. 1997. Internal trafficking and surface mobility of a functionally intact β_2 -adrenergic receptor-green fluorescent protein conjugate. *Molecular Pharmacology*, 51; 177-184.
- Bourne, H.R. 1997. How receptors talk to trimeric G proteins. *Current opinions in the Cell Biology*, 9; 134-142.
- Blumer, J.B., Cisimowski, M.J., Sato, M. and Lanier S.M. 2005. AGS proteins: receptor-independent activators of G-protein signaling. *Trends in Pharmacological Sciences*, 26 (9); 470-476.
- Chen, S., Lin, F. Xu, M. and Graham, R.M. 2002. Phe³⁰³ in TMVI of the α_{1B} -adrenergic receptor is a key residue coupling TM helical movements to G-protein activation. *Biochemistry*, 41; 588-596.
- Chen, S., Lin, F. Xu, M., Riek R.P., Novotny J. and Graham, R.M. 2002. Mutation of a Single TMVI residue Phe²⁸², in the β_2 -adrenergic receptor results in structurally distinct activated receptor conformations. *Biochemistry*, 41; 6045-6053.
- Conklin, B.R. and Bourne, H. R. 1993. Structural elements of G α subunits that interact with G γ receptors and effectors. *Cell*, 73; 631-641.
- Costa, T. and Cotecchia, S. 2005. Historical review: Negative efficacy and the constitutive activity of G-protein-coupled receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, 26 (12); 618-624.
- Dingledine, R., Myers S.J. and Nicholas, R.A. 1990. Molecular biology of mammalian amino acid receptors. *FASEB J.*, 4 (9); 2636-2645.
- Dohlman, H.G., Thorner, J., Caron M.G. and Lefkowitz, R.J. 1991. Model systems for the study of seven-transmembrane segment receptors. *Annu. Reviews in Biochemistry*, 60; 653-688.
- Dohlman, H.G. and Thorner, J. 1997. RGS proteins and signaling by heterotrimeric G proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 272 (7); 3871-3874.
- Donaldson, L.F., Hanley, M.R. and Villablanca, A.C. 1997. Inducible receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, 18; 171-181.
- Gether, U., Lin, S. and Kobilka, B.K. 1995. Fluorescent labeling of purified β_2 adrenergic receptor: evidence for ligand specific conformational changes. *The Journal of Biological Chemistry*, 270; 28268-28275.
- Gether, U. and Kobilka, B.K. 1998. G protein-coupled receptors. II. Mechanism of agonist activation. *The Journal of Biological Chemistry*, 273 (29); 17979-17982.
- Gilman, A.G. 1987. G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu. Reviews in Biochemistry*, 56; 615-649.
- Gurskaya, N.G., Verkhusa, V.V., Shcheglov, A.S., Staroverov, D.B., Chepurnykh, T.V., Fradkov, A.F., Lukyanov, S. and Lukyanov, K.A., 2006. Engineering of a monomeric green-to-red photoactivatable fluorescent protein induced by blue light. *Nature biotechnology*, 24 (4); 461-465.
- Hamm, H. 1998. The many faces of G protein signaling. *The Journal in Biological Chemistry*, 273 (2); 669-672.
- Hedin, K.E., Duerson, K. and Clapham D.E., 1993. Specificity of receptor-G protein interactions: searching for the structure behind the signal. *Cell Signaling*, 5; 505-518.

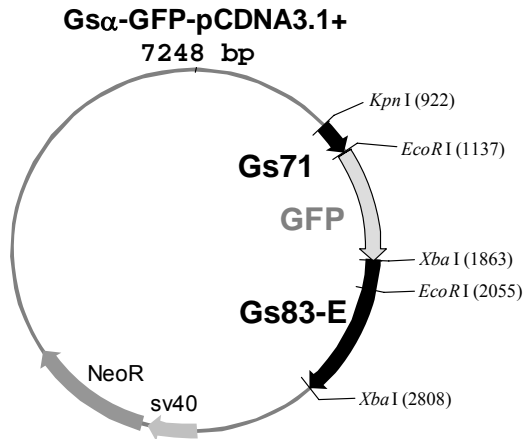
- Kallal, L., Gagnon A.W., Penn R.B. and Benovic, J.L. 1998. Visualization of agonist induced sequestration and down regulation of green fluorescent protein-tagged β_2 -adrenergic receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 273; 322-328.
- Kenakin, T.P. 1997. Agonist-specific receptor conformations. *Trends in Pharmacological Sciences*, 18, 416-417.
- Kjelsberg, M.A., Cottechia S., Ostrovski, J., Caron, M.G. and Lefwkowitz R.J 1992. Constitutive activation of the alpha 1-B-adrenergic receptor by all amino acid substitutions at a single site. Evidence for a region which constrains receptor activation. *The Journal in Biological Chemistry*, 267 (3); 1430-1433.
- Kukkonen, J.P., Nasman, J. A., and Kerman, K.E. 2002. Modeling of promiscuous receptor Gi/Gs protein coupling and effector response. *Trends in Pharmacological Sciences*, 22 (12); 616-622.
- de Ligt, R.A.F. 2000. Inverse agonism at G-protein coupled receptors: (patho) physiological relevance and implications for drug discovery. *British Journal of Pharmacology*, 130; 1-12.
- Lefkowitz, R.J., Cotecchia, S., Samama, P. and Costa, T. 1993. Constitutive activity of receptor coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *Trends in Pharmacological Sciences*, 14; 303-307.
- Marinissen, M.J. and Gutkind, J.S. 2001. G-protein coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends in Pharmacological Sciences*, 22 (7); 368-376.
- McCune, D.F., Edelmann S.E., Olges, J.R., Post, G.R., Waldrop, B.A., Waugh, D.J.J., Perez D.M. and Piascik, M.T. 2000. Regulation of the cellular localization and signaling properties of α_{1B} - and α_{1D} -adrenoreceptors by agonists and invers agonists. *Molecular Pharmacology*, 57; 659-666.
- MacEwan, A.J., Bevan N., Rees, S. and Milligan G. 1999. Visualizing differences in ligand regulation of wild-type and constitutively active mutant β_2 -adrenoreceptors-green fluorescent protein-fusion proteins. *Molecular Pharmacology*, 56; 1182-1191.
- McLean, A.J. and Milligan, G. 2000. Ligand regulation of green fluorescent protein-tagged forms of the human β_1 - and β_2 -adrenoreceptors; Comparisons with the unmodified receptors. *British Journal of Pharmacology*, 130; 1825-1832.
- Mhaouty-Kodja, S., Barak L.S., Scheer, A., Abuin, L., Diviani, D., Caron, M.G. and Cotecchia, S. 1999. Constitutively active alpha-1b adrenergic-receptor mutants display different phosphorylation and internalization features. *Molecular Pharmacology*, 55; 339-347.
- Milligan, G. 1999. Exploring the dynamics of regulations of G protein-coupled receptors using green fluorescent protein. *British Journal of Pharmacology*, 128; 501-510.
- Milligan, G. 2003. Constitutively activity and inverse agonists of G-protein-coupled receptors: a current perspective. *Molecular Pharmacology*, 64 (6); 1271-1276.
- Milligan, G. and Bond R.A. 1997. Inverse agonism and the regulation of receptor number. *Trends in Pharmacological Sciences*, 18, 468-474.
- Neer, E.J. 1995. Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell*, 80; 249-257.
- Onaran, H.O. and Costa, T. 2001. Intramolecular dynamics and ligand-induced conformational changes: a stochastic model of receptor action, in *Biomedical Applications of Computer Modelling*. Ed. Christopoulos, A. CRC press: 109-134.

- Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori T., Behnke, C.A., Motoshima, H., Fox B.A., LeTrong, I., Teller, D.C., Okada, T., Stenkamp, R.E., Yamamoto, M. and Miyano, M. 2000. Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptors. *Science*, 289; 739-745.
- Parnot, C., Miserey-Lenkei S., Bardin S., Corvol, P. and Clauser E. 2002. Lessons from constitutively active mutants of G protein-coupled receptors. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 13 (8); 336-343.
- Rademarker, B., Kramer, K., van Ingen, H., Kranendonk, M. and Timmerman, H. 1985. Non specific binding of the fluorescent beta-adrenergic receptor probe alprenolol-NBD. *J.Recept.Res.*, 5; 121-131.
- Rens-Domiano, S. and Hamm, H.E. 1995. Structural and functional relationships of heterotrimeric G proteins. *FASEB J.*, 9; 1059-1066.
- Rossier, O., Abuim, L., Fanelli, F., Leonardi, A., and Cotecchia, S. 1999. Inverse agonism and neutral agonism at α_{1a} - and α_{1b} -adrenergic receptor subtypes. *Molecular Pharmacology*, 56; 858-866.
- Samama, P., Cotecchia, S., Costa, T. and Lefkowitz, R.J. 1993. A mutation-induced activated state of the β_2 -adrenergic receptor-extending the ternary complex model. *The Journal of Biological Chemistry*, 268; 4625-4636.
- Shanker, A., Lane, L., Kosugi, S., Merendino J.J.Jr., Minegishi T., and Cutler G.B.1993. A constitutively activating mutation of the luteinizing hormone receptor in familial male precocious puberty. *Nature*, 365 (6447); 652-654.
- Spiegel, A.M. 1996. Defects in G-protein coupled signal transduction in human disease. *Annu. Rev. Physiol.*, 58; 143-170.
- Strader C. D., Fong, T. M., Tota, M.R., Underwood, D. and Dixon, R.A.F. 1994. Structure and function of G-protein coupled receptors. *Annu. Reviews in Biochemistry*, 63; 101-132.
- Tian, W.N., Duzic, E., Lanier, S.M., and Deth, R.C. 1994. Determinants of α_2 -adrenergic receptor activation of G-proteins: evidence for a pre-coupled receptor/G-protein state. *Molecular Pharmacology*, 45; 524-531.
- Yu, Y., Zhang, L., Yin, X., Sun, H., Uhl, G.R. and Wang, J.B. 1997. μ -Opioid receptor phosphorylation, desensitization and ligand efficacy. *The Journal of Biological Chemistry*, 272; 28869-28874.
- Yu, J.Z., Rasenick, M.M. 2002. Real-Time Visualization of a Fluorescent $G_{\alpha s}$: Dissociation of the Activated G Protein from Plasma Membrane. *Mol Pharmacol*, 61;352-359.
- Von Zastrow, M. and Kobilka, B.K. 1994. Agonist dependent and independent steps in the mechanism of adrenergic receptor internalization. *The Journal of Biological Chemistry*, 269; 18448-18452.
- Ugur, O. and Onaran H.O. 1997. Allosteric equilibrium model explains steady-state coupling of β -AR to adenylat cyclase in turkey erythrocyte. *The Journal of Biological Chemistry*, 323; 765-776.
- Wess, J. 1997. G protein-coupled receptors: molecular mechanisms involved in receptor activation and selectivity of G protein recognition. *FASEB J.*, 11;346-354.

EK 1.

Gαs-GFP Konstraktı

Bu çalışmada kullanılmamış olmakla birlikte, hazırlanan Gαs-GFP konstraktı şematik olarak Şekil 4.1.'de verilmiştir. Burada GFP proteini Gαs proteininin 71. aminoasidini kodlayan bölgenin hemen arkasına yerleştirilmiş ve GFP dizisinin sonuna Gαs proteininin 83. aminoasidinden itibaren sonuna kadar kodlayan cDNA yerleştirilmiştir. Çünkü hem bizim hem de başkalarının deneyimi GFP proteinin Gαs proteininin amino ya da karboksi terminaline eklenmesinin ya Gαs'in ya da GFP nin işlevlerini bozduğunu göstermiştir. Burada elde edilen konstrakta GFP, kısa ve uzun Gαs arasındaki farkı oluşturan amino asit dizisinin yerini tutmaktadır. Bu füzyon proteini GFP ye göre daha zayıf ama yeterli bir floresans vermekte ve Gαs'in fonksiyonlarını korumaktadır. Başka çalışmalarda kullanılabilir bu konstrakt bu çalışmada elde edilen bir biyoteknolojik yan ürün olarak sunulmuştur.



Şekil 4.1. Gsα klonlandığı pCDNA3.1+ plazmitinde Gsα-GFP cDNA sınır konumu görünmektedir.

Aşağıda Gαs'i ve GFP'i kodlayan cDNA'lar şematik olarak gösterilmiştir. Aşağıda altları çizili ATG ve TAA baz dizileri cDNA'ların başlatıcı ve sonlandırıcı kodonları, Gαs'in 5' ucunda yer alan GGTACC baz dizisi KpnI restriksiyon enziminin ve 3' ucunda TCTAGA XbaI enziminin spesifik olarak tanıdığı dizidir. Gαs cDNA'sında * işaretiyle temsil edilen 33 baz çifti 71-82. aminoasitlere karşılık gelmektedir. Füzyon oluşturulurken bu aminoasitler proteinin primer dizisinden çıkarılmış, bu bölgeye GFP yerleştirilmiştir.

Gαs (1182 baz çifti, 394 aa)

TG GGTACCATGGGC-----TTTAACGGAGAG*****AACAGCGATGGT-----CTCTTAATCTAGA

GFP (717 baz çifti, 239 aa)

ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGC-----TGGACGAGCTGTACAAGTAA

Gαs'in ilk 71 aminoasidini kodlayan 213 bazlık, 83-394. aminoasitleri kodlayan 936 bazlık bölümleri ve GFP'i kodlayan cDNA PCR aracılığıyla ayrı ayrı çoğaltılmıştır. PCR reaksiyonlarda kullanılan primerler:

Gαs'in ilk 213 bazlık bölümünü çoğaltmak için:

1. Forward Primer: 5' CTT GGT ACC ATG GGC TGC CTC
2. Reverse Primer: 5' GTA GAA TTC CTC TCC GTT AAA CCC ATT AAC ATG TAG

Gαs'in son 936 bazlık bölümünü çoğaltmak için:

3. Forward Primer: 5' CTA TCT AGA AAC AGC GAT GGT GAG AAG GCC AC
4. Reverse Primer: 5' CTA TCT AGA TTA GAG CAG CTC GTA TTG GCG AAG

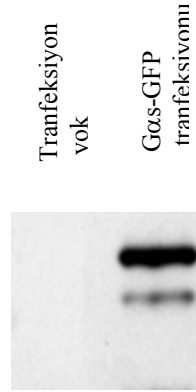
GFP'in cDNA'sını çoğaltmak için:

5. Forward Primer: 5' GCT AGA ATT CAT GGT GAG CAA GGG CGA GGA G
6. Reverse Primer: 5' GCT ATC TAG ACG ACT TGT ACA GCT CGT CCA TGC CG

Birinci primerin 5'-ucundaki altı çizili 6 baz, ikinci primerin 5'-ucundaki 6 baz sırasıyla KpnI ve EcoRI enzimlerinin tanıma bölgeleridir. Üçüncü ve 4. primerlerin 5' ucundaki altı çizili bazlar XbaI enziminin tanıma bölgesidir. Beşinci ve 6. primerlerin 5'-ucundaki altı çizili bazlar ise sırasıyla EcoRI ve XbaI enzimlerinin tanıma bölgeleridir. Birinci primer Gαs cDNA'sının 5'-ucuna 2. primer ise Gαs'in 63-71 aminoasitlerini kodlayan DNA bölgesine

komplementerdir. Üçüncü primer $G\alpha s$ 'in 83-90. aminositlerini kodlayan DNA bölgesine, dördüncü primer $G\alpha s$ cDNA'sının 3' ucuna komplementerdir. Beşinci primer GFP kodlayan cDNA'nın 5'-ucuna, 6. primer ise GFP'in son 11 bazına (sonlandırıcı kodon hariç) komplementerdir. İlk aşamada bu primerler kullanılarak $G\alpha s$ 'in ilk 71 aminoasitini kodlayan parça, 83-394. aminoasitlerini kodlayan parça ve GFP'yi kodlayan parçalar ayrı ayrı PCR ile çoğaltılmıştır. İkinci aşamada bu parçalar agaroz jelden saflaştırılıp yukarıda belirtilen uygun enzim kombinasyonlarıyla kesilmiştir. Üçüncü aşamada bu parçalar teker teker uygun enzimlerle kesilmiş pCDNA3.1+ vektörüne sırayla standart ligasyon protokolleriyle yerleştirilmiştir: İlk parça vektöre yerleştirildikten sonra E.coli'de klonlanıp yeniden saflaştırılmış ve elde edilen bu plazmit ikinci parçanın yerleştirilmesi için kullanılmış ve aynı işlem üçüncü parçanın yerleştirilmesi için tekrar edilmiştir.

Klonlanmış vektörün, hiç $G\alpha s$ eksprese etmeyen S49 cyc- lenfoma hücre kültürüne transfeksiyonu bu hücrelerde $G\alpha s$ -GFP füzyonunun ekspresyonunu sağlamıştır. $\beta 2$ -AR konstraktlarından farklı olarak bu durumda ekspresyon ligand bağlama çalışmaları ile saptanamayacağından imünoblot yöntemiyle gösterilmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Transfekte edilmemiş ve $G\alpha s$ -GFP füzyon proteini cDNAsı taşıyan vektör ile transfekte edilmiş s49 cyc- hücre zarı preparatlarından elde edilen Western blot analizi. Kullanılan antikor $G\alpha s$ 'nin amino terminalini tanımaktadır. Sağdaki hatta görünen kalın bant yaklaşık 85 kDa'a uymaktadır. Daha düşük ağırlıklı (yaklaşık 75 kDa) ve yoğunluklu bant ise muhtemelen bir parçalanma ürünüdür ve literatürde başkalarının yaptığı çalışmalarda da görülmektedir.

Bu $G\alpha s$ konstraktının tasarımı bize ait değildir. Bu konstrakt daha önce yapılmış ve fonksiyonel integretitesi (adenilat siklaza kenetlenebilirliği) kanıtlanmıştır (Yu ve Rasenick, 2002).

EK 2.

Konstraktların cDNA dizileri

β2-AR

ATGGGGCAACCCGGGAACGGCAGCGCCTTCTTGCTGGCACCCAATAGAAGCCATGCGCCGGACCACGACGTCACG
CAGCAAAGGGACGAGGTGTGGGTGGTGGGCATGGGCATCGTCATGTCTCTCATCGTCCCTGGCCATCGTGTGGC
AATGTGCTGGTCATCACAGCCATTGCCAAGTTCGAGCGTCTGCAGACGGTCACCAACTACTTTCATCACTTCACTG
GCCTGTGCTGATCTGGTCATGGGCCTGGCAGTGGTGCCTTTGGGGCCGCCATATTCCTTATGAAAATGTGGACT
TTTGGCAACTTCTGGTGCAGTTTTGGACTTCCATTGATGTGCTGTGCGTCACGGCCAGCATTTGAGACCCGTGTC
GTGATCGCAGTGGATCGCTACTTTGCCATTACTTACCTTTCAAGTACCAGAGCCTGCTGACCAAGAATAAGGCC
CGGGTGATCATTCTGATGGTGTGGATTGTGTGTCAGGCCTTACCTCCTTCTTGCCCATTCAGATGCACCTGGTACCGG
GCCACCCACCAGGAAGCCATCAACTGCTATGCCAATGAGACCTGCTGTGACTTCTTACGAACCAAGCCTATGCC
ATTGCCCTTCCATCGTGTCTTCTACGTTCCCCTGGTGTGATCATGGTCTTTCGTCTACTCCAGGGTCTTTCAGGAG
GCCAAAAGGCAGCTCCAGAAGATTGACAAAATCTGAGGGCCGCTTCCATGTCCAGAACCCTTAGCCAGGTGGAGCAG
GATGGGCGGACGGGGCATGGACTCCGCAGATCTTCCAAGTTCGTCTGAAGGAGCACAAGCCCTCAAGACGTTA
GGCATCATCATGGGCACCTTACCCTCTGCTGGCTGCCCTTCTTCATCGTTAACATTGTGCATGTGATCCAGGAT
AACCTCATCCGTAAGGAAGTTTACATCCTCCTAAATTGGATAGGCTATGTCAATTCTGGTTTCAATCCCTTATC
TACTGCCGGAGCCAGATTTAGGATTGCCTTCCAGGAGCTTCTGTGCCTGCGCAGGTCTTCTTTGAAGCCTAT
GGGAATGGCTACTCCAGCAACGGCAACACAGGGGAGCAGAGTGGATATCACGTGGAACAGGAGAAAAGAAAATAAA
CTGCTGTGTGAAGACCTCCAGGCACGGAAGACTTTGTGGGCCATCAAGGTACTGTGCCCTAGCGATAACATTGAT
TCACAAGGGAGGAATTGTAGTACAAAATGACTCACTGCTGTAA

β2-AR (CAM)

ATGGGGCAACCCGGGAACGGCAGCGCCTTCTTGCTGGCACCCAATAGAAGCCATGCGCCGGACCACGACGTCACG
CAGCAAAGGGACGAGGTGTGGGTGGTGGGCATGGGCATCGTCATGTCTCTCATCGTCCCTGGCCATCGTGTGGC
AATGTGCTGGTCATCACAGCCATTGCCAAGTTCGAGCGTCTGCAGACGGTCACCAACTACTTTCATCACTTCACTG
GCCTGTGCTGATCTGGTCATGGGCCTGGCAGTGGTGCCTTTGGGGCCGCCATATTCCTTATGAAAATGTGGACT
TTTGGCAACTTCTGGTGCAGTTTTGGACTTCCATTGATGTGCTGTGCGTCACGGCCAGCATTTGAGACCCGTGTC
GTGATCGCAGTGGATCGCTACTTTGCCATTACTTACCTTTCAAGTACCAGAGCCTGCTGACCAAGAATAAGGCC
CGGGTGATCATTCTGATGGTGTGGATTGTGTGTCAGGCCTTACCTCCTTCTTGCCCATTCAGATGCACCTGGTACCGG
GCCACCCACCAGGAAGCCATCAACTGCTATGCCAATGAGACCTGCTGTGACTTCTTACGAACCAAGCCTATGCC
ATTGCCCTTCCATCGTGTCTTCTACGTTCCCCTGGTGTGATCATGGTCTTTCGTCTACTCCAGGGTCTTTCAGGAG
GCCAAAAGGCAGCTCCAGAAGATTGACAAAATCTGAGGGCCGCTTCCATGTCCAGAACCCTTAGCCAGGTGGAGCAG
GATGGGCGGACGGGGCATGGACTCCGCAGATCTTCCAAGTTCGTCTGAGGAGAGAAAGCCGCAAGACGTTA
GGCATCATCATGGGCACCTTACCCTCTGCTGGCTGCCCTTCTTCATCGTTAACATTGTGCATGTGATCCAGGAT
AACCTCATCCGTAAGGAAGTTTACATCCTCCTAAATTGGATAGGCTATGTCAATTCTGGTTTCAATCCCTTATC
TACTGCCGGAGCCAGATTTAGGATTGCCTTCCAGGAGCTTCTGTGCCTGCGCAGGTCTTCTTTGAAGCCTAT
GGGAATGGCTACTCCAGCAACGGCAACACAGGGGAGCAGAGTGGATATCACGTGGAACAGGAGAAAAGAAAATAAA
CTGCTGTGTGAAGACCTCCAGGCACGGAAGACTTTGTGGGCCATCAAGGTACTGTGCCCTAGCGATAACATTGAT
TCACAAGGGAGGAATTGTAGTACAAAATGACTCACTGCTGTAA

β2-AR (F282L)

ATGGGGCAACCCGGGAACGGCAGCGCCTTCTTGCTGGCACCCAATAGAAGCCATGCGCCGGACCACGACGTCACG
CAGCAAAGGGACGAGGTGTGGGTGGTGGGCATGGGCATCGTCATGTCTCTCATCGTCCCTGGCCATCGTGTGGC
AATGTGCTGGTCATCACAGCCATTGCCAAGTTCGAGCGTCTGCAGACGGTCACCAACTACTTTCATCACTTCACTG
GCCTGTGCTGATCTGGTCATGGGCCTGGCAGTGGTGCCTTTGGGGCCGCCATATTCCTTATGAAAATGTGGACT
TTTGGCAACTTCTGGTGCAGTTTTGGACTTCCATTGATGTGCTGTGCGTCACGGCCAGCATTTGAGACCCGTGTC
GTGATCGCAGTGGATCGCTACTTTGCCATTACTTACCTTTCAAGTACCAGAGCCTGCTGACCAAGAATAAGGCC
CGGGTGATCATTCTGATGGTGTGGATTGTGTGTCAGGCCTTACCTCCTTCTTGCCCATTCAGATGCACCTGGTACCGG
GCCACCCACCAGGAAGCCATCAACTGCTATGCCAATGAGACCTGCTGTGACTTCTTACGAACCAAGCCTATGCC
ATTGCCCTTCCATCGTGTCTTCTACGTTCCCCTGGTGTGATCATGGTCTTTCGTCTACTCCAGGGTCTTTCAGGAG
GCCAAAAGGCAGCTCCAGAAGATTGACAAAATCTGAGGGCCGCTTCCATGTCCAGAACCCTTAGCCAGGTGGAGCAG
GATGGGCGGACGGGGCATGGACTCCGCAGATCTTCCAAGTTCGTCTGAAGGAGCACAAGCCCTCAAGACGTTA

GGCATCATCATGGGCACTCTCACCCCTCTGCTGGCTGCCCTTCTTCATCGTTAACATTGTGCATGTGATCCAGGAT
AACCTCATCCGTAAGGAAGTTTACATCCTCCTAAATTGGATAGGCTATGTCAATTCTGGTTTCAATCCCCTTATC
TACTGCCGGAGCCCAGATTTAGGATTGCCTTCCAGGAGCTTCTGTGCCTGCGCAGGTCTTCTTTGAAGGCCTAT
GGGAATGGCTACTCCAGCAACGGCAACACAGGGGAGCAGAGTGGATATCACGTGGAACAGGAGAAAAGAAAATAAA
CTGCTGTGTGAAGACCTCCCAGGCACGGAAGACTTTGTGGGCCATCAAGGTACTGTGCCTAGCGATAACATTGAT
TCACAAGGGAGGAATTGTAGTACAAATGACTCACTGCTGTAA

β2-AR-GFP

ATGGGGCAACCCGGGAACGGCAGCGCCTTCTTGCTGGCACCCAATAGAAGCCATGCGCCGGACCACGACGTCACG
CAGCAAAGGGACGAGGTGTGGGTGGTGGGCATGGGCATCGTCATGTCTCTCATCGTCTGGCCATCGTGTGGC
AATGTGCTGGTTCATCACAGCCATTGCCAAGTTTCGAGCGTCTGCAGACGGTCACCAACTACTTTCATCACTTCACTG
GCCTGTGCTGATCTGGTCAATGGCCTGGCAGTGGTGCCTTTGGGGCCGCCCATATTCCTTATGAAAATGTGGACT
TTTGGCAACTTCTGGTGCAGTTTTGGACTTCCATTGATGTGCTGTGCGTCACGGCCAGCATTGAGACCCCTGTGC
GTGATCGCAGTGGATCGCTACTTTGCCATTACTTACCTTTCAAGTACCAGAGCCTGCTGACCAAGAATAAGGCC
CGGGTGATCATTTCTGATGGTGTGGATTGTGTGAGGCCTTACCTCCTTCTTGCCATTAGATGCACTGGTACCGG
GCCACCCAGGGAAGCCATCAACTGCTATGCCAATGAGACCTGCTGTGACTTCTTACGAACCAAGCCTATGCC
ATTGCCCTTCCATCGTGTCTTCTACGTTCCCTGGTGATCATGGTCTTCTGCTACTCCAGGGTCTTTCAGGAG
GCCAAAAGGCAGCTCCAGAAGATTGACAAATCTGAGGGCCGCTTCCATGTCCAGAACCCTTAGCCAGGTGGAGCAG
GATGGGGCGACGGGGCATGGACTCCGCAGATCTTCCAAGTTCTGCTTGAAGGAGCACAAGCCCTCAAGACGTTA
GGCATCATCATGGGCACTTTCACCCCTCTGCTGGCTGCCCTTCTTCATCGTTAACATTGTGCATGTGATCCAGGAT
AACCTCATCCGTAAGGAAGTTTACATCCTCCTAAATTGGATAGGCTATGTCAATTCTGGTTTCAATCCCCTTATC
TACTGCCGGAGCCCAGATTTAGGATTGCCTTCCAGGAGCTTCTGTGCCTGCGCAGGTCTTCTTTGAAGGCCTAT
GGGAATGGCTACTCCAGCAACGGCAACACAGGGGAGCAGAGTGGATATCACGTGGAACAGGAGAAAAGAAAATAAA
CTGCTGTGTGAAGACCTCCCAGGCACGGAAGACTTTGTGGGCCATCAAGGTACTGTGCCTAGCGATAACATTGAT
TCACAAGGGAGGAATTGTAGTACAAATGACTCACTGCTGAAGCTTTCGAATTCTGCAGTGCACGGTACCGCGGGCC
CGGGATCCACCGTCCGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGGCCATCCTGGTCCGAG
CTGGACGGCGACGTAACCGGCCACAAGTTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTG
ACCTGAAAGTTTCATCTGCACCACCGCAAGCTGCCCCGCTGGCCACCCCTCGTGACCACCCCTGACCTACGGC
GTGCAGTCTTCCAGCGTACCCCGACCATGAAAGCAGCAGCAGCTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTAC
GTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTTCGAGGGCGAC
ACCCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAG
TACAACATAACAGCCACAACGTTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACCTCAAGATC
CGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGGCAGCGCCCC
GTGCTGTGCTGCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCAC
ATGGTCTGCTGGAGTTCTGTGACCGCCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA .

β2-AR(F282L)-GFP

ATGGGGCAACCCGGGAACGGCAGCGCCTTCTTGCTGGCACCCAATAGAAGCCATGCGCCGGACCACGACGTCACG
CAGCAAAGGGACGAGGTGTGGGTGGTGGGCATGGGCATCGTCATGTCTCTCATCGTCTGGCCATCGTGTGGC
AATGTGCTGGTTCATCACAGCCATTGCCAAGTTTCGAGCGTCTGCAGACGGTCACCAACTACTTTCATCACTTCACTG
GCCTGTGCTGATCTGGTCAATGGCCTGGCAGTGGTGCCTTTGGGGCCGCCCATATTCCTTATGAAAATGTGGACT
TTTGGCAACTTCTGGTGCAGTTTTGGACTTCCATTGATGTGCTGTGCGTCACGGCCAGCATTGAGACCCCTGTGC
GTGATCGCAGTGGATCGCTACTTTGCCATTACTTACCTTTCAAGTACCAGAGCCTGCTGACCAAGAATAAGGCC
CGGGTGATCATTTCTGATGGTGTGGATTGTGTGAGGCCTTACCTCCTTCTTGCCATTAGATGCACTGGTACCGG
GCCACCCAGGGAAGCCATCAACTGCTATGCCAATGAGACCTGCTGTGACTTCTTACGAACCAAGCCTATGCC
ATTGCCCTTCTCCATCGTGTCTTCTACGTTCCCTGGTGATCATGGTCTTCTGCTACTCCAGGGTCTTTCAGGAG
GCCAAAAGGCAGCTCCAGAAGATTGACAAATCTGAGGGCCGCTTCCATGTCCAGAACCCTTAGCCAGGTGGAGCAG
GATGGGGCGACGGGGCATGGACTCCGCAGATCTTCCAAGTTCTGCTTGAAGGAGCACAAGCCCTCAAGACGTTA
GGCATCATCATGGGCACTTTCACCCCTCTGCTGGCTGCCCTTCTTCATCGTTAACATTGTGCATGTGATCCAGGAT
AACCTCATCCGTAAGGAAGTTTACATCCTCCTAAATTGGATAGGCTATGTCAATTCTGGTTTCAATCCCCTTATC
TACTGCCGGAGCCCAGATTTAGGATTGCCTTCCAGGAGCTTCTGTGCCTGCGCAGGTCTTCTTTGGAGCACAAA
GCCCTCAAGACGTTAGGCATCATCATGGGCACTCTCACCCCTCTGCTGGCTGCCCTTCTTCATCGTTAACAAATAAA
CTGCTGTGTGAAGACCTCCCAGGCACGGAAGACTTTGTGGGCCATCAAGGTACTGTGCCTAGCGATAACATTGAT
TCACAAGGGAGGAATTGTAGTACAAATGACTCACTGCTGAAGCTTTCGAATTCTGCAGTGCACGGTACCGCGGGCC

CGGGATCCACCGGTGCGCCACC**ATGGT**GAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTTCGAG
CTGGACGGCGACGTAACCGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTG
ACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCCGTGCCCTGGCCACCCTCGTGACCACCCCTGACCTACGGC
GTGCAGTGTCTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTAC
GTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGAC
ACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAG
TACAAC TACAACAGCCACAACGCTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACCTTCAAGATC
CGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCCTACCAGCAGAACACCCCATCGGGCAGCGCCCC
GTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCAC
ATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA .

β2-AR-Dendra

ATGGGGCAACCCGGGAACGGCAGCGCCTTCTTGCTGGCACCCAATAGAAGCCATGCGCCGGACCACGACGTCACG
CAGCAAAGGGACGAGGTGTGGGTGGTGGGCATGGGCATCGTCATGTCTCTCATCGTCCCTGGCCATCGTGTGGC
AATGTGCTGGTTCATCACAGCCATTGCCAAGTTCGAGCGTCTGCAGACGGTCACCAACTACTTTCATCACTTCACTG
GCCTGTGCTGATCTGGTTCATGGGCTGGCAGTGGTGGCCTTTGGGGCCGCCCATATTTCTTATGAAAATGTGGACT
TTTGGCAACTTCTGGTGCAGTTTTGGACTTCCATTGATGTGCTGTGCGTCACGGCCAGCATTTGAGACCCCTGTGC
GTGATCGCAGTGGATCGCTACTTTGCCATTACTTACCTTTCAAGTACCAGAGCCTGCTGACCAAGAATAAGGCC
CGGGTGATCATTTCTGATGGTGTGGATTGTGTGAGGCCTTACCTCCTTCTTGCCATTTCAGATGCACTGGTACCGG
GCCACCCACCAGGAAGCCATCAACTGCTATGCCAATGAGACCTGCTGTGACTTCTTACGAACCAAGCCTATGCC
ATTGCCCTCTTCCATCGTGTCTTCTACGTTCCCTTGGTGATCATGGTCTTTCGCTTACTCCAGGGTCTTTCAGGAG
GCCAAAAGGCAGCTCCAGAAGATTGACAAAATCTGAGGGCCGCTTCCATGTCCAGAACCCTTAGCCAGGTGGAGCAG
GATGGGCGGACGGGGCATGGACTCCGCAGATCTTCCAAGTTCGTGTTGAAGGAGCACAAAGCCCTCAAGACGTTA
GGCATCATCATGGGCACCTTTCACCTCTGCTGGCTGCCCTTCTTTCATCGTTAACATTGTGCATGTGATCCAGGAT
AACCTCATCCGTAAGGAAGTTTACATCCTCCTAAATTGGATAGGCTATGTCAATTTCTGGTTTCAATCCCTTATC
TACTGCCGGAGCCCAGATTTCAAGATTGCCTTCCAGGAGCTTCTGTGCTGCGCAGGTCTTCTTTGAAGGCCAT
GGGAATGGCTACTCCAGCAACGGCAACACAGGGGAGCAGAGTGGATATCACGTGGAACAGGAGAAAAGAAAATAAA
CTGCTGTGTGAAGACCTCCAGGCACGGAAAGACTTTGTGGGCCATCAAGGTACTGTGCCTAGCGATAACATTGAT
TCACAAGGGAGGAATTGTAGTACAAATGACTCACTGCT**AAGCTT**CGAATTCTGCAGTCGACGGTACCAGCGGGCCC
GGGATCCACCGGTGCGCCACC**ATGA**ACACCCCGGAATTAACCTGATCAAGGAGGACATGCGCGTGAAGGTGCACA
TGGAGGGCAACGTGAACGGCCACGCCTTCGTGATCGAGGGCGAGGGCAAGGGCAAGCCCTACGAGGGCACCCAGA
CCGCCAACCTGACCGTGAAGGAGGGCGCCCCCTGCCCTTACGCTACGACATCCTGACCACCGCCGTGCACTACG
GCAACCGGGTGTTCACCAAGTACCCCGAGGACATCCCCGACTACTTCAAGCAGAGCTTCCCCGAGGGCTACAGCT
GGGAGCGCACCATGACCTTCGAGGACAAGGGCATCTGCACCATCCGCAGCGACATCAGCCTGGAGGGCGACTGCT
TCTTCCAGAACGTGCGCTTCAAGGGCACCAACTTCCCCCACAACGGCCCCGTGATGCAGAAGAAGACCCCTGAAGT
GGGAGCCGACCCAGAGAAGCTGCACGTGCGCGACGGCCTGCTGGTGGGCAACATCAACATGGCCCTGCTGCTGG
AGGCGCGGCCACTACTTGTGCGACTTCAAGACCACCTACAAGGCCAAGAAGGTGGTGCAGCTGCCCGACGCC
ACTTCGTGGACCACCGCATCGAGATCCTGGGCAACGACAGCGACTACAACAAGGTGAAGCTGTACGAGCACGCC
TGGCCCGCTACAGCCCCCTGCCAGCCAGGTGTGGTAA

β2-AR(F282L)-Dendra

ATGGGGCAACCCGGGAACGGCAGCGCCTTCTTGCTGGCACCCAATAGAAGCCATGCGCCGGACCACGACGTCACG
CAGCAAAGGGACGAGGTGTGGGTGGTGGGCATGGGCATCGTCATGTCTCTCATCGTCCCTGGCCATCGTGTGGC
AATGTGCTGGTTCATCACAGCCATTGCCAAGTTCGAGCGTCTGCAGACGGTCACCAACTACTTTCATCACTTCACTG
GCCTGTGCTGATCTGGTTCATGGGCTGGCAGTGGTGGCCTTTGGGGCCGCCCATATTTCTTATGAAAATGTGGACT
TTTGGCAACTTCTGGTGCAGTTTTGGACTTCCATTGATGTGCTGTGCGTCACGGCCAGCATTTGAGACCCCTGTGC
GTGATCGCAGTGGATCGCTACTTTGCCATTACTTACCTTTCAAGTACCAGAGCCTGCTGACCAAGAATAAGGCC
CGGGTGATCATTTCTGATGGTGTGGATTGTGTGAGGCCTTACCTCCTTCTTGCCATTTCAGATGCACTGGTACCGG
GCCACCCACCAGGAAGCCATCAACTGCTATGCCAATGAGACCTGCTGTGACTTCTTACGAACCAAGCCTATGCC
ATTGCCCTTCCATCGTGTCTTCTACGTTCCCTTGGTGATCATGGTCTTTCGCTTACTCCAGGGTCTTTTCAGGAG
GCCAAAAGGCAGCTCCAGAAGATTGACAAAATCTGAGGGCCGCTTCCATGTCCAGAACCCTTAGCCAGTGGAGCAG
GATGGGCGGACGGGGCATGGACTCCGCAGATCTTCCAAGTTCGTGTTGAAGGAGCACAAAGCCCTCAAGACGTTA
GGCATCATCATGGGCACCTTTCACCTCTGCTGGCTGCCCTTCTTTCATCGTTAACATTGTGCATGTGATCCAGGAT
AACCTCATCCGTAAGGAAGTTTACATCCTCCTAAATTGGATAGGCTATGTCAATTTCTGGTTTCAATCCCTTATC
TACTGCCGGAGCCCAGATTTCAAGATTGCCTTCCAGGAGCTTCTGTGCTGCGCAGGTCTTCTTTGGAGCACAAA

GCCCTCAAGACGTTAGGCATCATCATGGGCACTCTCACCCTCTGCTGGCTGCCCTTCTTCATCGTTAACAATAAA
CTGCTGTGTGAAGACCTCCCAGGCACGGAAGACTTTGTGGGCCATCAAGGTACTGTGCCTAGCGATAACATTGAT
TCACAAGGGAGGAATTGTAGTACAAATGACTCACTGCTAAGCTTTCGAATTCTGCAGTCGACGGTACCGCGGGCCC
GGGATCCACCGGTGCGCCACCATGAACACCCCCGGAATTAACCTGATCAAGGAGGACATGCGCGTGAAGGTGCACA
TGGAGGGCAACGTGAACGGCCACGCCTTCGTGATCGAGGGCGAGGGCAAGGGCAAGCCCTACGAGGGCACCCAGA
CCGCCAACCTGACCGTGAAGGAGGGCGCCCCCTGCCCTTCAGCTACGACATCCTGACCACCGCCGTGCACTACG
GCAACCGGGTGTTCACCAAGTACCCCGAGGACATCCCCGACTACTTCAAGCAGAGCTTCCCCGAGGGCTACAGCT
GGGAGCGCACCATGACCTTCGAGGACAAGGGCATCTGCACCATCCGCAGCGACATCAGCCTGGAGGGCGACTGCT
TCTTCCAGAACGTGCGCTTCAAGGGCACCAACTTCCCCCCCCAACGGCCCCGTGATGCAGAAGAAGACCTGAAGT
GGGAGCCAGCACCAGAGAAGCTGCACGTGCGGACCGCCTGCTGGTGGGCAACATCAACATGGCCCTGCTGCTGG
AGGGCGGCGCCACTACCTGTGCGACTTCAAGACCCTACAAGGCCAAGAAGGTGGTGCAGCTGCCCGACGCC
ACTTCGTGGACCACCGCATCCGAGATCCTGGGCAACGACAGCGACTACAACAAGGTGAAGCTGTACGAGCACGCC
TGGCCCGCTACAGCCCCCTGCCAGCCAGGTGTGGTAA

β 2-AR(CAM)-dendra

ATGGGGCAACCCGGGAACGGCAGCGCCTTCTTGCTGGCACCCAATAGAAGCCATGCGCCGGACCACGACGTACAG
CAGCAAAGGGACGAGGTGTGGGTGGTGGGCATGGGCATCGTCAATGTCTCTCATCGTCTGGCCATCGTGTGGC
AATGTGCTGGTCAACAGCCATTGCCAAGTTCGAGCGTCTGCAGACGGTACCAACTACTTCATCACTTCACTG
GCCTGTGCTGATCTGGTCAATGGCCTGGCAGTGGTGCCTTTGGGGCCGCCATATTCCTTATGAAAATGTGGACT
TTTGGCAACTTCTGGTGCAGTTCGGACTTCCATTGATGTGCTGTGCGTCACGGCCAGCATTGAGACCTGTGC
GTGATCGCAGTGGATCGCTACTTTGCCATTACTTCACCTTTCAAGTACCAGAGCCTGCTGACCAAGAATAAGGCC
CGGGTGATCATCTGATGGTGTGGATTGTGTGAGGCCTTACCTCCTTCTTGCCATTCAGATGCCTGGTACCGG
GCCACCCACCAGGAAGCCATCAACTGCTATGCCAATGAGACCTGCTGTGACTTCTTACGAACCAAGCCTATGCC
ATTGCCCTTCCATCGTGTCTTCTACGTTCCTGCTGGTGTGCTTCTGCTTACTCCAGGGTCTTTCAGGAG
GCCAAAAGGCAGTCCAGAAGATTGACAAATCTGAGGGCCGCTTCCATGTCCAGAACCCTAGCCAGGTGGAGCAG
GATGGGCGGACGGGGCATGGACTCCGCAGATCTTCCAAGTTCGTTCGAGGGAGAAGAAAGCCGCCAAGACGTTA
GGCATCATCATGGGCACCTTTCACCCCTCTGCTGGCTGCCCTTCTTCATCGTTAACATTTGTGCATGTGATCCAGGAT
AACCTCATCCGTAAGGAAGTTTACATCCTCCTAAATTGGATAGGCTATGTCAATTCGGTTCATCCCTTATC
TACTGCCGGAGCCCAGATTTTCAAGATTGCCTTCCAGGAGCTTCTGTGCTGCGCAGGTCTTCTTTGAAGGCCTAT
GGGAATGGCTACTCCAGCAACGGCAACACAGGGGAGCAGAGTGGATATCACGTGGAACAGGAGAAAAGAAAATAAA
CTGCTGTGTGAAGACCTCCCAGGCACGGAAGACTTTGTGGGCCATCAAGGTACTGTGCCTAGCGATAACATTGAT
TCACAAGGGAGGAATTGTAGTACAAATGACTCACTGCTGAAGCTTTCGAATTCTGCAGTCGACGGTACCGCGGGCC
CGGGATCCACCGGTGCGCCACCATGAACACCCCCGGAATTAACCTGATCAAGGAGGACATGCGCGTGAAGGTGCAC
ATGGAGGGCAACGTGAACGGCCACGCCTTTCGTGATCGAGGGCGAGGGCAAGGGCAAGCCCTACGAGGGCACCCAG
ACCGCAACCTGACCGTGAAGGAGGGCGCCCCCTGCCCTTCAGCTACGACATCCTGACCACCGCCGTGCACTAC
GCCAACCAGGTGTTTACCAAGTACCCCGAGGACATCCCCGACTACTTCAAGCAGAGCTTCCCCGAGGGCTACAGC
TGGCATGCGCACCATTGACCTTCGAGGACAAGGGCATCTGCACCATCCGCAGCGACATCAGCTGGAGGGCGACTGC
TTCTTCCAGAACGTGCGCTTCAAGGGCACCAACTTCCCCCCCCAACGGCCCCGTGATGCAGAAGAAGACCTGAAG
TGGGAGCCCAGCACCGAGAAGCTGCACGTGCGGACGGCCTGCTGGTGGGCAACATCAACATGGCCCTGCTGCTG
GAGGGCGGCGGCCACTACCTGTGCGACTTCAAGACCACCTACAAGGCCAAGAAGGTGGTGCAGCTGCCCGACGCC
CACTTCGTGGACCACCGCATCGAGATCCTGGGCAACGACAGCGACTACAACAAGGTGAAGCTGTACGAGCACGCC
GTGGCCCGCTACAGCCCCCTGCCAGCCAGGTGTGGTAA

G α s-GFP

ATGGGCTGCCTCGGCAACAGTAAGACCGAGGACCAGCGCAACGAGGAGAAGGCGCAGCGGAGGCCAACAAAAAG
ATCGAGAAGCAGCTGCAGAAGGACAAGCAGGTCTACCGGGCCACGCACCGCCTGCTGCTGCTGGGTGCTGGAGAG
TCTGGCAAAAGCACCATTGTGAAGCAGATGAGGATCCTACATGTTAATGGGTTTAAACGGAGAGGGGAATTCATGGT
GAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTTACCGGGGTGGTGGCCATCCTGGTTCGAGCTGGACGGCGACGTAACGGCCACAA
GTTTACCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCTGAAGTTTATCTGCACCACCGG
CAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCACCTCTGTAACACCTGACCTGGGGCGTGCAGTGTCTTACCGCTACCCCGA
CCACATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCCACCATCTTCTTCAA
GGACATGAGCAGTACAAGACCCCGCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCCGATCGAGCTGAA
GGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCAACAGCTGGAGTACAACATCAGCCACAACGTCTA
TATCACCGCCGACAAGCAGAAGAAGCGCATCAAGGCCAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGT
GCAGCTCGCCGACACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACTCT

GAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGC
CGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTCG**TCTAGAA**ACAGCGATGGTGAGAAGGCCACCAAAGT
GCAGGACATCAAAAACAACCTGAAGGAGGCCATTGAAACCATTGTGGCCGCCATGAGCAACCTGGTGCCCCCGT
GGAGCTGGCCAACCCCTGAGAACCAGTTCAGAGTGGACTACATTCTGAGCGTGATGAACGTGCCAAACTTTGACTT
CCCACCTGAATTCATGAGCATGCCAAGGCTCTGTGGGAGGATGAGGGAGTTCGTGCCCTGCTACGAGCGCTCCAA
CGAGTACCAGCTGATCGACTGTGCCAGTACTTCCTGGACAAGATTGATGTGATCAAGCAGGCCGACTACGTGCC
AAGTGACCAGGACCTGCTTCGCTGCCCGCTCCTGACCTCTGGAATCTTTGAGACCAAGTTCAGGTGGACAAAGT
CAACTTCCACATGTTTCGATGTGGGCGGCCAGCGGATGAACGCCGCAAGTGGATCCAGTGCTTCAATGATGTGAC
TGCCATCATCTTCGTGGTGGCCAGCAGCAGCTACAACATGGTCATCCGGGAGGACAACCAGACCAACCGTCTGCA
GGAGGCTCTGAACCTCTTCAAGAGCATCTGGAACAACAGATGGCTGCGTACCATCTCTGTGATCCTCTTCCTCAA
CAAGCAAGATCTGCTTGCTGAGAAGTCCCTCGCTGGGAAATCGAAGATTGAGGACTACTTTCCAGAGTTCGCTCG
CTACACCCTCCTGAGGATGCGACTCCCGAGCCCGGAGAGGACCCACGCGTGACCCGGGCCAAGTACTTCATCCG
GGATGAGTTTCTGAGAATCAGCACTGCTAGTGGAGATGGACGTCACTACTGCTACCCTCACTTTACCTGCGCCGT
GGACTGAGAACATCCGCCGTGTCTTCAACGACTGCCGTGACATCATCCAGCGCATGCATCTTCGCCAATACGA
GCTGCTCTAA

ÖZGEÇMİŞ

Moskova'da, Rusya'da 1973 doğdu. İlk, orta, lise öğrenimini Moskova'da tamamladı. 1990 girdiği Moskova Lomonosov Devlet Kimya Teknoloji Üniversitesi Biyoteknoloji Bölümü'nden 1996 yılında Kimya Mühendisi ünvanıyla mezun oldu.

Eylül 2003-2007 yılları arasında, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Disiplinası Biyoteknoloji Doktora öğrenci olarak Moleküler Biyoloji Araştırma ve Geliştirme Biriminde çalışma yapmaktadır.