TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BETA-ARRESTİN-2 PROTEİNİNİN P2X7 RESEPTÖRÜ İLE ETKİLEŞİMİ

Seda UYSAL

BİYOFİZİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Mehmet UĞUR

2013 ANKARA

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Biyofizik Yüksek Lisans **Programı**

çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından

Yüksek Lisans **Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 16/05/2013

Prof. Dr. Nuhan PURALI
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Mehmet UĞUR
Ankara Üniversitesi
Raportör

Prof. Dr. Belma TURAN
Ankara Üniversitesi

Prof. Dr. Ongun ONARAN
Ankara Üniversitesi

Doç. Dr. Can AKÇALI
Bilkent Üniversitesi

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	v
Simgeler ve Kısaltmalar	vi
Şekiller	viii
1. GİRİŞ	1
1.1. β-arrestin Proteinlerinin G proteini Kenetli Reseptörlerle Etkileşimi	1
1.1.1. G Proteini Kenetli Reseptörler	1
1.1.2. Arrestin Proteinleri	2
1.1.3. Arrestin Proteinlerinin GPKR İnternalizasyonu ve Hücre İçi Sinyal İletimindeki Görevleri	3
1.1.4. P2Y Reseptörleri ve βarr-1/2 Proteinleri ile Etkileşimleri	5
1.2. P2X7 Reseptörleri ve Bu Reseptörlerin βarr-1/2 Proteinleri ile Etkileşimleri	6
2. GEREÇ VE YÖNTEM	10
2.1. Hücrelerin Çoğaltılması, Deneye Hazırlanmaları, cDNA Transfeksiyonu ve Stabil Hücre Klonlarının Oluşturulması	10
2.2. Kullanılan Çözeltiler ve Kimyasallar	11
2.3. Konfokal Mikroskopi Yöntemi Kullanılarak Yapılan Deneyler	12
2.3.1. βarr-2-GFP Füzyon Proteininin Hücre İçi Dağılımının Konfokal Mikroskopi Yöntemi Kullanılarak İncelenmesi	12
2.3.2. FRAP Yöntemi Kullanılarak βarr-2-GFP proteininin Sitoplazmadaki ve Çekirdekteki Mobilitesinin Gösterilmesi	13
2.3.3. Lucifer Yellow Boyası Kullanılarak P2X7 Yanıtları Sırasında Hücre Zarı Bütünlüğünün Korunduğunun Gösterilmesi	13
2.3.4. Leptomisin B İle NES Pompasının İnhibisyonu	14
2.4. Hücre İçi Ca^{+2} Derişimi Ölçümü	14
3. BULGULAR	15
3.1. GFP ile İşaretli βarr-2 Proteininin ve P2X7 Reseptörünün Kalıcı	15

Olarak Eksprese Ettirildiği HEK-293 (HEK-P2X7-βarr-2-GFP) Hücre Serisinde ATP Uyarısıyla βarr-2-GFP Proteini Çekirdeğe Transloke Olmaktadır

3.1.1. P2X7 Eksprese Etmeyen Parent HEK-293-βarr-2-GFP Hücrelerinde ATP Uygulaması ile Yanıt Oluşmamaktadır 16

3.2. βarr-2-GFP Proteininin Çekirdeğe Translokasyonu P2X7 Reseptörünün Uyarılması ile Oluşmaktadır 20

3.2.1. βarr-2-GFP Proteininin Çekirdeğe Translokasyonu Yanıtı , ATP'nin Etkili Olmadığı Düşük Derişimlerde BzATP ile Oluşturulabilmektedir 20

3.2.2 P2Y'leri Aktive Eden Derişimlerde Uygulanan P2 Agonistleri; UTP ve ADP Yanıt Oluşturmamaktadır 23

3.2.3. GFP ile İşaretli βarr-2 Proteininin ve P2X7 Reseptörünün Eksprese Ettirildiği HEK-293 Hücre Serisinde, ATP Uyarısıyla Oluşan βarr-2-GFP Proteininin Çekirdeğe Translokasyon Yanıtı NaCl Deney Çözeltisinde Azalmaktadır. 24

3.3. ATP Uyarısı ile Oluşan βarr-2-GFP Proteininin Çekirdeğe Translokasyonu Yanıtının Hangi Mekanizma ile Oluştuğunun Araştırılması 25

3.3.1. NES Pompası Blokörü Olan Leptomycin B Uygulaması ile βarr-2-GFP Proteini Çekirdeğe Transloke Olmaktadır 25

3.3.2. Lucifer Yellow Boyası Kullanılarak P2X7 Reseptörünün Aktivasyonu Sonucunda Membran Bütünlüğünün Bozulmadığı Deneysel Olarak Gösterilmiştir 28

3.3.3. FRAP Yöntemi Kullanılarak βarr-2-GFP Proteinin Sitoplazmadaki ve Çekirdekteki Mobilitesi ve Bağlanma Özellikleri İncelenmiştir 30

4. TARTIŞMA 32

5. SONUÇ VE ÖNERİLER 37

ÖZET 38

SUMMARY 39

KAYNAKLAR 40

ÖZGEÇMİŞ 46

ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasının danışmanlığını üstlenen ve çalışmanın yapılması için gerekli tüm olanakları sağlayan değerli hocam Prof. Dr. Mehmet UĞUR'a teşekkür ederim.

Çalışma süresince desteklerini esirgemeyen Prof. Dr. Özlem UĞUR, Prof. Dr. Ongun ONARAN, Prof. Dr. Belma TURAN, Prof. Dr. Mehtap KUTLU, Doç. Dr. Kemal SAYAR ve değerli arkadaşlarım Şerife SAYAR ve Canan Veyselova'ya teşekkür ederim.

Yüksek lisans çalışmalarım sırasında emekleri ve mesaileri ile her zaman yanımda olan Biyofizik ABD çalışanlarına ve öğrencilerine ayrıca teşekkür ederim.

Her zaman, destekleri ve varlıklarıyla bana güç veren Aileme, Mustafa Hatipoğlu ve Ailesine sonsuz şükranlarımı sunarım.

SİMGELER ve KISALTMALAR

ADP	Adenozin difosfat
ATP	Adenozin trifosfat
A-740003	[N-(1-{[(cyanoimino)(5-quinolinylamino)methyl]amino}-2,2-dimethylpropyl)-2-(3,4-dimethoxyphenyl)acetamide] (P2X7 reseptörü antagonisti)
A-438079	3-[[5-(2,3-Dichlorophenyl)-1*H*-tetrazol-1-yl]methyl]pyridine Hydrochloride (P2X7R antagonisti)
βarr	Beta arrestin proteini
βarr-1	Beta arrestin-1 proteini
βarr-2	Beta arrestin-2 proteini
βarr-2-GFP	GFP ile işaretlenmiş beta arrestin-2 proteini
BzATP	2'(3')-*O*-(4-Benzoylbenzoyl)adenosine-5'-triphosphate
cAMP	Siklik Adenozin Mono Fosfat (Bir hücre içi ikincil mesajcı)
cDNA	Complementary DNA (Tamamlayıcı DNA)
DIC	Differential interference contrast microscopy
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
ERK 1/2	Extracellular-signal-regulated kinases 1 ve 2
FCS	Fetal calf serum
FRAP	Fluorescence recovery after photobleaching
FRET	Fluorescence Resonance Energy transfer
GDP	Guanin difosfat
GFP	Green fluorescent protein
GPKR	G proteini kenetli reseptör
GRK	G proteini kenetli reseptör kinaz
GTP	Guanin trifosfat
GTPaz	GTP fosfataz
HEK-293	Human Embryonic Kidney 293 cells
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
ICCD	Intensified Charge Coupled Device

JNK3	C-Jun N-terminal kinases
KN-62	4-[(2*S*)-2-[(5-isoquinolinylsulfonyl)methylamino]-3-oxo-3-(4-phenyl-1-piperazinyl)propyl] phenyl isoquinolinesulfonic acid ester (P2X7R antagonisti)
LMB	Leptomycin B (NES pompası inhibitörü)
NES	Nuclear export signal
PMT	Photomultiplier tubes
PPADS	Pyridoxalphosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonic acid (P2XR antagonisti)
UDP-glukoz	Urydyno-5'-difosforan-glukoz
UTP	Uridine-5'-triphosphate
YFP	Yellow Fluorescent Protein

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. β-arrestin - 1/2 Proteinlerinin Yapısı. Bu proteinler iki bölgeden oluşur: C ve N bölgeleri. Her iki proteinin de nükleer lokalizasyon kısmı N bölgesinde bulunur (1-185). Fonksiyonel NES (VxxxFxxLxL) dizisi ise sadece βarr-2 proteininin C terminalinde bulunur (Bu şekil Ma ve Pei, 2007 makalesinden alınmıştır)

Şekil 1.2. β-arrestin Proteinlerinin Desensitizasyonda, Sekestrasyonda ve GPKR'lerinin Hücre İçi Sinyal İletimindeki Rolü (Luttrell ve Lefkowitz, 2002).

Şekil 1.3. P2Y1 reseptörünün 100 µM ADP ile Aktive Edilmesiyle βarr-2 Proteininin Membrana Translokasyonu. Bu data P2Y1-CFP ve β-arrestin-2-YFP proteinlerinin kotransfeksiyon yapıldığı HEK-293 hücrelerinde yapılmıştır (Reiner ve ark., 2009).

Şekil 3.1. GFP ile İşaretli βarr-2 Proteininin ve P2X7 Reseptörünün Eksprese Ettirildiği HEK-293 Hücre Serisinde ATP Uyarısıyla βarr-2-GFP Proteininin Çekirdeğe Transloke Olduğunun Gösterilmesi. A. βarr-2-GFP Ekprese Eden HEK-P2X7 Hücrelerinin Uyarıdan Hemen Önceki Görünümleri. βarr-2-GFP dağılımının hemen hemen tamamının sitoplazmik olduğu ve çekirdekte derişiminin çok düşük olduğu Panel A da gözlenmektedir. **B. ATP Uyarısından Yaklaşık 30 Dakika Sonra Hücrelerin Durumu.** Panel A da rakamlarla işaretli hücrelerin, ATP uyarısından sonra çekirdeklerinde noktasal olarak βarr-2-GFPnin toplandığı Panel B de izlenebilmektedir. **C. βarr-2-GFP Ekprese Eden Ancak P2X7R Eksprese Etmeyen HEK-293 Hücrelerinin Uyarıdan Hemen Önceki Görünümleri. D. Aynı Hücrelerin 1 mM ATP Uyarısından Yaklaşık 30 Dakika Sonraki Durumu. E. HEK-P2X7-βarr-2-GFP ve HEK-293-βarr-2-GFP Hücrelerinde ATP (ATP 1 mM) Uygulaması ve Sadece Deney Çözeltisi (ATP 0 mM) Uygulaması ile 30 Dakika İçinde Oluşan Pozitif Hücrelerin Tüm Hücrelere Oranı.** ATP uygulaması ile Panel B de gösterilen hücrelere benzer davranış gösteren hücreler pozitif olarak kabul edilmiştir. HEK-P2X7-βarr-2 hücrelerine 1mM ATP uygulaması ile 29 ayrı gün tekrarlanan toplam 38 deneyden, yapılan sayımlarda toplam hücre sayısı 3529, aynı hücrelere sadece deney çözeltisi eklenmesi ile (ATP 0 mM) yapılan 14 ayrı gün toplam 15 deneyde, toplam hücre sayısı 1577 olarak belirlenmiştir. Ayrıca HEK-293-βarr-2 hücrelerine 1mM ATP uygulaması ile 12 ayrı günde tekrarlanan toplam 18 deneyde yapılan sayımlarda toplam hücre sayısı 1021, aynı hücrelere sadece deney çözeltisi eklenmesi ile (ATP 0 mM) yapılan 5 ayrı gün toplam 5 deneyde, toplam hücre sayısı 345 olarak belirlenmiştir.

Şekil 3.2. GFP ile İşaretli βarr-2 Proteininin ve P2X7 Reseptörünün Eksprese Ettirildiği HEK-293 Hücre Serilerinde, ATP Uyarısıyla βarr-2-GFP Proteininin Çekirdeğe Transloke Olduğunun, Vital Çekirdek Boyası Hoecht 34580 ile Gösterilmesi. Hoecht 34580 ile çekirdekleri boyanan hücrelerin bazılarında ATP uyarısından sonra çekirdekte noktasal olarak βarr-2-GFP nin toplandığı izlenmiştir. Hoecht boyası ve βarr-2-GFP proteini farklı dalga boyundaki lazerlerle ayrı ayrı uyarılıp, her iki florofor için ardışık görüntüler elde edilmiştir (Hoecht **mavi**, βarr-2-GFP **magenta** renkte gösterilmiştir). Ardışık olarak alınan bu görüntüler daha sonra birleştirilmiştir. 3 ayrı deneyden alınan görüntülerden belirli alanlar seçilerek, bu alanlarda yanıt veren toplam 69 hücre gözlenmiştir. Bu yanıt veren hücrelerin çok büyük bir çoğunluğunda, 68 tanesinde, βarr-2-GFP proteininin sadece çekirdekte, bir tanesinde ise bu proteinin hem çekirdekte hem sitoplazmada lokalize olduğu gözlenmiştir.

Şekil 3.3. A. GFP ile İşaretli βarr-2 Proteininin ve P2X7 Reseptörünün Eksprese Ettirildiği HEK-293 Hücre Serilerinde, ATP Uyarısıyla βarr-2-GFP Proteini Çekirdekçiğe Benzer Bir Yapıya Transloke Olmaktadır. B. ATP Uyarısı Yapılmadan Önce, Bazal Durumda, Bazı HEK-P2X7-βarr-2-GFP Hücrelerinde, βarr-2-GFP nin Çekirdekçik Benzeri Bir Yapı İçinde Bulunmaktadır. Hücrelerin konfokal mikroskopta, aynı anda hem DIC ışık hem de floresans görüntüleri alınmıştır. Bu görüntüler birleştirilerek, βarr-2-GFP proteinin çekirdekte hangi bölgede yoğunlaştığı araştırılmıştır. ATP uyarısı öncesinde, bazal koşullarda, çekirdeklerinde βarr-2-GFP varlığı saptanabilen hücreler, tüm hücrelerin % 4.3 ± 1.2 ünü oluşturur.

Şekil 3.4. A. βarr-2-GFP Proteininin Çekirdeğe Translokasyonu Yanıtının , ATP'nin Etkili Olmadığı Düşük Derişimlerde BzATP ile Oluşturulabileceğinin Gösterilmesi. HEK-P2X7-βarr2-GFP hücrelerine ATP 1 mM, ATP 5 µM, BzATP 5 µM ve Kontrol (ATP 0 mM) uygulaması yapılmıştır. 5 µM ATP uygulanmış hücrelerin yanıtları, ATP uygulanmamış hücrelerin yanıtları ile karşılaştırıldığında belirgin bir yanıt

gözlenmemiştir. Ancak 5 μM BzATP, 5 μM ATP ve 0 μM ATP yanıtları ile karşılaştırıldığında, ölçülebilir bir yanıt oluşturmaktadır. 5 μM BzATP ile oluşan yanıtlar 1 mM ATP ile oluşan yanıtlara benzer büyüklüktedir. Grafikte gösterilen sonuçlar aynı gün, paralel yapılan deneylerin sonuçlarıdır. Görüntü toplanması ve deney koşulları bölüm 3.1 ile tamamen aynıdır. Bahsedilen bütün bu deneyler aynı gün ve paralel olarak yapılmıştır. 7 gün yapılan 8 ayrı deneyde, BzATP (5μM) için toplam hücre sayısı 1013 hücre; ATP (1mM) için 803; ATP (5μM) için 915 hücre; ATP kontrolü için 833 hücre olarak bulunmuştur. **B. ATP ve BzATP Agonistleri Uygulanan HEK-P2X7 Hücrelerinde YoPro-1 Yanıtı Ölçülerek Elde edilen Doz-Cevap Eğrileri.** HEK-P2X7 hücrelerinde oluşan YoPro-1 yanıtlarında BzATP, ATP agonistine göre daha potent bir agonisttir. Yanıtın büyüklüğü olarak hücreden gelen YoPro-1 floresansının zamanla artış grafiğinin eğimi (ortalama geçirgenlik artışı) kullanılmıştır. Yanıtlar maksimum yanıta oranlanarak gösterilmiştir. **Mavi** renkteki eğri BzATP'nin, **kırmızı** renkteki ise ATP'nin doz-cevap eğrisini göstermektedir.

3.5. HEK-P2X7-βarr-2-GFP Hücrelerinde ATP Uyarısıyla Oluşan βarr-2-GFP Proteininin Çekirdeğe Translokasyon Yanıtı, 1mM UTP Uygulaması ile Oluşmamaktadır. HEK-P2X7-βarr2-GFP hücrelerine 1 mM ATP, UTP ve kontrol (0 mM ATP) uygulamaları yapılmıştır. ATP (1 mM) uygulaması ile belirgin bir yanıt oluşurken, UTP uygulaması ile βarr-2-GFP dağılımında görünür bir değişme olmamıştır ATP(1 mM) uygulaması ile 8 gün 9 ayrı deney (toplam 845 hücre), UTP uygulaması ile 7 gün 7 ayrı deney (toplam 917 hücre) ve ATP(0 mM) ile de 4 gün 4 ayrı deney (toplam 470 hücre) yapılmıştır. Grafiklerde gösterilen bütün sonuçlar, aynı gün, paralel yapılan deneylerden elde edilmiştir.

3.6. HEK-P2X7-βarr-2-GFP Hücrelerinde ATP Uyarısıyla Oluşan βarr-2-GFP Proteininin Çekirdeğe Translokasyon Yanıtı, 1mM ADP Uygulaması ile Oluşmamaktadır. HEK-P2X7-βarr-2-GFP hücrelerine 1 mM ATP, ADP ve kontrol (0 mM ATP) uygulamaları yapılmıştır. ATP (1 mM) uygulaması ile belirgin bir yanıt oluşurken, ADP uygulaması ile βarr-2-GFP dağılımında görünür bir değişme olmamıştır. ATP(1 mM) uygulaması ile 4 gün 5 ayrı deney (toplam 427 hücre), ADP uygulaması ile 3 gün 4 ayrı deney (toplam 496 hücre) ve ATP(0 mM) ile de 2 gün 2 ayrı deney (toplam 225 hücre) yapılmıştır. Grafiklerde gösterilen bütün sonuçlar, aynı gün, paralel yapılan deneylerden elde edilmiştir.

Şekil 3.7. GFP ile İşaretli βarr-2 Proteinini ve P2X7 Reseptörünü Eksprese Eden HEK-293 Hücre Serisinde, ATP Uyarısıyla βarr-2-GFP Proteininin Çekirdeğe Translokasyon Yanıtı, NaCl Deney Çözeltisinde KCL Deney Çözeltisi ile Karşılaştırıldığında Azalmaktadır. Her iki deney çözeltisi içindeki hücrelere ATP (1 mM) uygulanmış ve 25 dakika sonunda oluşan yanıt ölçülmüştür. NaCl çözeltisinde 5 gün 8 ayrı deney, KCl deney çözeltisinde ise 5 gün 6 ayrı deney yapılmıştır. NaCl deney çözeltisinde yapılan deneylerde toplam 731 hücre, KCl deney çözeltisinde yapılan deneylerde ise toplam 515 hücre sayılmıştır.

3.8. HEK-P2X7-βarr-2-GFP ve HEK-293-βarr-2-GFP Hücrelerinde NES Pompası LMB ile Bloke Edildiğinde, Hücrelerin Çok Büyük Bir Kısmında βarr-2-GFP Proteini Çekirdeğe Lokalize Olmaktadır. Hücreler serumsuz DMEM içinde hazırlanmış 20 ng/ml LMB de 20-22 saat inkübe edilmiştir. Kontrol olarak hem HEK-293-βarr-2-GFP hem de HEK-P2X7-βarr-2-GFP hücreleri LMB nin çözücüsü olan etanolde aynı süre inkübe edilmiştir.

3.9. LMB İnkübasyonu Yapılan, HEK-P2X7-βarr-2-GFP ve HEK-293-βarr-2-GFP Hücrelerinde, LMB Uygulanmayanlara Kıyasla βarr-2-GFP Proteininin Çekirdekte Toplaşması Belirgin Bir Şekilde Artmıştır. LMB etkisinin ölçümü, çekirdekte βarr-2-GFP toplanması gösteren hücre sayısının toplam hücre sayısına oranı bulunarak yapılmıştır. LMB uygulaması yapılan HEK-P2X7-βarr-2-GFP hücrelerinde 5 gün, 10 ayrı deney (toplam 1921 hücre), LMB uygulaması yapılmayan HEK-P2X7-βarr-2-GFP hücrelerinde ise 7 gün, 7 ayrı deney (toplam 1913 hücre) yapılmıştır. Ayrıca LMB uygulaması yapılan HEK-293-βarr-2-GFP hücrelerinde 3 gün, 4 ayrı deney (toplam 498 hücre), LMB uygulaması yapılmayan HEK-293-βarr-2-GFP hücrelerinde ise 3 gün, 3 ayrı deney (toplam 378 hücre) yapılmıştır.

Şekil 3.10. HEK-P2X7-βarr-2-GFP ve HEK-293-βarr-2-GFP Hücrelerinde NES Pompası LMB ile Bloke Edildiğinde, βarr-2-GFP Proteini Çekirdek İçinde Çekirdekçik Benzeri Bir Yapıda Toplanmaktadır. Hücreler serumsuz DMEM içinde hazırlanmış 20 ng/ml LMB de 20-22 saat inkübe edilmiştir. Hücrelerin konfokal mikroskopta, aynı anda hem DIC ışık hem de floresans görüntüleri alınmıştır. Bu görüntüler birleştirilerek, βarr-2-GFP proteinin çekirdekte ve çekirdekçikte lokalize olduğu gösterilmiştir.

3.11. ATP (1mM) Uygulanmış HEK-P2X7-βarr-2-GFP Hücrelerinde Lucifer Yellow Boyası ile Hücre Bütünlüğünün Korunduğu Gösterilmektedir. A. ATP (1mM) Uygulanmadan Önce Lucifer Yellow İçeren Deney Çözeltisindeki HEK-P2X7-βarr-2-GFP Hücrelerinin Görünümü. B. ATP (1mM) Uygulandıktan 26 Dakika Sonra Aynı Hücrelerin Görünümü. Konfokal mikroskopta GFP ile işaretli βarr-2 proteini ve Lucifer Yellow boyası ayrı ayrı uyarılarak, her iki florofor için ardışık görüntüler elde edilmiştir. Daha sonra bu görüntüler birleştirilmiştir. Deneyler materyal methotta anlatıldığı gibi yapılmıştır.

3.12. ATP (1mM) Uygulanmamış ve uygulanmış HEK-P2X7-βarr-2-GFP Hücrelerinde FRAP ile βarr-2-GFP Proteininin Mobilitesinin Gösterilmesi. A. ATP (1mM) Uygulanmadan Önce Sitoplazmik Bölgede Difüz Olarak Bulunan βarr-2-GFP Floresansının, Söndürme İşleminden Hemen Sonra Gösterdiği Tam Geri Dönüş. B. Benzer Bir Durumda, Başka Bir Hücrede βarr-2-GFP Floresansının, Söndürme İşleminden Hemen Sonra Gösterdiği Tam Olmayan Geri Dönüş. Ölçümler resimler üzerinde gösterilen bölgelerin floresans değerlerinin ortalamaları alınarak yapılmıştır. Bölgelerden biri söndürme işlemi yapılan alandan, diğeri ise söndürme yapılmayan hemen yakındaki başka bir bölgeden seçilmiştir. Her iki bölgeden gelen ortalama sinyal söndürme işlem,i öncesi aynıdır. **C. ATP (1mM) Uygulanmasından Sonra Çekirdekteki Toplaşma Bölgesinde de Bulunan βarr-2-GFP Floresansının, Söndürme İşleminden Hemen Sonra Gösterdiği Yavaş Geri Dönüş.** Floresans ölçümü resimde gösterilen bölgeden ortalama alınarak yapılmıştır. Bölge söndürme yapılan bölgeden seçilmiştir. Deneyler materyal methotta tarif edilen şekilde yapılmıştır.

1. GİRİŞ

1.1. β-arrestin Proteinlerinin G proteini Kenetli Reseptörlerle Etkileşimi

1.1.1. G Proteini Kenetli Reseptörler

G protein kenetli reseptörler, tüm ökaryotlarda bulunur ve en geniş hücre yüzey reseptör ailesini oluştururlar. Bu reseptörler hormonlar, nöroaktarıcılar ve bölgesel aracılar gibi çok çeşitli sinyal molekül yanıtlarına aracılık ederler. Aynı sinyal molekülleri farklı tipte reseptörleri etkinleştirebilir. Bu gurup reseptörlerin fonksiyonlarını düzenleyen kimyasallar, farmakolojide en geniş kullanım bulan ilaç grubudur. GPKR'lerin klasik olarak etkileştiği bilinen protein ailesi bir hücre içi protein ailesi olan G-proteinleridir. Bu proteinler sinyalin reseptörlerden hücre içerisine aktarılmasında aracı olarak çok önemli bir rol oynarlar.

Bu reseptörlere bağlanan sinyal moleküllerinin kimyasal ve işlevsel çeşitliliklerine rağmen, tüm GPKR'lerin benzer bir yapısı vardır. Bunlar lipit çift katmanını yedi kere kat eden tek bir polipeptid zincirinden oluşan proteinlerdir.

Hücre dışı sinyal molekülleri GPKR'lere bağlandıklarında, reseptörler konformasyonel bir değişikliğe uğrayıp trimerik GTP bağlayan proteinleri (G proteinler) etkinleştirebilme özelliği kazanırlar. G proteinleri hücre zarının sitoplazmaya bakan kısmına bağlıdırlar. Zarda reseptörler ile enzimleri veya iyon kanalları arasında aracı molekül olarak görev yaparlar. Etkileştikleri reseptör ve effektörlşerin farklı olduğu değişik tipte G proteinleri vardır ancak bunlar benzer yapılar gösterirler.

Üç protein altbiriminden oluşurlar (α, β, γ). Uyarılmamış durumda α kısmına GDP bağlıdır ve G proteini etkin değildir. Etkinleşmiş bir reseptör tarafından

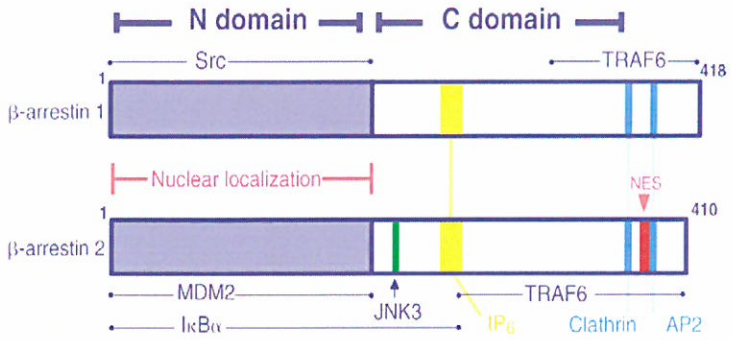
uyarıldıklarında α altbiriminden GDP ayrılıp yerine GTP bağlanır ve α alt biriminin βγ bağladığı yerde değişiklik oluşur. Böylece α alt birimi hedef proteinleri etkinleştirebilir. Bu hedef proteinlere örnek olarak; bazı enzimler (örnek; adenilat siklaz ve fosfolipaz) ve iyon kanalları verilebilir. G proteininin α alt birimi bir GTPaz'dır. Kendisine bağlı olan GTP'yi GDP'ye hidroliz eder. G proteininin α, β, γ alt birimleri başlangıçtaki durumlarına geri dönerler, böylece yanıt sonlanır (Alberts ve ark., 2008, Bölüm 15, s.: 853-854).

1.1.2. Arrestin Proteinleri

Son yıllarda G proteinlerinin dışında GPKR'lerinin etkileştiği ikinci bir protein ailesi daha tanımlanmıştır. Bu ailedeki proteinlerin ilk tanımlanan görevleri reseptör desensitizasyonu olduğu için bunlara arrestinler denmiştir. Arrestin proteinleri sitoplazmik proteinler olup, günümüze kadar dört çeşit arrestin proteini bulunmuştur. İlk grup fotoreseptör fonksiyonlarını düzenleyen görsel arrestin proteinleridir (Murakami ve ark., 1993; Craft ve ark., 1994). İkinci grubu ise göz dışındaki organlarda eksprese olan β-arrestin-1 (Lohse ve ark., 1990) ve β-arrestin-2 proteinleri (Attramadal ve ark., 1992) (βarr-1 ve βarr-2) oluşturmaktadır.

Arrestin ailesine ait proteinler büyük oranda homoloji gösterse de, birbirlerinden belirgin farklılıklar içerirler. Örneğin; βarr-1 ve βarr-2 proteinlerinin çekirdek ve sitoplazmadaki dağılımları önemli ölçüde farklıdır. Bu dağılım farklılığı βarr-2 proteininin, βarr-1 proteininde olmayan bir "nuclear export signal" (NES) dizisi içermesinden kaynaklanır (Wang ve ark., 2003) (Şekil 1.1). Bu diziden dolayı βarr-2 sürekli çekirdekten sitoplazmaya aktif olarak bir pompa tarafından taşınmaktadır, dolayısı ile bu proteinin çekirdekteki derişimi sitoplazmaya göre belirgin şekilde azdır. Buna karşın NES dizisi taşımayan βarr-1 proteini ise sitozol ve çekirdek kompartmanlarının her ikisinde de benzer bir dağılım gösterir (Scott ve ark., 2002). Eğer βarr-2 proteininin NES dizisinde bir mutasyon oluşturulur ya da βarr-1'in bir dizisiyle değiştirilirse, bu protein de çekirdekte belirgin bir derişim göstermeye başlar (Kendall ve Luttrell, 2009). Bu çekirdekteki derişim artışını bir nükleer

eksport pompa inhibitörü olan Leptomisin B uygulaması ile de görmek mümkündür (örnek olarak bkz. Wang ve ark., 2003).

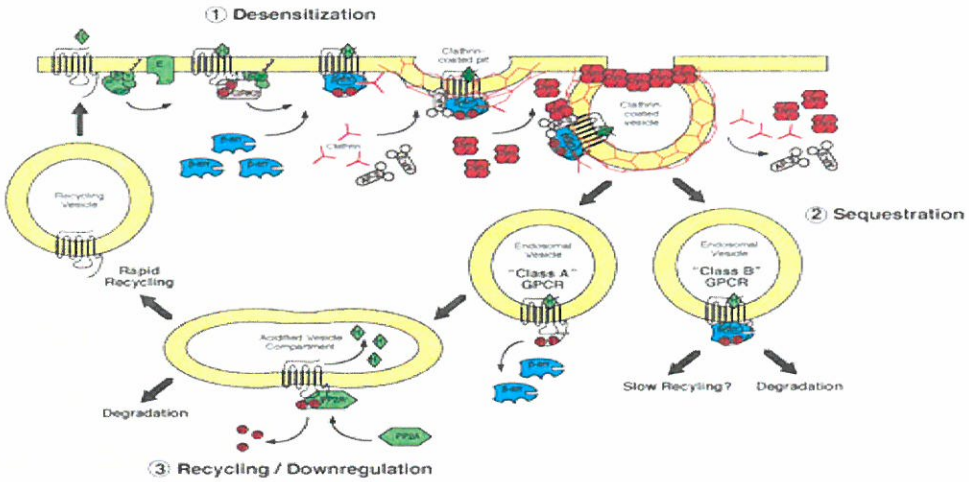


Şekil 1.1. β-arrestin - 1/2 Proteinlerinin Yapısı. Bu proteinler iki bölgeden oluşur: C ve N bölgeleri. Her iki proteinin de nükleer lokalizasyon kısmı N bölgesinde bulunur (1-185). Fonksiyonel NES (VxxxFxxLxL) dizisi ise sadece βarr-2 proteininin C terminalinde bulunur (Bu şekil Ma ve Pei, 2007 makalesinden alınmıştır).

1.1.3. Arrestin Proteinlerinin GPKR İnternalizasyonu ve Hücre İçi Sinyal İletimindeki Görevleri

Arrestinlerin şu an için en iyi bilinen görevleri GPKR'lerinin sinyallerini sonlandırma işlevleridir. Uygun agonist ile uyarıldığında GPKR'ler aktive olur, aktive olan reseptörler serin threonin kinaz ailesine ait kinazlar olan G-proteinine kenetli reseptör kinazlar (GRK'lar) tarafından fosforillenirler. Arrestin proteinleri, bu GRK'lar tarafından fosforile edilmiş reseptörlere bağlanarak G-proteini aracılı sinyalleri durdururlar (Luttrell ve Lefkowitz, 2002). Pek çok GPKR'ün aktivasyonu sonrasında, GFP ile işaretli floresan βarr-1 veya 2'nin ilk 10 dakika içerisinde sitoplazmadan hücre zarına hareket ettiği ilerleyen dakikalarda ise bu proteinlerin sitoplazma içerisinde öbekler halinde biriktiği konfokal mikroskopi kullanılarak izlenmiştir (örnek olarak: Luttrell ve ark., 1999; Luttrell ve ark., 2001; Shenoy ve Lefkowitz, 2003; Vrecl ve ark., 2008; Oakley ve ark., 2001). Bu olay β-arrestinin membrana translokasyonu olarak adlandırılır ve GPKR'lerin, aktivasyonlarını takiben desensitizasyonları ve internalizasyonları ile paralel seyreder. Bu oldukça netleşmiş, klasik görevlerinin yanı sıra β-arrestinlerin Src ailesinden tirozin kinaz (Luttrell ve ark., 1999), ERK1/2 komponentleri ve JNK3 map kinaz yolaklarında adaptör protein olarak görev aldığı dolayısı ile GPKR'lerin hücre içi sinyal

iletiminde G-proteinlerine alternatif bir ikinci yolak oluşturduğu iddiası da literatürde gün geçtikçe daha sık yer almaktadır (örnek olarak: Kyriakis ve Avruch, 1996; Pearson ve ark., 2001).



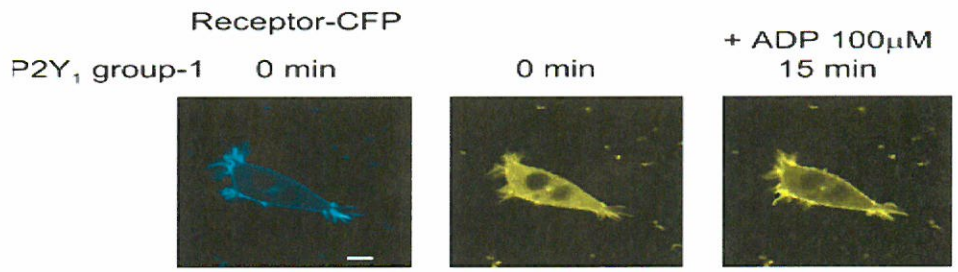
Şekil 1.2. β-arrestin Proteinlerinin Desensitizasyonda, Sekestrasyonda ve GPKR'lerinin Hücre İçi Sinyal İletimindeki Rolü (Bu şekil, Luttrell ve Lefkowitz, 2002 makalesinden alınmıştır.).

β-arrestin proteinlerinin yukarıda bahsedilen translokasyonunun hücredeki sinyal iletim görevi ile de yakından ilişkili olduğu düşünülmektedir (örnek olarak: Shenoy ve Lefkowitz, 2011; Chen ve ark., 2004; Defea, 2008). β-arrestinlerin hücre içerisinde çok sayıda proteinle teorik olarak etkileşebilecekleri de yakın zaman önce önerilmiştir. Bu önerilen proteinler arasında çekirdek ve çekirdekçik proteinleri de vardır (Xiao ve ark., 2007). Ayrıca β-arrestinlerin çekirdekte bazı görevler yapabileceklerine dair de bulgular mevcuttur ancak bunlar bu proteinin doğrudan çekirdekteki etkilerinden çok başka proteinler aracılığı ile oluşturduğu etkiler gibi görünmektedir (bir derleme için: Buchanan ve DuBois, 2006; Ma ve Pei, 2007). Ancak reseptör uyarısı ile β-arrestinlerin çekirdeğe transloke olduklarına dair deneysel bulgu çok sınırlıdır. Bir çalışmada bir GPKR olan mü-opioid peptid reseptörü uyarısı ile βarr-1'in (Kang ve ark., 2005), diğer bir çalışmada ise bir koku reseptörü uyarısı ile βarr-2'nin plazma zarı yerine çekirdeğe transloke olduğu (Neuhaus ve ark., 2007) deneysel olarak gösterilmiştir. Ancak bu çalışmalarda çekirdek içinde belli bir bölgeye bir toplaşma olmamıştır. Bu bulguların da gösterdiği gibi β-arrestinlerin çekirdekte bazı görevleri olması beklenen bir durumdur, ancak bu konuda literatür oldukça sınırlı bilgi içermektedir ve bu konu yeni yeni

anlaşılmaktadır. Bu açıklamanın da gösterdiği gibi β-arrestinler çok çeşitli ve birbirinden farklı temel fizyolojik mekanizmalarda önemli rol oynayan proteinler olarak gün geçtikçe daha çok ilgi görmektedirler (Şekil 1.2).

1.1.4. P2Y Reseptörleri ve βarr-1/2 Proteinleri ile Etkileşimleri

P2Y reseptörleri GPKR ailesinden pürinerjik reseptörlerdir. Bu G proteini kenetli reseptörler ATP, ADP, UTP, UDP ve UDP-glukoz gibi nükleotidler ile uyarılırlar. İnsanda klonlanmış 12 farklı P2Y reseptörü: P2Y1,2,4,5,6,8,9,10,11,12,13,14 (NCBI, GPCR23) tanımlanmıştır (Abbracchio ve ark., 2006., Kügelgen, 2008). Günümüze kadar bu reseptörlerin alt-tiplerinin tanımlanabilmesi ve farklı hücre tiplerinde P2Y reseptörlerinin alt-tiplerinin rolleri ve dağılımlarının anlaşılabilmesi için birçok çalışma yapılmıştır. Yine son yıllarda yapılan çalışmalarda βarr-1 ve 2 sitoplazmik proteinlerininin P2Y reseptörleri ile de etkileştikleri iddia edilmektedir. P2Y reseptörleri pek çok dokuda yaygın bir şekilde bulunduğu ve çok farklı fizyolojik ve fizyopatolojik olayda rol aldığı bilinmektedir.



Şekil 1.3. P2Y1 Reseptörünün 100 μM ADP ile Aktive Edilmesiyle βarr-2 Proteininin Membrana Translokasyonu. Bu data P2Y1-CFP ve β-arrestin-2-YFP proteinlerinin kotransfeksiyon yapıldığı HEK-293 hücrelerinde yapılmıştır (Bu şekil, Reiner ve ark., 2009 makalesinden alınmıştır.).

Literatürde konfokal mikroskopi ve FRET deneyleri ile insan P2Y reseptörlerinin over eksprese edildiği sistemlerde, bazı P2Y reseptör alt tiplerinin uyarılmasının βarr-1 ve 2 proteinlerinin (yukarıda diğer GPKR'ler için açıklanana benzeyen bir şekilde) membrana translokasyonuna neden olduğu gösterilmiştir (Hoffmann ve ark., 2008). Dolayısı ile P2Y pürinerjik reseptörler β-arrestinler ile etkileşme potansiyeline sahiptirler. HEK-293 hücre serilerinde yapılan bir çalışmada P2Y1

reseptörünün uyarılması ile βarr-2 proteinin βarr-1'e göre daha belirgin bir membran translokasyonu gösterdiği de iddia edilmiştir (Reiner ve ark., 2009) (Şekil 1.3).

1.2. P2X7 Reseptörleri ve Bu Reseptörlerin βarr-1/2 Proteinleri ile Etkileşimleri

Ligand bağımlı iyon kanalı ailesinden olan pürinerjik P2X reseptörleri ilk defa Alan North ve grubu tarafından klonlanmış ve yeni bir reseptör ailesi olarak tanımlanmıştır (Valera ve ark., 1994). Bu ailenin yedi üyesinden biri olan P2X7 reseptörü ise ilk defa aynı gruptan Anmarie Surprenant ve arkadaşlarınca 1996 yılında sıçan dokularından klonlanmıştır (Surprenant ve ark., 1996). P2X7 reseptörü hücre dışındaki ATP ile aktive olan non-spesifik bir katyon kanalıdır. P2X7 subüniteleri 595 aminoasitten oluşur, fonksiyonel kanalın ise trimerik ya da tetramerik olduğu öne sürülmektedir (North, 2002). Bu özellikleri ile P2X reseptörleri GPKR'lerinden (dolayısı ile de P2Y'lerden) tamamen ayrı bir yüzey reseptör ailesi oluşturmaktadır. Diğer P2X reseptörleri gibi P2X7R'ünün agonist ile uyarılmasından çok kısa bir süre (milisaniyeler) sonra küçük katyonlara seçici bir iyon kanalı aktive olur. Ancak P2X7 reseptörlerinin uyarılması ile diğer P2X'lerden farklı olarak (ancak P2X2 reseptörlerine benzer bir şekilde; Khakh ve ark., 1999; Virginio ve ark., 1999; Eickhorst ve ark., 2002), agonist uygulamasından saniyeler sonra hücre membranında, ethidium bromide, YoPro-1 gibi büyük molekül ağırlıklı floresan maddelere geçirgen ve "por" olarak adlandırılan bir yol daha açılır (North ve Suprenant, 2000; North, 2002). P2X7 reseptörünün bu fonksiyonun fizyolojik önemi henüz daha kesin olarak anlaşılamamıştır. P2X7 reseptörü, diğer ligand bağımlı katyon kanalları gibi, aktivasyonu sonucu membran depolarizasyonu ve Ca^{+2} geçirgen olması nedeniyle de, hücre içi Ca^{+2} artışı da oluşturmaktadır (North, 2002). P2X7 reseptörünün bu ligand bağımlı iyon kanalı görevinin yanı sıra, hücre içinde çeşitli proteinlerle etkileşerek de hücre içi sinyal iletimini tetikleyebileceği iddia edilmektedir (örnek olarak; Zou ve ark., 2001, Kim ve ark., 2001). Buna en iyi delil bu reseptörün uyarısı ile oluşan bleblenme yanıtıdır. Bu bleblenme yanıtı dış ortamdaki Ca^{+2} dan, dolayısı ile P2X7 reseptörünün katyon kanalı görevinden, bağımsız görünmekte ve bazı hücre içi kinazların aktivasyonu ile oluşmaktadır

(Mackenzie ve ark., 2005). P2X7 reseptörü uyarısının oluşturduğu pek çok kereler bildirilen bir başka yanıt ise immün sistem hücrelerinden interlökin salınmasıdır (İlk bulgular için: Perregaux ve Gabel, 1994). Ayrıca P2X7 uyarısının hücrelerde apoptozu tetiklediği, bu reseptörün hücrenin ölümünden sorumlu bir reseptör olduğu da iddia edilmektedir. Ancak aksine bu reseptörün tümör büyümesinde ve hücrelerin hipoksik ve düşük nutrientli ortamlara uyum gösterebilmesinde rolü olduğu da öne sürülmektedir (Adinolfi ve ark., 2012, Amoroso ve ark., 2012). P2X7 reseptörü agonistleri bakımından da diğer P2X reseptörlerinden farklılık göstermektedir. Reseptörü aktive eden ATP derişiminin EC50 si 100 μM'dan fazladır. 2-,3-(benzoyl-4-benzoyl)-ATP (BzATP, EC50 = 20 μM) P2X7 reseptörlerinde ATP'den (EC50 > 100 μM) belirgin olarak daha potent bir agonisttir (Jacobson ve ark., 2002). Ligand kapılı olan P2X7 reseptörü için tanımlanmış birçok antagonist bulunmaktadır. Literatürde geçen blokörler: Çeşitli küçük iyonlar (Kalsiyum, magnezyum, çinko, bakır, protonlar) ve süramin, PPADS, brilliant blue G, oxidized ATP, kalmidazolyum ve KN62 gibi kimyasalları içerir. Fakat bu blokörlerden çoğu tam anlamıyla P2X7 reseptörüne spesifik değildir (Buell ve ark., 1996; Surprenant ve ark., 1996; Garcıa ve ark., 1997; Rassendren ve ark., 1997; Ralevic ve ark., 1999). Kısa bir süre önce P2X7 reseptörüne yüksek derecede spesifik olduğu iddia edilen N-(1-{((cyanoimino)(5-quinolinylamino)methyl)amino}-2,2-dimethylpropyl)-2-(3,4-dimethoxyphenyl) acetamide (A-740003) (Honore ve ark, 2006) ve 3-((5-(2,3-dichlorophenyl)-1Htetrazol-1-yl)methylpyridine (A-438079) (Nelson ve ark., 2006) isimli antagonistler tanımlanmıştır.

GPKR'lerinden hem fonksiyonel hem de yapısal olarak tamamen ayrı bir hücre yüzey reseptörü ailesi oluşturan P2X'lerin ve bu ailenin bir üyesi olan P2X7'nin β-arrestinlerle etkileşimde bulunabileceklerine dair literatürde tek bir yayın mevcuttur (Feng ve ark., 2005). Bu çalışmada P2X7 reseptörlerinin uyarılması ile β-arrestinlerin, GPKR'lerin uyarılması ile olana benzer bir şekilde hücre zarına transloke oldukları ve bu yolla P2X7 reseptörünün desensitizasyonu ve bu reseptörün internalizasyonunu gerçekleştirdikleri iddia edilmiştir. Ancak bu çalışmada birkaç tutarsız ve eksik nokta yer almaktadır; bunlardan en önemlisi sunulan bulgulardan anlaşıldığı kadarı ile kullanılan βarr-2-GFP füzyon proteinin dağılımı literatürle

uyumlu olmayan bir şekilde hücre sitoplazması ve çekirdeğinde eşittir. İkinci nokta ise bu çalışmada ATP uygulaması ile oluştuğu iddia edilen yantın eksprese ettirilen P2X7 reseptörüne mi yoksa endojen P2Y GPKR'lerine mi ait olduğu yeterince kontrol edilmemiştir. Bu çalışmamızdaki bulgular bahsedilen bu çalışmadakilerle karşılaştırıldığında çok farklı iki fenomenle karşı karşıya olunduğu hemen anlaşılacaktır.

Bu tez çalışmasında temel olarak, her ikisinede ayrı ayrı fizyolojik ve farmakolojik önem atfedilen βarr-2 ve P2X7R proteinlerinin arasında bir ilişki olup olmadığı araştırılmıştır. Yapılan ön çalışmalarda daha önce yapılan çalışmaların sonucundan farklı olarak, P2X7 reseptörünün uyarılmasıyla βarr-2 proteininin çekirdeğe toplandığı gözlenmiştir. Bu sonuçtan yola çıkarak βarr-2'nin hücre çekirdeğinde yüksek afiniteli ve kapasiteli bir bağlanma bölgesine sahip olup olmadığı ve bu bağlanmanın P2X7 uyarısı ile kontrol edilip edilmediği soruları sorulmuştur. βarr-2 proteininin bazı çekirdek proteinleri ile etkileşebileceği teorik olarak ön görülmüş ise de bunu doğrudan gösteren deneysel bir çalışma yoktur. Ayrıca bilindiği gibi, klasik olarak βarr-2, GPKR uyarısı ile önce plazma membranına oradan tekrar sitoplazmadaki bazı organellere yer değiştirmektedir. Bu klasik translokasyon şekli βarr-2'nin bilinen fonksiyonları ile de uyumludur (GPKR internalizasyonu-desensitizasyonu). Buna karşılık βarr-2 için çekirdekte bir etkileşme bölgesinin olduğunun ve bu etkileşmenin bir reseptör uyarısı ile regüle edildiğinin doğrudan gösterilebilmesi ise bu protein için tamamen yeni, beklenmedik ve önemli olabilecek bir bulgudur. Böylece βarr-2 proteini için bilinmeyen, tamamen yeni fonksiyonlar tanımlanabilecektir Bu tez çalışması, ilginç bu ön gözlemlerimizin doğrulanması, genişletilmesi ve βarr-2 proteininin yanıtını doğuran mekanizmalardan bazılarının aydınlatılması amacını taşımaktadır.

Bu tez çalışmasından elde edilmiş bulguların iki alanda etki yapma olasılığı bulunmaktadır. Birinci alan P2X7 reseptörleri ile ilgilidir. P2X7 reseptörü göreceli olarak yeni keşfedilen bir ailenin üyesi olarak fonksiyonları ve sinyal ileti mekanizmaları henüz tam anlaşılamamış bir reseptördür. Buna rağmen bazı önemli hastalıkların fizyo-patolojisinde ön planda rol aldığı düşünülmektedir. Hatta bu

reseptörün antagonistleri romatoid artrit tedavisinde, bazı problemlere rağmen denenmektedir (Arulkumaran ve ark., 2011, ancak bkz. Keystone ve ark., 2012). P2X7 reseptörünün pek çok hastalığın fizyo-patolojisinde rol aldığına dair deliller gün geçtikçe çoğalırken, bunların altında yatan hücresel-moleküler mekanizmalar henüz daha karanlıktadır. P2X7 reseptörünün iyon kanalı olması, daha çok da Ca^{+2} geçirgen olması ile ilşkili akut etkilerinin dışında kalan, uzun ATP maruziyetiyle oluşan apoptozis (Mackenzie ve ark., 2005) ve tümör hücrelerinin stresli ortamlara adaptasyonu (Adinolfi ve ark., 2012) gibi uzun süreli ve muhtemelen protein ekspresyonlarının kontrolü üzerinden giden ve birbirleri ile çelişkili izlenimi veren bir dizi yanıtın hücresel mekanizması hakkında bilgi yok denecek kadar azdır. Bu çalışmadan elde edilen bulgular potansiyel olarak P2X7 reseptörü aktivasyonu ile hücre çekirdeğindeki olayların birleştirilmesine yarayacak bazı mekanizmaların önerilmesine yardımcı olabilecek niteliktedir. İkinci alan ise β-arrestin proteinlerinin fonksiyonları ile ilgilidir. Bu proteinlerin GPKR'lerin sinyal iletiminde çok önemli bir rolü olduğu artık genel kabul görmektedir. GPKR'lerin G-proteinlerinden çok, şeçicici olarak β-arrestinlerle etkileşmesini (ya da tersini) sağlayacak "biased-agonistlerin" yapılması farmakolojide yeni bir çalışma alanı oluşturmaktadır (derleme için; Rajagopal ve ark, 2010). Bu yolla farmakoterapide eski hedefleri (yani GPKRleri) değişik ve alışılmadık bir şekilde etkileyebilecek yeni farmakolojik araçların doğacağı umulmaktadır. β-arrestinlerin GPKR'lerde, G-proteinlerinden bağımsız ya da onlara paralel bir sinyal yolağı oluşturduğu gittikçe sağlamlaşan bir görüştür. Bu sinyal yolağının hücre içi sinyal ağında nerelere kadar uzandığı ve hangi bağlantıları yaptığı ise daha yeni yeni anlaşılmaya başlanmaktadır. Bu tez çalışmasından elde edilen bulguların, β-arrestin aracılı sinyal iletimi konusunda da yeni hücresel mekanizmalar önerme potansiyeline sahip olduğunu düşünmekteyiz.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Hücrelerin Çoğaltılması, Deneye Hazırlanmaları, cDNA Transfeksiyonu ve Stabil Hücre Klonlarının Oluşturulması

Çalışmada elimizde mevcut olan ATCC'den elde edilmiş insan HEK-293 hücre serisi ve bu hücrelere insan βarr-2-GFP proteininin kalıcı transfeksiyonu ile elde edilmiş hücre serisi kullanılmıştır (HEK-293 ve HEK-293-βarr-2-GFP hücre serileri). Ayrıca deneyler için bu insan HEK-293 hücrelerine sadece sıçan P2X7 reseptörünün ve hem sıçan P2X7 reseptörünün hem de insan βarr-2-GFP cDNA'sının kalıcı transfeksiyonu yapılmıştır. Bu transfeksiyon işlemi ile HEK-P2X7 ve HEK-P2X7-βarr-2-GFP olarak hücre serileri oluşturulup deneylerde kullanılmıştır.

Hücrelerin P2X7 reseptörü ve βarr-2-GFP cDNA'ları (genetisin ya da higromisin direnç geni içeren plazmitler içerisinde bulunan) ile transfeksiyonu Lipofektamin 2000 kullanılarak yapılmıştır. Stabil klonlar ise transfekte hücreler 96'lık kuyulara dağıtıldıktan sonra genetisin, ya da çift transfeksiyonlarda, higromisin kullanılarak seçilmiştir. P2X7 reseptörü için cDNA'lar Dr. Alan North'un, βarr-2-GFP konstrakları ise Dr. Tomasso Costa'nın hediyesidir. Bu füzyon proteinin işlevlerinin sağlam olduğu ve GPKR'leri ile β-arrestinlerin bilinen ve beklenen interaksiyonlarını gerçekleştirebildiği önceden gösterilmiştir (Molinari ve ark., 1998).

Tüm hücreler %5 CO_2 atmosferde 37° C sıcaklıkta DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (GIBCO BRL Life Tech. NY, ABD) içerisinde %10 fetal calf serum (FCS) içeren kültür ortamında, standart hücre kültürü inkübatörlerinde büyütülmüştür. Tüm hücreler içinde bulundukları flaskın yüzeyinin %70-80' ini kapladıklarında tripsin-EDTA (1mM) ile oda sıcaklığında kaldırılarak deneyden iki gün önce cam lamellere ya da 96 kuyuluk platelere ekilmiş, deney günü cam lameller önce yıkama çözeltisi ile yıkanıp ardından deney çözeltisi içerisinde özel metal tabanlı teflon gövdeli deney banyosunun tabanına yerleştirilerek deneye alınmıştır. P2X7 yanıtları divalan iyonların (Ca^{+2}, Mg^{+2} gibi) varlığından etkilendikleri için

P2X7 deneylerinde genel olarak nominal divalan iyonsuz çözeltiler tercih edilmiştir. Ancak biz deneylerimizi fizyolojik derişimlerde divalan iyon içeren çözeltilerde de tekrarladık. Deneylerimizde, Na^+ iyonlarının P2X7 reseptörünün oluşturduğu yanıtları azalttığı bilindiği için deney çözeltisi olarak KCl çözeltisi kullanılmıştır.

2.2. Kullanılan Çözeltiler ve Kimyasallar

Çalışmamızda kullanılan çözeltilerin içerikleri aşağıda belirtilen şekildedir. 1) NaCl deney çözeltisi: Na^+ 150 mM, K^+ 5 mM, HEPES 10 mM, pH 7.4 2) KCl deney çözeltisi: Na^+ 5 mM, K^+ 150 mM, HEPES 10 mM, pH:7.8 3) Yıkama çözeltisi: Na^+ 125 mM, K^+ 5 mM, HEPES 20 mM, Mg^{+2} 1 mM, Ca^{+2} 1.5 mM, pH:7.4

Hücrelere 3'-O-(4-benzoyl)benzoyl ATP (BzATP) 5 µM, adenosine 5'-triphosphate (ATP) 1 mM ve 5 µM, Adenosine 5'-diphosphate (ADP) 1 mM ve Uridine 5'-trifosfat (UTP) 1 mM derişiminlerinde uygulanmıştır.

NES pompa inhibitörü olan Leptomycine B (LMB) ise 20 ng/ml derişiminde kullanılmış ve hücreler 20-22 saat bu maddeyle 37 °C de inkübe edilmiştir.

Bunlar dışında floresan mikroskopi ölçümleri için YoPro-1 boyası 2,5 µM, Lucifer Yellow boyası 500 µM, Hoecht 34580 boyası 5 µg/ml, Fura-2 AM (inkübasyon süresi 50 dakika) boyası 4 µM derişimde kullanılmıştır.

2.3. Konfokal Mikroskopi Yöntemi Kullanılarak Yapılan Deneyler

2.3.1. βarr-2-GFP Füzyon Proteininin Hücre İçi Dağılımının Konfokal Mikroskopi Yöntemi Kullanılarak İncelenmesi

Çalışmamızda incelediğimiz ana yanıt, işaretli bir floresan protein olan βarr-2-GFP proteinin bir uyarı ile hücre kompartmaları arasında yer değiştirmesidir. Bu yanıt, konfokal mikroskop (Leica, TCS SP5) aracılığı ile, gerçek zamanlı (real-time) izlenmiştir. Kullanılmış olan floresan işaretlerin (βarr-2'ye bağlı GFP veya Hoechst boyası) canlı hücrelerde gözlenebilmeleri bunu mümkün kılmaktadır. Tüm deneyler hem HEK-P2X7-βarr-2-GFP hem de HEK-293-βarr-2-GFP hücrelerinde tekrarlanmıştır. Özel teflon deney banyosu içerisinde fizyolojik deney çözeltisinde duran canlı hücreler sıcaklık kontrolüne sahip ısıtıcılı mikroskop tablası üzerine yerleştirilmiş ve agonistler (yukarıda belirtildiği derişimlerde) çözelti içerisine uygulanmıştır. Deneyler 37 °C de yapılmıştır. Konfokal mikroskopta βarr-2-GFP proteini 488 nm lazerle uyarılmıştır. 510-585 nm dalga boyu aralığında toplanan floresan ışıma ile farklı derinlikteki optik kesitlerden oluşturulan görüntü desteleri ("image stack"), ardışık olarak 60 saniyede bir tekrarlanarak agonist uygulamasından önceki 3-4 ve uygulamayı takip eden 26-27 dakikalık bir sürede floresan işaretli proteinin hücre içerisindeki konumu ve bundaki değişmeler, üç boyutlu olarak izlenmiştir (bu şekilde değişimler üç uzay boyutu ve ek olarak zaman içerisinde de izlenmiştir). Görüntülerin alınması için 63X su immersiyon objektifi kullanılmıştır.

Agonist (yukarıda belirttiğimiz derişimlerde) uygulaması ile βarr-2-GFP proteinin hücre içindeki dağılımının değişmesi yanıtının bir ölçüsü olarak; Deney başlangıcında βarr-2-GFP'nin görünür bir çekirdek yerleşimi göstermediği hücrelerin uyarı sonrası belirgin bir çekirdek yerleşimi göstermeye başlayanlarının, toplam hücre sayısına oranı kullanılmıştır. Tüm deneylerimiz bu ölçünün tekrarlayan ve güvenilir bir ölçü olduğunu göstermiştir.

Bu çalışmamızda HEK-P2X7-βarr-2-GFP hücre serilerinde βarr-2-GFP proteinin ATP uyarısı ile çekirdekte toplandığını göstermek için vital çekirdek boyası olan Hoecht 34580 kullanılmıştır. Bu boya 405 nm dalga boyunda lazerle uyarılıp, 430-479 nm dalga boyu aralığında hücrenin çekirdek ve çekirdek sınırlarını gösteren görüntüler alınmıştır. Hoecht boyası ve βarr-2-GFP proteini ayrı ayrı uyarılıp, her iki florofor için ardışık görüntüler elde edilmiştir. Ardışık olarak alınan bu görüntüler birleştirilerek bu βarr-2-GFP proteininin çekirdekte lokalize olup olmadığı incelenmiştir.

2.3.2. FRAP Yöntemi Kullanılarak βarr-2-GFP Proteininin Sitoplazmadaki ve Çekirdekteki Mobilitesinin Gösterilmesi

Yukarıda belirtilen KCl deney çözeltisi kullanılarak, konfokal mikroskop aracılığıyla hem HEK-P2X7-βarr-2-GFP hem de HEK-293-βarr-2-GFP hücrelerinde, ATP uyarısından önce sitoplazmada, difüz şekilde bulunan ve ATP uyarısından sonra çekirdekte toplanan βarr-2-GFP proteininin floresansı tek noktada yüksek şiddette lazer uygulaması ile söndürülerek, söndürülmüş bölgedeki floresansın geri dönüş hızı ölçülmüştür (**Floresans Recovery After Photobleaching**). Ayrıca aynı deney ATP uyarısından sonra yanıt veren HEK-P2X7-βarr-2-GFP hücrelerinde çekirdekte toplanan floresan protein üzerinde tekrarlanmıştır. Bu yolla proteinin sitoplazmadaki mobilitesi ve çekirdekteki toplanma bölgesine bağlanmasının tersinirliği araştırılmıştır.

2.3.3. Lucifer Yellow Boyası Kullanılarak P2X7 Yanıtları Sırasında Hücre Zarı Bütünlüğünün Korunduğunun Gösterilmesi

Lucifer Yellow boyası negatif yüklü olup, hücre içinde de dışında da floresandır. Yukarıda bölüm 2.1. de tarif edildiği gibi yapılan bazı deneylerde, HEK-P2X7-βarr-2-GFP hücrelerinin KCl deney çözeltisine Lucifer Yellow (500 μM) eklenmiştir. ATP uyarısı ile βarr-2 dağılımında değişme yanıtı gösteren hücrelerin sitoplazmasına Lucifer Yellow boyasının girip girmediği konfokal mikrosop ile takip edilmiştir. Konfokal

mikroskopta Lucifer Yellow 458 nm dalga boyunda lazer ile uyarılıp, 556-625 nm dalga boyu aralığında floresan ışıma toplanarak görüntüler oluşturulmuştur. Yukarıda Hoecht boyası ile yapılan deneyde açıkladığımız gibi, GFP ile işaretli βarr-2 proteini ve Lucifer Yellow ayrı ayrı uyarılarak, her iki florofor için ardışık görüntüler elde edilmiştir.

2.3.4. Leptomisin B ile NES Pompasının İnhibisyonu

NES pompasının inhibe edilmesi için 20 ng/ml Leptomisin B ile hücreler 20-22 saat, serumsuz medium içinde, %5 CO_2 atmosferde ve 37 °C sıcaklıkta bekletilmiştir. Kontrol hücreleri ise aynı şartlarda LMB yerine onun çözücüsü olan etanol ile inkübe edilmiştir. Konfokal mikroskopta hücrelerin tüm derinliğini içerecek şekilde ardışık optik kesitler alınmıştır (Görüntü desteleri). Bu görüntüler çeşitli alanlarda (2-3 farklı alanda) tekrarlanmıştır. Bu deneyler hem HEK-P2X7-βarr-2-GFP hem de HEK-293-βarr-2-GFP hücrelerinde yapılmıştır. Bu deneylerde LMB nin etkisi, βarr-2-GFP nin görünür bir çekirdek yerleşimi gösterdiği hücrelerinin sayısının, toplam hücre sayısına oranı kullanılarak değerlendirilmiştir.

2.4. Hücre İçi Ca^{+2} Derişimi Ölçümü

LMTK hücreleri deney öncesi yıkama çözeltisi ile bir defa yıkanmış, yıkama çözeltisi içinde 4 μM Fura-2AM ile 37 °C de 50 dakika süreyle inkübe edilmiştir. Hücreler tekrar yıkanarak deneye alınmıştır. İnverted mikroskop altına yerleştirilen hücrelerde, mikroskoba bağlı bir mikroflorimetre sistemi (monokromatör uyarı ve PMT ölçüm sistemi içeren Ratiomaster, Photon Technologies International, NJ, ABD) kullanılarak, fura-2 boyası 340 ve 380 nm dalga boyunda uyarılmış ve 510 nm dalga boyunda floresan ışık ölçülmüştür. Ölçümlerin kaydedilmesi ve değerlendirilmesinde FELIX yazılımı (Photon Technologies International, NJ, ABD) kullanılmıştır. Sonuçlar f340/f380 floresans ışıma şiddeti oranı ile elde edilmiştir.

3. BULGULAR

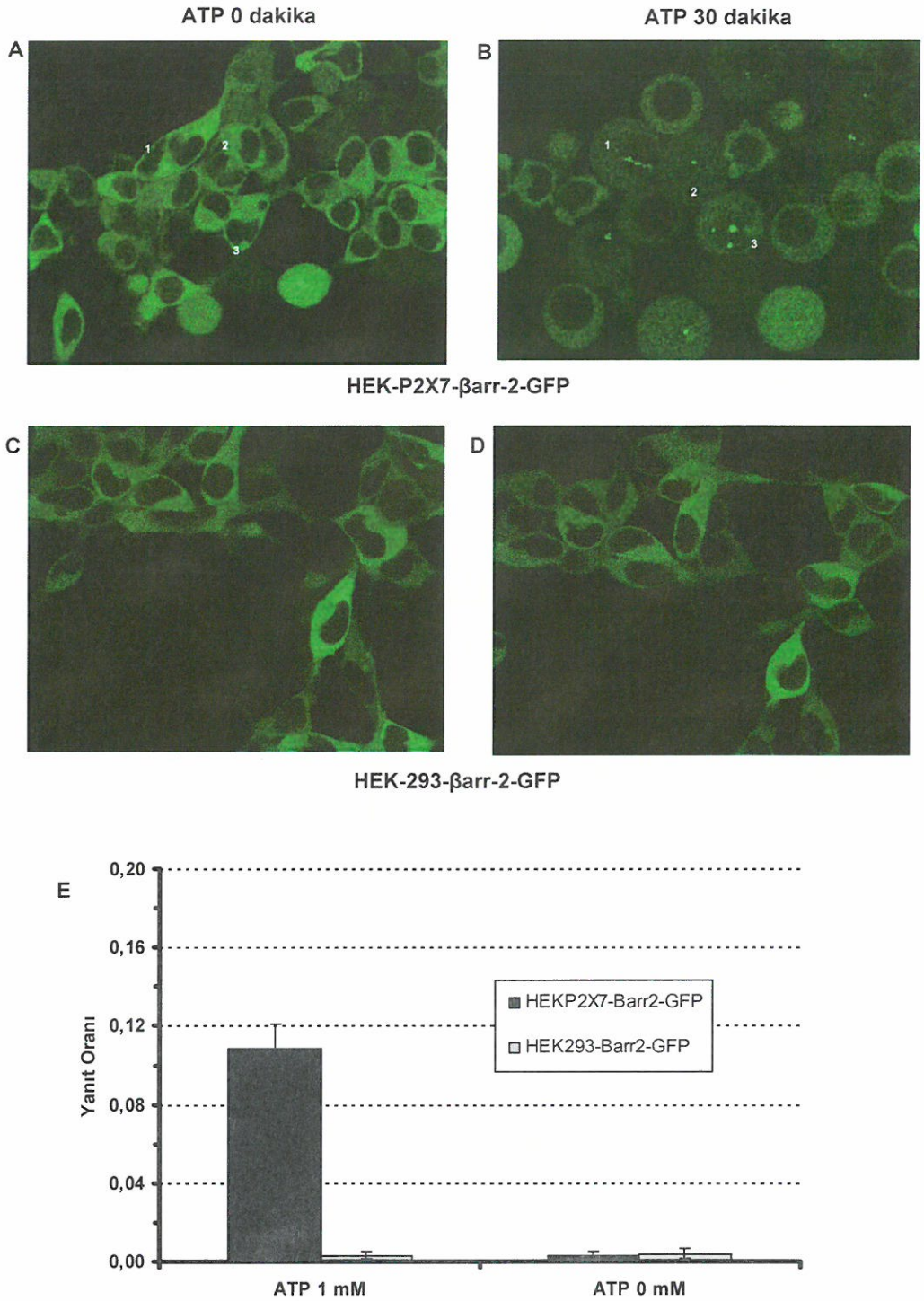
3.1. GFP ile İşaretli βarr-2 Proteininin ve P2X7 Reseptörünün Kalıcı Olarak Eksprese Ettirildiği HEK-293 (HEK-P2X7-βarr-2-GFP) Hücre Serisinde ATP Uyarısıyla βarr-2-GFP Proteini Çekirdeğe Transloke Olmaktadır

Bu tez çalışmasında incelenen esas yanıt, işaretli bir floresan protein olan βarr-2-GFP proteininin ATP uyarısı ile, bazal koşullarda bulunduğu hücre sitoplazmasından çekirdeğe yer değiştirmesidir. Bu yanıt canlı hücrelerde konfokal mikroskop (Leica, TCS SP5) aracılığı ile, gerçek zamanlı (real-time) olarak izlenerek ölçülmüştür. Bu ölçüm, hem P2X7 reseptörünü hem de βarr-2-GFP proteinini kalıcı transfeksiyon yaptığımız HEK-293 hücrelerinde yapılmıştır. Deney çözeltisinde duran canlı hücrelerin konulduğu banyo, sıcaklık kontrolüne sahip ısıtıcılı mikroskop tablası üzerine yerleştirilmiş ve deneyler 37 °C de yapılmıştır. P2X7 reseptörünü aktive etmek için hücrelere 1mM ATP uygulanmıştır. Hücreler konfokal mikroskop ile 488 nm lazerle uyarılarak farklı derinlikteki optik kesitlerden elde edilen görüntü desteleri ("image stack"), ardışık olarak 60 saniyede bir tekrarlanarak agonist uygulamasından önceki 3-4 ve uygulamayı takip eden 25 dakikalık bir sürede floresan işaretli proteinin hücre içerisindeki konumu ve bunda oluşan değişmeler, üç boyutlu olarak izlenmiştir. ATP uygulaması yapılmadan önce βarr-2-GFP proteinin dağılımının hemen hemen tamamının sitoplazmik olduğu ve çekirdekte derişiminin çok düşük olduğu (Şekil 3.1 A), agonist uyarısı ile ise, bir grup hücrede βarr-2-GFP proteinin hücre içindeki dağılımının değişerek, bu işaretli proteinin çekirdeğe transloke olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.1 B). Aynı koşullarda hücrelere ATP yerine deney çözeltisi uygulandığında bu translokasyon gözlenmemiştir. Bu değişikliğin ölçüsü olarak başlangıçta çekirdeklerinde βarr-2-GFP varlığı tespit edilemeyecek kadar zayıf olan hücrelerin ATP uyarısı sonrası belirgin ve net çekirdek yerleşimi göstermeye başlayanlarının, toplam hücre sayısına oranı kullanılmıştır. HEK-P2X7-βarr-2 hücrelerine 1mM ATP uygulaması ile 29 ayrı gün tekrarlanan toplam 38 deneyden, yapılan sayımlarda toplam hücre sayısı 3529 olarak belirlenmiştir. Yanıt veren hücrelerin yüzdesi ortalama olarak 10,9 ± 1,2 dir. Aynı hücrelere sadece deney

çözeltisi eklenmesi ile (ATP 0 mM) 14 ayrı gün yapılan 15 deneyde, 1577 toplam hücreden yapılan sayımda ise yanıt veren hücrelerin ortalama oranı % 0,3 ± 0,02 olarak bulunmuşur (Şekil 3.1 E). ATP uyarısı öncesinde, bazal koşullarda, çekirdeklerinde βarr-2-GFP varlığı saptanabilen hücreler gözlenmiştir (Şekil 3.3(B)). Ancak bunların oranı nispeten düşüktür (Tüm hücrelerin % 4.3 ± 1.2). Bu tip hücreler çekirdeklerindeki floresans miktarı ATP uyarısı sonrasında artsa bile yanıt veren hücreler arasında sayılmamışlardır. Tüm sayımlar ATP uygulamasından 25 dakika sonra yapılmıştır, ancak yanıt ATP uygulamasından 10-15 dakika sonra başlamakta ve zamanla yanıt veren hücre oranı artmaktadır.

3.1.1. P2X7 Eksprese Etmeyen Parent HEK-293-βarr-2-GFP Hücrelerinde ATP Uygulaması ile Yanıt Oluşmamaktadır

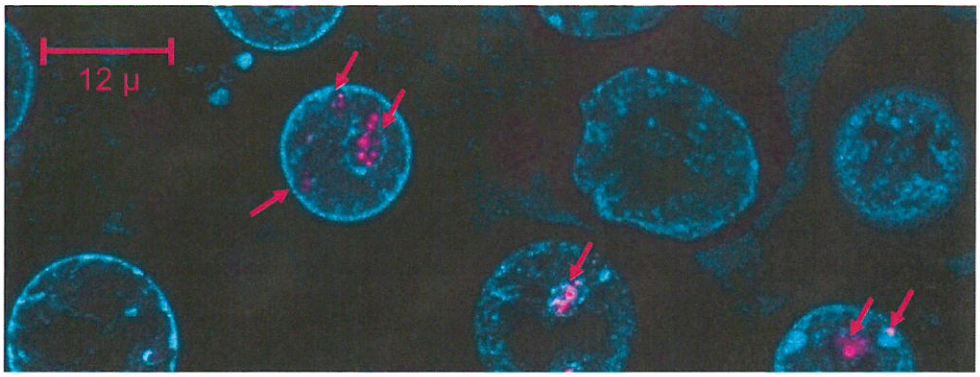
Yukarıda tarif edilen deneyler HEK-293-βarr-2-GFP hücrelerinde de tekrarlanmış ve bu hücrelerde 1 mM ATP uygulaması ile βarr-2-GFP proteininin çekirdeğe translokasyonun indüklenmediği gözlenmiştir (Şekil 3.1 C ve D). 12 günde yapılan 18 deneyde toplam 1021 hücreden yapılan ölçümde hücreler % 0,3 ± 0,2 oranında yanıt vermiştir (Şekil 3.1 E). Buna karşılık ATP uygulanmayan hücrelerde de benzer bir oran gözlenmiştir (5 ayrı gün yapılan 5 deneyde, toplam 345 hücreden yapılan ölçümde yanıt veren hücrelerin oranı % 0,4 ± 0,2 olarak bulunmuştur) (Şekil 3.1 E). HEK-293-βarr-2-GFP ve HEK-P2X7-βarr-2-GFP hücrelerinden elde edilen tüm data kıyaslandığında, P2X7 reseptörü eksprese eden HEK-293 hücrelerinde ATP uyarısı ile βarr-2-GFP proteininin çekirdeğe translokasyonu indüklendiği açıkça görülürken, bu reseptörü eksprese etmeyen HEK-293 hücrelerinde böyle bir yanıt gözlenmemektedir (Şekil 3.1). Ayrıca HEK-293-βarr-2-GFP hücrelerinde de, HEK-P2X7-βarr-2-GFP hücrelerine benzer olarak, ATP uygulaması yapılmayan, bazal durumda bulunan hücrelerin bazılarında βarr-2-GFP nin hücre çekirdeğinde hali hazırda toplaşmış olduğu gözlendi (Data gösterilmemiştir). Bu hücrelerin oranı HEK-P2X7-βarr-2-GFP hücrelerinde gözlenene benzer bir değer göstermekteydi (% 5,3 ± 0,9).



Şekil 3.1. GFP ile İşaretli βarr-2 Proteininin ve P2X7 Reseptörünün Eksprese Ettirildiği HEK-293 Hücre Serisinde ATP Uyarısıyla βarr-2-GFP Proteininin Çekirdeğe Transloke Olduğunun Gösterilmesi. A. βarr-2-GFP Ekprese Eden HEK-P2X7 Hücrelerinin Uyarıdan Hemen Önceki Görünümleri. βarr-2-GFP dağılımının hemen hemen tamamının sitoplazmik olduğu ve çekirdekte derişiminin çok düşük olduğu Panel A da gözlenmektedir. **B. ATP Uyarısından Yaklaşık 30 Dakika Sonra Hücrelerin Durumu.** Panel A da rakamlarla işaretli hücrelerin, ATP uyarısından sonra çekirdeklerinde noktasal olarak βarr-2-GFPnin toplandığı Panel B de izlenebilmektedir. **C. βarr-2-GFP Ekprese Eden Ancak P2X7R Eksprese Etmeyen HEK-293 Hücrelerinin Uyarıdan Hemen Önceki Görünümleri. D. Aynı Hücrelerin 1 mM ATP Uyarısından Yaklaşık 30 dakika Sonraki Durumu. E. HEK-P2X7-βarr-2-GFP ve HEK-293-βarr-2-GFP Hücrelerinde ATP (ATP 1 mM)**

Uygulaması ve Sadece Deney Çözeltisi (ATP 0 mM) Uygulaması ile 25 dakika İçinde Oluşan Pozitif Hücrelerin Tüm Hücrelere Oranı. ATP uygulaması ile Panel B de gösterilen hücrelere benzer davranış gösteren hücreler pozitif olarak kabul edilmiştir. HEK-P2X7-βarr-2 hücrelerine 1mM ATP uygulaması ile 29 ayrı gün tekrarlanan toplam 38 deneyden, yapılan sayımlarda toplam hücre sayısı 3529, aynı hücrelere sadece deney çözeltisi eklenmesi ile (ATP 0 mM) yapılan 14 ayrı gün toplam 15 deneyde, toplam hücre sayısı 1577 olarak belirlenmiştir. Ayrıca HEK-293-βarr-2 hücrelerine 1mM ATP uygulaması ile 12 ayrı günde tekrarlanan toplam 18 deneyde yapılan sayımlarda toplam hücre sayısı 1021, aynı hücrelere sadece deney çözeltisi eklenmesi ile (ATP 0 mM) yapılan 5 ayrı gün toplam 5 deneyde, toplam hücre sayısı 345 olarak belirlenmiştir.

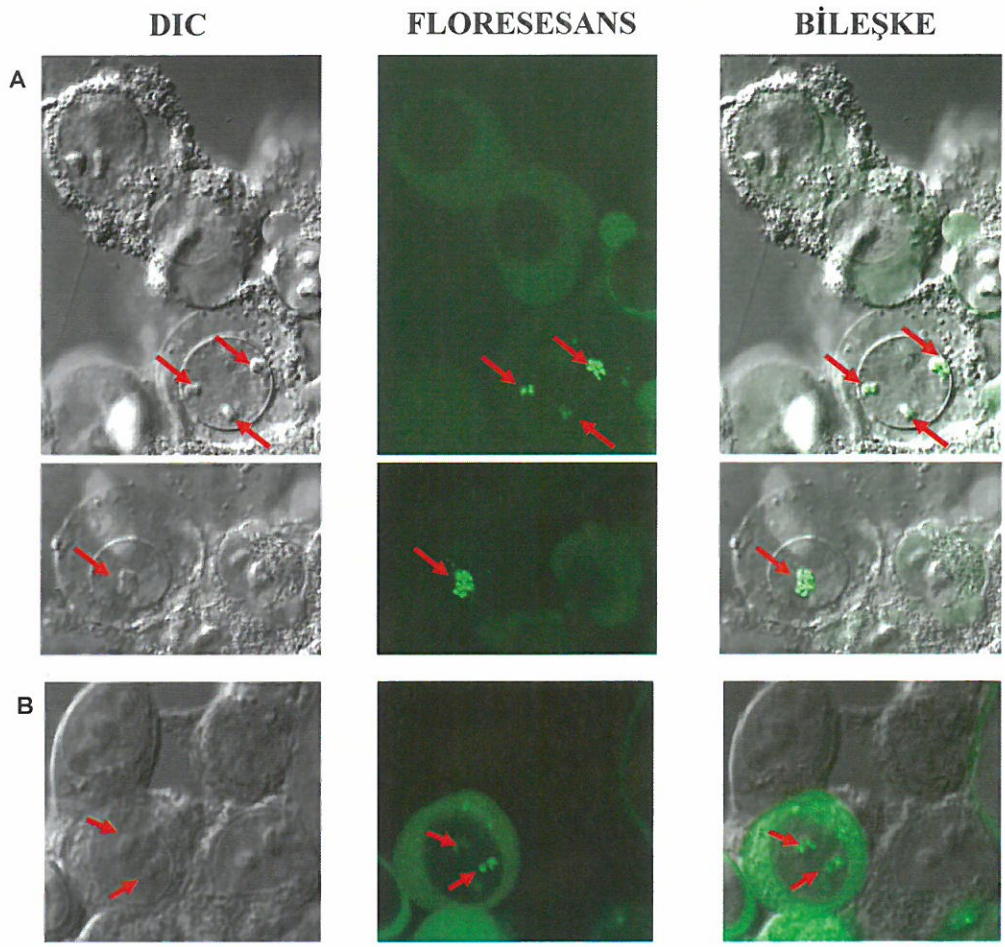
Bu proteininin uyarı sonrası çekirdekte toplandığını, yukarıda yapılan deneye ek olarak, HEK-P2X7-βarr-2-GFP hücrelerini eksitasyon-emisyon dalga boyları GFP den farklı olan vital çekirdek boyası Hoecht 34580 (5μg/ml) ile boyayarak konfokal mikroskop (Leica, TCS SP5) aracılığı ile gözlemledik (Şekil 3.2). Yanıt oluşan canlı hücrelerde, iki floroforun (βarr-2-GFP den gelen ve çekirdek boyasından gelen floresansın) kolokalizasyonu konfokal mikroskopi ile farklı optik kesitlerde ve üç boyutlu olarak gözlenmiştir. 3 ayrı deneyden alınan görüntülerden belirli alanlar seçilerek, bu alanlarda yanıt veren toplam 69 hücre gözlenmiştir. Bu yanıt veren hücrelerin çok büyük bir çoğunluğunda, 68 tanesinde, βarr-2-GFP proteininin sadece çekirdekte, bir tanesinde ise bu proteinin hem çekirdekte hem sitoplazmada lokalize olduğu gözlenmiştir.



Şekil 3.2. GFP ile İşaretli βarr-2 Proteininin ve P2X7 Reseptörünün Eksprese Ettirildiği HEK-293 Hücre Serilerinde, ATP Uyarısıyla βarr-2-GFP Proteininin Çekirdeğe Transloke Olduğunun, Vital Çekirdek Boyası Hoecht 34580 ile Gösterilmesi. Hoecht 34580 ile çekirdekleri boyanan hücrelerin bazılarında ATP uyarısından sonra çekirdekte noktasal olarak βarr-2-GFP nin toplandığı izlenmiştir. Hoecht boyası ve βarr-2-GFP proteini farklı dalga boyundaki lazerlerle ayrı ayrı uyarılıp, her iki florofor için ardışık görüntüler elde edilmiştir (Hoecht **mavi**, βarr-2-GFP **magenta** renkte gösterilmiştir). Ardışık olarak alınan bu görüntüler daha sonra birleştirilmiştir. 3 ayrı deneyden alınan görüntülerden belirli alanlar seçilerek, bu alanlarda yanıt veren toplam 69 hücre gözlenmiştir. Bu yanıt veren hücrelerin çok büyük bir çoğunluğunda, 68 tanesinde, βarr-2-GFP proteininin sadece çekirdekte, bir tanesinde ise bu proteinin hem çekirdekte hem sitoplazmada lokalize olduğu gözlenmiştir.

ATP uyarısıyla βarr-2-GFP proteininin çekirdeğe transloke olduğunu gösteren deneylerde, çekirdek içindeki yoğunlaşmanın, yaygın ve homojen değil, özellikle belli bölgelerde olduğunu gözlemledik (Şekil 3.1 B). DIC ışık ve floresan

görüntülerininin birleştirilmesi sonucunda, bu toplaşma bölgelerinin çekirdekçik olabileceğini düşündüren görüntüler elde ettik (Şekil 3.3 A). Ayrıca uyarı öncesinde, bazal durumda, çekirdeğinde βarr-2-GFP proteini toplaşmış olan az sayıdaki hücrede de, toplaşma bölgesinin çekirdekçik olabileceğini düşündüren görüntüler elde ettik (Şekil 3.3 B).



Şekil 3.3. A. GFP ile İşaretli βarr-2 Proteininin ve P2X7 Reseptörünün Eksprese Ettirildiği HEK-293 Hücre Serilerinde, ATP Uyarısıyla βarr-2-GFP Proteini Çekirdek İçinde, Çekirdekçiğe Benzer Bir Yapıya Transloke Olmaktadır. B. ATP Uyarısı Yapılmadan Önce, Bazal Durumda, Bazı HEK-P2X7-βarr-2-GFP Hücrelerinde, βarr-2-GFP nin Çekirdekçik Benzeri Bir Yapı İçinde Bulunmaktadır. Hücrelerin konfokal mikroskopta, aynı anda hem DIC ışık hem de floresans görüntüleri alınmıştır. Bu görüntüler birleştirilerek, βarr-2-GFP proteinin çekirdekte hangi bölgede yoğunlaştığı araştırılmıştır. ATP uyarısı öncesinde, bazal koşullarda, çekirdeklerinde βarr-2-GFP varlığı saptanabilen hücreler, tüm hücrelerin % 4.3 ± 1.2 ünü oluşturur.

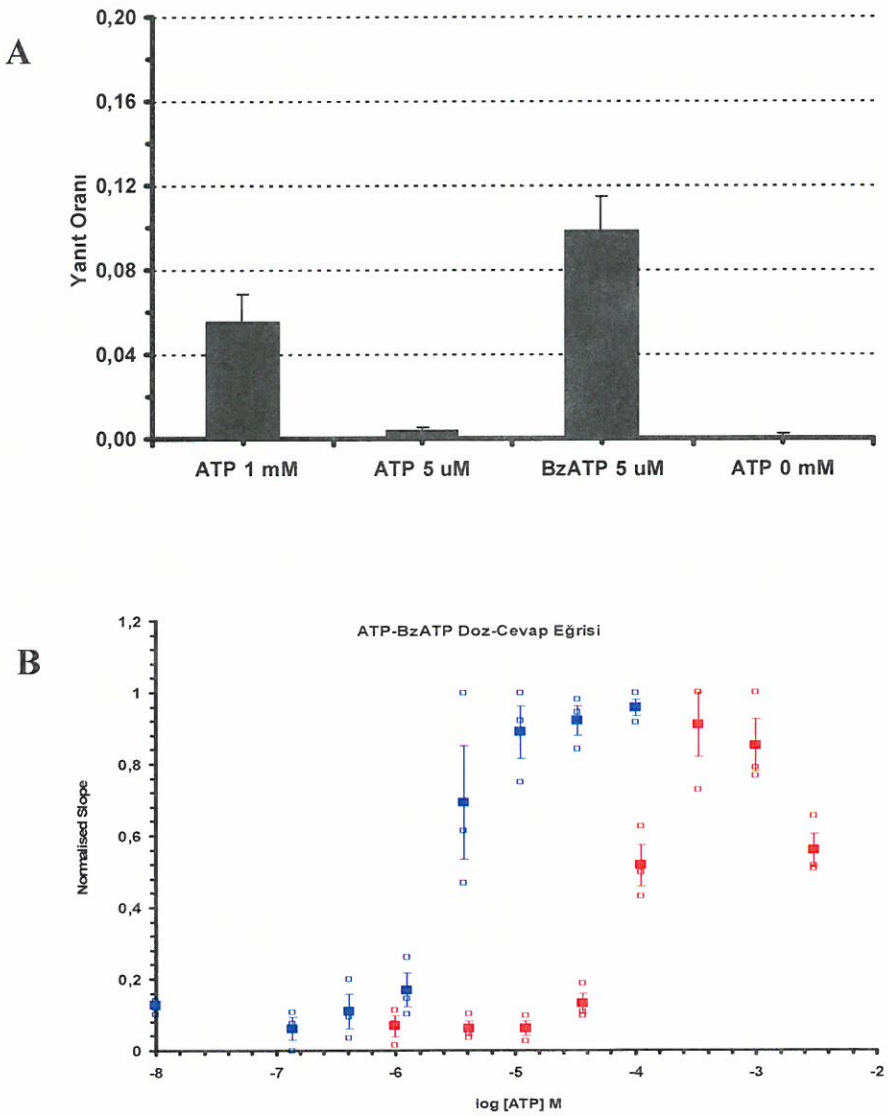
3.2. βarr-2-GFP Proteininin Çekirdeğe Translokasyonu P2X7 Reseptörünün Uyarılması ile Oluşmaktadır

Yukarıda açıklanan deneylerde βarr-2-GFP yer değiştirme yanıtının sadece P2X7R eksprese eden hücrelerde oluştuğu, P2X7R eksprese etmeyen hücrelerde böyle bir yanıt oluşmadığı gösterilmiştir, bu da bu yanıtın P2X7R uyarısına bağlı olduğunu düşündürmektedir. Bu bölümde de bu yer değiştirme yanıtının gerçekten hücrelerin eksprese ettikleri P2X7R uyarısı ile oluşup oluşmadığının net bir şekilde anlaşılması için aşağıda belirtilen ek deneyler yapılmıştır.

3.2.1. βarr-2-GFP Proteininin Çekirdeğe Translokasyonu Yanıtı, ATP nin Etkili Olmadığı Düşük Derişimlerde BzATP ile Oluşturulabilmektedir

Bu bölümde HEK-P2X7-βarr-2-GFP hücrelerinde ATP uyarısı ile oluşan βarr-2-GFP yer değiştirme yanıtının, P2X7R'lerinde ATP'ye göre daha etkin olduğu bilinen BzATP agonistine (Donnelly-Roberts ve ark, 2009; Suprenant ve ark,1996; North R.A., 2002; Evans ve ark, 1995; Bianchi ve ark, 1999) daha duyarlı olup olmadığı incelenmiştir. Bu amaçla paralel deneylerde bir grup hücreye BzATP diğer grup hücreye ATP aynı derişimde uygulanmıştır. Dozlar tedrici olarak azaltılarak ATP ile yanıtın oluşmadığı ancak BzATP'nin belirgin bir yanıt oluşturduğu doz (5 μM) bulunmuştur. Konfokal mikroskopta HEK-P2X7-βarr-2-GFP hücrelerine 5 μM ATP veya kontrol olarak deney çözeltisi (ATP içermeyen deney çözeltisinin uygulaması) uygulanmıştır. 5 μM ATP uygulanmış hücreler, ATP uygulanmayan kontrol hücreleriyle karşılaştırıldığında, ölçülebilir bir yanıt (βarr-2-GFP proteininin çekirdeğe translokasyon yanıtı) oluşmadığı gözlenmiştir (Şekil 3.4 A). Bu deneylere paralel olarak BzATP, ATP ile aynı derişimde (5 μM) kullanılıp, oluşan yanıt kontrol hücreleriyle karşılaştırıldığında, 5μM BzATP'nin belirgin bir yanıt oluşturduğu görülmektedir (Şekil 3.4 A). Ayrıca BzATP ile oluşan yanıt, aynı gün yapılan 1mM ATP uygulaması ile oluşan yanıtla karşılaştırıldığında bu yanıtların oldukça benzer büyüklükte olduğu da gözlenmiştir (Şekil 3.4 A). Bahsedilen bütün bu deneyler paralel olarak yapılmıştır. Yedi gün yapılan 8 ayrı deneyde, yanıt veren hücrelerin

oranı BzATP (5μM) için % 9.8 ± 1.6 (1013 hücre); ATP (1mM) için % 5.6 ± 1.3 (803 hücre); ATP (5μM) için % 0,4 ± 0,2 (915 hücre); ATP kontrolü için (0 mM) % 0,1 ± 0,1 (833 hücre); olarak bulunmuştur.



Şekil 3.4 A. βarr-2-GFP Proteininin Çekirdeğe Translokasyonu Yanıtının , ATP'nin Etkili Olmadığı Düşük Derişimlerde BzATP ile Oluşturulabileceğinin Gösterilmesi. HEK-P2X7-βarr2-GFP hücrelerine ATP 1 mM, ATP 5 μM, BzATP 5 μM ve Kontrol (ATP 0 mM) uygulaması yapılmıştır. 5 μM ATP uygulanmış hücrelerin yanıtları, ATP uygulanmamış hücrelerin yanıtları ile karşılaştırıldığında belirgin bir yanıt gözlenmemiştir. Ancak 5 μM BzATP, 5 μM ATP ve 0 μM ATP yanıtları ile karşılaştırıldığında, ölçülebilir bir yanıt oluşturmaktadır. 5 μM BzATP ile oluşan yanıtlar 1 mM ATP ile oluşan yanıtlara benzer büyüklüktedir. Grafikte gösterilen sonuçlar aynı gün, paralel yapılan deneylerin sonuçlarıdır. Görüntü toplanması ve deney koşulları bölüm 3.1 ile tamamen aynıdır. Bahsedilen bütün bu deneyler aynı gün ve paralel olarak yapılmıştır. 7 gün yapılan 8 ayrı deneyde, BzATP (5μM) için toplam hücre sayısı 1013 hücre; ATP (1mM) için 803; ATP (5μM) için 915 hücre; ATP kontrolü için 833 hücre olarak bulunmuştur. **B. ATP ve BzATP Agonistleri Uygulanan HEK-P2X7 Hücrelerinde YoPro-1 Yanıtı Ölçülerek Elde edilen Doz-Cevap Eğrileri.** HEK-P2X7 hücrelerinde oluşan YoPro-1 yanıtlarında BzATP, ATP agonistine göre daha potent bir agonisttir. Yanıtın büyüklüğü olarak hücreden gelen YoPro-1 floresansının zamanla artış grafiğinin eğimi (ortalama geçirgenlik

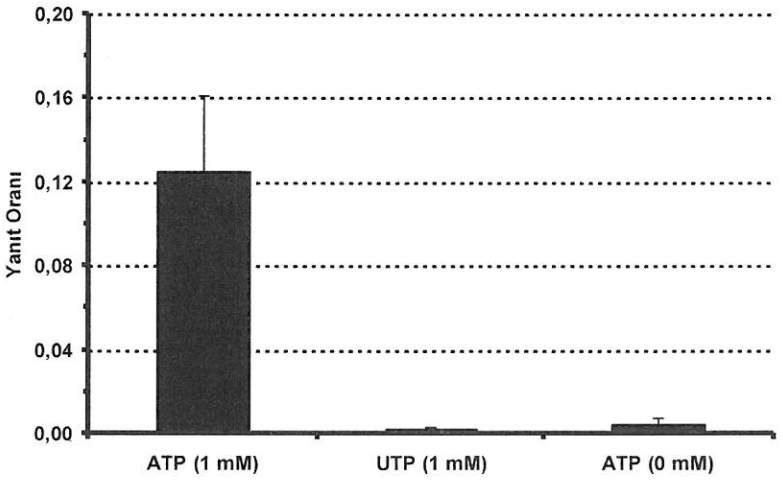
artışı) kullanılmıştır. Yanıtlar maksimum yanıta oranlanarak gösterilmiştir. **Mavi** renkteki eğri BzATP'nin, **kırmızı** renkteki ise ATP'nin doz-cevap eğrisini göstermektedir.

Bu çalışmamızda, diğer yapılan çalışmalarda gözlendiği gibi (Jacobson ve ark., 2002) BzATP'nin P2X7 reseptöründe ATP'ye göre daha potent bir agonist olduğunu doğrulamak için, HEK-P2X7 hücrelerinde bir DNA boyası olan ve hücre içerisine normal koşullarda giremeyen YoPro-1 floresan boyasının ATP ve BzATP uyarısı ile hücre içerisine girişi takip edilerek, hem ATP hem de BzATP için doz-yanıt ilişkisi belirlenmiştir. Bu doz cevap eğrileri, Perkin Elmer, EnVision spektroflorimetrik plate okuyucusu kullanılarak, plate okuyucunun ısıtıcısı sayesinde 37°C elde edilmiştir. Agonist uygulamasını takiben 490 nm'de uyarılan hücrelerden 510 nm de her 30 saniyede bir 15 dakika süre ile YoPro-1 floresansı ölçülmüş ve bu yolla P2X7 yanıtı takip edilmiştir. Bu yanıt kullandığımız HEK-P2X7 hücrelerinde sadece P2X7R'ne bağlı gelişen bir yanıttır, daha önceden bir çok çalışma ile (North R.A ve Suprenant A., 2000; North R.A., 2002; Sayar ve ark, 2009) bu hücrelerde karakterize edilmiştir. Yanıtın büyüklüğü olarak hücreden gelen YoPro-1 floresansının zamanla artış grafiğinin eğimi (ortalama geçirgenlik artışı) kullanılmıştır.Yapılan deney sonucunda, P2X7 yanıtında BzATP'nin ATP'ye göre daha potent bir agonist olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.4 B)

Elde edilen bu doz-cevap eğrileri, yukarıda açıklanan 5 µM BzATP ile çekirdeğe translokasyon yanıtının oluştuğu, ancak aynı derişimdeki ATP ile oluşmadığı bilgisi ile birleştirildiğinde, bu translokasyon yanıtının P2X7 reseptörü aracılığı ile olduğu fikri güçlenmektedir (Şekil 3.4 B).

3.2.2 P2Yleri Aktive Eden Derişimlerde Uygulanan P2 Agonistleri; UTP ve ADP Yanıt Oluşturmamaktadır

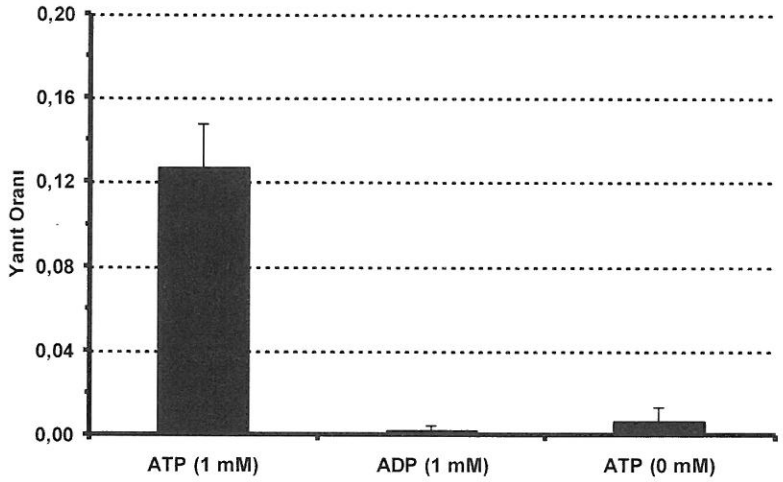
Bu bölümde sunulan deneylerde, P2X7R için iyi agonist olmayan ancak P2YR'ler için agonist olan UTP ve ADP (Jacobson ve Boeynaems, 2010) ile βarr-2-GFP yer değiştirme yanıtının oluşup oluşmadığı araştırılmıştır. Bu agonistlerin uygulanan derişimlerde HEK-293 hücrelerindeki P2Y reseptörlerini aktive edebildiği hücre içi Ca^{+2} derişimindeki artış ölçülerek, gösterildikten sonra (sonuçlar gösterilmemiştir), HEK-P2X7-βarr2-GFP hücrelerine 1 mM ADP, UTP, ATP ve ATP içermeyen kontrol (ATP içermeyen deney çözeltisi uygulaması) uygulamaları yapılmıştır. Hücrelerin deneye hazırlanması ve deney koşulları bölüm 3.1 de yapılan deneyler ile tamamen aynıdır.



3.5. HEK-P2X7-βarr-2-GFP Hücrelerinde ATP Uyarısıyla Oluşan βarr-2-GFP Proteininin Çekirdeğe Translokasyon Yanıtı, 1mM UTP Uygulaması ile Oluşmamaktadır. HEK-P2X7-βarr2-GFP hücrelerine 1 mM ATP, UTP ve kontrol (0 mM ATP) uygulamaları yapılmıştır. ATP (1 mM) uygulaması ile belirgin bir yanıt oluşurken, UTP uygulaması ile βarr-2-GFP dağılımında görünür bir değişme olmamıştır ATP(1 mM) uygulaması ile 8 gün 9 ayrı deney (toplam 845 hücre), UTP uygulaması ile 7 gün 7 ayrı deney (toplam 917 hücre) ve ATP(0 mM) ile de 4 gün 4 ayrı deney (toplam 470 hücre) yapılmıştır. Grafiklerde gösterilen bütün sonuçlar, aynı gün, paralel yapılan deneylerden elde edilmiştir.

Konfokal mikroskopta HEK-P2X7-βarr2-GFP hücrelerine 1mM ATP uygulaması sonrasında, βarr-2-GFP proteininin çekirdeğe translokasyon yanıtının indüklendiği gözlenirken (% 12,5 ± 3,6 ve %12,7 ± 2,1 sırası ile UTP ve ADP deneyleri ile paralel yapılan ATP (1mM) deneylerine ait ortalamalar), paralel yapılan deneylerde aynı

derişimde UTP (% 0,2 ± 0,1) (Şekil 3.5) veya ADP (% 0,2 ± 0,2) (Şekil 3.6) uygulandığında kontrol (ATP 0 mM) hücrelerindekine benzer düşük bir yanıt gözlenmiştir (UTP deneyleriyle birlikte yapılan ATP 0 uygulamasıyla, % 0,4 ± 0,3; ADP deneyleriyle birlikte yapılan ATP 0 uygulamasıyla, % 0,6 ± 0,6).

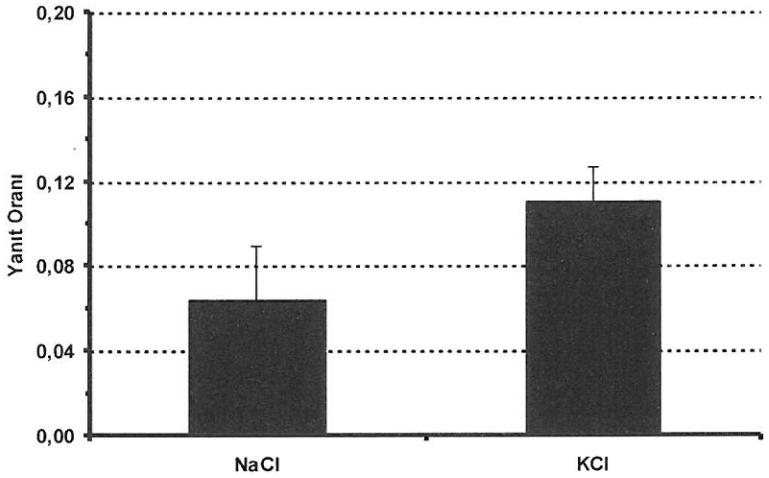


3.6. HEK-P2X7-βarr-2-GFP Hücrelerinde ATP Uyarısıyla Oluşan βarr-2-GFP Proteininin Çekirdeğe Translokasyon Yanıtı, 1mM ADP Uygulaması ile Oluşmamaktadır. HEK-P2X7-βarr-2-GFP hücrelerine 1 mM ATP, ADP ve kontrol (0 mM ATP) uygulamaları yapılmıştır. ATP (1 mM) uygulaması ile belirgin bir yanıt oluşurken, ADP uygulaması ile βarr-2-GFP dağılımında görünür bir değişme olmamıştır. ATP(1 mM) uygulaması ile 4 gün 5 ayrı deney (toplam 427 hücre), ADP uygulaması ile 3 gün 4 ayrı deney (toplam 496 hücre) ve ATP(0 mM) ile de 2 gün 2 ayrı deney (toplam 225 hücre) yapılmıştır. Grafiklerde gösterilen bütün sonuçlar, aynı gün, paralel yapılan deneylerden elde edilmiştir.

3.2.3. GFP ile İşaretli βarr-2 Proteininin ve P2X7 Reseptörünün Eksprese Ettirildiği HEK-293 Hücre Serisinde, ATP Uyarısıyla Oluşan βarr-2-GFP Proteininin Çekirdeğe Translokasyon Yanıtı NaCl Deney Çözeltisinde Azalmaktadır

ATP uyarısıyla βarr-2-GFP proteininin çekirdeğe translokasyon yanıtının gözlendiği ve KCl deney çözeltisinde yapılan deneyler NaCl deney çözeltisi ile de aynen tekrarlanmıştır. Literatürde Na^+ iyonlarının P2X7 reseptörü yanıtlarını azalttığı bilinmektedir. Bu bölümde yapılan paralel deneyler sonucunda, NaCl deney çözeltisinde oluşan βarr-2-GFP proteininin çekirdeğe translokasyon yanıtının ortalama büyüklüğü, KCl deney çözeltisinde oluşan ortalama yanıt büyüklüğü ile karşılaştırıldığında bir azalma görülmektedir (Şekil 3.7). NaCl deney çözeltisinde 5

günde yapılan 8 ayrı deneyde toplam 731 hücreden yapılan ölçümde yanıt oranı % 6,4 ± 2,5 olarak bulunmuştur. KCl deney çözeltisinde ise 5 günde, 6 ayrı deneyde toplam 515 hücreden yapılan ölçümde yanıt veren hücre oranı % 11,1 ± 1,6 olarak bulunmuştur.



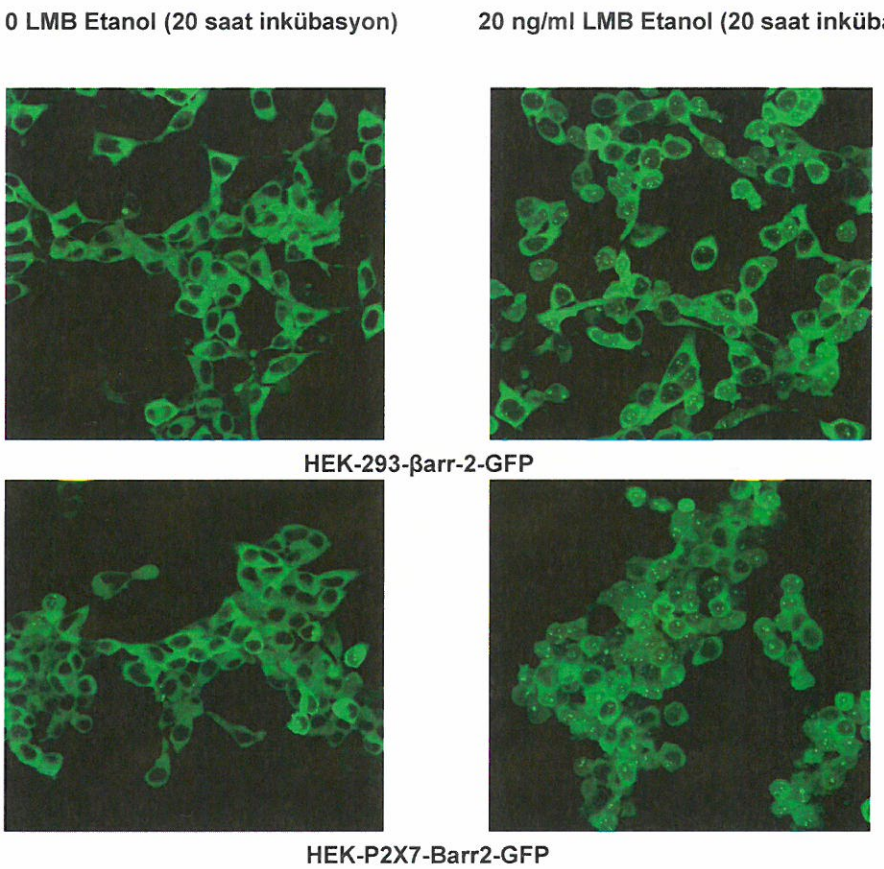
Şekil 3.7. GFP ile İşaretli βarr-2 Proteinini ve P2X7 Reseptörünü Eksprese Eden HEK-293 Hücre Serisinde, ATP Uyarısıyla βarr-2-GFP Proteininin Çekirdeğe Translokasyon Yanıtı, NaCl Deney Çözeltisinde KCL Deney Çözeltisi İle Karşılaştırıldığında Azalmaktadır. Her iki deney çözeltisi içindeki hücrelere ATP (1 mM) uygulanmış ve 25 dakika sonunda oluşan yanıt ölçülmüştür. NaCl çözeltisinde 5 gün 8 ayrı deney, KCl deney çözeltisinde ise 5 gün 6 ayrı deney yapılmıştır. NaCl deney çözeltisinde yapılan deneylerde toplam 731 hücre, KCl deney çözeltisinde yapılan deneylerde ise toplam 515 hücre sayılmıştır.

3.3. ATP Uyarısı ile Oluşan βarr-2-GFP Proteininin Çekirdeğe Translokasyonu Yanıtının Hangi Mekanizma ile Oluştuğunun Araştırılması

3.3.1. NES Pompası Blokörü Olan Leptomycin B Uygulaması ile βarr-2-GFP Proteini Çekirdeğe Transloke Olmaktadır

Bilindiği gibi βarr-2 proteini NES pompası tarafından sürekli aktif olarak hücre çekirdeği dışına taşınmaktadır (örnek olarak; Scott ve ark., 2002; Wang ve ark., 2003), dolayısı ile çekirdek içindeki derişimi sitoplazmaya göre belirgin olarak azdır. ATP uyarısı sonucunda βarr-2 proteinin çekirdeğe (ya da çekirdekçik olduğunu düşündüğümüz bölgeye) toplanması iki ana mekanizma ile (ya da bunların

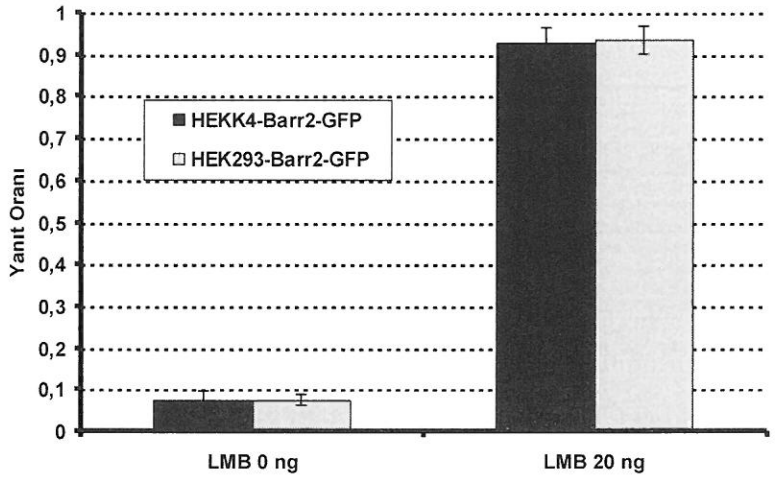
kombinasyonu ile) olabilir; 1) βarr-2'nin çekirdeğe (çekirdekçikteki bir proteine) bazal bir afinetisi olabilir. Ancak dinlenim durumundaki hücrelerde çekirdekçikteki bağlanmanın az olması, NES pompası tarafından βarr-2 derişiminin çekirdekte düşük tutulmasından kaynaklanıyor olabilir. ATP ile P2X7 uyarısı, NES pompasını inhibe ederek veya çekirdeğin bu proteine geçirgenliğini arttırarak bu proteinin çekirdek içi derişimini, dolayısı ile de çekirdekçiğe bağlanmasını, arttırabilir. 2) ATP uyarısı βarr-2 ile çekirdekçik arasındaki etkileşimi güçlendiriyor olabilir (görünür afinitede artış). Bunun sonucu bağlanma dengesi çekirdekçik lehine kayabilir.



3.8. HEK-P2X7-βarr-2-GFP ve HEK-293-βarr-2-GFP Hücrelerinde NES Pompası LMB ile Bloke Edildiğinde, Hücrelerin Çok Büyük Bir Kısmında βarr-2-GFP Proteini Çekirdeğe Lokalize Olmaktadır. Hücreler serumsuz DMEM içinde hazırlanmış 20 ng/ml LMB de 20-22 saat inkübe edilmiştir. Kontrol olarak hem HEK-293-βarr-2-GFP hem de HEK-P2X7-βarr-2-GFP hücreleri LMB nin çözücüsü olan etanolde aynı süre inkübe edilmiştir.

Bu bölümde yukarıda bahsettiğimiz hipotezlerin hangisinin doğru olduğunu araştırmak için ilk olarak NES pompası, 20 ng/ml derişimindeki Leptomycin B kullanılarak inhibe edilmiş, sonrasında HEK-P2X7-βarr-2-GFP ve HEK-293-βarr-2-GFP hücrelerinde çekirdekte (çekirdekçikte) bir βarr-2-GFP toplanması olup

olmadığı konfokal mikroskop aracılığı ile gözlenmiştir. Hücreler serumsuz DMEM içerisinde, 20 ng/ml derişimindeki Leptomycin B ile 20-22 saat inkübe edilmiştir. Kontrol olarak hücreler LMB nin çözücüsü olan etanolde aynı süre inkübe edilmiştir. LMB inkübasyonunu takiben, herhangi bir agonist uygulaması yapılmamış, bazal durumdaki hücrelerden elde edilen görüntülerde, çekirdekçiğinde bariz GFP floresansı gösteren hücrelerin toplam hücrelere oranı ölçülmüştür. 20 ng/ml LMB uygulanmış HEK-P2X7-βarr-2-GFP ve HEK-293-βarr-2-GFP hücrelerinde βarr-2-GFP proteini çekirdekte belirgin bir toplaşma göstermiştir (Şekil 3.8).



3.9. LMB İnkübasyonu Yapılan, HEK-P2X7-βarr-2-GFP ve HEK-293-βarr-2-GFP Hücrelerinde, LMB Uygulanmayanlara Kıyasla βarr-2-GFP Proteininin Çekirdekte Toplaşması Belirgin Bir Şekilde Artmıştır. LMB etkisinin ölçümü, çekirdekte βarr-2-GFP toplanması gösteren hücre sayısının toplam hücre sayısına oranı bulunarak yapılmıştır. LMB uygulaması yapılan HEK-P2X7-βarr-2-GFP hücrelerinde 5 gün, 10 ayrı deney (toplam 1921 hücre), LMB uygulaması yapılmayan HEK-P2X7-βarr-2-GFP hücrelerinde ise 7 gün, 7 ayrı deney (toplam 1913 hücre) yapılmıştır. Ayrıca LMB uygulaması yapılan HEK-293-βarr-2-GFP hücrelerinde 3 gün, 4 ayrı deney (toplam 498 hücre), LMB uygulaması yapılmayan HEK-293-βarr-2-GFP hücrelerinde ise 3 gün, 3 ayrı deney (toplam 378 hücre) yapılmıştır.

Deneyden elde edilen oranlar incelendiğinde, hem P2X7R eksprese eden hem de etmeyen HEK-293 hücrelerinde LMB uygulaması, LMB uygulanmayan hücrelere kıyasla, βarr-2-GFP proteininin çekirdekte toplaşmasını belirgin bir şekilde arttırmıştır (Şekil 3.9). 20 ng/ml LMB uygulaması yapılan HEK-P2X7-βarr-2-GFP hücrelerinde 5 gün, 10 ayrı deney yapılarak, toplam 1921 hücreden yapılan ölçümde yanıt oranı % 92,8 ± 4, LMB uygulaması yapılmayanlar da ise 7 gün, 7 ayrı deney yapılarak, toplam 1913 hücreden yapılan ölçümde yanıt oranı % 7,5 ± 2.1 olarak bulunmuştur. Ayrıca 20 ng/ml LMB uygulaması yapılan HEK-293-βarr2-GFP

hücrelerinde 3 gün, 4 ayrı deney yapılarak, toplam 498 hücreden yapılan ölçümde yanıt oranı % 93,7 ± 3,5, LMB uygulaması yapılmayanlarda ise 3 gün, 3 ayrı deney yapılarak, toplam 378 hücreden yapılan ölçümde yanıt oranı % 7,6 ± 1,2 olarak bulunmuştur.

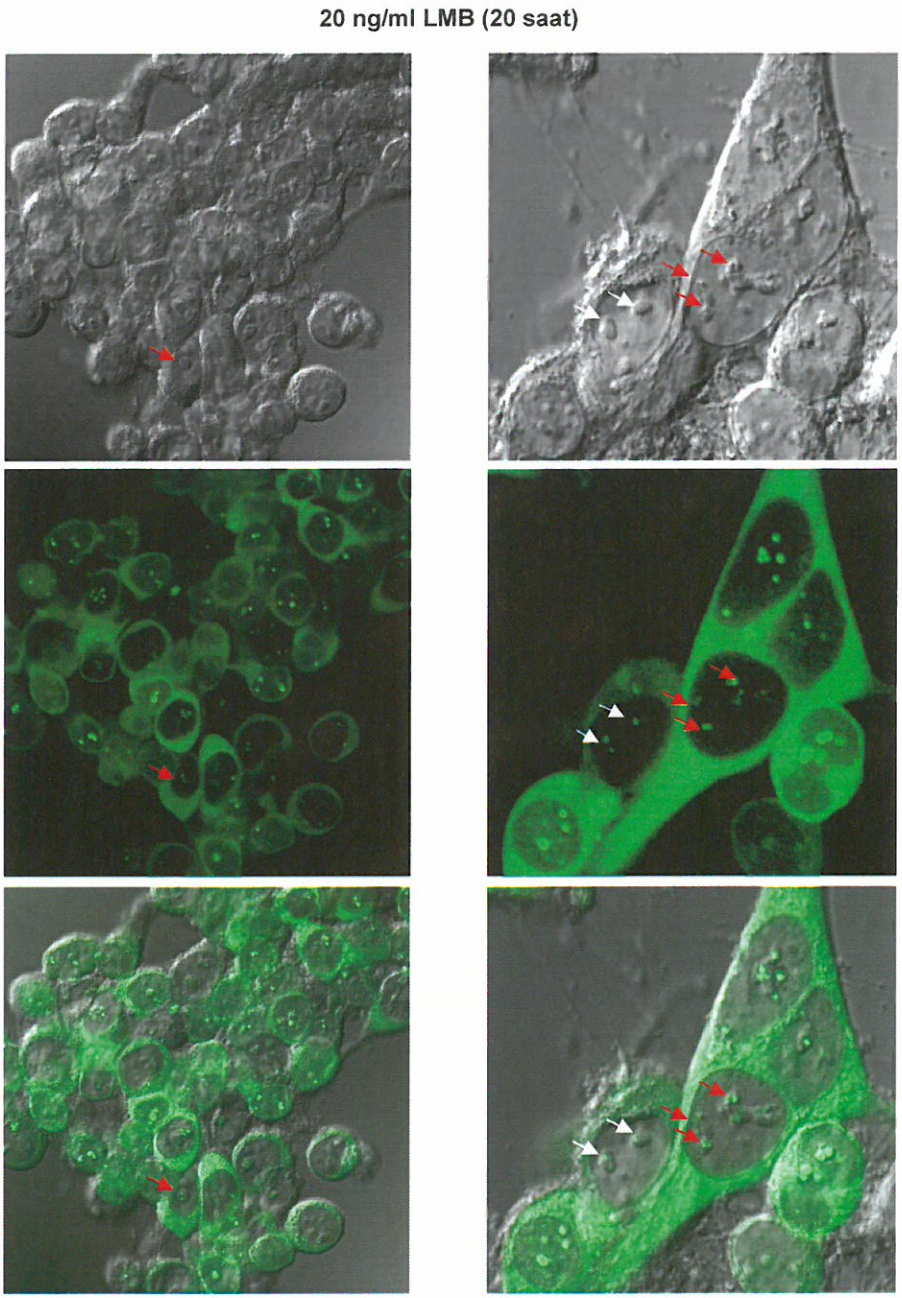
Hem HEK-P2X7-βarr-2-GFP hem de HEK-293-βarr-2-GFP hücrelerinde yapılan LMB deneylerinde, hücrelerin, aynı anda hem DIC hem de floresans görüntüleri alınmıştır. Bu görüntüler birleştirilerek, çekirdekte bulunan βarr-2-GFP proteinin aslında çekirdek içinde çekirdekçiğe benzer bir yapıda lokalize olduğu gösterilmiştir (Şekil 3.10).

Bu yapılan deneyler ile yukarıda belirttiğimiz hipotezlerden ikincisinin doğru olup olmadığı tam olarak anlaşılamamışsa da, βarr-2 proteininin P2X7 reseptörü eksprese etmeyen ve eden hücrelerin her ikisinde de, NES taşıyıcısının LMB ile inhibe edilmesi sonucu çekirdekçikte toplanması bu proteinin bu hücrelerin çekirdekçiğinde, P2X7R uyarısı gerektirmeyen, bazal bir afinitesi olduğunu ve buraya bağlanmasının, proteinin çekirdek içindeki derişiminin düşük olması nedeni ile az olduğunu kuvvetle düşündürmektedir.

3.3.2. Lucifer Yellow Boyası Kullanılarak P2X7 Reseptörünün Aktivasyonu Sonucunda Membran Bütünlüğünün Bozulmadığı Deneysel Olarak Gösterilmiştir

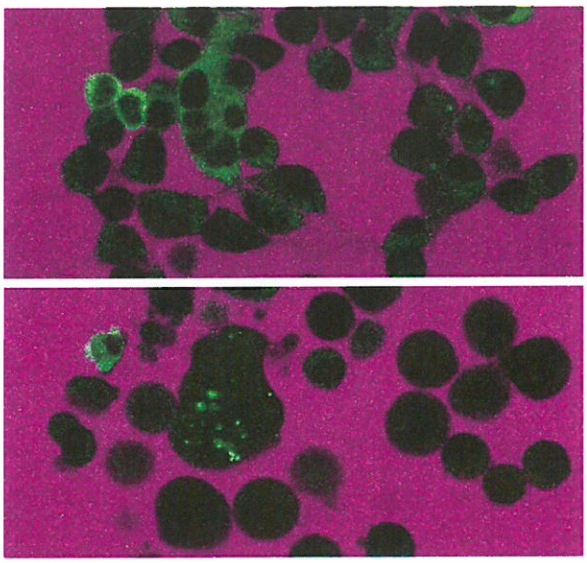
Yukarıdaki deneylerden elde edilen sonuçlardan yola çıkarak hem P2X7 reseptörünü hem de βarr-2-GFP proteinini eksprese eden HEK-293 hücrelerinde, P2X7 reseptörünün ATP ile aktive edilmesiyle βarr-2-GFP proteini sitoplazmadan çekirdeğe transloke olmaktadır. Bu proteinin çekirdeğe translokasyonunun hücre bütünlüğünün bozulmasından kaynaklanmadığını, P2X7 reseptörünün aktive olmasıyla gerçekleştiğini göstermek için, normal koşullarda hücre zarından geçemeyen negatif yüklü Lucifer Yellow boyası (500 μM) ile deneyler yapılmıştır. Deneyler materyal methotta tarif edildiği gibi yapılmıştır. Bu boya hücre içinde de

dışında da floresandır. ATP uyarısı ile yanıt gösteren hücrelerin sitoplazmasına Lucifer Yellow boyasının girip girmediği konfokal mikroskop ile takip edilmiştir.



Şekil 3.10. HEK-P2X7-βarr-2-GFP ve HEK-293-βarr-2-GFP Hücrelerinde NES Pompası LMB ile Bloke Edildiğinde, βarr-2-GFP Proteini Çekirdek İçinde Çekirdekçik Benzeri Bir Yapıda Toplanmaktadır. Hücreler serumsuz DMEM içinde hazırlanmış 20 ng/ml LMB de 20-22 saat inkübe edilmiştir. Hücrelerin konfokal mikroskopta, aynı anda hem DIC ışık hem de floresans görüntüleri alınmıştır. Bu görüntüler birleştirilerek, βarr-2-GFP proteinin çekirdekte ve çekirdekçikte lokalize olduğu gösterilmiştir.

Alınan görüntülerden βarr-2-GFP proteininin çekirdeğe translokasyonu yanıtını veren hücrelerde bu boyanın hücre dışından sitoplazmaya geçmediği gözlenmiştir (Şekil 3.11). Yukarıda Hoecht boyası ile yapılan deneyde açıkladığımız gibi, GFP ile işaretli βarr-2 proteini ve Lucifer Yellow ayrı ayrı uyarılarak, her iki florofor için ardışık görüntüler elde edilmiştir.

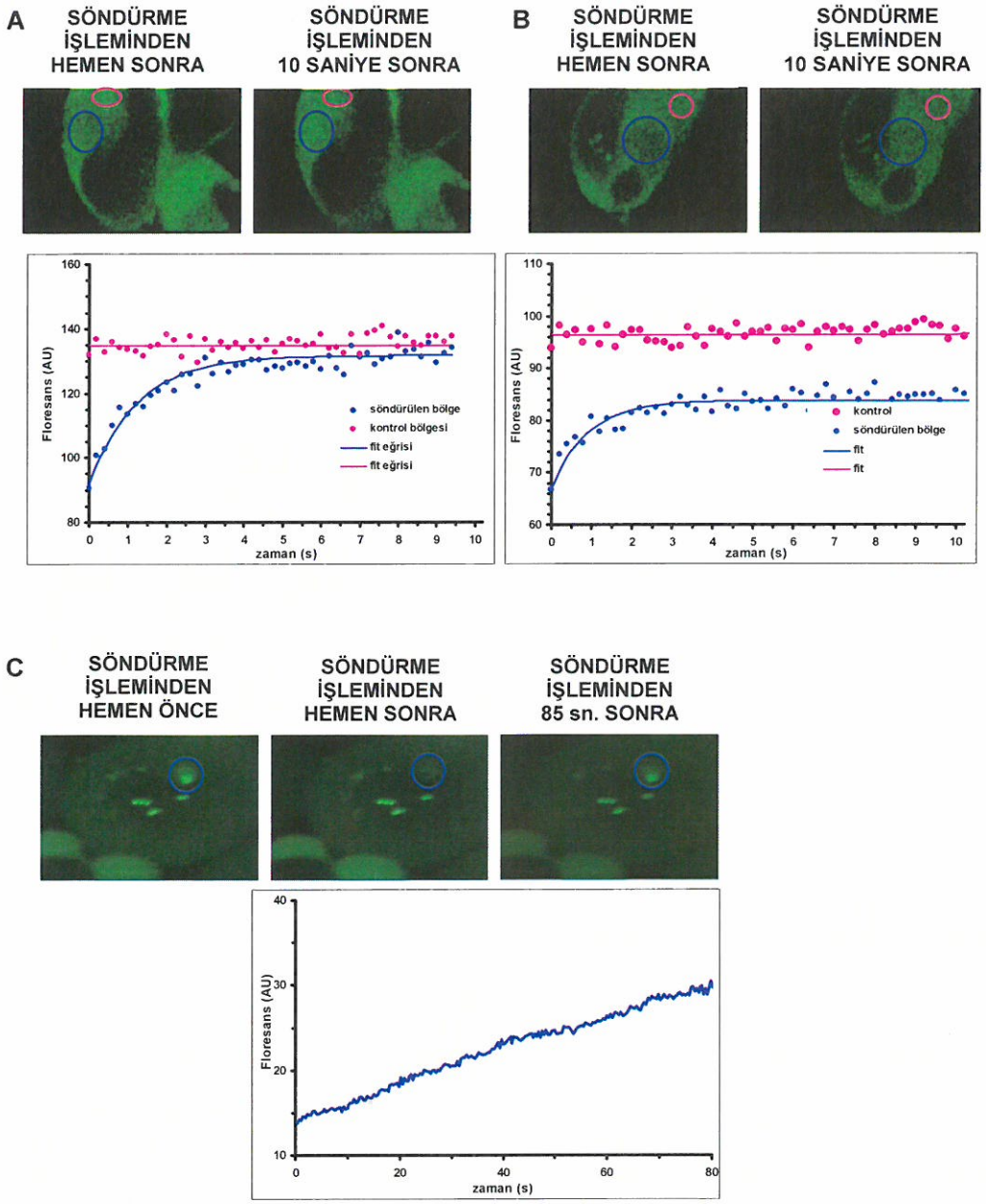


3.11. ATP (1mM) Uygulanmış HEK-P2X7-βarr-2-GFP Hücrelerinde Lucifer Yellow Boyası ile Hücre Bütünlüğünün Korunduğu Gösterilmektedir. (A) ATP (1mM) Uygulanmadan Önce Lucifer Yellow İçeren Deney Çözeltisindeki HEK-P2X7-βarr-2-GFP Hücrelerinin Görünümü. (B) ATP (1mM) Uygulandıktan 26 Dakika Sonra Aynı Hücrelerin Görünümü. Konfokal mikroskopta GFP ile işaretli βarr-2 proteini ve Lucifer Yellow boyası ayrı ayrı uyarılarak, her iki florofor için ardışık görüntüler elde edilmiştir. Daha sonra bu görüntüler birleştirilmiştir. GFP yeşil, Lucifer Yellow magenta renkle gösterilmiştir. Deneyler materyal methotta anlatıldığı gibi yapılmıştır.

3.3.3. FRAP Yöntemi Kullanılarak βarr-2-GFP Proteinin Sitoplazmadaki ve Çekirdekteki Mobilitesi ve Bağlanma Özellikleri İncelenmiştir

HEK-P2X7-βarr-2-GFP hücrelerinde, hem sitoplazmada difüz olarak bulunan hem de ATP uyarısından sonra çekirdek içinde noktalar halinde toplaşan βarr-2-GFP ile yapılan FRAP (Fluorescence Recovery After Photo Bleaching) deneyleri bu proteinin büyük ölçüde sitoplazmada mobil bir fazda olduğunu gösterdi (Şekil 3.12 A). Ancak bir kaç deneyde proteinin kısmen immobil bir faza da sahip olduğunu gözledik (Şekil 3.12 B). Ayrıca ATP uygulamasını takiben çekirdek içinde toplaşan βarr-2-GFP proteininin floresansında, lazer ile söndürmeyi (bleaching) takiben

oluşan geri dönüş (recovery) proteinin bu toplaşma bölgesine tersinir bir şekilde bağlandığını düşündürmektedir (Şekil 3.12 C).



3.12. ATP (1mM) Uygulanmamış ve Uygulanmış HEK-P2X7-βarr-2-GFP Hücrelerinde FRAP ile βarr-2-GFP Proteininin Mobilitesinin Gösterilmesi. A. ATP (1mM) Uygulanmadan Önce Sitoplazmik Bölgede Difüz Olarak Bulunan βarr-2-GFP Floresansının, Söndürme İşleminden Hemen Sonra Gösterdiği Tam Geri Dönüş. B. Benzer Bir Durumda, Başka Bir Hücrede βarr-2-GFP Floresansının, Söndürme İşleminden Hemen Sonra Gösterdiği Tam Olmayan Geri Dönüş. Ölçümler resimler üzerinde gösterilen bölgelerin floresans değerlerinin ortalamaları alınarak yapılmıştır. Bölgelerden biri söndürme işlemi yapılan alandan, diğeri ise söndürme yapılmayan hemen yakındaki başka bir bölgeden seçilmiştir. Her iki bölgeden gelen ortalama sinyal söndürme işlem,i öncesi aynıdır. **C. ATP (1mM) Uygulanmasından Sonra Çekirdekdeki Toplaşma Bölgesinde de Bulunan βarr-2-GFP Floresansının, Söndürme İşleminden Hemen Sonra Gösterdiği Yavaş Geri Dönüş.** Floresans ölçümü resimde gösterilen bölgeden ortalama alınarak yapılmıştır. Bölge söndürme yapılan bölgeden seçilmiştir. Deneyler materyal methotta tarif edilen şekilde yapılmıştır.

4. TARTIŞMA

Beta arrestin-1 ve 2 (βarr-1 ve βarr-2) G-Proteini Kenetli Reseptör (GPKR) ailesinden pek çok reseptörle etkileşebilen sitoplazmik proteinlerdir. Bu proteinler GPKRlerin desensitizasyonu ve internalizasyonundan, bu reseptörlerin G-proteininden bağımsız hücre içi sinyal iletmelerine kadar pek çok hücresel fonksiyonda önemli role sahiptir (örnek olarak; Luttrell ve Lefkowitz, 2002). P2X7 reseptörü (P2X7R) ise GPKR ailesine ait olmayan, ligand bağımlı iyon kanalı türünde pürinerjik bir reseptördür. Bu reseptörün ilginç bir özelliği, pek çok ligand bağımlı iyon kanalının aksine, agonist ile aktive olduktan sonra küçük iyonların (Na^+, K^+ gibi) yanı sıra, büyük molekül ağırlığına sahip moleküllerin hücre zarından geçişine izin veren bazı yolakları açmasıdır.

Canlı hücrelerde konfokal mikroskopi kullanarak yaptığımız deneylerde P2X7R'nü ve GFP işaretli βarr-2 füzyon proteinini (βarr-2-GFP) birlikte eksprese eden HEK-293 hücrelerinin (HEK-P2X7-βarr-2-GFP) bir bölümünde ATP (1 mM) uygulamasından 10-15 dakika sonra başlayan ve βarr-2-GFP'nin hücre içi dağılımının belirgin bir şekilde değiştiği bir yanıt gözledik. Uyarı öncesinde, literatürde bildirilenlerle uyumlu olarak (örnek olarak; Wang ve ark., 2003), sitoplazmik homojen bir dağılım gösteren ve çekirdekten dışlanan βarr-2-GFP'nin, ATP uyarısı ile bazı hücrelerde büyük oranda çekirdeğe toplandığını (Şekil 3.1 B ve Şekil 3.2), bu toplaşmanın çekirdek içerisinde homojen olmayıp çekirdeğin bir alt bölgesinde lokalize olduğunu izledik. DIC ve floresan görüntülerin birleştirilmesi sonucunda toplaşmanın olduğu bu çekirdek bölgesinin çekirdekçik olabileceğini kuvvetle düşündüren görüntüler elde ettik (Şekil 3.3 A). P2X7R eksprese etmeyen ancak βarr-2-GFP eksprese eden hücrelere (HEK-293-βarr-2-GFP) ATP (1 mM) uygulandığında (Şekil 3.1 D), ya da ATP uyarısı yapılmayan HEK-P2X7-βarr-2-GFP hücrelerinde (Şekil 3.1 A) bu davranış çok düşük oranda gözlendi. Bu bulgular HEK hücrelerinde gözlemlediğimiz ATP uygulaması ile oluşan βarr-2-GFP yer değiştirmesinin P2X7 reseptörü aracılığı ile oluştuğunu düşündürmektedir.

HEK-P2X7 hücrelerinde oluşan βarr-2-GFP yer değiştirme yanıtının P2X7R'lerinde ATP'ye göre daha etkin olduğu bilinen BzATP agonistine (Donnelly-Roberts ve ark, 2009; Suprenant ve ark,1996; North R.A., 2002; Evens ve ark, 1995; Bianchi ve ark, 1999) daha duyarlı olup olmadığı ölçülmüştür. 5 μM ATP ve 5 μM BzATP uygulanmış HEK-P2X7-βarr-2-GFP hücrelerinde oluşan yanıt, ATP uygulanmayan kontrol hücrelerinin yanıtları ile karşılaştırıldığında 5 μM ATP'nin ölçülebilir bir yanıt (βarr-2-GFP proteininin çekirdeğe translokasyon yanıtı) oluşturmadığı, 5 μM BzATP'nin ise ölçülebilir bir yanıt oluşturduğu gösterilmiştir (Şekil 3.4 A). Ayrıca 5 μM BzATP'nin 1mM ATP yanıtı ile benzer büyüklükte yanıtların oluştuğu izlenmiştir (Şekil 3.4 A). ATP ile 1 mM derişimde yanıt alınması ve 5 μM derişimde yanıt alınamaması, aynı şekilde BzATP ile 5 μM derişimde maksimuma yakın bir yanıt alınabilmesi P2X7 reseptörü için elde ettiğimiz YoPro-1 doz cevap eğrileri ile uyumludur (3.4 B). Aynı şekilde P2X7R için iyi bir agonist olmayan ancak P2YR ler için agonist olduğu bilinen UTP ve ADP (Jacobson ve Boeynaems, 2010) ile yapılan deneylerde, ölçülebilir bir yanıt oluşmadığı gözlenmiştir (Şekil 3.5 ve Şekil 3.6). Bütün bu çeşitli farmakolojik araçlar kullanılarak elde edilen bulgular ATP uygulaması ile gözlenen βarr-2-GFP yer değiştirme yanıtını oluşturan reseptörün, P2X7R olduğuna işaret etmektedir. Ayrıca ATP uygulaması hem KCl hem de NaCl deney çözeltisinde tekrarlanmıştır. ATP uygulaması NaCl deney çözeltisinde yapıldığında oluşan βarr-2-GFP proteininin çekirdeğe translokasyon yanıtı, KCl deney çözeltisinde oluşan yanıt ile karşılaştırıldığında yanıt oluşan hücre oranının daha az olduğu görülmüştür (Şekil 3.7). Bu da HEK-P2X7 hücrelerinde ATP uyarısı ile hücre içi yerleşimini değiştirmesine aracılık eden ATP-reseptörünün P2X7R olduğuna ek bir delil teşkil etmektedir.

βarr-2 proteininin NES pompası tarafından sürekli aktif olarak hücre çekirdeği dışına taşındığı bilinmektedir, dolayısı ile çekirdek içindeki derişimi sitoplazmaya göre belirgin olarak azdır. ATP uyarısı sonucunda βarr-2'nin çekirdeğe (ya da çekirdekçik olduğunu düşündüğümüz bölgeye) toplanması iki ana mekanizma ile (ya da bunların kombinasyonu ile) olabileceğini düşündük; 1) βarr-2'nin çekirdekte ve özellikle de çekirdekçikte bir proteine ya da diğer makro moleküllere belirli ve sabit bir afinetisi olabilir. Ancak dinlenim durumundaki hücrede çekirdekçikteki bağlanmanın az

olması, NES pompası tarafından βarr-2 derişiminin çekirdekte düşük tutulması nedeni ile olmaktadır. ATP uyarısı, NES pompasını inhibe ederek veya çekirdeğin bu proteine geçirgenliğini arttırarak bu proteinin çekirdek içi derişimini, dolayısı ile de çekirdekteki bağlanma bölgelerine (ya da çekirdekçiğe) bağlanmasını arttırıyor olabilir. 2) ATP uyarısı βarr-2 ile çekirdekteki (ya da çekirdekçikdeki) bağlanma bölgesi arasındaki affiniteyi arttırıyor olabilir. Bunun sonucunda da βarr-2'nin çekirdekteki (ya da çekirdekçikteki) bağlanması artabilir. Yaptığımız FRAP deneyleri sitoplazmadaki βarr-2 proteininin büyük kısmının mobil fazda olduğunu ve ATP uyarısı sonrası çekirdekte toplandıkları bölgeye ise tersinir bir şekilde bağlandıklarını düşündürmektedir. Dolayısı ile yukarıda hipotez edilen mekanizmaların çalışabilmesi için gerekli ön koşullar sağlanmaktadır.

Bu hipotezlerden hangisinin doğru olduğunun anlaşılması amacı ile NES pompasını doğrudan inhibe ederek βarr-2nin çekirdek içi derişimini arttırmayı ve bu proteinin, P2X7 uyarısından sonra olana benzer bir şekilde, çekirdek içinde belli bölgelerde toplanıp toplanmayacağını inceledik. NES inhibitörü LMB (5 ng/ml) ile hücrelerin 20 saat inkübe edilmesi sonrası HEK-293-βarr-2-GFP ve HEK-P2X7-βarr-2-GFP hücrelerinin önemli bir kısmında çekirdekte, belli bölgelerde bir βarr-2-GFP toplaşması olduğu gözlendi (Şekil 3.8). LMB inkübasyonu yapılmayan grupta ise bu toplaşma çok daha azdı (Şekil 3.8 ve 3.9). Bu deneylerde de daha önce yaptığımız şekilde DIC ve floresans görüntüleri birleştirilerek βarr-2-GFP proteininin çekirdekçik benzeri yapılarda toplandığı gözlenmiştir (Şekil 3.10). Literatürde LMB kullanılan çalışmalarda, βarr-2-GFP proteininin, NES inhibisyonu sonrasında çekirdek içinde homojen bir dağılım gösterdiği bildirilmektedir (örnek olarak; Wang ve ark., 2003). Bizim bulgularımız bu açıdan literatürden tamamen farklı olduğu açıkça görülmektedir.

Bilindiği gibi βarr-2 sadece GPKR'leri ile etkileştiği düşünülen bir hücre içi proteindir. Literatürde birçok çalışmada, GPKR'lerin uyarılması ile, GFP ile işaretli floresan βarr-1 veya 2'nin ilk 10 dakika içerisinde sitoplazmadan hücre zarına hareket ettiği ilerleyen dakikalarda ise bu proteinlerin sitoplazma içerisinde öbekler halinde biriktiği konfokal mikroskopi kullanılarak izlenmiştir (örnek olarak: Luttrell

ve ark., 1999; Luttrell ve ark., 2001; Shenoy ve Lefkowitz., 2003; Vrecl ve ark., 2008; Oakley ve ark., 2001). Yukarıda anlatıldığı gibi bizim elde ettiğimiz bulgular ise hem βarr-2'nin hem GPKR dışında bir başka tip reseptörle, yani P2X7 reseptörü ile etkileştiğini, hem de bu βarr-2 proteininin çekirdeğin içinde belli bir bölgeye toplaştığını göstermek açısından literatürde βarr-2 için bildirilenlerden oldukça farklıdır. Dolayısı ile βarr-2 fizyolojisinde yeni ve önemli mekanizmalara işaret etme potansiyeli taşımaktadır. Literatürde GPKR'lerinden hem fonksiyonel hem de yapısal olarak tamamen ayrı bir hücre yüzey reseptörü ailesinin üyesi olan P2X7R'nün βarr-2 proteini ile etkileşimde bulunabileceklerine dair tek bir yayın mevcuttur (Feng ve ark., 2005). Bu çalışmada P2X7 reseptörlerinin uyarılması ile β-arrestinlerin, GPKR'lerin uyarılması ile olana benzer bir şekilde hücre zarına transloke oldukları ve bu yolla P2X7 reseptörünün desensitizasyonu ve bu reseptörün internalizasyonunu gerçekleştirdikleri iddia edilmiştir. Fakat bu çalışmada βarr-2-GFP füzyon proteinin dağılımı literatürle uyumlu olmayan bir şekilde hücre sitoplazması ve çekirdeğinde eşittir. Ayrıca ATP uygulaması ile oluştuğu iddia edilen yantın eksprese ettirilen P2X7 reseptörüne mi yoksa endojen P2Y GPKR'lerine mi ait olduğu yeterince kontrol edilmemiştir. Bu çalışmamızdaki bulgular bahsedilen bu çalışmadakilerle karşılaştırıldığında çok farklı iki fenomenle karşı karşıya olunduğu hemen anlaşılacaktır.

Deneyin başlangıcında henüz daha ATP uyarısı almamış hücrelerin küçük bir bölümünün çekirdeklerinde de βarr-2-GFP proteininin yoğunlaştığını ve bu yoğunlaşmanın çekirdeğin bir alt bölgesinde, muhtemelen çekirdekçikte olduğunu gözlemledik (Şekil 3.3 B). Bu bulgu βarr-2 proteinin çoğunlukla hücre çekirdeğinden ve buradaki bağlanma bölgesinden uzak tutulmasına rağmen, hücrelerin belli dönemlerinde βarr-2 proteininin hücrenin çekirdeğine geçebildiğini ve özellikle çekirdekçikte, yüksek afinite ile bazı proteinlere ya da başka makro moleküllere bağlanabildiğini ve burada belli bir fizyolojik görev üstlenebileceklerini düşündürmektedir. ATP ve P2X7 uyarısı da βarr-2 proteininin çekirdeğe geçişini arttırarak bu proteinin çekirdekteki olası etkilerini modüle etme potansiyeline sahiptir.

Literatürde β-arrestinlerin teorik olarak etkileşebileceği bazı proteinlerden bahsedilmiştir. Önerilen bu proteinler arasında çekirdek ve çekirdekçik proteinleri de vardır (Xiao ve ark., 2007). Ayrıca β-arrestinlerin çekirdekte bazı görevler yapabileceklerine dair de bulgular literatürde mevcuttur ancak bunlar bu proteinin doğrudan çekirdekteki etkilerinden çok başka proteinler aracılığı ile oluşturduğu etkiler gibi görünmektedir (bir derleme için: Buchanan ve DuBois, 2006; Ma ve Pei, 2007). Çekirdekte görev yapabileceklerinin düşünülmesine karşın reseptör uyarısı ile β-arrestinlerin çekirdeğe transloke olduklarını gösteren deneysel bulgu çok sınırlıdır. Bir çalışmada bir GPKR olan mü-opioid peptid reseptörü uyarısı ile βarr-1'in (Kang ve ark., 2005), diğer bir çalışmada ise gene bir GPKR olan OR1 koku reseptörü uyarısı ile βarr-2'nin plazma zarı yerine çekirdeğe transloke olduğu (Neuhaus ve ark., 2007) deneysel olarak gösterilmiştir. Ancak bu çalışmalarda çekirdek içinde belli bölgelerde ya da çekirdekçikte bir toplaşma olmamıştır. Bu bulguların da gösterdiği gibi β-arrestinlerin çekirdekte bazı görevleri olması beklenen bir durumdur, ancak bu konuda literatür oldukça sınırlı bilgi içermektedir ve bu konu yeni yeni anlaşılmaktadır.

ATP uyarısı sonucunda βarr-2-GFP proteininin çekirdekte toplaşmasının, hücre bütünlüğünün bozulması ile birlikte seyretmediğini göstermek için hücre zarından geçmediği bilinen Lucifer Yellow boyası kullanılmıştır. Lucifer Yellow verilmiş HEK-P2X7-βarr-2-GFP hücrelerinde ATP (1 mM) uygulandıktan 25 dakika sonra yanıt veren hücreler incelenerek, bu boyanın başlangıç durumunu (yani hücre içine girmediği) koruduğu deneysel olarak gösterilmiştir (Şekil 3.11).

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada elde edilen deneysel bulgular: 1) Sadece GPKR'leri ile etkileştiği düşünülen βarr-2 proteininin, GPKR ailesine ait olmayıp, ligand bağımlı iyon kanalı yapısında bir pürinoseptör olan P2X7 reseptörü ile de etkileşebildiğini; 2) βarr-2 proteinin hücre çekirdeğinde, muhtemelen çekirdekçikte, yer alan bazı proteinlere (ya da başka makromoleküllere) yüksek bir afinitesi olduğunu; 3) βarr-2 proteinin bu bağlanma bölgelerinden NES pompasının aktivitesi sonucunda uzak tutulduğunu ve hücrenin çeşitli durumlarında ve P2X7 uyarısı ile bu bağlanma bölgelerine bağlanmasının artabildiğini düşündürmektedir.

Literatürde bilinmeyen ve yeni olan bu bulgularımızın βarr-2 proteininin henüz daha tanımlanmamış yeni görevlerinin aydınlatılmasında ve P2X7 reseptörünün etkileştiği yeni ve bilinmeyen hücre içi sinyal yolaklarının tanımlanmasında önemi olabileceğini düşünmekteyiz.

Bu tez çalışmasında yapılanlara ek olarak, yanıta aracılık eden reseptörün P2X7R'ü olduğundan tam anlamıyla emin olmak amacı ile, HEK-P2X7 hücrelerinde yanıtın spesifik P2X7 antagonistleri ile (A-438079 ve A-740003) uygun derişimlerde, inhibe edilip edilemediği incelenmelidir. Eğer bu yanıtın P2X7R'üne tam olarak spesifik olduğunu yapacağımız deneyler ile tanımlayabilirsek, bir sonraki aşamada, ATP uyarısı ile oluşan bu translokasyonun βarr-2 ve P2X7R çifti için spesifik olup olmadığının, bu fenomenin P2X2 gibi diğer P2Xlerle veya βarr-1 ile de oluşup oluşmadığı araştırılmalıdır.

Ayrıca βarr-2-GFP'nin toplaştığı bölgenin çekirdekçik olup olmadığının daha net anlaşılması için bazı çekirdekçiğe özgü proteinlerin (fibrillarin, nükleolin gibi) yanıt sonrası fikse edilmiş hücrelerde, spesifik bir antikor ile işaretlenmesi ve bu antikora bağlı floresan işaret ile GFP nin kolokalizasyonun araştırılmalıdır. Bunun yanı sıra ticari canlı çekirdekçik işaretleme kitleri de kullanılarak, canlı hücrelerde βarr-2-GFP'nin toplaştığı bölgenin tanımlanmasına çalışılmalıdır.

ÖZET

Beta-arrestin-2 Proteininin P2X7 Reseptörü ile Etkileşimi

β-arrestinlerin, G-proteini kenetli reseptörlerin (GPKR) sinyal iletiminin sonlandırılmasında görev aldığı bilinmektedir. Ayrıca β-arrestinlerin GPKR'leri ile oluşan sinyal iletiminde G-proteinleri aracılığıyla olana paralel, yeni bir sinyal iletim yolağı oluşturdukları da düşünülmektedir. Pürinerjik P2X7 reseptörleri ise ligand bağımlı iyon kanalları olarak GPKRlerinden tamamen ayrı, başka bir reseptör ailesine mensupturlar. P2X7 reseptörü ile β-arrestinler bir iletişim olduğuna dair literatürde bilgi yok denecek kadar azdır ve ikna edici, net bir çalışma bulunmamaktadır (Feng ve ark., 2005). Bu bilinenlerden farklı olarak, bu çalışmada HEK-P2X7-βarr-2-GFP hücrelerinde, konfokal mikroskopi yöntemi kullanılarak, βarr-2 proteininin ATP uyarısı ile (uyarıdan10-15 dk sonra) çekirdeğe toplandığı, bu toplaşmanın çekirdek içerisinde homojen olmayıp çekirdeğin bir alt bölgesinde (çekirdekçik olabileceği düşünülen) lokalize olduğu gösterilmiştir Yapılan kontrol deneyleri ile de desteklenen bu bulgular, HEK hücrelerinde gözlemlediğimiz ATP uygulaması ile oluşan βarr-2-GFP yer değiştirmesinin P2X7 reseptörü aracılığı ile oluştuğunu düşündürmektedir. Konfokal mikroskopta, HEK-P2X7 hücrelerinde oluşan yanıtın, P2X7Rlerinde ATP ye göre daha etkin olduğu bilinen BzATP agonistine (örnek olarak; Suprenant ve ark.,1996; North, 2002) daha duyarlı olduğu gösterilmiştir. Aynı şekilde P2X7R için iyi agonist olmayan ancak P2YR'ler için agonist olduğu bilinen UTP ve ADP (Jacobson ve Boeynaems, 2010) ile yapılan deneylerde, ölçülebilir bir yanıt oluşmadığı, böylece oluşan yanıtın P2YR'lerine ait bir yanıt olmadığına dair bir bulgu elde edilmiştir. Ayrıca ATP uygulaması NaCl deney çözeltisinde yapıldığında oluşan βarr-2-GFP proteininin çekirdeğe translokasyon yanıtı, KCl deney çözeltisinde oluşan yanıt ile karşılaştırıldığında yanıt oluşan hücre oranının daha az olduğu görülmüştür. Bu çalışmada yapılan tüm deneyler, ATP uygulaması ile gözlenen βarr-2-GFP yer değiştirme yanıtını oluşturan reseptörün, P2X7R olduğuna işaret etmektedir. βarr-2nin NES pompası tarafından sürekli aktif olarak hücre çekirdeği dışına taşındığı bilinmektedir, dolayısı ile çekirdek içindeki derişimi sitoplazmaya göre belirgin olarak daha azdır. Literatürde LMB kullanılan çalışmalarda, βarr-2-GFP proteininin, NES inhibisyonu sonrasında çekirdek içinde homojen bir dağılım gösterdiği bildirilmektedir (Wang ve ark., 2003). Bu çalışmada literatürde bilinenlerden tamamen farklı olarak, NES inhibitörü LMB (20 ng/ml) ile hücrelerin 20 saat inkübe edilmesi sonrası HEK-293-βarr-2-GFP ve HEK-P2X7-βarr-2-GFP hücrelerinin önemli bir kısmında βarr-2-GFP proteininin çekirdek içinde, çekirdekçik benzeri bir yapıda toplaştığı gözlendi. Bu bulgu βarr-2 proteinin çekirdekçikte yüksek afiniteli bir bağlanma bölgesine sahip olduğunu ve bu bölgeye bağlanmasının NES ve bazı reseptörler tarafından regüle edilebildiğini düşündürmektedir.

Anahtar Sözcükler: β-arrestin-2 proteini, G-proteini kenetli reseptörler, Hücre içi sinyal iletimi, NES pompası, P2X7 reseptörü,

SUMMARY

Beta-arrestin-2 Interactions with P2X7 Receptors

In the cell β-arrestins are known to play an important role in signal transduction of the G-protein dependent receptors (GPCRs). Even though this role was initially thought to be only inhibitory, it is now known that they have an important role in the G-protein independent cellular signal transduction via GPCRs. Purinergic P2X7 receptor, being a member of the ligand gated channel family, belongs to a class of receptors which are totally different from GPCRs. There is a single report in the literature indicating that P2X7 receptors can interact with β-arrestins (Feng and et al., 2005). Our observations in HEK-P2X7-βarr-2-GFP cells indicate that upon stimulation with 1 mM ATP (10-15 min after stimulation)), GFP tagged βarr-2, translocates into nucleus of the cell, forming clusters within the nucleus. These clusters of βarr-2-GFP, which are formed after ATP stimulation, appear to localize in a sub-compartment of nucleus. Combined DIC and fluorescent images suggest that this subcomparment may be the nucleolus. This ATP effect is not observed in HEK-293-βarr-2-GFP cells, which do not express the P2X7R, indicating that the receptor responsible for this translocation response is P2X7 receptor. Further support for the idea that in HEK-P2X7-βarr-2-GFP cells, the receptor mediating the ATP induced response of βarr-2 translocation is indeed P2X7R, comes from the finding that BzATP, which is known to be a more effective agonist than ATP for P2X7R (e.g., Suprenant et al., 1996; North, 2002), can induce βarr-2 translocation into the nucleus at a low concentration (5 μm), at which ATP is completely ineffective. Furthermore application of UTP or ADP (1 mM), which are effective agonist for purinergic P2YR but not P2X7R (Jacobson and Boeynaems, 2010), cause no measurable βarr-2 translocation response in the same cells. When taken together all these experiments suggest that the βarr-2 translocation response, observed with the application ATP is mediated by P2X7R. It has been proposed that βarr-2 is constantly moved out of the cell nucleus by the NES pump. Therefore, the nuclear concentration of βarr-2 is less than the cytoplasmic one. It has been reported in the literature that βarr-2-GFP, after inhibition of NES pump with LMB, show a homogeneous distribution within the cytoplasm and the nucleus (Wang et al., 2003). Our results with LMB are entirely different from what is known in the literature, after incubating (20 hours) the HEK-P2X7-βarr-2-GFP and HEK-293-βarr-2-GFP cells with LMB (20 ng/ml), we observed that in majority of the cells GFP tagged βarr-2 translocates into nucleus, forming clumps, probably in nucleolus. This finding may indicate that βarr-2 has a high affinity binding site within the nucleus (nucleolus), and its binding to this site can be regulated by the functions of NES and some mambrane receptors.

Keywords: β-arrestin-2 protein, GPCR, Cellular Signalling, NES Pump, P2X7 Receptor

KAYNAKLAR

ABBRACCHİO, M.P., BURNSTOCK, G., BOEYNAEMS, J.M., BARNARD, E.A., BOYER, J.L., KENNEDY, C, KNİGHT, G.E., FUMAGALLİ, M., GACHET, C., JACOBSON, K.A., WEİSMAN, G.A., (2006). International Union of Pharmacology LVIII: Update on the P2Y G Protein-Coupled Nucleotide Receptors: From Molecular Mechanisms and Pathophysiology to Therapy. *Pharmacol Rev.*, **58(3)**: 281–341

ADİNOLFİ, E., RAFFAGHELLO, L., GİULİANİ, A.L., CAVAZZİNİ, L., CAPECE, M., CHİOZZİ, P., AMOROSO, F., FALZONİ, S., ADİNOLFİ, E., FERRARİ, D., Dİ VİRGİLİO, F., (2012). The P2X7 receptor is a key modulator of aerobic glycolysis. *Cell Death Dis.*, **3**: e370

ALBERTS, B., JOHNSON A., LEWİS J., RAFF M., ROBERTS, K., WALTER, P., (2008). Hücrenin Moleküler Biyolojisi. 4. Baskı. Ankara: Sistem Ofset Basım Yayın, Bölüm 15, s. : 853-54.

ARULKUMARAN, N., UNWİN, R.J., TAM, F.W.K., (2011). A potential therapeutic role for P2X7 receptor (P2X7R) antagonists in the treatment of inflammatory diseases. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, **20(7)**: 897–915

ATTRAMADAL, H., ARRİZA, J.L., AOKİ, C., DAWSON, T.M., CODİNA, J., KWATRA, M.M., SNYDER, S.H., CARON, M.G., LEFKOWİTZ, R.J., (1992). β-Arrestin2, a Novel Member of the Arrestin/β-Arrestin Gene Family. *The Journal of Biological Chemistry*, **267(25)**: 17882-90

BİANCHİ, B.R, LYNCH, K.J., TOUMA, E., NİFORATOS, W., BURGARD, E.C., ALEXANDER, K.M., PARK, H.S., YU, H., METZGER, R., KOWALUK, E., JARVİS, M.F., VAN, BİESEN, T., (1999). Pharmacological characterization of recombinant human and rat P2X receptor subtypes. *Eur J Pharmacol.*, **376(1-2)**: 127-38

BUCHANAN, F.G., DuBois R.N., (2006). Emerging roles of beta-arrestins. *Cell Cycle*, **5(18)**: 2060-63

BUELL, G., MİCHEL, A.D., LEWİS, C., COLLO, G., HUMPHREY, P.P., SURPRENANT, A., (1996). P2X1 receptor activation in HL60 cells. *Blood*, **87(7)**: 2659–64

CHEN, W., REN, X.R., NELSON, C.D., BARAK, L.S., CHEN, J.K., BEACHY, P.A., DE SAUVAGE, F., LEFKOWİTZ, R.J., (2004). Activity-Dependent Internalization of Smoothened Mediated by β-Arrestin 2 and GRK2. *Science*, **306 (5705)**: 2257-60

CRAFT, C.M., WHİTMORE, D.H., WİECHMANN, A.F., (1994). Cone arrestin identified by targeting expression of a functional family. *J Biol Chem.*, **269(6)**: 4613-19

DEFEA, K., (2008). β-arrestins and heterotrimeric G-proteins: collaborators and competitors in signal Transduction. *British Journal of Pharmacology*, **153(S1)**: S298–S309

DONNELLY-ROBERTS, D.L., NAMOVİC, M.T., HAN, P., JARVİS, M.F. (2009). Mammalian P2X7 receptor pharmacology:comparison of recombinant mouse, rat and human P2X7 receptors. *British Journal of Pharmacology* **157**: 1203–1214

EİCKHORST, A.N., BERSON, A., COCKAYNE, D., LESTER, H.A.,, KHAKH, B.S., (2002). Control of P2X Channel Permeability by the Cytosolic Domain. *J Gen Physiol.*, **120(2)**: 119-31

EVANS, R.J., LEWİS, C., BUELL, G., NORTH, R.A., SURPRENANT, A., (1995). Pharmacological characterization of heterologously expressed ATP-gated cation channels (P2x purinoceptors). *Mol Pharmaco.*, **48(2)**: 178-83

FENG, Y.H., WANG, L., WANG, Q., Lİ, X., ZENG, R., GORODESKİ, G.I. (2005). ATP stimulates GRK-3 phosphorylation and β-arrestin-2-dependent internalization of P2X7 receptor. *Am J Physiol Cell Physiol.*, **288(6)**: C1342–56

GARCİA, M., STÜHMER, W., SOTO, F., (1997). Molecular characterization and pharmacological properties of the human P2X3 purinoceptor. *Brain Res.*, **47(1-2)**: 59–66

HOFFMANN, C., ZİEGLER, N., REİNER, S., KRASEL, C., LOHSE, M.J., (2008). Agonist-selective, Receptor-specific Interaction of Human P2Y Receptors with β-Arrestin-1 and -2. *Journal Of Biological Chemistry*, **283(45)**: 30933–941

HONORE, P., ROBERTS D.D., NAMOVİC M.T., HSİEH G., ZHU C.Z., MİKUSA J.P., HERNANDEZ G., ZHONG C., GAUVİN D.M., CHANDRAN P., HARRİS R., MEDRANO A.P., CARROLL W., MARSH K., SULLİVAN J.P., FALTYNEK C.R., JARVİS M.F., (2006). A-740003 [N-(1-{[(Cyanoimino)(5-quinolinylamino)methyl]amino}-2,2-dimethylpropyl)-2-(3,4-dimethoxyphenyl).acetamide], a Novel and Selective P2X7 Receptor Antagonist, Dose-Dependently Reduces Neuropathic Pain in the Rat. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **319(3)**: 1376–85

JACOBSON, K.A, JARVİS, M.F., WİLLİAMS, M., (2002). Purine and pyrimidine (P2) Receptors as drug targets. *J Med Chem.*, **45(19)**: 4057–93

JACOBSON, K.A., BOEYNAEMS, J.M. (2010). P2Y nucleotide receptors: Promise of therapeutic applications. *Drug Discov Today* **15(13-14)**: 570–578

KANG, J., SHİ, Y., XİANG, B., QU, B., SU, W., ZHU, M., ZHANG, M., BAO, G., WANG, F., ZHANG, X., YANG, R., FAN, F., CHEN, X., PEİ, G., MA, L., (2005). A nuclear function of beta-arrestin1 in GPCR signaling: Regulation of histone acetylation and gene transcription. *Cell*, **123(5)**: 833-47

KENDALL, R.T., LUTTRELL, L.M., (2009). Diversity in arrestin function. *Cell. Mol. Life Sci.*, **66(18)**: 2953–73

KEYSTONE, E.C., WANG, M.M., LAYTON, M., HOLLİS S., MCINNES, I.B., (2012). Clinical evaluation of the efficacy of the P2X7 purinergic receptor antagonist AZD9056 on the signs and symptoms of rheumatoid arthritis in patients with active disease despite treatment with methotrexate or sulphasalazine. *Ann Rheum Dis.*, **71(10)**: 1630-35

KHAKH, B.S., BAO, X.R., LABARCA, C., LESTER, H.A., (1999). Neuronal P2X transmitter-gated cation channels change their ion selectivity in seconds. *Nat Neurosci.*, **2(4)**: 322-30

KİM, M., JİANG, L.H., WİLSON, H.L., NORTH, R.A., SURPRENANT A., (2001). Proteomic and functional evidence for P2X7 receptor signalling complex. *EMBO J.*, **20(22)**: 6347-58

KÜGELGEN I.V., (2008). Pharmacology of mammalian P2X- and P2Y-receptors. *Biotrend Reviews.*, **3**: 9

KYRİAKİS, J.M., AVRUCH J., (1996). Sounding the Alarm: Protein Kinase Cascades Activated by Stress and Inflammation. *The Journal of Biological Chemistry*, **271(40)**: 24313–16

LOHSE, M. J.,BENOVİC, J.L.,CODİNA, J.,CARON, MG.,LEFKOWİTZ, R.J., (1990). Beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function. *Science*, **248(4962)**: 1547-50

LUTTRELL, L.M., FERGUSON, S.S., DAAKA, Y., MİLLER, W.E., MAUDSLEY, S., DELLA ROCCA, G.J., LİN, F., KAWAKATSU, H., OWADA, K., LUTTRELL, D.K., CARON, M.G., LEFKOWİTZ, R.J., (1999). Beta-Arrestin-Dependent Formation of b2 Adrenergic Receptor-Src Protein Kinase Complexes. *Science*, **283(5402)**: 655-61

LUTTRELL, L.M.,ROUDABUSH, F.L., CHOY, E.W., MİLLER, W.E., FİELD, M.E., PİERCE, K.L., LEFKOWİTZ, R.J., (2001). Activation and targeting of extracellular signal regulated kinases by β-arrestin scaffolds. *PNAS*, **98(5)**: 2449–54

LUTTRELL, L.M., LEFKOWİTZ, R.J., (2002). The role of b-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *Journal of Cell Science*, **115(3)**: 455-65

MA, L., PEİ, G., (2007). Beta-arrestin signaling and regulation of transcription. *Journal of Cell Science*, **120(2)**: 213-18

MACKENZİE, A.B., YOUNG, M.T., ADİNOLFİ, E., SURPRENANT, A., (2005). Pseudoapoptosis induced by brief activation of ATP-gated P2X7 receptors. *J Biol Chem.*, **280(40)**: 33968-76

MURAKAMİ, A.,YAJİMA, T., SAKUMA, H., MCLAREN MJ., INANA, G., (1993). X-Arrestin: a new retinal arrestin mapping to the X chromosome. *Federation of European Biochemical Societies*, **334(2)**: 203-9

NELSON, D.W., GREG, G R.J., KORT, M.E., PEREZ, M.A., VOİGHT, E.A., WANG, Y., GRAYSON, G., NAMOVİC, M.T., DONNELLY-ROBERTS, D.L., NİFORATOS, W., HONORE, P., JARVİS, MF., FALTYNEK, C.R., CARROLL, W.A., (2006). Structure-activity relationship studies on a series of novel, substituted 1-benzyl-5-phenyltetrazole P2X7 antagonists. *J Med Chem.*, **49(12)**: 3659-66

NEUHAUS, E.M., MASHUKOVA, A., BARBOUR, J., WOLTERS, D., HATT, H., (2006). Novel function of beta-arrestin2 in the nucleus of mature spermatozoa. *J Cell Sci.*, **119(15)**: 3047-56

NORTH, R.A., SUPRENANT, A., (2000). Pharmacology of cloned P2X receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*, **40**: 563–80

NORTH, R.A., (2002). Molecular Physiology of P2X Receptors. *Physiological Reviews*, **82(4)**: 1013–67

OAKLEY, R.H., LAPORTE, S.A., HOLT, J.A., BARAK, L.S., CARON, M.G., (2001). Molecular Determinants Underlying the Formation of Stable Intracellular G Protein-coupled Receptor-b-Arrestin Complexes after Receptor Endocytosis. *Journal Of Biological Chemistry*, **276(22)**: 19452–60

PEARSON, G., ROBİNSON, F., GİBSON, T.B., XU, B., KARANDİKAR, M., BERMAN, K., COBB, M.H., (2001). Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Pathways:Regulation and Physiological Functions. *Endocrine Reviews*, **22(2)**: 153–183

PERREGAUX, D., GABEL, C.A., (1994). Interleukin-1 beta maturation and release in response to ATP and nigericin. Evidence that potassium depletion mediated by these agents is a necesary and common feature of their activity. *J Biol Chem.*, **269(21)**: 15195–203

RALEVİC, V., THOMAS, T., BURNSTOCK, G., SPYER, K.M., (1999). Characterization of P2 receptors modulating neural activity in rat rostral ventrolateral Medulla. *Neuroscience*, **94(3)**: 867–78

RASSENDREN, F., Buell, G., Newbolt, A., North, R.A., Surprenant, A., (1997). Identification of amino acid residues contributing to the pore of a P2X receptor. *EMBO J.*, **16(12)**: 3446–54

RAJAGOPAL, S., RAJAGOPAL, K., LEFKOWİTZ, R.J., (2010). Teaching old receptors new tricks: biasing seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Drug Discov.*, **9(5)**:373-86

REİNER, S., ZİEGLER, N., LEON C., LORENZ, K., VON HAYN, K., GACHET, C., LOHSE, M.J., HOFFMANN, C., (2009). beta-Arrestin-2 interaction and internalization of the human P2Y1 receptor are dependent on C-terminal phosphorylation sites. *Mol Pharmacol.*, **76(6)**: 1162-71

SAYAR, S.C., SAYAR, K., UGUR, M., (2009). P2X7 Receptor Activates Multiple Selective Dye-Permeation Pathways in RAW 264.7 and Human Embryonic Kidney 293 Cells. *Molecular Pharmacology.*, **76(6)**: 1323–32

SCOTT, M.G., LE ROUZİC, E., PÉRİANİN, A., PİEROTTİ, V., ENSLEN, H., BENİCHOU, S., MARULLO, S., BENMERAH, A., (2002). Differential Nucleocytoplasmic Shuttling of β-Arrestins. *Journal of Biological Chemistry*, **277(40)**: 37693–701

SHENOY, S.K., LEFKOWİTZ, R.J., (2003). Multifaceted roles of β-arrestins in the regulation of seven-membranespanning receptor trafficking and signalling. *Biochem. J.*, **375(3)**: 503–15

SHENOY, S.K., LEFKOWİTZ, R.J., (2011). β-arrestin-mediated receptor trafficking and signal transduction. *Trends in Pharmacological Sciences*, **32(9)**: 521-33

SURPRENANT, A., RASSENDREN, F., KAWASHİMA, E., NORTH R.A., BUELL G., (1996). The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7) *Science*, **272(5262)**:735-38

VALERA, S., HUSSY, N., EVANS, R.J., ADAMİ, N., NORTH, R.A., SURPRENANT, A., BUELL, G., (1994). A new class of ligand-gated ion channel defined by P2x receptor for extracellular ATP. *Nature*, **371(6497)**: 516-19

VİRGİNİO, C., MACKENZİE, A., RASSENDREN, F.A., NORTH, R.A., SURPRENANT, A., (1999). Pore dilation of neuronal P2X receptor channels. *Nat Neurosci.*, **2(4)**: 315-21

VRECL, M., ANDERSON, L., HANYALOGLU, A., MCGREGOR, A.M., GROARKE, A.D., MİLLİGAN, G., TAYLOR, P.L., EİDNE, K.A., (2008). Agonist-Induced Endocytosis and Recycling of the Gonadotropin-Releasing Hormone Receptor:Effect of b-Arrestin on Internalization Kinetics. *Molecular Endocrinology,* **12(12)**: 1818-29

WANG, P., WU, Y., GE, X., MA, L., PEİ, G., (2003). Subcellular Localization of β-Arrestins Is Determined by Their Intact N Domain and the Nuclear Export Signal at the C Terminus. *The Journal Of Biological Chemistry*, **278(13)**: 11648–11653

XİAO, K., MCCLATCHY, D.B., SHUKLA, A.K., ZHAO, Y., CHEN, M., SHENOY S.K., YATES, J.R.3RD., LEFKOWİTZ, R.J., (2007). Functional specialization of β-arrestin interactions revealed by proteomic analysis. *PNAS*, **104(29)**: 12011-16

ZOU, H., UGUR, M., DRUMMOND, R., SİNGER, J.J., (2001). Coupling of a P2Z-like purinoceptor to a fatty acid activated K^+ channel in toad gastric smooth muscle cells. *Journal of Physiology*, **534(1)**: 59-70

ÖZGEÇMİŞ

I- KİŞİSEL BİLGİLER

Adı:	Seda
Soyadı:	UYSAL
Doğum yeri ve tarihi:	Konya – 14.05.1984
Uyruğu:	T.C.
Medeni durumu:	Bekar
İletişim adresi ve telefonu:	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik A.B.D. – 0312 3103010/337

II – EĞİTİMİ

Ankara Üniversitesi Biyofizik Anabilim Dalı (Tezli yükseklisans) (2011-)
Ankara Üniversitesi Biyoteknoloi Enstitüsü (Yükseklisans Özel Öğrenci) (2009-2010)
Orta Doğu Teknik Üniversitesi (Hazırlık Eğitimi) (2008-2009)
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü (2003-2008)
Ankara Anadolu Lisesi, Ankara (1998-2002)
Gaziosmanpaşa Orta Okulu (1995-1998)
Yabancı dili: Fransızca-İngilizce

III – ÜNVANI

Biyolog

IV- MESLEKİ DENEYİMİ

Labrotuvarda Kullanılan Yöntemler

- Hücre Kültürü
- Western Blot Yöntemi
- Patch Clamp Yöntemi
- Konfokal Mikroskopi Yöntem

V- BİLİMSEL ETKİNLİKLERİ

Aldığı Burslar

- Ankara Ticaret Odası (2003-2004)
- Başbakanlık Bursu (2003-2008)
- Tübitak Proje Bursu (2009-2010)
- Tübitak Proje Bursu (2012-2013)

Katılmış Olduğu Kongreler

- 1. Ulusal Hücresel Tedavi Ve Rejeneratif Tıp Kongresi (Kapadokya, 2009)
- 1. Biyoteknolji Araştırma ve Kariyer Günü (Ankara, 2009)
- Türk Kalp ve Damar Cerrahisi Derneği 11. Ulusal Kongresi (Antalya, 2010)
- 8. Ankara Biyoteknoloji Günleri Konferansı (Ankara, 2010)
- The International Symposium on New Approaches in Cardiovascular Disorders (Ankara, 2011)
- The Ephar Symposium, Molecular Pharmacology of G Protein Coupled receptors and Signalling Partners (İstanbul, 2011)
- Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası (Ankara, 2013)

Katılmış Olduğu Kurslar

- Invitro Fertilizasyon ve ICSI Uygulama Kursu (2007-2008)
- Orta Doğu Teknik Üniversitesi YabancıDil Sertifikası programı (2008-2009)

•Uygulamalı Mezenkimal Kök Hücre Kursu (2009)

Ödüller

Ogan-Cetinkaya F., Egin Y., Uysal S., Cubukcuoglu G., Dogan-Alakoc Y., Durdu S., Ozdag H., Akar A.R., Akar N. (2010). Evaluation of VKORC1 [G1639A] [C1173T], and prothrombotic gene polymorphisms in warfarin response of Turkish patients (Abstract No: 26). 5th International Clinical Vascular Biology Congress. Journal of Vascular Research, 1018-1172

VI- DİĞER BİLGİLER

Eğitim Programı Haricinde Aldığı Kurslar

•TS EN ISO 9001:2000 Kalite Yönetim Sistemi (2007)

•Türkiye Sualtı Sporları Dalış Fedarasyonu Üç Yıldız Dalgıçlık Eğtimi (2012)

Organizasyonunda Katkıda Bulunduğu Bilimsel Toplantılar

•The International Symposium on New Approaches in Cardiovascular Disorders (Ankara, 2011)