T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FLORESAN PROTEİN İŞARETLİ CCDC124 PROTEİNİNİN HÜCRESEL LOKALİZASYONU VE STRES ŞARTLARINDA HÜCRE ALTI TRANSLOKASYONU

AGİT ÇETİNKAYA
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

GEBZE
2023

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FLORESAN PROTEİN İŞARETLİ CCDC124 PROTEİNİNİN HÜCRESEL LOKALİZASYONU VE STRES ŞARTLARINDA HÜCRE ALTI TRANSLOKASYONU

AGİT ÇETİNKAYA
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİMDALI

DANIŞMANI
PROF. DR. UYGAR HALİS TAZEBAY

GEBZE
2023

T.R.

GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

CELL LOCALIZATION AND SUBCELL TRANSLOCATION OF FLUORESCENT PROTEIN LABELED CCDC124 PROTEIN AT STRESS CONDITIONS

AGİT ÇETİNKAYA

A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE

DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

THESIS SUPERVISOR

PROF. UYGAR HALİS TAZEBAY

GEBZE

2023

GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ	**YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU**

GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 06/07/2023 tarih ve 37 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 12/07/2023 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Agit Çetinkaya'nın tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE
(TEZ DANIŞMANI) : Prof. Dr. Uygar Halis TAZEBAY

ÜYE : Prof. Dr. Ayten KANDİLCİ

ÜYE : Dr. Öğr. Üyesi Nazlı KESKİN TOKLU

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
…..…/…..…/..…… tarih ve ……/…….. sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

Coiled-coil domain containing 124 (CCDC124) ökaryotlarda yüksek korunmuşluğa sahip bir gendir. Bu genin insanlarda kodladığı CCDC124 proteini 32 kDa olup, 223 amino asit uzunluğundadır. Daha önce yapılan çalışmalarda bu proteinin ribozomal bir protein olduğu ve düşük karmaşıklık bölgeleri (Low complexity regions- LCR) bölgeleri içerdiği gösterilmiştir. Çift özgüllük tirozin fosforilasyonu düzenlenmiş kinaz 3 (Dual Specificity Tyrosine Phosphorylation Regulated Kinase 3-DYRK3), DYRK ailesinden bir proteindir ve stres granül belirtecidir. Hücre içerisinde stres granülleri oluşumunda büyük bir etkiye sahiptir ve hücrenin fizyolojik işleyişinde görev alır. Bu tez kapsamında yapılan çalışmalarda CCDC124'ün hücre içerisindeki lokasyonu, stres şartlarındaki hücre altı translokasyonu ve bunun DYRK3 ile bağlantısının belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla CCDC124'ü hücre içerisinde görüntülemek için, CCDC124'ün N terminaline HALOtag ve SNAPtag ya da C terminaline GFP floresan protein füzyon edilecek şekilde ilgili plazmitlere klonlanmış olup U2OS, HEK293T, HCT116 ve HeLa hücrelerinde görüntüleme yapılmıştır. Viral enfeksiyon benzeri, oksidatif ve ozmotik stresler uygulanmıştır. Stres belirteci olarak ise DYRK3 kullanılmış ve hücrelere DYRK3 inhibitörü olan GSK626616 uygulanarak CCDC124 proteini üzerideki etkisine bakılmıştır. Strese yol açan maddelerin uygulamasından sonra sonuçlar Konfokal 780/880/980 ve Lattice Lightsheet 7 (LLSM7) mikroskopları kullanılarak değerlendirilmiştir. Görüntülemeler sonucunda CCDC124 proteininin sitoplazmada yaygın, bazen granüler yapılarda olduğu ve çekirdekçikte Fibrillarin 7 proteini ile etkileştiği gözlemlenmiştir. Ayrıca Fibrillarin 7'nin sitoplazmada oluşturduğu agrezomlarda da CCDC124 ile beraber oldukları görülmüştür. Bununla beraber CCDC124'ün mitokondri ile lokalize ve/veya etkileşen bir protein olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Coiled-coil domain containing 124 (CCDC124), Lattice Lightsheet Mikroskopi (LLSM), Mitokondri, DYRK3, Agrezom.

SUMMARY

Coiled-coil domain containing 124 (CCDC124) is a highly conserved gene in eukaryotes. The CCDC124 protein encoded by this gene in humans is 32 kDa and is 223 amino acids long. Previous studies have shown that this protein is a ribosomal protein and contains low complexity regions (LCR). Dual specificity tyrosine phosphorylation regulated kinase 3 (Dual Specificity Tyrosine Phosphorylation Regulated Kinase 3-DYRK3) is a protein from the DYRK family and is a stress granule marker. It has a great effect on the formation of stress granules in the cell and takes part in the physiological functioning of the cell. In the studies carried out within the scope of this thesis, it was aimed to determine the location of CCDC124 in the cell, its subcellular translocation under stress conditions and its connection with DYRK3. For this purpose, to display CCDC124 in the cell, HALOtag and SNAPtag to the N-terminus or GFP fluorescent protein to the C-terminus of CCDC124 were cloned into the corresponding plasmids and imaging was performed in U2OS, HEK293T, HCT116 and HeLa cells. Viral infection-like, oxidative, and osmotic stresses were applied. DYRK3 was used as a stress marker and its effect on CCDC124 was examined by applying GSK626616, a DYRK3 inhibitor, to the cells. After application of stressors, the results were evaluated using Confocal 780/880/980 and Lattice Lightsheet 7 (LLSM7) microscopes. As a result of the imaging, it was observed that the CCDC124 protein is widespread in the cytoplasm, sometimes in granular structures, and interacts with the Fibrillarin 7 in the nucleolus. In addition, it was observed that they were associated with CCDC124 in agresomes formed by Fibrillarin 7 in the cytoplasm. However, it was concluded that CCDC124 is a protein that localizes and/or interacts with mitochondria.

Key Words: Coiled-coil domain containing 124 (CCDC124), Lattice Lightsheet Microscopy (LLSM), Mitochondria, DYRK3, Aggresome.

TEŞEKKÜR

Öncelikle yüksek lisans eğitimimde, tüm laboratuvar imkanlarını ve engin bilgilerini benimle paylaşmanın yanı sıra etik değerleri ve iyi insan olup iyi bilim yapmayı yol gösteren danışmanım Prof. Dr. Uygar Halis Tazebay'a teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimimin başladığı dönemden itibaren gerek laboratuvar çalışmalarımda engin bilgileri ile gerekse günlük yaşantımda yol göstericiliği ile bana desteğini esirgemeyen Dr. Merve Tuzlakoğlu Öztürk'e teşekkür ederim. Bilimin kalbinin attığı İsveç'te tüm laboratuvar imkanlarını en açık şekilde benimle paylaşan, daha iyi bir bilim insanı olmam için çabalayan ve insani değerleriyle hayatımdaki en büyük rol modelim olan Asst. Prof. Erdinç Sezgin'e teşekkür ederim. Laboratuvarlarında geçirdiğim süre zarfında büyük destek sağlayan Dr. Jan Schlegel ve PhD. St. Cenk Onur Gürdap' a, tüm CSİ-Nano-Lab grubuna ve bu serüvenimi destekleyen EMBO' ya canı gönülden teşekkür ederim. Omuz omuza çalışmalarımızı beraber yürüttüğümüz laboratuvar arkadaşım Kübra Hacıbeyoğlu'na ve aynı laboratuvarı paylaştığım Ayten Kandilci ve ekibine çok teşekkür ederim.

2015'ten bu yana aynı eğitim basamaklarında yan yana yürüdüğüm, destekçim, dostum Yağmur Gültekin'e; dostluğuyla her daim yanımızda olan Buse Fındıklı ve Tayfun Dönmez'e; son iki yıldır neredeyse tüm hayatı paylaştığım hem laboratuvarda hem de günlük yaşantımda en büyük destekçim Hilal Civelek'e; yüksek lisans eğitimimin başından itibaren arkadaşlıklarıyla, zamanı daha dolu ve eğlenceli geçirmemi sağlayan sevgili arkadaşlarım: İlkay Ünal, Neslihan El, Erva Bacacı, Ali Burak Yıldız, Burçin Özbekle, Gizem Kugu, ve Leyla Dikmedaş'a canı gönülden teşekkür ederim. Hayatımda her zaman destekçim olan köşe taşım, canım dostum Berfin Ekinci'ye; son zamanlarda hayatıma katığım en önemli şeylerden olan anı yaşama duygusunu dostluğuyla bana öğreten sevgili Helin Giriş' e; her zaman yanımda olan Martyna Lukoseviciute ve Deniz Seçilmiş'e; hayatıma renk katan sevgili Çağrı Umut'a teşekkür ederim.

Arkamı dönüp baktığımda onlarca yıldır hayatımın her noktasında beni destekleyen, beni benden çok düşünen sevgili aileme ve özellikle canımın diğer yarısı olan ablam Irmak Timurtaş'a tüm varlığımla teşekkür ederim.

Desteklerinden dolayı Tübitak 2211 Yurt İçi Lisans Üstü Burs Programına teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
TABLOLAR DİZİNİ	xvii
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği	2
2. LİTERATÜR ÖZETİ	3
2.1. CCDC124	3
2.2. DYRK3	4
2.3. Hücre Görüntüleme Sistemleri	7
2.3.1. Işık Mikroskobu	7
2.3.2. Konfokal Mikroskop	8
2.3.3. Lattice Light Sheet Mikroskop	9
2.3.4. Floresan Boyalar ve Proteinler	10
2.4. Sıvı Sıvı Faz Ayrımı	11
2.5. Hücresel Stresler ve Stres Granülleri	12
2.6. Mitokondri	14
2.7. Agrezom	15
3. MATERYAL VE YÖNTEM	16
3.1. Materyal	16
3.1.1. Memeli Hücre Kültürü Materyalleri ve Kullanılan Hücreler	16
3.1.2. Bakteri Hücre Kültürü Materyalleri ve Kullanılan Hücreler	17
3.1.3. Kültür Ortamları	17
3.1.3.1. Memeli Hücre Kültür Ortamları	17
3.1.3.2. Bakteri Hücre Kültür Ortamları	18

3.1.4. Kullanılan Stok Solüsyonlar 18
3.1.5. Kullanılan Kitler ve Cihazlar 21
3.1.5.1. Kitler 21
3.1.5.2. Cihazlar 21
3.1.5.2.1. Hücre Görüntüleme Materyalleri; Mikroskoplar 22
3.1.5.2.2. Hücre Görüntüleme Materyalleri Ligantlar 23
3.1.6. Kullanılan Kimyasallar 23
3.1.7. Kullanılan Vektörler ve Primerler 25
3.1.8. Kullanılan Programlar 26
3.2. Yöntem 27
3.2.1. HALO-CCDC124 ve SNAP-CCDC124 Plazmitlerinin Hazırlanması 27
3.2.1.1. Kompetan Hücre Hazırlama 27
3.2.1.2. Transformasyon 28
3.2.1.3. Plazmit DNA İzolasyonu 28
3.2.1.4. Primerler 28
3.2.1.5. CCDC124'ün PZR ile Çoğaltımı, Ürünün Jelde Yürütülmesi ve Ürünün Temizlenmesi 31
3.2.1.6. BglII ve EcoRI Enzimleri ile SeC61β-SNAPtag, SeC61β-Halotag ve PZR ile Üretilen CCDC124 Geninin Kesimi 32
3.2.1.7. Agaroz Jel Elektroforezi ve Jelden Geri Kazanım 34
3.2.1.8. Ligasyon ve Ligasyon Ürünleri ile Transformasyon 34
3.2.2. HALO-CCDC124 ve SNAP-CCDC124 Plazmitlerinin Çoğaltılması ve Doğrulanması 36
3.2.2.1 HALO-CCDC124 ve SNAP-CCDC124 Plazmitlerinin İzolasyonu ve Enzim Kesim ile Doğrulanması 36
3.2.2.2. Sekanslama 36
3.2.2.3. Transfeksiyon 36
3.2.2.4. Hücre Kültüründen Pelet Eldesi 36
3.2.2.5. Western Blot 37
3.2.3. Görüntüleme 39
3.2.4. GPMVs 39

4. SONUÇLAR 40
4.1. HALO-CCDC124 ve SNAP-CCDC124 Plazmitleri 40
4.2. HALO-CCDC124 ve SNAP-CCDC124 Plazmitlerinin Doğrulanması 42
4.3. HALO-CCDC124, SNAP-CCDC124, CCDC124-GFP Plazmitlerinin Seçilimi 43
4.4. HALO-CCDC124 Proteininin Stres Şartları Altında Lokasyonu 46
4.5. CCDC124 Proteininin Organeller ile İlişkisi 47
4.6. CCDC124 ve DYRK3 Proteininin İlişkisi 48
4.7. Mutant CCDC124 Proteininin Normal ve Stres Koşullarında Lokasyonu 55
4.8. CCDC124 Proteininin Normal ve Stres Şartlarında LLSM 7 Mikroskobunda Uzun Süreli Görüntülenmesi 58
4.9. CCDC124 ve Fibrillarin 7 Proteinlerinin Çekirdekteki Lokalizasyonu 62
4.10. CCDC124 Mutant ve Nakavt Hücrelerde Mitokondri Profili 63
4.11. GPMVs 65
5. TARTIŞMA 67

KAYNAKLAR 71
ÖZGEÇMİŞ 76
EKLER 77

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler ve Kısaltmalar		Açıklamalar
°C	:	Derece Celcius
µg	:	Mikrogram
µl	:	Mikrolitre
µM	:	Mikromolar
µM	:	Mikromolar
ACRYL/BİS	:	Acrylamıde/Bıs-Acrylamıde
APS	:	Ammonium persulfate
ATP	:	Adenozin üç Fosfat
CCD	:	Coiled-coil domain
CCDC124	:	Coiled-coil domain containing 124
DDT	:	Dichlorodiphenyltrichloroethane
DIC	:	diferansiyel girişim kontrastı
DMEM	:	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	:	Dimethyl sulfoxide
DNA	:	Deoxyribonucleic acid
dNTP	:	DNA nükleotid bazları
DTT	:	DL-Dithiothreitol, threo-1,4-Dimercapto-2,3-butanediol
DYRK	:	Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase family
DYRK1	:	Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1
DYRK2	:	Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 2
DYRK3	:	Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 3
DYRK4	:	Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 4
EDTA	:	Ethylenediaminetetraacetic acid
ER	:	Endoplazmik retikulum
EtOH	:	Etil Alkol
FBS	:	Fetal Bovin Serum
FIB	:	Fibrillarin
FITC	:	Floresein izotiyosiyanat
FRAP	:	Floresan geri kazanım

FRET	:	Floresan Rezonans Enerji Transferi
g	:	Gram
GFP	:	Green fluorescent protein
GPMV	:	Giant Plasma Membrane Vesicles
GTPaz	:	Nucleotide guanosine triphosphate-ases
HCT116	:	Kolon kanseri hücre hattı
HEK293T	:	Human embryonic kidney 293 cells
HEPES	:	4-(2-Hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid, N-(2-Hydroxyethyl) piperazine-N′-(2-ethanesulfonic acid)
IDR	:	Intrinsically Disordered Regions
kDa	:	Kilo-Dalton
L	:	Litre
LB	:	Luria Bertani Broth
LCR	:	Low Complexity Regions
LLPS	:	Liquid-liquid phase separation
LLSM	:	Lattice Light Sheet Microscopy
LLSM7	:	Lattice light-sheet microscopy 7
Lso2	:	Late-annotated small open reading frame 2
M	:	Molar
mg	:	Miligram
ml	:	Mililitre
mM	:	Milimolar
mRNA	:	Messenger ribonucleic acid
mtDNA	:	Mitochondrial Deoxyribonucleic acid
PBS	:	Phosphate Buffered Saline
PCM	:	Sentrozom pericentriol material
PTM	:	Post-translasyonel Modifikasyon
PVDF	:	Poly(vinylidene fluoride)
PZR	:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	:	Ribonucleic acid
ROS	:	Reaktif Oksijen Türleri
Rpm	:	Rotorun dakikadaki dönme hızı
rRNA	:	Ribosomal Ribonükleik asit

SDS	:	Sodium dodecyl sulfate
SG	:	Stres Granül
SRM	:	Süper Çözünürlük Mikroskobu
SSRM1	:	Serine/arginine repetitive matrix protein 1
TAE	:	Tris-acetate-EDTA
TBS	:	Tris Buffered Saline
TEMED	:	N′-Tetramethyl ethylenediamine
Tris	:	Tris(hydroxymethyl) aminomethane
U2OS	:	Kemik kanseri epitelyal hücre hattı
WT	:	Wild type

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No:		Sayfa
2.1:	CCDC124'ün üçüncül yapı tahmini.	3
2.2:	CCDC124'ün yapı dinamikleri ve esneklik tahmini.	4
2.3:	DYRK protein ailesi.	5
2.4:	Simülasyon modelinde DYRK3'ün genel yapısı.	6
2.5:	Işık mikroskobunda görüntü oluşumu.	7
2.6:	Konfokal mikroskop çalışma prensibi.	8
2.7:	Süper Rezolüsyon Mikroskopları çalışma prensipleri.	9
2.8:	Hücre çekirdeğinde sıvı-sıvı faz ayrımı.	11
2.9:	Stres granüllerinin oluşumu ve dağılımı.	13
3.1:	SeC61β-Halotag plazmit haritası.	29
3.2:	SeC61β-SNAPtag plazmit haritası.	29
3.3:	CCDC124 gen sekansı ve eklenecek kesim bölgeleri.	30
3.4:	CCDC124 geni forward ve reverse primer tasarlanması.	30
4.1:	Sekans sonucu.	42
4.2:	HALO-CCDC124 ve SNAP-CCDC124 genlerinin Western Blot sonucu.	43
4.3:	HALO-CCDC124, SNAP-CCDC124, CCDC124-GFP plazmitleri ile transfekte edilmiş hücrelerin Konfokal mikroskop görüntüsü.	44
4.4:	HALO-CCDC124, SNAP-CCDC124, CCDC124-GFP plazmitleri ile transfekte edilmiş hücrelere sorbitol ve Poly I:C uygulaması Konfokal mikroskop görüntüleri.	44
4.5:	HALO-CCDC124, SNAP-CCDC124, CCDC124-GFP plazmitleri ile transfekte edilmiş hücrelerin Time-Lapse Konfokal mikroskop görüntüsü.	45
4.6:	HALO-CCDC124, CCDC124-GFP plazmitlerinin ko-transfeksiyonu sonucu, hücrelerin Konfokal mikroskop görüntüsü.	46
4.7:	HALO-CCDC124 plazmiti transfekte edilmiş hücrelere stres maddeleri uygulama sonrası Konfokal mikroskop görüntüsü.	46
4.8:	CCDC124 proteininin organellerle etkileşimi.	48
4.9:	HALO-CCDC124 plazmiti transfekte edilmiş hücrelere GSK626616	49

inhibitörü uygulama sonrası Konfokal mikroskop görüntüsü.
4.10: EGFP-DYRK3(WT), EGFP-DYRK3(K218M) ve mCherry-SRRM1 transfekte edilen hücrelerin Konfokal mikroskop görüntüsü. 50
4.11: CCDC124 plazmitinin EGFP-DYRK3(WT), EGFP-DYRK3(K218M) ve mCherry-SRRM1 plazmitleri ile ko-transfeksiyonu. 51
4.12: CCDC124 plazmitinin EGFP-DYRK3 (WT), EGFP-DYRK3 (K218M) ve mCherry-SRRM1 Plazmitleri ile ko-transfeksiyonu sonrası arsenit uygulaması. 52
4.13: CCDC124 plazmitinin EGFP-DYRK3(WT), EGFP-DYRK3(K218M) ve mCherry-SRRM1 plazmitleri ile ko-transfeksiyonu sonrası sorbitol uygulaması. 54
4.14: Mutant CCDC124 proteininin normal şartlarda Konfokal mikroskop görüntüsü. 55
4.15: Mutant CCDC124 proteinlerine GSK626616 inhibitörü uygulanması. 56
4.16: CCDC124 mutant plazmitleri transfeksiyonu sonrası arsenit uygulaması. 57
4.17: CCDC124-GFP (WT) plazmiti transfekte edilmiş hücrelerin LLSM7 Time Lapse görüntüsü. 58
4.18: CCDC124-GFP (WT) plazmiti transfekte edilmiş hücrelerin arsenit uygulaması, LLSM7 Time Lapse görüntüsü. 59
4.19: CCDC124-GFP (S122A) plazmiti transfekte edilmiş hücrelerin arsenit uygulaması, LLSM7 Time Lapse görüntüsü. 59
4.20: CCDC124-GFP (S141A) plazmiti transfekte edilmiş hücrelerin arsenit uygulaması, LLSM7 Time Lapse görüntüsü. 60
4.21: CCDC124-GFP (Double Mutant) plazmiti transfekte edilmiş hücrelerin arsenit uygulaması, LLSM7 Time Lapse görüntüsü. 60
4.22: Hücre bölünmesinde CCDC124. 61
4.23: HALO-CCDC124 plazmiti transfekte edilmiş hücrelerin sorbitol uygulaması, LLSM7 Time Lapse görüntüsü. 61
4.24: HALO-CCDC124 plazmiti transfekte edilmiş hücrelerin Poly I:C uygulaması, LLSM7 Time Lapse görüntüsü. 62
4.25: CCDC124 Proteini ve Fibrillarin 7 Etkileşimi. 63

4.26: CCDC124 mutant ve nakavt hücrelerde mitokondri. 64
4.27: CCDC124 mutant ve nakavt hücrelerde CCDC124 ve Mitokondri Etkileşimi. 65
4.28: GPMVs Grafiği. 66
5.1: CCDC124'ün kütle spektrofotometre sonucu, String analizi. 70

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo No:		Sayfa
3.1:	Memeli hücre kültürü materyalleri.	16
3.2:	Bakteri hücre kültürü materyalleri.	17
3.3:	Memeli hücre kültür ortamları.	17
3.4:	Luria Broth besiyeri içeriği.	18
3.5:	Luria Broth agar besiyeri içeriği.	18
3.6:	Kullanılan stok solüsyonlar ve hazırlanışları.	19
3.7:	Kullanılan kitler.	21
3.8:	Kullanılan cihazlar.	21
3.9:	Kullanılan mikroskoplar.	22
3.10:	Kullanılan ligandlar.	23
3.11:	Kullanılan kimyasallar.	23
3.12:	Kullanılan vektörler.	25
3.13:	Kullanılan primerler.	26
3.14:	Kullanılan programlar.	26
3.15:	PZR reaksiyon materyalleri ve miktarları.	31
3.16:	PZR termal döngü protokolü.	31
3.17:	PZR ile üretilen CCDC124'ün BglII kesim bileşenleri.	32
3.18:	SeC61β-Halotag plazmiti BglII kesim bileşenleri.	32
3.19:	SeC61β-SNAPtag plazmiti BglII kesim bileşenleri.	33
3.20:	PZR ile üretilen CCDC124'ün EcoRI kesim bileşenleri.	33
3.21:	SeC61β-Halotag plazmiti EcoRI kesim bileşenleri.	33
3.22:	SeC61β-SNAPtag plazmiti EcoRI kesim bileşenleri.	34
3.23:	Kesim sonrası jelden kazanılan ürün miktarları.	34
3.24:	Ligasyon bileşenleri.	35
3.25:	Transformasyon bileşenleri.	35
3.26:	Runnig jel bileşenleri.	37
3.27:	Stacking jel bileşenleri.	37
4.1:	SeC61β-SNAPtag ve SeC61β-Halotag plazmit yoğunlukları.	40
4.2:	Enzim kesim sonrası PZR ürünü CCDC124, SNAP vektör ve HALO vektör yoğunlukları.	41

4.3: Mini Preb. sonucu elde edilen plazmit yoğunlukları. 41

1. GİRİŞ

Çok sayıda protein etkileşimi ve biyokimyasal reaksiyon, ökaryotik hücrelerin içindeki sınırlı alanlarda aynı anda meydana gelir. Fosfolipid membranlar tarafından tanımlanan organeller, çeşitli sinyal yollarının ve biyolojik etkileşimlerin verimli ve spesifik bir şekilde ilerlemesine izin veren nispeten sınırlı alanlar sağlar. Proteinler ve nükleik asitler gibi biyomakromoleküller, sıvı-sıvı faz ayrımı (Liquid-liquid phase separation-LLPS) yoluyla sıvı benzeri membransız kondensatlara konservatif olabilir; bu, hücresel bileşenlerin çeşitli fonksiyonel süreçler için mekânsal olarak tanımlanmış bir şekilde konsantre edilmesi ve ayrılması için başka bir yol sağlar [1].

LLPS hücrelerde zarsız organellerin oluşumu ve ayrışmasının altında yattığı gösterilmiştir, Düzenlenmiş ve tersinir sıvı faz ayrımının belirgin bir örneği, mitoz sırasında, zarsız organellerin nükleer zarf parçalanması üzerine ortadan kaybolduğu ve mitoz tamamlandığında yeniden ortaya çıktığı zaman meydana gelebilir. Çift özgüllük kinaz 3 (Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 3-DYRK3)'ün, mitoz sırasında çeşitli zarsız organel türlerinin merkezi bir çözünmesi olarak işlev gördüğü görülmektedir. DYRK3 kinaz aktivitesi, mitotik sitoplazmanın anormal sıvı benzeri hibrit organellere karışmasını ve iğ gövdelerinin aşırı çekirdeklenmesini önlemek için gereklidir. Hücresel stres üzerine, çift özgüllük kinaz DYRK3'ün, doğası gereği düzensiz N-terminal alanı aracılığıyla stres granüllerine bölündüğünü ve kinaz aktivitesinin, muhtemelen çoklu RNA bağlayıcı proteinleri fosforile ederek stres granüllerinin çözülmesi için gerekli olduğunu kanıtlanmıştır [2], [3], [4]. DYRK3 için yapılan mass spektrofotometrik analizinde CCDC124 ile etkileştiği görülmüştür [2].

CCDC124 sentrozomlarda ve orta cisimcikte bulunan bir proteindir. Çoğu sentrozom proteini gibi bir Coiled-coil domain (CCD) bölgesi bulunmaktadır. Bu protein hücre döngüsünün interfaz evresinde sentrozomda ve telofaz evresinde orta cisimcikte bulunmaktadır. CCDC124, 223 amino asitten oluşmaktadır ve kütle spektrometre analizleri sonucunda kütlesi ~CCDC124 32 kDa olduğu görülmüştür [5], [6].

1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

Bu çalışmada CCDC124'ün hücrelerdeki lokalizasyonu ve translokasyonunun mikroskobik yöntemlerle belirlenmesi, DYRK3 inhibitörü ile yapılacak çalışmalarda, DYRK3 kinaz ile CCDC124 proteini arasındaki işlevsel bir etkileşimin araştırılması amaçlanmaktır.

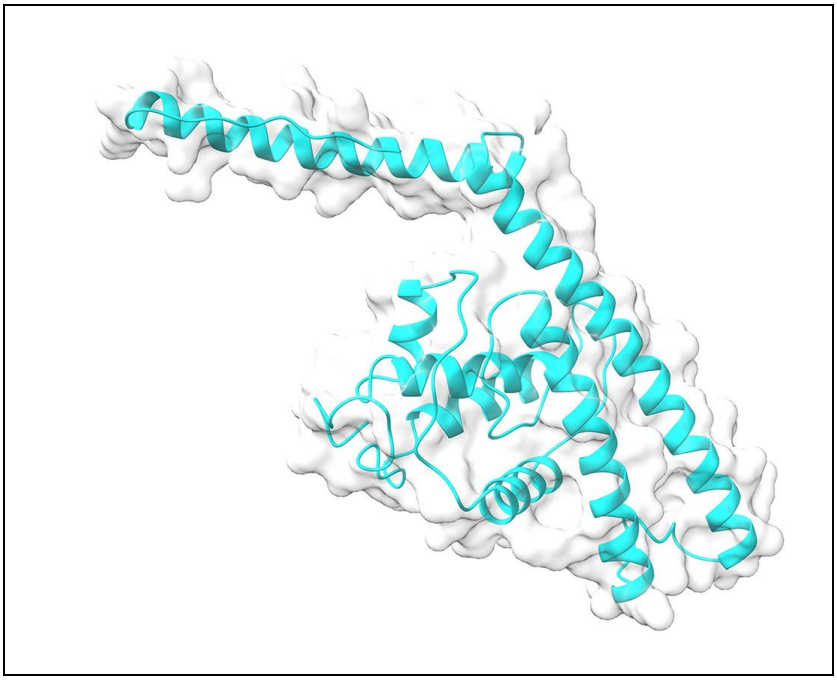
Bu tez çalışması kapsamında daha önce yapılan çalışmalarla hücre bölünmesiyle ilişkili olduğu ve hücre bölünmesinin çeşitli evrelerinde nerelerde konumlandığı ortaya çıkarılan CCDC124 proteinin, hücre içerisindeki lokasyonun ve translokasyonunun kesinleştirilmesi sağlanacaktır. Bununla birlikte LLPS görev yapan DYRK3 ile arasındaki ilişkiye bağlı olarak, CCDC124'ün sıvı sıvı faz ayrımındaki öneminin anlaşılması literatüre fayda sağlayacaktır.

Tez çalışmasında, CCDC124, farklı büyüklüklerdeki ve farklı dalga boylarına yanıt veren floresan proteinlerle işaretlenmiş ve hem normal hem de stres durumlarındaki hücre altı lokalizasyonu belirlenmiştir. Bunun yanı sıra CCDC124'ün hücre içerisinde direkt olarak etkileşimde olduğu organeller ve çekirdek içerisindeki konumu belirlenmiştir. DYRK3 proteini tarafından oluşan stres granüllerinin CCDC124 ile etkileşimine bakılmıştır. Aynı zamanda DYRK inhibitörü kullanılarak CCDC124 hücre içerisinde izlenmiştir. CCDC124 mutant ve nakavt hücre hatlarında etkileşimde olduğu organellerin aktivitesine ve morfolojisine bakılmıştır. Bu görüntüleme işlemleri yüksek çözünürlüklü mikroskoplarda gerçekleştirilmiştir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. CCDC124

Coiled-coil domain containing protein 124 (CCDC124), 223 amino asit uzunluğunda ve 32 kDa ağırlığında ökaryotik organizmalarda yüksek oranda korunmuş bir proteindir (Şekil 2.1) [5].



Şekil 2.1: CCDC124'ün üçüncül yapı tahmini. Wells ve diğerleri tarafından oluşturulan N-terminal kristalografik yapıya dayanan LOMETS ve Robetta araçları tarafından tahmin edilen CCDC124'ün üçüncül yapısı. Yapı şerit rengi: Camgöbeği.

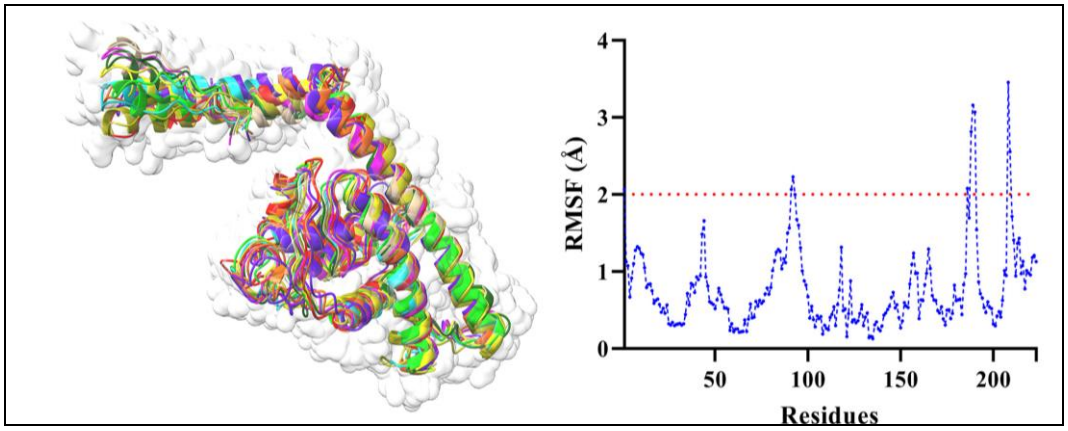
Daha önceki yapılan Northern blot analizlerinde, CCDC124'ün beyin, karaciğer, plasenta, ince bağırsak, kolon, pankreas, prostat ve dalak gibi insan dokularında ekspresyonunun yaygın olduğunu ve beyin, plasenta, karaciğer, dalak ve prostatta nispeten yüksek ekspresyon seviyelerinin tespit edildiği bulunmuştur [5].

CCDC124, yapısında Coiled-coil domain motifi içermektedir [5]. CCD motifi çoğu sentrozom proteininde bulunan bir motiftir [7]. CCDC124, çeşitli mRNA'lar ile etkileşime giren sitokinez ile ilgili bir Ribozom bağlama proteinidir (RBP) [8] .

Ribozom bağlayıcı faktörler ayrıca, mRNA'nın ilk alımından peptit zincirinin uzamasına ve olgun polipeptitin salınmasına kadar translasyonun tüm alt adımları

için gereklidir. Bununla beraber fizyoloji üzerindeki etkileri bilinmeyen birçok ribozomlarla etkileşim kuran protein tanımlanmıştır. Late-annotated short open reading frame 2 (Lso2), CCDC124'ün maya (*Saccharomyces cerevisiae* (*S.c.*)) ortaloğudur. Lso2 ribozomun translasyonun tüm alt adımlarında doğru ilerlemenin altında yatan GTPaz aktivasyon merkezi bölgesine çapraz bağlandığını bilinmektedir. Bu spesifik bağlanma aktivitesi, CCD içeren sarmal-kıvrımlı alan olan Lso2'nin insan ortolojisinde korunmuştur [9].

Düşük karmaşıklık bölgeler (LCR), çoğunlukla düzensiz bölgelerdir ve daha az amino asit topolojisi ve tekrarlarını içeren bir bileşimden oluşur. Düşük karmaşıklık bölgeleri (LCR) kümelenme-düzenleyici işlevleri nedeniyle, CCDC124'ün kümeleşme eğilimi incelenmiştir. Bu incelenme PlaToLoCo programı ile gerçekleştirilmiş ve CCDC124 proteininin N terminal bölgesinin LCR bölgeleri açığa çıkarılmıştır. CCDC124'ün, özellikle 151 ve 156 amino asit bölgesi (151-IAVLSV-156) arasında daha yüksek bir agregasyon eğilimine sahip olduğunu gösterilmiştir. CCDC124'ün özellikle N-terminal kolunun ve C-terminal ucunun uzun ve kısa düzensiz bölgelere sahip olduğunu ortaya çıkarılmıştır (Şekil 2.2.) [6].

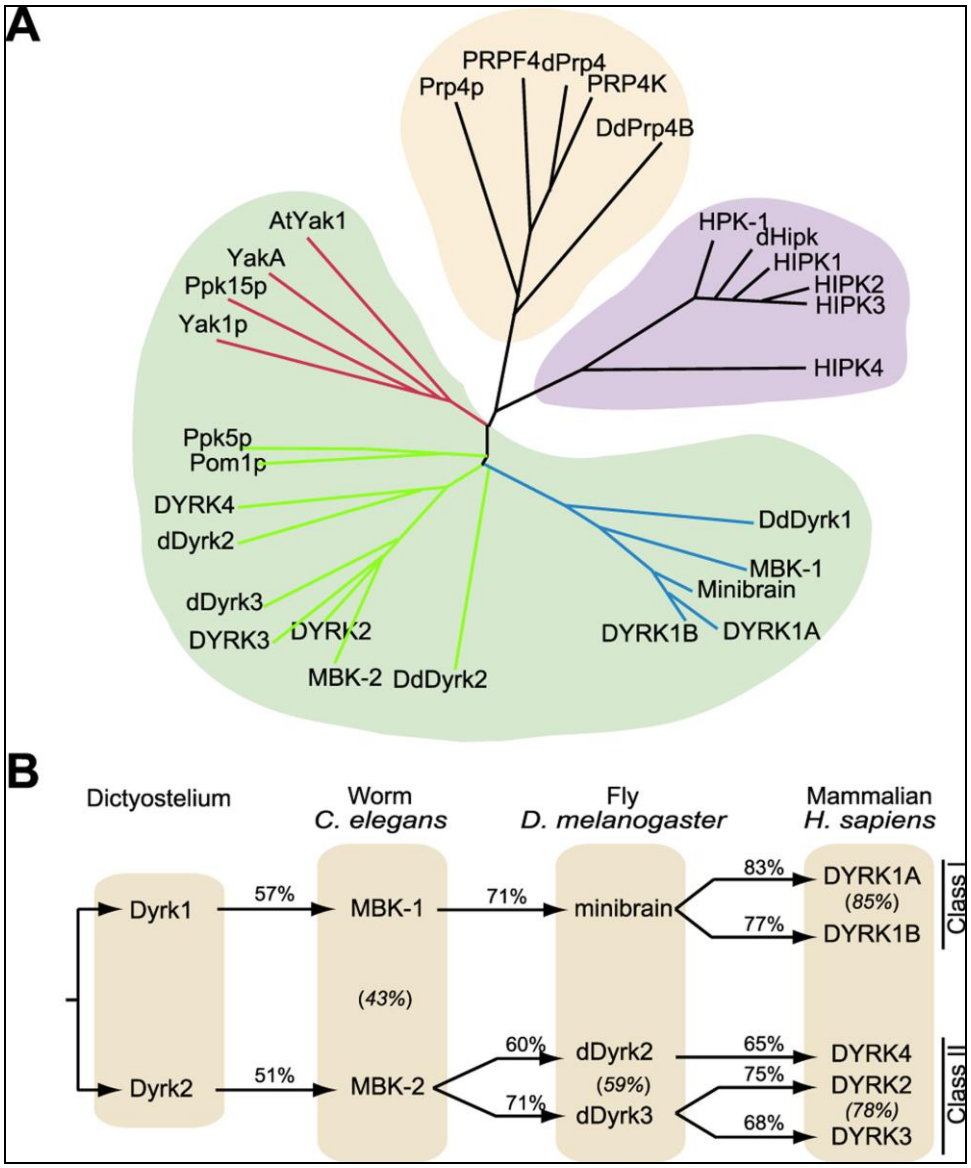


Şekil 2.2: CCDC124'ün yapı dinamikleri ve esneklik tahmini.

2.2. DYRK3

DYRK3, mayadan insanlara kadar birçok üyesi olan, evrimsel olarak yüksek korunmuşlukta bir protein kinaz ailesidir (Şekil 2.3). DYRK'ler, insanlarda birçok farklı hücresel süreçte yer alan geniş bir protein setini fosforile eden birçok geni

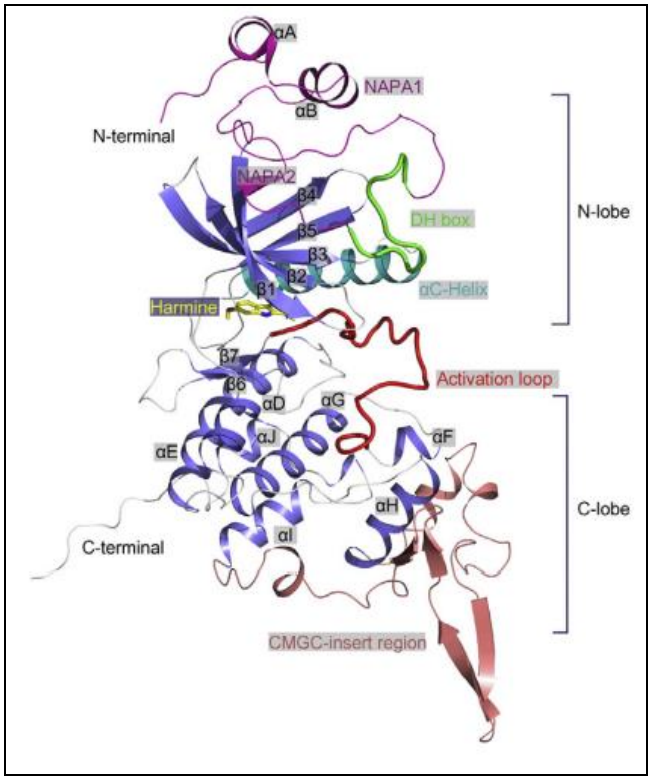
etkileyebilen faktörlerdir. Bunlar, genomik instabilite artan proliferasyona, programlanmış hücre ölümüne veya işlev bozukluğu, tümörün başlangıcı ve ilerlemesiyle ilgili olan sinyal yolaklarına kadar kanserin ayırt edici özellikleriyle bağlantısı kurulmuş faktörleri içerir [10].



Şekil 2.3: DYRK protein ailesi. a) Farklı DYRK ailesi üyelerinde kinaz alanının evrimsel farklılaşmasını gösteren köksüz filogenetik ağaç. b) DYRK alt familyası üyeleri, sınıf I ve sınıf II olmak üzere 2 ana gruba ayrılabilir.

Memeli DYRK alt ailesi 5 üyeden oluşur: DYRK1A, DYRK1B (MİRK olarak da adlandırılır), DYRK2, DYRK3 (REDK olarak da adlandırılır) ve DYRK4 [12]. Tüm insan DYRK'leri, hücrelerin sitozolünde birikir ve DYRK1A, DYRK2 ve DYRK4, özel NLS'ler aracılığıyla çekirdeğe translokasyon yapabilir.

Çift özgüllük kinaz DYRK3, çeşitli hücre içi kondensatların oluşumunu ve çözünmesini kontrol ederek çeşitli hücre fizyolojik süreçlerini düzenler. DYRK3'ün, memeli hücrelerinde ER ile Golgi kompleksi arasındaki zar trafiğini düzenlemek için erken salgı yolunun zar yapılarıyla ilişkili proteinlerin yoğunlaşması ve çözünmesi arasında dinamik bir denge kurduğu gösterilmiştir (Şekil 2.4) [13].



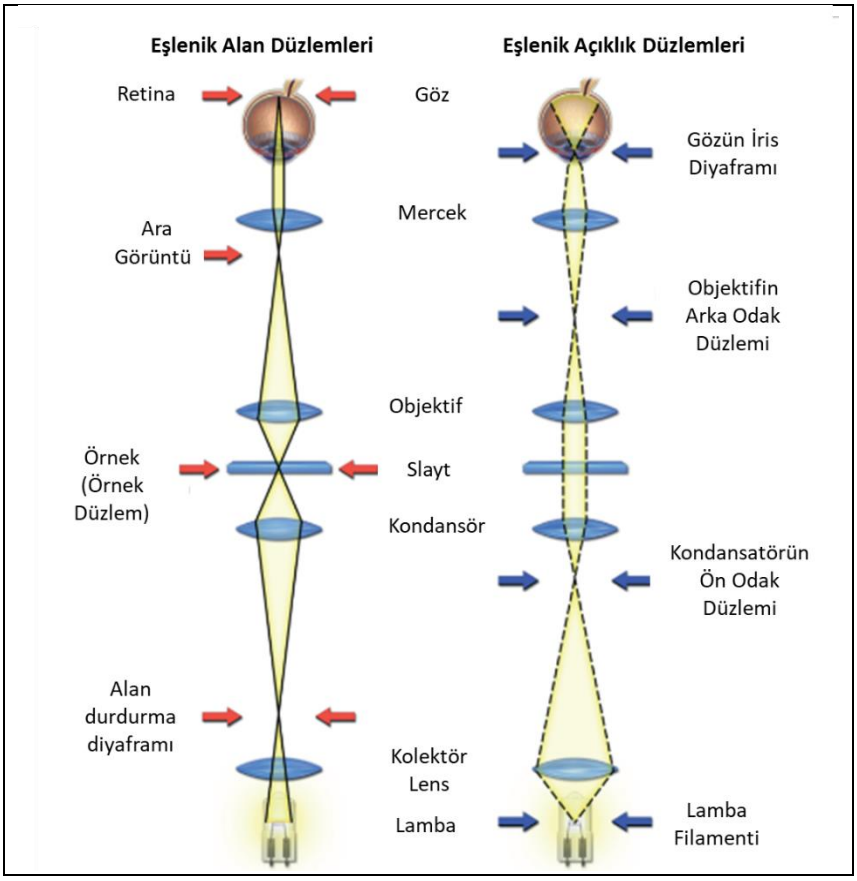
Şekil 2.4: Simülasyon modelinde DYRK3'ün genel yapısı.
Macenta, menekşe ve cam göbeği sırasıyla NAPA alanını, N lobunu ve C lobunu temsil eder. Etiketlenen renkler ile metin renkleri uyumludur.

Hücresel stres üzerine, çift özgüllük kinaz DYRK3'ün, doğası gereği düzensiz N-terminal alanı aracılığıyla stres granüllerine ayrıldığını ve kinaz aktivitesinin, muhtemelen çoklu RNA bağlayıcı proteinleri fosforile ederek, stres granüllerinin çözünmesi için gereklidir. DYRK3'ün *Caenorhabditis elegans* homologu olan MBK-2'nin, fosforilasyon yoluyla embriyonun ilk hücre bölünmesi sırasında P-granüllerinin çözünmesini kontrol etmektedir. Hem sitoplazmada hem de çekirdekte çok sayıda zarsız organelin mitoz sırasında kaybolduğu veya stres granülleri durumunda mitotik hücrelerde oluşmaya teşvik edilemediği bilinmektedir [2].

2.3. Hücre Görüntüleme Sistemleri

2.3.1. Işık Mikroskobu

Işık mikroskobu teknikleri ikiye ayrılabilir: aydınlık alan ve floresan. Aydınlık alan mikroskobunda, ışık kaynağı ve algılama hedefi, numunenin karşıt taraflarına yerleştirilir ve numune, numune ışığı emerken, saçarken veya saptırırken içerisinde geçen ışık üzerindeki etkisiyle görüntülenir. Görüntülenecek numunenin çoğu kalınlık olarak ince ve şeffaf olduğundan, fazla ışığı emmezler. Numuneler tarafından indüklenen ışığın faz kaymasının görülmesini sağlayan optikler eklenmeden görüntülenmesi zordur. Bu faz kaymasını görsele dönüştürmek için en yaygın kullanılan iki teknik, numunelerin açık bir arka plan üzerinde karanlık görünmesini sağlayacak olan faz kontrastı ve numunelere üç boyutlu (3B) gölgeli bir görünüm veren diferansiyel girişim kontrastıdır (DIC) (Şekil 2.5) [14].

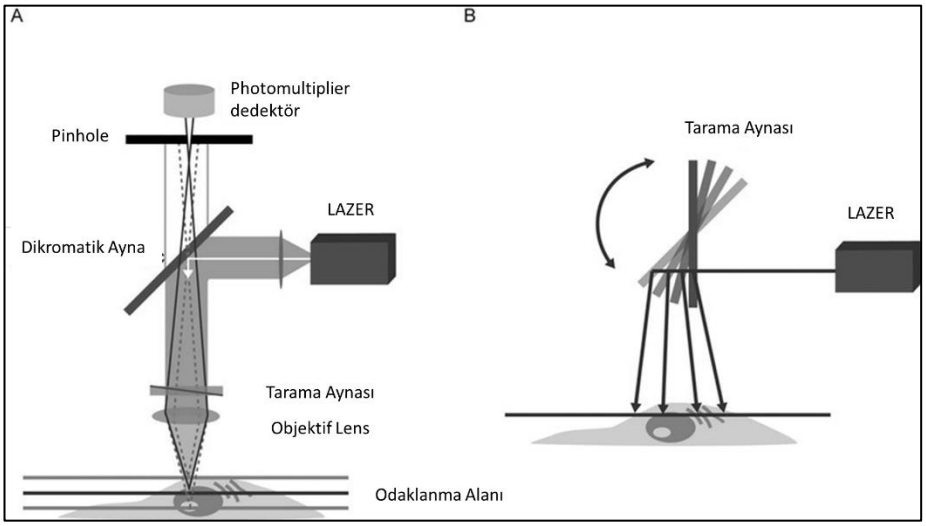


Şekil 2.5: Işık mikroskobunda görüntü oluşumu.

2.3.2. Konfokal Mikroskop

Konfokal mikroskop bir noktada ışık kaynağı üreterek dokuların derinliklerini yüksek çözünürlükte görselleştirmektedir (Şekil 2.6.). Ve elde edilen bu görüntünün 3B rekonstrüksiyonları için optik bölümleme sağlayan odak dışı ışığı reddeder. Temel çalışma prensibi bir ışık kaynağından yani lazerden çıkan ışığı belli kırınımlarla örneği aydınlatma ve algılama optiklerinin, dedektör üzerinde gerçek görüntüyü oluşturmak için numune üzerinde hareket ettirilen ışığın aynı kırınımla istenilen o sınırlı alana odaklanmasıdır. Konfokal mikroskopta görüntü alınırken tüm görünen alanı aydınlatılırken, odak alanı dışarısındaki herhangi bir kaynağın veya örneğin alana etkisi yoktur. Bu şekilde örnekte oluşacak bulanıklığı ve istenmeyen kirlilikleri azaltmaktadır [15].

Bununla birlikte birçok süper rezolüsyon mikroskobu gibi hücre içerisinde bulunan makromoleküllerin kendi ortamlarında gözlemlenmesini sağlar. Bu özelliği sayesinde biyofiziksel olarak değişiklik olmadan en doğru sonuçlara varmakta yardımcı olur. Aynı zamanda uzun süreli görüntülemelerde zamansal olarak hücredeki değişimi gözlemlemek açısından oldukça önemlidir [16].

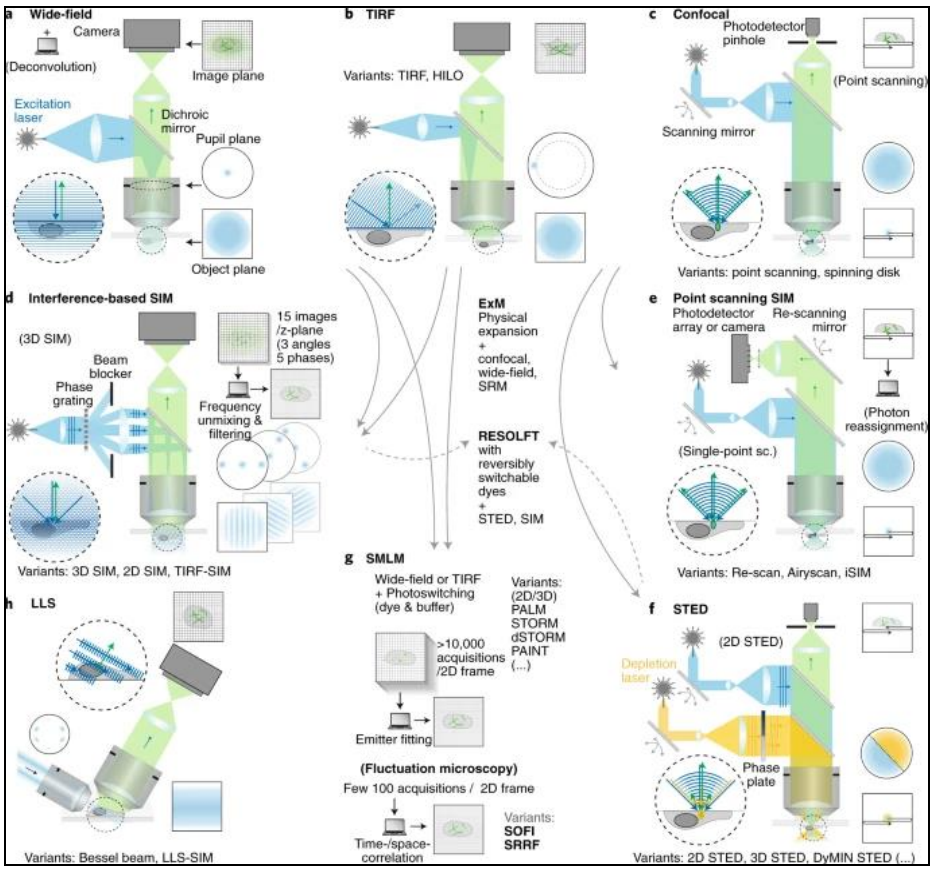


Şekil 2.6: Konfokal mikroskop çalışma prensibi. a) Örneği görüntülemek için lazerden gelen ışık ayna ile örneğe yansır ve örnekten gelen ışık dedektörde toplanır. b) Lazerden gelen ışık ile örneğin tüm alanını taramak için kullanılan sistem.

2.3.3. Lattice Light Sheet Mikroskop

LSSM süper rezolüsyon mikroskobudur. Süper rezolüsyon mikroskopları (SRM), optik çözünürlüğü kabaca 250 nm ile sınırlayan ve daha önce aşılmaz olduğu düşünülen fiziksel bir engel olan kırınım sınırını aşmayı başarmışlardır. Aynı zamanda görüntüdeki netlik engelini de aşmıştır. SRM teknikleri, hücre altı organizasyonun benzeri görülmemiş ayrıntılarla canlı/cansız örnekleri uzun süreli görüntüye dönüştürülmesine olanak sağlar [17], [18].

Süper çözünürlüklü mikroskopların görüntü alabilmeleri için görüntülenecek örnekte floresan protein veya boya olması gerekmektedir. Florasan proteinlerden çok daha fazla foton üretebildikleri için, organik floroforlar bu durumda tercih sebebi olabilmektedirler. Halotag ve SNAPtag etiketleri, canlı hücrelerde organik floroforlar ile moleküler özgüllük elde etmek için en sık kullanılan kendi kendini etiketleyen proteinlerdir. SRM'ın bir çok örneği vardır (Şekil 2.7) [19].



Şekil 2.7: Süper Rezolüsyon Mikroskopları çalışma prensipleri. Yaygın geleneksel (a–c) ve süper çözünürlüklü mikroskopi tekniklerinin (d–h) basitleştirilmiş ışık yolları.

2.3.4. Floresan Boyalar ve Proteinler

Floresan boyalar ve proteinler, hücrede var olan yapıların ve gerçekleşen süreçlerin yüksek hassasiyet ve özgüllükle görselle dönüştürülmesini ve araştırılmasını sağlamaktadır. Bu özelliği ile mikroskopi alanında büyük gelişmeler sağlanmıştır. Bu floresan problar, belirli bir dalga boyunda ışığı emme ve daha uzun bir dalga boyunda ışık yayma yöntemiyle görüntü oluşmasını seçici bir şekilde sağlamaktadır. Floresein izotiyosiyanat (FITC), rodamin ve siyanin boyaları gibi floresan boyalar, çeşitli uyarma ve emisyon spektrumları, yüksek kuantum verimi ve foto-stabilite nedeniyle konfokal mikroskopi görüntüleme sistemlerinde için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu boyalar, antikorlar, nükleik asitler ve küçük moleküller dahil olmak üzere çeşitli biyolojik moleküllere konjuge edilerek hücresel yapıların veya ilgilenilen moleküllerin, proteinlerin spesifik olarak hedeflenmesini ve direkt olarak etiketlenmesini sağlar [15], [18], [20].

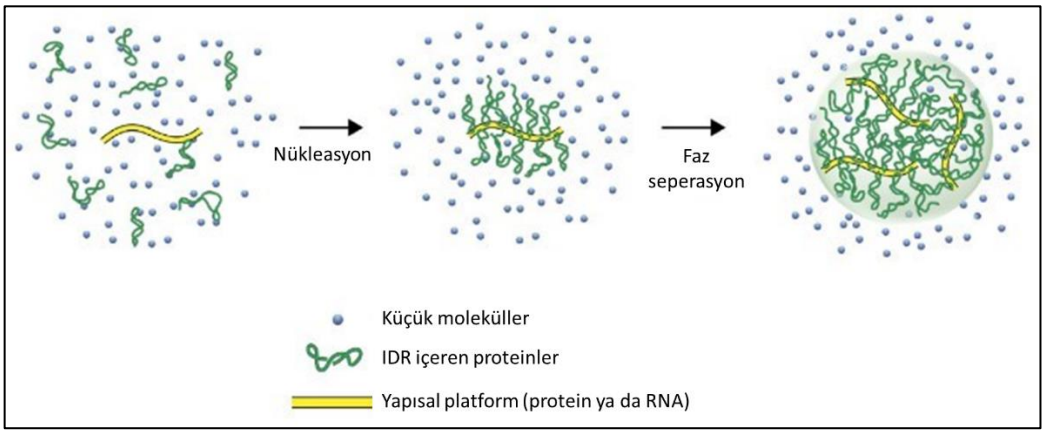
Görüntüleme sistemlerinde en yaygın olarak kullanılan floresan proteinlerin başında Yeşil floresan proteini (GFP) gelmektedir. GFP, ilk olarak Denizanası Aequorea victoria'da keşfedilmiştir ve 238 amino asit ve 27 kDa olan bir proteindir. Boyutunun diğer floresan proteinlere göre daha küçük olması, floresan proteinlerin ilk kullanılmaya başladığı zamanlarda öne çıkmasını sağlamıştır. İlk keşfedilen GFP' de değişiklikler yapılarak biyosensörler yapmak amacıyla kullanılmıştır. GFP ve varyantları gibi floresan proteinleri, canlı hücre görüntüleme sistemlerinin temel taşlarını oluşturmaktadır. Bu proteinler doğal halleri ile floresan özelliğe sahiptir ve etiketlenen moleküllerin/ makro-moleküllerin ekspresyonu devam ettikçe bu floresans proteinlerinde ekspresyonu devam eder. Yapılan çalışmalarla hücreleri canlı ve uzun süreli görüntüle başarılmış ve etiketlenen yapıları dinamik süreçte gerçek zamanlı takip edilmesi gerçekleştirilmiştir. Floresan rezonans enerji transferi (FRET) ve foto-ağartmadan sonra floresan geri kazanımı (FRAP) gibi ileri tekniklerin ortaya çıkışı, konfokal mikroskopi görüntülemenin çok yönlülüğünü daha da artırarak protein-protein etkileşimleri, hücre içi sinyal dinamikleri ve moleküler hareketlilik çalışmalarını olağan kılmıştır. Gelişmiş parlaklık, foto-stabilite ve spektral özelliklere sahip yeni floresan boyaların ve proteinlerin geliştirilmesi, hücresel biyolojinin inceliklerini daha derine inmesine ve karmaşık biyolojik olayları çözümlenmesine olanak sağlamıştır [21], [22], [23].

2.4. Sıvı Sıvı Faz Ayrımı

Bazı proteinler ve nükleik asitler, sıvı-sıvı faz ayrımı (LLPS) olarak bilinen bir fenomen olan bir hücre içinde farklı sıvı damlacıkları veya bölmeleri oluşturarak faz olarak ortamdan farklı olabilir. Gen ifadesi, sinyal iletimi ve zarsız organellerin üretimi, hücresel organizasyon için gerekli olan birçok işlem LLPS tarafından kontrol edilen hücresel aktivitelerden bazılarıdır. Proteinler, RNA ve DNA gibi biyo-makromoleküller faz ayrımına neden olur. Hidrofobik temaslar, elektrostatik etkileşimler, pi-pi yığılması ve konsantrasyon farklılıklarının getirdiği sıvı-sıvı karışımı gibi çok sayıda kuvvet bu etkileşimlerden sorumlu olabilir [24], [25] .

LLPS'de sebep olan birçok protein, yapılarında anormal alanlardan olan özünde düzensiz bölgeler (Intrinsically Disordered Regions-IDR) bulundurur. IDR'ler sıklıkla belirli amino asitlerin tekrarları gibi düşük karmaşıklıkta diziler içerir, ancak net bir üç boyutlu yapıya sahip değildir. Faz ayrımı, IDR'lerin zayıf ve çok değerlikli etkileşimler için sunduğu alanları sayesinde gerçekleşir (Şekil2.8) [26].

RNA molekülleri de LLPS'nin oluşumunda etkilidir. RNA moleküllerindeki tekrarlayan diziler veya belirli yapısal modeller, protein alımı için iskele görevi üstlenerek LLPS ye sebep olabilir. Örneğin FET protein ailesindekiler (FUS, EWSR1, TAF15) RNA bağlayıcı proteinler, RNA yardımı ile LLPS'nin oluşumuna yardım eder. Bu proteinler hem RNA bağlayıcı alanlara hem de IDR'lere sahiptir [27].



Şekil 2.8: Hücre çekirdeğinde sıvı-sıvı faz ayrımı.

Post-translasyonel değişiklikler (PTM), proteinlerin LLPS özelliklerini etkileyebilir. Hücrede gerçekleşen PTM'ler fosforilasyon, asetilasyon ve metilasyon gibi modifikasyonlardır. Proteinde gerçekleşen fosforilasyon merkezindeki değişim LLPS'yi teşvik edebilir ya da bozabilir. PTM' ler, faz ayrımının derecesini ve dinamiklerini değiştiren ve hücresel aktiviteyi etkileyen kontrol mekanizmaları olarak çalışır [29], [30].

Şaperonlar ve yardımcı faktörler bu LLPS'nin dinamik dengesi için hayati öneme sahiptir. Moleküler şaperonlar, protein katlanmasına yardımcı olur ve anormal faz ayrışmasını ve toplanmasını durdurmak amacıyla proteinleri di-asosiye olmaya yönlendirir [31].

LLPS, çeşitli zarsız organellerin oluşumunda kullanılır. Örneğin stres granülleri, P gövdeleri ve nükleoller LLPS tarafından teşvik edilir. Bu organeller, mRNA kontrolü, RNA işleme ve ribozom biyogenezi gibi hücre işleyişine direkt olarak etki sağlayacak işlevlerde görev alır. Bu şekilde kompartmanlaşma etkili bir şekilde bölümlere ayrılan kısımlarda işlevlerin yerine getirilmesini kolaylaştırır [25].

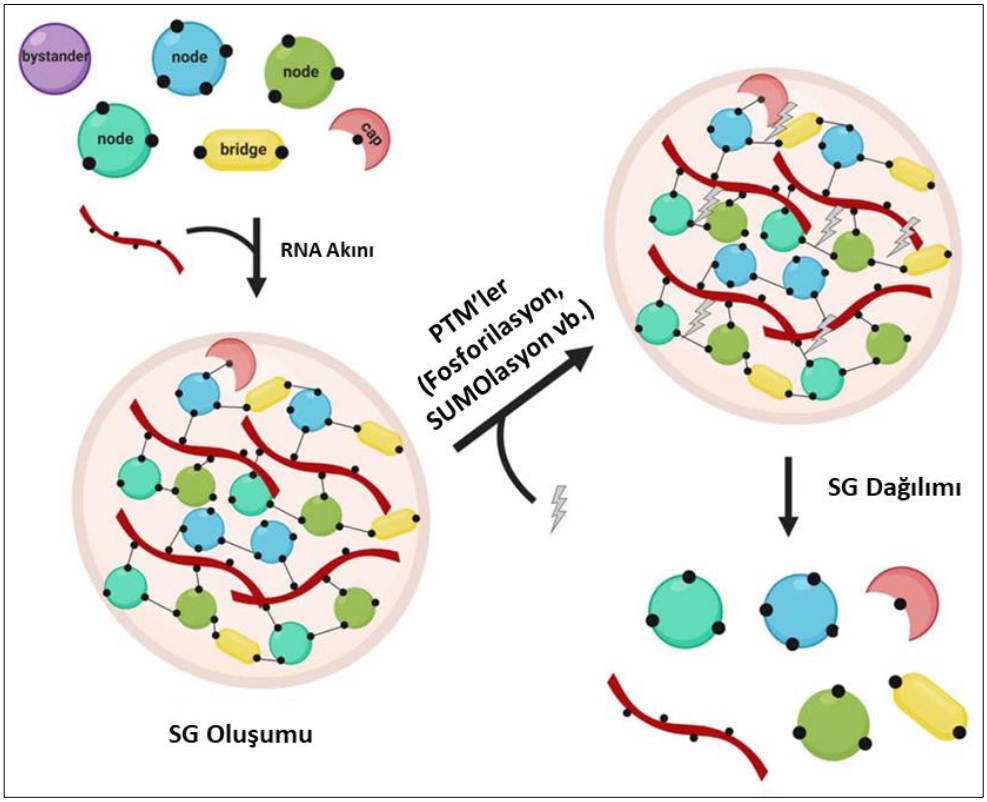
LLPS, transkripsiyonel kontrolde de rol almaktadır. Faz ayırma, transkripsiyonel kondensatlar oluşturmak için gen ekspresyonunun düzenlenmesi için gerekli olan belirli molekülleri transkripsiyon faktörleri, ko-aktivatörler ve kromatin değiştiricilerle birleştirebilen bir süreçtir. Genlerin doğru aktivasyonunu veya baskılanmasını sağlamak için LLPS, gen ekspresyonunun uzay-zamansal kontrolüne yardımcı olur [25].

Bununla birlikte LLPS'nin çeşitli hastalıklarla da ilişkilendirildiğini gösteren çalışmalar vardır. Amyotrofik lateral skleroz (ALS), Alzheimer hastalığı ve Huntington hastalığı gibi nörodejeneratif durumlar, normal olmayan LLPS ve protein agregatlarının üretimi ve birikimi ile bağlantılıdır. LLPS düzensizliğinin neden olduğu yanlış katlanmış proteinlerin birikmesi, hücresel homeostazı bozabileceği gibi hastalıkların tetiklenmesine ve şiddetinin artmasına neden olabilir [30], [CCDC124].

2.5. Hücresel Stresler ve Stres Granülleri

Ökaryotik hücrelerin sitoplazmik stres granülleri, çeşitli streslere yanıt olarak gelişen dinamik, zarsız organellerdir dolayısı ile koruyucu fosfolipid bir zardan yoksundur. Sitoplazmik stres granüllerinin yoğunluğu genellikle RNA bağlayıcı

proteinlerden, haberci RNA'dan (mRNA) ve kodlanmayan RNA'lardan oluşur. Termal (ısı) şok, oksidatif stres, ozmotik stres, viral enfeksiyon ve beslenme yetersizliği gibi dış etkilere maruz kalan hücrelerde stres granülleri oluştuğu görülmektedir. Gen ifadesini düzenlemek ve stresli durumlarda hücreyi korumak, stres granüllerinin temel işlevlerindendir. Translasyonun başlaması, strese maruz kalan hücrelerde genellikle baskılanır ve bu da translasyona girmemiş mRNA'ların birikmesine sebebiyet verir. Translasyona uğramamış mRNA'lar, onlarla giden RNA bağlayıcı proteinler ile stres granüllerinin temelini oluşturur ve bu yapı onların bozulmalarını önler ve koşullar daha uygun hale geldiği zamana kadar korunmalarını ve depolanmalarını sağlar. Stres granülleri, belirli mRNA'ların hücrede taşınmasını ve lokalizasyonunu etkileyebilir. Stres granülleri, mRNA'ları ve ilgili proteinleri yakalayarak bu moleküllerin hareketliliğini ve dağılımını etkiler. Stres granülleri koşullara bağlı olarak oluşan-dağılan dinamik yapılardır. Stres koşulları geçtikten sonra, granüle girmiş mRNA'lar serbest kalarak ve hücrenin düzenli fonksiyonlarının devamı sağlanır [33], [34], [35]. Şekil 2.9.'da stres granüllerinin oluşum ve dağılma süreçleri gösterilmiştir.



Şekil 2.9: Stres granüllerinin oluşumu ve dağılımı.

2.6. Mitokondri

Mitokondri, yaklaşık iki milyar yıl önce, öncü bir modern ökaryotik hücrenin proteo-bakteriyi hücre içerisine almasıyla ortaya çıkmıştır [36]. Günümüzde ise mitokondri, çeşitli hücresel süreçlerde kritik bir rol oynayan ökaryotik hücrelerde bulunan bir organeldir. Bu Mitokondri çift zarlı yapıda olup, mitokondriyal DNA (mtDNA) olarak adlandırılan kendine özgü genetik materyale sahiptir. Hücrenin ana enerji kaynağı olan adenozin trifosfat (ATP) üretiminden görevlidir. Bu görevinin yanı sıra hücresel metabolizmanın düzenlenmesi, kalsiyum homeostazı, reaktif oksijen türleri (ROS) üretimi ve apoptoz gibi temel hücresel işlevlerde de fonksiyoneldir. Yapılan çalışmalarda mitokondrinin ayrıca sinyal yolaklarının düzenlenmesi, adaptif bağışıklık ve farklılaşma gibi olaylarda rol aldığı gösterilmiştir. Mitokondriyal fonksiyondaki kusurlar, nörodejeneratif hastalıklar, metabolik sendromlar ve yaşlanma dahil olmak üzere çok çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilmiştir [18], [19], [20], [21], [22].

Mitokondride yaşanan stres, mitokondride işlevsel bozukluklara veya yapısal bozulmasına sebep olur. Bu durum hücrenin enerji metabolizmasının bozulmasına sebep olur. Mitokondri, işlevsel kararlılığını korumak için sürekli olarak füzyon, bölünme ve dönüşüme uğrayan oldukça dinamik bir organeldir. Mitokondride stresin kaynağı içsel veya dış kaynaklı olabilir. İç faktörler, mtDNA mutasyonları, mitokondriyal protein sentezindeki değişiklikleri veya mitokondriyal dinamiklerdeki dengesizlikler olarak sınıflandırılırken dış faktörler ise oksidatif stres, besin yoksunluğu, toksinler ve hastalık etmenleridir. Mitokondriyal stres, bozulmuş oksidatif fosforilasyon, azalmış ATP üretimi, artan reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi, değiştirilmiş kalsiyum sinyali ve bozulmuş mitokondriyal membran potansiyeli dahil olmak üzere birçok şekilde gerçekleşebilir. Bu durum mtDNA hasarına, mitokondriyal proteinin yanlış katlanmasına ve mitokondriyal kalite kontrol mekanizmalarında hasara yol açabilir. Mitokondriyal stres, nörodejeneratif hastalıklar, kardiyovasküler bozukluklar, metabolik sendromlar ve kanser dahil olmak üzere çeşitli patolojik durumlarda rol oynamaktadır. Mitokondriyal stresin altında yatan moleküler mekanizmaları ve bunun hücre fizyoloji üzerindeki etkisini anlamak, mitokondriyal disfonksiyonu hafifletmek ve hücresel homeostazı sürdürmek için çok önemlidir [37], [42], [43].

2.7. Agrezom

Agrezomlar, ilk olarak Kopito ve arkadaşları (2000) tarafından hücrelerde yanlış katlanmış proteinleri içeren nüklear “membransız sitoplazmik inklüzyon” olarak tanımlanmıştır [44]. Daha sonra yapılan çalışmalarda agrazomlarda ER proteinlerinin birikebileceği bulunmuştur [45]. Özellikle farklı hücre tipleri kullanılarak farklı koşullar altında gözlemlenen çeşitli protein inklüzyon cisimciklerinin birbirleriyle olan ilişkileri ve aynı temel yapıya sahip olup olmadıkları araştırılmıştır [46], [47]. Son yıllarda agrezomlar, memeli hücrelerinde, stres kaynaklı yanlış katlanmış proteinleri; ubikitini, moleküler şaperonları ve proteazomları co-lokalize eden nuclear inclusion body olarak tanımlanmaktadır. Agrezomlar ayrıca yanlış katlanmış toksik özellikteki proteinlerin otofaji aracılı degradasyonunu da sağlamaktadır [48]. Agresomların birleşmesi (assembly) perinükleer bir yapı olan sentrozomda gerçekleşir [49]. Sentrozom pericentriol material (PCM) ile çevrilmiştir ve hücrelerde MTOC (microtubule organizing centre) olarak görev alır. Ubikitin proteazom sistemi aracılığı ile lokalize protein bozulmaları için bir platform sağlar [50].

Agrozomlarla yapılan çalışmalarda çekirdekten agrozom yapıların çıkarıldığı görülmüştür. Bu yapıların içerisinde Fibrillarin olduğu kanıtlanmıştır. Fibrillarin (FIB), nükleolusun bir belirteci olarak görev yapar. rRNA'nın işlenmesinden sorumludur ve nükleolusun yoğun fibriller bileşeninde lokalizedir [32], [33]. Fibrilarin-pozitif cisimler, hasarlı rDNA, otofaji belirteçleri içerir ve heterokromatin fragmanları eşliğinde sitoplazmaya salınır [53].

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Memeli Hücre Kültürü Materyalleri ve Kullanılan Hücreler

. Tez çalışması kapsamında U2OS, HEK293T, HCT116 ve HeLa insan hücre hatları kullanılmıştır. Hücre hatları Gebze Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Tazebay laboratuvarlarında bulunmakta olup var olan hücre hattı stokları kullanılmıştır. HCT116 (8), HCT116 (11) laboratuvarımızda CRISPR-Cas9 teknolojisi ile daha önceki çalışmalarda özel olarak üretilmiştir. HCT116 (8), hücre hattında CCDC124 geni homozigot ve 8 nükleotit delesyonludur.
HCT116 (11), hücre hattında CCDC124 geni heterezigot, iki alelde 2 insersiyon ve ikinci alelde 4 nükleotid delesyon, sonrasında 10 nükleotid değişmiş ve 1 nükleotid delesyon içermektedir. Tablo 3.1.'de hücre hattı çalışmasında kullanılan materyaller ve üretici firmaları gösterilmektedir.

Tablo 3.1: Memeli hücre kültürü materyalleri.

Materyal Adı	Markası- Katalog Numarası
Petri	Thermo-Fisher/150318
Flask	Thermo-Fisher/159934
Hemasitometri	İSOLAB/075.03.002
Pipetler	GILSON/ F167360
Serolojik Pipet 10 ml	Capp/ Harmony SP-10-C
Serolojik Pipet 5 ml	Capp/ Harmony SP-5-C
6 kuyucuklu petri	Thermo-Fisher/ 152034
Cover Glasess 15mm	Paul Marienfeld/0111550
Pens	İSOLAB /LB.IS.052.30.001
Zefiran	Dermosept
Otomatik Pipetör	CAPPController Pipette
μ-Slide 8 Well Glass Bottom	IBIDI/ 80807-90

3.1.2. Bakteri Hücre Kültürü Materyalleri ve Kullanılan Hücreler

Gerçekleştirilen bakteriyel deneylerin tamamında *Escherichia coli* DH5α suşu kullanılmıştır. *Escherichia coli* DH5α suşu ticari olarak satın alınmıştır. Tablo 3.2.'de bakteri hücre kültürü materyalleri gösterilmektedir.

Tablo 3.2: Bakteri hücre kültürü materyalleri.

Materyal Adı	Markası- Katalog Numarası
Petri	FIRATMED/ PS5092.060x10
Vida kapaklı cam şişe	İSOLAB/ 061.01.100C
Drigalski spatülü	Superior/ C180024
Falkon 15mL/ 50ml	CAPP/5100015C/5100050C
Erlenmeyer	İSOLAB/ 028.01.051
DH5-alpha kompetan *E. coli*	NEB/ C2987H

3.1.3. Kültür Ortamları

3.1.3.1. Memeli Hücre Kültür Ortamları

Memeli hücre kültüründe kullanılan besiyeri Tablo 3.3'te belirtilen oranlarda karıştırılarak kullanılmıştır. Besiyeri hücrelere uygulanmadan önce su banyosunda 37°C'de ısıtılmıştır. Tablo 3.3.'de memeli hücre kültürü ortamları gösterilmektedir.

Tablo 3.3: Memeli hücre kültür ortamları.

Besiyeri Bileşeni	Miktar (Ağırlık/Hacim)
DMEM	450mL
FBS	50mL
Penisilin- Streptomisin	5mL

3.1.3.2. Bakteri Hücre Kültür Ortamları

Luria Broth (LB) besiyeri için Tablo 3.4' de gösterilen bileşenler belirtilen miktarlarda tartılıp 1L distile su (dH_2O) eklenerek manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Ardından otoklav cihazında 121°C'de 15 dakika boyunca steril edilmiştir. LB-Agar besiyeri için Tablo 3.5' de belirtilen miktarlar kullanılarak aynı yöntem tekrarlanmıştır. Transformasyon sonrasında kullanılan besiyeri ortamlarında *Escherichia coli* DH5α suşu için kanamisin (final kosantrasyonu 50 µg/mL) besi ortamına ilave edilmiştir. Tablo 3.4.'de Luria Broth besiyeri içeriği gösterilmektedir. Tablo 3.5.'de Luria Broth agar besiyeri içeriği gösterilmektedir.

Tablo 3.4: Luria Broth besiyeri içeriği.

Besiyeri Bileşeni	**Miktar (Ağırlık/Hacim)**
Pepton	10 g/L
Maya Ekstraktı	5 g/L
NaCl	10 g/L

Tablo 3.5: Luria Broth agar besiyeri içeriği.

Besiyeri Bileşeni	**Miktar (Ağırlık/Hacim)**
Pepton	10 g/L
Maya Ekstraktı	5 g/L
NaCl	10 g/L
Agar	15 g/L

3.1.4. Kullanılan Stok Solüsyonlar

Kullanılan stok solüsyonlar Tablo 3.6' da gösterilmektedir.

Tablo 3.6: Kullanılan stok solüsyonlar ve hazırlanışları.

Solüsyon Adı	**Hazırlanışı**
1X TBS-T Tamponu	10X TBS solüsyonu distile su ile 1X'e seyreltilmiştir ve son konsantrasyonu %0,1 olacak şekilde Tween 20 eklenmiştir.
Blocking Solüsyonu	1X-TBS-T üzerine son konsantrasyonu %5 süt tozu olacak şekilde karıştırılarak homojen hale getirilmiştir.
Running Tamponu	Wet transfer buffer distile su ile 1X'e seyreltilip 1000 ml için 4 ml % 25 SDS eklenmiştir.
Primer Antikor	CCDC124 antikorları (CCDC124 ab (rb. poly) Novus/ NBP2-48746), 1/1000 olacak şekilde blocking solüsyonla karıştırılmıştır.
CCDC124-Sekonder Antikor	Anti-rabbit, 1/5000 olacak şekilde Tween içermeyen blocking solüsyonda hazırlanmıştır.
Vinculin-Sekonder Antikor	Anti-mouse antikorları 1/5000 olacak şekilde Tween içermeyen blocking solüsyonda hazırlanmıştır.
Houskeeping (Vinculin) primer Antikor	Vinculin Mouse antikorları,1/1000 olacak şekilde blocking solüsyonla karıştırılmıştır.
Protein Lizis Tamponu	50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, dH_2O içinde çözülmüştür.
Protein Lizis Working Solüsyonu	1ml çalışma solüsyonu için; 970 µl protein lizis tamponu, 10 µl NP40, 10 µl 100X proteaz inhibitörü karıştırılmıştır.
50X Proteaz İnhibitör	1 tablet proteaz inhibitörü 1ml dH_2O'da çözülmüştür.

Tablo 3.6: Devam.

Wet Transfer Tamponu, 10X	250 mM Tris, 1,92 M glisin (30.3 gr Tris base ve 144 gr Glycine) 1L dH_2O içinde çözülürmüştür.
1X Transfer Working Solüsyonu	1000ml hazırlamak için 100 ml, 10X Wet transfer buffer, + 200ml %100 MetOH + 700ml dH_2O ile karıştırılmıştır.
10X TBS	200 mM Tris, 1,5 M NaCl, pH 8.0 (24.2 g Trizma base ve 87.6 g NaCl) 1 L dH_2O içinde çözülmüştür. pH 7.6'ya ayarlanmıştır.
1.5 M Tris-HCl, Ph 8.8	36.34 g Trizma base (MW:121.14) 180ml dH_2O içinde çözülmüştür. HCl ile pH 8.8'e ayarlanmıştır. dH_2O ile 200 ml'ye tamamlanmıştır.
0.5 M Tris-HCl, Ph 6.8	12.11 g Trisma base (MW:121.14) 180ml dH_2O içinde çözülmüştür. HCl ile pH 6.8'e ayarlanmıştır. dH_2O ile 200 ml'ye tamamlanmıştır.
APS, % 10 (W/V)	0.1 g Ammonium Persulfate (MW:228.20) 1 ml dH_2O içinde çözülmüştür ve -20°C'ta saklanmıştır.
Kanamisin (50 mg/ml)	2.5 g Kanamisin 50 ml 15 ml 50 ml dH_2O içerisinde çözülmüştür. Ardından 0.22 µm membran filtre kullanılarak steril edilip 1 ml olarak alikotlanmıştır.
0,5 M PIPES solüsyonu	15.1 g PIPES, 100 ml ddH_2O içerisinde çözülmüştür. Ve pH: 6,7 ye 5M KOH ile ayarlanmıştır.
Inoue Ultra Kompetan Hücre Tamponu / L	PIPES (0.5 M, pH 6.7) (10 mM)20 ml, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 10.88 g (55 mM), $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 2.20 g (15 mM), KCl 15 g (250 mM) karıştırılarak dH2O ile 1 litreye tamamlanmıştır.

Tablo 3.6: Devam.

GPMV Tamponu	10 mM HEPES, 2 mM CaCl2 ve 150 mM NaCl [pH 7.4] birleştirilerek elde edilmiştir.

3.1.5. Kullanılan Kitler ve Cihazlar

3.1.5.1.Kitler

Kullanılan kitler Tablo 3.7' de gösterilmektedir.

Tablo 3.7: Kullanılan kitler.

Kit İsimleri	**Kit Markası** **Katalog Numarası**
DNA-spin^{TM} Plazmid Miniprep Kit	İntron Biotechnology / 17096
PCR & DNA Cleanup Kit	NEB Monarch/ T1030
DNA Gel Extraction Kit	NEB Monarch/ T1020
DNA, RNA and protein purification kit	Macherey-Nagel/ 740420:50
Transfection Reagent	Thermo-Fisher/ Lipofectamine™ 3000

3.1.5.2. Cihazlar

Kullanılan cihazlar Tablo 3.8' de gösterilmektedir.

Tablo 3.8: Kullanılan cihazlar.

Cihaz Adı	**Cihazın Markası ve Modeli**
Nanodrop	Thermo Scientific / EC 1000 XL
PZR termal döngü sistemi	Bio-Rad/ T100
İmmunoblot Ekipmanları	Bio-Rad / Mini-PROTEAN® Tetra Handcast Systems

Tablo 3.8: Devam.

Laminar Akım Kabini	Cryste
CO_2 İnkübatörü	NUVE /EC 160
Su banyosu	MEMMERT22 /LT. WNB22 s
Soğutmalı Falkon Santrifüj	Nüve/ NF 800
Soğutmalı Eppendorf Santrifüj	HITACHI /CT15RE
Manyetik Karıştırıcı	SCILOGEX/MS-PA
Agaroz Jel ve Immunoblot Görüntüleme Cihazı	Bio-Rad / ChemiDoc XRS+
Agaroz Jel Elektroforez Sistemi	Bio-Rad/ Wide Mini-Sub® Cell GT Cell
Çalkalayıcı	Labnet /ROCKER 25
Hassas Terazi	ADAM /PGW 253i
Isı Bloğu	Benchmark/ BSH1002-E
Döndürücü/Çalkalayıcı	Biosan/RS-60
Vortex	SCILOGEX/ MX-S
Bunzen Beki	Gasprofi 1 /SCS micro 6.004.000

3.1.5.2.1. Hücre Görüntüleme Materyalleri; Mikroskoplar

Kullanılan hücre görüntüleme materyalleri olan mikroskoplar Tablo 3.9' da gösterilmektedir.

Tablo 3.9: Kullanılan mikroskoplar.

Cihaz Adı	**Cihazın Markası ve Modeli**
İnverted Mikroskop	LEİCA/ DMİ 1
Konfokal Mikroskop	ZEİSS/780
Konfokal Mikroskop	ZEİSS/880
Konfokal Mikroskop	ZEİSS/980
LLSM7	ZEİSS/ 7

3.1.5.2.2. Hücre Görüntüleme Materyalleri Ligandlar

Kullanılan ligandlar Tablo 3.10' da gösterilmektedir.

Tablo 3.10: Kullanılan ligandlar.

Ligand İsimleri	Ligand Markası -Katalog Numarası
Janelia Fluor® 646	TOCRİS/ 6148
SiR650-BG	SPIROCHROME/ SC504

3.1.6. Kullanılan Kimyasallar

Kullanılan vektörler Tablo 3.11' de gösterilmektedir.

Tablo 3.11: Kullanılan kimyasallar.

Kimyasal Adı	Kimyasal Markası -Katalog Numarası
Kanamisin	Sigma-Aldrich/420311-5GM
Agar	BD-BACTO™ /214010
Maya Ekstrakt	BD-BACTO™/212750
Pepton	BD-BACTO™/211677
Sodyum Klorür	Sigma-Aldrich/ 31434
DMEM	Thermo-Fisher /41966
PBS	Thermo-Fisher /70011-036
FBS	Thermo-Fisher/ 26140079
Tripsin/EDTA	Thermo-Fisher/ 15400054
Penisilin- Streptomisin	Thermo-Fisher/ 15140-122
L15	Thermo-Fisher/ 21083027
Süt Tozu	Pan Reac AppliChem/ A0830
Trizma Base	Sigma-Aldrich /T1503
Tergitol Solüsyonu	Sigma-Aldrich/ NP40s

Tablo 3.11: Devam.

Tween-20	Sigma-Aldrich/P1379
Sodyum Dodesil Sülfat	Sigma-Aldrich/L5750
Manganese (II) chloride tetrahydrate	Sigma-Aldrich/13446-34-9
Calcium chloride dihydrate	Sigma-Aldrich/10035-04-8
KCl	Sigma-Aldrich/7447-40-7
Glisin	ISOLAB /927.032.1000
Metanol	SUPELCO /1.06009.2511
Ammonium Persulfat	Sigma-Aldrich/A3678
Etanol	Sigma-Aldrich/ 32221
2-propanol	Sigma-Aldrich/ 24137
Hidroklorik asit	Sigma Aldrich/071102
Yükleme boyası/6X Purple Loading Dye	NEB/ B7024S
TEMED	Sigma Aldrich/T9281
Halt Proteaz İnhibitörü	Thermo-Fisher/ 78437
DMSO	Sigma-Aldrich /67-68-5
BglII	NEB/ R0144S
EcoRI	NEB/R0101S
10X Ligasyon Tamponu	NEB/ M0202S/kit
T4 DNA Ligaz	NEB/ M0202S
Buffer 3.1	NEB/ B6003S
CUTSMART	NEB/ B7204
Phusion DNA polimeraz	NEB/ M0530S
Paraformaldehit	Sigma-Aldrich/ 30525-89-4
HEPES	Sigma-Aldrich/ 7365-45-9
DTT	Sigma-Aldrich/ 3483-12-3

3.1.7. Kullanılan Vektörler ve Primerler

Kullanılan vektörler Tablo 3.12' de gösterilmektedir.

Tablo 3.12: Kullanılan vektörler.

Vektör Adı Kullanılma Amacı	Vektör Adı Kullanılma Amacı
SeC61b-SNAPtag	Kaset vektörü oluşturmak için (SNAPtag) kullanılmıştır.
SeC61b-Halotag	Kaset vektörü oluşturmak için (Halotag) kullanılmıştır.
CCDC124-GFP	Laboratuvar stoğumuzda bulunmaktadır.
CCDC124-GFP(S122A)	Laboratuvar stoğumuzda bulunmaktadır.
CCDC124-GFP(S141A)	Laboratuvar stoğumuzda bulunmaktadır.
CCDC124-GFP (Double Mutant)	Laboratuvar stoğumuzda bulunmaktadır. Görüntüleme için kullanılmıştır.
HALO-CCDC124	CCDC124' ü görüntüleme için kullanılmıştır.
SNAP-CCDC124	CCDC124' ü görüntüleme için kullanılmıştır.
EGFP-DYRK3(WT)	DYRK3(WT), görüntüleme için kullanılmıştır.
EGFP-DYRK3(K218M)	DYRK3(K218M), görüntüleme için kullanılmıştır.
mCherry-SRRM1	SRRM1, görüntüleme için kullanılmıştır.
EB3-3xmNeonGreen-N1	Mikrotübül görüntüleme için kullanılmıştır.
mNeonGreen-Giantin	Golgi görüntüleme için kullanılmıştır.
Lamp1-mScarlet-I	Lizozom görüntüleme için kullanılmıştır.

Tablo 3.12: Devam.

ER-mScarlet-I	ER. görüntüleme için kullanılmıştır.
4xmts-mScarlet-I	Mitokondri görüntüleme için kullanılmıştır.

Kullanılan primerler Tablo 3.13' de gösterilmektedir.

Tablo 3.13: Kullanılan primerler.

Primer Adı	**Nükleotit Dizisi**
Forward	GTCGAGATCTATGCCCAAGAAGTTCCAGGG
Reverse	GTACGAATTCTCACTTGGGGGCATTGAAGG

3.1.8. Kullanılan Programlar

Kullanılan programlar Tablo 3.14' de gösterilmektedir.

Tablo 3.14: Kullanılan programlar.

Kullanılan Program	**Kullanım Amacı**
ImageLab	Western Blot görüntüleme işlemleri.
ImageJ	Konfokal görüntülerini analiz işlemleri.
Fiji	Konfokal görüntülerini analiz işlemleri.
Imares	LLSM7 görüntülerini analiz işlemleri.
GraphPad Prism	Grafik oluşturma işlemleri.
Zotero	Referans oluşturma işlemleri.
SnapGene Viewer	Plazmit haritalarını ve sekans verilerini inceleme işlemleri.

3.2. Yöntem

3.2.1. HALO-CCDC124 ve SNAP-CCDC124 Plazmitlerinin Hazırlanması

SeC61β-SNAPtag ve SeC61β-Halotag plazmitleri içerisinden SeC61β geni çıkartılarak yerine CCDC124 geni aktarılması hedeflenmiştir.

3.2.1.1. Kompetan Hücre Hazırlama

-80°C de stok olarak bulunan *Escherichia coli* DH5α suşu bakterilerden öze yardımıyla, LB agar besiyeri dökülmüş petriye, çizgi ekim yapılmıştır. Ekim yapılan petri 37 °C de 16 saat büyütme etüvünde inkübe edilmiştir. 16 saat sonra var olan kolonilerden tek koloni seçilerek öze yardımıyla 3 ml LB sıvı besiyerine aktarılmış ve çalkalamalı inkübatörde 37 °C, 200rpm'de 16 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra üstel faza gelen bakteri kültüründen 2 ml alınarak 200 ml LB besiyeri içerisine aktarılmıştır. 37 °C, 200rpm'de OD_{600} değeri 0.55 olana kadar inkübe edilmiştir. Ardından bakteri kültürü bulunan erlenmeyer buz içerisinde 10 dakika bekletilmiştir. Daha sonra falkonlara aktarılarak 4000rpm de 4°C'de 10 dakika santrifüj yapılmıştır. Süpernatant atılarak pelet 56 ml soğuk inoue buffer içerinde çözülmüştür. Ardından 4000rpm de 4°C'de 10 dakika santrifüj yapılarak bakteriler çöktürülmüştür. 1200 µL DMSO üzerine, 16 ml inoue buffer eklenmiştir ve süpernatant atılarak pelet bu solüsyon içerisinde çözülmüş ve 10 dakika buz içerisinde bekletilmiştir. Eppendorf tüplere alikotlanarak sıvı azot içerisinde 30 saniye bekletilmiştir. Daha sonra -80°C ye stok E. coli DH5α kompetan bakterileri kaldırılmıştır.

3.2.1.2.Transformasyon

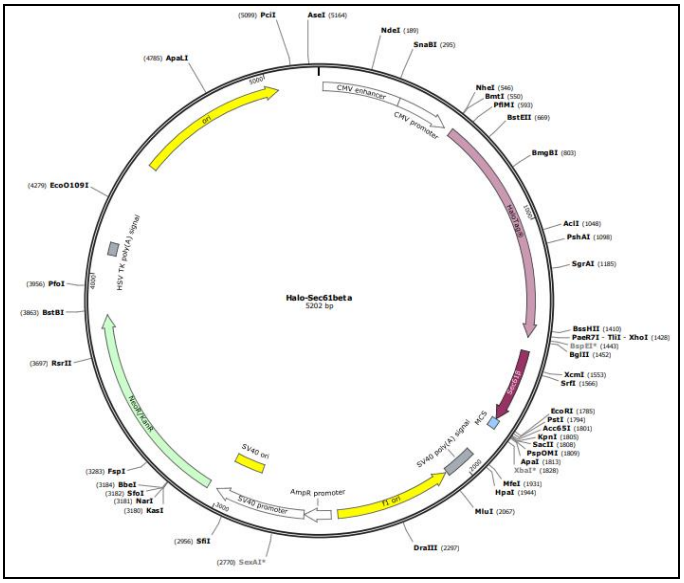
-80°C den stok *Escherichia coli* DH5α kompetan bakterileri buz üzerine alınarak çözünmesi beklenmiştir. Daha sonrasında 3 farklı tüpe 100 µL kompetan hücre aktarılmıştır. Bu tüplerin üzerlerine ayrı ayrı 2 µL (21µg/µL) plazmit DNA eklenmiştir. 1. tüpe SeC61b-SNAPtag plazmiti, 2. tüpe SeC61b-Halotag plazmiti eklenmiştir 3. Tüpte ise sadece kompetan bakteri eklenmiştir. Hafif darbelerle karışması sağlanmıştır ve 30 dakika buz üzerinde bekletilmiştir. Ardından ısı bloğuna alınarak 42°C de 2 dakika bekletilmiştir süre sonunda 3 dakika buzda bekletilmiştir. Tüplere antibiyotik içermeyen 900 µL LB besiyeri eklenmiştir. Sallamalı inkübatörde 37 °C, 200 rpm de 60 dakika büyütülmüştür. Ardından 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek bakteriler çöktürülmüştür. Süpernatant atılarak pelet 50 µL besiyerinde çözülmüştür ve Kanamisin (50 mg/mL) içeren LB-Agar besiyerlerine yayılmıştır. Ekim yapılan petri 37 °C de 16 saat büyütme etüvünde inkübe edilmiştir. Seçilen kolonilerden stok hazırlanarak kaldırılmıştır.

3.2.1.3. Plazmit DNA İzolasyonu

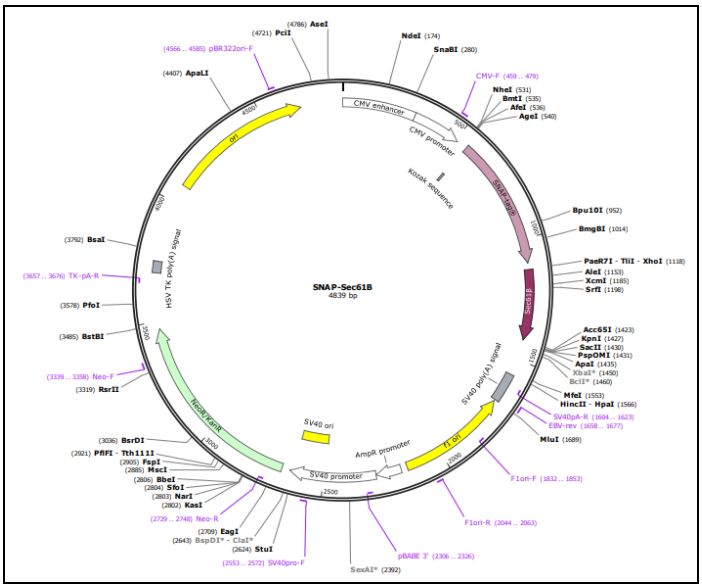
Macherey-Nagel NucleoBond Xtra Midi EF DNA, RNA ve protein izolasyon kiti kullanılarak plazmit DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Plazmitler EcoRI enzimi ile kesilerek kontrolü yapılmıştır.

3.2.1.4. Primerler

Çoğaltılan SeC61β-SNAPtag ve SeC61β-Halotag plazmitleri içerisinden SeC61β geni çıkartılarak yerine CCDC124 geni aktarılması hedeflenmiştir. Bu doğrultuda ortak kasete sahip olan bu plazmitlerden kesimleri gerçekleştiği takdirde SeC61β genini tamamen çıkaracak enzimler belirlenmek istenmiştir. Forward ucu için BglII ve Reverse ucu için ise EcoRI enzimi seçilmiştir.



Şekil 3.1: SeC61β-Halotag plazmit haritası.



Şekil 3.2: SeC61β-SNAPtag plazmit haritası.

Çıkarılan SeC61β geninin yerine CCDC124 genin konulmasını amacıyla primerler tasarlanmıştır. Primerler için genin forward ve Reverse uçlarından 20 bazı içeren bölgeler seçilmiştir. CCDC124 genini SeC61β geninin yerine yerleştirme işlemini kolaylaştırmak amacıyla tasarlanan primerlerin forward ucuna BglII enzim kesim bölgesi, reverse ucuna ise EcoRI kesim bölgesi eklenmiştir.

CCDC124 GENİ SEKANSI

ATGCCCAAGAAGTTCCAGGGTGAGAACACCAAGTCGGCAGCGGCCCGGGCACG
GAGGGCAGAGGCCAAGGCGGCCGCTGATGCCAAGAAGCAGAAGGAGCTGGAGG
ATGCCTACTGGAAGGACGACGACAAACACGTCATGAGGAAGGAGCAGCGCAAGG
AGGAGAAGGAGAAGCGGCGCCTCGACCAGCTGGAACGTAAGAAGGAGACGCAG
CGCCTACTGGAGGAGGAGGACTCCAAGCTCAAGGGCGGCAAGGCGCCGCGGGTG
GCCACGTCCAGCAAGGTCACCCGGGCCCAGATCGAGGACACGCTGCGCCGAGAC
CATCAGCTCAGGGAGGCCCCGGACACAGCCGAGAAAGCCAAGAGCCATCTGGAG
GTGCCGCTGGAGGAGAACGTGAACCGCCGCGTGCTGGAGGAGGGCAGCGTGGAG
GCGCGCACCATCGAGGACGCCATTGCAGTGCTCAGCGTGGCGGAGGAGGCGGCC
GACCGGCACCCAGAAAGACGCATGCGGGCAGCCTTCACAGCCTTTGAGGAAGCC
CAGCTGCCGCGGCTCAAACAAGAGAACCCCAACATGCGGCTGTCGCAGCTGAAA
CAGCTGCTCAAGAAGGAGTGGCTCCGCTCTCCTGACAACCCCATGAACCAGCGGG
CCGTGC**CCTTCAATGCCCCCAAGTGA**

Forward: Bgl I enzimi ile kesilecek. Bgl I kesim bölgesi: A*GATCT

Reverse: EcoR I enzimi ile kesilecek. EcoR I kesim bölgesi: G*AATTC

Şekil 3.3: CCDC124 gen sekansı ve eklenecek kesim bölgeleri.

Enzimlerin daha kolay bağlanabilmeleri ve gerekli Tm sıcaklığını sağlaması amacıyla 4 bazlık Stuffer bölgesi eklenmiş ve primer tasarımına son hali verilerek ticari olarak Sentebiolab şirketinden alınmıştır.

	STUFFER	ENZİM KESİM BÖLGESİ	CCDC BÖLGESİ
FORWARD:	GTCG	AGATCT	ATGCCCAAGAAGTTCCAGGG
CCDC124 ana zincir :			CCTTCAATGCCCCCAAGTGA
CCDC124 ana zincir :			GGAAGTTACGGGGGTTCACT
REVERSE:	GTAC	GAATTC	TCACTTGGGGGCATTGAAGG

FORWARD: **GTCGAGATCTATGCCCAAGAAGTTCCAGGG**

REVERSE: **GTACGAATTCTCACTTGGGGGCATTGAAGG**

Şekil 3.4: CCDC124 geni forward ve reverse primer tasarlanması.

3.2.1.5. CCDC124'ün PZR ile Çoğaltımı, Ürünün Jelde Yürütülmesi ve Ürünün Temizlenmesi

Ticari olarak alınan primerler kullanılarak, daha önce izole edilmiş CCDC124 geninden PZR yardımı ile CCDC124 geninin çoğaltımı sağlanmıştır. PZR işlemi için örnekler Tablo 3.13' de yer aldığı gibi hazırlanmıştır.

Tablo 3.15: PZR reaksiyon materyalleri ve miktarları.

Materyal	Kontrol	Örnek	Final Konsantrasyon
dH_2O	33.5	32.5	-
5X BUFFER-HF	10µL	10µL	1X
10mm dNTP	1 µL	1 µL	200 µM
10µM Forward primer	2.5 µL	2.5 µL	0.5 µM
10µM Reverse primer	2.5 µL	2.5 µL	0.5 µM
Örnek DNA	-	1 µL	1 ng
Phusion DNA Polimeraz	0.5 µL	0.5 µL	1u

Hazırlanan örnekler PZR cihazına yerleştirilmiştir. Protokol tablo 3.14' de özetlenmiştir.

Tablo 3.16: PZR termal döngü protokolü.

	Sıcaklık	Zaman
İlk Denatürasyon	98°C	30 saniye
	98°C	10 saniye
Döngü * 30	58°C	30 saniye
	72°C	30 saniye
Final	72°C	10 dakika
	4°C	∞

*Gri olarak gösterilen satırlar döngüyü göstermektedir.

PZR sonrasında elde edilen ürün %1'lik agaroz jelde ve 45 dakika 90 voltta yürütülmüştür. CCDC124 geninin doğru bir şekilde çoğaltılıp çoğaltılmadığı kontrol edilmiştir. PZR ürünlerinin temizliği kit (Monarch PCR & DNA cleanup kit, New England Biolabs) kullanılarak yapılmıştır.

3.2.1.6. BglII ve EcoRI Enzimleri ile SeC61β-SNAPtag, SeC61β-Halotag ve PZR ile Üretilen CCDC124 Geninin Kesimi

BglII ve EcoRI enzimleri aynı tampon içerisinde çalışmadıkları için ikili kesim gerçekleştirilmiştir. SeC61β-SNAPtag, SeC61β-Halotag ve PZR ile üretilen CCDC124 genin BglII enzimi ile kesimi aşağıdaki tablolarda yer alan koşullarda gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.17: PZR ile üretilen CCDC124'ün BglII kesim bileşenleri.

PZR ile üretilen CCDC124	17 µL (2.2 µg)
BglII	2.2 µL
Buffer3.1	2.5 µL
dH_2O	3.3 µL
Toplam	25 µL

Tablo 3.18: SeC61β-Halotag plazmiti BglII kesim bileşenleri.

SeC61β-Halotag Plazmiti	1 µL (4 µg)
BglII	4 µL
Buffer3.1	4 µL
dH_2O	31 µL
Toplam	40 µL

Tablo 3.19: SeC61β-SNAPtag plazmiti BglII kesim bileşenleri.

SeC61β-SNAPtag Plazmiti	0.93 µL (4 µg)
BglII	4 µL
Buffer3.1	4 µL
dH_2O	31.07 µL
Toplam	40 µL

Hazırlanan reaksiyon bileşenleri 37°C de 60 dakika ısı bloğu içerisinde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında BglII enzimi ve tampon Buffer3.1' i uzaklaştırmak için yıkama yapılması gerekmektedir. son hacim 0.3 M olacak şekilde NaAC yıkanmıştır. Ardından son hacme oranı 2 kat olacak şekilde soğuk, %100 EtOH eklenmiş ve örnekler -80°C de 30 dakika inkübe edilmiştir. Bu inkübasyon sonrasında 13.000 rpm de 15 dakika 4°C de santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılarak pelet üzerine, 50 µL %70 soğuk EtOH eklenmiştir. Ardından 13.000 rpm de 15 dakika 4°C de santrifüj edilmiş ve süpernatant atılarak pelet ile EcoRI enzim kesimine devam edilmiştir. EcoRI enzim kesimi tablolarda belirtilen koşullarda hazırlanmıştır.

Tablo 3.20: PZR ile üretilen CCDC124'ün EcoRI kesim bileşenleri.

PZR ile üretilen CCDC124	Pelet
EcoRI	2.2 µL
Tampon Cutsmart	2.5 µL
dH_2O	20.3 µL
Toplam	25 µL

Tablo 3.21: SeC61β-Halotag plazmiti EcoRI kesim bileşenleri.

SeC61β-Halotag Plazmiti	Pelet
EcoRI	4 µL
Tampon Cutsmart	4 µL
dH_2O	32 µL
Toplam	40 µL

Tablo 3.22: SeC61β-SNAPtag plazmiti EcoRI kesim bileşenleri.

SeC61β-SNAPtag Plazmiti	Pelet
EcoRI	4 µL
Tampon Cutsmart	4 µL
dH_2O	32 µL
Toplam	40 µL

Hazırlanan tüpler 37°C de 60 dakika ısı bloğu içerisinde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında agaroz jel elektroforezi basamağına geçilmiştir.

3.2.1.7. Agaroz Jel Elektroforezi ve Jelden Geri Kazanım

% 0.1'lik agaroz jel hazırlamak için 0.3 gr agarose üzerine 30 ml 1X-TAE buffer eklenerek mikrodalgada homojen oluncaya kadar eritilmiştir. Soğuduğu zaman üzerine 3 µL Redsafe boyası eklenerek karıştırılmıştır. Bloğa dökülerek donması beklenmiştir. Örnekler ise 6X loading bufferdan 1X olacak şekilde hazırlanarak kuyulara yüklenmiştir. 45 dakika 90 voltta yürütülmüştür. Ardından New England Biolabs (Monarch DNA gel Extraction kit) kiti kullanılarak örneklerin jelden geri kazanımı sağlanmıştır.

3.2.1.8. Ligasyon ve Ligasyon Ürünleri ile Transformasyon

Kesimleri gerçekleştirilen ve jelden geri kazanılan ürünler ligasyon basamağında kullanmak amacıyla Nano-Drop cihazında miktar ölçümleri gerçekleştirildi.

Tablo 3.23: Kesim sonrası jelden kazanılan ürün miktarları.

		Miktar	**A 260/280**
İnsert	PZR ürünü CCDC124	47.6 ng/µL	1.87
Halo vektör	Halotag Plazmiti	68.1 ng/µL	1.87
SNAP vektör	SNAPtag Plazmiti	100.9 ng/µL	1.86

Ölçümü yapılan örnekler ile ligasyon için matematiksel olarak hesaplanmıştır. Ligasyon örnekleri Tablo 3.23' de yer alan miktarlarda hazırlanmıştır.

Tablo 3.24: Ligasyon bileşenleri.

	HALO 5:1	**SNAP 5:1**	**SELF (SNAP)**
İnsert	1.4 µL	1.4 µL	-
Vektör	100 ng-1.5µL	100 ng-1.0µL	100 ng-1.0µL
10X Ligaz Tamponu	2 µL	2 µL	2 µL
Ligaz (1u/ µL)	1 µL	1 µL	1 µL
ddH_2O	14.1 µL	14.6 µL	16 µL
Toplam	20 µL	20 µL	20 µL

Tablo 3.25: Transformasyon bileşenleri.

HALO	**SNAP**	**SELF**	**POZİTİF KONTROL**	**NEGATİF KONTROL**
6.5 µL ligasyon ürünü	6.5 µL ligasyon ürünü	6.5 µL ligasyon ürünü	5 µL plazmit Sec61b-Halo	-
100 µL DH5α	100 µL DH5α	100 µL DH5α	100 µL DH5α	100 µL DH5α
3 Tekrar	3 Tekrar	3 Tekrar	1 Tekrar	1 Tekrar

Tablo 3.23'e göre hazırlanan örnekler 16°C de 18 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında, -80°C den stok Ecoli DH5α kompetan bakterileri buz üzerine alınarak çözünmesi sağlanmıştır. Ligasyon ürünü olan bu örnekler 3 (6.5 µL) tüpe bölünmüştür. Daha sonrasında 10 farklı tüpe 100 µL kompetan hücre aktarılmıştır. Bu tüplerin üzerlerine ayrı ayrı 6.5 µL ligasyon ürünleri eklenmiştir. İlk üç tüpe HALO 5:1 sonraki 3 tüpe SNAP 5:1 ve son 3 tüpe SELF (SNAP) eklenmiştir. 10. tüpe ise sadece kompetan bakteri eklenmiştir. Hafif darbelerle karışması sağlanmıştır ve 30 dakika buz üzerinde bekletilmiştir. Ardından ısı bloğuna alınarak 42°C de 2 dakika bekletilmiştir süre sonunda 3 dakika buzda bekletilmiştir. Tüpler üzerine antibiyotik içermeyen 900 µL LB besiyeri eklenmiştir. Sallamalı inkübatörde 37 °C, 200 rpm de 60 dakika büyütülmüştür. Ardından 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek bakteriler çöktürülmüştür. Süpernatant atılarak pelet 50 µL besiyerinde çözülmüş ve kanamisin (50 mg/ml) içeren LB-Agar besiyerlerine yayılmıştır. Ekim

yapılan petri 37 °C de 16 saat büyütme etüvünde inkübe edilmiştir. Seçilen kolonilerden stok hazırlanarak kaldırılmıştır.

3.2.2. HALO-CCDC124 ve SNAP-CCDC124 Plazmitlerinin Çoğaltılması ve Doğrulanması

3.2.2.1 HALO-CCDC124 ve SNAP-CCDC124 Plazmitlerinin İzolasyonu ve Enzim Kesim ile Doğrulanması

Macherey-Nagel NucleoBond Xtra Midi EF DNA, RNA ve protein izolasyon kiti kullanılarak plazmit DNA izolasyonu gerçekleştirilmiş ve izolasyonu gerçekleştirilen plazmitler BglII ve EcoRI enzimi ile kesilerek kontrolü yapılmıştır. Pozitif koloniler sekanslama işlemine tabii tutulmuştur.

3.2.2.2. Sekanslama

Sekanslama işlemi, BM Labosis BM Laboratuvar Sistemleri Limited Şirketi'nden hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilmiştir.

3.2.2.3. Transfeksiyon

Tüm Transfeksiyon işlemleri Thermo Fisher Lipofectamine™ 3000 Transfection Reagent kiti ile gerçekleştirilmiştir.

3.2.2.4. Hücre Kültüründen Pelet Eldesi

Transfeksiyon yapılan 10'luk petrilerdeki besiyeri uzaklaştırılmış, oda sıcaklığında bulunan 2 ml PBS eklenmiştir ve 15 saniye sonra uzaklaştırılmıştır. Bu işlem 2 defa tekrarlanmıştır. Daha sonra üzerine soğuk, 1 ml PBS eklenerek kazıyıcı yardımıyla hücreler petriden kazınmış ve bu işlem 2 kez gerçekleştirilmiştir. Elde edilen hücreler 4 °C'de 1500rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Elde edilen pelet üzerine 3 katı kadar lysis buffer working

solüsyonu eklenmiştir. Tüpler buz üzerine alınmıştır ve 5 dakika arayla vortekslenmiş ve bu işlem 4 kez tekrarlanmıştır. Ardından 4 °C'de 15000rpm'de 30 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant alınarak yeni tüplere aktarılmıştır. Protein miktarı Nano-Drop cihazında ölçülmüştür.

3.2.2.5. Western Blot

İzole edilen proteinlerin içerisinde HALO-CCDC124 ve SNAP-CCDC124 proteinlerinin varlığını tayin etmek amacıyla western blot gerçekleştirilmiştir. Western blot için hazırlanan jeller Tablo 3.26 ve Tablo 3.27'deki miktarlarda hazırlanmıştır. Jeller hazırlanırken alt kısma gelmesi açısından öncelikle 1mm genişliğinde boşluğa sahip camlar arasına %12'lik running jel (Tablo 3.26) dökülmüştür ve üzerine 2 ml izopropanol eklenmiştir. 30 dakika ardından izopropanol ortamdan uzaklaştırılarak üzerine Stacking jel (Tablo 3.25) dökülmüştür ve tarak takılmıştır.

Tablo 3.26: Runnig jel bileşenleri.

Running Jel (%12)	**1 Jel için Gerekli Miktar**
1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)	1250 µL
dH_2O	2175 µL
%40 Acryl/bis (37.5:1)	1500 µL
%25 SDS	20 µL
%10 APS	50 µL
TEMED	5 µL

Tablo 3.27: Stacking jel bileşenleri.

Stacking Jel (% 4)	**1 Jel için Gerekli Miktar**
0.5 M Tris-HCl pH 6.8	1250 µL
dH_2O	3175 µL

Tablo 3.27: Devam.

%40 Acryl/bis (37.5:1)	500 µL
% 25 SDS	20 µL
% 10 APS	50 µL
TEMED	5 µL

Protein lizatları içerisinde 30µg olacak şekilde tüplere dağıtılmıştır. 3X yükleme boyası son solüsyonda 1X yoğunlukta olacak şekilde tüplere eklenmiştir. Loading dye hazırlanırken ise 9 µL 3X Loading dye üzerine 1 µL 10X DDT eklenerek hazırlanmıştır. Boya ile karıştırılan protein 100°C'de 5 dakika ısı bloğu içerisine yerleştirilerek beklenmiştir. Denatüre olan örnekler ve 4 µL Pre-stained marker hazırlanan jele yüklenmiştir. Jel Bio-Rad-Mini Trans-Blot® Cell and Criterion™ Blotter sistemi kullanılarak running tamponu içerisinde 100 voltta oda sıcaklığında 1 saat yürütülmüştür.

Yürütmenin ardından transfer aşaması için Bio-Rad Trans-Blot® Turbo™ Transfer System cihazı kullanılmıştır. Wattman kağıtları 7cm X 9cm, PVDF membran 5.5cm X 8.8cm olarak kesilmiştir. PVDF membran 5'er dakika sırasıyla %100 metanol, dH_2O ve 1X Transfer working solüsyonu ile yıkanmıştır. Wattman kağıtları ise 1X Transfer working solüsyonu ile yıkanmıştır. Wattman kağıtları Turbo™ Transfer System cihazının kasetleri içerisine yerleştirilmiştir. Wattman kağıtları üzerine sırasıyla PVDF membran, jel ve wattman kağıtları yerleştirilmiştir. Hazırlanan jel Bio-Rad Trans-Blot® Turbo™ Transfer System cihazında 1.3 amperde, 25 voltta 42 dakika yürütülerek transfer işlemi gerçekleştirilmiştir.

Transfer ardından PVDF membran 10ml blocking solüsyonu içerisinde 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Bloklama ardından PVDF membran primer antikor için yatay olarak 95 kDa dan yatay olarak ikiye kesilmiştir ve 95 kDa üzeri 7 ml Vinculin primer antikor ile 95 kDa altı ise 7 ml CCDC124 total primer antikor ile 2 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Primer antikor inkübasyon süresi bitince 3 defa 10'ar dakika 1X TBS+0,1 % Tween 20 ile yıkanmıştır. Ve ardından 95 kDa üzeri 7 ml Vinculin-Sekonder Antikor ile 95 kDa altı ise 7 ml CCDC124-Sekonder Antikor ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Bu inkübasyon sonrasında 3 defa 10 dakika 1X TBS+0,1 % Tween 20 ile yıkanmıştır. Görüntüleme kimyasalı

olarak Thermo-Fisher/ECL kiti kullanılmıştır. Bio-Rad / ChemiDoc XRS+ cihazında görüntüler alınmıştır.

3.2.3. Görüntüleme

Gerçekleştirilen tüm görüntüleme işlemlerinde canlı hücre görüntüleme gerçekleştirilmiştir. Tag içeren genler Thermo Fisher Lipofectamine™ 3000 Transfection Reagent kiti ile transfekte edilerek görüntüleme işlemine tabii tutulmuştur. Görüntüleme işlemlerinde Zeiss LSM Confocal mikroskobun 780,880 ve 980 sürümleri kullanılmıştır. 3D hücre görüntüleme işlemlerinde ise ZEISS Lattice Lightsheet 7 mikroskobu kullanılmıştır. Hücrelere uygulanan stres koşullarında ozmotik stres için 0.4 M sorbitol uygulanmış ve 1 saat canlı hücre görüntüsü alınmıştır. Oksidatif stres için 500 µM arsenit uygulanmış ve uygulamanın hemen ardından 1 saat canlı hücre görüntüsü alınmıştır. Viral stres uygulamak için hücreler 1250 ng/ ml POLY I:C ile transfekte edilmiştir ve 1 saat canlı hücre görüntüsü alınmıştır.

3.2.4. GPMVs

GPMV'ler, hazırlanan DMEM besi yeri içerisinde büyütülmüş %70 konfluansa sahip U2OS hücrelerinden izole edilmiştir. Hücreler, deneyden 2 gün önce 6 oyuklu hücre kültürü plakalarına ekilerek hazırlanmıştır. Daha sonra iki kez 2 ml GPMV tamponu (10 mM HEPES, 2 mM $CaCl_2$ ve 150 mM NaCl [pH 7.4]) ile yıkanarak ve 1 ml GPMV tamponunda 1 saat inkübe edilmiştir. U2OS hücrelerinden kesecikler oluşturmak için, tampon ayrıca 25 mM paraformaldehit (Sigma-Aldrich) ve 2 mM 1,4-ditiyotreitol (DTT; Sigma-Aldrich) ile desteklenmiştir. Faz ayrılmış veziküller daha sonra toplanarak mikroskopta görüntülenmiştir.

4. SONUÇLAR

4.1. HALO-CCDC124 ve SNAP-CCDC124 Plazmitleri

Hazırlanan kompetan bakterilerle, SeC61β-SNAPtag ve SeC61β-Halotag plazmitleri ile transformasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Bunun sonucunda: Negatif kontrolde; 0, Pozitif kontrolde;197, SeC61β-SNAPtag plazmitinde; 126 ve SeC61β-Halotag plazmitinde 116 koloni gözlemlenmiştir. Hazırlanan kompetan hücrelerin verimli ve transformasyonun başarılı olduğu sonucuna varılmıştır.

Koloniler sayıldıktan sonra plazmit izolasyonu işlemi gerçekleştirilmiştir. İzolasyon sonucunda Tablo 4.1 de belirtilen yoğunluklarda plazmitler elde edilmiştir.

Tablo 4.1: SeC61β-SNAPtag ve SeC61β-Halotag plazmit yoğunlukları.

Örnek	**Yoğunluk**
SeC61β-SNAPtag	4300 ng/µL
SeC61β-Halotag	4060 ng/µL

CCDC124 genine uygun EcoRI ve BglII kesim bölgeleri içeren primerler tasarlanmıştır ve bu primerle CCDC124 geni kalıp DNA olarak kullanılarak PZR gerçekleştirilmiştir. PZR ürünü jelde yürütülerek, istenilen ürünün, istenmeyen DNA bölgeleri, enzimler ve kalıp DNA'dan uzaklaşması sağlanmıştır ve jelden geri kazanımla EcoRI ve BglII enzim kesim bölgelerinin tamamını içeren CCDC124 geni saf bir şekilde elde edilmiştir.

PZR ürünü ve çoğaltılan plazmitler EcoRI ve BglII enzimleri ile ikili kesim işlemine tabii tutulmuş ve agaroz jelde görüntülenmiştir. SeC61β-SNAPtag ve SeC61β-Halotag plazmitlerinden SeC61β kısmının çıktığı görülmüştür. SNAPtag vektör, Halotag vektör ve CCDC124 insert kısımları jelden geri kazanım işlemi ile kirlilikten ari kesim EcoRI ve BglII kesim bölgeleri içeren yapıları ile izole edilmiştir. Ölçüm sonucu Tablo 4.2'deki gösterilmektedir.

Tablo 4.2: Enzim kesim sonrası PZR ürünü CCDC124, SNAP vektör ve HALO vektör yoğunlukları.

Örnek	**Yoğunluk**	**$A_{260/280}$**
PZR ürünü CCDC124	47.6 ng/µL	1.87
SNAP vektör	100.9 ng/µL	1,86
HALO vektör	68.1 ng/µL	1,87

Elde edilen insert ve vektör DNA'lar ile ligasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlem sonrasında oluşan ürün direkt olarak transformasyonda kullanılmıştır. Transformasyon sonucunda HALO-CCDC124 petrisinde: 65, SNAP-CCDC124 petrisinde: 56, Self ligasyon petrisinde: 7, pozitif kontrol petrisinde: 158 ve negatif kontrol petrisinde: 0 koloni gözlemlenmiştir.

Her petriden 4 koloni seçilerek plazmit izolasyonu işlemi gerçekleştirildi. Ve plazmit izolasyonu sonrasında yoğunlukları ölçüldü. (Tablo 4.3)

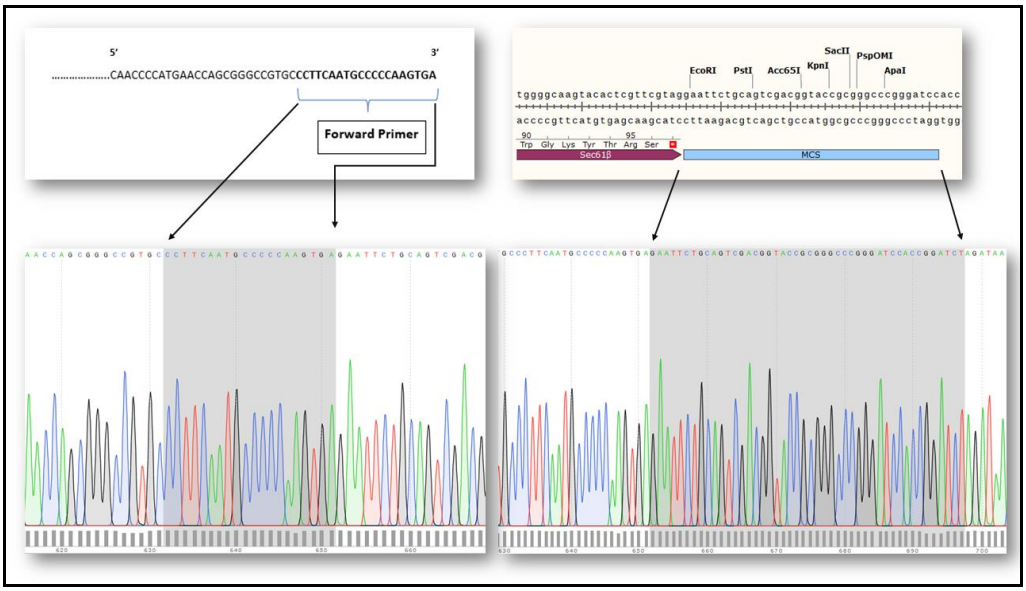
Tablo 4.3: Mini Preb. sonucu elde edilen plazmit yoğunlukları.

Örnek	**Yoğunluk**	**$A_{260/280}$**
SNAP-CCDC124 koloni 1	263.4 ng/µL	1.88
SNAP-CCDC124 koloni 2	209.4 ng/µL	1.84
SNAP-CCDC124 koloni 3	298.5 ng/µL	1.77
SNAP-CCDC124 koloni 4	283.1 ng/µL	1.87
HALO-CCDC124 koloni 1	315.0 ng/µL	1.85
HALO-CCDC124 koloni 2	322.2 ng/µL	1.87
HALO-CCDC124 koloni 3	300.7 ng/µL	1.77
HALO-CCDC124 koloni 4	425.1 ng/µL	1.80

4.2. HALO-CCDC124 ve SNAP-CCDC124 Plazmitlerinin Doğrulanması

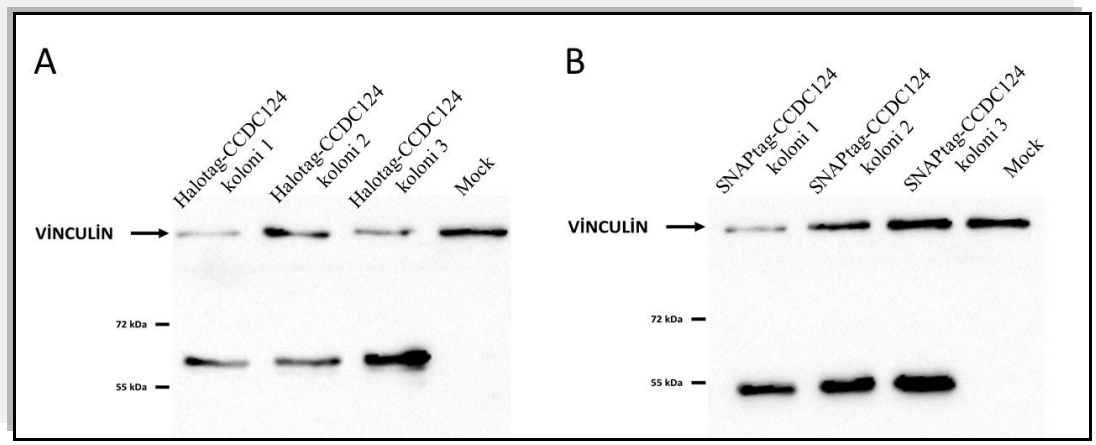
İzole edilen plazmitler EcoRI ve BglII enzimleri ile ikili kesim işlemine tabii tutulmuştur. Agaroz jel görüntüsüne göre tüm klonlar pozitiftir olarak gözlemlenmiştir.

Plazmitler hizmet alımı şeklinde sekanslanmıştır. Ve sonuçlar Şekil 4.1 görüldüğü şekilde analiz edilerek tüm klonların pozitif olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 4.1: Sekans sonucu. Sekanslama sonucu elde edilen dizilerin, hazırlanan CCDC124 Forward primerinin, SeC61β-SNAPtag ve SeC61β-Halotag plazmitlerindeki kesim bölgelerinin haritadan doğrulanması.

HALO-CCDC124 ve SNAP-CCDC124 plazmitleri HEK293T hücrelerine transfekte edilerek ifadesi sağlanmıştır. Transfeksiyondan 48 saat sonra lizatlar alınmıştır ve western blot gerçekleştirilmiştir. Yapılan western blot sonucunda hazırlanan iki plazmit türünden seçilen kolonilerin pozitif olduğu görülmüştür. Pozitif kolonilerin beklenilen boyutlarda hücrede ifade edildiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.2).

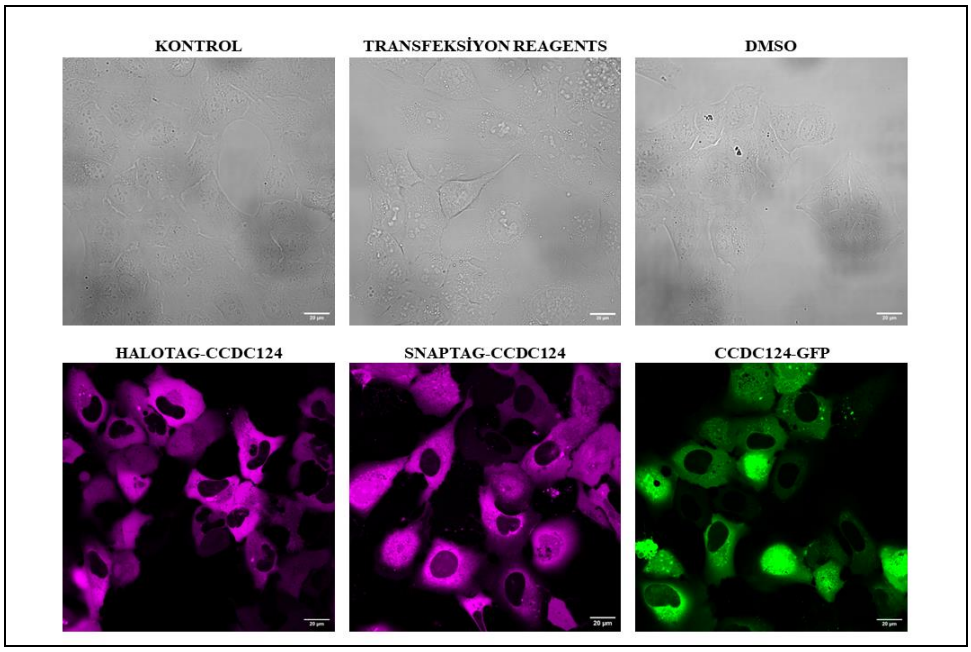


Şekil 4.2: HALO-CCDC124 ve SNAP-CCDC124 genlerinin Western Blot sonucu. A) Farklı kolonilerden elde edilen HALO-CCDC124 plazmitlerinin Hek293T hücrelerine transfeksiyonu sonrası elde edilen lizat ile gerçekleştirilen Western Blot Sonucu, B) Farklı kolonilerden elde edilen SNAP-CCDC124 plazmitlerinin Hek293T hücrelerine transfeksiyonu sonrası elde edilen lizat ile gerçekleştirilen Western Blot Sonucu.

Yapılan Western blot sonrasında HALO-CCDC124, SNAP-CCDC124 plazmitleri için 2. koloniler seçilmiştir.

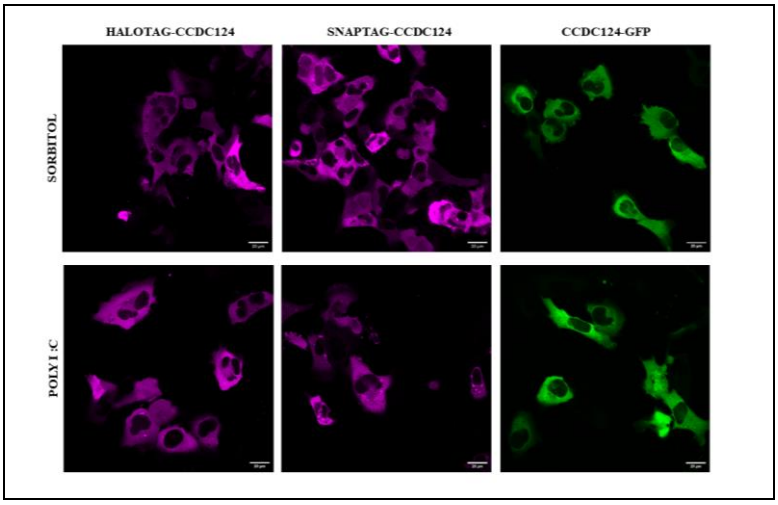
4.3. HALO-CCDC124, SNAP-CCDC124, CCDC124-GFP Plazmitlerinin Seçilmesi

Görüntüleme sistemlerinde Halotag, SNAPtag ve GFP arasında bir seçim yapmak amacıyla normal koşullarda canlı hücrelerde anlık olarak, 3 floresan protein gözlemlenmiştir. (Şekil 4.3)



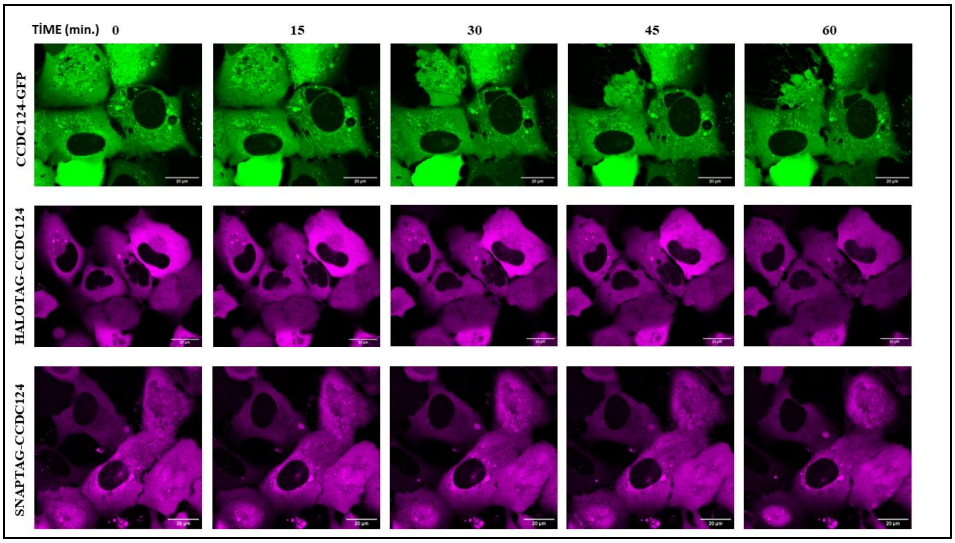
Şekil 4.3: HALO-CCDC124, SNAP-CCDC124, CCDC124-GFP plazmitleri ile transfekte edilmiş hücrelerin Konfokal mikroskop görüntüsü. Tüm plazmitler, U2OS hücre hattına transfekte edilmiştir. Konfokal 780'de görüntülenmiştir. Görüntüler, en az üç bağımsız deneyi temsil etmektedir. Ölçek çubukları, 20 µm'dir.

Ardından eş zamanlı devam eden bu deneyde HALO-CCDC124, SNAP-CCDC124, CCDC124-GFP plazmitleri transfekte edilen hücrelere Poly I:C ve Sorbitol stresi uygulanmıştır (Şekil 4.4).



Şekil 4.4: HALO-CCDC124, SNAP-CCDC124, CCDC124-GFP plazmitleri ile transfekte edilmiş hücrelere sorbitol ve Poly I:C uygulaması Konfokal mikroskop görüntüleri. Tüm plazmitler, U2OS hücre hattına transfekte edilmiştir. Konfokal 780'de görüntülenmiştir. Görüntüler, en az üç bağımsız deneyi temsil etmektedir. Ölçek çubukları, 20 µm'dir.

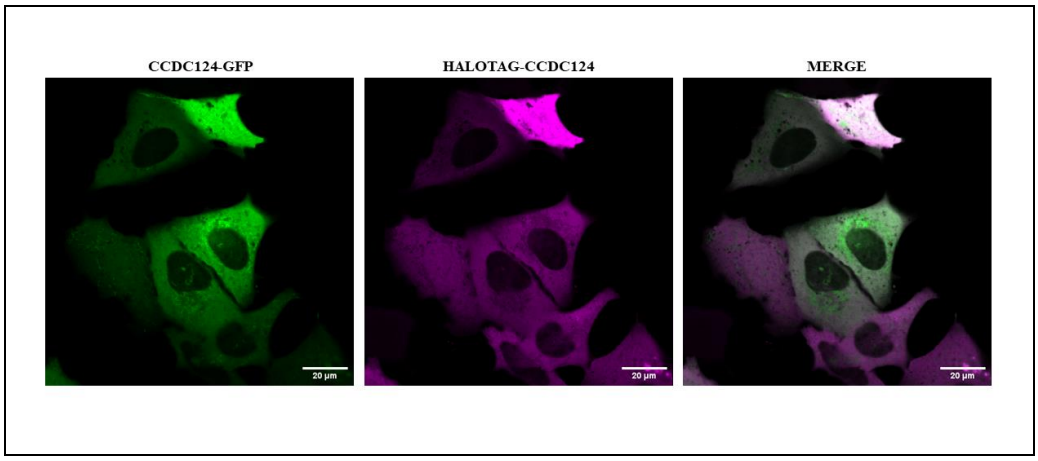
Floresan proteinlerin zamana bağlı olarak yıkılım profilleri ve floresan özelliklerini kaybetme sürelerini anlamak için Time-Lapse görüntü alınmıştır. Bu deneyde hücreler 15 dakika arayla toplamda 60 dakika olacak şekilde proteinlerin maksimum verimde çalıştığı dalga boyunda görüntülenmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5: HALO-CCDC124, SNAP-CCDC124, CCDC124-GFP plazmitleri ile transfekte edilmiş hücrelerin Time-Lapse Konfokal mikroskop görüntüsü. Tüm plazmitler, U2OS hücre hattına transfekte edilmiştir. Konfokal 780'de 15 dakika ara ile görüntülenmiştir. Görüntüler, en az üç bağımsız deneyi temsil etmektedir. Ölçek çubukları, 20 µm'dir.

Yapılan bu deneyler sonucunda CCDC124 proteinini yaygın olarak sitoplazmada bulunurken, bazı hücrelerde bunun yanı sıra sitoplazmada toplanmış halde ve çekirdekte toplanmış halde de görülmektedir.

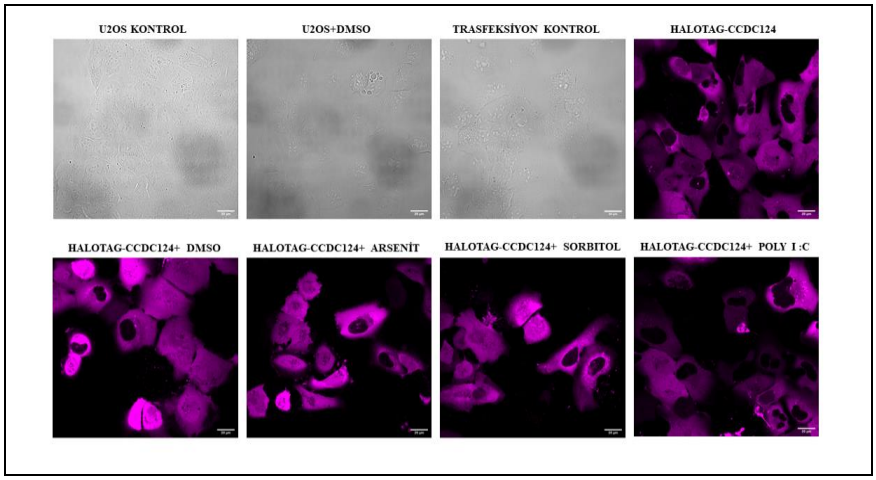
CCDC124 proteinini görüntülemek için en uygun floresan proteinin Halotag olduğu gözlemlenmiştir. HALO-CCDC124 ve SNAP-CCDC124 arasında belirgin bir fark gözlenmemiştir. Fakat CCDC124-GFP ile aralarında bazı bölgelerde farklı ışıma veren alanlar gözlemlenmiştir. Bunu anlamak amacıyla HALO-CCDC124 ve CCDC124-GFP kullanılarak ko-transfeksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Görüntülemeler sonrasında bu plazmit ürünlerinin tüm noktalarda merge ettiği görülmüştür. Bunun sonucunda; bu bölgelerde oluşan farklılığın GFP ve Halotag'ın yoğunlaştığı zaman gösterdikleri renk farklılıklarından olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6: HALO-CCDC124, CCDC124-GFP plazmitlerinin ko-transfeksiyonu sonucu, hücrelerin Konfokal mikroskop görüntüsü. Plazmitler, U2OS hücre hattına transfekte edilmiştir. Konfokal 780'de görüntülenmiştir. Görüntüler, en az üç bağımsız deneyi temsil etmektedir. Ölçek çubukları, 20 µm'dir.

4.4. HALO-CCDC124 Proteininin Stres Şartları Altında Lokasyonu

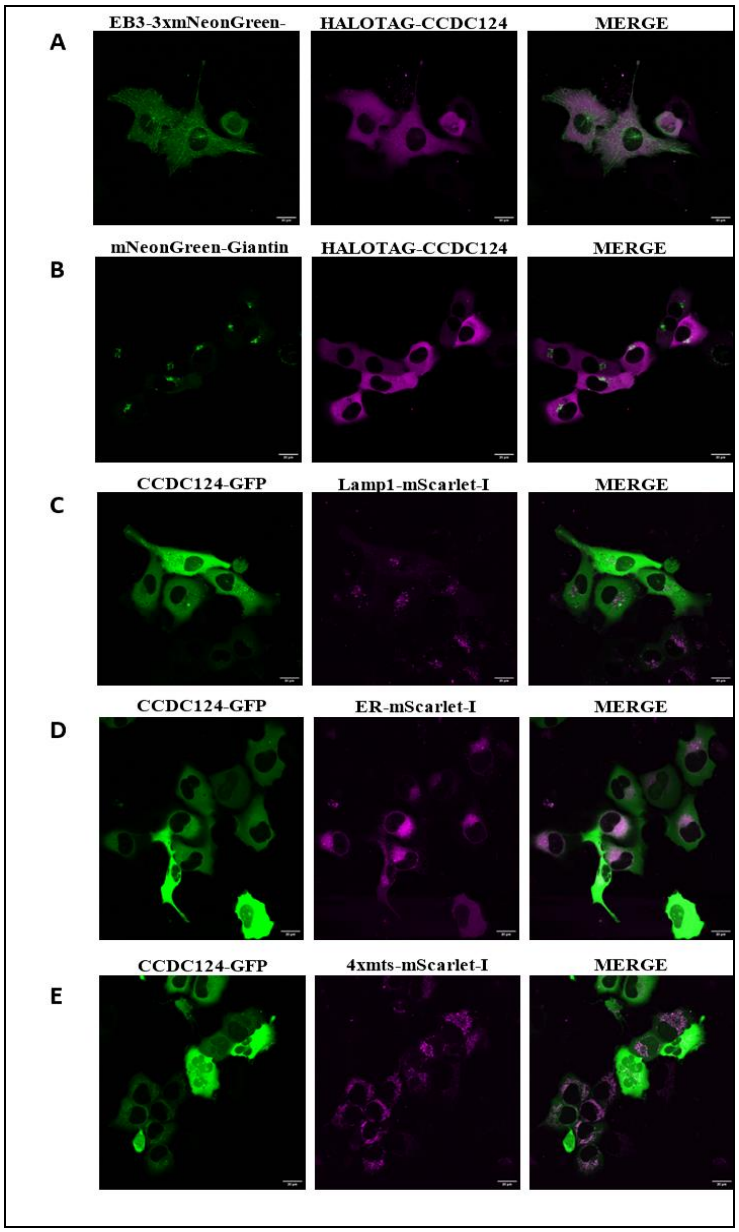
CCDC124 proteininin stres durumlarında hücre içindeki lokasyonunu anlamak amacıyla, Sorbitol, Poly I:C ve arsenit uygulanmıştır. Bunun sonucunda normal koşullardan farklı bir profil gözlemlenmemiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7: HALO-CCDC124 plazmiti transfekte edilmiş hücrelere stres maddeleri uygulama sonrası Konfokal mikroskop görüntüsü.U2OS hücre hattına transfekte edilmiştir. Konfokal 780'de görüntülenmiştir. 0.4 M sorbitol 1 saat, 500 µM arsenit 1 saat, 1250 ng/ ml POLY I:C 4 saat, uygulanmıştır. Görüntüler, en az üç bağımsız deneyi temsil etmektedir. Ölçek çubukları, 20 µm'dir.

4.5. CCDC124 Proteininin Organeller ile İlişkisi

CCDC124 proteininin organeller ile olan konumsal ilişkisini anlamak amacıyla, ko-lokalizasyon çalışmaları için üretilmiş organel plazmitleri ile ko-transfeksiyon yapılarak görüntülenmiştir. Yapılan bu deney sonucunda CCDC124 proteininin golgi, lizozom ve mikrotübüller ile lokasyon olarak merge olduğu görülmemiştir. (Şekil 4.8 A,B,C) Endoplazmik retikulum plazmiti ile yapılan ko-transfeksiyon sonucunda kesin bir sonuca varılamamıştır (Şekil 4.8. D). Mitokondri plazmiti ile yapılan ko-transfeksiyon sonucunda mitokondriyal hedefleme sinyali içeren bu plazmit ile CCDC124-GFP proteininin %100 merge olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.8 E).



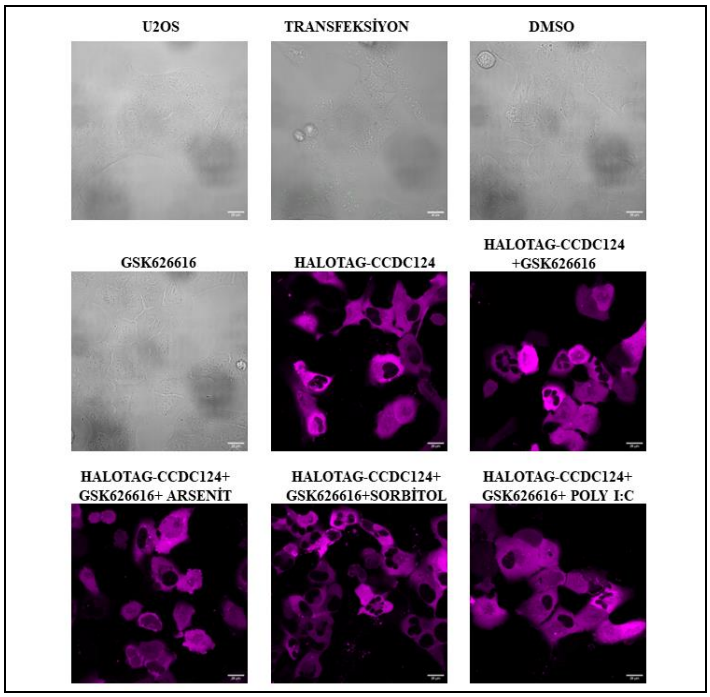
Şekil 4.8: CCDC124 proteininin organellerle etkileşimi. Mikrotübüller için a) HALO-CCDC124 ve EB3-3xmNeonGreen-N1, Golgi için b) HALO-CCDC124 ve mNeonGreen-Giantin, Lizozom için c) CCDC124-GFP ve Lamp1-mScarlet-I, Endoplazmik Retikulum için d) CCDC124-GFP ve ER-mScarlet-I, Mitokondri için e) CCDC124-GFP ve 4xmts-mScarlet-I, Plazmitleri co-transfekte edilmiştir.konfokalal Görüntüleri. Tüm plazmitler, U2OS hücre hattına transfekte edilmiştir. Konfokal 980'de görüntülenmiştir. Görüntüler, en az üç bağımsız deneyi temsil etmektedir. Ölçek çubukları, 20 µm'dir.

4.6. CCDC124 ve DYRK3 Proteininin İlişkisi

DYRK3 proteini için yapılan kütle spektroskopisi sonucunda CCDC124 proteini ile kuvvetli bir etkileşimi olduğu görülmüştür. Bundan yola çıkarak DYRK3

proteini ile CCDC124 proteini arasındaki interaksiyon anlaşılmaya çalışılmıştır. Hücre içerisindeki lokalizasyon ve ko-lokalizasyon çalışmalarında CCDC124 için HALO-CCDC124, CCDC124-GFP; DYRK3 için EGFP-DYRK3(WT), EGFP-DYRK3(K218M) kullanılmıştır. Çekirdekçikteki etkileşimlerini anlamak amacıyla mCherry-SRRM1 kullanılmıştır. DYRK3 ün yokluğundaki etkiyi anlamak amacıyla, DYRK ailesini inhibe eden GSK626616 ilaç olarak kullanılmıştır.

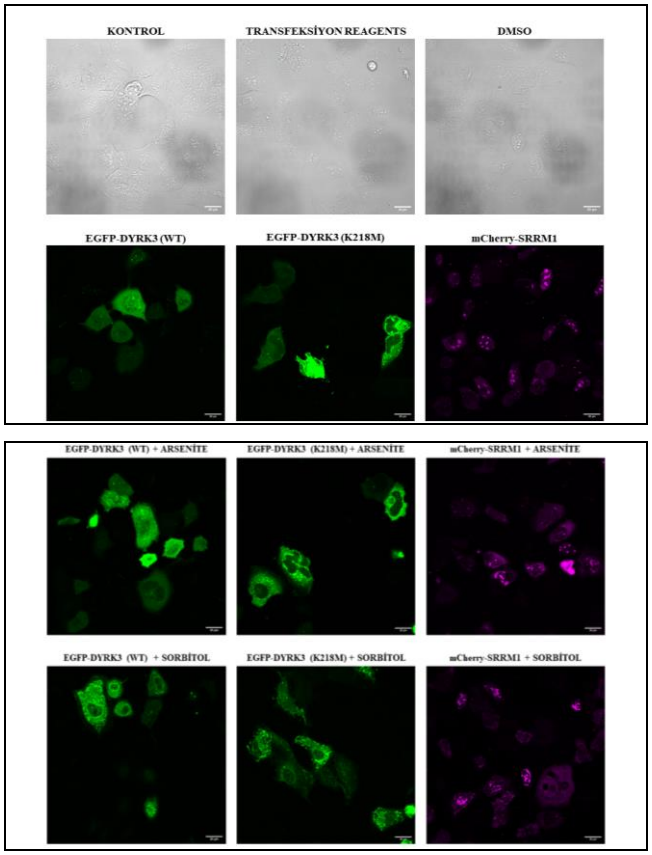
Normal şartlarda HALO-CCDC124 transfekte edilen hücrelere GSK626616 eklendiği zaman hücre içerisinde az miktarda granülleşmenin arttığı bununla birlikte stres uygulandığı zaman ise bu granülleşmenin belirgin bir seviyeye ulaştığı görülmektedir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9: HALO-CCDC124 plazmiti transfekte edilmiş hücrelere GSK626616 inhibitörü uygulama sonrası Konfokal mikroskop görüntüsü. U2OS hücre hattına transfekte edilmiştir. Konfokal 780'de görüntülenmiştir. 1 µM GSK626616 2 saat, 0.4 M sorbitol 1 saat, 500 µM arsenit 1 saat, 1250 ng/ ml POLY I:C 4 saat, uygulanmıştır. Görüntüler, en az üç bağımsız deneyi temsil etmektedir. Ölçek çubukları, 20 µm'dir.

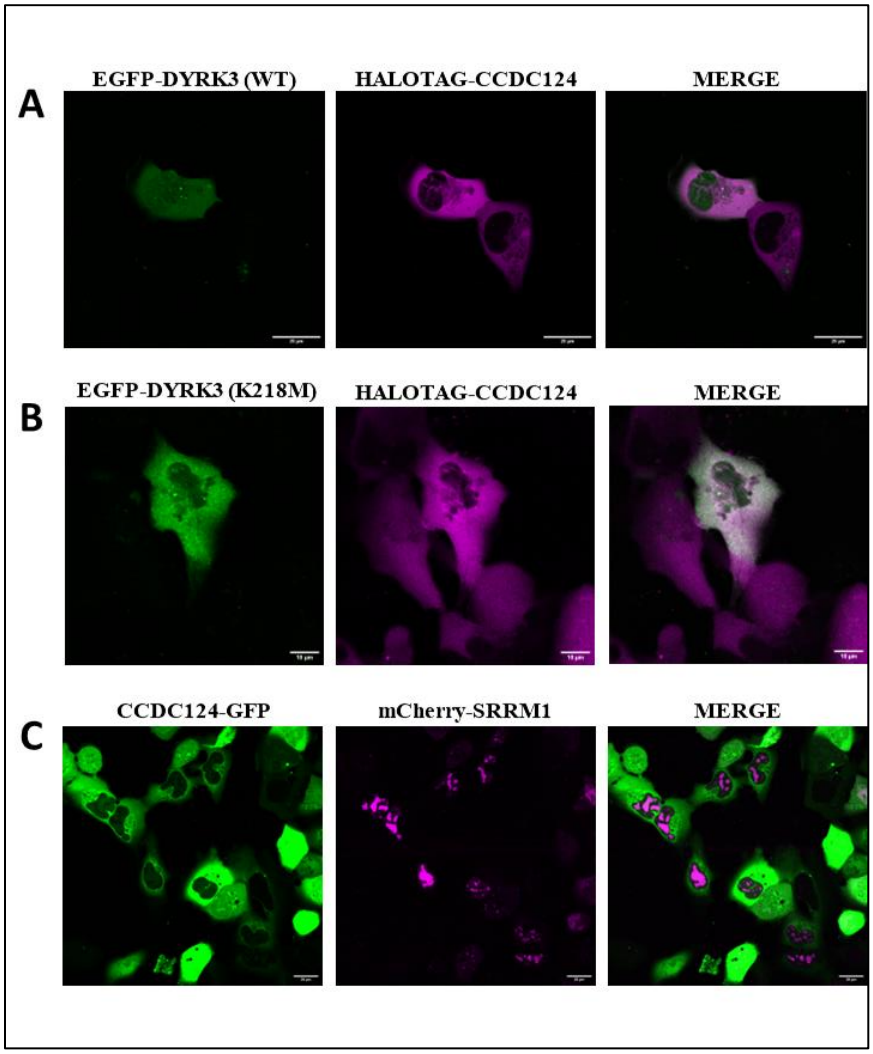
EGFP-DYRK3(WT), EGFP-DYRK3(K218M) ve mCherry-SRRM1 transfekte edilerek hücre içerisindeki normal durumlardaki lokalizasyonu incelenmiştir. Aynı plazmitlerle transfekte edilmiş diğer hücrelere stres oluşturan maddeler ve inhibitörler uygulanmıştır ve hücrelerdeki değişimleri gözlemlenmiştir. EGFP-

DYRK3(WT) normal şartlarda sitoplazma ve çekirdek içerisinde yaygın olarak bazı hücrelerde granüler yapılar gözlemlenmiştir. EGFP-DYRK3(K218M) normal şartlarda az miktarda çekirdekte yaygın ve bazı hücrelerde buna ek olarak granüller, sitoplazmada ise genel olarak granüler olarak gözlemlenmiştir. mCherry-SRRM1 normal şartlarda çekirdekte granüler yapılar olarak gözlemlenmiştir. Stres şartlarında ise mCherry-SRRM1'in granüler yapılarının dağıldığı gözlemlenmiştir. EGFP-DYRK3(WT) yaygın halden granüler yapılar haline geçtiği gözlemlenmiştir. EGFP-DYRK3(K218M) granüler halini koruyarak granüllerin boyutlarının arttığı gözlemlenmiştir. EGFP-DYRK3(WT) ve EGFP-DYRK3(K218M) proteinlerinin arsenit stresinden farklı olarak, sorbitol stresinde çekirdek zarı etrafında yoğunlaştığı gözlemlenmiştir. EGFP-DYRK3(K218M) tarafında oluşan granüler yapılar EGFP-DYRK3(WT) tarafından oluşan granüler yapılardan daha büyük olarak gözlemlenmiştir (Şekil 4.10).



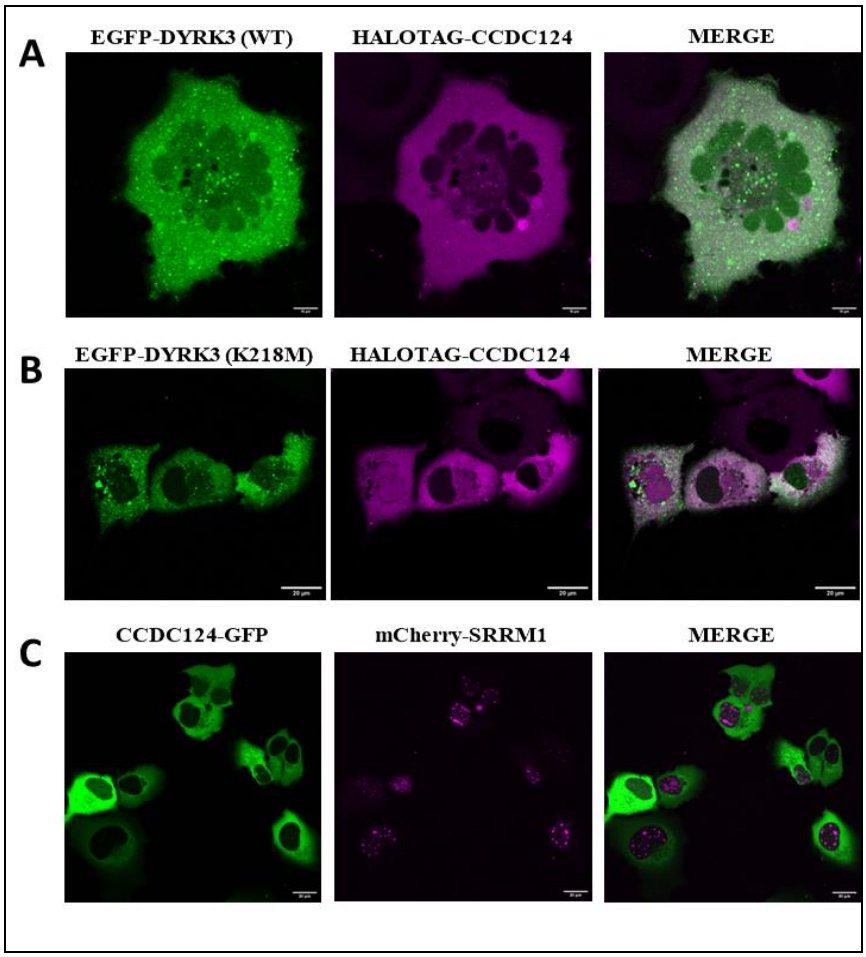
Şekil 4.10: EGFP-DYRK3(WT), EGFP-DYRK3(K218M) ve mCherry-SRRM1 transfekte edilen hücrelerin Konfokal mikroskop görüntüsü. U2OS hücre hattına transfekte edilmiştir. Konfokal 780'de görüntülenmiştir. 0.4 M sorbitol 1 saat, 500 µM arsenit 1 saat, 1250 ng/ ml POLY I:C 4 saat, uygulanmıştır. Görüntüler, en az üç bağımsız deneyi temsil etmektedir. Ölçek çubukları, 20 µm'dir.

EGFP-DYRK3(WT), EGFP-DYRK3(K218M) ve mCherry-SRRM1'in CCDC124 ile konumsal bağlantısını anlamak amacıyla ko-transfeksiyon yapılmıştır ve görüntülenmiştir. Görüntülemeler sonucunda EGFP-DYRK3(WT), EGFP-DYRK3(K218M) genel hatlarıyla hücre içerisindeki dağılımları aynı olduğu için görüntüler merge edildiği zaman proteinler üst üste denk gelmektedir fakat oluşan granüler yapılar denk gelmemektedir. mCherry-SRRM1 ile çekirdekte, %100 örtüşen bir profil gözlemlenmiştir (Şekil 4.11).



Şekil 4.11: CCDC124 plazmitinin EGFP-DYRK3(WT), EGFP-DYRK3(K218M) ve mCherry-SRRM1 plazmitleri ile ko-transfeksiyonu. a) HALO-CCDC124 ve EGFP-DYRK3(WT) ko-transfeksiyonu, b) HALO-CCDC124 ve EGFP-DYRK3(K218M) ko-transfeksiyonu, c) CCDC124-GFP ve mCherry-SRRM1 ko-transfeksiyonu. U2OS hücre hattına transfekte edilmiştir. Konfokal 780'de görüntülenmiştir. 1 µM GSK626616 2 saat, 0.4 M sorbitol 1 saat, 500 µM arsenit 1 saat, 1250 ng/ ml POLY I:C 4 saat, uygulanmıştır. Görüntüler, en az üç bağımsız deneyi temsil etmektedir. Ölçek çubukları, 20 µm'dir.

EGFP-DYRK3(WT), EGFP-DYRK3(K218M) ve mCherry-SRRM1 kullanılarak CCDC124 ko-transfeksiyon yapılmıştır. Transfeksiyon ardından arsenit uygulanmıştır ve hücreler canlı olarak görüntülenmiştir. Sonuç olarak EGFP-DYRK3(WT) çekirdekte ve sitoplazmada granüler hale geçmiştir ve stres granülleri oluşturmuştur. Oluşan bu granüller HALO-CCDC124 granülleri ile konumsal olarak aynı değildir. EGFP-DYRK3(K218M) ve HALO-CCDC124 ko-transfeksiyonunda, hücrelerde EGFP-DYRK3(K218M)'in granüler yapısı değişmemiştir. CCDC124 granülleri ile örtüşmemektedir. mCherry-SRRM1 arsenit stresinde granüler yapısını kaybetmiş ve çekirdek ve sitoplazmaya dağılmıştır. CCDC124-GFP'nin konumunda bir değişim gözlenmemiştir (Şekil 4.12).

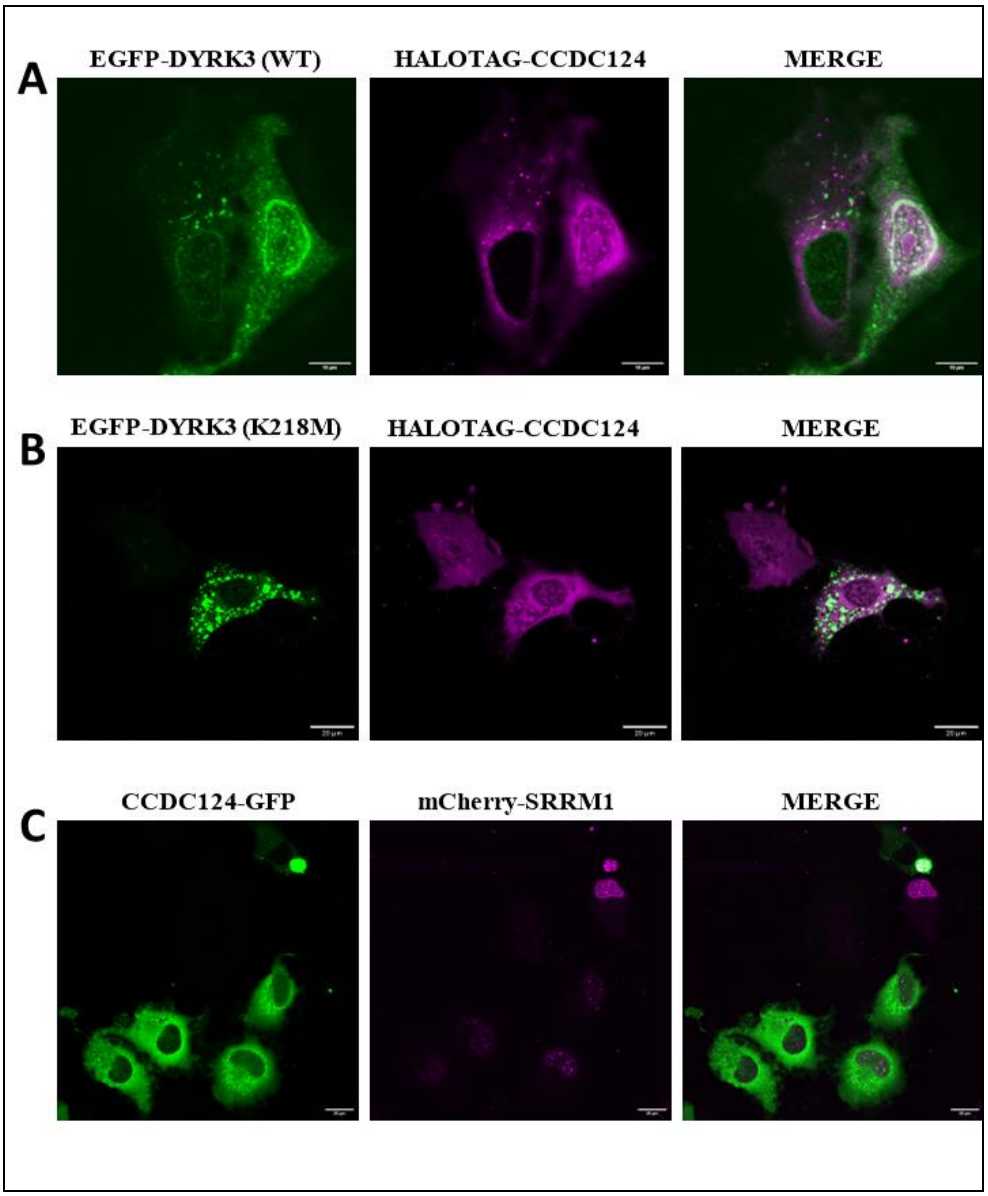


Şekil 4.12: CCDC124 plazmitinin EGFP-DYRK3(WT), EGFP-DYRK3(K218M) ve mCherry-SRRM1 Plazmitleri ile ko-transfeksiyonu sonrası arsenit uygulaması. U2OS hücre hattına transfekte edilmiştir. Konfokal 780'de görüntülenmiştir. 500 µM arsenit 1 saat uygulanmıştır. Görüntüler, en az üç bağımsız deneyi temsil etmektedir. Ölçek çubukları, 20 µm'dir.

EGFP-DYRK3(WT), EGFP-DYRK3(K218M) ve mCherry-SRRM1 kullanılarak CCDC124 ko-transfeksiyon yapılmıştır. Transfeksiyon ardından sorbitol uygulanmıştır. Ve hücreler canlı olarak görüntülenmiştir. Sonuç olarak EGFP-DYRK3(WT) ile HALO-CCDC124 ko-transfeksiyon setinde EGFP-DYRK3(WT), sitoplazmada ve çekirdekte granüler hale gelmiştir. Çekirdek membranında bir çizgi oluşturacak şekilde yoğunlaşmıştır. HALO-CCDC124 sitoplazmada ve çekirdekte granüler hale geçmiştir ve aynı şekilde Çekirdek membranında bir çizgi oluşturacak şekilde yoğunlaşmıştır. Sitoplazmada HALO-CCDC124 tarafından oluşan nadir granüller, EGFP-DYRK3(WT) sitoplazmik granülleri ile aynı konumdadır. Çekirdekte ise EGFP-DYRK3(WT) ve HALO-CCDC124 granülleri çakışmaktadır.

EGFP-DYRK3(K218M) ve HALO-CCDC124 ko-transfeksiyon setinde EGFP-DYRK3(K218M), çekirdekte az yoğun granüller, sitoplazmada ise yoğun granüller yapısında gözlemlenmiştir. HALO-CCDC124 çekirdekte belirgin yoğunlukta gözlemlenmektedir. Sitoplazmada ise granüler değil, fakat belirli bölgelerde yoğunlaşmalar oluşturan bir profile sahip olmuştur. Merge halinde ise çekirdekte oluşan yoğunlaşmaların çakıştığı görülmektedir. Sitoplazmada ise. HALO-CCDC124'ün yoğunlaştığı bölgeler ile EGFP-DYRK3(K218M)'ün oluşturduğu granüler alanların çakıştığı görülmektedir.

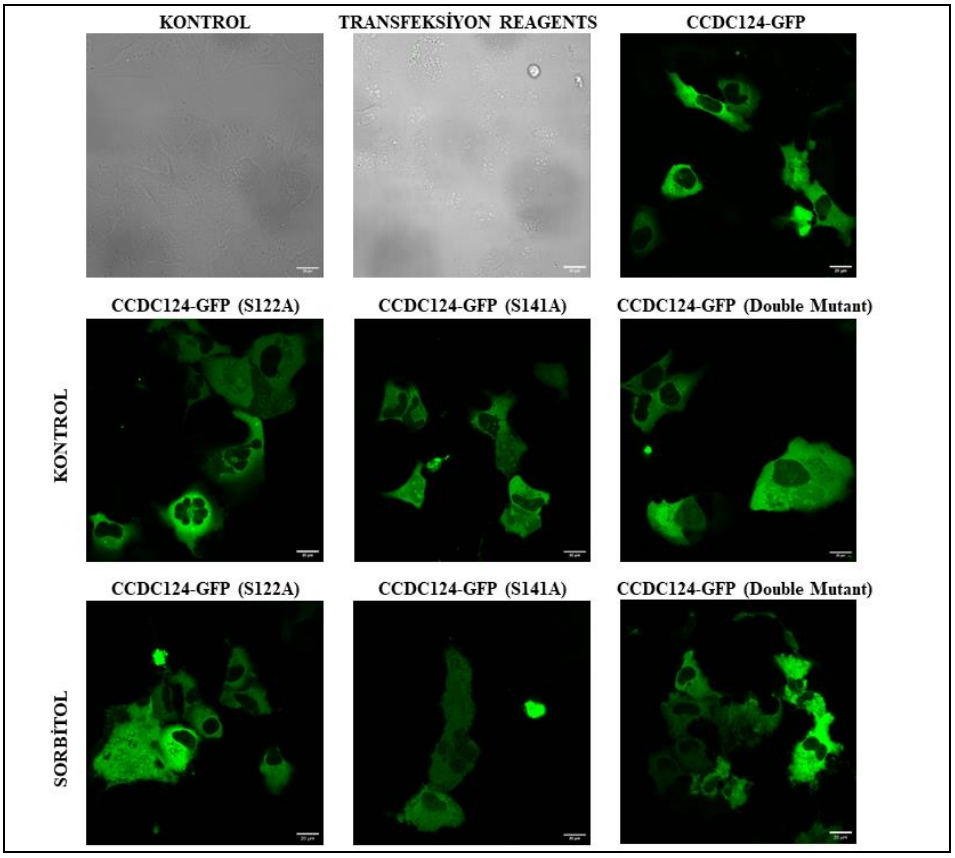
mCherry-SRRM1 ve CCDC124-GFP ko-transfeksiyon setinde, CCDC124-GFP genel olarak çekirdek etrafında yoğunlaşmış olarak görülmektedir. Şekilsiz yapılar olarak sitoplazmada yoğunlaşmıştır. Çekirdek içerisinde az yoğun olarak çekirdekçikte görülmektedir. mCherry-SRRM1 stres durumunda çekirdek içine dağılmıştır. Strese uğramayan hücrelerde çekirdekçikteki konumunu korumuştur. Görselleri merge ettiğimiz zaman ise CCDC124 ün stres durumunda çekirdekçikle beraber parçalandığını, mCherry-SRRM1' in ise çekirdekçikten çıktığı görülmüştür (Şekil 4.13).



Şekil 4.13: CCDC124 plazmitinin EGFP-DYRK3(WT), EGFP-DYRK3(K218M) ve mCherry-SRRM1 plazmitleri ile ko-transfeksiyonu sonrası sorbitol uygulaması. U2OS hücre hattına transfekte edilmiştir. Konfokal 780'de görüntülenmiştir. 0.4 M sorbitol 1 saat uygulanmıştır. Görüntüler, en az üç bağımsız deneyi temsil etmektedir. Ölçek çubukları, 20 µm'dir.

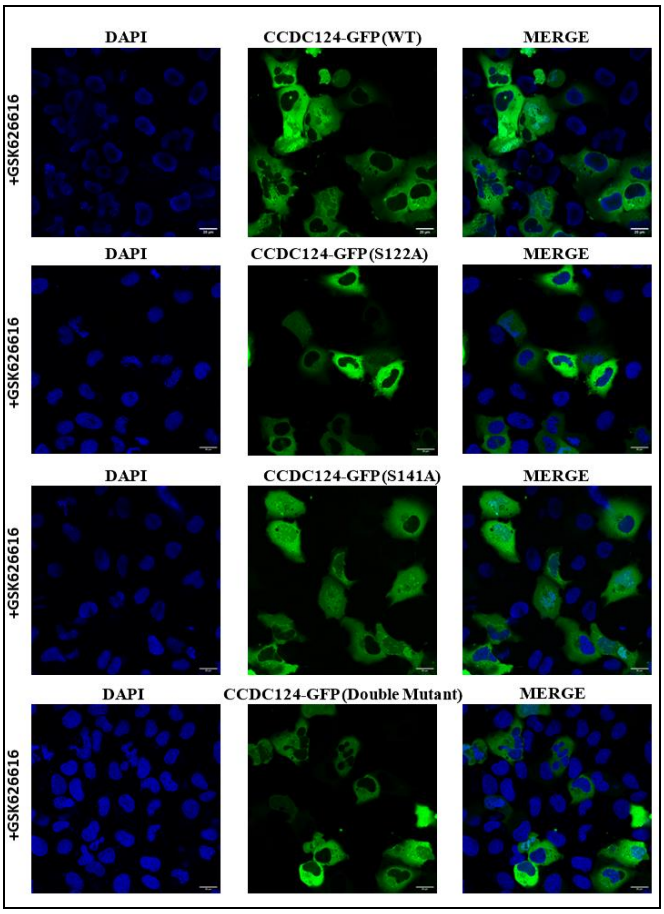
4.7. Mutant CCDC124 Proteininin Normal ve Stres Koşullarında Lokasyonu

Mutant CCDC124-GFP genleri U2OS hücre hattına transfekte edilmiştir. Transfeksiyon ardından sorbitol uygulanmış ve hücreler canlı olarak görüntülenmiştir. Sonuç olarak CCDC124-GFP-WT'a kıyasla mutant CCDC124-GFP proteinlerinin çekirdekte bulunma sıklığı artmıştır. CCDC124-GFP'de gerçekleşen mutasyonun hücre fizyolojisinde değişikliklere sebep olduğu saptanmıştır. Mutasyonlu CCDC124-GFP transfekte edilen ve sonrasında sorbitole maruz bırakılan hücrelerde, hücrelerin morfolojik yapılarının değiştiği, CCDC124-GFP-WT transfekte edilen hücrelerde çekirdekte bulunan CCDC124'ün çekirdekte olmadığı görülmüştür (Şekil 4.14). CCDC124' de bulunan 122. Ve 141. amino asitler fosforilasyon bölgeleridir mutasyonlar isimlerini bulundukları alandaki değişimden almaktadır ve double mutant bu iki bölgede de mutasyon içermektedir.



Şekil 4.14: Mutant CCDC124 proteininin normal şartlarda Konfokal mikroskop görüntüsü. U2OS hücre hattına transfekte edilmiştir. Konfokal 780'de görüntülenmiştir. Görüntüler, en az üç bağımsız deneyi temsil etmektedir. Ölçek çubukları, 20 µm'dir.

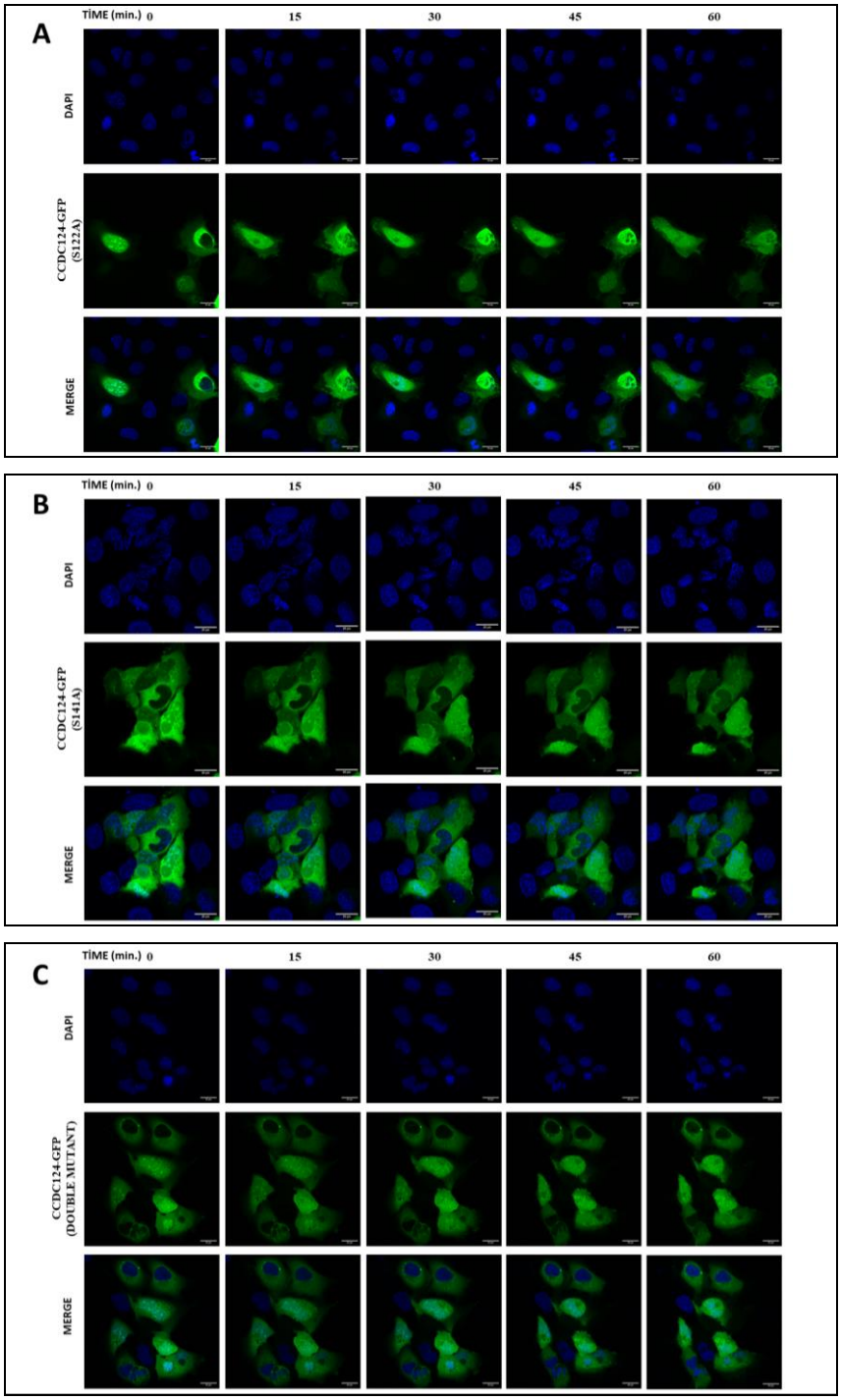
Mutant CCDC124-GFP genleri U2OS hücre hattına transfekte edilmiştir. Transfeksiyon ardından GSK626616 inhibitörü uygulanmıştır. 2 saat ardından görüntüleme işlemi başlatılmıştır. Sonuç olarak hücrelerin herhangi bir uygulamaya tabi tutulmamış halleri ve kendi aralarında karşılaştırıldığı zaman, GSK626616 inhibitörü uygulanan bazı hücrelerde çekirdek yapısı morfolojik olarak değişmiştir. İnhibitör uygulanan CCDC124-GFP (WT), CCDC124-GFP (S122A), CCDC124-GFP (S141A), CCDC124-GFP (DOUBLE MUTANT), arasında belirgin bir farklılık gözlemlenememiştir (Şekil 4.15).



Şekil 4.15: Mutant CCDC124 proteinlerine GSK626616 inhibitörü uygulanması. U2OS hücre hattına transfekte edilmiştir. Konfokal 780'de görüntülenmiştir. 1 µM GSK626616 2 saat uygulanmıştır. Görüntüler, en az üç bağımsız deneyi temsil etmektedir. Ölçek çubukları, 20 µm'dir.

CCDC124-GFP (S122A), CCDC124-GFP (S141A), CCDC124-GFP (DOUBLE MUTANT), plazmitleri transfekte edilen hücrelere arsenit uygulanarak 1 saat boyunca konfokal mikroskopta time-lapse görüntü alınmıştır. Bunun sonucunda üç mutantta da ortak olaylar gerçekleşmiştir. Çekirdekçikte yoğun olarak var olan

CCDC124 proteininin zamanla azaldığı, Az yoğun olarak var olan CCDC124 proteininin zamanla yok olduğu görülmüştür (Şekil 4.16).

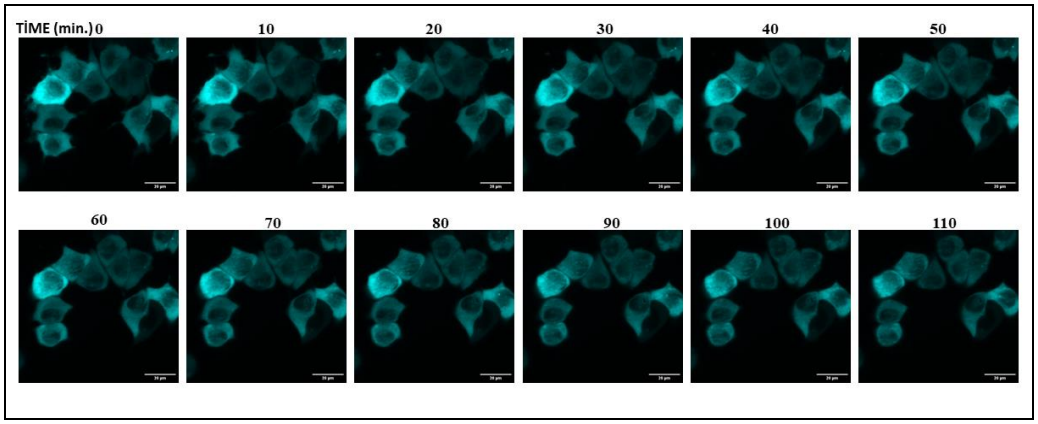


Şekil 4.16: CCDC124 mutant plazmitleri transfeksiyonu sonrası arsenit uygulaması. a) CCDC124-GFP (S122A) b) CCDC124-GFP (S141A) c) CCDC124-GFP (DOUBLE MUTANT). U2OS hücre hattına transfekte edilmiştir. Arsenit uygulamasından hemen sonra Konfokal 780'de 1 saat görüntülenmiştir. 500 µM arsenit 1 saat uygulanmıştır. Görüntüler, en az üç bağımsız deneyi temsil etmektedir. Ölçek çubukları, 20 µm'dir.

4.8. CCDC124 Proteininin Normal ve Stres Şartlarında LLSM 7 Mikroskobunda Uzun Süreli Görüntülenmesi

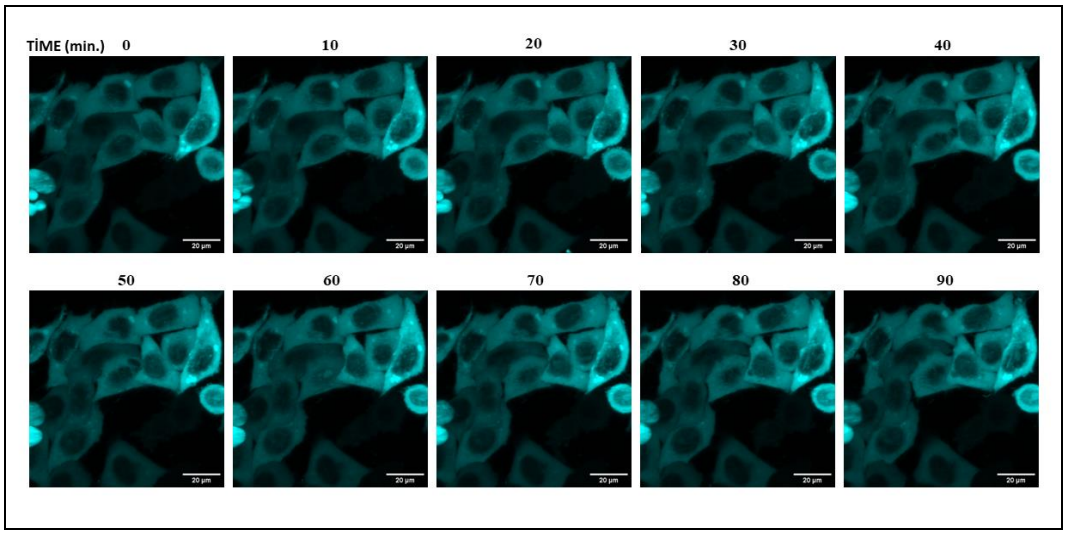
LLSM 7 mikroskobunun en önemli özelliklerinden biri 3D görüntüyü hızlı bir şekilde, çok alan tarayarak görüntülemesidir. Yapılan deneylerde hücrelere HALO-CCDC124, CCDC124-GFP (WT), CCDC124-GFP (S122A), CCDC124-GFP (S141A), CCDC124-GFP (DOUBLE MUTANT), transfekte edilerek çeşitli madde ve inhibitörler uygulanmıştır.

CCDC124-GFP (WT) transfekte edilen hücreler, 48 saat sonra yaklaşık olarak 2 saat görüntülenmiştir. CCDC124-GFP proteini yaygın olarak sitoplazmada bazı hücrelerde çekirdekte görülmüştür bununla birlikte bazı hücre sitoplazmalarında granüler CCDC124 proteinleri gözlemlenmiştir. Ve bu granüler yapıların zamana bağlı olarak kaybolduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.17)

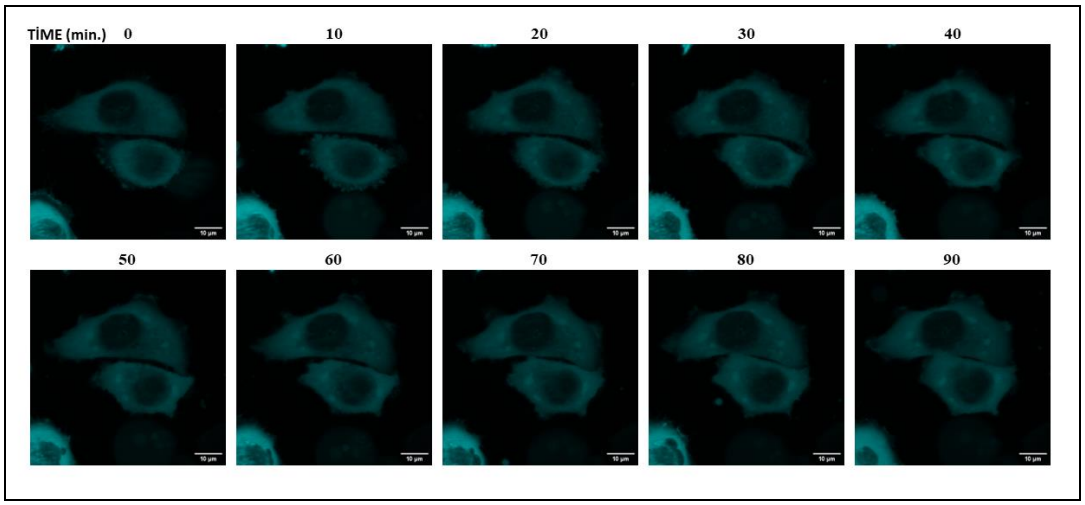


Şekil 4.17: CCDC124-GFP (WT) plazmiti transfekte edilmiş hücrelerin LLSM7 Time Lapse görüntüsü. HeLa hücre hattına transfekte edilmiştir. Görüntüler, en az üç bağımsız deneyi temsil etmektedir. Ölçek çubukları, 20 µm'dir.

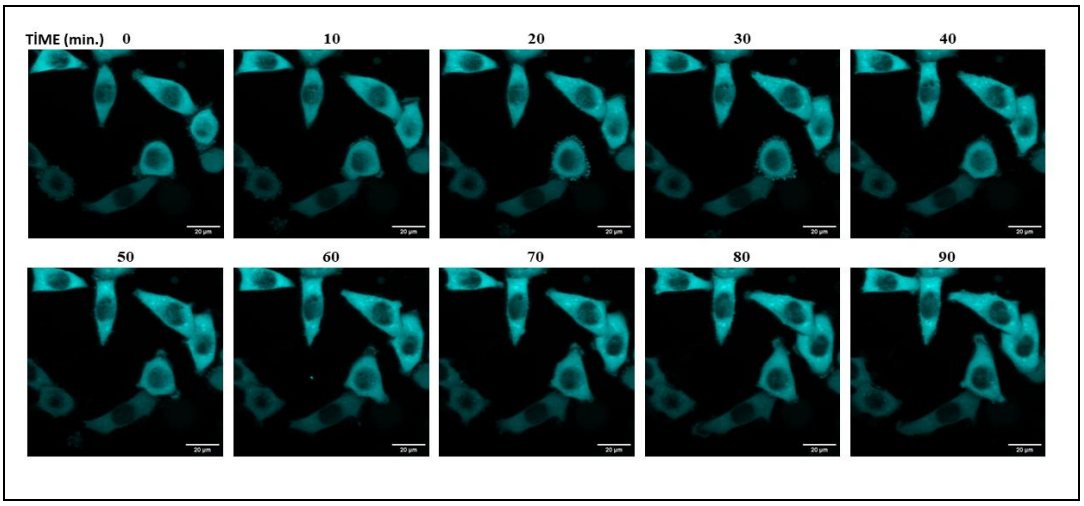
CCDC124-GFP (WT) (Şekil 4.18), CCDC124-GFP (S122A) (Şekil 4.19), CCDC124-GFP (S141A) (Şekil 4.20), CCDC124-GFP (DOUBLE MUTANT) (Şekil 4.21), transfekte edilen hücreler, 48 saat sonra, 90 dakika görüntülenmiştir. 0 anında arsenit stresi uygulanmıştır ve bu anda, CCDC124-GFP proteini yaygın olarak sitoplazmada bazı hücrelerde çekirdekte görülmüştür bununla birlikte bazı hücre sitoplazmalarında granüler CCDC124 proteinleri gözlemlenmiştir. Zaman ilerledikçe granüler yapıların olamadığı hücrelerde granüler yapıların oluştuğu görülmüştür. Granüler yapıların olduğu hücrelerde granül sayıların arttığı ve granüllerin boyutunun arttığı gözlemlenmiştir.



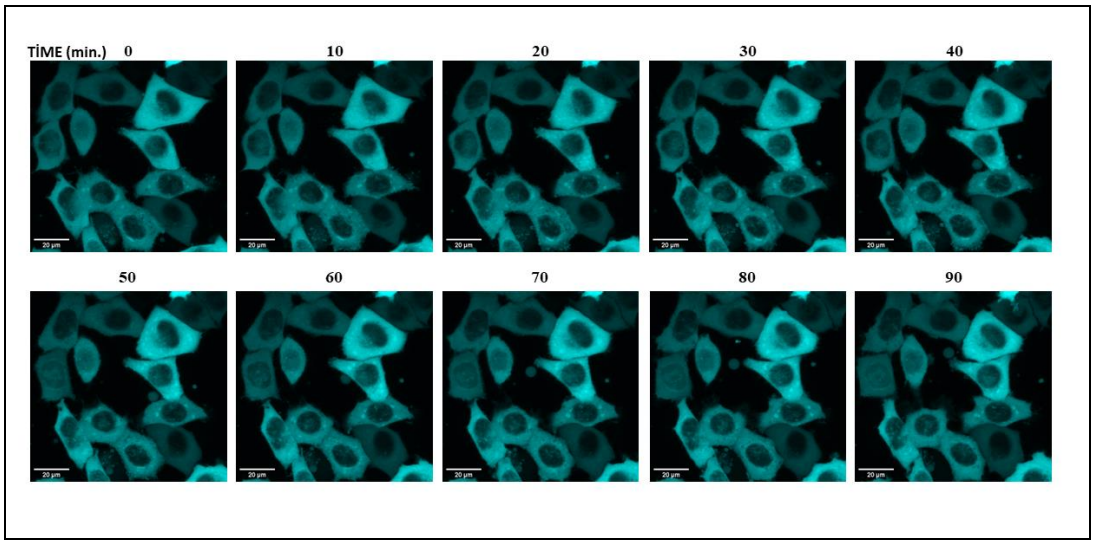
Şekil 4.18: CCDC124-GFP (WT) plazmiti transfekte edilmiş hücrelerin arsenit uygulaması, LLSM7 Time Lapse görüntüsü. HeLa hücre hattına transfekte edilmiştir. Arsenit uygulamasından hemen sonra LLSM7'de 1,5 saat görüntülenmiştir. 500 µM arsenit 1 saat uygulanmıştır. Görüntüler, en az üç bağımsız deneyi temsil etmektedir. Ölçek çubukları, 20 µm'dir.



Şekil 4.19: CCDC124-GFP (S122A) plazmiti transfekte edilmiş hücrelerin arsenit uygulaması, LLSM7 Time Lapse görüntüsü. HeLa hücre hattına transfekte edilmiştir. Arsenit uygulamasından hemen sonra LLSM7'de 1,5 saat görüntülenmiştir. 500 µM arsenit 1 saat uygulanmıştır. Görüntüler, en az üç bağımsız deneyi temsil etmektedir. Ölçek çubukları, 20 µm'dir.



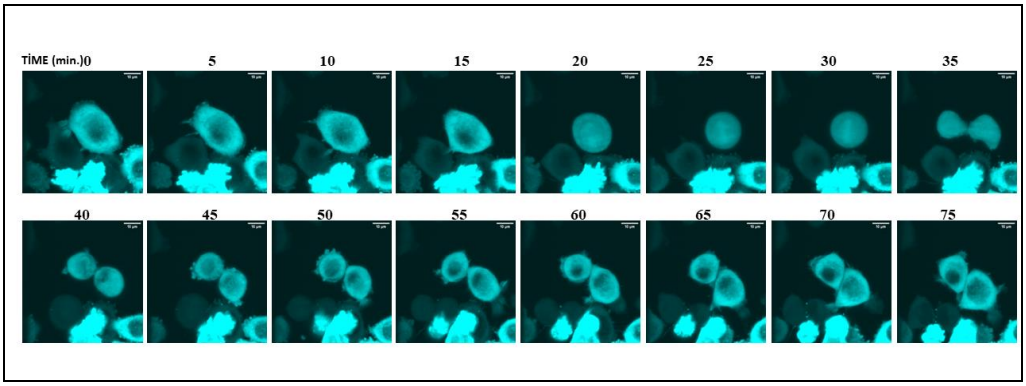
Şekil 4.20: CCDC124-GFP (S141A) plazmiti transfekte edilmiş hücrelerin arsenit uygulaması, LLSM7 Time Lapse görüntüsü. HeLa hücre hattına transfekte edilmiştir. Arsenit uygulamasından hemen sonra LLSM7'de 1,5 saat görüntülenmiştir. 500 µM arsenit 1 saat uygulanmıştır. Görüntüler, en az üç bağımsız deneyi temsil etmektedir. Ölçek çubukları, 20 µm'dir.



Şekil 4.21: CCDC124-GFP (Double Mutant) plazmiti transfekte edilmiş hücrelerin arsenit uygulaması, LLSM7 Time Lapse görüntüsü. HeLa hücre hattına transfekte edilmiştir. Arsenit uygulamasından hemen sonra LLSM7'de 1,5 saat görüntülenmiştir. 500 µM arsenit 1 saat uygulanmıştır. Görüntüler, en az üç bağımsız deneyi temsil etmektedir. Ölçek çubukları, 20 µm'dir.

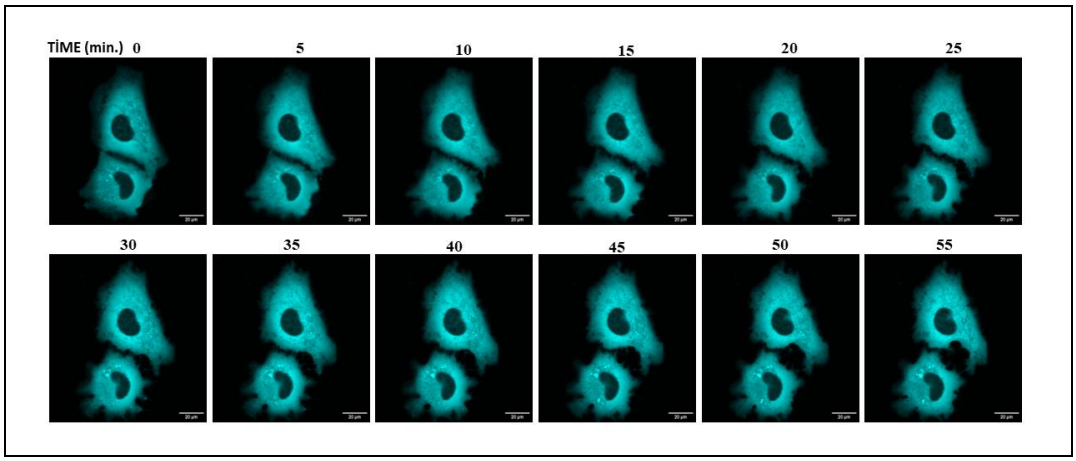
HALO-CCDC124 hücrelere transfekte edilmiştir. Halo-CCDC124 proteini yaygın olarak sitoplazmada görüntülenmiştir. Bir süre sonra hücre bölünmeye gitmiştir. Halo-CCDC124 proteininin profaz evresinden başlayarak hücrenin merkezine doğru toplandığı ve metafaz evresinde kromozomlarla aynı bölgede

konumlandığı görülmüştür. Anafaz evresinde ise bu yoğunluğun iki hücreye dağıldığı görülmüştür. Ve hücre bölündükten sonra Halo-CCDC124 proteini sitoplazmada yaygın olarak buluna haline geçmiştir (Şekil 4.22).



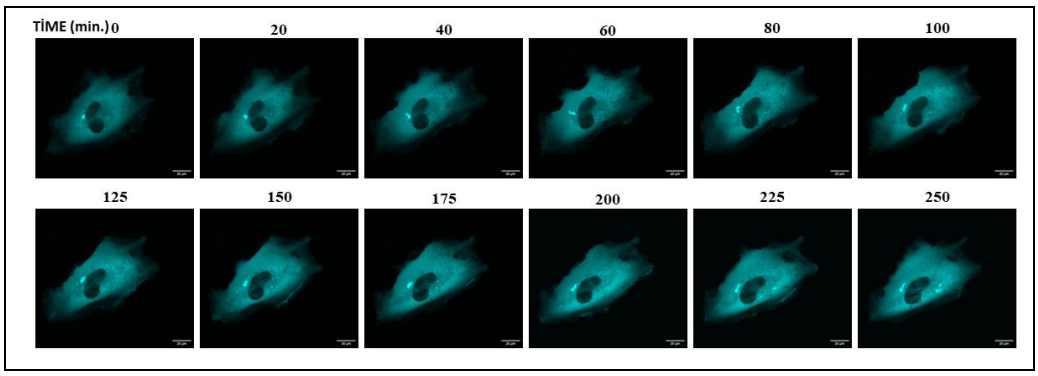
Şekil 4.22: Hücre bölünmesinde CCDC124. LLSM7 mikroskobunda 24 süreli alınmış Time Lapse görüntüsünden kesitler. Transfeksiyonda Halo-CCDC124 kullanılmıştır. U2OS hücre hattına kullanılmıştır. Görüntüler, en az üç bağımsız deneyi temsil etmektedir. Ölçek çubukları, 20 µm'dir.

U2OS hücrelerine HALO-CCDC124 hücrelere transfekte edilmiştir. transfekte edilen hücreler, 48 saat sonra, 55 dakika görüntülenmiştir. 0 anında sorbitol uygulanmıştır ve görüntüleme işlemi başlatılmıştır, Halo-CCDC124 proteini 0 anında yaygın olarak sitoplazmada bulunmaktadır. Ve sitoplazmada küçük granüler yapılar görülmektedir. Zamanla bu granüllerin sayıları be boyutları artmıştır (Şekil 4.23).



Şekil 4.23: HALO-CCDC124 plazmiti transfekte edilmiş hücrelerin sorbitol uygulaması, LLSM7 Time Lapse görüntüsü. U2OS hücre hattı kullanılmıştır. Sorbitol uygulamasından hemen sonra LLSM7'de görüntülenmiştir. 0.4 M sorbitol 55 dakika uygulanmıştır. Görüntüler, en az üç bağımsız deneyi temsil etmektedir. Ölçek çubukları, 20 µm'dir.

U2OS hücrelerine HALO-CCDC124 hücrelere transfekte edilmiştir. transfekte edilen hücrelere, 48 saat sonra, Poly I:C transfekte edilmiştir ve 4 saat görüntüleme işlemi başlatılmıştır. Halo-CCDC124 proteini 0 anında yaygın olarak sitoplazmada bulunmaktadır. Ve sitoplazmada küçük granüler yapılar görülmektedir. Zamanla bu granüllerin sayıları be boyutları artmıştır (Şekil 4.24).

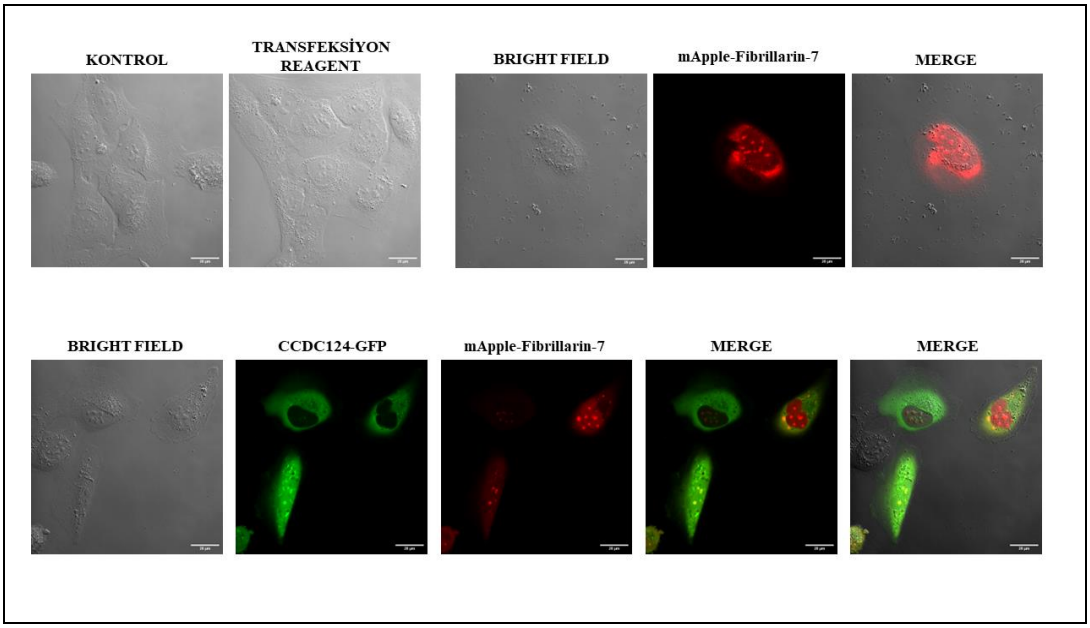


Şekil 4.24: HALO-CCDC124 plazmiti transfekte edilmiş hücrelerin Poly I:C uygulaması, LLSM7 Time Lapse görüntüsü. U2OS hücre hattı kullanılmıştır. Poly I:C uygulamasından hemen sonra LLSM7'de 4 saat görüntülenmiştir. 2500ng Poly I:C uygulanmıştır. Görüntüler, en az üç bağımsız deneyi temsil etmektedir. Ölçek çubukları, 20 µm'dir.

4.9. CCDC124 ve Fibrillarin 7 Proteinlerinin Çekirdekteki Lokalizasyonu

Fibrillarin 7 çekirdekçik belirtecidir. CCDC124 proteininin çekirdek içerisindeki konumunu anlamak amacıyla, öncelikle mApple-Fibrillarin 7 tek başına transfekte edilerek normal koşullardaki yeri belirlenmiştir. Genel olarak çekirdekçikte yoğunlaşmıştır ve sitoplazmada belirli bölgelerdedir. Bu bölgeler çekirdekçiktir. mApple-Fibrillarin 7 ve CCDC124-GFP ile yapılan co-transfekte edilerek CCDC124 proteininin çekirdekteki konumu anlaşılmaya çalışılmıştır. Sonuç olarak CCDC124 proteinini çekirdekçikte mApple-Fibrillarin 7 proteini ile konumsal olarak aynı olarak gözlemlenmiştir. CCDC124 proteinini bunun dışında çekirdek içerisinde farklı granüler yapılarda da görülmüştür. Normalin dışında olarak mApple-Fibrillarin 7 ve CCDC124-GFP çekirdeğe çok yakın bir konumda sitoplazmada merge etmiştir (Şekil 4.25).

Daha önce Salmina ve arkadaşları tarafından fibrillarin-pozitif nükleolar agrezomlar arasında hasarlı rDNA, otofaji belirteçleri bulunur ve heterokromatin eşliğinde sitoplazmaya salındığı bulunmuştur. Şekil 4.25. de görüldüğü üzre Fibrillarin ile CCDC124 sitoplazmada aynı konumda bulunmaktadır. Buda CCDC124'ün agrezom oluşumu esnasında bir basamakta agrezom'a katıldığı düşüncesini oluşturmuştur.

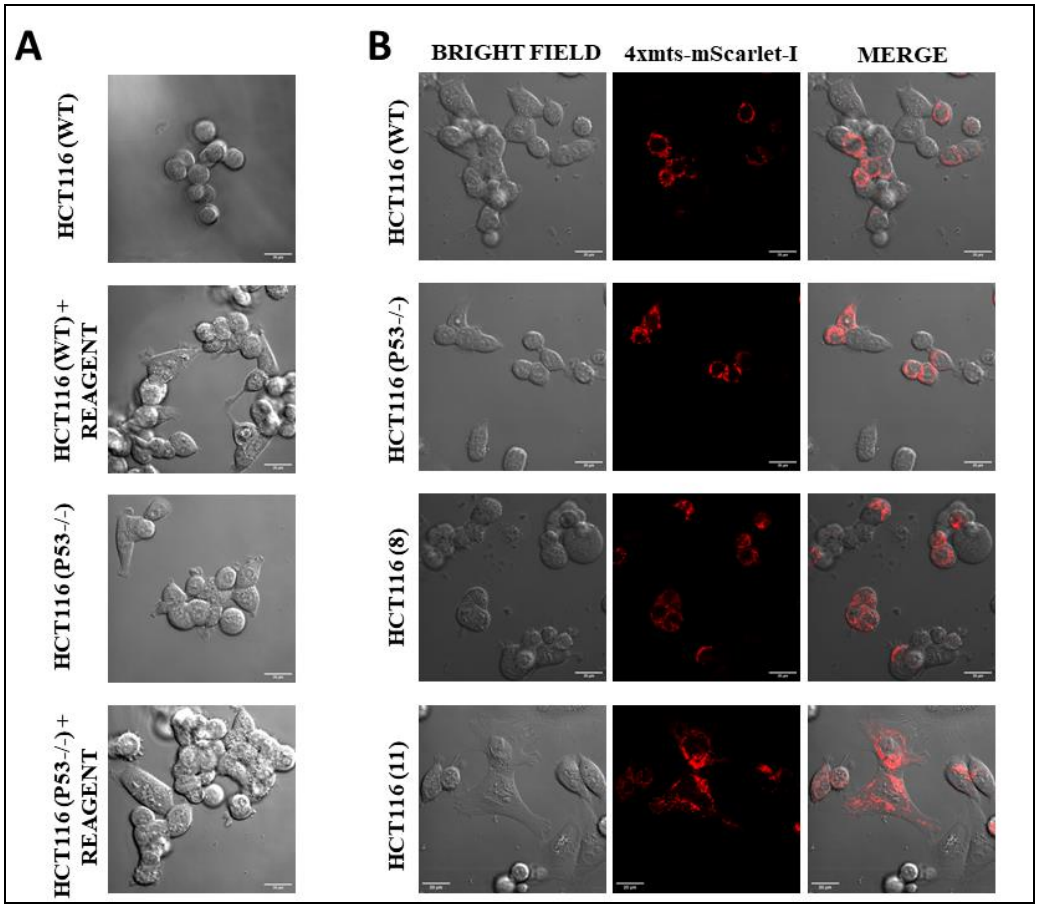


Şekil 4.25: CCDC124 Proteini ve Fibrillarin 7 Etkileşimi. CCDC124-GFP plazmiti kullanılmıştır. U2OS hücre hattına transfekte edilmiştir. Konfokal 880'de görüntülenmiştir. Görüntüler, en az üç bağımsız deneyi temsil etmektedir. Ölçek çubukları, 20 µm'dir.

4.10. CCDC124 Mutant ve Nakavt Hücrelerde Mitokondri Profili

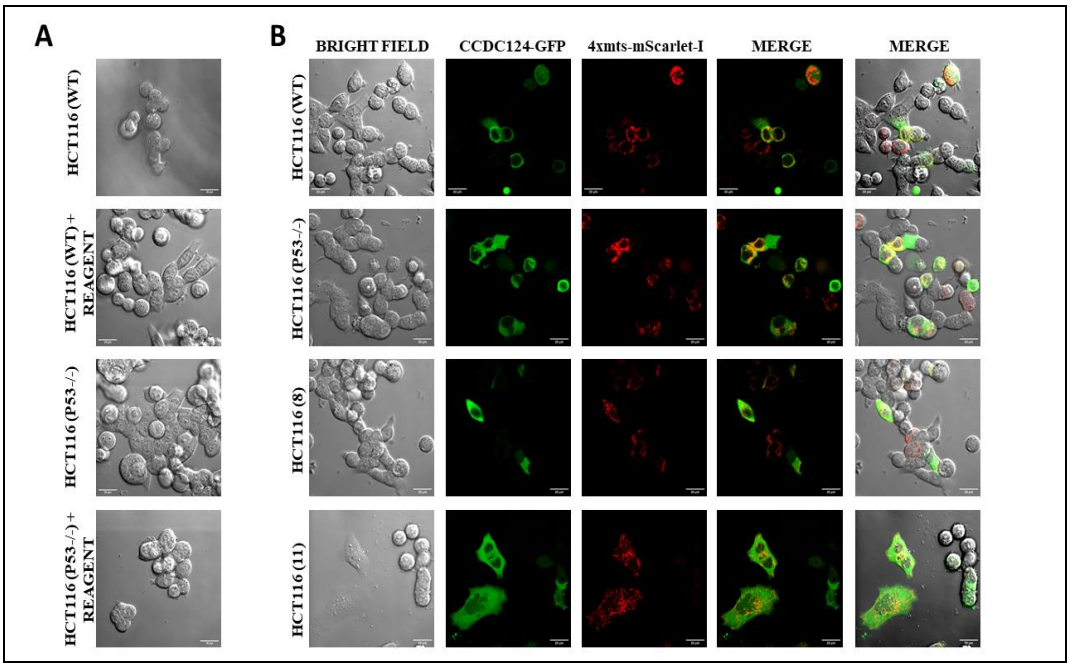
Daha önceki deneylerde CCDC124 proteininin mitokondri ile etkileşimi gözlemlenmiştir. CCDC124 mutant ve nakavt hücrelerde mitokondri morfolojisi merak uyandırmıştır. Bunun için HCT116 hücreleri kullanılmıştır. HCT116 (WT), HCT116 (P53-/-), HCT116 (8), HCT116 (11) hatlarına yapılan 4xmts-mScarlet-I plazmit transfeksiyonundan 48 saat sonra görüntüleme işlemi gerçekleştirilmiştir. Bunun sonucunda elde edilen görüntüler karşılaştırıldığında genel hücre morfolojilerinin birbirinden farklı olduğu gözlemlenmiştir. CCDC124 nakavt (HCT116 (11)) hücrelerin yapışan yüzey alanının kontrol hücresi olan HCT116

(P53-/-)' e göre daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. CCDC124 mutant (HCT116 (8)) hücrelerin kontrol hücresi olan HCT116 (WT)' a göre daha büyük hücre yapısına sahip olduğu görülmüştür (Şekil 4.26).



Şekil 4.26: CCDC124 mutant ve nakavt hücrelerde mitokondri. a) HCT116 (WT), HCT116 (P53-/-) hücrelerinin kontrol ve transfeksiyon reagent (+) görüntüleri, b) HCT116 (WT), HCT116 (P53-/-), HCT116 (8), HCT116 (11) hücrelerine 4xmts-mScarlet-I transfeksiyonu sonrası görüntüleri. U2OS hücre hattına transfekte edilmiştir. Konfokal 880'de görüntülenmiştir. Görüntüler, en az üç bağımsız deneyi temsil etmektedir. Ölçek çubukları, 20 µm'dir.

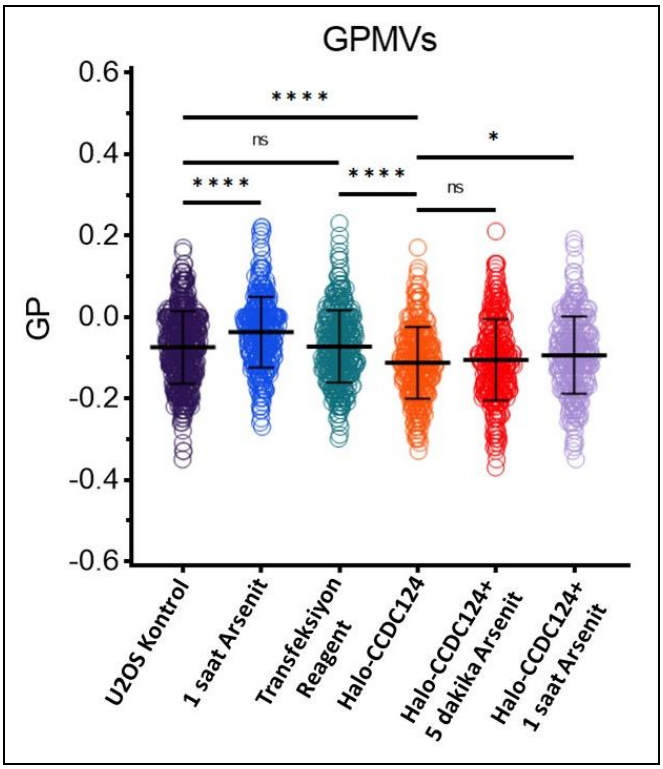
HCT116 (WT), HCT116 (P53-/-), HCT116 (8), HCT116 (11) hatlarına yapılan 4xmts-mScarlet-I ve CCDC124-GFP plazmit ko-transfeksiyonundan 48 saat sonra görüntüleme işlemi gerçekleştirilmiştir. Bunun sonucunda elde edilen görüntüler karşılaştırıldığında, CCDC124 transfekte etmediğimiz Şekil 4.26 ile aynı sonuçlara ulaşılmıştır. HCT116 (WT), HCT116 (P53-/-), HCT116 (8), HCT116 (11) hatlarında CCDC124-GFP ve 4xmts-mScarlet-I aynı konumda görülmüştür.



Şekil 4.27: CCDC124 mutant ve nakavt hücrelerde CCDC124 ve mitokondri etkileşimi. a) HCT116 (WT), HCT116 (P53-/-) hücrelerinin kontrol ve transfeksiyon reagent (+) görüntüleri, b) HCT116 (WT), HCT116 (P53-/-), HCT116 (8), HCT116 (11) hücrelerine CCDC124-GFP ve 4xmts-mScarlet-I transfeksiyonu sonrası görüntüleri. U2OS hücre hattına transfekte edilmiştir. Konfokal 880'de görüntülenmiştir. Görüntüler, en az üç bağımsız deneyi temsil etmektedir. Ölçek çubukları, 20 µm'dir.

4.11. GPMVs

Yapılan GPMVs deneyinde elde edilen görseller analiz edildiğinde, kontrol hücrelerine göre; hücreler arsenit stresine 1 saat maruz kaldıklarında hücrelerin membranlarındaki yoğunluk artmıştır. Transfeksiyon reagent'a maruz aruz kalan hücrelerde ise membran yoğunluğunda bir değişiklik saptanmamıştır. Halo-CCDC124 transfekte edilen edildiğinde hücrelerin membran yoğunluğunun azaldığı görülmüştür. Halo-CCDC124 transfekte edilip 5 dakika arsenite maruz bırakılan hücrelerde membran yoğunluğunun azaldığı görülmüştür. Halo-CCDC124 transfekte edilip 1 saat arsenite maruz bırakılan hücrelerde membran yoğunluğunun azaldığı görülmüştür.



Şekil 4.28: GPMVs Grafiği. ns: istatistiksel olarak anlamsız. *<0.05 ; ****<0.001.

5. TARTIŞMA

CCDC124 ökaryotlarda yüksek yoğunlukta korunmuş bölgeler içeren bir proteindir. Daha önce yapılan çalışmalarda CCDC124'ün sentrozomda ve midbody içinde yer alan CCDC124 proteinini ifade eder. Sentrozom proteinlerinin çoğuna benzer şekilde, bir CCD bölgesine sahiptir. CCDC124, toplam 223 amino asitten oluşur. Kütle spektrometresi analizi kullanılarak CCDC124'ün kütlesinin yaklaşık CCDC124 kDa olduğu bulunmuştur [5].

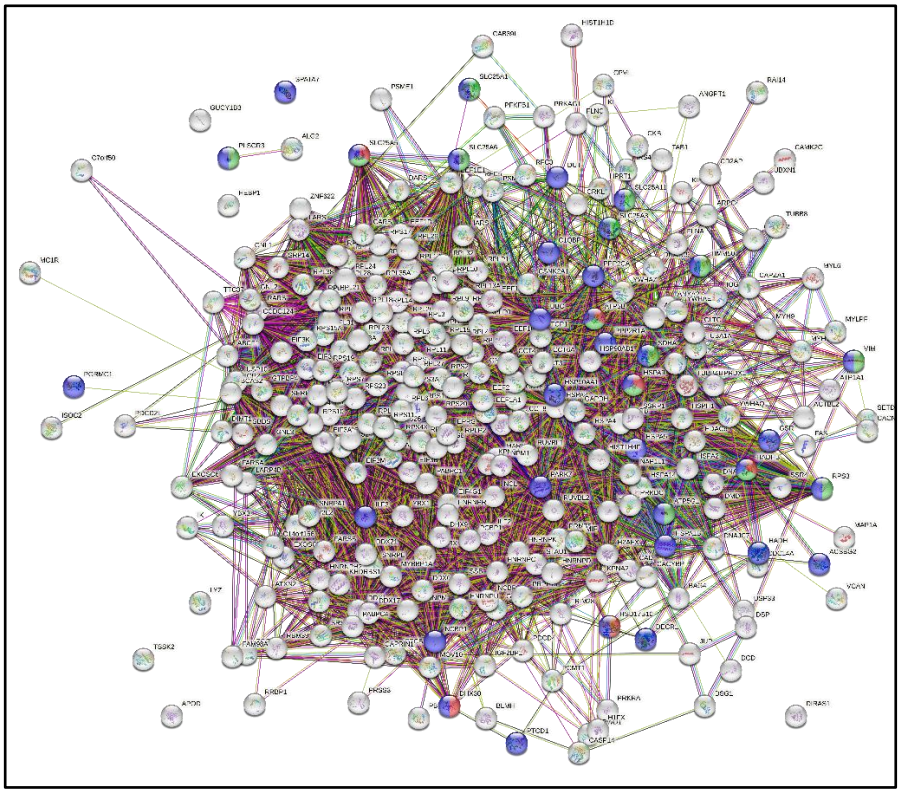
CCDC124 proteininin gen ve aminoasit dizisi bilinmesine rağmen hücredeki lokasyon ve translokasyonu tam olarak aydınlatılamamıştır. Daha önce yapılan çalışmalarda CCDC124 proteininin yerinin tayini için klonlamalar ile GFP işaretleme yaklaşımları kullanılmıştır fakat CCDC124 proteininin moleküler ağırlığının oldukça küçük olması özellikle GFP proteini ile neredeyse aynı moleküler ağırlığa sahip olması, bu proteinin yerinin tam olarak belirlenememesine sebep olduğu düşünülmüştür. CCDC124 proteininin hücre içi lokalizasyonunun tanımlanması ve aydınlatılması CCDC124'ün moleküler işlevlerinin anlaşılmasına, protein-protein interaksiyonun tanımlanmasına ve ilişkilendirileceği hastalıklarda yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine olanak sağlayacaktır. Tez çalışması kapsamında CCDC124 proteinin lokalizasyonunun spesifik olarak belirlenmesi amacıyla özgün floresan proteinleri CCDC124'ün farklı terminallerine klonlayarak hücre hatlarındaki konumunu yüksek çözünürlüklü mikroskoplar kullanarak analiz ettik. Klonlanan floresan proteinlerin bulundukları bölge oldukça büyük önem arz etmektedir. Proteinin N terminal veya C terminal ucuna floresan protein takılması da proteinde işlev bozukluklarına sebep olabilir. Bu amaçla farklı bir terminale SNAPtag ve Halotag klonlandı. SNAPtag: SNAP, istenilen herhangi bir proteine klonlanabilen ve floresan boya gibi uygun bir ligandla spesifik ve kovalent olarak etiketlenebilen 182 rezidülü bir polipeptittir ve 19.4 kDa'dur [23]. Halo ise bakteriyel bir enzimden türetilen sentetik bir ligand ile kovalent olarak bağlanmak üzere tasarlanmış 297 rezidülü bir proteinidir ve Halo 33 kDa'dur [23]. Halo ve SNAP'in ışıma güçleri GFP'den onlarca kat fazladır. Bu durumda az miktarda da olsa etiketlenen molekülün gerçek sinyalini almada kolaylık sağlar. Bu proteinlerin dezavantajı ise görüntülemek için ayrı bir ligand ile muamele gerektirmesi ve bu ligandların yıkılım zamanlarının çok uzun zamanlı görüntüleme işlemlerini

etkilemesidir. GFP dizisi genin N veya C terminaline takıldığında gen eksprese oldukça arada stop kodonu yoksa GFP de gen ile eksprese olarak proteine dönüşür [21]. Fakat SNAP ve Halo katlandıktan sonra ışıma yapabilmek için bir liganda ihtiyaç duyar. Bu durumda, eğer ortamda ligand yoksa yeni üretilen proteinlerin ışıma yapmayacağı anlamına gelmektedir. Halo ve SNAP arasında bir kıyaslama yapmak gerekirse SNAPtag' ın liganda afinitesi Halotag' a göre daha düşüktür. Yani ortamda bulunan liganda bağlanma olasılığı Halotag' da daha fazladır. İstenilen geni görüntülemek amacıyla yapılan çalışmaların başında gelen bu etiketleme işleminde en önemli kısımlarda bir tanesi de etiketin N terminaline ya da C terminaline yapılacağıdır. Çalışmalar göstermiştir ki GFP ile N-terminal etiketlemenin, ters transfeksiyon deneylerinde protein lokalizasyonunu olumsuz etkilerken, C-terminalinde GFP ile etiketlemenin, doğal proteinin lokalizasyonunu korumada genellikle daha iyidir. SNAPtag ise N-Terminal ucunda ifadesi, daha zayıf ifade eden proteinler için ifade seviyesini artırabilir.

GSK626616 bir DYRK inhibitörü olup anemi tedavisi için potansiyel yeni bir terapi olarak bir kullanılmaktadır. Rai ve arkadaşları GSK626616'nın stres uygulanan hücrelerde granüllerin belirginliğinin arttırdığını gözlemlemişlerdir. Wippich ve arkadaşları ise GSK626616'nın stres uygulanan hücrelerde mRNA'yı bağlayan proteinlerin fosforilasyonunu, stres granüllerinde bölünmeyi ve mTORC1'in aşağı akışını etkilediğini gözlemlenmiştir. Bu nedenden dolayı GSK626616'yı hücre içerisindeki granüler CCDC124'e etkisine bakmak için kullandık. CCDC124 proteinlerinde ve bu kondisyonlara uygulanan streslere GSK626616'nın direkt olarak belirgin bir farklılık oluşturmadığı gözlemlenmiştir. Fakat kütle spektrofotometri sonuçlarında çıkan etkileşimleri ve ortak protein sayıları bu proteinlerin genel olarak stres granülleri üzerine etkisi göz önüne alındığı zaman CCDC124 proteininin klonlamasında Halo'nun N-terminale klonlanan örnekler de genel olarak bakılmasının, bir etkisi olabileceği gibi uygulanan GSK626616'nın uygulandığı süre ve miktarının da diğer proteinleri etkilese dahi CCDC124 ü etkilemeyebileceği düşüncesini oluşturmaktadır. Genel olarak bu etkileşimlere LLSM 7'de bakılmayıp, konfokal mikroskoplarda bakılmasının küçük değişimler olsa dahi bunların net olarak gözlemlenememesinde etkisi olabileceği düşünülmektedir.

Mitokondri çift zarlı organellerden biridir. Hücrede enerji metabolizmasında temel işleve sahiptir [39]. Organeller ile CCDC124 arasındaki lokosyonel bağlantıyı

anlamaya çalıştığımızda, direkt mitokondriyal proteinleri hedefleyen plazmiti kullandığımızda CCDC124 proteini ile mitokondri hedefleyen plazmit ifadesinin mitokondride olduğu gözlemlendi. Gözlem sonucunda CCDC124'ün mitokondride lokalize olduğu açık bir şekilde görüldü. CCDC124 için yapılan kütle spektrofotometresi sonucunda 323 protein gözlemlenmiştir [54]. Bu proteinleri kategorize ettiğimiz zaman, 33 proteinin mitokondriyal proteinler olduğunu sonucuna varılmıştır ve bu da CCDC124 ile mitokondri arasında önemli bir etkileşim olduğunu düşündürmüştür. 323 protein, String programına yüklenerek etkileşim haritası oluşturulmuş ve etkileşim haritası Şekil 5.1 de belirtilmiştir. Bu proteinlerden bazıları Tımm50, SLC25A6, PLSCR3 dür. Tımm50, mitokondriyal iç zar ve matris için hedeflenen protein kargosu üzerindeki mitokondriyal hedefleme sinyalini veya ön sekansını tanıyan reseptör alt birimi olarak işlev görür. Ayrıca zar geçirgenliği bariyerinin korunmasında da rol oynayabilir ve bu genin insan hücrelerinde yıkılması, sitokrom c'nin salınması ve apoptoz ile sonuçlanır [55]. SLC25A6, ADP'yi sitoplazmadan mitokondriyal matrise ve ATP'yi mitokondriyal matristen sitoplazmaya aktaran kapılı bir gözenek işlevi görür. Protein, apoptozu indükleyen mitokondriyal ürünlerin salınımını düzenleyen geçirgenlik geçiş gözenek kompleksinin (PTPC) işlevinde yer alır [56]. PLSCR3, kalsiyuma bağımlı protein bağlama aktivitesi dahil olmak üzere birçok işlevi etkinleştirir bunlardan bazıları metal iyonu bağlama aktivitesi ve fosfolipid scramblase aktivitesidir. Kardiyolipin biyosentetik süreci dahil olmak üzere çeşitli işlemlerde yer alırken aynı zamanda apoptotik sürecin düzenlenmesinde, mitokondriden sitokrom c salınımının düzenlenmesinde görev alır [57]. CCDC124'ün hem mitokondrinin hem de mitokondrinin hücre üzerinde yaşamsal kararlar verdiği süreçte kullandığı proteinlerle etkileşmesi CCDC124 ile mitokondri arasında önemli bir bağlantı olabileceğini düşündürmüştür.



Şekil 5.1: CCDC124'ün kütle spektrofotometre sonucu, String analizi.

Agrezomlar hücrelerde yanlış katlanan protein yığınlarıdır. Yanlış katlanan proteinlerin bir arada toplanmasını ve o bölgede tutulmasını belirli proteinler sağlar. Yaptığımız çalışmalarda CCDC124 ile Fibrillarin 7 proteinini sitoplazmada merge halde görüntüledik. Daha önce yapılan çalışmalarda Fibrillarin proteinlerinin sitoplazmada görüntüsünün agrezomal yapılar olduğu kanıtlanmıştı. CCDC124 proteininin sitoplazmada Fibrillarin 7 proteini ile merge olması CCDC124'ün agrezomal bir protein olduğunu dolaylı yoldan bir protein üzerinden göstermiş oldu. Bu ise sitoplazmada bulunan CCDC124 tarafından oluşan çekirdeğe yakın granüllerin belirli bir kısmının agrezomlar olduğunu ortaya koymuştur. Fakat çekirdekten uzak sitoplazmada bulunan granüler yapıların özellikleri ise açık bir şekilde aydınlatılamamıştır.

KAYNAKLAR

[1] Zhang H., Ji X., Li P., Liu C., Lou J., Wang Z., (2020), "Liquid-liquid phase separation in biology: mechanisms, physiological functions and human diseases", Sci China Life Sci,63(7):953-85.

[2] Rai AK., Chen J., Selbach M., Pelkmans L., (2018), "Kinase-controlled phase transition of membraneless organelles in mitosis", Nature 559(7713):211-6.

[3] Wippich F., Bodenmiller B., Trajkovska MG., Wanka S., Aebersold R., Pelkmans L., (2013), "Dual Specificity Kinase DYRK3 Couples Stress Granule Condensation/Dissolution to mTORC1 Signaling", Cell, 152(4):791-805.

[4] Web1, (2020), https://www.embopress.org/doi/full/10.15252/embr.202051740, (Erişim tarihi: 19/06/2023).

[5] Telkoparan P., Erkek S., Yaman E., Alotaibi H., Bayık D., Tazebay UH., (2013), "Coiled-Coil Domain Containing Protein 124 Is a Novel Centrosome and Midbody Protein That Interacts with the Ras-Guanine Nucleotide Exchange Factor 1B and Is Involved in Cytokinesis", PLoS ONE, 8(7)., e69289.

[6] Tuzlakoğlu Öztürk M., Güllülü Ö., (2022), "Dimerization underlies the aggregation propensity of intrinsically disordered coiled-coil domain-containing 124", Proteins Struct Funct Bioinforma, 90(1)., 218-28.

[7] Jakobsen L., Vanselow K., Skogs M., Toyoda Y., Lundberg E., Poser I., (2011), "Novel asymmetrically localizing components of human centrosomes identified by complementary proteomics methods: Centrosome proteomics", EMBO J., 30(8), 1520-35.

[8] Arslan Ö., Soylu NK., Akillilar PT., Tazebay UH., (2021), "Coiled-coil domain-containing protein-124 (CCDC124) is a novel RNA binding factor up-regulated in endometrial, ovarian, and urinary bladder cancers", Cancer Biomark, 31(2), 149-64.

[9] Wang YJ., Vaidyanathan P., Rojas-Duran MF., Udeshi ND., Bartoli K., Carr S., (2018), "Lso2 is a conserved ribosome-bound protein required for translational recovery in yeast", PLoS Biol.

[10] Boni J., Rubio-Perez C., López-Bigas N., Fillat C., De La Luna S., (2020), "The DYRK Family of Kinases in Cancer: Molecular Functions and Therapeutic Opportunities", Cancers, 12(8), 2106.

[11] Aranda S., Laguna A., Luna SDL., (2011), "DYRK family of protein kinases: evolutionary relationships, biochemical properties, and functional roles", FASEB J.25(2)., 449-62.

[12] Becker W., Weber Y., Wetzel K., Eirmbter K., Tejedor FJ., Joost HG., (1998), "Sequence Characteristics, Subcellular Localization, and Substrate Specificity

of DYRK-related Kinases, a Novel Family of Dual Specificity Protein Kinases", J Biol Chem, 273(40)., 25893-902.

[13] Kim K., Cha JS., Cho YS., Kim H., Chang N., Kim HJ., (2018) "Crystal Structure of Human Dual-Specificity Tyrosine-Regulated Kinase 3 Reveals New Structural Features and Insights into its Auto-phosphorylation", J. Mol. Biol., 430(10), 1521-30.

[14] Murphy DB., Davidson MW., (2012.) "Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging", John Wiley & Sons; 564 s.

[15] Web 2, (2020), https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cpcy.68, (Erişim tarihi: 21/06/2023).

[16] Godin AG., Lounis B., Cognet L., (2014), "Super-resolution Microscopy Approaches for Live Cell Imaging", Biophys J, 107(8):1777-84.

[17] Jacquemet G., Carisey AF., Hamidi H., Henriques R., Leterrier C., (2020), "The cell biologist's guide to super-resolution microscopy", J Cell Sci, 133(11)., jcs240713.

[18] Schermelleh L., Ferrand A., Huser T., Eggeling C., Sauer M., Biehlmaier O., (2019), "Super-resolution microscopy demystified", Nat Cell Biol, 21(1)., 72-84.

[19] Erdmann RS., Baguley SW., Richens JH., Wissner RF., Xi Z., Allgeyer ES., (2019), "Labeling Strategies Matter for Super-Resolution Microscopy: A Comparison between HaloTags and SNAP-tags", Cell Chem Biol, 26(4)., 584-592.e6.

[20] Shihan MH., Novo SG., Le Marchand SJ., Wang Y., Duncan MK., (2021), "A simple method for quantitating confocal fluorescent images" Biochem Biophys Rep, 25: 100916.

[21] Cubitt AB., Heim R., Adams SR., Boyd AE., Gross LA., Tsien RY., (1995), "Understanding, improving and using green fluorescent proteins", Trends Biochem Sci, 20(11)., 448-55.

[22] De Los Santos C., Chang CW., Mycek MA., Cardullo RA., (2015), "FRAP, FLIM, and FRET: Detection and analysis of cellular dynamics on a molecular scale using fluorescence microscopy: FRAP, FLIM, AND FRET: DETECTION AND ANALYSIS", Mol Reprod Dev, 82(7-8)., 587-604.

[23] Shaner NC., Steinbach PA., Tsien RY., (2005), "A guide to choosing fluorescent proteins", Nat Methods, 2(12)., 905-9.

[24] Spruijt E., (2023), "Open questions on liquid–liquid phase separation", Commun Chem, 6(1)., 23.

[25] Hyman AA., Weber CA., Jülicher F., (2014), "Liquid-Liquid Phase Separation in Biology", Annu Rev Cell Dev Biol, 30(1)., 39-58.

[26] Web 3, (2020), https://www.science.org/doi/full/10.1126/science.aaf4382, (Erişim tarihi: 23/06/2023).

[27] Rippe K., (2022), "Liquid–Liquid Phase Separation in Chromatin", Cold Spring Harb Perspect Biol, 14(2)., a040683.

[28] Razin SV., Gavrilov AA., (2020), "The Role of Liquid–Liquid Phase Separation in the Compartmentalization of Cell Nucleus and Spatial Genome Organization", Biochem Mosc, 85(6)., 643-50.

[29] Luo YY., Wu JJ., Li YM., (2021), "Regulation of liquid–liquid phase separation with focus on post-translational modifications", Chem Commun, 57(98)., 1CCDC12475-87.

[30] Wang B., Zhang L., Dai T., Qin Z., Lu H., Zhang L., (2021) "Liquid–liquid phase separation in human health and diseases", Signal Transduct Target Ther, 6(1)., 290.

[31] Qamar S., Wang G., Randle SJ., Ruggeri FS., Varela JA., Lin JQ., (2018) "FUS Phase Separation Is Modulated by a Molecular Chaperone and Methylation of Arginine Cation-π Interactions, Cell,173(3):720-734.e15.

[32] Wegmann S., Eftekharzadeh B., Tepper K., Zoltowska KM., Bennett RE., Dujardin S., (2018), "Tau protein liquid–liquid phase separation can initiate tau aggregation", EMBO J, 37(7)., e98049.

[33] Marcelo A., Koppenol R., De Almeida LP., Matos CA., Nóbrega C, (2021), "Stress granules, RNA-binding proteins and polyglutamine diseases: too much aggregation", Cell Death Dis, 12(6)., 592.

[34] Hofmann S., Kedersha N., Anderson P., Ivanov P., (2021), "Molecular mechanisms of stress granule assembly and disassembly", Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res, 1868(1)., 118876.

[35] Protter DSW., Parker R., (2016), "Principles and Properties of Stress Granules", Trends Cell Biol, 26(9)., 668-79.

[36] Lane N., Martin W., (2010), "The energetics of genome complexity" Nature. 467(7318):929-34.

[37] Eisner V., Picard M., Hajnóczky G., (2018), "Mitochondrial dynamics in adaptive and maladaptive cellular stress responses", Nat Cell Biol. 20(7):755-65.

[38] Giacomello M., Pyakurel A., Glytsou C., Scorrano L., (2020), " The cell biology of mitochondrial membrane dynamics", Nat Rev Mol Cell Biol, 21(4):204-24.

[39] Kummer E., Ban N., (2021), "Mechanisms and regulation of protein synthesis in mitochondria" Nat Rev Mol Cell Biol, 22(5)., 307-25.

[40] Zhao Y., Gao C., Pan X., Lei K., (2023), "Emerging roles of mitochondria in animal regeneration", Cell Regen, 12(1)., 14.

[41] Spinelli JB., Haigis MC., (2018), "The multifaceted contributions of mitochondria to cellular metabolism", Nat Cell Biol, 20(7)., 745-54.

[42] Picard M., McEwen BS., (2018), "Psychological Stress and Mitochondria: A Systematic Review", Psychosom Med, 80(2)., 141-53.

[43] Eckl EM., Ziegemann O., Krumwiede L., Fessler E., Jae LT., (2021)"Sensing, signaling and surviving mitochondrial stress", Cell Mol Life Sci, 78(16):5925-51.

[44] Web 4, (2020), https://rupress.org/jcb/article/143/7/1883/16013/Aggresomes-A-Cellular-Response-to-Misfolded, (Erişim tarihi: 23/06/2023).

[45] Chin L., Olzmann J., Li L., (2008), "Aggresome Formation and Neurodegenerative Diseases: Therapeutic Implications", Curr Med Chem, 15(1)., 47-60.

[46] Web 5, (2020), https://www.nature.com/articles/nature07195, (Erişim tarihi: 22/06/2023).

[47] Moore DL., Jessberger S., (2017), "Creating Age Asymmetry: Consequences of Inheriting Damaged Goods in Mammalian Cells", Trends Cell Biol, 27(1)., 82-92.

[48] Web 6, (2019), https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14627652, (Erişim tarihi: 22/06/2023).

[49] Web 7, (2005), http://link.springer.com/10.1385/1-59259-895-1:305, (Erişim tarihi: 22/06/2023).

[50] Web 8, (2018), https://www.nature.com/articles/s41556-022-00869-0, (Erişim tarihi: 22/06/2023).

[51] Web 9, (1993), http://link.springer.com/10.1007/BF00187008, (Erişim tarihi: 22/06/2023).

[52] Ochs RL., Lischwe MA., Spohn WH., Busch H., (1985), "Fibrillarin: a new protein of the nucleolus identified by autoimmune sera", Biol Cell, 54(2)., 123-33.

[53] Salmina K., Huna A., Inashkina I., Belyayev A., Krigerts J., Pastova L., (2017), "Nucleolar aggresomes mediate release of pericentric heterochromatin and nuclear destruction of genotoxically treated cancer cells", Nucleus, 8(2):205-21.

[54] Telkoparan Akıllılar P., (2013), "Characterization of the coiled-coil domain-containing protein 124 (CCDC124) as a novel centrosome and MIDBODY component involved in cytokinesis", Doktora Tezi, İhsan Doğramacı Bilkent Üniversitesi.

[55] Geissler A., Chacinska A., Truscott K. N., Wiedemann N., Brandner K., Sickmann A., Meyer H. E., Meisinger C., Pfanner N., Rehling P., (2002), "The mitochondrial presequence translocase: an essential role of Tim50 in directing preproteins to the import channel", Cell, 111 (4), 507–518.

[56] Ding P. P., Huang X. D., Shen L., Du L., Cheng X. C., Lu Y. X., Liu H., Lin D. D., Xiao F. J., (2023), "PTPMT1 regulates mitochondrial death through the SLC25A6-NDUFS2 axis in pancreatic cancer cells", American Journal of Cancer Research, 13 (3), 992–1003.

[57] Dave K. R., Bhattacharya S. K., Saul I., DeFazio R. A., Dezfulian C., Lin H. W., Raval A. P., Perez-Pinzon M. A., (2011), "Activation of protein kinase C delta following cerebral ischemia leads to release of cytochrome C from the mitochondria via bad pathway", PloS ONE, 6 (7), e22057.

ÖZGEÇMİŞ

Agit Çetinkaya, 2015 yılında başladığı Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünü derece ile başarılı bir şekilde 2019 yılında tamamladı. Aynı yıl araştırma hayatına atılarak İstanbul Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü dahilinde BAP projesinde aktif araştırmacı olarak çalıştı. 2020 yılında yüksek lisans eğitimine Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında başladı. 2022 yılında EMBO' dan hibe kazanarak Karolinska Enstitüsünde misafir araştırmacı olarak süper çözünürlüklü mikroskoplarla görüntüleme eğitimi alarak, görüntüleme deneylerini gerçekleştirdi.

EKLER

Ek A: Tez Çalışması Kapsamında Yapılan Yayınlar

Cetinkaya A., Ozturk M., Schlegel J., Sezgin E., Tazebay U., (2023) ‘‘Cellular Localization and Subcellular Translocation of Fluorescent Protein Labelled CCDC124 Protein under Stress Conditions’’ 7. GTÜ Lisansüstü Araştırmalar Sempozyumu.