

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

CCDC124 VE MAKROMOLEKÜL FUS PROTEİN
ETKİLEŞİMİNİN BELİRLENMESİ

TUĞBA DURAN
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

GEBZE
2023

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

CCDC124 VE MAKROMOLEKÜL FUS
PROTEİN ETKİLEŞİMİNİN
BELİRLENMESİ

TUĞBA DURAN
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMANI
PROF. DR. UYGAR HALİS TAZEBAY
II. DANIŞMANI
DR. HASAN ÜMİT ÖZTÜRK

GEBZE

2023

T.R.
GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

**DETERMINATION OF THE
INTERACTION BETWEEN
MACROMOLECULE FUS AND CCD124**

TUĞBA DURAN
**A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE**
DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

THESIS SUPERVISOR
PROF. DR. UYGAR HALİS TAZEBAY
II. THESIS SUPERVISOR
DR. HASAN ÜMİT ÖZTÜRK

GEBZE
2023



YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU

GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 20/01/2023 tarih ve 2023/05 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 02/02/2023 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Tuğba DURAN'ın tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI)

: Prof. Dr. Uygur Halis Tazebay

ÜYE

: Prof. Dr. Tamer Yağcı

ÜYE

: Dr. Öğr. Üyesi Nazlı Keskin Toklu

ONAY

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

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

Ccdc124 (Coiled-coil domain containing 124) proteini ökaryotlarda korunmuş bir sentrozom ve midbody proteini olarak tanımlanmıştır. Ccdc124'ün sitokinez sırasında midbody yapısına metafaz, profaz, anafaz safhasında ise sentrozoma giderek hücre bölünmesinde yer aldığı bilinmektedir. Daha sonraki bir çalışmada ise Ccdc124 proteininin stres durumunda duraklamış ribozomlara bağlandığı ve stres sonrası translasyonel yeniden başlamada rol oynadığı gösterilmiştir. Bunlardan başka, Ccdc124'ün aynı zamanda bir RNA bağlayıcı protein olduğu yumurtalık, endometriyal ve idrar kesesi kanserleri gibi bazı kanser türlerinde ekspresyonunun arttığı bildirilmektedir. Aynı çalışmada stres granülleri ile yapılan deneylerde CCDC124'ün stres granül proteini TIA1 ve G3BP1 ile aynı granülde yer aldığı tespit edilmiştir.

Ccdc124'ün hem RNA bağlayıcı bir protein olduğunun gösterilmesi hem de stres granüllerinin varlığı, onun nörodejeneratif hastalıklarda bir rolü olabileceğini düşündürmektedir. Ccdc124'ün, Bio-ID testinde ve protein etkileşim ortakları bulmak için yapılan immünopresipitasyon (IP) çalışmalarında FUS (Fused in Sarcoma) proteini ile etkileşime girebileceği gözlemlenmiştir. Bu görüş, nörodejeneratif bir hastalık olan ALS'de FUS proteininin rolü ile desteklenmiştir. RNA'ya bağlanan protein FUS'da meydana gelen mutasyonlar, çekirdekten sitoplazmaya lokalizasyonunu değiştirerek ALS hastalığındaki protein kümeleşmesine sebep olmaktadır. Ayrıca hücrede strese cevaben oluşturulan stress granüllerinde yer alarak bağlı olduğu mRNA'ların translasyonunu önlemektedir.

ALS hastalığının patofizyolojisinde Ccdc124'ün potansiyel yeni işlevini değerlendirmek için yapılan bu tez çalışmasında FUS ve Ccdc124 proteinleri, hücrel proteinlerden uzaklaştırılmak amacıyla farklı kromatografi teknikleri ile saflaştırılmıştır. Pürifiye edilen proteinlerin birbirleriyle etkileşimleri Far Western Blot analiziyle incelenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Coiled-coil containing 124 protein (Ccdc124), FUS protein, Protein Saflaştırma, Protein –protein etkileşimi, Far Western Blotting.

SUMMARY

The Ccdc124 (Coiled-coil domain containing 124) protein has been identified as a conserved centrosome and midbody protein in eukaryotes. It is known that Ccdc124 is involved in cell division by turning to the midbody structure during cytokinesis, and to the centrosome during metaphase, prophase and anaphase. In addition, it is reported that Ccdc124 is also an RNA-binding protein and its expression is increased in some cancer types. In the same study, in experiments with stress granules, CCDC124 was found to be located in the same granule as stress granule protein TIA1 and G3BP1.

Its RNA binding protein properties and its presence in stress granules suggest that Ccdc124 protein may have a role in neurodegenerative diseases. It has been observed that the Ccdc124 protein can interact with the FUS (Fused in Sarcoma) protein with the help of Bio-ID test and immunoprecipitation (IP) studies applied for protein interactions. This view was supported by the determination of the role of the FUS protein in ALS, a neurodegenerative disease. Mutations in the structure of the FUS protein, another protein that binds to RNA, change the localization of RNA molecules from the nucleus to the cytoplasm, causing protein aggregation in ALS.

In this thesis study to evaluate the potential novel function of Ccdc124 in the pathophysiology of ALS disease, recombinantly produced FUS and Ccdc124 proteins were purified by different chromatography techniques to separate them from cellular proteins. The interactions of the purified proteins with each other were investigated by Far Western Blot analysis.

Keywords: Coiled-coil containing 124 protein (Ccdc124), FUS protein, Protein Purification, Protein-protein interaction, Western Blotting.

TEŞEKKÜR

Katkılarından dolayı danışman hocam Prof. Dr. Uygur Halis Tazebay’a ve bilgi ve tecrübelerini paylaşmaktan çekinmeyen Dr. Merve Tuzlakoğlu Öztürk’e,

Tez çalışmamın ortaya çıkmasında tecrübelerini paylaşarak tüm laboratuvar imkanlarını kullanmam için yardımcı olan ikinci danışmanım Dr. Hasan Ümit Öztürk’e ve çalışmamın her aşamasında büyük katkıları için Msc. Yağmur Ünal Gedik ve Msc. Esin Bayralı Ülker’e,

Birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum ve yardımlarını eksik etmeyen başta bursiyer ve stajyer arkadaşlarım olmak üzere TÜBİTAK MAM İTAL grubu araştırmacı ve teknisyenlerine,

Tavsiyeleri ve destekleri ile tez çalışmam ve sonraki araştırmalarım için hiçbir sorumu geri çevirmeden bilimin yolundan gitmem için beni motive eden TÜBİTAK MAM araştırmacılarından değerli hocalarım Dr. Beytullah Özgür ve Dr. Somer Bekiroğlu’na katkıları ve ayırdıkları tüm vakitler için çok teşekkür ederim.

Her zaman en büyük destekçim olan sevgisi ve sabrı için Velican Engin Gayır’a,

Tüm hayatım boyunca sevgi ve desteğiyle varlığını hep hissettiğim canım babam Erdal Duran’a,

Çıktığım tüm yollarda elimi hiç bırakmayan canım ikizim Tuğçe Duran’a çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği	2
2. CCDC124 PROTEİN	3
2.1. Hücre Döngüsünde Ccdc124	4
2.2. RNA bağlayıcı Ccdc124	6
2.3. Yapı Analizleri	7
2.4. Stres Granülleri	9
3. FUS PROTEİN	11
3.1. Sıvı-Sıvı Faz Ayrımı	14
3.2. RNA Bağlayıcı Protein FUS	15
4. PROTEİN PROTEİN ETKİLEŞİMLERİ	17
5. MATERYAL ve METOT	20
5.1. Materyal	20
5.1.1. Bakteri Suşu, Vektör ve Primerler	20
5.1.2. Antikorlar	22
5.1.3. Kullanılan Kimyasallar ve Kitler	22
5.1.4. Ekipman	24
5.1.5. Tampon ve Solüsyonlar	26
5.2. Metot	30
5.2.1. PZR Amplifikasyonu	31
5.2.2. Agaroz Jel Elektroforezi	32
5.2.3. Agaroz Jelden DNA İzolasyonu	32

5.2.4. Restriksiyon Enzimleri ile Plazmid ve DNA Kesimi	32
5.2.5. Kesilen DNA Ürünlerinin Ligasyonu	33
5.2.6. Transformasyon	34
5.2.7. Plazmid İzolasyonu	35
5.2.8. Protein Ekspresyonu	36
5.2.8.1. Hücre Lizisi	36
5.2.9. Protein Saflaştırma	37
5.2.9.1. İmmobilize Edilmiş Metal Afinite Kromatografisi	37
5.2.9.2. Protein Tampon Değişimi ve Konsantre İşlemi	39
5.2.9.3. İyon Değişimi Kromatografisi	40
5.2.9.4. FUS İnklüzyon Cisimcikleri (IB) Kromatografisi (IMAC)	41
5.2.10. SDS-PAGE	42
5.2.11. Western Blot	43
5.2.12. FUS Proteinini In vitro Yeniden Katlama	44
5.2.13. NMR (Nuclear Magnetic Resonance)	44
5.2.14. Far Western Blot	45
6. SONUÇLAR	46
6.1. Gen Klonlanması	46
6.2. Protein Ekspresyonu	49
6.2.1. FUS Protein Ekspresyonu	49
6.2.2. Ccdc124 Protein Ekspresyonu	54
6.3. Protein Saflaştırma	55
6.3.1. Ccdc124 Protein Saflaştırma	56
6.3.2. FUS Protein Saflaştırma	61
6.4. NMR Protein Etkileşimleri	64
6.5. Far Western Blot	65
7. TARTIŞMA	67
KAYNAKLAR	71
ÖZGEÇMİŞ	77

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklamalar</u>
ng	: Nanogram
µg	: Mikrogram
mg	: Miligram
µl	: Mikrolitre
ml	: Mililitre
M	: Molar
mM	: Milimolar
µM	: Mikromolar
bp	: Baz çifti
kb	: Kilobaz
kDA	: Kilodalton
OD	: Optik Yoğunluğu
AC	: Afinite Kromatografi
IEX	: İyon Değişimi Kromatografisi
dNTP	: Deoksinükleotid trifosfat
LB	: Luria-Bertani
dH ₂ O	: Distile Su
BSA	: Bovin Serum Albumin
APS	: Amonyum Persülfat
U	: Enzim birim
CV	: Column Volume
FUS	: Fused in Sarcoma
CCDC 124	: Coiled coil domain containing protein
ALS	: Amniyotrofik Lateral Skleroz
NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans
IDR	: Intrinsically Disordered Region
RBP	: RNA Binding Protein
RNP	: Ribonükleoprotein Kompleksi

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: Ccdc124 'ün tahmini 3 boyutlu yapısı.	3
2.2: Dimerik sarılı sarmalların ara yüzü ve yapısı.	8
3.1: FUS protein domainleri.	11
3.2: Çözünür durumdaki proteinin hastalık durumundaki agregat yapısına geçişi.	15
3.3: FUS aracılı Ribonükeloprotein Granül oluşumu.	16
5.1: pET21a plazmidi.	20
5.2: pQE81L plazmidi.	21
5.3: Tez boyunca yapılan deneylerin şematik özeti.	30
5.4: Histidin aminoasidi ile imidazol yapı benzerliği.	39
6.1: FUS gen PZR amplifikasyonu.	46
6.2: Restriksiyon Enzim kesimi reaksiyonu sonucu DNA Agaroz Jel.	47
6.3: FUS gen koloni PZR amplifiye sonuçları.	48
6.4: FUS geninin vektör üzerindeki sekans analizi.	49
6.5: 4 ve 24 saat boyunca 26 ve 30°C sıcaklıklarda FUS ekspresyon profilleri SDS-PAGE.	50
6.6: Farklı IPTG konsantrasyonlarının FUS protein üretimine etkisi.	51
6.7: LB besiyeri hacminin FUS protein üretimine etkisi.	52
6.8: Çözünür FUS protein üretimine sıcaklık ve bakteri suşu etkisi.	52
6.9: Kaotrafik ajan üre ile çözünür FUS protein eldesi.	54
6.10: 24 saat boyunca 16°C ve 28°C sıcaklıklarda Ccdc124 ekspresyon profilleri SDS-PAGE ve WB.	55
6.11: Ccdc124 tek step afinite saflaştırması (Lineer).	57
6.12: Ccdc124 tek step afinite saflaştırması (Gradient).	58
6.13: Ccdc124 katyon değişimi saflaştırması.	60
6.14: Ccdc124 ikinci step afinite saflaştırması.	61
6.15: FUS tek step afinite kromatografi sonuçları 8 M üre ile.	63
6.16: FUS tek step afinite kromatografi sonuçları 3 M üre ile.	64
6.17: FUS ikinci step afinite kromatografi sonuçları 3 M üre ile.	65
6.18: Bait protein olarak Ccdc124 proteini Far Western Blot sonuçları.	67

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa</u>
5.1: Klonlama Primerlerin Listesi.	21
5.2: Antikor Listesi.	21
5.3: Kit, Enzim ve Kimyasal Listesi.	22
5.4: Ekipman Listesi.	24
5.5: Besiyeri Solüsyonları.	26
5.6: Jel Solüsyonları.	27
5.7: Saflaştırma Solüsyonları.	28
5.8: PZR Bileşenleri.	31
5.9: PZR Döngü Koşulları	31
5.10: Restriksiyon Enzim Kesimi Koşulları.	32
5.11: Ligasyon Reaksiyon Koşulları.	33
5.12: Koloni PZR Reaksiyon Bileşenleri.	34
5.13: Koloni PZR Reaksiyon Koşulları.	34
5.14: Liziz Tampon Bileşenleri.	36
5.15: %12 SDS-PAGE Jel Bileşenleri.	42

1. GİRİŞ

Bu tezin konusu laboratuvarımızda görevleri, fonksiyonu ve lokalizasyonu belirlenmeye çalışılan Ccdc124 proteininin bir nörodejeneratif hastalık olan Amniyotrofik Lateral Skleroz (ALS) hastalığında sonuçsal etkileri ve işlevleri tanımlanmış olan FUS proteini ile etkileşiminin incelenmesidir.

Sentrozom ve orta cisimcik (midbody)'te lokalize olarak tanımlanan Ccdc124, ökaryotlarda evrimsel olarak korunan sarılı sarmal motife sahip bir proteindir. Proteini kodlayan genin delesyonu ya da aşırı ekspresyonu hücrede anormalliklere yol açmış ve proteinin hücre bölünmesinde rolü olduğu görüşü geçmiş çalışmalarda desteklenmiştir. Sonraki çalışmalar Ccdc124'ün RNA'ya bağlanan bir protein olduğu [1], yapısında düzensiz (disordered) dizilerin olduğu biyoinformatik analizlerle gösterilmiştir [2]. Hücrede Ccdc124'ün stres granülü bileşenleri TIA1 ve G3BP1 ile aynı granülde yer aldığı immunofloresan ve immün çöktürme deneyleri ile doğrulanmıştır [3].

Temel olarak nöron kaybı ile karakterize edilen nörodejeneratif hastalıklarda rol aldığı bilinen proteinlerin özellikleri, Ccdc124 ile benzeşmektedir. Nörodejeneratif hastalıklardaki rolünün belirlenmesi amacıyla Bio-ID ve ardından kütle spektrometresi çalışmalarıyla protein etkileşim partnerleri belirlenmiş, skor olarak en yüksek değeri FUS (Fused in Sarcoma) proteini almıştır.

FUS, RNA metabolizması, DNA tamiri ve stres granülü oluşumunda görev alan ve RNA'ya bağlanan bir proteindir. FUS proteininin yapılan birçok deneysel çalışma ile ALS, FTLD ve poliglutamin hastalıklarıyla ilişkilendirildiği gösterilmiştir. FUS'un bu hastalıklarda temel olarak yapısındaki N-terminal prion benzeri domain önem kazanmış, bu domainle hastalık durumundaki agregat yapıları oluşturduğu ortaya çıkarılmıştır [4].

Bu tez çalışması kapsamında Ccdc124 geni pQE81L vektörüne ve FUS geni pET-21a vektörüne klonlanarak *Escherichia Coli* (*E.Coli*) BL21DE3 bakteri hücresi her iki proteinin rekombinant üretimi için kullanılmıştır. Ccdc124 protein saflaştırması için önce katyon değişirici ardından afinite kromatografisi kullanılırken, FUS proteini için art arda afinite saflaştırmaları yapılmıştır. Elde edilen proteinler tampon değiştirme ve konsantre edilme işlemlerinden sonra Far Western Blot analizine hazır hale getirilmiştir.

1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

Bu tez çalışmasında, Ccdc124 ve FUS proteini arasında etkileşim olup olmadığı araştırılmıştır. Her iki protein farklı kromatografik teknikler ile bakteriyel proteinlerden saflaştırılmış ve analiz için konsantre etme ve tampon değiştirme işlemleri yapılmıştır.

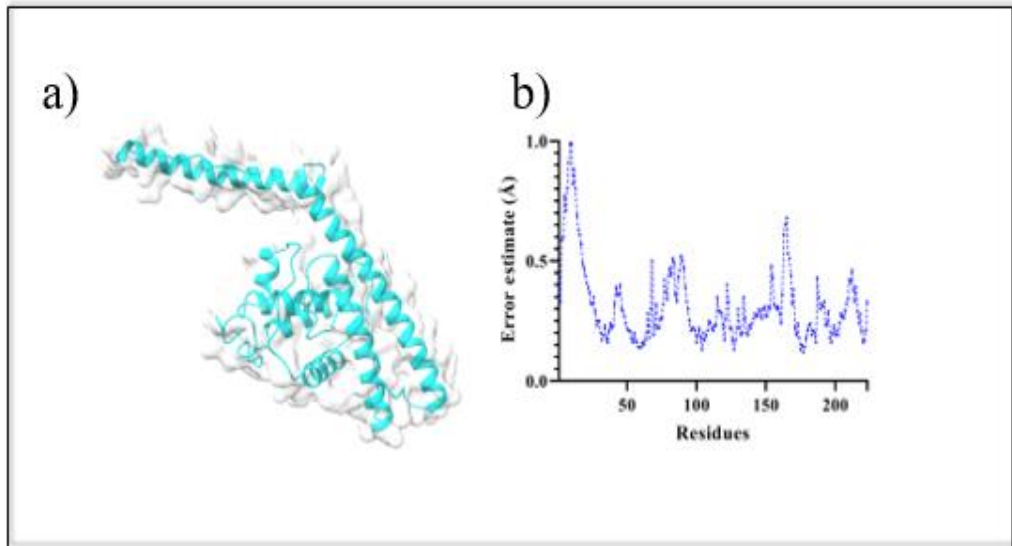
Bu çalışma sayesinde Ccdc124 proteininin ilk defa nörodejeneratif hastalık proteinlerinden biri ile fiziksel olarak etkileşimi incelenerek Ccdc124'ün nörodejeneratif hastalıklardaki rolü hakkında bilgi sahibi olunması amaçlanmaktadır.

2. CCDC124

Sarılı sarmal bölge bulunduran 124 (CCDC-124, Coiled coil containing-124) proteini ilk olarak Sodyum-İyodid importunda görevli olan NIS geninin transkripsyonel regülasyonunu aydınlatmaya yönelik yapılan bir doktora tez çalışmasında tespit edilmiştir.

19. Kromozomun p13.11 konumundaki Ccdc124 geninin toplam 5 adet ekzonu bulunmasına karşılık bir adet ekzonu protein yapımına katılmamaktadır. Düzensiz (disordered) ve sarılı-sarmal kısımlar bulunduran sentrozom proteinlerinin özelliğini bulunduran Ccdc124 proteini, 223 aminoasit uzunluğunda ve 32 kDA moleküler ağırlığa sahiptir. ProtParam Expasy programında proteinin izoelektrik noktası (pI) 9.54 ve Extinction coeff sayısı 124.90, Abs 0.1% (=1 g/l) 0.483 olarak bulunmuştur. Yapısında alternatif Kozak ribozom bağlanma sekansı içermesinden dolayı 176 aminoasitten oluşan ikinci bir varyantı bulunmaktadır [Telkoparan ve ark.].

Ccdc124 proteininin 7 treonin, 5 serin ve 1 tirozin aminoasitlerinde fosforilasyon bölgeleri olduğu ortaya çıkarılmıştır. Protein yapısında pozitif ve negatif yüklü aminoasitler oldukça fazla sayıda bulunmaktadır. Şekil 2.1 [Güllülü, Tuzlakoğlu, 2021]. Ccdc124 proteinin tahmini 3 boyutlu yapısı göstermektedir.



Şekil 2.1: Ccdc124 'ün tahmini 3 boyutlu yapısı. a) Ccdc124'ün FASTA dizisi kullanılarak LOMETS programında ortaya çıkarılan olası ilk üç boyutlu yapısı b) Robett moleküler yapı tahmini ile oluşturulan üç boyutlu yapıdaki tüm rezidülerin düşük hata tahminini gösteren grafik.

Ccdc124, ökaryotik hücrelerde evrimsel olarak korunan sentrozom ve midbody proteini olarak tanımlanmış ve hücre bölünmesinde ortaya çıkan bir yapıda (midbody) lokalize olduğunda RAS-GEF1B (Guanine Exchange factor, GEF) ile etkileşime girdiği birlikte çöktürme (Co-IP) ve ikili maya hibrit deneyleri ile belirtilmiştir [5]. RASGEF-1B ile etkileşim Ccdc124'ün C terminalindeki 142 ve 223 aminoasitleri arasında bulunan sekans ile gerçekleşmektedir [6].

Hücre bölünmesinin sitokinez aşamasında Ccdc124 proteini kodlayan genin susturulması ve aşırı ifadesi bölünme durumunun gerçekleşmemesine sebep olmakta ve çok çekirdekli hücreleri açığa çıkarmaktadır [5]. Bu durum Ccdc124'ün hücre bölünmesinin tamamlanmasında önemli görevlerde yer alabileceğini göstermektedir.

Sitokinezde görevli olmasının yanı sıra kantitatif kütle spektrometresi deneyleri ile Ccdc124'ün ribozoma bağlanan bir protein olduğu mayadaki Lso2 ortoloğu ile yapılan çalışmalarla gösterilmiştir [7].

Tüm insan dokularında eksprese edilen Ccdc124 [8] transkripsiyonun kanser dokularında güçlü bir şekilde upregüle olduğu gösterilmiştir [9].

2021 yılında Arslan ve arkadaşları yapılan bir çalışmada ise Ccdc124 mRNA ve protein ekspresyon seviyelerinin kanser hücrelerinde arttığı gösterilmekte ve yumurtalık, endometrium ve idrar kesesi kanserlerinde Ccdc124 proteini, yeni bir kanser biyobelirteci olarak tanımlamaktadır [1].

Ccdc124'ün hücre farklılaşması sırasında potansiyel düzenleyici işleve sahip olduğu, HL-60'ın hücre farklılaşması sırasındaki moleküler mekanizmasının anlaşılmasına yönelik yapılan proteomik profillemeye çalışması ile ortaya çıkarılmış ve bir anti kanser ilacı uygulandıktan sonra nükleusta transkripsiyon aktivitesine sahip olan altı adet nükleer proteinden biri olduğu ve zaman içinde downregüle olduğu gösterilmiştir [10].

2.2. Hücre Döngüsünde Ccdc124

Hücre proliferasyonu, başlangıçtaki bir ana hücreden gelen genetik bilginin kopyalanmasını ve iki yavru hücreye bölünmesini gerektirir. Hücre büyüklüğünü korumak ve oluşan yavru hücrenin doğru miktarda genetik ve biyosentetik materyal aldığından emin olmak için, hücreler bölünmeye hazırlık yaparlar ve bu hazırlıktan sonra bölünme süreci gerçekleşerek döngü tamamlanır [11].

Hücre döngüsünün sonunda iki yavru hücre oluşturabilmek için, hem çekirdeğin içeriği ve hem de sitoplazmanın hücreler arasında paylaşılması gerekmektedir. Mitotik faz, kopyalanan kromozomların hizalandığı, ayrıldığı ve hücrenin zıt kutuplarına taşındığı ardından hücrenin iki yeni özdeş yavru hücreye bölündüğü beş adımlı bir süreçtir. Burada nükleer bölünme gerçekleşmesinin ardından sitokinez olarak adlandırılan aşamada sitoplazmik bileşenler iki yavru hücreye fiziksel olarak ayrılırlar.

Sitokinez, erken anafazda başlayıp sitoplazmik bileşenlerin iki yavru hücreye fiziksel olarak ayrılmasıyla hücre bölünmesinin tamamlandığı mitotik fazın ikinci kısmıdır. Hayvan hücrelerinde, sitokinez, farklı hücre iskeleti ve filament türlerinin lokal ve oldukça koordineli polimerizasyonu/depolimerizasyonu ile yürütülür.

Sitokineзде, hücre zarı içeriye doğru hareket ederek ayrılma oluğu oluşturur ve oluğunun giderek genişlemesi ile iki adet yavru hücreyi birbirine bağlayan 1-3 um genişliğinde ince bir hücrelerarası köprü (ICB) meydana gelmektedir [12].

Hücrelerarası köprünün (ICB) orta kısmında yer alan, antiparalel mikrotübüller tarafından yoğunlaştırılarak oluşmuş protein açısından zengin bir organel olan orta cisimciğin (midbody) hücrelerin ayrılması (absisyon) için gerekli olan bir platform olduğu düşünülmektedir. Hücre bölünmesi sırasında ise Ccdc124, telofazda orta cisimciğe yerleşmekte ve sitokinezin moleküler bir bileşeni durumunu almaktadır [5].

2013 yılında Telkoparan ve arkadaşları tarafından yapılan çalışma Ccdc124'ün hücrelerde interfaz ve geç anafaz/telofaz aşamasına kadar sentrozomda lokalize olduğu, c-tubulin and centrin gibi farklı sentrozom belirteçleri ile gösterilmiştir. Bu proteinin lokasyonu mitozun post-anafaz, telofaz ve sitokinez evrelerinde ise midbody olarak belirlenmiştir. Aynı çalışmada yapılan RNA susturma (RNA interference) deneyleri ile proteini kodlayan genin susturulması halinde hücrelerin bölünemedikleri ve çok çekirdekli hücrelerin meydana gelmesine neden olduğu açığa çıkarılmıştır [5].

Ccdc124 proteinini kodlayan genin aşırı ifadesi ise proteinin interfaz, G1 ve erken profaz evresinde sentrozom çevresinde ve sitoplazmada lokalize olduğu, sitokinezin mekanizmasının bozulup çok çekirdekli hücrelerin meydana geldiği gösterilmiştir [6].

2.3. RNA Bağlayıcı Protein Ccdc124

RNA bağlayıcı proteinler (RBP'ler), RNA ile birleşerek dinamik yapıda ribonükleoprotein komplekslerini (RNP'ler) oluştururlar. Transkripsiyon, kırılma, modifikasyon, hücre içi trafik, translasyon dahil olmak üzere RNA'nın sentezinden yıkımına kadar önemli rolleri olan RBP'ler, RNA tanıma motifi (RRM), çinko parmak gibi domainlerle ile RNA'ya bağlanırlar. Sarılı- sarmal (coiled-coil) motifler de hücrenin ihtiyaçlarına bağlı olarak lokal protein sentezi bölgelerine götürülen RNA'ya bağlanan proteinlerde fazla sayıda görölmektedir [13].

RNA'ya bağlanan tüm insan proteinlerinin sekansları incelendiğinde (RNA-binding protein database, RBPDP) %36'lık kısmının sarılı sarmal yapıda olduğu gösterilmiştir [14].

Prolifere olan insan HeLa hücrelerinin mRNA interaktomunu belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmada, 860 adet yeni RBP listelenmiştir, coiled coil motifine sahip Ccdc124 ise bu proteinlerin arasında yer almıştır [15].

Hela hücre hattında yeşil floresan etiketli (GFP) 125 proteinin etkileştikleri proteinleri belirlemek için kütle spektrometre çalışmaları yapılmış ve sonucunda Ccdc124 proteinin 60S ribozomla ilişkili olan Rp10 ve Rp115 proteinleriyle etkileştiği gösterilmiştir [16].

Ayrıca Ccdc124'ün *Saccharomyces Cerevisia* mayasındaki ortoloğu Los2 (late-annotated short open reading frame-2) ribozomda lokalizedir ve A (aminoacyl) bölgesine yakın bir bölgede ribozomal 25S RNA ile etkileşime girmektedir. Ccdc124 proteinin mayalara dışardan verilerek yapılan immün çöktürme deneyleri ile bu proteinin de aynı bağlanma bölgesine sahip olduğu ortaya çıkarılmıştır. Bu durum Ccdc124 açlıktan kurtulma sırasındaki translasyon işlevleri dahil olmak üzere hücresel fizyoloji ve RNA metabolizmasında da geniş bir rol oynadığını göstermektedir.

Ccdc124 proteini duraklamış (hibernasyon durumundaki) ribozomlara bağlanmakta ve ribozomun tekrar aktive olması için gerekli olan proteinler arasında gösterilmiştir. Aynı zamanda 40S ve 60S ribozom alt ünitelerine bağlanıp 80S ribozomlara da bağlanmaktadır [7].

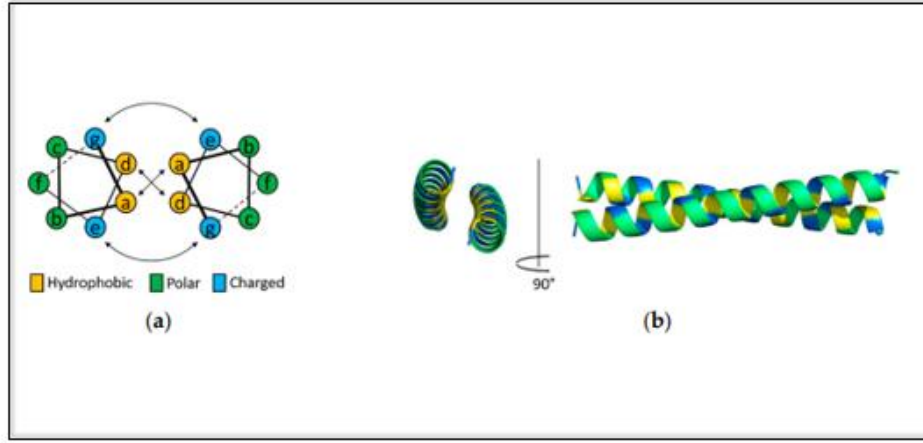
Protein-RNA etkileşimlerini istatistiksel olarak tahmin eden catRAPID algoritması ile Ccdc124'ün RNA bağlayan proteini olduğu ve muhtemel RNA bağlanma bölgesi aminoasit yapısının analiziyle temel olarak 74-124 residüleri olduğu gösterilmiştir.

RNA'ya bağlanan pek çok protein, protein-protein, protein-DNA, protein-RNA etkileşimlerinde görev alan düzensiz diziler içerdiğinden dolayı Ccdc124'ün de sahip olduğu bu diziler ile olası bir RNA bağlayıcı protein olmasını desteklemiştir. Ayrıca Ccdc124 proteinin maya ortoloğu sonuçlarına dayanan rRNA ile etkileşiminin yanı sıra mRNA'ya bağlanan bir protein olduğu ve 27 tane potansiyel mRNA hedeflerinin bulunduğu RIP (RNA Çöktürme) ve RNA-dizileme metotları ile gösterilmiştir [3].

2.4. Ccdc124 Yapısı

Sarılı sarmal (Coiled coil) motiflere sahip proteinler, birbirini süper halkalı sarmallar halinde saran alfa heliks yapısında olan proteinlerdir ve protein-protein etkileşimleri, oligomerizasyon, sentrozom oluşumu, hücre döngüsünün düzenlenmesi gibi görevleri tanımlanmaktadır [17].

Sarılı sarmal motifi, standart bir alfa heliksine yakın olan, dönüş başına ortalama 3,5 amino asit periyodikliğine sahiptir [18]. Bu motifin yedili tekrarları, sarmalların üstten görünüşünü gösteren şekilde (abcdefg)n olarak konumlanmaktadır. Şekil 2.3 hidrofobik amino asit kalıntılarının a ve d konumlarına yerleştirildiği, polar residülerin ise e ve g konumlarında olduğunu göstermektedir. Hidrofobik-polar etkileşimler ile sarmallar birbirine bağlanır, sarmalların ara yüzünde kalan amino asit residüleri hidrofobik-polar paternleri ile sarmallar arasındaki etkileşimi doğrudan etkilemektedir. Sarılı sarmallar, birbirine paralel veya antiparalel olarak düzenlenmiş iki ila altı heliks içerir ve homo veya hetero oligomerler olabilir.



Şekil 2.2: Dimerik sarılı sarmalların ara yüzü ve yapısı a) Dimerik yapının arayüzünde bulunan aminoasitler b) Sarılı sarmal omurga yapısı. Oluşan alfa heliksler hem hidrofobik hem de hidrofilik karakter göstermektedir.

Pek çok sarılı sarmallar moleküler boşluk (spacer) koyucular olarak hareket etmektedir ve bunlar fonksiyonel alanları ayırabilir ve büyük makromoleküler kompleksleri oluşturabilmektedir. Örneğin moleküler boşluk koyucular olarak işlev gören coiled coil proteinler kinetokorda da bulunmaktadır [19].

Sarılı sarmal motifler, RBP'de aşırı temsil edilmektedirler. Bu nedenle P body, stres granülleri, RNP granülleri, sitoplazmik RNA granülleri, nöronal RNP granülleri gibi çeşitli sıvı- sıvı faz ayrımı (2.3'te ayrıntılı açıklanmaktadır) ile oluşan organellerdeki sarılı sarmal motifinin yaygınlığını ölçen bir çalışma, nöronal RNP granüllerinin en yüksek prevalansa sahip olduğunu ortaya çıkarılmıştır [13]. LLPS organelleri içinde sarılı sarmal yapısının bu denli fazla görülmesinin sebebi, organel çekirdeğindeki (core) protein bileşenleri için moleküler boşluk sağladığını düşündürmektedir.

Sarılı sarmal ayrıca ikincil yapı, dimerler, trimerler ve daha yüksek dereceli oligomerik yapıların oluşumu ile de ilişkilendirilmiştir. Sarılı sarmal (CC) oluşumu, maya prionlarında amiloid benzeri durumlara geçmeden önceki önemli bir adım olduğu belirtilmiştir [20].

Mayada bulunan glutamin/asparagin (Q/N) açısından zengin bölümlerde ve çoklu glutamin aggregatlarını çevreleyen kısımlarda coiled coil motifine özgü olan yedili tekrarların yer aldığı bilinmektedir [21]. *In vitro* ve *in siliko* çalışmalar ise sarılı sarmal peptitlerin, sıcaklığa ya da pH değişimine maruz kalmasıyla alfa helikal yapının beta sheet fibrillere dönüştüğünü göstermektedir [22]. Bu nedenle sarılı sarmal

oligomerizasyonların, yapısal transformasyonu tetiklediği ve çapraz (cross) beta sheet amiloidleri (ikincil yapı) oluşturduğu düşünülmektedir [2].

Bunun yanında son araştırmalar, coiled coil motiflerin sıklıkla etkileşim bölgeleri içerdiklerini ve protein protein etkileşim bölgelerinde hareket ettiklerini göstermektedir.

Sinaptik transkriptlerin belirli uzak bölgelere hareketi, büyüme, sinaptik plastisite ve nöronal bağlantıların güçlendirilmesi için gereklidir. Bu durum, sentezlenen transkriptin uygun şekilde lokalize edilene kadar translasyonun engellenmesini gerektirir; sarılı sarmal motifine sahip proteinler ise transkript taşınmasında aktif rol almaktadır [18].

2021 yılında Güllülü ve Tuzlakoğlu tarafından yapılan *in siliko* ve *in vivo* çalışmalar ile Ccdc124 proteinin orta kısmında bulunan sekansın (151-IAVLSV-156) aggregasyona eğilimli olduğu ve N terminalinde ise düşük kompleksli domainin yer aldığı ortaya çıkarılmış, Ccdc124 yüksek derecede düzensiz (disordered) protein olarak tanımlanmıştır [2].

Ccdc124 monomerleri ile yapılan moleküler docking analizi ile 151 ve 156 aminoasitleri arasındaki dizide, V153 ve S155 residülerinin birbiri arasında ile potansiyel bir çekim olduğu ve bu şekilde bir dimer yapısı oluşturduğu gösterilmiştir. Yüksek dimerik ve oligomerik yapılarının oluşumunda V153 residüsünün rol aldığı ve oluşan Ccdc124 dimerik yapılarının baskın olarak sitoplazmada konumlandığı Co-IP, Immunostaining ve BiFC analizleri ile doğrulanmaktadır.

Yüksek dereceli (High Order) oligomerik organizasyon, hücre altı birikimlerle sıkı bir şekilde ilişkilendirilmektedir [20]. Bu nedenle Ccdc124'ün sitokinez öncesinde sentrozomdan midbody yapısına translokasyonu ve glikoz starvation polizomlarda Lso2'nin de oldukça fazla miktarda görülmesi Ccdc124 ve ortologlarının sentrozom, orta cisimcik, ribozom gibi farklı subunitlerde olası fonksiyonel dimerizasyonunu/ oligomerizasyonunu içerebilmektedir [2].

2.4. Ccdc124 ve Stres Granülü

Stres granülleri (SG), hücrede ısı şoku, oksidatif stres gibi olumsuz koşullarda bir proteininin translasyonunu durduran sürece dâhil olup, RNA ve RNA'ya bağlanan proteinlerden oluşan lipid membranı ile çevrili olmayan bir yapıdır. Stres granülleri ilk

olarak yapılarında poliadenilllenmiş mRNA'lar, poli-A bağlanma proteini (PABP) ve T hücre hücreiçi antijen 1 (TIA1) içeren sitoplazmadaki yoğun parçacıklar olarak gösterilmiştir.

SG'ler, stres durumunda protein translasyonu güvenli bir şekilde yeniden başlayana kadar RNA'yı bozulmadan korumak [23] ve yanlış katlanmış proteinlerin birikmesini önlemek için protein translasyon hızlarının ayarlanması gibi stres sinyali düzenlemeye hizmet etmektedir [24].

Hücrelerde RNA, lipid membranı olmaksızın konumlanmakta, RNA'nın lokalizasyonu genellikle RNA'ya bağlanan proteinler (RBP) tarafından kontrol edilmektedir. Hücrede RNA ve RBP'lerden oluşan birçok RNA granülü vardır, sitoplazmik stres granülü ise bunlardan biridir ve genellikle nörodejeneratif hastalıklarla ilişkilendirilmektedir [25].

Stres granüllerinin en önemli özelliği dinamik olmalarıdır ve yapısındaki proteinler sitoplazma ile sürekli olarak değiş tokuş halindedir. Bu nedenle SG'lerin geçici yapılar olduğu varsayılmaktadır, ancak yaşlanma ile ilişkili kronik stresler, hastalıkla ilgili proteinlerin toplanmasına yol açan kronik, kalıcı SG'lere yol açabilmektedir [26].

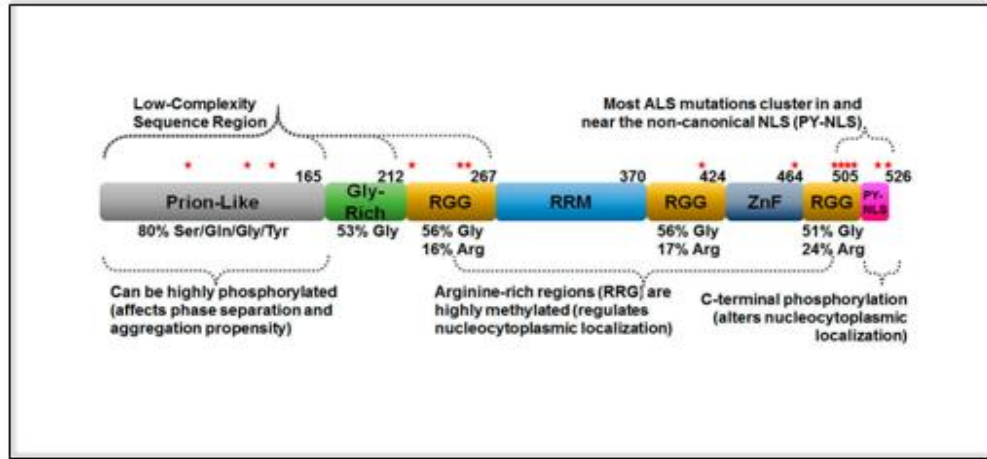
Yapılan bir doktora tez çalışması Ccdc124'ün bir stres granülü bileşeni G3BP1 (Ras GTPaz aktive edici protein bağlayıcı protein 1) ile sıcaklık ve ozmotik stres durumunda, bir arada sitoplazmada granüler yapı oluşturduğunu göstermiştir. Bu yapıların daha çok çekirdekte olduğu ve stresle arttığı ortaya çıkarılmıştır. Aynı zamanda bir diğer stres granülü bileşeni olan TIA-1 proteini ile yapılan deneyde ise, sıcaklık stresi durumunda Ccdc124'ün TIA-1 ile aynı sitoplazmik granül içinde olduğu gözlemlenmiştir [3].

3. FUS (FUSED IN SARCOMA)

FUS (Sarkomada kaynaşmış) proteini, gen ekspresyonu, RNA Pol II'ye bağlanarak transkripsiyon regülasyonu, alternatif kırılma (splicing), mikroRNA işleme, DNA hasarı tamiri ve mRNA taşıma gibi birçok işlevi olan özellikle RNA metabolizmasında rol alan RNA'ya bağlanan bir proteindir.

Amyotrofik lateral skleroz (ALS) ve FTLD gibi nörodejeratif hastalıklarda, hastaların motor nöronlarında patolojik immünoreaktif protein agregatlarının bulunması ile bilinen FET ailesinde (TLS/FUS, Ewing's sarcoma, and TATA-bağlama protein ilişkili faktör) yer almaktadır. FUS ilk olarak bir insan adipoz doku tümöründe (liposarkomada), kromozomal translokasyon t (12;16)(q13.3;p11.2)'dan kaynaklanan bir füzyon onkogenik protein olarak tanımlanmıştır.

16. kromozom üzerinde 15 ekzondan oluşan FUS geni, 526 aminoasitten oluşan bir proteini kodlamaktadır. FUS protein domain organizasyonu Şekil 3.1'de gösterilmiştir. Amino-terminal kısmında yer alan prion benzeri alan (PrLD), maya proteinlerindeki kendi kendine çoğalarak amiloid lifleri oluşturan domainlere benzemektedir. FUS ayrıca arginin/glisin açısından zengin bölgeler (RGG; tekrarlanan bir arginin-glisin-glisin motifi), bir RNA tanıma motifi (RRM), çinko parmak (ZnF) ve nükleer taşıma reseptörü transportin 1 tarafından tanınan nükleer lokalizasyon dizileri (NLS) içermektedir. Prion benzeri alanlar, aminoasit çeşitliliği az olduğu için düşük kompleksli alanlar (low complexity domain) olarak bilinirler ve RGG bölgeleriyle birlikte düzensiz (disordered) domainler olarak adlandırılırlar.



Şekil 3.1: FUS protein domainleri. N terminal proin benzeri alan, Glisin zengin bölge, Arjinin Glisin Glisin 1-2-3, RNA tanıma bölgesi, çinko parmak motifi ve nükleer lokalizasyon sinyali. Kırmızı yıldız ile işaretli olan lokasyonlar, ALS hastalığında görülen mutasyon konumlarını işaret etmektedir.

FUS'daki mutasyonlar, motor nöronların ölümüne yol açan nörodejeneratif bir hastalık olan ailesel ve nadiren sporadik amyotrofik lateral sklerozun (ALS) %5'ine neden olmaktadır [27]. Mutasyonlar çinko-parmak motif, RGG2 ve RGG3 alanlarını ve NLS'yi kodlayan ekzon 12-15'te ve QGSY açısından zengin ve RGG1 bölgelerini kodlayan ekzon 3-6' da meydana gelmektedir [28]. Mutasyonların çoğunda ise mutant FUS proteinleri, bozulmuş bir NLS'ye sahiptir ve bu nedenle sitoplazmada yanlış konumlandırılmıştır [29]. Fakat bazı ALS hastaların nöronlarında FUS pozitif olan protein toplulukları bulunmasına rağmen hasta, FUS gen mutasyonlarını taşımamaktadır [30].

FUS, özellikle nöron hücrelerinde, RNA'ları taşımakla görevlidir. Nöronlar, bir uzatılmış akson ve çok sayıda dallanmış dendrite sahip olan polarize hücreler olduğundan, aksonal ve dendritik proteinler, protein komplekslerinde taşınırlar ya da uzak bölgelere taşınan mRNA'ların translasyonu ile lokal olarak sentezlenmeleri gerekir. mRNA'lar, translasyonel olarak bastırılmış bir durumda nöronal taşıma granüllerinde RBP'lerle (FUS, TDP-43 gibi) birlikte hareket etmektedirler [31].

Normal sağlıklı bir nöron hücresinde, FUS ağırlıklı olarak çekirdekte bulunur ve proteinin sitoplazmik havuzu, fizyolojik RNA taşıma granüllerinin oluşumuna katkıda sağlamaktadır. FUS sahip olduğu sinyal dizileri ile nükleus ve sitoplazma arasında, bağlı olduğu mRNA'ların lokal translasyonu için hareket etmektedir [32]. RNA granüllerinin fazla sayıda olması, aksonlarda, dendritlerde ve sinaptik terminallerde

lokal translasyonda yer alan spesifik proteinlerin büyük mesafelere taşınmasını gerektiren nöronların karakteristiğidir.

FUS, nöronal RNA taşıma granüllerinin olduğu kadar stresle indüklenen stres granüllerinin de bir bileşenidir. Hücrede meydana gelen stres, sitoplazmada stres granüllerine dahil edilmek üzere RNA'ları hedefleyen FUS ekspresyonunu indükler [31] ve FUS bağlı olduğu RNA'lar ile birlikte stres granüllerine alınır. Stres granülleri, translasyonu durmuş RNA'lar ve proteinler içeren geçici hücresel yapılardır ve olumsuz koşullar altında hücrenin hayatta kalmasını destekler. Hücre bir strese (ısı, ozmotik stres) maruz kaldığında, bazı transkriptlerin translasyonu bloke edilir, transkriptler ribozomlardan salınarak stres granüllerine alınırlar. Stres durumu ortadan kalktığında granül dağılır ve mRNA'lar, RNP (Ribonükleoprotein) kompleksi ile görevli olduğu yere taşınırlar. RNA taşıma granülleri ve stres granülleri, belirli bir protein havuzunu paylaşmaktadırlar.

Hücrelerde mutasyona, translasyon sonrası modifikasyon(lar)a veya transportin kusuruna bağlı olarak çekirdekte bulunan FUS sitoplazmaya geçer ve burada birikerek inklüzyonlar oluşturur. FUS'un yanlış konumlanması temel olarak iki durumla sonuçlanır: Çekirdekteki temel işlevlerin kaybı ve sitoplazmada toksik işlevlerin kazanılması [33]. FTLD ve ALS hastalarındaki FUS pozitif protein toplulukları, sürekli olarak stres granülü (SG) işaret proteinleri ile birlikte etiketlenir. Sitoplazmik mislokalisasyon, FUS'un stres granülüne alımı için yaygın bir ön koşuldur [34].

Tatyana A. Shelkovanikova¹ ve arkadaşları [35] tarafından 2014 yılında yapılan bir çalışmaya göre ise sitoplazmada biriken FUS, fizyolojik RNA taşıma granüllerine yapısal olarak benzer yeni bir RNA granülü türü olan FUS granüllerini (FG'ler) çekirdeklendirir. FUS Granülleri, yeni sentezlenmiş transkriptleri ve RNA taşıma granüllerinde bulunan proteinler gibi bileşenleri yapısına alır. FUS granülleri kümelenir ve stres granülü bileşenleri gibi spesifik proteinleri yapısına katarak daha yüksek dereceli yapılar olan FUS agregatlarını oluşturur.

Bir stres durumunda FUS'un stres granüllerine dahil edilmesi geri dönüşümlü bir süreçtir [36]. FUS proteinlerinin stres granülleri içinde birikmesinin, ALS hastalığını başlatan bir olay olabileceği ve sürekli stresin sonunda bu proteinlerin geri döndürülemez patolojik agregasyonuna yol açabileceği tahmin edilmektedir. Çünkü sitoplazmada biriken mutant FUS, normal FUS'u da bağlayarak sitoplazmik stres granüllerine ayırabilmektedir [37]. Bununla birlikte, stres granüllerine alım, aslında

yanlış lokalize FUS'u çözünmez aggregasyonun (insoluble aggregation) öncüsü olmaktan ziyade geri dönüşü olmayan kümeleşmeden korumaktadır.

FUS' un farklı işlevleri yerine getirdiği DNA lezyonlarında, mRNA'larda ve diğer SG oluşum yerleri gibi hücre altı bölgelerde lokalizasyonu kolaylaştıran bir protein-protein etkileşimi moduna sahip olması gerekmektedir [38]. FUS'un etkileşimde bulunduğu partnerlerin bulunmasına yönelik yapılan bir proteomik çalışmasında, 42 adet ribozomal ve 70 adet ribozomal olmayan protein ortaya çıkarılmış, RNA'ya bağlanan proteinler en yüksek etkileşim partnerleri olarak gösterilmiştir [39]. Sıvı sıvı faz ayrımı ile sitoplazmadan ayrılan FUS, kromatin yeniden modellemesi, DNA hasarı yanıtı ve mitokondrideki proteinlerle etkileşirken, sıvı faz ile ayrılmayan FUS daha çok RNA kırılma sürecindeki proteinlerle etkileşmektedir [40].

3.1. Sıvı-Sıvı Faz Ayrımı (Liquid- Liquid Phase Separation)

Endoplazmik retikulum ve Golgi gibi zar içeren organellerin aksine hücrede lipit çift katmanlı zarla çevrili olmayan hücre altı bölümler bulunmaktadır. Hücrenin bu bölümlerinde, organelin bulunduğu çözücünden ayrı bir sıvı faza ayrıldığı bir süreç olan sıvı-sıvı faz ayrımı (LLPS) gerçekleşir [41]. Damlacık durumundaki bu yapılar, sıvılar gibi akar, kaynaşır ve küresel şekiller alma eğilimindedir. Bu yapılar membransız kondensatlar (membraneless condensates) olarak adlandırılmaktadır.

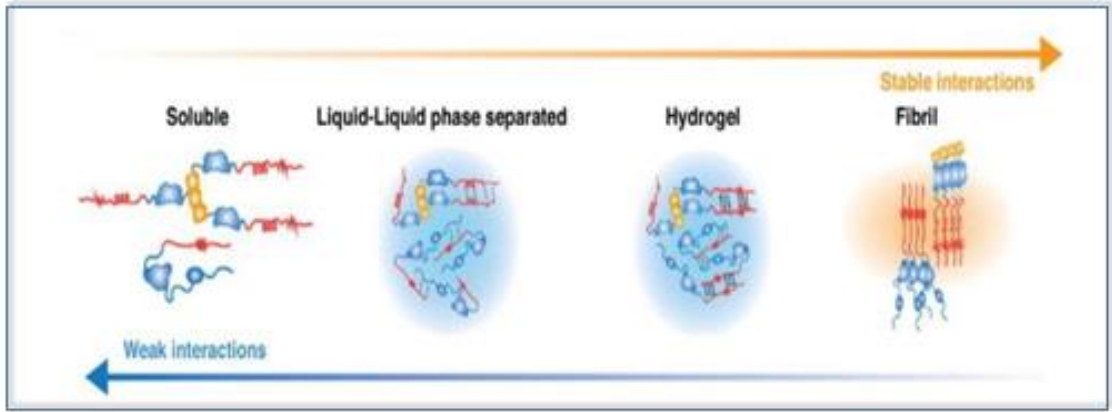
Kondensatlar, biyokimyasal reaksiyonları etkinleştirmek ve protein RNA konsantrasyonunu artırmak için çok değerlikli (multivalent) etkileşimler yoluyla proteinleri ve nükleik asitleri bir araya getirirler. Ayrıca bir hayatta kalma stratejisi olarak ısı ve pH değişikliği gibi streslere yanıt vermek için bir sensör görevi görebilmektedirler. Saniyeler içinde toplanıp demonte edilebilirler, hücrelere sinyallere hızlı ve özel olarak yanıt verme yeteneği sağlarlar [38].

Proteinler ve nükleik asitler, nükleolus, P body ve stres granülleri zarsız sıvı benzeri yapılarda faz ayrımı yapabilir [42]. Pek çok zarsız organel, RNA bağlama alanı, tekrarlanan motiflere sahip, faz ayrımına eğilimli ve doğal olarak düzensiz bölgeleri içeren proteinler açısından zenginleştirilmiştir.

İnsan FUS'unun da LLPS durumunda olduğu gösterilmiştir. FUS, LC ve RGG bakımından zengin domainlerinin katkısıyla in vitro ve in vivo LLPS sürecini yaşar.

Bu domainler ayrıca, sitoplazmik agregasyon için gerekmede ve sitotoksiteyi desteklemek için RNA bağlama alanı ile birlikte işlev görmektedir [42]. FUS PLD'deki tirozinlerin aromatik halka yapıları, pozitif yüklü amino asit yan zincirleri ile moleküller arası ve molekül içi katyon etkileşimleri yoluyla LLPS'yi yönlendirmektedir.

FUS'un sıvı faz ile bulunduğu yerden ayrılmış durumu, katı benzeri patolojik forma dönüşümü güçlendirmede rol oynamaktadır [43]. Spesifik olarak, ribonukleoprotein komplekslerindeki yüksek FUS konsantrasyonu, özellikle mutant FUS ve kalıcı RNP granüllerini içeren koşullar altında, bir sıvıdan katıya faz geçişini kolaylaştırabilir [44].



Şekil 3.2: Çözünür durumdaki protein yapısının hastalık durumundaki agregat yapısına geçişi. Soldan sağa gidildikçe zayıf çoklu (multivalent) etkileşimlerden stabil etkileşimlere geçilmektedir.

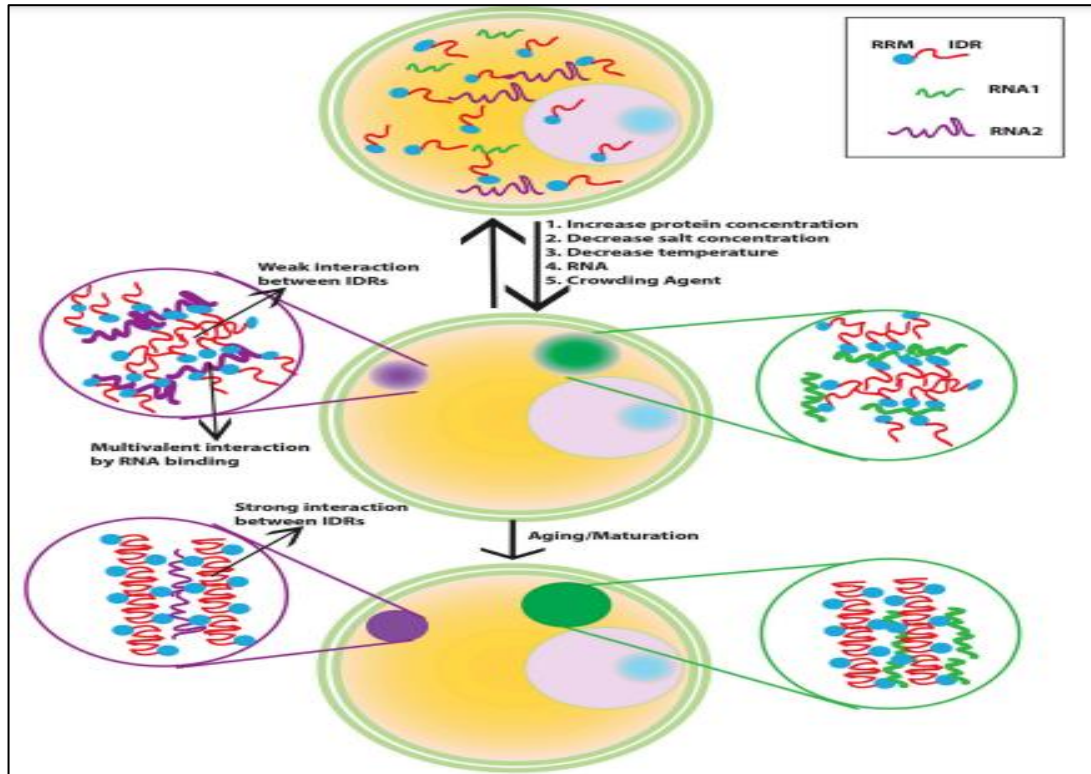
3.2. RNA Bağlayıcı Protein FUS

Sıvı fazla ayrılmış ribonükleoprotein komplekslerinin biyofiziksel özellikleri RNA içeriğine oldukça bağlıdır. Farklı RNA'lar, sıvı RNP damlacıkları üzerinde değişen özellikler verebilir ve bağlı oldukları proteinleri birçok açıdan etkileyebilmektedir [46].

RNA tanıma özelliği, küresel proteinler ve domainlerin özelliği olarak gösterilmesine karşılık genom boyunca RNA'ya bağlanan proteinler ile yapılan bir çalışmada, içsel olarak düzensiz bölgeleri içeren proteinlerin zenginleştiği bulunmuştur [15].

FUS, birçok farklı RNA'ya uzunluğa bağlı olarak spesifik olmayan şekilde bağlanmakta ve düzenli yapıların oluşumunu tetiklemektedir. FUS'da bulunan RNA tanıma ve çinko parmak motifi, temel RNA etkileşim bölgeleri olmasına rağmen yapısında yer alan RGG motifleri de sıklıkla RNA bağlayıcı proteinlerde bulunmaktadır [47].

FUS granülleri için LC domainleri de önemlidir. Bu alanların her biri, büyük ölçüde beta sheet ikincil yapıdan oluşan lifli topluluklar oluşturur. RNA bağlanmasının yokluğunda ise, protein toplanması çok yüksek protein konsantrasyonları gerektirmektedir. FUS, RNA'yı yüksek kooperatifite ile bağlar, bu durum RNA üzerinde sıkı paketlenmiş bir protein dizisinin oluşumu ile sonuçlanır. RNA, hem düşük RNA/protein oranlarında FUS toplanmasını teşvik etme hem de yüksek RNA/protein oranlarında birleşmeyi önleme yeteneğine sahiptir [48]. Şekil 3.3 RNA ile faz ayrımını göstermektedir [49].



Şekil 3.3: FUS aracılı Ribonükleoprotein Granül oluşumu. Genellikle RNP proteinleri düzensiz (IDR) ve RNA tanıma motifi (RRM) içermektedir. RNP granülleri, düzensiz bölgeler içeren proteinlerin lokal konsantrasyonunu hızla artıran sıvı-sıvı faz ayrımı ile oluşmaktadır. Sıvı faza katılan RNA'lar, granüllerin biyofiziksel özelliklerini ve lokalizasyonunu yönetir ve sıvı faz, zamanla moleküller arasında güçlü etkileşimler ile daha katı benzeri bir faza olgunlaşır. Lifli yapılar genellikle olgunlaşmış sıvı damlacıkları içinde gözlenir.

4. PROTEİN PROTEİN ETKİLEŞİMLERİ

Proteinler nadiren biyolojik fonksiyonlarını yerine getirmek için izole edilmiş moleküller olarak davranırlar [49]. Proteinlerin %80' den fazlasının tek başına işlev görmediği, bunun yerine farklı hücresel işlevleri yerine getirmek için sıklıkla birbirleriyle ve/veya DNA veya RNA gibi diğer moleküllerle etkileşime girdiği bilinmektedir [50].

Hücrelerdeki protein-protein etkileşimleri (PPI), "interaktom" adı verilen karmaşık bir ağ oluşturur [51]. İnteraktom, sinyal iletimi, hücre proliferasyonu, büyüme, farklılaşma ve apoptoz vb. gibi fizyolojik ve patolojik süreçlerde önemli bir role sahiptir. Bu nedenle, anormal protein protein etkileşimleri kanser, bulaşıcı hastalıklar ve nörodejeneratif hastalıklar gibi birçok insan hastalığı ile ilişkilidir [52].

Proteinlerin kendi arasındaki bağlantı nedeniyle, hastalıkla ilgili bir mutasyonun etkisi, belirli bir gen ürünüyle sınırlı değildir. Bunun yerine, tüm interaktom ağını etkiler ve buna bağlı olarak tüm bir protein alt kümesinin aktivitesini etkileyebilir. İnsan hastalıklarına da genellikle protein-protein komplekslerinin bağlanma arayüzündeki değişiklikler neden olur (53), bu da ikili PPI'lerin saptanmasını önemli bir adım haline getirmektedir. Bu nedenle hastalıkta yer alan tek genlere yerine, PPI bazlı analizler, hastalık durumu tarafından en çok değişen protein ağını inceler ve böylece bir mutasyonun hücresel fonksiyon üzerindeki etkisini belirlemek için bir alternatif sunar.

PPI'lar, tüm organizmalarda çeşitli moleküler ve hücresel mekanizmaları düzenlemesinden dolayı proteinler arasındaki yapısal ve işlevsel ilişkileri çözmeye yönelik kritik bir adım, protein-protein fiziksel temaslarını haritalandırmaktır. İnsan interaktom analizi ile fizyolojik ve patolojik süreçlerde önemli görevlerde yer alan yaklaşık 53.000 protein-protein etkileşimini ortaya çıkarılmıştır [54].

Pek çok deneysel tekniklerle proteinler arasındaki etkileşim ortaya çıkarılmaktadır. İkili maya çöktürme deneyleri, birlikte immün çöktürme, yüzey plazmon rezonans, tandem afinite saflaştırma kütle spektroskopisi (TAP-MS) bu tekniklerden bazılarıdır.

NMR (Nükleer Manyetik Rezonans) ise fizyolojik koşullar altında protein-protein komplekslerinin yapısı, dinamikleri ve termodinamiği hakkında bilgi sağlamak için kullanılan çok güçlü bir tekniktir [55].

NMR spektroskopi teknikleri, hücre zarında oluşan protein-protein komplekslerindeki bağlanma arayüzleri, moleküller arası afinite ve bağlanma kaynaklı konformasyonel değişiklikler hakkında bilgi amaçlı uygulanmaktadır. Ayrıca solüsyon NMR spektroskopisi, proteinlerin farklı tamponlarda ve çeşitli sıcaklıklarda incelenebilmesine izin verdiğinden, çözelti koşulları altında protein yapıları ve dinamikleri araştırma yapma imkanı sunmaktadır [56].

Tekniğin temeli, güçlü bir manyetik alan tarafından yönlendirilen manyetik olarak aktif çekirdeklerin, kimyasal ortamları tarafından yönetilen karakteristik frekanslarda elektromanyetik radyasyonu absorblamasıdır. Bu manyetik ortam, kimyasal bağlar, moleküler konformasyonlar ve dinamik süreçler gibi çeşitli faktörlerden etkilenir. Böylece aynı elementin çekirdekleri bile farklı spektral çizgiler oluşturur. Bu spektral çizgilerin farklı konumları kimyasal kaymalar olarak adlandırılır. Kimyasal kayma haritalaması, protein bağlanma bölgelerinin hassas bir göstergesidir, çünkü protein arayüzlerinin içindeki ve bunlara yakın ortamlar bağlanma sırasında değişerek bağlanma arayüzüne yakın olan çekirdeklerin kimyasal kaymalarını etkiler, ancak uzak olanları etkilememektedirler. Diğer bir deyişle, bir ligand ya da protein, ilgilenilen protein ile etkileştiğinde, değişen tepe noktaları, çizgi genişliği ve yoğunluk değişiklikleri, hangi amino asit rezidülerinin manyetik ortamlarında bir değişiklik yaşadığını gösterir ve bu da, bağlanma ara yüzünün tanımlanmasına izin verir. Pratikte bu, etiketlenmemiş proteinin izotopik olarak zenginleştirilmiş (^{15}N ve ^{13}C) bir protein örneğine titre edilmesi ve etiketli proteinin spektrumundaki pik pertürbasyonların izlenmesiyle elde edilebilmektedir.

Temel bir kural, $K_d < 1 \mu\text{M}$ ile protein-protein etkileşimlerinin genellikle yavaş değişimle (sıkı bağlanma) ve $K_d > 1 \text{ mM}$ ile protein-protein etkileşimlerinin hızlı değişimle (zayıf bağlanma) olmasıdır. Bu sayısal verilerden elde edilen spektrumlarla protein- protein etkileşimi hakkında bilgi sahibi olunmaktadır [57].

Protein protein etkileşimlerinin belirlenmesinde kullanılan diğer bir teknik Far Western Blot tekniğidir [58]. Far Western Blot tekniği ilk olarak ^{32}P etiketine sahip GST- füzyon proteinleri ile protein ekspresyon kütüphanelerini taramak için geliştirilmiştir. Bu teknik daha sonra protein-protein etkileşimlerini incelemek ve bir kütüphanede etkileşen protein partnerlerini taramak için kullanılmıştır.

Far Western Blot tekniği, ilgilenilen prey proteininin hücrelerde endojen olarak ekspresyonuna izin vererek bu proteinlerin saflaştırılmasının zor olduğu durumlarda özellikle kullanılmaktadır. Ayrıca iki proteinin birbirine bağlanıp bağlanmadığının ve

proteinlerin bağlanmadığı durumlarda aralarındaki fiziksel etkileşime üçüncü bir proteinin aracılık edip etmediğini belirleyebilmektedir. Bu tekniğin uygulanabilmesi için ilgilenilen proteinlerden en az birinin belirli miktarlarda saflaştırılması gerekmektedir.

Far Western Blot Tekniği, bir bait proteininin etkileşim partnerlerini belirlemek ve yüksek verimli taramalardan açığa çıkarılan birebir etkileşim partnerlerini doğrulamak için kullanılmaktadır [59]. Ayrıca post translasyonel modifikasyonların protein-protein etkileşimleri üzerindeki etkisini inceleyebilmek amacıyla da bu yöntem kullanılmaktadır. Protein saflaştırma ve standart olarak Western Blot tekniğinin uygulandığı laboratuvarlarda kullanılabilir olması bu tekniğin avantajları arasında yer almaktadır.

Bu teknikte etkileşimleri araştırılan iki proteinden biri, membranda gömülü halde bulunduğundan yalnızca doğrudan etkileşimler saptanmaktadır. Aksine immün çöktürme ve pull down teknikleri ise doğrudan ve dolaylı etkileşimleri saptayabildikleri için direkt bir sonuç vermeyebilmektedir.



Şekil 5.2: pQE81L plazmidi (Benchling).

- Primerler

Primerler, Benchling programı kullanılarak dizayn edilmiştir.

Tablo 5.1: Klonlama primerlerin listesi.

Primer	Primer Sekans	Kullanım amacı
FUS Forward Primer	5' – CGC GGATCC ATG GCC TCA AAC GAT – 3'	FUS gen klonlama
FUS Reverse Primer	5' – CCC AAGCTT ATA CGG CCT CTC CCT – 3'	FUS gen klonlama

5.1.2. Antikorlar

Tablo 5.2: Antikor listesi.

Antikor	Dilusyon	Katalog No
Anti- FUS	1:1000	4H11, Santa Cruz
Anti- Ccdc124	1:1000	27106-1-AP, ProteinTech
Anti-Mouse HRP	1:4000	A4416, Sigma
Anti- Mouse HRP	1:10000	A9044, Sigma
Anti-Rabbit AP	1:20000	31340, Thermo Scientific
Anti- His	1:10000	A7058, Sigma

5.1.3. Kullanılan Kimyasallar ve Kitler

Tablo 5.3: Kit, Enzim ve Kimyasal Listesi.

Kit, Enzim, Kimyasal	Ülke, Kod
CloneAmp™ HiFi PZR Premix	639298, Takara, Japonya
T4 DNA Ligaz	1527- 4017, Invitrogen, USA
Taq DNA Polimeraz	EP0401, Thermo Scientific, USA
MyTaq DNA Polimeraz	BIO 21105, Bioline, USA
ZymoPURE™ Midiprep Kit	D4200S, Zymo Research, USA
PZR Clean Up Kit	740609.50, Macherey-Nagel, USA
GeneRuler DNA Ladder Mix	SM0312, Thermo Scientific, USA
Ampisilin	A9393-25G, Sigma, USA
Agar	214010, BD
Trypton	211705, BD
Agaroz	A5093, Sigma, USA
Akrilamid	161-0100, Bio-Rad, USA
Bis-Akrilamid	161-0125, Bio-Rad, USA
TEMED	1610801, Bio-Rad, USA
Protein Moleküler Ağırlık Marker	26619, Thermo Scientific, USA
Metanol	34860, Sigma, USA

Tablo 5.3: Devam.

Metanol	34860, Sigma, USA
Asetik Asit	27225, Sigma, USA
2-Propanol	100995, Merck, Germany
Coomassie Brilliant Blue R-250	112553, Sigma, USA
2-Merkaptoetanol	805740, Sigma, USA
Amonyum Persülfat	161-0700, Bio-Rad, USA
DNaz (2500 units/ml)	1861610, Thermo Scientific, USA
Lizozim (50 mg/ml)	1861610, Thermo Scientific, USA
B-PER Hücre Liziz Solüsyonu	78243, Thermo Scientific, USA
Proteaz İnhibitör	S8820, Sigma, USA
IPTG	R0392, Thermo Scientific, USA
Trietanolamine	90279, Sigma, USA
4-Chloro-1-Naphthol (4C1N)	C6788, Sigma, USA
İmidazol	1047161000, Merck, Germany
4X Laemmli Protein Yükleme Boyası	1610747, BioRad, USA
BamHI- HF Restriksiyon Enzim	R3136S, NEB, USA
HindIII- HF Restriksiyon Enzim	R3104S, NEB, USA
Syber Green	4364344, Thermo Scientific, USA
Tween-20	9005-64, Sigma, USA
Bovin Serum Albümin (BSA)	A7638, Sigma, USA
Mini-Protean TGX Precast Jel	456-1043, BioRad, USA
1X DPBS	14190144, Thermo Scientific, USA

5.1.4. Ekipman

Tablo 5.4: Ekipman listesi.

Ekipman	Marka/Ülke
Jel Görüntüleme Cihazı	Azure Biosystem C600, USA
Nanodrop	Nanodrop –One C, Thermo Fisher, USA
Güç Kaynağı	Bio-Rad, USA
Elektroforez Sistemi	PowerPac HC, Bio-Rad, USA
Transfer Cihazı	Bio-Rad, USA
Isıtıcı	Techne Dri-Block, DB-2A, UK
Su Banyosu	Lauda LCB 0726, Germany
ThermoCycler	Bio-Rad, USA
Biyolojik Güvenlik Kabini	Esco Class II, Singapore
PZR kabini	Biosan, Latvia
Santrifüj	5417R Eppendorf, USA Avanti J26 XPI, Beckman Coulter, USA
Mini Santrifüj	Centrifuge 5415 R, Eppendorf, Germany
Ultra Santifüj	Avanti J-26 XPI, Beckman Coulter, USA
Konsantratör Amicon Ultra-15 Centifugal Filters, 3K	UFC900324, Merck, Germany
Konsantratör Vivaspin-500 5K	VS0112, Sartorius, Germany
Konsantratör Vivaspin-2 20K	VS02X1, Sartorius, Germany

Tablo 5.4: Devam.

Konsantratör Vivaspin-20 3K	VS2091, Sartorius, Germany
Konsantratör Vivaspin-6 5K	VS0611, Sartorius, Germany
Konsantratör Vivaspin-20 10K	VS2001, Sartorius, Germany
Vortex	Vortex V-1 Plus, Biosan, China
pH Metre	Mettler Toledo, USA
Western Blot Nitroselüloz Membran, 0.2 µm	1620112, Bio-RAD, USA
Western Blot Extra Thick Blot Filter Paper	1703966, Bio-RAD, USA
Millex- HP Fast Flow – Low Binding Filter Unit PES Membrane (0.45 µm)	SLHPR33RS, Merck, Germany
Millex-GP Fast Flow – Low Binding Filter Unit PES Membrane (0.22 µm)	SLGPR33RS, Merck, Germany
Spektrometre	DU730, Beckman Coulter, USA
Çalkalayıcı	Innova 4230, New Brunswick Scientific, USA
Kromatografi Sistemi ÄKTA Avant ÄKTA Pure	Cytiva, USA
Afinite Saflaştırma Kolon 1 ml	12009285, BioRAD, USA
Afinite Saflaştırma Kolon 5 ml	12009287, BioRAD, USA

Tablo 5.4: Devam.

Kasyon Değiştirici Saflaştırma Kolon	29400458, Cytiva USA
700 MHz NMR Spektrometre	Bruker Avance III, Germany

5.1.5. Tampon ve Solüsyonlar

Tablo 5.5: Besiyeri Solüsyonları.

İsim	İçerik
Luria Bertani (LB) Besiyeri	10 g Bacto Tripton 5 g Maya Ekstraktı 10 g NaCl
Luria Bertani (LB) Agar Besiyeri	10 g Bacto Tripton 5 g Maya Ekstraktı 10 g NaCl 15 g Bacto Agar
2xYT Broth	16 g Bacto Tripton 10 g Maya Ekstraktı 10 g NaCl
2xYT Agar	16 g Bacto Tripton 10 g Maya Ekstraktı 10 g NaCl 15 g Bacto Agar
Terrific Broth (TB) Besiyeri	12 g Bacto Tripton 24 g Maya Ekstraktı 5 ml Gliserol 4.62 g KH ₂ PO ₄ 25 g K ₂ HPO ₄
50 mg/ml Ampisilin	0.5 g Ampisilin 10 ml ddH ₂ O

Tablo 5.6: Jel Solüsyonları.

10x PBS (Fosfat Buffer Salin) Tamponu	80 g NaCl 8 KH ₂ PO ₄ 2 g KCl
10x TAE (Tris-Asetat) Tamponu	48.4 g Trizma Baz 3.7 gr EDTA 11.4 ml Asetik Asit
10x SDS-PAGE Yürütme Tamponu	30.30 g Trizma Baz 144.10 g Glisin 10 g SDS 1 L ddH ₂ O
%30 Akrilamid-Bisakrilamid Solüsyonu	292 g Akrilamid 8 gr Bisakrilamid 1 L ddH ₂ O
1.5 M Tris-HCl pH: 8.8	181.53 gr Trizma Baz 1 L ddH ₂ O
0.5 M Tris-HCl pH: 6.8	181.53 gr Trizma Baz 1 L ddH ₂ O
%10 SDS-PAGE Solüsyonu	10 g SDS 100 ml ddH ₂ O
Boyama Tamponu	450 ml ddH ₂ O 450 ml Metanol 100 ml Asetik Asit 1 gr Coomassie Brilliant Blue R-250
Destaining Tampon	450 ml ddH ₂ O 450 ml Metanol 100 ml Asetik Asit
Transfer Tamponu	3 g Trizma Baz 1 g Glisin 200 ml Metanol 800 ml 1 L ddH ₂ O
Trietanolamin Solüsyon	7.5 g NaCl 8.8 ml Trietanolamin
4-Chloro-1-Napthol (4C1N) Solüsyon	1 tablet (30 mg) 4C1N 10 ml Metanol

Tablo 5.7: Saflaştırma Solüsyonları.

Afinite Saflaştırma Bağlama Tampon	20 mM Na-P 150 mM NaCl 20 mM İmidazol pH:7.4
Afinite Saflaştırma Elüsyon Tampon	20 mM Na-P 1500 mM NaCl 300 mM İmidazol pH:7.4
İyon Değişimi Saflaştırma Bağlama Tampon	50 mM Sodyum Asetat pH:6
İyon Değişimi Saflaştırma Elüsyon Tampon	50 mM Sodyum Asetat 1 M NaCl pH:6
Sonikasyon Tampon	50 mM Tris-HCl (pH:8) 150 mM NaCl 1 mM EDTA 1 mg/ml Lizozim
Solubilizasyon Tampon (8 M üre)	50 mM Tris-HCl (pH:8) 250 mM NaCl 8 M Üre 5 mM β -Merkaptoetanol
Solubilizasyon Tampon (3 M üre)	50 mM Tris-HCl (pH:8) 250 mM NaCl 3 M Üre 5 mM β -Merkaptoetanol
Afinite Saflaştırma Bağlama Tamponu (8 M Üre)	20 mM Na-P 300 mM NaCl 30 mM İmidazol 8M Üre pH:8
Afinite Saflaştırma Elüsyon Tamponu (8 M Üre)	20 mM Na-P 300 mM NaCl 30 mM İmidazol 3M Üre pH:8

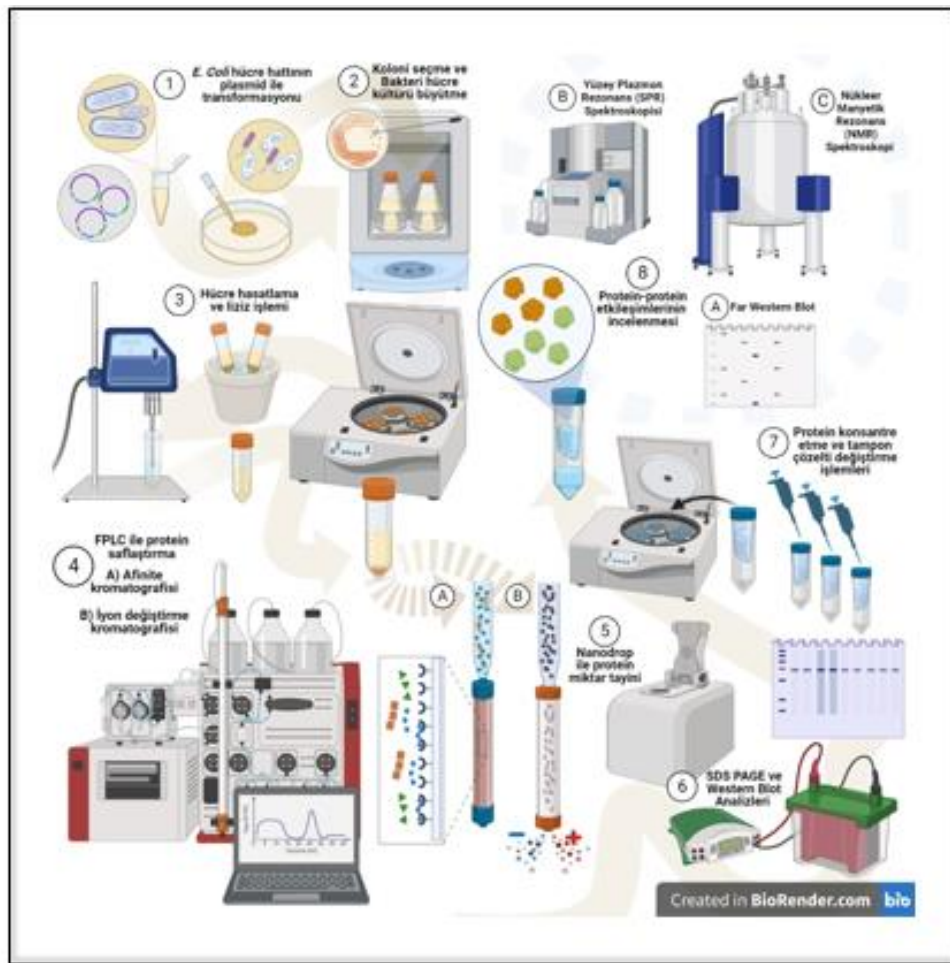
Tablo 5.7: Devam.

Afinite Saflaştırma Bağlama Tamponu (3 M Üre)	20 mM Na-P 300 mM NaCl 30 mM İmidazol 3M Üre pH:8
Afinite Saflaştırma Elüsyon Tamponu (3M Üre)	20 mM Na-P 300 mM NaCl 300 mM İmidazol 3M Üre pH:8
AC Tamponu Far Western Blot (3 M, 0.1 M Üre)	100 mM NaCl Gliserol 20 mM Tris pH:7.5 0.5 M EDTA Üre Süt Tozu 1 mM BE
In vitro Yeniden Katlama Tamponu	50 mM Tris-HCl pH: 8 150 mM NaCl 1 mM EDTA 500 mM Arjinin 2 mM GSH 1 mM GSSG %5 Gliserol

5.2. Metot

Bakteri hücrelerinde Cdc124 ve FUS'u kodlayan genin ekspresyonu için rekombinant DNA teknikleri kullanılarak proteinler elde edilmiş, her iki protein FPLC yöntemleri kullanılarak saflaştırılmıştır. Saflaştırma ve analiz işlemleri için proteinler, gereken tamponlara farklı membran boyutuna sahip konsantratörler yardımı ile alınmıştır.

Tez boyunca yapılan tüm deneylerin şematik özeti Şekil 5.3'te yer almaktadır.



Şekil 5.3: Tez boyunca yapılan tüm deneylerin şematik özeti (BioRender ile yapılmıştır).

5.2.1. PZR Amplifikasyonu

Laboratuvarımızda yapılan daha önceki bir çalışmada pENTER vektörüne klonlanan FUS geni, bu tez çalışmasında kalıp olarak PZR reaksiyonunda kullanılmıştır. Gerekli olan klonlama primerleri, Benchlig programında dizayn edilip Sentegen Biyoteknoloji firmasından sipariş verilmiştir. Primerler, son hacim 100 µM olacak şekilde ddH₂O ile dilüe edilerek çalışma stoğu olarak 10 µM primerler hazırlanmıştır. Klonlanmak istenen FUS geninin amplifikasyonu için kullanılan ileri (forward) ve geri (reverse) primerler tablo 5.1’de verilmiştir. PZR reaksiyonu için kullanılan bileşenler ve deney koşullarını gösteren reaksiyon detayları sırasıyla Tablo 5.8 ve 5.9’da verilmiştir.

Tablo 5.8: PZR bileşenleri.

PZR Bileşenleri	Stok Konsantrasyonu	Final Miktar	Hacim (25 µl)
Taslak (FUS gene pENTER)	15 ng/µl	45 ng	3 µl
CloneAmp HiFi PZR Premix (2X)	2X	1X	12.5 µl
10 Mm Forward P.	10 mM	0.5 mM	1.25 µl
10 mM Reverse P.	10 mM	0.5 mM	1.25 µl
ddH ₂ O	-	-	7 µl

Tablo 5.9: PZR Döngü Koşulları.

Aşama	Sıcaklık	Süre
Başlangıç Denatürasyon	98 °C	30 sn
30 cycle	Denatürasyon	98 °C
	Bağlanma	54 °C
	Uzatma	72 °C
Son uzatma	72 °C	10 dk
Son	+4 °C	∞

5.2.2. Agaroz Jel Elektroforezi

Elektroforez, DNA, RNA ve proteinleri, boyut ve yük gibi fiziksel özelliklerine göre ayırmak için elektrik akımı kullanan bir tekniktir. Boyutlarına göre fragmanlar farklı hızlarda hareket ederek ayrılmaktadırlar. Ortaya çıkan bantlar, daha sonra Ultraviyole ışık (UV) kullanarak görselleştirilmektedir.

PZR reaksiyonu ile amplifikasyonu yapılan DNA'yı analiz etmek için PZR ürünleri, %1'lik agaroz jelde görüntülendi. Bu amaçla, 1 gr agaroz, 100 ml TAE tamponu içinde çözüldü ve mikrodalgada erimesi sağlandı. Agaroz jel karışımı tanka dökülmeden önce DNA'yı jelde görüntülemek amacıyla son konsantrasyon 10 µg/ml olacak şekilde Syber Green boyası eklendi. Örnekler 6X DNA yükleme boyası ile karıştırılarak jele yüklendi ve 120 Volttan 30 dakika boyunca ayırma işlemi yapıldı. Elektroforez işleminden sonra agaroz jel, UV ışığı altında görüntülendi. PZR ürünlerinin boyutu, ticari bir marker kullanılarak belirlendi.

5.2.3. Agaroz Jelden DNA İzolasyonu

Klonlanmak istenen FUS geni, PZR reaksiyonu ile amplifiye edildi ve doğru büyüklükte olduğu doğrulanarak DNA'nın bulunduğu bantlar, bistrü yardımıyla jelden kesilerek 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Jelden DNA izolasyonu, MN Gel Extraction ve Purification kit kullanılarak yapıldı. FUS DNA'sı, 50 µl distile su ile elute edildi ve elde edilen DNA konsantrasyonu, Thermo Nanodrop One C Spektrofotometre'de ölçüldü.

5.2.4. Restriksiyon Enzimleri ile Plazmid ve DNA Kesimi

Restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesim işlemi, DNA dizisini spesifik bölgelerden tanıyarak kesen enzimlerin DNA ile inkübasyonu işlemi ile gerçekleştirilmektedir. Kesim işlemi sonunda oluşan yapışkan veya küt uçlu DNA'lar, spesifik olarak DNA Ligaz enzimi kullanılarak birbirlerine bağlanabilmektedirler.

Vektör ve amplifiye edilmiş FUS oligo DNA, BamHI-HF (R3136S) ve HindIII-HF (R3104S) restriksiyon enzimleri ile Tablo 5.10'daki koşullara uygun olarak 37 °C'de 1 saat boyunca kesilmiştir.

İnkübasyon sonunda DNA fragmentlerinin doğruluğu, %1'lik agaroz jel ile kontrol edilmiştir.

Tablo 5.10: Restriksiyon enzim kesimi koşulları.

Bileşenler	Hacim		Final Konsantrasyon
	Vektör (pET21a)	PZR Ürünü (FUS)	
DNA	5 uL	7 µl	1000 ng
10x Cut Smart Tampon	5 uL	5 µl	1X
BamHI-HF	1.5 uL	1.5 µl	1 uL (20 Unit)
HindIII-HF	1.5 uL	1.5 µl	1 uL (20 Unit)
Su	37 uL	35 µl	-
Toplam	50 uL	50 µl	

5.2.5. Kesilen DNA Ürünlerinin Ligasyonu

DNA ligasyonu, restriksiyon enzimleri ile kesilen iki DNA molekülünün, DNA Ligaz enzimi tarafından birleştirilmesidir. Ligasyon reaksiyonu Tablo 5.11'deki bileşenlere göre yapılmış ve reaksiyon gece boyunca 16°C'de inkübe edilmiştir. T4 DNA Ligaz enziminin inaktive edilmesi amacıyla reaksiyon 10 dakika boyunca 65°C'de bekletilmiş ve transformasyon işlemine kadar 4°C'de saklanmıştır.

Tablo 5.11: Ligasyon reaksiyon koşulları.

Bileşenler	Stok Konsantrasyon	Final Miktar	Hacim (20 µl)
Gen (FUS gen PZR ürünü)	17 ng/µl	5 ng	5.5 µl
Ligasyon Tampon	10X	1X	1 µl
Vektör	25.7 ng/µl	100 ng	4 µl
T4 DNA Ligaz	4 U/µl	0.8 U/µl	0.2 µl
ddH ₂ O	-	-	8.3 µl

5.2.6. Transformasyon

Bu tez çalışmasında kompetan hücre olarak *Escherichia coli* (*E. coli*) BL21DE3 suşu kullanılmıştır. Transformasyon için, kompetan hücreler -80°C derin dondurucudan alındı ve buz üzerinde çözünmesi sağlandı. *E.coli* hücrelerine (500 µl) 3 µl ligasyon ürünü ilave edilerek hafifçe karıştırıldı. Hazırlanan hücre ve ligasyon ürünü karışımı 30 dakika buz üzerinde inkübe edildi. 42°C’de 45 saniyelik inkübasyonun ardından hücreler 3 dakika süreyle buz üzerinde inkübe edilerek ısı şoku uygulandı. İnkübasyon sonunda hücrelere SOC besiyeri eklendi ve 60 dakika boyunca 37 °C’ de yatay çalkalama (200 rpm) ile hücrelerin büyümesi sağlandı. 150 µl hücre, 100 µg/µl ampisilin içeren LB agar platelerine yayıldı. Plateler 5 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra ters çevrilmiş durumda gece boyunca inkübasyon için 37°C sıcaklıktaki etüve kaldırıldı. İnkübasyonun ardından ligasyon reaksiyonunun başarılı bir şekilde gerçekleşip gerçekleşmediğini analiz etmek amacıyla 4 adet koloni seçildi ve bu koloniler kullanılarak koloni PZR yapıldı.

Koloni PZR reaksiyonu için seçilen koloniler 12.5 µl PZR karışımında çözüldü ve reaksiyon için kalıp olarak kullanıldı. Koloni PZR için bileşenler ve koşullar sırayla Tablo 5.12 ve Tablo 5.13’de listelenmiştir. PZR reaksiyonundan sonra elde edilen ürünler, %1 agaroz içeren agaroz jel ile analiz edilmiştir.

Tablo 5.12: Koloni PZR reaksiyon bileşenleri.

Bileşenler	Stok Konsantrasyon	Final Miktar	Hacim (12.5 µl)
Tek koloni (Kalıp olarak)	-	-	-
MyTaq Reaksiyon Tampon	5X	1X	2.5 µl
Forward Primer	10 µM	0.4 µM	0.5 µl
Reverse Primer	10 µM	0.4 µM	0.5 µl
MyTaq DNA Polimeraz	5 U/µl	1 U/µl	0.25 µl
ddH ₂ O	-	-	8.75 µl

Tablo 5.13: Koloni PZR reaksiyon koşulları.

Aşama		Sıcaklık	Zaman
Başlangıç Denatürasyon		95 °C	10 dk
35 döngü	Denatürasyon	95 °C	15 sn
	Bağlama	54 °C	15 sn
	Uzama	72 °C	1 dk
Son Uzama		72 °C	10 dk
Final		+4 °C	∞

5.2.7. Plazmid İzolasyonu

Ligasyon ürününü taşıdığı koloni PZR ile doğrulanan koloniler, 100 µg/µl ampicilin içeren 50 ml sıvı LB besiyerine aktarıldı ve gece boyu çalkalayıcıda 37°C’ de inkübasyon gerçekleştirildi. Gece boyu büyüyen bakteri kültürü 4000 rpm’de 10 dakika santrifüjlendi. Elde edilen bakteri pelletinden ZymoPure II Plazmid Isolation Midiprep Kiti (D4200S) kullanılarak plazmid DNA izolasyonu yapıldı. Plazmidler 150 µl ddH₂O ile elute edildi. Elde edilen plazmid DNA konsantrasyonu, UV-Vis Spektrofotometre ile ölçüldü.

- Plazmid Dizilemesi

Plazmit izolasyonu sonucunda elde edilen plazmid DNA’sı, insert genin plazmid içindeki konumunun doğrulanması için sekanslanması amacıyla BM Labosis şirketine gönderilmiştir. Sekanslama için gerekli olan primerler, klonlama aşamasında kullanılan FUS Forward ve Reverse primerleridir. Şekil 6.4’de sekanslama sonucu gösterilmiştir.

Dizileme işlemi sonucunda FUS geninin plazmid içine başarılı bir şekilde yerleştiği belirlendikten sonra protein ekspresyonu için kompetan *E.coli* hücreleri, sekanslama işlemi ile doğrulanan plazmitlerle transforme edilmiştir.

5.2.8. Protein Ekspresyonu

Ekspresyon vektörünü (Ccdc124 için pQE81L vektörü, FUS için pET21a vektörü) taşıyan BL21DE3 *E.coli* suşu, ampisilin (100 µg/ µl) içeren 5 ml LB besiyeri ile 37°C 220 rpm çalkalama koşullarında gece boyu büyütüldü. Ertesi gün, başlangıç kültürü için OD600 değeri 0.5 olacak şekilde gece boyu kültürden alınması gereken kültür hacmi hesaplandı. Gece boyu başlangıç kültürü, 100 µg/µl ampisilin içeren 20 ml LB besiyerine içinde inokule edildi. Bu aşamada gece boyu kültürden %50 gliserol stok hazırlandı ve -80 °C’de depolandı. Ekspresyon kültürü 600 nm’de absorbans 0.6-0.8 değerine ulaşana kadar büyütüldü ve protein ekspresyonunu indüklemek için gerekli olan IPTG miktarı hesaplanarak *E.Coli* kültürüne eklendi. Bakteri kültürleri 24 saat boyunca 180 rpm ile çalkalanarak FUS proteini için 30 °C ve Ccdc124 proteini için 16°C’de inkübe edildi. 24 saatlik protein üretiminin ardından kültürler, 5000 rpm’de 15 dakika santrifüj edildi ve bakteri hücreleri çöktürüldü.

5.8.2.1. Hücre Lizizi

Hücre lizisi, eksprese edilen proteinlerin saf ve verimli şekilde eldesi için hücrenin parçalanması ve hücre içeriğinin açığa çıkarılması işlemidir. Hücre lizisi, hem kimyasal olarak B-PER liziz solüsyonu ile hem de mekanik olarak ultrasonik ses dalgaları yoluyla sonikasyon işlemi ile gerçekleştirildi. Pelletler, 1 gr pellet için optimizasyonu yapılan proteaz inhibitörü, lizozim, DNaz bileşenleri ile bir araya getirilen B-PER liziz solüsyonu ile resüspanse edildi. Tablo 5.14 Liziz işlemi için kullanılan bileşenleri göstermektedir. Süspanse hücrelerin, buz üzerinde yarım saat çalkalanarak inkübe edilmesinin ardından, sonikasyon işlemi 10 saniye aralıklarla 10 döngü gerçekleştirildi. Elde edilen hücre lizatı, 4 °C’de ve 10.000 rpm’ de 15 dakika santrifüj işlemiyle fraksiyonlarına ayrıldı ve çözünür proteinleri içeren supernatant ve çözünmeyen (insoluble) proteinler ise pellet olarak hücre kalıntıları ile elde edildi.

Tablo 5.14: Liziz tampon bileşenleri.

Bileşenler	Hacim (4 ml)
B-PER Solüsyon	4 ml
DNaz (2500 units/ml)	8 µl
Lizozim (50 mg/ml)	8 µl
Proteaz İnhibitör	400 µl

Çözünür durumdaki Ccdc124 proteinleri liziz aşamasından sonra bakteriyel hücre proteinlerinden direkt olarak katyon iyon değiştirici ardından afinite kromatografi ile saflaştırılırken çözünmeyen durumda olan FUS proteinleri 3 ve 8 M üre içeren çözünme tamponu ile çözünür hale getirilip afinite kromatografi ile saflaştırma yapılmıştır.

5.2.9. Protein Saflaştırma

Rekombinant proteinler, spesifik özelliklerindeki (yük, boyut, hidrofobisite, ligand spesifisite) farklılıklara göre yapı, fonksiyon veya protein-protein etkileşimlerinin karakterizasyonu amacıyla kromatografi teknikleri kullanılarak saflaştırılmaktadır.

Proteine eklenen etiketler (tags), rekombinant proteinlerin afinite kromatografisi (AC) ile saflaştırılmasını sağlar. Diğer bir saflaştırma yöntemi iyon değiştirici kromatografisinde (IEX) ise ayırım, proteinlerin net yüzey yüklerindeki farklılıklarına göre yapılmaktadır.

5.2.9.1. İmmobilize Edilmiş Metal Afinite Kromatografisi (IMAC)

Afinite kromatografisi, biyokimyasal molekülleri (örneğin proteinler) bir karışımdan (hücre lizatı veya protein karışımı) moleküller arası spesifik etkileşimler yoluyla (örneğin antijen-antikor) proteinin belirli bir ligandla etkileşiminden faydalanarak ayırmak için kullanılan bir tekniktir.

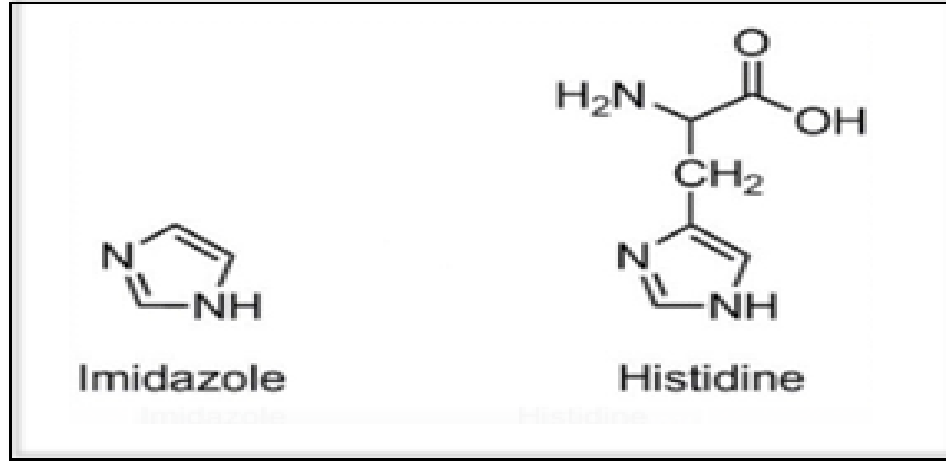
İmmobilize edilmiş metal afinite kromatografisi (IMAC) ise bazı aminoasitlerin (özellikle histidin) geçiş metallerle (Ni^{+2} , Zn^{+2} , Co^{+2}) olan spesifik etkileşimi kullanılarak ayırımın yapıldığı bir afinite kromatografi çeşididir. Metal iyonları farklı

şelatlayıcı ligand (IDA, NTA) kullanılarak rezin matrisine (agaroz, sefaroze) bağlanır ve metal iyonu ile spesifik olarak etkileşen proteinler ayrıştırılır. IMAC uzun ömürlü olması, hızlı ayırma, rejenerasyon ve proteolitik degradasyona karşı stabilite özelliği ile protein ayırma kromatografik yöntemler arasında güçlü bir teknik olarak yer almaktadır.

Saflaştırma aşamalarında 1 ml ve 5 ml Econofit Nuvia IMAC Kolon (BioRad) ve ÄKTA Avant ile ÄKTA Pure kromatografi sistemleri kullanılmıştır. %20 etanol içinde saklanan kolon saflaştırmanın ilk adımında, 0.45 µm filtre kullanılarak sterilize edilen ddH₂O su ile 1 ml/dk ve 5 ml/dk hız ile kolon hacminin (CV) yaklaşık beş katı hacminde yıkanarak etanolün uzaklaştırılması sağlanmıştır. Ardından düşük imidazol konsantrasyonu içeren bağlama tamponu (20 mM Na-P, 150 mM NaCl, 20 mM İmidazol, pH:7.4) sisteme verilerek kromatografi kolonu şartlanmış ve saflaştırma işlemine hazır hale getirilmiştir.

Bakteri proteinleri ve ekspresyonu yapılan spesifik çözümlü proteinleri içeren süpernatant, 0.22 µm filtreden geçirilip 1:1 oranında bağlama tamponu ile seyreltilerek sisteme yüklenmeye hazır hale getirilmiştir. Bu aşamada, SDS-PAGE için örnek ayrılmış, saflaştırma aşamasının başlangıcı ve sonunda elde edilen proteinler %12 SDS-PAGE ile karşılaştırılmıştır. Proteinleri içeren süpernatant, 5 ml kolon için 2.5 ml/dk hızla, 1 ml kolon için ise 0.3 ml/dk ve 0.5 ml/dk hızla sisteme verilmiş, kolona bağlanmayan proteinler saflaştırma sisteminin fraksiyon kolektör kısmında SDS-PAGE analizi için toplanmıştır. Tüm örnek sisteme yüklendikten sonra, yıkama işlemi bağlama tamponu ile 10 kolon hacminde (CV) yapılarak kolona spesifik olmayan biçimde bağlanan kontaminant proteinlerden (bakteri hücresel proteinlerden) uzaklaştırılması sağlanmıştır. Yıkama işlemi sistemdeki UV1 mAU değerinin azalarak belli bir değere düşmesi (20 mAU) ile tamamlanarak elüsyon adımına geçilmiştir. Elüsyon işlemi, hem step hem de lineer şekilde gradyan olarak elüsyon tamponu (20 mM Na-P, 150 mM NaCl, 300 mM İmidazol pH:7.4) kullanılarak 1 ve 5 ml/dk hızla yapılmıştır. Bağlanan histidin etiketli proteinleri kolondan ayırmak için, elüsyon tamponunda yüksek konsantrasyonda bulunan imidazolün histidin aminoasidine yapısal benzerliğinden faydalanılır. İmidazol, metal yüklü kromatografi ortamına bağlanma amacıyla proteinlerle rekabet ederek proteinlerin yerini alır (Şekil 5.4). Böylece his etiketli proteinler, imidazol ile yer değiştirerek kolondan ayrılır ve fraksiyon kollektörde 1.2 ml veya 5 ml hacminde toplanır.

Saflaştırma aşamasının tüm adımlarında elde edilen proteinler, konsantrasyonları ölçülerek %12'lik SDS-PAGE ile analiz edilmiş ve proteinle özgü antikor kullanılarak Western Blot ile analizi yapılmıştır. Elektroforez için gerekli olan hacim elüt edilen proteinlerden alındıktan sonra, proteinler +4 °C'de analiz deneyleri için saklanmıştır. SDS-PAGE jelindeki protein bantları ile bir sonraki saflaştırma adımı için elüsyonlar seçilerek tampon değişimi ve konsantre etme işlemi yapılmıştır.



Şekil 5.4: İmidazol ve histidin aminoasidinin yapısal benzerliği.

5.2.9.2. Protein Tampon Değişimi ve Konsantre İşlemi

Elüt edilen pürifiye proteinlerin, bir sonraki kromatografi ve analiz işlemleri için hem içinde bulunduğu elüsyon tamponu değiştirilmeli hem de konsantre hale getirilmelidir. Konsantrasyon işlemi, yüksek santrifüj hızında çalışabilen konsantratörler yardımıyla gerçekleştirilmiştir. Konsantratör, özel bir filtreleme membranı (selüloz, polietersülfon) ile ikiye bölünmüş bir tüptür. Konsantre edilecek proteinin boyutuna bağlı olarak, filtre membranının porlarına uygun olacak şekilde bir MWCO (Molecular Weight Cut-Off) değeri seçilir.

FUS (68 kDA) ve Ccdc124 (32 kDA) proteinleri için 5 kDA, 10 kDA ve 20 kDA boyutlarında 0.5 ml, 15 ml ve 20 ml konsantratörler (Thermo Scientific, Merck Millipore, Sartorius) kullanılmıştır. Konsantre edilmek istenen proteinin hacmine ve moleküler ağırlığına uygun olarak seçilen tüpler, santrifüjde dakikalardan saatlere varan sürelerde döndürülerek, membranın üst kısmında kalan pürifiye protein konsantre edilmiştir. Proteinler konsantre edilirken aynı zamanda bir sonraki adım için

gerekli olan tampon solüsyon, örnek üzerine örneğin hacminin yaklaşık 6 katı miktarda eklenerek, tampon değiştirme işlemi gerçekleştirilmiştir. Konsantrasyon ve tampon değişimi sonunda protein konsantrasyonu Nanodrop One C 200 cihazında 1mg/ml = 1 Abs'ye göre kontrol edilmiştir.

5.2.9.3. İyon Değişimi Kromatografisi

İyon değişim kromatografisi, yüklü biyomoleküllerin ayırımında kullanılan bir kromatografi çeşididir. Biyomoleküller sahip oldukları yüke göre, pozitif ve negatif yüklü rezine bağlanarak saflaştırılabilmektedir.

Ccdc124 proteinin pI değeri 9,4 (Expasy, Compute pI/MW) olduğu için bu değer altındaki pH değerlerde pozitif yükle yüklenecek ve eksi yüklü bir ortama bağlanacaktır. 50 mM Sodyum Asetat Trihidrat pH:6 tamponu içine alınan Ccdc124 proteinin iyon değiştirici saflaştırma adımı için, negatif yüklü agaroz matrikse sahip HiTrap Capto S kolon (1 ml, Cat No: 17546851, Cytiva) ve kromatografi sistemi olarak ÄKTA Avant 150 kullanılmıştır.

HiTrap Capto S kolon, bağlama tamponu ile 1ml/dk hızda 5 kolon hacminde (CV) yıkanarak kolonun saflaştırma işlemine hazır hale gelmesi sağlanmıştır. Tampon değiştirme işlemi ile sodyum asetat tamponu içinde bulunan Ccdc124 proteini, 0.5 ml/dk hızla sisteme verilmiştir. Örnek yükleme aşamasında zıt yüklü proteinler, negatif yüklü ortamın iyonik gruplarına bağlanarak kolon üzerinde yoğunlaşır. Yüksüz proteinler veya kolonun negatif iyonik grubuyla aynı yüke sahip olanlar, kolona bağlanmadan cihazın fraksiyon kolektör kısmında toplanmıştır. Tüm örnek sisteme yüklendikten sonra 1 ml/dk hızla bağlama tamponu ile yıkama işlemi yapılmış, spesifik olmayan şekilde bağlanan proteinler kolondan uzaklaştırılmıştır. İyon değiştirici kromatografide kullanılan elüsyon tamponları genellikle tuz iyonları içermektedir. Bu saflaştırmada da negatif yüklü rezin için Na (+) iyonunun, kolona bağlanan pozitif yüklü proteinlerle yer değiştirmesi amacıyla 50 mM Sodyum Asetat Trihidrat, 1 M NaCl pH:6 tamponu kullanılmıştır. Elüsyon işlemi 1 ml/dk hızda 5 kolon hacmi ile tamamlanmış 1.2 ml hacminde pürifiye edilen proteinler fraksiyon kolektörden elde edilmiştir.

Saflaştırma aşamasının tüm adımlarında elde edilen proteinler %12'lik SDS-PAGE ile analiz edilmiştir. Elektroforez için gerekli olan hacim elüt edilen proteinden

alındıktan sonra, proteinler +4 °C'de saklanmıştır. SDS-PAGE jelindeki pürifiye protein bantlarına göre sonraki analizler için konsantre etme ve tampon değiştirme işlemleri yapılmıştır.

5.2.9.4. FUS İnküzyon Cisimcikleri (IB) Kromatografi (IMAC)

E.coli'de eksprese edilen histidin etiketli proteinler, biyolojik olarak işlevsel çözünür proteinler ve inküzyon cisimcikleri (inclusion body) olarak iki ana formda üretilebilir. İnküzyon cisimcikleri, biyolojik aktiviteye sahip olmayan, ancak genellikle rekombinant proteinin yüksek ekspresyonuna izin veren çözünmeyen protein agregatlarıdır. İnküzyon cisimcikleri olarak ifade edilen proteinlerin biyolojik işlevini eski haline geri getirmek için üre veya guanidin-HCl ile çözündürme, saflaştırma ve yeniden katlama işlemleri gerekmektedir (Affinity Chromatography Handbook).

E.coli BL21DE3 suşunda eksprese edilen FUS proteini, inküzyon cisimcikleri halinde üretilmiştir. Ekspresyon aşamasında yapılan sıcaklık, besiyeri, inkübatör rpm değeri ve protein sentez süresi gibi yapılan optimizasyonlarla işlevsel halde çözünür protein elde edilememesi sebebiyle inküzyon cisimciklerinden çözünür protein eldesi protokolü uygulanarak pürifiye FUS proteini elde edilmiştir (TÜBİTAK BKTM Protein Karakterizasyon Lab Protokol 1).

İnküzyon cisimcikleri halindeki FUS'un eldesi amacıyla, 1 gram *E.coli* bakteri hücre pelleti için 10 ml Sonikasyon Tampon (50 mM Tris-HCl (pH:8), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mg/ml Lizozim) ile liziz işlemi uygulanmıştır. Resüspanse edilen hücreler, buz üzerinde yarım saat çalkalanarak inkübe edilmesinin ardından sonikasyon işlemi 10 saniye aralıklarla 10 döngü şeklinde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen hücre lizatı, +4°C' de ve 10.000 rpm'de 30 dakika santrifüj işlemiyle fraksiyonlarına ayrılmıştır. Rekombinant FUS proteini çözünür halde süpernatantta bulunmadığı için, bakteriyel proteinleri içeren süpernatant +4 °C 'de SDS-PAGE analizi için depolanmıştır. İnküzyon cisimcikleri halinde pellette bulunan FUS proteini, bir katotrofik ajan olan ürenin 3 ve 8 M konsantrasyon içeren tamponu ile çözülmüştür (50 mM Tris-HCl pH:8, 250 mM NaCl, 5 mM β-Merkaptoetanol). Üre içeren tamponla pelletin resüspanse edilmesinin ardından beta merkaptoetanol, son hacim 5 mM olacak şekilde doğru olmayan disülfid bağlarının indirgenmesi amacıyla

sonradan eklenmiştir. Çözünmez formdaki FUS proteininin +4 °C’de gece boyunca çalkalayıcıda üre ile çözünmesi sağlanmış ve inkübasyon sonunda çözünür ve çözünmeyen proteinler, +4 °C’de ve 18.000 g (9.960 rpm) 45 dakika santrifüj işlemiyle ayrılmıştır. Üre ile çözünür hale gelen FUS proteinini, 3.1.2 başlığındaki protokol kullanılarak afinite kromatografisi ile pürifiye edilmiştir. Fakat bu aşamada kullanılan bağlama ve elüsyon tampon bileşenlerine son konsantrasyonu 3 ve 8 M olacak şekilde hesaplanan üre eklenerek, saflaştırma süreci boyunca FUS proteininin hızlı şekilde doğru olmayan katlanması önlenmiştir. Saflaştırma aşamasında elde edilen tüm protein fraksiyonları, %12’lik SDS-PAGE ve WB ile kontrol edilmiştir.

5.2.10. SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

SDS-PAGE, proteinlerin güçlü bir deterjan (SDS) varlığında yüklerinin eşitlendiği (negatif) ve moleküler ağırlıklarına göre ayrıldıkları bir elektroforez çeşididir. Proteinlerin jel elektroforezi ile ayrılması, Coomassie boyama veya Western Blotting gibi ek analitik yöntemlerle takip edilir.

Tez boyunca yapılan tüm çalışmalarda %12’lik SDS-PAGE kullanılmıştır. Tablo 5.15’de SDS-PAGE jeli için gereken bileşenlerin listesi verilmiştir. Ekspresyon optimizasyonu sırasındaki örnekler, saflaştırma aşamasının tüm fraksiyonları, tampon değişimi ve konsantrasyon işleminden sonra kontrol için tüm proteinler SDS-PAGE ile kontrol edilmiştir. Proteinler, 4X ve 2X SDS yükleme boyası ile son hacim 1X olacak şekilde karıştırılıp, 95°C ’de 5 dk inkübasyonun ardından jele yüklenmiştir. 120 V, 90 dk yürütme işlemi ardından jel, Coomassie boyası ile 30 dk boyanmış, ardından destaining solüsyonu ile boya uzaklaştırılarak proteinler görünür hale getirilmiştir.

Tablo 5.15: %12 SDS-PAGE jel bileşenleri.

Bileşenler	Separation gel (12%)	Stacking gel (4%)
dH ₂ O	1.6 ml	0.68 ml
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	2 ml	----
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	----	0.13 ml
%30 Akrilamid/Bisakrilamid	1.7 ml	0.17 ml
%10 SDS	0.05 ml	0.01 ml
%10 Amonyum Persülfat (APS)	0.05 ml	0.01 ml
TEMED	0.002 ml	0.001 ml

5.2.11. Western Blot

Western Blot, SDS-PAGE işlemi ile ayrılan proteinlerin, proteinlere özgü antikorlarla spesifik olarak gösterildiği bir tekniktir.

SDS-PAGE ile moleküler ağırlığına göre ayrılan Ccdc124 ve FUS proteinlerin jeli, transfer tamponu ile önceden ıslatılmış nitroselüloz membrana 30 dk boyunca transfer edilmiştir. Transfer sonunda membran, %1 veya %5 BSA solüsyonu ile 1 saat bloklanmıştır ve ardından Ccdc124 proteini için anti-Ccdc124 (27106-1-AP, ProteinTech) antikor, FUS proteini için anti-FUS antikor (4H11, Santa Cruz) 1:1000 oranında %5 BSA dilüsyonu ile membranların üzerine eklenmiştir. Gece boyunca +4 °C’de çalkalanarak inkübasyon sonunda, birincil antikorların uzaklaştırılması için 1X PBS-T tamponu ile üç kez beşer dakika membranlar yıkanmıştır. Ccdc124 proteini için ikincil anti-tavşan antikor (31340, Thermo Scientific) 1:20000 oranında, FUS proteini için ikincil anti-fare antikor (A9044, Sigma) 1:4000 oranında %5 BSA solüsyon dilüsyonu ile membranların üzerine eklenmiştir. İkincil antikorlar membranlar ile yaklaşık 1 buçuk saat oda sıcaklığında muamele edildikten sonra üç kez beşer dakika 1X PBS-T tamponu ile yıkayıp ikincil antikorlar uzaklaştırılmıştır.

Ccdc124 protein görüntülenmesi için ikincil anti-tavşan antikorunda bulunan alkalin fosfat enziminin substratı NBT/BCIP solüsyonu, FUS için ikincil anti-fare antikorundaki horseradish fosfat enziminin substratı trietanolamin solüsyonu, 4C1N tableti ve H₂O₂ karışımı membranların üzerine eklenmiş ve protein bantları görüntülenmiştir.

Her iki proteinde de yer alan 6x-His etiketine karşı ise anti-His antikoru (A7058, Sigma) 1:10000 oranında %1 BSA solüsyonu ile dilüe edilip eklenmiş yaklaşık bir buçuk saat inkübasyon sonunda 1X PBS-T ile üç defa beşer dakika yıkanarak bağlanmayan antikorların uzaklaştırılması sağlanmıştır. Anti-His anikoru konjuge halde bulunan HRP enziminin substratına karşı hazırlanan 10 ml trietanolamin solüsyonu, bir adet 4C1N tableti ve 300 µ H₂O₂ karışımı, membran üzerine dökülmüş ve çalkalayıcıda inkübasyona bırakılmıştır. 15 dk inkübasyon süresi ardından Western membranı, Azure görüntüleme sisteminde incelenerek bantlar tespit edilmiştir.

5.2.12. FUS Proteini In vitro Yeniden Katlama

SDS-PAGE ve Western Blot analizi ile elde edilen saflaştırılmış FUS protein elüsyonları, elüsyon hacminin 20 katı in vitro yeniden katlama tamponu ile seyreltilmiştir. In vitro yeniden katlama tamponu içinde 3 gün boyunca +4 °C’de manyetik karıştırıcı üzerindeki FUS proteini, konsantratörler ile konsantre edilerek katlama tamponu 1X PBS tamponuna tampon değişimi yapılmıştır. Tampon değişimi sonunda var olan FUS proteini SDS-PAGE ve WB ile analiz edilmiştir.

5.2.13. NMR (Nuclear Magnetic Resonance)

Pürifiye Ccdc124 ve FUS proteinin peptit bağlarındaki tek boyutlu Hidrojen (¹H) NMR Spektroskopisi analizi için soğuk proba (cryo probe) sahip Bruker 700 MHz NMR cihazı kullanılmıştır. Pürifiye FUS ve Ccdc124 proteini 400 µl hacimde sırasıyla 40.44 nM ve 78.13 nM konsantrasyonda olmak üzere NMR pipeti ile NMR Shigemi tüpüne aktarılmıştır. Tüplerin içine son hacimde %10 konsantrasyonda olmak üzere 55 µl D₂O eklenerek deney başlatılmıştır.

Sistemin sıcaklığı 295 K (22 °C) ayarlanmasının ardından manyetik alanın homojen şekilde yayılmasını takiben shim coil ayarları yapılarak ‘EFP’ komutuyla örnekler NMR probu ile sisteme yüklenmiştir.

TopSpin 4.1.3 yazılımı kullanılarak tarama sayısı 64 olan örnekten gelen sinyal pikleri ppm spektrumunda gözlenmiştir.

5.2.14. Far Western Blot

Far Western Blot, standart Western Blot'ta membran üzerindeki bir proteini moleküler ağırlığına göre saptamak yerine bait proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre dağıldığı konumlarda immobilize edilmiş prey proteinlerini saptayabilir.

Standart SDS-PAGE sonrasında Western Blot membranında bulunan prey proteinlerin denatüre ve renatüre edilmesi sonrasında eklenen bait proteinlerle etkileşimin incelendiği protein protein etkileşim tekniğidir. SDS-PAGE'in hazırlanması sırasında, proteinler Laemmli jel yükleme tamponu ile disülfid bağları kırılarak indirgenip denatüre edilmektedir. Fakat pek çok protein-protein etkileşimi, indirgeyici ve denatüre koşullar altında bozulan ikincil ve üçüncül yapılara bağlı olduğu için, bir SDS-PAGE yükleme tamponu ile muameleden sonra varsa çok az bir protein kompleksinin devam etmesi olasıdır. Bu nedenle proteinlerin denatüre ve renatüre edilmesi etkileşim cevabının doğruluğu açısından önemlidir.

Far Western Blot tekniğinde SDS-PAGE ile ayırımın ardından membrana transfer edilen proteinler, genellikle üre ile denatüre edilir daha sonra ürenin konsantrasyonu gradyan şeklinde azaltılarak renatüre edilmektedir. Böylece proteinlerin ikincil ve üçüncül yapılarının kazanılmasına izin verilmektedir.

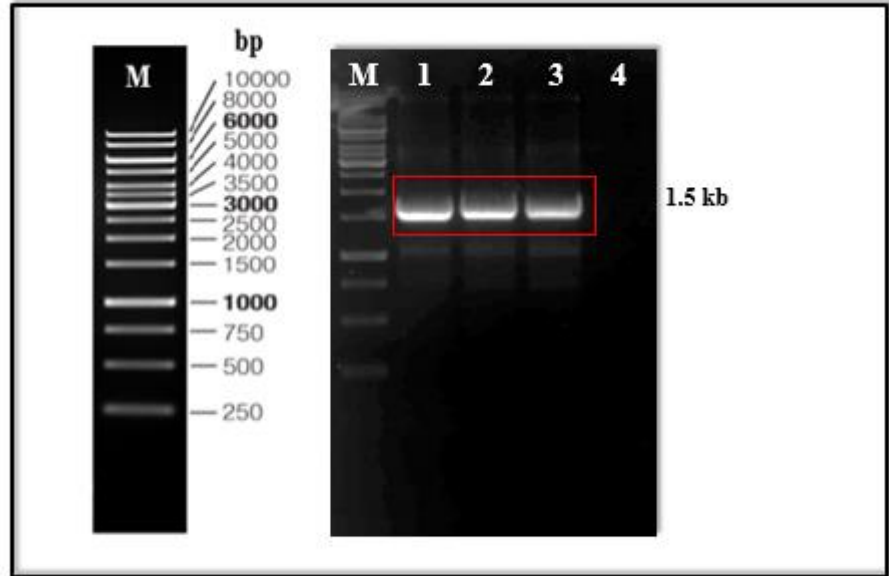
Bu tez çalışmasında FUS ve Ccdc 124 sırayla ayrı jellerde, prey proteinleri olarak SDS-PAGE ile ayrılmış ardından transfer işlemi ile nitroselüloz membrana aktarılmıştır. FUS (3 M üre konsantrasyonda denatüre durumda bulunduğu için) ve Ccdc124 proteinleri, protokoldeki 6 M üre içeren denatürasyon tampon yerine 3 M üre içeren tampon ile başlanarak, 1 M, 0.1 M olarak azaltılmış son olarak da hiç üre içermeyen tamponda gece boyu inkübe edilerek renatürasyon sağlanmıştır. Renatüre edilerek native yapısını alan proteinlere, ayrı jellerdeki FUS ve Ccdc124 bait proteinleri eklenmiş gece boyunca +4 °C çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda membran bağlanmayan FUS ve Ccdc124 proteinleri uzaklaştırılarak membran birincil antikolarla ile gece boyu ve ikincil anti-tavşan antikoru ile 2 saat muamele edilerek HRP ve AP enzimlerinin substratları ile protein bantları tespit edilmiştir.

6. SONUÇLAR

6.1. Gen Klonlaması

- PZR

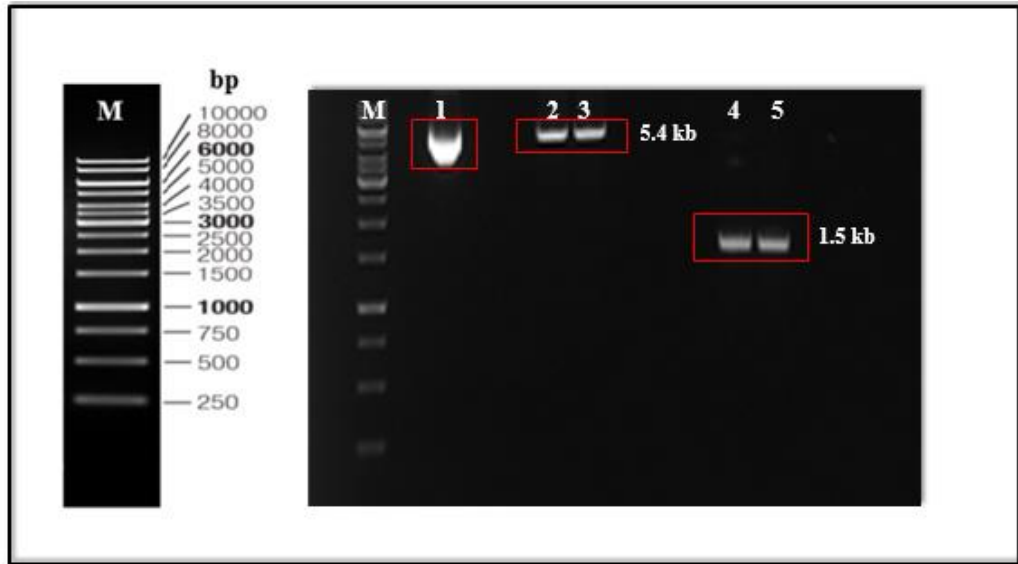
Ccdc124 proteininin Bio-ID analizi ile gösterilen olası etkileşim partneri FUS proteininin eldesi için öncelikle genin çoğaltılması amacıyla PZR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Laboratuvarımızda yapılan daha önceki bir çalışmada FUS geni pENTER plazmidine klonlanmış olup, plazmid bu tez çalışmasında kalıp (template) olarak kullanılmıştır. Primerlerin, FUS geninine bağlanma aşamasındaki sıcaklık, NEB Bio Calculator programı ile hesaplanarak reaksiyonda bu değer (54°C) kullanılmıştır. PZR ürünleri, %1'lik agaroz jel ile analiz edilmiştir (Şekil 6.1). FUS geninin boyutunun (1596 bp) jelde doğrulanmasının ardından örnekler agaroz jelden ekstrakte edilmiş ve enzim kesim reaksiyonu için saflaştırma işlemine tabi tutulmuştur. Pürifiye edilen PZR ürünlerinin konsantrasyonu 260 nm absorbans değeri ile ölçülerek 145 ng/μl olarak bulunmuştur.



Şekil 6.1: FUS geninin PZR amplifikasyonu. (M) GeneRuler 1 kb DNA Ladder, (1-3) Amplifiye edilmiş FUS bantları. Kırmızı şerit 1596 bp boyutundaki FUS DNA'sına denk gelmektedir.

- Plazmid ve FUS geninin Restriksiyon Enzimleri ile Kesimi, Ligasyonu, Transformasyonu

C terminal ucunda 6X-His etiketi bulunan pET21-a vektörü ve PZR reaksiyonu ile amplifiye edilmiş FUS geni, ligasyon reaksiyonu için yapışkan uçlar oluşturması amacıyla BamHI-HF ve HindIII-HF enzimi ile kesilmiştir. Restriksiyon enzim kesimini doğrulamak için kesim ürünleri %1'lik agaroz jele yüklenmiştir. Şekil 6.2 enzim kesimi sonuçlarını göstermektedir. Kesim reaksiyonu gerçekleştirilmeyen vektör DNA'sı da jele eklenmiş ve kontrol olarak kullanılmıştır. Agaroz jel sonucunda FUS (1.5 kb) ve pET21-a (5.4 kb) vektörünün kesim sonrası bant boyutları doğrulanmıştır.

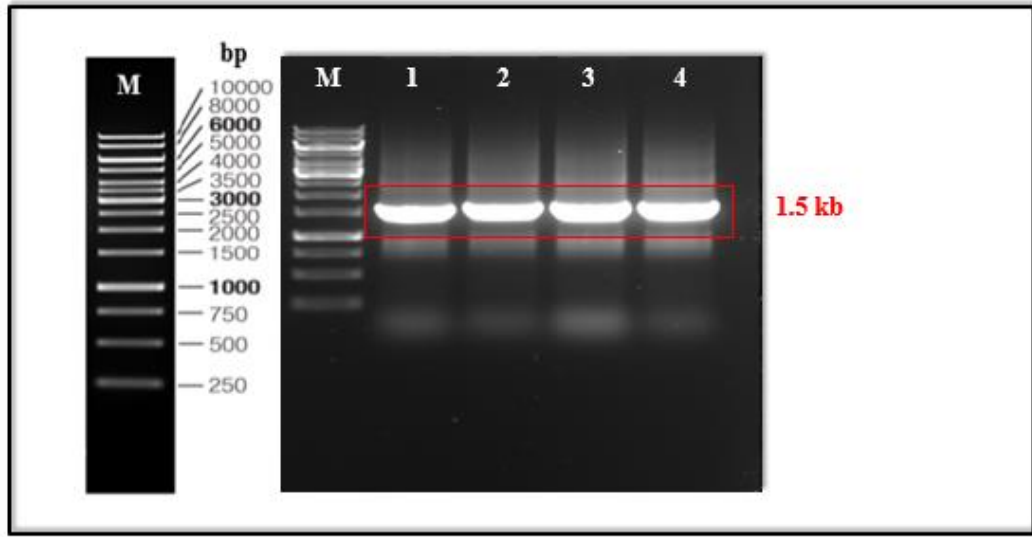


Şekil 6.2: Restriksiyon enzim kesim reaksiyonu sonucu DNA'ların jel görüntüsü. (M) GeneRuler 1 kb DNA Ladder, (1) Enzim ile kesilmeyen pET21-a plazmidi (2-3) Enzim ile kesilmiş Pet21a plazmidi (4-5) Enzim ile kesilmiş FUS DNA'sı. Plazmid ve insert genin boyutu jelde doğrulanmıştır. Kırmızı şeritler, vektör ve insert genin beklenen bant yerlerini göstermektedir (5443 bp ve 1596 bp).

Restriksiyon enzimleri ile kesilen FUS geni ve pET21-a plazmitinin agaroz jelden ekstraksiyonu, PZR Clean Up kiti ile yapılmış ve DNA'lar ligasyon deneyi ile birleştirilmiştir. Kit ile pürifiye edilen DNA'ların konsantrasyonu A260/A280 oranına göre hesaplanarak pET21-a: 25.17 ng/μl ve FUS DNA'sı ise 17 ng/μl olarak bulunmuştur. FUS geninin, pET21-a plazmidine ligasyonu fosfodiester bağ

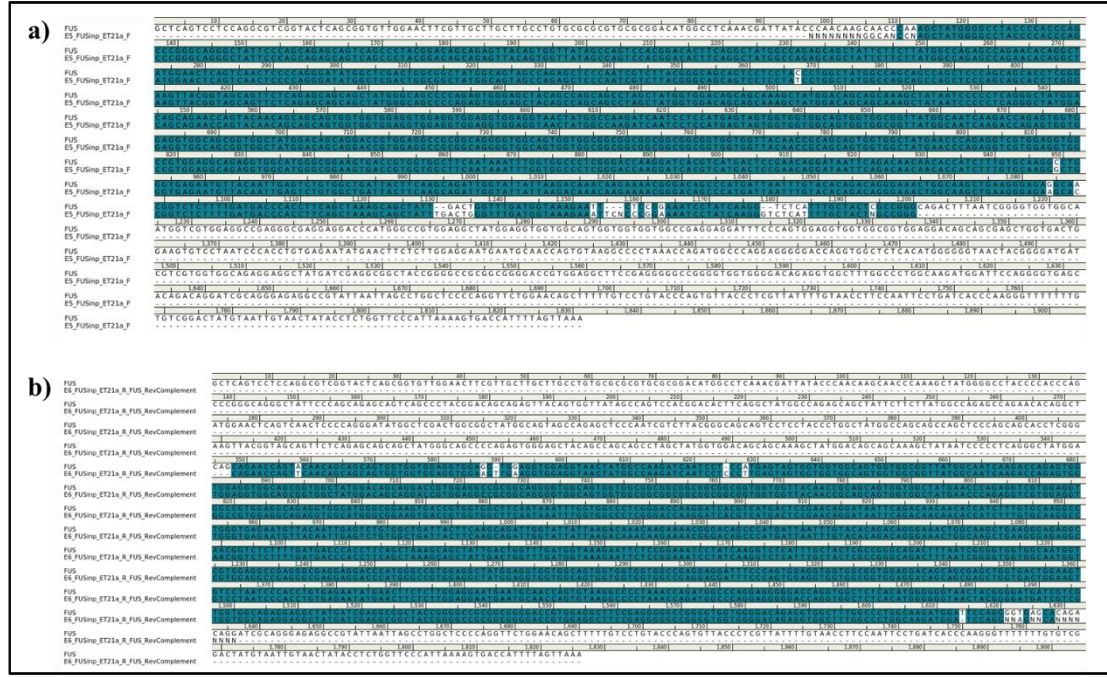
oluşumunu kataliz eden T4 DNA Ligaz ile Tablo 5.11’ deki koşullara göre gerçekleştirilmiştir.

16°C gece boyu inkübasyonu takiben ligasyon ürünü, BL21DE3 bakteri hücrelerine transforme edilerek ampisilin içeren LB agar besiyerinde gece boyu büyütülmüştür. Transformasyonun etkinliğinin kontrol edilmesi amacıyla ampisilin-LB agar platelerinden rastgele dört koloni seçilerek klonlama primerleri ile koloni PZR yapılmıştır. Koloni PZR ürünleri %1’lik agaroz jelde yürütülmüştür. Şekil 6.3 koloni PZR sonuçlarını göstermektedir.



Şekil 6.3: FUS geninin koloni PZR amplifiye sonuçları. (M) GeneRuler 1 kb DNA Ladder, (1, 2, 3, 4) PZR ürünleri. Kırmızı şerit ile işaretlenen alan, doğru boyutta amplifiye olan FUS DNA’sını göstermektedir.

Koloni PZR sonucunda seçilen dört koloninin de FUS genini taşıdığı doğrulanmış, plazmid izolasyonu amacıyla koloniler, ampisilin içeren sıvı besiyerinde gece boyu 37°C etüvde çalkalanarak büyütülmüştür. İnkübasyon sonunda plazmitler, MN Plazmit izolasyon kiti ile izole edilmiş ve FUS geninin varlığının kantitatif doğrulanması amacıyla dizilenmek üzere BM Labosis firmasına gönderilmiştir. Şekil 6.4 yapılan dizi analizi sonucunda FUS geninin doğru bölgeye yerleştiğinin FUS geninin doğru bölgeye yerleştiğinin doğrulanması amacıyla dizilenmek üzere BM Labosis firmasına gönderilmiştir. Şekil 6.4 yapılan dizi analizi sonucunda FUS geninin pET21-a vektörüne doğru şekilde klonladığını göstermektedir.



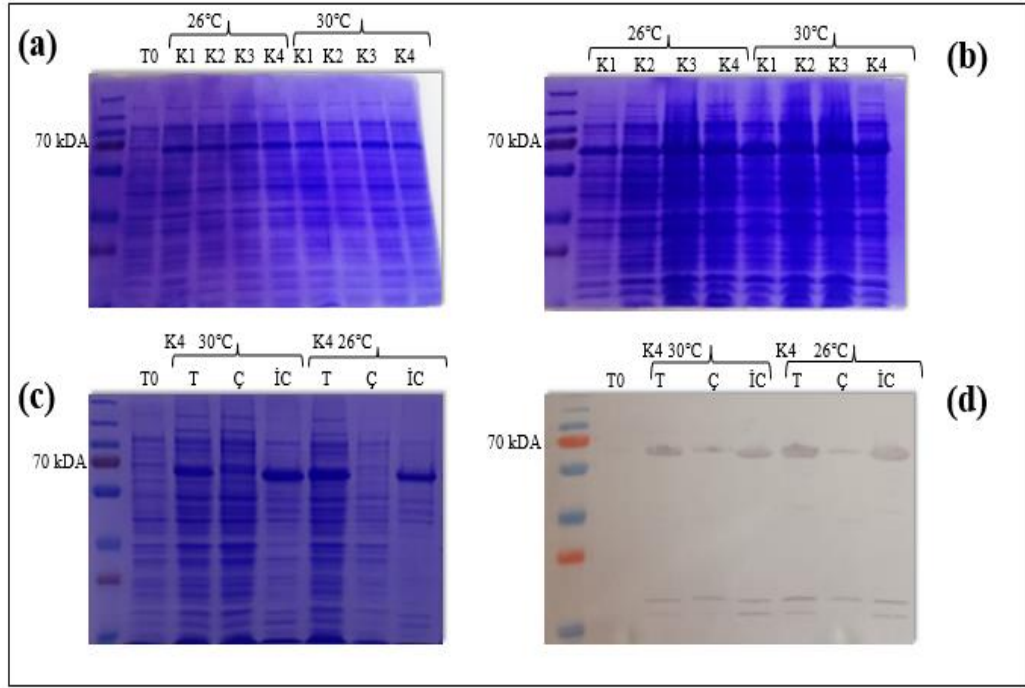
Şekil 6.4: pET21-a vektöründe bulunan FUS geninin sekans analizi. (a) FUS geni, plazmid üzerinde FUS klonlama Forward primer ile çoğaltılmıştır (b) FUS geni, plazmid üzerinde FUS klonlama Reverse primer ile çoğaltılmıştır.

6.2. Protein Ekspresyonu

6.2.1. FUS Protein Ekspresyonu

Sekanslama yoluyla FUS geninin doğruluğu analiz edilen plazmitler, *E.coli* BL21DE3 bakteri hücrelerine ısı şoku ile transforme edilmiştir. Transformasyon sonucu elde edilen bakteri kolonileri ile FUS protein ekspresyon optimizasyonu aşamasına geçilmiştir.

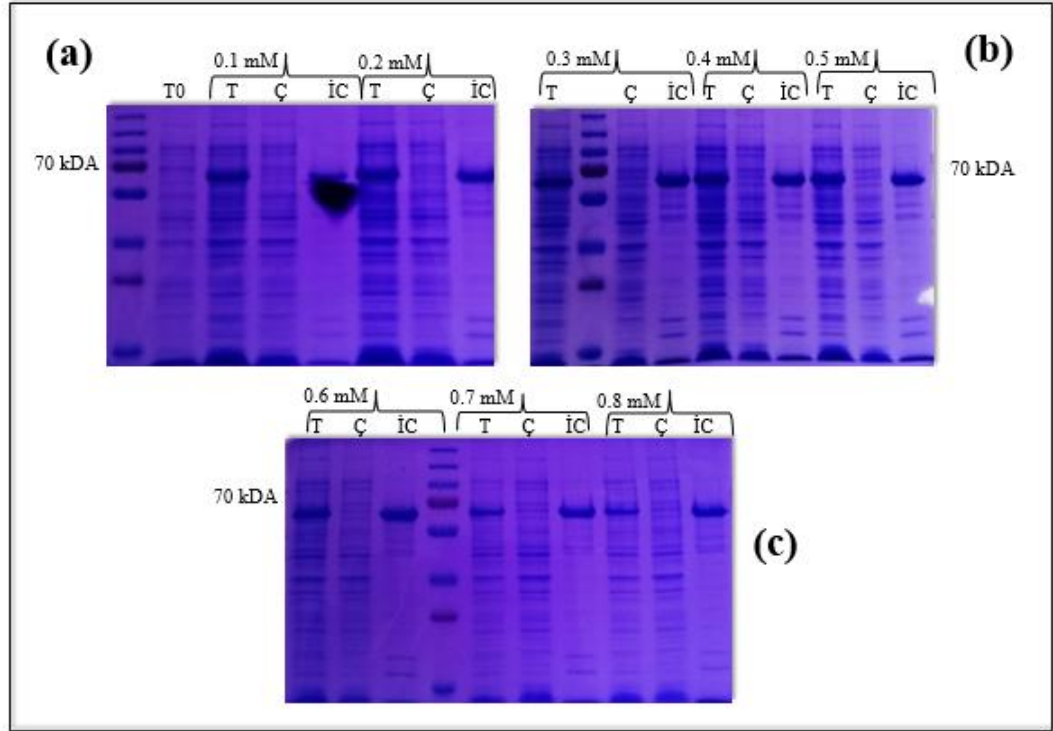
BL21DE3 bakteri hücreleri, gece boyunca 37°C'de 5 ml LB besiyeri ortamında çalkalanarak büyütülüp, hücreler 20 ml LB ekspresyon kültürüne alınarak 0.4 mM IPTG indüksiyonu yapılmıştır. İndüksiyon yapılmadan önce bakteri hücrelerinden örnek alınarak (T0 örneği) SDS-PAGE'de analiz edilmiştir. FUS protein ekspresyonu için indüklenen hücreler, 26 ve 30°C'de 4 ve 24 saat büyüme sürelerine tabi tutulup inkübasyon süreleri sonunda santrifüj ile LB besiyeri uzaklaştırılmıştır. Elde edilen hücreler, liziz solüsyonu ile parçalanarak protein ekspresyonu miktarı, SDS-PAGE ve Western Blot ile analiz edilmiştir (Şekil 6.5).



Şekil 6.5: BL21DE3 hücrelerinin 4 (a) ve 24 (b) saat boyunca 26 ve 30°C FUS ekspresyon profillerinin SDS-PAGE ve WB ile analizi. (a) 4 saatte protein ekspresyonu (b) 24 saatte protein ekspresyonu (c) K4 örneğinin çözünür ve çözünmez protein fraksiyonları SDS-PAGE (d) K4 örneğinin çözünür ve çözünmez protein fraksiyonları WB. 68 kDa FUS proteinin artmış ekspresyonu 30°C ve 24 saat üretim sonunda elde edilmiştir. T0: IPTG indüksiyonundan önce T: Hücre lizatı Ç: Çözünür protein İC: inklüzyon cisimcik durumundaki protein.

E.coli hücrelerinin 4 ve 24 saat boyunca FUS protein ekspresyon profilleri karşılaştırıldığında 24 saat sonunda (Şekil 6.5 b) 68 kDa moleküler ağırlığa sahip FUS üretiminin 4 saatlik üretime karşılık belirgin şekilde arttığı görülmüştür. Ayrıca denenen iki sıcaklık koşulları değerlendirilerek protein üretimine 30°C ile devam edilmesine karar verilmiştir. Şekil 6.5 b’de protein ekspresyon profilinin fazla olduğu FUS Koloni 4 örneğinin çözünür ve çözünmez protein fraksiyonları santrifüjle birbirinden ayrıldığında FUS proteininin çözünmez inklüzyon cisimcikleri olarak üretildiği (Şekil 6.5 c) tespit edilmiştir.

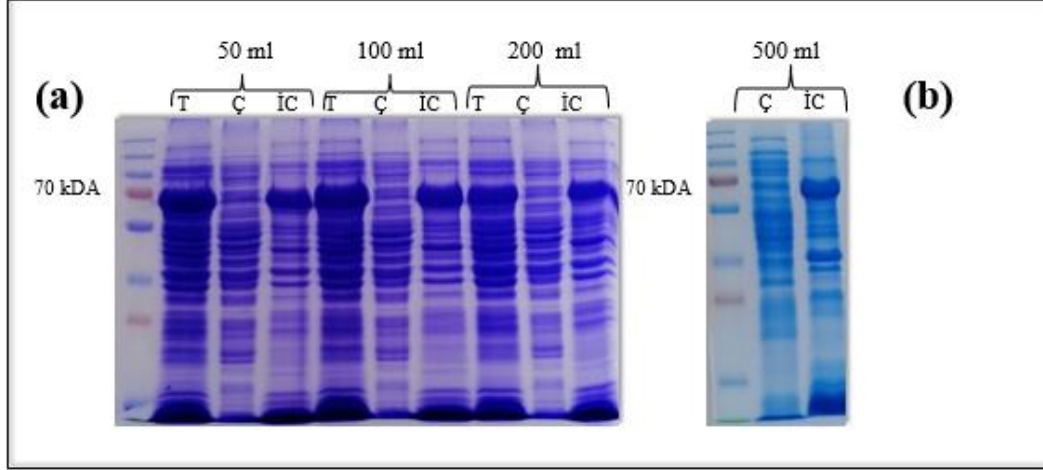
Biyolojik olarak aktif çözünür durumda FUS proteini elde edilmesi amacıyla, protein üretiminin indüklenmesini sağlayan IPTG konsantrasyonu değiştirilerek diğer parametrelerin aynı kaldığı üretim optimizasyonları yapılmıştır. Şekil 6.6 IPTG konsantrasyon değişikliklerinin protein üretimine etkisini göstermektedir.



Şekil 6.6: Farklı IPTG konsantrasyonlarının FUS protein üretimine etkisi (a) 0.1, 0.2 mM IPTG konsantrasyonları ile protein üretimi (b) 0.3, 0.4, 0.5 mM IPTG konsantrasyonları (c) 0.6, 0.7, 0.8 mM IPTG konsantrasyonları.

Protein indüklemesi amacıyla farklı IPTG konsantrasyon optimizasyonları sonrasında farklı IPTG konsantrasyonu uygulamasının çözünür FUS üretimine etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. Protein bantları karşılaştırılıp 0.4 mM IPTG konsantrasyonu sabit tutularak optimizasyonlara devam edilmiştir.

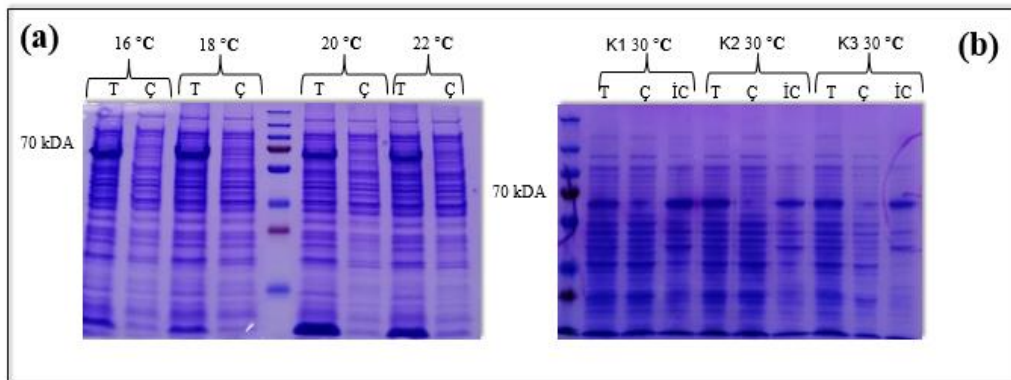
Şekil 6.5 ve Şekil 6.6'daki jel görüntülerinden FUS proteinin düşük de olsa çözünür durumda olduğu görülmüş, bakterinin büyüdüğü LB besiyeri miktarının artırılarak ölçek büyütmenin çözünür durumdaki FUS proteini üretimine etkisi incelenmiştir. 30°C, 0.4 mM IPTG konsantrasyon ve 220 rpm çalkalama hızı aynı kalarak 20 ml besiyeri ortam hacmi 50, 100 ve 500 ml'e çıkarılarak sonuçlar incelenmiştir (Şekil 6.7). SDS-PAGE sonuçlarına göre besiyeri kültür hacmi artışının çözünür FUS protein miktarına etkisi olmadığı görülmüştür.



Şekil 6.7: Bakterilerin büyüdüğü LB besiyeri hacminin FUS proteini üretimine etkisi. (a) 50, 100, 200 ml besiyeri hacim artışı. (b) 500 ml besiyeri hacim artışı.

Escherichia coli'de yanlış katlanmış veya katlanmamış proteinlerin hücresel birikimi, katlanma sürecini etkileyen mutasyonlardan, hücrelerin yüksek sıcaklıklar gibi çevresel strese maruz kalmasından ve rekombinant proteinlerin ekspresyonundan kaynaklanabilir. Böyle durumlarda polipeptit zinciri, biyolojik aktif bir duruma katlanmak yerine inklüzyon cisimcikleri adı verilen düzensiz agregatlar oluşturmak üzere birleşebilmektedir.

Bu nedenle bakterilerin büyüdüğü inkübasyon ortamının sıcaklığının azaltılması ile çözünür FUS proteini elde edilmeye çalışılmıştır. Şekil 6.8 (a) sıcaklık düşürülmesinin çözünür protein üretimine etkisini göstermektedir. Sıcaklığın düşürülmesi, çözünür FUS protein miktarında bir artışa yol açmamıştır.

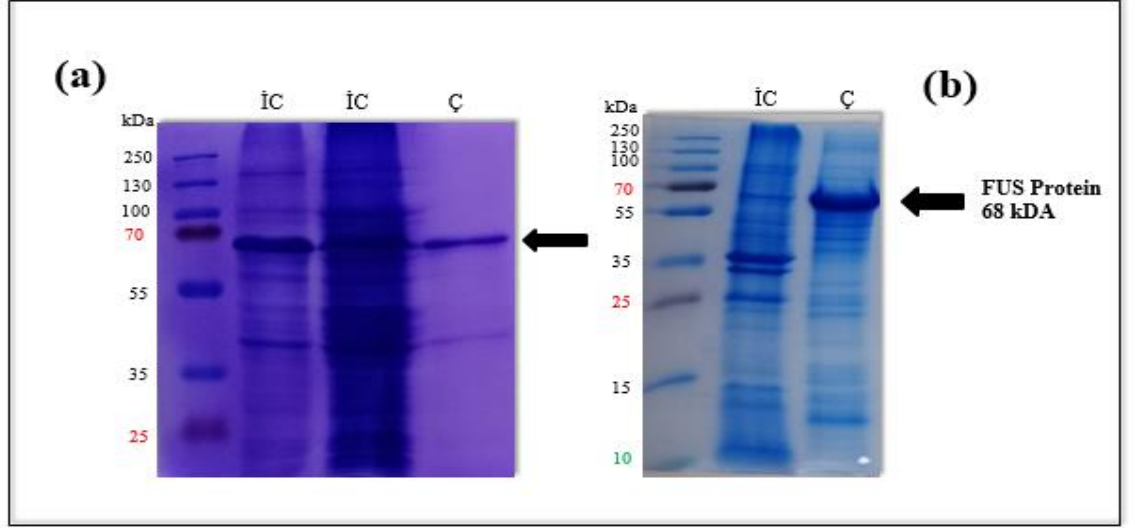


Şekil 6.8: Çözünür FUS protein üretimine sıcaklık ve bakteri suşu etkisi. (a) BL21DE3 bakteri hücrelerinin sıcaklığın düşürüldüğü ortamda büyümesinin çözünür FUS protein üretimine etkisi (b) Bakteri suşu Shuffle kullanılarak çözünür protein FUS üretiminin farklı kolonilere göre karşılaştırılması.

E.coli'de üretilmek istenen protein, stabilite ve aktivite için kritik olan disülfid bağları gibi translasyon sonrası modifikasyonlar içerdiğinde çözünür protein ekspresyonu zorlaşmaktadır. Üretilmek istenen proteinin sitoplazmada konumlanması, periplazmada bulunan doğru protein katlanması için gerekli olan redoks sisteminden mahrum bırakır. *E.coli*'nin yeni bir suşu olan Shuffle ise sitoplazmasında bir redoks sistemi ile disülfid bağlarının oluşumu için ortam sağlar ve biyolojik olarak aktif çözünür proteinlerin oluşumuna yol açmaktadır. Bu nedenle FUS genini içeren pET21a vektörünün *E.coli* Shuffle hücrelerine transformasyonu ile çözünür FUS proteini üretilmeye çalışıldı. Şekil 6.8 (b) kanamisinli TB besiyerinde büyüyen Shuffle bakterilerinin 30°C, 0.4 mM IPTG konsantrasyonda ve 220 rpm hızda çalkalanarak 24 saat boyunca FUS protein ekspresyonunu göstermektedir. Ekspresyon profilleri incelendiğinde, çözünür durumda FUS üretilmediği tüm proteinin inklüzyon cisimcikleri halinde üretildiği tespit edilmiştir.

Kaotropik Ajan ile Çözünür FUS Eldesi: *E.coli* BL21DE3 suşunda eksprese edilen FUS proteini, inklüzyon cisimcikleri halinde üretilmiştir. Ekspresyon aşamasında yapılan sıcaklık, besiyeri, rpm değeri ve büyüme süresi gibi yapılan optimizasyonlarla işlevsel halde çözünür protein elde edilememesi sebebiyle inklüzyon cisimcikleri saflaştırma protokolü uygulanarak saf FUS proteini elde edilmiştir (TÜBİTAK MAM İTAL, Protein Karakterizasyon Lab. Çözünmeyen Protein Çözme ve Saflaştırma Protokolü).

Yapılan ekspresyon optimizasyonları ile çözünür FUS proteininin elde edilememesi, inklüzyon cisimcikleri durumundaki FUS proteininin kullanılmasını gerektirmiştir. Inklüzyon proteinler, üre ve guanidin hidroklorür gibi kaotropların yüksek konsantrasyonunda çözünebilir ve diğer hücresel elemanlara kıyasla yüksek yoğunlukları nedeniyle santrifüjleme ile tüm hücre lizatından izole edilebilmektedir. [Anupam Singh, 2015]. Hücre lizisinden sonraki santrifüj aşamasında pelletteki inklüzyon FUS proteini, 3 ve 8 M üre içeren solubilizasyon tamponunda (50 mM Tris-HCl pH: 8, 250 mM NaCl, 5 mM B-Mercaptoethanol) çözünmüştür. Gece boyunca +4°C'de çalkalama sonunda inklüzyon FUS, yüksek hızda santrifüj ile çözünür proteinlerin bulunduğu süpernatant kısma geçirilmiştir. Farklı konsantrasyonlarda ürenin inklüzyon FUS'un çözünmesine etkisi Şekil 6.9'da gösterilmiştir.

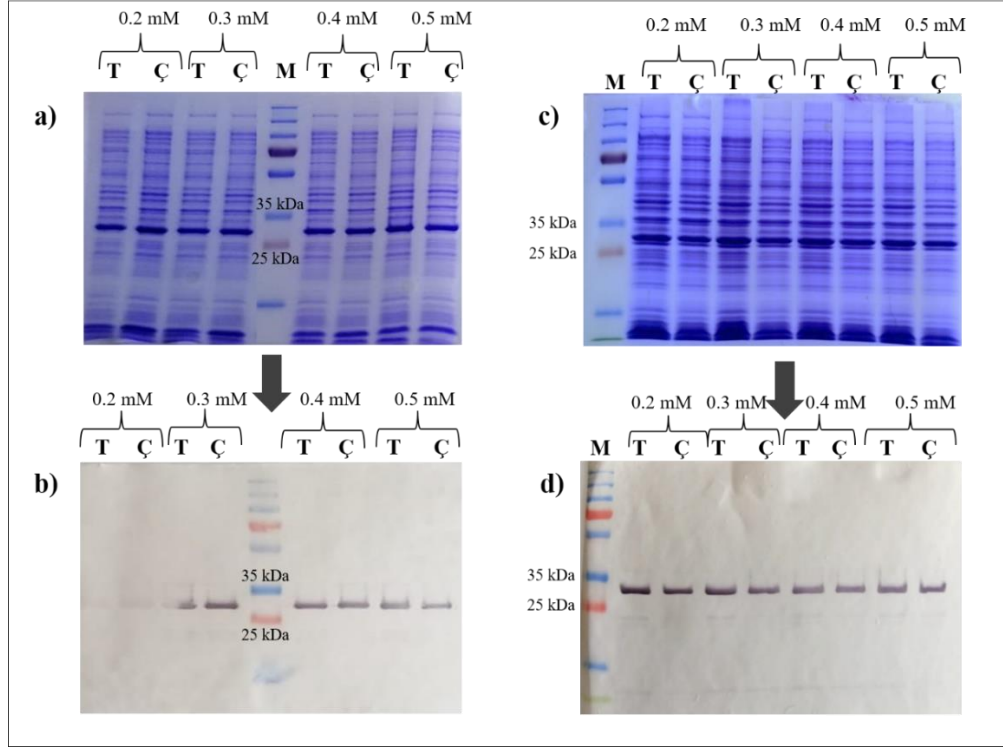


Şekil 6.9: Kaotrafik ajan üre ile çözünür protein eldesi (a) 3 M üre ile çözünür FUS (b) 8 M üre ile çözünür FUS.

Yüksek konsantrasyonda üre, inklüzyon proteinlerin yapısını bozarak protein denatürasyonuna ve üçüncül yapının bozulmasına sebep olmaktadır. Üre konsantrasyonunun azaldığı durumlarda (mild condition) bazı inklüzyon proteinler ikincil yapılarını korumakta ve in vitro tekrar katlama süreciyle biyolojik olarak aktif halini alması kolaylaşmaktadır (Singh and Panda (2005)). Bu nedenle çözünür FUS eldesi ve saflaştırma aşamaları için 3 M üre bulunan tampon kullanılmıştır.

6.2.2. Ccdc124 Protein Ekspresyonu

pQE81L vektörünü taşıyan BL21DE3 bakteri hücreleri, gece boyunca 37°C'de 5 ml LB besiyeri ortamında çalkalanarak büyütülüp, hücreler 20 ml LB ekspresyon kültürüne alınarak protein ekspresyonu amacıyla değişen konsantrasyonlarda IPTG indüksiyonu yapılmıştır. Ccdc124 protein ekspresyonu için indüklenen hücreler, 16 ve 28°C'de 24 saat büyüme sürelerine tabi tutulup inkübasyon süreleri sonunda santrifüj ile LB besiyeri uzaklaştırılmıştır. Elde edilen hücreler, lizis işlemi ile parçalanarak toplam ve çözünür protein fraksiyonları, SDS-PAGE ve anti-His antikoru kullanılarak (A7058) Western Blot ile analiz edilmiştir (Şekil 6.10).



Şekil 6.10: *E.coli* BL21DE3 hücrelerinin 24 saat boyunca 16° C ve 28° C sıcaklıklarda Ccdc124 ekspresyon profillerinin SDS-PAGE ve WB ile gösterimi. (a) 16°C’de protein ekspresyonu SDS-PAGE (b) 16°C’de protein ekspresyonu WB (c) 28°C’de protein ekspresyonu SDS-PAGE (d) 28°C’de protein ekspresyonu WB. T: Lizizde ortaya çıkan toplam protein Ç: Liziz aşaması ardından yapılan santrifüjleme ile elde edilen çözünür protein fraksiyonu.

Ccdc124 protein ekspresyon profilleri karşılaştırıldığında (Şekil 6.10) 32 kDa moleküler ağırlığa sahip Ccdc124 proteini ve alternatif kırılma ile ortaya çıkan izoformunun çözünür protein durumundaki yüksek ekspresyonu gözlemlenmiştir. Ccdc124 proteinin 16°C’de 0.4 mM IPTG 220 rpm hızda üretimine karar verilmiştir. Yüksek miktarda protein eldesi edilmesi amacıyla saflaştırma deneyleri için 1 litre besiyeri hacminde üretim gerçekleştirilmiştir.

6.3. Protein Saflaştırma

Rekombinant proteinlerin saflaştırılması manual ya da bir kromatografi sistemi kullanılarak ilgili protein özelliklerine göre gerçekleştirilmektedir. Bu tez çalışması kapsamında FUS ve Ccdc124 için var olan 6x-His etiketi aracılığıyla afinite kromatografi uygulanırken Ccdc124 için ayrıca katyon iyon değiştirici kromatografi kullanılarak proteinler saf olarak elde edilmiştir.

Genel olarak afinite kromatografisi, bir durağan faz (katı faz) ve bir mobil fazdan oluşur. Mobil faz, hücre lizatı veya biyomoleküller içeren herhangi bir karışımdır. Hedef molekülü bağlayan bir ligand, katı faza kovalent olarak bağlanır. Katı ve hareketli faz arasındaki etkileşim, proteini saf bir formda elde etmek için afinite kromatografisi tarafından kullanılır. Hedef protein nikel liganda bağlanır ardından değişen koşullar (pH ve imidazol konsantrasyonları) ile sabit fazdan elde edilmektedir.

Histidin etiketine sahip proteinler, şelatlayıcı ligandlar kullanılarak kromatografik ortam üzerine (agaroz vs) immobilize edilen Ni^{+2} ve diğer bazı metal iyonları için yüksek bir seçici afiniteye sahiptir. Bu şekilde His etiketi içeren proteinler, metal iyonu yüklü ortama seçici olarak bağlanırken, diğer hücresel proteinler bağlanmayacak veya zayıf bir şekilde bağlanacaktır.

6.3.1. Ccdc124 Protein Saflaştırma

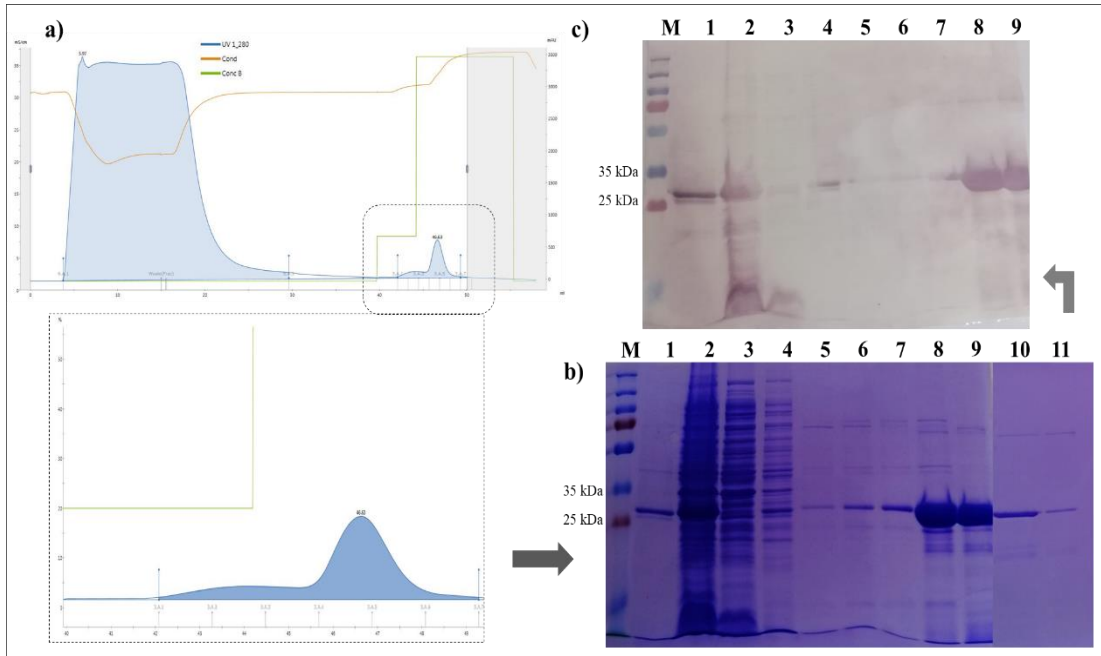
E.coli BL21DE3 hücresinde üretilen çözünür protein durumundaki Ccdc124, yüksek miktarda eksprese edildiği için farklı kromatografi teknikleri uygulanarak en saf durumda protein eldesi için optimizasyonlar gerçekleştirilmiştir. Saflaştırma optimizasyonları için başlangıç olarak tek adım afinite kromatografisi gerçekleştirilmiştir. Elüt edilen proteinlerdeki bakteriyel hücre proteinlerin elimine edilmesi amacıyla diğer bir optimizasyon katyon değiştirici kromatografi ardından elde edilen elüsyonlara afinite kromatografi uygulanarak saf halde Ccdc124 proteinini edilmiştir.

BioRAD Econofit IMAC (1 ml) kolon kullanılarak yapılan saflaştırmada Ccdc124'nin sisteme yüklenmesi, kolona bağlanma süresinin artırılması amacıyla 0.3 ml/dk hızla ayarlanıp direkt (şekil 6.11) ve gradient (şekil 6.12) olarak elüsyon yapılmıştır. Ccdc124 proteini ayrıca proteine spesifik olarak bağlanan anti-ccdc124 antikoru 1:1000 ve ikincil antikor olarak kullanılan ikincil anti-tavşan antikorunun 1:20000 oranında kullanılarak Western Blot ile gösterilmiştir.

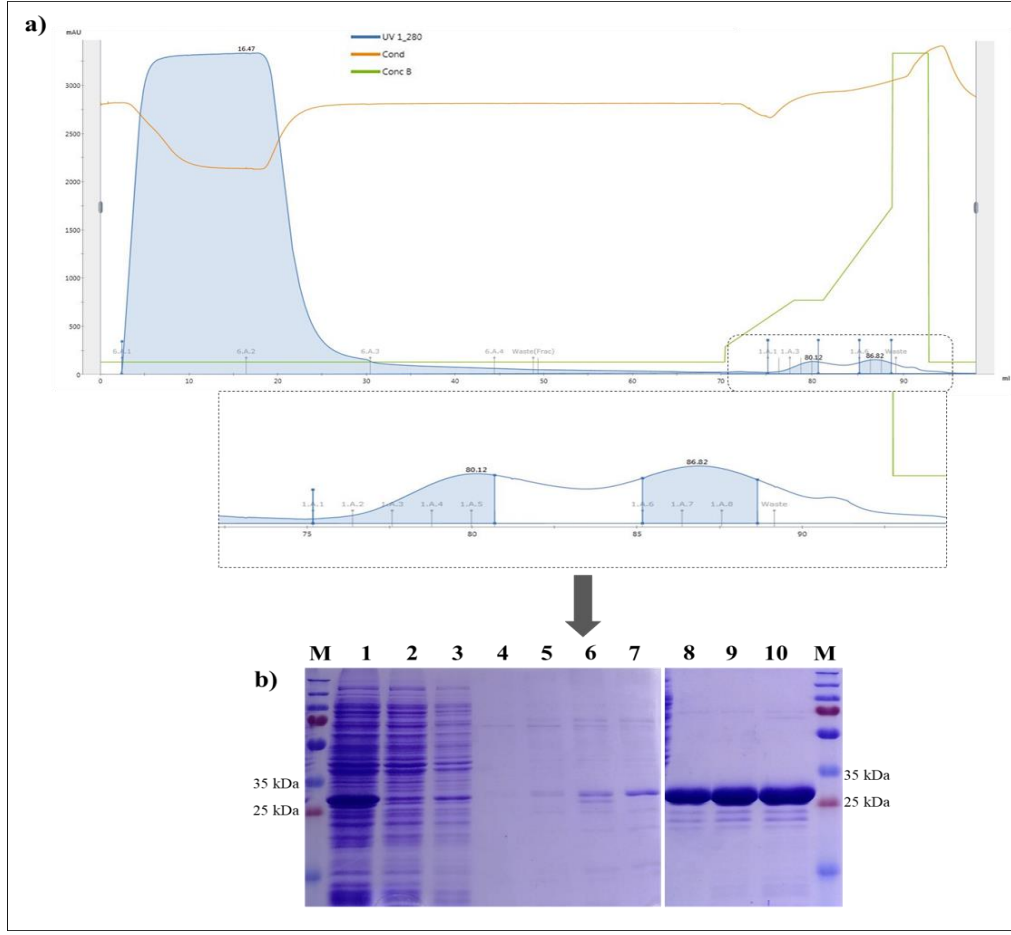
Şekil 6.11 tek step afinite kromatografi uygulandığında Ccdc124 proteininin saflaştırma sırasında elde edilen tüm protein fraksiyonlarını göstermektedir. Bu saflaştırma optimizasyon deneyinde elüsyon tampon % 100 B durumunda direkt sisteme verilmiş ve kolona bağlanan tüm proteinler 300 mM imidazol konsantrasyonu ile elde edilmiştir.

Şekil 6.12’de ise saf Ccdc124 protein eldesi için yine tek step afinite kromatografisi uygulanmış fakat bu aşamada elüsyon tamponu direkt olarak sisteme %100 verilmeyerek gradient elüsyon uygulanmıştır. Elüsyon tamponunun başlangıç olarak %5 oranından %20’ye kadar lineer şekilde artması sağlanmıştır. Bu elüsyon aşamasında %14 Elüsyon tamponu oranından itibaren protein pik artışı gözlemlenmiş ve fraksiyonlar toplanmıştır (Elu A2, A3, A4, A5). Lineer olarak %20’den %50 B olarak (Elu A6, A7, A8) ayarlanıp sonrasında %100 B ile bitirilmiştir. En yüksek pik %36 Elüsyon tampon oranında elde edilmiştir.

Saflaştırma işlemleri sonunda elde edilen proteinlerin nanodrop ile konsantrasyon ölçümü yapılmış ve SDS-PAGE ve WB analizi ile kontrol edilmiştir.



Şekil 6.11: Ccdc124 tek step afinite saflaştırması (a) ÄKTA Pure kromatogram (b) Saflaştırma sonuçları SDS-PAGE M: marker, 1:Çözünmeyen Ccdc124, 2: Kolona yüklenen örnek, 3: Kolona bağlanmayan proteinler, 4: Yıkama, 5-11: Elusyon A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7 (c) Western Blot.



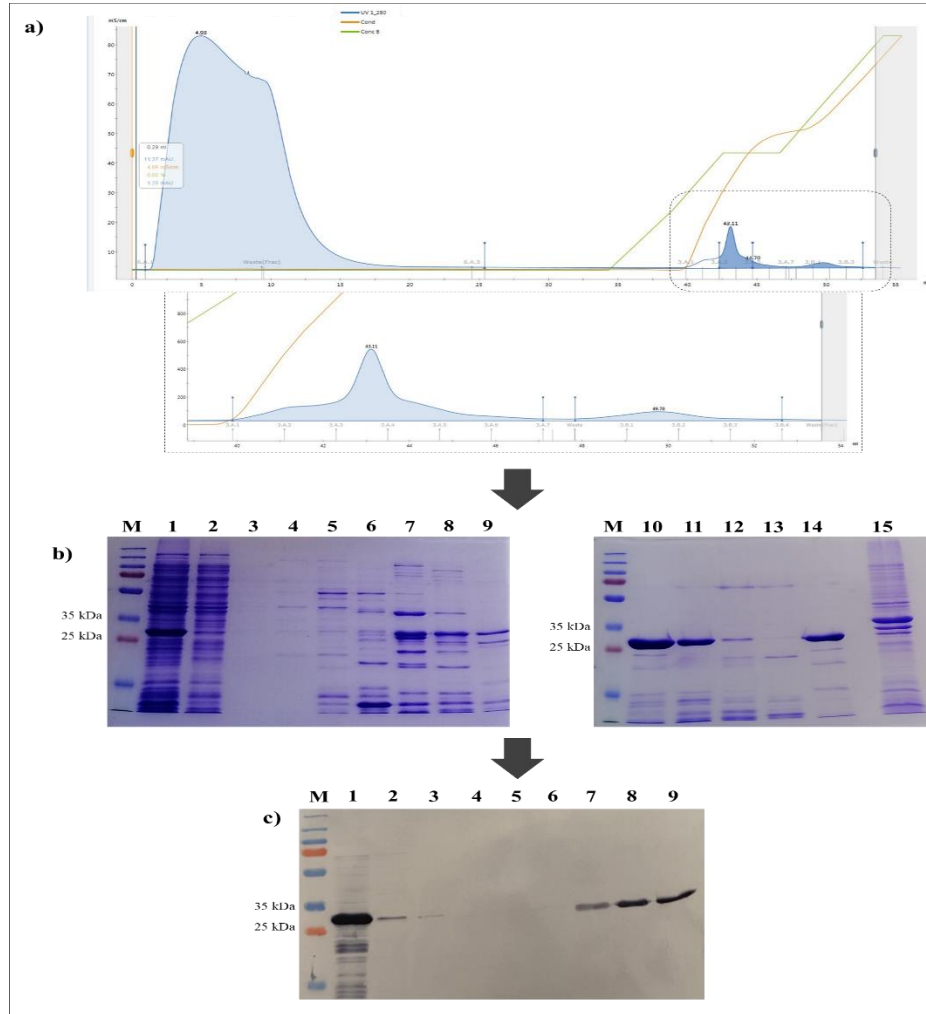
Şekil 6.12: Ccdc124 tek adım afinite kromatografi sonuçları (a) ÄKTA Pure kromatogram (b) Saflaştırma sonuçları SDS-PAGE M: Marker, 1: Kolona yüklenen örnek, 2: Kolona bağlanmayan proteinler, 3: Yıkama, 4-10: Elüsyon A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8 (c) Western Blot.

Yapılan afinite saflaştırmaları sonucunda spesifik olmayan proteinlerin elimine edilmesi amacıyla katyon iyon değişimi kromatografi (IEX) kullanılmıştır.

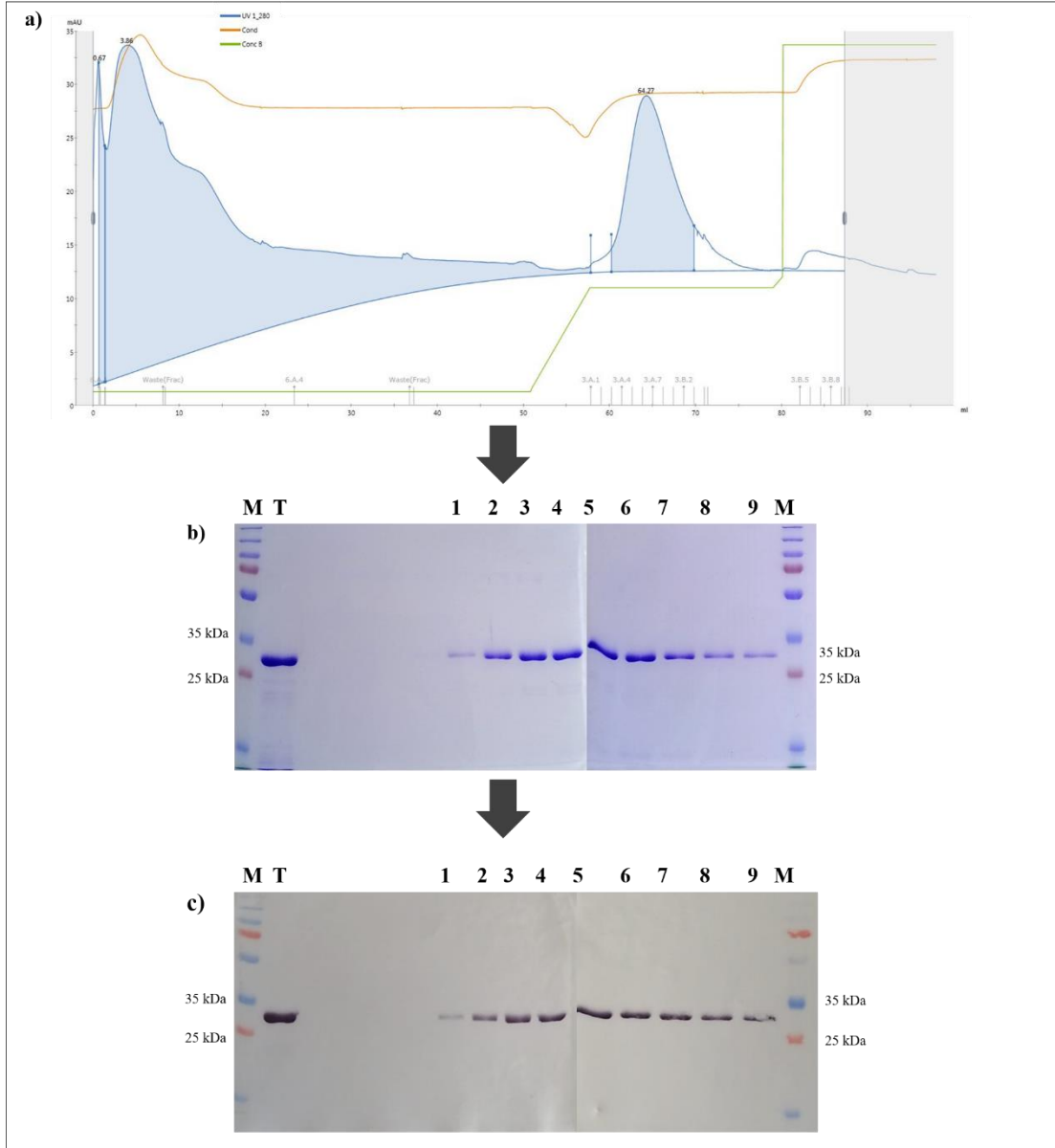
İyon değiştirici kromatografi net yüzey yükü ve pH arasındaki ilişkinin her protein için benzersiz olması özelliğinden yararlanır. Bu kromatografi sistemindeki ayırım, yüklü moleküller ile zıt yüklü iyon değiştirici kolon ortamı arasındaki tersinir (reversible) etkileşimlere göre yapılır. İzoelektrik noktasına (pI) eşdeğer bir pH değerinde net yükü olmayan protein, yüklü bir ortamla etkileşime girmeyecektir. Bununla birlikte, pI değerinin üzerindeki bir pH değerinde, protein pozitif yüklü bir ortama (anyon değiştiriciye) ve pI değerinin altındaki bir pH değerinde ise protein negatif yüklü bir ortama (katyon değiştiriciye) bağlanacaktır.

Saf Ccdc124 eldesi amacıyla ilk adım olarak denenen katyon değiştirici saflaştırma için hücre lizatından elde edilen süpernatant, IEX bağlama tamponu (50

mM Sodyum Asetat Trihidrat, pH:6) ile 1:1 oranında seyreltilmiş, HiTrap Capto S kolon (1 ml) kullanılarak ÄKTA Pure kromatografi sistemine 0.2 ml/dk hızla yüklenmiştir. Tüm örnek sisteme yüklendikten sonra bağlama tamponu ile yıkama yapılmış ve gradient olarak elüsyon tamponu (50 mM Sodyum Asetat Trihidrat, 1 M NaCl pH: 6) sisteme 1 ml/dk hızla verilmiştir. Yapılan SDS-PAGE analizleri (Şekil 6.13) yaklaşık 500 mM NaCl konsantrasyonda Ccdc124 proteininin hücrel proteinlerle elüt edildiği en saf halinin ise 700 mM NaCl elüsyon tampon konsantrasyonunda elde edildiğini göstermektedir. Elüsyon A8, B1 ve B2 afinite bağlama tamponuna konsantratörler ile değiştirilerek afinite saflaştırılması yapılmıştır (ikinci step saflaştırma). Saflaştırma sonunda Ccdc124 proteini hücrel proteinlerden ayrılmış ve en saf durumunda elde edilmiştir (Şekil 6.14).



Şekil 6.13: Ccdc124 katyon değişimi kromatografi sonuçları (a) ÄKTA Pure kromatogram (b) Saflaştırma sonuçları SDS-PAGE M: Marker, 1: Kolona yüklenen örnek, 2: Kolona bağlanmayan proteinler, 3: Yıkama, 4-14: Elüsyon A1, A2, A3, A4, A5, A6, B1, B2, B3, B4, A8, 15: Çözünmeyen Ccdc124 (c) Western Blot.



Şekil 6.14: Ccdc124 afinite kromatografi sonuçları (a) ÄKTA Pure kromatogram (b) Saflaştırma sonuçları SDS-PAGE M: marker, T: A8, B1, B2 Elüsyonları toplam kolona yüklenen örnek, 1-9: Ccdc124 elüsyonlar (c) Western Blot.

Yapılan iki stepli saflaştırma ile pürifiye protein, bulunduğu afinite elüsyon tamponundan 1X PBS tampona konsantratör (5 kDa, Amicon) ile değiştirilerek analize hazır hale getirilmiştir. Protein konsantrasyonu A280 değeri 2.6 mg/ml olarak ölçülmüştür.

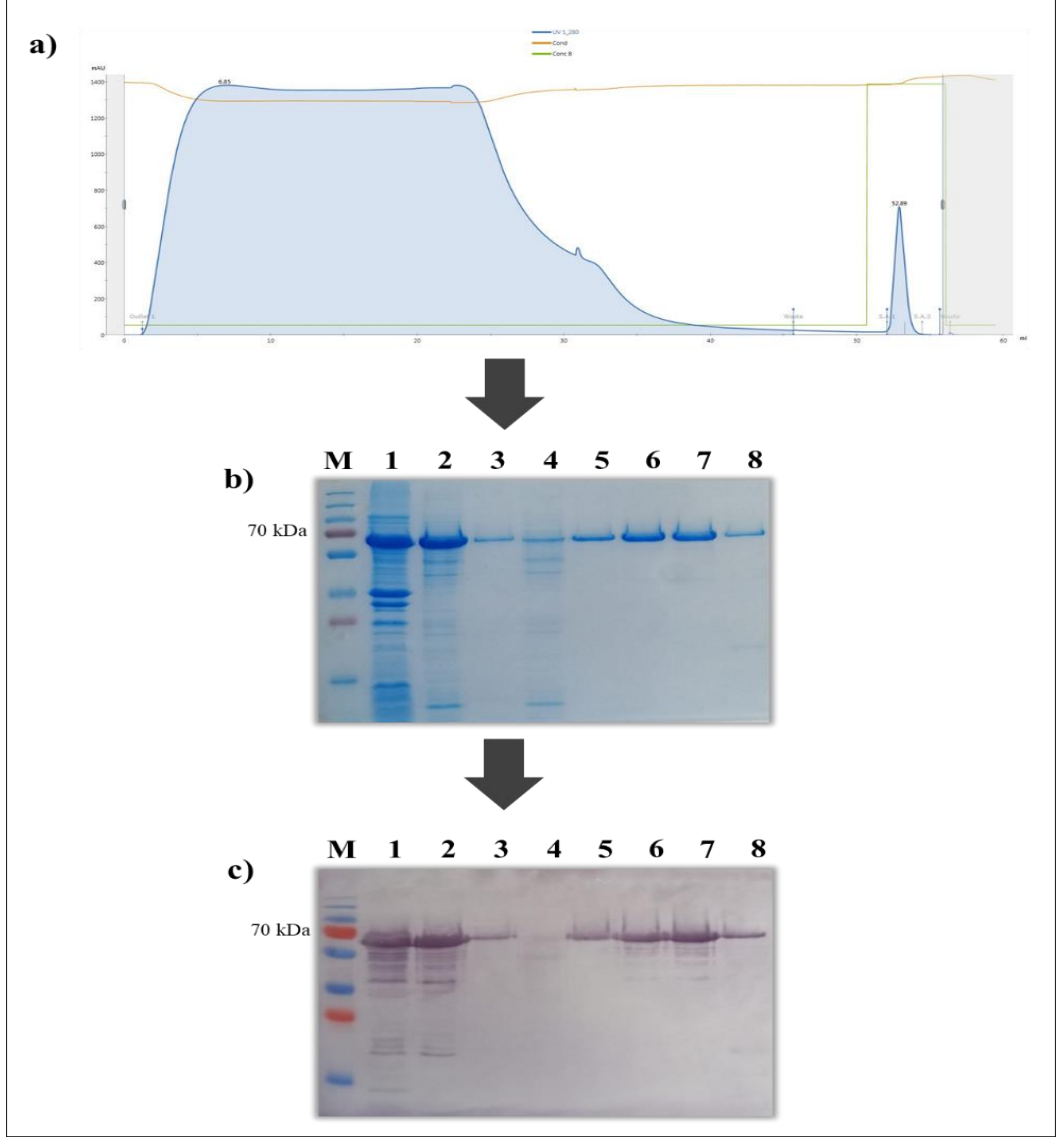
6.3.2. FUS Protein Saflaştırma

8 M üre ile çözüner durumda bulunan 6x-His etiketli FUS protein, tamponların da üreli olduğu afinite saflaştırma adımı ile ÄKTA Avant kromatografi sisteminde pürifiye hale getirilmiştir. FUS, 3 ve 8M üre ile kullanılabilir özelliğindeki BioRAD Econofit IMAC affinite kolonundaki Ni⁺² yüklü rezine 6x-His etiketi ile bağlanır ardından elüsyon tamponunda bulunan 300 mM imidazol ile 1 ml kolon için 1.2 ml, 5 ml kolon için 5 ml hacimde elüte edilmiştir. Elde edilen FUS protein elüsyonları, yeniden katlama tamponuna seyreltilerek *in vitro* ortamında yeniden katlanması sağlanmıştır. Katlama süresi sonunda tampon değışimi ve konsantre etme işlemleri sonucunda FUS proteininin verim kaybının yüksek olduğu görölmüştür.

Inclusion body proteinleri daha az üre konsantrasyonunda tamponlarla da çözülebileceğinden FUS proteinleri 3 M üreli tamponla çözünmüş, bu şekilde hem native benzeri yapılar korumaya çalışılmış hem de *in vitro* katlama adımlarından vazgeçilmiştir. Verim kaybının azaltıldığı bu yöntem ile yüksek miktarda FUS pürifiye protein elde edilerek analiz işlemlerinde kullanılmıştır.

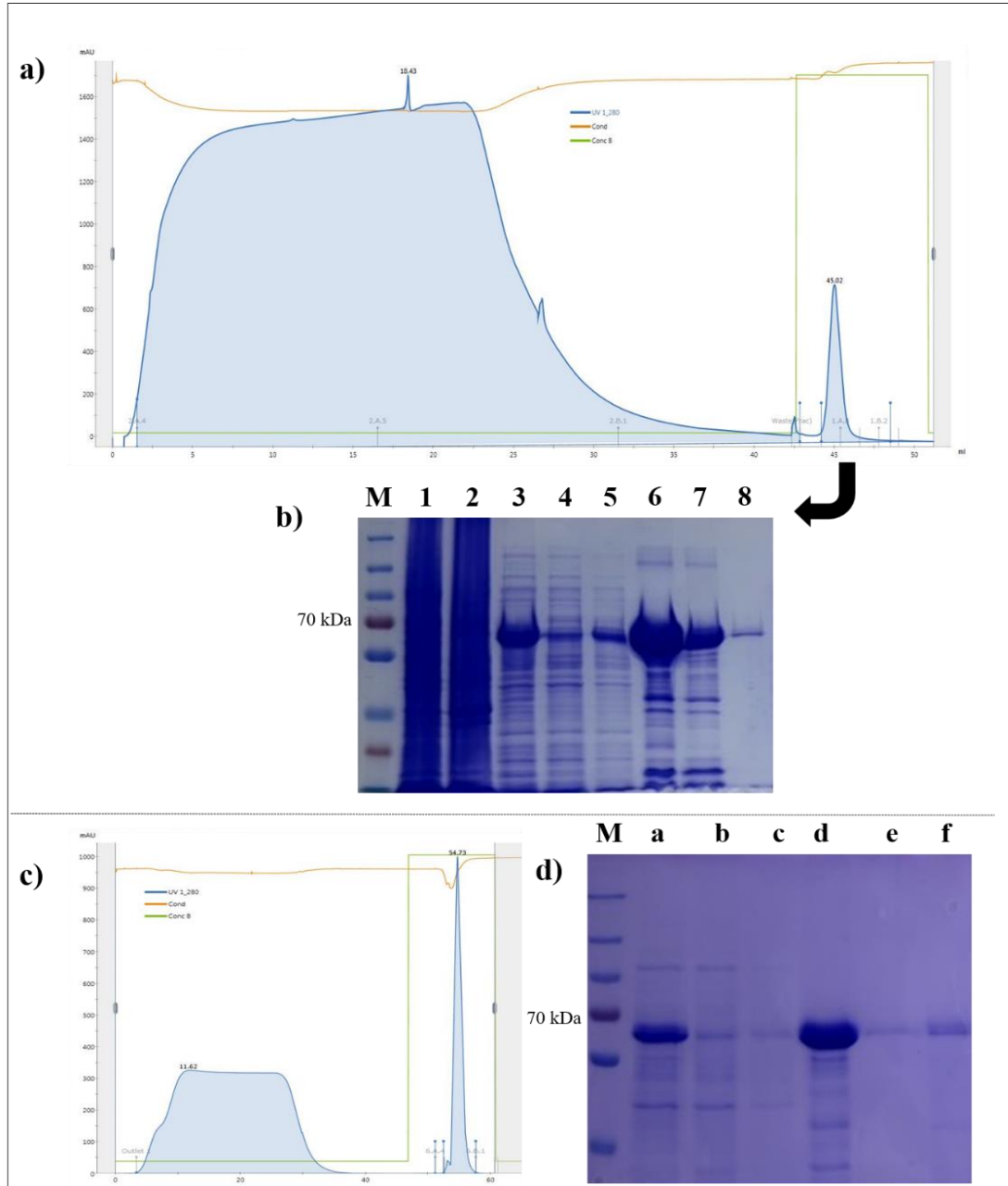
Şekil 6.15 FUS'un 8 M üreli tamponunda Şekil 6.16 ve Şekil 6.17 ise 3 M üreli tamponunda çözünererek yine aynı konsantrasyonda olan saflaştırma tamponlarıyla elde edilen saf hali SDS-PAGE ve WB ile gösterilmiştir.

Pürifiye edilen FUS proteinin konsantrasyonu A280 değeri ile 2.9 mg/ml olarak ölçölmüştür.

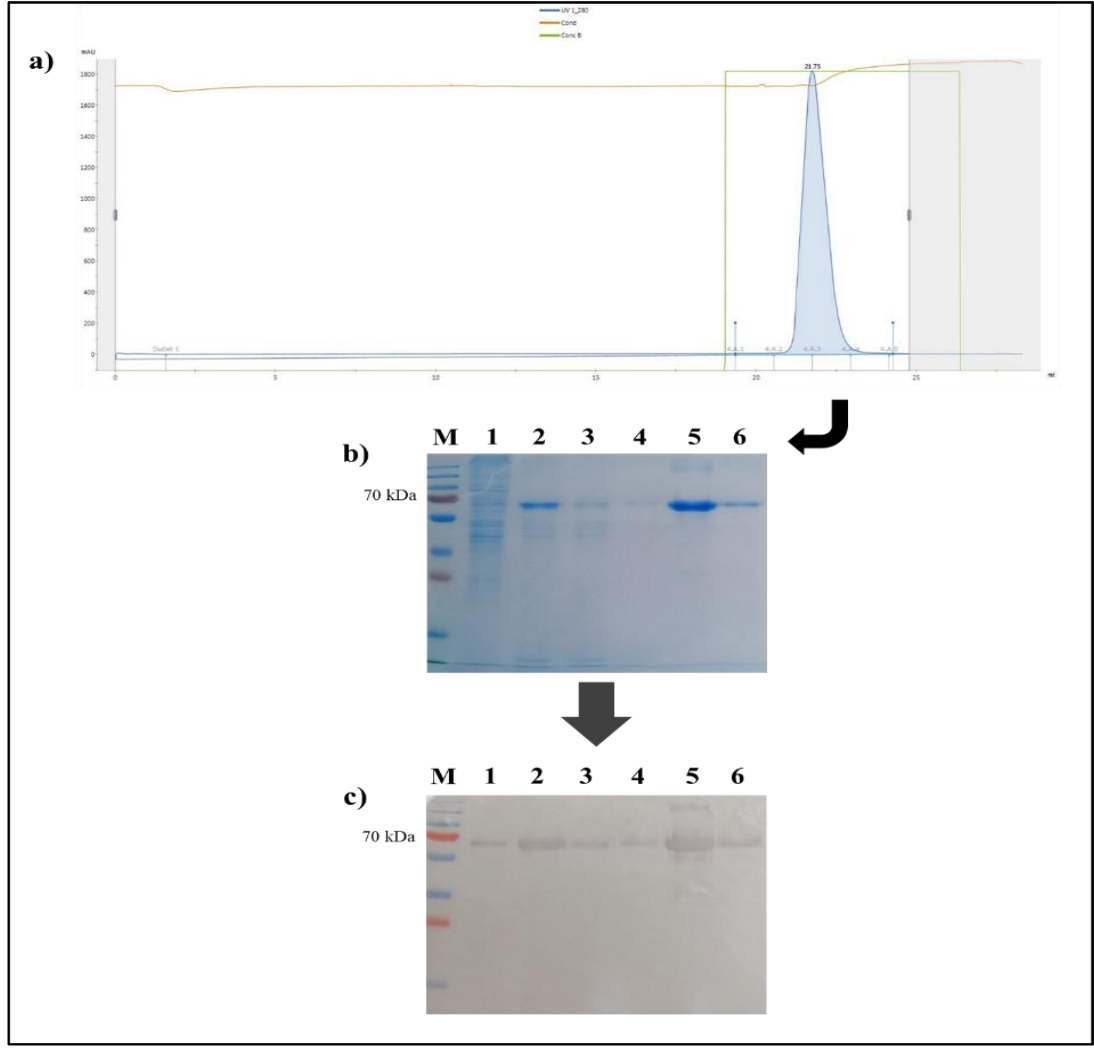


Şekil 6.15: FUS tek step afinite kromatografi sonuçları 8 M üre ile (a) FUS afinite kromatografi ÄKTA Pure kromatogram (b) Saflaştırma sonuçları SDS-PAGE M: marker, 1: FUS protein üre ile çözünmeden önce, 2: Kolona yüklenen örnek, 3: Kolona bağlanmayan, 4: Yıkama, 4-8: FUS Elüsyonlar (c) Western Blot. 8M üre ile çözünme ve saflaştırma sonunda pürifiye FUS elde edilmiştir.

Şekil 6.16' de 3M üre ile ilk adım saflaştırma sonrasında Elüsyon 7 bağlama tamponu ile dilüe edilerek ikinci step saflaştırma yapılmış ve FUS elüsyonlar elde edilmiştir (b). Elüsyon d, tekrar afinite saflaştırma stebi ile dilüe edilerek üçüncü kere saflaştırılmıştır ve sonuçlar Şekil 6.17'de yer almaktadır. Pürifiye haldeki FUS, anti-FUS antikoru ile muamele edilerek WB yapılmış ve tek bantlar gözlemlenmiştir (Şekil 6.17 c).



Şekil 6.16: FUS ilk step afinite kromatografi sonuçları 3M üre ile (a) ÄKTA Pure kromatogram (b) Saflaştırma sonuçları SDS-PAGE M:marker, 1-2: FUS protein üre ile çözünmeden önce, 3: Kolona yüklenen, 4: Bağlanmayanlar 5: Yıkama, 6-8: FUS Elüsyonlar (c) ÄKTA Pure kromatogram (d) Saflaştırma sonuçları SDS PAGE M: marker, 1: Kolona yüklenen örnek 2: Bağlanmayanlar 3: Yıkama 4-8: FUS elüsyonlar.



Şekil 6.17: FUS ikinci step afinite kromatografisi sonuçları 3M üre ile (a) ÄKTA Pure kromatogram (b) Saflaştırma sonuçları SDS-PAGE M: marker, 1: FUS protein dilüsyonu üre ile çözünmeden önce, 2: Kolona yüklenen Elüsyon d, 3: Bağlanmayanlar 4: Yıkama, 5-6: FUS Elüsyonlar (c) WB.

6.4. NMR Protein Etkileşimleri

Çözelti NMR spektroskopisi, atomik çözünürlük yapısını bozmadan amino asit seviyesi doğruluğu ile hedef protein-protein, protein-ilaç etkileşimini gösteren benzersiz bir tekniktir (Ziarek et al., 2011).

5 mm çapında NMR Shigemi tüpü için örnekler 400- 450 ul hacimde olması gerektiğinden pürifiye FUS ve Ccdc124 proteinleri 400 ul hacimde tüplere aktararak sırasıyla 40.44 nM ve 78.13 nM konsantrasyonunda ve %10 D₂O içinde incelenmiştir.

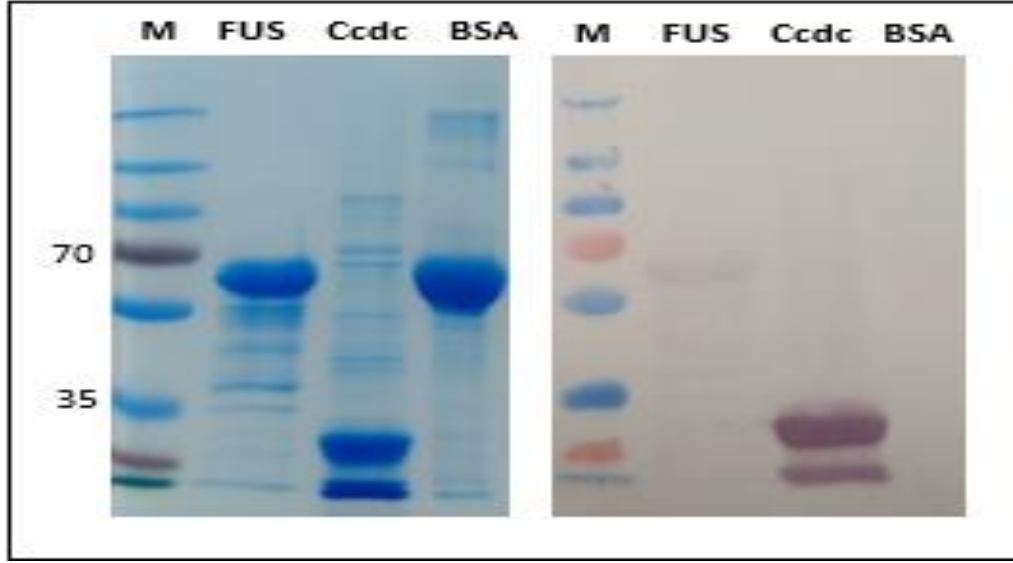
Proteinlerin hem düşük konsantrasyonu hem de N ve C atomlarının işaretli izotoplar olmaması sebebiyle NMR spektrumunda protein peptid bağına ait N-H 'in

hidrojen atomları gözlemlenememiştir. Proteinlerin yapı ve etkileşim analizleri için dört adet NMR aktif olan çekirdek izotopu (^1H , ^{15}N , ^{13}C , ^2H) biyomoleküler NMR’da kullanılmaktadır. Bu izotoplar proteinlerde doğal olarak ^{15}N % 0.36, ^{13}C %1 gibi çok düşük miktarlarda bulunmaktadır. İzotop etiketleme (isotope labelling) işlemi ile bakterilerin büyüme aşamasında etiketli atomlar, karbon ve nitrojen kaynağı olarak kullanılmakta bu şekilde üretilen rekombinant proteinler işaretli atomlara sahip olmaktadır.

FUS ve Ccdc124’ün C ve N atomları işaretli izotoplar olmadığı için protein etkileşimleri için gereken 2 boyutlu HSQC deneyi yapılamamıştır. Tek boyutlu ^1H NMR tekniği ile proteinde bulunan hidrojen atomlarının spektrumu elde edilmeye çalışılmış fakat hidrojen atomlarının doğal olarak bulunma oranı %>99.9 olmasına rağmen proteinlerin konsantrasyonu NMR spektrumdaki kimyasal kayma analizleri için düşük kalmıştır. FUS’un içinde bulunduğu elüsyon tamponundaki imidazol 7-8 ppm’de iki ayrı pik olarak, 3 M üreyi gösteren 5.5 ppm’de peak olarak gözlemlenmiştir.

6.5. Far Western Blot

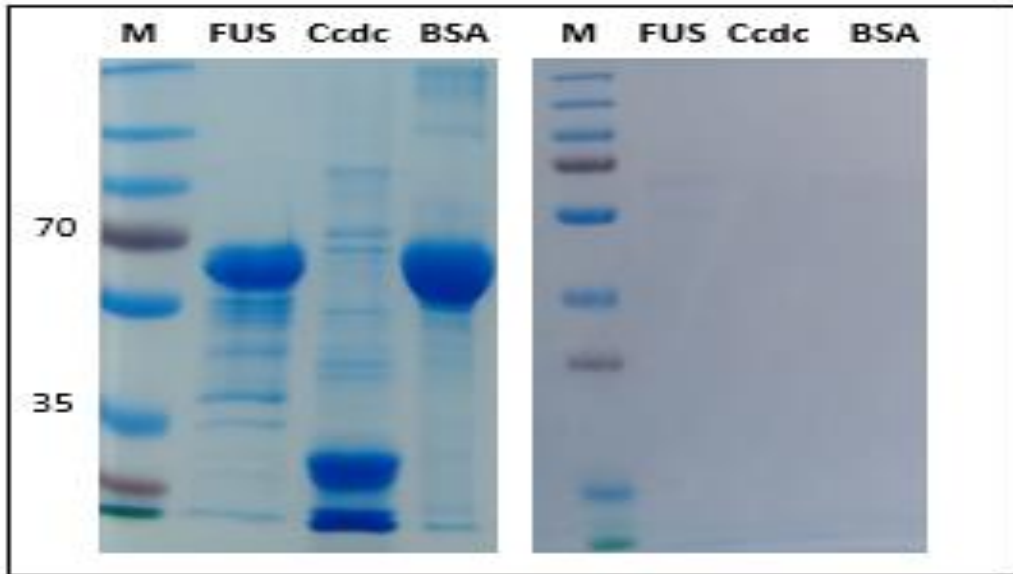
Far Western Blot, saflaştırılan FUS ve Ccdc124 proteinleri arasındaki etkileşiminin incelenmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir. Ayrı jellerde hem FUS hem Ccdc124 proteinleri ve kontrol proteinler Laemmli protein yükleme tamponu ile denatüre edilerek SDS-PAGE ile ayrılmıştır. Moleküler ağırlıklarına göre ayrılan proteinler, membrana aktararak üre içeren tamponlar aracılığıyla denatürasyon ve üre konsantrasyonunun azaldığı tamponlarda renatürasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. Membrandaki FUS proteinine Ccdc124 ve membrandaki Ccdc124 proteinine FUS proteinler bait olarak eklenmiş, bait proteinlere spesifik olarak anti-Ccdc124 ve anti-FUS antikorları kullanılarak etkileşim incelenmiştir. Şekil 6.18 ve Şekil 6.19 Far WB sonuçlarını göstermektedir.



Şekil 6.18: Bait protein olarak Ccdc124 Far Western Blot sonuçları. Prey FUS proteini + Bait Ccdc124 proteini + Anti- Ccdc124 Antikoru.

Far Western Blot sonuçlarına göre membranda bulunan FUS proteini, Ccdc124 proteini ile etkileşim sonucunda anti-Ccdc124 antikoru ile spesifik olarak tespit edilmiştir (Şekil 6.18).

SDS-PAGE jeli ile ayrılarak ayrı bir nitroselüloz membrana aktarılan proteinler, bait FUS proteini ile gece boyu inkübasyon sonucunda, anti-FUS antikoru ile tespit edilememiştir (Şekil 6.19).



Şekil 6.19: Bait protein olarak FUS Far Western Blot sonuçları. Prey Ccdc124 Proteini + Bait FUS proteini + Anti-FUS Antikoru.

7. TARTIŞMA

2013 yılında Özge Arslan tarafından yapılan doktora tez çalışmasında Ccdc124 proteininin G3BP1, PABPC1, HSP27 gibi stres granülü proteinleriyle etkileştiği gösterilmiş bu nedenle Ccdc124'ün de stres granüllerinde yer alabileceği hipotezine yönelik çalışmalar yapılmıştır. Yapılan deneyler sonucunda Ccdc124'ün G3BP1 ile sıcaklık stresi üzerine aynı granüllerde yer aldığı fakat oksidatif stres durumunda bu beraber konumlanmanın gerçekleşmediği görülmüştür [3].

Ccdc124'ün olası etkileşim partnerlerini bulmaya yönelik yapılan Bio-ID testi ve ardından yapılan kütle spektrometresi deneyi ile FUS proteini en yüksek skor değeri almıştır. FUS proteini, RNA 'ya bağlanarak işlev görmesi, düzensiz bölgeler içermesi ve stres granüllerinde konumlanıyor olması, Ccdc124'ün FUS'la etkileşerek stres granüllerinde konumlanması ile nörodejeneratif hastalıklarla ilişkili olabileceği ihtimalini desteklemektedir.

FUS proteini, gen ekspresyonu, mRNA transportu, pre-mRNA işlenmesi gibi görevlerde bulunan RNA'ya bağlanan bir protein ve stres granülü olarak bilinen stres kaynaklı ribonükleoprotein kompleksi granüllerinin bileşenlerinden biridir. FUS, ağırlıklı olarak çekirdekte yer almasına karşın, meydana gelen mutasyonlar veya stres granülündeki yanlış faz geçişleri ile sitoplazmada kalıcı hale gelir ve ALS hastalığı durumundaki motor nöronların sitoplazmasındaki agregat halini alır [61].

FUS'un farklı domainleri bulunmasına karşılık N terminalinde bulunan Prion benzeri domaini, Sıvı sıvı faz ayrımı (LLPS) olarak bilinen bir süreç ile sitoplazmadaki artmış FUS konsantrasyonunu hastalığa yatkın hale getirir. Sıvı- sıvı faz ayrımı ile damlacık içinde biriken proteinin yüksek konsantrasyonları, meydana gelen anormal geçişler ile damlacığın sıvı formdan katı hale geçişini destekler. Bu damlacıkların içinde temel olarak bulunan RNA'da faz geçişlerini yönetir. Düşük RNA:FUS konsantrasyonlarında bir çekirdekleyici gibi davranarak FUS proteinlerinin toplanmasına izin verir, fakat yüksek RNA: FUS durumlarında ise bu toplanmaya antagonist olarak davranmaktadır [62].

Yapılan bu tez çalışması kapsamında rekombinant Ccdc124 ve FUS proteinlerinin *E.coli* BL21DE3 ekspresyon sistemi kullanılarak aşırı ekspresyonu sağlanmıştır. Ccdc124 proteini, *E.coli*'de çözünür ve doğal formunda sentezlenirken FUS proteini, sulu çözeltilerde çözünmeyen sitoplazmik inklüzyon cisimciği formunda üretilmiştir.

E.Coli’de yüksek düzeyde rekombinant protein üretimi inklüzyon proteinleri oluşumu ile sonuçlanmaktadır [63]. İnküzyon proteinleri, dinamik, geri dönüşümlü (reversible) yapılardır ve native-like ikincil yapılar içermektedirler [64]. Protein ekspresyonu sırasında yüksek sıcaklığın kullanılması, yüksek indükleyici konsantrasyonu ve güçlü promotör sistemleri altında ekspresyon sıklıkla istenen proteinin yüksek translasyon hızında ekspresyonu ile sonuçlanmaktadır. Bu, bakteriyel protein kalite kontrol sistemini tüketmekte ve kısmen katlanmış veya yanlış katlanmış proteinleri, inklüzyon cisimcikleri oluşturmak üzere toplanmaktadır. İnküzyon proteinler, guanidin hidroklorür ve üre gibi kaotrofik ajanların yüksek konsantrasyonu ile çözünmektedir. Proteinlerin kararlılığı, büyük ölçüde çözücü molekülü arasındaki hidrojen bağı ağlarının varlığına bağlı olduğundan kaotropik ajanlar, proteinlerin stabilitesini ya doğrudan onlara bağlanıp aralarındaki hidrofobik etkileşimleri bozarak ya da hidrojen bağı bozup çözücünün özelliklerini değiştirerek değiştirebilirler [65]. Kaotropik ajanlar içerisinde 6 M guanidin hidroklorür ve 8 M üre en sık kullanılan solubilize ajandır. Ayrıca DTT ve BE yanlış kurulan disülfür bağlarını indirgemek için solubilize ajanlara eklenebilmektedir. Saflaştırma açısından ise, inklüzyon cisimciği formundaki protein, bakterinin hücresel proteinlerin yoğun olduğu süpernatantan eldeye göre daha saf ve daha konsantre halde izole edilebilmektedir.

İnküzyon cisimciği haldeki FUS yerine çözünür formda FUS eldesi için ekspresyon aşamasında besiyeri hacmi, ekspresyon sıcaklığı, IPTG konsantrasyon optimizasyonları denenmiş fakat nihayetinde proteinin çözünür formda eldesi için kaotropik ajanlar kullanılmıştır. Düşük üre konsantrasyonunda çözünebilir ve daha az miktarda beta yapısına sahip inklüzyon proteinler, klasik olmayan inklüzyonlar olarak bilinirler ve çalışmamızla 3 M üre konsantrasyonu ile çözünen FUS’un bu grupta olduğu sonucuna varılmıştır.

Ayrıca literatür araştırmaları FUS proteinin çözünür formda üretilmesinin vektördeki etiketlerle ilişkili olduğu gerçeğini açığa çıkarmıştır. MBP (Maltose Binding Protein) ve SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier) gibi çözünür etiketlerin rekombinant FUS protein ekspresyon seviyelerini yükselttiği ve şaperon görevini üstlenerek doğru protein katlanması üzerinde olumlu sonuçları gösterilmiştir.

Yüksek miktarda saflaştırılmış protein elde etmek için bakteri hücresi parçalanarak hücre proteinleri, nükleik asitleri, peptidoglikan hücre duvarı ve hücre zarı parçalarını uzaklaştırmak için çeşitli kromatografik saflaştırma adımları kullanılmıştır. Bakteri hücresi parçalandıktan sonra santrifüjleme işlemi ile

süpernatanta yer alan Ccdc124 proteini native olarak iki adımlı kromatografi tekniği ile saflaştırılırken, inklüzyon cisimciği halindeki FUS proteini santirifüj işlemiyle diğer hücresel bileşenlerden daha yoğun olduğu için pellet olarak elde edilmiş, deterjanlarla yıkanıp, denatüre edilerek saflaştırılmıştır.

Tez çalışması boyunca proteinler İyon Değişimi ve Afinite kromatografisi ile saflaştırılarak pürifiye şekilde elde edilmiştir. Afinite saflaştırması, bir rezin matrikse immobilize edilmiş bir ligand ile ona bağlanan protein partneri arasındaki spesifik bağlanma etkileşimine dayanan bir ayırma tekniğidir. Histidin etiketli Ccdc124 ve FUS, Nikel iyonuna sahip kolon kullanılarak imidazolün yüksek konsantrasyonu ile elde edilmiştir. Ccdc124 için yapılan diğer bir saflaştırma iyon değişimi kromatografisinde ise proteinlerdeki iyonlaşabilen moleküllerin toplam yüküne göre ayırım gerçekleşir ve yüklü rezine bağlanarak protein kolonda tutulur. Ardından protein eldesi için tuz ya da pH gradienti kullanılarak kolona bağlanan protein elüt edilir. Ccdc124 proteini, 700 mM NaCl konsantrasyondaki elüsyon tamponu ile kolondan ayrılmıştır.

Saflaştırma adımları arasında ve final protein eldesindeki tampon değişimi özel membranlara sahip konsantratörler ile Ccdc124 proteini 1X PBS tamponuna alınmıştır. Saflık oranı yüksek proteinler Ccdc124: 2.6 mg/ml ve FUS: 2.9 mg/ml konsantrasyonunda elde edilerek NMR ve Far Western Blot analizine hazır hale getirilmiştir.

Bir boyutlu (1D) ^1H NMR analizinde sinyal/gürültü oranını artırmak için gereken 1 mM'dan yüksek protein konsantrasyonları, her iki proteinin yapısındaki agregasyona eğilimli bölgeler nedeniyle elde edilememiş ayrıca izotop etiketleme yapılmadığı için proteinlerdeki H atomlarının pikleri görülememiştir.

FUS-Ccdc124 etkileşim analizi için yapılan Far Western Blot tekniğinde membrandaki Ccdc124 proteinine eklenen bait FUS'a karşılık anti-FUS ile bant tespit tespit edilememiştir. Anti-FUS antikoru membrandaki FUS proteini ile de bant oluşturmadığı için buradaki görülemeyen etkileşim sebebinin birincil antikor olması muhtemeldir. Membranda bulunan FUS proteinine eklenen Ccdc124 proteinine karşılık anti Ccdc124 antikorla non spesifik olarak bant elde edilmiştir. Far Western Blot tekniğinde transfer işleminin doğruluğu, bloklama solüsyonu ile inkübasyon ve yıkamaların zamanı gibi ayrı işlemler tespit edilmek istenen etkileşimi doğrudan etkilemektedir. Bu nedenle, Far Western Blot tekniğindeki her bir aşamanın kendi içinde optimizasyonlara tabi tutulması gerekir.

2016 yılında FUS'un proteomik analizi sonucunda yapılan immün çöktürme ve proteomik çalışmaları ile ortaya çıkarılan etkileşim proteinleri özellikle ribonükleoprotein komplekslerinde yer alan proteinlerdir. Bu proteinler daha çok IMP1 bağımlı ribonükleoprotein (RNP) granülleri, taşıma granülleri ve stres granülünde bulunmaktadır [66]. Ccdc124'ün stres granülünde yer aldığını gösteren çalışmalar ile FUS ile stres granülünde bulunması muhtemeldir. Yine aynı çalışmada RNAaz kullanılarak yapılan pull down deneylerinde, RNA'nın bulunduğu durumlarda FUS ile partnerleri arasında etkileşim gücünün arttığı gösterilmiştir. Ccdc124'ün de RNA'ya bağlanan bir protein olması her iki proteinin RNA varlığında etkileşebilecekleri hipotezini desteklemektedir.

FUS'un sıvı sıvı faz ayrımı yaptığı ve yapmadığı durumlarda etkileşimde bulunduğu partnerlerini belirlemek için yapılan bir çalışma ise LLPS durumunda interaktomunun değiştiğini göstermektedir. Ayrıca fazla ayrılmış durumda FUS ve etkileşim partnerlerinin lokal konsantrasyonunun artmasıyla nedeniyle LLPS yapmadığı durumlara göre etkileşim gücünün arttığı gösterilmiştir. Bu çalışmada da etkileşimde olduğu partnerleri büyük çoğunlukla RNA kırılma, ribozom biyogenezis ve translasyonda görevli proteinlerdir [67]. Ccdc124'ün de yüklü aminoasit sekansı, hidrofobik çekirdekten yoksun oluşu ve düzensiz bölgelere sahip olması onun LLPS yaptığına, FUS ile aynı LLPS kompartmanında yer alabileceğine ilişkin hipotezimizi desteklemektedir.

Gerçek zamanlı bağlanma kinetiğini ortaya çıkaran teknikler kullanılarak pürifiye FUS ve Ccdc124 proteinleri arasında etkileşim gücü ve lokalizasyonu daha ileri çalışmalarla ortaya çıkarılabilir.

KAYNAKLAR

- [1] Arslan Ö., Soylu N. K., Akillilar P. T., Tazebay U. H., (2021), “Coiled-coil domain-containing protein-124 (Ccgc124) is a novel RNA binding factor up-regulated in endometrial, ovarian, and urinary bladder cancers”, *Cancer Biomarkers: Section A of Disease Markers*, 31(2), 149–164.
- [2] Tuzlakoğlu Öztürk, M., Güllülü Ö., (2022), “Dimerization underlies the aggregation propensity of intrinsically disordered coiled-coil domain-containing 124”, *Proteins*, 90(1), 218–228.
- [3] Arslan Ö., (2021), “Olası bir RNA bağlayıcı protein olan coiled-coil domain containing protein 124 (CCDC 124)’ ün etkileştiği RNA hedeflerinin belirlenmesi ve insan kanser doku örneklerinde ifade seviyelerinin incelenmesi”, Doktora Tezi, Gebze Teknik Üniversitesi.
- [4] Chen C., Ding X., Akram N., Xue S., Luo S. Z., (2019), “Fused in Sarcoma: Properties, Self-Assembly and Correlation with Neurodegenerative Diseases”, *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(8), 1622.
- [5] Telkoparan P., (2013), “Characterization of the coiled-coil domain-containing protein 124 (Ccgc124) as a novel centrosome and midbody component involved in cytokinesis”, Doktora Tezi, Bilkent Üniversitesi.
- [6] Arslan Ö., (2015), “Coiled-Coil Domain Containing Protein 124 (CCDC 124) Artışının Hücre Fizyolojisine ve Bölünmesine Etkileri”, Yüksek Lisans Tezi, Gebze Teknik Üniversitesi.
- [7] Wang Y. J., Vaidyanathan P. P., Rojas-Duran M. F., Udeshi N. D., Bartoli K. M., Carr S. A., Gilbert W. V., (2018), “Lso2 is a conserved ribosome-bound protein required for translational recovery in yeast”, *PLoS Biology*, 16(9), e2005903.
- [8] Telkoparan P., Erkek S., Yaman E., Alotaibi H., Bayik D., Tazebay U. H., (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”, *Public Library of Science One*, 8, e69289.
- [9] Kechavarzi B., Janga S.C., (2014), “Dissecting the expression landscape of RNA-binding proteins in human cancers”, *Genome Biology* 15, R14.
- [10] Novikova S., Tolstova T., Kurbatov L., Farafonova T., Tikhonova O., Soloveva N., Rusanov A., Archakov A., Zgoda V., (2022), “Nuclear Proteomics of Induced Leukemia Cell Differentiation”, *Cells*, 11(20), 322.
- [11] Barnum K. J., O’Connell M. J., (2014), “Cell cycle regulation by checkpoints”, *Methods in Molecular Biology*, 1170, 29–40.

- [12] Mierzwa B., Gerlich D. W. (2014), "Cytokinetic abscission: molecular mechanisms and temporal control", *Developmental Cell*, 31(5), 525–538.
- [13] Ford L. K., Fioriti L., (2020), "Coiled-Coil Motifs of RNA-Binding Proteins: Dynamicity in RNA Regulation", *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 607947.
- [14] Cook K. B., Kazan H., Zuberi K., Morris Q., Hughes T. R., (2011), "RBPDB: a database of RNA-binding specificities", *Nucleic Acids Research*, 39, D301–D308.
- [15] Castello A., Fischer B., Eichelbaum K., Horos R., Beckmann B. M., Strein C., Davey N. E., Humphreys D. T., Preiss T., Steinmetz L. M., Krijgsveld J., (2012), "Insights into RNA biology from an atlas of mammalian mRNA-binding proteins", *Cell*, 149(6), 1393–1406.
- [16] Hein M. Y., Hubner N. C., Poser I., Cox J., Nagaraj N., Toyoda Y., Gak I. A., Weisswange I., Mansfeld J., Hyman A. A., Mann M., (2015), "A human interactome in three quantitative dimensions organized by stoichiometries and abundances", *Cell*, 163(3), 712–723.
- [17] Park W. M., (2020), "Coiled-Coils: the Molecular Zippers that Self-Assemble Protein Nanostructures" *International Journal of Molecular Sciences*, 21(10), 3584.
- [18] Truebestein, L., Leonard T. A., (2016), "Coiled-coils: The long and short of it", *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 38(9), 903–916.
- [19] White G. E., Erickson H. P., (2006), "Sequence divergence of coiled coils--structural rods, myosin filament packing, and the extraordinary conservation of cohesins", *Journal of Structural Biology*, 154(2), 111–121.
- [20] Behbahanipour M., García-Pardo, J., Ventura, S., (2021), "Decoding the role of coiled-coil motifs in human prion-like proteins", *Prion*, 15(1), 143–154.
- [21] Wickner R., Edskes H., Shewmaker F., Nakayashiki T., (2007), "Prions of fungi: inherited structures and biological roles", *Nature Review Microbiology*, 5, 611–618.
- [22] Ciani B., Hutchinson E. G., Sessions R. B., Woolfson D. N., (2002), "A designed system for assessing how sequence affects alpha to beta conformational transitions in proteins", *The Journal of Biological Chemistry*, 277(12), 10150–10155.
- [23] Kedersha N., Cho M. R., Li W., Yacono P. W., Chen S., Gilks N., Golan D. E., Anderson P., (2000), "Dynamic shuttling of TIA-1 accompanies the recruitment of mRNA to mammalian stress granules", *The Journal of cell biology*, 151(6), 1257–1268.
- [24] An H., Litscher G., Watanabe N., Wei W., Hashimoto T., Iwatsubo T., Buchman V. L., Shelkovernikova T. A., (2022), "ALS-linked cytoplasmic FUS assemblies are compositionally different from physiological stress granules and sequester

- hnRNPA3, a novel modifier of FUS toxicity'', *Neurobiology of Disease*, 162, 105585.
- [25] Boeynaems S., Alberti S., Fawzi N. L., Mittag T., Polymenidou M., Rousseau F., Schymkowitz J., Wolozin B., Tompa P., Fuxreiter M., (2018), ''Protein Phase Separation: A New Phase in Cell Biology'', *Trends in Cell Biology*, 28(6), 420–435.
 - [26] Wolozin B., Ivanov P., (2019), ''Stress Granules and Neurodegeneration'', *Nature reviews: Neuroscience*, 20(11), 649–666.
 - [27] Polymenidou M., Lagier-Tourenne C., Hutt K., (2011), ''Long pre-mRNA depletion and RNA missplicing contribute to neuronal vulnerability from loss of TDP-43'', *Nature Neuroscience* 14, 459–468.
 - [28] Kwiatkowski T. J., Jr, Bosco D. A., Leclerc A. L., Tamrazian E., Vanderburg C. R., Russ C., Davis A., Hosler B. A., Haines J. L., Pericak-Vance M. A., Yan J., Ticozzi N., (2009), ''Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis'', *Science (New York, N.Y.)*, 323(5918), 1205–1208.
 - [29] Nomura T., Watanabe S., Kaneko K., Yamanaka K., Nukina N., Furukawa Y., (2014), ''Intranuclear aggregation of mutant FUS/TLS as a molecular pathomechanism of amyotrophic lateral sclerosis'', *The Journal of Biological Chemistry*, 289(2), 1192–1202.
 - [30] Deng H. X., Zhai H., Bigio E. H., Yan J., Fecto F., Ajroud K., Mishra M., Ajroud-Driss S., Mugnaini E., Siddique T., (2010), ''FUS-immunoreactive inclusions are a common feature in sporadic and non-SOD1 familial amyotrophic lateral sclerosis'', *Annals of Neurology*, 67(6), 739–748.
 - [31] Ederle, H., Dormann D., (2017), ''TDP-43 and FUS en route from the nucleus to the cytoplasm'', *FEBS Letters*, 591(11), 1489–1507.
 - [32] Iko, Y., Kodama T. S., Kasai N., Oyama T., Morita E. H., Muto T., Okumura M., Fujii R., (2004), ''Domain architectures and characterization of an RNA-binding protein, TLS'', *The Journal of Biological Chemistry*, 279(43), 44834–44840.
 - [33] Sharma A., Lyashchenko A., Lu L., (2016), ''ALS-associated mutant FUS induces selective motor neuron degeneration through toxic gain of function'', *Nature Commun* 7, 10465.
 - [34] Bentmann E., Neumann M., Tahirovic S., Rodde R., Dormann D., Haass C., (2012), ''Requirements for stress granule recruitment of fused in sarcoma (FUS) and TAR DNA-binding protein of 43 kDa (TDP-43)'', *The Journal of Biological Chemistry*, 287(27), 23079–23094.
 - [35] Shelkovernikova T. A., Robinson H. K., Southcombe J. A., Ninkina N., Buchman V. L., (2014), ''Multistep process of FUS aggregation in the cell cytoplasm involves

- RNA-dependent and RNA-independent mechanisms'', *Human Molecular Genetics*, 23(19), 5211–5226.
- [36] Shelkovnikova T. A., Peters O. M., Deykin, A. V., Connor-Robson N., Robinson H., Sadchikova E. R., Kovrazhkina E. A., Parone P. A., Buchman V. L., (2013), "Fused in sarcoma (FUS) protein lacking nuclear localization signal (NLS) and major RNA binding motifs triggers proteinopathy and severe motor phenotype in transgenic mice'', *The Journal of Biological Chemistry*, 288(35), 25266–25274.
 - [37] Vance C., Scotter E. L., Nishimura A. L., Troakes C., Mitchell J. C., Kathe C., Urwin H., Manser C., Miller C. C., (2013), "ALS mutant FUS disrupts nuclear localization and sequesters wild-type FUS within cytoplasmic stress granules'', *Human Molecular Genetics*, 22(13), 2676–2688.
 - [38] Rhoads S. N., Monahan Z. T., Yee D. S., Shewmaker F. P., (2018), "The Role of Post-Translational Modifications on Prion-Like Aggregation and Liquid-Phase Separation of FUS'', *International Journal of Molecular Sciences*, 19(3), 886.
 - [39] Kamelgarn M., Chen J., Kuang L., Arenas A., Zhai J., Zhu H., Gal J., (2016), "Proteomic analysis of FUS interacting proteins provides insights into FUS function and its role in ALS'', *Biochimica et Biophysica Acta*, 1862(10), 2004–2014.
 - [40] Reber S., Jutzi, D., Lindsay H., Devoy A., Mechttersheimer J., Levone B. R., Domanski M., Bentmann E., Dormann D., (2021), "The phase separation-dependent FUS interactome reveals nuclear and cytoplasmic function of liquid-liquid phase separation'', *Nucleic Acids Research*, 49 (13), 7713–7731.
 - [41] Peng P. H., Hsu K. W., Wu K. J., (2021), "Liquid-liquid phase separation (LLPS) in cellular physiology and tumor biology'', *American Journal of Cancer Research*, 11(8), 3766–3776.
 - [42] Murthy A. C., Dignon G. L., Kan Y., Zerze G. H., Parekh S. H., Mittal J., Fawzi N. L., (2019), "Molecular interactions underlying liquid-liquid phase separation of the FUS low-complexity domain'', *Nature Structural and Molecular Biology*, 26(7), 637–648.
 - [43] Patel A., Lee H., Jawerth L., (2015), "A Liquid-to-Solid Phase Transition of the ALS Protein FUS Accelerated by Disease Mutation'', *Cell*, 162(5), 1066–1077.
 - [44] Lin Y., Protter D. S., Rosen M. K., Parker R., (2015), "Formation and Maturation of Phase-Separated Liquid Droplets by RNA-Binding Proteins'', *Molecular Cell*, 60(2), 208–219.
 - [45] Loughlin F. E., Wilce J. A., (2019), "TDP-43 and FUS-structural insights into RNA recognition and self-association'', *Current Opinion in Structural Biology*, 59, 134–142.
 - [46] Guo L., Shorter J., (2015), "It's Raining Liquids: RNA Tunes Viscoelasticity and Dynamics of Membraneless Organelles'', *Molecular Cell*, 60(2), 189–192.

- [47] Bonucci A., Murrall M. G., Banci L., Pierattelli R., (2020), ‘‘A combined NMR and EPR investigation on the effect of the disordered RGG regions in the structure and the activity of the RRM domain of FUS’’, *Scientific Reports*, 10(1), 20956.
- [48] Schwartz J. C., Wang X., Podell E. R., Cech T. R., (2013), ‘‘RNA seeds higher-order assembly of FUS protein’’, *Cell reports*, 5(4), 918–925.
- [49] Berggård T., Linse S., James P., (2007), ‘‘Methods for the detection and analysis of protein-protein interactions’’, *Proteomics*, 7(16), 2833–2842.
- [50] Gonzalez M. W., Kann M. G., (2012), ‘‘Protein interactions and disease’’, *Plos Computational Biology*, 8(12), e1002819.
- [51] Venkatesan K., Rual J. F., Vazquez A., Stelzl U., Lemmens I., Hirozane-Kishikawa T., Hao T., Zenkner M., Xin X., Goh K. I., Yildirim M. A., Simonis N., Heinzmann K., Gebreab F., Sahalie J. M., Cevik S., Simon C., de Smet A. S., Dann E., Smolyar A., Vidal M., (2009), ‘‘An empirical framework for binary interactome mapping’’, *Nature Methods*, 6(1), 83–90.
- [52] Lu H., Zhou Q., He J., Jiang Z., Peng C., Tong R., Shi J., (2020), ‘‘Recent advances in the development of protein-protein interactions modulators: mechanisms and clinical trials.’’, *Signal transduction and targeted therapy*, 5(1), 213.
- [53] González-Avendaño M., Zúñiga-Almonacid S., Silva I., Lavanderos B., Robinson F., Rosales-Rojas R., (2021), ‘‘PPI-MASS: An Interactive Web Server to Identify Protein-Protein Interactions From Mass Spectrometry-Based Proteomics Data’’, *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8, 701477.
- [54] Luck K., Kim DK., Lambourne L., (2020), ‘‘A reference map of the human binary protein interactome’’, *Nature*, 580, 402–408.
- [55] Purslow J. A., Khatiwada B., Bayro M. J., Venditti V., (2020), ‘‘NMR Methods for Structural Characterization of Protein-Protein Complexes’’, *Frontiers in Molecular Biosciences*, 7, 9.
- [56] Kang C., (2019), ‘‘Applications of In-Cell NMR in Structural Biology and Drug Discovery’’, *International Journal of Molecular Sciences*, 20(1), 139.
- [57] Gao G., Williams J. G., Campbell S. L., (2004), ‘‘Protein-protein interaction analysis by nuclear magnetic resonance spectroscopy’’, *Methods in Molecular Biology*, 261, 79–92.
- [58] Kaelin W. G., Jr, Krek W., Sellers W. R., De Caprio J. A., Ajchenbaum F., Fuchs C. S., Chittenden T., Li Y., Farnham P. J., Blunar M. A., (1992), ‘‘ Expression cloning of a cDNA encoding a retinoblastoma-binding protein with E2F-like properties’’, *Cell*, 70(2), 351–364.
- [59] Gupta R., Sharma, S., Sommers J. A., Kenny M. K., Cantor S. B., (2007), ‘‘FANCD1 (BACH1) helicase forms DNA damage inducible foci with replication protein A

- and interacts physically and functionally with the single-stranded DNA-binding protein”, *Blood*, 110(7), 2390–2398.
- [60] Müller-McNicoll M., Neugebauer K., (2013), “How cells get the message: dynamic assembly and function of mRNA–protein complexes”, *Nature Review Genetic*, 14, 275–287.
 - [61] Harrison A. F., Shorter J., (2017), “RNA-binding proteins with prion-like domains in health and disease”, *The Biochemical Journal*, 474(8), 1417–1438.
 - [62] Portz B., Lee, Shorter J., (2021), “FUS and TDP-43 Phases in Health and Disease”, *Trends in Biochemical Sciences*, 46(7), 550–563.
 - [63] Williams D.C., Van Frank R. M Muth, J P., Bunnell W.L., (1982), “Cytoplasmic inclusion bodies in *Escherichia coli* producing biosynthetic human insulin proteins”, *Science*, 215, 687–689.
 - [64] Ventura S., Villaverde A., (2006), “Protein quality in bacterial inclusion bodies”, *Trends in Biotechnology*, 24(4), 179–185.
 - [65] Salvi G., De Los Rios P., Vendruscolo M., (2005), “Effective interactions between chaotropic agents and proteins”, *Proteins*, 61(3), 492–499.
 - [66] Kamelgarn M., Chen, J., Kuang L., Arenas A., Zhai J., Zhu H., Gal J., (2016), “Proteomic analysis of FUS interacting proteins provides insights into FUS function and its role in ALS”, *Biochimica et Biophysica acta*, 1862(10), 2004–2014.
 - [67] Reber S., Jutzi D., Lindsay H., Devoy A., Mechttersheimer J., Levone B. R., Domanski M., Bentmann E., Dormann D., Mühlemann O., Barabino S. M. L., Ruepp M. D., (2021), “The phase separation-dependent FUS interactome reveals nuclear and cytoplasmic function of liquid-liquid phase separation.”, *Nucleic Acids Research*. 49(13), 7713–7731.

ÖZGEÇMİŞ

Tuğba DURAN, Bartın Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nden mezun oldu. Gebze Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde yüksek lisans eğitimine başladı. Yüksek Lisans tez çalışmasını eş danışmanı Dr. Hasan Ümit Öztürk gözetiminde TÜBİTAK MAM İTAL Protein Saflaştırma ve Karakterizasyon Laboratuvarı'nda tamamlamıştır.