

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

COILED-COIL DOMAIN CONTAINING PROTEIN 124
(CCDC 124) ARTIŞININ HÜCRE FİZYOLOJİSİNE VE
BÖLÜNMESİNE ETKİLERİ

ÖZGE ARSLAN
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

GEBZE
2015

**T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**COILED-COIL DOMAIN CONTAINING
PROTEIN 124 (CCDC 124) ARTIŞININ
HÜCRE FİZYOLOJİSİNE VE
BÖLÜNMESİNE ETKİLERİ**

**ÖZGE ARSLAN
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**DANIŞMANI
DOÇ. DR. UYGAR HALİS TAZEBAY**

**GEBZE
2015**

T.R.
GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF SCIENCES

**EFFECTS OF COILED-COIL DOMAIN
CONTAINING PROTEIN 124 (CCDC 124)
OVEREXPRESSION ON CELLULAR
PHYSIOLOGY AND CELL DIVISION**

ÖZGE ARSLAN
A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE
DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND GENETIC

THESIS SUPERVISOR
ASSOC. PROF. DR. UYGAR HALİS TAZEBAY

GEBZE

2015

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

GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 05/12/2014 tarih ve 2014/67 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 19/12/2014 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Özge ARSLAN'ın tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE
(TEZ DANIŞMANI) : Doç. Dr. Uygur Halis TAZEYAY
ÜYE : Prof. Dr. Tamer YAĞCI
ÜYE : Yrd. Doç. Dr. Tunahan ÇAKIR

Uygur H. Taze Yay
Tamer Yağci
Tunahan Çakir

ONAY

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

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

Ccdc124 (Coiled-coil domain-containing 124) memeli hücrelerinde işlevi yeni tanımlanmış bir proteindir. İnsan hücrelerinde proteinin lokalizasyonu hücre döngüsünün interfaz evresinde sentrozom; mitozun post-anafaz, telofaz ve sitokinez evrelerinde ise orta-cisimcik (midbody) olarak belirlenmiştir. Geçmişte yapılan bilimsel çalışmalarda Ccdc124 proteinini kodlayan genin susturulması durumunda hücreler üzerinde meydana gelen değişiklikler kısmi olarak araştırılmış ve bu durumun hücrelerin bölünememesiyle sonuçlandığı ve çok çekirdekli hücrelerin meydana gelmesine neden olduğu belirlenmiştir [Telkoparan, 2013]. Yapılan bu tez çalışmasında ise insan osteosarkoma hücre hattına (U2OS) ait hücreler üzerinde Ccdc124 proteininin aşırı ifade edilmesine bağlı değişikliklerin moleküler ve morfolojik düzeyde incelenmesi sağlanmıştır. Bu proteine ait genin, aşırı ifade edilmesinin sağlanması için insan Ccdc124 geni taşıyan ifade vektörleri kullanılmış ve ilgili genin transfeksiyona bağlı ifade artışı immüno blot analizleriyle doğrulanmıştır. İmmünofloresan analizler sonucunda ise aşırı ifade edilen Ccdc124 proteinin, G1 ve erken profaz evresinde sentrozomda konumlandığı bulgulanmıştır. Bunu takiben yapılan hücre akım sitometri analizleriyle de Ccdc124 proteinin ifadesindeki artışın sitokinez mekanizmasında olumsuz bir etki yaratarak sitoplazma bölünmesini engellediği ve popülasyondaki çok çekirdekli hücre sayısında belirgin bir artışa sebep olduğu tespit edilmiştir. Çalışmaya ek olarak Ccdc124 proteiniyle etkileştiği bilinen ve bir orta cisimcik proteini olan RasGEF1B (Ras guanin nükleotit değiştirici faktör 1B)'nin birbirine bağlanma bölgeleri araştırılmıştır. Bu deney için transfekte edilen HEK 293 hücre hatlarına ait lizatlara birlikte çöktürme yöntemi uygulanmış, ardından kullanılan immüno blot yöntemiyle RasGEF1B'nin Ccdc124 proteinine bu proteinin C son ucuna yakın olan bölgesinden bağlandığı bulgulanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Coiled-Coil Domain124 (Ccdc124), Sitokinez, U2OS, RasGEF1B, HEK293, Hücre Akım Sitometrisi.

SUMMARY

Ccdc124 (Coiled-coil domain-containing 124) is a protein whose function is newly identified in mammalian cells. It is localized at centrosome in interphase and at midbody zone in post anaphase, telophase and cytokinesis during the cell cycle in human cells. In previous studies it was shown that knocking-down Ccdc124 gene resulted in inhibition of cytokinesis and generation of multinuclated cells [Telkoparan et al., 2013]. In this thesis, it is aimed to investigate effects of Ccdc124 overexpression by morphological and molecular technics in human osteosarcoma cell line (U2OS). First of all, U2OS cells are transfected with human Ccdc124 expression vector to overexpress this protein and the expression level is controlled with western blot analysis. By using immunofluorescence analysis, it is determined that Ccdc124 protein is localized at centrosome in G1 and early prophase. Additionally, flow cytometry analyses show that the overexpression of this protein causes cytokinesis failure and a significant increase in the number of multinucleated cells. In the second part of this study, the interaction between Ccdc124 and a midbody protein Ras guanine-nucleotide exchange factor (RasGEF1B) is investigated in human embryonic kidney 293 (HEK 293) cell line by co-immunoprecipitation (CoIP) method. Finally it is discovered that Ccdc124 protein has a binding region at its C terminal for the interaction of RasGEF1B.

Key Words: Coiled-Coil Domain124 (Ccdc124), Cytokinesis, U2OS, RasGEF1B, HEK293, Flow Cytometry.

TEŞEKKÜR

Başta tez çalışmam süresince beni yönlendiren ve Gebze Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü öğretim üyesi olan Sayın Doç. Dr. Halis Uygur TAZEBAY'a teşekkür ederim.

Bütün çalışmam boyunca yanımda olan, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan değerli arkadaşlarım Merve T. ÖZTÜRK, Türkan ÇAKAR, Z. Onur ÇALIŞKANER, Emrah ÖZÇELİK, Ömer GÜLLÜLÜ ve Abdullah Abdul WAHEED'e çok teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım sırasında desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen Pelin B. ERÇİN, Metin ÇETİN, Görkem ODABAŞ, İrem Y. CAMCI ve Serhat AKIN'a teşekkür ederim.

Tuğçe KESKİNER, Emrah KIRDÖK, F. Şeyma ÖZEN, Mehmet SARIHAN, Fatma SAĞIR, Veysel SÜZERER, Ebru TURHANLAR ve aynı katı paylaştığımız diğer arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bölüm başkanımız Sn. Prof. Dr. Tamer YAĞCI'ya, tüm MBG öğretim üyelerine ve aynı binayı paylaştığımız yüksek lisans/doktora öğrencilerine teşekkür ederim.

Bilimsel alana yönelmem konusunda bana ilham veren dedem Prof. Dr. Ruhi TÖRE'yi saygıyla anarak, benden desteklerini asla esirgememiş olan babam Dr. Ender ELTAN'a, vazgeçmememi sağlayan annem Bengi ELTAN'a, bilimsel anlamda yaptığımız tartışmalarla bana yeni bakış açıları sunan kardeşim Selen ELTAN'a teşekkür ederim.

Ve göstermiş olduğu desteklerinden dolayı sevgili eşim ve en zor zamanlarımı benimle paylaşan hayat arkadaşım Hakan ARSLAN'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği	2
2. HÜCRE DÖNGÜSÜ	4
2.1. Mitotik Evrelerin Moleküler Mekanizması	5
2.1.1. Mitoz Düzenleyici Faktörler	5
2.1.2. Anafaz Destekleyici Kompleks (APC) Molekülleri	6
2.2. Sitokinez	6
2.2.1. Sitokinezin Zamansal Düzenlemesi	8
2.2.2. Ayrılma Yarığının Oluşumu	9
2.2.3. Hücreler Arası Köprü Oluşumu	11
2.2.4. Orta Cisimcik (Midbody) Oluşumu	12
2.2.5. Ayrılma	14
3. COİLED-COİL DOMAIN CONTAINİNG PROTEİN 124 (Ccdc124)	16
4. RAS SUPER AİLESİ	18
4.1. Ras Guanin Nükleotit Değiştirici Faktör 1B (RasGEF1B)	19
5. MATERYAL ve YÖNTEM	21
5.1. Materyal	21
5.1.1. Hücre Hattı Seçimi	21
5.1.1.1. U2OS	21
5.1.1.2. HEK 293	21
5.1.2. Hücre Kültürü Solüsyonları	22

5.1.3. Liziz Solüsyonları	22
5.1.4. İmmünblot Solüsyonları	23
5.1.5. Flow Sitometri Solüsyonları	24
5.1.6. İmmüno Floresan Solüsyonları	24
5.1.7. Kimyasal Malzemeler	25
5.1.8. Kullanılan Cihazlar	26
5.1.9. Antikorlar	26
5.2. Yöntem	27
5.2.1. Hücre Kültürü	27
5.2.1.1. Hücre Kültürü Ortamı	27
5.2.1.2. Alt kültürleme ve Kültür saklama	27
5.2.2. Hücre Hattı Transfeksiyonu	27
5.2.2.1. Kalıcı Hücre Hattı Klonları Eldesi	28
5.2.2.2. Geçici Transfeksiyon	29
5.2.3. Liziz ve Protein Miktar Tayini	29
5.2.4. Birlikte Çöktürme Yöntemi	31
5.2.5. İmmünoblot Analizi	31
5.2.6. FACS Analizi	32
6. SONUÇLAR ve YORUMLAR	33
6.1. Sonuçlar	33
6.1.1. Ccdc124 Proteininin Aşırı İfadesinin U2OS Hücre Hattı Üzerindeki Etkileri	33
6.1.1.1. Transfekte Edilmiş U2OS Hücrelerinde Ccdc124 Proteininin İfade Profili	33
6.1.1.2. Ccdc124 Proteininin İfadesinin Arttırıldığı Hücrelerdeki Konumu	35
6.1.1.3. Ccdc124 Proteininin İfadesinin Arttırıldığı Hücrelerde Hücre Döngüsü Profili	38
6.1.1.4. Ccdc124 Proteinin İfade Artışının DNA Profiline Etkisi	43
6.1.2. Ccdc124 ve RasGEF1B Bağlanma Bölgesinin Saptanması	47
6.2. Yorumlar	48
6.2.1. Ccdc124 Proteininin Aşırı İfadesinin Hücre Döngüsü Üzerindeki Etkileri	48

6.2.2. Ccdc124 Proteini ile RasGEF Proteinin Etkileşim Bölgesinin Saptanması	50
KAYNAKLAR	52
ÖZGEÇMİŞ	58
EKLER	59

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler ve</u> <u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklamalar</u>
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
°C	: Derece Celsius
APC	: Anafaz destekleyici kompleks
APS	: Amonyum sülfat
C	: Sitokinez
Ccdc124	: Coiled-coil domain124
CK II	: Kazein kinaz II
CDK1	: Siklin bağımlı kinaz
CDK2	: Siklin kinaz 2
CoIP	: Birlikte çöktürme
FACS	: Akım sitometrisi
FBS	: Fetal sığır serumu
FSC	: Forward scatter
GFP	: Yeşil floresan protein
GTÜ	: Gebze Teknik Üniversitesi
g	: Gram
HEK 293	: İnsan embriyonik böbrek hücre hattı 293
ICB	: Hücreler arası köprü
IF	: İmmünofloresan
kDa	: Kilodalton
L	: Litre
M	: Mitoz
MBG	: Moleküler Biyoloji ve Genetik
mM	: Milimolar
MPF	: Olgunlaşmayı düzenleyici faktör
NIS	: Sodyum iyodid simporter

nm	: Nanometre
PBS	: Tuzlu fosfat tamponu
Plk1	: Polo-benzeri-kinaz 1
PRC1	: Sitokinez düzenleyici protein 1
RasGEF1B	: Ras guanin nükleotit değıştirici faktör 1B
Rpm	: Rotorun dakikadaki dönme hızı
SSC	: Side scatter
TEMED	: Tetrametiletilediamin
U2OS	: İnsan osteosarkoma hücre hattı
WB	: İmmünoblot

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: Hücre döngüsünün düzenlenmesinde görev alan G1, G2 ve M kontrol noktalarının şemasal gösterimi.	4
2.2: Anafaz düzenleyici kompleks (APC)'in mitozdan anafaza geçiş moleküler kontrol mekanizması.	6
2.3: Erken anafaz evresinden ayrılma evresine kadar gerçekleşen mikrotübül düzenlenmesi, hücreler arası köprü ve orta cisimcik oluşumu.	7
2.4: Sitokinezin Augmin, CDK1 ve Aurora-B moleküllerine ait aktif ve inaktif formların fosforillenmeye bağlı zamansal düzenlemesi.	8
2.5: Metafaz evresinden sitokinez evresinde gerçekleşen ayrılmaya kadar antiparalel mikrotübül organizasyonu ve ayrılma yarığının oluşumu.	9
2.6: RhoA bağımlı yolak sonucu aktomiyozin halkasının meydana gelerek ayrılma yarığının oluşumu.	10
2.7: Hücreler arası köprüye ait 17 nanometre çapındaki filamentlerden oluşan kasılma zonu ve yoğun mikrotübül demeti organizasyonu gösteren orta cisimcik yapısının mikroskop görüntüsü.	11
2.8: Orta cisimciğe ait elektron mikroskobu görüntüsü.	13
2.9: 17 nanometre çaplı filament oluşumu ve mikrotübüllerin tekrar organize olması sonucu meydana gelen sitokinetik ayrılma modeli.	15
3.1: Ccdc124 proteinine ait aminoasit dizisi.	16
3.2: Ccdc124 proteininin tahmini üç boyutlu yapısı.	17
4.1: G proteinlerinin GEF ve GAP proteinleriyle yolaklar üzerindeki aktive ve inaktive etme etkisi.	18
4.2: RasGEF1B proteininin tahmini üç boyutlu yapısı.	19
5.1: Deneyde kullanılan gruplara transfekte edilen plazmidlerin şemasal görüntüsü.	28
6.1: Kalıcı transfeksiyon için kullanılan plazmidlerin içerikleri.	33
6.2: Farklı boylarda Ccdc124 proteini ifade ettiği düşünülen U2OS hücre klonlarına ait bu proteinin ifadeleri.	34

6.3:	Sonraki aşamalarda kullanılmak üzere seçilen N2/10, 1-2/4, 2-2/8,3-3/7 gruplarına ait immüno blot yöntemiyle elde edilen membran görüntüleri.	35
6.4:	N2 grubuna ait G1 ve erken profaz fazındaki hücrelerin immunofloresan görüntüsü.	36
6.5:	1-2 grubuna ait G1 fazındaki hücelere ait immunofloresan görüntüsü.	36
6.6:	1-2 grubuna ait erken profaz fazındaki hücelere ait immunofloresan görüntüsü.	37
6.7:	2-2 grubuna ait G1 ve erken profaz fazındaki hücelere ait immunofloresan görüntüsü.	37
6.8:	3-3 grubuna ait G1 ve erken profaz fazındaki hücelere ait immunofloresan görüntüsü.	38
6.9:	Deney gruplarına ait 7AAD ve GFP ışıma profili.	39
6.10:	N2 grubu FACS analizi sonuçlarına ait grafik görüntüleri.	39
6.11:	1-2 grubu FACS analizi sonuçlarına ait grafik görüntüleri.	40
6.12:	2-2 grubu FACS analizi sonuçlarına ait grafik görüntüleri.	41
6.13:	3-3 grubu FACS analizi sonuçlarına ait grafik görüntüleri.	42
6.14:	Deney gruplarına ait çekirdek profili istatistiksel analiz grafiği.	43
6.15:	RasGEF1B ve Ccdc124 ile transfekte edilmiş hücre gruplarına ve clear lizatlarına ait Ccdc124 antikoru ile inkübe edilmiş membran görüntüsü.	47
6.16:	RasGEF1B ve Ccdc124 ile transfekte edilmiş hücre gruplarına ve clear lizatlarına ait Myc antikoru ile inkübe edilmiş membran görüntüsü	48

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa:</u>
5.1: Yürütme jeline ait kimyasal oranları.	23
5.2: Ayırma jeline ait kimyasal oranları.	23
5.3: Kullanılan kimyasal madde listesi.	25
5.4: Kullanılan cihaz listesi.	26
5.5: Kullanılan antikor listesi.	26
5.6: Kalıcı transfeksiyonda kullanılan hücre miktarına bağlı kullanılan DNA ve kimyasal miktarları.	28
5.7: Geçici transfeksiyonda kullanılan hücre miktarına bağlı kullanılan DNA ve kimyasal miktarları.	29
5.8: Standart grafik oluşturmak için kullanılan BSA konsantrasyonları.	30
6.1: N2 grubu hücre döngüsündeki fazlara ait yüzde verileri.	40
6.2: 1-2 grubu hücre döngüsündeki fazlara ait yüzde verileri.	41
6.3: 2-2 grubu hücre döngüsündeki fazlara ait yüzde verileri.	42
6.4: 3-3 grubu hücre döngüsündeki fazlara ait yüzde verileri.	43
6.5: G1 fazında bulunan diploid hücre yüzdelerinin deney grupları arası ikili karşılaştırılması.	44
6.6: S fazında bulunan diploid hücre yüzdelerinin deney grupları arası ikili karşılaştırılması.	44
6.7: G2/M fazında bulunan diploid hücre ve G1 fazında bulunan 4N çekirdek içeriğine sahip hücre yüzdelerinin deney grupları arası ikili karşılaştırılması.	45
6.8: 8N çekirdek içeriğine sahip hücre yüzdelerinin deney grupları arası ikili karşılaştırılması.	45
6.9: 16N çekirdek içeriğine sahip hücre yüzdelerinin deney grupları arası ikili karşılaştırılması.	45
6.10: 32N çekirdek içeriğine sahip hücre yüzdelerinin deney grupları arası ikili karşılaştırılması.	46
6.11: Multinükleer hücre yüzdelerinin deney grupları arası ikili karşılaştırılması.	46

1. GİRİŞ

Kanser, ölümcül sonuçlara neden olması ve özellikle son yıllarda giderek artmakta olan prevalansı nedeniyle dünyada ve ülkemizde insan sağlığını tehdit eden hastalıkların başında gelmektedir [Web 1, 2008]. Kontrolsüz hücre çoğalmasıyla karakterize edilen bu hastalığın tedavisi yönünde geliştirilmek istenen yöntemler, bilim adamlarını mitotik bölünmenin moleküler mekanizmasının tam olarak aydınlatılmasına yöneltmiştir. Özellikle sitokinez sürecinde meydana gelen problemlerin; hücre ölümünde, birçok kanser türünde genomik amplifikasyonların karakterizasyonunda ve yaşa bağlı hastalıkların gelişmesinde kritik etkilere sahip olduğu da bilinmektedir [Bhalla, 2003], [Carmena and Earnshaw, 2003].

Hücre döngüsü sürecinde interfaz safhasını takiben görülen mitotik bölünme ise bir hücrenin bölünerek kardeş iki hücre meydana getirmesi olarak tanımlanmaktadır. Mitoz (M) evresi sırası ile karyokinez olarak isimlendirilen profaz, metafaz, anafaz ve telofaz fazlarını içerirken, sitoplazmanın bölünmesiyle sonuçlanan sitokinez fazıyla devam etmekte ve bu süreç absisyon (bölünen hücrelerin birbirlerinden ayrılması) ile tamamlanmaktadır.

Sitokinezin hücre bölünmesi üzerindeki etkisiyle ilgili birçok çalışma bulunmasına rağmen son yıllarda sitokinezin sonuna doğru görülen midbody (Flemming body veya orta cisimcik) üzerine yoğunlaşmıştır. Yoğun mitotik iğipliği demeti içeren bu yapının, hücre iskeletiyle ve yağların taşınmasıyla ilgili birçok farklı yolakta görev alan proteinleri içerdiği gösterilmiş olmasına karşın, proteinlerin nasıl organize edildiğine ve orta cisimciğe nasıl hedeflendiklerine dair bilinenler sınırlı bulunmaktadır [Skop et al., 2004], [Hu et al., 2012].

Sitokinez evresinde orta cisimcikte konumlandığı tespit edilmiş proteinler arasında yer alan sarılı-sarmal-bölge-içeren-124 (Coiled-coil domain containing-124; Ccdc124) proteininin ise bazı göğüs kanseri tiplerinde olmak üzere beyin, plasenta, yumurtalık, testis gibi bazı dokularda yüksek ifadeye sahip olduğu tespit edilmiştir [Gündüz, 2010]. Yine yapılan başka bir çalışmada sitokinez için önemli olduğu, ifadesinin edilmediği durumlarda sitoplazma ayrılmasının gerçekleşmeyerek çok çekirdekli hücre oluşumuna neden olduğu gösterilmiştir [Telkoparan, 2013]. Hücre bölünmesi sırasında önce sentrozomda, sonra da telofaz evresinde orta cisimcikte konumlanan Ccdc124'ün başka proteinlerle de etkileşebiliyor olabileceği

düşünülmektedir. Özellikle sitokinez olayında görev alan proteinler arasında yer alan Ras guanin nükleotit değiştirici faktör 1B (RasGEF1B)'nin ise orta cisimcikte gerçekleşen Rap konumlanması sinyal yolağı aktivasyonunda öneme sahip olduğu ortaya çıkmıştır. Bu olayı takiben 2013 yılında yapılmış olan bir çalışmayla da Ccdc124 ile RasGEF1B arasında bir etkileşim olduğu literatürde rapor edilmiştir [Telkoparan, 2013].

1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

Omurgalı osteoblastları ve *Drosophila* embriyoları üzerinde yapılan çalışmalardan elde edilen bilgiler doğrultusunda, sitokinezin gerçekleşmediği mitotik bölünmelerde çok çekirdekli hücrelerin meydana geldiği bilinmektedir [Alberts et al., 2002]. Sitokinezde görevli olduğu düşünülen Ccdc124 proteinini kodlayan genin susturulması durumunda da çok çekirdekli hücrelerin meydana geldiği tespit edilmiştir [Telkoparan, 2013]. Ayrıca sitokinezde görevli olan bir başka protein olan RasGEF1B ile etkileşime geçtiği de yapılan deneylerle gösterilmiştir [Telkoparan, 2013]. Yapılmış olan bu çalışmayla ise öncelikle Ccdc124 proteinini kodlayan genin aşırı ifade edilmesi durumunda hücreler üzerinde meydana gelecek değişikliklerin hücre morfolojisi üzerindeki olası etkilerinin tespiti amaçlanmış, daha sonra da bu proteinin üzerinde bulunan RasGEF1B'ye bağlanma bölgesi tespit edilmeye çalışılmıştır.

Ccdc124 geninin aşırı ifade edilmesi durumunda ortaya çıkacak koşulların ve diğer proteinlerle olan ilişkisinin tespitinin bu proteinin hücre bölünmesi sırasındaki biyolojik işlevinin daha net olarak ortaya konulmasına yardımcı olacağı ve mitotik bölünme bozukluğuna bağlı hastalıkların tedavisi konusunda geliştirilecek tedavi stratejileri için yeni bir perspektif oluşturabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışma için U2OS hücre hattına ait insan osteosarkoma hücreleri, Ccdc124 genine ait farklı bölge içerikleri taşıyan ifade vektörü aracılığıyla transfekte edilerek, bu proteine ait genin aşırı ifade edilmesi sağlanmış ve immüno blot analizleriyle transfeksiyonunun gerçekleşip gerçekleşmediği kontrol edilmiştir. Aşırı ifadenin gerçekleştiği tespit edilen hücreler üzerinde immünofloresan yöntemler kullanılarak proteinin hücre içi lokalizasyonu tespit edilmiş ve flow sitometrik ölçümlerle bu hücrelere ait morfolojik değişiklikler belirlenmiştir. Yapılan analizler sonucu Ccdc124

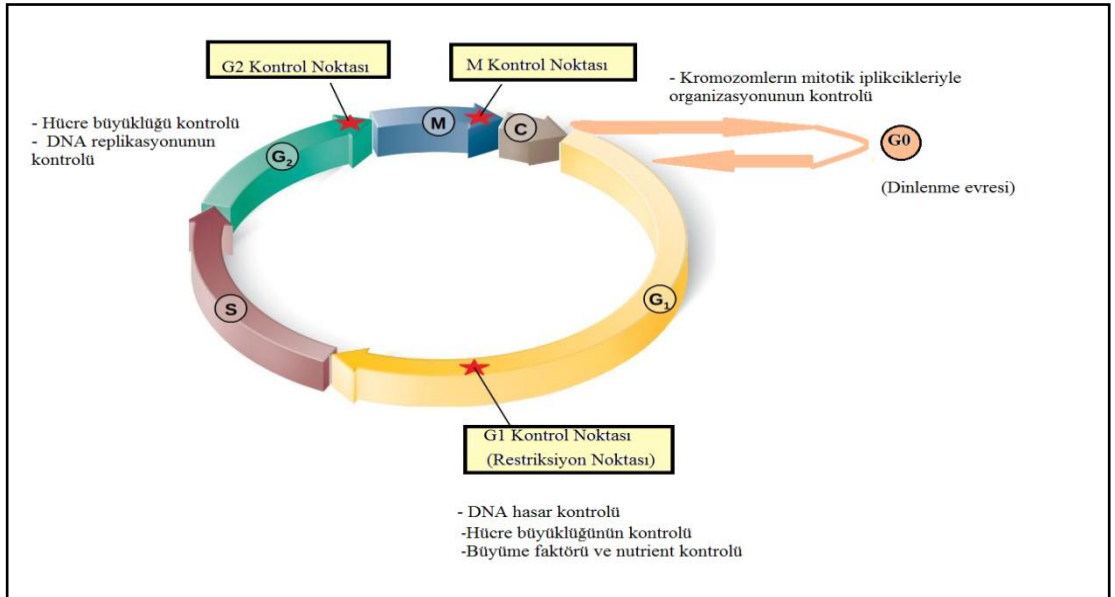
proteinin aşırı ifadesinin, hücre bölünmesi sırasında meydana gelen sitoplazmik ayrılma üzerinde olumsuz bir etkiye ve çok çekirdekli hücrelerin görülme sıklığında artışa neden olduğu gösterilmiştir.

Ccdc124 'ün RasGEF1B proteinine bağlanma bölgesinin saptanması için ise HEK293 hücre hattına, Ccdc124 proteinine ait farklı uzunluktaki konstraktlarının ve RasGEF1B'nin transfeksiyonu sağlanmıştır. Transfeksiyonun ardından ise birlikte çöktürme yöntemiyle analizler yapılmıştır. Deney sonucunda Ccdc124'ün son ucunun RasGEF1B ile bağlanma bölgesi içerdiği belirlenmiştir.

2. HÜCRE DÖNGÜSÜ

Sadece ökaryotik hücrelerde görülen mitotik bölünme, bir hücrenin genomik materyalini eşleyerek iki hücreye bölünmesiyle sonuçlanan biyolojik bir süreçtir. Bu süreç G1, S, G2 ve M fazlarının birbirini izlemesi ile gerçekleşmektedir. G1 evresinde hücre bölünmesi için gerekli proteinler sentezlenirken, S evresinde genomik bilginin ve sentrozomun kopyalanması gerçekleşmekte, G2 evresinin sonuna kadar ise bölünme için gerekli koşulların tümü sağlanmaktadır. Mitoz (M) evresi ise profaz, metafaz, anafaz ve telofaz safhalarını içeren bir karyokinez fazını, bir de bu fazı takiben sitoplazmanın bölünmesiyle sonuçlanan sitokinez (C, cytokinesis) fazını içermektedir.

Hücre tarafından kontrol altında tutulan bu sürecin G1, G2 ve M olarak adlandırılan kontrol noktaları tarafından düzenlenmesi Şekil 2.1’de gösterilmiştir. S fazına geçişte hücrenin boyutunun yeterli olmaması durumunda G0 safhasına geri dönüşle sonuçlanırken, DNA hasarı meydana geldiği durumlarda p53 aktivitesine bağlı olarak hücre apoptoza gidebilmektedir. Yine mitoz sürecinde yer alan bir kontrol mekanizması da, olumsuz bir durum söz konusu olduğunda mitozun durmasına neden olabilmektedir.



Şekil 2.1: Hücre döngüsünün düzenlenmesinde görev alan G1, G2 ve M kontrol noktalarının şemasal gösterimi. M: mitoz, C: sitokinez evresini simgelemektedir.

2.1. Mitotik Evrelerin Moleküler Mekanizması

2.1.1. Mitoz Düzenleyici Faktörler

Hücre döngüsünün temel fazlarından biri olan mitoz, mitoz düzenleyici faktörlerin kinaz aktivitesi göstererek bazı özel proteinleri fosforile etmesi sonucu meydana gelmektedir. Bu proteinlerin aktif fosforile formlarının kromozomların kondensasyonunda, nükleer kılıfın kaybolmasında ve mitotik ağın formasyonunda oldukça önemli olduğu düşünülmektedir. *Xenopus* yumurtasıyla yapılan çalışmalarda mitozun geç evreleri olarak bilinen anafaz ve telofaz evrelerinde siklin ve mitoz düzenleyici protein düzeylerinde ciddi düşüşler olduğu tespit edilmiştir [Murray et al., 1989]. Defosforilasyon ve degradasyonlara bağlı olarak da gelişen birçok durum değişikliğinin de mitoz süresince devam ettiği bilinmektedir.

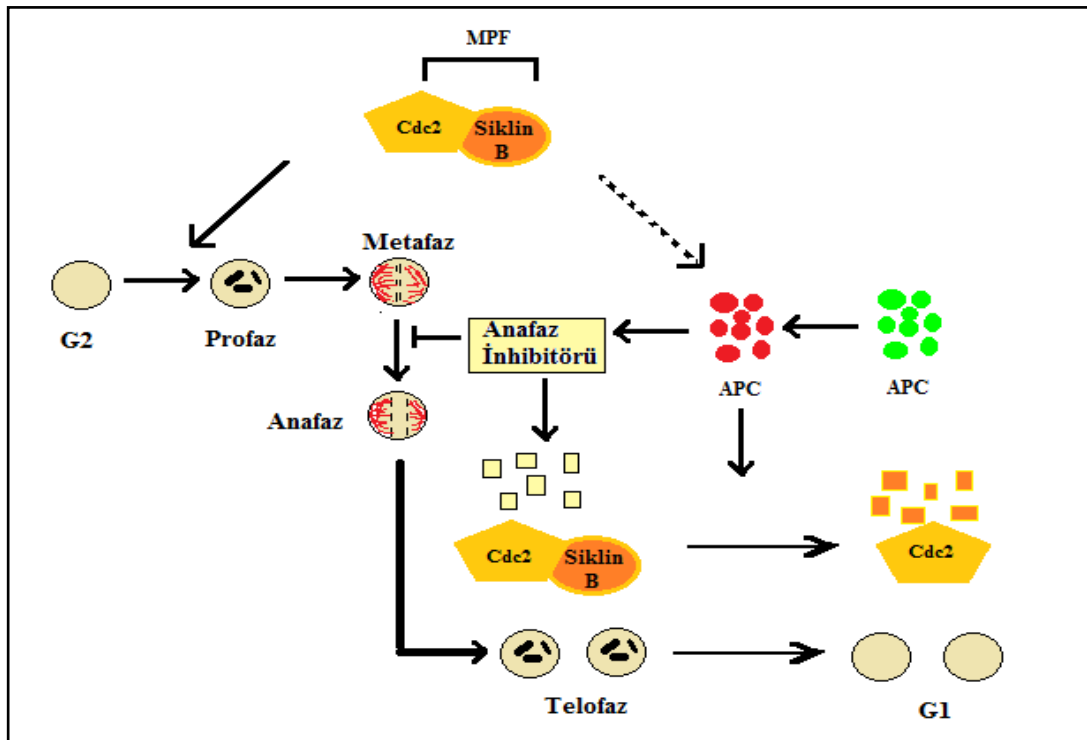
Bu süreçlerden biri olan siklin bağımlı kinaz 2 (Cdk2) aktivitesi, S evresinde sentrosomun kendini eşlemesi ile sonuçlanmaktadır. Sentrozom, yosun ve eğrelti otu gibi ilkel bitki hücreleri ve nöronların haricinde tüm hayvan hücrelerinde bulunan, birbirine dik iki sentriyolden oluşan, çekirdeğe yakın konumlanmış zarsız bir organeldir. Mikrotübül organize edici merkez olarak da bilinen sentrozomların, bölünme sırasında kromozomların ayrılması ve kutuplara taşınmasında görevli olan iğ iplikçiklerinin oluşmasını da sağladığı bilinmektedir.

Erken mitoz sırasında ise mitoz düzenleyici proteinlerin porlu çift katlı membran yapısında ve laminar filamentlere sahip çekirdek zarında bulunan lamin A, B ve C'nin, serin rezidülerinden fosforile ederek laminar filamentleri depolarize etmesi de bu değişiklikler arasında sayılabilmektedir.

Bir maya türü olan *S. Cerevisiae* ve *Xenopus* ile yapılan deneyler sonucunda ise kromozomun yapısal proteinlerinden olan kondensinin, mitoz düzenleyici faktörler tarafından direk veya indirek bir şekilde etkilenecek fosforile halde DNA'ya bağlandığı da bilinmektedir. Mitotik evrenin metafaz safhasında gerçekleşen bu olay kromozom kondensasyonu olarak da tanımlanmaktadır. Mikrotübül bağımlı proteinlerin fosforillenmesi mitotik iplikçiklerin meydana gelmesi, golgi ve endoplazmik retikulum gibi membranöz organellerin kaybolması gibi bazı olayların da mitoz düzenleyici faktörler tarafından gerçekleştirildiği düşünülmektedir.

2.1.2. Anafaz Destekleyici Kinaz (APC) Molekülleri

B siklinin anafaz destekleyici kinaz (APC) bağımlı poliubikutinlenmesi metafaz ve anafaz safhalarında meydana gelmektedir. APC'nin anafaz inhibitörlerini degrade etmesi, kardeş kromatitler arasında bulunan kohezin molekülünün inaktivasyonuna neden olmakta ve bu durum kardeş kromatitlerin ayrılmasıyla sonuçlanmaktadır. Daha sonra APC moleküllerinin siklin B'yi hedeflemesi sonucu olgunlaşma düzenleyici faktör (maturation promoting faktör) (MPF) aktivitesi düşerek telofaz evresi sonuçlanmaktadır. Yukarıda açıklanmış olan bu yolağın organizasyonu Şekil 2.2'de gösterilmiştir.

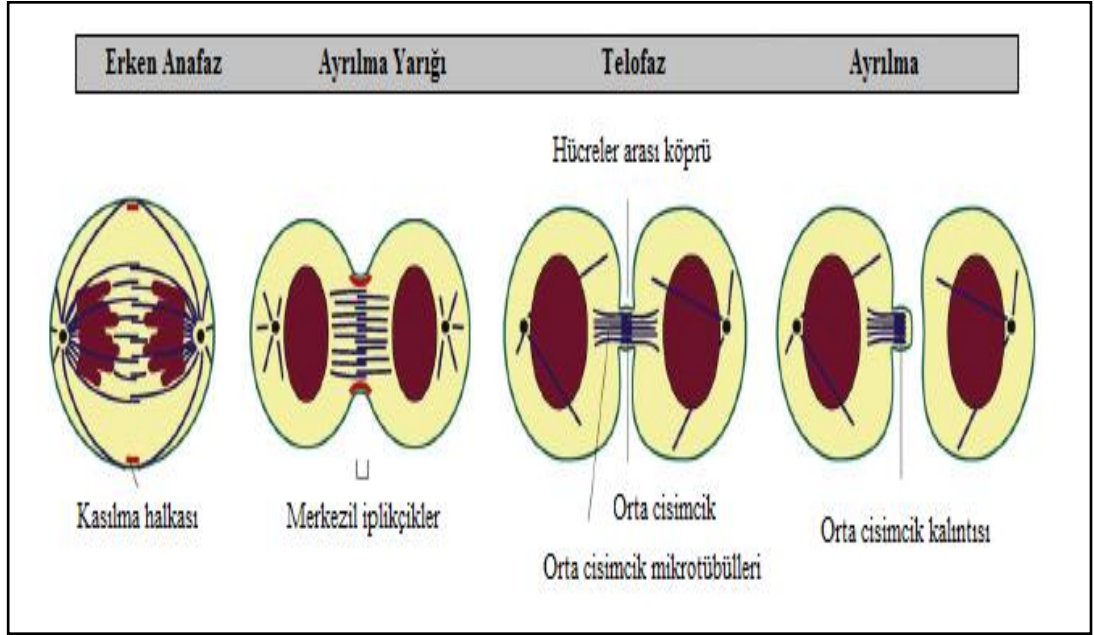


Şekil 2.2: Anafaz düzenleyici kompleks (APC)'in anafaza geçiş moleküler kontrol mekanizması.

2.2. Sitokinez

Sitokinez, mitotik hücre bölünmesi sırasında kromozomların ayrılmasını takiben, ayrılma yarığı ve aktomiyozin kasılma halkası oluşumuyla başlayan ve sitoplazmanın bölünmesiyle tamamlanan bir süreçtir [Barr and Gruneberg, 2007] [Pollard, 2010], [Fededa and Gerlich, 2012].

Hücre bölünmesinin anafaz evresinde başlayarak telofaz evresinin sonuna kadar devam eden süreç içerisinde sentrozomal asterler arasındaki antiparalel mikrotübül organizasyonu ile ayrılma yarığı denilen bir değişiklik meydana gelmektedir [Fededa and Gerlich, 2012], [Alberts et al., 2002]. Erken anafaz evresinden ayrılmaya kadar devam eden bu süreç Şekil 2.3’de şematize edilerek gösterilmiştir.



Şekil 2.3: Erken anafaz evresinden ayrılma evresine kadar gerçekleşen mikrotübül düzenlenmesi, hücreler arası köprü ve orta cisimcik oluşumu.

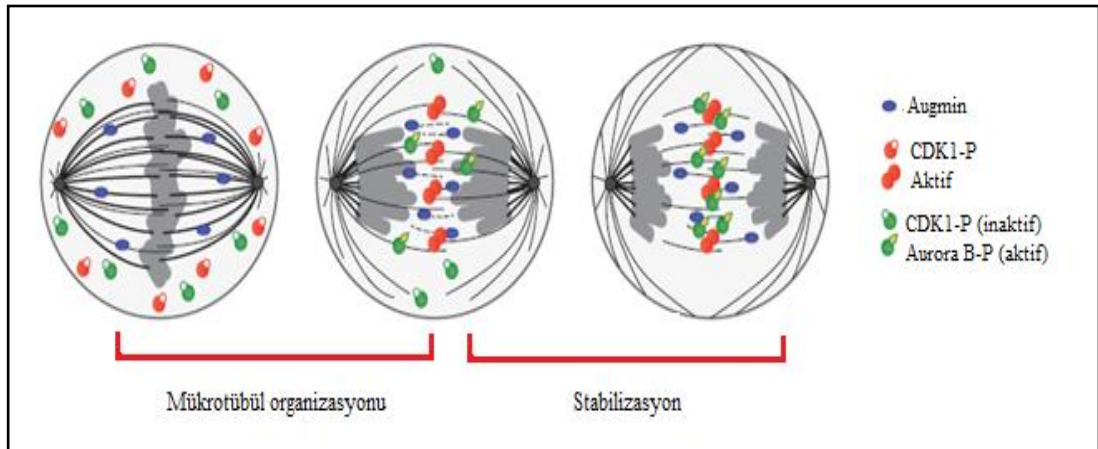
Bölünme sırasında sitokinezin gerçekleşme zamanı ve gerçekleşme düzlemi oldukça önem taşımaktadır. Mitoz (M) fazının erken fazında gerçekleşecek bir sitoplazmik bölünme kromozomların ayrılmamasıyla sonuçlanabileceği gibi, hücre bölünme düzleminin doğru bölgede yer almaması yavru hücrelerin sitokinez sonunda eşit sayıda kromozom setine sahip olmamasına neden olabilmektedir [Alberts et al., 2002].

Hayvan hücrelerinde görülen mitotik iplikler sadece kardeş kromozomların birbirinden ayrılmasında değil, aynı zamanda kasılma halkasına bağlı konumlanarak hücre bölünme düzleminin belirlenmesinde de önemli bir rol oynamaktadırlar. Kasılma halkasıyla mikrotübüllerden oluşan iç ipliklerinin yerleşimi arasındaki bağlantı, deniz omurgalıların döllenmiş yumurtalarıyla yapılan çalışmalarda da gösterilmiştir [Beams and Kessel, 1976].

2.2.1. Sitokinezin Zamansal Düzenlemesi

Sitokinezin zamansal organizasyonu ise kromozom ayrılması ile belirlenmektedir. Bu olay kromozomların ayrılmasında ve sitokinetik yarığın oluşmasında görev alan E3 ubiquitin ligaz anafazı destekleyici kompleksin (APC'nin) aktivasyonu ile gerçekleşmektedir [Pines, 2006]. APC molekülü kardeş kromatidler arasındaki bağı proteozom aracılığıyla gerçekleştiren bir yıkımla yok ederek proteaz seperaz inhibitörü sekürini hedeflemekte ve böylece kromozom ayrılmasını tetiklemektedir. Bu olayla eş zamanlı olarak siklin bağımlı kinaz 1 (CDK1), koaktivatör siklin B degradasyonu ile inaktive olmakta ve yarış halindeki fosfatazların CDK1'i defosforile edilmesiyle sitokinetik yarık oluşmaktadır [Wurzenberger and Gerlich, 2011]. Kardeş hücrelerin fiziksel olarak tamamen ayrılması ise Aurora B mitotik kinaz sinyal yolağının aktivasyonu ile zamansal olarak düzenlenmektedir (Şekil 2.4) [Norden et al., 2006], [Mendoza, 2009], [Steigemann et al., 2009].

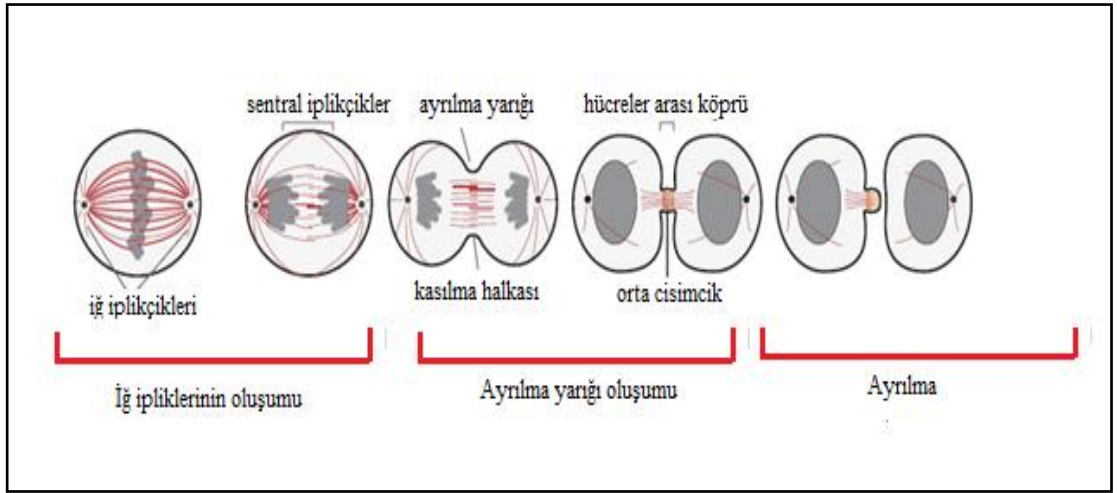
Metafaz safhasında görülen ve hücre merkezinde yer alan interpolar mikrotübüllerden oluşan iğ ipliklerinin yanı sıra, anafaz başında augmin kompleksi tarafından meydana getirilen non-sentrozomal bir yapının da oluştuğu yapılan bazı çalışmalarda gösterilmiştir. [Uehara et al., 2009], [Uehara and Goshima, 2010]. Sitokinezin moleküler olarak zamansal düzenlemesinin genel olarak ifadesi Şekil 2.4'de gösterilmiştir.



Şekil 2.4: Sitokinezin Augmin, CDK1 ve Aurora-B moleküllerine ait aktif ve inaktif formların fosforillenmeye bağlı zamansal düzenlemesi.

2.2.2. Ayrılma Yarığının Oluşumu

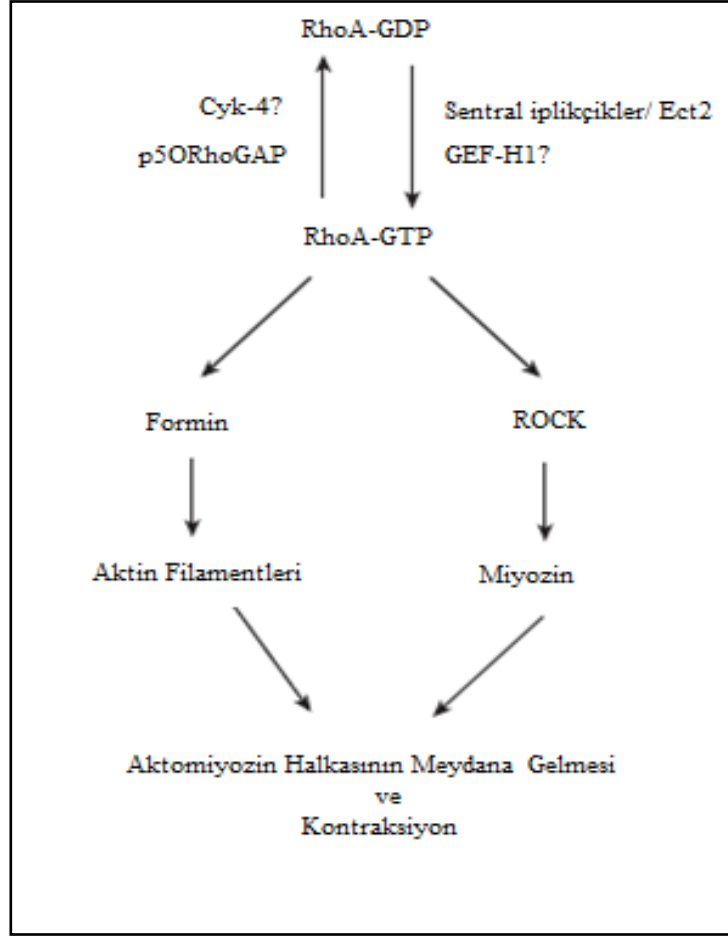
Ayrılma yarığı üst üste dizilmiş aktin ve miyozin-II iplikçiklerinin oluşturduğu, Ca^{+2} -kalmodülin/miyozin kinaz aktivitesiyle oluşan bir kuvvet sonucu meydana gelen bir yapıdır. Bu yapının oluşumu zamansal olarak sitokinezin başlangıcı olarak kabul edilmektedir. Aşağıda yer alan Şekil 2.5’de iç iplikçiklerinin oluşumundan ayrılmaya kadar geçen zaman arasında iç iplikçiklerinin organizasyonu gösterilmektedir.



Şekil 2.5: Metafaz evresinden sitokinez evresinde gerçekleşen ayrılmaya kadar antiparalel mikrotübül organizasyonu ve ayrılma yarığının oluşumu.

Mitotik iç ipliklerinin bölünme düzlemini kontrol etmesiyle ilgili yapılan araştırmalar sentrozom kökenli asterler tarafından oluşturulan bölünme yarığının, iki sentrozomun birbirine iç iplikleriyle bağlanması sonucu gerçekleşebildiğini göstermiştir [Alberts et al., 2002]. Bu hücrelerde asterler tarafından kasılma halkasına özgü bazı sinyaller gönderildiği düşünülmüş ve bu konuda yapılan çalışmalar sonucunda asterlerden gelen sinyalin small GTPaz RhoA yolağı boyunca iletilerek ekvatorial hücre korteksinde yer alan aktomiyosin halkasının oluşumuna yol açtığı belirlenmiştir [Piekný et al., 2005]. RhoA tarafından başlatılan bu düzenleme bir GAP (GTPaz Aktive eden Proteini) olan CYK4 ve bu protine özgü GEF (guanin değiştirici faktörü) olan Ect2 ile gerçekleşmektedir. Daha sonra merkez iç ipliğinde konumlanmış Polo-benzeri-kinaz 1 (Plk 1) aktivitesiyle CYK-4 ve Ect-2 arasındaki etkileşim sağlanmakta ve mekanizma RhoA-GTP ile iki yolak üzerinden devam etmektedir [Burkard et al., 2007]. RhoA bağımlı olarak meydana gelen ayrılma

yarığı oluşumuna ait yukarıda anlatılmış yolağın şemasal ifadesi Şekil 2.6'da verilmiştir.



Şekil 2.6: RhoA bağımlı yolak sonucu aktomiyozin halkasının meydana gelerek ayrılma yarığının oluşumu.

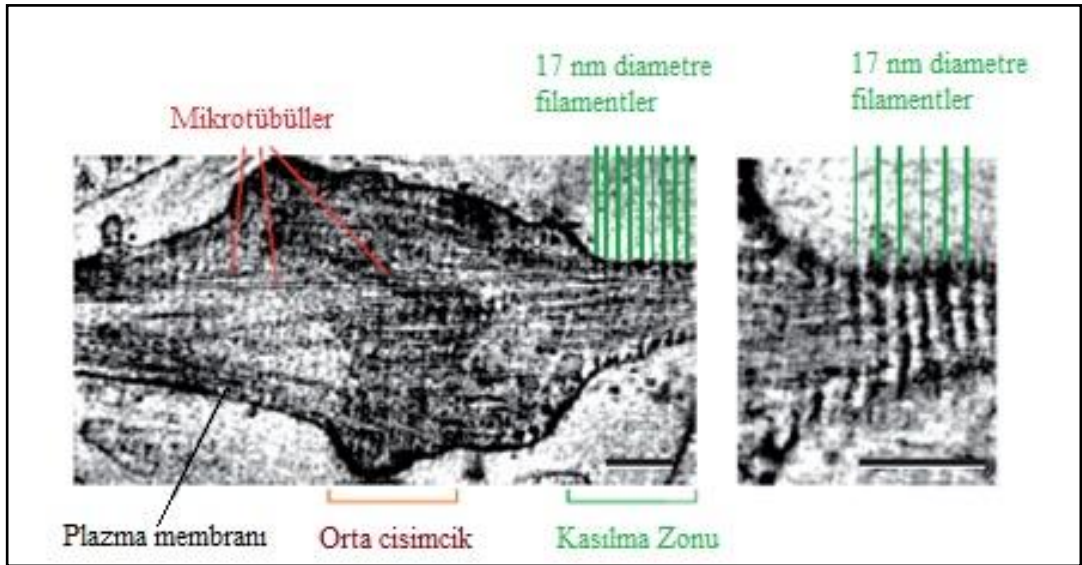
Bu yolaklardan ilki RhoA'nın diaphanous-related formini aktive ederek aktin filamentlerinin formasyonunu düzenlemesiyle gerçekleşirken, ikincisi bir kinaz olan ROCK'un miyozin II'yi aktive etmesiyle meydana gelmektedir. Her iki yolağın sonucunda da özellikle plazma membranında bulunan ve katlanmaya yardımcı anillin proteini ile aktomisin halka formasyonu oluşmaktadır [Severson et al., 2002], [Watanabe et al., 2008], [Fededa and Gerlich, 2012], [Matsumura, 2005], [Piekny and Maddox, 2010].

Aktomisin halkasının ayrılma oluşunun oluşumunda oldukça önemli olmasının yanında bu yapı oldukça dinamik bir formdadır ve polimerizasyon depolimerizasyon döngüsünün kontrolünü gerçekleştirmektedir. Aktin ağında meydana gelen kasılma

ise sadece miyozin II motor aktivitesiyle değil çapraz bağlı aktin filamentlerinin depolimerizasyonu da sağlanmaktadır [Kruse and Julicher, 2003].

2.2.3. Hücreler Arası Köprü Oluşumu

Bölünme oluşunun oluşumunun ardından, kardeş hücrelerin arasında 1–3 μm genişliğinde hücreler arası bir köprü (ICB) meydana gelmektedir. Bu hücreler arası köprü genellikle sitokinez sona erene kadar uzunca bir süre varlığını devam ettirmektedir. Hücreler arası köprünün mikroskop görüntüsü aşağıda Şekil 2.7’de yer almaktadır.



Şekil 2.7: Hücreler arası köprüye ait 17 nanometre çapındaki filamentlerden oluşan kasılma zonu ve yoğun mikrotübül demeti organizasyonu gösteren orta cisimcik yapısının mikroskop görüntüsü.

Geç telofaz evresi boyunca varlığını sürdüren hücreler arası köprü oluşumu sırasında aktin depolarizasyonunun engellenmesinin sitokinezin oluşumunu engellediği bilinmektedir [Dambournet et al., 2011], [Schiel et al., 2012]. Bu mekanizmanın düzenlenmesi henüz tam olarak açıklanamamış olsa da, inaktive olmuş RhoA'nın lokalizasyonu ve hücreler arası köprüdeki plazma membranının yağ kompozisyonu ile ilgili olduğu düşünülmektedir [Dambournet et al., 2011], [Schiel et al., 2012].

Hücreler arası antiparalel mikrotübül demetinden meydana gelmiş bu köprüde 100'den fazla proteinin lokalize olduğu tespit edilmesine karşın, burada yer alan proteinlerin görevleriyle ilgili bilgiler henüz sınırlıdır. Orta cisimciğin ise hücre bölünmesinin sitokinez evresini tamamlanmasında görev alan bir platform olduğu düşünülmektedir [Skop et al., 2004].

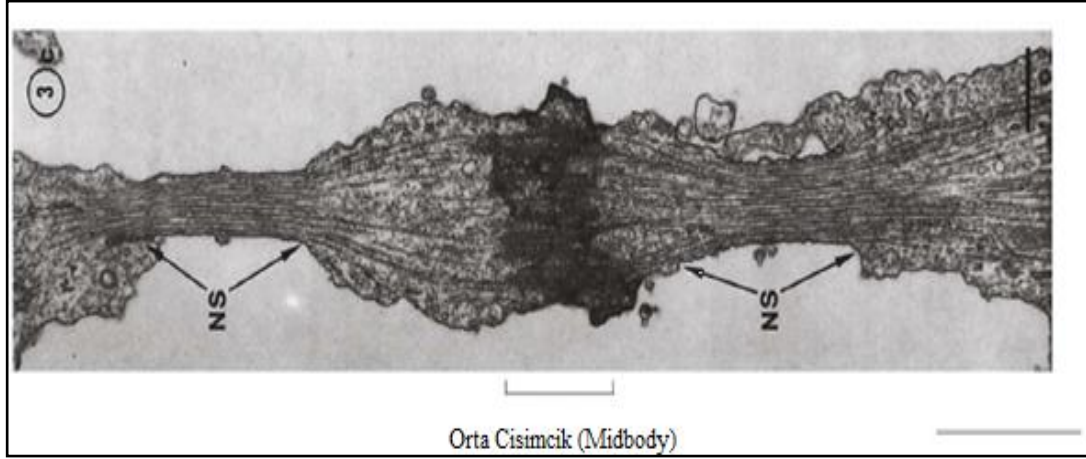
Sitokinetik yarı oluşumunun tamamlanmasının ardından, endozom ve golgi tarafından oluşturulan veziküller orta cisimcikte birikmeye başlamakta, daha sonra veziküllerin plazma membranıyla birleşmesi kardeş iki hücrenin birbirinden ayrılmasıyla sonuçlanmaktadır [Gromley et al., 2005], [Goss and Toomre, 2008], [Schiel et al., 2011]. Bu süreç boyunca sentriolin, exocyst complex, Rab 35 [Kouranti et al., 2006], Rab11 [Fielding et al., 2005], t-SNARES [Low et al., 2003] [Gromley et al., 2005] ve BRUCE [Pohl and Jentsch, 2008] gibi ayrılma etkilili rol oynayan veziküllerle etkileşim halinde olan birçok faktör de görev almaktadır.

Memeli hücre kültürü üzerinde kinetik incelemeler yapıldığında ise kardeş hücrelerin ayrılması gerçekleşmeden önce hücreler arası köprüde vezikül yapılarının kaybolduğu gözlemlenmiştir [Goss and Toomre, 2008], [Guizetti and Gerlich, 2010], [Guizetti et al., 2011]. Ayrıca bitki hücrelerinde bölünme esnasında görülen hücre plağına bu tip hayvan hücrelerinde hücrelerarası köprü oluşumunda rastlanmamaktadır [Schiel et al., 2011], [Guizetti et al., 2011].

2.2.4. Orta Cisimcik (Midbody) Oluşumu

Orta cisimcik (Midbody/ Flemming body) memeli hücrelerinde sitokinezin sonuna doğru görülen ve bölünen hücrelerin ayrılmasını sağlayan, hücreler arası köprünün ortasında yer alan önemli bir yapıdır [Paweletz, 2001]. İlk olarak 1891 yılında Walther Flemming tarafından tanımlanmış olan bu yapının daha sonra yapılan bazı çalışmalarda da gözlemlendiği vurgulanmıştır [Buck and Tisdale, 1962], [Mullins and Bieseke, 1977], [Mullins and McIntosh, 1982], [Euteneuer and McIntosh, 1980], [Saxton and McIntosh, 1987]. Flemming, bu yapıyı ışık mikroskobu ve histokimyasal boyama yöntemlerini kullanarak yaptığı deneyler sırasında bölünen kardeş iki hücre arasında yer alan kromofilik bir alan olarak tanımlamıştır.

Elektron mikroskopunun gelişimi ile orta cisimciğin mikrotübüllerden ve veziküllerden oluşma, hücrenin ortasında amorf elektron dağılımına sahip olma gibi konularda bitkilerde görülen fragmoplast (orta lamel) yapısıyla oldukça benzer olduğu tespit edilmiştir [Hepler and Jackson, 1968], [Otegui et al., 2005]. Aşağıda şekilde orta cisimciğe ait elektron mikroskobu görüntüsü yer almaktadır (Şekil 2.8).



Şekil 2.8: Orta cisimciğe ait elektron mikroskobu görüntüsü (NS kasılma bölgelerini ifade etmek için kullanılmıştır).

Mikrotübüllerden orta cisimcik oluşumu sırasında, golgi kompleksi ve endoplazmik retikulum sisternası gibi çeşitli membranlı organellerin yer aldığı bilinmektedir. Ayrılma yarığının oluşumunun ardından; membrana sahip organellerin, mikrotübüllerin bulunduğu kısımda gittikçe azaldıkları ve bölünecek kardeş hücreler arasında amorf elektron yoğunluğuna sahip materyallerin tekrar organize edilerek orta cisimciğin meydana geldiği gösterilmiştir [Mullins and Biese, 1977], [Buck and Tisdale, 1962], [Jones, 1969], [Robbins and Gonatas, 1964], [Moll and Paweletz, 1980]. Orta cisimciğin sahip olduğu bu amorf yapı; bölünmenin son safhasında mikrotübüller tarafından oluşturulan yoğun bir mitotik iğ iplikliği demetinden meydana gelmektedir. Ayrıca sitokinez, asimetrik hücre bölünmesi ve kromozom ayrılmasında görevli birçok proteini içeren kompakt bir yapı olduğu da bilinmektedir [Mullins and McIntosh, 1982]. Orta cisimciğin izolasyonu ile yapılan deneylerle bu alanın ribozomal ve mitokondrial proteinlerin yanında, direk hücre bölünmesiyle ilişkili proteinleri de içerdiği gösterilmiştir [Skop et al., 2004]. Daha sonra yapılan çalışmalarda ise ESCRT (endosomal sorting complex required for transport) için önemli olan Cep 55 proteini ve mikrotübül

organizasyonunda görevli Plk-1 proteinlerinin orta cisimcik yapısında yer alan proteinlerden olduğu belirtilmiştir [Skop et al., 2004], [Fabbro et al., 2005], [Van der Horst et al., 2009], [Fededa and Gerlich, 2012], [Hu et al., 2012], [Tong et al., 2002]. Elektron mikroskopuyla yapılan çalışmalarda matriks içine gömülü mikrotübüllerden meydana geldiği tespit edilmiş olmasına rağmen içeriği tam olarak bilinmemektedir. Kütle spektrometresi kullanılarak yapılan analizler sonucu ise orta cisimciğin sadece hücre iskeletiyle ilgili olan proteinler değil yağların taşınması gibi birçok farklı yolakta görev alan proteinleri içerdiği gösterilmiştir [Skop et al., 2004].

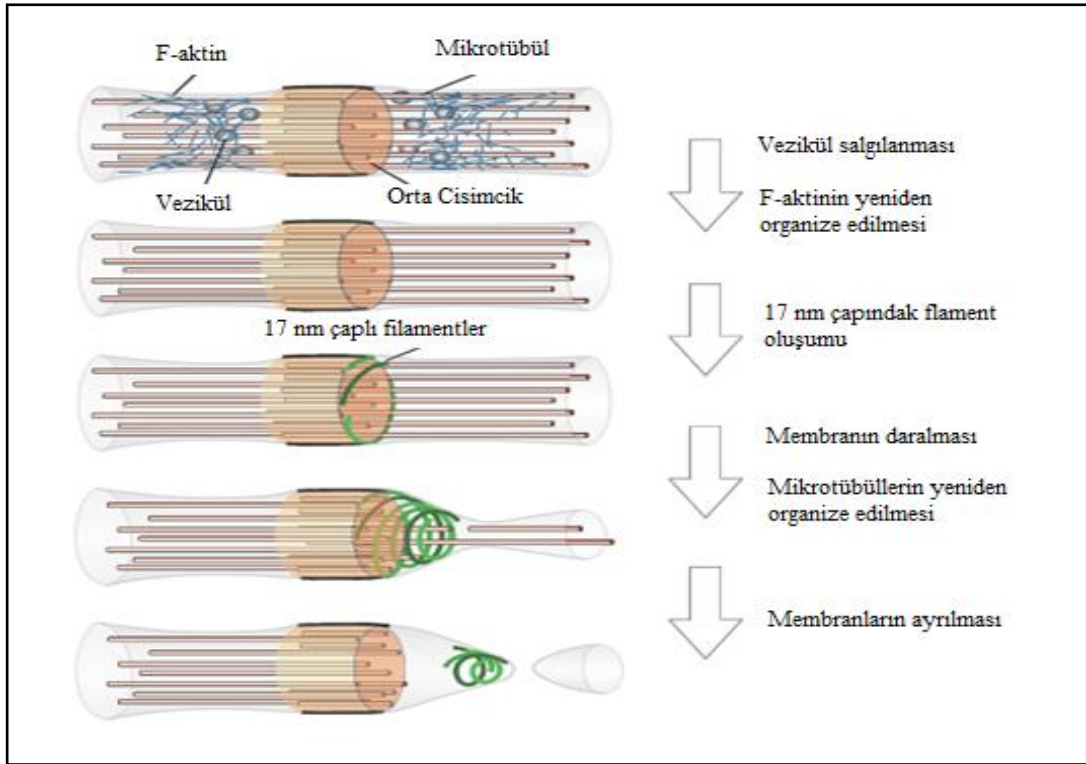
Orta cisimciğin, özellikle sitokinezin son aşaması olan absisyonda oldukça önemli olduğu da düşünülmektedir [Skop et al., 2004]. Bu yapının oluşumunda meydana gelecek herhangi bir problemin, absisyon evresinin gerçekleşmesinde sorunlara neden olduğu yapılan bazı çalışmalarla gösterilmiştir [Gromley et al., 2005], [Fabbro et al., 2005], [Zhao et al., 2006]. Orta cisimcik yapısının oluşmadığı durumlarda kanser riskinin arttığı [Ganem et al., 2007], poliploidi ve multiselüler sınırsız formasyonlarının meydana geldiği gözlemlenmiştir [Gromley et al., 2003].

Bu alanda yapılan çalışmalarda hücrenin orta kısmında yer alan bu bölgede immunofloresan yöntemlerinin kullanılmasının bazı problemlere neden olduğu da bildirilmiştir [Mullins and McIntosh, 1982], [Saxton and McIntosh, 1987], [Dhonukshe et al., 2006]. Bu nedenle orta cisimcikte yer alan proteinlere dair elde veriler bulunmasına rağmen bu proteinlerin nasıl organize edildiğine ve orta cisimciklere nasıl hedeflendiklerine dair bilinenler sınırlı bulunmaktadır [Hu et al., 2012].

2.2.5. Ayrılma

Mitozun son safhası olarak tarif edilen absisyon, sitokinetik yarıktan aktomisin halkası oluşuncaya kadar devam etmektedir. Bu olayı takiben birkaç saat içinde hücrelerarası köprünün; aktin bağımlı olarak 1–2 μm 'ye kadar daralmasıyla, iki kardeş hücre fiziksel olarak ayrılmakta ve bu süreç “absisyon” olarak adlandırılan hücre bölünmesiyle sonuçlanmaktadır [Steigemann and Gerlich, 2009], [Guizetti and Gerlich, 2010]. Absisyon süreci aynı zamanda hücre iskeleti yapısının hücrelerarası köprüden ayrılarak, hücre korteksi ve plazma membranının fizyonu ile sonuçlanan bir olaydır.

Elektron mikroskobu analizleri, hücreler arası köprü oluşumunun geç evrelerinde bu plak yapısının yerine 17 nm çapındaki köprüyü helikal bir şekilde saran orta cisimcik yapısının meydana geldiği göstermiştir [Guizetti et al.,2011]. Bölünme olayının ise, hücrelerarası köprüyü oluşturan mikrotübüllerin depolimerize olarak hücre korteksinin kasılması ve karşılıklı iki membran arasının daralmasıyla gerçekleştiği düşünülmektedir [Schiel et al., 2011], [Guizetti et al., 2011], [Guizetti and Gerlich, 2010]. Sitokinetik ayrılma modeline ait bilgiler ise aşağıda Şekil 2.9’da özetlenmiştir.



Şekil 2.9: 17 nanometre çaplı filament oluşumu ve mikrotübüllerin tekrar organize olması sonucu meydana gelen sitokinetik ayrılma modeli.

Ayrılma sürecini takiben golgiden salgılanan kesecikler ve erken endozom kesecikleri orta cisimcikte birikmektedir [Steigemann and Gerlich, 2009]. Geç sitokinez evresinde orta cisimciğe gelen Cep 55 (Senrozomal protein 55) ise, ALIX ve Tsg101 proteinlerini bu bölgeye çekerek ESCRT-III (Taşıma için gerekli endozomal ayrıştırıcı kompleks)’in oluşumunu başlatmaktadır [Morita et al., 2007]. SNARE proteininin de bu bölgede konumlanmasıyla sitokinetik ayrılma tamamlanmaktadır [Barr and Gruneberg, 2007].

3. COILED-COIL DOMAIN CONTAINING PROTEIN 124 (Ccdc124)

Birçok sentrozom proteininde olduğu gibi sarılı-sarmal-bölge-içeren-124 (Coiled-coil domain containing-124, *CCDC-124*) proteini ilk olarak sodyum/iyodid simportunda görevli NIS geniyle ilgili yapılan araştırmalar sırasında tespit edilmiştir [Kent et al., 2002], [Jakobsen et al., 2011]. 223 amino asit uzunluğuna sahip olan bu protein yüksek ökaryotlarda korunmuş olmakla birlikte, prokaryotlarda bulunmamaktadır. Protein yapısında %42 gibi çok yüksek oranda artı veya eksi yüklü amino asitler (K, R, D, E, H) bulundurmaktadır (Şekil 3.1). Karşılaştırmalı sekans analizleri sonucunda kodlanmayan 1 exon olmak üzere, 5 adet exonaya sahip olduğu tespit edilmiştir [Telkoparan, 2013]. Tavşanlarda poliklonal anti-N-terminus antikolar kullanılarak yapılan immünoolojik analizler sonucunda bu gene ait protein ürünü büyüklüğünün yaklaşık 32 kDa olduğu gösterilmiştir [Telkoparan, 2013]. İkinci bir alternatif Kozak ribozom bağlanma dizisine sahip olması deneniyle, 176 aminoasitten oluşan ve 26 kDa ağırlığında bir izoformunun bulunduğu da tespit edilmiştir [Lee et al., 2012]. Bu proteine ait genel aminosit dizisi ve bu dizide yer alan yüklü aminosaitler Şekil 3.1’de gösterilmiştir.

```
MPKKFQGENTKSAAARARRAEAKAAADAKKQKELEDAYWKDDDKHVMRKEQRKEEK  
EKRRLDQLERKKETQRLLEEDSKLKGGKAPRVATSSKVTRAQIEDTLRRDHQLREAPDT  
AEKAKSHLEVPLEENVNRRVLEEGSV EARTTEDAIAVLSVAEEAADRHPERRMRAAFTAF  
EEAQLPRLKQENPNMRLSQLQLLKEEWLRSPDNPMNQRAVPFNAPK
```

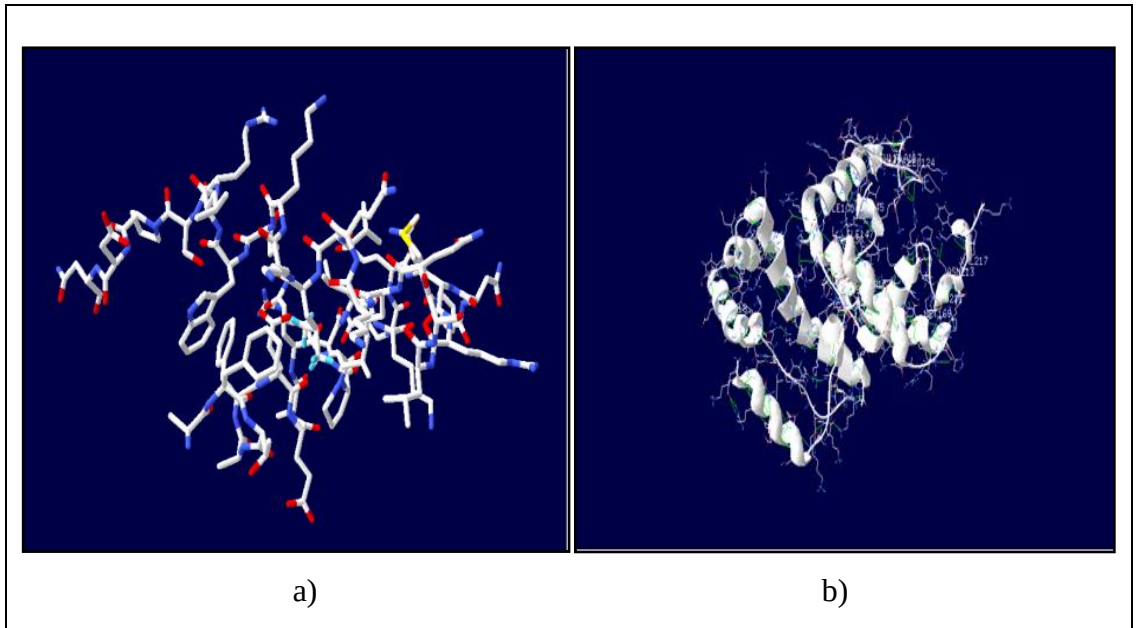
Şekil 3.1: CDC124 proteinine ait aminoasit dizisi (Proteinin yapısındaki pozitif yüklü amino asitler (K, R, H) pembe renkle, negatif yüklü amino asitler (E, D) mavi renk ile işaretlenmiştir).

Biyoinformatik analizler sonucunda 84% olasılıkla çekirdekte lokalize olduğu düşünülen Ccdc124 proteinin, daha sonra yapılan ayrıntılı deneyler sonucu interfaz ve erken mitoz safhalarında sentrozomda, hücreler arası köprü oluşumunun ardından orta cisimcikte konumlandığı gösterilmiştir [Telkoparan, 2013].

Protein Knowledge Database UniProtKB (The UniProt Consortium, 2010) tarafından bir fosfoprotein olarak tanımlanan bu proteinin, yapılan biyoinformatik çalışmalar sonucunda olası 5 serin, 7 tireonin ve 1 tirozin fosforilasyon bölgesine sahip olduğu düşünülmektedir. Bu proteinin ökaryotik hücrelerde korunmuş olması,

fosforilasyonun düzenlenmesi konusunda önemli bir rol üstleniyor olabileceğine işaret etmektedir [Gündüz, 2010]. Aynı zamanda Ccdc124 proteininin mitoz düzenleyici olarak görev alan Kazein kinaz (CK II) ve Polo-benzeri-kinaz I (Plk 1)'in substratı olabileceğine dair veriler de bulunmaktadır. CCDC-124 ve Ras Guanine Exchange Factor 1B (RasGEF1B) arasında bir etkileşim olduğu ise ikili maya hibrid sistemi ve birlikte çöktürme deneyleriyle gösterilmiştir [Telkoparan, 2013].

Swiss PDB Wiewer programı kullanılarak elde edilen Ccdc124 proteinine ait üç boyutlu yapı ise aşağıda gösterilmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Ccdc124 proteininin tahmini üç boyutlu yapısı. a) Yan zincirsiz iskelet formu, b) Kurdele gösteriminde yer alan alfa heliks yapısı.

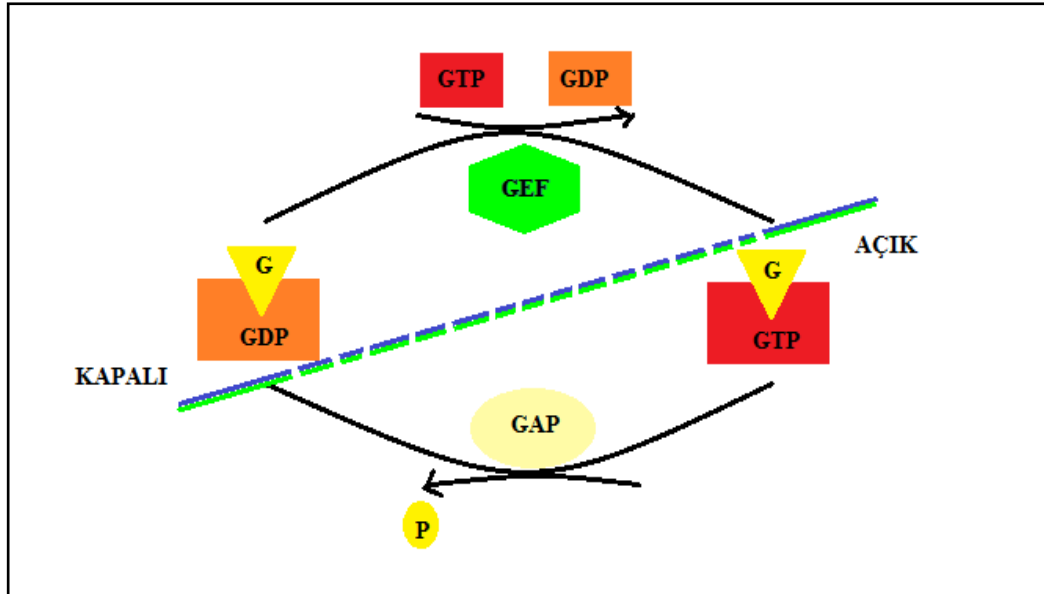
Ekspresyon analizleri sonucu *CCDC-124* geninin beyin, plesanta, yumurtalık, testis, karaciğer ve özellikle iskelet kasında yüksek ekspresyon seviyesine sahip oldukları da gösterilmiştir [Gündüz, 2010]. Yine yapılan başka bir çalışmada ise dalak ve prostatta da yüksek CCDC-124 seviyesine rastlanmıştır [Telkoparan, 2013].

4. RAS SÜPER AİLESİ

Ras süper ailesi hücreye ait birçok sinyal yolağının açılıp kapaması görevini üstlenen oldukça önemli bir ailedir. Bu protein ailesiyle ilgili ilk çalışmalar rattan izole edilen mürin leukaemia virüsünün yeni doğmuş bir kemirgene verilmesi ve bu olayın sarkomayı tetiklemesine kadar uzanmaktadır [Harvey, 1964]. İlk kez tanımlanmaları ise 1982 yılında Edward M. Scolnick ve ekibi tarafından ratlarda sarkomaya neden olan Harvey sarkoma virüsü ve Kristen sarkoma virüsüyle yapılan çalışmalar sırasında olmuştur. Daha sonra H-RAS ve K-RAS adı verilen bu iki genin insan kanser hücrelerinde de aktive oldukları belirlenmiştir [Santos et al., 1982]. Robin Weiss ve Michael Wigler tarafından keşfedilen N-RAS dahil olmak üzere günümüzde Ras ailesine ait üç onkogen olduğu bilinmektedir.

Hücre içi sinyal iletiminde kilit roller üstlenen ve yapısında 6 beta-sheet, 5 alfa heliks bulunduran bu protein ailesinin hücre adezyonu, migrasyon, aktin iskeleti integrasyonu, hücre bölünmesi, transformasyon ve hücre büyümesi gibi birçok görev üstlendiği tahmin edilmektedir [Shields et al., 2000].

GTPaz alt birimine sahip olan Ras, sinyal yollarında sistemi açma kapama görevini üstlenen bir G proteinidir. GEF ve GAP bağımlı bu yolağın çalışma mekanizması Şekil 4.1’de özetlenmiştir.



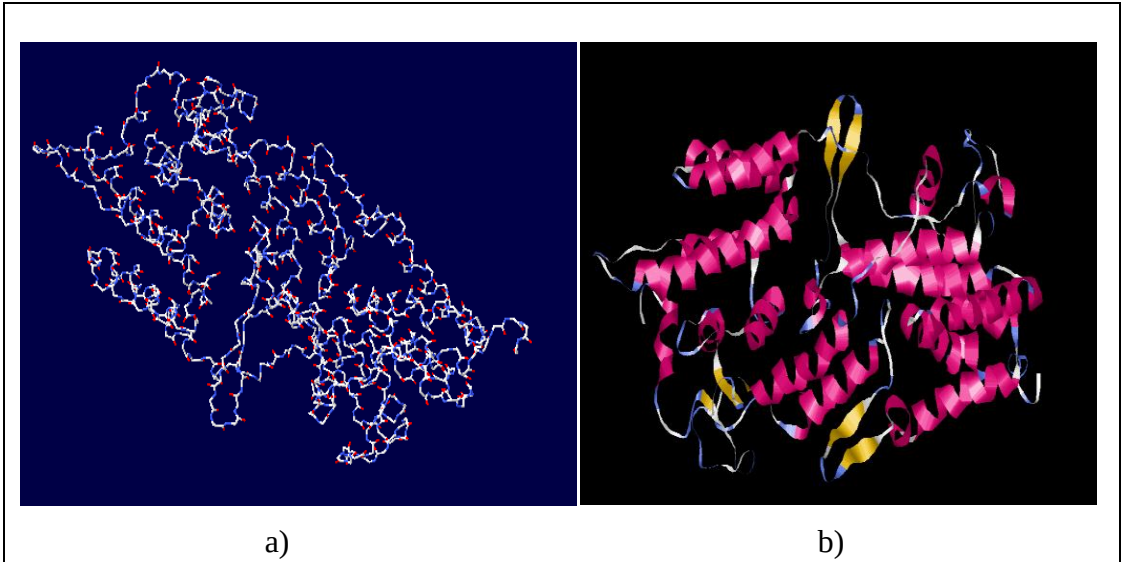
Şekil 4.1. G proteinlerinin GEF ve GAP proteinleriyle yollar üzerindeki aktive ve inaktive etme etkisi.

Yolağın inaktive olması sırasında GDP'ye (nüleotit guanozin difosfata) bağlanmakta ve yolağın çalışması için Thr-35 and Gly-60 arasında gerçekleşen konfigürasyonla üçüncü bir fosfat içeren guanozin trifosfatla (GTP) etkileşime geçmektedir. Biyolojik süreç içerisinde gerçekleşen bu konformasyonel değişikliğin ise guanin nükleotit değiştirici faktör (GEF) ve GTPaz aktive edici proteinler (GAP) yardımıyla gerçekleştiği bilinmektedir [Quilliam et al., 2002].

4.1. Ras Guanin Nükleotit Değiştirici Faktör 1B

RasGEF genleri Ras ailesi altında yer alan ve evrimsel olarak nematodlardan insana kadar korunmuş olan bir dizilimdir. Genellikle oldukça korunmuş olan bir domain içeren karboksil terminalinden ve daha az korunmuş olan bir amino terminalinden meydana geldiği bilinmektedir.

RasGEF1B ise Rap ailesine ait, Ras proteinleriyle etkileştiği gösterilmiş bir guanin değiştirici faktördür. İnsanda bu proteine ait 473, 472 ve 431 aminoasitten meydana gelmiş üç adet izoformun bulunduğu tespit edilmiştir [UniProtKB]. Swiss PDB Wiewer programı kullanılarak elde edilen RasGEF1B proteinine ait üç boyutlu görseller aşağıda yer almaktadır (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. RasGEF1B proteininin tahmini üç boyutlu yapısı a) Yan zincirsiz iskelet formu, b) alfa heliks (pembe renkli)-beta yaprak (sarı renkli) içeren ikincil yapısı.

Bu molekülün Phe39 bölgesi ile Rap2 için özgül olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir [Yaman et al., 2009]. Buna karşın efektör domaininde tek bir aminoasit bakımından farklılık gösteren Rap1 üzerinde bir etkisi bulunmamaktadır [Bos, 1997]. Bununla birlikte H-Ras, R-Ras, Rheb, TC21, RalB ve M-Ras gibi Ras alt ailesine ait diğer nükleotit exchange faktörleri üzerinde de bir etkisi bulunmamaktadır.

Yapılan bazı çalışmalarda ise erken ve geç endozom arasında taşıma görevi yapıyor olabileceği üzerine durulmuştur. Telofaz sırasında orta cisimcikte konumlandığı ve yine burada konumlanan Ccdc124 ile bağlanabildiği gösterilmiştir [Telkoparan, 2013].

5. MATERİYAL ve YÖNTEM

5.1. Materyal

5.1.1. Hücre Hattı Seçimi

Ccdc124 proteininin aşırı ifadesi için kullanılacak hücre hattı olarak, hücre büyüklüğü ve organel yapılarının belirli olması nedeniyle görüntüleme çalışmalarına izin veren U2OS seçilmiştir. RasGEF ile Ccdc124'ün bağlanma bölgesinin tespiti için ise dışardan gen aktarımı diğer hatlara görece olarak yüksek olan HEK 293T hücre hattının kullanılması uygun görülmüştür.

5.1.1.1. U2OS

U2OS hücreleri, 2T hücre orijininden gelen ve 15 yaşındaki bir kadından alınarak kültüre edilmiş insan osteosarkoma hücreleridir. İlk defa 1964 yılında Ponten ve Saksela tarafından tanımlanmış olan bu hücrelerin epitelyal bir morfolojiye sahip oldukları bilinmektedir. U2OS hücreleri günümüzde hücre döngüsünün kontrolü, apoptoz ve büyümenin durdurulması gibi birçok konuda yapılan çalışmalarda kullanılmaktadır.

Bu hücrelerde p53 ve Rb ifadesi görülmesine rağmen p16 ifadesi gözlenmemektedir. İnsulin-benzeri büyüme hormon faktörü I (IGF-I) ve insulin benzeri büyüme faktörü II (IGF II) reseptörleri yönünden pozitifdir. Hem organel büyüklüklerinin görüntüleme konusunda sağladıkları avantajlar hem de kolay transfekte edilebiliyor olmaları bu hücre hattının seçilmesinde önemli başlıkları oluşturmaktadır.

5.1.1.2. HEK 293

İnsan embriyonik böbrek hücre hattı olan (HEK 293) 1970'lerin başında Hollanda'da Alex van der Eb'in laboratuvarında embriyonik böbrek hücrelerinin adenovirüs 5 DNA'sı ile transfekte edilmesi sonucu elde edilmiştir. Günümüzde

kolay kültüre edilebilmesi ve kolay transfekte edilebilmesiyle en çok kullanılan hücre hatları arasında yer almaktadır.

Yapılan çalışmada ise HEK293T vektöre ait SV40 enhanser bölgesine bağlanarak protein ifadesini arttıran büyük T antijenini sürekli olarak eksprese eden hücre hattı seçilmiştir. Böylece T antijeni sayesinde hücre döngüsünü inhibe eden proteinlere bağlanan ve sürekli hücre döngüsüne giren popülasyonda transfeksiyon, transdüksiyon, plazmit amfilikasyonu uygulamalardaki başarı oranını yükseltilmiştir.

5.1.2. Hücre Kültürü Solüsyonları

- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)

Besiyeri olarak kullanılan DMEM, bizim yaptığımız deneylerde %10 fetal serum, %10 penisilin ve 3.3 mM L-glutamin içerecek şekilde hazırlanmıştır.

- Tripsin

Hücrelerin kültüre edildikleri petriyle temaslarını ortadan kaldıran bir enzimdir. Çalışmalar sırasında -20 °C'de saklanan enzim, tripsin-Etilendiamin tetraasetik asit şeklinde PBS içerisinde 3X olacak şekilde hazırlanmıştır.

- PBS

Ticari olarak satın alınmış olan 10X PBS, hücre kültürü çalışmalarında 1:10 oranında steril distile su ile seyreltilerek 1X PBS olarak kullanılmıştır.

- Hücre Dondurma Besiyeri

Fetal sığır serumu içerisine %10 DMSO eklenerek hazırlanan besiyeri, alüminyum folyo ile sarılıp, steril olarak +4 °C'de inkübe edilmiştir.

5.1.3. Liziz Solüsyonu

- Liziz Tamponu

Son konsantrasyonda 500 mM Tris (pH=8), 250 mM NaCl, %1 NP40 ve 1X proteaz inhibitörü konularak üzeri ddH₂O ile 1L'ye tamamlanmıştır. Deneylerde kullanılan liziz tamponunun taze olarak hazırlanması gerekmektedir.

5.1.4. İmmünoblot Solüsyonları

- Jel Formülasyonları (10 ml)

Tris tamponu, SDS ve % 40 akrilamid ddH₂O içerisinde aşağıdaki tablolarda yer alan oranlar göz önüne alınarak hazırlanmıştır (Tablo 5.1 ve Tablo5.2). %10 APS and TEMED ise hızlı polimerleşmeye neden oldukları için en son eklenmiştir.

Tablo 5.1: Yürütme jeline ait kimyasal oranları.

YÜRÜTME JELİ	12%		
	1	2	4
1.5 Tris HCl pH 8.8	1250	2500	5000
ddH ₂ O	2175	4350	8700
40% Acryl/bis	1500	3000	6000
25 % SDS	20	40	80
10% APS	50	100	200
TEMED	5	10	20

Tablo 5.2: Ayırma jeline ait kimyasal oranları.

AYIRMA JELİ	4%			
	1	2	3	4
0.5 Tris HCl pH 6.8	1250	2500	3750	5000
ddH ₂ O	3175	6350	9525	12700
40% Acryl/bis	500	1000	1500	2000
25 % SDS	20	40	60	80
10% APS	50	100	150	200
TEMED	5	10	15	20

- Yürütme Tamponu, 5X

15.1 g tris, 95 g glisin, 50 ml 10% SDS ddH₂O ile 1L'ye tamamlanmıştır.

- Transfer Tamponu, 10X

30.3 g tris ve 144 g glisin ddH₂O içerisinde çözülerek 1L'ye tamamlanmıştır. Deneyde kullanılmadan önce taze olarak hazırlanan solüsyon ddH₂O ile 1X olacak şekilde seyreltilerek ve %20 metanol eklenerek 4 C°'de saklanmıştır.

- TBS, 10X

12.1 g tris ve 87.6 g NaCl 1 L ddH₂O içerisinde çözülerek, pH'ı 8.0 olacak şekilde ayarlanmıştır.

- TBS-T

Hazırlanmış olan 1X TBS solüsyonunun içine %0.1 tween-20 eklenmiştir.

- 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8

200ml ddH₂O içerisinde 121.1 g trizma base çözülmüş ve pH 8.8 olarak ayarlanmıştır.

- 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8

200ml ddH₂O içerisinde 121.1 g tris çözülerek hazırlanan solüsyonun pH'ı, HCl ve NaOH kullanılarak 6.8 olacak şekilde ayarlanmıştır.

- APS

0.1 g amonyum sülfat, 1 ml ddH₂O içerisinde çözülerek filtre edilmiş ve taze hazırlanan solüsyon -20°C'de muhafaza edilmiştir.

- Strip Solüsyonu

Son konsantrasyon 100 mM β -mercaptoethanol, %2 SDS, 62.5 mM Tris-HCl içerecek ve pH: 6.7 olacak şekilde hazırlanmıştır.

5.1.5. Flow Sitometri Solüsyonları

- 7AAD Boyama Solüsyonu

PBS'in içinde 1/1000 Triton-X, 1 ml de 10 μ g RNAaz ve 500.000 hücre için 10 μ l 7AAD çözülmüştür.

5.1.6. İmmüno Floresan Solüsyonları

- Yıkama Solüsyonu

1X PBS'in içerisine Triton-X %0.1 olacak şekilde eklenerek hazırlanmıştır.

- Bloklama Solüsyonu

1X PBS'in içerisinde %0.1 Triton-X ve %2 BSA çözülerek hazırlanmıştır.

- DAPI Boyası

1X bloklama solüsyonu içerisinde 1/100.000 oranında DAPI çözülerek hazırlanmıştır.

- Tübülin Boyası

1X bloklama solüsyonu içerisinde 1/200 oranında gama tübülün çözülmüştür.

5.1.7. Kimyasal Malzemeler

Deney için kullanılan kimyasallara ve kimyasalların markalarına/katalog numaralarına ait liste aşağıdaki Tablo 5.3'de yer almaktadır.

Tablo 5.3: Kullanılan kimyasal madde listesi.

KİMYASALIN ADI	KİMYASALIN MARKASI/ KATALOG NUMARASI
2-Mercaptoethanol	Aldrich/ M6250
Albumin	Sigma/ 7906
Anti Flag Affinity Gel	Sigma/ A2220
Bradford Reagent	Sigma/ B6916
FBS	BioWest/ S1860
Fugene6	Roche/ 11 815 091 001
Geneticin-G418	Gibco/ 10131
GFP Trap-A	Chromotek
Glycine	Sigma/ G7126
Hidroklorik asit	Sigma/ 071102
High glucose DMEM	Gibco/ 41966
Liqui-gel 37 5 1	MP/ 800804
Methanol	Sigma/ 34885
PBS	Lonza/ BE17-517Q
PEI	Sigma/ 408727
Pen /Strept	Lonza/ BE17-16E
Sodyum kloride	Sigma/ 13423
TEMED	Sigma/ T9281
Tergitol solüsyonu	Sigma/ NP40S
Trypsin	Lonza/ BE17-61E
Trizma base	Sigma/ T6066
Tween 20	Sigma/ P1379

5.1.8. Kullanılan Cihazlar

Deney için kullanılan cihazlara ve cihazların markalarına/model numaralarına ait liste aşağıdaki Tablo 5.4’de yer almaktadır.

Tablo 5.4: Kullanılan cihaz listesi.

CİHAZIN ADI	CİHAZIN MARKASI/ MODELİ
Floresan mikroskopu	Nikon/ H600L
Flow cytometri	Accuri – BD
İnkübatör	Heal Force/ Smart cell
Laminar Flow	Cryste
Santrifüj	Labogene/ ScanSpeed 1580R
Santrifüj tüp	Labogene/ Scanspeed 1730R
Santrifüj (Hücre kültürü)	Nüve/ NF400F
Shaker	Labnet/ Rocker 25
Su banyosu	Wisd/ WiseBath
İmmün –Blot Ekipmanları ve Güç Kaynağı	BioRad
Shaker	Labnet/ Rocker 25
Heat-block	Benchwork
Görüntüleme cihazı	BioRad

5.1.9. Antikolar

Araştırma sırasında kullanılan antikora ait bilgiler ve immünoblot sırasında kullanılma oranlarına ilişkin bilgiler Tablo 5.5’de gösterilmiştir.

Tablo 5.5: Kullanılan antikor listesi.

ANTİKOR	ELDE EDİLDİĞİ ORGANİZMA	FİRMA	KATALOG NUMARAS	WB	IF
Ccdc124-Cter	Tavşan(173-223)	Bethyl	A301-834	1/100	
Ccdc124-Middle	Tavşan(100-150)	Bethyl	A301-835	1/100	
Aktin	Goat	Sigma	A2304	1/500	
Anti-mouse	Goat	Sigma	A9169	1/500	
GFP antikor	Tavşan	Sigma	G1544	1/100	
Anti-Flag-HRP	Fare	Sigma	A8592	1/100	
Anti-RasGEF1B	Tavşan	Sigma	HPA044574	1/100	
Anti-c-Myc	Fare	Sigma	M4439	1/100	
Alexa 488	Fare	Invitrogen	898234		1/50
Anti-beta tübülün	Tavşan	Santa	Sc-5286		1/10
Anti-gama tübülün	Fare	Abcam	11316		1/20

5.2. YÖNTEM

5.2.1 Hücre Kültürü

5.2.1.1. Hücre Kültürü Ortamı

U2OS hücreleri %10 (v/v) FBS ve %1 (v/v) penisilin/streptomisin ve yüksek glikoz içeren besiyeri ortamında kültüre edilmiş, 37°C’de ve %5 CO₂ içeren koşullarda inkübatörde muhafaza edilmiştir. Hücrelerinin besiyerleri ortalama 2-3 günde bir taze besiyeri ile değiştirilmiş ve hücre yoğunluğu %70-80’e ulaştığında alt kültürleme yapılmıştır.

5.2.1.2. Alt kültürleme ve Kültür saklama

Alt kültürleme için hücrelerin besiyeri uzaklaştırılarak 1X PBS ile yıkama yapılmış ve hücre-hücre/ hücre-yüzey bağlantılarını koparmak için 1ml 1X tripsin-etilendiamin tetraasetik asit eklenerek yaklaşık 2-3 dk 37°C, %5 CO₂ inkübatöründe enzimin aktive olması beklenmiştir. Enzimatik aktivitenin durdurulması için ortama tekrar besiyeri eklenmiş ve kalkmış olan hücreler pipet yardımıyla toplanarak oda sıcaklığında 1500 rpm’de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası üst sıvı uzaklaştırılarak hücrelerin üzerine taze besiyeri eklenmiş ve pipetaj yapılarak homojenize edilmiştir. Hücre yoğunluğuna bağlı olarak %20-30 oranında hücre her bir besiyerine ekilecek şekilde bölünerek inkübasyona bırakılmıştır.

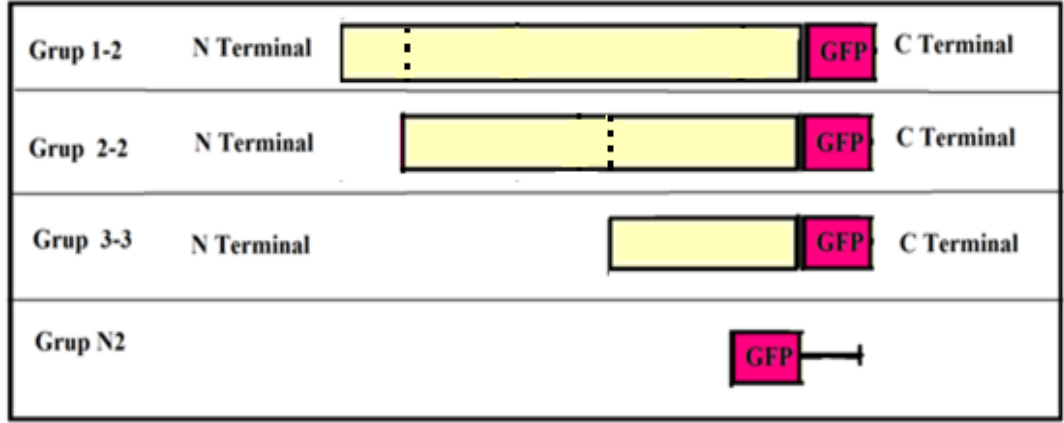
Hücrelerin sıvı nitrojende dondurularak saklanması santrifüj edilerek çöktürülen hücreler dondurma besiyerinde homojenize edilerek dondurma tüplerine bölünmüş ve sıvı nitrojende (buhar fazı) muhafaza edilmiştir.

5.2.2. Hücre Hattı Transfeksiyonu

Deneyde kullanılan U2OS hücre hatlarının transfeksiyonu için kalıcı transfeksiyon, HEK 293 hücre hatlarının transfeksiyonu için ise geçici transfeksiyon yöntemi seçilmiştir.

5.2.2.1. Kalıcı Hücre Hattı Klonları Eldesi

Ccdc124-GFP ekspresyonunun kalıcı olarak ifade edilebilmesi için U2OS hücreleri için geneticin-G418 kullanılarak sitotoksosite eğrisi hazırlanmış ve 600 µg/µl G418 konsantrasyonu koloni seçimi için uygun bulunmuştur. Şekil 5.1’de yer alan farklı uzunluklardaki Ccdc124-GFP plazmidleri, U2OS hücrelerine Fugene6 kullanılarak Tablo 5.6’daki oranlar kullanılarak aktarılmıştır.



Şekil 5.1: Deneyde kullanılan gruplara transfekte edilen plazmidlerin şemasal görüntüsü.

Tablo 5.6: Kalıcı transfeksiyonda kullanılan hücre miktarına bağlı kullanılan DNA ve kimyasal miktarları.

	6 KUYUCUKLU KÜLTÜR KABI	100 MİLİMETRE KÜLTÜR KABI
Besiyeri (serumsuz)	2 ml	10 ml
FuGENE// PEI	3 µl	18 µl
DNA	1 µl	6 µl
Ekilen hücre miktarı	300.000	1.000.000

Transfeksiyondan 48 saat sonra hücreler 150 milimetrelik kültür kabına aktarılmıştır. 24 saat büyüme besi yerinde kalan hücreler seçici besi yeri içeren antibiyotikli ortama alınmıştır. 7-14 gün sonra elde edilen koloniler 6 kuyucuklu kültür kabına aktararak çoğaltılmıştır.

5.2.2.2. Geçici Transfeksiyon

HEK 293 hücreleri her kuyucukta 1×10^6 hücre olacak şekilde 10 mm kültür kabına ekilerek 24 saat boyunca kültüre edilmiştir. Ekimden 24 saat sonra tranfeksiyonun yapılacağı hücrelerin besi yerleri serumsuz besiyeriyle önce yıkanmış, sonra da serumsuz besiyeriyle tamamlanmıştır. Bu sırada bir tüpün içine bir miktar serumsuz besiyeri konulmuş ve tüpün duvarlarına gelmeyecek şekilde üzerine transfeksiyon ajanı (PEI) ve tranfekte edilecek DNA (GFP-Ccdc124 ve c-Myc-RasGEF1B-3xFlag vektörleri) oranı 3 olacak şekilde 5'er dakika arayla ortama eklenerek 15 dakika oda sıcaklığında inkübasyon sağlanmıştır. İnkübasyonun ardından serumsuz besiyeri içerisindeki hücrelerin üzerine damla damla eklenmiş ve inkübatöre kaldırılmıştır. Transfeksiyondan 24 saat sonra besiyerleri serum bulunduran besiyeriyle değiştirilmiş ve transfeksiyonun 48. saatinde lizat elde edilmiştir.

Geçici transfeksiyon için kullanılan hücre sayıları, DNA ve kimyasal oranları gibi veriler Tablo 5.7'da yer almaktadır.

Tablo 5.7: Geçici transfeksiyonda kullanılan hücre miktarına bağlı kullanılan DNA ve kimyasal miktarları.

	6 KUYUCUKLU KÜLTÜR KABI	100 MİLİMETRE KÜLTÜR KABI
Besiyeri (serumsuz)	2 ml	10 ml
FuGENE// PEI	6 µg /µl	21 µg /µl
DNA	2 µg /µl	7 µg /µl
Ekilen hücre miktarı	300.000	1.000.000

5.2.3. Liziz ve Protein Miktar Tayini

Protein miktar tayininin yapılması için hücre örneklerinin besiyeri uzaklaştırılarak, 2 ml 37 °C'deki PBS kullanılarak iki kere yıkama yapılmış ve hücrelerin üzerine +0 °C'deki 2 ml PBS eklenerek kazıyıcı yardımıyla hücreler

kaldırılmıştır. +4 °C’de 1500 rpm’de 5 dakika santrifüj edilen örneklerin üstündeki supernatant uzaklaştırılarak peletler -80 °C’de saklanmıştır.

Hazırlanan örnekler daha sonra buz kabına alınarak peletlerin yavaşça çözülmesi sağlanmış ve peletin 3 katı kadar taze olarak hazırlanmış olan liziz tamponu eklenmiştir. Liziz tamponunun eklenmesinin ardından vorteks yapılarak, 5-10 dakika buzda bekletilen örneklerin daha sonra tekrar vorteks yapılarak tamamen çözünmesi sağlanmıştır. En son aşamada ise 14000 rpm’de 30 dakika +4 °C’de santrifüj edilen örneklere ait hücre artıkları çöktürülmüş ve süpernatantlar dikkatlice yeni tüplere aktararak lizat eldesi sağlanmıştır.

Protein miktar tayininin yapılması için ise öncelikle, albumin (BSA)’nın 1.5 mg/ml, 1.25 mg/ml, 1 mg/ml, 0.75 mg/ml, 0.5 mg/ml, 0.25 mg/ml ‘lik örnekleri hazırlanarak bir standart grafik oluşturulmuştur. Blank için ise hazırlanan liziz buffer kullanılmıştır.

Standart grafik oluşturmak için kullanılan BSA konsantrasyonları ve bu konsantrasyonları belirlemek amacıyla kullanılan Bradford yöntemine ait sayısal veriler Tablo 5.8’de gösterilmiştir.

Tablo5.8: Standart grafik oluşturmak için kullanılan BSA konsantrasyonları.

TÜP NUMARASI	1	2	3	4	5	6	7	8 (BLANK)
BSA konsantrasyonu (mg/ml)	0,25	0,5	0,75	1	1,25	1,5	2	-
Yüklenen BSA (µl)	5	5	5	5	5	5	5	-
Yüklenen Bradford (µl)	250	250	250	250	250	250	250	250
dH ₂ O (µl)	-	-	-	-	-	-	-	5
Son Hacim (µl)	255	255	255	255	255	255	255	255

Daha önceden oda sıcaklığına getirilmiş Bradford’dan 96 kuyucuklu kültür kabına 5’er µl yüklenen örneklerin, standart grafik verilerinin ve blanklerinin üzerine 250 µl eklenerek üzeri ışıktan etkilenmesini önlemek amacıyla alüminyum folyoyla

kapatılmış ve 20 dakika çalkalayıcıda, 20-25 dakika da oda sıcaklığında bekletildikten sonra ölçüm alınmıştır.

5.2.4. Birlikte Çöktürme Yöntemi

RasGEF1B/Ccdc124 çöktürmesi için, GFP-Ccdc124 ve Myc-RasGEF1B-3xFlag vektörleriyle transfekte edilen HEK 293 hücrelerinden elde edilerek -80°C’de saklanan lizatlar buzun üzerinde çözölmüş ve üzerine peletin 3 katı kadar liziz tamponu eklenmiştir. Buzun üzerinde 30 dakika inkübasyonun ardından +4 °C’de 13000 rpm’de 30 dakika santrifüj edilerek elde edilen supernatantın üzerine 500µl dilüsyon tamponu (NP 40 içermeyen liziz tamponu) içinde 20-30 µl bead eklenmiştir. 6000 g’de 2 dakika +4 °C’de santrifüj edilen örnekler ait süpernatantlar alınarak iki defa dilüsyon tamponuyla yıkama yapılmıştır. Çöken Flag boncuklarının üzerine hücre lizatları eklenip 2 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiş ve 6000g’de 2 dakika +4 °C’de santrifüj edilerek elde edilen süpernatant clear lizat olarak kullanılmıştır. Peletin ise soğuk 500 µl dilüsyon tamponu ile iki kere yıkanmasının ardından, 95°C’de 10 dakika inkübasyon gerçekleştirilmiş ve 4000 rpm’de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Böylece santrifüj ile boncuklar çöktürülerek örneğin üstte kalması sağlanmıştır.

Fraksiyonların saptanması için SDS-PAGE ile immunoblot analizleri yapılarak PVDF membrana aktarılmış ve c-Myc, Ccdc124 ve calnexin antikorlarıyla ile inkübe edilerek immüno blot analizi gerçekleştirilmiştir.

5.2.5.İmmünoblot Analizi

Ccdc124 ile çalışılırken %10 ile % 12’lik SDS gel kullanılabilir. Ancak bu deney için % 12 jel kullanması tavsiye edilmektedir. Tablo 4.1 ve 4.2 ‘deki oranlar esas alınarak %12’lik yürütme jeli APS ve TEMED donabileceğinden en son eklenerek hazırlanmış ve üzerine izopropanol konularak jelin hava alması önlenmiştir. Yürütme jeli donduktan sonra ise üzerine %4’lük ayırma jeli dökülerek onluk tarak yerleştirilmiş ve jellerin donması beklenmiştir.

Örnekler ve marker kaynayan suda 5 dakika tutularak proteinlerin denatüre olması sağlanmış ve beta-mercaptoethanol eklenerek hazırlanmış olan 4X yükleme

boyası, son hacimde 1X olacak şekilde ayarlanarak örneklerin üzerine eklenmiştir. Her kuyuda 40µg protein olacak şekilde yükleme yapılmış ve jel 70 mA de 30 dakika yürütülmüştür. Jel yürüdükten sonra membran methanol ile bir kez yıkandıktan sonra ddH₂O'dan geçirilmiştir. Önceden 1X'e indirilmiş methanol eklenmiş +4 °C'de bekleyen transfer tamponu eklenerek wattman kağıtları da aynı şekilde ıslatılmıştır. 100 voltta 1 saat transfer yapıldıktan sonra membran 1 saat %5 süt tozu ile bloklanmıştır. Bloklamanın ardından 2 saat birincil antikorlarla (C-ter ve Mid Ccdc124ab için 1/1000, N-ter ab için 1/ 5000 ve GFP için 1/1000) muamele edilen membran, 3 kez 10'ar dakika 1XTBS-tween ile yıkanarak 1 saat 1/5000 anti-rabbit antikor ile tekrar inkübe edilmiştir. Inkübasyon bitiminde yine üçer kez 10 dakika TBS-T ile yıkama yapıldıktan sonra görüntü alınmıştır.

5.2.6. FACS Analizi

10'luk kültür kabında kültüre edilmiş olan hücreler PBS ile yıkanarak 1 ml 3X tripsin eklenmiş ve 37 °C'de 2 dakika bekletilerek hücrelerin kalkması sağlanmıştır. Tripsinle kaldırılan hücrelerin üzerine 2 ml DMEM eklenerek tripsin inaktive edilmiş ve 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek hücreler çöktürülmüştür. Elde edilen peletin üstünde kalan sıvı kısım uzaklaştırılarak üzerine -20 °C'de 20 dakika bekletilmiş, 4ml %70'lik ethanol eklenmiş ve örneklerin en az 24 saat +4 °C'de inkübasyonu sağlanmıştır.

24 saat inkübasyonun ardından +4 °C'de saklanan hücreler +4 °C'de 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve peletin üzerindeki sıvı uzaklaştırılmıştır. 500.000 hücre için PBS'in içerisinde son konsantrasyon 1/1000 Triton X, 10 µl 7AAD ve 1ml'de 10 µg RNAaz olacak şekilde bir çözelti hazırlanarak peletlerin üzerine eklenmiş ve örnekler içinde homojenize edilmiştir.

Elde edilen çözelti ve hücre süspansiyonu polipropilen tüplerin içine alınarak etrafı folyoyla sarılmış ve 37 °C'de 1.5 saat inkübe edildikten sonra gerekli analizler yapılmıştır.

6. SONUÇLAR ve YORUMLAR

6.1. Sonuçlar

6.1.1. Ccdc124 Proteininin Aşırı İfadesinin U2OS Hücre Hattı Üzerindeki Etkileri

Çalışmanın başında 36 adet kalıcı transfeksiyon klonu imünoblot yöntemi kullanılarak Ccdc124 ifadeleri yönünden taranarak incelenmiştir. Bu analizlerde, tam boy ve orta boy Ccdc124-GFP ifade eden hücrelerde 40-55 kDa arasında bant beklenirken, en küçük boy Ccdc124 ifade eden hücrelerde 40-35 kDa boyunda bantlar beklenmektedir. Yapılan analizlerde, kalıcı transfeksiyon yöntemi ile rekombinant Ccdc124-GFP aktarılan tüm hücre gruplarında beklenen Ccdc124-GFP protein versiyonları başarı ile bulgulanmış (Şekil 6.1) ve değişik boylardaki Ccdc124 proteinlerinin hücre biyolojisine etkileri araştırılmıştır.

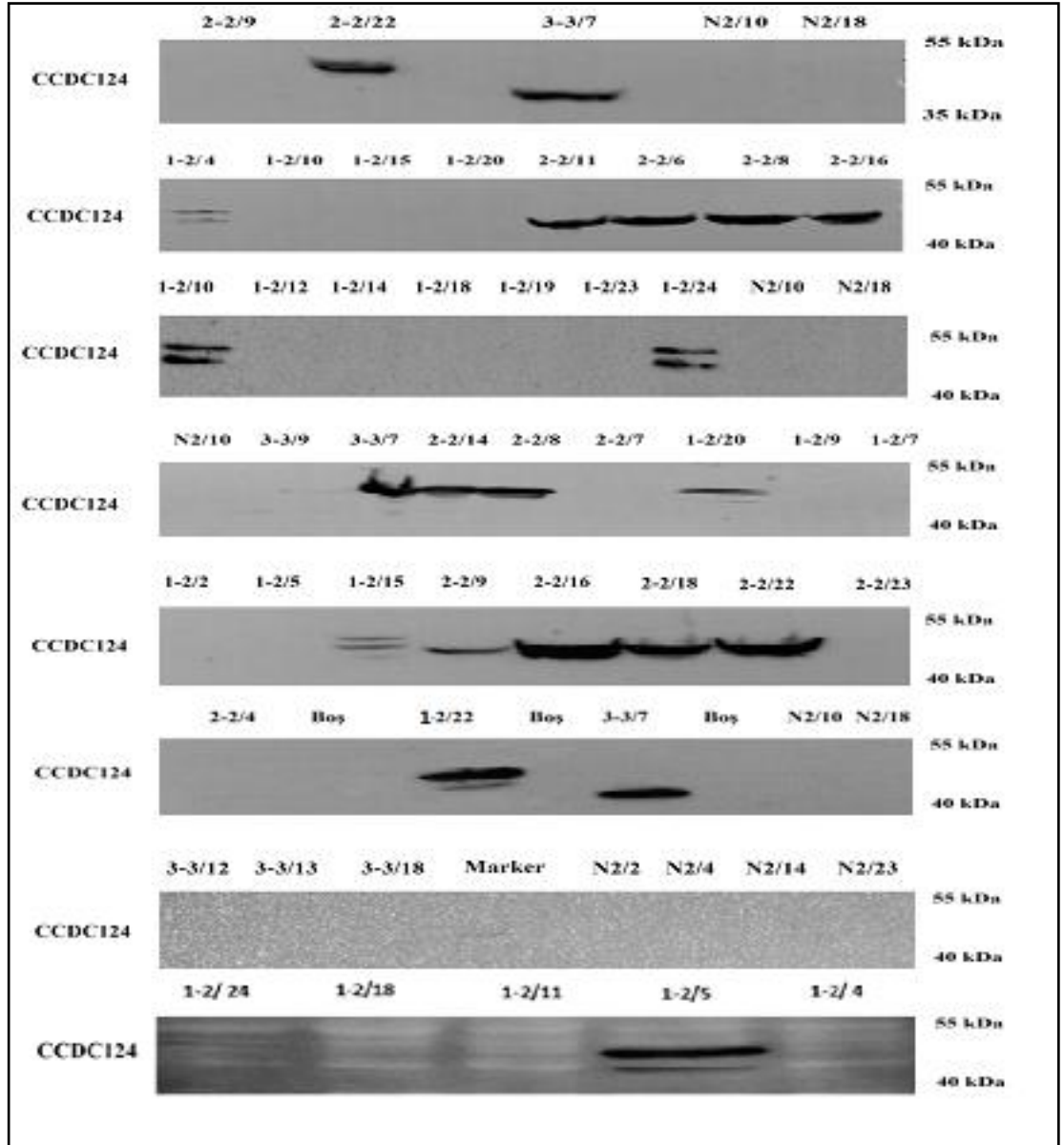
Grup 1-2	N Terminal Met 1 Lys 223 C Terminal
Grup 2-2	N Terminal Leu 64 Met Lys 223 C Terminal
Grup 3-3	N Terminal Val 142 Met Lys 223 C Terminal
Grup N2	N Terminal C Terminal

Şekil 6.1: Kalıcı transfeksiyon için kullanılan plazmidlerin içerikleri.

6.1.1.1. Transfekte Edilmiş U2OS Hücrelerinde Ccdc124 Proteininin İfade Profili

Kalıcı transfeksiyon yöntemi kullanılarak elde edilmiş ve 1 rakamı ile başlayan klonlarda en uzun Ccdc124 taşıyan rekombinant yapıların, 2 rakamı ile kodlanmış klonlarda N-ucu eksik Ccdc124 geni taşıyan rekombinant yapıların ve 3 rakamı ile kodlanmış klonlarda da Ccdc124'ün C-son ucunu taşıyan rekombinant yapıların aktarıldığı hücrelerden gelen lizatlar incelenmiştir (Şekil 6.1).

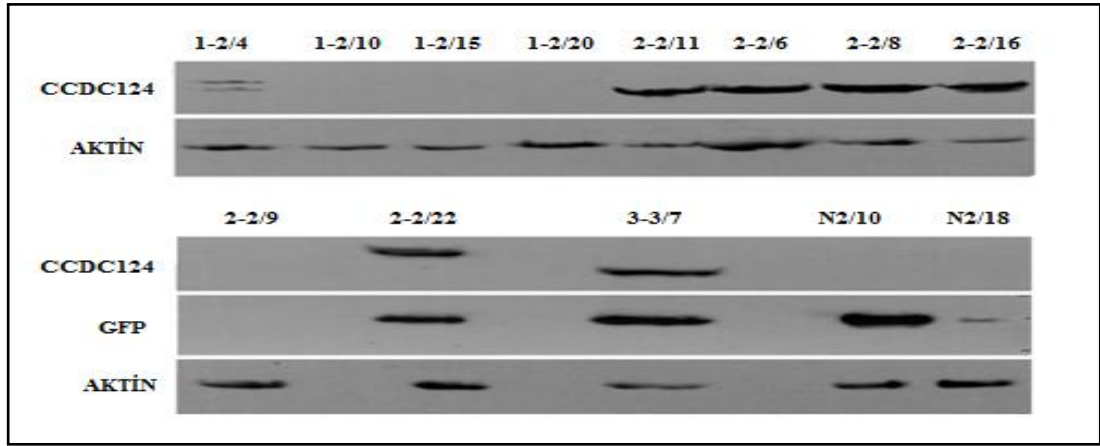
Ccdc124 proteininin aşırı ifade edildiği düşünülen toplam 36 bağımsız U2OS hücre klonu immünoiblotlama (Western blot) yöntemi kullanılarak bu proteinin ifadesi yönünden taramak sureti ile analiz edilmiştir. Kontrol olarak insan alfa-aktin protein ifadesi yapılan her immünoiblot analizinde görüntülenmiş ve böylece örneklerin kuyucuklara yükleme miktarından kaynaklanabilecek problemler ortadan kaldırılmıştır. Şekil 6.2’de sunulan immünoiblotlarda taramalarımızın sonuçları gösterilmektedir.



Şekil 6.2: Farklı boylarda Ccdc124 proteini ifade ettiği düşünülen U2OS hücre klonlarına ait bu proteinin ifadeleri.

Taranan 36 bağımsız klonun 21 tanesinde Ccdc124 ifadesi tesbit edilemezken, kalan 15 klonda Ccdc124 protein ifadesi net olarak tespit edilmiştir. 1-2 numaralı gruplarda 55 kDa ile 40 kDa arasında çift bant görülmüş, 2-2 gruplarına ait kuyucuklarda ise birer bant belirlenmiştir. 3-3 gruplarında 40 kDa ile 35 kDa arasında bantlaşmaya rastlanmıştır. N2/10 gruplarında ise anti-Ccdc 124 antikorunu kullanıldığında hiçbir bantlaşma gözlemlenmemiştir. Deney sonucunda Ccdc124 protein ifadesi tespit edilen hücre kolonileri kayıt altına alınmış ve ayrı ayrı dondurularak GTÜ-MBG Bölümünde bulunan sıvı azot tanklarında bankalanmıştır.

Araştırmada kullanılmak üzere 1-2/4, 2-2/8, 3-3/7 ve N2/10 numaralı hücre hatları seçilmiş ve bu seçimde kullanılan membran görüntüleri aktin ifadeleriyle birlikte aşağıda verilmiştir (Şekil 6.3).

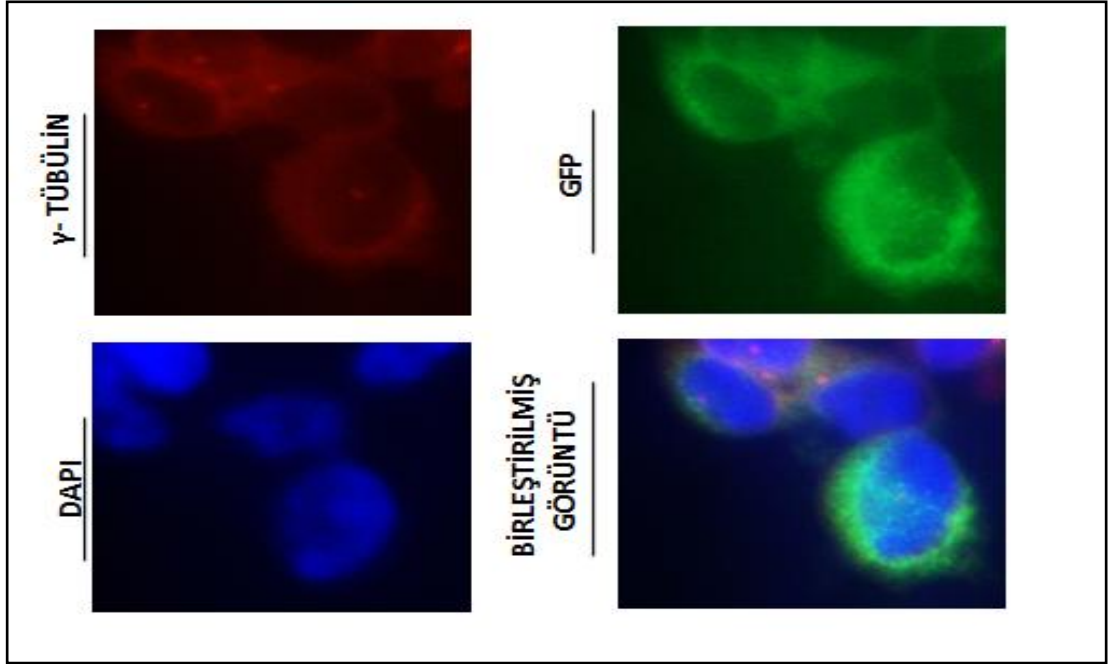


Şekil 6.3: Sonraki aşamalarda kullanılmak üzere seçilen N2/10, 1-2/4, 2-2/8, 3-3/7 gruplarına ait immüno blot yöntemiyle elde edilen membran görüntüleri.

6.1.1.2. Ccdc124 Proteininin İfadesinin Arttırıldığı Hücrelerdeki Konumu

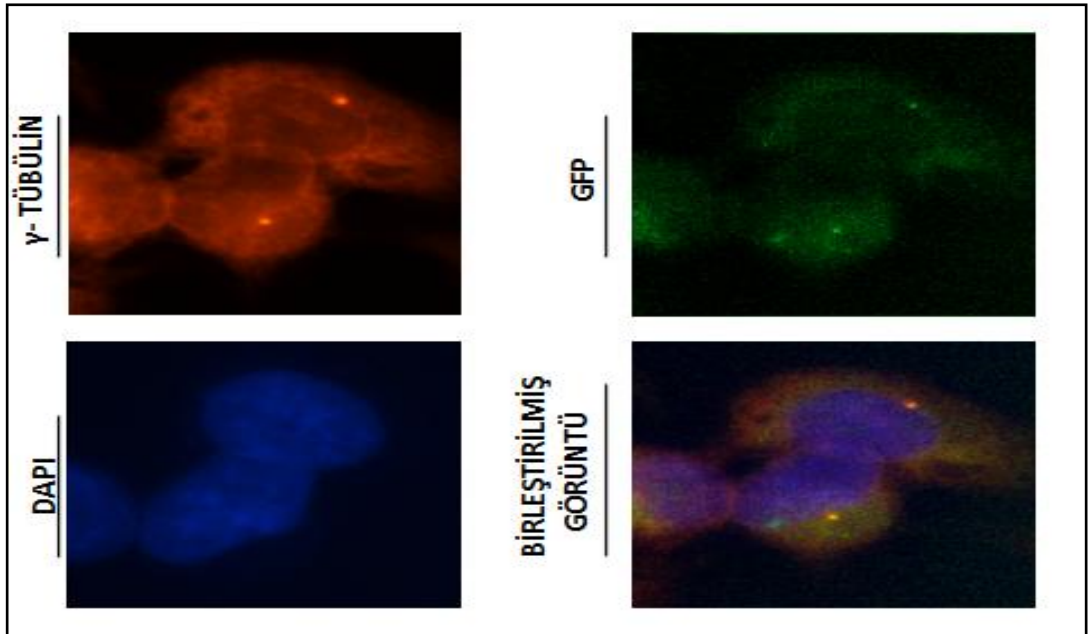
İmmünofloresan boyama sırasında hücre iskeletinin ve sentrozomların gözlemlenmesi için kırmızı renkle gözlemlenen gamma tübülün kullanılırken, nükleusu gözlemek için mavi renkli olarak görülen DAPI boyaması kullanılmıştır. Ccdc124 proteini ise C son ucunda GFP bulundurması nedeniyle hücre içinde yeşil renkli olarak gözlemlenmiştir.

Kontrol grubu olarak kullanılan N2/10 grubuna ait immünofloresan boyama sonucunda G1 ve erken profaz GFP proteinin sitoplazma içine dağılmış halde olduğu belirlenmiştir (Şekil 6.4).

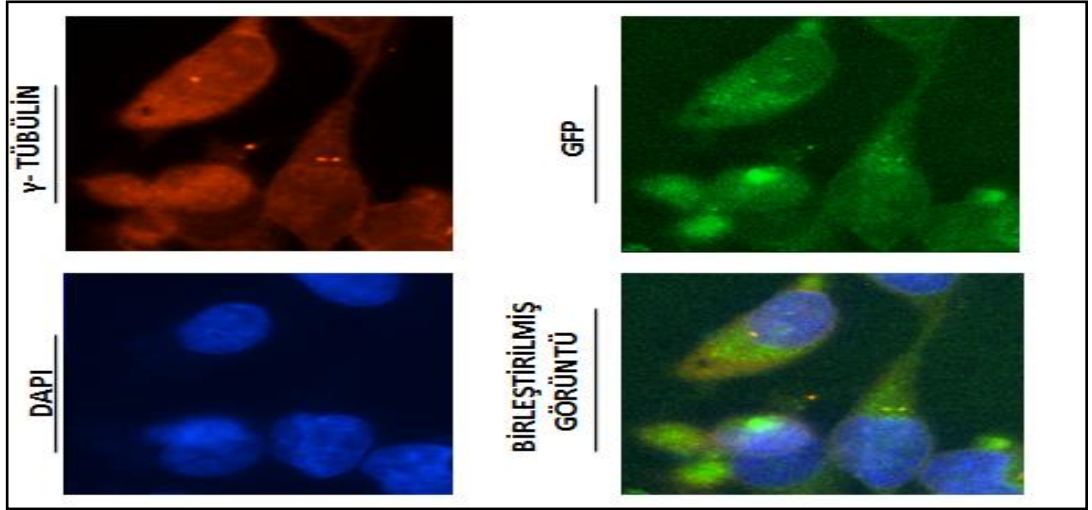


Şekil 6.4: N2 grubuna ait G1/erken profaz fazındaki hücrelerin immunofloresan görüntüsü.

1-2/4 numaralı gruba ait görüntüler sırasında hem G1 fazında hem de iki sentrozomun bulunduğu erken profaz evresini henüz tamamlamış hücelere rastlanmış ve her iki evrede de ilgili proteinin sentrozom etrafında ve sitoplazma içinde dağılmış olarak konumlandığını gözlemlenmiştir (Şekil 6.5 ve Şekil 6.6).

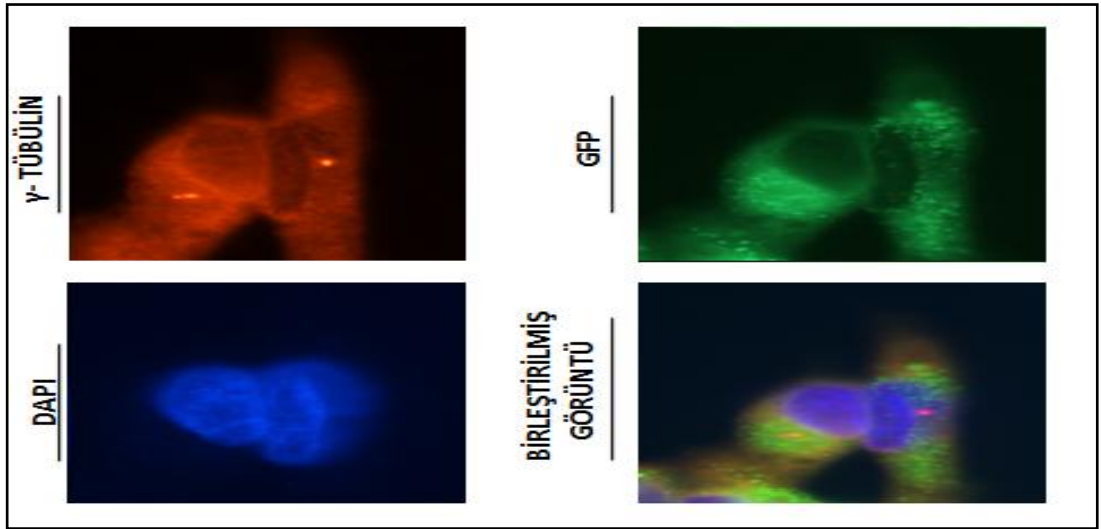


Şekil 6.5: 1-2 grubuna ait G1 fazındaki hücelere ait immunofloresan görüntüsü.



Şekil 6.6: 1-2 grubuna ait erken profaz fazındaki hücelere ait immunofloresan görüntüsü

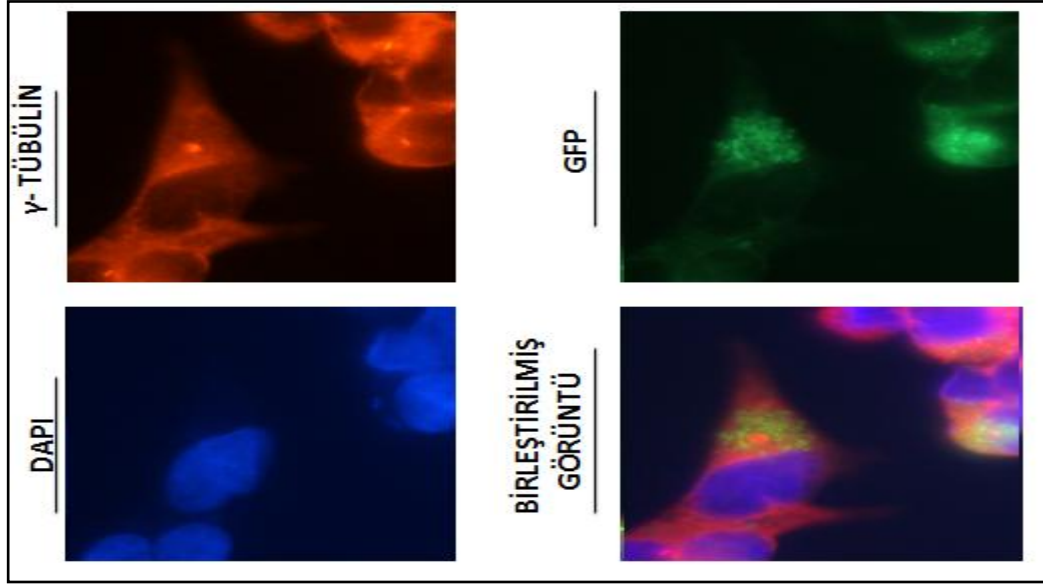
2-2/8 numaralı gruba ait immünofloresan boyama sonucunda GFP ile işaretlenmiş ve aşırı ifade edilen Ccdc124 proteininin G1 ve erken profaz süresince tüm sitoplazmaya dağılmış olarak bulunduğu tespit edilmiştir (Şekil6.7).



Şekil 6.7: 2-2 grubuna ait G1 ve erken profaz fazındaki hücelere ait immunofloresan görüntüsü.

3-3/7 numaralı örneklerin çekirdekleri DAPI ile boyanmış ve gama tübülünle sentrozom ve mikrotübüllerin hücre içi dağılımı gözlemlenmiştir. Daha önceden GFP ile işaretlenerek aşırı ifadesi sağlanan Ccdc124 proteini ise yeşil renkli olarak görüntülenmiştir. Elde edilen tüm görüntüler birleştirildiğinde ise Ccdc124

proteininin 2-2/8 grubunda gözlenen duruma benzer olarak G1 ve erken profazda sitoplazmaya dağılmış halde bulunduğu tespit edilmiştir (Şekil 6.8).



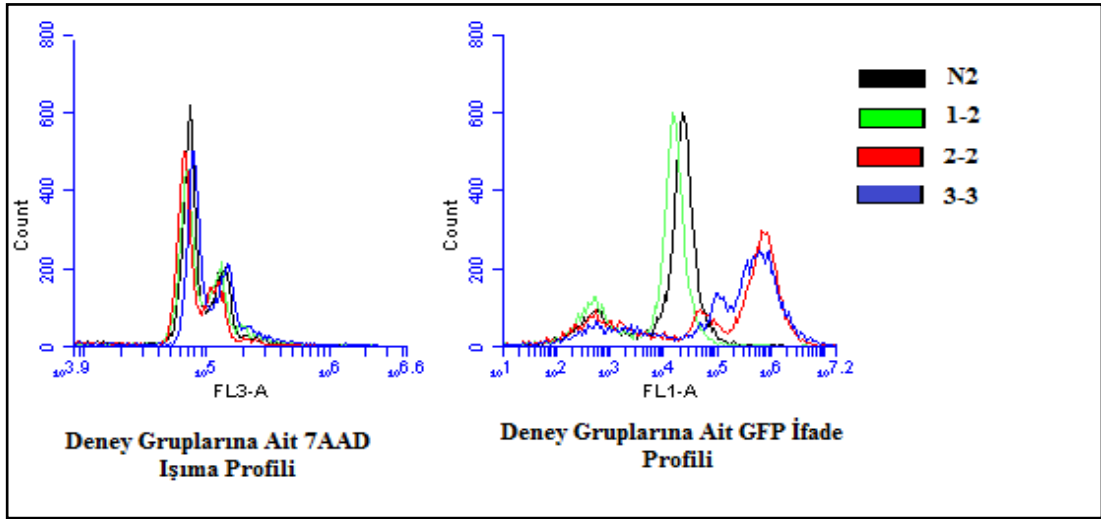
Şekil 6.8: 3-3 grubuna ait G1 ve erken profaz fazındaki hücelere ait immunofloresan görüntüsü.

6.1.1.3. Ccdc124 Proteininin İfadesinin Arttırıldığı Hücrelerde Hücre Döngüsü Profili

Daha önceki çalışmalarda Ccdc124 seviyeleri düşürülmüş hücrelerin, çoğunlukla hücre döngüsünün sitokinez (C) evresinde bloke oldukları ve bunun sonucu olarak füzyona girmeleri sureti ile çok çekirdekli hücre yapılarının ortaya çıktığı belirlenmiştir [Telkoparan vd, 2013]. Bu nedenle, Ccdc124 ifadesi artırılmış hücre hatlarını elde etmemizi takiben, bu hücrelerin hücre döngüsü evreleri hücre akım sitometrisi (FACS) metodları ile incelenmiştir. Anılan erken çalışmalarda hücreler araştırmacılarca sayılarak veriler bir araya getirilmiş ve grafikler oluşturulmuştur. Bizim çalışmamızda ise, daha titiz bir yöntem olan FACS kullanılmıştır.

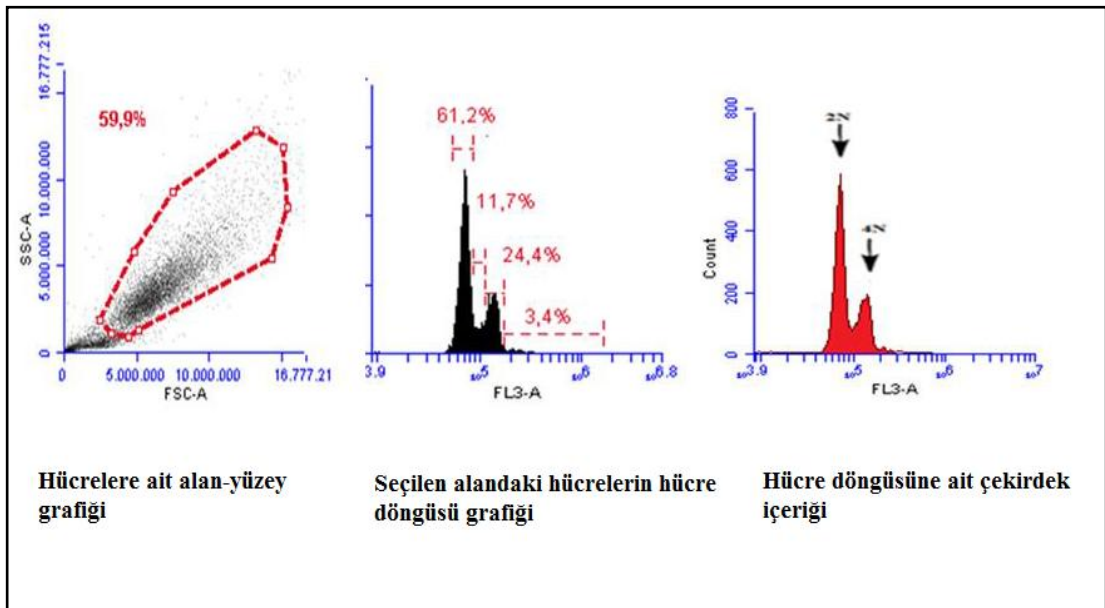
FACS analizi için 7AAD ile çekirdek boyaması gerçekleştirilmiş ve boyamanın gerçekleşip gerçekleşmediğinin ışımaya bağlı kontrolü sağlanmıştır. İmmün analizlerine ek olarak deney gruplarına ait GFP analizleri yapılarak hücrelerin ekspresyon miktarları karşılaştırılmıştır. 7AAD ışımaları açısından gruplar arası herhangi bir farklılığa rastlanmazken, GFP ışıması bakımından N2 ve 1-2

gruplarının, 2-2 ve 3-3 gruplarına göre daha az ışıma verdikleri tespit edilmiştir (Şekil6.9).



Şekil 6.9: Deney gruplarına ait 7AAD ve GFP ışıma profili.

N2 grubuna ait FACS analizi sırasında popülasyonun % 60'ını içeren kapı seçilerek bu alanda dağılım gösteren hücreler üzerinde inceleme gerçekleştirilmiştir. Ortalama FSC genişliği ve yüksekliğine göre grafik seçilerek tek olarak sayılmış hücreler tespit edilmiş ve hücre döngüsüne ait grafikler bu alanlara göre oluşturulmuştur (Şekil 6.10).



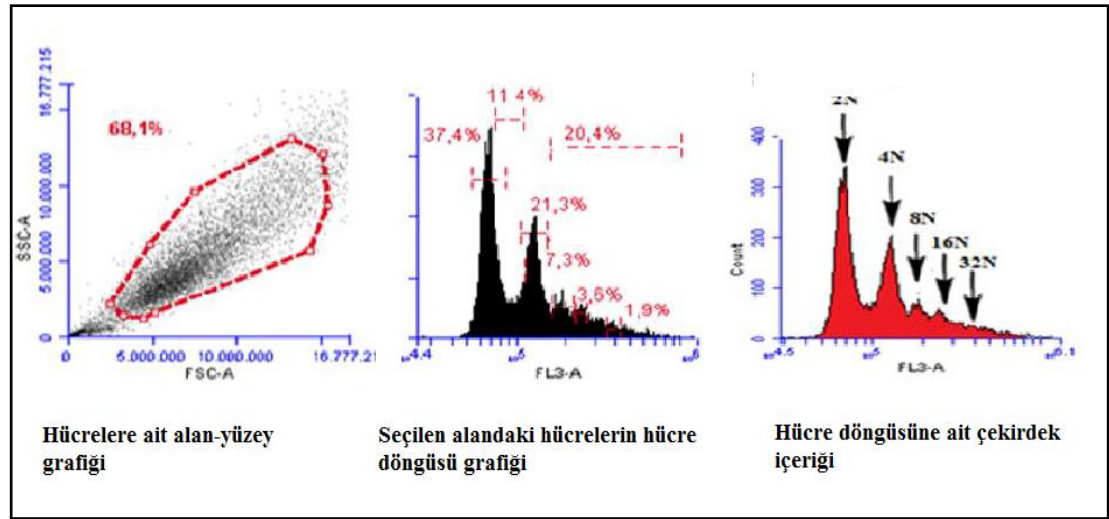
Şekil 6.10: N2 grubu FACS analizi sonuçlarına ait grafik görüntüleri.

Deney sonucunda seçilen kapıda yer alan hücrelerin %61.2'sinin G0/G1 fazında, %11.7'sinin S fazında, %24.4'ünün ise G2/M fazında olduğu belirlenmiştir. Hücrelerin %3.4'ünün çekirdek içeriğinin ise 4N'in üzerinde olduğu tespit edilmiştir (Tablo 6.1).

Tablo 6.1: N2 grubu hücre döngüsündeki fazlara ait yüzde verileri.

N2 GRUBU (ALINAN KAPIYA GÖRE)	ALAN YÜZDESİ
Tüm Alan	%100,00
G0/G1 fazındaki diploid hücreler	%61,24
S fazındaki diploid hücreler	%11,67
G2/M fazındaki diploid hücreler	%24,39
Çok çekirdekli hücreler	%3,39

1-2 grubu için de ortalama FSC genişliği ve yüksekliğine göre grafik seçilerek tek olarak sayılmış hücreler tespit edilmiş ve hücre döngüsüne ait grafikler bu alanlara göre oluşturulmuştur (Şekil 6.11).



Şekil 6.11: 1-2 grubu FACS analizi sonuçlarına ait grafik görüntüleri.

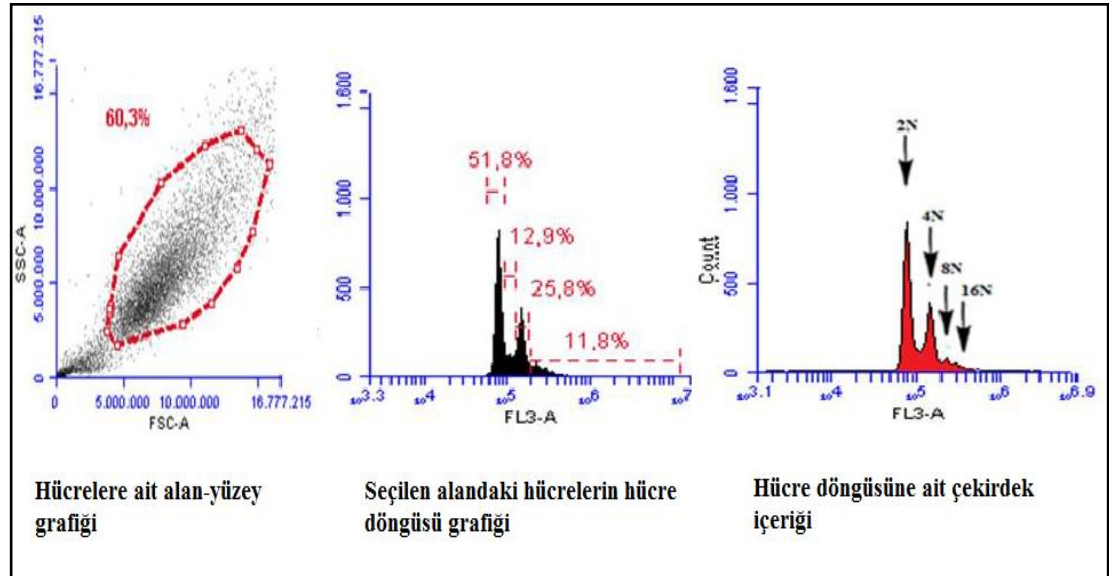
1-2 grubuna ait FACS grafiklerin elde edilmesi için tüm populasyonun %68.1'ini kapsayan bir alan seçilmiştir. Elde edilen veriler bu alanda yer alan hücrelerin %37.4'ünün G0/G1 fazında, %11.4'ünün S fazında, %21.3'ünün G2/M fazında, %20.4'ünün çok çekirdekli yapıda olduğunu ortaya koymuştur. Çok

çekirdekli hücrelerin %7.3'ünü 8N, %3.6'sını 16N, %1.9'unu ise 32N çekirdek içeriğine sahip hücrelerin oluşturduğu belirlenmiştir (Tablo 6.2)

Tablo 6.2: 1-2 grubu hücre döngüsündeki fazlara ait yüzde verileri.

1-2 GRUBU (ALINAN KAPIYA GÖRE)	ALAN YÜZDESİ
Tüm Alan	%100,00
G0/G1 fazındaki diploid hücreler	%37,37
S fazındaki diploid hücreler	%11,42
G2/M fazındaki diploid hücreler	%21,29
Çok çekirdekli hücreler	%20,37
8N çekirdek içeriğine sahip hücreler	%7,28
16N çekirdek içeriğine sahip hücreler	%3,61
32N çekirdek içeriğine sahip hücreler	%1,89

2-2 grubuna ait hücre döngüsü grafiklerinin oluşturulması için, bu gruba ait ortalama FSC genişliği ve yüksekliğine göre bir kapı seçilerek, tek olan hücreler belirlenmiş ve bu kapıya göre gerekli analizler gerçekleştirilmiştir (Şekil 6.12).



Şekil 6.12: 2-2 grubu FACS analizi sonuçlarına ait grafik görüntüleri.

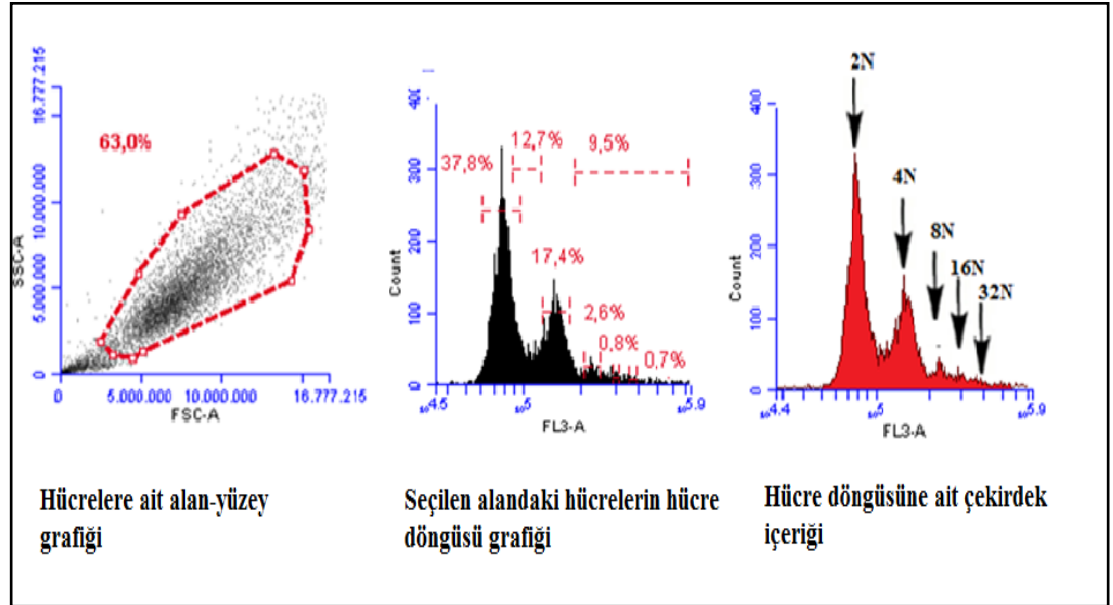
2-2 grubuna ait verilerin elde edilmesi amacıyla örnek populasyonun %60.3'ü seçilerek bu alana bir kapı yerleştirilmiştir. Bu alanda dağılım gösteren hücrelerin %51.8'i G0/G1 evresinde, %12.9'unun diploid S evresinde, %25.8'inin diploid

G2/M evresinde olduğu belirlenmiştir. Hücrelerin %11.8'inin ise çok çekirdekli hücre oranını temsil ettiği anlaşılmıştır (Tablo 6.3).

Tablo 6.3: 2-2 grubu hücre döngüsündeki fazlara ait yüzde verileri.

2-2 GRUBU (ALINAN KAPIYA GÖRE)	ALAN YÜZDESİ
Tüm Alan	%100,00
G0/G1 fazındaki diploid hücreler	%51,83
S fazındaki diploid hücreler	%12,94
G2/M fazındaki diploid hücreler	%25,79
Çok çekirdekli hücreler	%11,81

Ccdc124 proteinin en küçük parçasını içeren 3-3 grubunun FSC-SSC grafiğinde %63'lük alanda dağılım gösteren hücreler seçilmiştir. 3-3 grubuna için de hücre döngüsü grafiklerinin oluşturulması için, bu gruba ait ortalama FSC genişliği ve yüksekliğine göre bir kapı seçilerek, tek olan hücreler belirlenmiş ve bu kapıya göre gerekli analizler gerçekleştirilmiştir (Şekil 6.13).



Şekil 6.13: 3-3 grubu FACS analizi sonuçlarına ait grafik görüntüleri.

Bu bölgede yer alan hücre popülasyonunun %37.8'inin G0/G1 fazındaki, %12.7'sinin diploid S fazındaki, %17.4'ünün diploid G2/M fazındaki hücrelerden meydana geldiği, %9.5'ini ise çok çekirdekli hücrelerin oluşturduğu gösterilmiştir.

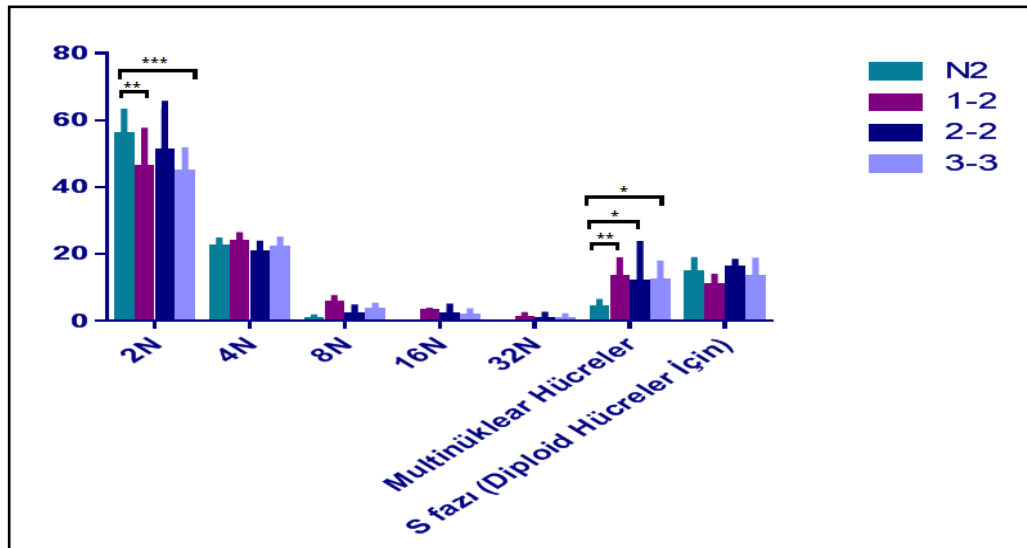
Çok çekirdekli hücrelerin % 2.6'sını 8N, %0.8'ini 16N, %0.7'sini ise 32N hücrelerin meydana getirdiği belirlenmiştir (Tablo 6.4).

Tablo 6.4: 3-3 grubu hücre döngüsündeki fazlara ait yüzde verileri.

3-3 GRUBU (ALINAN KAPIYA GÖRE)	ALAN YÜZDESİ
Tüm Alan	%100,00
G0/G1 fazındaki diploid hücreler	%37,83
S fazındaki diploid hücreler	%12,68
G2/M fazındaki diploid hücreler	%17,42
Çok çekirdekli hücreler	%9,51
8N çekirdek içeriğine sahip hücreler	%2,62
16N çekirdek içeriğine sahip hücreler	%0,83
32N çekirdek içeriğine sahip hücreler	%0,70

6.1.1.4. Ccdc124 Proteinin İfade Artışının DNA Profiline Etkisi

Ccdc124 proteininin aşırı ifadesinin hücre döngüsü üzerindeki etkisinin istatistiksel olarak analiz edilmesi için “two way ANOVA” ($P < 0,05$) kullanılmıştır (Tablo 6.13). 1-2 ve 3-3 gruplarının G0/G1 fazındaki diploid hücrelerinde kontrol grubuna göre olarak anlamlı bir fark olduğu gözlemlenirken, 2-2 grubuyla kontrol grubu arasında önemli istatistiksel bir farklılık gözlemlenmemiştir (Şekil 6.14) (Tablo 6.5).



Şekil 6.14: Deney gruplarına ait çekirdek profili istatistiksel analiz grafiği.

Tablo 6.5: G1 fazında bulunan diploid hücre yüzdelерinin deney grupları arası ikili karşılaştırılması.

TUKEY ÇOKLU KARŞILAŞTIRMA TESTİ	ANLAMLI	ANLAMLILIK DURUMU
2N		
N2 ve 1-2	Evet	Anlamlı
N2 ve 2-2	Hayır	-
N2 ve 3-3	Evet	Anlamlı
1-2 ve 2-2	Hayır	-
1-2 ve 3-3	Hayır	-
2-2 ve 3-3	Hayır	-

S fazındaki diploid hücrelere ait sayısal oranlar incelendiğinde ise gruplar arası herhangi bir fark tespit edilememiştir (Şekil 6.14) (Tablo 6.6).

Tablo 6.6: S fazında bulunan diploid hücre yüzdelерinin deney grupları arası ikili karşılaştırılması.

TUKEY ÇOKLU KARŞILAŞTIRMA TESTİ	ANLAMLI	ANLAMLILIK DURUMU
S fazı (Diploid Hücreler İçin)		
N2 ve 1-2	Hayır	-
N2 ve. 2-2	Hayır	-
N2 ve 3-3	Hayır	-
1-2 ve 2-2	Hayır	-
1-2 ve 3-3	Hayır	-
2-2 ve 3-3	Hayır	-

4N çekirdek içeriğine sahip G2/M fazında bulunan diploid hücreler ve G1 fazında bulunan 4N çekirdek içeriğine sahip hücrelere ait sayısal oranlar incelendiğinde ise gruplar arası herhangi bir fark belirlenmemiştir (Şekil 6.14) (Tablo 6.16). Aynı durum 8N, 16N ve 32N çekirdek içeriğine sahip hücreler ayrı ayrı karşılaştırıldığında ortaya çıkmıştır (Tablo 6. 7-10).

Tablo 6.7: G2/M fazında bulunan diploid ve G1 fazında bulunan 4N çekirdek içeriğine sahip hücre yüzdelерinin deney grupları arası ikili karşılaştırılması.

TUKEY ÇOKLU KARŞILAŞTIRMA TESTİ	ANLAMLI	ANLAMLILIK DURUMU
4N		
N2 ve 1-2	Hayır	-
N2 ve 2-2	Hayır	-
N2 ve 3-3	Hayır	-
1-2 ve 2-2	Hayır	-
1-2 ve 3-3	Hayır	-
2-2 ve 3-3	Hayır	-

Tablo 6.8: 8N çekirdek içeriğine sahip hücre yüzdelерinin deney grupları arası ikili karşılaştırılması.

TUKEY ÇOKLU KARŞILAŞTIRMA TESTİ	ANLAMLI	ANLAMLILIK DURUMU
8N		
N2 ve 1-2	Hayır	-
N2 ve 2-2	Hayır	-
N2 ve 3-3	Hayır	-
1-2 ve 2-2	Hayır	-
1-2 ve 3-3	Hayır	-
2-2 ve 3-3	Hayır	-

Tablo 6.9: 16N çekirdek içeriğine sahip hücre yüzdelерinin deney grupları arası ikili karşılaştırılması.

TUKEY ÇOKLU KARŞILAŞTIRMA TESTİ	ANLAMLI	ANLAMLILIK DURUMU
16N		
N2 ve 1-2	Hayır	-
N2 ve 2-2	Hayır	-
N2 ve 3-3	Hayır	-
1-2 ve 2-2	Hayır	-
1-2 ve 3-3	Hayır	-
2-2 ve 3-3	Hayır	-

Tablo 6.10: 32N çekirdek içeriğine sahip hücre yüzdelерinin deney grupları arası ikili karşılaştırılması.

TUKEY ÇOKLU KARŞILAŞTIRMA TESTİ	ANLAMLI	ANLAMLILIK DURUMU
32N		
N2 ve 1-2	Hayır	-
N2 ve 2-2	Hayır	-
N2 ve 3-3	Hayır	-
1-2 ve 2-2	Hayır	-
1-2 ve 3-3	Hayır	-
2-2 ve 3-3	Hayır	-

FACS analizleriyle ortaya konulan en dikkat çekici sonuç ise populasyonlar içerisinde yer alan toplam çok çekirdekli (multinükleer, >4N) hücre oranları dikkate alındığında gruplar arasında anlamlı fark olduğu gözlemlenmesidir. Özellikle N2 ile 1-2 grupları arasında gözlemlenen bu farkın, Ccdc124 proteinin aşırı ifade edildiği 2-2 ve 3-3 gruplarında da bulunduğu belirlenmiştir. İlgili proteinin aşırı ifadesinin çok çekirdekli hücre sayısının popülasyondaki artışına neden olduğu tüm grupların kontrol olarak kullanılan N2 grubuyla karşılaştırılması sonucu istatistiksel olarak da Şekil 6.14 ve Tablo 6.11’de gösterilmiştir.

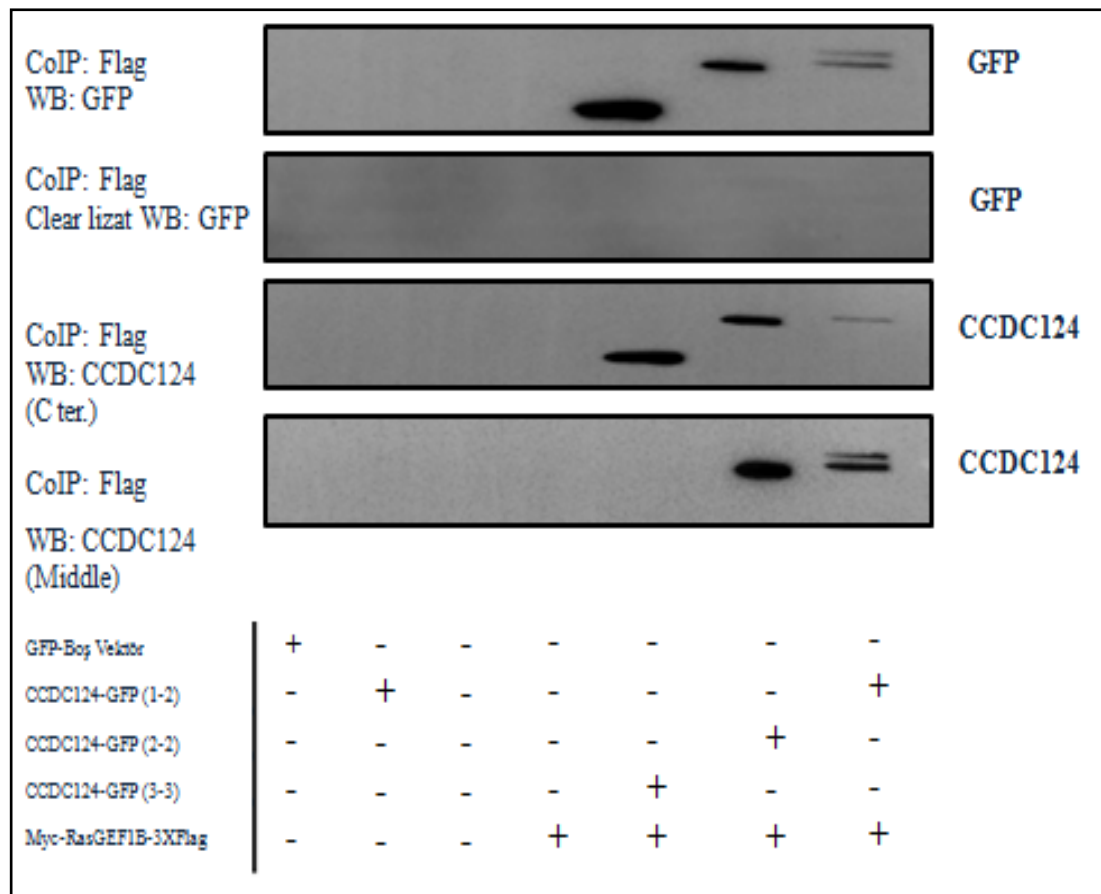
Tablo 6.11: Multinükleer hücre yüzdelерinin deney grupları arası ikili karşılaştırılması.

TUKEY ÇOKLU KARŞILAŞTIRMA TESTİ	ANLAMLI	ANLAMLILIK DURUMU
Çok Çekirdekli Hücreler		
N2 ve 1-2	Evet	Anlamlı
N2 ve 2-2	Evet	Anlamlı
N2 ve 3-3	Evet	Anlamlı
1-2 ve 2-2	Hayır	-
1-2 ve 3-3	Hayır	-
2-2 vs. 3-3	Hayır	-

6.1.2. Ccdc124 ve RasGEF1B Bağlanma Bölgesinin Saptanması

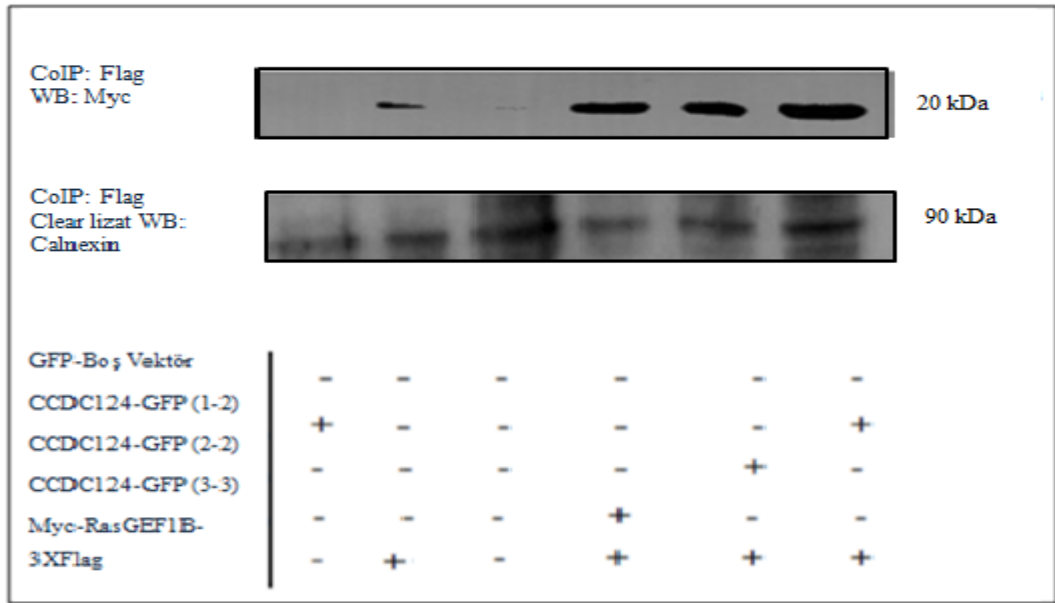
Çeşitli konstraklarla transfekte edilmiş hücre hatlarına ait lizatlar Flag boncuklarla çöktürülmüş ve daha sonra Ccdc124 antikoruyla membranda görüntülenmiştir. Deney sonucunda sadece RasGEF1B ve sadece Ccdc124 ile transfekte edilmiş gruplarda banda rastlanmazken; Ccdc124 ve RasGEF1B ile transfekte edilen gruplarda 55-35 kDa arasında bantlaşma tespit edilmiştir. Kontrol olarak kullanılmış olan transfekte edilmemiş grupta ise herhangi bir banda rastlanmamıştır.

Deney sırasında birlikte çöktürme yapılan gruplara ait lizatlardan Flag ile çökmeyen kısım ise clear-lizat olarak adlandırılmış ve bu örnekler de jelde yürütülerek Ccdc124 antikoru ile muamelesi sağlanmıştır. Görüntüleme sırasında Ccdc124'e ait bantlaşmanın beklendiği 55-35 kDa arasında belirgin bir bantlaşmaya rastlanmamıştır (Şekil 6.15).



Şekil 6.15: RasGEF1B ve Ccdc124 ile transfekte edilmiş hücre gruplarına ve clear lizatlarına ait Ccdc124 antikoru ile inkübe edilmiş membran görüntüsü.

Membranlara yapılan yükleme sırasında meydana gelmiş olabilecek olumsuz durumların kontrolü için RasGEF1B ile Ccdc124 arasındaki etkileşimin gözlemlendiği membran strip edilerek RasGEF1B'nin C terminalinde bulunan c-Myc antikoruyla inkübe edilmiştir. Deney sonucunda ise RasGEF1B ile transfecte edilmiş tüm gruplarda 20-25 kDa arasında belirgin bir bantlaşma tespit edilmiştir. Clear lizatların yüklenmiş olduğu jele ait membranın ise strip edildikten sonra calnexin antikoruyla inkübasyonu sağlanmış ve her grupta 70-100 kDa arasında bantlaşma gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 6.16).



Şekil 6.16: RasGEF1B ve Ccdc124 ile transfecte edilmiş hücre gruplarına ve clear lizatlarına ait Myc antikoruna inkübe edilmiş membran görüntüsü.

6.2. Yorumlar

6.2.1. Ccdc124 Proteininin Aşırı İfadesinin Hücre Döngüsü Üzerindeki Etkileri

Sonuçları sunulan tez çalışmasında öncelikle taramalar yapılarak klonlara ait Ccdc124 protein ifadeleri tespit edilmiş, daha sonra ise aşırı ifadeye sahip hücrelerde görülebilecek olası hücre döngüsü bozuklukları incelenmiştir.

Ccdc124 proteininin aşırı ifade edildiği örneklerle ait immüno blot analizlerinde C uç bölgesine (173-223 aminoasit arasına) bağlanan antikor kullanıldığında 40 - 55

kDa arasında bantlaşmalara rastlanmıştır. Tam boy Ccdc124 ifade eden 1-2 grubuna ait lizatların yürütüldüğü kuyucuklarda çift bantlaşma görülürken, 2-2 ve 3-3 gruplarına ait kuyucuklarda tek bir bantın bulunduğu tespit edilmiştir. Daha önceki çalışmalarda Ccdc124 proteininin 47. amino asidinin lösine çevrilmesiyle altta yer alan bantın kaybolduğunun ve iki ayrı Kozak diziye sahip olduğunun gösterilmiş olması, hücre içinde bu proteine ait iki izoformun varlığını desteklemektedir. Ayrıca birbirine yakın olan bu bantlar proteinin fosforilleniyor olabileceğini de düşündürmektedir.

İmmunofloresan analizler sonucu N2 grubu GFP içeren boş vektörle transfekte edilmesi nedeniyle, sitoplazmaya dağılmış yeşil renkli GFP molekülleri tespit edilmiştir. 1-2 grubuyla yapılan immunofloresan analizlerde Ccdc124 proteininin hücre döngüsünde G1 ve erken profaz evrelerinde sentrozom çevresinde ve sitoplazma içerisinde dağılmış olarak konumlandığı olduğu belirlenmiştir. Özellikle bu proteinin sentrozom etrafında konumlandığının tespit edilmiş olması daha önce yapılmış çalışmalarda da bulgulanmıştır [Telkoparan, 2013]. Ayrıca proteinin perisentrosomal bir konuma sahip olması, Ccdc124 proteininin bu alandaki proteinlerle ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. 2-2 ve 3-3 gruplarında ise Ccdc124 proteininin sitoplazmaya dağılmış olduğu, ancak sentrozomda konumlanmadığı tespit edilmiştir. Bu durum sadece 1-2 grubunda ifade edilen Ccdc124 proteinin N ucunda yer alan ilk 64 aminoasidin sentrozoma konumlanmada görevli sinyal motifi taşıyor olabileceğine işaret etmektedir.

Hücre döngüsü analizlerinde ise kontrol olarak kullanılan N2 grubunda çok çekirdekli hücre oranı populasyonun % 3-4 ünde görülürken, Ccdc124 proteinine ait farklı boylarda konstrakları aşırı ifade eden gruplarda bu oranın % 20 'ye yaklaştığı gözlemlenmiştir. 1-2, 2-2 ve 3-3 gruplarında meydana gelen bu oransal farklılığın hücre döngüsüne ait diğer fazlarda tespit edilememiş olması, Ccdc124 proteinin sitoplazma bölünmesinde kritik bir görev üstlenmekte olabileceğini göstermektedir. Böylece Ccdc124'ün, sitokinez sırasında aşırı ifade edilmesinin bir probleme neden olarak çekirdek eşlenmesi gerçekleşmesine rağmen sitoplazma bölünmesinin gerçekleşmediği ve buna bağlı olarak hücre populasyonunda multinükleer hücre oranında sayısal artış meydana geldiği düşünülmektedir.

Farklı konstrakt uzunluğuna sahip hücrelere ait populasyonlarda çok çekirdekli hücre artış oranları karşılaştırıldığına ise 1-2 grubunda gözlemlenen çok çekirdekli

hücre oranının, diğer gruplara göre daha yüksek olduğu görülmüştür. GFP ışına ve immüno analizlerle diğer gruplara göre düşük miktarda Ccdc124 ifade ettiği tespit edilen bu gruptaki ifade düşüklüğünün ise kontrakt uzunluğundan ya da plazmidi içlerinden atmış olmalarından kaynaklı olabileceği sonucuna varılmıştır.

6.2.2. Ccdc124 Proteini ile RasGEF Proteinin Etkileşim Bölgesinin Saptanması

RasGEF1B ile Ccdc124 arasındaki etkileşim ilk defa Pelin Telkoparan tarafından 2013 yılında yapılmış olan bir çalışmayla gösterilmiş olup, bağlanma bölgelerine ait henüz tam olarak bir bilgi bulunmamaktadır. Bu çalışmada kullanılmış olan Ccdc124'e ait farklı uzunluktaki kontraktların RasGEF1B ile bağlanma profilleri ise bu bölgenin yaklaşık konumunun saptanması için yeni ipuçları sağlamaktadır.

c-Myc-RasGEF1B-3XFlag ve GFP-Ccdc124'e ait farklı uzunluktaki kontraktlarla transfekte edilmiş gruplara ait lizatlar flag antikoruyla inkübe edildiğinde RasGEF1B ve buna bağlandığı düşünülen Ccdc124 beraber izole edilmiştir. Böylece Ccdc124 proteinine özgü antikor kullanıldığında 55 ile 35 kDa arasında bantlaşma tespit edilmiştir. Ayrıca bantların transfekte edilen Ccdc124 parçalarıyla uyumlu olarak dağılım gösterdiği de gözlemlenmiştir. 1-2 ve 2-2 gruplarına ait bantlarda belirgin bir ifade farklılığı belirlenmezken 3-3 ile transfekte edilmiş hücre hattına ait bantın daha kalın olduğu tespit edilmiştir. Bu durumun nedeninin 3-3'e ait parçanın diğer Ccdc124 parçalarına göre daha kısa olması ve buna bağlı olarak birim zamanda eksprese edilen proteinin miktarının artması olduğu düşünülmektedir.

Transfekte edilmemiş, sadece tam boy Ccdc124 ve sadece RasGEF1B ile transfekte edilmiş gruplarda ise herhangi bir bant belirlenmemiş ve bundan hareketle herhangi bir etkileşime rastlanmamıştır. Tam boy Ccdc124 ile transfekte edilen grubun clear lizatına ait membranında calnexin bantı görülmesine rağmen çöktürme uygulandıktan sonra Ccdc124 antiodisi ile muamele edilen membranda bant görülmemesi protein beadler tarafından tutulmadığını göstermektedir. Bu durum ayrıca flag antikorusunun GFP ve Ccdc124 ile özgül olmayan bir bağlanma gerçekleştirmediğini kanıtlamaktadır.

Sadece RasGEF1B ile transfekte edilen grubuna ise çöktürme işlemi uygulandıktan sonra, Ccdc124 antikoru kullanıldığında bant görülememesine rağmen Myc antikoruyla muamele edildiğinde bant verdiği belirlenmiştir. Böylece gruba ait transfeksiyonun gerçekleştiği, ayrıca çöktürme işlemiyle ilgili bir sorun yaşanmadığı gösterilmiştir.

Ccdc 124 proteinini ortadan tanıyan antikor kullanıldığında 1-2 grubunda çift bant görülürken, C ucundan tanıyan antikor kullanıldığında tek bant gözlemlenmiştir. Bu durumun nedeninin proteinin 32 kDa izoformunun ucuna eklenen GFP'nin proteinin konformasyonunu değiştirmesi ve C ucunda yer alan antikor tanıma bölgesini kapanması olduğu düşünülmektedir. 3-3 grubunda ise herhangi bir bant görülmemesinin nedeni proteini ortadan tanıyan antikoru tanıma bölgesinin bu grupta bulunmuyor olmasıdır.

Deney sonucunda tüm gruplarda yer alan Ccdc124'ün C terminalinde yer alan 142-223 aminoasitlerinin arasında yer alan bölgenin RasGEF1B'ün olası bağlanma bölgesini içerebileceği sonucuna ulaşılmıştır.

KAYNAKLAR

- Alberts B., Johnson A., Lewis J., (2002), "Molecular Biology of the Cell", 4th Edition, Garland Science.
- Barr F. A., Gruneberg U., (2007), "Cytokinesis: placing and making the final cut", Cell, 131, 847-860.
- Barr, F. A., Gruneberg, U., (2007), "Cytokinesis: placing and making the final cut", Cell, 131, 847-860.
- Beams H. W., Kessel R. G., (1976), "Cytokinesis: A comparative study of cytoplasmic division in animal cells", American Scientist, 63, 279-290.
- Bhalla K. N., (2003), "Microtubule-targeted anticancer agents and apoptosis", Oncogene, 22, 9075-9086.
- Bos J. L., (1997), "Ras-like GTPases", Biochimica et Biophysica Acta, 133, M19-M31.
- Buck R. C., Tisdale J. M., (1962), "The fine structure of the mid-body of the rat erythroblast", The Journal of the Cell Biology, 13, 109-115.
- Burkard M. E., Randall C. L., Larochelle S., Zhang C., Shokat K. M., Fisher R. P., Jallepalli P. V., (2007), "Chemical genetics reveals the requirement for Polo-like kinase 1 activity in positioning RhoA and triggering cytokinesis in human cells", The Proceedings of the National Academy of Sciences, 104, 4383-4388.
- Carmena M., Earnshaw W. C., (2003), "The cellular geography of aurora kinases", Nature Reviews Molecular Cell Biology, 4, 842.
- Cooper G. M., Der C. J., Krontiris T. G., (1982), "Cellular transforming genes", Science, 217, 801-806.
- Dambournet D., Machicoane M., Chesneau L., Sachse M., Rocancourt M., El Marjou A., Formstecher E., Salomon R., Goud B., Echard A., (2011), "Rab35 GTPase and OCRL phosphatase remodel lipids and F-actin for successful cytokinesis", Nature Cell Biology, 13, 981-988.
- Dhonukshe P., Baluska F., Schlicht M., Hlavacka A., Samaj J., Friml J., Gadella T. W. Jr., (2006), "Endocytosis of cell surface material mediates cell plate formation during plant cytokinesis", Developmental Cell, 10, 137-150.
- Euteneuer U., McIntosh J. R., (1980), "Polarity of midbody and phragmoplast microtubules", The Journal of the Cell Biology, 87, 509-515.

Fabbro M., Zhou B. B., Takahashi M., Sarcevic B., Lal P., (2005), “Cdk1/Erk2- and Plk1- dependent phosphorylation of a centrosome protein, Cep55, is required for its recruitment to midbody and cytokinesis”, *Developmental Cell*, 9, 477-488.

Fededa J. P., Gerlich D. W., (2012), “Molecular control of animal cell cytokinesis”, *Nature Cell Biology*, 14, 440-447.

Fielding A. B., Schonteich E., Matheson J., Wilson G., Yu X., Hickson G. R., Srivastava S., Baldwin S. A., Prekeris R., Gould G. W., (2005), “Rab11-FIP3 and FIP4 interact with Arf6 and the exocyst to control membrane traffic in cytokinesis”, *The European Molecular Biology Organization Journal*, 24, 3389-3399.

Ganem N. J., Storchova Z., Pellman D., (2007), “Tetraploidy, aneuploidy and cancer”, *Current Opinion in Genetics and Development*, 17, 157-162.

Goss J. W., Toomre D. K., (2008), “Both daughter cells traffic and exocytose membrane at the cleavage furrow during mammalian cytokinesis”, *Journal of the Cell Biology*, 181, 1047-1054.

Gromley A., Jurczyk A., Sillibourne J., Halilovic E., Mogensen M., Groisman I., Blomberg M., Doxsey S., (2003), “A novel human protein of the maternal centriole is required for the final stages of cytokinesis and entry into S phase”, *The Journal of Cell Biology*, 161, 535-545.

Gromley A., Yeaman C., Rosa J., Redick S., Chen C. T., Mirabelle S., Guha M., Sillibourne J., Doxsey S., (2005), “Centriolin anchoring of exocyst and SNARE complexes at the midbody is required for secretory-vesicle-mediated abscission”, *Cell*, 123, 75-87.

Guizetti J., Gerlich D. W., (2010), “Cytokinetic abscission in animal cells”, *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 21, 909-916.

Guizetti J., Schermelleh L., Mäntler J., Maar S., Poseret I., (2011), “Cortical constriction during abscission involves helices of ESCRT-III-dependent filaments”, *Science*, 331, 1616-1620.

Gündüz İ., (2010), “Monoclonal Antikör production for Coiled-coil domain-containing-124 (Ccdc124) and its molecular characterization”, *Yüksek Lisans Tezi, Bilkent Üniversitesi*.

Harvey J. J., (1964), “An unidentified virus which causes the rapid production of tumors in mice”, *Nature*, 204, 1104-1105.

Hepler P. K., Jackson W. T., (1968), “Microtubules and early stages of cell-plate formation in the endosperm of *Haemaphys katherinae* Baker”, *The Journal of the Cell Biology*, 38, 437-446.

Hu C. K., Coughlin M., Mitchison T. J., (2012), “Midbody assembly and its regulation during cytokinesis”, *Molecular Biology Cell*, 23, 1024-1034.

- Jakobsen L., Vanselow K., Skogs M., Toyoda Y., Lundberg E., (2011), “Novel asymmetrically localizing components of human centrosomes identified by complementary proteomics methods”, *The European Molecular Biology Organization Journal*, 30, 1520-1535.
- Jones O. P., (1969), “Elimination of midbodies from mitotic erythroblasts and their contribution to fetal blood plasma”, *Journal of the National Cancer Institute*, 42, 753-759.
- Kent W. J., Sugnet C. W., Furey T. S., Roskin K. M., Pringle T. H., Zahler A. M., Haussler D., (2002), “The human genome browser at USCS”, *Genome Research*, 12, 996-1006.
- Kouranti I., Sachse M., Arouche N., Goud B., Echard A., (2006), “Rab35 regulates an endocytic recycling pathway essential for the terminal steps of cytokinesis”, *Current Biology*, 16, 1719-1725.
- Kruse K., Julicher F., (2003), “Self-organization and mechanical properties of active filament bundles”, *Physical Reviews*, E67, 051913.
- Lee S., Liu B., Lee S., Huang S. X., Shen B., Qian S. B., (2012), “Global mapping of translation initiation sites in mammalian cells at single-nucleotide resolution”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109, e2424-2432.
- Low S. H., Li X., Miura M., Kudo N., Quiñones B., Weimbs T., (2003), “Syntaxin 2 and endobrevin are required for the terminal step of cytokinesis in mammalian cells”, *Developmental Cell*, 4, 753-759.
- Matsumura F., (2005), “Regulation of myosin II during cytokinesis in higher eukaryotes”, *Trends Cell Biology*, 15, 371-377.
- Mendoza M., (2009), “A mechanism for chromosome segregation sensing by the NoCut checkpoint”, *Nature Cell Biology*, 11, 477–483.
- Moll E. and Paweletz N., (1980), “Membranes of the mitotic apparatus of mammalian cells”, *The European Journal of Cell Biology*, 21, 280-287.
- Morita E., Sandrin V., Chung H. Y., Morham S. G., Gygi S. P., Rodesch C. K., Sundquist W. I., (2007), “Human ESCRT and ALIX proteins interact with proteins of the midbody and function in cytokinesis”, *The European Molecular Biology Organization Journal*, 26, 4215-4227.
- Mullins J. M., Biesele J. J., (1977), “Terminal phase of cytokinesis in D-98s cells.”, *The Journal of the Cell Biology*, 73, 672–684.
- Mullins J. M., McIntosh J. R., (1982), “Isolation and initial characterization of the mammalian midbody”, *The Journal of the Cell Biology*, 94, 654-661.

- Murray A. W., Kirschner M. W., (1989), "The role of cyclin synthesis and degradation in the control of maturation promoting factor activity", *Nature*, 339, 275-280.
- Norden, C., Mendoza M., Dobbelaere J., Kotwaliwale C. V., Biggins S., Barral Y., (2006), "The NoCut pathway links completion of cytokinesis to spindle midzone function to prevent chromosome breakage", *Cell* 125, 85-98.
- Otegui M. S., Verbrugghe K. J., Skop A. R., (2005), "Midbodies and phragmoplasts: analogous structures involved in cytokinesis", *Trends in Cell Biology*, 15, 404-413.
- Pawelczak N., (2001), "Walther Flemming: pioneer of mitosis research", *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2, 72-75.
- Piekny A., Werner M., Glotzer M., (2005), "Cytokinesis: welcome to the Rho zone", *Trends Cell Biology*, 15, 651-658.
- Piekny J., Maddox A. S., (2010), "The myriad roles of Anillin during cytokinesis", *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 21, 881-991.
- Pines J., (2006), "Mitosis: a matter of getting rid of the right protein at the right time", *Trends Cell Biology*, 16, 55-63.
- Pohl C., Jentsch S., (2008), "Final stages of cytokinesis and midbody ring formation are controlled by BRUCE", *Cell*, 132, 832-845.
- Pollard T. D., (2010), "Mechanics of cytokinesis in eukaryotes", *Current Opinion in Cell Biology*, 22, 50-56.
- Quilliam L. A., Rebhun J. F., Castro A. F., (2002), "A growing family of guanine nucleotide exchange factors is responsible for activation of Ras-family GTPases", *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 71, 391-444.
- Robbins E., Gonatas N. K., (1964), "The ultrastructure of a mammalian cell during the mitotic cycle", *The Journal of the Cell Biology*, 21, 429-463.
- Santos E., Tronick S. R., Aaronson S. A., Pulciani S., Barbacid M., (1982), "T24 human bladder carcinoma oncogene is an activated form of the normal human homologue of BALB- and Harvey-MSV transforming genes", *Nature*, 298, 343-347.
- Saxton W. M., McIntosh J. R., (1987), "Interzone microtubule behavior in late anaphase and telophase spindles", *The Journal of the Cell Biology*, 105, 875-886.
- Schiel J. A., Park K., Morphew M. K., Reid E., Hoenger A., Prekeris R., (2011), "Endocytic membrane fusion and buckling-induced microtubule severing mediate cell abscission", *Journal of Cell Science*, 124, 1411-1424.
- Schiel J. A., Simon G. C., Zaharris C., Weisz J., Castle D., Wu C. C., Prekeris R., (2012), "FIP3-endosome-dependent formation of the secondary ingression mediates ESCRT-III recruitment during cytokinesis", *Nature Cell Biology*, 14, 1068-1078.

Severson A. .F., Baillie D. L., Bowerman B., (2002), “A formin homology protein and a profilin are required for cytokinesis and Arp2/3-independent assembly of cortical microfilaments in *C. Elegans*”, *Current Biology*, 12, 2066-2075.

Shields J. M., Pruitt K., McFall A., Shaub A., Der C. J., (2000), “Understanding Ras: 'it ain't over 'til it's over'”, *Trends Cell Biology*, 10, 147-154.

Skop A. R., Liu H., Yates J., Meyer B. J., Heald R, (2004), “Dissection of the mammalian midbody proteome reveals conserved cytokinesis mechanisms”, *Science*, 305, 61-66.

Steigemann P., Wurzenberger C., Schmitz M. H., Held M., Guizetti J., Maar S., Gerlich D. W., (2009), “Aurora B-mediated abscission checkpoint protects against tetraploidization”, *Cell*, 136, 473-484.

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.

Telkoparan P., (2013), “Characterization of the coiled-coil domain-containing protein 124 (*Ccdc124*) as a novel centrosome and midbody component involved in cytokinesis”, *Doktora Tezi, Bilkent Üniversitesi*.

Tong C., Fan H. Y., Lian L., Li S. W., Chen D. Y., (2002), “Polo-like kinase-1 is a pivotal regulator of microtubule assembly during mouse oocyte meiotic maturation, fertilization, and early embryonic mitosis”, *Biology of Reproduction*, 67, 546-554.

Uehara R., Goshima G., (2010), “Functional central spindle assembly requires de novo microtubule generation in the interchromosomal region during anaphase”, *The Journal of Cell Biology*, 191, 259-267.

Uehara R., , Nozawa R. S., Tomioka A., Petry S., Vale R. D., Obuse C., Goshima G., (2009), “The augmin complex plays a critical role in spindle microtubule generation for mitotic progression and cytokinesis in human cells”, *The Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106, 6998-7003.

Van der Horst A., Simmons J., Khanna K. K., (2009), “Cep55 stabilization is required for normal execution of cytokinesis”, *Cell Cycle*, 8, 3742-3749.

Watanabe S., , Ando Y, Yasuda S, Hosoya H, Watanabe N, Ishizaki T, Narumiya S., (2008), “mDia2 induces the actin scaffold for the contractile ring and stabilizes its position during cytokinesis in NIH 3T3 cells”, *Molecular Biology of the Cell*, 19, 2328-2338.

Web 1,(2008), <http://www.who.int/gho/ncd/mortalitymorbidity/cancer/en/index.html>, (Erişim tarihi: 28/01/2014).

Wurzenberger C., Gerlich D. W., (2011), “Phosphatases: providing safe passage through mitotic exit”, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12, 469-482.

Yaman E., Gasper R., Koerner C., Wittinghofer A., Tazebay U. H., (2009), "RasGEF1A and RasGEF1B are guanine nucleotide exchange factors that discriminate between Rap GTP-binding proteins and mediate Rap2-specific nucleotide Exchange", *Federation of European Biochemical Societies Journal*, 276, 4607-4616.

Zhao W. M., Seki A., Fang G., (2006), "Cep55, a microtubule-bundling protein, associates with centralspindlin to control the midbody integrity and cell abscission during cytokinesis", *Molecular Biology of the Cell*, 17, 3881-3896.

ÖZGEÇMİŞ

Özge Arslan 1987 yılında Ankara’da doğdu. 2005 yılında başladığı Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü’nü 2010 yılında başarıyla tamamlayarak, aynı yıl yüksek lisans eğitimine Hacettepe Üniversitesi Biyoloji bölümünde başladı. 2012 yılından itibaren yüksek lisans çalışmalarına Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında devam ederek 2015 yılında yüksek lisans derecesiyle mezun oldu.

EKLER

Ek A: Flow Sitometri Analiz Verileri

Tablo A1.1: N2 grubu hücre yüzey alanı ve çekirdek yapısına ait FACS analizi verileri.

N2 GRUBU	SAYIM	OLAY / ML	ALAN YÜZDESİ	TÜM ALAN	ORTALAMA FSC-ALANI	ORTALAMA SSC-ALANI
Tüm alan	10.000	1.250	%100,00	%100,00	4.937.969,46	2.843.450,35
Kapıya göre	5.991	749	%59,91	%59,91	6.900.962,52	3.949.101,64

Tablo A1.2: N2 grubuna ait hücre genişlik ve yüksekliklerine ait FACS analizi verileri.

N2 GRUBU	SAYIM	OLAY / ML	ALAN YÜZDESİ	TÜM ALAN YÜZDESİ	ORTALAMA FSC-GENİŞLİĞİ	ORTALAMA FSC-YÜKSEKLİĞİ
Tüm alan	10.000	1250	%100,00	%100,00	4937969,46	2555606,69
Tek hücre alanı	5.808	726	%58,08	%58,08	6438692,18	3393008,17

Tablo A1.3: N2 grubu hücre döngüsüne ait FACS analizi oransal verileri.

N2 GRUBU (ALINAN KAPIYA GÖRE)	SAYIM	OLAY/ ML	ALAN YÜZDESİ	TÜM ALAN YÜZDESİ	ORTALAMA FL3 İŞIMASI
Alan	5.808	726	%100,00	%58,08	92.607,91
M1 (169.372,0 / 1.700.045,0)	203	25	%3,39	%2,03	252.501,88
M2 (110.179,0 / 176.124,0)	1.461	183	%24,39	%14,61	135.257,72
M3 (83.804,0 / 114.571,0)	699	87	%11,67	%6,99	98.182,44
M4 (52.426,0 / 87.144,0)	3.669	459	%61,24	%36,69	70.190,18

Tablo A1.4: 1-2 grubu hücre yüzey alanı ve çekirdek yapısına ait FACS analizi verileri.

1-2 GRUBU	SAYIM	OLAY / ML	ALAN YÜZDESİ	TÜM ALAN YÜZDESİ	ORTALAMA FSC-ALANI	ORTALAMA SSC-ALANI
Tüm alan	10.000	2.000	%100,00	%100,00	7.785.922,05	5.850.455,88
Alınan kapıya göre	6.809	1.362	%68,09	%68,09	7.427.519,48	4.936.640,75

Tablo A1.5: 1-2 grubuna ait hücre genişlik ve yüksekliklerine ait FACS analizi verileri.

1-2 GRUBU	SAYIM	OLAY / ML	ALAN YÜZDESİ	TÜM ALAN YÜZDESİ	ORTALAMA FSC-GENİŞLİĞİ	ORTALAMA FSC-YÜKSEKLİĞİ
Tüm alan	10.000	1250	%100,00	%100,00	4937969,5	2555606,7
Tek hücre alanı	5.753	719	%57,53	%57,53	6565188,3	3425126,8

Tablo A1.6: 1-2 grubu hücre döngüsüne ait FACS analizi oransal verileri.

1-2 GRUBU (ALINAN KAPIYA GÖRE)	SAYIM	OLAY/ ML	ALAN YÜZDESİ	TÜM ALAN	ORTALAMA FL3 İŞİMASI
Alan	10.000	2.000	%100,00	%100,00	126.233,78
M5 (53.174,0 / 85.619,0)	3.737	747	%37,37	%37,37	67.318,66
M6 (105.010,0 / 152.677,0)	2.129	426	%21,29	%21,29	126.237,07
M7 (357.430,0 / 438.380,0)	189	38	%1,89	%1,89	394.018,60
M8 (163.428,0 / 221.981,0)	728	146	%7,28	%7,28	189.371,05
M9 (229.664,0 / 273.713,0)	361	72	%3,61	%3,61	250.227,68
M10 (162.542,0 / 1.307.044,0)	2.037	407	%20,37	%20,37	313.589,12
M11 (79.860,0 / 113.932,0)	1.142	228	%11,42	%11,42	96.993,88

Tablo A1.7: 2-2 grubu hücre yüzey alanı ve çekirdek yapısına ait FACS analizi verileri.

2-2 GRUBU	SAYIM	OLAY / ML	ALAN YÜZDESİ	TÜM ALAN YÜZDESİ	ORTALAMA FSC-ALANI	ORTALAMA SSC-ALANI
Tüm alan	10.000	667	%100,00	%100,00	6.529.159,77	4.743.950,31
Alınan kapıya	6.027	402	%60,27	%60,27	7.902.141,32	5.289.987,39

Tablo A1.8: 2-2 grubuna ait hücre genişlik ve yüksekliklerine ait FACS analizi verileri.

2-2 GRUBU	SAYIM	OLAY / ML	ALAN YÜZDESİ	TÜM ALAN YÜZDESİ	ORTALAMA FSC-GENİŞLİĞİ	ORTALAMA FSC-YÜKSEKLİĞİ
Tüm alan	10.000	1250	%100,00	%100,00	4937969,46	2555606,69
Tek hücre alanı	5.552	694	%55,52	%55,52	6835751,84	3539751,18

Tablo A1.9: 2-2 grubu hücre döngüsüne ait FACS analizi oransal verileri.

2-2 GRUBU (ALINAN KAPIYA GÖRE)	SAYIM	OLAY/ ML	ALAN YÜZDESİ	TÜM ALAN YÜZDESİ	ORTALAMA FL3 İŞİMASI
Alan	7.104	474	%100,00	%71,04	132.118,97
M12 (58.411,0 / 95.156,0)	3.682	245	%51,83	%36,82	78.141,75
M13 (91.415,0 / 131.034,0)	919	61	%12,94	%9,19	109.406,89
M14 190.321,0/13.554.685,0)	839	56	%11,81	%8,39	363.629,67
M15(124.230,0 / 189.936,0)	1.832	122	%25,79	%18,32	151.076,01

Tablo A1.10: 3-3 grubu hücre yüzey alanı ve çekirdek yapısına ait FACS analizi verileri.

3-3 GRUBU	SAYIM	OLAY / ML	ALAN YÜZDESİ	TÜM ALAN	ORTALAMA FSC-ALANI	ORTALAMA SSC-ALANI
Tüm alan	10.000	1.000	%100,00	%100,00	6.787.726,37	4.824.276,39
Alınan kapıya göre	6.300	630	%63,00	%63,00	7.851.112,99	5.068.893,53

Tablo A1.11: 3-3 grubuna ait hücre genişlik ve yüksekliklerine ait FACS analizi verileri.

3-3 GRUBU	SAYIM	OLAY / ML	ALAN YÜZDESİ	TÜM ALAN	ORTALAMA FSC-	ORTALAMA FSC-
Tüm alan	10.000	1250	100,00%	100,00%	4937969,46	2555606,69
Tek hücre alanı	5.607	701	56,07%	56,07%	6881381,98	3545000,11

Tablo A1.12: 3-3 grubu hücre döngüsüne ait FACS analizi oransal verileri

3-3 GRUBU (ALINAN KAPIYA GÖRE)	SAYIM	OLAY/ ML	ALAN YÜZDESİ	TÜM ALAN YÜZDESİ	ORTALAMA FL3 İŞİMASI
Alan	10.000	1.000	%100,00	%100,00	106.833,62
M16 (208.051,0 / 253.334,0)	262	26	%2,62	%2,62	228.451,27
M17 (60.411,0 / 94.999,0)	3.783	378	%37,83	%37,83	77.354,02
M18 (124.776,0 / 177.083,0)	1.742	174	%17,42	%17,42	147.973,53
M19 (183.731,0 / 745.375,0)	951	95	%9,51	%9,51	314.416,28
M20 (291.237,0 / 319.344,0)	83	8	%0,83	%0,83	304.870,33
M21 (356.676,0 / 398.372,0)	70	7	%0,70	%0,70	375.221,50
M22 (86.314,0 / 124.775,0)	1.268	127	%12,68	%12,68	101.490,95

Ek B: Flow Sitometri İstatistiksel Analizleri

Tablo B1.1: G1 fazında bulunan diploid hücre yüzdelereine bağlı olarak deney gruplarının ikili karşılaştırılması.

TUKEY ÇOKLU KARŞILAŞTIRMA TESTİ	ORTALAMA FARKI	FARKIN %95 GÜVEN ARALIĞI	ANLAMLILIK DURUMU
2N			
N2 ve 1-2	9,6	3,0777 - 16,122	Anlamlı
N2 ve 2-2	4,9	-1,6223 - 11,422	-
N2 ve 3-3	11,34	4,8177 - 17,862	Anlamlı
1-2 ve 2-2	-4,7	-11,222 - 1,8223	-
1-2 ve 3-3	1,74	-4,7823- 8,2623	-
2-2 ve 3-3	6,44	-0,082342- 12,962	-

Tablo B1.2: S fazında bulunan diploid hücre yüzdelereine bağlı olarak deney gruplarının ikili karşılaştırılması.

TUKEY ÇOKLU KARŞILAŞTIRMA TESTİ	ORTALAMA FARKI	FARKIN %95 GÜVEN ARALIĞI	ANLAMLILIK DURUMU
S fazı (Diploid Hücreler İçin)			
N2 ve 1-2	3,6	-2,9223 - 10,122	-
N2 ve. 2-2	-1,5	-8,0223 - 5,0223	-
N2 ve 3-3	1,26	-5,2623 - 7,7823	-
1-2 ve 2-2	-5,1	-11,622 - 1,4223	-
1-2 ve 3-3	-2,34	-8,8623 - 4,1823	-
2-2 ve 3-3	2,76	-3,7623 - 9,2823	-

Tablo B1.3: G2/M fazında bulunan diploid hücre ve G1 fazında bulunan 4N çekirdek içeriğine sahip hücrelerin yüzdelere bağlı olarak deney gruplarının ikili karşılaştırması.

TUKEY ÇOKLU KARŞILAŞTIRMA TESTİ	ORTALAMA FARKI	FARKIN %95 GÜVEN ARALIĞI	ANLAMLILIK DURUMU
4N			
N2 ve 1-2	-1,2	-7,7223- 5,3223	-
N2 ve 2-2	1,86	-4,6623- 8,3823	-
N2 ve 3-3	0,54	-5,9823- 7,0623	-
1-2 ve 2-2	3,06	-3,4623- 9,5823	-
1-2 ve 3-3	1,74	-4,7823- 8,2623	-
2-2 ve 3-3	-1,32	-7,8423- 5,2023	-

Tablo B1.4: 8N çekirdek içeriğine sahip hücre yüzdelere bağlı olarak deney gruplarının ikili karşılaştırılması.

TUKEY ÇOKLU KARŞILAŞTIRMA TESTİ	ORTALAMA FARKI	FARKIN %95 GÜVEN ARALIĞI	ANLAMLILIK DURUMU
8N			
N2 ve 1-2	-4,74	-11,262 - 1,7823	-
N2 ve 2-2	-1,26	-7,7823 - 5,2623	-
N2 ve 3-3	-2,98	-9,5023 - 3,5423	-
1-2 ve 2-2	3,48	-3,0423 - 10,002	-
1-2 ve 3-3	1,76	-4,7623 - 8,2823	-
2-2 ve 3-3	-1,72	-8,2423 - 4,8023	-

Tablo B1.5: 16N çekirdek içeriğine sahip hücre yüzdelereine bağlı olarak deney gruplarının ikili karşılaştırılması.

TUKEY ÇOKLU KARŞILASTIRMA 16N	ORTALAMA FARKI	FARKIN %95 GÜVEN	ANLAMLILIK DURUMU
N2 ve 1-2	-2,88	-9,4023 - 3,6423	-
N2 ve 2-2	-2,06	-8,5823 - 4,4623	-
N2 ve 3-3	-1,72	-8,2423 - 4,8023	-
1-2 ve 2-2	0,82	-5,7023 - 7,3423	-
1-2 ve 3-3	1,16	-5,3623 - 7,6823	-
2-2 ve 3-3	0,34	-6,1823 - 6,8623	-

Tablo B.6: 32N çekirdek içeriğine sahip hücre yüzdelereine bağlı olarak deney gruplarının ikili karşılaştırılması.

TUKEY ÇOKLU KARŞILASTIRMA 32N	ORTALAMA FARKI	FARKIN %95 GÜVEN	ANLAMLILIK DURUMU
N2 ve 1-2	-1,1	-7,6223 - 5,4223	-
N2 ve 2-2	-0,68	-7,2023 - 5,8423	-
N2 ve 3-3	-0,72	-7,2423 - 5,8023	-
1-2 ve 2-2	0,42	-6,1023 - 6,9423	-
1-2 ve 3-3	0,38	-6,1423 - 6,9023	-
2-2 ve 3-3	-0,04	-6,5623 - 6,4823	-

Tablo B1.7: Multinükleer hücre yüzdelerine bağlı olarak deney gruplarının ikili karşılaştırılması.

TUKEY ÇOKLU KARŞILAŞTIRMA TESTİ	ORTALAMA FARKI	FARKIN %95 GÜVEN ARALIĞI	ANLAMLILIK DURUMU
Multinükleer Hücreler			
N2 ve 1-2	-9,08	-15,602- -2,5577	Anlamlı
N2 ve 2-2	-7,68	-14,202- -1,1577	Anlamlı
N2 ve 3-3	-7,88	-14,402- -1,3577	Anlamlı
1-2 ve 2-2	1,4	-5,1223- 7,9223	-
1-2 ve 3-3	1,2	-5,3223- 7,7223	-
2-2 vs. 3-3	-0,2	-6,7223- 6,3223	-

Ek C: Telif Hakkı Bulunan Materyaller İçin Alınan İzinler

ŞEKİL NO	LİSANS TARİHİ	LİSANS NO	TELİF SAHİBİ
2.3	17.10.2014	3491300786236	Elsevier
2.4	17.10.2014	3491291505378	Nature Publishing Group
2.5	17.10.2014	3491291505378	Nature Publishing Group
2.6	17.10.2014	3491300455259	Elsevier
2.7	17.10.2014	3491291505378	Nature Publishing Group
2.8	17.10.2014	3491300786236	Elsevier
2.9	17.10.2014	3491291505378	Nature Publishing Group