

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

COILED-COIL DOMAIN CONTAINING 124(CCDC-124)
PROTEİNİNE ÖZGÜ MONOKLONAL ANTİKOR
SAFLAŞTIRILMASI, İMMÜN BOYAMA VE
BİYOKİMYASAL METOTLAR İLE ANALİZİ

ÇİĞDEM ÜLKÜSEVEN
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

GEBZE

2018

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

COILED-COIL DOMAIN CONTAINING 124
(CCDC-124) PROTEİNİNE ÖZGÜ
MONOKLONAL ANTİKOR
SAFLAŞTIRILMASI,
İMMÜN BOYAMA VE BİYOKİMYASAL
METOTLAR İLE ANALİZİ

ÇİĞDEM ÜLKÜSEVEN
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMANI
PROF.DR.UYGAR HALİS TAZEBAY

GEBZE
2018

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

**MONOCLONAL ANTIBODY PURIFICATION FOR
COILED-COIL DOMAIN CONTAINING (CCDC-124)
ITS IMMUNOSTAINING AND BIOCHEMISTRY
ANALYSES**

ÇİĞDEM ÜLKÜSEVEN
**A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE**
DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

THESIS SUPERVISOR
PROF. DR. UYGAR HALİS TAZEBAY

GEBZE
2018

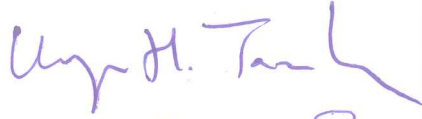
GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 27/ 06/ 2018 tarih ve 2018/33 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 18/ 07/ 2018 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Çiğdem ÜLKÜSEVEN'in tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

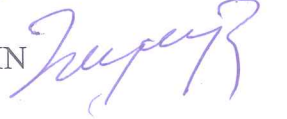
(TEZ DANIŞMANI)

: PROF. DR. UYGAR HALİS TAZEBAY



ÜYE

: DR. ÖĞR. ÜYESİ ZEYNEP TOKCAER KESKİN



ÜYE

: PROF. DR. TAMER YAĞCI



ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun

...../...../..... tarih ve/..... sayılı kararı.

ÖZET

CCDC-124 (Coiled-coil domain-containing 124) memeli hücrelerinde işlevi yeni açığa çıkmakta olan proteindir. Bu proteinin bazı hücre hatlarındaki hücre içi lokasyonu, hücre döngüsünün interfaz evresinde sentrozom; mitozun post-anafaz, telofaz ve sitokinez evrelerinde ise orta-cisimcik (midbody) olarak belirlenmiştir [1]. Geçmişte yapılan bilimsel çalışmalarda CCDC-124 proteini kodlayan genin susturulması durumunda hücreler üzerinde meydana gelen değişiklikler kısmi olarak araştırılmış ve bu durumun hücrelerin tam olarak bölünememesi ile sonuçlandığı ve çok çekirdekli hücrelerin meydana gelmesine neden olduğu ortaya konulmuştur [2]. CCDC-124 proteinin hücre içindeki işlevinin açığa çıkması amacıyla hibridoma teknolojisi kullanılarak CCDC-124 proteinine özgü hibridomalar üretilmiştir [3]. Yapılan bu tez çalışmasında ise özgüllüğü en yüksek olan 4B3 hibridoma klonu, affinite kromatografi tekniği kullanılarak monoklonal antikorlar saflaştırılmıştır. 4B3 hibridoma klonundan saflaştırılan monoklonal antikorlar, His işaretli kolon ile saflaştırılan saf CCDC-124 proteini ve HeLa hücre hattından alınan lizatlarla birlikte Western Blotting ile analizi yapılmıştır. Yapılan bu analizde, kullanılan monoklonal antikorlar ile CCDC-124 proteininin 35 kDa ve 15 kDa civarında iki ayrı izoformu gözlemlenmiştir. CCDC-124'ün hücre içindeki lokalizasyonuna ilişkin yapılan immün boyama analizinde ise RPE PLK-1 GFP hücre hattında monoklonal antikorlar denenmiştir. Monoklonal antikor ile yapılan immün boyama çalışmalarında CCDC-124 proteinin, PLK-1 ile kolokalizasyonuna rastlanmış olup her ikisinin de sentrozomdaki lokasyonu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Coiled-coil domain containing 124 (Ccdc124), Sentrozom, Hibridoma Teknolojisi, Monoklonal Antikor, Affinite Kromatografisi.

SUMMARY

The exactly role of CCDC-124 (Coiled-coil domain containing 124) protein is poorly defined up to date. In some of the cell lines, it has been determined that during interphase, CCDC-124 is located inside the centrosome; while during mitosis, specifically post-anaphase, telophase, and cytokinesis, the protein is located at the midbody [1]. It has previously been shown that when the gene that encodes for the protein CCDC-124 is silenced, the cells failed to divide, which resulted in multinucleated cells [2]. In order to elucidate the precise role of CCDC-124 in the cells, hybridoma cells that are unique to CCDC-124 are generated [3]. In this study, the 4B3 monoclonal antibodies, which have very high specificity for CCDC-124 protein, obtained from the mice are purified via affinity chromatography. These purified 4B3 monoclonal antibodies along with purified CCDC-124 and the lysates obtained from the HeLa cells, are used for western blotting. The western blotting results showed that the CCDC-124 protein was consist of two separated bands as 15kDa and 35kDa. Afterwards, in order to detect the cellular localization of CCDC-124 protein, the 4B3 monoclonal antibodies are used in RPE-PLK1 GFP cell lines by applying immunostaining technique. The immunostaining results demonstrated that the CCDC-124 protein is co-localized with polo-like kinase 1 (PLK-1), which verified the presence of CCDC-124 inside the centrosome.

Keywords: Coiled-coil domain containing 124 (CCDC-124), Centrosome, Hybridoma Technology, Monoclonal Antibody, Affinity Chromatography.

TEŞEKKÜR

Öncelikle akademik çalışmamda beni destekleyen, bakış açısı ile gelişimimde ve ilerlememde katkısı olan Gebze Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölüm Başkanı ve danışman hocam Prof. Dr. Uygur Halis TAZEBAY'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarımın başından sonuna kadar benimle birlikte olan; çalışma disipliniyle, bilgisiyle, planlaması ve sabrıyla örnek bilim insanı olan sevgili Dr. Merve TUZLAĞOĞLU ÖZTÜRK'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans çalışmalarım sırasında bilgi ve tecrübelerini paylaşan, emek veren, kolektif çalışma bilincini kazandıran Tazebay laboratuvarındaki çalışma arkadaşlarım başta Ömer GÜLLÜLÜ olmak üzere Özge ARSLAN, Sinem GÜL, Eda Gazel PEHLİVAN, Gamze ÇAKIRCA ve İlkay SEVGİN'e çok teşekkür ederim.

Aynı laboratuvarı paylaşmaktan büyük keyif aldığım, dayanışmalarını ve emeklerini esirgemeyen değerli arkadaşlarım Emrah ÖZÇELİK, Türkan ÇAKAR ve Zihni Onur ÇALIŞKANER'e çok teşekkür ederim.

Bölümümüzde görev alan Prof. Dr. Tamer YAĞCI ve Dr. Hülya AKDEMİR KOÇ başta olmak üzere bütün öğretim üyelerine, öğretim elemanlarına, bölümde görev alan çalışanlara ve genç bilim emekçilerine teşekkür ederim.

Bana inanan, cesaretlendiren ve fikirleriyle yön veren sevgili Hakan EROL'a, Berken AÇIKGÜZ'e, Mine DARCAN'a, Sezgin BAL'a ve Yücel ÖZDEMİR'e çok teşekkür ediyorum.

Yaşamım boyunca yanımda olan, sonsuz sevgi ve saygılarıyla değer katan sevgili aile üyelerim Erdi ÜLKÜSEVEN, Mehmet ÜLKÜSEVEN ve Nurcan ÜLKÜSEVEN'e çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	Xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği	2
2. HÜCRE DÖNGÜSÜ	3
2.1. Mitoz Bölünme	4
2.2. Sentrozom	5
2.3. Sitokinez	8
2.4. Merkezi İğ İplikçiklerinin Biraraya Gelmesi	9
2.5. Bölünme Düzleminin Belirlenmesi	10
2.6. Kontraktıl Halkanın Oluşması	10
2.7. Sitokinetik Oluğun Girişi	11
2.8. Orta Cisimcik (Midbody) Oluşumu	11
2.9. Polo Benzeri Kinaz 1	12
2.10. Coiled-Coil Domain-Containing Protein	13
2.11. Coiled Coil Domain-Containing Protein 124 (CCCD-124)	14
3. ANTİKORLAR	15
3.1. Hibridoma Teknolojisi	17
4. MATERYAL VE METOT	20
4.1. Materyal	20
4.1.1. Hücre Hattı Seçimi	20
4.1.1.1. HEK293T Hücreleri	20
4.1.1.2. HeLa Hücreleri	21
4.1.1.3. RPE PLK-1 GFP Hücreleri	21

4.1.2. Hücre Kültürü Solüsyonları	22
4.1.3. Western Blotting Solüsyonları	22
4.1.4. İmmün Boyama Solüsyonları	24
4.1.5. SDS-PAGE Jel Solüsyonları	25
4.1.6. Coomassie Blue Staining Solüsyonları	26
4.1.7. Protein G Kolonu ile Affinite Kromatografisi Solüsyonları	26
4.1.8. Kimyasal Malzemeler	27
4.1.9. Hücre Transfeksiyonu	27
4.1.9. Hücre Transfeksiyonu	28
4.1.10. Kullanılan Cihazlar	29
4.2. Metot	30
4.2.1. Hücre Kültürü	30
4.2.1.1. Hücre Kültürü Ortamı	30
4.2.1.2. Alt Kültürleme	31
4.2.1.3. Hücrelerin Dondurulması	31
4.2.1.4. Dondurulmuş Stok Hücrelerin Açılması	31
4.2.1.5. Hibridoma Üst Sıvılarının Saklanması	32
4.2.2. Geçici Hücre Hattı Transfeksiyonu	32
4.2.3. Protein G Kolonu ile Affinite Kromatografisi	32
4.2.4. Western Blotting	33
4.2.5. Coomassie Blue Staining	33
4.2.6. İmmün Boyama	34
5. SONUÇLAR	35
5.1. 4B3 Hibridoma Klonunun Büyütülmesi	35
5.2. Üst Sıvının Protein G Kolonu ile Affinite Kromatografisi	36
5.3. Monoklonal Antikorların Coomassie Blue Staining ile Analizi	36
5.4. Monoklonal Antikorların Western Blotting ile Analizi	38
5.5. Monoklonal Antikorların İmmün Boyama ile Analizi	39
6. TARTIŞMA	42
7. KAYNAKLAR	44
8. ÖZGEÇMİŞ	50

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler ve</u> <u>Kisaltmalar</u>	<u>Açıklamalar</u>
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
L	: Litre
Mm	: Milimolar
°C	: Derece Celcius
4B3	: Hibridoma Klonu
Ab	: Antikor
APC	: Anafaz destekleyici kompleks
APS	: Amonyum persülfat
C	: Sitokinez
CCDC124	: Coiled-coil domain-containing 124
CDC14	: Tirozin protein fosfataz
CDC42	: Cell division control protein 42
CDK1	: Siklin bağımlı kinaz 1
CEP55	: Centrosomal protein of 55 kDa
CEP63	: Sentrosomal protein 63
CPC	: Kromozomal Passenger Kompleks
CYK-4	: Gho ailesi Gtpase aktive eden protein
EMC2	: ER membrane protein complex subunit 2
Fab	: Antijen Bağlayan Fragment
FBS	: Fetal sığır serumu
Fc	: Kristalizasyon Fragmenti
G	: Gram
GFP	: Yeşil floresan protein
GTÜ	: Gebze Teknik Üniversitesi
HEK 293T	: İnsan embriyonik böbrek hücre hattı 293T
HEK293	: İnsan epitelyum böbrek hücre hattı
HGPRT	: Hipoksantin Guanin Fosforiboz Transferaz
IF	: İmmünfloresan
Ig	: Immunoglobulin
IgG	: Immunoglobulin G
KDa	: Kilodalton
M	: Mitoz
MAb	: Monoklonal Antikor
MBG	: Moleküler Biyoloji ve Genetik
MJ	: MegaJul
MKLP1	: Mitotic Kinesin Like Protein 1
MTOC	: Mikrotübül Organizasyon Merkessi
PBS	: Tuzlu fosfat tamponu
PCM	: Perisentriolar Materyal
PEI	: Polietilemin
PLK-1	: Polo-benzeri-kinaz 1
RasGEF1B	: Ras guanin nükleotit değiştirici faktör 1B

RHOA : Transforming Protein RhoA
ROCK1 : Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 1
Rpm : Rotorun dakikadaki dönme hızı
TEMED : Tetrametiletilediamin
WB : Western Blotting

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: Hücre döngüsü şeması.	3
2.2: Hücre döngüsü aşamaları.	5
2.3: Sentrozomun yapısı.	6
2.4: Sitokinez.	8
2.5: Orta-cisimciğin ince kesitli EM görüntüsü.	12
3.1: Antikorun moleküler yapısı.	16
3.2: Hibridoma teknolojisinin aşamaları.	18
5.1: Hibridoma hücrelerinin 100 µm'de mikroskop görüntüsü.	35
5.2: Hibridoma hücrelerinin 25 µm'de mikroskop görüntüsü.	35
5.3: Üst sıvının protein G kolonu ile affinite kromatografisi.	36
5.4: Monoklonal antikorların coomassie blue staining ile analizi.	37
5.5: Monoklonal antikorların western blotting ile analizi.	38
5.6: RPE-PLK1 GFP hücreleriyle immün boyama (Mid pAb).	39
5.7: RPE-PLK1 GFP hücreleriyle immün boyama (mAb).	40
5.8: RPE-PLK1 GFP hücreleriyle immün boyama (mAb).	40
5.9: RPE-PLK1 GFP hücreleriyle immün boyama (mAb).	41

TABLolar DİZİNİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa</u>
4.1: Yürütme jeli için gerekli malzemeler ve miktarlar.	23
4.2: Ayırma jeli için gerekli malzemeler ve miktarlar.	23
4.3: Yürütme jeli için gerekli malzemeler ve miktarlar.	25
4.4: Ayırma jeli için gerekli malzemeler ve miktarlar.	25
4.5: HEK293T transfeksiyon malzemeleri ve miktarları.	27
4.6: Kullanılan kimyasal malzemeler.	28
4.7: Kullanılan cihazlar.	29
4.8: Kullanılan antikorlar.	30

1. GİRİŞ

Sitokinez, hücre döngüsünün son aşaması olup, hücre bölünmesi sırasında iki yavru hücrenin fiziksel olarak ayrılması olayını içermektedir [4]. Hücre bölünmesinde yer alan anafaz ve kromozomal ayrılmanın yaşandığı aşamalardan sonra hücreler, sitoplazmik köprüyle bağlanan iki kardeş hücreyi meydana getirmek için plazma membranının daralmasını sağlamak üzere bir aktin ve miyozin filament ağı olan bir kasılma halkası oluşturur. Bu hücre içi köprü, ayrılmanın son aşaması sırasında çözülen midbody yani orta cisimcik içerir [5]. Sitokinez dediğimiz bu aşamanın tamamlamadaki başarısızlık tetraploidiye [6], [7], [8] neden olur ve kromozomal kararsızlığa da yol açarak tümör büyümesini teşvik ettiği öne sürülmüştür [6], [7]. Theodor Boveri de anormal mitoz ve malign tümörler arasında bir bağlantı olabileceği fikrini ilk tanıyan kişidir ve 1888 yılında sentrozomu karakterize ederken çoklu sentrozomlu bir hücrenin genomik kararsızlığa ve dolayısıyla kansere yola açacağını öne sürmüştür. Bu durumun ise sentrozomların anormal bölünmesi veya hücre bölünmesinin bastırılması sonucu nedeniyle tetraploidi ile sonuçlanacağını belirtmiştir [9].

Memeli somatik hücrelerinin bölünmede yaşadığı başarısızlık durumunda ileriye gitmelerini önlemek için G1 fazında ikili çekirdekli hücreleri tutuklayan herhangi bir özel mekanizması yoktur. Sonuç olarak, bölünmedeki başarısızlık tetraploidiye ve anöploidiye yol açabilen aynı zamanda da potansiyel olarak tümör oluşumuna neden olabilen bir faktördür [10].

CCDC-124, mantardan insana kadar bütün ökaryotik canlıların genomunda korunmuş olup, sarılı sarmal alan içeren bir sentrozomal proteindir. CCDC-124'ün ekspresyonu tüm insan dokularında var olup; beyin, plasenta, karaciğer, prostat ve dalak dokularında daha fazla eksprese olmaktadır. Ccdc124'ün hücre içi lokasyonuna ilişkin yapılan çalışmalarda; hücre döngüsünün safhalarından interfaz, profaz, metafaz ve anafaz aşamasında gamma tübülün ile kolokalize olduğu görülmüştür [1]. CCDC-124 proteininin hücrede ifadesinin düşürülmesi veya artırılması durumlarında sitoplazma bölünmesinin gerçekleşmeyerek çok çekirdekli hücre oluşumuna neden olduğu gösterilmiştir [11]. Özellikle sitokinezde görev alan proteinlerden biri olan Ras guanin nükleotit değiştirici faktör 1B (RAS-GEF1B)'nin ise orta cisimcikte

gerçekleşen Rap konumlanması sinyal yolağında Rap2'nin aktivasyonunda rol oynadığı ortaya konmuştur [2].

Öncelikle gerçekleştirdiğimiz bu tez çalışmasında, CCDC-124 proteine özgü olarak hibridoma teknolojisi yardımıyla üretilen ve en efektif hat olan 4B3 hibridoma klonunun Protein G Affinite Kromatografisi tekniği kullanılarak saflaştırılması amaçlanmıştır.

Daha sonrasında saflaştırıldığı düşünülen örneklerin, antikor karakterizasyonuna sahip olup olmadığıyla ilgili analizler yapılmıştır.

Saflaştırılan monoklonal antikorların, CCDC-124 proteinine özgü olduğunu ispatlamak için deneyler yapılmıştır. Monoklonal antikor ile immün boyama tekniği kullanılarak CCDC-124'ü, PLK-1 proteini ile lokasyonuna bakılmıştır. İmmün boyamada ilk defa kullanılan bu antikor ile CCDC-124'ün PLK-1 ile kolokalize olduğu gösterilmiştir.

1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

Daha önce yapılan çalışmalarda insan HeLa hücre hattında olmak üzere çeşitli hücre hatlarında yapılan immün boyama deneylerinde, CCDC-124 proteinini C, N ve M bölgelerinden tanıyan antikorlar ile proteinin hücre içi lokasyonu belirlenmiştir. Bu tez çalışmasında CCDC-124 proteinini poliklonal antikorların aksine tek bir epitoptan tanıyan monoklonal antikorun, bu proteinin işlevini anlamak adına yapılan çalışmalara ışık tutacağı düşünülmektedir.

Yapısı ve lokalize olduğu yer itibariyle sentrozomal bir protein olan CCDC-124'ün, bu organel içinde etkileştiği veya partneri olarak görev aldığı düşünülen diğer proteinler ile ilgili ilişkisini anlayabilmek için yapılacak olan immün boyama çalışmalarına katkı sunacaktır.

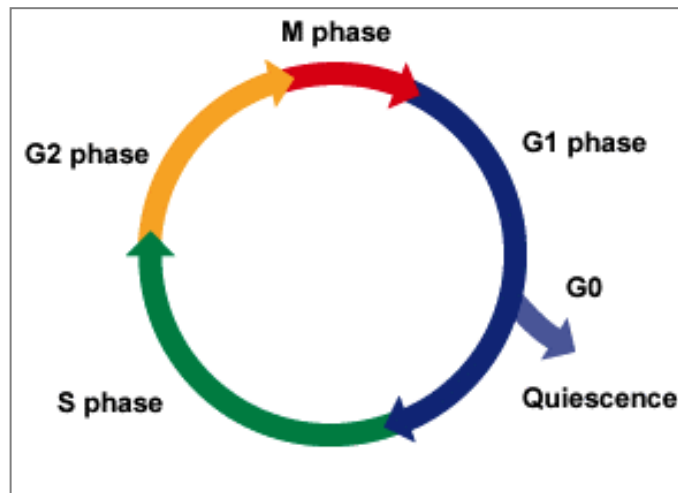
Yapılan çalışmalarda, CCDC-124 proteinin bütün insan dokularında ifadesi olduğu bilinmekte olup; beyin, karaciğer, prostat, dalak ve plasenta dokularında daha yüksek ifade oranı olduğu saptanmıştır. CCDC-124'e özgü monoklonal antikorun, sıralanan dokular ile yapılacak doku boyama çalışmalarında kullanılması amaçlanmaktadır. Kanserli dokular ile yapılacak olan doku boyama çalışmaları, CCDC-124'e özgü monoklonal antikorların, bazı kanser tanı kitlerinde kullanılması olanağını doğurmaktadır.

2. HÜCRE DÖNGÜSÜ

Hücre bölünmesi, hücre döngüsü içerisinde yer alan bir evredir. Hücre döngüsü, atasal hücrenin ikiye bölünmesiyle başlamakta olup, bunun sonucunda ortaya çıkan iki kardeş hücrenin de ikiye bölünmesine dek süren olaylar dizisini kapsamaktadır [12].

Hücre döngüsünün temel fonksiyonu, kromozomlardaki DNA'yı çift kopya halinde çoğaltmak ve bu kopyaları genetik açıdan birbirine eş olan iki kardeş hücreye dağıtmaktır. DNA'nın kopyalanması ve eşit olarak dağıtılması hücre döngüsü içerisinde iki ayrı ana evre olan; kromozom kopyalanmasını içeren yaklaşık 10-12 saat süren S fazı(Sentez), sonrasında kromozomların ayrılmasını ve hücre bölünmesinin gerçekleştiği daha az süre içinde gerçekleşen M fazında(Mitoz) gerçekleşmektedir. M fazı dediğimiz mitotik faz iki belirgin olaydan oluşmaktadır. Bunlardan ilki çekirdek bölünmesi yani mitoz, diğeri ise sitoplazmik bölünme diğeri adıyla sitokinezdir.

Hücrelerin büyümeleleri ve bölünebilmeleri için bünyesinde bulundurduğu proteinleri ve organelleri çoğaltmaları gerekmektedir. Hücre döngüsü içerisinde, hücrelerin büyümelerine olanak tanıyan Gap diye adlandırılan boşuk fazları olarak ifade edilen aşamalar yer almaktadır. Bir ökaryotik hücrede; hücre döngüsü, gap fazlarını da içerisine alan İnterfaz evresi sırasıyla 4 ayrı evreye ayrılır: G1, S, G2, M ve G2 evreleridir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1: Hücre döngüsü aşamaları.

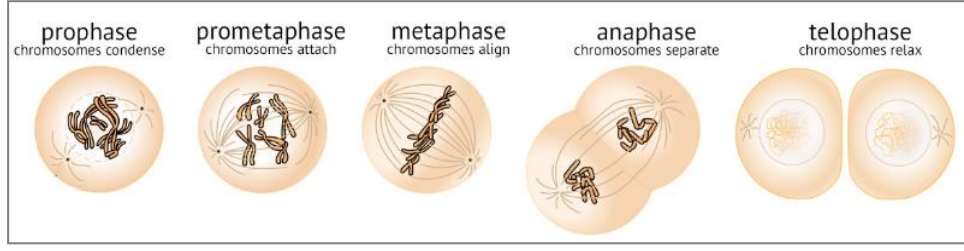
Gap fazları, hücrenin bulunduğu iç ve onu oluşturan dış ortam koşullarını tayin etmek ve bunlara karşı önlem almak için imkân sunmaktadır. Gap 1, DNA sentezi öncesini temsil ederken, Gap 2 DNA eşleşmesi sonrasında, S ise DNA sentezini temsil etmektedir. Hücre, dış çevreden uygun olmayan sinyaller alması durumunda hücre, Gap 0 diye adlandırılan dinlenme evresinde kalmaktadır. Bazı hücreler yaşamları son bulana kadar da Gap 0 evresinde durabilmektedir. Fakat çoğunlukla bölünmeyen hücrelerde-kas ve sinir hücrelerinde-, hücre döngüsü geçici veya kalıcı olarak Gap 0 evresinde kalabilmektedir. Memeli hücreleri de hücre kültürü ortamında serumsuz bırakıldıklarında, hücreler çoğalmayı durdurup Gap 0 evresine girermektedirler [13].

Hücre döngüsünün fazları, hücrelerin çeşitliliğine göre farklılık göstermektedir. Hızlı çoğalmakta olan insan hücrelerinde 24 saatlik hücre döngüsünün G1, S, G2, M fazları sırasıyla yaklaşık olarak 11, 8, 4, 1 saatlik zaman dilimini kapsamaktadır. Budding yeast hücre döngüsünü 90 dakikada tamamlarken, yumurta fertilizasyonundan sonraki erken embriyonik hücreler, hücre döngülerini 30 dakikada tamamlayabiliyorlar [14]. Dokularda da ise farklılık göstermektedir. Örneğin, sindirim kanalı epiteli ve epidermis dokusunda hızlı hücre yenilenmesi mevcutken, pankreas ve tiroitte yavaş bölünme gerçekleşmektedir.

2.1. Mitoz Bölünme

Somatik hücre çekirdeğindeki kromozom sayılarını korumakta olan, ölü veya hasara uğramış hücreleri yenileriyle değiştirmeyi sağlayan döngü, mitoz döngüsüdür. Mitoz, hücre döngüsünün sadece bir bölümünü kapsamaktadır. Mitotik faz, karyokinez diye adlandırılan çekirdek bölünmesini ve sitokinez diye adlandırılan sitoplazma bölünmesi olaylarını içerir ve hücre döngüsünün en kısa süren sürecidir [12].

S fazının tamamlanması ve ardından Gap 2 evresine geçişle birlikte hücre M fazında hücre, kendisinde meydana gelecek olan değişikliklerin üstesinden gelmeye çalışmaktadır. Mitoz evresiyle başlayan bu değişme durumu, iki kardeş kromatitin birbirinden ayrılması ve ortaya çıkan genetik olarak birbirinin aynı olan iki kadeş hücreye düzgün bir şekilde dağıtılmasını içermektedir. Mitoz bölünmesi, kromozomların mikroskobik ortamda görünüşleri temel alınarak 5 bölüme ayrılmaktadır: profaz, prometafaz, metafaz, anafaz ve telofaz (Şekil 2.2)



Şekil 2.2: Hücre döngüsü aşamaları.

Profaz evresinde, replike olan kromozomların her biri, birbiriyle yakından ilişkili iki kardeş kromatid içermektedir. Çekirdek dışında ise, iki sentrozom arası boyunca mitotik iğcikler uzamaya başlamaktadır.

Prometafaz evresi ise çekirdek zarının erimeye başlamasıyla başlamaktadır. Bu evrede kromozomlar, mitotik iplikçiklere bağlanıp, aktif bir şekilde hareket edebilmektedirler. Kromozomların her iki kromatidi de kinetokor bölgesine sahiptirler. Mikrotübüller de kinetokorlara tutunmaktadır [14].

Metafazda kromozomlar, iğ iplikçiklerinin ekvator bölgesinde sıralanmaktadır. Ve bu aşamada bir kromozomun kardeş kromatidleri, hücrenin zıt kutuplarından gelen mikrotübüllere tutunmaktadır.

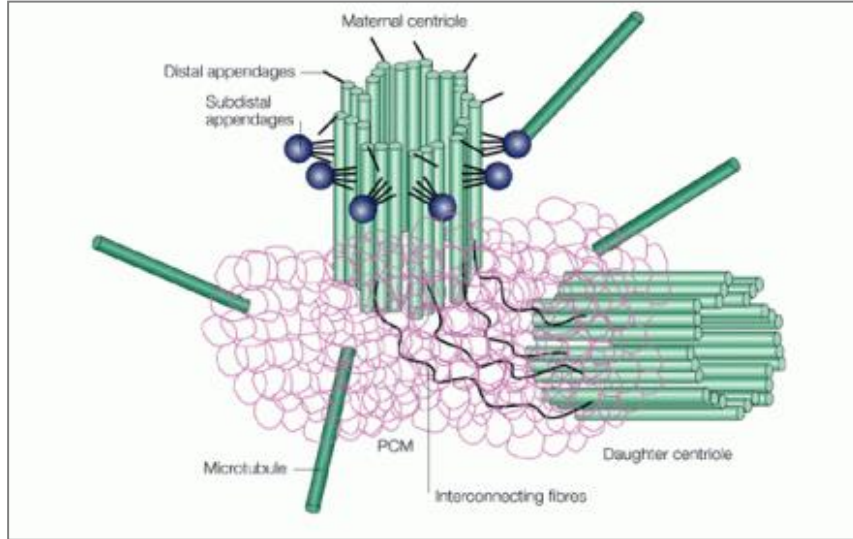
Anafazda, kardeş kromatidler iki yavru kromozomları oluşturmak üzere birbirlerinden ayrılırlar. Bahsedilen ayrılma, kinetokorlara bağlı olan mikrotübüllerin boylarının kısılmasıyla başlamaktadır [13].

Son olarak telofazda ise, yavru kromozom setleri iğ iplikçiklerinin kutuplarına ulaşmışlardır ve yoğunluğunu kaybetmişlerdir. Kromozom setlerinin etrafında çekirdek zarı yeniden oluşmaya başlamaktadır. İki çekirdeğin oluşmaya başlamasıyla, mitozun sonuna gelindiği belirgin bir biçimde ortaya çıkmaktadır [13]. Sitoplazma bölünmesi diğer ismiyle sitokinez bu esnada gerçekleşmektedir.

2.2. Sentrozom

Sentrozom, çok hücreli organizmalarda bulunmakta olup köken olarak tek hücrelilerin basal gövdesinden/ aksoneminden evrim geçirmiştir [15]. Sentrozomun birçok fonksiyonu vardır. Bunlardan en önemlisi çoğalan hücrelerde, mikrotübülleri organize eden merkez(MTOC) olmasıdır. Aynı zamanda bölünen hücrelerde mitotik

iğ iplikçiğın oluşumda, hüresel işlemleri organize etmede- polarity, hareketlilik, adhezyon, sinyal alma- yardımcı olmaktadır. Çekirdek, golgi aygıtı ve hücreden hücreye bağlantı noktalarında önemli rol üstlenmektedir [16]. Hayvan hücrelerinin, mikrotübül iskeletinin düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. İnterfaz sırasında sentrozom, hücrelerarası trafik, hücre adezyonu, hücre polaritesi gibi temel fonksiyonlara yardımcı olan mikrotübüllerin organizasyonundan sorumludur [15]. Bölünmeyen hücrelerde sentrozom hücre çekirdeğine yakın pozisyonda yer alarak hücre şeklini, polaritesini ve organellerin doğru yerde konumlanmasına yardımcı olmak için mikrotübülleri düzenlemektedir [17]. Bölünen hücrelerde ise, kromozomal içeriği eşit olarak iki kardeş hücreye dağıtmaya yardımcı olan bipolar mitotik iğ iplikçiğini oluşturmak için duplike olurlar [18].



Şekil 2.3: Sentrozomun yapısı.

Sentrozom yapısal olarak sentriyol diye adlandırılan birbirine dikey pozisyonda yer alan iki silindirik organelden oluşur ve iki sentriyolün yakın uçlarını, fiberler aracılığıyla tutunmaktadır (Şekil 2.3). Sentriyollerin etrafı yapusal olmayan proteinlerden oluşan perisentriyolar materyal(PCM) ile çevrilidir [19]. Perisentriyolar materyal, gama tübülün kompleksinin yanı sıra CENTRIN, CEP135, NINEIN gibi büyük sarılı sarmal proteinler içermektedir ve bu proteinler de mikrotübüllerin çekirdeklenmesi ve pozisyonlarının belirlenmesinde rol almaktadır [20]. Her bir sentriyol, çembersel yapı içinde biraraya gelmiş üçlü mikrotübüllerin dokuzlu setinden oluşmaktadır. Sentriyolleri oluşturan çiftin arasında, nesil farkından ötürü yapısal ve

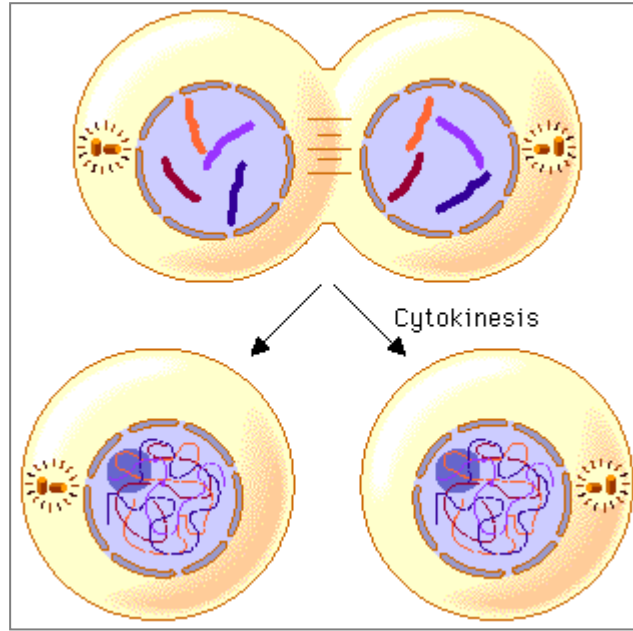
fonksiyonel olarak asimetri bulunmaktadır. Nesil olarak eski olan olgun diye de adlandırılan anne sentriyol, distal ucundaki dokuzlu uzantının ikili setiyle ayrılırken; genç olanı, henüz olgunlaşmamış olan daughter sentriyol bir önceki hücre döngüsü sırasında toplanan anne sentriyolün yaklaşık yüzde 80'i kadardır. Her iki sentriyolde, mikrotübüllerin yakın bölgelerinde çekirdeklenmektedir. Fakat sadece anne sentriyol, mikrotübülleri subdistal uzantılarından bağlayabilmektedir [21]. Sentriyol denilen yapı membrana bağlandığı durumda basal body olarak adlandırılırlar ki bu yapı da aksonemin ve hücreye sertlik, hareket sağlayan cilia denen yapının oluşması için kalıp işlevi görmektedir [22]. Sentriyoller, özelleşmiş hücrelerde cilia oluşum süresinde primer siliyum ya da silia olarak basal body işlevi görmektedir. Yapılan son çalışmalarda cilianın hücreSEL ve gelişimsel süreçlerde sayısının arttığı, fonksiyonu olmayan silialar ve birkaç genetiksel hastalık arasında bağlantı olduğu görülmüştür [23].

Sentrozom döngüsünün ayırt edici aşamaları mevcuttur. Çözülme ya da ayrılma, birbiriyle dikey olarak sıkı bağı olan anne ve daughter sentriyollerin arasındaki bağı kaybolmasıyla tanımlanmaktadır. Sentriyollerin birbirinden ayrılması, sitokinez tamamlanmadan önce erken G1 fazı boyunca gerçekleşmektedir [24] ve separaz, proteaz gibi enzimlerin varlığı ile anafaz öncesi kardeş kromatidlerin ayrılmasını da sağlamaktadır [25]. Pro-sentriyollerin oluşmaya başlaması, S fazından önce ya da başlangıcında olduğu görülmektedir. Bu fikir, insan hücrelerindeki parental sentriyollerin yakın çevresinde CENTRİN oluşmasıyla desteklenmektedir. CENTRİN, birçok ökaryotik organizmanın sentriyolüyle ilişkili olduğu atasal proteindir. Sentrozom duplikasyonu, birçok türde farklı sonuçlar elde edildiğinden dolayı henüz kesin olarak anlaşılmamıştır [16].

Sentrozom, hücre döngüsünden önce duplike olup birbirlerinden ayrılmaktadır. Sentrozom döngüsü, iki ana bölümden oluşmaktadır: sentrozom duplikasyonu ve sentrozom hareketi. Sentrozom duplikasyonu, geç G1 ile erken G2 fazları arasında yer almakta olup ve 4 ayrı bölümden oluşuyor: sentriyollerin ayrılması, sentriyol duplikasyonu, sentriyol uzaması ve sentrozomun olgunlaşması [26].

2.3. Sitokinez

Sitokinez, bir hücrenin iki kardeş hücreye bölünüp, sitoplazmasını da paylaştığı hücre döngüsünün son aşamasıdır [5], [27]. Sitokinez, hücre döngüsü içerisinde doğrudan gözlemlenen ilk önemli olaydır. Derisidikenlilerin embriyolarında yapılan yapay değişimler sayesinde sitokinezin mekanizması açığa çıkmıştır [28]. Tipik bir hayvan hücresi mitoz aşamasında, anafazdan itibaren hücrenin ekvatorial korteksinde yarıma meydana gelmektedir (Şekil 2.4). Daha sonra bu oluk iki yavru hücrenin ayrılması için ileriye doğru gitmektedir [29]. Rapport ve arkadaşları iğ iplikçiklerinin bu yarımda kilit rol oynadığını açığa çıkartmışlardır [30].



Şekil 2.4: Sitokinez.

Sitokinez, ökaryotlarda hem yapısal elemanlar hem de temel işlemler açısından değişiklik gösteren bir süreçtir [31]. Bazı gelişimsel durumlarda mitoz, sitokinez tarafından takip edilmemektedir ve çoklu çekildeki hücrelerin oluşmasıyla sonuçlanmaktadır. Bu olay algelerde [32], hayvan ve bitki hücrelerinin erken embriyogenez evresinde de tipik olarak gerçekleşmektedir. Hayvan sitokinezinde yeni membran oluşumundan ziyade iki yavru hücrenin plazma zarının, aktinomyozin ile ilişki sonucunda iki kardeş hücrenin tutulması sağlanmaktadır [33]. Bitki hücreleri için

Arapdosis bitkisinin genetiksel olarak açığa çıkarılmasından sonra sitokinezi yöneten birçok proteini ortaya konulmuştur [34], [35].

Sitokinezin gerçekleşeceği zaman, hücrenin daha sonraki yaşamı için önemli bir yere sahiptir. Özellikle mitotik hücrelerin ikiye ayrılması sürecinde kromozomlarda yaşanan fiziksel ayırım gözlenmektedir. Bazı hücrelerin kromozomlarının düzgün ayrılmaması sonucu malignan tümör hattını oluşturacak olan aneuploid gelişmesine yol açmaktadır [27].

Hücre bölünme düzleminin doğru bölgede konumlanmaması kromozomların iki yavru hücreye eşit olarak dağıtılmamasına ve iki katı genoma [tetraploidi] sahip hücrelerin oluşmasına neden olmaktadır [36]. Tetraploidi olan farelerden alınan epitel hücrelerinin tümör oluşumunu tetiklediği gösterilmiştir [37]. Sitokinezin, tümörgenezis ile yapılan çalışmalarda, tümör baskılayıcı genlerde yapılan mutasyonlar, sitokinezin başarısızlığını artırdığı gözlemlenmiştir [38].

2.4. Merkezi İğ İplikçiklerinin Biraraya Gelmesi

Hayvan hücrelerinde, anafaz boyunca başlayan ve sitokinez sırasında CDK-1 aktivesindeki azalma, mikrotübüllerin stabilize edilmesine ve mitotik iğ iplikçiklerinin yeniden düzenlenmesine sebep olmaktadır. Merkezi iğ iplikçiklerinin biraraya gelmesi, bölünme düzleniminin belirlenmesinde önemli bir olaydır. Merkezi iğ iplikçığı, motor proteinleri, mikrotübüllerle ilişkili proteinlerin ve protein kinazların biriktiği bölgede antiparalel mikrotübül demetlerinden oluşmaktadır [39]. Merkezi iğ mikrotübülleri, metafazdaki iğ iplikçiklerinden köken almaktadır [40].

Mikrotübülleri paketlenme işleminde önemli rolü olan “Sitokinez İçin Gerejki Protein” yani PRC-1 birbirine antiparalel mikrotübüllerin arasındaki homodimer seçici arayüze bağlanmaktadır [41], [42]. PRC-1 aktivitesi anafaz başlangıcına kadar Siklin Bağımlı Kinaz -1 yani CDK-1 fosforilasyonu ile engellenmekte olup ve PRC-1 ‘in dimerizasyonu da engellenmiş olmaktadır [43].

Merkezi iğ için bir başka bileşimi de “Central Spindle” bileşimidir. Bu bileşim, MLKP-1 ve Rho protein ailesinde olan GTPaz aktive eden CYK-4’ün iki kopyasından oluşmaktadır [5], [39]. Central Spindle, yüksek düzeyde bir yığın olaran mikrotübüller boyunca merkezi bölgeden pozitif uçlara doğru yolculuk etmektedir [39].

Kromozomal Yolcu Kompleksi (CPC), birçok proteinin altbirimleri oluşturan ve Aurora B proteinini içeren, merkezi için toplanmasında temel olan üçüncü bileşimdir. Metafaz evresi boyunca CPC, mitotik iplikçiğe kromozomların bağlanmasını düzenleyen yer olan sentromerde lokalize olmaktadır. Anafaz başlangıcında CPC, merkezi iğe doğru yer değiştirir [27]. Hücrelerde merkezi için toplanma mekanizması, merkezi iğ ana kompleksinin karşılıklı olarak birbirine bağımlıdır ve her birinin toplanma için gerekli olmasından dolayı kompleks bir sistemdir [39].

2.5. Bölünme Düzleminin Belirlenmesi

Bölünme, her zaman kromozomların ayrılma eksenine dik olarak gerçekleşir ve böylece genomun eşit bölünmesi sağlanmaktadır. Tipik olarak, sitoplazmayı eşit paylaşmak için hücrenin ortasında gerçekleşmektedir [44]. Ayrılmış kromozomların kütleleri arasındaki bölünme düzleminin pozisyonu, kromozom kaybını önlemek için temeldir. Hayvan hücrelerinde bölme düzlemi, erken anafaz sırasında iplikçik konumu sinyalinin hücre korteksine aktarımı ile belirlenir. İplikçiğin pozisyonu ise, doku morfogenezi boyunca biyokimyasal, geometriksel ve mekanik sinyaller tarafından kontrol edilmektedir [45].

Merkezi iplikçik aynı zamanda GTPase olan RHO proteinin aktive edip konsantrasyonunu artırarak bölünme düzleminin belirlenmesinde katkıda bulunmaktadır [46], [5]. Diğer küçük GTPaselar gibi RHO da Guanin Değişim Faktörü ve GAP'ler tarafından düzenlenmektedir. Ekvatoryal bölgedeki RHO'nun aktivasyonu, CYK-4'ün PLK-1 tarafından fosforile olmasını takriben merkezi iplikçiğin alt birimi olan CYK-4'ün bağlanmasıyla merkezi iplikçikte lokalikasyonu görülen RHO-GEF ECT2'ye bağlıdır [47]. ECT-2, CDK-1'nin inaktive olmasından sonra sitokinez esnasında kromozomların ayrılmasını koordine etmek için ekvatoryal kortekse doğru yer değiştirmektedir [48].

2.6. Kontraktıl Halkanın Oluşması

RHO yolağı, aktinomyozin halkanın oluşmasını iki ana efektörle teşvik etmektedir. Birincisi, RHO proteini, aktin polimerizasyonunu sağlayan FORMIN proteinleri ile, dallanmamış aktin filamentlerinin çekirdeklenmesini uyarır [49].

İkincisi ise RHO, RHO ile ilgili protein kinaz olan ROCK ile MIYOZIN-2'nin aktivasyonunu teşvik etmektedir [50].

AKTIN ve MIYOZIN-2, birkaç farklı mekanizma ile hücre ekvatorunda toplanmak ve direkt olarak kontraktıl halkanın oluşacağı yerde lokalize olmak üzere, hücre korteksine birbirlerinden bağımsız olarak hücre korteksine bağlanmaktadır. Aktin filamentleri ve bazı organizmalardaki MIYOZIN-2 proteinleri, kortikal yol ile hücre ekvatoruna doğru hareket etmektedir.

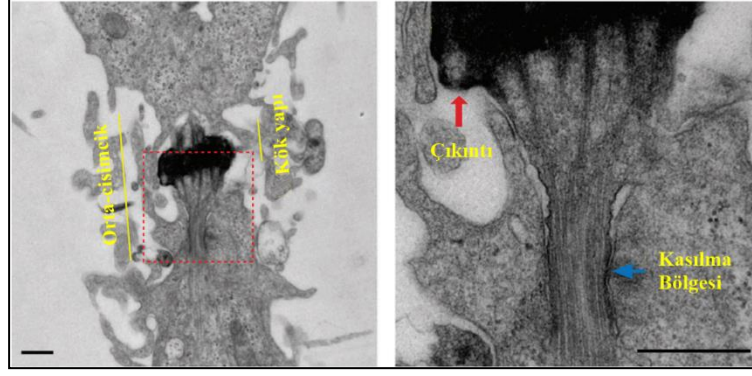
AKTIN ve MIYOZIN-2'nin yanısıra kontraktıl halka ANILLIN proteini de içerir [51]. ANILLIN; AKTIN, MIYOZIN, RHO ve CDK-4'e bağlanır ve bu nedenle merkezi iplikçikten aldığı sinyaller ile ekvatoryal korteksle ilişkilendirilmektedir [52]. ANNILIN aynı zamanda, aktinomyozin halkasının plazma membranına bağlanmasına katkıda bulunmaktadır [51].

2.7. Sitokinetik Oluğun Girişi

Aktinomyozin halkanın kasılması, oluşan iki yavru hücrenin sitoplazmasını ayıran plazma membranının bükülmesine neden olmaktadır. Aktinomyozin kasılması için önerilen klasik model, bipolar miyozin filamentlerinin, kas sarkomerleri gibi aktin filamentleri boyunca hareket etmesidir [53]. Bunun üzerine yapılan deneylerde MIYOZIN-2, floresans mikroskopunda sitokinetik olukta gözlemlenmiştir [54] ve mutasyona uğratılmış MIYOZIN-2'nin sitokinezi teşvik edemediği ortaya konulmuştur [55].

2.8. Orta Cisimcik (Midbody) Oluşumu

Midbody ilk olarak Flemming tarafından 19.yüzyılın başlarında tanımlanmış olup [56], daha sonraki analizleri elektron mikroskobu (Şekil 2.5) [57] ve cry elektron tomografisi ile yapılmıştır [58].



Şekil 2.5: Orta-cisimciğin ince kesitli EM görüntüsü.

Midbody yapısal olarak statik olmayıp, sitokinezin geç evresinde morfolojik olarak bir dizi değişimin üstesinden gelmektedir. Ayrılma oluşu tamamlandığında yüzüğün her iki yanında birbirleriyle bağlantılı simetrik iki yapı oluşmaktadır. Midbody ayrılmadan önce hücre bölünmesinde geçici olarak oluşan organel benzeri yapı olarak sitokinez sırasında var olan proteinlerden tanımlanmıştır [56]. Morfolojik olarak memeli orta cisimciği, sitokinetik karın oluşu tarafından sıkı bir şekilde birleştirilmiş iğ iplikçiklerinden türemiş mikrotübülleri içeren yoğun bir yapıya sahiptir [59]. Orta cisimciğin rolünün tam olarak açığa çıkmamasına rağmen; sitokinez, asimetrik hücre bölünmesi ve kromozom ayrılması için gerekli olan proteinleri içerdiği biliniyor [60]. Midbody mikrotübülleri, oldukça asetilenmiş, post translasyonel modifikasyonlarla ilişkili kararlı mikrotübüllerle bağlantılı ve nokadozal gibi hücreye sarsıntı veren ilaçlara karşı dirençlidir [61]. Hücrelerarası köprü, ayrılma ile ilgili birçok faktöre karşı bağlanma ortamı sağlamaktadır. Bunların birçoğu, orta cisimciğin merkez bölgesine ya da direkt hücrelerarası köprünün yakın bölgesine bağlanmaktadır. Midbody, ayrılma oluşunun girişine dair kalıntı sağlamaktadır [62].

2.9. Polo Benzeri Kinaz 1

Sitokinez için önemli olan birçok protein, daha büyük alt birim bileşenleri olarak işlev görmektedir. Bahsedilen bileşeni oluşturan bir protein de, mikrotübüle bağlanan ve MKLP-2 ile etkileşime giren PLK-1'dir (Polo Benzeri Kinaz-1). PLK-1'in anafaz ve telofaz sırasında merkezi iğ iplikçisindeki lokalizasyonu için PLK-1 ile MKLP-2'nin fosforilasyonu ve bu iki proteinin bileşeni sitokinezin tamamlanması için

gereklidir [63]. Aynı zamanda PLK1'in ECT-2'nin CYK-4'e bağlanması için önemli olduğu da gösterilmiştir. Böylece sitokinezin başlatılmasını ve tamamlanmasını teşvik eder. Protein kinazlar, hücre döngüsünün düzenlenmesinde merkezi bir rol oynamakla birlikte sitokinezdeki moleküler olayları organize ettiği bilinmektedir. PLK-1 ayrıca serin ve treonin kinazlarının ailesine aittir ve mitoz sırasında, merkezdeki matürasyon, bipolar iğ oluşumu ve sitokinezde önemli rol oynamaktadır. PLK-1'in insan lösemi hücre dizilerinin yanı sıra akut bireylerden alınan hücre örneklerinde fazla ifade edildiği bilinmektedir. Yine miyelojenöz lösemi ve akut lenfoblastik lösemi kanser progresyonunda rolü olduğu öne sürülmektedir [64].

2.10. Coiled-Coil Domain-Containing Protein

Ökaryotik sentrozom ve PCM'i oluşturan çok sayıda proteinin sarılı sarmal bir yapıya sahip olduğu bilinmektedir [65]. PCM'in birarada toplanmasını sağlayan ve onu oluşturan bileşenlerin rolü henüz açık bir şekilde tanımlanmamış olsa da bu bileşenlerin birçoğu sarılı sarmal proteinlerdir. Bununla birlikte PCM'in oluşumundaki ve bu yapının devam ettirilmesindeki bir takım hatalar genellikle mikrotübüllerin çekirdeklenememesi ve sentrozomdaki gamma tübülün yokluğu ile ilişkilendirilir [66]. PCM'in kesin olarak bileşimini, zamansal ve mekânsal olarak düzenlenmesine yol açan moleküler dinamikleri araştırmak üzere, Jakobsen ve arkadaşları, proteinlerin antikör ve hücre-dışı ekranı ile kombine edilmiş proteomik tabanlı bir kütle spektrometresi tekniğiyle, insan sentrozom proteomunu kapsamlı bir şekilde elde etmişlerdir. Bu çalışmada araştırmacılar, 40 yeni aday sentrozom proteinini tanımlamışlardır. Yapılan bu analizlerde, sentrozomal proteinlerin çoğunluğunun(60%), sarılı sarmal tipi oligomerizasyon motifleri [67], içerdiğini ve bunların, uygun sentrozom düzeneği için önemli görülen baskın yapısal özellikleri olduğunu göstermiştir. Çoklu dokularda ve çeşitli kanser hücre hatlarında eksprese edilen ve sitokinezin de tamamlanması için gerekli olan CEP55 proteinine yapılan Cdna sekans analizlerinden sonra proteinler ile etkileşiminde rol oynayan sarılı sarmal yapıda motif içerdiği görülmüştür [68]. Bir başka örnek olan CEP63 ise, mitotik bölünmeye giriş ve iğ iplikçisi oluşumu ile ilgili yolların aktif bir bileşenidir [69] ve altı sarılı sarmal olan bir proteini kodladığı bilinmektedir. Hücre içerisinde, DNA onarımı, kromozom yoğunlaşması ve mitoz sırasında kardeş kromatid kohezyonu

dâhil olmak üzere hücre içinde birkaç kritik fonksiyonu yerine getirmek için DNA ile etkileşime giren yapısal kromozom devamlılığını sağlayan [70] proteinler (SMC) yapısal olarak hidrofobik paketlenmesi sağlayan sarılı sarmal motifler içerdiği görülmüştür [71].

2.11. Coiled-Coil Domain-Containing 124 (CCDC-124) Proteini

Coiled-coil domain-containing 124 proteini, sentrozom ve orta cisimcik proteini. Sentrozomda bulunan çoğu proteinin yapısına özgü sarılı sarmal bölge motifi içerir. Bu protein, mantardan insana kadar ökaryotlarca korunurken prokaryotik canlılarda varlığına rastlanmaz. 19. kromozomun kısa kolunda bulunan gen tarafından kodlanan CCDC-124 proteini, 223 aminoasit uzuluğunda ve biri kodlanmayan beş tane ekson bölgesine sahiptir. Yapılan Western Blotting çalışmalarında, CCDC-124 proteinin yaklaşık olarak 32kDa ağırlığa sahip olduğu görülmüştür. Başka bir analiz olan Northern Blotting ile de CCDC-124 proteinin insana ait tüm dokularda ekspres edildiğini ortaya çıkarırken; beyin, plsentta, karaciğer, dalak ve prostat dokularından alınan örneklerde diğer dokulara oranla bu proteinin ifadesinin daha fazla olduğu tespit edilmiştir [1].

Coiled-coil domain-containing 124 proteini, hücre döngüsü içerisinde geç anafaz-telofaz evresi esnasında lokalizasyonunu değiştirdiği gözlemlenmiştir. Geç anafaz evresine kadar sentrozomda konumlanırken, sitokinetik yarıma esnasında telofazda orta cisimcik(midbody) denen bölgeye göç etmektedir [1].

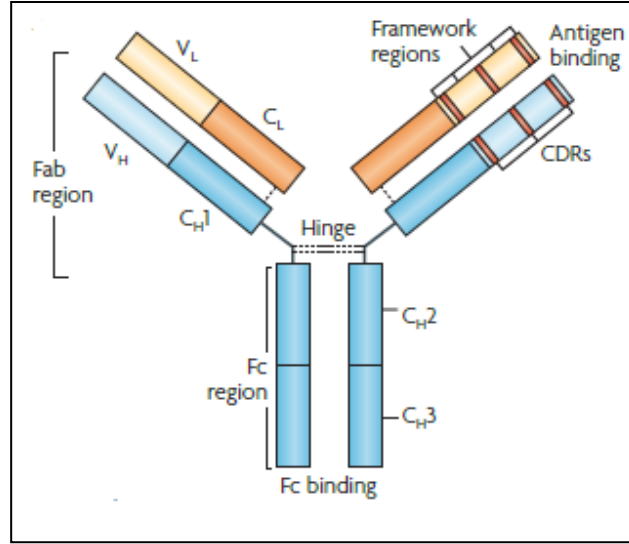
CCDC-124 proteininden yoksun bırakılan çalışmalarda, sentrozom oluşumunda herhangi bir değişikliğe rastlanmazken çok çekirdekli hücrelerin sayısında bir hayli artış olduğu gözlemlenmiştir. Tam tersi olarak, bu proteinin ekspresyonun arttırıldığı çalışmada ise yine aynı sonuç elde edilmiştir [11].

Daha önceki çalışmalarda Ras süper ailesine ait endozomda lokalize olan RASGEF1B'nin CCDC-124 ile arasında bağlantı olduğu ortaya konulmuştur. RasGEF1B Guain nükleotidi değiştirici faktördür. RAP-2'yi G proteinleri ile aktive eder. RasGEF1B'de CCDC124 proteini ile ortacisimcik(midbody) denilen ve geçici olarak oluşan bu yapıda bağlantı kurmaktadır [2].

3. ANTİKORLAR

Bağımsızlık sisteminin hümorale kolunu oluşturan ve insanlarda plazma proteinlerinin yaklaşık % 20'sini ihtiva eden bir molekül ailesi ve ayrıca immünoglobulinler (Ig) olarak da adlandırılan antikorlar, bağımsızlık sistemi tarafından bakteri ve virüs gibi yabancı maddeleri tanımlamak ve etkisizleştirmek için kullanılan büyük proteinlerdir [72]. Lenfositlerin yüzeyinde, ekzokrin salgılarında ve ekstrasvasküler sıvılarda farklı immünoglobulin popülasyonları bulunmaktadır. Genel olarak antikorlar, vücuda yabancı olan moleküller veya vücuttaki diğer ajanlara yanıt olarak üretilen konakçı proteinlerdir. Bu cevap, yabancı organizmaların veya organizmaların hareketine karşı kendini korumak için bir konak organizmanın kullandığı kilit bir mekanizmadır. Spesifik reseptörleri taşıyan B-lenfositleri antijenin antijenik belirleyicilerini algılar ve bağlarlar ve bu, B-lenfositleri plazma hücrelerine dönüştürerek bölünme ve farklılaşma sürecini uyarır. Ağırlıklı olarak antikorları sentezleyen bu lenfoid veya plazma hücreleridir [73].

Yapısal olarak her immunoglobulin, iki özdeş ağır polipeptid zincirinden ve iki özdeş hafif polipeptid zincirinden meydana gelir. Her ağır ve hafif zincir, domain yani etki alanı adı verilen katlanmış bölgelerden oluşur. Hem ağır (~55 kD) hem de hafif (~25 kD) zincirin iki özdeş kopyası disülfür ve kovalent olmayan bağlarla birlikte tutulur ve sonuçta elde edilen molekül ~150 kD'lik bir şematik Y-şekilli molekülle temsil edilir (Şekil 2.6). Ig sınıfına bağlı olarak, herhangi bir antikoru oluşturmak için beşe kadar yapısal molekül kombine edilebilir. Memelilerde beş Ig sınıfı vardır (IgG, IgM, IgA, IgD ve IgE); ve avianslarda üç sınıf vardır (IgY, IgM ve IgA). Özelleşmiş memelilerde IgG ve IgA, ağır zincirin korunmuş bölgelerindeki polimorfizmlere bağlı olarak izotipler olarak adlandırılan alt sınıflara ayrılmaktadır. Ig sınıfı, bağımsızlık yanıtının hem tipini hem de zamansal niteliğini belirlemektedir [74].



Şekil 3.1: Antikörün moleküler yapısı.

Antikorların temel protein yapısına ek olarak karbonhidrat bileşenleri de bulunmaktadır. Antikorlar, ağır zincirler boyunca doğal olarak glikolizedirler. Özellikle bir antikorun Fc kısmı boyunca karbonhidrat içeriği, antikorun birçok hareketini büyük ölçüde etkilemektedir. Bu, antikorun plazma hücrelerinden uygun şekilde salgılanmasını, dolaşımdaki kinetiklerini, antikora bağımlı hücre aracılı sitotoksikite ve tamamlayıcının eylemlerini ve uygun radyo-etiket veya bağlayıcı eki ile ilgili kimyayı içermektedir [75].

Tüm antikor molekülleri aynı temel yapısal özellikleri taşımaktadır. Fakat antijenleri bağlayan bölgelerde dikkate değer değişkenlik gözükmemektedir. Antijen bağlayıcı bölgelerin bu değişkenliği, farklı antikorların çeşitli sayıda yapısal olarak farklı antijeni bağlama kapasitesini açıklamaya yardımcı olmaktadır. Her bir bireyde, her biri aynı antijen bağlama bölgesine sahip antikor molekülleri üreten ve diğer klonlar tarafından üretilen antikorlardan bu bölgede farklı olan milyonlarca farklı B hücresi klonu bulunmaktadır. Tetanoz toksoid gibi bir immünojen tarafından humoral bir bağışıklık tepkisi tetiklendiğinde, antijen adı verilen yabancı maddenin farklı bölgelerine karşı bir canlıda çok sayıda antikor üretilmektedir. Bunlar genellikle 6 veya 8 aminoasit içeren antijenik determinantlar veya epitoplara olarak bilinmektedir. Her biri farklı bir B hücresi klonundan çıkan bu antikorlar, aynı antijenin özellikli epitopunu tanıyabilmektedir. Farklı B hücresi klonundan salgılanan antikorlar hep

birlikte poliklonal; aynı B hücresi klonundan köken alan bir antikor, bu nedenle benzersiz bir özgüllüğe sahip olan monoklonal antikor olarak adlandırılmaktadır [76].

3.1. Hibridoma Teknolojisi

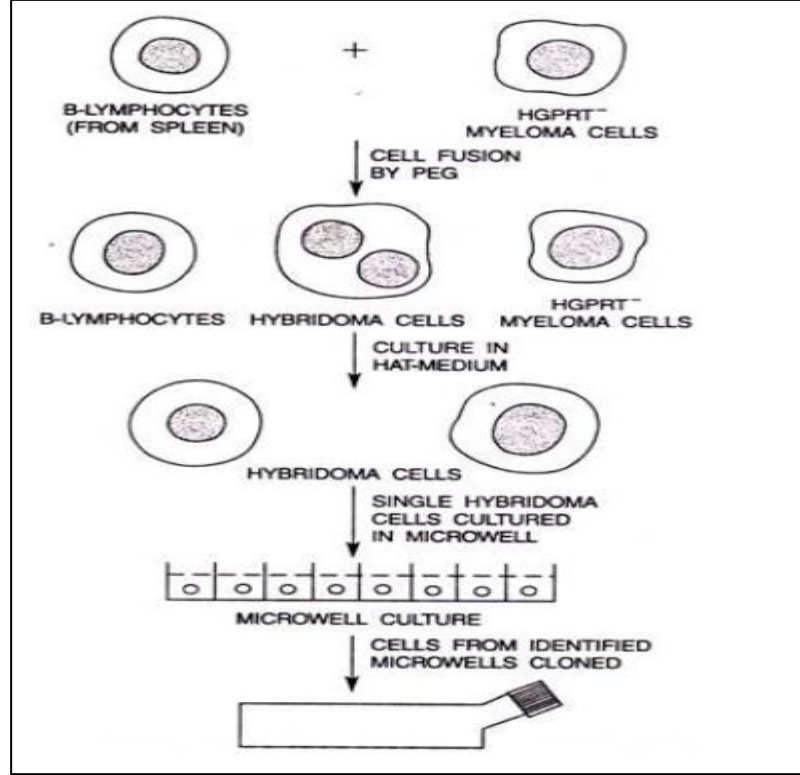
Hibridoma hücreleri, fazla miktarda ve arzu edilen monoklonal antikorların üretilmesi için tasarlanmış hücrelerdir. Monoklonal antikorlar, hibridoma teknolojisi olarak bilinen bir teknikle uzmanlaşmış hibridoma hücrelerinde üretilebilmektedirler [77]. Hibridoma teknolojisi, 1975 yılında Georges Kohler ve Cesar Milstein isimli bilim insanları tarafından keşfedilmiş olup, Niels Jerne ile birlikte 1984 yılında Nobel Fizyoloji ve Tıp ödülüne layık görülmüştür [78]. Bu teknoloji, fare antikor salgılayan plazma hücrelerini-ki bu hücreler doku kültüründe sürekli hücre bölünmesi için doğru genleri sağlar- ve ölümsüz murin miyeloma hücrelerini- işlevsel immünoglobulin genleri için-, her birinin yararları ile füzyonuna dayanmaktadır. Gerçekleştirilmek istenen bu füzyonun ana amacı, iki farklı hücre tipinin niteliği olan sürekli büyüme ve büyük miktarlarda saf antikor üretme yeteneğinin birleştirebilmesidir [77].

Hibridoma teknolojisinin temel olarak bağışıklama, füzyon ve seçim, görüntüleme, karakterizasyon ve görüntüleme olmak üzere 5 ana aşamadan oluşmaktadır (Şekil 3.2).

B-lenfositleri, monoklonal antikorların daha fazla üretilmesini tetikleyecek antijen ile immünize edilmiş bir hayvanın, örneğin, farenin dalağından izole edilmektedir. Bağışıklama, antijenin ya deri altından ya da periton boşluğunda, ardından antijenin takviye dozları ile uygun bir adjuvant yani yardımcı (bağışıklık tepkisini uyaran bir antijenik olmayan preparat) ile birlikte enjekte edilmesiyle elde edilir. Bağışıklama, kullanılan antijene özgü (klonal seçim) antikor üreten B lenfositlerinin popülasyonunu artırır ki bu da istenen hibridoma klonunu büyük ölçüde elde etme imkânı vermektedir [80].

Miyelomalar ise mineral yağı periton içine enjekte ederek birkaç farede indüklenmektedirler. Bu miyelomaların ilk örneklerinin çoğu, Potter (1972) tarafından BALB / c farelerinden izole edilmiştir ve bu hücreler MOPC kısaltması ile ifade belirtilmiştir. BALB / c miyelomalarının türevleri füzyonlar için en yaygın kullanılan eş haline gelmiştir. Miyelomalar, antikorların salgılanması için gerekli olan tüm hücresel sistemlere sahiptir ve aynı zamanda çoğu proteinleri salgılamaktadırlar.

Birden fazla tipte antikor salgılayan hibridomaların üretimini önlemek için, füzyonlar için kullanılan miyelomlar, fonksiyonel antikorların üretilmemesi için seçilmiştir [79].



Şekil 3.2: Hibridoma teknolojisinin aşamaları.

Laboratuvar hayvanları (ör. Fareler) önce bir antikora karşı bir antikorun izole edilmesine ilgi duyduğumuz bir antijene maruz bırakılmaktadır. Splenositler memeliden izole edildiğinde, B hücreleri, polietilen glikol veya Sendai virüsü kullanılarak HGPRT (hipoksantin-guanin fosforibosiltransferaz) geninden yoksun olan ölümsüzleştirilmiş miyeloma hücreleriyle kaynaştırılmaktadır.

Kaynaşmış hücreler, HAT (Hipoksantin Aminopetridin Timidin) ortamında inkübe edilmektedir. Miyeloma hücrelerindeki aminopetridin, novo veya kurtarma ortamı ile nükleotid üretmedikleri için ölür, nükleotid sentezine izin veren yolu bloke olmaktadır. Bu nedenle, kaynaşamayan miyeloma hücreleri ölür. Başarılı füzyon olamamış B hücreleri ise kısa ömürlü oldukları için ölürlür. B hücrelerinden gelen HGPRT geninin işlevsel olması nedeniyle sadece füzyonları başarılı bir şekilde gerçekleşmiş B hücresi-miyeloma melezleri hayatta kalmaktadır. Bu hücreler

antikorlar üretir (B hücrelerinin bir özelliği) ve ölümsüzdür (miyeloma hücrelerinin bir özelliği) [80].

İnkübe edilen ortam daha sonra her bir oyuğun sadece 1 hücresi içereceği ölçüde çok gözlü plakalara seyreltilir. Daha sonra her bir kuyucuktaki süpernatant, istenen antikor için kontrol edilebilir. Bir kuyucuktaki antikorlar aynı B hücresi tarafından üretildiğinden, bunlar aynı epitopa doğru yönlendirilecek ve monoklonal antikorlar olarak bilinecektir.

4. MATERYAL VE METOT

4.1. Materyal

4.1.1. Hücre Hattı Seçimi

CCDC-124 proteininin hücre içindeki lokalizasyonunu gözlemleyebilmek için hücre büyüklüğü ve organel yapılarının net bir şekilde görüntülenebildiği insan HeLa hücre hattı, sentrozom işaretleyicisi olarak kullanılan PLK-1 ile CCDC-124'ün hücre kolokalizasyonunun görülmesi için RPE PLK1 GFP hücre hattı, Western Blotting için ise gen aktarım oranı açısından yüksek verim sağlayan HEK293T hücre hattının kullanılması uygun görülmüştür.

4.1.1.1. HEK293T Hücreleri

HEK293 hücreleri, sağlıklı bir insan fetüsünden elde edilen embriyonik böbrek hücrelerinden türetilmiş bir hücre hattıdır. Bu özel hat normal HEK hücrelerinin adenovirüs 5 DNA'sı ile transformasyonu ve kültürlenmesi ile başlatılmıştır. Dönüşüm, viral genomdan yaklaşık 4.5 kilobazın HEK hücrelerinin 19 nolu kromozomuna entegre olmasıyla gerçekleşmiştir. Bu çalışma 1970'lerin başında, bilim adamı Alex Van der Eb tarafından, Leiden Üniversitesi'ndeki laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Hücreleri transfekte etmek için kullanılan kalsiyum fosfat tekniği de yine Van der Eb' in laboratuvarında çalışan diğer bir araştırmacı Frank Graham tarafından bulunmuştur. HEK293 ismi, Frank Graham'ın 293 üncü denemesi olduğu için bu şekilde adlandırılmıştır. Normal HEK293 hücrelerinden farklı olarak Hek293T hücreleri SV40 T-antijeni içermektedir. T antijeni, hücre döngüsünü inhibe eden proteinlere bağlanarak sürekli hücre döngüsüne giren bir popülasyon sağlamakta ve dolayısıyla transfeksiyon, transdüksiyon ve plazmit ampifikasyonu gibi uygulamalarda başarı oranını yükseltmektedir.

4.1.1.2. HeLa Hücreleri

Hela hücre hattı, Johns Hopkins Hastanesi Cerrahi Departmanı'nda Dr George O. Gey' in Doku Kültürü Laboratuvarında araştırmacı Mary Kubicek tarafından silindir tüp tekniği ile serviks kanseri biyopsi örneklerinin kültürü sonucu elde edilmiştir. Hücreler, biyopsi örneğinin sahibi 30 yaşındaki kadın hasta Henrietta Lacks'ın isim ve soyisimlerinin ilk iki harfi kullanılarak "HeLa" olarak adlandırılmıştır [43].

Organel büyüklüklerinin hücresel görüntüleme konusunda sağladığı avantajlarının yanı sıra hem kolay transfekte olması hem de yüksek verimde transfeksiyon etkinliği göstermesi immünfloresan deneyleri açısından bu hücre hattının seçilmesinde etken olmuştur.

4.1.1.3. RPE PLK-1 GFP Hücreleri

Retinal pigment epitelyumu (RPE), retinal görsel hücreleri besleyen nörosensor retinanın hemen dışındaki pigmentli hücre tabakasıdır ve altta yatan koroid ve üst retina görme hücrelerine sıkıca bağlıdır [44]. Bu bölgeden elde edilen RPE-340 hücreleri pGRN145 hTERT (insan telomeraz ters transkriptaz) vektörü ile transfekte edilmiş ve bu şekilde hTERT-RPE-1 ölümsüz hücre hattı elde edilmiştir [45].

Sentrozom, cilia ve orta cisimciğin düzenlenmesinde kritik görevleri olan PLK1 proteini, silia oluşturan birçok hücre hattına nazaran çok daha kısa zamanda (yaklaşık 48 saatte) ve yüksek oranda silia oluşumu göstermesi [46] ve hücre döngüsü sürecinin rahat bir şekilde gözlemlenebilmesinden ötürü FUCCI (Fluorescence Ubiquitin Cell Cycle Indicator) teknolojisinde de ağırlıklı kullanılan hTERT-RPE-1 hücre hattında çokça çalışılmıştır [47].

Bu çerçevede PLK-1 proteini ile ilişkili canlı hücre görüntüleme deneylerinde Burkard ve arkadaşlarının hTERT-RPE-1 hücre hattı üzerinde homolog rekombinasyon tekniğiyle oluşturduğu PLK-1^{as} (PLK-1'in katalitik cebinde geniş pürin analoglarını kabul edebileceği aminoasit modifikasyonları yapılmış GFP füzyon hat) hücre hattı kullanılmıştır [48].

4.1.2. Hücre Kültürü Solüsyonları

- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)

Besiyeri, yüksek glikoz içeriğine sahip DMEM (Gibco 41966) içerisine ek olarak %10 oranında fetal sığır serumu (Gibco 10270106), %1 oranında penisilin/streptomisin (Gibco 15140122) eklenerek hazırlanmıştır.

- Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS)

Hücre kültürü çalışmalarında ticari olarak satın alınmış olan DPBS (Gibco 14190) kullanılmıştır.

- Tripsin

Hücrelerin kültüre edildikleri petriyle temasını sağlayan fokal adhezyon moleküllerini ve birarada olmasını sağlayan kaderin moleküllerini parçalayan bir enzimdir. Çalışmalar sırasında -20°C' de saklanan enzim, DPBS içerisinde 2X olacak şekilde hazırlanmıştır.

- Hücre Dondurma Besiyeri

Fetal sığır serumu (Gibco 10270106) içerisine %10 Dimetil Sülfoksit (DMSO) (Santa Cruz Biotechnology SC-358801) eklenerek hazırlanan dondurma besiyeri, alüminyum folyo ile sarılıp, steril olarak +4 °C' de inkübe edilerek kullanılmıştır.

4.1.3. Western Blotting Solüsyonları

- Liziz Tamponu

Her deney için taze hazırlanması gereken liziz tamponu son konsantrasyonda, 500 mM Tris pH 8.0, 250 mM NaCl, %1 NP40 ve 1X proteaz inhibitörü barındıracak şekilde hazırlanmıştır.

- Jel Formülasyonları

Tris tamponu, SDS ve akrilamid ddH₂O içerisinde aşağıdaki tablolarda yer alan oranlar göz önüne alınarak hazırlanmıştır (Tablo 4.1) ve (Tablo 4.2).

Tablo 4.1: Yürütme jeli için gerekli malzemeler ve miktarlar.

YÜRÜTME JELİ	%12
1.5 M Tris-HCl pH 8.8	1250 µl
ddH ₂ O	1675 µl
% 30 Acryl / bis (37.5:1)	2000 µl
% 25 SDS	20 µl
%10 APS	50 µl
TEMED	5 µl

Tablo 4.2: Ayırma jeli için gerekli malzemeler ve miktarlar.

AYIRMA JELİ	%4
0.5 M Tris-HCl pH 6.8	1250 µl
ddH ₂ O	3009 µl
% 30 Acryl / bis (37.5:1)	666 µl
% 25 SDS	20 µl
%10 APS	50 µl
TEMED	5 µl

- Transfer Tamponu, 10X

30.3 g Tris ve 144 g glisin ddH₂O içerisinde çözülerek 1L' ye tamamlanmıştır. Her deneyde taze hazırlanmak koşuluyla, %10 10X transfer tamponu %20 metanol içerecek şekilde ddH₂O ile 1X'e seyreltilerek 4 °C'de saklanıp kullanılmıştır.

- Yürütme Tamponu, 1X

Her deneyde taze hazırlanmak koşuluyla son konsantrasyonda %10 10X transfer tamponu ve %4 oranda %25 SDS solüsyonundan içerecek şekilde eklenerek ddH₂O ile 1L'ye tamamlanmıştır.

- TBS, 10X

24.2 g Tris ve 87.6 g NaCl 1 L ddH₂O içerisinde çözülerek, pH'ı 7.6 olacak şekilde ayarlanmıştır.

- 1X TBS-T
10X TBS solüsyonu ddH₂O içerisinde 1X'e düşürülüp içerisine %1 Tween-20 eklenmiştir.
- 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8
ddH₂O içerisinde 36.34 g Tris çözülüp pH 8.8 'e ayarlanmış ve ddH₂O ile 200ml ye tamamlanmıştır.
- 1.5 M Tris-HCl, pH 6.8
ddH₂O içerisinde 12.11 g Tris çözülüp pH 6.8 'e ayarlanmış ve ddH₂O ile 200ml ye tamamlanmıştır.
- %10 APS Solüsyonu
Her deneyde taze hazırlanmak koşuluyla 0.1 g amonyum persülfat, 1 ml ddH₂O içerisinde çözülüp -20°C' de muhafaza edilerek kullanılmıştır.
- Strip Solüsyonu
Her deneyde taze hazırlanmak son konsantrasyon 100 mM β-mercaptoethanol, %2 SDS, 62.5 mM Tris-HCl içerecek ve pH 6.7 olacak şekilde hazırlanmıştır.
- 50X Proteaz İnhibitörü solüsyonu
1 tablet proteaz inhibitörü (Roche 11 873 580 001) 1ml ddH₂O içerisinde çözülüp -20°C' de muhafaza edilerek kullanılmıştır.
- WB Bloklama solüsyonu
1X TBS-T içerisinde ağırlıkça %5 BSA veya süt tozu çözülerek hazırlanmıştır.

4.1.4. İmmün Boyama Solüsyonları

- Yıkama Solüsyonu (1X DPBS-T)
1X DPBS'in içerisine %1 Triton-X olacak şekilde eklenerek hazırlanmıştır.

- IF Bloklama Solüsyonu

1X DPBS-T içerisinde ağırlıkça %2 BSA veya süt tozu çözülerek hazırlanmıştır.

- DAPI Boyası

1X DPBS içerisinde 1/10.000 oranında DAPI solüsyonu eklenerek hazırlanmıştır.

4.1.5. SDS-PAGE Solüsyonları

Tris tamponu, SDS ve akrilamid ddH₂O içerisinde aşağıdaki tablolarda yer alan oranlar göz önüne alınarak hazırlanmıştır (Tablo 4.3) ve (Tablo 4.4).

Tablo 4.3: Yürütme jeli için gerekli malzemeler ve miktarlar.

YÜRÜTME JELİ	%12
1.5 M Tris-HCl pH 8.8	1250 µl
ddH ₂ O	1675 µl
% 30 Acryl / bis (37.5:1)	2000 µl
% 25 SDS	20 µl
% 10 APS	50 µl
TEMED	5 µl

Tablo 4.4: Ayırma jeli için gerekli malzemeler ve miktarlar.

AYIRMA JELİ	%4
0.5 M Tris-HCl pH 6.8	1250 µl
ddH ₂ O	3009 µl
% 30 Acryl / bis (37.5:1)	666 µl
% 25 SDS	20 µl
% 10 APS	50 µl
TEMED	5 µl

- Transfer Tamponu, 10X

30.3 g Tris ve 144 g glisin ddH₂O içerisinde çözülerek 1L' ye tamamlanmıştır. Her deneyde taze hazırlanmak koşuluyla, %10 10X transfer tamponu %20 metanol içerecek şekilde ddH₂O ile 1X'e seyreltilerek 4 °C'de saklanıp kullanılmıştır.

- Yürütme Tamponu, 1X

Her deneyde taze hazırlanmak koşuluyla son konsantrasyonda %10 10X transfer tamponu ve %4 oranda %25 SDS solüsyonundan içerecek şekilde eklenerek ddH₂O ile 1L'ye tamamlanmıştır.

4.1.6. Coomassie Blue Staining Solüsyonları

- Fixleme Solüsyonu

ddH₂O içerisinde %50 metanol ve %10 asetik asit içeren solüsyon hazırlanmıştır.

- Boyama Solüsyonu

ddH₂O içerisinde 0.1% Coomassie Brilliant Mavisi, %50 metanol ve %10 asetik asit içeren solüsyon hazırlanmıştır.

- Yıkama Solüsyonu

ddH₂O içerisinde %40 metanol, %10 asetik asit içeren solüsyon hazırlanmıştır.

- Saklama Solüsyonu

ddH₂O içerisinde %10 asetik asit içeren solüsyon hazırlanmıştır.

4.1.7. Protein G Kolonu ile Affinite Kromatografisi Solüsyonları

- Bağlanma solüsyonu

ddH₂O içerisinde 0.02 M Sodyum Fosfat kimyasalının pH'sını 7.0'a ayarlanarak hazırlanmıştır.

- Yıkama solüsyonu

ddH₂O içerisinde 0.1 M Glisin-HCL çözeltisinin pH'sı 2.7'ye ayarlanarak bir solüsyon hazırlanmıştır.

- Nötrleştirici solüsyon

ddH₂O içerisinde 1 M Tris-HCL çözeltisinin pH'sı 9.0'a ayarlanarak bir solüsyon hazırlanmıştır.

- Alkol solüsyonu

ddH₂O içerisinde 20%'lik etanol solüsyonu hazırlanmıştır.

4.1.8. Hücre Transfeksiyonu

İmmün boyama çalışmalarında kullanılan HEK293T hücrelerinin transfeksiyonunda ise hem ucuz hem de efektif bir reaktif olan PEI kullanılmıştır (Tablo 4.5).

Tablo 4.5: HEK293T transfeksiyon malzemeleri ve miktarları.

KÜLTÜR KABI	HÜCRE SAYISI	DNA MİKTARI	PEI MİKTARI	SERUMSUZ BESİYERİ
10 cm petri	2.10 ⁶	6.25 µg	18.75 µl	10 ml

4.1.9. Kimyasal Malzemeler

Deneylerde kullanılan kimyasallara, kimyasalların markalarına ve katalog numaralarına ait liste aşağıdaki Tablo 4.6' da yer almaktadır.

Tablo 4.6: Kullanılan kimyasal malzemeler.

KİMYASALIN ADI	KİMYASALIN MARKASI	KİMYASALIN KATALOG NUMARASI
2-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich	M6250
3X-SDS Sample Buffer	Biolabs	B7703S
6X Purple Loading Dye	NEB	B7024S
Bradford Reagent	Sigma Aldrich	B6916
BSA	Sigma Aldrich	7906
Dimethyl Sulfoxide (DMSO)	Santa Cruz Biotech.	SC-358801
DMEM	Gibco	41966
DMEM/F-12	Gibco	31330-038
DPBS	Gibco	14190
Ethanol	Sigma Aldrich	16368
Fetal Bovine Serum (FBS)	Gibco	10270-106
Fluo. mounting medium	DAKO	S3023
Glycine	MP Biomedicals	808822
Hidroklorik asit	Sigma Aldrich	071102
L-Glutamine	Gibco	25030-024
Metanol	EMD Millipore	1.06009
PBS Tablet	Sigma Aldrich	P4417
Penicillin/Streptomycin	Gibco	15140-122
Polyethylenimine (PEI)	Polysciences	23966
Protein G HP Column	GE Healthcare	17-0618-01
Protein Marker	Thermofisher	26616
Sodium dodecyl sulfate	Sigma Aldrich	5750
TEMED	Sigma Aldrich	T9281
Triton-X	Sigma Aldrich	T8787
Trizma base (Tris)	Sigma Aldrich	T6066
Trypsin-EDTA	Gibco	15400054
Tween 20	Sigma Aldrich	P1379

4.1.10. Kullanılan Cihazlar

Deneylerde kullanılan cihazlara, cihazların markalarına ve model numaralarına ait liste aşağıdaki Tablo 4.7' de yer almaktadır.

Tablo 4.7: Kullanılan cihazlar.

CİHAZIN ADI	CİHAZIN MARKASI	CİHAZIN MODELİ
Agaroz Jel ve Immunoblot Görüntüleme Cihazı	BIO-RAD	ChemiDoc XRS+
Agaroz Jel Yürütme Sistemi	BIO-RAD	Wide Mini-Sub® Cell GT Cell
Canlı Hücre Görüntüleme Mikroskobu	Leica	DMi8
Çalkalayıcı	Labnet	ROCKER 25
Döndürücü/Çalkalayıcı	Biosan	RS-60
Floresan Mikroskobu	NİKON	H600L
Floresan Mikroskop (Upright)	Leica	DM2500 LED
Hassas Terazı	ADAM	PGW 253i
Affinite Kromatografisi	GE HealthCare AKTA Purifier	Inertsil ODS-3V 5µm
WesterN Blotting Ekipmanları ve Güç Kaynağı	Biorad	
İnkübatör	Heal Force	Smart Cell
Kuru Banyo (Isı Bloğu)	Benchmark	BSH1002-E
Laminar Akım Kabini	Cryste	
pH Metre	Hanna	HI-2211
Soğutmalı Eppendorf	HITACHI	CT-15RE
Santrifüj Cihazı	NÜVE	NF-1200R
Su Banyosu	Wisd	WiseBath
Vortex	SCIOLOGEX	MX-S

4.1.11. Kullanılan Antikorlar

Deneylerde kullanılan antikorlara ait bilgiler; western blotting ve immün boyama çalışmaları sırasında kullanılma oranlarına ilişkin bilgiler Tablo 4.8'de gösterilmiştir.

Tablo 4.8: Kullanılan antikorlar.

ANTİKOR	ELDE EDİLDİĞİ ORGANİZMA	FİRMA	KATALOG NUMARASI	WB ORANI	IF ORANI
Anti-Mouse IgG	Keçi	Sigma Aldrich	2429		1/5000
CCDC-124 C Terminus	Tavşan(100-150)	Bethyl Laboratories	A301-835	1/1000	1/200
CCDC-124 Middle	Tavşan(100-150)	Bethyl Laboratories	A301-834A	1/1000	1/200
CCDC-124 N-Terminus	Tavşan	Abcam		1/1000	1/200
Mouse Alexa-488	Fare	Cell Signaling Technology	4408S		1/500
Mouse Alexa-555	Fare	Cell Signaling Technology	4409S		1/500
Rabbit Alexa-488	Tavşan	Cell Signaling Technology	4413S		1/500
Rabbit Alexa-555	Tavşan	Cell Signaling Technology	4412S		1/500
γ -Tubulin	Fare(38-53)	Abcam	ab11316		1/200
γ -Tubulin	Tavşan	Abcam	ab27074		1/200

4.2. Metot

4.2.1. Hücre Kültürü

4.2.1.1. Hücre Kültürü Ortamı

Hek293T ve HeLa hücre hatları %10 FBS ve %1 penisilin/streptomisin içeren yüksek glikozlu DMEM besi yeri ortamında, RPE-PLK1 hücre hattı DMEM/F12, %10 FBS, %1 Pen/Strep ve %1 L-Glutamin içeren besi ortamında ve hibridoma klonu olan 4B3 klonu ise %20 FBS ve %1 penisilin/streptomisin içeren yüksek glikozlu DMEM besi yerinde 37°C sıcaklık ve %5 CO₂ koşulları barındıran inkübatörde muhafaza edilmiştir. Hücrelerin besi yerleri ortalama 3-4 günde bir değiştirilmiş, hücre yoğunluğu %80 civarına geldiğinde alt kültürlenme yapılmıştır.

4.2.1.2. Alt Kültürleme

Alt kültürleme için hücrelerin besi yerleri vakum yardımıyla uzaklaştırılmıştır. Daha sonra ortamda kalan eski besiyeri kalıntılardan uzaklaştırmak için 1X PBS ile yıkanmıştır. Hücrelerin hücrelerle ve büyüdüğü ortamla bağlantılarını koparmak için 1X Tripsin ilave edilip, enzimin aktivasyonunu sağlamak için yaklaşık 2 dk 37°C sıcaklık ve %5 CO₂ inkübatörde inkübe edilmiştir. Enzim aktivasyonunu durdurmak için ortama yeni besi yeri eklenip, mikropipet ile pipetajlanıp oda sıcaklığında 1500 rpm'de 5 dk santrifüjlendi. Santrifüjden alınan hücrelerin üst sıvısı vakum aracılığıyla çekilir ve ardından yeni besi yeri eklenerek homojenizasyonu sağlandı.

4B3 hibridoma klonu içinse besiyerinin renk değişimine bağlı olarak, hücrelerin pipet yardımıyla homojenizasyonu sağlanmış olup, 1500 rpm'de 5 dk santrifüjlenir ve ardından üst sıvı toplanmak üzere ayrılır, kalan pellet yeni besi yerine alındı.

4.2.1.3. Hücrelerin Dondurulması

Hücreler, yaklaşık %40 çoğalma gözlemlendiği anda besiyeri ortamından eski besi yeri çekildikten sonra 1X PBS ile yıkanan hücrelere uygulanan tripsin ile 1500 rpm de 5dk santrifüj yapılmıştır. Üst sıvı çekilip, pellet dondurma besiyeri olarak hazırlanan %5 DMSO + %95 FBS solüsyonu içerisinde çözülür ve kriyotüplere dağıtılarak -80°C'de 1 hafta saklanıp daha sonra hücreler -80°C'den sıvı azota alınmıştır.

4.2.1.4. Dondurulmuş Stok Hücrelerin Açılması

Sıvı nitrojen tankından alınan hücreler 37°C'deki su banyosunda 1-2 dakika bekletildi. Daha sonra 15ml lik falkon tüp içerisine 10ml taze büyüme besiyeri eklenip hücreler içerisine transfer edildi. 1500 rpm de 5 dk santrifüj yapılan hücrelerin üst sıvısı atılıp, pellet 7ml taze besiyerinde çözülerek T25 flaska ekildi.

4.2.1.5. Hibridoma Üst Sıvılarının Saklanması

Hibridoma hücre klonlarının alt kültürleme sırasında toplanan üst sıvıları kontaminasyon riskinden ötürü %0,2 oranında Sodium Azide eklenerek -20°C'de saklandı.

4.2.2. Geçici Hücre Hattı Transfeksiyonu

HEK 293T hücreleri her kuyucukta 2 milyon olacak şekilde 10cm'lik kültür kabında ekilerek 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Ekimin yapıldığı zamandan 24 saat sonra her kuyucuk 1ml serumsuz besiyeri içerisine gerekli miktarda plazmid DNA eklendikten sonra birkaç defa yavaşça pipetlenip oda sıcaklığında 5dk inkübasyon yapıldı. Ardından üzerine PEI reaktifinden eklenip tekrar yavaşça pipetleme yapıp 15 dk karanlıkta oda sıcaklığında bekletilen karışım 9ml taze serumsuz besiyeri eklenen hücrelerin üzerine damlatılıp 24 saat 37°C 'de %5 CO₂ sağlayan inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda besiyeri taze serumlu besiyeri ile değiştirilip transfekte edilen plazmid DNA'nın ekspresyonunun sağlanması için 24 saat süre ile inkübasyona bırakıldı.

4.2.3. Protein G Kolonu ile Affinite Kromatografi

-20 °C'de muhafaza edilmek üzere hibridoma hücrelerinin üst sıvısı, 1500 rpm'de 5 dk'lık süre ile santrifüjden geçirilmiş ve sonrasında ise 0.45'lik filtre aracılığıyla filtrasyonu gerçekleştirilmiştir. Üst sıvıdaki kontaminasyonu engellemek için 0.2M NaN₃ eklenmiştir.

Donmuş olan üst sıvı, buzun içine alınmış, kendi ısını kaybetmeden erimesi sağlanmıştır.

Saflaştırmayı gerçekleştireceğimiz cihaz, ilk olarak 100 ml kadar %20'lik etanol ve ardından 60 ml kadar da ddH₂O ile temizlendi. Örneği yükleyeceğimiz alan bağlanma solüsyonuyla dolduruldu. Bu sırada almaçlar da bağlanma solüsyonu içerisinde bekletildi. Daha sonra sistem bağlanma solüsyonuyla yıkandı.

+4 °C'de muhafaza edilen IgG kolonu sisteme takıldı. Kolon sisteme takıldıktan hemen sonra A almaç bağlanma solüsyonuna, B almaç ise elution solüsyonuna

takıldı. Buzda bekletilen 50 ml miktarında olan üst sıvı, 10 ml'lik enjektör yardımıyla hava ve köpük bırakmadan sisteme yüklendi.

Cihazdan geçen örneklerin boşalacağı tüplere nötrleştirmek amacıyla her birine pH'sı 9.4 olan TrisHCl'den 50 µl eklendi. Cihazda kayıtlı olan IgG kolonu için uygun metodu girdikten sonra saflaştırılma işlemi başlatıldı. Saflaştırma işlemi sona erdikten sonra kolon, 1 ml'de %20 etanol ile yıkayıp, +4'de kaldırıldı. Son olarak sistemin temizliği için ddH₂O ile sonra ise %20 etanol ile yıkanıp kapatıldı, almaçlar ise %20'lik etanole takıldı.

4.2.4. Western Blotting

Hücreler 10 cm petriden 1X soğuk DPBS ile kazınarak toplanıp ve 1500 rpm de 5 dk santrifüj yapıldı. Üst sıvı atılıp hücre pelletinin üzerine 200 µl Liziz tamponu eklendi. 30 dk buzda inkübasyona bırakılan karışım 10 dakikada bir 10 s vortekslendi. İnkübasyon sonrası 14000rpm de 30 dk 4 °C'de santrifüj yapıldı ve üst sıvı (proteinlerin bulunduğu faz) toplandı. Protein konsantrasyonu belirlendi, her kuyuda 30µg protein olacak şekilde eppendorflara ayrıldı. Üzerine 3X SDS örnek tamponu eklenir ve 100 °C'de 5dk denatüre edildi. Aynı işlem saflaştırılmış protein ile de yapıldı. Ardından 1X yürütme tamponu içerisinde SDS-PAGE'de yaklaşık 1,5 saat yürütülen örnekler, 1X Transfer tamponu içerisinde 100V gerilim altında 1,5 saat boyunca PVDF membrana transfer edildi. Transfer sonrası gece boyu WB bloklama solüsyonunda 4 °C'de çalkalanan membrana taze WB bloklama solüsyonu içerisinde oda sıcaklığında çalkalamalı inkübasyonla 2 saat birincil antikor uygulaması yapıldı. Ardından 3 defa 10'ar dakika 1X TBS-T ile yıkanan membrana yine taze WB bloklama solüsyonu içerisinde oda sıcaklığında çalkalamalı inkübasyonla 1 saat ışıktan korumalı şekilde ikincil antikor uygulaması yapıldı Uygulama sonrası 3 defa 10'ar dakika 1X TBS-T ile yıkanan membranın ECL solüsyonu ile görüntüsü alındı.

4.2.5. Coomassie Blue Staining

SDS-PAGE ile yürütülen jel, dikkatli bir şekilde kaba alındı. Kabin içerisinde hazırlanan Coomassie Mavisi Boyama solüsyonlarından ilk önce örneğin üzerini kapatacak bir biçimde hazırlanan Coomassie Mavisi Boyama solüsyonu eklendi ve ışıktan etkilenmemesi için üzeri alüminyum folyo ile kaplanıp, çalkalayıcıda yaklaşık

3-4 saat bekletildi. Bekletilen jele nüfuz eden boyayı yıkamak için yıkama solüsyonunda 3 kere 30dk lık periyotlar ile bekletildi. Daha sonra jelin görüntüleme cihazından görüntüsü alındı.

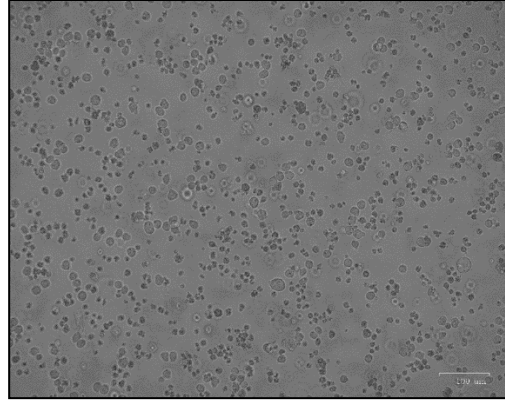
4.2.6. İmmün Boyama

Deneyin başlangıcından bir gün önce 6-kuyulu petriye steril lamel konup üzerine 20×10^4 hücre ekildi. Ertesi gün 2 defa 5'er dk 1X DPBS ile yıkanan hücreler %100 metanol ile 10dk $-20\text{ }^\circ\text{C}$ ' de inkübasyona bırakıldı. Ardından 3 defa 5'er dk yıkama solüsyonuyla yıkanan hücelere bloklama solüsyonu eklenip 1 saat oda sıcaklığında çalkalamalı inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası bloklama solüsyonu ortamdan çekilir ve taze bloklama solüsyonu içerisine 1/200 oranında primer antikor eklenip hücreler tekrar oda sıcaklığında 1 saat çalkalamalı inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası primer antikor solüsyonu ortamdan çekildi ve 3 defa 5'er dk yıkama solüsyonuyla yıkandı. Devamında taze bloklama solüsyonu içerisine 1/500 oranında ikincil antikor eklenip hücreler ışıktan korumalı bir şekilde oda sıcaklığında 1 saat çalkalamalı inkübasyona bırakıldı. İkincil antikor inkübasyonundan sonra hücreler 2 defa yıkama solüsyonu ile yıkanıp 15 dk oda sıcaklığında DAPI solüsyonu içerisinde çalkalamalı inkübasyona bırakıldı. DAPI uygulamasından sonra 15dk ddH₂O ile yıkanıp DAKO floresans kapama solüsyonu ile lam üzerine kapatıldı.

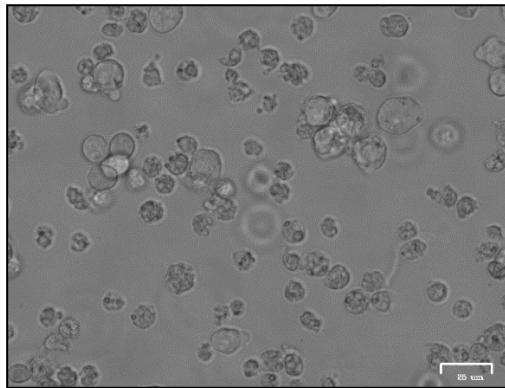
5. SONUÇLAR

5.1. 4B3 Hibridoma Klonunun Büyütülmesi

2010 yılında hibridoma teknolojisi ile üretilen hibridoma klonlarından en iyi sonuç veren klon olan 4B3 hibridoma hücre klonu [3], canlılığı yitirilmeden hücre kültürü ortamında high glucose dmem besi yeri ile sağlıklı bir şekilde büyütüldü (Şekil 5.1). Kullanılan besi yerindeki asidite, renk değişimiyle gözlemlenmiştir. Sarı ve turuncu arasında renk değiştiren besi yerindeki hücreler, pasajlanarak yeni besi yeri ortamına alınmıştır.



Şekil 5.1: Hibridoma hücrelerinin 100 µm’de mikroskop görüntüsü.

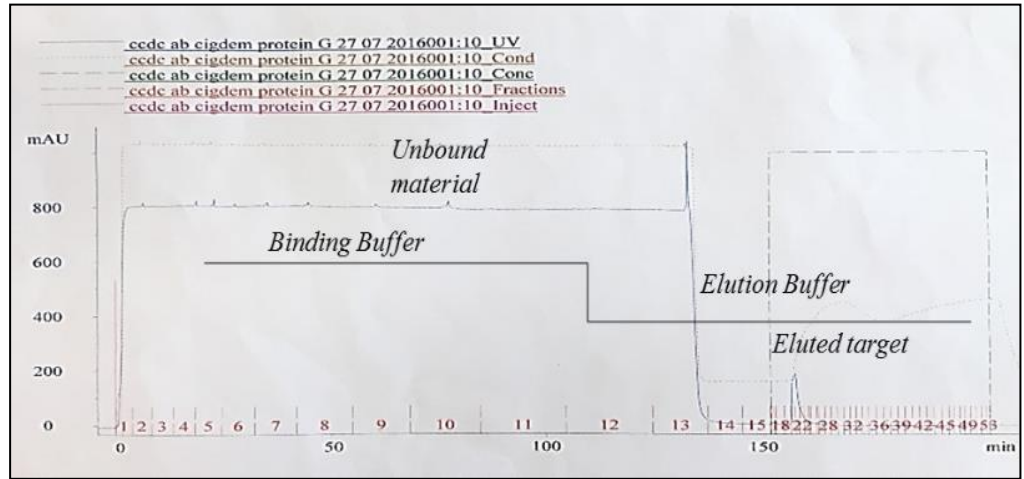


Şekil 5.2: Hibridoma hücrelerinin 25 µm’de mikroskop görüntüsü.

Yapısal olarak adherent olmayan, süspansiyon halde bulunan (Şekil 5.2) hibridoma hücreleri, pasajlanırken tripsin gibi enzimler kullanılmamıştır. Şekil 5.1 ve 5.2’de görülen hibridoma hücreleri, T75 flaskının içerisinde bulunmaktadır.

5.2. Üst Sıvının Protein G Kolonu ile Affinite Kromatografisi

Daha önce de belirttiğimiz hibridoma hücresi klonlarından 4B3 klonunun hücre kültürü çalışmaları sırasında elde edilen üst sıvısı-ki monoklonal antikor içermektedir., ile protein G kolonu ile affinite kromatografisi yapılmıştır.



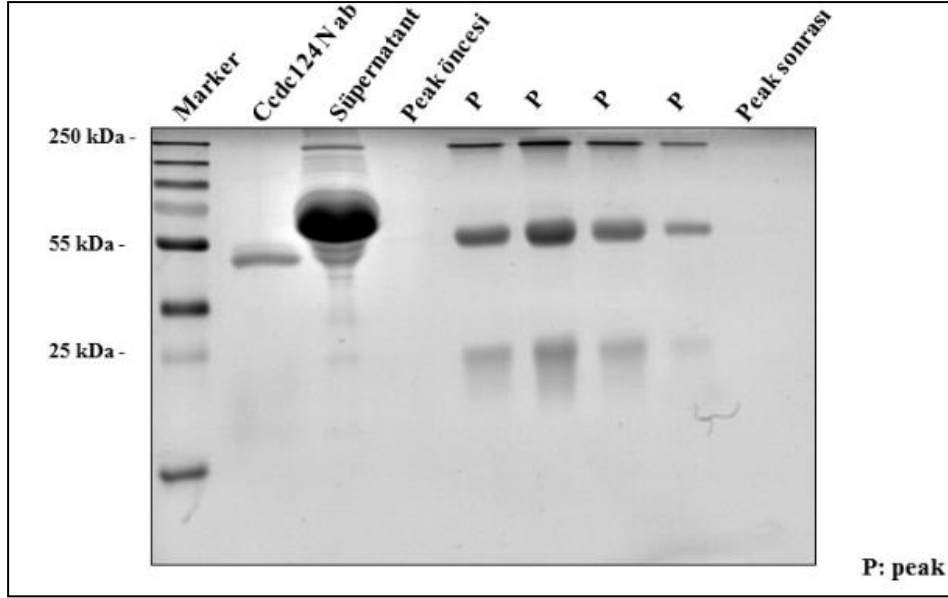
Şekil 5.3: Üst sıvının protein G kolonu ile affinite kromatografisi.

Yapılan bu çalışmada, Şekil 5.3’te görüldüğü üzere kromatografi cihazına yüklenen örneklerin bir kısmı protein G kolonuna bağlanmazken bir kısmı ise bağlanmıştır. Kolona bağlanmasının göstergesi olan peakin dâhilinde olan örnekler, tüp içerisinde toplanmış ve buzda bekletilmiştir.

5.3. Monoklonal Antikorların Coomassie Blue Staining ile Analizi

Protein G kolonu ile saflaştırılan örneklerdeki protein varlığı diğer bir ifadeyle immunoglobulinel yapıda olduğunu tespit etmek için yapılan coomassie blue staining

deneyi yapılmıştır. Literatürde bilinen haliyle immunoglobulin proteinin ağır ve hafif olmak üzere iki tane zincir içerdiği bilinmektedir. Ağır zincirin yaklaşık olarak 50 kDa ağırlığında, hafif zincirin ise 20 kDa ağırlığında olduğu görülmüştür.

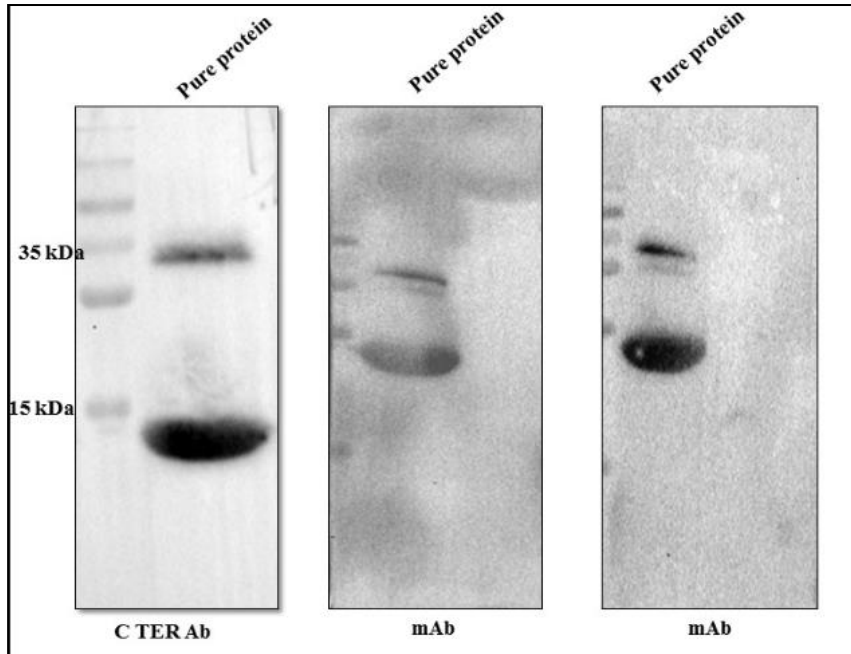


Şekil 5.4: Monoklonal antikorların coomassie blue staining ile analizi.

Saflaştırdığımız örnekler ile yaptığımız bu deneyde, olumlu sonuç beklediğimiz örneklerle birlikte pozitif ve negatif kontrol de kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak CCDC-124 proteinin N Terminal'ine özgü antikor ve saflaştırılmayan hibridoma hücresinin üst sıvısı kullanılmıştır. Pozitif kontrollerden çıkan sonuç, N Terminal antikorun jelde yeterince yürütülmemesi veya jelle örneği yüklediğimiz esnada yapılan denatürasyonun tam olarak gerçekleşmediği için 50 kDa'da bant vermiş, hafif zincir olan 20 kDa ağırlığında ise bant gözlemlenmemiştir. Hibridoma üst sıvısı ise bünyesinde barındırdığı yoğun proteinlerden dolayı jelin yürütülmesi esnasında zorlanmıştır. Aynı zamanda süpernatantta gözlemlenen kalın bandın yaklaşık olarak 66 kDa ağırlığında olan albümin proteini olduğu düşünülmektedir. Protein G kolonuna bağlanmayan örneklerden alınan negatif kontroller ise bize atık örneklerin immunoglobulin ihtiva etmediğini göstermiştir. Protein G kolonuna bağlanan örneklerin 55 kDa ve 25 kDa ağırlığında iki ayrı bant vermiş olması bizlere bu proteinlerin immunoglobulin olduğunu göstermiştir.

5.4. Monoklonal Antikorların Western Blotting ile Analizi

İmmunoglobulin yapıda olduğu analiz edilen ve antikor olduğu ispat edilen monoklonal antikorların, CCDC-124 proteinine özgü olduğunu göstermek için Western Blotting analizi yapıldı. Bu deneyin amacı, SDS-PAGE ile yürütülen protein örneklerine birincil antikor olarak ticari ve saflaştırdığımız monoklonal antikorlarla ile muamele etmektir. Yapılan Western Blotting analizleriyle, saflaştırılan monoklonal antikorların yüksek μg proteinleri tanımakta zorluk çektiği görülmüştür. HEK293T CMV-CCDC-124 hücre hattından alınan lizatlar ve *E.coli* 'den His-Tag ile saflaştırılan CCDC-124 proteinlerini ile yapılan deneyde, lizatları tanımadığı ortaya konulmuştur.

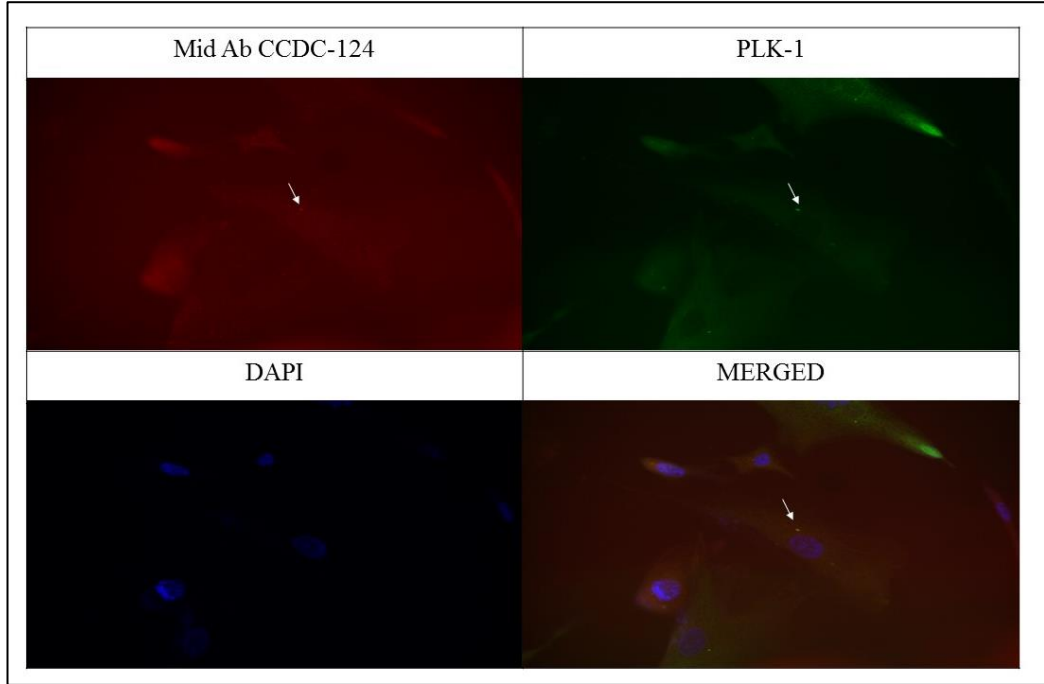


Şekil 5.5: Monoklonal antikorların western blotting ile analizi.

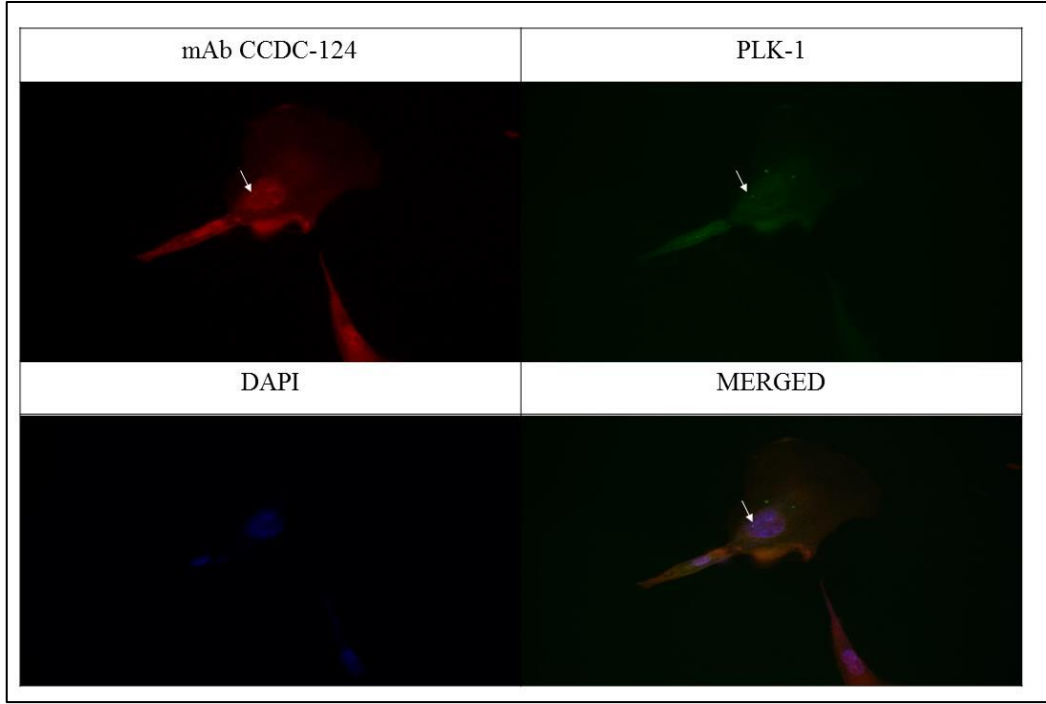
Yapılan Western Blotting çalışmaları bize saf CCDC-124 proteini örneğinde gerek ticari alınan poliklonal antikorlarda gerekse saflaştırdığımız monoklonal antikorlarda, CCDC-124 proteinin 35 kDa ve 15 kDa civarında olmak üzere iki izoformu olduğunu göstermiştir.

5.5. Monoklonal Antikorların İmmün Boyama ile Analizi

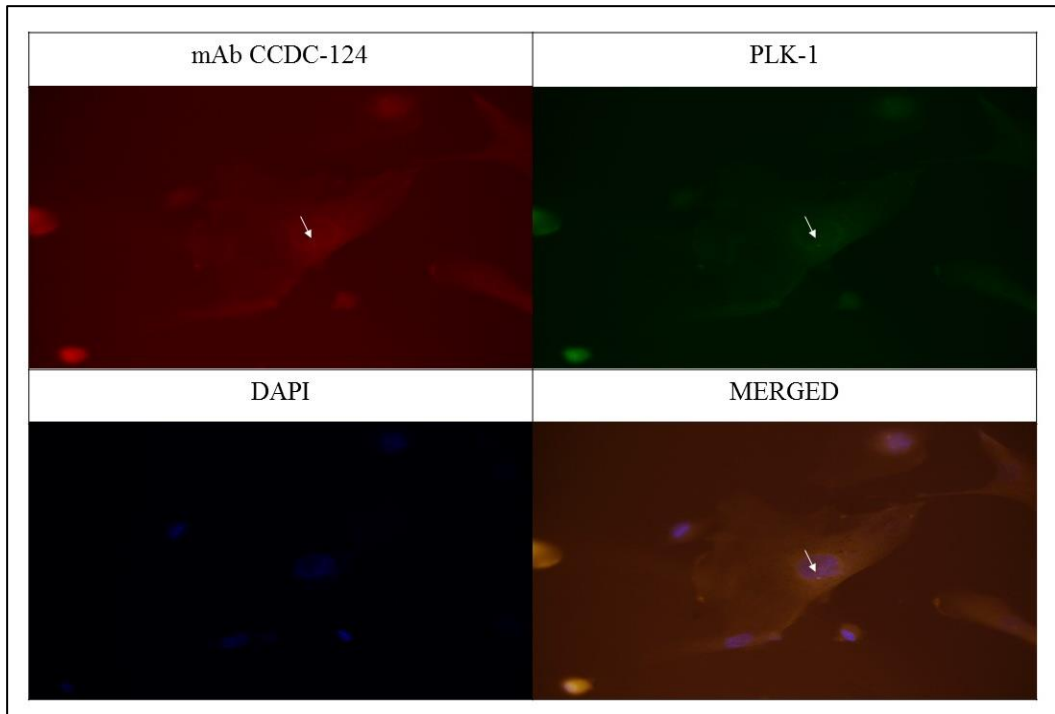
Saflaştırdığımız monoklonal antikorlar, immün boyama deneyleri ile analiz edilmiştir. Bu deneylerde, diğer analizler sırasında kullandığımız CCDC-124 proteinine özgü ticari poliklonal antikorların aksine saflaştırılan monoklonal antikorlar hücre içinde efektif sonuç vermiştir. Poliklonal antikorların, hücre içinde proteine özgü olmayan pek çok yapıya bağlandığı ve kirli bir arka plan verdiği; monoklonal antikorların ise tek bir epitoptan tanıdığı CCDC-124 proteini ile olumlu sonuç vermiştir (Şekil 5.7). Aynı zamanda yapılan immün boyama çalışmalarında, ticari poliklonal antikorların aksine monoklonal antikorların seyreltme yüzdeki daha az olmalı olduğu sonucu çıkmıştır.



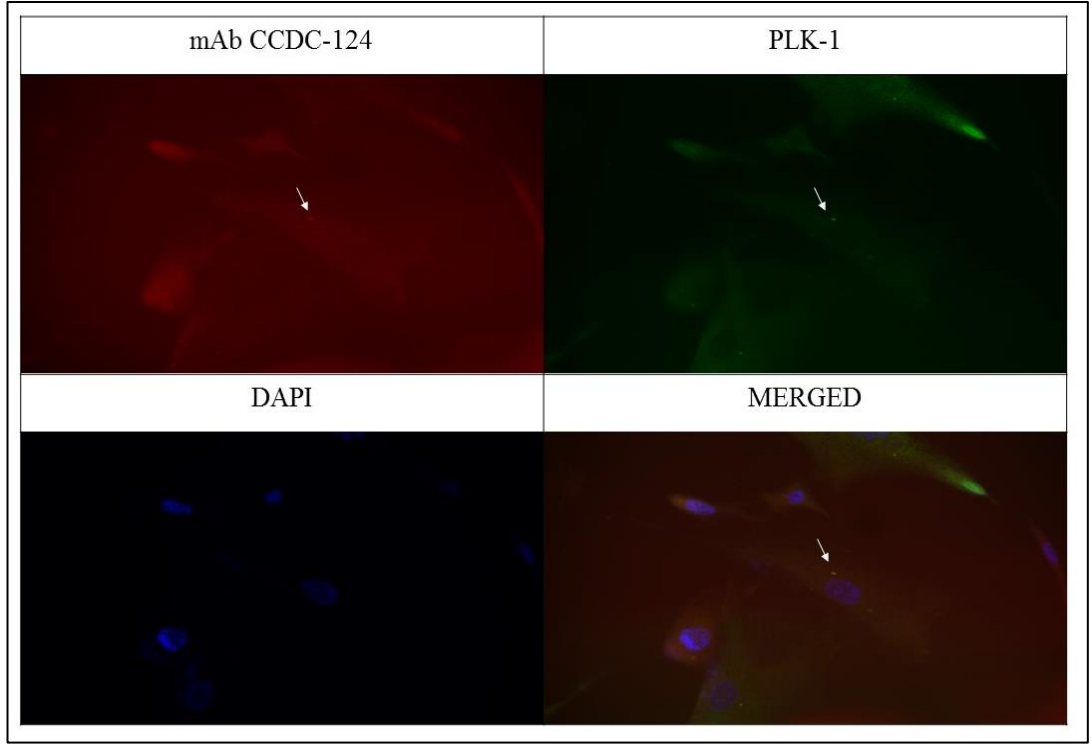
Şekil 5.6: RPE-PLK1 GFP hücreleriyle immün boyama (Mid pAb).



Şekil 5.7: RPE-PLK1 GFP hücreleriyle immün boyama (mAb).



Şekil 5.8: RPE-PLK1 GFP hücreleriyle immün boyama (mAb).



Şekil 5.9: RPE-PLK1 GFP hücreleriyle immün boyama (mAb).

RPE-PLK GFP hücre hattını kullanarak yaptığımız immün boyama çalışmalarında kullanılan monoklonal antikor ile PLK-1 ile CCDC-124'ün hücre içinde kolokalize olduğu görülmüştür.

Aynı zamanda saflaştırılan monoklonal antikorlar, ilk defa immün boyama deneylerinde kullanılmış olup hücre içinde ilk defa gözlemlenme fırsatını doğurmuştur.

6. TARTIŞMA

4B3 hibridoma klonundan hücre kültürü çalışmaları ile alınan üst sıvı affinite kromatografisi ile saflaştırılmış ve immün boyama, biyokimyasal metotlar ile analiz edilmiştir.

Bu çalışmalar ışığında, üst sıvının saflaştırılması sırasında yapılan kromatografi çalışmaları bize monoklonal antikorun protein G ailesinden geldiğini göstermiştir.

Saflaştırılan monoklonal antikorları tayin etmek için yapılan deneylerden biri olan western blottingte, HEK293T CMV - CCDC-124 hücre hattı lizatlarını tanıyamaması, saf proteini tanıması bize bu proteine karşı düşük özgüllüğü olduğunu düşündürmektedir. Western Blotting deneylerinden çıkan bir başka sonuç, proteini tek bir epitop denilen özel bölgeden tanıyan monoklonal antikorun, bu deneyler sırasında bu bölgenin denatüre olması olabileceği ve yüksek ısıya maruz kalmasından ötürü üç boyutlu yapısının bozulmasıdır. Aynı zamanda western blotting çalışmalarında kullanılan His-Tag püre CCDC-124 örneğiyle yapılan analizlerde birincil antikorlar olan poliklonal ve monoklonal antikorlar, CCDC-124 proteinini 33 kDa ve 15 kDa civarında olmak üzere iki bant verdiği gösterilmiştir. Bu sonuç bize, bu proteinin saf halde iki ayrı izoformu olduğunu düşündürmektedir.

İmmün boyama deneylerindeki veriler bize, saflaştırdığımız monoklonal antikorun poliklonal antikora kıyasla daha spesifik olduğu sonucunu göstermiştir. Tek bir B hücresi klonundan ve dolayısıyla tek bir epitopa özgü monoklonal antikorların bu deneyler sırasında olumlu sonuç verdiği görülmüştür. Aynı zamanda ilk defa immün boyama deneylerinde ilk defa kullanılan CCDC-124 monoklonal antikor, poliklonal antikorların aksine az seyreltik olmasına rağmen özgüllüğü yüksek derecededir. İmmün boyama deneyleri esnasında kontrol amaçlı kullanılan poliklonal antikorlar, çekirdek ve sitoplazmada spesifik olmayan bağlanmalar gerçekleştirmiş ve yapılan deneyler sırasında kullanmanın riskli olduğunu göstermiştir. Özellikle poliklonal antikor ile yapılacak olan immün boyama deneylerinde, olası CCDC-124 ile kolokalize olması beklenen proteinlerin seçilmesini zorlaştıracaktır. Tüm bu immün boyama deney verilerinin ışığında monoklonal antikor kullanmanın hem zamansal hem de analizlerdeki kesinlik adına uygun olduğu düşünülmektedir. Hücre içindeki işlevi, yeri ve hücre içindeki olası eşleri henüz kesin olmayan CCDC-124 proteini ile yapılacak olan immün boyama deneylerinde bu antikorun kullanılması

deney verilerinde olumlu sonuç çıkartacaktır. Aynı zamanda kanserli hücre hatlarında da aynı işlevi görecektir.

Sonuçlar bizlere, saflaştırdığımız monoklonal antikorların western blotting analizlerinde yeterli olmayıp immün boyama deneylerin de ise yüksek özgüllük vermesi bu antikorun yapısal olabileceğini fikrini düşündürmektedir. Özellikle en başta bahsedilen gibi, CCDC-124 proteinin her dokuda ifade edilmesi ve bazı dokularda daha fazla ifadesi verileri ışığında yapılacak olan herhangi bir doku boyaması çalışmalarında saflaştırılan monoklonal antikorların, kullanılmasının olumlu sonuç vereceği tahmin edilmektedir. Sentrozomdaki ve hücre bölünmesindeki aksaklıkların aynı zamanda kanser biyolojisiyle de ilgili olması dolayısıyla, kanserli dokularda kullanılması bu monoklonal antikorların belirteç görevi görebileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Telkoparan P., Erkek S., Yaman E., Alotaibi H., Bayık 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”, PLoS ONE, 692-89.
- [2] Telkoparan P., (2013), “Characterization of the coiled-coil domain- containing protein 124 (Ccdc124) as a novel centrosome and midbody component involved in cytokinesis”, Doctoral Thesis, Bilkent University.
- [3] Gurbuz I. (2010), “Monoclonal Antibody Production For Coiled Coil Domain Containing-124 (CCDC-124) and Its Molecular Characterization”, Master Thesis, Bilkent University.
- [4] Eggert U. S., Mitchison T. J., Field, C. M. (2006) “Animal cytokinesis: from parts list to mechanisms.”, Annual Review of Biochemistry, 543–566.
- [5] Glotzer M., (2005), “The molecular requirements for cytokinesis”, Sciencemag, 0036-8075.
- [6] Fujiwara T., Bandi M., Nitta M., Ivanova E.V., Bronson, R.T. and Pellman, D., (2005), “Cytokinesis failure generating tetraploids promotes tumorigenesis in p53-null cells.”, Nature, 1043–1047.
- [7] Ganem N.J., Storchova Z., Pellman D. (2007), “Tetraploidy, aneuploidy and cancer.” Current Opinion Genetics Development, 157–162.
- [8] Caldwell C.M., Green R.A., Kaplan K.B., (2007), “APC mutations lead to cytokinetic failures in vitro and tetraploid genotypes in Min mice.” Journal Cell Biology, 1109–1120.
- [9] Boveri T., (2008), “Concerning the origin of malignant tumours by Theodor Boveri.”, Journal of Cell Science, 121-184
- [10] Uetake Y., Sluder G., (2004), “Cell cycle progression after cleavage failure: mammalian somatic cells do not possess a “tetraploidy checkpoint”. Journal Cell Biology 165, 609–615.
- [11] Arslan Ö., (2015), “Coiled-Coil Domain Containing Protein 124 (Ccdc 124) Artışının Hücre Fizyolojisine ve Bölünmesine Etkileri”, Yüksek Lisans Tezi, Gebze Teknik Üniversitesi.
- [12] Jackson R., Urry L., Wasserman S., Minorsky P., Reece J., Cain M., (2010), “Campbell Biology”, 3. Baskı, Palme Yayıncılık.
- [13] Albert B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P., (2015), “Molecular Biology of the Cell”, 6th Edition, Garland Science.

- [14] Bryant J., Francis D., (2006), "The Eukaryotic Cell Cycle", 2th Edition, Society for Experimental Biology.
- [15] Bornens M., Azimzadeh J., (2004), "Origin and Evolution of The Centrosome", 1th Edition, Advance in Experimental Medicine and Biology.
- [16] Bornens M., (2012), "The Centrosome in Cell and Organisms", Science, 422-6.
- [17] Graser S., Stierhof Y. D., Nigg E. A., (2007), "Cep68 and Cep215 are required for centrosome cohesion", Journal Cell Science, 4321-31.
- [18] Bettencourt Dias M., Glover D. M., (2007), "Centrosome Biogenesis and Function: centrosomics brings new understanding", Nature Review Molecular Cell Biology, 451-63.
- [19] Fukasawa K., (2005), "Centrosome amplification, chromosome instability and cancer development", Cancer Letters, 0304-3835.
- [20] Salisbury J. L., (2003), "Centrosomes: coiled-coils organize the cell center", Elsevier, Current Biology, R88-R90.
- [21] Piel M., Meyer P., Khodjakov A., Rieder CL., Bornens M., (2000), "The respective contributions of the mother and daughter centrioles to centrosome activity and behavior in vertebrate cells", Journal of Cell Biology, 0021-9525.
- [22] Breugel M., Hirono M., Andreeva A., Yanagisawa HA., Yamaguchi S., Nakazawa Y., Morgner N., Petrovich M., Ebong I. O., Robinson C. V., Johnson C. M., Veprintsev D., Zuber B., (2011), "Structures of SAS-6 suggest its organization in centrioles." Science, 1196-9.
- [23] Gherman A., Davis E., Katsanis N., (2006), "The ciliary proteome database: an integrated community", Nature Genetics, 961-962.
- [24] Piel M., Nordberg J., Euteneuer U., Bornens M., (2001), "Centrosome-dependent exit of cytokinesis in animal cells.", Science, 1550-3.
- [25] Tsou M. F., Stearns T., (2006), "Controlling centrosome number: licences and blocks", Current Opinion Cell Biology, 0955-0674.
- [26] Nam H. J., Naylor R., Deursen J., (2016), "Centrosome dynamics as a source of chromosomal instability", Cell Press Review, 0962-8924.
- [27] Barr F. A., Gruneberg U., (2007), "Cytokinesis: placing and making the final cut.", Development Cell, 646-659 .
- [28] Rappaport R., (1986), "Establishment of the mechanism of cytokinesis in animal cells.", Interview Review Cytokinesis, 245-281.

- [29] D'avino P. P., Savoian M. S., Glover D. M., (2005), "Cleavage furrow formation and ingression during animal cytokinesis: a microtubule legacy", *Journal of Cell Science*, 1549-58.
- [30] Rappaport R., (1961), "Experiment Concerning The Cleavage Stimulus in Sand Dollar Eggs", *Journal of Experimental Zoology* 148, 81–89.
- [31] Canman J. C., Wells W. A., (2004), "Rappaport furrows on our minds: the ASCB Cytokinesis", *Journal of Cell Biology*, 0021-9525.
- [32] Menzel D., (1994), "Cell differentiation and the cytoskeleton in *Acetabularia*", *New Phytologist*, 369-393.
- [33] Baluska F., Volkmann D., Barlow P.W., (2004), "Eukaryotic cells and their cell bodies: Cell Theory revised.", *Annals of Botany* 94, 9–32.
- [34] Mayer U., Jurgens G., (2004), "Cytokinesis: lines of division taking shape", *Current Opinion in Plant Biology*, 1369-5266.
- [35] Jurgens G., (2005), "Cytokinesis in Higher Plants", *Annual Review Plant Biology*, 1543-5008.
- [36] Ganem N. J., Storchova Z., Pellman D., (2007), "Tetraploidy, aneuploidy and cancer", *Elsevier Science Direct*, 0959-437X.
- [37] Fujiwara T., Bandi M., (2005), "Cytokinesis failure generating tetraploids promotes tumorigenesis in p53-null cells", *Nature*, 1043–1047.
- [38] Caldwell C. M., Green R. A., Kaplan K. B., (2007), "APC mutations lead to cytokinetic failures in vitro and tetraploid genotypes in *Min* mice", *Journal of Cell Biology*, 1109-20.
- [39] Glotzer M., (2009), "The 3Ms of central spindle assembly: microtubules, motors and MAPs", *Nature Review Molecular Cell Biology*.
- [40] Uehara R., Goshime G., (2010), "Functional central spindle assembly requires de novo microtubule generation in the interchromosomal region during anaphase", *Journal of Cell Biology*, 259–267.
- [41] Bieling P., Telley I., Surrey T., (2010), "A Minimal Midzone Protein Module Controls Formation and Length of Antiparallel Microtubule Overlaps", *Cell*, 420-432.
- [42] Subramanian R., (2010), "Insights into Antiparallel Microtubule Crosslinking by PRC1, a Conserved Nonmotor Microtubule Binding Protein", *Cell*, 433–443.
- [43] Zhu C., Lau E., Schwarzenbacher R., Bossy-Wetzels E., Jiang W., (2006), "Spatiotemporal control of spindle midzone formation by PRC1 in human cells", *PNAS*, 6196–6201.

- [44] Betschinger J., Knoblich J., (2004), “Dare to Be Different: Asymmetric Cell Review Division in *Drosophila*, *C. elegans* and Vertebrates”, *Current Biology Review*, R674–R685.
- [45] They, M., Jimenez-Dalmaroni, A., Racine, V., Bornens, M. & Julicher, F., (2007), “Experimental and theoretical study of mitotic spindle orientation”, *Nature Letter*, 493–496.
- [46] Bement, W. M., Benink, H. A., Dassow G. A, (2005), “A microtubule-dependent zone of active RhoA during cleavage plane specification”, *The Journal of Cell Biology*, 91-101.
- [47] Nishimura Y., Yonemura S., (2005), “Centralspindlin regulates ECT2 and RhoA accumulation at the equatorial cortex during cytokinesis”, *Journal of Cell Science*, 104-114.
- [48] Su K. C., Takaki T., Petronczki M., (2011), “Targeting of the RhoGEF Ect2 to the Equatorial Membrane Controls Cleavage Furrow Formation during Cytokinesis.”, *Cell Press*, 1104-15.
- [49] 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*, 2066–2075.
- [50] Matsumura F., (2005), “Regulation of myosin II during cytokinesis in higher eukaryotes”, *Science Direct Review*, 0962-8924.
- [51] Piekny A., Maddox A. S., (2010), “The myriad roles of Anillin during cytokinesis”, *Elsevier Review*, 1084-9521.
- [52] Gregory S. L., Ebrahimi S., Milverton., (2008), “Cell Division Requires a Direct Link between Microtubule-Bound RacGAP and Anillin in the Contractile Ring”, *Journal of Cell Science* 18, 25-29.
- [53] Canmann J. C., (2003), “Determining the position of the cell division plane.”, *Nature Letter*, 1074–1078.
- [54] Vale R. D., Spudich J. A., Griffis E. R., (2009), “Dynamics of myosin, microtubules, and Kinesin-6 at the cortex during cytokinesis in *Drosophila* S2 cells”, *Journal Cell Biology*, 727–738.
- [55] Egelhoff T. T., Lee R. J., Spudich J. A., (1993), “Dictyostelium Myosin Heavy Chain Phosphorylation Sites Regulate Myosin Filament Assembly and Localization In Vivo”, *Cell*, 363-371.
- [56] Flemming W., (1891), “Neue Beiträge zur Kenntnis der Zelle, Architect Microscopy Anatomy”, 685–751.

- [57] Buck R. C., (1962), "An Electron Microscopic Study of the Development of the Cleavage Furrow in Mammalian Cells", *The Journal Of Cell Biology*, 117-25.
- [58] Elad N., Abramovitch S., Sabanay H., Medalia O., (2010), "Microtubule organization in the final stages of cytokinesis as revealed by cryo-electron tomography", *Journal of Cell Science*, 207-215.
- [59] Mullins J. L., McIntosh J. R., (1982), "Isolation Midbody and Initial Characterization of the Mammalian", *The Journal of Cell Biology*, 654-61.
- [60] Miller Y. K., Cheng S. C., (2000), "Bim1p/Yeb1p mediates the Kar9p-dependent cortical attachment of cytoplasmic microtubules.", *Molecular Cell Biology*, 2949-59.
- [61] Foe V. E., Dassow G. V., (2008), "Stable and dynamic microtubules coordinately shape the myosin activation zone during cytokinetic furrow formation.", *Journal of Cell Biology*, 457-470.
- [62] Eggert U. S., Mitchison T. J., Field C. M., (2006), "Animal Cytokinesis: From Parts List to Mechanisms", *Annual Review Biochemical*, 543-66.
- [63] Neef R., Preisinger C., Sutcliffe J., Kopajtich R., Nigg E.A., Mayer T.U. and Barr F.A., (2003), "Phosphorylation of mitotic kinesin-like protein 2 by polo-like kinase 1 is required for cytokinesis." *Journal Cell Biology*, 863-875.
- [64] Ikezoe T., Yang J., Nishioka C., Takezaki Y., Tasaka T., Togitani K., Koeffler H.P., Yokoyama A., (2009), "A novel treatment strategy targeting polo like kinase 1 in hematological malignancies.", *Leukemia*, 1564-1576.
- [65] Kumar S., (2013), "MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0.", *Molecular Biology Evolution*, 2725-9.
- [66] Haren L., Steams T., Lüders J., (2009), "Plk1-dependent recruitment of γ -tubulin complexes to mitotic centrosomes involves multiple PCM components.", *PLoS ONE*, 1954-3530.
- [67] Jakobsen L, Vanselow K, Skogs M, Toyoda Y, Lundberg E, (2011), "Novel asymmetrically localizing components of human centrosomes identified by complementary proteomics methods.", *EMBO Journal*, 1520-35.
- [68] Garay M., Rustom A., Gerdes H., Kutsche K., (2006), "The novel centrosomal associated protein CEP55 is present in the spindle midzone and the midbody", Elsevier.
- [69] Löffler H., Fechter A., (2015), "Cep63 Recruits Cdk1 to the Centrosome: Implications for Regulation of Mitotic Entry, Centrosome Amplification, and Genome Maintenance." *American Association for Cancer Research Journal*, 2129-39.
- [70] Hirano T., (2005), "Condensins: Organizing and Segregating the Genome.", *Current Biology*, R265-R275.

- [71] Crick F. H. C., (1953), "The packing of helices: simple coiled-coils.", *Acta Crystallization*, 689-697.
- [72] Wang W., Wang E. Q., Balthasar J. P., (2008), "Monoclonal Antibody Pharmacokinetics and Pharmacodynamics." *Nature*, 548-58.
- [73] Oliver C., Jamur M. C., (2010), "Immunocytochemical Methods and Protocols", 3th Edition, Humana Press.
- [74] Lipman N. S., Jackson L. R., Trudel L. J., (2005), "Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources.", *ILAR Journal*, 258-68.
- [75] Smith B. T., (2012), "Introduction to diagnostic and therapeutic monoclonal antibody.", Doctoral Thesis, University of New Mexico Health Sciences Center.
- [76] Nelson P. N., Reynolds G. M., Waldron G. E., Ward E., Giannopoulos K., Murray P. G., (2000), "Monoclonal antibodies", *Journal Clinical Pathology: Molecular Pathology*, 111-117.
- [77] Bretton P. R., (1994), "Detection of occult micrometastases in the bone marrow of patients with prostate carcinoma.", *The Prostate*, 108-14.
- [78] Köhler G., Milstein C., (1975), "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity", *Nature Letter*, 495-497.
- [79] Greenfield EA., (2014), "Generating Monoclonal Antibody", 2th Edition., Harbor Laboratory.
- [80] Pandey S., (2010), "Hybridoma Techonology for production of monoclonal antibody", *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 0976-0444.
- [81] Marx U, Embleton MJ, Fischer R, Gruber FP, Hansson U, Heuer J, de Leeuw WA, Logtenberg T, Merz W, Portetelle D, Romette JL, Straughan DW, (1997), "Monoclonal Antibody Production", *ECWAM Workshop*, 121-137.

ÖZGEÇMİŞ

Çiğdem Ülküseven 1992 yılında İstanbul'da doğdu. 2010 yılında başladığı Marmara Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nü 2014 yılında başarıyla tamamlayarak, 2015 yılında üniversitenin Atatürk Eğitim Fakültesi'nde Pedagojik Formasyon eğitimi aldıktan sonra aynı yıl Gebze Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı ve 2018 yılında yüksek lisans derecesiyle mezun oldu.