T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

COILED-COIL DOMAIN CONTAINING 124 (Ccdc124) PROTEİNİNİN MİKRORNALAR TARAFINDAN REGÜLASYONUNUN İNCELENMESİ

İLKAY SEVGEN
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

GEBZE
2020

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

COILED-COIL DOMAIN CONTAINING 124 (Ccdc124) PROTEİNİNİN MİKRORNALAR TARAFINDAN REGÜLASYONUNUN İNCELENMESİ

İLKAY SEVGEN
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

I. DANIŞMANI
PROF. DR. UYGAR HALİS TAZEBAY
II. DANIŞMANI
DR. MERVE TUZLAKOĞLU ÖZTÜRK

GEBZE
2020

T.R.

GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

INVESTIGATION OF REGULATION BY MICRORNAS OF COILED-COIL DOMAIN CONTAINING 124 (Ccdc124) PROTEIN

İLKAY SEVGEN

A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE

DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

I. THESIS SUPERVISOR

PROF. DR. UYGAR HALİS TAZEBAY

II. THESIS SUPERVISOR

DR. MERVE TUZLAKOĞLU ÖZTÜRK

GEBZE

2020

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

GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 17/07/2020 tarih ve 2020/34 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 23/07/2020 tarihinde tez savunma sınavı yapılan İLKAY SEVGEN'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 : PROF. DR. TAMER YAĞCI

ÜYE : DR. ÖĞR. ÜYESİ TUĞRUL DORUK

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun

…….. tarih ve ……. sayılı kararı.

ÖZET

Coiled-coil domain containing 124(Ccdc124) mantardan insana kadar tüm ökaryotlarda korunmuş bir proteindir. Yapılan çalışmalarda proteinin hücre bölünmesinin interfaz evresinde sentrozomda, post-anafaz evresinden sitokinetik bölünmeye kadar orta cisimcikte bulunduğu, bölünme dışında ise koşullara bağımlı olarak hücrenin farklı kompartımanlarında yer aldığı gösterilmiştir. Proteinin hücre içi fonksiyonunun belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalarda, CCDC124 geni, CRISPR/Cas9 yöntemi ile hedeflenip mutant hücre hatları oluşturulduğunda hücre bölünmesinde aksaklıklar gözlenmiş ve hücrelerin çok çekirdekli oldukları immün-boyama yöntemleri ile tespit edilmiştir. Yapılan veri tabanı araştırmalarında Ccdc124 proteini fonksiyon olarak RNA-bağlayıcı protein olarak geçmektedir. Ayrıca, Ccdc124 proteinin etkileşim partnerlerinin bulunmasına yönelik yapılan çalışmalar sonucunda, etkileştiği doğrulanan proteinlerin birçoğunun mikroRNA biyogenezi ve regülasyonunda görev aldığı görülmüştür. Hücre içerisinde farklı yollarla sentezlenen ve genellikle 19-22 nükleotit uzunluğunda bulunan mikroRNAlar, küçük, kodlanmayan ve öncü mRNAlar'ın 3'UTR bölgelerine bağlanarak hedef mRNAlar'ın degredasyonuna ya da inhibisyonuna neden olurlar. Dolayısıyla, mikroRNA molekülleri gen ekspresyonunu post-transkripsiyonel olarak düzenleyip hedef mRNA'ların hücre içerisinde işlevsel olarak susturulmalarına katkıda bulunurlar.

Bu tez çalışması kapsamında, Ccdc124 proteinin ifadesinin mikroRNAlar tarafından düzenlenip düzenlenmediği araştırılmış, hedef mikroRNAlar veri tabanları, literatür çalışmaları ve deneysel çalışmalar tarafından belirlenip, Ccdc124 proteinin regülasyonundaki rolleri incelenmiştir. Bu çalışmada, hedef mikroRNA miR-138 yaklaşık %60 oranında düştüğü belirlenmiştir. İlerleyen basamaklarda olası miRNA bağlanma bölgeleri yönlendirilmiş mutagenez yöntemleri ile değiştirilerek süreçteki etkileri gözlemlenmiştir. Tez çalışmasının ikinci kısmında, seçilen farklı genlerin 3'UTR bölgelerinin mikroRNAlar tarafından regülasyonunun CCDC124-3'UTR'si varlığında etkilenip etkilenmediğine dair veriler elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Coiled-coil domain containing 124 (Ccdc124), Orta-Cisimcik, Sentrozom, mikroRNA, Lüsiferaz Testi, Yönlendirilmiş Mutagenez.

SUMMARY

The Coiled-coil domain containing-124 (Ccdc124) protein is conserved in all eukaryotes, from fungi to human. In the studies, Ccdc124 protein is located at the interphase stage in the centrosome, from the post-anaphase phase to the cytokinetic division in the mid-body, and however, it has been shown that CCDC124 is present in different comparments of the cell depending on the conditions. In studies to determine the intracellular function of protein, the CCDC124 gene was targeted by CRISPR/Cas9 method and mutant cell lines were constructed and thus disorders were observed in cell division. In this case, multinucleated cells were identified by immunostaining methods. Ccdc124 protein is functionally referred to as RNA-binding protein. In addition, as a result of studies to find interaction partners of Ccdc124 protein, many of the proteins that it interacts have been found to be involved in microRNA biogenesis and regulation.

MicroRNAs are synthesized in different ways within the cell, usually small non-coding 19-22 nucleotides in length, bind to 3'UTR regions of precursor mRNAs and cause degradation or inhibition of target mRNAs. Thus, microRNA molecules regulate gene expression post-transcriptionally and contribute to the functional silencing of target mRNAs within the cell.

In this thesis, it was investigated whether the expression of Ccdc124 protein was regulated by microRNAs, target microRNAs were determined by databases, literature studies and experimental studies and their roles were determined in Ccdc124 protein regulation. In this study, the target microRNA was determined as mir-138 and it was determined that the expression of CCDC124-3'UTR decreases about 60% by luciferase assays. In the following steps, possible miRNA binding sites were altered by site directed mutagenesis methods and their effects in the process were observed. In the second part of this thesis, data were obtained whether the expression of different selected genes was affected by the presence of CCDC124-3'UTR.

Key Words: Coiled-coil domain-containing 124 (Ccdc124), Midbody, Centrosome, MicroRNA, mir-138, Luciferase Assay, Site-Directed Mutagenesis

TEŞEKKÜR

Öncelikle akademik hayatım boyunca beni destekleyen, bilgi ve tecrübelerini her zaman benimle paylaşan ve bu çalışmanın oluşmasını sağlayan değerli danışmanım Prof. Dr. Uygar Halis TAZEBAY'a teşekkür ederim.

Çalışmalarımda her zaman sonsuz desteğini yanımda hissettiğim, bilgisini, tecrübesini ve dostluğunu hiçbir zaman esirgemeyen, çalışma disiplinini, hoş sohbetini hiçbir şeye değişmeyeceğim ve bu çalışmanın oluşmasını sağlayan ikinci danışmanım Dr. Merve TUZLAKOĞLU ÖZTÜRK'e teşekkür ederim.

Tez savunmamda tavsiyelerini ve desteklerini eksik etmeyen jüri üyelerim Prof. Dr. Tamer YAĞCI ve Dr.Öğr.Üyesi Tuğrul DORUK'a teşekkürü borç bilirim.

Çalışma alanında desteklerini eksik etmeyen, dostluğunu hiçbir şeye değişmeyeceğim, en mutlu ve güzel zamanları birlikte yaşadığım ve birlikte çalışmaktan onur duyduğum yakın arkadaşlarım Kübra HACIBEYOĞLU, Mayıs Gamze ÇAKIRCA ve Sinem GÜL'e teşekkürü borç bilirim.

Birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum ve yardımlarını eksik etmeyen değerli arkadaşlarım Asyah ABBOOD, Eda Gazel PEHLİVAN, Ömer GÜLLÜLÜ, Çiğdem ÜLKÜSEVEN, Özge ARSLAN ve Rıdvan AYAZ'a teşekkür ederim.

Aynı ofisi paylaşmaktan mutluluk duyduğum değerli arkadaşlarım Emrah ÖZÇELİK, Türkan ÇAKAR, Onur ÇALIŞKANER, Ahmet KALAYCI, Büşra AYDEMİR ÇELİK'e teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca desteklerini eksik etmeyen ve etmeyecek olan, benimle hep gurur duyan, en değerlim, sevgili aileme teşekkür ederim.

Hayatımda olmasından mutluluk duyduğum, beni her zaman destekleyen, "İyikim" dediğim sevgili eşim Kaan KÜÇÜK'e teşekkürü borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
TABLOLAR DİZİNİ	xvi
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği	2
2. HÜCRE DÖNGÜSÜ	4
2.1. Mitoz Bölünme	6
2.1.1. Hücre Döngüsü Kontrol Sistemi	7
2.1.2. Sentrozom Döngüsü	8
2.2. Sitokinez	10
2.2.2. Orta Cisimcik (Midbody) Organizasyonu	13
2.2.3. Ayrılma	14
3. COILED-COIL DOMAIN-CONTAINING 124 PROTEİNİ (CCDC124)	16
4. MİKRORNA BİYOGENEZİNİN REGÜLASYONU VE FONKSİYONLARI	17
4.1. MikroRNA Biyogenezi	18
4.2. MikroRNA'ların Hedef Molekülü Tanıması	19
4.3. mikroRNA-138'in Hücredeki Rolü	21
4.4. miRNA ve siRNA arasındaki benzerlik ve farklılıklar	21
5. MATERYAL VE METOT	23
5.1. Materyal	23
5.1.1. Agaroz Jel Solüsyonları	23
5.1.2. Mikrobiyoloji Suşları	23
5.1.3. Mikrobiyoloji Besi Yeri ve Solüsyonları	23

5.1.4. Oligonükleotitler 24
5.1.5. Vektörler 25
5.1.6. Hücre Hattı Seçimi 25
5.1.7. Hücre Kültürü Solüsyonları 26
5.1.8. İmmünoblot Solüsyonları 26
5.1.10. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Bileşenleri 29
5.1.11. Ligasyon Deney Bileşenleri 30
5.1.12. Hücre Transfeksiyonu 30
5.1.13. Lüsiferaz Testi Solüsyonları 32
5.1.14. Kullanılan Antikorlar 32
5.2. Metot 34
5.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) 34
5.2.2. Restriksiyon Endonükleaz Kesimi 34
5.2.3. Nükleik Asit Konsantrasyon Tayini 34
5.2.4. Yönlendirilmiş Mutagenez 34
5.2.5. Agaroz Jelde DNA'nın Yürütülmesi 35
5.2.6. Agaroz Jelden DNA İzolasyonu 35
5.2.7. Vektörlerin Oluşturulması 36
5.2.8. Ultra Kompetent Hücre Hazırlanışı 37
5.2.9. Transformasyon 37
5.2.10. Bakteri Hücrelerinin Saklanması 38
5.2.11. Stok Hücrelerin Kriyoprezervasyonu 38
5.2.12. Dondurulmuş Stok Hücrelerin Açılması 38
5.2.13. Hücre Kültürü 38
5.2.14. Transfeksiyon 39
5.2.15. Lüsiferaz Testi Deneyleri 39
6. SONUÇLAR 41
6.1. Biyoinformatik Analiz Sonuçları 41
6.2. PsiCHECK-2 Vektörüne Klonlanan Bölgelerin Kontrol Edilmesi 45
6.3. Lüsiferaz Testi Deneyleri 47
6.3.1. Transfekte Edilen psiCHECK-3'UTR Vektörünün Endojen RNA interferans Sistemi Tarafından Hedeflenmesi 47

6.3.2. CCDC124-3'UTR bölgesinin miR-138 varlığında ekspresyonun belirlenmesi 49
6.3.3. Yönlendirilmiş Mutagenez Yöntemiyle ile Oluşturulan Mutant Plazmitler 52
6.3.4. Mutant Plazmitler ile Lüsiferaz Testi Sonuçları 55
6.4. Western Blotlama Analizleri 57
6.4.1. MiR-138 ve B-si RNA İnterferanslarının Protein İfade Seviyesine Etkilerinin Kıyaslanması 59
6.5. B-si Transfekte Edilen Hücrelerde HIF1A ve AKT2 Ekspresyonları Üzerine Etkilerinin İncelenmesi 60
7. ÖNERİLER 65

KAYNAKLAR 68
ÖZGEÇMİŞ 75
EKLER 76

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler ve Kısaltmalar		**Açıklamalar**
µg		Mikrogram
µl	:	Mikrolitre
µM	:	Mikromolar
^{o}C	:	Derece Celcius
APS	:	Amonyumsülfat
C	:	Sitokinez
Ccdc124	:	Coiled-coildomain containing 124
CDK	:	Siklin Bağımlı Kinaz
EMT	:	Epitel Mezenkimal Geçişi
FBS	:	Fetal sığır serumu
GTÜ	:	Gebze Teknik Üniversitesi
HIF1A	:	Hipoksinin neden olduğu faktör 1-alfa
G	:	Gram
KDa	:	Kilodalton
L	:	Litre
M	:	Mitoz
MBG	:	Moleküler Biyoloji ve Genetik
MiRNA	:	MikroRNA
MKLP1	:	Mitotic Kinesin Like Protein 1
Mm	:	Milimolar
Nm	:	Nanometre
PBS	:	Tuzlu fosfat tamponu
PCM	:	Perisentrioller matriks
Plk1	:	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
siRNA	:	Susturucu RNA
TEMED	:	Tetrametiletilenediamin

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No:		Sayfa
2.1:	Hücre döngüsü şeması.	5
2.2:	Hücre Bölünmesi Aşamaları.	6
2.3:	Siklin-CDK kompleksleri tarafından hücre döngüsünün kontrolü.	8
2.4:	Sentrozom yapısının şematik gösterimi.	9
2.5:	Sitokinez sırasında aktomiyozin halkası, ayrılma yarığı ve orta cisimcik oluşumu.	11
2.6:	Erken anafaz evresiyle başlayıp fiziksel ayrılmayla sonuçlanan sitokinez evreleri. a)Ekvatoral RhoA aktivasyonu, b)Aktomiyozin kasılma halkası c)Aktomiyozin kasılma halkası moleküler organizasyonu, d)Orta cisimcik, e)Ayrılma bölgesi proteinleri.	12
2.7:	Elektron mikroskobu ile yakalanmış ayrılmakta olan kardeş hücreler arasında beliren köprü ve bu köprünün merkezinde orta cisimcik oluşumu. Ölçek 1 µm boyundadır.	13
2.8:	Orta cisimciği oluşturan bölümler ve bu bölümlerde görev alan proteinler.	14
4.1:	MikroRNA biyogenez yolağına genel bakış.	19
4.2:	MikroRNA biyogenezi ve hedef mRNA ile eşleşmesi.	20
4.3:	siRNA ve miRNA'ların gen susturma mekanizmaları.	22
5.1:	psiCHECK-2 vektörünün şematik gösterimi.	25
5.2:	CCDC124-3'UTR bölgesi ve tasarlanan forward ve reverse primer bölgeleri.	36
6.1:	CCDC124 mRNA'sını hedefleyen mikroRNA'ların microrna.org (miRanda) veri tabanında belirlenmesi ve bağlandığı bölgenin gösterilmesi.	42
6.2:	10 memeli tür arasında Ccdc124 geninin 3'UTR bölgesinin hizalanması.	44

6.3:	Transformasyon sonrası seçilen kolonilerden izole edilen plazmidlerin XhoI ve NotI restriksiyon enzimleri ile kontrol kesimi. Sırasıyla 1., 2., 3., 4. seçilmiş kolonilerden izole edilen plazmidler.	45
6.4:	Transformasyon sonrası seçilen kolonilerden izole edilen plazmidlerin PCR ile kontrolü. Sırasıyla 1., 2., 3., 4. seçilmiş kolonilerden izole edilen plazmidler. "No DNA" negatif kontrol.	45
6.5:	İzole edilen 2. plazmidin sekans analiz sonucu. Mavi ile belirtilen bölge 3'UTR bölgesini göstermektedir. Sekanslama primeri ile sekanslatılmıştır.	46
6.6:	Luminometrik ölçümün grafiklendirilmesi.	48
6.7:	Luminometrik ölçümün grafiklendirilmesi (İkinci tekrar).	48
6.8:	Ortalama luminometrik ölçümün grafiklendirilmesi.	50
6.9:	Ortalama luminometrik ölçümün grafiklendirilmesi.	51
6.10:	Mutant-1 bölgesinin kromatogram sonucu.	53
6.11:	MetroNome[TM] veri tabanı sonucu.	54
6.12:	Mutant-2 kromatogram sonucu.	55
6.13:	Luminometrik ölçümün grafiklendirilmesi.	56
6.14:	Luminometrik ölçümün grafiklendirilmesi.	56
6.15:	A-si, B-si, C-si ve Scrambled (negatif kontrol) siRNA'ları ile transfekte edilmemiş (Untransfected) HeLa hücrelerde Ccdc124 protein ifadesinin immünoblot deneyi ile (anti-Ccdc124 antikoru ile bakılmıştır) karşılaştırılması (A, B, C). Ccdc124 protein ifadesinin grafiksel gösterimi (D).	58
6.16:	B-si ve Scrambled (negatif kontrol) siRNA'ları ile transfekte edilmemiş ve miR138 ve miRNegeatif mikroRNA'ları ile transfekte edilmiş hücrelerdeki Ccdc124 proteininin ifadesinin transfekte edilmemiş (Untransfected) HeLa hücreleri kıyaslanması (Anti-alfa tubulin, Anti-Ccdc124).	59
6.17:	AKT2 kromatogram sonucu.	61
6.18:	AKT2 sekans dizisi.	61
6.19:	HIF1A kromatogram sonucu.	62

6.20: HIF1A sekans dizisi. 62
6.21: Luminometrik ölçümün grafiklendirilmesi. 63
6.22: Luminometrik ölçümün grafiklendirilmesi (2. Tekrar) 63

TABLOLAR DİZİNİ

TabloNo:		Sayfa
5.1:	Kullanılan primerler ve dizileri.	24
5.2:	Yürütme jeli için gerekli malzemeler ve miktarlar.	27
5.3:	Ayırma jeli için gerekli malzemeler ve miktarlar.	27
5.4:	PCR deney malzemeleri ve miktarları.	29
5.5:	Yönlendirilmiş mutagenez PCR deney malzemeleri ve miktarları.	29
5.6:	Ligasyon deney bileşenleri ve konsantrasyonları.	30
5.7:	HeLa hücre hattının vektörlerle transfeksiyon malzemeleri ve miktarları.	30
5.8:	HeLa hücre hattının vektörlerle ve mikroRNA ile transfeksiyon malzemeleri ve miktarları.	31
5.9:	HeLa hücre hattının siRNA ile transfeksiyon malzemeleri ve miktarları.	31
5.10:	HeLa hücre hattının siRNA ve vektörlerle transfeksiyon malzemeleri ve miktarları.	31
5.11:	Kullanılan Antikorlar.	32
5.12:	Kullanılan cihazlar.	33
5.13:	Uygulanan PCR Şartları.	34
5.14:	Yönlendirilmiş mutagenez için uygulanan PCR Şartları.	35
6.1:	TargetScan sunucusunda yapılan analiz sonucu.	42
6.2:	Yönlendirilmiş Mutagenez yöntemi ile değiştirilen miR-138 bölgesinin ve Mutant-1 gösterimi.	52

1. GİRİŞ

Hücre bölünmesi, telomer uzunluğuna bağımlı olarak replikatif yaşlanma ve kanserle olan ilişkisinden dolayı güncel bir konu olduğu için en çok çalışılan konular arasında yer almaktadır. Ömür uzunluğunu arttırmak ve kaliteli bir yaşam sağlamak adına yapılan çalışmalarda hücre bölünmesinin temel mekanizmalarını aydınlatma yoluna gitmiştir. Hücre bölünmesi büyüme, gelişme, soy aktarımı, doku yenilenmesi gibi kritik öneme sahip süreçlerden oluşmaktadır [8].

Kromozom sayısının sabit tutularak atasal bir hücreden iki eş yavru hücrenin oluşmasını sağlayan mitoz bölünme, hücre içerisinde bir dizi olaylar döngüsünden oluşmaktadır. Mitoz bölünme; hazırlık, kontrol, DNA miktarının iki katına çıktığı evrelerini (G1-S-G2) içeren interfaz evresinden ve kalıtım materyalinin yoğunlaştığı, kardeş kromatitlerin eşit olarak kardeş hücrelere paylaştırıldığı çekirdek bölünmesi (karyokinez) ve devamında sitoplazmik bölünmesinden (sitokinez) oluşmaktadır. Sentrozom; karyokinezde kardeş kromatitlerin eşit olarak ayrılmasını sağlayan iğ ipliklerinin oluşumunda görev alır. Hücre bölünmesinin son aşaması olan sitokinezde iki kardeş hücreyi birbirine bağlayan ve hücre içi köprü görevi gören orta cisimcik (mid-body) ise aktomiyozin kasılma halkasının anti-paralel mikrotübülleri sıkıştırması ile hücrelerin ayrılmasını sağlayan dinamik elektro-yoğun bir yapıya sahiptir [8].

Mantardan insana kadar tüm ökaryotlarda korunmuş bir protein olan Coiled-coil domain containing 124'ün (Ccdc124) anafazın sonuna kadar sentrozomda konumlanırken, mitozun son evresi olan telofazda orta cisimciğe göç ettiği yapılan son araştırmalarda belirlenmiştir. Ccdc124 proteini diğer sentrozom proteinleri gibi sarılı sarmal motif bulundurmaktadır. Daha önceki çalışmalarda Ccdc124 proteinin özellikle sitokinezde görev alan ve orta cisimcikte Rap2 aktivasyonunu sağlayan Ras guanin nükleotit değiştirici faktör 1B (RASGEF1B) ile etkileştiği ortaya konmuştur [5]. Ccdc124'ün hücre içi fonksiyonunun belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalarda, proteinin ifadesinin arttırıldığı/azaltıldığı koşullarda ve CCDC124 geninin CRISPR/Cas9 yöntemi ile hedeflenip mutant hücre hatları oluşturulduğunda hücre bölünmesinde aksaklıklar gözlenmiş ve hücrelerin çok çekirdekli oldukları immün-boyama yöntemleri ile tespit edilmiştir [1], [2], [3], [4]. Ayrıca, koşullara bağımlı olarak (yüksek sıcaklık, düşük sıcaklık, stres durumu vb.) proteinin hücrenin farklı kompartmanlarında görev aldığı da düşünülmektedir [6].

Ccdc124 proteini; veri tabanı taramalarında ve in-silico çalışmalarında RNA-bağlayıcı protein olarak geçmektedir. Kütle-spektrometresi çalışmaları ile stres granülleri, P-body gibi membransız organellerde görev alan proteinlerle etkileştiği belirlenmiş ve bu etkileşimler birlikte çöktürme yöntemi ile doğrulanmıştır (Tarbp2, Ybx1, Adarb1 vs.- Merve TUZLAKOĞLU ÖZTÜRK, Yayına Hazırlanmakta Olan Data). Etkileşen bu proteinlerin birçoğunun mikroRNA biyogenezinde ve regülasyonunda görev aldığı bilinmektedir [6], [7].Bu çalışmalar doğrultusunda, öncelikle veritabanı çalışmalarında Ccdc124 proteinin ifadesini hedefleyen mikroRNA'lar belirlenmiş ve CCDC124-pre-mRNA'sını yüksek oranla hedefleyen mikroRNA'nın "miR138" olduğu tespit edilmiştir. Deneysel kurgu aşamasında öncelikle CCDC124 geninin 3'UTR bölgesi psiCHECK-2 vektörüne klonlanmıştır. miR-138 varlığında ve yokluğunda negatif-pozitif kontrollerle birlikte lüsiferaz test protokolü uygulanmıştır. Ayrıca endojen Ccdc124 proteinin HeLa hücre hattında siRNA'lar tarafından ne kadar baskılandığı belirlenmiş ve miR138 baskılamasıyla karşılaştırılmıştır. Tezin ikinci bölümünde ise, Hypoxia-inducible factor 1-alpha (HIF-1α) ve Rac-beta serine/threonine-protein kinase (AKT2) genlerinin 3'UTR kısımları psiCHECK2 vektörüne klonlanmıştır. Ccdc124 protein ekspresyonunu siRNA ile düşürdüğü koşullarda HIF-1α ve AKT2 genlerinin ekspresyonunun değişip değişmediği ve böylece Ccdc124 proteinin mikroRNA metabolizmasında rolü olup olmadığı belirlenmiştir.

1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

Bu tez çalışmasında, Ccdc124 proteinin ifadesinin mikroRNA'lar tarafından düzenlenip düzenlenmediği insan HeLa hücre hattında araştırılmıştır. Hedef mikroRNA'lar veri tabanları, literatür çalışmaları ve deneysel çalışmalar ile belirlenip, Ccdc124 proteinin regülasyonundaki rolleri belirlenmiştir. İlerleyen basamaklarda olası miRNA bağlanma bölgeleri yönlendirilmiş mutagenez yöntemleri ile değiştirilerek süreçteki etkileri gözlemlenmiştir.

Bu çalışma sayesinde; Ccdc124 proteinin fonksiyonel yapı ve işlevi üzerine yapılan araştırmaların bir boyutu olarak mikroRNA'lar ile ilişkisi hakkında bilgi sahibi olunması amaçlanmaktadır. Üzerinde literatür çalışması az bulunan Ccdc124 proteinin

hücre içerisinde farklı kompartmanlardaki farklı görevlerinin belirlenmesine katkı sağlanması amaçlanmıştır.

2. HÜCRE DÖNGÜSÜ

Hücre çoğalması, hücre döngüsü adı verilen ayrıntılı bir olaylar dizisi ile meydana gelir. Bir bölünme döngüsünden bir sonraki döngüye kadar hücrede gerçekleşen biyokimsayasal ve fiziksel değişiklikleri içeren süreçler dizinine "hücre döngüsü" denir. Hücre döngüsü sonunda morfolojik ve genetik yapı olarak birbirine tıpa tıp benzeyen iki yavru hücre oluşumuyla döngü tamamlanır. Bu şekilde kromozomlar ve diğer bileşenler çoğaltılır ve daha sonra iki kardeş hücreye dağıtılır. Hücre üremesi tüm yaşamın gelişimi ve işlevi için temeldir. Tek hücreli organizmalarda, hücre bölünmesi yeni bir organizma oluşumu yani çoğalma olarak ifade edilirken; çok hücreli canlılarda büyüme, gelişme, doku yenilenmesi gibi önemli süreçlerde rol oynamaktadır [8].

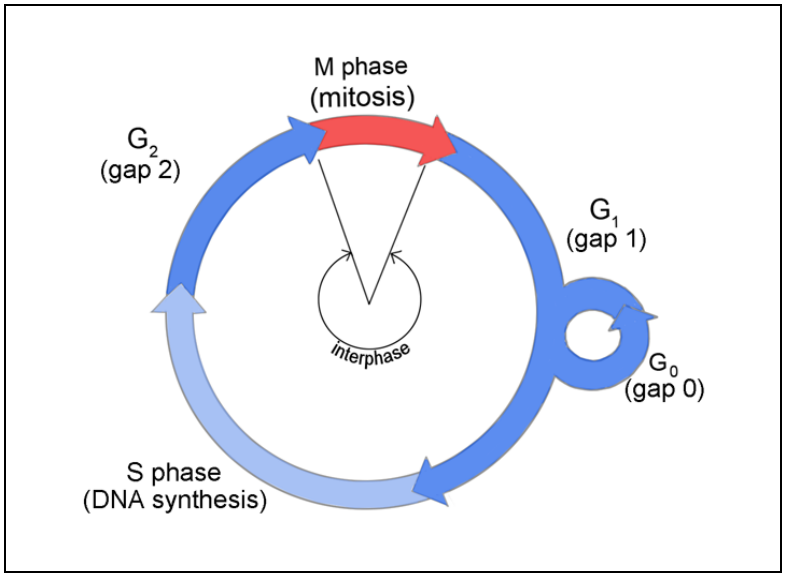
Hücre döngüsü kronolojik sıralamaya göre 4 evreye ayrılmaktadır: Gap1(G1), Sentez(S), Gap2(G2) ve Mitoz(M). Hücre döngüsünün %95'lik kısmını hazırlık evreleri oluştururken, mitoz bölünme %5'lik kısmını teşkil etmektedir. Bu evrelerden mitoz evresine geçmeden önceki G1-S-G2 evreleri interfaz evresi olarak adlandırılmakta ve hazırlık, sentez işlemlerini kapsamaktadır. Hücrenin bileşenleri olan sitoplazmik organellerin, yapısal proteinlerin, membranların, RNA moleküllerinin çoğunun sentezlendiği ve DNA miktarının iki katına çıktığı evreye "S fazı" denir. Bu evre memeli hücrelerine 10-12 saat sürmektedir.

S fazından sonra, yaklaşık olarak 1 saat süren ve iki katına çıkmış DNA'nın kısalıp kalınlaşmasıyla oluşan kromozomların iki yavru hücreye eşit olarak paylaştırıldığı evreye "M fazı" denir. M evresi profaz-prometafaz-metafaz-anafaz-telofaz evrelerini kapsayan çekirdek bölünmesinden (karyokinez) oluşmaktadır. Son olarak bu süreç sitoplazma bölünmesi (sitokinez) ile sonlanmaktadır.

G1 ve G2 fazları ise S ve Mitoz fazlarına geçmeden önce iç ve dış çevresel uyaranlara karşı hücre içi hazırlıkların ve kontrollerin yapıldığı evrelerdir [9].

Mitotik hücre döngüsü dört faza ayrılabilir: G1, S, G2 ve M. Kromozom replikasyonu Sentez (S) fazında meydana gelir. Her bir kromozomun kopyalanmasına neden olan hücre döngüsünün kopyalanan çiftin her bir kromozomuna "kromatit" denir ve verilen bir çiftin iki kromatidine "kardeş-kromatitler" denir. Kardeş kromatitler, çoğaltmadan sonra kardeş-kromatit birleşmesi adı verilen bir işlemle bir arada tutulur ve bu bağlanmış durum, kromozomlar birbirinden ayrılana kadar

korunur. Kardeş kromatit yapışmasına “kohezin” adı verilen bir protein aracılık eder [10].

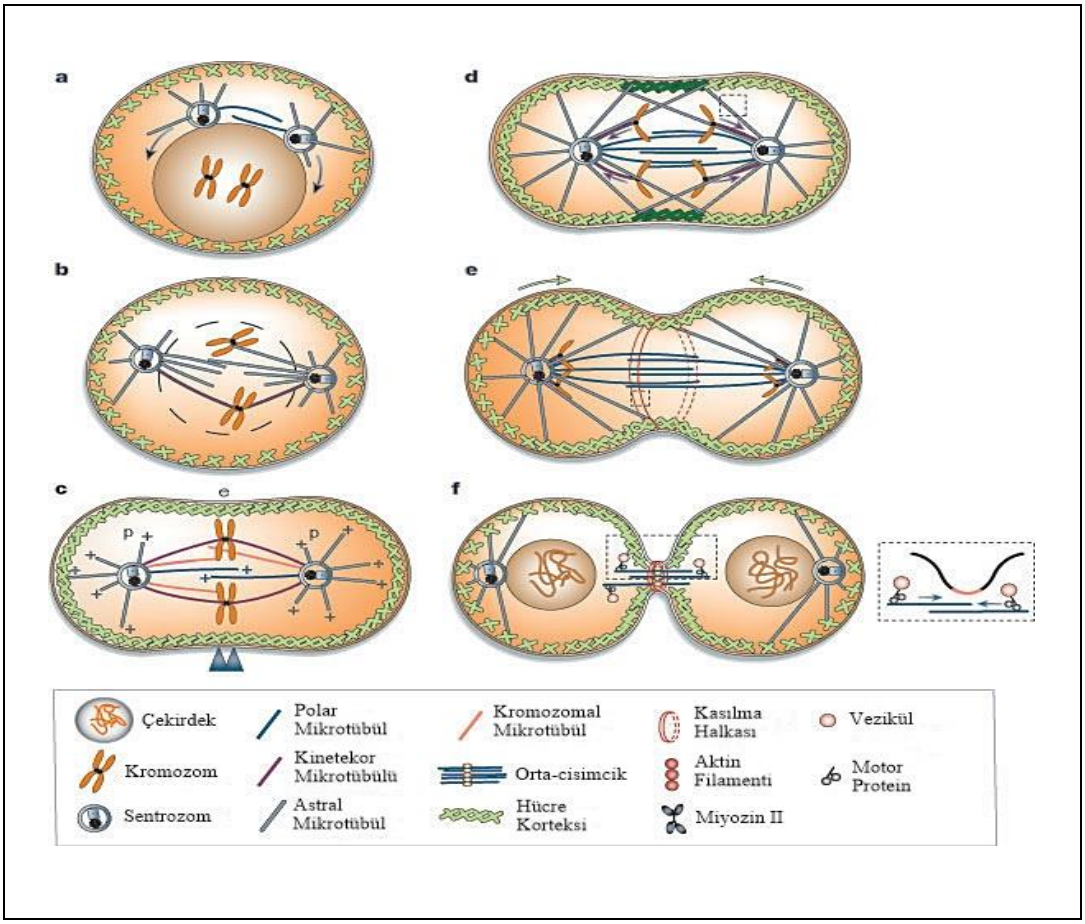


Şekil 2.1: Hücre döngüsü şeması.

G1 ve G2 fazları, hücrelerin S ve M fazlarına geçişlerinden önce hazırlıklarının tamamlandığından emin olmak için ve hücrelerin yeterli büyüklüğe gelmesi ve iç ve dış ortamı izlemeleri için zaman sağladığından dolayı “Gap” olarak adlandırılmıştır. G1 fazı, çevresel şartlar hücrenin yaşayabilmesi için uygun olduğu ve dışardan gelen sinyaller hücrenin büyümesini ve bölünmeye gitmesini teşvik edici sinyaller olduğu zaman, hücrenin sonraki evreler için ATP ve protein ürettiği evredir. Hücrenin büyüyüp bölünmeye gitmesi için şartlar uygun olmadığında G1 evresine giriş süresi şartların olgunlaşmasına bağlı olarak değişir. Bu durumda, hücreler G1 boyunca ilerlemeyi geciktirir ve çoğalmaya devam etmeden önce günler, haftalar veya hatta yıllar boyunca kalabilecekleri G0 (G sıfır) olarak bilinen özel bir dinlenme durumuna girebilir. Hücre dışı koşullar uygunsa, büyümesi ve bölünmesi için sinyaller mevcutsa, G1 veya G0'nin başındaki hücreler, “Start” (mayalarda) veya “Restriction point” (memeli hücrelerinde) olarak bilinen Gl'in sonuna yakın kontrol noktasına ilerler [8].

G1 sonundaki kontrol noktasını geçen hücreler S fazına girerek hücre içi bileşenlerini iki katına çıkarırlar. Sentez evresinde DNA ile birlikte sentrozomların sayısı da iki katına çıkmaktadır. Sentrozomlar; metafaz- anafaz geçişinde kardeş kromatitlerin kutuplara çekilmesi sağlayan mitotik iğ ipliklerinin oluşumdan sorumludur. S fazında DNA molekülünün replikasyonu sırasında ve hücre içi diğer

proteinlerin sentezinde hata olup olmadığı hücre döngüsü kontrol proteinleri tarafından kontrol edildikten sonra hücreler G2 fazından M fazına ilerler [8], [10].



Şekil 2.2: Hücre Bölünmesi Aşamaları.

2.1. Mitoz Bölünme

M fazı temel olarak 4 safhadan oluşmaktadır: Profaz, Metafaz, Anafaz, Telofaz.

Profaz: Her biri birbirine bağlı kardeş kromatitlerin kısalıp kalınlaşarak mikroskopta görülebilir hale gelen kromozomları oluşturduğu evredir. Bu evrede, sentrozomu oluşturan sentriyoller, mitotik iğ iplikleirini oluşturarak kutuplara doğru hareket eder. Çekirdek zarının yıkımı bu evrede başlar.

Metafaz: Kromozomların sentromer bölgelerinden iğ ipliklerine tutunarak metafaz plağında sıralandığı ve sinyal gelene kadar bu düzlemde bekledikleri evredir.

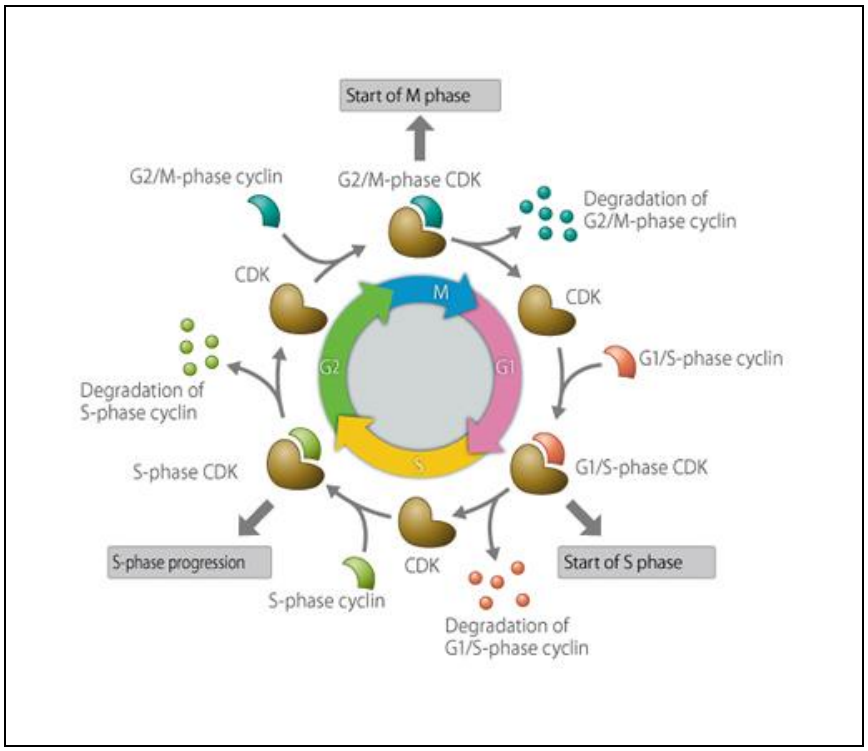
Anafaz: Kardeş kromatitlerin iğ ipliklerinin aracılığı ile kutuplara çekildiği evredir.

Telofaz: Ayrılan kardeş kromatidlerinin yoğunluğunu kaybederek kromatin iplikleri halini aldığı ve çekirdek zarının tekrar oluştuğu evredir. Karyokinezin tamamlanıp sitokinezin başladığı evredir.

2.1.1. Hücre Döngüsü Kontrol Sistemi

Hücre döngüsü kontrol sistemi, hücre döngüsü olaylarının sırasını ve zamanlamasını kontrol eden düzenleyici ağdır. Sistem, döngünün doğru düzende ilerlemesini sağlayan bir dizi biyokimyasal olaylardan oluşmaktadır. Bu sistemin temel bileşenleri, çeşitli hücre içi ve hücre dışı uyarıya cevap veren, sağlam ve çok yönlü bir düzenleyici ağ yapısına sahip siklin-bağımlı kinazlar (CDK) ve bunların düzenleyicileridir. Hücre döngüsü üç ana düzenleyici kontrol noktası boyunca ilerler: G1'in sonundaki döngünün girişini tanımlayan “Başlat”; mitoz içine girişin kontrol edildiği “G2 / M kontrol noktası”; ve mitozun son olaylarının başladığı “Metafaz-Anafaz geçişi” [8].

Serine/threonin kinaz ailesinden olan siklin-bağımlı kinazların (CDK) enzimatik aktiviteleri temel düzenleyici bir alt birim olan siklinler tarafından sağlanır. CDK proteinlerinin konsantrasyonları hücre döngüsü boyunca sabit iken, faaliyetlerindeki salınımlar, katalitik aktivitelerini sağlayan siklinlerin hücre döngüsündeki değişikliklere bağlıdır. Farklı tip siklinlerin hücre döngüsünün farklı evrelerinde üretilmesi, hücre döngüsü geçişlerinde farklı siklin-CDK komplekslerinin oluşumunu sağlar. Bu olay, hücre döngüsünün bir düzen içerisinde geriye dönmeksizin ilerlemesi için önemli bir olgudur [11].

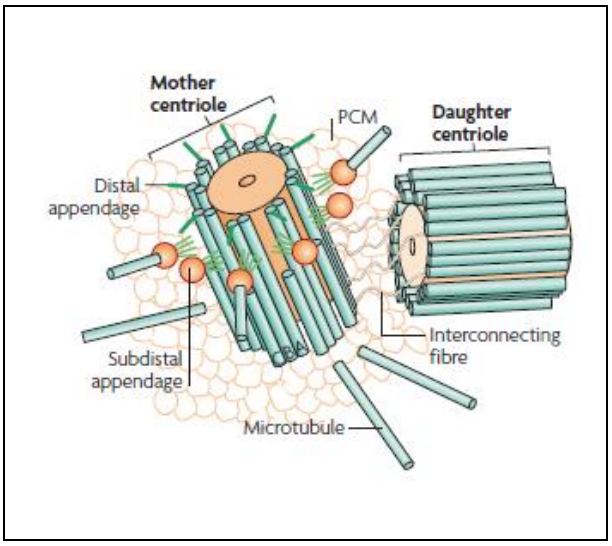


Şekil 2.3: Siklin-CDK kompleksleri tarafından hücre döngüsünün kontrolü.

2.1.2. Sentrozom Döngüsü

Hücre iskeleti; hücre organizasyonu, hareketliği ve bölünmesinin arkasındaki önemli bir oyuncudur. Hücre iskeletinin koordinatörlerinden biri mikrotübül organizasyon merkezidir (MTOC) [13].

Sentrozom, hayvanlar, yüksek mantarlar ve bazı ökaryotik soylarda mikrotübül hücre iskeletinin ana düzenleyicisi olarak bilinen organeldir. Yüksek ökaryotik organizmalarda, sentrozom membransız bir organeldir. Sentrozomlar, genellikle hücrenin merkezinde bulunur ve her hücre döngüsünde çoğaltılır. Mikrotübülleri organize etme yetenekleri sayesinde hücre polaritesine ve hücre bölünmesine katılırlar ve çoğu hayvan türünün gelişiminde anahtar rol oynarlar. Hayvan hücrelerinde, sentrozom elektro-yoğun bir yapıya sahip perisentriolar materyalin (PCM) çevrelediği birbirine dik konumlanan ve her biri dokuz mikrotübül üçlemesinden oluşan bir çift sentriyolden oluşur. PCM, sentriollerin etrafında bulunan büyük sarılı sarmal yapıdaki proteinlerin hiyerarşik toplanmasından elde edilen bir organizasyona sahiptir [14], [15]. Yapılan çalışmalarda, gama-tubulin ile lokalize olan perisentriol materyal proteinlerinin büyük bir çoğunluğunun sarılı-sarmal domainine sahip proteinlerden oluştuğu ve bu proteinlerin orta cisimcikte de konumlandığı belirlenmiştir [19].



Şekil 2.4: Sentrozom yapısının şematik gösterimi.

Hücre bölünmesi sırasında, sentrozom bir seri yapısal değişimlere maruz kalır. Sentrozom döngüsü 4 fazdan oluşur: (1) G1 ve S fazları boyunca sentrozom duplikasyonu, (2) G2 fazında sentrozom olgunlaşması, (3) mitotik fazda sentrozom ayrılması, (4) geç mitotik faz-G1 fazı geçişinde sentrozom çözülmesi. Sentrozomun hücre döngüsü ile ilişkili olarak çoğaltılmasını sağlayan hücre döngüsü kontrol sistemleri siklin-bağımlı kinazlardır (CDK). S fazı anahtar bileşeni Cdk2 proteinin siklin-A ve siklin-E ile kompleks oluşturması sentriol duplikasyonu için anahtar bileşenlerdendir. Aktif haldeki Cdk2'nin substratları Nucleophosmin, CP110, MPS1 proteinleridir. Nucleophosmin çoğaltılmamış sentrozomda bulunur ve Cdk2 tarafından fosforile edildiği durumda sentrozomdan ayrılır. Bu durumda pro-sentriol oluşumunu sağlar. Aynı şekilde, önemli bir sentrozomal protein olan CP110'un mitotik ve interfaz siklin-Cdk kompleksleri tarafından fosforile edilmesi durumunda S fazında sentrozom duplikasyonunu etkilediği düşünülmektedir. MPS1 ise SAC (spindle assembly checkpoint) kontrol noktası için temel rol oynayan bir protein kinazdır ve ana sentriol ve yavru sentriol arasındaki düzenlemelerde görev alır [16], [17].

Sentrozomda gama-tubulin halka kompleksi ve bazı PCM proteinlerin birikmesi ile mikrotübül çekirdeklenmesini sağlanarak sentrozom olgunlaşmasına izin verilir. Sentrozom olgunlaşmasının en önemli etkeni önceden bahsedildiği gibi fosforilasyondur. Fosforilasyondan sorumlu proteinler Polo-like kinaz (Plk) ve Aurora kinaz'dır [18], [20].

Mitozun erken safhalarında, sentrozomların ayrılmasını sağlayan motor proteinleri, profaz evresinin başlarında duplike olan iki sentrozom proteinlerinin

hücrenin kutuplara doğru çekilmesi için güç uygularlar. Bu ayrılma G2/M geçişinde olurken iki aşamada gerçekleşir. İlk olarak, ana sentriol arasındaki bağlantı yıkılır; ardından mikrotübül motor proteinleri aracılığı ile sentrozomlar ayrılır.

Kardeş kromatitlerin anafaz evresinde kutuplara ayrılmasından sonra, iki hücrenin ayrılmasını tetikleyen olayın ana ve yavru sentriol arasındaki oryantasyonun kaybolması, olgun sentriolin bölünme çizgisine doğru hareket etmeye başlaması ve bu hareketin hücre bölünmesinin son aşaması olan ayrılma için kilit bir adım olduğu düşünülmektedir. Döngüsünü tamamlayan hücrelerde, mitozdan sonra sentrozom, perisentriolar materyalin (PCM) çoğunu ve mikrotübül çekirdeklenme kapasitesini kaybeder [19].

2.2. Sitokinez

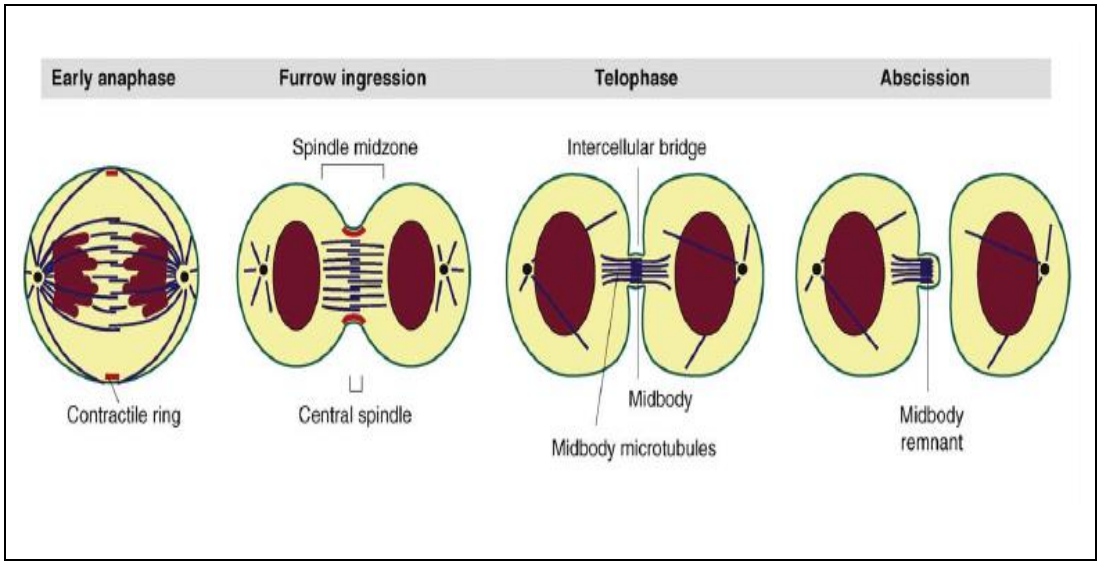
Mitoz tamamlandığında, sitoplazmik makromoleküllerin ve organellerin kardeş hücrelere eşit olarak paylaştırıldığı son aşamaya "sitoplazmik bölünme/sitokinez" denir. Mitozda oluşturulan iki yeni çekirdek ve sentrozomlar, sitokinez aşamasında her hücrede bir tek çekirdek ve bir tek sentrozom olacak şekilde paylaştırılır [8].

Simetrik olarak bölünen bir hayvan hücresinde sitokinez, kardeş kromatitlerin anafazdaki zıt kutuplara doğru hareket ettikten sonra, hücrenin ekvator bölgesinde bölünme çizgisi oluşması için ayrılma yarığının meydana gelmesi ile başlar. Bu ayrılma yarığı, plazma zarına bağlanan bir kasılma halkasının oluşumuna bağlıdır. Kasılma halkası, aktin ve miyozin filamentlerinden oluşan bir ağ yapısıdır ve miyozinlerin motor aktivitelerini kullanarak aktin filamentleri üzerinde yer değiştirmesi halinde kasılma sağlanır. Bölünme düzleminin pozisyonu ve kasılma halkasının oluşumu mikrotübüllerin iki populasyonu tarafından belirlenir: astral mikrotübüller ve merkezcil iğ mikrotübülleri. Merkezcil iğ mikrotübülleri, anafazda ayrılan kromozomlar arasında oluşan son derece stabil anti-paralel mikrotübül dizisidir. Astral mikrotübüller, sentrozomdan çevresel olarak yayılan dinamik mikrotübüllerdir. Bu astral mikrotübüllerin bir alt kümesi, iğ ipliklerinin kromozomal bölgeden bölünme düzlemine doğru büyür ve ekvator korteks ile doğrudan temas eder. Ayrıca, çoğu astral mikrotübülden daha stabildir [21].

Kasılma halkası düzeneği, aktin çekirdeklenmesini indükleyen ve miyozini aktive eden RhoA guanosin trifosfataz (GTPase) tarafından yönlendirilir. Sitokinez

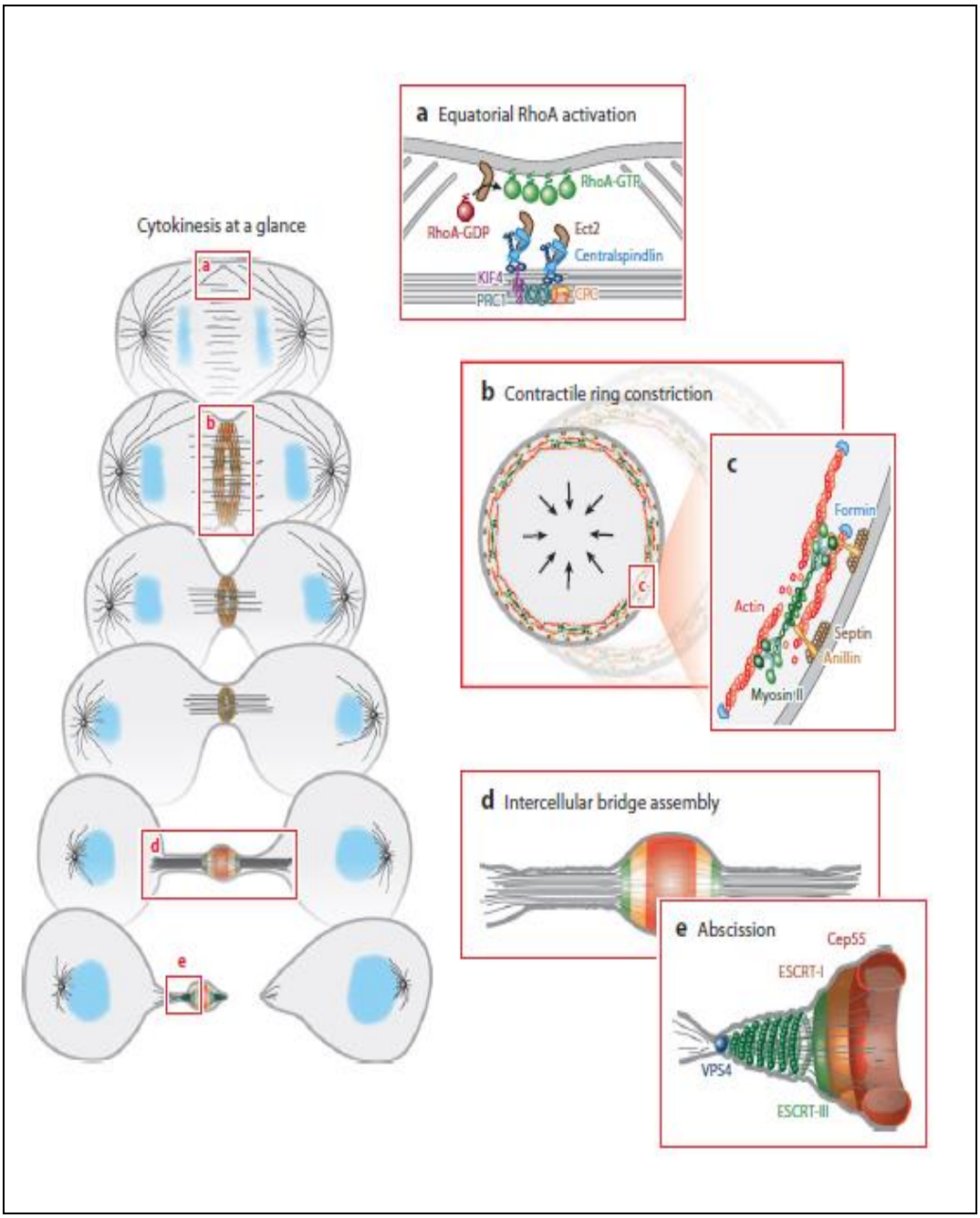
sırasında, bölünme düzlemi içindeki merkezcil iğ ipleri ve hücre korteksi ile ilişkili olan RhoA'nın aktivitesinin lokasyon bağımlı düzenlenmesi GEF'ler (Guanin nükleotid değiştirici faktör) ve GAP'lar (GTPaz aktive eden protein) tarafından yönlendirildiği düşünülmektedir.

Kasılma halkasının aşamalı olarak daralması ve birçok proteinin organizasyonu sonucu oluşan ve iki hücrenin son olarak tamamen ayrılmasını düzenleyen yapıya orta-"cisimcik (midbody)" denir. *Drosophila*'da yapılan son çalışmalar, orta-cisimciğin hücrenin kaderini belirlemede önemli bir yapı olduğunu ortaya çıkarmıştır [22].



Şekil 2.5: Sitokinez sırasında aktomiyozin halkası, ayrılma yarığı ve orta cisimcik oluşumu.

Aktin bağlanmasına yardımcı bir diğer iskelet proteini Anillin'dir. Anillin aktivatör olan RhoA and ROCK1/2'a F-aktin, miyozin ve septinin çapraz bağlanmasını sağlayarak sitokinetik kasılma halkasını stabilize eden bir multidomain proteindir. Hayvan hücreleri ile yapılan çalışmalarda, Anillin'in susturulduğu hücrelerde kasılma halkası girişimi ve oluşumundaki bozukluklardan dolayı sitokinezde kusurlar görülmüştür [22], [24], [25].



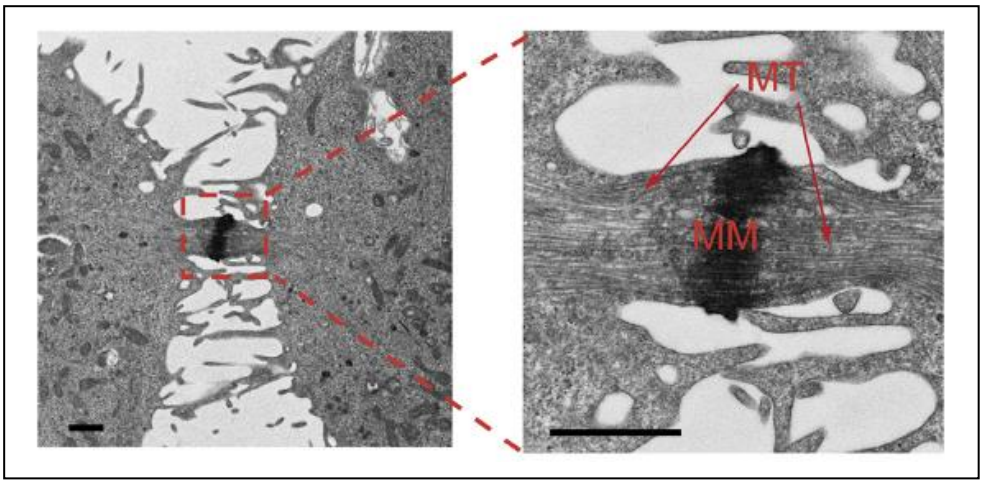
Şekil 2.6: Erken anafaz evresiyle başlayıp fiziksel ayrılmayla sonuçlanan sitokinez evreleri. a)Ekvatoral RhoA aktivasyonu, b)Aktomiyozin kasılma halkası c)Aktomiyozin kasılma halkası moleküler organizasyonu, d)Orta cisimcik, e)Ayrılma bölgesi proteinleri.

Kasılma ilerledikçe, yeni oluşan hücreler arasında oluşan merkezi dar hücre içi köprü görevi gören bir orta cisimcik (midbody) oluşumu gözlenir. Orta cisimcik, ESCRT-III proteinlerinden oluşan filamentlerin birleştirilmesini sağlayan ayrı bir membran bölünme olayı olan absisyonu yönetir. Şekil 2.6'de bölünme aşamalarında

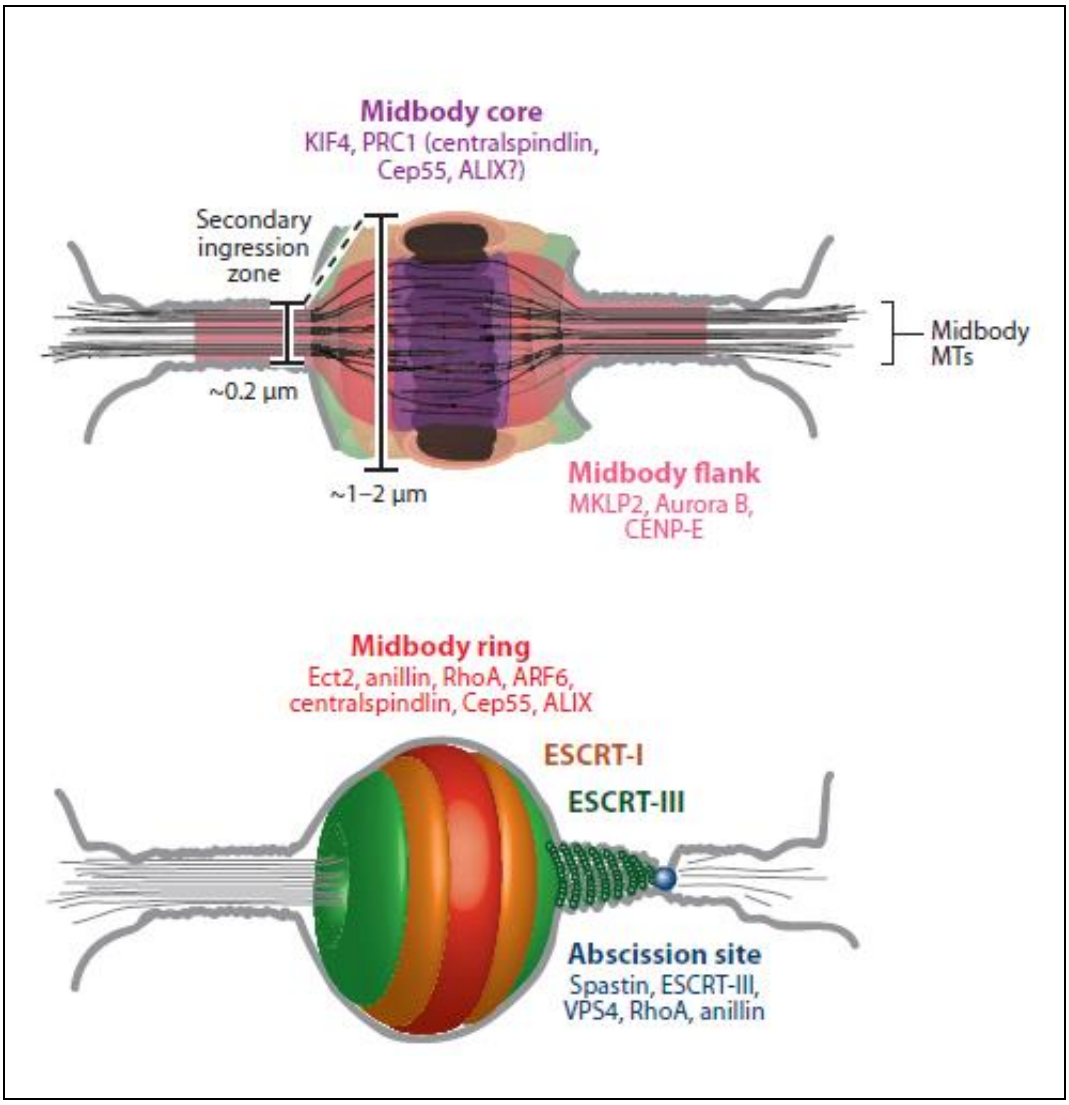
orta cisimcik oluşumu gösterilmiş ve bu organizasyonda yer alan proteinler şematize edilmiştir.

2.2.2. Orta Cisimcik (Midbody) Organizasyonu

Orta cisimcik ilk olarak 19. yüzyılın sonlarında Flemming tarafından tanımlanmış, ancak yarım yüzyıldan sonra elektron mikroskopunun (EM) ve daha yakın zamanda ise cry-elektron tomografisi ile ayrıntılı olarak analiz edilmiştir. Bu organel, merkezinde şekilsiz bir elektron yoğun matris ihtiva eden başlangıç çapı yaklaşık 1 µm olan mikro tüplerin sıkılaştırılmasından ibarettir. Orta cisimcik matrisi, ilk kez Flemming tarafından gözlemlenen ve böylece "Flemming body" olarak adlandırılan orta cisimciğin merkezi "çıkıntısına" karşılık gelir. Orta cisimcik statik bir yapı değildir ve sitokinezin son safhaları boyunca bir seri morfolojik değişimlere maruz kalır. EM tarafından gözlemlenen Orta cisimcik matrisindeki yoğunluklar yüksek protein konsantrasyonunu yansıtmaktadır. Orta cisimcik matrisi çevreleyen bölgelere genellikle "orta cisimcik kolları" denir. Kısacası, orta cisimcik matrisi ve kolları birlikte tüm orta cisimciği oluşturur. Şekil 2.7 ve Şekil 2.8'de bu bölgeler görüntülenmektedir [23].



Şekil 2.7: Elektron mikroskobu ile yakalanmış ayrılmakta olan kardeş hücreler arasında beliren köprü ve bu köprünün merkezinde orta cisimcik oluşumu. Ölçek 1 µm boyundadır.



Şekil 2.8: Orta cisimciği oluşturan bölümler ve bu bölümlerde görev alan proteinler.

2.2.3. Ayrılma

Hücre, topolojik olarak, ayrılma olarak bilinen sitokinezin son aşamasında iki ayrı kardeş hücreye bölünür. Kasılma halkası kapandıkça, orta bölgesi, hücre içi köprüyü düzenleyen elektro-yoğun bir şekilde doldurulmuş olan orta cisimciği oluşturmak üzere yeniden düzenlenir. Kontraktil halka plazma membranı altında olduğu için plazma membranını kesemez ve orta cisimciğin mikrotübüllerle yoğun bir şekilde organize olması, halkanın daralmasını ve ayrılmanın tamamlanmasını engeller. Bu nedenle, yakın zamanlı bir çalışma, hücre-hücre köprüsünün bir tarafındaki hücreler arasındaki bağlantıyı daraltarak ayrılma olayını ortaya çıkaran, diğer taraftan ortadaki mikrotübüllerin sökülmesi ile eş zamanlı olarak membran ile ilişkili ESCRT

(Endosomal Sorting Complex Required for Transport) filament sistemine bir geçiş olduğunu göstermektedir [28], [33].

Ayrılma yarığı oluşumundan hemen sonra, endozom ve golgi tarafından oluşturulan veziküller orta cisimcikte birikmeye başlamakta, sonrasında veziküllerin plazma membranıyla birleşmesi kardeş iki hücrenin birbirinden ayrılmasıyla sonuçlanmaktadır [29], [32]. Bu süreçte sentriolin, Rab 35, Rab11, t- ve v-SNARES ve BRUCE gibi ayrılmada etkili rol oynayan veziküllerle etkileşim halinde olan birçok faktör de görev almaktadır. Geri dönüşüm endozomları absisyonda önemli role sahiptir özellikle RAP11-FIB3 içeren endozomlar geç telofazda ayrılma yarığına taşınır ve kortikal aktin iskeletinin yıkılmasını regüle ederek absisyonu başlatmaktadır [30].

Absisyonun tamamlanmasında anahtar rol oynayan faktör ESCRT kompleksidir. Bu kompleks membran deformasyonu içeren pek çok biyolojik proseste yer almaktadır. Cep55, ESCRT alımını yönlendiren anahtar bir proteindir ve ESCRT-I ve ALIX, CEP55'e kenetlenir ve bu, proteinin merkezindeki alışılmadık bir sarılı-sarmal-bölgesine bağlanmak için rekabet eder. Plk1'in fosforillemesiyle Cep55, ESCRT proteini olan TSG101 ve ALIX ile bağlantı kurarak orta cisimcikte ESCRTIII kompleksinin birikmesini başlatmaktadır [34]. ESCRT partneri spastin mikrotübüllerin depolimerizasyonunu sağlayarak absisyondaki son fiziksel bağlantıyı sonlandırmaktadır [31].

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

Sarılı-sarmal bölge içeren-124 (Coiled-coil domain containing-124) proteini tüm ökaryotlarda korunmuş bir protein olup, yapılan çalışmalarda hücre içinde sentrozom, orta cisimcik ile birlikte koşullara bağımlı olarak hücrenin farklı kompartımanlarında yer aldığı gösterilmiştir. 19. kromozomun kısa kolunda bulunan bir gen tarafından kodlanan 223 aminoasitlik bir proteindir. Yapılan dizi analizleri sonucunda 5 ekzondan oluştuğu ve bu ekzonlardan birinin kodlanmadığı belirlenmiştir. Proteinin anti-N ucuna karşı geliştirilmiş poliklonal antikorlar yardımıyla yapılan immünolojik analizler sonucunda büyüklüğünün yaklaşık olarak 32 kDa olduğu tespit edilmiştir. Proteinin alternatif ikinci bir mRNA kodlanma dizisi olması nedeniyle, 176 aminoasit uzunluğunda 26kDa ağırlığında bir izoformunun bulunduğu da tespit edilmiştir [2]. Ayrıca, Ccdc124 proteini %42 oranında artı ve eksi yüklü aminoasitler (K, R, D, E, H) bulundurmakla birlikte, biyoinformatik analizlere dayanılarak olası 5 serin, 7 treonin ve 1 tirozin fosforilasyon bölgesine sahip olduğu düşünülmektedir.

Hücre döngüsünün interfaz evresinden geç anafaza kadar sentrozomda konumlanan Ccdc124 proteini, sitokinetik ayrılmayla beraber orta cisimciğe göç ettiği belirlenmiştir [2]. Proteinin hücre içi fonksiyonunun belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalarda, proteinin ifadesinin arttırıldığı ya da azaltıldığı hücrelerde sentrozom konumlanması etkilenmezken, hücre bölünmesinde aksaklıklar gözlemlenmiştir [2], [3]. Ayrıca, CCDC124 geni, CRISPR/Cas9 yöntemi ile hedeflenip mutant hücre hatları oluşturulduğunda yine hücre bölünmesinde aksaklıklar gözlenmiş ve çok çekirdekli hücrelerin oluştuğu immün-boyama yöntemleri ile tespit edilmiştir [4].

Yapılan çalışmalarda, Ccdc124 proteinin RasGEF1B ile etkileşim içerisinde olduğu belirlenmiştir. Northern blot analizleri sonucunda CCDC124 geninin iskelet kası, beyin, plesanta, yumurtalık, testis, karaciğer, dalak ve prostatta ekspresyonun çok olduğu tespit edilmiştir [2]. Ayrıca, CCDC124 proteinin etkileşim partnerlerinin bulunmasına yönelik yapılan çalışmalar sonucunda, etkileştiği doğrulanan proteinlerin birçoğunun mikroRNA biyogenezinde ve regülasyonunda ((Tarbp2, Ybx1, Adarb1 vs.- Merve TUZLAKOĞLU ÖZTÜRK, Yayına Hazırlanmakta Olan Data), “pre-mRNA splicing” ve DNA tamirinde görev aldığı görülmüştür. Ccdc124 proteinin Plk1 ile direkt olarak etkileşim gösterdiği birlikte çöktürme deneylerinde tespit edilmiştir [6], [7].

4. MİKRORNA BİYOGENEZİNİN REGÜLASYONU VE FONKSİYONLARI

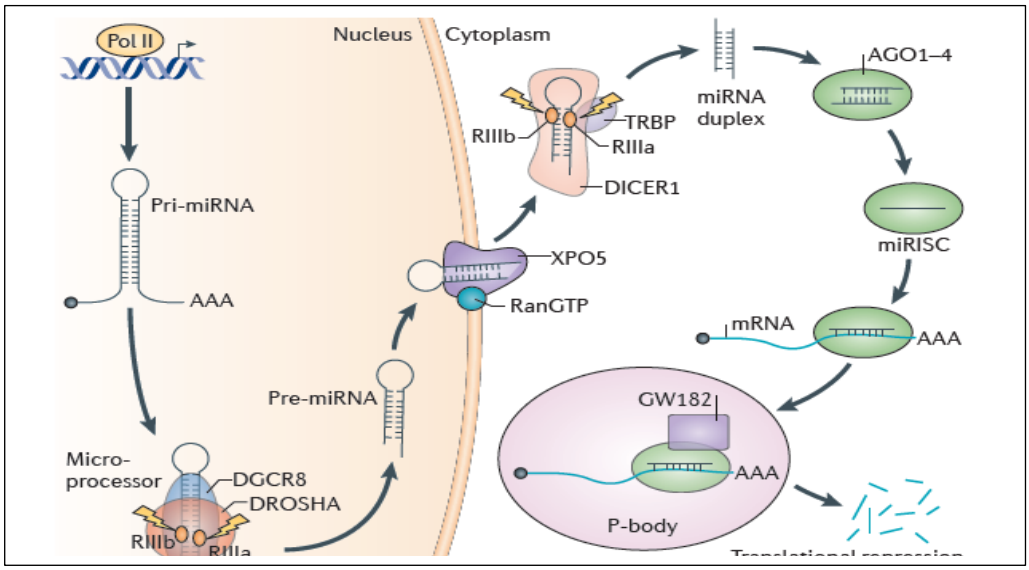
İlk olarak 1993 yılında Ambros ve Ruvkun grupları tarafından *Caenorhabditis elegans'ta* keşfedilen ve küçük kodlanmayan RNA'lar olarak bilinen mikroRNA'lar gen ekspresyonunun post-transkripsiyonel regülasyonunda önemli rol oynayan, yaklaşık olarak 19-23 nükleotit uzunluğunda büyük bir düzenleyici RNA molekül ailesidir [35], [37]. Bugüne kadar keşfedilmiş 24521 mikroRNA bulunurken, bu sayı günümüzde artmaya devam etmektedir. Evrimsel olarak korunmuş tek iplikli endojen olan bu RNA molekülleri ökaryotik organizmalarda çoğu gelişimsel ve hücresel işlemler olan hücre bölünmesi [39], [40] doku gelişimi [41], [42], hücre proliferasyonu [43], [44], hücre farklılaşması [45], nöral asimetri [46], metabolizma [47], kök hücre özellikleri [48], apoptoz [49], kanser oluşumu, protein salınımı [50] ve viral enfeksiyon [51] gibi geniş bir spektrumda gen regülasyonunda rol oynamaktadır. Hatta, bu küçük RNA moleküllerinin hücre-hücre iletişimini sağlayan sinyal molekülleri olarak servis edildiği belirlenmiş, çoğu hastalığın potansiyel biyobelirteçleri olarakta rapor edilmiş, değişen mikroRNA ekspresyon seviyelerinin spesifik tümör hücrelerine katkısı olduğu tespit edilmiştir. 2013 yılının ortalarında, insan genomunun Y kromozomu dışındaki tüm kromozomlarına dağılmış 2000'in üzerinde farklı mikroRNA'yı kodladığı ve tahminlere dayanarak insan genlerinin yaklaşık olarak %3-4'ünü oluşturduğu belirlenmiştir [35], [36], [37].

Yakın zamana kadar, mikroRNA'ların gen ekspresyonu üzerinde yalnızca hedef mRNA'nın negatif regülasyonu ile yaygın bir etkisinin olduğuna inanılmaktaydı. Bununla birlikte, artan çalışmalar, mikroRNA'ların spesifik hücresel koşullara, dizilere ve kofaktörlere cevap olarak baskılama ve uyarma yapabildiğini göstermektedir. Yapılan son çalışmalarda mikroRNA'ların farklı hücre kompartmanları arasında translasyon düzeyinde hatta post-transkripsiyonel düzeyinde görev yaptığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, mikroRNA'ların gen ekspresyonunu nasıl düzenlediğini açıklamayı daha da zorlaştırmıştır [36], [38].

4.1. MikroRNA Biyogenezi

MikroRNA (miRNA) biyogenezi, RNA polimeraz II aracılığıyla çekirdekte post- ya da birlikte-transkripsiyonel olarak işlenmesiyle başlar [52]. Hali hazırda tanımlanmış tüm miRNA'ların yaklaşık yarısı intrageniktir ve çoğunlukla intronlardan ve nispeten az sayıda protein kodlayıcı gen ekzonundan işlenirken, diğerleri intergeniktir, yani bir konakçı geninden bağımsız olarak kopyalanır ve kendi promotörleri tarafından düzenlenir. Bazen miRNA'lar, benzer "küme" bölgelerine sahip uzun bir transkript olarak kopyalanır ve bu durumdaki miRNA'lar bir aile olarak kabul edilir [53].

miRNA biyogenezi, iki Ribonükleaz III endonükleaz olan Drosha ve Dicer tarafından gerçekleştirilen hem nükleer hem de sitoplazmik bölünme olayları ile iki aşamalı bir süreçtir [75-81]. RNA polimeraz II tarafından transkripsiyonu yapılan miRNA geninden hairpin yapısı içeren, uzun ve olgun miRNA (pri-miRNA) oluşmaktadır. Ribonükleaz enzimi olan Drosha ve RNA bağlayıcı protein olan kofaktör DiGeorge Sendromu Kritik Bölge-8 (DGCR8) tarafından miRNA'nın hairpin yapısı uzaklaştırılır [57], [58]. Böylece 60-70 nükleotit uzunluğunda öncü-miRNA (pre-miRNA) oluşur. Öncü-miRNA, onun karakteristik sapını ve 3'çıkıntısını tanıyan Exportin-5 (XPO5) ve ona bağlı olan Ran guanosin trifosfataz (RanGTP) ile birlikte (XPO5 / RanGTP) sitoplazmaya taşınır [59], [60]. İlerleyen sitoplazmik işlemlerde, çift iplikli RNA-bağlayıcı protein TRBP ile kompleks halinde bir RNAaz olan Dicer tarafından hairpin yapısı ikinci bir kesimle uzaklaştırılıp 21-24 nükleotit uzunluğunda miRNA-dupleksi oluşturulur. Olgun miRNA'nın fonksiyonel zinciri Argonaute (Ago2) proteinleri ile birlikte RNA kaynaklı susturma kompleksi (RISC) içine yüklenir ve böylece RISC yapısı ile birlikte hedef mRNA'lar parçalama, transkripsiyonel baskılama ya da deadenilasyon yöntemleri ile susturulur [61]. Aksi takdirde, merkezi uyumsuzluklara sahip olan veya Ago2 yüklü olmayan miRNA dupleksleri pasif olarak çözülür ve bozulur [52].



Şekil 4. 1: MikroRNA biyogenez yolağına genel bakış.

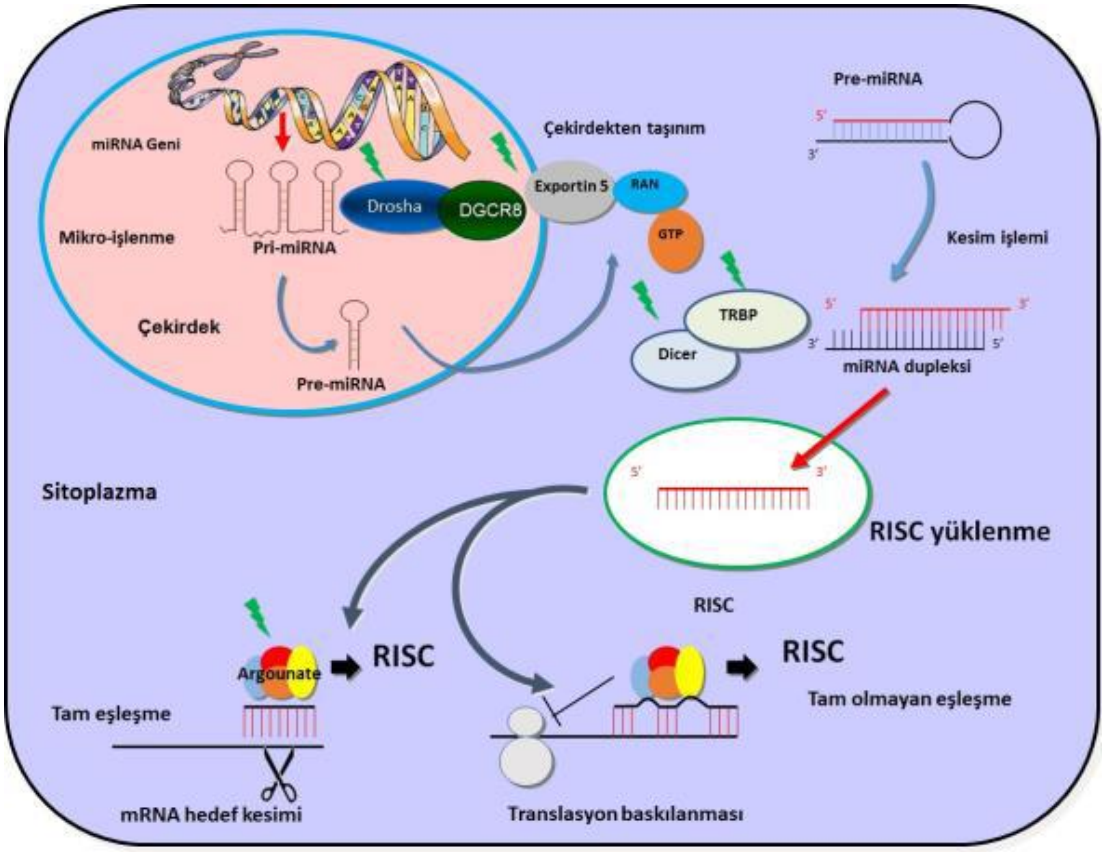
4.2. MikroRNA'ların Hedef Molekülü Tanıması

miRNA'ların hedef mRNA'lara bağlandığı ve ifadesini negatif olarak düzenlediği yaygın olarak kabul edilmektedir. Tek bir miRNA kılavuzu birkaç mRNA hedefini düzenleyebilirken ve bunun tersine birden fazla miRNA tek bir mRNA hedefini iş birliği içinde düzenleyebilmektedir [46].

Aktive edilmiş RISC kompleksi, hedef mRNA'ya kılavuz iplikçik ile hedefin 3'UTR'si arasındaki Watson-Crick baz eşleşmesiyle bağlanır [67], [68]. Hedef tanıma, temel olarak miRNA kılavuzunun tohum bölgesi (İNG., seed sequence) olan yani 5' ucunda bulunan 2-8 arasındaki bazlardaki eşleşmeye dayanır [69], [70], [71], [72]. Kılavuz ile hedef arasındaki tamamlayıcı alanların derecesi ve yapısının gen susturma mekanizmasını belirlediği düşünülmektedir. Ago2 endonükleaz kesimi sonucu mRNA parçalanması için genellikle mükemmele yakın, geniş kapsamlı baz-eşleşmesi tercih edilirken, daha yaygın olan translasyonel inhibisyon için her bölgede sadece orta derecede baz eşleşmesi olan birden fazla tamamlayıcı bölge gereklidir. Tohumda bağlanma, miRNA özgüllüğü ve aktivitesine katkıda bulunan etkileşimin termal stabilitesi için önemlidir [70], [73]. Tohumdaki G:U wooble (uyumsuzluk) baz eşleşmesi fenomeninin başlangıçta miRNA fonksiyonuna zarar verdiğini düşündürmekteydi. Dolayısıyla, miRNA:mRNA etkileşimi bir G:U wooble eşleşmenin varlığında meydana gelebilir ve miRNA'nın özgüllüğünü ve aktivitesini

etkiler [69], [70], [71], [74]. Ancak son araştırmalar, tüm miRNA'lar için bu durumun geçerli olmadığını ortaya koymuştur.

Susturucu bir miRISC kompleksinin oluşumu, GW182 protein ailesinin miRISC tarafından alınmasıyla başlar. GW182, miRNA'yı takip eden poli(A)-deadenilaz kompleksleri PAN2-PAN3 ve CCR4-NOT gibi diğer efektör proteinleri [75] elde etmek için gereken iskelet yapıyı sağlar [76], [77]. GW182'nin triptofan (W)-tekrarları ve "poli (A) -birleştirme proteini C" (PABPC) arasındaki etkileşim, etkili deadenilasyonu teşvik eder [76]. "Decapping protein 2" (DCP2) ve ilişkili proteinler tarafından 5'cap'in uzaklaştırma işlemi kolaylaştırıldıktan sonra, exoribonuclease 1 (XRN1) tarafından 5'-3' degradasyon gerçekleşir [78] (Şekil 4.2).



Şekil 4.2: MikroRNA biyogenezi ve hedef mRNA ile eşleşmesi.

4.3. mikroRNA-138'in Hücredeki Rolü

MikroRNA'ların hücrede çeşitli biyolojik fonksiyonlarda görev aldığı bilinmektedir. Gen ekspresyonun düzenlenmesinde ve dolayısıyla protein ifadesindeki önemi, birçok kanserde anormal miRNA seviyeleri gen ifadesini aşağı veya yukarı tetiklediğinden, birçok organizmada hastalık oluşumuyla ilişkilidir.

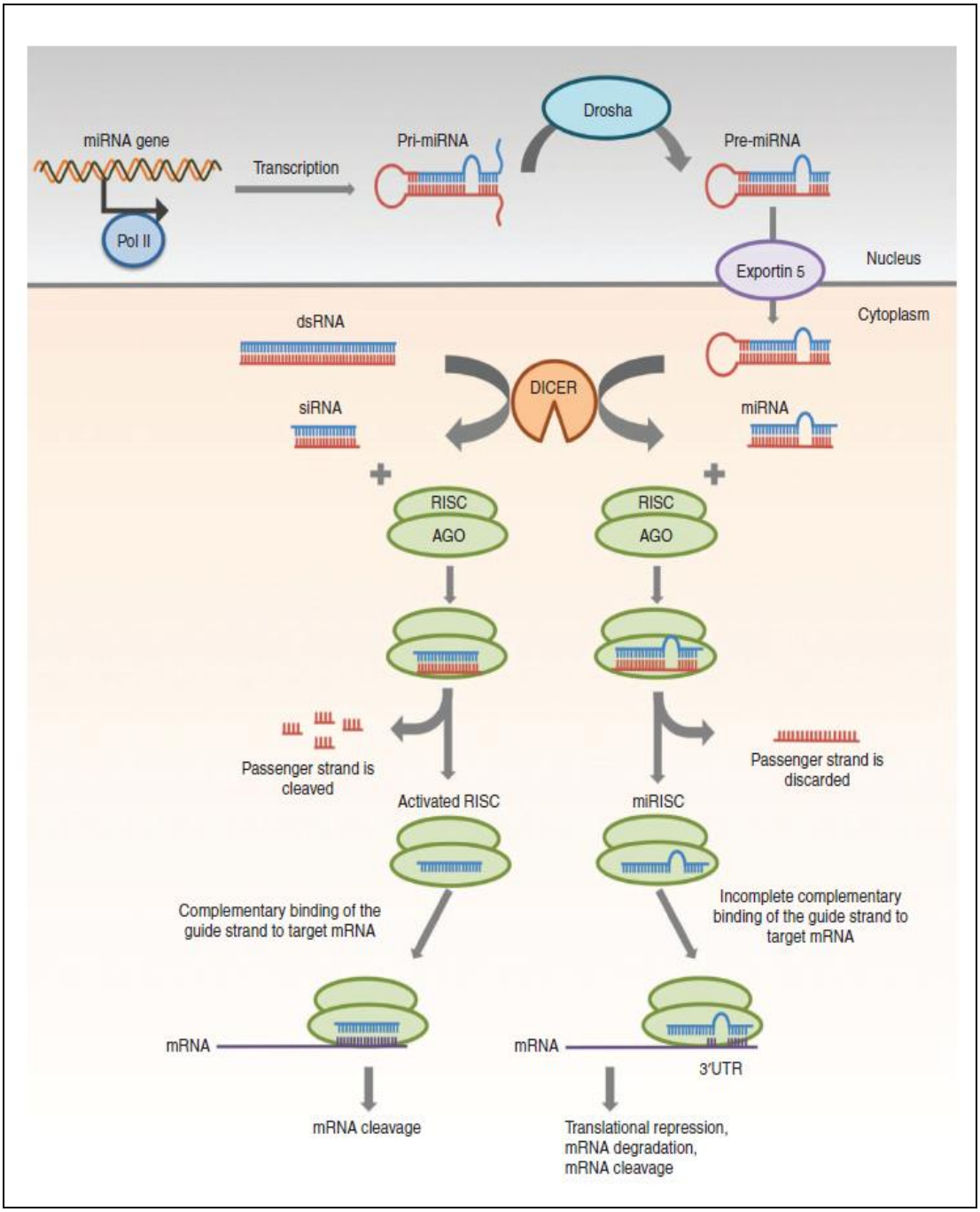
MikroRNA-138'in (miR-138) yapılan araştırmalar sonucunda çeşitli genlerin ifadelerini hedeflediği tespit edilmiştir. *Liu* ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada miR-138'in skuamöz karsinoma hücre hatlarında epitel-mezenkimal geçişi (EMT) baskıladığını, dolayısıyla hücre göçünü ve istilasını düzenlediği gösterilmiştir [86]. *Lee* ve arkadaşlarının yaptığı çalışma ise; AsPC-1 ve RL95-2 hücrelerinde miR-138 transfeksiyonundan sonra "nötrofil jelatinaz ile ilişkili lipokalinin" (NGAL) ifadesinin ve göç kabiliyetinin azaldığını, bunun sonucunda NGAL baskılanmasının tümör metastazında malignite için gerekli olan bir adım olan epitelyal mezenkimal geçiş yeteneğinin kaybına yol açabileceğini öne sürmektedir [87].

Yeh ve arkadaşları, yumurtalık kanseri ile ilgili çalışmalarında, miR-138'in yumurtalık kanser hücre hattının istilasını ve metastazı baskılamada potansiyel bir terapötik ajan olabileceğini göstermişlerdir [88]. Başka bir çalışmada ise, *Liu* ve arkadaşları bir onkogen olan siklin D1'in (CCND1) direkt olarak miR-138 tarafından hedeflendiğini tespit etmişler ve CCND1 mRNA'sının miR-138 tarafından ifadesinin azaltıldığını ve NPC hücre hatlarında hücre döngüsünün G1 evresinde durduğunu göstermişlerdir [89].

4.4. miRNA ve siRNA arasındaki benzerlik ve farklılıklar

miRNA ve siRNA'ların arasında belirli benzerlikler ile birlikte farklılıklar da bulunmaktadır. İkisi de Dicer enzimi tarafından işlenir ve karmaşık RISC kompleksine dahil edilir. Fakat miRNA'lar tek iplikli iken siRNA'ların ekzojen çift iplikli olduğu düşünülmektedir. siRNA ve miRNA arasındaki diğer bir fark, siRNA'lar hayvan hücrelerindeki mRNA hedeflerine mükemmel bir uyumlulukla bağlanırlarken, miRNA'lar hatalı eşleşmeleri sayesinde birden fazla mRNA dizisinin translasyonunu inhibe edebilirler. siRNA ve miRNA'nın her ikisi de RNA'nın indüklediği transkripsiyonel susturma (RISC) adı verilen bir işlemle epigenetikte bir rol

oynayabilir. Dolayısıyla, aynı şekilde, her ikisi de kontrol edici gen ifadesinde oynadıkları roller nedeniyle terapötik kullanım için önemli hedeflerdir [91].



Şekil 4.3: siRNA ve miRNA'ların gen susturma mekanizmaları.

5. MATERYAL VE METOT

5.1. Materyal

5.1.1. Agaroz Jel Solüsyonları

%1 Agaroz Jel: 1g agaroz 100ml 1X TAE'de çözülmüştür. Son konsantrasyonu 1X olacak şekilde Red-Safe eklenmiştir.

- RedSafe

  1mg Red Safe 1ml ddH2O'da çözülmüştür (1mg/ml).

- 50X TAE

  242g Tris, 37.2g EDTA, 57.1 ml Glacial Asetik Asit karıştırılıp ddH2O ile 1L'ye tamamlanmıştır. Çalışma solüsyonu olarak 1X'e seyreltilmiş hali kullanılmıştır.

5.1.2. Mikrobiyoloji Suşları

Bakteriyel suş olarak *Escherichia coli* (E. coli) DH5α kullanılmıştır.

5.1.3. Mikrobiyoloji Besi Yeri ve Solüsyonları

- LB Besi yeri

  10 g pepton, 5g maya ekstraktı ve 10g NaCl 1 litre ddH_2O içerisinde çözülmüş ve otoklavlanmıştır.

- Agar Besiyeri

  15 gr Bacto agar LB besi yerine eklenip otoklavlanmıştır. Otoklav sonrası petrilere dökülerek kullanılmıştır.

- %80 Gliserol Bakteri Stok Solüsyonu

  80ml %100 gliserol 20ml ddH_2O eklenip otoklavlanmıştır.

- 0.5 M PIPES Solüsyonu (pH 6.7)

15.1g PIPES 80ml ddH_2O da çözülüp 5M KOH ile pH 6.7 ye ayarlanıp ddH_2O ile 100ml ye tamamlanmış ve 0.22 µm filtre ile filtrelenmiştir.

- Inoue Ultra-kompetan Hücre Tamponu

0.5 M PIPES Solüsyonu (pH 6.7) son konsantrasyonda 10 mM olacak şekilde, 55 mM $MnCl_2.4H_2O$, 15 mM $CaCl_2.2H_2O$, 250 mM KCl ile karıştırılıp ddH_2O ile 1L'ye tamamlanmış ve 0.22 µm filtre ile filtrelenmiştir.

- Ampisilin

100 mg toz ampisilin 100 ml ddH_2O içerisinde çözülüp filtre edilerek stok solüsyonu elde edilmiştir. Çalışma solüsyonu 100µg/ml'dir.

5.1.4. Oligonükleotitler

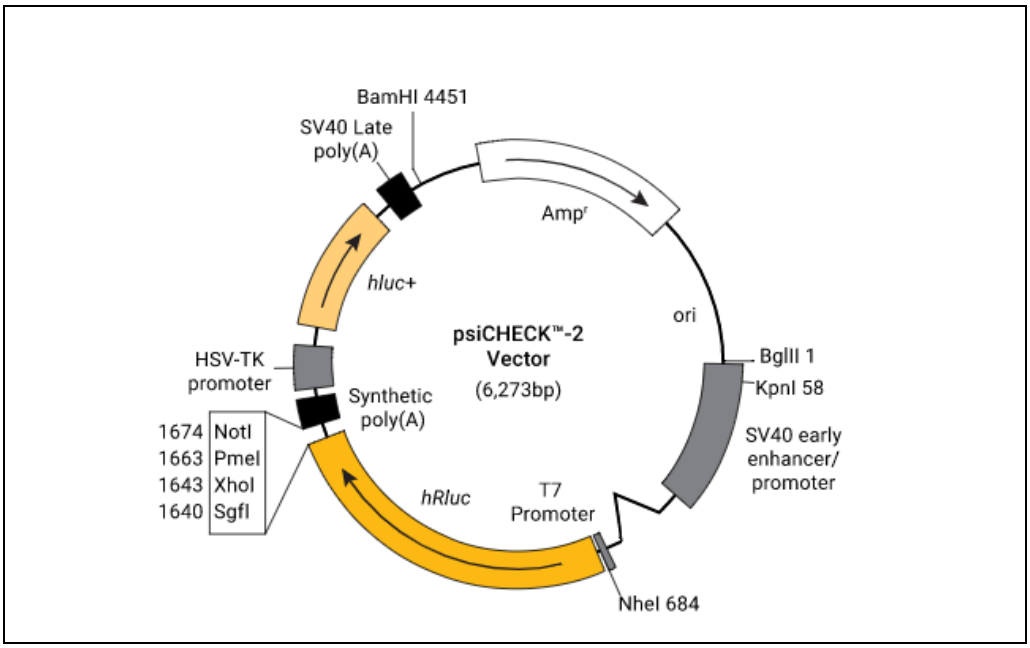
PCR ve yönlendirilmiş mutagenez deneylerinde kullanılan oligonükleotitler aşağıda Tablo 5.1'de belirtilmiştir ve ticari olarak sentezlettirilmiştir (IONTEK, İstanbul, Türkiye).

Tablo 5.1: Kullanılan primerler ve dizileri.

PRİMER ADI	PRİMER DİZİSİ (5'-3')
PSİCHECK-2_SEQ_PRIMER	GCTAAGAAGTTCCCTAA
CCDC124_3'UTR_FRW	TACTCTCGAGCTTCAATGCCCCCAAGTG
CCDC124_3'UTR_REV	GTAGCGGCCGCTAGGCTTCAAGTGCCTCA
CCDC124_3'UTR_MUT1_FRW	GCCATGCTCTTATCATTCGCCACCCGTCCT
CCDC124_3'UTR_MUT1_REV	AGGACGGGTGGCGAATGATAAGAGCATGGC
CCDC124_3UTR_MUT2_FRW	CCAAGGCGCCGGGCCTTAGGGCCATGCTCT
CCDC124_3UTR_MUT2_REV	AGAGCATGGCCCTAAGGCCCGGCGCCTTGG

5.1.5. Vektörler

PCR, moleküler klonlama ve yönlendirilmiş mutagenez deneylerinde Promega firması tarafından temin edilen psiCHECK-2 vektörü kullanılmıştır (Şekil 5.1).



Şekil 5.1: psiCHECK-2 vektörünün şematik gösterimi.

5.1.6. Hücre Hattı Seçimi

- HeLa Hücreleri

Hela hücre hattı, Johns Hopkins Hastanesi Cerrahi Departmanı'nda Dr George O. Gey' in Doku Kültürü Laboratuvarı'nda 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 bu hücre hattının seçilmesinde etken olmuştur.

5.1.7. Hücre Kültürü Solüsyonları

- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)

Besi yeri, 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 bir arada olmasını sağlayan Kaderin moleküllerini parçalayan bir enzimdir. Çalışmalar sırasında -20°C’ ta saklanan enzim, DPBS içerisinde son konsantrasyonu 3X olacak şekilde hücrelere uygulanmıştır.

- Hücre Dondurma/Saklama Besi yeri

Fetal sığır serumu (Gibco 10270106) içerisine %10 Dimetil Sülfoksit (DMSO) (Santa Cruz Biotechnology SC-358801) eklenerek hazırlanan dondurma/saklama besi yeri, karanlık ortamda, +4 ^{o}C’ta stoklanarak kullanılmıştır.

5.1.8. İmmünoblot Solüsyonları

- RIPA Liziz Tamponu

Son konsantrasyonu 5X olacak şekilde hazırlanan tampon 250 Mm Tris, 750 Mm NaCl, %5 SDS, %1 NP40, %8 Igepal içermektedir.

- RIPA Liziz Solüsyonu

1,5 X RIPA liziz tamponuna son konsantrasyonu 1X olacak şekilde proteaz inhibitörü eklenerek hazırlanmıştır.

- 50X Proteaz İnhibitörü solüsyonu

1 tablet proteaz inhibitörü (Roche 11 873 580 001) 1ml ddH_2O içerisinde çözülüp -20°C' de muhafaza edilerek kullanılmıştır.

- SDS-PAGE ve Jel Formülasyonları

Ayırma ve yürütme jelleri Tablo 5.2 ve Tablo 5.3'te verilen bileşen ve oranlar kullanılarak hazırlanmıştır.

Tablo 5.2: Yürütme jeli için gerekli malzemeler ve miktarlar.

YÜRÜTME JELİ	%12
1.5 M Tris-HCl pH 8.8	1250 µl
ddH_2O	1675 µl
% 30 Acryl / bis (37.5:1)	2000 µl
% 25 SDS	20 µl
%10 APS	50 µl
TEMED	5 µl

Tablo 5.3: Ayırma jeli için gerekli malzemeler ve miktarlar.

AYIRMA JELİ	%4
0.5 M Tris-HCl pH 6.8	1250 µl
ddH_2O	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 ddH_2O içerisinde çözülerek 1L' ye tamamlanmıştır. Her deneyde taze hazırlanmak koşuluyla, 1X transfer tamponu %20 metanol içerecek şekilde ddH_2O hazırlanarak soğuk olarak kullanılmıştır.

- Yürütme Tamponu, 1X

Her deneyde taze hazırlanmak koşuluyla, son konsantrasyonda 1X transfer tamponuna %4 oranında SDS eklenerek ddH_2O ile 1L"ye tamamlanmıştır.

- TBS, 10X

24.2 g Tris ve 87.6 g NaCl 1 L ddH_2O içerisinde çözülerek, pH'ı 7.6 olacak şekilde ayarlanmıştır.

- 1X TBS-T

10X TBS solüsyonu ddH_2O içerisinde 1X'e düşürülüp içerisine %1 Tween-20 eklenmiştir.

- 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8

ddH_2O içerisinde 181,5 g Tris çözülüp pH 8.8 'e ayarlanmıştır ve 1L'ye tamamlanmıştır.

- 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8

ddH_2O içerisinde 60,5 g Tris çözülüp pH 6.8 'e ayarlanmış ve 1L'ye tamamlanmıştır.

- %10 APS Solüsyonu

Her deneyde taze hazırlanmak koşuluyla 0.1 g amonyum persülfat, 1 ml ddH_2O içerisinde çözülerek kullanılmıştır.

- WB Bloklama solüsyonu

1X TBS-T içerisinde ağırlıkça %5 BSA veya yağsız süt tozu çözülerek hazırlanmıştır.

5.1.10. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Bileşenleri

Standart PCR amplifikasyonları için kullanılan bileşenleri Tablo 5.4' de belirtilmiştir.

Tablo 5.4: PCR deney malzemeleri ve miktarları.

BİLEŞENLER
100 ng Kalıp DNA
0.5 µM Forward Primer
0.5 µM Reverse Primer
0.2 mM dNTP Mix
1.5 mM $MgCl_2$
1,25U Taq DNA Polimeraz
1X Taq Buffer

Yönlendirilmiş mutagenez yöntemi için kullanılan bileşenler Tablo 5.5'da belirtilmiştir.

Tablo 5.5: Yönlendirilmiş mutagenez PCR deney malzemeleri ve miktarları.

BİLEŞENLER
20 ng kalıp vektör
0.2 µM Forward Primer
0.2 µM Reverse Primer
250 µM ya da 0.2 mM dNTP
1X buffer
1,5 µl Pfu Ultra II DNA polimeraz

5.1.11. Ligasyon Deney Bileşenleri

Ligasyon deneyinde kullanılan bileşenler aşağıdaki Tablo 5.6' de belirtilmiştir.

Tablo 5.6: Ligasyon deneyi bileşenleri ve konsantrasyonları.

BİLEŞENLER
1X Ligasyon Tamponu
T4 DNA Ligaz (5 U)
150 ng Kesilmiş Vektör
Entegre edilecek DNA bölgesi (3:1 veya 5:1 molar oranda)

5.1.12. Hücre Transfeksiyonu

Lüsiferaz testi ve western blot deneylerinde vektörlerin ve mikroRNA'ların transfeksiyonu için Lipofectamine-2000 reaktifi kullanılmıştır. siRNA'ların transfeksiyonu ise Lipofectamine-RNAiMAX reaktifi ile gerçekleştirilmiştir.

Tablo 5.7: HeLa hücre hattının vektörlerle transfeksiyon malzemeleri ve miktarları.

KÜLTÜR KABI	EKİLEN HÜCRE SAYISI	OPTİMEM TAMPON MİKTARI	PLAZMİT DNA MİKTARI	LİPOFECTAMİNE – 2000 REAKTİF MİKTARI	TOPLAM BESİYERİ (SERUMLU)
96-kuyu petri	10.10^3	20 µl	50 ng ya da 100 ng	0,3 µl	100 µl

Tablo 5.8: HeLa hücre hattının vektörlerle ve mikroRNA ile transfeksiyon malzemeleri ve miktarları.

KÜLTÜR KABI	EKİLEN HÜCRE SAYISI	OPTİMEM TAMPON MİKTARI	PLAZMİD DNA MİKTARI	MİKRORNA MİKTARI (miR138 veya miRNegatif)	LİPOFECTAMİNE-2000 REAKTİF MİKTARI	TOPLAM BESİYERİ (SERUMLU)
96-kuyu petri	10.10^3	20 µl	50ng ya da 100ng	20nM (1µl)	0,3 µl	100 µl

Tablo 5.9: HeLa hücre hattının siRNA ile transfeksiyon malzemeleri ve miktarları.

KÜLTÜR KABI	EKİLEN HÜCRE SAYISI	OPTİMEM TAMPON MİKTARI	siRNA MİKTARI	LİPOFECTAMİNE-RNAiMAX REAKTİF MİKTARI	TOPLAM BESİYERİ (SERUMLU)
6-kuyu petri	12.10^4	600 µl	10 nM (1,5µl)	6 µl	3 ml

Tablo 5.10: HeLa hücre hattının siRNA ve vektörlerle transfeksiyon malzemeleri ve miktarları.

KÜLTÜR KABI	EKİLEN HÜCRE SAYISI	OPTİMEM TAMPON MİKTARI	siRNA MİKTARI	PLAZMİD DNA MİKTARI	LİPOFECTAMİNE-RNAiMAX REAKTİF MİKTARI	TOPLAM BESİYERİ (SERUMLU)
96-kuyu petri	10.10^3	20 µl	10nM (0,5µl)	50 ng	0,2 µl	100 µl

5.1.13. Lüsiferaz Testi Solüsyonları

- Dual-Glo Lüsiferaz Reaktifi

Promega firmasından satın alınan kit içerisinde hazır olarak bulunan 100 ml Dual-Glo Lüsiferaz Tamponu liyofilize olan Dual-Glo substratının üzerine transfer edilerek reaktif oluşturulmuştur. Bu reaktif -80ºC'ta muhafaza edilerek kullanılmış.

- Dual- Glo Stop & Glo Reaktifi

Bu reaktif deney aşamasında Dual Glo Stop& Glo Substrate, Dual Glo Stop& Glo Tamponu içerisinde 1:100 oranında karıştırılarak taze olarak hazırlanmıştır. Dual Glo Stop& Glo Tamponu ve Dual Glo Stop& Glo Substrate -20ºC'ta muhafaza edilmiştir.

5.1.14. Kullanılan Antikorlar

Western blot deneylerinde kullanılan antikorlar sırasıyla aşağıda belirtilmiştir (Tablo 5.11).

Tablo 5.11: Kullanılan Antikorlar.

ANTİKOR	ELDE EDİLDİĞİ ORGANİZMA	FİRMA	KATALOG NUMARASI	WB oranı
Ccdc124	Tavşan	Protein Tech	27106-1-AP	1/1000
Calnexin	Tavşan	Abcam	ab22595	1/2000
Rabbit IgG	Keçi	Sigma Aldrich	A9169	1/5000
Mouse IgG	Tavşan	Sigma Aldrich	A9044	1/5000
α-Tubulin	Fare	Sigma Aldrich	T5168	1/1000

5.1.15. Kullanılan Cihazlar

Deneylerde kullanılan cihazlara, cihazların markalarına ve model numaralarına ait liste aşağıdaki Tablo 5.12' da yer almaktadır.

Tablo 5.12: Kullanılan cihazlar.

CİHAZIN ADI	CİHAZIN MARKASI	CİHAZIN MODELİ
İmmunoblot Ekipmanları	BIO-RAD	Mini-PROTEAN® Tetra Handcast Systems
Agaroz Jel Yürütme Sistemi	BIO-RAD	Wide Mini-Sub® Cell GT Cell
Agaroz Jel ve Immunoblot Görüntüleme Cihazı	BIO-RAD	ChemiDoc XRS+
Canlı Hücre Görüntüleme Mikroskobu	Leica	DMi8
Çalkalayıcı	Labnet	ROCKER 25
Hassas Terazi	ADAM	PGW 253i
Kuru Banyo (Isı Bloğu)	Benchmark	BSH1002-E
Döndürücü/Çalkalayıcı	Biosan	RS-60
Vortex	SCILOGEX	MX-S
Soğutmalı Eppendorf Santrifüj Cihazı	HITACHI	CT-15RƐ
Soğutmalı Falkon Santrifüj Cihazı	NÜVE	NF-1200R
PCR Cihazı	Biometra	Analytik-Jena
Laminar Akım Kabini	Cryste	
İnkübatör	Heal Force	Smart Cell
Su Banyosu	Wisd	WiseBath
Multimod Mikroplaka Okuyucu	Thermo Scientific	Varioskan Flash

5.2. Metot

5.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Polimeraz zincir reaksiyonu aşağıda belirtilen sıcaklıklarda gerçekleştirilmiştir.

Tablo 5.13: Uygulanan PCR Şartları.

SÜREÇ	SICAKLIKLAR	SÜRELER	TEKRAR SAYISI
Ana Denatürasyon	94 ºC	5 dk	1 defa
Denatürasyon	94 ºC	30 saniye	29 defa
Bağlanma	60 ºC	1 dk	
Uzama	72 ºC	1dk / 1kb	
Son Uzama	72 ºC	7 dk	1 defa

5.2.2. Restriksiyon Endonükleaz Kesimi

1 µg DNA'yı kesmek için totalde 4 ünite enzim olacak şekilde reaksiyon kurulmuştur. Reaksiyon 37ºC'ta 30dk-1saat arasında bekletilmiştir. Enzim kesiminde NotI ve XhoI enzimleri kullanılmıştır.

5.2.3. Nükleik Asit Konsantrasyon Tayini

Nükleik asitlerin konsantrasyonları ve saflıkları Nanodrop cihazında belirlenmiştir.

5.2.4. Yönlendirilmiş Mutagenez

Hedef bölgeye uygun tasarlanan mutant primerler ile plazmit DNA'nın çoğaltılması sağlanmıştır. Yönlendirilmiş mutagenez için PCR amplifikasyonu sıcaklık koşulları aşağıda tabloda belirtildiği gibidir.

Tablo 5.14: Yönlendirilmiş mutagenez için uygulanan PCR Şartları.

SÜREÇ	SICAKLIKLAR	SÜRELER	TEKRAR
Ana Denatürasyon	94 ºC	2 dk	1 defa
Denatürasyon	94 ºC	30 saniye	30 defa
Bağlanma	56 ºC -61 ºC	1 dk	
Uzama	72 ºC	90 saniye / 1kb	
Son Uzama	72 ºC	7 dk	1 defa

PCR sonrası örneklerden 5 µl alınıp 1X Yükleme boyası ile karıştırılıp agaroz jel elektroforezinde yürütülüp amplifikasyon durumu incelenmiştir. Ürün oluşumu gözlenen örneklere DpnI kesimi uygulanmıştır. Buna göre, ürünlere 1X olacak şekilde CutSmart Tampondan 5 µl ve 1 µl DpnI enzimi eklenerek 2 saat 37 ºC'ta inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda 1X T4 DNA Ligaz Tamponu ve 2 µl T4 DNA Ligaz enzimi eklenerek karışım 16 saat 16ºC'ta inkübe edilmiştir. Gece boyu ligasyonu sağlanan örneğin hacmi 3 eşit parçaya bölünerek transformasyon aşamasına geçilmiştir (Bknz., Bölüm 5.2.9).

5.2.5. Agaroz Jelde DNA'nın Yürütülmesi

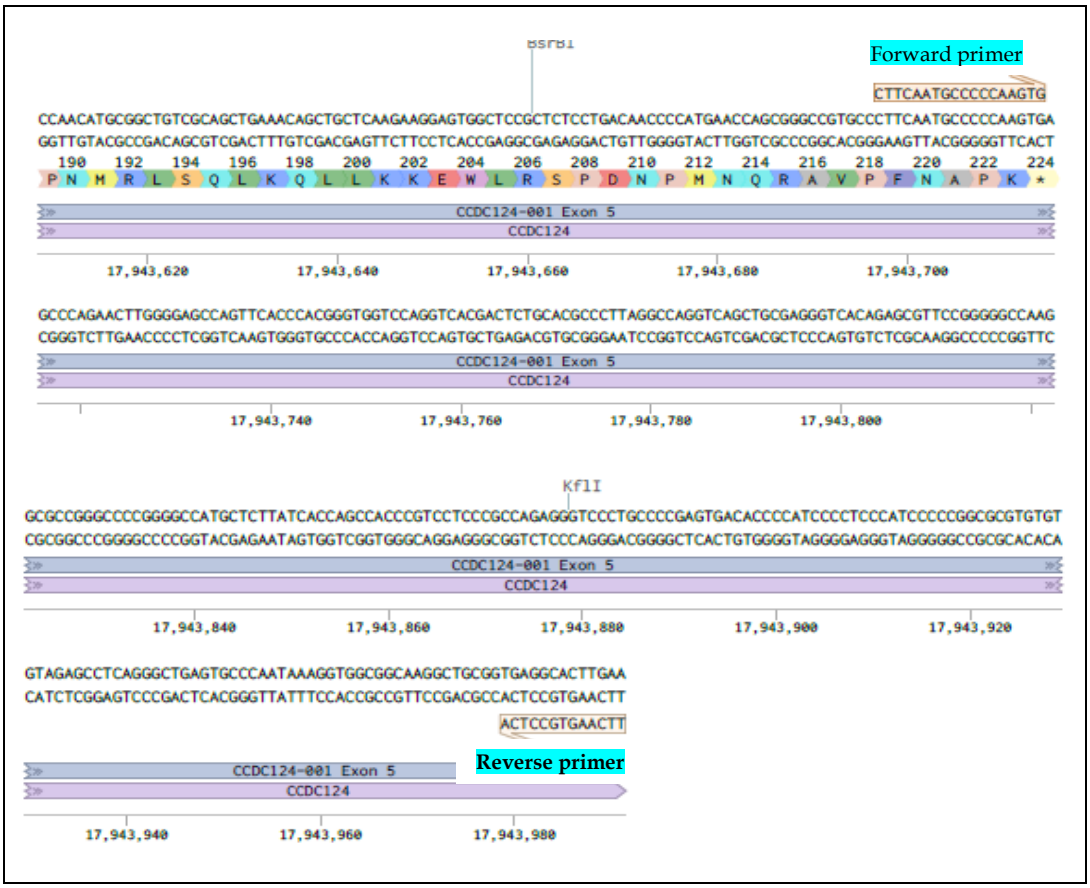
%1'lik olacak şekilde uygun miktar agaroz 1X TAE Tamponun içerisine eklenip mikrodalga fırında eritilmiştir ve içerisine son konsantrasyonu 10 µg/ml olacak şekilde RedSafe eklenmiştir. Örnekler 6X Yükleme boyasının son konsantrasyonu 1X olacak şekilde hesaplanıp jel kuyularına yüklenmiştir. Örnekler DNA'nın büyüklüğüne uygun volt ve sürelerde yürütülmüştür.

5.2.6. Agaroz Jelden DNA İzolasyonu

Klonlanacak DNA bölgeleri PCR yöntemi ile çoğaltıldıktan sonra agaroz jelde yürütülüp uygun büyüklükte olup olmadıkları kontrol edilmiştir ve QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Cat No: 28704) kullanılarak jelden izole edilmiştir.

5.2.7. Vektörlerin Oluşturulması

CCDC124 geninin 3'UTR bölgesini amplifiye etmek için bu bölgeye uygun ileri (CCDC124-3'UTR-Frw) ve geri (CCDC124-3'UTR-Rvr) primerler tasarlanmıştır. Amplifiye edilen CCDC124-3'UTR bölgesi ve psiCHECK-2 vektörü XhoI ve NotI enzimleri ile kesilmiştir. Kesilen 3'UTR bölgesi psiCHECK2 vektörüne klonlanarak psiCHECK-3'UTR vektörü elde edilmiştir. psiCHECK-Mutant1 ve psiCHECK -Mutant2 vektörleri ise yönlendirilmiş mutagenez yöntemi ile psiCHECK-3'UTR üzerinde uygun mutant primerler kullanılarak elde edilmiştir (Şekil 5.2).



Şekil 5.2: CCDC124-3'UTR bölgesi ve tasarlanan forward ve reverse primer bölgeleri.

Hedef bölge olan CCDC124 geninin 3'UTR bölgesinin tamamı tasarlanan CCDC124_3'UTR_FRW ve CCDC124_3'UTR_REV primerleri ile PCR yöntemi ile çoğaltılmıştır. Çoğaltılan bu DNA bölgesi ve klonlama yapılacak olan psiCHECK2 vektörü sırasıyla XhoI ve NotI restriksiyon enzimleri ile kesim bölgelerinden kesilmiştir. Kesim sonrası PCR ürünümüz 3'UTR bölgesi ve psiCHECK2 vektörü

uygun sıcaklık koşullarında ligasyonları sağlandıktan sonra *E.coli* DH5α suşuna transforme edilmiştir. Seçilen bakteri kolonilerine mini-prep DNA izolasyonu protokolü uygulanarak izole edilen plazmidlerin ligasyonunun olup olmadığının kontrolleri PCR (Şekil 6.4) ve restriksiyon enzim kesimi (Şekil 6.3) yöntemleri ile yapılmıştır.

5.2.8. Ultra Kompetent Hücre Hazırlanışı

Stok *E.coli* DH5α bakteri hücrelerinden ön kültür elde edebilmek için 50 µl alınıp 3 ml LB içerisine eklendikten sonra gece boyu 37 ^{o}C' ta çalkalamalı (200 rpm) inkübasyona bırakılmıştır. Büyüyen ön kültürden hacimce %1'i aşmayacak şekilde 250 ml LB'ye aşılama yapılıp 37 ^{o}C' ta çalkalamalı inkübasyona bırakılmıştır. Bakteri yoğunluğu 600 nm'de ölçülen absorbans değerleri talip edilerek 0.55'e ulaştığında kültür buz üzerine alınmıştır. Bu işlemden sonra buz üzerinde olmak koşuluyla santrifüj sonrası hücre pelleti 80 ml soğuk Inoue Ultra Competent Hücre Tamponunda çözülüp tekrar 4 ^{o}C' ta 10 dk 4000 rpm'de santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonrası üst sıvı dökülüp hücre pelleti 20 ml soğuk Inoue Ultra Competent Hücre Tamponunda çözülmüştür. Üzerine 1.5 ml DMSO eklenip karıştırılarak 10dk buzda bekletilmiştir. Ardından karışım ependorflara dağıtılarak sıvı azotta 2-3 dk bekletilerek -80 ^{o}C soğutucuda daha sonra kullanılmak üzere saklamıştır.

5.2.9. Transformasyon

100 µl ultra kompetent E. Coli DH5α suşu 20ng plazmid DNA ile dikkatli bir şekilde karıştırılıp buzda 30 dakika bekletilmiştir. 30dk sonunda 42ºC ye alınıp 90 saniye ısı şoku uygulanmıştır. Ardından 3dk buzda bekletilip her tüpe 1ml LB eklenip 1 saat 37ºC'de çalkalanarak inkübe edilmiştir. 1 saat sonunda 10.000 rpm'de 5dk santrifüj edilip supernatantlar dikkatli ve yavaş bir şekilde uzaklaştırılıp pelletin üzerinde kalan bir miktar LB ile pellet çözülüp önceden hazırlanmış katı besiyeri üzerine dökülüp iyice yayılmıştır ve gece boyunca 37ºC'de inkübasyona bırakılmıştır.

5.2.10. Bakteri Hücrelerinin Saklanması

Bakteriler katı agar üzerinde tek koloni düşürme yöntemiyle ekilmiştir. 16-18 saat 37ºC'ta inkübasyona bırakıldıktan sonra tekil koloni seçilerek 3 ml LB içerisinde büyütülmüştür. Ardından %80 gliserol stok solüsyonu içerisine eklenerek -80ºC'ta saklanmıştır.

5.2.11. Stok Hücrelerin Kriyoprezervasyonu

Hücreler tripsin ile petriden kaldırıldıktan sonra üzerine taze besi yeri eklenip 5 dk 1500 rpm'de santrifüj edilmiştir. Pellet olarak dibe çöken hücrelerin üzerindeki üst sıvı uzaklaştırılmıştır. Hücreler dondurma/saklama solüsyonu içerisinde çözülüp kriyotüplere aktarılmıştır. -80ºC'ta 1 hafta saklandıktan sonra uzun süreli stoklama için sıvı azota aktarılmıştır.

5.2.12. Dondurulmuş Stok Hücrelerin Açılması

Sıvı azottan veya -80 ºC'tan çıkarılan stok hücreler önceden ısıtılmış 10 ml taze medium ile 15 ml'lik falkona aktarılmıştır. Hücreler 1500 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra üst sıvı uzaklaştırılmıştır. Pellet olan hücreler 10 ml taze medium ile iyice çözüldükten sonra 10 cm'lik petriye aktarılarak 37ºC'ta %5 CO_2'li ortamda inkübasyona bırakılmıştır.

5.2.13. Hücre Kültürü

HeLa vahşi tip hücre hattı -196ºC sıvı azottan alınıp üzerindeki dondurma/saklama mediumu, taze DMEM (%10 FBS ve %1 Pen/Strep içeren) ile uzaklaştırılmıştır. Hücreler 10 cm'lik petrilere ekilip 37 ºC sıcaklık ve %5 CO_2 sağlayan inkübatörde büyütülmüştür.

5.2.14. Transfeksiyon

- Lipofectamine 2000 Reaktif ile;

Her plazmit DNA ve/veya mikroRNA için iki ependorf tüp hazırlanıp, birinci ve ikinci tüplere gerekli miktarda Optimem tamponu eklenip birinci tüplere uygun miktarlarda plazmit DNA (50ng) ve/veya mikroRNA (20 nM) eklenmiştir. İkinci tüplere ise Lipofectamine 2000 Reaktifi eklenerek 5 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Ardından birinci tüpler ikinci tüplerin üzerine transfer edilerek oda sıcaklığında 20 dk inkübasyonu sağlanmıştır. Bu işlemden sonra transfeksiyon karışımı hücrelerin ekili olduğu serumlu medium içerisine damla damla damlatılarak eklenmiştir. Hücreler lüsiferaz testi deneyleri için 48.saate kadar 37 ºC sıcaklık ve %5 CO_2 sağlayan inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır.

- Lipofectamine RNAiMAX Reaktif ile transfeksiyon;

Her bir siRNA için iki ependorf tüp hazırlanarak, birinci ve ikinci tüplere gerekli miktarda Optimem tamponu eklenip birinci tüplere uygun miktarlarda siRNA eklenmiştir. İkinci tüplere ise Lipofectamine RNAiMAX Reaktifi eklenmiştir. Ardından birinci tüpler ikinci tüplerin üzerine transfer edilerek oda sıcaklığında 20 dk inkübasyonu sağlanmıştır. Bu işlemden sonra transfeksiyon karışımı hücrelerin ekili olduğu serumlu medium içerisine damla damla damlatılarak eklenmiştir. Hücreler lüsiferaz testi deneyleri için 48.saate kadar 37 ºC sıcaklık ve %5 CO_2 sağlayan inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır.

5.2.15. Lüsiferaz Testi Deneyleri

Bu deneylerde altı ışık geçirmeyen 96 kuyulu plate kullanılmıştır. Her örnekten 3 kontrolü olacak şekilde her kuyuya $10x10^3$ hücre ekimi yapılmıştır. Hücre ekiminden 24 saat sonra Lipofectamine-2000 ile plazmitler ve mikroRNA'ların transfeksiyonu sağlanmıştır.

Transfeksyiondan 48 saat sonrasında, hücrelerin üzerindeki besi yeri uzaklaştırılıp 75 µl ATM (Anaerobic Transport Medium) eklenmiş ve oda sıcaklığında inkübasyon sağlanmıştır. Ardından her örneğin üzerine 75 µl Dual-Glo Lüsiferaz Reaktifi eklenerek pipet yardımı ile hücrelerin parçalanması sağlanmıştır. 25. dk'da

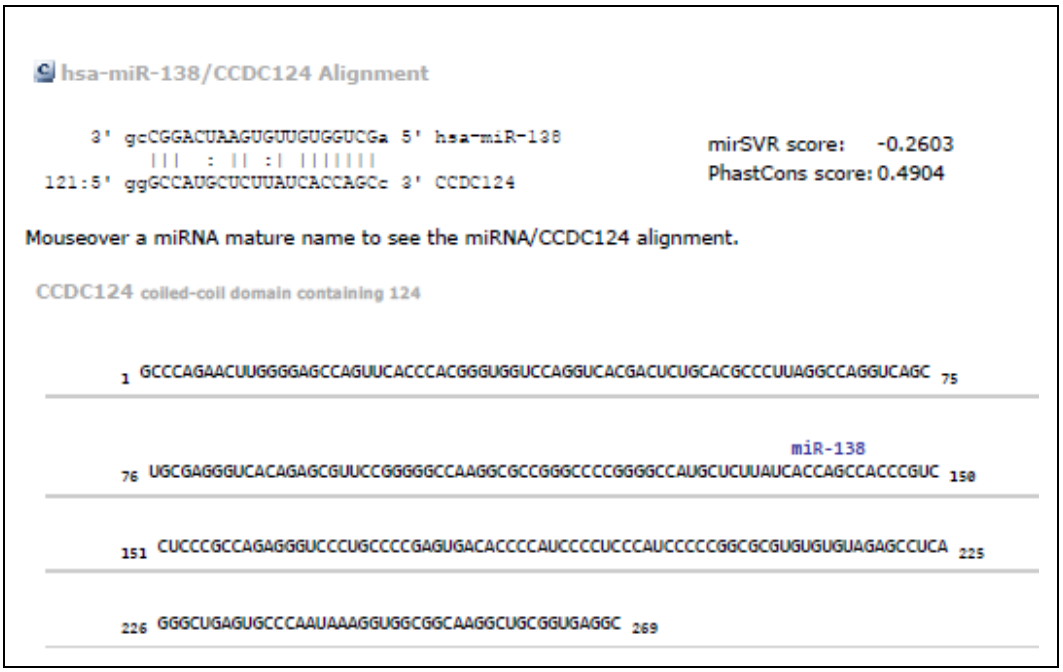
560 nm dalga boyunda “Firefly” luminometrik ölçüm yapılmıştır. Luminometrik ölçüm tamamlandıktan sonra her örneğin üzerine 75 µl Dual-Glo&Stop-Glo Lüsiferaz Reaktifi eklenip 25.dk’da 480 nm dalga boyunda Renilla luminometrik ölçümü yapılmıştır. Kör ölçümler tüm kontrollerden çıkarılıp Renilla/Firefly oranları grafiksel olarak gösterilmiştir.

6. SONUÇLAR

6.1. Biyoinformatik Analiz Sonuçları

Hücrede bir mRNA dizisi birden fazla mikroRNA tarafından hedeflenebileceği gibi, bir mikroRNA'nın birden fazla mRNA hedefi de olabilmektedir. Dolayısıyla hücre içerisinde Ccdc124 proteinin ribozomda oluşumundan önce mRNA'sını hedefleyen mikroRNA'ların belirlenmesi gerekmektedir. Bu tez çalışmamızın hedefleri doğrultusunda öncelikli olarak biyoinformatik çalışmalarla olası mikroRNA'lar belirlenmiş, ardından hedef mikroRNA'ların Ccdc124 mRNA'sı ile etkileşimi üzerine çalışılmıştır.

Yapılan araştırmalar sonucunda kullandığımız miRanda (http://www.microrna.org/microrna/getGeneForm.do) sunucusundaki analizlerde Ccdc124 mRNA'sının iyi bir mirSVR (miRNA support vector regression algorithm) skoru ile hedeflenmesini sağlayan korunmuş bir mikroRNA belirlenmiştir. miSVR skoru, mRNA ifade seviyesi üzerindeki miRNA etkisinin bir tahminidir yani bu skor ne kadar negatif olursa, etkinin o kadar büyük olacağı öngörülmektedir. Sonuç olarak, Ccdc124 mRNA'sını hedefleyen diğer mikroRNA'lar içerisinde en iyi negatif sonuca sahip ve iyi mirSVR skorlu mikroRNA'nın "hsa-miR-138" olduğu belirlenmiştir (Şekil 6.1).



Şekil 6.1: CCDC124 mRNA'sını hedefleyen mikroRNA miR-138'in microrna.org (miRanda) veri tabanında belirlenmesi ve bağlandığı bölgenin gösterilmesi.

TargetScan (http://www.targetscan.org/vert_72/) sunucusunda yapılan analiz sonucunda da hsa-miR-138'in Ccdc124 mRNA'sını hedeflediği sonucuna varılmıştır. Ayrıca hedeflenen bu bölgenin 84 farklı tür arasından 13'ünde korunmuş olduğu belirlenmiştir. Tablo 6.1'de gösterilen skorlandırmalarda, mikroRNA'nın bağlandığı bölgenin 3' ucuna yakın olup olmaması ve bağlanma bölgesinin korunmuşluğuna göre, miR-138 orta kuvvette (site type:7 mer) bağlanan mikroRNA listesinde yer aldığını göstermektedir (Tablo 6.1).

Tablo 6.1: TargetScan sunucusunda yapılan analiz sonucu.

	Predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom)	Site type	Context++ score	Context++ score percentile
Position 136-142 of Ccdc124 3'UTR hsa-miR-138 -5p	5' ,,, GGGCCAUGCUCUUAUCACCAGCC . . . 3' GCCGGACUAAGUGUUGUGGUCGA	7mer-m8	-0.33	94

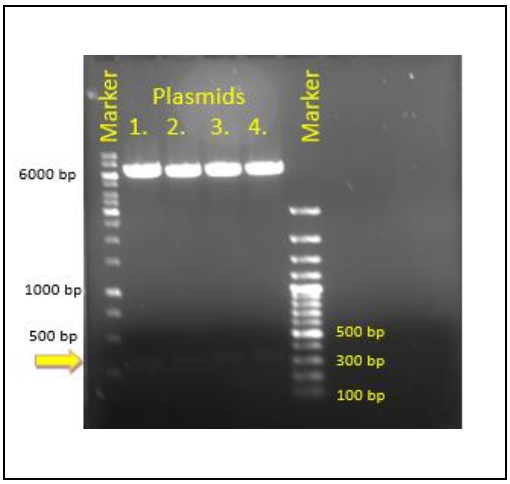
Bu sonuçlar doğrultusunda, miR-138'in bağlandığı bölgenin korunmasının CCDC124 geninin 3'UTR'sine bağlı olup olmadığını anlamak için 10 tür içerisinde CCDC124 geninin 3'UTR bölgeleri Clustal Omega (https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/) sunucusunda hizalanmıştır. Ccdc124 proteininin insandan mantara birçok ökaryotik organizmada korunmuş bir protein olduğu bilinmekle birlikte Clustal Omega sunucusunda yapılan hizalama analizinde 10 yakın tür memeli arasında bu proteinin 3'UTR bölgelerinin %75 oranında korunmuş olduğunu belirlenmiştir. Hsa-miR-138 bağlanma bölgesinin ise (133-147. Baz aralığı) bu memeli türleri arasında %100 korunduğu tespit edilmiştir (Şekil 6.2).

```
marmoset      GCCCAGAACUGGGGGAGCCAGUUCACCCACGGGUGAUCCAGGUCACGAUUCUGCACGCCC    60
Squirrel      GCCCAGAACUGGGGGAGCCAGUUCACCCACGGGUGGUCCAGGUCACGAUUCCGCACGCCC    60
rhesus        GCCCAGAACUGGGGGAGCCAGUUCACCCACGGGUGGUCCAGGUCACGACUCUGCACGCCC    60
macaque       GCCCAGAACUGGGGGAGCCAGUUCACCCACGGGUGGUCCAGGUCACGACUCUGCACGCCC    60
baboon        GCCCAGAACUGGGGGAGCCAGUUCACCCACGGGUGGUCCAGGUCACGACUCUGCACGCCC    60
gibbon        GCCCAGAACUUGGGGAGCCAGUUCACCCACGGGUGGUCCAGGUCACGACUCUGCACGCUC    60
Gorilla       GCCCAGAACUUGGGGAGCCAGUUCACCCACGGGUGGUCCAGGUCACGACUCUGCACGCCC    60
chimp         GCCCAGAACUUGGGGAGCCAGUUCACCCACGGGUGGUCCAGGUCACGACUCUGCACGCCC    60
human         GCCCAGAACUUGGGGAGCCAGUUCACCCACGGGUGGUCCAGGUCACGACUCUGCACGCCC    60
orangutan     GCCCAGAACUUGGGGAGCCAGUUCACCCACGGGUGGUCCAGGUUACGACUCUGCACGCCU    60
              ********** ************************ ******* **** ** ******

marmoset      UUUCGCCAGGUCAGCUUCGAGGAUCACCGAGCAGUCCGGGGACCCAG-----GUGCCG-G    114
Squirrel      UUCCGCCAGGUCAGCUGCGAGGAUCACCGAGCAGUCCGGGGACCCAG-----GUGCAG-G    114
rhesus        UUACGCCAGGUCAGCUUCAAGGGUCACAGAGCGUUCCGGGGGGGGGCCAAGGCGUCAGG    120
macaque       UUACGCCAGGUCAGCUUCAAGGGUCACAGAGCGUUCCGGGGGG-GGGCCAAGGCGUCAGG    119
baboon        UUACGCCAGGUCAGCUUCAAGGGUCACAGAGCGUUCCGGGGG---GGCCAAGGCGUCGGG    117
gibbon        UUAGACCAGGUCAGCUGCGAGGGUCACAGAGCGUUCCGGGG-----GCCAAGGCGCCGGG    115
Gorilla       UUAGGCCAGGUCAGCUGCGAGGGUCACAGAGCGUUCCGG-------GCCAAGGCGCCGGG    113
chimp         UUAGGCCAGGUCAGCUGCGAGGGUCACAGAGCGUUCCGGGG-----GCCAAGGCGCCGGG    115
human         UUAGGCCAGGUCAGCUGCGAGGGUCACAGAGCGUUCCGGGG-----GCCAAGGCGCCGGG    115
orangutan     UUAGGCCAAGUCAGCUGCGAGGGUCACAGAGCGUUCUGGGG-----GCCAAGGCGCCGGG    115
              **   *** ******* * *** **** ****  ** **       *     * *    *

marmoset      UCCCCAGAGCCAUGCUCUAUCACCAGCCACCCCUCCUCCUGCCAGAGGGUCCCUGCCCCA    174
Squirrel      UCCCCAGGGCCAUGUUCUAUCACCAGCCACCCCUCCUCCUGCCAGAGGGUUCCUGCCCCG    174
rhesus        CCCCGGGGCCAUGCUGUUAUCACCAGCCACCCGUCCUCCCGCCAGAGGAUCCCUGCCCCA    180
macaque       CCCCGGGGCCAUGCUGUUAUCACCAGCCACCCGUCCUCCCGCCAGAGGAUCCCUGCCCCA    179
baboon        CCCCGGGGCCAUGCUGUUAUCACCAGCCACCCGUCCUCCCGCCAGAGGAUCCCUGCCCCA    177
gibbon        CCCCGGGGCCAUGCUCUUAUCACCAGCCACCCGUCCUCCCGCCAGAGGGUCCCUGCCCCG    175
Gorilla       CCCCGGGGCCAUGCUCUUAUCACCAGCCACCCGUCCUCCCGCCAGAGGGUCCUUGCCCCG    173
chimp         CCCCGGGGCCAUGCUCUUAUCACCAGCCACCCGUCCUCCCGCCAGAGGGUC-CUGCCCCG    174
human         CCCCGGGGCCAUGCUCUUAUCACCAGCCACCCGUCCUCCCGCCAGAGGGUCCCUGCCCCG    175
orangutan     CCCCGGGGCCAUGCUCUUAUCACCAGCCACCCGUCCUCCCGCCAGAGGGUCCCUGCCCCG    175
               ***  *  *       *************** ****** ******** *   ******

marmoset      AGUGACACCCCACCCCCUCCCAUCCCCCAGCGCGUGUGUAUAGAGCCUCAGGGCUGAGUG    234
Squirrel      AGUGACACCCCAUCUCCUCCCAUCCCCCAGCGCGUGUGUGUAGAGCCUCAGGGCUGAGUC    234
rhesus        AGUGACACCCCACCCCCUCCCAUCCCCCAGCGCGUGUGUGUAGAGCCUCAGAGCUGAGUG    240
macaque       AGUGACACCCCACCCCCUCCCAUCCCCCAGCGCGUGUGUGUAGAGCCUCAGAGCUGAGUG    239
baboon        AGUGACACCCCACCCCCUCCCAUCCCCCAGCGCGUGUGUGUAGAGCCUCAGAGCUGAGUG    237
gibbon        AGUGACACCCCAUCCCCUCCCAUCCCCCAGCGCGUGUGUGUAGAACCUCAGGGCUGAGCG    235
Gorilla       AGUGACACCCCAUCCCCUCCCAUCCCCCGGCGCGUGUGUGUAGAGCCUCAGGGCUGAGUG    233
chimp         AGUGACACCCCAUCCCCUCCCAUCCCCCGGCGCGUGUGUGUAGAGCCUCAGGGCUGAGUG    234
human         AGUGACACCCCAUCCCCUCCCAUCCCCCGGCGCGUGUGUGUAGAGCCUCAGGGCUGAGUG    235
orangutan     AGUGACACCCCAUCCCCUCCCAUCCCCCAGCGCGUGUGUGUAGAGCCUCAGGGCUGAGUG    235
              ************ * ************* ********** **** ****** ******

marmoset      CCCAAUAAAGGUGGCGGCAAGGCUGCGGUGAGGCACUUGAA---     275
Squirrel      CCCAAUAAAGGUGGCGGCAAGGCUGCGGUGAGGCACUUGAA---     275
rhesus        CCCAAUAAAGGUGGCGGCAAGGCUGCAGUGAGGCACUUGAA---     281
macaque       CCCAAUAAAGGUGGCGGCAAGGCUGCAGUGAGGCACUUGAA---     280
baboon        CCCAAUAAAGGUGGCGGCAAGGCUGCAGUGAGGCACUUGAA---     278
gibbon        CCCAAUAAAGGUGGCGGCAAGGCUGCGGUGAGCACGCACUUGAA     279
Gorilla       CCCAAUAAAGGUGGCGGCAAGGCUGCGGUGAGGCACUUGAA---     274
chimp         CCCAAUAAAGGUGGCGGCAAGGCUGCGGUGAGGCACUUGAA---     275
human         CCCAAUAAAGGUGGCGGCAAGGCUGCGGUGAGGCACUUGAA---     276
orangutan     CCCAAUAAAGGUGGCGGCAAGGCUGCGGUGAGGCACUUGAA---     276
              ************************** *****
```

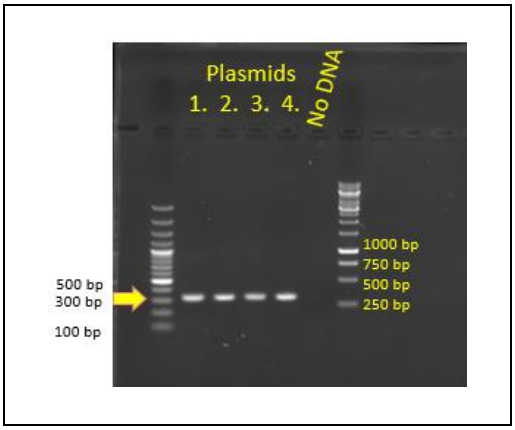
Şekil 6.2: 10 memeli tür arasında CCDC124 geninin 3'UTR bölgesinin hizalanması.

6.2. PsiCHECK-2 Vektörüne Klonlanan Bölgelerin Kontrol Edilmesi

PsiCHECK-2 vektörüne klonlanan CCDC-3'UTR bölgesinin ligasyonun olup olmadığının kontrolleri PCR (Şekil 6.6) ve restriksiyon enzim kesimi (Şekil 6.5) yöntemleri ile yapılmıştır. Klonlama vektörü psiCHECK-2'nin büyüklüğü 6273 bp ve klonlanan CCDC124-3'UTR bölgesinin büyüklüğü yaklaşık 306 bp'dir. Enzim kesimi ve PCR ile kontrollerinde klonlanan 3'UTR jelde beklendiği bant hizasında görülmüştür (Şekil 6.4). Aynı şekilde enzim kesimi sonrası jelde plazmit bantları beklenen hizada (~6000 bp üzeri) görülmüştür (Şekil 6.3).

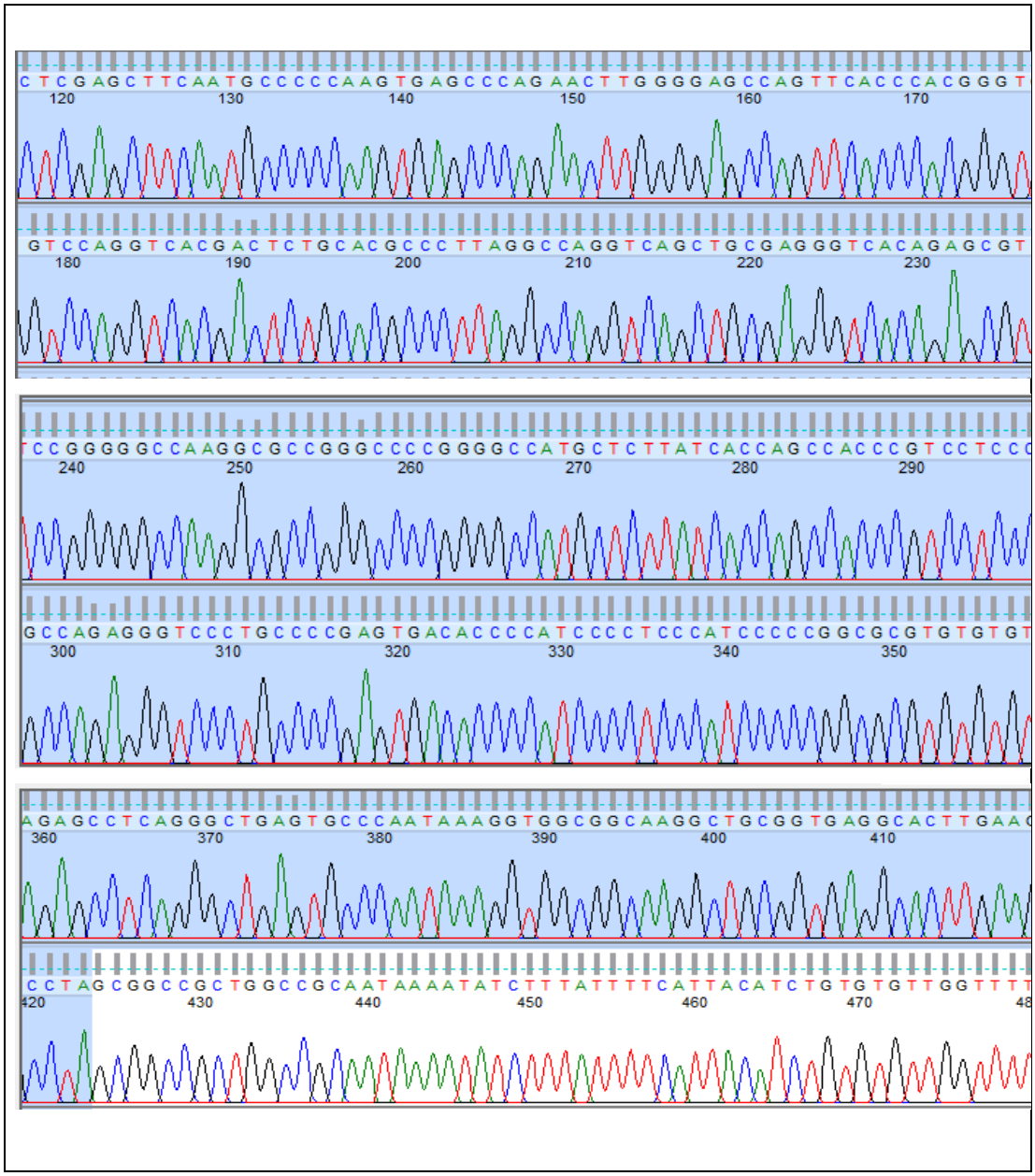


Şekil 6.3: Transformasyon sonrası seçilen kolonilerden izole edilen plazmitlerin XhoI ve NotI restriksiyon enzimleri ile kontrol kesimi. Sırasıyla 1, 2, 3, 4 numaralı kolonilerden izole edilen plazmitler.



Şekil 6.4: Transformasyon sonrası seçilen kolonilerden izole edilen plazmitlerin PCR ile kontrolü. Sırasıyla 1, 2, 3, 4 numaralı kolonilerden izole edilen plazmitler. "No DNA" kalıp içermeyen negatif kontrolü göstermektedir.

Kontrol enzim kesimi ve PCR ile doğrulanan plazmitler dizilenmek üzere IONTEK (İstanbul, Türkiye) firmasına gönderilmiş ve sonuçlar dizi analizleriyle de doğrulanmıştır (Şekil 6.5). Dizi analizi sonuçlarımızda *CCDC124* geninin 3'UTR bölgesinin sorunsuz bir şekilde psiCHECK-2 vektörüne klonlandığı belirlenmiştir.



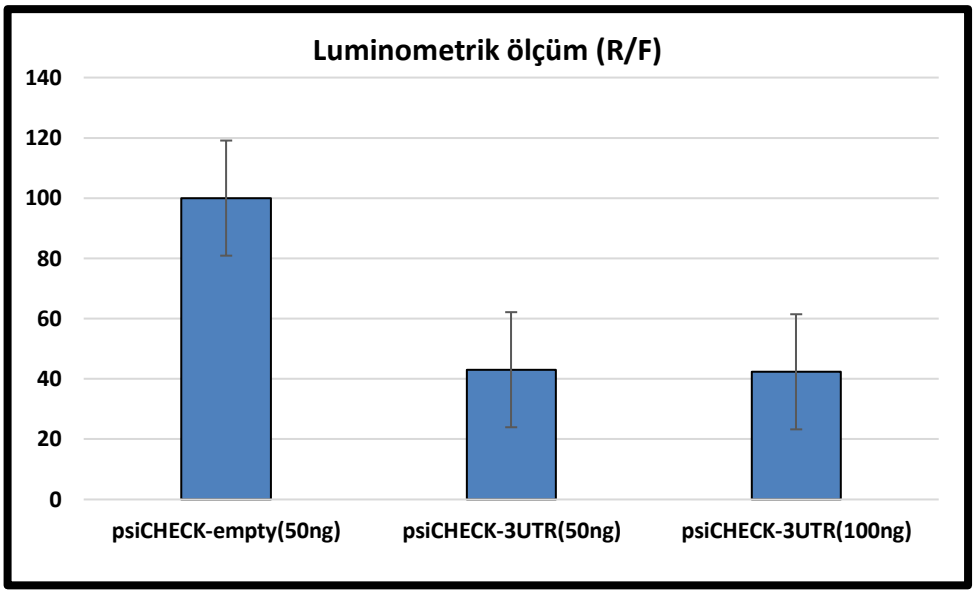
Şekil 6.5: İzole edilen 2 numaralı plazmitin kromatogram sonucu. Mavi ile belirtilen bölge 3'UTR bölgesini göstermektedir.

6.3. Lüsiferaz Testi Deneyleri

6.3.1. Transfekte Edilen psiCHECK-3'UTR Vektörünün Endojen RNA interferans Sistemi Tarafından Hedeflenmesi

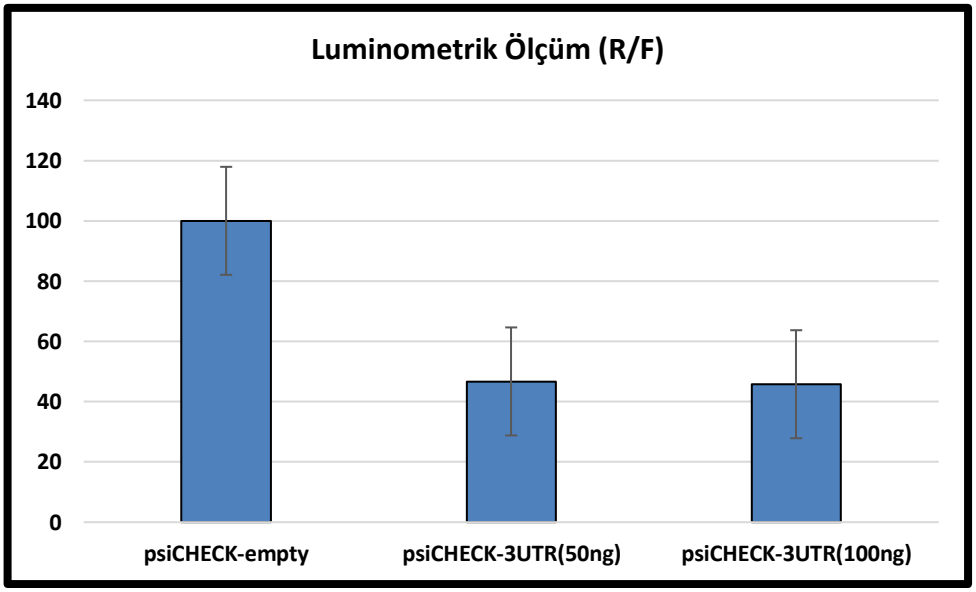
HeLa hücre hatında yapılan lüsiferaz testi deneylerinde öncelikle CCDC-3'UTR bölgesini içeren psiCHECK-2 plazmitinin (psiCHECK-3'UTR) endojen RNA interferanslar tarafından hedeflenip hedeflenmediğine bakılmış ve farklı konsantrasyonlarına bağlı olarak lüsiferaz aktivitesinde değişiklik olup olmadığı tespit edilmiştir.

"psiCHECK-empty" herhangi bir klonlama yapılmamış boş vektörü ifade etmektedir. psiCHECK-empty vektöründe Renilla proteinin ekspresyonunu baskılayacak hiçbir bölge klonlanmadığı için bu plazmitten sentezlenen Renilla ve Firefly proteinlerin ekspresyonu %100 kabul edilmiştir. Bu vektöre göre diğer vektörlerden sentezlenen Renilla ve Firefly proteinlerinin ekspresyon seviyeleri kıyaslanarak yüzdelik oranları belirlenmiştir. psiCHECK-3'UTR'nin ise iki farklı konsantrasyonlarda (50ng ve 100ng) transfeksiyonları sağlanmıştır. psiCHECK-3'UTR vektöründe Renillanın ucuna klonlanan CCDC-3'UTR bölgesi nedeniyle hücredeki RNA interferanslar tarafından hedeflendiği için, bu vektörden sentezlenen Renillanın pozitif kontroldekine (psiCHECK-empty) göre azalması beklenmektedir. Grafiksel sonuçlarda gözlendiği gibi bu azalmanın yaklaşık olarak %60 oranında olduğu belirlenmiştir. psiCHECK-3'UTR plazmitinin artan konsantrasyonlarında hedeflenme oranın değişmediği gösterilmiştir. Sonuç olarak, Ccdc124-3'UTR bölgesinin hücre içerisinde endojen RNA interferanslar tarafından hedeflendiğini ve bu hedeflenmenin %60 olduğu gösterilmiştir. Ayrıca artan konsantrasyonlarda bu oranın değişmediği belirlenmiştir. Bundan sonraki deneylerde bu plazmitin transfeksiyondaki konsantrasyonu 50 ng olacak şekilde ayarlanmıştır (Şekil 6.6, Şekil 6.7, Ek-A).



Şekil 6.6: Luminometrik ölçümün grafiklendirilmesi.

Aynı deney ikinci kez tekrar edilmiş olup sonucu aşağıdaki grafikte gösterilmiştir (Şekil 6.7) (Ek-B).



Şekil 6.7: Luminometrik ölçümün grafiklendirilmesi (İkinci tekrar).

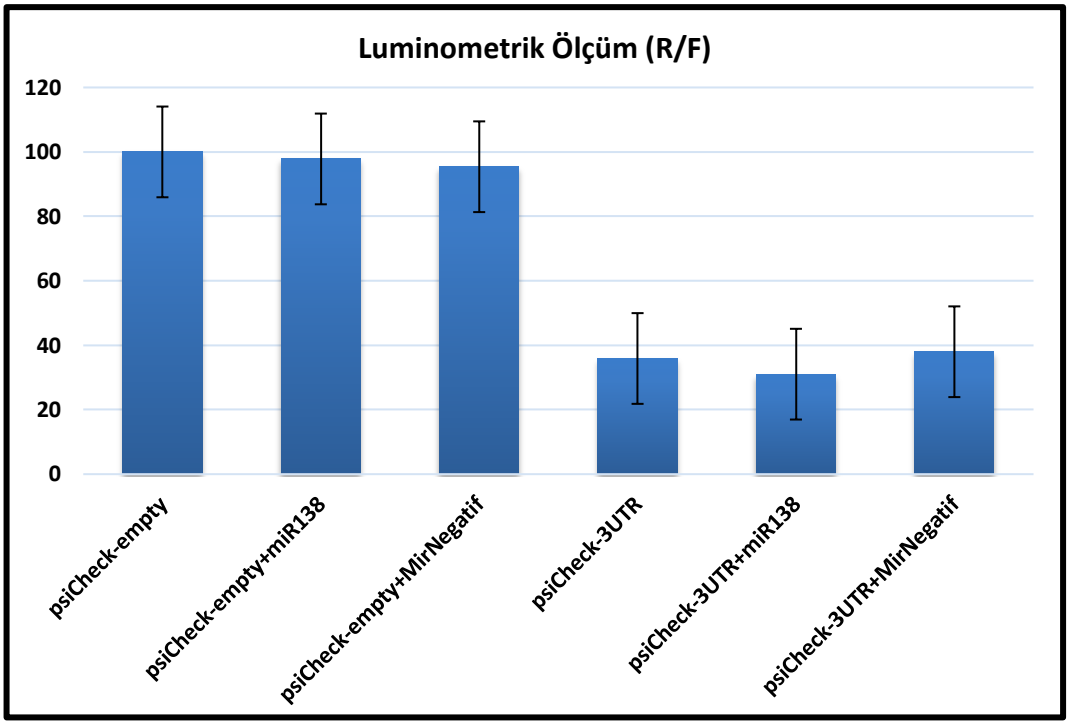
6.3.2. CCDC124-3'UTR bölgesinin miR-138 varlığında ekspresyonun belirlenmesi

Yaptığımız biyoinformatik çalışmalarda CCDC124 geninin 3'UTR bölgesinin miR-138 mikroRNA'sı tarafından hedeflendiğini belirlemiştik. Bundan sonraki çalışmalardaki hedefimiz CCDC124-3'UTR'sinin miR138 varlığında ekspresyonun ne kadar düştüğünü belirlemek olmuştur.

Pozitif kontrol olarak aynı şekilde psiCHECK-empty plazmiti transfekte edilmiştir. Bu deneyde kullanılan miRNegatif (HMC003-5NMOL-miRNA negative control- Sigma Aldrich, miRNegatif-1) negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Bu negatif kontrol insan gen dizilerine homolojisi olmayan *Caenorhabditis elegans* dizisi olarak tasarlanmış bir miRNA'dır. Dolayısıyla, hücre içine girdiğinde hiçbir hedefi olmadığından ekspresyonu değiştirmemesi beklenmektedir.

Bu deneyin tasarlanması aşamasında hücre ekimi yapıldıktan 24 saat sonra klonlama plazmitleri (50ng) ve mikroRNA'ların (50nM) transfeksiyonu kullanılarak yapılmıştır. Transfeksiyondan 4 saat sonrasında besi yeri değişikliği yapılarak hücreler büyümeye bırakılmış ve 48 saat sonra lüsiferaz ölçümü yapılmıştır. Renilla (480nm) ve Firefly (560nm) lüminometrik ölçümlerinin oranları grafikte gösterildiği gibidir (Şekil 6.8, Ek-C).

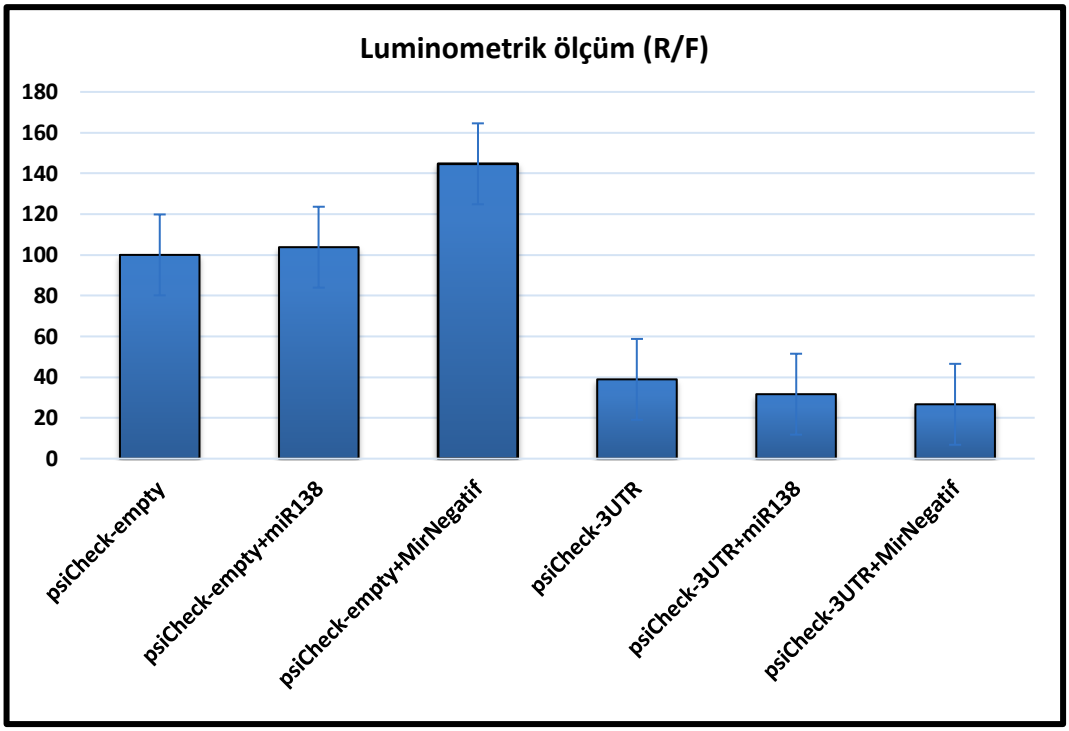
Şekil 6.8'daki grafikte gösterildiği gibi boş plazmit olan psiCHECK-empty plazmitinin transfekte edildiği hücrelere ayrıca miR-138 transfekte edildiğinde sonuçlarda anlamlı bir sonuç gözlenmemiştir. Aynı şekilde psiCHECK-empty transfekte edilmiş hücrelere miRNegatif transfekte edildiğinde Renilla ucunda hedef olmadığı için Renilla/Firefly oranında beklenen ile uyumlu olarak değişiklik olmadığı gözlenmiştir. CCDC124-3'UTR'nin klonlandığı plazmitin (psiCHECK-3UTR) hücre içi endojen RNA interferanslar tarafından yaklaşık olarak %65 oranında susturulduğu gözlenirken, mir-138 transfekte edildiğinde bu oranın %70 olduğu gözlenmiştir.



Şekil 6.8: Ortalama luminometrik ölçümün grafiklendirilmesi.

psiCHECK-3'UTR+miR138 transfekte edilen hücrelerde lüsiferaz aktivitesinin psiCHECK-3'UTR ile yakın olması nedeniyle yöntemde farklılığa gidilmiş ve transfeksiyondan 4 saat sonrasında besi yeri değişikliği yapılmadan 48 saat sonra luminometrik ölçüm gerçekleştirilmiştir. Böylece transfeksiyonun iyi bir şekilde gerçekleştiğinden emin olarak sonucun anlamlı olup olmadığını belirlemek için deney tekrar edilmiştir (Şekil 6.9, EK-D).

Şekil 6.9'de gösterilen grafiğe göre, yapılan bu deneyde psiCHECK-3'UTR'nin endojen RNA interferanslar tarafından yaklaşık olarak %60 oranında susturulduğu ve miR138 verildiğinde ise bu oranın %70'e yükseldiği gözlenmiştir. Dolayısıyla transfeksiyon yapıldıktan besi yerinin değiştirilmemesi sonucunda miR-138 etkinliğinin arttığı belirlenmiştir.



Şekil 6.9: Ortalama luminometrik ölçümün grafiklendirilmesi.

Şekil 6.9'da psiCHECK-empty+miRNegatif kontrolündeki hücrelerde miRNegatif kontrolünün transfeksiyonunun ekspresyona etki etmeyip psiCHECK-empty kontrolündeki gibi bir sonuç vermesi beklenirken bu sonucun farklı olduğu tespit edilmiştir. Aynı şekilde psiCHECK-3UTR+miRNegatif kontrolündeki hücrelerde miRNegatif kontrolünün transfeksiyonunun ekspresyona etki etmeyip psiCHECK-3'UTR kontrolündeki gibi bir sonuç vermesi beklenirken aksine ekspresyonu daha da düşürdüğü gözlenmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda ticari olarak alınan miRNegatif'in CCDC124 mRNA'sının 3'UTR bölgemizde hedeflediği bölge olup olmadığına BLAST yapılarak bakılmıştır. Bunun sonucunda CCDC124 mRNA'sının 3'UTR bölgesiyle eşleşme olduğu belirlenmiştir. Dolayısıyla bundan sonraki lüsiferaz testlerimizde miRNegatif olarak *Arabidopsis thaliana'*dan elde edilmiş miRNegative (HMC002- 5NMOL- miRNA Negatif control- Sigma Aldrich, miRNegatif-2) kullanılmıştır.

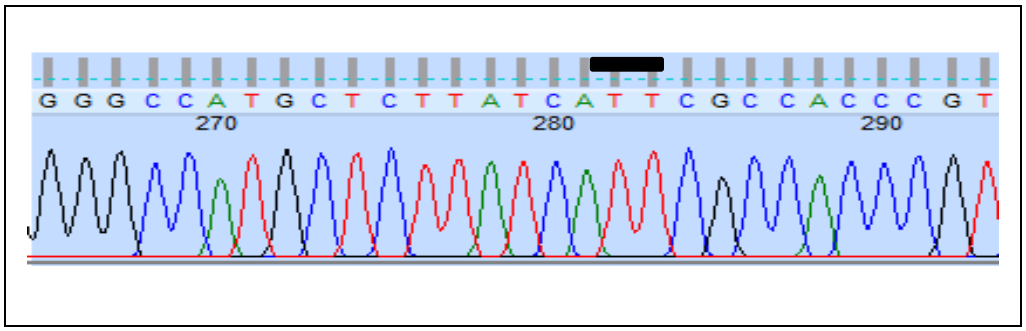
6.3.3. Yönlendirilmiş Mutagenez Yöntemiyle ile Oluşturulan Mutant Plazmitler

miR-138 bağlanmasını engellediğimiz zaman CCDC124-3UTR bölgesi kaynaklı ifadenin değişip değişmediğine bakmak için miR-138'in en iyi bağlanma gösterdiği bölge yönlendirilmiş mutagenez yöntemiyle değiştirilmiştir. miR-138 bağlanma bölgesi için tasarlanan mutant primerler ile mutant plazmitler oluşturulmuştur. Bağlanma bölgesinin değiştirilmesi için tasarlanan baz dizisi aşağıda gösterildiği gibidir. Bu bölgenin seçilmesinin sebebi; mikroRNA 3' ucuna yakın bağlanmaların mikroRNA etkinliğini arttırmasıdır. Dolayısıyla 3' ucuna yakın ve en iyi bağlanmanın olduğu bölge olarak "CCA" bazlarının olduğu yer seçilmiştir. Burada "CCA" bazları "TTC" bazlarına dönüştürülmüş ve "Mutant-1" olarak isimlendirilmiştir (Tablo 6.2).

Tablo 6.2: Yönlendirilmiş Mutagenez yöntemi ile değiştirilen miR-138 bölgesinin ve Mutant-1 gösterimi.

Ccdc124 - 3'UTR 136-142 bölgesi	5' ,,, GGGCCAUGCUCUUAUCACCAGCC ....
hsa-miR-138 -5p	3' GCCGGACUAAGUGUUGUGGUCGA
Mutant-1 miR138 bağlanma bölgesi	5',,, GGGCCAUGCUCUUAUCATTCGCC ….

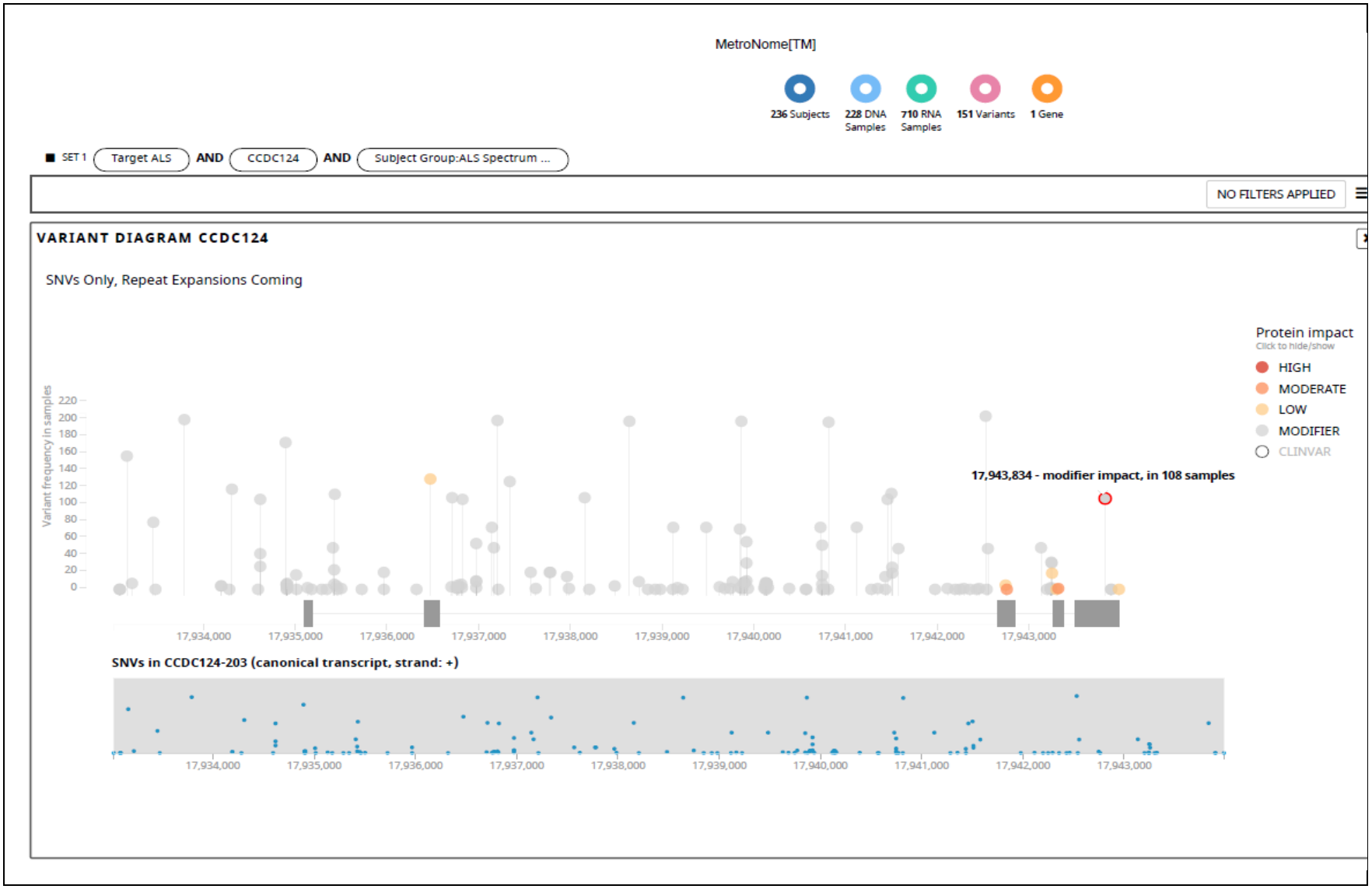
Bu bölge için tasarlanan primerlerle yapılan mutant plazmitin (Mutant 1) dizisi dizi analizleriyle doğrulanmıştır (Şekil 6.10).



Şekil 6.10: Mutant-1 bölgesinin kromatogram sonucu.

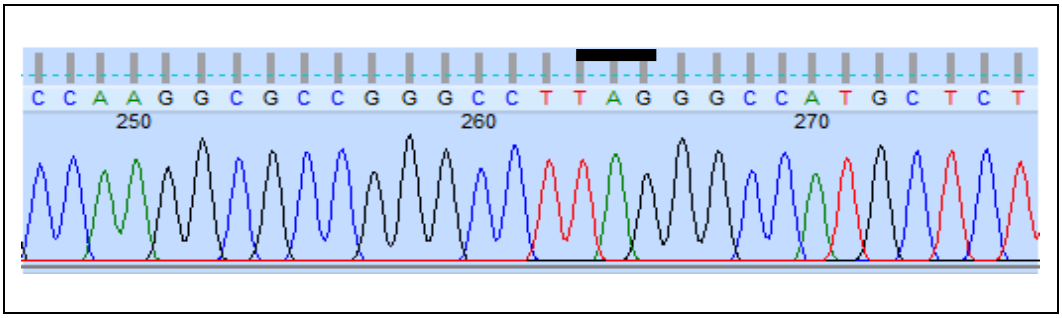
Ayrıca yaptığımız Metronome[TM] veri tabanı analizinde Amyotrofik lateral skleroz (ALS) ve bu gibi mutasyona eğilim gösteren çeşitli hastalıklarda özellikle etken rol oynayan genler seçilerek sonuçları listelenmiştir. ALS hastalığında çeşitli hasta örneklerinden toplanan doku örneklerinde özellikle membransız organellerde görev alan proteinleri kodlayan genlerin etkileriyle birlikte *CCDC124* genindeki bazlarda gelen değişiklikler sonucu gözlenen etkiler listelenmiştir. Bu bazlardaki değişikliklerin etkileri "YÜKSEK- ILIMLI- DÜŞÜK- DEĞİŞTİRİCİ" şekilde ölçülendirilmiştir. Listede bakılan "DEĞİŞTİRİCİ" özellikte etki gösteren 3 örnekte oluşan 1 baz değişikliği sonucu amino asit değişikliği (Valin -> Glisin ya da Glutamic asit -> Glutamin) ile "missense" (yanlış anlam) mutasyonu gözlenmiştir. 159 örnekte meydana gelen çeşitli baz değişiklileri ise "DÜŞÜK" etki değeri listesinde sınıflandırılmış ve bu gruplarda sinonim (aynı anlamlı) amino asit değişiklikleri (Glisin -> Glisin) gösterilmiştir. Aynı şekilde, yaklaşık olarak 3700 örnekten bakılan baz değişikliklerinin etkileri "DEĞİŞTİRİCİ" olarak nitelendirilmiştir. Bu baz değişiklikleri CCDC124 geninin çeşitli bölgelerine denk gelmekle birlikte bu bölgeler ekzon ve intron bölgelerini kapsamaktadır.

Çalışmamız kapsamında "DEĞİŞTİRİCİ" etki gösteren listesinde yer alan ve 3'UTR bölgesine denk gelen 17,934,834. bazdaki değişikliğin 108 bireyde belirlendiği gözlenmiş, bu bölgenin miR138 bağlanma bölgesinden 16 baz öncesine denk geldiği tespit edilmiştir. Bu bazdaki değişiklik "Sitozin (C)" bazının "Timin (T)'e" değişimidir. Dolayısıyla, bu bölgedeki "Sitozin (C)" bazını yönlendirilmiş mutagenez yöntemiyle MetroNome[TM] veri tabanındaki gibi "Timin (T)" bazına değiştirip etkileri lüsiferaz testi deneyleri ile gözlenmiştir (Şekil 6.11). Bu oluşturulan mutant Mutant-2 olarak isimlendirilmiştir.



Şekil 6.11: MetroNome[TM] veri tabanı sonucu.

Bu bölge için oluşturulan primerlerle yapılan mutagenez (Mutant 2) PCR sonucu dizi analizleriyle doğrulanmıştır (Şekil 6.12).



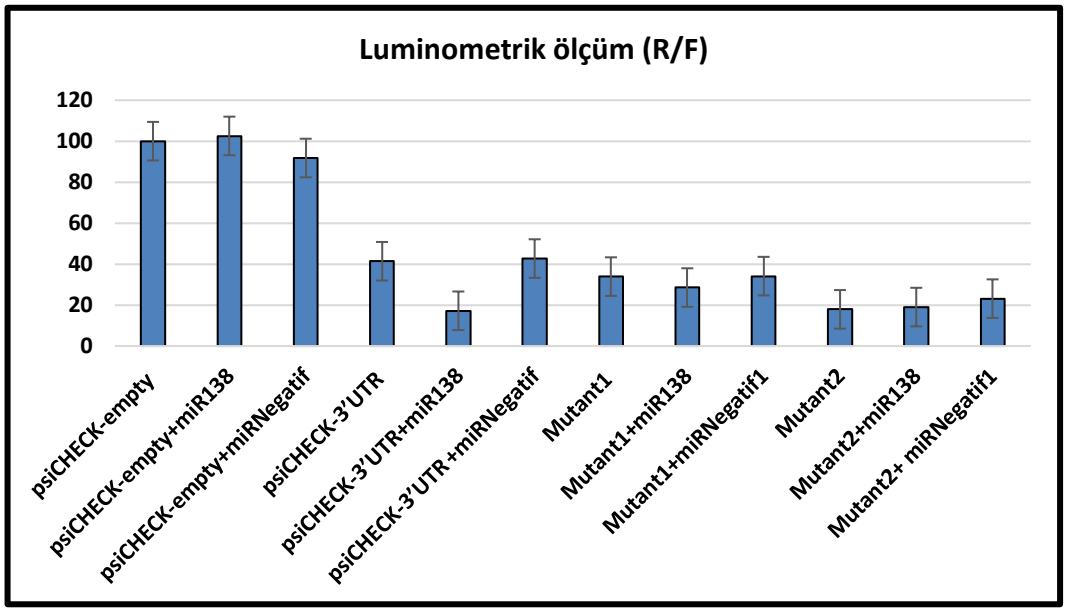
Şekil 6.12: Mutant-2 kromatogram sonucu.

6.3.4. Mutant Plazmitler ile Lüsiferaz Testi Sonuçları

MikroRNA'lar tarafından hedeflenen bölgelerin değiştirilmesinin ifadede değişikliğe etkilerine lüsiferaz deneyleri ile bakılmıştır. Mutant plazmitlerin transfekte hücrelerin ve Mutant plazmit + miR-138 transfekte edilmiş hücrelerin luminometrik ölçümleri aşağıdaki grafikte verilmiştir. Bu deneyde farklı bir miRNegatif kontrol (HMC002- 5NMOL- miRNA Negatif control- Sigma Aldrich, miRNegatif-2) kullanılmıştır. Bu negatif kontrol insan gen dizilerine homolojisi olmayan *Arabidopsis thaliana* dizisi olarak tasarlanmış bir miRNA'dır. Dolayısıyla, hücre içine girdiğinde hiçbir hedefi olmadığından ekspresyonu değiştirmemesi beklenmektedir. Ayrıca transfeksiyonda miR-138 ve miRNegatif'in son konsantrasyonu 20nM'e düşürülmüştür.

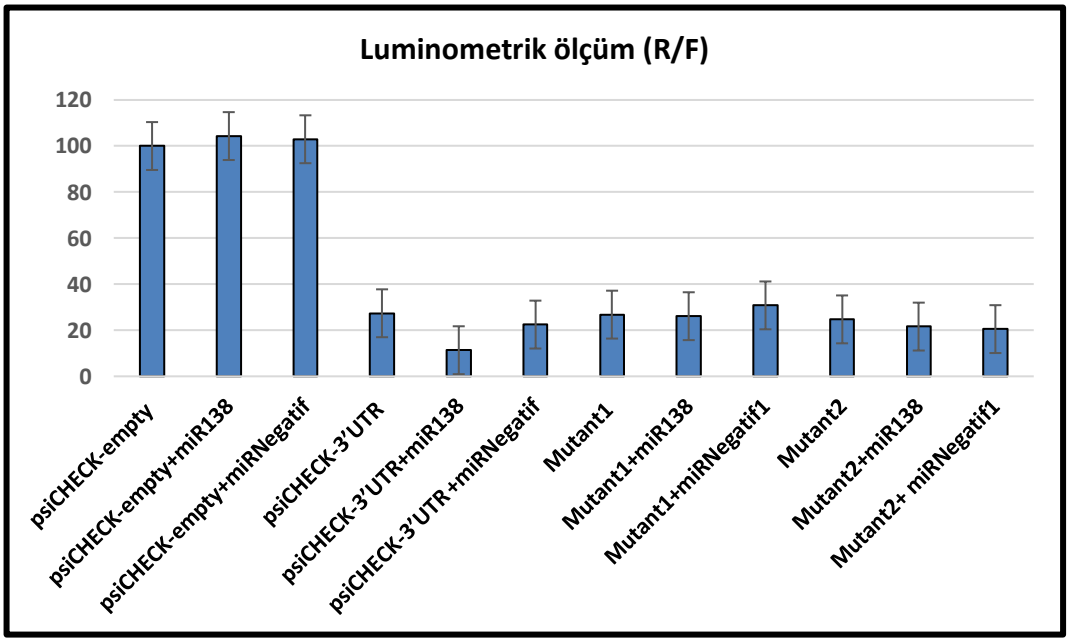
Bu sonuçlar doğrultusunda, psiCHECK-3'UTR ekspresyonunun %60 düştüğü gözlenirken psiCHECK-3'UTR+mir138 transfekte edilmiş hücrelerde ekspresyonun %83 oranında düştüğünü yani sadece psiCHECK-3'UTR hücrelerdeki endojen RNA interferanslara kıyasla miR-138 %50 daha ekspresyonu baskılama etkisi göstermiştir. miR-138 bağlanma bölgesini kapsayan Mutant-1 hücrelerinde %82'lik bir geri kazanım söz konusudur. Aynı şekilde Mutant-1 hücrelerine ekstra miR-138 transfeksiyonu yapıldığı zaman (Mutant1+miR138) %15'lik bir ekspresyon baskılanması yapabileceği görülmektedir. Mutant-2 ile yapılan lüsiferaz testi sonucunda ekspresyonun psiCHECK-empty plazmidine göre %85 düştüğünü ve bu hücrelere miR138 verdiğimizde ekspresyonun değişmediği aynı kaldığı gözlenmiştir.

Negatif kontrol olarak verilen mikroRNA'nın uygun olarak çalıştığı sonuçlarımızda gösterilmiştir (Şekil 6.13, Ek-E).



Şekil 6.13: Luminometrik ölçümün grafiklendirilmesi.

Aynı deney tekrar edilmiş ve sonuçları aşağıdaki grafikte verilmiştir. Tekrarlanan iki deneyde de aynı sonuçlara ulaşılmıştır (Şekil 6.14, Ek-F).

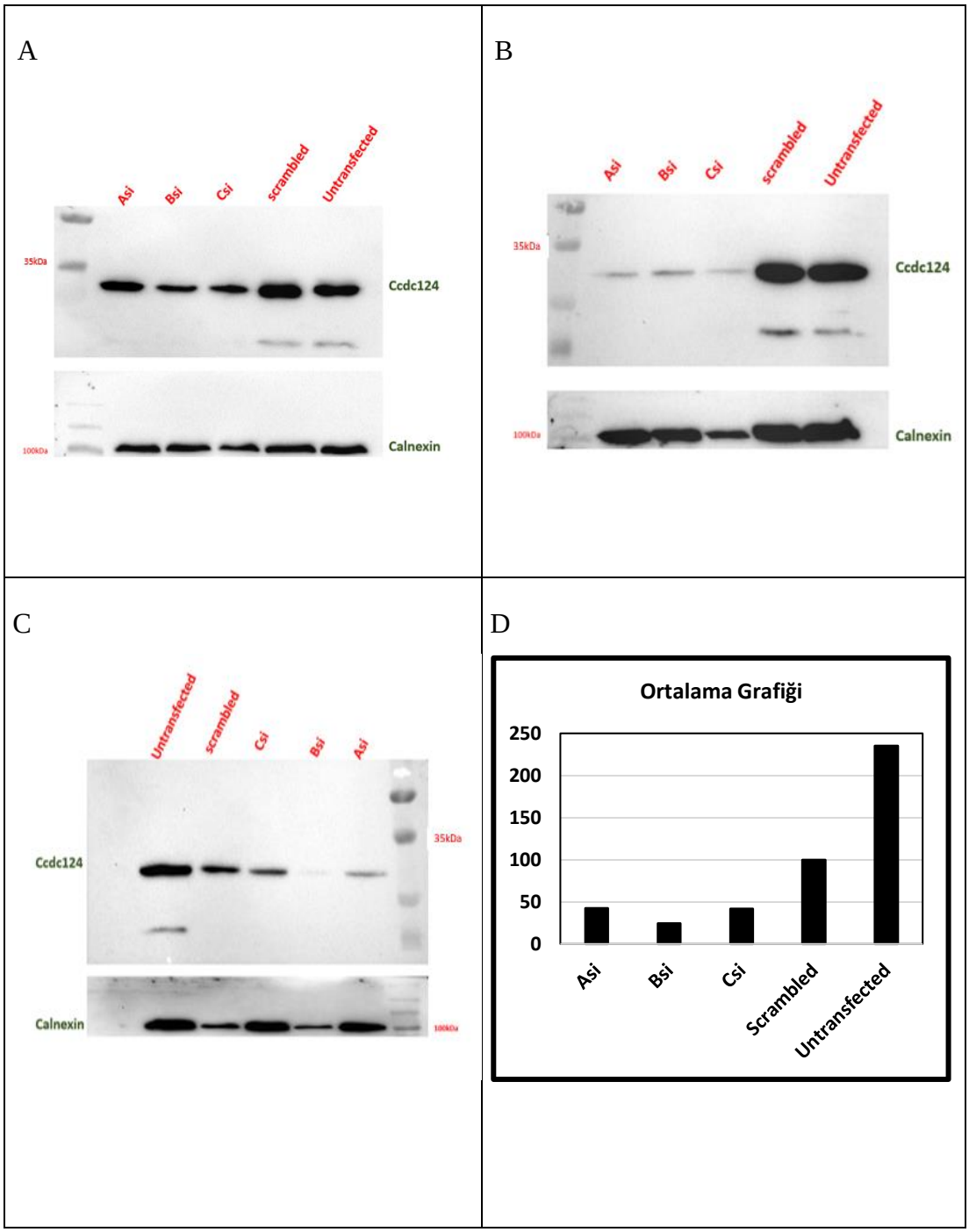


Şekil 6.14: Luminometrik ölçümün grafiklendirilmesi.

6.4. Western Blotlama Analizleri

Ekzojen olarak hücrelere verilen miR138'in protein seviyesinde değişiklik yapıp yapmadığına bakmak için western blot deneyleri ile protein seviyeleri karşılaştırılmıştır. Öncesinde Ccdc124 proteinin ekspresyon seviyesini mikroRNA'lardan daha iyi baskılayan siRNA'lar ile düşürülüp düşürülmediğine bakılmıştır. Ticari olarak sipariş edilen bu siRNA kiti 3 farklı siRNA içermekte olup mRNA dizisi içerisinde farklı bölgelere bağlanarak ekspresyonu inhibe etmektedir. Bu 3 farklı siRNA'nın (A-si, B-si, C-si) hangisinin ekspresyonu daha iyi düşürdüğüne bakmak için western blot analizi yapılmak üzere deney kurulmuştur. "Scrambled" olarak isimlendirilen kontrol grubu negatif kontroldür ve hücrede hiçbir mRNA hedefi olmayan boş siRNA transfeksiyonunu göstermektedir. Dolayısıyla sonuçlarda hiçbir transfeksiyon yapılmayan kontrole (Untransfected) göre ekspresyonu değiştirmemesi beklenmektedir. "Untransfected" olarak isimlendirilen kontrol hiçbir transfeksiyon işlemi uygulanmamış kontrol grubudur.

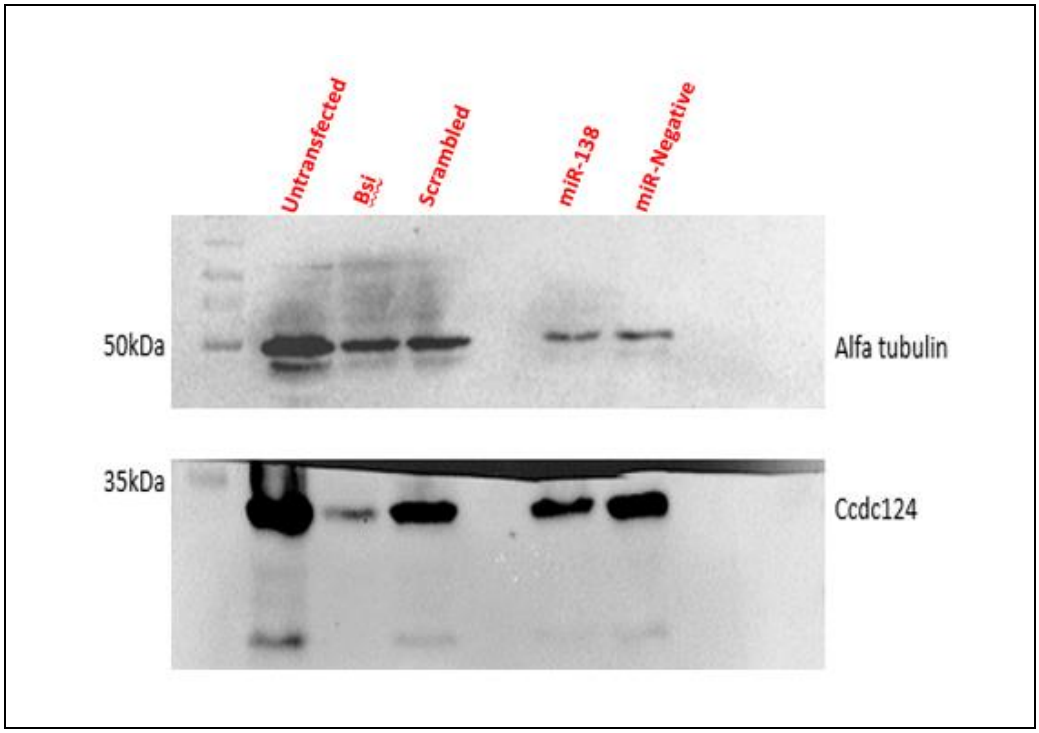
Yapılan western blotlama analizleri sonucunda Ccdc124 mRNA'sını hedefleyen siRNA'ların Ccdc124 proteinin özellikle 15 kDa büyüklüğünde sentezlenen izoformunu %100 oranında hedeflemekte olup 32 kDa büyüklüğündeki izoformunun ifadesinin yaklaşık olarak %75 oranında azalttığı gösterilmiştir. En iyi sonuç veren siRNA'nın "B-si" olduğu sonucuna varılmıştır. Bununla birlikte alternatif olarak A-si ve C-si kullanılabileceği de gösterilmiştir. Tekrar edilen 3 deney sonucu elde edilen membran görüntüleri Şekil 6.15'de (A, B, C) verilmiştir. Membran görüntülerindeki bantların yoğunluğu ImageJ programında kıyaslanmıştır ve grafiksel olarak Şekil 6.15-D'de gösterilmiştir.



Şekil 6.15: A-si, B-si, C-si ve Scrambled (negatif kontrol) siRNA'ları ile transfekte edilmemiş (Untransfected) HeLa hücrelerde Ccdc124 protein ifadesinin immünoblot deneyi ile (anti-Ccdc124 antikoru ile bakılmıştır) karşılaştırılması (A, B, C). Ccdc124 protein ifadesinin grafiksel gösterimi (D).

6.4.1. MiR-138 ve B-si RNA İnterferanslarının Protein İfade Seviyesine Etkilerinin Kıyaslanması

MikroRNA'ların hücre içinde birden fazla hedefi varken siRNA'ların mikroRNA'lara göre daha spesifik olduğu ve hedef mRNA'ya odaklandıklarından bahsetmiştik. Bundan dolayı, birden fazla hedefi olan miR-138 ile tek hedefi olan Ccdc124 siRNA'sının protein ifadesine etkilerini kıyaslanmak üzere western blotlama analizleri yapılmıştır (Şekil 6.16).

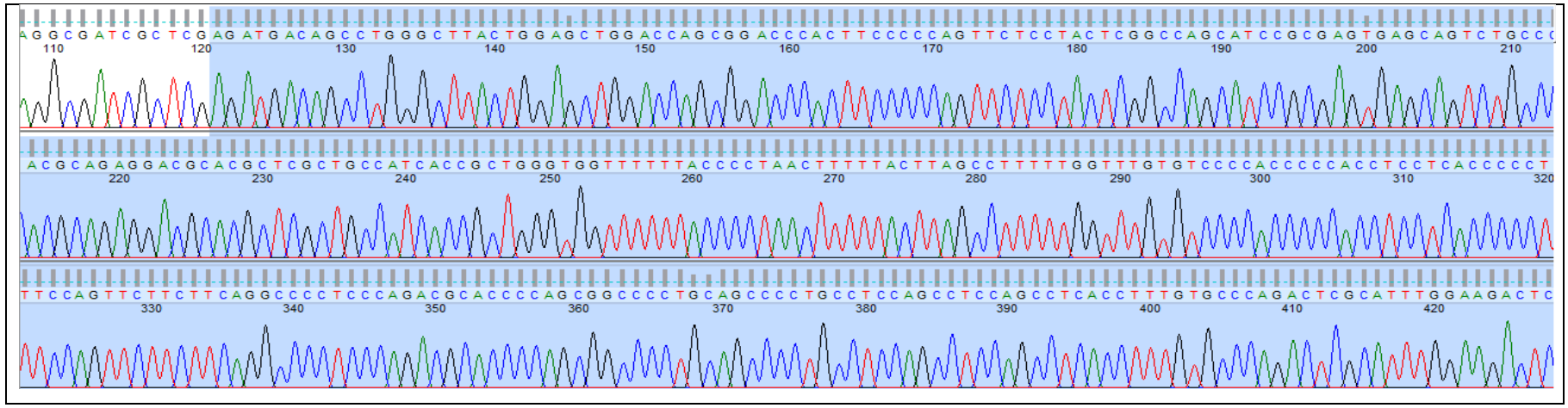


Şekil 6.16: B-si ve Scrambled (negatif kontrol) siRNA'ları ile transfekte edilmemiş ve miR138 ve miRNegeatif mikroRNA'ları ile transfekte edilmiş hücrelerdeki Ccdc124 proteininin ifadesinin transfekte edilmemiş (Untransfected) HeLa hücreleri kıyaslanması (Anti-alfa tubulin, Anti-Ccdc124).

Yapılan westernblot analizine göre (Şekil 6.16) miR138 transfekte edilmiş hücrelerde Ccdc124 proteinin ifade edilme seviyesi ile transfekte edilmemiş hücreler arasında (Untransfected) anlamlı bir fark görülmemiştir. Ccdc124 proteinin ifadesinin azaldığının en iyi görüldüğü hücreler B-si siRNA'sının transfekte edildiği hücreler (Bsi) olduğu belirlenmiştir.

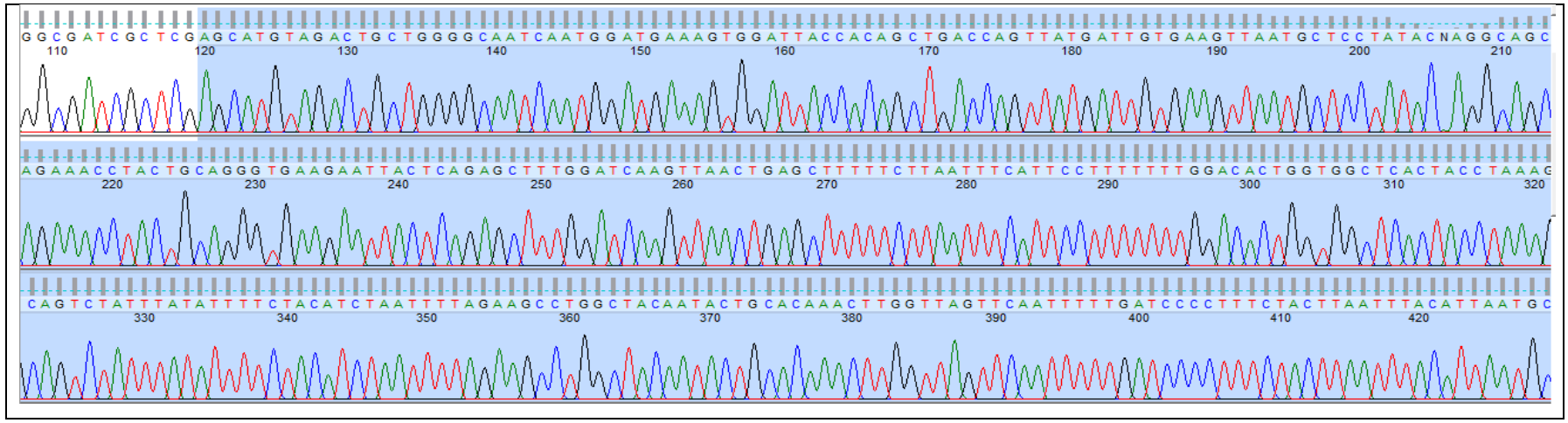
6.5. B-si Transfekte Edilen Hücrelerde HIF1A ve AKT2 Ekspresyonları Üzerine Etkilerinin İncelenmesi

siRNA transfekte edilerek hücrelerde Ccdc124 protein ekspresyon seviyesinin düşürülmesi sonucunda hücre içi RNA interferanslar üzerinde bir değişiklik olup olmadığının araştırılması bu tezin ikinci parçası olarak planlanmıştır. Bu bölümdeki çalışmamızda Ccdc124'ün mikroRNA regülasyonu üzerindeki etkisine bakmak için deney kurulmuştur. Ccdc124 mRNA'sının mikroRNA'lar üzerindeki etkileri gözlemlemek için HIF1A ve AKT2 genleri rastgele seçilmiştir ve bu çalışma kapsamında Yrd. Doç. Dr. Özgür ŞAHİN'nin laboratuvarından HIF1 ve AKT2 genlerinin 3'UTR bölgeleri psiCHECK-2 plazmidine klonlanmış olarak alınmıştır. Bu plazmid IONTEK (İstanbul, Türkiye) firmasında sekanslama primeri ile tekrar doğrulanmış ve kromatografi analizi sonucunda AKT2 ve HIF1A 3'UTR bölgelerine ek olarak son ekzon bölgelerinin de psiCHECK-2 plazmidine klonlandığı belirlenmiştir (Şekil 6.17, Şekil 6.18, Şekil 6.19, Şekil 6.20).

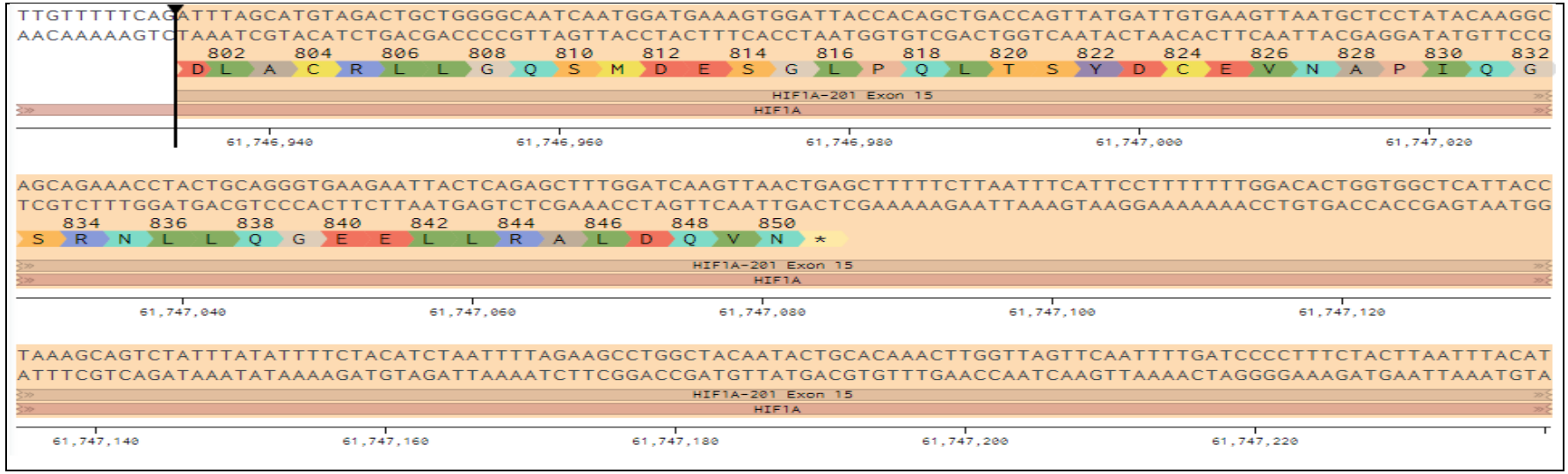


Şekil 6.17: AKT2 kromatogram sonucu.

Şekil 6.18: AKT2 sekans dizisi.

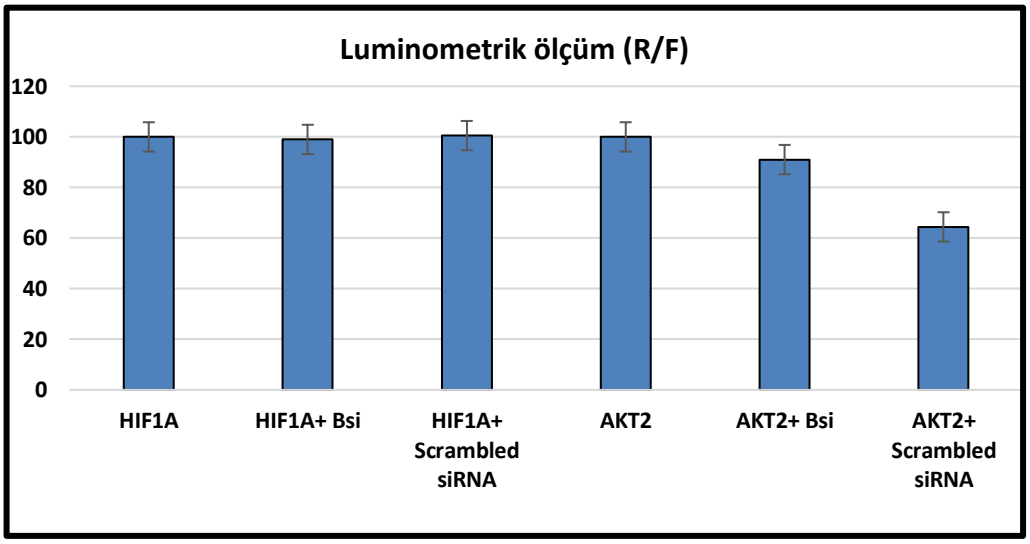


Şekil 6.19: HIF1A kromatogram sonucu.

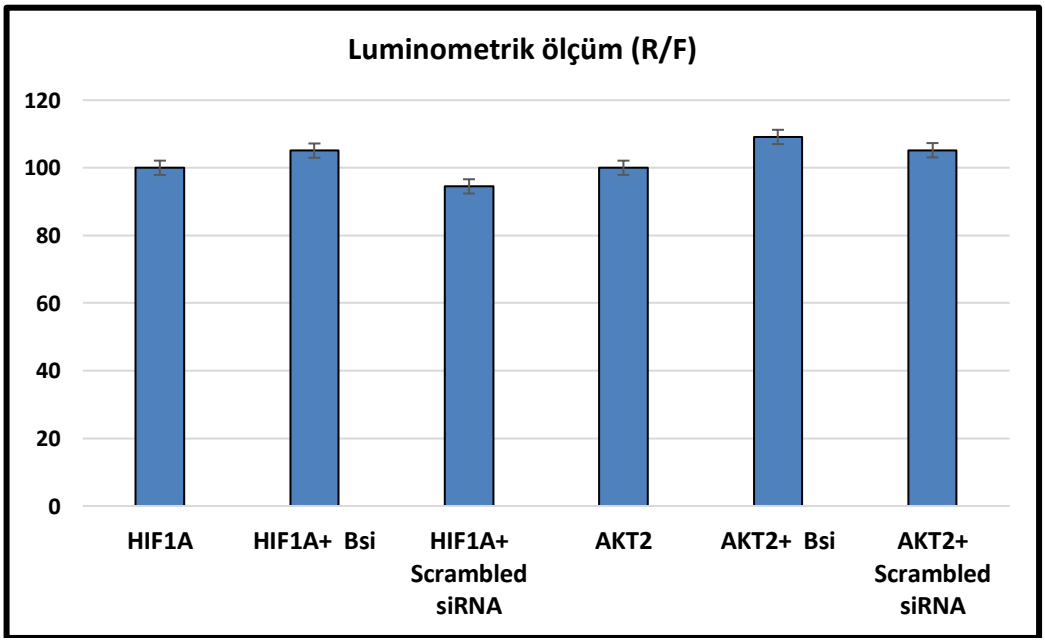


Şekil 6.20: HIF1A sekans dizisi.

HeLa vahşi tip hücre hattında Ccdc124 mRNA'sını diğerlerine kıyasla daha iyi hedeflediğini belirlediğimiz B-si siRNA'sı ile Ccdc124 ekspresyon seviyesi düşürülüp ertesi gün HIF1A-3'UTR ve AKT2-3'UTR bölgelerini içeren psiCHECK2 plazmidleri (50ng) transfekte edilmiştir. Böylece Ccdc124 ekspresyonu düştüğünde mikroRNA regülasyon mekanizmasında bir değişiklik olup olmadığı 2 kez tekrar edilen Lüsiferaz testi deneyi ile test edilmiştir (Şekil 6.21, 6.22 ve EK-G, EK-H).



Şekil 6.21: Luminometrik ölçümün grafiklendirilmesi.



Şekil 6.22: Luminometrik ölçümün grafiklendirilmesi (2. Tekrar).

Şekil 6.21 ve Şekil 6.22'daki sonuçlara göre B-si siRNA'sı ile düşürülen Ccdc124 proteinin HIF1A ve AKT2 ekspresyonu üzerine bir etkisi olmadığını göstermiştir. Fakat bu sonuçların psiCHECK-empty vektörüne göre kıyaslandığında; HIF1 ve AKT2 3'UTR bölgesine ek olarak son ekzonun klonlanmış olması Renilla ekspresyonunu etkilediğini düşündürmektedir. Bu sonuçlara göre HIF1A ekspresyonunun %200 AKT2 ekspresyonunun ise yaklaşık olarak %150 fazla olduğu belirlenmiştir (EK-I).

7. ÖNERİLER

Yapılan çalışmalar sonucunda; Ccdc124 mRNA'sının endojen mikroRNA'lar tarafından %60 oranında hedeflenip mRNA'nın susturulduğu belirlenmiş ve artan konsantrasyonlarda bu hedeflenme oranının değişmediği gözlenmiştir. 50 ng olarak transfekte edilen psiCHECK-3'UTR'nin 100 ng konsantrasyonda da %60 oranında endojen RNA interferanslar tarafından hedeflendiği belirlenmiştir. Biyoinformatik ve deneysel çalışmalar sonucunda ise en iyi hedef mikroRNA'nın miR-138 olduğu ve miR138 tarafından hedeflenmenin hücrelerin pasaj sayısı gibi faktörlere bağlı olarak sonucunda mRNA seviyesinin %70 ile %85 oranına azaldığı belirlenmiştir. Dolayısıyla miR138'in Ccdc124 mRNA'sı üzerine etkisi endojen mikroRNA'lar ile kıyaslandığı zaman yaklaşık olarak %50 ekspresyona etki ettiği belirlenmiştir. MiR-138'in Ccdc124 mRNA'sı üzerinde yapılan mutasyon sonucunda (Mutant1) %80'lik geri kazanımın sağlandığı gösterilmiş ve ekspresyonun arttığı belirlenmiştir ve miR-138'in Ccdc124 mRNA'sı üzerine etkisi bir kere daha kanıtlanmıştır.

Bu çalışmalara ek olarak yapılan biyoinformatik analizler sonucunda MetroNome[TM] veri tabanında Ccdc124 DNA'sında meydana gelen baz değişikliklerinin ALS hastalığı ile ilişkisi gösterilmiş ve bunun üzerine Ccdc124 DNA'sının 3'UTR bölgesine denk gelen ve ALS hastalığı ile ilişkisi olabilecek anlamlı bazlar belirlenmiştir. Belirlenen bu bazlardan 17,934,834. bazdaki değişikliğin(Sitozin => Timin) 108 bireyde gözlendiği ve Ccdc124 3'UTR bölgesinde miR-138 bağlanma bölgesinden 16 baz öncesine denk geldiği belirlenmiştir. Değişen bu bazın Sitozin bazından Timin bazına mutagenez yöntemiyle değişikliği ile yeni bir mutant Ccdc124 3'UTR (Mutant2) oluşturulmuştur. Yaptığımız deneyler sonucunda, oluşturulan Mutant2'nin %75- %85 oranında mRNA ekspresyonunu azalttığı belirlenmiştir. Mutant2 transfekte edilen hücrelere ayrıca miR-138 verildiğinde ise ekspresyonun değişmediği yani %75-%85'lik oranın aynı kaldığı gösterilmiştir. Ayrıca Mutant2'nin ekspresyona etkisinin psiCHECK-3'UTR transfekte edilen hücrelere miR138 verildiğinde mRNA ekspresyonuna etkisine eşit oranda olduğu grafiksel olarak gösterilmiştir. Mutant2'nin bu etkisinin ALS hastalığı ile ilişkisinin; FUS ve TDP43 proteinleri gibi Ccdc124 proteinin RNA bağlayıcı bir protein olması ile alakalı olabileceği düşünülmektedir. Mutant2'deki Sitozinin Timin bazına değişikliği Ccdc124'ün bu bölgede RNA bağlama ve RNA interferanslar tarafından

hedeflenme kapasitesini arttırdığı ve ekspresyon üzerinde etkisi olduğunu göstermektedir. Bu çalışma kapsamında nöral hücreler üzerinde Ccdc124-3'UTR bölgesi ve oluşturulan Mutant2'nin etkisine bakılması düşünülmektedir.

siRNA'lar ile yapılan çalışmada Ccdc124 protein seviyesinin en iyi düşürüldüğü siRNA (B-si) belirlenmiş fakat bu B-si siRNA'sı ile birlikte Asi ve Csi siRNA'larının alternatif olarak kullanıldığında beklenilen etkiyi göstereceği gösterilmiştir. Ccdc124 proteinin siRNA'lar tarafından protein seviyesinin düşmesine bakıldığında; 2 izoform şeklinde sentezlenen Ccdc124 proteinin yaklaşık 15 kDa büyüklüğünde sentezlenen izoformunun ekspresyonunu tamamen engellediği, 32 kDa büyüklüğündeki izoformunu ise %75 oranında azalttığı gözlenmiştir.

Birden fazla hedefi olan miR-138'in protein seviyesinde etkisini incelemek için yaptığımız immünoblotlama deneylerinde, tek hedefi Ccdc124 olan siRNA'lar kadar protein seviyesine etki etmediği ve deneyin tekrar edilmesi gerektiği düşünülmektedir.

Lüsiferaz testi deneylerinde ve immünoblotlama deneylerinde miRNegatif mikroRNA'ların transfeksiyon ya da olası hedefler kaynaklı hücrede değişikliklere neden olduğu düşünülmektedir. Özellikle bu etkinin *Caenorhabditis elegans* dizisi olarak tasarlanmış bir miRNA olan miRNegatif (HMC003-5NMOL-miRNA negative control- Sigma Aldrich) negatif kontrolünde gözlendiği; *Arabidopsis thaliana* dizisi olarak tasarlanmış miRNA olan miRNegatif (HMC002-5NMOL-miRNA negative control- Sigma Aldrich) negatif kontrolünün lüsiferaz dizi sonuçlarında ise bir etki gözlenmemiştir.

Ccdc124 proteinin mikroRNA regülasyonu ve biyogenezi üzerinde bir etkiye sahip olup olmadığını incelemek için yaptığımız çalışmalarımızda; Ccdc124 protein seviyesini en iyi baskılayan B-si siRNA'sı ile Ccdc124 proteini düşürülüp rastgele seçilmiş olan HIF1α-3'UTR ve AKT2-3'UTR ile lüsiferaz testi protokolü uygulanmıştır. Buradaki amacımız; Ccdc124 proteinin baskılandığı hücrelerde mikroRNA yolağında bir aksama olup olmadığı ve bu aksama sonucunda 3'UTR bölgelerinin hedeflenmesinin ve baskılanmasının değişip değişmediğini incelemektir. Bu çalışmalar sonucunda; Ccdc124 proteinin baskılanmasının HIF1α ve AKT2 ekspresyonunda bir değişikliğe neden olmadığı görülmüştür. Ayrıca kromatografi sonuçlarına baktığımızda klonlanan HIF1α-3'UTR ve AKT2-3'UTR bölgelerine ek olarak protein kodlayan son ekzonun da klonlandığı belirlenmiştir. Hiçbir klonlama yapılmamış psiCHECK-empty vektörünün transfekte edildiği Hela hücreleri ile HIF1α -3'UTR ve AKT2-3'UTR vektörlerinin transekte edildiği hücrelerdeki lüsiferaz testi

sonuçlarında 3'UTR bölgeleri içermesine rağmen ekspresyonun sırasıyla %200 ve %150 fazla olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda ile HIF1α -3'UTR ve AKT2-3'UTR ek olarak klonlanmış son ekzon bölgelerinin Renilla mRNA'sının stabilitesini arttırdığını ve bundan dolayı açığa çıkan Renilla protein aktivitesinin artmış olabileceğini düşündürmektedir. Bu kısımdaki deneylerin HIF1α ve AKT2 ekzon bölgelerinin olmadan tekrar edilmesi düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

[1] 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.

[2] 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, 8(7), e69289.

[3] Arslan Ö., (2015), “Coiled-Coil Domain Containing Protein 124 (Ccdc124) Artışının Hücre Fizyolojisine ve Bölünmesine Etkileri”, Yüksek Lisans Tezi, Gebze Teknik Üniversitesi.

[4] Gül S., (2015), “CRISPR\CAS9 Yöntemi Aracılığı ile İnsan CCDC124 Geni Delesyonunun Hücre Bölünmesi Üzerine Etkileri”, Yüksek Lisans Tezi, Gebze Teknik Üniversitesi.

[5] 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.

[6] Güllülü Ö., (2017), “Coiled Coil Containing 124 (CCDC124) Proteinin İşlevleri ve Hücre-altı Konumunun Translasyon Sonrası Mekanizmalarla Düzenlenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, Gebze Teknik Üniversitesi.

[7] Öztürk T. M., Güllülü Ö., Gül S., Arslan Ö., Erman B., Telkoparan P., Sevgen İ., Tazebay U. H., (2018), “Coiled-coil domain-containing protein 124 is a novel component of phase separated complexes”, EMBO EMBL Symposium: Cellular Mechanisms Driven by Liquid Phase Separation, 178, Germany, May 2018.

[8] Morgan D., (2007), “The Cell Cycle: Principals of Control”, Yale J Biol Med. 2007 Sep, 80(3), 141–142.

[9] Alberts B., Johnson A., Lewis J. (2002), “Molecular Biology of the Cell”, 4th Edition, Garland Science.

[10] Watson J. D., Baker T., Bell S., Gann A., Levine M., Losick R., (2003), "Molecular Biology of the Gene".

[11] Malumbres M., (2014), “Cyclin-dependent kinases”, Genome Biology, 15,1-10.

[12] Cooper G.M. and Hausman, R.E. (2004), "The Cell: A Molecular Approach", 3rd edition, ASM Press.

[13] Kuhn M., Hyman A. A., Beyer A., (2014), “Coiled-Coil Proteins Facilitated the Functional Expansion of the Centrosome.” PLoS Comput. Biol. 10.

[14] Azimzadeh J., (2014), “Exploring the evolutionary history of centrosomes.” Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci. 369.

[15] Bettencourt-Dias, M., Glover, D. M., (2007), “Centrosome biogenesis and function: Centrosomics brings new understanding.” Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 8, 451–463.

[16] Loncarek J., Khodjakov A. (2009), “Ab ovo or de novo? Mechanisms of centriole duplication.” Mol. Cells 27, 135–142.

[17] Azimzadeh J., Bornens M., (2007), “Structure and duplication of the centrosome.” J. Cell Sci. 120, 2139–2142.

[18] Bornens M., (2012), “The centrosome in cells and organisms.” Science (80-.). 335, 422–426.

[19] Jakobsen L., (2011), “Novel asymmetrically localizing components of human centrosomes identified by complementary proteomics methods.” EMBO J. 30, 1520–1535.

[20] Hirota T., (2003), “Aurora-A and an interacting activator, the LIM protein Ajuba, are required for mitotic commitment in human cells.” Cell 114, 585–598.

[21] Jordan S.N., Canman J. C., (2012), “Rho GTPases in animal cell cytokinesis: An occupation by the one percent.” Cytoskeleton (Hoboken) 69(11), 919-930.

[22] Glotzer M., (2005), “The molecular requirements for cytokinesis.” Science (80). 307, 1735–1739.

[23] D’Avino P. P., Capalbo L., (2016), “Regulation of midbody formation and function by mitotic kinases.” Semin. Cell Dev. Biol. 53, 57–63.

[24] Derksen P. W. B., Van de Ven R. A. H., (2017), “Shared mechanisms regulate spatiotemporal RhoA-dependent actomyosin contractility during adhesion and cell division.” Small GTPases 0, 1–9.

[25] D’Avino P. P., (2009), “How to scaffold the contractile ring for a safe cytokinesis - Lessons from Anillin-related proteins.” J. Cell Sci. 122, 1071–1079.

[26] Wang Y. L., (2005), “The mechanism of cortical ingression during early cytokinesis: Thinking beyond the contractile ring hypothesis.” Trends Cell Biol. 15, 581–588.

[27] Fededa J. P., Gerlich D. W., (2012), “Molecular control of animal cell cytokinesis.” Nat. Cell Biol. 14, 440–447.

[28] Rappaport R., (1971), " Cytokinesis in Animal Cells." Int. Rev. Cytol. 31, 169–214.

[29] Schiel JA, Prekeris R., (2011), "ESCRT or endosomes? Tales of the separation of two daughter cells." Commun. Integr. Biol. 4:606–8.

[30] Steigemann P. (2009), “Aurora B-Mediated Abscission Checkpoint Protects against Tetraploidization.” Cell 136, 473–484.

[31] Reid E, Connell J, Edwards TL, Duley S, Brown SE, Sanderson CM., (2005), “The hereditary spastic paraplegia protein spastin interacts with the ESCRT-III complex-associated endosomal protein CHMP1B.” Hum. Mol. Genet. 14:19–38.

[32] Goss JW, Toomre DK. (2008), “Both daughter cells traffic and exocytose membrane at the cleavage furrow during mammalian cytokinesis.” J. Cell Biol. 181:1047–54.

[33] Barr FA, Gruneberg U., (2007), “Cytokinesis: placing and making the final cut. Cell 131:847–60.

[34] Bastos RN, Barr FA., (2010), “Plk1 negatively regulates Cep55 recruitment to the midbody to ensure orderly abscission.” J. Cell Biol. 191:751–60

[35] Orang A. V., Safaralizadeh R., Kazemzadeh-Bavili M., (2015), “Mechanisms of miRNA-mediated gene regulation from common downregulation to mRNA-specific upregulation.” Int. J. Genomics.

[36] MacFarlane L.-A., R. Murphy P., (2010), “MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer.” Curr. Genomics 11, 537–561.

[37] O’Brien J., Hayder H., Zayed Y., Peng C., (2018), “Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation.” Front. Endocrinol. (Lausanne). 9, 1–12.8

[38] Winter J., Jung S., Keller S., Gregory R. I., Diederichs S., (2009), “Many roads to maturity: MicroRNA biogenesis pathways and their regulation.” Nat. Cell Biol. 11, 228–234.

[39] Hatfield S. D., Shcherbata H. R., Fischer K. A., Nakahara K., Carthew R. W., and Ruohola-Baker H., (2005), “Stem cell division is regulated by the microRNA pathway,” Nature, vol. 435, no. 7044, pp. 974–978.

[40] Croce C. M. and Calin G. A., (2005), “miRNAs, cancer, and stem cell division.” Cell, vol. 122, no. 1, pp. 6–7.

[41] Johnston Jr. R. J. and Hobert O., (2003), “A microRNA controlling left/right neuronal asymmetry in Caenorhabditis elegans.” Nature, vol. 426, no. 6968, pp. 845–849.

[42] Zhao Y., Samal E., and Srivastava D., (2005), “Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis” Nature, vol. 436, no. 7048, pp. 214–220.

[43] Cheng A. M., Byrom M. W., Shelton J., and Ford L. P., (2005), “Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis.” Nucleic Acids Research, vol. 33, no. 4, pp. 1290–1297.

[44] Chen J. F., Mandel E. M., Thomson J. M., (2006), “The role ofmicroRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation.” Nature Genetics, vol. 38, no. 2, pp. 228–233.

[45] Naguibneva I., Ameyar-Zazoua M., Polesskaya A., (2006), “The microRNA miR-181 targets the homeobox proteinHox-A11 during mammalian myoblast differentiation.” Nature Cell Biology, vol. 8, no. 3, pp. 278–284.

[46] Bartel D. P., (2004), “MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function.” Cell, vol. 116, no. 2, pp. 281–297.

[47] Filipowicz W., (2005), “RNAi: the nuts and bolts of the RISC machine.” Cell, vol. 122, no. 1, pp. 17–20.

[48] Jamshidi-Adegani F., Langroudi L, Shafiee A., Mohammadi- Sangcheshmeh A., Ardeshirylajimi A., and Barzegar M, 2014, “Mir- 302 cluster exhibits tumor suppressor properties on human unrestricted somatic stem cells” Tumour Biology.

[49] Matsushima K., Isomoto H., Yamaguchi N., (2011), “MiRNA-205 modulates cellular invasion and migration via regulating zinc finger E-box binding homeobox 2 expression in esophageal squamous cell carcinoma cells.” Journal of Translational Medicine, vol. 9, article 30.

[50] Poy M. N., Eliasson L., Krutzfeldt J., (2004), “A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion.” Nature, vol. 432, no. 7014, pp. 226–230.

[51] Mollaie H. R., Monavari S. H., Arabzadeh S. A., Shamsi- Shahrabadi M., Fazlalipour M., and Afshar R. M., (2013), “RNAi and miRNA in viral infections and cancers.” Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, vol. 14, no. 12, pp. 7045–7056.

[52] Ha M., Kim VN., (2014), “Regulation of microRNA biogenesis.” Nat Rev Mol Cell Biol., 15:509–24.

[53] Tanzer A, Stadler PF., (2004), “Molecular evolution of a microRNA cluster.” JMol Biol., 339:327–35.

[54] Carthew R. W. and Sontheimer E. J., (2009), “Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs.” Cell, vol. 136, no. 4, pp. 642–655.

[55] Kim V. N., Han J., and Siomi M. C., (2009), “Biogenesis of small RNAs in animals.” Nature Reviews Molecular Cell Biology, vol. 10, no. 2, pp. 126–139.

[56] Denli AM, Tops BB., Plasterk RH., Ketting RF., Hannon GJ., (2004), “Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex.” Nature, 432:231–5.

[57] Alarcon CR., Lee H., Goodarzi H., Halberg N., Tavazoie SF., (2015), “N6methyladenosine marks primary microRNAs for processing.” Nature, 519:482–5.

[58] Han J., Lee Y., Yeom KH., Kim YK., Jin H., Kim VN., (2004), “The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing.” Genes Dev., 18:3016–27.

[59] Okada C., Yamashita E., Lee SJ., Shibata S., Katahira J., Nakagawa A., (2009), “A high-resolution structure of the pre-microRNA nuclear export machinery.” Science, 326:1275–9.

[60] Zhang H., Kolb FA., Jaskiewicz L.,Westhof E, FilipowiczW., (2004), “Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III.” Cell, 118:57–68.

[61] Diederichs S., Haber D. A., (2007), “Dual role for Argonautes in microRNA processing and posttranscriptional regulation of microRNA expression.” Cell 131, 1097–1108.

[62] Ruby JG., Jan CH., Bartel DP., (2007), “Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing.” Nature, 448:83–6.

[63] Babiarz JE., Ruby JG., Wang Y., Bartel DP., Blelloch R., (2008), “Mouse ES cells express endogenous shRNAs, siRNAs, and other Microprocessorindependent, Dicer-dependent small RNAs.” Genes Dev., 22:2773–85.

[64] Xie M., Li M., Vilborg A., Lee N., Shu MD., Yartseva V., (2013), “Mammalian 5′- capped microRNA precursors that generate a single microRNA.” Cell, 155:1568–80.

[65] Yang JS., Maurin T., Robine N., Rasmussen KD., Jeffrey KL., Chandwani R, (2010), “Conserved vertebrate mir-451 provides a platform for Dicer-independent, Ago2-mediated microRNA biogenesis.” Proc Natl Acad Sci USA., 107:15163–8.

[66] Cheloufi S., Dos Santos CO., Chong MMW., Hannon GJ., (2010), “A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis.”, Nature, 465:584–9.

[67] Wightman B. H. I., Ruvkun G., (1993), “Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediated temporal pattern formation in C. elegans.” Cell, 75, 855-862.

[68] Lee R.C. F. R., Ambros V., (1993), “The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14.” Cell, 75, 843-854.

[69] Brennecke J., Stark A., Russell R. B., Cohen S. M., (2005), “Principles of microRNA-target recognition.” PLoS Biol., 3, e85.

[70] Doench J. G., Sharp P. A., (2004), “Specificity of microRNA target selection in translational repression.” Genes Dev., 18, 504-511.

[71] Krek A., Grun D., Poy M. N., Wolf R., Rosenberg L., Epstein E. J., MacMenamin P., da Piedade I., Gunsalus K. C., Stoffel M., Rajewsky N., (2005), “Combinatorial microRNA target predictions.” Nat. Genet., 37, 495-500.

[72] Lewis B. P., Shih I. H., Jones-Rhoades M. W., Bartel D. P., Burge C. B., (2003), “Prediction of mammalian microRNA targets.” Cell, 115, 787-798.

[73] Stark A., Brennecke J., Russell R. B., Cohen S. M., (2003), “Identification of Drosophila MicroRNA targets.” PLoS Biol., 1, E60.

[74] Enright A. J., John B., Gaul U., Tuschl T., Sander C., Marks D. S., (2003), “MicroRNA targets in Drosophila.” Genome Biol., 5, R1.

[75] Behm-Ansmant I., Rehwinkel J., Doerks T., Stark A., Bork P., Izaurralde E., (2006), “mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes.” Genes Dev. 20:1885–98.

[76] Jonas S., Izaurralde E., (2015), “Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing.” Nat Rev Genet., 16:421–33.

[77] Christie M., Boland A., Huntzinger E., Weichenrieder O., Izaurralde E., (2013), “Structure of the PAN3 pseudokinase reveals the basis for interactions with the PAN2 deadenylase and the GW182 proteins.” Mol Cell., 51:360–73.

[78] Braun J.E., Truffault V., Boland A., Huntzinger E., Chang C.T., Haas G., (2012), “A direct interaction between DCP1 and XRN1 couples mRNA decapping to 5′ exonucleolytic degradation.” Nat Struct Mol Biol., 19:1324–31.

[79] Barman B., Bhattacharyya S.N., (2015), “mRNA targeting to endoplasmic reticulum precedes ago protein interaction and microRNA (miRNA)-mediated translation repression in mammalian cells.” J Biol Chem., 290:24650–6.

[80] Nishi K., Takahashi T., Suzawa M., Miyakawa T., Nagasawa T., Ming Y., (2015), “Control of the localization and function of a miRNA silencing component TNRC6A by Argonaute protein.” Nucleic Acids Res, 43:9856–73.

[81] Detzer A., Engel C., Wunsche W., Sczakiel G., (2011), “Cell stress is related to re-localization of Argonaute 2 and to decreased RNA interference in human cells.” Nucleic Acids Res., 39:2727–41.

[82] Bose M., Barman B., Goswami A., Bhattacharyya S.N., (2017), “Spatiotemporal uncoupling ofMicroRNA-mediated translational repression and target RNA degradation controls microRNP recycling in mammalian cells.” Mol Cell Biol. 37:e00464–16.

[82] Gibbings D.J., Ciaudo C., Erhardt M., Voinnet O., (2009), “Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity.” Nat Cell Biol., 11:1143–9.

[83] Barrey E., Saint-Auret G., Bonnamy B., Damas D., Boyer O., Gidrol X., (2011), “PremicroRNA and mature microRNA in human mitochondria.” PLoS ONE, 6:e20220.

[84] Zhang X., Zuo X., Yang B., Li Z., Xue Y., Zhou Y., (2014), “MicroRNA directly enhances mitochondrial translation during muscle differentiation.” Cell, 158:607–19.

[85] Gagnon K.T., Li L., Chu Y., Janowski B.A., Corey D.R., (2014), “RNAi factors are present and active in human cell nuclei.” Cell Rep., 6:211–21.

[86] Liu X., Wang C., Chen Z., Jin Y., Wang Y., (2011), “MicroRNA-138 suppresses epithelial-mesenchymal transition in squamous cell carcinoma cell lines.” Biocem J 440: 23–31.

[87] Lee Y. C., Tzeng W. F., Chiou T. J., Chu S. T., (2012), “MicroRNA-138 Suppresses Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin Expression and Inhibits Tumorigenicity.” PLoS One 7, 1–9.

[88] Yeh Y. M., Chuang C. M., Chao K. C., Wang L. H., (2013), “MicroRNA-138 suppresses ovarian cancer cell invasion and metastasis by targeting SOX4 and HIF-1α.” Int. J. Cancer 133, 867–878.

[89] Liu X., (2012), “MiR-138 suppressed nasopharyngeal carcinoma growth and tumorigenesis by targeting the CCND1 oncogene.” Cell Cycle 11, 2495–2506.

[90] Kim V., (2005), “Narry MicroRNA Biogenesis: Coordinated Cropping and Dicing.” Nature 6, 376-385.

[91] Lam Jenny K.W., Chow Michael Y.T., Zhang Yu, Leung Susan W.S., (2015), “siRNA versus miRNA as therapeutics for gene silencing.” Molecular Therapy-Nucleic Acids, 4, 9, e252.

ÖZGEÇMİŞ

İlkay Sevgen 11.01.1994 yılında Adana'da doğdu. 2012 yılında Gebze Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünde başladığı lisans eğitimini 2017 yılında bölüm ve fakülte üçüncüsü olarak başarıyla tamamladı. 2020 yılında Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'ndan yüksek lisans derecesiyle mezun oldu. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde araştırma görevlisi olarak eğitimine devam etmektedir.

EKLER

Ek A: Şekil 6.6'daki Grafiğin Luminometrik Ölçümlerinin Ham Verileri

Renilla Luminometric1

Plate:1 - Wavelength:480 nm

Blank	122.4	148.8	101.5
psiCHECK-empty (50ng)	82640	116600	65190
psiCHECK-3'UTR (50ng)	25700	6366	29650
psiCHECK-3'UTR (100ng)	85590	48620	140500

Renilla Luminometric-2

Plate:1 - Wavelength: 480nm

Blank	119.2	140.6	102.6
psiCHECK-empty (50ng)	77480	109400	60610
psiCHECK-3'UTR (50ng)	24420	5979	27500
psiCHECK-3'UTR (100ng)	80940	45810	130800

Firefly Luminometric1

Plate:1 - Wavelength:560nm

Blank	316.3	420.4	253.7
psiCHECK-empty (50ng)	335900	461500	245900
psiCHECK-3'UTR (50ng)	255100	78080	250700
psiCHECK-3'UTR (100ng)	763400	556700	1237000

Firefly Luminometric2

Plate:1 - Wavelength:560nm

Blank	305.9	404.1	245.1
psiCHECK-empty (50ng)	329400	453600	239600
psiCHECK-3'UTR (50ng)	249600	74770	245400
psiCHECK-3'UTR (100ng)	748100	546600	1205000

Şekil A1.1: Şekil 6.6'daki grafiğin luminometrik ölçümlerinin ham verileri.

Ek B: Şekil 6.7'deki Grafiğin Luminometrik Ölçümlerinin Ham Verileri

Renilla Luminometric1

Plate:1 - Wavelength:480nm

Blank	81.57	78.85	66.85
psiCHECK-empty (50ng)	29780	12480	14350
psiCHECK-3'UTR (50ng)	17760	14450	7202
psiCHECK-3'UTR (100ng)	8917	14690	124900

Renilla Luminometric2

Plate:1 - Wavelength:480nm

Blank	78.83	78.44	66.43
psiCHECK-empty (50ng)	28620	12080	13710
psiCHECK-3'UTR (50ng)	17110	13900	6573
psiCHECK-3'UTR (100ng)	8623	14020	119200

Firefly Luminometric1

Plate:1 - Wavelength:560nm

Blank	140.8	118.2	84.11
psiCHECK-empty (50ng)	161600	80940	91970
psiCHECK-3'UTR (50ng)	258800	199300	153200
psiCHECK-3'UTR (100ng)	113400	189200	35130

Firefly Luminometric2

Plate:1 - Wavelength:560nm

Blank	132.5	118.8	89.72
psiCHECK-empty (50ng)	158800	79920	90330
psiCHECK-3'UTR (50ng)	254500	195200	151600
psiCHECK-3'UTR (100ng)	111500	185500	33950

Şekil B1.1: Şekil 6.7'deki grafiğin luminometrik ölçümlerinin ham verileri.

Ek C: Şekil 6.8'deki Grafiğin Luminometrik Ölçümlerinin Ham Verileri

Renilla Luminometric1

Plate:1 - Wavelength:480nm

Blank	58.8	40.78	58.16
psiCHECK-empty	10590	8071	3950
psiCHECK-empty+miR138	5989	2151	6871
psiCHECK-empty+miRNegatif	8003	7583	4207
psiCHECK-3'UTR	5740	4994	3136
psiCHECK-3'UTR+miR138	4529	3221	7081
psiCHECK-3'UTR +miRNegatif	5878	6355	3603

Renilla Luminometric2

Plate:1 - Wavelength:480nm

Blank	39.54	45.27	48.44
psiCHECK-empty	10120	7687	3754
psiCHECK-empty+miR138	5791	2056	6479
psiCHECK-empty+miRNegatif	7640	7084	4037
psiCHECK-3'UTR	5480	4748	2938
psiCHECK-3'UTR+miR138	4240	3023	6668
psiCHECK-3'UTR +miRNegatif	5524	6016	3423

Firefly Luminometric1

Plate:1 - Wavelength:560nm

Blank	46.73	44.15	26.1
psiCHECK-empty	51620	26750	11550
psiCHECK-empty+miR138	19040	6734	23100
psiCHECK-empty+miRNegatif	25250	34660	18600
psiCHECK-3'UTR	48090	47750	20000
psiCHECK-3'UTR+miR138	47120	30020	41590
psiCHECK-3'UTR +miRNegatif	50580	42780	39480

Firefly Luminometric2

Plate:1 - Wavelength:560nm

Blank	51.45	40.91	27.73
psiCHECK-empty	49770	25850	11250
psiCHECK-empty+miR138	18500	6426	22340
psiCHECK-empty+miRNegatif	24520	33050	17790
psiCHECK-3'UTR	45960	46070	19280
psiCHECK-3'UTR+miR138	45350	28810	39700
psiCHECK-3'UTR +miRNegatif	48570	41280	38040

Şekil C1.1: Şekil 6.8'deki grafiğin luminometrik ölçümlerinin ham verileri.

Ek D: Şekil 6.9'daki Grafiğin Luminometrik Ölçümlerinin Ham Verileri

Renilla Luminometric1

Plate:1 - Wavelength:480nm

Blank	111.7	140.5	144.4
psiCHECK-empty	105600	120600	152400
psiCHECK-empty+miR138	24120	21310	19910
psiCHECK-empty+miRNegatif	130700	73720	92710
psiCHECK-3'UTR	54190	67810	48200
psiCHECK-3'UTR+miR138	26850	23450	23290
psiCHECK-3'UTR +miRNegatif	26570	23980	37280

Renilla Luminometric2

Plate:1 - Wavelength:480nm

Blank	113.4	136	143
psiCHECK-empty	102700	117600	147800
psiCHECK-empty+miR138	23450	20780	19120
psiCHECK-empty+miRNegatif	128300	72300	90570
psiCHECK-3'UTR	53130	66650	46360
psiCHECK-3'UTR+miR138	26590	22680	22710
psiCHECK-3'UTR +miRNegatif	26170	23220	36360

Firefly Luminometric1

Plate:1 - Wavelength:560nm

Blank	246.8	321.5	287.7
psiCHECK-empty	290500	341400	373600
psiCHECK-empty+miR138	52580	56840	56570
psiCHECK-empty+miRNegatif	186600	144400	168400
psiCHECK-3'UTR	424600	509100	223600
psiCHECK-3'UTR+miR138	215000	173800	229700
psiCHECK-3'UTR +miRNegatif	295700	237900	340000

Firefly Luminometric2

Plate:1 - Wavelength:560nm

Blank	240.2	308.5	288.3
psiCHECK-empty	284500	329100	359100
psiCHECK-empty+miR138	51280	55140	55770
psiCHECK-empty+miRNegatif	185100	141800	164800
psiCHECK-3'UTR	413200	495300	220500
psiCHECK-3'UTR+miR138	207700	167900	220300
psiCHECK-3'UTR +miRNegatif	287600	228800	327500

Şekil D1.1: Şekil 6.9'daki grafiğin luminometrik ölçümlerinin ham verileri.

Ek E: Şekil 6.13'deki Grafiğin Luminometrik Ölçümlerinin Ham Verileri

Renilla Luminometric1

Plate:1 - Wavelength:480nm

Blank	52.98	46.18	51.68	Mutant1	4025	5115	3228
psiCHECK-empty	5321	1831	3422	Mutant1+miR138	2208	849.8	1277
psiCHECK-empty+miR138	6095	532.5	3490	Mutant1+miRNegatif1	1760	3386	2677
psiCHECK-empty+miRNegatif1	7994	2748	6085				
psiCHECK-3'UTR	5128	8763	11680	Mutant2	4080	2943	11080
psiCHECK-3'UTR+miR138	299.8	2464	659.2	Mutant2+miR138	6037	2442	3203
psiCHECK-3'UTR +miRNegatif1	7857	791.9	1578	Mutant2+ miRNegatif1	7994	5962	4096

Firefly Luminometric1

Plate:1 - Wavelength:560nm

Blank	39.32	29.23	32.98	Mutant1	23300	6645	19780
psiCHECK-empty	9659	3926	6862	Mutant1+miR138	4537	4332	3399
psiCHECK-empty+miR138	5286	951.1	4193	Mutant1+miRNegatif1	2498	7792	8038
psiCHECK-empty+miRNegatif1	7260	10010	5368				
psiCHECK-3'UTR	9733	19050	47510	Mutant2	24310	7323	58660
psiCHECK-3'UTR+miR138	1597	4869	2910	Mutant2+miR138	11080	6170	25140
psiCHECK-3'UTR +miRNegatif1	43420	3328	10100	Mutant2+ miRNegatif1	28560	8281	24890

Şekil E1.1: Şekil 6.13'deki grafiğin luminometrik ölçümlerinin ham verileri.

Ek F: Şekil 6.14'deki Grafiğin Luminometrik Ölçümlerinin Ham Verileri

Firefly Luminometric1

Plate:1 - Wavelength:560nm

Blank	23.68	14.23	12.6	Mutant1	2214	3307	692.8
psiCHECK-empty	562.6	811.6	2742	Mutant1+miR138	75.27	1537	321.4
psiCHECK-empty+miR138	369.4	1218	252.1	Mutant1+miRNegatif1	1240	1887	4788
psiCHECK-empty+miRNegatif1	1458	795.1	744.8				
psiCHECK-3'UTR	5926	14920	2130	Mutant2	1467	1357	1429
psiCHECK-3'UTR+miR138	1061	255.6	502.6	Mutant2+miR138	104.4	468.3	1396
psiCHECK-3'UTR +miRNegatif1	2500	4864	1654	Mutant2+ miRNegatif1	7988	4599	76950

Renilla Luminometric1

Plate:1 - Wavelength:480nm

Blank	45.75	46.19	50.34	Mutant1	626.4	1417	297.7
psiCHECK-empty	659.8	1218	3699	Mutant1+miR138	71.18	640.6	236.6
psiCHECK-empty+miR138	525.4	1427	673.5	Mutant1+miRNegatif1	772.5	612.6	652.8
psiCHECK-empty+miRNegatif1	1078	371.9	740.6				
psiCHECK-3'UTR	1508	1497	832.3	Mutant2	480.1	343.3	697.8
psiCHECK-3'UTR+miR138	1299	123.7	201.8	Mutant2+miR138	102	252.4	576
psiCHECK-3'UTR +miRNegatif1	945.9	1177	689.2	Mutant2+ miRNegatif1	2450	1054	8639

Şekil F1.1: Şekil 6.14'deki grafiğin luminometrik ölçümlerinin ham verileri.

Ek G: Şekil 6.21'deki Grafiğin Luminometrik ölçümlerinin ham verileri

Renilla Luminometric1

Plate:1 - Wavelength:480nm

Blank	187.6	220.2	194.4
psiCHECK-empty	137100	152800	157600
psiCHECK-empty+Bsi	67540	60990	78280
psiCHECK-empty+Scrambled siRNA	476300	370900	452000
HIF1A	2051000	2024000	2164000
HIF1A+ Bsi	1378000	1611000	1402000
HIF1A+Scrambled siRNA	3354000	3467000	3842000
AKT2	279800	348400	441900
AKT2+ Bsi	97680	102900	151700
AKT2+ Scrambled siRNA	108600	144900	210800

Firefly Luminometric1

Plate:1 - Wavelength:560nm

Blank	315.4	427.8	378.7
psiCHECK-empty	328200	364500	383900
psiCHECK-empty+Bsi	167100	154100	200900
psiCHECK-empty+Scrambled siRNA	1226000	947500	1172000
HIF1A	1843000	1765000	1767000
HIF1A+ Bsi	1128000	1442000	1251000
HIF1A+Scrambled siRNA	2915000	2911000	3314000
AKT2	521700	627400	769500
AKT2+ Bsi	224100	238400	370100
AKT2+ Scrambled siRNA	337200	426500	720500

Şekil G1.1: Şekil 6.21'deki grafiğin luminometrik ölçümlerinin ham verileri.

Ek H: Şekil 6.22'deki Grafiğin Luminometrik Ölçümlerinin Ham Verileri

Renilla Luminometric1

Plate:1 - Wavelength:480nm

Blank	167.6	192.5	191.4
psiCHECK-empty	133400	117000	132500
psiCHECK-empty+Bsi	78860	57570	61940
psiCHECK-empty+Scrambled siRNA	164700	231400	211400
HIF1A	1014000	713500	999800
HIF1A+ Bsi	850300	665400	736500
HIF1A+Scrambled siRNA	1463000	1510000	1844000
AKT2	227400	194400	200700
AKT2+ Bsi	85730	89320	100800
AKT2+ Scrambled siRNA	219100	295700	334700

Firefly Luminometric1

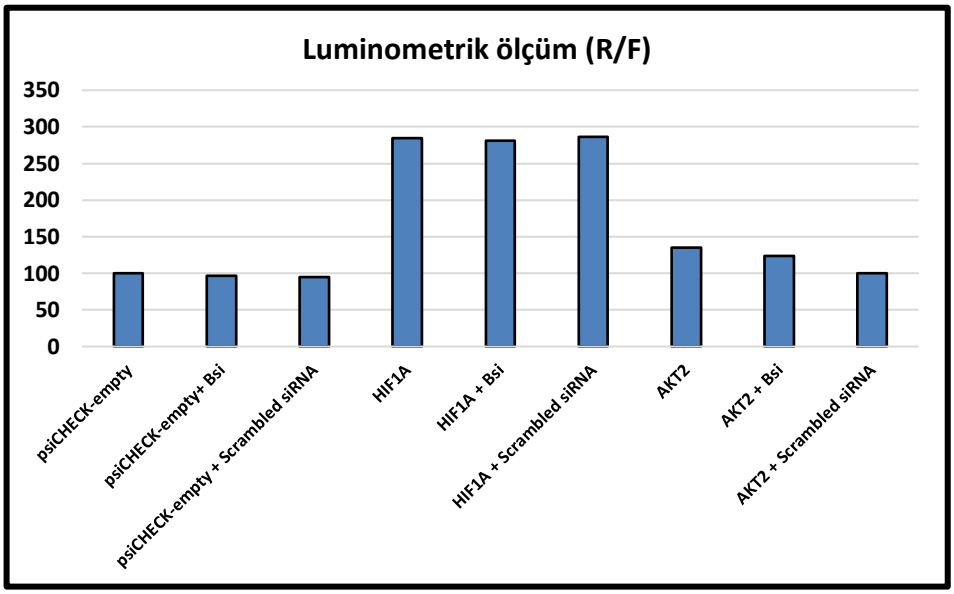
Plate:1 - Wavelength:560nm

Blank	156	173.7	150.4
psiCHECK-empty	164600	126800	155200
psiCHECK-empty+Bsi	90530	74410	76470
psiCHECK-empty+Scrambled siRNA	260100	345700	377300
HIF1A	377600	267700	393800
HIF1A+ Bsi	305000	255900	255700
HIF1A+Scrambled siRNA	576200	625800	739700
AKT2	102100	100500	102000
AKT2+Bsi	39880	41510	42450
AKT2+Scrambled siRNA	111700	138000	145400

Şekil H1.1:Şekil 6.22'deki grafiğin luminometrik ölçümlerinin ham verileri.

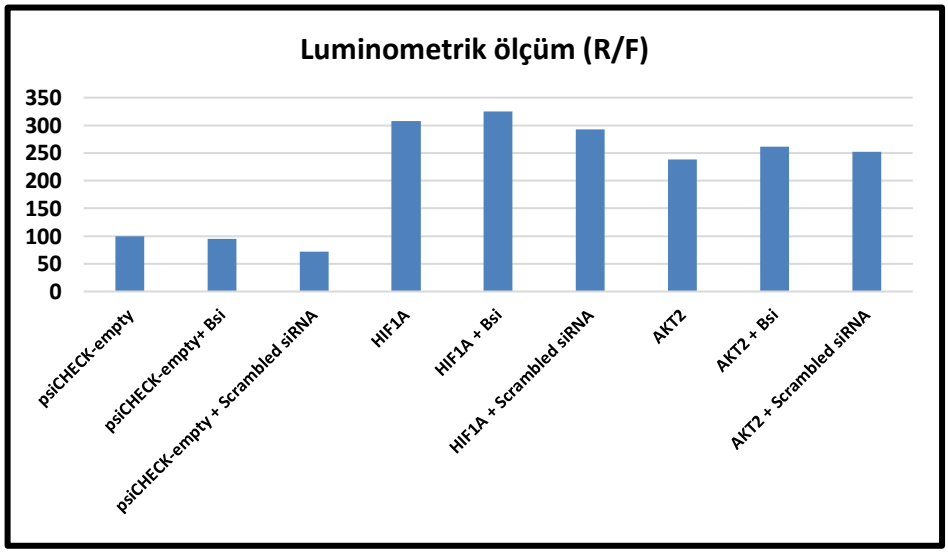
EK I: EK G ve EK H Verilen Luminometrik Ölçümlere Göre Çizilen Grafikler

Grafikteki verilerde psiCHECK-empty vektöründen sentezlenen Renilla ve Firefly ekspresyonu %100 olarak kabul edilmiştir. Bu sonuca göre HIF1A ve AKT2 ile ilgili ekspresyon yüzdeleri kıyaslanmıştır.



Şekil I1.1: EK-G'deki verilere göre çizilen grafik.

Deney tekrar edilmiştir (ŞekilI1.2).



Şekil I1.2: EK-H'daki verilere göre çizilen grafik.