

**T.C.**  
**GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**  
**LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

**COILED COIL DOMAIN CONTAINING PROTEIN 124'ÜN POST-  
TRANSLASYONEL MODİFİKASYONLARININ HÜCRESEL MOLEKÜLER  
ETKİLEŞİMLER ÜZERİNE ETKİLERİ**

**GAMZE ÇAKIRCA**

**DOKTORA TEZİ**  
**MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN: PROF. DR. UYGAR HALİS TAZEBAY**

**OCAK 2024**

**T.C.**  
**GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**  
**LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

**COILED COIL DOMAIN CONTAINING PROTEIN 124'ÜN**  
**POST-TRANSLASYONEL MODİFİKASYONLARININ HÜCRESEL**  
**MOLEKÜLER ETKİLEŞİMLER ÜZERİNE ETKİLERİ**

**GAMZE ÇAKIRCA**

**DOKTORA TEZİ**  
**MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK**  
**ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN: PROF. DR. UYGAR HALİS TAZEBAY**

**OCAK 2024**

**T.R.**  
**GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY**  
**GRADUATE SCHOOL**

**THE EFFECTS OF POST-TRANSLATIONAL MODIFICATIONS OF  
COILED COIL DOMAIN CONTAINING PROTEIN 124 ON CELLULAR  
MOLECULAR INTERACTIONS**

**GAMZE ÇAKIRCA**

**A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF  
DOCTOR OF PHILOSOPHY  
DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND  
GENETICS**

**THESIS SUPERVISOR PROF. DR. UYGAR HALİS TAZEBAY**

**JANUARY 2024**

## DOKTORA JÜRİ ONAY FORMU

GTÜ Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Yönetim Kurulunun 18/12/2023 tarih ve 2023/25 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 12/01/2024 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Gamze ÇAKIRCA'nın tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir.

### JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : Prof. Dr. Uygur Halis TAZEYAY

ÜYE

: Prof. Dr. Tamer YAĞCI

ÜYE

: Prof. Dr. Ayten KANDİLCİ

ÜYE

: Prof. Dr. Batu ERMAN

ÜYE

: Prof. Dr. Betül YILMAZ

### ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Yönetim Kurulunun  
...../...../..... tarih ve ...../..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

## ÖZET

Tüm ökaryotlarda korunmuş, ribozomla ilişkili RNA bağlayıcı protein olan Coiled-coil domain-containing 124 (Ccdc124) proteini, stresin neden olduğu translasyonel kapanmanın ardından ribozom aktivitesinin devam etmesine yardımcı olmaktadır. Translasyondan bağımsız hücresel işlevi hala bilinmemekle birlikte, Ccdc124 proteini, ribozom dışında; hücre döngüsünün interfaz evresinde sentrozom veya sitokinetik bölünme sırasında orta cisimcik gibi hücresel konumlarda da bulunur. Daha önce HEK293 (insan embriyonik böbrek) hücrelerinde yapılan LC-MS/MS tabanlı proteomik analizler sonucu birçok yeni Ccdc124 protein partnerleri keşfedilmiştir. Haritalanan etkileşim partnerlerinin bir kısmının çekirdekçik biyosentezi ve işleyişinde yer aldığı görülmüştür. Yapılan bu tez çalışmasının ilk kısmında, HEK 293T ve U2OS (osteosarkom) hücre tiplerinde kanserle bağlantılı nükleolus belirteci olan Nükleofosmin (Npm1) ve Nükleolin (Ncl) ile Ccdc124 proteini arasındaki etkileşimin aydınlatılmasına yönelik çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bu etkileşim immün boyama ve birlikte çöktürme deneyleri ile teyit edilmiştir. Çalışmanın ikinci kısmı, Ccdc124'ün fosforilasyonunun partner etkileşimi üzerine etkisinin araştırılmasını kapsamaktadır. Ccdc124 proteininin mutasyona uğratılmış translasyon sonrası modifikasyon (PTM) bölgeleri ve mutant proteinlerin Npm1 etkileşimi üzerindeki rolü analiz edilmiştir. Yapılan immün boyama çalışmalarında mutant proteinlerin, Npm1 ile etkileşiminde yabancı tipe oranla düşüş olduğu görülmüştür. Npm1, çeşitli DNA onarım yollarına aracılık ederek genomik stabilitenin korunmasında yer alan kritik bir proteindir [Scott ve Oeffinger, 2016]. Nükleolar stres algılama, DNA hasarı tepkisini içeren moleküler mekanizmalarda Ccdc124'ün davranışının aydınlatılması amacıyla, çalışmanın son kısmında, Ccdc124 proteininin bir DNA interkalatörü olan Dox (doksorubisin) uygulamasına verdiği yanıtın araştırılması ve Dox yanıtı olarak DNA hasar durumunda nükleolar lokalizasyonu değiştiği bilinen Npm1 ile etkileşim dinamiği analiz edilmiştir. Yapılan in vitro deneyler sonucunda hem yabancı tip hem de mutant Ccdc124 proteinlerinin Dox yanıtı olarak Npm1 proteini ile benzer yol izleyerek lokasyonunun çekirdekçikten çekirdek içine yayıldığına yönelik veriler elde edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Coiled-coil domain-containing 124 (Ccdc124), Doksorubisin, Çekirdekçik, PTM, Ribozom, RNA bağlayıcı protein.

## SUMMARY

Coiled-coil domain containing 124 (Ccdc124), a conserved ribosome-associated RNA-binding protein in all eukaryotes, helps maintain ribosome activity following stress-induced translational shutdown. Although its translation-independent cellular function is still unknown, the Ccdc124 protein is located not only the ribosome but also found in cellular locations such as the centrosome during the interphase of the cell cycle or the midbody during cytokinetic division. Previous LC-MS/MS-based proteome analyses carried out in HEK293 (human embryonic kidney) cells have led to the identification of a large number of novel Ccdc124 protein partners. Some of the mapped interaction partners were found to be involved in nucleolus biosynthesis and functioning. In the first part of this thesis, studies were carried out to elucidate the interaction between Nucleophosmin (Npm1), which is a cancer-associated nucleolar stress marker, and Ccdc124 protein in HEK 293T and U2OS (osteosarcoma) cell types. This interaction has been confirmed by immunostaining and co-precipitation experiments. In the second part of the study, it covers the investigation of the effect of phosphorylation of Ccdc124 on partner interaction. The role of the proteins mutated from the post-translational modification regions of the Ccdc124 on the interaction of Npm1 has been analyzed. In the immunostaining experiments, it was shown that the mutant proteins' interactions with Npm1 decreased compared to the wild-type protein. Npm1 is a critical protein involved in maintaining genomic stability by mediating various DNA repair pathways. In order to elucidate the behavior of Ccdc124 in molecular mechanisms including nucleolar stress sensing and DNA damage response, in the last part of the study, the response of Ccdc124 protein to Dox (doxorubicin) treatment, a DNA intercalator, and its interaction dynamics with Npm1, which is known to change its nucleolar localization as Dox response, were analyzed. Based on the results of the in vitro experiments, it was demonstrated that the wild-type and mutant forms of the Ccdc124 protein translocate from the nucleolus to the nucleus with a similar path as the Npm1 protein in response to Dox.

**Key Words: Coiled-coil domain containing 124 (Ccdc124), Doxorubicin, Nucleolus, PTM, Ribosome, RNA binding protein.**

## TEŞEKKÜR

Başta, akademik yolumun doktora basamağında bana elini uzatan, tecrübe ve bilgisini aktararak bu çalışmanın oluşmasını sağlayan sevgili danışmanım Prof. Dr. Uygur Halis TAZEYAY'a teşekkürü borç bilirim.

Laboratuvardaki deneysel çalışmalarımın başında tüm akademik bilgi ve birikimini benimle paylaşan Dr. Merve TUZLAKOĞLU ÖZTÜRK, Dr. Ömer GÜLLÜLÜ ve ekip arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Her türlü desteğini hissettiğim başta Prof. Dr. Tamer YAĞCI, Prof. Dr. Ayten KANDİLCİ ve Prof. Dr. Nuri ÖZTÜRK olmak üzere Dr. Türkan GÜZEL, Dr. Emrah ÖZÇELİK, Dr. Z. Onur ÇALIŞKANER ve Dr. Hüseyin BALCI, Dr. İrem YALIM CAMCI, Arzu AYSAN, Maide ŞEKER, Nurşah ERSEZEN'e, ayrıca geçmişten günümüze isimlerini saymadığım tüm laboratuvar ekiplerine teşekkür ederim.

Akademisyenlik yolunda hiçbir zaman eksikliğini hissettirmeyen, yardıma ihtiyacım olduğunda hazır olduğunu bildiğim sevgili Mehmet Soner TÜRKÜNER'e ve tüm moleküler biyoloji ve genetik bölümü akademik üyelerine, idari personellerine teşekkür ederim.

Mesleki öğretileri ile kalmayıp hayat tecrübelerinden de faydalandığım kıymetli hocam Dr. Müge SERHATLI'ya ve TÜBİTAK çalışma hayatım boyunca bir parçası olmaktan gurur duyduğum ekip arkadaşlarım olan Dr. Şenay KÖM, Sümeyye ONAT ve Sude Nur ARSLAN'a teşekkür ederim.

Ayrıca, her daim yanımda olan, dostluklarına çok kıymet verdiğim sevgili arkadaşlarım İlkay SEVGİN KÜÇÜK'e ve GTÜ-MAR Veteriner Sağlık Teknikeri Leyla DİKMEDAS'a teşekkür ederim.

Altyapısı ve tüm cihaz teknik donanımını kullanmamda kolaylık sağlayan Gebze Teknik Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim dalı Başkanlığı'na ve GTÜ Merkez Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi (GTÜ-MAR) Müdürlüğü'ne teşekkür ederim.

Ve hayatım boyunca attığım her adımda desteklerini hissettiğim, varlıklarıyla bana güç veren, hayattaki en değerlilerim aileme teşekkür ederim.

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa

|                                                           |      |
|-----------------------------------------------------------|------|
| ÖZET                                                      | v    |
| SUMMARY                                                   | vi   |
| TEŞEKKÜR                                                  | vii  |
| İÇİNDEKİLER                                               | viii |
| SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ                            | x    |
| ŞEKİLLER DİZİNİ                                           | xii  |
| TABLolar DİZİNİ                                           | xiii |
| <br>                                                      |      |
| 1. GİRİŞ                                                  | 1    |
| 2. MEMBRANSIZ ORGANELLER                                  | 3    |
| 2.1. Sentrozom                                            | 4    |
| 2.2. Kaja Cismiler                                        | 5    |
| 2.3. P Cismiler                                           | 6    |
| 2.4. Stres Granülleri                                     | 6    |
| 2.5. Çekirdekçik                                          | 7    |
| 2.5.1. Ribozom Biyogenezi                                 | 9    |
| 2.5.2. Ribozom Hibernasyonu                               | 11   |
| 2.5.3. Çekirdekçik ve Hastalıklardaki Rolü                | 12   |
| 3. TRANSLASYON VE SONRASI DÜZENLEMELER                    | 13   |
| 4. RNA-BAĞLAYICI PROTEİNLER                               | 15   |
| 4.1. RNA-bağlayıcı Proteinlerin Yapıları                  | 15   |
| 4.2. RNA-bağlayıcı Proteinlerde IDR bölgeleri             | 16   |
| 4.3. RNA-bağlayıcı Proteinlerin Hastalıklarla İlişkisi    | 17   |
| 5. NÜKLEOFOSMİN (NPM1)                                    | 19   |
| 5.1. Npm1 Yapısı                                          | 19   |
| 5.2. Npm1'in Ribozom Sentezindeki Rolü                    | 20   |
| 5.3. Npm1'in Stres Durumunda Hücredeki Rolü               | 20   |
| 5.4. Npm1'in Genomik Stabilitate ve DNA Onarımındaki Rolü | 21   |
| 5.5. Npm1'in Hastalıklardaki Rolü                         | 22   |
| 6. DOKSORUBİSİN VE KANSER TEDAVİSİNDEKİ ROLÜ              | 24   |
| 7. COİLED-COİL DOMAIN-CONTAINİNG 124 (CCDC124) PROTEİNİ   | 26   |
| 8. TEZİN AMACI, KATKISI VE İÇERİĞİ                        | 28   |
| 9. MATERYAL                                               | 29   |
| 9.1. Hücre Hattı Seçimi                                   | 29   |
| 9.1.1. HEK 293T Hücreleri                                 | 29   |
| 9.1.2. U2OS Hücreleri                                     | 29   |
| 9.1.3. HCT116 Hücreleri                                   | 30   |
| 9.2. Hücre Kültürü Solüsyonları                           | 30   |
| 9.3. İmmunoblot Solüsyonları                              | 30   |
| 9.4. İmmün boyama Solüsyonları                            | 32   |
| 9.5. Birlikte Çöktürme (CO-IP) Solüsyonları               | 32   |
| 9.6. Bakteriyel Suşlar                                    | 33   |
| 9.7. Mikrobiyoloji Solüsyonları                           | 33   |
| 9.8. Diğer Tampon ve Solüsyonlar                          | 33   |
| 9.9. Kimyasal Malzemeler                                  | 34   |

|         |                                                                                                         |    |
|---------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 9.10.   | Kullanılan Cihazlar                                                                                     | 35 |
| 9.11.   | Kullanılan Antikorlar                                                                                   | 36 |
| 9.12.   | Kullanılan Vektörler                                                                                    | 37 |
| 10.     | METOT                                                                                                   | 39 |
| 10.1.   | LC-MS/MS Proteomik Analizler                                                                            | 39 |
| 10.2.   | Hücre Kültürü                                                                                           | 39 |
| 10.2.1. | Hücre Kültürü Ortamı                                                                                    | 39 |
| 10.2.2. | Hücrelerin Kültürlenmesi ve Saklanması                                                                  | 39 |
| 10.2.3. | Stok Hücrelerin Açılması                                                                                | 40 |
| 10.2.4. | Hücrelerin Sayımı ve Canlılık Tespiti                                                                   | 40 |
| 10.3.   | Transfeksiyon                                                                                           | 40 |
| 10.3.1. | PEI Reaktifi ile Transfeksiyon                                                                          | 40 |
| 10.3.2. | JetPRIME Reaktifi ile Transfeksiyon                                                                     | 41 |
| 10.4.   | Doksorubisin Uygulaması                                                                                 | 42 |
| 10.4.1. | İmmün Boyama Deneyi                                                                                     | 42 |
| 10.5.   | İmmunoblot Deneyi                                                                                       | 43 |
| 10.6.   | Birlikte Çöktürme (CO-IP) Deneyi                                                                        | 43 |
| 10.7.   | Protein Konsantrasyon Tayini                                                                            | 44 |
| 10.8.   | Bakteri Kültürü                                                                                         | 44 |
| 10.9.1. | Ultra Kompetan Hücre Hazırlanışı                                                                        | 44 |
| 10.9.2. | Bakterilerin Saklanması                                                                                 | 45 |
| 10.9.3. | Transformasyon                                                                                          | 45 |
| 10.9.   | Plazmit DNA İzolasyonu                                                                                  | 45 |
| 10.10.  | Plazmit DNA Konsantrasyon Tayini                                                                        | 45 |
| 11.     | SONUÇLAR                                                                                                | 46 |
| 11.1.   | Proteomik Analiz Sonuçları                                                                              | 46 |
| 11.2.   | Ccdc124-Ncl Etkileşimi                                                                                  | 47 |
| 11.2.1. | Co-IP Sonuçları                                                                                         | 47 |
| 11.3.   | Ccdc124-Npm1 Etkileşimi                                                                                 | 48 |
| 11.3.1. | Ccdc124-HA ile Npm1 Co-IP Sonuçları                                                                     | 48 |
| 11.3.2. | Endojen Ccdc124 ile Npm1 İmmün Boyama Sonuçları                                                         | 49 |
| 11.3.3. | Ccdc124-HA ile Npm1 İmmün Boyama Sonuçları                                                              | 51 |
| 11.3.4. | Ccdc124-GFP ile Npm1 İmmün Boyama Sonuçları                                                             | 52 |
| 11.4.   | DNA Hasarı Varlığında Ccdc124'ün Lokalizasyon Dinamiği                                                  | 53 |
| 11.4.1. | Hücrelerde DNA Hasar Oluşumu Kontrolü                                                                   | 53 |
| 11.4.2. | DNA Hasar Durumunda Ccdc124'ün Lokalizasyonu                                                            | 54 |
| 11.5.   | Ccdc124-WT, S122A, S141A, S122A/S141A (DM-A) Proteinlerin Lokalizasyon Tayini ve Npm1 ile Etkileşimleri | 56 |
| 11.5.1. | Hücre İçi Ekspresyon Kontrolü                                                                           | 56 |
| 11.5.2. | Co-IP Sonuçları                                                                                         | 57 |
| 11.5.3. | Hücre içi Lokalizasyon Sonuçları                                                                        | 59 |
| 11.6.   | DNA Hasarı Varlığında Ccdc124-WT, S122A, S141A, S122A/S141A (DM-A) Proteinlerin Lokalizasyon Tayini     | 60 |
| 12.     | YORUMLAR                                                                                                | 63 |
|         | KAYNAKLAR                                                                                               | 66 |
|         | ÖZGEÇMİŞ                                                                                                | 72 |
|         | TEZ ÇALIŞMASI KAPSAMINDA YAPILAN YAYINLAR                                                               | 73 |

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

|                   |                                                              |
|-------------------|--------------------------------------------------------------|
| µg                | : Mikrogram                                                  |
| µL                | : Mikrolitre                                                 |
| µM                | : Mikromolar                                                 |
| mL                | : Mililitre                                                  |
| mM                | : Milimolar                                                  |
| γ-H2AX            | : Gamma Histon 2 proteini                                    |
| °C                | : Derece Celcius                                             |
| g                 | : Gram                                                       |
| kDa               | : Kilodalton                                                 |
| L                 | : Litre                                                      |
| Rpm               | : Rotorun dakikadaki dönme hızı                              |
| ALCL              | : Anaplastik büyük hücreli lenfoma                           |
| ALS               | : Amyotrofik lateral skleroz                                 |
| AML               | : Akut Miyeloid Lösemi                                       |
| APE1              | : Apuridik / apirimidinik (AP) endonükleaz                   |
| APS               | : Amonyum persülfat                                          |
| Arf7              | : Oksin yanıtı faktörü                                       |
| ATM               | : ATM serin / treonin kinaz                                  |
| ATR               | : Serin / treonin kinaz ATR                                  |
| BER               | : Baz eksizyon tamiri                                        |
| BRCA1             | : Meme kanseri tip 1 duyarlılık proteini                     |
| BSA               | : Bovine Serum Albumin                                       |
| Ccdc124           | : Coiled-coil domain containing 124                          |
| CDK2              | : Siklin bağımlı kinaz 2                                     |
| CO-IP             | : Birlikte Çöktürme                                          |
| CO <sub>2</sub>   | : Karbon Dioksit                                             |
| DDT               | : DNA hasar toleransı                                        |
| DFC               | : Yoğun fibrillar merkez                                     |
| dH <sub>2</sub> O | : Distile Su                                                 |
| DMEM              | : Dulbecco's Modified Eagle Medium                           |
| DMSO              | : Dimetil Sülfoksit                                          |
| Dox               | : Doksorubisin                                               |
| eIF3              | : Ökaryotik başlatma faktörü 3                               |
| FBS               | : Fetal Bovine Serum                                         |
| FC                | : Fibrillar merkez                                           |
| Flag              | : DYKDDDDK sekansa sahip peptit                              |
| FUS               | : Fused in Sarcoma proteini                                  |
| GC                | : Granüler merkez                                            |
| GFP               | : Yeşil Floresan Protein                                     |
| Gstm1             | : Glutasyon S-transferaz mu 1                                |
| GTÜ               | : Gebze Teknik Üniversitesi                                  |
| HA                | : Human influenza hemagglutinin                              |
| HEK 293T          | : İnsan embriyonik böbrek hücre hattı 293T                   |
| HPF               | : Ribozom modülasyon faktörü hazırda bekletme teşvik faktörü |
| IDR               | : Özünde düzensiz bölgeler                                   |

|        |                                                                              |
|--------|------------------------------------------------------------------------------|
| IDP    | : Özünde düzensiz protein                                                    |
| IF     | : İmmün boyama                                                               |
| KH     | : K Homoloji                                                                 |
| LLPS   | : Sıvı-Sıvı Faz Ayrımı                                                       |
| MBG    | : Moleküler Biyoloji ve Genetik                                              |
| MDM2   | : E3 ubiquitin-protein ligaz                                                 |
| MDS    | : Miyelodisplastik sendromlar                                                |
| mRNA   | : Mesajcı Ribonükleik Asit                                                   |
| mTOR   | : Rapamisin'in memeli hedefi proteini                                        |
| MYC    | : Pro-proliferatif genin ekspresyonunu aktive eden transkripsiyon faktörleri |
| NES    | : Nükleer export sinyalleri                                                  |
| NPM1   | : Nükleofosmin 1 proteini                                                    |
| NCL    | : Nükleolin proteini                                                         |
| NIS    | : Sodyum/iyodür simportu                                                     |
| NLS    | : Nükleer lokalizasyon sinyali                                               |
| NoLs   | : Çekirdekçik lokalizasyon sinyali                                           |
| NOR    | : Çekirdekçik düzenleme bölgesi                                              |
| PAD    | : Peptidil arjinin deiminaz proteini                                         |
| PCM    | : Perisentriyol materyal                                                     |
| PBS    | : Tuzlu fosfat tamponu                                                       |
| PLK1   | : Polo benzeri kinaz-1                                                       |
| PNC    | : Perinükleolar merkez                                                       |
| pTEN   | : Fosfataz ve tensin homologu                                                |
| PTM    | : Translasyon sonrası modifikasyonlar                                        |
| P53    | : Tümör protein 53                                                           |
| RaiA   | : Ribozomla ilişkili inhibitör A                                             |
| RAS    | : G-Proteini türünde bir proto-onkogen                                       |
| RBM38  | : RNA bağlanma motifi 38 proteini                                            |
| RBF    | : Küçük ribozomal bağlanma faktörleri                                        |
| RBP    | : RNA bağlayıcı protein                                                      |
| rDNA   | : Ribozomal DNA                                                              |
| RGG    | : Arjinin-Glisin-Glisin motifi                                               |
| RMF    | : Ribozom modülasyon faktörü                                                 |
| RNP    | : Ribonükleoprotein                                                          |
| RpL5   | : Ribozomal protein L5                                                       |
| RRM    | : RNA tanıma bölgeleri                                                       |
| rRNA   | : Ribozomal RNA                                                              |
| SERBP1 | : SERPİNE1 mRNA bağlayıcı 1                                                  |
| SGs    | : Stres Granül                                                               |
| SnRNP  | : Küçük nükleer ribonükleoprotein                                            |
| SnoRNP | : Küçük nükleolar ribonükleoprotein                                          |
| Stm1   | : Yedi transmembran proteini 1                                               |
| TBS    | : Tris Tamponlu Salın                                                        |
| TEMED  | : Tetrametiletilediamin                                                      |
| WB     | : İmmünoblot                                                                 |
| ZnF    | : Çinko parmak motifi                                                        |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|                                                                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 2.1:</b> Ökaryotik hücrelerde membransız organeller.                                               | 4  |
| <b>Şekil 2.2:</b> Sentrozom yapısı.                                                                         | 5  |
| <b>Şekil 2.3:</b> Ökaryotik hücrede çekirdekçik yapısı [Shaw, 2010].                                        | 8  |
| <b>Şekil 2.4:</b> Ribozom biyogenezinin şematik gösterimi.                                                  | 10 |
| <b>Şekil 5.1:</b> Npm1 protein yapı ve bölgeleri.                                                           | 19 |
| <b>Şekil 5.2:</b> Npm1'in çeşitli DNA hasar yanıtındaki işlevleri.                                          | 22 |
| <b>Şekil 6.1:</b> Doksorubisin etki mekanizması özeti.                                                      | 24 |
| <b>Şekil 6.2:</b> Doksorubisin-DNA interkalasyonu.                                                          | 25 |
| <b>Şekil 11.1:</b> Ccdc124 etkileşim partnerleri ağı (STRING Database).                                     | 46 |
| <b>Şekil 11.2:</b> Ccdc124-HA ile Ncl etkileşimin immüno blot görüntüsü.                                    | 47 |
| <b>Şekil 11.3:</b> Ccdc124-HA ile Npm1 etkileşimin immüno blot görüntüsü.                                   | 48 |
| <b>Şekil 11.4:</b> U2OS hücrelerinde Ccdc124-Npm1 immün boyama görüntüsü.                                   | 49 |
| <b>Şekil 11.5:</b> 293T hücrelerinde Ccdc124-Npm1 immün boyama görüntüsü.                                   | 50 |
| <b>Şekil 11.6:</b> Hct116 hücrelerinde Ccdc124-Npm1 immün boyama görüntüsü.                                 | 50 |
| <b>Şekil 11.7:</b> Ccdc124-HA ile Npm1 etkileşimi immün boyama görüntüsü.                                   | 51 |
| <b>Şekil 11.8:</b> Stabil Ccdc124-GFP ile Npm1 etkileşimi immün boyama görüntüsü.                           | 52 |
| <b>Şekil 11.9:</b> U2OS hücrelerinde Dox uygulaması immün boyama kontrol görüntüsü                          | 54 |
| <b>Şekil 11.10:</b> U2OS hücrelerinde Dox varlığı/yokluğunda Ccdc124 ve Npm1<br>immün boyama görüntüleri-1. | 55 |
| <b>Şekil 11.11:</b> U2OS hücrelerinde Dox varlığı/yokluğunda Ccdc124 ve Npm1<br>immün boyama görüntüleri-2. | 55 |
| <b>Şekil 11.12:</b> Mutant proteinlerin Western Blot görüntüsü.                                             | 57 |
| <b>Şekil 11.13:</b> Mutant proteinlerin Npm1 ile etkileşiminin immüno blot görüntüsü.                       | 58 |
| <b>Şekil 11.14:</b> Co-IP deney kontrollerinin immüno blot görüntüsü.                                       | 58 |
| <b>Şekil 11.15:</b> GFP etiketli mutant proteinler ile Npm1 etkileşimi immün boyama<br>görüntüleri.         | 59 |
| <b>Şekil 11.16:</b> Dox varlığı/yokluğu durumunda Ccdc124-GFP lokalizasyonu<br>immün boyama görüntüleri.    | 60 |
| <b>Şekil 11.17:</b> Dox varlığı/yokluğu durumunda S122A-GFP lokalizasyonu<br>immün boyama görüntüleri.      | 61 |
| <b>Şekil 11.18:</b> Dox varlığı/yokluğu durumunda S141A-GFP lokalizasyonu<br>immün boyama görüntüleri.      | 61 |
| <b>Şekil 11.19:</b> Dox varlığı/yokluğu durumunda S-DM-A-GFP lokalizasyonu<br>immün boyama görüntüleri.     | 62 |
| <b>Şekil 11.20:</b> U2OS hücrelerinde % Npm1/Ccdc124 etkileşim grafiği.                                     | 62 |

## TABLÖLER DİZİNİ

|                                                                 |    |
|-----------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tablo 9.1:</b> Yürütme jeli için gerekli malzeme ve oranlar. | 31 |
| <b>Tablo 9.2:</b> Ayırma jeli için gerekli malzeme ve oranlar.  | 31 |
| <b>Tablo 9.3:</b> Kullanılan kimyasal malzemeler.               | 34 |
| <b>Tablo 9.3:</b> Kullanılan kimyasal malzemeler devam.         | 35 |
| <b>Tablo 9.4:</b> Kullanılan cihazlar.                          | 35 |
| <b>Tablo 9.4:</b> Kullanılan cihazlar devam.                    | 36 |
| <b>Tablo 9.5:</b> Kullanılan antikorlar.                        | 36 |
| <b>Tablo 9.5:</b> Kullanılan antikorlar devam.                  | 37 |
| <b>Tablo 9.6:</b> Kullanılan vektörler.                         | 37 |
| <b>Tablo 9.6:</b> Kullanılan vektörler devam.                   | 38 |
| <b>Tablo 10.1:</b> PEI transfeksiyon miktarları.                | 41 |
| <b>Tablo 10.2:</b> JetPRIME transfeksiyon miktarları.           | 41 |

# 1. GİRİŞ

Ökaryotik hücreler, hücresel ortamlarını düzenlemek adına çok sayıda biyokimyasal işlem gerçekleştirir. Bu işlem, hücre içi bileşenlerin, zara bağlı veya zarsız olabilen organeller halinde bölümlendirilmesiyle sağlanır. Sentrozom, Cajal cisimler, P cisimleri ve çekirdekçik dahil olmak üzere çok sayıda zarsız organel, hücre içinde sıvı damlacıkları olarak bulunur. Sıvı-sıvı faz ayrımı (LLPS) adı verilen bu özellik, hücre malzemenin yoğunlaşmasından kaynaklanır. Bu organizasyon aynı zamanda hücrenin stres sırasında zindeliğini geliştirir [Gomes and Shorter, 2019; Koppers et al., 2020]. Zarsız organeller arasında önemli bir yere sahip olan çekirdekçik; esas olarak ribozom biyosentezinde rol oynayan çekirdek altı cisimdir. Artan çekirdekçik sayısı ve / veya boyutu tarihsel olarak patolojiler tarafından kanserli lezyonların prognostik bir göstergesi olarak kullanılmıştır. Bu artış, kanser hücrelerinde artan protein sentezi ihtiyacına atfedilmiştir. Bunlara ek olarak çekirdekçik; hücre fonksiyonların düzenlenmesi, özellikle hücre stresine yanıt, genom stabilitesinin korunması, DNA hasar onarımının ve ribonükleoproteinlerin (RNPs) gen ekspresyonunda önemli rol oynamaktadır [Correll et al., 2019].

Ccdc124, strese bağlı translasyon kapanmasından sonra ribozom aktivitesinin sürdürülmesinde rol oynayan, ribozomla ilişkili korunmuş bir RNA bağlayıcı proteindir. Geç-anafaz evresine kadar sentrozomda bulunan protein, sitokinez aşamasında orta cisimciğe göç etmektedir [Telkoparan vd., 2013]. Yapılan LC-MS/MS tabanlı proteomik analizlerle yeni Ccdc124 protein partnerleri keşfedilmiş ve haritalanan partnerlerden bir kısmının çekirdekçik içi ribozom biyogenezi ve işleyişinde yer aldığı görülmüştür.

Gerçekleştirdiğimiz bu tez çalışmasının ilk kısmında, kanserle bağlantılı çekirdekçik belirteci olan Npm1 ile yabancı-tip Ccdc124 proteini arasındaki etkileşimin aydınlatılmasına yönelik çalışmalar HEK 293T, U2OS ve HCT116 hücre tiplerinde gerçekleştirilmiştir. Bu etkileşim immün boyama ve birlikte çöktürme deneyleri ile teyit edilmiştir.

Çalışmamızın ikinci kısmı, Ccdc124'ün fosforilasyonunun partner etkileşimi üzerine etkisinin araştırılmasını kapsamaktadır. Proteinin, translasyon sonrası modifikasyonları içinden fosforlanma bölgeleri (122, 141 ve 122/141. Serin

bölgeleri) mutasyona uğratılmış ve mutant proteinlerinin, Npm1 ile etkileşimindeki rolü analiz edilmiştir. Mutant proteinleri içeren vektörlerin HEK 293T hücrelerine transfeksiyonu yapılmış ve Npm1 proteini ile birlikte çöktürme tekniği uygulanarak etkileşimlerinin gözlenmesi amaçlanmıştır. Bunun yanı sıra, bu mutant proteinleri stabil olarak sentezleyen U2OS hücre hattında Npm1 antikoru kullanılarak immün boyama tekniği uygulanarak etkileşim profilleri analiz edilmiştir.

Çalışmamızın son kısmı ise, yabancı-tip ve mutant Ccdc124 proteinlerinin bir DNA interkalatörü olan Dox uygulamasına verdiği yanıtın araştırılması ve Dox yanıtı olarak DNA hasarı durumunda çekirdekçik lokalizasyonu değiştiği bilinen Npm1 ile etkileşim dinamiği immün boyama tekniği ile analiz edilmiştir.



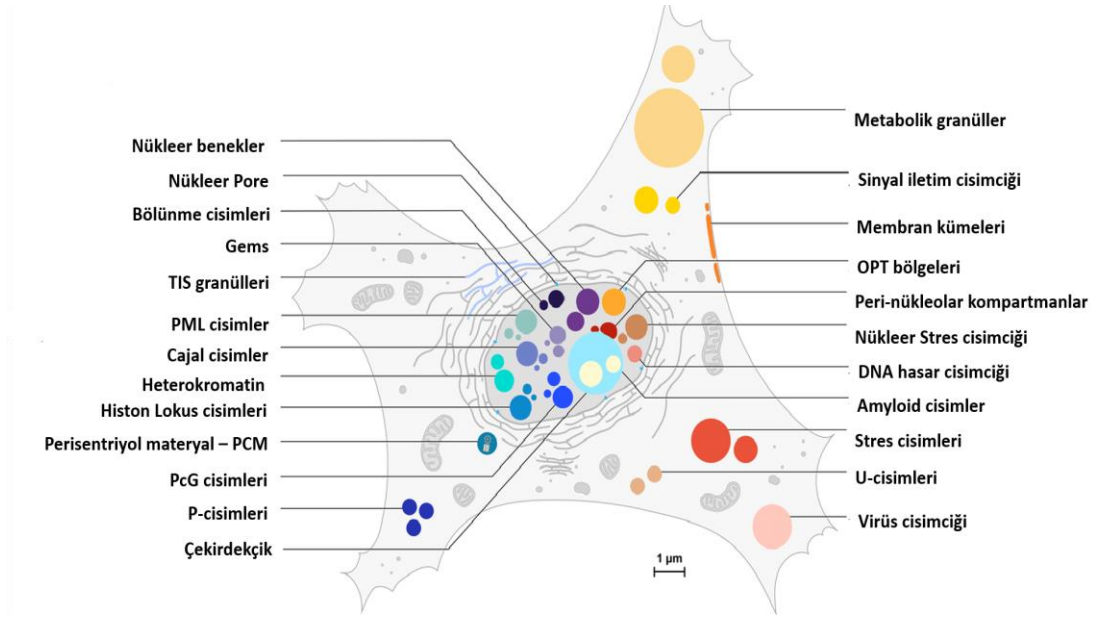
## 2. MEMBRANSIZ ORGANELLER

Alexander Oparin, Sovyet biyokimyacı, yaptığı gözlemlerden yola çıkarak yaşamın, organik maddelerin damlacıklar halinde diğer seyreltik çözeltilerden kendiliğinden birleşerek ortaya çıktığını öne sürmüştür [Oparin, 1938]. Bu teori, hücrelerin kullandıkları membranları ve membrana bağlı organelleri açıklayamadığı için o dönem geçerliliğini kaybetse de aslında günümüzde yapılan çalışmalar gösteriyor ki; hücreler membrana bağlı organellerinin yanı sıra bazı bileşenlerini membransız organeller halinde de düzenlemektedirler. Bu membransız organeller, belirli protein ve RNA'ların belli bir bölgede oluşturduğu yoğunluk sebebiyle etrafındaki ortama karışmadan sıvı-sıvı faz (LLPS) ayrımı adı verilen bir işlemle oluşmaktadır. Organellerin bu faz ayrımı özellikleri iki türlü etkileşim ile sağlanmaktadır; yağ veya su moleküllerin kendi aralarındaki homotipik etkileşimleri bunlardan biri; diğeri ise su ve yağ moleküllerinin birbiri arasındaki heterotipik etkileşimleridir. Böylelikle içlerinde biyokimyasal reaksiyonları aktive veya inhibe eden mekanizmalar gelişmektedir.

Membransız organellerin tümü sıvı özellik göstermemekle birlikte içeriğindeki protein-RNA konsantrasyonuna ve etkileşim güçlerine bağlı olarak daha sıvıdan daha jel benzeri yapılara kadar geniş bir skalada bulunabilmektedirler. Membransız organellerin bu skaladaki esnekliği; bünyelerindeki RNA bağlayan proteinler (RBPs)'in sinerjik olarak birlikte çalışan RNA tanıma bölgeleri (RRM) ve özünde düzensiz bölgeleri (IDR) gibi çoklu multivalent (çok değerlilik) özellikleri içermesine dayanmaktadır [Gomes and Shorter, 2019].

Li ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda tekrarlı SRC Homoloji 3 (SH3) bölgesi içeren motif ile prolin bakımından zengin motif (PRM) içeren ligandın birleştirilmesi sonucu proteinlerin sıvı damlacıklar oluşturduğunu göstermiştir [Li et al., 2012].

Membransız birçok organel; protein, nükleik asit veya her ikisinin birleşerek yoğun bir ortam oluşturmasıyla meydana gelmektedir. Bu organeller hücre içinde çekirdekte bulunabildiği gibi sitoplazmada da bulunabilmektedir (Web 1, 2023). Çekirdek içerisindeki organellere; çekirdekçik (nükleolus), Cajal cisimleri, nükleer benekler, promiyelositik lösemi (PML) cisimleri sayılabilirken; sitoplazma içerisindeki membransız organellere P cisimleri, stres granülleri ve sentrozom (perisentriyol materyal) sayılabilmektedir (Şekil 2.1).

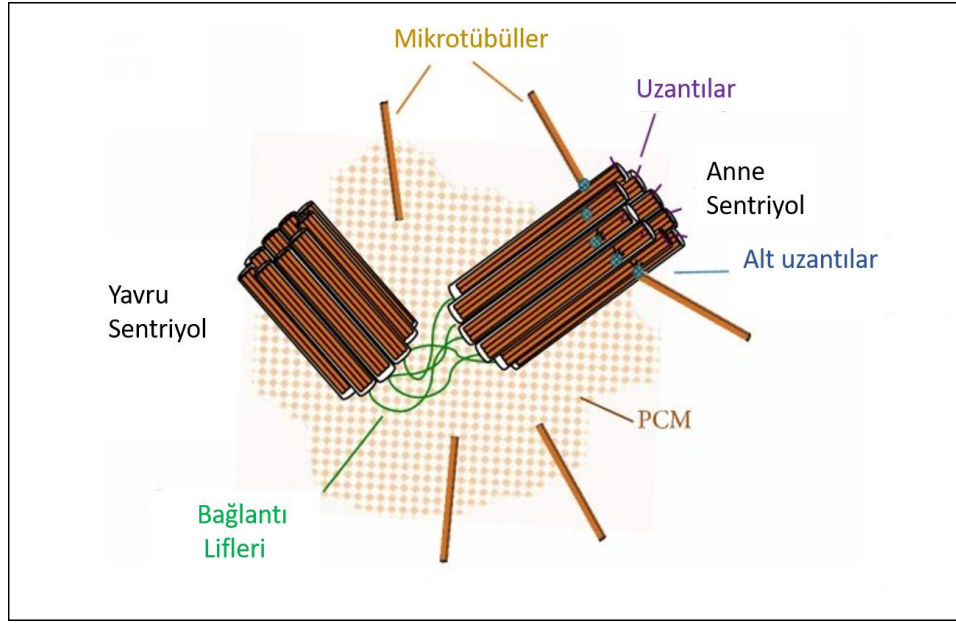


**Şekil 2.1:** Ökaryotik hücrelerde membransız organeller.

Tüm bu membransız organeller; hücre bölünmesi, ribozom biyogenezi, sinyal iletimi, stres cevabı, RNA metabolizmasının düzenlenmesi gibi hücrenin farklı süreçlerinde rol oynamaktadır [Koppers et al., 2020; Gomes and Shorter, 2019].

## 2.1. Sentrozom

Membransız organellerden biri olan sentrozom, kendini kopyalayabilme özelliğine sahip ana mikrotübül düzenleme merkezi (MTOC)'dir. Hayvan hücrelerinde bulunan bu organellerin, hücre döngüsü süreci, hücre içi sinyalleme ve bölünme sürecinde mitotik ağı düzenlenme gibi çeşitli kritik görevleri bulunmaktadır [Blanco-Ameijeiras et al., 2022]. Sentrozomlar, iki adet dokuz katlı radyal simetrik yapılar olan sentriyollerin etrafının protein kütlesi (perisentriyol materyal – PCM) ile çevrilmesinden oluşmaktadır (Şekil 2.2) [Barbelanne and Tsang, 2014]. Hücreler mitoz bölünmeye hazırlanırken sentrozom olgunlaşması denilen süreç başlar ve bu süreçte PCM miktarında hızlı bir artış olur. Mikrotübüllerin çekirdeklenmesi ve düzenlenmesinin yanı sıra hücre döngüsü düzenlenmesi ve hücre sinyali gibi süreçlerde yer alan yaklaşık birkaç yüz protein bu artışın sebebi olmaktadır [Raff, 2019].



**Şekil 2.2:** Sentrozom yapısı.

Sentrozomlar, hücre bölünmenin S fazındayken iki katına çıkmaktadır ve profaz fazındayken çekirdeğin membranına bağlı durumdan zıt kutuplara göç etmektedirler. Kromozomlara iğ iplikçikleri ile tutunarak bölünme ile birlikte iki yavru hücrede de birer sentrozom oluşturmaktadırlar [Ribeiro et al., 2002]. Bunun dışında kalan anomaliler (yavruardan birinde iki sentrozom veya hiç sentrozom içermemesi) bir çok çalışmada kanserle ilişkilendirilmiştir. Hücrenin bölünmeyi doğru olarak gerçekleştirmesinden sorumlu membransız organel olan sentrozomlar, bölünmenin etkinliğini büyük oranda artırıp/azaltma yetisine sahiptirler [Lancaster and Baum, 2014].

## 2.2. Kajal Cisimler

İlk olarak nöronlarda çekirdek içinde aksesuar olarak tanımlanan Kajal cisimler, oldukça küçük ve sarmal iplik içeren bir protein olan Coilin proteini ile özdeşleştirilmiş nükleoplazmik yapılardır. Günümüzde Kajal cisimler (CBs), en iyi karakterize edilen organellerden biridir. Bu cisimler içlerinde, ribonükleoproteinleri (RNP'ler), özellikle spliceozomal küçük nükleer RNP'leri (SnRNP'ler) ve küçük nükleolar RNP'leri (SnoRNP'ler) konsantre ederler. SnoRNP'lerin çoğu küçük nükleer RNA'ların (SnRNA'lar) yönlendirilmiş modifikasyonlarında görev almaktadır. Ayrıca bünyelerinde bulunan U7 SnRNP'lerin histon mRNA'ların 3'

ucunun işleme sebebiyle Kaja cisimler replikasyona bağı mRNA düzenlenmesinde de rol oynamaktadırlar [Morris, 2008; Meier, 2017].

### 2.3. P Cisimleri

Ökaryot hücrelerde korunmuş, 5'-3' mRNA bozunmasında rol oynayan proteinler ile mRNA'ların oluşturduğu kompleksleri içeren sitoplazmik ribonükleoprotein (RNP) granülleri olarak bilinen P cisimleri, sıvı-sıvı faz ayrımı özelliği gösteren membransız organellerdendir [Luo et al., 2018]. P cisimlerinin oluşumunu ve dağılımını çeşitli faktörler etkilese de bunların başında mRNA'lar gelmektedir. Translasyonun durması ile ribozomdan ayrılan mRNA'lar P cisimlerinin iskeletini oluşturmaktadır. Translasyonel baskılama ile ekspresyonu azalan mRNA fragmentleri P cisimlerinin sayısını ve boyutunu azaltırken, aşırı ekspresyonları ise P cisimlerinin sayısını ve boyutunu artırmaktadır. P cisimlerinin işlevleri arasında; mRNA ve non-sense mRNA depolaması ve bozulması, translasyonel baskılama ve mikroRNA (miRNA) / small interference RNA (siRNA) aracılı geçici gen susturulması sayılabilmektedir. Ayrıca hücrede viral bir enfeksiyon oluştuğunda virüs kaynaklı proteinlerin sentezini önlemek için viral mRNP'lerin mRNA üzerine kapanmalarını koordine etmektedir [Jeon et al., 2022]. Stres granüllerinden farklı olarak hücre içinde sürekli olarak bulunmakta ve hücrel stres durumlarında (sodyum arsenit veya soğuk şok) sayıları daha da artmaktadır. Ayrıca 5'-3' mRNA bozunması genellikle P cisimlerinin oluşumunu desteklemektedir [Sheth and Parker, 2003].

### 2.4. Stres Granülleri

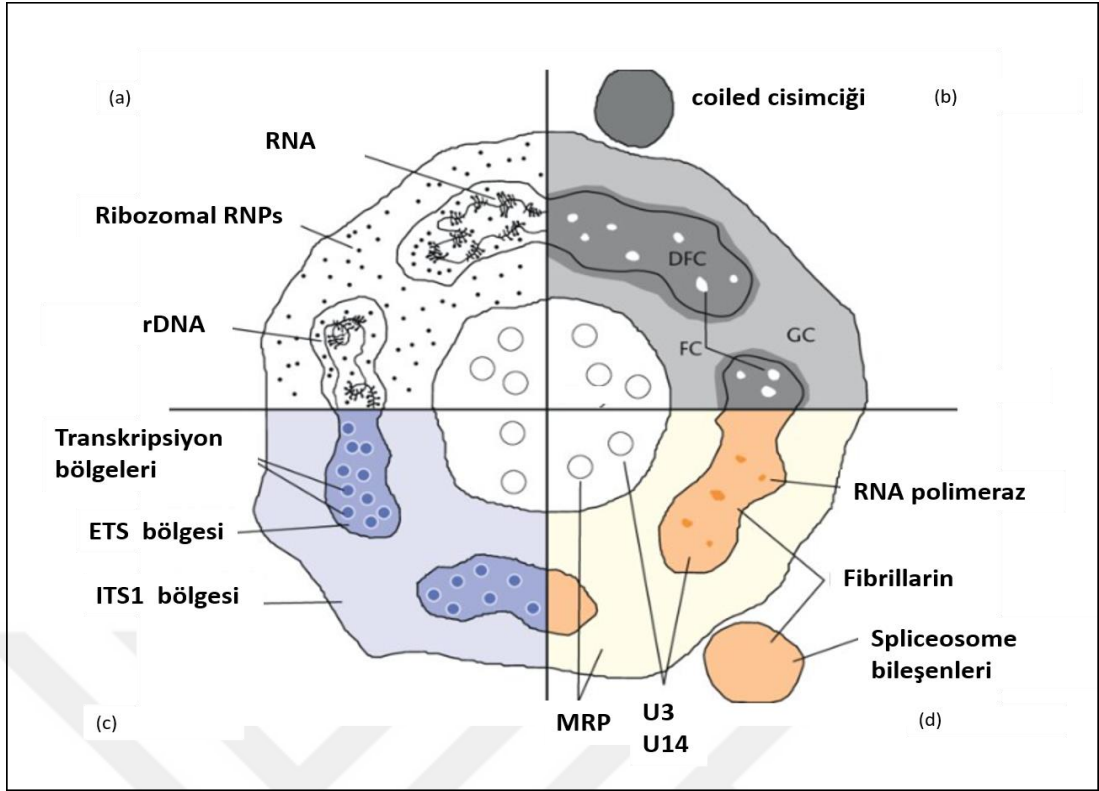
Sitoplazmik membransız organellerden biri olan stres granülleri; ısı şoku, viral enfeksiyon, oksidatif stres, ultraviyole ışın, açlık, DNA hasarı gibi olumsuz çevresel koşullara maruz kalan hücrenin stres durumlarında ortaya çıkmaktadır. Boyutları değişkenlik gösteren granüller, çevrilemeyen haberci ribonükleoproteinler (mRNP)'den oluşmaktadır. Stres granüllerinin düzenlenmesini, çoğu zaman translasyon başlama faktörü (eIF2a)'nın fosforile olmasıyla translasyonun gecikmesi/önlenmesi durumu sağlamaktadır [Anderson and Kedersha, 2009]. Stres granüllerinin hücredeki rolleri arasında mRNA lokalizasyon/translasyon/bozunma, hücrenin sinyal yollarını ve antiviral tepkilerini düzenleme sayılabilmektedir.

Granüllerin oluşması, mRNA'ların translasyon faktörleriyle etkileşimini teşvik ederek indükleyici bir etki yapmaktadır. Yapılan bir çalışmada, viral enfeksiyon durumunda stres granüllerinin çok sayıda antiviral proteinin aktivasyonunu sağladığı ve bunun da bağışıklık tepkisini ve virüs direncini artırdığı gözlenmiştir [Onomoto et al., 2012]. Stres granüllerin içerisinde bulunan bazı bileşenler (eIF3 veya ribozomal 40S), P cisimleri içerisinden gelmektedir. Hücre içinde mRNA döngüsüne bağlı olarak aynı mRNA bazı durumlarda stres granülleri bazı durumlarda ise P cisimlerin içinde bulunabilmektedir. P cisimleri ve stres granülleri arasındaki bu etkileşim, mRNA'ların düzenlenmesinde birlikte rol oynadıklarını göstermektedir [Protter and Parker, 2016].

## 2.5. Çekirdekçik

Çekirdekçiğe dair ilk bulgular 1781 yılına uzanmaktadır. İtalyan bir fizikçi olan Felice Fontana o yıllarda yılan balığı derisinde çekirdek ve çekirdekçik yapılarının varlığını kayıt altına almıştır [Pederson, 2011]. Çekirdekçik, nükleolar düzenleme bölgeleri (NOR) olarak bilinen ribozomal gen tekrar dizilerinin etrafında oluşan membransız organellerden biridir. Sıvı-sıvı faz ayrımı özelliği gösteren bu yapılar, su yüzeyindeki yağ damlaları gibi ayrılıp birleşebilmektedir. Bu özelliği nükleoplazma ile değişim dinamiğine olasılık vermektedir [Corman et al., 2023].

Çekirdekçik, birbirinden farklı görevlerde yer alan dört bölgeye ayrılmaktadır (Şekil 2.3). Bunlar; fibriller merkez (FC), yoğun fibriller merkez (DFC), granüler merkez (GC) ve perinükleolar merkez (PNC) olarak adlandırılmaktadır. GC, bu alt merkezler içerisinde en büyüğüdür ve DFC ile FC merkezlerini çevrelemektedir. Negatif yük bakımından zengin proteinleri (Npm1, Ncl) bünyesinde barındırmaktadır. İçeriğindeki bu proteinler RNA ile birleştiğinde sıvı-sıvı faz ayrımı özellik göstermektedir. Ribozomal DNA (rDNA)'ların aktif olarak kopyalandığı merkez FC'dir ve onu çevreleyen DFC, ribozomal RNA (rRNA)'ların translasyonunda görevli olan proteinleri (fibrillerin gibi) içine alan bir merkezdir [Shaw, 2010]. PNC ise bünyesinde çok miktarda RNA bağlayıcı protein, heterojen nükleer ribonükleoprotein (hnRNP) ve RNA polimeraz III transkriptleri bulundurmaktadır [Frottin et al., 2019; Weeks et al., 2019].



**Şekil 2.3:** Ökaryotik hücrede çekirdekçik yapısı [Shaw, 2010].

Çekirdekçiğin ana görevi ribozom biyogenezinin farklı aşamalarına temel oluşturmak olsa da buna ek olarak mitoz bölünmenin düzenlenmesi, protein kalite kontrolü, RNA düzenleme, telomeraz montajı, hücre döngüsünde, hücrenin strese olan tepkisi, viral enfeksiyon, DNA replikasyonu ve onarımı gibi birçok süreçte rolü bulunmaktadır [Dubois and Boisvert, 2016]. Jacobson ve arkadaşlarının memeli hücrelerinde yaptıkları bir çalışma, sinyal tanıma bölgesi içeren RNA ve proteinlerin sitoplazmaya geçmeden önce çekirdekçikte bulunabileceklerini göstermektedir. Bu da çekirdekçiğin sinyal tanıma (SRP) komplekslerinin toplanma ve işlenme bölgesi olduğuna kanıt niteliktedir [Jacobson and Pederson, 1998]. Ayrıca yapılan proteomik çalışmalar, sitozolik faktörlere (%14) kıyasla çekirdekçik proteinlerinin (%20) yapısında faz geçişi sağlayan özünde düzensiz bölgelerin daha zengin olduğunu ortaya koymuştur [Corman et al., 2023].

### 2.5.1. Ribozom Biyogenezi

Ökaryotik hücrelerde çekirdekçik, nükleoplazma ve sitoplazma içerisinde aşamalı olarak gerçekleşen ribozom sentezi birçok korunmuş alt ünite proteine gereksinim duyan ve fazla enerji harcayan bir süreçtir. Ribozomun oluşumundan sorumlu genler çekirdekçinin FC merkezinde ve yeni sentezlenen rRNA'lar ise DFC merkezinde bulunur. Fibriller merkezler çekirdekçinin yapısal ve fonksiyonel birimlerini temsil etmektedirler [Penzo et al., 2019].

Ökaryotik model organizma olan *Saccharomyces Cerevisiae*'da ribozom, 60S ve 40S olmak üzere evrensel iki alt birimden oluşmaktadır. 60S alt birim; üç ribozomal RNA (25S, 5.8S ve 5S) ve 46 farklı ribozomal protein içerirken, 40S alt birim; bir adet ribozomal RNA (18S) ve 33 farklı ribozomal protein içermektedir. Ribozomun biyogenezi için çeşitli RNA bağlayıcı proteinler, endo-ekzo nükleazlar ve helikazlar gibi 200'den fazla protein gerekmektedir [Peña et al., 2017]. Bu proteinler, ribozomun oluşması için rRNA'ların katlanma ve işlenmesini, proteinlerin birbirleriyle ve RNA ile ağlarının oluşmasını, çekirdek iç-dış lokalizasyonunu ve kalite kontrolünü desteklemektedirler [Ben-Shem et al., 2011].

RNA polimeraz 1 (Pol I) tarafından çekirdekçikte sentezlenen 35S pre-rRNA transkripti, metilasyon, asetilasyon gibi bazı modifikasyonlara uğrayarak olgunlaşmakta ve 18S, 5.8S ve 28S rRNA'lara dönüşmektedir. 47S rRNA ise RNA polimeraz III (Pol III) tarafından 5S rRNA'yı oluşturmak üzere nükleoplazma içerisinde sentezlenerek çekirdekçiğe aktarılmaktadır (Şekil 2.3).



## 2.5.2. Ribozom Hibernasyonu

Bakterilerde, stres durumunda 70S ribozomların dimerizasyonu ile oluşan 100S kompleksler, yaklaşık 60 yıl önce E.coli hücre lizatları ile yapılan çalışmalarda hızla protein sentezi için dönüşebilen ribonükleoproteinler olarak kabul edilmişlerdir. Bu translasyon bakımından inaktif kompleksler, 70S ribozomların 50S–30S–30S–50S konformasyonunda düzenlenmektedir ve bünyelerinde mRNA bulunmamaktadır. Bu kompleksler E.coli’de büyüme fazına göre değişiklik göstermektedir: Üstel büyüme fazında 100S kompleksler görülmezken bakterinin durağan fazında ortaya çıkmaya başlamaktadır. Mevcut stres durumu azaldığında bu komplekslerin oluşumu da tersine dönmekte ve inaktif olan dimerize ribozom alt birimleri ayrışmaktadır [Prossliner et al., 2018]. 100S dimer kompleksler, ribozomların durağan büyüme fazında ve stres durumlarında hibernasyon adı verilen hazırda bekleme durumuna girmesine sebep olmaktadır. Bakterilerde translasyonun durmasından ve inaktif olan 100S komplekslerin geri dönüşümünden sorumlu birkaç küçük ribozomal bağlanma faktörleri (RBF) bulunmaktadır. Hibernasyon durumunda RBF’ler (ribozom modülasyon faktörü (RMF), hazırda bekletme teşvik faktörü (HPF) ve ribozomla ilişkili inhibitör A (RaiA)) ribozomun mRNA bağlanma kanalını kapatmakta, alıcı A bölgesini ve tRNA bölgesi olan peptidil P bölgesini bloke ederek ribozomu korumaya almaktadır [Wells et al., 2020]. Bakterilerde olduğu gibi ökaryotlarda da çeşitli hibernasyon durumunda ribozomlar bulunmaktadır. 80S ribozomları birçok stres durumunda (ozmotik stres, glikoz açlık vs) hücrelerde birikerek inaktif duruma geçmektedirler. Stres durumu sonrası translasyonun yeniden aktivasyonu için 80S ribozomlar birbirlerinden ayrılmaktadırlar. Ökaryotlarda ilk hibernasyon faktörü, yedi transmembran proteini 1 (Stm1), glikoz açlığının ardından mayadan elde edilen ribozomda bulunmuştur. Glutasyon S-transferaz mu 1 (Gstm1) proteini ve memelilerdeki homoloğu SERPİNE1 mRNA bağlayıcı 1 (SERBP1) proteini, bakterilerdeki hibernasyona benzer şekilde 40S A ve P bölgelerinin yanı sıra mRNA giriş bölgesine bağlanarak translasyonu durdurmaktadır [Ben-Shem et al., 2011]. Wells ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışma, Lso2 proteini ve onun memelilerdeki homoloğu olan Ccdc124 proteininin, ribozomun hibernasyon durumundan çıkması için translasyonel iyileşmede görev aldığını göstermektedir. Bu proteinler, hibernasyon durumundaki inaktif 80S ribozomu koruyarak aktifleşme için hızlı geri dönüşüm durumunu stabilize etmektedirler [Wells et al., 2020].

### 2.5.3. Çekirdekçik ve Hastalıklardaki Rolü

Çekirdekçiğin morfolojisi ve bu morfolojinin kanser ile bağlantısı yaklaşık 100 yıl önce patoloğlar tarafından ortaya konmuştur. Buna göre, kanser hücrelerindeki çekirdekçiklerin sağlıklı hücrelerdekilere oranla daha büyük ve yapılarının anormal olduğu görülmüştür. Günümüzde ise yapılan çalışmalar düzensiz çekirdekçik morfolojisinin rDNA transkripsiyonunda hiper aktivasyon yarattığını göstermektedir. Ayrıca çekirdekçikteki düzensizlik, Npm1 gibi ribozomal protein ve/veya çekirdekçik proteinlerinin gereğinden fazla birikmesine sebep olmaktadır. Biriken proteinler de p53'ü stabilize ederek hücre döngüsünün durmasına veya hücrenin apoptoza uğramasına neden olmaktadır. Ribozom biyogenezindeki bozulma da p53'ün birikmesine sebep olan nükleer stres mekanizmalarının aktifleşmesini tetiklemektedir.

Tümör oluşumu sırasında onkogenlerin ve tümör baskılayıcıların birçoğu polimeraz I transkripsiyonu ile çekirdekçik içerisinde modüle olmaktadır. Translasyon ve ribozom biyogenezi aktivatörlerinden RAS, MYC ve mTOR dahil olmak üzere onkoproteinler ve p53, PTEN gibi tümör baskılayıcılar ribozom biyogenezini ve hücre büyümesini sınırlayıcı kontrol noktalarında görev almaktadırlar. Bu nedenle kanserlerde çoğunlukla r-proteinlerinin değişmiş ekspresyonu gözlenmektedir [Corman et al., 2023]. Bu da çekirdekçiği hem kanser sinyal hedefi hem de kanserleşme için önemli yolların düzenleyicisi yapmaktadır. Geri besleme döngüsü, kanserin özelliklerinin belirleyicisi olarak merkeze çekirdekçiği koymaktadır. Çekirdekçiğin bu değişebilen ek işlevleri kanserin kötü huylu dönüşümü için önemli bir izin verici adım olarak görülmektedir [Quin et al., 2014].

Hücre içerisinde ribozom biyogenezi enerjinin büyük bir kısmını harcadığından dolayı çekirdekçik hücrenin sağlığını gösteren temel yapılardan biri olmaktadır. Ribozom biyogenezi, kanserlerde artmakta ve nörodejeneratif bozukluklar gibi bazı diğer hastalıklarda ise tehlikeye girmekte olduğu göz önüne alındığında çekirdekçik bu tür hastalıkların tedavisi için terapötik hedef haline gelmektedir [Corman et al., 2023].

### 3. TRANSLASYON VE SONRASI DÜZENLEMELER

Hücre içerisindeki en önemli mekanizmalardan biri olan translasyon, hücrenin her türlü ihtiyacına uygun proteinlerin sentezinin gerçekleştiği bir süreçtir. Protein sentezi sitoplazmada bulunan ribozomlar tarafından gerçekleştirilmektedir. Sentezlenen proteinler; hücre döngüsünün tüm aşamaları, hücrenin çevresel koşullara verdiği tepkiler, hücrenin biyokimyasal reaksiyonları gibi birçok farklı alanda kullanılmaktadır. Translasyon süreci mRNA'nın üçerli kodlarının ribozom tarafından her bir kodona karşılık gelen antikodonu bulunduran tRNA'ları kullanarak okunması ve ilgili aminoasitleri peptit bağları ile bağlamasıyla gerçekleşmektedir. Peptit bağları ile birbirine bağlanan aminoasitler proteinlerin birincil yapılarını oluşturmaktadır. Proteinlerin aktif özellik kazanmaları bu yapıların katlanarak işlevsel hale gelmeleri ile sağlanmaktadır. Görevini gerçekleştirmek üzere proteinler translasyon sonrası modifikasyonlara (PTM) uğrayarak hedef bölgeye/göreve iletilmektedirler [Malys and McCarthy, 2011]. Translasyon sonrası modifikasyonlar, çok sayıda biyolojik işlevi kontrol etmekte önemli bir role sahiptirler. Örneğin, protein sinyalleri, lokalizasyonlarındaki değişiklikler, bozunmalar, hücresel bir olayı aktif veya pasif konuma getirme gibi işlevler PTM yoluyla gerçekleşmektedir. Ayrıca membransız organellerin oluşumunu veya dağılımını içerisinde bulunan proteinlerin etkileşimlerini değiştirerek kontrol etmektedirler. Çeşitli PTM'ler proteinde bulunan IDR yükünü, proteinin hidrofobikliğini, boyutunu ve yapısını değiştirmektedir. Bu değişiklikler, proteinlere fosforil, metil, asil, glikosil, alkil gibi fonksiyonel grupların eklenmesiyle veya oksidasyon, deaminasyon, deaminasyon gibi kimyasal değişiklikler aracılığı ile olmaktadır. Fosforil grubunun, aminoasitlerin hidroksil grubuna eklenmesi fosforilasyon olarak adlandırılmaktadır. Fosforil grubu negatif yüklüdür bu nedenle ilavesi polar ve yüksüz bir bölgeyi negatif yüklü bir aminoasit bölgesine çevirmektedir. Böylece fosforile olan proteinin yük durumunun yanı sıra bununla beraber de etkileşimi, lokasyonu, işlevi değişebilmektedir [Owen and Shewmaker, 2019]. Metil grubunun arjinin aminoasidine eklenmesi metilasyon olarak adlandırılmaktadır. Arjinin aminoasitindeki yan zincir, birden fazla metillenebilen pozitif yüklü guanidinyum bölgesi içermektedir. Bu bölgenin metilasyonu metiltransferaz adı verilen bir protein tarafından katalizlenmektedir. Arjinin metilasyonu, grubun yükünü değiştirmemekte bunun yerine hacmini,

hidrofobikliğini ve hidrojen bağı potansiyelini değiştirmektedir. Asetil grubunun lizin aminoasitine eklenmesi asetiltransferaz proteinleri ile gerçekleşerek asetilasyon adını almaktadır. Asetil grubu eklenmiş bir lizin aminoasitinin pozitif yükü nötralize olmakta bu da hidrofobikliğini artırmaktadır. Deiminasyon reaksiyonu ise arjinin aminoasitinde gerçekleşen bir diğer PTM'dir. Sitrulinasyon adı da verilen bu işlem bir fonksiyonel grubun eklenmesi ile değil, arjinin aminoasitinin yan zincirinin oksitlenmesi ile meydana gelmektedir. Bu reaksiyonu peptidil arjinin deiminaz (PAD) enzimi katalizlemektedir. Deiminasyon sonucu aminoasitin pozitif yükü kaybolmakta ve nötr yüke çevrilmektedir. PAD enzimi arjininde bulunan RGG/RG motifi üzerinde işlev görmektedir. Bu motif, birçok faz seperasyon özelliği gösteren proteinler ve RNA bağlayıcı proteinler üzerinde bulunmaktadır. Örneğin, yapılan bir çalışmada, RNA bağlayıcı bir protein olan FUS (Fused in Sarcoma) proteinin sitrulinlenmesinin, membransız organellerden stres granülü içine girişinin kısıtlanmasına sebep olduğu gösterilmektedir [Tanikawa et al., 2018]. RNA bağlayıcı proteinler üzerindeki PTM çeşitleri, bu proteinlerin bağlanma yeteneğini, aktivitesini etkileşim ve katlanmalarını değiştirdiği bilinmektedir. Farklı RBP türlerinin farklı işlevleri üzerinde rolleri bulunan PTM'lerin, anormal modifikasyonları tümör hücrelerindeki RBP disfonksiyonuna da yol açtığı belirtilmektedir. Zhang ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, göğüs ve kolon kanseri hücrelerinde, RBM38 (RNA bağlanma motifi 38) proteininin 195.serin bölgesinden fosforlanması, konformasyon değişikliğine sebep olduğu ve tümör baskılayıcı p53 proteininin ekspresyonu için translasyon başlatma faktörü 4E'ye bağlanamamasına yol açtığı gösterilmiştir [Zhang et al., 2014].

## 4. RNA-BAĞLAYICI PROTEİNLER

İnsanda bulunan yaklaşık 1914 RNA-bağlayıcı protein, tüm protein kodlayan genlerin sadece %7,5'ini oluşturmaktadır. Bu proteinler, hücrelerin taşınması, lokasyon ve gelişimi, farklılaşması ve metabolizması gibi önemli süreçlerde yer almaktadırlar.

RNA bağlayıcı proteinler (RBPs), transkripsiyon sonrası gen düzenlenmesinin hemen her adımında rol oynayan kilit elemanları temsil etmektedirler. RNA'ların taşınması, bozunması veya translasyonu gibi kritik hücresel işlevlere aracılık etmektedirler. Ayrıca diğer proteinlerle etkileşerek RNA eklenmesi, stabilite korunması gibi görevlerde de bulunmaktadır. RBP'lerin çeşitliliği; RNA'lara bağlanma modları ve özelliklerine göre değişmektedir [Beckmann et al., 2015; Qin et al., 2020].

### 4.1. RNA-bağlayıcı Proteinlerin Yapıları

RNA-bağlayıcı proteinlerin (RBP) büyük çoğunluğu belirli bir alanda birden fazla tekrarlayan dizileri içermektedir. Yapısal olarak yaygın olan bu tekrarlayan diziler; RNA tanıma motifi (RRM), K homolojisi (KH) alanı, çift sarmallı RNA bağlanma motifi (dsRBD), arginin-glisin-glisin (RGG) motifi, tirozin bakımından zengin alan ve çinko parmaklar (ZnF) gibi motiflerden oluşmaktadır. RNA-bağlayıcı proteinlerin işlevlerindeki farklılık, motiflerin farklı kombinasyonlarına sahip olmalarıyla gerçekleşmektedir. Bu çeşitlilik, RBP'lerin özgüllüğünü ve afinitesini artırmaktadır [Qin et al., 2020]. RBP'lerin RNA ile olan etkileşimleri üzerine yapılan yapısal çalışmalar kanonik ve kanonik olmayan bağlanma modlarını ortaya koymaktadır. Ayrıca belirli RBP'ler kanonik modlardan ziyade RRM bölgeleriyle, C- ve N-terminal uçları aracılığıyla bir ya da iki baz tipinden oluşan karmaşıklığı düşük motif içeren RNA'lara bağlanmaktadır [Dominguez et al., 2018]. RNP granülleri adı da verilen membransız organellerin yapısını da oluşturan RBP'ler farklı hücre tiplerinde karakterize edilmekte ve birçoğu yapısında bulunan özünde düzensiz bölgeler (IDR) aracılığı ile bağlanmalarını gerçekleştirmektedir [Hentze et al., 2018].

## 4.2. RNA-bağlayıcı Proteinlerde IDR bölgeleri

Hücre içerisindeki amino asitlerin bir araya gelmesi ile oluşan proteinlerin nasıl birbirinden farklı görevleri yerine getirdikleri büyük ilgi gören bir konu olmuştur. Protein dizilerinin belirli bir görevi ve yapıyı, içerdikleri amino asit dizilerinde sakladıklarını Anfinsen ve arkadaşları 1960’larda yaptığı çalışmalarda öne sürmüştür [Anfinsen, 1973]. Termodinamik hipotezi olarak da adlandırılan bu varsayım; proteinin doğal ortamındaki üç boyutlu yapısının, tüm sistemdeki enerjinin en düşük olacağı yapısal şekilde olduğunu belirtmektedir. Bu yapı da atomlar arası etkileşimlerin toplamı ve amino asit dizilerinin farklılığı ile belirlenmektedir [Babu, 2016].

Proteinlerin üç boyutlu yapısının önemli bir belirleyicisi; amino asit dizilerinin arasındaki hidrofobik etkileşimler olmaktadır. Bu etkileşimler yoluyla katlanan polipeptit segmentler tanımlı bir üçüncül yapıyı oluşturmaktadır. Bir polipeptit zinciri katlanmaya yeterli hidrofobik etkileşim içermiyorsa bu bölgeler özünde düzensiz bölgeler (IDRs) olarak adlandırılmaktadır. 90’lı yılların sonuna kadar IDR bölgeleri ve IDR bölgeleri içeren proteinler (IDP), X-ışını kristalografik analizleri gibi protein araştırma yöntemlerinde sorun yaratan ve engelleyici yapılar olarak görülmüştür. Daha sonraları Wright ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarda, bu düzensiz IDP’lerin hücre içinde protein partner etkileşimlerinde önemli bir rol oynadığını göstermişlerdir. IDR içeren bir protein veya RNP, hedef molekül ile etkileştiğinde düzensiz olan bölgeleri hedef molekülün yüzeyine bağlı olarak farklı bir katlanma yapısı sergilemektedir. Proteinler, hedef molekül değiştiğinde birbirinden farklı katlanma yapısı göstermekte ve bu özellikleri onları hücre içi ağlar için kor bölge yapmaktadır [Sato, 2022].

IDR bölgeleri fazla miktarda polar veya yüklü amino asit içermektedir. Yeterli hidrofobik etkileşimleri bulunmadığından tamamen veya kısmen benzersiz bir üç boyutlu yapıları mevcut olmamaktadır. Bu da koşullara bağlı dinamik bir denge içinde konformasyon çeşitliliği göstermelerini sağlamaktadır [Wei et al., 2016]. Proteinlerde bulunan çok değerlilik özellikleri gibi IDR bölgeleri de proteinlerin konsantrasyon artırımı veya etkileşim partnerlerindeki değişimleri için olasılık tutmaktadır. IDR bölgeleri bulunan birçok RNA bağlayıcı protein, RNA ile etkileşime girdiğinde faz ayrımı özellik gösterebilmektedir. IDP’ler faz ayrımını indükleyerek membransız organellerin agregat oluşturmalarında da önemli bir rol

oynamaktadırlar. A-sinüklein ve  $\beta$  amiloidin birikmesiyle oluşan agregatlar geri dönüşümlü hale gelmez ise Parkinson veya Alzheimer gibi önemli nörodejeneratif hastalıkların oluşumuna öncülük edebilmektedirler. Ayrıca IDR bölgelerinin translasyon sonrası modifikasyonlara daha açık halde olması proteinlerin normal işlevinin yanı sıra işlevi dışında anormali haline gelmesine yol açmaktadır. Dolayısıyla bu bölgelerde gelişen hatalı modifikasyonların hastalıklara sebep olma oranı daha fazla olmaktadır. Bu nedenle IDR yolu ile gelişen hastalıklarda yapı incelemeleri, bu hastalıkların teşhis veya tedavisi için yeni ilaçların geliştirilmesinde büyük öneme sahip olmaktadır [Wheeler et al., 2016].

### 4.3. RNA-bağlayıcı Proteinlerin Hastalıklarla İlişkisi

RNA'ya bağlanan protein sınıfı olan RNP'ler türler arasında yüksek oranda korunmaktadır. Hücrelerdeki genlerin ekspresyonunda ve hücre homeostazisinin korunmasında kritik rolleri bulunmaktadır. RNA'ların eklenmesi, modifikasyonu, taşınması, lokalizasyonları ve stabiliteilerinin yanı sıra translasyon gibi hücresel süreçleri yapılandırma gibi fonksiyonel görevleri çeşitliliği sağlamaktadır. Hücrenin işlevleri gereğince bazı RBP'ler aşırı ifade edilirken bazılarının ifadesi düşürülebilir. Hücredeki RBP'lerin işlevsel ve yapısal bozuklukları kanser dahil olmak üzere birçok hastalığa sebep olabilmektedir [Qin et al., 2020]. Bazı RNP'lerin oluşturduğu granül yapılar sadece nükleer ya da sitoplazmik hastalığa bağlı hücrelerde oluşmaktadır. RNA veya proteinlerin mutant formları çekirdeklenerek fizyolojik açıdan olumsuz etki ile birlikte toksik işlev kazanarak hücresel metabolizmayı bozabilmektedir. Amyotrofik lateral skleroz (ALS) başta olmak üzere birçok nörodejeneratif hastalık, birden fazla RNP granülün içeriğinde bulunan bileşenlerin mutasyonundan kaynaklanmaktadır. Örneğin, Fus (Fused in Sarcoma) proteininin mutant formları ALS hastalığında sitoplazmik RNP granülleri oluşturmaktadır. Fus proteinindeki bu mutasyonların çoğu, nükleer lokalizasyon sinyali (NLS) üzerinde bulunmaktadır ve böylece translokasyon bozuklukları ve çekirdek hedefinde sapmalar ile sitoplazmada yanlış konumlanmaya sebep olmaktadır. ALS hastalığında rolü olan diğer RNA bağlayıcı protein TAR DNA-bağlayıcı 43 (TDP-43) proteini hastalık söz konusu olduğunda motor nöronlarındaki çekirdek lokasyonundan tamamen sitoplazma lokalizasyonuna geçmektedir. Stres granülü oluşumunu da destekleyen bu mutasyon TDP-43'ün RRM bölgesinde (D169G) bulunmaktadır.

ALS hastalığının yanı sıra Akut miyeloid lösemi (AML) hastalığında yine RNA bağlayıcı proteinlerin rolü bulunmaktadır. Nükleofosmin (NPM1) proteinini kodlayan gende görülen bir mutasyonun AML hastalığında en çok rastlanan genomik değişiklik olduğu bilinmektedir. AML hastalığının ilk teşhisinde %20-30 ve hastalık seyrinin devamında %50 civarında Npm1 mutasyonu görülmektedir. Tüm bunlar bir araya getirildiğinde hastalıklardaki mutant proteinlerin, nükleer ve sitoplazmik granüller üzerindeki farklı etkilerinin ve RNP granül ağlarının oluşumundaki rollerinin kritik olduğunu görülmektedir [An et al., 2021; Zarka et al., 2020].

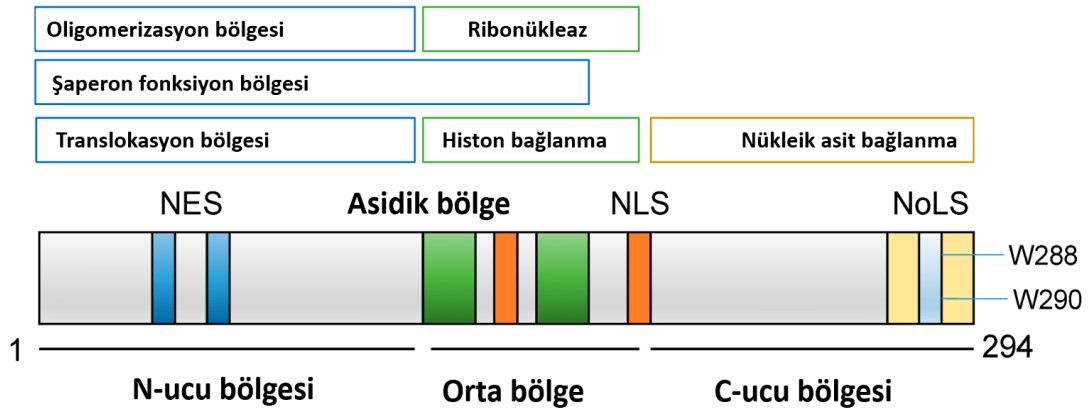


## 5. NÜKLEOFOSMİN (NPM1)

Çekirdekçik bölgesinin granüler kısmında yer alan nükleofosmin (Npm1) proteini B23 veya numatrin olarak da adlandırılan bir fosfoproteindir. Hücrelerde yüksek seviyelerde eksprese edilmektedir. Npm1 proteini hücre içinde çeşitli görevlerde yer almaktadır. Bunların en başında ribozom biyogenezi ve sentrozom duplikasyonu sayılabilmekle beraber, tümör protein 53 (P53) ve Oksin yanıtı faktörü (Arf7) gibi bazı tümör baskılayıcı genlerin aktivitesini artırıcı ve azaltıcı olarak işlev göstermektedir. Hücrede meydana gelen DNA hasarı ve hipoksi gibi stres koşullarında Npm1 seviyesinde artış görülmektedir [Grisendi et al., 2005].

### 5.1. Npm1 Yapısı

İnsanda bulunan NPM1 geni 5q35 kromozomu üzerinde bulunmaktadır ve 12 adet ekzondan oluşmaktadır. İşlev kazanmak için geçirdiği değişiklikler sonucu 294 aminoasiti kodlayan 11 ekzona sahip olmaktadır. Yabancıl tip NPM1 geninin yanı sıra NPM1.2 ve NPM1.3 olmak üzere iki adet izoformu daha bulunmaktadır. Ancak bu izoformların ekspresyon ve işlevleri çok fazla bilinmemektedir [Lim and Wang, 2006].



Şekil 5.1: Npm1 protein yapı ve bölgeleri.

Hücrede yüksek ekspresyonla NPM1 geninden sentezlenen Npm1 proteini, 294 aminoasit içeren, 37 kDa ağırlığında bir fosfoproteindir. Çekirdekçik ve sitoplazma arasında gidip gelen bu proteinin mekik aktivesi bulunmaktadır. Bu özelliği normal hücre fonksiyonu için önem arz etmektedir. Yapısal olarak; N-ucu, merkez bölge ve C-ucu olmak üzere üç bölgeye ayrılmaktadır (Şekil 5.1).

N-ucu alanı yüksek oranda korunmuş bir bölge olmakla beraber çekirdekçik ve sitoplazma arasındaki translokasyonunu sağlayan nükleer export sinyalleri (NES) bu alanda bulunmaktadır. Ayrıca hidrofobik yapısından dolayı N-ucu beş monomerin birleşerek Npm1'in pentamer oluşturmada destek görevindedir. Npm1'de bulunan merkez bölge yüksek oranda asidik özellik göstermektedir. Bu özelliği histonlara bağlanma kapasitesinin artmasında ve kromatinlerin yeniden düzenlenmesinin etkinleştirilmesinde önemli rol oynamaktadır. Aromatik aminoasitlerden oluşan korunmuş C-ucu çekirdekçik lokalizasyon sinyalini (NoLS) içeren bölgedir. NoLS bölgesi nükleoplazmaya lokalizasyon için önemlidir ve burada gerçekleşecek herhangi bir mutasyon Npm1'in çekirdekçikten ayrılmasıyla sonuçlanmaktadır [Nishimura et al., 2002; Federici and Falini, 2013; Zarka et al., 2020].

## **5.2. Npm1'in Ribozom Sentezindeki Rolü**

Npm1 proteini ribozomal RNA (rRNA)'nın düzenli sentezinin yapıldığı çekirdekçik bölgesinde bulunmaktadır. rRNA'nın 5S kısmı ile bağlanarak lokasyon değişiminde refakat görevi yapan ribozomal protein L5 (rpL5) ile etkileşime girmektedir. Bu etkileşim Npm1'in olgun ribozoma ulaşmasını sağlamaktadır. Npm1, ribozomların sentezinde görev alarak hücrenin büyümesini destekleyen kritik bir proteindir. Npm1 fonksiyonundaki kayıp, rpL5 ve 5S rRNA'nın lokasyon değişimini bloklamakta ve hücrenin döngüsünün durmasına sebep olmaktadır [Yu et al., 2006; Zarka et al., 2020].

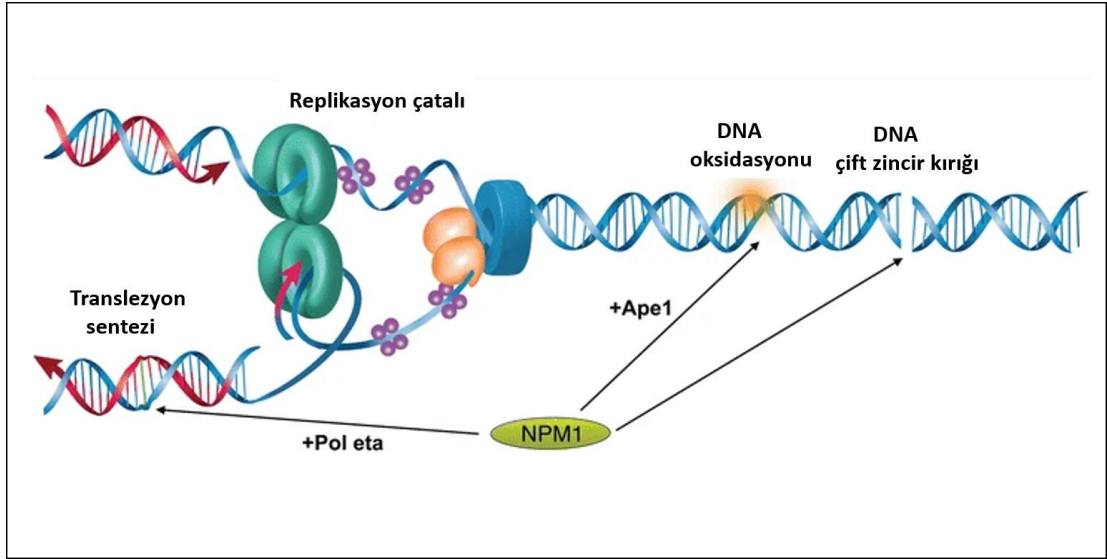
## **5.3. Npm1'in Stres Durumunda Hücredeki Rolü**

Stres durumunda hücreler, tepkilerini hızlandırmakta ve metabolizmalarını değiştirmektedirler. Hücre, stres durumuna ve şiddetine bağlı olarak cevap oluştururken genellikle hücre döngüsünü durdurmakta veya apoptozu aktive etmektedir. Ayrıca hücre, çekirdeğin yeniden düzenlenmesi ve çekirdek içi işlevlerin (çoğalma, transkripsiyon) durması ve stres tepkilerinin aktivasyonu (DNA onarımı) yoluna da gidebilmektedir. Hücre içinde stres algılama merkezi olarak çekirdekçik görev almaktadır. Stres durumunda tepkilerin koordine edilmesi yine bu merkez üzerinden olmaktadır [Verine-Boulon et al., 2010]. Stres sinyallerinin tepkiye dönüştürülmesi çoğunlukla tümör baskılayıcı ve genom koruyucusu olan p53'ün stabilizasyonu veya aktivasyonu ile gerçekleştirilmektedir. Bu stres yolları, hücresel

p53'ün ekspresyonundaki artışı tetikleyecek farklı mekanizmalara dayanmaktadır. Bunlardan biri Npm1'in stres tepkisinde Arf ve p53 protein aktivitelerini modüle etmesi gösterilebilmektedir. Npm1, bu proteinlerin transkripsiyonel olarak ekspresyonlarındaki artışı düzenleyerek p53 proteini ile etkileşime girmektedir [Lee and Gu, 2010]. Ayrıca DNA hasarı durumunda oluşan strese bağlı olarak, çekirdekçikten nükleoplazmaya geçmektedir. Burada p53'ü negatif regüle eden MDM2 (E3 ubiquitin-protein ligaz) proteini ile etkileşime girmekte, böylece p53-MDM2 kompleks oluşumunun aktivasyonunu sağlayarak p53'ün bozulmasını engellemektedir [Kurki et al., 2004].

#### **5.4. Npm1'in Genomik Stabilite ve DNA Onarımındaki Rolü**

Npm1 proteini hücre döngüsü sırasında sentrozomlara bağlanarak çoğalmalarını bir defa olacak şekilde sınırlandırarak genomik stabilitenin korunmasını sağlamaktadır. Hücrelerin erken G1 fazında, Npm1 bağlı sentrozom popülasyonunda artış görülmekle birlikte faz ilerledikçe bu bağ zayıflamakta ve proteinler birbirinden ayrılmaktadır. Bu ayrışma CDK2/siklin E protein kompleksinin Npm1'i fosforillemesi ile gerçekleşmektedir. Npm1'in fosforillenmesi, sentriollerin duplikasyonunu tetiklemektedir [Okuda et al., 2000]. Ayrıca hücreler, DNA'da meydana gelen çift sarmallı kopmalar sonrasında, Npm1 proteininin kromatin bağlama faktörü olarak da işlev görmesini sağlamaktadır. Hücrede artan Npm1 seviyesi DNA tamiri ile ilişkilendirilmektedir. Hücrenin DNA hasar toleransı (DDT) sırasında aktive ettiği translezyon sentezi mekanizmasında polimeraz aktivitesini düzenlemekle görevlidir. Ayrıca, APE1 (Apurinik / apirimidinik (AP) endonükleaz) gibi baz eksizyon tamiri (BER) enzimlerini, protein seviyelerini kontrol ederek modüle etmektedir [Sekhar ve Freeman, 2023]. Dahası Npm1'in 199.treonin bölgesi üzerinden fosforile olması, gamma-histon proteini ( $\gamma$ -H2AX), BRCA1 ve DNA onarımı için görevli proteinlerle etkileşime girmesine sebep olmaktadır. Bu da çift sarmallı kopma bölgelerine lokalize olmasıyla sonuçlanmakta (Şekil 5.2) ve homolog rekombinant sürecine katılmasına olanak sağlamaktadır [Box et al., 2016]. Npm1 proteininin kaybı ise ATR ve ATM gibi DNA tamir kinazlarını hedef alan  $\gamma$ -H2AX artmasına sebep olmaktadır [Zarka et al., 2020].



Şekil 5.2: Npm1'in çeşitli DNA hasar yanıtındaki işlevleri.

## 5.5. Npm1'in Hastalıklardaki Rolü

Hücre içinde sayısız görevi olan Npm1, genom stabilitesinde ve apoptoz düzenlemesinde rol oynamaktadır. Bu işlevleri ekspresyon seviyesine ve gen dozuna bağlı olarak, bir onkogen veya tümör baskılayıcı olarak hücrede rol oynamasına sebep olmaktadır. Npm1'in kanserle ilişkilendirilmesi ilk defa non-Hodgkin lenfomada, hücrelerin yaklaşık üçte birinde Npm1-ALK (anaplastik lenfoma reseptörü) füzyonunun görülmesi ile ortaya konmuştur. Zaman içerisinde Npm1'in birçok tümör oluşumundaki rolü aydınlığa kavuşturulmuştur. Literatür incelendiğinde, genel olarak Npm1'in aşırı ekspresyonu çeşitli histolojik kökenleri olan katı tümörlerde dikkat çekmektedir. Örneğin, prostat ve tiroid kanserlerinde normal dokulara oranla Npm1 seviyesinde artış görülmüş, bu artışın da hücrenin büyüklüğünün artması ve tümörün yayılmacılığı ile ilişkili olduğu bulunmuştur [Loubeau et al., 2014]. Mesane kanserlerinde ise yüksek Npm1 seviyesi, kanserin nüksü, ilerlemesi ve tekrarlaması bakımından belirteç olarak görülmektedir. Npm1 seviyesinin artması kadar azalması da bazı kanser türlerinde görülmektedir. Örneğin mide kanserlerinde normal dokuya oranla Npm1 seviyesinde düşüş görülmüş, meme kanserinde de yine düşük Npm1 seviyesi kötü prognosisla ilişkilendirilmiştir [Box et al., 2016].

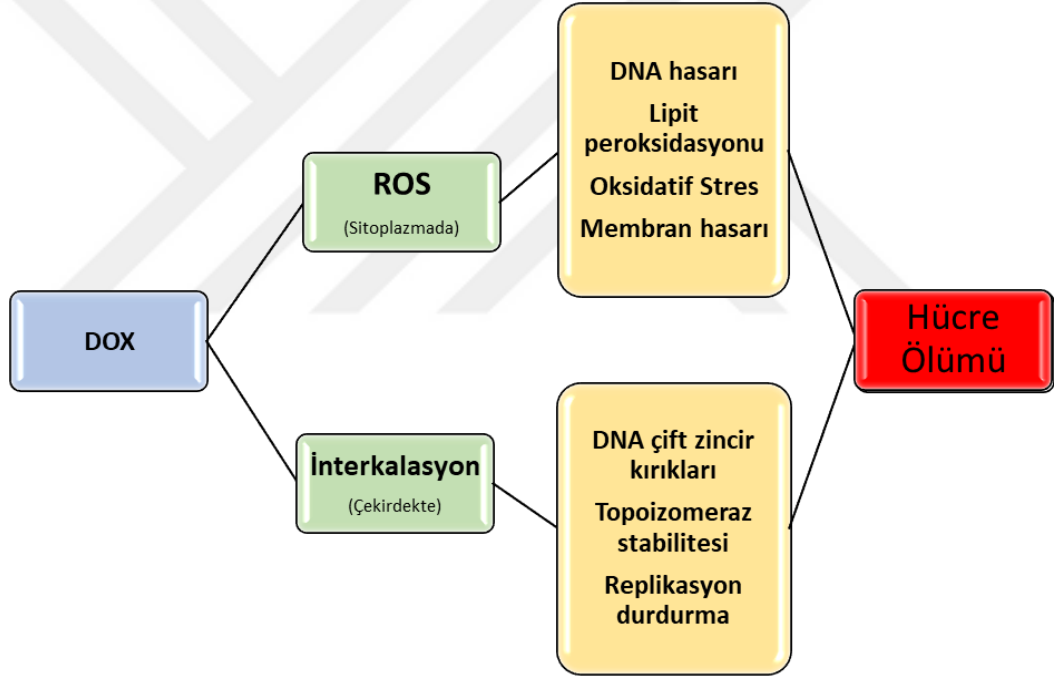
Ekspresyon seviyesindeki değişikliğin yanı sıra bazı hastalıklarda NPM1 geninin mutasyona uğradığı görülmektedir. Hem lenfoid hem de miyeloid bozukluklardaki

kromozomal yer değişiklikleri ve akut miyeloid lösemi (AML) gibi hematopoetik tümörlerde Npm1'in mutasyonlarına bağlı genetik değişiklikler meydana gelmektedir. Bu değişikliğin oluştuğu tümör hücrelerinde, Npm1'in işlevi birkaç yol ile bozulmaktadır; bunlardan ilki yabancı tip ve mutasyona uğramış hetero-dimerize Npm1'in antogonize olarak çalışması; ikinci olarak ise eksprese olduğu genin tek işlev gören alele indirgenmesi ile hücre içindeki miktarının azalması olarak sıralanabilmektedir. Yapılan çalışmalar, Npm1'in orta kısmındaki translokasyon ve C-ucu mutasyonunun; promiyelositik lösemi, anaplastik büyük hücreli lenfoma (ALCL), AML, kronik miyelojenöz lösemi ve miyelodisplastik sendromlar (MDS) gibi yüksek oranda hematolojik bozukluklarda olduğunu göstermektedir. Ekspresyon seviyesine ve gen dozuna bağlı olarak Npm1, bir onkogen veya tümör baskılayıcı olarak hücrede rol oynamaktadır. Hücre içindeki ekspresyonunun kaybı veya aşırı ifadesi gibi fonksiyonundaki değişiklikler birçok farklı mekanizmayı tetiklemekte ve neoplastik dönüşüme sebep olmaktadır. Bunların yanı sıra, Npm1, kanser hücrelerinin kontrolsüz bir şekilde büyümesiyle de ilişkilidir. Tümör hücreleri hayatta kalmak için sürekli bir büyüme göstermekte, bu büyüme de devam eden ribozom biyogenezini ve sürekli bir protein sentezini gerektirmektedir. Npm1 ribozom biyogenezindeki işlevi sebebiyle tümör türlerinden bağımsız olarak bu süreçte önemli bir proteindir [Grisendi et al., 2005].

## 6. DOKSORUBİSİN VE KANSER TEDAVİSİNDEKİ ROLÜ

Adriamisin olarak da adlandırılan doksorubisin, antrasiklin sınıfına ait bir bileşiktir. İlk olarak 1950’lerde toprak bakterisi *Streptomyces peucetius* suşundan izole edilen bileşiğin tümörlere karşı etkili olduğu görüldükten sonra 1960’larda klinik çalışmalarda kullanılmaya başlanmıştır [Weiss, 1992].

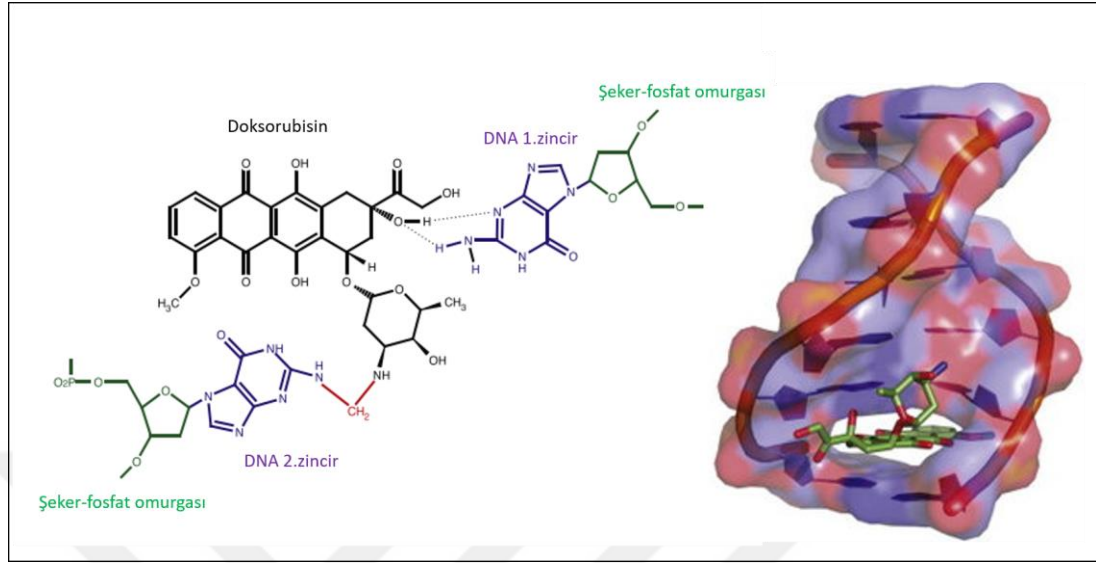
Katı tümörler ve akut lösemiler gibi kanserlerin tedavisinde yaygın olarak kullanılan doksorubisin ve başka antrasiklin yapılar son on yılda fazlaca araştırılmış ve önemli kanser önleyici kemoterapötik ilaçlar arasında yer almışlardır. Doksorubisin aracılı hücre ölümü farklı mekanizmalar ile gerçekleşmektedir. Bu mekanizmaların özeti Şekil 6.1’de verilmiştir.



Şekil 6.1: Doksorubisin etki mekanizması özeti.

Doksorubisin, Topoizomerez II enzimini hapsederek DNA’da çift zincirli kırıkların kapanmasını engellemektir. Topoizomerez II enzimi ATP ile çalışmaktadır. Süper sarmallı ve dolaşmış DNA’ya bağlanarak çift zinciri kırarak DNA replikasyonu ve transkripsiyonu gibi biyolojik süreçler sırasında oluşan gerginliği azaltır. Daha sonra DNA zincirlerini yeniden kapatır. Topoizomerez II enziminin doksorubisin varlığında işlevini tamamlayamaması sitokinezi önlemekte ve süreç hücre ölümüyle

sonuçlanmaktadır. Diğer bir etkisini DNA interkalatörü olarak gösteren doksorubisin DNA zincirindeki GC baz çiftlerini içeren bölgeye guanin ile hidrojen bağı oluşturarak girmektedir (Şekil 6.2.) [Yang et al., 2014].



**Şekil 6.2:** Doksorubisin-DNA interkalasyonu.

Doksorubisinin DNA içeriğine eklenmesi ipler arası çapraz bağlantı oluşturmakta bu da hücrelerin onarımı için zorluk teşkil etmektedir. DNA hasarı oluşumuna sebep olan bu olayda hücre çok sayıda hasar yanıt proteinine ihtiyaç duymaktadır ve uzun süreli hasar hücre ölümünü tetiklemektedir [Forrest et al., 2012].

Yapılan çalışmalar göstermektedir ki; bazı yan etkilere sahip olmasına rağmen antrasiklin ilaç sınıfında doksorubisin en fazla kanser öldürücü etkiye sahip olmakta ve yaygın olarak mesane, meme, mide, akciğer, yumurtalıklar, tiroid, yumuşak doku sarkomu, multipl miyelom ve Hodgkin lenfoma kanserlerinin tedavisinde kullanılmaktadır [Weiss, 1992].

## 7. COILED-COIL DOMAIN-CONTAINING 124 (CCDC124) PROTEİNİ

Coiled-coil domain-containing 124 (Ccgc124) proteinini kodlayan CCDC124 geni, ökaryot genomlarda korunmuş ve ilk olarak sentrozom proteini olarak keşfedilmiştir [Telkoparan vd., 2013]. İçerdiği CCD bölgesi, N-ucundaki 18-82'nci aminoasitleri arasında olan protein, 223 aminoasit büyüklüğünde ve yaklaşık 32 kDa ağırlığında olduğu belirtilmiştir. CCDC124 geninin *Saccharomyces cerevisiae*'daki ortoloğu olan LSO2 (late-annotated short open reading frame-2) geninden sentezlenen protein, ribozomal 25S RNA ile etkileşmektedir [Wang et al., 2018]. Lso2 proteini 92 amino asit içermesiyle ortologlarından boyut olarak büyük ölçüde farklıdır ve insandaki ortologu olan Ccgc124'ün N-ucunun sadece yarısına karşılık gelmektedir (*Arabidopsis thaliana* ortologu AtOxs1, 234 a.a.; fisyon mayası *Schizosaccharomyces pombe* ortologu Oxs1, 207 a.a.; filamentli mantar *Neurospora crassa* ortologu NcOxs1, 224 a.a) [He et al., 2017; Wang et al., 2018; Telkoparan vd., 2013]. Ayrıca *S. cerevisiae* Lso2 proteini, Ccgc124 dahil tüm diğer ortologlarda orta bölge / C-ucunda bulunan RNA bağlama alanları ve özünde düzensiz bölgeleri (IDR) içermemektedir [Arslan vd., 2021]. Her iki protein de düşük ve yüksek ökaryotlarda benzer şekilde ribozom hibernasyonunun geri aktivasyonunda rol oynamaktadır. Ancak, mayalarda tüm Lso2 popülasyonu ribozomla bağlantılıyken Ccgc124 proteininin çok az bir kısmı hibernasyon monozomunda yer almaktadır [Wang et al., 2018]. Ayrıca Lso2'den farklı olarak Ccgc124, geç-anafaz evresine kadar sentrozomda; sitokinez sırasında orta cisimcikte, çoklu hücre altı bölmelerinde olduğu gösterilmiş, hücrelerin döngü aşamaları, stres koşulları gibi durumlarında farklı sinyal yollarında bulunduğu gösterilmiştir. Bağışıklık uyarımı sırasında Protein Kinaz R ile etkileşimde olduğu Hek 293 hücrelerinde; sitokinez sırasında RasGEF1B / Rap2 sinyal yolunda yer aldığı HeLa hücrelerinde gösterilmiştir [Telkoparan vd., 2013; Li et al., 2011]. Ayrıca Ccgc124 proteininin translasyon sonrası modifikasyona uğrayan bölgelerinden 141.serin aminoasitinin PLK-1 (Polo benzeri kinaz-1), 122.serin aminoasitinin CK2 (Kazein kinaz 2) tarafından fosforillendiği yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur [Güllülü, 2017]. Bunlara ilave olarak, Ccgc124'ün birçok onkogenik bağlamdaki rolünü aydınlatmayı amaçlayan çalışmalarda Ccgc124 ekspresyon seviyeleri ile katı tümörlerin oluşumu arasında bir ilişki bulunmaktadır [Arslan vd., 2021].

Eski literatür ve güncel çalışmalar dikkate alındığında Ccdc124'ün sağlıklı bir hücre için birçok organeldeki varlığının, işlevinin ve miktarının kritik olduğu görülmektedir. Bu sebeple bu proteinin fonksiyonunun ve hücre içi partnerlerinin aydınlatılması; Akut Miyeloid Lösemi (AML) gibi kanserlerde, hücre bölünmesine bağlı anomalilerde olası tedavi potansiyelleri için bir ihtiyaç olarak görülmektedir.



## 8. TEZİN AMACI, KATKISI VE İÇERİĞİ

Daha önce yapılan çalışmalarda; Ccdc124 proteininin lokasyon bölgelerinden birkaçı (sentrozom, orta cisimcik) araştırılmış ve translasyon sonrası modifikasyonlarından fosforilasyon bölgeleri aydınlatılmıştır [Telkoparan vd., 2013; Güllülü, 2017]. Ayrıca Hek 293 hücre hattında işaretli Ccdc124 proteinin stabilizasyonu yapıldıktan sonra proteomiks analizi ile etkileşim partnerleri listelenmiştir. Listelenen partner adayları arasında çekirdekçikte lokalize olan ribozomla ilişkili proteinler dikkat çekmiştir. Bu tez çalışması kapsamında da Ccdc124 proteinin literatüre ek olarak, membransız organel olan çekirdekçik içerisindeki konumunun ve birçok hastalıkta rolü bulunan ribozom biyogenezinden sorumlu Npm1 proteini ile partner ilişkisinin aydınlatılması amaçlanmıştır. Ccdc124'ün translasyon sonrası modifikasyonlarının (fosforilasyon bölgelerinin) Npm1 ile olası partner ilişkileri üzerine etkilerinin DNA hasarı durumuna bağlı ve/veya bağlı olmadan incelenmesi amaçlanmıştır.

Npm1, genomik stabilitenin korunmasında rol oynayan kritik bir proteindir. Npm1 genindeki mutasyonlar ve/veya proteinin aşırı ekspresyonunun araştırıldığı önceki çalışmalarda; akut miyeloid lösemi (AML), anaplastik büyük hücreli lenfoma (ALCL) ve solid kanserler gibi hastalıklardaki rolü aydınlatılmıştır. Bu nedenle, Ccdc124'ün Npm1'in yeni bir etkileşim partneri olarak aydınlatılması; çekirdekçik stres algılama ve DNA hasarı cevabı için görevli olan moleküller ve mekanizmalarının daha iyi karakterize edilmesine, Npm1'in kritik rol oynadığı kanserleri hedef alan potansiyel tedavi yollarının geliştirilmesine ışık tutacaktır.

## **9. MATERİYAL**

### **9.1. Hücre Hattı Seçimi**

Yabancı-tip ve mutant Cdc124 proteinlerinin hücre içindeki dağılımının gözlemlenebilmesi için hücre büyüklüğünün ve organellerinin net olarak görüntülenebildiği, 15 yaşında bir kadın osteosarkom hastasının tibia sarkomundan türetilen U2OS hücre hattı kullanılmıştır.

İmmüno blot ve birlikte çöktürme deneyleri için vektör aktarımının yüksek verimle gerçekleşmesi ve günümüzde kolay kültüre edilebilmesi sebebiyle HEK 293T hücre hattı kullanılmıştır.

Hücre farklılığının lokasyona ve partner dinamiğine etkisi olup olmadığının kontrolü için HCT116 hücre hattı kullanılmıştır.

#### **9.1.1. HEK 293T Hücreleri**

İlk olarak 293tsA1609neo olarak adlandırılan 293T hücre hatları, insan embriyonik böbrek hücrelerinden elde edilmiştir. Hücrelerin içerdiği SV40 T antijeni, plazmit transfeksiyonu, ampfilikasyonu gibi uygulamalarda yüksek oran sağlamaktadır. Bu hücre hattı, SV40 replikasyon bölgesini taşıyan vektörleri çoğaltma yetkisine sahiptir. Retrovirüs üretmek için kullanıldığında yüksek titreler verir [Web 2, 2023].

#### **9.1.2. U2OS Hücreleri**

U2OS hücreleri, 1964 yılında 15 yaşında bir osteosarkom hastasının tibiasının orta derecede farklılaşmış bir sarkomundan türetilen epitel morfolojideki hücrelerdir. Poliploid bir karyotipte ve kromozomal olarak zengindir. Hücre hattı, trombosit benzeri türetilmiş bir büyüme faktörü (PDGF) benzeri protein 2 salgılar, insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) reseptörlerini eksprese eder ve artan DNA sentezi ile IGF-I ve II ilavesine yanıt verir [Web 3, 2023].

### 9.1.3. HCT116 Hücreleri

HCT 116 hücreleri, Ras proto-onkogenin 13.kodon bölgesinde mutasyon kolon kanseri yetişkin bir erkekten izole edilmiştir. Ras geninde bulunan bu mutasyon aynı zamanda PCR analizleri için pozitif kontrol olarak kullanılabilir. [Web 4, 2023].

## 9.2. Hücre Kültürü Solüsyonları

- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM): Besiyeri olarak kullanılan DMEM (Gibco 41966); %10 FBS ve %1 penisilin/streptomisin (Gibco 15140122) içerecek şekilde hazırlanmıştır.
- Dulbecco's phosphate-buffered saline (dPBS): Ticari olarak satın alınan 1X dPBS (Gibco 14190) solüsyonu, hücre kültürü çalışmalarında direkt olarak kullanılmıştır.
- Trypsin: Hücrelerin kültüre edildikleri petriyle ve birbirleriyle temaslarını sağlayan kaderin moleküllerini parçalayarak hücrelerin temaslarını ortadan kaldıran bir enzimdir. Saklama koşullarına göre -20 °C'de bulunan enzim, 1X olacak şekilde dPBS içerisinde hazırlanmıştır.
- Hücre Dondurma Besiyeri: Besiyer, FBS içine %10 DMSO eklenerek hazırlanmış, alüminyum folyo ile sarılarak +4 °C 'de muhafaza edilmiştir.

## 9.3. İmmunoblot Solüsyonları

- Liziz Tamponu: Tampon, 500 mM Tris (pH=8), 250 mM NaCl, %1 NP40 ve 1X proteaz inhibitörü ile 1L'ye ddH<sub>2</sub>O ile tamamlanarak hazırlanmıştır. Deneyler sırasında taze olarak hazırlanması gerekmektedir.
- HEPES Tamponu: Tampon, 25 mM HEPES, 150 mM NaCl, %1 Triton x 100 ve 1X proteaz inhibitörü ile 1L'ye ddH<sub>2</sub>O ile tamamlanarak hazırlanmıştır. Deneyler sırasında taze olarak hazırlanması gerekmektedir.
- Jel Formülasyonları: Tris tamponu, SDS ve akrilamid ddH<sub>2</sub>O içerisinde aşağıdaki tablolarda yer alan oranlar kullanılarak hazırlanmıştır (Tablo 9.1 ve Tablo 9.2 ).

**Tablo 9.1:** Yürütme jeli için gerekli malzeme ve oranlar.

| YÜRÜTME JELİ           | %12     |         |
|------------------------|---------|---------|
|                        | 1       | 2       |
| 1.5 Tris HCl pH 8.8    | 1250 µL | 2500 µL |
| dH <sub>2</sub> O      | 1675 µL | 3350 µL |
| %30 Acryl/bis (37.5:1) | 2000 µL | 4000 µL |
| %25 SDS                | 20 µL   | 40 µL   |
| %10 APS                | 50 µL   | 100 µL  |
| TEMED                  | 5 µL    | 10 µL   |

**Tablo 9.2:** Ayırma jeli için gerekli malzeme ve oranlar.

| AYIRMA JELİ            | %4      |         |
|------------------------|---------|---------|
|                        | 1       | 2       |
| 0.5 Tris HCl pH 6.8    | 1250 µL | 2500 µL |
| dH <sub>2</sub> O      | 3000 µL | 6018 µL |
| %30 Acryl/bis (37.5:1) | 666 µL  | 1332 µL |
| %25 SDS                | 20 µL   | 40 µL   |
| %10 APS                | 50 µL   | 100 µL  |
| TEMED                  | 5 µL    | 10 µL   |

- Transfer Tamponu, 10X: 1L ddH<sub>2</sub>O içerisinde 30.3 g Tris ve 144 g Glisin çözülerek hazırlanan stok tampon, deney sırasında %10 olacak şekilde içerisinde %20 metanol ilave edilerek 1X'e ddH<sub>2</sub>O ile seyreltilerek kullanıldı.
- Yürütme Tamponu, 1X: Deney sırasında taze olarak hazırlanan tampon 10X transfer tamponu içerisinde %0.4 oranda %25 SDS konularak ddH<sub>2</sub>O ile 1L'ye tamamlanmıştır.

- TBS, 10X: Stok çözelti, 1L ddH<sub>2</sub>O içerisinde 24.2 g Tris ve 87.6 g NaCl çözülerek, 7.6 pH değerine ayarlanmıştır.
- 1X TBS-T: 10X TBS stok çözeltisi 1X'e indirilerek içine %0.1 tween-20 eklenerek hazırlanmıştır.
- 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8: 200ml ddH<sub>2</sub>O içerisinde 36.34 g Tris çözölmüş ve 8.8 pH değerine ayarlanmıştır.
- 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8: 200ml ddH<sub>2</sub>O içerisinde 121.1 g Tris çözölmüş ve 6.8 pH değerine ayarlanmıştır.
- %10 APS: 1 ml ddH<sub>2</sub>O içerisinde 0.1 g amonyum sülfat çözölmek filtre edilmiş ve hazırlanan solüsyon -20°C'de muhafaza edilmiştir.
- Strip Solüsyonu: Deney sırasında taze olarak hazırlanan solüsyon, son konsantrasyon 100 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, %2 SDS, 62.5 mM Tris-HCl içerecek şekilde 6.7 pH değerine ayarlanarak hazırlanmıştır.
- 50X Proteaz İnhibitörü solüsyonu: 1 mL ddH<sub>2</sub>O içerisinde 1 adet protease inhibitörü tableti (Roche 11873580001) çözölmek -20°C'de muhafaza edilmiştir.
- Western Blot Bloklama solüsyonu: 1X TBS-T içerisinde %5 oranında süt tozu çözölmek deney sırasında taze olarak hazırlanmıştır.

#### **9.4. İmmün boyama Solüsyonları**

- Yıkama solüsyonu 1X DPBS-T: Solüsyon, 1X DPBS-T içerisinde %0,1 Triton-X 100 olacak şekilde hazırlanmıştır.
- Bloklama solüsyonu: Solüsyon, 1X DPBS-T içerisinde %2 BSA olacak şekilde hazırlanmıştır.
- Hoechst 33258 boyası: Boya, 1X DPBS içerisinde 1/10.000 oranında Hoechst 33258 eklenerek hazırlanmıştır.

#### **9.5. Birlikte Çöktürme (CO-IP) Solüsyonları**

- Yıkama solüsyonu: 1X DPBS içersine %0.02 Tween20 eklenerek hazırlanmıştır.

- Elüsyon solüsyonu: Tek bir örnek için 29µL 3X SDS yükleme tamponu içerisine 1µL 30X DTT eklenerek hazırlanmıştır.

## 9.6. Bakteriyel Suşlar

Bu tez çalışmasında, bakteriyel suş olarak Escherichia Coli (E.coli) DH5α kullanılmıştır.

## 9.7. Mikrobiyoloji Solüsyonları

- LB Besiyeri: 400 mL ddH<sub>2</sub>O içerisinde 4 g Pepton, 2 g Maya ekstraktı ve 4 g NaCl çözülerek otoklavlanmıştır.
- Agar Besiyeri: 400 mL ddH<sub>2</sub>O içerisinde 4 g Pepton, 2 g Maya ekstraktı, 4 g NaCl ve 6 g Bacto agar çözülerek otoklavlanmıştır.
- %80 Gliserol solüsyonu: Stok solüsyon 20 mL ddH<sub>2</sub>O içerisine 80 mL %100 gliserol eklenerek otoklavlanmıştır.
- 0.5 M PIPES pH 6.7 solüsyonu: 100 mL ddH<sub>2</sub>O içerisinde 15.1 g PIPES çözülerek 5M KOH ile pH 6.7 değerine ayarlanmış ve filtreden geçirilerek hazırlanmıştır.
- Inoue Ultra Competent Hücre solüsyonu: 1L ddH<sub>2</sub>O içerisinde 20 mL 0.5 M PIPES (pH 6.7), 10.88 g MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 2.2g CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O ve 18.65 g KCl eklenmiş ve filtreden geçirilerek hazırlanmıştır.
- Ampicillin ve Kanamycin: 100 mg/mL Ampicillin ve 50 mg/mL Kanamycin stok solüsyonları ddH<sub>2</sub>O içerisinde çözülüp filtre edilerek hazırlanmıştır. Deneyde her birinden 100 ug/mL kullanılmıştır.

## 9.8. Diğer Tampon ve Solüsyonlar

- Polyethylenimine (PEI) (1µg/µL): 50 mg PEI 50 ml dH<sub>2</sub>O içerisinde çözülerek 80 °C'de ısıtılmış ardından oda sıcaklığında soğuması beklenip 7.0 pH değerine ayarlanarak filtre ile steril edilmiş ve stok çözelti -20 °C'de saklanmıştır.

## 9.9. Kimyasal Malzemeler

Deneyler sırasında kullanılan kimyasallar, markaları ve katalog numaraları aşağıdaki Tablo 9.3'te yer almaktadır.

**Tablo 9.3:** Kullanılan kimyasal malzemeler.

| KİMYASAL ADI                | MARKASI           | KATALOG NO  |
|-----------------------------|-------------------|-------------|
| 2-Mercaptoethanol           | Sigma Aldrich     | M6250       |
| 50X Proteaz İnhibitörü      | Roche             | 11873580001 |
| BSA                         | Sigma Aldrich     | 7906        |
| DMEM                        | Gibco             | 41966       |
| DMSO                        | Fisher Scientific | BP231-1     |
| DPBS                        | Gibco             | 14190       |
| Dynabeads Protein G         | Life Technologies | 10004D      |
| FBS                         | Gibco             | 26140-111   |
| Glycine                     | MP Biomedicals    | 808822      |
| Hoechst                     | Thermo Scientific | 33258       |
| Methanol                    | EMD Millipore     | 1.06009     |
| Mowiol® 4-88                | Sigma Aldrich     | 81381       |
| Nucleobond Xtra Midi / Maxi | Macherey-Nagel    | 740420.50   |
| NP-40                       | Applichem         | A1694,0250  |
| Süt Tozu                    | Applichem         | AB0830,0500 |
| TEMED                       | Sigma Aldrich     | T9281       |
| PEI                         | Polysciences      | 23966       |
| Penicillin/Streptomycin     | Gibco             | 15140-122   |

**Tablo 9.3:** Kullanılan kimyasal malzemeler devam.

|                         |                   |          |
|-------------------------|-------------------|----------|
| Protein Ladder          | Thermo Scientific | 26616    |
| SDS Running Tampon      | Biorad            | 161-0732 |
| Tergitol Solution       | Sigma Aldrich     | NP40S    |
| Trizma Base             | Sigma Aldrich     | T6066    |
| Tyripsin-EDTA           | Gibco             | 15400054 |
| Tween20                 | Sigma Aldrich     | P1379    |
| Qubit Protein Assay Kit | Thermofisher      | Q33212   |

## 9.10. Kullanılan Cihazlar

Deneyler sırasında kullanılan cihazlar, markaları ve model numaraları aşağıdaki Tablo 9.4'te yer almaktadır.

**Tablo 9.4:** Kullanılan cihazlar.

| CİHAZIN ADI                  | MARKASI    | MODELİ        |
|------------------------------|------------|---------------|
| Buzdolabı                    | Bosch      | -             |
| Chemi Doc XRS+               | Biorad     | 721BR04545    |
| CO <sub>2</sub> İnkübatör    | Heal Force | Smart Cell    |
| Çalkalayıcı                  | Labnet     | ROCKER 25     |
| Döndürücü                    | Biosan     | RS-60         |
| Hassas Terazı                | ADAM       | PGW 253i      |
| Hücre görüntüleme mikroskobu | Leica      | DMI8          |
| Hücre Kültürü Kabini         | Cryste     | Puricube 1200 |
| Isı bloğu                    | Benchmark  | BSH1002-E     |

**Tablo 9.4:** Kullanılan cihazlar devam.

|                                 |                |                            |
|---------------------------------|----------------|----------------------------|
| İmmunoblot görüntüleme cihazı   | BIO-RAD        | ChemiDoc XRS+              |
| İmmunoblot ekipmanları          | BIO-RAD        | Mini-PROTEAN Tetra Systems |
| Konfokal Mikroskobu             | Zeiss          | LSM 880                    |
| NanoDrop                        | Shimadzu       | BiospecNano                |
| Otoklav                         | Priorclave     | -                          |
| pH metre                        | Mettler Toledo | S220                       |
| Sıvı Nitrojen Tankı             | Taylor Wharton | LS4800                     |
| Soğutmalı santrifüj (eppendorf) | HITACHI        | CT-15R                     |
| Soğutmalı santrifüj (falkon)    | NÜVE           | NF-1200R                   |
| Su banyosu                      | Wisd           | Wisebath                   |
| Qubit                           | Thermofisher   | 4 Fluorometer              |
| Vortex                          | SCIOLOGEX      | MX-S                       |

### 9.11. Kullanılan Antikorlar

Deneyler sırasında kullanılan antikorlar ve kullanılma oranları aşağıdaki Tablo.9.5'te yer almaktadır.

**Tablo 9.5:** Kullanılan antikorlar.

| ANTİKOR ADI                | FİRMA ADI           | KATALOG NO | ORAN   |
|----------------------------|---------------------|------------|--------|
| CCDC124 Polyclonal         | Bethyl Laboratories | A301-834A  | 1/200  |
| Anti-DDDDK tag             | Abcam               | Ab18230    | 1/1000 |
| Anti-HA tag                | Abcam               | Ab137838   | 1/1000 |
| Alexa Fluor® 594 Conjugate | Cell Signaling      | #8890      | 1/500  |

**Tablo 9.5:** Kullanılan antikorlar devamı.

|                                                    |                           |         |       |
|----------------------------------------------------|---------------------------|---------|-------|
| Alexa Fluor® 488 Conjugate                         | Cell Signaling Technology | #4412   | 1/500 |
| Anti-Nucleophosmin                                 | Abcam                     | AB40696 | 1/150 |
| Anti-Nucleolin                                     | ABCAM                     | AB70493 | 1/150 |
| HRP- conjugated anti-rabbit IgG Secondary Antibody | Cell Signaling            | 7074P2  | 1/500 |
| HRP-conjugated anti-Mouse IgG Secondary Antibody   | Cell Signaling            | 7076S   | 1/500 |
| Monoclonal Anti-Vinculin                           | Sigma                     | V9131   | 1/200 |
| Anti-GFP                                           | Cell Signaling            | #2555   | 1/200 |

## 9.12. Kullanılan Vektörler

Deneyler sırasında kullanılan vektörler ve temin edilen firma bilgileri aşağıdaki Tablo.9.6’da yer almaktadır.

**Tablo 9.6:** Kullanılan vektörler.

| VEKTÖR ADI              | FİRMA ADI                             |
|-------------------------|---------------------------------------|
| pEGFP-N2                | Clontech Laborated                    |
| pcDNA4/TO/Myc/His A,B,C | İnvitrogen / Thermo Fisher Scientific |
| pCDNA4/Myc-HisB         | Addgene                               |
| p3xFlag-CMV10           | Sigma Aldrich                         |
| pCCDC124-GFP            | Telkoparan vd, 2013                   |
| pS122A-GFP              | Güllülü, 2017                         |

**Tablo 9.6:** Kullanılan vektörler devam.

|             |                     |
|-------------|---------------------|
| pS141A-GFP  | Güllülü, 2017       |
| pS-DM-A-GFP | Güllülü, 2017       |
| pCCDC124-HA | Telkoparan vd, 2013 |
| pS122A-HA   | Telkoparan vd, 2013 |
| pS141A-HA   | Telkoparan vd, 2013 |
| pS-DM-A-HA  | Güllülü, 2017       |
| Pmex-HA     | Addgene             |

## **10. METOT**

### **10.1. LC-MS/MS Proteomik Analizler**

Daha önce yapılan çalışmalarda; 3xFlag-CMV 14 ifade vektöründe kararlı N-terminali ve C-terminali -Flag etiketli Ccdc124 yapıları Hek hücrelerinde stabil hale getirilmiş ve Flag bağlı boncuklar yardımıyla çöktürüldükten sonra lizatlar, Kütle spektrometreye uygun hale gelmesi için filtre destekli numune hazırlama yöntemi (FASP) ile hazırlanmıştır. Proteomik analizler SILAC yöntemi ile gerçekleştirilerek Ccdc124 proteininin etkileşim partnerleri aydınlatılmıştır. Bu partnerler içerisinde çekirdekçikte bulunan Nükleolin ve Nükleofosmin proteinleri ile Ccdc124 etkileşiminin validasyonu ve işlevsel ilişkisinin araştırılması bu tez çalışmasının konusunu oluşturmuştur.

### **10.2. Hücre Kültürü**

#### **10.2.1. Hücre Kültürü Ortamı**

HEK293T ve U2OS hücre hatları yüksek glikozlu besiyeri (%10 FBS ve %1 penisilin/streptomisin) ortamında kültüre edilerek, 37°C sıcaklık ve %5 CO<sub>2</sub> koşulu sağlayan inkübatörde büyütülmüştür. Hücrelerinin besiyerleri 3 gün aralılarla taze besiyeri ile değiştirilmiş ve hücrelerin yoğunluğu %70-80'e geldiğinde kültüre edilmişlerdir.

#### **10.2.2. Hücrelerin Kültürlenmesi ve Saklanması**

Hücreleri kültüre ederken besiyerleri uzaklaştırılarak 1X DPBS ile yıkama yapılmıştır. Yıkamanın ardından hücre-hücre/ hücre-yüzey bağlantılarını koparmak için 1ml 1X tripsin ilave edilerek 1-2 dk boyunca inkübatörde bekletilmiştir. Tripsin etkisinin durması için ortama besiyeri eklenerek hücreler pipet yardımıyla falkon içerisine toplanarak 1500 rpm'de 5dk boyunca santrifüj edilmiştir. Falkonun dibinde biriken hücreler üst sıvı uzaklaştırılarak taze besiyeri ile homojenize edilmiştir. Toplanan hücrelerden ¼ oranında yeni petriye ekilerek inkübasyona bırakılmıştır. Hücreleri sıvı azot içerisinde dondurmak için; toplanan hücreler santrifüj edilip üst sıvı uzaklaştırıldıktan sonra dondurma besiyeri ile hızlı bir şekilde homojenize

edilerek kriyotüplere aktarılmıştır. Hazırlanan tüpler önce -80°C’de 1 hafta, daha sonra sıvı azot içerisine alınarak saklanmıştır.

### **10.2.3. Stok Hücrelerin Açılması**

Sıvı azot tankından alınan kriyotüp, 1-2 dk 37°C’ye ayarlı su banyosunda tutularak donmuş hücrelerin çözülmesi beklenir. Taze besiyeri ile kriyotüp içerisindeki hücreler, falkona alınarak 1500 rpm’de 5 dk santrifüj edilerek çöktürülür. Üst sıvı atıldıktan sonra pelet taze besiyeri ile homojen olarak çözülüp flask içerisine ekilir.

### **10.2.4. Hücrelerin Sayımı ve Canlılık Tespiti**

Hücre sayısını hesaplamak için hücreler ve tripan mavisi 1: 1 oranında karıştırılır ve bir thoma sayma odasına 10 µl numune yüklenir. Hücreler mikroskop altında sayılıp ve canlılıkları yüzde olarak hesaplanır. Hücre zarı hasarı olmayan canlı hücreler renksiz kalırken, ölü hücreler bozulmuş zar bütünlüğü nedeniyle hücreye boya alarak boyanır. Bu nedenle canlı hücreler parlak görünürken, ölü hücreler mikroskop altında mavi olarak gözlenir [Crowley et al., 2016].

## **10.3. Transfeksiyon**

Bu tez çalışmasında transfeksiyon kolaylığı sebebiyle HEK 293T hücreleri için PEI reaktifi kullanılırken; transfeksiyonu Hek 293T hücrelerine göre kısmen zor olan U2OS hücreleri için JetPRIME reaktifi kullanılmıştır.

### **10.3.1. PEI Reaktifi ile Transfeksiyon**

HEK 293T hücreleri petri kabına ekilerek yoğunlukları %70-80 olacak şekilde 24 saat inkübe edilmiştir. Ertesi gün serum içermeyen besiyerine transfekte edilecek DNA plazmiti eklenerek oda sıcaklığında 2-3 dk bekletilmiştir. Ardından içerisine 3:1 oranında PEI reaktif eklenerek 20 dk boyunca oda sıcaklığında tutulmuştur. Bu sırada hücreler inkübatörden alınarak besiyerleri uzaklaştırılmış ve serumsuz besiyer eklenmiştir. Süre sonunda DNA-PEI karışımı damla damla hücrelerin üzerine verilerek 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün hücrelerin serumsuz besiyeri çektilirerek serum içeren taze besiyer konulmuş ve tekrar 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonlar sonrası hücreler toplanarak immunoblot çalışmaları için

lizat alınmıştır. Deneylerde kullanılan PEI transfeksiyon miktarları aşağıdaki Tablo 10.1’de verilmiştir.

**Tablo 10.1:** PEI transfeksiyon miktarları.

| PETRİ BOYUTU | HÜCRE SAYISI       | DNA PLAZMIT MİKTARI | PEI MİKTARI | TOPLAM BESİYERİ |
|--------------|--------------------|---------------------|-------------|-----------------|
| 6-kuyu petri | 2. 10 <sup>5</sup> | 3 µg                | 9 µL        | 2 mL            |
| 15 cm petri  | 3. 10 <sup>6</sup> | 10 µg               | 30 µL       | 20 mL           |

### 10.3.2. JetPRIME Reaktifi ile Transfeksiyon

U2OS hücreleri petri kabına ekilerek yoğunlukları %70-80 olacak şekilde 24 saat inkübe edilmiştir. Ertesi gün JetPRIME tamponu içerisine transfekte edilecek DNA plazmiti eklenerek oda sıcaklığında 2-3 dk bekletilmiştir. Ardından içerisine JetPRIME reaktifi eklenerek 10 dk boyunca oda sıcaklığında karanlıkta tutulmuştur. Bu sırada hücreler inkübatörden alınarak besiyerleri uzaklaştırılmış ve taze besiyer eklenmiştir. Süre sonunda DNA-JetPRIME karışımı damla damla hücrelerin üzerine verilerek 4 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda hücrelerin besiyeri çektirilerek serum içeren taze besiyer konulmuş ve 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonlar sonrası hücreler immün boyama çalışmaları için kullanılmıştır. Deneylerde kullanılan JetPRIME transfeksiyon miktarları aşağıdaki Tablo 10.2’de verilmiştir.

**Tablo 10.2:** JetPRIME transfeksiyon miktarları.

| PETRİ BOYUTU | HÜCRE SAYISI       | PLAZMIT MİKTARI | TAMPON MİKTARI | JetPRIME MİKTARI | TOPLAM BESİYERİ |
|--------------|--------------------|-----------------|----------------|------------------|-----------------|
| 10 cm petri  | 1 .10 <sup>6</sup> | 7 µg            | 500 µL         | 20 µL            | 10 mL           |

## 10.4. Doksorubisin Uygulaması

Hücreler üzerinde geçici olarak genotoksik stres oluşturmak amacıyla, Cdc124 proteini stabil olarak eksprese eden U2OS hücre hatlarının doksorubisin uygulanmıştır. İlaç inkübasyonu için; taze besiyeri içerisine son konsantrasyonu 2 uM olacak şekilde doksorubisin ilave edilmiş ve pipetlenerek ilacın homojenizasyonu sağlanmıştır. Daha sonra hücrelerin besiyerleri çektilirerek doksorubisin içeren besiyeri hücre üzerine konulmuştur. Hücreler 2 saat boyunca inkübe edildikten sonra ilaç içeren besiyerleri çektilirilmiş ve taze besiyeri eklenmiştir. Hücreler bu şekilde 36 saat inkübatöre konulmuş süre sonunda immün boyama çalışmaları için kullanılmıştır.

### 10.4.1. İmmün Boyama Deneyi

Hücreler içerisine steril lamel konulan 12-kuyulu petriye ekilmiştir. Daha sonra ilaç uygulaması yapılmış/yapılmamış hücreler 1X DPBS ile 2 defa yıkanarak, %4 paraformaldehit ile 20 dk oda sıcaklığında hücrelerin fikse olması için inkübe edilmiştir. Ardından 3'er kez 5'er dk boyunca yıkama solüsyonu ile yıkanmış ve 1 saat boyunca oda sıcaklığında bloklama solüsyonu ile çalkalanmaya bırakılmıştır. Süre sonunda solüsyon hücreler üzerinden uzaklaştırılarak taze bloklama solüsyonu içine 1/200 oranında primer antikor eklenerek hücreler 1 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Antikor solüsyonu uzaklaştırıldıktan sonra 3'er kez 5'er dk boyunca yıkama solüsyonu ile yıkanan hücrelerin üzerine taze hazırlanan bloklama solüsyonu içerisine 1/500 oranında ikincil antikor konularak ilave edilmiş ve 1 saat süresince hücreler inkübasyona bırakılmıştır. İkincil antikor inkübasyonu sonrası 3'er kez 5'er dk yıkama solüsyonu ile hücreler yıkandıktan sonra 15 dk oda sıcaklığında 1/10.000 oranında Hoechst solüsyonu ile çalkalanmaya bırakılmıştır. Süre sonunda hücreler 2'şer kez 10'ar dk dH<sub>2</sub>O ile yıkanarak Mowiol kapama solüsyonu kullanılarak lam üzerine kapatılmıştır.

## 10.5. İmmunoblot Deneyi

Tablo 9.1 ve Tablo 9.2'deki oranlar esas alınarak %12'lik yürütme jeli ve üzerine %4'lük ayırma jeli hazırlanmış ve onluk tarak yerleştirilerek jellerin donması beklenmiştir. Hücreler bulundukları petri kabından 1X DPBS ile hücre kazıyıcı kullanılarak falkona toplanmış ve 5 dk 1500 rpm'de santrifüj edilerek hücrelerin çökmesi sağlanmıştır. Üst sıvı atılarak pellet üzerine protease inhibitör içeren liziz tamponu eklenerek 30 dk boyunca buzda inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre içinde 10 dk'd bir 5'er dk tüpler vortekslenmiştir. İnkübasyon sonrası falkonlar 30 on 30 off toplam 8 döngü, %40 vuruş hızı olacak şekilde sonikasyona konulmuştur. Hücre debrislerinden kurtulmak için lizatlar +4 °C'de 15000 rpm'de 30 dk santfij edilmiş, üst sıvı toplanarak lizat olarak kullanılmıştır. Lizat içersindeki protein konsantrasyonu *Qubit Protein Assay Kit* kullanarak belirlenmiştir. Belirlenen miktar lizat, ayrı bir ependorfa alınarak üzerine 1X DTT içeren 3X SDS örnek tamponu konularak 95 °C'de 5 dk proteinlerin denatüresi sağlanmıştır. Ardından 1X yürütme tampionunda proteinler yürütülerek *Transfer Blot* cihazında 1X transfer tampionu içerisinde PVDF membrana aktarılmıştır. Transfer sonrası gece boyu bloklama solüsyonunda +4°C'de membran çalkalanmaya bırakılmıştır. Bloklama ardından 2 saat boyunca taze bloklama solüsyonu içerisindeki birincil antikor ile çalkalanmaya bırakılmıştır. Süre sonunda 3'er kez 10'ar dk boyunca 1X TBS-T solüsyonu ile yıkanarak taze bloklama solüsyonu içerisinde ikincil antikor ile 1 saat boyunca çalkalanarak inkübe edilmiştir. Uygulama sonrası tekrar sonunda 3'er kez 10'ar dk boyunca 1X TBS-T solüsyonu ile yıkanmış ve ECL solüsyonu ile membranın görüntüsü *ChemiDoc* cihazında alınmıştır.

## 10.6. Birlikte Çöktürme (CO-IP) Deneyi

Deney için kullanılan Dynabeads Protein G (Life Technologies 10004D) manyetik boncuk tüpü +4°C'den alınarak homojen hale gelene kadar oda sıcaklığında yavaşça çalkalanmıştır. Elde edilen her bir lizat için 50 µL Dynabead kullanılmıştır. Dynabeadler ependorfa konularak boncuklar ile sıvının ayrılmasını sağlayan manyetik ayırıcıya yerleştirilmiştir. Boncuklar kalacak şekilde sıvı yavaşça pipet yardımıyla uzaklaştırılmıştır. Ependorflar manyetik ayırıcıdan alınarak, boncuklar 2'şer kez 1X DPBS ile yıkanmıştır. Her yıkamada ependorflar manyetik ayırıcıya yerleştirilerek sıvı uzaklaştırılmıştır. Boncuklara bağlanmasını istenen antikor CO-IP

yıkama tamponu içerisinde taze hazırlanarak boncukların üzerine konulmuştur. Boncuklar 2 saat boyunca oda sıcaklığında çalkalanmaya bırakılmıştır. Süre sonunda antikor içeren boncuk karışımı manyetik ayırıcıya yerleştirilerek sıvı uzaklaştırılır ve hücrelerden alınan lizat boncukların üzerine eklenerek gece boyu +4°C’de yavaşça döndürülmeye bırakılmıştır. Ertesi gün lizat içeren boncuklar manyetik karıştırıcıya yerleştirilerek sıvı bağlanmayan proteinlerin göstergesi olarak ayrı bir yerde toplanmıştır. Boncuklar 3’er kez CO-IP yıkama tamponu ile yıkanmıştır. Son yıkamadan sonra boncuklar yeni bir ependorfa alınarak üzerlerine 30µL CO-IP elüsyon tamponu eklenerek 70°C’de 10 dk boyunca denatüre edilmiştir. Aynı işlem kontrol olarak kullanılacak olan lizat için de yapılmıştır. Süre sonunda boncuklar manyetik karıştırıcıya yerleştirilerek sıvı toplanarak kontrollerle birlikte SDS-PAGE için jele yüklenmiştir.

## **10.7. Protein Konsantrasyon Tayini**

Deneyde kullanılan hücre lizatlarının konsantrasyonu *Qubit Protein Assay Kit* kullanılarak Qubit 4 Fluorometer cihazında ölçülmüştür.

## **10.8. Bakteri Kültürü**

Bakteri hücresi olan E. coli DH5α suşu LB içerisinde 37 °C’de, 250 rpm’de yaklaşık 16 saat boyunca çalkalanmaya bırakılmıştır. Ertesi gün bu hücreler, tek koloni olacak şekilde LB agar üzerine ekilerek gece boyu 37 °C’de çalkalanmadan büyütülmüştür. Deneyde kullanılacak olan antibiyotik besiy ortamına eklenmiştir.

### **10.9.1. Ultra Kompetan Hücre Hazırlanışı**

Stokta bulunan E.coli DH5α bakterilerinden ön kültür yapılmak üzere 50 µL alınarak 5 mL önceden hazırlanıp otoklavlanmış LB içerisine konularak gece boyu 37°C’de çalkalanmaya bırakılmıştır. Ertesi gün büyüyen ön kültür bakterilerinden alınarak 250 mL LB içerisine aktararak aşılama yapılmıştır. Aktarılan ön kültür miktarı toplam miktarın %1’ini geçmeyecek şekilde aktarılmıştır. Yaklaşık 50-60 dakika aralıklarla çalkalanan kültürden bir miktar alınarak 600 OD’de ölçülmüş ve OD değeri 0.55’e ulaştığında bakteri kültürü alınarak 4000 rpm’de +4°C’de 10 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası üst sıvı atılarak bakteri peleti üzerine soğuk Inoue Kompetan Hücre tamponundan 80 µL ilave edilerek homojenize edilmiş ve

tekrar santrifüj yapılmıştır. Çöken bakteri peleti 20 mL Inoue Kompetan Hücre tamponu ile çözülüp üzerine 1.5 mL DMSO ilave edilmiştir. Bu karışım 10 dk boyunca buzda bekletilmiştir. Ardından karışım ependorflara dağıtılarak kısa süreli sıvı azota daldırılıp -80°C’de saklanmıştır.

### **10.9.2. Bakterilerin Saklanması**

Stok bakteriler gliserol kullanılarak saklanmıştır. Katı agar petride koloni oluşturduktan sonra tek bir koloni alınarak LB içinde büyütülmüştür. Büyüyen bakterilerden 625 µL içerisine 375 µL %80 gliserol eklenerek -80°C’de saklanmıştır.

### **10.9.3. Transformasyon**

-80°C’den alınan 150 µL ultra kompetan bakteri hücreleri eridikten sonra üzerlerine 20 ug plazmit DNA eklenerek karıştırılmıştır. Bu karışım yaklaşık 30 dakika boyunca buz üzerinde bekletildikten sonra 42°C’de 2 dakika ısı şokunun ardından 3 dakika tekrar buza alınmıştır. Ardından üzerine 800 µL LB konularak 37°C’de 1 saat süresince çalkalanmaya bırakılmıştır. Süre sonunda 10.000 rpm’de 2 dakika santrifüj edilmiş çöken pelet az miktar LB ile homojen hale getirilip katı agar besiyeri içeren petriye yaydırılmıştır. Petriler 37°C’de gece boyu çalkalanmadan inkübe edilmiştir. Ertesi gün plazmit içeren koloniler plazmit izolasyonu yapmak üzere seçilmiştir.

## **10.9. Plazmit DNA İzolasyonu**

Plazmit DNA izolasyonu için *Nucleobond Xtra Midi / Maxi* kiti kullanılmıştır.

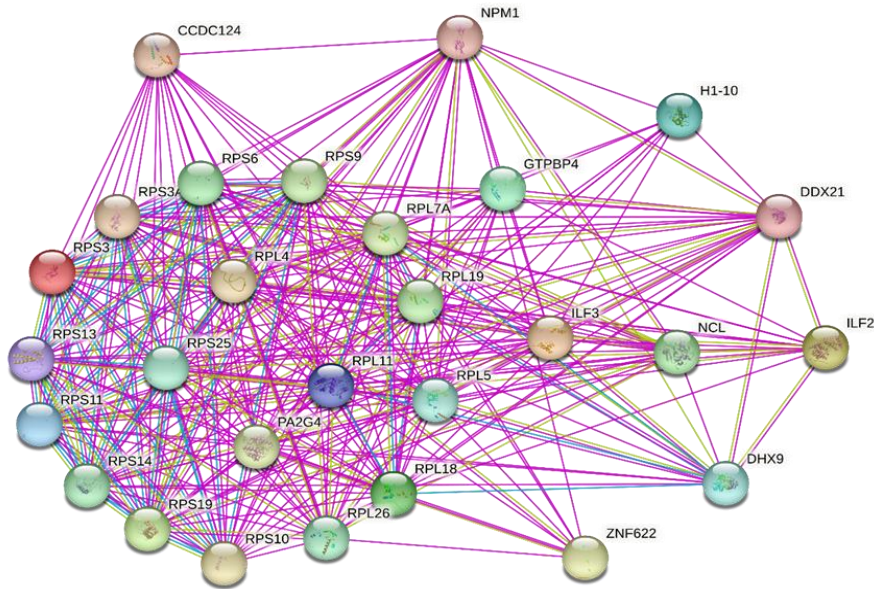
## **10.10. Plazmit DNA Konsantrasyon Tayini**

İzolasyonları yapılan plazmit DNA konsantrasyonları ve saflıkları *NanoDrop* cihazında ölçülmüştür.

## 11. SONUÇLAR

### 11.1. Proteomik Analiz Sonuçları

Daha önce Telkoparan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda; kararlı izotop etiketlemesiyle Ccdc124 interaktomu oluşturulmuş ve afinite saflaştırmasına bağlı kantitatif proteomik yöntemler uygulanmıştır. HEK293 hücreleri kullanılarak yapılan Flag etiketleme deneyi sonucu stabil olarak Flag-Ccdc124 eksprese eden hücrelerden proteinin olası etkileşim ortakları analiz edilmiş, yaklaşık 320 partner protein tanımlanmıştır. Bu tanımlanan proteinler arasında membransız organellerle ilişkili proteinler, RNA bağlayıcı proteinler, stres ve ısı şoku faktörleri, ribozom proteinleri gibi proteinler yer almaktadır. Bunlara ek olarak çekirdek lümeni ve çekirdekçik oluşumunda rol oynayan Nükleofosmin (Npm1), Nükleolin (Ncl), ve Nükleolar GTP bağlayıcı protein (Gtbp4) gibi çekirdek içerisinde bulunan faktörlerin Ccdc124 ile yüksek oranda etkileştiği görülmüştür [Telkoparan vd., 2013]. Yüksek oranda etkileşen proteinler STRING database kullanılarak etkileşim ağı oluşturulmuş ve Şekil 11.1’de gösterilmiştir. Etkileşen partnerler arasından kanser ve nörodejeneratif hastalıklarda kritik rollere sahip olduğu bilinen Npm1 ve Ncl proteinleri seçilerek validasyon deneyleri yapılmış, Ccdc124’ün bu proteinlerle etkileşiminin farklı koşullardaki dinamiği aydınlatılmıştır.

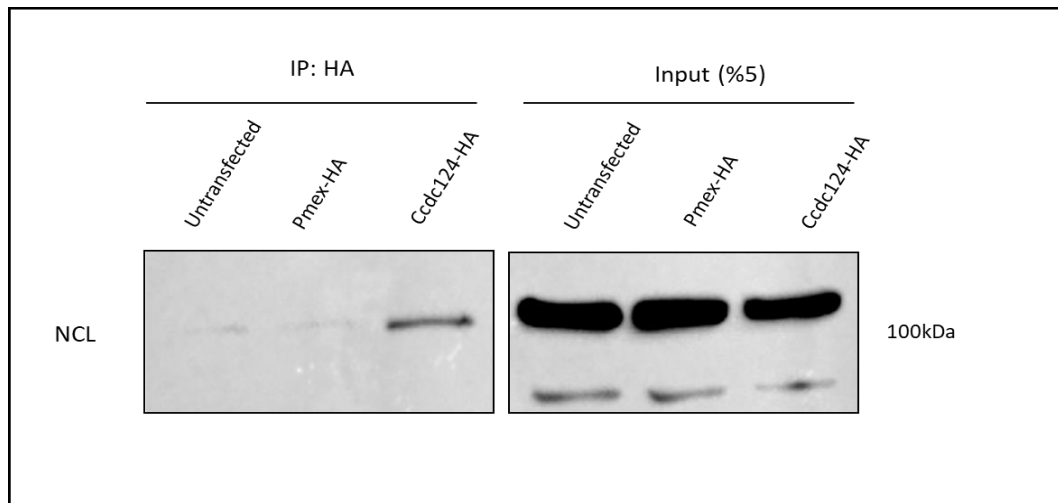


Şekil 11.1: Ccdc124 etkileşim partnerleri ağı (STRING Database).

## 11.2. Ccdc124-Ncl Etkileşimi

### 11.2.1. Co-IP Sonuçları

Memelilerde en fazla eksprese edilen çekirdekçik proteini Nükleolin (Ncl), nükleolar düzenleme bölgelerinin başlıca gümüş (Au) bağlayıcı bileşeni olmaktadır. Ayrıca DNA transkripsiyonu, replikasyonu ve onarımı için gerekli olan H2A-H2B dimerlerinin açılımını destekleyen Ncl, stres durumuna bağlı olarak RNA bağlama aktivitesine sahiptir [Scott and Oeffinger, 2016]. Daha önce yapılan proteomiks çalışmalarda Ncl'nin Ccdc124 ile partner aday ilişkisinin bulunması ve Ccdc124'ün çekirdek içi lokalizasyonunun aydınlatılması amacıyla yapılan birlikte çöktürme (Co-IP) deneyleri, Ncl ve Ccdc124'ün protein-protein etkileşimi açısından çekirdekçik içerisinde birlikteliklerini doğrulamaktadır. İlk olarak, geçici Ccdc124 eksprese eden HEK293T hücreleri oluşturulmuştur. C-ucunda HA etiketi bulunan *pCDNA4/Myc-HisB* iskeletine sahip Ccdc124-HA plazmiti ve kontrol plazmiti (Pmex-HA) PEI transfeksiyon ajanı kullanılarak hücrelere aktarılmıştır. Transfeksiyon sonunda hücreler toplanarak lizat alınmış ve *Dynabead* kullanılarak birlikte çöktürme (Co-IP) deneyi yapılmıştır. Çöktürülen proteinler PVDF membrana aktararak hücre içinde endojen olarak sentezlenen Ncl proteinini görüntülemek üzere membran anti-Nükleolin antikoru ile işaretlenmiştir. Ccdc124'ün Ncl ile etkileşimi Western Blot yöntemi ile gösterilmiştir. Membran üzerinde görülen Ncl bandının zayıflığı hücre doğal fizyolojik durumundayken Ccdc124 ile Ncl etkileşimini doğrulamakla birlikte etkileşim miktarının azlığını göstermektedir (Şekil 11.2).

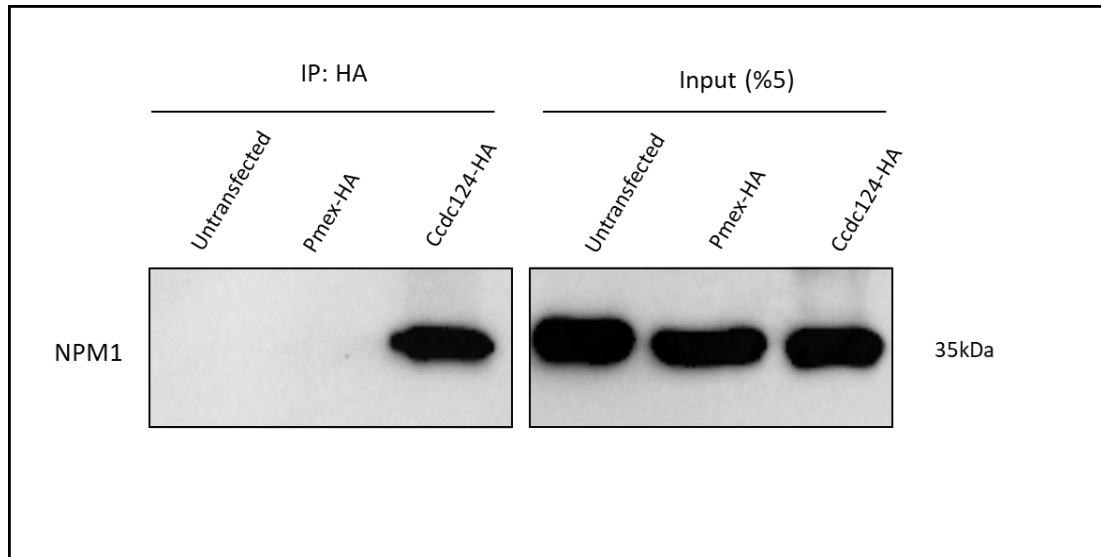


Şekil 11.2: Ccdc124-HA ile Ncl etkileşimin immünoiblot görüntüsü.

## 11.3. Ccdc124-Npm1 Etkileşimi

### 11.3.1. Ccdc124-HA ile Npm1 Co-IP Sonuçları

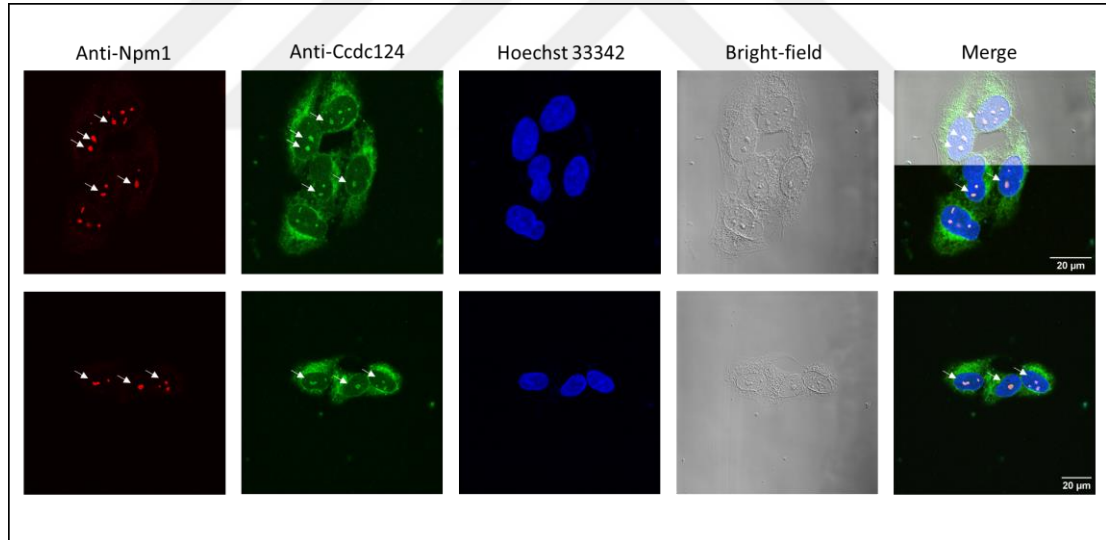
Çekirdekçik belirteci olan Npm1, nükleol ve sitoplazma arasında mekik hareketi yaptığı bilinen bir fosfoproteindir. Ribozom biyogeneğinde rol almakla birlikte nükleer lokalizasyon sinyalleri aracılığı ile proteinlere bağlanarak şaperon işlevi göstermektedir. Nörodejeneratif hastalıklarda ve kanserdeki rolü göz önüne alındığında hastalıkların tedavisine ışık tutmak amacıyla etkileşim partnerlerinin aydınlatılması önem kazanmaktadır. Buna istinaden yaptığımız çalışmalarda, Ccdc124'ün Npm1 ile olası etkileşimini aydınlatabilmek üzere HA etiketli Ccdc124 plazmiti (Ccdc124-HA) ve kontrol plazmit (Pmex-HA) Hek293T hücrelerine geçici olarak eksprese edilmesi için PEI transfeksiyon ajanı kullanılarak verilmiştir. Transfeksiyon sonrasında hücreler liziz tamponu ile parçalanarak protein içerikleri toplanmıştır. Daha sonra *Dynabead Protein G* kullanılarak lizatlar beadlere yüklenmiş ve birlikte çöktürme (Co-IP) deneyi gerçekleştirilmiştir. Çöktürülen proteinler jele yüklendikten sonra PVDF membrana aktarılarak hücre içinde endojen sentezlenen Npm1 proteinini görüntülemek üzere membran anti-Nükleofosmin antikoru ile işaretlenmiştir. Western blot deneylerinin sonucunda Npm1 proteinin Ccdc124 ile hücre doğal fizyolojik durumunda iken yüksek oranda etkileştiği görülmüştür (Şekil 11.3).



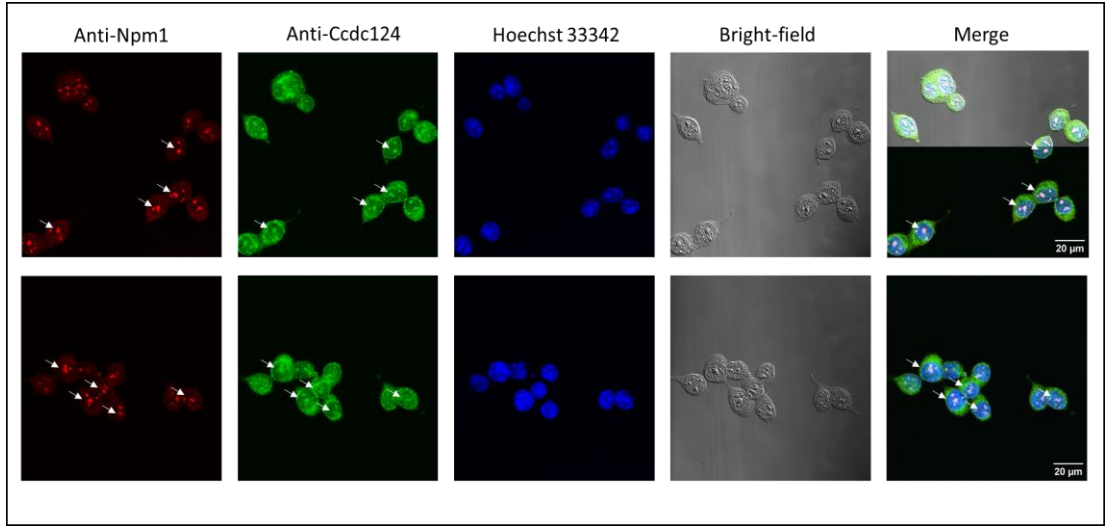
**Şekil 11.3:** Ccdc124-HA ile Npm1 etkileşimin immünoiblot görüntüsü.

### 11.3.2. Endojen Ccdc124 ile Npm1 İmmün Boyama Sonuçları

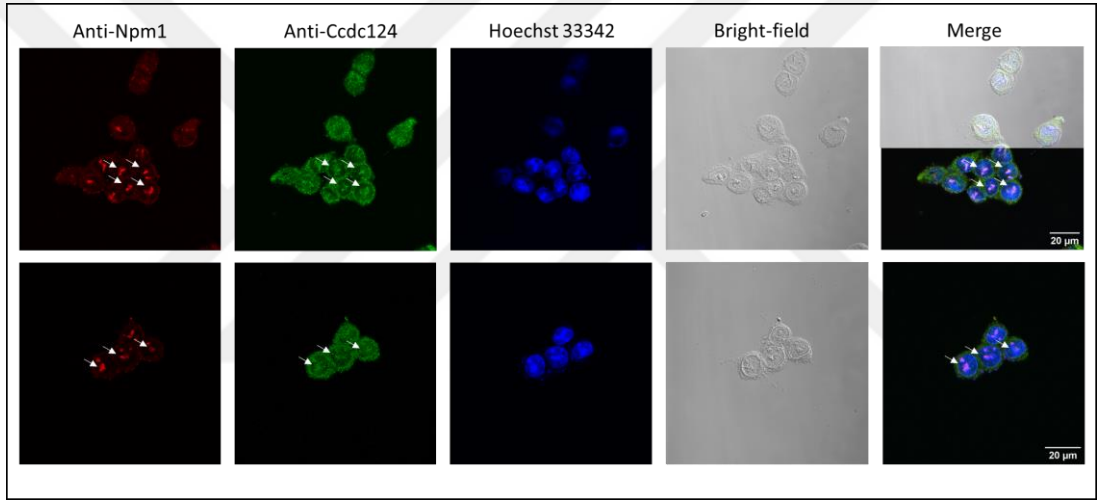
Ccdc124 proteininin hücre içindeki lokasyonunun tayini ve Npm1 ile olan etkileşimi immün boyama (IF) yöntemi uygulanarak analiz edilmiştir. Hücre içinde endojen olarak bulunan Ccdc124 ve Npm1 proteinlerinin immün boyama işlemi gerçekleştirilmek üzere, hücreler para-formaldehit ile fikse edildikten sonra birincil antikor olarak anti-Ccdc124 ve anti-Nükleofosmin; ikincil antikor olarak *Alexa Fluor 488* ve *Alexa Fluor 593* kullanılarak boyanmıştır. Hücrelerin görüntüleri Konfokal mikroskopunda 63x yağlı objektif kullanılarak alınmıştır. Bu proteinlerin etkileşimi, ilk olarak sitoplazma ve çekirdek büyüklüğü sebebiyle görüntüleme kolaylığı sağlayan U2OS hücrelerinde (Şekil 11.4), daha sonra ise bu durumun hücre hattı spesifik olup olmadığının kontrolü için Hek293T (Şekil 11.5) ve HCT116 hücrelerinde (Şekil 11.6) bakılmıştır. İmmün boyama sonuçlarına göre Ccdc124 proteininin her bir hücre hattında çekirdekçik içinde lokalize olduğu görülmüştür. Çekirdekçik içindeki lokalizasyonu belirlenen Ccdc124'ün ayrıca Npm1 proteini ile etkileşim içinde olduğu da yapılan deneylerle ortaya konmuştur.



**Şekil 11.4:** U2OS hücrelerinde Ccdc124-Npm1 immün boyama görüntüsü.



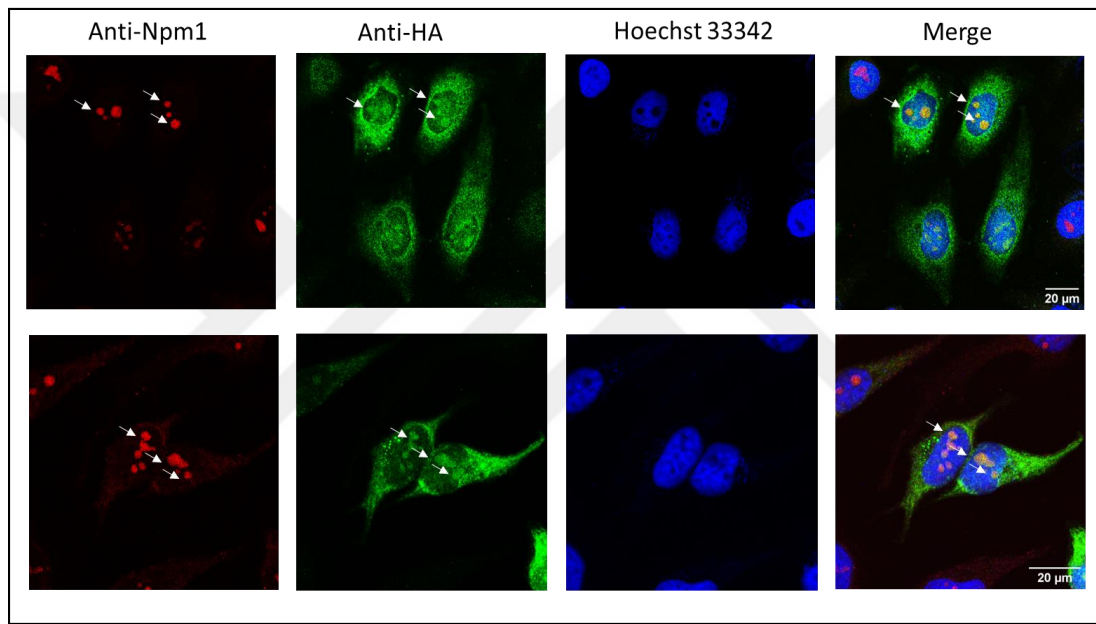
**Şekil 11.5:** 293T hücrelerinde Ccdc124-Npm1 immün boyama görüntüsü.



**Şekil 11.6:** Hct116 hücrelerinde Ccdc124-Npm1 immün boyama görüntüsü.

### 11.3.3. Ccdc124-HA ile Npm1 İmmün Boyama Sonuçları

Hek 293T hücrelerine C-ucunda HA etiketi bulunan Ccdc124 vektörünün PEI ajanı kullanılarak daha önce anlatıldığı gibi geçici olarak transfeksiyonu yapılmıştır. Transfeksiyondan 24 saat sonra hücrelerin besiyerleri çektirilmiş ve taze besiyer ile 24 saat daha bekletilmişlerdir. Süre sonunda hücreler para-formaldehit ile oda sıcaklığında 20 dakika fikse edildikten sonra anti-HA ve anti-Nükleofosmin antikorları ile işaretlenmiş, ikincil antikor olarak da Alexa fluor 488 ve Alexa Fluor 594 kullanılmıştır. Hücrelerin görüntüleri Konfokal mikraskobu ile alınmıştır (Şekil 11.7).



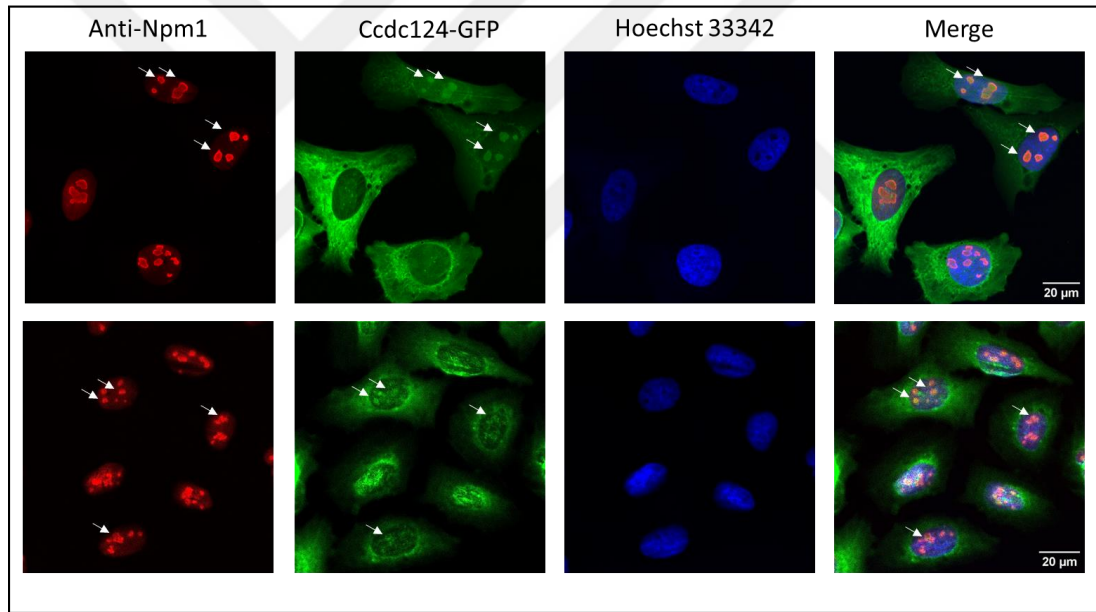
**Şekil 11.7:** Ccdc124-HA ile Npm1 etkileşimi immün boyama görüntüsü.

Deney sonuçları Npm1 ve Ccdc124'ün protein-protein etkileşimi doğrulamıştır. Proteinin endojen veya etiketli olma durumu hücrede Npm1 ile çekirdekçi içi birlikteliklerini etkilememiştir.

#### 11.3.4. Ccdc124-GFP ile Npm1 İmmün Boyama Sonuçları

Laboratuvarımızda daha önce yapılan çalışmalarda; stabil olarak C-ucu GFP etiketli Ccdc124 eksprese eden U2OS hücreleri hazırlanmıştır. Bu hücreler, CMV promotora sahip *PE GFP-N2* omurgasında bulunan Ccdc124-GFP geninin lentiviral sistemle hücrelere entegre edilmesiyle oluşturulmuştur.

Elimizde bulunan stabil Ccdc124-GFP eksprese eden U2OS hücreleri anti-Nükleofosmin antikoru ile boyanarak Ccdc124-Npm1 etkileşiminin antikör kaynaklı olup olmadığının kontrolü sağlanmıştır. Boyanan hücrelerin görüntüleri Konfokal mikroskobun Z-stack özelliği kullanılarak alınmıştır. İmmün boyama deneyi sonucunda (Şekil 11.8) hücrelerde stabil eksprese olan Ccdc124'ün Npm1 ile hücre içi lokalizasyon açısından çekirdekçik içerisindeki birliktelikleri doğrulanmıştır (beyaz oklar ile gösterilmiştir).



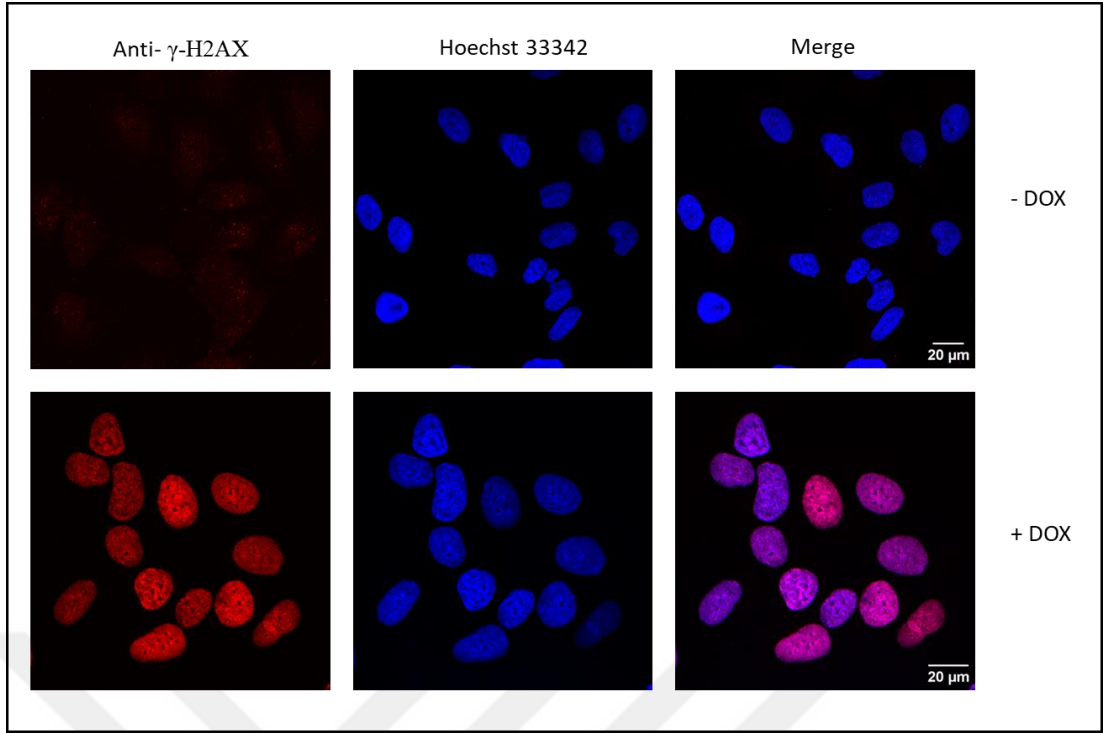
**Şekil 11.8:** Stabil Ccdc124-GFP ile Npm1 etkileşimi immün boyama görüntüsü.

## 11.4. DNA Hasarı Varlığında Ccdc124'ün Lokalizasyon Dinamiği

Adriamisin olarak da adlandırılan doksorubisin, antrasiklin bileşik sınıfına sahiptir. İlk olarak 1969 yılında *Streptomyces peucetius* bakterisinden elde edilmiştir. Doksorubisin, kendisi gibi bir antrasiklin olan daunorubisinin hidroksilasyonu ile oluşmaktadır ve bazı lösemi grupları, Hodgkin lenfoması, yumuşak doku sarkomu gibi birçok kanser çeşidinin tedavisinde anti-tümör ilaç olarak kullanılmaktadır [Yang et al., 2014]. DNA hasarı durumunda hücrelerde bol miktarda bulunan Npm1 proteini, strese yanıt olarak nükleoplazmaya geçiş yapmakta ve DNA hasarının onarımına doğrudan katılmaktadır [Scott and Oeffinger, 2016]. Npm1 etkileşimi doğrulanan Ccdc124 proteininin DNA hasar durumundaki davranışını belirlemek üzere immün boyama deneyleri yapılmıştır.

### 11.4.1. Hücrelerde DNA Hasar Oluşumu Kontrolü

Çalışmanın bu aşamasında, ilk olarak U2OS hücrelerinde DNA hasarı oluşturmak için kullanılacak ajanın miktarı ve süresi belirlenmiştir. Doksorubisin (Dox), 1  $\mu$ M, 1.5  $\mu$ M ve 2  $\mu$ M konsantrasyonda olacak şekilde 2 saat boyunca hücrelere uygulanarak DNA hasar oluşumlarının tetiklenmesi amaçlanmıştır. Bu tetiklenmenin kontrolü için ilaç uygulamasından 36 saat sonra hücreler para-formaldehit ile 20 dk boyunca oda sıcaklığında fikse edilmiştir. Fikse edilen hücrelerde DNA hasar oluşumu kontrol edebilmek üzere immün boyama deneyleri gerçekleştirilmiştir. DNA hasar belirteci olan  $\gamma$ -H2AX proteinin varlığı için anti-  $\gamma$ -H2AX antikoru ile hücrelerin işaretlenmesi yapılmıştır. Yapılan deneylerin sonuçlarına göre hücrelerde DNA hasarı oluşturmak için en ideal koşul 2  $\mu$ M konsantrasyondaki ilacın 2 saat tutularak hücrelerin 36 saat sonra fikse edilmesi ile elde edilmiştir (Şekil 11.9). Çalışmanın bundan sonraki tüm ilaç uygulama adımları bu koşullarda gerçekleştirilmiştir.

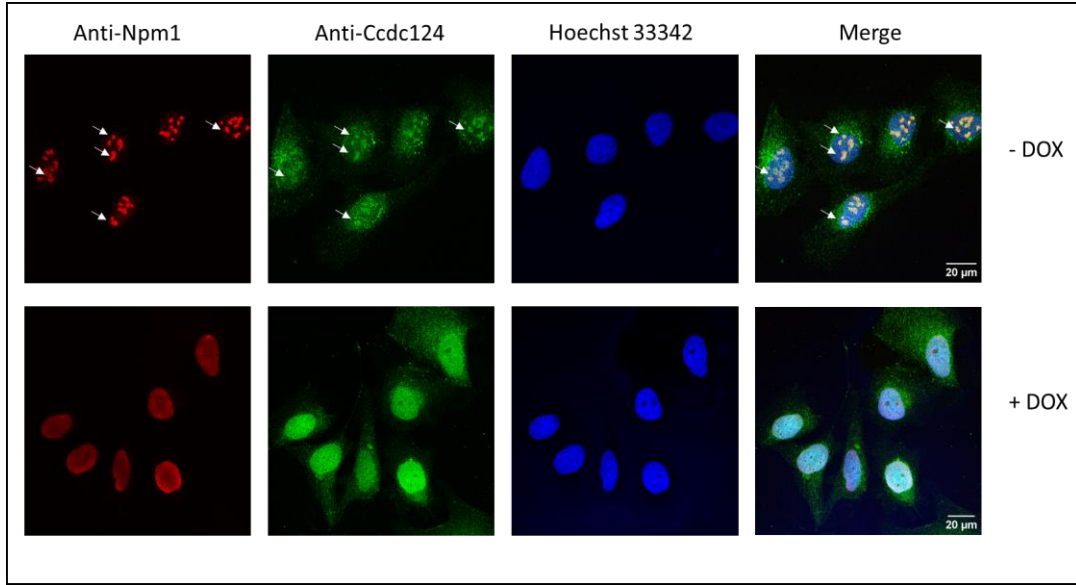


**Şekil 11.9:** U2OS hücrelerinde Dox uygulaması immün boyama kontrol görüntüsü.

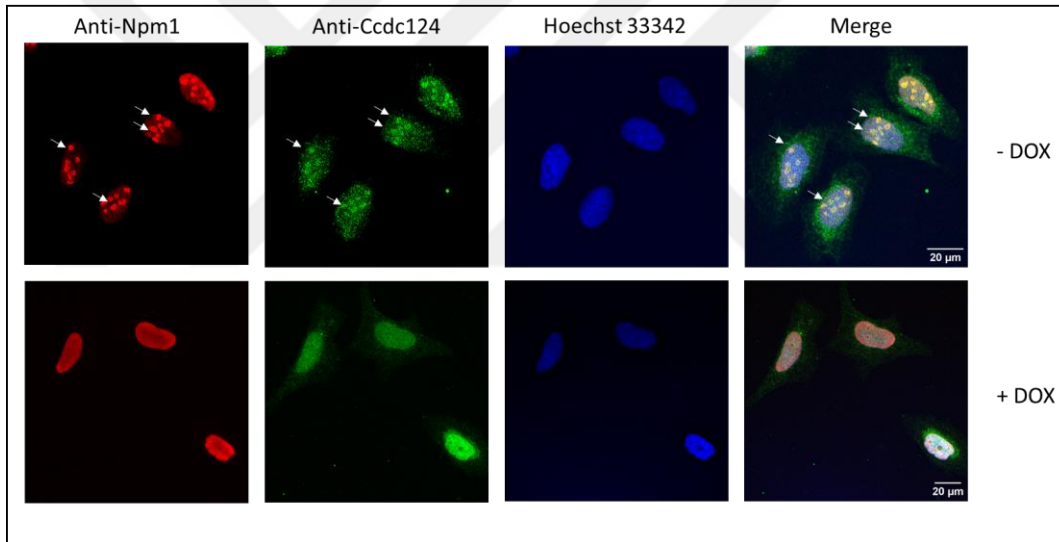
#### 11.4.2. DNA Hasar Durumunda Ccdc124'ün Lokalizasyonu

DNA hasarı onarımında doğrudan rol alan Npm1 proteini hücrede hasar oluştuğunda hasarlı bölgede lokalize olmaktadır. Hücrenin DNA'sında çift sarmallı kopmalar meydana geldiğinde, Npm1'in kromatin bağlama faktörü olarak görev almaktadır. Hücrenin normal koşullarında daha çok çekirdekçik içerisinde bulunan Npm1 DNA hasar durumunda çekirdekçığı terk ederek nükleoplazmaya geçmektedir.

Çekirdekçik proteinlerinden biri olduğunu gösterdiğimiz Ccdc124'ün hücredeki olası DNA hasar durumunda lokalizasyon dinamiğini aydınlatmak üzere; Dox varlığında/yokluğunda immün boyama deneyleri yapılmıştır. Hücrelerde DNA hasarı oluşturmak üzere ilaç uygulaması daha önce açıklanan koşullarda gerçekleştirilmiş ve hücreler para-formaldehit ile fikse edildikten sonra anti-Ccdc124 ve anti-Nükleofosmin antikorları ile işaretlenmişlerdir. Boyanan hücrelerin görüntüleri Konfokal mikroskobunun 63x yağlı objektifi ile Z-stack özelliği kullanılarak alınmıştır. Görüntüler analiz edildiğinde yapılan immün boyama deneyleri sonucu normal fizyolojik koşullarda çekirdekçik içinde bulunan Ccdc124'ün DNA hasarı durumunda çekirdekçikten çıktığı ve Npm1 benzeri davranış göstererek nükleoplazma içerisinde dağıldığı Şekil 11.10-11'da gözlenmiştir.



**Şekil 11.10:** U2OS hücrelerinde Dox varlığı/yokluğunda Ccdc124 ve Npm1 immün boyama görüntüleri-1.



**Şekil 11.11:** U2OS hücrelerinde Dox varlığı/yokluğunda Ccdc124 ve Npm1 immün boyama görüntüleri-2.

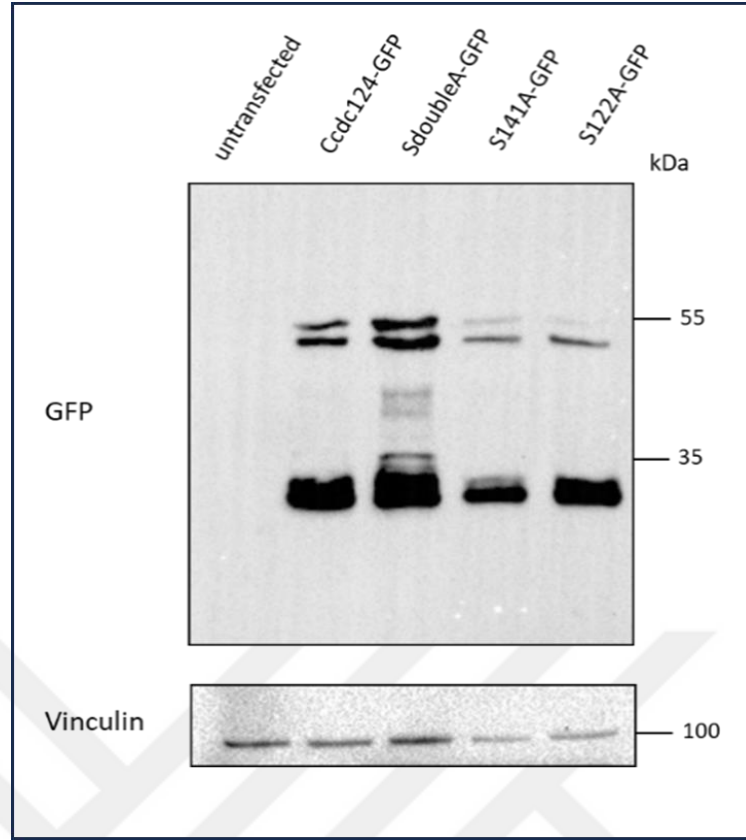
## **11.5. Ccdc124-WT, S122A, S141A, S122A/S141A (DM-A) Proteinlerin Lokalizasyon Tayini ve Npm1 ile Etkileşimleri**

Ccdc124'ün Kazein Kinaz II tarafından fosforlanan 122. ve Polo Kinaz I tarafından fosforlanan 141. Serin amino asit bölgeleri daha önceki çalışmalarda aydınlatılmıştır. Fosforillenmenin proteinin stabilitesine etkileri yine aynı çalışmada bölgelerin yönlendirilmiş mutagenesi yapılarak Alanin amino asidine dönüştürülmesi ile analiz edilmiştir. Oluşturulan HA etiketli vektörlerden Ccdc124-wt-HA, S141A-HA ve S-DM-A-HA benzer profil sergilemiş ancak S122A-HA vektöründe ccdc124 stabilitesi kaybolmuştur [Güllülü, 2017]. Etiket temelli degradasyon sebebi ile bu mutant proteinlerin GFP etiketli vektörleri U2OS hücre hattında stabil olarak ekspresye olacak şekilde önceki çalışmada hazırlanmıştır.

Çalışmanın bu bölümünde GFP etiketli mutant proteinlerin stabil ekspresyonunu sağlayan U2OS hücreleri kullanılmıştır. Bu hücrelerde Ccdc124 ve mutant proteinlerin Npm1 etkileşimleri incelenmiş, proteinin translasyon sonrası modifikasyonlarından fosforillenmenin partner ilişkileri üzerine etkileri araştırılmıştır. GFP etiketli proteinlerin ekspresyon kontrolleri Western blot yöntemi kullanılarak gerçekleştirildikten sonra lokalizasyon dinamikleri ve Npm1 etkileşim profilleri immün boyama yöntemleri ve birlikte çöktürme (Co-IP) deneyleri ile analiz edilmiştir. Translasyon sonrası fosforil bölgelerinin hücre içi lokalizasyon ve partner etkileşimindeki rollerinin aydınlatılması amaçlanmıştır.

### **11.5.1. Hücre İçi Ekspresyon Kontrolü**

Elimizde bulunan GFP etiketli proteinleri stabil olarak eksprese eden U2OS hücreleri, uygun koşullarda büyütülerek iki-üç pasaj geçtikten sonra toplanmıştır. Toplanan hücrelerin liziz tamponu ile parçalanmaları sağlandıktan sonra elde edilen lizatlar her bir örnek için 50 µg olacak şekilde western jelinde yürütülerek PVDF membran üzerine aktarılmıştır. Membran daha sonra anti-GFP antikoru ile işaretlenmiştir. Proteinlerin hücre içindeki ekspresyonu Western Blot yöntemi ile doğrulanmıştır ve Şekil 11.12'da gösterilmiştir.

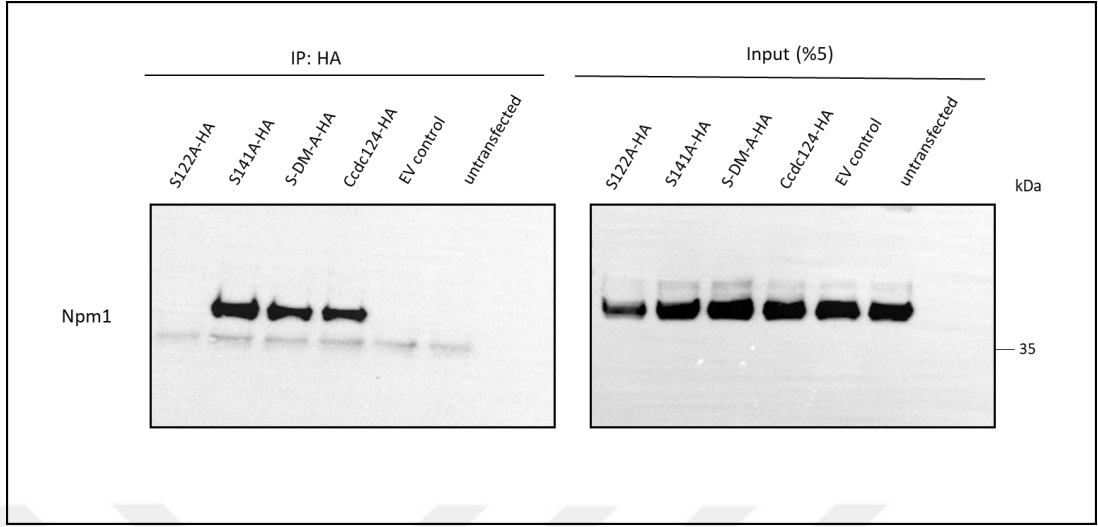


Şekil 11.12: Mutant proteinlerin Western Blot görüntüsü.

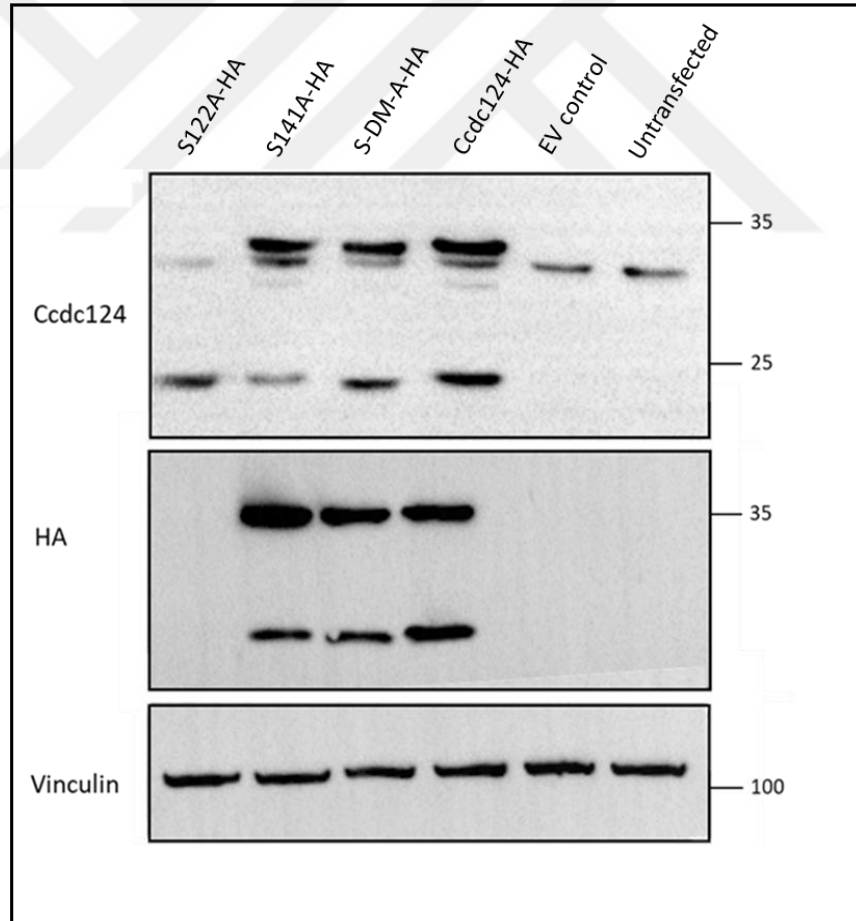
### 11.5.2. Co-IP Sonuçları

Proteinlerin hücre içinde ekspresyon kontrolleri yapıldıktan sonra etkileşim dinamiğinin analizi için Co-IP yöntemiyle Npm1 etkileşimlerine bakılmıştır. Hek293T hücreleri 10 cm'lik petride büyütüldükten sonra PEI ajanı ile HA etiketli mutant proteinleri (S122A, S141A ve S-DM-A) eksprese eden plazmitlerle transfeke edilmiştir. Transfeksiyon sonunda hücreler toplanarak lizat alınmış ve lizat içerisindeki mutant proteinler manyetik beadler aracılığı ile lizat içerisinden çekilerek Western blot jeline yüklenmiştir. Jelde yürütülen proteinler PVDF membrana aktarılarak etkileşimine bakılacak olan Npm1 (Şekil 11.13), kontrollerinin yapıldığı Ccdc124, HA ve vinculin antikoru (Şekil 11.14) ile muamele edilerek görüntüleri alınmıştır. Birlikte çöktürme deney sonucunda Ccdc124-WT, S141A ve S-DM-A proteinlerinin Npm1 ile etkileşimleri görülmekle birlikte HA etiketli S122A proteininin etkileşimi görülmemektedir. Bu proteinin hücre içindeki stabilite problemine yol açtığı önceki çalışmalarda belirtilmiştir [Güllülü, 2017]. Bu nedenle

bu proteinin Npm1 ile etkileşiminin varlığı ya da yokluğu bu deneyde ortaya konulamamıştır.



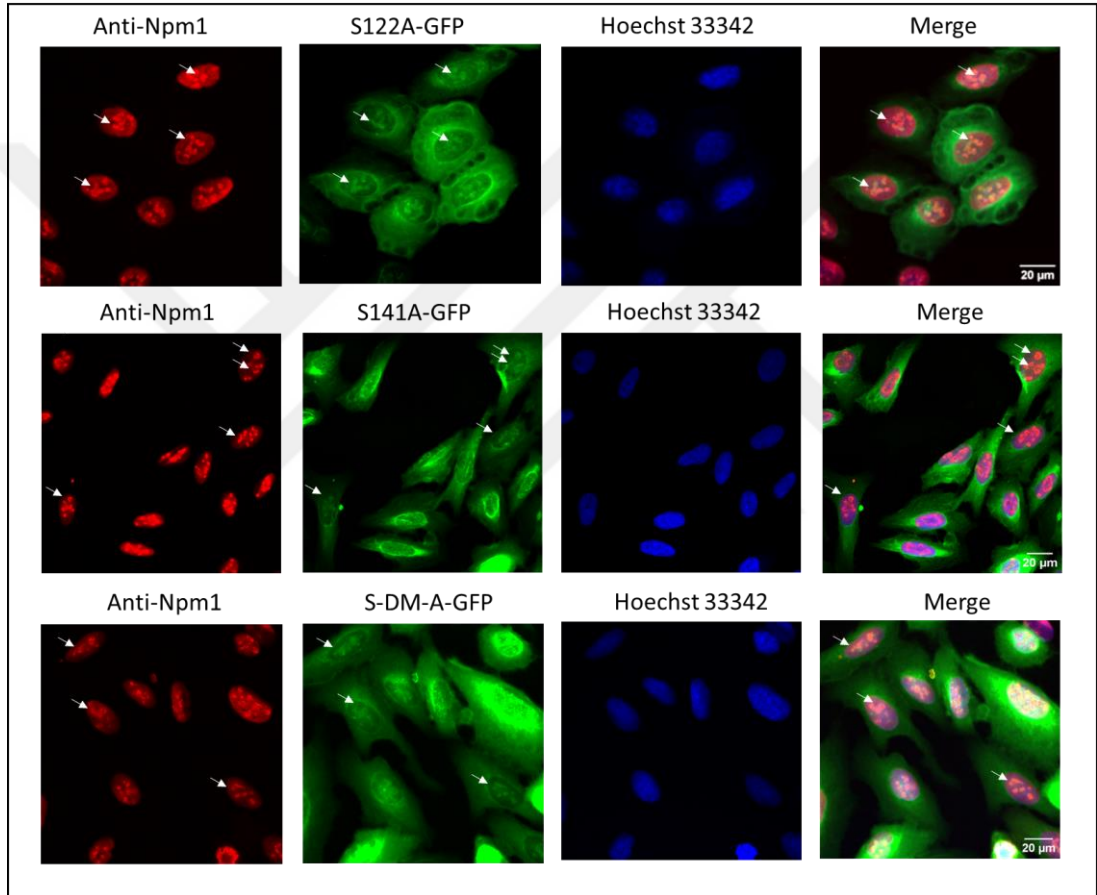
**Şekil 11.13:** Mutant proteinlerin Npm1 ile etkileşiminin immünoiblot görüntüsü.



**Şekil 11.14:** Co-IP deney kontrollerinin immünoiblot görüntüsü.

### 11.5.3. Hücre içi Lokalizasyon Sonuçları

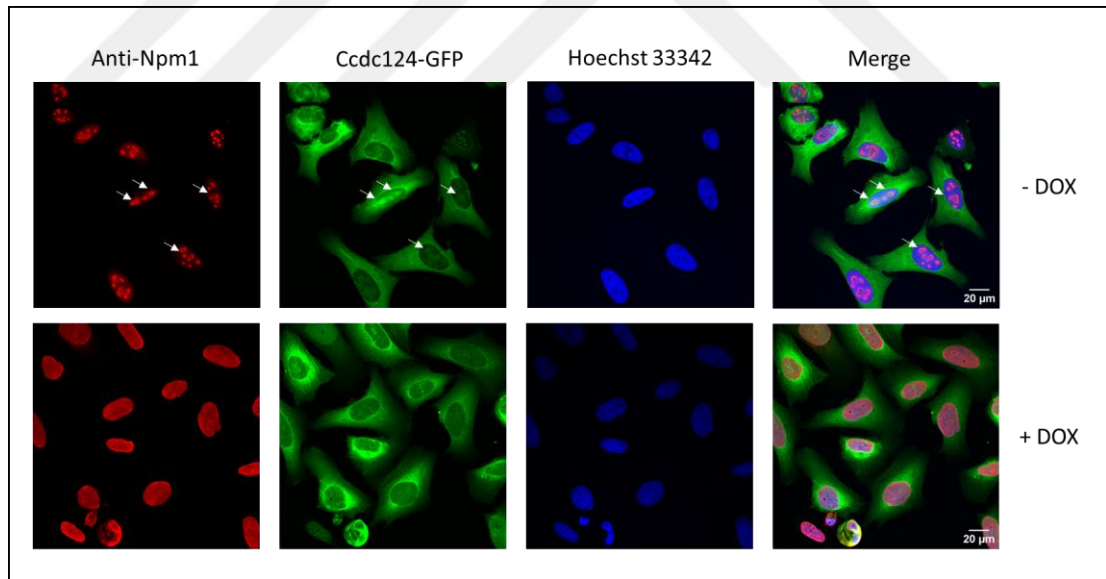
GFP etiketli mutant proteinlerin stabil olarak ekspresyonunu sağlayan U2OS hücreleri 6-kuyulu plate içerisinde yoğunlukları %50-60 olacak şekilde büyütülerek para-formaldehit varlığında fikse edilmiş ve anti-Nükleofosmin antikoru kullanılarak immün boyama yöntemiyle boyanmıştır. Boyama sonucu Ccdc124'ün fosforil bölge mutasyonunu içeren proteinlerin (S122A, S141A, S-DM-A) çekirdekçik içerisinde lokalize oldukları görülmüş ve Npm1 ile etkileşimleri konfokal mikroskobunun Z-stack özelliği kullanılarak gösterilmiştir (Şekil 11.15).



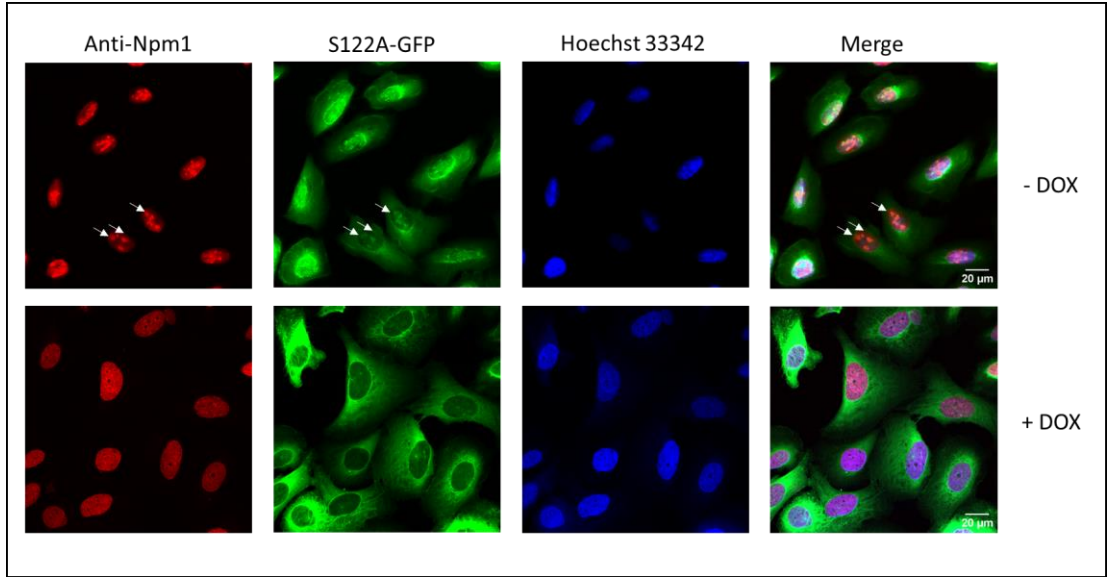
**Şekil 11.15:** GFP etiketli mutant proteinler ile Npm1 etkileşimi immün boyama görüntüleri.

## 11.6. DNA Hasarı Varlığında Ccdc124-WT, S122A, S141A, S122A/S141A (DM-A) Proteinlerin Lokalizasyon Tayini

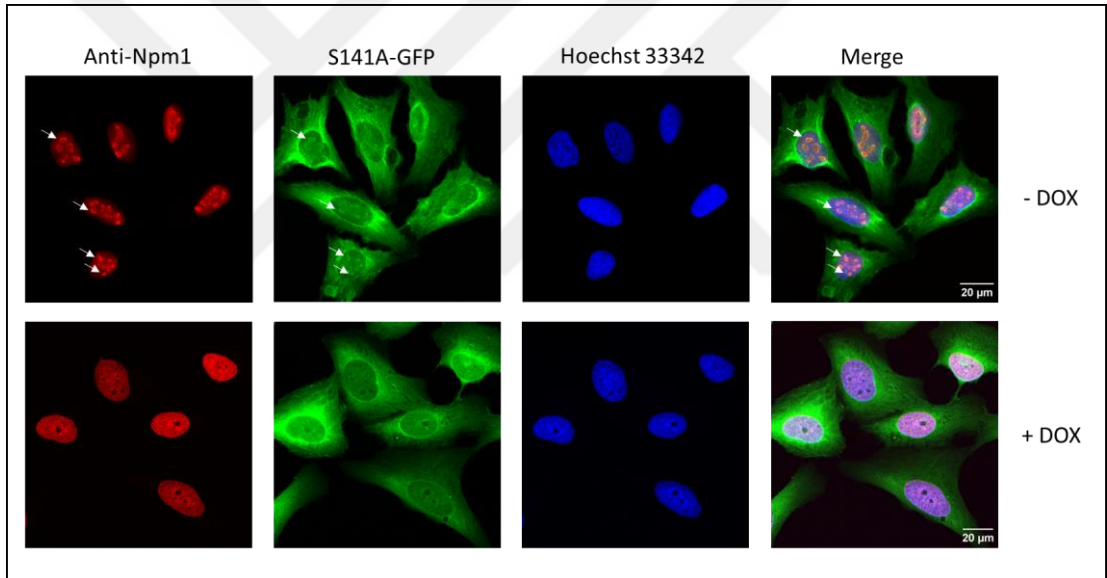
GFP etiketli Ccdc124-WT ve mutant proteinlerin (S122A, S141A, S-DM-A) stabil eksprese olduğu U2OS hücreleri uygun koşullarda petri kabı içerisinde büyütüldükten sonra DNA hasarı oluşturmak üzere bir grup hücreye 2  $\mu$ M Doksorubisin 2 saat boyunca uygulanmış, diğer grup hücreye kontrol grubu olarak ilaç verilmemiştir. Uygulama sonrası hücrelerin besiyerleri çektirilerek taze besiyeri ilave edilmiş ve 36 saat sonra ilaçlı ve kontrol grubu hücreler para-formaldehit ile fiks edilmiştir. Hücreler immün boyama yöntemi ile anti-Nükleofosmin antikoru kullanılarak işaretlenmiştir. Hücrelerin görüntüleri Konfokal mikroskobunun Z-stack özelliği kullanılarak alınmıştır. Görüntüler analiz edildiğinde ilaç uygulanmayan hücrelerde proteinler çekirdekçik içerisinde görülürken, ilacın meydana getirdiği DNA hasarı durumunda Npm1 proteinine benzer hareket ederek çekirdekçik içerisinden çıktıkları ve nükleoplazmaya geçtikleri görülmüştür (Şekil 11.16-19). İlaç varlığı/yokluğu durumunda çekirdekçik içerisinde Npm1 ile etkileşen hücrelerin sayımları yapılmış ve grafikleri % etkileşim oranı olarak verilmiştir (Şekil 11.20.).



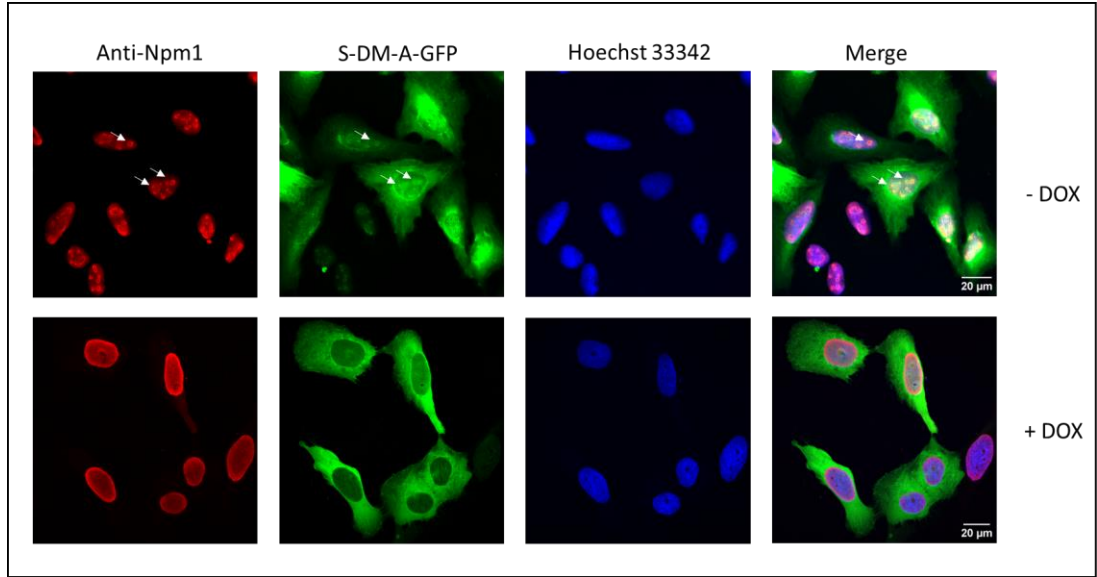
**Şekil 11.16:** Dox varlığı/yokluğu durumunda Ccdc124-GFP lokalizasyonu immün boyama görüntüleri.



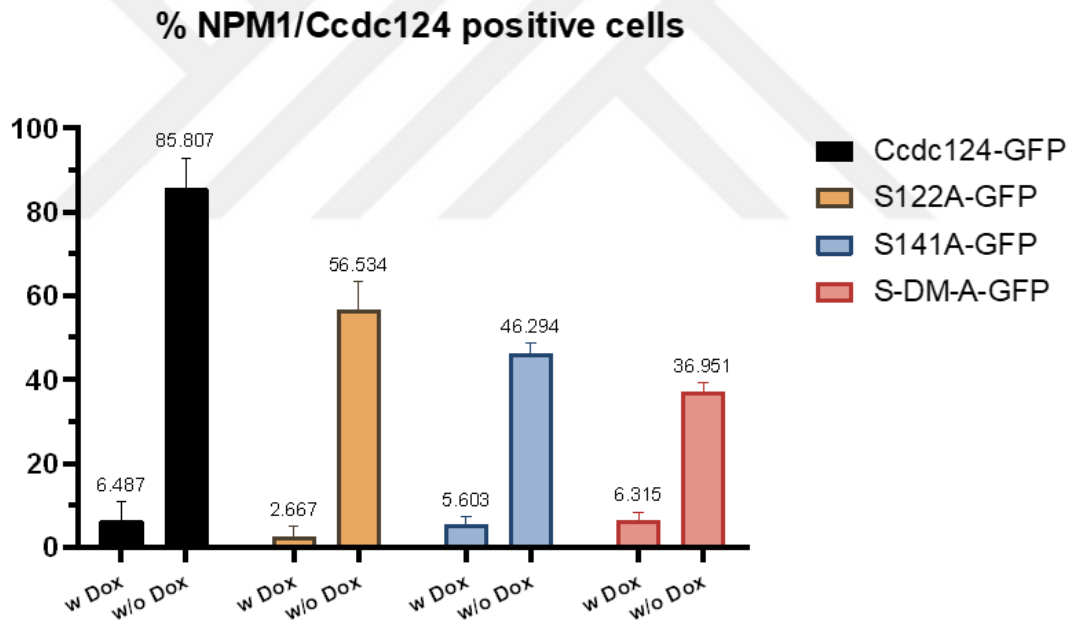
**Şekil 11.17:** Dox varlığı/yokluğu durumunda S122A-GFP lokalizasyonu immün boyama görüntüleri.



**Şekil 11.18:** Dox varlığı/yokluğu durumunda S141A-GFP lokalizasyonu immün boyama görüntüleri.



**Şekil 11.19:** Dox varlığı/yokluğu durumunda S-DM-A-GFP lokalizasyonu immün boyama görüntüleri.



**Şekil 11.20:** U2OS hücrelerinde % Npm1/Ccdc124 etkileşim grafiği.

## 12. YORUMLAR

Yapılan proteomik çalışmaların sonuçları; Ccdc124'ün yaklaşık 320 etkileşim partner adayını ortaya koymuştur. Bunların içinde membransız organellerin yapısında bulunan proteinler, ribonükleoproteinler, ribozomun alt birim proteinleri ve biyogenezinden sorumlu proteinler ile çekirdekçik proteinleri yer almaktadır. Çekirdekçik içerisindeki proteinlerin (Npm1, Ncl) katı tümörlerde ribozom biyogenezi üzerinde ve DNA hasar tamirinde aldıkları görevlerin öneminin literatürde fazlaca yer bulması [Scott and Oeffinger, 2016] göz önüne alındığında Ccdc124'ün çekirdekçik proteinleri ile olan etkileşimi tedaviye yönelik çalışmaların aydınlatılmasında büyük önem kazanmaktadır. Yapılan immün boyama çalışmaları ile, hücre içerisinde birçok bölgede lokalize olmakla [Güllülü, 2017; Telkoparan vd., 2013] birlikte Ccdc124'ün çekirdekçik içerisindeki lokalizasyonu da hem stabil hücre hattı hem de çeşitli hücre hatlarında belirgin bir şekilde ortaya konulmuştur. Etkileşim partner adaylarından çekirdekçikte olduğu bilinen Npm1 ve Ncl ile partner etkileşimi her bir protein için ayrı ayrı Co-IP deneyleri yapılarak valide edilmiştir. Wang ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, Ccdc124 ortoloğu olan Lso2 proteinin ribozomal 25S RNA ile etkileştiği ve ribozom hibernasyonunda ribozomun yeniden aktive olması için görev aldığı gösterilmiştir [Wang et al., 2018]. Bu çalışma ve deneysel teyitler göz önüne alındığında, Npm1'in çekirdekçik içinde ribozom ile ilişkili bir görevde Ccdc124 ile birlikte rol oynadığını düşündürmektedir.

Npm1, yapısında bulunan lokalizasyon sinyalleri ve geçirdiği translasyon sonrası modifikasyonlar aracılığı ile çekirdekçik ve nükleoplazma arasında mekik hareketi yapmaktadır [Nishimura et al., 2002]. Bu aşamada bazı proteinlerin taşınmasında eşlikçi protein olarak da rol oynamaktadır. Ayrıca hücrede meydana gelen DNA hasar durumunda çekirdekçikten çıkarak genomik stabilitenin korunması için görev almaktadır. Bunu; çift sarmallı kopmalar sonrasında kromatin bağlanma faktörü olarak görev alarak, DNA hasar toleransı sırasında polimeraz aktivitesinin düzenlenmesini sağlayarak yapmaktadır [Sekhar and Freeman, 2023]. Npm1'in bu davranışı Ccdc124'ün de DNA hasarı sırasındaki olası rolünün Npm1 ile etkileşimi üzerinden aydınlatılmasını akla getirmektedir. Ccdc124'ün hücrede meydana gelen DNA hasarı durumunda davranışı ve olası lokalizasyon dinamiğini analiz etmek amacıyla yapılan immün boyama deneyleri sonucunda; 2 saat doksorubisin uygulanarak hasar oluşturulan hücrelerde, hasar olmayanlara kıyasla Ccdc124'ün

çekirdekçiği bırakarak Npm1 benzeri davranış gösterdiği ve nükleoplazma içine dağıldığı görülmüştür. Şaşırtıcı şekilde ilaç uygulanarak lokalizasyonu değişen Npm1 ve Ccdc124'ün hasar durumunda benzer davranış göstermesine rağmen partner ilişkilerinin zayıfladığı/olmadığı yapılan immün boyama deneylerinde gözlenmiştir. DNA hasarı durumunda olası mekanizmaların aydınlatılması için ön basamak olan bu çalışmada, Ccdc124'ün hücredeki hasar durumunda Npm1'den bağımsız diğer proteinlere eşlik ettiği veya Npm1'e yardımcı rol oynadığı düşünülmektedir.

Hücrelerin fonksiyonlarını düzenlenmesinde hücre altı lokalizasyonlar önem kazanmaktadır. Translasyon sonrası modifikasyonlar; proteinlerde yapı, görev ve etkileşim ağlarında çeşitliliğe sebep olmaktadır. Proteinlerin üzerinde bulundukları modifikasyonlara bağlı olarak toplam yüklerinde veya konformasyonlarında görülen değişim, etkileşimde bulundukları partnerleri ile olan bağlarını arttırabilmekte, zayıflatabilmekte veya koparabilmektedir. Ayrıca proteinin hücre içindeki görev ve lokasyonunun değişimi için de modifikasyonlar önem kazanmaktadır. Örneğin Npm1 çoğunlukla çekirdekçik içerisinde bulunurken geçirdiği çeşitli translasyon sonrası modifikasyonlar (asetilasyon, ubikütinasyon, SUMOlasyon, glutatyonilasyon ve fosforilasyon) proteinin çekirdek, sitozol ve çekirdekçik arasında mekik görevi üstlenmesine neden olmaktadır. Bütün bu modifikasyonlar çekirdek boyunca Npm1'in DNA hasar tamirine katılmasını sağlamaktadır. Yapılan çalışmalar göstermiştir ki; DNA çift zincir kırıklarının oluşumunda Npm1'in 199. Treonin amino asitinin fosforlanması proteinin hasarlı bölgede  $\gamma$ -H2AX ile birlikte lokalizasyonunu sağlamaktadır [Sekhar and Freeman, 2023]. Bu literatür ışığında, Ccdc124'ün translasyon sonrası modifikasyonlarından 2 adet fosforilasyon bölgesinin, Npm1 ile olan etkileşimindeki rolünü hem normal fizyolojik durumda hem de DNA hasarı durumunda aydınlatmak amacı ile S122A, S141A ve S122A/S141A (S-DM-A) mutant proteinler kullanılarak immün boyama ve Co-IP deneyleri yapılmıştır. Co-IP deneyleri sonucunda; mutant proteinlerin Npm1 ile etkileştikleri görülmüştür. Aynı mutant proteinlerin hücre içi lokalizasyonunu belirlemek amacı ile yapılan immün boyama deneyi sonucunda da proteinlerin yabancıl tip Ccdc124'te olduğu gibi çekirdekçik içerisinde bulunduğu ancak her hücrede yaygın olarak belirlemedikleri görülmüştür. Bu durum proteinin fosforlanmasının çekirdekçik içi lokalizasyonu için önemini vurgular niteliktedir. Aynı mutant proteinlerin DNA hasar durumundaki davranışlarını analiz etmek üzere

doksorubisin uygulanan hücrelerde, mutant proteinlerin yabancı tip Ccdc124'ün lokalizasyon değiştirdiği gibi çekirdekçik içinden nükleoplazmaya geçtikleri görülmüştür. Bunun üzerine ilaç uygulanan ve ilaç uygulanmayan hücrelerde çekirdekçik içerisinde Npm1 ile etkileşimlerinin kantitatif analizi yapılmıştır. Yapılan analizler sonucu Npm1 ile etkileşme oranları hesaplanmış ve yabancı tipe kıyasla oranlarda düşüş görülmüştür. DNA hasar durumunda etkileşimleri en azınerken; normal fizyolojik durumda yüzde oranlar; Ccdc124WT/Npm1 için % 85.8, S122A/Npm1 etkileşimi için %56.5, S141A/Npm1 etkileşimi için %46.2 ve S-DM-A/Npm1 etkileşimi için %36.9 olarak grafiklendirilmiştir. Daha önceden yapılan *in silico* modelleme çalışmalarında da yabancı tip Ccdc124'ün N-ucunda bulunan alfa heliks kolu ile Npm1'in N-ucu oligomerizasyon bölgesinin etkileştiği gösterilmiştir. Bu etkileşim Ccdc124'ün fosforil bölgeleri dışında kalmaktadır. *In silico* analizler ve yapılan immün boyama deneyleri ışığında; çekirdekçik içerisindeki Npm1-Ccdc124 etkileşimi gösterilmekle birlikte Ccdc124 fosforilasyonunun bu etkileşimi tamamen bozmadığı ancak zayıflattığı görülmektedir.

Literatürdeki çalışmalar; Npm1'in Ewing sarkomu, kolorektal, baş ve boyun, böbrek, AML, karaciğer, lenfoma gibi birçok kanserde kritik rolü olduğunu ortaya koymaktadır. Örneğin Npm1'deki ekspresyonundaki değişim kemoterapötik ilaçlara yanıt ile ilişkilendirilmektedir. Birçok kanser tedavisinde kullanılan doksorubisin, antiproliferatif aktivitesini, Npm1 tarafından kontrol edilen APE1 ekspresyonu ile düzenlemektedir. APE1 aktivitesi kanserli hücrelerin hayatta kalmasını desteklerken yapılan bir çalışmada Npm1'in merkezi asidik bölgelerinin hedeflenmesi oligomerizasyonunu bozduğu ve kanser hücrelerini kemoterapötik ilaçlara duyarlı hale getirdiğini göstermektedir. Bu sonuçlar Npm1'in kanserin tedavisi için DNA hasar tamiri mekanizmasındaki önemini göstermektedir [Yu et al., 2021].

Yapılan bu tez çalışması, ele alınan Ccdc124 proteini ve translasyon sonrası modifikasyonlarının normal fizyolojik durumda ve kemoterapötik ajan varlığında Npm1 ile partner ilişkisindeki önemini vurgular niteliktedir. Ayrıca Npm1 kaynaklı birçok kanser türü için geliştirilen tedavilerin temel partner mekanizmalarını aydınlatmak adına literatüre katkı sağlamaktadır.

## KAYNAKLAR

- An H., de Meritens C. R., Shelkovnikova T. A., (2021). Connecting the “dots”: RNP granule network in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1868(8). doi:10.1016/j.bbamcr.2021.119058.
- Anderson P., Kedersha N., (2009). Stress granules. *Current biology : CB*, 19(10), R397–R398. doi:10.1016/j.cub.2009.03.013.
- Anfinsen C. B., (1973). Principles that govern the folding of protein chains. *Science*, 181(4096). doi:10.1126/science.181.4096.223.
- Arslan Ö., Soylu N. K., Akillilar P. T., Tazebay U. H., (2021). Coiled-coil domain-containing protein-124 (Ccdc124) is a novel RNA binding factor up-regulated in endometrial, ovarian, and urinary bladder cancers. *Cancer Biomarkers*, 31(2). doi:10.3233/cbm-200802.
- Babu M. M., (2016). The contribution of intrinsically disordered regions to protein function, cellular complexity, and human disease. *Biochemical Society Transactions*, 44(5). doi:10.1042/BST20160172.
- Barbelanne M., Tsang W., (2014). Molecular and cellular basis of autosomal recessive primary microcephaly. *BioMed Research International*. doi: 10.1155/2014/547986.
- Beckmann B. M., Horos R., Fischer B., Castello A., Eichelbaum K., Alleaume A. M., . . . Hentze M. W., (2015). The RNA-binding proteomes from yeast to man harbour conserved enigmRBPs. *Nature Communications*, 6. doi:10.1038/ncomms10127.
- Ben-Shem A., De Loubresse N. G., Melnikov S., Jenner L., Yusupova G., Yusupov M., (2011). The structure of the eukaryotic ribosome at 3.0 Å resolution. *Science*, 334(6062), doi: 10.1126/science.1212642.
- Blanco-Ameijeiras J., Lozano-Fernández P., Martí E., (2022). Centrosome maturation – in tune with the cell cycle. *Journal of Cell Science*, 135(2). doi: 10.1242/jcs.259395.
- Box J. K., Paquet N., Adams M. N., Boucher D., Bolderson E., O'Byrne K. J., Richard D. J., (2016). Nucleophosmin: From structure and function to disease development. *BMC Molecular Biology*, 17(1).doi: 10.1186/s12867-016-0073-9.
- Corman A., Sirozh O., Lafarga V., Fernandez-Capetillo O., (2023). Targeting the nucleolus as a therapeutic strategy in human disease, *Trends in Biochemical Sciences*, 48(3). doi:10.1016/j.tibs.2022.09.006.
- Correll C. C., Bartek J., Dundr M., (2019). The nucleolus: A multiphase condensate balancing ribosome synthesis and translational capacity in health, aging and ribosomopathies, *Cells*, 8(8). doi:10.3390/cells8080869.

Crowley L. C., Marfell B. J., Christensen M. E., Waterhouse N. J., (2016). Measuring cell death by trypan blue uptake and light microscopy. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2016(7). doi:10.1101/pdb.prot087155.

Dominguez D., Freese P., Alexis M. S., Su A., Hochman M., Palden T., . . . Burge C. B., (2018). Sequence, Structure, and Context Preferences of Human RNA Binding Proteins. *Molecular Cell*, 70(5). doi:10.1016/j.molcel.2018.05.001.

Dubois M. L., Boisvert F. M., (2016). The nucleolus: Structure and function. *The Functional Nucleus*, doi:10.1007/978-3-319-38882-3\_2.

Federici L., Falini B., (2013). Nucleophosmin mutations in acute myeloid leukemia: A tale of protein unfolding and mislocalization. *Protein Science*, 22(5). doi:10.1002/pro.2240.

Forrest R. A., Swift L. P., Rephaeli A., Nudelman A., Kimura K. I., Phillips D. R., Cutts S. M., (2012). Activation of DNA damage response pathways as a consequence of anthracycline-DNA adduct formation. *Biochemical Pharmacology*, 83(12). doi:10.1016/j.bcp.2012.02.026.

Frottin F., Schueder F., Tiwary S., Gupta R., Körner R., Schlichthaerle T., . . . Hipp M. S., (2019). The nucleolus functions as a phase-separated protein quality control compartment. *Science*, 365(6451). doi:10.1126/science.aaw9157.

Gomes E., Shorter J., (2019). The molecular language of membraneless organelles. *Journal of Biological Chemistry*, 294(18). doi:10.1074/jbc.TM118.001192.

Grisendi S., Bernardi R., Rossi M., Cheng K., Khandker L., Manova K., Pandolfi P. P., (2005). Role of nucleophosmin in embryonic development and tumorigenesis. *Nature*, 437(7055). doi:10.1038/nature03915.

Güllülü Ö., (2017). Coiled-coil domain-containing 124 (Ccdc124) proteininin işlevleri ve hücre-altı konumunun transkripsiyon sonrası mekanizmalarla düzenlenmesi. Yüksek lisans Tezi, Gebze Teknik Üniversitesi.

He Y., Chen Y., Song W., Zhu L., Dong Z., Ow D. W., (2017). A Pap1-Oxs1 signaling pathway for disulfide stress in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Research*, 45(1). doi:10.1093/nar/gkw818.

Hentze M. W., Castello A., Schwarzl T., Preiss T., (2018). A brave new world of RNA-binding proteins. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(5). doi:10.1038/nrm.2017.130.

Jacobson M. R., Pederson T., (1998). Localization of signal recognition particle RNA in the nucleolus of mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(14). doi:10.1073/pnas.95.14.7981.

Jeon P., Ham H. J., Park S., Lee J. A., (2022). Regulation of Cellular Ribonucleoprotein Granules: From Assembly to Degradation via Post-translational Modification. *Cells*, 11(13). doi:10.3390/cells11132063.

Koppers M., Özkan N., Fariás G. G., (2020). Complex Interactions Between Membrane-Bound Organelles, Biomolecular Condensates and the Cytoskeleton. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8. doi:10.3389/fcell.2020.618733.

Kurki S., Peltonen K., Latonen L., Kiviharju T. M., Ojala P. M., Meek D., Laiho M., (2004). Nucleolar protein NPM interacts with HDM2 and protects tumor suppressor protein p53 from HDM2-mediated degradation. *Cancer Cell*, 5(5). doi:10.1016/S1535-6108(04)00110-2.

Lancaster O. M., Baum B., (2014). Shaping up to divide: Coordinating actin and microtubule cytoskeletal remodelling during mitosis. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 34. doi:10.1016/j.semcdb.2014.02.015.

Lee J. T., Gu W., (2010). The multiple levels of regulation by p53 ubiquitination., *Cell Death and Differentiation*, 17(1). doi:10.1038/cdd.2009.77.

Li P., Banjade S., Cheng H. C., Kim S., Chen B., Guo L., . . . Rosen M. K., (2012). Phase transitions in the assembly of multivalent signalling proteins. *Nature*, 483(7389). doi:10.1038/nature10879.

Li S., Wang L., Berman M., Kong Y. Y., Dorf M. E., (2011). Mapping a Dynamic Innate Immunity Protein Interaction Network Regulating Type I Interferon Production. *Immunity*, 35(3). doi:10.1016/j.immuni.2011.06.014.

Lim M. J., Wang X. W., (2006). Nucleophosmin and human cancer. *Cancer Detection and Prevention*, 30(6). doi:10.1016/j.cdp.2006.10.008.

Lindstrom E. W., (1938). The origin of life. *Journal of Heredity*, 29(12). doi:10.1093/oxfordjournals.jhered.a104436.

Loubeau G., Boudra R., Maquaire S., Lours-Calet C., Beaudoin C., Verrelle P., Morel L., (2014). NPM1 silencing reduces tumour growth and MAPK signalling in prostate cancer cells. *PLoS One*. 9:e96293. doi: [10.1371/journal.pone.0096293](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096293).

Luo Y., Na Z., Slavoff S. A., (2018). P-Bodies: Composition, Properties, and Functions. *Biochemistry*, 57(17). doi:10.1021/acs.biochem.7b01162.

Malys N., McCarthy J. E., (2011). Translation initiation: Variations in the mechanism can be anticipated. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68(6). doi:10.1007/s00018-010-0588-z.

Meier U. T., (2017). RNA modification in Cajal bodies. *RNA Biology*, 14(6). doi:10.1080/15476286.2016.1249091.

Morris G. E., (2008). The Cajal body. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1783(11). doi:10.1016/j.bbamcr.2008.07.016.

Nishimura Y., Ohkubo T., Furuichi Y., Umekawa H., (2002). Tryptophans 286 and 288 in the C-terminal Region of Protein B23.1 are Important for Its Nucleolar Localization. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 66(10). doi:10.1271/bbb.66.2239.

Okuda M., Horn H. F., Tarapore P., Tokuyama Y., Smulian A. G., Chan P. K., . . . Fukasawa K., (2000). Nucleophosmin/B23 is a target of CDK2/cyclin E in centrosome duplication. *Cell*, 103(1). doi:10.1016/S0092-8674(00)00093-3.

Onomoto K., Jogi M., Yoo J. S., Narita R., Morimoto S., Takemura A., . . . Fujita T., (2012). Critical role of an antiviral stress granule containing RIG-I and PKR in viral detection and innate immunity. *PLoS ONE*, 7(8). doi:10.1371/journal.pone.0043031.

Oparin A.I., (1953) [Originally published 1938; New York: The Macmillan Company]. The Origin of Life. Translation and new introduction by Sergius Morgulis (2nd ed.). Mineola, NY: Dover Publications. ISBN 978-0-486-49522-4. LCCN 53010161.

Owen I., Shewmaker F., (2019). The role of post-translational modifications in the phase transitions of intrinsically disordered proteins. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(21). doi:10.3390/ijms20215501.

Pederson T., (2011). The nucleus introduced. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(5). doi:10.1101/cshperspect.a000521.

Penzo M., Montanaro L., Treré D., Derenzini M., (2019). The ribosome biogenesis-cancer connection. *Cells*, 8(1). doi:10.3390/cells8010055.

Peña C., Hurt E., Panse V. G., (2017). Eukaryotic ribosome assembly, transport and quality control. *Nature Structural and Molecular Biology*, 24(9).doi: 10.1038/nsmb.3454.

Prossliner T., Winther K. S., Sørensen M. A., Gerdes K., (2018). Ribosome hibernation. *Annual Review of Genetics*, 52. doi:10.1146/annurev-genet-120215-035130.

Protter D. S., Parker R., (2016). Principles and Properties of Stress Granules. *Trends in Cell Biology*, 26(9). doi:10.1016/j.tcb.2016.05.004.

Qin H., Ni H., Liu Y., Yuan Y., Xi T., Li X., Zheng L., (2020). RNA-binding proteins in tumor progression. *Journal of Hematology and Oncology*, 13(1). doi:10.1186/s13045-020-00927-w.

Quin J. E., Devlin J. R., Cameron D., Hannan K. M., Pearson R. B., Hannan R. D., (2014). Targeting the nucleolus for cancer intervention. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1842(6). doi:10.1016/j.bbadis.2013.12.009.

Raff J. W., (2019). Phase Separation and the Centrosome: A Fait Accompli? *Trends in Cell Biology*, 29(8). doi:10.1016/j.tcb.2019.04.001.

Ribeiro K. C., Pereira-Neves A., Benchimol M., (2002). The mitotic spindle and associated membranes in the closed mitosis of trichomonads. *Biology of the Cell*, 94(3). doi:10.1016/S0248-4900(02)01191-7.

Sato M., (2022). Biological Significance of Intrinsically Disordered Protein Structure. *Chem-Bio Informatics Journal*, 22. doi:10.1273/cbij.22.26.

Scott D. D., Oeffinger M., (2016). Nucleolin and nucleophosmin: Nucleolar proteins with multiple functions in DNA repair1. *Biochemistry and Cell Biology*, 94(5). doi:10.1139/bcb-2016-0068.

Sekhar K. R., Freeman M. L., (2023). Nucleophosmin Plays a Role in Repairing DNA Damage and Is a Target for Cancer Treatment. *Cancer Research*, 83(10). doi:10.1158/0008-5472.CAN-22-3631.

Shaw P. J., (2010) Nucleolus. In: Encyclopedia of Life, Sciences (ELS). *John Wiley & Sons, Ltd: Chichester*. doi: 10.1002/9780470015902.a0001352.pub3.

Sheth U., Parker R., (2003). Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science*, 300(5620). doi:10.1126/science.1082320.

Spannl S., Tereshchenko M., Mastromarco G. J., Ihn S. J., Lee H. O., (2019). Biomolecular condensates in neurodegeneration and cancer. *Traffic*, 20(12). doi:10.1111/tra.12704.

Tanikawa C., Ueda K., Suzuki A., Iida A., Nakamura R., Atsuta N., . . . Matsuda K., (2018). Citrullination of RGG Motifs in FET Proteins by PAD4 Regulates Protein Aggregation and ALS Susceptibility. *Cell Reports*, 22(6). doi:10.1016/j.celrep.2018.01.031.

Telkoparan P., (2013). Characterization of the coiled-coil domain-containing protein 124 (Ccdc124) as a novel centrosome and midbody component involved in cytokinesis. Doctoral Thesis, Bilkent University.

Telkoparan P., Erkek S., Yaman E., Alotaibi H., Bayik D., Tazebay U. H., (2013). Coiled-Coil Domain Containing Protein 124 Is a Novel Centrosome and Midbody Protein That Interacts with the Ras-Guanine Nucleotide Exchange Factor 1B and Is Involved in Cytokinesis. *PLoS ONE*, 8(7). doi:10.1371/journal.pone.0069289.

Turi Z., Lacey M., Mistrik M., Moudry P., (2019). Impaired ribosome biogenesis: Mechanisms and relevance to cancer and aging. *Aging*, 11(8). doi:10.18632/aging.101922.

Verine Boulon S., Westman B. J., Hutten S., Boisvert F. O., Lamond A. I., (2010). The Nucleolus under Stress. *Molecular Cell*, 40. doi: 10.1016/j.molcel.2010.09.024.

Wang Y. J., Vaidyanathan P. P., Rojas-Duran M. F., Udeshi N. D., Bartoli K. M., Carr S. A., Gilbert W. V., (2018). Lso2 is a conserved ribosome-bound protein required for translational recovery in yeast. *PLoS Biology*, 16(9). doi:10.1371/journal.pbio.2005903.

Web 1, (2023). <https://animationlab.utah.edu/phase-separation>, (Eriřim tarihi: 25/11/2023).

Web 2, (2023). <https://www.atcc.org/products/crl-3216>, (Eriřim tarihi: 26/11/2023).

Web 3, (2023). <https://www.atcc.org/products/htb-96>, (Eriřim tarihi: 26/11/2023).

Web 4, (2023). <https://www.atcc.org/products/ccl-247>, (Eriřim tarihi: 26/11/2023).

Weeks S. E., Metge B. J., Samant R. S., (2019). The nucleolus: a central response hub for the stressors that drive cancer progression. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 76(22). doi:10.1007/s00018-019-03231-0.

Wei G., Xi W., Nussinov R., Ma B., (2016). Protein Ensembles: How Does Nature Harness Thermodynamic Fluctuations for Life? the Diverse Functional Roles of Conformational Ensembles in the Cell. *Chemical Reviews*, 116(11). doi:10.1021/acs.chemrev.5b00562.

Weiss R. B., (1992). The anthracyclines: Will we ever find a better doxorubicin? *Seminars in Oncology*, 19(6).

Wells J. N., Buschauer R., Mackens-Kiani T., Best K., Kratzat H., Berninghausen O., . . . Beckmann R., (2020). Structure and function of yeast Lso2 and human CCDC124 bound to hibernating ribosomes. *PLoS Biology*, 18(7). doi:10.1371/journal.pbio.3000780.

Wheeler J. R., Matheny T., Jain S., Abrisch R., Parker R., (2016). Distinct stages in stress granule assembly and disassembly. *eLife*, 5(Se). doi:10.7554/eLife.18413.

Yang F., Teves S. S., Kemp C. J., Henikoff S., (2014). Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, 1845(1). doi:10.1016/j.bbcan.2013.12.002.

Yu A. C., Chern Y. J., Zhang P., Pasiliao C. C., Rahman M., Chang G., . . . Tai I. T., (2021). Inhibition of nucleophosmin 1 suppresses colorectal cancer tumor growth of patient -derived xenografts via activation of p53 and inhibition of AKT. *Cancer Biology and Therapy*, 22(2). doi:10.1080/15384047.2020.1839278.

Yu Y., Maggi L. B., Brady S. N., Apicelli A. J., Dai M. S., Lu H., Weber J. D., (2006). Nucleophosmin Is Essential for Ribosomal Protein L5 Nuclear Export. *Molecular and Cellular Biology*, 26(10). doi:10.1128/mcb.26.10.3798-3809.2006.

Zarka J., Short N. J., Kanagal-Shamanna R., Issa G. C., (2020). Nucleophosmin 1 mutations in acute myeloid leukemia. *Genes*, 11(6). doi:10.3390/genes11060649.

Zhang J., Xu E., Ren C., Yan W., Zhang M., Chen M., . . . Chen X., (2014). Mice deficient in Rbm38, a target of the p53 family, are susceptible to accelerated aging and spontaneous tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(52). doi:10.1073/pnas.1415607112.

## ÖZGEÇMİŞ

Gamze ÇAKIRCA lisans eğitimini 2007-2012 tarihleri arasında Marmara Üniversitesi, Kimya Öğretmenliği bölümünde tamamladıktan sonra yine aynı üniversitede 2012-2016 tarihleri arasında Biyokimya Yüksek lisans programında eğitime devam etmiştir. Burada yaptığı çalışmalardan sonra Gebze Teknik Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik dalında 2016 yılında Doktora eğitime başlamıştır. Doktora çalışmaları devam ederken TÜSEB COVID19 projesinde (2020-2021) yer almış ve daha sonra TUBİTAK, Yaşam bilimleri merkezinde BSL3 laboratuvarında virüs ve aşı çalışmalarına katılmıştır (2021-2023).



## TEZ ÇALIŞMASI KAPSAMINDA YAPILAN YAYINLAR

Çakırca G., Tuzlakoğlu Öztürk M., Telkoparan-Akillilar P., Güllülü Ö., Çetinkaya A., Tazebay U. H., (2023). Proteomics analysis identifies the ribosome associated coiled-coil domain-containing protein-124 as a novel interaction partner of Nucleophosmin-1. *Biology of the cell*, 10.1111/boc.202300049.

