

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

COILED COIL DOMAIN CONTAINING PROTEIN 124
(CCDC124)' ÜN HÜCRE İÇİ LOKALİZASYON VE
TRANSLOKASYON DİNAMİĞİNİN İNCELENMESİ

KÜBRA HACİBEYOĞLU

DOKTORA TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMAN: PROF. DR. UYGAR HALİS TAZEBAY

KASIM 2024

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

**COILED COIL DOMAIN CONTAINING PROTEIN 124
(CCDC124)' ÜN HÜCRE İÇİ LOKALİZASYON VE
TRANSLOKASYON DİNAMİĞİNİN İNCELENMESİ**

KÜBRA HACİBEYOĞLU

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

DANIŞMAN: PROF. DR. UYGAR HALİS TAZEBAY

KASIM 2024

T.R.
GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL

**INVESTIGATION OF INTRACELLULAR LOCALIZATION
AND TRANSLOCATION DYNAMICS OF COILED COIL
DOMAIN CONTAINING PROTEIN (CCDC124)**

KÜBRA HACİBEYOĞLU

A THESIS OF DOCTORATE
DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND
GENETICS

ADVISOR: PROF. DR. UYGAR HALİS TAZEBAY

NOVEMBER 2024

DOKTORA JÜRİ ONAY FORMU

GTÜ Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Yönetim Kurulunun 11/11/2024 tarih ve 2024/61 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 20/11/2024 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Kübra HACİBEYOĞLU'nun tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

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

ÜYE

: Prof. Dr. Mehmet Batu ERMAN

ÜYE

: Prof. Dr. Tamer YAĞCI

ÜYE

: Prof. Dr. Ayten KANDİLCİ

ÜYE

: Dr. Öğr. Üyesi Zeynep TOKCAER KESKİN

ONAY

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

İMZA/MÜHÜR



Aileme

ÖZET

CCDC124 (Coiled-coil domain containing 124) proteini mantardan insana kadar tüm ökaryotlarda korunmuş RNA-bağlayıcı bir proteindir. Bu doğrultuda yapılan çalışmalar CCDC124 proteininin hücre döngüsünün interfaz evresinde sentrozomda konumlandığı, post-anafaz evresinden sitokinetik bölünmeye kadar olan sürede ise orta cisimcik (midbody) konumlandığını göstermektedir. Ayrıca *Ccdc124* geninin CRISPR/Cas9 yöntemi ile susturulması durumlarında ise hücre yapısının bozulduğu ve çok çekirdekli yapıların oluştuğu gözlenmiştir. Son gerçekleştirilen çalışmalarda CCDC124 proteininin nükleolus belirteci Nükleofosmin ile etkileşimi gösterilmiştir. Farklı şartlarda hücrenin farklı kompartmanlarında konumlanan ve bu konumlandığı yapıların membransız organeller özelliği göstermesi ve CCDC124 proteininin etkileşim partnerlerini bulmaya yönelik yapılan çalışmalar doğrultusunda stres granül oluşumunda etkili olan protein partnerleriyle etkileşmesi CCDC124 proteininin stres granül oluşumunda etkili olabileceği düşüncesini açığa çıkartmıştır.

Bu doğrultuda tez kapsamında yapılan çalışmaların ilk aşamasında, CCDC124 proteininin amino (N) ve karboksil (C) ucuna farklı büyüklükteki bölünmüş GFP11 fragmenti eklenerek CCDC124 proteininin insan osteosarkoma (U2OS) ve embriyonik böbrek (HEK293T) hücre hattında kalıcı ifadesi sağlanmıştır. Bu yaklaşımla CCDC124 proteininin hücre içerisinde rahat bir şekilde gözlenmesi hedeflenmiştir. Oluşturulan GFP11_{x4} ve GFP11_{x1} etiketli CCDC124 proteininin floresan yoğunluğuna bakıldığında CCDC124 proteininin C terminalinde konumlanan GFP11_{x4} proteini daha yüksek konsantrasyon gösterdiği tespit edilmiştir. Çalışmanın ikinci aşamasında, U2OS hücre hattında kalıcı ifadesi sağlanan hücrelerin viral stres (Poly IC), sıcaklık stresi (46 °C) ve oksidatif stres (H₂O₂) uygulaması yapılarak CCDC124 proteininin stres granül belirteci olan G3BP1 ile etkileşimi immünboyama yöntemi yapılarak araştırılmıştır. Çalışmanın son aşamasında ise *g3bp1* geni mCherry-N1 plazmidine klonlanarak CCDC124 proteininin, aşırı ifadesi gerçekleştirilmiş G3BP1 proteini ile normal büyüme şartlarında ve stres şartları altında canlı hücre görüntülemesi ve birlikte çöktürme deneyleri gerçekleştirilerek G3BP1 ve CCDC124 proteininin ortak konumlanma gösterip göstermediğine dair veriler elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: CCDC124 (Coiled-Coil Domain Containing 124), Bölünmüş Yeşil Floresan Proteini, Stres Granülü (SGs), G3BP1 (Ras GTPaz Aktive Edici Protein Bağlayıcı Protein 1).

ABSTRACT

Protein is an RNA-binding protein that is conserved in all eukaryotes from fungi to humans. Studies done in this context indicate that the CCDC124 protein is located in centrosome during interphase phase of the cell cycle, and in the midbody from the post-anaphase phase to the cytokinetic division. It is also observed that the cell structure is disrupted and multinucleated structures were formed when *Ccdc124* gene was silenced by CRISPR/Cas9 method. At the last studies protein's colocalization with Nucleophosmin is showed which is the marker of nucleolus. To evidence is shown whether CCDC124 protein is colocalized with protein partner interacted at stress granule and under the different conditions CCDC124 protein is localized at the different location where is membranless organelles. In the studies are carried out to find interaction partners of the CCDC124 protein, which is located in different compartments of the cell under different conditions, it has been determined that it interacts with protein partners that are effective in stress granule formation. This result is revealed the idea that the CCDC124 protein may be effective in stress granule formation.

In the first part of this thesis, CCDC124 protein in the human osteosarcoma (U2OS) and embryonic kidney cell line is provided stably expression by adding different size GFP11 fragment in amino (N) and carboxyl (C) terminus. With this approach, it is aimed to easily observe the CCDC124 protein inside the cell. When looking at the fluorescence intensity of the constructed CCDC124 labeled with GFP11_{x4} ve GFP11_{x1}, it is determined that GFP11_{x4} protein located in C terminus of the CCDC124 protein showed a higher concentration. In the second part of this thesis, stably cell line is exposed to viral stress (Poly IC), heat stress (46 C°) and oxidative stress (H₂O₂) and CCDC124-G3BP1, stress granule markers, proteins interaction is investigated by immunofluorescence. The last part of this thesis, *g3bp1* gene is cloned into mCherry-N1 plasmid and data are obtained on whether overexpression G3BP1 and CCDC124 protein are showed colocalization under normal growth conditions and stress condition by live cell imaging and coimmunoprecipitation experiments.

Key Words: CCDC124 (Coiled-Coil Domain Containing 124), Split GFP, Stress Granules (SGs), G3BP1 (Ras GTPase-Activating Protein-Binding Protein 1).

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmalarım boyunca değerli katkılarını esirgemeyip bana laboratuvarında çalışma şansı tanıyan değerli danışmanım Prof. Dr. Uygur Halis TAZEYAY'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bütün tez çalışma sürecimde yanımda olan, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan her daim koşulsuz desteğini hissettiğim Merve ÖZTÜRK TUZLAKOĞLU'a ve doktora çalışmalarım boyunca aynı laboratuvar ortamını paylaşmaktan mutluluk duyduğum tüm çalışma arkadaşlarıma özellikle Sinem GÜL, İlkay SEVGİN KÜÇÜK ve son zamanlarımda çalışma şansını yakaladığım çalışma arkadaşlarım Agit ÇETİNKAYA ve Hilal CİVELEK'e teşekkürlerimi sunarım.

Aynı laboratuvarı beraber paylaşmaktan mutluluk duyduğum nezaketi ile örnek aldığım değerli Prof. Dr. Ayten KANDİLCİ'ye ve gerek aynı laboratuvar ortamını paylaştığım gerek ise değerli fikir ve sohbetlerini benimle paylaşan Emrah ÖZÇELİK ve Açelya YAŞAR'a teşekkür ederim.

Bütün doktora çalışmam boyunca katkılarını esirgemeyen değerli Prof. Dr. Tamer YAĞCI'ya ve bilgilerini benimle paylaşan Metin ÇETİN ve Arzu AYSAN'a teşekkür ederim.

Yardımcılığı ile her daim yanımda olan Leyla DİKMETAŞ'a ve Songül KOYUN'a desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Bu zorlu yolda karşılaştığım ve hiçbir zaman kardeşliğini, sohbetini, iyi niyetini ve fikirlerini benden esirgemeyen, her düştüğümde elimden tutup kaldıran arkadaşlarımda da öte dostum Yeşim KAYA'ya beni bu yolda da yalnız bırakmadığı ve desteğini esirgemediği için teşekkür ederim.

Her geçen yıl daha da bağlanıp arkadaşlarımda da öte aile gibi olduğum, her anımda yanımda olan canım dostlarımla Dilek ÇAĞLAR SİLKİN ve Havva ÜNLÜ TAŞKAYA'ya teşekkür ederim.

Her kararımı yanımda olan en az benim kadar bu süreci yaşayan ve destek olan, tezimi ithaf ettiğim sevgili annem ve babam Nurgül HACİBEYOĞLU ve Mehmet Nuri HACİBEYOĞLU 'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ailemin minik üyesi canım yeğenim Mehmet Emin HACİBEYOĞLU en güzel teşekkürüm sana öyle bir zamanda geldin öyle bir zamanda elimi tuttun ki senin sayende stresli süreçlerimin üstesinden gelebildim. Doktora çalışmamda YÖK 100/2000 bursu desteğini sağlayan YÖK 'e teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	vi
ABSTRACT	vii
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xiv

1. GİRİŞ	1
1.1. Literatür Özeti, Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği	2
2. SIVI SIVI FAZ AYRIMI	3
2.1. Zarsız Organeller	4
2.2. Zarsız Organeller ve Nörodejeneratif Hastalıklar	6
2.3. Stres Bağımlı Zarsız Organeller	7
2.3.1. Nükleer Stres Body	8
2.3.2. Sitoplazmik Stres Granülü	9
2.3.2.1. G3BP	10
2.3.2.1.1. G3BP1	12
2.4. Stres Türleri	14
2.4.1. Viral Stres	14
2.4.2. Oksidatif Stres	14
2.4.3. Sıcaklık Stresi	15
2.5. Bölünmüş Yeşil Floresan Protein	16
2.6. CCDC124	18
3. MATERYAL VE YÖNTEM	21
3.1. Materyal	21
3.1.1. Agaroj jel Solüsyonları	21
3.1.2. Mikrobiyoloji Suşları	21
3.1.3. Mikrobiyoloji Solüsyonları	21
3.1.4. Vektörler	22
3.1.5. Oligonükleotitler	22
3.1.6. Hücre Hattı Seçimi	22
3.1.6.1. Hek 293T Hücre Hattı	23
3.1.6.2. U2OS Hücre Hattı	23
3.1.7. Hücre Kültürü Solüsyonları	23
3.1.8. Transfeksiyon Solüsyonları	24
3.1.9. Liziz Solüsyonları	24
3.1.10. İmmünoblot Solüsyonları	24
3.1.11. İmmünboyama Solüsyonları	25
3.1.12. Antikorlar	26
3.1.13. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	27

3.1.14. Ligasyon Ürünleri	27
3.1.15. Hücre Transfeksiyonu	27
3.1.16. Kullanılan Kimyasallar	28
3.1.17. Kullanılan Kitler ve Cihazlar	29
3.2. Yöntem	30
3.2.1. Genel Metot	30
3.2.1.1. Vektör Hazırlama	30
3.2.1.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	31
3.2.1.3. Restriksiyon Endonükleaz Enzimleri ile Kesim	32
3.2.1.4. Agaroza Jelden Geri Kazanma	32
3.2.1.5. Ligasyon	32
3.2.1.6. Kompetent Hücre Hazırlanması	32
3.2.1.7. Transformasyon	33
3.2.1.8. Plazmid İzolasyonu	33
3.2.1.8.1. Küçük Hacim İzolasyon	33
3.2.1.8.2. Büyük Hacim İzolasyon	34
3.2.1.9. Nükleik Asit Miktar Tayini	34
3.2.1.10. Agaroza Jel	34
3.2.1.11. Bakteri Hücrelerinin Stoklanması	34
3.2.2. Hücre Kültürü Yöntemleri	34
3.2.2.1. Hücre Hatlarının Büyüme Şartları	34
3.2.2.2. Hücre Hatlarında Geçici Transfeksiyon	35
3.2.2.3. Lentivirüs Transfeksiyonunun Yapılması	35
3.2.2.3.1. Lentiviral Vektör Üretimi	35
3.2.2.3.2. Lentiviral Transduksiyon	36
3.2.2.3.3. Kalıcı Hücre Hattı Oluşturulması	36
3.2.2.4. Stok Hücrelerin Kriyoprezervasyonu	38
3.2.2.5. Donmuş Hücrelerin Açılması	39
3.2.2.6. Lizat Toplama	39
3.2.2.7. İmmünoiblotlama	39
3.2.2.8. İmmünofloresan (IF)	40
3.2.2.9. Canlı Hücre Görüntüleme	41
3.2.2.10. Birlikte Çöktürme (CO-IP)	41
4. SONUÇLAR	42
4.1. Vektör Oluşturma	42
4.2. HEK 293T Hücre Hattında Aşırı İfade Edilmiş Ccdc124'ün Stres Granülü ile Etkileşimi	46
4.3. CCDC124 'ün U2OS Hücre Hattında Aşırı İfadesi	48
4.4. U2OS Hücre Hattında Aşırı İfade Edilmiş GFP11x4::CCDC124 'ün Stres Granülü ile Etkileşimi	49
4.5. U2OS Hücre Hattında Aşırı İfade Edilmiş CCDC124::GFP11x4 'ün Stres Granülü ile Etkileşimi	54
4.6. G3BP1-mCherry ile Canlı Hücre Görüntüleme	60
5. YORUMLAR	66
KAYNAKLAR	69
ÖZGEÇMİŞ	79
TEZ METNİNDEN TÜRETİLEN YAYINLAR/SUNUMLAR	80

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Ab	: Antikor
FBS	: Fetal Bovin Serumu
G3BP	: Ras GTPaz Aktivite Edici Protein SH3 Domain Bağlanma Protein
GFP	: Yeşil Floresan Protein
GTÜ	: Gebze Teknik Üniversitesi
HEK 293T	: İnsan Embriyonik Böbrek Hücre Hattı 293T
IDR	: İçsel Düzensiz Bölgeler
IF	: İmmünofloresan
IP	: İmmünpresipitasyon
kDa	: Kilodalton
LCD	: Düşük Karmaşıklık Bölgeleri
MBG	: Moleküler Biyoloji ve Genetik
mg	: Miligram
mm	: Milimetre
μ L	: Mikrolitre
μ g	: Mikrogram
nM	: NanoMolar
PBS	: Fosfat Tampon Solüsyonu
PFA	: Paraformaldehit
TBS	: Tris Tampon Solüsyonu
U2OS	: İnsan Kemik Osteosarkom Epitel Hücreleri
WB	: İmmünoblot

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1: Sıvı sıvı faz ayrımını yönlendiren kritik etkileşimler.	4
Şekil 2.2: Ökaryotik hücrelerin çekirdeğinde, sitoplazmasında ve zarlarında bulunan sayısız yoğunlaşmanın şeması.	5
Şekil 2.3: Nörodejeneratif hastalıklarda düzensiz proteinlerin sıvı yapıdan katı yapıya geçişi.	7
Şekil 2.4: Sitoplazmadaki ve çekirdekteki stres bağımlı zarsız organeller.	8
Şekil 2.5: Stres granül bileşenleri.	10
Şekil 2.6: G3BP'nin yapısı.	12
Şekil 2.7: Ökaryotik başlama faktörü 2 (eIF2 α) translasyon kontrolü.	13
Şekil 2.8: Floresan proteinlerin kullanım alanları.	17
Şekil 2.9: CCDC124 protein dizisi.	19
Şekil 2.10: CCDC124 proteinin amino asit analizi.	20
Şekil 3.1: Oluşturulan plazmid haritası.	31
Şekil 4.1: CCDC124 proteininin farklı GFP11 etiketleri ile immüno blot analizleri ve ekspresyon seviye grafikleri.	43
Şekil 4.2: GFP11 ₄ ile etiketli CCDC124 proteininin HEK293T hücre hattında transfeksiyon görüntüsü.	45
Şekil 4.3: HEK293T hücre hattında kalıcı ifadesi gerçekleştirilen CCDC124::GFP11 ₄ proteininin görüntüleri.	47
Şekil 4.4: HEK293T hücre hattında kalıcı ifadesi gerçekleştirilen CCDC124::GFP11 ₄ proteininin immüno floresan görüntüleri.	47
Şekil 4.5: Farklı GFP11 etiketleri ile işaretlenmiş CCDC124 proteininin kalıcı ifadesi.	49
Şekil 4.6: pcDNA 3.1/ GFP11 ₄ ::CCDC124 plazmidinin H ₂ O ₂ stresi altında immüno boyama görüntüleri.	51
Şekil 4.7: pcDNA 3.1/ GFP11 ₄ ::CCDC124 plazmidinin Poly IC stresi altında immüno boyama görüntüleri.	52
Şekil 4.8: pcDNA 3.1/ GFP11 ₄ ::CCDC124 plazmidinin 46 C° stresi altında immüno boyama görüntüleri.	53
Şekil 4.9: pcDNA 3.1/ GFP11 ₄ ::CCDC124 plazmidinin 37 C° altında immüno boyama görüntüleri.	54
Şekil 4.10: pcDNA 3.1/ CCDC124::GFP11 ₄ plazmidinin H ₂ O ₂ stresi altında immüno boyama görüntüleri.	56
Şekil 4.11: pcDNA 3.1/ CCDC124::GFP11 ₄ plazmidinin Poly IC stresi altında immüno boyama görüntüleri.	57
Şekil 4.12: pcDNA 3.1/ CCDC124::GFP11 ₄ plazmidinin 46 C° stresi altında immüno boyama görüntüleri.	58
Şekil 4.13: pcDNA 3.1/ CCDC124::GFP11 ₄ plazmidinin 37 C° altında immüno boyama görüntüleri.	59
Şekil 4.14: CCDC124::GFP11 ₄ ve GFP11 ₄ ::CCDC124 proteinlerinin stres şartlarındaki immüno blot görüntüsü.	60
Şekil 4.15: U2OS hücre hattında canlı hücre görüntüsü.	61
Şekil 4.16: U2OS hücre hattında kalıcı olarak ifade edilen pEGFP-N2/CCDC124 plazmidinin canlı hücre görüntüsü.	61
Şekil 4.17: U2OS hücre hattında kalıcı olarak ifade edilen pcDNA3.1/GFP11 ₄ ::CCDC124 plazmidinin canlı hücre görüntüsü.	62

- Şekil 4.18:** U2OS hücre hattında kalıcı olarak ifade edilen pcDNA 3.1/CCDC124::GFP11x₄ plazmidinin canlı hücre görüntüsü. 63
- Şekil 4.19:** U2OS hücre hattında kalıcı olarak ifade edilen pcDNA 3.1/CCDC124::GFP11x₁ plazmidinin canlı hücre görüntüsü. 64
- Şekil 4.20:** CCDC124-G3BP1 etkileşiminin birlikte çöktürme görüntüsü. 65



TABLÖLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 3.1: Kullanılan primer ve sekansları.	22
Tablo 3.2: Yürütme jeli için kullanılan kimyasallar ve miktarları.	24
Tablo 3.3: Ayırma jeli için kullanılan kimyasallar ve miktarları.	25
Tablo 3.4: Çalışmalarda kullanılan antikörler.	26
Tablo 3.5: Polimeraz Zincir Reaksiyonu Bileşenleri.	27
Tablo 3.6: Ligasyon ürünü şartları ve miktarları.	27
Tablo 3.7: Çalışmada kullanılan transfeksiyon solüsyonları ve miktarları.	28
Tablo 3.8: Kimyasal ürünler ve onlara ait bilgiler.	28
Tablo 3.9: Kullanılan kitler.	29
Tablo 3.10: Kullanılan Cihazlar.	29
Tablo 3.11: Standart PZR koşulları.	32
Tablo 3.12: Lentiviral Vektör oluşumu için uygulanan PEI transfeksiyon basamakları.	37
Tablo 3.13: pcDNA3.1/CCDC124::GFP11 _{X4} plazmidinin transfeksiyonu için gerekli koşullar.	37
Tablo 3.14: pcDNA3.1/ GFP11 _{X4} ::CCDC124 plazmidinin transfeksiyonu için gerekli koşullar.	38
Tablo 3.15: pcDNA3.1/CCDC124::GFP11 _{X1} plazmidinin transfeksiyonu için gerekli koşullar.	38

1. GİRİŞ

Son yıllarda, sıvı-sıvı faz ayrımının (LLPS) nörobiyolojideki rolünü ve aynı zamanda Amiyotrafik lateral skleroz (ALS), frontotemporal demans (FTD) gibi nörodejeneratif hastalıkların beyindeki patolojik sonuçlarını araştıran çalışmalarda hızlı bir artış yaşanmıştır. Bu çalışmalar doğrultusunda LLPS'nin çeşitli işlevler için protein ve/veya RNA ları sıvı benzeri kondensatlara yoğunlaştıran evrensel bir mekanizma olduğu anlaşılmaktadır. Nöronlarda, DNA hasar onarımı, lokal mRNA translasyonu ve nöronal stres tepkisinde dahil olduğu çeşitli şartlarda RNA ve protein kondensatlarının oluşumu rapor edilmiştir. Hatta bu yapılara katılan proteinlerin büyük oranda RNA bağlayıcı protein olduğu (RBP) ve ALS, FTD gibi nörodejeneratif hastalıklarda rol oynadığı tespit edilmiştir [1].

Amiyotrafik lateral skleroz (ALS) Lou Gehrig hastalığı olarak da bilinen kaslarda sertleşme, sertlik ve atrofi ile karakterize olan ve ileriki dönemlerde istemli kasları kontrol eden nöronların dejenerasyonu nedeniyle istemli hareketlerin tamamen kaybolmasıyla izlenen bir motor nöron hastalığıdır. Ailesel ALS ile ilişkilendirilmiş SOD1, FUS, TARDBP ve C9orf72 gibi genler düzinelerce genden sadece bazılarıdır ve bu genler ALS vakalarının sadece küçük bir yüzdesini oluşturur. Vakalarının büyük bir çoğunluğunu ise nedeni bilinmeyen sporadik ALS türleri oluşturmaktadır [2,3].

CCDC124 proteini mantardan insana kadar tüm ökaryotlarda korunmuş RNA-bağlayıcı bir proteindir. Daha önce yapılan çalışmalarda %84 olasılıkla çekirdekte lokalize olduğu [4] ve daha sonra yapılan ayrıntılı çalışmalar sonucunda, hücre bölünmesi sırasında yer değiştirdiği geç anafaza kadar sentrozomda konumlandığı, sonrasında sentrozomdan ayrılarak hücreler arası orta bölgeye ardından orta cisimciğe hareket ettiği gözlemlenmiştir [5]. Bunun yanı sıra yapılan çalışmalar doğrultusunda özellikle sitokinezde görev alan ve Rap2 aktivasyonunu sağlayan Ras guanin nükleotit değiştirici faktör 1B (RASGEF1B) proteini ile CCDC124 proteininin etkileştiği tespit edilmiştir [6]. Yapılan çalışmalar CCDC124 proteininin olası LLPS etkisi gösterebileceği ve stres tepkisinde bu yapıların oluşturduğu zarsız organellerde (stres granül) konumlanabileceği düşünülmektedir.

1.1. Literatür Özeti, Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

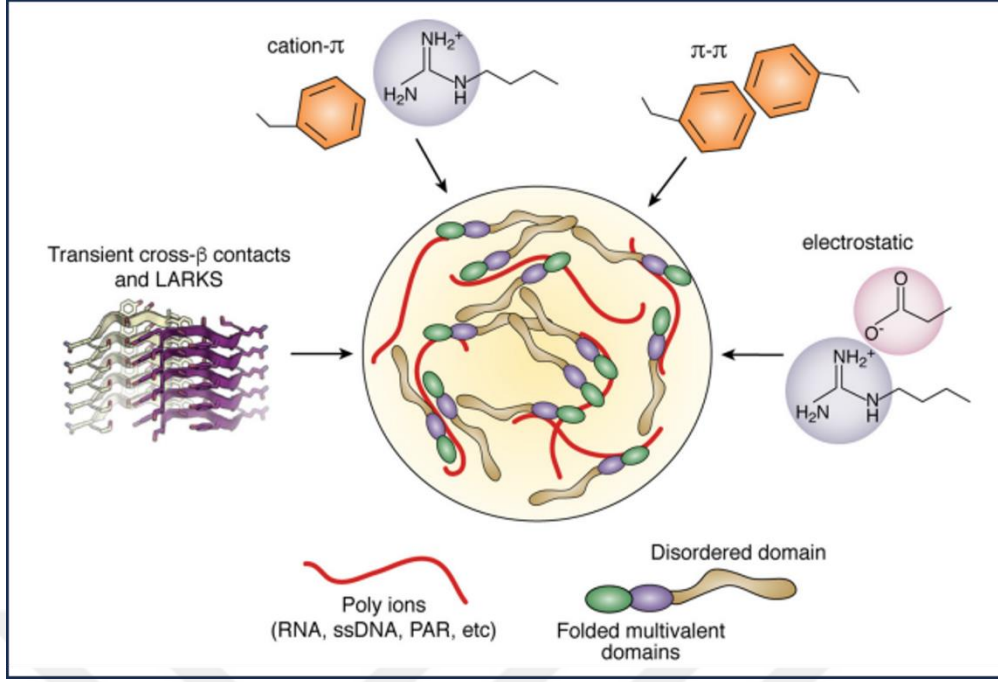
CCDC124 proteininin daha önce yapılan çalışmalar doğrultusunda hücre içerisinde çeşitli bölgelerde konumlandığı tespit edilmiş olup protein lokalizasyonunun belirlenmesi ve stres şartlarında nerede konumlandığı küçük floresan etiketi takılarak hücre içerisindeki konumunun rahatça izlenebilir olmasıyla tespit edilebileceği öngörülmüştür. Bu kapsamda yapılan çalışmalarda Ccdc124 geninin N ve C ucuna GFP11 fragmenti eklenerek oluşturulan plazmidler GFP1-10 plazmidi ile eş transfeksiyon gerçekleştirilerek U2OS (insan osteosarkomu) hücre hattında kalıcı ifadesi gerçekleştirilmiştir. Kalıcı olarak ifade edilen GFP11 etiketli CCDC124 proteinleri sıcaklık (46 C°), oksidatif stres (2mM H₂O₂) ve viral stres (500 ng/μL Poly IC) şartlarında stres granül belirteci olan G3BP1 antikoru ile immünboyama yöntemiyle gözlenmiştir. Yapılan immünboyama çalışmalarına ek olarak canlı hücre görüntülemesi ve eş çöktürme deneyleri gerçekleştirilerek CCDC124 proteininin stres granül oluşumunda etkili olup olmadığının belirlenmesinde etkili olması hedeflenmiştir.

2. SIVI SIVI FAZ AYRIMI

Hücrelerde faz ayrımı, makromolekül bileşiklerin yağ-su ayrımı gibi çeşitli etkileşim kuvvetleri altında belirgin bir şekilde sıvı faz oluşturduğu biyolojik bir olgudur [7]. Makromoleküllerin polimerizasyonu ile oluşturulan damlacıklar akışkan özelliğe sahip olup aşamalı olarak küresel şekil alma eğilimindedir ve birkaç saniye içinde birleşip ayrışabildiklerinden dolayı sinyallere hızlı ve doğru bir şekilde yanıt verebilir. Hücre içi bileşenlerin faz ayrımı ile reaksiyon bölmeleri oluşturabileceği ve aynı anda birden fazla biyolojik olayın gerçekleşebileceği bir ortam oluşturabileceğine inanılmaktadır. Araştırmacılar tarafından 1899 gibi erken bir tarihte sitoplazmanın çeşitli kimyasal özelliklere sahip yüzen damlacıklar oluşturabileceği hipotezi ilk kez öne sürülmüştür [8]. Bunun yanı sıra 21. yüzyılın başlarında *Caenorhabditis elegans*'taki P granüllerinin damlacık benzeri özelliklere sahip olduğunun tesadüfen keşfedilmesi faz ayrışmasının belirli molekülleri bir araya getirerek kaotik ve kalabalık hücrelerde düzenli bir bölme oluşturmaya neden olduğu hipotezini ortaya atmıştır [9].

Faz ayrılmış sistemler, zarsız organeller [10], biyomoleküler kondensatlar [11], faz ayrılmış cisimler [12], sıvı damlacıklar [13], granüller [14] veya düzenekler [15] olmak üzere birçok isimle anılır.

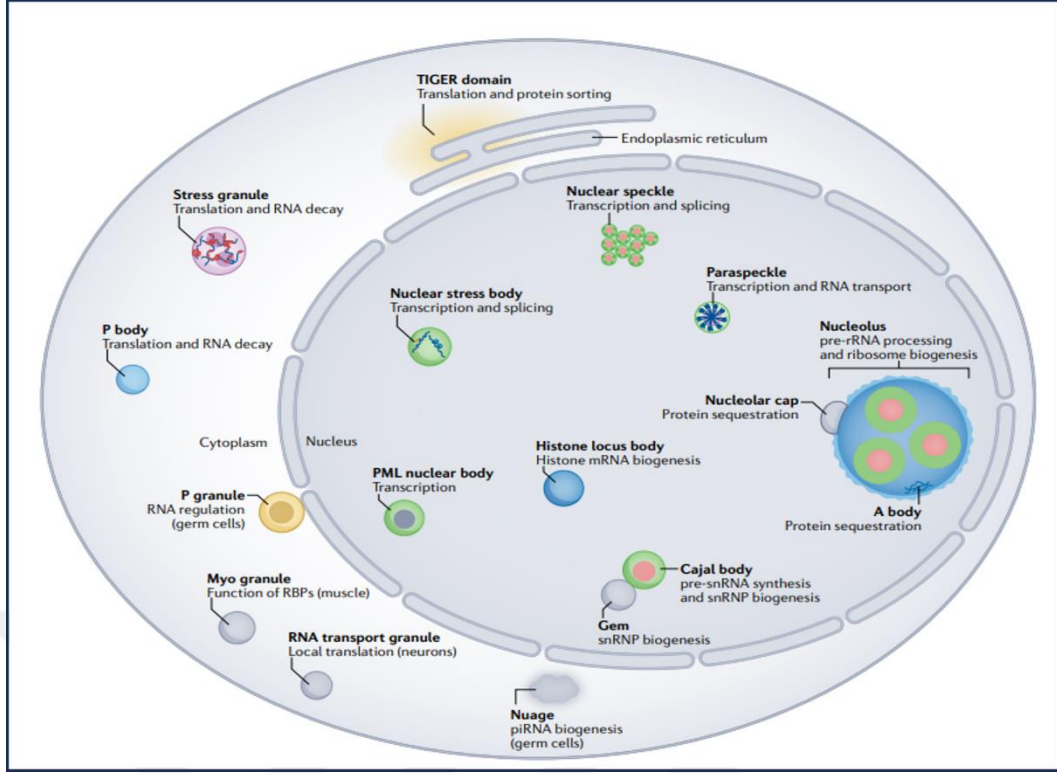
Elektrostatik, hidrofobik, pi-pi ve katyon-pi içeren zayıf molekül içi ve moleküller arası etkileşimler sıvı sıvı faz ayrımı zarsız organellerin oluşumu için itici bir güç oluşturmaktadır (Şekil 2.1) [16-18]. Son zamanlarda yapılan çalışmalar protein ve RNA moleküllerinin sıvı sıvı faz ayrımı ile bir araya gelerek biyolojik fonksiyonların ve aktivitelerin düzenlenmesi için zarsız organellerin oluşumda etkili olduğunu göstermiştir [10].



Şekil 2.1: Sıvı sıvı faz ayrımını yönlendiren kritik etkileşimler.

2.1. Zarsız Organeller

Ökaryotik hücrelerdeki sınırlı boşluklarda çok sayıda protein etkileşimleri ve biyokimyasal reaksiyonlar aynı anda meydana gelir. Bu hücresel süreçlerin uzay-zamansal özgülüğünü ve etkinliğini sağlayan çok sayıda mekanizma tanımlanmıştır. Çeşitli sinyal yollarının ve biyolojik etkileşimlerin verimli ve spesifik olarak ilerlemesine izin veren nispeten sınırlı alanlar sağlayan ve fosfolipid zarlarla sınırlanan organeller mevcuttur [19]. Golgi cisimciği, endoplazmik retikulum ve mitokondri gibi lipid tabakalı çift zarla çevrelenen organeller dışında membransız organel adı verilen (MLOs) ve zarla çevrili olmayan birçok organel bulunmaktadır (Şekil 2.2) [20]. İlk MLO olarak adlandırılan nükleolus, 1770’lerde Felice Fontana tarafından ökaryotik hücre bölünmesinin ara fazı sırasında mikroskop altında görülebilen bir hücresel bölme olarak gözlemlenmiş ve ilk güvenilir tanımları ise bundan yaklaşık 60 yıl sonra 1830 yıllarında raporlanabilmiştir [21].



Şekil 2.2: Ökaryotik hücrelerin çekirdeğinde, sitoplazmasında ve zarlarında bulunan sayısız yoğunlaşmanın şeması.

Zarsız organeller genellikle molekül içi ve moleküller arası etkileşime izin veren çok değerlikli moleküller içerir [22]. Proteinler ve/veya nükleik asitler arasındaki çok değerlikli etkileşimler sıvı sıvı faz ayrımının en temel biyokimyasal ilkesidir [23]. Proteinlerin çok değerlikli etkileşimini destekleyen bölgeler ise içsel düzensiz bölgeler (IDR) ve düşük karmaşıklık bölgeleri (LCD) dir [24]. Serin, arjinin, glutamin, glutamat ve lizin gibi hidrofilik, tirozin, fenilalanin ve triptofan gibi aromatik kalıntılar ve yüklü kalıntılar gibi bazı spesifik amino asitler genellikle IDR’lerde oldukça zengindir. Bu kalıntılar sırasıyla elektrostatik, pi-pi ve katyon-pi etkileşimlerinin oluşmasında katkıda bulunurlar. Buna rağmen lösin, valin ve izolösin gibi alifatik kalıntılar IDR’lerde daha az rastlanır [25].

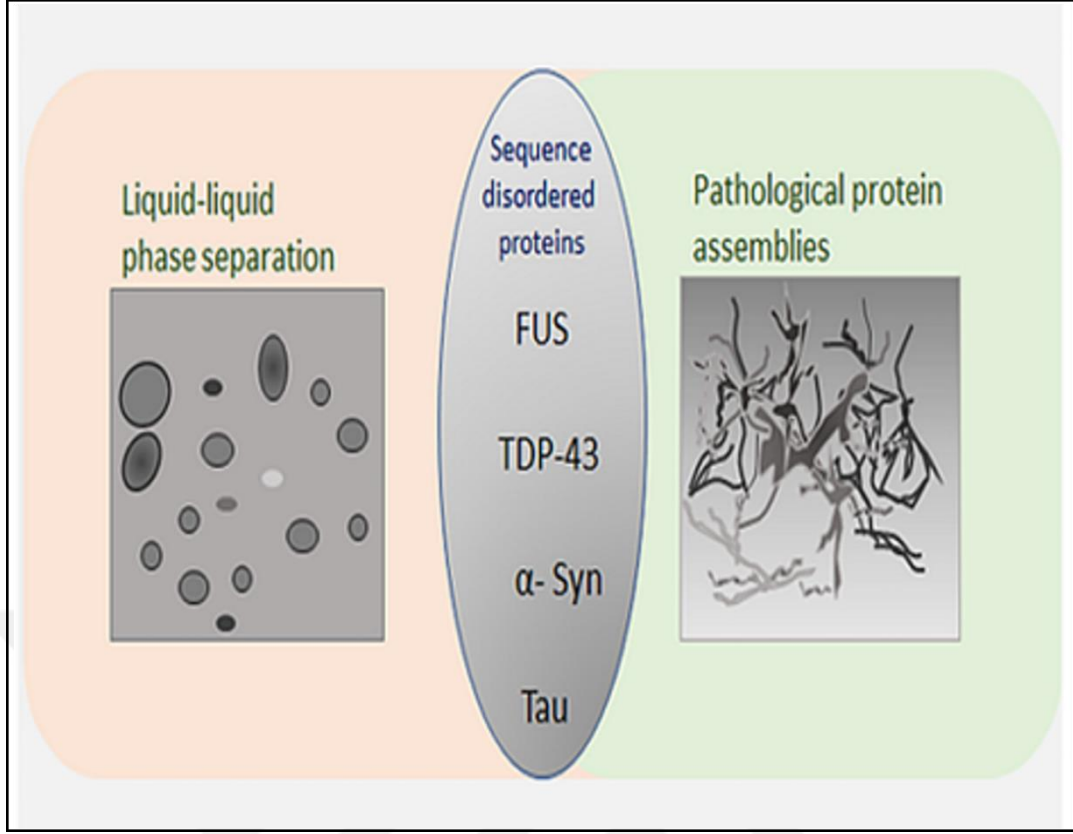
Biyolojik makromoleküllerin faz ayrımı proteinler ile sınırlı değildir. RNA, faz ayırma konsensatlarının bir başka önemli bileşenlerindendir. RNA, hücrede sıvı sıvı faz ayrımını teşvik ederek RNA/protein açısından zengin zarsız agregat oluşumunda yaygın olarak yer alır [26]. Birçok RNA bağlayıcı protein (RBP), prion benzeri alanlar (PLD’ler) olarak adlandırılan içsel düzensiz bölgelere (IDR) ve düşük karmaşıklık bölgelerine (LCD) sahiptir, böylece kalabalık bir ortamda faz ayırma konsensatları oluşturabilmektedir [27-29].

Faz ayrımının oluşumu, RNA'nın tipi ve konsantrasyonu ile yakından ilgilidir. Yüksek RNA/protein oranı faz ayırma damlacıklarının oluşumunu engellerken, düşük RNA/protein oranı faz ayırma damlacıklarının oluşumunu destekleyebilmektedir. Nükleer RNA seviyesinin azalması veya RNA bağlanmasının genetik değişimi, hücrelerde aşırı faz ayrımına yol açar, bu da sitotoksik katı benzeri agregatların oluşumunu destekler [27].

2.2. Zarsız Organeller ve Nörodejeneratif Hastalıklar

İnsanlarda çok çeşitli nörolojik bozuklukların meydana gelmesinde proteinlerin yanlış katlanması ve agregat oluşumu sorumludur. Hücrede yanlış katlanmış bu proteinlerin yeniden katlanmasında veya parçalanması durumunda moleküler şaperonlar devreye girer. Uygun şartlar altında birçok protein amiloid fibril oluşturma potansiyeline sahiptir [30]. Fizyolojik koşullar altında amiloidoza aracılık edebilen birçok protein bol miktarda kendiliğinden düzensiz bölgelere (IDR) sahip olmasının yanı sıra agregat oluşumu için gerekli birçok kısa amino asit bölgeleri/motifleri barındırır [31]. Agregatların biyokimyasal stabilitesi, yanlış katlanmış proteinlerin doğal durumlarından amiloid yapılara dönüşmesinde (prion benzeri çoğalmaya neden olma) etkili olur [32]. Proteinler, hücresel yaşlanma, proteotoksik stres veya patojenik mutasyonun varlığı göz önüne alındığında kontrol mekanizmasından kurtularak oligomer yapılardan amorf yapılara ve hatta fibril oluşumlarına kadar değişen yapılar oluşturarak birikmeye başlarlar.

Alzheimer (AD) de nörofibriler yumaklar ve amiloid plaklar, Parkinson (PD) de Lewy cisimcikleri, Lewy nöritleri ve bulaşıcı süngerimsi ensefalopatide amiloid plaklar gibi yanlış katlanmış proteinlerin kalıcı kümelerinin varlığı nörolojik hastalıkların bir özelliği olmuştur. Son zamanlarda sıvı sıvı faz seperasyonu, Alzheimer (AD) hastalığında bulunan Tau ve çeşitli taupatiler, Amyotrofik lateral skleroz ve Frontotemporal demans (ALS ve FTD) hastalıklarında bulunan FUS ve TDP43 proteinleri, Parkinson (PD) hastalığında bulunan α -Syn ve diğer sinükleinopatilerin de dahil olduğu ve nöropatolojilerde yer alan çok sayıda protein tarafından paylaşılabilecek bir süreç olarak gelişti (Şekil 2.3) [33].



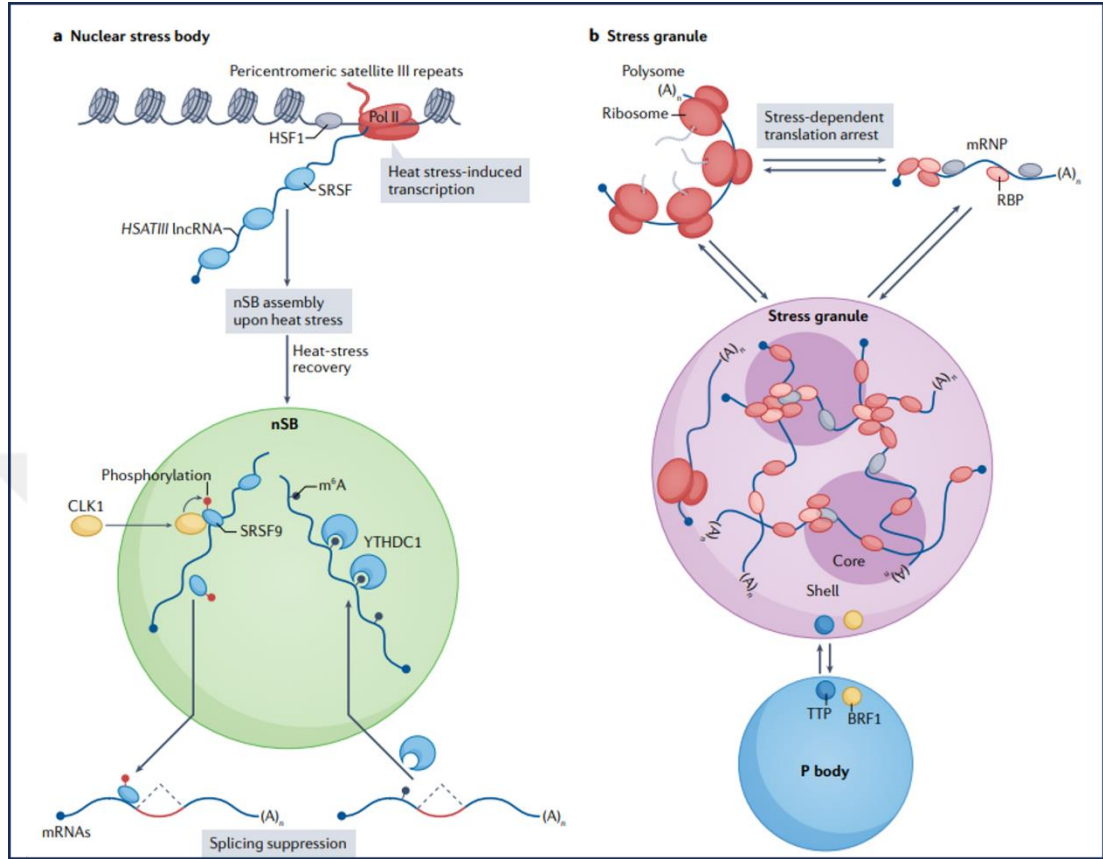
Şekil 2.3: Nörodejeneratif hastalıklarda düzensiz proteinlerin sıvı yapıdan katı yapıya geçişi.

Nörodejenerasyon aynı zamanda uygun stres granül (SG) oluşumunun eksikliğinden de kaynaklanıyor olabilir [34]. Nöronlar strese yanıt olarak geçici SG oluşturabilirler fakat SG oluşum dinamiklerindeki kusurlar nörodejenerasyon oluşumunu hızlandırabilir [35].

2.3. Stres Bağımlı Zarsız Organeller

Spesifik zarsız organellerin oluşumu, sıcaklık değişimi, ozmotik basınç, radyasyon ve genellikle DNA'ya zarar veren kimyasalların neden olduğu çeşitli streslere yanıt olarak indüklenir. Bu stresler, gen ifade süreçlerini büyük oranda etkiler. Örneğin ısı şoku, transkripsiyon, RNA işleme-taşıma ve çeviri dahil olmak üzere gen ifadesinin birçok adımını durdurur [20,36]. Nükleolus gibi zarsız organeller termal stres koşulları altında iç yapılarında şiddetli değişiklikler sergilerken, bazı zarsız organeller çeşitli stres kaynaklı olayların örneğin spesifik RNA'ların sentezi, RNP komplekslerinin yeniden modellenmesi ve RNA modifikasyonlarının değiştirilmesi gibi nedenlerden dolayı yeniden oluşur [36-39]. Stres kaynaklı zarsız organeller arasında, nükleer stres

body (nSB)'ler ve sitoplazmik stres granülleri, zıt özellikler sergileyen en karakterize zarsız organellerdir (Şekil 2.4) [20].



Şekil 2.4: Sitoplazmadaki ve çekirdekteki stres bağımlı zarsız organeller.

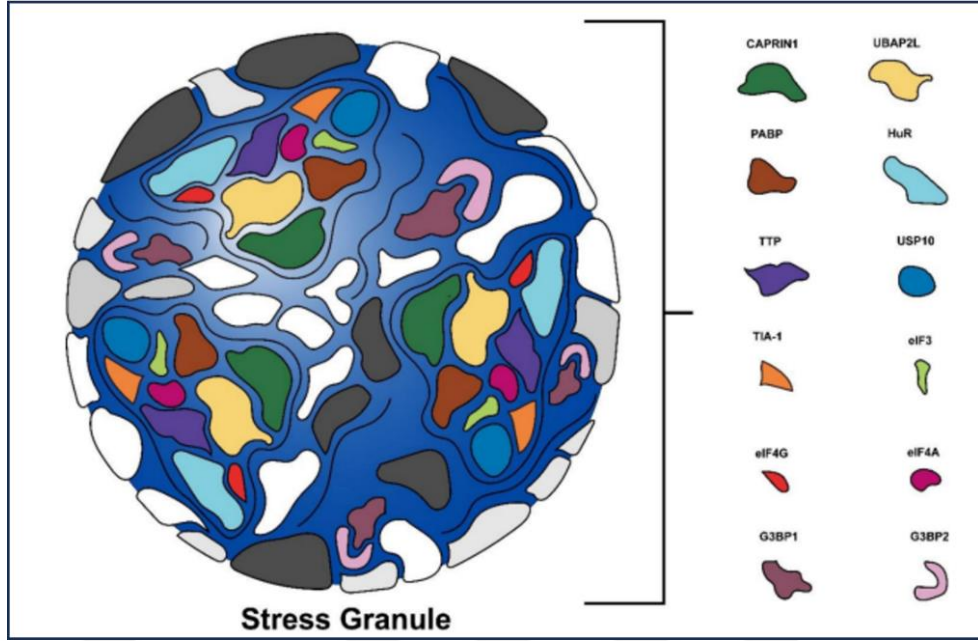
2.3.1. Nükleer Stres Body

Nükleer Stres Body'ler (nSB), termal stres üzerine çekirdekte spesifik olarak oluşur [40]. nSB'ler Primata özgü pericentromeric yüksek oranda tekrarlayan uydu III (HSATIII) bölgelerinden kopyalanan ısı stresi kaynaklı lncRNA'lar üzerinde oluşurlar. Bu uydu III bölgeleri, esas olarak normal koşullarda transkripsiyonel olarak sessiz olan ancak ısı stresi koşullarında transkripsiyon faktörü ısı şok faktörü protein 1 (HSF1) tarafından aktive edilen ve insan kromozomları 9, 12 ve 15'in pericentrometrik bölgelerinde bulunan GGAAT tekrarlarından oluşur (Şekil 2.4a) [41]. HSATIII lncRNA'ların GGAAU tekrarları, nSB'leri birleştirmek için yapı iskelesi bağlanma faktörü B (SAFB) ve spesifik serin/arginin açısından zengin ekleme faktörleri (SRSF'ler) gibi spesifik RBP'leri seçici olarak alabilir [42].

2.3.2. Sitoplazmik Stres Granülü

Stres granülleri, kimyasallar (örneğin arsenit), UV ışığı, ısı ve oksijen radikalleri ile ilişkili çeşitli çevresel streslere maruz kaldıktan sonra hızla oluşan 0.1–2 µm boyutunda sitoplazmik zarsız organellerdir. Stres granül oluşumu, stres koşullarında global translasyon durması ile indüklenir, bu da daha sonra stres granülleri oluşturmak üzere yoğunlaşan ve ribozoma bağlı olmayan mRNA'larla ilişkili RBP'lerin birikmesine neden olur (Şekil 2.4b) [40]. Fakat bazı çalışmalar ise bu durumun aksine SG oluşması için global translasyonun durmasının gerekli olmadığını [43], SG'lerin bir araya gelmesindeki bozulmanın çekirdek içindeki faktörlerin tükenmesinden dolayı kaynaklandığını ve bu durumun global protein sentezini etkilemediğini ileri sürmüştür [44]. Stres faktörü ortadan kalktıktan sonra ise stres granülü hızla parçalara ayrılır ve translasyon işlemi yeniden etkinleştirilir [40].

Stres granülleri 200'den fazla protein içerir ve bunların çoğu, mRNA stabilitesi ve translasyon kontrolü gibi çeşitli transkripsiyon sonrası kontrol formlarında yer alan RBP'lerdir [45]. G3BP1 ve G3BP2, UBAP2L, TIA1, TTP, FMRP ve CAPRIN1 dahil olmak üzere spesifik RBP'ler, stres granülü oluşturan faktörler olarak işlev görür (Şekil 2.5) [46-50]. Bu proteinlerden iki tanesi Ras GTPaz Aktive Edici Protein SH3 Domain Binding Protein 1 (G3BP1) ve Ras GTPaz Aktive Edici Protein SH3 Domain Binding Protein 2 (G3BP2) proteinleri SG oluşumu için oldukça önemlidir ve bu önemin yanında SG oluşumunun temel bileşenleri olarak SG lerin gerçekleştirdiği işlevler bakımından da oldukça kritik bir öneme sahiptir [51].



Şekil 2.5: Stres granül bileşenleri.

2.3.2.1. G3BP

Ras GTPaz Aktive Edici Protein SH3 Domain Binding Protein (G3BP), son birkaç yılda önemli bir kanser markör proteini [52] ve potansiyel hedef ilaç olduğunu kanıtlayan [53-55] ve her yerde ifade edilen 68 kDa büyüklüğünde bir proteindir. Adından da anlaşıldığı üzere RasGAP in SH3 alanına bağlanır [56]. Memelilerde G3BP protein ailesi G3BP1, G3BP2a ve onun varyantı olan G3BP2b den oluşur. G3BP1 ve G3BP2 proteinleri insanlarda sırasıyla 5. ve 4. kromozom üzerinde farklı genler tarafından kodlanmaktadır [57].

G3BP protein ailesi, nükleer taşıma faktörü 2 C-terminalinde (NTF2 alanı), asidik açıdan zengin bölge, prolin açısından zengin (PxxP) motif, RNA tanıma motifi (RRM) ve RGG alanı (arginin glisin açısından zengin kutular) olmak üzere beş farklı motif içerir (Şekil 2.6) [57,58]. NTF2 yapısal alanı, her zincir üç alfa heliks ve bir beta yaprağından oluşan bir homodimer oluşturur [59]. FGDF motifini içeren peptit, G3BP'nin NTF2 alanının yüzeyindeki hidrofobik bir oyuğa bağlanır ve bu, SG'lerin oluşumunu engeller [60]. NTF2 alanı, nükleer taşıma ve hücrel lokalizasyon ile ilişkilidir ve ayrıca diğer şaperon proteinlerinin yanı sıra onun oligomerizasyonuna aracılık etmek için bir taşıyıcı olarak kullanılabilir [48,59]. G3BP'nin 149. serin

aminoasidinin (Ser-149'un) fosforilasyon aracılı modifikasyonu, G3BP'nin mRNA bozulmasına aracılık etmedeki rolünü etkiler [61].

Asidik açıdan zengin bölge, faz ayrımını olumsuz olarak düzenleyebilir [62].

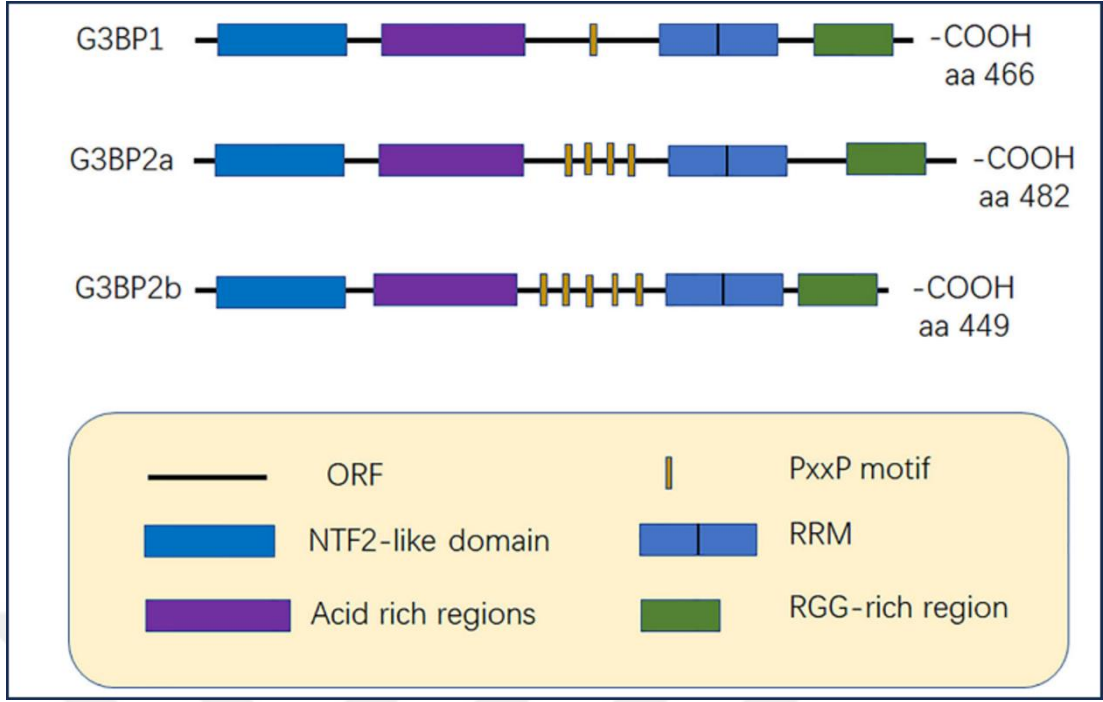
G3BP'nin PxxP alanı, protein kinaz aktivasyonu (PKR), G3BP1'in antiviral aktivitesi ve stres granülünün çekirdeklenmesi için gereklidir [63,64].

RRM alanı, RNA bağlanması için gerekli olan motif boyunca dağılmış korunmuş hidrofobik amino asitlerden oluşan iki kısa diziyi, RNP1 ve RNP2'yi içerir [65].

RGG alanı, arjinin-glisin-glisin kümelerinden oluştuğundan dolayı RGG olarak adlandırılır. Bu alan büyük miktarda arjinin içerdiğinden dolayı kolayca metillenir. G3BP1'in metillenmesi stres granülü oluşumunu engeller [66]. G3BP1'in RG açısından zengin alanı, RNA bağlanma afinitesini artırır ve G3BP1-RNA kompleksini düzenleyerek protein-protein etkileşimine aracılık eder [62]. Yakın zamanlarda yapılan çalışmalarda, G3BP1'in G3BP2'nin aksine Wnt/ β -catenin sinyal yolağında negatif düzenleyici olduğu bulunmuştur [67,68]. Bazı durumlarda G3BP1 ve G3BP2'nin fonksiyonları gereksizdir [69]. Örneğin G3BP1'in yıkılması, G3BP1'in fonksiyonunun ve ifadesinin kaybının telafisi için G3BP2'nin ifadesini artırır fakat tam tersi durumda bu olay geçerli değildir [69,70].

G3BP'lerin normal tüm hücrelerde ifade edilmesine karşın izoformları olan G3BP1'in akciğer ve böbrekte, G3BP2a'nın beyinde ve G3BP2b'nin ise ince bağırsak gibi spesifik dokularda ifade edildiği tanımlanmıştır [57].

G3BP'lerin hücrenin proliferasyonunda etkisinin olmasının yanı sıra tek görevinin bu olmadığı düşünülmektedir. Bunun yanı sıra ortaya çıkan kanıtlar neticesinde, bu proteinlerin çeşitli hücresel ve hücre altı durumlarda bir dizi hücre sinyaline yanıt olarak çeşitli kontrol seviyelerindeki gen ifadesinde değişikliklere aracılık edebileceği gösterilmiştir. Örneğin, G3BP'ler SG'leri oluşturur [48], antiviral aktivitelere sahiptirler [71] ve aynı zamanda epitelyal-mezenkimal geçişe (EMT) bağlı metastazda rol oynarlar [72,73].



Şekil 2.6: G3BP'nin yapısı.

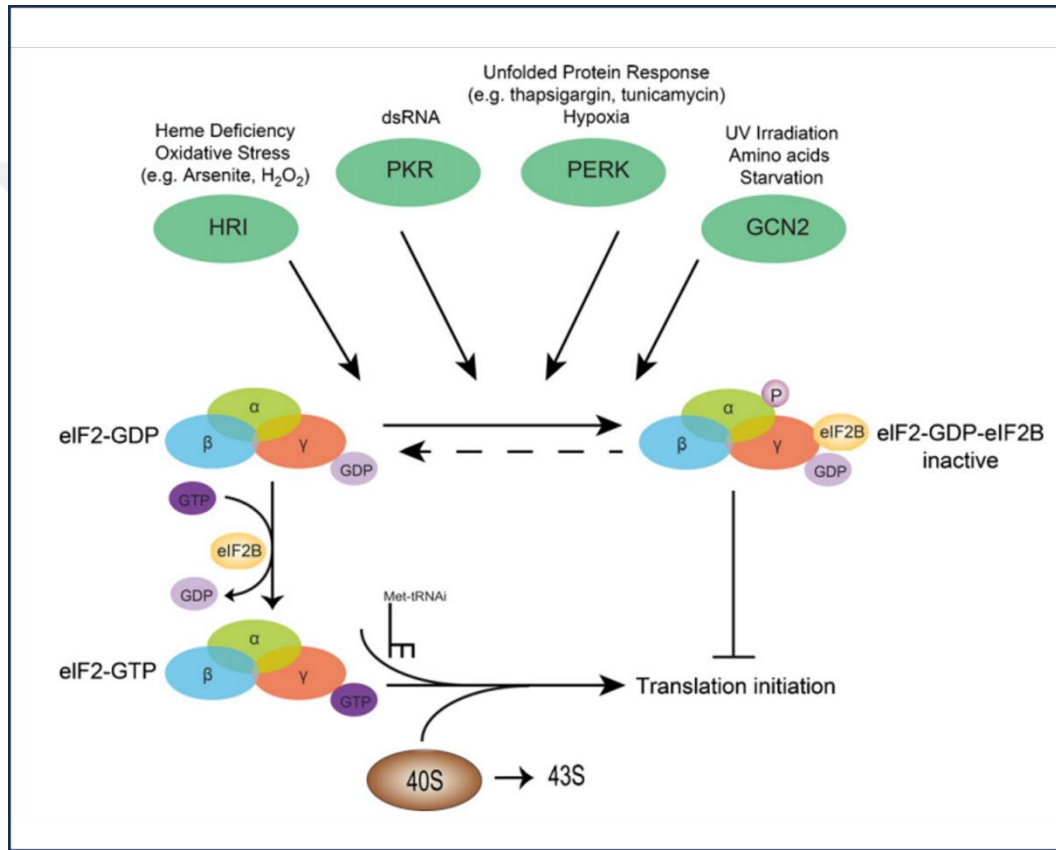
2.3.2.1.1. G3BP1

G3BP1 geni, kromozom 5'te bulunup insanlarda G3BP1 kodlar. Transkripsiyonda, 14 farklı transkriptten sadece 2 tanesi 466 amino asit içeren protein kodlar ve diğerleri duyu aracılı olmayan bozunma (GTEx) ile bozulur. Çevrilmemiş bölgelerdeki boyut protein kodlayan iki transkript arasındaki farka neden olur. Transkriptler arasındaki bu ayrımlar, transkriptlerin düzenlenmesinde ve/veya lokalizasyonunda bir farklılığa işaret eder.

G3BP1 yapısal olarak heterojen nükleer ribonükleoprotein (hnRNP) süper ailesi proteinlerine benzer [74]. Bu benzerlik nedeniyle, G3BP1'in öncelikle sitoplazmada lokalize olduğu gözlemlenmesine rağmen, NTF2 benzeri alanının nükleer mekik hareketinde rol oynadığı öne sürülmüştür [59].

Stres granül belirteci olan G3BP'nin protein ailesi olarak bilinen G3BP1 stres sırasında çift sarmallı RNA (dsRNA) bağımlı PKR, protein kinaz R-benzeri endoplazmik retikulum kinaz (PERK), heme ile düzenlenen inhibitör (HRI), genel kontrol bastırılabilir-2 (GCN2) veya mikrotübül afinitesi kinaz 2'yi (MARK2) olarak adlandırılan beş kinazdan biri aktive olur. Aktive edilmiş kinaz ise çeviri başlatma

faktörü eIF2 α 'nın alt birimini fosforile eder [75,76]. eIF2 α 'nın fosforile edilmesiyle başlatma kompleksi kullanılmaz hale gelir ve bu durumda çeviri başlangıcında bir duraklamaya yol açar [77]. G3BP ise fosforilsyona gerek duyulmadan stres granüllerine alınır. Bu durum, G3BP'lerin fosforilasyon durumunun mRNA'ları hücrel stres sırasında bozulmadan koruyarak kaderini etkileyebileceğini düşündürmektedir. eIF2 α 'nın translasyon kontrol mekanizmasına ait görsel Şekil 2.7'da ayrıntılı olarak gösterilmektedir [78].



Şekil 2.7: Ökaryotik başlama faktörü 2 (eIF2 α) translasyon kontrolü.

Stres sırasında aktive edilen kinazlardan her biri farklı bir stres veya stres türüne tepki vermektedir. Dolayısıyla, eIF2 α kinazları arasındaki benzerliğin kinaz alanlarındaki önemli dizi benzerliklerinin olmasının yanı sıra bu kinazların hangi sinyaller tarafından etkinleştirildiğini yapılarındaki benzersiz özellikler belirler.

2.4. Stres Türleri

2008 yılında yapılan bir çalışmaya göre stres tipleri Tip I ve Tip II olarak belirtilen iki özel kategoride sınıflandırılmıştır. Tip I stresler hipoksi, ısı şoku ve arsenik içeren SG oluşumunu tetiklerken, Tip II stresler ise etoposid gibi genotoksik ilaçlar, metil metansülfanat (MMS) benzeri ilaçlar ve X-ray içeren MAPK basamaklarını etkinleştirir [79].

Bazı çalışmalar, viral enfeksiyonların bir dizi hücrel stres reaksiyonunu tetikleyebildiğine ve sonuç olarak SG'lerin birleştirilmesini veya sökülmesini düzenleyebildiğine işaret ederek, SG'lerin konakçı ve virüs tarafından kodlanmış mRNA'ların translasyonunu dengelemedeki önemini ortaya koymaktadır [80-82].

2.4.1. Viral Stresi

SG protein bileşenlerinin virüsler ile etkileşiminin aydınlatılması için yapılan çalışmalar ilk kez 2002 yılında rapor edilmiştir. Li ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada Batı Nil virüsünde bulunan genomun negatif ipliğindeki 3 ucundaki yapının SG bileşenlerinden olan TIA-I ve TIAR proteinler ile etkileşime girdiği tespit edilmiştir [83].

Viral enfeksiyon stres tepkisini tetikleyerek SG oluşumuna neden olmaktadır. Virüs ile enfekte olmuş hücrelerde virüs RNA'sını tanıyan ve antiviral ajanlar üreten RIG-I benzeri reseptörler (RLR) bulunmaktadır ve bu reseptörler virüslerin temizlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Virüslerle enfekte edilmiş hücrelerin RLR'leri, 40S ribozom alt birimleri, mRNA'ları ve RNA bağlayıcı proteinlerine bakıldığında virüslerin oluşturduğu SG'ler ile aynı yerde konumlandığı tespit edilmiştir [84].

2.4.2. Oksidatif Stres

Oksidatif stres, oksidan ya da reaktif oksijen (ROS) olarak adlandırılan serbest radikallerin ve reaktif metabolitlerin üretimi ve bunların antioksidanlar olarak adlandırılan koruyucu mekanizmalar tarafından ortadan kaldırılması arasındaki dengesizliği tanımlamaktadır [85]. Oluşan bu dengesizlik, önemli biyomoleküllerin ve hücrelerin önemli ölçüde zarar görmesine neden olabilmektedir [86]. ROS, bitki ve hayvan hücrelerinde hücre içi ve hücre dışı koşulların neden olduğu değişikliklere

yanıt olarak sinyal yollarının uyarılmasında önemli bir rol oynamaktadır [87]. Yapılan çalışmalar doğrultusunda ROS'un sürekli oluşan çevresel stres altında zamanla üretildiği ve bundan dolayı hücre yapısında ve fonksiyonlarında önemli hasar meydana gelebileceği, somatik mutasyonlara ve neoplastik transformasyona neden olabileceği düşünülmüştür [88]. Bunun yanı sıra oksidatif stresin, DNA mutasyonlarını arttırarak veya DNA hasarını, genom kararsızlığını ve hücre çoğalmasını indükleyerek kanserin başlaması ve ilerlemesinde etkili olduğu belirtilmiştir [89].

Bir hücrede gerçekleşen oksidatif hasarın Alzheimer, Parkinson ve prion hastalığı dahil olmak üzere birçok protein hastalıklarının oluşmasında etkili olduğu düşünülmektedir [90]. Daha sonra yapılan çalışmalarda ise glikoz yoksunluğunun, hidrojen peroksitin ve sodyum arsenitin neden olduğu oksidatif stresin SG oluşumunda önemli bir tetikleyici olduğu öne sürülmüştür. Farklı oksidatif stres şartlarına yanıt veren SG'lerin farklı bileşenleri olduğu görülmektedir. Örneğin, arsenit kaynaklı SG'ler esas olarak eIF4 kompleksini içerir ve eIF2'nin fosforilasyonunu gerektirirken, eIF3, eIF4E ve eIF4G konsantrasyonları hidrojen peroksit kaynaklı SG'lerde düşük olduğu tespit edilmiştir [91].

2.4.3. Sıcaklık Stresi

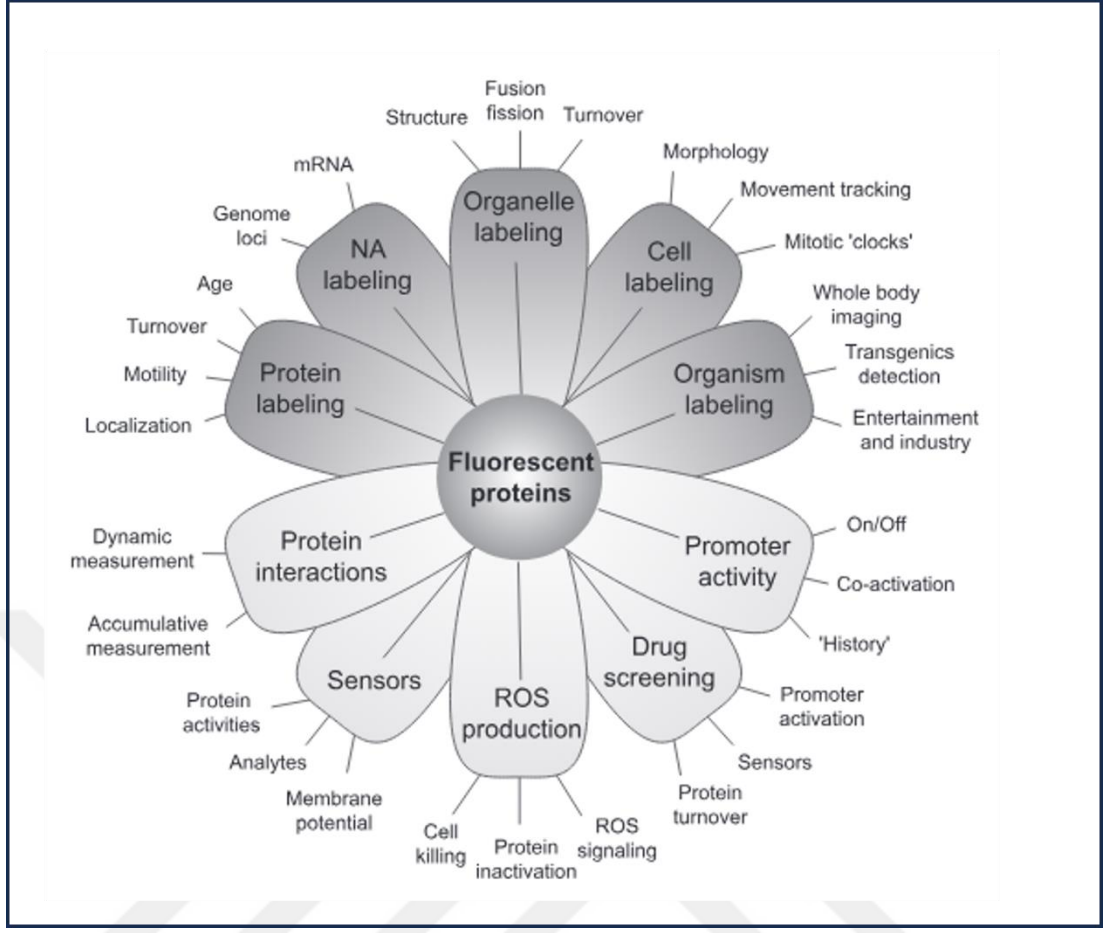
Ritosso tarafından 1960'ların başında yapılan çalışmalarda, *Drosophila busckii* artan sıcaklıklara maruz bırakıldıktan sonra tanımlanmayan kromozom modellerinin indüklendiği tanımlanmaktadır [92]. Ritosso ve Berendes'in de aralarında bulunduğu araştırmacılar elde edilen bulguların, ısı şokuyla indüklenen proteinlerin keşfedilmesine ve stres proteinleri üzerine yapılacak olan sonraki çalışmalara temel oluşturulmasına katkıda bulunmuştur [93]. Günümüzde çeşitli organizmalardan hücrelerin, ısı şoku proteinlerinin (Hsps) ekspresyonu arttırılarak hücresel streslere yanıt verme yeteneğinin korunduğu düşünülmektedir [94]. Yapılan daha sonraki çalışmalarda oksidatif stres, toksinler, enfeksiyonlar ve hipoksi gibi birçok stres şartlarının HSP ekspresyonunu meydana getirdiği tespit edilmiştir [95]. Deckers ve arkadaşlarının gerçekleştirmiş olduğu çalışmada sıcaklığın neden olduğu Hsp70 promotör aktivasyonunun hem sıcaklık hem de hipertermi süresi tarafından ayarlandığı gösterilmiştir [96].

Isı şoku genleri tepkisi genleri (HSG), hem arsenit stresi hem de sıcaklık stresi ile indüklenebilir olmasından dolayı uzun bir süre boyunca arsenit stresinin ısı stresinin kimyasal bir taklidi olduğu düşünülmüştür [97,98]. Yapılan çalışmalar doğrultusunda ısı stresi uygulanan hücreler ve arsenit stresi uygulanan hücreler kıyaslandığında ısı stresi uygulanan hücrelerde daha az SG ve PB (P granül) tespit edilmiştir [99].

2.5. Bölünmüş Yeşil Floresan Protein

Shimomura ve arkadaşları tarafından *Aequorea* denizanasından elde edilen yeşil floresan proteini (GFP), kemilüminasan protein olan aequorine ile eşlik eden bir protein olarak tespit edilmiştir [100]. 1992 yılında Prasher ve arkadaşları tarafından *Aequorea victoria*'dan elde edilen yeşil floresan proteininin (GFP) cDNA ve genomik klonlarının dizisi ortaya çıkarılmıştır [101]. Chalfie tarafından 1995 yılında gerçekleştirilen bir başka çalışma ise GFP'nin bakterilerde ifade edilmesi hücre ve moleküler biyolojide ilgi uyandıracak çalışmalara sebebiyet vereceği düşüncesini ortaya çıkarmıştır [102]. 1996 yılında Yang ve arkadaşları tarafından yapılan bir başka çalışmada ise rekombinant yabani tip olan *Aequorea victoria GFP*'sinin kristal yapısı keşfedilmiştir. Bu yapı beta fiçı olarak isimlendirilmiştir [103]. Buna ek olarak GFP'nin kemilüminasan özellikleri, on bir iplikçikli bir β -varilinin çekirdeğinde bir kromoforu katı bir şekilde tutan, sıkı bir şekilde paketlenmiş üç boyutlu yapısından kaynaklanmaktadır [104].

GFP, hem N hem de C terminal füzyonlarını tolere eden ve belirli hücresel konumlara hedeflenebilen 238 amino asit uzunluğunda monomerik, stabil, çözünebilen küçük bir floresan proteindir. GFP gibi floresan proteinleri, protein protein etkileşimi, protein ve hücre takibinin incelenmesi gibi çeşitli amaçlar doğrultusunda yaygın olarak kullanılmaktadır [105]. Bunun yanı sıra Şekil 2.8'de floresan proteinlerinin diğer kullanım alanları gösterilmektedir [106].



Şekil 2.8: Floresan proteinlerin kullanım alanları.

Son zamanlarda, kendi başına işlev görmeyen fakat hücre içi diğer proteinler tarafından ifade edilebilen epitop etiketleri kullanılarak canlı hücre protein etiketleme ve görüntülenmesinin yapılması giderek yaygınlaşmıştır. Bu sayede hedef proteine bağlanan bir epitop etiketi, küçük bir moleküle bağlanacak bir enzim substratı haline gelebilmektedir [107].

Bölünmüş ikili GFP yaklaşımı ilgili proteininin doğrudan görüntülenmesini sağlayarak hücre biyolojisi çalışmalarında büyük bir öneme sahip olmuştur [108]. Bu yaklaşımda sfGFP dizisi onuncu ve onbirinci β -ipliği arasından GFP11 birimi 16 amino asitlik kısa bir peptit dizisi olacak şekilde GFP1-10 ve GFP11 şeklinde ayrılır [109]. GFP 1-10 kromofor yapısını oluşturan 3 kısmı içermesine rağmen GFP kromoforunun olgunlaşmasını sağlayan E222 kısmı GFP11 epitopunda olduğu için, tek başına floresan özelliği gösterememektedir [110].

GFP11 ve GFP 1-10 ikili sistemi içeren yaklaşım, etiketlenmiş proteinlerdeki potansiyel bozulmaları en aza indirerek proteinlerin doğal hücresel bağlamlarında başka proteinlerle etkileşimini inceleme fırsatı tanımaktadır [111].

2.6. Ccdc124

Sarılı sarmal bölge içeren (CCDC, Coiled-coil domain containing) protein ailesi yaklaşık 180 gen tarafından kodlanır ve CCDC2'den CCDC201'e kadar üye içerir. Bu üyelerin bazıları insanlarda bulunmaz bazıları ise psödogen (işlevsel olmayan gen) özelliği taşımaktadır. Bu aile içerisinde yer alan proteinler, iki veya daha fazla sarılı sarmal alandan oluşan homo-oligomerlerden ya da oligomerlerden oluşmaktadır ve konformasyon değişikliklerine eğimlidirler. Bunun yanı sıra bu genler insan organlarında ve dokularında da yüksek oranda ifade edilmektedir. CCDC birçok fizyolojik işlerde görevlidir örneğin hücrelerde sitoplazmada, çekirdekte, mitokondride ve epitelyal silialarda ifade edilirler ve aynı zamanda DNA tanıma-bölünmesi, kromozom ayrılması, protein iskelesi ve keseciklerin oluşumu gibi olaylarda da görev alabilmektedirler [112,113].

CCDC124 (Sarılı sarmal bölge içeren 124), ilk olarak sodyum/iyodid simportunda görevli olan NIS geniyle ilgili yapılan araştırmalarda fark edilmiş 223 amino asit uzunluğunda ve ökaryotlarda yüksek oranda korunmuş bir proteindir [5,114]. Proteinin yapısı incelendiğinde yaklaşık 42% oranında negatif yüklü veya pozitif yüklü amino asit dizilimi göstermektedir (Şekil 2.9, Şekil 2.10). Yapılan immünolojik çalışmalar doğrultusunda CCDC124 proteininin 32 kDa büyüklüğünde olduğu ayrıca ikinci bir alternatif Kozak bağlanma bölgesi içermesinden dolayı 176 amino asit uzunluğunda ve yaklaşık 26 kDa büyüklüğünde bir izoformunun olduğu tespit edilmiştir [5, 115].

Ccdc124, kromozomun 19p13.11 bölgesi tarafından transkribe edilir ve cDNA'sını kodlayan 6 adet ekzon bulunmaktadır. İki adet varyantı olmasına rağmen aynı proteini kodladığı tespit edilmiştir. Telkoparan tarafından 2013 de gerçekleştirilen çalışmalar CCDC124 proteininin hücre bölünmesinin interfaz, profaz ve metafaz safhasında sentrozomda konumlandığını sitokinez safhasında ise orta cisimciğe göç ettiğini göstermektedir. Bunun yanı sıra hücre regülasyonunda etkili olan Kazein kinaz (CK II)'ın substratı olduğu bildirilmiştir. Ayrıca CCDC124 proteininin Rap2

aktivasyonunda görev alan Ras Guanine (RasGEF1B) ile etkileştiği belirtilmiştir [6]. Kütle spektroskopisi gerçekleştirilerek CCDC124 proteininin mayalardaki ortoloğu olan Lso2'nin GTPaz aktivasyon bölgesinde ribozoma bağlandığını ve CCDC124'ün mayalara aktarılarak yapılan çalışmalarda CCDC124'ün de aynı bölgeden ribozoma bağlandığı belirlenmiştir [116].

CCDC124'ün yapılan in siliko karakterizasyon çalışmalarında N terminal ucunda bulunan LC (low complexity) bölgesinin agregat ve dimerik-oligomerik durumların oluşumunda etkili olduğu belirtilmiştir [117].

CCDC124 proteininin olası partner proteinlerinin incelenmesi için yapılan kütle spektroskopisi sonuçları ilgili proteininin stres granül ve nörodejeneratif hastalıkların oluşumunda etkili proteinler ile etkileştiği tespit edilmiştir. (Merve TUZLAKOĞLU ÖZTÜRK, Yayına Hazırlanmakta Olan Data).

```
>NP_001129675.1 coiled-coil domain-containing protein 124 [Homo sapiens]
  MPKKFQGENTKSAAARARRAEAKAAADAKKQKELEDAYWKDDDKHV
MRKEQRKEEKEKRRLDQLEKKETQRLLEEEDSKLKGGKAPRVATSSKVTR
AQIEDTLRRDHQLREAPDTAEKAKSHLEVPLEENVNRRVLEEGSVEARTIED
AIAVLSVAEEAADRHPERRMRAAFTAFEEAQLPRLKQENPNMRLSQLKQLK
KEWLRSPDNPMNQRAVPFNAPK
```

Şekil 2.9: CCDC124 protein dizisi.

Number of amino acids: 223				
Molecular weight: 25835.24				
Theoretical pI: 9.54				
Amino acid composition:				
Ala (A)	29	13.0%	Phe (F)	4 1.8%
Arg (R)	25	11.2%	Pro (P)	11 4.9%
Asn (N)	8	3.6%	Ser (S)	9 4.0%
Asp (D)	13	5.8%	Thr (T)	8 3.6%
Cys (C)	0	0.0%	Trp (W)	2 0.9%
Gln (Q)	12	5.4%	Tyr (Y)	1 0.4%
Glu (E)	30	13.5%	Val (V)	10 4.5%
Gly (G)	4	1.8%	Pyl (O)	0 0.0%
His (H)	4	1.8%	Sec (U)	0 0.0%
Ile (I)	3	1.3%	(B)	0 0.0%
Leu (L)	19	8.5%	(Z)	0 0.0%
Lys (K)	26	11.7%	(X)	0 0.0%
Met (M)	5	2.2%		
Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 43				
Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 51				

Şekil 2.10: CCDC124 proteinin amino asit analizi, ExPASy ProtParam dizi analizi kullanılmıştır (<http://web.expasy.org/protparam/>).

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Agaroz jel Solüsyonları

Tris-Asetat-EDTA (TAE) (50X,1L): 242 g Tris, 57.1 mL Glasial Asetik Asit ve 18.612 g EDTA 1L ddH₂O içinde çözünür.

Agaroz jel (%1): 1 gr Agaroz 100 mL TAE(1X) içinde çözünerek hazırlanır.

3.1.2. Mikrobiyoloji Suşları

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

3.1.3. Mikrobiyoloji Solüsyonları

LB Besiyeri (1L) (otoklavlı): 10 g Pepton, 5 g Maya Ekstratı ve 10 g NaCl 1 L ddH₂O içinde çözünerek otoklavlanır.

LB Agar Besiyeri (1L) (otoklavlı): 10 g Pepton, 5 g Maya Ekstratı, 10 g NaCl ve 15 g Bacto Agar 1L ddH₂O içinde çözünerek otoklavlanır.

%80 Gliserol Stok Solüsyonu (otoklavlı): 80 mL %100 (Steril) Gliserol 20 mL ddH₂O içinde çözünerek otoklavlanır.

0.5 M PIPES Solüsyonu (pH 6.7): 15.1 g PIPES 80 mL ddH₂O içinde çözüldükten sonra pH 5M KOH ile 6.7 ye ayarlanır. ddH₂O ile 100 ml ye tamamlandıktan sonra tampon 0.45 µm filtre ile filtrelenmiştir.

Inoue Ultra Competent Hücre Tamponu (1L): 20 mL 0.5 M PIPES Solüsyonu (pH: 6.7), 10.88 g MnCl₂.4H₂O, 2.2 g CaCl₂.2H₂O ve 15 g KCl 1 L ddH₂O ile çözüldükten sonra 0.45 µm filtre ile filtrelenmiştir.

Ampicillin: 100 mg/mL stok solüsyonu ddH₂O ile çözülüp filtrelenmiştir. Elde edilen solüsyonlar -20 °C de saklanmıştır. Çalışma konsatrasyonu 100 µg/mL dir.

Kanamycin: 50 mg/mL stok solüsyonu ddH₂O ile çözülüp filtrelenmiştir. Elde edilen solüsyonlar -20 °C de saklanmıştır. Çalışma konsatrasyonu 50 µg/mL dir.

3.1.4. Vektörler

Bu çalışmada pcDNA 3.1 Hygro (+), pEGFP-N2 (Clontech Laboratories), pHRm-NLS-dCas 9-GFP 11 x₇ (Addgene), mCherry-N1 ve Pentra4_G3BP1 vektörleri kullanılmıştır.

3.1.5. Oligonükleotidler

Tablo 3.1: Kullanılan primer ve sekansları.

PRİMER	SEKANS (5'-3')
Ccdc124_Frw	GGAGCTAGCATGCCCAAGAAGTTCCAGGGTGAGAA C
Ccdc124_Rev	TACGGATCCTCCGCCACTACCTCCCTTGGGGGCATT GAA
Gfp11x4_Frw	GACGGATCCCGTGACCACATGGTCCTTC
Gfp11x4_Rev	GCTACTCGAGTCAAGTTATACCCGCCGCGTTCA
Gfp11x1_Frw	GACGGATCCCGTGACCACATGGTCCTTC
Gfp11x1_Rev	TATGGATCCTCCGCCACTACCTCCAGTTATACCCGC CGCGTT
4XGFP_N_Frw	TTAGCTAGCATGCGTGACCACATGGTCCTT
4XGFP_N_Rev	TATGGATCCTCCGCCACTACCTCCAGTTATACCCGC CGCGTT
Ccdc124_N_Frw	TATGGATCCCCCAAGAAGTTCCAGGGTGAGAACAC C
Ccdc124_N_Rev	ATTACTCGAGTCACTTGGGGGCATTGAAGGGCACG G
G3BP1_Frw	GGGGAAGCTTATGGTGATGGAGAAGCCTAGTCCCC
G3BP1_Rev	TTAGGATCCCTGCCGTGGCGCAAGCCCCC

3.1.6. Hücre Hattı Seçimi

Ccdc124'ün çeşitli stres şartlarında stres granül belirteci olan G3BP1 ile etkileşimi, organel büyüklüğünün hücresel görüntülemeye etkin bir şekilde avantaj sağlaması bakımından U2OS hücre hattı kullanılarak gösterilmiştir. GFP11 epitopu ile

etiketlenen Cdc124 füzyon proteininin ifadesi ve CO-IP deneyleri için yüksek transfeksiyon verimliliği gösteren Hek293T hücre hattı kullanılmıştır.

3.1.6.1. HEK293T Hücre Hattı

Hek 293T, sağlıklı bir insan fetüsünden elde edilen embriyonik böbrek hücrelerinin (Hek293) adenovirüs 5 DNA'sı ile transformasyonu sonucu elde edilmiş özel bir hücre hattıdır.

Başlangıçta 293tsA1609neo olarak adlandırılan 293T hücre çizgisi, SV40-T antijeni içeren ve insan embriyonik böbrek 293 hücrelerinin yüksek derecede transfekte edilebilen bir türevidir. 293T hücre hattı retroviral üretim, gen ekspresyonu ve protein üretimi için yaygın olarak kullanılmaktadır [118].

3.1.6.2. U2OS Hücre Hattı

İnsan osteosarkomu (U2OS), 1964 yılında 15 yaşındaki bir kızın kaval kemiğinin orta derecede farklılaşmış sarkomundan elde edilen ve çok sık kullanılan bir hücre hattıdır [119]. U2OS osteosarkomu, özellikle mitoz, apoptoz ve kansere yol açan mekanizmaların incelenmesi için yaygın olarak kullanılmaktadır.

U2OS hücreleri diğer osteosarkom hücre dizileri ile kıyaslandığında en düşük düzeyde kromozomal varyasyona sahiptir ve hücrelerin yalnızca 2%' sin de normal kontrol fibroblast hücrelerine benzer şekilde p53 ve pRb fonksiyonuna bağlı olarak çok kutuplu mitoz bulunur [120]. U2OS, organel büyüklüğünün hücresel görüntülemeye etkin bir şekilde avantaj sağlaması bakımından yaygın olarak tercih edilen hücre hatlarından biridir.

3.1.7. Hücre Kültürü Solüsyonları

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM): Hek 293T ve U2OS hücre hatları için kullanılan 4.5g/L D-glukoz içeren DMEM (Gibco 41966) besiyeri %10 oranında fetal sıgır serumu (Gibco 10270106) ve %1 oranında penisilin/streptomisin (Gibco 15140122) antibiyotiği eklenerek hazırlanmıştır.

Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS): Hücre kültürü çalışmaları boyunca ticari olarak satın alınan DPBS (Gibco14190) kullanılmıştır.

Trypsin-EDTA: Fokal adhezyon moleküllerini ve bir arada tutan Kaderin moleküllerini parçalayarak hücrenin petri kabıyla temasını kesen bir enzimdir. Ticari olarak satın alınan enzim (Gibco 15400054) -20 °C' ta muhafaza edilmiştir.

Hücre Dondurma/Saklama Besiyeri: Hücre kültürü çalışmalarında Fetal sığır serumu (Gibco 10270106) içerisine %10 oranında Dimetilsülfoksit (DMSO) ilave edilerek + 4 °C'ta stoklanarak kullanılmıştır.

3.1.8. Transfeksiyon Solüsyonları

PEI Transfeksiyon Solüsyonu: 100 mg Polyethylenimine 100 mL ddH₂O içinde çözünerek pH HCl ile 7.0'e ayarlanmıştır. Sonrasında 0.22 um fitreden geçirilerek -20 C°'de saklanmıştır.

3.1.9. Liziz Solüsyonları

Protein Liziz Solüsyonu: 50 mM Tris-HCl (pH: 8.0), 150 mM NaCl, %1 NP40 ve 1X Proteaz İnhibitör (50X) kullanılarak hazırlanmıştır.

3.1.10. İmmüno blot Solüsyonları

Jel Formülasyonu: %25 SDS, Tris tamponu ve %40 akrilamid aşağıda tabloda (Tablo 3.2 ve Tablo 3.3) verilen oranlar göz önünde bulundurularak ddH₂O içerisinde hazırlanmıştır. APS ve TEMED hızlı polimerleşmeyi sağladığından dolayı en son eklenmiştir.

Tablo 3.2. Yürütme jeli için kullanılan kimyasallar ve miktarları.

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

Tablo 3.3. Ayırma jeli için kullanılan kimyasallar ve miktarları.

Ayırma Jeli	4%		
	1	2	3
0.5 M Tris HCl pH:6.8	1250 µL	2500 µL	3750 µL
ddH ₂ O	3175 µL	6350 µL	9525 µL
%40 Acrly/bis	500 µL	1000 µL	1500 µL
%25 SDS	20 µL	40 µL	60 µL
%10 APS	50 µL	100 µL	150 µL
TEMED	5 µL	10 µL	15 µL

Islak Transfer Solüsyonu (10X,1L): 30.3 g Tris base (250 mM), 144 g Glisin (1.92 M) 1L ddH₂O içinde hazırlanmaktadır.

Yürütme Solüsyonu: 100 mL Islak Transfer Solüsyonu (10X), 4 mL SDS (%25) 900 mL ddH₂O kullanılarak hazırlanmıştır.

Transfer Çalışma Solüsyonu (1X,1L): 100 mL Islak Transfer Solüsyonu (10X), 200 mL Metanol 700 mL ddH₂O içinde hazırlanmaktadır.

TBS (10X)(pH:7.6) : 24.2 g Tris base, 87.6 g NaCl 1 L ddH₂O içinde çözünerek pH 7.6'ya ayarlanır.

Tris-HCl (1.5M, pH: 8.8): 36.34 g Tris base 200 mL ddH₂O içerisinde çözünerek pH HCl ile 8.8 e ayarlanmıştır.

Tris-HCl (0.5M, pH:6.8): 12.11 g Tris base 200 mL ddH₂O içerisinde çözünerek pH HCl ile 6.8 e ayarlanmıştır.

APS (%10) (-20 °C): 1 g Amonyum Persülfat 1 mL ddH₂O içerisinde çözünerek hazırlanmıştır.

Bloklama Solüsyonu (w/v): %5 BSA veya süt tozu 1X TBS-T içerisinde çözünerek hazırlanmıştır.

% 25 Sodium Dodecyl Sulfate (SDS): 25 gr SDS tartılarak 100 ml deionize suda çözülmüştür.

3.1.11. İmmünboyama Solüsyonları

Yıkama Solüsyonu: %1 Triton-X, 1XPBS solüsyonunun içerisine eklenerek hazırlanmıştır.

Fiksasyon Solüsyonu (%4 PFA): 40 gr paraformaldehit 800 mL 1XPBS içerisinde 55-60 C° de 1N NaOH ilave edilerek hazırlanmıştır. Soğutulduktan sonra 1000 mL tamamlanan solüsyon 0.22 µm filtreden geçirilerek pH 6.9 ayarlanmıştır.

Bloklama Solüsyonu: %2 BSA 1X PBS-T (TritonX100) solüsyonunun içerisine eklenerek hazırlanmıştır.

Hoechst Boyaması: 1XPBS solüsyonu içerisine 1/1000 oranında Hoechst solüsyonu eklenerek hazırlanmıştır.

Mowiol Solüsyonu: 2,4 g Mowiol 488 ve 6g glycerol 6 mL H₂O ilave edilerek oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Ardından 12 mL 0.2 M Tris-Cl (pH 8.5) eklenerek 50 C° de 10 dakika süreyle karıştırılmıştır. Homojenize olduktan sonra 5000 g de 15 dakika santrifüj edildikten sonra -20 C° de muhafaza edilmiştir.

3.1.12. Antikorlar

Çalışmalarda kullanılan antikorlar ve onlara ait bilgiler aşağıdaki Tablo 3.4 de ayrıntılı olarak gösterilmiştir.

Tablo 3.4: Çalışmalarda kullanılan antikorlar.

Antikorlar	Organizma	Firma Adı	Katalog Numarası	WB	IF
Birincil Antikor					
Ccdc124 (total)	Tavşan	ProteinTech	27106-1-AP	1/1000	1/150
Ccdc124 (C term)	Tavşan	Bethyl	A301835	1/1000	
Anti-GFP	Tavşan	Cell Signaling	2555S	1/1000	
Vinculin	Fare	Sigma	V9131	1/1000	
Calnexin	Tavşan	Abcam	Ab22595	1/3000	
G3BP1	Fare	Merck	3729374		1/150
Anti-tRFP	Tavşan	Evrogen	AB233	1/1000	
Anti-HA Tag	Fare	Cell Signaling	2367S		
İkincil Antikor					
Anti-mouse	Keçi	Sigma	A2304	1/5000	
Anti-Rabbit	Keçi	Sigma	A9169	1/5000	
Alexa 488	Tavşan	Cell Signaling	4412S		1/500
Alexa 594	Fare	Cell Signaling	8890S		1/500

3.1.13. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Deney boyunca kullanılan PCR bileşenleri ve miktarları aşağıda Tablo 3.5 de ayrıntılı olarak gösterilmiştir.

Tablo 3.5: Polimeraz Zincir Reaksiyonu Bileşenleri.

Bileşenler	Miktarlar
Kalıp DNA (20ng/ μ L)	2 μ L
İleri Primer	2.5 μ L
Geri Primer	2.5 μ L
dNTP Mix	1 μ L
(10X)Tag Polimeraz Tamponu /5XPhusion GC Tamponu	5 μ L/10 μ L
Tag Polimeraz/Phusion	1 μ L /0.5 μ L
ddH ₂ O	36 μ L /32.5 μ L
Toplam	50

3.1.14. Ligasyon Ürünleri

Çalışma boyunca kullanılan ligasyon ürünleri ve şartları aşağıda Tablo 3.6 da gösterilmiştir.

Tablo 3.6. Ligasyon ürünü şartları ve miktarları.

İçerikler	Miktarlar
Eklenicek DNA kalıp	3:1 ve/veya 5:1
Vektör	100 ng veya 150 ng
10X T4 Tamponu	2 μ L
T4 Ligaz	1 μ L
ddH ₂ O	20 μ L ye tamamlanır.

3.1.15. Hücre Transfeksiyonu

Hücre görüntüleme ve immunofloresan görüntüleme için kullanılan U2OS hücre hatlarında düşük toksisite sağlaması, lizat alma çalışmalarında kullanılan HEK 293T hücre hattında ise eş transfeksiyondan dolayı oluşacak düşük transfeksiyon etkisini

engellemek için Jet Prime reaktifi kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan diğer transfeksiyon bileşenleri ve miktarları Tablo 3.7 de ayrıntılı olarak gösterilmiştir.

Tablo 3.7: Çalışmada kullanılan transfeksiyon solüsyonları ve miktarları.

	100 mm petri	6 well petri	12 well petri
Lipofectamine 2000	60 µl	6 µl	4 µl
Jet Prime	20 µl	4 µl	1.6 µl
PEI	1/3-1/5-1/7	1/3-1/5-1/7	1/3-1/5-1/7
Plazmid Konsantrasyonu	7 µg	2 µg- 3 µg	0.8 µg
DMEM /OPTIMEM	500 µl	200 µl	75 µl
Hücre Sayısı	0.5x10 ⁶ - 1x10 ⁶	10x10 ⁴ -15x10 ⁴	3x10 ⁴ – 5x10 ⁴
Kültür Besiyeri	10 mL	2 mL	1 mL

3.1.16. Kullanılan Kimyasallar

Çalışma boyunca kullanılan kimyasal ürünler ve onlara ait bilgiler aşağıdaki Tablo 3.8 de ayrıntılı bir şekilde açıklanmıştır.

Tablo 3.8: Kimyasal ürünler ve onlara ait bilgiler.

Kimyasal Adı	Katalog Numarası ve Markası
Akrilamid/bis-acrilamid % Solüsyon	Sigma/ A3699
Amonyum persülfat (APS)	Sigma/A3678
BSA	Sigma Aldrich 7906
DMSO	Merck/ 116743.1000
DPBS	Gibco/ 14190
High glucose DMEM	Gibco/ 41966
İzopropanol	Sigma 24137
Lipofectamin2000	Invitrogen /11668
Metanol	Sigma/ 34885
NP40	Sigma NP40S
PBS	Lonza/ BE17-517Q
Polyethylenimine (PEI)	Polysciences 23966
Pen /Strept	Gibco/ 15140-122
Sodium dodecyl sulfate	Sigma /L5750
TEMED	Sigma/ T9281
Trypsin-EDTA	Gibco/15400054

Tablo 3.8: Devamı.

Triton X100	Sigma/T8787
Trizma base	Sigma/ T6066
Tween 20	Sigma/ P1379
Red Safe	Intron/21141
Ampisillin	
Kanamisin	

3.1.17. Kullanılan Kitler ve Cihazlar

Çalışma boyunca kullanılan kitler, cihazlar ve onlara ait bilgiler aşağıdaki Tablo 3.9 ve 3.10 de ayrıntılı bir şekilde açıklanmıştır.

Tablo 3.9. Kullanılan kitler.

Kit İsimleri	Kit Markası	Katalog Numarası
Monarch DNA Gel Extraction Kit	BioLabs	T1020S
Monarch PCR&DNA Cleanup Kit	BioLabs	T1030S
DNA-spin™ Plasmid DNA Purification Kit	Intron Biotechnology	1050611152
Mega quick-spin™ plus Fragment DNA Purification Kit	Intron Biotechnology	105820254
Nucleospin® Plasmid	Macherey-Nagel	1809/004
Nucleospin® Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel	1810/005
NucleoBond® Xtra Midi EF	Macherey-Nagel	2009/004

Tablo 3.10: Kullanılan Cihazlar.

CİHAZIN ADI	CİHAZIN MARKASI	CİHAZIN MODELİ
Agaroz Jel Yürütme Sistemi	BIO-RAD	Wide Mini-Sub® Cell GT Cell
Agaroz Jel ve Immunoblot Görüntüleme Cihazı	BIO-RAD	ChemiDoc XRS+
Canlı Hücre Görüntüleme Mikroskobu	Leica	DMi8
Çalkalayıcı	Labnet	ROCKER 25
FACS	BD FACSJazz	
Hassas Terazı	ADAM	PGW 253i
İmmunoblot Ekipmanları	BIO-RAD	Mini-PROTEAN® Tetra Handcast Systems
İnkübatör	Heal Force	Smart Cell

Tablo 3.10: Devamı.

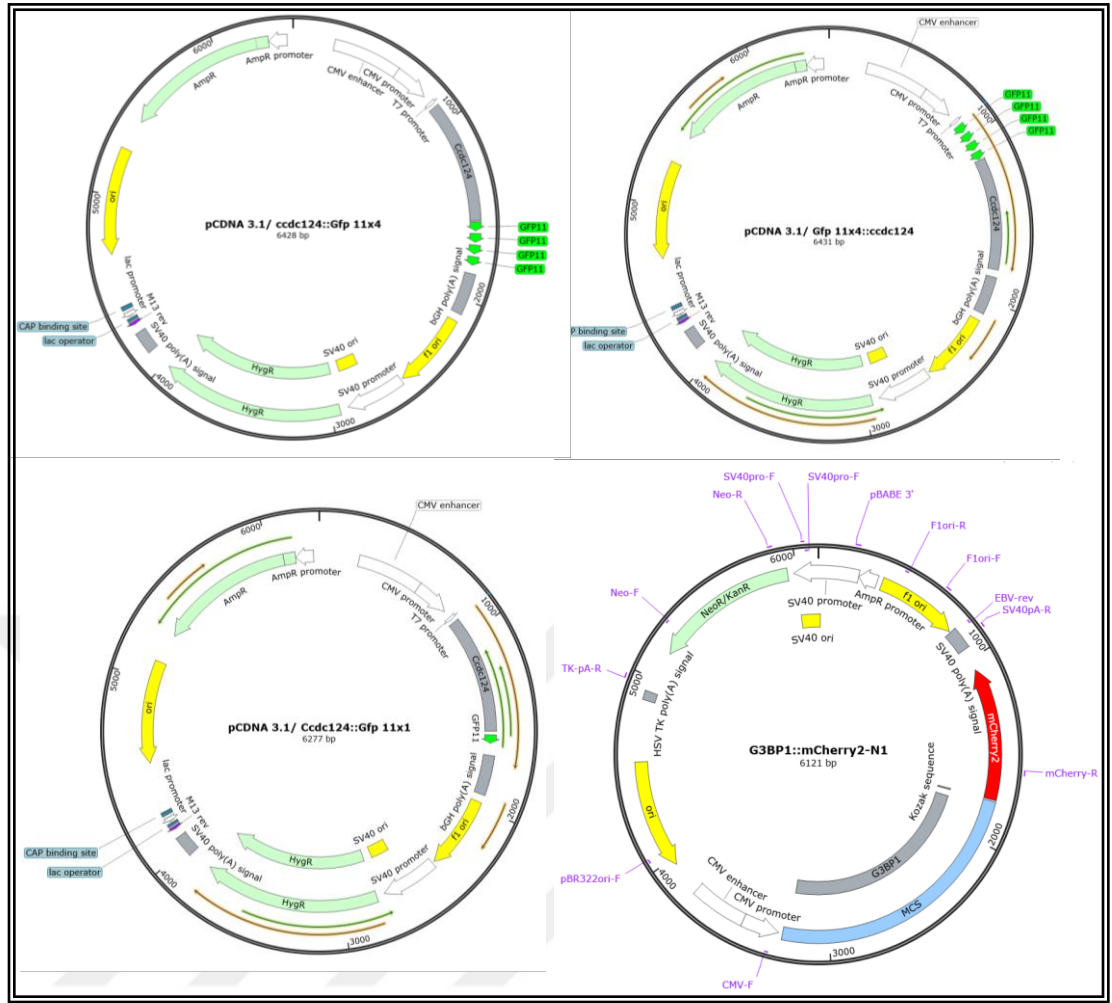
Konfokal Mikroskop	Zeiss	LSM-880
Kuru Banyo (Isı Bloğu)	Benchmark	BSH1002-E
Laminar Akım Kabini	Cryste	
NanoDrop	Thermo	NanoDrop Lite
PCR Cihazı	Biometra	Analytik-Jena
pH metre	Mettler Toledo	
Su banyosu	Wisd	WiseBath
Soğutmalı Eppendorf Santrifüj Cihazı	HITACHI	CT-15RE
Soğutmalı Falkon Santrifüj Cihazı	NÜVE	NF-1200R
Vortex	SCILOGEX	MX-S
Qubit™	Invitrogen	

3.2. Yöntem

3.2.1. Genel Metot

3.2.1.1. Vektör Hazırlama

N-terminal ve C-terminal GFP11x₄ etiketli CCDC124 vektörü (pcDNA 3.1/CCDC124::GFP11x₄, pcDNA 3.1/GFP11x₄::CCDC124) oluşturmak ve aynı zamanda C-terminal GFP11x₁ etiketli CCDC124 vektörü (pcDNA 3.1/CCDC124::GFP11x₁) oluşturmak için pcDNA 3.1 Hygro (+) plazmidi ve, G3BP1-mCherry plazmidi oluşturmak için mCherry-N1 (Nuri ÖZTÜRK) kalıp olarak kullanılmış olup Pentr4_G3BP1 plazmidi (Erdoğan SEZGİN) insert olarak kullanılmıştır.



Şekil 3.1: Oluşturulan plazmid haritası (SnapGene).

3.2.1.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

pcDNA 3.1/Ccdc124::GFP11x₄, pcDNA 3.1/Ccdc124::GFP11x₁ ve pcDNA 3.1/GFP11x₄::Ccdc124 füzyon proteinini oluşturabilmek için Ccdc124 nükleotit dizisini içeren ve GFP11x₄ - GFP11x₁ nükleotit dizisini içeren sırasıyla *Nhe*I- *Bam*HI ve *Bam*HI – *Xho*I kesim bölgeleri bulunduran ve Tablo 3.2 de ayrıntılı olarak ifade edilen primerler kullanılarak standart PZR gerçekleştirilmiştir. Standart PZR koşulları Tablo 3.13 de ayrıntılı olarak gösterilmiştir.

Tablo 3.11: Standart PZR koşulları.

Basamaklar	Sıcaklık	Süre	
Başlangıç sıcaklığı	94 °C	2 dakika	
Denatürasyon	94 °C	30 saniye	} X2
Primer Bağlanma Sıcaklığı	59 °C/ 57 °C	1 dakika**	
Uzama	72 °C	1 dakika/20 saniye	
Son uzama	72 °C	7 dakika	
Tutma	4 °C	∞	

PZR sonrası ürünler Monarch PCR&DNA Cleanup Kit ve Nucleospin® Gel and PCR Clean-up Kit kullanılarak saflaştırılmıştır.

3.2.1.3. Restriksiyon Endonükleaz Enzimleri ile Kesim

Kesilecek her PZR ürünü için µg başına 3 ünite restriksiyon enzimleri kullanılmıştır.

3.2.1.4. Agaroz Jelden Geri Kazanma

Restriksiyon enzimleri ile kesilen plazmidler %1 lik 1X TAE tamponu ile hazırlanan agaroz jele yüklenmiş ve Monarch DNA Gel Extraction Kit, Mega quick-spin™ plus Fragment DNA Purification Kit prosedürü takip edilerek jelden saflaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.2.1.5. Ligasyon

İnsert ve ilgili vektör konsantrasyonu NeBiocalculator programı kullanılarak hesap edilir ve 16 C° de gece boyu ligasyona bırakılır.

3.2.1.6. Kompetent Hücre Hazırlanması

Escherichia coli suşu olan DH5α bakteri hücresi 2 mL LB içerisinde 37 °C de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası ön kültürden %1 oranında olacak şekilde 50 mL LB içeren sıvı kültüre 2. aşılama yapıp 37 °C de inkübasyona bırakılmıştır. Hücrelerin 600 nm de OD değeri 0.55' e ulaştıktan sonra hücreler inkübasyondan alınıp 10 dk buzda bekletilmiştir. Buzda inkübasyon sonrası hücreler

4000 rpm de +4 °C de 20 dakika santrifüj yapılarak elde edilen hücre pelleti 16 mL soğuk Inoue Ultra Competent Hücre Tamponu ile çözünmüştür. 4000 rpm de +4 °C de 10 dakika süreyle tekrar santrifüje bırakılan hücre pelleti 4 mL Inoue Ultra Competent Hücre Tamponu ile çözünmüştür. Sonrasında 300 µl DMSO eklenerek 10 dakika buzda inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonrasında karışımlar eppendorflara aktarılacak sıvı azotta 1-2 dakika bekletildikten sonra -80 °C’ de daha sonra kullanılmak üzere muhafaza edilmiştir.

3.2.1.7. Transformasyon

100 µl ultra competent *Escherichia coli* suşu DH5α bakteri hücrelerine 30 µg plazmid olacak şekilde eklenmiştir. Hücrelere 30 dakika buzda inkübasyona bırakıldıktan sonra 42 °C’ de 2 dakika ısı şoku uygulanmıştır. Isı şokundan sonra 3 dakika tekrar buzda inkübe edildikten sonra karışıma 1 mL LB eklenerek 37 °C’ de 1 saat karıştırmalı inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonrası örnekler 10000 rpm de 3 dakika santrifüj yapılarak elde edilen pellet bir miktar LB içerisinde çözünerek ilgili antibiyotik içeren katı besiyerine yayma yöntemiyle ekimi gerçekleştirilmiştir. Ekimi yapılan tabaklar 37 °C’ de gece boyu inkübasyona bırakılmıştır.

3.2.1.8. Plazmid İzolasyonu

3.2.1.8.1. Küçük Hacim İzolasyon

Transforme edilen bakteri hücreleri 5 ml Luria-Bertani (LB) ve ilgili antibiyotik içeren sıvı besiyerinde 200 rpm de 37 C de gece boyu inkübasyona bırakılmıştır. Hücreler 4000 rpm de +4 C de 20 dakika santrifüj edilerek pellet eldesi oluşturulmuştur. Elde edilen pellet 250 µl Resüspanسیون Tamponu ile çözülür. 250 µl Liziz Tamponu ilave edilerek hücre peletinin 6-8 kez ters çevirilerek 5 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılır. Inkübasyon sonrası 300 µl Nötrolizasyon Tamponu eklenerek 6-8 kez ters çevirilerek 11000 g de 10 dakika santrifüj yapılmıştır. Elde edilen süpernatant kolona yüklenerek 11000 g de 1 dakika santrifüj yapılır. Yıkama Tamponundan 600 µl eklenerek 1 dakika 11000 g de santrifüj yapıldıktan sonra 11000 g de 2 dakika santrifüj tekrarlanarak kalan yıkama tamponunun uzaklaştırılması sağlanmıştır. Yıkama Tamponu uzaklaştırıldıktan sonra 50 µl Elüsyon Tamponu kolona eklenerek 2 dakika

oda sıcaklığında bekletildikten sonra 2 dakika 11000 g de santrifüj yapılarak plazmid eldesi sağlanmıştır.

3.2.1.8.2. Büyük Hacim İzolasyon

Büyük hacimde plazmid izolasyonu NucleoBond® Xtra Midi EF kit protokolü kullanılarak uygulanmıştır.

3.2.1.9. Nükleik Asit Miktar Tayini

Nükleik asit ve saflaştırılmış PZR miktar tayini NanoDrop (Shimadzu, Biospec Nano) cihazı kullanılarak belirlenmiştir. µg başı 1 µL ilgili enzim kullanılarak vektörün hedeflenen insert kısmını alıp almadığı tespit edilmiştir.

3.2.1.10. Agaroz Jel

%1 oranında hesaplanan agaroz, mikrodalga fırında 1X TAE (Tris-Asetat-EDTA) tamponu içerisinde hazırlanıp üzerine son konsantrasyonu 1X olacak şekilde RedSafe eklenerek jel görüntüsü alınmıştır.

3.2.1.11. Bakteri Hücrelerinin Stoklanması

Katı besiyerine ekim yapılan bakteri hücrelerinden tek koloni alınarak 3mL LB ve ilgili antibiyotiği içeren sıvı besiyerine ekim yapılarak 37 °C de 200 rpm de gece boyu büyütülmüştür. Sonrasında 625 µl bakteri hücresi 375 µl %80 gliserol eklenerek – 80 °C’de saklanmıştır.

3.2.2. Hücre Kültürü Yöntemleri

3.2.2.1. Hücre Hatlarının Büyüme Şartları

U2OS, HEK293T hücre hatları yüksek glukoz içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium;Gibco), %10 (v/v) FBS (Fetal Bovine Serum) ve %1 (v/v) Pen/Strep içeren besi ortamında 37 C° sıcaklık ve %5 CO2 sağlayan inkübatörde büyütülmüştür.

3.2.2.2. Hücre Hatlarında Geçici Transfeksiyon

Oluşturulan pcDNA 3.1/Ccdc124::Gfp11x₁, pcDNA 3.1/Ccdc124::Gfp11x₄ ve pcDNA 3.1/ Gfp11x₄::Ccdc124 plazmitleri Hek293T hücre hattına Lipofectamine 2000 transfeksiyon protokolü uygulanarak transfeke edilmiştir (Tablo 3.14). Hek293T hücre hattı, %10 FBS+pen/strep içeren DMEM (Gibco) medyumunu kullanılarak kültür ortamında (37°C / %5 CO₂) büyümeye bırakılmıştır. Hücrelerin transfeksiyondan bir gün önce 6-welle her biri 2x10⁵ hücre/2mL olacak şekilde ekimi gerçekleştirilmiştir.

Miktarları belirtilen malzemelerden hazırlanan karışım 5 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 1.tüp 2. tüpe aktararak 20 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir.

Sonrasında Hek293T hücrelerinin üzerine damla damla verilmiştir. 3-4 saat sonra besiyeri %10 FBS+pen/strep içeren DMEM (Gibco) medyumunu ile değiştirilmiştir.

3.2.2.3. Lentivürüs Transfeksiyonunun Yapılması

3.2.2.3.1. Lentiviral Vektör Üretimi

Hek 293T (insan embriyonik böbrek hücreleri) hücre hattı Neubauer lamı yardımıyla sayılıp her well 20x10⁴ yoğunlukta olacak şekilde DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)- Yoğun Glukoz (Gibco), %10 FBS ve %1 penisilin-streptomisin içeren besiyeri ile ekim yapılmıştır. Hücreler %70 yoğunluk oranına ulaştığında son konsantrasyon 1.25 µg, 1 µg ve 1.25 µg olacak şekilde sırasıyla pHRM-SFFV GFP 1-10 lentiviral plazmidi short ve long olarak adlandırılan paketleme plazmidi ve viral glikoproteini kodlayan zarflama plazmidi Tablo 3.12 de belirtilen miktar ve adımlar sırasıyla uygulanarak PEI (polyetilenimin) transfeksiyon ajanları yardımıyla transfeke edilerek 37°C'de, %5 CO₂ içeren inkübasyon ortamına bırakılmıştır.

Transfeksiyon sonrasında 6-well deki hücreler 60 mm'lik plate lere aktarılmıştır. Transfeksiyondan yaklaşık 72 saat sonra 60 mm'lik plate lere aktarılan transfeke edilmiş HeK 293T hücrelerinin üst sıvısı falcona toplanıp 2000 rpm de 5 dakika santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonrasında elde edilen süpernatant (sıvı kısım) 0.45 nM lık filtre ile filtrelenip ependorflere ayrılarak daha sonra kullanılmak üzere -80 C° de

muhafaza edilmiştir. 60 mm'lik plate taze besiyeri eklenerek 72 saat sonra sıvı kısım tekrar 0.45 nM'lık filtre kullanılarak filtrelenip -80 C° ye kaldırılmıştır.

3.2.2.3.2. Lentiviral Transdüksiyon

Transdüksiyon işlemi öncesi HEK293T ve U2OS hücre hatları sırasıyla 20×10^4 ve 10×10^4 yoğunlukta olacak şekilde 6-welle ekim yapılarak 24 saat boyunca 37°C'de, %5 CO₂ içeren inkübasyon ortamına bırakılmıştır.

Üretilen Lentivirüs buzda çözülüp HEK293T hücre hattı için 500 µl virüs, 500 µl DMEM ve 500 µl polybrene, U2OS hücre hattı için 1000 µl virüs, 500 µl DMEM ve 500 µl polybrene karışımı hücrelerin ekildiği besiyeri değiştirilerek kuyulara eklenmiştir. Polybrene son konsantrasyonu 8 mg/ml olacak şekilde ayarlanmıştır. Gece boyunca 37°C'de inkübe edildikten sonra lentivirüs/polibren/medyum karışımı boşaltılıp yerine taze medyum eklenmiştir. Diğer kontroller için gerekli miktarlar Tablo 3.13, Tablo 3.14 ve Tablo 3.15 de gösterilmiştir. Bu çalışmada stable hücre hattı oluşturabilmek için özellikle U2OS hücre hattına transfeksiyon sonrasında uygun antibiyotik ile (Hygromisin) 2 hafta kadar baskılanma yapılmıştır.

3.2.2.3.3. Kalıcı Hücre Hattı Oluşturulması

Transfeksiyon sonrasında transfekte edilmiş hücreler Neuber lamı yardımıyla sayılarak her plate de 50 hücre olacak şekilde seyreltildikten sonra 3 tane 96'lık welle ekim yapıp 37°C'de, %5 CO₂ içeren inkübasyon ortamına bırakılmıştır. Yaklaşık 7-10 gün sonra ekim yapılan 96'lık plate ler Nikon eclipse TS100 mikroskobu yardımıyla görüntülenmiş ve wellerde tek hücre olup olmadığı kontrol edilmiştir. Tek hücre olduğu belirlenen kuyular işaretlenip ZoeTM Fluorescent Cell Image (Bio-Rad) mikroskobu kullanılarak GFP parlama yapıp yapmadıkları belirlenmiştir. Işıma yapan hücreler kademeli olarak büyütülerek dondurma medyumu olarak adlandırılan %95 FBS (Fetal Bovine Serum) ve %5 oranında DMSO (Dimetilsülfoksit) içeren besiyerinde dondurulup - 80 °C de ve sıvı azotta daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere muhafaza edilmiştir.

Tablo 3.12: Lentiviral Vektör oluşumu için uygulanan PEI transfeksiyon basamakları.

1.tüp		
250 µl Optimem + 10.5 µl PEI	250 µl Optimem + 10.5 µl PEI	250 µl Optimem + 10.5 µl PEI
2.tüp		
10 µl (pHRM SFFV GFP 1-10) + 1 µl short plazmid + 1 µl long plazmid + 250 µl optimem	10 µl (pHRM SFFV GFP 1-10) + 1 µl short plazmid + 1 µl long plazmid + 250 µl optimem	10 µl (pHRM SFFV GFP 1-10) + 1 µl short plazmid + 1 µl long plazmid + 250 µl optimem
↓ 5 dakika oda sıcaklığında bekletilir 1.tüp 2.tüpe aktarılır ve kuyulara damla damla eklenir		

Tablo 3.13: pcDNA3.1/CCDC124::GFP11_{x4} plazmidinin transfeksiyonu için gerekli koşullar.

	(pHRM SFFV GFP 1-10) Lentivirüs transfeksiyonu	pcDNA3.1/CCDC124::GFP11 _{x4} Tansfeksiyonu	Eş transfeksiyon	Untransfected
1.tüp	-	250 µl Optimem + 6.7µl (2µg) pcDNA3.1/CCDC124::GFP11 _{x4}	250 µl Optimem + 6.7µl (2µg) pcDNA3.1/CCDC124::GFP11 _{x4}	250 µl Optimem + -----
2.tüp	-	250 µl Optimem + 6 µl Lipofectamin	250 µl Optimem + 6 µl Lipofectamin	250µl Optimem + 6µl Lipofectamin
	1000µl DMEM 500 µl virüs 500µl DMEM/polybrene	1000 µl DMEM	500 µl DMEM 500 µl virüs 500 µl DMEM/polybrene	1500 µl DMEM

Tablo 3.14: pcDNA3.1/ GFP11_{X4}:: CCDC124 plazmidinin transfeksiyonu için gerekli koşullar.

	(pHRM SFFV GFP 1-10) Lentivirüs transfeksiyonu	pcDNA3.1/GFP11 _{X4} :: CCDC124 Tansfeksiyonu	Eş transfeksiyon	Untransfected
1.tüp	-	250 µl Optimem + 0.7µl (2µg) pcDNA3.1/ GFP11 _{X4} ::CCDC124	250 µl Optimem + 0.7µl (2µg) pcDNA3.1/ GFP11 _{X4} ::CCDC124	250 µl Optimem + -----
2.tüp	-	250 µl Optimem + 6 µl Lipofectamin	250 µl Optimem + 6 µl Lipofectamin	250µl Optimem + 6µl Lipofectamin
	1000µl DMEM 500 µl virüs 500µl DMEM/polybrene	1000 µl DMEM	500 µl DMEM 500 µl virüs 500 µl DMEM/polybrene	1500 µl DMEM

Tablo 3.15: pcDNA3.1/CCDC124::GFP11_{X1} plazmidinin transfeksiyonu için gerekli koşullar.

	(pHRM SFFV GFP 1-10) Lentivirüs transfeksiyonu	pcDNA3.1/CCDC124:: GFP11 _{X1} Tansfeksiyonu	Eş transfeksiyon	Untransfected
1.tüp	-	250 µl Optimem + 0.7µl (2µg) pcDNA3.1/ CCDC124: GFP11 _{X1}	250 µl Optimem + 0.7µl (2µg) pcDNA3.1/ CCDC124::GFP11 _{X4}	250 µl Optimem + -----
2.tüp	-	250 µl Optimem + 6 µl Lipofectamin	250 µl Optimem + 6 µl Lipofectamin	250µl Optimem + 6µl Lipofectamin
	1000µl DMEM 500 µl virüs 500µl DMEM/polybrene	1000 µl DMEM	500 µl DMEM 500 µl virüs 500 µl DMEM/polybrene	1500 µl DMEM

3.2.2.4. Stok Hücrelerin Kriyoprezervasyonu

Hücre hatları erken pasaj döneminde 1XPBS ile yıkanarak tripsin ile kaldırılmıştır. Tripsin ile toplanan hücreler 1000 rpm de 5 dakika oda sıcaklığında santrifüj edilmiştir. Üst sıvı çekilip pellet (%5 DMSO + %95 FBS) içeren dondurma besiyeri içerisinde çözülerek kriyotüplere dağıtılmıştır. Hücreler – 80 °C de 1 hafta bekletildikten sonra daha sonra kullanılmak üzere sıvı azota aktarılmıştır.

3.2.2.5. Donmuş Hücrelerin Açılması

Sıvı azottan alınan hücreler 37 °C su banyosunda birkaç dakika çözünmesi sağlandıktan sonra 5 mL DMEM içeren falkona hücreler transfer edilmiştir. Transfer edilen hücreler 1000 rpm de oda sıcaklığında 5 dakika santrifüj yapılmıştır. Üst sıvı atılıp kalan pelet 1000 µL DMEM ile çözülerek 100 mm lik petri kabına ekimi yapılmıştır.

3.2.2.6. Lizat Toplama

Transfekte edilen hücreler 48 saat sonra inkübatörden alınıp 1XPBS ile 2 kez yıkanmıştır. Yıkama sonrası hücreler 1XPBS eklenerek kazıyıcı yardımıyla toplanmıştır. 1400 rpm +4 C° 5 dakikada santrifüj yapılarak elde edilen pelet 3 katı kadar taze hazırlanmış liziz tamponu ilave edilerek 15 dakika boyunca buzda bekletilmiştir. 5'er dakika ara ile vortekslenerek buzda bekletilen hücreler 15000 rpm 4 C° da 30 dakika santrifüje bırakılmıştır. Santrifüj sonrası üst sıvı ayrı bir tüpe aktırılarak örneklerin protein konsantrasyonunun Qubit® Protein Assay cihazı yardımıyla belirlenmesi gerçekleştirilmiştir.

3.2.2.7. İmmünoblotlama

Protein konsantrasyonu belirlenen örnekler 3XSDS tamponu eklenerek 100 C° de 5 dakika denatürasyona bırakılmıştır. Denatüre edilen proteinler son konsantrasyonu 30-40 ug olacak şekilde SDS-PAGE yüklenmiştir. 1X Yürütme Tamponu içerisinde boyalar jelden çıkana kadar yürütülmüştür. Yürütülen örneklerin 1X Transfer Tamponu kullanılarak PVDF membranına BIO-RAD Trans-Blot® Turbo™ Transfer sistemi yardımıyla transfer edilmesi sağlanmıştır. Transfer sonrası PVDF membranı % 5 süt tozu içerisinde 4 C° de gece boyu çalkalamaya bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası membran süt tozu içerisinde hazırlanan birincil antikor kullanılarak 2 saat çalkalamalı inkübasyonda bırakılmıştır. Ardından 3 defa 10' ar dakika 1XTBS-T (1XTBS+%0,1 Tween 20) ile yıkanma işlemi gerçekleştikten sonra 1/5000 konsantrasyonunda hazırlanan ikincil antikor eklenerek 1 saat oda sıcaklığında karanlık ortamda çalkalamalı inkübatörde bırakılmıştır. İkincil antikor sonrası membran 3 defa 10'ar dakika 1XTBS solüsyonu ile yıkanmıştır. Yıkama sonrasında membran görüntüsü ECL solüsyonu kullanılarak alınmıştır.

3.2.2.8. İmmünboyama (IF)

pcDNA3.1/Ccdc124::Gfp11x₄, pcDNA3.1/Ccdc124::Gfp11x₁ ve pcDNA3.1/Gfp11x₄::Ccdc124 plazmidi kullanılarak oluşturulan füzyon proteinin U2OS (İnsan Kemik Osteosarkom Epitel Hücreleri) hücre hatlarında kalıcı ifade edilmesi sağlandıktan sonra elde edilen kalıcı (stable) hücre hatları çeşitli stres faktörlerine maruz bırakılarak (sıcaklık, H₂O₂ ve Poly I:C) İmmünfloresan Yöntemi (IF) uygulanarak hücre içi lokalizasyonunun belirlenmesi amaçlanmaktadır.

Her bir kuyuya 30.000 hücre olacak şekilde stable hücre hatları ve U2OS hücre hatları ekilmiştir. Hücreler 12-well de büyütüldükten 24 ya da 48 saat sonra U2OS hücreleri ise 46 °C de 30 dakika, 2 mM H₂O₂ ye 2 saat ve 500 ng/ µl konsantrasyonundaki Poly I:C ye maruz bırakılmıştır. Maruziyet sonrası hücreler 1XPBS (phosphate buffer saline) tamponu ile 2 kez yıkanmıştır. Yıkama sonrası hücreler %4 lük PFA (paraformaldhyte) ile 20 dakika oda sıcaklığında sabitlenmiştir. Sonrasında 3 kez 1XPBS ile yaklaşık 5 dakika yıkama gerçekleştikten sonra hücreler %3 konsantrasyonun da BSA içeren bloklama bufferında 1 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında 1/150 oranında G3BP1 ve Ccdc 124 antikoru içeren bloklama tamponu her kuyudaki hücrelere eklenerek 1 saat boyunca maruz bırakılmıştır. Daha sonra hücreler 3 kez 1XPBS-T (Triton X-100 içeren fosfat tamponu) ile yıkanarak kalan antikor kalıntılarından uzaklaştırılması sağlanmıştır. 1/500 oranında Alexa 488 ve Alexa 594 antikorları kullanılarak hazırlanan bloklama tamponu eklendikten sonra hücreler karanlık ortamda 1 saat bekletilmiştir. 1 saatin sonunda hücrelerin antikor tamponu çekilerek 1XPBS tamponu ile 5 dakika toplamda 3 kez olacak şekilde yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Yıkama işlemi bitiminde hücreler 1/1000 oranında Hoechst (DNA boyanmasını sağlayan floresan boya) içeren bloklama tamponunda 10 dakika boyunca maruz bırakılmıştır. 10 dakika sonrasında hücrelerin 2 defa 5 dakika aralıklarla ddH₂O ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Lamel üzerinde bulunan hücreler alınarak mowiol (polivinil alkol) olarak adlandırılan ve yapıştırıcı özelliği olan sentetik polimer kullanılarak lamellerin lam üzerine kapatılması gerçekleştirilmiştir. Preparatların LSM 880 ve DMI8 Leica Mikroskobu kullanılarak görüntülenmiştir.

3.2.2.9. Canlı Hücre Görüntüleme

U2OS hücre hattında kalıcı hale getirilen hücreler 6 kuyulu petriye 4×10^4 hücre olacak şekilde ekilmiştir. 24 saat sonra kuyulara G3BP1-mCherry etiketli plazmid JetPrime protokolü uygulanarak transfekte edilmiştir. Transfeksiyondan 24-48 saat sonra ifade edildiği düşünülen hücreler metal chambera yerleştirilerek Poly I:C stresine maruz bırakılmış ve LSM 880 Konfokal mikroskobunda 37 C° de 5 saat boyunca canlı hücre görüntülenmesi sağlanmıştır.

3.2.2.10. Birlikte Çöktürme (CO-IP)

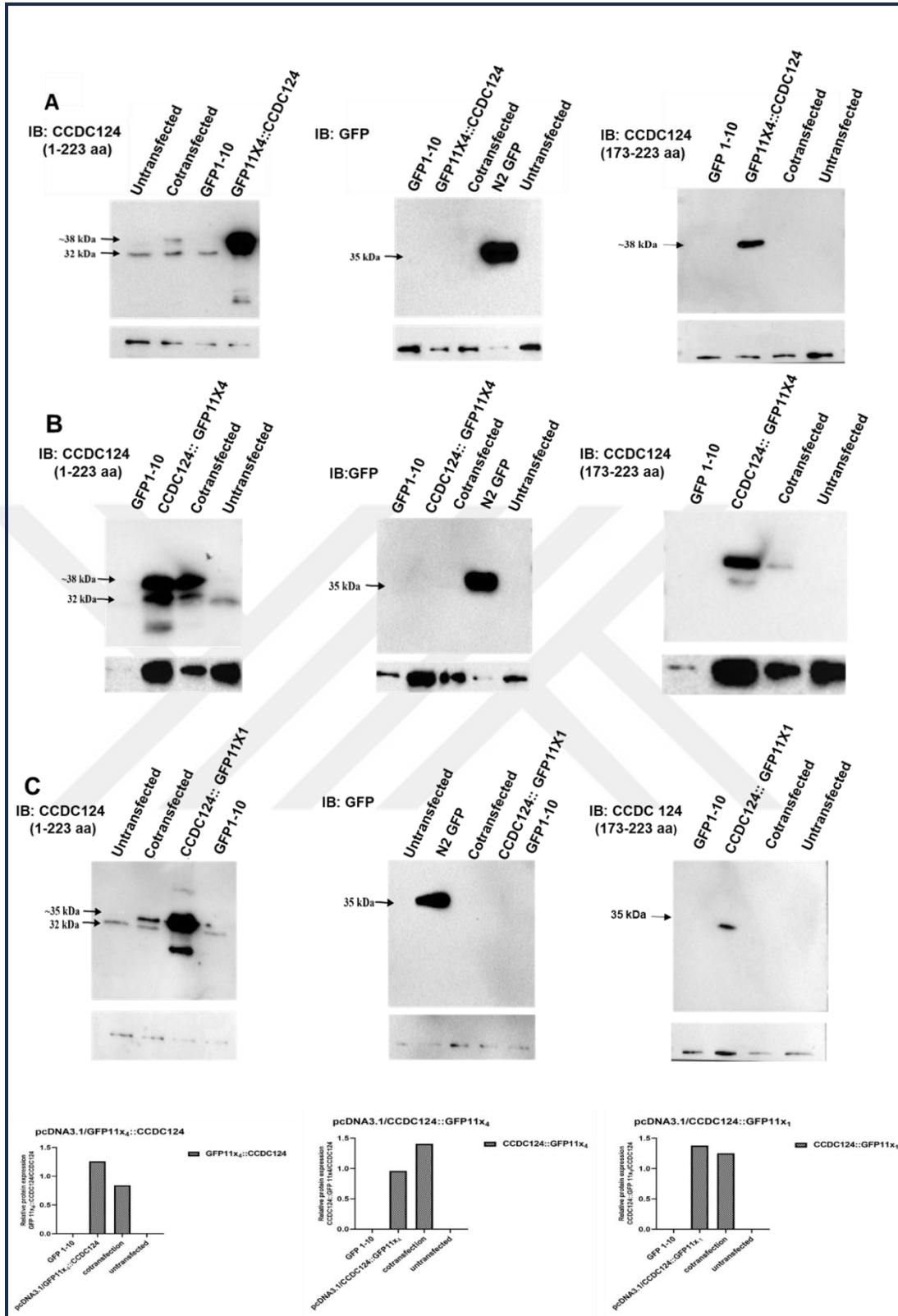
Dynabead yavaşça homojenize edilmiştir. Homojenize edildikten sonra 2 tane 15 cm'lik petriden elde edilen lizatlar 25-50 μL HA antikoru bead içeren ependorflere aktarılmıştır. Ependorfler manyetik ayırıcıya (DynaMag) yerleştirilerek üst sıvı boncuklara dokunulmadan çekilmiştir. Tüpler magnetten ayrıldıktan sonra oda sıcaklığındaki 1XPBS ile iki kez yavaş pipetleme yapılarak yıkanmıştır ve sonrasında üst sıvı yavaşça çekilmiştir. Hücre lizatı (100-1000 μl) manyetik boncuklara eklenerek pipetleme yapılmıştır ve sonrasında $+4\text{ C}^\circ$ de gece boyu çalkalayıcıya bırakılmıştır. Ertesi gün çalkalayıcıdan alınan lizat-boncuk karışımı manyetik ayırıcıya yerleştirilerek üst sıvısı çekilmiş ve daha sonra SDS-PAGE gel de yaklaşık %2'si input olarak kullanılmak üzere buzda bekletilmiştir. Boncuk-lizat karışımı hazırlanan coIP yıkama tamponu ile üç kez yıkanmıştır. Yıkama sonrası lizat-boncuk kompleksi 100 μl coIP yıkama tamponu ilave edilerek pipetleme yapılarak yeni ependorflere aktarılmıştır. Ependorfler manyetik ayırıcıya yerleştirildikten sonra üst sıvı uzaklaştırılıp, kalan lizat-boncuk karışımı 30 μl co-IP elüsyon tamponu ile 10 μl input ise 5 μl co-IP elüsyon tamponu ilave edilerek 70 C° de 10 dakika denatüre edilmiştir. Sonrasında tüpler manyetik ayırıcıya yerleştirilerek hacminin % 2' si input olarak ayrılan üst sıvının ise hacminin tamamı SDS-PAGE yüklenilerek Western Blot protokolü takip edilmiştir.

4. SONUÇLAR

4.1. Vektör Oluşturma

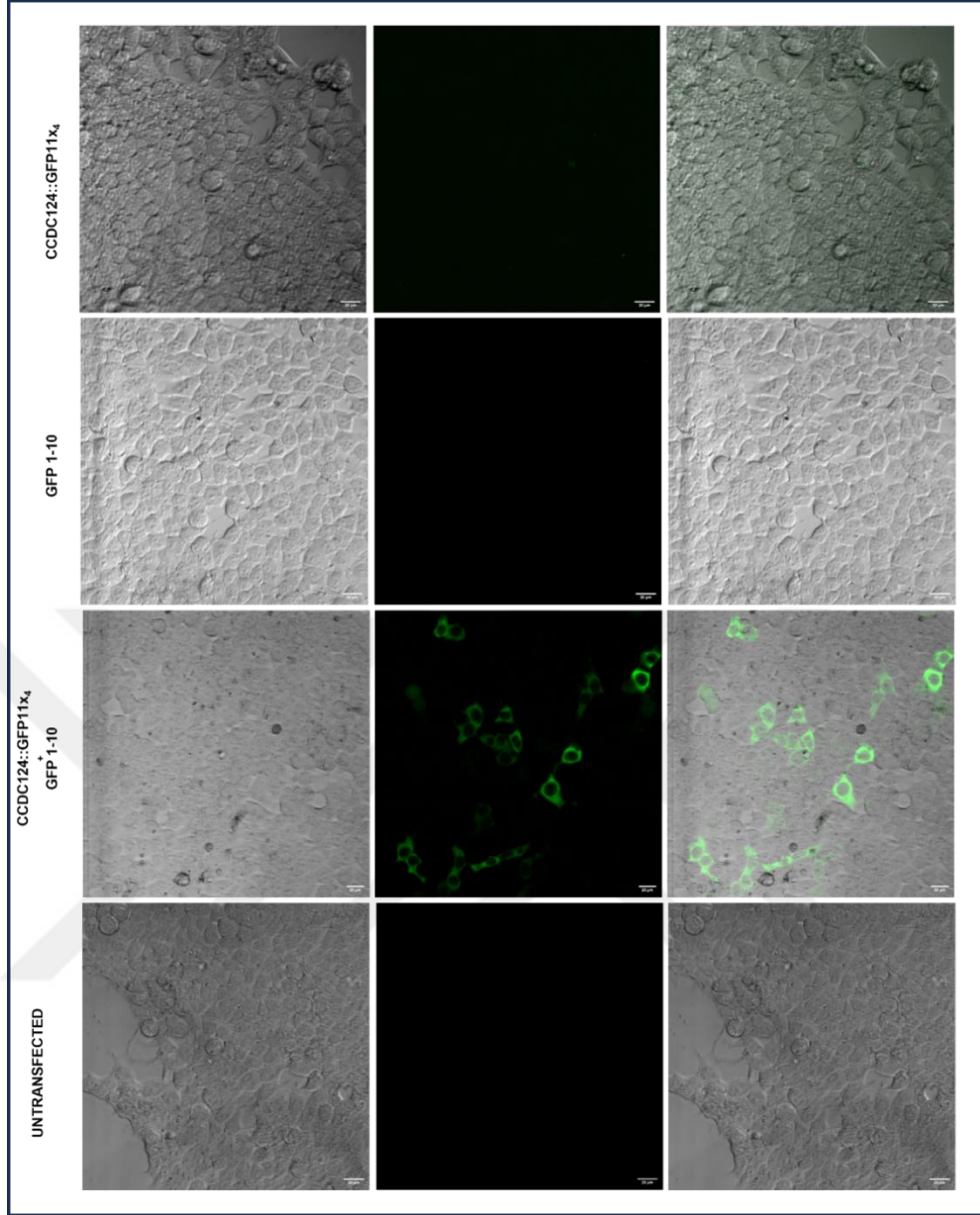
pcDNA3.1/CCDC124::GFP11x₄ ve pcDNA3.1/CCDC124::GFP11x₁ plazmidinin oluşturulması için CCDC124-GFP plazmidindeki *Ccdc124* gen bölgesi *NheI*-*BamHI* enzim kesim bölgeleri içeren *Ccdc124_Frw*- *Ccdc124_Rev* primerleri (Tablo 3.1) kullanılarak amplifiye edilmiş ve pcDNA 3.1 Hygro (+) kalıp plazmidine klonlaması gerçekleştirilmiştir. Klonlama sonrası kalıp vektördeki *Ccdc124* gen bölgesinin varlığı *NheI*-*BamHI* enzimleri kullanılarak doğrulanmış, ardından ilgili büyüklükteki plazmidler dizi analizi için IONTEK veya Sentebiolab firmasına (İstanbul/Türkiye) (Ankara/Türkiye) gönderilmiştir. Sekans sonrası pHRM-NLS-dCas9-GFP11x₇ plazmidindeki *GFP11x₄* ve *GFP11x₁* gen bölgesini kapsayan ve *BamHI*-*XhoI* kesim bölgeleri içeren *Gfp11x₄_Frw*- *Gfp11x₄_Rev* primerleri ve *Gfp11x₁_Frw*- *Gfp11x₁_Rev* primerleri (Tablo 3.1) kullanılarak sekanslama sonucu doğrulanmış ve *Ccdc124* gen bölgesi içeren pcDNA 3.1 Hygro (+) vektörüne klonlanması gerçekleştirilir. *Gfp11x₄_Frw* ve *Gfp11x₁_Frw* primerlerinin hedef bölgesi aynı olduğu için ikinci kez bir primer tasarlanmamıştır. Klonlama sonrası elde edilen füzyon gen bölgelerinin *NheI*-*XhoI* RE ile ön kontrolü yapılmış ve uygun büyüklükte gösterilen plazmidler dizi analizi için ilgili firmalara gönderilmiştir.

pcDNA3.1/GFP11x₄::CCDC124 plazmidinin oluşturulması için *GFP11x₄* gen bölgesini kapsayan ve *NheI*-*BamHI* enzim kesim bölgeleri içeren 4XGFP_N_ *Frw*- 4XGFP_N_ *Rev* primerleri (Tablo 3.1) kullanılarak amplifiye edilmiş ve pcDNA3.1 Hygro (+) vektörüne klonlanmıştır. Klonlama sonrası gen bölgesinin varlığı *NheI*-*BamHI* enzimleri ile kullanılarak kontrol edilmiştir. Ön kontrol sonrası uygun büyüklüğe sahip plazmidler dizi analizi için ilgili firmalara gönderilmiştir. Sekans sonrası *Ccdc124* gen bölgesi *BamHI*-*XhoI* kesim bölgelerini içeren *Ccdc124_N_ Frw*- *Ccdc124_N_ Rev* primerleri kullanılarak amplifiye edilmiş ve sekans sonrası doğrulanmış plazmidlere klonlanması gerçekleştirilmiştir. Klonlama sonrası plazmidlerin füzyon gen bölgesi içerip içermediği *NheI*-*XhoI* RE ile ön kontrolü yapılmıştır. Kontrol sonucu uygun büyüklükteki plazmidler dizi analizine gönderilmiştir.



Şekil 4.1: CCDC124 proteininin farklı GFP11 etiketleri ile immünoiblöt analizleri ve ekspresyon seviye grafikleri.

Sekans sonrası füzyon gen bölgelerini içeren plazmidler pcDNA3.1/GFP11x₄::CCDC124, pcDNA3.1/GFP11x₄::CCDC124 ve pcDNA3.1/CCDC124::GFP11x₁ protein analizi gerçekleştirebilmek için HEK293T hücre hattı kullanılarak transfekte edilmiştir. pcDNA 3.1-GFP (1-10) ve ayrı ayrı ve oluşturulan plazmidlerin pcDNA 3.1-GFP (1-10) plazmidi ile eş transfeksiyonu sonucunda elde edilen proteinler 40 µg olacak şekilde membrana yüklenmiş olup CCDC124 proteinini farklı bölgelerden tanıyan antikorlar kullanılarak Şekil 4.1’ de gösterildiği gibi analizleri gerçekleştirilmiştir. GFP antikoruna, bölünmüş GFP ile oluşturulan plazmidleri tanımadığından dolayı çalışmalar boyunca GFP antikoruna kullanılmamıştır. pcDNA3.1/ GFP11x₄::CCDC124, pcDNA3.1/GFP11x₄::CCDC124 plazmidleri beklenildiği üzere yaklaşık 38 kDa büyüklüğünde bir bant gösterirken pcDNA3.1/CCDC124::GFP11x₁ plazmidi ise yaklaşık 35kDa büyüklüğünde bir bant profili göstermektedir.



Şekil 4.2: GFP11₄ ile etiketli CCDC124 proteininin U2OS hücre hattında transfeksiyon görüntüsü (20µm).

Elde edilen plazmidlerden pcDNA3.1/CCDC124::GFP11x₄, U2OS hücre hattına transfekte edilmiş ve oluşturulan pcDNA3.1/CCDC124::GFP11x₄, plazmidinin tek başına herhangi bir ışına yapmadığı görülmüştür. Bölünmüş GFP yapısı sonucunda 10. ve 11. β ipliğinden bölünen GFP; GFP1-10 ve GFP11 olarak ayrılır ve GFP nin kromofor yapısı GFP1-10 kısmında kalırken onun olgunlaşmasından sorumlu E222 kısmı ise GFP 11 kısmında kaldığı için tek başlarına herhangi bir ışına özelliği göstermezler [31]. Şekil 4.2 de olduğu gibi elde edilen plazmid ve pcDNA 3.1-GFP (1-10) plazmidinin eş transfeksiyonu sonucunda ışına gözlenmiştir.

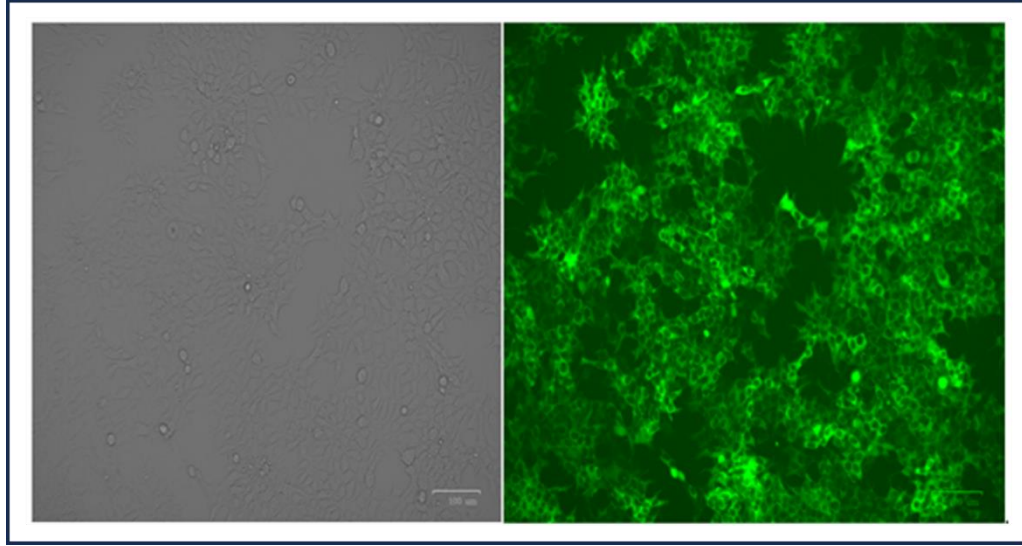
4.2. HEK 293T Hücre Hattında Aşırı İfade Edilmiş Ccdc124'ün Stres Granülü ile Etkileşimi

Bölünmüş GFP11 etiketi kullanılarak oluşturulan pcDNA 3.1/Ccdc124::GFP11_{x4} plazmidi Tablo 3.12 ve Tablo 3.13 de belirtilen miktarlar kullanılarak HEK293T hücre hattına transfeksiyonu gerçekleştirilerek bir havuz oluşturulmuştur.

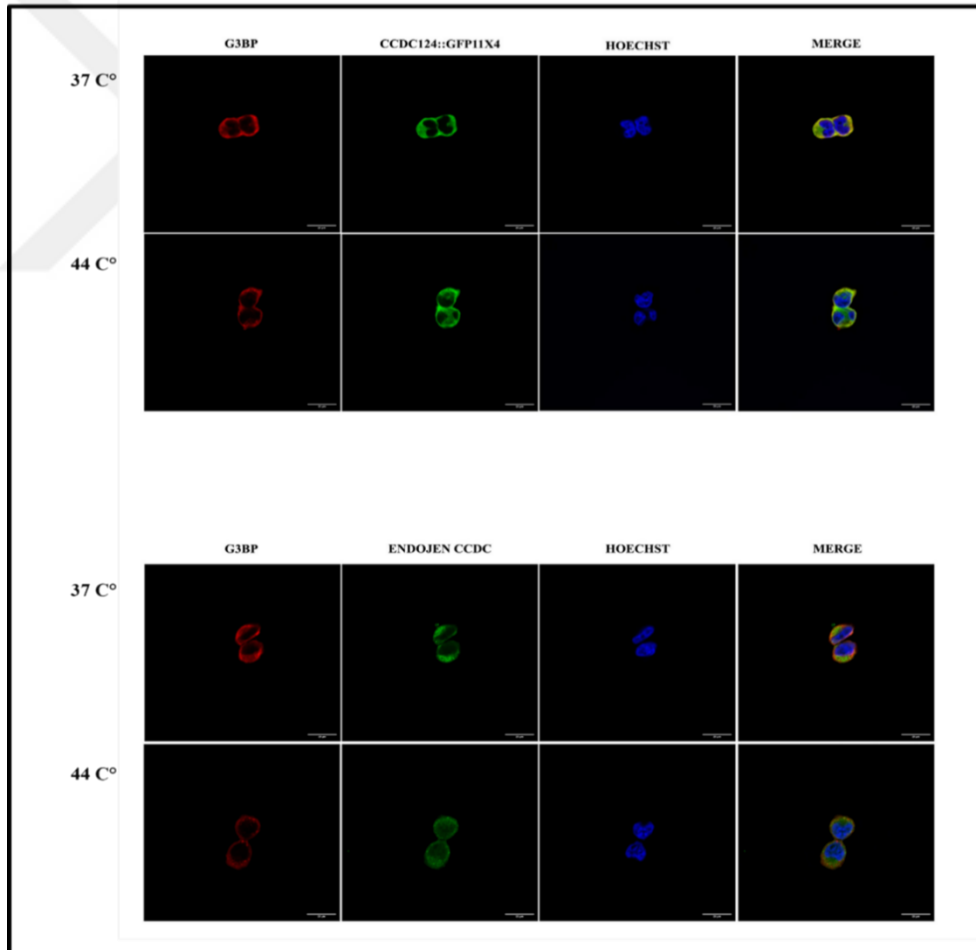
Transfeksiyon sonrası elde edilen havuzdan GFP ışıması yapan hücreler oluşturabilmek için 96'lık kuyulara tek hücre düşecek şekilde hücre ekimi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen 96'lık kuyular belirli aralıklar ile kontrol edilmiş GFP ışıması yapan ve tek koloni düşen kuyular seçilerek büyütülmesi gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.3).

Laboratuvarımızda Pelin Telkoparan ve Merve Tuzlakoğlu Öztürk tarafından yapılan kütle spektrometresi ve biotinleme sonu elde edilen Mass Speck sonuçları doğrultusunda CCDC124 'ün DDX17, HNRNPA1, FUS ve G3BP1 proteinleri ile etkileşim göstermesi stres granül yapısının incelenmesi ve bu yapının oluşumunda CCDC124 proteininin etkisinin olup olmadığı belirlenmek istenmiştir. Bu doğrultuda büyütülme aşaması sonrası tek hücre düştüğü ve GFP ışıması yaptığı belirlenen kalıcı hücre hattı immünboyama yöntemi kullanılarak stres şartları altında CCDC124 proteininin lokalizasyonu tespit edilmek istenmiş ve bu doğrultuda en yaygın tercih edilen sıcaklık stresi kullanılmıştır. Hücreler ilk olarak yaklaşık 1 saat boyunca 44 C° de sıcaklık stresine maruz bırakılmış kontrol olarak ise normal büyüme şartları korunarak (37 C°) inkübe edilen hücreler kullanılmıştır. Her iki şartta da inkübe edilen hücreler stres granül belirteci olan G3BP antikoru (kırmızı olarak gösterilen) ve çekirdeğin gözlenmesini sağlayan Hoechst 3342 (mavi olarak gösterilen) floresan boyası kullanılarak incelenmiştir.

İmmünboyama çalışmaları sonucu konfokal mikroskobunda görüntülenen ve Şekil 4.4 de gösterilen hücrelerin strese girdiği fakat stres şartında sitoplazmada konumlanan CCDC124 proteininin lokalizasyonunda herhangi bir değişiklik olmadığı ve sitoplazmada bulunan stres granül belirteci olan G3BP ile bir etkileşim göstermediği gözlenmiştir. Hücre büyümesi için gerekli normal şartlar altında ise (37 C°) hücrede herhangi bir stres granül oluşumunun gözlenmediği ve bundan dolayı da bu grubun kontrol grubu olarak kullanılması gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.3: HEK293T hücre hattında kalıcı ifadesi gerçekleştirilen CCDC124::GFP11_{X4} proteininin görüntüleri (Bar 100 μ m).



Şekil 4.4: HEK293T hücre hattında kalıcı ifadesi gerçekleştirilen CCDC124::GFP11_{X4} proteininin immüno Floresan görüntüleri (Bar 20 μ m).

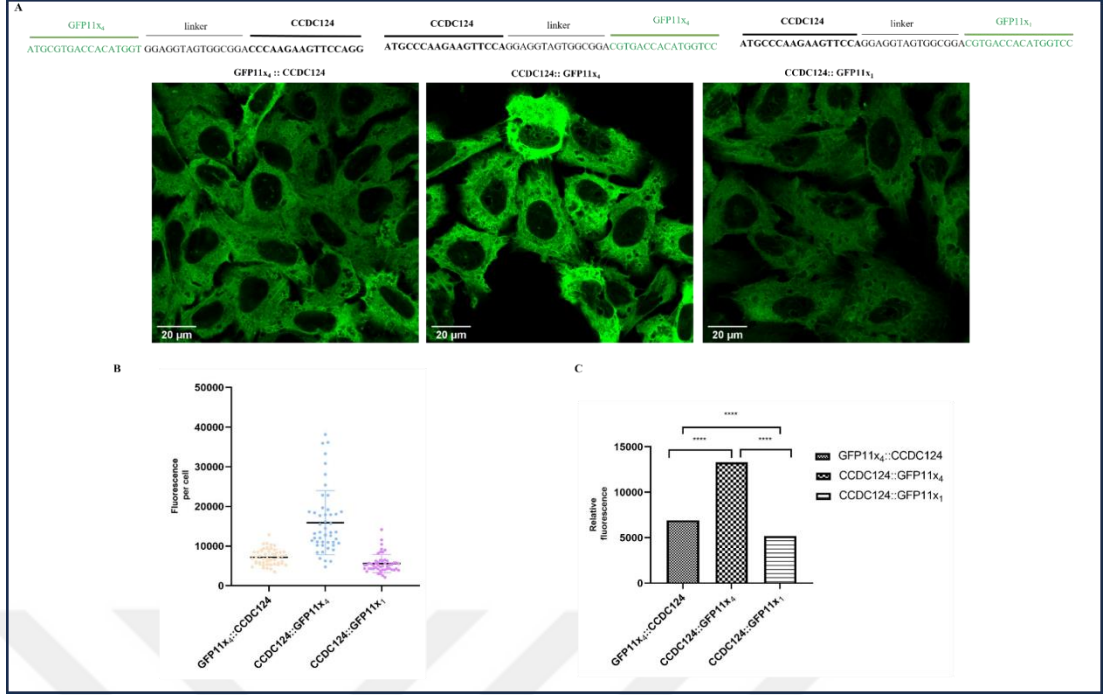
Bu çalışma sonucunda 44 C° nin stres şartı oluşturmak için yeterince etkili olmadığı (bütün hücre popülasyonunda stres şartına rastlanmamıştır) ve HEK293T hücre hattının ilgili proteininin lokalizasyonunun belirlenmesinde yeterli büyüklükte olmadığından dolayı başka stres şartları ve görüntülemeye organel yapısı büyüklüğünün vermiş olduğu avantajdan dolayı U2OS hücre hattı kullanılması sonucuna varılmıştır.

4.3. CCDC124'ün U2OS Hücre Hattında Aşırı İfadesi

HEK293T hücre hattında immünboyama analizi gerçekleştirilen pcDNA 3.1/Ccdc124::GFP11_{X4} plazmidinin yanı sıra pcDNA3.1/ GFP11_{X4}::CCDC124 ve pcDNA3.1/CCDC124::GFP11_{X1} plazmidlerinin U2OS hücre hattında kalıcı bir ifade gösterebilmesi için Tablo 3.12, Tablo 3.13, Tablo 3.14 ve Tablo 3.15 de belirtilen miktarlar kullanılarak transfeksiyonu gerçekleştirilmiştir. Transfeksiyon sonrası tek hücre elde etmek için 3 tane 96'lık well hücre ekimi gerçekleştirilmiştir. Tek hücre düştüğü ve düşen hücrenin ışıma yaptığı tespit edildikten sonra hücrelerin belirli aralıklarla Hygromisin antibiyotigi uygulanarak oluşturulan plazmidin antibiyotiğe direnç geni barındırmasından dolayı baskılanması ve direnç geni göstermeyen plazmidlerin ise ortamdan uzaklaştırılması sağlanmıştır.

Transfeksiyon sonrası CCDC124::GFP11_{X4}, GFP11_{X4}::CCDC124 ve CCDC124::GFP11_{X1} proteinlerini kalıcı olarak ifade eden U2OS hücre hatları oluşturulmuş ve bu kalıcı ifadelerin seviyelerinin karşılaştırılması gerçekleştirilmiştir. %4 PFA ile fikse edilen hücreler konfokal mikroskopunda incelenmiş ve elde edilen görüntüler Şekil 4.5A'da gösterilmiştir. Görüntülerden elde edilen sonuçlar doğrusulda 50 bağımsız hücre analiz edilmiş ve analiz sonucunda CCDC124'ün C-terminus ucuna eklenen GFP11_{X4} etiketinin, CCDC124'ün N-terminusuna eklenen ya da CCDC124'ün C-terminusuna eklenen GFP11_{X1} etiketine kıyasla daha baskın bir şekilde ifade edildiği Şekil 4.5C'de ve her bir hücrenin ekspresyon ifadesi Şekil 4.5B'de (Mann Whitney test: **** P < 0,0001) gösterilmiştir.

Bu sonuçlar doğrultusunda bu kalıcı hücre hatları kullanılarak yapılacak deneylerde CCDC124::GFP11_{X4} proteininin ifade eden hücre hatlarına ve bu hücre hattına nispeten benzer ifade yoğunluğu gösteren GFP11_{X4}::CCDC124 proteinini ifade eden hücre hatlarına öncelik tanınmıştır.

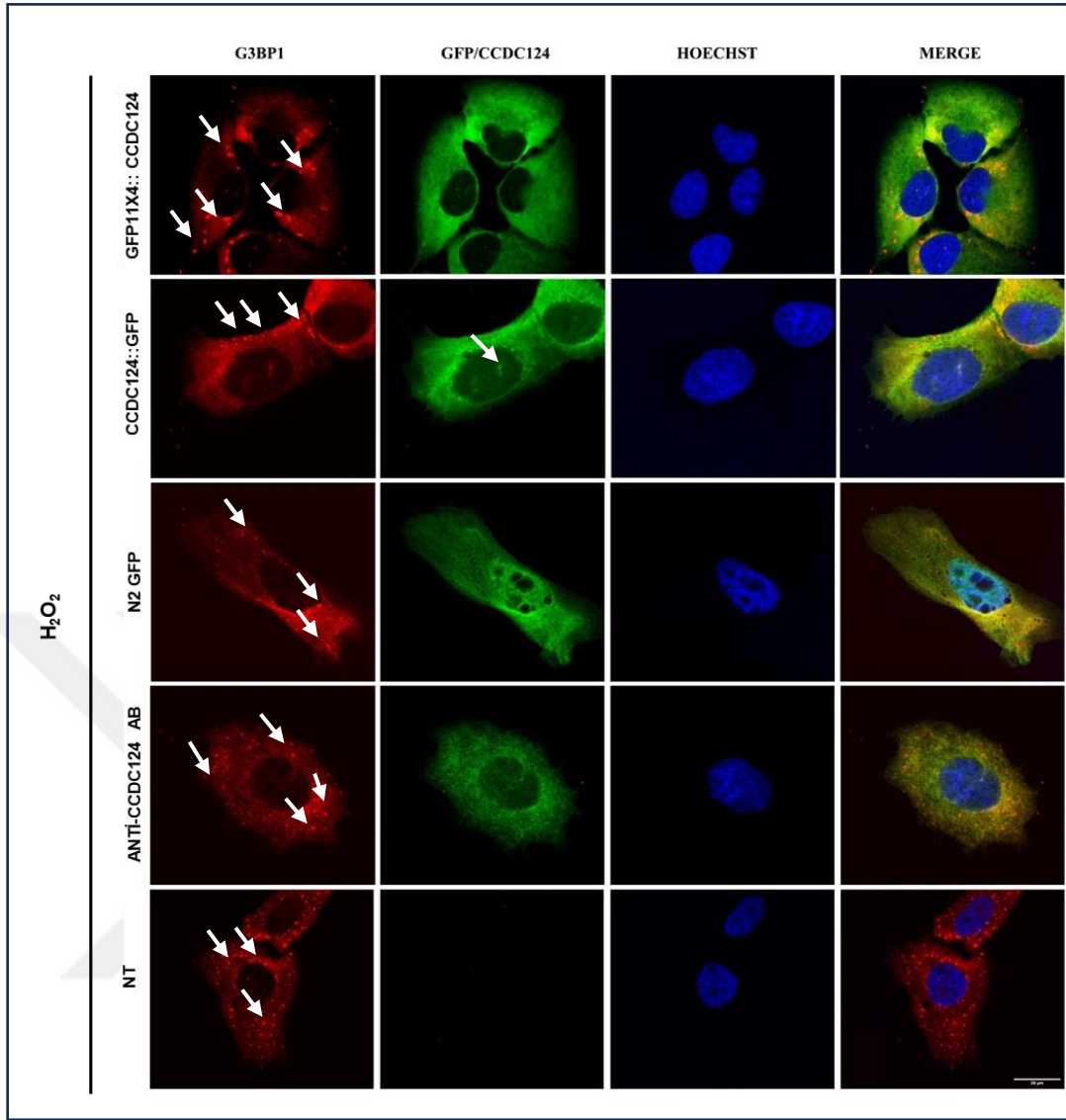


Şekil 4.5: Farklı GFP11 etiketleri ile işaretlenmiş CCDC124 proteininin kalıcı ifadesi. **A)** pHRM-SFFV GFP 1-10 lentiviral vektör ve oluşturulan (pcDNA3.1/CCDC124::GFP11x₄, pcDNA3.1/CCDC124::GFP11x₁ and pcDNA3.1/ GFP11x₄::CCDC124) plazmidlerinin U2OS hücre hattında eş transfeksiyonu sonrası oluşturulan kalıcı hücre hatları. Bar 20µm. **B)** CCDC124::GFP11x₄, GFP11x₄::CCDC124 and CCDC124:: GFP11x₁ plazmidlerinin kalıcı hücre hattı oluşturularak floresan yoğunluğunun Image J programı ile gösterilmesi. Grafikte ki her bir nokta 50 hücreyi temsil eder. **C)** CCDC124::GFP11x₄, GFP11x₄::CCDC124 and CCDC124:: GFP11x₁ floresan yoğunluğunun ölçümünü temsil eder. (Mann Whitney test: **** P < 0,0001).

4.4. U2OS Hücre Hattında Aşırı İfade Edilmiş GFP11x₄:: CCDC124'ün Stres Granülü ile Etkileşimi

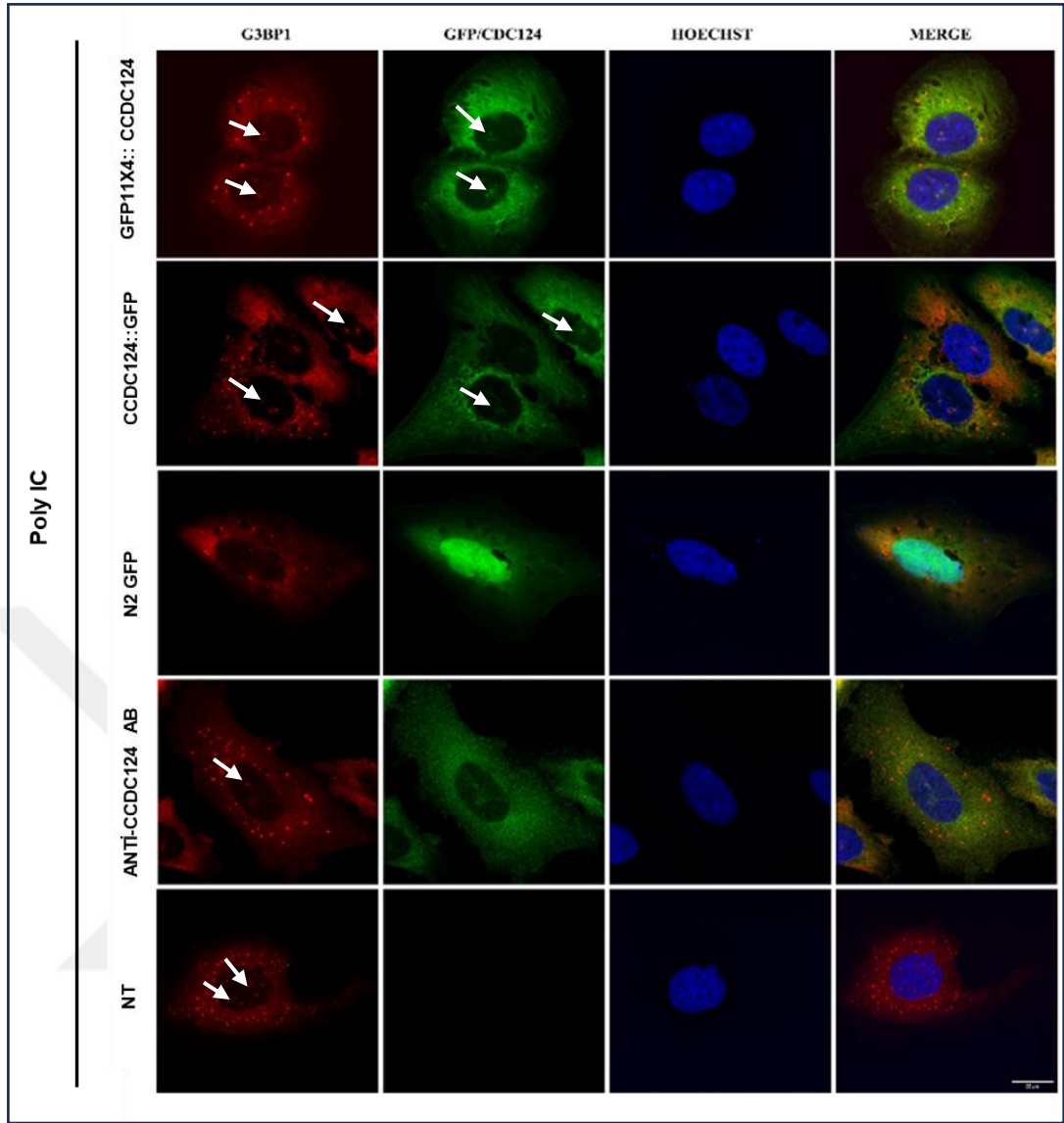
U2OS hücre hattında aşırı ifade edilmiş GFP11x₄::CCDC124 proteinleri stres granül belirteci olan G3BP1 antikor boyaması yapılarak H₂O₂ (2mM), Poly IC (500ng/µl), sıcaklık (46 C°) stres şartlarında ve normal şartlarda oluşturulmuş CCDC124 proteininin lokalizasyonu gözlenmiştir (Şekil 4.6) (Şekil 4.7) (Şekil 4.8) (Şekil 4.9). Stres granül belirteci olan G3BP1 boyamasını kırmızı renkli görürken CCDC124 proteininin N terminalinde bulunan GFP11x₄ etiketi içermesi sebebiyle hücre içinde yeşil renkte görünmektedir. Çekirdek yapısının görüntülenmesi için ise Hoechst boyaması gerçekleştirilmiştir.

GFP11x4::CCDC124 proteinlerinin H₂O₂ (2mM) varlığında yapılan immünboyama çalışmalarında Şekil 4.6’ da beklenildiği üzere stres granül oluşumu gözlenmiş olup bunun yanısıra çok da yaygın olmamak kaydı ile çekirdekte konumlanan ve beyaz oklarla gösterilen CCDC124 ve G3BP1 etkileşimi gösteren granüller gözlenmiştir. pEGFP-N2 plazmidi ile geçici transfeksiyon yapılan hücrelerde çekirdek ve sitoplazmada yaygın GFP ışıması gözlemlenirken CCDC124 etiketli GFP kalıcı ifadesinde ise sitoplazmada yaygın fakat çekirdekte de gözlemlenen yapılar olduğu tespit edilmiştir. CCDC124 antikör boyaması olan hücreler kullanılarak olası antikör kaynaklı spesifik olmayan bağlanmaların olup olmadığı kontrol olarak kullanılmıştır. Yapılan immünboyama çalışmalarında stres şartlarında oluşturulan bölünmüş küçük GFP11 etiketli CCDC124 ‘ün ve 223 kDA büyüklüğündeki tam uzunluktaki GFP etiketli CCDC124 proteininin kıyaslanması gerçekleştirilmiştir. Tam uzunluktaki GFP etiketli CCDC124 proteininin de çekirdekte G3BP1 ile etkileştiği gözlenmiştir. Negatif kontrol olarak transfekte edilmemiş U2OS hücre hatlarının G3BP1 boyaması kullanılmıştır.



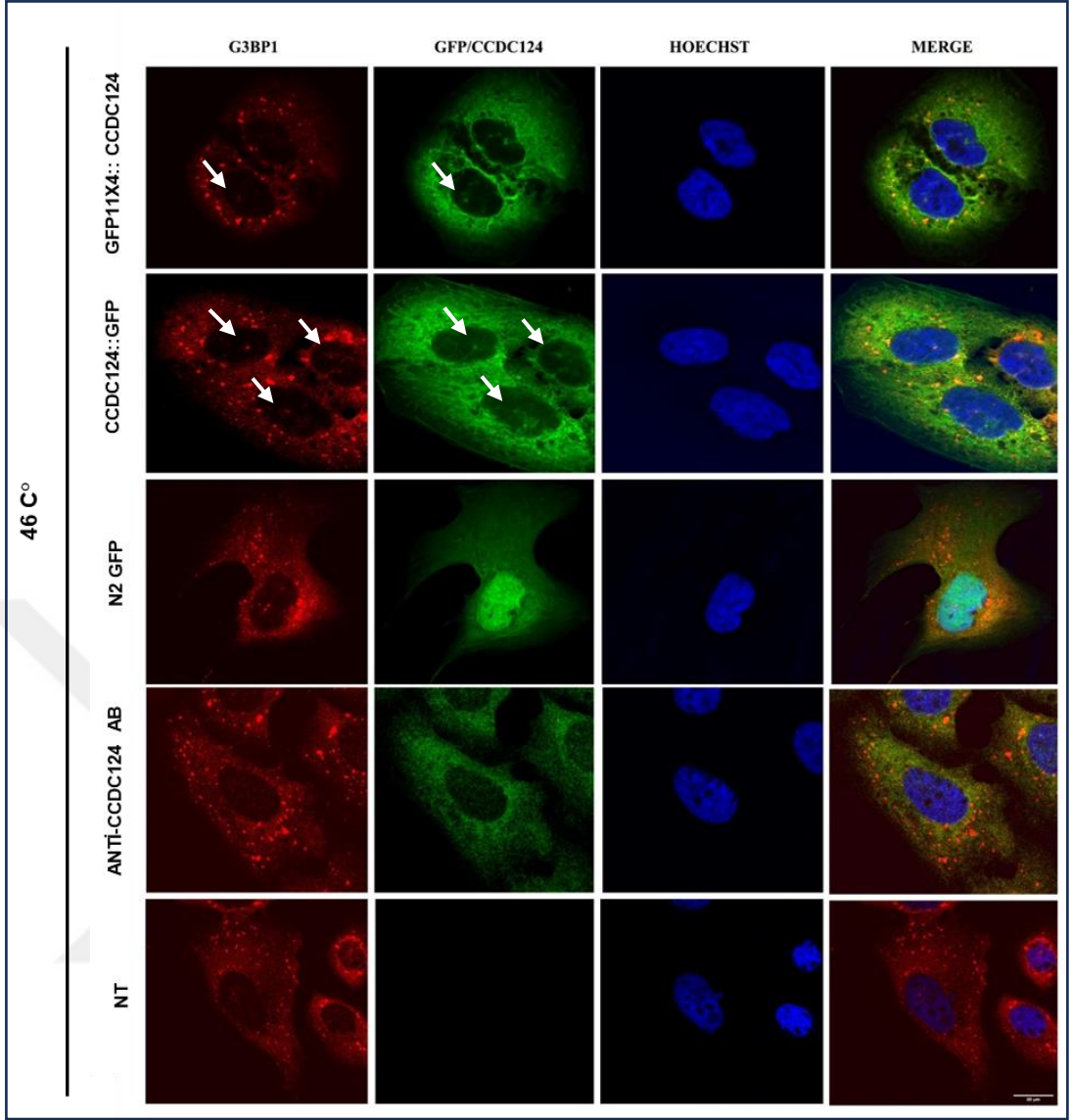
Şekil 4.6: pcDNA 3.1/ GFP11x₄::CCDC124 plazmidinin H₂O₂ stresi altında immünboyama görüntüleri (Bar 20 µm).

GFP11x₄::CCDC124 proteinlerinin Poly IC (500ng/µl) varlığında yapılan immünboyama çalışmalarında CCDC124 proteininin aşırı ifade edildiği CCDC124::GFP ve GFP11x₄::CCDC124 örneklerinde CCDC124 proteininin çekirdekte G3BP1 ile etkileştiği bunun yanısıra CCDC124 proteininin antikor boyamasında da bu etkileşimin olduğu gözlenmektedir. Negatif kontrol olarak kullanılan ve CCDC124 boyaması olmayan non-transfected (NT) hücrelerde G3BP1'in CCDC124 proteininden bağımsız olarak çekirdekte konumlandığı gözlenmektedir (Şekil 4.7).



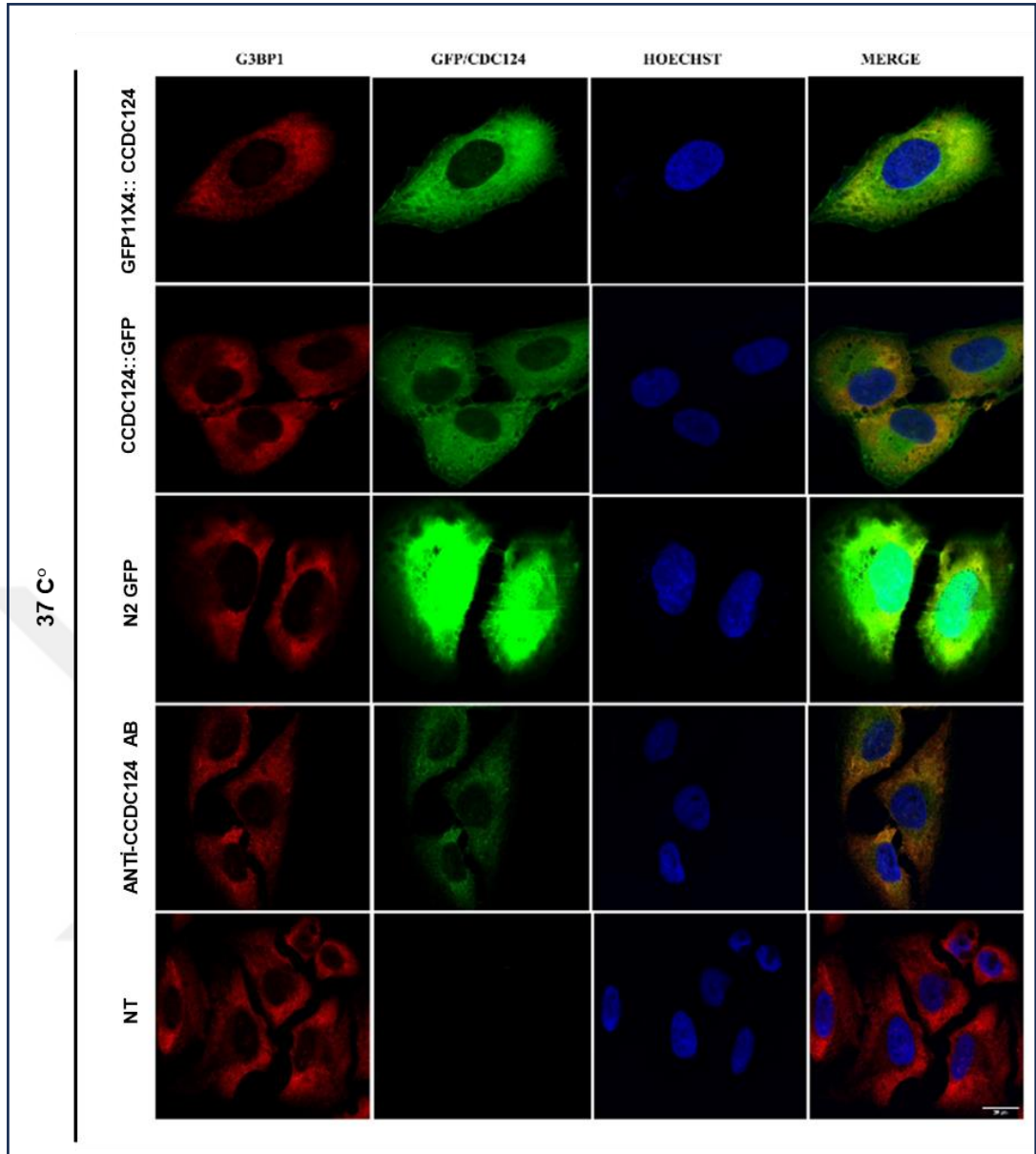
Şekil 4.7: pcDNA 3.1/ GFP11x4::CCDC124 plazmidinin Poly IC stresi altında immünboyama görüntüleri (Bar 20 µm).

GFP11x4::CCDC124 proteinlerinin sıcaklık (46 C°) varlığında yapılan immünboyama çalışmalarında diğer stres şartlarına benzer sonuçlar gözlemledik. CCDC124 proteininin aşırı ifade edildiği ve GFP etiketli hücrelerde CCDC124 proteininin çekirdek içinde G3BP1 ile etkileştiği tespit edilmiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.8: pcDNA 3.1/ GFP11x4::CCDC124 plazmidinin 46 C° stresi altında immünboyama görüntüleri (Bar 20 µm).

GFP11x4::CCDC124 proteinlerinin normal büyüme şartlarında büyütülerek yapılan (37 C°) immünboyama çalışmalarında hücrelerde stres granül yapısı beklenildiği üzere gözlenmemiştir (Şekil 4.9).



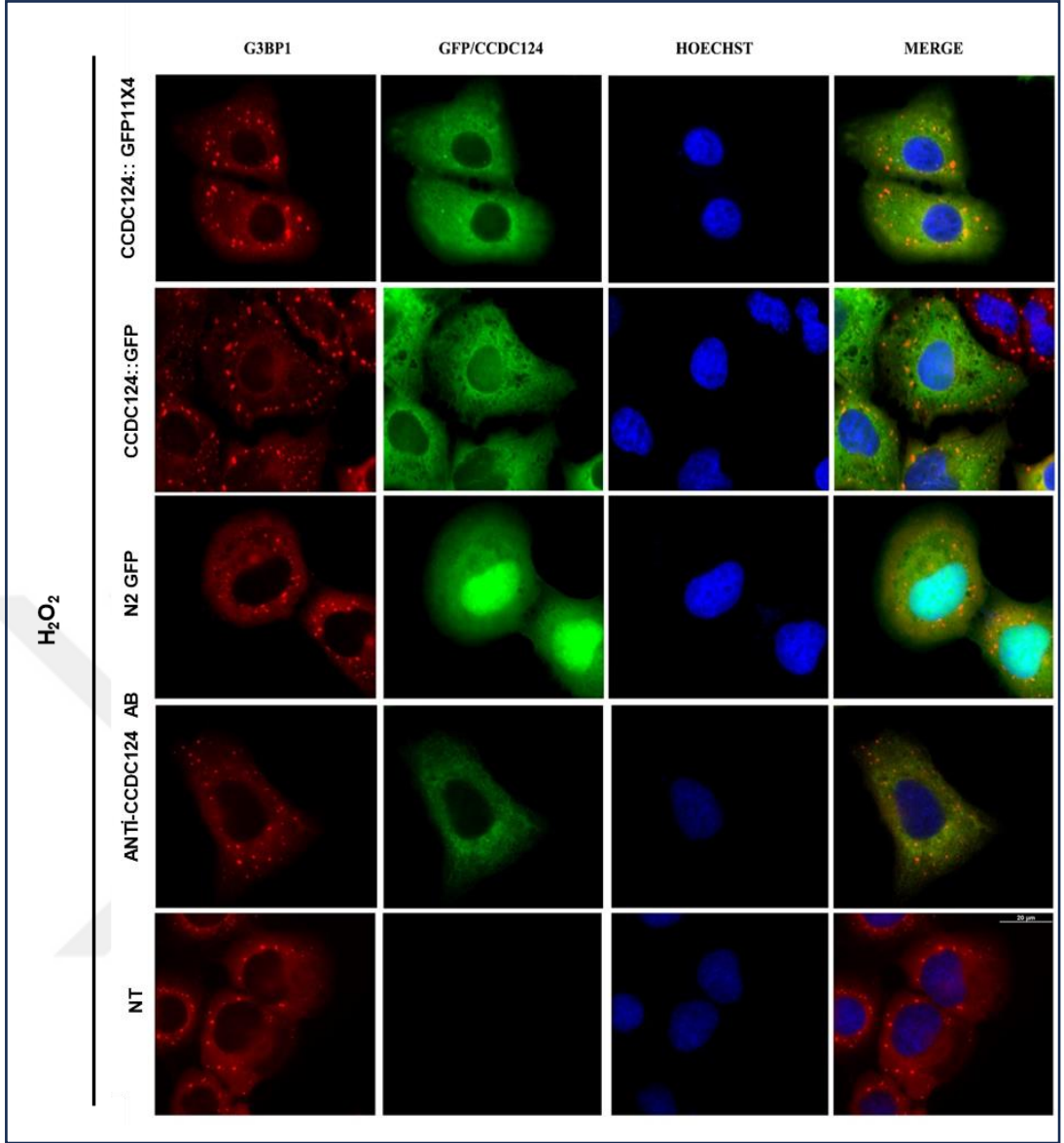
Şekil 4.9: pcDNA 3.1/ GFP11x₄::CCDC124 plazmidinin 37 C° altında immünboyama görüntüleri (Bar 20 µm).

4.5. U2OS Hücre Hattında Aşırı İfade Edilmiş CCDC124::GFP11x₄:’ün Stres Granülü ile Etkileşimi

U2OS hücre hattında aşırı ifade edilmiş CCDC124::GFP11x₄ proteinleri stres granül belirteci olan G3BP1 antikor boyaması yapılarak H₂O₂ (2mM), Poly IC (500ng/µl), sıcaklık (46 C°) stres şartlarında ve normal şartlarda oluşturulmuş CCDC124 proteininin lokalizasyonu gözlenmiştir (Şekil 4.10) (Şekil 4.11) (Şekil 4.12) (Şekil 4.13). CCDC124 proteininin C terminalinde bulunan GFP11x₄ etiketi içermesi

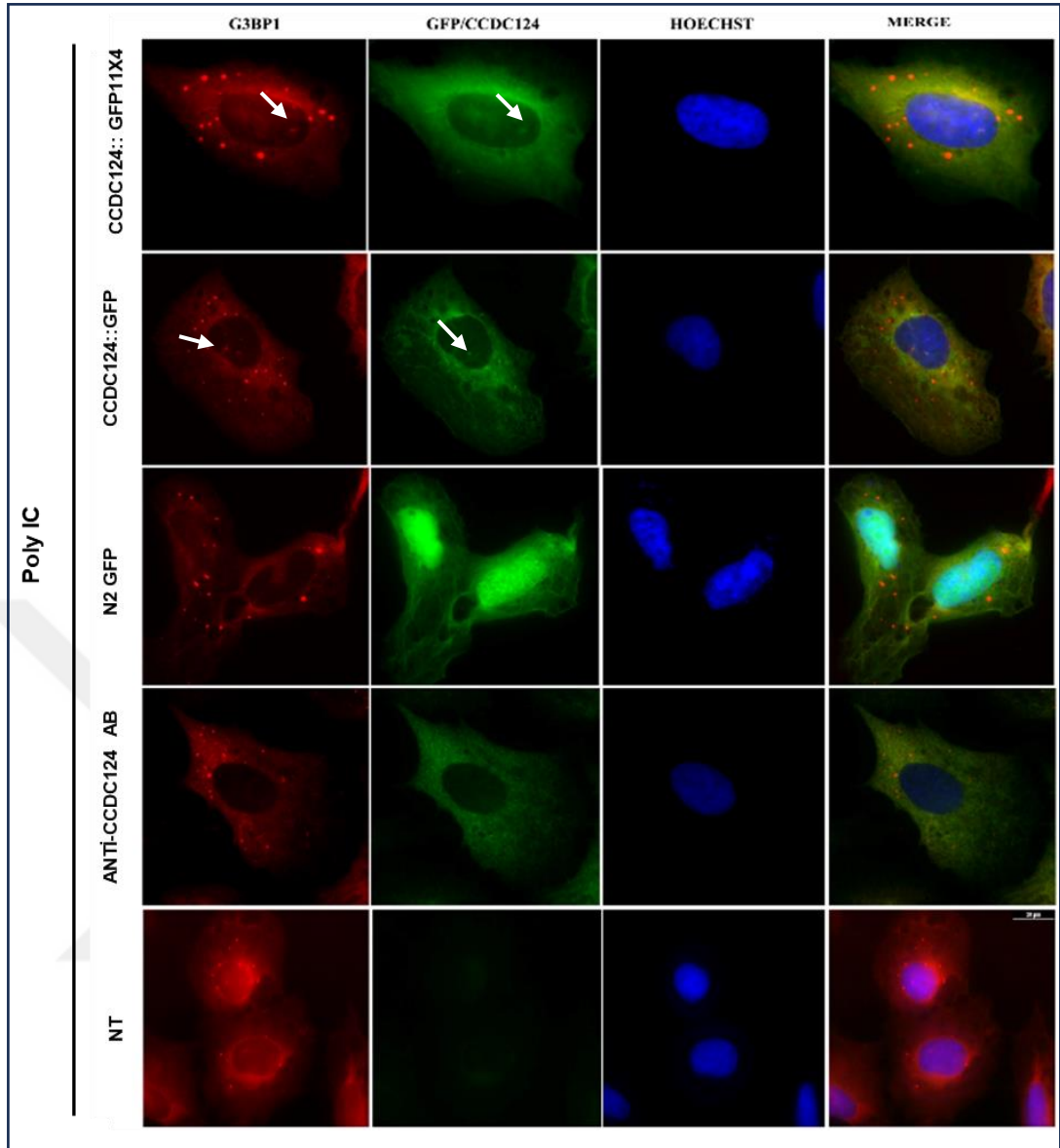
sebebiyle hücre içinde yeşil renkte görünmektedir. Çekirdek görüntülenmesi Hoechst boyaması ile mavi renkte gösterilirken G3BP1'in varlığı kırmızı renkte gösterilmiştir.

H₂O₂ (2mM) varlığında yapılan immünboyama çalışmalarında CCDC124::GFP11_{x4} proteinlerinin stres şartlarında stres granül oluşturduğu oluşan granüler yapının yoğun olarak sitoplazmada konumlandığı tespit edilmiştir. Çekirdekte sitoplazmaya oranla daha az konumlandığı ve G3BP1 ile etkileşimi beyaz oklarla gösterilmiştir (Şekil 4.10). pEGFP-N2 plazmidi ile gerçekleştirilen transfeksiyon sonucu yaygın GFP ışınması gözlenmiştir. Antikor kaynaklı spesifik bağlanmaların kontrolü için CCDC124 antikor boyaması gerçekleştirilmiştir. Bunun yanısıra oluşturulan bölünmüş küçük GFP11 etiketli CCDC124 'ün ve 223 kDA büyüklüğündeki tam uzunluktaki GFP etiketli CCDC124 proteininin kıyaslanması gerçekleştirilmiştir. U2OS hücre hatlarının G3BP1 boyaması negatif kontrol olarak kullanılmıştır.



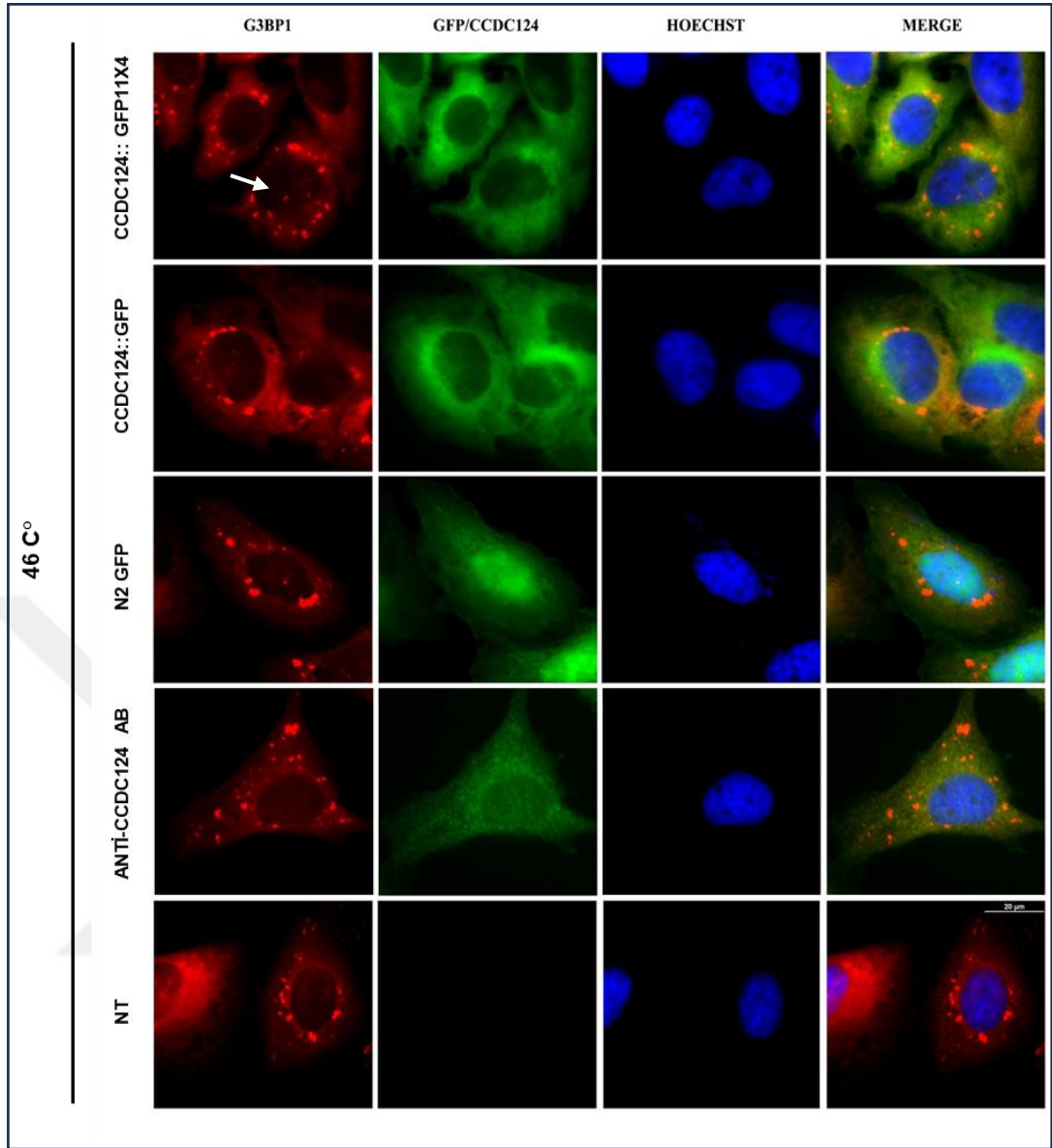
Şekil 4.10: pcDNA 3.1/ CCDC124::GFP11x₄ plazmidinin H₂O₂ stresi altında immünboyama görüntüleri (Bar 20 μm).

Poly IC (500ng/μl) varlığında yapılan immünboyama çalışmalarında CCDC124 proteininin aşırı ifade edildiği CCDC124::GFP ve CCDC124::GFP11x₄ örneklerinde CCDC124 proteininin çekirdekte G3BP1 proteinini tanıyan antikor boyaması ile etkileştiği gözlenmektedir. Negatif kontrol olarak kullanılan ve CCDC124 boyaması olmayan hücrelerde G3BP1 antikor boyaması gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.11).



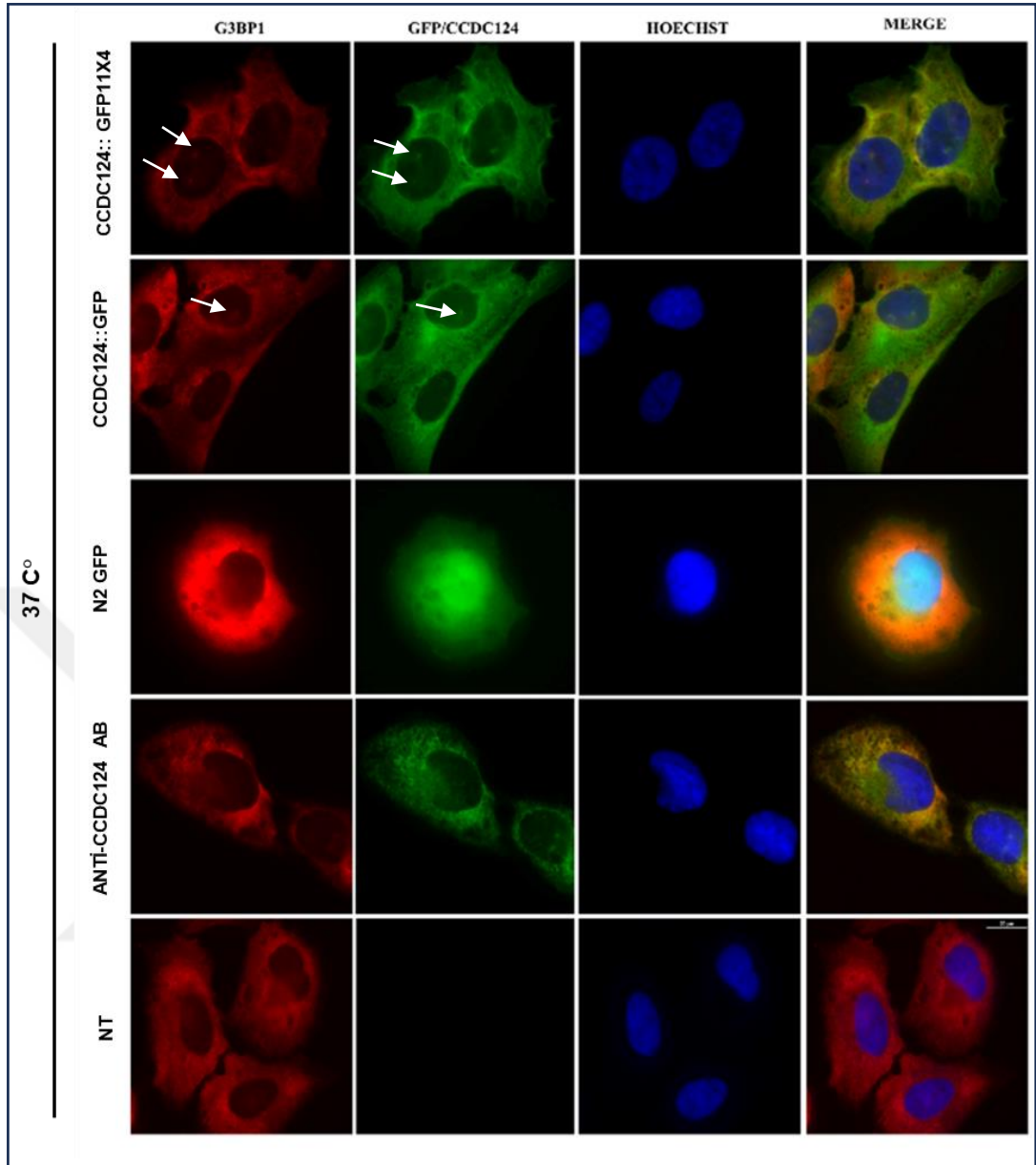
Şekil 4.11: pcDNA 3.1/ CCDC124::GFP11X4 plazmidinin Poly IC stresi altında immünboyama görüntüleri (Bar 20 μ m).

Sıcaklık (46 C°) varlığında yapılan çalışmalarda diğer stres şartlarına benzer sonuçlar gözlenmiştir. CCDC124::GFP proteininin çekirdek içinde G3BP1 ile etkileştiği ve oluşan granüler yapının daha dağılmış halde olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.12).



Şekil 4.12: pcDNA 3.1/ CCDC124::GFP11x₄ plazmidinin 46 C° stresi altında immünboyama görüntüleri (Bar 20 µm).

Normal büyüme şartlarında büyütülerek yapılan (37 C°) çalışmalarda hücrelerde stres granül yapısı gözlenmemiştir fakat G3BP1 proteinini tanıyan antikor kullanılarak yapılan immünboyama sonucunda çekirdekte G3BP1 granüler yapısı gözlenmiştir (Şekil 4.13).

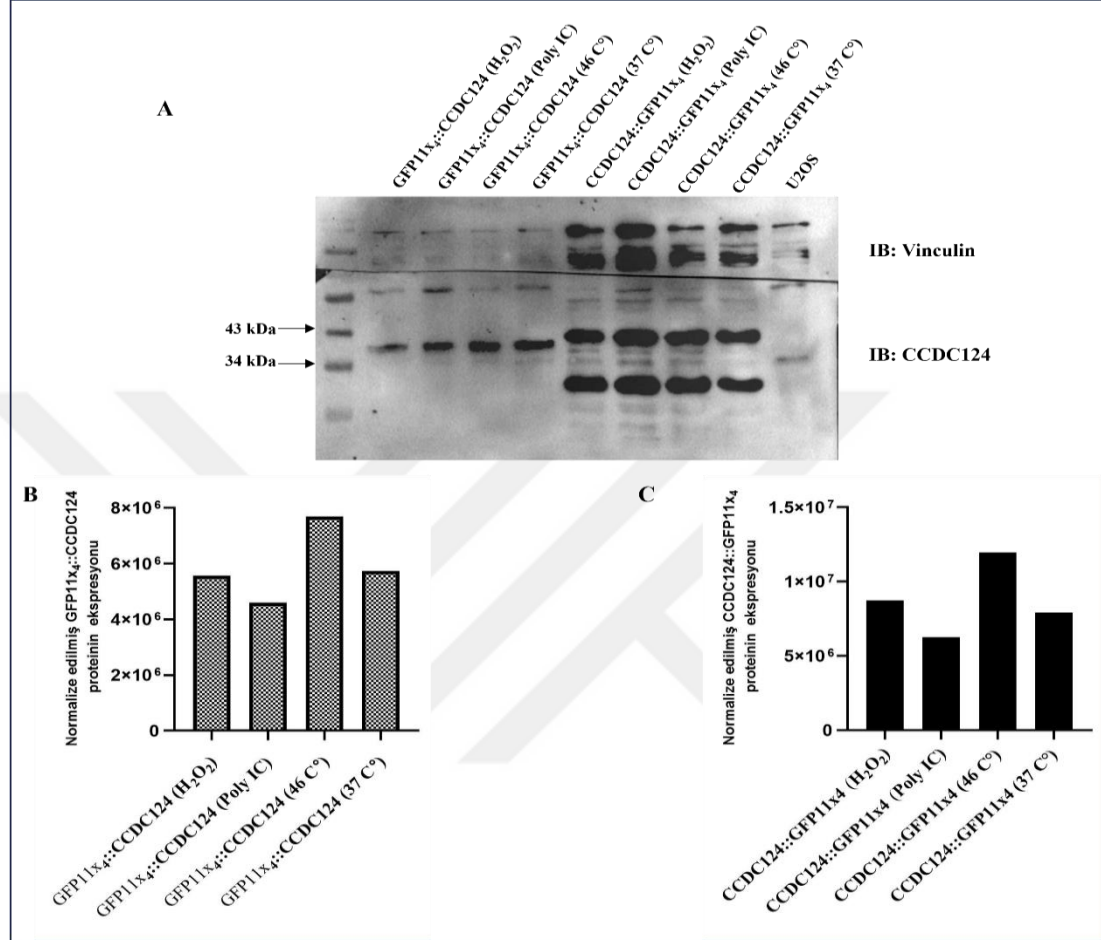


Şekil 4.13: pcDNA 3.1/ CCDC124::GFP11x₄ plazmidinin 37 C° altında immünboyama görüntüleri (Bar 20 µm).

CCDC124::GFP11x₄ ve GFP11x₄::CCDC124 proteinleri aşırı ifade eden U2OS hücreleri H₂O₂ (2mM) 2 saat, Poly IC (7500 ng/µl) 4 saat ve 46 C° 30 dakika stres şartlarına maruz bırakılmıştır. Daha sonra 100 mm'lik petriden kaldırılan hücrelerin farklı stres şartları altında CCDC124 protein ekspresyon seviyelerine bakılmıştır (Şekil 4.14a).

GFP11x₄::CCDC124 proteininin yapılan çalışmalar sonucunda Poly IC stresine maruz kaldıktan sonra ekspresyon seviyesinin diğer stres şartlarına oranla daha fazla azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 4.14b).

CCDC124::GFP11x₄ proteininin çeşitli stres şartlarında ekspresyon seviyeleri incelendiğinde Poly IC stresine maruz bırakılan hücrelerin CCDC124 ekspresyon seviyelerinin daha fazla azaldığı gözlenmiştir (Şekil 4.14c).

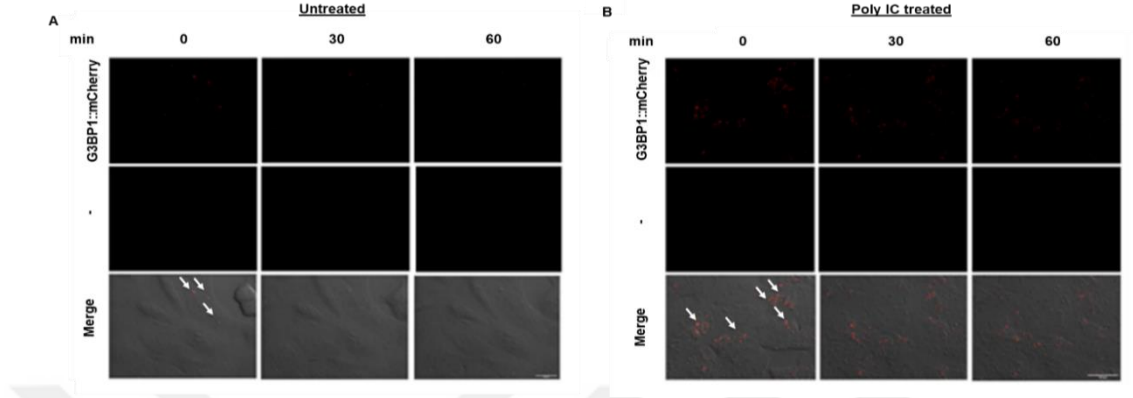


Şekil 4.14: CCDC124::GFP11x₄ ve GFP11x₄::CCDC124 proteinlerinin stres şartlarındaki immünblot görüntüsü. (Housekeeping olarak kullanılan Vinculin'e göre normalize edilmiştir).

4.6. G3BP1-mCherry ile Canlı Hücre Görüntüleme

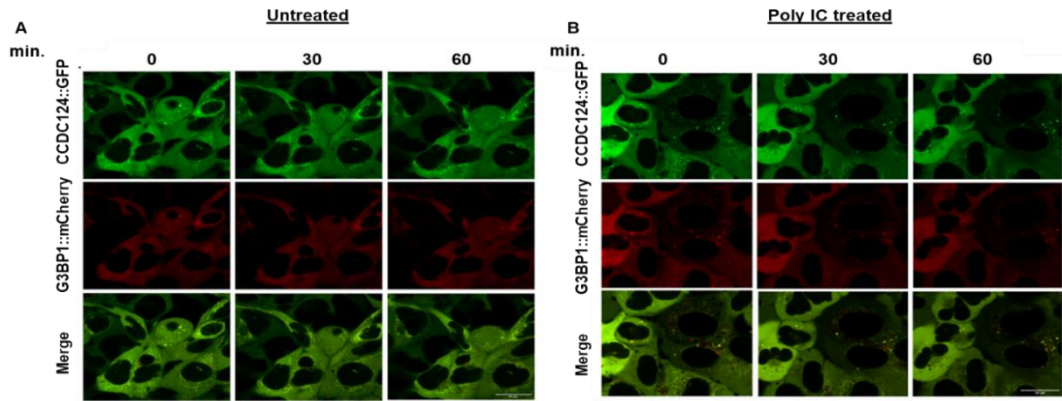
Gerçekleştirilen canlı hücre görüntülemesinde G3BP1::mCherry plazmidini ile geçici olarak aşırı ifade edilen U2OS hücre hattı ve pEGFP-N2/CCDC124, pcDNA 3.1/ GFP11x₄::CCDC124, pcDNA 3.1/ CCDC124::GFP11x₄ ve pcDNA 3.1/ CCDC124::GFP11x₁ plazmidleri kullanılarak bu hücre hattında kalıcı ifade edilen hücrelerin 37 °C de ve Poly IC şartlarında görüntülenmesi gerçekleştirilmiştir. G3BP1::mCherry plazmidini transfeksiyonu gerçekleştirildikten yaklaşık 48 saat sonra

Poly IC uygulaması yapılan hücrelerin ve kontrol şartlarında bırakılan hücrelerin canlı hücre görüntülemesi Şekil 4.15, Şekil 4.16, Şekil 4.17, Şekil 4.18 ve Şekil 4.19 de ayrıntılı olarak gösterilmiştir.



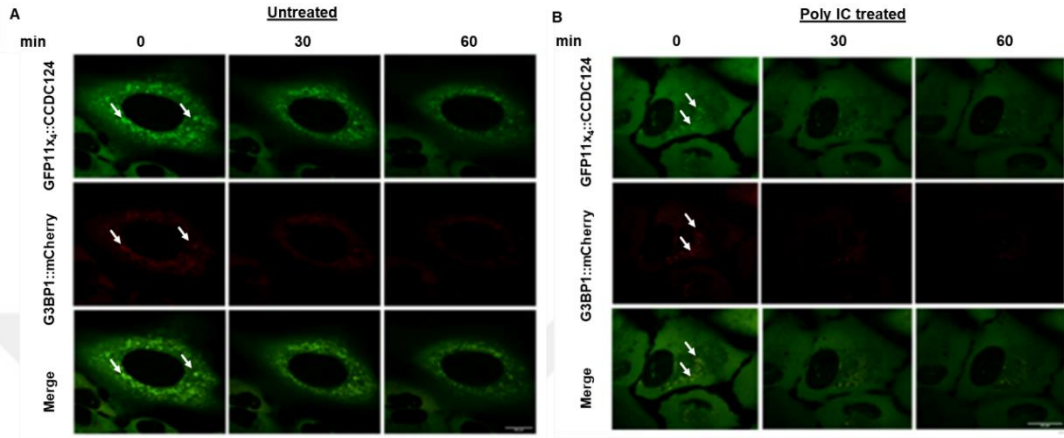
Şekil 4.15: U2OS hücre hattında canlı hücre görüntüsü. **A)** 37 °C de inkübe edilen U2OS hücre hattının G3BP1::mCherry plazmidini ile transfeke edildikten 48 saat sonra canlı hücre görüntüsü **B)** G3BP1::mCherry plazmidini ile transfeke edildikten 48 saat sonra Poly IC uygulaması yapılan U2OS hücre hattının canlı hücre görüntüsü. (Bar 20 µm).

U2OS hücre hattında gerçekleştirilen canlı hücre görüntüsünde Poly IC uygulaması yapılan hücrelerde stres granül yapısının kontrol şartlarında görüntülemesi yapılan hücrelere oranla daha fazla olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.15).



Şekil 4.16: U2OS hücre hattında kalıcı olarak ifade edilen pEGFP-N2/CCDC124 plazmidinin canlı hücre görüntüsü. **A)** G3BP1::mCherry plazmidini ile geçici transfeksiyonu yapılmış kalıcı olarak ifade edilen pEGFP-N2/CCDC124 plazmidini içeren U2OS hücre hattının 48 saat sonraki canlı hücre görüntüsü **B)** G3BP1::mCherry plazmidini ile transfeke edildikten 48 saat sonra Poly IC uygulaması yapılan hücre hattının canlı hücre görüntüsü. (Bar 20 µm).

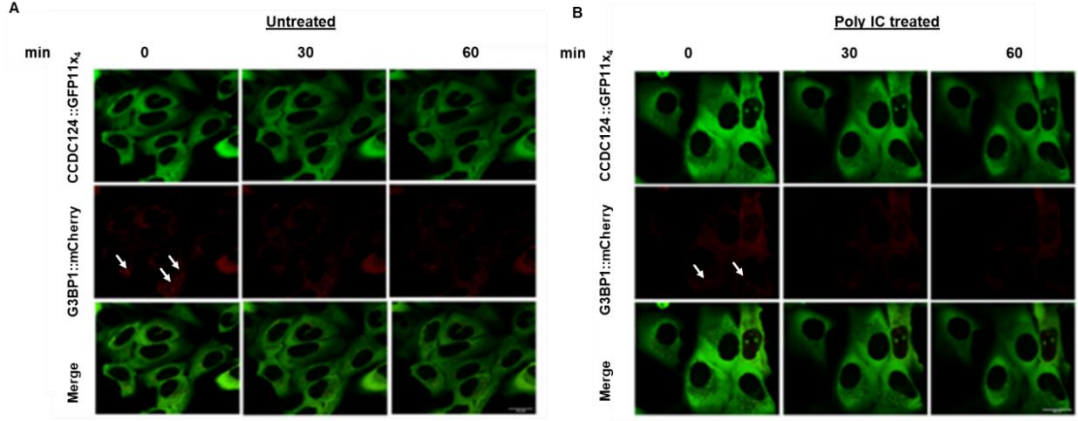
pEGFP-N2/CCDC124 plazmidi ile kalıcı ifade edilmiş U2OS hücre hattının hem Poly IC uygulaması sonrası yapılan canlı hücre görüntülerinde hem de kontrol şartlarında büyütülmüş hücrelerin canlı hücre görüntülerinde stres granülü gözlenmiş ve granüler yapıların CCDC124::GFP ile etkileştiği gözlenmiştir (Şekil 4.16).



Şekil 4.17: U2OS hücre hattında kalıcı olarak ifade edilen pcDNA 3.1/ GFP11x4::CCDC124 plazmidinin canlı hücre görüntüsü. **A)** G3BP1::mCherry plazmidi ile geçici transfeksiyonu yapılmış kalıcı olarak ifade edilen pcDNA 3.1/ GFP11x4::CCDC124 plazmidini içeren U2OS hücre hattının 48 saat sonraki canlı hücre görüntüsü **B)** G3BP1::mCherry plazmidi ile transfekte edildikten 48 saat sonra Poly IC uygulaması yapılan hücre hattının canlı hücre görüntüsü. (Bar 20 μm).

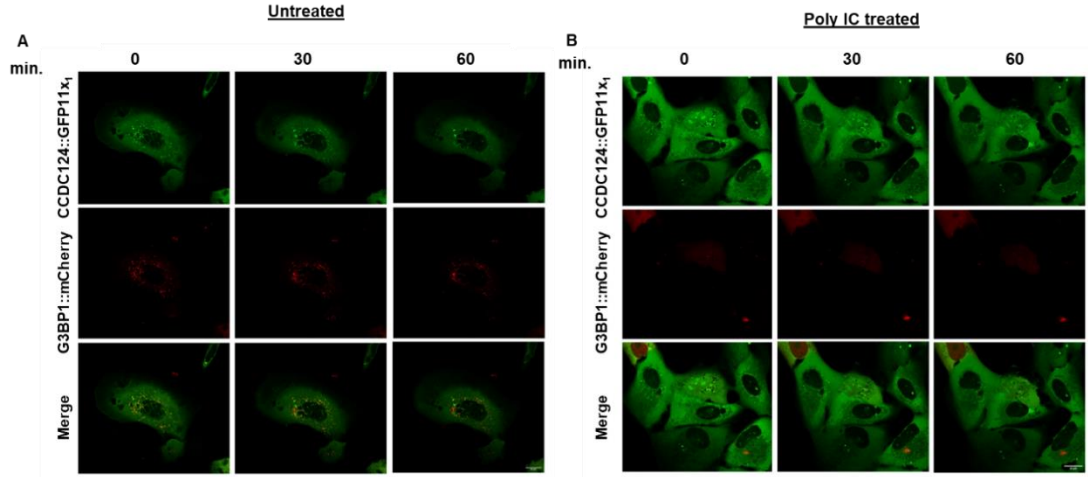
pcDNA 3.1/ GFP11x4::CCDC124 plazmidi kullanılarak kalıcı ifadesi gerçekleştirilmiş U2OS hücre hattında Poly IC ve kontrol şartlarında büyütülmüş hücrelerin canlı hücre görüntülemesi gerçekleştirilmiştir. Her iki uygulamada da stres granülü oluşumu gözlenmiş olup ve bu yapıların GFP11x4::CCDC124 ile etkileştiği tespit edilmiştir. Bunun yanısıra kontrol şartlarında büyütülmüş hücrelerde daha fazla granüler yapı gözlenmiştir (Şekil 4.17).

pcDNA 3.1/ CCDC124::GFP11x4 plazmidi kullanılarak kalıcı ifadesi gerçekleştirilmiş U2OS hücre hattında Poly IC ve kontrol şartlarında büyütülmüş hücrelerin canlı hücre görüntülemesi gerçekleştirilmiştir. Kontrol şartlarında büyütülmüş hücrelerde stres granül yapısının sayıca daha fazla olduğu gözlenmiş ve CCDC124::GFP11x4 ile kısmen etkileşim gözlenmiştir (Şekil 4.18).



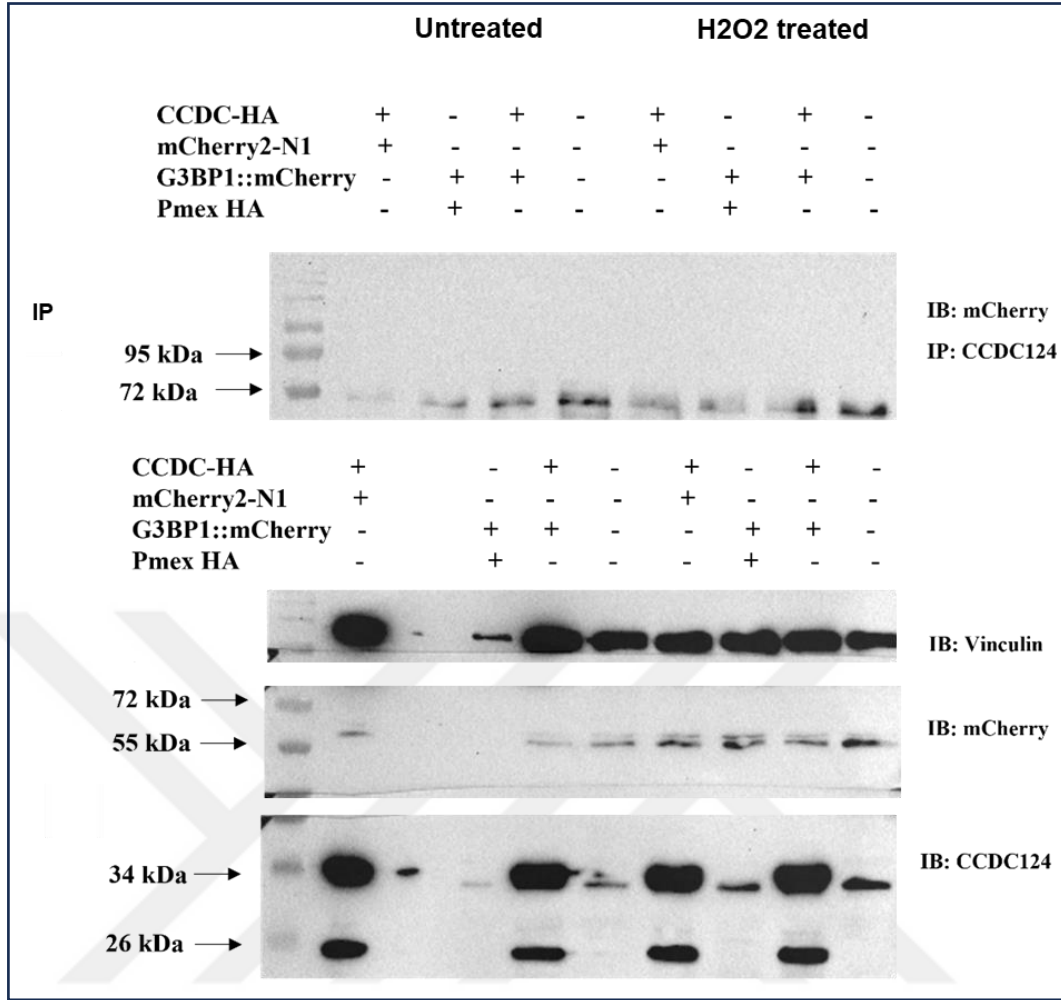
Şekil 4.18: U2OS hücre hattında kalıcı olarak ifade edilen pcDNA 3.1/CCDC124::GFP11x₄ plazmidinin canlı hücre görüntüsü. **A)** G3BP1::mCherry plazmidi ile geçici transfeksiyonu yapılmış kalıcı olarak ifade edilen pcDNA 3.1/CCDC124::GFP11x₄ plazmidini içeren U2OS hücre hattının 48 saat sonraki canlı hücre görüntüsü **B)** G3BP1::mCherry plazmidi ile transfekte edildikten 48 saat sonra Poly IC uygulaması yapılan hücre hattının canlı hücre görüntüsü. (Bar 20 µm).

pcDNA 3.1/CCDC124::GFP11x₁ plazmidi kullanılarak kalıcı ifadesi gerçekleştirilmiş U2OS hücre hattında Poly IC ve kontrol şartlarında büyütülmüş hücrelerin canlı hücre görüntülemesi gerçekleştirilmiştir. Kontrol şartlarında büyütülmüş hücre hattında stres granülü gözlenmiştir. Gözlenen stres granülleri CCDC124::GFP11x₁ ile etkileşim göstermektedir (Şekil 4.19).



Şekil 4.19: U2OS hücre hattında kalıcı olarak ifade edilen pcDNA 3.1/CCDC124::GFP11x₁ plazmidinin canlı hücre görüntüsü. **A)** G3BP1::mCherry plazmidi ile geçici transfeksiyonu yapılmış kalıcı olarak ifade edilen pcDNA 3.1/CCDC124::GFP11x₁ plazmidini içeren U2OS hücre hattının 48 saat sonraki canlı hücre görüntüsü **B)** G3BP1::mCherry plazmidi ile transfekte edildikten 48 saat sonra Poly IC uygulaması yapılan hücre hattının canlı hücre görüntüsü. (Bar 20 µm).

Canlı hücre görüntülemesinde etkileşim gösterdiği gözlemlenen CCDC124 ve G3BP1 proteini normal büyüme şartlarında ve H₂O₂ birlikte çöktürme deneyleri yapılarak etkileşim gösterdikleri teyit edilmek istenmiştir. DynaBead olarak adlandırılan özel manyetik boncuklar HA antikoru ile kaplanmıştır. Çalışmalarda CCDC124-HA proteini çekilmiş etkileşim görmek istediğimiz G3BP1::mCherry proteini mCherry antikoru varlığında immünblot yöntemi ile gösterilmek istenmiştir. Beklenen büyüklükte (~80 kDa) (~53.2 kDa G3BP1, ~26.2 kDa mCherry) bant varlığına rastlanmamıştır. Yapılan çalışmalarda canlı hücre görüntülemesinde görülen etkileşim gösterilememiştir (Şekil 4.20).



Şekil 4.20: CCDC124-G3BP1 etkileşiminin birlikte çöktürme görüntüsü.

5. YORUMLAR

CCDC124 (Coiled coil Domain içeren 124) proteininin lokalizasyon incelenmesine yönelik yapılan tez çalışmasında GFP etiket yaklaşımına alternatif olarak daha küçük etiket epitopu içeren GFP11 bölgesi kullanılarak ilgili protein stres şartları altında gözlenmiştir. Bu yaklaşımı sfGFP 11 β - ipliğinden ayrılarak GFP11 ve GFP1-10 olarak adlandırılan iki tane bölünmüş floresan proteini oluşturmaktadır. GFP11 epitopu 16 amino asitlik bir kısım içermektedir ve GFP1-10 ile beraber ışığa özelliği göstermektedir. Günümüzde protein işaretleme, protein etkileşimi incelenmesi, ilaç taraması vb. sebeplerden sıklıkla başvurulmuş bir yöntem olmasının yanısıra son yıllarda bu yaklaşıma alternatif bazı etiket proteinleri uygulamaları gerçekleştirilmiştir [109]. Bu uygulamaların en büyük avantajı yaklaşık 223 amino asit büyüklüğündeki floresan proteininin oluşturduğu olası dezavantajı minimuma indirgeyerek ve hatta elimine ederek ilgili proteinlerin doğal hücresel şartlarda takibinin gerçekleştirilmesini sağlamaktır.

Bu çalışmada bu yenilikçi yaklaşım kullanılarak daha önce sentrozomda ve orta cisimcikte konumlandığı tespit edilmiş CCDC124 proteininin hücre altı konumlanma incelemeleri gerçekleştirilmiştir. Daha önce CCDC124 proteini ile yapılan çalışmalarda CCDC124 proteininin nörodejeneratif hastalıklarla ilişkili ve stres granül oluşumunda etkili öncelikli proteinlerle etkileştiği tespit edilmiştir (Merve TUZLAKOĞLU ÖZTÜRK, yayına hazırlanmakta olan data). Bu veriler CCDC124'ün stres granül oluşumunda ya da stres mekanizmasında bir görevinin olup olmadığı düşüncesini akla getirmektedir.

Bölünmüş floresan etiketi kullanılarak CCDC124 proteininin N- ve C- ucuna bir ve/veya dört tekrarlı GFP11 etiketi eklenerek (GFP11_{x1}, GFP11₄) U2OS hücre hattında kalıcı ifadesi sağlanmıştır. Kalıcı ifadesi sağlanan bir ve/veya dört kopya GFP11 etiketi içeren hücreler kıyaslandığında bir kopya GFP11 içeren U2OS hücre hattının ifadesinin dört tekrarlı GFP11 içeren hücre hattının ifadesinden nispeten daha düşük floresan sinyali içerdiği tespit edilmiş olup çalışmalar boyunca dört tekrarlı GFP11 içeren hücre hatları kullanılmıştır (Şekil 4.5).

Stres granülü ile CCDC124 proteininin etkileşiminin incelenmesi için yapılan immüno floresan boyamalar sonucunda CCDC124 proteini H₂O₂, sıcaklık ve viral stres

şartları altında gözlemlenmiştir. G3BP1 antikor boyamalarının ve CCDC124 proteininin sitoplazmik stres granül oluşumunda herhangi bir etkileşim gözlemlenmediği fakat CCDC124 proteininin stres faktöründen bağımsız çekirdek içi yapılanmalarda özellikle nükleus çevresinde konumlandığı tespit edilmiştir (Şekil 4.7-4.13). Sıcaklık stres faktörü ilk Hek 293T hücre hattında 44 °C uygulanmış olup bu sıcaklığın tüm hücrelerde stres faktörü oluşturmadığı, sıcaklığın ve hücre hattının SG boyamasının incelenmesinde uygun olmadığı belirlenerek ve literatürlerde de stres faktörü için başka sıcaklık uygulamaları göz önüne alındığında U2OS hücre hattında 46 °C uygulanmasına karar kılınmıştır (Şekil 4.4). CCDC124 proteininin G3BP stres belirteci ile etkileşiminin daha ayrıntılı incelenmesi için G3BP'nin protein ailesinden olan G3BP1 ile etkileşimi üzerine durulmuştur. Literatürdeki çalışmalar doğrultusunda hem G3BP1 hem de G3BP2a proteinlerinin hücre çekirdeklerinde konumlandığı bildirilmiş olup Tourriere ve arkadaşları tarafından 2001 yılında yapılan bir çalışma fare embriyonik fibroblast hücrelerinde G3BP1'in nükleer lokalizasyon gösterdiği, buna karşılık Parker ve arkadaşları tarafından 1996 yılında gerçekleştirilen bir başka çalışmada ise hücre döngüsünün herhangi bir aşamasında Epidermal Büyüme Faktörü (EGF) dönüştürülmüş fibroblast hücrelerin nükleer lokalizasyonunda G3BP1 tespit edilememiştir [56,61]. Bu çalışmalar çekirdek içi CCDC124 proteininin çekirdek içi konumlanmasına ve stres granül belirteç proteini ile etkileşmesine dayanarak NS (Nükleer stres body) olabilmesi düşüncesini açığa çıkarmıştır. Bu doğrultuda laboratuvar da daha önce HeLa hücre hattında gerçekleştirilen CCDC124 protein boyaması çalışmaları ile karşılaştırıldığında Nükleer Speckle'in granüler yapısından sayısal ve morfolojik olarak oldukça farklı bir konumlanma gerçekleştirdiği gözlenmektedir. Bu durum da hücre içi etkileşimin gerçekleştiği yerin Nükleer Speckle dışında bir yapı olduğunu düşünmeye sevk etmiştir. mCherry ile etiketlenmiş G3BP1 oluşturularak aşırı ifade edilmiş G3BP1 ve CCDC124 proteinlerinin canlı hücre takibi gerçekleştirilmiştir. 37 °C ve 37 °C + Poly IC uygulaması yapılan hücrelerde özellikle 37 °C'de sitoplazmada konumlanma olduğu ve G3BP1/CCDC124 proteinlerinin immünboyama sonuçlarının aksine aynı yerde konumlandığı gözlenmiştir (Şekil 4.17-4.19). Bu durum stres granül oluşumunun stres şartından bağımsız oluşabildiğini ve G3BP1 proteininin aşırı ifadesinin stres olarak algılanıp, herhangi bir stres faktörü oluşturulmadan hücrenin ona göre davranış gösterebildiği fikrini düşündürmüştür. Nitekim literatürde belirtilen çalışmalarda stres uyarısı olmayan hücrelerde G3BP1'in aşırı ekspresyonunun SG oluşumunu indüklediği

kaydedilmiştir [48]. CCDC124 proteininin ise G3BP1 proteininin aşırı ifadesinden strese girdiği belki de aynı yerde konumlanmasının nedeninin bu olduğu gerçeğini düşünmemize neden olmuştur. Öte yandan aynı durum CCDC124 proteininin C terminalinde konumlanmış GFP11_{x4} (CCDC124:: GFP11_{x4}) için geçerli değildir. Fakat yine CCDC124 proteininin C terminalinde konumlanan GFP11_{x1} (CCDC124:: GFP11_{x1}) 37 °C’de sitoplazmada G3BP1 ile konumlandığı görülmüştür. Bu durum CCDC124 lokalizasyonunda GFP11 etiketinin konumunun ve hatta tekrarlı sayısının bile hücre içi tespitinde önemli olduğunu göstermektedir. G3BP1 ve CCDC124 proteinleri arasındaki ilişkinin daha iyi anlaşılabilmesi için gerçekleştirilen eş çöktürme deneylerinde beklenen büyüklükte bir bant tespit edilememiş olup ilgili çalışmanın G3BP1::mCherry için özgül olan bir antikorla tekrar denemesi etkileşimleri konusunda bir sonuca varılmasını sağlayabilecektir (Şekil 4.20).

KAYNAKLAR

- [1] Carey Jenny L., Lin Guo., (2022), “Liquid-Liquid Phase Separation of TDP-43 and FUS in Physiology and Pathology of Neurodegenerative Diseases”, *Frontiers in Molecular Biosciences* 9.
- [2] Liu C., Fang Y., (2019), “New insights of poly (ADP-ribosylation) in neurodegenerative diseases: A focus on protein phase separation and pathologic aggregation”, *Biochemical Pharmacology* 167, 58-63.
- [3] Hardiman O., Al-Chalabi A., Chio A., Corr E.M, Logroscino G, Robberecht W, Shaw P.J, Simmons Z, van den Berg L.H., (2017), “Amyotrophic lateral sclerosis”, *Nature Reviews Disease Primers* 3, 17071.
- [4] Arslan Ö., (2015), " Coiled-Coil Domain Containing Protein 124 (Ccdc 124) Artışının Hücre Fizyolojisine ve Bölünmesine Etkileri ", Yüksek Lisans Tezi, Gebze Teknik Üniversitesi.
- [5] 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*.
- [6] Yaman E., Gasper R., Koerner C., Wittinghofer A., Tazebay U. H., (2009), “RasGEF1A and RasGEF1B are guanine nucleotide exchange factors that discriminate between Rap GTP-binding proteins and mediate Rap2-specific nucleotide Exchange”, *Federation of European Biochemical Societies Journal* 276, 4607-4616.
- [7] Shin Y., Brangwynne C.P., (2017), “Liquid phase condensation in cell physiology and disease”, *Science* 357.
- [8] Guo Q., Shi X., Wang X., (2021), “RNA and liquid-liquid phase separation”, *Non-coding RNA Research* 6, 92–99.
- [9] Brangwynne C.P., Eckmann C.R., Courson D.S., Rybarska A., Hoege C., Gharakhani J., Jülicher F., Hyman A.A., (2009), “Germline P granules are liquid droplets that localize by controlled dissolution/condensation”, *Science* 324, 1729–1732.
- [10] Boeynaems S., Alberti S., Fawzi N.L., Mittag T., Polymenidou M., Rousseau F., Schymkowitz J., Shorter J., Wolozin B., Van Den Bosch L., Tompa P, Fuxreiter M., (2018), “Protein Phase Separation: A New Phase in Cell Biology”, *Trends Cell Biology* 28 (6), 420–435.
- [11] Banani S.F., Lee H.O., Hyman A.A., Rosen M.K., (2017), “Biomolecular condensates: Organizers of cellular biochemistry”, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 18, 285–298.

- [12] Banani S.F., Rice A.M., Peeples W.B., Lin Y., Jain S., Parker R., Rosen M.K., (2016), “Compositional Control of Phase-Separated Cellular Bodies”, *Cell* 166, 651–663.
- [13] Courchaine E.M., Lu A., Neugebauer K.M., (2016), “Droplet organelles?”, *EMBO Journal* 35 (15), 1603–1612.
- [14] Mateju D., Franzmann T.M., Patel A., Kopach A., Boczek E.E., Maharana S., Lee H.O., Carra S., Hyman A.A., Alberti S., (2017), “An aberrant phase transition of stress granules triggered by misfolded protein and prevented by chaperone function”, *EMBO Journal* 36 (12), 1669–1687.
- [15] Nair S.J., Yang L., Meluzzi D., Oh S., Yang F., Friedman M.J., Wang S., Suter T., Alshareedah I., Gamliel A., Ma Q., Zhang J., Hu Y., Tan Y., Ohgi K.A., Jayani R.S., Banerjee P.R., Aggarwal A.K., Rosenfeld M.G., (2019), “Phase separation of ligand-activated enhancers licenses cooperative chromosomal enhancer assembly”, *Nature Structural & Molecular Biology* 26(3), 193–203.
- [16] Laflamme G., Mekhail K., (2020), “Biomolecular condensates as arbiters of biochemical reactions inside the nucleus”, *Communications Biology* 3(1), 773.
- [17] Gomes E., Shorter J., (2019), “The molecular language of membraneless organelles”, *Journal of Biological Chemistry* 294(18), 7115–7127.
- [18] Hughes M.P., Sawaya M.R., Boyer D.R., Goldschmidt L., Rodriguez J.A., Cascio D., Chong L., Gonen T., Eisenberg D.S., (2018), “Atomic structures of low-complexity protein segments reveal kinked sheets that assemble networks”, *Science* 359(6376), 698–701.
- [19] Su X., Ditlev J.A., Hui E., Xing W., Banjade S., Okrut J., King D.S., Taunton J., Rosen M.K., Vale R.D., (2016), “Phase separation of signaling molecules promotes T cell receptor signal transduction”, *Science* 352(6285), 595–599.
- [20] Hirose T., Ninomiya K., Nakagawa S., Yamazaki T., (2023), “A guide to membraneless organelles and their various roles in gene regulation”, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 24(4), 288–304.
- [21] Antifeeva I.A., Fonin A.V., Fefilova A.S., Stepanenko O.V., Povarova O.I., Silonov S.A., Kuznetsova I.M., Uversky V.N., Turoverov K.K., (2022), “Liquid–liquid phase separation as an organizing principle of intracellular space: overview of the evolution of the cell compartmentalization concept”, *Cellular and Molecular Life Science* 79(5), 251.
- [22] Li P., Banjade S., Cheng H.C., Kim S., Chen B., Guo L., Llaguno M., Hollingsworth J.V., King D.S., Banani S.F., Russo P.S., Jiang Q.X., Nixon B.T., Rosen M.K., (2012), “Phase transitions in the assembly of multivalent signalling proteins”, *Nature* 483(7389), 336–340.
- [23] Lin Y., Protter D.S., Rosen M.K., Parker R., (2015), “Formation and maturation of phase-separated liquid droplets by RNA-binding proteins”, *Molecular Cell* 60(2), 208–219.

- [24] Lin Y., Currie S.L, Rosen M.K., (2017), “Intrinsically disordered sequences enable modulation of protein phase separation through distributed tyrosine motifs”, *The Journal of Biological Chemistry* 292(46), 19110-19120.
- [25] Hayashi Y., Ford L.K., Fioriti L., McGurk L., Zhang M., (2021), “Liquid-Liquid Phase Separation in Physiology and Pathophysiology of the Nervous System”, *The Journal of Neuroscience* 41(5), 834-844.
- [26] Zhang H., Ji X., Li P., Liu C., Lou J., Wang Z., Wen W., Xiao Y., Zhang M., Zhu X., (2020), “Liquid-liquid phase separation in biology: mechanisms, physiological functions and human diseases”, *Science China Life Sciences* 63(7), 953-985.
- [27] Maharana S., Wang J., Papadopoulos D.K., Richter D., Pozniakovsky A., Poser I., Bickle M., Rizk S., Guillén-Boixet J., Franzmann T.M., Jahnel M., Marrone L., Chang Y.T., Sternecker J., Tomancak P., Hyman A.A., Alberti S., (2018), “RNA buffers the phase separation behavior of prion-like RNA binding proteins”, *Science* 360(6391), 918-921.
- [28] Wang J., Choi J.M., Holehouse A.S., Lee H.O., Zhang X., Jahnel M., Maharana S., Lemaitre R., Pozniakovsky A., Drechsel D., Poser I., Pappu R.V., Alberti S., Hyman A.A., (2018), “A Molecular Grammar Governing the Driving Forces for Phase Separation of Prion-like RNA Binding Proteins”, *Cell* 174(3), 688-699.
- [29] Guo L., Kim H.J., Wang H., Monaghan J., Freyermuth F., Sung J.C., O'Donovan K., Fare C.M., Diaz Z., Singh N., Zhang Z.C., Coughlin M., Sweeny E.A., DeSantis M.E., Jackrel M.E., Rodell C.B., Burdick J.A., King O.D., Gitler A.D., Lagier-Tourenne C., Pandey U.B., Chook Y.M., Taylor J.P., Shorter J., (2018), “Nuclear-Import Receptors Reverse Aberrant Phase Transitions of RNA-Binding Proteins with Prion-like Domains”, *Cell* 173(3), 677-692.
- [30] Tzotzos S., Doig A.J., (2010), “Amyloidogenic sequences in native protein structures”, *Protein Science* 19(2), 327–348.
- [31] Knowles T.P., Vendruscolo M., Dobson C.M., (2014), “The amyloid state and its association with protein misfolding diseases”, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15(6), 384–396.
- [32] Brundin P., Melki R., Kopito R., (2010), “Prion-like transmission of protein aggregates in neurodegenerative diseases”, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11(4), 301–307.
- [33] Ahmad A., Uversky V.N., Khan R.H., (2022), “Aberrant liquid-liquid phase separation and amyloid aggregation of proteins related to neurodegenerative diseases”, *International journal of Biological Macromolecules* 220, 703-720.
- [34] Mahboubi H., Stochaj U., (2017), “Cytoplasmic stress granules: Dynamic modulators of cell signaling and disease”, *Biochimica Biophysica Acta Molecular Basis of Disease*, 1863(4):884-895.

- [35] Wolozin B., (2014), “Physiological protein aggregation run amuck: stress granules and the genesis of neurodegenerative disease”, *Discovery. Medicine* 17(91), 47–52.
- [36] Biamonti G., Vourc'h C., (2010), “Nuclear stress bodies”, *Cold Spring Harbor Perspective in Biology* 2(6), a000695.
- [37] Ivanov P., Kedersha N., Anderson P., (2019), “Stress granules and processing bodies in translational control”, *Cold Spring Harbor Perspective Biology* 11(5), a032813.
- [38] Ninomiya K., Iwakiri J., Aly M.K., Sakaguchi Y., Adachi S., Natsume T., Terai G., Asai K., Suzuki T., Hirose T., (2021), “m6 A modification of HSATIII lncRNAs regulates temperature-dependent splicing”, *EMBO Journal* 40(15), e107976.
- [39] Audas T.E., Audas D.E., Jacob M.D., Ho J.J., Khacho M., Wang M., Perera J.K., Gardiner C., Bennett C.A., Head T., Kryvenko O.N., Jorda M., Daunert S., Malhotra A., Trinkle-Mulcahy L., Gonzalgo M.L., Lee S., (2016), “Adaptation to stressors by systemic protein amyloidogenesis”, *Developmental Cell* 39(2), 155–168.
- [40] Mähl P., Lutz Y., Puvion E., Fuchs J.P., (1989), “Rapid effect of heat shock on two heterogeneous nuclear ribonucleoprotein-associated antigens in HeLa cells”, *Journal of Cell Biology* 109(5), 1921–1935.
- [41] Denegri M., Moralli D., Rocchi M., Biggiogera M., Raimondi E., Cebianchi F., De Carli L., Riva S., Biamonti G., (2002), “Human chromosomes 9, 12, and 15 contain the nucleation sites of stress-induced nuclear bodies”, *Molecular Biology of the Cell* 13(6), 2069–2079.
- [42] Ninomiya K., Adachi S., Natsume T., Iwakiri J., Terai G., Asai K., Hirose T., (2020), “LncRNA-dependent nuclear stress bodies promote intron retention through SR protein phosphorylation”, *EMBO Journal* 39(3), e102729.
- [43] Buchan J.R., Parker R., (2009), “Eukaryotic stress granules: the ins and out of translation what are stress granules?”, *Molecular Cell* 36(6), 932–941.
- [44] Mokas S., Mills J.R., Garreau C., Fournier M.J., Robert F., Arya P., Kaufman R.J., Pelletier J., Mazroui R., (2009), “Uncoupling stress granule assembly and translation initiation inhibition”, *Molecular Biology of the Cell* 20(11), 2673–2683.
- [45] Markmiller S., Soltanieh S., Server K.L., Mak R., Jin W., Fang M.Y., Luo E.C., Krach F., Yang D., Sen A., Fulzele A., Wozniak J.M., Gonzalez D.J., Kankel M.W., Gao F.B., Bennett E.J., Lécuyer E., Yeo G.W., (2018), “Context-dependent and disease-specific diversity in protein interactions within stress granules”, *Cell* 172(3), 590–604.
- [46] Zhou H., Luo J., Mou K., Peng L., Li X., Lei Y., Wang J., Lin S., Luo Y., Xiang L., (2023), “Stress granules: functions and mechanisms in cancer”, *Cell & Bioscience* 13(1), 86.

- [47] Gilks N., Kedersha N., Ayodele M., Shen L., Stoecklin G., Dember L.M., Anderson P., (2004), “Stress granule assembly is mediated by prion-like aggregation of TIA-1”, *Molecular Biology of the Cell* 15(12), 5383–5398.
- [48] Tourrière H., Chebli K., Zekri L., Courselaud B., Blanchard J.M., Bertrand E., Tazi J., (2003), “The RasGAP-associated endoribonuclease G3BP assembles stress granules. *Journal of Cell Biology* 160(6), 823–831.
- [49] Stoecklin G., Stubbs T., Kedersha N., Wax S., Rigby W.F., Blackwell T.K., Anderson P., (2004), “MK2-induced tristetraprolin:14–3–3 complexes prevent stress granule association and ARE-mRNA decay”, *EMBO Journal* 23(6), 1313–1324.
- [50] Solomon S., Xu Y., Wang B., David M.D., Schubert P., Kennedy D., Schrader J.W., (2007), “Distinct structural features of caprin-1 mediate its interaction with G3BP-1 and its induction of phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2 α , entry to cytoplasmic stress granules, and selective interaction with a subset of mRNAs”, *Molecular and Cellular Biology* 27(6), 2324–2342.
- [51] Alam U., Kennedy D., (2019), “Rasputin a decade on and more promiscuous than ever? A review of G3BPs”, *Biochimica et acta Biophysica acta Molecular Cell Research* 1866(3), 360–370.
- [52] Zhang H.Z., Liu J.G., Wei Y.P., Wu C., Cao Y.K., Wang M., (2007), “Expression of G3BP and RhoC in esophageal squamous carcinoma and their effect on prognosis”, *World Journal of Gastroenterology* 13(30), 4126–4130.
- [53] Shim J.H., Su Z.Y., Chae J.I., Kim D.J., Zhu F., Ma W.Y., Bode A.M., Yang C.S., Dong Z., (2010), Epigallocatechin gallate suppresses lung cancer cell growth through Ras-GTPase-activating protein SH3 domain-binding protein 1”, *Cancer Prevention Research (Philadelphia)* 3(5), 670–679.
- [54] Cui W., Wei Z., Chen Q., Cheng Y., Geng L., Zhang J., Chen J., Hou T., Ji M., (2010), “Structure-based design of peptides against G3BP with cytotoxicity on tumor cells”, *Journal of Chemical Information and Modeling* 50(3), 380–387.
- [55] Zhang H., Zhang S., He H., Zhao W., Chen J., Shao R.G., (2012), “GAP161 targets and downregulates G3BP to suppress cell growth and potentiate cisplatin-mediated cytotoxicity to colon carcinoma HCT116 cells”, *Cancer Science* 103(10), 1848–1856.
- [56] Parker F., Maurier F., Delumeau I., Duchesne M., Faucher D., Debussche L., Dugue A., Schweighoffer F., Tocque B., (1996), “A RasGTPase-activating protein SH3-domain-binding protein”, *Molecular and Cellular Biology* 16(6), 2561–2569.
- [57] Kennedy D., French J., Guitard E., Ru K., Tocque B., Mattick J., (2001), “Characterization of G3BPs: Tissue Specific Expression, Chromosomal Localisation and rasGAP (120) Binding Studies” *Journal of Cellular Biochemistry* 84(1), 173–187.
- [58] Kang W., Wang Y., Yang W., Zhang J., Zheng H., Li D., (2021), “Research Progress on the Structure and Function of G3BP”, *Frontiers in Immunology* 12, 718548.

- [59] Vognsen T., Moller I.R., Kristensen O., (2013), “Crystal Structures of the Human G3BP1 NTF2-Like Domain Visualize FxFG Nup Repeat Specificity”, *Plos One* 8(12), e80947.
- [60] Kristensen O., (2015), “Crystal Structure of the G3BP2 NTF2-Like Domain in Complex With a Canonical FGDF Motif Peptide”, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 467(1), 53–57.
- [61] Tourrière H., Gallouzi I.E., Chebli K., Capony J.P., Mouaikel J., van der Geer P., Tazi J., (2001), “RasGAP-Associated Endoribonuclease G3Bp: Selective RNA Degradation and Phosphorylation-Dependent Localization”, *Molecular and Cellular Biology* 21(22), 7747–7760.
- [62] Guillén-Boixet J., Kopach A., Holehouse A.S., Wittmann S., Jahnel M., Schlüßler R., Kim K., Trussina I.R.E.A., Wang J., Mateju D., Poser I., Maharana S., Ruer-Gruß M., Richter D., Zhang X., Chang Y.T., Guck J., Honigmann A., Mahamid J., Hyman A.A., Pappu R.V., Alberti S., Franzmann T.M., (2020), “RNA-Induced Conformational Switching and Clustering of G3BP Drive Stress Granule Assembly by Condensation”, *Cell* 181(2), 346–361.e17.
- [63] Reineke L.C., Lloyd R.E., (2015), “. The Stress Granule Protein G3BP1 Recruits Protein Kinase R to Promote Multiple Innate Immune Antiviral Responses”, *Journal of Virology* 89(5), 2575–2589.
- [64] Reineke L.C., Kedersha N., Langereis M.A., van Kuppeveld F.J., Lloyd R.E., (2015) “Stress Granules Regulate Double-Stranded RNA-Dependent Protein Kinase Activation Through a Complex Containing G3BP1 and Caprin1”, *mBio* 6(2), e02486.
- [65] Burd C.G., Dreyfuss G., (1994) “Conserved Structures and Diversity of Functions of RNA-Binding Proteins”, *Science* 265(5172), 615–621.
- [66] Tsai W.C., Reineke L.C., Jain A., Jung S.Y., Lloyd R.E., (2017) “Histone Arginine Demethylase JMJD6 is Linked to Stress Granule Assembly Through Demethylation of the Stress Granule-Nucleating Protein G3BP1”, *The Journal of Biological Chemistry* 292(46), 18886–18896.
- [67] Bikkavilli R.K., Malbon C.C., (2011), “Arginine methylation of G3BP1 in response to Wnt3a regulates β -catenin mRNA”, *Journal of Cell Science* 124(13), 2310–2320.
- [68] Bikkavilli R.K., Malbon C.C., (2012), “Wnt3a-stimulated LRP6 phosphorylation is dependent upon arginine methylation of G3BP2”, *Journal of Cell Science* 125(10), 2446–2456.
- [69] Kedersha N., Panas M.D., Achorn C.A., Lyons S., Tisdale S., Hickman T., Thomas M., Lieberman J., McInerney G.M., Ivanov P., Anderson P., (2016), “G3BP-Caprin1-USP10 Complexes Mediate Stress Granule Condensation and Associate with 40S Subunits”, *The Journal of Cell Biology* 212(7), 845–860.

- [70] Scholte F.E., Tas A., Albulescu I.C., Žusinaite E., Merits A., Snijder E.J., van Hemert M.J., (2015), “Stress Granule Components G3BP1 and G3BP2 Play a Proviral Role Early in Chikungunya Virus Replication”, *Journal of Virology* 89(8), 4457–4469.
- [71] Bidet K., Dadlani D., Garcia-Blanco M.A., (2014), “G3BP1, G3BP2 and CAPRIN1 are required for translation of interferon stimulated mRNAs and are targeted by a dengue virus non-coding RNA, *PLoS Pathogens* 10(7), e1004242.
- [72] Wei S.C., Fattet L., Tsai J.H., Guo Y., Pai V.H., Majeski H.E., Chen A.C., Sah R.L., Taylor S.S., Engler A.J., Yang J., (2015), “Matrix stiffness drives epithelial-mesenchymal transition and tumour metastasis through a TWIST1-G3BP2 mechanotransduction pathway”, *Nature Cell Biology* 17(5), 678–688.
- [73] Zhang H., Ma Y., Zhang S., Liu H., He H., Li N., Gong Y., Zhao S., Jiang J.D., Shao R.G., (2015), “Involvement of Ras GTPase-activating protein SH3 domain-binding protein 1 in the epithelial-to-mesenchymal transition-induced metastasis of breast cancer cells via the Smad signaling pathway”, *Oncotarget* 6(19), 17039–17053.
- [74] Sidibé H., Dubinski A., Vande Velde C., (2021), “The multi-functional RNA-binding protein G3BP1 and its potential implication in neurodegenerative disease”, *Journal of NeuroChemistry* 157(4), 944-962.
- [75] Lu Y.N., Kavianpour S., Zhang T., Zhang X., Nguyen D., Thombre R., He L., Wang J., (2021), “MARK2 Phosphorylates EIF2 in Response to Proteotoxic Stress”, *PLoS Biology* 19(3), e3001096.
- [76] Taniuchi S., Miyake M., Tsugawa K., Oyadomari M., Oyadomari S., (2016), “Integrated Stress Response of Vertebrates Is Regulated by Four EIF2 Kinases”, *Scientific Reports* 6, 1–11.
- [77] Gebauer F., Hentze M.W., (2004), “Molecular Mechanisms of Translational Control”, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5(10), 827–835.
- [78] Valiente-Echeverría F., Melnychuk L., Mouland A.J., (2012), “Viral modulation of stress granules”, *Virus Research* 169(2), 430-437.
- [79] Arimoto K., Fukuda H., Imajoh-Ohmi S., Saito H., Takekawa M., (2008), “Formation of stress granules inhibits apoptosis by suppressing stress-responsive MAPK pathways”, *Nature Cell Biology* 10(11), 1324–1332.
- [80] McInerney G. M., Kedersha N. L., Kaufman R. J., Anderson P., Liljestrom, P., (2005), “Importance of eIF2alpha phosphorylation and stress granule assembly in alphavirus translation regulation”, *Molecular Biology of the Cell* 16(8), 3753–3763.
- [81] Reineke L., Neilson J., (2019), “Differences between acute and chronic stress granules, and how these differences may impact function in human disease” *Biochemical Pharmacology* 162, 123–131.
- [82] Eiermann N., Haneke K., Sun Z., Stoecklin G., Ruggieri A., (2020), “Dance with the devil: stress granules and signaling in antiviral responses”, *Viruses* 12(9), 984.

- [83] Li W., Li Y., Kedersha N., Anderson P., Emara M., Swiderek K.M., Moreno G.T., Brinton M.A., (2002), "Cell proteins TIA-1 and TIAR interact with the 3' stem-loop of the West Nile virus complementary minus-strand RNA and facilitate virus replication", *Journal of Virology* 76(23), 11989–12000.
- [84] Onomoto K., Yoneyama M., Fung G., Kato H., Fujita T., (2014), "Antiviral in nate immunity and stress granule responses", *Trends Immunology* 35(9), 420-428.
- [85] Reuter S., Gupta S. C., Chaturvedi M. M., Aggarwal B. B., (2010), "Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked?", *Free radical biology & medicine*, 49, 1603-1616.
- [86] Durackova Z., (2010), "Some current insights into oxidative stress", *Physiological Research* 59(4), 459–469.
- [87] Jabs T., (1999), "Reactive oxygen intermediates as mediators of programmed cell death in plants and animals", *Biochemical Pharmacology* 57(3), 231–245.
- [88] Khandrika L., Kumar B., Koul S., Maroni P, Koul H.K., (2009), "Oxidative stress in prostate cancer", *Cancer Letters* 282(2), 125–136.
- [89] Visconti R., Grieco D., (2009), "New insights on oxidative stress in cancer", *Current Opinion Drug Discovery Development* 12(2), 240–245.
- [90] Doyle S.M, Genest O., Wickner S., (2013), "Protein rescue from aggregates by powerful molecular chaperone machines", *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 14(10), 617–29.
- [91] Emara M.M., Fujimura K., Sciaranghella D., Ivanova V., Ivanov P., & Anderson P., (2012), "Hydrogen peroxide induces stress granule formation independent of eIF2 α phosphorylation", *Biochemical and Biophysical Research Communications* 423(4), 763–769.
- [92] Latchman D.S., (1999), "Stress proteins: an overview", *Springer* 1-7.
- [93] Berendes H.D., (1965), "Salivary gland function and chromosomal puffing patterns in *Drosophila hydei*", *Chromosoma* 17, 35-77.
- [94] Schelesinger M.J., Ashburner M., Tissieres A., (1982), "Heat shock, from bacteria to man", *New York Cole Spring Harbor Laboratory*.
- [95] Verma A., Sumi S., Seervi M., (2021), "Heat shock proteins-driven stress granule dynamics: yet another avenue for cell survival", *Apoptosis* 26(7-8), 371-384.
- [96] Deckers R., Debeissat C, Fortin P.Y., Moonen C.T.W., Couillaud F., (2012), "Arrhenius analysis of the relationship between hyperthermia and Hsp70 promoter activation: a comparison between ex vivo and in vivo data", *International journal of Hyperthermia* 28(5), 441-450.
- [97] Thompson D.J., (1993), "A chemical hypothesis for arsenic methylation in mammals", *Chemico-Biological Interactions* 88(2–3), 89–94.

- [98] Wijeweera J.B., Thomas C. M., Gandolfi A.J., Brendel K., (1995), "Sodium arsenite and heat shock induce stress proteins in precision-cut rat liver slices", *Toxicology* 104(1–3), 35–45.
- [99] Aulas A., Fay M.M., Lyons S.M., Achorn C.A., Kedersha N., Anderson P., (2017), "Stress-specific differences in assembly and composition of stress granules and related foci", *Journal of Cell Science* 130(5), 927–937.
- [100] Shimomura O., Johnson F.H, Saiga Y., (1962), "Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous Hydromedusan, *Aequorea*", *Journal of Cellular and Comparative Physiology* 59, 223-239.
- [101] Prasher D.C., Eckenrode V.K., Ward W.W., Prendergast F.G., Cormier M.J., (1992), "Primary structure of the *Aequorea* green-fluorescent protein", *Gene* 111(2), 229-233.
- [102] Chalfie M., (1995), "Green Fluorescent Protein", *Photochem. Photobiol.* 62, 651-656.
- [103] Yang F., Moss L.G, Phillips G.N Jr., (1996), "The molecular structure of green fluorescent protein", *Nature Biotechnology*, 14 (10): 1246-1251.
- [104] Tsien R.Y., (1998), "The green fluorescent protein", *Annual.Review.Biochemical*, 67,509-544 5.
- [105] Zacharias D.A., Baird G.S., Tsien R.Y., (2000), "Recent advances in technology for measuring and manipulating cell signals", *Current opinion in neurobiology*, 10(3), 416-421.
- [106] Chudakov D.M., Matz M.V., Lukyanov S., Lukyanov K.A., (2010), "Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues", *Physiological reviews*, 90(3), 1103-1163.
- [107] Fernandez-Suarez M. and Ting A.Y., (2008), "Fluorescent probes for super-resolution imaging in living cells", *Nature Review Molecular Cell Biology*, 9(12), 929–943.
- [108] Ghosh I., Hamilton A.D., Regan L., (2000), "Antiparallel Leucine Zipper-Directed Protein Reassembly: Application to the Green Fluorescent Protein", *Journal of the American Chemical Society*, 122, 5658-5659.
- [109] Kamiyama D., Sekine S., Barsi-Rhyne B., Hu J., Chen B., Gilbert L.A., Ishikawa H., Leonetti M.D., Marshall W.F., Weissman J.S., Huang B., (2016), "Versatile protein tagging in cells with split fluorescent protein", *Nature Communication*, 7, 11046.
- [110] Barondeau D.P., Putnam C.D., Kassmann C. J., Tainer J.A., Getzoff E.D., (2003), "Mechanism and energetics of green fluorescent protein chromophore synthesis revealed by trapped intermediate structures", *Proceedings of the National Academy of Science*, 100, 12111–12116.

- [111] Cabantous S., Terwilliger T.C., Waldo G.S., (2005), “Protein tagging and detection with engineered self-assembling fragments of green fluorescent protein “, *Nature Biotechnology*, 23(1), 102-107.
- [112] Liu Z., Yan W., Liu S., Liu Z., Xu P., Fang W., (2023), “Regulatory network and targeted interventions for CCDC family in tumor pathogenesis”, *Cancer Letters*, 565, 216225.
- [113] Priyanka P.P., Yenugu S., (2021), “Coiled-coil domain-containing (CCDC) proteins: functional roles in general and male reproductive physiology”, *Reproductive Sciences*, 28(10), 2725–2734.
- [114] Kent W. J., Sugnet C. W., Furey T. S., Roskin K. M., Pringle T. H., Zahler A. M., Haussler D., (2002), “The Human Genom Browser at UCSC”, *Genome Research*, 12, 996-1006.
- [115] Lee S., Liu B., Lee S., Huang S. X., Shen B., Qian S. B., (2012), “Global mapping of translation initiation sites in mammalian cells at single-nucleotide resolution”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109, e2424-2432.
- [116] 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, e2005903-e2005903.
- [117] Tuzlakoglu Öztürk M., Güllülü Ö., (2022), ““Dimerization underlies the aggregation propensity of intrinsically disordered coiled-coil domaincontaining 124” Proteins: Structure, Function and Bioinformatics, 90 (1), 218– 228.
- [118] Web 1, (2016), “<https://www.atcc.org/Products/All/CRL-3216.aspx>”, (Erişim tarihi: 05/05/2017).
- [119] Niforou K.M., Anagnostopoulos A.K., Vougas K., Kittas C., Gorgoulis V.G., Tsangaris G.T., (2008), “The Proteome Profile of the Human Osteosarcoma U2OS Cell Line”, *CANCER GENOMICS and PROTEOMICS*, 5, 63-78.
- [120] Isfort R.J., Cody D.B., Lovell G., Doersen C.J., (1995), “Analysis of oncogenes, tumor suppressor genes, autocrine growth factor production and differentiation state of human osteosarcoma cell lines”, *Molecular Carcinogenesis*, 14, 170-178.

ÖZGEÇMİŞ

Kübra HACIBEYOĞLU 2007 yılında girdiği Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Biyoloji bölümünü 2012 yılında başarıyla tamamlayarak aynı yıl Abant İzzet Baysal Üniversitesinde yüksek lisansa başladı. 2018 yılından bu yana Gebze Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünde Prof. Dr. Uygur Halis TAZEBAY 'ın laboratuvarında doktora eğitimine devam etmektedir.



TEZ METNİNDEN TÜRETİLEN YAYINLAR

Hacibeyoğlu K, Tuzlakoğlu Öztürk M, Arslan Ö, Tazebay UH. (2024), “Live Cell Protein Imaging of Tandem Complemented-GFP11-Tagged Coiled-Coil Domain-Containing Protein-124 Identifies this Factor in G3BP1-Induced Stress-Granules”,The Protein Journal.

