



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**CCDC84'ÜN NÜKLEER LOKALİZASYON
SİNYAL DİZİSİNİN KARAKTERİZASYONU VE
HİSTON PROTEİNLERİ H2A1A VE H2A1H İLE
ETKİLEŞİMLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

İhsan NALKIRAN

DOKTORA TEZİ

Prof. Dr. Ersan KALAY

TRABZON-2020



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**CCDC84'ÜN NÜKLEER LOKALİZASYON
SİNYAL DİZİSİNİN KARAKTERİZASYONU VE
HİSTON PROTEİNLERİ H2A1A VE H2A1H İLE
ETKİLEŞİMLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

İhsan NALKIRAN
ORCID: 0000-0002-7246-2592

DOKTORA TEZİ

Prof. Dr. Ersan KALAY
ORCID: 0000-0002-1467-2268

TRABZON-2020

ONAY

Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Doktora Programı öğrencisi İhsan NALKIRAN'ın hazırladığı “CCDC84’ün Nükleer Lokalizasyon Sinyal Dizisinin Karakterizasyonu ve Histon Proteinleri H2A1A ve H2A1H ile Etkileşimlerinin Araştırılması” başlıklı çalışma Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 16.09.2020

Prof. Dr. Ersan KALAY
(Danışman)

Prof. Dr. Ali İrfan GÜZEL

Prof. Dr. Murat KASAP

Prof. Dr. Ahmet ALVER

Dr. Öğr. Üyesi Tuba DİNÇER

Sağlık Bilimleri Enstitüsü’ne/...../20..... tarihinde teslim edilen bu tez Enstitü Yönetim Kurulu’nun/...../20..... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Ersan KALAY
Enstitü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Hazırlama ve Yazım Kılavuzu standartlarına uygun olarak hazırlanarak yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kullanılan kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

16.09.2020
İhsan NALKIRAN

İthaf

Bu doktora tezimi, benim bu günlere gelmem için hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan ve her zaman yanımda olan sevgili aileme ithaf ediyorum.



TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışmam boyunca değerli bilgi, birikim ve tecrübeleri ile bana destek olan danışman hocam sayın Prof. Dr. Ersan KALAY'a, tez izleme komitemde bulunan ve önerilerini esirgemeyen sayın Dr. Öğr. Üyesi Tuba DİNÇER'e ve sayın Prof. Dr. Ahmet ALVER'e şükranlarımı sunarım.

Doktora eğitimim boyunca bilgi ve tecrübeleri ile katkı sağlayan Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Figen CELEP EYÜPOĞLU'na, Dr. Öğr. Üyesi Bayram TORAMAN'a, Dr. Öğr. Üyesi Gökhan YILDIZ'a ve Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Ali İrfan GÜZEL'e teşekkür ederim.

Desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen Dr. Gülden YORGANCIOĞLU BUDAK'a, Arş. Gör. İdris ER'e, tüm bölüm arkadaşlarıma, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne teşekkür ederim.

Doktora çalışmam boyunca hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan ve bana sürekli destek olan sevgili eşim Dr. Öğr. Üyesi Hatice SEVİM NALKIRAN'a, sevgili kızım Elif Gökçe NALKIRAN'a, sevgili oğlum Yusuf Gökalp NALKIRAN'a ve tüm aileme varlıklarından dolayı şükranlarımı sunarım.

Bu çalışmayı Prof. Dr. Ersan KALAY'ın yürütücülüğünde 114Z883 no'lu proje ile destekleyen TÜBİTAK'a ve TDK-2018-7837 no'lu proje ile destekleyen Karadeniz Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederim.

İhsan NALKIRAN

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY	
BEYAN	
İthaf	
TEŞEKKÜR	
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
RESİMLER DİZİNİ	xii
KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ	xiv
ÖZET	xviii
ABSTRACT	xix
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Splaysing	3
2.1.1. Splaysing ile İlişkili Proteinlerin Hücre İçi Lokalizasyonu	4
2.2. Nükleer Transport	5
2.2.1. Nükleer Transport Mekanizmaları	5
2.2.2. NLS Dizileri	9
2.2.2.1. Kanonikal NLS Dizileri	9
2.2.2.2. Kanonikal Olmayan NLS Dizileri	9
2.2.3. İmportin α 'nın Yapısı	10
2.2.4. NLS Dizilerinin Belirlenmesinde Kullanılan NLS Tahmin Programları	11
2.3. Splaysing ile İlişkili Proteinlerin Farklı Hücresel Süreçlerle İlişkisi	11
2.3.1. Splaysingin Histon Proteinleri ile İlişkisi	12
2.4. Tez Çalışması Öncesinde Elde Edilen Ön Veriler	14
3. GEREÇ ve YÖNTEM	18
3.1. Gereç	18
3.1.1. Kimyasallar	18
3.1.2. Antikorlar	19
3.1.2.1. Primer Antikorlar	19

3.1.2.2. Sekonder Antikorlar	19
3.1.3. Rezinler	20
3.1.4. Kitler, Enzimler ve Markırlar	20
3.1.5. Sarf Malzemeler	20
3.1.6. Cihazlar	20
3.1.7. Bakteri Suşları	22
3.1.8. Kullanılan Vektörler	22
3.1.9. Solüsyon, Tampon ve Besiyerleri	22
3.1.9.1. Bakteri Kültürleri İçin Kullanılan Besiyerleri	22
3.1.9.2. Agaroze Jel Elektroforezinde Kullanılan Çözeltiler	23
3.1.9.3. SDS-PAGE Solüsyonları	23
3.1.9.4. Western Blot Solüsyonları	24
3.1.9.5. İmmünopresipitasyonda Kullanılan Solüsyonlar	25
3.1.9.6. İmmüno Floresanda Kullanılan Solüsyonlar	27
3.1.9.7. Memeli Hücre Kültüründe Kullanılan Solüsyonlar	27
3.1.9.8. Transfeksiyon Solüsyonları	27
3.2. Yöntem	28
3.2.1. <i>In Silico</i> Analiz ile CCDC84 Üzerindeki Olası NLS Dizilerinin Belirlenmesi	28
3.2.1.1. CCDC84'ün Olası NLS Dizisinin Belirlenmesi	29
3.2.1.2. CCDC84'ün NLS Dizisindeki Kritik Aminoasitlerin Belirlenmesi	30
3.2.2. <i>HIST1H2AA</i> ve <i>HIST1H2AH</i> Genlerinin Klonlanması	32
3.2.3. PCR Ürünlerinin Agaroze Jelde Yürütülmesi ve Saflaştırılması	33
3.2.4. Gateway Klonlama Yöntemi ile Giriş Vektörlerin Oluşturulması	34
3.2.5. Gateway Klonlama Yöntemi ile Ekspresyon Vektörlerin Oluşturulması	35
3.2.6. Oluşturulan Vektörlerin Dizilenerek Kontrolü	36
3.2.7. <i>E. coli</i> Transformasyonu	38
3.2.8. Plazmid İzolasyonu	39
3.2.8.1. Standart Plazmid İzolasyonu	39
3.2.8.2. Endotoksin İçermeyen Plazmid İzolasyonu	41
3.2.9. Hücre Kültürü	42
3.2.9.1. Hücrelerin Çözülmesi	43
3.2.9.2. Hücrelerin Pasajlanması	43

3.2.9.3. Hücrelerin Dondurulması	43
3.2.10. HeLa Hücrelerinin Transfeksiyonu	44
3.2.11. Hücre İçi Lokalizasyonun İmmüno Floresan ile Analizi	45
3.2.12. İmmünopresipitasyon	46
3.2.12.1. HEK293 Hücrelerinin Kalsiyum Fosfat Yöntemi ile Transfeksiyonu	46
3.2.12.2. Memeli Hücrelerinden TNTE Buffer Kullanılarak Protein İzolasyonu	48
3.2.12.3. Anti-FLAG M2 Rezinlerin Hazırlanması	48
3.2.12.4. İzole Edilen Proteinin Ön Temizliği	49
3.2.12.5. Anti-FLAG M2 Rezinler ile İmmünopresipitasyon Yöntemi	49
3.2.12.6. Elüsyon	50
3.2.13. GST-Trap Rezinler ile İmmünopresipitasyon	50
3.2.13.1. Memeli Hücrelerinden RIPA Buffer Kullanılarak Protein İzolasyonu	51
3.2.13.2. GST-Trap_A Rezinlerin Hazırlanması	52
3.2.13.3. GST-Trap_A Rezinler ile İmmünopresipitasyon Yöntemi	52
3.2.14. İmmünoblot	53
3.2.14.1. SDS-PAGE İçin Ayırma ve Yükleme Jelinin Hazırlanması	53
3.2.14.2. SDS-PAGE Jel Elektroforezi	54
3.2.14.3. Membrana Transfer İşlemi ve Görüntüleme	54
4. BULGULAR	56
4.1. CCDC84'ün NLS Dizisinin <i>In Silico</i> Yaklaşımlarla Analizi	56
4.2. CCDC84'ün Hücre İçi Yerleşiminin Analizi	57
4.2.1. Endojen CCDC84'ün Hücre İçi Yerleşiminin Analizi	57
4.2.2. GST-CCDC84'ün Hücre İçi Yerleşiminin Analizi	58
4.3. CCDC84'ün NLS Dizisinin Karakterizasyonu	59
4.3.1. CCDC84'ün 1-50. aa'leri Arasındaki Bölgenin Hücre İçi Yerleşiminin Analizi	61
4.3.2. CCDC84'ün 51-332. aa'leri Arasındaki Bölgenin Hücre İçi Yerleşiminin Analizi	62
4.3.3. CCDC84'ün 64-230. aa'leri Arasındaki Bölgenin Hücre İçi Yerleşiminin Analizi	63
4.3.4. CCDC84'ün 231-332. aa'leri Arasındaki Bölgenin Hücre İçi Yerleşiminin Analizi	64
4.3.5. GST-CCDC84 Xmut Fragmentin Hücre İçi Yerleşiminin Analizi	65

4.3.6. GST-CCDC84 Ymut Fragmentin Hücre İçi Yerleşiminin Analizi	66
4.3.7. GST-CCDC84 XmutYmut Fragmentin Hücre İçi Yerleşiminin Analizi	67
4.4. H2A1A ve H2A1H'nin CCDC84 ile Etkileşiminin İmmünopresipitasyon ile Doğrulanması	69
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	72
6. KAYNAKLAR	81
ÖZGEÇMİŞ	102



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No	Sayfa
Tablo 1. MALDI-TOF/TOF kütle analizinde elde edilen sonuçlar	16
Tablo 2. Transformasyon için kullanılan bakteri suşları ve genotipleri	22
Tablo 3. NLS dizisinin belirlenmesinde kullanılan attB kuyruklu primerler	30
Tablo 4. NLS üzerindeki kritik aminoasitlerin belirlenmesinde kullanılan primerler	31
Tablo 5. <i>HIST1H2AA</i> ve <i>HIST1H2AH</i> genlerinin amplifikasyonunda kullanılan attB kuyruklu primerler	33
Tablo 6. CCDC84'ün NLS dizisinin karakterizasyonu için oluşturulan vektörlerinin dizilenmesinde kullanılan primerler	37
Tablo 7. CCDC84'ün NLS dizisinin karakterizasyonu için oluşturulan vektörlerinin dizilenmesinde kullanılan primerler	37
Tablo 8. Çalışmada kullanılan memeli ekspresyon vektörlerine ait bilgiler	38
Tablo 9. İmmünofloresan koşulları	46
Tablo 10. %10'luk ayırma jeli içeriği	53
Tablo 11. %5'lik yükleme jeli içeriği	53
Tablo 12. Western blotlama koşulları	55

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No		Sayfa
Şekil 1.	Splaysingin iki aşamalı transesterifikasyon reaksiyonu	3
Şekil 2.	Splaysozom kompleksi ve katalitik splaying reaksiyonu	3
Şekil 3.	SnRNA'ların nükleer ve sitoplazmik transportu	5
Şekil 4.	Kanonikal nükleer transport mekanizması	7
Şekil 5.	Kanonikal olmayan nükleer transport mekanizması	8
Şekil 6.	İmportin α 'nın yapısı	10
Şekil 7.	Kromatin-adaptör kompleksleri	12
Şekil 8.	Alternatif splaying kromatin adaptör modeli	13
Şekil 9.	Splaysingin kromatin üzerindeki etkisi	13
Şekil 10.	Histon modifikasyonlarının splaying üzerindeki etkisi	14
Şekil 11.	CCDC84'ün aminoasit dizisi	61
Şekil 12.	CCDC84'ün olası NLS dizisinin ve kritik aminoasitlerin belirlenmesi	61
Şekil 13.	Oluşturulan fragmentlerin hücre içi lokalizasyon yüzdeleri	68

RESİMLER DİZİNİ

Resim No	Sayfa
Resim 1. İmmünopresipitasyon sonucu elde edilen proteinlerin SDS-PAGE ile analizi	15
Resim 2. Olası NLS dizisinin yer aldığı bölgenin belirlenmesi	29
Resim 3. NLS üzerindeki kritik aminoasitlerin belirlenmesi	31
Resim 4. CCDC84 üzerindeki NLS dizisinin cNLS Mapper kullanılarak <i>in silico</i> analizi	56
Resim 5. Endojen CCDC84'ün HeLa hücre hattında hücre içi yerleşiminin immünofloresan yaklaşım ile görüntülenmesi	57
Resim 6. Endojen CCDC84'ün HeLa hücrelerinde nükleus ve sentrozomda yerleşiminin immünofloresan yaklaşım ile görüntülenmesi	58
Resim 7. GST'nin HeLa hücre hattında hücre içi yerleşiminin immünofloresan yaklaşım ile görüntülenmesi	58
Resim 8. GST-CCDC84'ün HeLa hücre hattında hücre içi yerleşiminin immünofloresan yaklaşım ile analizi	59
Resim 9. GST-CCDC84 1-50. aa'nın HeLa hücre hattında hücre içi yerleşiminin immünofloresan yaklaşım ile analizi	62
Resim 10. GST-CCDC84 51-332. aa'nın HeLa hücre hattında hücre içi yerleşiminin immünofloresan yaklaşım ile analizi	63
Resim 11. GST-CCDC84 64-230. aa'nın HeLa hücre hattında hücre içi yerleşiminin immünofloresan yaklaşım ile analizi	64
Resim 12. GST-CCDC84 231-332. aa'nın HeLa hücre hattında hücre içi yerleşiminin immünofloresan yaklaşım ile analizi	65
Resim 13. GST-CCDC84 Xmut fragmentin HeLa hücre hattında hücre içi yerleşiminin immünofloresan yaklaşım ile analizi	66
Resim 14. GST-CCDC84 Ymut fragmentin HeLa hücre hattında hücre içi yerleşiminin immünofloresan yaklaşım ile analizi	67
Resim 15. GST-CCDC84 XmutYmut fragmentin HeLa hücre hattında hücre içi yerleşiminin immünofloresan yaklaşım ile analizi	68
Resim 16. FLAG-CCDC84 ile GST-H2A1A arasındaki olası etkileşimin immünopresipitasyon ile analizi	70

Resim 17. FLAG-CCDC84 ile GST-H2A1H arasındaki olası etkileşimin immünopresipitasyon ile analizi	70
Resim 18. Endojen-CCDC84 ile GST-H2A1A ve GST-H2A1H arasındaki olası etkileşimin immünopresipitasyon ile analizi	71



KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

Amp	Ampisilin
AP	Afinite pürifikasyon
APS	Amonyum persülfat
ARM	Armadillo tekrarları
CAS	Cellular apoptosis susceptibility
CCDC84	Coiled-coil domain-containing protein 84
Cy3	Cyanin 3
Del	Delesyon
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DNA	Deoksiribo nükleik asit
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
EJC	Ekzon bağlanma kompleksi
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FBS	Fetal bovin serum
FG nup	Fenilalanin-glisin tekrarlarınca zengin nükleoporinler
GST	Glutasyon S transferaz
HaCaT	İnsan keratinosit hücre hattı
HCl	Hidroklorik asit
HEK	İnsan embriyonik böbrek hücre hattı
HeLa	Henrietta lacks servikal kanser hücre hattı
HnRNP	Heterojen nükleer ribonükleer protein
HRP	Horse radish peroksidaz
H2A1A	Histon H2A tip 1-A
H2A1H	Histon H2A tip 1-H
IB	İmmünoblot
IBB	İmportin β bağlama domaini
IF	İmmünofloresan
IP	İmmünopresipitasyon
Kan	Kanamisin
K31	31. pozisyondaki lizin aminoasidi
LB	Luria bertani

MALDI	Matris destekli lazer desorpsiyon/iyonizasyon
MPD	Mikrosefalik primordial dwarfism
mRNA	Mesajcı RNA
MS	Kütle spektrometrisi
Mut	Mutant tip
NLS	Nükleer lokalizasyon sinyali
NPC	Nükleer por kompleksi
NTF2	Nükleer transport faktörü 2
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PBS	Fosfatla tamponlanmış tuz çözeltisi
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
Pen	Penisilin
PFA	Paraformaldehit
PMSF	Fenil metil sülfonil florür
PRPF3	Pre-mRNA processing faktör 3
PTM	Post-translasyonel modifikasyon
PVDF	Polivinilidenflorid
PY	Prolin-tirozin
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay buffer
RNA	Ribonükleik asit
RNAPII	RNA polimeraz II
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SnRNA	Küçük nükleer ribonükleik asit
SnRNP	Küçük nükleer ribonükleoprotein
Strep	Streptomisin
SV40 T-ag	Simian virüsü 40 T-antijeni
TAE	Tris asetat EDTA
TBS	Tris tamponlanmış tuz çözeltisi
TBS-T	Tris tamponlanmış tuz çözeltisi-tween 20
TEMED	Tetrametiletildiamin
TNTE	Tris sodyum triton EDTA
TOF	Time of flight
TXNL4B	Thioredoxin like 4B

T/E	Tripsin/EDTA
UV	Ultraviyole
Wt	Wild (yabanıl) tip

Simgeler

α	Alfa
β	Beta
λ	Gama
g	Gram
kDa	Kilodalton
L	Litre
M	Molar
MA	Moleküler ağırlık
μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre
mL	Mililitre
μm	Mikrometre
N	Normal
ng	Nanogram
°C	Santigrad derece
∞	Sonsuz

Formüller

CaCl₂	Kalsiyum klorür
C₂H₄O₂	Glasiyel asetik asit
C₂H₅OH	Etanol
C₄H₁₀O₂S₂	Dithiothreitol
C₄H₁₁NO₃	Tris baz
C₄H₁₂ClNO₃	Tris HCl
C₆H₁₂O₆	Glukoz
C₆H₁₆N₂	TEMED
C₈H₁₈N₂O₄S	HEPES
C₁₂H₂₀N₃Br	Etidyum bromür
C₁₉H₁₀Br₄O₅S	Bromfenol mavisi
ddH₂O	Ultra saflıkta su

HCl	Hidroklorik asit
HO(CH₂O)_nH	Paraformaldehit
H₂O	Su
KH₂PO₄	Potasyum fosfat monobazik
NaCl	Sodyum klorür
NaF	Sodyum florür
NaOH	Sodyum hidroksit
Na₂CO₃	Sodyum karbonat
Na₂EDTA.2H₂O	EDTA disodyum dihidrat
Na₂HPO₄.2H₂O	Di-sodyum hidrojen fosfat
Na₃VO₄	Sodyum orthovanadate
Na₄O₇P	Sodyum pyrophosphate
(NH₄)₂S₂O₈	Amonyum persülfat

ÖZET

CCDC84'ün Nükleer Lokalizasyon Sinyal Dizisinin Karakterizasyonu ve Histon Proteinleri H2A1A ve H2A1H ile Etkileşimlerinin Araştırılması

Splyasing, pre-mRNA'ların yapısından intronların kesilip çıkartılması ve ardından ekzonların birleştirilerek olgun mRNA'ların oluşturulduğu kompleks bir mekanizmadır. Bu mekanizmada 300'den fazla protein görev almaktadır. Splyasing ile ilişkili proteinler nükleus, sitoplazma ve sentrozom gibi hücre içi bölgelerde lokalizasyon göstererek splyasingin düzenlenmesinin yanısıra kromatin yapılanması, transkripsiyon gibi farklı süreçlerde işlev göstermektedir. Anabilim Dalımızda, mikrosefalik primordial dwarfizm ile ilişkilendirilen CCDC84'ün fonksiyonunu aydınlatmaya yönelik çalışmalar kapsamında, nükleusa lokalize olduğunun ve splyasing mekanizmasında yer aldığının gösterilmesiyle birlikte histon proteinleri H2A1A ve H2A1H ile etkileşim içerisinde olabileceği ön verisine ulaşıldı. Bu tez çalışması ile CCDC84'ün nükleer lokalizasyon sinyal (NLS) dizisinin karakterizasyonu ve histon proteinleri H2A1A ve H2A1H ile etkileşimine yönelik ön verilerin test edilerek, fonksiyonunun daha ileri düzeyde anlaşılmasına katkı sağlayacak verilere ulaşılması amaçlanmıştır. CCDC84'ün NLS dizisinin karakterizasyonu immünofloresan yaklaşımı kullanılarak yapılırken, histon proteinleri H2A1A ve H2A1H ile olası etkileşimi immünopresipitasyon ve immünoblot yaklaşımları ile araştırıldı. Sonuç olarak, CCDC84'ün 18. ve 50. aminoasitler arasında yer alan ve iki farklı aminoasit kümesinden oluşan kanonikal bir NLS dizisi taşıdığı ve bu dizi üzerinde kanonikal nükleer transport mekanizması için kritik öneme sahip olan arjinin ve lizin aminoasitleri belirlendi. CCDC84'ün histon proteinleri H2A1A ve H2A1H ile arasındaki olası etkileşim doğrulanamadı ve bu etkileşimlerin yanlış pozitiflik olabileceği düşünüldü. Elde ettiğimiz bulgular, CCDC84'ün sentrozomda lokalizasyonunun gösterildiği literatürdeki son çalışmalar ile önem kazanırken, bu bulguların CCDC84'ün işlevlerinin anlaşılması sürecine önemli katkılar sağlayacağı kanaatindeyiz.

Anahtar Kelimeler: CCDC84, H2A1A, H2A1H, NLS, Splyasing

ABSTRACT

Characterization of Nuclear Localization Signal Sequence of CCDC84 and Investigation of Its Interactions with Histone Proteins H2A1A and H2A1H

Splicing is a complex mechanism in which introns are removed from the structure of pre-mRNAs, and then mature mRNAs are formed by combining exons. More than 300 proteins can function in this mechanism. Splicing-related proteins localized in intracellular regions such as the nucleus, cytoplasm, and centrosome function in various processes such as chromatin structuring and transcription as well as regulation of splicing. In studies conducted in our department to elucidate the function of CCDC84 protein which is associated with microcephalic primordial dwarfism, it was shown that CCDC84 is localized to the nucleus and involved in the splicing mechanism, and preliminary data were obtained that it could interact with histone proteins H2A1A and H2A1H. In this thesis, it is aimed to reach data that will contribute to the further understanding of the function of CCDC84 by characterization of the nuclear localization signal (NLS) sequence of CCDC84 and testing the preliminary data for the interaction of CCDC84 with histone proteins H2A1A and H2A1H. While the characterization of the NLS sequence of CCDC84 was achieved using immunofluorescence, its potential interaction with histone proteins H2A1A and H2A1H was investigated by immunoprecipitation and immunoblot methods. As a result, a bipartite canonical NLS sequence, which is located between the 18th and 50th amino acids of CCDC84, was identified and arginine and lysine amino acids critical for the canonical nuclear transport mechanism were determined on this sequence. Possible interaction of CCDC84 with histone proteins H2A1A and H2A1H could not be confirmed and these interactions were thought to be false positives. While the findings we obtained become increasingly important with the latest studies in the literature showing the localization of CCDC84 in the centrosome, we believe that these findings will contribute significantly to the understanding of the functions of CCDC84.

Keywords: CCDC84, H2A1A, H2A1H, NLS, Splicing

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Prekürsör mRNA (pre-mRNA) kırılması (splaysing), gen ekspresyonu sürecinde sentezlenen pre-mRNA'ların yapısından intronların kesilip çıkartılması ve ekzonların birleştirilerek olgun mRNA'ların oluşturulması sürecidir (1). Splaysing, pre-mRNA kırılması kompleksi (splaysozom) olarak bilinen çok bileşenli bir kompleks tarafından iki sıralı transesterifikasyon reaksiyonu ile gerçekleşen (2), 300'den fazla proteinin işlev gördüğü kompleks bir mekanizmadır (2-4). Splaysing ile ilişkilendirilen birçok protein farklı hücresel süreçte işlev görmektedir (5, 6). Ayrıca, splaysing ile ilişkili proteinler nükleus, sitoplazma ve sentrozom gibi çeşitli hücre içi bölgelerde lokalizasyon göstermekte (7-11) ve bu proteinlerin hücre içi lokalizasyonu splaysingin düzenlenmesinde kritik rol oynamaktadır (10, 12-17).

Birçok proteinin işlevini doğru bir şekilde yerine getirebilmesi için spesifik lokalizasyon sinyalleri ile doğru hücre içi bölgelere hedeflenmeleri gerekir (18). Proteinlerin nükleusa transportu; hücre çoğalması, transformasyon, kanserogenez ve sinyal iletimi gibi hücresel süreçlerde yer alan birçok proteinin aktivitesinin düzenlenmesinde rol oynar (19, 20). Birçok proteinin nükleusa transportunda nükleer transport reseptör proteinleri ile proteinlerin nükleer lokalizasyon sinyal (NLS) dizileri arasındaki fiziksel etkileşimler aracılık ederken (18), çok az sayıda proteinin NLS dizisi ayrıntılı bir şekilde tanımlanmıştır. Nükleer transportu düzenleyen mekanizmaların tanımlanması çok önemli bir araştırma alanıdır (21). Ayrıca, proteinlerin nükleer transport süreci hastalıkların tedavisinde etkili bir yol olabilir (22). Bu amaçla, çalışmalarda NLS dizileri kullanılmakta (23, 24) ve ilaç dağıtım sistemleri geliştirilmektedir (25-28). Nükleer transport mekanizmaları hakkında gerçekleştirilecek birçok çalışma hastalıkların tedavisine yönelik katkılar sağlayacaktır (29). Bu nedenle, splaysingde rol alan proteinlerin nükleer transport mekanizmalarının aydınlatılması ve splaysing ile ilişkili proteinlerin NLS dizilerinin belirlenmesi, protein fonksiyonlarının karakterizasyonu ve splaysing ile ilişkili hastalıkların tedavisi için kritik öneme sahiptir.

Splaysing, transkripsiyon ve kromatin organizasyonu hücrelerde birbirleri ile entegre süreçlerdir (30). Splaysing mekanizmasının kromatin organizasyonu ve transkripsiyon üzerinde büyük bir etkiye sahip olabileceği bildirilmektedir (31). Son zamanlarda splaysing mekanizması da dahil olmak üzere (30), genom fonksiyonunun tüm yönleri üzerindeki etkileri nedeniyle ökaryotik DNA'yı kromatine indirgeyen histon proteinleri çalışma alanı

olarak büyük ilgi görmektedir (32). Splaysing ile ilişkili proteinlerin kromatin yapısında yer alan histon proteinleri ile ilişkisini araştırmaya yönelik bu tür çalışmalar splaysing ile kromatin yapısı arasındaki bağlantıların aydınlatılmasına katkı sağlayacaktır.

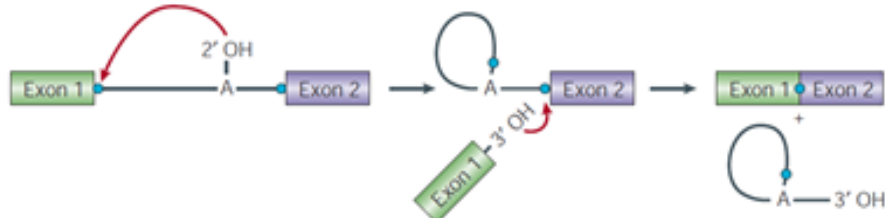
Bu tez çalışması ile ilk kez grubumuz tarafından mutasyonu mikrosefalik primordial dwarfizm (MPD) ile ilişkilendirilen ve splaysing faktör olan pre-mRNA processing faktör 3 (PRPF3) ile doğrudan etkileştiği gösterilen (33) coiled-coil domain-containing protein 84'ün (CCDC84) karakterizasyonuna yönelik olarak NLS dizisinin belirlenmesi ve histon proteinleri histon H2A tip 1-A (H2A1A) ile histon H2A tip 1-H (H2A1H) arasındaki olası etkileşimin araştırılması amaçlandı. CCDC84'ün nükleusta lokalizasyonuna yönelik verilere grubumuz tarafından yürütülen bir doktora tezi çalışması kapsamında ulaşılrken (33), CCDC84'ün H2A1A ve H2A1H histon proteinleri ile etkileşim içerisinde olabileceği yönündeki ön veriler CCDC84'ün etkileşim partnerlerinin araştırıldığı TÜBİTAK tarafından desteklenen 114Z883 no'lu proje kapsamında gerçekleştirilen afinite pürifikasyon (AP) ve kütle spektrometresi (MS) analizleri ile elde edildi. Gerçekleştirilen *in silico* analizler, CCDC84 üzerinde 18-50. aa'ler arasında kalan 33 aminoasitlik bölgenin CCDC84'ün nükleusa transportunda rol alan NLS dizisi olabileceğini gösterdi. Bu doğrultuda hedeflerimizi; ilk aşamada immünofloresan yaklaşımı ile CCDC84'ün NLS dizisinin sınırlarının tanımlanması ve NLS dizisi üzerindeki nükleusa lokalizasyon için kritik olan aminoasitlerin belirlenmesi, ikinci aşamada ise immünopresipitasyon ve immüno blot yaklaşımları ile CCDC84'ün H2A1A ve H2A1H histon proteinleri ile etkileşimine yönelik elde ettiğimiz ön verilerin doğrulanması oluşturdu.

Bu sayede, CCDC84'ün karakterizasyonu sürecine katkı sağlanırken, CCDC84'ün NLS dizisinin karakterizasyonu ve splaysing mekanizması ile kromatin yapısı arasında yeni bir etkileşimin varlığının ortaya çıkartılması amaçlandı.

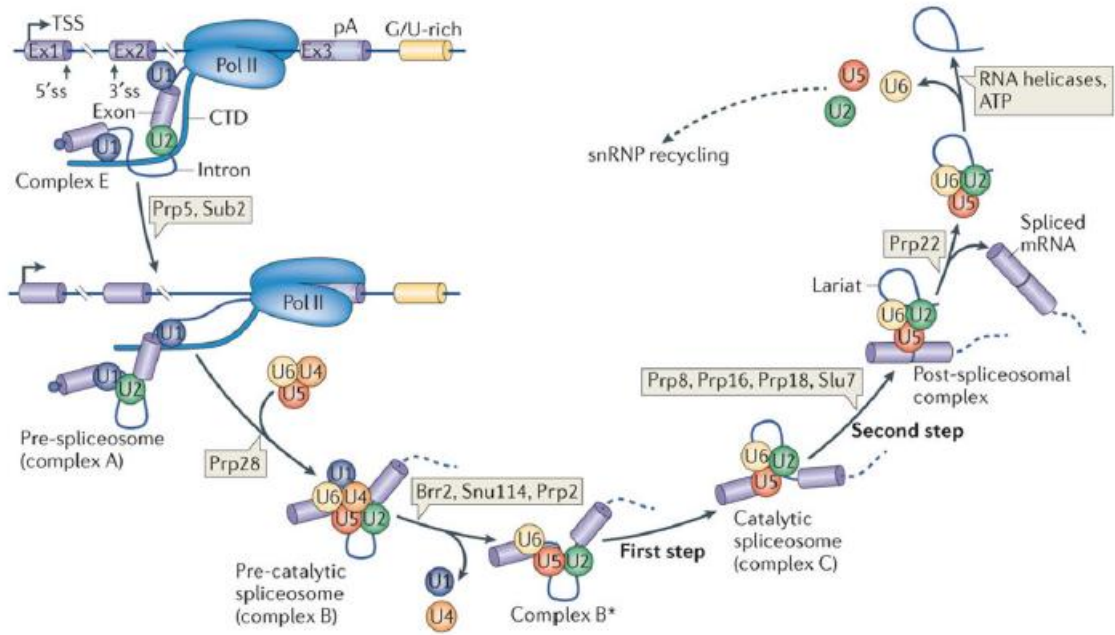
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Splysing

Splysing, gen ekspresyonu sürecinde sentezlenen pre-mRNA'ların yapısından intronların kesilip çıkartılması ve ardından ekzonların birleştirilerek olgun mRNA'ların oluşturulması sürecidir (1). Splysing, bir multiribonükleoprotein kompleksi olan splaysozomun rol aldığı iki sıralı transesterifikasyon reaksiyonu ile gerçekleşmektedir (Şekil 1). Splaysozom kompleksinin yapısında beş küçük nükleer ribonükleik asit (snRNA) ve bu kompleks ile ilişkili 300'den fazla düzenleyici proteinin bulunduğu bilinmektedir (2-4). Splysing, beş küçük nükleer ribonükleoprotein (snRNP) ve diğer splysing faktörlerin düzenli etkileşimleri ile gerçekleşir (Şekil 2) (34-36).



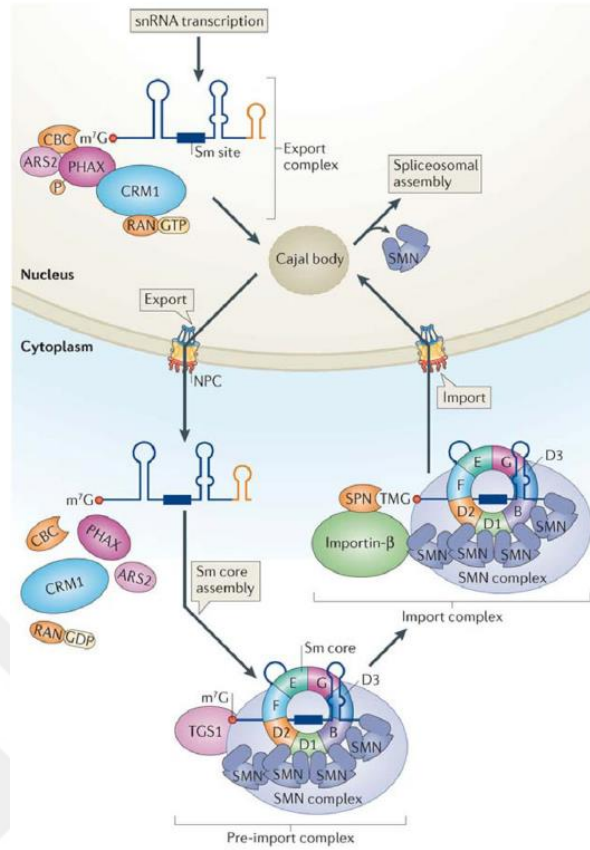
Şekil 1. Splysingin iki aşamalı transesterifikasyon reaksiyonu (Patel'den, 2)



Şekil 2. Splaysozom kompleksi ve katalitik splysing reaksiyonu (Matera'dan, 4)

2.1.1. Splaysing ile İlişkili Proteinlerin Hücre İçi Lokalizasyonu

Bir proteinin fonksiyonunu yerine getirebilmesi için, hücre içinde doğru bölgeye hedeflenmesi gerekir. Bu işlem, spesifik lokalizasyon sinyal dizileri ile gerçekleşir (18). Birçok protein nükleusa taşınmasına rağmen, çok az sayıda proteinin NLS dizisi ayrıntılı bir şekilde tanımlanmıştır (21). NLS dizilerinin tanımlanması protein fonksiyonlarının aydınlatılmasına katkı sağlamaktadır (37). Splaysing ile ilişkili birçok protein nükleus ve sitoplazma gibi çeşitli hücre içi bölgelerde lokalizasyon göstermekte (7-11), nükleus ve sitoplazma arasında mekik hareketi yaparak splaysing mekanizmasının düzenlenmesinde rol oynamaktadır (10, 12-17). Bu proteinlerden splaysing faktör ASF/SF2, nükleus ve sitoplazma arasında mekik yaparak splaysingde fonksiyonel görev almaktadır (10). ASF/SF2 ile ilişkili bir protein olan p32, ASF/SF2'nin hem fosforilasyonunu hem de pre-mRNA'ya bağlanmasını inhibe ederek splaysingi düzenlemekte (17), mitokondride ve sitoplazmada lokalizasyon göstermektedir (9). Apoptozis ve splaysing ilişkili protein kompleksi bileşenleri olan SAP18 ve RNPS1 proteinleri birer mekik proteinleri olarak nükleus ile sitoplazma arasında yer değiştirmekte ve birbirlerinin alternatifi olarak görev yapmaktadır (38). Benzer şekilde; heterojen ribonükleer proteinlerden (hnRNP) biri olan hnRNPA1 splaysing proteini nükleer ve sitoplazmik bölmeler arasında mekik hareketi yapmaktadır (39). Splayozom kompleksinin temel bileşenleri olan snRNP'lerin biyogenezinde yer alan proteinlerin ve snRNA'ların sitoplazma ve nükleus arasında transportu splaysing sürecinde yer alan kompleks mekanizmalardan biridir (Şekil 3). Sm sınıfı snRNP'ler primer olarak nükleusta işlev görmekte, yeni sentezlenen snRNA'lar ise ilk olarak sitoplazmaya taşınmakta ve burada nükleusa geri aktarılmadan önce ek olgunlaşma adımlarına tabi tutulmaktadır (12-16). SnRNP'lerin nükleusa transportu ise snurportin (40) ve importin β ile gerçekleşmektedir (41). NEK2 ve RBM8A ise hem sentrozomda hem de nükleusta lokalize, splaysing ve sentrozom ile ilişkili süreçlerde rol oynayan proteinlerdir (11, 42-49). Tüm bu veriler doğrultusunda splaysing ile ilişkili proteinlerin nükleusa transportu kompleks ve kritik bir süreçtir. Splaysing ile ilişkili proteinlerin NLS dizilerinin belirlenmesi, fonksiyonlarının karakterizasyonu ve nükleer transport mekanizmalarının aydınlatılmasında anahtar rol oynar.



Şekil 3. SnRNA'ların nükleer ve sitoplazmik transportu (Matera'dan, 4)

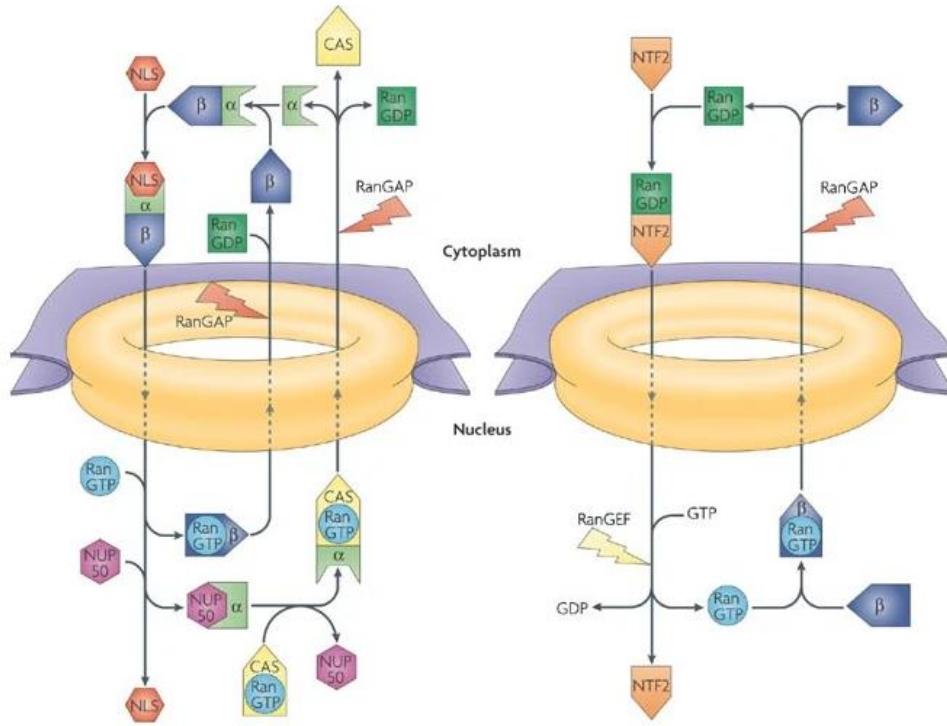
2.2. Nükleer Transport

Tüm ökaryotik hücreler kompleks endomembran sistemler ve organeller içerir. Bu organeller, farklı metabolik aktiviteler için ayrı bölmeler sağlar. Proteinlerin bu özelleşmiş bölgelere ve organellere transportu, fonksiyonlarını yerine getirebilmesi için temel bir gereksinimdir (50). Nükleositoplazmik transport; hücre çoğalması, transformasyonu, tümörögenез ve sinyal transdüksiyonu gibi birçok mekanizmada yer alan proteinlerin aktivitesinin düzenlenmesinde rol oynar (19, 20) ve nükleer por kompleksi (NPC) boyunca aktif ve seçici bir mekanizma aracılığı ile meydana gelir (51).

2.2.1. Nükleer Transport Mekanizmaları

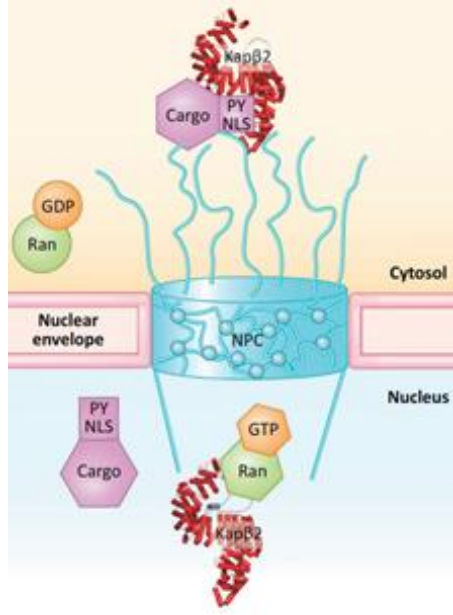
İyonların, metabolitlerin ve diğer küçük moleküllerin NPC boyunca hareketi pasif difüzyon ile gerçekleşebilirken, 40 kDa'dan büyük makromoleküllerin transportu ise genellikle spesifik transport reseptörlerini gerektirir (52). Bununla birlikte, bazı küçük proteinlerin (<20-30 kDa) verimli bir şekilde nükleusa transportu için NLS dizilerinin gerektiği gösterilmiştir (53). Proteinlerin nükleusa transportunda rol oynayan NLS

dizilerinin spesifik reseptörler tarafından tanınmasına ilişkin en az iki nükleer transport mekanizması ortaya konmuştur. Bu iki mekanizma, kanonikal NLS dizilerin ve importin α (karyoferin α) ve importin β (karyoferin β 1) reseptörlerin rol aldığı kanonikal nükleer transport mekanizması (Şekil 4) ve kanonikal olmayan prolin-tirozin NLS (PY-NLS) dizilerin ve importin β 2 reseptörün (transportin 1) rol aldığı kanonikal olmayan importin β 2 nükleer transport mekanizmasıdır (Şekil 5) (54). Nükleusa transport sürecinde en iyi anlaşılan mekanizma ise kanonikal nükleer transport mekanizmasıdır (55). Bu mekanizmanın ilk adımı, importin α -kargo kompleksinin oluşumudur. Kanonikal NLS'ler, importin α ile tanınır ve oluşan importin α -kargo kompleksi, importin α 'nın N-terminalinde yer alan importin β bağlanma bölgesi (IBB) aracılığı ile importin β 'ya bağlanır ve üçlü bir kompleks oluşur (56, 57). İmportin β , üçlü kompleksin NPC ile etkileşimine aracılık ederek kargo proteinin nükleusa transportunu sağlar (58). Nükleer transport sonrası RanGTP'nin importin β 'ya bağlanması, kompleksin ayrışmasına ve NLS dizisi içeren proteinin salınmasına yol açar (51). Nup50 ise nükleusta NLS dizisi içeren proteinin importin α 'dan ayrılmasında rol oynar (59). Cellular apoptosis susceptibility (CAS) proteini, importin β benzeri RanGTP bağlayıcı motif içerir ve importin α 'ya sadece RanGTP varlığında bağlanarak importin α /CAS/RanGTP eksport kompleksini oluşturur ve importin α 'nın tekrar sitoplazmaya taşınmasına aracılık eder. (60, 61). İmportin β ise RanGTP ile eksport kompleksi oluşturarak sitoplazmaya geri döner (62). Sitoplazmaya taşındıktan sonra, RanGTP/importin β nükleer eksport kompleksi ve RanGTP/CAS/importin α nükleer eksport kompleksi RanGTP'nin RanGDP'ye dönüştürülmesi yoluyla ayrıştırılır. Böylelikle hem importin α hem de importin β bir sonraki nükleer transport için tekrar kullanılabilir durumuna döner. RanGDP ise nükleer transport faktörü 2 (NTF2) ile nükleusa taşınır (Şekil 4) (62, 63).



Şekil 4. Kanonikal nükleer transport mekanizması (Stewart'tan, 64)

Kanonikal olmayan nükleer transport mekanizmasında ise, kanonikal olmayan PY-NLS taşıyan protein doğrudan importin $\beta 2$ transport reseptörü tarafından tanınır. Importin $\beta 2$ transport reseptörü, NPC'deki belirli nükleoporinlerle etkileşerek proteinlerin transportunu kolaylaştırır. Transport sonrası, nükleoplazmada yüksek seviyelerde RanGTP, importin $\beta 2$ 'ye doğrudan bağlanarak kompleksin konformasyonel değişimine neden olur ve kargo proteinin kompleksten salınmasını teşvik eder (Şekil 5) (51, 65-70). Kanonikal olmayan nükleer transport mekanizması, ribozomal proteinler (71), hnRNP'ler (72, 73), kor histon proteinler (74, 75), transkripsiyon faktörler (76, 77) gibi birçok temel hücresel bileşenin nükleusa transportunda rol oynamaktadır (78).



Şekil 5. Kanonikal olmayan nükleer transport mekanizması (Guo'dan, 79)

Proteinlerin çoğu importin β aracılı mekanizmalar ile NPC yoluyla taşınırken, bir dizi protein için ise alternatif nükleer transport mekanizmaları tanımlanmıştır. Importin β bağımsız bu mekanizmalar, kalsiyum bağlayıcı proteinler olan kalmodulin ve kalretikulin gibi alternatif taşıyıcılar ile transportu ve transport reseptörlerden bağımsız olarak NPC bileşenleri ile doğrudan etkileşimin aracılık ettiği transportu içerir. Birçok protein ise birden fazla mekanizma tarafından nükleusa taşınır. Bu nükleer transport süreçlerinin, bir yolun inhibe edildiği koşullar altında hücre fonksiyonlarının korunmasını sağlayabileceği öne sürülmüştür (80). Kalmodulinin, importin β 'nın NLS dizisine bağlanmasına benzer bir şekilde, spesifik dizilere bağlanarak transkripsiyon faktörleri SRY ve SOX9'un nükleer transportunda rol aldığı gösterilmiştir (81). Bazı proteinler, reseptör proteinlerine ihtiyaç duymadan nükleusa taşınabilmekte ve kargo proteinin NPC'de fenilalanin-glisin tekrarları zengin nükleoporinlere (FG nup) doğrudan bağlanmasıyla reseptörden bağımsız nükleer transport gerçekleştirebilmektedir. Importin transport reseptörleri ile yapısal olarak benzerlik gösteren β katenin gibi armadillo (ARM) tekrarlarına sahip proteinler, NPC'ye doğrudan bağlanabilmekte ve importin β 'dan bağımsız olarak nükleusa taşınabilmektedir. Bazı proteinler ise, "piggyback mekanizması" olarak bilinen, fonksiyonel NLS dizisi içeren proteinlerle etkileşimleri yoluyla nükleusa taşınabilmektedir (82).

2.2.2. NLS Dizileri

Proteinlerin nükleusa transportunda NLS dizileri ve bu dizileri tanıyan transport reseptörleri rol oynar (66). NLS dizileri, kanonikal NLS dizileri ve kanonikal olmayan NLS dizileri olarak sınıflandırılır (83).

2.2.2.1. Kanonikal NLS Dizileri

Kanonikal NLS dizileri, kanonikal nükleer transport mekanizmasında, importin α adaptör proteini tarafından tanınarak kargo proteinlerin nükleusa transportundan sorumlu olan (54, 56, 66), bir proteine konjuge edildiğinde proteinin nükleer lokalizasyonunu sağlamak için yeterli olabilen kısa aminoasit dizileridir. Kanonikal NLS dizilerin çoğu tek bir aminoasit kümesinden veya iki farklı aminoasit kümesinden oluşan NLS dizileri olmak üzere iki sınıfa ayrılır. Tek bir aminoasit kümesinden oluşan NLS dizileri simian virüsü 40 T-antijeni (SV40 T-ag) NLS PKKKRKV dizisi ile örneklenen kısa bir bazik aminoasit kümesinde oluşan NLS dizileridir. İki farklı aminoasit kümesinden oluşan NLS dizileri ise hücresel nükleoplazmin proteininde bulunan KRPAATKKAGQAKKKK dizisi ile örneklendirilen ve 10 ile 12 aminoasitlik bir bağlayıcı dizi ile ayrılan iki bazik aminoasit kümesinden oluşan NLS dizileridir (84). Son zamanlarda yapılan birçok çalışmada farklı kanonikal NLS dizileri tanımlanmıştır (85-89). NLS dizilerindeki bu kümeler arjinin ve lizin bazik aminoasitleri bakımından zengindir (90). NLS dizilerindeki lizin ve arjinin aminoasitleri tarafından sağlanan pozitif yükler ile importin α üzerindeki triptofan, asparajin ve negatif yüklü aminoasitler arasında gerçekleşen hidrofobik ve elektrostatik etkileşimler aracılığıyla importin α ve kargo proteini arasındaki bağlanma gerçekleşir (91-97).

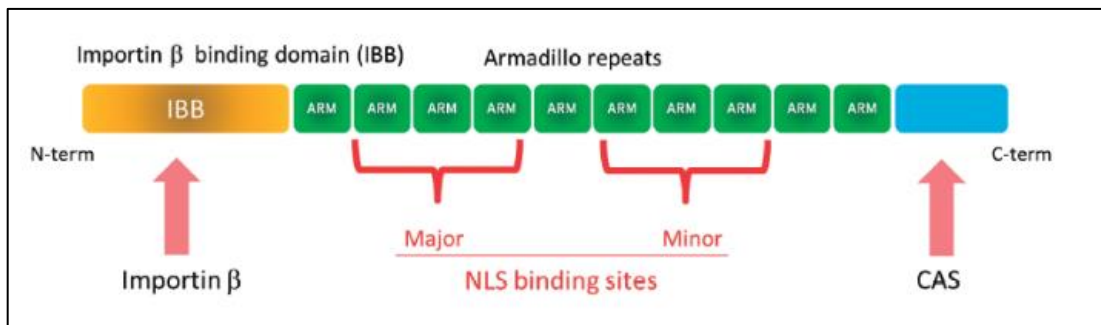
2.2.2.2. Kanonikal Olmayan NLS Dizileri

Kanonikal NLS dizilerine ek olarak, hücresel ve viral proteinlerde kanonikal olmayan NLS dizileri tanımlanmıştır (98, 99). Kanonikal olmayan NLS dizileri bazik aminoasit kümeleri içermez (68, 100) ve dizi, uzunluk ve aminoasit kompozisyonu bakımından kanonikal NLS dizilerinden farklılık gösterirler (101). Birçok proteinde kanonikal olmayan NLS dizileri tanımlanmıştır (54). Ribozomal proteinler, CREB, HTLV-1 protein Rex, PTHrP, siklin B1, TRF (54), Hrp1 ve Nab2 maya proteinleri ve hnRNPA1 proteini (39, 57, 100), SREBP-2 (102), GAL4 (103), HIV-1 Rev ve Tat retroviral proteinleri (104) gibi birçok protein kanonikal olmayan NLS dizileri taşıyan hücresel ve viral proteinlerdir. Kanonikal olmayan NLS dizileri kargo proteinin importin β 2 ile doğrudan etkileşimine aracılık eden PY-NLS dizilerini içerir (83). PY-NLS dizilerinin konsensus

motifi, bir N-terminal hidrofobik motif, bir merkezi arjinin kalıntısı ve bir C-terminal PY dizisinden oluşur (57). İlginç bir şekilde, Hrp1 ve Nab2 maya proteinlerinde tanımlanan arjinin-glisin bakımından zengin NLS dizileri ve M9 olarak adlandırılan hnRNPA1 proteininin glisin ve asparajin bakımından zengin NLS dizisinin de PY-NLS ile aynı özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir (39, 57, 100).

2.2.3. İmportin α 'nın Yapısı

İmportin α , kanonikal nükleer transport mekanizmasında bir adaptör protein görevi görür ve kanonikal NLS dizisi içeren kargo proteinleri bağlar (56). Altı farklı insan importin α proteini tanımlanmıştır. Bu proteinler, importin $\alpha 1$, importin $\alpha 3$, importin $\alpha 4$, importin $\alpha 5$, importin $\alpha 6$ ve importin $\alpha 7$ 'dir (90, 105-109). İmportin α , küçük N ve C-terminal domainleri ve 10 tane art arda tekrarlanmış ARM tekrarından oluşan büyük bir merkezi domainden oluşur. ARM tekrarları, NLS bağlanmasında rol oynayan bir cep oluşturur. İmportin α 'nın N terminalinde yer alan IBB domaini, importin β 'ya bağlanmaya aracılık eder (110, 111). Kargo ve importin β olmadığında, IBB domaini, importin α 'nın NLS bağlama bölgesini bloke eder (112, 113). Tek bir kümeden oluşan NLS'ler importin α 'nın 2-4 ARM tekrarları üzerinde bulunan major NLS bağlama bölgesine bağlanır. İki farklı aminoasit kümesinden oluşan NLS'ler ise importin α 'nın 2-4 ARM tekrarları üzerinde bulunan major ve 6-8 ARM tekrarları üzerinde bulunan minör NLS bağlama bölgelerine bağlanır (64, 114, 115). NLS dizilerindeki lizin ve arjinin aminoasitleri tarafından sağlanan pozitif yükler ile importin α üzerindeki triptofan, asparajin ve negatif yüklü aminoasitler arasında gerçekleşen hidrofobik ve elektrostatik etkileşimler aracılığıyla importin α ve kargo proteini arasındaki bağlanma gerçekleşir (91-97). İmportin α 'nın C terminali ise CAS gibi nükleustan sitoplazmaya taşınmada rol oynayan faktörlerin bağlanmasında rol oynar (Şekil 6) (116).



Şekil 6. İmportin α 'nın yapısı (Oka'dan, 115)

2.2.4. NLS Dizilerinin Belirlenmesinde Kullanılan NLS Tahmin Programları

Proteinler, hücredeki diğer proteinlerle etkileşime girerek ve kompleksler oluşturarak fonksiyonlarını yerine getirirler. Bu etkileşimlerin gerçekleştirilmesi için temel yollardan biri, proteinlerin spesifik hücre içi bölgelere hassas ve düzenlenmiş bir şekilde lokalizasyonudur (117). Bazı proteinler, belirli hücre içi bölgelere lokalizasyonlarını destekleyen intrinsik moleküler özelliklere sahiptir. Bu özellikler arasında hidrofobik transmembran domainleri, NLS dizileri ve salgılanmayı destekleyen sinyal dizileri bulunur (118). Hücre içi yerleşimin deneysel olarak belirlenmesi genellikle pahalı ve zaman alıcı bir yaklaşımdır. Bunun yerine; son yıllarda, proteinlerin hücre içi yerleşimlerinin belirlenmesi amacıyla hızlı ve büyük oranda doğru tahminler yapabilen çeşitli biyoinformatik araçlar geliştirilmiştir (119-122). Bu araçlar kullanılarak nükleusa transportta rol alan NLS'lerin (123) belirlenmesi nükleer proteinlerin fonksiyonlarının aydınlatılmasına büyük katkı sağlamaktadır. PSORT II (121), predictNLS (124) ve cNLS Mapper (125) gibi araçlar proteinlerin hücre içi yerleşimini ve NLS dizilerini belirlemede yaygın olarak kullanılan araçlardır (126). Ancak, bu gibi araçlar her zaman doğru sonuçlar vermemekte (126, 127), analiz sonuçlarının deneysel çalışmalar ile de doğrulanmaları gerekmektedir (128).

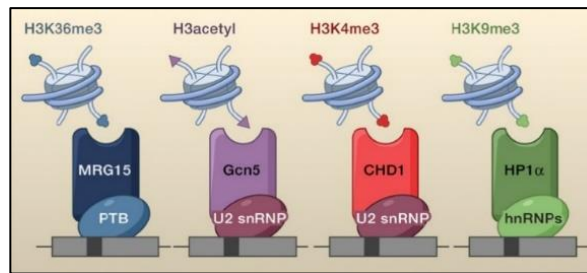
2.3. Splaysing ile İlişkili Proteinlerin Farklı Hücre İçi Süreçlerle İlişkisi

Splaysing; mRNA transkripsiyonu, transport ve translasyon dahil olmak üzere (30), hücre biyolojisinin hemen hemen her yönünü etkileyen dinamik bir süreçtir (5, 6). Bu nedenle, splaysing ve diğer hücre içi süreçler arasındaki ilişki hakkında bilgilerin elde edilmesi hücre farklılaşması, gelişimi ve hastalık mekanizmaları gibi temel biyolojik süreçleri aydınlatmaya katkı sağlayacaktır (30). Birçok splaysing protein farklı hücre içi süreçlerde görev almaktadır (5, 6). Apoptozis ve splaysing ilişkili protein kompleksi bileşenleri olan SAP18 ve RNPS1 birer mekik proteinleridir ve nükleus ile sitoplazma arasında yer değiştirerek birbirlerinin alternatifi olarak splaysingde görev almaktadır (38). PTB ilişkili splaysing faktör PSF'nin ise transkripsiyon, topoizomeraaz aktivitesi, nükleer RNA retansiyonu ve DNA rekombinasyonu gibi süreçlerde rol oynadığı gösterilmiştir (129-135). NEK2, NEK2A ve RNA bağlayıcı protein RBM8A'nın hem splaysing hem de sentrozom ile ilişkili süreçlerde rol oynadığı gösterilmiştir (11, 47, 136-139). Ayrıca, splaysing ile kromatin mekanizmaları arasındaki ilişki hakkındaki çalışmalar her iki hücre içi sürecin birbiri ile etkileşim halinde olduğunu göstermektedir (30, 31).

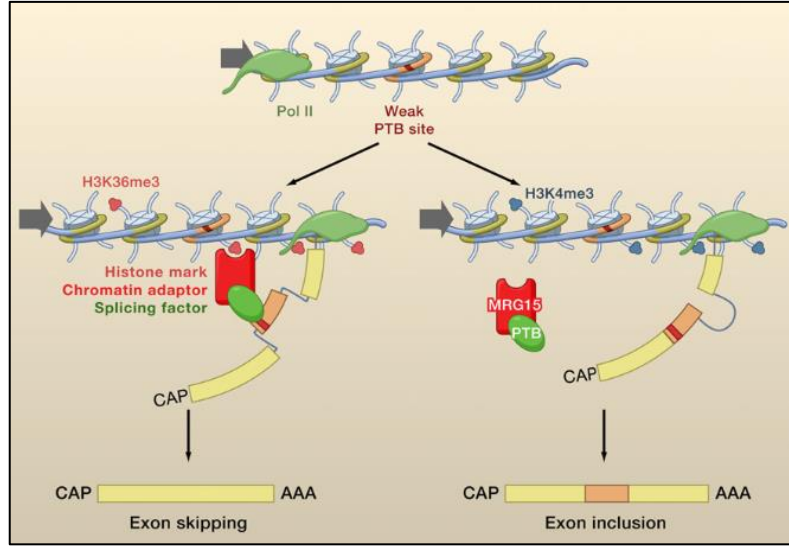
2.3.1. Splaysingin Histon Proteinleri ile İlişkisi

Splaysingde rol oynayan proteinlerin karakterizasyonundaki büyük ilerlemeye rağmen gen regülasyonu ve nükleer organizasyon süreçlerinin splaysing üzerindeki etkisi daha az anlaşılmıştır. Bununla birlikte, mevcut çalışmalar splaysing, transkripsiyon ve kromatin organizasyonunun hücrede birbirleri ile etkileşim halinde olduğunu bildirmektedir (30). Splaysing, kromatin organizasyonu ve transkripsiyonel aktiviteyi etkileyebilen bir mekanizma olmakla birlikte (140, 141), kromatin yapısı da splaysing mekanizmasını etkileyebilmektedir (31). Splaysing sürecinde kesilme yerlerinin belirlenmesinde ve ekzon seçimi ile ilgili kararların verilmesinde kromatinin yapısı belirleyici olabilmektedir (142). Özellikle alternatif splaysing sürecinin düzenlenmesinde kromatin yapısının önemli olabileceği önerilmektedir (143-148).

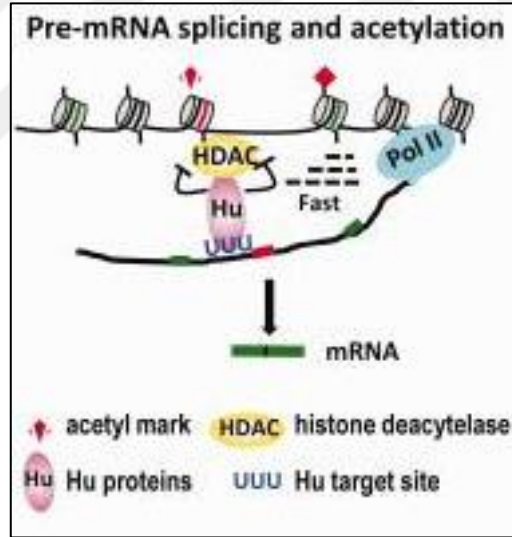
Kromatin çeşitli yollarla splaysing ile etkileşime girebilmektedir. Bu mekanizmaların birincisinde, modifiye edilmiş histonlar ve splaysing faktörleri arasında köprü oluşturabilen adaptör proteinler rol oynamaktadır (148-151). Kromatin ve splayozom kompleksi arasındaki fiziksel etkileşimin belirli bir adaptör molekül ile gerçekleştiğini öneren bu mekanizma “kromatin splaysing adaptör modeli” olarak adlandırılmaktadır. Bu modelde, H3K36me3/MRG15/PTB, H3K4me3/CHD1/U2snRNP, H3asetil/Gcn5/U2snRNP ve H3K9me3/HP1a/hnRNP'ler dahil olmak üzere spesifik histon modifikasyonları, kromatin adaptör proteinleri ve splaysing faktörleri ile oluşturdukları kombinasyonlar ile kesilme yeri seçiminde rol almaktadır (Şekil 7, 8) (152). Kromatin ile splaysing arasındaki ilişkiyi gösteren ikinci mekanizmada; splaysing faktörleri, kromatin yapısını ve transkripsiyonel aktiviteyi etkilemekte (Şekil 9) (153-156), üçüncü mekanizmada ise, RNA polimeraz II'nin (RNAPII) uzama kinetiğini etkileyen histon modifikasyonların splaysingün düzenlenmesini etkileyebileceği bildirilmektedir (Şekil 10) (146, 147, 157-159).



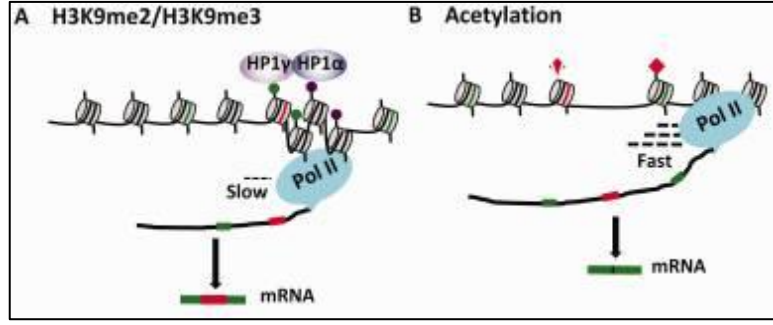
Şekil 7. Kromatin-adaptör kompleksleri (Luco'dan, 152)



Şekil 8. Alternatif splicing kromatin adaptör modeli. Histon modifikasyonları, belirli histon işaretlerini okuyan ve buna bağlı olarak splicing faktörlerini sürece dahil eden bir adaptör proteinin bağlanmasını belirler ve alternatif splicing gerçekleşir (Luco'dan, 152)



Şekil 9. Splicing'in kromatin üzerindeki etkisi. Hedef pre-mRNA bölgelerine bağlanan splicing düzenleyici bir protein olan Hu proteinini, histon deasetilaz'ın enzimatik aktivitesini inhibe eder ve bu durum ilgili kromozomal bölgede lokalize H3 ve H4'ün hiperasetilasyonuna yol açar. Bu bölge boyunca RNAPII'nin uzama oranında ortaya çıkan artış, Hu proteinleri tarafından düzenlenen alternatif ekzonların atlanmasını teşvik eder (Zhou'dan, 160)



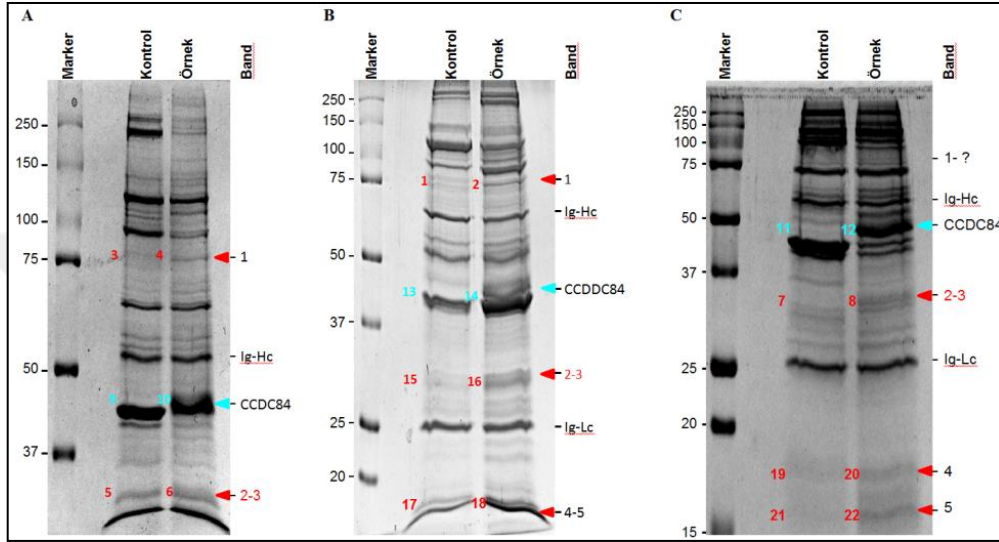
Şekil 10. Histon modifikasyonlarının splicing üzerindeki etkisi. (A) H3K9me2 ve H3K9me3, sırasıyla HP1 α ve HP1 γ tarafından tanınır ve bağlanır. RNAPII, HP1'e bağlı kromozomal bölgede yavaşlar ve bu durum yakındaki bir alternatif ekzonun daha fazla dahil edilmesine yol açar. (B) H3 ve H4'ün hiperasetilasyonu daha rahat bir kromatin yapısına, RNAPII uzama oranının artmasına ve alternatif ekzonların atlanmasına neden olur (Zhou'dan, 160)

2.4. Tez Çalışması Öncesinde Elde Edilen Ön Veriler

Doğum öncesi ve sonrası dönemde görülen gelişme geriliği, mikrosefali ve atipik yüz görünümü ile karakteristik MPD nadir görülen bir kalıtsal hastalık grubudur (161, 162). MPD'nin genetik etiyolojisini aydınlatmaya yönelik olarak grubumuz tarafından yürütülen ve TÜBİTAK tarafından desteklenen 114Z883 no'lu proje kapsamında, MPD tanısı konulan bir hastanın ailesi üzerinden gerçekleştirdiğimiz genetik haritalama çalışmaları sonucu hastalığın, CCDC84 geni üzerinde dokuzuncu intronun splay bölgesinde meydana gelen dört nükleotitlik homozigot bir delesyona (g.17185_17188delAAGT) bağlı olarak ortaya çıktığı gösterilmiştir. Gerçekleştirilen tüm bu çalışmalar sonucu, hasta bireyde görülen g.17185_17188delAAGT mutasyonunun proteinde açık okuma çerçevesinde kaymaya neden olduğu ve CCDC84'ün dokuzuncu intronundan dokuzuncu ekzonuna 60 nükleotitlik gen bölgesinin ilave edilerek protein sentezinin erken sonlanmasına (p.Lys269Serfs10Stop) yol açtığı belirlenmiştir.

CCDC84'ün fonksiyonunu tanımlamaya yönelik grubumuz tarafından yürütülen AP (Resim 1) ve MS çalışmaları ile H2A1A ve H2A1H histon proteinleri ile etkileşim içerisinde olabileceği ön verilerine ulaşıldı (Tablo 1). Ayrıca, anabilim dalımızda gerçekleştirilen bir doktora tezi çalışmasında CCDC84'ün splicing ile ilişkili nükleer bir protein olduğu gösterilmiştir (33). Gerçekleştirilen *in silico* analizler, CCDC84 üzerinde 18-50. aa'ler arasında kalan 33 aminoasitlik bölgenin CCDC84'ün nükleusa transportunda rol alan bir NLS dizisi olabileceğini gösterdi. Literatürde CCDC84'ün splicing mekanizmasında rol aldığı yönündeki verilerden farklı olarak sentrozomal proteinlerle de ilişkili olabileceğini

gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalarda, CCDC84'ün asetilasyona bağlı bir şekilde sentrozom duplikasyonu ile ilişkili protein HsSAS-6'nın bozulmasını modüle ederek sentriol sayısını sınırladığı (163) ve GFP etiketli pericentriolar material 1 proteinin yem olarak kullanıldığı MS bazlı çalışmalar sonucu CCDC84'ün potansiyel bir sentrozom bileşeni olduğu bildirilmektedir (164).



Resim 1. İmmünopresipitasyon sonucu elde edilen proteinlerin SDS-PAGE ile analizi. A) %7.5, B) %10 ve C) %15'lik jel fotoğraflarıdır. Kontrol olarak ifade edilen sütun; CCDC84'ün kalıcı transfekte edilmediği HEK293 Flp-In hücrelerden izole edilen proteinleri, örnek olarak ifade edilen sütun ise, FLAG etiketi taşıyan CCDC84'ün kalıcı olarak transfeksiyonunun yapıldığı hücrelerden izole edilen proteinleri göstermektedir. Mevcut jel fotoğraflarının sağ taraflarındaki oklar, MS yöntemiyle analizlerinin gerçekleştirilmesi için seçilmiş bantları işaret etmektedir. Mavi renkle boyalı oklar CCDC84 proteinini, kırmızı renkle boyalı oklar CCDC84 ile etkileştiği tahmin edilen protein bantlarını işaret etmektedir. MS analizi için jelden kesilen bantlar, 1-22 arası numaralandırılmış ve jelde işaretlenmiştir. IgHc; immünglobulin ağır zincir, IgLc; immünglobulin hafif zinciri göstermektedir. Markır olarak precision plus protein dual color standards kullanılmıştır

FLAG etiketi taşıyan CCDC84 proteini ile gerçekleştirilen AP ve ardından yapılan SDS-PAGE metodu sonucu kesilip MALDI-TOF/TOF kütle analizine gönderilen protein bantlarında tanımlanan proteinlerden “expect” skoru düşük, “best protein score”u yüksek olan proteinlerin CCDC84 ile etkileşim içinde olma ihtimalinin yüksek olabileceği değerlendirildi (Tablo 1). Jel görüntüsünde yer alan örnek sütunundaki bantlara karşılık kontrol sütununda da bant görülmesi halinde; bu durum spesifik olmayan etkileşimleri gösterdiğinden dolayı dikkate alınmadı.

Tablo 1. MALDI-TOF/TOF kütle analizinde elde edilen sonuçlar

BAND ID	Best Protein	Best Protein Mass	Best Protein Score	Expect	Best Protein Description
1	KIF11	119085	101	1,60E-06	Kinesin-like protein KIF11
2	PRPF3	77481	166	5,10E-13	U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein Prp3
2	ACTB	41710	91	1,70E-05	Actin, cytoplasmic 1
3	ACTB	41710	74	0,00081	Actin, cytoplasmic 1
3	ACTG	41766	74	0,00081	Actin, cytoplasmic 2
4	PRPF3	77481	202	1,30E-16	U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein Prp3
5	EFHD2	26680	99	2,40E-06	EF-hand domain-containing protein D2
5	CAPZB	31331	60	0,018	F-actin-capping protein subunit beta
6	RS3A	29926	43	1	40S ribosomal protein S3a
7	EFHD2	26680	127	4,00E-09	EF-hand domain-containing protein D2
7	CAPZB	31331	103	1,00E-06	F-actin-capping protein subunit beta
8	RS3A	29926	100	2,30E-06	40S ribosomal protein S3a
8	ROA1	38723	80	0,0002	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1
9	ACTB	41710	433		Actin, cytoplasmic 1
9	ACTG	41766	433	1,00E-39	Actin, cytoplasmic 2
10	CCDC84	37950	449	2,60E-41	Coiled-coil domain-containing protein 84
10	ACTB	41710	88	3,10E-05	Actin, cytoplasmic 1
11	ACTB	41710	357	4,00E-32	Actin, cytoplasmic 1
11	ACTG	41766	357	4,00E-32	Actin, cytoplasmic 2
12	CCDC84	37950	359	2,60E-32	Coiled-coil domain-containing protein 84
13	ACTB	41710	138	3,20E-10	Actin, cytoplasmic 1
13	ACTG	41766	138	3,20E-10	Actin, cytoplasmic 2
14	CCDC84	37950	493	1,00E-45	Coiled-coil domain-containing protein 84
15	THOC4	26872	72	0,0013	THO complex subunit 4
16	EFHD2	26680	109	2,60E-07	EF-hand domain-containing protein D2
16	CAPZB	31331	71	0,0015	F-actin-capping protein subunit beta
17	RS18	17708	159	2,60E-12	40S ribosomal protein S18
17	H2AX	15135	64	0,0083	Histone H2A.x
18	RS16	16435	131	1,60E-09	40S ribosomal protein
18	RS18	17708	87	4,40E-05	40S ribosomal protein S18
19	RS18	17708	232	1,30E-19	40S ribosomal protein S18
19	ML12A	19781	63	0,01	Myosin regulatory light chain 12A
20	RS18	17708	227	4,00E-19	40S ribosomal protein S18
21	MYL6	16919	152	1,30E-11	Myosin light polypeptide 6
21	H2AZ	13545	69	0,0027	Histone H2A.Z
22	H2A1A	14225	152	1,30E-11	Histone H2A type 1-A (UniProtKB-Q96QV6)
22	H2A1H	13898	152	1,30E-11	Histone H2A type 1-H (UniProtKB-Q96KK5)

Kontrol renkli olmayan satırlar ile; FLAG etiket taşıyan CCDC84 ile presipite edilen proteinlerden elde edilen bantlar ise sarı renkli satırlar ile gösterilmiştir. Mavi renk ile yazılı proteinler rezinlere bağlanan CCDC84'ü belirtmektedir. Kahverengi renk ile yazılı proteinler FLAG etiketi taşıyan CCDC84 ile presipite edilen fakat kontrol bantlarında da tespit edilen proteinleri göstermektedir. Kırmızı renk ile yazılı proteinler ise FLAG etiketi taşıyan CCDC84 ile presipite edilen fakat kontrol bantlarında olmayıp CCDC84 ile etkileştiğini tahmin ettiğimiz proteinleri göstermektedir.

AP ve MS çalışmaları ile CCDC84 ile etkileştiği yönünde ön veriye ulaştığımız proteinlerden H2A1A ve H2A1H histon proteinleri *HIST1H2AA* ve *HIST1H2AH* genleri tarafından kodlanmaktadır (165, 166). Bu tez çalışması ile splysing ile ilişkilendirilmiş olan

CCDC84'ün NLS dizisinin belirlenmesi ve histon proteinleri H2A1A ve H2A1H ile arasındaki olası etkileşimlerin doğrulanması amaçlandı. Bu sayede, CCDC84'ün karakterizasyonu sürecine katkı sağlanırken, CCDC84'ün NLS dizisinin karakterizasyonu ve splaysing ile kromatin arasında yeni bir etkileşimin ortaya çıkartılması hedeflendi.



3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Kimyasallar

Agar	Merck, 1.016.130.500
Agaroz	Lonza, 50004
Akrilamid	Bio-Rad, 161-0146
Amonyum persülfat	Sigma, A9164
Ampisilin	Sigma, A9518-5G
Beta merkaptotanol	Merck, 8.057440.0250
Bromofenol mavisi	Merck, 1.08122.005
Coomassie brilliant blue R-250	Sigma, 112553
Deoksinükleotid trifosfat	Promega, U1420
Dithiothreitol	Thermo scientific, R0861
Di-sodyum hidrojen fosfat dihidrat	Merck, M1065801000
Dulbecco's modified eagle's medium	Thermo, 41965-039
EDTA disodyum dihidrat	AppliChem, A2937.0500
Etanol	AppliChem, A 8075,1000
Etidyum bromür	Sigma, E-7637
Fetal bovin serum	Gibco, 10500064
Glasiyel asetik asit	Merck, 1.00056.2500
Glisin	Chemcruz, sc-29096
HEPES	Sigma, H0887
Hidroklorik asit	Merck, 1.00314.2500
İzopropanol	Applichem, A3928,0500PE
Kalsiyum klorür	Merck, 910TA654681
Kanamisin	Sigma, 60615-5G
Maya özütü	Merck, VM445253 224
Orange G	Sigma, O-1625
Paraformaldehit	Sigma, P6148
Penisilin/streptomisin	Thermo, 15140-122
PMSF	Sigma, 1741932998611
Potasyum fosfat monobazik	Sigma, NIST200B

Prolong GOLD antifade mounting media DAPI	Thermo Fisher, P36935
Proteinaz K	Promega, V3021
Sephadex G-50	Sigma, S5897-25G
Sigmafast proteaz inhibitör kokteyl tableti	Sigma, S8830
Sodyum deoksikolat	Santa Cruz, sc-280670
Sodyum dodesil sülfat	Merck, 822050
Sodyum florür	Sigma, S7920
Sodyum hidroksit	Merck, 1.06462
Sodyum karbonat	Merck, 106392
Sodyum klorür	Merck, 1.01540.0500
Sodyum orthovanadate	Sigma, S6508
Sodyum pyrophosphate	Sigma, P8010
TEMED	AppliChem, A1148
Tripton	Biomatik, A8566-500G
Tris baz	Sigma, T6791
Tris HCl	Sigma, 93363
Triton X-100	Sigma, 9002-93-1
Tween 20	J. T. Baker, 73-74

3.1.2. Antikorlar

3.1.2.1. Primer Antikorlar

Mouse-anti-FLAG M2 monoklonal	Sigma-Aldrich, F3165-1MG
Mouse-anti-myc monoklonal	Santa Cruz (9E10), sc-40
Mouse-anti-pericentrin monoklonal	Abcam, ab28144
Rabbit-anti- α tubulin poliklonal	Abcam, ab15246
Rabbit-anti-CCDC84 poliklonal	Abcam, ab150860
Rabbit-anti-GST poliklonal	Santa Cruz, sc-459

3.1.2.2. Sekonder Antikorlar

Anti-mouse-alexa flour 488	Abcam, ab150117
Anti-mouse-HRP	Bio-Rad, 170-5047
Anti-rabbit-alexa fluor 488	Abcam, ab150061
Anti-rabbit-Cy3	Abcam, ab6939
Anti-rabbit-HRP	Bio-Rad, 170-5045

3.1.3. Rezinler

Anti-FLAG M2 affinity gel

Sigma, A2220

GST-Trap_A agaroz

Chromotek, sta-20

Mouse IgG agaroz

Sigma, A0919

3.1.4. Kitler, Enzimler ve Markırlar

BigDye terminator v3.1 cycle sequencing kit

Thermo, 4337455

Clarity western ECL substrate

BIORAD, 1705060

Dreamfect gold transfection reagent

Ozbiosciences, DG81000

E.Z.N.A. endo-free plasmid DNA mini kit I

Omegabiotek, D6948-01

E.Z.N.A. plasmid DNA mini kit I

Omegabiotek, D6943-01

Gateway BP klonaz II enzim karışımı

Thermo, 11789-020

Gateway LR klonaz II enzim karışımı

Thermo, 11791-100

Generuler 100 bp plus DNA ladder

Thermo, SM0321

PCR clean-up gel extraction kit

Macherey-Nagel, 740609.50

Precision plus protein dual color standards

BIORAD, 1610374

Thermo phusion hot start taq polimeraz

Thermo, F-549L

3.1.5. Sarf Malzemeler

Falkon tüpler (15 ve 50 mL)

Isolab, Fransa

Kültür flaskı (25 ve 75 cm²)

Corning, ABD

Mikrosantrifüj tüpler (1.5 mL)

Eppendorf, Almanya

Pipet uçları

Axygene, ABD

PVDF membran

BIORAD, 1620177

Serolojik pipetler (5, 10 ve 25 mL)

SPL, Güney Kore

Steril pastör pipeti

Isolab, Fransa

Whatmann kağıdı 3MM

GE-Healthcares, 3030-861

6 kuyucuklu tabak

Corning, ABD

100 mm petri kabı

Corning, ABD

3.1.6. Cihazlar

Accuri C6 flow sitometri

Becton Dickinson, ABD

Bulaşık makinesi

Bosch, Almanya

Buzdolabı (+4 °C)

Bosch, Almanya

Buz makinası	Hoshizaki, Japonya
ChemiDoc MP görüntüleme sistemi	BIO-RAD, ABD
CO ₂ 'li etüv	Heraeus, Almanya
Çalkalayıcı inkübatör	GFL, Almanya
Derin dondurucular (-20 °C)	Bosch, Almanya
Dikey elektroforez ve immüno blot sistemi	BIORAD, ABD
Distile su cihazı	GFL, Almanya
Doğru akım güç kaynağı (300 volt)	BIORAD, ABD
Genetik analizör cihazı	ABI 3130, ABD
Hassas terazi	AHAUS, ABD
İnverted mikroskop	Nikon, Japonya
Jel görüntüleme sistemi	Gel Logic 2000, Kodak
Klas II steril kabinler	Metisafe, Türkiye
Konfokal mikroskop	Leica TCS SP8, Almanya
Manyetik karıştırıcı	IKA, ABD
Merdaneli karıştırıcı	Stuart, İngiltere
Mikrodalga fırın	Arçelik MD554, Türkiye
Mikrosantrifüj	Hettich, Almanya
Mikrosantrifüj	Thermo IEC, ABD
Nanodrop 2000 UV-vis spektrofotometre	Thermo, ABD
Orbital karıştırıcı	Nüve SL 350, Türkiye
Otoklav	Tutnauer 3150 ELV, İtalya
Pastör fırını	Memmert, Almanya
pH metre	Hanna, Portekiz
Sıcak su banyosu	Stuart, İngiltere
Sıvı azot tankı	Thermo Scientific, ABD
Soğutmalı yüksek devirli santrifüj	Eppendorf 5804R
Sonikatör	Sonics VCX500, ABD
Spektrofotometre	Eppendorf, Almanya
Termomikser	Eppendorf, Almanya
Thermal cycler	Gene Amp 9700, ABD
Thermal cycler	Techne TC512, İngiltere
Vakum pompası	Isolab, Fransa

Vorteks	IKA, ABD
Yatay elektroforez düzeneği	HU13, İngiltere
Yüksek devirli santrifüj	Eppendorf 5810, Almanya
Zaman ve hız ayarlı rotator	Stuart, İngiltere
-80 °C dondurucu	Thermo Scientific, ABD

3.1.7. Bakteri Suşları

Tez çalışmasında *E. coli*'ye ait farklı suşlar kullanılarak plazmidlerin bakterilere transformasyonu gerçekleştirildi. İlgili genin homolog rekombinasyona dayalı gateway klonlama sistemi kullanılarak klonlanması ile oluşturulan vektörlerin çoğaltılmasında *E. coli DH5α* suşu kullanılırken, herhangi bir gen klonlanmamış ve yapısında *ccdB* geni taşıyan plazmidlerin çoğaltılmasında *ccdB* genine dirençli *E. coli DB3.1* suşu kullanıldı (Tablo 2) (167).

Tablo 2. Transformasyon için kullanılan bakteri suşları ve genotipleri

Bakteri Suşu	Genotip
<i>DH5α</i>	F- recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+) supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1
<i>DB3.1</i>	F- gyrA462 endA1 Δ(sr1-recA) mcrB mrr hsdS20(rB-, mB-) supE44 ara14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(Smr) xyl5 Δleu mtl1

3.1.8. Kullanılan Vektörler

Homolog rekombinasyona dayalı gateway klonlama sistemi kullanılarak giriş vektörleri oluşturmak için pDONR201 vektörü, memeli ekspresyon vektörleri oluşturmak için pDEST27-GST, p3xFLAG-CMV/DEST ve pcDNA3myc/DEST destination vektörleri kullanıldı.

3.1.9. Solüsyon, Tampon ve Besiyerleri

3.1.9.1. Bakteri Kültürleri İçin Kullanılan Besiyerleri

Luria Bertani (LB) Sıvı Besiyeri

10 g tripton, 5 g maya özütü ve 10 g sodyum klorür 800 mL deiyonize distile su içerisinde çözüldü. Solüsyonun pH'sı 1N NaOH ile 7.0'a ayarlandı ve hacim 1 L'ye tamamlandı. Ardından 1.2 atm basınçta, 121 °C'de 20 dakika otoklav yapılarak steril edildi ve soğumaya bırakıldı (168).

Luria Bertani Agar (LBA) Besiyeri

LB agar besiyeri, erlenmayerde LB sıvı besiyeri içerisine %1.5 oranında agar ilave edilerek hazırlandı (169). LB agar besiyeri 1.2 atm basınçta, 121 °C’de 20 dakika otoklav yapılarak steril edildi ve soğumaya bırakıldı. Soğuyan LB agar besiyerin kullanımı için mikrodalga fırında defrost ayarda ısıtılarak sıvı hale gelmesi sağlandı ve kaynar haldeki LB agar besiyerinin 50-55 °C’ye soğutulması sağlandı. Çoğaltılacak vektörün taşıdığı antibiyotik direnç genine göre 50-55 °C’ye soğutulmuş LB agar besiyerine 100 µg/mL ampisilin veya 50 µg/mL kanamisin eklendi ve belirli büyüklükteki petri kaplarına aktararak donması sağlandı.

3.1.9.2. Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan özeltiler

50X Tris-Asetat-EDTA (TAE) Tamponu

242 g tris baz 700 mL deiyonize distile su içerisinde çözüldü. Çözelti üzerine 57.1 mL %100 glasiyal asetik asit ve 100 mL 0.5 M EDTA özeltisi (pH: 8.0) dikkatli bir şekilde eklendi. Çözeltinin pH’sı 8.5’e ayarlandı ve son hacmi 1 L’ye tamamlandı. Çalışma solüsyonu deiyonize su ile 1:50 oranında seyreltilerek kullanıldı. Stok solüsyon ve çalışma solüsyonu oda sıcaklığında saklandı.

Etidyum Bromür Solüsyonu

Toz haldeki etidyum bromürden deiyonize distile su kullanılarak konsantrasyonu 10 mg/mL olacak şekilde etidyum bromür solüsyonu hazırlandı. Işıktan korunması için karanlık bir ortamda muhafaza edildi.

10X Orange G DNA Yükleme Tamponu

20 g süktroz 40 mL deiyonize distile su içerisinde çözüldü. 100 mg orange G ilave edilerek solüsyon deiyonize distile su ile 50 mL’ye tamamlandı.

3.1.9.3. SDS-PAGE Solüsyonları

Ayırma Jel Tamponu, 1.5 M Tris HCl (pH: 8.8)

36.33 g tris 180 mL deiyonize su içinde çözüldü, 12 N HCl ile solüsyonun pH’sı 8.8’e ayarlandı. Son hacmi 200 mL olacak şekilde deiyonize su ilave edildi. Ardından 0.2 µm filtreden geçirildi ve kullanılmak üzere oda sıcaklığında muhafaza edildi.

Yükleme Jel Tamponu, 0.5 M Tris HCl (pH: 6.8)

6.057 g tris 90 mL deiyonize distile su içinde çözöldü, 12 N HCl ile solösyonunun pH'sı 6.8'e ayarlandı. Son hacmi 200 mL olacak şekilde deiyonize su ilave edildi. Ardından 0.2 µm filtreden geçirildi ve kullanılmak üzere oda sıcaklığında muhafaza edildi.

%10 Sodyum Dodesil Sulfat (SDS)

10 g SDS 100 mL deiyonize distile su içinde çözöldü ve kullanılmak üzere oda sıcaklığında muhafaza edildi.

10X Tris Glisin Tamponu

30.3 g tris baz ve 144 g glisin 1 L deiyonize su içinde çözöldü ve kullanılmak üzere oda sıcaklığında muhafaza edildi.

SDS-PAGE Yürütme Tamponu (1X)

100 mL 10X tris glisin tamponu üzerine 890 mL deiyonize su ve 10 mL %10'luk SDS ilave edilerek hazırlandı.

%10 Amonyum Persölfat (APS)

1 mL deiyonize su üzerine 100 mg APS eklendi ve hafif vorteks ile APS'nin çözölməsi sağılandı. Hazırlanan %10'luk APS çözeltisi +4 °C'de saklandı. Her çalışma öncesi %10'luk APS çözeltisi taze olarak hazırlandı.

5X SDS-PAGE Yükleme Tamponu

Final konsantrasyonları 0.25 M tris-CI (pH: 6.8), %10 SDS, %50 gliserol, %0.01 bromofenol mavisi olacak şekilde solusyon 10 mL'de hazırlandı ve -20 °C'de saklandı. Solösyonun kullanımından önce son konsantrasyonu 0.5 M olacak şekilde DTT ilave edildi.

3.1.9.4. Western Blot Solösyonları

SDS-PAGE Transfer Tamponu (10X)

100 mL 10X tris glisin tamponunun üzerine 800 mL distile su ilave edildi. 900 mL solösyonun üzerine 100 mL metanol ilave edilerek 1X olacak şekilde 1 L hazırlandı.

%20 Tween 20

20 mL stok tween 20, 80 mL deiyonize su içinde çözöldü ve homojen haldeki %20 tween 20 solösyonu +4 °C'de muhafaza edildi.

10X PBS Stoğu

1.37 M NaCl, 26.8 mM KCl, 0.1 M Na₂HPO₄, 17.6 mM KH₂PO₄ 800 mL distile su içerisinde hazırlandı. Ardından solüsyonun pH'sı 1 N HCl ile 7.4'e ayarlandı. Son hacim deiyonize su ile 1 L'ye tamamlandı.

10X TBS Stoğu

24 g Tris HCl, 5.6 g tris baz, 88 g NaCl 800 mL distile su içerisinde hazırlandı. Solüsyonun pH'sı 12 N HCl ile 7.6'ya ayarlandı. Son hacim deiyonize su ile 1 L'ye tamamlandı.

1X TBS-Tween 20 (TBST)

10X TBS'den 50 mL alınarak 450 mL deiyonize su ile 1X TBS hazırlandıktan sonra, son konsantrasyon %0.05 olacak şekilde %20'lik tween 20 solüsyonundan 1.25 mL eklendi ve oda sıcaklığında saklandı.

3.1.9.5. İmmünopresipitasyonda Kullanılan Solüsyonlar

1 M Tris HCl (pH: 7.2)

24.22 g tris baz 180 mL deiyonize distile suda çözüldü. Solüsyonun pH'sı 12 N HCl ile 7.2'ye ayarlandı ve son hacim 200 mL olacak şekilde deiyonize su eklendi. Solüsyon otoklav yapılarak oda sıcaklığında muhafaza edildi.

5 M NaCl

58.44 g NaCl üzerine 200 mL deiyonize su eklenerek çözülmesi sağlandı ve otoklav yapılarak oda sıcaklığında saklandı.

0.5 M Na₂EDTA (pH: 8.0)

16.81 g Na₂EDTA 60 mL deiyonize su içinde çözüldü. Solüsyonun pH'sı 10 M'lık NaOH ile 8'e ayarlandı. Deiyonize su eklenerek son hacim 100 mL'ye tamamlandı ve otoklav yapılarak oda sıcaklığında saklandı.

%20 Triton X-100

2 mL triton X-100, 8 mL deiyonize su içinde çözüldü ve homojen hale gelmesi için 37 °C su banyosunda bekletildi. Tamamen çözüldükten sonra +4 °C'de saklandı.

100X Sodyum Orthovanadate (NaVan) 200 mM

3.68 g Na_3VO_4 , 90 mL steril deiyonize distile su içinde çözöldü. 1 N NaOH ile pH 10.0'a ayarlandı. Sarı renge dönuşen solüsyon renksiz olana kadar kaynatıldı. Ardından oda sıcaklığına gelene kadar soğutuldu ve pH'sı tekrar kontrol edilerek 10.0'a ayarlandı. Deiyonize su ile 100 mL'ye tamamlandı ve alikotlanarak -20 °C'de saklandı. Liziz tamponu içinde çalışma konsantrasyonu 2 mM olacak şekilde 1X final konsantrasyona seyreltildi.

50X Sodyum Florür (NaF) 1 M

4.2 g NaF, 100 mL steril deiyonize distile su içinde çözöldü. Solüsyon alikotlanarak -20 °C'de saklandı. Çalışma konsantrasyonu 20 mM olacak şekilde liziz tamponu içinde 1X final konsantrasyona seyreltildi.

20X Sodyum PyroPhosphate (NaPPi) 100 mM

4.44 g NaPPi 100 mL steril deiyonize distile su içinde çözöldü ve +4 °C'de saklandı. Liziz tamponu içinde çalışma konsantrasyonu 5 mM olacak şekilde 1X final konsantrasyona seyreltildi.

100X PMSF 100 mM

0.174 g PMSF, 10 mL etanol içinde sulandırıldı. Solüsyon alikotlanarak -20 °C'de saklandı. Liziz tamponu içinde çalışma konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde 1X final konsantrasyona seyreltildi.

10X Proteaz İnhibitör Kokteyli

Bir adet proteaz inhibitör kokteyl tableti 10 mL steril deiyonize distile suda çözöldü ve -20 °C'de saklandı. Lizis bufferda çalışma konsantrasyonu 1X olacak şekilde seyreltildi.

1X TNTE Hücre Patlatma Tamponu

TNTE hücre patlatma tamponu 50 mM tris-Cl (pH: 7.4), 150 mM sodyum klorür, %0.5 triton X-100, 1 mM EDTA (pH: 7.0), 5 mM NaPPi, 1X PI, %10 gliserol, 2 mM NaVan, 20 mM NaF, 1 mM PMSF konsantrasyonlarda olacak şekilde solüsyonlar eklenerek ve ddH₂O ile hacmi 10 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

1X İmmünopresipitasyon Yıkama Tamponu

Son konsantrasyonları 50 mM tris-Cl (pH: 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA (pH: 8.0), %0.1 triton X-100 olacak şekilde ddH₂O ile hazırlandı.

0.2 M Glisin-HCl (pH: 2.5)

1.5 g glisin, 60 mL deiyonize distile su içerisinde çözündü ve 12 N HCl ile pH'sı 2.5'e ayarlandı. Steril ddH₂O ile son hacim 100 mL'ye tamamlandı. Ardından otoklav yapılarak sterilize edildi.

3.1.9.6. İmmüno Floresanda Kullanılan Solüsyonlar

%4 Paraformaldehit (PFA)

2 g paraformaldehit, 40 mL PBS içerisinde 60 °C'de ısıtılarak çözündü ve 1 N HCl ile pH'sı 7.2'ye ayarlandı. Deiyonize su ile son hacim 50 mL'ye tamamlandı. Ardından solüsyon 0.45 µm'lik filtreden geçirildi ve sterilize edildi.

İmmüno Floresan Bloklama Solüsyonu

Ticari olarak satın alınan 1 mL keçi serumu 9 mL 1X PBS üzerine eklenerek %10'luk bloklama solüsyonu hazırlandı.

İmmüno Floresan Permeabilizasyon Solüsyonu (%0.2 Triton X-100)

100 µL %20 triton X-100, 1X PBS ile 10 mL'ye tamamlanarak %0.2'lik triton X-100 solüsyonu hazırlandı.

3.1.9.7. Memeli Hücre Kültüründe Kullanılan Solüsyonlar

%10 FBS-DMEM-Penisillin/Streptomisin Besiyeri

90 mL DMEM besiyerine 10 mL FBS ve %1 pen/strep (100 U/mL penisillin-100 U/mL streptomisin) eklenerek hazırlandı.

3.1.9.8. Transfeksiyon Solüsyonları

2X HEPES

0.8 g NaCl, 0.027 g Na₂HPO₄.2H₂O ve 1.2 g HEPES 90 mL deiyonize distile su içinde çözündü. Solüsyonun pH'sı 0.5 N NaOH ile 7.05'e ayarlandı ve son hacim deiyonize distile su ile 100 mL'ye tamamlandı. Solüsyon 0.22 µm'lik filtreden geçirilerek steril edildi ve 15 mL'lik falkonlara dağıtılarak -20 °C'de saklandı.

2.5 M CaCl₂

36.75 g CaCl₂, 100 mL steril deiyonize distile suda çözöldükten sonra 0.22 µm'lik filtre ile steril edildi ve 15 mL'lik tüplere dağıtılarak -20 °C'de saklandı.

3.2. Yöntem

3.2.1. *In Silico* Analiz ile CCDC84 Üzerindeki Olası NLS Dizilerinin Belirlenmesi

Proteinlerin nükleusa taşınmasına aracılık eden NLS dizileri arjinin ve lizin bazik aminoasitleri bakımından zengin dizileridir (19, 90). NLS dizilerindeki lizin ve arjinin aminoasitleri tarafından sağlanan pozitif yükler ile importin α üzerindeki triptofan, asparajin ve negatif yüklü aminoasitler arasında gerçekleşen hidrofobik ve elektrostatik etkileşimler aracılığıyla importin α ve kargo proteini arasındaki bağlanma gerçekleşir (91-97). Proteinlerin fonksiyonlarının aydınlatılması kapsamında, proteinlerin hücre içi yerleşimlerinin ve etkileştiği proteinlerin belirlenmesi, fonksiyonel dizilerinin (motiflerin veya domainlerin) tanımlanması büyük önem taşımaktadır (170-175). Proteinlerin üzerindeki bu tarz fonksiyonel bölgelerin tanımlanması, proteinlerin fonksiyonlarının ve çalışma mekanizmalarının anlaşılması ve bu bölgeleri etkileyen genetik değişikliklerin anlamlandırılması sürecinde kritik veriler sağlamaktadır.

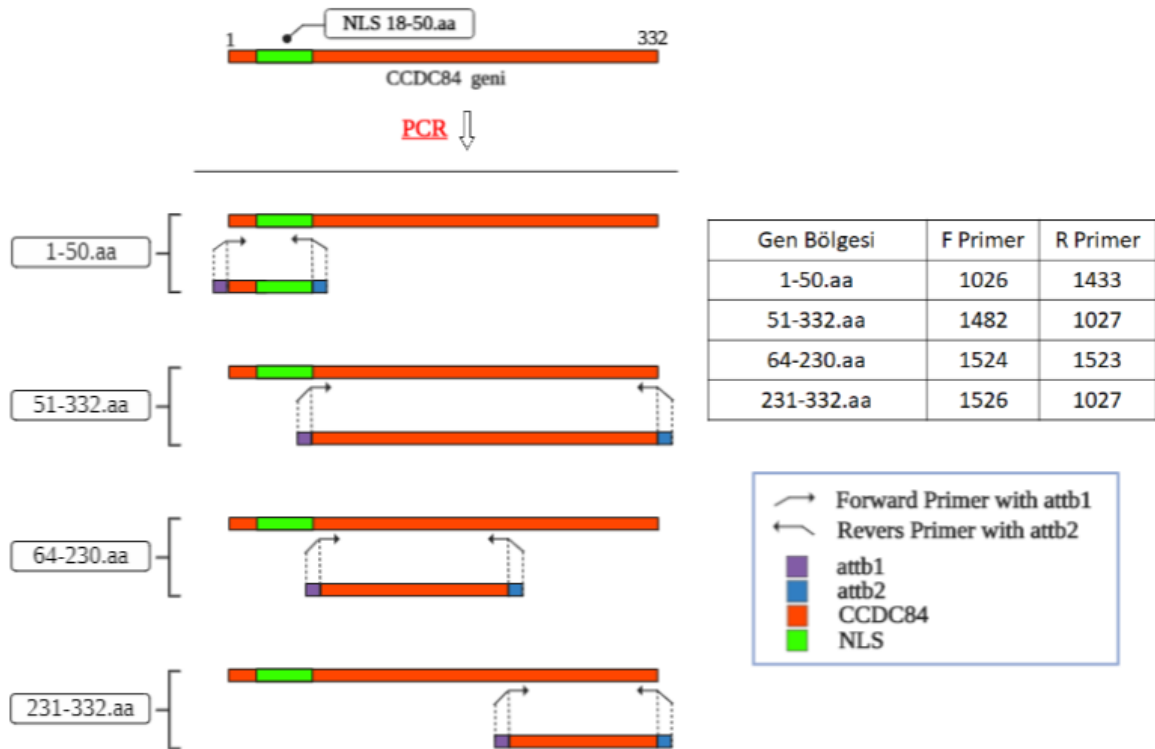
Tez çalışması kapsamında CCDC84'ün olası NLS dizisi, *in silico* NLS dizilerini tahmin eden cNLS Mapper adlı program aracılığı ile araştırıldı. cNLS Mapper programı, seçilen cut-off skoruna eşit veya daha yüksek bir skora sahip olası NLS dizilerini göstermektedir. Skor değerinin yüksek olması daha güçlü NLS özelliğini gösterir. Programın verdiği NLS dizisine ait sekiz, dokuz ve on skorları proteinin sadece nükleusa lokalize olabileceğini; yedi ve sekiz skorları nükleusa lokalize olmakla birlikte çok az bir miktar sitoplazmada da görülebileceğini; üç, dört ve beş skorları hem nükleusta hemde sitoplazmada eşit bir şekilde lokalize olabileceğini; bir ve iki skorları ise sadece sitoplazmada lokalize olabileceğini göstermektedir (176).

Yapılan *in silico* analiz, CCDC84 üzerinde 18-50. aa'ler arasında kalan 33 aminoasitlik bölgenin NLS dizisi olabileceğini gösterirken bu durumu deneysel olarak doğrulayan veri literatürde bulunmamaktadır. Belirlenen tahmini NLS dizisi içeren gen bölgesi ve NLS dizisi içermeyen gen bölgeleri ilgili primerler ile klonlandı. Bu gen bölgelerinin GST etiketi taşıyan ekspresyon vektörlerine klonlanması faj lambdanın att sekansları üzerinden faja özgü enzimler ile gerçekleştirdiği homolog rekombinasyona dayalı gateway klonlama sistemi kullanılarak gerçekleştirildi. Ardından NLS içeren bölge üzerindeki kritik “arjinin” ve “lizin” aminoasitlerinin “alanin” aminoasitlerine değişimleri gerçekleştirilerek mutasyonlar oluşturdu ve mutant NLS içeren bu gen bölgeleri NLS dizisi içermeyen CCDC84'ün 51-332. aa'ler arasında kalan gen bölgesi ile birleştirildi. Elde edilen

NLS dizisi bakımından mutant *CCDC84* genlerinin GST etiketi taşıyan ekspresyon vektörlerine klonlanması faj lambdanın att sekansları üzerinden faja özgü enzimler ile gerçekleştirdiği homolog rekombinasyona dayalı gateway klonlama sistemi kullanılarak gerçekleştirildi (177).

3.2.1.1. *CCDC84*'ün Olası NLS Dizisinin Belirlenmesi

CCDC84'ün olası NLS dizisinin sınırlarının belirlenmesi amaçlandı. *CCDC84*'ün NLS dizisinin belirlenmesinde cNLS Mapper programının göstermiş olduğu 18-50. aa'ler arasındaki bölgenin ve bu gen bölgesinin dışında kalan bölgelerin PCR ile çoğaltılmasında kalıp DNA olarak Anabilim Dalımızda yürütülen TÜBİTAK projesi kapsamında klonlanan *CCDC84*'e ait entry vektör (Ent32) kullanıldı. Bu gen bölgelerinin PCR ile çoğaltılması için PCR reaksiyonunda 5' uçlarında sırası ile attB1 ve attB2 klonlama dizileri bulunan ve genlerin sınırlarını belirleyen spesifik ileri ve geri amplifikasyon primerleri dizayn edildi (Tablo 3) ve ilgili primerler ile PCR reaksiyonu gerçekleştirilerek gen bölgeleri amplifiye edildi (Resim 2).



Resim 2. Olası NLS dizisinin yer aldığı bölgenin belirlenmesi

Tablo 3. NLS dizisinin belirlenmesinde kullanılan attB kuyruklu primerler

Primer No	Primer Dizisi (5'-3')	Primer Adı
976	tcgcgtaacgctagcatggatctc	pDONR201_F
1026	ggggacaagtttgataaaaaagcaggcttc ATG GCGCGCGGCGCAGCGCTGCCCTC	CCDC84_GW_attB1
1027	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtctc ttt GCTTTTCTGTATGTGACTGCT TCTTC	CCDC84_GW_attB2_ws
1433	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtc tca GCGCGGATGGCCTTGCGGGC	CCDC84NLS_D_R1
1482	ggggacaagtttgataaaaaagcaggcttcGCTCAGGTGGAGCGCTATGTGCCC	CCDC84_F_wo_NLS_1
1523	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtcTATATCCTGATGGCCAATGAATGT	CCDC84NLSwo/R2(230.aa)
1524	ggggacaagtttgataaaaaagcaggcttcTGCTGGTGCCTGTGCTGCGGCTGT	CCDC84NLS/F2 (64.aa)
1526	ggggacaagtttgataaaaaagcaggcttcCCAGGAGTTGGTAACATCCACTCA	CCDC84NLS/F4 (231.aa)

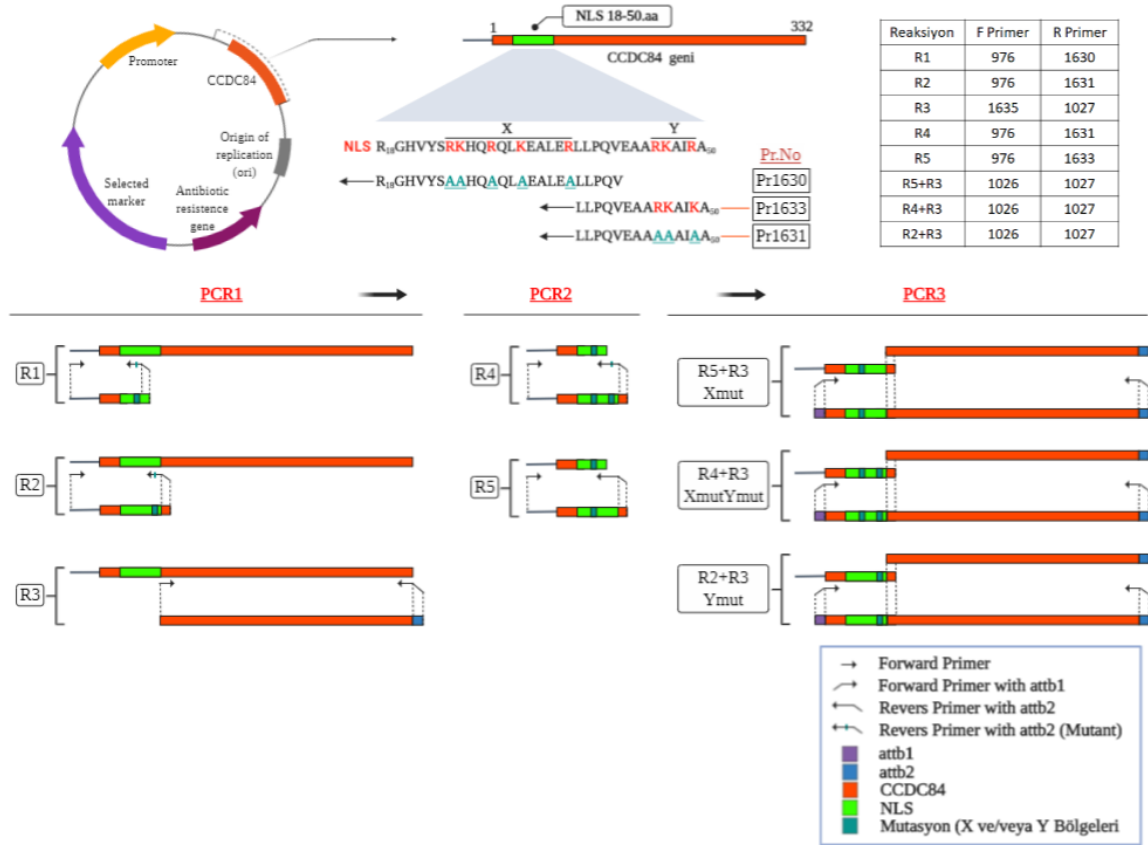
Klonlama primerlerinde bakteriyofaj lambda (λ) rekombinasyon bölgesine ait attB dizileri küçük, gene özgü kısımlar büyük harflerle gösterildi. Başlama kodonu (atg) ve stop kodonları (tca, tta) koyu ve altı çizili gösterildi. ws: N-terminale etiket ekleyen ekspresyon vektörlerinin oluşturulmasında kullanılan ve stop kodonu taşıyan primer. wo: N-terminale etiket ekleyen ekspresyon vektörlerinin oluşturulmasında kullanılan ve stop kodonu taşımayan primer.

3.2.1.2. CCDC84'ün NLS Dizisindeki Kritik Aminoasitlerin Belirlenmesi

CCDC84'ün NLS dizisindeki kritik aminoasitlerin belirlenmesi amacıyla literatürdeki proteinlerin yapısında tanımlanan kanonikal NLS dizileri incelendi. Bu doğrultuda yapılan çalışmalarda proteinlerin nükleusa transportunda kritik rol oynayan arjinin ve lizin aminoasitlerinin (91-93) NLS dizilerinde iki veya daha fazla sayıda ve birbirlerine çok yakın konumlarda olması gerektiği bildirilmektedir (178). Literatürdeki veriler doğrultusunda NLS dizisindeki pozitif yüklü bazik aminositlerin importinlerle etkileşimlerinin bozulması amacıyla (179), *in silico* analizler sonucu CCDC84 üzerinde belirlenen 18-50. aa'ler arasında yer alan bölgedeki arjinin ve lizin bazik aminoasitleri mutant primerler kullanılarak sırasıyla X bölgesi mutant, Y bölgesi mutant, ve X-Y bölgesi mutant olacak şekilde polar olmayan alanin aminoasidine dönüştürüldü (Resim 3).

NLS içeren bölge üzerindeki kritik “arjinin” ve “lizin” aminoasitlerinin “alanin” aminoasitlerine değişimleri gerçekleştirilerek mutasyonlar oluşturuldu. Bu işlem için kalıp DNA olarak, Anabilim Dalımızda yürütülen TÜBİTAK projesi kapsamında klonlanan *CCDC84*'e ait entry vektör (Ent 32) kullanıldı. Gen bölgelerinin PCR ile çoğaltılması için PCR reaksiyonunda 5' uçlarında sırası ile attB1 ve attB2 klonlama dizileri bulunan ve bulunmayan, genlerin sınırlarını belirleyen spesifik ileri ve geri amplifikasyon primerleri ve NLS dizisinin üzerindeki aminoasit değişimlerinin gerçekleştirilmesi için ilgili nükleotidleri değiştirilerek mutasyona uğratılmış spesifik ileri ve geri amplifikasyon primerleri dizayn edildi (Tablo 4). Resim 3'te gösterildiği gibi sırası ile PCR1 ve PCR2 reaksiyonları ile önce NLS dizisi üzerinde mutant NLS bölgeleri ve NLS dizisi içermeyen *CCDC84* geninin geri kalan kısmı PCR ile amplifiye edildi. Elde edilen X bölgesi mutant, Y bölgesi mutant ve X-

Y bölgelerinin her ikisi de mutant NLS dizilerini içeren PCR ürünleri, NLS içermeyen *CCDC84* geninin geri kalan kısmı ile PCR3 reaksiyonu ile ilgili 5' uçlarında sırası ile attB1 ve attB2 klonlama dizileri bulunan ileri ve geri amplifikasyon primerleri kullanılarak amplifiye edildi.



Resim 3. NLS üzerindeki kritik aminoasitlerin belirlenmesi

Tablo 4. NLS üzerindeki kritik aminoasitlerin belirlenmesinde kullanılan primerler

Primer No	Primer Dizisi (5'-3')	Primer Adı
1630	GGCCGCCTCCACCTGGGGCAGGAGCgcCTCCAAAGCCTCCgcCA GCTGCgcCTGGTGCgcGgcGCTGTAAACGTGCCCCGCGACCAC	CCDC84_R_NLS M+1
1631	GTGTTCGGGCACATAGCGCTCCACCTGAGCGGCGgcGATGGCCg cGgcGGCCGCCTCCACCTGGGGCAGGAG	CCDC84_R_NLS M+2
1633	GTGTTCGGGCACATAGCGCTCCACCTGAGCGGCGCGGATGGCC TTGCGGGCCGCCTCCACCTGGGGCAGGAG	CCDC84_R_NLS M+3
1635	GCCGCTCAGGTGGAGCGCTATGTGCCCGAACACGAGCGATGCT GCTGGTGCCTGTGCTGCGGC	CCDC84_F_NLS linker

Klonlama primerlerindeki mutant nükleotidler küçük, gene özgü kısımlar büyük harflerle gösterildi.

Primerler ile sınırları belirlenmiş genlerin PCR ile çoğaltılması hata düzeltme (proofreading) aktivitesine sahip olan phusion hot start taq polimeraz ile üretici firmanın önerdiği protokol doğrultusunda aşağıda yer alan PCR karışımı ve reaksiyon koşullarında ilgili primerler ve kalıp DNA kullanılarak gerçekleştirildi (Resim 2, 3).

PCR Karışımı

1X

5X HF tamponu (Thermo)	5 µL
dNTP karışımı (10 mM)	0.5 µL
Pr F (10 pmol/µL)	1 µL
Pr R (10 pmol/µL)	1 µL
Phusion hot start taq pol (Thermo)	0.25 µL
cDNA (200ng/µL)	2 µL
dH ₂ O	15.25 µL
Toplam	25 µL

PCR Koşulları

Sıcaklık (°C)

Süre

Başlangıç denatürasyonu	98 °C	30 s	} 30 Döngü
Denatürasyon	98 °C	10 s	
Bağlanma	62 °C	1 min	
Sentez	72 °C	1.5 min	
Son sentez	72 °C	10 min	
Bekleme	10 °C	∞	

3.2.2. *HIST1H2AA* ve *HIST1H2AH* Genlerinin Klonlanması

Tez çalışması kapsamında *HIST1H2AA* ve *HIST1H2AH* genlerinin GST, myc ve FLAG etiketi taşıyan ekspresyon vektörlerine klonlanması faj lambdanın att sekansları üzerinden faja özgü enzimler ile gerçekleştirdiği homolog rekombinasyona dayalı gateway klonlama sistemi kullanılarak gerçekleştirildi (177).

HIST1H2AA ve *HIST1H2AH* genlerine ait dizilerin PCR ile çoğaltılması reaksiyonunda kalıp ürün olarak kullanılmak üzere, daha önce Anabilim Dalımızda HaCaT hücrelerinden elde edilen RNA'dan sentezlenen cDNA kullanıldı. *HIST1H2AA* ve *HIST1H2AH* genlerinin PCR ile çoğaltılması için 5' uçlarında sırası ile attB1 ve attB2 klonlama dizileri bulunan ve genlerin sınırlarını belirleyen spesifik ileri ve geri amplifikasyon primerleri dizayn edildi (Tablo 5).

Tablo 5. *HIST1H2AA* ve *HIST1H2AH* genlerinin amplifikasyonunda kullanılan attB kuyluklu primerler

Primer No	Primer Dizisi (5'-3')	Primer Adı
1300	Ggggacaagttgtacaaaaagcaggcttc ATG TCTGGACGAGGGAAGCA	H2A1A_F1
1301	Ggggaccactttgtacaagaaagctgggtc tca TTACTTGCTTTGGGCTTTATGGTG	H2A1A_R1
1303	Ggggacaagttgtacaaaaagcaggcttc ATG TCTGGACGTGGCAAGC	H2A1H_F1
1304	Ggggaccactttgtacaagaaagctgggtc tca TTATTGGCCTTATGGTGGCTCTC	H2A1H_R1

Klonlama primerlerinde bakteriyofaj lambda (λ) rekombinasyon bölgesine ait attB dizileri küçük, gene özgü kısımlar büyük harflerle gösterildi. Başlama kodonu (atg) ve stop kodonları (tca, tta) koyu ve altı çizili gösterildi.

Primerler ile sınırları belirlenmiş genlerin PCR ile çoğaltılması hata düzeltme (proofreading) aktivitesine sahip olan phusion hot start taq polimeraz ile üretici firmanın önerdiği protokol doğrultusunda aşağıda yer alan PCR karışımı ve reaksiyon koşullarında ilgili primerler ve kalıp DNA kullanılarak gerçekleştirildi.

PCR Karışımı

1X

5X HF tamponu (Thermo)	5 μ L
dNTP karışımı (10 mM)	0.5 μ L
Pr F (10 pmol/ μ L)	1 μ L
Pr R (10 pmol/ μ L)	1 μ L
Phusion hot start taq pol (Thermo)	0.25 μ L
cDNA (200 ng/ μ L)	2 μ L
dH ₂ O	15.25 μ L
Toplam	25 μ L

PCR Koşulları

Sıcaklık (°C)

Süre

Başlangıç denatürasyonu	98 °C	30 s	} 30 Döngü
Denatürasyon	98 °C	10 s	
Bağlanma	62 °C	1 min	
Sentez	72 °C	1.5 min	
Son sentez	72 °C	10 min	
Bekleme	10 °C	∞	

3.2.3. PCR Ürünlerinin Agaroz Jelde Yürütülmesi ve Saflaştırılması

PCR ile ilgili genlerin amplifikasyonu sonrası PCR ürünlerinin tamamı %2'lik agaroz jelde 100 voltta 1 saat yürütüldü. Yürütme sonrası PCR ürünleri jelden kesilerek macherey-nagel PCR clean-up gel extraction kit kullanılarak üretici firmanın protokolü doğrultusunda saflaştırıldı. Kesilen PCR ürünleri 1.5 mL'lik ependorf tüplerin içine alınarak

hassas terazide tartıldı. Tartılan miktarın üzerine 2 kat hacimde (örn; 100 mg agaroz jel için 200 µL) NTI buffer eklendi ve karışım termomikserde 50 °C’de 5-10 dakika inkübe edilerek jelin tamamen çözünmesi sağlandı. NTI bufferda tamamen çözünmüş haldeki PCR ürünleri ilgili kitin içindeki silika membranlı kolonlara aktararak 11 000 g’de 30 saniye santrifüj edildi. Santrifüj sonrası toplama tüpündeki membrandan geçenler uzaklaştırılarak silika membranının üzerine 700 µl NT3 buffer eklendi ve 11 000 g’de 30 saniye santrifüj edildi. Ardından enzimatik reaksiyonları inhibe edebilen NT3 bufferdan kalan etanolün tamamen uzaklaştırılması için kolon 11 000 g’de 2 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpü uzaklaştırıldı ve PCR ürünlerinin bulunduğu silika membranlı kolon temiz bir ependorf tüpe alındı. Kolondaki membranın üzerine 15-30 µl DNA elüsyon tamponu olan NE buffer eklendi ve oda sıcaklığında 2-3 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası kolonlar 11 000 g’de 1 dakika santrifüj edilerek PCR ürünlerinin elüsyonu gerçekleştirildi.

3.2.4. Gateway Klonlama Yöntemi ile Giriş Vektörlerin Oluşturulması

Elde edilen attB uçlu PCR ürünlerinin agaroz jelden saflaştırılması sonrası BP reaksiyonu ile üretici firmaya ait aşağıdaki protokol doğrultusunda giriş (entry) vektörlerin oluşturulması için genler ve gen bölgeleri pDONR201 donor vektörüne klonlandı (177, 180).

Bacteriophage (BP) Rekombinasyon Reaksiyonu

	<u>1X</u>
PCR ürünü (30 ng/µL)	1.5 µL
pDONR201 donor vektörü (150 ng/µL)	0.5 µL
BP klonaz II enzim karışımı	0.5 µL
Toplam	2.5 µL

BP reaksiyonu için hazırlanacak karışımın bileşenleri buz üzerine alındı ve reaksiyon karışımı buz üzerinde hazırlandı. pDONR201 donor vektörü ve PCR ürünü ependorf tüpte karıştırıldıktan sonra karışımın üzerine -80 °C’de saklanan BP klonaz II enzim karışımı eklendi. Tüm karışım hızlıca spin edilerek 25 °C’de 1.5 saat inkübe edildi. 1.5 saatlik inkübasyon sonrası her bir BP reaksiyon ürününe 0.5 µL proteinaz K eklenerek 37 °C’de 10 dakika inkübe edildi. Ardından ilgili genleri taşıyan giriş vektörleri *E. coli DH5α* suşuna transforme edildi (*Bkz. Başlık: 3.2.7.*). Transformasyon ürünleri 50 µg/mL kanamisin antibiyotiği içeren LB agar besiyerine ekilerek 37 °C’de 16 saat büyütüldü. 12-16 saat sonunda büyüyen *E. coli DH5α* suşu kolonilerinden seçilerek 50 µg/mL kanamisin antibiyotiği içeren 5 mL LB sıvı besiyerine aktarıldı ve 37 °C’de 220 rpm’de çalkalayıcı

etüvde 12-16 saat büyütüldü. 12-16 saat sonunda büyüyen ve spektrofotometre OD₆₀₀ değeri 2-3 arasında olan kültürden 4.5 mL kullanılarak plazmid izolasyonu yapıldı (*Bkz. Başlık 3.2.8.1.*). Plazmid izolasyonu sonrası elde edilen plazmidler, büyüklüğü bilinen kontrol plazmid ile birlikte %0.8'lik agaroz jelde 60 voltta 1 saat yürütüldü ve doğru büyüklükte olup olmadıkları kontrol edildi. Doğru büyüklükte olan plazmidlerin konsantrasyonları, OD_{260/280} ve OD_{260/230} saflık değerleri nanodrop cihazında 1 µL örnek ile ölçüldü ve not edildi. Ardından plazmidlerin dizi doğruluğu sanger DNA dizi analizi ile kontrol edildi (*Bkz. Başlık 3.2.6.*). Dizi analizi ile doğrulanan plazmidler etiketlenerek -20 °C'de muhafaza edildi. LB sıvı besiyerindeki kültür devam ettirilerek logaritmik fazda 500 µL alınarak bakterilerin gliserol stokları oluşturuldu ve -80 °C'de muhafaza edildi (181).

3.2.5. Gateway Klonlama Yöntemi ile Ekspresyon Vektörlerin Oluşturulması

CCDC84'ün NLS dizisinin karakterizasyonunda belirlenen gen bölgelerine ait giriş vektörleri kullanılarak ilgili gen bölgeleri GST etiketleyen pDEST27 memeli ekspresyon vektörlerine, *HIST1H2AA* ve *HIST1H2AH* genlerine ait giriş vektörleri kullanılarak genler GST etiketleyen pDEST27, myc etiketleyen pcDNA3myc/DEST ve FLAG etiketleyen p3xFLAG-CMV/DEST memeli ekspresyon vektörlerine üretici firmaya ait protokol doğrultusunda aşağıda verilen reaksiyon içeriği ve hacminde kullanılarak aktarıldı (180, 181).

LeftRight (LR) Rekombinasyon Reaksiyonu

1X

Giriş vektörü (40 ng/µL)	1 µL
Destinasyon vektörü (40 ng/µL)	1 µL
LR klonaz II enzim karışımı	0.5 µL
Toplam	2.5 µL

LR reaksiyonu için hazırlanacak karışımın bileşenleri buz üzerine alındı ve reaksiyon karışımı buz üzerinde hazırlandı. Oluşturulan giriş vektörleri ve ilgili destination vektörleri ependorf tüpte karıştırıldıktan sonra karışımın üzerine -80 °C'de saklanan LR klonaz II enzim karışımı eklendi. Tüm karışım hızlıca spin edilerek 25 °C'de 1.5 saat inkübe edildi. 1.5 saatlik inkübasyon sonrası her bir LR reaksiyon ürününe 0.5 µL proteinaz K eklenerek 37 °C'de 10 dakika inkübe edildi. Ardından ilgili genleri taşıyan ekspresyon vektörleri *E. coli DH5α* suşuna transforme edildi (*Bkz. Başlık: 3.2.7.*). Transformasyon ürünleri 100 µg/mL ampisilin antibiyotiği içeren LB agar besiyerine ekilerek 37 °C'de 12-16 saat

büyütüldü. 12-16 saat sonunda büyüyen *E. coli DH5α* suşu kolonilerinden seçilerek 100 µg/mL ampisilin antibiyotiği içeren 5 mL LB sıvı besiyerine aktarıldı ve 37 °C’de 220 rpm’de çalkalayıcı etüvde 12-16 saat büyütüldü. 12-16 saat sonunda büyüyen ve spektrofotometre OD₆₀₀ değeri 2-3 arasında olan kültürden 4.5 mL kullanılarak plazmid izolasyonu yapıldı (*Bkz. Başlık: 3.2.8.2.*). Plazmid izolasyonu sonrası elde edilen plazmidler, büyüklüğü bilinen kontrol plazmid ile birlikte %0.8’lik agaroz jelde 60 volta 1 saat yürütüldü ve doğru büyüklükte olup olmadıkları kontrol edildi. Doğru büyüklükte olan plazmidlerin konsantrasyonları, OD_{260/280} ve OD_{260/230} saflık değerleri nanodrop cihazında 1 µL örnek ile ölçüldü ve not edildi. Ardından plazmidlerin dizi doğruluğu sanger DNA dizi analizi ile kontrol edildi (*Bkz. Başlık 3.2.6.*) ve etiketlenerek -20 °C’de muhafaza edildi. LB sıvı besiyerindeki kültür devam ettirilerek logaritmik fazda 500 µL alınarak bakterilerin gliserol stokları oluşturuldu ve -80 °C’de muhafaza edildi (181).

3.2.6. Oluşturulan Vektörlerin Dizilenerek Kontrolü

Tez çalışmasında kullanılan giriş ve ekspresyon vektörleri %0.8’lik agaroz jele 0.2 µg/µL konsantrasyondaki ve 3.2 kb büyüklükteki pGEM referans plazmidi ile birlikte her bir kuyuya 2 µL plazmid olacak şekilde yüklendi ve yürütüldü. Referans plazmidi baz alınarak her bir dizileme reaksiyonuna 400-800 ng arasında kalıp plazmid DNA’ları eklendi. Döngüsel dizileme reaksiyonu, BigDye terminator v3.1 cycle sequencing kitinin önerdiği protokole göre her bir gene özgü spesifik primerler kullanılarak gerçekleştirildi (Tablo 6, 7) (182). Döngüsel dizileme reaksiyonu koşulları, Applied Biosystems 9700 thermal cycler cihazında aşağıda verilen koşullarda gerçekleştirildi.

<u>Dizileme PCR Karışımı</u>	<u>1X</u>
BigDye	1 µL
5X Seq. buffer	1.5 µL
İleri ya da geri primer (10 pmol/µL)	0.32 µL
Kalıp plazmid (400-800 ng/uL)	1.5 µL
dH ₂ O	5.68 µL
Toplam	10 µL

<u>Döngüsel Dizileme Reaksiyonu Koşulları</u>	<u>Sıcaklık (°C)</u>	<u>Süre</u>
Başlangıç denatürasyonu	96 °C	2 min
Denatürasyon	96 °C	15 s
Bağlanma	50 °C	15 s
Sentez	60 °C	2 min
Son sentez	10 °C	5 min
Bekleme	10 °C	∞

} 25 Döngü

Tablo 6. CCDC84'ün NLS dizisinin karakterizasyonu için oluşturulan vektörlerinin dizilenmesinde kullanılan primerler

Primer No	Primer Dizisi (5'-3')	Primer Adı
976	TCGCGTTAACGCTAGCATGGATCTC	pDONR201_F
977	GTAACATCAGAGATTTTGAGACAC	pDONR201_R
1024	GACCATCTCTGACATTCATTGG	CCDC84 cDNA Amp F
1026	ggggacaagttgtacaaaaagcaggcttc ATG GCGCGCGCGCAGCGTGCCCTC	CCDC84_GW_attB1
1027	ggggaccacttgtacaagaaagctgggtc tca TTAGCTTTTTTCTGTATGTGACTGC TTCTTC	CCDC84_GW_attB2_ws
1029	AACACCTGAGCCATGGAAC	CCDC84_Seq Pr_F
1030	ACCTTTCACCATGGATTCTTG	CCDC84_Seq Pr_R
1056	GTGTACGGTGGGAGGTCTA	pCMV5' Forward
1397	ggggacaagttgtacaaaaagcaggcttc ATG GCGAGCTCAGATCCGTGAG	CCDC84_mg_Ex5F
1433	ggggaccacttgtacaagaaagctgggtc tca GCGCGGATGGCCTTGCGGGC	CCDC84NLS_D_R1
1434	ggggaccacttgtacaagaaagctgggtc tca GTCAGGTTTCCATGGCTCAG	CCDC84NLS_D_R2
1444	GGATGGTCCTATTTCTTGTTTC	CCDC84_MG_Ex9_4R
1445	GAACCAAGAAATAGGACCATCC	CCDC84_MG_Ex9_5F
1482	ggggacaagttgtacaaaaagcaggcttcGCTCAGGTGGAGCGCTATGTGCCC	CCDC84_F_wo_NLS_1
1522	ggggaccacttgtacaagaaagctgggtcCTCCTTGATCACTTTATCCTCCTT	CCDC84NLSwo/R1 (150.aa)
1526	ggggacaagttgtacaaaaagcaggcttcCCAGGAGTTGGTAACATCCACTCA	CCDC84NLS/F4 (231.aa)

Klonlama primerlerinde bakteriyofaj lambda (λ) rekombinasyon bölgesine ait attB dizileri küçük, gene özgü kısımlar büyük harflerle gösterildi. Başlama kodonu (atg) ve stop kodonları (tca, tta) koyu ve altı çizili gösterildi.

Tablo 7. *HIST1H2AA* ve *HIST1H2AH* genlerine ait vektörlerinin dizilenmesinde kullanılan attB kuyruklu primerler

Primer No	Primer Dizisi (5'-3')	Primer Adı
976	TCGCGTTAACGCTAGCATGGATCTC	pDONR201_F
977	GTAACATCAGAGATTTTGAGACAC	pDONR201_R
1300	Ggggacaagttgtacaaaaagcaggcttc ATG TCTGGACGAGGGAAGCA	H2A1A_F1
1302	CCCCTATCCGCTCTGCATAG	H2A1A_seq_R2
1303	Ggggacaagttgtacaaaaagcaggcttc ATG TCTGGACGTGGCAAGC	H2A1H_F1
1305	CGCTCGGCATAATTACCTTG	H2A1H_seq_R2

Klonlama primerlerinde bakteriyofaj lambda (λ) rekombinasyon bölgesine ait attB dizileri küçük, gene özgü kısımlar büyük harflerle gösterildi. Başlama kodonu (atg) ve stop kodonları (tca, tta) koyu ve altı çizili gösterildi.

Giriş ve ekspresyon vektörlerinin döngüsel dizileme reaksiyonu ürünleri sephadex G-50 ile üretici firmanın protokolüne göre saflaştırıldı. Saflaştırma öncesi 1 g sephadex G-50, 13 mL deiyonize distile suda çözülerek 30 dakika +4 °C'de bekletildi. Ardından kolonlar

macherey-nagel toplama tüplerine alındı. Kolonlar üzerine 600 µL taze hazırlanmış sephadex G-50 solüsyonu eklenerek 750 g'de 2 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpleri uzaklaştırılarak kolonlar temiz 1.5 mL'lik ependorf tüplere aktarıldı. Döngüsel dizileme reaksiyonu ürünleri kolondaki sephadex G-50'ye zarar vermeden sephadex G-50'nin üzerine dikkatli bir şekilde bırakıldı ve 750 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Saflaştırılan reaksiyon ürünleri 96 kuyuya sahip plate içindeki kuyulara transfer edildi. Ardından plate ABI 3130 genetik analiz cihazına yüklendi ve dizileme işlemi gerçekleştirildi. Dizileme sonrası sonuçlar “Chromas 2.32” ve “SeqScape software v2.5” programları kullanılarak analiz edildi ve referans genleri ile karşılaştırıldı (Tablo 8).

Tablo 8. Çalışmada kullanılan memeli ekspresyon vektörlerine ait bilgiler

Hedef Organizma	Varış Vektörü	Klonlanan Gen	Sentezlenen Proteinlerin Moleküler Ağırlıkları (~)
Memeli	3xFLAG-p3xFLAG-CMV/DEST	-	2.8 kDa
Memeli	3xFLAG-p3xFLAG-CMV/DEST	H2A1A	17 kDa
Memeli	3xFLAG-p3xFLAG-CMV/DEST	H2A1H	17 kDa
Memeli	pcDNA3myc/DEST	-	1.2 kDa
Memeli	pcDNA3myc/DEST	H2A1A	16 kDa
Memeli	pcDNA3myc/DEST	H2A1H	16 kDa
Memeli	pDEST27-GST	-	26 kDa
Memeli	pDEST27-GST	H2A1A	40 kDa
Memeli	pDEST27-GST	H2A1H	40 kDa
Memeli	pDEST27-GST	CCDC84 1-50.aa	32 kDa
Memeli	pDEST27-GST	CCDC84 51-332.aa	57 kDa
Memeli	pDEST27-GST	CCDC84 64-230.aa	44 kDa
Memeli	pDEST27-GST	CCDC84 231-332.aa	37 kDa
Memeli	pDEST27-GST	CCDC84 Xmut	63 kDa
Memeli	pDEST27-GST	CCDC84 Ymut	63 kDa
Memeli	pDEST27-GST	CCDC84 XmutYmut	63 kDa

3.2.7. *E. coli* Transformasyonu

İlgili genleri taşıyan rekombinant plazmidlerin “inoue” yöntemi kullanılarak kompetan hale getirilen *E. coli DH5α* suşuna transformasyonu aşağıda yer alan protokole göre “ısı şoku” yöntemi ile gerçekleştirildi (183).

1. Isıtıcı bloğu 42 °C'ye ayarlandı ve *E. coli DH5α* suşu -80 °C'den çıkarılarak buz üzerinde çözündü.
2. 50 µL *E. coli DH5α* suşu üzerine 0.05 µg/µL plazmid eklendi ve 5 dakikada bir hafifçe karıştırılarak 30 dakika boyunca buz üzerinde bekletildi.
3. 30 dakika sonunda ısıtıcı blokta 42 °C'de 30-45 saniye ısı şokuna maruz bırakıldı.
4. 30-45 saniye sonunda bakteriler tekrar buz üzerine kaldırılarak 2 dakika bekletildi.

5. Ardından bakterilerin üzerine 1 mL antibiyotik içermeyen LB besiyeri eklendi ve 37 °C’de 220 rpm hızda 1 saat çalkalamalı inkübatörde inkübe edildi.
6. 1 saat sonunda bakteriler 3 000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı.
7. Bakteri pelletinin üzerine 1 mL antibiyotik içermeyen LB eklendi, hafifçe pipetaj yapılarak bakterilerin LB besiyerinde homojen bir şekilde dağılması sağlandı ve ardından 3 000 rpm hızda 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı.
8. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra bakteri pelletinin üzerine 100-150 µL LB besiyeri eklendi ve hafifçe pipetaj yapılarak hücrelerin LB besiyerinde homojen halde dağılması sağlandı.
9. LB besiyerinde homojen haldeki bakteriler uygun antibiyotik içeren (50 µg/mL kanamisin veya 100 µg/mL ampicilin) LB-agar katı besiyerine yayıldı ve 37 °C’de 12-16 saat büyümeye bırakıldı.

3.2.8. Plazmid İzolasyonu

Transformasyon aşamasından yaklaşık 16 saat sonra LB-agar katı besiyerinde büyüyen kolonilerden seçilerek uygun antibiyotik içeren (50 µg/mL kanamisin veya 100 µg/mL ampicilin) 5 mL LB besiyerinde inoküle edildi ve 37 °C’de 220 rpm hızda 12-16 saat çalkalamalı inkübatörde kültüre edildi. 12-16 saat sonunda büyüyen ve spektrofotometre OD₆₀₀ değeri 2-3 arasında olan kültürden 4.5 mL alınarak plazmid izolasyonu yapıldı. Gateway klonlama protokolüne göre klonlamanın ilk aşaması olan BP reaksiyonu sonrası elde edilen entry vektörler için bakterilerden plazmid izolasyonu, endotoksin uzaklaştırma işleminin yapılmadığı standart izolasyon yöntemi ile gerçekleştirildi. Gateway klonlama protokolüne göre klonlamanın ikinci aşaması olan LR reaksiyonu sonrası elde edilen memeli ekspresyon vektörlerinin plazmid izolasyonu ise, bakteri kaynaklı endotoksinlerin memeli hücreleri için toksik etki göstermesinden dolayı, endotoksinleri uzaklaştıran ve endotoksinleri içermeyen plazmid izolasyonu ile gerçekleştirildi (184, 185).

3.2.8.1. Standart Plazmid İzolasyonu

Gateway klonlama protokolüne göre klonlamanın ilk aşaması olan BP reaksiyonu sonrası elde edilen entry vektörler için plazmid izolasyonunda endotoksin uzaklaştırma işleminin yapılmadığı standart izolasyon kiti olan E.Z.N.A. plazmid DNA mini kit I kullanıldı ve kit protokolüne göre aşağıdaki şekilde plazmid izolasyonu gerçekleştirildi.

1. 37 °C’de 220 rpm hızda çalkalamalı inkübatörde 12-16 saat boyunca kültüre edilen entry vektörleri taşıyan bakteri kültürlerinin OD₆₀₀ değerleri spektrofotometrede ölçüldü.
2. OD₆₀₀ değerleri 2.0-3.0 arasında olan kültürden 4.5 mL alındı ve ependorf tüplere aktarıldı.
3. Bakteri hücreleri 10 000 g’de 1 dakika santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı.
4. Pellet üzerine 250 µL solüsyon I/RNase A (10 mg/µL) eklendi. Dikkatli ve hassas bir şekilde pipetaj yapılarak pelletin tamamen süspansiyon haline getirilmesi sağlandı.
5. Karışımın üzerine 250 µL solüsyon II eklenerek, tüpler berrak bir lizat elde etmek için birkaç kez nazikçe altüst edildi. Ardından lizatlar DNA’nın kırılmasını önlemek için şiddetli pipetajdan kaçınılarak 2-3 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Inkübasyon süresinin 5 dakikayı geçmemesine dikkat edildi.
6. Lizatlara 350 µL solüsyon III eklenerek, tüpler zaman kaybetmeden beyaz presipitat oluşuncaya kadar 4-5 kez altüst edildi.
7. Tüpler maksimum hızda (14 000 g) 10 dakika santrifüj edildi ve beyaz presipitatların çökmesi sağlandı.
8. 10 dakikalık süre aşamasında, 2 mL’lik DNA kolonları toplama tüpüne aktarıldı. Kolonların üzerine 100 µL 3 M NaOH solüsyonu eklendi ve maksimum hızda (14 000 g) 1 dakika santrifüj edilerek dengelendi.
9. Elde edilen süpernatantın tamamı presipitat ile temas etmeden dengelenen kolonlara transfer edilerek maksimum hızda (14 000 g) 1 dakika santrifüj edildi.
10. Filtreden geçip toplama tüpünde biriken süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra kolon üzerine 500 µL HB solüsyonu eklendi. Ardından kolonlar maksimum hızda (14 000 g) 1 dakika santrifüj edildi.
11. Filtreden geçip toplama tüpünde biriken süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra kolon üzerine 700 µL DNA yıkama solüsyonu (%100’lük etanol ile dilüe edildi) eklendi ve maksimum hızda (14 000 g) 1 dakika santrifüj edildi. Bu işlem bir kez daha yapıldı ve santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırıldı.
12. Alkol kalıntılarının tamamen uzaklaştırılması için kolonlar maksimum hızda (14 000 g) 2 dakika santrifüj edildi ve temiz ependorflara aktarılacak şekilde 65 °C’de 5-10 dakika bekletildi.
13. Alkol kalıntıları tamamen uzaklaştırıldıktan sonra kolonlar üzerlerine 50-100 µL elüsyon solüsyonu eklendi ve oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildi.
14. Ardından kolonların aktarıldığı ependorf tüpler maksimum hızda (14 000 g) 1 dakika santrifüj edildi.

15. İzole edilen plazmidlerden 2 µL alınarak %0.8'lik agaroz jelde yürütülerek boyutları kontrol edildi. Plazmidlerin konsantrasyonları nanodrop cihazında ölçüldü, dizilendi ve -20 °C'ye kaldırıldı.

3.2.8.2. Endotoksin İçermeyen Plazmid İzolasyonu

Gateway klonlama protokolüne göre klonlamanın ikinci aşaması olan LR reaksiyonu sonrası elde edilen ve memeli hücrelerine transfekte edilecek olan ekspresyon vektörlerinin izolasyonu endotoksin uzaklaştırma işleminin yapıldığı E.Z.N.A. endo-free plasmid DNA mini kit I kullanılarak kit protokolüne göre gerçekleştirildi.

1. 37 °C'de 220 rpm hızda çalkalamalı inkübatörde 12-16 saat boyunca kültüre edilen ekspresyon vektörleri taşıyan bakteri kültürlerinin OD₆₀₀ değerleri spektrofotometrede ölçüldü.
2. OD₆₀₀ değerleri 2.0-3.0 arasında olan kültürden 4.5 mL alındı ve ependorf tüplere aktarıldı.
3. Bakteri hücreleri 10 000 g'de 1 dakika santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı.
4. Pelletin üzerine 250 µL solüsyon I/RNase A (10 mg/µL) ilave edildi. Dikkatli ve hassas bir şekilde pipetaj yapılarak pelletin tamamen süspanse hale getirilmesi sağlandı.
5. Karışımın üzerine 250 µL solüsyon II eklenerek, tüpler berrak bir lizat elde etmek için birkaç kez nazikçe altüst edildi. Ardından lizatlar DNA'nın kırılmasını önlemek için şiddetli pipetajdan kaçınılarak 2-3 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon süresinin 5 dakikayı geçmemesine dikkat edildi.
6. Lizatlara 125 µL N3 solüsyonu eklendi ve tüpler zaman kaybetmeden beyaz presipitat oluşuncaya kadar 4-5 kez altüst edildi.
7. Tüpler maksimum hızda (14 000 g) 10 dakika santrifüj edildi ve beyaz presipitatların çökmesi sağlandı.
8. 10 dakikalık süre aşamasında, 2 mL'lik DNA kolonları toplama tüpüne aktarıldı. Kolonların üzerine 100 µL 3 M NaOH solüsyonu eklendi ve maksimum hızda (14 000 g) 1 dakika santrifüj edilerek dengelendi.
9. Elde edilen süpernatantın tamamı presipitat ile temas etmeden yeni bir ependorf tüpe transfer edildi ve hacmi pipet ile ölçüldü.
10. Ölçülen miktar kadar süpernatanın üzerine (1:1 oranında) ETR binding solüsyonu eklendi ve tüp 10 kere altüst edildi.

11. Elde edilen karışımdan 700 µL alındı ve dengelenen kolonlara transfer edilerek maksimum hızda (14 000 g) 1 dakika santrifüj edildi.
12. Filtreden geçip toplama tüpüne birikenler uzaklaştırıldı. Kalan karışım kolonlara transfer edilerek maksimum hızda (14 000 g) 1 dakika santrifüj edildi. Filtreden geçip toplama tüpüne birikenler uzaklaştırıldı.
13. Kolonda yer alan plazmid üzerine 500 µL ETR yıkama solüsyonu eklenerek maksimum hızda (14 000 g) oda sıcaklığında 1 dakika santrifüj edildi. Filtreden geçip toplama tüpüne birikenler uzaklaştırıldı.
14. 500 µL HBC solüsyonu kolona eklenerek maksimum hızda (14 000 g) oda sıcaklığında 1 dakika santrifüj edildi. Filtreden geçip toplama tüpüne birikenler uzaklaştırıldı.
15. 700 µL DNA yıkama solüsyonu (%100'lük etanol ile dilüe edildi) kolona eklenerek maksimum hızda (14 000 g) oda sıcaklığında 1 dakika santrifüj edildi. Bu işlem 1 kere daha tekrarlandı.
16. Alkol kalıntılarının tamamen uzaklaştırılması için kolonlar maksimum hızda (14 000 g) 2 dakika santrifüj edildi ve temiz ependorflara aktarılaraq 65 °C'de 5-10 dakika bekletildi.
17. Alkol kalıntıları tamamen uzaklaştırıldıktan sonra kolonlar üzerlerine endotoksin içermeyen 50-100 µL elüsyon solüsyonu eklendi ve oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildi.
18. Ardından kolonların aktarıldığı ependorf tüpler maksimum hızda (14 000 g) 1 dakika santrifüj edildi.
19. İzole edilen plazmidlerden 2 µL alınarak %0.8'lik agaroz jelde yürütülerek boyutları kontrol edildi. Plazmidlerin konsantrasyonları nanodrop cihazında ölçüldü, dizilendi ve -20 °C'ye kaldırıldı.

3.2.9. Hücre Kültürü

Tez çalışmamızın protein ekspresyonu, immüno blot ve immüno presipitasyon deneylerinde insan embriyonik böbrek hücreleri olan HEK293 (ATCC® CRL-1573™), HEK293 Flp-In ve immüno floresan deneylerinde ise servikal kanser hücrelerinden köken alan HeLa (ATCC® CCL-2™) hücre hatları kullanıldı. Her iki hücre hattı fetal bovin serum (FBS) ve %1 pen/strep antibiyotikleri içeren yüksek glukoz seviyesine sahip DMEM (4.5 g/L glukoz) besiyerinde 37 °C'de %5 CO₂ koşullarını sağlayan nemlendirilmiş doku kültürü inkübatöründe kültüre edildi (186).

3.2.9.1. Hücrelerin Çözülmesi

Sıvı azot tankından alınan hücreler 37 °C sıcaklığa sahip su banyosunda, içinde çok az miktarda donmuş hücre kalacak şekilde çözüldü ve ardından buz üzerine transfer edildi. Hücrelerin üzerine %20 FBS ve %1 pen/strep içeren yüksek glukoz seviyesine sahip DMEM (4.5 g/L glukoz) besiyeri eklendi ve 1 200 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra aynı işlem bir kez daha gerçekleştirildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve hücre pelleti aynı besiyeri ile hücreler birbirlerinden ayrılıp tek hücre haline gelene kadar süspanse edildi ve ilgili büyüklükteki flaska ekildi. Ertesi gün flaskta bulunan besiyeri %10 FBS ve %1 pen/strep içeren yüksek glukoz seviyesine sahip DMEM (4.5 g/L glukoz) besiyeri ile değiştirildi. Hücreler 37 °C’de %5 CO₂ koşullarını sağlayan nemlendirilmiş doku kültürü inkübatöründe kültüre edildi (186).

3.2.9.2. Hücrelerin Pasajlanması

Kültüre edilen hücreler bulundukları ortamda %80-90’lık konfluensiye ulaştığında pasajlama işlemi yapıldı. Öncelikle hücreler steril 15 mL’lik falkon tüplere alındı ve etiketlendi. Ardından pasajlanacak hücrelerin üzerindeki eski besiyeri uzaklaştırıldı. Hücreler PBS ile dikkatli bir şekilde yıkandı. Yıkama sonrası PBS uzaklaştırıldı ve zaman kaybetmeden kullanılan flask büyüklüğüne göre; T25 flask için 1 mL ve T75 flask için 2 mL tripsin/EDTA (T/E), hücrelerin üzerine eklenerek inkübatöre kaldırıldı. Hücreler yüzey ile olan bağlantıları koparılanaya kadar yaklaşık 4 dakika inkübatörde T/E’ye maruz bırakıldı. T/E uygulaması sonrası reaksiyonun inhibe edilmesi için FBS içeren besiyeri eklendi. Hücreler toplanarak steril, etiketlenmiş 15 mL’lik falkon tüpe aktarıldı ve 1 200 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. Hücre pelleti %10 FBS ve %1 pen/strep içeren yüksek glukoz seviyesine sahip DMEM (4.5 g/L glukoz) besiyeri ile seyreltilerek istenilen büyüklükte temiz flasklara ekildi ve 37 °C’de %5 CO₂ koşullarını sağlayan nemlendirilmiş doku kültürü inkübatöründe kültüre edildi (186).

3.2.9.3. Hücrelerin Dondurulması

Hücrelerin dondurulması aşamasında hücrelerin üzerindeki eski besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreler PBS ile dikkatli bir şekilde yıkandı. Yıkama sonrası PBS uzaklaştırıldı ve T/E hücrelerin üzerine eklenerek inkübatöre kaldırıldı. Hücreler yüzey ile olan bağlantıları koparılanaya kadar yaklaşık 4 dakika inkübatörde T/E’ye maruz bırakıldı. T/E uygulaması sonrası reaksiyonun inhibe edilmesi için FBS içeren besiyeri eklendi. Hücreler toplanarak steril, etiketlenmiş 15 mL’lik falkon tüpe aktarıldı ve 1 200 rpm’de 5 dakika

santrifüj edildi. Pellet dağıtılmadan besiyeri uzaklaştırıldı. Pellet, üzerine tekrar FBS içeren besiyeri eklenerek süspanse edildi ve 1 200 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. Pelletin üzerine 900 µL soğutulmuş %20 FBS içeren yüksek glukoz seviyesine sahip DMEM (4.5 g/L glukoz) eklendi ve süspanse edildi. Ardından hücreler dondurma tüpüne transfer edildi ve 20 dakika buz üzerinde bekletildi. 20 dakikanın ardından hücrelerin üzerine 100 µL DMSO (%10) eklenerek tekrar buz üzerine alındı ve 10 dakika daha bekletildi. Toplam 30 dakikalık süre sonunda hücreler -80 °C’de bir gün bekletildi ve ardından sıvı azot tankında muhafaza edildi.

3.2.10. HeLa Hücrelerinin Transfeksiyonu

İmmünofloresan deneyleri için HeLa hücrelerine ekspresyon vektörlerinin geçici transfeksiyonu dreamfect gold transfeksiyon ajanı kullanılarak üretici firmanın protokolüne göre gerçekleştirildi. Transfeksiyon öncesi kullanılacak olan lameller 0.1 N HCl ile muamele edilerek sırasıyla distile su ve %70’lik alkol ile yıkandı. Yıkama sonrası lameller alkolü uzaklaştırmak için steril şartlarda kurutuldu ve ardından UV’ye maruz bırakılarak steril edildi. 6 kuyucuklu tabakların her bir kuyusuna 24 x 24 mm boyutlarında steril lameller yerleştirildi. HeLa hücreleri flastan tripsinize edildi ve sayıldı. Her bir kuyuda 1.5×10^5 HeLa hücresi ekildi ve toplam hacim %10 FBS ve %1 pen/strep içeren yüksek glikoz seviyesine sahip DMEM (4.5 g/L glukoz) besiyeri ile 2 mL’ye tamamlandı ve 24 saat 37 °C’de %5 CO₂ koşullarını sağlayan nemlendirilmiş doku kültürü inkübatöründe kültüre edildi. Yaklaşık 20-22 saat sonra hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırılarak hücrelerin üzerine 1.8 mL antibiyotik ve FBS içermeyen yüksek glukoz seviyesine sahip DMEM (4.5 g/L glukoz) besiyeri eklendi ve tekrar 37 °C’de %5 CO₂ koşullarını sağlayan nemlendirilmiş doku kültürü inkübatöründe kültüre edildi. Transfeksiyondan 30 dakika önce -20 °C’de muhafaza edilen dreamfect gold ajanı oda sıcaklığına alındı ve hafifçe vortekslendi. Transfeksiyon için toplam 200 µL karışımda 1:3 oranında ekspresyon vektörü: dreamfect gold transfeksiyon ajanı olacak şekilde karışım 1 ve karışım 2 hazırlandı. İlgili ekspresyon vektörlerinden 1 µg alınarak üzerine 100 µL DMEM eklendi ve karışım 1 elde edildi. Ardından 3 µL dreamfect gold alınarak üzerine 100 µL DMEM eklendi ve karışım 2 elde edildi. Ekspresyon vektörlerini içeren karışım 1, karışım 2’nin üzerine eklenerek 2-3 kez yavaş ve dikkatli bir şekilde pipetlendi ve 15 dakika boyunca oda sıcaklığında ekspresyon vektörleri ile transfeksiyon ajanının inkübasyonu sağlandı. 15 dakikalık inkübasyon sonrası 200 µL karışım 1.8 mL DMEM bulunan kuyunun her yerine eşit şekilde damla damla eklendi

ve hücreler 37 °C’de %5 CO₂ koşullarını sağlayan nemlendirilmiş doku kültürü inkübatöründe 24 saat kültüre edildi. Transfeksiyondan 4 saat sonra besiyeri uzaklaştırılarak hücrelerin üzerine 2 mL, %10 FBS ve %1 pen/strep içeren yüksek glukoz seviyesine sahip DMEM (4.5 g/L glukoz) besiyeri eklendi ve hücreler tekrar 37 °C’de %5 CO₂ koşullarını sağlayan nemlendirilmiş doku kültürü inkübatörüne kaldırıldı ve kültüre devam edildi. Transfeksiyondan 24 saat sonra immünofloresan deneyi ilgili immünofloresan protokolüne uygun şekilde gerçekleştirildi.

3.2.11. Hücre İçi Lokalizasyonun İmmünofloresan ile Analizi

Gateway klonlama yöntemi ile ekspresyon vektörlerinin HeLa hücrelerine transfeksiyonu sonrası eksprese edilen proteinler immünofloresan yöntemi kullanılarak görüntülendi (187). İlgili immünofloresan protokolüne göre 6 kuyucuklu tabaklara yerleşik haldeki lamellerin üst yüzeyinde tutunan ve çoğalan hücreler üzerinde bulunan eski besiyeri uzaklaştırılarak kuyular iki kez 1X PBS ile yıkandı. Yıkama sonrası 1X PBS uzaklaştırılarak kuyulara fiksasyon için taze hazırlanmış 1.5 mL %4 paraformaldehit (PFA) ilave edilerek hücreler, oda sıcaklığında %4 PFA ile 10 dakika boyunca inkübe edilerek lamellere fikse edildi. Fiksasyon sonrası %4 PFA uzaklaştırılarak kuyular beş kez beş dakikada bir 1X PBS ile yıkandı. Yıkama sonrası 1X PBS uzaklaştırılarak kuyulara permeabilizasyon için deiyonize distile suda hazırlanan %20’lik triton X 100 (ddH₂O içinde hazırlanmış) içeren %0.2’lik permeabilizasyon solüsyonundan 1 mL eklenerek hücreler 5-7 dakika permeabilize edildi. Ardından permeabilizasyon solüsyonu uzaklaştırılarak kuyular beş kez beş dakikada bir 1X PBS ile yıkandı. Yıkama sonrası 1X PBS uzaklaştırıldı ve kuyulara 1X PBS ile hazırlanan ve %10 keçi serumu içeren bloklama solüsyonundan 1.5 mL eklenerek hücreler oda sıcaklığında bir saat bloklama solüsyonu ile inkübe edildi. Primer antikör hafifçe vortekslendi ve ilgili firmanın protokolüne göre önerilen oranda bloklama solüsyonu ile dilüe edildi. Dilüe haldeki primer antikordan 120 µL alınarak parafilm üzerine damlatıldı. Primer antikör ile hücreler inkübe olacak şekilde lamel primer antikörün üzerine yerleştirildi ve belirtilen şartlara göre hücreler primer antikör ile inkübe edildi. İnkübasyon sonrası kuyulardaki bloklama solüsyonu uzaklaştırılarak kuyulara 1X PBS eklendi ve hücrelerin bulunduğu yüzey üst tarafta olacak şekilde lamellar kuyulara yerleştirildi. Kuyular beş kez beş dakikada bir 1X PBS ile yıkadı. Sekonder antikör hafifçe vortekslendi ve ilgili firmanın protokolüne göre önerilen oranda bloklama solüsyonu ile dilüe edildi. Dilüe haldeki sekonder antikordan 120 µL alınarak parafilm üzerine damlatıldı. Sekonder antikör ile

hücreler inkübe olacak şekilde lamel sekonder antikorun üzerine yerleştirildi ve hücreler sekonder antikor ile belirtilen şartlara göre inkübe edildi. İnkübasyon sonrası kuyulardaki 1X PBS uzaklaştırılarak kuyulara yeniden 1X PBS eklendi ve hücrelerin bulunduğu yüzey üst tarafta olacak şekilde lamellar kuyulara yerleştirildi. Kuyular beş kez beş dakikada bir 1X PBS ile yıkandı. Son aşamada, lamlar %70'lik etanol ile yıkandı. Alkol tamamen uzaklaştırıldıktan sonra her bir lamın üzerine kapatma solüsyonundan bir damla damlatıldı ve lameller, hücrelerin bulunduğu yüzey kapatma solüsyonu ile temas edecek şekilde lamın üzerine yerleştirildi (Tablo 9). Hazırlanan preparatın karanlık bir ortamda kuruması sağlandı. Preparatın kurumasının ardından lamelin lamın üzerinde hareket etmesini engellemek amacıyla lamelin etrafı sabitlendi. Hazırlanan preparatlar konfokal mikroskop ile görüntülendi ve analiz edildi.

Tablo 9. İmmünofloresan koşulları

Fiksasyon	%4 paraformaldehit oda sıcaklığında 10 dakika
Yıkama	PBS ile 5 kez 5'er dakika
Permeabilizasyon	%0.2 triton X-100 (PBS içinde) oda sıcaklığında 5-7 dakika
Yıkama	PBS ile 5 kez 5'er dakika
Bloklama	%10 fetal bovin serum (PBS içinde)
Primer (1°) antikorlar	Rabbit-anti-GST poliklonal, (Santa cruz, sc-459) 1:1 000 Rabbit-anti-CCDC84 poliklonal, (Abcam, ab150860) 1:200 Mouse-anti-pericentrin monoklonal, (Abcam ab28144) 1:150
1°Antikor inkübasyonu	Bloklama solüsyonunda hazırlanır. Oda sıcaklığında etiketli proteinler için 1 saat / +4 °C'de endojen proteinler için 16 saat
Yıkama	PBS ile 5 kez 5'er dakika
Sekonder (2°) antikorlar	Donkey-anti-rabbit IgG H&L (AF 488) (ab150061) 1:1 000 -anti-mouse IgG H&L (AF 488) (ab150117) 1:1 000 Goat-anti-rabbit IgG H&L (Cy3) (ab6939) 1:1 000
2° Antikor inkübasyonu	Bloklama solüsyonunda hazırlanır. Oda sıcaklığında 1 saat
Yıkama	PBS ile 5 kez 5'er dakika
Kapatma Medyumu	Prolong GOLD antifade mounting media DAPI

3.2.12. İmmünopresipitasyon

3.2.12.1. HEK293 Hücrelerinin Kalsiyum Fosfat Yöntemi ile Transfeksiyonu

Gateway klonlama stratejisi kullanılarak oluşturulan memeli ekspresyon vektörlerinin HEK293 memeli hücre hattına transfeksiyonu kalsiyum fosfat yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi (188). Ekspresyon vektörlerinin kontrolü için hücreler altı kuyucuklu tabaklara %30-40 konfluent olacak şekilde 2 mL, %10 FBS ve %1 pen/strep içeren yüksek glukoz seviyesine sahip DMEM (4.5 g/L glukoz) besiyeri içinde ekildi ve hücrelerin kuyucukların yüzeyine tutunması için bir gece 37 °C'de %5 CO₂ koşullarını

sağlayan nemlendirilmiş doku kültürü inkübatörde kültüre edildi. Ertesi gün transfeksiyon öncesi hücrelerin üzerinde bulunan besiyeri uzaklaştırıldı ve 1.8 mL %10 FBS içeren ancak antibiyotik içermeyen yüksek glukoz seviyesine sahip DMEM (4.5 g/L glukoz) besiyeri eklenerek 37 °C'de %5 CO₂ koşullarını sağlayan nemlendirilmiş doku kültürü inkübatöründe kültüre edilmeye devam edildi. Transfeksiyon aşamasında ilgili ekspresyon vektörlerinden 1-2 µg alınarak steril distile su ile 20 µL'ye tamamlandı. Diğer yandan 10 µL 2.5 M CaCl₂, 2 mL final transfeksiyon hacminde, final konsantrasyonu 12.5 mM olacak şekilde 70 µL steril distile suda seyreltildi. Karışımın toplam hacmi 100 µL olacak şekilde 20 µL DNA-H₂O karışımı üzerine 80 µL CaCl₂-H₂O karışımı eklendi. Ardından DNA-CaCl₂ karışımı düşük hızda vortekslenirken karışımın üzerine dikkatli bir şekilde damla damla 100 µL 2X HEPES eklendi ve son hacim 200 µL'ye tamamlandı. DNA, CaCl₂ ve HEPES karışımı 15-20 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi ve ardından hücrelerin üzerine damla damla eklendi. Karışım yüzeye eşit dağılacak şekilde altı kuyucuklu tabak hafifçe karıştırıldı ve 37 °C'de %5 CO₂ koşullarını sağlayan nemlendirilmiş doku kültürü inkübatörüne kaldırıldı. 6 saat sonunda antibiyotik içermeyen besiyeri uzaklaştırılarak %10 FBS ve %1 pen/strep içeren yüksek seviyede glukozu sahip DMEM (4.5 g/L glukoz) besiyerinden eklendi ve 37 °C'de %5 CO₂ koşullarını sağlayan nemlendirilmiş doku kültürü inkübatöründe kültüre edildi. Transfeksiyondan 24 saat sonra ise ilgili proteinlerin ekspresyonlarının analizi yapıldı.

İmmünopresipitasyon deneyleri için ise hücreler 100 mm'lik tabaklara hücre yoğunluğu %30-40 olacak şekilde 10 mL, %20 FBS ve %1 pen/strep içeren yüksek glukoz seviyesine sahip DMEM (4.5 g/L glukoz) besiyeri içinde ekildi ve hücrelerin tabağın yüzeyine tutunması için bir gece 37 °C'de %5 CO₂ koşullarını sağlayan nemlendirilmiş doku kültürü inkübatöründe kültüre edildi. Ertesi gün ilgili ekspresyon vektörlerinden 8-10 µg alınarak steril distile su ile 100 µL'ye tamamlandı. Diğer yandan 50 µL 2.5 M CaCl₂, 10 mL final transfeksiyon hacminde, final konsantrasyonu 12.5 mM olacak şekilde 350 µL steril distile suda seyreltildi. Karışımın toplam hacmi 500 µL olacak şekilde 100 µL DNA-H₂O karışımı üzerine 400 µL CaCl₂-H₂O karışımı eklendi. Ardından DNA-CaCl₂ karışımı düşük hızda vortekslenirken karışımın üzerine dikkatli bir şekilde damla damla 500 µL 2X HEPES eklendi ve son hacim 1 mL'ye tamamlandı. DNA, CaCl₂ ve HEPES içeren karışım 15-20 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi ve 9 mL antibiyotiksiz medyum içeren besiyeri üzerine damla damla eklendi. Karışım yüzeye eşit dağılacak şekilde altı kuyucuklu tabak hafifçe karıştırıldı ve 37 °C'de %5 CO₂ koşullarını sağlayan nemlendirilmiş doku kültürü inkübatöre

kaldırıldı. 6 saat sonunda antibiyotik içermeyen besiyeri uzaklaştırılarak hücrelerin üzerine %10 FBS ve %1 pen/strep içeren yüksek glukoz seviyesine sahip DMEM (4.5 g/L glukoz) besiyerinden eklendi ve 37 °C’de %5 CO₂ koşullarını sağlayan nemlendirilmiş doku kültürü inkübatöründe kültüre edildi. Transfeksiyondan 24 saat sonra ise ilgili proteinler ile immünopresipitasyon deneyi gerçekleştirildi.

3.2.12.2. Memeli Hücrelerinden TNTE Buffer Kullanılarak Protein İzolasyonu

İmmünopresipitasyon deneyi ve proteinlerin ekspresyonlarının analizi için HEK293 ve HEK293 Flp-In wt CCDC84 kalıcı transfekte hücreler 100 mm’lik tabaklarda kültüre edilerek ilgili ekspresyon vektörleri ile kalsiyum fosfat yöntemi kullanılarak transfekte edildi (Bkz. 3.2.12.1.). Transfeksiyondan 24 saat sonra 1X TNTE hücre lizis bufferı kullanılarak protein izolasyonu gerçekleştirildi (189). 24 saat sonunda 100 mm’lik tabaklar buz üzerine alındı ve besiyeri dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı. Hücreler PBS ile yıkandı ve ardından PBS uzaklaştırıldı. Hücrelerin üzerine 50 mM tris-Cl (pH: 7.4), 150 mM sodyum klorür, %1 triton X-100, 1 mM EDTA, 5 mM NaPPi, 1X PI, 2 mM NaVan, 20 mM NaF, 1 mM PMSF ve %10 gliserol içeren 1X TNTE hücre lizis bufferı eklendi ve 30 dakika boyunca orbital çalkalayıcıda bufferın tüm hücrelere ulaşması sağlandı. 30 dakikalık sürenin ardından hücreler kazıyıcı yardımı ile petrinin zemininden kopararak temiz ependorf tüplere transfer edildi. Genomik DNA’nın degrades olması için %50 genlikte (amplitude) beş döngü sonikasyon (5 saniye puls, 25 saniye bekleme) gerçekleştirildi. Sonikasyon sonrası lizatlar +4 °C’de 13 000 g’de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüjün ardından süpernatantlar steril ependorflara transfer edildi. IP deneyi öncesi ilgili genlerin ekspresyonunun kontrolü için 1 mL hücre lizatından 80 µL alındı. Total proteindeki ilgili proteinin ekspresyonu analiz edildi. Kalan 920 µL hücre lizatı ise -20 °C’ye kaldırıldı.

3.2.12.3. Anti-FLAG M2 Rezinlerin Hazırlanması

HEK293 ve HEK293 Flp-In wt CCDC84 kalıcı transfekte hücre hatlarında gerçekleştirilen immünopresipitasyon deneyleri anti-FLAG M2 affinity gel kullanılarak üretici firmanın önerdiği protokol ile gerçekleştirildi. Yüzeyi anti-FLAG antikoru ile kaplı olan rezinlerin dengelenmesi 2-8 °C’de gerçekleştirildi. Rezinlerin pipet ucu yüzeyine yapışmasını en aza indirmek için pipet ucu kesildi. Dengelenmenin gerçekleştirileceği ependorf tüp öncelikle pH’sı 7.4 olan TBS çözeltisi ile yıkandı ve tüpün içine 1 mL TBS konuldu. Stok rezin altüst edilerek iyice homojen hale getirildi ve ucu kesilmiş olan pipet ucu TBS ile yıkandı. Tüplerdeki TBS solüsyonu üzerine TBS ile yıkanmış ve ucu kesik pipet

ucu ile her 1 mL lizat için 40 µL rezin süspansiyonu (20 µL rezin) eklendi. Ardından rezin süspansiyonu 1 000 g'de 1 dakika santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı. Bu şekilde rezin 3 kere 1 mL TBS ile yıkanarak gliserol uzaklaştırıldı. Ardından rezinler 2 kere 1 mL 0.1 M glisin-HCl (pH: 3.5) ile yıkanarak serbest antikorlar uzaklaştırıldı. Sonrasında rezin 5 kere 1 mL TBS ile yıkandı. Son yıkamadan sonra rezin miktarı kadar TBS eklenerek rezinler süspansiyon haline getirildi. Her bir kondisyon için 40 µL rezin süspansiyonu tüplere aktarıldı (190). Böylelikle, anti-FLAG M2 bağlı rezinler hazır hale getirildi.

3.2.12.4. İzole Edilen Proteinin Ön Temizliği

İmmünopresipitasyon deneyi öncesi proteinlerin anti-FLAG M2 rezinlere spesifik olmayan etkileşimler ile bağlanmasının engellenmesi için ilgili proteinler mouse IgG–agaroza ile muamele edildi. Yüzeyi mouse IgG kaplı agaroz rezinlerin dengelenmesi 2-8 °C'de gerçekleştirildi. Dengelenmenin gerçekleştirileceği ependorf tüp pH'sı 7.4 olan TBS çözeltisi ile yıkandı ve tüpün içine 1 mL TBS konuldu. Stok rezin altüst edilerek homojen hale getirildi ve pipet ucu makas ile bir miktar kesilerek TBS ile yıkandı. Tüplerdeki TBS solüsyonu üzerine TBS ile yıkanmış ve ucu kesik olan pipet ucu ile her 1 mL lizat için 20 µL rezin süspansiyonu (10 µL rezin) eklendi. Ardından rezin süspansiyonu 1 000 g'de 1 dakika santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı. Bu şekilde rezin 5 kere 1 mL TBS ile yıkanarak gliserol uzaklaştırıldı. Son yıkamadan sonra rezinler bir kez de liziz buffer ile yıkandı ve 1 000 g'de 1 dakika santrifüj edildi. Son yıkamadan sonra rezin miktarı kadar TBS eklenerek rezinler süspansiyon haline getirildi. "Ön temizlik" için her bir 1 mL lizat üzerine 20 µL rezin süspansiyonu konuldu ve ependorflar parafin ile sarılarak, +4 °C'de dönen çember üzerinde 1 saat 9 rpm de inkübasyona bırakıldı. Ön temizlik bitince ependorflar 1 000 g'de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası çöken rezinlere dokunmadan proteinleri içeren lizat yeni bir ependorf tüpe aktarıldı (190).

3.2.12.5. Anti-FLAG M2 Rezinler ile İmmünopresipitasyon Yöntemi

İzole edilen proteinlerin mouse IgG–agaroza ile gerçekleştiriler ön temizliği sonrası elde edilen her bir kondisyona ait lizatlar, dengelenen 20 µL saf anti-FLAG M2 affinity gel rezinlerin üzerine eklendi ve +4 °C'de 1 saat 15 dakika 9 rpm'de dönen çember üzerinde karıştırılarak inkübe edildi. İnkübasyon sonrası tüpler 1 000 g'de 1 dakika santrifüj edildi. Rezinin tüpün dibine çökmesi için tüpler 1-2 dakika buzda bekletildi. Ardından tüplerdeki süpernatanın tamamı yeni bir tüpe alınarak -20 °C'de saklandı. Spesifik olmayan bağlantıları engellemek için rezin 4 kez 1 mL yıkama tamponu ile yıkandı ve her yıkama sonrası 1 000

g'de 1 dakika santrifüj edildi. Her yıkamada rezinlerin yıkama tamponunda tamamen çözünmesi sağlandı. Yıkama sonrası yıkama tamponu uzaklaştırıldıktan sonra rezinlerin üzerine tekrar 200 µL yıkama tamponu eklendi ve rezin uçları kesilmiş pipet ucu ile kolonlara aktarıldı. Eppendorfta kalan rezinlerin üzerine tekrar 200 µL yıkama tamponu eklendi ve kolonlara aktarıldı. Kolonlar 1 000 g'de 15-20 saniye santrifüj edildi ve kolonların toplama kapları boşaltıldı. Kolonların üzerine 3 kez 500 µL yıkama tamponu eklendi ve kolonlar 1 000 g'de 1 dakika santrifüj edilerek yıkandı. Son aşamada kolonlar 1 000 g'de 1 dakika santrifüj edilerek yıkama tamponu iyice uzaklaştırıldı ve kolonlar steril, etiketlenmiş eppendorflara toplandı (190).

3.2.12.6. Elüsyon

Elüsyon işlemi oda sıcaklığında gerçekleştirildi. 40 µL rezin süspansiyonu üzerine 20 µL 0.1 M glisin-HCl (pH: 2.5) eklendi ve 1 000 g'de 1 dakika santrifüj edildi ve steril bir eppendorf tüpte toplandı. Resin üzerine 73 µL 0.1 M glisin-HCl (pH: 2.5) eklendi ve eppendorflar hafifçe karıştırılarak oda sıcaklığında 4 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası eppendorflar 1 000 g'de 1 dakika santrifüj edildi ve protein steril eppendorf tüplere toplandı. Toplanan proteinlerin üzerine toplam hacim 100 µL olacak şekilde 7 µL 1 M tris (pH: 9) solüsyonu eklendi. IP ürünlerinden 19.2 µl steril eppendorfa alınarak 1 mL'sinde 0.038 g 0.5 mM DTT içeren 5X yoğunluktaki yükleme tamponundan, yükleme tamponunun son hacmi 1X olacak şekilde 4.8 µL eklendi ve 99 °C'de 5 dakika kaynatılarak SDS-PAGE ile yürütüldü (190). Proteinleri konsantre hale getirmek için ise örnekler 1 saat boyunca liyofilizasyon işlemi uygulandı. Liyofilizasyon sonrası konsantre haldeki proteinlerin miktarı ölçüldü. Ölçülen miktar üzerine toplam hacim 20 µL olacak şekilde 93 µL 0.1 M glisin-HCl (pH: 2.5) + 7 µL 1 M tris (pH: 9) karışım solüsyonundan eklendi. Ardından 20 µL konsantre protein üzerine 1 mL'sinde 0.038 g 0.5 mM DTT içeren 5X yoğunluktaki yükleme tamponundan, yükleme tamponunun son hacmi 1X olacak şekilde 5 µL eklendi ve 99 °C'de 5 dakika kaynatılarak SDS-PAGE ile yürütüldü (190).

3.2.13. GST-Trap Rezinler ile İmmünopresipitasyon

Kütle spektrometresi ve enzim aktivitesi ölçümlerini içeren biyokimyasal analizler için GST-füzyon proteinleri ve bu proteinlerin etkileşim faktörleri, GST-Trap rezinler kullanılarak immünopresipitasyon yoluyla hızlı ve verimli bir şekilde izole edilebilir. GST-Trap_A, agaroz rezinlerin yüzeyine kovalent olarak bağlanmış küçük bir GST-bağlayıcı protein içerir ve GST ile füzyon yapılmış ilgilenilen herhangi bir proteinin saflaştırılmasını

sağlar. Bu rezinlerin yüzeyinde yer alan antijen bağlama bölgesi hafif zincir bulundurmamakta, antijen bağlanma görevini ağır zincirin V_HH bölgesi ile gerçekleştirmektedir. Nanobody olarak adlandırılan bu yapılar oldukça düşük yoğunluktaki proteinleri bağlama yeteneğine sahiptir ve immünoiblot analizlerinde ağır ve hafif zincirlere karşılık gelen aynı molekül ağırlığına sahip proteinlerin görüntülenmesinin engellenmesi problemini ortadan kaldırmaktadır (191).

3.2.13.1. Memeli Hücrelerinden RIPA Buffer Kullanılarak Protein İzolasyonu

İmmünoipresipitasyon deneyi ve proteinlerin ekspresyonlarının analizi için, HEK293 ve HEK293 Flp-In wt CCDC84 kalıcı transfekte hücreler 100 mm'lik tabaklarda kültüre edilerek ilgili ekspresyon vektörleri ile kalsiyum fosfat yöntemi kullanılarak transfekte edildi (Bkz. 3.2.12.1.). Transfeksiyondan 24 saat sonra RIPA buffer kullanılarak protein izolasyonu gerçekleştirildi (192). 24 saat sonunda 100 mm'lik tabaklar buz üzerine alındı ve besiyeri dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı. Hücrelere PBS eklendi ve kazıyıcı yardımı ile hücreler 100 mm'lik tabaktan toplanarak daha önce soğutulmuş ve buz üzerinde bekleyen tüpe transfer edildi. Ardından hücreler +4 °C'de 500 g'de 3 dakika santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Hücreler iki kere soğuk PBS ile dikkatli ve yavaş bir şekilde resüspende edilerek yıkandı. Yıkama sonrası hücre pelleti üzerine 10 mM tris-Cl (pH: 7.5), 150 mM sodyum klorür, %1 triton X-100, %0.1 SDS, 0.5 mM EDTA (pH: 7), 5 mM NaPPi, 1X PI, 2 mM NaVan, 20 mM 1X NaF, 1 mM PMSF ve %1 deoksikolat içeren 200 µL RIPA buffer eklenerek resüspende edildi. 30 dakika boyunca orbital çalkalayıcıda RIPA bufferın tüm hücrelere ulaşması sağlandı. Bu süre boyunca her 10 dakikada bir tüpler pipet ile resüspende edildi. Ardından, genomik DNA'nın degrade olması için %50 genlikte (amplitude) beş döngü sonikasyon (5 saniye puls, 25 saniye bekleme) gerçekleştirildi. Sonikasyon sonrası lizatlar +4 °C'de 20 000 g'de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüjün ardından lizat daha önce soğutulmuş ve buz üzerinde bekleyen steril ependorf tüpe transfer edildi. Lizatın üzerine 10 mM tris-Cl (pH: 7.5), 150 mM sodyum klorür ve 0.5 mM EDTA (pH: 7) içeren dilüsyon/yıkama solüsyonundan 300 µL eklendi. Pellet ise atıldı. Total proteinlerinin ekspresyonlarının analizi için lizattan 40 µL alındı ve üzerine 1 mL'sinde 0.038 g 0.5 mM DTT içeren 5X yoğunluktaki yükleme tamponundan, yükleme tamponunun son hacmi 1X olacak şekilde 10 µL eklendi ve -20 °C'ye kaldırıldı. Geri kalan 460 µL ise immünoipresipitasyon yapılmak üzere sıvı azotta dondurularak -80 °C'ye kaldırıldı.

3.2.13.2. GST-Trap_A Rezinlerin Hazırlanması

Anti-FLAG M2 affinity gel rezinler ile gerçekleştirilen immünopresipitasyon deneylerinin sonuçlarının doğrulanması amacıyla GST-Trap_A rezinleri kullanılarak ilgili firmanın önerdiği protokole göre HEK293 ve HEK293 Flp-In wt CCDC84 kalıcı transfekte hücre hatlarında immünopresipitasyon deneyi gerçekleştirildi. GST-Trap_A rezinlerin dengelenmesi 2-8 °C’de gerçekleştirildi. Dengelenmenin gerçekleştirileceği ependorf tüp soğuk dilüsyon/yıkama bufferı ile yıkandı ve tüpün içine 500 µL soğuk dilüsyon/yıkama bufferı konuldu. Pipet ucu makas ile bir miktar kesilerek soğuk dilüsyon/yıkama bufferı ile yıkandı. Stok rezin altüst edilerek homojen hale getirildi ve tüplerdeki 500 µL soğuk dilüsyon/yıkama bufferı üzerine soğuk dilüsyon/yıkama bufferı ile yıkanmış ve ucu kesik olan pipet ucu ile her 460 µL lizat için 20 µL rezin süspansiyonu (10 µL rezin) eklendi. Tüpler +4 °C’de 2 500 g’de 2 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası rezinler 500 µL soğuk dilüsyon/yıkama bufferı ile yıkandı ve süpernatant uzaklaştırıldı. Bu işlem toplam üç kez tekrarlandı. Böylelikle, GST-Trap_A rezinler hazır hale getirildi.

3.2.13.3. GST-Trap_A Rezinler ile İmmünopresipitasyon Yöntemi

460 µL hacimde dilüe edilmiş lizat, dengelenmiş GST-Trap_A rezinlerin üzerine eklendi ve +4 °C’de 1 saat 9 rpm’de dönen çember üzerinde karıştırılarak inkübe edildi. 1 saatlik sürenin sonunda rezinler ile muamele olan lizat +4 °C’de 2 500 g’de 2 dakika santrifüj edildi ve süpernatant analiz edilmek üzere etiketli ependorfa transfer edildi. Rezinler üzerine 500 µL soğuk dilüsyon/yıkama solüsyonu eklenerek resüspende edildi ve ependorflar +4 °C’de 2 500 g’de 2 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırıldı ve yıkama işlemi iki kez daha tekrarlandı. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra elüsyon iki basamakta gerçekleştirildi. Birinci basamakta kolonda yer alan GST-Trap_A rezinler üzerine 40 µL 0.2 M glisin-HCl, (pH: 2.5) eklendi ve oda sıcaklığında 3-4 dakika inkübasyona bırakıldı. Ardından +4 °C’de 2 500 g’de 2 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elüsyon temiz bir tüpe toplandı. Dengeleme için elüsyon üzerine 4 µL 1 M tris (pH: 10.4) eklendi. İkinci basamakta; GST-Trap_A rezinler üzerine 40 µL 2X SDS-sample buffer eklendi ve resüspende edildi. Resüspende GST-Trap_A rezinler, immünokomplekslerin uzaklaştırılması için 95 °C’de 10 dakika kaynatıldı ve +4 °C’de 2 500 g’de 2 dakika santrifüj edilerek rezinlerin çökmesi sağlandı. Elüsyon üzerine 1 mL’inde 0.038 g 0.5 mM DTT içeren 5X yoğunluktaki yükleme tamponundan, yükleme tamponunun son hacmi 1X olacak şekilde eklenerek SDS-PAGE’de yürütüldü ve immünoblot yöntemi ile analiz edildi (193).

3.2.14. İmmüno blot

3.2.14.1. SDS-PAGE İçin Ayırma ve Yükleme Jelinin Hazırlanması

Poliakrilamid jelin hazırlanması için dizayn edilmiş uzun ve kısa özel camlar distile su ile yıkandıktan sonra %70'lik etanol ile yıkanarak dikkatli bir şekilde temizlendi. Temizlenen camlar birbiri üzerine koyularak jel standı üzerinde uygun pozisyonda yerleştirildi. İlgili proteinlerin molekül ağırlıklarına göre %10 konsantrasyonda SDS-PAGE ayırma jeli hazırlandı (Tablo 10) ve jel hızlı bir şekilde temizlenen camlar arasına kısa camın üst seviyesinin 1 santimetre altına kadar döküldü. Ayırma jelinin hava ile ilişkisini engellemek ve jelin düz bir şekilde polimerize olmasını sağlamak amacıyla ayırma jelinin üzerine izopropanol ilave edildi ve yaklaşık 45-60 dakika polimerleşmesi sağlandı. Polimerleşen ayırma jelin üzerindeki izopropanol dökülerek jelin üst kısmı distile su ile birkaç kez yıkandı. Ardından %5 konsantrasyonunda yükleme jeli hazırlandı (Tablo 11) ve ayırma jelinin üzerine döküldü. %70'lik etanol ile temizlenen ve 10 veya 15 kuyucuk içeren ilgili kalınlıktaki taraklar camlar arasına dikkatlice yerleştirildi. Yükleme jelinin polimerize olması için yaklaşık 45-60 dakika beklendi (194).

Tablo 10. %10'luk ayırma jeli içeriği

İçerik	%10 (1 mm)
ddH ₂ O	2.43 mL
Akrilamid (%40 akrilamid karışımı)	1.25 mL
1.5 M tris HCl (pH: 8.8)	1.25 mL
%10 SDS	0.05 mL
%10 APS*	0.05 mL
TEMED	5 µL
Toplam	5 mL

*Taze hazırlanmalıdır.

Tablo 11. %5'lik yükleme jeli içeriği

İçerik	%5 (1 mm)
ddH ₂ O	3.14 mL
Akrilamid (%40 akrilamid karışımı)	0.50 mL
0.5 M tris HCl (pH: 6.8)	1.25 mL
%10 SDS	0.05 mL
%10 APS*	0.05 mL
TEMED	3 µL
Toplam	5 mL

*Taze hazırlanmalıdır.

3.2.14.2. SDS-PAGE Jel Elektroforezi

-20 °C’de muhafaza edilen protein lizatları buz üzerine alınarak yavaş bir şekilde çözülmesi sağlandı. 5X yükleme boyası içermeyen lizatlara, son konsantrasyon 1X olacak şekilde yükleme boyası eklendi ve 99 °C’de 5 dakika kaynatıldı. Daha önce yükleme boyası eklenip -20 °C’de muhafaza edilen protein lizatları ise direk 99 °C’de 5 dakika kaynatıldı. Bu aşamada daha önce hazırlanmış olan ilgili konsantrasyondaki poliakrilamid jelin tarakları çıkarıldı ve jel distile su ile temizlenerek yükleme standına yerleştirildi. Ardından yükleme standı dikey jel elektroforez tankına yerleştirildi ve tank içerisine SDS-PAGE yürütme solüsyonu eklendi. Kaynatılan örnekler oda sıcaklığında santrifüj edildikten sonra ilk kuyuda 1 µL protein markır ve diğer kuyulara protein lizatından 20-30 µL yüklendi. Jel 75 voltta 15 dakika, sonrasında 100 voltta 90-100 dakika yürütüldü (195).

3.2.14.3. Membrana Transfer İşlemi ve Görüntüleme

SDS-PAGE sonrası jel dikey jel elektroforezinden alınarak iki cam arasındaki boşluklar arasındaki yürütme solüsyonu kalıntıları distile su ile yıkanarak uzaklaştırıldı. Jel kısa camın üzerinde kalacak şekilde spatula ile camlar dikkatli bir şekilde birbirinden ayrıldı ve jelin fazlalık kısımları spatula ile kesilerek atıldı. Blotlama için dört adet ince whatman kağıdı ve iki adet sünger yatak, önceden hazırlanarak +4 °C’de soğumaya bırakılan 1X transfer buffer içinde dengelendi. Blotlama kasetinin beyaz iç yüzeyine bir adet sünger yatak yerleştirildi. 1X transfer buffer içinde dengelenmiş olan iki adet whatman kağıdı sünger yatağının üzerine dikkatli bir şekilde konuldu. Jelin büyüklüğüne göre PVDF membran kesilerek soğuk metanol içinde 30 saniye boyunca aktive edildi. Aktif haldeki membran blotlama kasetinin beyaz yüzeyinde serili whatmann kağıdının üzerine hava kabarcığı olmayacak şekilde yerleştirildi. Ardından jel membran üzerine uygun pozisyonda yerleştirildi. 1X transfer buffer içinde dengelenmiş olan diğer iki adet whatman kağıdı jelin üzerine konuldu. En son aşamada ise dengelenmiş 1 adet sünger yatak whatman kağıtların üzerine konularak bloklama kasedi kapatıldı. Transfer tankının içi +4 °C’de soğutulan 1X transfer buffer ile tankın üzerinde işaretli uygun seviyeye kadar dolduruldu ve sıvı içine transfer süresince transfer bufferın homojen olarak dağılması için magnetik karıştırıcı konuldu. Ardından bloklama kasedi transfer ünitesine yerleştirildi ve ünite 1X transfer bufferı içeren tank içine anot siyah ve katot kırmızı tarafta olacak şekilde konuldu. Transfer işlemi 100 voltta ve 300 miliamperde 1 saat 10 dakika gerçekleştirildi. Transfer işlemi sonrası membran kasetten alındı ve transferin olduğu yüzey işaretlenerek %0.05’lik tween

20 içeren TBS (TBST) solüsyonu bulunan bir kaba konuldu. TBST solüsyonu uzaklaştırılarak membranın üzerine TBST solüsyonunda hazırlanan ve %5 yağsız süt tozu içeren bloklama solüsyonu eklendi. Bir saat oda sıcaklığında veya +4 °C’de gece boyu orbital karıştırıcıda bırakılarak membran ile bloklama solüsyonunun inkübasyonu sağlandı. Bloklama işleminin sonuna doğru proteinlerin immüno blot işlemlerinde kullanılacak olan ilgili primerler, primer antikörleri üreten firmaların önerdiği bilgilere göre %2.5 yağsız süt tozu içeren TBST solüsyonunda dilüe edildi (Tablo 12). Bloklama aşaması sonrası bloklama solüsyonu uzaklaştırıldı ve membranın üzerine ilgili proteine veya proteinin taşıdığı etikete özgü primer antikör solüsyonu eklendi. Membranın primer antikör ile inkübasyonu ilgili primer antikörü üreten firmanın önerdiği protokole göre oda sıcaklığında bir saat veya +4 °C’de gece boyu orbital karıştırıcıda gerçekleştirildi. Primer antikör ile inkübasyonun ardından membran beş kez beş dakika TBST solüsyonu ile orbital karıştırıcıda çalkalanarak yıkandı. Yıkama sonrası HRP konjuge sekonder antikörler, antikörleri üreten firmaların önerdiği bilgilere göre %2.5 yağsız süt tozu içeren TBST solüsyonunda dilue edildi (Tablo 12). TBST solüsyonu uzaklaştırılarak membran üzerine ilgili sekonder antikör solüsyonu eklendi ve orbital çalkalayıcıda oda sıcaklığında bir saat inkübe edildi. Membran, sekonder antikör ile inkübasyon sonrası tekrar beş kez beş dakika TBST ile yıkandı ve pens ile temiz bir kaba aktarıldı. Membranın üzerine, üretici firmanın önerdiği bilgiler doğrultusunda ve membranın büyüklüğüne göre herhangi bir HRP konjuge sekonder antikör ile kullanılabilen yaklaşık 300-500 µL clarity western ECL solüsyonu (1:1 oranında clarity western peroxide reagent ve clarity western luminol/enhancer reagent karıştırıldı) eklendi. ECL ile inkübasyon sonrası membran ChemiDoc MP Görüntüleme Sistemi kullanılarak görüntülendi (196).

Tablo 12. Western blotlama koşulları

Jel konsantrasyonu	%7.5-%10
Membran tipi	PVDF 0.2 µm
Bloklama	%5 yağsız süt tozu içeren 1X TBST ile oda sıcaklığında 1 saat
Primer (1°) antikörler	Rabbit-anti-GST poliklonal, (Santa cruz, sc-459) 1:1 000 Mouse-anti-FLAG monoklonal, (Sigma A2220) 1:1 000 Rabbit-anti-CCDC84 poliklonal, (Abcam, ab150860) 1:5 000
1° Antikör inkübasyonu	1X TBST içinde oda sıcaklığında 1 saat
Yıkama	1X TBST ile 4 x 5 dakika
Sekonder (2°) antikörler	Goat-anti-rabbit IgG-HRP Goat-anti-mouse IgG-HRP
2° Antikör inkübasyonu	1X TBST içinde 1:8 000 oranında oda sıcaklığında 1 saat
Yıkama	1X TBST ile 4 x 5 dakika
Görüntüleme	1 mL clarity western ECL solüsyonu (1:1 oranda clarity western peroxide reagent ve clarity western luminol/enhancer reagent)

4. BULGULAR

4.1. CCDC84'ün NLS Dizisinin *In Silico* Yaklaşımlarla Analizi

Nükleusta lokalize olduğu immüno Floresan yaklaşımlar ile daha önce grubumuz tarafından gösterilmiş olan CCDC84'ün bu tez çalışması kapsamında NLS dizisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. İlk aşamada, CCDC84 *in silico* yaklaşımlar ile analiz edildi. Bu kapsamda PSORT II (121), predictNLS (124) ve cNLS Mapper (125) programları kullanıldı. Bu programlardan PSORT II ve predictNLS NLS tahmin programları CCDC84 üzerinde herhangi bir NLS dizisi öngörmedi. Buna karşın; cNLS Mapper, programın önerdiği şekilde eşik değeri yedi seçildiğinde, CCDC84'ün 18-50.aa'leri arasında 33 aminoasitlik bir NLS dizisinin olabileceğini işaret etmiştir (Resim 4).

cNLS Mapper Result		
Predicted NLSs in query sequence		
MAPAQRCPLCRQTFFCG	RGHVYSRKHQRQLKEALERLLPQVEAARKAIRA	50
AQVERYVPEHERCCWCLCCGCEVREHL	SHGNLTVLYGGELLEHLASPEHKK	100
ATNKFWWENKAQVQMKFLVTPQDYARFKKSMVKGLDSYEEKEDKVIKE		150
MAAQIREVEQSRQEVVRSVLEPQAVPDPEEGSSAPRSWKGMNSQVASSLQ		200
QPSNLDLPPAPELDWMETGPSLTFIGHQDIPGVGNIHSGATPPWMIQDEE		250
YIAGNQEIGPSYEEFLKEKEKQKLKKLPPDRVGANFDHSSRTSAGWLPSF		300
GRVWNNGRRWQSRHQFKTEAAAMKKQSHT		329

Predicted monopartite NLS		
Pos.	Sequence	Score

Predicted bipartite NLS		
Pos.	Sequence	Score
18	RGHVYSRKHQRQLKEALERLLPQVEAARKAIRA	7.2

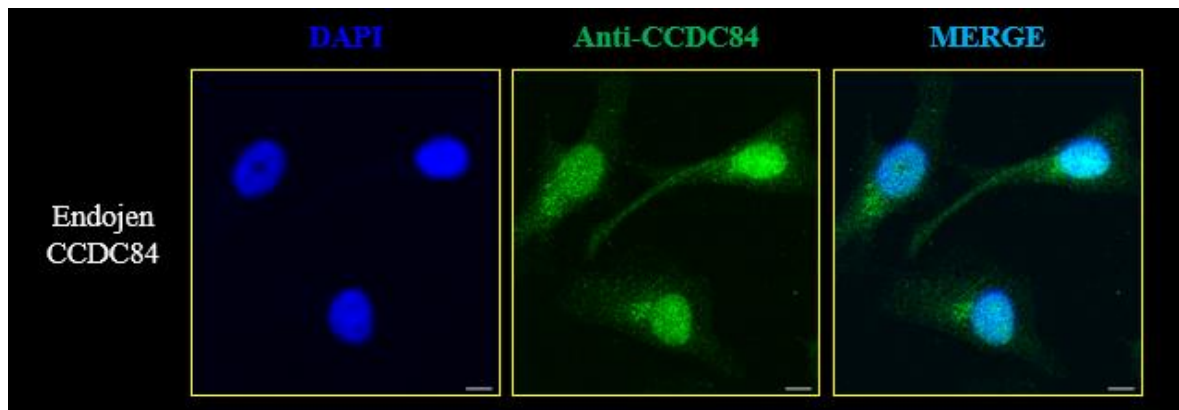
Resim 4. CCDC84 üzerindeki NLS dizisinin cNLS Mapper kullanılarak *in silico* analizi. Proteinin 18-50. aa'leri arasında kalan ve kırmızı ile gösterilen bölge proteinin nükleusa yerleşiminden sorumlu dizi olarak tahmin edilmektedir

4.2. CCDC84'ün Hücre İçi Yerleşiminin Analizi

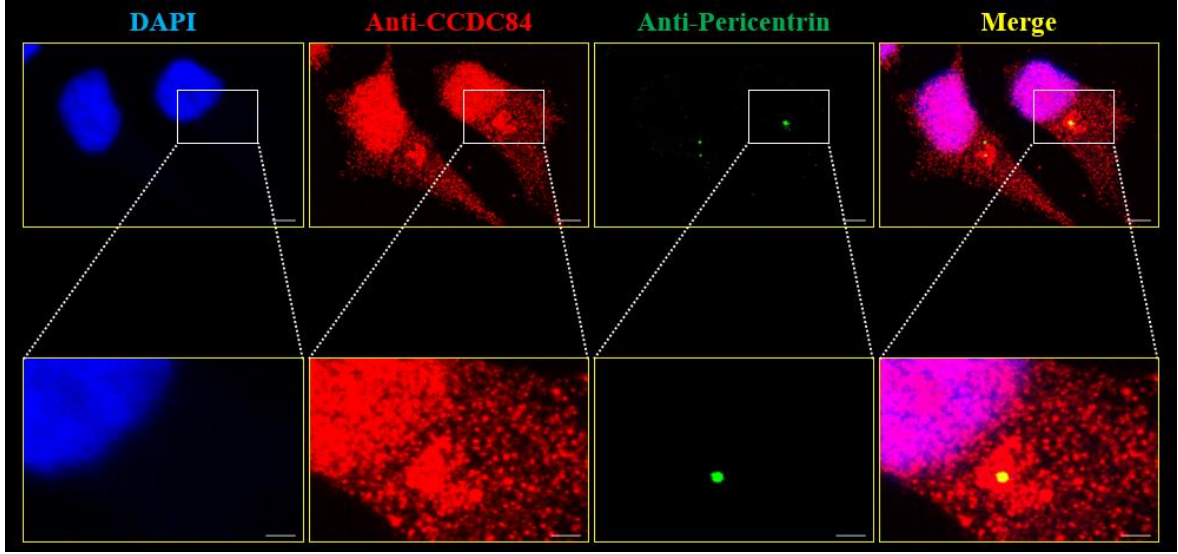
CCDC84'ün NLS dizisinin karakterizasyonuna yönelik gerçekleştirilen immünofloresan yaklaşımlarda, mutant ve yabanıl tip CCDC84'e ait gen bölgelerinin 40 kDa'dan büyük moleküler ağırlığa sahip olması amacıyla 26 kDa büyüklüğünde GST etiket proteini klonlamalarda kullanıldı. CCDC84'ün hücre içi yerleşiminin analizi için ilk aşamada, endojen CCDC84'ün hücre içi yerleşimi ve GST etiketinin bu yerleşim üzerine etkisinin olup olmadığı immünofloresan yaklaşım ile incelendi. Sonrasında, CCDC84'ün NLS dizisinin belirlenmesi amacıyla oluşturulan GST etiketli CCDC84 fragmanlarının ve CCDC84 mutantlarının hücre içi yerleşimleri ayrı ayrı analiz edildi.

4.2.1. Endojen CCDC84'ün Hücre İçi Yerleşiminin Analizi

Endojen CCDC84'ün hücre içi yerleşimi CCDC84'e özgü bir antikor kullanılarak HeLa hücrelerinde test edildi. Oluşturulan preparattan 100 hücre sayıldı ve endojen CCDC84'ün %100 oranında nükleusta lokalize olduğu görüldü. Bununla birlikte, CCDC84'ün hücrelerin bir kısmında çekideğin bir kenarında kuyruklu yıldız şeklinde sitoplazmaya doğru uzanan bir yerleşim gösterdiği gözlemlendi (Resim 5). Bu yerleşimin belirlenmesi için HeLa hücre hattında anti-CCDC84, anti-pericentrin primer antikorlar ve uygun sekonder antikor kullanılarak gerçekleştirilen immünofloresan analizleri sonucu CCDC84'ün nükleusta lokalizasyonuna ek olarak pericentrin ile sentrozomda kolocalize olduğu görüldü (Resim 6).



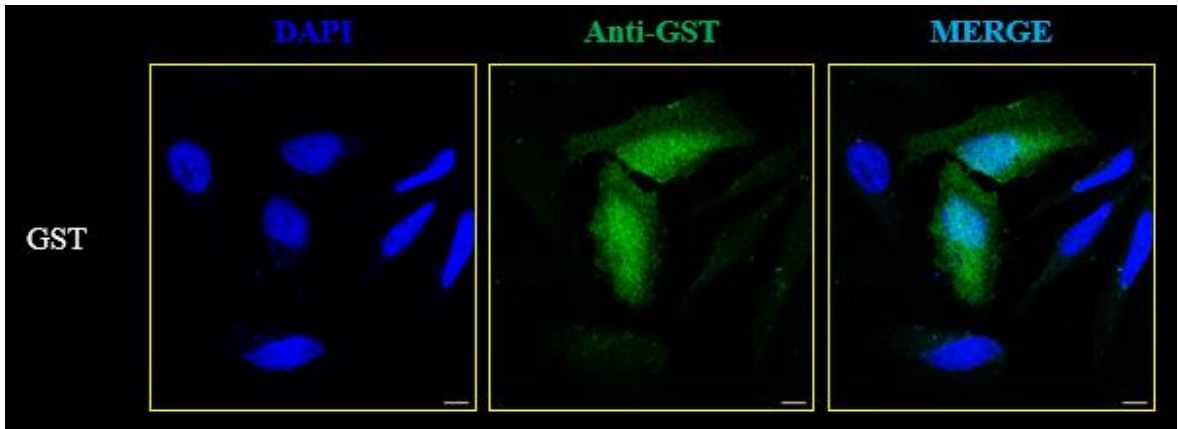
Resim 5. Endojen CCDC84'ün HeLa hücre hattında hücre içi yerleşiminin immünofloresan yaklaşım ile görüntülenmesi. Yeşil: Endojen CCDC84, Mavi: DAPI. Bar uzunluğu: 10 µm



Resim 6. Endojen CCDC84'ün HeLa hücrelerinde nükleus ve sentrozomda yerleşiminin immüno Floresan yaklaşım ile görüntülenmesi. Kırmızı: Endojen CCDC84, Yeşil: Pericentrin, Mavi: DAPI. Bar uzunluğu: Üstteki resimler için 5 μ m, alttaki resimler için 2 μ m

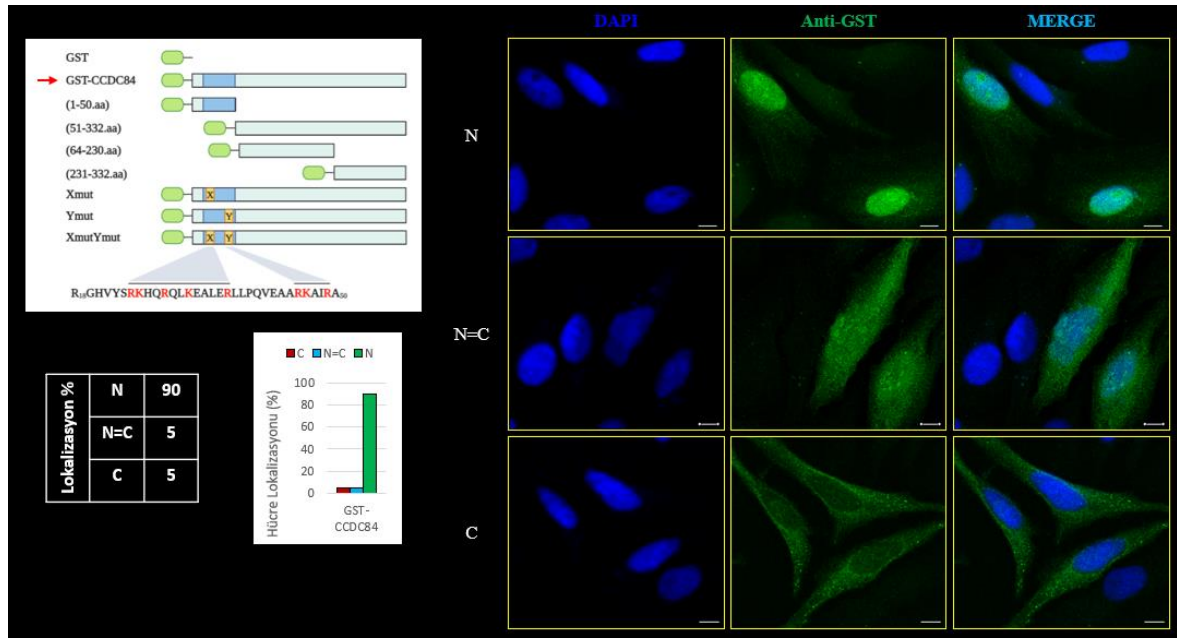
4.2.2. GST-CCDC84'ün Hücre İçi Yerleşiminin Analizi

GST etiketli CCDC84'ün ve oluşturulan mutant ve yabancı tip gen bölgelerinin hücre içi lokalizasyonunu takip etmek amacıyla kullanılacak olan GST etiket proteininin hücre içi lokalizasyonunun belirlenmesi için HeLa hücre hattında gerçekleştirilen transfeksiyon ve sonrasında anti-GST ve uygun sekonder antikor kullanılarak gerçekleştirilen immüno Floresan analiz sonucu GST etiket proteininin 40 kDa'dan küçük olmasından dolayı sitoplazma ve nükleusta eşit bir şekilde difüz halde olduğu görüldü (Resim 7).



Resim 7. GST'nin HeLa hücre hattında hücre içi yerleşiminin immüno Floresan yaklaşım ile görüntülenmesi. Yeşil: GST, Mavi: DAPI. Bar uzunluğu: 10 μ m

GST-CCDC84'ün hücre içi lokalizasyonunun belirlenmesi için HeLa hücre hattında gerçekleştirilen transfeksiyon ve sonrasında anti-GST ve uygun sekonder antikor kullanılarak gerçekleştirilen immüno Floresan işaretleme ile oluşturulan preparatta transfekte olan 100 hücre sayıldı. GST etiketli CCDC84'ün %90 oranında nükleusta, %5 oranında hem nükleusta hem de sitoplazmada difüz bir halde ve %5 oranında ise sadece sitoplazmada lokalize olduğu görüntülendi (Resim 8).



Resim 8. GST-CCDC84'ün HeLa hücre hattında hücre içi yerleşiminin immüno Floresan yaklaşım ile analizi. Kırmızı ok: Test edilen GST etiketli CCDC84'ün şematik görünümü. N: GST-CCDC84'ün nükleusta yerleşimi, N=C: GST-CCDC84'ün nükleus ve sitoplazmada eşit dağılımı, C: GST-CCDC84'ün sitoplazmada yerleşimi. Yeşil: GST-CCDC84, Mavi: DAPI. Bar uzunluğu: 10 µm

4.3. CCDC84'ün NLS Dizisinin Karakterizasyonu

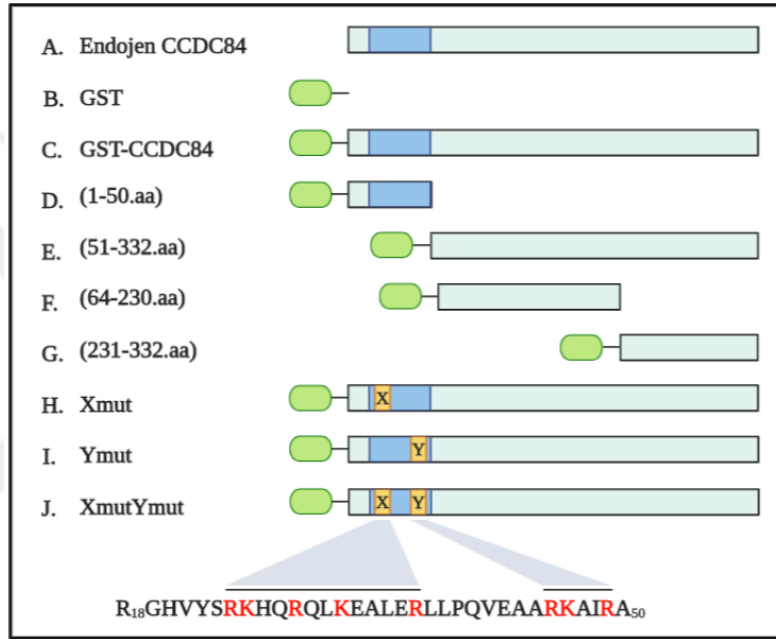
Proteinlerin NLS dizisinin belirlenmesi fonksiyonlarının aydınlatılmasında kritik rol oynamaktadır. NLS dizisinin karakterizasyonunda, olası NLS dizisinin silinmesi ve NLS dizisi için kritik öneme sahip olduğu bilinen pozitif yüklü bazik arjinin ve lizin aminoasitlerinin alanin gibi polar olmayan aminoasitlere dönüştürülerek NLS dizisinin importinlerle etkileşiminin bozulması amaçlanarak proteinlerin hücre içi yerleşimleri üzerindeki etkilerinin immüno Floresan yaklaşım ile incelenmesi yöntemleri kullanılmaktadır (179, 197-199).

Bu doğrultuda, ilk aşamada, CCDC84'ün NLS dizisinin karakterizasyonuna yönelik olarak gerçekleştirilen *in silico* analizler sonucunda cNLS Mapper programının CCDC84 için vermiş olduğu olası NLS dizisini içeren ve içermeyen bölgeler (Şekil 11) GST etiketli ekspresyon vektörlerine immünofloresan analizinde kullanılmak üzere klonlandı. Bu yaklaşımla, 332 aminoasitten oluşan CCDC84 proteinini kodlayan gen ve küçük ancak örtüşen fragmanlar halinde dizayn edilen (Şekil 12) CCDC84'ün 1-50. aa'leri arasında kalan bölge (1-50. aa), 51-332. aa'leri arasında kalan bölge (51-332. aa), 64-230. aa'leri arasında kalan bölge (64-230. aa) ve 231-332. aa'leri arasında kalan bölge (231-332. aa) ayrı ayrı klonlanarak GST etiketli memeli ekspresyon vektörleri oluşturuldu (Şekil 12D-G). Oluşturulan her bir ekspresyon vektörü geçici transfeksiyonla HeLa hücrelerine transfekte edildi ve transfeksiyonun 24. saatinde fikse edilerek önce anti-GST pimer antikoru, sonrasında uygun sekonder antikor ile inkübe edildi. Son aşamada ise, DAPI içeren kapatma solüsyonu ile kapatılarak preparatlar hazırlandı. Oluşturulan preparatlar konfokal mikroskopta değerlendirildi. Her bir deney üç kez tekrarlandı ve her bir preparatta transfekte olan 100 hücre sayıldı.

Ardından, cNLS Mapper programının CCDC84 için vermiş olduğu 18-50. aa'leri arasındaki hedef NLS dizisi içinde yer alan, arjinin ve lizince zengin 24-36. aa'leri arasında kalan ve X bölgesi olarak adlandırdığımız bölge ve 45-49. aa'leri arasında kalan ve Y bölgesi olarak adlandırdığımız bölge içinde yer alan arjinin ve lizinler PCR'a dayalı yaklaşımla alanine dönüştürülerek sırası ile CCDC84-Xmut, CCDC84-Ymut ve CCDC84-XmutYmut CCDC84 mutant genleri oluşturuldu ve GST etiketli memeli ekspresyon vektörüne klonlandı (Şekil 12H-J). CCDC84-Xmut, CCDC84-Ymut ve CCDC84-XmutYmut CCDC84 mutant genlerini taşıyan GST etiketli ekspresyon vektörleri ile HeLa hücrelerine transfeksiyon sonrası, anti-GST pimer antikoru ve sonrasında uygun sekonder antikor kullanılarak immünofloresans işaretleme gerçekleştirildi. Oluşturulan preparatlar konfokal mikroskop ile analiz edildi. Her bir deney 3 kez tekrarlandı ve her bir preparattan en az 100 hücre sayıldı.

MAPAQRCPLCRQTFFCGR₁₈GHVYSRKHQRQLKEALERLLPQVEAARKAIRA₅₀AQVE
 RYVPEHERCCWCLCCGCEVREHL SHGNLTVLYGGLLEHLASPEHKKATNKFWWEN
 KAEVQMKEKFLVTPQDYARFKKSMVKGLDSYEEKEDKVIKEMAAQIREVEQSRQEV
 VRSVLEPQAVPDPEEGSSAPRSWKGMNSQVASSLQQPSNLDLPPAPELDWMETGPSL
 TFIGHQDIPGVGNIHSGATPPWMIQDEEYIAGNQEIGPSYEEFLKEKEKQKLKKLPPDR
 VGANFDHSSSTAGWLPSTSGFVWNNRRWQSRHQFKTEAAAMKKQSHTEKS

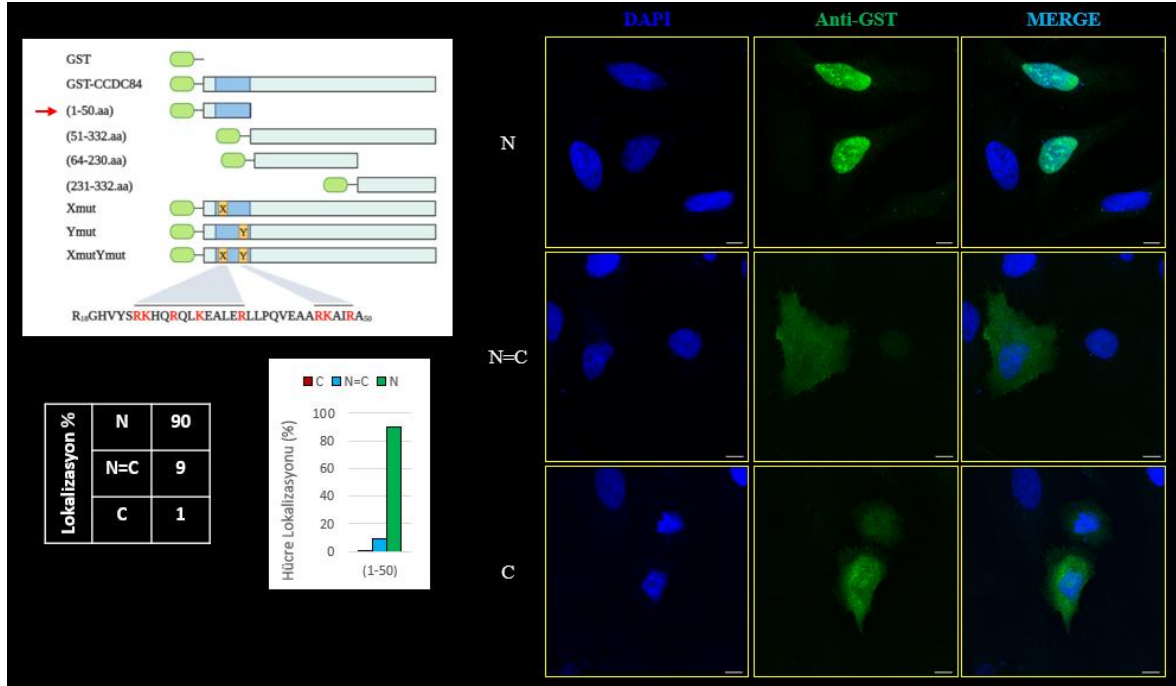
Şekil 11. CCDC84'ün aminoasit dizisi. Kırmızı işaretli aminoasitler lizin aminoasitlerini, mavi işaretli aminoasitler arjinn aminoasitlerini, altı çizili bölge ise olası NLS dizisini göstermektedir



Şekil 12. CCDC84'ün olası NLS dizisinin ve kritik aminoasitlerin belirlenmesi. (A) Endojen CCDC84, (B) GST, (C) GST-CCDC84, (D, E, F, G) NLS dizisinin belirlenmesi için oluşturulan fragmentler, (H, I, J), NLS dizisindeki kritik aminoasitlerin belirlenmesi için oluşturulan mutant fragmentler. Mavi: 18-50.aa, Yeşil: GST, X: X bölgesi, Y: Y bölgesi

4.3.1. CCDC84'ün 1-50. aa'leri Arasındaki Bölgenin Hücre İçi Yerleşiminin Analizi

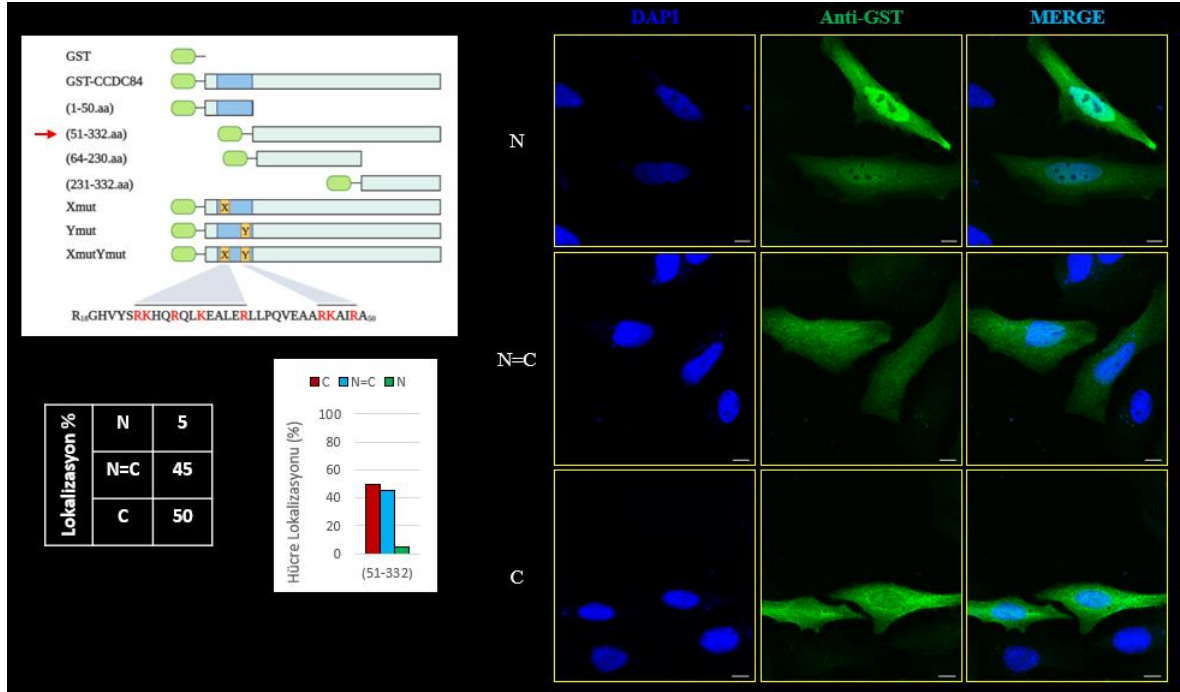
İlk aşamada, cNLS Mapper programının NLS olarak öngördüğü CCDC84'ün 1-50. aa'leri arasında kalan bölgenin hücre içi yerleşimi analiz edildi. CCDC84'ün 1-50.aa'leri arasındaki bölgenin %90 oranında nükleusta, %9 oranında hem nükleusta hem de sitoplazmada difüz bir halde ve %1 oranında sadece sitoplazmada lokalize olduğu görüldü (Resim 9).



Resim 9. GST-CCDC84 1-50. aa'nın HeLa hücre hattında hücre içi yerleşiminin immüno Floresan yaklaşım ile analizi. Kırmızı ok: Test edilen GST etiketli CCDC84 1-50. aa'nın şematik görünümü. N: GST-CCDC84 1-50. aa'nın nükleusta yerleşimi, N=C: GST-CCDC84 1-50. aa'nın nükleus ve sitoplazmada eşit dağılımı, C: GST-CCDC84 1-50. aa'nın sitoplazmada yerleşimi. Yeşil: GST-CCDC84 1-50. aa, Mavi: DAPI. Bar uzunluğu: 10 µm

4.3.2. CCDC84'ün 51-332. aa'leri Arasındaki Bölgenin Hücre İçi Yerleşiminin Analizi

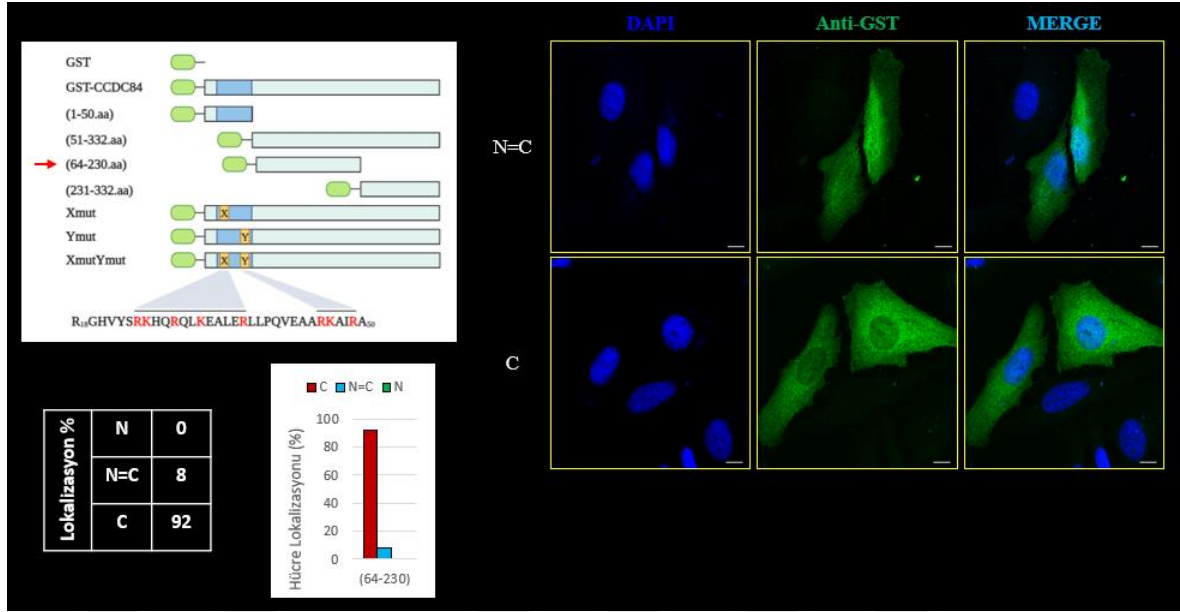
İkinci aşamada, cNLS Mapper programının NLS dizisi olarak öngördüğü bölgenin dışında kalan 51-332. aa'leri arasında kalan bölgenin hücre içi yerleşimi analiz edildi. Sonuç olarak proteinin 51-332. aa'leri arasındaki 282 aminoasitlik bölgenin %45 oranında hem nükleusta hemde sitoplazmada difüz bir halde, %50 oranında sadece sitoplazmada ve %5 oranında ise sadece nükleusta lokalize olduğunu görüldü (Resim 10).



Resim 10. GST-CCDC84 51-332. aa'nın HeLa hücre hattında hücre içi yerleşiminin immüno Floresan yaklaşım ile analizi. Kırmızı ok: Test edilen GST etiketli CCDC84 51-332. aa'nın şematik görünümü. N: GST-CCDC84 51-332. aa'nın nükleusta yerleşimi, N=C: GST-CCDC84 51-332. aa'nın nükleus ve sitoplazmada eşit dağılımı, C: GST-CCDC84 51-332. aa'nın sitoplazmada yerleşimi. Yeşil: GST-CCDC84 51-332. aa, Mavi: DAPI. Bar uzunluğu: 10 µm

4.3.3. CCDC84'ün 64-230. aa'leri Arasındaki Bölgenin Hücre İçi Yerleşiminin Analizi

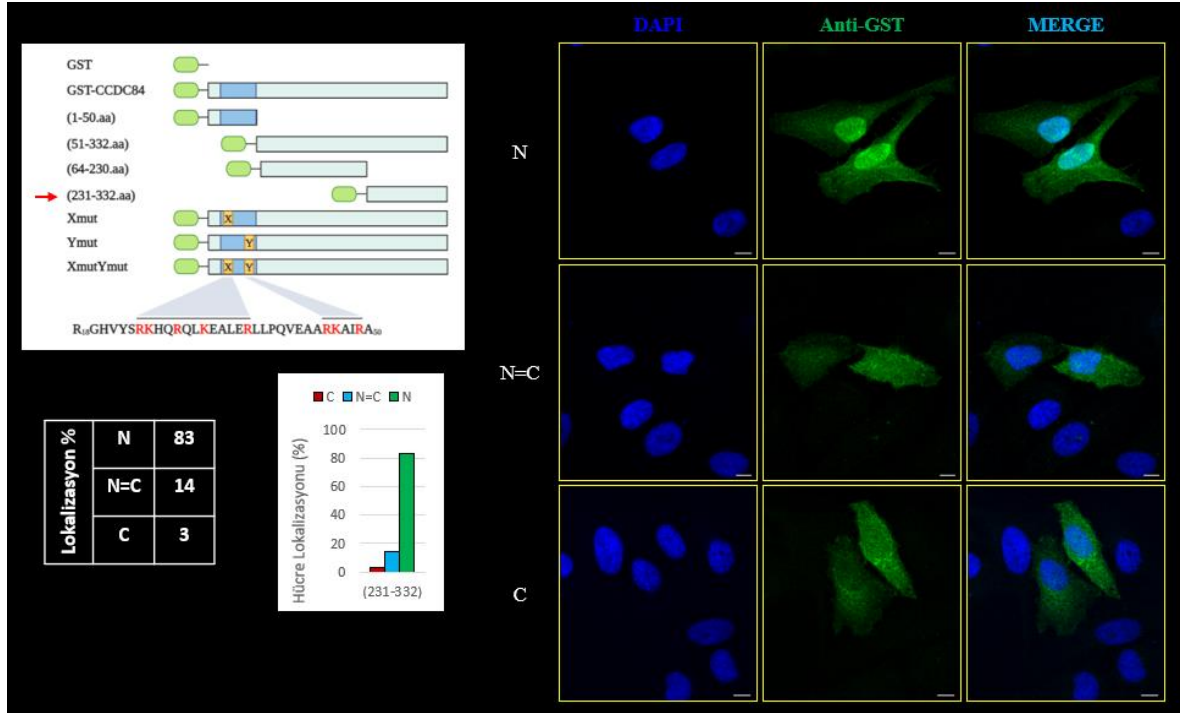
CCDC84'ün nükleusa yerleşim göstermeyen 51-332. aa'leri arasındaki 282 aminoasitlik bölümünün iki küçük parçaya ayrılacak şekilde klonlanması ile oluşturulan 64-230. aa'leri arasındaki 167 aminoasitlik bölgenin %92 oranında sitoplazmada, %8 oranında hem nükleusta hem de sitoplazmada difüz bir halde lokalize olduğu görüldü. Bu bölgenin nükleusa lokalizasyonuna rastlanmadı (Resim 11).



Resim 11. GST-CCDC84 64-230. aa'nın HeLa hücre hattında hücre içi yerleşiminin immüno Floresan yaklaşım ile analizi. Kırmızı ok: Test edilen GST etiketli CCDC84 64-230. aa'nın şematik görünümü. N: GST-CCDC84 64-230. aa'nın nükleusta yerleşimi, N=C: GST-CCDC84 64-230. aa'nın nükleus ve sitoplazmada eşit dağılımı, C: GST-CCDC84 64-230. aa'nın sitoplazmada yerleşimi. Yeşil: GST-CCDC84 64-230. aa, Mavi: DAPI. Bar uzunluğu: 10 µm

4.3.4. CCDC84'ün 231-332. aa'leri Arasındaki Bölgenin Hücre İçi Yerleşiminin Analizi

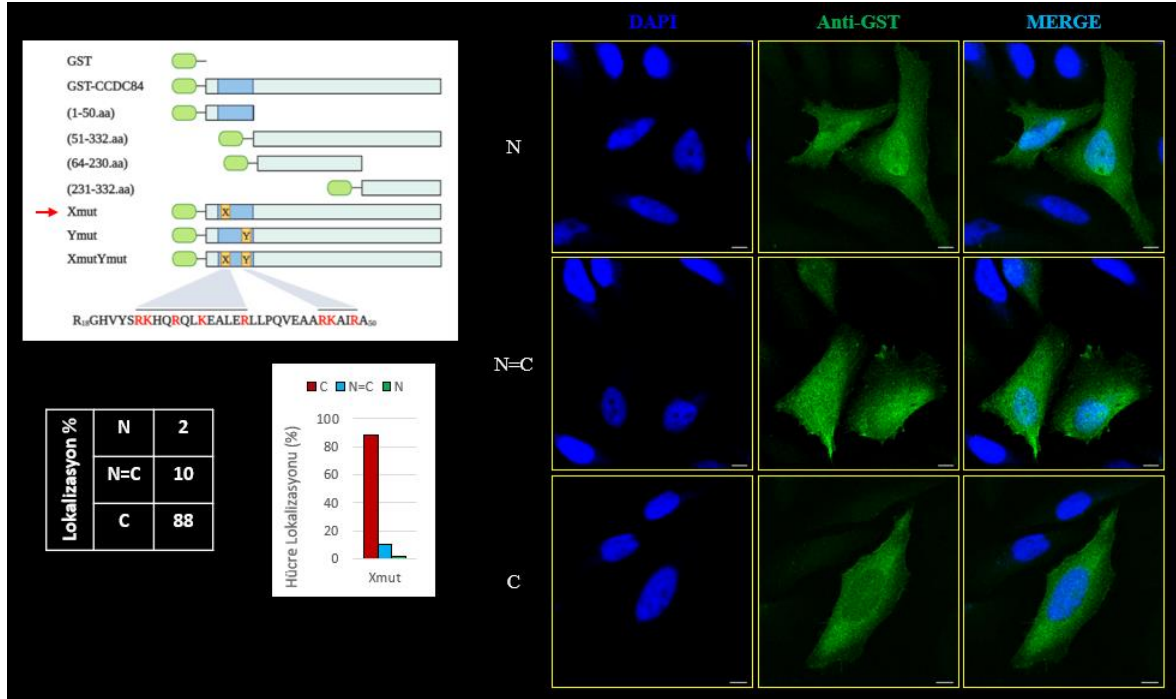
CCDC84'ün C-terminalinde 231-332. aa'leri arasında kalan 102 aminoasitlik bölgenin ise HeLa hücrelerinde yapılan immüno Floresan analiz sonucunda bu bölgenin %83 oranında nükleusta, %14 oranında hem nükleusta hem de sitoplazmada difüz bir halde ve %3 oranında sadece sitoplazmada lokalize olduğu görüldü (Resim 12).



Resim 12. GST-CCDC84 231-332. aa'nın HeLa hücre hattında hücre içi yerleşiminin immüno Floresan yaklaşım ile analizi. Kırmızı ok: Test edilen GST etiketli CCDC84 231-332. aa'nın şematik görünümü. N: GST-CCDC84 231-332. aa'nın nükleusta yerleşimi, N=C: GST-CCDC84 231-332. aa'nın nükleus ve sitoplazmada eşit dağılımı, C: GST-CCDC84 231-332. aa'nın sitoplazmada yerleşimi. Yeşil: GST-CCDC84 231-332. aa, Mavi: DAPI. Bar uzunluğu: 10 µm

4.3.5. GST-CCDC84 Xmut Fragmentin Hücre İçi Yerleşiminin Analizi

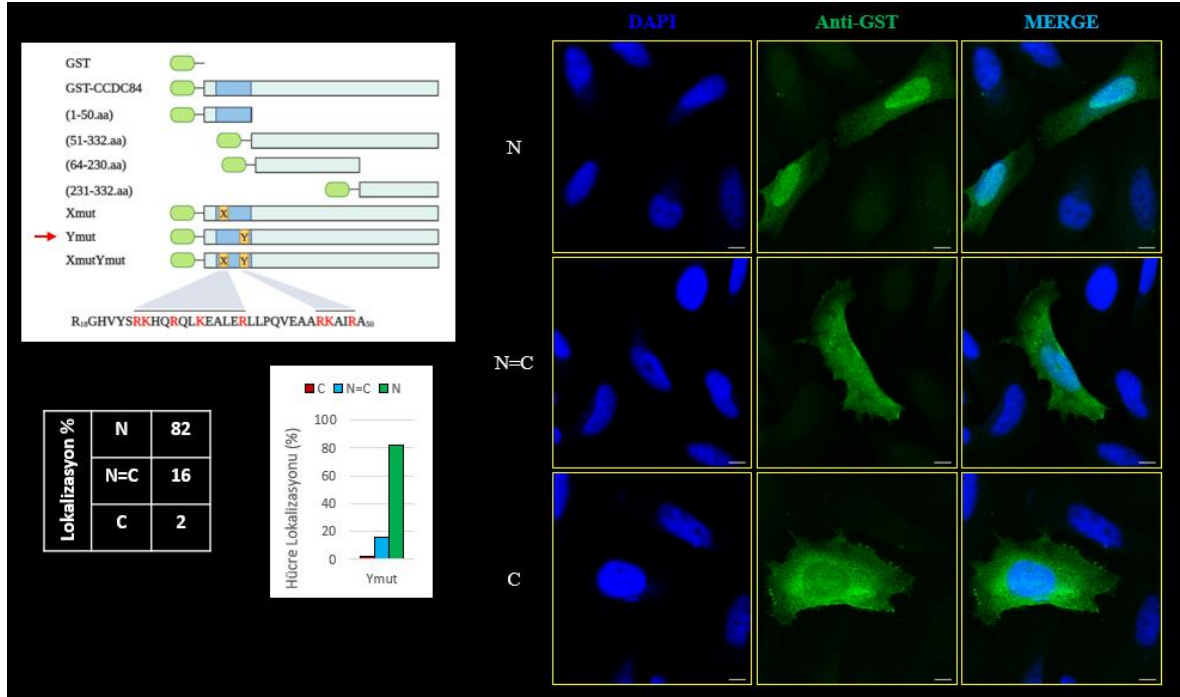
CCDC84'in küçük parçalar halinde analizi sonucunda cNLS Mapper programının vermiş olduğu olası NLS dizisinin yer aldığı CCDC84'ün N-terminal bölgesinde 1-50. aa'ler arasındaki bölgenin NLS dizisi olabileceğini destekleyen verilere ulaşıldı (Resim 4). Nükleusa lokalize olan 1-50. aa'ler arasında kalan ve NLS dizilerine özgü olan lizin ve arjinin aminoasitlerinin nispeten yoğun olarak bulunduğu ve X bölgesi olarak adlandırdığımız 24-36. aa'ler arasında kalan üçü arjinin ve ikisi lizin aminoasitlerinden oluşan 12 aminoasitlik bölgedeki arjinin ve lizin aminoasitlerinin alanine dönüştürülmesi ile oluşturduğumuz CCDC84-Xmut'un immüno Floresan analiz sonucunda proteinin %2 oranında nükleusta, %10 oranında hem nükleusta hem de sitoplazmada difüz bir halde, %88 oranında sadece sitoplazmada lokalize olduğu görüldü (Resim 13).



Resim 13. GST-CCDC84 Xmut fragmentin HeLa hücre hattında hücre içi yerleşiminin immüno Floresan yaklaşım ile analizi. Kırmızı ok: Test edilen GST etiketli CCDC84 Xmut'un şematik görünümü. N: GST-CCDC84 Xmut'un nükleusta yerleşimi, N=C: GST-CCDC84 Xmut'un nükleus ve sitoplazmada eşit dağılımı, C: GST-CCDC84 Xmut'un sitoplazmada yerleşimi. Yeşil: GST-CCDC84 Xmut, Mavi: DAPI. Bar uzunluğu: 10 µm

4.3.6. GST-CCDC84 Ymut Fragmentin Hücre İçi Yerleşiminin Analizi

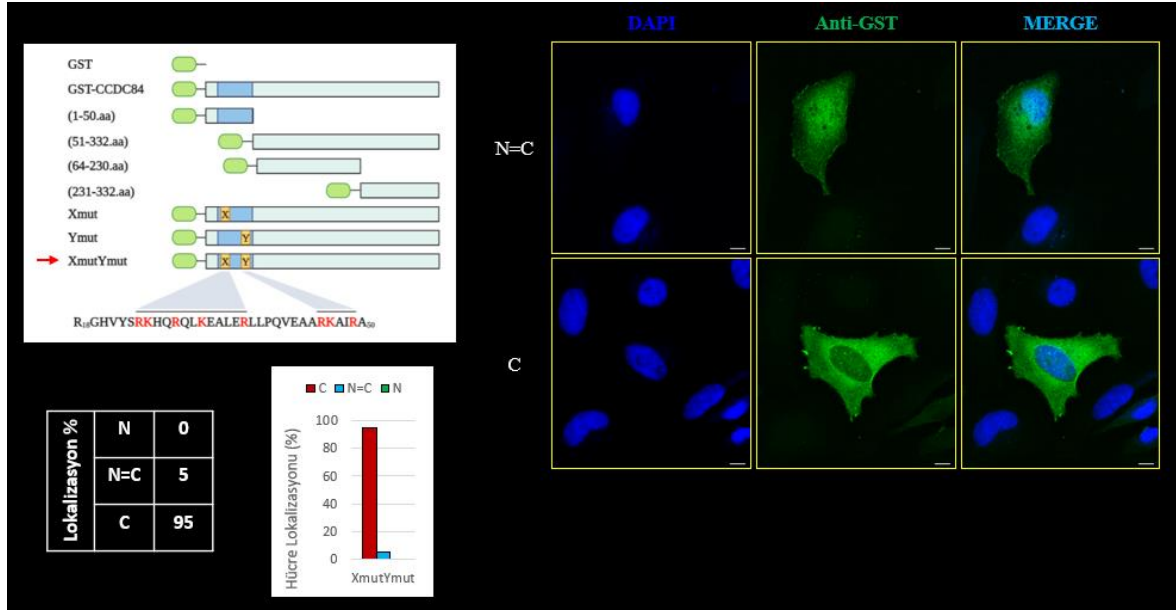
CCDC84'ün cNLS Mapper programı tarafından NLS dizisi olarak öngördüğü 18-50. aa'leri arasında kalan ve NLS dizilerine özgü olan lizin ve arjinin aminoasitlerinin nispeten yoğun olarak bulunduğu ve Y bölgesi olarak adlandırdığımız 45-49 aa.'leri arasında kalan bölge analiz edildi. Bu bölgedeki 45-49 aa.'ler arasında kalan ikisi arjinin ve biri lizin aminoasitlerinden oluşan 5 aminoasitlik bölgedeki arjinin ve lizin aminoasitlerinin alanine dönüştürülmesi ile oluşturduğumuz CCDC84-Ymut'un immüno Floresan analiz sonucunda, proteinin %82 oranında nükleusta, %16 oranında hem nükleusta hem de sitoplazmada difüz bir halde, %2 oranında sadece sitoplazmada lokalize olduğu görüldü (Resim 14).



Resim 14. GST-CCDC84 Ymut fragmentin HeLa hücre hattında hücre içi yerleşiminin immüno Floresan yaklaşım ile analizi. Kırmızı ok: Test edilen GST etiketli CCDC84 Ymut'un şematik görünümü. N: GST-CCDC84 Ymut'un nükleusta yerleşimi, N=C: GST-CCDC84 Ymut'un nükleus ve sitoplamada eşit dağılımı, C: GST-CCDC84 Ymut'un sitoplamada yerleşimi. Yeşil: GST-CCDC84 Ymut, Mavi: DAPI. Bar uzunluğu: 10 µm

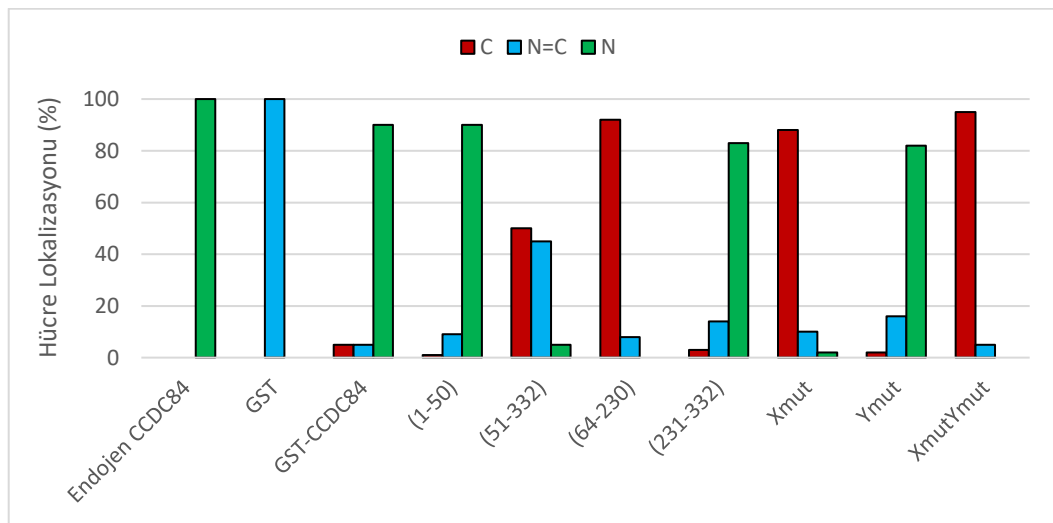
4.3.7. GST-CCDC84 XmutYmut Fragmentin Hücre İçi Yerleşiminin Analizi

CCDC84'ün cNLS Mapper programı tarafından NLS dizisi olarak öngördüğü 18-50. aa'leri arasındaki bölge içinde yer alan, lizin ve arjinin aminoasitlerince zengin 24-36. aa'ler ve 45-49. aa'ler arasında kalan ve "X" ve "Y" bölgesi olarak adlandırılan iki bölgedeki tüm arjinin ve lizin aminoasitlerini alanine dönüştürmesi ile oluşturulan memeli akspresyon vektörünün HeLa hücrelerine transfeksiyonu ve immüno Floresan ile analizi sonucunda; CCDC84-XmutYmut proteinin nükleusa lokalizasyon göstermediği, %5 oranında nükleusta ve sitoplazmada difüz bir halde, %95 oranında ise sadece sitoplazmada lokalize olduğu görüldü (Resim 15).



Resim 15. GST-CCDC84 XmutYmut fragmentin HeLa hücre hattında hücre içi yerleşiminin immüno Floresan yaklaşım ile analizi. Kırmızı ok: Test edilen GST etiketli CCDC84 XmutYmut'un şematik görünümü. N: GST-CCDC84 XmutYmut'un nükleusta yerleşimi, N=C: GST-CCDC84 XmutYmut'un nükleus ve sitoplamada eşit dağılımı, C: GST-CCDC84 XmutYmut'un sitoplamada yerleşimi. Yeşil: GST-CCDC84 XmutYmut, Mavi: DAPI. Bar uzunluğu: 10 µm

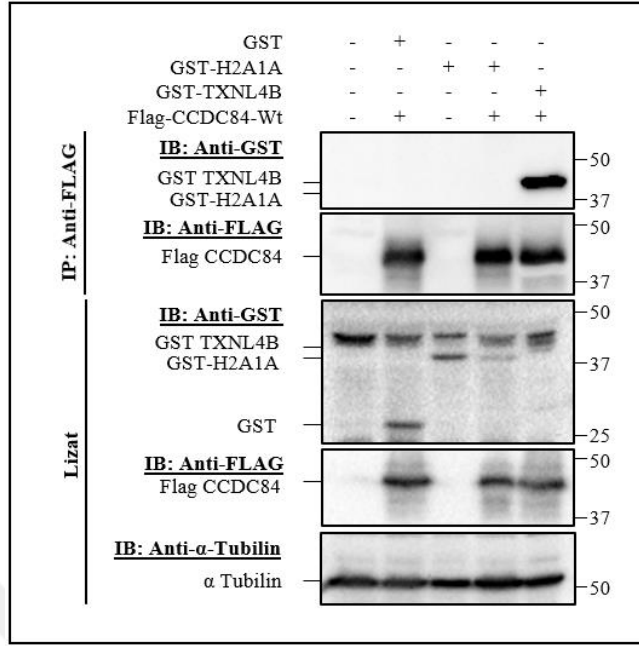
Gerçekleştirilen immüno Floresan analizler sonucu, CCDC84 üzerinde cNLS Mapper programının öngördüğü 18-50. aa'ler arasındaki bölgenin NLS dizisini taşıdığı görüldü (Şekil 13).



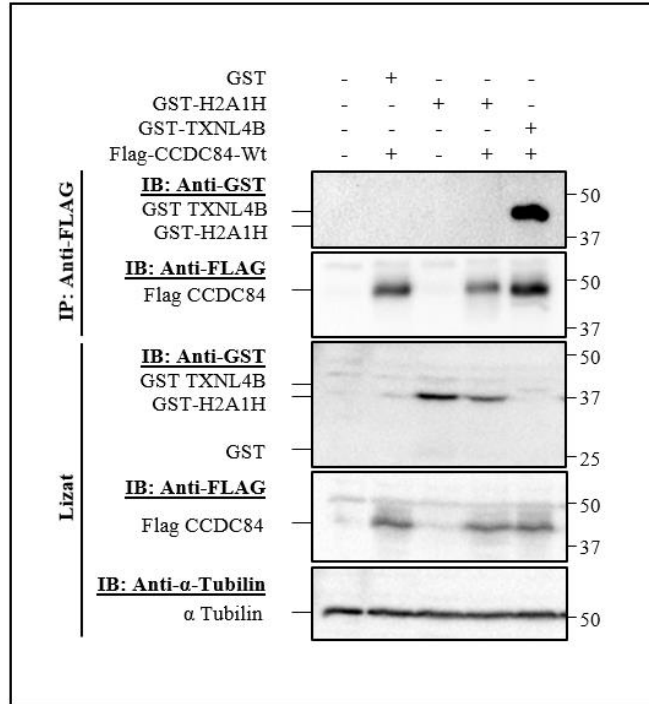
Şekil 13. Oluşturulan fragmentlerin hücre içi lokalizasyon yüzdeleri

4.4. H2A1A ve H2A1H'nin CCDC84 ile Etkileşiminin İmmünopresipitasyon ile Doğrulanması

Splaysing ile ilişkilendirilen CCDC84'ün (33) H2A1A ve H2A1H histon proteinleri ile etkileşimine yönelik AP ve MS yöntemi ile elde edilmiş olan ön verilerin sırasıyla immünopresipitasyon ve immüno blot yöntemi ile doğrulanması amaçlandı. Bu amaçla, ilk aşamada FLAG etiketi taşıyan yabanıl tip CCDC84'ün kalıcı olarak transfekte edildiği HEK293 Flp-In hücrelerine GST-H2A1A proteinini geçici olarak transfekte edildi. Bu deneyde, laboratuvarımızda daha önce CCDC84 ile etkileştiği gösterilen TXNL4B proteinini pozitif kontrol olarak kullanıldı. Transfeksiyonun ardından hücrelerden izole edilen protein lizatlar, immünopresipitasyon deneyi öncesi proteinlerin anti-FLAG M2 rezinlere spesifik olmayan etkileşimler ile bağlanmasının engellenmesi için mouse IgG-agaroz ile muamele edildi. Ardından, protein lizatları anti-FLAG M2 rezinleri ile immünopresipite edilerek CCDC84 ve CCDC84'ün etkileştiği protein kompleksi çekildi. CCDC84'ün GST-H2A1A ile etkileşim halinde olup olmadığının tespiti için anti-FLAG, anti-GST ve anti- α tubulin antikorları kullanılarak %10'luk poliakrilamid jelde immüno blot analizleri gerçekleştirildi. Analizler sonucu FLAG-CCDC84'ün GST-H2A1A histon proteinini ile etkileşmediği görüldü (Resim 16). İkinci aşamada, FLAG etiketi taşıyan yabanıl tip CCDC84'ün kalıcı olarak transfekte edildiği HEK293 Flp-In hücrelerine GST-H2A1H proteinini geçici olarak transfekte edildi. TXNL4B proteinini ise pozitif kontrol olarak kullanıldı. FLAG-CCDC84 ile GST-H2A1H histon proteinleri arasında etkileşimin var olup olmadığı aynı yöntemler kullanılarak analiz edildi. Analizler sonucu FLAG-CCDC84'ün GST-H2A1H ile etkileşmediği görüldü (Resim 17).

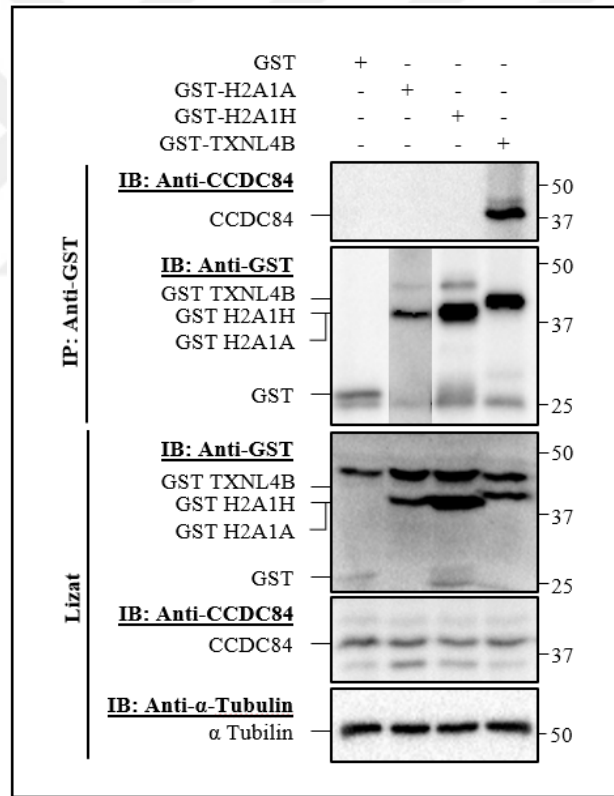


Resim 16. FLAG-CCDC84 ile GST-H2A1A arasındaki olası etkileşimin immünopresipitasyon ile analizi. Wt: Yabancıl Tıp, IP: İmmünopresipitasyon, IB: İmmünoblot.



Resim 17. FLAG-CCDC84 ile GST-H2A1H arasındaki olası etkileşimin immünopresipitasyon ile analizi. Wt: Yabancıl Tıp, IP: İmmünopresipitasyon, IB: İmmünoblot.

CCDC84 ile histon proteinleri H2A1A ve H2A1H arasındaki etkileşimin var olup olmadığı GST bağlayıcı protein bağlı boncuklar olan GST-Trap_A kullanılarak sırasıyla immünopresipitasyon ve immünoiblot analizleri ile test edildi. GST-H2A1A ve GST-H2A1H proteinleri HEK293 hücrelerine geçici olarak transfekte edilirken GST-TXNL4B proteinini pozitif kontrol olarak kullanıldı. Transfeksiyonun ardından hücrelerden izole edilen protein lizatları GST-Trap_A rezinler üzerinden geçirilerek immünopresipite edildi ve CCDC84 ve CCDC84'ün etkileştiği protein kompleksi çekildi. CCDC84'ün GST-H2A1A ile etkileşim halinde olup olmadığının tespiti için anti-CCDC84, anti-GST ve anti- α tubulin antikorları kullanılarak %10'luk poliakrilamid jelde immünoiblot analizleri gerçekleştirildi. Analizler sonucu GST-H2A1A ve GST-H2A1H'nin endojen CCDC84 ile etkileşmediği görüldü. (Resim 18).



Resim 18. Endojen-CCDC84 ile GST-H2A1A ve GST-H2A1H arasındaki olası etkileşimin immünopresipitasyon ile analizi. Wt: Yabanıl Tip, IP: İmmünopresipitasyon, IB: İmmünoiblot.

Tüm bu analizler sonucu CCDC84'ün histon proteinleri H2A1A ve H2A1H ile arasındaki olası etkileşimlere yönelik ön veriler doğrulanamadı.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu tez çalışması ile ilk kez grubumuz tarafından mutasyonu MPD ile ilişkilendirilen ve splaysingin temel bileşenlerinden biri olan PRPF3 ile doğrudan etkileştiği gösterilen (33) CCDC84'ün NLS dizisi ve histon proteinleri H2A1A ve H2A1H arasındaki olası etkileşimi araştırıldı. CCDC84'ün nükleusta lokalizasyonuna yönelik verilere CCDC84'ün fonksiyonunu tanımlamaya yönelik grubumuz tarafından yürütülen bir doktora tezi çalışması kapsamında ulaşılrken (33), CCDC84'ün histon proteinleri H2A1A ve H2A1H ile etkileşim içerisinde olabileceği yönündeki ön veriler ise CCDC84'ün etkileşim partnerlerinin araştırıldığı TÜBİTAK tarafından desteklenen 114Z883 no'lu proje kapsamında gerçekleştirilen AP ve MS analizleri ile elde edildi.

Splaysing, 300'ün üzerinde proteinin görev aldığı kompleks bir mekanizma olup (2-4), mRNA transkripsiyonu, transport ve translasyon dahil olmak üzere gen düzenleyici mekanizmalar ile etkileşim içindedir. Splaysing ile düzenleyici mekanizmalar arasındaki ilişki hakkında bilgilerin elde edilmesi hücre farklılaşması, gelişim ve hastalıkların moleküler mekanizmaları gibi temel biyolojik süreçleri aydınlatmaya katkı sağlayacaktır (30). Splaysingde rol oynayan birçok protein farklı hücresel süreç ile ilişkilendirilmiştir (5, 6). PTB ilişkili splaysing faktör PSF'nin, transkripsiyon, topoizomerez aktivitesi, nükleer RNA retansiyonu ve DNA rekombinasyonu gibi süreçlerde rol oynadığı gösterilmiştir (129-135). Splaysing ile ilişkili proteinler nükleus, sitoplazma ve sentrozom gibi çeşitli hücre içi bölgelerde lokalizasyon göstermekte (7-11) ve bu sayede splaysingin düzenlenmesinde kritik rol oynamaktadır (10, 12-17). Splaysing faktör ASF/SF2 ile ilişkili bir protein olan p32, ASF/SF2'nin hem fosforilasyonunu hem de pre-mRNA'ya bağlanmasını inhibe ederek splaysingi düzenlemekte (17), mitokondride ve sitoplazmada lokalizasyon göstermektedir (9). ASF/SF2 ise nükleus ve sitoplazma arasında mekik yaparak splaysingde fonksiyonel görev almaktadır (10). Apoptozis ve splaysing ilişkili protein kompleksi bileşenleri olan SAP18 ve RNPS1 ise nükleus ile sitoplazma arasında yer değiştirerek birbirlerinin alternatifi olarak işlev görmektedir (38). HnRNPA1, nükleer ve sitoplazmik bölmeler arasında mekik hareketi yapan diğer bir splaysing proteindir (39). SnRNP'lerin biyogenezinde görevli proteinlerin ve snRNA'ların sitoplazma ve nükleus arasında transportu splaysingdeki kompleks mekanizmalardan biridir (Şekil 3). Bu süreçte snRNA'lar ilk olarak sitoplazmaya taşınmakta ve burada nükleusa geri aktarılmadan önce ek olgunlaşma aşamaları

geçirmektedir (12-16). SnRNP'lerin nükleusa transportu ise snurportin (40) ve importin β ile gerçekleşmektedir (41).

Proteinlerin fonksiyonlarının aydınlatılması kapsamında, proteinlerin hücre içi yerleşimlerinin ve etkileştiği proteinlerin belirlenmesi, fonksiyonel dizilerinin (motiflerin veya domainlerin) tanımlanması büyük önem taşımaktadır (170-175). Nükleus ve sitoplazma arasında gerçekleşen transport; hücre çoğalması, transformasyonu, tümörögenез ve sinyal transdüksiyonu gibi birçok hücreyel süreç ile ilişkilidir (19, 20). Nükleer transport, spesifik lokalizasyon sinyal dizilerinin rol oynadığı (18) NPC boyunca aktif ve seçici bir mekanizma aracılığı ile meydana gelmektedir (51). Özellikle nükleer proteinlerin nükleusa transportu için gerekli olan ve taşıyıcı proteinlere bağlanmaya aracılık eden NLS dizilerinin tanımlanması protein fonksiyonlarının aydınlatılmasına katkı sağlamaktadır (37). Ayrıca, proteinlerin nükleusa transport süreci, hastalıkların tedavisinde etkili bir yol olabilir (22). Bu doğrultuda nükleer transportun etkinliğini artırmaya yönelik çalışmalarda NLS'ler kullanılmakta (23, 24), NLS'ler üzerindeki modifikasyonların hedeflenmesi ile spesifik ilaç dağıtım yöntemleri geliştirilmektedir (25-28). Nükleer transport mekanizmaları hakkında gelecekte gerçekleştirilecek birçok çalışma hastalıkların tedavi süreçlerine katkılar sağlayacaktır (29).

Yakın geçmişte yapılan çalışmalar ile CCDC84'ün nükleusta ve sentrozomun proksimal ucunda lokalize olduğu ve sentrozom duplikasyonunun düzenlenmesinde rol aldığı bildirilmiştir (163). Daha önce grubumuz tarafından yürütölen çalışmalar kapsamında da CCDC84'ün nükleusta lokalize olduğu immünofloresan çalışmalar ile gösterilmiştir (33). Proteinlerin nükleusa transportunda proteinlerin üzerinde yer alan NLS dizileri ve bu dizileri tanıyan spesifik transport reseptörleri rol oynar (54). Ancak, hücre nükleusunda yerleşim gösteren bütün proteinlerin üzerinde NLS dizisi bulunmamaktadır. NLS içermeyen bazı proteinlerin nükleusa taşınabileceğini destekleyen birçok kanıt vardır (200-202). Bazı proteinler ise, "piggyback mekanizması" olarak da adlandırılan, fonksiyonel bir NLS dizisi içeren proteinlerle etkileşimleri yoluyla nükleusa taşınabilmektedir (82, 202, 203). Birçok protein ise kanonikal NLS dizilerinden farklı olarak kargo proteinin importin β 2 ile doğrudan etkileşimine aracılık eden kanonikal olmayan PY-NLS dizileri taşır (54, 83). Bu proteinlerin bazıları, ribozomal proteinler, CREB, HTLV-1 protein Rex, PTHrP, siklin B1, TRF (54), SREBP-2 (102), GAL4 (103), HIV-1 Rev ve Tat retroviral proteinleridir (104). İlginç bir şekilde, Hrp1 ve Nab2 maya proteinlerinde tanımlanan arjinin-glisin bakımından zengin

NLS dizileri ve M9 olarak adlandırılan hnRNPA1 proteininin glisin ve asparajin bakımından zengin NLS dizisinin de PY-NLS ile aynı özelliklere sahip olduğu ve kanonikal olmayan NLS dizileri taşıdığı gösterilmiştir (39, 57, 100). Proteinlerin çoğu importin β aracılı mekanizmalar ile NPC yoluyla nükleusa taşınırken, bazı protein için ise farklı nükleer transport mekanizmaları tarif edilmiştir. Importin β bağımsız bu mekanizmalar, kalsiyum bağlayıcı proteinler kalmodulin ve kalretikulin gibi alternatif taşıyıcılar ile transportu ve transport reseptörlerden bağımsız olarak NPC bileşenleri ile doğrudan etkileşimin aracılık ettiği transportu içerir. Birçok protein ise birden fazla mekanizma ile nükleusa taşınır. Bu nükleer transport süreçlerinin, bir yolun inhibe edildiği durumlarda hücre fonksiyonlarının korunmasını sağlayabileceği öne sürülmüştür (80). Kalmodulinin, importin β 'nın NLS dizisine bağlanmasına benzer bir şekilde, spesifik dizilere bağlanarak SRY ve SOX9 transkripsiyon faktörlerinin nükleer transportunda rol aldığı gösterilmiştir (81). Bazı proteinler ise, reseptör proteinlerine ihtiyaç duymadan nükleusa taşınabilmekte ve kargo proteinin FG nup'lara doğrudan bağlanmasıyla reseptörden bağımsız proteinin nükleer transportu gerçekleşebilmektedir. Importin α transport reseptörleri ile yapısal olarak benzerlik gösteren β -katenin gibi ARM tekrarlarına sahip proteinler, NPC'ye doğrudan bağlanarak importin β 'dan bağımsız bir şekilde nükleusa taşınabilmektedir (82). Bununla birlikte, STAT1 proteinin primer dizisi fonksiyonel kanonikal bir NLS dizisi içermez. STAT1'in yapısında yer alan bazik rezidüleri, STAT1'in dimerizasyonu ile importin α tarafından tanınan bir kanonikal NLS dizisi oluşturur ve STAT1'in nükleusa transportunda rol oynar (204). Bu aşamada, CCDC84'ün nükleusa yerleşiminin hangi mekanizma ile sağlandığı bilinmemektedir. Yapmış olduğumuz *in-silico* analizler sonucunda CCDC84'ün üzerinde 18 ile 50. aa'ler arasında kalan bölgede bir NLS dizisinin olabileceğinin tespit edilmesi (Resim 4), bir protein kompleksine ihtiyaç duymadan nükleer transport mekanizmaları ile nükleusa taşınabileceğini göstermektedir. Ancak, bu analiz programları, farklı proteinlerden elde edilen verileri değerlendirerek tahminde bulunmakta ve yanlış sonuçlar verebilmektedir (126, 127). Bu nedenle, *in-silico* analiz sonuçlarının deneysel çalışmalarla doğrulanmaları gerekmektedir (128).

Proteinlerin üzerindeki NLS dizilerinin tanımlanmasına yönelik olarak kullanılan temel yaklaşım, proteinin parçalar halinde, bilinen bir etiketle hücrede eksprese ettirilerek immüno Floresan yöntem ile takip etmektir (179, 197-199). Bu doğrultuda, CCDC84 proteininin tamamı ve örtüşen dört farklı bölgesi (Şekil 12D-G) klonlandı ve HeLa hücrelerinde eksprese ettirilerek immüno Floresan yöntemle takip edildi (Resim 8-12). GST

etiketi ile füzyon halindeki CCDC84'ün tamamını ve 1-50. aa'leri arasında kalan bölgeyi eksprese eden vektörlerle transfekte edilen hücrelerin %90'ında proteinin nükleusta lokalize olduğu görüldü (Resim 8, 9). Bununla birlikte, 231-332. aa'ler arasında kalan N-terminal bölgenin %83 oranında nükleusta lokalize olduğu görüldü (Resim 12). Buna karşın, 231-332. aa arasında kalan N-terminal bölgeyi de içine alan 51-332. aa'ler arasında kalan bölge %5 oranında nükleusta görülürken (Resim 10), 64-230. aa'ler arasında kalan bölgenin nükleusa hiç taşınmadığı görüldü (Resim 11). Tam boyut GST-CCDC84, endojen CCDC84'e kıyasla düşük oranda da olsa bazı hücrelerde nükleusta ve sitoplazmada difüz halde, bazı hücrelerde ise sadece sitoplazmada görüldü. Proteinlerin hücre içinde fazladan eksprese ettirilmesi veya incelenecek proteine GST gibi büyük boyutlarda bir kuyruğun eklenmesi proteinlerin hücre içinde yanlış bir şekilde lokalize olmasına neden olabilmektedir (205, 206). Çalışmada kullandığımız 26 kDa moleküler ağırlığındaki GST etiket proteininin sitoplazma ve nükleusta eşit bir şekilde difüz yerleşim göstermesine rağmen tam boyuttaki CCDC84'ün GST ile füzyonunun %90 oranında nükleusa yerleşim göstermesi, CCDC84'ün nükleusa lokalizasyon gösterdiğini doğrulamaktadır. Bu sonuçlar, yakın geçmişte, CCDC84'ün nükleusta lokalize olduğunu gösteren çalışma (207) ile tutarlılık gösterirken, 26 kDa moleküler ağırlığındaki GST'nin, CCDC84'ün NLS dizisinin araştırılmasında etiket olarak kullanılabileceğini de göstermiştir. CCDC84'ün analiz edilen dört fragmentinden 1-50. aa'ler arasında kalan ve *in-silico* analizlerinde işaret ettiği 18-50. aa'ler arasını kapsayan bölgenin de %90 oranında nükleusta lokalize olmasının (Resim 9) yanı sıra, 231-332. aa'ler arasında kalan bölge de %83 oranında nükleusta lokalizasyon göstermiştir (Resim 12). Bu bölgenin, nükleusta yerleşim göstermeyen 51-332. aa'ler arasında kalan bölgenin içinde yer almasından dolayı; bu durum yanlış pozitiflik olarak değerlendirildi. Küçük parçalar halinde eksprese ettirilen proteinlerin üç boyutlu yapılarını kazanırken, protein üzerinde bir araya gelen dizilerin veya proteinin yüzeyine taşınan dizilerinin nükleer lokalizasyon dizilerini taklit edebildikleri bilinmektedir (179). Bu durum, CCDC84'ün sitoplazmada etkileştiği proteinlere bağlı olarak kazandığı yeni konformasyon ile C-terminalde arjinin ve lizin aminoasitlerinin yer aldığı bir diziyi açığa çıkararak, bu dizinin proteinin nükleusa transportunda katkı sağlayabileceğinin yanı sıra nükleusa transport sürecini güçlendirebileceği fikrini de desteklemektedir. Bu noktadan hareketle, CCDC84'ün N-terminalindeki 1-50. aa'leri arasında kalan bölgenin proteinin nükleer transportuna aracılık eden temel diziyi içerdiği düşünülerek bu bölgeye odaklanılmıştır.

Kanonikal NLS dizileri arjinin ve lizin aminoasitleri bakımından zengin tek bir kümeden oluşabildikleri gibi aralarında yaklaşık 10-12 aminoasitlik bağlayıcı bir dizi olan iki farklı aminoasit kümesinden de oluşabilmektedir (84, 90). Ancak, tanımlanan birçok kanonikal NLS dizisinde aminoasit kümeleri arasında farklı uzunlukta bağlayıcı dizilerin bulunduğu görülmüştür. Ayrıca, ikiden fazla bazik aminoasit kümesi de farklı uzunluklardaki bağlayıcı diziler ile NLS dizisini oluşturabilmektedir (88, 89). Tek bir kümeden oluşan NLS dizileri importin α 'nın 2-4 ARM tekrarları üzerinde bulunan major NLS bağlanma bölgesine bağlanırken, iki farklı aminoasit kümesinden oluşan NLS dizileri ise importin α 'nın 2-4 ARM tekrarları üzerinde bulunan major ve 6-8 ARM tekrarları üzerinde bulunan minör NLS bağlanma bölgelerine bağlanır (64, 114, 115). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda birçok protein üzerinde farklı kanonikal NLS dizileri tanımlanmıştır (85-89). *In silico* analizler ile CCDC84 üzerinde belirlemiş olduğumuz 18-50. aa'ler arasında kalan 33 aminoasitlik dizi içerisindeki arjinin ve lizin aminoasitlerinin yoğun olarak görüldüğü bölgedeki aminoasitler değiştirilerek (Şekil 11), bu bölgenin nükleusa transportu üzerindeki etkisi test edildi. Özellikle "X" olarak tanımlanan bölge içindeki 24, 28 ve 36. pozisyonlarındaki arjinin aminoasitleri ve 25 ve 31. pozisyonlarındaki lizin aminoasitlerinin nükleer lokalizasyon için güçlü bir şekilde belirleyici olduğu görülürken, X bölgesi ile sekiz aminoasitlik bir bağlayıcı dizi ile ayrılan ve Y bölgesi olarak tanımlanan bölge içindeki 45 ve 49. pozisyonlardaki arjinin ve 46. pozisyonundaki lizin aminoasitlerinin X bölgesine göre çok daha zayıf bir etki ettiği görüldü. Kanonikal NLS'ler tipik olarak pozitif yüklü aminoasitlerden oluşur, ancak bu aminoasitlerin hepsi NLS fonksiyonuna eşit katkıda bulunmaz (89). Birçok protein yapısında iki farklı aminoasit kümesinden oluşan NLS dizisi bulundurmakta, nükleer lokalizasyondan sorumlu olan bu kümeler proteinlerin nükleusa transportuna eşit katkıda bulunmamaktadır. Aminoasit kümelerinden biri sürece güçlü bir şekilde katkı sağlarken diğer aminoasit kümesi ise sürece çok daha zayıf bir şekilde katkıda bulunmaktadır (88, 179). CCDC84'ün 18-50. aa'ler arasında kalan aminoasit diziliminin importinler tarafından tanınan kanonikal NLS dizilerine benzer arjinin ve lizin kompozisyonu bu bölgenin protein için iki farklı aminoasit kümesinden oluşan kanonikal bir NLS dizisi olduğunu işaret etmektedir. Ayrıca, MS yaklaşımları ile CCDC84'ün importin α sınıfına ait importin-4, importin-5, importin-7, importin-9 ile etkileşim halinde olabileceği gösterilmiştir (163). CCDC84'ün importin α proteinleri ile etkileşim halinde olabileceğine dair analizler ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimiz bulgular CCDC84'ün kanonikal

nükleer transport mekanizmaları ile nükleusa taşındığını ortaya koyan güçlü kanıtlar olarak değerlendirilmiştir.

Nükleer transport, nükleer proteinler ve transport reseptörleri arasındaki etkileşimlerin modüle edilmesi ile düzenlenmektedir (94). NLS dizisindeki post-translasyonel modifikasyonlar (PTM'ler), nükleer transportun ve kargo proteininin hücre içi lokalizasyonunun düzenlenmesinde rol oynar (208-211). Nükleer transportun düzenlenmesinde en yaygın PTM'lerden biri lizin asetilasyonudur (212-219). Ku70'in nükleusa transportunun, NLS dizisindeki spesifik lizin aminoasitlerinin asetilasyonu ile kontrol edildiği (209), TyrRS'nin NLS dizisinin asetilasyonunun oksidatif stres altında proteinin nükleer taşınmasını arttırdığı (210), H3 ve H4 histon proteinlerinin NLS dizilerinin asetilasyonunun nükleer transportu teşvik ettiği (211) gösterilmiştir. CCDC84'ün NLS dizisi içinde kalan 31. pozisyonundaki lizin aminoasidi (K31) asetillenerek modifiye edilmektedir. Asetilasyon özellikle hücre döngüsünün G1 ve M evresinde artış gösterirken, S ve G2 evrelerinde CCDC84 üzerindeki asetil grupları uzaklaştırılmaktadır. Bununla birlikte, CCDC84 yoğun olarak nükleusta lokalizasyon gösterirken (Resim 5), CCDC84'ün K31 pozisyonunun deasetile formu sentrozomda yığılma göstermektedir. CCDC84'ün K31 pozisyonundan asetillasyonu ise sentrozomal lokalizasyonu azaltmaktadır (163). Bu durum, CCDC84'ün splaying ile birlikte sentrozom üzerinden hücre döngüsünün yönetilmesinde de rol aldığını ve bu iki farklı görevin NLS dizisi üzerindeki asetilasyonla yönetildiğini göstermektedir.

Diğer taraftan, kanonikal NLS dizisi ile nükleusa yerleşimini doğruladığımız CCDC84'ün, sentrozomun proksimal ucunda lokalize olduğunu (163) doğrulamaya yönelik gerçekleştirdiğimiz çalışma sonucunda CCDC84'ün sentrozomal markır olan perisentrin ile sentrozomda birlikte yerleşim gösterdiği, yerleşimin perisentrine kıyasla daha geniş bir alana dağılım gösterdiği tespit edildi (Resim 6). NLS dizisi taşıyan nükleer bir proteinin sentrozomda lokalizasyon göstermesi ve sentrozomal proteinler ile etkileşmesi, nükleer proteinlerin sentrozomun fonksiyonunun düzenlenmesinde rol oynayabileceğini (163, 220-223) ve üzerinde nükleustan sitoplazmaya taşınmasında rol oynayan nükleer eksport sinyallerinin yer alabileceğini göstermektedir (224-228). CCDC84'ün nükleusa lokalizasyonunun yanı sıra sentrozomda ve bir miktar sitoplazmada lokalizasyon göstermesi CCDC84'ün nükleer eksport sinyal dizisi taşıyabileceğini işaret etmektedir.

Splaysing, çok sayıda proteinin katıldığı kompleks bir mekanizma olup bu süreçte 300'ün üzerinde proteinin görev alabileceği ifade edilmektedir (2-4). *In silico* analizler bu proteinlerin önemli bir kısmında NLS dizisi olabileceğini gösterirken bunlardan çok azı ıslak laboratuvar çalışmaları ile doğrulanmıştır (229, 230). Bunun dışında NLS dizisi taşımayan ve splaysing için kritik öneme sahip splaysing faktör olan USP4, etkileşim partneri SART3 aracılığı ile nükleusa taşınmakta, SART3'ün NLS dizisi çıkarıldığında ise USP4'ün nükleusa taşınması engellenmekte ve deubikuitinaz aktivitesi yerine getirilememektedir (203). Geline aşamada, splaysing sürecinde görev alan proteinlerin yapılarındaki NLS dizileri aracılığıyla nükleusa transportu ile NLS dizisine sahip olmadan aracı proteinlerle nükleusa transportlarına dair splaysing sürecinin daha ileri düzeyde anlaşılmasına katkı sağlayacak ayrıntılı bilgi bulunmamaktadır. Splaysing ile ilişkili proteinlerin nükleusa transportu sürecinin aydınlatılmasında ve fonksiyonlarının karakterizasyonunda NLS dizilerinin belirlenmesi anahtar rol oynamaktadır. CCDC84 üzerinde tanımlanan NLS dizisinin, gelecekte ortaya konulacak yeni verilerle birleştirildiğinde splaysing sürecinin daha iyi anlaşılmasına ve ilişkili olduğu hastalıkların tedavisine katkı sağlayabileceğini düşünmekteyiz.

Splaysing ile ilişkili bir protein olan (33) ve sentrozom duplikasyonunda rol alan CCDC84, sadece sentrozomda lokalize olan birçok tipik sentrozomal proteinden farklı olarak hem sentrozom hem de nükleusta lokalizasyon göstermektedir (163). CCDC84'ün hücre içi lokalizasyonuna benzer şekilde hem sentrozomda hem de nükleusta lokalize olan, splaysing ve sentrozom ile ilişkili proteinler tanımlanmıştır (11, 43, 48). Sentrozomda lokalize ve sentrozomun temel bir bileşeni olan NEK2 (42-45), mitotik hücrelerde sentrozom ayrılmasında, bipolar iğ oluşumunda ve mayotik hücrelerde kromatin yoğunlaşmasının kontrolünde rol oynayan bir protein kinazdır. NEK2; CROCC, CEP250 ve NINL gibi sentrozomal proteinleri fosforilleyerek bipolar iğ ve yüksek doğrulukta kromozom ayrılması için gerekli olan sentrozom bölünmesinin düzenlenmesinde, NDC80'in fosforilasyonu yoluyla mitozda kinetokor mikrotübül bağlanma stabilitesinin düzenlenmesinde, CDC20 ve MAD2L1'in fosforilasyonu yoluyla ise mitotik kontrol noktası protein kompleksinin düzenlenmesinde rol oynar. Ayrıca; NEK2, MAD2L1'in kinetokora ve MAPK1 ve NPM1'in sentrozoma lokalizasyonu için gereklidir (46). Bunun yanı sıra NEK2, onkogenik splaysing faktör olan SRSF1 ile nükleer benekler içinde birlikte lokalize olmakta ve SRSF1'i fosforile ederek, SRSF1'in aktivitesini ve SRSF1'in hedefi olan genlerin alternatif splaysingini düzenlemektedir (47). NEK2'nin hücre nükleusunda spesifik splaysing faktörleri ile

etkileşime girdiği, NEK2'nin alternatif splays varyantı olan NEK2A'nın SRSF1, hnRNPA1, hnRNPF ve SAM68 gibi splaysing regülatör proteinlerle etkileştiği gösterilmiştir (47). Hem nükleusta hem de sentrozomda lokalize olan bir başka splaysing ile ilişkili protein ise RNA bağlayıcı protein RBM8A'dır (11, 48). RBM8A, nükleustaki mRNA'ların ekzon-ekzon bağlantılarının yakınında bağlanan ve “exon junction complex (EJC)” olarak adlandırılan (231-233) kompleksin eIF4AIII, MLN51 ve Magoh ile birlikte çekirdek bileşenidir (38, 234, 235). EJC, pre-mRNA splaysing ve splaysing sonrası gerçekleşen olaylar arasındaki bağlantıyı sağlar. Örneğin, mRNA'ya bağlanan EJC bileşenleri translasyonu artırır (49). RBM8A, splaysingdeki görevinin yanı sıra doğrudan sentrozomda RBM8A-Magoh kompleksinde yer alarak (11, 48) hücre bölünmesinin düzenlenmesinde (136, 137) ve sentrozom proliferasyonunda rol oynamaktadır (138). CCDC84'ün hem nükleusta ve hem de sentrozomda lokalizasyonu ve splaysing ile sentriol duplikasyonunda rol oynaması her iki süreç arasındaki ilişkinin aydınlatılmasında yeni bir bakış açısı oluşturmaktadır. Sentrozomların, mikrotübüllerin hücre içi organizasyonunun düzenlenmesinde ve kromozomların yeni hücrelere dağıtılmasında (236), hücre motilitesi, hücre içi sinyalizasyon, adhezyon, mikrotübül hücre iskeleti tarafından protein trafiğinin koordinasyonu ve polarite kazanımında (237), gelişim ve DNA hasar cevap yollarıyla ilişkili süreçlerde rol alması (238) CCDC84'ün de bu süreçler ile ilişkili olabileceğini desteklemektedir.

Splaysing ile transkripsiyon ve kromatin organizasyonunun hücrede birbirleri ile etkileşim halinde olması (30), özellikle splaysingin kromatin ve transkripsiyon mekanizmaları üzerinde rollerinin tanımlanması (31), splaysing ve kromatin yapısı arasında kompleks bir ilişki olduğunu göstermektedir. Bu tez çalışması kapsamında ikinci olarak, splaysing ile ilişkilendirilen CCDC84'ün (33) histon proteinleri H2A1A ve H2A1H ile olası etkileşimleri hakkındaki MS analizi ile elde edilen ön verilerin doğrulanması ve bu sayede splaysing ile kromatin arasında yeni bir etkileşimin varlığının ortaya çıkartılması amaçlandı. Bu amaçla gerçekleştirilen immünopresipitasyon analizleri sonucu CCDC84 ile histon proteinleri H2A1A ve H2A1H arasındaki olası etkileşimlere yönelik ön veriler doğrulanamadı.

Protein-protein etkileşimleri neredeyse tüm hücrel süreçler için gereklidir. Bu süreçlerin aydınlatılmasında protein-protein etkileşimlerin tanımlanması kritik bir adımdır (239). MS'nin immünopresipitasyon deneyleri ile birleştirilmesi, protein kompleksi

elemanlarının tanımlanmasına olanak sağlamaktadır (240-243). Ancak, bu yaklaşımlarda her zaman spesifik tanımlamalar elde edilememekte ve yanlış pozitif sonuçlar görülebilmektedir (244-248). MS ile elde edilen RBM17 ile SF3B3 ve PRPF6 arasındaki olası protein-protein etkileşimleri immünopresipitasyon deneyleri ile doğrulanamamıştır (249). Ayrıca, histon proteinleri, hnRNP proteinleri, ısı şoku proteinleri, ribozomal proteinler, aktin, tubulin, DEAD kutusu proteinleri gibi çeşitli hücrel proteinlerin protein A/G boncuklarına ve sepharose matrisine bağlanması nedeniyle protein etkileşim çalışmalarında spesifik olmayan etkileşimler olarak kabul edilebileceği bildirilmektedir (250, 251). Ek olarak, histon proteinlerinin nükleik asitler ve diğer hücrel bileşenlerle kolayca spesifik olmayan etkileşimler yapabileceğini (252), H2A ailesinin birçok üyesinin yüksek dizi homolojisine sahip olduğunu (253) ve bundan dolayı MS bazlı yöntemlerde H2A histon proteinlerinin tanımlanmasında yanlış pozitifliklerin olabileceği bildirilmiştir (254). Literatürdeki bu veriler doğrultusunda CCDC84'ün histon proteinleri H2A1A ve H2A1H ile arasındaki olası etkileşimlerin spesifik olmayan etkileşimler olabileceği ve deterjan, buffer içeriği, yıkama koşulları gibi immünopresipitasyon aşamalarının bu spesifik olmayan etkileşimleri ortadan kaldıracabileceği (240) düşünülmektedir.

Sonuç olarak, CCDC84'ün 18-50.aa'leri arasında yer alan ve iki farklı bazik aminoasit kümesinden oluşan kanonikal bir NLS dizisi taşıdığı gösterildi ve NLS dizisinde yer alan nükleer lokalizasyon için kritik öneme sahip arjinin ve lizin aminoasitleri belirlendi. Böylelikle, CCDC84'ün kanonikal nükleer transport mekanizması ile nükleusa taşındığını ortaya koyan güçlü kanıtlar elde edildi. Ayrıca, CCDC84'ün histon proteinleri H2A1A ve H2A1H ile arasındaki olası etkileşim kullanılan mevcut yöntemler ile doğrulanamadı ve olası etkileşimin yanlış pozitiflik olabileceği düşünüldü. Bu tez çalışması sonucu elde edilen bulguların ve ileride yapılacak detaylı çalışmaların, CCDC84'ün nükleer lokalizasyonunda rol oynayan mekanizmaların ayrıntılı bir şekilde belirlenmesine, CCDC84'ün NLS dizisinde meydana gelebilecek mutasyonların kritik aminoasitlerde oluşturacağı değişimler ile ilişkili olarak tanımlanacak hastalıkların moleküler mekanizmalarının araştırılmasına ve tedavisine, splayasing ve sentrozom mekanizmaları arasındaki yeni bağlantıların tanımlanmasına ve farklı hücrel süreçlerdeki rollerinin aydınlatılmasına katkılar sağlayabileceği kanaatindeyiz.

6. KAYNAKLAR

1. De Conti L, Baralle M, Buratti E (2013). Exon and intron definition in pre-mRNA splicing. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 4: 49-60.
2. Patel AA, Steitz JA (2003). Splicing double: insights from the second spliceosome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 960-970.
3. Hegele A, Kamburov A, Grossmann A, Sourlis C, Wowro S, Weimann M, Will CL, Pena V, Luhrmann R, Stelzl U (2012). Dynamic protein-protein interaction wiring of the human spliceosome. *Mol Cell* 45: 567-580.
4. Matera AG, Wang Z (2014). A day in the life of the spliceosome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15: 108-121.
5. Hoskins AA, Moore MJ (2012). The spliceosome: a flexible, reversible macromolecular machine. *Trends Biochem Sci* 37: 179-188.
6. Wahl MC, Will CL, Luhrmann R (2009). The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell* 136: 701-718.
7. Peng R, Dye BT, Perez I, Barnard DC, Thompson AB, Patton JG (2002). PSF and p54nrb bind a conserved stem in U5 snRNA. *RNA* 8: 1334-1347.
8. Dye BT, Patton JG (2001). An RNA recognition motif (RRM) is required for the localization of PTB-associated splicing factor (PSF) to subnuclear speckles. *Exp Cell Res* 263: 131-144.
9. Brokstad KA, Kalland KH, Russell WC, Matthews DA (2001). Mitochondrial protein p32 can accumulate in the nucleus. *Biochem Biophys Res Commun* 281: 1161-1169.
10. Caceres JF, Screaton GR, Krainer AR (1998). A specific subset of SR proteins shuttles continuously between the nucleus and the cytoplasm. *Genes Dev* 12: 55-66.
11. Ishigaki Y, Nakamura Y, Tatsuno T, Hashimoto M, Iwabuchi K, Tomosugi N (2014). RNA-binding protein RBM8A (Y14) and MAGOH localize to centrosome in human A549 cells. *Histochem Cell Biol* 141: 101-109.
12. Jae N, Preusser C, Kruger T, Tkacz ID, Engstler M, Michaeli S, Bindereif A (2011). SnRNA-specific role of SMN in trypanosome snRNP biogenesis in vivo. *RNA Biol* 8: 90-100.
13. Palfi Z, Jae N, Preusser C, Kaminska KH, Bujnicki JM, Lee JH, Gunzl A, Kambach C, Urlaub H, Bindereif A (2009). SMN-assisted assembly of snRNP-specific Sm cores in trypanosomes. *Genes Dev* 23: 1650-1664.

14. Boon KL, Grainger RJ, Ehsani P, Barrass JD, Auchynnikava T, Inglehearn CF, Beggs JD (2007). Prp8 mutations that cause human retinitis pigmentosa lead to a U5 snRNP maturation defect in yeast. *Nat Struct Mol Biol* 14: 1077-1083.
15. Tkacz ID, Lustig Y, Stern MZ, Biton M, Salmon-Divon M, Das A, Bellofatto V, Michaeli S (2007). Identification of novel snRNA-specific Sm proteins that bind selectively to U2 and U4 snRNAs in *Trypanosoma brucei*. *RNA* 13: 30-43.
16. Murphy MW, Olson BL, Siliciano PG (2004). The yeast splicing factor Prp40p contains functional leucine-rich nuclear export signals that are essential for splicing. *Genetics* 166: 53-65.
17. Petersen-Mahrt SK, Estmer C, Ohrmalm C, Matthews DA, Russell WC, Akusjarvi G (1999). The splicing factor-associated protein, p32, regulates RNA splicing by inhibiting ASF/SF2 RNA binding and phosphorylation. *EMBO J* 18: 1014-1024.
18. Macara IG (2001). Transport into and out of the nucleus. *Microbiol Mol Biol Rev* 65: 570-594.
19. Fried H, Kutay U (2003). Nucleocytoplasmic transport: taking an inventory. *Cell Mol Life Sci* 60: 1659-1688.
20. Gama-Carvalho M, Carmo-Fonseca M (2001). The rules and roles of nucleocytoplasmic shuttling proteins. *FEBS Lett* 498: 157-163.
21. Marshall KS, Zhang ZY, Curran J, Derbyshire S, Mymryk JS (2007). An improved genetic system for detection and analysis of protein nuclear import signals. *BMC Mol Biol* 8: 6.
22. Kosyna FK, Depping R (2018). Controlling the gatekeeper: Therapeutic targeting of nuclear transport. *Cells* 7: 221.
23. Escriou V, Carriere M, Scherman D, Wils P (2003). NLS bioconjugates for targeting therapeutic genes to the nucleus. *Adv Drug Deliv Rev* 55: 295-306.
24. Wilson GL, Dean BS, Wang G, Dean DA (1999). Nuclear import of plasmid DNA in digitonin-permeabilized cells requires both cytoplasmic factors and specific DNA sequences. *J Biol Chem* 274: 22025-22032.
25. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA, Zhang F (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 339: 819-823.

26. Ma S, Chang J, Wang X, Liu Y, Zhang J, Lu W, Gao J, Shi R, Zhao P, Xia Q (2014). CRISPR/Cas9 mediated multiplex genome editing and heritable mutagenesis of BmKu70 in *Bombyx mori*. *Sci Rep* 4: 4489.
27. Weisbart RH, Chan G, Jordaan G, Noble PW, Liu Y, Glazer PM, Nishimura RN, Hansen JE (2015). DNA-dependent targeting of cell nuclei by a lupus autoantibody. *Sci Rep* 5: 12022.
28. Weisbart RH, Gera JF, Chan G, Hansen JE, Li E, Cloninger C, Levine AJ, Nishimura RN (2012). A cell-penetrating bispecific antibody for therapeutic regulation of intracellular targets. *Mol Cancer Ther* 11: 2169-2173.
29. Kim YH, Han ME, Oh SO (2017). The molecular mechanism for nuclear transport and its application. *Anat Cell Biol* 50: 77-85.
30. Braunschweig U, Gueroussov S, Plocik AM, Graveley BR, Blencowe BJ (2013). Dynamic integration of splicing within gene regulatory pathways. *Cell* 152: 1252-1269.
31. Brinster RL, Allen JM, Behringer RR, Gelinas RE, Palmiter RD (1988). Introns increase transcriptional efficiency in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 836-840.
32. Luger K, Dechassa ML, Tremethick DJ (2012). New insights into nucleosome and chromatin structure: an ordered state or a disordered affair? *Nat Rev Mol Cell Biol* 13: 436-447.
33. Budak G (2019). Mikrosefalik primordial dwarfism'in etiyolojisinde rol alan CCDC84'ün mRNA kırılmasında görevli PRPF3 ile etkileşiminin araştırılması. Doktora Tezi. Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Trabzon.
34. Brow DA (2002). Allosteric cascade of spliceosome activation. *Annu Rev Genet* 36: 333-360.
35. Matlin AJ, Moore MJ (2007). Spliceosome assembly and composition. *Adv Exp Med Biol* 623: 14-35.
36. Staley JP, Woolford JL (2009). Assembly of ribosomes and spliceosomes: complex ribonucleoprotein machines. *Curr Opin Cell Biol* 21: 109-118.
37. Lin JR, Hu J (2013). SeqNLS: nuclear localization signal prediction based on frequent pattern mining and linear motif scoring. *PLoS One* 8: e76864.

38. Tange TO, Shibuya T, Jurica MS, Moore MJ (2005). Biochemical analysis of the EJC reveals two new factors and a stable tetrameric protein core. *RNA* 11: 1869-1883.
39. Michael WM, Choi M, Dreyfuss G (1995). A nuclear export signal in hnRNP A1: a signal-mediated, temperature-dependent nuclear protein export pathway. *Cell* 83: 415-422.
40. Narayanan U, Achsel T, Luhrmann R, Matera AG (2004). Coupled in vitro import of U snRNPs and SMN, the spinal muscular atrophy protein. *Mol Cell* 16: 223-234.
41. Palacios I, Hetzer M, Adam SA, Mattaj IW (1997). Nuclear import of U snRNPs requires importin beta. *EMBO J* 16: 6783-6792.
42. Andersen JS, Wilkinson CJ, Mayor T, Mortensen P, Nigg EA, Mann M (2003). Proteomic characterization of the human centrosome by protein correlation profiling. *Nature* 426: 570-574.
43. Hames RS, Fry AM (2002). Alternative splice variants of the human centrosome kinase Nek2 exhibit distinct patterns of expression in mitosis. *Biochem J* 361: 77-85.
44. Fry AM, Mayor T, Meraldi P, Stierhof YD, Tanaka K, Nigg EA (1998). C-Nap1, a novel centrosomal coiled-coil protein and candidate substrate of the cell cycle-regulated protein kinase Nek2. *J Cell Biol* 141: 1563-1574.
45. Fry AM, Meraldi P, Nigg EA (1998). A centrosomal function for the human Nek2 protein kinase, a member of the NIMA family of cell cycle regulators. *EMBO J* 17: 470-481.
46. Fang G, Zhang D, Yin H, Zheng L, Bi X, Yuan L (2014). Centlein mediates an interaction between C-Nap1 and Cep68 to maintain centrosome cohesion. *J Cell Sci* 127: 1631-1639.
47. Naro C, Barbagallo F, Chieffi P, Bourgeois CF, Paronetto MP, Sette C (2014). The centrosomal kinase NEK2 is a novel splicing factor kinase involved in cell survival. *Nucleic Acids Res* 42: 3218-3227.
48. Kataoka N, Yong J, Kim VN, Velazquez F, Perkinson RA, Wang F, Dreyfuss G (2000). Pre-mRNA splicing imprints mRNA in the nucleus with a novel RNA-binding protein that persists in the cytoplasm. *Mol Cell* 6: 673-682.
49. Nott A, Le Hir H, Moore MJ (2004). Splicing enhances translation in mammalian cells: an additional function of the exon junction complex. *Genes Dev* 18: 210-222.
50. Chacinska A, Koehler CM, Milenkovic D, Lithgow T, Pfanner N (2009). Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms. *Cell* 138: 628-644.

51. Gorlich D, Kutay U (1999). Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15: 607-660.
52. Cook A, Bono F, Jinek M, Conti E (2007). Structural biology of nucleocytoplasmic transport. *Annu Rev Biochem* 76: 647-671.
53. Breeuwer M, Goldfarb DS (1990). Facilitated nuclear transport of histone H1 and other small nucleophilic proteins. *Cell* 60: 999-1008.
54. Marfori M, Mynott A, Ellis JJ, Mehdi AM, Saunders NF, Curmi PM, Forwood JK, Boden M, Kobe B (2011). Molecular basis for specificity of nuclear import and prediction of nuclear localization. *Biochim Biophys Acta* 1813: 1562-1577.
55. Gorlich D, Kostka S, Kraft R, Dingwall C, Laskey RA, Hartmann E, Prehn S (1995). Two different subunits of importin cooperate to recognize nuclear localization signals and bind them to the nuclear envelope. *Curr Biol* 5: 383-392.
56. Kau TR, Way JC, Silver PA (2004). Nuclear transport and cancer: from mechanism to intervention. *Nat Rev Cancer* 4: 106-117.
57. Chook YM, Suel KE (2011). Nuclear import by karyopherin- β s: Recognition and inhibition. *Biochim Biophys Acta* 1813: 1593-1606.
58. Lee SJ, Matsuura Y, Liu SM, Stewart M (2005). Structural basis for nuclear import complex dissociation by RanGTP. *Nature* 435: 693-696.
59. Matsuura Y, Stewart M (2005). Nup50/Npap60 function in nuclear protein import complex disassembly and importin recycling. *EMBO J* 24: 3681-3689.
60. Kutay U, Bischoff FR, Kostka S, Kraft R, Gorlich D (1997). Export of importin alpha from the nucleus is mediated by a specific nuclear transport factor. *Cell* 90: 1061-1071.
61. Gorlich D, Dabrowski M, Bischoff FR, Kutay U, Bork P, Hartmann E, Prehn S, Izaurralde E (1997). A novel class of RanGTP binding proteins. *J Cell Biol* 138: 65-80.
62. Matsuura Y, Stewart M (2004). Structural basis for the assembly of a nuclear export complex. *Nature* 432: 872-877.
63. Ribbeck K, Lipowsky G, Kent HM, Stewart M, Gorlich D (1998). NTF2 mediates nuclear import of Ran. *EMBO J* 17: 6587-6598.
64. Stewart M (2007). Molecular mechanism of the nuclear protein import cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 195-208.
65. Izaurralde E, Adam S (1998). Transport of macromolecules between the nucleus and the cytoplasm. *RNA* 4: 351-364.

66. Mattaj IW, Englmeier L (1998). Nucleocytoplasmic transport: the soluble phase. *Annu Rev Biochem* 67: 265-306.
67. Nakielny S, Dreyfuss G (1999). Transport of proteins and RNAs in and out of the nucleus. *Cell* 99: 677-690.
68. Lee BJ, Cansizoglu AE, Suel KE, Louis TH, Zhang Z, Chook YM (2006). Rules for nuclear localization sequence recognition by karyopherin beta 2. *Cell* 126: 543-558.
69. Chook YM, Jung A, Rosen MK, Blobel G (2002). Uncoupling Kapbeta2 substrate dissociation and ran binding. *Biochemistry* 41: 6955-6966.
70. Gorlich D, Pante N, Kutay U, Aebi U, Bischoff FR (1996). Identification of different roles for RanGDP and RanGTP in nuclear protein import. *EMBO J* 15: 5584-5594.
71. Jakel S, Gorlich D (1998). Importin beta, transportin, RanBP5 and RanBP7 mediate nuclear import of ribosomal proteins in mammalian cells. *EMBO J* 17: 4491-4502.
72. Albertini M, Pemberton LF, Rosenblum JS, Blobel G (1998). A novel nuclear import pathway for the transcription factor TFIIS. *J Cell Biol* 143: 1447-1455.
73. Siomi MC, Eder PS, Kataoka N, Wan L, Liu Q, Dreyfuss G (1997). Transportin-mediated nuclear import of heterogeneous nuclear RNP proteins. *J Cell Biol* 138: 1181-1192.
74. Mosammaparast N, Guo Y, Shabanowitz J, Hunt DF, Pemberton LF (2002). Pathways mediating the nuclear import of histones H3 and H4 in yeast. *J Biol Chem* 277: 862-868.
75. Mosammaparast N, Jackson KR, Guo Y, Brame CJ, Shabanowitz J, Hunt DF, Pemberton LF (2001). Nuclear import of histone H2A and H2B is mediated by a network of karyopherins. *J Cell Biol* 153: 251-262.
76. Xiao Z, Liu X, Lodish HF (2000). Importin beta mediates nuclear translocation of Smad 3. *J Biol Chem* 275: 23425-23428.
77. Forwood JK, Lam MH, Jans DA (2001). Nuclear import of Creb and AP-1 transcription factors requires importin-beta 1 and Ran but is independent of importin-alpha. *Biochemistry* 40: 5208-5217.
78. Cherezova L, Burnside KL, Rose TM (2011). Conservation of complex nuclear localization signals utilizing classical and non-classical nuclear import pathways in LANA homologs of KSHV and RFHV. *PLoS One* 6: e18920.
79. Guo L, Fare CM, Shorter J (2019). Therapeutic dissolution of aberrant phases by nuclear-import receptors. *Trends Cell Biol* 29: 308-322.

80. Wagstaff KM, Jans DA (2009). Importins and beyond: non-conventional nuclear transport mechanisms. *Traffic* 10: 1188-1198.
81. Argentaro A, Sim H, Kelly S, Preiss S, Clayton A, Jans DA, Harley VR (2003). A SOX9 defect of calmodulin-dependent nuclear import in campomelic dysplasia/autosomal sex reversal. *J Biol Chem* 278: 33839-33847.
82. Speese SD, Ashley J, Jokhi V, Nunnari J, Barria R, Li Y, Ataman B, Koon A, Chang YT, Li Q, Moore MJ, Budnik V (2012). Nuclear envelope budding enables large ribonucleoprotein particle export during synaptic Wnt signaling. *Cell* 149: 832-846.
83. Cautain B, Hill R, de Pedro N, Link W (2015). Components and regulation of nuclear transport processes. *FEBS J* 282: 445-462.
84. Nigg EA (1997). Nucleocytoplasmic transport: signals, mechanisms and regulation. *Nature* 386: 779-787.
85. Hu J, Sun L, Wang LM, Jiang SJ (2009). Analysis of the nuclear localization signal of TRF1 in non-small cell lung cancer. *Biol Res* 42: 217-222.
86. Hirose S, Komoike Y, Higashinakagawa T (2006). Identification of a nuclear localization signal in mouse polycomb protein, M33. *Zoolog Sci* 23: 785-791.
87. Magico AC, Bell JB (2011). Identification of a classical bipartite nuclear localization signal in the Drosophila TEA/ATTS protein scalloped. *PLoS One* 6: e21431.
88. Zhu M, Fang T, Li S, Meng K, Guo D (2015). Bipartite nuclear localization signal controls nuclear import and DNA-binding activity of IFN regulatory factor 3. *J Immunol* 195: 289-297.
89. Liu Q, Yu J, Zhuo X, Jiang Q, Zhang C (2010). Pericentrin contains five NESs and an NLS essential for its nucleocytoplasmic trafficking during the cell cycle. *Cell Res* 20: 948-962.
90. Kohler M, Speck C, Christiansen M, Bischoff FR, Prehn S, Haller H, Gorlich D, Hartmann E (1999). Evidence for distinct substrate specificities of importin alpha family members in nuclear protein import. *Mol Cell Biol* 19: 7782-7791.
91. Chook YM, Blobel G (2001). Karyopherins and nuclear import. *Curr Opin Struct Biol* 11: 703-715.
92. Dingwall C, Laskey RA (1998). Nuclear import: a tale of two sites. *Curr Biol* 8: R922-924.
93. Lange A, McLane LM, Mills RE, Devine SE, Corbett AH (2010). Expanding the definition of the classical bipartite nuclear localization signal. *Traffic* 11: 311-323.

94. McLane LM, Corbett AH (2009). Nuclear localization signals and human disease. *IUBMB Life* 61: 697-706.
95. Conti E, Uy M, Leighton L, Blobel G, Kuriyan J (1998). Crystallographic analysis of the recognition of a nuclear localization signal by the nuclear import factor karyopherin alpha. *Cell* 94: 193-204.
96. Fontes MR, Teh T, Kobe B (2000). Structural basis of recognition of monopartite and bipartite nuclear localization sequences by mammalian importin-alpha. *J Mol Biol* 297: 1183-1194.
97. Hodel MR, Corbett AH, Hodel AE (2001). Dissection of a nuclear localization signal. *J Biol Chem* 276: 1317-1325.
98. Pollard VW, Michael WM, Nakielnny S, Siomi MC, Wang F, Dreyfuss G (1996). A novel receptor-mediated nuclear protein import pathway. *Cell* 86: 985-994.
99. Siomi H, Dreyfuss G (1995). A nuclear localization domain in the hnRNP A1 protein. *J Cell Biol* 129: 551-560.
100. Xu D, Farmer A, Chook YM (2010). Recognition of nuclear targeting signals by Karyopherin-beta proteins. *Curr Opin Struct Biol* 20: 782-790.
101. Sessler RJ, Noy N (2005). A ligand-activated nuclear localization signal in cellular retinoic acid binding protein-II. *Mol Cell* 18: 343-353.
102. Nagoshi E, Imamoto N, Sato R, Yoneda Y (1999). Nuclear import of sterol regulatory element-binding protein-2, a basic helix-loop-helix-leucine zipper (bHLH-Zip)-containing transcription factor, occurs through the direct interaction of importin beta with HLH-Zip. *Mol Biol Cell* 10: 2221-2233.
103. Chan CK, Hubner S, Hu W, Jans DA (1998). Mutual exclusivity of DNA binding and nuclear localization signal recognition by the yeast transcription factor GAL4: implications for nonviral DNA delivery. *Gene Ther* 5: 1204-1212.
104. Truant R, Cullen BR (1999). The arginine-rich domains present in human immunodeficiency virus type 1 Tat and Rev function as direct importin beta-dependent nuclear localization signals. *Mol Cell Biol* 19: 1210-1217.
105. Nachury MV, Ryder UW, Lamond AI, Weis K (1998). Cloning and characterization of hSRP1 gamma, a tissue-specific nuclear transport factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 582-587.

106. Kohler M, Ansieau S, Prehn S, Leutz A, Haller H, Hartmann E (1997). Cloning of two novel human importin-alpha subunits and analysis of the expression pattern of the importin-alpha protein family. *FEBS Lett* 417: 104-108.
107. Seki T, Tada S, Katada T, Enomoto T (1997). Cloning of a cDNA encoding a novel importin-alpha homologue, Qip1: discrimination of Qip1 and Rch1 from hSrp1 by their ability to interact with DNA helicase Q1/RecQL. *Biochem Biophys Res Commun* 234: 48-53.
108. Cortes P, Ye ZS, Baltimore D (1994). RAG-1 interacts with the repeated amino acid motif of the human homologue of the yeast protein SRP1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 7633-7637.
109. Cuomo CA, Kirch SA, Gyuris J, Brent R, Oettinger MA (1994). Rch1, a protein that specifically interacts with the RAG-1 recombination-activating protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 6156-6160.
110. Weis K, Dingwall C, Lamond AI (1996). Characterization of the nuclear protein import mechanism using Ran mutants with altered nucleotide binding specificities. *EMBO J* 15: 7120-7128.
111. Gorlich D, Henklein P, Laskey RA, Hartmann E (1996). A 41 amino acid motif in importin-alpha confers binding to importin-beta and hence transit into the nucleus. *EMBO J* 15: 1810-1817.
112. Harreman MT, Hodel MR, Fanara P, Hodel AE, Corbett AH (2003). The auto-inhibitory function of importin alpha is essential in vivo. *J Biol Chem* 278: 5854-5863.
113. Kobe B (1999). Autoinhibition by an internal nuclear localization signal revealed by the crystal structure of mammalian importin alpha. *Nat Struct Biol* 6: 388-397.
114. Christie M, Chang CW, Rona G, Smith KM, Stewart AG, Takeda AA, Fontes MR, Stewart M, Vertessy BG, Forwood JK, Kobe B (2016). Structural biology and regulation of protein import into the nucleus. *J Mol Biol* 428: 2060-2090.
115. Oka M, Yoneda Y (2018). Importin alpha: functions as a nuclear transport factor and beyond. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 94: 259-274.
116. Herold A, Truant R, Wiegand H, Cullen BR (1998). Determination of the functional domain organization of the importin alpha nuclear import factor. *J Cell Biol* 143: 309-318.
117. Alspaugh JA (2017). Targeting protein localization for anti-infective therapy. *Virulence* 8: 1105-1107.

118. Omer CA, Gibbs JB (1994). Protein prenylation in eukaryotic microorganisms: genetics, biology and biochemistry. *Mol Microbiol* 11: 219-225.
119. Nair R, Rost B (2005). Mimicking cellular sorting improves prediction of subcellular localization. *J Mol Biol* 348: 85-100.
120. Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S, von Heijne G (2000). Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J Mol Biol* 300: 1005-1016.
121. Nakai K, Horton P (1999). PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends Biochem Sci* 24: 34-36.
122. Reinhardt A, Hubbard T (1998). Using neural networks for prediction of the subcellular location of proteins. *Nucleic Acids Res* 26: 2230-2236.
123. Brameier M, Krings A, MacCallum RM (2007). NucPred--predicting nuclear localization of proteins. *Bioinformatics* 23: 1159-1160.
124. Cokol M, Nair R, Rost B (2000). Finding nuclear localization signals. *EMBO Rep* 1: 411-415.
125. Kosugi S, Hasebe M, Tomita M, Yanagawa H (2009). Systematic identification of cell cycle-dependent yeast nucleocytoplasmic shuttling proteins by prediction of composite motifs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 10171-10176.
126. Nguyen Ba AN, Pogoutse A, Provart N, Moses AM (2009). NLStradamus: a simple Hidden Markov Model for nuclear localization signal prediction. *BMC Bioinformatics* 10: 202.
127. Lisitsyna O, Seplyarskiy V, Sheval E (2017). Comparative analysis of nuclear localization signal (NLS) prediction methods. *Biopolym Cell* 33: 147-154.
128. Simon I, Wright M, Flohr T, Hevezi P, Caras IW (2001). Determining subcellular localization of novel drug targets by transient transfection in COS cells. *Cytotechnology* 35: 189-196.
129. Sewer MB, Nguyen VQ, Huang CJ, Tucker PW, Kagawa N, Waterman MR (2002). Transcriptional activation of human CYP17 in H295R adrenocortical cells depends on complex formation among p54(nrb)/NonO, protein-associated splicing factor, and SF-1, a complex that also participates in repression of transcription. *Endocrinology* 143: 1280-1290.

130. Zhang Z, Carmichael GG (2001). The fate of dsRNA in the nucleus: a p54(nrb)-containing complex mediates the nuclear retention of promiscuously A-to-I edited RNAs. *Cell* 106: 465-475.
131. Mathur M, Tucker PW, Samuels HH (2001). PSF is a novel corepressor that mediates its effect through Sin3A and the DNA binding domain of nuclear hormone receptors. *Mol Cell Biol* 21: 2298-2311.
132. Akhmedov AT, Lopez BS (2000). Human 100-kDa homologous DNA-pairing protein is the splicing factor PSF and promotes DNA strand invasion. *Nucleic Acids Res* 28: 3022-3030.
133. Straub T, Knudsen BR, Boege F (2000). PSF/p54(nrb) stimulates "jumping" of DNA topoisomerase I between separate DNA helices. *Biochemistry* 39: 7552-7558.
134. Urban RJ, Bodenbun Y, Kurosky A, Wood TG, Gasic S (2000). Polypyrimidine tract-binding protein-associated splicing factor is a negative regulator of transcriptional activity of the porcine p450scc insulin-like growth factor response element. *Mol Endocrinol* 14: 774-782.
135. Straub T, Grue P, Uhse A, Lisby M, Knudsen BR, Tange TO, Westergaard O, Boege F (1998). The RNA-splicing factor PSF/p54 controls DNA-topoisomerase I activity by a direct interaction. *J Biol Chem* 273: 26261-26264.
136. Le Hir H, Gatfield D, Braun IC, Forler D, Izaurralde E (2001). The protein Mago provides a link between splicing and mRNA localization. *EMBO Rep* 2: 1119-1124.
137. Sudo H, Tsuji AB, Sugyo A, Kohda M, Sogawa C, Yoshida C, Harada YN, Hino O, Saga T (2010). Knockdown of COPA, identified by loss-of-function screen, induces apoptosis and suppresses tumor growth in mesothelioma mouse model. *Genomics* 95: 210-216.
138. Silver DL, Watkins-Chow DE, Schreck KC, Pierfelice TJ, Larson DM, Burnetti AJ, Liaw HJ, Myung K, Walsh CA, Gaiano N, Pavan WJ (2010). The exon junction complex component Magoh controls brain size by regulating neural stem cell division. *Nat Neurosci* 13: 551-558.
139. Hayward DG, Fry AM (2006). Nek2 kinase in chromosome instability and cancer. *Cancer Lett* 237: 155-166.
140. de Almeida SF, Carmo-Fonseca M (2012). Design principles of interconnections between chromatin and pre-mRNA splicing. *Trends Biochem Sci* 37: 248-253.

141. Moore MJ, Proudfoot NJ (2009). Pre-mRNA processing reaches back to transcription and ahead to translation. *Cell* 136: 688-700.
142. Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389: 251-260.
143. Schwartz S, Ast G (2010). Chromatin density and splicing destiny: on the cross-talk between chromatin structure and splicing. *EMBO J* 29: 1629-1636.
144. Tilgner H, Guigo R (2010). From chromatin to splicing: RNA-processing as a total artwork. *Epigenetics* 5: 180-184.
145. Kornblihtt AR, Schor IE, Allo M, Blencowe BJ (2009). When chromatin meets splicing. *Nat Struct Mol Biol* 16: 902-903.
146. Schor IE, Rascovan N, Pelisch F, Allo M, Kornblihtt AR (2009). Neuronal cell depolarization induces intragenic chromatin modifications affecting NCAM alternative splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 4325-4330.
147. Allo M, Buggiano V, Fededa JP, Petrillo E, Schor I, de la Mata M, Agirre E, Plass M, Eyrales E, Elela SA, Klinck R, Chabot B, Kornblihtt AR (2009). Control of alternative splicing through siRNA-mediated transcriptional gene silencing. *Nat Struct Mol Biol* 16: 717-724.
148. Luco RF, Pan Q, Tominaga K, Blencowe BJ, Pereira-Smith OM, Misteli T (2010). Regulation of alternative splicing by histone modifications. *Science* 327: 996-1000.
149. Sims RJ, 3rd, Millhouse S, Chen CF, Lewis BA, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Manley JL, Reinberg D (2007). Recognition of trimethylated histone H3 lysine 4 facilitates the recruitment of transcription postinitiation factors and pre-mRNA splicing. *Mol Cell* 28: 665-676.
150. Loomis RJ, Naoe Y, Parker JB, Savic V, Bozovsky MR, Macfarlan T, Manley JL, Chakravarti D (2009). Chromatin binding of SRp20 and ASF/SF2 and dissociation from mitotic chromosomes is modulated by histone H3 serine 10 phosphorylation. *Mol Cell* 33: 450-461.
151. Gunderson FQ, Johnson TL (2009). Acetylation by the transcriptional coactivator Gcn5 plays a novel role in co-transcriptional spliceosome assembly. *PLoS Genet* 5: e1000682.
152. Luco RF, Allo M, Schor IE, Kornblihtt AR, Misteli T (2011). Epigenetics in alternative pre-mRNA splicing. *Cell* 144: 16-26.

153. Lin S, Coutinho-Mansfield G, Wang D, Pandit S, Fu XD (2008). The splicing factor SC35 has an active role in transcriptional elongation. *Nat Struct Mol Biol* 15: 819-826.
154. Zhou HL, Hinman MN, Barron VA, Geng C, Zhou G, Luo G, Siegel RE, Lou H (2011). Hu proteins regulate alternative splicing by inducing localized histone hyperacetylation in an RNA-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: E627-635.
155. de Almeida SF, Grosso AR, Koch F, Fenouil R, Carvalho S, Andrade J, Levezinho H, Gut M, Eick D, Gut I, Andrau JC, Ferrier P, Carmo-Fonseca M (2011). Splicing enhances recruitment of methyltransferase HYPB/Setd2 and methylation of histone H3 Lys36. *Nat Struct Mol Biol* 18: 977-983.
156. Kim S, Kim H, Fong N, Erickson B, Bentley DL (2011). Pre-mRNA splicing is a determinant of histone H3K36 methylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 13564-13569.
157. Shukla S, Kavak E, Gregory M, Imashimizu M, Shutinoski B, Kashlev M, Oberdoerffer P, Sandberg R, Oberdoerffer S (2011). CTCF-promoted RNA polymerase II pausing links DNA methylation to splicing. *Nature* 479: 74-79.
158. Saint-Andre V, Batsche E, Rachez C, Muchardt C (2011). Histone H3 lysine 9 trimethylation and HP1gamma favor inclusion of alternative exons. *Nat Struct Mol Biol* 18: 337-344.
159. Batsche E, Yaniv M, Muchardt C (2006). The human SWI/SNF subunit Brm is a regulator of alternative splicing. *Nat Struct Mol Biol* 13: 22-29.
160. Zhou HL, Luo G, Wise JA, Lou H (2014). Regulation of alternative splicing by local histone modifications: potential roles for RNA-guided mechanisms. *Nucleic Acids Res* 42: 701-713.
161. Klingseisen A, Jackson AP (2011). Mechanisms and pathways of growth failure in primordial dwarfism. *Genes Dev* 25: 2011-2024.
162. Mc KV (1955). Primordial dwarfism and ectopia lentis. *Am J Hum Genet* 7: 189-198.
163. Wang T, Zou Y, Huang N, Teng J, Chen J (2019). CCDC84 acetylation oscillation regulates centrosome duplication by modulating HsSAS-6 degradation. *Cell Rep* 29: 2078-2091.
164. Quarantotti V, Chen JX, Tischer J, Gonzalez Tejedo C, Papachristou EK, D'Santos CS, Kilmartin JV, Miller ML, Gergely F (2019). Centriolar satellites are acentriolar assemblies of centrosomal proteins. *EMBO J* 38: e101082.

165. Marzluff WF, Gongidi P, Woods KR, Jin JP, Maltais LJ (2002). The human and mouse replication-dependent histone genes. *Genomics* 80: 487-498.
166. Rabinovich EI, Kapetanaki MG, Steinfeld I, Gibson KF, Pandit KV, Yu GY, Yakhini Z, Kaminski N (2012). Global methylation patterns in idiopathic pulmonary fibrosis. *Plos One* 7: e33770.
167. Reece-Hoyes JS, Walhout AJM (2018). Propagating gateway vectors. *Cold Spring Harb Protoc* 2018(1): pdb.prot094920.
168. Bertani G (1951). Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 62: 293-300.
169. Lennox ES (1955). Transduction of linked genetic characters of the host by bacteriophage P1. *Virology* 1: 190-206.
170. Butler GS, Overall CM (2009). Proteomic identification of multitasking proteins in unexpected locations complicates drug targeting. *Nat Rev Drug Discov* 8: 935-948.
171. Hung MC, Link W (2011). Protein localization in disease and therapy. *J Cell Sci* 124: 3381-3392.
172. Li Z, Liu Z, Zhong W, Huang M, Wu N, Xie Y, Dai Z, Zou X (2016). Large-scale identification of human protein function using topological features of interaction network. *Sci Rep* 6: 37179.
173. An JY, Meng FR, You ZH, Chen X, Yan GY, Hu JP (2016). Improving protein-protein interactions prediction accuracy using protein evolutionary information and relevance vector machine model. *Protein Sci* 25: 1825-1833.
174. Huang YA, You ZH, Chen X, Chan K, Luo X (2016). Sequence-based prediction of protein-protein interactions using weighted sparse representation model combined with global encoding. *BMC Bioinformatics* 17: 184.
175. Xiong J (2006). *Essential Bioinformatics*. 1st ed. Cambridge University Press, Cambridge; pp: 85-94.
176. Kosugi S, Hasebe M, Matsumura N, Takashima H, Miyamoto-Sato E, Tomita M, Yanagawa H (2009). Six classes of nuclear localization signals specific to different binding grooves of importin alpha. *J Biol Chem* 284: 478-485.
177. Hartley JL, Temple GF, Brasch MA (2000). DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome Res* 10: 1788-1795.

178. Boisvert M, Bouchard-Levesque V, Fernandes S, Tijssen P (2014). Classic nuclear localization signals and a novel nuclear localization motif are required for nuclear transport of porcine parvovirus capsid proteins. *J Virol* 88: 11748-11759.
179. Nagarajan UM, Long AB, Harreman MT, Corbett AH, Boss JM (2004). A hierarchy of nuclear localization signals governs the import of the regulatory factor X complex subunits and MHC class II expression. *J Immunol* 173: 410-419.
180. Landy A (1989). Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. *Annu Rev Biochem* 58: 913-949.
181. Hanahan D, Jessee J, Bloom FR (1991). Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods Enzymol* 204: 63-113.
182. Kretz K, Callen W, Hedden V (1994). Cycle sequencing. *PCR Methods Appl* 3: S107-112.
183. Sambrook J, Russell DW (2006). The inoue method for preparation and transformation of competent *e. coli*: "ultra-competent" cells. *CSH Protoc* 2006: pdb.prot3944.
184. Grimm S, Voss-Neudecker F (2003). High-purity plasmid isolation using silica oxide. *Methods Mol Biol* 235: 83-87.
185. Feliciello I, Chinali G (1993). A modified alkaline lysis method for the preparation of highly purified plasmid DNA from *Escherichia coli*. *Anal Biochem* 212: 394-401.
186. Sandell L, Sakai D (2011). Mammalian cell culture. *Curr Protoc Essent Lab Tech* 5: 1-32.
187. Maity B, Sheff D, Fisher RA (2013). Immunostaining: detection of signaling protein location in tissues, cells and subcellular compartments. *Methods Cell Biol* 113: 81-105.
188. Jordan M, Schallhorn A, Wurm FM (1996). Transfecting mammalian cells: optimization of critical parameters affecting calcium-phosphate precipitate formation. *Nucleic Acids Res* 24: 596-601.
189. Tang Z, Takahashi Y (2018). Analysis of protein-protein interaction by Co-IP in human cells. *Methods Mol Biol* 1794: 289-296.
190. Brizzard BL, Chubet RG, Vizard DL (1994). Immunoaffinity purification of FLAG epitope-tagged bacterial alkaline phosphatase using a novel monoclonal antibody and peptide elution. *Biotechniques* 16: 730-735.

191. Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hamers C, Songa EB, Bendahman N, Hamers R (1993). Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* 363: 446-448.
192. Peach M, Marsh N, Miskiewicz EI, MacPhee DJ (2015). Solubilization of proteins: the importance of lysis buffer choice. *Methods Mol Biol* 1312: 49-60.
193. Einarson MB, Pugacheva EN, Orlinick JR (2007). Identification of protein-protein interactions with glutathione-S-transferase (GST) fusion proteins. *CSH Protoc* 2007: pdb top11.
194. Garfin DE (1990). One-dimensional gel electrophoresis. *Methods Enzymol* 182: 425-441.
195. Smith BJ (1994). SDS polyacrylamide gel electrophoresis of proteins. *Methods Mol Biol* 32: 23-34.
196. Litovchick L (2018). Immunoblotting: Transfer of proteins from gels to membranes. *Cold Spring Harb Protoc* 2018: pdb.prot098442.
197. Bonifaci N, Moroianu J, Radu A, Blobel G (1997). Karyopherin beta2 mediates nuclear import of a mRNA binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 5055-5060.
198. Tinland B, Koukolikova-Nicola Z, Hall MN, Hohn B (1992). The T-DNA-linked VirD2 protein contains two distinct functional nuclear localization signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 7442-7446.
199. Lange A, Mills RE, Lange CJ, Stewart M, Devine SE, Corbett AH (2007). Classical nuclear localization signals: definition, function, and interaction with importin alpha. *J Biol Chem* 282: 5101-5105.
200. Shiota C, Coffey J, Grimsby J, Grippo JF, Magnuson MA (1999). Nuclear import of hepatic glucokinase depends upon glucokinase regulatory protein, whereas export is due to a nuclear export signal sequence in glucokinase. *J Biol Chem* 274: 37125-37130.
201. Jans DA, Briggs LJ, Gustin SE, Jans P, Ford S, Young IG (1997). The cytokine interleukin-5 (IL-5) effects cotransport of its receptor subunits to the nucleus in vitro. *FEBS Lett* 410: 368-372.
202. Xia YP, Yeh CT, Ou JH, Lai MM (1992). Characterization of nuclear targeting signal of hepatitis delta antigen: nuclear transport as a protein complex. *J Virol* 66: 914-921.

203. Park JK, Das T, Song EJ, Kim EE (2016). Structural basis for recruiting and shuttling of the spliceosomal deubiquitinase USP4 by SART3. *Nucleic Acids Res* 44: 5424-5437.
204. Fagerlund R, Melen K, Kinnunen L, Julkunen I (2002). Arginine/lysine-rich nuclear localization signals mediate interactions between dimeric STATs and importin alpha 5. *J Biol Chem* 277: 30072-30078.
205. Yang H, Wang H, Shivalila CS, Cheng AW, Shi L, Jaenisch R (2013). One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell* 154: 1370-1379.
206. Maeshima K, Eltsov M, Laemmli UK (2005). Chromosome structure: improved immunolabeling for electron microscopy. *Chromosoma* 114: 365-375.
207. Hart T, Chandrashekhar M, Aregger M, Steinhart Z, Brown KR, MacLeod G, Mis M, Zimmermann M, Fradet-Turcotte A, Sun S, Mero P, Dirks P, Sidhu S, Roth FP, Rissland OS, Durocher D, Angers S, Moffat J (2015). High-resolution CRISPR screens reveal fitness genes and genotype-specific cancer liabilities. *Cell* 163: 1515-1526.
208. Terry LJ, Shows EB, Wente SR (2007). Crossing the nuclear envelope: hierarchical regulation of nucleocytoplasmic transport. *Science* 318: 1412-1416.
209. Fujimoto H, Ikuta T, Koike A, Koike M (2018). Acetylation of nuclear localization signal controls importin-mediated nuclear transport of Ku70. *bioRxiv*: 403485. doi: 10.1101/403485.
210. Cao X, Li C, Xiao S, Tang Y, Huang J, Zhao S, Li X, Li J, Zhang R, Yu W (2017). Acetylation promotes TyrRS nuclear translocation to prevent oxidative damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114: 687-692.
211. An S, Yoon J, Kim H, Song JJ, Cho US (2017). Structure-based nuclear import mechanism of histones H3 and H4 mediated by Kap123. *Elife* 6: e30244.
212. Liu Y, Peng L, Seto E, Huang S, Qiu Y (2012). Modulation of histone deacetylase 6 (HDAC6) nuclear import and tubulin deacetylase activity through acetylation. *J Biol Chem* 287: 29168-29174.
213. Li T, Diner BA, Chen J, Cristea IM (2012). Acetylation modulates cellular distribution and DNA sensing ability of interferon-inducible protein IFI16. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 10558-10563.

214. Dietschy T, Shevelev I, Pena-Diaz J, Huhn D, Kuenzle S, Mak R, Miah MF, Hess D, Fey M, Hottiger MO, Janscak P, Stagljär I (2009). p300-mediated acetylation of the Rothmund-Thomson-syndrome gene product RECQL4 regulates its subcellular localization. *J Cell Sci* 122: 1258-1267.
215. Shimazu T, Horinouchi S, Yoshida M (2007). Multiple histone deacetylases and the CREB-binding protein regulate pre-mRNA 3'-end processing. *J Biol Chem* 282: 4470-4478.
216. di Bari MG, Ciuffini L, Mingardi M, Testi R, Soddu S, Barila D (2006). c-Abl acetylation by histone acetyltransferases regulates its nuclear-cytoplasmic localization. *EMBO Rep* 7: 727-733.
217. Thevenet L, Mejean C, Moniot B, Bonneaud N, Galeotti N, Aldrian-Herrada G, Poulat F, Berta P, Benkirane M, Boizet-Bonhoure B (2004). Regulation of human SRY subcellular distribution by its acetylation/deacetylation. *EMBO J* 23: 3336-3345.
218. Madison DL, Yaciuk P, Kwok RP, Lundblad JR (2002). Acetylation of the adenovirus-transforming protein E1A determines nuclear localization by disrupting association with importin- α . *J Biol Chem* 277: 38755-38763.
219. Spilianakis C, Papamatheakis J, Kretsovali A (2000). Acetylation by PCAF enhances CIITA nuclear accumulation and transactivation of major histocompatibility complex class II genes. *Mol Cell Biol* 20: 8489-8498.
220. Sillibourne JE, Delaval B, Redick S, Sinha M, Doxsey SJ (2007). Chromatin remodeling proteins interact with pericentrin to regulate centrosome integrity. *Mol Biol Cell* 18: 3667-3680.
221. Gergely F, Karlsson C, Still I, Cowell J, Kilmartin J, Raff JW (2000). The TACC domain identifies a family of centrosomal proteins that can interact with microtubules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 14352-14357.
222. Gangisetty O, Lauffart B, Sondarva GV, Chelsea DM, Still IH (2004). The transforming acidic coiled coil proteins interact with nuclear histone acetyltransferases. *Oncogene* 23: 2559-2563.
223. Yokoyama H, Nakos K, Santarella-Mellwig R, Rybina S, Krijgsveld J, Koffa MD, Mattaj IW (2013). CHD4 is a RanGTP-dependent MAP that stabilizes microtubules and regulates bipolar spindle formation. *Curr Biol* 23: 2443-2451.

224. Sato M, Okada N, Kakui Y, Yamamoto M, Yoshida M, Toda T (2009). Nucleocytoplasmic transport of Alp7/TACC organizes spatiotemporal microtubule formation in fission yeast. *EMBO Rep* 10: 1161-1167.
225. Ling YC, Vjestica A, Oliferenko S (2009). Nucleocytoplasmic shuttling of the TACC protein Mia1p/Alp7p is required for remodeling of microtubule arrays during the cell cycle. *PLoS One* 4: e6255.
226. Matsuyama A, Arai R, Yashiroda Y, Shirai A, Kamata A, Sekido S, Kobayashi Y, Hashimoto A, Hamamoto M, Hiraoka Y, Horinouchi S, Yoshida M (2006). ORFeome cloning and global analysis of protein localization in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nat Biotechnol* 24: 841-847.
227. Sato M, Toda T (2010). Space shuttling in the cell: nucleocytoplasmic transport and microtubule organization during the cell cycle. *Nucleus* 1: 231-236.
228. Kataoka N, Diem MD, Yoshida M, Hatai C, Dobashi I, Dreyfuss G, Hagiwara M, Ohno M (2011). Specific Y14 domains mediate its nucleo-cytoplasmic shuttling and association with spliced mRNA. *Sci Rep* 1: 92.
229. Deery EC, Vithana EN, Newbold RJ, Gallon VA, Bhattacharya SS, Warren MJ, Hunt DM, Wilkie SE (2002). Disease mechanism for retinitis pigmentosa (RP11) caused by mutations in the splicing factor gene PRPF31. *Hum Mol Genet* 11: 3209-3219.
230. Huang CJ, Ferfoggia F, Raleff F, Kramer A (2011). Interaction domains and nuclear targeting signals in subunits of the U2 small nuclear ribonucleoprotein particle-associated splicing factor SF3a. *J Biol Chem* 286: 13106-13114.
231. Le Hir H, Gatfield D, Izaurralde E, Moore MJ (2001). The exon-exon junction complex provides a binding platform for factors involved in mRNA export and nonsense-mediated mRNA decay. *EMBO J* 20: 4987-4997.
232. Kim VN, Yong J, Kataoka N, Abel L, Diem MD, Dreyfuss G (2001). The Y14 protein communicates to the cytoplasm the position of exon-exon junctions. *EMBO J* 20: 2062-2068.
233. Le Hir H, Izaurralde E, Maquat LE, Moore MJ (2000). The spliceosome deposits multiple proteins 20-24 nucleotides upstream of mRNA exon-exon junctions. *EMBO J* 19: 6860-6869.
234. Ballut L, Marchadier B, Baguet A, Tomasetto C, Seraphin B, Le Hir H (2005). The exon junction core complex is locked onto RNA by inhibition of eIF4AIII ATPase activity. *Nat Struct Mol Biol* 12: 861-869.

235. Shibuya T, Tange TO, Sonenberg N, Moore MJ (2004). EIF4AIII binds spliced mRNA in the exon junction complex and is essential for nonsense-mediated decay. *Nat Struct Mol Biol* 11: 346-351.
236. Nigg EA, Stearns T (2011). The centrosome cycle: Centriole biogenesis, duplication and inherent asymmetries. *Nat Cell Biol* 13: 1154-1160.
237. Bornens M (2012). The centrosome in cells and organisms. *Science* 335: 422-426.
238. Arquint C, Gabryjonczyk AM, Nigg EA (2014). Centrosomes as signalling centres. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 369: 20130464.
239. Phizicky EM, Fields S (1995). Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. *Microbiol Rev* 59: 94-123.
240. Free RB, Hazelwood LA, Sibley DR (2009). Identifying novel protein-protein interactions using co-immunoprecipitation and mass spectroscopy. *Curr Protoc Neurosci Chapter* 46: 1-14.
241. Kocher T, Superti-Furga G (2007). Mass spectrometry-based functional proteomics: from molecular machines to protein networks. *Nat Methods* 4: 807-815.
242. Ma H, Guo M, Shan B, Xia Z (2012). Targeted functional analysis of p300 coactivator in Wnt/beta-catenin signaling pathway using phosphoproteomic and biochemical approaches. *J Proteomics* 75: 2601-2610.
243. Li Y, Stewart NK, Berger AJ, Vos S, Schoeffler AJ, Berger JM, Chait BT, Oakley MG (2010). Escherichia coli condensin MukB stimulates topoisomerase IV activity by a direct physical interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 18832-18837.
244. Wabnitz PA, Loo JA (2002). Drug screening of pharmaceutical discovery compounds by micro-size exclusion chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 16: 85-91.
245. Zehender H, Le Goff F, Lehmann N, Filipuzzi I, Mayr LM (2004). SpeedScreen: The "missing link" between genomics and lead discovery. *J Biomol Screen* 9: 498-505.
246. Zhang B, Palcic MM, Schriemer DC, Alvarez-Manilla G, Pierce M, Hindsgaul O (2001). Frontal affinity chromatography coupled to mass spectrometry for screening mixtures of enzyme inhibitors. *Anal Biochem* 299: 173-182.
247. Slon-Usakiewicz JJ, Ng W, Dai JR, Pasternak A, Redden PR (2005). Frontal affinity chromatography with MS detection (FAC-MS) in drug discovery. *Drug Discov Today* 10: 409-416.

248. Heo M, Maslov S, Shakhnovich E (2011). Topology of protein interaction network shapes protein abundances and strengths of their functional and nonspecific interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 4258-4263.
249. De Maio A, Yalamanchili HK, Adamski CJ, Gennarino VA, Liu Z, Qin J, Jung SY, Richman R, Orr H, Zoghbi HY (2018). RBM17 interacts with U2SURP and CHERP to regulate expression and splicing of rna-processing proteins. *Cell Rep* 25: 726-736.
250. Trinkle-Mulcahy L, Boulon S, Lam YW, Urcia R, Boisvert FM, Vandermoere F, Morrice NA, Swift S, Rothbauer U, Leonhardt H, Lamond A (2008). Identifying specific protein interaction partners using quantitative mass spectrometry and bead proteomes. *J Cell Biol* 183: 223-239.
251. Huang BX, Kim HY (2013). Effective identification of Akt interacting proteins by two-step chemical crosslinking, co-immunoprecipitation and mass spectrometry. *PLoS One* 8: e61430.
252. Skene PJ, Henikoff S (2013). Histone variants in pluripotency and disease. *Development* 140: 2513-2524.
253. Monteiro FL, Baptista T, Amado F, Vitorino R, Jeronimo C, Helguero LA (2014). Expression and functionality of histone H2A variants in cancer. *Oncotarget* 5: 3428-3443.
254. Boyne MT, 2nd, Pesavento JJ, Mizzen CA, Kelleher NL (2006). Precise characterization of human histones in the H2A gene family by top down mass spectrometry. *J Proteome Res* 5: 248-253.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Soyadı, Adı : İhsan NALKIRAN
Uyruğu : T.C.
Doğum Tarihi ve Yeri : 18.02.1989, RİZE/Merkez
Telefon (İş) : 0(464) 2123009
E-Posta : nalkiranihsan@gmail.com
Yazışma Adresi (İş) : RTEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ABD 53020 RİZE

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık	Karadeniz Teknik Üni. Tıbbi Biyoloji ABD	Halen
Yüksek Lisans	İstanbul Üni. Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırmaları Enstitüsü, Moleküler Tıp ABD	2014
Lisans	İstanbul Üni. Moleküler Biyoloji ve Genetik	2010
Lise	Rize Fen Lisesi	2006

AKADEMİK/MESLEKİ DENEYİMİ

Görevi	Kurum	Süre (Yıl -Yıl)
1. Arş. Gör.	RTEÜ Tıbbi Biyoloji ABD	Halen
2. Arş. Gör. (35. madde ile görev.)	KTÜ Tıbbi Biyoloji ABD	2017-2020
3. Arş. Gör.	RTEÜ Tıbbi Biyoloji ABD	2012-2017

YABANCI DİL

İngilizce: YÖKDİL Sağlık Bilimleri; 71.25, ÜDS; 65

UZMANLIK ALANI

Moleküler Biyoloji, Kanser, İnsan Genetiği, Hücre Biyolojisi

YAYINLAR

1. İplik ES, **Nalkiran I**, Turan S, Arikan S, Yaylim I, Ergen A (2019). Investigation of Gpx1 gene expression, serum Gpx1 and selenium levels on colorectal cancer. Clinical and Experimental Health Sciences 9: 65-70.

2. Nalkiran HS, Sahin SB, Ayaz T, **Nalkiran I**, Guzel AI, Eldes T, Yildiz Y (2019). Association of paraoxonase-1 L55M and Q192R polymorphisms with PCOS risk and potential risk factors for atherosclerosis. *Biomarkers in Medicine* 13: 279-289.
3. **Nalkiran I**, Turan S, Arikan S, Kahraman OT, Acar L, Yaylim I, Ergen A (2015). Determination of gene expression and serum levels of MnSOD and GPX1 in colorectal cancer. *Anticancer Research* 35: 255-259.

BİLDİRİLER

1. Toraman B, Livaoğlu M, Dinçer T, Budak G, **Nalkiran İ**, Ünsal S, Yıldız G, Akarsu NA, Kalay E (2017). Kalıtsal nonsendromik yarık dudak/damak hastalığında genetik etiyolojinin araştırılması. XV. Tıbbi Biyoloj ve Genetik Kongresi, MUĞLA, 26-29 Ekim 2017, 225.
2. Uzun H, Sevim Nalkiran H, Akça N, Eren H, **Nalkiran İ**, Saydam F, Güzel Aİ (2017). Y chromosome microdeletions in 102 cases: Is the incidence of acquired non-obstructive azoospermia increasing. ESAU Meeting Bodrum Turkey, MUĞLA, TÜRKİYE, 21-21 Mayıs 2017, 84-84.
3. Sevim Nalkiran H, Ayaz T, **Nalkiran İ**, Güzel A.İ, Durakoğlugil T, Yildiz Y (2017). Investigation of association between paraoxonase-1 L55M (RS854560) and Q192R (RS662) polymorphisms and potential atherosclerotic risk factors in PCOS patients. 2. Ege Endokrin Hastalıklar ve Genetik Sempozyumu, İZMİR, TÜRKİYE, 23-25 Şubat 2017, cilt.9, no.suppl.1, 27-27.
4. **Nalkiran İ.**, Turan S, Acar L, Arikan S, Timirci Kahraman Ö, Yaylim İ, Ergen A (2015). MnSOD and GPX1 gene expressions in colorectal cancer. 5 th International Congress of Molecular Medicine From Cell to Bedside, İZMİR, TÜRKİYE, 20-22 Mayıs 2015, 57-57.
5. Ekşi Y.E, Ermiş Karaali Z, **Nalkiran İ**, Zeybek Ü, Ergen A (2012). Tip2 diyabetli hastalarda myeloperoksidaz ve glutamat-sistein ligaz katalitik altbirim gen polimorfizmlerinin incelenmesi. 24. Ulusal Biyokimya Kongresi, KONYA, TÜRKİYE, 25-28 Eylül 2012, 173-173.

ÖDÜLLER

1. Toraman B, Livaoğlu M, Dinçer T, Budak G, **Nalkiran İ**, Ünsal S, Yıldız G, Akarsu NA, Kalay E (2017). Kalıtsal nonsendromik yarık dudak/damak hastalığında genetik etiyolojinin araştırılması. XV. Tıbbi Biyoloj ve Genetik Kongresi, MUĞLA, 26-29 Ekim 2017, 225.

2. Ekşi Y.E, Ermiş Karaali Z, **Nalkiran İ**, Zeybek Ü, Ergen A (2012). Tip2 diyabetli hastalarda myeloperoksidaz ve glutamat-sistein ligaz katalitik altbirim gen polimorfizmlerinin incelenmesi. 24. Ulusal Biyokimya Kongresi, KONYA, TÜRKİYE, 25-28 Eylül 2012, 173-173.

