

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

COILED-COIL DOMAIN-CONTAINING 124 (CCDC124)
PROTEİNİNİN İŞLEVLERİ VE HÜCRE-ALTI KONUMUNUN
TRANSLASYON SONRASI MEKANİZMALARLA DÜZENLENMESİ

ÖMER GÜLLÜLÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

GEBZE
2017

**T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**COILED-COIL DOMAIN-CONTAINING 124
(CCDC124) PROTEİNİNİN İŞLEVLERİ VE
HÜCRE-ALTI KONUMUNUN
TRANSLASYON SONRASI
MEKANİZMALARLA DÜZENLENMESİ**

**ÖMER GÜLLÜLÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**DANIŞMANI
PROF. DR. UYGAR HALİS TAZEBAY**

GEBZE

2017

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

**REGULATION OF SUBCELLULAR
LOCALIZATION AND FUNCTIONS OF
COILED-COIL DOMAIN-CONTAINING 124
(CCDC124) PROTEIN BY POST-
TRANSLATIONAL MECHANISMS**

ÖMER GÜLLÜLÜ
**A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE**
DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

THESIS SUPERVISOR
PROF. DR. UYGAR HALİS TAZEBAY

GEBZE

2017

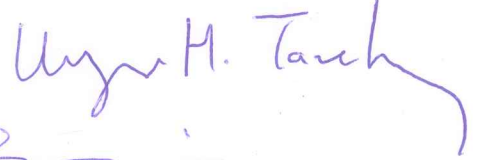
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ	YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU
----------------------------------	--------------------------------------

GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 07/06/2017 tarih ve 2017/30 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 15/06/2017 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Ömer GÜLLÜLÜ' nün tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

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



ÜYE

: Prof. Dr. Tamer YAĞCI



ÜYE

: Prof. Dr. Batu ERMAN



ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun

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

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

Mantardan insana kadar tüm ökaryotlarda korunmuş olan Coiled-coil domain containing 124 (Ccdc124) proteini, memeli hücrelerinde yeni tanımlanmış fonksiyonel bir proteindir. İnsan hücrelerinde lokalizasyonu hücre döngüsünün interfaz evresinde sentrozomda; mitozun post-anafaz evresinden sitokinetik bölünmeye kadar ortacisimcikte (midbody) görülmektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda *Ccdc124* proteinini kodlayan genin susturulması veya ifadesinin artırılması durumunda hücrelerin bölünemediği ve çok çekirdekli hücrelerin meydana geldiği belirlenmiştir [1], [2], [3], [4]. Yapılan bu tez çalışmasının ilk kısmında, *Ccdc124* proteininin hücre içi potansiyel protein etkileşim partnerlerini bulmaya yönelik yapısal biyoinformatik çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Belirlenen adayların etkileşimleri immünboyama ve birlikte çöktürme deneyleri ile teyit edilmiştir. Çalışmanın ikinci kısmında, *Ccdc124* proteininin translasyon sonrası modifikasyon bölgelerinden Y38, S122 ve S141 aminoasitleri, N veya C-terminalinde farklı etiketlere sahip *Ccdc124* vektörleri kalıp olarak kullanılarak yönlendirilmiş mutagenез tekniği ile mutasyona uğratılmıştır. Ardından ilgili vektörlerle transfekte edilen hücrelerde protein stabilite ve degradasyon durumları açısından immünoblot, hücre içi lokalizasyon değişimi açısından ise immünboyama teknikleri ile analiz edilmiştir. Yapılan immünoblot çalışmalarında farklı protein degradasyon profilleri gözlemlenmiştir. İmmünboyama çalışmalarında ise tüm mutantlarda sentrozom lokalizasyonu bozulmakla birlikte ortacisimcik lokalizasyonu etkilenmemiştir. Ek olarak bazı mutantlarda daha önce görülmeyen hücre içi ve dışı nükleik asit-*Ccdc124* örtüşmeleri gözlemlenmiştir. Çalışmanın son kısmında ise, *Ccdc124*'ün translasyon sonrası uğradığı fosforilasyon durumlarının belirlenmesi amaçlanmıştır. In vitro kinaz deneyi ile Kazein Kinaz 2 (CK2) tarafından fosforillendiği önceki deneysel çalışmalarla gösterilmiş olan *Ccdc124*'ün [1], CK2 fosforilasyonu teyit edilerek, gerek literatürdeki veriler, gerekse gerçekleştirdiğimiz biyoinformatik araştırmalar çerçevesinde potansiyel kinazlarından biri olarak tahmin edilen PLK1 ile etkileştiği ve fosforilasyona uğradığına yönelik veriler elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Coiled-coil domain containing 124 (*Ccdc124*), Orta-Cisimcik, Sentrozom, Yönlendirilmiş Mutagenез, In-vitro Kinaz, İmmünboyama.

SUMMARY

The Coiled-coil domain containing-124 (Ccdc124) protein, which is conserved in all eukaryotes, from fungi to human, is a newly identified functional protein in mammalian cells. It localizes in centrosomes in the interphase of cell cycle; then from post-anaphase stage, it translocates to midbody until cytokinetic division completion. Previous studies have shown that the silencing or over-expression of the gene coding for the *Ccdc124* protein results in non-divided and multinuclear cells [1], [2], [3], [4]. In the first part of this thesis, structural bioinformatics studies were carried out to find intracellular potential protein interaction partners of the Ccdc124 protein. Interactions of the identified candidates have been confirmed by immunostaining and co-Immunoprecipitation experiments. In the second part of the study, amino acids Y38, S122 and S141 from the post-translational modification regions of the Ccdc124 protein were mutated by site-directed mutagenesis technique by using Ccdc124 vectors with different labels at the N- or C-terminus as a template. Subsequently, immunoblot experiments were performed in terms of protein stability and degradation status; and immunostaining in terms of intracellular localization change in cells transfected with the mutant vectors. Different protein degradation profiles were observed from immunoblot studies. All mutants have not affected the midbody localization as well as disrupted the centrosome localization of Ccdc124. In addition, in some mutants, intracellular and extracellular nucleic acid-Ccdc124 overlaps that have not been seen previously have been observed. In the last part of the study, it was aimed to determine the phosphorylation status of Ccdc124 after translation. Casein Kinase 2 (CK2) phosphorylation on Ccdc124, which has been demonstrated in previous experimental studies [1], confirmed; and data obtained about both interaction and phosphorylation of Ccdc124 by PLK1 which is the potential candidate kinase according to both data from literature and performed bioinformatics studies.

Key Words: Coiled-coil domain-containing 124 (Ccdc124), Midbody, Centrosome, Site-Directed Mutagenesis, In-vitro Kinase, Immunostaining.

TEŞEKKÜR

Başta, lisans eğitimimde, yüksek lisans eğitimimde ve akademik hayatımda desteğini ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyip bilgisi ile bu çalışmanın oluşmasının yolunu açan değerli danışmanım Prof. Dr. Uygur Halis TAZEBAY'a teşekkür ederim.

Bütün çalışmam boyunca yanımda olmasından sonsuz mutluluk duyduğum, her an bilgisinden ve tecrübelerinden faydalandığım, dostluğunu, dert ortaklığını hiçbirşeye değişmeyeceğim çok değerli arkadaşım Merve TUZLAÇOĞLU ÖZTÜRK'e teşekkür ederim.

Yokluğunda kesinlikle eksikliğini hissettiğim, çok değerli dostluğuna ve arkadaşlığına her an ihtiyaç duyduğum, fikişsel katkısını kelimelerle ifade edemeyeceğim beyin fırtınalarının vazgeçilmez insanı Emrah ÖZÇELİK'e teşekkür ederim.

Bilgi ve tecrübeleriyle yanımda olan, her an yardım etmek için can atan ve katkılarını asla esirgemeyen çok değerli arkadaşlarım, Sinem GÜL, Özge ARSLAN, Eda Gazel PEHLİVAN, Z. Onur ÇALIŞKANER, Türkan ÇAKAR, Abdullah Abdul WAHEED, Çiğdem ÜLKÜSEVEN, Gamze ÇAKIRCA, Gökmen ŞİMŞEK, İlkey SEVGİN ve Gizem DURU'ya teşekkür ederim.

Değerli arkadaşlarım Kaan ÖMEROĞLU, Mustafa Safa KARAGÖZ, Merve ÜSTÜN, Gözde ÖZÇELİK, M. Soner TÜRKÜNER ve aynı binayı paylaştığımız tüm MBG bölümü öğretim üyeleri, öğretim elemanları, öğrencileri ve çalışanlarına teşekkür ederim.

Ve hayatım boyunca yanımda olan, varlıklarıyla mutluluğuma mutluluk katan ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen en güvenilir limanım sevgili aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması TÜBİTAK-KBAG 1001 projesi (Proje No: 114Z349) tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
TABLolar DİZİNİ	xvi
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği	2
2. HÜCRE DÖNGÜSÜ	4
2.1. Hücre Döngüsü Regülatörü CK2	5
2.2. Sentrozom ve Hücre Döngüsü	6
2.3. Orta-Cisimciğin (Midbody) Düzenlenmesi	8
2.4. Sentrozom ve Orta-Cisimcik Regülatörü PLK1	10
2.5. Sitokinez Regülatörü PRC1	13
2.6. Endozomal Yolak ve Sitokinezin Regülasyonu	13
2.7. Translasyon ve Translasyon Sonrası Düzenlemeler	17
2.8. Coiled-Coil Domain-Containing 124 (CCDC124) Proteini	18
3. MATERYAL VE METOT	20
3.1. Materyal	20
3.1.1. Agaroz Jel Solüsyonları	20
3.1.2. Mikrobiyoloji Suşları	20
3.1.3. Mikrobiyoloji Solüsyonları	20
3.1.4. Oligonükleotidler	21
3.1.5. Vektörler	21
3.1.6. Hücre Hattı Seçimi	22
3.1.6.1. HEK293T Hücreleri	22
3.1.6.2. HeLa Hücreleri	23
3.1.6.3. hTERT-RPE-1 Hücreleri	23

3.1.7. Hücre Kültürü Solüsyonları	24
3.1.8. İmmünblot Solüsyonları	24
3.1.9. Birlikte çöktürme (CO-IP) Solüsyonları	27
3.1.10. İmmünboyama Solüsyonları	27
3.1.11. Hücre Senkronizasyonu Bileşenleri	27
3.1.12. Ligasyon Deney Bileşenleri	27
3.1.13. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Bileşenleri	28
3.1.14. Kimyasal Malzemeler	28
3.1.15. Hücre Transfeksiyonu	30
3.1.16. Kullanılan Cihazlar	30
3.1.17. Kullanılan Antikorlar	31
3.2. Metot	33
3.2.1. Biyoinformatik Analizler	33
3.2.2. Hücre Kültürü	34
3.2.3. Transfeksiyon	34
3.2.4. Transformasyon	35
3.2.5. Restriksiyon Endonükleaz Deneyi	35
3.2.6. DNA Çöktürme Deneyi	35
3.2.7. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	35
3.2.8. Yönlendirilmiş Mutageniz	36
3.2.9. Ultra Kompetent Hücre Hazırlanışı	36
3.2.10. Agaroz Jelden DNA Geri-Kazanım Deneyi	36
3.2.11. İmmünboyama Deneyi	36
3.2.12. Hücre Senkronizasyonu	37
3.2.13. Bakteri Hücrelerinin Saklanması	37
3.2.14. Plazmid DNA İzolasyonu	38
3.2.15. Nükleik Asit Konsantrasyon Tayini	38
3.2.16. Protein Konsantrasyon Tayini	38
3.2.17. Vektörlerin Yapımı	38
3.2.18. DNA'nın Agaroz Jel Elektroforezi	38
3.2.19. Stok Hücrelerin Kriyoprezervasyonu	39
3.2.20. Dondurulmuş Stok Hücrelerin Açılması	39
3.2.21. İmmünoblot	39

3.2.22. Birlikte Çöktürme (co-IP)	40
4. SONUÇLAR	41
4.1. Biyoinformatik Analiz Sonuçları	41
4.1.1. CCDC124-Rab11-FIP3 Etkileşimi	42
4.1.2. CCDC124-YB-1 Etkileşimi	45
4.1.3. CCDC124-PRC-1 Etkileşimi	49
4.2. Yönlendirilmiş Mutagenез Sonuçları	51
4.2.1. S122A, S141A ve S122A&S141A-HA Mutantları	51
4.2.2. S122A, S141A ve S122A&S141A-GFP Mutantları	56
4.2.3. Y38A, Y38E ve Y38F-HA Mutantları	59
4.2.4. CCDC124-mCherry Hazırlanışı ve Mutantlar	62
4.2.4.1. CCDC124-mCherry-PLK1 ^{as} Canlı Hücre Görüntüleme	68
4.3. CCDC124-PLK1 Etkileşimi	70
4.4. CK2 ve PLK1 In-Vitro Fosforilasyonu	70
5. YORUMLAR	72
KAYNAKLAR	76
ÖZGEÇMİŞ	82
EKLER	83

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler ve</u> <u>Kisaltmalar</u>	<u>Açıklamalar</u>
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
°C	: Derece Celcius
G	: Gram
kDa	: Kilodalton
L	: Litre
MJ	: MegaJul
Mm	: Milimolar
Rpm	: Rotorun dakikadaki dönme hızı
APC	: Anafaz destekleyici kompleks
APEX1	: APEX nuclease - multifunctional DNA repair enzyme - 1
APS	: Amonyum persülfat
ASPM	: Abnormal Spindle-like, Microcephaly-associated Protein
AURKA	: Aurora Kinase A
AURKB	: Aurora Kinase B
AURKC	: Aurora Kinase C
BRUCE	: Baculoviral IAP repeat-containing protein 6
CAND1	: Cullin-associated and neddylation-dissociated 1
CCDC124	: Coiled-coil domain-containing 124
CDC42	: Cell division control protein 42
CDK1	: Siklin bağımlı kinaz 1
CEP55	: Centrosomal protein of 55 kDa
CHMP4B	: Charged multivesicular body protein 4b
CK II	: Kazein kinaz II
CLIC4	: Chloride intracellular channel protein 4
CRMP-1	: Collapsin response mediator protein 1
DCTN1	: Dynactin 1
EMC2	: ER membrane protein complex subunit 2

FBS	:	Fetal sığır serumu
GFP	:	Yeşil floresan protein
GNB2L1	:	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1
GNL1	:	Guanine nucleotide binding protein like-1
GTÜ	:	Gebze Teknik Üniversitesi
HEK 293T	:	İnsan embriyonik böbrek hücre hattı 293T
HSPA5	:	78 kDa glucose-regulated protein
ICB	:	Hücreler arası köprü
IF	:	İmmü floresan
M	:	Mitoz
MBG	:	Moleküler Biyoloji ve Genetik
MDPI	:	Multidisciplinary Digital Publishing Institute
MKLP1	:	Mitotic Kinesin Like Protein 1
MMGT1	:	Membrane magnesium transporter 1
MPLKIP	:	M-phase-specific PLK1-interacting protein
NIS	:	Sodyum iyodid simporter
NRTK1	:	Neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 1
PBS	:	Tuzlu fosfat tamponu
PIN1	:	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1
Plk1	:	Polo-benzeri-kinaz 1
PPP1CC	:	Protein Phosphatase 1 Catalytic Subunit Gamma
PRC1	:	Sitokinez düzenleyici protein 1
Rab11-FIP3	:	Rab11 ailesi etkileşim partneri 3
RACGAP1	:	Rac GTPase-activating protein 1
RAP2A	:	Ras Oncogene Family Member Rap2A
RasGEF1B	:	Ras guanin nükleotit değiştirici faktör 1B
RHOA	:	Transforming Protein RhoA
ROCK1	:	Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 1
TEMED	:	Tetrametiletilediamin
WB	:	İmmünoblot
XPO1	:	Exportin 1
YB-1	:	Y-box bağlayıcı protein 1

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: Hücre döngüsü şeması.	4
2.2: Hücre bölünmesi aşamaları.	5
2.3: Orta-cisimciğin ince kesitli EM görüntüsü.	9
2.4: PLK1'in bölgeleri ve spesifik aminoasitleri.	11
2.5: PLK1 PB bölgesi ile substratlarındaki fosforillenmiş özgün motiflerine bağlanır.	12
2.6: Endozomların ve ESCRT kompleksinin sitokinetik bölünmedeki rolleri.	16
4.1: CCDC124 (Mor) – Rab11-FIP3 (Sarı) yapısal etkileşim modeli.	43
4.2: GLU143 (CCDC124) – THR702 (Rab11-FIP3) aminoasit etkileşim modeli.	43
4.3: LYS56 (CCDC124) – MET721 (Rab11-FIP3) ve GLN51 (CCDC124) – ILE724 (Rab11-FIP3) aminoasit etkileşim modelleri.	44
4.4: ARG192 (CCDC124) – GLU706 (Rab11-FIP3) aminoasit etkileşim modeli.	44
4.5: CCDC124 – Rab11-FIP3 etkileşimi immünboyama görüntüsü.	45
4.6: CCDC124 – Rab11-FIP3 etkileşimi birlikte çöktürme görüntüsü.	45
4.7: CCDC124 (Mor) – YB-1 (Kırmızı) yapısal etkileşim modeli.	46
4.8: LEU34 (CCDC124) – ARG19 (YB-1) aminoasit etkileşim modeli.	47
4.9: GLU35 (CCDC124) – ARG47 (YB-1) aminoasit etkileşim modeli.	47
4.10: ASN44 (CCDC124) – LYS119 (YB-1) aminoasit etkileşim modeli.	48
4.11: VAL53 (CCDC124) – LYS44 (YB-1) aminoasit etkileşim modeli.	48
4.12: CCDC124 – YB-1 etkileşimi immünboyama görüntüsü.	49
4.13: CCDC124 (Mor) – PRC1 (Yeşil) yapısal etkileşim modeli.	49
4.14: TYR38 (CCDC124) – GLU108 (PRC1) aminoasit etkileşim modeli.	50
4.15: LYS29 (CCDC124) – SER146 (PRC1) ve ASP115 (CCDC124) – GLU75 (PRC1) aminoasit etkileşim modelleri.	50
4.16: CCDC124 – PRC1 etkileşimi immünboyama görüntüsü.	51
4.17: S122A-HA plazmidinde yönlendirilmiş mutagenез ile S122A & S141A mutasyonlarının yapımı.	52

4.18:	S122A&S141A-HA mutasyon bölgesi kromatogramı.	52
4.19:	S122A-HA, S141A-HA ve S122A&S141A-HA mutantlarının immüno blot görüntüsü.	53
4.20:	S122A-HA, S141A-HA ve S122A&S141A-HA mutantlarının immün boyama görüntüsü (Alfa-Tübülün).	54
4.21:	S122A-HA, S141A-HA ve S122A&S141A-HA mutantlarının immün boyama görüntüsü (Gamma-Tübülün).	55
4.22:	CCDC124-GFP plazmidinde yönlendirilmiş mutagenез ile S122A, S141A ve S122A&S141A mutasyonlarının yapımı.	56
4.23:	S122A-GFP, S141A-GFP ve S122A&S141A-GFP mutasyon bölgesi kromatogramları.	57
4.24:	S122A-GFP, S141A-GFP ve S122A&S141A-GFP mutantlarının immüno blot görüntüsü.	58
4.25:	S122A-GFP, S141A-GFP ve S122A&S141A-GFP mutantlarının immün boyama görüntüsü.	59
4.26:	CCDC124-HA plazmidinde yönlendirilmiş mutagenез ile Y38A-E-F mutasyonlarının yapımı.	60
4.27:	Y38A-HA, Y38E-HA ve Y38F-HA mutasyon bölgesi kromatogramları.	60
4.28:	Y38A-HA, Y38E-HA ve Y38F-HA mutantlarının immüno blot görüntüsü.	61
4.29:	Y38A-HA, Y38E-HA ve Y38F-HA mutantlarının immün boyama görüntüsü (Alfa-Tübülün).	61
4.30:	Y38A-HA, Y38E-HA ve Y38F-HA mutantlarının immün boyama görüntüsü (Gamma-Tübülün).	62
4.31:	CCDC124-mCherry plazmid hazırlanışı.	63
4.32:	CCDC124-mCherry plazmidinde yönlendirilmiş mutagenез ile S122A, S141A ve S122A&S141A mutasyonlarının yapımı.	64
4.33:	S122A-mCherry, S141A-mCherry ve S122A&S141A-mCherry mutasyon bölgesi kromatogramları.	65
4.34:	S122A-mCherry, S141A-mCherry ve S122A&S141A-mCherry mutantlarının immüno blot görüntüsü.	66
4.35:	Kimyasal genetik ile PLK1'in analog-duyarlı kontrolü.	67

4.36:	CCDC124-mCherry ve PLK1 ^{as} immünboyama görüntüsü.	68
4.37:	CCDC124-mCherry-PLK1 ^{as} Canlı Hücre Görüntüleme.	69
4.38:	CCDC124 – PLK1 etkileşimi birlikte ���t�rme görüntüsü.	70
4.39:	CK2 ve PLK1’in CCDC124’� in-vitro fosforilasyonu.	71



TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa</u>	
3.1:	Kullanılan primerler ve dizileri.	21
3.2:	Kullanılan vektörler.	22
3.3:	Yürütme jeli için gerekli malzemeler ve miktarlar.	25
3.4:	Ayırma jeli için gerekli malzemeler ve miktarlar.	25
3.5:	Ligasyon deney malzemeleri ve miktarları.	28
3.6:	PCR deney malzemeleri ve miktarları.	28
3.7:	Kullanılan kimyasal malzemeler.	29
3.8:	HeLa ve hTERT-RPE1 transfeksiyon malzemeleri ve miktarları.	30
3.9:	HEK293T transfeksiyon malzemeleri ve miktarları.	30
3.10:	Kullanılan cihazlar.	31
3.11:	Kullanılan antikörler.	32
3.12:	Uygulanan PCR Şartları.	35
4.1:	İkincil eleme etkileşim aday listesi.	42
A1.1:	İlk eleme etkileşim aday listesi.	83
A1.2:	CCDC124'ün potansiyel PTM bölgeleri.	84
B1.1:	CCDC124-Rab11FIP3 enerji analiz verileri.	85
B1.2:	CCDC124-YB-1 enerji analiz verileri.	85
B1.3:	CCDC124-PRC1 enerji analiz verileri.	86
C1.1:	Telif hakkı bulunan materyaller için alınan izinler.	86

1. GİRİŞ

Hücre bölünmesi, telomer bağımlı replikatif yaşlanma ve kanser gibi pek çok güncel olguyla doğrudan bağlantılı olduğundan üzerinde en çok çalışılan konulardan biri haline gelmiştir. İnsanların ömürlerinin uzunluğunu ve kalitesini arttırmak, özellikle kontrolsüz hücre bölünmesiyle karakterize olan kanser gibi hastalıklara nokta atışı çözüm önerileri üretebilmek amacıyla yapılan araştırmalar, hücre bölünmesinin moleküler mekanizmasını aydınlatmak üzerine yoğunlaşmıştır. Hücre bölünmesi, büyüme, gelişme, gen aktarımı ve doku yenilenmesi gibi kritik öneme sahip süreçlerden sorumludur. Kromozom sayısının sabit tutularak atasal bir hücreden birbirine eş iki yavru hücrenin meydana getirildiği bir süreç olan mitoz bölünme; bölünmeye hazırlık evresi olan interfaz evresini (G1,S,G2), ardından sırasıyla profaz, metafaz, anafaz ve telofaz evrelerinden oluşan çekirdek bölünmesi (karyokinez) sürecini ve devamında da sitokinez olarak isimlendirilen sitoplazma bölünmesini içeren bir süreçtir. Bölünme sürecinde en büyük rol, orta-cisimcik olarak adlandırılan aktomiyozin kasılma halkasının anti-paralel mikrotübülleri sıkıştırmasıyla ortaya çıkan, bölünme için gerekli olan proteinlerin bulunduğu, dinamik, geçici ve elektro-yoğun bir organeldir [6].

Mantardan insana kadar tüm ökaryotlarda korunmuş olan Coiled-coil domain containing-124 (Ccdc124) proteini, pek çok sentrozom proteininde olduğu gibi sarılı sarmal bölge motifine sahiptir. İnterfazda sentrozomda konumlanan, telofazda ise orta cisimciğe göçen proteinler arasında yer alan Ccdc124 proteininin hücrede ifadesinin düşürülmesi veya artırılması durumlarında sitoplazma bölünmesinin gerçekleşmeyerek çok çekirdekli hücre oluşumuna neden olduğu gösterilmiştir. [1], [2], [3], [4]. Özellikle sitokinezde görev alan proteinlerden biri olan Ras guanin nükleotit değiştirici faktör 1B (RasGEF1B)'nin ise orta cisimcikte gerçekleşen Rap konumlanması sinyal yolağında Rap2'nin aktivasyonunda rol oynadığı ortaya konmuştur [5], [2].

Gerçekleştirdiğimiz bu tez çalışmasının ilk kısmında CCDC124 proteininin hücre içi potansiyel protein etkileşim partnerlerini bulmaya yönelik yapısal biyoinformatik çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Belirlenen adayların etkileşimleri immünboyama ve/veya birlikte çöktürme deneyleri ile teyit edilmiştir.

Çalışmamızın ikinci kısmında, CCDC124 proteininin bilinen ve potansiyel translasyon sonrası modifikasyon bölgeleri yönlendirilmiş mutagenез tekniği ile

mutasyona uğratılmış ve DNA dizi analizi ile teyit edilmiştir. Ardından ilgili vektörlerin HEK293T, HeLa ve hTERT-RPE-1 hücre hatlarına transfeksiyonları yapılmıştır. Transfekte edilen hücreler protein stabilitesi açısından immünblot, hücre içi lokalizasyon açısından ise immünboyama teknikleri ile analiz edilmiştir. Yapılan immünblot çalışmalarında mutant vektörlerin oluşturduğu protein stabilite / degradasyon profillerinin gözlemlenmesi amaçlanmıştır. İmmünboyama çalışmalarında ise CCDC124 proteininin hücre içi lokalizasyon değişimleri; özellikle sentrozom ve orta-cisimcik lokalizasyon durumlarının gözlemlenmesi amaçlanmıştır. İmmünboyama çalışmalarında orta-cisimcik lokalizasyonunun gözlemlenebilmesi için hücreler sitokinez evresinde senkronize edilmiştir.

Çalışmamızın son kısmı ise, CCDC124'ün translasyon sonrası fosforilasyonu üzerinedir. Kazein Kinaz 2 (CK2) ile fosforillendiği daha önce gösterilmiş olan CCDC124'ün [1], biyoinformatik veritabanlarında potansiyel kinazlarından biri olarak tahmin edilen PLK1 ile fosforilasyon durumu merak edilmiş ve in vitro kinaz tekniği ile bir PLK1 substratı olup olmadığı sorgulanmıştır.

1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

İnsan HeLa hücre hattında CCDC124 proteininin, hücre döngüsünün farklı evrelerinde nerelerde konumlandığı araştırılmış ve bazı aminoasitlerinin translasyon sonrası modifikasyona uğradığı belirlenmiştir [1], [2]. Tez çalışmamızda CCDC124 proteininin işlevlerinin ve kararlılığının literatüre ek olarak hangi translasyon sonrası mekanizmalarla düzenlendiği ve konumunun özellikle bilinen lokalizasyonlarının (sentrozom ve orta-cisimcik) nasıl değiştiğinin araştırılması ve literatüre ek olarak hücre içerisindeki yeni etkileşim partnerlerinin biyoinformatik analizlerle tespit edilerek deneysel olarak doğrulanması amaçlanmaktadır.

Daha önce yapılan çalışmalarla hücre bölünmesi ile ilişkili olduğu ve hücre bölünmesinin çeşitli evrelerinde nerelerde konumlandığı ortaya çıkarılan CCDC124 proteininin bilinen işlevlerinin ne tür translasyon sonrası modifikasyonlarla düzenlendiği, hücre-altı konumunun hangi translasyon sonrası modifikasyonlara bağlı olduğu ve yeni etkileşim partnerlerinin neler olabileceğini aydınlatmayı amaçladığımız tezimiz, kontrolsüz hücre bölünmesiyle karakterize olan kanser gibi insan sağlığını tehdit eden oluşumlara karşı bir hedef geliştirilmesinde fayda sağlayacak veriler elde edilmesini sağlayıp, aynı zamanda hücre bölünmesiyle

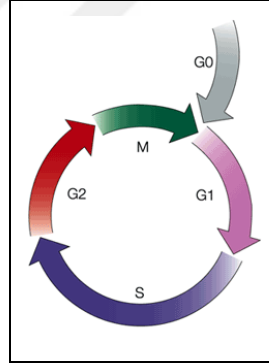
bağlantılı anomalileri temel alan hastalıklar için potansiyel tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine ışık tutacaktır.



2. HÜCRE DÖNGÜSÜ

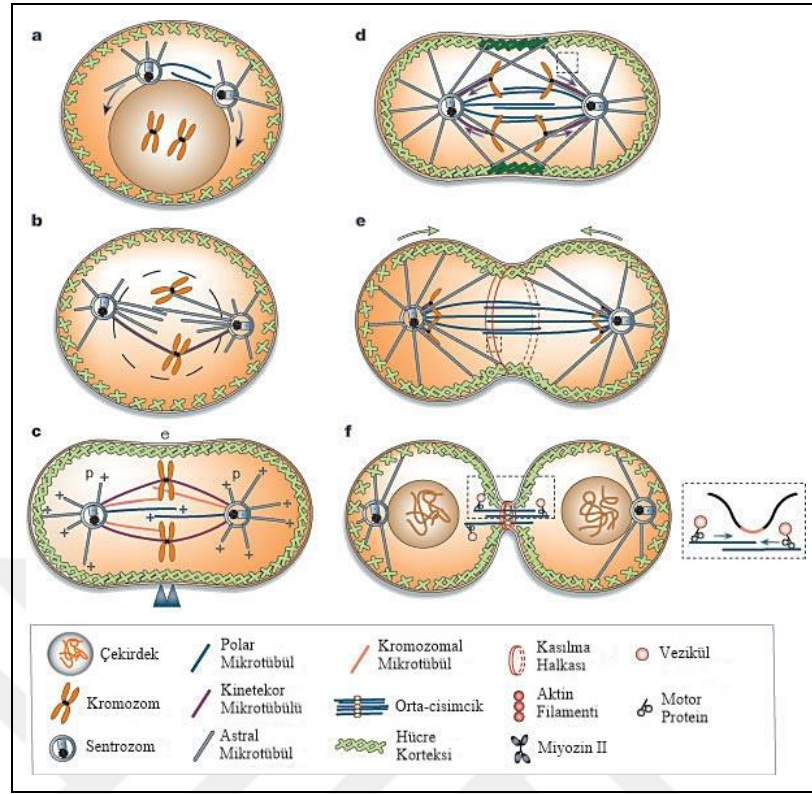
Hücre döngüsü, döngü sürecinde gerçekleşen olayların kronolojik sıralamasına göre Gap1(G1), Sentez(S), Gap2(G2) ve Mitoz(M) olmak üzere 4'e ayrılmaktadır (Şekil 2.1). Mitoz dışındaki diğer 3 faz İnterfaz evresi olarak nitelendirilir. Yaklaşık olarak bir epitel hücresi bir günlük bölünme sürecinin yaklaşık 22 saatini interfazda geçirir. Genetik materyalin iki katına çıkması ve ayrılma olayları sırasıyla S ve M fazlarında gerçekleşir. S fazında hem DNA hem de sentrozomlar iki katına çıkar. İki katına çıkan sentrozomlar, M fazında gerçekleşecek olan kardeş kromatitlerin ayrılmasından sorumlu mitotik ipliklerin kutuplarını oluşturmak için ayrılırlar [6].

G1 ve G2 fazları, S ve M fazlarını gözle görülür biçimde ayırdığı için Gap olarak nitelendirilmişlerdir. G1 evresinde iğ ipliği proteinleri, ATP ve diğer bazı proteinlerin sentezine ek olarak hücrenin büyüklüğü ve önceki bölünmeden kaynaklı DNA hasarı da kontrol edilir. Eğer bir hasar varsa bu durumun düzeltilmesi adına hücre döngüsü durdurulur ve hasar giderildikten sonra tekrar döngünün devamı sağlanır. G2 evresi ise bölünme öncesi son hazırlık evresidir. Organellerin sayısı artırılıp hücre bölünmesi için gerekli olan enzimler ve diğer moleküllerin sentezlenir [7].



Şekil 2.1: Hücre döngüsü şeması.

M (mitoz) evresinde çekirdek bölünmesi (karyokinez) ve sitoplazma bölünmesi (sitokinez) gerçekleşir. Sırasıyla profaz, prometafaz, metafaz, anafaz, post-anafaz ve telofaz safhalarının gerçekleştiği karyokinezi takiben, sitokinezle yavru hücrelerin sitoplazmaları ayrılır ve bölünme tamamlanmış olur (Şekil 2.2) (**a.** Profaz, **b.** Prometafaz, **c.** Metafaz, **d.** Anafaz, **e.** Post-Anafaz, **f.** Telofaz/Sitokinez). Başarılı bir hücre bölünmesi, genetik materyalin tamamının iki katına çıkarılması ve eşit olarak iki hücreye dağıtılmasını gerektirir; sonuç olarak iki tane birbirinin aynısı kardeş hücre oluşur [7].



Şekil 2.2: Hücre Bölünmesi Aşamaları.

2.1. Hücre Döngüsü Regülatörü CK2

CK2, kazein gibi asidik proteinleri fosforilleyen bir serin/threonin protein kinazdır. Başta hücre döngüsünün kontrolü olmak üzere birçok hücresel süreçte rol oynamaktadır. CK2 hücrede tetramer yapıda bulunmakta ve bünyesinde 2 alfa-2 beta alt ünitesi barındırmaktadır. Alfa alt üniteler katalitik aktiviteye sahipken, beta alt ünitesi otoposforilasyondan sorumludur [8].

CK2, hücre döngüsünün her sürecinde aktif rol oynamakta ve bazı proteinlerin fosforilasyonunu katalize etmektedir. Mayada yapılan genetik çalışmalar CK2'nin özellikle G1/S ve G2/M geçişinde rol oynadığını ortaya koymuştur. Memeli hücrelerinde yapılan çalışmalarda ise CK2 alt ünitelerine karşı antisense oligonükleotidler, CK2 antikör mikroyeksiyonu ve CK2 inhibitörü eklenen durumlarda hücre döngüsü durmaktadır. Hücre döngüsü ağırlıklı olarak Siklin-bağımlı kinaz (CDK) ailesi üyeleri tarafından düzenlenmektedir. Hücre döngüsünün en erken evrelerinde dahi düzenlenmelerinde rol oynayan CK2, CDK-aktive edici kinaz (CAK)'ın bağlandığı Siklin H ile kompleks kurarak S315'inci aminoasidinden

fosforile etmektedir. Bu fosforilasyon, CDK-CAK etkileşimini direk etkilememesine rağmen tam CAK aktivitesi için gereklidir [8], [10]. G2/M geçişinde mitotik iğ ipliği ve sentrozomda lokalize olan CK2, mitozda rol oynayan β -Tubulin, Cdc25B, Tau, Condensin, PP2A ve MAP gibi proteinlerle etkileşim veya substrat temelli etkileşim göstermektedir. PLK1 ve CDK1 tarafından sıralı fosforilasyona uğrayan Wee1 proteini, CK2 tarafından fosforillendiği takdirde degrade edilmekte ve mitozun başlamasını sağlamaktadır. Ayrıca CK2'nin aktivitesinin zayıflatılması veya alt birimlerinin ifadesinin düşürülmesi SAC'ı ortadan kaldılmaktadır [10].

Mitozda CK2'nin sinyalizasyonu Wee1A tarafından CDK1'in aktivasyonu ile başlamaktadır. CDK1 aktive olduğunda CK2'nin her iki alt ünitesini de fosforillemektedir. Fosforilasyon sonrası alfa alt ünitesi, PLK1 ve PIN1 proteinleri için bağlanma bölgesini düzenlemektedir. CK2, CDK1 ve PLK1, Wee1A'nın übikütinasyonu ve 26S Proteozom tarafından degradasyonu ile sonuçlanan sürecin hiyerarşik fosforilasyonundan sorumludurlar [9].

Yakın zamanda yapılan proteomik çalışmalarda CK2-alfa'nın PLK1 PBD etkileşim partneri olduğu ortaya çıkarılmıştır. PLK1 PBD bölgesinin korunmuş etkileşim motifini barındırması da bu etkileşimi doğrular niteliktedir. Proteomik çalışmalar ek olarak CK2'nin sentrozom, iğ iplikleri ve orta-cisimcik lokalizasyonunu doğrulamaktadır [8].

2.2. Sentrozom ve Hücre Döngüsü

Hücre döngüsü sürecinin bir düzenleyicisi olan sentrozom, hayvan hücrelerinin mikrotübül organize edici merkezidir (MTOC). Mantar ve bitkiler sentrozomdan yoksun olduklarından farklı MTOC yapılarını kullanarak mikrotübüllerini (hücre sitoskeletoninin önemli bir parçası) düzenlerler. Sentrozomlar, etrafı amorf yapıda protein kütlesiyle (perisentriyolar materyal – PCM) çevrili birbirine dik şekilde konumlanmış iki sentriyolden meydana gelmektedir. PCM mikrotübüllerin bir araya gelmesi ve bağlanmasını sağlayan proteinler içermektedir. Her bir sentriyol dokuz tane üçlü mikrotübülün bir araya gelmesiyle oluşturduğu halkasal formattadır [11].

Sentrozom hücre döngüsünün profaz fazında çekirdek membranına bağlı durumdadır. Mitozda çekirdek membranı dağılır ve sentrozomlar, kromozomlara tutunacak mitotik iplikleri oluşturmak için mikrotübül çekirdeklenmesi başlar.

Sentriyollerden eski olanına anne sentriyol denir; siliya ve kamçı oluşumunda merkezi bir role sahiptir [12].

Sentrozom hücre döngüsünün S fazında iki katına çıkar. Mitozun profaz aşamasında sentrozomlar zıt kutuplara göç ederler. Daha sonra mitotik iplik zıt kutuplardaki iki sentrozom arasında oluşur. Bölünmeyle birlikte her yavru hücre bir sentrozoma sahip olur. Bu sürecin dışındaki sonuçlar (bir hücreye iki sentrozom aktarılması veya hiç aktarılmaması) kanserle ilişkilendirilir [13]. İlginçtir ki sentriyoller mitoz süreci için gerekli değildir. Sentriyoller lazer ışıyla yok edildiğinde mitozun morfolojik olarak normal ipliklerle normal bir şekilde gerçekleştiği gözlemlenmiştir. Dahası, sentriyollerin iki katına çıkarılmasından sorumlu gende gerçekleştirilen mutasyon meyve sineği *Drosophila*‘nın gelişimini neredeyse hiç etkilememiştir. Sentriyollerin yokluğunda motor proteinler iç ipliklerini oluşturan mikrotübüllere odaklanarak çift kutuplu iç ipliği oluşumunu sağlar. Birçok hücre sentriyollerini olmadan tamamıyla interfaza geçebilirler. Sentriyollerin aksine sentrozomlar canlının yaşamını sürdürebilmesi için gereklidir [14]. Asentrozomal hücreler (sentrozomsuz hücre) astral mikrotübüllerin radyal dizilerinden yoksundurlar. Ayrıca hem iç ipliklerinin doğru konumlandırılmasını sağlayamazlar hem de sitokinezde merkezi lokalizasyonu sağlayamazlar. Bazı asentrozomal hücre tipleri hücre döngüsünü takiben tutuklanır. Fakat bu durum evrensel değildir. Hücre bölünmesinin doğru bir şekilde gerçekleşmesini sağladığı varsayılan sentrozom hücre bölünmesinin etkinliğini büyük ölçüde artırmaktadır [15].

Sentrozom, yukarıda da bahsedildiği gibi sentriyollerin etrafını saran PCM sonrası oluşan membransız dinamik bir organeldir. Mikrotübülleri organize ederek hücre şekli, polarizasyonu, yapışma ve hareketliliği düzenlemektedir. Bunun yanı sıra, organellerin taşınımını ve doğru konumunu elde etmesini kolaylaştırır [16]. Jakobsen ve arkadaşları sentrozomun dinamik yapısını ve kompozisyonunu anlamak için antikör temelli hücre-altı görüntüleme tekniğiyle ilişkili kütle spektrometresi temelli proteomik analizi gerçekleştirdi. Analiz sonucunda 116 bilinen ve 40 yeni sentrozomal protein keşfedilmiştir. Bu 40 proteinin 22si doğrulanarak yeni sentrozom bileşeni olarak literatüre geçmiştir. Ayrıca bu 22 protein içindeki 5 proteinin her iki sentriyolle de ilişkili olduğu belirlenmiştir [17]. İlginçtir ki, bu ve buna benzer analizler sonucunda elde edilen proteinlerin büyük bir çoğunluğu (~ %60) özgün bir helis yapısına sahip sarılı-sarmal yapı (CCD) motifleri ihtiva eden proteinler olduğu belirlenmiştir. Ek olarak, belirlenen proteinler farklı boyama teknikleri ile hem

interfaz evresinde hem de mitotik evrelerde konumları karşılıklı değerlendirilmiş ve CCD ihtiva eden proteinlerin büyük çoğunluğunun hücre döngüsü sürecinde sentrozom, iğ iplikleri ve orta-cisimcikte konumlandığı gün yüzüne çıkarılmıştır. Bu aday proteinlerin ifadeleri RNAi metodu ile azaltıldığında hücre bölünmesi kaynaklı birden fazla hata tespit edilmiştir [18]. Benzer şekilde, Skop ve arkadaşları da orta-cisimciğin oluşması ve sitokinezin gerçekleşmesinde CCD ihtiva eden proteinlerin baskın rolü olduğunu göstermiştir [19].

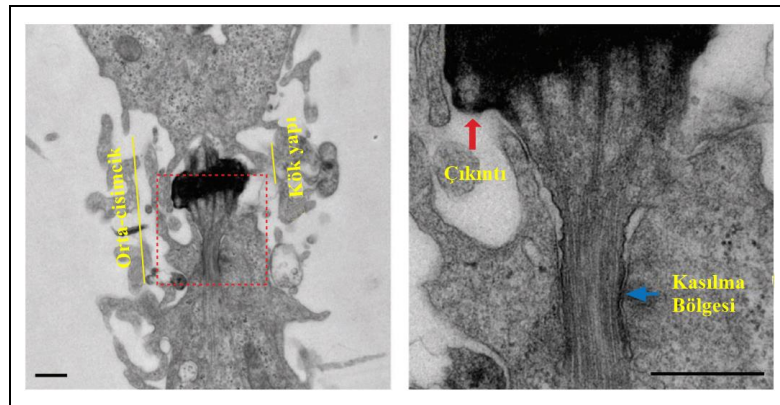
2.3. Orta-Cisimciğin (Midbody) Düzenlenmesi

Bölünen hücrelerin arasında orta alanda oluşan elektro-yoğun geçici bir organel olan orta-cisimcik, ilk olarak 1891 yılında Alman biyolog Walther Flemming tarafından açıklandı. Memeli orta-cisimciği sitokineзде orta bölgedeki iğ iplikleri sıkıca bir araya gelmiş anti paralel mikrotübül halini aldıktan sonra kesim daralmasıyla meydana gelir [20]. Sitokinez sırasında meydana gelen orta-cisimciğin tam olarak bileşimini anlayabilmek için Skop ve arkadaşları Çin Hamsteri Yumurtalık (CHO) hücrelerinden orta-cisimciği izole ederek sıvı kromatografi - kütle spektroskopisi (LC-MS) ilişkili çok boyutlu protein tanımlama yöntemleriyle çalışmışlar ve 160 yeni aday protein bulmuşlardır. Bulunan bu proteinlerin %36' sının daha önce sitokineзде rol oynadığı bilinmektedir [19]. Orta-cisimcik proteinlerinin bir listesi elde edilmesine rağmen hala nasıl organize oldukları ve o bölgeye konumlandığı hakkındaki bilgiler kısıtlıdır.

Orta-cisimcik (midbody), anafaz sırasında ayrılan kardeş kromatidlerin arasında iki kutuplu mikrotübüllerin (merkezi iğ iplikleri) bulunduğu orta-bölgede (midzone) oluşmaktadır. Orta-cisimciğin orta-bölgede oluşması ayrılma oluşunun oluşmasıyla doğrudan ilişkilidir. Ayrılma oluşunun engellenmesi hücrelerde merkezi iğ ipliklerinin düzensiz bir şekilde birikmesiyle sonuçlanır. Ayrılma oluşunun antiparalel merkezi iğ ipliği demetlerini tek büyük bir pakette sıkıştırıp orta-cisimciğin oluşacağı bölgeyi hazırladığı düşünülmektedir. Sıkıştırma esnasında, orta cisimciğin merkezinde bir çıkıntı meydana gelir, buna kök yapı (stem body) denir. Orta-bölgenin merkezinde oluşan elektro-yoğun materyal, bu çıkıntının içinde birikir ve şişkin bir şekil oluşturur. Orta-bölgenin çekirdek yapısı Centralspindlin (MKLP1 ve RacGAP1) ve KIF4 kinezinlerini içerir. Bu yapı antiparalel çapraz bağlayıcı protein olan PRC1 ile etkileşerek, Aurora B ve PLK1 tarafından düzenlenen orta-bölgenin organize

edilmesinde ve stabilizasyonunda rol oynar. Ayrılma için gerekli olan kasılmanın orta-cisimciğin her iki ucunda da konumlanan Aurora B'nin sınırında olduğu gözlemlenmiştir. Orta cisimcikte konumlanan Aurora B'nin kinaz aktivitesi, kök yapıda ayrılma için gerekli kasılmayı negatif etkileyerek ayrılma halkasının orta-cisimciğin dışında gerçekleşmesini sağlar. N-etilmaleimide duyarlı faktör bağlanma protein reseptörü (SNARE'ler), Exocyst ve ESCRT kompleksi (Endozomal Ayırma Kompleksi) ayrılmanın düzenlenmesi için orta-cisimciğe lokalize olmaktadır. Bu noktada ESCRT kompleksi hem mikrotübül-parçalayan proteinlerin aktivitesini sağlayarak hem de orta-cisimciğin kesilmesini sağlayacak enzimleri uyararak ayrılmanın başlamasını sağlar. Bununla birlikte ESCRT kompleksinin ve mikrotübül-parçalayan proteinlerin o bölgeye lokalizasyonunun zamansal ve mekânsal düzenlenmesine dair henüz net bir bilgi bulunmamaktadır [21].

Orta-cisimciğin detaylı yapısını ortaya oyan İnce kesitli Elektron Mikrograf (EM) görüntüsü (Şekil 2.3) (Bar: 500nm), merkezdeki kök yapıda yoğunlaşan elektron-yoğun materyali ve muhtemel ayrılma noktasındaki sıkıştırılmış mikrotübülleri göstermektedir. Kök yapıda gerçekleştirilen seri kesitler, çıkıntı ve mikrotübüller arası boşluğun elektron-yoğun materyalle doldurulduğunu ve veziküllerin kök yapı içinde değil dışarısında biriktiğini ortaya koymuştur. Kök yapısının içerisinde bulunan elektron-yoğun materyalin kompakt bir yapı oluşturarak veziküllerin içeri nüfuz edemediği düşünülmektedir [21].



Şekil 2.3: Orta-cisimciğin ince kesitli EM görüntüsü.

2.4. Sentrozom ve Orta-Cisimcik Regülatörü PLK1

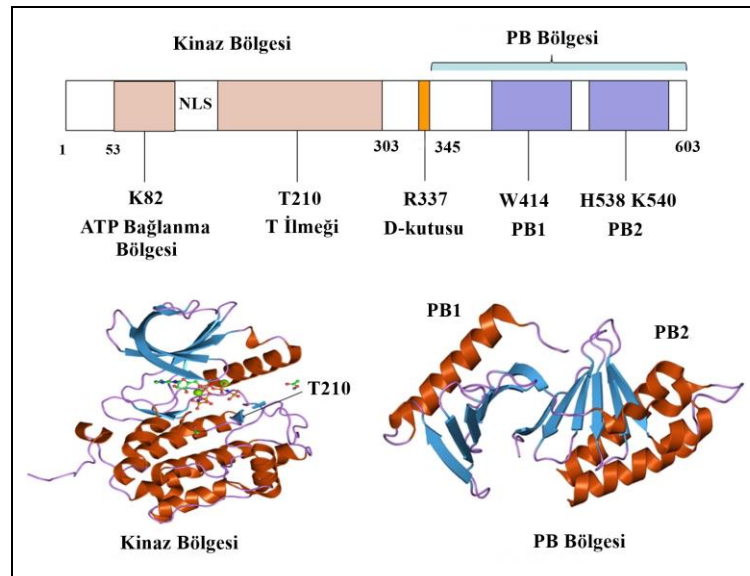
İnsanlarda, hücre döngüsü esnasında farklı fonksiyonlar gerçekleştiren PLK ailesinin bugüne kadar tanımlanmış 5 tane üyesi vardır (PLK1'den 5'e). Hücre bölünmesi sırasında birden fazla olayı düzenleyen PLK ailesi üyeleri, N-ucunda Ser/Thr kinaz katalitik bölgesine (KD) ve C-ucunda substratları tanımak için bir veya daha fazla polo-box bölge (PBD) içerecek şekilde benzer yapıya sahiptirler [22].

PLK1, polo benzeri kinaz ailesinin evrimsel olarak en fazla korunan üyesidir. Mitoza giriş, sentrozomların çiftlenmesi ve ayrılması, kromozom kollarının ayrılması, mikrotübül-kinetokor etkileşimi, İğ ipliği birleşim kontrol noktasının (SAC) susturulması ve sitokinez gibi birçok süreçte rol oynamaktadır. Hücrede inhibe edilmesi veya tamamen ortadan kaldırılması hücre döngüsünde pro-metafazda duraklamaya, ayrılmamış sentrozomlara, monopolar iğ iplikleri oluşumuna, mikrotübül-kinetokor etkileşiminde hasarlara ve kromozomların eşlenmesinde hatalara sebep olmaktadır [23]. Gelişme sırasında embriyonik dokularda ve ağırlı olarak yetişkinlerde proliferatif dokularda eksprese edilir. PLK1 ekspresyonu hücre döngüsüyle doğrudan ilişkilidir; S fazı tamamlandıktan sonra artmaya başlar ve G2-M süresince artış devam eder. Ekspresyon seviyesinin zirve yaptığı nokta mitotik fazdır ve mitozdan çıkışta ekspresyon düşmeye başlar. PLK1'in ekspresyon seviyesi, kinaz bölgesindeki aktivasyon halkasında bulunan Thr210 aminoasitinin fosforilasyon durumu ve G2'de ekspresyon seviyesindeki artış ile doğrudan ilişkilidir. Erken mitozda sentrozomda ve kinetokorlarda lokalize olan PLK1, anafaz başlangıcında Sitokinezin Protein Regülatörü 1 (PRC1) ile etkileşerek orta-bölgeye lokalize olur. PRC1, CDK1 tarafından negatif regülasyonu sağlanan orta-bölgedeki anti-paralel mikrotübüllerle etkileşmektedir. PLK1'in orta-bölgeye lokalize olması için PRC1'in Thr602 aminoasidini fosforiller. PLK1 erken sitokinezde, aktomiyozin halka oluşumunu tetikleyen RhoA'nın aktivasyonunda ve Cep55' i fosforile ederek ESCRT kompleksinin ayrılma bölgesine lokalizasyonunda rol oynamaktadır. PLK1 mitoz sırasında pleiotropik rol oynar ve mitozun başından sonuna kadar gerekli bir proteindir [24].

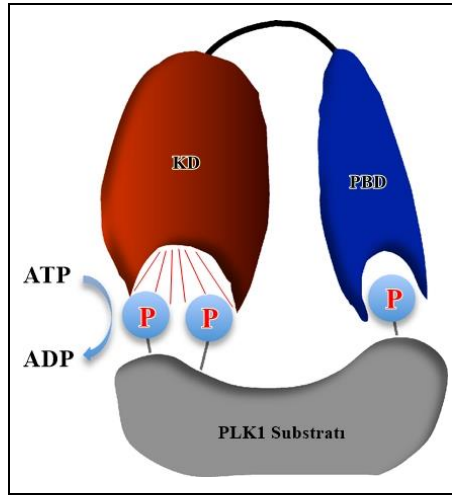
Polo-box bölgesi (PBD), PLK1'in hücre içi farklı yapılara hedeflenmesinde ve lokalize faaliyetlerinin belirlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Ser-(pThr/pSer)-(Pro/X) motifini spesifik olarak tanımaktadır. PBD bölgesi içerisindeki spesifik aminoasitler, fosforile substratlara bağlanmaya aracılık eder ve fosfo-kısaç bir bölge

oluşturur (Şekil 2.4). İlk PBD’de bulunan Trp414 (W414) ve Leu490 (L490) aminoasitleri polar olmayan etkileşimler yoluyla substrat tanıma için kritik iken ikinci PBD motifindeki His538 (H538) ve Lys540 (K540) aminoasitleri substratların Thr/Ser aminoasitlerindeki negatif yüklü fosfat gruplarıyla etkileşim göstermektedir. Fakat çoğunlukla PLK1 substratlarının PLK1 tarafından fosforile edilebilmesi için daha önce farklı kinazlar tarafından fosforile edilmesi gerekir (Şekil 2.5). Yapılan çalışmalar, PLK1 substratlarının büyük çoğunluğunun CDK1 veya MAPK ile fosforillendiğini ortaya koymuştur [25].

PLK1’in en çarpıcı özelliklerinden biri, mitotik bölünmenin ardışık basamakları boyunca çeşitli hücre altı yapılarına dinamik lokalizasyondur. Geç G2 evresinde ve profazda sentrozomda lokalizasyon gösteren PLK1, pro-metafaz ve metafazda kinetokor üzerinde, anafazda kromozom ayrılmasının ardından orta bölgede, telofazda ise orta-cisimcikte lokalize olur. Hem nükleusta hem de sitoplazmada lokalizasyon gösteren PLK1’in miktarı, gerçekleştireceği fonksiyonlara bağlı olarak nükleositoplazmik geçişlerle dinamik bir şekilde değişmektedir. PLK1-bağımlı sinyalizasyon ve geri bildirim döngüleri, G2-M geçişinde CDK1 / siklin B aktivasyonunu ve dolayısıyla mitotik girişin zamanlamasını kontrol eder. PLK1 aynı zamanda Dynactin p150 proteinini fosforilleyerek profaz sırasında çekirdek zarının parçalanmasını düzenlemektedir. PLK1’in sentrozomal lokalizasyonu sentriol-çevresi materyalin (PCM) oluşumunu kontrol eder ve sentrozomları mikrotübüller için bir merkez haline getirir [26].



Şekil 2.4: PLK1’in bölgeleri ve spesifik aminoasitleri.



Şekil 2.5: PLK1 PB bölgesi ile substratlarındaki fosforillenmiş özgün motiflerine bağlanır.

Reseptör protein Cenexin 1, CDK1-bağımlı fosforilasyonla PLK1'i sentrozoma yönlendirir ve bu noktada PLK1'in etkileşim hedefi Ninein-Benzeri Protein ve Pericentrin'dir. Pro-metafaz esnasında sentrozom lokalizasyonunu koruyan PLK1, çift kutuplu iğ ipliği birleşimini sağlayarak ve kinetokorlarda birikerek kinetokor-mikrotübül etkileşiminde önemli rol oynamaktadır. PLK1'in kinetokora bağlanması polo-box etkileşim proteini 1 (PBIP1) vasıtasıyla gerçekleşir. Erken mitozda PLK1, PBIP1'i fosforile ederek degradasyonunu tetikler. Metafazda ise kinetokorlardaki PLK1 seviyesi düşerek SAC ve kromozom ayrılmasını negatif etkiler. Dolayısıyla metafaz esnasında kinetokor-mikrotübül etkileşmesini sağlar [22].

Aurora A, G2 sırasında PLK1'in aktivasyonundan ve mitoz geçişten sorumlu öncül kinazdır. RNAi veya kimyasal inhibisyon yöntemiyle Aurora A'nın susturulması, profazda sentrozomda PLK1'in Thr210 aminoasidinin fosforilasyonunu engellemektedir. Aurora A miktarıyla PLK1'in Thr210 aminoasit fosforilasyonu doğru orantı içerisinde. Çok düşük miktarda Aurora A aktivitesi dahi sentrozomda PLK1'in tam aktif olması için yeterlidir. Bu da gösteriyor ki Aurora A, PLK1'in ana aktivatörüdür. Aurora A ile etkileşen diğer bir faktör olan BORA da PLK1 aktivasyonunda rol oynamaktadır. BORA, G2 fazında PLK1 ile kompleks oluşturmaktadır. İn vitro çalışmalar göstermektedir ki, BORA varlığında Aurora A tarafından PLK1'in Thr210 aminoasit fosforilasyonu önemli ölçüde artmıştır. PP1C nin alt ünitesi MYPT1, PLK1 ile etkileşerek Thr210 fosforilasyonunu ortadan kaldırır [27].

2.5. Sitokinez Regülatörü PRC1

PRC1, merkezi iğ iplikleri olarak adlandırılan, anafaz başlangıcından sonra hücrenin ortasında oluşan antiparalel mikrotübül demetlerini düzenleyen korunmuş bir modülün parçası olan bir mikrotübül paketlenme proteindir. PRC1'in veya homologlarının çeşitli organizmalarda genetik olarak çıkarılması, mitotik iğ ipliği ve kromozomların ayrılması üzerinde belirgin bir etki göstermeden sitokinezi engellemekte ve iki çekirdekli hücre oluşumunu tetiklemektedir. PRC1'in CDK1 fosforilasyonu ile metafaz sırasındaki aktivitesinin engellendiği düşünülmektedir. Bu hipotez ile uyumlu olarak, mayadaki PRC1 homologu Ase1'in CDK1 fosforilasyonu ile negatif olarak regüle edildiği gözlemlenmiştir. PRC1 ayrıca PLK1 tarafından T602 aminoasitinden fosforillenmektedir. Bu fosforilasyon PRC1'i negatif regüle ederek prematür orta bölge oluşumunu engellemektedir [28]. PRC1'in N-terminal bölgesi, merkezi iğ ipliği ile etkileşim, dimerizasyon, MKLP1, CENP-E ve KIF4A ile gerçekleştirdiği etkileşimlerden sorumludur. C-terminal bölgesi ise PLK1 için etkileşim bölgesini barındırmaktadır [29].

2.6. Endozomal Yolak ve Sitokinezin Regülasyonu

Sitokinez sırasında endozomal veziküllerin plazma membranına taşınması, endositik yolağın sitokinezin düzenlenmesinde rol oynayabileceğine dair fikir oluşturmuştur. Ayrıca, yapılan çalışmalar neticesinde kesilme bölgesinde lipid ve protein kompozisyonunun belirgin bir seviyede olması; sitokinez sürecinin sağlıklı sonuçlanabilmesi için endozomal yolağın lipid ve proteinleri kesilme noktasına taşıdığını düşündürmektedir (Şekil 2.6). Ek olarak, kasılma halkasının doğru pozisyonlanmasını sağlayan geri dönüşüm endozomları Mikrotübül Organize Edici Merkezde (MTOC) lokalizedir [30].

Birçok kanıt endozomal kaynaklı membranların sitokinezde rol oynadığına dair modeli desteklemektedir. Zebra balığı embriyolarında sitokinezin son aşamalarında özellikle kesilme noktasında görülmüştür. Memeli hücrelerindeki çalışmalar, mitozun başlangıcında, hücre yuvarlandığında internalize membranların hücre yüzeyine geri dönüşümünün önemli ölçüde yavaşladığını göstermiştir. Bununla birlikte, Clathrin-temelli endositoz, hücre bölünmesi boyunca normal olarak devam etmektedir. Dolayısıyla, mitozun başlangıcında plazma zarının yüzey alanında azalma ve

endozomal sistemde hücre yüzeyi temelli membran birikimi vardır. Anafaz başladığında, endositik geri dönüşüm başlar ve plazma membranında büyük miktarda endozom füzyonu gözlemlenmektedir. Yapılan bir çalışmada, kasılma esnasında bölünen HeLa hücrelerinin anafazda kutup noktalarındaki plazma membranında, geç telofazda da orta-cisimcikte endositik veziküller gözlemlenmiştir. Daha sonra, kutup bölgesinde oluşan ve sitokinez için gerekli olan bu endositik veziküllerin geç sitokineзде bir kargo vasıtasıyla orta-cisimciğe taşındığı ortaya çıkarılmıştır [31].

Birçok endositik protein sitokinezin son aşamalarında rol oynamaktadır. Clathrin-bağımlı endositozda rol oynayan bir protein olan GTPaz dynamin'in inhibisyonu, C.elegans embriyolarında bölünme yarığı kasılmasını engeller. Clathrin-bağımlı endositozda rol oynayan yardımcı proteinlerden Eps15'in dominant negatif formunun ekspresyonu da endositozu durdurarak sitokineze engel olmaktadır. Endositik proteinlerden bir diğeri VAMP8'in ise bölünme oluşuna lokalize olduğu ve sitokinez için gerekli olduğu gösterilmiştir [31].

Kesilme yarığına membran iletimi, bölünme sonrası oluşacak iki hücre için gerekli olan yüzey alanının sağlanmasında önemli rol oynamaktadır. Deniz keşanesi embriyoları ve Xenopus yumurtaları kullanılarak yapılan araştırmalarda, membran iletiminin kesilme yarığını hedef aldığı gösterilmiştir [30].

Çeşitli RNAi uygulamaları ve proteomik analizler, yüksek miktarda membran trafiğı proteinlerinin sitokinez için gerekli olduğunu ortaya koymuştur. Skop ve arkadaşları CHO hücrelerinden orta-cisimcik izolasyonu yaparak proteomik analiz gerçekleştirmişlerdir ve ilginç bir şekilde en büyük protein sınıfının %33 ile salgı ve membran trafiğı ile ilgili proteinler olduğunu belirlemişlerdir [32].

Sitokinez için gerekli olan Rab GTPase ailesi proteinleri, hedefleme ve füzyon olaylarını kontrol eden farklı efektör proteinlerle etkileşerek GTP/GDP bağılı formları arası döngülerini sağlamaktadır. Sitokineзде, plazma zarının organizasyonunda ve vezikül oluşumunda rol oynayan Rab11, endozomal veziküllerde lokalizasyon gösteren bir proteindir. RNAi tekniğı ile Rab11'in ifadesinin düşürülmesi geç sitokineзде kasılmanın gerilemesine sebep olmaktadır. Rab11, geç telofazda geri dönüşüm endozomlarının kesilme yarığına ulaştırılmasında kritik rol oynamaktadır [33].

Sitokineзде rol oynayan diğeri bir geri dönüşüm endozomal protein ailesi ise Rab11-ailesi etkileşim proteinleridir (Rab11-FIP). Bu ailenin bir üyesi, Rab11 ve ARF6 ile üçlü kompleks oluşturan Rab11-FIP3'tür. Rab11-FIP3 ifadesi düşürülmüş

HeLa hücreleri Faz-kontrast canlı görüntüleme ile analiz edildiğinde sitokinezin geç evreleri için gerekli olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca yine Rab11-FIP3'ün RNAi tekniği ile ifadesinin düşürülmesi, geri dönüşüm endozomlarının kesilme yarığına ve orta-cisimciğe göçünü engellemekle birlikte %20-30 oranında çift çekirdekli hücre oluşumuna sebep olmaktadır. Hücreler uzun bir sitoplazmik köprü vasıtasıyla uzun süre bağlı kalmaktadır. Çoğu kez, ayrılamayan hücreler apoptoza uğramaktadır [30].

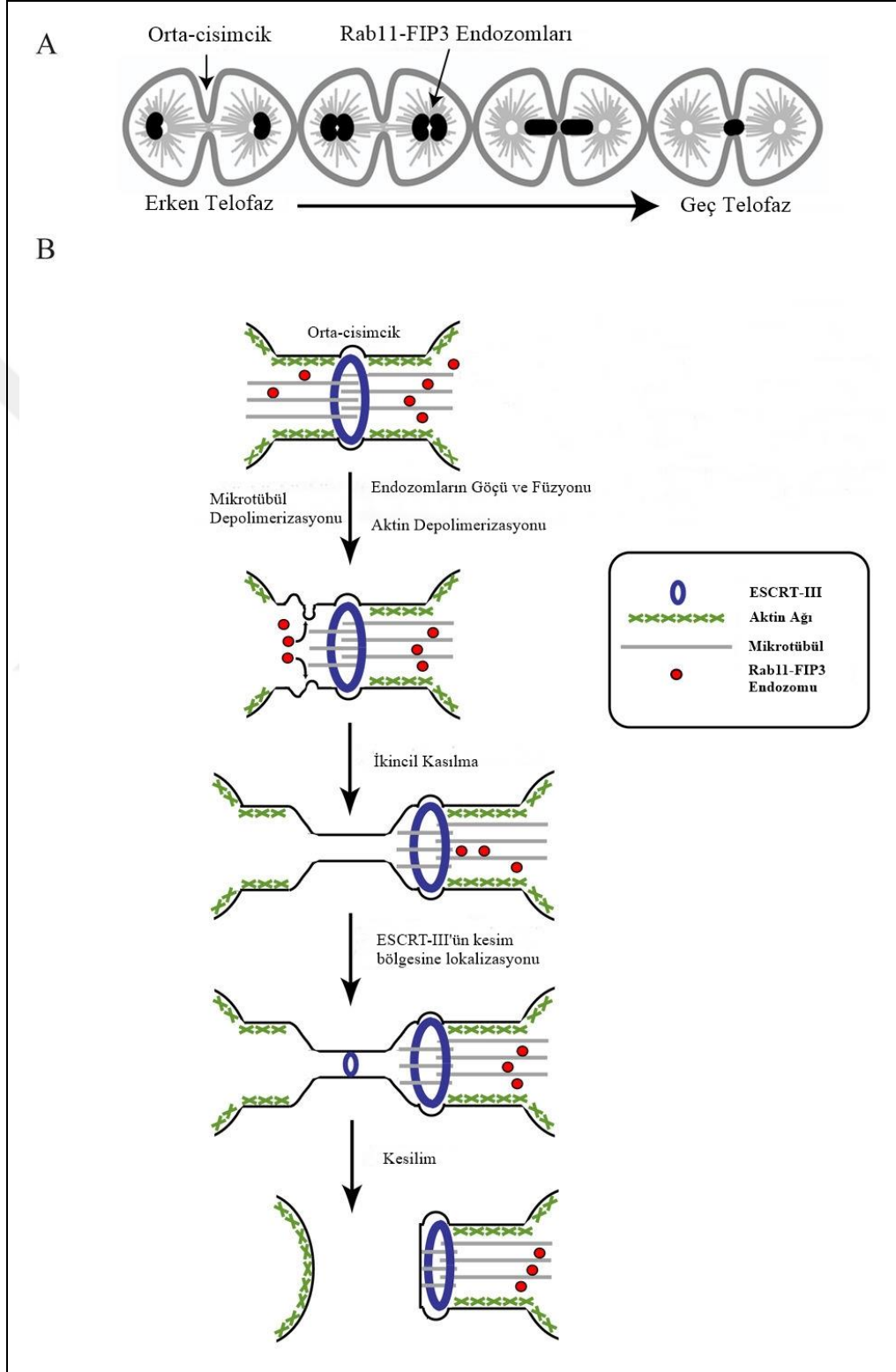
Rab11-FIP'ler, Rab11 bağlanma bölgesi (RBD) olarak adlandırılan C-terminal bölgesinde korunmuş 20 aminoasitlik bir motif ile Rab11'e bağlanmaktadır. Rab11-FIP3'ün bağlanma bölgesi ise 733-756 ncı aminoasitler arasındadır. Rab11-FIP3 ayrıca 202-237 ve 234-269 uncu aminoasitler arasında iki kalsiyum bağlama bölgesine (EF bölgesi) sahiptir. Ek olarak, 5-197 aminoasitler arası, FIP3'ün N-ucunda bulunan prolin zengin bir bölgedir ve çok sayıda protein-protein etkileşimine aracılık etmektedir. C-terminal bölgesi de homodimerizasyon ve Rab11 ile heterotetramerik kompleks oluşturmak için kullanılmaktadır [31].

Rab11-FIP3'ün 3-boyutlu kristal yapısı tamamen bilinmemektedir; sadece RBD bölgesini barındıran bir kısmın (695-756 ncı aminoasitler arası) yapısı bilinmektedir. Ek olarak, yapısal biyoloji tahmin programları 463-692 ncı aminoasitler arası bölgeyi geniş alfa-helis sarı-sarmal bölge olarak göstermektedir [30], [31].

Rab11-FIP3'ün *D. melanogaster* homologu Nuf proteini, embriyolarda geri dönüşüm endozomlarının orta-cisimciğe göçüne ek olarak kesilme noktasında aktin polimerizasyonunda da rol oynamaktadır. RNAi tekniği ile ifadesinin düşürülmesi hücrelerin hareketini engellemektedir. Yapılan çalışmalar, Rab11-FIP3'ün, aktin yeniden modellenmesi ile doğrudan ilişkili bir protein olan ARF6'yı, hücrenin konumsal olarak hareket yönündeki bölgesine hedeflenmesine aracılık eden polarize Rac1 proteininin aktivasyonunu düzenlendiğini ortaya koymuştur [34]. Ayrıca son çalışmalar göstermektedir ki, Nuf proteini, *Drosophila* PLK proteini olan Polo ile dozaj-duyarlı bir etkileşim göstermekte ve Nuf'un hücre döngüsü bağımlı lokalizasyonunu dolaylı yoldan düzenlemektedir. In vivoda Polo aktivitesi engellendiğinde Nuf'un fosforilasyon seviyesi düşüp daha uzun süre sentrozom lokalizasyonu gösterdiği gözlemlenmiştir. In vitroda ise, Polo direk Nuf'a bağlanıp Ser225 ve Thr227 aminoasitlerinden fosforillemektedir [35].

GFP-Rab11-FIP3'ü ifade eden HeLa hücreleri canlı görüntüleme mikroskopisi ile gözlemlendiğinde Rab11-FIP3'ün mitoz sırasında mekânsal ve zamansal dinamiklerden geçtiği görülmüştür. Rab11-FIP3, metafaz ve erken anafaz sırasında

yaygın bir şekilde sitoplazmaya, sentrozoma, endozomal membran yapılarına, geç sitokinezde ise hızlıca bölünme noktasına ve orta-cisimciğe yerleşmektedir. Hücre bölünmesi gerçekleştikten sonra tekrar sentrozoma dönmektedir [36].



Şekil 2.6: Endozomların ve ESCRT kompleksinin sitokinetik bölünmedeki rolleri.

2.7. Translasyon ve Translasyon Sonrası Düzenlemeler

Sentrozomun ve genetik materyalin iki katına çıkarılması, hücre döngüsünün tüm safhaları ve neredeyse hücre içi faaliyetlerin tümü göz önüne alındığında gerçekleştirilen faaliyetlerde yüksek oranda proteinlerin aktivite gösterdiği gözlemlenmektedir. Hücre içerisindeki kritik önemdeki süreçlerden birisi de translasyon olarak nitelendirilen protein üretim sürecidir. Moleküler biyoloji ve genetikte translasyon, hücresel ribozomların protein üretme sürecidir [37].

Transkripsiyonda çekirdekte DNA'dan haberci RNA (mRNA) oluşturulur ve translasyon sürecine geçilir. Translasyon sürecinde mRNA kodları ribozom tarafından çözülerek kodlara uygun aminoasitler zinciri oluşturulup polipeptid oluşumu sağlanır. Daha sonra polipeptid katlanarak aktif bir protein formatına ulaşır ve hücredeki fonksiyonunu gerçekleştirmeye başlar. Ribozom, mRNA'daki kodları çözmek için özel taşıyıcı RNAlar (tRNA) üzerindeki antikodonları kullanır. Her bir tRNA özelleşmiş olarak mRNA üzerindeki her bir aminoasit için özgün olan kodona bağlanabilecek antikodon dizi içerdiğinden ribozomun kodu okuma işlemi tRNAlar tarafından gerçekleşir [37]. Basitçe translasyon 4 aşamada gerçekleşir:

- Başlama: Ribozomu oluşturan protein kompleksi ribozomun başarılı bir şekilde mRNA'yı bağlamasını sağlar ve ilk tRNA başlangıç kodonuna bağlanır.
- Uzama: tRNA aminoasit zincirini bir sonraki kodona bağlanan tRNA'ya iletir
- Translokasyon: Ribozom hareket ederek bir sonraki kodonu tanır ve uzama işlemi devam ederek polipeptid zinciri oluşur.
- Sonlandırma: Stop kodonuyla karşılaşan ribozom uzaması tamamlanan polipeptid zincirini serbest bırakır.

Translasyon işlemi biten polipeptid zinciri katlanıp aktif protein haline ulaşır. Daha sonra translasyon-sonrası düzenlemeler vasıtasıyla aktif proteinin uygun forma ulaşması sağlanır ve görevini gerçekleştirmek üzere hedef bölgesine yönlendirilir [38]. Translasyon sonrası düzenlemeler aminoasitlerin yan zincirlerinde veya N (Amin) veya C (Karboksil) uçlarında gerçekleşir. Bu bölgelere fosfat, asetat, amid veya metil gibi yeni işlevsel gruplar ekler. Fosforilasyon, enzimlerin aktivitelerinin düzenlenmesi için çok sıklıkla kullanılan translasyon sonrası modifikasyondur [39]. Birçok ökaryotik hücrede ayrıca glikozilasyon, lipidasyon gibi translasyon sonrası düzenlemeler de gerçekleşir. Glikozilasyon, karbonhidrat moleküllerinin aminoasit yan zincirlerine bağlanmasıyla gerçekleşir ve protein katlanmasını ve kararlılığını

sağlar. Lipidasyon ise aynı şekilde yağ moleküllerinin bağlanmasıyla hedef proteinin hücre membranına yönlendirilmesini sağlar. Propeptid (öncül polipeptid) kesim süreci ise bir diğer translasyon sonrası modifikasyondur. Ana polipeptid zincirinden öncül polipeptid dizisinin kesilmesi proteinin olgun forma ulaşması için gerekli bir süreçtir. Polipeptid zincirindeki sistein aminoasitleri arasında gerçekleşen disülfid bağları da translasyon sonrası modifikasyon olarak bilinmektedir. Örneğin insülin hormon peptidi disülfid bağların oluşumundan sonra iki defa kesilmekte ve polipeptid zincirinin ortasından propeptid dizisi atılmaktadır. Sonuç olarak oluşan protein iki polipeptid zincirinin disülfid bağlarıyla birbirine bağlanmış halini alır. Bazı translasyon sonrası modifikasyonlar da oksidatif stres sonucu oluşur. Örneğin karbonilasyon, modifiye proteinleri hedef olarak degradasyonunu sağlar [40].

Sıklıkla translasyon sonrası modifikasyona uğrayan aminoasitler: Hidroksil gruplarından serin, treonin, tirozin aminoasitleri; amin gruplarından lizin, arjinin, histidin aminoasitleri; tiyolat anyonu sistein; karboksilatlardan aspartat ve glutamat; ve N ve C- uçlarıdır. Nadiren de amidlerden asparajin ve glutamin; okside metiyoninler ve yan zincirlerdeki metilenlerde gerçekleşebilir. Translasyon sonrası düzenlemeler deneysel olarak kütle spektrometresi, Eastern blot, Western blot gibi tekniklerle belirlenebilir [41].

2.8. Coiled-Coil Domain-Containing 124 (CCDC124) Proteini

Yeni bir sentrozom ve orta-cisimcik proteini olan CCDC124, birçok sentrozom ve orta-cisimcik proteini gibi CCD ihtiva eden bir proteindir. Bu bölge proteinin N-ucunda 18-82'nci aminoasitler arasındadır. İnterfazda sentrozomda ve telofaz evresinde orta-cisimciğe göç ederek sitokinez süresince de burada konuşlanmaktadır. 223 aminoasit büyüklüğünde olan CCDC124 proteini kütle spektrometresi analizleriyle ~32 kDa ağırlığında olduğu belirlenmiştir. CCDC124 proteininin ifadesinin düşürülmesi veya artırılması sonucunda sentrozom sayısı ve oluşumu etkilenmezken, büyük ve çoklu sayıda çekirdeğe sahip hücrelerin sayısının arttığı gözlemlenmiştir [1], [2], [3], [4]. Aynı şekilde, zebra balığı erken embriyolarında yapılan öncü çalışmalarda, CCDC124 gen ifadesinin baskılanması benzer şekilde çok çekirdekli embriyonik hücre oluşumlarına sebep olmuştur [1].

Gerek eski literatür verileri gerekse güncel veriler göz önünde bulundurulduğunda CCDC124'ün hücre bölünmesinde kritik bir/birçok rol oynadığı ve hücrenin sağlıklı bir döngü gerçekleştirebilmesi için hücre içerisinde varlığının ve miktarının çok kritik olduğu ortaya çıkmaktadır. Bütün fonksiyonlarının ve hücre içi etkileşim partnerlerinin aydınlatılması özellikle hücre bölünmesine bağlı hastalıklara/anomalilere potansiyel tedavi hedefleri oluşturmak adına acil bir ihtiyaç olarak görülmektedir.



3. MATERİYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Agaroz Jel Solüsyonları

- Etidyum Bromür

1mg Etidyum Bromür 1ml ddH₂O'da çözölmüştür (1mg/ml). %1 Agaroz Jel: 1g agaroz 100ml 1X TAE'de çözölmüştür.

- 50X TAE

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

3.1.2. Mikrobiyoloji Suşları

Bakteriyel suş olarak Escherichia coli (E. coli) DH5 α kullanılmıştır.

3.1.3. Mikrobiyoloji Solüsyonları

- LB Besiyeri

4 g pepton, 2g maya ekstraktı ve 4g NaCl 400ml ddH₂O içerisinde çözölmüş ve otoklavlanmıştır.

- Agar Besiyeri

6gr Bacto agar LB Besiyerine eklenip otoklavlanmıştır. Otoklav sonrası petrilere dökölerek kullanılmıştır.

- %80 Gliserol Stok Solüsyonu

80ml %100 (steril) gliserol 20ml ddH₂O eklenip otoklavlanmıştır.

- 0.5 M PIPES Solüsyonu (pH 6.7)

15.1g PIPES 80ml ddH₂O da çözölüp 5M KOH ile pH 6.7 ye ayarlanıp ddH₂O ile 100ml ye tamamlanmış ve 0.45 μ m filtre ile filtrelenmiştir.

- Inoue Ultra Competent Hücre Tamponu

20ml 0.5 M PIPES Solüsyonu (pH 6.7), 10.88g MnCl₂.4H₂O, 2.2g CaCl₂.2H₂O, 18.65g KCl karıştırılıp ddH₂O ile 1L'ye tamamlanmış ve 0.45 mm filtre ile filtrelenmiştir.

- Ampicillin ve Kanamycin

Sırasıyla 100mg/ml ve 50mg/ml stok solüsyon ddH₂O içerisinde çözülüp filtre edilmiştir. Çalışma solüsyonu 100µg/ml dir.

3.1.4. Oligonükleotidler

PCR ve yönlendirilmiş mutagenез deneylerinde kullanılan oligonükleotidler aşağıda Tablo 3.1'de belirtilmiş ve IONTEK firması (İstanbul,Türkiye) tarafından sentezlenmiştir.

Tablo 3.1: Kullanılan primerler ve dizileri.

PRİMER	SEKANS (5'-3')
mCherry_Frw	CTTAGGATCCAAGTGAGCAAGGGCGAGGA
mCherry_Rev	CGTGGGTAACTTACTTGTACAGCTCGTCC
Y38A_Frw	GAGCTGGAGGATGCCGCCTGGAAGGACGACGAC
Y38A_Rev	GTCGTCGTCCTTCCAGGCGGCATCCTCCAGCTC
Y38E_Frw	GAGCTGGAGGATGCCGAGTGGAAGGACGACGAC
Y38E_Rev	GTCGTCGTCCTTCCACTCGGCATCCTCCAGCTC
Y38F_Frw	GAGCTGGAGGATGCCTTCTGGAAGGACGACGAC
Y38F_Rev	GTCGTCGTCCTTCCAGAAGGCATCCTCCAGCTC
S122A_Frw	GCCGAGAAAGCCAAGGCCCATCTGGAGGTGCCG
S122A_Rev	CGGCACCTCCAGATGGGCCTTGGCTTCTCGGC
S141A_Frw	GTGCTGGAGGAGGGCGCCGTGGAGGCGCGCACC
S141A_Rev	GGTGCGCGCCTCCACGGCGCCCTCCTCCAGCAC

3.1.5. Vektörler

PCR, moleküler klonlama ve yönlendirilmiş mutagenез deneylerinde kullanılan vektörler ve temin edilen firma bilgileri aşağıdaki Tablo 3.2'de belirtilmiştir.

Tablo 3.2: Kullanılan vektörler.

VEKTÖR	FİRMA
pEGFP-N2	Clontech Laboratories
pmCherry-C1	Clontech Laboratories
pcDNA4/TO/Myc/His A,B,C	Invitrogen / Thermo Fisher Scientific
p3xFlag-CMV10	Sigma Aldrich
pCCDC124-GFP (pEGFP-N2 omurgasında)	[1]
pCCDC124-HA (pcDNA4/TO/Myc/His A,B,C omurgasında)	[1]
pS122A-HA (pcDNA4/TO/Myc/His A,B,C omurgasında)	[1]
pS141A-HA (pcDNA4/TO/Myc/His A,B,C omurgasında)	[1]

3.1.6. Hücre Hattı Seçimi

Ccdc124 proteininin vahşi tipi ve mutant hallerinin hücre içi lokalizasyonunu gözlemleyebilmek için hücre büyüklüğü ve organel yapılarının net bir şekilde görüntülenebildiği Hela hücre hattı, PLK1 ile Ccdc124'ün hücre içi lokalizasyonunun canlı görüntülenmesi için hTERT RPE-1 hücre hattı, Western blot ve CO-IP deneyleri için ise gen aktarım oranı açısından yüksek verim sağlayan HEK 293T hücre hattının kullanılması uygun görülmüştür.

3.1.6.1. HEK293T Hücreleri

HEK293 hücreleri, sağlıklı bir insan fetüsünden elde edilen embriyonik böbrek hücrelerinden türetilmiş bir hücre hattıdır. Bu özel hat normal HEK hücrelerinin adenovirüs 5 DNA'sı ile transformasyonu ve kültürlenmesi ile başlatılmıştır. Dönüşüm, viral genomdan yaklaşık 4.5 kilobazın HEK hücrelerinin 19 nolu kromozomuna entegre olmasıyla gerçekleşmiştir. Bu çalışma 1970'lerin başında, bilim adamı Alex Van der Eb tarafından, Leiden Üniversitesi'ndeki laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Hücreleri transfekte etmek için kullanılan kalsiyum fosfat tekniği

de yine Van der Eb' in laboratuvarında çalışan diğer bir araştırmacı Frank Graham tarafından bulunmuştur. HEK293 ismi, Frank Graham'ın 293 üncü denemesi olduğu için bu şekilde adlandırılmıştır. Normal HEK293 hücrelerinden farklı olarak Hek293T hücreleri SV40 T-antijeni içermektedir. T antijeni, hücre döngüsünü inhibe eden proteinlere bağlanarak sürekli hücre döngüsüne giren bir popülasyon sağlamakta ve dolayısıyla transfeksiyon, transduksiyon ve plazmit amplifikasyonu gibi uygulamalarda başarı oranını yükseltmektedir [42].

3.1.6.2. HeLa Hücreleri

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

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

3.1.6.3. hTERT-RPE-1 Hücreleri

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

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

Bu çerçevede PLK1 proteini ile ilişkili canlı hücre görüntüleme deneylerinde Burkard ve arkadaşlarının hTERT-RPE-1 hücre hattı üzerinde homolog rekombinasyon tekniğiyle oluşturduğu PLK1^{as} (PLK-1'in katalitik cebinde geniş pürin analoglarını kabul edebileceği aminoasit modifikasyonları yapılmış GFP füzyon hat) hücre hattı kullanılmıştır [48].

3.1.7. Hücre Kültürü Solüsyonları

- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)

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

- Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS)

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

- Tripsin

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

- Hücre Dondurma Besiyeri

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

3.1.8. İmmüno blot Solüsyonları

- Liziz Tamponu

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

- Jel Formülasyonları

Tris tamponu, SDS ve akrilamid ddH₂O içerisinde aşağıdaki tablolarda yer alan oranlar göz önüne alınarak hazırlanmıştır (Tablo 3.3) ve (Tablo 3.4).

Tablo 3.3: Yürütme jeli için gerekli malzemeler ve miktarlar.

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

Tablo 3.4: Ayırma jeli için gerekli malzemeler ve miktarlar.

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

- Transfer Tamponu, 10X

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

- Yürütme Tamponu, 1X

Her deneyde taze hazırlanmak koşuluyla son konsantrasyonda %10 10X transfer tamponu ve %04 oranda %25 SDS solüsyonundan içerecek şekilde eklenerek ddH₂O ile 1L"ye tamamlanmıştır.

- TBS, 10X

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

- 1X TBS-T

10X TBS solüsyonu ddH₂O içerisinde 1X'e düşürülüp içerisine %1 Tween-20 eklenmiştir.

- 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8

ddH₂O içerisinde 36.34 g Tris çözülüp pH 8.8 'e ayarlanmış ve ddH₂O ile 200ml ye tamamlanmıştır.

- 1.5 M Tris-HCl, pH 6.8

ddH₂O içerisinde 12.11 g Tris çözülüp pH 6.8 'e ayarlanmış ve ddH₂O ile 200ml ye tamamlanmıştır.

- %10 APS Solüsyonu

Her deneyde taze hazırlanmak koşuluyla 0.1 g amonyum persülfat, 1 ml ddH₂O içerisinde çözülüp -20°C' de muhafaza edilerek kullanılmıştır.

- Strip Solüsyonu

Her deneyde taze hazırlanmak son konsantrasyon 100 mM β -mercaptoethanol, %2 SDS, 62.5 mM Tris-HCl içerecek ve pH 6.7 olacak şekilde hazırlanmıştır.

- 50X Proteaz İnhibitörü solüsyonu

1 tablet proteaz inhibitörü (Roche 11 873 580 001) 1ml ddH₂O içerisinde çözülüp -20°C' de muhafaza edilerek kullanılmıştır.

- WB Bloklama solüsyonu

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

3.1.9. Birlikte çöktürme (co-IP) Solüsyonları

- Co-IP Yıkama Tamponu

1X DPBS içerisine %0.2 Tween-20 eklenmiştir.

- Co-IP Elüsyon Tamponu

30 µl hazırlamak için, 29 µl 3X SDS örnek tamponunun içerisine 1 µl 30X DTT eklenip karıştırılmıştır.

3.1.10. İmmünboyama Solüsyonları

- Yıkama Solüsyonu (1X DPBS-T)

1X DPBS'in içerisine %1 Triton-X olacak şekilde eklenerek hazırlanmıştır.

- IF Bloklama Solüsyonu

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

- DAPI Boyası

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

3.1.11. Hücre Senkronizasyonu Bileşenleri

- Nocodazole

20 mM stok konsantrasyonu olacak şekilde DMSO içerisinde çözülmüştür. Çalışma konsantrasyonu olarak 200nM kullanılmıştır.

- Thymidine

100 mM stok konsantrasyonu olacak şekilde ddH₂O içerisinde çözülmüştür. Çalışma konsantrasyonu olarak 2.5 mM kullanılmıştır.

3.1.12. Ligasyon Deney Bileşenleri

Ligasyon deneyinde kullanılan malzemeler ve miktarları aşağıdaki Tablo 3.5' de belirtilmiştir.

Tablo 3.5: Ligasyon deney malzemeleri ve miktarları.

BİLEŞENLER	MİKTARLAR
10X Ligasyon Tamponu	2 µl
T4 DNA Ligaz	1 µl
Kesilmiş Vektör	150 ng
Entegre edilecek DNA bölgesi	3:1 veya 5:1 molar oranda
ddH ₂ O	20 µl'ye tamamlanır.

3.1.13. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Bileşenleri

Standart PCR amplifikasyonları ve yönlendirilmiş mutageniz amplifikasyonlarında kullanılan malzemeler ve miktarlar Tablo 3.6' da belirtilmiştir.

Tablo 3.6: PCR deney malzemeleri ve miktarları.

BİLEŞENLER	MİKTARLAR
Kalıp DNA (20ng/µl)	2 µl
Forward Primer (10pmol/µl)	1 µl
Reverse Primer (10pmol/µl)	1 µl
10mM dNTP Mix	2 µl
10X Pfu Ultra II Tamponu	5 µl
Pfu Ultra II Polimeraz	1.5 µl
ddH ₂ O	37.5 µl
TOPLAM	50 µl

3.1.14. Kimyasal Malzemeler

Deneylerde kullanılan kimyasallara, kimyasalların markalarına ve katalog numaralarına ait liste aşağıdaki Tablo 3.7' de yer almaktadır.

Tablo 3.7: Kullanılan kimyasal malzemeler.

KİMYASALIN ADI	KİMYASALIN MARKASI	KİMYASALIN KATALOG NUMARASI
2-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich	M6250
3MB-PP1 (Selective PLK1 Inhibitor)	MERCK Millipore	529582
6X Purple Loading Dye	NEB	B7024S
BSA	Sigma Aldrich	7906
Bradford Reagent	Sigma Aldrich	B6916
BI2536 (PLK1 Inhibitor)	Selleckchem	S1109
Fluo. mounting medium	DAKO	S3023
Dimethyl Sulfoxide (DMSO)	Santa Cruz Biotech.	SC-358801
DMEM	Gibco	41966
DMEM/F-12	Gibco	31330-038
DPBS	Gibco	14190
Fetal Bovine Serum (FBS)	Gibco	10270-106
Glycine	MP Biomedicals	808822
Hidroklorik asit	Sigma Aldrich	071102
L-Glutamine	Gibco	25030-024
Metanol	EMD Millipore	1.06009
TEMED	Sigma Aldrich	T9281
Nocodazole	Sigma Aldrich	M1404
Polyethylenimine (PEI)	Polysciences	23966
Penicillin/Streptomycin	Gibco	15140-122
TBBt (CK2 Inhibitor)	MERCK Millipore	218697
Tergitol Solution	Sigma Aldrich	NP40S
Thymidine	Sigma Aldrich	T1895
Trizma base (Tris)	Sigma Aldrich	T6066
Trypsin-EDTA	Gibco	15400054
Tween 20	Sigma Aldrich	P1379

3.1.15. Hücre Transfeksiyonu

Hücre görüntüleme ve immünfloresan deneylerinde hücreye düşük toksisite sağlaması ve hTERT-RPE-1 gibi düşük transfeksiyon oranı gösteren hücre tiplerinde yüksek performans sağlamasından ötürü HeLa ve hTERT-RPE-1 hücre hatlarıyla bağlantılı çalışmalarda transfeksiyon reaktifi olarak JetPRIME kullanılmıştır (Tablo 3.8).

Tablo 3.8: HeLa ve hTERT-RPE1 transfeksiyon malzemeleri ve miktarları.

KÜLT. KABI	EKİLEN HÜCRE SAYISI	JETPRIME TAMPON MİKTARI	PLAZMİD DNA MİKTARI	JETPRIME REAKTİF MİKTARI	TOPLAM BESİYERİ (SERUMLU)
6-kuyu petri	$1,5 \cdot 10^5$	200 μ l	2 μ g	4 μ l	2 ml
10cm petri	$1 \cdot 10^6$	500 μ l	10 μ g	20 μ l	10 ml

İmmünoblot çalışmalarında kullanılan HEK293T hücrelerinin transfeksiyonunda ise hem ucuz hem de efektif bir reaktif olan PEI kullanılmıştır (Tablo 3.9).

Tablo 3.9: HEK293T transfeksiyon malzemeleri ve miktarları.

KÜLTÜR KABI	HÜCRE SAYISI	DNA MİKTARI	PEI REAKTİF MİKTARI	TOPLAM BESİYERİ (SERUMSUZ)
10cm petri	$1 \cdot 10^6$	7.5 μ g	22.5 μ l	10 ml

3.1.16. Kullanılan Cihazlar

Deneylerde kullanılan cihazlara, cihazların markalarına ve model numaralarına ait liste aşağıdaki Tablo 3.10' da yer almaktadır.

Tablo 3.10: Kullanılan cihazlar.

CİHAZIN ADI	CİHAZIN MARKASI	CİHAZIN MODELİ
İmmunoblot Ekipmanları	BIO-RAD	Mini-PROTEAN® Tetra Handcast Systems
Agaroz Jel Yürütme Sistemi	BIO-RAD	Wide Mini-Sub® Cell GT Cell
Agaroz Jel ve İmmunoblot Görüntüleme Cihazı	BIO-RAD	ChemiDoc XRS+
Canlı Hücre Görüntüleme Mikroskobu	Leica	DMi8
Konfokal Mikroskop	Zeiss	LSM-880
Çalkalayıcı	Labnet	ROCKER 25
Hassas Terazi	ADAM	PGW 253i
Kuru Banyo (Isı Bloğu)	Benchmark	BSH1002-E
Döndürücü/Çalkalayıcı	Biosan	RS-60
Vortex	SCIOLOGEX	MX-S
Soğutmalı Eppendorf Santrifüj Cihazı	HITACHI	CT-15RE
Soğutmalı Falkon Santrifüj Cihazı	NÜVE	NF-1200R
PCR Cihazı	Biometra	Analytik-Jena
Laminar Akım Kabini	Cryste	
İnkübatör	Heal Force	Smart Cell
Su Banyosu	Wisd	WiseBath
Multimod Mikroplaka Okuyucu	Thermo Scientific	Varioskan Flash

3.1.17. Kullanılan Antikorlar

Deneylerde kullanılan antikorlara ait bilgiler; immünoblot ve immünfloresan çalışmaları sırasında kullanılma oranlarına ilişkin bilgiler Tablo 3.11’de gösterilmiştir.

Tablo 3.11: Kullanılan antikorlar.

ANTİKOR	ELDE EDİLDİĞİ ORGANİZMA	FİRMA	KATALOG NUMARASI	WB oranı	IF oranı
Primer Antikorlar					
CCDC124-Middle	Tavşan (100-150)	Bethyl Laboratories	A301-834A	1/1000	1/200
α -Tubulin	Mouse (149-448)	Santa Cruz Bio	SC-5286		1/200
γ -Tubulin	Fare (38-53)	Abcam	ab11316		1/200
YB-1	Fare (51-140)	Sigma Aldrich	WH0004904 M1		1/200
Flag-Tag	Fare	Abcam	ab18230	1/1000	1/200
HA-Tag	Tavşan	Abcam	ab137838	1/1000	1/200
PRC1	Fare	Abcam	ab119338		1/200
Calnexin	Tavşan	Abcam	ab22595	1/2000	
Rab11-FIP3	Keçi	Santa Cruz Bio	sc-165328		1/200
Sekonder Antikorlar					
Rabbit IgG	Keçi	Sigma Aldrich	A9169	1/5000	
Mouse Alexa-555	Fare	Cell Signaling Technology	4409S		1/500
Mouse Alexa-488	Fare	Cell Signaling Technology	4408S		1/500
Rabbit Alexa-555	Tavşan	Cell Signaling Technology	4412S		1/500
Rabbit Alexa-555	Tavşan	Cell Signaling Technology	4413S		1/500

3.2. Metot

3.2.1. Biyoinformatik Analizler

RCSB Protein DataBank'ta (<http://www.rcsb.org>) 3 boyutlu yapısı bulunmayan veya henüz X-Ray Kristalografi veya NMR analizi yapılmamış proteinlerin 3 boyutlu yapılarını tahmin etmek için Phyre2 - Protein Homology/analogY Recognition Engine V 2.0 (www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2), I-TASSER – Iterative Threading ASSEmbly Refinement (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>), PSIPRED - Protein Structure Analysis Workbench (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) ve FOLDpro - Protein Fold Recognition and Template-Based 3D Structure Prediction (<http://mine5.ics.uci.edu:1026/foldpro.html>) programları kullanılmıştır.

Öncelikle CCDC124'ün Gen Ontolojisi (GO) terimlerinde (RNA bağlama, sitoplazma, sentrozom, hücre döngüsü, orta-cisimcik, hücre bölünmesi) ve ekspresyon paternleri çerçevesinde ortak partnerleri AmiGO (<http://amigo.geneontology.org/amigo>) ve QuickGO (<https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/>) veritabanları ile, ardından hücre içi lokalizasyon noktaları, bilinen etkileşim partnerleri [1] ve geniş ölçekli kütle spektrometresi verileri göz önüne alınarak MiCroKiTS 4.0 (<http://microkit.biocuckoo.org>) ve BioGRID 3.4 (<https://thebiogrid.org>) veritabanları araştırılıp etkileşim aday listesi ortaya çıkarılmıştır (Tablo A1.1). Daha sonra listedeki adaylar, 3 boyutlu yapı uyumu, kavite-oyuk uyumu, izoelektrik nokta, pH 7.0 de net yük gibi parametreler çerçevesinde etkileşim modelleri yapan PATCHDOCK (<https://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/PatchDock/>) programı vasıtasıyla 3 boyutlu PDB verileri kullanılarak etkileşime tabi tutulmuştur. Etkileşim gösteren ve Etkileşim Doğruluk Puanı (Confidency Score) $\geq 2.10^4/2.5.10^4$ olan adaylar hidrojen bağı yapma potansiyeli ($\sim 1-5$ Å mesafe), GROMOS96 programı (<http://www.gromos.net>) ile etkileşim gösteren aminoasitlerin yan zincirlerinin bağlanma öncesi ve sonrası enerji düzeyleri (bağ, aç, gerilme, bağısızlık ve elektrostatik çekim enerjileri) göz önüne alınarak değerlendirmeye tabi tutulmuş ve yüksek etkileşim ihtimali olan aday listesi ortaya çıkarılmıştır (Tablo 4.1.).

Ayrıca CCDC124'ün translasyon sonrası modifikasyon (PTM) bölgelerine yönelik gerçekleştirdiğimiz araştırmalarda, deneysel verileri ve tahmin modellerini kullanan veritabanlarından GPS (<http://gps.biocuckoo.org>), PROTEOMEscout (<https://proteomescout.wustl.edu>), PhosphoNET (<http://www.phosphonet.ca>),

HMMpTM (<http://aias.biol.uoa.gr/HMMpTM/>), PTMcode (<http://ptmcode.embl.de/>) ve NetworKIN (<http://networkin.info/>) kullanılarak potansiyel PTM bölgeleri belirlenmiştir (Tablo A1.2).

3.2.2. Hücre Kültürü

Hek293T ve HeLa hücre hatları yüksek glukozlu DMEM, %10 FBS ve %1 Pen/Strep içeren, hTERT-RPE-1 hücre hattı ise DMEM/F12, %10 FBS, %1 Pen/Strep ve %1 L-Glutamin içeren besi ortamında, 37°C sıcaklık ve %5 CO₂ sağlayan inkübatörde büyütülmüştür.

3.2.3. Transfeksiyon

- JetPRIME prosedürü

JetPRIME tampon eklenip içerisine gerekli miktarda plazmid DNA eklenip 10s vorteks yapılır ve ardından mini spinner ile kısa çöktürme yapılır. Daha sonra üzerine JetPRIME reaktifinden eklenip tekrar 10s vorteks yapılır ve mini spinner ile kısa çöktürme yapılır. 10 dk karanlıkta oda sıcaklığında bekletilen karışım serumlu besiyeri içeren hücrelerin üzerine damlatılıp 8 saat (canlı hücre görüntüleme için) veya 24 saat (immünfloresan için) 37°C 'de %5 CO₂ sağlayan inkübatörde inkübasyona bırakılır. Süre sonunda besiyeri taze besiyeri ile değiştirilip transfekte edilen plazmid DNA'nın ekspresyonunun sağlanması için 24-30 saat süre ile inkübasyona bırakılır.

- PEI prosedürü

1ml serumsuz besiyeri içerisine gerekli miktarda plazmid DNA eklendikten sonra birkaç defa yavaşça pipetlenip oda sıcaklığında 5dk inkübasyon yapılır. Ardından üzerine PEI reaktifinden eklenip tekrar yavaşça pipetleme yapıp 15 dk karanlıkta oda sıcaklığında bekletilen karışım 9ml taze serumsuz besiyeri eklenen hücrelerin üzerine damlatılıp 24 saat 37°C 'de %5 CO₂ sağlayan inkübatörde inkübasyona bırakılır. Süre sonunda besiyeri taze serumlu besiyeri ile değiştirilip transfekte edilen plazmid DNA'nın ekspresyonunun sağlanması için 24 saat süre ile inkübasyona bırakılır.

3.2.4. Transformasyon

200 µl ultra competent E.coli DH5α bakteri hücrelerinin üzerine 15ng plazmid DNA eklenip dikkatlice karıştırılır. Karışım 30dk buzda bekletilip 42°C’ de 2dk ısı şoku uygulanır. Hemen ardından 5dk buzda bekletilen karışıma 1ml LB eklenip 37°C ‘de 1 saat karıştırmalı inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonrası 7000 rpm de 7dk santrifüj gerçekleştirilir. Dipte biriken pellet bir miktar LB içerisinde çözülerek önceden petriye dökülmüş agar besiyeri üzerine yayılır ve 37°C’de gece boyu inkübasyona bırakılır.

3.2.5. Restriksiyon Endonükleaz Deneyi

Kesilecek her 1µg plazmid DNA için 4 ünite restriksiyon enzimi kullanılmıştır.

3.2.6. DNA Çöktürme Deneyi

Plazmid DNA hacminin 1/10’u kadar hacim Sodyum asetat eklenip karıştırılır. Ardından plazmid DNA’nın hacminin 2.5 katı kadar %100 etanol eklenip tekrar karıştırılır. -80°C’ de 30dk veya sıvı azotta 3 dk bekletilen örnek 14000rpm’de +4°C’de 15dk santrifüj yapıp üst sıvı atılır. Ardından 500 µl %70 etanol eklenip 14000rpm’de +4°C’de 5dk santrifüj yapıp üst sıvı atılır. Evaporatörde 20-30dk kurutulan örnekler, istenen miktarda nükleaz içermeyen ddH₂O ile çözülür.

3.2.7. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Standart PCR amplifikasyonları ve yönlendirilmiş mutageniz amplifikasyonlarında uygulanan koşullar Tablo 3.12’de belirtilmiştir.

Tablo 3.12: Uygulanan PCR Şartları.

SÜREÇ	SICAKLIKLAR	SÜRELER	TEKRAR SAYISI
Ana Denatürasyon	95 °C	5 dk	1 defa
Denatürasyon	95 °C	1 dk	18 defa
Bağlanma	60 °C	1 dk	
Uzama	68 °C	1dk / 1kb	
Son Uzama	68 °C	10 dk	1 defa
Bekleme	4 °C	∞	1 defa

3.2.8. Yönlendirilmiş Mutagenез

Yönlendirilmiş mutagenез PCR amplifikasyonu sonrası örnekten 5 µl alınarak agaroz jel elektroforezinde yürütölüp amplifikasyon durumu gözlemlenir. Geri kalan örnek üzerine 10 µl Cutsmart Tampon ve 2 µl DpnI enzimi eklenip 2 saat 37 °C de inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonrası 4 µl 10X Ligasyon Tamponu ve 2 µl T4 DNA Ligaz eklenip 16 °C’ de gece boyu ligasyona bırakılır. Ertesi gün örnek hacmi 4 eşit hacime bölünerek 4 petriye transformasyonu gerçekleştirilir.

3.2.9. Ultra Kompetent Hücre Hazırlanışı

Stok E.coli DH5α bakteri hücrelerinden ön kültür elde edebilmek için 50 µl alınıp 3ml LB içerisine eklendikten sonra gece boyu 37 °C’ de çalkalamalı inkübasyona bırakılır. Büyüyen ön kültürden hacimce %1’i aşmayacak şekilde 250ml LB’ye aşılama yapıp 37 °C’ de çalkalamalı inkübasyona bırakılır. 45 dakikada bir OD ölçölür ve 0.55’e ulaştığında kültür alınıp 4000rpm de 4 °C’ de 10dk santriföl yapılır. Devam eden süreç tamamen buz üzerinde olmak koşuluyla santriföl sonrası hücre pelleti 80ml soğuk Inoue Ultra Competent Hücre Tamponunda çözölüp tekrar 4000rpm de 4 °C’ de 10dk santriföl yapılır. Santriföl sonrası üst sıvı dökölüp hücre pelleti 20ml soğuk Inoue Ultra Competent Hücre Tamponunda çözölür. Üzerine 1.5ml DMSO eklenip karıştırılarak 10dk buzda bekletilir. Ardından karışım eppendorflara dağıtılarak sıvı azotta 2-3 dk bekletilir ve -80 °C soğutucuda daha sonra kullanılmak üzere saklanır.

3.2.10. Agaroz Jelden DNA Geri-Kazanım Deneyi

Moleküler klonlama çalışmasında vektöre entegre edilecek DNA bölgesi, agaroz jelde yürütölüp QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Cat No: 28704) kullanılarak geri kazanılmıştır.

3.2.11. İmmünboyama Deneyi

Deneyin başlangıcından bir gün önce 6-kuyulu petriye steril lamel konup üzerine 15×10^4 hücre ekilir. Ertesi gün 2 defa 5’er dk 1X DPBS ile yıkanan hücreler %100

metanol ile 10dk -20 °C' de inkübasyona bırakılır. Ardından 3 defa 5'er dk yıkama solüsyonuyla yıkanan hücrelere bloklama solüsyonu eklenip 1 saat oda sıcaklığında çalkalamalı inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonrası bloklama solüsyonu ortamdan çekilir ve taze bloklama solüsyonu içerisine 1/200 oranında primer antikor eklenip hücreler tekrar oda sıcaklığında 1 saat çalkalamalı inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonrası primer antikor solüsyonu ortamdan çekilir ve 3 defa 5'er dk yıkama solüsyonuyla yıkanır. Devamında taze bloklama solüsyonu içerisine 1/500 oranında ikincil antikor eklenip hücreler ışıktan korumalı bir şekilde oda sıcaklığında 1 saat çalkalamalı inkübasyona bırakılır. İkincil antikor inkübasyonundan sonra hücreler 2 defa yıkama solüsyonu ile yıkanıp 15 dk oda sıcaklığında DAPI solüsyonu içerisinde çalkalamalı inkübasyona bırakılır. DAPI uygulamasından sonra 15dk ddH₂O ile yıkanıp DAKO floresans kapama solüsyonu ile lam üzerine kapatılır.

3.2.12. Hücre Senkronizasyonu

Bazı immünfloresan deneylerinde hücreler, hücre döngüsünün mitoz fazında senkronize edilmiştir. Hücreler öncelikle 16 saat boyunca 2.5 mM thymidine maruz bırakılmıştır. Ardından besiyeri tazelenip 8 saat inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra tekrar 16 saat boyunca 2.5 mM thymidine maruz bırakılmıştır. Ardından besiyeri ortamdan çekilip 200nM Nocodazole içeren besiyeri eklendikten sonra 12 saat inkübasyona bırakılmıştır. Nocodazole uygulaması sonrası besiyeri ortamdan çekilip hücreler taze besiyeri ile yıkanarak toplanmıştır. Toplanan hücreler 1500 rpm de oda sıcaklığında 5dk santrifüj yapıp 6-kuyulu petriye ekilmiştir. 2.5-3 saat sonra immünfloresan yapılmıştır.

3.2.13. Bakteri Hücrelerinin Saklanması

Bakteri hücreleri gliserol stok yöntemi ile saklanmıştır. Katı agar petriden tekil koloni alınıp 3ml LB'de büyütülmüştür. Ardından 625 µl kulture 375 µl %80 gliserol eklenip karıştırılarak -80 °C' de saklanmıştır.

3.2.14. Plazmid DNA İzolasyonu

Küçük ölçekli plazmid DNA izolasyonu için NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel), orta ve büyük ölçekli plazmid DNA izolasyonu için NucleoBond® Xtra Midi / Maxi (Macherey-Nagel) kitleri kullanılmıştır.

3.2.15. Nükleik Asit Konsantrasyon Tayini

Nükleik asit konsantrasyonları ve saflıkları NanoDrop (Shimadzu, Biospec-Nano) cihazında ölçülmüştür.

3.2.16. Protein Konsantrasyon Tayini

Deneylerde kullanılmak üzere izole edilen proteinlerin absorbanları Bradford solüsyonu kullanılarak 595nm'de Varioskan™ cihazında ölçülmüştür ve konsantrasyonların hesabında ölçülen absorbanlar kullanılmıştır.

3.2.17. Vektörlerin Yapımı

C-terminal mCherry etiketli CCDC124 vektörünün (pCCDC124-mCherry) hazırlanması için pCCDC124-GFP vektöründeki GFP gen bölgesi BamHI/HpaI arası ilgili restriksiyon enzimleri ile kesilmiştir. mCherry_Frw ve mCherry_Rev primerleri ile pmCherry-C1 vektöründen amplifiye edilen mCherry gen bölgesi, kesilmiş pCCDC124-GFP vektörüne klonlanmıştır.

Y38A, Y38E, Y38F aminoasit değişimleri yönlendirilmiş mutagenез tekniği ile pCCDC124-HA plazmidi üzerinde yapılmıştır. S122A, S141A ve S122A & S141A aminoasit değişimleri ise yine yönlendirilmiş mutagenез tekniği ile pCCDC124-HA, pCCDC124-GFP ve pCCDC124-mCherry vektörleri üzerinde yapılmıştır. Kullanılan primerler, oligonükleotidler alt başlığında belirtilmektedir.

3.2.18. DNA'nın Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz, mikrodalga fırında 1X TAE tamponu içerisinde eritilmiş ve son konsantrasyonda 10 µg/ml olacak şekilde etidyum bromür eklenmiştir (1 kb'den kısa olan DNA örnekleri için % 1-2 agaroz jel, 1 kb' den uzun DNA örnekleri için % 0.8

agaroz jel kullanılmıştır). DNA numuneleri, 1x mor yükleme boyası ile hazırlanmış ve jelde kuyulara yüklenmiştir. Jel 1X TAE içerisinde, DNA' nın boyutuna bağlı olarak farklı gerilim ve sürelerde yürütülmüştür.

3.2.19. Stok Hücrelerin Kriyoprezervasyonu

Hücreler erken pasaj sayısında iken petriden tripsin ile kaldırılıp 1500 rpm de 5dk santrifüj yapılır. Üst sıvı çekilip, pellet dondurma besiyeri (%5 DMSO + %95 FBS) içerisinde çözülür ve kriyotüplere dağıtılarak -80°C'de 1 hafta saklanır. Daha sonra hücreler -80°C'den sıvı azota alınır.

3.2.20. Dondurulmuş Stok Hücrelerin Açılması

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

3.2.21. İmmünoblot

Hücreler 10cm petriden 1X soğuk DPBS ile kazınarak toplanır ve 1500 rpm de 5 dk santrifüj yapılır. Üst sıvı atılıp hücre pelletinin üzerine 200 µl Liziz tamponu eklenir. 30 dk buzda inkübasyona bırakılan karışım 10 dakikada bir 10 s vortekslenir. İnkübasyon sonrası 14000rpm de 30 dk 4°C'de santrifüj yapılır ve üst sıvı (proteinlerin bulunduğu faz) toplanır. Protein konsantrasyonu belirlenip, her kuyuda 30µg protein olacak şekilde eppendorflara ayrılır. Üzerine 3X SDS örnek tamponu eklenir ve 100 °C'de 5dk denatüre edilir. Ardından 1X yürütme tamponu içerisinde SDS-PAGE'de yaklaşık 1.5 saat yürütülen örnekler, 1X Transfer tamponu içerisinde 100V gerilim altında 1.5 saat boyunca PVDF membrana transfer edilir. Transfer sonrası gece boyu WB bloklama solüsyonunda 4 °C'de çalkalanan membrana taze WB bloklama solüsyonu içerisinde oda sıcaklığında çalkalamalı inkübasyonla 2 saat birincil antikor uygulaması yapılır. Ardından 3 defa 10'ar dakika 1X TBS-T ile yıkanan membrana yine taze WB bloklama solüsyonu içerisinde oda sıcaklığında çalkalamalı inkübasyonla 1 saat ışıktan korumalı şekilde ikincil antikor uygulaması yapılır.

Uygulama sonrası 3 defa 10'ar dakika 1X TBS-T ile yıkanan membranın ECL solüsyonu ile görüntüsü alınır.

3.2.22. Birlikte Çöktürme (co-IP)

Dynabead (Dynabeads Protein G; Life Technologies 10004D) manyetik boncuk tüpü homojen olana kadar elde yavaşça çalkalanır. Her 15 cm'lik petriden elde edilen protein lizatı için 50 µl Dynabead olacak şekilde eppendorf tüpe aktarılır. Tüp manyetik ayırıcıya (DynaMag) yerleştirilir ve boncuklara dokunulmadan üst sıvı pipetle uzaklaştırılır. Tüpler magnetten ayrıldıktan sonra oda sıcaklığındaki 1X DPBS ile iki kez yavaşça yıkanır ve ardından üst sıvı uzaklaştırılır. Bağlanması istenen antikor (1-10 µg arası) 200 µl co-IP yıkama tamponu içinde karıştırıldıktan sonra boncukların üzerine eklenip oda sıcaklığında 2 saat çalkalayıcı/döndürücü de (12 rpm) antikorların boncuklara bağlanması sağlanır. Süre sonunda boncuk-antikor kompleksi magnetle yerleştirilip üst sıvı uzaklaştırılır. Hücre lizatı (100-1000 µl) boncuk-antikor kompleksi üzerine eklenip yavaşça pipetlenip 4°C' de gece boyu çalkalayıcı/döndürücü de (9 rpm) döndürülür. Ertesi gün boncuk-antikor-protein lizat kompleksi magnetle yerleştirilip üst sıvı SDS-PAGE'de input olarak kullanılmak üzere ayrı bir tüpe alınıp buzda bekletilir. Boncuk-antikor-protein kompleksi 3 kez 200 µl co-IP yıkama tamponu ile yıkandıktan sonra 100 µl co-IP yıkama tamponu eklenip yavaşça pipetlenir ve yeni bir eppendorf tüpe aktarılır. Tüp magnetle yerleştirilerek üst sıvıyı uzaklaştırılır. Boncuk-antikor-protein kompleksine 30 µl co-IP elüsyon tamponu, buzda bekletilen üst sıvıdan alınan 10 µl örneğe de 5 µl co-IP elüsyon tamponu eklenip 100 °C'de 5 dk denatüre edilir. Süre sonunda Boncuk-antikor-protein kompleksini barındıran tüpler magnetle yerleştirilerek hacmin 20 µl'si, üst sıvıların bulunduğu tüplerdeki hacmin ise tamamı SDS-PAGE'e yüklenerek devamında western blot prosedürü uygulanır.

4. SONUÇLAR

4.1. Biyoinformatik Analiz Sonuçları

Orta-cisimciğin ve sentrozomun kritik proteinlerinden birisi olan ve miktar bağımlı hücre içi regülasyonu etkileyen bir protein olan CCDC124'ün henüz bilinen çok az etkileşim partneri bulunmaktadır. Hücre içerisindeki farklı lokalizasyonları, miktar bağımlı hücrenin kaderini etkilemesi ve farklı stabilite durumları göz önüne alındığında henüz ortaya çıkarılmamış etkileşim partnerleri olabileceği fikri gündeme gelmiştir. Bu çerçevede tez çalışmamızın da amaçlarından birisi olarak belirlediğimiz, CCDC124'ün yeni etkileşim partnerlerinin bulunması adına önce biyoinformatik çalışmalarla yüksek etkileşim adayları ortaya çıkarılmış, ardından da deneysel çalışmalarla ilgili proteinlerin etkileşimleri teyit edilmiştir.

Metot kısmında belirttiğimiz parametreler çerçevesinde gerçekleştirdiğimiz analizlerden ortaya çıkan ilk eleme etkileşim aday listesi Tablo A1.1'de görülmektedir.

İlk eleme etkileşim aday listesi, metot kısmında da belirtildiği gibi, hidrojen bağı yapma potansiyeli ve etkileşim gösteren aminoasitlerin yan zincirlerinin bağlanma öncesi ve sonrası enerji düzeyleri (Tablo B1.1-3) göz önüne alınıp değerlendirmeye tabi tutularak ikincil eleme etkileşim aday listesi oluşturulmuştur (Tablo 4.1). GROMOS96 ile yapılan enerji analizleri, etkileşim öncesi ve sonrası yapılarak aminoasitlerin etkileşim potansiyelleri değerlendirilmiştir. Normal şartlarda etkileşim gösteren iki aminoasitin yan zincirleri, etkileşim sonrası daha kararlı yapıya bürünmekte ve bünyelerindeki enerjiyi bir miktar kaybetmektedirler (ağırlıklı olarak hidrojen bağı sayısına bağlı olarak). Bu çerçevede değerlendirmemiz toplam enerjinin etkileşim öncesine göre düşmesi prensibine dayanmaktadır. Bazı aminoasitlerde düşüşün aksine artış görünmesi, etkileşim ihtimalinin diğerlerine kıyasla düşük olabileceğini düşündürmektedir (Tablo B1.1-3).

Tablo 4.1: İkincil eleme etkileşim aday listesi.

SIRA NUMARASI	PROTEİN ADI	PATCHDOCK SKORU	HİDROJEN BAĞI SAYISI
1	RAB11-FIP3	23591 (2,3591.10 ⁴)	4
2	YB-1	21375 (2,1375.10 ⁴)	4
3	PRC1	20030 (2,0030.10 ⁴)	3

Tablo 4.1’ deki aday etkileşim proteinler için 3-boyutlu etkileşim modelleri oluşturulup etkileşim bölgeleri belirtilmiştir. Daha sonra immünboyama ve/veya birlikte çöktürme deneyleri yapılarak etkileşimler teyit edilmiştir.

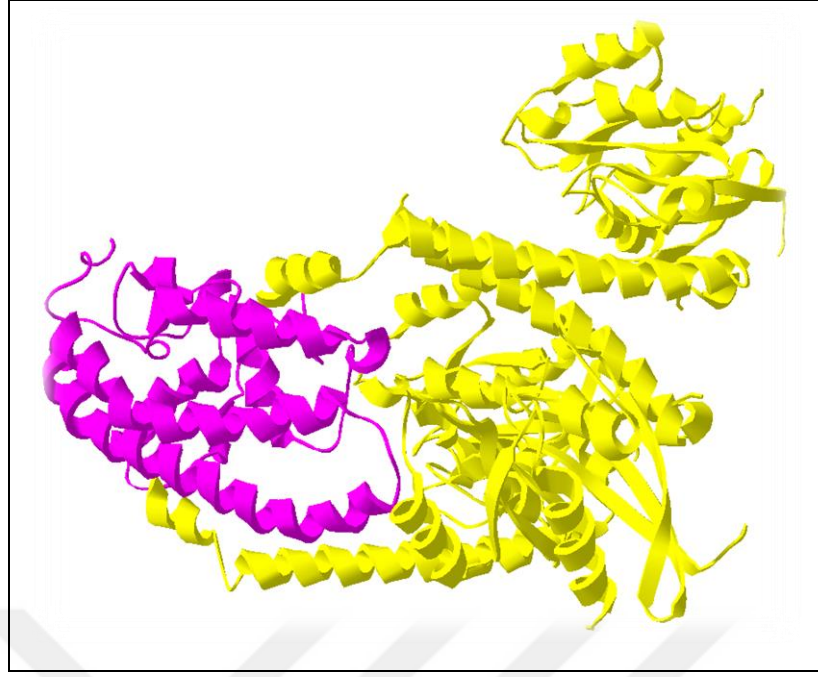
Ek olarak, detaylı literatür taraması ve biyoinformatik veritabanlarının kullanımı ile CCDC124’ün potansiyel translasyon sonrası modifikasyon bölgeleri belirlenmiştir (Tablo A1.2). Hem daha önce gerçekleştirilen deneysel çalışmalar, hem de Tablo A1.2 dikkate alınarak Y38, S122 ve S141 aminoasitleri üzerine yoğunlaştırılmıştır.

4.1.1. CCDC124-Rab11-FIP3 Etkileşimi

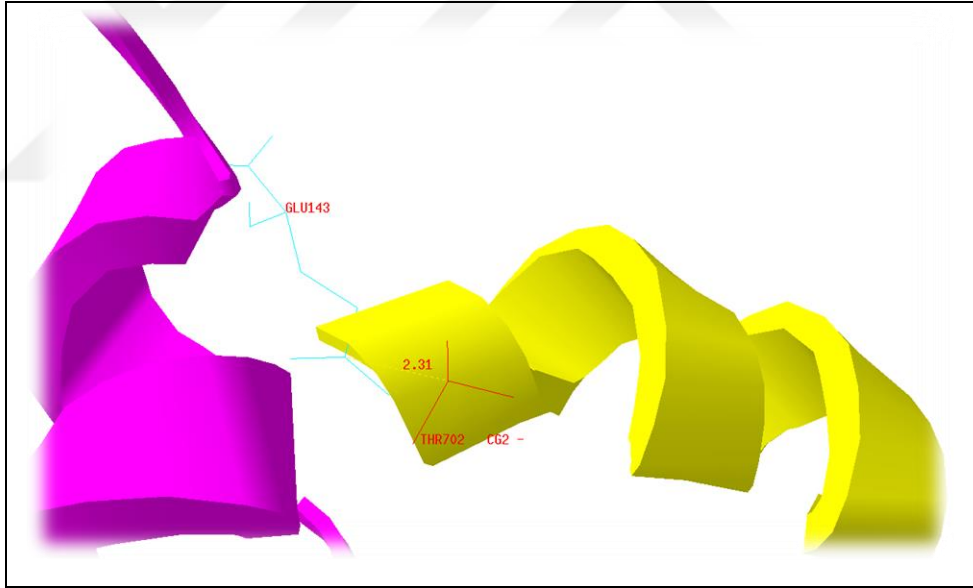
Endositik trafiğin ana regülatörlerinden birisi olan Rab11-FIP3, geç sitokineзде endozomal veziküllerin kesilme oluşuna iletimini sağlar. Ayrıca İnterfazda geri dönüşüm endozomlarının yapısal bütünlüğü için de gereklidir. Dynein ve dynactin proteinleri arasındaki etkileşimi sağlayarak dynein motor kompleksinin çeşitli kargolara bağlanmasını sağlar [52].

Gerçekleştirdiğimiz yapısal biyoinformatik çalışmaları sırasıyla CCDC124’ün GLU143, LYS56, GLN51 ve ARG192 aminoasitlerinin Rab11-FIP3’ün THR702, MET721, ILE724 ve GLU706 aminoasitleri ile etkileşebileceğini ortaya çıkarmıştır (Şekil 4.1-4).

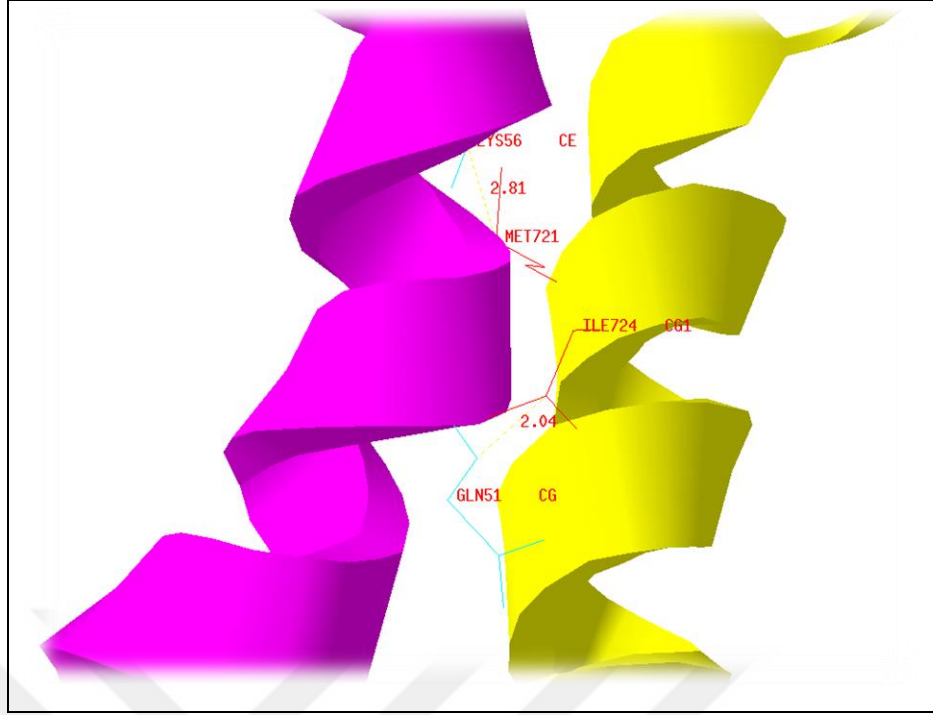
Akabinde gerçekleştirdiğimiz immünboyama (Şekil 4.5) ve birlikte çöktürme (Şekil 4.6) deneyleri, CCDC124’ün Rab11-FIP3 ile hem hücre içi lokalizasyon açısından sentrozom, orta-cisimcik ve Rab11-FIP3+ veziküllerde (beyaz oklarla belirtilmiştir), hem de direk protein-protein etkileşimi açısından birlikteliklerini doğrulamaktadır.



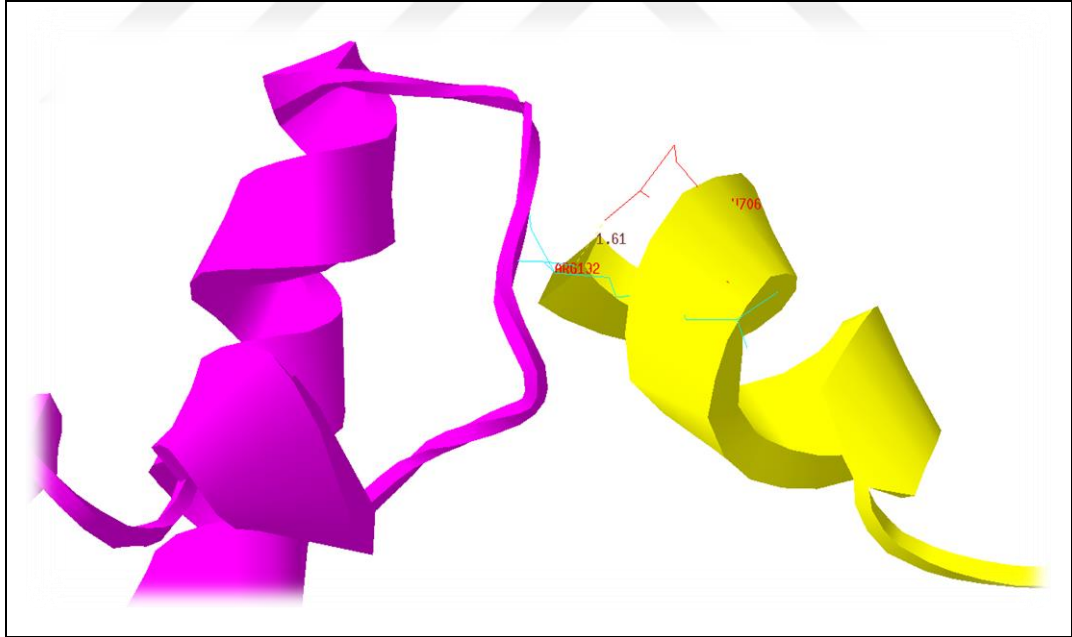
Şekil 4.1: CCDC124 (Mor) – Rab11-FIP3 (Sarı) yapısal etkileşim modeli.



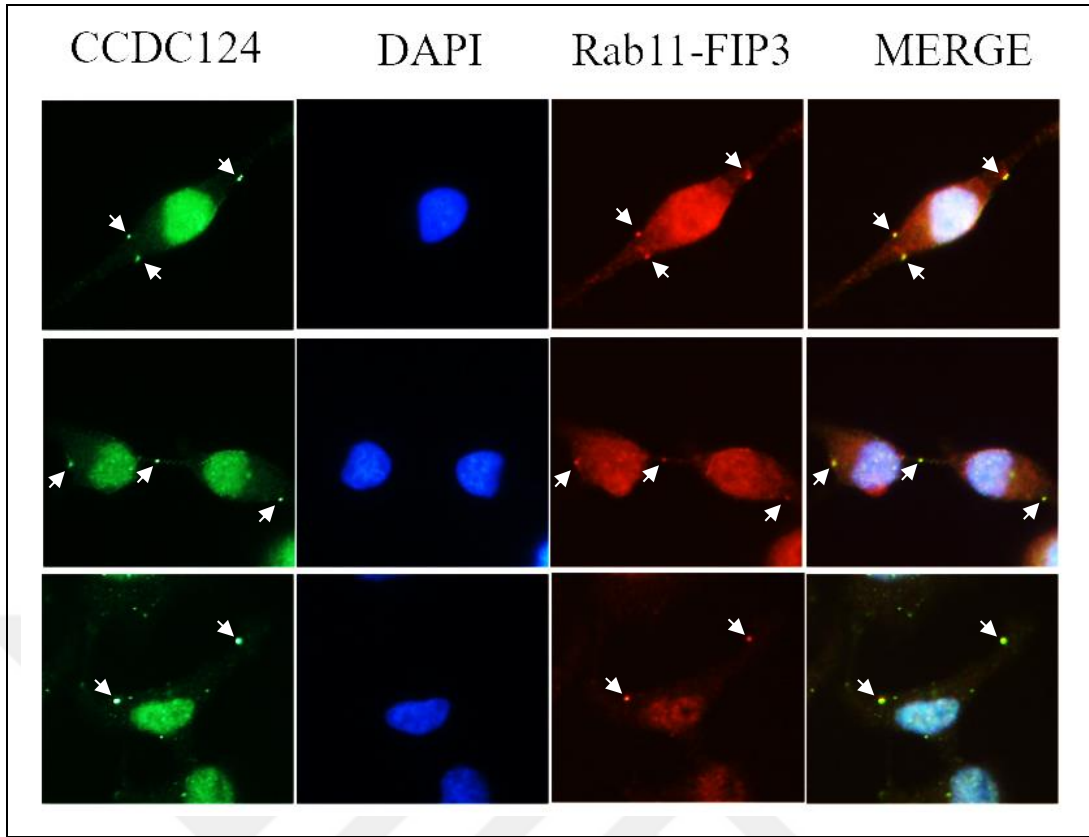
Şekil 4.2: GLU143 (CCDC124) – THR702 (Rab11-FIP3) aminoasit etkileşim modeli.



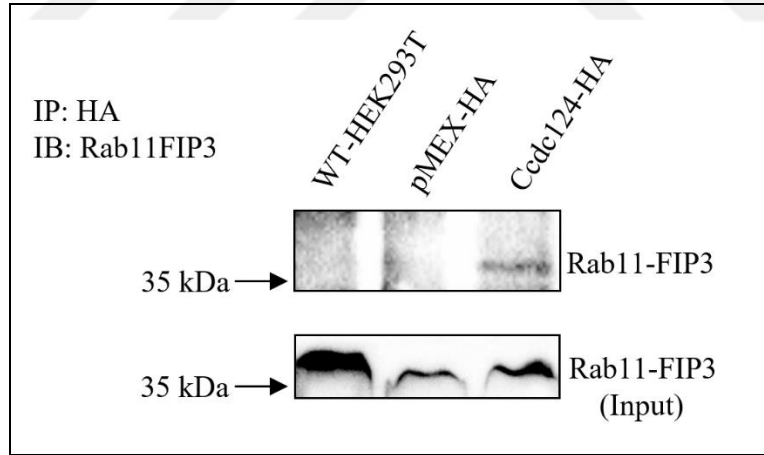
Şekil 4.3: LYS56 (CCDC124) – MET721 (Rab11-FIP3) ve GLN51 (CCDC124) – ILE724 (Rab11-FIP3) aminoasit etkileşim modelleri.



Şekil 4.4: ARG192 (CCDC124) – GLU706 (Rab11-FIP3) aminoasit etkileşim modeli.



Şekil 4.5: CCDC124 – Rab11-FIP3 etkileşimi immünboyama görüntüsü.



Şekil 4.6: CCDC124 – Rab11-FIP3 etkileşimi birlikte çöktürme görüntüsü.

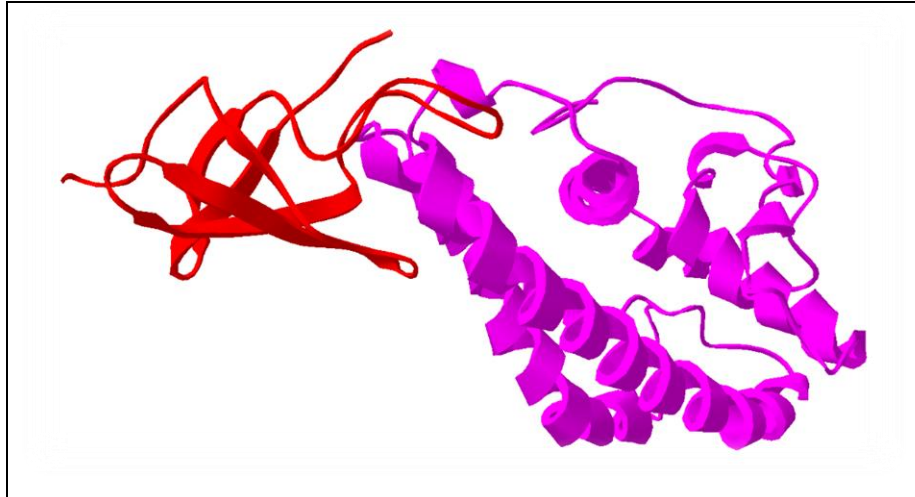
4.1.2. CCDC124-YB-1 Etkileşimi

Y-box bağlayıcı proteinler, soğuk şok bölgesine (CSD) sahip süper protein ailesinin üyeleridir. Transkripsiyonun düzenlenmesi, translasyon modülasyonu, DNA onarımı, ilaç direnci, hücre dışı sinyallere karşı stres tepkisi ve embriyogenezinin erken safhalarında yer almaktadırlar. Birçok çalışma, aktif proliferasyon gösteren

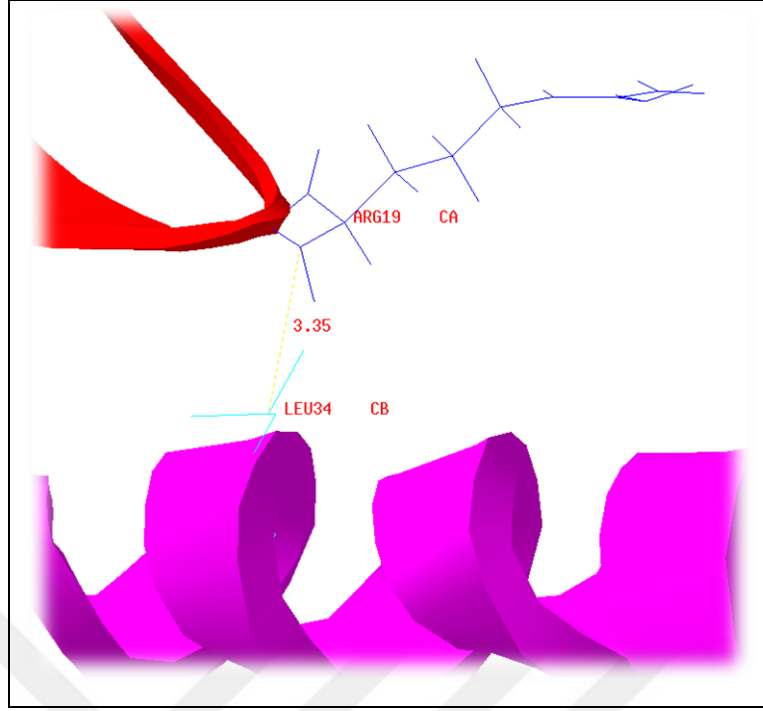
hücrelerdeki YB-1 protein ifadesinin, aktif proliferasyon göstermeyen (durağan/bölünmeyen) hücelere kıyasla arttığını göstermektedir. YB-1, DNA polimeraz α , çoğalan hücre nükleer antijeni (PCNA), timidin kinaz ve topoizomeraz II gibi hücre proliferasyonunda rol oynayan birçok geni aktive etmektedir. YB-1' in shRNA ile ifadesinin düşürülmesi, hücrelerin proliferasyon hızında düşüşe ve apoptoz oranında ciddi artışa sebep olmaktadır [49]. Ayrıca, YB-1'in amino-uç bölgesi Siklin D1 ile etkileşerek hücre döngüsünün G2/M geçişini düzenlemektedir. Fareler üzerinde yapılan çalışmalar ise, YB1 geninin genomdan her iki allelden de tamamen çıkarılması durumunda embriyonik seviyede öldürücü etki göstermiştir [50]. Yapılan kütle spektrometresi çalışmaları ise göstermektedir ki, YB-1, hücre bölünmesi ile doğrudan ilişkili olan AURKA, CDC20 ve CK2 ile etkileşmektedir [51].

Gerçekleştirdiğimiz yapısal biyoinformatik çalışmaları sırasıyla CCDC124'ün LEU34, GLU35, ASN44 ve VAL53 aminoasitlerinin YB-1'in ARG19, ARG47, LYS119 ve LYS44 aminoasitleri ile etkileşebileceğini ortaya çıkarmıştır (Şekil 4.7-11).

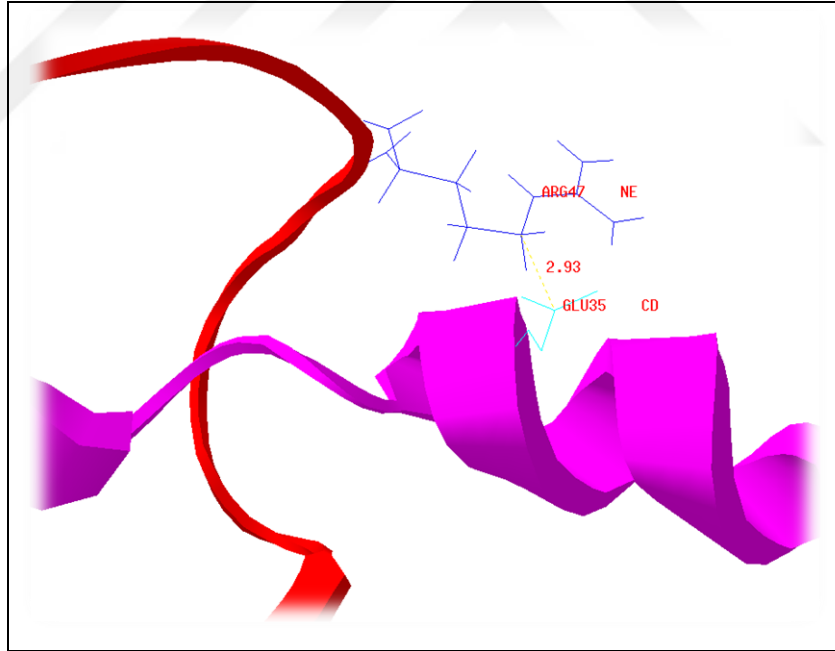
Akabinde gerçekleştirdiğimiz immünboyama (Şekil 4.12) deneyi, CCDC124'ün YB-1 ile hücre içi lokalizasyon açısından orta-cisimcik ve sitoplazmada farklı noktalarda birlikteliklerini doğrulamaktadır (beyaz oklarla belirtilmiştir).



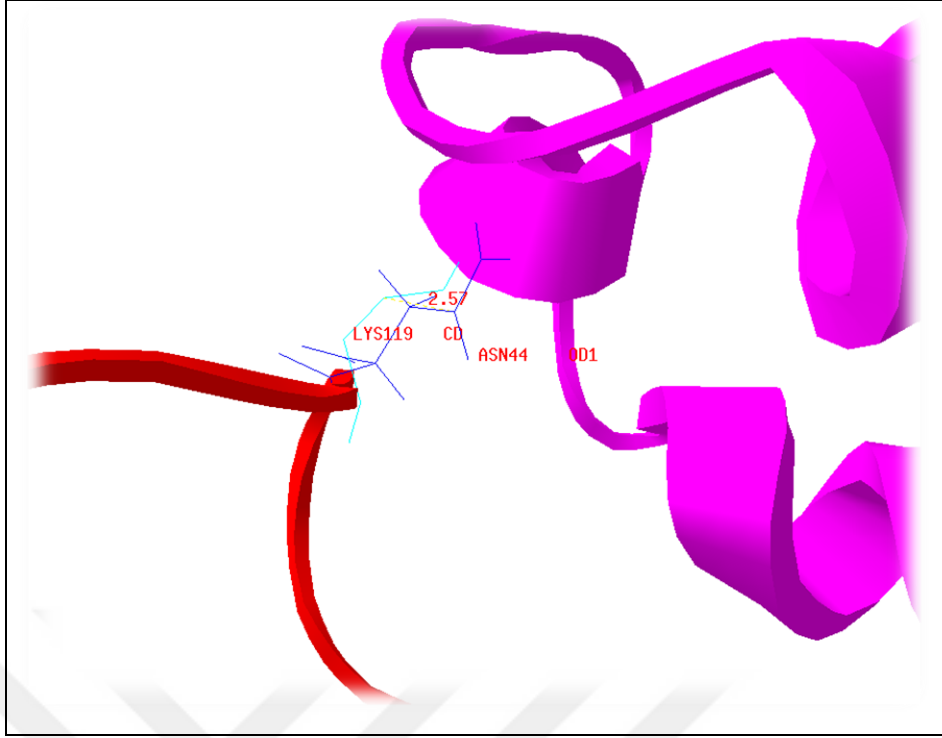
Şekil 4.7: CCDC124 (Mor) – YB-1 (Kırmızı) yapısal etkileşim modeli.



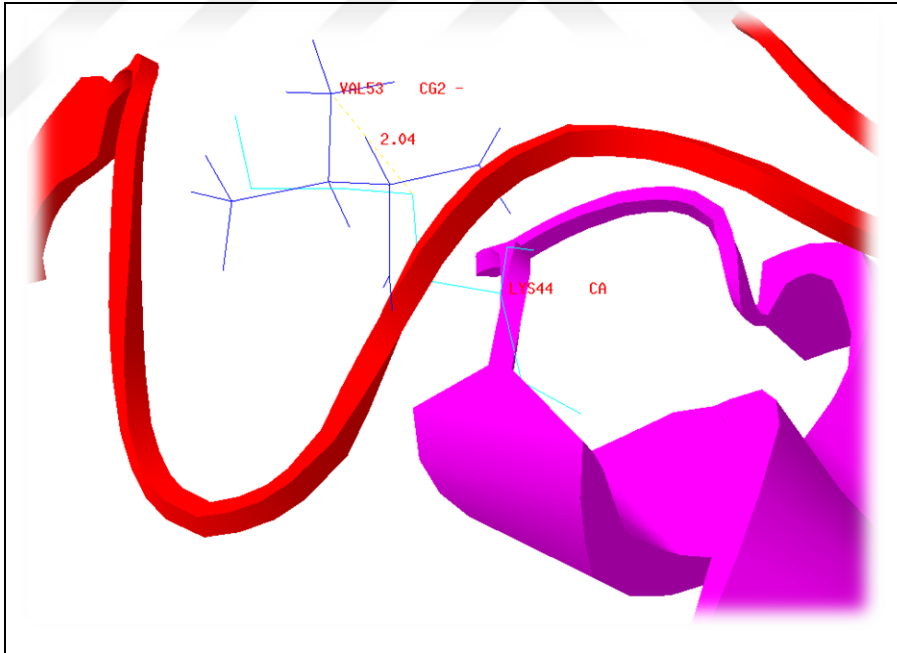
Şekil 4.8: LEU34 (CCDC124) – ARG19 (YB-1) aminoasit etkileşim modeli.



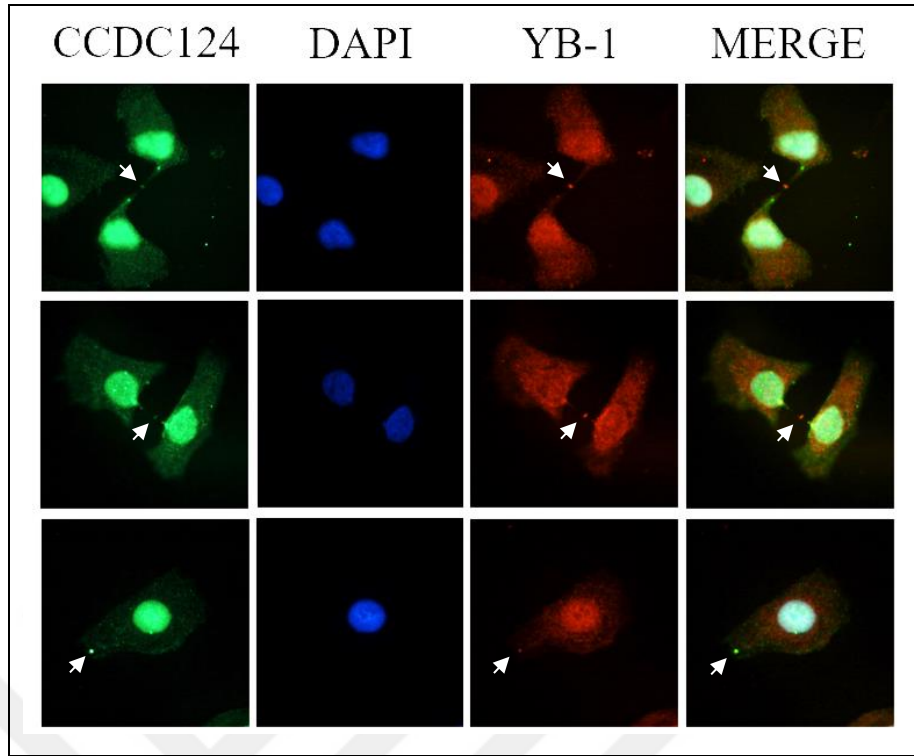
Şekil 4.9: GLU35 (CCDC124) – ARG47 (YB-1) aminoasit etkileşim modeli.



Şekil 4.10: ASN44 (CCDC124) – LYS119 (YB-1) aminoasit etkileşim modeli.



Şekil 4.11: VAL53 (CCDC124) – LYS44 (YB-1) aminoasit etkileşim modeli.

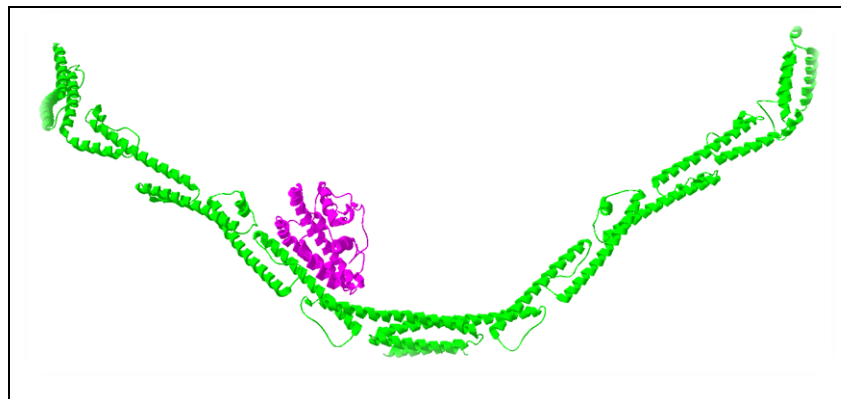


Şekil 4.12: CCDC124 – YB-1 etkileşimi immünboyama görüntüsü.

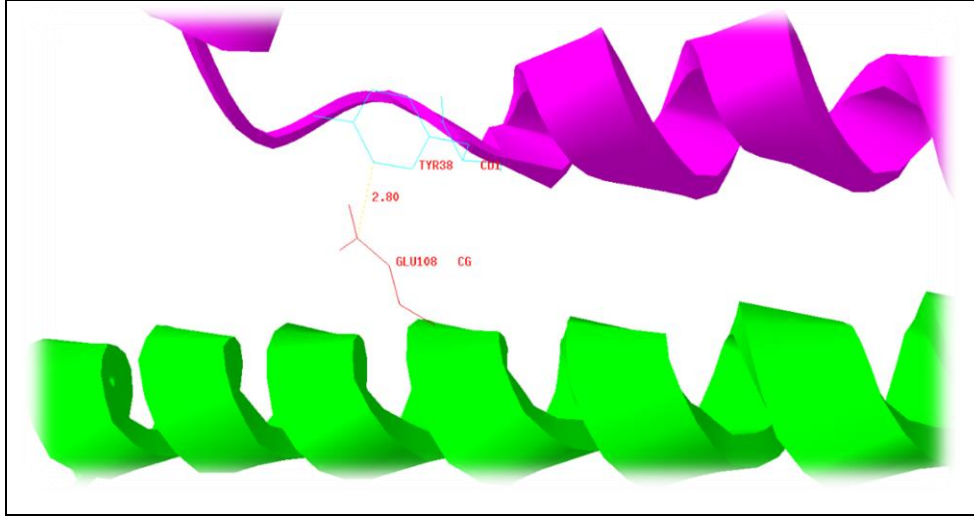
4.1.3. CCDC124-PRC-1 Etkileşimi

Gerçekleştirdiğimiz yapısal biyoinformatik çalışmaları sırasıyla CCDC124'ün TYR38, LYS29 ve ASP115 aminoasitlerinin PRC-1'in GLU108, SER146 ve GLU75 aminoasitleri ile etkileşebileceğini ortaya çıkarmıştır (Şekil 4.13-15).

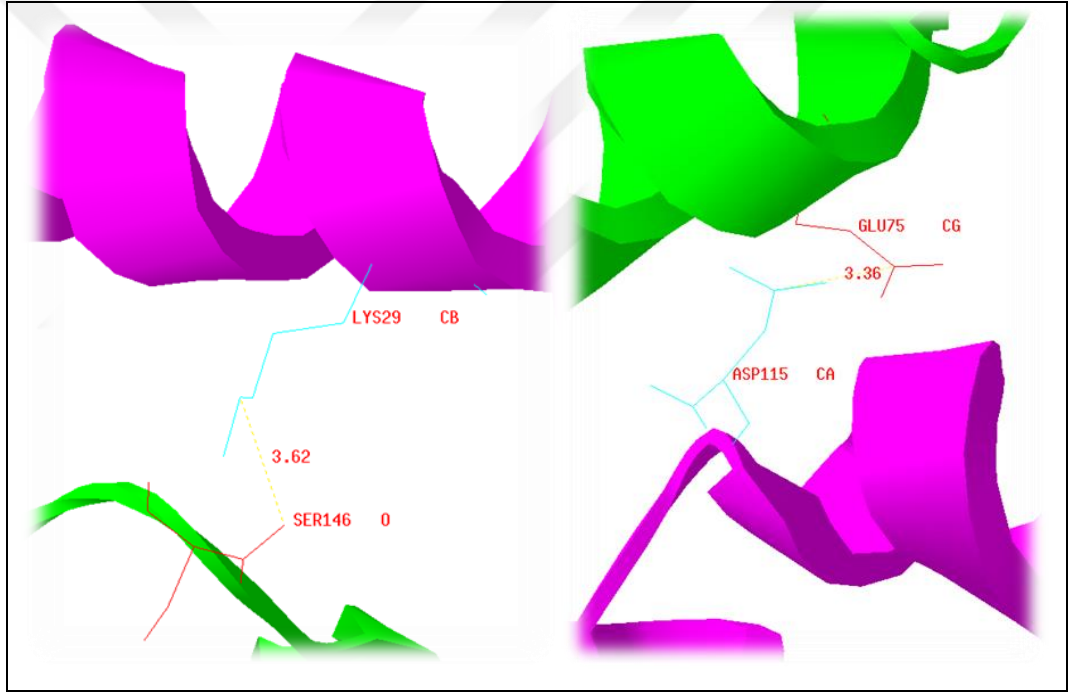
Akabinde gerçekleştirdiğimiz immünboyama (Şekil 4.16) deneyi, CCDC124'ün PRC-1 ile hücre içi lokalizasyon açısından orta-cisimcikte birlikteliklerini doğrulamaktadır (beyaz oklarla belirtilmiştir).



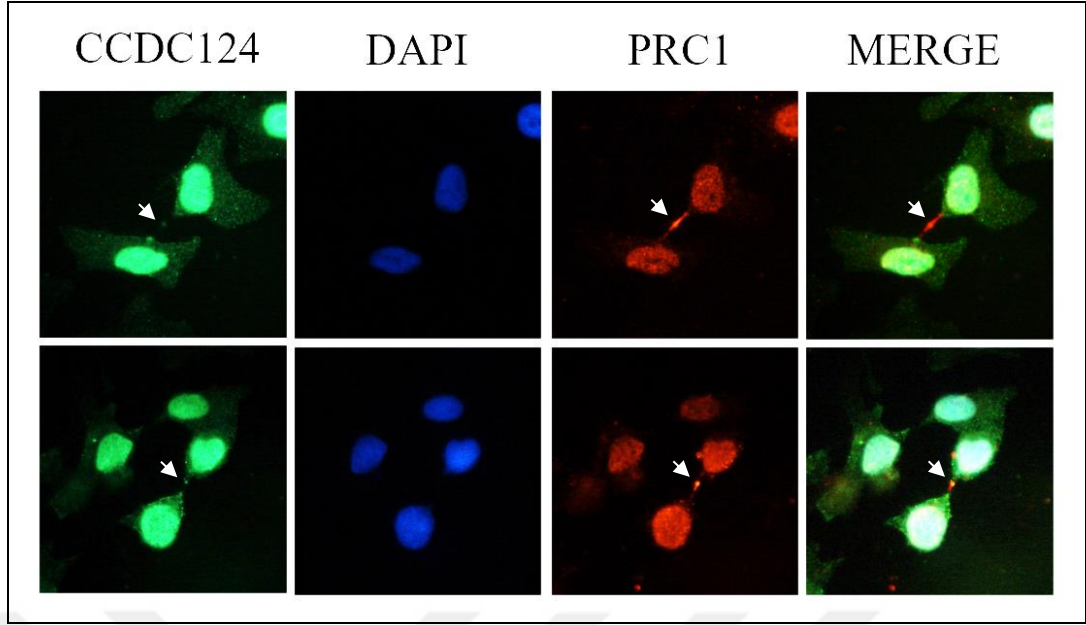
Şekil 4.13: CCDC124 (Mor) – PRC-1 (Yeşil) yapısal etkileşim modeli.



Şekil 4.14: TYR38 (CCDC124) – GLU108 (PRC-1) aminoasit etkileşim modeli.



Şekil 4.15: LYS29 (CCDC124) – SER146 (PRC1) ve ASP115 (CCDC124) – GLU75 (PRC1) aminoasit etkileşim modelleri.

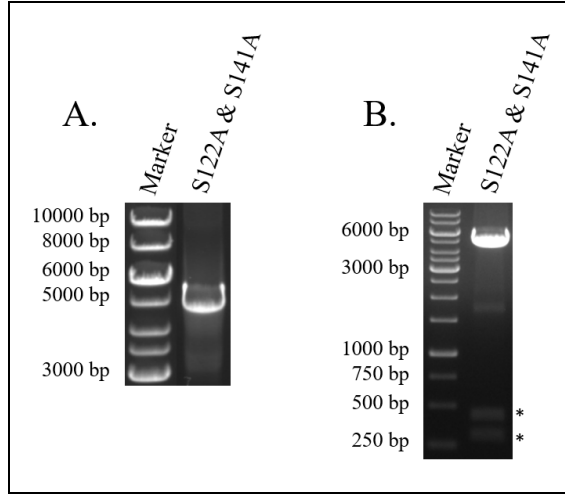


Şekil 4.16: CCDC124 – PRC1 etkileşimi immünboyama görüntüsü.

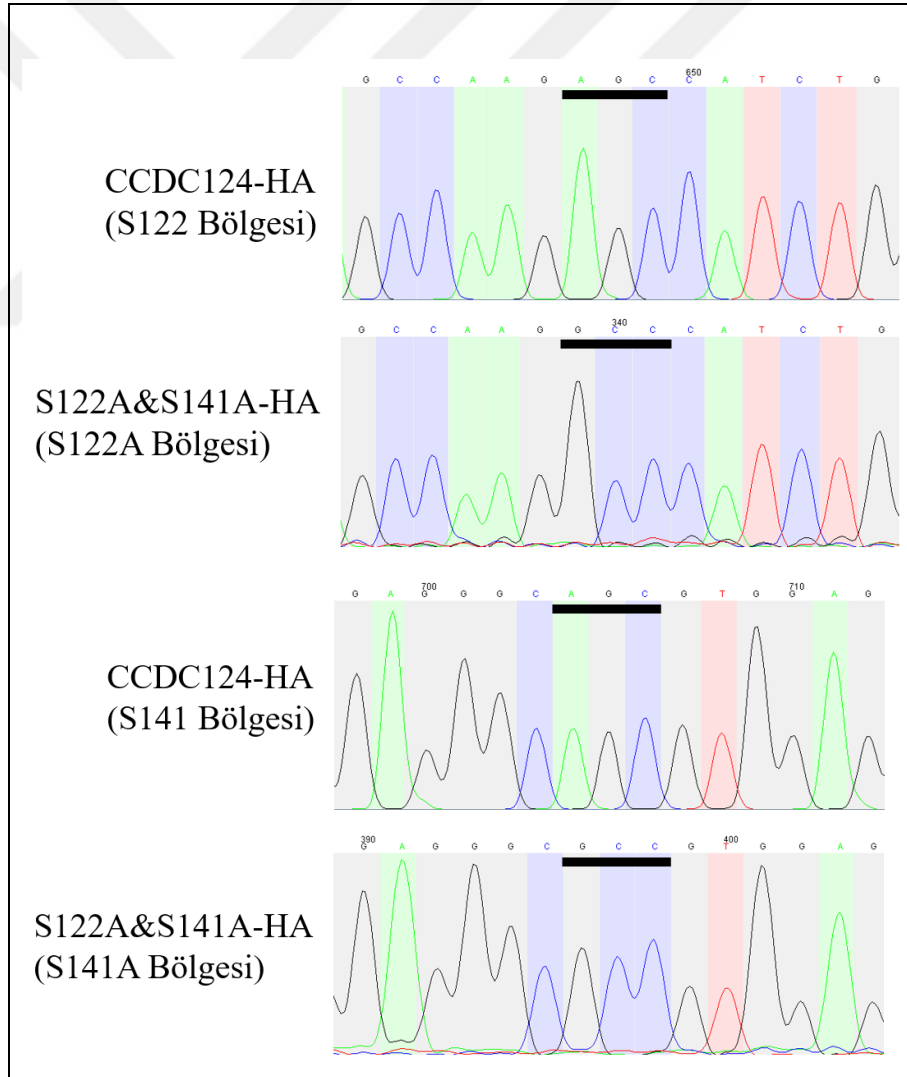
4.2. Yönlendirilmiş Mutagenез Sonuçları

4.2.1. S122A, S141A ve S122A&S141A-HA Mutantları

Metot kısmında belirtilen PCR miktarları ve şartları uygulanarak S122A-HA plazmidi kalıp olarak kullanılıp ilgili mutasyon primerleri (S141A_Frw, S141A_Rev) ile plazmid amplifiye edilerek agaroz jel elektroforezinde amplifikasyon durumu gözlemlenmiştir (Şekil 4.17A). Ardından metil grubu barındıran GATC motifini kesen DpnI enzimi ile mutasyonsuz kalıp DNA parçalanmıştır. İki ucu da küt olan mutasyonlu DNA'nın kendi üzerine kapanması için ligasyon yapılmıştır. Daha sonra transformasyonu yapılan örneklerden plazmid DNA izolasyonu yapıp AflII-ApaI enzimleri ile bölge kontrol kesimi (*Ccdc124* gen bölgesi) yapılmıştır (Şekil 4.17B). Kontrol kesiminde doğru büyüklükteki kesim bantlarını veren örnek IONTEK firması (İstanbul,Türkiye) tarafından dizilenerek mutasyon bölgesi teyit edilmiştir (Şekil 4.18).

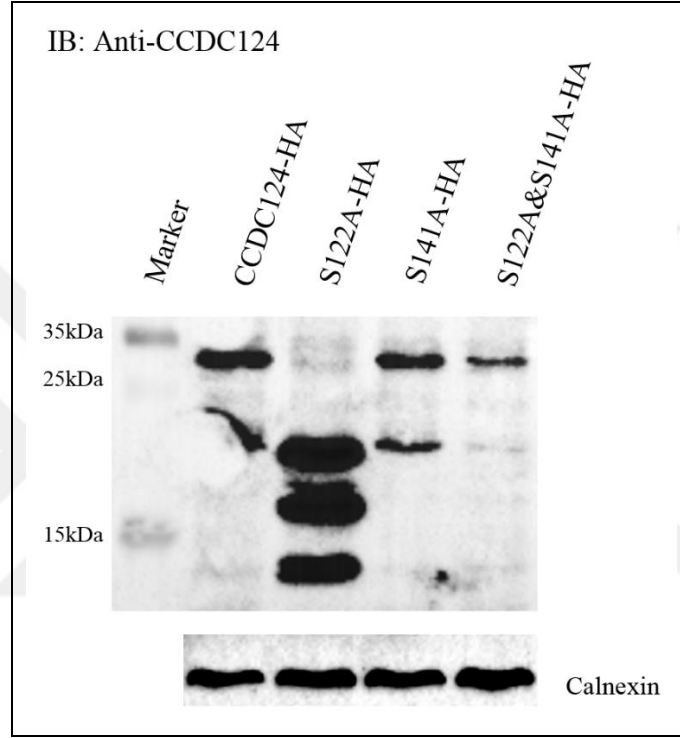


Şekil 4.17: S122A-HA plazmidinde yönlendirilmiş mutagenез ile S122A & S141A mutasyonlarının yapımı.



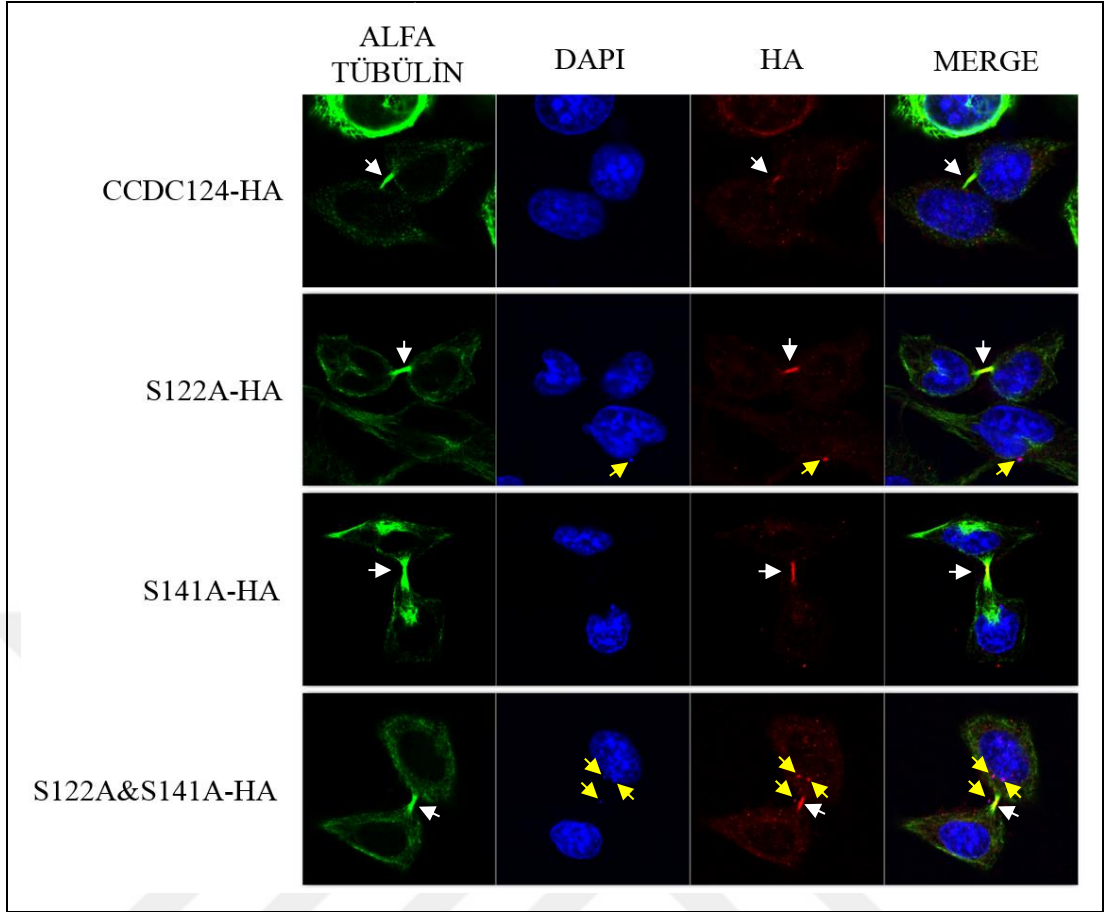
Şekil 4.18: S122A&S141A-HA mutasyon bölgesi kromatogramı.

Hazırlanan S122A&S141A-HA mutasyon vektörü, tekil mutasyonlarla (S122A-HA ve S141A-HA) birlikte HEK293T hücrelerine transfekte edilerek elde edilen lizatlarla her bir örnek için 40µg toplam protein olacak şekilde immünblot deneyi gerçekleştirilmiştir. CCDC124-HA, S141A-HA ve S122A&S141A-HA vektörleri benzer bant profillerini gösterirken, S122A-HA vektörü önceki çalışmalarda da [1] teyit edildiği üzere degrade bant profili sergilemektedir (Şekil 4.19).



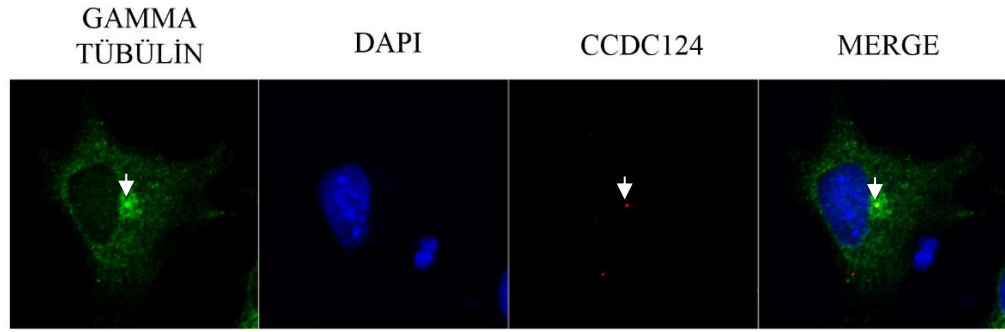
Şekil 4.19: CCDC124-HA S122A, S141A ve S122A&S141A mutantlarının immünoblot görüntüsü.

Hazırlanan S122A-HA, S141A-HA ve S122A&S141A-HA mutasyon vektörleri HeLa hücrelerine transfekte edilerek HA-antikoru ile immünboyama deneyi gerçekleştirilmiştir. Hem mutantlar, hem de kontrol vektörü olan CCDC124-HA hücreler arası köprüde yoğun ifade göstererek orta-cisimcik lokalizasyonunun bozulmadığını ortaya koymuştur (Şekil 4.20) (Beyaz oklar). Fakat bütün mutantların sentrozom lokalizasyonunun bozulduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.21) (Beyaz oklar). Ayrıca, ağırlıklı olarak S122A-HA ve S122A&S141A-HA mutantlarında nükleik asit-CCDC124 etkileşimi gözlemlenmiştir (Şekil 4.20) (A. CCDC124-GAMMA TÜBÜLİN, B. Mutantlar; pMEX-HA: Boş –HA vektör kontroldür) (Sarı oklar).

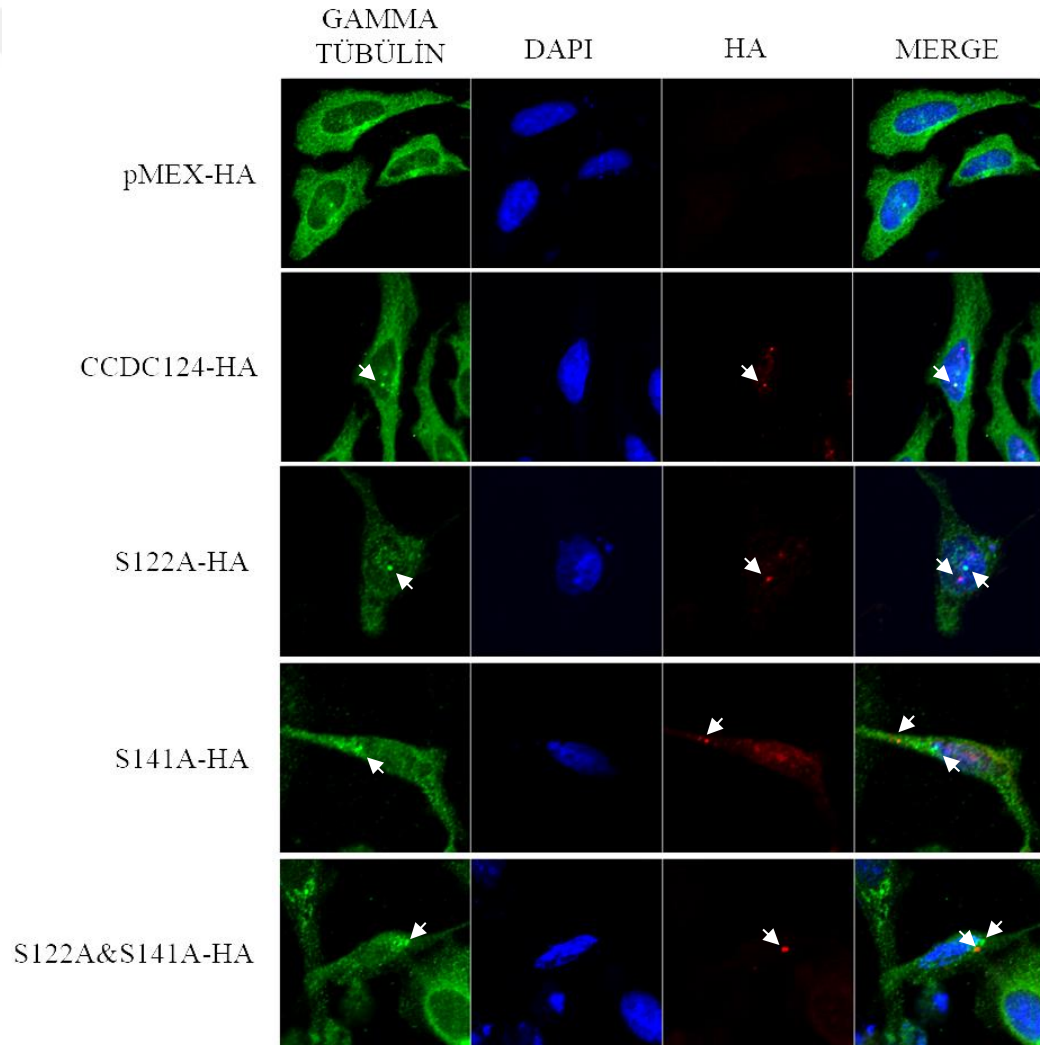


Şekil 4.20: S122A-HA, S141A-HA ve S122A&S141A-HA mutantlarının immünboyama görüntüsü (Alfa-Tübülün).

A.



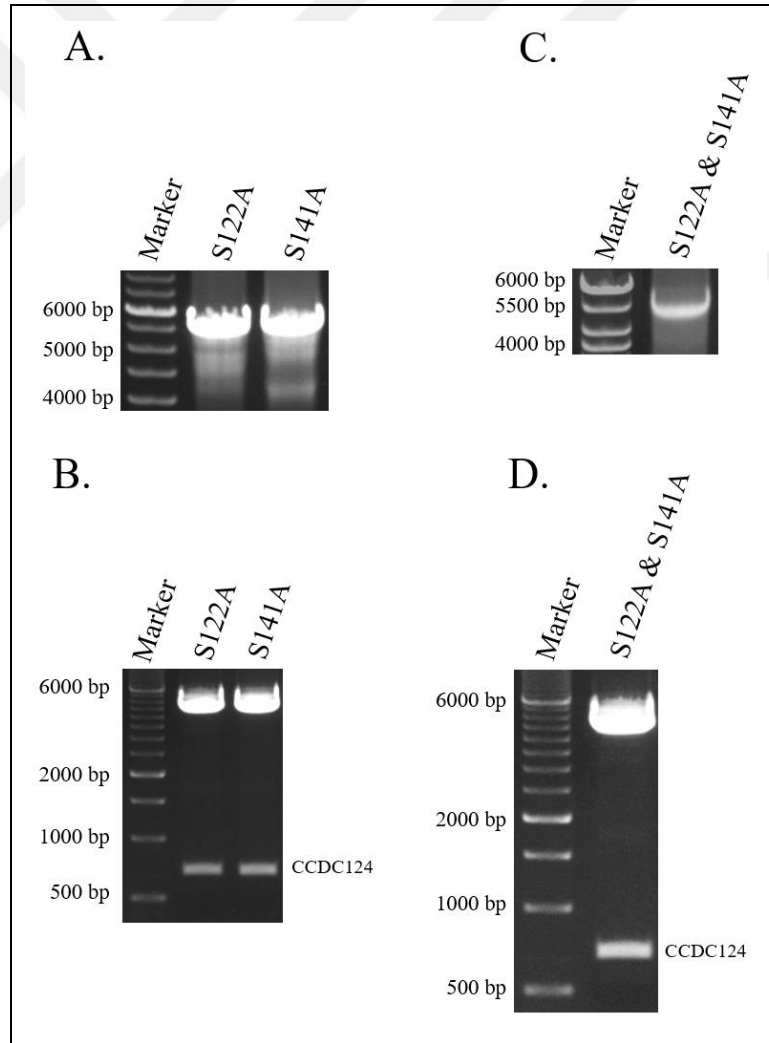
B.



Şekil 4.21: S122A-HA, S141A-HA ve S122A&S141A-HA mutantlarının immünboyama görüntüsü (Gamma-Tübülün).

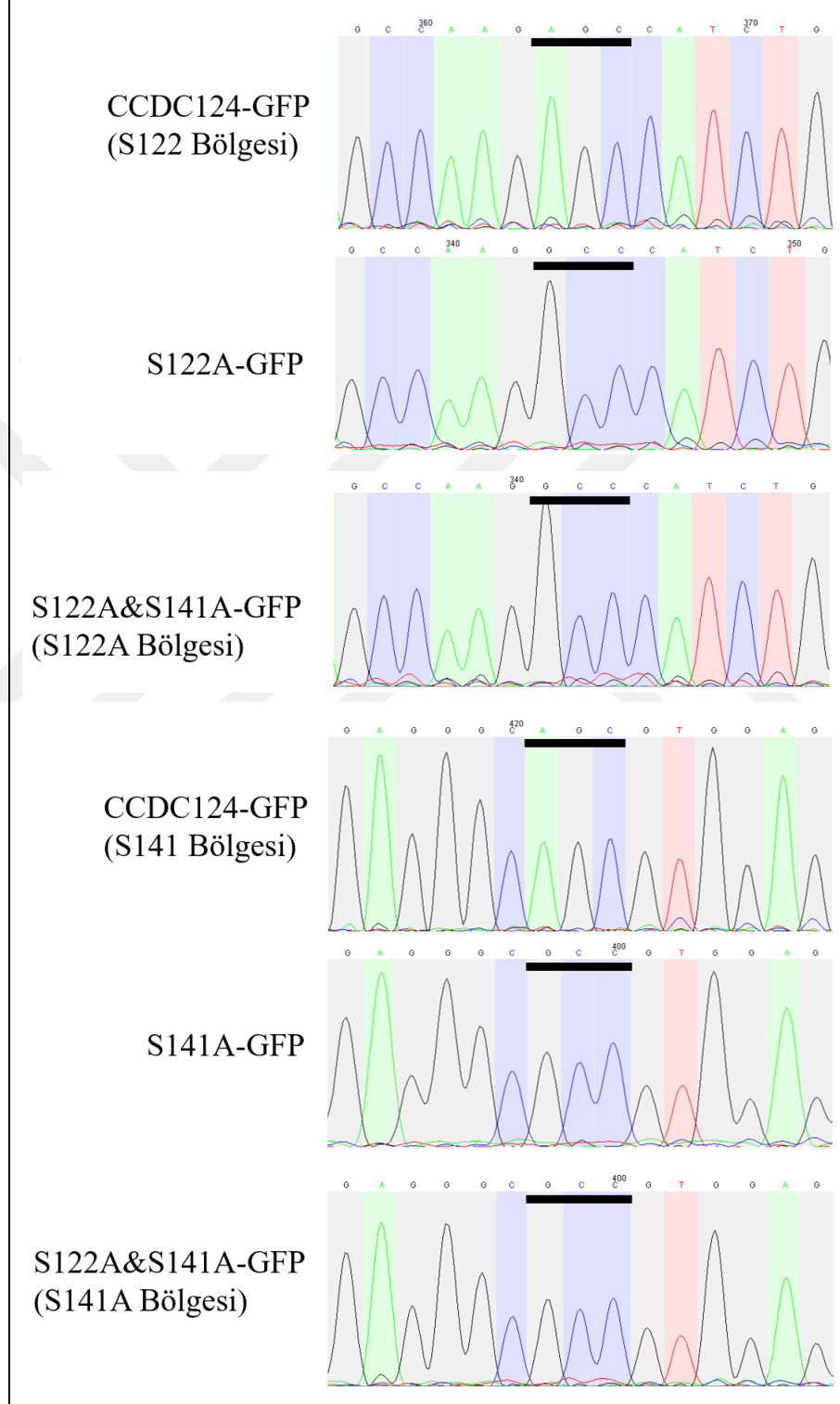
4.2.2. S122A, S141A ve S122A&S141A-GFP Mutantları

Metot kısmında belirtilen PCR miktarları ve şartları uygulanarak CCDC124-GFP plazmid kalıp olarak kullanılıp ilgili mutasyon primerleri (S122A_Frw, S122A_Rev, S141A_Frw, S141A_Rev) ile plazmid amplifiye edilerek agaroz jel elektroforezinde amplifikasyon durumu gözlemlenmiştir. S122A&S141A-GFP mutanlığı için S122A-GFP vektörü kalıp olarak kullanılmıştır (Şekil 4.22A), (Şekil 4.22C). Ardından DpnI enzimi ile mutasyonsuz kalıp DNA parçalanmıştır. İki ucu da küt olan mutasyonlu DNA'nın kendi üzerine kapanması için ligasyon yapılmıştır. Daha sonra transformasyonu yapılan örneklerden plazmid DNA izolasyonu yapıp EcoRI-BamHI enzimleri ile bölge kontrol kesimi (*Ccdc124* gen bölgesi) yapılmıştır (Şekil 4.22B), (Şekil 4.22D).



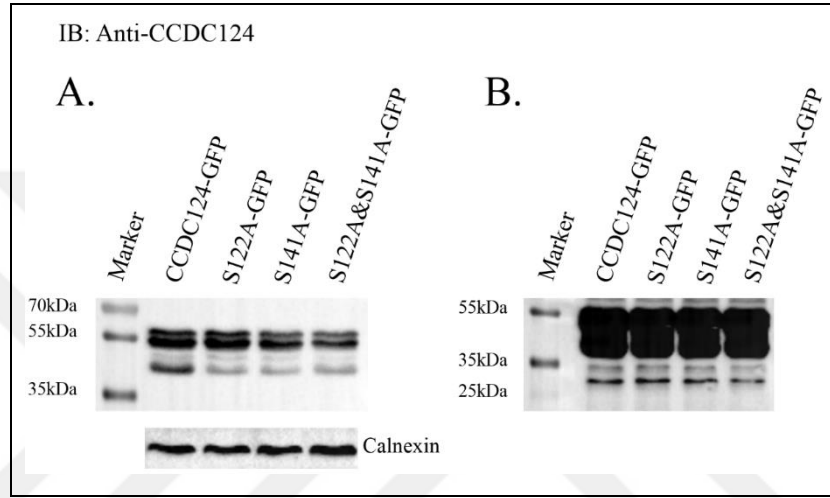
Şekil 4.22: CCDC124-GFP plazmidinde yönlendirilmiş mutagenез ile S122A, S141A ve S122A&S141A mutasyonlarının yapımı.

Kontrol kesiminde doğru büyüklükteki kesim bantlarını veren örnek IONTEK firması (İstanbul,Türkiye) tarafından dizilenerek mutasyon bölgesi teyit edilmiştir (Şekil 4.23).



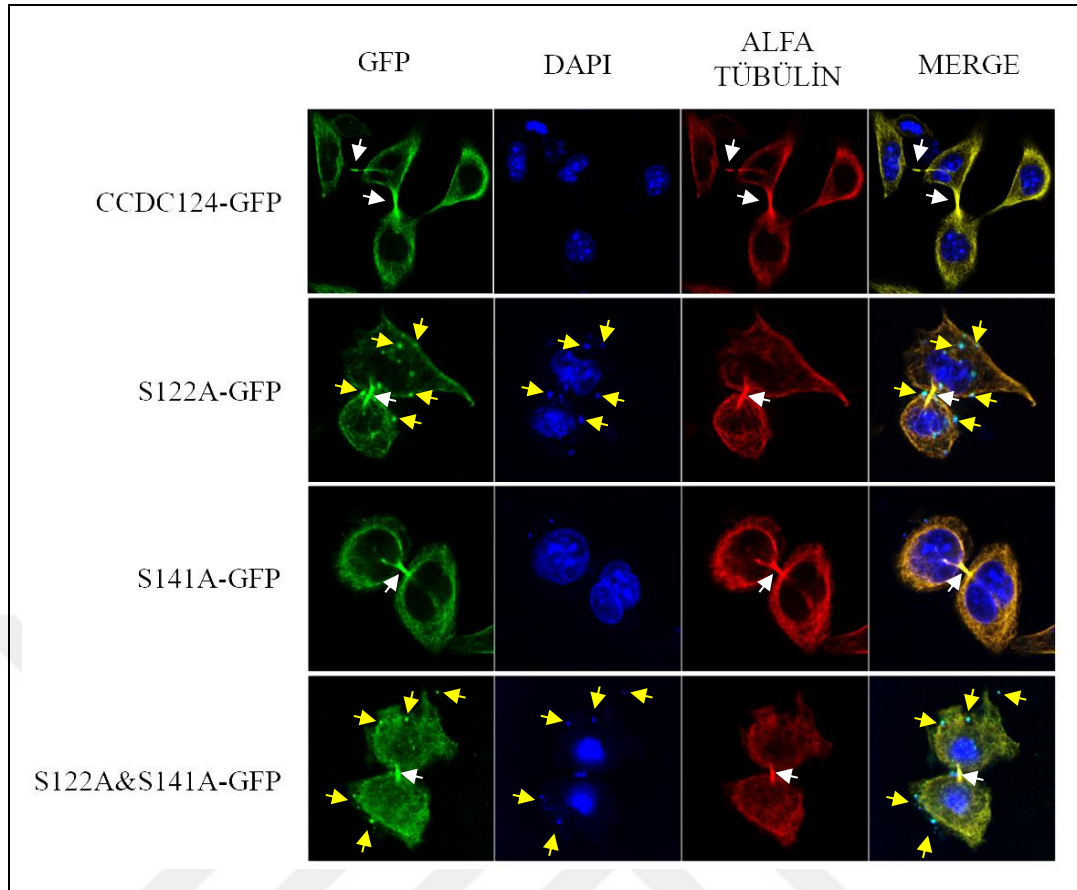
Şekil 4.23: CCDC124-GFP S122A, S141A ve S122A&S141A mutasyon bölgesi kromatogramları.

Hazırlanan S122A-GFP, S141A-GFP ve S122A&S141A-GFP mutasyon vektörleri HEK293T hücrelerine transfekte edilerek elde edilen lizatlarla her bir örnek için 40µg toplam protein olacak şekilde immünblot deneyi gerçekleştirilmiştir. Hem mutantlar, hem de kontrol vektörü olan CCDC124-GFP, beklenen bant profili olan ~59 kDa (~32 kDa CCDC124 + ~27 kDa GFP) bantına ek olarak daha küçük moleküler ağırlıkta 5 farklı bant profili daha sergilemektedirler (Şekil 4.24) (**A.** Düşük pozlama süresi uygulandığında, **B.** Yüksek pozlama süresi uygulandığında).



Şekil 4.24: CCDC124-GFP S122A, S141A ve S122A&S141A mutantlarının immünoblot görüntüsü.

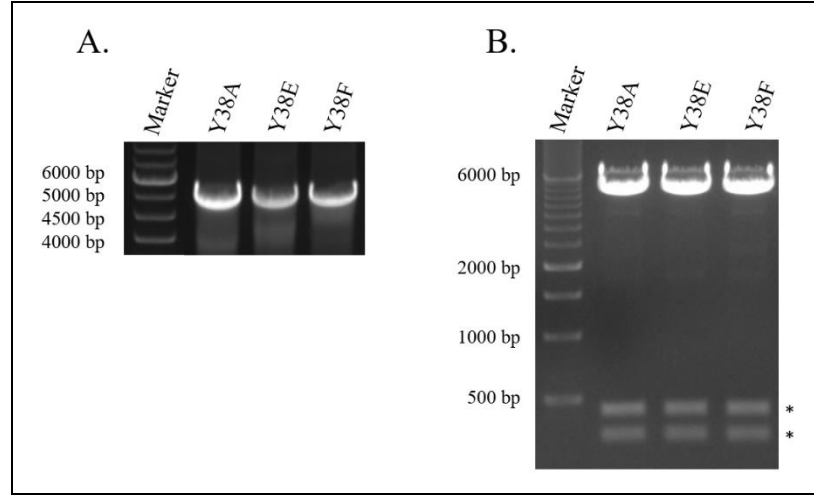
Hazırlanan S122A-GFP, S141A-GFP ve S122A&S141A-GFP mutasyon vektörleri HeLa hücrelerine transfekte edilerek immünboyama deneyi gerçekleştirilmiştir. Hem mutantlar, hem de kontrol vektörü olan CCDC124-GFP hücreler arası köprüde yoğun ifade göstererek orta-cisimcik lokalizasyonunun bozulmadığını ortaya koymuştur (Beyaz oklar). Ayrıca, Şekil 4.20’de görülen S122A-HA ve S122A&S141A-HA mutantlarındaki nükleik asit-CCDC124 etkileşimi, S122A-GFP ve S122A&S141A-GFP mutantlarında daha belirgin bir şekilde gözlemlenmiştir (Şekil 4.25) (Sarı oklar).



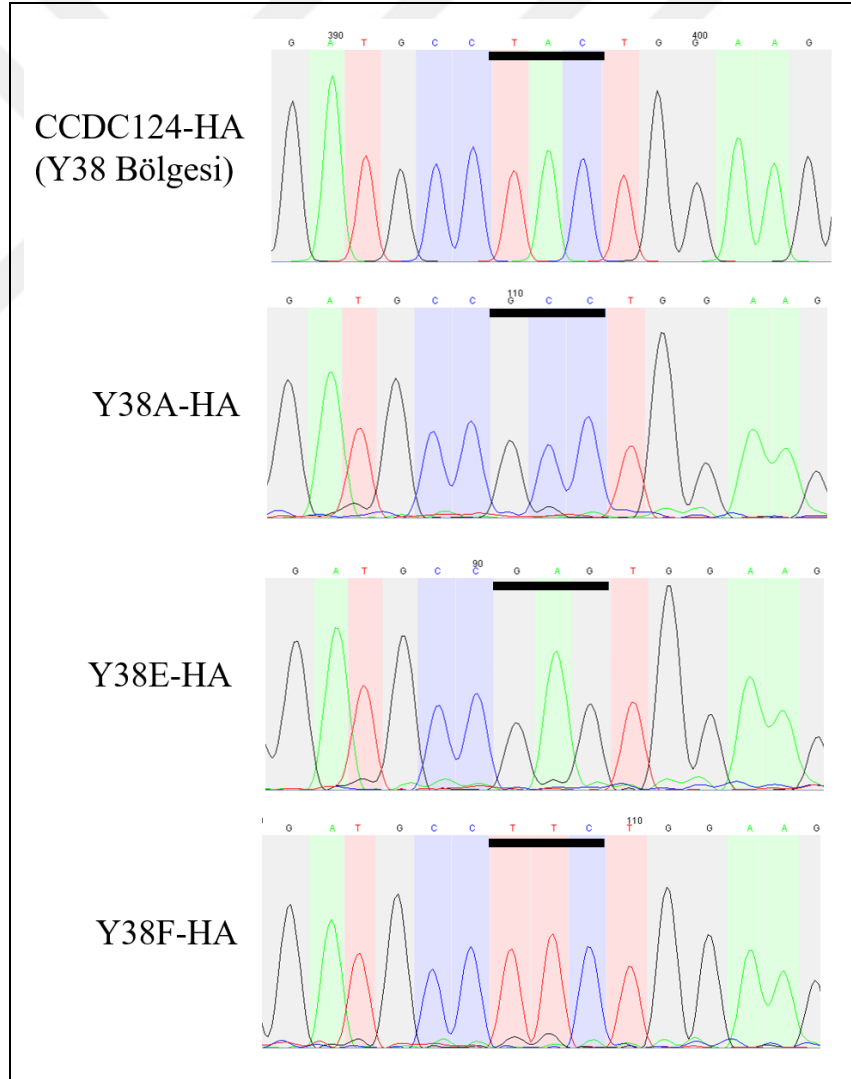
Şekil 4.25: CCDC124-GFP S122A, S141A ve S122A&S141A mutantlarının immünboyama görüntüsü.

4.2.3. Y38A, Y38E ve Y38F-HA Mutantları

Metot kısmında belirtilen PCR miktarları ve şartları uygulanarak CCDC124-HA plazmidi kalıp olarak kullanılıp ilgili mutasyon primerleri (Y38A_Frw, Y38A_Rev, Y38E_Frw, Y38E_Rev, Y38F_Frw, Y38F_Rev) ile plazmid amplifiye edilerek agaroz jel elektroforezinde amplifikasyon durumu gözlemlenmiştir (Şekil 4.26A). Ardından DpnI enzimi ile mutasyonsuz kalıp DNA parçalanmıştır. İki ucu da küt olan mutasyonlu DNA'nın kendi üzerine kapanması için ligasyon yapılmıştır. Daha sonra transformasyonu yapılan örneklerden plazmid DNA izolasyonu yapıp AflII-ApaI enzimleri ile bölge kontrol kesimi (*Ccdc124* gen bölgesi) yapılmıştır (Şekil 4.26B). Kontrol kesiminde doğru büyüklükteki kesim bantlarını veren örnek IONTEK firması (İstanbul,Türkiye) tarafından dizilenerek mutasyon bölgesi teyit edilmiştir (Şekil 4.27).

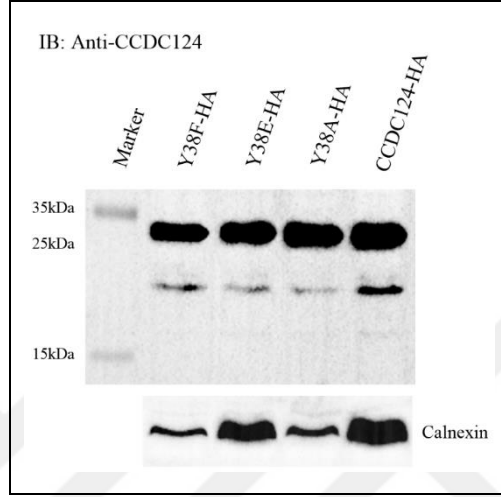


Şekil 4.26: CCDC124-HA plazmidinde yönlendirilmiş mutagenез ile Y38A-E-F mutasyonlarının yapımı.

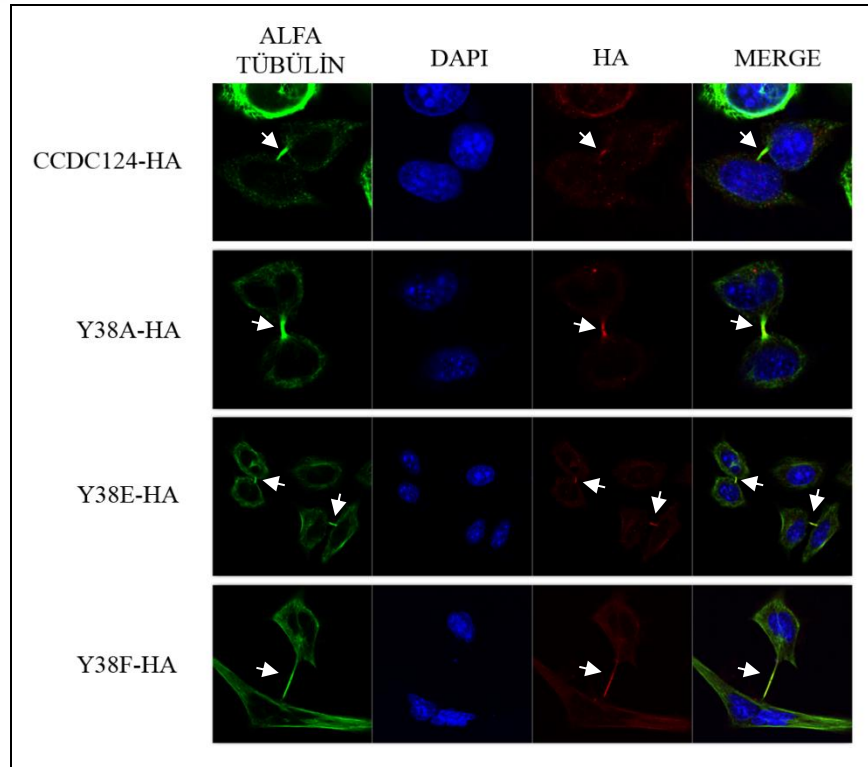


Şekil 4.27: CCDC124-HA Y38A, Y38E ve Y38F mutasyon bölgesi kromatogramları.

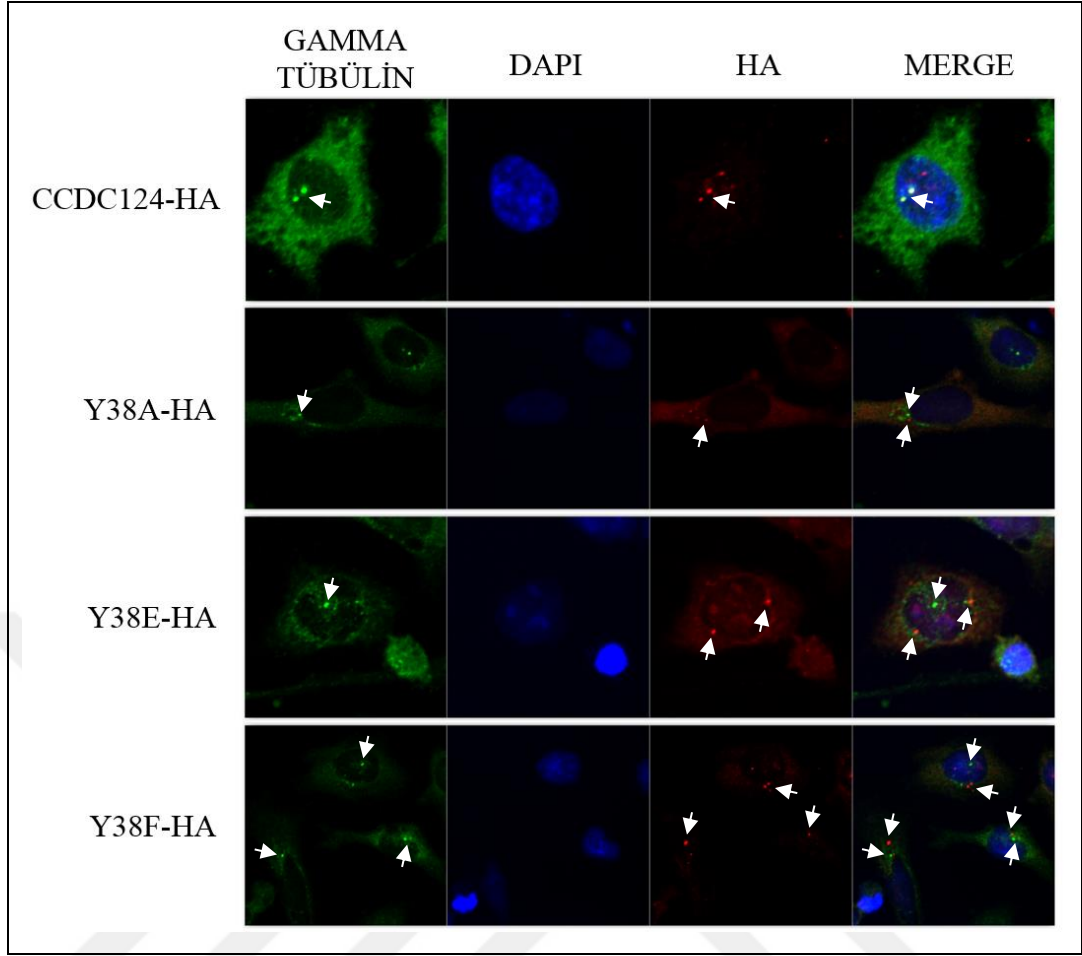
Hazırlanan Y38A-HA, Y38E-HA v e Y38F-HA mutasyon vektörleri HEK293T hücrelerine transfekte edilerek elde edilen lizatlarla her bir örnek için 40µg toplam protein olacak şekilde immünblot deneyi gerçekleştirilmiştir. Hem mutantlar, hem de kontrol vektörü olan CCDC124-HA benzer bant profillerini sergilemektedir (Şekil 4.28).



Şekil 4.28: CCDC124-HA Y38A, Y38E ve Y38F mutantlarının immünoblot görüntüsü.



Şekil 4.29: CCDC124-HA Y38A, Y38E ve Y38F mutantlarının immünboyama görüntüsü (Alfa-Tübülün).



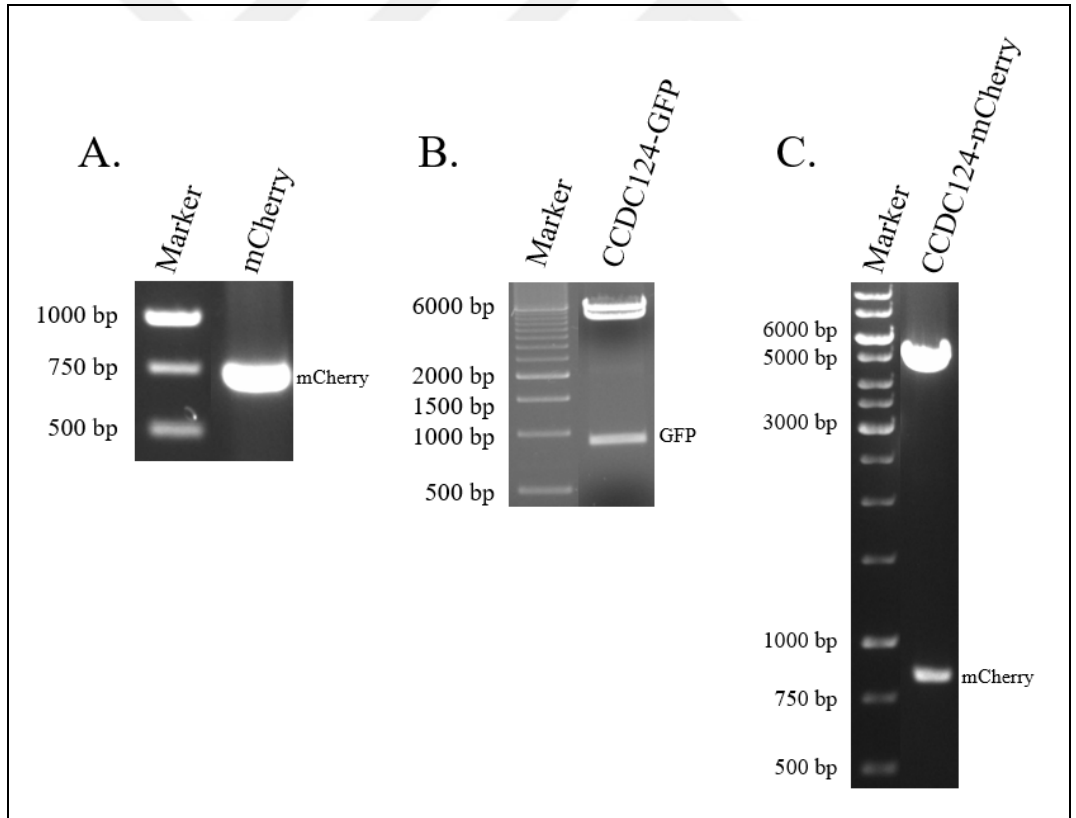
Şekil 4.30: CCDC124-HA Y38A, Y38E ve Y38F mutantlarının immünboyama görüntüsü (Gamma-Tübülün).

Hazırlanan Y38A-HA, Y38E-HA ve Y38F-HA mutasyon vektörleri HeLa hücrelerine transfekte edilerek HA-antikoru ile immünboyama deneyi gerçekleştirilmiştir. Hem mutantlar, hem de kontrol vektörü olan CCDC124-HA hücreler arası köprüde yoğun ifade göstererek orta-cisimcik lokalizasyonunun bozulmadığını ortaya koymuştur (Şekil 4.29) (Beyaz oklar). Fakat bütün mutantların sentrozom lokalizasyonunun bozulduğu gözlemlenmiştir. (Şekil 4.30) (Beyaz oklar).

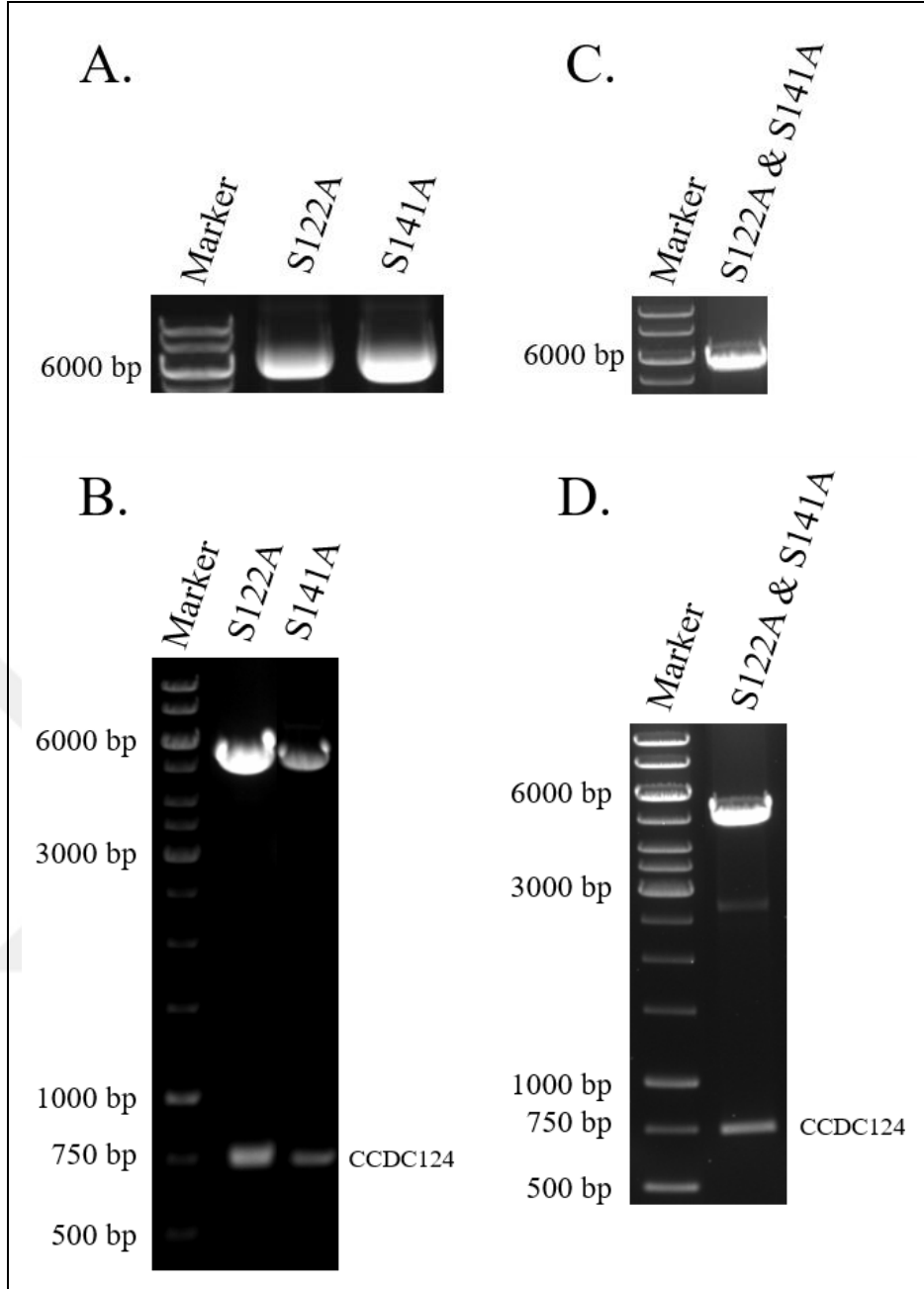
4.2.4. CCDC124-mCherry Hazırlanışı ve Mutantları

Öncelikle CCDC124-mCherry plazmidini hazırlamaya yönelik klonlama gerçekleştirilmiştir. pmCherry-C1 plazmidinden *mCherry* gen bölgesi ilgili primerler ile (mCherry_Frw, mCherry_Rev) amplifiye edilmiştir (Şekil 4.31A). Ardından CCDC124-GFP plazmidindeki *GFP* bölgesi BamHI-HpaI enzimleri ile kesilerek çıkarılmış (Şekil 4.31B) ve amplifiye edilen *mCherry* gen bölgesi vektöre

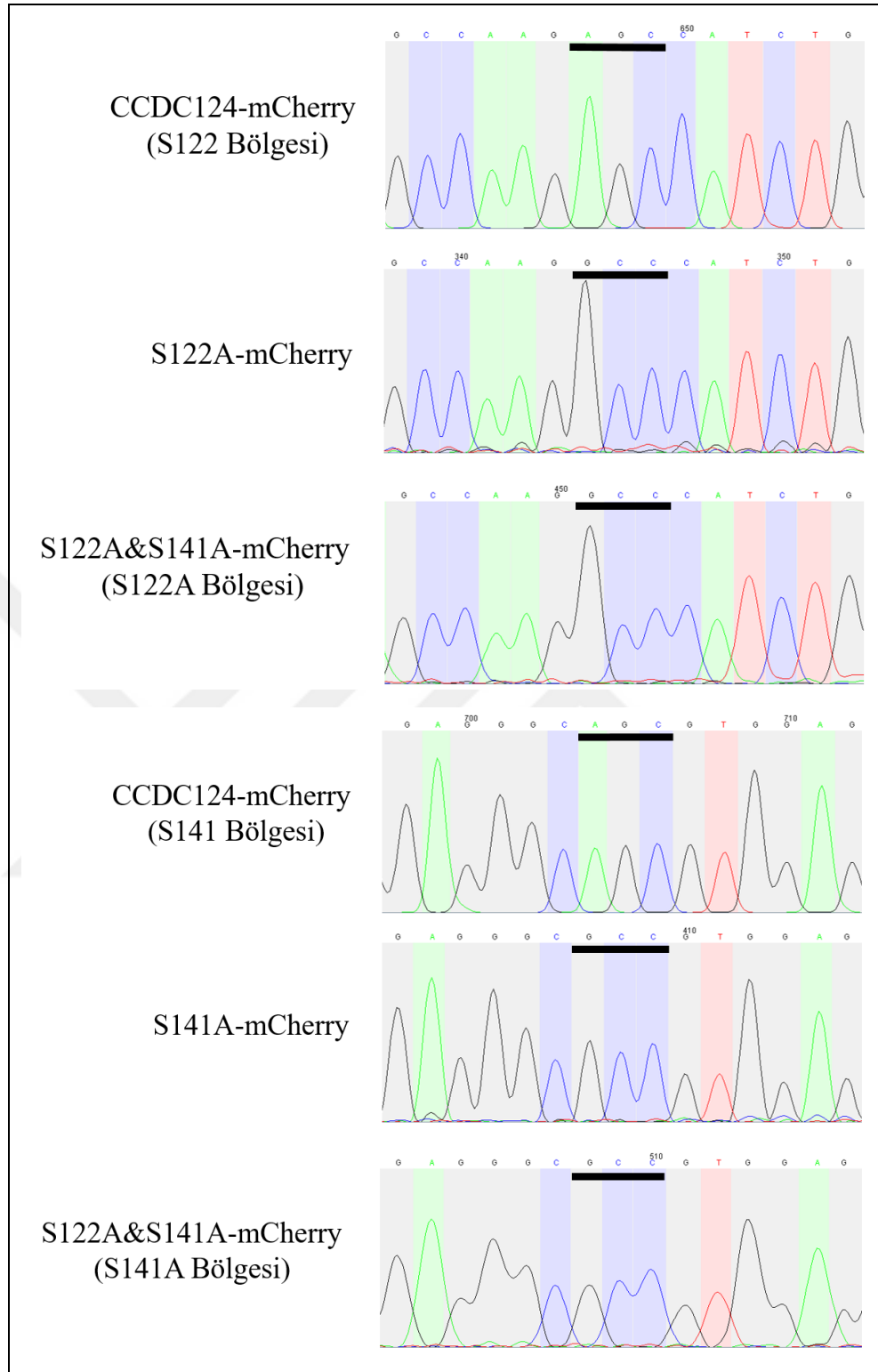
klonlanmıştır. Klonlama sonrası vektördeki *mCherry* gen bölgesinin varlığı BamHI-HpaI enzim kesimi ile teyit edilmiştir (Şekil 4.31C). Ardından mutasyonlar için Metot kısmında belirtilen PCR miktarları ve şartları uygulanarak CCDC124-mCherry plazmid kalıp olarak kullanılıp ilgili mutasyon primerleri (S122A_Frw, S122A_Rev, S141A_Frw, S141A_Rev) ile plazmid amplifiye edilerek agaroz jel elektroforezinde amplifikasyon durumu gözlemlenmiştir (Şekil 4.32A), (Şekil 4.32C). Ardından DpnI enzimi ile mutasyonsuz kalıp DNA parçalanmıştır. İki ucu da küt olan mutasyonlu DNA'nın kendi üzerine kapanması için ligasyon yapılmıştır. Daha sonra transformasyonu yapılan örneklerden plazmid DNA izolasyonu yapıp EcoRI-BamHI enzimleri ile bölge kontrol kesimi (*Ccdc124* gen bölgesi) yapılmıştır (Şekil 4.32B), (Şekil 4.32D). Kontrol kesiminde doğru büyüklükteki kesim bantlarını veren örnekler IONTEK firması (İstanbul,Türkiye) tarafından dizilenerek mutasyon bölgeleri teyit edilmiştir (Şekil 4.33).



Şekil 4.31: CCDC124-mCherry plazmid hazırlanışı.



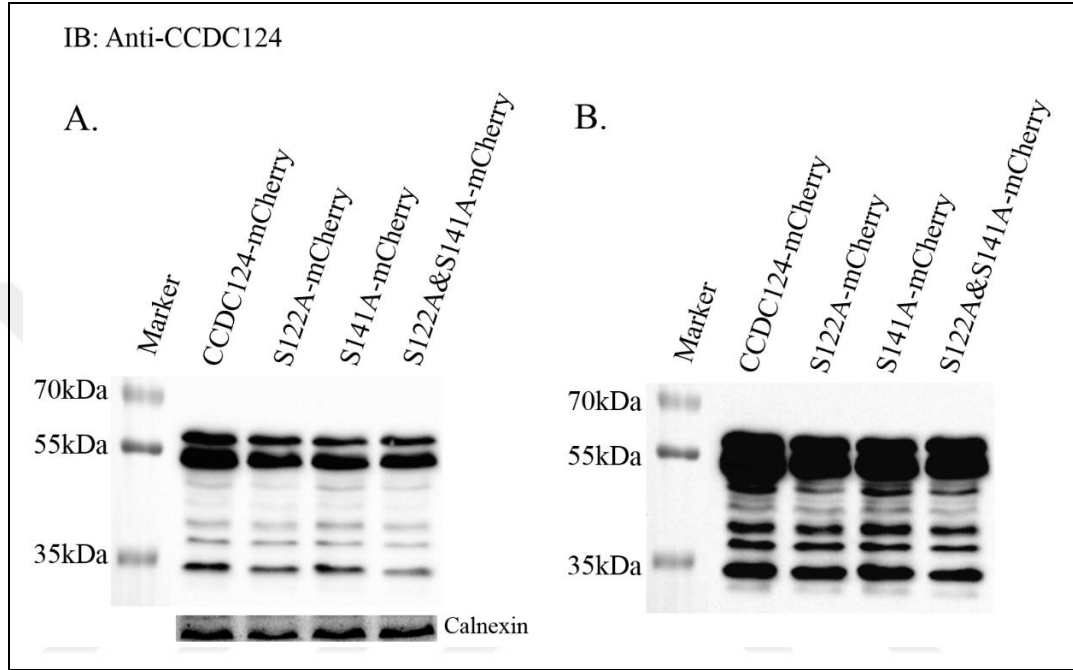
Şekil 4.32: CCDC124-mCherry plazmidinde yönlendirilmiş mutagenез ile S122A, S141A ve S122A&S141A mutasyonlarının yapımı.



Şekil 4.33: CCDC124-mCherry S122A, S141A ve S122A&S141A mutasyon bölgesi kromatogramları.

Hazırlanan CCDC124-mCherry, S122A-mCherry, S141A-mCherry ve S122A&S141A-mCherry mutasyon vektörleri HEK293T hücrelerine transfeke edilerek elde edilen lizatlarla her bir örnek için 40µg toplam protein olacak şekilde

immünblot deneyi gerçekleştirilmiştir. Hem mutantlar, hem de kontrol vektörü olarak kullanılan CCDC124-mCherry, beklenen bant profili olan ~61 kDa (~32 kDa CCDC124 + ~29 kDa mCherry) bantına ek olarak daha küçük moleküler ağırlıkta 6 farklı bant profili daha sergilemektedirler (Şekil 4.34) (A. Düşük pozlama süresi uygulandığında, B. Yüksek pozlama süresi uygulandığında).

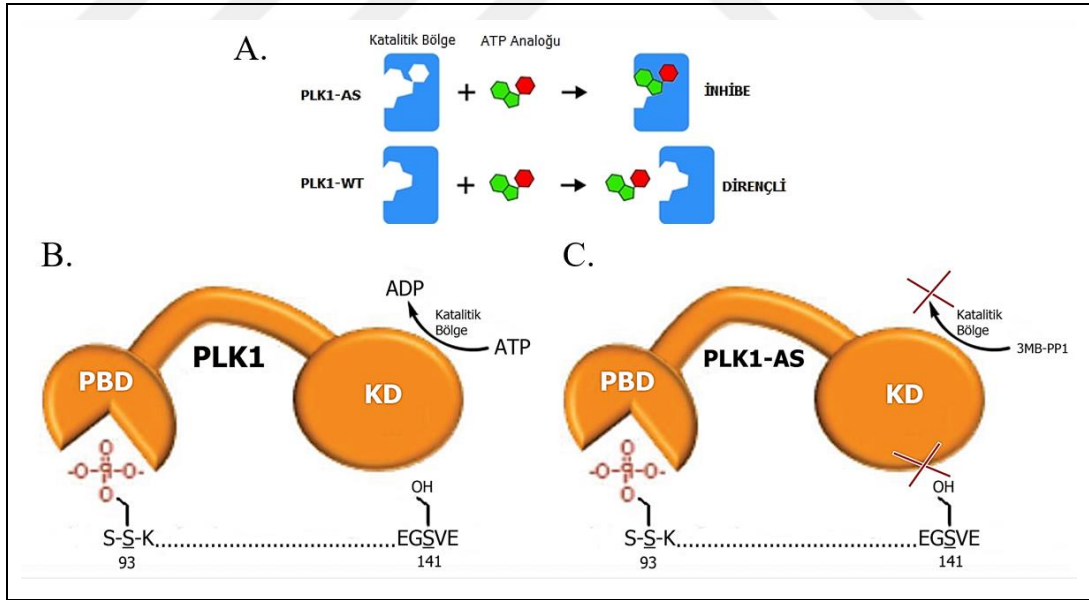


Şekil 4.34: CCDC124-mCherry S122A, S141A ve S122A&S141A mutantlarının immünblot görüntüsü.

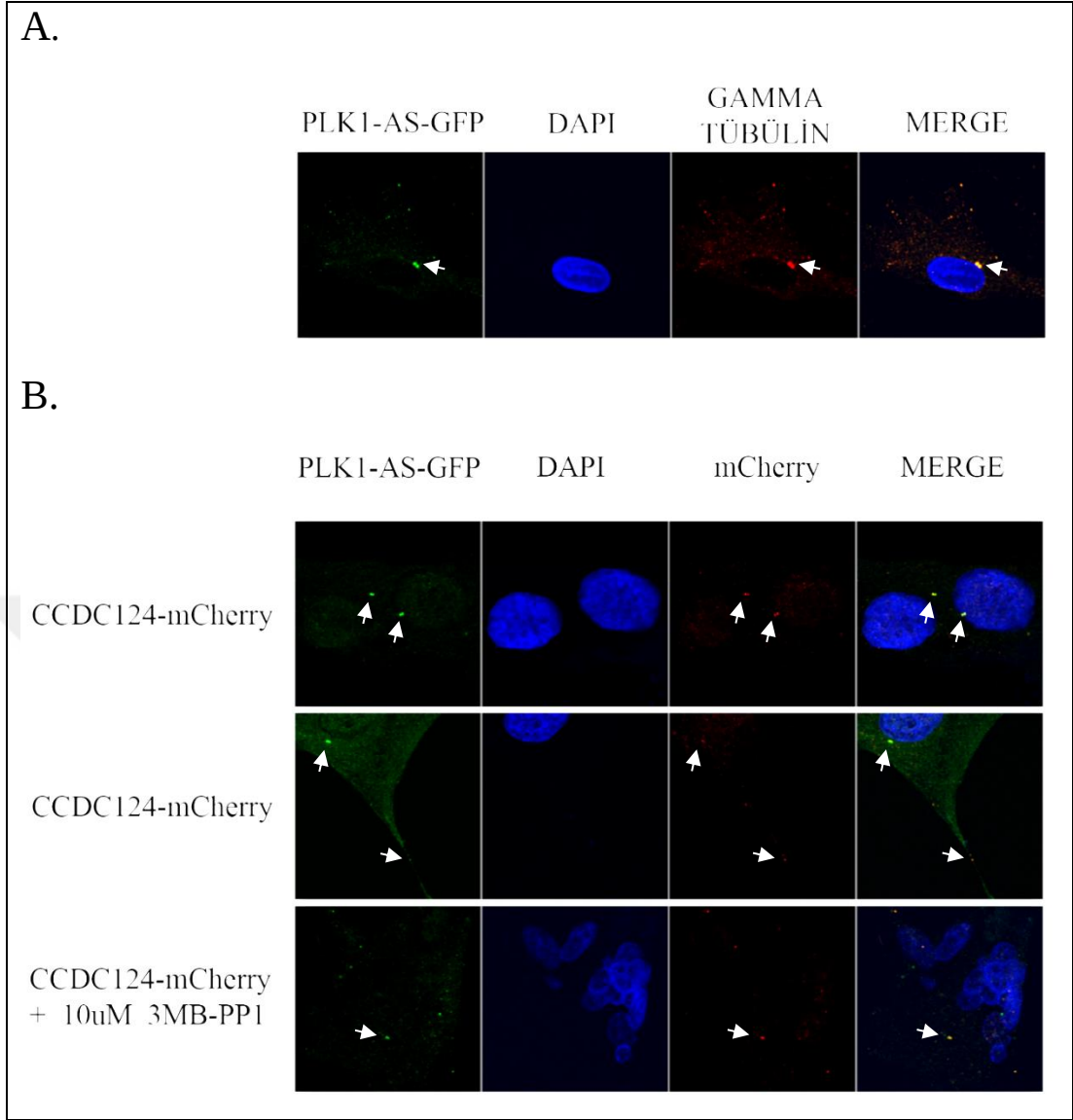
Analog-duyarlı enzim tasarımı, spesifik bir kinazın fonksiyonunu çalışmaya yönelik yapılan uygulamadır. Bu çalışmada kullanılan analog-duyarlı PLK1 proteini (PLK1^{as}), gen hedefleme ve transgenik komplementasyon teknikleri kullanılarak hTERT-RPE1 somatik hücre hattında *Plk1* geni hedeflenerek gerçekleştirilmiştir. *Plk1* geninin katalitik ATP bağlama bölgesinde yapılan aminoasit mutasyonları (C67V, L130G), proteine hem daha büyük ATP-analoglarını / Pürin-analoglarını hem de ATP'yi bağlayabilme özelliği kazandırmıştır (Şekil 4.35A). ATP varlığında normal vahşi tip PLK1 gibi çalışan protein, analog varlığında aktivitesini yitirmekte ve iğ ipliklerinin biraraya gelmesi engellenerek mitoz tutuklanmakta, ayrıca sentrozom olgunlaşmasında ve kromozom eşlenmesinde hatalara sebep olmaktadır. Anafaz sırasındaki akut inhibisyonu ise direk kesilme yarığı oluşumunun engellenmesi ile hücre bölünmesini engellemekte ve multinükleer hücre oluşumuna sebep olmaktadır. PLK1 hücre içerisinde substratlarına çok büyük oranda PBD bölgesi ile bağlanarak

etkileşim göstermekte ve KD bölgesinin substrat üzerinde gerçekleştireceği fosforilasyonun ilgili etkileşim motifinin bulunduğu bölgedeki serin veya treonin aminoasitlerini fosforilasyona uğrattığı bilinmektedir. CCDC124'ün, PLK1'in PBD ve KD bölgelerinin etkileşebileceği potansiyel bölgeler göz önüne alınarak ATP (Şekil 4.35B) veya ATP analogu 3MB-PP1 (Şekil 4.35C) varlığında gerçekleştirebileceği etkileşim modeli şematize edilmiştir.

Hem normal ATP'yi hem de ATP analoglarını (örn. 3MB-PP1) bağlayabilmesi için hTERT-RPE1 hücrelerinde PLK1'in ATP bağlayıcı katalitik cebinde yapılan mutasyon [48] (Şekil 4.35), ne sentrozom (Şekil 4.36A) ne de orta-cisimcik (Şekil 4.36B) lokalizasyonunu etkilememektedir (Beyaz oklar). Hazırladığımız CCDC124-mcherry vektörü de PLK1as hücrelerine transfekte edildiğinde hem sentrozom hem de orta-cisimcikteki birlikte lokalizasyonları gözlemlenmektedir. Spesifik PLK1 inhibitörü olan ATP analogu 3MB-PP1, CCDC124-mCherry transfekte hücelere 10µM dozda ve 48 saat uygulandığında multinükleer hücreler görülmekle birlikte CCDC124'ün sentrozomdaki PLK1 etkileşimi bozulmamaktadır (Şekil 4.36B) (Beyaz oklar).



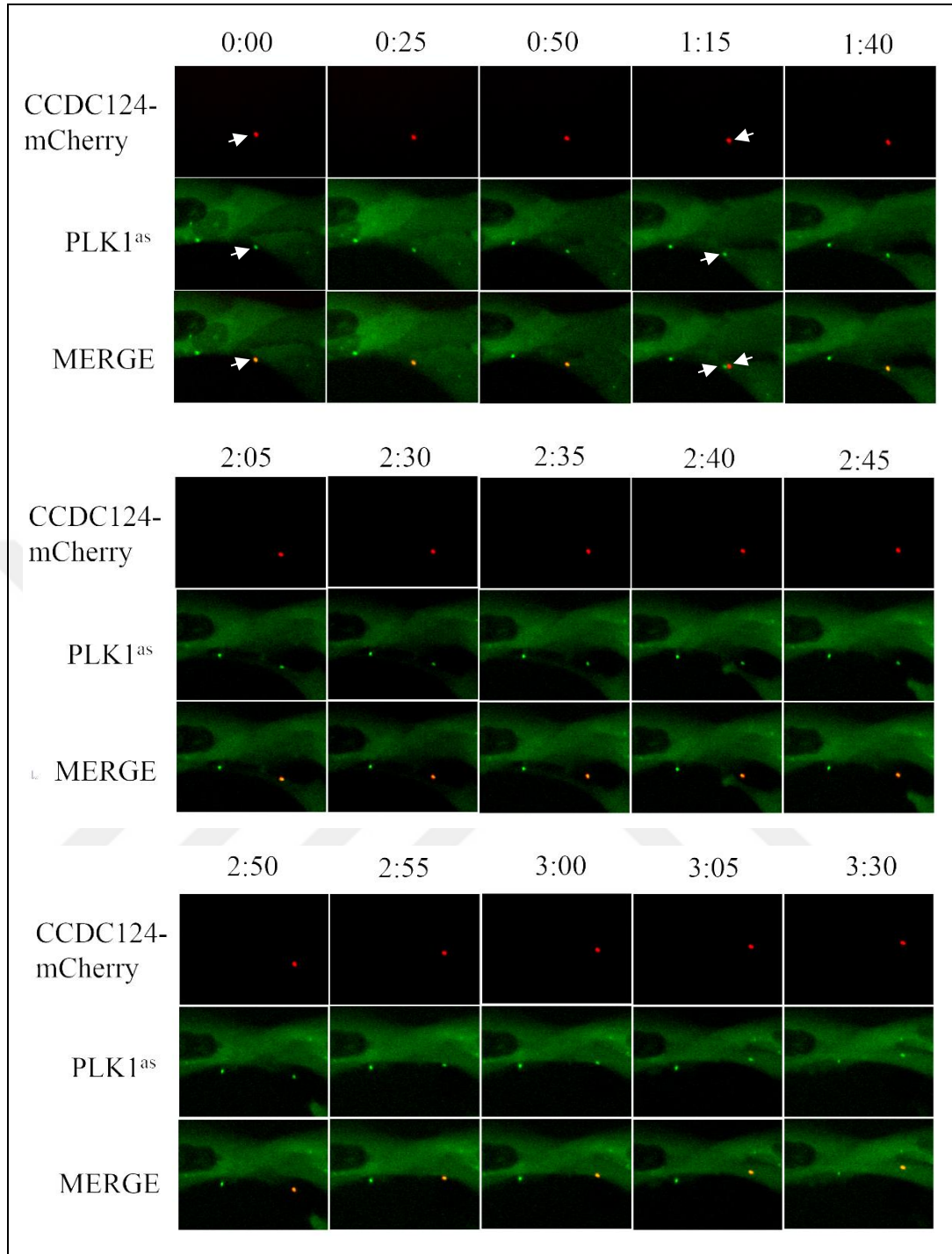
Şekil 4.35: Kimyasal genetik ile PLK1'in analog-duyarlı kontrolü.



Şekil 4.36. CCDC124-mCherry ve PLK1^{as} immünboyama görüntüsü.

4.2.4.1. CCDC124-mCherry-PLK1^{as} Canlı Hücre Görüntüleme

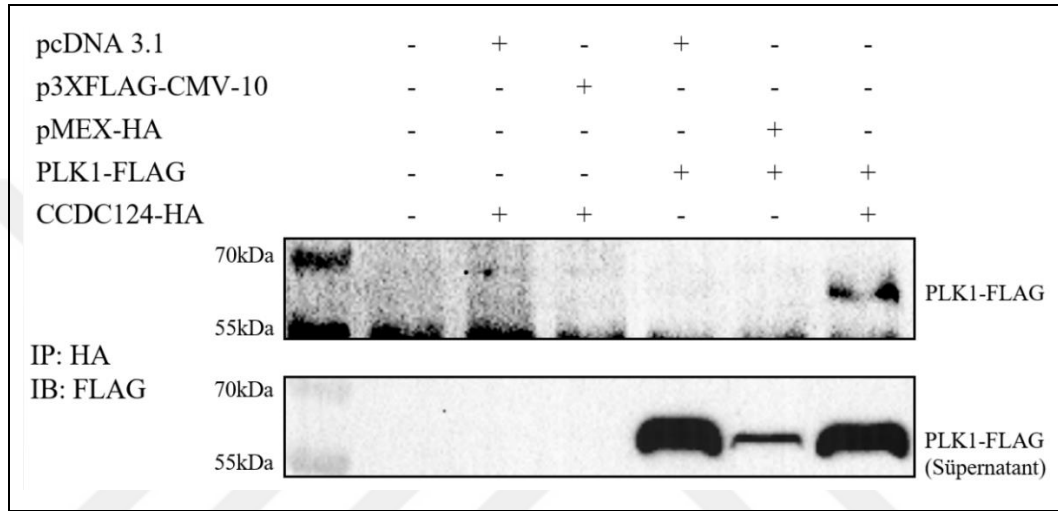
Genellikle çoğu enzim-substrat ilişkisi, özellikle translasyon sonrası modifikasyonlar göz önüne alındığında kısa süreli etkileşimlerle gerçekleşmektedir. Bu sebeple enzim ve substratın canlı hücre görüntüleme çalışmalarında genellikle proteinler dinamik bir şekilde etkileşip ayrılmaktadırlar. Gerçekleştirdiğimiz canlı hücre görüntüleme deneyinde mCherry işaretli CCDC124, GFP işaretli PLK1 ile dinamik etkileşim göstermektedir. Görüntülemeye 75.dk (1:15) görüntüsü etkileşimin koptuğunu, 100.dk (1:40) ise tekrar etkileşimin başladığını teyit etmektedir. Çalışmada orta-cisimcik olduğu düşünülen etkileşim noktası, 175.dk (2:55) da iki hücrenin bölünmesinden sonra hücrelerden birine göç etmektedir (Şekil 4.37).



Şekil 4.37: CCDC124-mCherry-PLK1^{as} canlı hücre görüntüleme.

4.3. CCDC124-PLK1 Etkileşimi

Gerçekleştirdiğimiz birlikte çöktürme deneyi CCDC124 ile PLK1'in direk etkileşim gösterdiğini teyit etmektedir. Özel manyetik nano-boncuklar (DynaBead) HA-antikoru ile kaplanıp CCDC124-HA proteini çekilmiş ve etkileşim gösterdiği PLK1-Flag proteininin varlığı Flag antikoru ile immünblot yapılarak teyit edilmiştir (Şekil 4.38).



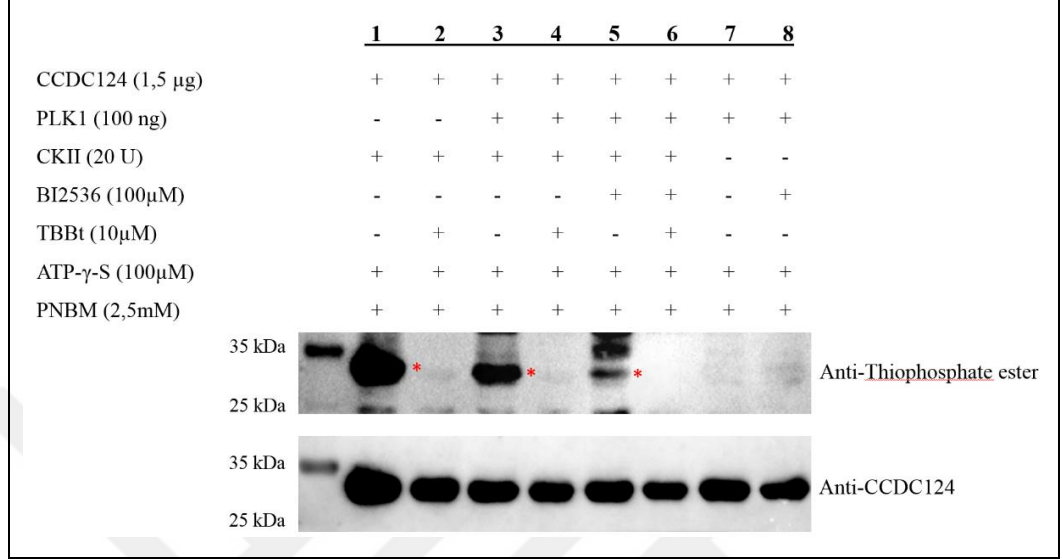
Şekil 4.38: CCDC124 – PLK1 etkileşimi birlikte çöktürme görüntüsü.

4.4. CK2 ve PLK1 In-Vitro Fosforilasyonu

Gerçekleştirilen in vitro fosforilasyon deneyinde, önceki bilimsel çalışmaları doğrular nitelikte CCDC124'ün CK2'nin direk substratı olduğu teyit edilmiştir. PLK1'in direk fosforilasyon sağladığına dair henüz net veri elde edilememekle birlikte (7.kuyu), PLK1'in substratlarının üzerinde daha önceden fosforillenen spesifik PBD bağlanma motifine (Ser-(pThr/pSer)-(Pro/X)) bağlanıp KD vasıtasıyla fosforilasyon yaptığı bilindiğinden ve ilgili PBD bağlanma motifinin CCDC124'te de bulunması, CK2 ile aralarında sıralı fosforilasyon durumu olduğu düşündürmüştür. Bu çerçevede PLK1 enzimi ile CK2'nin inhibitör varlığı/yokluğu şeklinde tasarlanan farklı kombinasyonları denenerek aralarındaki ilişki teyit edilmiştir (Şekil 4.37).

CCDC124, CK2 tarafından direk fosforile edilebilmiştir (1.kuyu). CK2 inhibitörü TBBt varlığında da beklendiği gibi fosforilasyon gerçekleşmemektedir (2.kuyu). CK2 + PLK1 birlikte reaksiyona sokulduğunda fosforilasyon yine

gerçekleşmektedir (3.kuyu). Fakat CK2 + PLK1 reaksiyonuna PLK1 inhibitörü BI2536 eklendiğinde CCDC124'ün fosforilasyon seviyesi düşmektedir (5.kuyu) (Şekil 4.39).



Şekil 4.39: CK2 ve PLK1'in CCDC124'ü in-vitro fosforilasyonu.

5. YORUMLAR

Yapılan biyoinformatik çalışmalar ve deneysel teyitleri; Rab11-FIP3, YB-1 ve PRC1'in, CCDC124'ün etkileşim partnerleri olabileceğini göstermiştir. Hücre iki endozomal trafiğin ana regülatörlerinden birisi olan Rab11-FIP3, GO terimleri açısından yapılan analizde de CCDC124 ile en çok ortak terime sahip olan aday olarak göze çarpmaktadır (sitoplazma, plazma membranı, sitoiskelet, sentrozom ve orta-cisimcik). Ek olarak endozomlarda da lokalizasyon gösteren Rab11-FIP3, CCDC124'ün immünboyama çalışmalarında hücre içerisinde birçok noktada gözlemlenmesi göz önüne alındığında, Rab11-FIP3 ile etkileşim ilgili veziküller içerisine lokalize olarak görev bölgelerine göç edebileceğini düşündürmektedir (Şekil 4.1-6).

DNA ve RNA bağlayıcı bir protein olan YB-1, pre-mRNA splicing, DNA tamiri, sitoplazmik mRNA'nın stabilizasyonu ve paketlenmesi ve ribonükleoproteinlerle (RNPs) etkileşim göstererek miRNA biyogenezi gibi birçok süreçte rol oynayan bir proteindir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, YB-1'in hem G2/M geçişini kontrol ettiğini [50], hem de orta-cisimcikte lokalize olduğu bilinen proteinlerle etkileşim gösterdiğini ortaya koymuştur [51]. Ayrıca YB-1'in meme kanseri [55], sarkoma invazyonu ve metastaz [56] ve prostat kanseri [57] ile doğrudan ilişkili olduğu bilinmektedir. Ek olarak, YB-1'in DNA tamir sürecinde etkileşim gösterdiği APEX1 proteini ile yapılan kütle spektrometre çalışmasında CCDC124'ün etkileşim partnerlerinden biri olduğu belirtilmektedir [60]. Literatürde biyoinformatik veritabanlarında da RNA-bağlayıcı bir protein olarak belirtilen CCDC124'ün [53], [54], bu bilgiler ışığında YB-1 ile arasındaki ilişki ele alındığında, RNA ve/veya DNA bağlanma temelli ortak noktada buluşabilecekleri ve YB-1'in yukarıda bahsettiğimiz görevleri çerçevesinde fonksiyonel birliktelik gösterebileceği düşünülmektedir (Şekil 4.7-12).

Sitokinezin en önemli regülatör proteinlerinden birisi olan PRC1, orta-bölgenin uzay-zamansal regülasyonunu sağlayarak başarılı bir sitokinez sürecinin zeminini hazırlar. İnterfazda nükleusta, mitozda mitotik iğ ipliklerinde lokalize olan PRC1, birçok CDK'nın substratıdır. Bölünme için gerekli olan KIF14, RACGAP1 ve PLK1 proteinlerinin merkezi iğ ipliklerine bağlanmasını sağlar. Onkogen olarak davranıp mesane kanseri hücrelerinin proliferasyonunu desteklemekte ve apoptoz inhibisyonunda rol oynamaktadır [59]. CCDC124'ün PLK1 ile direk etkileşim

gösterdiğini ve PLK1 tarafından fosforilasyona uğradığını teyit ettiğimiz çalışmamız, mitotik iğ iplikleri üzerinde fosforilasyon bağımlı PRC1-PLK1-CCDC124 etkileşim kurularak orta-cisimciğin regülasyonunu gerçekleştirdikleri fikrini düşündürmüştür (Şekil 4.13-16).

Ccdc124, hem bu çalışmada hem de önceki çalışmalarda [1], [2], [3], [4] gösterildiği gibi hücre içerisindeki miktarı optimal düzeyde olması gereken kritik bir proteindir. Bu nedenle hücre içerisindeki miktarında değişim olduğunda hücre bölünemeyip çoklu nükleusa sahip tek hücre halinde kalmaktadır. Mutantlarla yapılan immünblot çalışmalarında –HA, -GFP ve mCherry etiketli mutantlar birbirlerinden farklı protein profilleri göstermiştir. Gözlemlenen degradasyon profilleri Ccdc124'ün hücre içinde kararlılığının düşük olduğunu göstermektedir. S122A-HA mutantında gözlemlenen degradasyon profilinin S122A&S141A-HA mutantında ortadan kalkması, S122 kaynaklı degradasyonun S141 üzerinde gerçekleşen translasyon sonrası modifikasyon (büyük ihtimalle fosforilasyon) bağımlı olduğunu düşündürmektedir (Şekil 4.19). İlginçtir ki, ilgili mutantların C-terminalindeki HA etiketi yerine GFP etiketi eklendiğinde bütün mutantlarda (S122A-GFP, S141A-GFP ve S122A&S141A-GFP) degradasyon ortadan kalkmıştır (Şekil 4.24). Bu da CCDC124'ün GFP gibi büyük bir proteinle füzyon olmasının yapısal katlanma kaynaklı ilgili degradasyon aminoasitlerinin regülasyonunu engelleyici bir 3-boyutlu yapı oluşturduğunu düşündürmektedir. Keza aynı durum, benzer büyüklükteki diğer bir etiket olan mCherry'de de gözlemlenmiştir (Şekil 4.34). İmmünboyama çalışmalarında, tüm mutantlarda sentrozom lokalizasyonunun bozulması, CCDC124'ün sentrozom konumlanmasının protein stabilitesi veya ilgili aminoasitlerin translasyon sonrası modifikasyonunun gerçekleştirilememesine bağlı olabileceği fikrini gündeme getirmiştir (Şekil 4.21), (Şekil 4.30). Fakat tüm mutantlarda orta-cisimcik lokalizasyonu etkilenmemiştir (Şekil 4.25), (Şekil 4.29). Orta-cisimcik konumlanmasının üzerinde çalıştığımız translasyon sonrası modifikasyon bölgeleri dışında farklı bölgeler vasıtasıyla gerçekleştiğini düşündürmektedir. Ayrıca bazı mutantlarda hücre içi ve dışı nükleik asit-Ccdc124 örtüşmeleri gözlemlenmiştir (Şekil 4.20), (Şekil 4.25) (Sarı oklar). Bu durum, literatürde yapılan nükleus kütle spektrometresi verilerinde CCDC124'ün DNA-bağlayıcı bir protein olarak görünmesi [58] ve biyoinformatik veritabanlarında RNA-bağlayıcı bir protein olarak [53], [54] belirtilmesi üzerine; agrege olmuş ve kendi üzerine katlanmalar gerçekleştirerek (500nm'ye yakınsayan dalga boylarında

sekonder yapı oluşturmuş RNA'ya da bağlandığı bilinen) DAPI çekirdek boyasını bağlayan RNA molekülleri veya DNA ile etkileşebileceği fikrini desteklemiştir.

PLK1 ile yapılan birlikte çöktürme çalışması CCDC124'ün PLK1 ile direk etkileştiğini ortaya koymuştur (Şekil 4.38). Genellikle enzim-substrat ilişkileri dinamik bir etkileşim göstermektedir; bu çerçevede canlı hücre görüntüleme çalışması değerlendirildiğinde CCDC124-mCherry (kırmızı) - PLK1-GFP (yeşil) çakışması 75.dk'da (1:15) bozulmakta ve hemen ardından (1:40) etkileşim tekrar kurulmaktadır (Şekil 4.37). Bu çerçevede değerlendirdiğimizde CCDC124'ün orta-cisimcik lokalizasyonu sürecinde, dinamik bir şekilde PLK1'in fosforilasyonuna ihtiyaç duyduğunu düşündürmektedir. CCDC124-mCherry – PLK1-GFP immünboyama çalışması da yine ilgili etkileşimin hem sentrozomda hem orta-cisimcikte korunduğunu teyit etmiştir. ATP-analoğu ile yapılan immünboyama çalışmasında ise PLK1^{as}-GFP hTERT-RPE1 hücreleri 48 saat 10µM 3MB-PP1'e maruz bırakılarak PLK1 spesifik olarak inhibe edilmiştir. PLK1 inhibisyonu bağımlı hücreler multinükleer hale gelmiş ve sentrozom duplikasyonu gerçekleşmemiştir. PLK1 inhibe multinükleer hücrelerde CCDC124'ün PLK1 ile sentrozom lokalizasyonu korunmaktadır (Şekil 4.36). Bu veriler ışığında CCDC124'ün sentrozom lokalizasyonunun PLK1 bağımlı olmadığını düşündürmektedir.

CCDC124'ün translasyon sonrası fosforilasyon durumunun incelenmesinde S122 aminoasitini bünyesinde barındıran potansiyel CK2 fosforilasyon motifi (S-X-X-E/D) ve S141 aminositini bünyesinde barındıran potansiyel PLK1 fosforilasyon motifi (D/E-X-φ-X) (φ: Hidrofobik aminoasit) göz önüne alınarak CK2 ve PLK1 enzimleri ile in vitro fosforilasyon deneyleri gerçekleştirilmiştir. PLK1'in substratlarının üzerinde daha önceden fosforillenen spesifik PBD bağlanma motifine (S-pT/pS-P/X) bağlanıp KD vasıtasıyla fosforilasyon yaptığı bilindiğinden ve ilgili PBD bağlanma motifinin CCDC124'te de bulunması, CK2 ile aralarında sıralı fosforilasyon durumu olduğu düşündürmüştür. Bu çerçevede öncelikle CK2'nin saf CCDC124 proteinini fosforile ettiği [1] teyit edilmiştir. Aynı reaksiyon PLK1 için saf CCDC124 ile denenmiş ve fosforilasyon gözlemlenmemiştir. Ardından CK2 ile PLK1 birlikte reaksiyona konmuş ve fosforilasyon bantı gözlemlenmiştir. İkili fosforilasyon reaksiyonuna PLK1 inhibitörü eklendiğinde ise fosforilasyon miktarı düşmüştür (Şekil 4.39). Bu da CCDC124'ün PLK1 tarafından fosforilasyona uğratılabilmesi için CK2 tarafından öncül fosforilasyon gerçekleştirilmesi gerektiğini ortaya koymuştur. PLK1'in PBD bölgesinin CCDC124 üzerinde bağlanma motifindeki S93

aminoasitinin potansiyel fosforilasyon kinazları Human Protein Reference Database biyoinformatik programı (<http://www.hprd.org>) ile analiz edildiğinde GPCRK1, PKA, PKC, MAPKAPK2, CK1 ve CK2 olabileceği ortaya çıkmaktadır. Bu bilgiler ışığında CCDC124'ün PBD bağlanma motifindeki fosforile aminoasit S93'ün CK2 tarafından öncül fosforilasyonu sağlanıp ardından PLK1'in CCDC124'e bağlanıp S141 aminoasitini fosforilleyebileceği fikri ortaya çıkmaktadır.



KAYNAKLAR

- [1] Telkoparan P., (2013), "Characterization of the coiled-coil domain-containing protein 124 (Ccdc124) as a novel centrosome and midbody component involved in cytokinesis", Doctoral Thesis, Bilkent University.
- [2] Telkoparan P., Erkek S., Yaman E., Alotaibi H., Bayık D., Tazebay U. H., (2013), "Coiled-Coil Domain Containing Protein 124 Is a Novel Centrosome and Midbody Protein That Interacts with the Ras-Guanine Nucleotide Exchange Factor 1B and Is Involved in Cytokinesis", PLoS ONE 8(7), e69289.
- [3] Arslan Ö., (2015), "Coiled-Coil Domain Containing Protein 124 (Ccdc 124) Artışının Hücre Fizyolojisine ve Bölünmesine Etkileri", Yüksek Lisans Tezi, Gebze Teknik Üniversitesi.
- [4] Gül S., (2015), "CRISPR/CAS9 Yöntemi Aracılığı ile İnsan Ccdc124 Geni Delesyonunun Hücre Bölünmesi Üzerine Etkileri", Yüksek Lisans Tezi, Gebze Teknik Üniversitesi.
- [5] Yaman E., Gasper R., Koerner C., Wittinghofer A., Tazebay U. H., (2009), "RasGEF1A and RasGEF1B are guanine nucleotide exchange factors that discriminate between Rap GTP-binding proteins and mediate Rap2-specific nucleotide Exchange", Federation of European Biochemical Societies Journal, 276, 4607-4616.
- [6] Cooper G.M., (2000), "Chapter 14: The Eukaryotic Cell Cycle", The cell: a molecular approach (2nd Edition), 5432, ASM Press.
- [7] Lodish, H., Berk A., Kaiser C. A., Krieger M., Scott M. P., Bretscher A., Ploegh H., Matsudaira P., (2008) "Molecular Cell Biology", 6th Edition, New York City: W.H. Freeman and Company, 2008. Print.
- [8] St. Denis N. A., (2010), "Mitotic regulation of protein kinase CK2", Doctoral Thesis, Western University.
- [9] Salvi M., Raiborg C., Hanson P. I., Campsteijn C., Stenmark H., Pinna L. A., (2014), "CK2 involvement in ESCRT-III complex phosphorylation", Arch Biochem Biophys., 2014 Mar, 1(545), 83-91.
- [10] Medley J. C., Kabara M. M., Stubenvoll M. D., DeMeyer L. E., Song M. H., (2017), "Casein kinase II is required for proper cell division and acts as a negative regulator of centrosome duplication in *Caenorhabditis elegans* embryos", Biology Open (2017) 6, 17-28.

- [11]Morgan D., (2007), "The Cell Cycle: Principals of Control", Yale J Biol Med. 2007 Sep, 80(3), 141–142.
- [12]Ribeiro K., Pereira-Neves A., Benchimol M., (2002), "The mitotic spindle and associated membranes in the closed mitosis of trichomonads", Biology of the Cell 94 (3), 157–172.
- [13]Lancaster O., Baum, B., (2014), "Shaping up to divide: Coordinating actin and microtubule cytoskeletal remodelling during mitosis", Seminars in Cell & Developmental Biology 34, 109–115.
- [14]Basto R., Lau J., Vinogradova T., Gardiol A., Woods G., Khodjakov A., Raff W., (2006), "Flies without centrioles", Cell, 125 (7), 1375–1386.
- [15]Rieder, C. L., Faruki S., Khodjakov A., (2001), "The centrosome in vertebrates: more than a microtubule-organizing center". Trends in Cell Biology, 11 (10), 413–419.
- [16]Bornens M., Azimzadeh J., (2007), "Origin and Evolution of the Centrosome, Eukaryotic Membranes and Cytoskeleton", Advances in Experimental Medicine and Biology, 607, 119–129.
- [17]Jakobsen L., Vanselow K., Skogs M., Toyoda Y., Lundberg E., (2011), "Novel asymmetrically localizing components of human centrosomes identified by complementary proteomics methods", EMBO Journal, 30, 1520–1535.
- [18]Steigemann P., Gerlich D. W., (2009), "Cytokinetic abscission: cellular dynamics at the midbody", Trends Cell Biology, 19, 606-616.
- [19]Skop A.R., Liu H., Yates J., Meyer B.J., Heald R., (2004), "Dissection of the mammalian midbody proteome reveals conserved cytokinesis mechanisms", Science, 305, 61–66
- [20]Glotzer M., (2005), "The molecular requirements for cytokinesis", Science 307 (5716), 1735–1739.
- [21]Hu C. K., Coughlin M., Mitchison T. J., (2012), "Midbody assembly and its regulation during cytokinesis", Molecular Biology of the Cell, Volume 23, 1024-1034.
- [22]Park C. H., Park J. E., Kim T. S., Kang Y. H., Soung N. K., Zhou M., Kim N. H., Bang J. K., Lee K. S., (2015), "Mammalian Polo-like kinase 1 (Plk1) promotes proper chromosome segregation by phosphorylating and delocalizing the PBIP1·CENP-Q complex from kinetochores", J Biol Chem. 2015 Mar, 27, 290(13), 8569-8581.

- [23]Liu Z., Sun Q., Wang X., (2017), “PLK1, A Potential Target for Cancer Therapy”, *Translational Oncology* 2017 Feb, 10(1), 22-32.
- [24]D’Avino P. P., Capalbo L., (2016), “Regulation of midbody formation and function by mitotic kinases”, *Seminars in Cell & Developmental Biology* Volume 53, 57–63
- [25]Park J. E., Kim T. S., Meng L., Bang J. K., Kim B. Y., Lee K. S., (2015), “Putting a bit into the polo-box domain of polo-like kinase 1”, *Journal of Analytical Science and Technology*, 6(1), 27-36.
- [26]Dionne L. K., Wang X. J., Prekeris R., (2015), “Midbody: From Cellular Junk to Regulator of Cell Polarity and Cell Fate”, *Current Opinion in Cell Biology*, 35, 51–58.
- [27]Schmucker S., Sumara I., (2014), “Molecular dynamics of PLK1 during mitosis”, *Molecular & Cellular Oncology*, 1(2), e954507.
- [28]Hu C. K., Ozlü N., Coughlin M., Steen J. J., Mitchison T. J., (2012), “Plk1 negatively regulates PRC1 to prevent premature midzone formation before cytokinesis”, *Molecular Biology of the Cell*, 23(14), 2702-2711.
- [29]Shrestha S., Wilmeth L. J., Eyer J., Shuster C. B., (2012), “PRC1 controls spindle polarization and recruitment of cytokinetic factors during monopolar cytokinesis”, *Molecular Biology of the Cell*, 23(7), 1196-1207.
- [30]Collins L. L., Simon G., Matheson J., Wu C., Miller M. C., Otani T., Yu X., Hayashi S., Prekeris R., Gould G. W., (2012), “Rab11-FIP3 is a cell cycle-regulated phosphoprotein”, *BMC Cell Biology*, 13(4), 387-399.
- [31]Schonteicha E., Pilli M., Simon G. C., Matern H. T., Junutula J. R., Sentz D., Holmes R. K., Prekeris R., (2007), “Molecular characterization of Rab11-FIP3 binding to ARF GTPases”, *European Journal of Cell Biology*, 86(2007), 417–431.
- [32]Ai E., Skop A. R., (2009), “Endosomal recycling regulation during cytokinesis”, *Communicative & Integrative Biology*, 2(5), 444-447.
- [33]Simon G. C., Prekeris R., (2008) The role of FIP3-dependent endosome transport during cytokinesis, *Communicative & Integrative Biology*, 1(2), 132-133.
- [34]Takahashi S., Takei T., Koga H., Takatsu H., Shin H. W., Nakayama K., (2011), “Distinct roles of Rab11 and Arf6 in the regulation of Rab11-FIP3/arfophilin-1 localization in mitotic cells”, *Genes Cells*. 2011 Sep, 16(9), 938-950.

- [35] Brose L., Cresta J., Taoa L., Sullivan W., (2017), "Polo kinase mediates the phosphorylation and cellular localization of Nuf/FIP3, a Rab11 effector", *Molecular Biology of the Cell*, 28(11), 1435-1443.
- [36] Schiell J. A., Simon G. C., Zaharris C., Weisz J., Castle D., Wu C. C., Prekeris R., (2012), "FIP3-endosome-dependent formation of the secondary ingression mediates ESCRT-III recruitment during cytokinesis", *Nature Cell Biology*, 14(10), 1068-1078.
- [37] Griffiths A., (2008), "Introduction to Genetic Analysis", 9th Edition, New York: W.H. Freeman and Company, 335–339.
- [38] Malys N., McCarthy J. E. G., (2010), "Translation initiation: variations in the mechanism can be anticipated", *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68(6), 991–1003.
- [39] Walsh C.T., (2006), "Posttranslational modification of proteins : expanding nature's inventory. Englewood: Roberts and Company Publishers, 576(2005).
- [40] Voet P. D., Voet J. G., Charlotte W., (2006), "Fundamentals of biochemistry : life at the molecular level", 2nd Edition, Wiley.
- [41] Khoury G.A., Baliban R.C., Floudas C.A., (2011), "Proteome-wide post-translational modification statistics: frequency analysis and curation of the swiss-prot database.", *Nature Scientific Reports*, 90(2011).
- [42] Web 1, (2016), "<https://www.atcc.org/Products/All/CRL-3216.aspx>", (Erişim tarihi: 05/05/2017).
- [43] Lucey B. P., Nelson-Rees W. A., Hutchins G. M., (2009) "Henrietta Lacks, HeLa Cells, and Cell Culture Contamination". *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 133(9), 1463-1467.
- [44] Boyer M.M., Poulsen G.L., Nork T.M., (2000), "Relative contributions of the neurosensory retina and retinal pigment epithelium to macular hypofluorescence", *Arch Ophthalmol.*, 118(1), 27-31.
- [45] Web 2, (2016), "<https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-4000.aspx>", (Erişim tarihi: 09/05/2017).
- [46] Plotnikova O. V., Pugacheva E. N., Golemis E. A., (2009), "Primary Cilia and the Cell Cycle", *Methods Cell Biol.*, 94, 137–160.

- [47]Zielke N., Edgar B. A., (2015), “FUCCI sensors: powerful new tools for analysis of cell proliferation”, *WIREs Developmental Biology*, 4(5), 469–487.
- [48]Burkard M. E., Randall C. L., Larochelle S., Zhang C., Shokat K. M., Fisher R. P., Jallepalli P. V., (2007), “Chemical genetics reveals the requirement for Polo-like kinase 1 activity in positioning RhoA and triggering cytokinesis in human cells”, *PNAS*, 104(11), 4383–4388.
- [49]Khandelwal P., (2009), “The N-Terminal Domain of Y-Box Binding Protein-1 Induces Cell Cycle Arrest in G2/M Phase by Binding to Cyclin D1”, *International Journal of Cell Biology*, V.2009, p.11.
- [50]Eliseeva I. A., (2011), “Y-Box-Binding Protein 1 (YB-1) and Its Functions”, *Biochemistry*, 76(13), 1402-1433.
- [51]Stark C., (2006), “BioGRID: a general repository for interaction datasets”, *Nucleic Acids Res.*, 1(34), 535-539.
- [52]McKenney R. J., Huynh W., Tanenbaum M. E., Bhabha G., Vale R. D., (2014), "Activation of cytoplasmic dynein motility by dynactin-cargo adapter complexes", *Science*, 18(345), 337-341.
- [53]Castello A., Fischer B., Eichelbaum K., Horos K., Beckmann B. M., Strein C., Davey N. E., Humphreys D. T., Preiss T., Steinmetz L. M., Krijgsveld J., Hentze M. W., (2012), "Insights into RNA Biology from an Atlas of Mammalian mRNA-Binding Proteins", *Cell*, 149, 1393–1406.
- [54]Kechavarzi B., Janga S. C., (2014), "Dissecting the expression landscape of RNA-binding proteins in human cancers", *Genome Biology*, 2014(15), R14.
- [55]Wang X., Guo X. B., Shen X. C., Kuang Y. T., (2015), "Prognostic role of YB-1 expression in breast cancer: a meta-analysis", *Int J Clin Exp Med.*, 8(2), 1780–1791.
- [56]El-Naggar A. M., Veinotte C. J., Cheng H., Grunewald T. G. P., Negri G. L., Somasekharan S. P., Sorensen P. H., (2015), "Translational Activation of HIF1 α by YB-1 Promotes Sarcoma Metastasis", *Cancer Cell*, 27(5), 682–697.
- [57]Shiota M., Fujimoto N., Imada K., Yokomizo A., Itsumi M., Naito S., (2016), "Potential Role for YB-1 in Castration-Resistant Prostate Cancer and Resistance to Enzalutamide Through the Androgen Receptor V7", *J Natl Cancer Inst.*, 108(7), djw005.
- [58]Kaffe M., (2013), "Functional analysis of the RLS-associated MEIS1 intronic locus", *Doctoral Thesis, Munich Technical University*.

- [59]Kanehira M., Katagiri T., Shimo A., Takata R., Shuin T., Miki T., Fujioka T., Nakamura Y., (2007), "Oncogenic role of MPHOSPH1, a cancer-testis antigen specific to human bladder cancer", *Cancer Res.*, 67(7), 3276-3285.
- [60]Kristensen A. R., Gsponer J., Foster L. J., (2012), "A high-throughput approach for measuring temporal changes in the interactome", *Nature Methods*, 9(9), 907-909.
- [61]Todd M. A. M., Ivanochko D., Picketts D. J., (2015), "PHF6 Degrees of Separation: The Multifaceted Roles of a Chromatin Adaptor Protein", *Genes*, 6(2), 325-352.
- [62]Lera R. F., Burkard M. E., (2012), "The Final Link: Tapping the Power of Chemical Genetics to Connect the Molecular and Biologic Functions of Mitotic Protein Kinases", *Molecules*, 17(10), 12172-12186.

ÖZGEÇMİŞ

Ömer Güllülü 1990 yılında Gebze’de doğdu. 2011 yılında başladığı Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünü 2014 yılında başarıyla tamamlayarak 2015 yılında yüksek lisans eğitimine Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında başladı. 2015 yılından bu yana TÜBİTAK KBAG 1001 Projesinde (Proje No: 114Z349) bursiyer olarak çalışmaktadır.



EKLER

Ek A: Etkileşim Aday Listesi ve Potansiyel PTM bölgeleri

Tablo A1.1: İlk eleme etkileşim aday listesi.

SIRA NUMARASI	PROTEİN ADI	PATCHDOCK SKORU
1	RAB11-FIP3	23591 (2,3591.10 ⁴)
2	ASPM	21590 (2,1590.10 ⁴)
3	PPP1CC	21464 (2,1464.10 ⁴)
4	ROCK1	21416 (2,1416.10 ⁴)
5	YB-1	21375 (2,1375.10 ⁴)
6	RHOA	20677 (2,0677.10 ⁴)
7	RASGEF1B	20503 (2,0503.10 ⁴)
8	RACGAP1	20158 (2,0158.10 ⁴)
9	GNB2L1	20067 (2,0067.10 ⁴)
10	PRC1	20030 (2,0030.10 ⁴)
11	RAP2A	19873 (1,9873.10 ⁴)
12	GNL1	19773 (1,9773.10 ⁴)
13	PIN1	19701 (1,9701.10 ⁴)
14	BRUCE	19412 (1,9412.10 ⁴)
15	PLK1	19405 (1,9405.10 ⁴)
16	CHMP4B	18988 (1,8988.10 ⁴)
17	CLIC4	18988 (1,8988.10 ⁴)
18	NRTK1	18367 (1,8367.10 ⁴)
19	CK2	18202 (1,8202.10 ⁴)
20	MKLP1	17388 (1,7388.10 ⁴)
21	CAND1	17357 (1,7357.10 ⁴)
22	APEX1	17103 (1,7103.10 ⁴)
23	MPLKIP	16509 (1,6509.10 ⁴)
24	CDC42	16206 (1,6206.10 ⁴)
25	AURKB	15874 (1,5874.10 ⁴)
26	CDK1	15569 (1,5569.10 ⁴)
27	AURKA	15332 (1,5332.10 ⁴)
28	CEP55	15296 (1,5296.10 ⁴)
29	MMGT1	15271 (1,5271.10 ⁴)
30	DCTN1	15103 (1,5103.10 ⁴)
31	AURKC	15007 (1,5007.10 ⁴)
32	EMC2	14890 (1,4890.10 ⁴)
33	XPO1	14653 (1,4653.10 ⁴)
34	HSPA5	13488 (1,3488.10 ⁴)
35	CRMP-1	11809 (1,1809.10 ⁴)

Tablo A1.2: CCDC124'ün potansiyel PTM bölgeleri.

AMİNOASİT POZİSYONU	AMİNOASİT / PEPTİD	MODİFİKASYON TİPİ	VERİTABANI
4	K	Metilasyon	GPS
7	G	Miristoylasyon	GPS
10	T	Fosforilasyon	GPS
12	S	Fosforilasyon	PhosphoNET, HMMpTM
38	Y	Nitrilasyon ¹ , Sülfasyon ¹ , Fosforilasyon ²	¹ GPS, ² PTMfunc, ² PTMcode, ² HMMpTM, ² PROTEOMEscout
40	K	Metilasyon	GPS
70	T	Fosforilasyon	NetworKIN, HMMpTM
79	S	Fosforilasyon	GPS, PhosphoNET, HMMpTM
80	K	¹ Sumoylasyon, ² Asetilasyon	¹ GPS, ² PROTEOMEscout
85	K	Asetilasyon	PTMcode, PROTEOMEscout
91	T	Fosforilasyon	PhosphoNET, PTMcode, HMMpTM, PROTEOMEscout
92	S	Fosforilasyon	NetworKIN, PhosphoNET, PTMcode, PROTEOMEscout
93	S	Fosfo-bağlanma	GPS, PhosphoNET, HMMpTM
96	T	Fosforilasyon	PTMcode, HMMpTM
103	T	Fosforilasyon	GPS, NetworKIN, PhosphoNET, PTMcode, HMMpTM, PROTEOMEscout
105	R	Metilasyon	PROTEOMEscout
111	R	Metilasyon	PROTEOMEscout
116	T	Fosforilasyon	PhosphoNET
122	S	Fosforilasyon	PhosphoNET, HMMpTM, PROTEOMEscout
124-128	LEVPL	SUMO-bağlanma	GPS
134-137	RRVL	APC/C-bağlanma (D-Box)	GPS
141	S	Fosforilasyon	GPS, PhosphoNET, HMMpTM, PROTEOMEscout
151-155	IAVLS	SUMO-bağlanma	GPS
155	S	Fosforilasyon	HMMpTM, PROTEOMEscout
163	R	Metilasyon	PROTEOMEscout
174	T	Fosforilasyon	HMMpTM
185	K	Sumoylasyon	GPS
194	S	Fosforilasyon	PhosphoNET, PTMcode, HMMpTM, PROTEOMEscout
196-200	LKQLL	SUMO-bağlanma	GPS
201	K	Sumoylasyon	GPS
207	S	Fosforilasyon	PhosphoNET, HMMpTM, PROTEOMEscout

Ek B: Enerji Analizleri

Tablo B1.1: Ccdc124-PRC1 enerji analiz verileri.

		Aminoasit	Bağ Enerjisi	Açı Enerjisi	Burulma Enerjisi	Bağısızlık Enerjisi	Elektrostatik Çekim Enerjisi	TOPLAM (MJ)
ETKİLEŞİM ÖNCESİ	PRC1	SER146	0,777	1,941	1,985	297,44	-15,43	286,771
		GLU108	0,506	2,725	6,519	99999904	-41,57	99999872
		GLU75	0,593	3,802	1,520	1442,02	-1,29	1447,083
	CCDC124	LYS29	8,902	8,185	5,654	112893,47	9,19	112928,602
		TYR38	4,509	44,118	4,111	32042190	-50,79	32042208
		ASP115	2,679	5,979	3,342	1602276,88	3,34	1602295,250
ETKİLEŞİM SONRASI	PRC1	SER146	0,777	1,941	1,985	386,55	-17,9	373,348
		GLU108	0,506	2,725	6,519	99999904	-41,56	99999872
		GLU75	0,593	3,802	1,520	1442,02	-1,13	1446,803
	CCDC124	LYS29	1351,807	197,801	7,122	1684,2	-23,55	3217,376
		TYR38	4,509	44,118	4,111	32042190	-50,83	32042192
		ASP115	2,679	5,979	3,342	1602276,88	3,3	1602292,125

Tablo B1.2: Ccdc124-Rab11FIP3 enerji analiz verileri.

		Aminoasit	Bağ Enerjisi	Açı Enerjisi	Burulma Enerjisi	Bağısızlık Enerjisi	Elektrostatik Çekim Enerjisi	TOPLAM (MJ)
ETKİLEŞİM ÖNCESİ	Rab11FIP3	THR702	1,692	1,403	0,896	12,820	88,440	105,249
		GLU706	0,249	4,257	4,778	-13,680	-14,130	-18,528
		MET721	2,128	2,259	1,659	31,560	-13,570	24,037
		ILE724	3,273	3,037	2,091	-5,240	-11,350	-8,191
	CCDC124	GLN51	27,223	11,811	3,361	-24,240	-163,250	-145,091
		LYS56	2,999	6,563	2,303	-11,580	-5,930	-5,650
		GLU143	1,551	5,203	11,082	13011,140	11,140	13040,117
		ARG192	24,097	89,053	15,568	53292,710	-265,630	53155,793
ETKİLEŞİM SONRASI	Rab11FIP3	THR702	4,735	2,676	1,641	-7,800	85,350	86,601
		GLU706	0,728	2,067	4,591	-25,470	-15,080	-33,158
		MET721	1,173	7,690	1,858	-24,790	-16,520	-30,592
		ILE724	3,273	3,037	2,091	-5,240	-11,360	-8,192
	CCDC124	GLN51	21,694	11,181	3,398	-24,220	-163,290	-151,238
		LYS56	2,421	6,300	2,302	-11,810	-5,950	-6,737
		GLU143	81,848	30,312	11,025	540,730	-0,050	663,865
		ARG192	62,740	122,891	15,692	1068,900	-271,180	999,045

Tablo B1.3: Ccdc124-YB-1 enerji analiz verileri.

		Aminoasit	Bağ Enerjisi	Açı Enerjisi	Burulma Enerjisi	Bağırsızlık Enerjisi	Elektrostatik Çekim Enerjisi	TOPLAM (MJ)
ETKİLEŞİM ÖNCESİ	YB-1	ARG19	10,36	10,332	4,201	1635745,13	-233,4	1635536,75
		ASN44	7,722	6,926	4,554	99999904	-176,37	99999744
		ARG47	10,583	5,368	7,577	61,15	-235,17	-149,873
		VAL53	7,964	5,672	2,089	99999904	59,62	99999904
	CCDC124	LEU34	18,715	21,453	1,516	1635790,13	3,21	1635845,38
		GLU35	4,491	26,56	4,717	58,1	9,12	112,37
		LYS44	8,97	6,907	9,902	99999904	-2,28	99999904
		LYS119	19,22	15,849	16,96	99999904	44,58	99999904
ETKİLEŞİM SONRASI	YB-1	ARG19	93,712	17,741	4,196	409,31	-238,03	291,747
		ASN44	3753,252	334,834	16,039	6631,87	-173,3	10576,197
		ARG47	8,47	4,798	7,625	64,35	-237,33	-151,435
		VAL53	19609,352	230,688	21,014	7362,62	57,94	27478,709
	CCDC124	LEU34	308,76	24,367	1,952	435,41	3,47	784,18
		GLU35	3,874	26,148	4,735	49,37	8,32	101,74
		LYS44	4131,71	215,774	13,762	7741,31	-1,46	12103,056
		LYS119	9815,894	279,237	29,921	7407,46	70,28	17610,756

Ek C: Telif Hakkı Bulunan Materyaller İçin Alınan İzinler

Tablo C1.1: Telif hakkı bulunan materyaller için alınan izinler.

ŞEKİL NO	LİSANS TARİHİ	LİSANS NO	TELİF SAHİBİ
2.1	23.05.2017	4114751373695	Nature Publishing Group
2.2	23.05.2017	4114771226004	Nature Publishing Group
2.3	24.05.2017	4115331455659	American Society for Cell Biology
2.4	23.05.2017	4114751141593	Elsevier
2.5	Açık Erişim	[25]	Springer
2.6	23.05.2017	4114750828147	Elsevier
4.35A	Açık Erişim	[62]	MDPI
4.35B, 4.35C	Açık Erişim	[61]	MDPI