T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

OLASI BİR RNA BAĞLAYICI PROTEİN OLAN COILED-COIL DOMAIN CONTAINING PROTEIN 124 (CCDC 124)'ÜN ETKİLEŞTİĞİ RNA HEDEFLERİNİN BELİRLENMESİ VE İNSAN KANSER DOKU ÖRNEKLERİNDE İFADE SEVİYELERİNİN İNCELENMESİ

ÖZGE ARSLAN

DOKTORA TEZİ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

GEBZE

2021

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

OLASI BİR RNA BAĞLAYICI PROTEİN OLAN COILED-COIL DOMAIN CONTAINING PROTEIN 124 (CCDC 124)'ÜN ETKİLEŞTİĞİ RNA HEDEFLERİNİN BELİRLENMESİ VE İNSAN KANSER DOKU ÖRNEKLERİNDE İFADE SEVİYELERİNİN İNCELENMESİ

ÖZGE ARSLAN

DOKTORA TEZİ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMANI
PROF. DR. UYGAR HALİS TAZEBAY

GEBZE
2021

T.R.

GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF SCIENCES

IDENTIFYING THE RNA TARGETS OF COILED-COIL DOMAIN CONTAINING PROTEIN 124 (CCDC 124) AND IT'S EXPRESSION LEVEL IN HUMAN CANCER TISSUES

ÖZGE ARSLAN

A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF

PhD OF SCIENCE

DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND GENETIC

THESIS SUPERVISOR

PROF. DR. UYGAR HALİS TAZEBAY

GEBZE

2021

GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ	**DOKTORA JÜRİ ONAY FORMU**

GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 09/04/2021 tarih ve 2021/17 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 26/04/2021 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Özge ARSLAN'ın tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE
(TEZ DANIŞMANI) : Prof. Dr. Uygar Halis TAZEBAY

ÜYE : Prof. Dr. Nuri ÖZTÜRK

ÜYE : Prof. Dr. Batu ERMAN

ÜYE : Prof. Dr. Nusret AKPOLAT

ÜYE : Prof. Dr. Ahmet KOÇ

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
……/……./..…… tarih ve …..…/…..... sayılı kararı.

ÖZET

CCDC124 (Coiled-coil-Domain-Containing protein124) geni DNA dizisi verilerinin analizine dayalı yapılmış olan daha önceki biyoinformatik çalışmalar bu proteinin RNA bağlayan bir protein olabileceğini göstermiştir. Yapılmış olan bu tez çalışmasıyla ise Ccdc124'in RNA bağlayan bir protein olduğu immunopresipitasyon ve sekanslama yöntemleri kullanılarak deneysel olarak gösterilmiş ve ilk defa olası RNA hedefleri listelenmiştir. Bu hedefler arasından seçilen HERC2 ve GCN1 RNA' ları ise Q-PCR yöntemi kullanılarak doğrulanmıştır. Ccdc124 proteininin bağlandığı olası RNA hedeflerinin belirlenmesinin ardından, proteinin yoğun RNA içeriğine sahip hücre altı yapılarda konumlanıyor olabileceği düşünülerek nükleer benekler ve stres granülleri incelenmiştir. İncelemeler için immunofloresan yöntemi kullanılmış, SC35 ile işaretlenmiş nükleer beneklerle Ccdc124 proteininin ortak konumlanma gösterdiği belirlenmiştir. CRISPR/Cas9 sistemi kullanılarak Ccdc124'ün hedeflendiği hücrelerde ise böyle bir konumlanmaya rastlanmadığı tespit edilmiştir. Stres granülü oluşumuyla Ccdc124 proteini arasındaki ilişkinin tespiti için ise stres granülü işaretleyicisi olarak G3BP1, TIA-1, HNRNPA1, PABPC1 kullanılmış ve sıcaklık stresi (42°C ve 46°C) ile oksidatif stres (sodyum arsenit ile tetiklenmiş) durumları çalışılmıştır. Bu deneyler sonucunda Ccdc124 proteini bazı stres granülü işaretleyicileriyle ortak konumlanma göstermesine rağmen, tüm stres granüllerinde benzer konumlanmadığı tespit edilmiştir. Bu nedenle Ccdc124'ün genel olarak tüm stres granüllerinde bulunan bir protein olmadığını ancak bazı hücrelere ve bazı özel koşullara bağlı olarak stres granüllerinde konumlandığını düşünülmektedir. Kanser dokularına ait örneklerle normal doku örnekleri kullanılarak Ccdc124'ün mRNA ifade seviyeleri karşılaştırılmıştır ve mesane, özofagus, tiroid bezi, adrenal bez, over, endometriyum kanserlerinde artış gösterdiği tespit edilmiştir. Daha sonra bu dokular arasından seçilen mesane, over ve endometriyum dokuları immunohistokimyasal yöntemler kullanılarak analiz edilmiş, endometriyum ve over dokularında Ccdc124 protein ifade artışının olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Coiled-Coil Domain124 (Ccdc124), RNA bağlayıcı protein, stres granülü, nükleer benek, HERC2, GCN1.

SUMMARY

Bioinformatics studies based on analysis of CCDC124 (Coiled-coil-Domain-Containing protein124) gene DNA sequence indicated that this protein has RNA binding potential. This thesis aimed to show that Ccdc124 is a RNA-binding protein by using immunoprecipitation and sequencing methods, and possible RNA targets were listed for the first time. HERC2 and GCN1 RNAs, presented in the target list, were validated through the Q-PCR method. After determining the possible RNA targets of Ccdc124 protein, nuclear speckles and stress granules were examined considering the protein's potential localization of subcellular structures with dense RNA content. With immunofluorescence method, it was determined that Ccdc124 protein was colocalization with nuclear speckles marked with SC35. However, such positioning was not detected when Ccdc124 targeted the CRISPR/Cas9 system was used. Moreover, to determine the relationship between stress granule formation and Ccdc124 protein, G3BP1, TIA-1, HNRNPA1, PABPC1 were used as markers of stress granule. Heat stress (42°C and 46°C) and oxidative stress (triggered by sodium arsenite) conditions were examined. The results indicated that although Ccdc124 protein colocalized with some stress granule markers, it was not observed for all stress granules. Therefore, it was thought that Ccdc124 is not a protein found in all stress granules in general; yet, it located in stress granules depending on the cell types and special conditions. Also, the results showed that Ccdc124 mRNA expression levels remarkably increased in bladder, esophagus, thyroid gland, adrenal gland, ovarium and endometrium cancers in comparison between cancer tissue samples and normal tissue samples. Furthermore, immunohistochemical methods were used in the selected tissues (endometrium, ovary, and urinary bladder), and Ccdc124 protein expression was identified as high in endometrium and ovarian cancer tissues as compared to normal tissue samples.

Key Words: Coiled-Coil Domain124 (Ccdc124), RNA binding protein, stress granule, nuclear speckle, HERC2, GCN1.

TEŞEKKÜR

Başta tez çalışmam süresince beni bilimsel olarak yönlendiren Sayın Prof. Dr. Halis Uygar TAZEBAY olmak üzere, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşarak destekleyen Sayın Prof. Dr. Ayten KANDİLCİ'ye, laboratuvar arkadaşlarıma, Gebze Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü öğretim üyelerine ve elemanlarına çok teşekkür ederim.

Aynı zamanda dokrora çalışmalarımın son dönemlerinde yapmak istediğim çalışmaların gerçekleşmesi için bana laboratuvarını açan Sayın Prof. Dr. Ahmet KOÇ'a, immunohistokimya çalışmalarını birlikte yürüttüğümüz Sayın Prof. Dr. Neşe KARADAĞ SOYLU'ya ve ekibinde yer alan Eylem Giriş ve Mustafa Hüz'e, kısa bir zaman ekiplerine dahil olmama rağmen dostluklarını ve desteklerini hep hissettiren laboratuvar arkadaşlarım Kübra DURMUŞ, Dr. Selcen KORKMAZ ve Kübranur KORKMAZ'a, her koşulda yanımda olan ailem Dr. Ender ELTAN, Bengi ELTAN, Selen ELTAN, Fatma ARSLAN, Hüseyin ARSLAN ve Serkan ARSLAN'a çok teşekkür ederim.

Doktora sürecinin en zor zamanlarını benimle paylaşan, beni bu yolda ilerlemem için her zaman destekleyen ve teşvik eden hayat arkadaşım Hakan ARSLAN'a ve bana verdiği güçle yoluma devam etmemi sağlayan sevgili kızım Ece ARSLAN'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bilim heyecanını bana aşılayarak bu alana yönlenmem konusunda bana ilham veren dedem Sayın Prof. Dr. Ruhi TÖRE'nin anısına….

İÇİNDEKİLER

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler ve Kısaltmalar		Açıklamalar
µg	:	Mikrogram
µl	:	Mikrolitre
µM	:	Mikromolar
µM	:	Mikromolar
µm	:	Mikrometre
A	:	Alanin
bp	:	Baz çifti
D	:	Aspartik asit
ddH2O	:	Distile su
E	:	Glutemik asit
g	:	Gram
G	:	Glisin
H	:	Histidin
HCl	:	Hidroklorik asit
I	:	Izolösin
K	:	Lizin
kDa	:	Kilodalton
L	:	Litre
mM	:	Nanometre
NaOH	:	Sodyum hidroksdit
nM	:	Milimolar
nm	:	Nanometre
^{o}C	:	Derece Celsius
P	:	Prolin
Q	:	Glutamin
R	:	Arjinin
S	:	Serin
T	:	Treonin

V	:	Valin
APS	:	Amonyum sülfat
Ccdc124	:	Coiled-coil domain124
DMEM	:	Dulbecco's Modified Eagle Medium
FACS	:	Akım sitometrisi
FBS	:	Fetal sığır serumu
FSC	:	Forward scatter
G3BP	:	Stress Granule Assembly Factor
GCN1	:	General control non-derepressible 1
GFP	:	Yeşil floresan protein
GTÜ	:	Gebze Teknik Üniversitesi
HERC2	:	HECT ve RLD Domain İçerem E3 Ubikitin Protein Ligaz 2
IF	:	İmmünofloresan
MBG	:	Moleküler Biyoloji ve Genetik
mRNA	:	Mesajcı Ribonükleik Asit
NS	:	Nükleer speckle
PABPC	:	Poly(A) Binding Protein Cytoplasmic
PBS	:	Tuzlu fosfat tamponu
PCR	:	Polimer Zincir Reaksiyonu
Q-PCR	:	Kantitatif Polimer Zincir Reaksiyonu
ORF	:	Açık okuma bölgesi
RIP	:	RNA ile çöktürme
Rpm	:	Rotorun dakikadaki dönme hızı
SC35	:	Serine And Arginine Rich Splicing Kırpılma Factor 2, SRSF2
SG	:	Stres granülü
SSC	.	Side scatter
TEMED	:	Tetrametiletilenediamin
TIA-1	:	Cytotoxic granule-associated RNA binding protein
Tm	:	Erime sıcaklığı
TUBA1B	:	Tubulin alpha 1b
WB	:	Immuno blot
IHC	:	Immunohistokimya

ŞEKİLLER DİZİNİ

TABLOLAR DİZİNİ

1. GİRİŞ

Kanser, özellikle son yıllarda artan prevalansı nedeniyle en çok araştırılan konular arasında yer almakta ve yenilikçi tedavi stratejileri üzerine birçok çalışma yapılmaktadır [Web 1, 2018]. Kontrolsüz hücre bölünmesiyle karakterize edilen ve vücutta yayılım gösterebilen bu hastalığın oluşumunu tetikleyen moleküler mekanizmaların tam olarak aydınlatılması ise kanserle mücadele konusunda oldukça büyük önem taşımaktadır.

Kanser tedavisine yönelik yeni tedavi yöntemleri geliştirilmesi için temel basamaklardan biri ise kuşkusuz hücre bölünme mekanizmasının tam olarak aydınlatılmasıdır. İlk olarak sodyum/iyodid simportunda görevli NIS geninin transkripsiyonel regülasyonuna yönelik yapılan araştırmalar sırasında tespit edilmiş olan sarılı-sarmal-bölge-içeren-124 (Coiled-coil domain containing-124; Ccdc124) proteinin interfaz, profaz, metafaz evrelerinde sentrozomda, sitokinez evresinde ise orta cisimde konumlanarak hücre bölünmesinde görev aldığı bilinmektedir [Telkoparan vd., 2013]. Aynı zamanda bu proteinin ifade seviyelerindeki değişimin sitoplazmik bölünmeyi engellediği ve böylece çok çekirdekli hücrelerin oluşmasına neden olarak hücre stabilitesini bozduğuna dair bulgular da mevcuttur [Telkoparan, 2013], [Arslan, 2015]. Yapılan biyoinformatik analizler ise bu proteinin olası RNA hedeflerinin bulunabileceğine de işaret etmektedir. Özellikle son yıllarda yapılmış olan çalışmalarda RNA hedefleyen proteinlerin translasyon ve kırpılma gibi RNA biyogenezinde rol oynadığı gösterilmiş olup, post-transkripsiyonel düzeyde RNA metabolizmasında meydana gelebilecek problemlerin ise kanserle ilişkilendirilebileceği belirtilmiştir [Kim et al., 2009], [Kechavarzi and Janga, 2014]. Olası RNA hedefleyen bir protein olarak Ccdc124 proteininin de taşıdığı bu özellikler nedeniyle kanser oluşumunu tetikleyen moleküler mekanizmalarda rol alıyor olabileceği düşünülmektedir.

1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

Yapılmış olan bu çalışmayla Ccdc124 (Coiled-coil-Domain-Containing protein124) ‘ün RNA metabolizması ile olan ilişkisinin saptanması ve bu ilişkiler göz

önünde bulundurularak, Ccdc124'ün RNA seviyesi açısından kanser dokularına ait örneklerle normal doku örnekleri arasındaki farkın tespit edilmesi amaçlanmıştır. Böylece Ccdc124 proteininin kanser matabolizmasıyla olan ilişkisinin saptanmaya çalışılması planlanmış, moleküler seviyedeki etkileşimlerinin ve ifade düzeyindeki değişim nedenlerinin tespitiyle, kanser tadavisinde kullanılan yöntemler için yeni bir bakış açısı sunulması hedeflenmiştir.

Daha önce yapılan çalışmalarda RNA bağlayan proteinlerin RNA biyogenezinde önemli roller üstlendiği gösterilmiş olup, biyoinformatik analizler sonucunda RNA bağlayıcı bir protein olduğu tahmin edilen Ccdc124 proteininin hücre içi bu görevine ve kanser dokularında RNA seviyesindeki ifade değişimlerine yönelik literatürde herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Yapılmış olan bu çalışmayla ise ilk defa Ccdc124 proteininin olası RNA hedefleri belirlenmiş ve kanser tiplerinde ifade edilme farklılıklarına dair ilk bulgular elde edilmiştir. Olası RNA hedeflerin belirlenmesi için farklı konstraklar kullanılarak kalıcı olarak transfekte edilmiş HeLa hücre hatlarında RNA ile birlikte çöktürme yöntemi uygulanmış, deney sonucunda elde edilen örnekler sekanslanarak hem RNA bağlama kapasitesi hem de olası RNA hedefleri belirlenmiştir. Belirlenen hedefler arasından seçilen GCN1 ve HERC2 mRNA'larına ait bulgular ise RNA ile çöktürme ve Q-PCR yöntemleri kullanılarak doğrulanmıştır.

Proteinlerin RNA bağlama kapasitesinin yanı sıra hücre içi konumlanmalarının da proteinlere ait biyolojik fonksiyonunun anlaşılabilmesi açısından büyük önem taşımaktadır. Literatürde yapılan çalışmalar sırasında interfaz, profaz ve metafazda sentrozomda, sitokinez sırasında ise orta cisimcikte gözlemlenmiş olan Ccdc124 proteininin bu tez çalışması kapsamında farklı fizyolojik koşullar altında gerçekleştirilen immunofloresan boyama denemeleri sırasında ilk defa çekirdek içi konumlanmasının bulunduğu gösterilmiştir. Ayrıca bu konumlanmanın nükleer benek alanlarıyla örtüştüğü tespit edilirken, stres durumunda ise proteinin nükleer beneklerden ayrılarak çekirdek içi membransız başka alanlara yöneldiği gözlemlenmiştir. Yine stres durumuyla ilgili yapılan çalışmalar sırasında elde edilen veriler proteinin bazı stres granülü yapılarında da görev alıyor olabileceğini düşündürmektedir.

Kanser metabolizmasına yönelik Ccdc124 proteininin RNA seviyesindeki değişimlerin gözlemlenebilmesi için ise insan kanser hücre hatlarına ait cDNA örneklerinin Q-PCR yöntemi ile analiz edilmesi sağlanmış ve elde edilen veriler

istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Analizler sonucunda adrenal bez, endometriyum, özofagus, karaciğer, tiroid, mesane ve over kanserlerinde Ccdc124 mRNA ifadesinde anlamlı artışın gerçekleşmekte olduğu tespit edilmiştir. Bu kanserler arasından seçilen over, mesane ve endometriyum dokularına ait örneklerde ise immunohistokimya yöntemi kullanılarak Ccdc124 protein ifadesindeki değişiklikler tespit edilmeye çalışılmıştır. İmmunohistokimya boyamaları sonucunda endometriyum ve over kanser dokularında Ccdc124 protein ifadesinde belirgin artışlar gözlemlenirken, dokulara ait epitel hücrelerde ve promordial foliküllerde yüksek Ccdc124 protein ifadesine ait ilk bulgular elde edilmiştir.

2. COILED-COIL DOMAIN CONTAINING PROTEIN 124 (Ccdc124)

2.1. Ccdc124 Proteinin Evrimsel Önemi

Sarılı-sarmal-bölge-içeren-124 (Coiled-coil domain containing-124, Ccdc-124) proteini ilk olarak sodyum/iyodid simportunda görevli NIS geniyle ilgili yapılan araştırmalar sırasında tespit edilmiş olup, 223 amino asit uzunluğuna sahip olan bu proteinin yüksek ökaryotlarda oldukça korunmuş olmasına rağmen prokaryotlarda bulunmadığı bilinmektedir [Kent et al., 2002], [Telkoparan, 2013].

İmmünolojik analizlerle CCDC124 geni tarafından kodlanan protein ürün büyüklüğünün yaklaşık 32 kDa olduğu gösterilmiş olmasına rağmen, proteinin ikinci bir alternatif Kozak ribozom bağlanma dizisine sahip olduğu ve 176 aminoasitten oluşan bir izoformunun daha bulunduğu da tespit edilmiştir [Telkoparan, 2013], [Lee et al., 2012].

Kromozomda 19p13.11 bölgesi tarafından transkribe edilen Ccdc124 cDNA'sını ise kodlayan 6 adet ekzon bulunmaktadır. İki adet varyanta sahip olan proteinin varyantlarından birinin 5' UTR kısmında bir farklılık bulunmasına rağmen, iki varyantın da aynı proteini kodladığı bilinmektedir. 2013 yılında Zhou ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalar insan kanser hücreleriyle yapılan fosfoproteomik analizler sırasında ise Ccdc124 protein sekansında yer alan serin 141 ve serin 194'ün fosforile olduğu gösterilmiştir [Zhou et al., 2013]. Biyoinformatik analizler ise Ccdc124 proteininin 5 serin, 7 tireonin ve 1 tirozin fosforilasyon bölgesine sahip olabileceğine işaret etmektedir. Bu verilerin yanı sıra Ccdc124'ün Kazein kinaz (CK II) ve Polo-benzeri-kinaz I (Plk 1) proteinlerinin substratı olabileceğine dair veriler de bulunmaktadır.

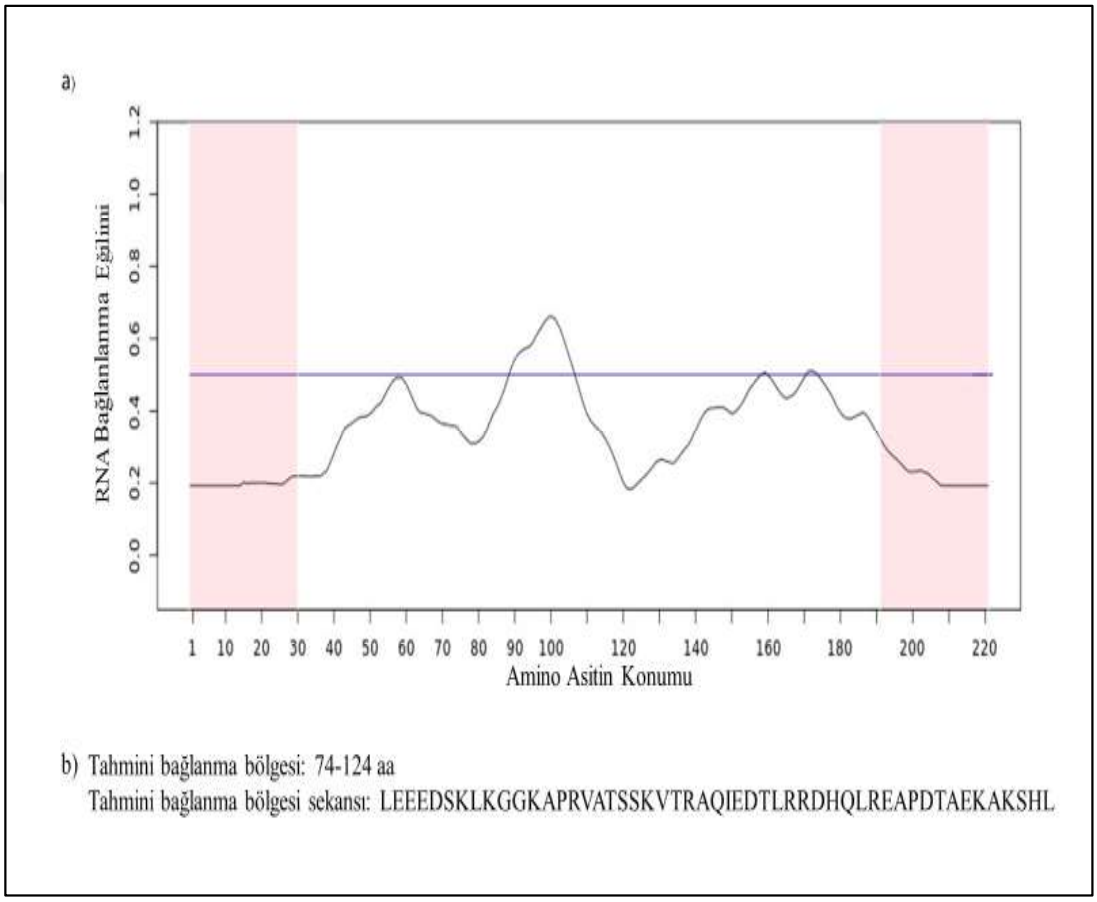
2011 yılında Jakobsen ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada sentrozom konumlanmasına sahip bazı proteinlerin sarılı sarmal yapısına sahip olduğu gösterilmiştir [Jakobsen et al., 2011]. 2013 yılında Telkoparan tarafından yapılan bir çalışmayla ise sarılı sarmal yapıya sahip olan proteinlerden biri olan Ccdc124 proteininin de interfaz, profaz ve metafazda sentrozomda konumlandığı fakat sitokinez sırasında orta cisimciğe göç ettiği belirlenmiştir. Yine aynı çalışmada ikili maya hibrid sistemi ve birlikte çöktürme deneyleriyle ise Ras Guanine Exchange Factor 1B

(RasGEF1B) arasında bir etkileşim olduğu da belirlenmiştir [Telkoparan, 2013]. Telkoparan tarafından aynı yıl yayınlanan tez çalışmasında ise Ccdc124 proteininin ifadesi düşürüldüğünde sitokinezin engellenerek, çok çekirdekli hücrelerin meydana geldiği belirtilmiştir [Telkoparan, 2013]. Bu çalışmadan iki yıl sonra yapılmış olan başka bir tez çalışmasıyla ise Ccdc124 proteininin fazla ifadesinin de çok çekirdekli hücre popülasyonunda artış meydana getirdiği FACS analizleriyle gösterilmiş ve proteinin N ucunda yer alan ilk 64 aminoasidin sentrozomda konumlanmada görevli sinyal motifi taşıyor olabileceğine işaret edilmiştir [Arslan, 2015].

2015 yılında HeLa hücre hattında 1125 proteinin GFP ile işaretlenerek etkileştikleri proteinleri kütle spektrometrisiyle belirlemesi için yapılan başka bir çalışma ise RRBP1, NOP56, SRP72 gibi proteinlerin yanı sıra 60S ribozomla ilişkili olan Rpl35 ve Rpl0 proteinleriyle Ccdc124'ün etkileştiği tespit edilmiştir [Hein et al., 2015]. 2018 yılında Wang ve arkadaşları tarafından Ccdc124'ün mayadaki ortoloğu olan Lso2 ile yapılan deneyler sırasında Lso2'nin ribozomun 25S rRNA'sının A bölgesine bağlandığı gösterilmiştir [Wang et al., 2018]. Ayrıca kütle spektrometresi ve immunopresipitasyon deneyleriyle yapılan bu çalışmalar sonucunda ribozoma bağlanmanın GTPaz aktivasyon bölgesinde meydana geldiği belirlenmiş ve mayalara Ccdc124 proteini aktarılarak bu proteinin de aynı bağlanma bölgesine sahip olduğu ortaya çıkarılmıştır. Bunun yanı sıra her iki proteinin de tRNA bağlama kapasitesinin olduğundan bahsedilmiş ve olası tRNA hedefleri listelenmiştir. Wang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmadan iki yıl sonra yayınlanan bir çalışmayla ise Ccdc124 proteininin hiberne olmuş ribozoma bağlandığı ve ribozomun tekrar aktive olmasında görevli faktörler arasında yer aldığı cryo-elektron mikroskobisi deneyleriyle gösterilmiştir [Wells et al., 2020]. Yine aynı çalışmada Ccdc124 proteininin Lso2 gibi tRNA ve mRNA bağlanma bölgeleriyle etkileştiği, 40S ve 60S ribozom alt birimlerine bağlanarak rotasyona uğramamış 80S ribozomları stabilize ediyor olabileceği belirtilmiştir.

Photoactivatable-Ribonucleoside-Enhanced Crosslinking (PAR-CL) metodu kullanılarak insan hücrelerindeki mRNA bağlayan proteinlerin tespit edilmesine yönelik çalışmalara ait verilerin içerisinde ise Ccdc124'ün mRNA bağladığına dair veriler mecuttur. Bu çalışmalardan biri 2012 yılında Castello ve arkadaşları tarafından HeLa hücreleriyle gerçekleştirilirken, bir diğeri 2015 yılında Beckmann ve arkadaşları tarafından Huh7 hücreleriyle yapılmıştır [Castello et al., 2012],

[Beckmann et al., 2015]. Ccdc124 proteini her iki çalışmada da lizatlarla oligo(dT) bağlı bocukların inkübasyonu sonrası boncuklara bağlanarak çekilmesi sonucu elde edilen proteinlere ait listede yer almıştır. Bu çalışmaların yanı sıra CatRAPID programı kullanılarak yapılan tahminlerde de proteinin ortalama bağlanma eğilimi 0.65 (>0.5 RNA bağlanma ihtimalinin bulunduğunu göstermekte) olarak hesaplanmakta ve 74 ile 124 amino asidler arasında olası bir bağlanma bölgesinin olabileceğine işaret etmektedir (Şekil 2.1) [Zanzoni et al., 2013].

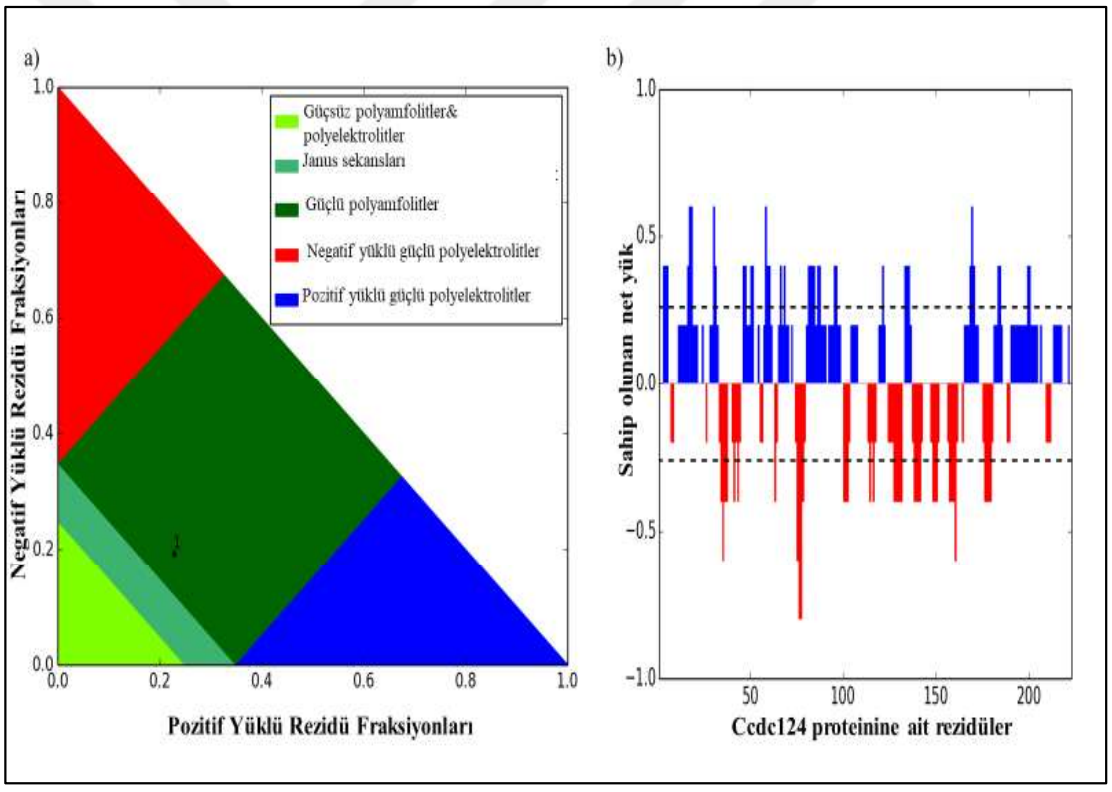


Şekil 2.1: Ccdc124 proteininin RNA bağlama potansiyeline ait CatRAPID programı kullanılarak yapılan analizler. a) Ccdc124 proteinine ait amino asid dizisinin RNA bağlanma eğilimlerine ait diyagram. b) Dizide yer alan ve olası bağlanma bölgesi olarak tahmin edilen bölgeye ait sekans.

Telkoparan tarafından 2013 yılında yapılan deneylerle ise plasentada proteine ait her iki izoformda olmak üzere, beyin, over, testis, karaciğer, dalak ve prostatta Ccdc124 proteinine ait ifade seviyesinin yüksek olduğu gösterilmiştir [Telkoparan, 2013].

2.2. Biyoinformatik Açıdan Ccdc124 Proteini

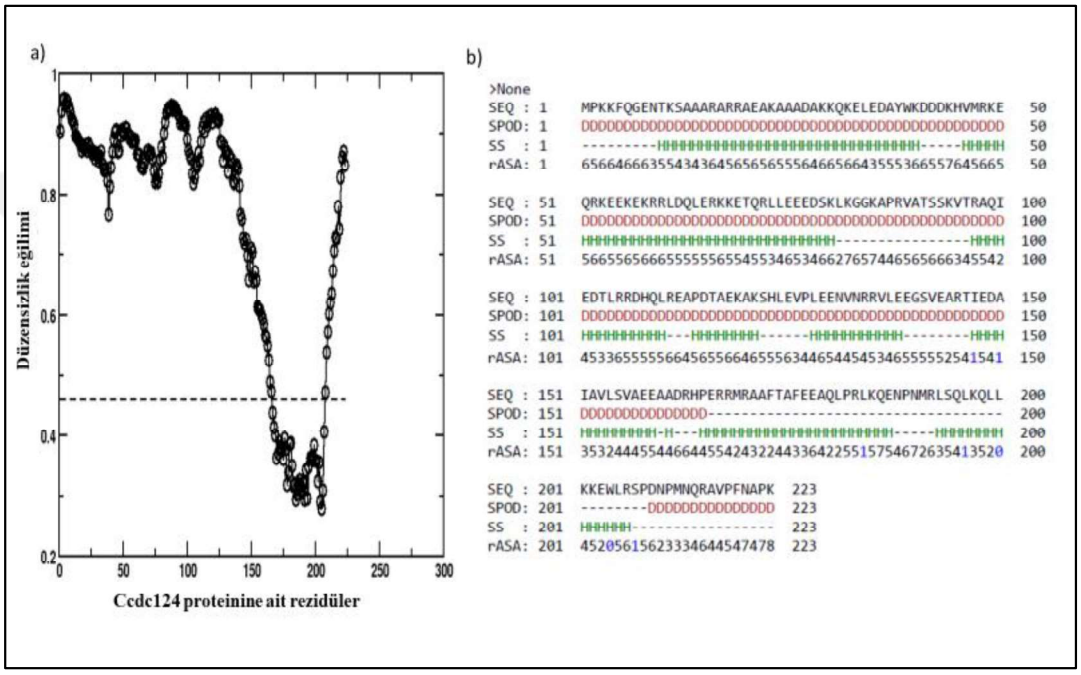
Biyoinformatik analizler, birçok proteine ait bilgilerin sınırlı olması nedeniyle, olası üç boyutlu yapılar ve bağlanma eğilimlerinin belirlenmesi için literatürde yer alan çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır. Bu programlar arasında yer alan analizlerden biri de proteinin sahip olduğu yük dağılımına göre değerlendirme yapan CIDER analizidir [Holehouse et al., 2017]. Ccdc124 protein sekansına bağlı olarak yapılan CIDER analiz sonuçları %42 oranında artı veya eksi yüklü amino asit (K, R, D, E, H) bulunduran Ccdc124 proteininin hücresel faz ayrımında işlev görebilecek yapıda güçlü bir polyamfolit olduğunu göstermektedir. Şekil 2.2'de Ccdc124 proteinine ait CIDER analizi sonuçlarına ait grafikler yer almaktadır [Web 4].



Şekil 2.2: Ccdc124 proteinine ait CIDER analizi sonuçları. a) Ccdc124'ün yük dağılımına bağlı sınıflandırılma diyagramı. b) Proteine ait rezidülerin yük dağılım grafiği.

SPOT gibi bazı *in silico* analizlerle gerçekleştirilen proteinlere ait üç boyutlu yapı tahminleri Ccdc124'ün düzensiz bölgeler (intrinsically disordered regions, IDRs) içeriyor olabileceğine işaret etmekte ve son yıllarda elde edilen proteinin üç

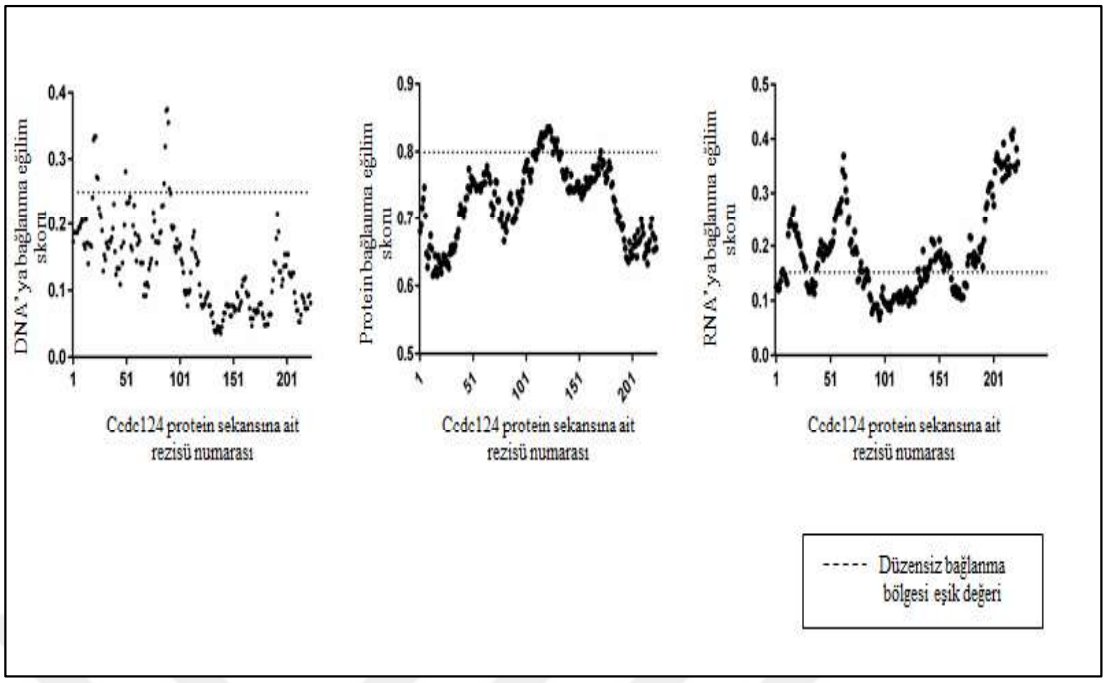
boyutlu yapısına ilişkin gerçekleştirilen elektron mikroskobisi verileri de bu tahminleri desteklemektedir [Hanson et al., 2017], [Web 5]. Ccdc124 protein sekansı kullanılarak yapılmış olan SPOT analizi Şekil 2.3'de yer almaktadır. Şekil 2.3 a'da yer alan grafikte kesikli çizgiler eşik değerini göstermektedir. Ccdc124 proteini için ise bu değer 0.46 olarak belirlenmiştir. Şekil 2.3 b'de ise erişilebilir yüzey alanı (rASA) değeri 0 ile 9 arasında derecelendirilmiş olup, değeri <%20 olan rezidüler maviyle gösterilmiştir.



Şekil 2.3: Ccdc124 proteinine ait sekans kullanılarak yapılmış SPOT analizi. a) Proteine ait rezidülerin düzensizlik eğilimini gösteren grafik. b) Ccdc124 sekansına ait sekans (Seq), ikincil yapı (SS), erişilebilir yüzey alanı (rASA), düzensizlik durumunu gösteren (SPOT) analizi.

Olası bu değişken üç boyutlu protein yapısının fonksiyonel esnekliğe katkı sağlayabileceği gibi Ccdc124 proteininin hücre içi fazsal ayrışma bölgelerinde de bulunuyor olabileceğini düşündürmektedir [Holehouse et al., 2015].

Proteinlerin sahip olduğu düzensiz bölgeler ve bu bölgelerin DNA, RNA ve protein bağlama eğilimleri için kullanılan ve Şekil 2.4'de yer alan DisoRDPbind analizi sonuçları da özellikle bu bölgelerin RNA bağlanma kapasitesinin bulunduğunu göstermektedir [Peng ve Kurgan, 2015].



Şekil 2.4: Ccdc124 protein sekansa dayalı DNA, RNA ve protein bağlama eğilimini gösteren DisoRDPbind analiz sonuçlarına ait dağılım grafiği.

Yapısal ve fonksiyonel analizlerin yanısıra proteinlerin hücre içi konumlanmalarına ait olasılıkların değerlendirildiği bazı biyoinformatik analizler de Ccdc124 proteini için kullanılmaktadır. Bunlar arasında yer alan WoLF PSORT analizi sonuçları ise proteinin sadece sitoplazmada değil aynı zamanda çekirdek içinde de konumlanmasının söz konusu olabileceğini göstermektedir [Web 2], [Web 3].

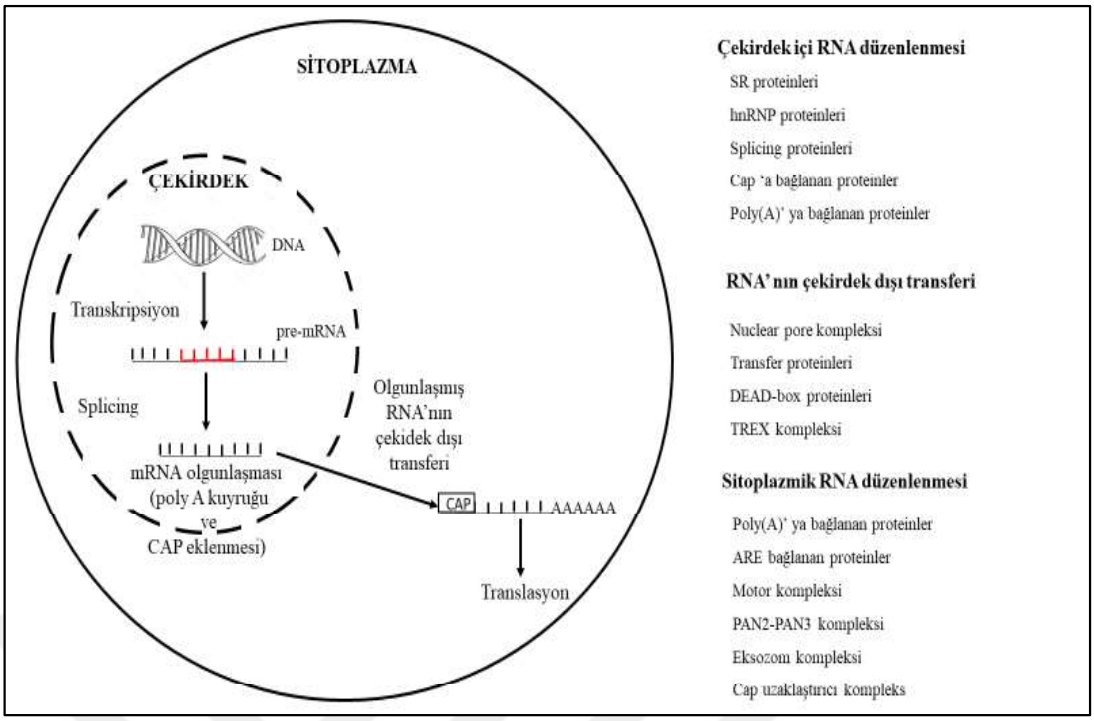
3. RNA BAĞLAYICI PROTEİNLER, HÜCRESEL STRES KOŞULLARI VE MEMBRANSIZ HÜCRE ORGANELLERİNİN KANSER METABOLİZMASINDAKİ ROLÜ

İnsan genomununda bulunan genlerden sadece 20,000-25,000 genin (insan genomunun %1.5'inden azı) protein kodladığı ve bu genlerin bir kısmının ökaryotlarda korunmuş ya da benzerlik gösteriyor olduğu bilinmektedir [International Human Genome Sequencing Consortium, 2004]. Embriyonik gelişim sırasında tek bir hücreden bir organizmaya giden süreçte aynı genomik yapıya sahip olan hücrelerin gen ve protein ifadesindeki ve farklılıklar ise hücre içi mekanizmaların esnek ve dinamik bir yapıda olduğunu göstermektedir. Bu esnek ve dinamik yapı içerisindeki homoestatik düzen ise RNA bağlayıcı proteinlerin ifade değişiklikleri, hücresel stres, membransız organel elemanlarına ait mutasyon ve anomaliler gibi birçok nedene bağlı olarak bozulabilmektedir. Hücre içi dengenin bozulması ise hücrenin kanserleşmeye yönelimiyle sonuçlanabilmektedir. Bu nedenle kanserleşme metabolizmasının anlaşılması, kasnserin teşhis ve tedavisi açısından büyük önem teşkil etmektedir.

3.1. Kanser Metabolizmasında RNA Bağlayan Proteinlerin Rolü

Kanserin oluşum mekanizmalarından biri hücrenin proteom yapısında meydana gelen değişikliklerdir. Proteom yapısındaki bu değişiklerin en önemli yolaklarından biri ise RNA bağlayıcı proteinlerin görev aldığı alternatif kırpılma, miRNA ve noncoding RNA metabolizmalarında meydana gelen değişikliklerdir [Ghigna, 2015].

Ökaryotlardaki gen ifadesi düzenlemesi, hücre içi homeostasinin korunarak patolojik sonuçların önlenmesi açısından önem taşınmakla birlikte literatürde yer alan çalışmalar bu sürecin oldukça karmaşık mekanizmaların kontrolü altında gerçekleştiğini göstermektedir. 2001 yılında İnsan Genom Projesi'ne ait sonuçların açıklanmasının ardından kanserin moleküler mekanizması araştırmalarının başlamasıyla, hücre içi RNA metabolizmasının anlaşılabilmesinin önemi de daha çok vurgulanmaya başlanmıştır. Transkripsiyonunu takiben çekirdek içi olgunlaşma ve tekrar organize olmadan itibaren, çekirdek dışına çıkma, sitoplazmada konumlanmaya kadar devam eden ve oldukça dinamik bir yapıda olan RNA metabolizmasına ait döngü ve bu döngüde yer alan bazı proteinler Şekil 3.1 'de gösterilmektedir.



Şekil 3.1: mRNA'nın çekirdek içinde sentezlenmesi, olgunlaşarak çekirdek dışına çıkışı ve sitoplazmada translasyona uğraması.

RNA'nın hücre içi bu sürecinde görev alan en önemli moleküller ise RNA bağlayan proteinlerdir. mRNA ile proteinlerin oluşturduğu bu kompleks yapı ribonükleoprotein (RNP) olarak adlandırılmakta ve RNA bağlayan proteinler (RBP'ler) etkileştikleri RNA'ların degradasyondan, konumlamaya, stabiliteden fonksiyonunun belirlenmesine kadar pek çok yolakta görev almaktadır [Singh ve arkadaşları, 2015]. İlk olarak RNA pol II'inin keşfiyle gündeme gelen RBP'ler, daha sonra ribozomal yapıda görev almayan heterojen ribonükleer protein (hnRNP), poli A'ya bağlanan protein (PABP), başlığa bağlanan sitoplazmik proteinler gibi başka RBP'lerin açığa çıkarılmaya başlanmasıyla farklı bir boyut kazanmıştır.

Daha önce yapılan çalışmalar ise RNP kompleksinin oluşabilmesi için proteine özgü RNA sekans motiflerini tanıması gerekmediği belirtilmiş ve bazı RBP'lerin mRNA'lardaki 5′ 7-metilguanozin (m7G) başlık veya 3′ poliadenozin (polyA) kuyruk gibi genel yapılarını tanımak üzere yapılandığını göstermiştir [Singh et al., 2015]. RNA tanıyıcı elementler (RNA recognition elements, RREs) olarak isimlendirilen, protein sekansı ve yapısı tarafından RNA'ya bağlanmak üzere oluşturulan bu elementlerin hem çok kısa hem de dejenere olmaları nedeniyle tam olarak açığa çıkarılabilmeleri için daha kapsamlı araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

RNA ile protein arasındaki bağlanma eğiliminin tespit edilmesi için en sık kullanılan yöntem RNA ile çöktürme (RNA immunoprecipitation, RIP) ve sonrasında mikroarray (RIP-Chip veya sekanslama (RIP-seq) ile RNA hedeflerinin gösterilmesidir. Daha stabil bağlanmaların belirlenmesi için bu teknikler hala önemli yöntemler arasında bulunmaktadır. Ancak bilimsel yeni yöntemlerin keşfiyle birlikte RNA- protein etkileşiminin belirlenmesi için UV uygulanmasıyla yapılan CLIP gibi bazı teknikler (i-CLIP, par-CLIP, HITS-CLIP, vb gibi) kullanılmaya başlanılmış ve böylece etkileşimin kalıcılığı arttırılarak daha etkin çöktürme sağlanmaya başlanmasıyla daha önce bilinmeyen RBP proteinler tespit edilmeye de başlanmıştır [Ule et al., 2003], [Danan et al., 2016], [Jangi et al., 2014], [Licatalosi et al., 2008]. Aynı zamanda daha hassas sekanslama metodlarının kullanılması yapılan çalışmaların daha ayrıntılı sonuçlara ulaşılmasını mümkün kılmaktadır. Geleneksel yöntemlerle RRE dizileri RNA hedef dizilerinin analiz edilerek tespit edilmesini takiben biyokimyasal olarak doğrulanması şeklinde bir yol izlenirken, özellikle bu yeni metodlar proteine ait bağlanma bölgesiyle RNA arasında çapraz bağlanmaya neden olarak proteine ait bağlanma bölgesinin daha rahat saptanmasını mümkün kılmaktadır.

Özellikle proteomun tekrar yapılanmasını sağlayan alternatif kırpılmada meydana gelen değişiklerin kanser oluşumunda önemli olabileceğinin düşünülmesi ise kırpılma metabolizmasındaki görevleri nedeniyle RNA bağlayan proteinlere dair araştırmalarının hızlanmasını sağlamıştır. Apoptotik yolaklarda rol oynayarak kanserleşmeyle ilişkilendirilen uzun intronik kodlanmayan RNA olarak bilinen FAS antisense RNA (FAS-AS1) ve kaspaz 2 (Caspase 2, CASP2) mRNA'sıyla etkileşen RNA bağlanma motifi protein 5 (RNA Binding Motif Protein 5, RBM5) proteini bu araştırmalara örnektir [Sehgal et al., 2014], [Fushimi et al., 2008], [Silva et al.,2015]. Apoptoz yolağında görev alan Bcl-x mRNA'sının alternatif kırpılma mekanizmasını düzenleyen ve öncül-onkogen c (proto-oncogen c, Src)'yi tirozin fosforilasyonuyla aktive olarak düzenleyen Sam68 proteinin yine kanserleşmede görev aldığı düşünülen bir diğer RNA bağlayıcı protein olduğu bilinmektedir [Paronetto et al., 2007], [Bus`a et al., 2007], [Silva et al., 2015].

RNA bağlayan proteinler ayrıca miRNA, noncoding RNA gibi geri besleme mekanizmaların çalışmasında da önemli bir yere sahiptir [Ghigna, 2015]. RNA susturma metabolizmasında argonotun mikroRNA bağlanması bu örneklerden biri olarak literatürde yer almaktadır.

3.2. Kanser Metabolizmasında Hücresel Stres

Sıcaklık değişimi, hücre içi oksidan artışı, viral ajanların varlığı, aminoasit yokluğu gibi bazı fiziksel koşulların oluşumunun canlılar üzerinde stres yaratarak farklı olumsuz etkilere neden olduğu bilinmektedir [Patel et al., 2011], [Halliwell, 2007], [Velichko et al., 2015], [Petrova et al., 2016].

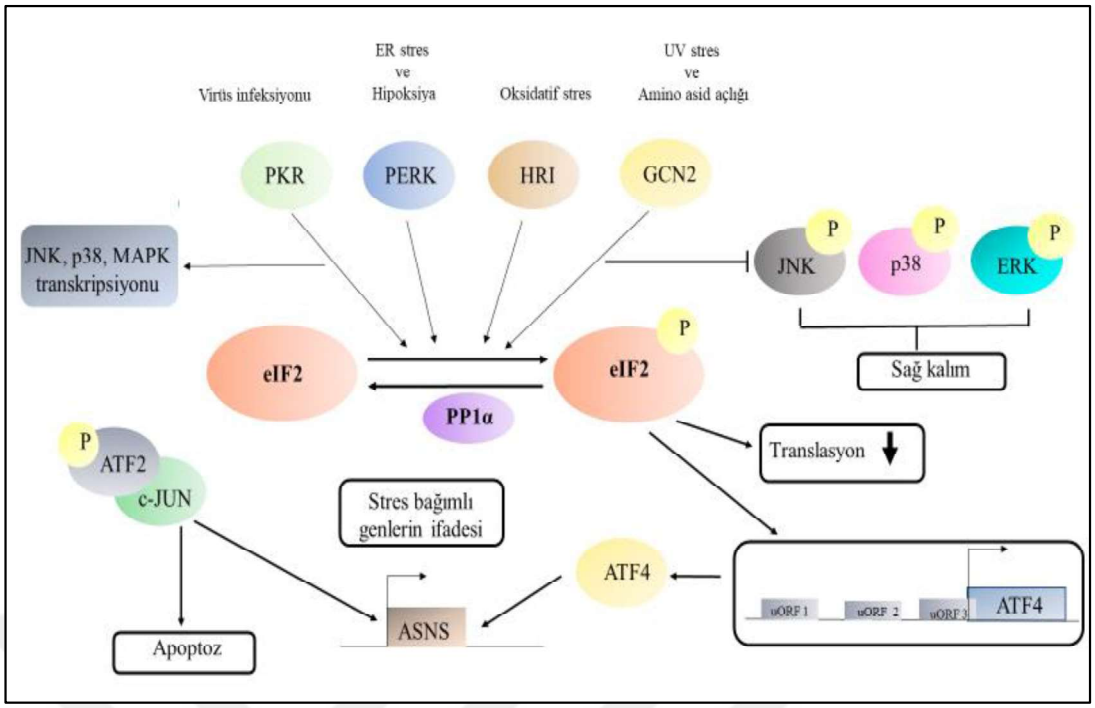
Hücresel stres cevaplarında ise temel olarak ökaryotik başlatıcı faktör 2 (eukaryotic initiation factor 2, eIF2) fosforilasyonu büyük önem taşımaktadır. eIF2 proteininin α alt ünitesinin hücre içi fosforilasyonu için ise dsRNA ile aktive edilen proetin kinaz (dsRNA-activated protein kinase, PKR), PKR benzeri endoplazmik retikulum kinaz (PKR-like endoplasmic reticulum kinase, PERK), heme düzenleyici başlatıcı faktör 2α kinaz (heme-regulated initiation factor-2α kinase, HIR) ve genel kontrol baskılanamaz protein 2 (general control nonderepressible 2, GCN2) olmak üzere dört farklı kinaza ihtiyaç duyulmaktadır [Wek et al., 2006]. Kinaz yardımıya eIF2'nin serin 51'den fosforillenmesi sonucu ise bu proteinin eIF2B tarafından GTP bağlı aktif formuna dönüştürülmesi engellenmektedir. eIF2–GTP'nin oluşmamasının sonucu olarak da 43S öncül başlangıç kompleksi (preinitiation compleks) formasyonu oluşamamakta ve böylece translasyon azalmaktadır. Translasyonda meydana gelen bu düşüş, stres koşullarında oluşan zararı düzeltmeye yönelik gen ifadelerinin başlatılması adına zaman kazandıran en önemli adaptasyonlardan biridir.

Stres durumunda gerçekleşen ikinci bir düzenleme ise, translasyon düşmüş olmasına rağmen, hücre canlılığının devam etmesi adına verilen hücresel bir cevap olarak bazı protein ifadelerinin arttırılmasıdır (Şekil 3.2 ve Şekil 5.30). Seçici olarak gerçekleşen bu translasyon mekanizmasının nasıl gerçekleştiğine dair ilk bulgular ise mayalarla yapılan çalışmalardan gelmektedir. *Saccharomyces cerevisiae* ile yapılan deneyler, sonucunda stres bağımlı gerçekleşen eIF2'nin alfa alt ünitesinin fosforile olmasının genel kontrol baskılanamaz protein 4 (general control nonderepressible 4, GCN4) mRNA'sının translasyona uğramasıyla sonuçlandığı belirtilmiştir [Mueller ve Hinnebusch, 1986]. GCN4 mRNA'sı, GCN4 proteinini kodlayan dizinin 150-360 nükleotid yukarısında dört adet ön açık okuma bölgesi (upstream open reading frame, uORF) içermektedir. 1986 yılında yapılan ve GCN4 mRNA'sına ait başlama kodonlarında nokta mutasyonaları yapılarak gerçekleştirilen deneyde, GCN4'ün sahip olduğu dört adet uORF'den ikinci, üçüncü ve dördüncünün GCN4'ün translasyon

inhibisyonuna neden olduğu belirtilmiştir [Mueller ve Hinnebusch, 1986]. Yine aynı çalışmada ilk başta yer alan uORF'nin ise stres koşullarında etkin olan GCN4 translasyonu için gerekli olduğu ortaya çıkarılmıştır. Ayrıca stres durumunda ilk ORF'nin translasyonunun ardından ribozomların ortamdaki eIF2α-P birkimine bağlı olarak, diğer uORF'lerin translasyonunu atladığı, tekrar başlatma (reinitiation) ile de GCN4'ün protein ifadesinin gerçekleştiği bildirilmiştir [Abastado et al., 1991], [Hinnebusch et al., 1997].

Memelilerde ise GCN4'ün bir ortoloğu bulunmamasına rağmen yapılan çalışmalar eIF2'nin fosforillenmesi sonucu transkripsiyon faktörü etkinleştirici 4 (activating transcription factor 4, ATF4) protein ifadesinin hücresel aminoasit açlığına cevap olarak attığı gösterilmiştir (Şekil 1.6). İki adet uORF bölgesine sahip olan ATF4 lösin fermuarı alt ünitesiyle DNA'ya bağlanmakta ve transkripsiyon faktörü olarak görev yapmaktadır. ATF4'ün sahip olduğu uORF bölgelerinden ilkinden üç aminoasitlik pozitif etkileyen element (positive-acting element) olarak görev yapan kısa bir peptid sentezlenirken, ikinci bölgesinden ise ATF4'ü kodlayan bölümün bir kısmını da içine alan ve böylece ATF4'ün translasyonunu inhibe eden 59 aminoasitlik bir peptid dizisi sentezlenmektedir [Vattem ve Wek, 2004]. İnsan ve farede ise üç adet uORF bölgesi bulunmakta ve bu canlılarda üçüncü uORF ise kodlanan ATF4'ün bir kısmını içermektedir. Yapılan çalışmalar stres olmayan durumda uORF bölgelerinin translasyonunun ATF4 ifadesini inhibe ettiğini göstermektedir. Aynı zamanda bu çalışmalar stres durumunda 5' ucunda yer alan ilk uORF'nin translasyona uğradığını, eIF2-GTP miktarının düşüşüne bağlı olarak ikinci veya üçüncünün ise geçilerek ATF4'ün ifade edildiği belirtilmektedir [Vattem ve Wek, 2004], [Young ve Wek, 2016]. ATF4 proteinin ifadesinin artışı ise endoplasmik retikulum (ER) stresinde apoptoz cevabının oluşmasında görevli CHOP/GADD153 (C/EBP homologous protein/ DNA damage-inducible gene 153) ifadesi ve stres cevabına bağlı ifade edilen birçok genin transkripsiyon faktörü olan transkripsiyon faktörü etkinleştirici 3 (activating transcription factor 3, ATF3) gibi birçok protein regülasyonunu sağlamaktadır [Jiang et al., 2004], [Harding et al., 2000], [Wek et al., 2006].

Tümörleşme sürecinde kanser hücreleri hipoksiye ve glikoz azlığı gibi birçok metabolik stres koşuluna maruz kalmaktadır (Şekil 3.2). Bu süreç sonucunda ise hücre otofaji ve katlanmamış protein üretimi stres cevap yolaklarını kullanarak devamlılıklarını sağlamaya çalışmaktadırlar.



Şekil 3.2: Hücresel stres cevabında rol alan protein yolakları.

3.2.1. Hücresel Açlık Stresi

Hücresel stresin en önemli etkenlerinden biri aminoasit ya da protein yoksunluğuna bağlı olarak gerçekleşen hücresel açlık stresidir. Özellikle *Homo sapiens* tarafından sentezlenemeyen ve dolayısıyla dışardan alınması gerekli olan metiyonin, histidin, lösin, izolösin, lizin, penilalanin, treonin, triptofan, valin ya da yarı gerekli olan glutamin ve tirozin yoksunlukları büyüme gibi metabolik faaliyetler üzerinde oldukça büyük önem taşımaktadır [Reeds, 2000]. Aminoasit yoksunluğu sonucu Rapamisin kompleks 1 mekanik hedefi (mechanistic Target of Rapamycin Complex 1, mTORC1) ve GCN2 protein kinazın görev aldığı iki farklı yolağın devreye girdiği bilinmektedir [Gallinetti et al., 2013]. mTORC1'in metiyonin, arjinin ve lösin varlığında Rag GTPazı aktive eden kinazları aktive etmekte, GCN2'nin ise gerekli amainoasit yoksunluğuna cevaben aktive olmaktadır [Gu et al., 2017], [Wek et al., 1995]. GCN2'nin sadece aminoasit yoksunluğunda değil aynı zamanda glukoz yoksunluğu ve UV'ye maruz kalma sonucunda oluşan streslerde de aktive olduğu da bilinmektedir [Yang et al., 2000], [Deng et al., 2002]. 2012 yılında yapılan başka bir çalışmada ise metiyonin/ sistein ya da tirozin gibi gerekli aminoasit yoksunluklarının hücrede plazmid ya da retroviral kaynaklı sessizleştirilmiş entegre transgenlerin

asetilasyona bağlı olarak tekrar aktive olduğu da gösterilmiştir [Palmisano et al., 2012].

Hücresel açlık yani aminoasit yoksunluğu cevabı ökaryotik hücrelerde yüksüz tRNA'ların GCN2'nin HisRS (histidil-tRNA sentetaz) ile homoloji gösteren alt birimine bağlanmasıyla başlamaktadır [Diallinas ve Thireos, 1994], [Wek et al., 1995]. GCN2'de meydana gelen bu konformasyonel değişiklik sonucu treonin 882 ve 887 rezidülerinde otofosforilasyon gerçekleşmekte ve GCN2 eIF2α'yi fosforile etmektedir [Romano et al., 1998]. Fosforile olan eIF2α ise translasyonun başlamasını engellemekte ve böylece aminoasit yoksunluğuna karşı bir adaptasyon tepkisi ortaya çıkmaktadır. Translasyonun azalmasıyla aynı anda ise açlık cevabına özel bazı mRNA'ların ve bakterilerde GCN4, memelilerde ise ATF4 geninin ifadesi arttırılmaktadır [Gallinetti et al., 2013] (Şekil 3.2).

GCN2 aynı zamanda bazı kanserlerle bağlantılı olduğu aminoasit ve glukoz yoksunluğunda GCN2-ATF4-asparjin sentetaz yolağının aktive olarak kanser hücrelerinin sağkalımında görev aldığı gösterilmiştir [Ye, 2010]. Yine aynı çalışmada GCN2 ve ATF4 yokluğunda ise tümör büyümesinin durduğu rapor edilmiştir.

3.2.2. Sıcaklık Stresi

Sıcaklık stresi ve sıcaklık stresi cevabı daha önce organizma düzeyinde çalışılmış olmasına karşın, ilk hücresel yanıtlara dair bulgular 1962 yılında bir meyve sineği türü olan *Drosophila busckii*'nin tükrük bezi kromozomlarının oluşturduğu puf yapılanmasındaki farklılıklar düzeyinde elde edilebilmiştir [Ritossa, 1962]. 1973 yılında ise bu puf bölgelerinin oluşum mekanizmalarının moleküler analizleri yapılmaya başlanmış ve birkaç protein tespit edilmiştir [Tissiéres et al., 1974].

Sıcaklık stresi sonrası aktive olan metabolik yolakta yer alan en önemli protein gruplarından bir tanesi de arkealardan ökaryotlara kadar nerdeyse tüm evrimsel basamaklarda korunmuş olan sıcaklık şoku proteinleri olarak adlandırılan HSP (ısı şoku proteinleri)'dir [Lindquist, 1986]. HSP'ler özellikle stres sırasında sitoplazmada meydana gelen membransız sitoplazmik yapılar içinde yer alarak proteinlerin katlanmasından, çoklu protein yapılarının korunması ve bazı protein yapılarının ise parçalanmasına kadar pek çok olayda görev alan moleküler çaperonlar olarak tanımlanmaktadır.

Bu özellikleriyle HSP'lerin sadece stresle başa çıkmadaki rollerinin dışında kanserde ifade artışlarının olduğunun tespit edilmesi de bilimsel araştırmalarında önemli bir hale gelmelerine neden olmuştur [Garrido et al., 1998], [Kamal et al., 2004], [Graner et al., 2007]. Özellikle Hsp70 ve Hsp 27 proteinlerinin böbrek kanseri, mesane kanseri, osteoblastoma, endometriyum kanseri gibi birçok kanser türünde ifade artışı gözlemlenmiştir [Ciocca ve Calderwood, 2005]. Aynı zamanda yayılım ve apoptoz direnci konusunda rol alan bu proteinlerin tümörleşme tanısının konulmasında bir belirteç olabilecekleri ifade edilmiştir. Ayrıca bu durum kemoterapiye dayanıklı bazı kanser türlerinin tedavisinde kullanılabilecek bir hedef olabileceklerini de düşündürmektedir.

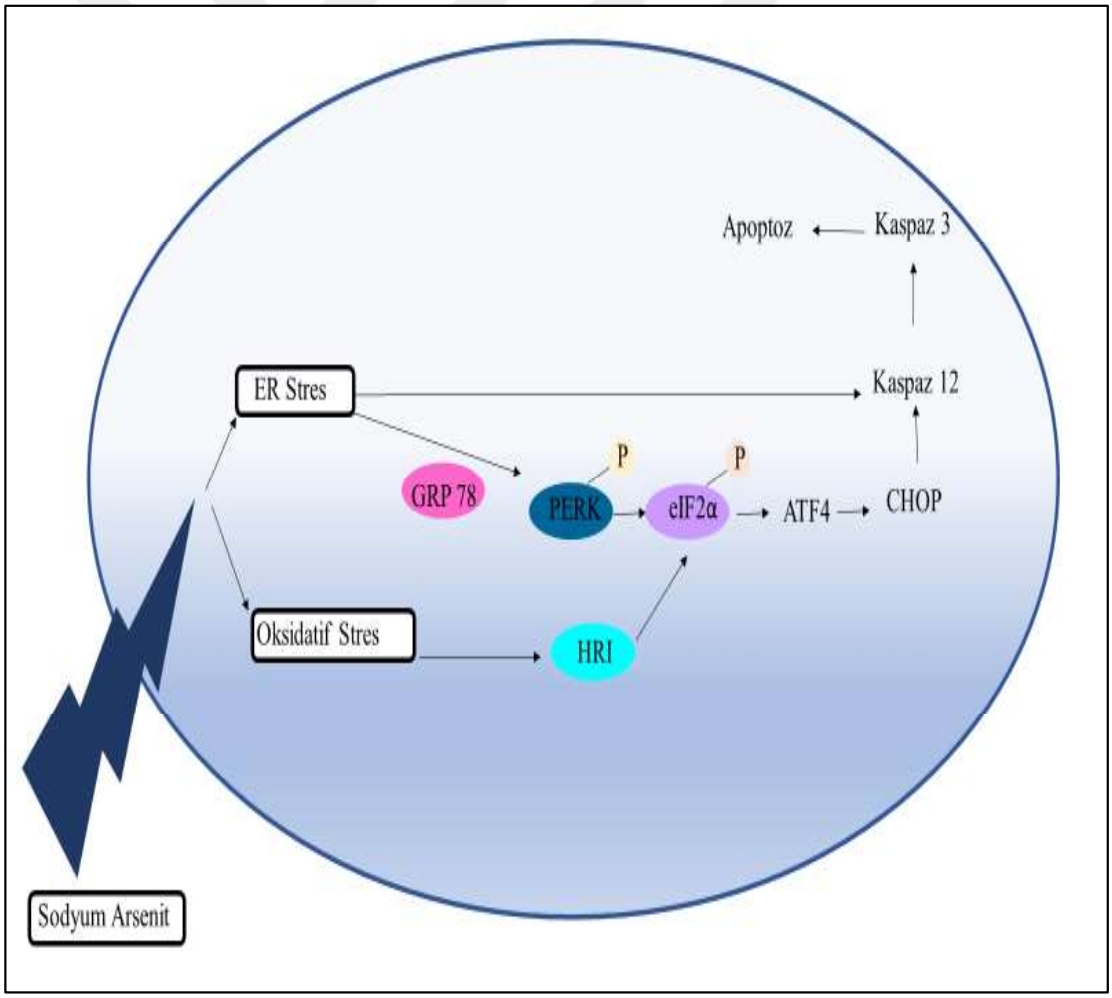
3.2.3. Oksidatif Stres

Oksidatif stres reaktif metabolitlerle serbest radikal ürünleri arasında meydana gelen dengenin bozularak reaktif oksijen ürünleri (ROS) oluşması sonucu hücrede gelen stres olarak tanımlanmaktadır [Reuter et al., 2010]. Hücre tarafından oksidan adı verien reaktif oksijen ürünlerinin zararlı etkilerinden korunmak amaçlı enzimlerin ve antioksidanların yer aldığı bazı mekanizmalar geliştirilmiştir. Ayrıca hücre içinde katalaz ve peroksidaz gibi bazı enzimlerin de serbest radikallerin uzaklaştırılmasında kullanıldığı ve böylece homeostazisini korunmaya çalışıldığı bilinmektedir. ROS ürünlerinin oluşumu hücre membanında lipit peroksidasyonuna neden olabildiği gibi, bazı proteinlerle ya da nükleik asitlerle reaksiyona girebilmekte ve bu durum hücrenin hasara uğramasıyla apoptoza kadar pek çok şekilde sonuçlanabilmektedir [Davies ve Goldberg, 1987], [Dahl et al., 2015], [Barzilai ve Yamamoto, 2004].

Metal mutagenezlerinin oksidatif strese neden olduğu bilinmesine rağman ilk defa 1994 yılında insan fibroblastlarıyla yapılan çalışmada sodyum arsenitin hem oksijenaz aktivitesinde hem de ferritin düzeyinde belirgin artışa sebep olduğu bildirilmiştir [Lee ve Ho, 1995]. Aynı zamanda katalaz aktivitesini düşürmesiyle de bu ajanın oksidatif stresi indükleyebileceği bilinmektedir.

Daha sonra yapılan araştırmalarda ise sodyum arsenit yapılan oksidatif stresi mimik etmek için kullanılmaya başlanmıştır [Lee et al., 2005]. Sodyum arsenit varlığında hücresel stres cevaplarıyla ilgili ise literatürde çeşitli veriler mevcuttur. 2001 yılında eritrositlerle, 2005 yılında da murin embriyonik fibroblastlarla yapılan

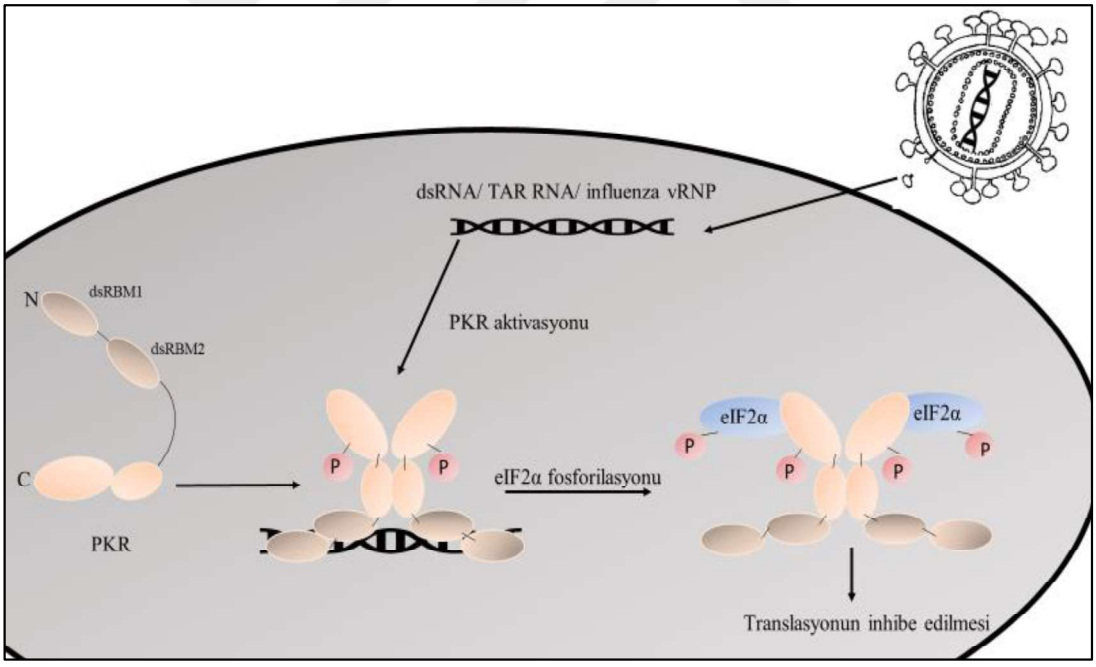
deneylerde sodyum arsenit varlığında HRI (hem regüle edici inhibitör kinaz)'ın aktive olarak translasyonun durduğuna yönelik elde edilmiş veriler bulunmaktadır [Lu et al., 2001], [McEwen et al., 2005]. Bu çalışmalarda hücrelere sodyum arsenit uygulandığında HRI yokluğuna bağlı olarak eIF2α'nın fosforilasyonunun gerçekleşmediği belirlenmiştir. Diğer bir bulgu ise nöronal hücrelerde sodyum arsenitin protein katlanması üzerindeki negatif etkisine bağlı olarak UPR (katlanmamış protein cevabı) yolağını aktifleştirerek GRP78 (glucose regulated protein 78) üzerinden PERK'in otofosforile olarak eIF2α'yı fosforile etmesidir [Sun et al., 2017]. Aktive olan eIF2α-ATF4 dışında ise kaspaz 12 ve kaspaz 3'ün de sodyum arsenite cevap olarak aktive olduğundan ve hücreyi apoptoza götürdüğünden bahsedilmiştir. Literatürde yer alan sodyum arsenite bağlı gelişen hücresel stres cevapları Şekil 3.3'de yer almaktadır.



Şekil 3.3: Sodyum arsenitin hücre içi etki mekanizması.

3.2.4. Viral Stres

Sıcaklık ve oksidatif ajan varlığı gibi durumların dışında hücre içi stres oluşumuna neden olan en önemli etkenlerden birisi de viral ajanlardır. Literatürde yer alan çalışmalar virüs infeksiyonunu takiben 2′,5′-oligoadenilat sentetaz ve Mx (interferon-induced GTP-binding protein) gibi interferonla etkin hale gelen genlerin yanı sıra "double-stranded (ds) RNA-dependent protein kinase (PKR) proteinin de aktive olduğunu göstermektedir [Sadler ve Willams, 2008]. PKR proteinin aktive olması translasyonun başlaması için gerekli olan eIF2α'nın serin 51'den fosforillenmesine neden olmaktadır. eIF2α'nın fosforillenmesi ise guanine nucleotide exchange factor eIF2β alt biriminden ayrılmasıyla sonuçlanmaktadır (Şekil 3.4). Aynı zamanda PKR ifadesi dayalı çalışmalar PKR proteinin bazı RNA ve DNA virüs infeksiyonunda korunmada önemli olduğunu göstermektedir [Al-khatib et al., 2003], [Noguchi et al., 2001], [Gorchakov et al., 2004].



Şekil 3.4: Viral infeksiyon sonrası PKR aktivasyonu.

Virüs infeksiyonuna bağlı olarak gelişen stres granülü formasyonu ise viral ajanın türüne bağlı olarak değişmektedir [Ortiz et al., 2016]. Bazı viral ajanlarla enfekte olan hücrelerde stres granülü oluşurken, bazılarında lider protein inhibisyonu, C proteini aktivitesine bağlı PKR inaktivasyonu, eIF2α fosforilasyon inhibisyonu gibi

birçok yolağın aktivitesi sonucu stres granül oluşumlarına rastlanmamaktadır [Onomoto et al., 2014]. Farklı virüslere verilen stres granülü oluşum yanıtları Tablo 3.1'de yer almaktadır.

Bu duruma bağlı olarak Sendai ve kızamık virüsü infeksiyonlarında stres sonucu oluşan stres granülü yapılarına rastlanmazken, Respiratuvar Sinsitiyal Virüsü (RSV) infeksiyonunda RasGAP SH3 domain-binding protein 1 (G3BP1) ve T-cell intracellular antigen (TIA1) proteinlerini içeren stres granülü oluşumlarına rastlanmaktadır.

Tablo 3.1: Farklı virüs tiplerine verilen hücresel yanıtlardan stres granülü oluşum durumu.

	Genetik Materyal	Zarf Bulundurma	Stres Ganülü oluşumu	Örnek
DNA virüsü	dsDNA	Var	Var	
			Yok	Vaccinia virüs
		Yok	Var	
			Yok	Adenovirüs
	ssDNA	Yok	Var	
			Yok	
RNA virüsü	RNA (+)	Yok	Var (Geçici)	Poliovirüs, EMCV
			Yok	Mengovirüs, TMEV
		Var	Var (Geçici)	Sindbis virüs, SFV, HCV, Corona virüsü
			Yok	Rubella virüsü, JEV
	RNA (-)	Var	Var	VSV (Türe bağlı), RSV
			Yok	VSV (Türe bağlı), Junin virüs, Influenza virüs, Sendai virüs, Kızamık virüsü
	RNA (+/-)	Çift kapsid	Var	Reovirüs
			Yok	Rotavirüs
	RNA(+) via DNA	Var	Var	
			Yok	

Kanser ve viral stres arasındaki ilişki konusunda ise literatürde yer alan çalışmalarda PKR proteininden sıklıkla bahsedilmekte ve dsRNA enfeksiyonu sonucu aktive olan PRK'nın interferon cevabı gibi tümörleşme mekanizmasında da rol aldığından bahsedilmektedir [Mounir ve Koromilas, 2010]. PKR'nin kanserleşmedeki rolüyle ilgili deneyler ise farklı sonuçlar içermektedir [Marchal et al., 2014]. Literatürde yer alan bazı çalışmalarda PKR aktivasyonunun antitümör etkisi bulunduğundan, malignant kanserlerde PKR ifadesinin baskılandığından veya inaktive olduğundan bahsedilirken, bazı çalışmalarda ise aşırı ifadesinin kolon, melanoma, karaciğer, meme ve tiroid kanseri oluşumuyla bağlantılı olduğuna dikkat çekilmektedir [Yoon et al., 2009], [Mounir et al., 2009], [Roh et al., 2005], [Terada et al., 2000]. Aynı zamanda proliferatif transkripsiyon faktörü olan NF-kB'nin tetiklediği kanserleşme yolağında PKR proteinin görev alıyor olabileceği tahmin edilmekte ve aynı kanser tiplerinde görülen PKR/eIF2/NF-kB aktivite farklılıklarının tespit edilmesi de bu görüşü desteklemektedir [Delgado ve Lucca, 2007].

3.3.Kanser Metabolizmasında Membransız Organellerin Rolü

Bu esnek ve dinamik yapı içerisinde keşfedilmiş en yeni yapılar membransız granüler yapılardır. Son yıllarda yapılan çalışmalarla çekirdek içerisindeki nükleolus, Cajal body, PML body (promyelocytic leukaemia body), Polycomb body, nükleer benek (nükleer speckle) gibi yapılar bulunurken, sitoplazmada ise stres granülü, P-body gibi memransız organeller tanımlanmış bulunmaktadır. Geri dönüşümlü olan ve bulunduğu çevreden daha yoğunlukları bakımından ayrılan bu yapıların zengin RNA içeriğine sahip olasının yanı sıra, RNA bağlayıcı proteinlerle birlikte bir kor halinde bulundukları gösterilmiştir. Her bir farklı kompartmanın ise hücre içi farklı görevler içerecek şekilde özel içeriklere sahip oldukları da bilinmektedir.

Kanserle membransız hücre içi organeller arasındaki ilişkinin araştırılması ise son birkaç yılda dikkat çeken konular arasında yer almaktadır. Bunlardan bir tanesi hücre içi faz ayrımında görev alan ve E3 übikitin ligaz adaptör proteini gibi görev yapan Speckle-Type Poz Protein (SPOP) proteininin meme, prostat, endometriyum gibi birçok kanser arasındaki ilişkinin gösterilmesidir. Bu konuda yapılmış olan bir diğer çalışma ise yine faz ayrımında görevli olduğu bilinen LPSS proteininin pankreas kanseri tedavisinde kullanımına ilişkindir [Ming et al., 2019].

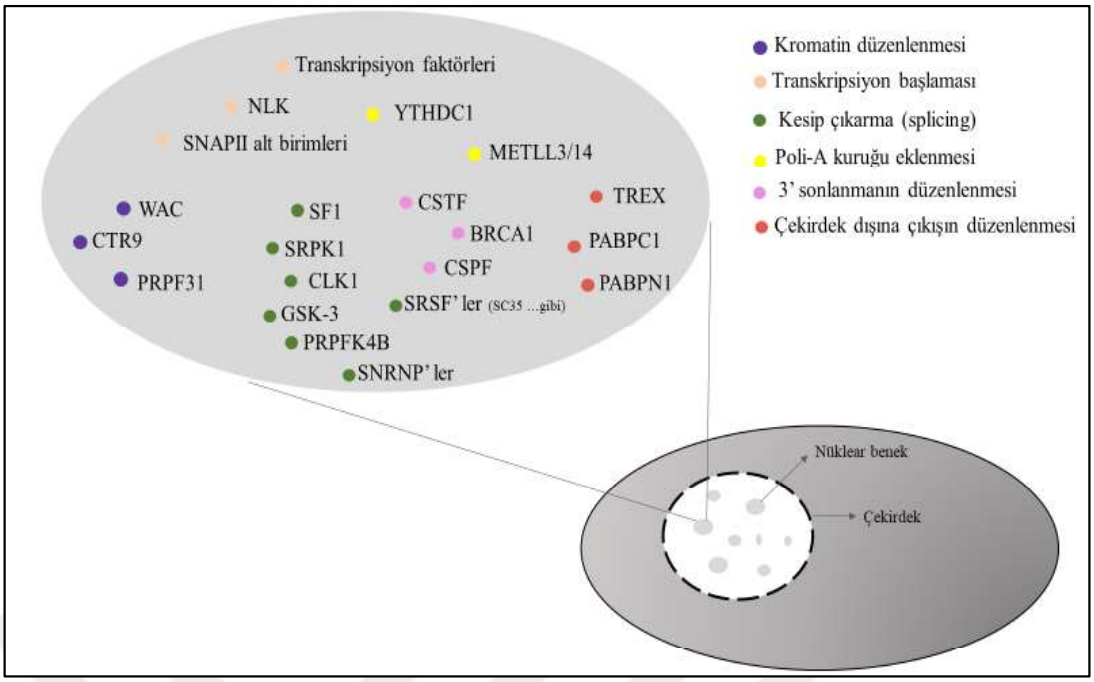
3.3.1.Nükleer Benekler

Günümüzde hücre içi en önemli aktivitelerden biri olan gen ifadesinin gerçekleştiği çekirdek yapısı henüz tam olarak aydınlatılamamış olmakla birlikte, bu yapı ve organizasyonunun tam olarak anlaşılabilmesi için çekirdek içi yapılanmaların araştırılması büyük bir önem taşımaktadır. Bu çekirdek içi yapılanmalardan biri olan ve kırpılma faktörlerini barındıran nükleer benekler kromatinler arasında yer alan, çekirdek içi membransız küçük organeller olarak tanımlanmaktadır. İlk olarak Santiago Ramon y Cajal tarafından 1910 yılında boyanmış örnekler üzerinde, ışık mikroskobuyla yapılan araştırmalar sırasında fark edilmiş ve Cajal tarafından "grumos hialinos" (hiyalin topaklar) olarak adlandırılmışlardır [y Cajal, 1910], [Lafarga, 2009]. Nükleer benekler Swift tarafından 1959 yılında yapılan çalışmalar sırasında RNA içeren bulutsu yapılar olarak betimlenmiş olmasına rağmen, ilk defa J. Swanson Beck tarafından 1961 yılında sıçan karaciğerinde yapılan çalışma sırasında benek (speckle) kelimesiyle betimlenmiş ve adlandırılmıştır [Swift, 1959] [Beck, 1961]. Swift ve Beck'in bulgularının birleştirilmesi ise yaklaşık yirmi yıl sonra gerçekleşebilmiştir. Yapılan çalışmalarda kırpılma faktörlerine yönelik antikorlar kullanıldığında çekirdek içinde benek benzeri bir boyama profiliyle karşılaşılmıştır [Spector ve Lamond, 2011]. Bu çalışmalar arasında yer alan Spector ve Lerner'ın Smith (Sm) antikorlarını kullanarak yaptıkları deneyler sonucunda ise U1, U2, U4, U5 ve U6 gibi küçük nükleer ribonükleoproteinlerin (small nuclear ribonucleoprotein, snRNP'lerin) bu alanlarda konumlandığı tespit edilmiştir [Lerner et al., 1981], [Spector et al., 1984]. Günümüzde ise nükleer benekler, kırpılmada görevli olan bu snRNP'leri bulundurmaları nedeniyle kırpılma (splicing) benekleri olarak da adlandırılmaktadır.

Kırpılma olayında görev alan birçok protein bu alanda bulunuyor olmasına rağmen, literatürde yer alan bazı çalışmalarda kırpılma olayının nükleer beneklerin etrafındaki perikromatin fibriller alanlarda gerçekleşiyor olabileceği, bazı çalışmalarda ise nükleer beneklerin içinde bu biyolojik sürecin gerçekleştiği görüşü yer almaktadır. Fakat bugün transkripsiyonla eş zamanlı gerçekleşen kırpılma olayının perikromatin fibriller arasında meydana geldiğine, transkripsiyonu takiben gerçekleşen kısmın nükleer beneklerde gerçekleştiğine dair mevcut kanıtlar bulunmaktadır [Girard et al., 2012].

İmmunofloresan analizlerle gözlemlenebilen nükleer beneklerin interfaz safhasındaki bir memeli hücresinde 25-50 adet bulunduğu ve farklı büyüklüklerde olabildiği bildirilmiştir. Elektron mikroskobuyla yapılan çalışmalar ise nükleer beneklerin 20-25nm büyüklükte olduğunu göstermiştir. Aynı zamanda daha sonra yapılan çalışmalarla ise nükleer beneklerin protein ve RNA'dan oluşan dinamik yapılar olduğu belirlenmiştir. İmmunofloresan boyama çalışmalarıyla da özellikle poliA kuyruğuna sahip RNA'lar tarafından sarılmış bir kora sahip olduğu da gösterilmiş bulunmaktadır.

Nükleer beneklerde kırpılma mekanizmasında görev alan proteinlerin bulunmasının yanı sıra Sarmal bobinli WW alan içeren adaptör proteini (WW Domain Containing Adaptor With Coiled-Coil, WAC) ve RNA polimeraz ilişkili protein CTR9 (RNA polymerase-associated protein CTR9) gibi epigenetik kontrolde rol oynayan proteinler; serin/treonin-protein kinaz 1 (serine/threonine-protein kinase 1, SRPK1), çift özgüllük protein kinaz 1 (Dual specificity protein kinase 1, CLK1), glikojen sentaz kinaz 3 beta (Glycogen synthase kinase 3 beta, GSK3B), Serin / treonin-protein kinaz PRP4 homologu (Serine/threonine-protein kinase PRP4 homolog, PRPF4B) gibi kinazlar ve protein fosfotaz 1 nükleer inhibitörü (Nuclear inhibitor of protein phosphatase-1, NIPP1) gibi fosfotazların da konumlandığı da literatürde yer almaktadır [Hernandez et al., 2004], [Saitoh et al., 2004], [Keshwani et al., 2015], [Trinkle-Mulcahy et al., 1999], [Corkery et al., 2015], [Galganski et al., 2017]. Bu durum, ilgili alanların sadece kırpılma ile ilgili bir bölge olmanın ötesinde RNA metabolizmasıyla yakından ilişkili olduğunun gösterilmesi bakımından oldukça önemlidir. Nitekim bugün nükleer beneklerde konumlanan proteinlerin gen ifadesi düzenlenmesinden, tanskripsiyon basamaklarının tamamlanarak RNA'ların çekirdekten sitoplazmaya iletilmesine kadar birçok olayda görev aldığı bilinmektedir. Şekil 3.5 'de bu yapılarda konumlanarak çeşitli düzenlemelerde direk ya da indirek olarak rol alan protein örnekleri yer almaktadır.



Şekil 3.5: Nükleer beneklerde konumlanan bazı proteinler ve bu proteinlerin biyolojik fonksiyonları.

Wang ve arkadaşları tarafından 2018 yılında yapılan bir çalışmada ise endojen intron içermeyen mRNA'ların ve mRNA'ların çekirdek içinden çıkmasında görev alan TREX kompleksi (TRanscription-EXport complex) yapısının nükleer beneklerde konumlandığı belirtilmiştir. Aynı zamanda bu konumlanmanın nükleer beneklerin mRNA'lar için çekirdekten çıkış öncesi bir kontrol bölgesi olabileceğine dair bir ipucu olabileceğine dikkat çekilmiştir [Wang et al., 2018].

Nükleer beneklerle ilgili yapılan çalışmalarda en çok kullanılan antikorların başında ise serin/arjininince zengin kırpılma faktörü 2 (Serine/arginine-rich splicing factor SC35, SRSF2) gelmektedir. Bu antikor fosforile haldeki serin ve arjininince zengin proteinleri tanıması nedeniyle imunofloresan boyama çalışmalarında sıklıkla yer almaktadır. Kırpılma için gerekli olan bu proteinin ATP bağımlı olarak RNA'ların pürin bakımımdan zengin 5' ve 3' kırpılma bölgelerine bağlanma kapasitesine sahip olduğu bilinmektedir. Bu özelliği nedeniyle RNA-spliceozom bağlanmasını sağlamasının yanı sıra U1 ve U2 snRNP'nin pre-mRNA ile ilişki kurmasına yardımcı olmaktadır.

RNA biyogenezi konusunda önemli bir yere sahip olan nükleer beneklerde konumlanan protein ifadelerine bağlı değişikliklerin ise kanser gibi hastalıkların oluşumuyla bağlantılı olduğuna dair birçok çalışma literatürde mevcuttur. Özellikle

alternatif kırpılma olayında görev alan bazı proteinlerin kanserle ilişkili olduğu bilinmektedir [Venables, 2004]. Bu proteinlerden biri de SRPK1 tarafından fosforile edilen ve mRNA stabilitesi, translasyon, miRNA düzenlemesi, nükleer stres ve sumolasyon gibi birçok yolakta görev alan serin/arjininince zengin kırpılma faktörü 1 (Serine/arginine rich splicing factor 1, SRSF1) proteinidir. Literatürde yer alan bazı çalışmalarda SRSF1 proteinin akciğer, kolon, meme, tiroid, karaciğer, pankreas kanserlerinde proto onkogen gibi bir rol oynuyor olabileceğine dikkat çekilmektedir [Karni et al., 2007], [Gout et al., 2012], [Anczuków et al., 2015], [Sheng et al., 2017]. Yine alternatif siplicing olayında görev alan proteinlerden biri olan meme kanseri tip 1 duyarlılık proteini (Breast cancer type 1 susceptibility protein, BRCA1) ifadesine bağlı değişiklerin over ve meme kanseri oluşumunda önemli bir yere sahip olduğu bilinmektedir. BRAC1 genindeki mutasyonlarla meme kanseri arasındaki ilişkiye dayalı ilk güçlü kanıtlar ise 1994 yılında Miki ve arkadaşları tarafından pozisyonel klonlama metodu kullanılarak yapılan deneyler sonucunda elde edilmiştir [Miki et al., 1994]. Günümüzde ise meme ve over kanserlerinin teşhis ve tedavisi için kullanılan en önemli hedef protein olarak tanınmaktadır [Godet ve Gilkes, 2017].

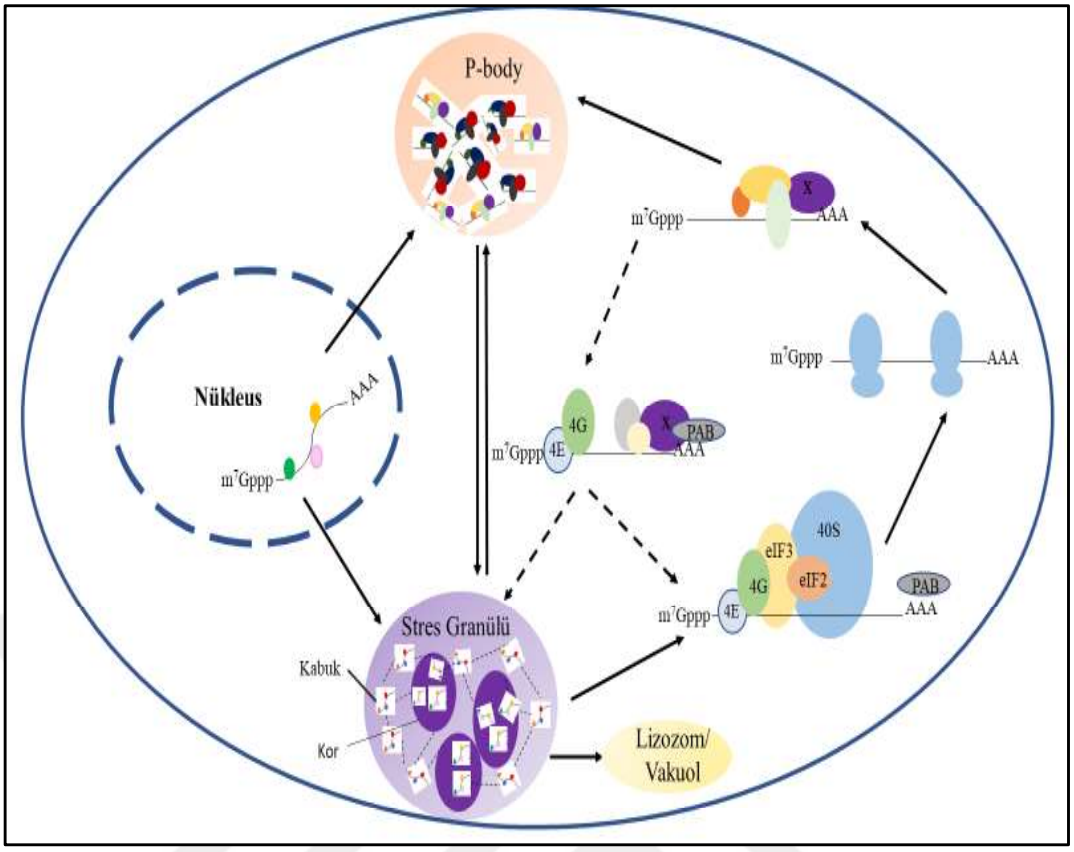
3.3.2. Stres Granülleri

Çevresel stres koşullarının değişimine verilen hücresel cevaplardan bir tanesi de sitoplazmada protein ve RNA içeriğine sahip membransız granüler yapılar oluşturmaktır. Bu yapı ilk defa 1986 yılında tavuk embriyo fibroblastlarıyla yapılan deneyler sırasında sıcaklık stresine bağlı olarak gözlemlenmiş olup, başka memelilerde, mayalarda, *Drosophila*'da ve bitkilerde de varlığı gösterilmiştir [Collier and Schlesinger, 1986], [Nover et al., 1989], [Kedersha et al., 1999].

Yapılan çalışmalar sitoplazmik stres granüllerinin mRNA, protein ve bazı translasyon faktörlerini içerdiğini bilinmektedir [Buchan ve Parker, 2009]. Daha önce yapılan çalışmalarda stres sonucu ve eIF2-GTP-tRNAi^{Met} oluşumunun gerçekleşememesini takiben oluştuğu bilinmektedir. Gilks ve arkadaşları tarafından 2004 yılında yapılmış olan bir çalışmayla eIF2α'nın fosforillenmesinin ardından TIAR ve TIA-1 tarafından eIF2-eIF5 öncül başlangıç kompleksinin meydana geldiği bildirilmiştir. Yine aynı çalışmada bu kompleksin stres granüllerinin kor yapısını oluşturuyor olabileceğinden söz edilmektedir [Gilks et al., 2004]. Bu durumun yanı

sıra günümüzde memelilerde TIA-1'in yanı sıra G3BP1 ve Ataksin 2 (ATXN2) proteinlerinin de stres granülü oluşumuna katkı sağladığı bilinmektedir. 2016 yılında yapılan başka bir çalışmayla ise stres granüllerinin stabil bir yapıda olan kor ve zayıf etkileşimlerin meydana getirdiği daha dinamik bir yapıya sahip kabuk olmak üzere iki farklı alandan oluştuğu deneysel olarak kanıtlanmıştır [Jain et al., 2016]. Ayrıca memeli ve mayalardan izole edilen stres granülü yapılarıyla yapılan kütle spektrometresi analizlerinde bu granüllerde çok sayıda ATP bağımlı helikaz ve protein modelleyici varlığı tespit edilmiştir. Bu durum stres granüllerinin oluşumunun ATP'ye ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir.

Stres granülleriyle ilgili bir diğer bulguysa kendisi gibi mRNP'ler ve translasyona uğramamış mRNA'ların oluşturduğu sitoplazmik granüler yapılar olan P body ile aralarında bir dönüşüm bulunmasıdır. Bu iki yapı genel olarak birbirlerine benzemelerine rağmen P-body translasyonu bakılayıcı proteinler ve RNA yıkımı mekanizması içerirken, stres granülleri translasyon başlangıcında takılı kalmış mRNA'lar, translasyon başlatıcı proteinler içermektedir [Aizer et al., 2014], [Jain et al., 2016]. Stres granülleri ve P-body dönüşümleri sırasında polizomlardan çıkan mRNA'lar RNP'ler ile bağlanarak P-body yapılarını oluşturmakta ya da tekrar translasyona yönelmektedir. Bu yönelimin ise ya poliA kuyruğu varlığına ya da özgün mRNA bağlayan proteinlerle (X faktörü olarak adlandırılmakta) gerçekleştiği düşünülmektedir. Stres granülünün yapısında yer alan mRNP'lerin ise tekrar translasyona girebilmeleri için eIF2, eIF3 ve ribozomun 40 S alt ünitesi gibi yapılara ihtiyaç duyulmaktadır. İki granüler yapı arasında meydana gelen bu döngü aynı zamanda stres granüllerinin otofajiye uğraması ile de sonuçlanabilmektedir [Bunchan et al., 2013]. Bu döngüye ait bir modelleme Şekil 3.6'da yer almaktadır.



Şekil 3.6: Stres granülü ile P-body yapılarının arasındaki dönüşüme ait modelleme. (Deneysel olarak kanıtlamamış kısımlar kesikli oklarla gösterilmiştir.)

Stres granülleri sadece stres cevabında ve gen regülasyonunda değil aynı zamanda tümör oluşumu ve viral enfeksiyonlarda da oldukça önemlidir.

Genel olarak çekirdek yapıyla beraber protein-protein, protein-RNA ilişkilerinin meydana getirdiği faz ayrılmasıyla oluşan granüler yapılar olduğunun bilinmesine rağmen bu alanlarla ilgili ayrıntılı bilgiler henüz elde edilememiştir.

4.MATERYAL ve YÖNTEM

4.1. Materyal

4.1.1. Hücre Hattı Seçimi

Ccdc124 proteininin olası RNA hedeflerinin belirlenmesinde hücre hattı olarak, hücre büyüklüğüne bağlı olarak organel yapılarının belirgin olmasıyla görüntüleme çalışmalarına izin vermesi ve kolay transfekte edilebilmesi nedeniyle HeLa kullanılmıştır. Stres granülü ve nükleer speckle organizasyonlarında CCDC124 proteininin varlığının göstermek amacıyla ise HCT 116 p53-/-, HCT 116 p53-/- Ccdc124 CRISPR/Cas9 ve HeLa hücre hatlarının kullanılması tercih edilmiştir. Proteinin ifadesinin kanserle olan ilişkilerinin belirlenmesi için ise insan kanser hücre hatlarına ait cDNA örnekleri ve doku panellerinin kullanılması uygun görülmüştür.

4.1.1.1. HeLa

HeLa hücreleri, 8 Şubat 1951 yılında Henrietta Lacks isimli 31 yaşındaki bir kadından alınarak kültüre edilmiş epitelyal kökenli insan servikal kanseri hücreleridir. İlk defa George Otto Gey tarafından kültüre edilmiş olan bu hücreler kolay transfekte edilmesi ve hücre büyüklükleri nedeniyle günümüzde en çok kullanılan hücre hatları arasında yer almaktadır.

4.1.1.2. HCT 116

Kolon kanser hücre hattı olarak bilinen HCT116 transfeksiyon olması nedeniyle tercih edilen hücre hatları arasında yer almaktadır. Yapılmış olan bu çalışmada ise 1998 yılında Bunz ve arkadaşları tarafından homolog rekombinasyonla p53-/- yapılmış olan HCT116 hattı kullanılırken, elde edilen bulguların negatif kontrolü için Crispr/cas9 yöntemi kullanılarak Ccdc124 ifadesi susturulmuş HCT116 p53-/- hücre hattı modeli tercih edilmiştir [Bunz et al., 1998].

4.1.1.3. İnsan Kanser cDNA Paneli

Ccdc124 proteininin cDNA seviyesinde ifadesinin kanser hatlarındaki değişiminin Q-PCR yöntemiyle saptanması için Origene firmasından temin edilen kanser doku panelleri kullanılmıştır. Bu panellere ait katalog bilgileri ise Tablo 4.1'de yer almaktadır.

Tablo 4.1: Ccdc124 ifadesinin RNA düzeyında belirlenmesi için kullanılan paneller.

PANEL İSMİ	MARKASI	KATALOG NUMARASI
Ovarian Cancer Tissue qPCR Panel III	Origene	HORT 303
Cancer Survey cDNA Array	Origene	CSRT 303

Farklı kanser tiplerindeki Ccdc124 ifade seviyelerinin karşılaştırılması için 18 farklı kanser içeren panel tercih edilirken; over kanserinin daha ayrıntılı analizi için 48 farklı hastadan alınmış 6 sağlıklı, 9 adet IA, 2 adet IB, 3 adet IC, 3 adet IIB, 1 adet IIC, 1 adet II, 3 adet IIIA, 6 adet IIIB, 12 adet IIIC, 1adet III,1 adet IV evresindeki kanserli doku cDNA örneklerini içeren qPCR panelinin kullanılması tercih edilmiştir. Her bir kuyucukta 2-3 ng cDNA içeren panaller ise -20^{o}C'de saklanmış, satın alınan paneller üç tekrarlı olacak şekilde kullanılmıştır.

4.1.1.4. İnsan Kanser Doku Paneli

Ccdc124 protein seviyesi ifadesinin kanser hatlarındaki değişiminin immunohistokimya yöntemiyle saptanması için ise Biomax firmasından satın alınan mesane, over ve endometriyum kanser doku panelleri kullanılmıştır. Panellere ait bilgiler Tablo 4.2' de gösterilmiştir.

Tablo 4.2: Ccdc124 ifadesinin protein düzeyinde belirlenmesi için kullanılan paneller.

PANEL İSMİ	MARKASI	KATALOG NUMARASI
Urinary bladder tissue array	Biomax	BL1002a
Endometrioid carcinoma tissue array	Biomax	UT501a
Ovarian carcinoma tissue array	Biomax	OV485

Tablo 4.2'de gösterilmiş olan mesane doku panellerinde 8 normal, 40 kanserli dokuya ait toplam 48 örnek dublike olarak bulunurken, endometriyal doku kanser panelinde 5 adet normal, 45 kanseli doku olmak üzere 50 örnek, over kanser panelinde ise dublike olarak yer alan 8 normal, 40 kanserli doku örneği olmak üzere 48 örnek yer almaktadır.

Dokulara ait değerlendirme yapılırken ise İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezi'nde Patoloji Anabilimdalı'nda görev yapan Prof. Dr. Neşe Karadağ Soylu ile birlikte örneklerin temin edildiği hastalara ait bilgiler göz önünde bulundurularak inceleme yapılmıştır.

4.1.2. Hücre Kültürü Solüsyonları

- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)

HeLa hücre hatlarının kültüre edilmesi için besiyeri olarak kullanılan 4.5g/L D-glukoz içeren DMEM, %10 fetal serum eklenerek hazır hale getirilmiş ve hücre ortamına Tablo 4.3'de belirtilen antibiyotik miktarları taze olarak eklenmiştir. Kullanılmadan önce ise su banyosunda ısıtılarak sıcaklığı 37C°' ye getirilmiş ve hücrelerin üzerine eklenmiştir.

Tablo 4.3: DMEM kullanılarak kültüre edilmiş hücre hatları ve bu hatların besiyerine ilave edilen antibiyotik konsantrasyonları.

Kullanılan Hücre Hattı	**Kullanılan Antibiyotik**	**Antibiyotik konsantrasyonu**
Hela (WT)	Penisilin/Streptomisin	0.1 μg/ml
HeLa (GFP)	Genetisin	0.6 μg/ml
HeLa (Ccdc124-GFP)	Genetisin	0.6 μg/ml

- Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12)

HCT116 p53-/- ve HCT116 p53-/- Ccdc124 Crisper/Cas9 hücre hatlarının kültüre edilmesinde kullanılan DMEM/ F-12 besiyeri, %10 fetal serum ve 0.1 μg/ml penisilin/streptomisin eklenerek kullanılmıştır.

- Tripsin

Hücrelerin kültüre edildikleri petriyle temaslarını ortadan kaldıran bir enzimdir. Çalışmalar sırasında kullanılmak üzere -20°C'de saklanan enzim, tripsin-etilendiamin tetraasetik asit şeklinde PBS içerisinde 3X olacak şekilde hazırlanmıştır.

- PBS

Ticari olarak satın alınmış olan 10X PBS, hücre kültürü çalışmalarında 1:10 oranında steril distile su ile seyreltilerek 1X PBS olarak kullanılmıştır.

- Hücre Dondurma Besiyeri

Fetal sığır serumu içerisine %10 DMSO eklenerek hazırlanan besiyeri, alüminyum folyo ile sarılıp, steril olarak +4 ºC'de inkübe edilmiştir.

- Antibiyotik Hazırlanması

Kullanılmak üzere seçilen antibiyotik liyofilize halde bulunması nedeniyle belirlenen konsantrasyonlara göre ddH2O'da çözülerek hazırlanmış ve 0.22μm filtreden geçirilerek besiyerine taze olarak eklenmiştir.

4.1.3. Liziz Solüsyonu

- Liziz Tamponu

Son konsantrasyonda 500 mM Tris (pH=8), 250 mM NaCl, %1 NP40 ve 1X proteaz inhibitörü konularak üzeri ddH_2O ile 1L'ye tamamlanmıştır. Deneylerde kullanılan liziz tamponunun taze olarak hazırlanması gerekmektedir.

4.1.4. İmmünoblot Solüsyonları

- Jel Formülasyonları (10 ml)

Tris tamponu, SDS ve % 40 akrilamid ddH_2O içerisinde aşağıdaki tablolarda yer alan oranlar göz önüne alınarak hazırlanmıştır (Tablo 4.4 ve Tablo 4.5). %10 APS and TEMED ise hızlı polimerleşmeye neden oldukları için en son eklenmiştir.

Tablo 4.4: Yürütme jeline ait kimyasal oranları.

YÜRÜTME JELİ	12%		
	1	2	4
1.5 Tris HCl pH 8.8	1250	2500	5000
ddH_2O	2175	4350	8700
40% Acryl/bis	1500	3000	6000
25 % SDS	20	40	80
10% APS	50	100	200
TEMED	5	10	20

Tablo 4.5: Ayırma jeline ait kimyasal oranları.

AYIRMA JELİ	4%			
	1	2	3	4
0.5 Tris HCl pH 6.8	1250	2500	3750	5000
ddH_2O	3175	6350	9525	12700
40% Acryl/bis	500	1000	1500	2000
25 % SDS	20	40	60	80
10% APS	50	100	150	200
TEMED	5	10	15	20

- Yürütme Tamponu, 5X

  15.1 g tris, 95 g glisin, 50 ml 10% SDS ddH_2O ile 1L'ye tamamlanmıştır.

- Transfer Tamponu, 10X

30.3 g tris ve 144 g glisin ddH_2O içerisinde çözülerek 1L'ye tamamlanmıştır. Deneyde kullanılmadan önce taze olarak hazırlanan solüsyon ddH_2O ile 1X olacak şekilde seyreltilerek ve %20 methanol eklenerek 4 C°'de saklanmıştır.

- TBS, 10X

12.1 g tris ve 87.6 g NaCl 1 L ddH_2O içerisinde çözülerek, pH'ı 8.0 olacak şekilde ayarlanmıştır.

- TBS-T

Hazırlanmış olan 1X TBS solüsyonunun içine %0.1 tween-20 eklenerek hazırlanmıştır.

- 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8

200ml ddH_2O içerisinde 121.1 g trizma base çözülmüş ve pH 8.8 olacak şekilde ayarlanmıştır.

- 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8

200ml ddH_2O içerisinde 121.1 g tris çözülerek hazırlanan solüsyonun pH'ı hidroklorik asit (HCl) ve sodyum hidroksit (NaOH) kullanılarak 6.8 olacak şekilde ayarlanmıştır.

- APS

0.1 g amonyum sülfat, 1 ml ddH_2O içerisinde çözülerek filtre edilmiş ve taze hazırlanan solüsyon -20°C'de muhafaza edilmiştir.

- Strip Solüsyonu

Son konsantrasyonu 100 mM β-mercaptoethanol, %2 SDS, 62.5 mM Tris-HCl içerecek ve pH 6.7 olacak şekilde hazırlanmış ve membranın strip edilmesinde 65°C'de 30 dakika inkübasyonu için kullanılmıştır.

4.1.5. RIP Solüsyonları

- RIP Liziz Tamponu

RNA çöktürmesi için kullanılan Magna RIP kitinin içinde yer alan liziz bufferdan 100 µL alınarak, içine 0.5 µL protein inhisyon kokteyli ve 0.25 µL RNase inhibitör eklenerek hazırlanmıştır.

- RIP Immunoprecipitation Tamponu

860 µL RIP yıkama tamponunun içinde 35 µL 0.5 M EDTA ve 5 µL RNase inhibitörü eklenerk toplam hacim 900 µL'ye tamamlanmıştır.

- Proteinase K Tamponu

Toplam hacim 150 µL olacak şekilde 117 µL RNA çöktürmesi için kullanılan yıkama tamponu, 15 µL 10% SDS ve 18 µL Proteinase K eklenerek hazırlanmıştır.

4.1.6. PCR ve Q-PCR Solüsyonları

Kanser dokularında Ccdc124 ifadesinin saptanması ve proteinin bağlandığı olası hedeflerin doğrulanması için yapılan PCR dneylerinde kullanılan solüsyonarına ait bilgiler Tablo 4.6'da verilmiştir.

Tablo 4.6: PCR için kullanılan reaksiyon içeriği.

Kullamılan Reaksiyon İçeriği	Kullanılan Hacim
	33 ul
Taq buffer	5 ul
$MgCl_2$	4 ul
dNTP	2 ul
Reverse primer	2 ul
Forward primer	2 ul
cDNA	1 ul
Taq DNA polimeraz	1 ul

PCR analizini takiben gerçekleştrilrn Q-PCR analizinde kullanılan solüsyonlarına ait bilgiler ise Tablo 4.7'de ayrıntılı olarak belirtilmiştir.

Tablo 4.7: Q-PCR için kullanılan reaksiyon içeriği.

Kullanılan Reaksiyon İçeriği	Kullanılan Hacim
Maxima cyber gren	12,5 ul
Forward primer	1 ul (0.4 uM)
Reverse primer	1 ul (0.4 uM)
Water, nuclease free	10.5 ul

4.1.7. Kimyasal Malzemeler

Deney için kullanılan kimyasallara, kitlere, bu kimyasal ve kitlerin markalarına/katalog numaralarına ait liste aşağıdaki Tablo 4.8'de yer almaktadır.

Tablo 4.8: Kullanılan kimyasal madde listesi.

KİMYASAL VE KİTLERİN ADI	KİMYASALIN MARKASI/ KATALOG NUMARASI
2-Mercaptoethanol	Aldrich/ M6250
Bradford Reagent	Sigma/ B6916
FBS	Biowest/ S181G
Akrilamid/bis-akrilamid %Solüsyon	Sigma/ A3699
Lipofectamin2000	Invitrogen /11668
Geneticin-G418	Gibco/ 10131
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma /A2153
Hidroklorik asit	Sigma/ 071102
High glucose DMEM	Gibco/ 41966
DMEM/F-12	Gibco/ 11320033
Liqui-gel 37 5 1	MP/ 800804
İzopropanol	Sigma 24137
Metanol	Sigma/ 34885
PBS	Lonza/ BE17-517Q
Magna RIP Kit	Merck 17-701
Pen /Strept	Lonza/ BE17-16E
Sodyum arsenit	Merck hc72333377

Tablo 4 .8 Devam.

Sodyum kloride	Sigma/ 13423
TEMED	Sigma/ T9281
RevertAid RT Reverse Transcription Kit	Thermo /K1691
Tripsin	Gibco/15400054
RNA izolasyon kiti	MN 740955.50
Trizma base	Sigma/ T6066
Tween 20	Sigma/ P1379
DMSO	Merck/ 116743.1000
Cyber	Thermo/ K0253
Fenol	AppliChem/ 141323
NP40	Sigma NP40S
Kloroform	Merck/102445
İzoamilalkol	Merck/ 100979.2500
Blue Loading Buffer Pack	BioLabs/ B7703S
Amonyum persülfat (APS)	Sigma/A3678

4.1.8. Kullanılan Cihazlar

Deney için kullanılan cihazlara ve cihazların markalarına/model numaralarına ait liste aşağıdaki Tablo 4.9'da yer almaktadır.

Tablo 4.9: Kullanılan cihaz listesi.

CİHAZIN ADI	CİHAZIN MARKASI/ MODELİ
Floresan mikroskobu	Nikon/ H600L
FACS	BD FACSJazz
İnkübatör	Heal Force/ Smart cell
Laminar Flow	Cryste
Sanrifüj	Labogene/ ScanSpeed 1580R
İmmunohistokimya Cihazı	Dako Link
Santrifüj (Hücre kültürü)	Nüve/ NF400F
Shaker	Labnet/ Rocker 25
Su banyosu	Wisd/ WiseBath
İmmün –Blot Ekipmanları ve	BioRad
NanoDrop	Thermo/ NanoDrop Lite
Heat-block	Benchwork
Görüntüleme cihazı	BioRad/ ChemiDoc XRS+

Tablo 4.9 Devam.

Konfokal mikroskobu	LSM880
Q-PCR cihazı (RNA hedefleri	Applied Biosystem/StepOnePlus
Q-PCR cihazı (kanser örnekleri	Stratagene/Mx3000P
PCR cihazı	Biometra/Professional Thermocycler
Western (yürütme, transfer)	Biorad
pH metre	Mettler Toledo
Hassas Terazi	Sartorius/ BL210S
Varioskan (Protein	Thermo Varioskan Flash
Agaroz jel yürütme sistemi	Biorad/ SubCell GT
Sheaking inkübatör	FINEPCR/BAE07
Floresan Hücre Görüntüleme	Biored/ Zoe

4.1.9.Antikorlar

Araştırma sırasında immunofloresan yönteminde kullanılan antikorlara ait bilgiler ve immünoblot sırasında kullanılma oranlarına ilişkin bilgiler Tablo 4.10'da gösterilmiştir.

Tablo 4.10: Kullanılan antikor listesi.

ANTİKOR	KAYNAK	FİRMA	KATALOG NO	WB	IF	IHC
Anti	Tavşan	Proteintec	27106-1-	1/100		
Anti	Tavşan	Bethyl	A301-835	1/100	1/100	
Anti fare	Keçi	Sigma	A2304	1/500		
Anti tavşan	Keçi	Sigma	A9169	1/500		
Anti GFP	Tavşan	Sigma	G1544	1/100		
GAPDH	Tavşan	Cell	5174S	1/100		
SC35	Fare	BD	556363		1/100	
G3BP	Fare	Abcam	ab56574		1/100	
TIA-1	Fare	Santa Cruz	sc166247		1/50	
Alexa 555	Fare	Cell	4409S		1/500	
Alexa 555	Tavşan	Cell	4413S		1/500	
Alexa 488	Fare	Cell	4408S		1/500	
Alexa 488	Tavşan	Cell	4412S		1/500	
Alexa 594	Fare	Cell	8890S		1/500	
Alexa 594	Tavşan	Cell	8889S		1/500	

Tablo 4.10 Devam.

Hoechst		Thermo	H3570		1/10000	
Calnexin	Tavşan	Abcam	ab22595	1/100		
Anti Flag	Fare	Sigma	F3165		1/100	
Ccdc124	Tavşan	Bioss	8083R			1/150

4.1.10. Marker

Western ve agaroz jel deneyleri sırasında gözlemlenen bantların büyüklüklerinin tespit edilmesi amacıyla kullanılan işaretleyiciler Tablo 4.11'de gösterilmiştir.

Tablo 4.11: Kullanılan işaretleyicilerin listesi.

MARKER	FİRMA/ KATALOG NUMARASI
Protein Marker	Thermo/ S26619
DNA Ladder (1 kb)	Fermentas / SM0313
DNA Ladder (100bp)	Fermentas/ SM0321

4.2. YÖNTEM

4.2.1. Hücre Kültürü

4.2.1.1. Hücre Kültürü Ortamı

HeLa hücreleri %10 (v/v) FBS ve yüksek glikoz içeren besiyeri ortamında kültüre edilmiş olup, kullanılan hücre hatlarına göre ortama %1 (v/v) penisilin/streptomisin veya 0.6 μg/ml genetisin eklenmiştir. HCT116 p53-/- hücre hattı için ise %10 (v/v) FBS, %1 (v/v) penisilin/streptomisin içeren DMEM/F-12 besiyeri kullanılmıştır. 37ºC'de ve %5 CO_2 içeren koşullarda inkübatörde muhafaza edilen hücrelerinin besiyerleri ortalama 2-3 günde bir taze besiyeri ile değiştirilmiş ve hücre yoğunluğu %70-80'e ulaştığında alt kültürleme yapılmıştır.

4.2.1.2. Alt kültürleme ve Kültür Saklama

Alt kültürleme yapılacak hücrelerin öncelikle besiyerleri uzaklaştırılarak 1X PBS ile yıkama yapılmıştır. Hücre-hücre/hücre-yüzey bağlantılarının ortadan kaldırılması amacıyla 1 ml 3X tripsin eklenerek enzim aktivitesinin sağlanması için yaklaşık 2-3 dk 37ºC'de hücreler inkübe edilmiştir. Daha sonra ortama tekrar besiyeri eklenerek enzimatik aktivite durdurulmuş ve hücreler toplanarak oda sıcaklığında 5 dakika 1500 rpm'de santrifüj edilmiştir. Santrifüjün ardından hücreler taze besiyeriyle homojenize edilmiştir. Hücre yoğunluğu %20-30 olacak şekilde yeni besiyerine ekilerek 37ºC'de ve %5 CO_2 içeren ortamda inkübasyona bırakılmıştır.

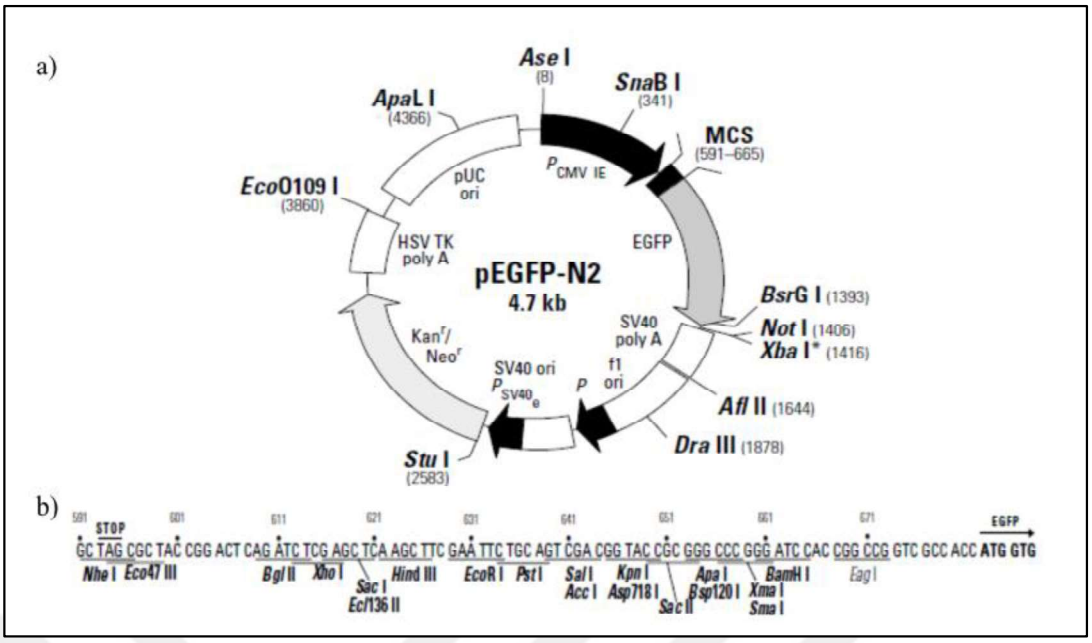
Hücrelerin dondurularak uzun süre saklanması için %10 DMSO içeren FBS kullanılmış, bu besiyerinde homojenize edilen hücreler 1ml'lik dondurma tüplerine aktarılarak kademeli olarak önce -80°C'de, ardından da sıvı nitrojende saklanarak muhafaza edilmiştir.

4.2.2. Hücre Hattı Transfeksiyonu

Deneyde kullanılan HeLa hücre hatlarının kalıcı olarak transfeksiyonu için GFP ve GFP-Ccdc124 ifade eden plazmidler hücrelere aktarılmış ve bu plazmidleri kalıcı olarak ifade eden klonların elde edilmesi sağlanmıştır. Stres granülü yapılarının işaretlenmesi için ise HCT p53-/- olan ve Crispr/Cas9 yöntemi kullanılarak Ccdc124 ifadesi durdurulmuş hücre hatları Flag-HNRNPA1 ve Flag-PABPC1 ifade eden plazmitlerle transfekte edilmiştir.

4.2.2.1. Kalıcı Olarak Transfekte Edilmiş Hücre Hattı Eldesi

HeLa hücrelerinde GFP ifade edilmesinin sağlanması için plazmit olarak pEGFP-N2 kullanılmış, CCDC124-GFP konstraktlarının elde edilmesi için çoklu klonlama bölgesinde yer alan EcoRI ile BamHI kesim noktaları arasına Ccdc124 protein sekansı yerleştirilerek oluşturulan bir plazmit kullanılmıştır. Çalışmada kullanılmış olan pEGFP-N2 plazmidine ait sirküler ve linear yapı Şekil 4.1'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1: Kullanılan pEGFP-N2 plazmidinin yapısı. a) Kullanılan plazmidin sirküler ve b) linear yapısı. (pEGFP-N2 was a Clontech Axel Brunger'den temin edilmiştir.)

Koloni seçimi için ise neomisinin muadili olan geneticin-G418 direncinin kullanılması uygun görülerek, transfekte edilen hücrelerin seçilebilmesi için farklı konsantrasyonlarda (0.2 µg/ ml, 0.4 µg/ ml, 0.6 µg/ ml, 0.8 µg/ ml, 1.0 µg/ ml, 1.2 µg/ ml, 1.4 µg/ml, 1.6 µg/ ml, 1.8 µg/ ml, 2.0 µg/ ml, 2.5 µg/ ml) geneticin-G418 içeren besiyerleri hazırlanmıştır. Deney sonucunda elde edilmiş olan sitotoksisite eğrisinde bir hafta sonunda %100 hücre ölümüne neden olan en düşük doz olan 0.6 µg/ ml G418 konsantrasyonun tek koloni seçimi için uygun olduğu belirlenmiş, vektör aktarımı için ise lipofectamin 2000 kullanılmıştır. Tranfeksiyon için 300.000 hücre ekilmiş ve Tablo 4.12'de yer alan koşullarda transfeksiyon gerçekleştirilmiştir.

Tablo 4.12: Kalıcı transfeksiyonda kullanılan hücre miktarına bağlı kullanılan DNA ve kimyasal miktarları.

	6 KUYUCUKLU KÜLTÜR KABI
Opti-MEM	150 µl
Lipofectamin	10 µl
DNA	2.5 µg

Transfeksiyonu takiben 48 saat sonra hücreler 150 mm'lik kültür kabına aktarılarak büyüme besiyerinde 24 saat inkübe edilmiş ve bu prosedür sonucunda yaşayan hücreler seçici besiyeri olarak geneticin içeren antibiyotikli ortama alınmıştır. 7-14 gün sonra elde edilen ve plazmidi taşıdığı düşünülen kolonilerin 6 kuyucuklu kültür kabına aktarılarak çoğaltılması sağlanmıştır.

4.2.2.2. Geçici Olarak Transfekte Edilmiş Hücre Hattı Eldesi

Crispr/Cas9 yöntemi kullanılarak Ccdc124 ifadesi azaltılmış olan HCT p53-/- hücre hatları 6 kuyucuklu besiyerinin içine yerleştirilen lamlar üzerine her bir kuyucukta 150.000 hücre olacak şekilde ekilmiştir. Ekimi takiben 24 saat sonra hücreler Flag-HNRNPA1 ve Flag-PABPC1 ifade eden plazmitlerle Tablo 4.2' de yer alan koşullarda transfeksiyon yapılmıştır. Transfeksiyondan 24 saat sonra besi yerleri değiştirilmiş, 48 saat sonra da stres granülü analizlerinde kullanılmak üzere lama tutunmuş olan hücreler immunfloresan boyama için fikse edilmiştir.

4.2.3. Flow Sitometri

Transfeksiyonun ardından tek hücre koloni seçimi yapılmadan önce GFP ve Ccdc-GFP ifade eden hücrelerin flow sitometri yöntemiyle ayrılması planlanmıştır. Bunun için hücreleri ayırmak için %2 BSA ve 4mM EDTA içeren 10 ml PBS solüsyonu kullanılmış, ayrılan hücreler ise daha önceden -20°C'de soğutulmuş FBS içine toplanmıştır. Flow sitometri yöntemiyle GFP ifadesine bağlı olarak ayrılan hücreler 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve santrifüj sonrası üst sıvı atılarak büyüme besiyeri içinde hücreler kültüre edilmiştir. Daha sonra tek koloni seçimi yapılarak deney için gerekli hücre hatları elde edilmiştir.

4.2.4. Liziz ve Protein Miktar Tayini

Transfekte edilen hücre hatlarına ait ifadenin doğrulanabilmesi için öncelikle liziz yapılmış ve elde edilen lizatların western yöntemi kullanılarak jelde yürütülmesi sağlanmıştır. Protein miktar tayininin yapılması için hücre örneklerinin besiyeri uzaklaştırılarak, 2 ml 37 ºC'deki PBS kullanılarak iki kere yıkama yapılmış ve

hücrelerin üzerine 0 ºC'deki 2 ml PBS eklenerek kazıyıcı yardımıyla hücreler kaldırılmıştır. +4 ºC'de 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilen örneklerin üstündeki supernatant uzaklaştırılarak peletlerin üzerine hacmin katı kadar taze olarak hazırlanmış olan liziz tamponu eklenmiştir. Liziz tamponunun eklenmesinin ardından örnekler vorteks yapılarak, 5-10 dakika buzda bekletilmiştir. Daha sonra tekrar vorteks yapılmasını takiben örnekler 14000 rpm'de 30 dakika +4 ºC'de santrifüj edilerek çöktürülmüş ve süpernatantlar dikkatlice yeni tüplere aktarılmıştır.

Standart grafik oluşturmak için kullanılan BSA konsantrasyonları ve bu konsantrasyonları belirlemek amacıyla kullanılan Bradford yöntemine ait sayısal veriler Tablo 4.13'de gösterilmiştir.

Tablo 4.13: Standart grafik oluşturmak için kullanılan BSA konsantrasyonları.

TÜP NUMARASI	1	2	3	4	5	6	7	8
BSA (mg/ml)	0,25	0,5	0,75	1	1,25	1,5	2	-
Yüklenen BSA (µl)	5	5	5	5	5	5	5	-
Bradford (µl)	250	250	250	250	250	250	250	250
dH_2O (µl)	-	-	-	-	-	-	-	5
Son Hacim (µl)	255	255	255	255	255	255	255	255

Daha önceden oda sıcaklığına getirilmiş Bradford'dan 96 kuyucuklu kültür kabına 5'er µl yüklenen örneklerin, standart grafik verilerinin ve blanklerinin üzerine 250 µl eklenerek üzeri ışıktan etkilenmesini önlemek amacıyla alüminyum folyoyla kapatılmış ve 20 dakika çalkalayıcıda, 20-25 dakika da oda sıcaklığında bekletildikten sonra ölçüm alınmıştır.

4.2.5. İmmünoblot Analizi

Ccdc124 ile çalışılırken %10 ile %12'lik SDS gel kullanılabilmektedir. Ancak bu deney için %12 jel kullanması tavsiye edilmektedir. Tablo 4.3 ve 4.4 'deki oranlar esas alınarak %12'lik yürütme jeli APS ve TEMED donabileceğinden en son eklenerek hazırlanmış ve üzerine izopropanol konularak jelin hava alması önlenmiştir.

Yürütme jeli donduktan sonra ise üzerine %4'lük ayırma jeli dökülerek onluk tarak yerleştirilmiş ve jellerin donması beklenmiştir.

Örnekler ve marker kaynayan suda 5 dakika tutularak proteinlerin denatüre olması sağlanmış ve beta-mercaptoethanol eklenerek hazırlanmış olan 3X yükleme boyası, son hacimde 1X olacak şekilde ayarlanarak örneklerin üzerine eklenmiştir. Her kuyuda 20µg protein olacak şekilde yükleme yapılmış ve jel 90 mA de 1 saat yürütülmüştür. Jel yürüdükten sonra membran methanol ile bir kez yıkandıktan sonra ddH_2O'dan geçirilmiştir. Önceden 1X'e indirilmiş methanol eklenmiş +4 ^oC'de bekleyen transfer tamponu eklenerek wattman kağıtları da aynı şekilde ıslatılmıştır. 100 voltta 1 saat transfer yapıldıktan sonra membran 1 saat %5 süt tozu ile bloklanmıştır. Bloklamanın ardından gece boyunca birincil antikorlarla muamele edilen membran, 3 kez 10'ar dakika 1XTBS-tween ile yıkanarak 1 saat BSA içinde seyreltilmiş sekonder antikor ile tekrar inkübe edilmiştir. İnkübasyon bitiminde yine üçer kez 10 dakika TBS-T ile yıkama yapıldıktan sonra BioRad görüntüleme cihazıyla analizi gerçekleştirilmiştir. Görüntü alımı sısında ECL (Thermo, 32106) kullanılmıştır.

4.2.6. RNA ile Birlikte Çöktürme Yöntemi İçin Deney Gruplarının Belirlenmesi

RNA ile çöktürme (RIP) anlizi için yabanıl tip ve sadece GFP/Ccdc124-GFP ifade etmek üzere kalıcı olarak transfekte edilmiş HeLa hücreleri kullanılmıştır. Bu deneyden elde edilecek olası RNA hedeflerine ait verilerin sağlıklı değerlendirilmesi açısından Tablo 4.14'de yer alan örneklerin karşılaştırılması planlanmıştır.

Tablo 4.14: RIP analizinde kullanılmak üzere tasarlanan deney grupları.

Kullanılan Hücre Hattı	**Beadleri Kaplamak için Kullanılan Antikor**
HeLa (WT)	Ccdc124 antibody (Middle)
HeLa (GFP)	GFP antibody
HeLa (Ccdc124-GFP)	Boş
HeLa (Ccdc124-GFP)	Ccdc124 antibody (Middle)

4.2.7. RNA ile Çöktürme Yöntemi

Hücrelerin ~80-90% yoğunluğa ulaşması beklenerek hücreler önce soğuk PBS ile yıkanarak scraper ile toplanmış ve 1500 rpm'de 5 dakika 4°C 'de santrifüj edilmiştir. Üzerlerine RIP liziz tamponu eklenen örnekler daha sonra buz üzerine alınarak 5 dakika inkübe edilmiştir.

Magnetik boncukların hazırlanması için önce her tüpe 50 µL magnetik bead süspansiyonu eklenmiş, süspansiyonun üzerine 0.5 mL RIP yıkama tamponu eklenerek kısa vorteksin ardından, magnetic ayırıcıyla süpernatant uzaklaştırılmıştır.

Mıknatıstan uzaklaştırılan tüplerin üzerine 0.5 mL RIP yıkama tamponu eklenerek yeniden yıkama yapılmış, ortamdan süpernatant uzaklaştırılarak 100 µL RIP yıkama tamponu ve ~5 µg Ccdc124 (middle) ve GFP antikoru eklenerek oda sıcaklığında 30 dakika rotasyon uygulanarak inkübe edilmiştir. Boş beadlerin hazırlanması sırasında ise antkior bağlama basamağı kullanılmamıştır. İnkübasyonun ardından kısaca santrifüj edilen tüpler manyetik ortama konularak süpernatant tekrar uzaklaştırılır. Tüpler mıknatıstan uzaklaştırılarak üzerine 0.5 mL RIP yıkama tamponuyla iki kere yıkanarak tüpler buzun üzerine alınmıştır.

RNA ile çöktürme işleminin gerçekleştirilmesi için ise her bir örneğe 900 µL RIP immunoprecipitation tamponu eklenmiş, daha önce buzun üzerine alınmış olan ve içinde beadlerin bulunduğu tüplere aktarılmıştır. Daha sonra RIP lizatlarının hızlıca çözünmesi sağlanarak 4°C'de 14000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Overnight inkübasyona bırakılan örnekler kısa bir süre santrifüj edildikten sonra manyetik ayırıcıya yerleştirilmiş ve elde edilen süpernatant ise ortamdan uzaklaştırılmıştır. Her tüpe 0.5 mL RIP yıkama tamponu eklenerek kısa bir süre santrifüj yapılarak uygulanan yıkama dört kere tekrarlanmıştır.

Deneyin en son aşaması olan RNA pürifikasyonunun gerçekleştirilmesi için ise her bir örnek için 150 µL proteinase K tamponu hazırlanmış ve örnekler 55°C'de 30 dakika boyunca çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından tüpler kısa bir süre santrifüj edilmiş ve manyetik ayırıcının içine yerleştirilerek elde edilen süpernatant yeni bir tüpe aktarılmıştır. Her tüpe süpernatantla temas edecek şekilde 250 µL RIP yıkama tamponu eklenmiştir.15 sn vortekslenerek hazırlanmış 400 µL fenol:kloroform:izoamil alkol örneklerin üzerine eklenmiş ve 14000 rpm'de 10 dk oda sıcaklığında santrifüj edilerek, örneklerin fazlara ayrılması sağlanmıştır. Elde edilen

350 µL sulu faz tekrar ortamdan uzaklaştırılarak yeni bir tüpe alınmış ve üzerine 400 µL kloroform eklenerek tekrar 15 saniye vorteks yapılmıştır. Vorteksin ardından 14000 rpm'de 10 dakika oda sıcaklığında santrifüj edilmiş, ayrılan 300 µL sulu faz ayrılırak yeni bir tüpe alınmıştır. RNA'nın çökmesinin sağlanması için 50 µL tuz solüsyonu I, 15 µL tuz solüsyonu II, 5 µL of çöktürme indükleyici ajan, 850 µL saf ethanol eklenerek -80°C'overnight inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyonun ardından 4°C'de 14000 rpm'de 30 dakika santrifüj edilen örneklerden süpernatant dikkatlice uzaklaştırılmıştır. Elde edilen pelet ampul suyla önceden hazırlanarak -20ºC'de soğutularak elde edilen 80%'lik ethanol ile bir kez yıkanarak, tekrar 14000 rpm'de 15 dakika +4°C'de santrifüj edilmiştir. Süpernatantın dikkatlice uzaklaştırılmasının ardından pelet havada kurumaya bırakılmıştır.20 µL RNaz bulunmayan su içinde çözülen peletler 600 µL RNA taşıma solüsyonu (Omega, R0527) içinde analize gönderilmiştir. Tüm deney prosedürü boyunca ise steril edilmiş RNase içermeyen uçlar kullanılmıştır.

4.2.8. cDNA Sentezi

RNA ile çöktürme yöntemi kullanılarak elde edilen RNA havuzu, random hekzamer primer ve su, nükleaz içermeyen tüplerin içine Tablo 4.15'de belirtildiği miktarlarda eklenerek ilk reaksiyon oluşturulmuştur. RNA'ların GC içerikleri ve ikincil yapıları göz önüne alınarak, tüpler 70°C'de 5 dakika inkübasyona bırakılmış ve süre bitiminde tekrar buzun üstüne alınmıştır.

Tablo 4.15: cDNA sentezi için reaksiyona eklenen bileşenlerin ilk kısmı.

REAKSİYON BİLEŞENLERİ	KULLANILAN MİKTAR
Kullanılacak RNA	0.1 ng - 5 µg
Primer (Random Hexamer primer)	1 µL
Nükleaz içermeyen su	Toplam hacim 12 µL'ye tamamlanacak
Toplam hacim	12 µL

İnkübasyonu takiben Tablo 4.16'da yer alan komponentler sırasıyla hazırlanıp karışıma eklenmiştir. Tüpdeki içeriklerin nazikçe karışması için kısa bir santrifüj yapılmıştır.

Tablo 4.16: cDNA sentezi için reasiyona eklenen bileşenlerin ikinci kısmı.

REAKSİYON BİLEŞENLERİ	KULLANILAN MİKTAR
5X Reaksiyon Tamponu	4 µL
RiboLock RNase Inhibitör (20 U/µL)	1 µL
10 mM dNTP karışımı	2 µL
RevertAid M-MuLV RT (200 U/µL)	1 µL
Toplam hacim	20µL

cDNA sentezi için 42°C'de 60 dk inkübasyon sağlanmış ve örnekler 70°C'de 10 dakika tutularak reaksiyon sonlandırılmıştır.Reverse transcription reaksiyon ürünleri daha sonra yapılacak PCR uygulaması için -20°C'de bir haftadan az olmak koşuluyla saklanmış, daha uzun süreli saklanması için -80 °C kullanılmıştır.

4.2.9. Q-PCR için Primerlerin Tasarlanması

İnsan hücre kanser dokularına ait cDNA'larda Ccdc124 ifadesinin belirlenmesi için proteine özgü forward ve reverse primerler tasarlarmış, kontrol için ise GAPDH primerleri kullanılmıştır. RIP deneyi için ise RNA array sonucunda elde edilen listede yer alan RNA'lar arasından seçilen GCN1, HERC2 ve TUBA1B'e ait primerler tasarlanmıştır. Primer tasarımı için ise NCBI Primer Blast programı kullanılmış, G-C içeriği %40-60, Tm değeri 55-65°C arasında yer alan ve ekzon-ekzon bağlantılarının olduğu bölgeleri içeren primerler seçilmiştir. Deneyde kullanılan primer dzilerine ait bilgiler Tablo 4.17'da yer almaktadır.

Tablo 4.17: Q-PCR analizinde kullanılmak üzere tasarlanmış primerlere ait bilgiler.

Primer Adı	Primer Dizisi	TM	Baz sayısı	Ürün Büyüklük Miktarı
CCDC F	GACACAGCCGAGAAAGCCAA	59.4	20	275 bp
CCDC R	CGGAGCCACTCCTTCTTGAG	61.4	20	
GAPDH F	GGCTGAGAACGGGAAGCTTGTCAT	64.4	24	143 bp
GAPDH R	CAGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGA	64.4	24	
GCN1 F	CAGATCCTCACTGTCCAAGC	57.9	20	159 bp
GCN1 R	TGAAGCCAGAACCTGTAAGC	58.9	20	
HERC2 F	ACTTTACTGGTGTTCTCCTTC	55.1	21	235 bp
HERC2 R	TCCTCATTATTTCTACAGTTCTGA	55	24	
TUBA1B F	TCCGCAGCCGCTACTTA	51.7	17	149 bp
TUBA1B R	CACTCACGCATAGTGGCTA	51.6	19	

Tasarlanan primerler PCR yöntemi kullanılarak jelde yürütülerek kontaminasyon ve primer dimeri gibi yönlerden jelde yürütülerek kontrol edilmiş ve gradient PCR yöntemi kullanılarak protokol için gerekli Tm sıcaklıkları belirlenmiştir.

4.2.10. Q-PCR Analizi

Origene Disease tissue qPCR array panellerininde yer alan örneklerin analizinde kullanılmak üzere Tablo 4.18'de yer alan master mix solüsyonu hazırlanmış ve her bir kuyucuğa 25 µL olacak şekilde eklenmiştir.

Tablo 4.18: Q-PCR analizinde kullanılan master mix solüsyonu içeriği.

Maxima cyber gren	12,5 µL
Forward primer	1 µL (0.4 µM)
Reverse primer	1 µL (0.4 µM)
Water, nuclease free	10.5 µL

Panellerde yer alan örnekler Stratagene Mx3000P cihazı kullanılarak Şekil 4.2'de yer alan protokol uygulanmıştır. Deney analizleri ise MxPro programında gerçekleştirilmiştir. Ccdc124 proteininin olası RNA hedeflerinin belirlenmesi için yapılan RIP deneyi için ise Applied Biosystem Step One Plus cihazı kullanılmış, analizler ise Step One Software v2.3 kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen Ct (treshold cycle) değerlerinin normalizayonu kanser örneklerinde GAPDH kullanılarak $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$) formülüyle hesaplanmıştır.

	95°C…….10 dakika	
(Denatürasyon)	95°C…….15 saniye	40 döngü
(Annealing)	55°C …….1 dakika	
(Extention)	72°C……...30 saniye	
	95°C……...1 dakika	
	55°C……...30 saniye	
	95°C……30 saniye	

Şekil 4.2 : Q-PCR analizinde kullanılan protokol.

4.2.11. Stres İndüklemesi

Stresin indüklenmesi için stres koşulları uygulanmadan önce hücrelerin besiyeri değiştirilerek stres etkinliğinin artması sağlanmıştır. Sıcaklık stresi oluşturmak için hücreler 50 dakika 42°C 'de ve 46 °C'de inkübe edilmiştir. Oksidatif stres oluşturmak için ise hücrelerin bulunduğu besiyerine 0.5 mM sodyum arsenit ($NaAsO_2$) eklenerek 60 dakika inkübasyon sağlanmıştır.

4.2.12. Immunofloresan Boyama

Altı kuyucuklu kültür kabına lam yerleştirilerek 300.000 hücre ekilmiş ve hücrelerin 24 saat inkübasyonları sağlanmıştır. İnkübasyon sonunda hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırılarak 1X PBS ile iki kere yıkama yapılmış ve hücreler soğuk %100 methanol (MetOH) içerisinde 10 dakika boyunca -20ºC'de tutularak hücrelerin fikse olmaları sağlanmıştır. Fiksasyonu takiben 3 defa 5 dakika PBS-T ile yıkama yapılmıştır. Daha sonra örnekler 1 saat boyunca %2 BSA içeren bloking solüsyonunda, 1 saat de primer antikoru içeren bloklama solüsyonunda inkübe edilmiştir.

Stres indüklemesini takiben gerçekleştirilen immünofloresan boyama çalışma örneklerinde stres granüllerinin tespiti için primer antikor olarak G3BP, TIA-1 ve Flag seçilirken, nükleer beneklerin analizi için SC35 antikoru kullanılmıştır. İnkübasyonun ardından hücreler tekrar 3 defa 5 dakika PBS-T ile yıkanmış, örnekler oda sıcaklığında sekonder antikorlarla 1 saat daha karanlıkta inkübe edilmiştir. Ardından örnekler 3 kez 5'er dakika PBS-T ile yıkanarak, çekirdek boyaması için 1/10000 oranında Hoechst ile 10 dakika oda sıcaklığında muamele edilmiştir. Daha sonra ddH_2O içerisinde 15 dakika bekletilerek yıkanan örnekler, 10ul %80 gliserol damlatılmış lam ve lamel arasına alınmıştır. Immunofloresan boyama yöntemi kullanılarak hazırlanan örnekler konfokal mikroskobu ile görüntülenerek analiz edilmiştir.

4.2.13. RPKM Analizi

Deney sonucunda Ccdc124 proteinine bağlanan RNA'ların belirlenmesi amacıyla RNA sekans datası kullanılmış ve her bir gene ait okuma sayısı kilobaz milyondaki toplam okuma sayısına bölünerek elde edilen değer gen büyüklüğüne oranlanmıştır. Bu oranlamalarla formülüze edilmiş ve Şekil 5.1'de gösterildiği şekilde planlanmış olan her bir deney grubunda yer alan okumalar için ayrı ayrı olacak şekilde hesaplanmış olan RPKM değerleri daha sonra kendi aralarında karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırmalar sonucunda RPKM değeri bakımından öncelikli olarak tercihen 2 kat ve üzeri değere sahip olan hedefler değerlendirmeye alınmıştır.

4.2.14. İmmunohistokimya

Kanser dokularında immunohistokimya boyamalarının yapılması için İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezi'nden hizmet alımı yapılmış ve çalışma kapsamında ticari olarak temin edilmiş mesane, over ve endometriyum kanser doku panelleri 1 saat 60°C'de inkübe edilerek deparafinize edilmiştir. Ardından örnekler Dako Link Omnis cihazına yerleştirilmiştir. Cihaza yerleştirilen örneklerin dehidre edilmesi için ksilen kullanımı yerine Clearıfy, Clearing Agent (StatLab) kullanılmıştır. Antijen retrival için ise sodyum sitrat tamponu (pH=6.1) (EnVision FLEX Target Retrieval Solution, düşük pH) kullanılmış ve bu kimyasalla 97°C' de 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyonu takiben ise Tween 20 içeren TBS tamponunda (Dako Omnis Wash Buffer) 40 dakika yıkama gerçekleştirilmiştir. Yıkamanın ardından örnekler primer antikor olarak kullanılan Ccdc124 antikoru 1/150 olacak şekilde oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiştir. Primer antikorun uygulanmasını takiben ise tekrar yıkama yapılmış ve EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent kullanılarak 3 dakika bloklama gerçekleştirilmiştir. Bloklamadan sonra tekrar 2 dakika yıkama yapılmış ve yıkamadan sonra 10 dakika linker (EnVision FLEX+Rabbit Linker) uygulaması yapılmıştır. Tekrar 2 dakika yıkama yapılmış, ardından hem tavşan hem de fare sekonder antikoru da içeren 20 dakika EnVision FLEX/HRP ile inkübe edilmiştir. İki kere yıkama tamponuyla 2 dakika, 31 saniye distile su, 2 dakika tekrar yıkama tamponuyla yıkama yapılmıştır. EnVFLEX Substrat Working Solution kullanılarak 5 dakika inkübasyon gerçekleştirilmiş, ardınan 1 kere 2 dakika yıkama solüsyonu, 1kere 31 saniye distile su ile, bir kere de 2 dakika yıkama solüsyonu ile yıkama yapılmıştır. Hematoksilenle boyama 8 dakika olacak şekilde gerçekleştirilip, son olarak 2 dakika distile su, 2 dakika da yıkama solüsyonuyla örnekler yıkanmıştır.

Elde edilen örnekler mikroskop altında incelenmiş ve immunoreaktivasyon patolog Prof. Dr. Neşe Karadağ Soylu (Turgut Özal Tıp Merkezi, İnönü Üniversitesi, Malatya) ile analiz edilerek tümöral alanlardaki yaygınlığı yüzdesi ve boyanma şiddeti (düşük, orta, yüksek) kullanılarak tanımlanmıştır. Preparatlardaki boyanma şiddeti (0=boyanma yok, 1= düşük boyanma, 2= orta boyanma, 3= yüksek boyanma) ve boyanma yaygınlığı (%5-%25=1, %26-%50=2, %51-%75=3, %76-%100=4) skorlama sistemi kullanılarak değerlendirilmiştir. Örneklerdeki %5'in altında görülen boyanmalar negatif olarak kabul edilmiştir. İmmunohistokimya (IHC) skoru boyanma

şiddeti (0-3) ve yaygınlığı (0-4) skorları çarpılarak elde edilmiş ve 0=negatif, 1-4=düşük, 5-8=orta, 9-12= yüksek olarak sınıflandırılmıştır [Remmele et al.,, 1987].

4.2.15. İstatistiksel analizler

Ccdc124 proteienin olası RNA bağlanma hedefleriyle ilgili yapılan analizler sırasında Sidak çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır ($p<0.05$).

İnsan kanser doku örneklerinde Ccdc124 ifadesinin belirlenebilmesi sırasında, RT-PCR yöntemi kullanılarak elde edilen ΔΔCt değerleri kanser ve normal doku karşılaştırmalarında Mann Whitney test yöntemi, kanser evreleme analizlerinde Kruskal-Wallis testi kullanılarak GraphPad programında analiz edilmiştir *(*$p<0.05$) [Aljada et al., 2015]

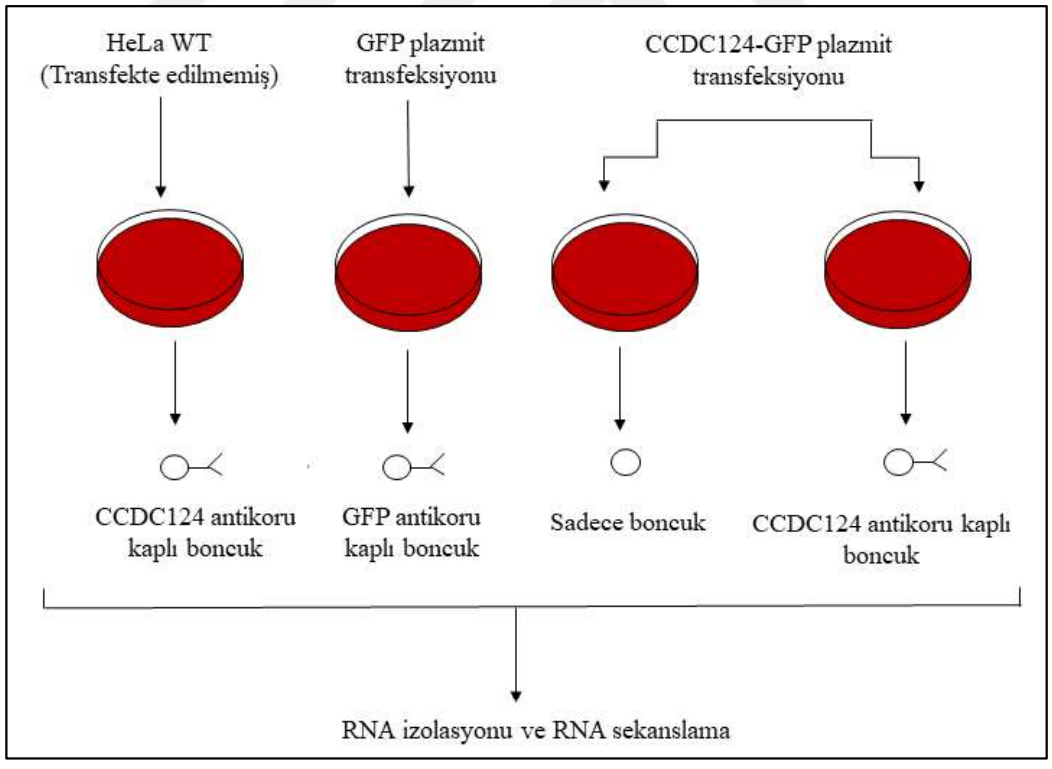
HCT116 p53-/- hücre hattı ve Crispr/Cas9 yöntemi kullanılarak yapılan ve Ccdc124 ifadesinin gerçekleşmediği HCT116 p53-/- hücre hatlarında NS analizlerine ait sayısal veriler ise Dunn's çoklu karşılaştırma testi kullanılarak analiz edilmiştir.

5. SONUÇLAR

5.1. Sonuçlar

5.1.1. Ccdc124 Proteininin RNA ile Olan İlişkisinin Belirlenmesi

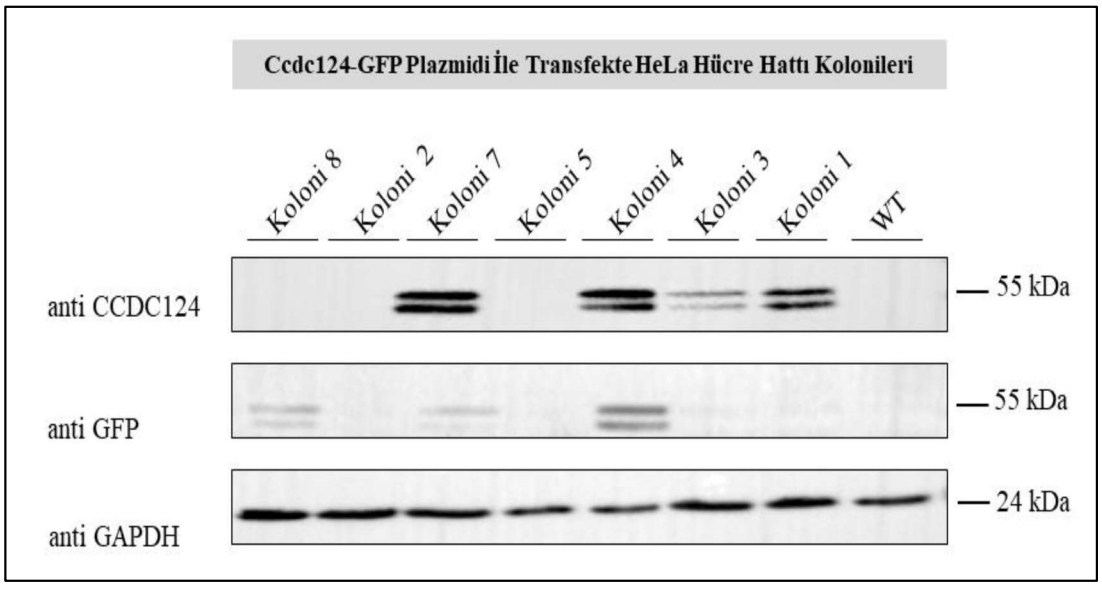
Bir RNA bağlayan protein olduğu *in silico* analizlerle öngörülen (Şekil 2.1 ve 2.4) Ccdc124 proteininin olası RNA hedeflerinin belirlenmesi için ilk olarak HeLa hücreleri Ccdc124-GFP ve GFP ifade eden plasmidlerle transfekte edilmiş, daha sonra bu gruplardan elde edilen lizatlar GFP ve Ccdc124 antikoru kaplı IgG boncuklar kullanılarak yapılan immünolojik çöktürme (immunoprecipitation, IP) deneylerine tabi tutulmuştur. Deney sonucunda izole edilen RNA'lar ise sekanslanarak elde edilen veriler RFKM analiziyle değerlendirilmiştir (Şekil 5.1)



Şekil 5.1: Olası RNA hedeflerinin tespit edilmesine yönelik hazırlanan deney grupları ve deney dizaynı.

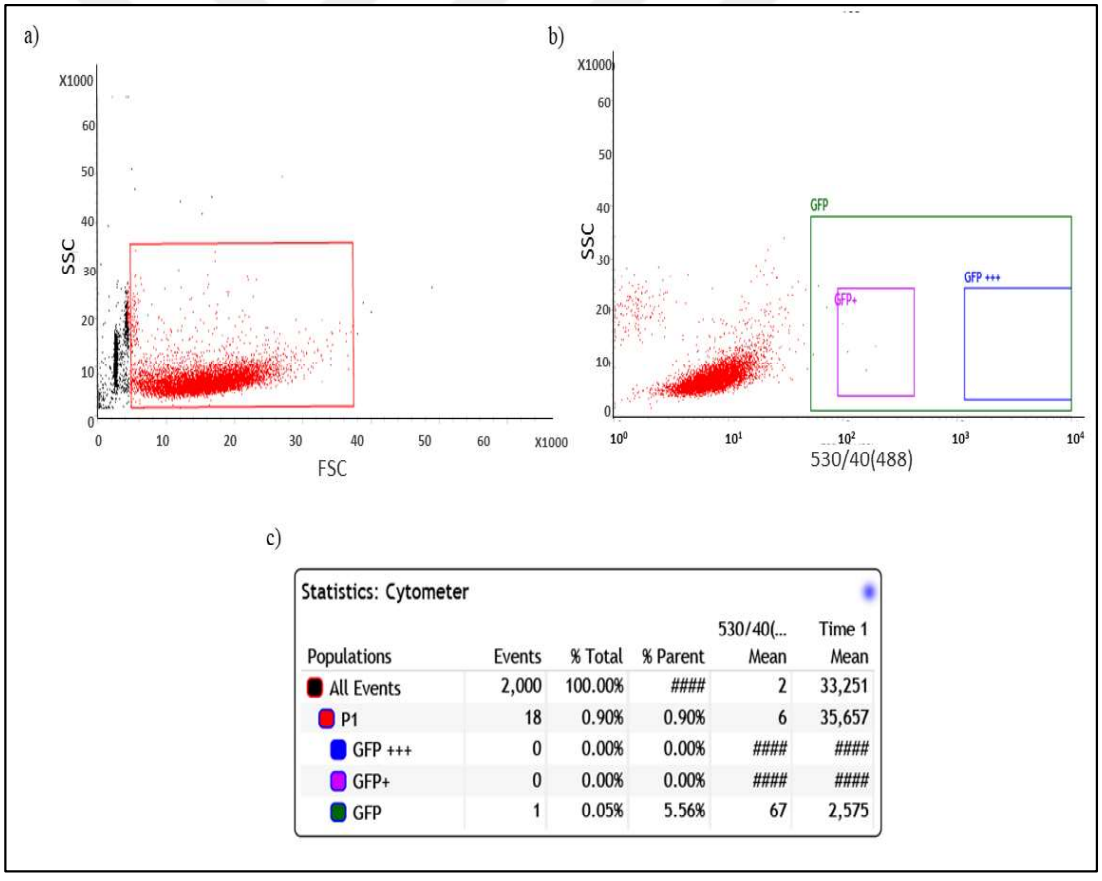
5.1.1.1. Transfekte Edilmiş HeLa Hücrelerinde Ccdc124 Proteininin İfade Profili

Ccdc124-GFP ifade eden hücre hatlarının oluşturulması amacıyla HeLa hücreleri Ccdc124-GFP plazmidiyle kalıcı olarak transfekte edilmiş ve bir hücre havuzu meydana getirilmiştir. Daha sonra transfekte edilmiş HeLa hücre hatları konsantrasyonu sitotoksitite deneyleri sonucu belirlenen 0.6 μg/ml genetisin varlığında yüksek glikoz içeren DMEM içerisinde kültüre edilmiştir. Kültür sonucunda çoğalan hücreler 96 kuyucuklu hücre kabına aktarılarak, tek koloni seçimi gerçekleştirilmiştir. Tek koloni seçimi sonrası elde edilen 9 koloniden her biri çoğaltılarak 10cm kültür kabına aktarıldıktan sonra ise bu gruplardan elde edilen lizatlar western blot yöntemiyle ifade ettiği Ccdc124 protein miktarları bakımından incelenmiştir. Bu deneyler sırasında öncelikli olarak Ccdc124 proteinini 100-150 aminoasit arasından tanıyan antikor kullanılmış, daha sonra membrandaki antikorlar strip tamponu (Bölüm 4.1.4.) yardımıyla kaldırılarak aynı membranda her bir koloninin GFP ifadesine bakılmıştır. Her bir kuyuya yüklenen total protein miktarının kontrol edilmesi için ise GAPDH antikoru kullanılmıştır. Yapılan western blot analizine ait sonuçlar Şekil 5.2'de yer almaktadır.



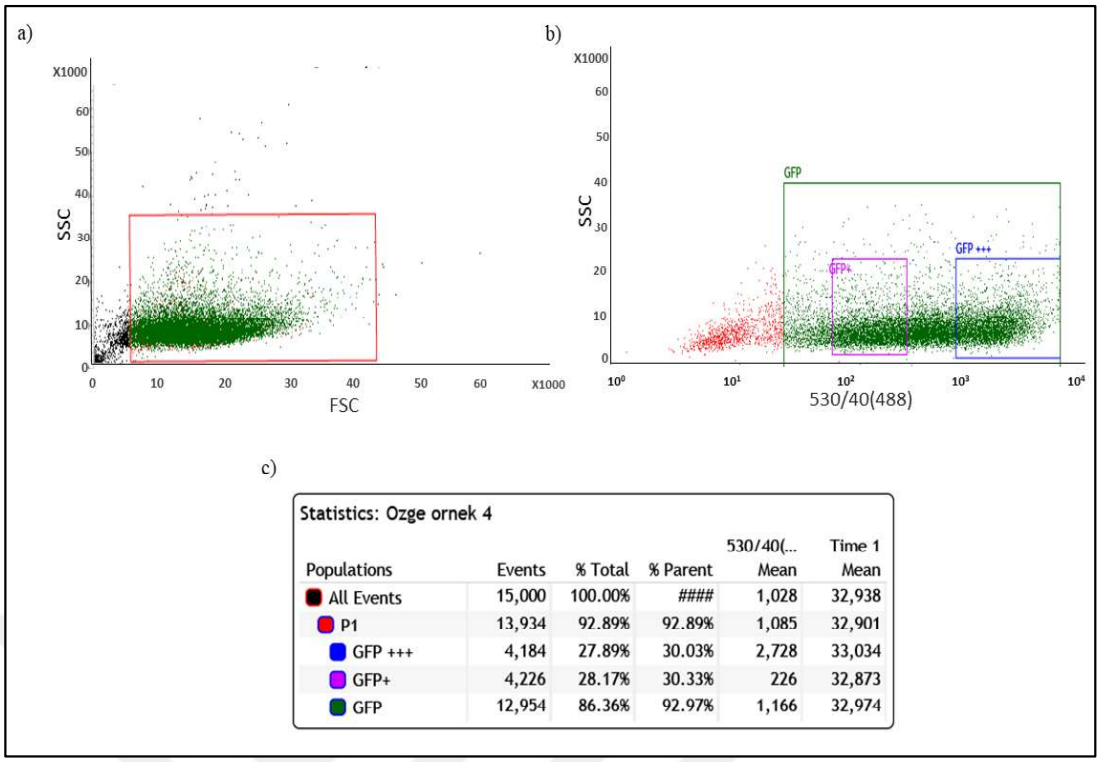
Şekil 5.2: Kalıcı olarak transfekte edilen CCDC-GFP kolonilerine ait western blot analizi görüntüleri.

Western blot deneyi sonucu elde edilen sonuçlara bağlı olarak en yüksek ifadenin gösterildiği hücre kolonilerinden olan koloni 4'ün deneyde kullanılması kararlaştırılmıştır. Ancak bu grubun kültürlenmesi sırasında yapılan kontrollerde bazı hücrelerde floresan ışımanın azaldığı görülmüş ve akım sitometrisi kullanılarak bu koloninin içinden tekrar seçilim yapılmasına karar verilmiştir. Seçilim sırasında yabanıl ve hiçbir vektörle transfekte edilmemiş HeLa hücreleri kontrol grubu olarak kullanılmış ve beklendiği üzere bu grupta GFP sinyaline rastlanmamıştır. Grup 4'de ise belirgin bir GFP sinyali görülmüş ve bu sinyalin alındığı hücre grubu ifade ettiği GFP miktarına bağlı olarak iki alt gruba ayrılmıştır. Bu gruplardan daha fazla Ccdc124-GFP ifadesinin olduğu grup RNA ile çöktürme deneylerinde kullanılmak üzere seçilmiş ve bu hücrelerin kültürlenmesine devam edilmiştir. Yapılmış olan akım sitometrisine ait ayrıntılı bilgileri ise Şekil 5.3 ve 5.4'de yer almaktadır.



Populations	Events	% Total	% Parent	530/40(... Mean	Time 1 Mean
All Events	2,000	100.00%	####	2	33,251
P1	18	0.90%	0.90%	6	35,657
GFP +++	0	0.00%	0.00%	####	####
GFP+	0	0.00%	0.00%	####	####
GFP	1	0.05%	5.56%	67	2,575

Şekil 5.3: Yabanıl tip hücre hattına ait akım sitometri analizi. a) Yabanıl tip HeLa hücre hatlarında akım sitometrisi analizi için seçilen hücre popülasyonu. b) Akım sitometri analizi için seçilen hücre popülasyonunun 488 nm dalga boyunda lazerle uyarılması sonucu ışıma miktarlarına göre bu popülasyondan seçilen alt populasyonlar. c) Akım sitometri analizi sırasında analiz edilen hücre sayıları ve yüzdeleri.



c)

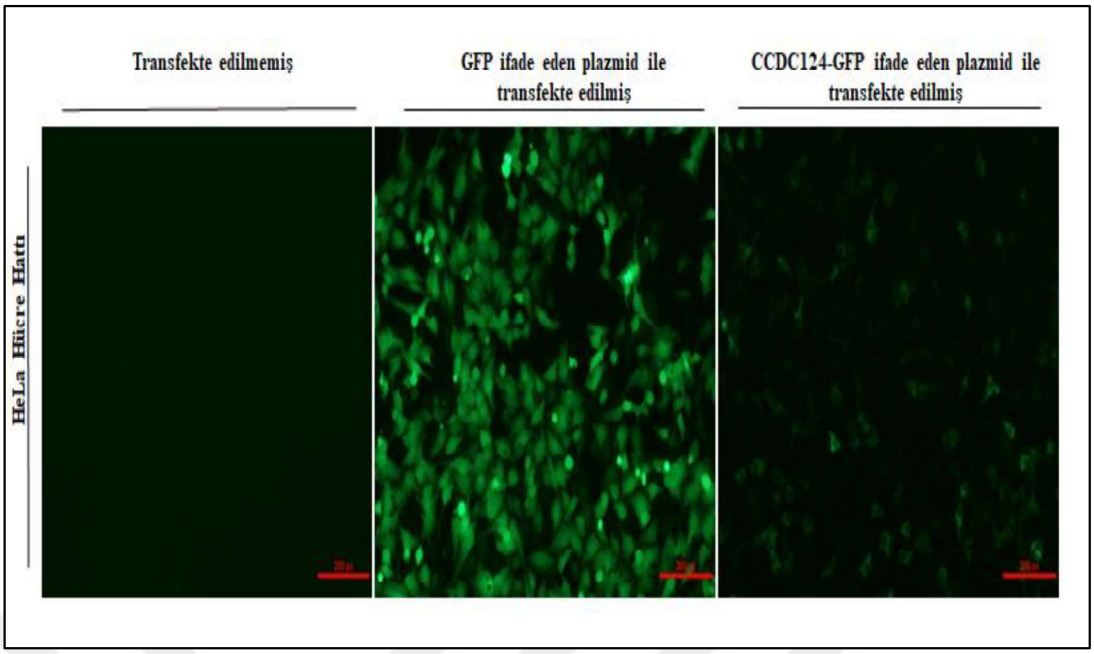
Statistics: Ozge ornek 4

Populations	Events	% Total	% Parent	530/40(... Mean	Time 1 Mean
All Events	15,000	100.00%	####	1,028	32,938
P1	13,934	92.89%	92.89%	1,085	32,901
GFP +++	4,184	27.89%	30.03%	2,728	33,034
GFP+	4,226	28.17%	30.33%	226	32,873
GFP	12,954	86.36%	92.97%	1,166	32,974

Şekil 5.4: Koloni 4 (Ccdc124- GFP ifade eden) hücre hattına ait akım sitometri analizi.a) Koloni HeLa hücre hatlarında akım sitometrisi analizi için seçilen hücre popülasyonu. b) Akım sitometri analizi için seçilen hücre popülasyonunun 488 nm dalga boyunda lazerle uyarılması sonucu ışıma miktarlarına göre bu popülasyondan seçilen alt populasyonlar. c) Akım sitometri analizi sırasında analiz edilen hücre sayıları ve yüzdeleri.

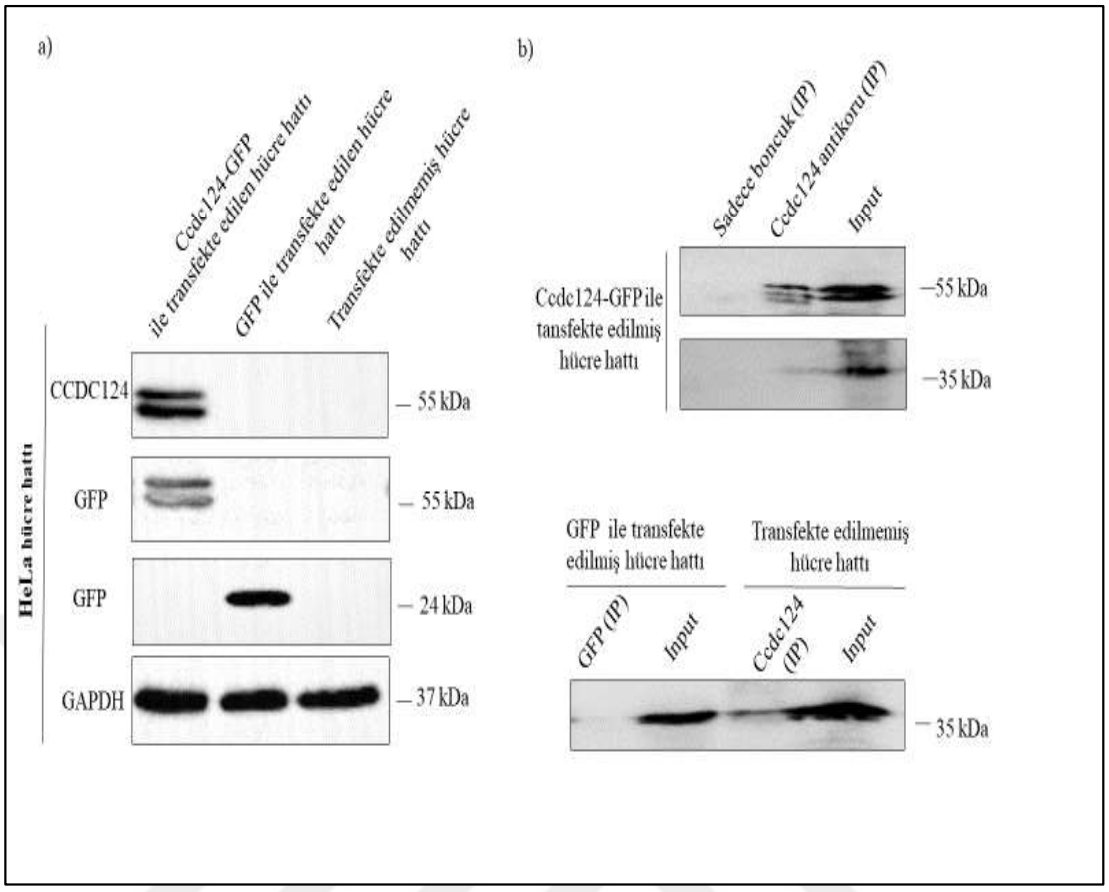
Şekil 5.3 ve Şekil 5.4'de yer alan analizlerde kırmızıyla çerçevelenmiş alanlar canlı hücre popülasyonunu göstermektedir. Bu örneklem grubunda yer alan hücrelerin Ccdc124-GFP ifadelerine ait analizlerde yer alan yeşil çerçeve toplam Ccdc124-GFP sinyali alınan hücreleri gösterirken, mor çerçevede yer alanlar daha az, mavi ile çerçevede yer alanlar ise daha yüksek Ccdc124-GFP sinyali saptanan hücre gruplarını göstermektedir.

Ccdc124-GFP ifade eden HeLa hücre hattının eldesini takiben ise sadece CMV promotoru kontrolündeki GFP ifade eden başka bir plazmid kullanılarak yabanıl tip HeLa hücrelerinin transfekte edilmesi sağlanmış ve tekrar tek hücre kolonileri elde edilmiştir. Elde edilen hücre hatlarının her biri floresan görüntüleme ve western blot yöntemleri kullanılarak tekrar kontrol edilmiştir. Floresan mikroskobu kullanılarak elde edilen görüntüler Şekil 5.5'de yer almaktadır.



Şekil 5.5: Transfekte edilmemiş yabanıl tip HeLa hücre hattına ve GFP ya da Ccdc124-GFP ifade eden plazmidlerle transfekte edilen hücre hatlarına ait floresan mikroskobu görüntüleri (Bar= 200 µm).

Ccdc124 proteininin olası RNA hedeflerinin belirlenmesinde kullanılacak hücre hatlarına ait western blot görüntüleri ise Şekil 5.6a'da gösterilmektedir. Hücre hatlarının eldesini takiben ise RNA ile çöktürme yöntemi uygulanmıştır. Bu deney sırasında ise Magna RIP kitinde yer alan manyetik IgG boncuklara Ccdc124 ve GFP antikorları bağlanmış, ayrıca antikor bağlanmayan boncuklar da kontrol grubu olarak deneyde yer almıştır. Daha önce Şekil 5.1'de belirtildiği gibi deney gerçekleştirilmiş ve deneyde kullanılan antikorların bağlanma eğilimleri ve başarıları ise, sekanslama öncesi hem IP hem de total lizatları içeren inputlara ait örnekler western blotla analiz edilerek gösterilmiştir. Bu görüntüler ise Şekil 5.b'de yer almaktadır. Ccdc124 proteininin boncuklarına bağlanma profilinin tespiti ise Ccdc124 antikoru kullanılmıştır. Buna göre Ccdc124-GFP ile transfekte edilen gruba ait lizatlar Ccdc124 antikoru bağlanmış boncuklarla muamele edildiğinde hem endojen hem de GFP ile füzyon halindeki Ccdc124'ü bağlama kapasitesinin olduğu görülmüştür. Yine GFP antikoru bağlanmış boncukların GFP ile transfekte edilmiş gruplarda az bir miktar endojen Ccdc124 bağladığı, transfekte edilmemiş grupta ise Ccdc124 antikoru bağlanmış boncukların endojen proteine bağlandığı tespit edilmiştir.



Şekil 5.6: Sekanslama öncesinde yapılan kontrollere ait western blot sonuçları. a) Transfekte edilmemiş, GFP plazmidiyle ve Ccdc124 ile transfekte edilmiş hücre hatalrına ait western blot sonuçları. b) RNA ile çöktürme deneyi sırasında kullanılan boncukların Ccdc124 bağlama kapasitelerinin kontrolüne ait westen sonuçları.

5.1.1.2. RNA İle Çöktürme Yöntemiyle Elde Edilen Hedef RNA'ların Analizi

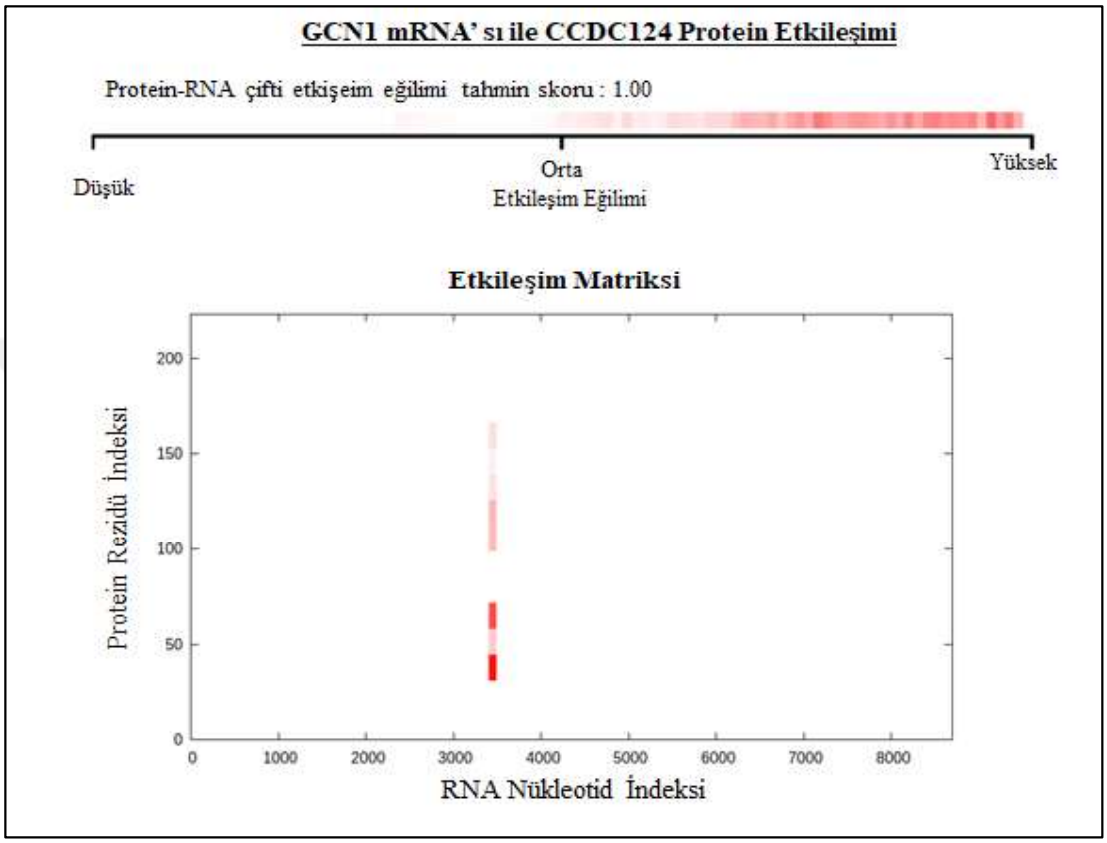
RNA ile çöktürme deneyinin ardından elde edilen RNA örnekleri, sekans analizlerinin hizmet alımı yoluyla yapılması için Amerika'da bulunan Omega Bioservices'e gönderilmiştir. cDNA kütüphaneleri elde edilerek ve HiSeq 2500 sistemi kullanılarak yapılan bu analizde her bir grup için 50 milyon okuma yapılmıştır. Bu analizden gelen sonuçlar ise bölüm 4.2.13'de ayrıntılı olarak bahsedilmiş olan RPKM metodu kullanılarak kendi aralarında karşılaştırılmış, Ccdc124 proteininin bağlanma eğiliminin bulunduğu düşünülen bir grup RNA tespit edilmiştir. Elde edilen bu RNA'lara ait bilgiler ve bu hedeflerin gruplar arası karşılaştırma sonuçları ise aşağıda yer alan Tablo 5.1'de gösterilmektedir.

Tablo 5.1: Sekanslama sonucuna ait veri analizi sonucuna göre olası RNA hedefleri.

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 5	Grup 5/ Grup 3 RFKM oranları	Grup 5/ Grup 2 RFKM oranları	Grup 1/ Grup 2 RFKM oranları	Grup 1/ Grup 5 RFKM oranları
MAP3K6	686	63	183	1123	6	13	8	3
SBF1	2029	177	423	2641	6	11	9	4
HTT	1105	134	311	2231	7	12	7	3
SCRIB	759	86	246	1546	6	13	7	3
INTS1	3449	353	596	4276	7	9	7	5
HERC2	1569	165	467	2376	5	11	7	3
GCN1	2161	266	489	3068	6	8	7	4
USP19	1398	180	460	2173	4	9	6	3
RNF213	1556	171	419	1793	4	8	7	3
FASN	1493	181	256	1518	5	6	7	5
ARHGAP35	845	174	237	1715	7	7	3	3
TELO2	1200	254	561	2865	5	8	3	2
TLN1	6908	1096	1016	5203	5	3	5	6
CAD	1319	207	368	1694	4	6	5	3
ARAP1	805	149	247	1235	5	6	4	3
CLUH	863	163	337	1580	4	7	4	2
HUWE1	1969	350	852	3197	3	7	4	2
BCR	1752	401	293	1876	6	3	3	5
MADD	1078	203	354	1558	4	5	4	3
LRRC45	626	113	302	1114	3	7	4	2
UBR4	1631	280	635	2511	3	6	4	2
TBCD	1568	319	399	2083	5	4	3	3
DLG5	835	201	257	1332	5	4	3	3
TONSL	911	136	333	1038	3	5	5	2
UNC45A	2405	499	946	3988	4	5	3	2
TSC2	1452	265	445	1733	3	4	4	3
DNAJC5	679	184	339	1476	4	6	2	2
TYK2	1103	185	341	1181	3	4	4	3
PRRC2B	1648	434	703	3160	4	5	2	2
LSS	1624	449	477	2511	5	4	2	3
VARS	1752	324	733	2241	3	4	4	2
RECQL4	1539	278	578	1842	3	4	4	2
NUMA1	1158	284	421	1836	4	4	3	2
MCM3AP	757	201	310	1549	4	5	2	2
ARHGAP23	871	217	269	1265	4	4	3	3
CAMSAP1	549	171	221	1136	5	4	2	2
SMARCA4	2484	763	1119	5052	4	4	2	2
NUP188	2806	677	1253	4507	3	4	3	2
NOL6	1121	276	542	1847	3	4	3	2
UPF1	758	199	268	1212	4	4	2	2
CCHCR1	566	167	271	1099	4	4	2	2
FLNA	13450	2946	3598	13960	3	3	3	3
VCP	6819	1702	2785	10006	3	4	3	2
KIAA0100	2592	671	1140	4437	3	4	2	2
CHD3	1776	483	544	2330	4	3	2	3
PC	1770	397	381	1268	3	2	3	4
HERC1	702	190	237	1080	4	4	2	2
FOCAD	1303	228	369	1079	2	3	4	3
PRPF8	5315	1284	1369	5020	3	2	3	3
FLII	3046	770	1134	3947	3	4	2	2
POLD1	2551	695	833	3149	3	3	2	3
SNRNP200	2365	563	980	2900	2	4	3	2
MTOR	954	271	407	1551	3	4	2	2

RPKM metoduyla gerçekleştirilen elemeyi takiben (Bölüm 4.2.13) elde edilen listede yer alan RNA'ların Ccdc124 proteinine bağlanma eğilimi *in silico* olarak catRAPID programıyla analiz edilmiştir [Zanzoni et al., 2013]. Böylece ilgili listeden bağlanma eğilimi en yüksek olarak tahmin edilen RNA'lardan valide edilmek üzere

GCN1 ve HERC2 hedef olarak belirlenmiştir. Bu hedeflere ait ayrıntılı analiz sonuçları Şekil 5.7–5.8 yer alırken ve bu analiz sonucunda elde edilmiş en yüksek etkileşim eğilimleri Tablo 5.2-5.3'de yer almaktadır. Diğer etkileşimlere ait bilgiler ise bu tezin EK A1de sunulmaktadır.



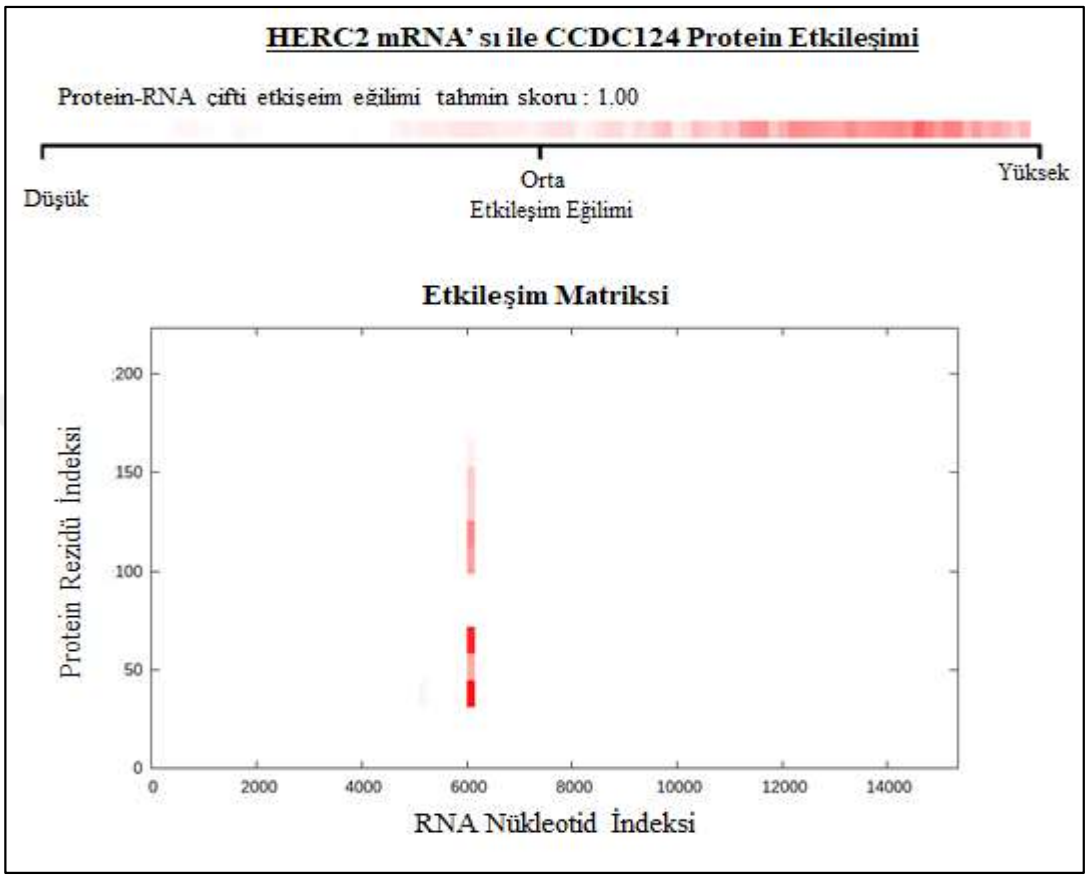
Şekil 5.7: CatRAPID programı kullanılarak elde edilmiş Ccdc124 proteini ile GCN1 mRNA'sı etkileşimi eğilim analiz sonuçları.

Tablo 5.2: Ccdc124 proteini ile GCN1 mRNA'sı etkileşimi eğilimlerine ait bölgesel analiz sonuçları.

Protein Bölgesi	RNA Bölgesi	Etkileşim Eğilimi
26-77	3336-3683	431.99
51-102	3336-3683	411.16
101-152	3336-3683	373.94
98-149	3336-3683	372.89
48-99	3336-3683	367.59

GCN1 mRNA'sı ile Ccdc124 proteini arasındaki etkileşime ait biyoinformatik analiz sonuçları bağlanma eğilimi skorunu 1.00 olarak tahmin etmiş ve böylece bağlanma ihtimalinin yüksek olduğu gösterilmiştir (Şekil 5.7). Yine bu analizde yer

alan etkileşim matriksi ise GCN1 mRNA'sının 3336-3683 arasındaki nükleotidleriyle, proteinin 26-77 ve 51-102 rezidüleri arasının olası bağlanma bölgeleri olabileceğine işaret etmektedir (Tablo 5.2).



Şekil 5.8: CatRAPID programı kullanılarak elde edilmiş Ccdc124 proteini ile HERC2 mRNA'sı etkileşimi eğilim analiz sonuçları.

Tablo 5.3: Ccdc124 proteini ile HERC2 mRNA'sı etkileşimi eğilimlerinin bölgesel analiz sonuçları.

Protein Bölgesi	RNA Bölgesi	Etkileşim Eğilimi
26-77	5854-6467	410.85
51-102	5854-6467	404.77
101-152	5854-6467	370.51
98-149	5854-6467	362.77
48-99	5854-6467	348.43

Olası RNA hedefleri arasında yer alan HERC2 mRNA'sı ile Ccdc124 proteini arasındaki etkileşimin de bağlanma eğilimi skoru 1.00 olarak tahmin edilmiştir (Şekil 5.8). Etkileşim matriksi ile de bu yüksek etkileşim ihtimalinin HERC2 mRNA'sının

5854-6467 arasındaki nükleotidleriyle, Ccdc124 proteininin 26-77 ve 51-102 rezidüleri arasında olduğu tahmin edilmiştir (Tablo 5.3).

Hedef listede yer alan diğer tüm RNA'lar ve bu RNA'lara ait CatRAPID programı kullanılarak elde edilmiş bağlanma potansiyeli ve Ccdc124 proteini-RNA hedefi arasındaki etkileşimine ait veriler Tablo 5.4'de yer almaktadır.

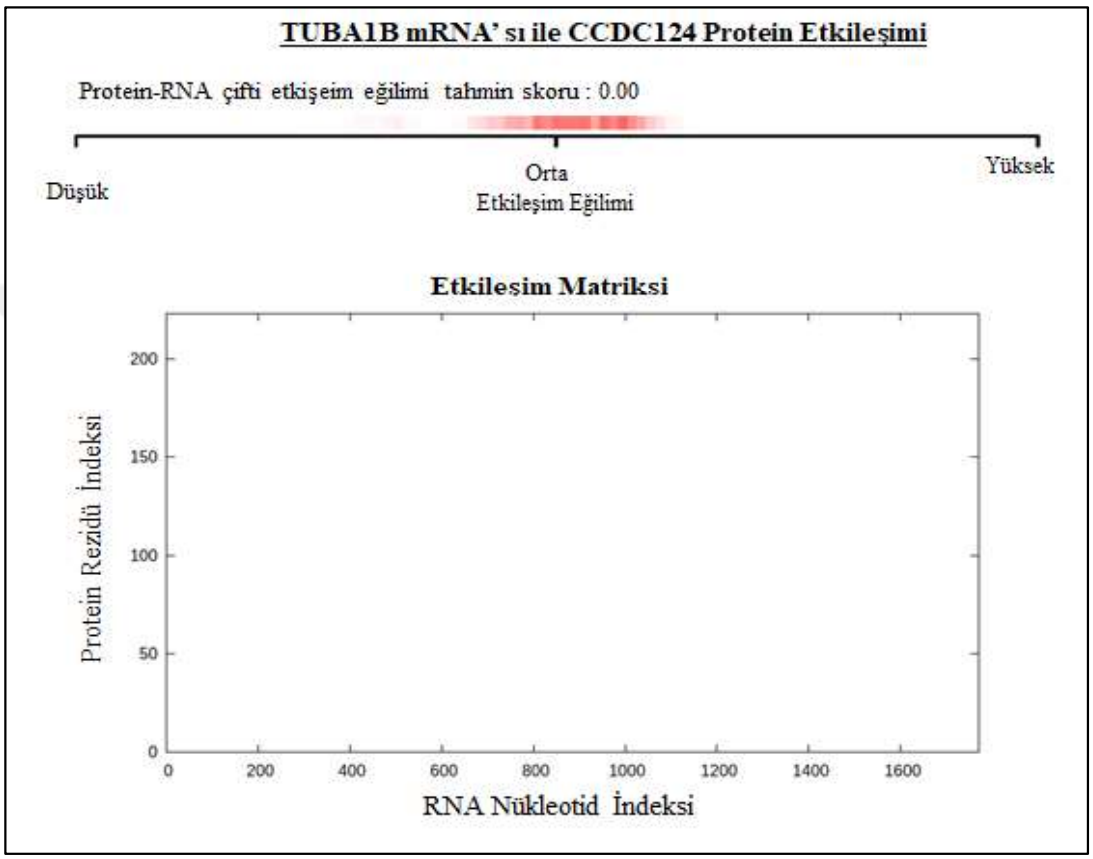
Tablo 5.4: Hedeflere ait listede yer alan RNA'ların Ccdc124 proteinine bağlanma eğilimlerinin belirlenmesine yönelik yapılan CatRAPID analizi sonuçları.

Gen İsmi	**CatRAPID Analizine göre Bağlanma Potansiyeli**	**CatRAPID Analizine Göre Protein-RNA Arası Maksimum Etkileşim**
MAP3K6	1.0	175,34
SBF1	0.2	103,87
HTT	0.99	338,76
SCRIB	1.0	267,4
INTS1	0.99	290,5
HERC2	1.00	410,85
GCN1	1.00	431,99
USP19	1.00	226,88
RNF213	0.00	301,02
FASN	0.00	105,66
ARHGAP35	1.00	125,03
TELO2	0.93	127,65
TLN1	1.00	401,18
CAD	0.97	305,72
ARAP1	1.00	235,34
CLUH	1.00	251,85
HUWE1	0.96	433,74
BCR	0.99	298,33
MADD	0.99	58,14
LRRC45	0.80	37,54
UBR4	1.00	417,46
TBCD	1.00	178,52
DLG5	0.69	71,2
TONSL	0.99	50,58

Tablo 5.4 devam.

UNC45A	0.00	115,3
TSC2	0.10	64,5
DNAJC5	0.98	275,51
TYK2	1.00	177,26
PRRC2B	1.00	111,02
LSS	1.00	40,6
VARS	0.77	172,14
RECQL4	0.69	43,15
NUMA1	1.00	79,3
MCM3AP	0.00	132,91
ARHGAP23	1.00	93,34
CAMSAP1	0.66	264,73
SMARCA4	0.16	65,39
NUP188	0.00	291,86
NOL6	0.88	239,66
UPF1	0.35	95,66
CCHCR1	0.00	123,62
FLNA	0.91	392,58
VCP	0.63	156,1
KIAA0100	1.00	49,49
CHD3	1.00	65,94
PC	0.23	154,95
HERC1	0.96	76,45
FOCAD	1.00	315,95
PRPF8	0.98	313,91
FLII	0.01	53,94
MYH9	1.00	79,21
ABL1	0.69	279,18
POLD1	0.94	131,56
SNRNP200	1.00	318,85
MTOR	0.57	434,43
MAD1L1	0.00	31,08

Negatif kontrol olarak kullanılması amaçlanarak listede yer almayan RNA'ların da bir kısmı yine bu analize tabi tutulmuş, buna yönelik olarak ifadesi yüksek ve RPKM değeri düşük olan alfa tübülin kodlayan TUBA1B geni seçilmiştir. TUBA1B'ye ait ayrıntılı CatRAPID analiz sonuçları Şekil 5.9 ve Tablo5.5'de yer almaktadır.



Şekil 5.9: CatRAPID programı kullanılarak elde edilmiş Ccdc124 proteini ile TUBA1B mRNA'sı etkileşimi eğilim analiz sonuçları. (Etkileşim olmadığı için grafikte veri bulunmamaktadır.)

Tablo 5.5: Ccdc124 proteini ile TUBA1B mRNA'sı etkileşimi eğilimlerinin bölgesel analiz sonuçları.

Protein Bölgesi	RNA Bölgesi	Etkileşim Eğilimi
51-102	1421-1492	15.60
26-77	1421-1492	14.88
51-102	596-667	14.82
51-102	126-197	14.76
26-77	126-197	14.13

Ccdc124 proteininin olası RNA hedefleri arasında yer aldığı düşünülmeyen TUBA1B mRNA'sı ile Ccdc124 proteini arasındaki etkileşimin bağlanma eğilimi skoru 0.00 olarak tahmin edilmiştir. Etkileşim matriksinde de ilgili protein ve RNA arasında bir etkileşim bulunmadığı öngörülmektedir. Yine TUBA1B mRNA'sına ait nükleotidleriyle, Ccdc124 proteininin rezidüleri arasındaki eğilimin ise oldukça düşük olduğu gözlemlenmiştir.

RNA ile çöktürme deneyleri sonucunda sekanslamada en çok bulunan ancak RFKM analizi sonucu elenen RNA'lar için de CatRAPID analizleri gerçekleştirilmiştir. Ccdc124 proteiniyle herhangi bir etkileşim tespit edilememiş olan bu RNA'lara ait biyoinformatik analizi sonuçları ise Tablo 5.6'da gösterilmiştir.

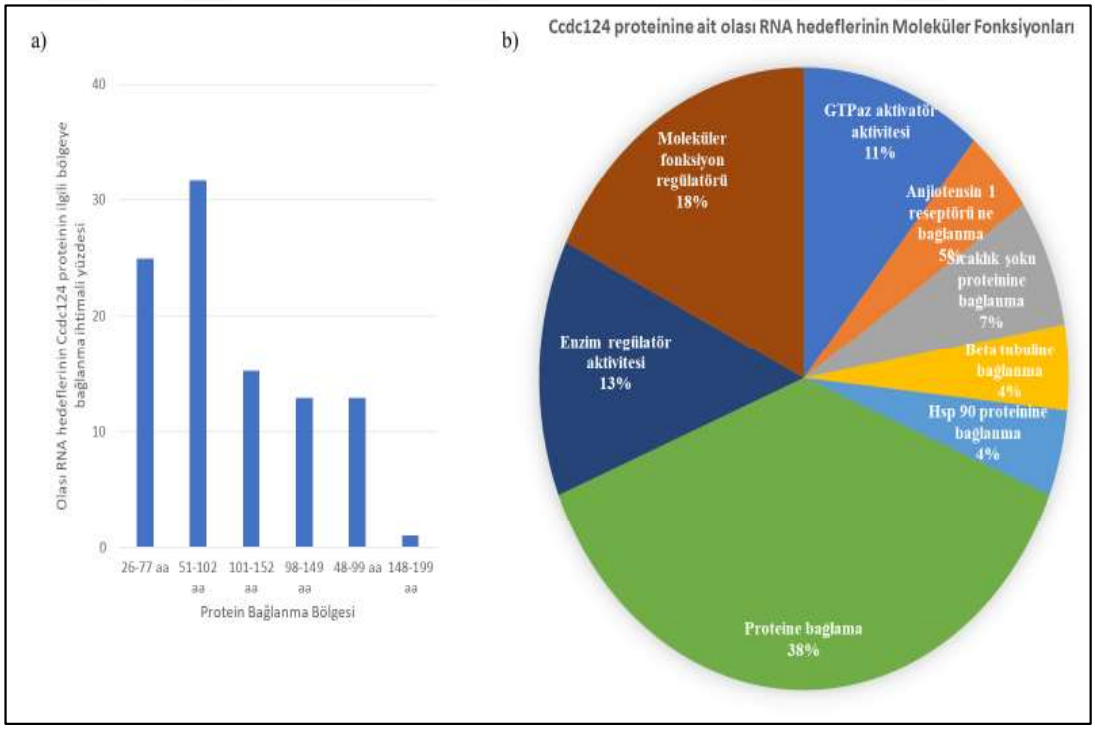
Tablo 5.6: Hedeflere ait listede yer almayan RNA'ların Ccdc124 proteinine bağlanma eğilimlerinin belirlenmesine yönelik yapılan CatRAPID analizi sonuçları.

GEN	**ÖRNEK 1**	**ÖRNEK 2**	**ÖRNEK 3**	**ÖRNEK 5**	**CatRAPID Bağlanma Potansiyeli**	**CatRAPID Protein-RNA Arası Max. Etkileşim**
ACTB	46680	56847	48191	58819	0.00	23.58
FTH1	34359	33996	42830	41053	1.00	11,32
GAPDH	43070	40682	35925	38512	0.08	61.93
ENO1	27652	22206	22069	30108	0.00	18.63
ALDOA	20382	17404	15081	23459	0.86	28.42
ANXA2	19539	17882	13830	20461	1.00	63.26
CCT5	15094	13138	15468	19620	1.00	150.54
TPI1	18891	16741	15513	19390	0.90	139.72
LDHA	22269	22362	18577	19006	0.66	18.94
TUBA1B	22057	22786	19971	18599	0.00	15.60
KRT8	18319	14160	6943	18368	0.00	27.38
LMNA	10746	7788	2957	18339	0.46	124.13
KRT7	12010	16919	11083	18139	0.02	28.82
ATP5B	16680	15204	10728	17952	0.02	49.90
ACTG1	17639	25609	15196	17793	0.66	27.41
PKM	3795	7269	9520	17551	0.00	45.25
EIF3B	8548	3877	3487	17279	0.00	125.99

Tablo 5.6 Devam.

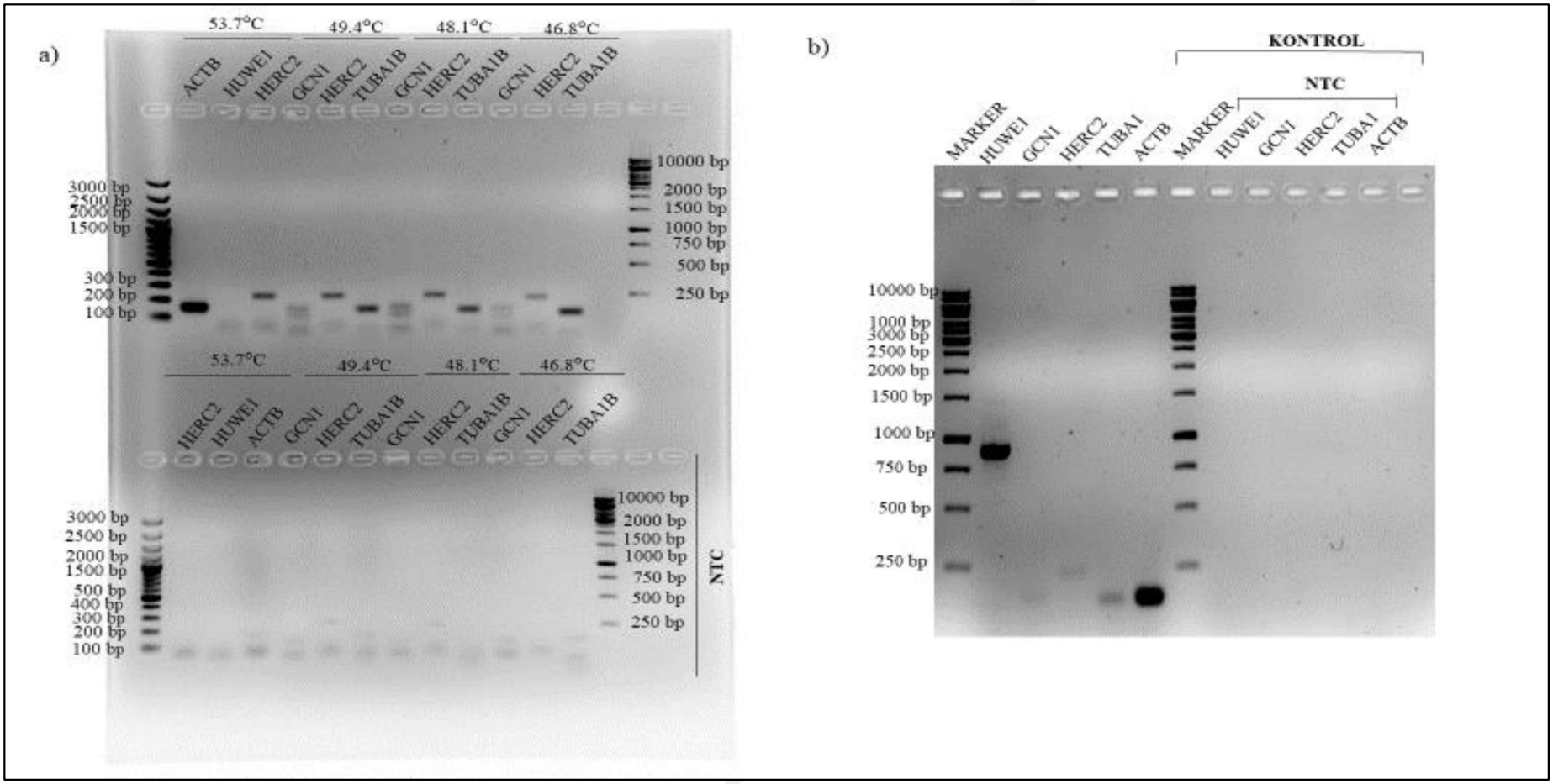
IRAK1	6426	1813	3579	14485	0.01	37.55
PRDX1	15441	14117	14886	14421	1.00	61.21
CALM2	12073	15175	16816	14063	1.00	18,03
FLNA	13450	2946	1897	13960	0.90	94.19
TCP1	9214	6745	6331	13953	0.9	139.72
PSMD2	9164	5380	3447	13759	0.00	129.28
SQSTM1	10424	10138	5299	13439	0.00	125.74

Hem RNA ile çöktürme deneyleri hem de CatRAPID analiz sonuçlarının birbiriyle uyumlu olduğu tespit edildikten sonra, yine CatRAPID analizinden elde edilen veriler ışığında Ccdc124 proteini üzerinde yer alan olası RNA bölgelerine ait veriler grafiğe yansıtılmıştır. Buna göre proteinin N bölgesinin RNA bağlama eğilimin daha yüksek olduğu, özellikle 26-77 ve 51-102 aminoasitleri arasının bu kapasiteye sahip olabileceği öngörülmektedir. Aynı zamanda The Gene Ontology Resource (GO) programı kullanılarak hedef listede yer alan 27 RNA'nın kodladığı proteine ait biyolojik fonksiyon analizi gerçekleştirilmiştir. İki analize ait sonuçlar ise Şekil 5.10'da yer almaktadır.



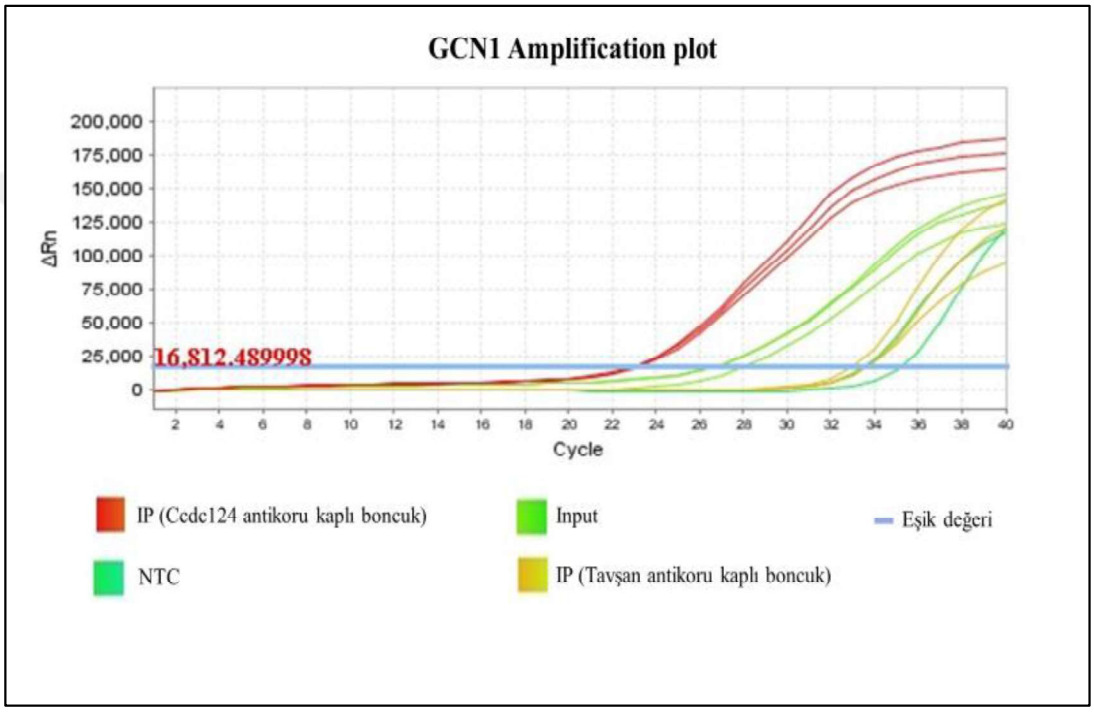
Şekil 5.10: Ccdc124 proteinine ait genel RNA bağlama bölgesi eğilimi (a) ve RNA hedeflerinin moleküler fonksiyon tahmini grafiği.

RNA ile çöktürme, sekanslama ve biyoinformatik analizlerin ardından validasyon için seçilen GCN1, HERC2 ve negatif kontrol olarak belirlenen TUBA1B için primer tasarlanmıştır (Tablo 4.16). Bu primerlere ait deney koşullarının belirlenmesi amacıyla sıcaklık gradiyenti oluşturularak PCR denemeleri yapılmıştır. Böylece primerlerin bağlanma ve ilgili ürünü oluşturma kapasiteleri karşılaştırılmıştır. Denemeler sırasında örnek içermeyen ve sadece PCR reaksiyon içeriklerini bulunduran kuyucuklar da negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Bu kuyucuklar sadece örneğe ait ürünlerin çoğaltıldığından emin olmak amacıyla kullanılmış olup, kalıp içermeyen kontrol (nontemplate control, NTC) olarak adlandırılmıştır. İlgili deneyler sonucunda tasarlanan primerlerin ilgilenilen ürünleri çoğalttığı ancak dimer oluşturma potansiyellerinin bulunduğu tespit görülmüştür. Q-PCR sırasında uygulanacak protokolde ise 50°C'nin erime sıcaklığı olarak kullanılmasına karar verilmiştir. PCR sonucunda elde edilen ürünlerin agaroz jeldeki görüntüleri ise Şekil 5.11'de yer almaktadır.



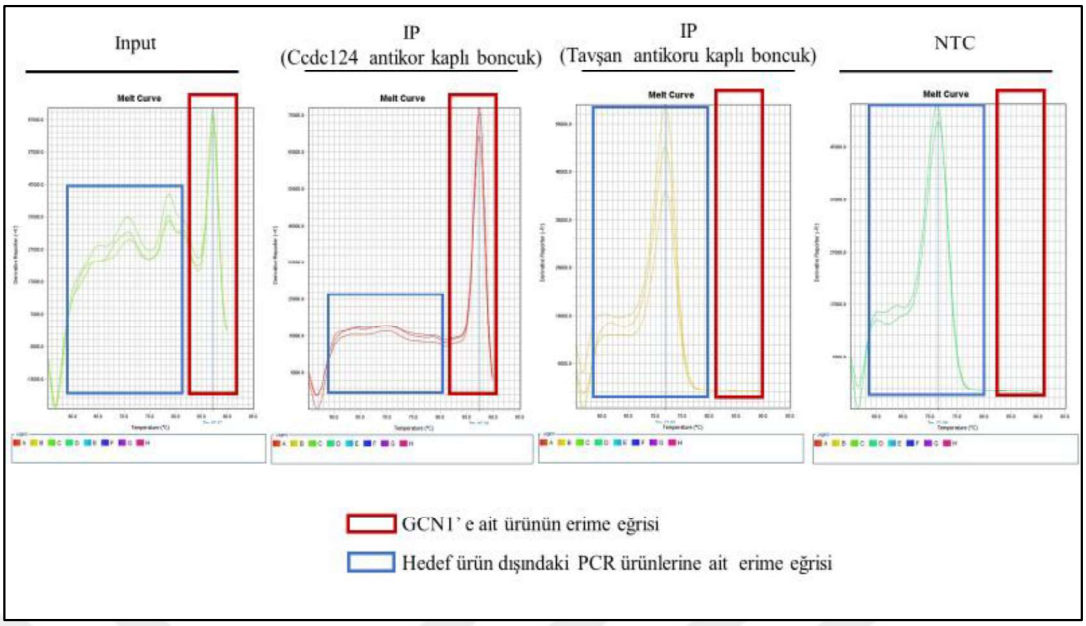
Şekil 5.11: GCN1, HERC2 ve TUBA1B primerleriyle yapılan PCR deneylerine ait jel görüntüsü. a)46°C-54°C arasında yapılan gradient PCR sonuçlarının jel görüntüsü. b) Gradient PCR deneyi sonucunda kullanılmasına karar verilen 50°C'de gerçekleştirilen PCR denemesine ait jel görüntüsü.

Primerlerle ilgili ön deneylerin tamamlanmasını takiben RNA ile çöktürme deneyi transfekte edilmemiş yabanıl tip HeLa hücre hattıyla tekrarlanmıştır. Deney sonucu elde edilen RNA örnekleri cDNA'ya çevrilmiş, her bir cDNA örneği ise GCN1, HERC2 ve TUBA1B primerleri kullanılarak Q-PCR deneyleri gerçekleştirilmiştir. Örnekler için her bir deneme de üç tekrar olmak üzere üç ayrı deneme yapılmıştır. Her bir hedef RNA'ya ait Q-PCR analiz sonuçları Şekil 5.12-5.17'de gösterilmektedir.



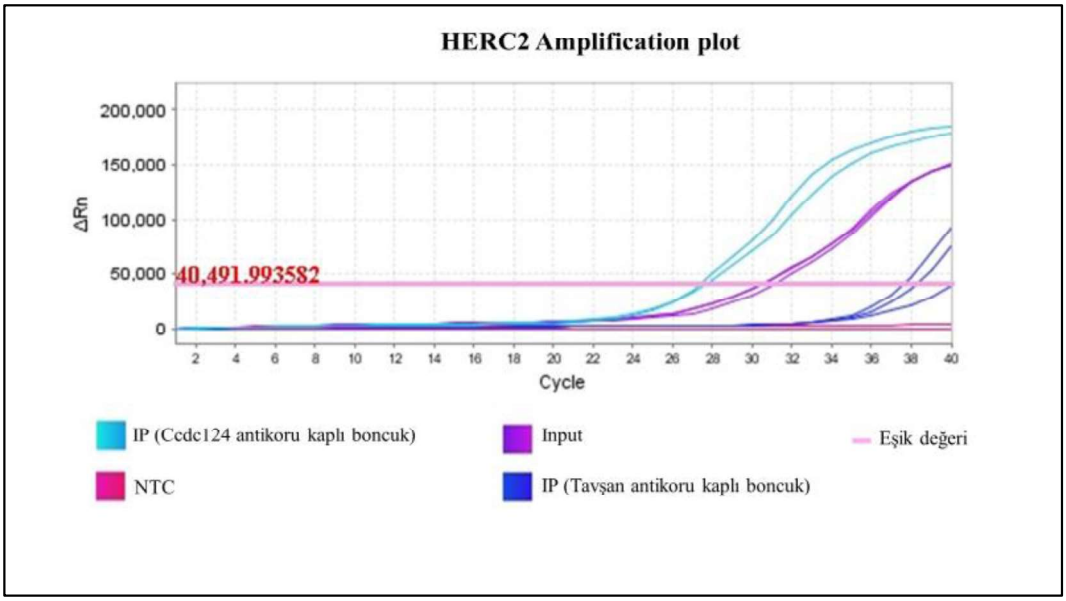
Şekil 5.12: Ccdc124 proteininin olası bir RNA hedefi olarak GCN1'e ait amplifikasyon grafiği.

Q-PCR analizi sonuçları değerlendirilirken ilk önce GCN1'e ait amplifikasyon grafikleri incelenmiştir. Beklenilen durumun aksine tavşan antikoru kaplı IgG boncuklarla çekilen RNA'lara ait cDNA örneklerinde ve template içermeyen örneklerde son döngülerde de olsa da bir miktar çoğalma tespit edilmiştir. Değerlendirmenin daha sağlıklı yapılabilmesi ve çoğaltılan ürünlerin istenilen ürün olup olmadığının gösterilmesi amacıyla da erime eğrileri incelenmiştir. Bu eğrilerde ise input ve IP (Ccdc124 antikoru kaplı boncuk) örneklerinde istenen ürünün çoğaltıldığı görülmüştür. Input analizi ve IP (tavşan antikoru kaplı boncuk) deneylerini takiben elde edilen örneklerde ise primer dimeri olduğu düşünülen küçük bir bölgeden ışıma alındığı tespit edilmiştir. GCN1'e ait erime eğrisi şekil 5.13'de yer almaktadır.



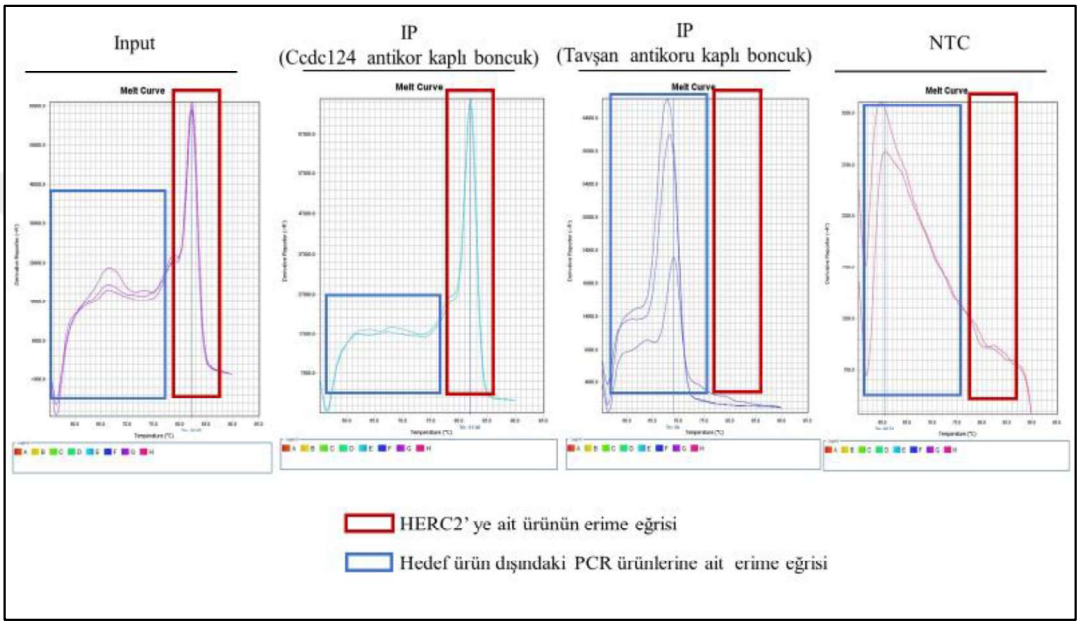
Şekil 5.13: Ccdc124 proteininin olası bir RNA hedefi olarak GCN1'e ait erime eğrisi grafikleri.

GCN1'i takiben olası hedefler arasında yer alan HERC2 kullanılarak Q-PCR deneyi tekrarlanmıştır. Elde edilen sonuçlarda beklendiği üzere input ve IP (Ccdc124 antikoru kaplı boncuk) gruplarında ürün çoğaldığı gözlemlenirken, beklenildiğinden farklı olarak IP (tavşan antikoru kaplı boncuk) grubuna ait örneklerde de bir miktar ürün çoğalması tespit edilmiştir. HERC2 primeri kullanılarak yapılan Q-PCR analizine ait sonuçlar Sekil 5.14'da gösterilmiştir.



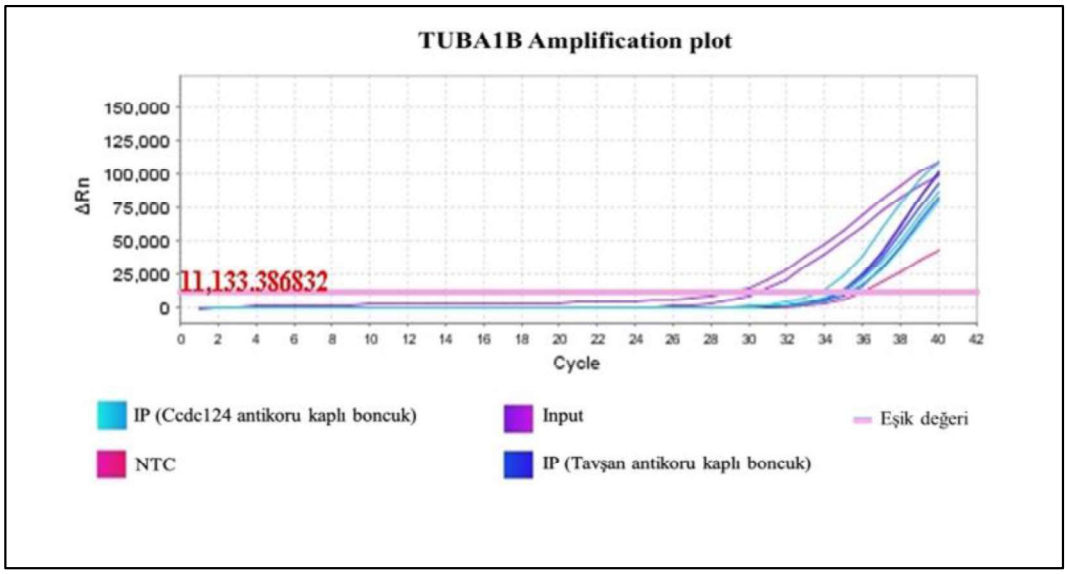
Şekil 5.14 : Ccdc124 proteininin olası bir RNA hedefi olarak HERC2'ye ait amplifikasyon grafiği.

HERC2 primeri kullanılan örneklere ait sonuçlar hakkında ayrıntılı yorum yapılabilmesi amacıyla deneye ait erime eğrileri de incelenmiştir. Bu inceleme sonucunda input ve IP (Ccdc124 antikoru kaplı boncuk) deney gruplarında istenilen ürün çoğalırken, IP (tavşan antikoru kaplı boncuk) grubunda beklenen ürün dışında başka bir bölgenin çoğaldığı tespit edilmiştir. Yine daha önceki PCR denemeleri bize bu ürünün primer dimeri kaynaklı olabileceğini göstermiştir. HERC2'ye ait erime grafikleri ise Şekil 5.15'de yer almaktadır



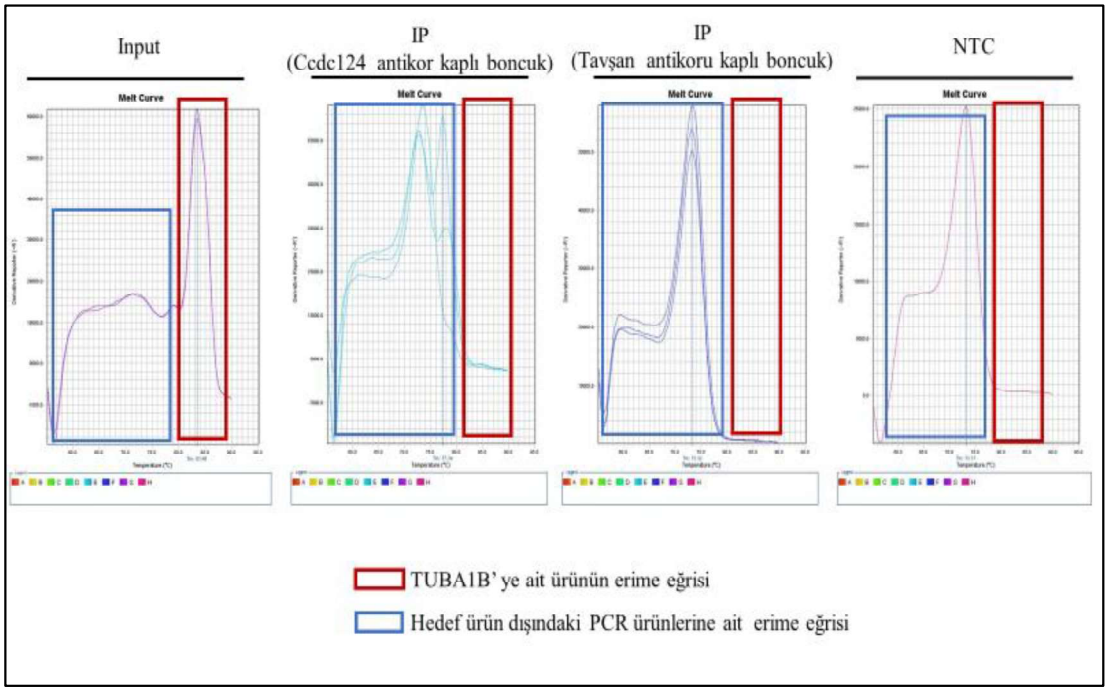
Şekil 5.15: Ccdc124 proteininin olası bir RNA hedefi olarak HERC2'ye ait erime eğrisi grafikleri.

Olası RNA hedeflerinin valide edilmesini takiben Ccdc124 proteiniyle etkileşmediği düşünülen TUBA1B'ye ait primerler kullanılarak Q-PCR analizleri tekrarlanmıştır. Analizlerin sonucunda input, IP (Ccdc124 antikoru kaplı boncuk), IP (tavşan antikoru kaplı boncuk) ve NTC gruplarında ürün oluştuğu tespit edilmiştir. Deney sonuçlarına ait grafik 5.16'da gösterilmiştir.



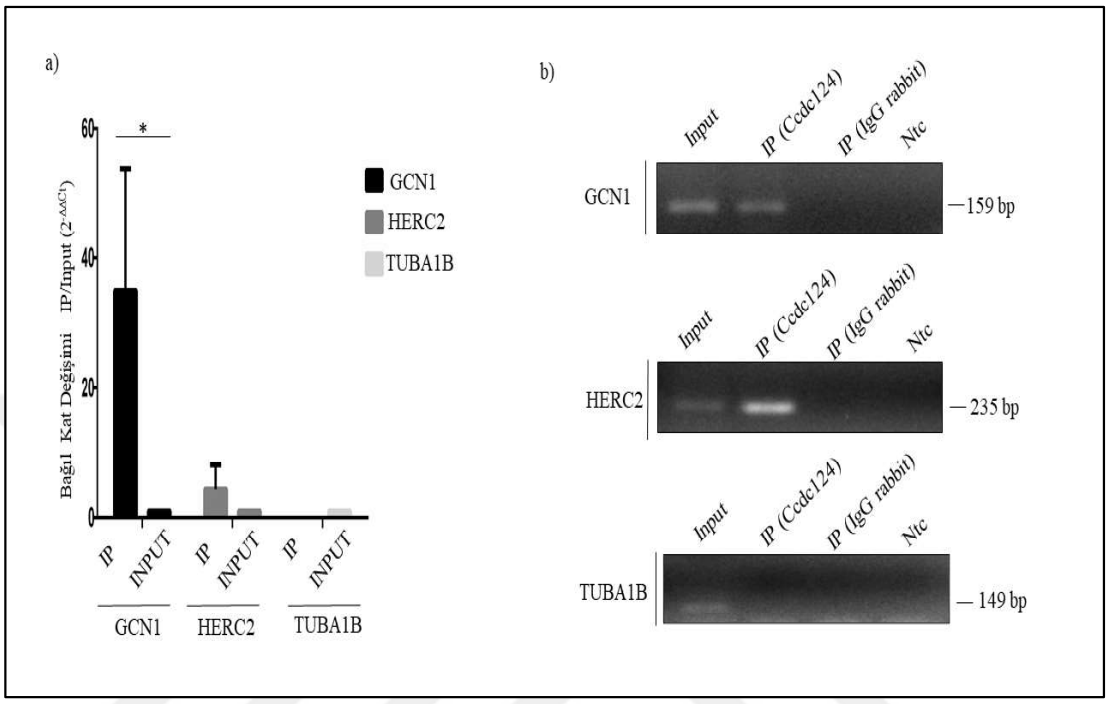
Şekil 5.16: Ccdc124 proteininin olası bir RNA hedefi olarak TUBA1B'ye ait amplifikasyon grafiği.

Beklenildiği üzere yine erime eğrileri dikkate alındığında beklenen ürünün input dışında diğer örneklerde görülmediği belirlenmiştir. Böylece negatif kontrol olarak kullanılan TUBA1B'nin RNA'sıyla Ccdc124 proteini arasında kuvvetli bir etkileşimin bulunmadığı deneysel olarak da gösterilmiştir. TUBA1B'ye ait erime grafiği ise Şekil 5.18'de yer almaktadır.



Şekil 5.17: Ccdc124 proteininin olası bir RNA hedefi olarak TUBA1B'ye ait erime eğrisi grafikleri.

RNA ile çöktürme deneyine ait sonuçlar karşılaştırılmıştır. GCN1, HERC2 ve TUBA1B'nin deney sonuclarına ait istatistiksel analizler ve PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüleri Şekil 5.19'da ve EK B2'de yer almaktadır.



Şekil 5.18 : RNA ile çöktürme ve Q-PCR analiz sonuçlarına göre Ccdc124 proteininin olası hedeflerinin bağlanma eğilimi sonuçları. a) GCN1, HERC2 ve TUBA1B'nin input ve IP örneklerindeki bağıl kat değişim grafikleri. b) RNA ile çöktürme deneyi sonucu elde edilen örneklerin Q-PCR sonrası jel görüntüsü.

5.1.2. Ccdc124 Proteininin Hücre Altı Yapılarda Gösterilmesi

Literatürde yer alan antikor boyaması çalışmalarında Ccdc124 proteininin sentrozom yapısının etrafında konumlandığı gösterilmiştir [Telkoparan, 2013], [Arslan, 2015]. Bilindiği üzere sentrozom etrafında yer alan ve perisentriol matriks olarak adlandırılan bu yapı faz ayrımı sonucu meydana gelmektedir [Woodruff et al., 2017]. Faz ayrım bölgelerinde bulunduğu gösterilmiş olan proteinlerin en önemli özelliklerinden birisi de içerdikleri düzensiz bölgelerdir (intrinsically disordered region, IDR) [Boeynaems, 2018]. Ccdc124 proteininin aminoasit sekansına dayalı olarak gerçekleştirilen SPOT gibi bazı biyoinformatik programları proteinin özellikle N terminaline yakın bölgesinin yüksek düzensizlik eğilimine sahip olabileceğine işaret etmekte ve bu öngörü cryo-elektron mikroskobisi bulgularıyla da desteklenmektedir

(Şekil 1.1) [Web 5]. Aynı zamanda bu analizler Ccdc124 proteininin poliamfolit bir yapıda olduğuna işaret etmektedir. Günümüzde bilinen IDR'ye sahip proteinlerin %75'ini ise poliamfolit proteinler meydana getirmektedir [Sickmeier et al., 2007]. Bu bulgular bize Ccdc124'ün başka hücre altı lokalizasyon organellerinde de görevli olabileceğini düşündürmüş ve ilk deneylerin immunofloresan boyama yöntemi kullanılarak yapılmasına karar verilmiştir.

Kütle spektrometresi ve biotinleme çalışmaları sonucunda SRPK1, PCBP1, DDX17, HNRNPA1 gibi nükleer beneklerde bulunduğu bilinen proteinlerle ve G3BP1 ve FUS gibi stres granülü bileşeniyle etkileşim içinde olabileceğinin belirlenmesi ise bizi ilk olarak nükleer benek (nükleer speckle, NS) ve stres granülü (SG) yapılarının incelenmesine yönlendirmiştir. Aynı zamanda nükleer beneklerin ve stres granüllerinin zengin RNP içeriğine sahip olması ve Ccdc124'ün RNA bağlama kapasitesinin tespit edilmesi de bu hipotezimizi desteklemektedir.

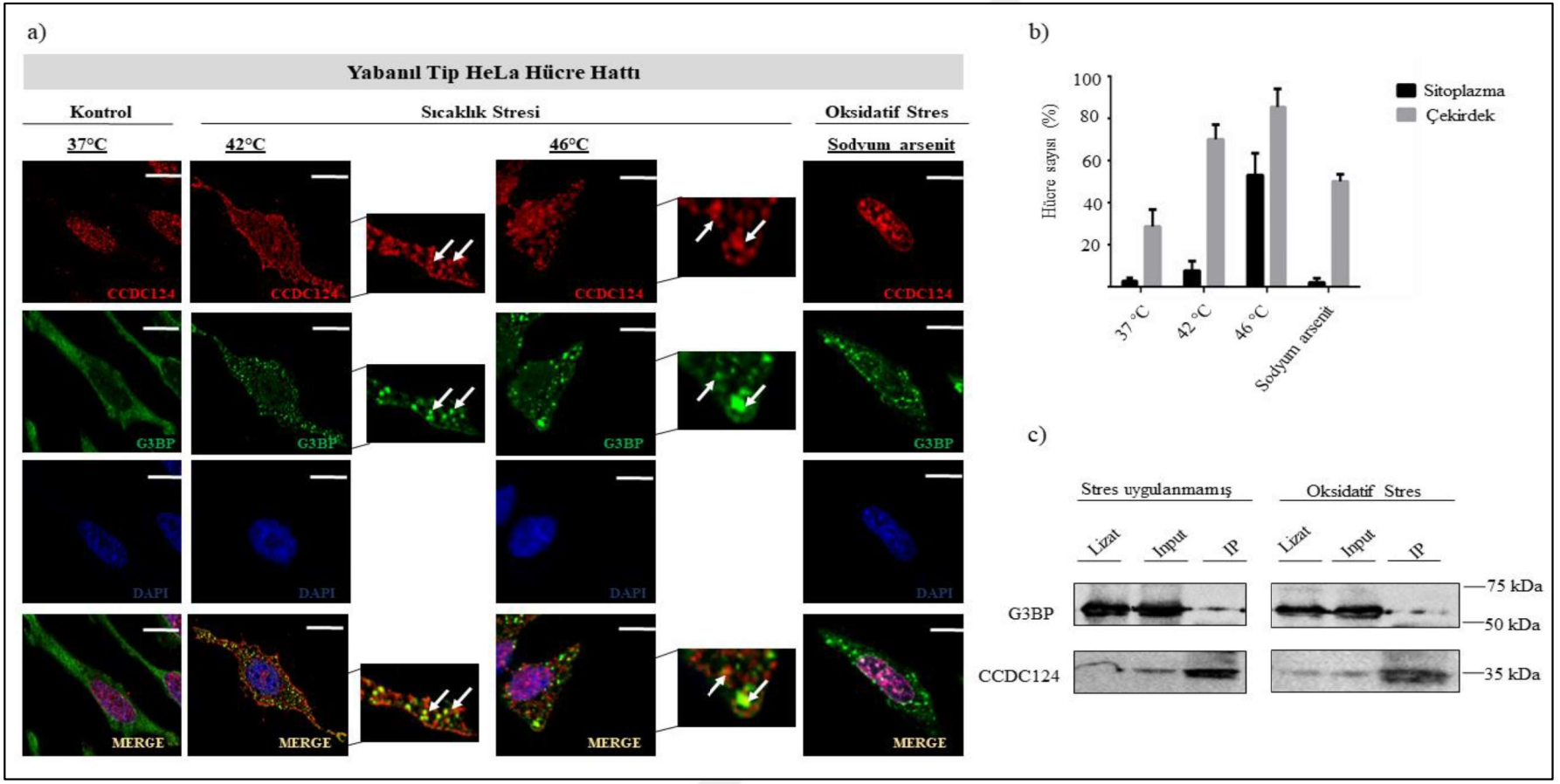
5.1.2.1. Stres granüllerinde Ccdc124 Konumlanması

Ccdc124 proteininin stres granülü oluşumunda rol alıp almadığının belirlenmesi için yabanıl tip HeLa hücre hattı kullanılmıştır. Literatürde HeLa hücre hattı kullanılarak yapılan sıcaklık stresi indüklemesi çalışmalarında ise farklı sıcaklıklar kullanılmış olup (42°C ve 46°C) oluşan stres granülü içeriklerinin farklı olabileceği belirtilmiştir [White ve Lloyd, 2011], [Markmiller et al., 2017]. Bu nedenle yapılan ilk denemelerde hücrelerde sıcaklık stresine bağlı granül oluşumunu tetiklemek amacıyla 42°C ve 46°C olmak üzere iki farklı sıcaklıkta inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Oksidatif strese bağlı granül oluşumu sağlamak için ise hücreler 50 dakika boyunca 0.05 mM sodyum arsenite maruz bırakılmıştır. Stres granüllerinin varlığını göstermek amacıyla G3BP proteinine özgü antikor kullanılarak boyama yapılmıştır (Şekil 5.19a).

Deney sonucunda hiçbir uygulamaya maruz bırakılmayarak 37°C'de inkübe edilmiş hücreler G3BP antikoruyla boyandığında sitoplazmada herhangi bir granüler yapıya rastlanmazken; sıcaklık stresi ve oksidatif stres durumlarında sitoplazmada granül yapıları gözlemlenmiştir (Şekil 5.19 a). Bu durum stres indüklemesinin doğru bir şekilde yapıldığının bir göstergesi olarak kabul edilmiştir. Ccdc124 antikoruyla yapılan boyamalarda ise 37°C'de inkübe edilen ve oksidatif stres oluşturulan hücrelerde sitoplazmada granülleşme gözlemlenmezken, sıcaklık stresi durumunda

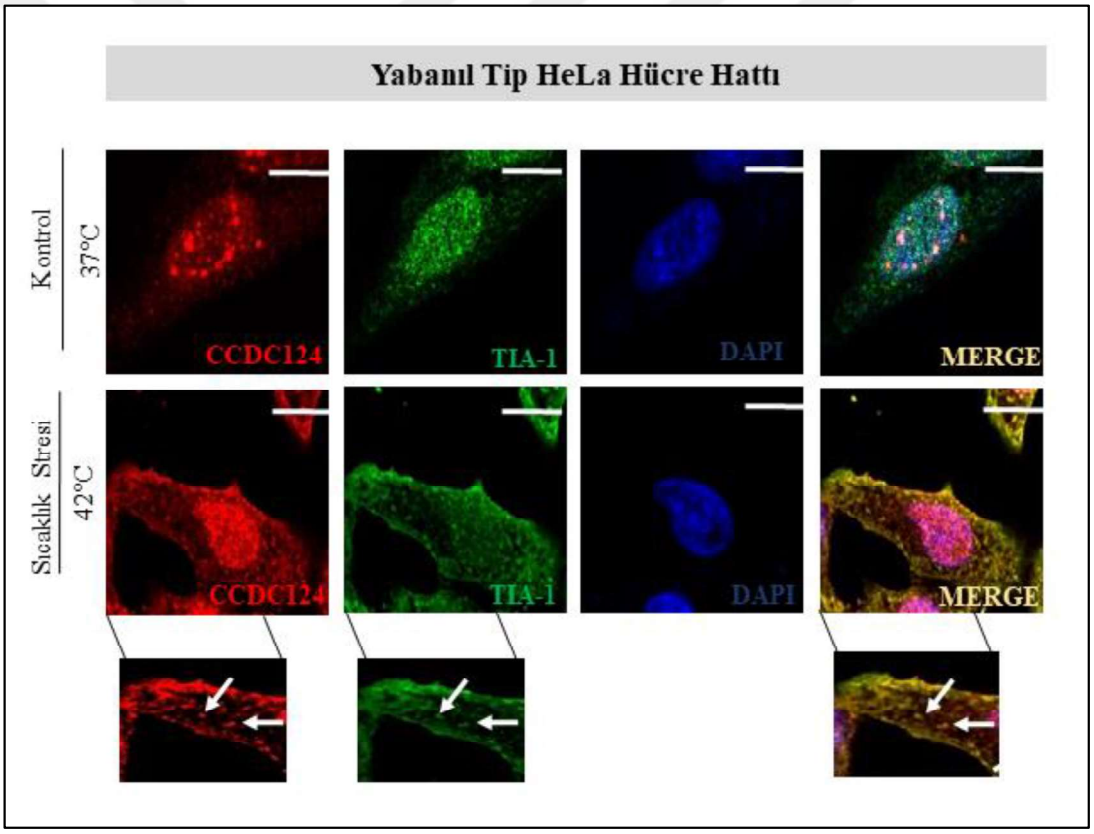
Ccdc124 proteininin sitoplazmada granüler yapılar oluşturduğu tespit edilmiştir (Şekil 5.19 b). Ayrıca gözlemlenen bu granüler yapıların G3BP antikoru ile boyanmış stres granüllerinin konumlarıyla eşleştiği gözlemlenmiştir (Şekil 5.19 a). Aynı zamanda hem 42°C'de hem de 46°C'de Ccdc124 proteininin SG'de konumlandığı tespit edilmiş olması sıcaklık stresine ilişkin Ccdc124 çalışmalarında her iki sıcaklığın da kullanılabileceğini göstermektedir. Aynı zamanda farklı stres koşullarındaki Ccdc124-G3BP ortak konumlanmalarına ait sayısal bilgiler Şekil 5.19 b'de grafiğe yansıtılmıştır. Bu grafiğe göre sıcaklık stresi uygulandığı durumda sitoplazmik ortak konumlanmaların artarken, oksidatif stres uygulandığında sitoplazmadaki ortak konumlanmada bir artış gözlemlenememiştir. Yine bu analiz sırasında G3BP ile Ccdc124 proteinleri arasındaki ortak konumlanmalara çekirdek içinde daha çok rastlandığı ve durumun stresle birlikte arttığı gözlemlenmiştir (Şekil 5.19 b).

Immunofloresan deneylerini takiben ise G3BP ile Ccdc124 proteini arasında bir etkileşimin bulunup bulunmadığının anlaşılması için immunopresipitasyon (IP) deneyi gerçekleştirilmiştir. Bu deneyin gerçekleşmesi sırasında Ccdc124 antikoru bağlanmış boncuklarla yabanıl tip HeLa hücre hattından elde edilen toplam lizat inkübe edilerek iki proteinin etkileşimi western blot yöntemi kullanılarak test edilmiştir. Analiz sonucunda G3BP ile Ccdc124 proteininin etkileştiği ve bu durumun stres bağımlı olmadığı belirlenmiştir. Sodyum arsenit varlığında ve stres uygulanmadığı koşullarda tekrarlanmış olan IP deneyini takiben gerçekleştirilen western blot analizine ait veriler ise Şekil 5.19 c'de gösterilmiştir.



Şekil 5.19: Stres bağımlı G3BP ve Ccdc124 protein ilişkisi. a) G3BP ve Ccdc124 proteinin kontrol grubu, sıcaklık stresi ve oksidatif strese bağlı olarak konumlanması. b) G3BP ve Ccdc124 proteinin ortak konumlanmasına ait yüzdelik hücre dağılımı. c) Stressiz ve stres indüklenmesinin olduğu durumlarda G3BP-Ccdc124 etkileşimi. (Bar = 20 µm)

Bu deneyi takiben Ccdc124 proteininin sıcaklık stresine yanıt olarak stres granüllerinde konumlanmasının farklı bir işaretleyiciyle tekrar gösterilmesine karar verilmiştir. Bu deneylerde kullanılmak üzere ise literatürde yer alan çalışmalarda SG'nin kor yapısında bulunduğu gösterilmiş olan TIA-1 proteinine ait antikor immunfloresan boyama için seçilmiştir [Gilks et al., 2004] Sıcaklık stresinin mimik edilmesi için 42°C kullanılmıştır (Şekil 5.20). Böylece sıcaklık stresine bağlı olarak ortaya çıkan bu cevap hem TIA-1 hem de G3BP işaretlemesiyle gerçekleştirilen iki bağımsız deneyle de gösterilmiştir (Şekil 5.19 ve Şekil 5.20). Deney sonucunda TIA-1 ve Ccdc124 proteininin sıcaklık stresinde aynı sitoplazmik granüller içinde beraber konumlandığı tespit edilmiştir.

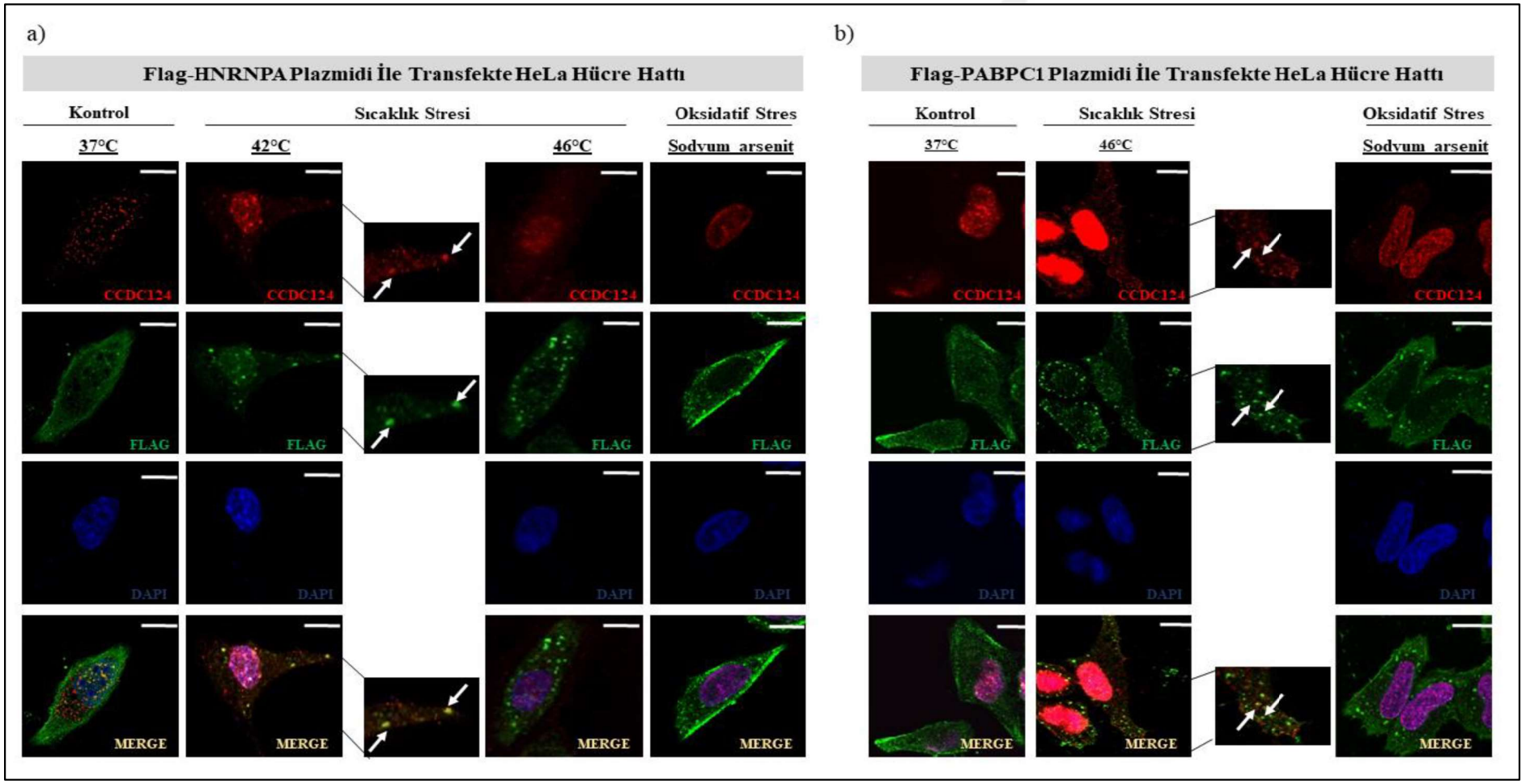


Şekil 5.20: Kontrol grubuyla sıcaklık stresi uygulanmış hücrelerin TIA-1 ve Ccdc124 antikorlarıyla immunfloresan boyama yöntemiyle karşılaştırılması. (Bar = 20 µm)

Ccdc124 proteiniyle etkileştiği düşünülen hnRNPA1 ve PABPC1 proteinlerinin ise stres granülünde bulundukları daha önce literatürdeki çalışmalarla gösterilmiştir [Guil et al., 2006], [Wheeler et al., 2017]. Söz konusu etkileşimin stres granülünde olabilme ihtimali göz önünde bulundurularak Flag-hnRNPA1 ve Flag-PABPC1

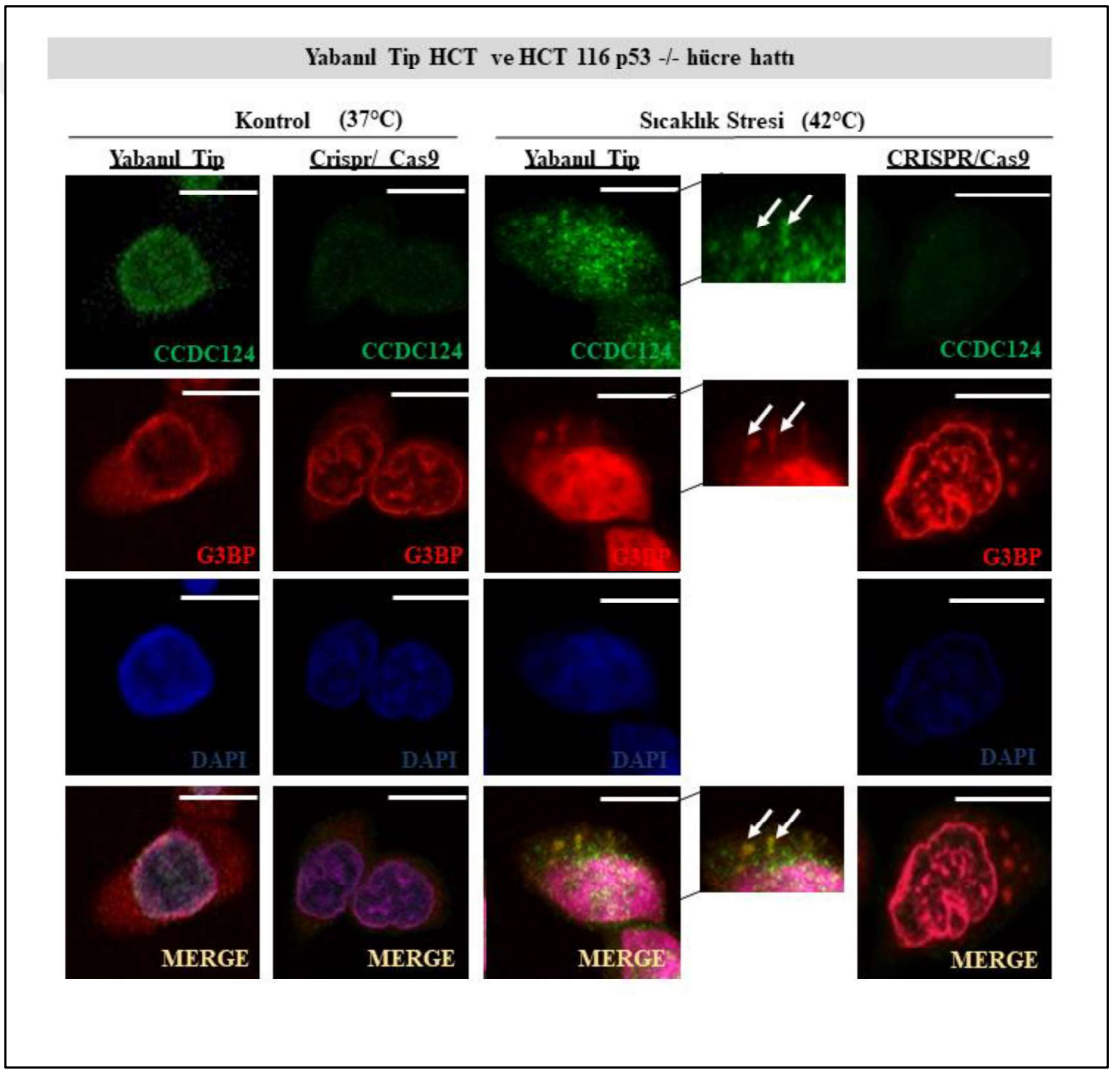
plasmidleriyle geçici olarak transfekte edilmiş olan HeLa hücre hatlarında immunofloresan boyamalarını takiben konfokal mikroskobuyla görüntüleme yapılmıştır. Her bir deney grubu immunofloresan boyama öncesi 37°C'de inkübe edilmiş olan hücrelerde hücresel stres durumu gözlenmediği kabul edilerek bu örnekler kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Sıcaklık stresinin mimik edilmesi için 42°C ve 46°C'de, oksidatif stresin mimik edilmesi için ise sodyum arsenit içeren besiyerinde inkübasyon gerçekleştirilmiştir.

Deney sonucunda 42°C'de oluşturulmuş sıcaklık stresine bağlı olarak Ccdc124 proteiniyle Flag antikoru kullanılarak işaretlenmiş hnRNPA1 proteinlerinin aynı sitoplazmik granüler yapılarda bulunduğu gözlemlenirken, 46°C'de oluşturulmuş sıcaklık stresinde benzer bir durum gözlemlenmemiştir. Flag-PABPC1 ile transfekte edilmiş olan hücrelerde ise 42°C'de herhangi bir stres granülü oluşumu gözlemlenememiş olup, 46°C'de yapılan deneylerde Ccdc124 proteiniyle ortak sitoplazmik konumlanmalar tespit edilmiştir. Oksidatif strese maruz kalmış hücrelerde meydana gelen stres granüllerinde ise Ccdc124 proteini ve PABPC/hnRNPA1 proteinleri arasında herhangi bir ortak konumlanmaya rastlanmamıştır. İmmunofloresan analizlere ait veriler Şekil 5.21'de yer almaktadır.



Şekil 5.21: Transfekte edilmemiş kontrol grubuyla Flag-hnRNPA1 ve Flag-PABPC1plasmidleriyle transfekte HeLa hücre hatlarında sıcaklık stresine bağlı olarak sitoplazmik Ccdc124 konumlanması. (Bar = 20 μm)

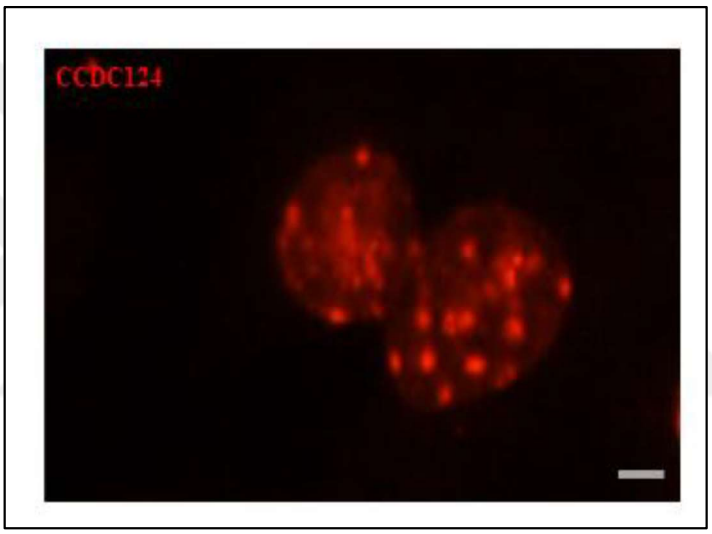
SG'de Ccdc124 proteininin konumlanmasına ilişkin deneyleri takiben laboratuvarımızda Sinem Gül'den temin edilmiş ve CRISPR/Cas9 sistemi kullanılarak elde edilmiş olan Ccdc124 proteini ifade edilmeyen HCT 116 p53-/- hücre hatlarıyla immunofloresan boyamalar tekrarlanmıştır [Gül, 2015]. Özgül olmayan antikor yapışmalarından kaynaklı elde edilebilecek pozitif bulguların bu şekilde önlenmesi amaçlanmıştır. Yapılan bu deneylerin sonucunda da Crispr/Cas9 gruplarında Ccdc124 boyaması ve buna bağlı bir ortak konumlanma tespit edilemezken, kontrol gruplarında sıcaklık stresine bağlı sitoplazmik Ccdc124 granülleri ve G3BP ortak konumlanması gözlemlenmiştir (Şekil 5.22).



Şekil 5.22: HCT 116 p53-/- ve CRISPR/Cas9 yöntemiyle Ccdc124 delesyonu yapılmış hücre hatlarında G3BP ve Ccdc124 antikor boyaması. (Bar = 20 µm)

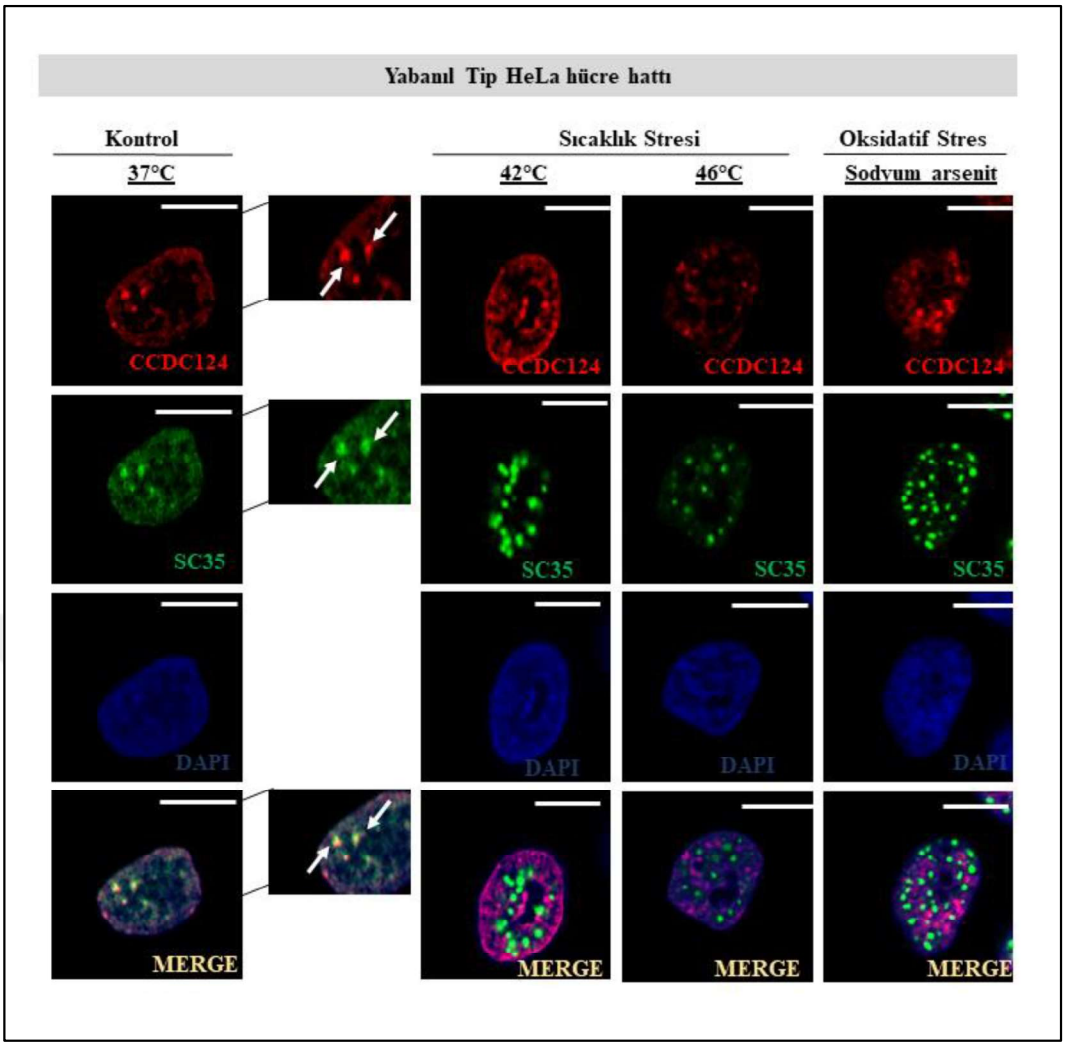
5.1.2.2. Nükleer speckle Yapılarında Ccdc124 Proteininin Konumlanması

SG'nin incelenmesi sırasında konfokal görüntüleme için hazırlanmış preparatlarda Ccdc124 proteininin çekirdekte de lokalize olduğu gözlemlenmiş ve konuda literatür incelemesi gerçekleştirilmiştir. Bu incelemeler sırasında çekirdek içi dağılım profilinin özellikle 2011 yılında yapılan bir çalışmada nükleer benek yapılarının gözlemlenmesi için kullanılan kırpılma faktör boyamasıyla büyük benzerlik gösterdiği görülmüştür (Şekil 5.23) [David L. Spector and Angus I. Lamond, 2011].



Şekil 5.23: HeLa hücre hatlarında Ccdc124 proteinine özgü antikorun çekirdek boyaması. (Bar = 5 μm)

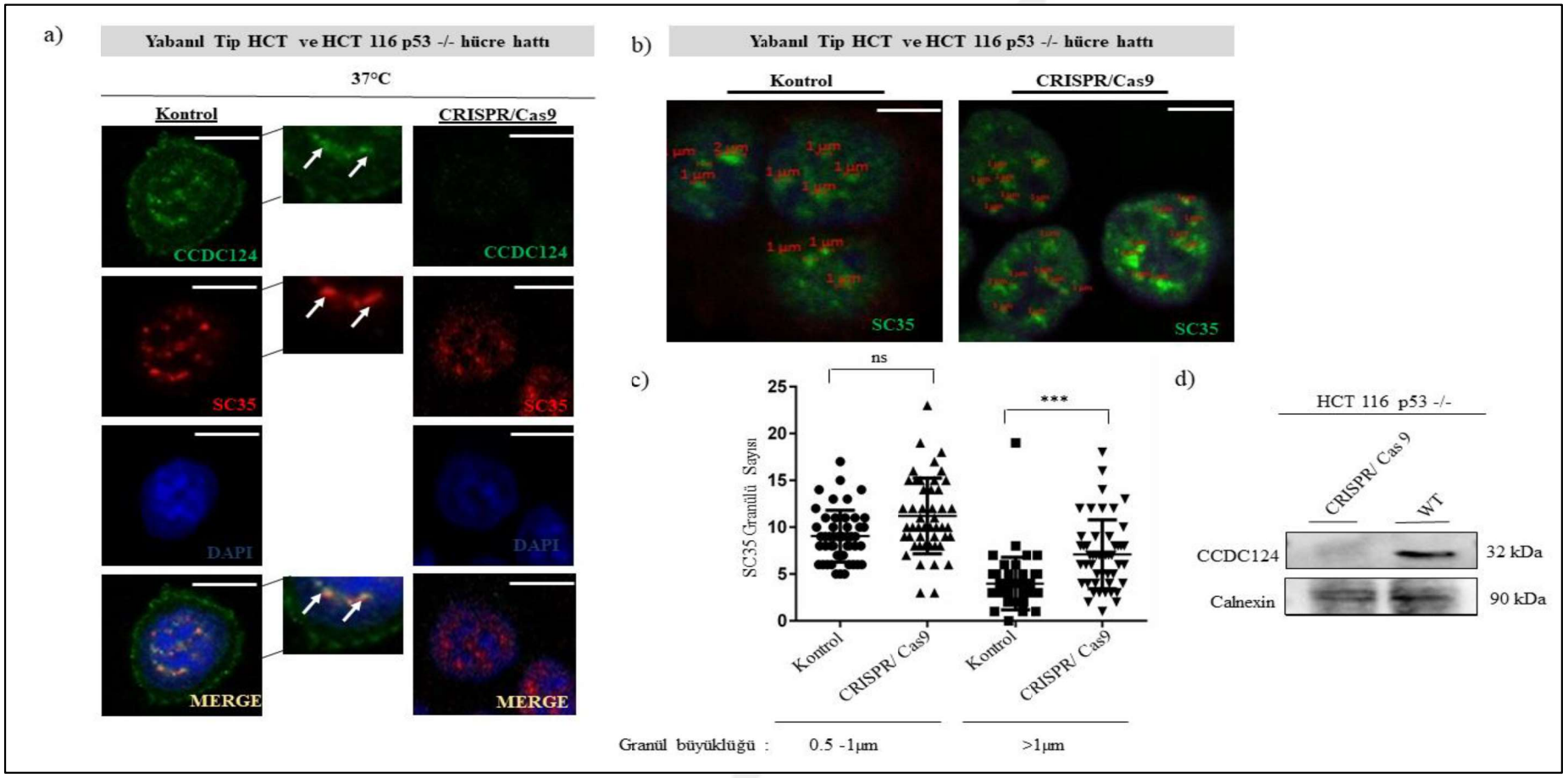
Morfolojik olarak saptanan bu benzerliği takiben nükleer beneklerde Ccdc124 konumlanmasının immunofloresan boyama tekniğiyle araştırılmasına karar verilmiştir. SC35'e özgü antikorların ise NS'de gözlemlenmesinde ise en sık kullanılan antikorlardan olduğu bilinmektedir [Hall et al., 2006]. Bu nedenle nükleer benek alanlarının immunofloresan boyama yöntemiyle gözlemlenebilmesi için SC35 antikoru kullanılmak üzere seçilmiştir. İmmunofloresan boyama için yabanıl tip HeLa hücre hattı kullanılmasına karar verilmiştir. Aynı zamanda çekirdek içi konumlanmanın strese bağlı değişiminin gözlemlenmesi için ise sıcaklık stresi ve oksidatif stres koşulları yaratılarak deneyler tekrarlanmıştır. Boyamalara ait görüntüler Şekil 5.24'de yer almaktadır.



Şekil 5.24: SC35 ve Ccdc124 proteininin kontrol grubu, sıcaklık stresi ve oksidatif strese bağlı olarak konumlanması. (Bar = 20 µm)

Stres granülüyle ilgili çalışmalarda olduğu gibi bu çalışmada da özgül olmayan antikor boyaması kaynaklı hatalı gözlemlerin önlenmesi amacıyla daha önce HeLa hücre hattında yapılmış olan deneyler HCT 116 p53-/- hücre hatlarında tekrarlanmış ve negatif kontrol olarak da bu hücre hattında Crispr/Cas9 yöntemi kullanılarak hazırlanmış Ccdc124 ifadesi olmayan hücre grubu kullanılmıştır. Bu boyamalara ait görüntüler Şekil 5.25 a'da gösterilmiştir. Aynı zamanda yapılan deneyler sırasında Crispr/Cas9 örneklerinde SC35 granülü yapılarında büyüklük ve sayı yönünden bazı farklılıklar olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 5.25 b ve Şekil 5.25 c). Bu farklılıların belirlenmesi amacıyla her sayımda 50 örnek olacak şekilde üç farklı sayım ve ölçüm yapılarak bulgular grafiğe aktarılmıştır. Elde edilen sayısal veriler ANNOVA (Kruskal-Wallis testi) kullanılarak çoklu karşılaştırma yöntemiyle analiz edilmiştir. Analiz sonucunda Ccdc124 ifadesiyle SC35 granül büyüklüğü arasında bir ilişki

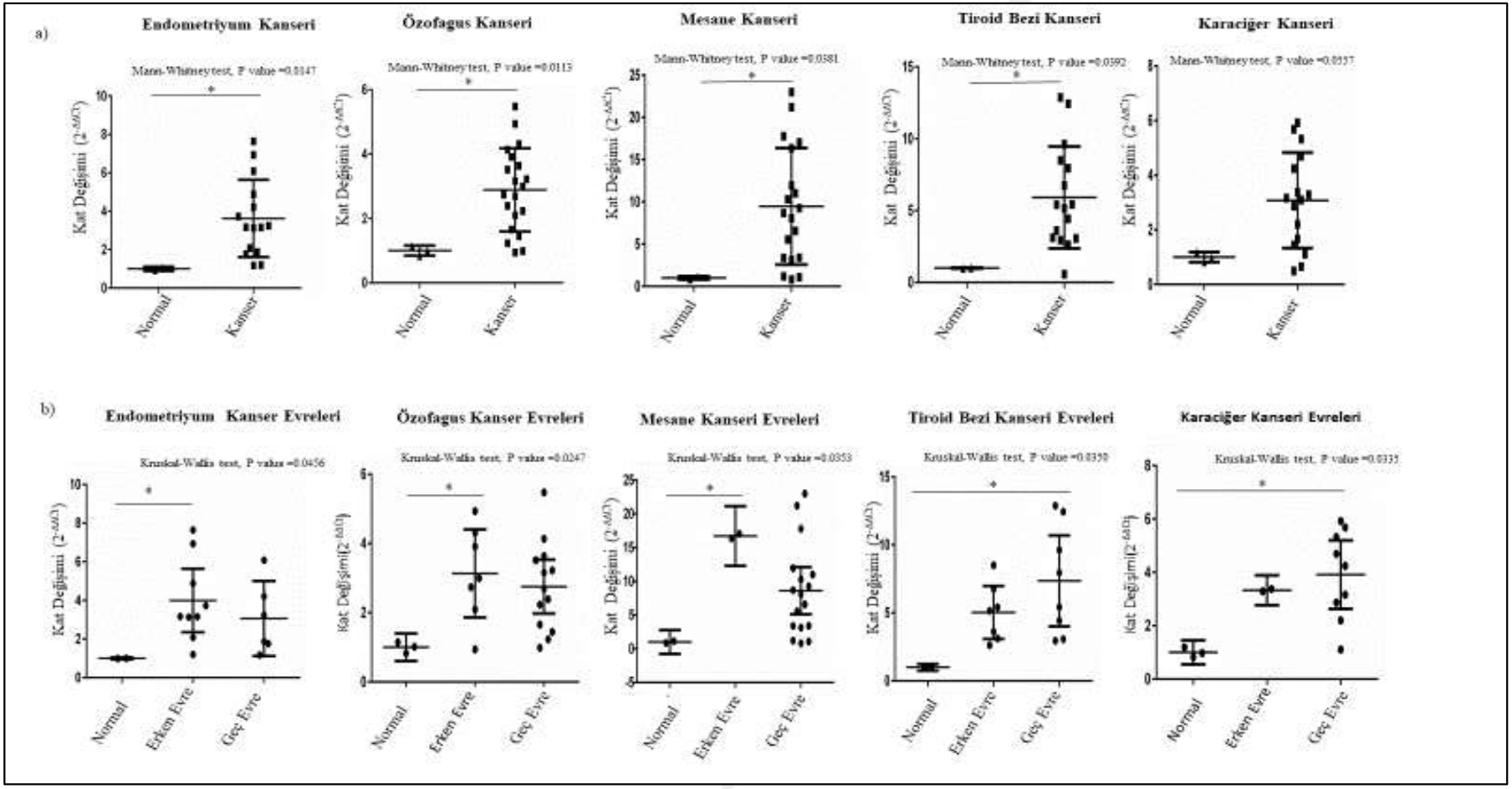
olabileceğine dair ilk bulgular elde edilirken, 1mm'den büyük SC35 granül sayısında anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p>0.05$). Elde edilen istatistiksel bilgiler ve ölçümlere ait örnekler ise Şekil 5.25 b, Şekil 5.25 c ve EK B1'de yer almaktadır. Kullanılan hücre hatlarında Ccdc124 protein ifadesinin olmadığının gösterilmesi için ise hücre gruplarından elde edilen lizatlar kullanılmış ve western blot yöntemiyle gruplar karşılaştırılmıştır. Crispr/ Cas9 yöntemi kullanılmış olan örneklerde Ccdc124 antikoru kullanıldığında herhangi bir bant tespit edilmezken, kontrol grubunda Ccdc124 protein ifadesi bulunduğu deneysel olarak ispatlanmıştır. Kuyulardaki lizat varlığı ise calnexin antikoru kullanılarak gösterilmiştir (Şekil 5.25 d).



Şekil 5.25: HCT 116 p53-/- ve CRISPR/Cas9 yöntemiyle Ccdc124 protein delesyonu yapılmış HCT 116 p53-/- hücre hatlarında NS analizi. a) SC35 ve Ccdc124 antikoruyla gerçekleştirilmiş immunofloresan analiz sonuçları. (Bar = 20 µm) b) SC35 granül büyüklük ölçümleri. (Bar = 10 µm) c) SC35 granüllerinin büyüklüğüne bağlı ölçümlerin dağılım grafiği. d) Kullanılan hücre hatlarına ait western blot analizi.

5.1.3. Ccdc124 Proteininin İnsan Kanser Hücre Hatlarındaki İfadesinin Belirlenmesi

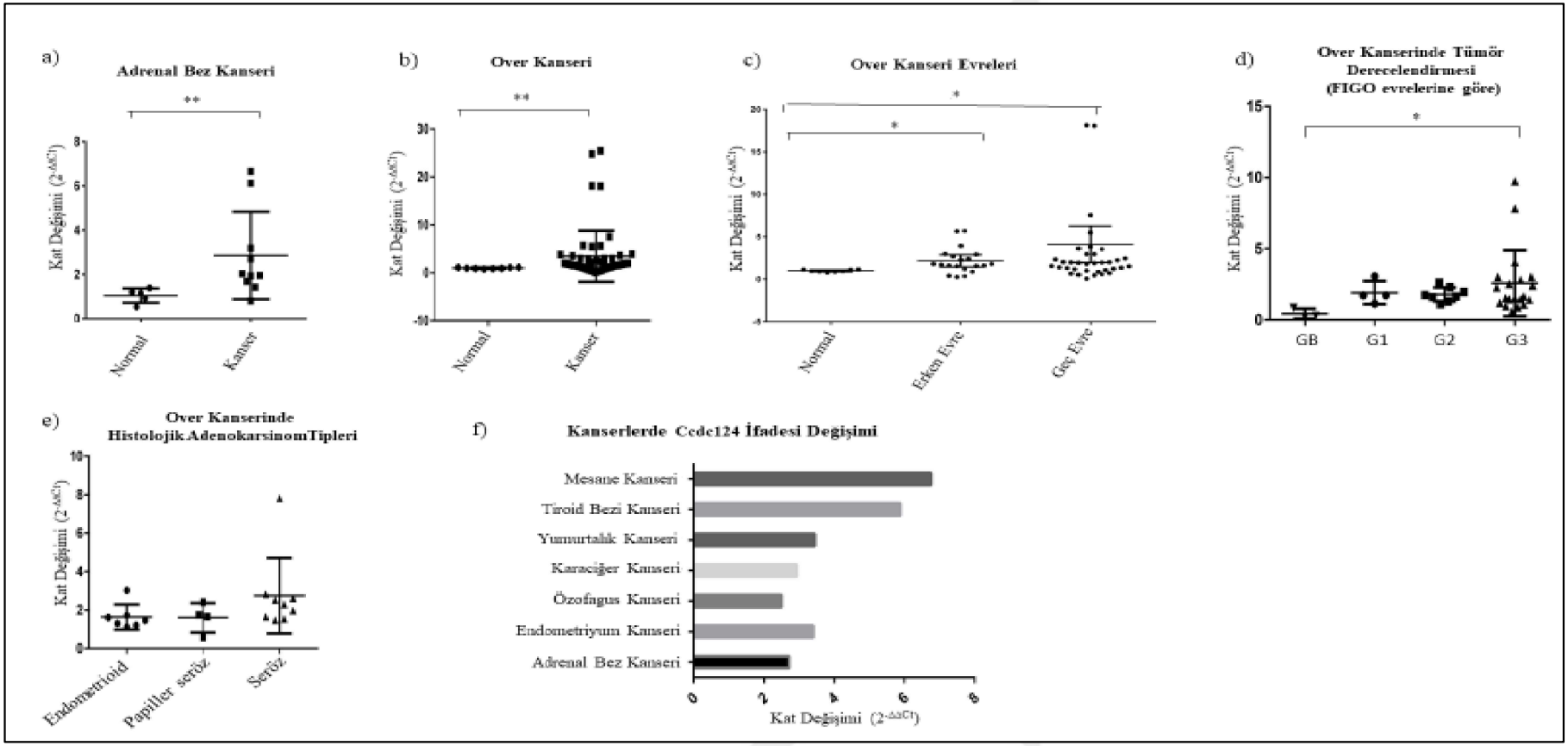
İnsan kanser doku örneklerinde Ccdc124 ifadesinin belirlenebilmesi için RT-PCR yöntemi kullanılmış ve her bir kanser dokusu için normalize edilerek hesaplanmış olan ΔΔ Ct değerleri GraphPad programında analiz edilmiştir. Kanser ve normal doku karşılaştırmalarında Mann Whitney test yöntemi kullanılırken ve kanser evreleme analizlerinde Kruskal Wallis testi kullanılmıştır (p<0.05) [Aljada et al., 2015]. Firmadan temin edilen paneller kullanılarak yapılan deneyler sonucunda elde edilen verilere ait grafiklerde standart sapma SEM (standard error of the median) ile hesaplanmıştır. Bu hesaplamalar sonucunda endometriyum, özofagus, mesane, tiroid, adrenal bez ve over kanserlerinde Ccdc124 ifadesinde RNA seviyesinde belirgin ve anlamlı bir artışın olduğu belirlenmiştir. Ccdc124 ifade artışının kanser evrelerine göre dağılımı incelendiğinde ise endometriyum, özofagus, mesane kanserlerinin erken evrelerinde, tiroid bezi ve karaciğer kanserlerinin geç evrelerinde bu artışın gerçekleştiği tespit edilmiştir. Kanser evrelerine ait veriler değerlendirilirken ise 0 ve I. evreler erken evreler olarak kabul edilirken; II., III. ve IV. evreler geç evre olarak kabul edilmiştir (Şekil 5.26)



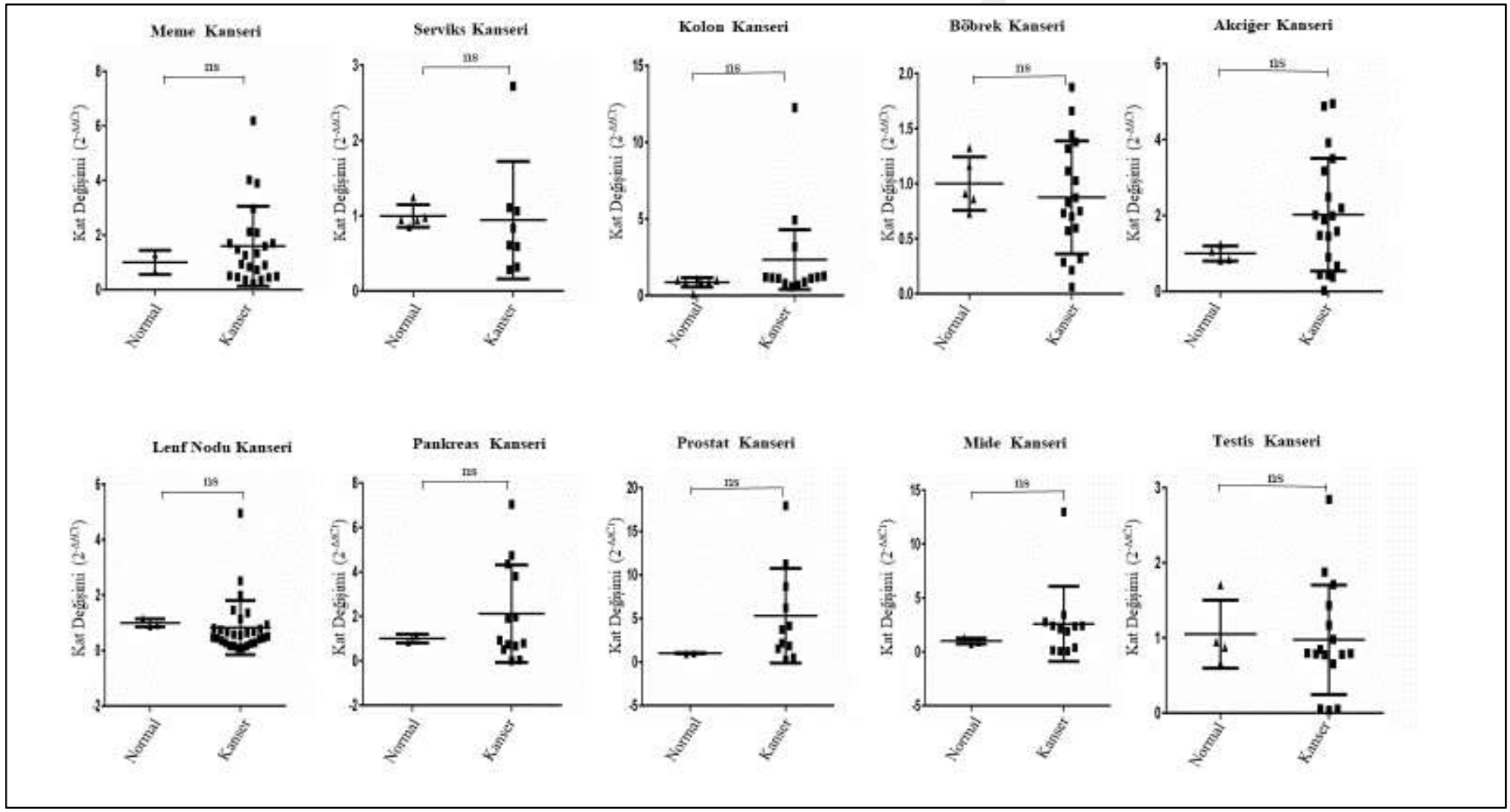
Şekil 5.26: Kanser örneklerinde Ccdc124 ifadesine ait grafikler. a) Farklı kanser türlerinde Ccdc124 ifade miktarı dağılımı (Mann Whitney test, *p<0.05). b) Endometriyum, özofagus, mesane, tiroid ve karaciğer kanserine ait evrelere göre Ccdc124 ifadesi dağılımı (Kruskal Wallis ,*p <0.05).

Adrenal bez kanserine evrelemeye bağlı Ccdc124 mRNA ifade miktar dağılım istatistiksel analizleri örneklem sayısının az olması nedeniyle gerçekleştirilemezken, over kanserinin hem erken hem de geç evrelerinde anlamlı bir Ccdc124 ifade artışı olduğu tespit edilmiştir (Şekil 5.27 a-c). Aynı zamanda Uluslararası Jinokolji ve Obstetrik Federasyonu (Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique, FIGO) tarafından belirlenen kriterlere göre yapılan over kanseri sınıflandırmasına göre de veriler tekrar değerlendirilmiştir. Bu değerlendirme sonucunda G2 ve G3 evresindeki hastalarda Ccdc124 ifadesinde belirgin bir artış gözlemlenmiştir (Şekil 28d). Yumurtalık kanserine ait örneklerde histolojik sınıflandırmalarına bağlı olarak ise endometrioid, papiller seröz ve seröz adenokarsinom örnekleri normal over dokularıyla karşılaştırılmış, bu karşılaştırma sonucunda seröz ve papiller seröz adenokarsinom örneklerinde Ccdc124 mRNA ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir (Şekil 5.27 e). Elde edilen verilere göre ise en fazla Ccdc124 mRNA ifade artışının özofagus (~2,9 kat), adrenal bez (~2,9 kat), mesane (~7 kat), karaciğer (~3,4 kat), tiroid bezi (~5,9 kat), over (~3,8 kat) ve endometriyum(~3,6 kat) dokularında gözlemlendiği belirlenmiştir (Şekil 5.27 f).

Aynı deney setinde yer alan meme, serviks, kolon, böbrek, akciğer, lenf nodu, pankreas, prostat, mide ve testis kanserlerine ait örneklerle yapılan analizler sonucunda ise Ccdc124 ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilememiştir. Bu kanserlere ait istatistiksel değerlendirmeler Şekil 5.28'de yer almaktadır.

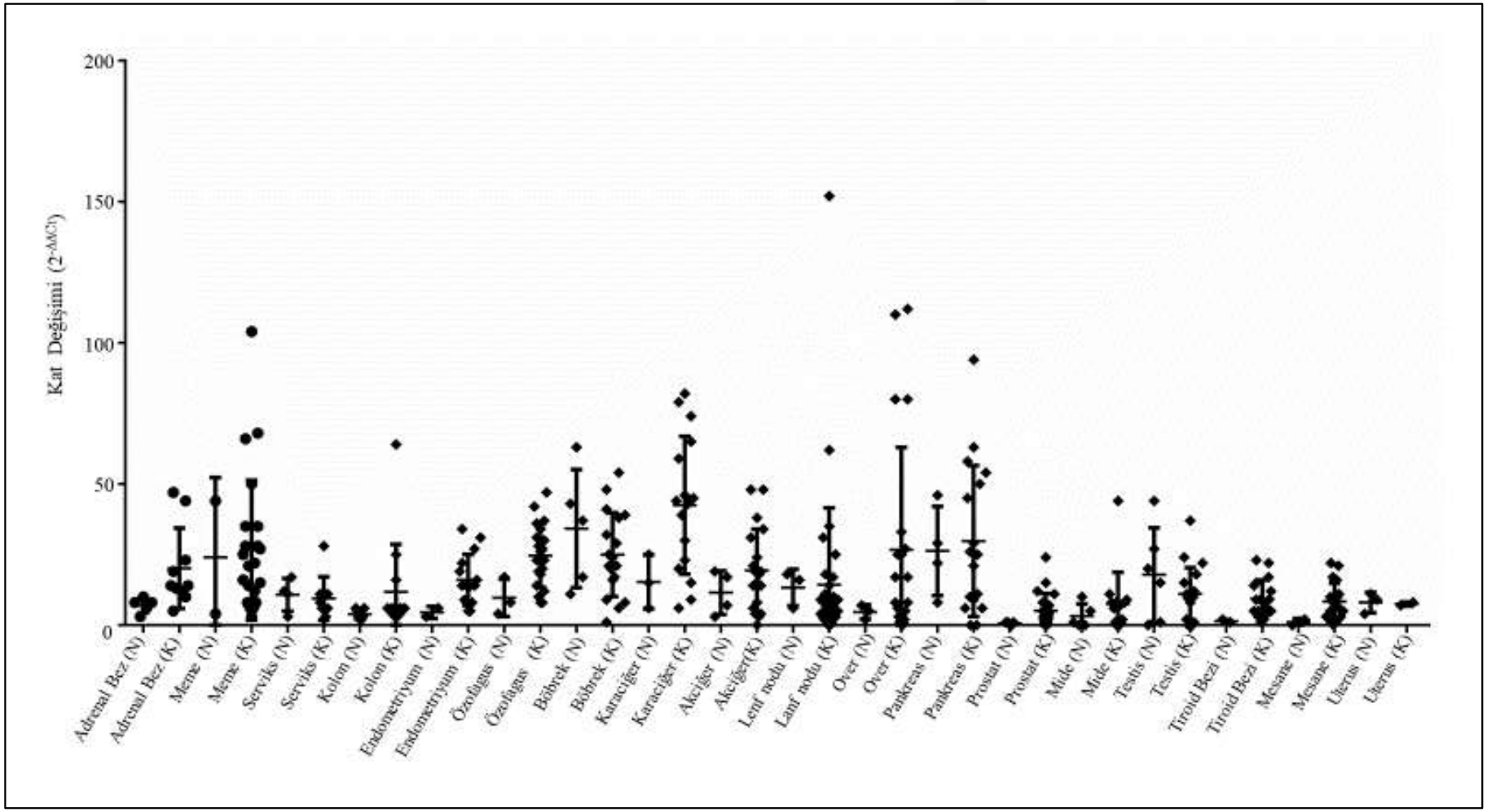


Şekil 5.27: Adrenal bez kanseri ve over kaseri örneklerinde Ccdc124 ifade profili.a) Adrenal bezde b) over kanserinde c) over kanseri evrelerinde kanserli örneklerle ile normal örneklerin Ccdc124 ifadesi karşılaştırılması (Mann Whitney testi, *p<0.05, **p ,< 0.01, ***p < 0.001). d) Over kanseri FIGO evrelemesinde ve e) yumutalık kanseri histolojik sınıflandırmasında kanserli örneklerin Ccdc124 ifadesi karşılaştırılması (Kruskal-Wallis çoklu karşılaştırma testi p < 0.05. f) Kanserlerde Ccdc124 ifadesinin normal ve tümörlü dokularda kat değişimlerine ait grafiksel karşılaştırılması.



Şekil 5.28: Meme, serviks, kolon, böbrek, akciğer,lenf nodu, pankreas, prostat, mide ve testis kanserlerinde Ccdc124 ifade dağılım grafikleri.

Ccdc124 ifadesinin normal dokulara ve kanserlere göre dağılım verilerinin kendi arasında görece değerlendirilmesine karar verilmiştir. Bu değerlendirilmenin yapılması için önce tüm örnekler β-actin'e göre normalize edilmiş, daha sonra da en düşük değere sahip olan örneğe göre (prostat dokusu örneği) hesaplama yapılmıştır. Analiz sonucunda elde edilen grafik incelendiğinde ise normal böbrek ve testis dokularında en yüksek seviyedeyken, normal mesane, prostat ve tiroit dokularında en düşük seviyede olduğu gözlemlenmiştir. Analize ait grafik dağılım verileri Şekil 5.29'da yer almaktadır.



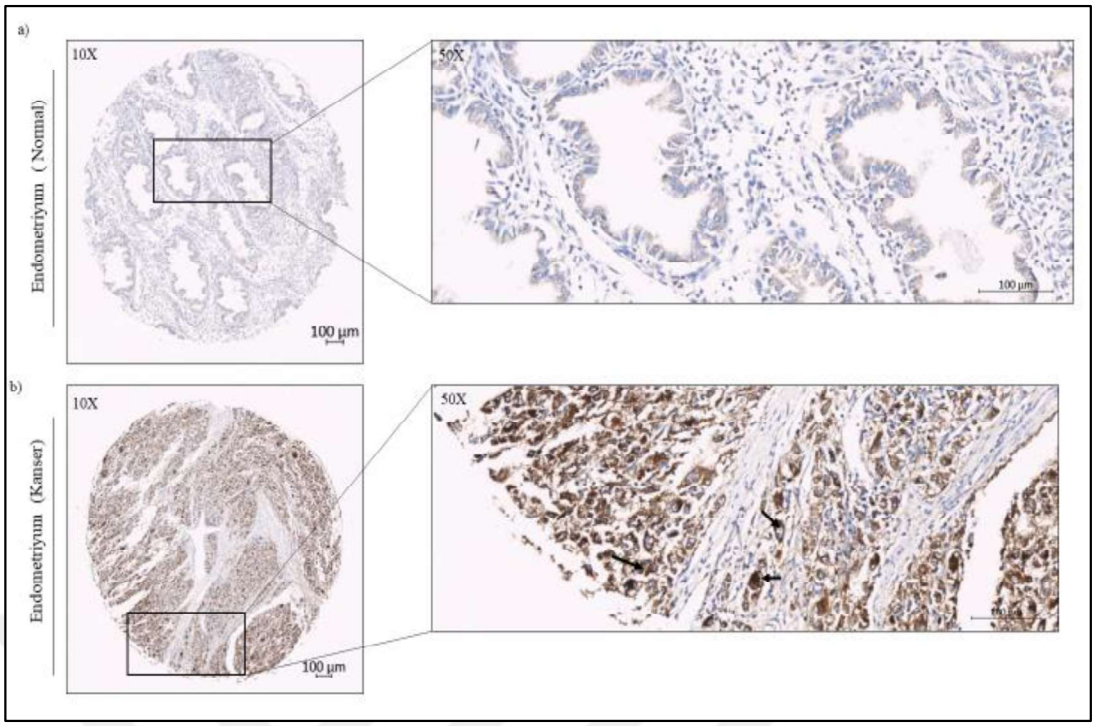
Şekil 5.29: CCDC124 mRNA seviyesinin normal ve kanser dokularında dağılım grafiği.

5.1.4. Endometriyum, Mesane ve Over Kanser Dokularında CCD124 Proteinin İfade Profili

Tez çalışması kapsamında daha önce kanser dokularına ait cDNA örnekleri (over, mesane, adrenal bez, endometriyum, karaciğer, tiroid bezi) kullanılarak yapılmış olan Q-PCR analizleri Ccdc124 ifadesinin mRNA düzeyinde arttığı belirlenmiş olup, bu durumun protein ifadesine yansıma durumunun belirlenmesi amacıyla immunofloresan boyama yönteminin kullanılması kararlaştırılmıştır. İmmunofloresan boyamanın yapılması için ise endometriyum, over ve mesane kanseri doku örnekleri örneklem olarak seçilmiştir. Kanser doku panelinde Ccdc124 antikoru kullanılarak yapılan boyamalarda antikorun dağılım ve yoğunluğu skorlanmış (IHC değeri) ve elde edilen değerler istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

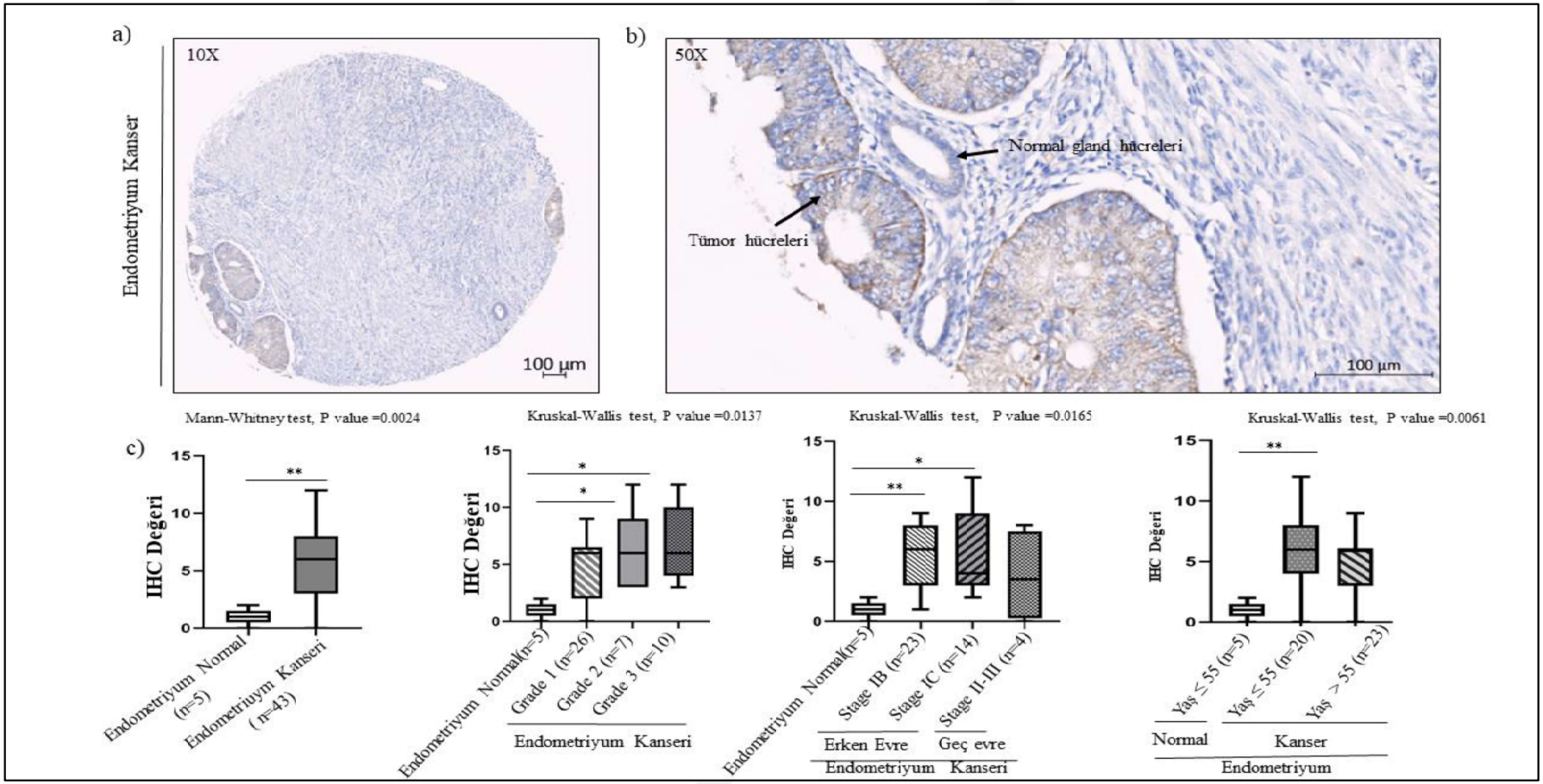
5.1.4.1. Endometriyum Kanseri

Endometriyum kanserine ait örneklerde normal doku stromalarında Ccdc124 antikor boyaması yoğun olarak gözlemlenmezken, kanserli endometriyum dokularında istatistiksel olarak da anlamı olduğu belirlenmiş olan güçlü antikor boyanması gözlemlenmiştir ($p<0.01$) (Şekil 5.30 ve Şekil 5.31). Aynı zamanda yapmış olduğumuz analizler endometriyum kanseri TMA örneklerinin %37.2 düşük, %44.2 orta, %14 yüksek, %4.6 negatif IHC değerine (n=43) sahip olduğu belirlenmiş ve özellikle Ccdc124 antikor boyamasının hem glandular hem de stromal hücrelerde dağılım gösterdiği tespit edilmiştir ($p<0.01$) (Şekil 5.31a ve Şekil 5.31b).



Şekil 5.30: Ccdc124 proteininin normal endometriyum dokusu ve endometriyum kanseri örneklerindeki immunohistokimya analizi. a) Normal endometriyum dokusu (10X ve 50X büyütme) (IHC değeri=1) b) Endometriyum kanser dokusu (10X ve 50X büyütme) (IHC değeri=12). Oklar pozitif boyanan alanları göstermektedir. (Scale bar = 100 µm.)

Yapılan ayrıntılı analizler Ccdc124 protein ifade seviyesinin özellikle Grade 2 ve Grade 3 endometriyum kanseri dokularında normal dokulara göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir (p<0.05) (Şekil 5.31c) Evrelere göre dokulardaki protein artışları karşılaştırıldığında ise özellikle erken evrede istatistiksel olarak anlamlı bir Ccdc124 protein ifade artışı tespit edilmiştir (p<0.05 ve p<0.01) (Şekil 5.31c). Endometriyum kanser hastalarının yaş dağılımları incelendiğinde ise özellikle 55 yaş altı hastalarda normal örneklere göre ilgili protein ifadesinde yükseliş gözlemlenmiştir (p<0.01). Yapılmış olan IHC değerlerine ait istatistiksel bulgular ile daha önce Q-PCR analizine ait bulgularımız desteklemiş olup, endometriyum kanserinde CCDC124 genine ait hem protein hem de RNA ifade seviyelerinde kanser bağımlı bir artış meydana geldiği ve bu ın özellikle kanserin erken evresinde gözlemlendiği belirlenmiştir. Tablo 5.7‘ de ise çalışmada kullanılmış olan 43 hasta örneğine ait klinikopatolojik durum dağılımları ve bu örneklere ait IHC değerlerine ait ayrıntılı değerlendirmeler yer almaktadır.



Şekil 5.31: Ccdc124 antikoruyla yapılan endometriyum kanseri dokularına ait immuhistokimya deney sonuçları ve istatistiksel analizleri. a) Endometriyum kanseri dokularında immunohistokimyasal boyama (10X büyütme). b) Endometriyum kanseri doku larında IHC boyama (50X büyütme). (Oklar normal gland hücrelerini ve tümör hücrelerini göstermektedir.) c) IHC deneylerine ait istatistiksel analiz sonuçları. (Mann Whitney ve Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır (*p <0.05 ve **p <0.01).

Tablo 5.7: Endometriyum kanserinde Ccdc124 antikor boyamasına ait IHC değerlerinin kanser örneklerine ait klinikopatolojik durumlarına göre dağılımı.

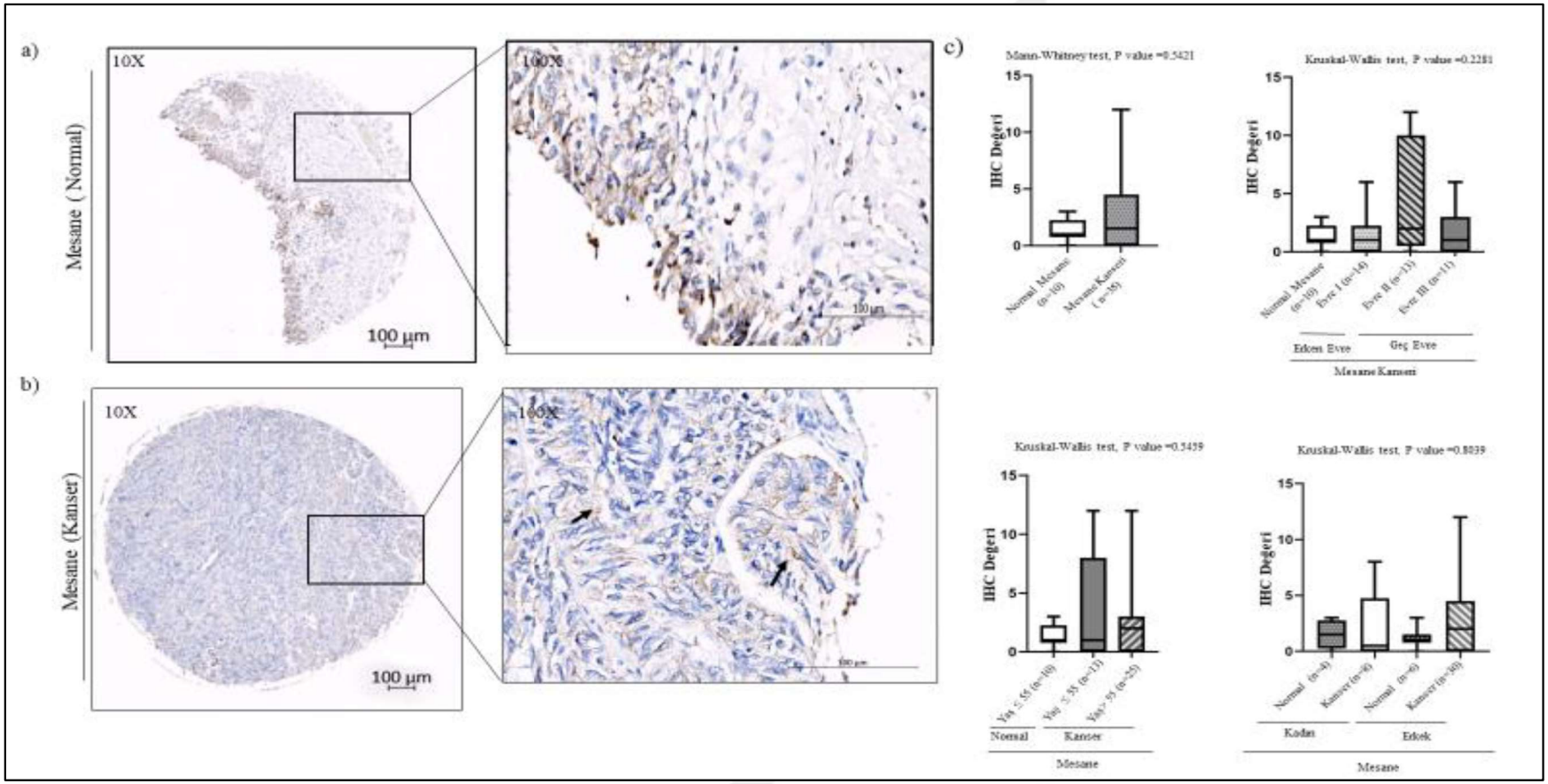
Endometrium Kanseri (Ccdc124 Boyaması)

Colled Coil Domain Containing protein 124 (Ccdc124)

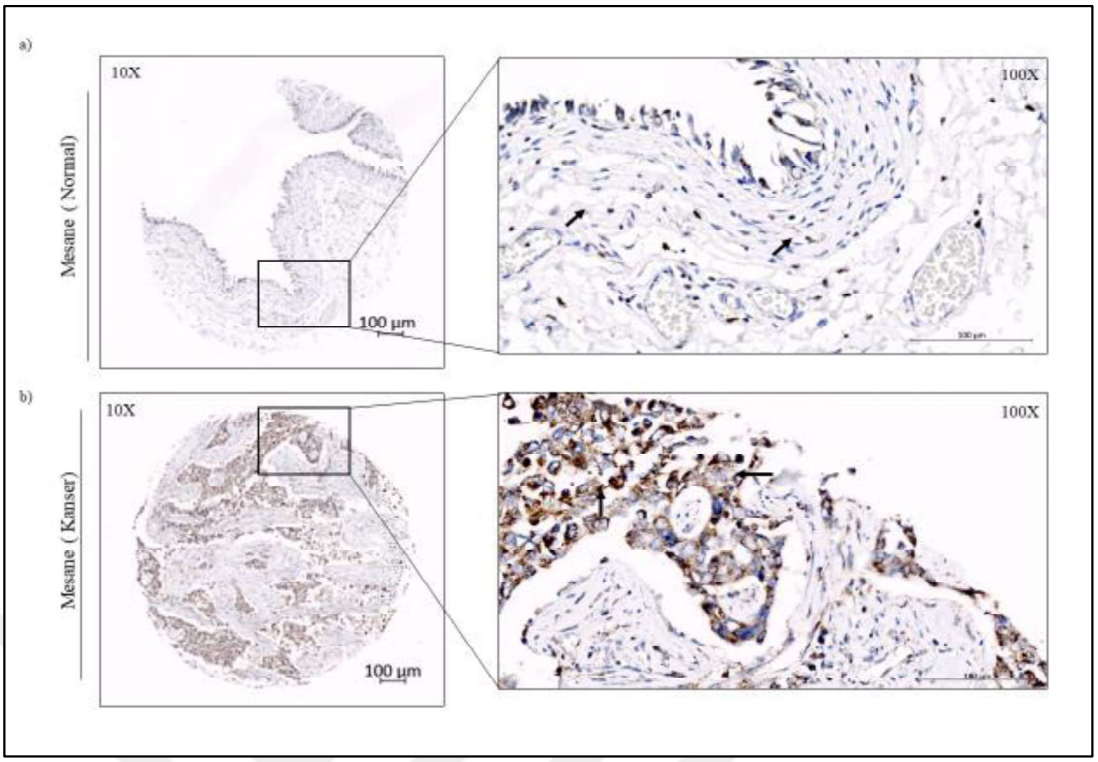
			Endometriyum Kanserinde IHC Değeri					
		N	Negatif	Düşük	Orta	Yüksek	Ki-kare, df	*P* değeri
Yaş	≤ 55	20	(1) 50%	(6) 38%	(9) 47%	(4) 67%		
	>55	23	(1) 50%	(10) 63%	(10) 53%	(2) 33%	1.517, 3	0,6783
Grade	Grade 1	26	(2) 100%	(10) 63%	(12) 67%	(2) 33%		
	Grade2	7	(0) 0%	(2) 13%	(3) 17%	(2) 33%		
	Grade 3	9	(0) 0%	(4) 25%	(3) 17%	(2) 33%	3.938, 6	0,6851
Evre	Evre IB	23	(0) 0%	(7) 41%	(13) 76%	(3) 50%		
	Evre IC	14	(0) 0%	(8) 47%	(3) 18%	(3) 50%		
	Evre II-III	4	(1) 100%	(2) 12%	(1) 6%	(0) 0%	14.77, 6	0,0222*
Patolojik Tanı	Berrak hücre adenokarsinoma	2	(0) 0%	(1) 6%	(1) 6%	(0) 0%		
	Endometriod adenokarsinom	38	(1) 50%	(14) 88%	(17) 94%	(6) 100%		
	Seröz adenokarsinom	2	(1) 50%	(1) 6%	(0) 0%	(0) 0%	10.76, 6	0,0961

5.1.4.2. Mesane Kanseri

Endometriyum dokusuna ait analizleri takiben mesane kanserine ait TMA örneklerinde de immunohistokimyasal analizler yapılmıştır. Normal mesane dokusunda epitelyal ve glomerulus kısımlarında düşük miktarda Ccdc124 antikor boyaması tespit edilirken, düz kas hücrelerinin bulunduğu alanda herhangi bir boyanma gözlemlenmemiş bulunmaktadır (Şekil 5.32 a). Mesane dokusuna ait tüm TMA örneklerine ait IHC değerleri incelendiğinde ise mesane kanserleri örneklerinde %44.7 düşük, %15.8 orta, % 7.8 yüksek, %31.6 negatif değer hesaplanmıştır. Ancak normal mesane dokusunun aksine mesane kanseri örneklerinde (n=38) Ccdc124 antikor boyamaları düz kas hücrelerin yer aldığı alanlarda tespit edilmiştir (Şekil 5.32b ve Şekil 5.33). İstatistiksel analizler ise normal ve kanserli mesane dokuları arasında Ccdc124 protein ifadesi bakımından anlamlı bir fark bulunmadığını göstermiş olup, kanser doku örnekleri arasında cinsiyet yaş ve evreleme dağılımı bakımından da herhangi bir fark gözlemlenmemiştir (Şeki 5.32c) (p<0.05). Tablo 5.8'de ise hasta örneklerine ait klinikopatolojik durum dağılımları ve bu örneklere ait IHC değerlerine ait ayrıntılı değerlendirmeler yer almaktadır.



Şekil 5.32: Ccdc124 antikoruyla yapılan normal mesane ve mesane kanseri dokularına ait immuhistokimya deney sonuçları ve istatistiksel analizleri. a) Normal mesane doku örneklerine ait IHC boyama (10X ve 100 X büyütme). (IHC değeri=1) b) Mesane kanseri doku örneklerine ait IHC boyama (10X ve 100X büyütme). (IHC değeri=6) (Oklar normal gland hücrelerini ve tümör hücrelerini göstermektedir.) c) IHC deneylerine ait istatistiksel analiz sonuçları.



Şekil 5.33: Ccdc124 proteininin normal mesane ve mesane kanseri örneklerindeki immunohistokimya analizi. a) Normal mesane dokusu (10X ve 100X büyütme) (IHC değeri=1) b) Mesane kanseri dokusu (10X ve 100X büyütme) (IHC değeri=12). Oklar pozitif boyanan alanları göstermektedir. (Scale bar = 100 µm.)

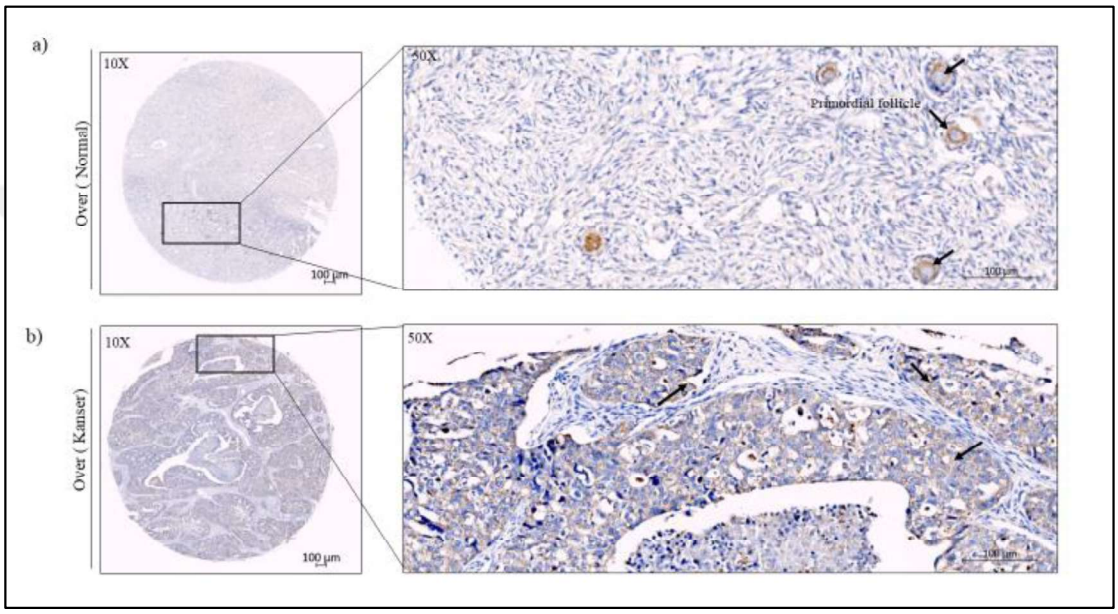
Tablo 5.8: Mesane kanserinde Ccdc124 antikor boyamasına ait IHC değerlerinin kanser örneklerine ait klinikopatolojik durumlarına göre dağılımı.

Mesane Kanseri (Ccdc124 Antikor Boyaması)

Coiled Coil Domain Containing protein 124 (Ccdc124)			N	Mesane Kanserinde IHC değerleri					
				Negatif	Düşük	Orta	Yüksek	Kikare,df	*P* değeri
	Yaş	≤ 55	13	(5) 42%	(3) 18%	(4) 67%	(1) 33%		
		>55	25	(7) 58%	(15) 82%	(2) 33%	(2) 67%	5.178, 3	0.1592
	Cinsiyet	Kadın	8	(4) 33%	(2) 12%	(2) 33%	(0) 0%		
		Erkek	30	(8) 67%	(15) 88%	(4) 67%	(3) 100%	3.316, 3	0.3455
	Evre	Evre I	14	(4) 33%	(9) 53%	(1) 17%	(1) 0%		
		Evre II	13	(3) 25%	(4) 24%	(3) 50%	(3) 100%		
		Evre III	10	(4) 33%	(4) 24%	(2) 33%	(0) 0%		
		Evre IV	1	(1) 8%	(0) 0%	(0) 0%	(0) 0%	11.44, 9	0.2465
	Patolojik tanı	Urotelyal karsinom	34	(11) 92%	(14) 82%	(6) 100%	(3) 100%		
		Skuamöz hücreli karsinom	4	(1) 8%	(3) 18%	(0) 0%	(0) 0%	2.035, 3	0.5651

5.1.4.3. Over Kanseri

Normal over dokusu ve over kanseri örneklerinde ise diğer doku örnekleriyle benzer şekilde stromal hücrelerde herhangi bir boyanmaya rastlanmamış olup, primordial oositlerde yoğun sitoplazmik boyanmalar gözlemlenmiştir (Şekil 5.34a). Over kanseri örneklerinde ise boyanmalar stromal hücre içeren alanlarda olmak üzere düşük yoğunluklu olarak gözlemlenmiştir (Şekiş 5.34b ve Şekil 5.35a-b).

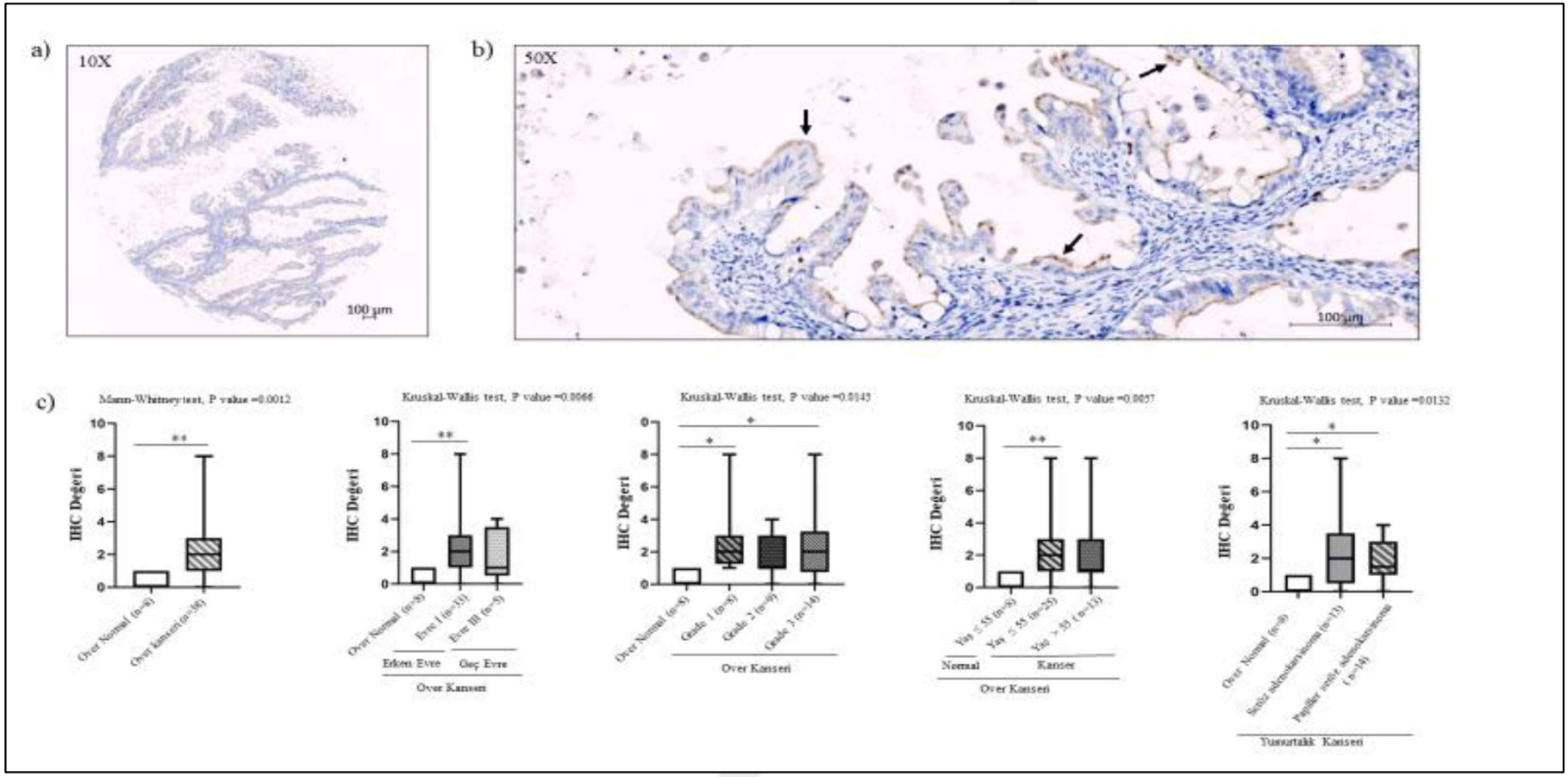


Şekil 5.34: Ccdc124 proteininin normal over ve over kanseri örneklerindeki immunohistokimya analizi. a) Normal over dokusu (10X ve 50X büyütme) (IHC değeri=1) b) Over kanseri dokusu (10X ve 50X büyütme) (IHC değeri=8). Oklar pozitif boyanan alanları göstermektedir. (Scale bar = 100 µm.)

Aynı zamanda boyanan over kanseri örneklerinin %76.3'ünde düşük, % 10.5'inde orta, %13.2'sinde de ise negatif Ccdc124 antikor boyama aktivitesi tespit edilmiştir. Yapılan istatistiksel analizler sonucu ise Ccdc124 protein ifadesi bakımından normal over dokusu ile over kanser dokusu arasında anlamlı bir fark olduğu belirlenmiştir (p<0.01) (Şekil 5.35 c). Özellikle over kanserinin erken evresinde (evre 1) Ccdc124 protein ifadesinde anlamlı bir artış gözlemlenmiş olup, geç evreyle (sadece evre 3) normal doku arasında istatistksel olarak anlamlı bir farklılık gözlemlenememiştir (p<0.01) (Şekil 5.35c). Aynı zamanda IHC değerleri kullanılarak yapılan analizler sonusu over kanserinde Grade 1 ve Grade 3'de Ccdc124 protein ifadesinin arttığı tespit edilmiştir (p <0.05) (Şekil 5.35c). Dahası hem 55 yaş altı

bireylerde hem de 55 yaş üstü bireylerde over kanserine bağlı olarak Ccdc124 protein seviyesinde belirgin bir yükselme gözlemlenmiştir (p<0.01). Aynı zamanda protein seviyesindeki bu artışın over kanserine ait alt tiplerde (seröz adenokarsinom ve seröz papiller karsinom) değişiklik göstermediği belirlenmiştir (p<0.05) (Şekil 5.35c).

Over kanseri örneklerine ait klinikopatolojik değerlendirmeler ve bu değerlendirmelere ait Ccdc124 antikor boyamasına ait IHC değeri dağılımları ise Tablo 5.9'da yer almaktadır.



Şekil 5.35: Ccdc124 antikoruyla yapılan over kanseri dokularına ait immuhistokimya deney sonuçları ve istatistiksel analizleri. a) Papiller müsinoz adenokarsinoma örneklerine ait IHC boyaması (10X büyütme). b) Papiller müsinoz adenokarsinoma örneklerine ait immunohistokimyasal boyaması (50X büyütme). (Oklar Ccdc124 antikoruyla boyanmış hücreleri göstermektedir.) c) IHC deneylerine ait istatistiksel analiz sonuçları. (Analizler sırasında Mann Whitney ve Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır.)

Tablo 5.9: Over kanserinde Ccdc124 antikor boyamasına ait IHC değerlerinin kanser örneklerine ait klinikopatolojik durumlarına göre dağılımı.

Over Kanseri (Ccdc124 Boyaması)

Coiled-Coil Domain Containing protein 124 (Ccdc124)			*N*	Yumurtalık Kanserinde IHC Değeri				Ki-kare, df	*P* Değeri
				Negatif	Düşük	Orta	Yüksek		
	Yaş	≤ 55	25	(3) 60%	(19) 66%	(3) 75%	(0) 0%		
		>55	13	(2) 40%	(10) 34%	(1) 25%	(0) 0%	0.2262, 2	0.8931
	Grade	Grade 1	8	(0) 0%	(7) 30%	(1) 33%	(0) 0%		
		Grade 2-3	22	(4) 100%	(16) 70%	(2) 67%	(0) 0%	1.690, 2	0.4296
	Evre	Evre I	33	(4) 80%	(23) 86%	(4) 100%	(0) 0%		
		Evre III	5	(1) 20%	(4) 14%	(0) 0%	(0) 0%	0.8211, 2	0.6633
	Patolojik Tanı	Disgerminom	1	(0) 0%	(1) 3%	(0) 0%	(0) 0%		
		Endodermal sinüs karsinoma	2	(0) 0%	(2) 7%	(0) 0%	(0) 0%		
		Endometrioid adenokarsinoma	2	(0) 0%	(2) 7%	(0) 0%	(0) 0%		
		İmmatür teratom	1	(1) 20%	(0) 0%	(0) 0%	(0) 0%		
		Papiller müsinöz adenokarsinoma	2	(0) 0%	(1) 3%	(1) 25%	(0) 0%		
		Seröz adenokarsinoma	13	(3) 60%	(8) 28%	(2) 50%	(0) 0%		
		Papiller seröz adenokarsinoma	14	(1) 20%	(13) 45%	(0) 0%	(0) 0%		
		Nöroendokrin farklılaşma gösteren karsinoma	1	(0) 0%	(1) 3%	(0) 0%	(0) 0%		
		Berrak hücreli karsinom	2	(0) 0%	(1) 3%	(1) 25%	(0) 0%	19.27, 16	0.2550

5.2. Yorumlar

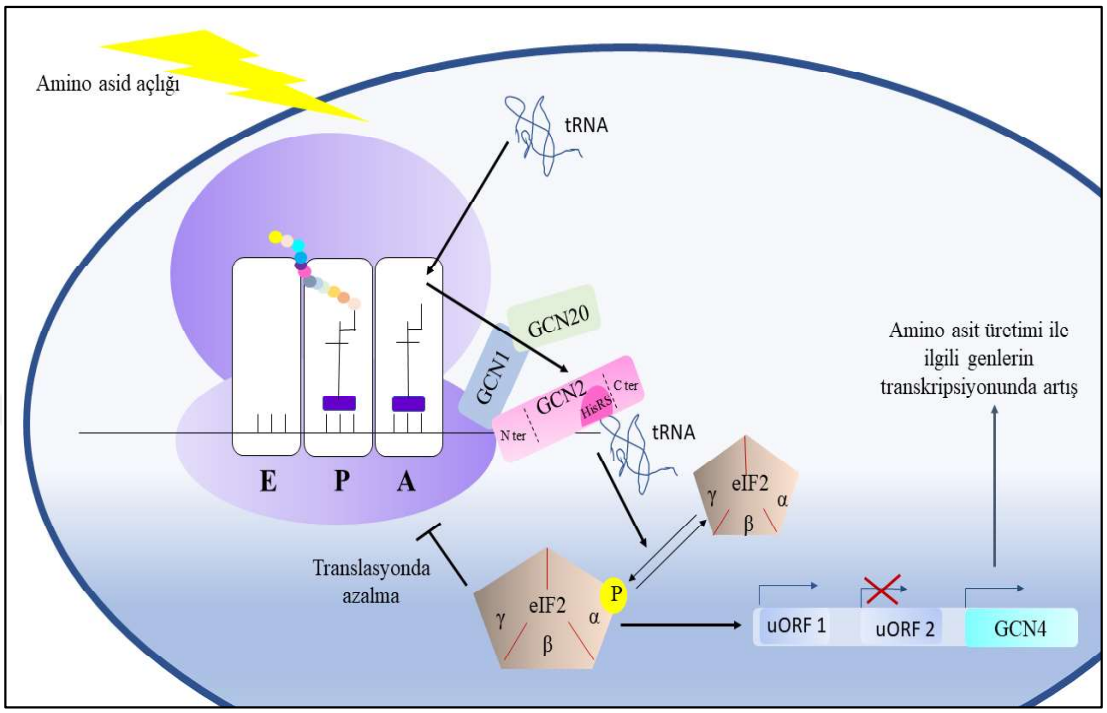
5.2.1. RNA bağlayıcı bir protein olarak Ccdc124

Daha önce yapılan CCDC124 geni DNA dizisi verilerinin analizine dayalı olarak yapılan biyoinformatik çalışmalarda bu proteinin RNA bağlayan bir protein olabileceğinden bahsedilmiş olup, 2012 yılında yapılmış olan UV uygulaması sonucu RNA ile protein arasında gerçekleşen çapraz bağlanmaya dayalı deney sonuçlarında da RNA bağlayan bir protein olarak yer almıştır [Castello et al., 2012]. Bu tez çalışması kapsamında ise gerçekleştirdiğimiz CatRAPID analizi sonuçları Şekil 2.1'de de yer aldığı gibi proteinin 74-124 aminoasitlerinin arasında olası bir bağlanma bölgesi içeriyor olabileceğini göstermektedir. Bunu takiben yapılmış olan SPOT analizi ise bu bölgenin düzensizlik eğiliminin yüksek olduğuna işaret etmektedir (Şekil 2.3).

Yapılmış olan bu tez çalışmasıyla ise ilk defa Ccdc124 proteininin *in silico* olarak mRNA'lara bölgesel bağlanma eğilimleri gösterilmiş, ardından RNA ile çöktürme analizi gerçekleştirilerek, olası RNA hedefleri belirlenmiştir. RNA ile çöktürme sonrası sekanslama yapılarak elde edilen ve Tablo 5.4'de yer alan hedef RNA listesinden RPKM oranları ve CatRAPID analiz sonuçları göz önünde bulundurularak bir değerlendirme yapılmış ve değerlendirme sonucunda seçmiş olduğumuz GCN1 ve HERC2 mRNA'larının Ccdc124 proteiniyle etkileştiği saptanırken, Tablo 5.6'da gösterildiği üzere hedef listede yer almayan ve bu nedenle negatif kontrol olarak kullandığımız TUBA1B'nin beklendiği üzere böyle bir etkileşimin bulunmadığı RIP analizini takiben gerçekleştirilen Q-PCR analizleriyle gösterilmiştir (Şekil 5.12- Şekil 5.18).

Deneysel olarak Ccdc124 proteiniyle görece kuvvetli bir etkileşim sergileyen GCN1 mRNA'sının mayalardan insana kadar korunmuş olan GCN1 proteinini kodladığı bilinmektedir. Amino asid açlığında ise GCN1 proteini GCN20 ile kompleks yaparak ribozoma bağlanabilen bir yapı oluşturmaktadır. Bu fiziksel yapıda ise GCN2 proteinin N terminaline bağlanarak GCN2 üzerinde bulunan histidil tRNA sentetaz benzeri domainine bağlanmış tRNA'ların ribozomla etkileşime girmesini sağlamaktadır [Marton et al., 1993], [Sattlegger ve Hinnebusch 2000], [Garcia-Barrio et al., 2000], [Sattlegger ve Hinnebusch 2005]. Daha sonra amino asit açlığına cevap olarak aktive olan GCN2, ökaryotik başlatıcı faktör (eIF2α)'nın α alt ünitesini fosforile

ederek bir açma kapama düğmesi görevi görmekte ve hücre içi stres yolağıyla ilgili GCN4, ATF4 gibi genlerin aktivitesini kontrol etmektedir. GCN1 proteininin amino asit açlık cevabındaki rolü Şekil 5.36'da gösterilmiştir.



Şekil 5.36: GCN1 proteinin amino asit açlık cevabındaki rolü.

Schizosaccharomyces pombe ile yapılan çalışmalarda da memeli RACK1 homoloğu olan Cpc2'nin yokluğunda amino asit açlığına bağlı olarak gelişen GCN2'nin otofosforilasyonuna bağlı eIF2'nin fosforilasyon mekanizmasının bozulduğu ve amino asit yokluğu hassasiyeti geliştirdiği gözlemlenmiştir [Tarumoto et al., 2013]. Yine aynı yıl Telkoparan tarafından yapılan araştırmalarda RACK1 ile Ccdc124 proteinlerinin etkileşiyor olabileceği kütle spektrometresi deneyleriyle gösterilmiş ve hücre içi konumlanmalarının benzerliğine dikkat çekilmiştir [Telkoparan, 2013].

Öte yandan insandaki Ccdc124 proteininin ortoloğu olan "late-annotated short open reading frame 2 (Lso2) ile yapılan immünolojik çöktürme deneyleri bu proteinlerin 25S ribozomal RNA'nın A bölgesindeki GTPase aktivasyon bölgesine bağlanarak translasyonda etkileşime girerek görev aldığını göstermiştir. Ccdc124 proteinininin de benzer bir bölge taşıyor olabileceğinden bahsedilmiştir [Wang et al., 2018]. Yine 2020 yılında yapılmış olan cryo-elektron mikroskobisine dayalı başka bir

çalışmada ise Ccdc124 proteininin hibernasyon halinde bulunan boş ribozomlara bağlanarak translasyonun başlamasında görev alan proteinler arasında olduğu gösterilmiştir [Wells et al., 2020]. Bu potansiyel aktivite daha önce Ccdc124 proteiniyle etkileştiği düşünülen RACK1 proteinin de 40S ribozom alt birimine bağlanarak translasyon sonlanmasında görev alıyor olması açısından oldukça ilgi çekicidir [Nilsson et al., 2004].

Literatürde yer alan bu bilgiler bize Ccdc124 'ün GCN1 mRNA'sına bağlanarak GCN1 translasyonunun düzenlenmesinde görev alıyor olabileceğini düşündürmektedir. Özellikle 2018 yılında Wang tarafından Lso2 ile yapılan ve 2020 yılında Wells tarafından ribozom hibernasyonuna dayalı gerçekleştirilen çalışmalar, bu düzenlenmenin ribozoma bağlanmayla gerçekleşiyor olma ihtimaline de işaret etmektedir. Ccdc124 proteininin GCN1 mRNA'sı üzerindeki olası negatif düzenlemesinin, GCN2 bağımlı strese cevabı olarak translasyon inhibisyonunun gerçekleşmesinin engellemesi beklenmektedir. Nitekim bu hipotezi, 2011 yılında yayınlanan bir çalışmada Sendai virüsü infeksiyonunda gerçekleşen bir hücresel cevap olarak Ccdc124 ifadesinin düştüğünün rapor edilmiş olması da desteklemektedir [Li et al., 2011]. RNA virüs infeksiyonunda, viral C proteinin e2IFα'nın fosforillenme kısıtlamasının PKR üzerinden gerçekleşiyor olabileceği gösterilmesine rağmen, literatürde yer alan bazı çalışmalarda infeksiyona bağlı hücresel cevaplarda GCN1 regülasyonunun kullanılması bize ikinci bir mekanizmanın Ccdc124 proteini tarafından GCN1 regülayonuna bağlı olarak e2IFα'nın fosforillenmesinin engelleniyor olabileceğini düşündürmektedir [Takeuchi et al., 2008], [Tian et al., 2002], [Hirohata et al., 2015]. Aynı zamanda GCN1 bağımlı GCN2 aktivasyonunun sadece amino asid açlığı ve virüs bağımlı değil, UV zararı ve oksidatif streste de gerekli olduğu gösterilmiştir [Anda et al., 2017]. Bu bulgular özellikle hücresel stres cevaplarıyla, GCN1 regulasyonu ve Ccdc124 proteini arasındaki ilişkisin daha ayrıntılı araştırılmasının gerekliliğini vurgulamaktadır.

Yine yapılan çalışmada Ccdc124 proteininin HERC2 mRNA'sına bağlanma eğiliminin de olduğu gösterilmiştir. Bu bağlanma eğilimi GCN1 mRNA'sına olan eğilimden daha düşük seviyede gözlemlenmiş olmasına karşın bu durumun etkileşim stabilitesinin daha az olmasına bağlı olabileceği düşünülmektedir. Literatürde yer alan çalışmalarda HERC2 proteininin çekirdekle sitoplazma arasındaki transferde olduğu ve bir E3 übikitin ligaz olarak übikitinleyerek BRCA1 proteinlerin degredasyonunda

görev aldığı gösterilmiştir [Wu et al., 2010]. Aynı zamanda başka E3 übikitin ligazların aktivasyonunda da rol alan bu proteinin DNA hasarı durumunda görev alan 53BP1, RAP80, BRCA1, RNF8, XBA gibi bazı proteinlerle de ilişkili olduğu bildirilmiştir [Kuhnle et al., 2011], [Bekker-Jensen et al., 2009], [Kang et al., 2010] 2014 yılında Cubillos-Rojas ve arkadaşları ise HERC2 proteininin p53 oligomerizasyonunda görev aldığını göstermişlerdir [Cubillos-Rojas et al., 2014]. Literatürde yer alan bu çalışmalar göz önüne alındığında ileri de yapılacak olan çalışmalarda CCDC124 proteini ve HERC2 mRNA'sı etkileşiminin CLIP gibi yöntemlerle daha etkin bir biçimde gözlemlenerek, bu etkileşimin hücre metabolizması üzerindeki etkisinin anlaşılmasının önemli olduğu düşünülmektedir.

5.2.2. Hücre altı yapılarda Ccdc124 proteininin konumlanması

Ccdc124 proteininin bağlandığı olası RNA hedeflerinin belirlenmesine yönelik çalışmalarda proteinin RNA bağlama kapasitesinin gösterilmesinin ardından, proteinin yoğun RNA içeriğine sahip hücre altı yapılarda konumlanıyor olabileceği düşünülmüştür. İlgili analizlerin gerçekleştirilmesi için ise immunofloresan yöntemi kullanılarak konfokal mikroskobu kullanılmasına karar verilmiştir. Daha önce 2013 yılında yayınlanmış olan Telkoparan'a ait doktora tez çalışması sırasında elde edilen veriler doğrultusunda Ccdc124 proteiniyle etkileştiği düşünülen G3BP, PABPC1, HSP27 gibi proteinlerin SG yapısında bulunuyor olmaları bizi öncelikli olarak bu yapıların incelenmesine yönlendirmiştir [Telkoparan, 2013], [Galganski et al., 2017]. SG konumlanmasına dair verilerin incelenmesi sırasında ise Ccdc124 antikor boyamalarının çekirdek içi granüler yapılanmalarda konumlandığı tespit edilmiştir. Tespit edilen bu kromatinler arası granüler yapıların sayısal ve morfolojik olarak kırpılma faktörlerini içeren NS yapılarına benzediği yapılan literatür araştırmaları sonucunda belirlenmiştir (Şekil 5.23) [Spector ve. Lamond, 2011]. Aynı zamanda SG konumlanması için kullanılan HNRNPA1 ve TIA-1 ile kırpılma mekanizmasıyla karakterize olmuş bu yapılarda yer alan proteinlerle çekirdek içi gerçekleşen ortak konumlanmalar ve laboratuvarımızda devam eden çalışmalarda Ccdc124 proteininin bağlandığı düşünülen SRSF2 (SC35), DDX3X, TARDBP gibi proteinlerin de bu yapıda konumlanıyor olması NS'ın da incelenmesine neden olmuştur.

Yapılan çalışmalar sonucunda daha önce sentrozomda ve orta cisimcikte konumlandığı tespit edilmiş olan Ccdc124 proteininin SG ne NS olmak üzere iki farklı hücre altı organelde daha konumlanıyor olduğu immunofloresan boyama deneyleriyle gösterilmiştir [Telkoparan vd., 2013] (Şekil 5.19- Şekil 5.25). Aynı zamanda literatürde DDX4 proteiniyle yapılmış bir çalışmada protein sekansında yer alan düzensiz bölgelere sahip polyamfolid yapıların faz ayrımında önemli olabileceğinden bahsedilmektedir [Lin et al., 2016]. Bu tez çalışması sırasında yapılan SPOT analiziyle ise düzensizlik eğilimi yüksek olan bölgeler bulundurması (Şekil 2.3), özellikle proteinin N terminal bölgesinin belirli bir üç boyutlu yapısının olmaması ve CIDER analizinde gösterildiği üzere pozitif ve negatif yük dağılımları sergileyen poliamfolid bir protein olması (Şekil2.2) NG ve SG gibi membransız faz ayrım organellerindeki gözlemlerine ait verileri desteklemektedir. Bu nedenle ileride yapılacak çalışmalarla Ccdc124 proteininin bu yapılardaki görevinin incelenmesi hücre içi membransız granüler yapı organizasyonlarının tam olarak anlaşılması, hücresel stres cevabı ve RNA metabolizmasının aydınlatılması açısından oldukça önemlidir.

5.2.2.1.Ccdc124 Proteininin Stres Granülü Konumlanması

Stres granülü oluşumuyla Ccdc124 proteini arasındaki ilişkinin tespiti için yapılan deneyler sonucunda immunofloresan boyamalar sıcaklık stresi koşullarında (42°C ve 46°C) G3BP1 proteiniyle Ccdc124 proteininin bazı stres granüllerinde ortak konumlandığı gösterilmiştir. Ancak benzer bir otak konumlanma oksidatif stres durumunda gözlemlenmemiştir. Bu bulgunun yanı sıra nükleus içi ortak konumlanmalar da gözlemlenmiş olup, bu ortak konumlanmanın hem sıcaklık hem de oksidatif stres cevabına bağlı olarak artış gösterdiği belirlenmiştir. Nitekim 2007 yılında yayınlanmış bir tez çalışmasında UV uygulanma süresiyle doğru orantılı olarak G3BP'nin konumlanmasının sitoplazmadan nükleusa doğru bir yönelim gösterdiği belirtilmiştir ve literatürde yer alan birçok çalışmalarda stres dozuna bağlı olarak hücresel cevaplarda meydana gelen farklılıklara dikkat çekilmiştir [Behrmann, 2007], [Adler et al., 1996], [Latonen et al., 1996]. Bu durum bize deneysel çalışmalar sırasında uygulanmış olan stres koşullarına bağlı olarak G3BP1 proteinin çekirdek konumlanmasının artıyor olabileceğini düşündürmekte ve sıcaklık seviyesindeki artışla çekirdek içi ortak konumlanmanın artıyor olması da bu düşünceyi

güçlendirmektedir. Yine bu deneysel çalışmalar sırasında hem stresli hem de stressiz koşullarda gerçekleştirilmiş olan birlikte çöktürme deneyleri ise laboratuvarımızda daha önce yapılmış olan kütle spektrometrisi analizlerinde yer alan ve Ccdc124 proteini ile etkileştiği düşünülen G3BP1 arasındaki etkileşimi doğrulamış bulunmakta ancak bu etkileşimin stres bağımlı olmadığını göstermektedir. Ccdc124 ve G3BP arasındaki etkileşim mekanizmasının tam olarak anlaşılabilmesi için ise ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Ccdc124 proteininin konumlanma çalışmalarında stres granüllerinin dinamik yapısı ve stres dozu bağımlı hücresel cevaplar arası farklılıklar göz önünde bulundurularak sıcaklık stresi deneyleri için iki farklı sıcaklık (42°C ve 46°C) seçilmiştir. Bu deneyler sırasında ise TIA-1 ile işaretlenmiş stres granüllerinde 42°C'de, Flag-HNRNPA1 ile işaretlenmiş stres granüllerinde 42°C'de, Flag-PABPC1 ile işaretlenmiş stres garnüllerinde ise 46°C'de Ccdc124 protein konumlanması gösterilmiş olup, oksidatif stres sonucu oluşan stres granüllerinde ise Ccdc124 proteini varlığına ait bir bulguya rastlanmamıştır. TIA-1 ile işaretlenmiş hücrelerde sodyum arsenikle oluşturulan oksidatif stres ve 46°C'de oluşturulan sıcaklık stresinde, Flag-PABPC1 ile işaretlenmiş hücrelerde ise 42°C'de oluşturulan sıcaklık stresinde bu protenlerin SG'de yeterince bulunmamasına bağlı olarak granüler yapılara rastlanmamış olup, ilgili deney gruplarına ait verilere tezde yer verilmemiştir.

Bu bulguların yanısıra G3BP1, PABPC1, HNRNPA1 ve TIA-1 gibi bazı stres granülü işaretleyicileriyle Ccdc124 proteininin sitoplazmik konumlarının aynı olduğunu göstermiş olmasına rağmen, tüm stres granüllerinde benzer konumlanma tespit edilememiş ve benzer bir durumdan Markmiller ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada da söz edilmiştir. 2018'de yayınlanan çalışma sonucunda HeLa ve HepG2 hücrelerinde sodyum arsenitle oluşturulan stres granüllerinde tespit edilememiş olmasına rağmen, öncül nöronal hücrelerdeki stres granüllerinde rastlandığı rapor edilmiştir [Markmiller et al., 2018]. Bu durum bize Ccdc124'ün genel olarak tüm stres granüllerinde bulunan bir protein olmadığını ancak bazı hücrelere ve bazı özel koşullara bağlı olarak stres granüllerinde konumlandığını düşündürmektedir.

Literatrüde yer alan bir çalışmada Gcn1/Gcn20 kompleksini de içeren GCN2 düzenleyici kompleksinin sıcaklık stresine bağlı oluşan stres granüllerinde bulunduğu belirtilmiştir [Cherkasov et al., 2015]. Ccdc124 proteininin valide edilen RNA

hedeflerinden biri olarak GCN1 olduğu düşünüldüğünde, bu durum Ccdc124'ün stres granülünde konumlanmasa bile bu yolak üzerinde görev alıyor olabileceğini göstermektedir.

5.2.2.2. Ccdc124 Proteininin Nükleer Benek Konumlanması

Nükleer benekler kırpılma faktörlerini bulunduran, transkripsiyon, mRNA olgunlaşması ve RNA'ların çekirdek dışına aktarılması gibi birçok biyolojik süreçte rol alan kromatinler arası granül yapılarıdır. Yapılan bu çalışmayla ise nükleer beneklerin önemli işaretleyicilerinden biri olan SC35 ile Ccdc124'ün konumlanmasının çekirdek içinde aynı bölgelerde olduğu tespit edilmiştir. Bu ortak konumlanmanın CRISPR/Cas9 sistemi kullanılarak Ccdc124'ün hedeflendiği hücrelerde bulunmaması ise elde edilen veriyi desteklemektedir. Nitekim TIA-1 antikoruyla yapılan boyamalarda sadece sitoplazmik değil, aynı zamanda nükleer konumlanmadaki benzerliklere rastlanmıştır. TIA-1 'in hücre içinde hem sitoplazmik hem de nükleer konumlanmasının olduğu ve iki konum arasında taşınmanın da transkripsiyon bağımlı gerçekleştiği bilinmektedir [Zhang et al., 2005]. Dahası 2000 yılında Förch ve arkadaşları tarafından yapılan deneyler sonucunda TIA-1'in U1snRNP'in ona özgü 5'ss kısmını takiben zengin U sekansına sahip mRNA'lara bağlanmasına aracılık ettiği, yokluğunda *msl-2* pre-mRNA'sının tanınmasının ve kırpılma düzenlemesinin gerçekleşmediği, FAS'ın ise alternatif kırpılma düzenlemesindeki seçilimde etkili olduğu gösterilmiştir [Förch et al., 2000]. McAlinden ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada ise COL2A1'e ait intron 2'deki AU bakımından zengin cis elementlere bağlanarak 2. ekzonun kırpılma düzenlemesini sağladığı tespit edilmiştir [McAlinden et al., 2007].

Yine bu hücre hatlarında nükleer beneklerin büyüklüğünde bir artış olduğu da elde edilen bulgular arasında yer almaktadır. Fei ve arkadaşları tarafından 2017 yılında yayınlanan bir çalışmada nükleer beneklerin RNA içeriği miktarı ile benek büyüklüğünün arasında pozitif bir ilişki olduğunu, RNA birikiminin benek büyüklüğünü belirliyor olabileceğini belirtmişlerdir [Fei et al., 2017]

Aynı zamanda deney sonuçları sıcaklık stresi ve oksidatif stres durumlarında Ccdc124 proteiniyle SC35'in çekirdek içinde farklı granüler yapılarda bulunduklarına işaret etmektedir. Literatürde yer alan çalışmalarda ise sıcaklık stresi durumunda

SC35'in nükleer beneklerde bulunmaya devam ettiğini gösteriyor olması, bize Ccdc124'ün sıcaklık stresi bağımlı olarak nükleer beneklerden çıkıp çekirdek içi başka bir granüler yapıya yöneldiğini düşündürmektedir [Jolly et al., 1999], [Denegri et al., 2001]. Nitekim literatürde buna benzer birçok örnek bulunmaktadır. Bu örneklerden birisi nükleer benekler ile sıcaklık stresi durumunda gözlemlenen nükleer stres granülleri arasındaki ilişkidir. Stres durumu yokken NS'lerde bulunan ve kırpılmaden görevli olan SF2/ASF proteini, sıcaklık stresinde NS'lerden ayrılarak nükleer stres granüllerinde konumlanmaktadır [Denegri et al., 2001].

SG ile yapılan çalışmalar sırasında ise G3BP ile çekirdek içi ortak konumlanmaların sıcaklık ve oksidatif strese bağlı olarak artması (Şekil 5.19 b) bu ortak konumlanmanın NS dışında başka bir çekirdek içi hücre altı yapıda gerçekleşiyor olabileceğine işaret etmektedir. Literatürde yer alan çalışmalarda G3BP'nin Ser149'dan fosforilenerek çekirdek içinde konumlamasına ilişkin bulgular yer almasına karşın bu konumlanmanın ayrıntılarına ait bilgiler henüz mevcut bulunmamaktadır [Tourrière, et al., 2001]. Bu nedenle bu konumlanmanın ileride yapılacak daha ayrıntılı çalışmalarla aydınlatılmasının hem Ccdc124 proteininin strese bağlı cevaptaki rolünün hem de Ccdc124-G3BP ilişkisinin tespit edilmesinde önemli olabileceği düşünülmektedir.

5.2.3. Ccdc124 Proteininin Kanserle Olan İlişkisi

Daha önce yapılan çalışmalarda Ccdc124 proteininin başka proteinlerle etkileşimi üzerinde durulmuş ve RasGEF gibi bazı proteinlere bağlanma eğiliminin olduğu gösterilmiştir [Telkoparan vd., 2013]. Ccdc124'ün RNA bağlama eğilimi ise biyoinformatik analizlerle tahmin edilmiş olmasına rağmen ilk defa bu çalışmayla deneysel olarak bu eğilim belirlenmiş ve hedef RNA'lara ilişkin yeni bilgiler elde edilmiştir. Literatürde yer alan birçok çalışmada RNA bağlayan proteininlerin kanser gelişimiyle yakın ilişkili olduğuyla belirtilmiştir [Vo et al., 2012], [Neelamraju et al., 2015], [Vikesaa et al.,2006]. Bu durum RNA bağlayan bir protein olarak Ccdc124'ün de kanserle ilişkisinin araştırılması gerekliliğini ortaya çıkarmıştır.

Yapılmış olan bu çalışmayla Ccdc124 mRNA'sının ifadesiyle kanser metabolizması arasında bir ilişki bulunabileceği gösterilmiş ve özellikle adrenal bez, endometriyum, özofagus, karaciğer, tiroid bezi, mesane ve over kanserinde bu ifadenin

arttığı belirlenmiştir. Endometriyum, mesane ve özofagus kanserlerinin erken evrelerinde anlamlı bir ifade artışı gösteren Ccdc124'ün bu kanserlerin saptanmasında kullanılabileceği gibi; karaciğer ve tiroid bezi kanserlerinde geç evrelerde meydana gelen Ccdc124 mRNA ifadesindeki artışın gerçekleşmesi ise bu kanserlerin tedavisinde kullanılabilecek bir hedef olarak Ccdc124 proteininin önemini vurgulamaktadır.

Yapılan ayrıntılı analizler ayrıca over kanserinin hem erken hem de geç evrelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artışın olduğu, hasta örneklerinin histolojik adenokarsinom tipleri arasında seröz ve papiller seröz tiplerinde anlamlı bir ifade artışı olduğu, Uluslararası Jinekoloji ve Obstetrik Federasyonu (International Federation of Gynecology and Obstetrics, FIGO) tarafından yapılan sınıflandırmaya göre hastalığın G2 ve G3 evrelerindeki örneklerde ilgili proteine ait mRNA ifadesinde artış görüldüğü tespit edilmiştir. Over kanserine ait bu sınıflandırmada G3 evresindeki hücreler daha düzensiz ve metastaza yatkın olarak tanımlanmakta olup bu evreye ait hücrelerin metabolizmalarına dair ayrıntılı bir bilgi literatürde yer almamaktadır. 2014 yılında yapılan bir çalışmada erken epitelyal over kanserinde fertiliteyi koruma amaçlı yapılan operasyonlar güvenli olarak görülürken, G3 evresindeki tümörler için bunun güvenli olmayabileceğine değinilmektedir [Zapardiel et al., 2014]. Aynı zamanda bu hastalarda yumurtalığın alınmasına bağlı tekrar tümörleşme olgusuna rastlanmakta, bu durum da tedavide kemoterapinin kullanılmasını gerekli kılmaktadır. Bu nedenle Ccdc124 proteininin G3 evresindeki ifade artışına bağlı metabolik yolağın ilerideki çalışmalarla aydınlatılmasının bu evredeki hastaların tedavisinde yeni stratejiler geliştirilmesine yardımcı olabileceğini göstermektedir.

Ccdc124 proteininin RNA hedefi olduğu deneysel olarak gösterilmiş olan HERC2'nin DNA hasarı sonrası tümör baskılayıcı olarak görev alan BRAC1'in degredasyonuna neden olduğu bilinmektedir [Wu et al., 2010]. Aynı zamanda HERC2'nin CPH alt birimiyle p53 proteinin son 43 aminoasitlik bölgesine bağlandığı ve tümör baskılayıcı p53 proteinin düzenlenmesinde önemli bir yere sahip olduğu da deneysel olarak gösterilmiştir [Cubillos-Rojas et al., 2014]. Bunun yanı sıra HEK293 hücrelerinde doğal immün cevapla ilgili yapılan bir çalışmada ise Ccdc124 proteininin PKR (protein kinaz R) ile etkileşerek baskılanmasını sağladığı tespit edilmiştir [Li et al., 2011]. PKR ise p53 ile etkileşerek tümör baskılayıcı gibi görev yaptığı bilinmektedir [Yoon et al., 2009]. HERC2 proteininin BRCA1, p53, PKR gibi kanserleşme

metabolizması üzerinde önemli etkileri bulunduğu tespit edilmiş olan iki proteinle olan etkileşimi kanser çalışmaları bakımından Ccdc124'ün önemine işaret etmektedir. Bu nedenle tez çalışmaları sırasında Q-PCR analizleri sonucunda elde edilen ve Ccdc124 protein ifadesinde istatistiksel olarak belirgin bir artış gözlemlenen kanser tiplerinde, Ccdc124 proteini ile HERC2 mRNA'sı arasındaki ilişkinin araştırılması ve bu ilişkinin diğer tümörleşme mekanizmalarının üzerindeki direk veya indirek etkilerinin ayrıntılı olarak değerlendirilmesi gerekmektedir.

Son zamanlarda yapılan çalışmalar ise RNA bağlayan proteinlerin oogenezi mRNA metazbolizmasında görev alarak düzenlediğini göstermektedir [Brook et al., 2009], [Rosario et al., 2017], [Clarke et al., 2012]. İlginç olarak bu tez çalışması sırasında gerçekleştirilen IHC deneylerinde de over dokusundaki oosit folikül sitoplazmalarında yoğun Ccdc124 antikor boyanmalarına rastlanmıştır. Ccdc124 protein ifadesinde gözlemlenen bu artış, uyku durumunda olan primordial oosit metabolizması ve Wells ve arkadaşları tarafından 2020 yılında yapılan Ccdc124 proteininin hibernasyon durumundaki ribozomlara bağlanarak ribozom aktivasyonuna katkıda bulunuyor olabileceği vurgusu göz önünde bulundurulduğunda oldukça dikkat çekici bulunmaktadır [Wells et al., 2020]. Aynı zamanda yapılan bu deneyler sırasında kullanılan endometriyum, mesane ve over dokularına ait epitelyal kısımlarda da Ccdc124 antikor boyama tespit edilmiştir. Özellikle Pelin Telkoparan tarafından daha önce yapılmış olan deneysel çalışmalarla bu proteinin hücre bölünmesi evrelerinde sentrozom ve orta cisimcik alanlarında konumlanıyor olması, proliferasyon özelliği yüksek olması nedeniyle epitelyal hücrelerde daha fazla ifade ediliyor olabileceğini düşündürmektedir.

Ccdc124 protein ifadesinin over ve endometriyum kanserinde yükseliyor olması ise, bu dokulara ait kanser olgusu gelişiminde bu proteinin ifade miktarının önemli olabileceğine işaret etmektedir. Aynı zamanda bu bulgular daha önce elde edilmiş olan Q-PCR deneyleri kullanılarak yapılmış olan ve Ccdc124 mRNA miktarı arttışlarının gözlemlendiği sonuçlarımızı da desteklemektedir. Bunun yanı sıra over kanser tipleri arasında yer alan papiller seröz ve seröz karsinom örneklerinde de hem protein hem de mRNA seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı artışlar tespit edilmiş bulunmaktadır. Yine over kanseri örneklerinde Grade 2 ve Grade 3 örneklerinde benzer şekilde hem protein hem de mRNA seviyelerinde artış gözlemlenmiştir. Bu durum yüksek ve orta dereceli tümörlerde artan Ccdc124 ekspresyon seviyesinin,

hücrelerin farklılaşma yeteneğinin azalması ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Nitekim daha önce literatürde yapılmış çalışmalarla da hücre çoğalması ile farklılaşma hızı arasında ters orantılı bir ilişki olduğunu gösterilmiştir [Mattern et al., 2004], [Silvia Hardiany et al., 2017], [Ruijtenberg et al., 2016]. Elde ettiğimiz bulgular ise Ccdc124 proteinin proliferasyonda rol alıyor olabileceği hipotezimizi daha da güçlendirmektedir. Ccdc124 proteininin henüz hücre çoğalması ve karsinogenezdeki rolü tam olarak anlaşılmış olmamasına ragmen elde edilen yeni bulgular bu mekanizmalar aralarındaki dengenin daha iyi anlaşılabilmesi için önemli ipuçları sunmaktadır.

Endometriyum ve over dokularından elde edilmiş olan bulguların aksine Q-PCR analizinde Ccdc124 mRNA seviyesinde artış bulunmuş olan mesane kanserinde immunohistokimya yöntemi kullanılarak Ccdc124 protein ifadesinde herhangi bir anlamlı farklılık bulunamamıştır. Bu farklılığın Greenbaum'un araştırmalarında da belirttiği üzere posttranskripsiyonel mekanizmalarla düzenleme ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir [Greenbaum et al., 2003].

Yapılmış olan bu tez çalışmasıyla elde edilen yeni bulgular sınırlı sayıda kanser örneğine dayanmasına rağmen Ccdc124 proteini ve kanser gelişimi arasındaki ilişkinin anlaşılması açısından büyük önem taşımaktadır. Elde edilen sonuçlar Ccdc124 proteininin biyolojik fonksiyonu hakkındaki bilgilerimizi genişletmiş bulunmakla birlikte, özellikle ileride yapılacak olan kanser tanı ve tedavisine yönelik yeni bir hedef olarak Ccdc124 proteinin önemini vurgulamaktadır.

KAYNAKLAR

Abastado J. P., Miller, P. F., Jackson B. M., Hinnebusch A. G., (1991), "Suppression of ribosomal reinitiation at upstream open reading frames in amino acid-starved cells forms the basis for GCN4 translational control", Molecular and Cellular Biology, 11, 486-496.

Adler V., Polotskaya A., Kim J., Dolan L., Davis R., Pincus M., Ronai Z., (1996), "Dose rate and mode of exposure are key factors in JNK activation by UV irradiatio", Carcinogenesis, 17(9), 2073-2076.

Aizer A., Kalo A., Kafri P., Shraga A., Ben-Yishay R., Jacob A., Kinor N., Shav-Tal Y., (2014), "Quantifying mRNA targeting to P-bodies in living human cells reveals their dual role in mRNA decay and storage", Journal of Cell Science, 127, 4443-4456.

Aljada A., Saleh A. M., Alkathiri M., Shamsa H. B., Al-Bawab A., Nasr A., (2015), "Altered Sirtuin 7 Expression is Associated with Early Stage Breast Cancer", Breast Cancer (Auckl), 9, 3-8.

Al-khatib K., William B., Silverman R. H., Halford W., Carr D., (2003), "The murine double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR and the murine 2′,5′-oligoadenylate synthetase-dependent RNase L are required for IFN-β-mediated resistance against herpes simplex virus type 1 in primary trigeminal ganglion culture", Virology, 313, 126-135.

Anczuków O., Akerman M., Cléry A., Wu J., Shen C., Shirole N. H., Raimer A., Sun S., Jensen M. A., Hua Y., Allain F. H., Krainer A. R., (2015), "SRSF1-Regulated Alternative Splicing in Breast Cancer", Molecular Cell, 60, 105-117.

Anda S., Zach R., Grallert B., (2017), "Activation of Gcn2 in response to different stresses." PLoS One, 12, e0182143.

Arslan Ö., (2015), “Coiled-coil domain-containing protein 124 (Ccdc124) artışının hücre fizyolojisine ve bölünmesine etkileri”, Yüksek Lisans Tezi, Gebze Teknik Üniversitesi.

Behrmann J., (2007),” Determining the Role of the RNA-binding Protein, RasGAP-SH3 domain-Binding Protein, in the Mammalian Cellular Response to Ultraviolet Radiation”, Yüksek Lisans Tezi, McGill Üniversitesi.

Barzilai A., Yamamoto K. I., (2004), "DNA damage responses to oxidative stress", DNA Repair, 3, 1109-1115.

Beck J. S., (1961), "Variations in the morphological patterns of Autoimmune nuclear fluorescence", The Lancet, 277, 1203-1205.

Beckmann B. M., Horos R., Fischer B., Castello A., Eichelbaum K., Alleaume A., Schwarzl T., Curk T., Foehr S., Huber W., Krijgsveld, J., Hentze M. W., (2015), "The RNA-binding proteomes from yeast to man harbour conserved enigmRBPs", Nature Communications, 6, 10127.

Bekker-Jensen, S., Danielsen J. R., Fugger K., Gromova I., Nerstedt A., Lukas C., Bartek J., Lukas J., Mailand N., (2009), "HERC2 coordinates ubiquitin-dependent assembly of DNA repair factors on damaged chromosomes", Nature Cell Biology, 12, 80.

Boeynaems S., Alberti S., Fawzi N. L., Mittag T., Polymenidou M., Rousseau F., Schymkowitz J., Shorter J., Wolozin B., Van Den Bosh L, Tompa P., Fuxreiter M., (2018), "Protein Phase Separation: A New Phase in Cell Biology", Trends in cell biology, 28, 420-435.

Brook, M., Smith J., Gray N. K., (2009), "The DAZL and PABP families: RNA-binding proteins with interrelated roles in translational control in oocytes", Reproduction, 137(4), 595-617.

Buchan J. R., Parker R., (2009), "Eukaryotic Stress Granules: The Ins and Outs of Translation", Molecular Cell, 36, 932-941.

Buchan J. R., Kolaitis R., Taylor J. P., Parker R., (2013), "Eukaryotic Stress Granules Are Cleared by Autophagy and Cdc48/VCP Function", Cell 153, 1461-1474.

Busà R., Paronetto M. P., Farini D., Pierantozzi E., Botti F., Angelini D. F., Attisani F., Vespasiani G., Sette C., (2007), "The RNA-binding protein Sam68 contributes to proliferation and survival of human prostate cancer cells", Oncogene 26, 4372.

Castello A., Fischer B., Eichelbaum K., Horos R., 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.

Cervantes-Ortiz S. L., Zamorano C. N., Grandvaux Nathalie, (2016), "Respiratory Syncytial Virus and Cellular Stress Responses: Impact on Replication and Physiopathology", Viruses 8, 124.

Cherkasov V., Grousl T., Theer P., Vainshtein Y., Glasser C., Mongis C., Kramer G., Stoecklin G., Knop, M., Mogk A., Bukau B., (2015), "Systemic control of protein synthesis through sequestration of translation and ribosome biogenesis factors during severe heat stress", FEBS Letters, 589, 3654-3664.

Ciocca D. R., Calderwood S. K., (2005). "Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications.", Cell stress & chaperones, 10(2): 86-103.

Clarke H. J., (2012), "Post-transcriptional control of gene expression during mouse oogenesis", Results and Problems in Cell Differentation, 55, 1-21.

Collier N. C., Schlesinger M. J., (1986), "The dynamic state of heat shock proteins in chicken embryo fibroblasts", Journal of Cell Biology, 103, 1495-1507.

Corkery D. P., Holly A. C., Lahsaee S., Dellaire G., (2015), "Connecting the speckles: “Splicing kinases and their role in tumorigenesis and treatment response", Nucleus, 6, 279-288.

Cubillos-Rojas, M., Amair-Pinedo F., Peiró-Jordán R., Bartrons R., Ventura F., Rosa J. L., (2014), "The E3 ubiquitin protein ligase HERC2 modulates the activity of tumor protein p53 by regulating its oligomerization", The Journal of Biological Chemistry, 289, 14782-14795.

da Silva M. R., Moreira G. A., Gonçalves da Silva R. A., de Almeida Alves Barbosa É., Pais Siqueira R., Teixera R. R., Almeida M. R., Silva Júnior A., Fietto J. L. R., Bressan G. C., (2015), “Splicing regulators and their roles in cancer biology and therapy”, BioMed Research International, 2015, 150514-150514.

Dahl, J. U., Gray, M. J., Jakob U., (2015), "Protein quality control under oxidative stress conditions", Journal of Molecular Biology, 427, 1549-1563.

Danan C., Manickavel S., Hafner M., (2016), "PAR-CLIP: A method for transcriptome-wide identification of RNA binding protein interaction sites", Methods in molecular biology, 1358, 153-173.

Davies K. J., Goldberg A. L., (1987), "Oxygen radicals stimulate intracellular proteolysis and lipid peroxidation by independent mechanisms in erythrocytes", The Journel of Biological Chemistry, 262, 8220-8226.

Delgado A. N., De Lucca F. L., (2007), "Knockdown of PKR expression by RNAi reduces pulmonary metastatic potential of B16-F10 melanoma cells in mice: Possible role of NF-κB", Cancer Letters, 258, 118-125.

Denegri M., Chiodi I., Corioni M., Cobianchi F., Riva, S., Biamonti G., (2001), "Stress-induced Nuclear Bodies Are Sites of Accumulation of Pre-mRNA Processing Factors", Molecular Biology of the Cell, 12, 3502-3514.

Deng J., Harding H. P., Raught B., Gingras A. C., Berlanga J. J., Scheuner D., Kaufman R. J., Ron, D., Sonenberg N., (2002), "Activation of GCN2 in UV-Irradiated Cells Inhibits Translation", Current Biology 12, 1279-1286.

Diallinas G., Thireos G., (1994), "Genetic and biochemical evidence for yeast GCN2 protein kinase polymerization", Gene 143, 21-27.

Fei J., Jadaliha M., Harmon T. S., Li I. T., Hua B., Hao Q., Holehouse A. S., Reyer M., Sun Q., Freier S. M., Pappu R. V., Prasanth K. V., Ha T., (2017), "Quantitative analysis of multilayer organization of proteins and RNA in nuclear speckles at super resolution", Journal of Cell Science, 130, 4180-4192.

Förch P., Puig O., Kedersha N., Martínez C., Granneman S., Séraphin B., Anderson P., Valcárcel J., (2000), "The Apoptosis-Promoting Factor TIA-1 Is a Regulator of Alternative Pre-mRNA Splicing", Molecular Cel, 6, 1089-1098.

Fushimi K., Ray P., Kar A., Wang L., Sutherland L. C., Wu J. Y., (2008), "Up-regulation of the proapoptotic caspase 2 splicing isoform by a candidate tumor suppressor, RBM5", Proceedings of the National Academy of Sciences, 105, 15708-15713.

Galganski L., Urbanek M. O., Krzyzosiak W. J., (2017), "Nuclear speckles: molecular organization, biological function and role in disease", Nucleic acids research, 45, 10350-10368.

Gallinetti J., Harputlugil E., Mitchell J. R., (2013), "Amino acid sensing in dietary-restriction-mediated longevity: roles of signal-transducing kinases GCN2 and TOR", The Biochemical journal, 449, 1-10.

Garcia-Barrio M., Dong J., Ufano S., Hinnebusch A. G., (2000), "Association of GCN1–GCN20 regulatory complex with the N-terminus of eIF2α kinase GCN2 is required for GCN2 activation", The European Molecular Biology Organization Journal, 19, 1887-1899.

Garrido C., Fromentin A., Bonnotte B., Favre N., Moutet M., Arrigo A. P., Mehlen P., Solary E., (1998), "Heat shock protein 27 enhances the tumorigenicity of immunogenic rat colon carcinoma cell clones", Cancer research, 58, 5495-5499.

Ghigna C., Cartegni L., Jordan P., Paronetto M., (2015), "Posttranscriptional Regulation and RNA Binding Proteins in Cancer Biology", BioMed Research International, 2015, 2.

Gilks N., Kedersha N., Ayodele M., Shen L., Stoecklin G., Dember L. M., Anderson P., (2004), "Stress granule assembly is mediated by prion-like aggregation of TIA-1", Molecular Biology of the Cell, 15, 5383-5398.

Girard C., Will C. L., Peng J., Makarov E. M., Kastner B., Lemm I., Urlaub H., Hartmuth K., Lührmann R., (2012), "Post-transcriptional spliceosomes are retained in nuclear speckles until splicing completion", Nature Communications, 3, 994.

Godet I., Gilkes D. M., (2017), "BRCA1 and BRCA2 mutations and treatment strategies for breast cancer", Integrative cancer science and therapeutics, 4, 10.15761/ICST.1000228.

Gorchakov R., Frolova E., Williams B. R. G., Rice C. M., Frolov I., (2004), "PKR-dependent and -independent mechanisms are involved in translational shutoff during Sindbis virus infection", Journal of Virology, 78, 8455-8467.

Gout S., Brambilla E., Boudria A., Drissi R., Lantuejoul S., Gazzeri S., Eymin B., (2012), "Abnormal expression of the pre-mRNA splicing regulators SRSF1, SRSF2, SRPK1 and SRPK2 in non small cell lung carcinoma", PLoS One, 7, e46539-e46539.

Graner M. W., Cumming R. I., Bigner D. D., (2007), "The heat shock response and chaperones/heat shock proteins in brain tumors: surface expression, release, and Possible Immune Consequences", The Journal of Neuroscience, 27, 11214-11227.

Greenbaum, D., Colangelo C., Williams K., Gerstein M., (2003), “Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale”, Genome Biology, 4, 117.

Gu X., Orozco J. M., Saxton R. A., Condon K. J., Liu G. Y., Krawczyk P. A., Scaria S. M., Harper J. W., Gygi, S. P., Sabatini D. M., (2017), "SAMTOR is an S-adenosylmethionine sensor for the mTORC1 pathway", Science, 358, 813-818.

Guil S., Long J. C., Cáceres J. F., (2006), "hnRNP A1 relocalization to the stress granules reflects a role in the stress response", Molecular and Cellular Biology, 26, 5744-5758.

Gül S., (2015), "CRISPR/Cas9 yöntemi aracılığı ile insan CCDC124 geni mutasyonun hücre bölünmesi üzerine etkileri“, Yüksek Lisans Tezi, Gebze Teknik Üniversitesi.

Hall L. L., Smith K. P., Byron M., Lawrence J. B., (2006), "Molecular anatomy of a speckle", The anatomical record. Part A, Discoveries in molecular, cellular, and evolutionary biology, 288, 664-675.

Halliwell B., (2007), "Oxidative stress and cancer: have we moved forward?" Biochemical Journal, 401, 1-11.

Hanson J., Yang Y., Paliwal K., Zhou Y., (2017), "Improving protein disorder prediction by deep bidirectional long short-term memory recurrent neural networks", Bioinformatics, 33, 685-692.

Harding H. P., Novoa I., Zhang Y., Zeng H., Wek R., Schapira M., Ron D., (2000), "Regulated Translation Initiation Controls Stress-Induced Gene Expression in Mammalian Cells", Molecular Cell, 6, 1099-1108.

Hein M. Y., Hubner N. C., Poser I., Cox J., Nagaraj N., Toyoda Y., Gak I. A., Weisswange I., Mansfeld J., Buchholz F., Hyman A. A., Mann M., (2015), "A Human Interactome in Three Quantitative Dimensions Organized by Stoichiometries and Abundances", Cell 163, 712-723.

Hernandez F., Perez M., Lucas J. J., Mata A. M., Bhat R., Avila J., (2004), "Glycogen synthase kinase-3 plays a crucial role in tau exon 10 splicing and intranuclear distribution of SC35. Implications for Alzheimer's disease", Journal Biological Chemistry, 279, 3801-3806.

Hinnebusch A. G., (1997), "Translational regulation of yeast GCN4- A window on factors that control initiator-tRNA binding to the ribosome", Journal of Biological Chemistry, 272, 21661-21664.

Hirohata Y., Kato A., Oyama M., Kozuka-Hata H., Koyanagi N., Arii J., Kawaguchi Y., (2015), "Interactome analysis of herpes simplex virus 1 envelope glycoprotein H", Microbiology and Immunology, 59, 331-337.

Holehouse A. S., Das R. K., Ahad J. N., Richardson M. O., Pappu R. V., (2017), "CIDER: Resources to analyze sequence-ensemble relationships of intrinsically disordered proteins", Biophysical Journal, 112, 16-21.

Holehouse A. S., Pappu R. V., (2015), "Protein polymers: Encoding phase transitions", Nature Materials, 14, 1083-1084.

Holehouse A.S., Ahad J., Das R.K., Pappu, R.V., (2015), "CIDER: Classification of intrinsically disordered ensemble regions", Biophysical Journal, 108, 228a.

International Human Genome Sequencing Consortium, (2004), "Finishing the euchromatic sequence of the human genome", Nature, 431, 931-45.

Jain S., Wheeler J. R., Walters R. W., Agrawal A., Barsic A., Parker R., (2016), "ATPase-Modulated Stress Granules Contain a Diverse Proteome and Substructure", Cell, 164, 487-498.

Jakobsen L., Vanselow K., Skogs M., Toyoda Y., Lundberg E., (2011), "Novel asymmetrically localizing components of human centrosomes identified by complementary proteomics methods", The European Molecular Biology Organization Jounal, 30, 1520-1535.

Jangi M., Boutz P. L., Paul P., Sharp P. A., (2014), "Rbfox2 controls autoregulation in RNA-binding protein networks", Genes& Development, 28, 637-651.

Jiang H. Y., Wek S. A., McGrath B. C., Lu D. H., Tsonwin H., Heather P., Wang X., Ron D., Cavener D. R., Wek R. C., (2004), "Activating transcription factor 3 is integral to the eukaryotic initiation factor 2 kinase stress response", Molecular and Cellular Biology, 24, 1365-1377.

Jolly C., Vourc'h C., Robert N. M., Morimoto R. I., (1999), "Intron-independent association of splicing factors with active genes", The Journal of Cell Biology, 145, 1133-1143.

Kamal A., Boehm M. F., Burrows F. J., (2004), "Therapeutic and diagnostic implications of Hsp90 activation", Trends in Molecular Medicine, 10, 283-290.

Kang T. H., Lindsey-Boltz L. A., Reardon J. T., Sancar A., (2010). "Circadian control of XPA and excision repair of cisplatin-DNA damage by cryptochrome and HERC2 ubiquitin ligase", Proceedings of the National Academy of Sciences, 107, 4890-4895.

Karni R., de Stanchina E., Lowe S. W., Sinha R., Mu D., Krainer A. R., (2007), "The gene encoding the splicing factor SF2/ASF is a proto-oncogene", Nature structural & molecular biology, 14, 185-193.

Kechavarzi B., Janga S. C., (2014), "Dissecting the expression landscape of RNA-binding proteins in human cancers", Genome Biology, 15, R14.

Kedersha N. L., Gupta M., Li W., Miller I., Anderson P., (1999), "RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 alpha to the assembly of mammalian stress granules", The Journal of Cell Biology, 147,1431-1442.

Kent W. J., Sugnet C. W., Furey T. S., Roskin K. M., Pringle T. H., Zahler A. M., Haussler D., (2002), "The human genome browser at USCS", Genome Research, 12, 996-1006.

Keshwani M. M., Hailey K. L., Aubol B. E., Fattet L., McGlone M. L., Jennings P. A., Adams J. A., (2015), "Nuclear protein kinase CLK1 uses a non-traditional docking mechanism to select physiological substrates", The Biochemical journal, 472, 329-338.

Kim, M. Y., et al., (2009), "Emerging roles of RNA and RNA-binding protein network in cancer cells", BMB Reports, 42(3), 125-130.

Kühnle S., Kogel U., Glockzin S., Marquardt A., Ciechanover A., Matentzoglu K., Scheffner M., (2011), "Physical and functional interaction of the HECT ubiquitin-protein ligases E6AP and HERC2", Journal of Biological Chemistry, 286, 19410-19416.

Lafarga M., Casafont I., Bengoechea R., Tapia O., Berciano M. T., (2009), "Cajal's contribution to the knowledge of the neuronal cell nucleus", Chromosom, 118, 437-443.

Latonen L, Taya Y, Laiho M., (2001), "UV-radiation induces dose-dependent regulation of p53 response and modulates p53-HDM2 interaction in human fibroblasts", Oncogene, 20, 6784-93.

Lee P. C., Ho I. C., Lee T., (2005), "Oxidative Stress Mediates Sodium Arsenite-Induced Expression of Heme Oxygenase-1, Monocyte Chemoattractant Protein-1, and Interleukin-6 in Vascular Smooth Muscle Cells", Toxicological Sciences, 85, 541-550.

Lee S., Liu B., Lee S., Huang S. X., Shen B., Qian S. B., (2012), "Global mapping of translation initiation sites in mammalian cells at single-nucleotide resolution", Proceedings of the National Academy of Sciences, 109, E2424-2432.

Lee T. C., Ho I. C., (1995), "Modulation of cellular antioxidant defense activities by sodium arsenite in human fibroblasts", Archives of Toxicology, 69, 498-504.

Lerner E. A., Lerner M. R., Janeway C. A., Steitz J. A., (1981), "Monoclonal antibodies to nucleic acid-containing cellular constituents: probes for molecular biology and autoimmune disease", Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 78, 2737-2741.

Li S., Wang L., Berman M., Kong Y., Dorf M. E., (2011), "Mapping a Dynamic Innate Immunity Protein Interaction Network Regulating Type I Interferon Production", Immunity, 35, 426-440.

Licatalosi D. D., Mele A., Fak J. J., Ule J., Kayikci M., Chi S. W., Clark T. A., Schweitzer A. C., Blume J. E., Wang X., Darnell J. C., Darnell R. B., (2008). "HITS-CLIP yields genome-wide insights into brain alternative RNA processing", Nature, 456:464.

Lin Y. H., Forman K. D., Chan H. S., (2016), "Sequence-Specific Polyampholyte Phase Separation in Membraneless Organelles", Physical Review Letters, 117, 178101.

Lindquist S., (1986), "The heat shock response", Annual review of biochemistry, 55, 1151-1191.

Lu L., Han A., Chen J., (2001), "Translation initiation control by heme-regulated eukaryotic initiation factor 2α kinase in erythroid cells under cytoplasmic stresses." Molecular and Cellular Biology, 21, 7971-7980.

Marchal J. A., Lopez G. J., Peran M., Comino A., Delgado J. R., García-García J. A., Conde V., Aranda F. M., Rivas C., Esteban M., Garcia M. A., (2014). "The impact of PKR activation: from neurodegeneration to cancer", The FASEB Journal, 28, 1965-1974.

Markmiller S., Soltanieh S., Server K. L., Mak R., Jin W., Fang M. Y., Luo E., Krach F., Yang D., Sen A., Fulzele A., Wozniak J. M., Gonzalez D. J., Kankel M. W., Gao F., Bennett E. J., Lécuyer E., Yeo G. W., (2018), "Context-Dependent and Disease-Specific Diversity in Protein Interactions within Stress Granules", Cell, 172, 590-604.

Markmiller S., Soltanieh S., Server K., Mak R., Jin W., Luo E., Krach F., Kankel M. W., Sen A., Bennett E. J., Lécuyer Eric, Yeo G. W., (2017), "Proximity labeling reveals an extensive steady-state stress granule interactome and insights to neurodegeneration", bioRxiv, 152520.

Marton M. J., Crouch D., Hinnebusch A. G., (1993), "GCN1, a translational activator of GCN4 in Saccharomyces cerevisiae, is required for phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2 by protein kinase GCN2", Molecular and Cellular Biology, 13, 3541-3556.

Marton, M. J., Vazquez de Aldan, C. R., Qiu H., Chakraburtty K., Hinnebusch A. G., (1997), "Evidence that GCN1 and GCN20, translational regulators of GCN4, function on elongating ribosomes in activation of eIF2alpha kinase GCN2", Molecular and cellular biology, 17, 4474-4489.

Mattern J. ve Volm M., (2004), "Imbalance of Cell Proliferation and Apoptosis During Progression of Lung Carcinomas", Anticancer Research, 24(6), 4243-4246.

McAlinden A., Liang L., Mukudai Y., Imamura T., Sandell L. J., (2007), "Nuclear protein TIA-1 regulates COL2A1 alternative splicing and interacts with precursor mRNA and genomic DNA", Journal of Biological Chemistry, 282, 24444-24454.

McEwen E., Kedersha N., Song B., Scheuner D., Gilks N., Han A., Chen J. J., Anderson P., Kaufman R. J., (2005), "Heme-regulated inhibitor kinase-mediated phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2 inhibits translation, induces stress granule formation, and mediates survival upon arsenite exposure", Journel of Biological Chemistry, 280, 16925-16933.

Miki Y., Swensen J., Shattuck-Eidens D., Futreal P. A., Harshman K., Tavtigian S., Liu Q., Cochran C., Bennett L. M., Ding W. et al., (1994), "A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1", Science, 266, 66-71.

Ming Y., Chen X., Xu Y., Wu Y., Wang C., Zhang T., Mao R., Fan Y., (2019), "Targeting liquid-liquid phase separation in pancreatic cancer", Translational Cancer Research, 8, 96-103.

Mounir Z., Koromilas A. E., (2010), "Uncovering the PKR pathway's potential for treatment of tumors", Future Oncology, 6, 643-645.

Mounir Z., Krishnamoorthy J. L., Robertson G. P., Scheuner D., Kaufman R. J., Georgescu M. M., Koromilas A. E., (2009), "Tumor suppression by PTEN requires the activation of the PKR-eIF2alpha phosphorylation pathway", Science signaling, 2, ra85-ra85.

Mueller P. P., Hinnebusch A. G., (1986), "Multiple upstream AUG codons mediate translational control of GCN4", Cell, 45**,** 201-207.

Neelamraju Y., Hashemikhabir S., Janga S. C., (2015), "The human RBPome: From genes and proteins to human disease", Journal of Proteomics, 127, 61-70.

Nilsson J., Sengupta J., Frank J., Nissen P., (2004), "Regulation of eukaryotic translation by the RACK1 protein: a platform for signalling molecules on the ribosome", The European Molecular Biology Organization Reports, 5, 1137-1141.

Noguchi T., Satoh S., Noshi T., Hatada E., Fukuda R., Kawai A., Ikeda S., Hijikata M., Shimotohno K., (2001), "Effects of mutation in hepatitis C virus nonstructural protein 5A on interferon resistance mediated by inhibition of PKR kinase activity in mammalian cells", Microbiology and Immunology, 45, 829-840.

Nover L., Scharf K. D., Neumann D., (1989), "Cytoplasmic heat shock granules are formed from precursor particles and are associated with a specific set of mRNAs", Molecular Cell Biology, 9, 1298-1308.

Onomoto K., Yoneyama M., Fung G., Kato H., Fujita T., (2014), "Antiviral innate immunity and stress granule responses", Trends in Immunology, 35, 420-428.

Ruijtenberg, S. ve van den Heuvel S., (2016), "Coordinating cell proliferation and differentiation: Antagonism between cell cycle regulators and cell type-specific gene expression", Cell Cycle, 15(2), 196-212.

Palmisano I., Della Chiara G., D'Ambrosio R. L., Huichalaf C., Brambilla P., Corbetta S., Riba M., Piccirillo R., Valente S., Casari G., Mai A., Martinelli Boneschi F., Gabellini D., Poli G., Schiaffino M. V., (2012), "Amino acid starvation induces reactivation of silenced transgenes and latent HIV-1 provirus via down-regulation of histone deacetylase 4 (HDAC4)", Proceedings of the National Academy of Sciences, 109, E2284-2293.

Paronetto M. P., Achsel T., Massiello A., Chalfant C. E., Sette C., (2007), "The RNA-binding protein Sam68 modulates the alternative splicing of Bcl-x", The Journal of Cell Biology, 176, 929-939.

Patel V. P., Chu C. T., (2011), "Nuclear transport, oxidative stress, and neurodegeneration", International Journal of Clinical and Experimental Pathology, 4, 215-229.

Peng Z., Kurgan L., (2015), "High-throughput prediction of RNA, DNA and protein binding regions mediated by intrinsic disorder", Nucleic Acids Researchs, 43, e121.

Petrova N. V., Velichko A. K., Razin S. V., Kantidze O. L., (2016), "Early S-phase cell hypersensitivity to heat stress", Cell Cycle, 15, 337-344.

Reeds P. J., (2000), "Dispensable and indispensable amino acids for humans.", The Journal of Nutrition, 130, 1835s-1840s.

Remmele W., Stegner H. E., (1987), "Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue", Pathologe, 8(3), 138-140.

Reuter S., Gupta S. C., Chaturvedi M. M., Aggarwal B. B., (2010), "Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked?", Free radical biology & medicine, 49, 1603-1616.

Ritossa F., (1962), "A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in drosophila", Experientia, 18, 571-573.

Roh M. S., Kwak J. Y., Kim S. J., Lee H. W., Kwon H. C., Hwang T. H., Choi P. J., Hong Y. S., (2005), "Expression of double-stranded RNA-activated protein kinase in small-size peripheral adenocarcinoma of the lung", Pathology International, 55, 688-693.

Romano P. R., Garcia-Barrio M. T., Zhang X., Wang, Q., Taylor D. R., Zhang F., Herring C., Mathews M. B., Qin J., Hinnebusch A. G.., (1998), "Autophosphorylation in the activation loop is required for full kinase activity *in vivo* of human and yeast eukaryotic initiation factor 2α kinases PKR and GCN2", Molecular and Cellular Biology, 18, 2282-2297.

Rosari, R., Childs A. J., Anderson R. A., (2017, "RNA-binding proteins in human oogenesis: Balancing differentiation and self-renewal in the female fetal germline", Stem Cell Research, 2, 193-201.

Sadler A. J., Williams B. R. G., (2008), "Interferon-inducible antiviral effectors", Nature Reviews Immunology, 8, 559.

Saitoh N., Spahr C. S., Patterson S. D., Bubulya P., Neuwald A. F., Spector D. L., (2004), "Proteomic analysis of interchromatin granule clusters", Molecular Biology of the Cell, 15, 3876-3890.

Sattlegger E., Hinnebusch A. G., (2000), "Separate domains in GCN1 for binding protein kinase GCN2 and ribosomes are required for GCN2 activation in amino acid-starved cells", The European Molecular Biology Organization Journal, 19, 6622-6633.

Sattlegger E., Hinnebusch A. G., (2005), "Polyribosome binding by GCN1 is required for full activation of eukaryotic translation initiation factor 2α kinase GCN2 during amino acid starvation", Journal of Biological Chemistry, 280, 16514-16521.

Sehgal L., Mathur R., Braun F. K., Wise J. F., Berkova Z., Neelapu S., Kwak L. W., Samaniego F., (2014), "FAS-antisense 1 lncRNA and production of soluble versus membrane Fas in B-cell lymphoma", Leukemia, 28, 2376-2387.

Sheng J., Zhao J., Xu Q., Wang L., Zhang W., Zhang Y., (2017), "Bioinformatics analysis of SRSF1-controlled gene networks in colorectal cancer", Oncology letters, 14, 5393-5399.

Sickmeier M., Hamilton J. A., LeGall T., Vacic V., Cortese M. S., Tantos A., Szabo B., Tompa P., Chen J., Uversky V. N., Obradovic Z., Dunker A. K., (2007), "DisProt: the Database of Disordered Proteins", Nucleic Acids Research, 35, D786-793.

Silvia H. N., Mulyawan W., Siregar N., Wanandi S. I., (2017), "Analysis of Apoptosis and Cell Proliferation in Glioma Related to the Tumor Grade", Advanced Science Letters, 23, 6771-6773.

Singh G., Pratt G., Yeo G. W., Moore M. J., (2015), "The Clothes Make the mRNA: Past and Present Trends in mRNP Fashion", Annual review of biochemistry, 84, 325-354.

Spector D. L., Lamond A. I., (2011), "Nuclear speckles", Cold Spring Harbor perspectives in biology, 3, a000646.

Spector D. L., Schrier W. H., Busch H., (1984), "Immunoelectron microscopic localization of snRNPs", Biology of the Cell, 49, 1-10.

Sun H., Yang Y., Shao H., Sun W., Gu W., Wang H., Jiang L., Qu L., Sun D., Gao Y., (2017), "Sodium arsenite-induced learning and memory impairment is associated with endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in rat hippocampus", Frontiers in Molecular Neuroscience, 10, 286.

Swift H., (1959), “Studies on nuclear fine structure”, Brookhaven symposia in biology, 12, 134-152.

Takeuchi K., Komatsu T., Kitagawa Y., Sada K., Gotoh B., (2008), "Sendai Virus C Protein Plays a Role in Restricting PKR Activation by Limiting the Generation of Intracellular Double-Stranded RNA", Journal of Virology, 82, 10102-10110.

Tarumoto Y., Kanoh J., Ishikawa F., (2013), "Receptor for activated C-kinase (RACK1) homolog Cpc2 facilitates the general amino acid control response through Gcn2 kinase in fission yeast", The Journal of Biological Chemistry, 288, 19260-19268.

Telkoparan P., (2013), “Characterization of the coiled-coil domain-containing protein 124 (Ccdc124) as a novel centrosome and midbody component involved in cytokinesis”, Doktora Tezi, Bilkent Üniversitesi.

Telkoparan P., Erkek S., Yaman E., Alotaibi H., Bayik D., Tazebay U. H., (2013), "Coiled-coil domain containing protein 124 is a novel centrosome and midbody protein that interacts with the Ras-guanine nucleotide exchange factor 1B and is involved in cytokinesis", PLoS One, 8, e69289.

Terada T., Ueyama J., Ukita Y., Ohta T., (2000), "Protein expression of double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR) in intrahepatic bile ducts in normal adult livers, fetal livers, primary biliary cirrhosis, hepatolithiasis and intrahepatic cholangiocarcinoma", Liver, 20, 450-457.

Tian B., Zhang Y., Luxon B. A., Garofalo R. P., Casola A., Sinha M., Brasier A. R., (2002), "Identification of NF-kappaB-dependent gene networks in respiratory syncytial virus-infected cells", Journal of Virology, 76, 6800-6814.

Tissiéres A., Mitchell H. K., Tracy U. M., (1974), "Protein synthesis in salivary glands of Drosophila melanogaster: Relation to chromosome puffs", Journal of Molecular Biology, 84, 389-398.

Tourrière H., Gallouzi I. E., Chebli K., Capony J. P., Mouaikel J., van der Geer P., Tazi J., (2001), "RasGAP-associated endoribonuclease G3Bp: selective RNA degradation and phosphorylation-dependent localization", Molecular and Cellular Biology, 21, 7747-7760.

Trinkle M. L., Ajuh P., Prescott A., Claverie M. F., Cohen S., Lamond A. I., Cohen P., (1999), "Nuclear organisation of NIPP1, a regulatory subunit of protein phosphatase 1 that associates with pre-mRNA splicing factors", Journal of Cell Science, 112, 157-168.

Ule J., Jensen K. B., Ruggiu M., Mele A., Ule A., Darnell R. B., (2003), "CLIP identifies nova-regulated RNA networks in the brain", Science, 302, 1212-1215.

Vattem K. M., Wek R. C., (2004), "Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells", Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 101, 11269-11274.

Velichko A. K., Petrova N. V., Razin S. V., Kantidze O. L., (2015), "Mechanism of heat stress-induced cellular senescence elucidates the exclusive vulnerability of early S-phase cells to mild genotoxic stress", Nucleic Acids Research, 43, 6309-6320.

Venables J. P., (2004), "Aberrant and alternative splicing in cancer", Cancer research, 64, 7647-7654.

Vikesaa J., Hansen T. V. O., Jønson L., Borup R., Wewer U. M., Christiansen J., Nielsen F. C., (2006), "RNA-binding IMPs promote cell adhesion and invadopodia formation", The European Molecular Biology Organization Journal, 25, 1456-1468.

Vo D. T., Abdelmohsen K., Martindale J. L., Qiao M., Tominaga K., Burton T. L., Gelfond J. A.L., Brenner A. J., Patel V., Trageser D., Scheffler B., Gorospe M., Penalva L. O.F., (2012), "The oncogenic RNA-binding protein Musashi1 is regulated by HuR via mRNA translation and stability in glioblastoma cells", Molecular Cancer Research, 10, 143-155.

Wang K., Wang L., Wang J., Chen S., Shi M., Cheng H., (2018), "Intronless mRNAs transit through nuclear speckles to gain export competence", The Journal of Cell Biology, 217, 3912-3929.

Wang Y. J., Vaidyanathan P. P., Rojas-Duran M. F., Udeshi N. D., Bartoli K. M., Carr S. A., Gilbert W. V., (2018), "Lso2 is a conserved ribosome-bound protein required for translational recovery in yeast", PLoS biology, 16, e2005903-e2005903.

Web 1,(2018), http://www.who.int/cancer/en/, (Erişim tarihi: 22.02.2021).

Web 2, (2019), https://wolfpsort.hgc.jp/, (Erişim tarihi: 25.03.2019).

Web 3, (2019), https://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Acembly/av.cgi?db=human&c=Gene&l=LOC115098, (Erişim tarihi: 25.03.2019).

Web 4, (2019), http://pappulab.wustl.edu/CIDER/analysis,(Erişim tarihi:22.03.2019).

Web 5, (2020), https://www.ebi.ac.uk/pdbe/pdbe-kb/proteins/Q96CT7, (Erişim tarihi:17.02.2020).

Wek R. C., Jiang H. Y., Anthony T.G., (2006), "Coping with stress: eIF2 kinases and translational control", Biochemical Society Transactions, 34, 7-11.

Wek S. A., Zhu S., Wek R. C., (1995), "The histidyl-tRNA synthetase-related sequence in the eIF-2 alpha protein kinase GCN2 interacts with tRNA and is required for activation in response to starvation for different amino acids", Molecular and Cellular Biology, 15, 4497-4506.

Wells, J. N., Buschauer R., Mackens-Kiani T., Best K., Kratzat H., Berninghausen O., Becker T., Gilbert W., Cheng J., Beckmann R., (2020), "Structure and function of yeast Lso2 and human CCDC124 bound to hibernating ribosomes", PLoS Biology, 18(7), e3000780.

Wheeler J. R., Jain S., Khong A., Parker R., (2017), "Isolation of yeast and mammalian stress granule cores", Methods, 126, 12-17.

White J. P., Lloyd R. E., (2011), "Poliovirus unlinks TIA1 aggregation and mRNA stress granule formation", Journal of Virology, 85, 12442-12454.

Woodruff J. B., Ferreira G. B., Widlund P. O., Mahamid J., Honigmann A., Hyman A. A., (2017), "The centrosome is a selective condensate that nucleates microtubules by concentrating tubulin", Cell, 169, 1066-1077.

Wu W., Sato K., Koike A., Nishikawa H., Koizumi H., Venkitaraman A. R., Ohta T., (2010), "HERC2 is an E3 ligase that targets BRCA1 for degradation", Cancer research, 70, 6384-6392.

y Cajal S. R., (1910), “El núcleo de las células piramidales del cerebro humano y de algunos mamíferos”, Trab Lab Invest Biology, 8, 27–62.

Yang R., Wek S. A., Wek R. C., (2000), "Glucose limitation induces GCN4 translation by activation of Gcn2 protein kinase", Molecular and Cellular Biology, 20, 2706-2717.

Ye J., Kumanova M., Hart L. S., Sloane K., Zhang H., De Panis D. N., Bobrovnikova-Marjon E., Diehl J. A., Ron D., Koumenis C., (2010), "The GCN2-ATF4 pathway is critical for tumour cell survival and proliferation in response to nutrient deprivation", The European Molecular Biology Organization Journal, 29, 2082-2096.

Yoon C. H., Lee E. S., Lim D. S., Bae Y. S., (2009), "PKR, a p53 target gene, plays a crucial role in the tumor-suppressor function of p53", Proceedings of the National Academy of Sciences, 106, 7852-7857.

Young S. K., Wek R. C., (2016), "Upstream Open Reading Frames Differentially Regulate Gene-specific Translation in the Integrated Stress Response", Journal of Biological Chemistry, 291, 16927-16935.

Zanzoni A., Cirillo D., Marchese D., Agostini F., Tartagli G. G., Klus P., (2013), "catRAPID omics: a web server for large-scale prediction of protein–RNA interactions", Bioinformatics, 29, 2928-2930.

Zapardiel I., Diestro M. D., Aletti G., (2014), "Conservative treatment of early stage ovarian cancer: Oncological and fertility outcomes", European Journal of Surgical Oncology, 40, 387-393.

Zhang T., Delestienne N., Huez G., Kruys V., Gueydan C., (2005), "Identification of the sequence determinants mediating the nucleo-cytoplasmic shuttling of TIAR and TIA-1 RNA-binding proteins", Journal of Cell Science, 118, 5453-5463.

Zhou H., Di Palma S., Preisinger C., Peng M., Polat A. N., Heck A. J. R., Mohammed S., (2013), "Toward a comprehensive characterization of a human cancer cell phosphoproteome", Journal of Proteome Research, 12, 260-271.

EKLER

Ek A:.CatRAPID Analizi Sonuçları.

Tablo A1.1: GCN1 mRNA'sı ile Ccdc124 proteininin olası bağlanma eğilimini gösteren CatRAPID analizi sonuçları.

Protein Bölgesi	**RNA Bölgesi**	**Etkileşim Eğilimi**
26-77	3336-3683	431.99
51-102	3336-3683	411.16
101-152	3336-3683	373.94
98-149	3336-3683	372.89
48-99	3336-3683	367.59
148-199	3336-3683	360.12
123-174	3336-3683	359.40
126-177	1260-1607	354.06
26-77	3336-3683	338.20
76-127	3336-3683	334.23
73-124	3336-3683	332.93
26-77	1779-2126	332.35
26-77	1952-2299	330.77
26-77	914-1261	330.27
26-77	1433-1780	327.06
26-77	2990-3337	325.42
26-77	395-742	324.86
51-102	1260-1607	321.65
26-77	1606-1953	316.90
51-102	1779-2126	316.02

Ek A1.2:: HERC2 mRNA'sı ile Ccdc124 proteininin olası bağlanma eğilimini gösteren CatRAPID analizi sonuçları.

Protein Bölgesi	**RNA Bölgesi**	**Etkileşim Eğilimi**
26-77	5854-6467	410.85
51-102	5854-6467	404.77
101-152	5854-6467	370.51
98-149	5854-6467	362.77
48-99	5854-6467	348.43
126-177	5854-6467	348.43
123-174	5854-6467	347.37
148-199	5854-6467	337.51
26-77	4936-5549	335.72
51-102	4936-5549	328.39
26-77	2488-3101	326.66
51-102	2488-3101	321.66
26-77	4324-4937	317.96
26-77	2794-3407	316.44
51-102	2794-3407	314.56
26-77	958-1571	314.51
51-102	4324-4937	313.77
76-127	5854-6467	311.83
51-102	958-1571	304.82
101-152	4936-5549	301.15

Ek A1.3: TUBA1B mRNA'sı ile Ccdc124 proteininin olası bağlanma eğilimini gösteren CatRAPID analizi sonuçları.

Protein Bölgesi	**RNA Bölgesi**	**Etkileşim Eğilimi**
51-102	1421-1492	15.60
26-77	1421-1492	14.88
51-102	596-667	14.82
51-102	126-197	14.76
26-77	126-197	14.13
51-102	1261-1332	14.11
26-77	596-667	14.05
51-102	36-107	13.79
26-77	1261-1332	13.39
51-102	351-422	13.15
101-152	126-197	13.15
26-77	36-107	13.09
51-102	56-127	12.99
51-102	1401-1472	12.95
51-102	1436-1507	12.63
98-149	126-197	12.61
101-152	1421-1492	12.57
26-77	351-422	12.46
101-152	1401-1472	12.45
51-102	1331-1402	12.42