

**T.C.**  
**EGE ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KEMİK PAGET HASTALIĞI VE FRONTOTEMPORAL  
DEMANS İLE GÖZLENEN İNKLÜZYON CİSİMCİK MİYOPATİ  
HASTALIĞINDA GÖRÜLEN MUTASYONLARIN  
ENDOPLAZMİK RETİKULUM İLİŞKİLİ PROTEİN YIKIM  
MEKANİZMASI (ERİY) ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**Biyokimya (Eczacılık) Programı**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Eczacı**

**Ahmet Uygur ÖRS**

**Danışman**

**Yrd. Doç. Dr. Petek BALLAR**

**İZMİR**

**2010**



**T.C.**  
**EGE ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KEMİK PAGET HASTALIĞI VE FRONTOTEMPORAL  
DEMANS İLE GÖZLENEN İNKLÜZYON CİSİMCİK MİYOPATİ  
HASTALIĞINDA GÖRÜLEN MUTASYONLARIN  
ENDOPLAZMİK RETİKULUM İLİŞKİLİ PROTEİN YIKIM  
MEKANİZMASI (ERİY) ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**Biyokimya (Eczacılık) Programı**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Eczacı**

**Ahmet Uygur ÖRS**

**Danışman**

**Yrd. Doç. Dr. Petek BALLAR**

**İZMİR**

**2010**



## DEĞERLENDİRME KURULU ÜYELERİ

**Adı Soyadı**

**İmza**

**Başkan** : Yrd. Doç. Dr. Petek BALLAR

**(Danışman)**

**Üye** : Prof. Dr. Aysun PABUÇÇUOĞLU

**Üye** : Prof. Dr. Metiner TOSUN

Yüksek Lisans Tezinin kabul edildiği tarih: .....

## ÖNSÖZ

Biyokimya Ana Bilim Dalında yüksek lisans yapmama olanak tanıyan, deneyimleri ve önerileri ile bana rehber olan değerli hocam Prof. Dr. Aysun PABUÇÇUOĞLU'na,

Bilimsel gelişimime katkıda bulunan, çalışmalarımnda maddi ve manevi desteğini esirgemeyen tez danışmanım değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Petek BALLAR' a,

Deneysel çalışmalarımnda sabır ve özveri ile benden yardımını ve samimiyetini esirgemeyen Araş. Gör. Fadime AYDIN KÖSE'ye ve Ecz. Gülçin ARSLAN'a,

Deneyimleri ve önerileri ile rehber ve yardımcı olan değerli hocam Prof.Dr. Metiner TOSUN'a, Yrd.Doç.Dr. Yasemin ERAÇ'a ve Araş.Gör. Çiğdem SELLİ KARAKAYA'ya,

Deneysel çalışmalarımnda laboratuvarlarını açan Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı Başkanlığı'na ve Araş.Gör. Ayşenur YURTMAN'a ve FABAL'daki (Farmasötik Bilimler Araştırma Laboratuvarı) cihazların kullanımına izin veren Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dekanlığına,

Sonsuz sevgi ve fedakârlıklarıyla bana hep destek olan sevgili aileme, candostum Tğm.Emrah AYDOĞAN'a ve Mustafa ÜLGEY'e,

Çalışmalarımıza destek sağlayan Türkiye Bilimler Akademisi'ne ve Loreal Woman In Science Programı'na,

Saygı ve teşekkürlerimi sunuyorum.

İZMİR 07/2010

Ecz. Ahmet Uygur ÖRS

## İÇİNDEKİLER

|                                                                                                                     |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| ÖNSÖZ .....                                                                                                         | I  |
| Tablo Dizini .....                                                                                                  | IV |
| Şekiller Dizini .....                                                                                               | V  |
| Kısaltmalar .....                                                                                                   | VI |
| BÖLÜM I.....                                                                                                        | 1  |
| GİRİŞ VE AMAÇ .....                                                                                                 | 1  |
| 1. GENEL BİLGİLER .....                                                                                             | 3  |
| 1.1. Valosin İçeren Protein (p97/VCP) .....                                                                         | 3  |
| 1.2. Kemik Paget Hastalığı ve Frontotemporal Demans ile Gözlenen İnklüzyon Cismcik Miyopati Hastalığı (IBMPFD)..... | 8  |
| 1.3. Endoplazmik Retikulum İlişkili Yıkım (ERİY) .....                                                              | 15 |
| BÖLÜM II.....                                                                                                       | 19 |
| 2. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....                                                                                          | 19 |
| 2.1. Gereçler .....                                                                                                 | 19 |
| 2.2. Sarf Malzemeleri .....                                                                                         | 20 |
| 2.2.1. Kitler .....                                                                                                 | 20 |
| 2.2.2. Malzemeler.....                                                                                              | 20 |
| 2.3. Kimyasal Maddeler .....                                                                                        | 20 |
| 2.4. Çözeltiler .....                                                                                               | 21 |
| 2.4.1. SDS-PAGE.....                                                                                                | 21 |
| 2.4.2. Western Blot.....                                                                                            | 22 |
| 2.4.3. Bakteri .....                                                                                                | 23 |
| 2.5. Transformasyonda Kullanılacak DH5α Bakterilerinin Hazırlanması .....                                           | 24 |
| 2.6. Yönlendirilmiş Mutajenez .....                                                                                 | 24 |
| 2.6.1. Primerlerin Tasarımı İçin Kullanılan Kriterler .....                                                         | 26 |
| 2.6.2. Primerlerin Belirlenmesi .....                                                                               | 28 |
| 2.6.3. Primerlerin Reaksiyona Hazırlanması.....                                                                     | 30 |
| 2.6.4. Mutajenez Protokolü .....                                                                                    | 31 |
| 2.6.5. Bakteri Transformasyonu.....                                                                                 | 32 |
| 2.6.6. Kolonilerin Seçimi .....                                                                                     | 33 |
| 2.6.7. DNA konsantrasyonlarının belirlenmesi.....                                                                   | 33 |
| 2.7. DNA Dizi Analizi.....                                                                                          | 34 |
| 2.7.1. Örneklerin Hazırlanması .....                                                                                | 34 |
| 2.7.2. Primerler.....                                                                                               | 35 |
| 2.7.3. Yöntem.....                                                                                                  | 35 |
| 2.8. Plazmid DNA'nın Amplifikasyonu .....                                                                           | 35 |
| 2.8.1. Protokol (Midi prep) .....                                                                                   | 36 |
| 2.9. Hücre Kültürü.....                                                                                             | 37 |
| 2.9.1. Hücre hattının seçimi .....                                                                                  | 37 |
| 2.9.2. Pasajlama.....                                                                                               | 38 |
| 2.9.3. Mikoplazma Kontrolü .....                                                                                    | 38 |
| 2.9.4. Hücrelerin stoklanması.....                                                                                  | 39 |
| 2.9.5. Transfeksiyon.....                                                                                           | 40 |
| 2.10. Hücre parçalanması ve protein miktar tayini .....                                                             | 41 |
| 2.10.1. Protein Miktar Tayini .....                                                                                 | 41 |
| 2.11. Protein Analizi .....                                                                                         | 44 |
| 2.11.1. SDS-PAGE .....                                                                                              | 44 |
| 2.11.2. Transfer .....                                                                                              | 46 |

|         |                                                                                                                  |    |
|---------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.11.3. | Membrandaki Proteinlerin Görülmesi ve Bloklama.....                                                              | 47 |
| 2.11.4. | İmmünoblot .....                                                                                                 | 47 |
| 2.12.   | İmmünopresipitasyon (IP) .....                                                                                   | 50 |
| 2.12.1. | Hücrelerin Hazırlanması ve Transfeksiyon .....                                                                   | 50 |
| 2.12.2. | IP için Hücrelerin Parçalanması .....                                                                            | 50 |
| 2.12.3. | IP için Örneklerin Hazırlanması .....                                                                            | 50 |
| 2.12.4. | IP Boncukların Hazırlanması .....                                                                                | 51 |
| 2.12.5. | IP boncukları ile lizatların etkileştirilmesi .....                                                              | 51 |
|         | BÖLÜM III .....                                                                                                  | 53 |
| 3.      | BULGULAR .....                                                                                                   | 53 |
| 3.1.    | Biyoinformatik İnceleme .....                                                                                    | 53 |
| 3.1.1.  | Türler arası sekansların karşılaştırılması.....                                                                  | 53 |
| 3.2.    | SDM ile Elde Edilen Mutasyonların Değerlendirilmesi .....                                                        | 56 |
| 3.2.1.  | Yönlendirilmiş Kontrolü (QuikChange II) .....                                                                    | 56 |
| 3.2.2.  | VCP Mutasyonları ve Kolonilerin Seçimi .....                                                                     | 57 |
| 3.2.3.  | DNA Dizi Analizi Sonuçları .....                                                                                 | 58 |
| 3.3.    | Protein Miktar Tayini için Standart Eğri Çizimi .....                                                            | 60 |
| 3.4.    | Yabancıl tip VCP'nin ve ATPaz inaktif mutant VCP-QQ'nun ekspresyon testi .....                                   | 61 |
| 3.5.    | Mutant VCP kodlayan plazmidlerin ekspresyon testi .....                                                          | 62 |
| 3.6.    | CD3δ üzerine IBMPFD-ilişkili VCP mutantlarının etkisi .....                                                      | 63 |
| 3.7.    | Tirozinaz C89R üzerine IBMPFD-ilişkili VCP mutantlarının etkisi .....                                            | 65 |
| 3.8.    | CFTRΔF508 üzerine IBMPFD-ilişkili VCP mutantlarının etkisi .....                                                 | 66 |
| 3.9.    | IBMPFD-ilişkili VCP mutantlarının Ufd1-Npl4 kofaktörleri ile hücre içerisindeki etkileşmesinin incelenmesi ..... | 67 |
|         | BÖLÜM IV .....                                                                                                   | 72 |
| 4.      | TARTIŞMA VE SONUÇ .....                                                                                          | 72 |
|         | ÖZET.....                                                                                                        | 78 |
|         | ABSTRACT.....                                                                                                    | 80 |
|         | YARARLANILAN KAYNAKLAR.....                                                                                      | 82 |
|         | ÖZGEÇMİŞ .....                                                                                                   | 91 |

## ***Tablo Dizini***

|                                                                                                  |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tablo 1: Bugüne kadar IBMPFD ile ilişkilendirilen VCP Mutasyonları ve Aminoasit Değişimleri..... | 10 |
| Tablo 2: IBMPFD Hastalarında VCP Geninde Belirlenen Mutasyonlar ve Baz Değişimleri.....          | 11 |
| Tablo 3: 4X Protein Yükleme Tamponu İçeriği .....                                                | 22 |
| Tablo 4: Stratagene QuikChange II SDM Kiti İçeriği .....                                         | 25 |
| Tablo 5: Yönlendirilmiş Mutajenez Reaksiyonlarında Kullanılan Primerler .....                    | 30 |
| Tablo 6: QuikChange II SDM kontrol reaksiyonun hazırlanması .....                                | 31 |
| Tablo 7: QuikChange II SDM reaksiyonunun hazırlanması.....                                       | 31 |
| Tablo 8: Yönlendirilmiş Mutajenez PCR Programı.....                                              | 32 |
| Tablo 9: Seçilen Kolonilerden Elde Edilen DNA'ların Konsantrasyonları .....                      | 33 |
| Tablo 10: DNA Dizi Analizi için Örneklerin Hazırlanması .....                                    | 34 |
| Tablo 11: DNA Dizi Analizinde Kullanılan Primerler .....                                         | 35 |
| Tablo 12: PureLink Hipure Plasmid Filter Midiprep Kit İçeriği .....                              | 36 |
| Tablo 13: Plazmid DNA'ların Konsantrasyonu.....                                                  | 37 |
| Tablo 14: EZ-PCR Mikoplazma Kiti İçeriği.....                                                    | 39 |
| Tablo 15: Mikoplazma Kontrolü için kullanılan PCR programı .....                                 | 39 |
| Tablo 16: Transfekte edilen VCP ve Substrat Miktarları .....                                     | 41 |
| Tablo 17: Pierce BCA Protein Tayin Kiti İçeriği.....                                             | 41 |
| Tablo 18: Standart Albümin Çözeltilerinin Hazırlanması .....                                     | 42 |
| Tablo 19: SDS-PAGE Ayırma (Resolving) Jeli Hazırlanması .....                                    | 45 |
| Tablo 20: SDS-PAGE Yığınlama (Stacking) Jeli Hazırlanması.....                                   | 45 |
| Tablo 21: Mutasyon Denemeleri ve Gözlenen Koloni Sayıları .....                                  | 58 |
| Tablo 22: Standart Albümin Çözeltilerine Karşı Okunan Absorbans Değerleri.....                   | 61 |
| Tablo 23: VCP-wt, VCP-QQ ve Kontrol Transfeksiyon Testi Miktarları .....                         | 62 |

## Şekiller Dizini

|                                                                                                                                                        |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 1: VCP proteinin domain yapısı.....                                                                                                              | 4  |
| Şekil 2: VCP Geninin Kromozomda Lokalizasyonu .....                                                                                                    | 9  |
| Şekil 3: IBMPFD ile ilişkilendirilen mutasyonların VCP'de lokalizasyonu.....                                                                           | 11 |
| Şekil 4: VCP'nin çeşitli dokularda görünümü.....                                                                                                       | 12 |
| Şekil 5: Kas hücrelerinde TDP-43 proteininin görünümü. ....                                                                                            | 13 |
| Şekil 6: TDP-43 ile VCP'nin Kolokalizasyonu.....                                                                                                       | 14 |
| Şekil 7: Endoplazmik Retikulum ilişkili yıkım mekanizması.....                                                                                         | 17 |
| Şekil 8: QuikChange II Yönlendirilmiş mutajenez yöntemine genel bakış .....                                                                            | 26 |
| Şekil 9: VCP Geninin Genomik Alanları.....                                                                                                             | 28 |
| Şekil 10: Türler Arası VCP Aminoasit Dizilerinin Karşılaştırılması.....                                                                                | 55 |
| Şekil 11: Yönlendirilmiş Mutajenez Kontrolü.....                                                                                                       | 56 |
| Şekil 12: R159C-3'ün 450. bazdan itibaren DNA dizisi .....                                                                                             | 59 |
| Şekil 13: BSA Standart Doğrusu ve Doğru Denklemi.....                                                                                                  | 61 |
| Şekil 14: VCP yabanıl tip ve VCP-QQ ekspresyon testi .....                                                                                             | 62 |
| Şekil 15: VCP Mutant Ekspresyon Testi. ....                                                                                                            | 63 |
| Şekil 16: wt-VCP ve QQ-VCP'nin CD3δ üzerine etkisinin incelenmesi. ....                                                                                | 64 |
| Şekil 17: IBMPFD-ilişkili mutant VCP'lerin ve QQ-VCP'nin CD3δ üzerine etkisinin incelenmesi.....                                                       | 64 |
| Şekil 18: wt-VCP'nin ve QQ-VCP'nin Tirozinaz C89R üzerine etkisinin incelenmesi.....                                                                   | 65 |
| Şekil 19: Tirozinaz C89R eksprese eden hücelere mutant VCP'lerin transfeksiyonu. ....                                                                  | 66 |
| Şekil 20: CFTRΔ508 eksprese eden hücelere mutant VCP'lerin transfeksiyonu. ....                                                                        | 67 |
| Şekil 21: Input: Ufd1-Npl4 eksprese eden 293 HEK hücrelerine mutant VCP'lerin ve yabanıl tip VCP'nin transfeksiyonu .....                              | 68 |
| Şekil 22: Ufd1-Npl4 eksprese eden hücelere mutant VCP'lerin transfeksiyonunun ardından yapılan immünopresipitasyon .....                               | 68 |
| Şekil 23: IP: Proteazom inhibe edilerek Ufd1-Npl4 eksprese eden hücrelerde mutant R93C, VCP-QQ ve VCP-wt'in transfeksiyonu ile yapılan ön deneme ..... | 69 |
| Şekil 24: IBMPFD ile ilişkili VCP mutantlarının proteazomu inhibe edilen hücrelerde Ufd1-Npl4 ile etkileşimi.....                                      | 70 |
| Şekil 25: IBMPFD ile ilişkili VCP mutantlarının proteazomu inhibe edilen hücrelerde Ufd1-Npl4 ile etkileşimi.....                                      | 71 |

## ***Kısaltmalar***

**AAA:** ATPases associated with diverse cellular activities  
**AAT:**  $\alpha$ -1 Antitripsin  
**ADP:** Adenozin difosfat  
**AKT:** Aktive olan serin-treonin protein kinaz  
**ALS:** Amiyotrofik lateral skleroz  
**ATP:** Adenozin trifosfat  
**bp:** Base pair (baz çifti)  
**BSA:** Bovine serum albumin  
**C2C12:** Mouse myoblast cell line  
**CDC48:** Cell division control protein 48  
**CFTR:** Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator  
**DMAP:** Dimetilaminopiridin  
**DMEM:** Dulbecco's Modified Eagle Medium  
**DNA:** Deoksiribonükleik asit  
**dNTP:** Deoksi nükleotitler  
**ER:** Endoplazmik retikulum  
**ERAD:** Endoplasmic Reticulum-associated degradation  
**ERİY:** Endoplazmik Retikulum ilişkili yıkım  
**FBS:** Fotal bovine serum  
**FPLC:** Fast protein liquid chromatography  
**FTD:** Frontotemporal dementia  
**HDAC6:** Histondeasetilaz 6  
**HEK:** Human embryonic kidney cell line  
**HMG-KoA:** 3-hidroksi-3-metilglutaril Koenzim A  
**HRP:** Horseradish peroxidase  
**IB:** İmmünoblotlama  
**IBM:** Inclusion body myopathy (İnklüzyon vücut miyopati)  
**IBMPFD:** Inclusion body myopathy with Paget disease of bone and frontotemporal dementia  
**IP:** İmmünopresipitasyon  
**JAK-2:** Janus kinase  
**kb:** Kilobaz  
**kDa:** Kilodalton  
**mA:** Miliamper  
**MEM:** Minimum essential medium Eagle  
**NEM:** Maleik asidin imidi  
**NMR:** Nükleer manyetik rezonans  
**Npl4:** Nuclear protein localization protein 4  
**PAGE:** Polyacrylamide Gel Electrophoresis  
**PBS:** Phosphate buffered saline  
**PCR:** Polimeraz chain reaction  
**PI3K:** Fosfoinozit-3-kinaz

**PolyQ80:** Poliglutamin içeren protein  
**PTPH1:** Cytoskeletal protein tyrosine phosphatase  
**PVDF:** Poliviniliden Florür  
**RPM:** Revolutions per minute  
**SDM:** Site-directed mutagenesis  
**SVIP:** Small p97/VCP-interacting protein  
**Tau:** Taurin  
**TDP-43:** TAR binding protein 43  
**TER94:** Transitional endoplasmic reticulum ATPase 94  
**UBX:** Ubikitin düzenleyici X bölgesi  
**Ufd1:** Ubiquitin fusion degradation protein I  
**UPS:** Ubikitin-proteazom sistemi  
**V:** Volt  
**VAT:** VCP-like ATPase  
**VCP:** Valosin-containing protein  
**VIMP:** VCP-interacting membrane protein

## ***BÖLÜM I***

### ***GİRİŞ VE AMAÇ***

Kemik Paget hastalığı ve frontotemporal demans ile gözlenen inklüzyon cisimciği miyopati hastalığı (Inclusion body myopathy with Paget disease of bone and frontotemporal dementia, IBMPFD), otozomal dominant olarak taşınan genetik bir hastalıktır. Hastalık tanısı konulabilmesi için hastalar; kemik Paget hastalığı, frontotemporal demans ve miyopati hastalıklarının belirtilerinden en az ikisini göstermelidir. IBMPFD’li hastaların kas ve beyin dokularında TDP-43 ile birlikte akümüle olmuş ubikitin içeren inklüzyonlar görülmüştür.

IBMPFD hastalarında, 9.kromozomda 9p13-p12’de yer alan valosin-içeren protein (VCP) geninde 12 farklı mutasyon bulunmuştur. VCP, AAA-ATPaz (ATPases Associated with diverse cellular Activities) ailesinin bir üyesi olup; ubikitin bağımlı protein yıkımı, stres yanıtları, programlı hücre ölümü, membran füzyonu, ER (Endoplazmik Retikulum) ve Golgi’nin yeniden yapılanmasında rol alır. VCP, Endoplazmik Retikulum ilişkili yıkım (ERİY) yolağında görev yapan anahtar bir proteindir. ERİY’in retrotranslokasyon basamağında görev yapmaktadır. IBMPFD’de ile ilişkilendirilen mutasyonların; VCP’nin ERİY işlevinde değişiklik veya kaybına bağlı olarak ubikitinlenmiş proteinlerin yıkımında bir hasara neden olduğu düşünülmektedir.

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda, IBMPFD hastalığı ile ilişkilendirilen VCP mutasyonlarının poliubikitinlenmiş proteinlerin düzeylerinde artışa neden olduğu üzerinde durulmuştur. Ancak, yapılan çalışmalar sadece iki VCP mutasyonu (R95 ve R155) üzerinde gerçekleştirilmiş ve ERİY substratı olarak kistik fibröz hastalarında sıklıkla gözlenen kistik fibröz transmembran iletim regülatör (Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein, CFTR) proteininin mutantı olan CFTR $\Delta$ F508 kullanılmıştır. R95G ve R155H mutant VCP'lerin, CFTR $\Delta$ F508 proteinin denge durumunu artırdığı göz önüne alınarak ERİY'i olumsuz etkilediği sonucuna varılmıştır. Ancak sikloheksimid izleme (cycloheximide chase) yöntemi ile yıkım hızındaki değişme gözlenmemiştir (1).

Yaptığımız araştırmalarda 3 farklı ERİY substratı; CD3 $\delta$ , CFTR $\Delta$ F508 ve Tirozinaz C89R kullanarak, 12 farklı VCP mutasyonunun ERİY üzerine etkileri incelenmek istenmiştir. Ayrıca bu mutantların, VCP kofaktörleri Npl4 ve Ufd1 proteinleri ile etkileşimleri test edilmiştir.

## 1. GENEL BİLGİLER

### 1.1. Valosin İçeren Protein (p97/VCP)

p97/VCP (Valosin-containing Protein), çeşitli hücresel işlemlerde görev alan tip II AAA (ATPases associated with a variety of activities) ATPaz süperfamilyasının bir üyesidir. AAA ATPaz süperenzim ailesi iki AAA bölgesi içerir, hekzamer yapısı oluşturarak ATP'den elde ettiği enerji ile farklı hücresel işlevlerde rol alır.

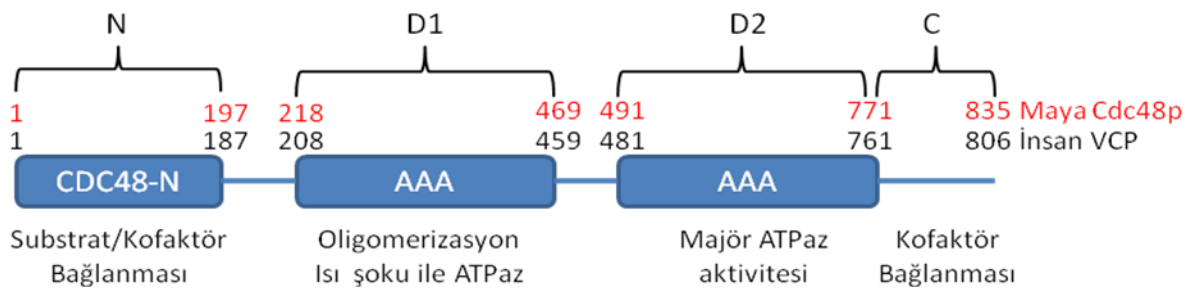
VCP, farklı türler arasında yüksek homoloji gösterir. DNA dizi analizi sonuçlarına göre, VCP geni mayadan insana %69 oranında korunmuştur. Benzerliği yüksek olan DNA dizilerinin AAA bölgesi ile ilgili olduğu bulunmuştur (2). Memelilerde p97/VCP adıyla bilinen gen ürününün; *Archaeobacteria*'da VAT (VCP-like ATPase), *Drosophila melanogaster*'da TER94 (Transitional endoplasmic reticulum ATPase), *Saccharomyces cerevisiae*'da CDC48 (Cell division control protein 48), *Xenopus*'da p97 adlı homologları bulunmaktadır (2-6).

VCP, 806 aminoasitten oluşur, molekül ağırlığı 97 kDa'dır (7). Hesaplanmış izoelektrik noktası 5.14'dür (NCBI, AAI21795). VCP, hücrede sitozolde bol miktarda bulunan ve hücre için gerekli olan bir proteindir. Toplam hücresel proteinlerin %1'den fazlasını VCP oluşturur. VCP, birçok farklı fonksiyonu ile araştırmacıların farklı alanlarda ilgisini çekmektedir (7).

VCP'nin birbiriyle ilişkisiz görülen bir çok hücresel süreçte rolü vardır. Bu aktiviteler; organel biyogenez, programlı hücre ölümü, çekirdeğin yeniden oluşumu ve paketlenmesi, Golgi ve ER membranı füzyonu ve onarımı, transkripsiyon faktörü aktivasyonu, DNA onarımı, hücre döngüsünün düzenlenmesi, B ve T hücrelerinin

uyarılması, ER ilişkili protein yıkımıdır (8). VCP'nin tüm bu aktiviteleri doğrudan ya da dolaylı olarak ubiquitin-proteazom sistemi tarafından düzenlenmektedir.

VCP molekülünü, N terminali (1-187), D1 bölgesi (209-460), D2 bölgesi (481-761), C terminali (762-806), N-D1 bağlayıcı L1 bölgesi (188-208) ve D1-D2 bağlayıcı L2 bölgesi (461-480) oluşturur (9-10) (**Şekil 1**). Hem D1 hem de D2 bölgeleri, Walker A ve B motifleri içerir ki bu motif ATP bağlanması ve hidrolizi için gereklidir. Kristalografi ve biyokimyasal çalışmalar sonucunda, VCP'nin oligomerizasyonundan sorumlu bölgesinin D1 bölgesi olduğu gösterilmiştir (11, 10). D1 ve D2'nin  $\alpha/\beta$  katlanmalarının benzer olduğu fakat heliks yapısının son derece farklı olduğu gözlenmiştir. N-terminal bölgesinin oldukça esnek olması ve C-terminalinin büyük ölçüde düzensiz olması nedeniyle hem N hem de C terminalinin elektron mikroskopisi ve kristalografi ile gösterilmesi zordur. Buna karşın, X-ışını kristalografi çalışmaları ile ADP bağlanan N-D1 bölgesi hakkında çeşitli bilgiler ortaya konulmuştur (10).



**Şekil 1: VCP proteininin domain yapısı**

VCP'de N-terminalinin p47 ve Ufd1-Npl4 kompleksi gibi kofaktör ve adaptör proteinlerin bağlandığı yer olduğu gösterilmiştir (12). p47 ve Ufd1-Npl4 kompleksi

ve bazı diğerkofaktörlerin birbirini dışlayıcı bir şekilde VCP'ye bağlandığı gösterilmiş, bunların N bölgesinin aynı alanı ile etkileştiğı düşünölmektedir.

*In vivo* ve *in vitro* çalışmalar, VCP'nin biyolojik işlevlerini gösterebilmesi için ATPaz aktivitesine gereksinimi olduğuna işaret etmektedir. Diğerk AAA proteinleri gibi, VCP'nin de enzimatik aktivitesini gösterebilmesi için magnezyum iyonuna ihtiyacı vardır ve bu aktivite maleik asit imidi (NEM) tarafından inhibe edilir (6, 13). VCP'nin ATPaz etkisinden D2 bölgesinin birincil derecede sorumlu olduğugösterilmiştir. Diğerk moleküler şaperon proteinleri gibi VCP'nin ATPaz aktivitesi de yüksek ısı, pH, tuz konsantrasyonu, alkol, ADP ve oksidan ajanlar gibi çeşitli etkenlerden etkilenmektedir. Yabanıl tip VCP, sıcaklık 50-55°C civarında iken ısıyla artan ATPaz aktivitesi göstermektedir. D1 bölgesi mutasyona uğratıldığında ısıyla artan ATPaz aktivitesi ortadan kalkmaktadır. Buna karşın, D2 bölgesi mutasyona uğratıldığında, 37°C'de düşük aktivite gösterirken; sıcaklık 50°C'nin üzerine çıktığı zaman artan aktivite göstermektedir (13). Bu da D2'nin majör ATPaz aktivitesinden sorumlu olduğunu, D1'in ise ısıya bağımlı artan aktiviteden sorumlu olduğunu göstermektedir.

VCP molekülünün C terminal uzantısının (762-806) rezidülerinin yapısal ve işlevsel olarak tarifi çok daha zordur (11). C alanının en önemli özelliklerinden biri, esnek asidik rezidülerin varlığıdır. Bu yapı aynı zamanda majör tirozin fosforilasyon bölgesini (Tyr805) içerir (14). Lavoie ve arkadaşları membranla birleşik JAK-2 (Janus kinase) ve PTPH1 (Cytoskeletal protein tyrosine phosphatase) gibi kinaz ve fosfatazın VCP ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Tirozinin defosforilasyonunun; VCP ile ER membranı arasındaki ilişkiyi sağlamlaştırdığı, dolayısı ile transisyonel ER oluşumunu desteklediğini göstermişlerdir (15). Ayrıca, VCP, aktive olan serin-

treonin protein kinaz (AKT) tarafından fosforillenir. VCP'nin fosforillenmesi, işlev gösterebilmesi için gereklidir (16-17). AKT ise fosfolipid bağlanması ve fosfoinozitol-3-kinaz (PI3K) sinyal yolu üzerinden fosforlanması ile uyarılır (18). AKT tarafından fosforillenen lipid bağlayıcı bölüm VCP'nin hücre membranına yönlendirilmesine neden olmaktadır (19).

VCP'nin farklı işlevleri; hücre içi etkileştiği proteinler (p47, gp78, Npl4-Ufd1, VIMP, SVIP gibi) ile düzenlenir (20-21). p47, ubiquitin düzenleyici X (UBX) bölgesi taşımakta olup ER ve Golgi aparatının biyogenezinde ve onarımında rol alır. VCP'nin N terminaline bağlanır, komşu membranların birleşme mekanizmasında şaperon benzeri görev alır (22, 15). UBX, ubiquitin düzenleyici proteinlerin C-terminalinde bulunur ve genellikle CDC48 (N) bölgesi ile etkileşme birimidir (23). p47-VCP kompleksinin işlevi, p47'nin hücre bölünme döngüsünde AKT ile fosforilasyonuna bağlıdır (24-25).

VCP'nin, ER membranında bulunan bir ubiquitin ligaz (E3) olan gp78'in sitozolik kuyruğu ile etkileştiği bilinmektedir. gp78-VCP etkileşmesi; poliubikitinlenmiş CD3δ, apolipoprotein B100 ve hidroksimetilglutaril-KoA redüktazın (HMG-KoA Redüktaz'ın) ERİY'de yıkımı sırasında, VCP'nin sayılan ERİY substratlarına bağlanmasını güçlendirmektedir (26). Böylelikle, substratların ubiquitinasyonu ile retrotranslokasyonu birbirine kenetlenmektedir.

Npl4-Ufd1-VCP kompleksi, çekirdeğin yeniden yapılanmasında ve hedef proteinlerin ubiquitin-proteazom sistemine yönlendirilmesinde görev yapar (27-28). Bu sitozolik kompleks, VCP'nin ER membranı üzerinde Derlin-1, VIMP (VCP-interacting membrane protein) ve diğer kompleksler ile etkileşimini artırır (29-31). *Xenopus* yumurtalarında Cdc48/p97 ve adaptörleri Ufd1-Npl4'ün; mikrotübül

dinamiklerinin modülasyonunu ve mitozun sonundaki yığılmayı düzenleyerek iğ ipliklerinin oluşumunu düzenlediği gösterilmiştir. p97'nin maya homologu Cdc48'in genetik analizi ile mitotik yolağın yerine getirilmesinden sonra mitotik iğ iplerinin oluşumu için Cdc48'in gerekli olduğu bulunmuştur. Cdc48/p97-Ufd1-Npl4 iğ ipliği oluşum faktörlerine direk bağlanmakta ve mikrotübüllerle etkileşmesini düzenlemektedir (32). Dolayısıyla VCP-Ufd1-Npl4 kompleksinin ERİY dışında gösterilen en önemli işlevi mitoz sonrası mikrotübül oluşumunun düzenlenmesidir.

SVIP (small p97/VCP-interacting protein), mikrozomal membran üzerinde bulunur. gp78'e benzer şekilde p97/VCP ve Derlin-1 ile etkileşir. SVIP, p97/VCP-gp78-derlin1 kompleksini inhibe ederek ERİY'de düzenleyici rol gösterir (21).

VCP'nin ayrıca agrezomun oluşumunda gerekli olduğu gösterilmiştir (33-35). Agrezomlar, mikrotübüle bağlı hücrel yapılardır; yanlış katlanmış ve agregre olmuş proteinleri tutarlar. Agrezomlar; bu proteinlerin, otofajik yıkımı için gerekli mekanizmaya sahiptirler. VCP, tercihi olarak agregre olmaya eğilimli poliglutamin içeren proteinlerin agregasyonu ile ilişkilidir (36). Histondeasetilaz 6 (HDAC6) bir agrezom proteini olup, ubikitinlenmiş proteinlere ve VCP'ye bağlanır. HDAC6, otofaji üzerinden yıkılan yanlış katlanmış proteinlerin ubikitin-proteazom sisteminde yıkılmadan agrezoma geçişini düzenler (37).

VCP'nin ubikitin içeren nükleer cisimcikler ile serebral kortekste lokalize olduğu birden fazla nöronal dejeneratif hastalıkta gözlenmiştir. Bunlara örnek olarak Huntington, Alzheimer, Creutzfeldt-Jakob ve Parkinson hastalığı verilebilir (38). Kimonis ve arkadaşlarının 2008 yılında yayınladıkları bir çalışmada, VCP hastalıklarının %30'unda miyopati, %28'inde miyopati ve kemik Paget hastalığı,

%20'sinde miyopati ve frontotemporal demans, %12'sinde ise miyopati, kemik Paget hastalığı ve frontotemporal demans fenotiplerinin gözleendiği bildirilmiştir (39).

## **1.2. Kemik Paget Hastalığı ve Frontotemporal Demans ile Gözlenen İnküzyon Cisimcik Miyopati Hastalığı (IBMPFD)**

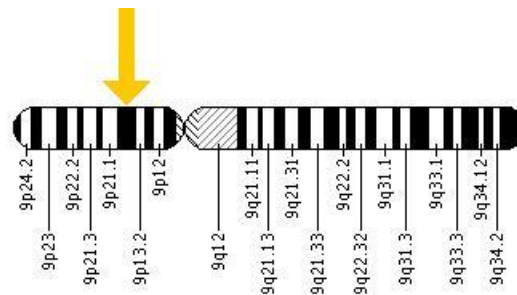
İnküzyon cisimcik miyopatileri (IBMs); genetik ve düzensiz olarak ortaya çıkan, kaslarda şekilsiz vakuollerle ve sitoplazmik agregatlar ile karakterize olup, kas güçsüzlüğüne yol açan bir hastalıktır (40). Sitoplazmik agregatlar; Alzheimer hastalarının beyinlerinde biriken proteinlere benzer şekilde ubiquitin,  $\beta$ -amiloid, apolipoprotein E ve fosforillenmiş taurin içerirler (41).

Genetik IBM'lerden bir tanesi, kemik Paget hastalığı ve frontotemporal demans ile gözlenen inküzyon cisimcik miyopati hastalığı (Inclusion Body Myopathy with Paget's Disease of the Bone and Frontotemporal Dementia, IBMPFD)'dır. Otozomal dominant bir hastalık olan IBMPFD, 9. Kromozomun 9p21.1-p12 bölgesinde haritalanmıştır. Bu bölge genler açısından yoğun olup, IBMPFD dışında IBM2 ve nemalin miyopati gibi iki farklı miyopati de dahil birçok bozukluğun gözleendiği bir çoklu hastalık lokusudur.

IBMPFD tanısı koyabilmek için, bireyde miyopati oluşumu, kemik Paget hastalığı ve frontotemporal demans belirtilerinden iki ya da daha fazlası izlenmelidir (42). IBMPFD hastalarında Paget hastalığının ortaya çıkışı 50'li yaşlardan önce gözlenir. Kemik Paget hastalığı, anormal ve aşırı aktif osteoklastlar nedeniyle kemik kalınlaşması ile belirgindir. En sık karşılaşılan şikayetler bel kemiği, kalça ve kafatası ağrılarıdır. Frontotemporal demans ise, IBMPFD hastalarında ortalama 55 yaşlarında ortaya çıkar. Davranış ve yönetim ile ilgili bulanıklıklara, frontal lobda gözlenen değişimler neden olur (43).

Hastalarda üç önemli fenotipik özellik görülür (44): 1) Aynı yaş ortalamasındaki hastaların %90'ında 45 yaşının başlarında kas zayıflığına bağlı sakatlıkların, 2) Kemik Paget hastalığı ile birlikte ilerleyen hastaların %51'inde osteolitik lezyonların, 3) Hastaların %32'sinde 54 yaşının başlarında konuşma ve davranış bozukluğu ile karakterize olan tipik frontotemporal dejenerasyon (FTD) gelişimidir (38). Diğer rapor edilen fenotipik bozukluklar, kardiyomiyopati, hepatik fibröz, katarakt, duysal motor aksonal nöropati şeklinde sıralanabilir (45-47). Hastalığın gelişimi ile hastalar yıllar içinde destekleyici aparatlara ve tekerlekli sandalyeye ihtiyaç duyar. Hastaların bir çoğu solunum ve kalp yetmezliğine bağlı ya da bunama nedeniyle gelişen fiziksel komplikasyonlarına bağlı olarak hayatını kaybeder (48-49).

IBMPFD hastalığının, 9. Kromozomda 9p13-p12 lokalize olan VCP genindeki mutasyonlara bağlı olduğu ilk kez 2004 yılında gösterilmiştir (50) (**Şekil 2**). Bugüne kadar IBMPFD hastalığı ile ilişkilendirilen 12 farklı aminoasit üzerinde VCP mutasyonu olduğu rapor edilmiştir (**Tablo 1**). Bu aminoasitler; R93, R95, P137, R155, G157, R159, R191, L198, A232, T262, N387 ve A439'dir (51, 39, 52).



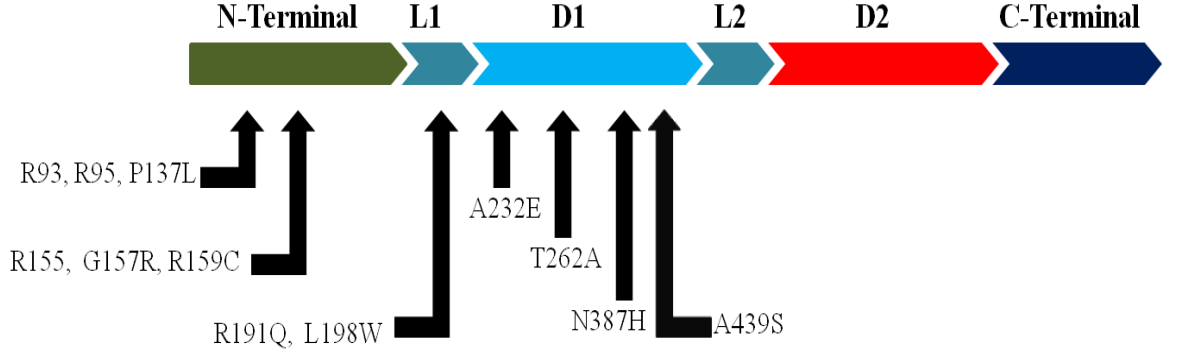
**Şekil 2: VCP Geninin Kromozomda Lokalizasyonu**  
(<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/VCP>)

| <b>Frontotemporal Demans ve Paget Hastalığı ile ilişkilendirilen VCP Mutasyonları</b> |                          |                                    |
|---------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|------------------------------------|
| <b>Mutasyon ve Konumu</b>                                                             | <b>wt'daki Aminoasit</b> | <b>mt'daki Dönüştüğü Aminoasit</b> |
| R93C                                                                                  | Arginin                  | Sistein                            |
| R95G                                                                                  | Arginin                  | Glisin                             |
| R95C                                                                                  | Arginin                  | Sistein                            |
| R155H                                                                                 | Arginin                  | Histidin                           |
| R155C                                                                                 | Arginin                  | Sistein                            |
| R155P                                                                                 | Arginin                  | Prolin                             |
| R155S                                                                                 | Arginin                  | Serin                              |
| G157R                                                                                 | Glisin                   | Arginin                            |
| P137L                                                                                 | Prolin                   | Lösin                              |
| R159H                                                                                 | Arginin                  | Histidin                           |
| R159C                                                                                 | Arginin                  | Sistein                            |
| R191Q                                                                                 | Arginin                  | Glutamin                           |
| L198W                                                                                 | Lösin                    | Triptofan                          |
| A232E                                                                                 | Alanin                   | Glutamik asit                      |
| T262A                                                                                 | Tireonin                 | Alanin                             |
| N387H                                                                                 | Asparagin                | Histidin                           |
| A439S                                                                                 | Alanin                   | Serin                              |

**Tablo 1: Bugüne kadar IBMPFD ile ilişkilendirilen VCP Mutasyonları ve Aminoasit Değişimleri**

Mutasyonlardan;

- R93C, R95C, R95G, P137L, R155C, R155H, R155P, R155S, G157R, R159C ve R159H VCP'nin N-terminalinde;
- R191Q ve L198W, N ve D1 bölgelerini bağlayan bölgede (L1);
- A232E, T262A, N387H ve A439S, D1 bölgesinde bulunur (**Şekil 3**) (51-54).



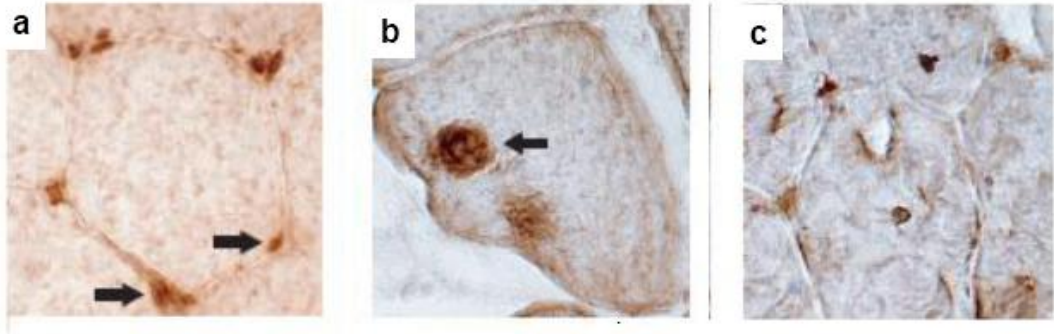
**Şekil 3: IBMPFD ile ilişkilendirilen mutasyonların VCP’de lokalizasyonu (51-54)**

| IBMPFD Hastalarında Belirlenen VCP Mutasyonları |              |       |               |             |                 |
|-------------------------------------------------|--------------|-------|---------------|-------------|-----------------|
| Aminoasit                                       | Baz Değişimi | Ekzon | Bölge         | Aile Sayısı | Referans        |
| R93C                                            | 277C>T       | 3     | CDC48         | 4           | (55-56, 50)     |
| R95G                                            | 283C>G       | 3     | CDC48         | 2           | (57)            |
| R95C                                            | 283C>T       | 3     | CDC48         | 1           | (39)            |
| P137L                                           | 410C>T       | 4     | CDC48         | 1           | (52)            |
| R155C                                           | 463C>T       | 5     | CDC48         | 5           | (57-59, 56, 50) |
| R155H                                           | 464G>A       | 5     | CDC48         | 8           | (57, 56)        |
| R155P                                           | 464G>C       | 5     | CDC48         | 1           | (57)            |
| R155S                                           | 463C>A       | 5     | CDC48         | 2           | (52)            |
| G157R                                           | 469G>C       | 5     | CDC48         | 2           | (51)            |
| R159H                                           | 476G>A       | 5     | CDC48         | 2           | (60)            |
| R159C                                           | 476G>A       | 5     | CDC48         | 2           | (61)            |
| R191Q                                           | 572G>A       | 5     | L1            | 1           | (57)            |
| L198W                                           | 593T>G       | 6     | L1            | 1           | (45)            |
| A232E                                           | 695C>A       | 6     | L1-D1 Kavşağı | 1           | (57)            |
| T262A                                           | açıklanmamış | 7     | D1            | 1           | (39)            |
| N387H                                           | 1159A>C      | 10    | D1            | 1           | (45)            |
| A439S                                           | 1315G>T      | 11    | D1            | 4           | (52)            |

**Tablo 2: IBMPFD Hastalarında VCP Geninde Belirlenen Mutasyonlar ve Baz Değişimleri**

VCP’deki bu mutasyonların, VCP’nin hekzamer oluşturmasını engellemediği ve ATPaz aktivitesini değiştirmediği gösterilmiştir (1). IBMPFD’li hastalarda mutasyonların VCP’nin işlevini değiştirerek ya da kayba uğratarak, ubiquitin-proteazom sisteminde ubiquitinle konjuge proteinlerin birikimine neden olduğu, hücrenin hayatta kalmasını zorlaştıran ER stresini indüklediği düşünülmektedir (62, 50).

IBMPFD ile enfekte olmuş dokuların sitoplazmik ve intranükleer bölümlerine belirgin ubikitinlenmiş inklüzyonlar belirlenmiştir (63, 47, 60). Normal kontrol hastalarından alınan kaslarda poliklonal antikorlarla yapılan immünohistokimya çalışmalarında VCP'nin büyük ölçüde endomizial (endomizyum, kas içindeki bağ tabakalarının oluşturduğu yapı) kapillerde olduğu gözlenmiştir (**Şekil 4a, sağ ok**). Kas liflerinde ise VCP birikimi periferde lipofusin granüllerinde (**Şekil 4a, sol ok**) ve daha difüze olarak küçük miktarlarda sitoplazmada gözlenmiştir. IBMPFD'li hasta kasında ise kas liflerinde büyük fokal inklüzyonların (**Şekil 4b, ok**) VCP içerdiği belirlenmiştir. Bir başka örnekte ise kas liflerinde birden fazla küçük lokus gözlenmiştir (**Şekil 4c**) (50).



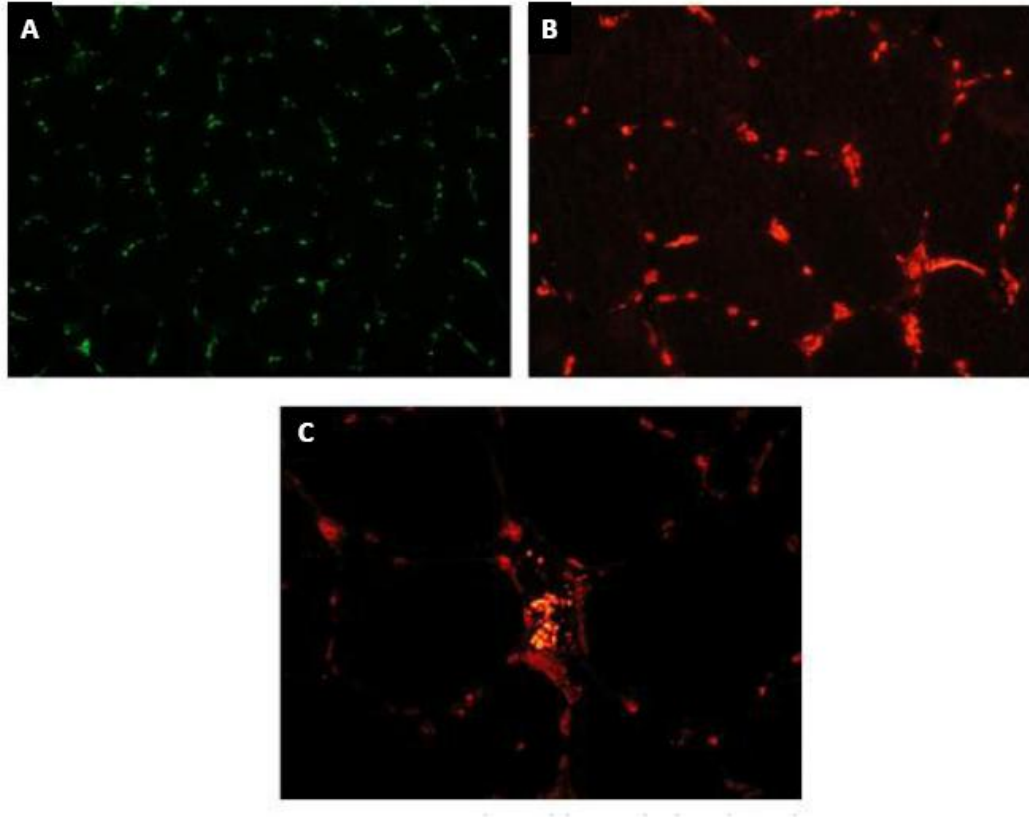
**Şekil 4: VCP'nin çeşitli dokularda görünümü.**

a) Normal Endomizial kapillerde (sağ ok) ve Kas liflerinde periferde lipofusin granüllerinde görünüşü (Sol ok) b) IBMPFD'li Kas liflerinde büyük fokal inklüzyonların VCP içermesi (ok) c) IBMPFD'li Kas liflerinden birden fazla lokus halinde görünümü (50).

IBMPFD nöropatolojisi, distrofik sinir hücrelerinin oluşturduğu akson benzeri sitoplazmik uzantılar (nöritler), bol miktarda ubikitin pozitif nöronal intranükleer inklüzyonlar ve nadir rastlanan intrasitoplazmik inklüzyonlar ile karakterizedir. TAR DNA binding protein 43 (TDP-43), ubikitinlenmiş bu inklüzyonlarda tanımlanan majör proteindir (64). TDP-43, bir çekirdek proteini olup, ekzon atlanmasında ve transkripsiyonun düzenlenmesinde görev alır (65). Frontotemporal demans ve ALS

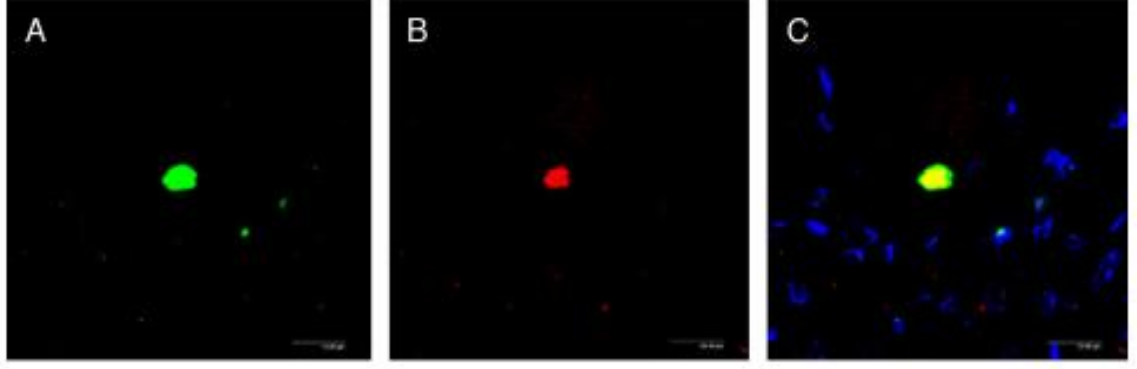
(Amiyotrofik lateral skleroz) hastalarının beyin dokularında ubikitinle biriken TDP-43 inklüzyonlarına rastlanmıştır (64).

IBMPFD’li 6 hastanın kasları incelendiğinde, hepsinde belirgin ubikitinle lokalize olan TDP-43 inklüzyonlarına rastlanmıştır (66). Inklüzyonların, ağırlıklı subsarkolemmal ve sarkoplazmik olduğu görülmüştür. VCP mutasyonları nedeniyle oluşan ubikitin inklüzyonlarının majör komponentinin TDP-43 olduğu bulunmuştur. Mutasyonların VCP’nin fonksiyonunu bozarak TDP-43 proteinopatisinin oluşmasına zemin hazırladığı önerilmiştir (44). Kontrol kas hücrelerinde TDP-43 çekirdekte bulunurken (**Şekil 5A, 5B**), IBMPFD’li kasın birçok kas lifinde sitoplazmada (**Şekil 5C**) gözlenmektedir. Ayrıca, IBMPFD’li kas hücrelerinde bulunan TDP-43 içeren inklüzyonlar VCP ile kolokalize durumdadır (**Şekil 6**)(67).



**Şekil 5:Kas hücrelerinde TDP-43 proteininin görünümü.**

(A) ve (B) Kontrol kas hücrelerinde TDP-43’ün nükleusta görünümü (C) IBMPFD’li kasta TDP-43’ün sitoplazmada görünümü (67)



**Şekil 6: TDP-43 ile VCP'nin Kolokalizasyonu (67)**

Daha önce belirtildiği üzere, IBMPFD'li hastaların kas ve beyin dokusunda sitoplazmik ve nükleer agregatların (protein birikim ürünleri) birikimi gözlenmektedir (60, 50). VCP mutant proteinini eksprese eden hücrelerle yapılan çalışmada, agrege olmaya eğilimli poliglutamin içeren protein (polyQ80)'in yıkımının başarısızlığa uğradığı gösterilmiştir. PolyQ80 inklüzyonları, çok sayıda ve çözünmeyen agregatlar halinde akümüle olmuşlardır. Bu birikmeye, protein agregatlarının agrezoma geçişi sırasında bir aksaklığın neden olduğu önerilmiştir (33). Agrezomlar, yanlış katlanmış ve agregat oluşturmuş proteinlerin biriktirildiği mikrotübüle bağlı yapılar olup protein agregatlarının otofajik yıkım mekanizması için gereklidir (68). IBMPFD ilişkili mutant VCP proteinleri eksprese eden hücrelerde ve hayvanlarda; nondejeneratif otofagozomların akümüasyonu, vakuollerin birleşmesi ve agregat halindeki proteinlerin yıkımının engellediği gözlenmiştir. Otofajik inhibisyon olduğunda TDP-43'ün, IBMPFD mutant eksprese eden hücrelerde olduğu gibi sitozolda akümüle olduğu bulunmuştur. Bu veriler ışığında, VCP'nin otofajide de işlevi olduğu ve dolayısıyla IBMPFD kasının patolojisinde VCP'deki mutasyonlar sonucu bozulan otofajinin de işlevi olduğu önerilmektedir (69). Bir diğer çalışmada IBMPFD'de bozulan otofagozom olgunlaşmasının, ubikitin konjugatlarının akümüasyonuna ve ubikitin pozitif

vakuollerin oluşmasına neden olduğu gösterilmiştir. Otofaji tarafından ubiquitinlenmiş proteinlerin temizlenmesi için VCP'nin gerekli olduğu belirtilmiştir (70).

Nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopisi kullanılarak, IBMPFD'li R93, R95 ve R155 rezidülerini içeren mutantlarının, ERİY'de VCP'nin Npl4 proteinine bağlandığı bölgede konumlandığı gösterilmiştir (28). Isaacson ve arkadaşları, 2007 yılında NMR çalışmalarıyla VCP üzerinde Npl4'ün bağlandığı yapısal yeri gösterip, Npl4 bağlanan bölgedeki aminoasitlerin bazılarının IBMPFD'de mutasyona uğradığını (R93, R95 ve R155), bu nedenle Ufd1-Npl4 kompleksinin VCP'ye bağlanması sırasında bir inhibisyon ya da bir farklılaşma ile ERİY'de fonksiyon bozukluğuna neden olabileceğini önermişlerdir (71).

C2C12 fare miyoblast hücrelerine R155H ve R95G mutantları transfekte edilen hücreler yabancı tip hücreler ile karşılaştırıldığında; mutant eksprese eden hücrelerde ubiquitinlenmiş proteinlerin, ATPaz etkinliği ortadan kaldırılan VCP-QQ mutantına benzer şekilde arttırdığı görülmüştür. Bir ERİY substratı olan CFTR $\Delta$ F508 proteinin steady state (denge) düzeyinin artması, ubiquitinlenmiş proteinlerin arttığı olgusunu desteklemektedir (1).

### **1.3. Endoplazmik Retikulum İlişkili Yıkım (ERİY)**

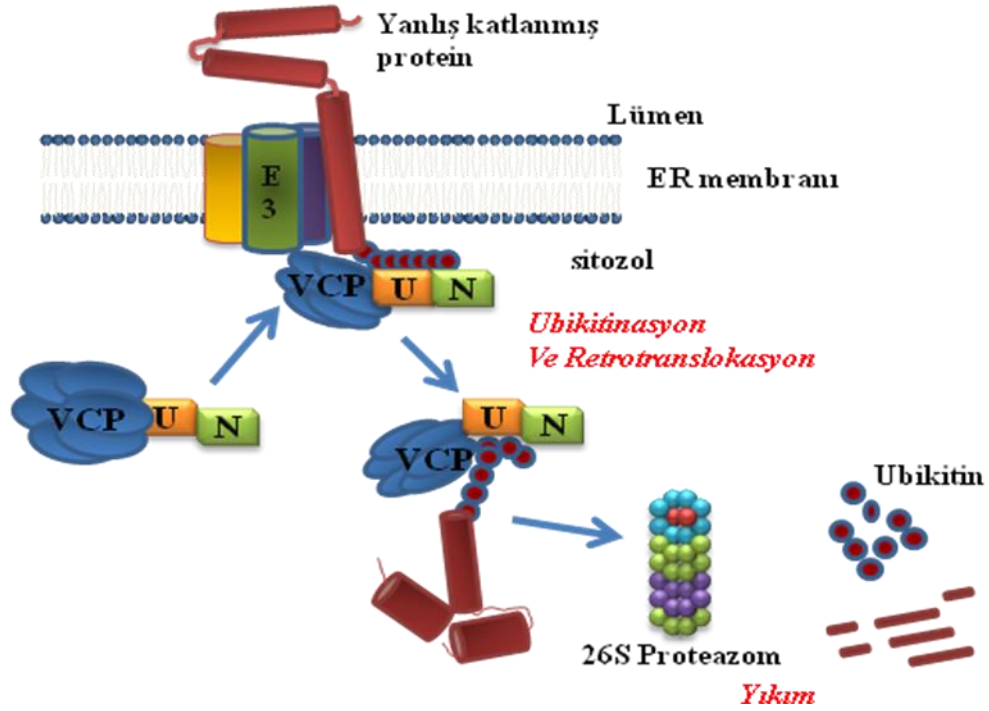
Proteinlerin katlanması karmaşık ve hataya eğilimli bir süreçtir. Genetik mutasyonlar, viral enfeksiyonlar, sıcaklık şoku ve oksidatif stres gibi diğer hücresel değişiklikler; hem yeni sentezlenmiş hem de daha önce sentezlenen proteinlerin yanlış katlanmasına neden olurlar. Proteinlerin yanlış katlanması; kistik fibröz,  $\alpha$ -1-antitripsin yetmezliği ve protein birikmesi ile ilişkili Huntington, Parkinson, Alzheimer, IBMPFD gibi hastalıklara neden olabilir (72).

Endoplazmik Retikulum, salgılayıcı yolağın ilk bölümüdür (73-74). Proteinlerin işlev gösterebilmesi için doğru katlanması ve modifiye edilmesi, lümene translokasyonu ya da ER membranına eklenmesi gerekir. Tüm bu süreçler salgılayıcı yolak tarafından yönetilir (73-74). Eğer bu yolakta hata olursa, yanlış katlanmış ürünlerin ortaya çıkmasına neden olur. Yanlış katlanmış proteinler ER’de alıkonularak, protein kalite kontrol mekanizması olarak bilinen ERİY (Endoplasmic Reticulum associated Degradation, ERAD) ile ortadan kaldırılır (23).

ER’de birbirinden bağımsız iki kalite kontrol mekanizması vardır: 1) Çeşitli ER şaperonları ve katlanma enzimleri ile proteinlerin katlanmasına tekrar tekrar çalışılması 2) ERİY ile yanlış katlanmış ya da katlanmamış proteinlerin ER’den sitoplazmaya retrotranslokasyonu ile ubikitin-proteazom sisteminde yıkılmasıdır (75-78).

ERİY; yanlış katlanan proteinlerin tanınması, poliubikitinasyonu, sitozole taşınması ve proteazomal yıkım basamaklarından oluşur (**Şekil 7**). Ubikitin, 76 aminoasitten oluşan bir peptittir. Substratlarının yüzeylerinde bulunan lizin rezidülerinin  $\epsilon$ -amino grupları ile izopeptit bağı ile kovalent olarak ubikitinasyon adı verilen reaksiyon ile bağlanır. Ubikitin proteini, yapısında 7 lizin rezidüsü içerir. Proteazom aracılı yıkım için belirleyici özellik, ubikitinin 48.lizini üzerinden gerçekleşen ubikitin zincirinin uzamasıdır. Yıkım için en az dört ubikitin zincirine gereksinim vardır. Poliubikitinlenmiş substrat, 26S proteazoma hedeflenebilir ve yıkılabilir (23).

Ubikitinasyon, 3 enzimin birlikte çalışması ile gerçekleşir. Ubikitin aktifleyici enzim E1, ubikitin konjuge edici enzim E2 ve ubikitin ligaz E3. Ubikitin ligazlar (E3’ler) substratlara spesifik olarak ubikitinasyonu sağlar.



**Şekil 7: Endoplazmik Retikulum ilişkili yıkım mekanizması.** Hatalı proteinler, farklı kalite kontrol mekanizmaları tarafından ER lümeninde tanılır. Sitoplazmik lizin rezidüleri ubiquitin ligazlar ile ubiquitinlenir. VCP-Ufd1-Npl4 kompleksi yardımıyla dislokale olur ve proteazoma iletilir (Araş. Gör. Fadime AYDIN KÖSE tarafından şema haline getirilmiştir).

26S proteozomda yıkılması için ubiquitinlenmiş ER-ilişkili proteinlerin ER'dan sitoplazmaya retrotranslokasyonu, sitoplazmik ATPaz kompleksine gereksinim duyar. Bu kompleksi, bir AAA-ATPaz olan p97/VCP ve kofaktörleri Ufd1 ve Npl4 oluşturur (79-81). Ufd1 ve Npl4 heterodimer yapı oluşturur. ER membranında p97'nin ubiquitinlenmiş proteinlerle etkileşmesine ve p97/VCP'nin ubiquitinlenmiş moleküle afinitesinin artırılmasına yardım eder. p97/VCP, E3 ligazlarla da etkileşir, bu etkileşme hedeflenen substratın ubiquitinasyonunu artırır (82). p97/VCP, ER-membranına bağlı birden fazla protein ile etkileşir: p97/VCP-interacting membran proteini (VIMP), Derlin-1, Derlin-2, gp78, SVIP ve ERİY E3 Hrd1 (83). gp78-VCP etkileşmesi; poliubikitinlenmiş CD3δ, apolipoprotein B100 ve hidroksimetilglutaril-KoA redüktazın ERİY'de VCP'ye bağlanmasını artırmakta ve bu substratların

ubikitinasyonu ile retrotranslokasyonunu kenetleyip ubikitin-proteazom sisteminde yıkılmasını sağlamaktadır (26).

Sadece yanlış katlanmış proteinler ERİY'in substratları değildir. ERİY, kolesterol biyosentezinde (mevalonat yolağında) anahtar enzim olan 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim-A redüktazın (HMG-KoA Redüktaz, HMGR) yıkılarak düzenlenmesinde de rol alır (84).

ERİY sürecindeki bozukluklar çeşitli hastalıkların ortaya çıkmasında rol oynar. Bu hastalıklar iki grupta incelenebilir. Birinci grup hastalıkları, ERİY'in bileşenlerinde meydana gelen mutasyonlar nedeniyle fonksiyon kaybına bağlı olarak anormal proteinlerin hücrelerde birikmesi ve hasara neden olması oluşturur. Bu grup hastalıkların başında Parkinson hastalığı gelir. Parkinson hastalığı, Parkin mutasyonları ile ilişkili nörodejeneratif bir hastalıktır (85). Parkin, PARK2 geni tarafından kodlanan bir ubikitin ligazdır (86). Parkin geninde mutasyon sonucu oluşan anormal küçük protein işlev gösteremez ve hızlıca UPS'de yıkılır. Bu grup hastalıklara IBMPFD ve Alzheimer hastalığı da örnek verilebilir.

İkinci grup hastalıklara, salgı ya da membran proteinlerinin vaktinden önce yıkımı neden olur. Kistik fibrözde olduğu gibi, aslında işlevsel olan mutant proteinlerin görev yerine ulaşip çalışmasına engel olurlar. Kistik fibröz hastalığına neden olan CFTR $\Delta$ F508 mutasyonu, CFTR'ın katlanmasını geciktirir, sonuç olarak mutant CFTR $\Delta$ F508 ERİY tarafından substrat olarak belirlenir ve yıkılır. Bu mutasyonun, CFTR proteininin klor kanalı işlevini bozmadığı ve mutant proteinin görevini yapabildiği bilinmektedir (87). ERİY'deki bozuklukların neden olduğu diğer hastalıklara;  $\alpha$ -1 Antitripsin (ATT) yetmezliği, diyabet, Huntington hastalıkları, viral hastalıklar ve albinizm sayılabilir (88-91).

## ***BÖLÜM II***

### **2. GEREÇ VE YÖNTEMLER**

#### **2.1. Gereçler**

Soğutmalı Yer Tipi Santrifüj (KUBOTA 7780), Masaüstü Santrifüj (KUBOTA 3300), pH Metre (Hanna Instruments HI221), Dijital Vorteks (IKA MS3), Güç kaynağı (Thermo Scientific OWL EC 300 XL), Dikey Elektroforez (BIO-RAD Mini-PROTEAN Tetra Cell), Membran Transfer Sistemi (Thermo Scientific VEP-2 OWL), Yatay Elektroforez (Owl EasyCast B1A), Çalkalamalı İnkübatör (IKA 4000 i), Thermal Cycler (Techne TC-312), Mikroplaka Okuyucu (Molecular Devices VERSAmax Tunable), Çalkalamalı blok ısıtıcı (Grant-bio PHMT), Nanovette UV/Vis Spektrofotometre (Beckman-Coulter DU730), Inverted Floresan Mikroskop (Leica DM IL), CO<sub>2</sub> İnkübatörü (Thermo Scientific Model 370), Laminer Hava Kabini (Thermo Scientific Class II MSC-Advantage), Otomatik Film Banyo Cihazı (PROTEC ECOMAX), Rotatör (VWR), Orbital Çalkalayıcı (LABNET Orbit 1000), Neubauer Hemositometre (Hausser Scientific), Şarjlı pipetaj aleti (Nichiryo, Finnpiquette, Gilson), -80°C derin dondurucu (Sanyo), Buz Makinesi (Hoshizaki), Hassas ve Kaba Analitik Teraziler (Denver Instrument), Etüv (Memmert Universal), Su banyosu (Memmert Universal WNB 7-45), Otoklav (Hirayama), Manyetik karıştırıcı (Yellowline MAG HS 7), Vakum Pompası (Major Science), Buz Dolabı ve -20°C Derin Dondurucu (White-Westing House).

## **2.2. Sarf Malzemeleri**

### **2.2.1. Kitler**

BCA Protein Assay Kit (Pierce), Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, QuickChange II), PureLink Hipure Plasmid Filter Miniprep/ Midiprep/ Maxiprep Kit (Invitrogen), EZ-PCR Mikoplazma kiti (Biological Industries) kullanılmıştır.

### **2.2.2. Malzemeler**

PVDF membran MILLIPORE'dan, CL-X Posure Film PIERCE'dan ve kullanılan tüm plastik malzemeler CORNING firmasından temin edilmiştir.

## **2.3. Kimyasal Maddeler**

Memeli Proteaz İnhibitör Kokteyli, Agaroz, Etidyum Bromür, N,N,N',N'-Tetrametilendiamin, Polietilen Glikol 8000, Glisin, Sodyum Klorür, Sodyum Fosfat Monobazik Fosfat Anhidr, Sodyum Fosfat Dibazik Fosfat Anhidr, Sodyum Azid, Bakteriyolojik Maya Ekstratı, Bakteriyolojik Tripton, Bakteriyolojik Agar Etilendiamintetraasetik asid (EDTA), Etilenglikoltetraasetikasit (EGTA), Amonyum Persülfat, Tween-20, Triton X-100, Nonidet P-40, Ponceau S Stain, Gliserol, Magnezyum sülfat heptahidrat, TRIS, 2-Merkaptoetanol, Ampisilin Sodyum tuzu, Kanamisin sülfat ve Deoksikolik asit AMRESCO firmasından satın alınmıştır.

Akrilamit- Bisakrilamit Solüsyonu ve Dodesilsülfat Sodyum SERVA'dan 100 bp DNA Markırı NEB'den, Unstained Protein Molekül Ağırlık Markırı ise FERMENTAS'dan temin edilmiştir.

% 0,05 Tripsin-EDTA, Yüksek Glukoz'lu DMEM, L-Glutamin ve Tripan Mavisi BIOLOGICAL INDUSTRIES'den, Protein A sefaroze boncukları

ZYMED'den, Lipofectamin 2000 ve Opti-MEM besiyeri INVITROGEN'den, Mg132 ALEXIS firmasından satın alınmıştır.

Kullanılan Kemiluminesan Substrat ve Sekonder Antikor Rabbit Anti-Mouse IgG, (H+L) PIERCE marka kullanılmıştır.

Antikorlardan monoklonal Anti-HA, Anti-c-MYC, Anti-Flag M2, Anti- $\beta$ -Actin antikorları SIGMA firmasından, monoklonal Anti-GFP antikoruna ise Santa Cruz firmasından satın alınmıştır.

IPTG ( İzopropil-1-tiyo- $\beta$ -D-galaktopiranozit) ve X-gal (5-bromo-4-kloro-3-indolil- $\beta$ -D-galaktopiranozit) Prof. Dr. Zeki Topçu tarafından hediye edilmiştir.

## **2.4. Çözeltiler**

### **2.4.1. SDS-PAGE**

#### *2X RIPA (Radyoimmunopresipitasyon Assay) Lizatlama Tamponu:*

40 mg SDS (dodesilsülfat sodyum tuzu), 200 mg 7-DOC (deoksikolikasit) tartıldı, 0,4 ml NP-40, 4 ml 10X PBS ilave edilip distile su ile 20 ml'ye tamamlandı ve 4°C'de saklandı.

#### *10X PBS (Phosphate Buffered Saline) :*

87,5 g sodyum klorür, 11,5 g sodyum monohidrojen fosfat, 2,3 g sodyum dihidrojen fosfat tartıldı ve distile su ile 1 litreye tamamlanıp pH'sı 7,4'e ayarlandı. Otoklavlandı ve oda sıcaklığında saklandı.

#### *IP (İmmünopresipitasyon) için Hücre Lizatlama Tamponu:*

25 ml 1,5 M NaCl, 0,5 ml 0,5 M EDTA, 0,5 ml 0,5 M EGTA, 2,5 ml 1 M Tris-HCl (pH=7,5), 1,25 ml NP-40 (% 0,5) distile su ile 250 ml'ye tamamlandı, 4°C'de saklandı.

SDS-PAGE 4X Ayırma Tamponu (Resolving Buffer) :

1,5 M Tris HCl (90,855 g), % 0,4 h/h TEMED (2 ml), % 0,4 a/h SDS (2 g), distile suda çözündürüldü 500 ml'ye tamamlanıp, pH'sı 8,9 olarak ayarlandı ve 4°C'de saklandı.

SDS-PAGE 4X Yiğirlama Tamponu (Stacking Buffer) :

0,5 M Tris HCl (30,285 g), % 0,4 h/h TEMED (2 ml), % 0,4 a/h SDS (2 g) distile suda çözündürüldü, 500 ml'ye tamamlanıp, pH'sı 6,8'e ayarlandı ve 4°C'de saklandı.

4X Protein Yükleme Tamponu:

|                   | Final Konsantrasyonu | 50 ml için Gerekli Miktar (4x) |
|-------------------|----------------------|--------------------------------|
| Tris HCL          | 50 mM                | 10 ml 1 M Tris HCl             |
| SDS               | %10 a/h              | 4 g                            |
| Gliserol          | %10 h/h              | 2 ml %99'luk gliserol          |
| 2-Merkaptoetanol  | %1                   | 2 ml 14,7 M 2-ME               |
| EDTA              | 12,5 mM              | 5 ml 0,5 M EDTA                |
| Bromofenol mavisi | %0,02 a/h            | 40 mg                          |

**Tablo 3: 4X Protein Yükleme Tamponu İçeriği**

10 ml 1 M Tris HCl (pH=6,8), 4g SDS, 2 ml %99'luk Gliserol, 2 ml 14,7 M 2-ME, 5 ml 0,5 M EDTA, 40 mg Bromofenol mavisi distile suda çözündürüldü, 50 ml'ye tamamlandı. 1'er ml olarak tüplere bölünüp, -20°C'de saklandı.

10X SDS-PAGE Yürütme Tamponu:

30,2 g Tris Baz, 144 g Glisin, 10 g SDS (dodesilsülfat sodyum tuzu) tartılıp, distile suda çözündürüldü ve 1 litreye tamamlandı, oda sıcaklığında saklandı.

**2.4.2. Western Blot**

10X Transfer Tamponu:

30,33 g Tris-baz, 144 g Glisin distile suda çözündürülüp, 1 L'ye tamamlandı, oda sıcaklığında saklandı.

#### 1X Yıkama Tamponu:

100 ml 10X PBS, 1 ml Tween-20 distile suyla 1 L'ye tamamlandı, pH'sı 7,4'e ayarlandı. Oda sıcaklığında saklandı.

### **2.4.3. Bakteri**

#### LB Medya (Bakteri Besi Ortamı):

10 g NaCl, 10 g Tripton, 5 g Maya ekstresi distile suda çözündürüldü, 1 L'ye tamamlandı. 121°C'de 20 dakika tutularak otoklavlama işlemi gerçekleştirildi. Kullanılacağı zaman taze hazırlandı ve oda sıcaklığında saklandı.

#### LB Agar:

500 ml LB medyaya 10 g agar ilave edilip, otoklavlandı. 50°C'ye soğuduktan ilgili antibiyotik ilavesinden sonra seri olarak steril ortamda petrilere döküldü. Agar-petriler 4°C'de saklandı.

#### TSS Ajanı (Transformasyonda Kullanılan Bakteri Hazırlığı için) :

10 g Polietilen Glikol (PEG MA8000, % 10), 5 ml Dimetilsülfoksit (DMSO, %5 h/h), 1,23 g Magnezyumsülfatheptahidrat ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 50 mM) LB medyada çözündürülüp, 100 ml'ye tamamlandı, pH'sı 6,5'e ayarlanıp, otoklavlandı. Kullanılacağı zaman taze hazırlandı. 4°C'de saklandı.

#### %2 X-Gal Çözeltisi:

2 mg X-Gal tartılıp, 100 ml steril distile suda hazırlanıp, filtre sterilizasyonu yapıldı.

#### 1M IPTG (İzopropil-1-tiyo-β-D-galaktopiranozit) Çözeltisi:

4,766 mg IPTG tartılıp, 1 ml distile suda çözündürüldü ve filtre sterilizasyonundan sonra kullanıldı. Kullanılırken final konsantrasyonu 10 mM olacak şekilde seyretildi.

## 2.5. Transformasyonda Kullanılacak DH5α Bakterilerinin Hazırlanması

Stok DH5α bakterisinden bir miktar örnek 5 ml LB medya içerisinde 37°C’de üremeye bırakıldı. Ertesi gün üreyen bakteri 1:100 oranında dilüe edildi ve 600 nm’de okunan absorbans değeri 0,3-0,4 olana kadar 37°C’de inkübe edildi. Okunan absorbans değeri 0,3-0,4<0,5 olunca, örnek, buz üzerinde 20 dakika bekletildi. Ardından 4°C’de çöktürülen bakteriler soğuk TSS tamponu ile süspande edilip, steril tüplere 100’er µl halinde bölündü ve -80°C’ye kaldırıldı.

## 2.6. Yönlendirilmiş Mutajenez

*In vitro* yönlendirilmiş mutajenez (Site-directed mutagenesis, SDM), protein yapısının ve fonksiyonunun arasındaki karmaşık ilişkiyi tanımlamak, gen ekspresyon unsurlarını çalışmak ve vektör modifikasyonlarını gerçekleştirmek için çok değerli bir tekniktir. Genellikle sekansının bilindiği bir gen kodlayıcı plazmid üzerinde yapılır.

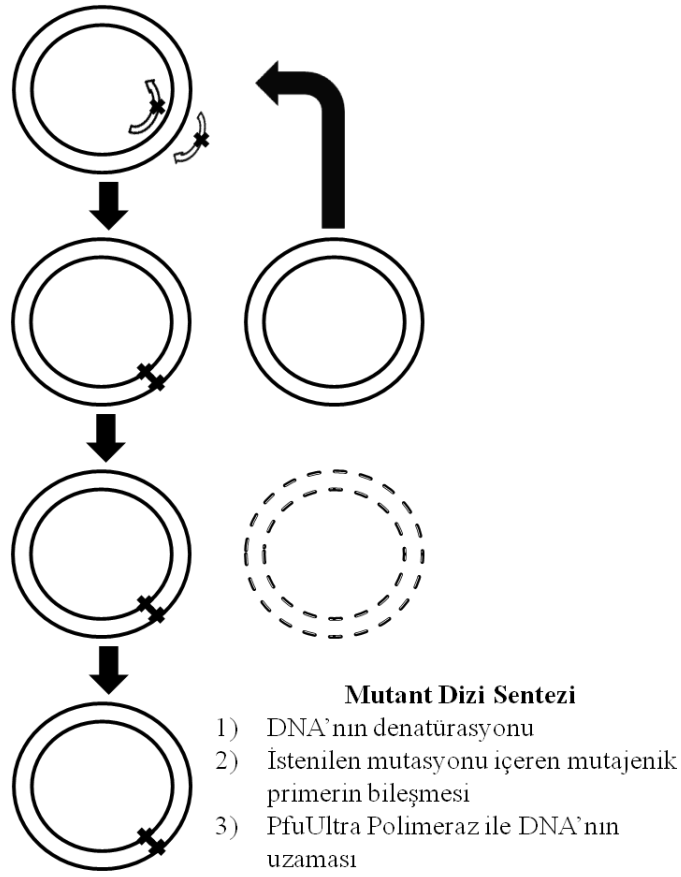
Çalışmalarımızda 11 farklı VCP mutant proteininin cDNA’sını taşıyan plazmidler Stratagene’in QuikChange II Site-Directed mutajenez kiti kullanılarak elde edilmiştir.

QuikChange II SDM kiti ile uygulanan yöntemde yüksek doğruluklu (high-fidelity) PfuUltra DNA polimeraz kullanılır ve replikasyon, mutajenik primerler ile yönetilir. Oligonükleotit primerler, vektörün (DNA’nın) birbirini tamamlayan karşılıklı iplikleriyle komplementer oluşturacak şekilde tasarlanır. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) sırasında PfuUltra DNA polimeraz ile ortama ilave edilen deoksinükleotitler (dNTP’ler) kullanılarak uzama gerçekleşir (**Şekil 8**). PCR sırasında, oligonükleotit primerlerin uzamasıyla mutasyonlu plazmid meydana gelir. PCR reaksiyonunu takiben, ürün Dpn I ile etkileştirilir. Dpn I endonükleaz enzimi

(hedef DNA dizisi 5'-Gm<sup>6</sup>ATC-3'), metillenmiş ve yarı metillenmiş parental DNA'yı keserek sentezlenen mutasyonu içeren DNA'nın seçiminde kullanılır. Tasarlanmış mutasyonları vektör formunda bulunduran DNA, XL1-Blue veya DH5α süperkomponent hücrelere transforme edilir.

| <b>QuikChange II site-directed Mutajenez Kiti İçeriği</b>                                                    |                     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|
| Gereken Malzemeler                                                                                           | Katalog #<br>200524 |
| Pfu Ultra High-Fidelity DNA polymerase (2,5 U/μl)                                                            | 80 U                |
| 10X Reaksiyon Tamponu                                                                                        | 500 μl              |
| Dpn I Restriksiyon Enzimi (10 U/μl)                                                                          | 300 U               |
| Oligonükleotit kontrol primer #1 [34-mer (100 ng/μl)]<br>5' CCA TGA TTA CGC CAA GCG CGC AAT TAA CCC TCA C 3' | 750 ng              |
| Oligonükleotit kontrol primer #2 [34-mer (100 ng/μl)]<br>5' GTG AGG GTT AAT TGC GCG CTT GGC GTA ATC ATG G 3' | 750 ng              |
| pWhitescript 4,5-kb kontrol plazmid (5ng/ μl)                                                                | 50 ng               |
| dNTP karışımı                                                                                                | 30 μl               |
| XL1-Blue süperkomponent hücreler                                                                             | 8x200 μl            |
| pUC18 kontrol plazmidi (0,1 ng/ μl in TE Buffer)                                                             | 10 μl               |

**Tablo 4: Stratagene QuikChaneg II SDM Kiti İçeriği**



**Şekil 8: QuikChange II Yönlendirilmiş mutajenez yöntemine genel bakış.** PCR sırasında DNA'nın denatürasyonundan sonra, vektörün (DNA'nın) birbirini tamamlayan karşılıklı iplikleriyle komplementer oluşturacak şekilde tasarlanan primerler DNA ipliklerine bağlanır. Pfu HF DNA polimeraz enzimi ile PCR sırasında uzama gerçekleşir.

#### 2.6.1. Primerlerin Tasarımı İçin Kullanılan Kriterler

Bu yöntemde kullanılacak mutajenik oligonükleotit primerler, istenilen mutasyona uygun olarak ayrı ayrı tasarlandı.

Mutajenik primerler dizayn edilirken göz önünde bulundurulacak faktörler:

1) Her iki mutajenik primer, istenilen mutasyonu içermeli ve plazmidin zıt iplikçiklerdeki aynı diziye bağlanabilmelidir.

2) Primerlerin boyu 25-45 baz arasında olmalı ve primerlerin erime sıcaklığı (melting temperature, T<sub>m</sub>) 74°C'a eşit ve daha büyük olmalıdır.

$$T_m = 81.5 + 0.41(\%GC) - 675/N - \% \text{ yanlış eşleşme}$$

T<sub>m</sub> hesaplanması: N primerin baz uzunluğu

%GC ve % yanlış eşleşme tam sayı olarak alınmalıdır.

**Örnek:** #PB1 5'-GTT CGG AAT ACC CTT TGT GTA CGC CTA GG 3'

$$\%GC = (15/29) \times 100 = 51,724$$

$$N:29$$

$$\% \text{ yanlış eşleşme} = (1/29) \times 100 = 3,44$$

$$T_m = [81,5 + (0.41 \times 52)] - [(675/29) + 3] = 76,54$$

3) İstenilen mutasyon, baz değişikliği, çıkartılması veya eklenmesi primerin ortasında olmalı ve her iki tarafında da doğru diziye sahip 10-15 adet baz bulunmalıdır.

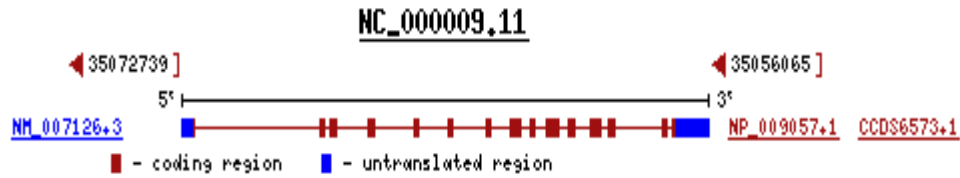
4) Optimal olarak, primerlerin GC oranı en az % 40 olmalı ve primerler bir veya daha fazla sayıda C ve G bazları ile sona ermelidir.

5) Mutasyon verimliliğinin garanti altına alınması için primerlerin hızlı polinükleotid likit kromatografisi (fast polynucleotide liquid chromatography, FPLC) veya poliakrilamid jel elektroforezi (polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE) ile saflaştırılması gerekmektedir.

## 2.6.2. Primerlerin Belirlenmesi

### 2.6.2.1. VCP Geni

VCP geni kromozom 9'un kısa kolunda (p) 13.3 lokalizedir (9p13.3). VCP geni, valosin içeren protein olarak bilinen 806 aminoasitten oluşan enzimi kodlamaktadır. VCP geni, 17 ekzondan oluşmaktadır (55). Ekzon 3 CDC48'i (N Bölgesini), ekzon 5 N-D1 bağlayıcı bölgesi L1'i ve ekzon 6 AAA-ATPaz aktivitesinden sorumlu D1 ve D2 bölgelerini kodlamaktadır.



### Şekil 9: VCP Geninin Genomik Alanları

#### 2.6.2.2. İnsan VCP aminoasit Dizisi ve IBMPFD ilişkili mutasyona uğrayan aminoasitler

AAI21795 Valosin-containing protein (www.ncbi.nlm.nih.gov)

1 MASGADSKGDDLSTAİLKQKNRPNRLİVDEAİNEDNSVVLSQPKMDELQLFRGDTVLLK  
61 GKKRREAVCİVLSDDTCSDEKİRMNRVVRNNL**R****V**RLGDVİSiQPCPDVKYGKRİHVLPİD  
121 DTVEGİTGNLFEVYLY**P**YFLEAYRPİRKGDİFLV**R****G****G****M**RAVEFKVETDPSPYCİVAPDT  
181 VİHCEGEPIK**R**EDDEES**L**NEVGYYDDİGGCR KQLAQİKEMVELPLRHPALFK**A**İGVKPPRG  
241 İLLYGPPGTGLTİARAVANE**T**GAFFFLİNGPEİMSKLAGESESNLRKAF EEAENAPAI  
301 İFİDELDAİAPKREKTHGEVERRİVSQLLTMDGLKQRAHVİVMAATNRPNŞİDPALRRF  
361 GRFDREVDİGİPDATGRLEİLQİHTK**N**MKLADDVDLEQVANETHGHVGADLAALCSEAAL  
421 QAİRKMDLİDLEDETİD**A**EVMNSLAVTMDDFRWALSQSNPSALRETVVEVPQVTWEDİG  
481 GLEDVKRELQELVQYPVEHPDKFLKFGMTPSKGVLFYGPFGCKTLLAKAİANECQANFİ  
541 SİKGPELLTMWFGESANVREİFDKARQAAPCVLFFDELDSİAKARGGNİGDGGGAADRV  
601 İNQİLTEMDGMSTKKNVFIİGATNRPDİİDPAİLRPGRDLQİYİPLPDEKSRVAİKAN  
661 LRKSPVAKDVDLEFLAKMTNGFSGADLTEİCQRACKLAİRESİESEİRRERERQTNPSAM  
721 EVEEDDPVPEİRRDHFEAMRFARRSVSDNDİRKYEMFAQTLQQSRGFGSFRFPSGNQGG  
781 AGPSQSGSGGTGGSVYTEDNDDDLYG

### 2.6.2.3. *İnsan VCP Baz Dizisi IBMPFD ilişkili mutasyona uğrayan bazlar*

AAI21795 Valosin-containing protein ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov))

1 atg gct tct gga gcc gat tca aaa ggt gat gac cta tca aca gcc att ctc aaa cag aag  
61 aac cgt ccc aat cgg tta att gtt gat gaa gcc atc aat gag gac aac agt gtg gtg tcc  
121 ttg tcc cag ccc aag atg gat gaa ttg cag ttg ttc cga ggt gac aca gtg ttg ctg aaa  
181 gga aag aag aga cga gaa gct gtt tgc atc gtc ctt tct gat gat act tgt tct gat gag  
241 aag att cgg atg aat aga gtt gtt cgg aat aac ctt **cgt** gta **cgc** cta ggg gat gtc atc  
301 agc atc cag cca tgc cct gat gtg aag tac ggc aaa cgt atc cat gtg ctg ccc att gat  
361 gac aca gtg gaa ggc att act ggt aat ctc ttc gag gta tac ctt aag **ccg** tac ttc ctg  
421 gaa gcg tat cga ccc atc cgg aaa gga gac att ttt ctt gtc **cgt** ggt **ggg** atg **cgt** gct  
481 gtg gag ttc aaa gtg gtg gaa aca gat cct agc cct tat tgc att gtt gct cca gac aca  
541 gtg atc cac tgc gaa ggg gag cct atc aaa **cga** gag gat gag gaa gag tcc **ttg** aat gaa  
601 gta ggg tat gat gac att ggt ggc tgc agg aag cag cta gct cag ata aag gag atg gtg  
661 gaa ctg ccc ctg aga cat cct gcc ctc ttt aag **gca** att ggt gtg aag cct cct aga gga  
721 atc ctg ctt tac gga cct cct gga aca gga aag acc ctg att gct cga gct gta gca aat  
781 gag **act** gga gcc ttc ttc ttc ttg atc aat ggt cct gag atc atg agc aaa ttg gct ggt  
841 gag tct gag agc aac ctt cgt aaa gcc ttt gag gag gct gag aag aat gct cct gcc atc  
901 atc ttc att gat gag cta gat gcc atc gct ccc aaa aga gag aaa act cat ggc gag gtg  
961 gag cgg cgc att gta tca cag ttg ttg acc ctc atg gat ggc cta aag cag agg gca cat  
1021 gtg att gtt atg gca gca acc aac aga ccc aac agc att gac cca gct cta cgg cga ttt  
1081 ggt cgc ttt gac agg gag gta gat att gga att cct gat gct aca gga cgc tta gag att  
1141 ctt cag atc cat acc aag **aac** atg aag ctg gca gat gat gtg gac ctg gaa cag gta gcc  
1201 aat gag act cac ggg cat gtg ggt gct gac tta gca gcc ctg tgc tca gag gct gct ctg  
1261 caa gcc atc cgc aag aag atg gat ctc att gac cta gag gat gag acc at t gat **gcc** gag  
1321 gtc atg aac tct cta gca gtt act atg gat gac ttc cgg tgg gcc ttg agc cag agt aac  
1381 cca tca gca ctg cgg gaa acc gtg gta gag gtg cca cag gta acc tgg gaa gac atc ggg  
1441 ggc cta gag gat gtc aaa cgt gag cta cag gag ctg gtc cag tat cct gtg gag cac cca  
1501 gac aaa ttc ctg aag ttt ggc atg aca cct tcc aag gga gtt ctg ttc tat gga cct cct  
1561 ggc tgt ggg aaa act ttg ttg gcc aaa gcc att gct aat gaa tgc cag gcc aac ttc atc  
1621 tcc atc aag ggt cct gag ctg ctc acc atg tgg ttt ggg gag tct gag gcc aat gtc aga  
1681 gaa atc ttt gac aag gcc cgc caa gct gcc ccc tgt gtg cta ttc ttt gat gag ctg gat  
1741 tcg att gcc aag gct cgt gga ggt aac att gga gat ggt ggt ggg gct gct gac cga gtc  
1801 atc aac cag atc ctg aca gaa atg gat ggc atg tcc aca aaa aaa aat gtg ttc atc att  
1861 ggc gct acc aac cgg cct gac atc att gat cct gcc atc ctc aga cct ggc cgt ctt gat  
1921 cag ctc atc tac atc cca ctt cct gat gag aag tcc cgt gtt gcc atc ctc aag gct aac  
1981 ctg cgc aag tcc cca gtt gcc aag gat gtg gac ttg gag ttc ctg gct aaa atg act aat  
2041 ggc ttc tct gga gct gac ctg aca gag att tgc cag cgt gct tgc aag ctg gcc atc cgt  
2101 gaa tcc atc gag agt gag att agg cga g aa cga gag agg cag aca aac cca tca gcc atg  
2161 gag gta gaa gag gat gat cca gtg cct gag atc cgt cga gat cac ttt gaa gaa gcc atg  
2221 cgc ttt gcg cgc cgt tct gtc agt gac aat gac att cgg aag tat gag atg ttt gcc cag  
2281 acc ctt cag cag agt cgg ggc ttt ggc agc ttc aga ttc cct tca ggg aac cag ggt gga  
2341 gct ggc ccc agt cag ggc agt gga ggc ggc aca ggt ggc agt gta tac aca gaa gac aat  
2401 gat gat gac ctg tat ggc taa

#### 2.6.2.4. Primerlerin Belirlenmesi

| İstenilen Mutasyon | Primerler                                                                                                          | Erime Sıcaklığı (°C) |                                               |
|--------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|-----------------------------------------------|
| R93C               | #PB1 Forward: gtt cgg aat aac ctt tgt gta cgc cta gg<br>#PB2 Reverse: ccctaggcgtacacaaagggtattccgaac               | 74,6                 | Integrated DNA Technologies (XX IDT, Belçika) |
| R95G               | #PB3 Forward: g aat aac ctt cgt gta tgc cta ggg gat gtc<br>#PB4 Reverse: gacatcccctaggcatacacgaagggtattc           | 74,1                 |                                               |
| P137L              | #PB5 Forward: g gta tac ctt aag ctg tac ttc ctg gaa g<br>#PB6 Reverse: ctccaggaagtacagcttaaggtatacc                | 73,2                 |                                               |
| R155C              | #PB7 Forward: gac att ttt ctt gtc tgt ggt ggg atg c<br>#PB8 Reverse: gcatcccaccacagacaagaaaaatgtc                  | 72,9                 |                                               |
| G157R              | #PB9 Forward: ctt gtc cgt ggt cgg atg cgt gct g<br>#PB10 Reverse: c agc acg cat ccg acc acg gac aag                | 76,7                 |                                               |
| R159C              | #PB11 Forward: cgt ggt ggg atg tgt gct gtg gag ttc<br>#PB12 Reverse: gaactccacagcacatcccaccacg                     | 77,1                 |                                               |
| R191W              | #PB13 Forward: g gag cct atc aaa caa gag gat gag gaa g<br>#PB14 Reverse: cttcctcatcctctgtttgataggctcc              | 74,6                 |                                               |
| L198W              | #PB15 Forward: gag gaa gag tcc tgg aat gaa gta ggg<br>#PB16 Reverse: ccctacttcattccaggactcttcctc                   | 74,1                 |                                               |
| A232E              | #PB17 Forward: ct gcc ctc ttt aag gaa att ggt gtg aag c<br>#PB18 Reverse: gcttcacaccaatttccttaaagagggcag           | 74,8                 |                                               |
| T262A              | #PB19 Forward: ct gta gca aat gag gct gga gcc ttc ttc<br>#PB20 Reverse: gaagaaggctccagcctcatttgctacag              | 76                   |                                               |
| N387H              | #PB21 Forward: cag atc cat acc aag cac atg aag ctg gca g<br>#PB22 Reverse: ctgccagctcatgtgcttggtatggatctg          | 76,3                 |                                               |
| A439S              | #PB23 Forward: gat gag acc att gat tcc gag gtc atg aac<br>#PB24 Reverse: gttcatgacctcggaatcaatgggtctcatc           | 74,6                 |                                               |
| R95C               | PB1.Forward:cggaataaccttcgtgtaggcctaggggatgtcagcatc<br>PB2.Reverse: gatgctgacatcccctaggcctacacgaagggtattccg        | 86,27                | Alpha DNA (Kanada)                            |
| R155S              | PB3. Forward: ggagacattttctgtcagtgggtgggatgcgtgctgtg<br>PB4.Reverse: cacagcacgcatcccaccactgacaagaaaaatgtctcc       | 85,22                |                                               |
| L198W              | PB5.Forward:gaggatgaggaagagtcctggaatgaagtagggtatgatgac<br>PB6.Reverse: gtcatacatccctacttcattccaggactcttctcatcctc   | 84,95                |                                               |
| A232E              | PB7. Forward: catcctgccctctttaaggaaattggtgtgaagcctcctag<br>PB8. Reverse: ctaggaggcttcacaccaatttccttaaagagggcaggatg | 85,04                |                                               |

**Tablo 5: Yönlendirilmiş Mutajenez Reaksiyonlarında Kullanılan Primerler**

#### 2.6.3. Primerlerin Reaksiyona Hazırlanması

QuikChange II yönlendirilmiş mutajenez kiti protokolünde her bir oligonükleotit primerinden 125 ng kullanılması önerilmektedir. Primerler steril ultra saf su ile konsantrasyonu 1 µg/µl olacak şekilde hazırlanmıştır. PCR yapılacağı zaman 125 ng/µl olarak kullanılmıştır.

#### 2.6.4. Mutajenez Protokolü

1) Kontrol reaksiyonu için Tablo 6’da ifade edilen reaksiyon karışımı toplam 50 µl hacimde olacak şekilde hazırlandı.

| Reaktifler                           | Reaksiyon için kullanılan miktar (Hacim, µl) | Reaksiyonun gerçekleşmesi için istenilen miktar |
|--------------------------------------|----------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| 10X Reaksiyon Tamponu                | 5                                            |                                                 |
| pWhitescript 4.5-kb kontrol plazmidi | 2                                            | 10 ng                                           |
| Kontrol primer #1                    | 1,25                                         | 125 ng                                          |
| Kontrol primer #2                    | 1,25                                         | 125 ng                                          |
| dNTPmix                              | 1                                            |                                                 |
| dH <sub>2</sub> O                    | 38,5                                         |                                                 |
| Pfu Ultra HF DNA polimeraz           | 1                                            | 2,5 U/µl                                        |

**Tablo 6: QuikChange II SDM kontrol reaksiyonun hazırlanması**

2) Her bir örnek için (12 farklı VCP mutanıtı için) Tablo 7’da ifade edilen reaksiyon karışımı hazırlandı. Kalıp DNA olarak pCDNA3.1-myc-VCP-wt kullanıldı. pCDNA3.1-myc-VCP-wt DH5α bakterilerine transforme edilerek ampisilinli LB besiyeri içerisinde 37°C’de 250 r.p.m.’de çalkalanarak bir gece inkübe edildi ve çoğaltıldı. Midiprepi yapılarak plazmid elde edildi. Plazmid konsantrasyonu, DU730 Nanovette (Beckman-Coulter) spektrofotometrede ölçüldü.

| Reaktifler                 | Reaksiyon için kullanılan miktar (Hacim, µl) | Reaksiyonun gerçekleşmesi için istenilen miktar |
|----------------------------|----------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| 10X Reaksiyon Tamponu      | 5                                            |                                                 |
| pCDNA3.1-myc-VCP-wt        | 1,5                                          | 25 ng                                           |
| Mutant primer #1           | 1                                            | 125 ng                                          |
| Mutant primer #2           | 1                                            | 125 ng                                          |
| dNTPmix                    | 1                                            |                                                 |
| dH <sub>2</sub> O          | 39,5                                         |                                                 |
| Pfu Ultra HF DNA polimeraz | 1                                            | 2,5 U/µl                                        |

**Tablo 7: QuikChange II SDM reaksiyonunun hazırlanması**

3) PCR uygulamasında Thermal Cycler cihazında Tablo 8'deki program kullanıldı. Yönlendirilmiş mutajenez yapılmak istenilen nokta mutasyonu ile baz değişimi için 18 döngü yeterli görüldü.

|          |      |           |
|----------|------|-----------|
| 1 Döngü  | 95°C | 1 dakika  |
| 18 Döngü | 95°C | 50 saniye |
|          | 60°C | 50 saniye |
|          | 68°C | 8 dakika  |
| 1 Döngü  | 68°C | 7 dakika  |

**Tablo 8: Yönlendirilmiş Mutajenez PCR Programı**

4) Termal döngüyü takiben reaksiyon ürünü buz üzerinde 2 dakika bekletilerek sıcaklığının 37°C'nin altına düşmesi sağlandı.

5) PCR ürünü, içerisinde bulunan parental DNA'yı ortadan kaldırmak, sadece PCR ürünü DNA'yı ortamda tutabilmek için Dpn I endonükleaz enzimi ile 37°C'de (su banyosunda) 1 saat inkübe edildi ve sonra PCR ürünü DH5α veya XL1-Blue süperkomponent hücrelerine transforme edildi.

#### **2.6.5. Bakteri Transformasyonu**

Plazmid veya PCR ürünü DH5a bakterilerinin bulunduğu tüpe eklenip 30 dakika buzda bekletildi. Gerekli görüldüğü durumlarda 30 dakika sonunda önce 42 °C'de sonra 0°C'de bekletilerek sıcaklık şoku uygulandı. Bakteri, üzerine LB media eklenerek 37°C'de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra, uygun antibiyotik içeren LB agarlara ekilip 37°C'de en az 16 saat inkübe edildi.

XL1-Blue bakterilerine kontrol plazmidi içeren mutant PCR ürünü transforme edilirken son basamağa kadar tüm aşamalar DH5a'ya benzer şekilde gerçekleştirildi. Son aşamada ekim yapılacak olan ampisilinli LB-agara %2'lik X-Gal ve 10 mM IPTG çözeltisi yayıldı ve sonrasında ekim gerçekleştirildi. Agar plakalar, 37°C'de 16 saatten fazla inkübe edildi.

### 2.6.6. Kolonilerin Seçimi

16 saat inkübasyon süresi sonunda koloni görülen mutajenez reaksiyonları belirlendi. Her bir reaksiyon için birbirlerine uzak bölgelerden 3 farklı koloni seçildi ve miniprepi yapıldı. Miniprep için PureLink Quick Plazmid Miniprep Kiti firmanın önerdiği (Invitrogen) protokol takip edilerek gerçekleştirildi.

### 2.6.7. DNA konsantrasyonlarının belirlenmesi

Elde edilen DNA'ların konsantrasyonuna Nanovette (DU730 Spektrofotometre, Beckman-Coulter, ABD) ile bakıldı. Plazmid DNA'lar midiprep ile elde edildikten sonra TE tamponunda çözüldü. Her bir örnekten 2'şer µl alınarak köre karşı 260 nm ve 280 nm'de absorbansları okunup, DU730 Nanovette cihazı dsDNA programı ile konsantrasyonları bulunup saflıkları incelendi.

| Örnek  | Konsantrasyon (µg/µl) | Örnek  | Konsantrasyon (µg/µl) |
|--------|-----------------------|--------|-----------------------|
| R93C1  | 0,235                 | R159C1 | 0,120                 |
| R93C2  | 0,183                 | R159C2 | 0,100                 |
| R93C3  | 0,155                 | R159C3 | 0,178                 |
| R95C1  | 0,339                 | R191Q1 | 0,172                 |
| R95C2  | 0,306                 | R191Q2 | 0,286                 |
| R95C3  | 0,179                 | R191Q3 | 0,194                 |
| P137L1 | 0,269                 | L198W1 | 0,963                 |
| P137L2 | 0,098                 | L198W2 | 0,794                 |
| P137L3 | 0,372                 | L198W3 | 0,871                 |
| R155C1 | 0,085                 | T262A1 | 0,173                 |
| R155C2 | 0,267                 | T262A2 | 0,488                 |
| R155C3 | 0,224                 | T262A3 | 0,479                 |
| R155S1 | 0,804                 | N387H1 | 0,144                 |
| R155S2 | 0,971                 | N387H2 | 0,100                 |
| R155S3 | 0,856                 | N387H3 | 0,106                 |
| G157R1 | 0,044                 | A439S1 | 0,227                 |
| G157R2 | 0,335                 | A439S2 | 0,152                 |
| G157R3 | 0,372                 | A439S3 | 0,202                 |

**Tablo 9: Seçilen Kolonilerden Elde Edilen DNA'ların Konsantrasyonları**

## 2.7. DNA Dizi Analizi

Mutajenez reaksiyonu sonucu istenilen mutasyonların gerçekleşip gerçekleşmediğini belirlemek için örneklerin DNA dizi analizleri yaptırılmıştır (Macrogen Seoul, Kore).

### 2.7.1. Örneklerin Hazırlanması

Örnekler, firmanın önerdiği konsantrasyonda ve çözücünde hazırlandı. Çözücü olarak ultra saf su kullanıldı. Örneklerin final konsantrasyonu (100 ng/μl) olarak her birinden 20 μl hazırlandı.

| Kod No | Verilen Örnek Adı | Örnekten Alınan miktar (μl) | Eklenen Ultrasafsu Miktarı (μl) | Kod No | Verilen Örnek Adı | Örnekten Alınan Miktar (μl) | Eklenen Ultrasafsu Miktarı (μl) |
|--------|-------------------|-----------------------------|---------------------------------|--------|-------------------|-----------------------------|---------------------------------|
| 1      | R93C1             | 8,5                         | 11,5                            | 19     | R159C1            | 16,7                        | 3,3                             |
| 2      | R93C2             | 10,9                        | 9,1                             | 20     | R159C2            | 20                          | -                               |
| 3      | R93C3             | 12,9                        | 7,1                             | 21     | R159C3            | 11,2                        | 8,8                             |
| 4      | R95C1             | 5,9                         | 14,1                            | 22     | R191Q1            | 11,6                        | 8,4                             |
| 5      | R95C2             | 6,5                         | 13,5                            | 23     | R191Q2            | 6,9                         | 13,1                            |
| 6      | R95C3             | 11,2                        | 8,8                             | 24     | R191Q3            | 10,3                        | 9,7                             |
| 7      | P137L1            | 7,4                         | 12,6                            | 25     | L198W1            | 2,1                         | 17,9                            |
| 8      | P137L2            | 20                          | -                               | 26     | L198W2            | 2,5                         | 17,5                            |
| 9      | P137L3            | 5,4                         | 14,6                            | 27     | L198W3            | 2,3                         | 17,7                            |
| 10     | R155C1            | 17,9                        | 2,1                             | 28     | T262A1            | 11,6                        | 8,4                             |
| 11     | R155C2            | 7,5                         | 12,5                            | 29     | T262A2            | 4,1                         | 15,9                            |
| 12     | R155C3            | 8,9                         | 11,1                            | 30     | T262A3            | 4,2                         | 15,8                            |
| 13     | R155S1            | 2,5                         | 17,5                            | 31     | N387H1            | 13,9                        | 6,1                             |
| 14     | R155S2            | 2,1                         | 17,9                            | 32     | N387H2            | 20                          | -                               |
| 15     | R155S3            | 2,3                         | 17,7                            | 33     | N387H3            | 18,9                        | 1,1                             |
| 16     | G157R1            | 20                          | -                               | 34     | A439S1            | 8,8                         | 11,2                            |
| 17     | G157R2            | 6                           | 14                              | 35     | A439S2            | 13,2                        | 6,8                             |
| 18     | G157R3            | 5,3                         | 14,7                            | 36     | A439S3            | 10                          | 10                              |

**Tablo 10: DNA Dizi Analizi için Örneklerin Hazırlanması**

### 2.7.2. Primerler

DNA dizi analizinde kullanılan primerlerin (Alpha DNA, Kanada) final konsantrasyonları 1 µg/µl olacak şekilde hazırlandı.

1 µg/µl olarak hazırlanan primer çözeltilerinden her bir örnek için final konsantrasyonu 60 ng/µl olarak 20'er µl alınarak hesaplandı.

| Primerler                                      | Mutant VCP Dizileri                               | Baz Aralığı  | Tm (°C) | Üretici Firma    |
|------------------------------------------------|---------------------------------------------------|--------------|---------|------------------|
| PB9<br>5'-CAGTTGTTCCGAGGTGACAC-3'              | R93C<br>R95C<br>P137L<br>R155C,<br>G157R<br>R159C | 148-<br>167  | 70,3    | Alpha DNA(Knada) |
| PB10<br>5'-CGATGGCATCTAGCTCATC-3'<br>(reverse) | R191Q<br>L198W<br>A232E<br>T262A                  | 928-<br>910  | 67,55   |                  |
| PB11<br>5'-GTTGTTGACCCTCATGGATG-3'             | N387H<br>A439S                                    | 981-<br>1000 | 68,25   |                  |

**Tablo 11: DNA Dizi Analizinde Kullanılan Primerler**

### 2.7.3. Yöntem

Makrogen firması tarafından tek geçişli sekanslama (single pass sequencing) yöntemi ile (capillary electrophoresis 3730XL) yapılmıştır.

## 2.8. Plazmid DNA'nın Amplifikasyonu

Bakterilerde çoğaltılan plazmidler, PureLink Hipure Plazmid Filter Midiprep Kiti (Invitrogen, ABD) ile elde edildi.

| <b>PureLink Hipure Plasmid Filter Midiprep Kit içeriği</b> |                                           |
|------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|
| <b>İçerik</b>                                              | <b>Midiprep (25 reaksiyon, K2-100-04)</b> |
| Resuspansiyon Tamponu (R3)                                 | 100 ml                                    |
| RNaz A                                                     | 550 µl                                    |
| Lizitlama Tamponu (L7)                                     | 100 ml                                    |
| Presipitasyon Tamponu (N3)                                 | 100 ml                                    |
| Equilibration Tamponu (EQ1)                                | 250 ml                                    |
| Yıkama Tamponu (W8)                                        | 500 ml                                    |
| Elüsyon Tamponu (E4)                                       | 125 ml                                    |
| TE Tamponu (TE)                                            | 15 ml                                     |

**Tablo 12: PureLink Hipure Plasmid Filter Midiprep Kit İçeriği**

### **2.8.1. Protokol (Midi prep)**

Tüm işlemler, Invitrogen firmasının önerdiği protokol takip edilerek yapıldı. Kısaca özetlemek gerekirse önce filtreli kartuş-kolon sistemine kolonun açılmasını sağlamak için equilibration tamponu (EQ1) eklendi. Bakteri pelleti, RNAaz eklenmiş tampon (R3) ile süspande edildi. Lizitlama tamponu (L7) eklendikten sonra nazıkçe karıştırılıp inkübe edildi. Presipitasyon tamponu (N3) eklendikten sonra bakteri lizati porları açılmış filtreli kartuş-kolon sistemi içerisine eklendi. Gereken yıkamaların ardından kolon, steril santrifüj tüpü üzerine yerleştirildi. Elüsyon tamponu (E4) ile plazmid, kolondan elüe edildi ve izopropanol eklenip santrifüj edildi. Pellet (plazmid DNA), soğuk % 70'lik etanol eklenerek süspansiyon haline getirildi ve tekrar santrifüj edildi. Geriye kalan pelletin havanın etkisiyle kurutuldu. Elde edilen plazmid DNA'lar TE tamponunda çözüldü. DU730 Nanovette spektrofotometre cihazı kullanılarak konsantrasyonları ölçüldü. Her bir örnekten 2'şer µl alınarak TE tamponuna karşı (kör) okundu ve konsantrasyonları bulundu.

| Plazmid                | Konsantrasyon (µg/µl) | Plazmid                   | Konsantrasyon (µg/µl) |
|------------------------|-----------------------|---------------------------|-----------------------|
| pCDNA3.1               | 0,85                  | pFlag-Npl4                | 0,37                  |
| pCDNA3.1-myc-VCP-wt    | 0,53                  | GFP-CFTRΔF508             | 0,45                  |
| pCDNA3.1-myc-VCP-QQ    | 1,95                  | pCDNA3.1-myc-VCP-T262A    | 1,46                  |
| pCDNA3.1-myc-VCP-R93C  | 1,28                  | pCDNA3.1-myc-VCP-N387H    | 1,45                  |
| pCDNA3.1-myc-VCP-R95C  | 1,3                   | pCDNA3.1-myc-VCP-A439S    | 1,42                  |
| pCDNA3.1-myc-VCP-P137L | 1                     | pCDNA3.1-myc-VCP-R159C    | 1,22                  |
| pCDNA3.1-myc-VCP-R155C | 1,45                  | pCDNA3.1-myc His Tyr C89R | 1                     |
| pCDNA3.1-myc-VCP-R155S | 1,54                  | pCDNA3.1-myc-VCP-L198W    | 0,98                  |
| pCDNA3.1-myc-VCP-G157R | 1,83                  | pCDNA3.1-myc-VCP-R191Q    | 0,89                  |
| pCI-neo-CD3delta       | 0,65                  | pFlag-Ufd1                | 0,954                 |

**Tablo 13: Plazmid DNA'ların Konsantrasyonu**

## 2.9. Hücre Kültürü

### 2.9.1. Hücre hattının seçimi

Çalışmalarda 293 HEK insan embriyo böbrek hücre hattı (human embryonic kidney cell line) kullanıldı. 293 HEK hücre hattı Yrd. Doç. Dr. Devrim Gözüağık (Sabancı Üniversitesi) tarafından American Type Culture Collection'dan (ATCC) sağlanmıştır.

293 HEK hücreleri ilk kez 1977 yılında tanımlanmıştır, insan embriyo böbrek hücrelerine viral antijen özelliği çıkartılmış adenovirüs5 DNA'sının transformasyonu ile oluşturulmuştur (92). 293 HEK hücreleri yüksek transfeksiyon verimliliği, yetiştirmesinin ve ilerletilmesinin kolay olması nedeniyle, çalışmamızda seçilmiştir.

293 HEK hücre hattı, konvansiyonel hücre kültürü şartları olan 37°C’de, %5’lik CO<sub>2</sub> inkübatöründe (Thermo) %10 fötal sığır serumu (FBS) stoğu içeren Dulbecco’s Modification of Eagle’s Medium (DMEM) içerisinde inkübe edildi. Besi ortamı 1X 4.5 g/L glukoz ve sodyum pirüvat içeren DMEM, ve %10 FBS stoğu içerir.

### **2.9.2. Pasajlama**

Hücreler; 100 mm’lik kültür kaplarını % 90 oranında kaplayacak oranda büyüdüğünde, besi ortamı vakumla uzaklaştırılıp, % 0,05’lik Tripsin-EDTA ile yıkandı ve hücrelerin yüzeyden daha kolay ayrışması için 37 °C’deki CO<sub>2</sub> inkübatöründe 45 saniye bekletildi. Hücreler %10 FBS’li DMEM içerisinde toplandı ve 1:8 dilüe edilerek 100 mm’lik hücre kültür kaplarına ekildi.

### **2.9.3. Mikoplazma Kontrolü**

Mikoplazmalar; serbest yaşayan 0,2-0,3 nm büyüklüğünde, yaklaşık 600-1700 kb büyüklüğünde 500 gen taşıyan, 0,22 nm’lik filtreden geçebilen en küçük organizmalardır. Mikrodizilerde, davranış ve büyümeye, metabolizmadan morfolojiye hücrenin neredeyse her özelliğinde değişiklik yapması nedeniyle sorun oluştururlar.

Çalışılan hücrelerin mikoplazma kontaminasyonu taşımadığından emin olmak amacıyla EZ-PCR Mikoplazma kiti (Biological Industries) kullanıldı. Mikoplazma dahil prokaryotların rRNA gen dizisi, rRNA operon ana halkasının uzunluğu ve dizilişi (örneğin 16S ile 23 S geni arasındaki bölge) türden türe farklılık göstererek korunmuştur. Bu belirleme yönteminde, mikoplazmaya spesifik 16S rRNA gen bölgesi iki primer kullanarak amplifikasyonu sağlanır. Agaroze jel elektroforezi ile amplifiye olan bölüm belirlenir.

| <b>EZ-PCR Mikoplazma Test Kiti İçeriği</b> |        |
|--------------------------------------------|--------|
| Reaksiyon Karışımı                         | 200 µl |
| Tampon özeltisi                           | 1 ml   |
| Pozitif Kontrol Örneđi                     | 20 µl  |

**Tablo 14: EZ-PCR Mikoplazma Kiti İçeriği**

#### **2.9.3.1. EZ-PCR Mikoplazma Test Kiti Protokolü**

Mikoplazma testi Biological Industries firmasının önerdiği protokole göre uygulanmıştır. Özetle hücre besiyerinden alınan örnek önce hücre kalıntılarından uzaklaştırılmak sonra da olası mikoplazma sedimentini ayırmak için santrifüj edildi. Pellet reaksiyon tamponu ile süspande edildi ve 95°C’de 3 dakika ısıtıldı. Test edilecek örnek, reaksiyon karışımı varlığında PCR reaksiyonuna hazırlandı. Thermal Cycler’da Tablo 15’te belirtilen program kullanıldı.

|          |       |            |
|----------|-------|------------|
| 1 Döngü  | 94 °C | 30 saniye  |
| 35 Döngü | 94 °C | 30 saniye  |
|          | 60 °C | 120 saniye |
|          | 72 °C | 60 saniye  |
| 1 Döngü  | 94 °C | 30 saniye  |
| 1 Döngü  | 60 °C | 120 saniye |
| 1 Döngü  | 72 °C | 5 dakika   |

**Tablo 15: Mikoplazma Kontrolü için kullanılan PCR programı**

Elde edilen PCR ürünü direkt olarak %2’lik agaroz jelde (etidyumbromurlü) yürütüldü. EZ-PCR Mycoplasma Test kitinde kullanılan primerler, 270 bp’lik DNA fragmanları amplifikasyonuna uygundur. 100 bp DNA ladder (BioLabs) kullanılarak karşılaştırma yapıldı. UV lamba altında bakıldığında 270 bp’ye karşılık gelen DNA fragmanı bulunmadığından, kullanılan 293 HEK hücre hattının mikoplazma içermediği gösterildi.

#### **2.9.4. Hücrelerin stoklanması**

293 HEK hücreleri yapılan mikoplazma kontrollerinin ardından stok alındı. Hücreler, 100 mm’lik kültür kabının yüzeyini %70-80’ini kaplayacak kadar

büyüdüğünde besi ortamı uzaklaştırıldı. %0,05'lik Tripsin-EDTA çözeltisi ile tripsinize edildi. Hücreler steril 1X PBS ile yıkandı ve 1000 devir/dakikada (r.p.m.'de) toplandı. FBS içerisinde süspande edildi. %10 DMSO ve %90 FBS ile hazırlanan dondurma çözeltisinde  $2 \times 10^6$  hücre/1ml olacak şekilde kriyovial tüpleri içerisine alındı. Dondurulup sıvı azot tankı içerisinde saklandı.

#### **2.9.5. Transfeksiyon**

Transfeksiyondan bir gün önce 100 mm'lik hücre kültür kaplarına  $1.2 \times 10^6$ 'şar hücre ekilerek bir gece inkübe edildi. Ertesi gün substrat veya Ufd1 ve Npl4 kodlayan plazmidlerin 1 µg'ı başına 1 µl lipofektamin kullanılarak transfeksiyon işlemi gerçekleştirildi. Invitrogen firması eşit hacimli DNA'lı Opti-MEM I ile 5 dakika önceden inkübe edilmiş lipofektaminli Opti-MEM I'in karıştırılmasını ve 30 dakika oda sıcaklığında beklemenin ardından hücrelere damla damla uygulanmasını önermektedir.

Hücreler transfeksiyondan en az 6 saat sonra, 6 kuyucuklu hücre kültür kaplarına eşit dağıtıldı. Ertesi gün, VCP yabanıl ve mutant tiplerin transfeksiyonu, lipofektamin kullanılarak gerçekleştirildi. Hücreler 16 saat boyunca konvansiyonel şartlarda inkübe edildi. 16 saat sonunda besi ortamları vakumla uzaklaştırıldı ve 1 ml soğuk 1X PBS ile 2 kez yıkanarak 4°C'de 10000 devir/dak'da 1 dakika santrifüj edilerek toplandı. Yıkama işlemi sonunda hücreler besi ortamından gelen protein yapılı bileşiklerden kurtarılmış oldu.

| Plasmid           | Transfekte edilen miktarı (µg) | Plasmid              | Transfekte edilen miktarı (µg) |
|-------------------|--------------------------------|----------------------|--------------------------------|
| VCP-wt            | 0,4                            | VCP-G157R            | 0,5                            |
| VCP-QQ            | 0,5                            | VCP-R159C            | 0,3                            |
| VCP-R93C          | 0,4                            | VCP-R191Q            | 0,3                            |
| VCP-R95C          | 0,4                            | VCP-L198W            | 0,4                            |
| VCP-P137L         | 0,4                            | VCP-T262A            | 0,4                            |
| VCP-R155C         | 0,4                            | VCP-N387H            | 0,3                            |
| VCP-155S          | 0,4                            | VCP-A439S            | 0,4                            |
| pCDNA3.1(kontrol) | 0,5                            | pCDNA3.1-myc-TyrC89R | 4                              |
| pCI-neo-HA-CD3δ   | 1,5                            | GFP-CFTRΔF508        | 7                              |
| pFlag-Ufd1        | 1,5                            | pFlag-Npl4           | 3                              |

**Tablo 16: Transfekte edilen VCP ve Substrat Miktarları**

## 2.10. Hücre parçalanması ve protein miktar tayini

Hücreler, örnek tüpü başına 30 µl 1X PBS ve 30 µl 2X RIPA tamponuna 0,6'şar µl 100X PIC ekleyerek 5 dakikada bir vortekslemek yoluyla 20 dakika süreyle parçalandı. Hücre pelletini uzaklaştırmak için 14.000 r.p.m'de 10 dakika boyunca 4°C'de santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantlar temiz tüplere transfer edildi.

### 2.10.1. Protein Miktar Tayini

BCA-protein deney kiti (Pierce) kullanılarak toplam protein miktarlarına bakıldı.

| BCA Protein Tayin Kiti İçeriği |         |         |
|--------------------------------|---------|---------|
| BCA Ajanı A                    | 500 ml  | 2 adet  |
| BCA Ajanı B                    | 25 ml   | 1 adet  |
| Standart Albümin Ampülleri     | 2 mg/ml | 10 adet |

**Tablo 17: Pierce BCA Protein Tayin Kiti İçeriği**

BCA Protein tayini; total proteinin kolorimetrik olarak tayini için bikinkoninik asit (BCA) yöntemine dayanır. BCA yönteminin prensibi alkali ortamda  $\text{Cu}^{+2}$ 'nin  $\text{Cu}^{+1}$ 'e protein aracılı indirgenmesidir. Bu deneyin pembe renkli reaksiyon ürünü, bikinkoninik asitin iki molekülünün bir bakır iyonu ile şelasyonu ile oluşur. Suda çözünebilir kompleks, geniş çalışma aralığının (20-2000 ug/ml) üstünde, artan

protein konsantrasyonları ile 562 nm’de lineer absorbans gösterir. Protein konsantrasyonları, sığır serum albumini (BSA) proteininin standartlarına referans alınarak belirlenmiştir. BSA proteininin bilinen konsantrasyonlarının seyreltme serileri hazırlanır ve standart eğri üzerinde her bilinmeyen konsantrasyonunun tespitinden önce bilinmeyenlerin yanında analiz edilir.

#### **2.10.1.1. Standartların ve Çalışma Belirtecinin Hazırlanması**

İçerisindeki protein miktarı tayin edilecek örnek; konsantrasyonları bilinen standart albümin çözeltileri ile hazırlanan, bilinen konsantrasyon değerlerine karşılık okunan absorbans değerleri ile karşılaştırılarak elde edilen doğru denkleminde bilinmeyen değere karşı okunan absorbans değeri girilerek bulundu.

#### **2.10.1.2. Standart Albümin Çözeltilerinin Hazırlanması ve Doğru Denkleminin Bulunması**

Kitle birlikte verilen 1 ml’lik ampüllerin her biri 2 mg/ml albümin içerir. Gerekli dilüsyonlar Tablo 18’de belirtildiği gibi yapıldı.

| <b>Mikroplaka ile çalışmak için Standartların Hazırlanması</b> |                               |                      |                              |
|----------------------------------------------------------------|-------------------------------|----------------------|------------------------------|
| Vial                                                           | Dilüsyon Miktarı (Distile Su) | BSA Kaynağı ve Hacmi | İstenilen BSA Konsantrasyonu |
| A                                                              | 0 µl                          | Ana stoktan 300 µl   | 2000 µg/ml                   |
| B                                                              | 125 µl                        | Ana stoktan 375 µl   | 1500 µg/ml                   |
| C                                                              | 325 µl                        | Ana stoktan 325 µl   | 1000 µg/ml                   |
| D                                                              | 175 µl                        | B tüpünden 175 µl    | 750 µg/ml                    |
| E                                                              | 325 µl                        | C tüpünden 325 µl    | 500 µg/ml                    |
| F                                                              | 325 µl                        | E tüpünden 325 µl    | 250 µg/ml                    |
| G                                                              | 325 µl                        | F tüpünden 325 µl    | 125 µg/ml                    |
| H                                                              | 400 µl                        | G tüpünden 100 µl    | 25 µg/ml                     |
| I                                                              | 400 µl                        | 0                    | 0 µg/ml=Kör                  |

**Tablo 18: Standart Albümin Çözeltilerinin Hazırlanması**

Doğruyu çizmek ve doğru denklemini bulmak için, her bir standart çözeltiliden 25 µl kuyucuklara konuldu. 200 µl BCA çalışma belirteci eklendikten sonra, 30 saniye orbital çalkalayıcıda karıştırıldı. Plaka, streç film ile sarıldıktan sonra 37°C’de yarım saat inkübe edildi. Distile suya karşı (kör) 562 nm’de okundu.

Doğruyu çizmek için apsise (x eksenine) bilinen konsantrasyon değerleri, ordinata (y eksenine) bilinen konsantrasyon değerine karşılık okunan absorbans değerleri yerleştirildi (Tablo 22) ve doğru çizilerek doğru denklemi ve eğim bulundu.

#### **2.10.1.3. Çalışma (Working Reagent, WR) Belirtecinin Hazırlanması**

- 1) Gereken toplam çalışma belirtec miktarını hesaplamak için;

(Standart sayısı + Örnek sayısı) x (tekrar sayısı) x (örnek başına WR hacmi)  
formülü kullanıldı. Mikroplaka ile çalışırken örnek başına 200 µl WR kullanıldı.

- 2) Çalışma belirteci hazırlanırken 50 kısım BCA belirteç A'ya, 1 kısım BCA belirteç B (50:1, Belirteç A:B) eklendi ve karıştırıldı.

#### **2.10.1.4. Örneklerin Hazırlanması ve Miktarlarının Belirlenmesi**

- 1) Mikroplakanın her bir kuyucuğuna 8 µl distile su konuldu.
- 2) Miktarı tayin edilecek örnekler önce vortekslenip 2'şer µl kuyucuklara konuldu.
- 3) Her bir kuyucuğa 200'şer µl BCA çalışma belirteci (WR) konuldu ve bir dakika orbital çalkalayıcıda karışması sağlandı. Daha sonra plaka streç film ile sarılıp, 37 °C'de 30 dakika boyunca inkübe edildi.
- 4) 30 dakika sonunda 562 nm'de köre karşı (1X PBS: 2X RIPA, 1:1) VERSAMax mikroplaka okuyucuda okundu.
- 5) Absorbans değerlerinin ortalaması alındıktan sonra, doğru denkleminde yerine konularak içerdiği protein miktarı bulundu.

Hücrelerin parçalanması sonucu elde edilen her örnek için yukarıdaki protokole göre total protein miktarları bulundu. Her örnek toplam 40 µg protein

içercek şekilde SDS-PAGE ile protein fraksiyonlarına ayrılıp, PVDF membrana transferi gerçekleştirildi

## **2.11. Protein Analizi**

Temeli; elektroforez işlemiyle poliakrilamid jelde göç ettirilen proteinlerin, membrana transferi ile immobilize edilmesi ve membrandaki proteinlerin immünolojik metotlarla tayin edilmesine dayanır. Membran olarak sıklıkla nitroselülöz veya poliviniliden florür (PVDF) membranlar tercih edilir. Jel, membran ile temas ettirilir ve elektrik akımı uygulanır. Elektrik akımı ile proteinlerin jelden membran üzerine jeldeki ayrıştığı sıralamaya göre transferi sağlanır. Membran, antikorlarla etkinleştirildiğinde, jeldeki proteinlerin ilgisine göre lekeler oluşur.

### **2.11.1. SDS-PAGE**

Poliakrilamid jel elektroforezi ile ayırıştırma yöntemi; SDS-PAGE (sodyumdodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi) olarak anılır. Teknik, proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre ayırıştırılmasını esas alır. Western blot ile birlikte herhangi bir proteinin varlığının ve miktarının belirlenmesinde kullanılır. Genellikle bir moleküler ağırlık markırı kullanılarak büyüklükleri bilinen bantlar oluşturulur ve markırdaki bantlar referans alınarak ilgilenilen proteinler, jelden PVDF veya nitroselülöz membrana transferinin ardından immünoablottama ile belirlenir.

Poliakrilamid jel, N,N-metilenbis-akrilamid (Bis) ve akrilamid adlı iki bileşiğin polimerizasyonu ile oluşur. Bis, jelde çapraz bağları oluşturan ajandır. Polimerizasyon, dimetilaminopiridin (DMAP) veya tetraetilmetilendiamin (TEMED) ile birlikte kullanılan amonyumpersülfatın (AP) ilavesi ile başlatılır.

Moleküllerin jel içinde ayrışmasını, göreceli olarak jelin por büyüklüğü belirler. Jelin por büyüklüğünün belirlenmesinde iki faktör etkilidir: içerdiği akrilamit oranı (%) ve çapraz bağların miktarı (%C). Akrilamit oranı arttıkça, por büyüklüğü azalır. %5 C kadar çapraz bağ, en küçük por büyüklüğünü verir.

| <b>Ayırma Jeli</b>   |                                                     |         |        |        |
|----------------------|-----------------------------------------------------|---------|--------|--------|
| Jel (%)              | % 8                                                 | % 10    | % 12   | % 15   |
| Bir jel için (10 ml) |                                                     |         |        |        |
| % 30'luk Akrilamit   | 2,67 ml                                             | 3,33 ml | 4 ml   | 5 ml   |
| 4X Ayırma Tamponu    | 2,5 ml                                              | 2,5 ml  | 2,5 ml | 2,5 ml |
| Distile su           | 4,8 ml                                              | 4,1 ml  | 3,5 ml | 2,5 ml |
| % 10'luk AP          | 50-100 µl (Oda sıcaklığında her bir jel için 75 µl) |         |        |        |

**Tablo 19: SDS-PAGE Ayırma (Resolving) Jeli Hazırlanması**

| <b>Yığılma Jeli (%3,5'luk) 3 ml</b> |                                   |
|-------------------------------------|-----------------------------------|
| % 30'luk Akrilamit                  | 0,35 ml                           |
| 4X Yığılma Tamponu                  | 0,75 ml                           |
| Distile su                          | 1,9 ml                            |
| % 10'luk AP                         | 20-30 µl (Oda sıcaklığında 25 µl) |

**Tablo 20: SDS-PAGE Yığılma (Stacking) Jeli Hazırlanması**

Tablo 19 ve tablo 20'ye göre jeller oda sıcaklığında hazırlandı. Örneklerde fraksiyonlarına ayrılmak istenen proteinlerin molekül ağırlıkları dikkate alınarak CD3δ ve IP için %10'luk, Tirozinaz C89R ve CFTRΔF508 substratları için %8'lik jel hazırlandı.

#### **2.11.1.1. Örneklerin Jele Yüklenmesi**

Protein bulunan örneklerin, yükleme işlemi öncesi denatüre edilmesi gerekir. Proteinlerin üç boyutlu doğal yapılarının çeşitli etkenlerle bozulmasına denatürasyon denir. Örneklerin denatürasyon işlemi, örnekler 4X yükleme tamponu eklenip ısıtma işlemi ile gerçekleştirildi. 4X yükleme tamponu SDS ve 2-merkaptetanol içerir. SDS, bir deterjan olup hem proteinlerin 3 boyutlu yapılarının bozulmasına hem de proteinin negatif yük kazanmasına yardımcı olur. Proteinlere bağlanan SDS miktarı

proteinin büyüklüğü ile orantılıdır. 2-merkaptoetanol proteinlerin ikincil ve üçüncül yapılarının oluşması sırasında etkin rol alan disülfid bağlarının çözülmesine katkıda bulunur.

CD3δ ve Tirozinaz C89R substratları ile çalışıldığında örnekler 4X yükleme tamponu ilavesinden sonra vortekslenip, blok ısıtıcıda 95°C’de beş dakika bekletilerek denatüre edildi. CFTRΔF508 proteini, 4X yükleme tamponu ilavesinden sonra vorteklenip, 37°C’de 15 dakika bekletilerek denatüre edildi. CFTR, 60°C’nin üzerinde ısıtıldığında çökmektedir ve çözülmeyen yapılar haline gelerek yığılma jelinden geçememektedir (93).

Jel hazırlanıp çapraz bağlanma tamamlandıktan sonra, örnekler jel üzerindeki yükleme kuyucuklarına 40 µg protein olacak şekilde yüklendi ve elektroforez başlatıldı, 200 V’de yürütüldü.

### **2.11.2. Transfer**

Jelde ayrılmış elektriksel yükü bulunan proteinlerin, elektrik alan içerisinde jelden membrana taşınması esasına dayanır. Transfer ıslak ya da yarı kuru durumda yapılabilir. Yarı kuru transfer yaş transferden hızlıdır ancak 100 kDa’dan (1 dalton, 1 hidrojen atomunun ağırlığına eşittir) daha büyük proteinlerin membrana transferi esnasında yaş transfere göre daha az başarılıdır. Çalışmada yaş transfer yöntemi kullanıldı.

Protein taşıyan poliakrilamid jel ile membran doğrudan temas ettirilip iletici bir çözelti içerisinde birleşen iki elektrot arasına sandviç gibi sıkıştırıldı. Soğukta 90 dakika 200 mA elektrik akımı uygulanarak negatif yüklü proteinler pozitif kutba doğru hareket etti, membran ile karşılaştıklarında hareketsiz kaldılar ve membrana bağlandılar, böylelikle membran sürüklenmelerini durdurdu. Membran olarak PVDF

membran kullanıldı. PVDF membranlar, kullanılmadan önce metanol ile ıslatılıp, etkinleştirildi.

### **2.11.3. Membrandaki Proteinlerin Görülmesi ve Bloklama**

Transfer işleminden sonra proteinlerin membrana geçip geçmediğini anlamak için membran yıkama tamponu ile yıkandı ve %2'lik Poncaeu kırmızısı ile ajitasyon ile boyandı. Kırmızı bantların görülmesi proteinlerin varlığını gösterdi. Membran yıkama tamponu ile yıkanarak Poncaeu uzaklaştırıldı.

Western blotta en önemli nokta incelenen protein ile kullanılan antikorlar arasındaki spesifik bağlanmadır. Spesifik olmayan protein bağlanmalarını engellemek için membranın transfer sırasında protein bağlanmayan bölgelerin bloklanması gerekir. Bunun için deneylerde, yıkama solüsyonu ile hazırlanan %5'lik süt ile membran, yarım saat boyunca oda sıcaklığında ajitasyon yoluyla inkübe edildi. Bloklama işleminden sonra membran yıkama solüsyonu ile bir kez 5 dakika boyunca yıkandı ve primer antikor eklendi.

### **2.11.4. İmmünoblot**

Doğrudan belirleme yöntemi ve Dolaylı belirleme yöntemi olmak üzere iki yöntem vardır.

Çalışmada, antikor immünoreaktivliğini arttırmak amacıyla dolaylı belirleme yöntemi tercih edilmiştir. Bu yöntemde, primer antikor antijene bağlanır. Primer antikora karşı geliştirilmiş işaretlenmiş ikincil bir antikor kullanarak bağlanmaya devam edilir. Her bir primer antikor, işaretlenmiş sekonder antikora bağlanabilen birden fazla bölge içerdiğinden sinyal oluşumu artırılmış olup deneyin duyarlılığı artırılır. Çalışmada kullanılan sekonder antikorlar horse radish peroksidaz (HRP) enzimi ile konjuge edilmiş durumdadır.

#### **2.11.4.1. İmmünüblot Basamakları**

1. Bloklama sonrası, membran bir kez 1X tamponu ile 5 dakika boyunca yıkandı.
2. Oda sıcaklığında primer antikor ile orbital çalkalayıcıda bir saat inkübe edildi
3. Bir saat sonunda 15 dakika (5 dakikada bir) 1X yıkama tamponu ile yıkandı.
4. Sekonder antikor ile 1 saat orbital çalkalayıcıda inkübe edildi.
5. Sekonder antikorlar uzaklaştırılıp, 5 dakikada bir 5 kez 1X yıkama tamponu ile yıkandı ve görüntüleme basamağına geçildi.

#### **2.11.4.2. Primer Antikorlar**

Çalışmalarda kullanılan antikorlar; monoklonal anti-HA 1:50000 oranında, monoklonal anti-c-myc 1:14000 oranında, anti-flag 1:1000, monoklonal anti- $\beta$ -aktin 1:20000 oranında, anti-flag poliklonal ve ubikitin antikorları 1:20000 oranında % 5'lik yağsız sütte hazırlandı, koruyucu olarak 1:1000 oranında sodyumazit çözeltisi eklendi ve +4°C'de saklandı.

Çalışmada, monoklonal anti-aktin antikorları ile immünoblot yapılarak aktin düzeyleri karşılaştırıldı ve dolayısıyla proteinlerin yükleme seviyesi kontrol edildi. Anti-myc antikorları kullanarak myc ile işaretlenmiş VCP proteinlerinin seviyeleri ve myc işaretli Tirozinaz C89R ERİY substratının yıkılma seviyeleri karşılaştırıldı. Anti-HA antikorları ile HA ile işaretlenmiş bir ERİY substratı olan CD3 $\delta$  yıkılma seviyeleri karşılaştırıldı. Anti-GFP antikorları ile GFP işaretli CFTR $\Delta$ F508 substratının yıkılma seviyeleri karşılaştırıldı. Anti-flag antikorları ile IP'de VCP ile birlikte çöktürülen Ufd1 ve Npl4 varlığı tayin edildi.

#### **2.11.4.3. Sekonder Antikorlar**

Sekonder antikor olarak goat anti-mouse (Pierce) antikoru 1:7500 oranında %5'lik yağsız sütte hazırlandı ve kullanıldı.

#### **2.11.4.4. Görüntüleme**

HRP enzimi ile konjuge edilmiş sekonder antikorlar ile inkübe edilen membranların görüntülenmesi için SuperSignal WestPico Chemiluminescent Substrate (Pierce) kullanılmıştır. SuperSignal WestPico Chemiluminescent Substrate, immüno blotlar üzerinde HRP'yi belirlemek için yüksek duyarlılıklı bir substrattır. Substrat olarak kullanılan luminol, HRP ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> varlığında okside olur ve uyarılmış ürün olan 3-aminofthalat oluşur. Bu ürün, 425 nm'de ışıma verir. Bu ışıma, sadece enzim-substrat reaksiyonu sırasında oluşur. Yani geçici ve kısıtlı süre zarfında gözlenebilir. Substratın aşırı yoğun sinyal çıkışı pikogram düzeyindeki antijenin tespitini mümkün kılar. Sinyalin duyarlılığı, yoğunluğu ve süresi fotoğrafik veya diğer görüntüleme metotları kullanarak HRP'nin kolay belirlenmesine izin verir. Optimal sonuçları elde etmek için blotlar, tekrarlanan şekilde film ile etkileştirilebilir veya belirteçleri uzaklaştırılıp tekrar işaretlenebilir.

Çalışma sırasında membranlar, SuperSignal WestPico Chemiluminescent Substrate çalışma çözeltileri membran başına 3 ml olacak şekilde 1:1 oranında karıştırılarak taze hazırlandı ve membranla 1 dakika inkübe edildi. Fazla çözelti uzaklaştırıldıktan sonra membran protein kısmı yukarı bakacak şekilde streç film ile kaplandı ve film kasetine yerleştirdi. Blot filmlerine (CL-XPosure Film, Pierce) karanlık odada maruz bırakıldı. Filmler, otomatik film banyo makinasında banyo edildi.

## **2.12. İmmünopresipitasyon (IP)**

İmmunopresipitasyonda, hücreden elde edilen ekstre, ilgili proteini tanıyan antikorlarla inkübe edilir, bu sırada antikor hedef proteine bağlanır. A/G çifti agaroz boncuklar ile antikor-antijen kompleksi çöktürülür. Fiziksel olarak örnekten ilgili protein izole edilir. SDS-PAGE ile bileşenlerine ayrılır ve immünoiblot ile analiz gerçekleştirilir.

### **2.12.1. Hücrelerin Hazırlanması ve Transfeksiyon**

293 HEK hücreleri, 100 mm'lik hücre kültür kabına  $1,2 \times 10^6$  hücre olarak ekildi. 24 saat sonra Ufd1 ve Npl4 VCP-kofaktörlerini kodlayan pFlag-Ufd1 ve pFlag-Npl4'un transfeksiyonu lipofektamin kullanılarak yapıldı. Ertesi gün, hücreler 6 kuyucuklu kültür kaplarına eşit sayıda dağıtılıp ( $2,5 \times 10^5$ ) ekildi. 6 saat sonra mutant ve yabanıl tip VCP'yi kodlayan plazmidlerin transfeksiyonu lipofektamin ile gerçekleştirildi.

Deneyin türüne göre, Ufd1-Npl4-VCP transfekte olan hücreler toplanmadan önce 4 saat 10mM Mg132 ile etkileştirilmiştir.

### **2.12.2. IP için Hücrelerin Parçalanması**

Hücreler örnek başına 120 µl IP için hazırlanan lizatlama tamponu ile 5 dakikada bir 15 saniye vortekslenerek 20 dakika boyunca parçalanmaları sağlandı. 4°C'de 14000 r.p.m.'de 10 dakika santrifüj edildi. Hücre kalıntılarına dokunmadan, hücre lizatı temiz tüplere alındı. Lizatlardan 20'şer µl, steril tüplere input için ayrıldı.

### **2.12.3. IP için Örneklerin Hazırlanması**

Her bir örnekten input için 20 µl lizat ayrıldıktan sonra; kalan lizatların üzerlerine 80'er µl %50 gliserol çözeltisi ve 200'şer µl IP tamponu ve ortama taze olarak 100X PIC'den eklendi.

Ayrı temiz bir falkon tüpünde, her bir örnek başına; 20 µl IP tamponu ve 0,5 µl anti-α-myc antikor karışımı konuldu ve karıştırıldı. Hazırlanan bu çözeltiden, örnek tüplerine 20'şer µl eklendi. Tüplerin ağızları kapatılıp, parafilm ile sarıldı. 4°C'de 1 saat süre ile rotatorda rotasyon hareketi ile inkübe edildi.

#### **2.12.4. IP Boncukların Hazırlanması**

Çalışmalarda Protein A sefaroze boncuklar kullanıldı. Protein A, *Staphylococcus aureus*'un yüzeyinde bulunan bir proteindir, IgG antikorlarına bağlanma yeteneği çok fazladır. Protein A sefaroze boncuklarının tercih edilmesinin nedeni, IP'de kullanılacak anti-c-myc antikorunun IgG1 izotip olmasıdır. Boncuk stoğu çıkartılıp, vortekslerek süspansiyon olmaları sağlandı. Her bir örnek için 20'şer µl boncuk stoğundan alındı. Soğuk IP yıkama tamponu eklenip, vortekslendi ve santrifüj edilerek (4°C 5000 r.p.m. 2 dakika) 5 kez yıkama işlemi yapıldı. Son yıkamadan sonra, süpernatant ortamdan uzaklaştırıldı. Boncuk miktarı kadar IP tamponu eklenip, homojen hale getirildi.

#### **2.12.5. IP boncukları ile lizatların etkileştirilmesi**

IP için hazırlanan örneklerin antikorlar ile 1 saatlik inkübasyonu sonunda, her bir örnek tüpüne hazırlanan IP boncuk süspansiyonundan 20'şer µl eklendi ve 45 dakika süre ile 4°C'de rotasyonel olarak alt üst hareketle inkübe edildi.

45 dakika sonunda, örnekler alınıp santrifüj (5000 r.p.m'de 4°C'de 2 dakika) edildi ve süpernatant pellete zarar vermeden uzaklaştırıldı. Pellet, 5 kez IP yıkama tamponu ile yıkanarak santrifüj edildi (4°C 5000 r.p.m) ve süpernatant pellete zarar vermeden uzaklaştırıldı.

Her bir örnek tüpüne başta eklenen antikor-IP tamponu miktarı kadar (20µl) 2X Yükleme tamponu eklendi. Blok ısıtıcıda 95°C'de 5 dakika inkübe edilerek

denatüre edildi. %10'luk jel kullanılarak SDS-PAGE'de 200 V'de yürütüldü. IP input için ayrılan 20 µl lizat örneklerine de 4X yükleme tamponu eklenip 95°C'de 5 dakika denatürasyon işleminden sonra %10'luk jele yüklendi. Transferi yapıp, immünoiblot ile görüntüendi.

## BÖLÜM III

### 3. BULGULAR

#### 3.1. Biyoinformatik İnceleme

##### 3.1.1. Türler arası sekansların karşılaştırılması:

Farklı türler arasında VCP proteininin dizisi CLUSTAIW2 programı ile yapılmıştır (Şekil 10). IBMPFD hastalarında rapor edilmiş mutasyona uğrayan amino asitlerin farklı türler arasında korunduğu gözlenmiştir.

```
Homosapiens      -----MASGADSKGDD-LSTAILKQKNRPNRLIVDEAINEDNSVVS 40
Musmusculus      -----MASGADSKGDD-LSTAILKQKNRPNRLIVDEAINEDNSVVS 40
Rattusnorvegicus -----MASGADSKGDD-LSTAILKQKNRPNRLIVDEAINEDNSVVS 40
Gallusgallus      -----MASGSDSKADD-LSTAILKQKNRPNRLIVDEAINEDNSVVS 40
Xenopuslaevis     -----MASGSDTKSDD-LSTAILKQKSRPNRLIVDESINEDNSMVVS 40
Daniorerio        -----MASGGESKNDL-LSTAILKQKNRPNRLIVDESINEDNSVVS 40
Drosophilamelanogaster -----MADSKGED-LATAILKRKDRPNRLIVEEAQNDNSVVS 37
Saccharomycescerevisiae MGEEHKPLLDASGVDPREEDKTATAILRRKKKNMLLVDDAINDNSVIA 50
                  :: : * :*****:*. : * :*****:

Homosapiens      LSQPKMDELQFRGDTVLLKGKKRREAVCIVLSDDTCSDEKIRMNRVVRN 90
Musmusculus      LSQPKMDELQFRGDTVLLKGKKRREAVCIVLSDDTCSDEKIRMNRVVRN 90
Rattusnorvegicus LSQPKMDELQFRGDTVLLKGKKRREAVCIVLSDDTCSDEKIRMNRVVRN 90
Gallusgallus      LSQAKMDELQFRGDTVLLKGKKRREAVCIVLSDDTCSDEKIRMNRVVRN 90
Xenopuslaevis     LSQAKMDELQFRGDTVLLKGKKRREAVCIVLSDDTCSDEKIRMNRVVRN 90
Daniorerio        LSQAKMDELQFRGDTVLLKGKKRRETVCIVLSDDTCSDEKVRMNRVVRN 90
Drosophilamelanogaster LSQAKMDELQFRGDTVILKGKKRKETVCIVLSDDTCDDEKIRMNRVVRN 87
Saccharomycescerevisiae INSNTMDKLELFRGDTVLVKGKKRKDTVLIVLIDDELEDGACRINRVVRN 100
                  :.. .*****:*****:*****:*****:*****:

Homosapiens      NLEVVLGDVISIQPCPDVKYKGRIHVLPIDDTVEGITGNLFEVYLKPYFL 140
Musmusculus      NLEVVLGDVISIQPCPDVKYKGRIHVLPIDDTVEGITGNLFEVYLKPYFL 140
Rattusnorvegicus NLEVVLGDVISIQPCPDVKYKGRIHVLPIDDTVEGITGNLFEVYLKPYFL 140
Gallusgallus      NLEVVLGDVISIQPCPDVKYKGRIHVLPIDDTVEGITGNLFEVYLKPYFL 140
Xenopuslaevis     NLEVVLGDVISIQPCPDVKYKGRIHVLPIDDTVEGITGNLFEVYLKPYFL 140
Daniorerio        NLEVVLGDVISIQPCPDVKYKGRIHVLPIDDTVEGITGNLFEVYLKPYFL 140
Drosophilamelanogaster NLCVHLSDVVSQSCPDVKYKGKRVRLPIDESEGVTGNLFEIYLKPYFL 137
Saccharomycescerevisiae NLEVVLGDLVTIHPCPDIKYATRISVLPIDDTIEGITGNLFDVFLKPYFV 150
                  ** :*.*****:*****:*****:*****:*****:
```

Homosapiens EAYRPIRKGDIFLVGGMPAVEFKVVETDPSPYCIVAPDVTIHCEGEPIK 190  
 Musmusculus EAYRPIRKGDIFLVGGMPAVEFKVVETDPSPYCIVAPDVTIHCEGEPIK 190  
 Rattusnorvegicus EAYRPIRKGDIFLVGGMPAVEFKVVETDPSPYCIVAPDVTIHCEGEPIK 190  
 Gallusgallus EAYRPIRKGDIFLVGGMPAVEFKVVETDPSPYCIVAPDVTIHCEGEPIK 190  
 Xenopuslaevis EAYRPIRKGDIFLVGGMPAVEFKVVETDPSPYCIVAPDVTIHCEGEPIK 190  
 Daniorerio EAYRPIRKGDIFLVGGMPAVEFKVVETDPSPYCIVAPDVTIHCEGEPIK 190  
 Drosophilamelanogaster EAYRPIHMGDNFIVAAAMPPIEFKVVLTDFEPYCIVAPETVIFCDGDPK 187  
 Saccharomycescerevisiae EAYRPVRKGDHFVVGGMFQVEFKVVDVEPEEYAVVAQDTIIHWEGEPIN 200  
 \*\*\*\*\*: \*\* \*:\*\*\*.\*\*\* :\*\*\*\*\* .:\*. \*\*:\*\*\* :\*:\*. \*\*:\*\*\*:

Homosapiens REDEEESLNEVGYYDDIGGCRKQLAQIKEMVELPLRHPALFKAIGVKPPRG 240  
 Musmusculus REDEEESLNEVGYYDDIGGCRKQLAQIKEMVELPLRHPALFKAIGVKPPRG 240  
 Rattusnorvegicus REDEEESLNEVGYYDDIGGCRKQLAQIKEMVELPLRHPALFKAIGVKPPRG 240  
 Gallusgallus REDEEESLNEVGYYDDIGGCRKQLAQIKEMVELPLRHPALFKAIGVKPPRG 240  
 Xenopuslaevis REDEEESLNEVGYYDDIGGCRKQLAQIKEMVELPLRHPALFKAIGVKPPRG 240  
 Daniorerio REDEEESLNEVGYYDDIGGCRKQLAQIKEMVELPLRHPALFKAIGVKPPRG 240  
 Drosophilamelanogaster REDEEESLNAVGYDDIGGCRKQLAQIKEMVELPLRHPALFKAIGVKPPRG 237  
 Saccharomycescerevisiae REDEENNMNEVGYYDDIGGCRKQMAQIREMVELPLRHPALFKAIGVKPPRG 250  
 \*\*:\*\*\*.:\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*:\*\*\*:\*\*\*\*\* \*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*

Homosapiens ILLYGPPGTGKTLIARAVANETGAFFFLNGPEIMSKLAGESSENLRRKAF 290  
 Musmusculus ILLYGPPGTGKTLIARAVANETGAFFFLNGPEIMSKLAGESSENLRRKAF 290  
 Rattusnorvegicus ILLYGPPGTGKTLIARAVANETGAFFFLNGPEIMSKLAGESSENLRRKAF 290  
 Gallusgallus ILLYGPPGTGKTLIARAVANETGAFFFLNGPEIMSKLAGESSENLRRKAF 290  
 Xenopuslaevis ILLYGPPGTGKTLIARAVANETGAFFFLNGPEIMSKLAGESSENLRRKAF 290  
 Daniorerio ILLYGPPGTGKTLIARAVANETGAFFFLNGPEIMSKLAGESSENLRRKAF 290  
 Drosophilamelanogaster ILLYGPPGTGKTLIARAVANETGAFFFLNGPEIMSKLAGESSENLRRKAF 287  
 Saccharomycescerevisiae VLMYGPPGTGKTLIARAVANETGAFFFLNGPEVMSKLAGESSENLRRKAF 300  
 \*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:

Homosapiens EEAEKNAPAIIFIDELDAIAPKREKTHGEVERRIVSOLLTMDGLKQRAH 340  
 Musmusculus EEAEKNAPAIIFIDELDAIAPKREKTHGEVERRIVSOLLTMDGLKQRAH 340  
 Rattusnorvegicus EEAEKNAPAIIFIDELDAIAPKREKTHGEVERRIVSOLLTMDGLKQRAH 340  
 Gallusgallus EEAEKNAPAIIFIDELDAIAPKREKTHGEVERRIVSOLLTMDGLKQRAH 340  
 Xenopuslaevis EEAEKNAPAIIFIDELDAIAPKREKTHGEVERRIVSOLLTMDGLKQRAH 340  
 Daniorerio EEAEKNAPAIIFIDELDAIAPKREKTHGEVERRIVSOLLTMDGLKQRAH 340  
 Drosophilamelanogaster EEAEKNAPAIIFIDEIDAIAPKRDKTHGEVERRIVSOLLTMDGMKSSH 337  
 Saccharomycescerevisiae EEAEKNAPAIIFIDEIDAIAPKRDKTHGEVERRIVSOLLTMDGMKARSN 350  
 \*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:

Homosapiens VIVMAATNRPNPIDPALRRFGRFDREVDIGIPDATGRLEILQIHTKMKL 390  
 Musmusculus VIVMAATNRPNPIDPALRRFGRFDREVDIGIPDATGRLEILQIHTKMKL 390  
 Rattusnorvegicus VIVMAATNRPNPIDPALRRFGRFDREVDIGIPDATGRLEILQIHTKMKL 390  
 Gallusgallus VIVMAATNRPNPIDPALRRFGRFDREVDIGIPDATGRLEILQIHTKMKL 390  
 Xenopuslaevis VIVMAATNRPNPIDPALRRFGRFDREVDIGIPDATGRLEILQIHTKMKL 390  
 Daniorerio VIVMAATNRPNPIDPALRRFGRFDREVDIGIPDATGRLEILQIHTKMKL 390  
 Drosophilamelanogaster LIVMAATNRPNPIDPALRRFGRFDREVDIGIPDATGRLEILQIHTKMKL 387  
 Saccharomycescerevisiae VVIAATNRPNPIDPALRRFGRFDREVDIGIPDATGRLEILQIHTKMKL 400  
 \*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:

Homosapiens ADDVDLEQVANETHGHVGADLAALCEAALQAIKKMDLIDLEDETIDAE 440  
 Musmusculus ADDVDLEQVANETHGHVGADLAALCEAALQAIKKMDLIDLEDETIDAE 440  
 Rattusnorvegicus ADDVDLEQVANETHGHVGADLAALCEAALQAIKKMDLIDLEDETIDAE 440  
 Gallusgallus ADDVDLEQVANETHGHVGADLAALCEAALQAIKKMDLIDLEDETIDAE 440  
 Xenopuslaevis SDDVDLEQVANETHGHVGADLAALCEAALQAIKKMDLIDLEDETIDAE 440  
 Daniorerio ADDVDLEQVANETHGHVGADLAALCEAALQAIKKMDLIDLEDETIDAE 440  
 Drosophilamelanogaster HDDVDLEQIAAESHGHHVGADLASLCEAALQAIKKMDLIDLEDETIDAE 437  
 Saccharomycescerevisiae ADDVDLEALAAETHGHVGADIASLCEAAMQAIKKMDLIDLEDETIDAE 450  
 \*\*\*\*\* :\* \*:\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:

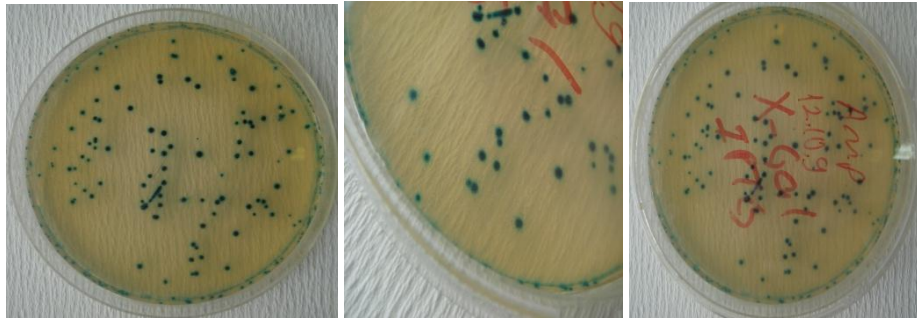
Homosapiens VMNSLAVTMDDFRWALSQSNPSALRETVEVPQVTWEDIGGLEDVKRELQ 490  
 Musmusculus VMNSLAVTMDDFRWALSQSNPSALRETVEVPQVTWEDIGGLEDVKRELQ 490  
 Rattusnorvegicus VMNSLAVTMDDFRWALSQSNPSALRETVEVPQVTWEDIGGLEDVKRELQ 490  
 Gallusgallus VMNSLAVTMDDFRWALSQSNPSALRETVEVPQVTWEDIGGLEDVKRELQ 490  
 Xenopuslaevis VMNSLAVTMDDFRWALSQSNPSALRETVEVPQVTWEDIGGLEDVKRELQ 490  
 Daniorerio VMNSLAVTMDDFRWALSQSNPSALRETVEVPQVTWEDIGGLEDVKRELQ 490  
 Drosophilamelanogaster VLASLAVTMENFRYAMTKSSPSALRETVEVPQVTWEDIGGLEDVKRELQ 487  
 Saccharomycescerevisiae VLDLSLGVMTDNFRFALGNSNPSALRETVEVPQVTWEDIGGLEDVKRELQ 500  
 \*:\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:



### 3.2. SDM ile Elde Edilen Mutasyonların Değerlendirilmesi

#### 3.2.1. Yönlendirilmiş Kontrolü (QuikChange II)

QuikChange II SDM kiti kontrolü; kit ile birlikte sunulan pWhitescript plazmidi ve kontrol primerleri kullanılarak yapıldı. PCR ürünü, XL-1 Blue bakterilerine transformasyonu yapıldı. Antibiyotiksiz LB içerisinde 250 r.p.m.'de 37°C'de 1 saat inkübe edildi. Bu esnada, ampisilinli LB agar petrisine, hazırlanan 100 µl IPTG ve 100 µl X-gal çözeltileri eklerək agarın üzerine yayıldı ve 30 dakika bekletildi. 37°C'de. 16 saat inkübasyonun sonunda petrilere mavi koloniler görüldü.



**Şekil 11: Yönlendirilmiş Mutajenez Kontrolü.** β-galaktozidaz (β-gal+) enzim yeteneği kazanan bakterilerin IPTG'li (İzopropil-1-tiyo-β-D-galaktopiranozit) ortamda X-gal'i (5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-galaktopiranozit) parçalaması sonucu kolonilerin mavi renkte görülmesi

pWhitescript 4,5-kb kontrol plazmidi DNA dizisi "TAA" ile sonlanmaktadır. Kontrol primerlerini kullanılarak yönlendirilmiş mutajenez ile Timin (T) bazı Sitozin (C) bazına dönüştürüldüğünde β-galaktozidaz (*lacZ*) enzimini kodlayıcı gen dizisi elde edilir. Transformasyonda kullanılan XL-1 Blue bakterilerinde *lacI<sup>q</sup>* mutasyonu bulunmaktadır. *lacI<sup>q</sup>* mutasyonu, *lacI* baskılayıcının verimini artırarak *lac* operonunun transkripsiyonunu durdurur. Bir laktoz analogu olan IPTG ortama ilave edildiğinde, *lac* operonu baskıdan kurtulur ve β-galaktozidaz enziminin transkripsiyonu gerçekleşir. Deney sonunda, β-galaktozidaz (β-gal+) enzim yeteneği kazanan bakterilerin IPTG'li ortamda X-gal'i parçalaması sonucu açığa çıkan okside ürün nedeniyle bakteri kolonileri mavi renkte görülür.

### 3.2.2. VCP Mutasyonları ve Kolonilerin Seçimi

#### 3.2.2.1. Başarılı Mutasyon Denemelerinin Belirlenmesi

QuikChange II yönlendirilmiş mutajenez kiti ile gerçekleştirilen mutasyon denemeleri PCR ürünlerinden R93C, R95C, P137L, R155C, R155S, G157R, R159C, R191Q, L198W, T262A, N387H ve A439S'nin DH5 $\alpha$  bakterilerine transformasyonu sonucu koloniler görüldü. A232E mutasyon denemeleri başarısız oldu.

R93C, P137L, G157R, R159C, R191Q, T262A, N387H ve A439S mutasyon denemeleri PCR ürünleri ilk denemede koloniler görülmüştür. XXX-IDT'den alınan primerleri tekrar kullanarak R95C ve R155C mutasyon denemeleri, PCR sırasında annealing (birleşme) sıcaklığı 55°C'ye düşürülerek ve dNTP miktarları 1  $\mu$ l daha artırılarak reaksiyon tekrarlandı. Yapılan transformasyon sonucu ampisilinli LB agar petrilere koloni oluşumu gözlemlendi. Reaksiyonlar sonucu koloni oluşumu gözlenmeyen mutasyon denemeleri için, Alpha DNA'dan alınan primerler kullanılarak R95G, R155S, L198W ve A232E reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Yapılan tüm denemelerde annealing derecesinin düşürülmesine ve dNTP miktarının artırılmasına rağmen R95G ve A232E reaksiyonları sonunda yapılan transformasyonlarda koloni oluşumu gözlenmedi. R155S ve L198W reaksiyon ürünlerinin transformasyonu sonucu koloni oluşumu gözlenlenmiştir.

Yapılan mutasyon denemeleri sonucunda, koloni oluşumu gözlenen reaksiyonlar ve gözlenen koloni sayıları Tablo 21'de ifade edilmiştir.

| Mutasyon Denemesi | Koloni Sayısı | Mutasyon Denemesi | Koloni Sayısı |
|-------------------|---------------|-------------------|---------------|
| R93C              | 15            | R159C             | 10            |
| R95C              | 3             | R191Q             | 10            |
| P137L             | 30'dan fazla  | L198W             | 3             |
| R155C             | 30'dan fazla  | T262A             | 20            |
| R155S             | 6             | N387H             | 20            |
| G157R             | 15            | A439S             | 7             |

**Tablo 21: Mutasyon Denemeleri ve Gözlenen Koloni Sayıları**

### 3.2.2.2. Kolonilerin Seçimi

Yapılan mutasyon denemeleri sonucunda gözlenen kolonilerden, her bir mutasyon denemesi için 3'er koloni seçildi. Koloni seçimleri sırasında, birbirinden ayrı ayrı ve agar petride farklı alanlara konuşlanmış kolonilerden örnek alınmaya özen gösterildi. İstenilen her bir mutasyon için, transformasyonları sonunda oluşan 3 farklı koloniden örnek alındı ve miniprep yapıldı. Miniprep ile elde edilen DNA, istenilen mutasyonun gerçekleşip gerçekleşmediğini belirlemek için sekanslamaya gönderildi. Örneklerin final konsantrasyonu (100 ng/μl) olarak her birinden 20 μl hazırlandı. Çözücü olarak ultrasaf su kullanıldı. Sekanslamada kullanılan primerler, 1 μg/μl olarak hazırlanan primer çözeltilerinden, final konsantrasyonu 60 ng/μl olarak hazırlandı.

### 3.2.3. DNA Dizi Analizi Sonuçları

#### 3.2.3.1. Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Macrogen (Kore), firmasından gelen sekans sonuçları "ab1" dosya formatında alınmıştır. 4Peaks (Mekentosj, ABD) programı kullanılarak sekans sonuçları değerlendirilmiştir. Programda veriler, her nükleotide özgü olan sinyallerin (piklerin) büyüklüğüne göre değerlendirilerek nükleotit dizisi çıkarılmaktadır. Alınan nükleotit dizisi; translasyon ikonu kullanılarak protein sentezi sırasında okunan aminoasit dizilişine dönüştürülebilmektedir. Bu sırada çerçeve (frame) değiştirilerek okumanın en verimli olanı değerlendirmeye alınmaktadır.

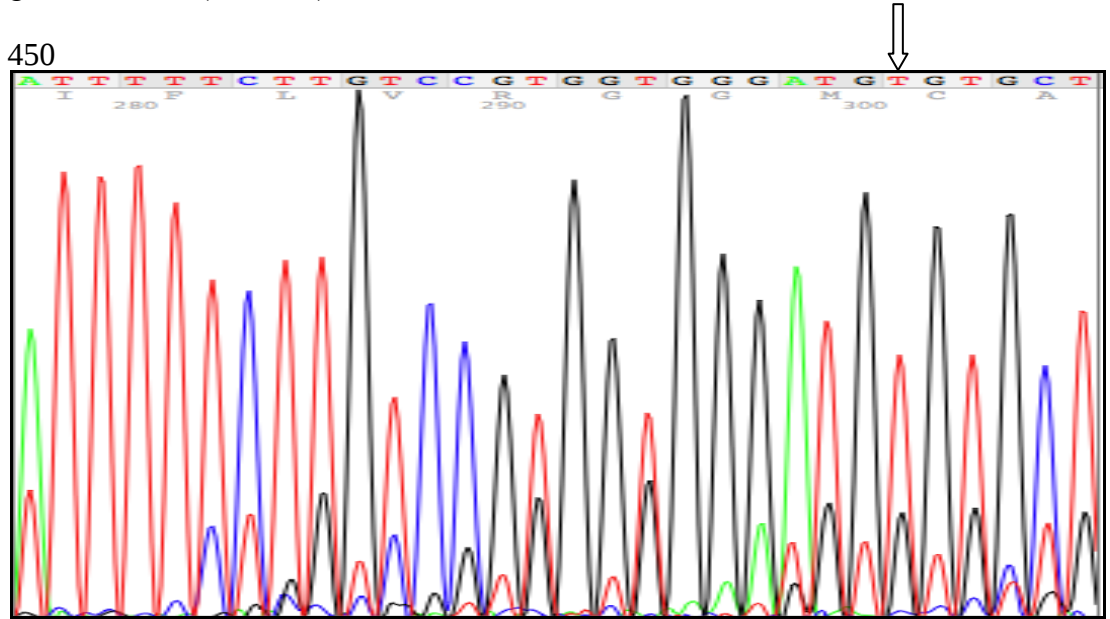
### 3.2.3.1.1 Sonuçlarının Değerlendirilmesine Örnek: R159C-3

Yabanıl VCP’de 159. aminoasit “Arginin” aminoasidi iken planlanan reaksiyon sonucu oluşan mutant tip (R159C-VCP) de 159. aminoasitin “Sistein” amino asidine dönüştüğü görülmüştür.

Yabanıl VCP’de Arginin aminoasitini kodlayan üçlü baz dizisi “cgt” (474) şeklindedir. Yönlendirilmiş mutajenez kiti ile gerçekleştirilmek istenilen R159C mutasyonu için tasarlanan primerlerde “cgt” (474) üçlü dizisinin, “sistein” aminoasidini kodlayan “tgt”(474) üçlü baz dizisine dönüşmesi istenmiştir. Bunun için kullanılan primerle 475. sırada yer alan “Sitozin” bazının “Timin” bazına dönüşümü hedeflenmiştir.

Yabanıl VCP Baz dizisi 450.bazdan başlayarak:

450 att ttt ctt gtc cgt ggt ggg atg **cgt** gct şeklindedir. DNA dizi analiz sonuçları ile karşılaştırıldığında; R159C-3 adlı örnekte istenilen mutasyonun gerçekleştiği görülmektedir (Şekil 12).



Şekil 12: R159C-3’ün 450. bazdan itibaren DNA dizisi

Kırmızı pikler Timin; yeşil pikler Adenin, mavi pikler Sitozin, siyah pikler ise Guanin bazının sinyallerini ifade etmektedir.

Değerlendirme sırasında dikkat edilen bir önemli nokta da istenilen mutasyonun dışında ekstra mutasyonların varlığının değerlendirilmesidir. Yine bu değerlendirme yapılırken, sekanslama cihazının verdiği piklerin gürültüsüne ve sıklığına dikkat edilmiştir.

DNA dizi analiz sonucu ile yabanıl VCP'nin baz dizisi karşılaştırıldığında istenen mutasyonun gerçekleştiği görülmüştür. DNA dizi analiz sonuçları incelendiğinde istenmeyen bir mutasyona rastlanmamıştır.

#### **3.2.3.2. İstenen mutasyonların gerçekleştiği örnekler**

3.2.3.1 de açıklandığı gibi elde edilen kolonilerden izole edilen plazmidlerde istenen mutasyonların gerçekleşip gerçekleşmediği, sekans sonuçlarının 4Peaks programı ile değerlendirilmesiyle saptanmıştır.

Değerlendirme sonucuna göre; R93C-1, R95C-1, P137L-1, R155C-3, R155S-2, G157R-2 ve G157R-3, R159C-1, R191Q-1, L198W-2 ve L198W-3, T262A-3, N387H-3 ve A439S-1 şeklinde kodlanan örneklerde istenen mutasyonun gerçekleştiği belirlendi.

### **3.3. Protein Miktar Tayini için Standart Eğri Çizimi**

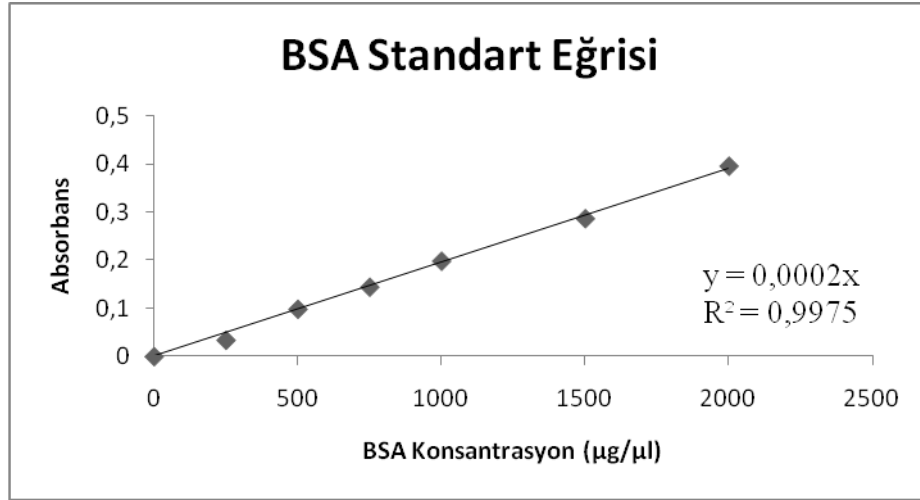
Çeşitli konsantrasyonlarda hazırlanan sığır serum albümin çözeltilerinin, mikroluka okuyucuda okunan absorbans değerleri tabloda ifade edilmiştir .

Doğruyu çizmek için apsise (x eksenine) bilinen konsantrasyon değerleri, ordinata (y eksenine) bilinen konsantrasyon değerine karşılık okunan absorbans

değerleri girildi (**Tablo 22**) ve doğru çizilerek doğru denklemi ve doğrunun eğimi bulundu.

| Konsantrasyon (µg/ml) | Absorbans |
|-----------------------|-----------|
| 0                     | 0         |
| 250                   | 0.034     |
| 500                   | 0.098667  |
| 750                   | 0.144667  |
| 1000                  | 0.198667  |
| 1500                  | 0.287334  |
| 2000                  | 0.396667  |

**Tablo 22: Standart Albümin Çözeltilerine Karşı Okunan Absorbans Değerleri**



**Şekil 13: BSA Standart Doğrusu ve Doğru Denklemi**

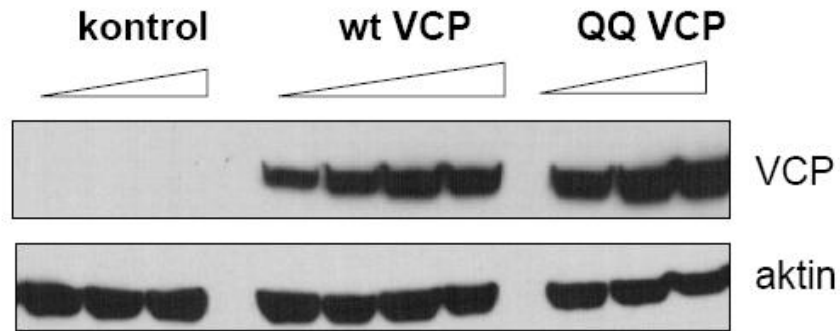
#### **3.4. Yabancı tip VCP'nin ve ATPaz inaktif mutant VCP-QQ'nun ekspresyon testi**

293 HEK hücrelerine yabancı tip VCP'yi ve ATPaz inaktif mutant QQ-VCP'yi kodlayan plazmidlerin ve kontrol olarak pCDNA3.1 boş plazmidinin 0,5 µg, 1 µg, 2 µg veya 3 µg olarak transfeksiyonları yapılmıştır. Hücrelerin ekspresyon verimliliği karşılaştırılarak çalışmalarda kullanılacak uygun doz aralığı seçilmek istenmiştir. 293 HEK hücreleri deneyden bir gün önce 6 kuyucuklu hücre kültür kaplarına  $2 \times 10^5$ 'er hücre olarak ekilmiştir. Ertesi gün hücrelere yabancı tip VCP , mutant VCP-QQ ve

boş plazmidin transfeksiyonu yapılmıştır. 16 saat sonra parçalanmış, anti-myc antikoru ile immünoiblot analizi yapılmıştır.

| Plazmid İçeriği | Transfekte edilen miktarları (µg) |   |   |   |
|-----------------|-----------------------------------|---|---|---|
| pcDNA3.1        | 0,5                               | 1 | 2 | - |
| VCP-wt          | 0,5                               | 1 | 2 | 3 |
| VCP-QQ          | 0,5                               | 1 | 2 | - |

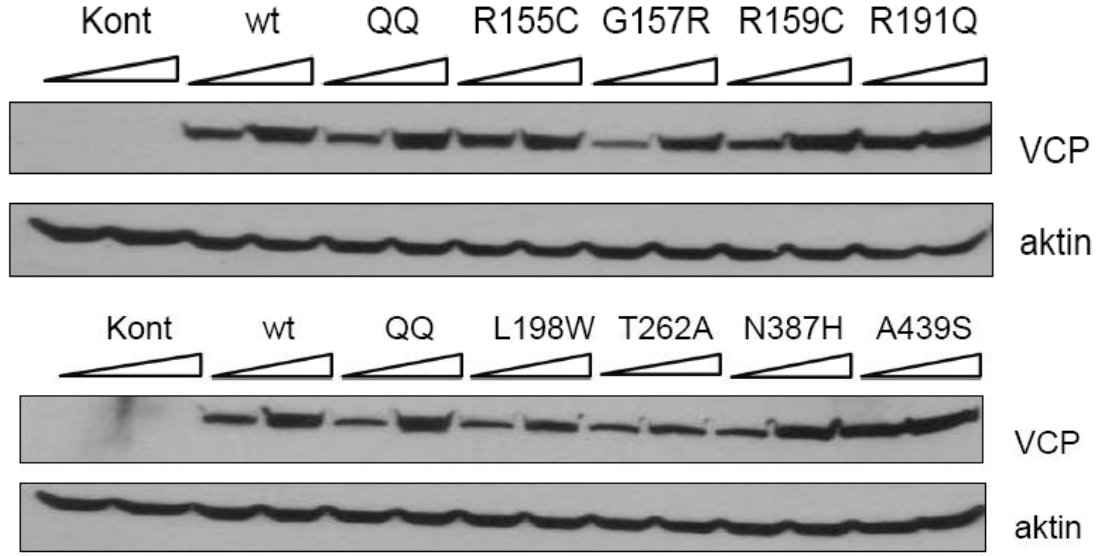
**Tablo 23: VCP-wt, VCP-QQ ve Kontrol Transfeksiyon Testi Miktarları**



**Şekil 14: VCP yabancı tip ve VCP-QQ ekspresyon testi.** 293 HEK hücrelerine VCP yabancı tip ve ATPaz inaktif olduğu bilinen mutant VCP-QQ'yu kodlayan plazmidlerin artan dozda transfeksiyonu yapılmıştır. Artan doza karşı verdikleri ekspresyon düzeyi anti-myc-m antikoru kullanılarak belirlenmiştir. Anti-β-aktin antikoru ile yükleme kontrolü yapılmıştır.

### 3.5. Mutant VCP kodlayan plazmidlerin ekspresyon testi

Mutant VCP'lerin ekspresyon verimliliği ile yabancı tip VCP'nin ve ATPaz inaktif mutant VCP-QQ'nun ekspresyon verimliliği karşılaştırılmak istenmiştir. Bu amaçla mutant VCP'ler 0,5 µg ve 1,5 µg olmak üzere farklı iki dozda hücrelere transfekte edilmiştir. 293 HEK hücreleri deneyden bir gün önce 6 kuyucuklu hücre kültür kaplarına  $2 \times 10^5$ 'er hücre olarak ekilmiştir. Ertesi gün hücrelere yabancı (wt, wild type) ve mutant VCP'lerin transfeksiyonu yapılmıştır. 16 saat sonra parçalanmış, anti-myc antikoru ile immünoiblot analizi yapılmıştır

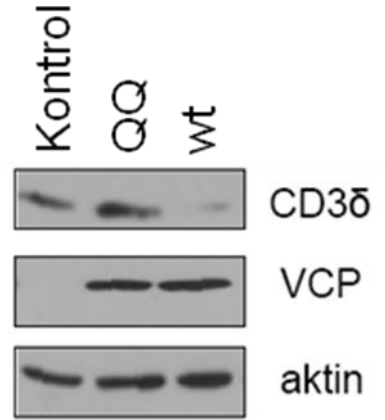


**Şekil 15: VCP Mutant Ekspresyon Testi.** 293 HEK hücrelerine VCP yabanıl tip ve mutantlarını kodlayan plazmidlerin artan dozda transfeksiyonu yapılmıştır. Artan doza karşı verdikleri ekspresyon düzeyi anti-myc-m antikorunu kullanarak belirlenmiştir. Anti- $\beta$ -aktin antikorunu ile yükleme kontrolü yapılmıştır.

Elde edilen veriler göz önüne alınarak IBMPFD ilişkili VCP mutantlarını kodlayan plazmidlerin farklı oranları kullanılarak tüm VCP ekspresyonlarının eşitlenmesine çalışılmıştır.

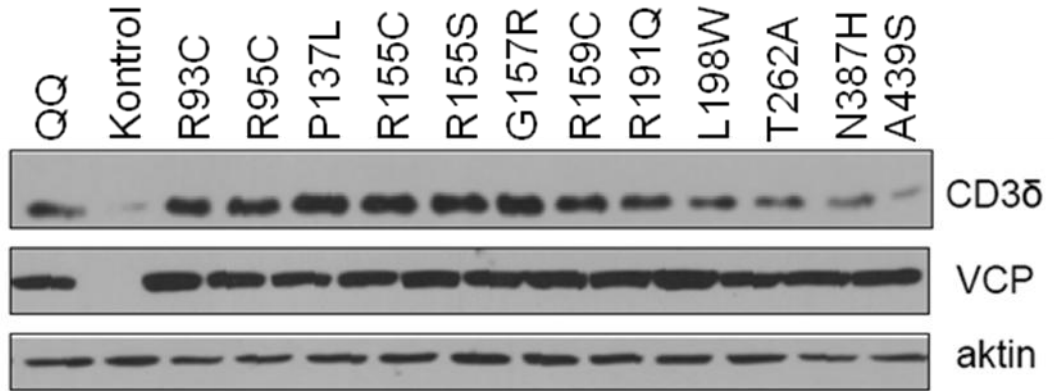
### 3.6. CD3 $\delta$ üzerine IBMPFD-iliskili VCP mutantlarının etkisi

293 HEK hücreleri deneyden bir gün önce  $1,2 \times 10^6$ 'şar hücre olarak 100 mm'lik hücre kültür kaplarına ekildi. Ertesi gün CD3 $\delta$  transfeksiyonu yapıldı. Transfeksiyondan 6 saat sonra hücreler eşit olarak 6 kuyucuklu hücre kültür kaplarına ( $2 \times 10^5$ ) ekildi. Ertesi gün, yabanıl tip ve mutant tip VCP'lerin transfeksiyonu CD3 $\delta$  eksprese eden hücrelere yapıldı. İkinci transfeksiyondan 16 saat sonra hücreler parçalandı ve immünoiblot ile proteinleri belirlendi.



**Şekil 16: wt-VCP ve QQ-VCP'nin CD3δ üzerine etkisinin incelenmesi.** CD3δ eksprese eden 293 HEK hücrelerine yabancı tip ve QQ VCP'leri kodlayan plazmidlerin transfeksiyonu gerçekleştirilmiştir. CD3δ substratının düzeyi, anti-HA antikoruna ile VCP düzeyleri anti-myc antikoruna ile belirlenmiştir. Yükleme kontrolü olarak, anti-β-aktin antikoruna ile aktin düzeylerine bakılmıştır.

Şekil 16'da görüldüğü üzere, wt-VCP CD3δ düzeyinde bir azalışa neden olurken, QQ-VCP eksprese edildiğinde CD3δ akümülyasyona uğramıştır.

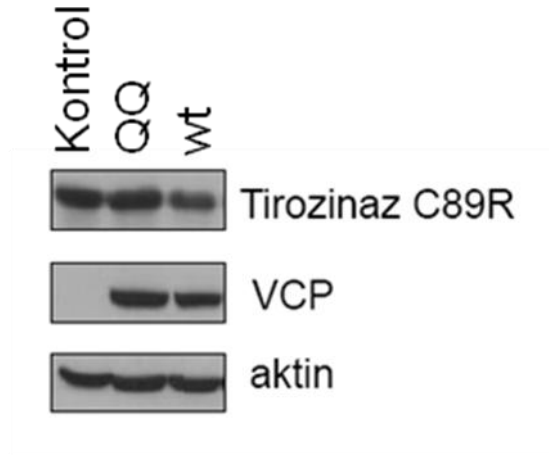


**Şekil 17: IBMPFD-ilişkili mutant VCP'lerin ve QQ-VCP'nin CD3δ üzerine etkisinin incelenmesi.** CD3δ eksprese eden 293 HEK hücrelerine IBMPFD ilişkili mutant VCP'leri ve QQ-VCP'yi kodlayan plazmidlerin transfeksiyonu gerçekleştirilmiştir. CD3δ substratının düzeyi, anti-HA antikoruna ile VCP düzeyleri anti-myc antikoruna ile belirlenmiştir. Yükleme kontrolü olarak, anti-β-aktin antikoruna ile aktin düzeylerine bakılmıştır.

R93C, R95C, P137L, R155C, R155S, G157R ve R159C mutantlarını eksprese eden hücrelerde, VCP-QQ ile karşılaştırıldığında benzer oranda birikme olduğu görülmektedir.

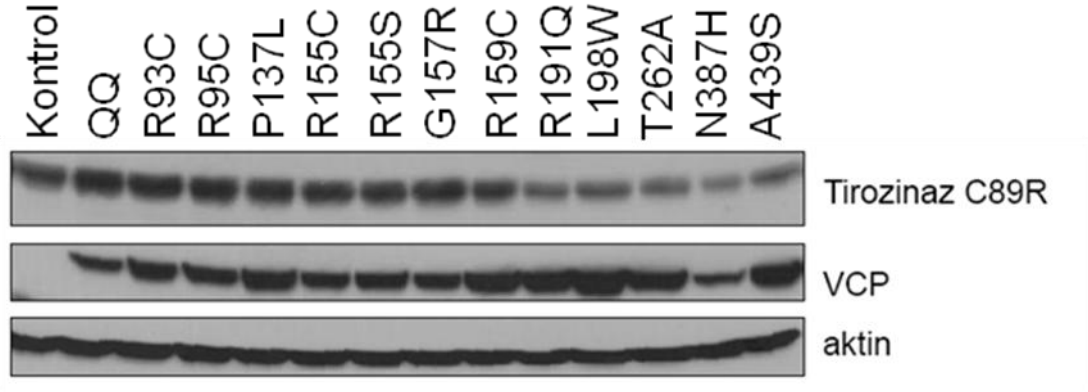
### 3.7. Tirozinaz C89R üzerine IBMPFD-ilişkili VCP mutantlarının etkisi

293 HEK hücreleri deneyden bir gün önce  $1,2 \times 10^6$ 'şar hücre olarak 100 mm'lik hücre kültür kaplarına ekildi. Ertesi gün Tirozinaz C89R transfeksiyonu yapıldı. Transfeksiyondan 6 saat sonra hücreler eşit olarak 6 kuyucuklu hücre kültür kaplarına ( $2 \times 10^5$ ) ekildi. Ertesi gün, Tirozinaz C89R eksprese eden hücrelere yabancı ve mutant VCP'lerin transfeksiyonu yapıldı. İkinci transfeksiyondan 16 saat sonra hücreler parçalandı ve immüno blot ile proteinleri belirlendi.



**Şekil 18: wt-VCP'nin ve QQ-VCP'nin Tirozinaz C89R üzerine etkisinin incelenmesi.** Tirozinaz C89R eksprese eden 293 HEK hücrelerine wt-VCP'yi ve QQ VCP'yi kodlayan plazmidlerin transfeksiyonu gerçekleştirilmiştir. Tirozinaz C89R substratının düzeyi ve VCP düzeyleri anti-myc antikoru ile belirlenmiştir. Yükleme kontrolü olarak, anti- $\beta$ -aktin antikoru ile aktin düzeylerine bakılmıştır.

Şekil 16'ya benzer olarak Şekil 18'de, wt-VCP mutant Tirozinaz C89R düzeyinde bir azalışa neden olurken, QQ-VCP eksprese edildiğinde Tirozinaz C89R birikime uğramıştır.

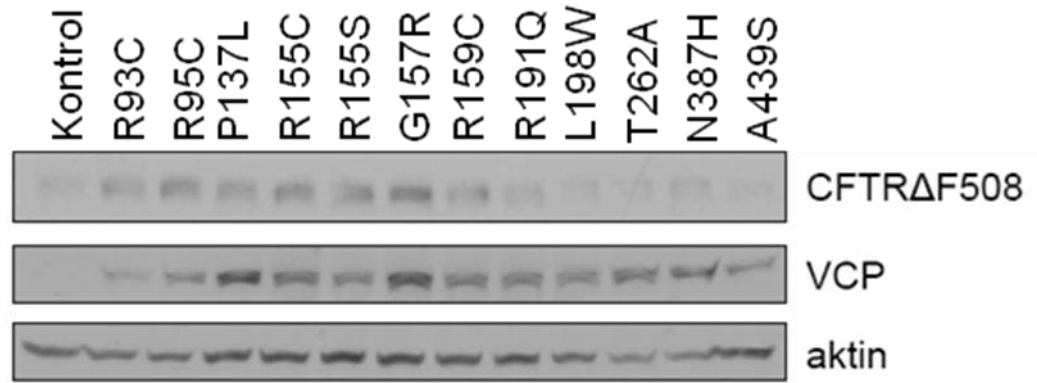


**Şekil 19: Tirozinaz C89R eksprese eden hücrelere mutant VCP'lerin transfeksiyonu.** Tirozinaz C89R eksprese eden 293 HEK hücrelerine ATPaz inaktif mutant VCP-QQ'yu ve mutant VCP'leri kodlayan plazmidlerin transfeksiyonu gerçekleştirilmiştir. Tirozinaz C89R substratının düzeyi ve VCP'lerin ekspresyon düzeyleri anti-myc antikoru ile belirlenmiştir. Yükleme kontrolü olarak, anti- $\beta$ -aktin antikoru ile aktin düzeylerine bakılmıştır.

R93C, R95C, P137L, R155C, R155S, G157R ve R159C mutantlarını eksprese eden hücrelerde, VCP-QQ mutantını eksprese eden hücrelerle benzer oranda akümülayon görülmüştür.

### 3.8. CFTR $\Delta$ F508 üzerine IBMPFD-ilişkili VCP mutantlarının etkisi

293 HEK hücreleri deneyden bir gün önce  $1,2 \times 10^6$ 'şar hücre olarak 100 mm'lik hücre kültür kaplarına ekildi. Ertesi gün CFTR $\Delta$ F508 transfeksiyonu yapıldı. Transfeksiyondan 6 saat sonra hücreler eşit olarak 6 kuyucuklu hücre kültür kaplarına ( $2 \times 10^5$ ) ekildi. Daha sonra, CFTR $\Delta$ F508 eksprese eden hücrelere kontrol plazmidi ve mutant tip VCP'lerin transfeksiyonu yapıldı. İkinci transfeksiyondan 16 saat sonra hücreler parçalandı ve immünoblot ile protein analizi yapıldı.

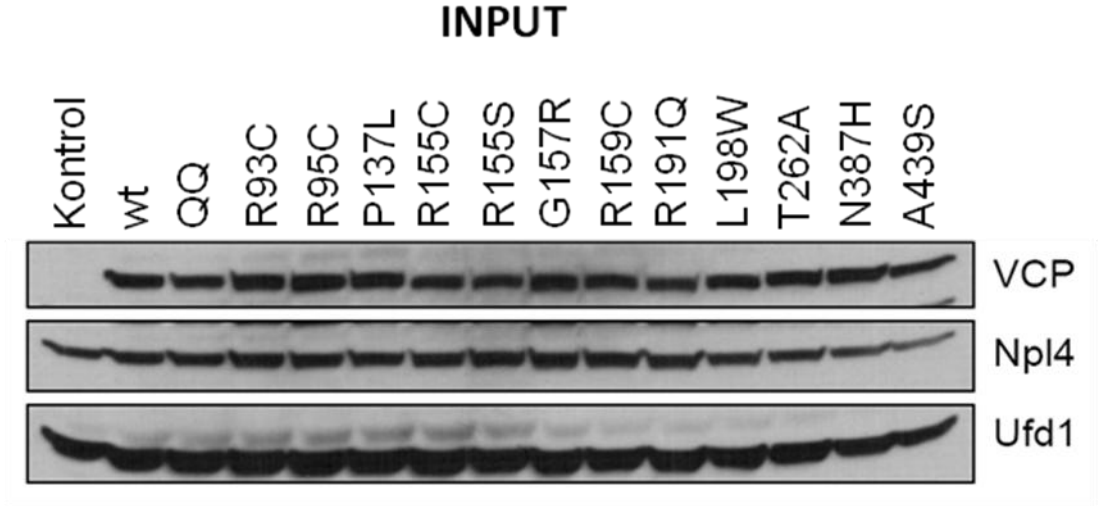


**Şekil 20: CFTRΔF508 eksprese eden hücrelere mutant VCP'lerin transfeksiyonu.** CFTRΔF508 eksprese eden 293 HEK hücrelerine mutant VCP'leri kodlayan plazmidlerin transfeksiyonu gerçekleştirilmiştir. CFTRΔF508 substratının düzeyi anti-GFP antikoru ile VCP'lerin ekspresyon düzeyleri anti-myc antikoru ile belirlenmiştir. Yükleme kontrolü olarak, anti-β-aktin antikoru ile aktin düzeylerine bakılmıştır.

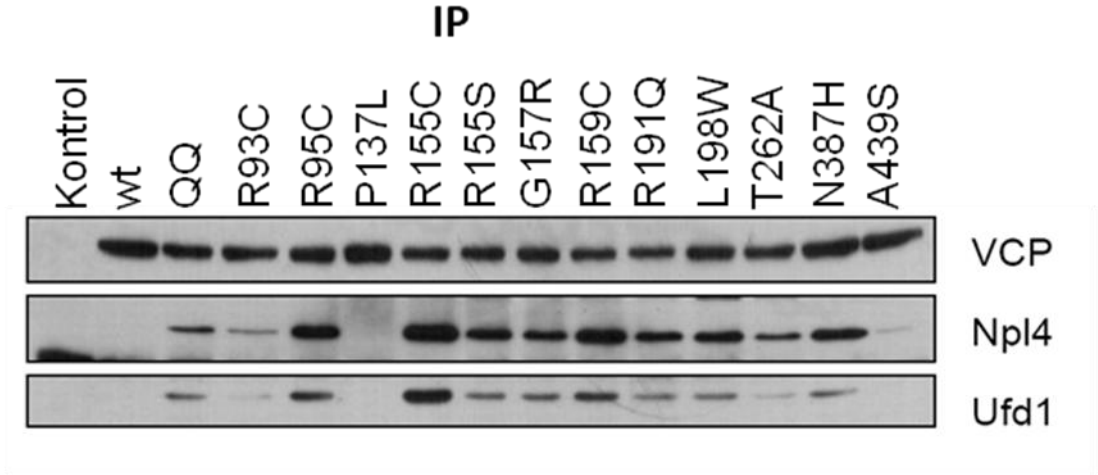
R93C, R95C, P137L, R155C, R155S, G157R ve R159C mutant tiplerini eksprese eden hücrelerde CFTRΔF508 substratının biriktiği görülmektedir.

### **3.9. IBMPFD-ilişkili VCP mutantlarının Ufd1-Npl4 kofaktörleri ile hücre içerisindeki etkileşmesinin incelenmesi**

293 HEK hücreleri deneyden bir gün önce  $1,2 \times 10^6$ 'şar hücre olarak 100 mm'lik hücre kültür kaplarına ekildi. Ertesi gün Ufd1'in ve Npl4'ün transfeksiyonu birlikte yapıldı. Transfeksiyondan 6 saat sonra hücreler eşit olarak 6 kuyucuklu hücre kültür kaplarına ( $2 \times 10^5$ ) ekildi. Ertesi gün, Ufd1-Npl4 eksprese eden hücrelere yabancı ve mutant VCP'lerin transfeksiyonu yapıldı. İkinci transfeksiyondan 16 saat sonra hücreler parçalandı ve IP'si yapıldı, immüno blot ile protein analizi yapıldı.



**Şekil 21: Input: Ufd1-Npl4 eksprese eden 293 HEK hücrelerine mutant VCP'lerin ve yabancı tip VCP'nin transfeksiyonu.** Ufd1-Npl4 eksprese eden 293 HEK hücrelerine mutant tip VCP'lerin ve yabancı tip VCP'nin transfeksiyonu gerçekleştirilmiştir. IP için parçalandıktan sonra %10'u input için ayrılmıştır. Ufd1 ve Npl4 proteinlerinin düzeyleri anti-flag antikoru ile VCP düzeyleri ise anti-myc antikoru ile belirlenmiştir.

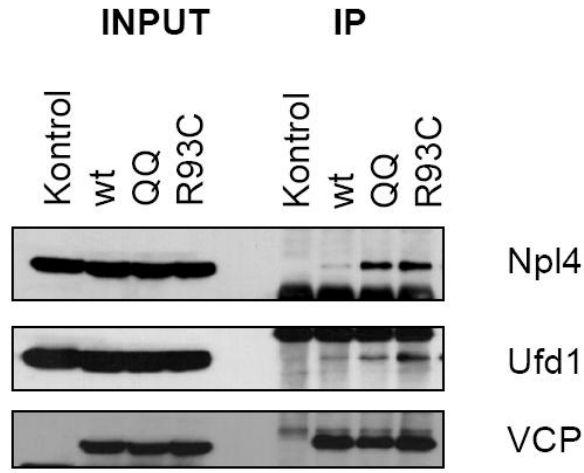


**Şekil 22: Ufd1-Npl4 eksprese eden hücelere mutant VCP'lerin transfeksiyonunun ardından yapılan immünopresipitasyon.** Ufd1-Npl4 eksprese eden 293 HEK hücrelerine mutant tip VCP'lerin ve yabancı tip VCP'nin transfeksiyonunun ardından parçalanıp, anti-myc antikoru ile immünopresipitasyonu yapılmıştır. VCP ile etkileşen Ufd1 ve Npl4 anti-flag antikoru ile VCP düzeyleri ise anti-myc antikoru ile belirlenmiştir.

Proteazom inhibe edilmediği takdirde; P137L ve yabancı tip VCP eksprese eden hücrenin benzer şekilde Ufd1 ve Npl4 ile etkileşmesi gözlenmemiştir. Bunun

yanında R159C ve R155C eksprese eden hücrelerde, Ufd1 ve Npl4 ile etkileşmenin en fazla olduğu görülmektedir.

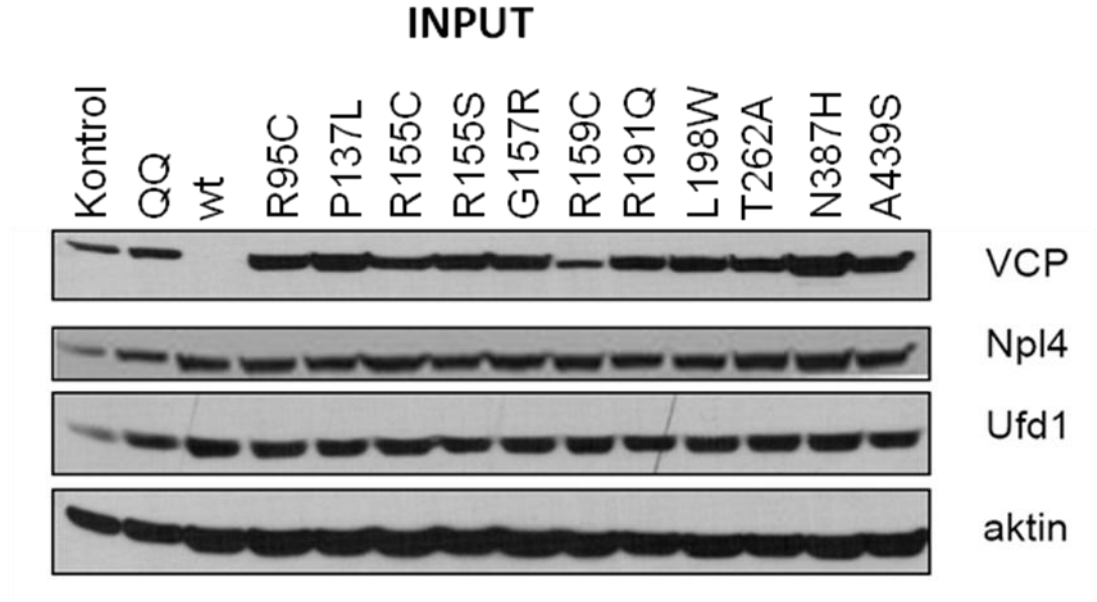
VCP'nin Ufd1-Npl4 etkileşmesinin gözlenebilmesi için VCP-Ufd1-Npl4 kompleksinin, kompleks halinde kenetlenmesi gerektiği düşünülerek proteazomun inhibe edilmesine karar verilmiştir. Bu amaçla Mg132 ile hücreler 4 saat etkileştirilmiştir. Ön denemede sadece VCP yabancı tip, mutant VCP-QQ ve VCP-R93C ile çalışılmıştır.



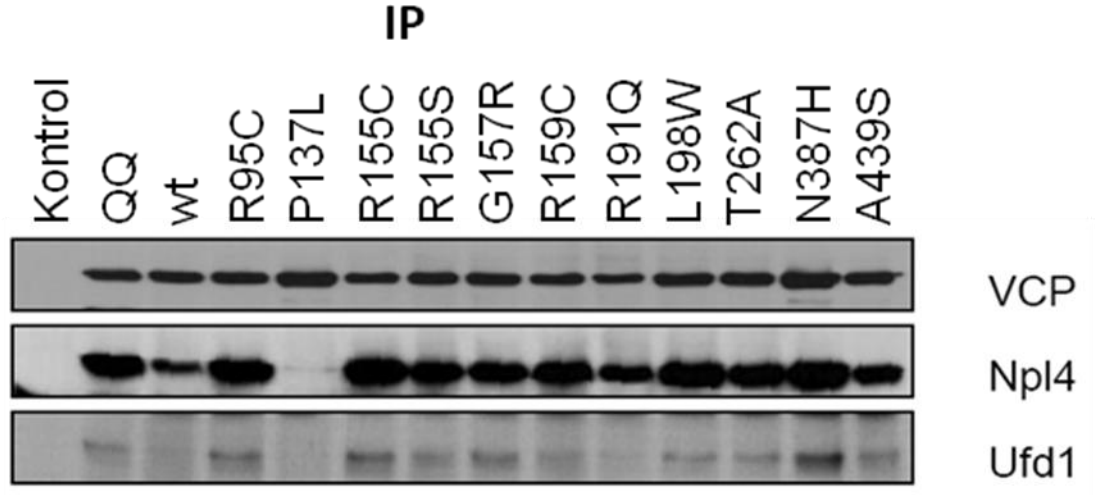
**Şekil 23: IP: Proteazom inhibe edilerek Ufd1-Npl4 eksprese eden hücrelerde mutant R93C, VCP-QQ ve VCP-wt'in transfeksiyonu ile yapılan ön deneme.** Ufd1-Npl4 eksprese eden 293 HEK hücrelerine VCP tiplerinin transfeksiyonunun ardından, VCP'lerin UN etkileşmesinin gözlenebilmesi için proteazomlar Mg132 ile inhibe edilmiştir. Mg132 eklendikten 4 saat sonra hücreler IP için parçalanmış, %10'u input için ayrılmıştır. VCP'ler, anti-myc antikoru kullanarak çöktürülmüştür. VCP ile çöken Ufd1 ve Npl4 proteinlerini ve inputtaki Npl4 ve Ufd1 düzeylerini belirlemek için anti-flag antikoru kullanılmıştır. VCP düzeyleri anti-myc antikoru ile belirlenmiştir.

Hastalarda sık rastlanan R93C mutant proteinin Ufd1-Npl4 eksprese eden HEK hücrelerinde proteazom inhibe edildiği takdirde VCP-QQ (ATPaz inaktif) mutantına benzer şekilde Ufd1 ve Npl4 ile etkileştiği görülmektedir. Bu deneysel koşullarda yabancı tip VCP'nin Ufd1 ve Npl4 ile etkileşimi gözlenebilmiştir. Bu deney koşulları

kullanılarak IBMPFD-ilişkili diğer mutantlar üzerinde de immünopresipitasyon deneyi tekrar edilmiştir.



**Şekil 24: IBMPFD ile ilişkili VCP mutantlarının proteazomu inhibe edilen hücrelerde Ufd1-Npl4 ile etkileşimi.** Ufd1-Npl4 eksprese eden 293 HEK hücrelerine VCP tiplerinin transfeksiyonunun ardından, VCP'lerin UN etkileşmesinin gözlenebilmesi için proteazomlar Mg132 ile inhibe edilmiştir. Mg132 eklendikten 4 saat sonra hücreler IP için parçalanmış, %10'u input için ayrılmıştır. VCP'lerin seviyesi anti-myc antikoru ile, Npl4'ün ve Ufd1'in düzeyleri anti-flag antikoru ile belirlenmiştir. Anti- $\beta$ -aktin antikoru ile aktin düzeylerine bakılarak yükleme kontrolü yapılmıştır.



**Şekil 25: IBMPFD ile ilişkili VCP mutantlarının proteazomu inhibe edilen hücrelerde Ufd1-Npl4 ile etkileşimi.** Ufd1-Npl4 eksprese eden 293 HEK hücrelerine VCP tiplerinin transfeksiyonunun ardından, VCP'lerin Ufd1-Npl4 ile etkileşmesinin gözlenebilmesi için proteazomlar Mg132 ile inhibe edilmiştir. Mg132 eklendikten 4 saat sonra hücreler parçalanmış ve anti-myc antikoru kullanılarak IP'si yapılmıştır. VCP ile birlikte çöken Ufd1 ve Npl4 proteinleri anti-flag antikoru ile VCP düzeyleri anti-myc antikoru ile belirlenmiştir.

Ufd1-Npl4 eksprese eden 293 HEK hücrelerinde proteazom inhibe edildiği takdirde P137L-VCP mutant eksprese eden hücrede, mutant VCP'nin Npl4 ve Ufd1 ile etkileşmediği IP sonucunda görülmektedir. wt-VCP, QQ-VCP dahil diğer mutant VCP'lere göre daha az Ufd1-Npl4 ile etkileşmekte ise de P137L-VCP ile Ufd1-Npl4'un etkileşmediği görülmektedir.

## ***BÖLÜM IV***

### **4. TARTIŞMA VE SONUÇ**

Kemik Paget hastalığı ve frontotemporal demans ile gözlenen inklüzyon cisimcik miyopati hastalığı, otozomal dominant taşınan genetik bir hastalıktır. IBMPFD’li hastalardan alınan kas liflerinde inklüzyon ve vakuol oluşumuna rastlanmıştır. Inklüzyonlara, proteinlerin proteazomal yıkımı dahil bir çok hücresel süreçte görev alan p97/VCP’de meydana gelen mutasyonların neden olduğu düşünülmektedir (50). IBMPFD’li hastaların kaslarında p97/VCP ubikitin içeren agregatlar oluşturmaktadır. p97/VCP’nin işlev gösterememesi nedeniyle ubikitin-proteazom sisteminin ve ERİY’in görevini yerine getirememesi sonucu, yanlış katlanmış yıkılamayan proteinlerin, agregasyona ve akümülyasyona neden olabileceği önerilmektedir (40).

IBMPFD hastalığının 9. Kromozomun 9p13-p12 bölgesinde lokalize olan VCP genindeki mutasyonlara bağlı olduğu ilk kez 2004 yılında gösterilmiştir (50). Hastalardaki mutasyonların VCP’nin işlevini değiştirerek ya da kayba uğratarak, ubikitin-proteazom sisteminde ubikitinle konjuge proteinlerin akümülyasyonuna neden olup, hücrenin hayatta kalmasını zorlaştıran ER stresini indüklediği düşünülmektedir (62, 50). *In vivo* ve *in vitro* çalışmalar, VCP’nin biyolojik işlevlerini gösterebilmesi için ATPaz aktivitesine gereksinimi olduğunu

göstermektedir. VCP'deki IBMPFD ile ilişkilendirilen mutasyonların, VCP'nin oligomerizasyonunu veya ATPaz aktivitesini etkilemediği gösterilmiştir (1).

Weihl ve arkadaşları (1); C2C12 fare miyoblast hücrelerine R155H ve R95G mutantları transfekte ettiklerinde, yabancı tip transfekte edilen hücreler ile mutant transfekte ettikleri hücreleri karşılaştırdıklarında; mutant hücrelerde ubiquitinlenmiş proteinlerin, ATPaz etkinliğini ortadan kaldırılan VCP-QQ mutantına benzer şekilde arttığını göstermişlerdir. Aynı çalışmada, R95G ve R155H mutantları CFTR $\Delta$ F508'in yıkımını yavaşlattığını, yıkılamayan CFTR $\Delta$ F508'in mutant VCP ile kolokalize olduğunu göstermişlerdir.

CD3 $\delta$  eksprese eden 293 HEK hücrelerine IBMPFD ile ilişkilendirilen 11 farklı mutasyonun transfeksiyonundan sonra; R93C, R95C, P137L, R155C, R155S, G157R ve R159C eksprese eden hücrelerde ATPaz inaktif mutant VCP-QQ'ya benzer şekilde CD3 $\delta$ 'nın birikimine neden olmuştur. Farklı bir ERİY substratı olan Tirozinaz C89R eksprese eden hücrelere, 11 farklı VCP mutantı transfekte edildiğinde R93C, R95C, P137L, R155C, R155S, G157R ve R159C eksprese eden hücrelerin Tirozinaz C89R'nin akümülyasyonuna neden olduğu görüldü. Bu durum CD3 $\delta$ 'nın sonuçları ile tutarlıdır. Mutasyonların VCP'nin işlevinde nasıl bir değişiklik yapıp ERİY'i etkilediği bilinmemektedir. IBMPFD ilişkili mutasyonların VCP'nin kofaktörleri ile etkileşmesini inhibe ettiği ya da işlev gösterebilmesi için AAA bölgelerinde konformasyonel değişiklik sonucu hekzamer yapısını oluşturamadığı, bu nedenle ATPaz etkisini göstermesini inhibe ettiği önerilmiştir. Ancak mutantların oligomerizasyonu ve ATPaz aktivitesini etkilemediği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (1). Yakın zamanda yayınlanan bir çalışmada ise IBMPFD-ilişkili mutant VCP'lerin ADP-bağlı formu destabilize ederek nükleotid

durumları arasındaki geçişin zamanlamasını değiştirdiği ve bu nedenle substrat ve VCP N bölgesi arasındaki etkileşimi önlediği önerilmektedir (94).

IBMPFD-ilişkili mutant VCP'lerin kofaktör etkileşmesinde sorunlara neden olduğu bir diğer hipotezdir. VCP'nin hücre içerisinde görev yaptığı çok farklı işlevleri olduğu ve bunların VCP ile etkileşen kofaktörler yardımıyla belirlendiği düşünüldüğünde bu hipotez daha da kuvvetlenmektedir. Yine çok kısa süre önce yayınlanan bir çalışmada, IBMPFD ilişkili VCP mutantlarının (R95G, R155H) kofaktör bağlanmasında denge sorunu yaşadığı ve bunun proteinopatilere yol açtığı da önerilmiştir (95). Mutant VCP'lerin ubiquitin ligaz E4B ile etkileşiminin azaldığı ancak deubikitine edici enzim ataxin3 ile etkileşiminin arttığı gösterilmiştir. Yine aynı çalışmada IBMPFD ilişkili mutant VCP'lerle E4B etkileşmesinin, yabanıl tip VCP'den farklı olarak, Ufd1 ve Npl4 ile yarışmaya girdiği gösterilmiştir. Bu durum da yabanıl tip VCP'nin aksine IBMPFD-ilişkili mutant VCP'lerin başka proteinlerle etkileşmesinde sorunlar yaşadığını önermektedir.

Diğer taraftan Ufd1-Npl4 kompleksi hakkında Isaacson ve arkadaşları, sık rastlanan R95G ve R155H mutasyonunun VCP'nin N bölgesinde Npl4 bağlandığı bölgede olduğunu NMR ile göstermişler, VCP'nin kofaktörleri ile etkileşemediğini ve bu nedenle ERİY'de görevini yerine getiremediği hipotezini desteklemişlerdir (71). Ancak bu çalışma ile P137L-VCP dışındaki tüm IBMPFD ilişkili VCP mutantların Ufd1-Npl4 kompleksi ile yabanıl tip VCP'ye göre daha fazla etkileştiği bulunmuştur (**Şekil 25**). VCP'nin N bölgesinde yer alan 137. konumunda bulunan prolin aminoasitinin ya da çevresindeki bir bölgenin Ufd1-Npl4 ile etkileşmesinde işlevi olduğunu düşünmekteyiz. Bu çerçevede ilerideki çalışmalarda 137. amino asit çevresindeki aminoasitler mutasyona uğratarak VCP üzerinde Ufd1-Npl4 bağlanma bölgesinin aydınlatılması planlanmaktadır.

Weihl ve arkadaşları 2005 yılında yaptıkları bir çalışmada, R95G ve R155H mutantlarının bir ERİY substratı olan CFTR $\Delta$ F508 proteininde akümülyasyona yol açtığını göstermişlerdir (1).

Bu tez çalışmasında IBMPFD hastalarında rapor edilmiş tüm VCP mutantları, mutasyona özgü primerler kullanılarak yönlendirilmiş mutajenez yöntemi ile elde edilmiştir. Bu mutasyonların; CFTR $\Delta$ F508, Tirozinaz C89R ve CD3 $\delta$  adlarıyla bilinen ERİY substratları üzerindeki etkileri ön tarama amacıyla incelenmiştir. Bulgularımıza göre VCP'nin kofaktör bağlanma bölgesi N domaininde gözlenen IBMPFD-ilişkili mutantlar, substratların belirgin düzeyde birikimine yol açmaktadır. Ön taramada belirlenen bu N domain mutantlarının UNC45 gibi IBMPFD hastalığı ile ilişkilendirilmiş proteinler üzerine etkisi gelecek çalışmalarda incelenecektir.

Sonuçlarımız ERİY substrat düzeyinde belirgin birikime neden olan IBMPFD ilişkili VCP mutantlarının, mutasyonu kofaktör bağlanma bölgesi N domainde içerenler olduğunu göstermiştir. VCP'nin ERİY'in retrotranslokasyon aşamasında kofaktörleri Ufd1-Npl4 olduğundan bu mutantların kofaktör etkileşme kapasiteleri immünopresipitasyon yöntemi ile incelenmiştir. İlginç olarak, P137L mutant VCP dışında tüm IBMPFD ilişkili mutantlar VCP'nin ATPaz inaktif mutanıtı VCP-QQ'ya benzer olarak yabancı VCP'ye göre çok daha fazla Ufd1-Npl4 ile etkileşmiştir. Bu duruma göre mutant VCP'lerin Ufd1-Npl4 ile etkileşmesinde problem olmadığı ancak kenetlenme problemi olduğunu ve kompleksin tekrar ayrışmadığını önermekteyiz. Gelecekte yapılacak çalışmalarla IBMPFD ilişkili VCP mutantlarının şaperon fonksiyonundaki etkileri yanısıra otofajide birlikte çalıştığı HDAC6 ile etkileşimi üzerine etkileri incelenecektir.

UNC45 adlı bir protein kas filament oluşumu sırasında miyozinin biraraya getirilmesi (*miyozin assembly*)’nde rol alan bir moleküler şaperondur. *C. elegans*’da sarkomerlerin biraraya gelerek oluşması UFD2 ve CHN1 aracılı gerçekleşmektedir. Bu iki ubiquitin ligaz enzimi UNC45 ubiquitinasyonunu düzenleyerek çizgili kas gelişiminde görev almaktadır. *C. elegans*’da IBMPFD ilişkili iki VCP mutanları (R95G, R155H) kullanıldığında UNC45 yıkımının bozulduğu, bu proteinin biriktiği olduğu ve bunun da miyotübüllerde şiddetli miyofibril disorganizasyonuna neden olduğu gözlenmiştir (96). Memelilerde UFD2 homologu olan E4B ubiquitin ligazı da UNC45 yıkımında görev almaktadır. İlginç olarak Fernándeiz-Sa’iz ve arkadaşlarının 2010 yılında yaptıkları çalışma IBMPFD ilişkili VCP mutantlarının E4B ile etkileşimlerinde bozukluklar olduğunu göstermiştir (95). Tüm bu çalışmalarda kullanılan mutantlar R95G ve R155H mutantlarıdır. Bu mutantların sadece UNC45’in yanısıra klasik ERİY substratı olan CFTRΔF508 birikimine de neden olduğu bilinmektedir (96, 1).

Çalışmamız, diğer çalışmalarda kullanılan iki mutant bildirilmiş tüm IBMPFD ilişkili VCP mutantlarını içermektedir. Elde edilen veriler VCP’nin N bölgesinde bulunan mutantların (R93C, R95C, P137L, R155C, R155S, G157R ve R159C) tüm test substratlarımızın düzeyini oldukça etkili bir şekilde arttırdığını göstermektedir. Mutantların Ufd1-Npl4 kofaktörleri ile etkileşimi incelendiğinde ise P137L mutanları dışında tüm mutantların etkileşimi arttırdığı görülmektedir.

İleri çalışmalar VCP’nin 137. amino asidinin Ufd1-Npl4 etkileşimi üzerine olan etkilerinin incelenmesi, UNC45 substratına tüm mutantların etkisinin miyoblast hücrelerinde araştırılması ve ERİY mekanizmasında görevli diğer proteinlerin

düzeylerinin UNC45 kaynaklı defektlerin giderilmesinde kullanıp kullanılamayacağını belirlenmesi üzerine olacaktır.

## **ÖZET**

### **KEMİK PAGET HASTALIĞI VE FRONTOTEMPORAL DEMANS İLE GÖZLENEN İNKLÜZYON CİSİMCİK MİYOPATİ HASTALIĞINDA GÖRÜLEN MUTASYONLARIN ENDOPLAZMİK RETİKULUM İLİŞKİLİ PROTEİN YIKIM MEKANİZMASI (ERİY) ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Bu çalışmada, IBMPFD hastalığı ile ilişkilendirilen 11 farklı VCP mutasyonlarının ERİY mekanizması üzerine etkileri incelendi. Ayrıca VCP'deki bu mutasyonların, VCP'nin Ufd1 ve Npl4 ile etkileşmesinde bir değişikliğe neden olup olmadığı araştırıldı.

Bu amaçla, bugüne kadar IBMPFD ile ilişkilendirilen 11 farklı VCP mutanları yönlendirilmiş mutajenez ile elde edildi. ERİY substratı eksprese eden 293 HEK hücrelerine IBMPFD'li mutantlar, yabancı VCP ve ATPaz inaktif mutant VCP-QQ ile birlikte transfeksiyonu yapıldı. Ardından immüno blot yöntemi ile ERİY üzerindeki etkilerine bakıldı. Çalışmada ERİY substratları olarak CD3δ, CFTRΔF508 ve Tirozinaz C89R kullanıldı. VCP'nin Ufd1 ve Npl4 ile etkileşmelerine, Npl4-Ufd1 eksprese eden 293 HEK hücrelerine IBMPFD'li mutantların transfeksiyonunun ardından VCP'nin immüno presipitasyon yöntemi ile çöktürülmüş ve immüno blot analizi yapılmıştır.

Yapılan çalışmalar sonucunda, IBMPFD ile ilişkilendirilen mutasyonların sadece VCP'nin N bölgesinde lokalize olan R93C, R95C, P137L, R155C, R155S, G157 ve R159C mutasyonlarının ERİY substratlarında belirgin birikime neden olduğu görüldü. İmmünopresipitasyon sonuçlarına göre mutantlardan sadece P137L'nin hem Ufd1 hem de Npl4 ile etkileşemediği görüldü. Ayrıca bu çalışma ile P137L-VCP dışındaki tüm IBMPFD ilişkili VCP mutantların Ufd1-Npl4 kompleksi ile yabani tip VCP'ye göre daha fazla etkileştiği bulunmuştur. Çalışmada elde edilen sonuçlara dayanarak VCP'nin N bölgesinde yer alan 137. konumunda bulunan prolin aminoasitinin ya da 137. aminoasit çevresindeki bir bölgenin Ufd1-Npl4 ile etkileşmesinde işlevi olduğunu düşünmekteyiz.

Bu sonuçlara göre VCP'nin sadece kofaktör etkileşiminde önemli olan N bölgesinde bulunan mutasyonları, ERİY üzerinde belirgin bir işlev bozukluğuna neden olmaktadır. Gelecekte yapılacak çalışmalarla N bölgesindeki mutasyonların ERİY mekanizması üzerindeki etkilerinin moleküler ayrıntıları incelenecek ve P137L mutant VCP'nin Ufd1-Npl4 ile etkileşmesini nasıl inhibe ettiği araştırılacaktır.

## ***ABSTRACT***

### **INVESTIGATION OF THE EFFECT OF MUTATIONS CAUSING INCLUSION BODY MYOPATHY WITH PAGET'S DISEASE OF BONE AND FRONTOTEMPORAL DEMENTIA ON ENDOPLASMIC RETICULUM ASSOCIATED DEGRADATION (ERAD)**

In this study, the effect of all reported IBMPFD-associated VCP mutations on ERAD pathway was investigated. Furthermore, the hypothesis that these VCP mutations cause an imbalance in VCP-Ufd1-Npl4 complex was analyzed.

To test the hypothesis, 11 IBMPFD-associated VCP mutations were generated using site-directed mutagenesis. VCP mutants, wt-VCP and ATPase inactive mutant encoding plasmids were transfected in 293 HEK cells expressing ERAD substrates (CD3 $\delta$ , CFTR $\Delta$ F508 and Tyrosinase C89R). Afterwards, analysis the effect of IBMPFD mutants on ERAD was determined by immunoblot. The interaction of VCP and Ufd1-Npl4 were examined in 293 HEK cells expressing Npl4-Ufd1 by IP.

Our results revealed that only mutantions localized within N domain of VCP (R93C, R95C, P137L, R155C, G157R and R159C mutations) increased the levels of ERAD substrates. Our IP results demonstrated that only P137L VCP does not interacted with Npl4 and Ufd1. However, other 10 mutants interact with Ufd1-Npl4 more than VCP-wt expressing cells. We suggest that proline at position 137 or a

region including this aminoacid might have an important role in VCP-Npl4-Ufd1 interaction.

These results suggest that mutations only within N domain of p97/VCP abrogate its function during ERAD. Further studies will focus on molecular mechanisms of this inhibition and the role of aminoacid at position 137 of VCP in VCP-Ufd1-Npl4 interaction.

## YARARLANILAN KAYNAKLAR

1. Wehl, C. C., Dalal, S., Pestronk, A. and Hanson, P. I. (2006). Inclusion body myopathy-associated mutations in p97/VCP impair endoplasmic reticulum-associated degradation, *Hum Mol Genet*, 15 (2): 189-99
2. Frohlich, K. U., Fries, H. W., Rudiger, M., Erdmann, R., Botstein, D. and Mecke, D. (1991). Yeast cell cycle protein CDC48p shows full-length homology to the mammalian protein VCP and is a member of a protein family involved in secretion, peroxisome formation, and gene expression, *J Cell Biol*, 114 (3): 443-53
3. Koller, K. J. and Brownstein, M. J. (1987). Use of a cDNA clone to identify a supposed precursor protein containing valosin, *Nature*, 325 (6104): 542-5
4. Neuwald, A. F., Aravind, L., Spouge, J. L. and Koonin, E. V. (1999). AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes, *Genome Res*, 9 (1): 27-43
5. Pamnani, V., Tamura, T., Lupas, A., Peters, J., Cejka, Z., Ashraf, W. and Baumeister, W. (1997). Cloning, sequencing and expression of VAT, a CDC48/p97 ATPase homologue from the archaeon *Thermoplasma acidophilum*, *FEBS Lett*, 404 (2-3): 263-8
6. Peters, J. M., Walsh, M. J. and Franke, W. W. (1990). An abundant and ubiquitous homo-oligomeric ring-shaped ATPase particle related to the putative vesicle fusion proteins Sec18p and NSF, *EMBO J*, 9 (6): 1757-67
7. Wang, Q., Song, C. and Li, C. C. (2004). Molecular perspectives on p97-VCP: progress in understanding its structure and diverse biological functions, *J Struct Biol*, 146 (1-2): 44-57
8. Halawani, D., LeBlanc, A. C., Rouiller, I., Michnick, S. W., Servant, M. J. and Latterich, M. (2009). Hereditary inclusion body myopathy-linked p97/VCP mutations in the NH2 domain and the D1 ring modulate p97/VCP ATPase activity and D2 ring conformation, *Mol Cell Biol*, 29 (16): 4484-94
9. DeLaBarre, B. and Brunger, A. T. (2003). Complete structure of p97/valosin-containing protein reveals communication between nucleotide domains, *Nat Struct Biol*, 10 (10): 856-63
10. Zhang, X., Shaw, A., Bates, P. A., Newman, R. H., Gowen, B., Orlova, E., Gorman, M. A., Kondo, H., Dokurno, P., Lally, J., Leonard, G., Meyer, H., van Heel, M. and Freemont, P. S. (2000). Structure of the AAA ATPase p97, *Mol Cell*, 6 (6): 1473-84
11. Wang, Q., Song, C. and Li, C. C. (2003). Hexamerization of p97-VCP is promoted by ATP binding to the D1 domain and required for ATPase and biological activities, *Biochem Biophys Res Commun*, 300 (2): 253-60
12. Meyer, H. H., Shorter, J. G., Seemann, J., Pappin, D. and Warren, G. (2000). A complex of mammalian ufd1 and npl4 links the AAA-ATPase, p97, to ubiquitin and nuclear transport pathways, *EMBO J*, 19 (10): 2181-92

13. Song, C., Wang, Q. and Li, C. C. (2003). ATPase activity of p97-valosin-containing protein (VCP). D2 mediates the major enzyme activity, and D1 contributes to the heat-induced activity, *J Biol Chem*, 278 (6): 3648-55
14. Egerton, M. and Samelson, L. E. (1994). Biochemical characterization of valosin-containing protein, a protein tyrosine kinase substrate in hematopoietic cells, *J Biol Chem*, 269 (15): 11435-41
15. Lavoie, C., Chevet, E., Roy, L., Tonks, N. K., Fazel, A., Posner, B. I., Paiement, J. and Bergeron, J. J. (2000). Tyrosine phosphorylation of p97 regulates transitional endoplasmic reticulum assembly in vitro, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97 (25): 13637-42
16. Livingstone, M., Ruan, H., Weiner, J., Clauser, K. R., Strack, P., Jin, S., Williams, A., Greulich, H., Gardner, J., Venere, M., Mochan, T. A., DiTullio, R. A., Jr., Moravcevic, K., Gorgoulis, V. G., Burkhardt, A. and Halazonetis, T. D. (2005). Valosin-containing protein phosphorylation at Ser784 in response to DNA damage, *Cancer Res*, 65 (17): 7533-40
17. Vandermoere, F., El Yazidi-Belkoura, I., Slomianny, C., Demont, Y., Bidaux, G., Adriaenssens, E., Lemoine, J. and Hondemack, H. (2006). The valosin-containing protein (VCP) is a target of Akt signaling required for cell survival, *J Biol Chem*, 281 (20): 14307-13
18. Hui, L., Pei, D. S., Zhang, Q. G., Guan, Q. H. and Zhang, G. Y. (2005). The neuroprotection of insulin on ischemic brain injury in rat hippocampus through negative regulation of JNK signaling pathway by PI3K/Akt activation, *Brain Res*, 1052 (1): 1-9
19. Shiozawa, K., Goda, N., Shimizu, T., Mizuguchi, K., Kondo, N., Shiozawa, N., Shirakawa, M. and Hiroaki, H. (2006). The common phospholipid-binding activity of the N-terminal domains of PEX1 and VCP/p97, *FEBS J*, 273 (21): 4959-71
20. Alzayady, K. J., Panning, M. M., Kelley, G. G. and Wojcikiewicz, R. J. (2005). Involvement of the p97-Ufd1-Npl4 complex in the regulated endoplasmic reticulum-associated degradation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors, *J Biol Chem*, 280 (41): 34530-7
21. Ballar, P., Zhong, Y., Nagahama, M., Tagaya, M., Shen, Y. and Fang, S. (2007). Identification of SVIP as an endogenous inhibitor of endoplasmic reticulum-associated degradation, *J Biol Chem*, 282 (47): 33908-14
22. Dreveny, I., Kondo, H., Uchiyama, K., Shaw, A., Zhang, X. and Freemont, P. S. (2004). Structural basis of the interaction between the AAA ATPase p97/VCP and its adaptor protein p47, *EMBO J*, 23 (5): 1030-9
23. Vembar, S. S. and Brodsky, J. L. (2008). One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9 (12): 944-57

24. Kano, F., Kondo, H., Yamamoto, A., Tanaka, A. R., Hosokawa, N., Nagata, K. and Murata, M. (2005). The maintenance of the endoplasmic reticulum network is regulated by p47, a cofactor of p97, through phosphorylation by cdc2 kinase, *Genes Cells*, 10 (4): 333-44
25. Kano, F., Tanaka, A. R., Yamauchi, S., Kondo, H. and Murata, M. (2004). Cdc2 kinase-dependent disassembly of endoplasmic reticulum (ER) exit sites inhibits ER-to-Golgi vesicular transport during mitosis, *Mol Biol Cell*, 15 (9): 4289-98
26. Ballar, P., Shen, Y., Yang, H. and Fang, S. (2006). The role of a novel p97/valosin-containing protein-interacting motif of gp78 in endoplasmic reticulum-associated degradation, *J Biol Chem*, 281 (46): 35359-68
27. Miyachi, K., Hirano, Y., Horigome, T., Mimori, T., Miyakawa, H., Onozuka, Y., Shibata, M., Hirakata, M., Suwa, A., Hosaka, H., Matsushima, S., Komatsu, T., Matsushima, H., Hankins, R. W. and Fritzler, M. J. (2004). Autoantibodies from primary biliary cirrhosis patients with anti-p95c antibodies bind to recombinant p97/VCP and inhibit in vitro nuclear envelope assembly, *Clin Exp Immunol*, 136 (3): 568-73
28. Pye, V. E., Beuron, F., Keetch, C. A., McKeown, C., Robinson, C. V., Meyer, H. H., Zhang, X. and Freemont, P. S. (2007). Structural insights into the p97-Ufd1-Npl4 complex, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104 (2): 467-72
29. DeLaBarre, B., Christianson, J. C., Kopito, R. R. and Brunger, A. T. (2006). Central pore residues mediate the p97/VCP activity required for ERAD, *Mol Cell*, 22 (4): 451-62
30. McCracken, A. A. and Brodsky, J. L. (1996). Assembly of ER-associated protein degradation in vitro: dependence on cytosol, calnexin, and ATP, *J Cell Biol*, 132 (3): 291-8
31. Schmitz, A. and Herzog, V. (2004). Endoplasmic reticulum-associated degradation: exceptions to the rule, *Eur J Cell Biol*, 83 (10): 501-9
32. Cao, K., Nakajima, R., Meyer, H. H. and Zheng, Y. (2003). The AAA-ATPase Cdc48/p97 regulates spindle disassembly at the end of mitosis, *Cell*, 115 (3): 355-67
33. Ju, J. S., Miller, S. E., Hanson, P. I. and Wehl, C. C. (2008). Impaired protein aggregate handling and clearance underlie the pathogenesis of p97/VCP-associated disease, *J Biol Chem*, 283 (44): 30289-99
34. Kitami, M. I., Kitami, T., Nagahama, M., Tagaya, M., Hori, S., Kakizuka, A., Mizuno, Y. and Hattori, N. (2006). Dominant-negative effect of mutant valosin-containing protein in aggresome formation, *FEBS Lett*, 580 (2): 474-8
35. Wojcik, C., Yano, M. and DeMartino, G. N. (2004). RNA interference of valosin-containing protein (VCP/p97) reveals multiple cellular roles linked to ubiquitin/proteasome-dependent proteolysis, *J Cell Sci*, 117 (Pt 2): 281-92

36. Higashiyama, H., Hirose, F., Yamaguchi, M., Inoue, Y. H., Fujikake, N., Matsukage, A. and Kakizuka, A. (2002). Identification of ter94, *Drosophila* VCP, as a modulator of polyglutamine-induced neurodegeneration, *Cell Death Differ*, 9 (3): 264-73
37. Boyault, C., Gilquin, B., Zhang, Y., Rybin, V., Garman, E., Meyer-Klaucke, W., Matthias, P., Muller, C. W. and Khochbin, S. (2006). HDAC6-p97/VCP controlled polyubiquitin chain turnover, *EMBO J*, 25 (14): 3357-66
38. Kimonis, V. E. and Watts, G. D. (2005). Autosomal dominant inclusion body myopathy, Paget disease of bone, and frontotemporal dementia, *Alzheimer Dis Assoc Disord*, 19 Suppl 1: S44-7
39. Kimonis, V. E., Fulchiero, E., Vesa, J. and Watts, G. (2008). VCP disease associated with myopathy, Paget disease of bone and frontotemporal dementia: review of a unique disorder, *Biochim Biophys Acta*, 1782 (12): 744-8
40. Askanas, V. and Engel, W. K. (2002). Inclusion-body myositis and myopathies: different etiologies, possibly similar pathogenic mechanisms, *Curr Opin Neurol*, 15 (5): 525-31
41. Trojanowski, J. Q. and Lee, V. M. (2000). "Fatal attractions" of proteins. A comprehensive hypothetical mechanism underlying Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders, *Ann N Y Acad Sci*, 924: 62-7
42. Foster, N. L., Wilhelmsen, K., Sima, A. A., Jones, M. Z., D'Amato, C. J. and Gilman, S. (1997). Frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17: a consensus conference. Conference Participants, *Ann Neurol*, 41 (6): 706-15
43. Watts, G. D., Thorne, M., Kovach, M. J., Pestronk, A. and Kimonis, V. E. (2003). Clinical and genetic heterogeneity in chromosome 9p associated hereditary inclusion body myopathy: exclusion of GNE and three other candidate genes, *Neuromuscul Disord*, 13 (7-8): 559-67
44. Gitcho, M. A., Strider, J., Carter, D., Taylor-Reinwald, L., Forman, M. S., Goate, A. M. and Cairns, N. J. (2009). VCP mutations causing frontotemporal lobar degeneration disrupt localization of TDP-43 and induce cell death, *J Biol Chem*, 284 (18): 12384-98
45. Guyant-Marechal, L., Laquerriere, A., Duyckaerts, C., Dumanchin, C., Bou, J., Dugny, F., Le Ber, I., Frebourg, T., Hannequin, D. and Campion, D. (2006). Valosin-containing protein gene mutations: clinical and neuropathologic features, *Neurology*, 67 (4): 644-51
46. Haubenberger, D., Bittner, R. E., Rauch-Shorny, S., Zimprich, F., Mannhalter, C., Wagner, L., Mineva, I., Vass, K., Auff, E. and Zimprich, A. (2005). Inclusion body myopathy and Paget disease is linked to a novel mutation in the VCP gene, *Neurology*, 65 (8): 1304-5

47. Hubbers, C. U., Clemen, C. S., Kesper, K., Boddich, A., Hofmann, A., Kamarainen, O., Tolksdorf, K., Stumpf, M., Reichelt, J., Roth, U., Krause, S., Watts, G., Kimonis, V., Wattjes, M. P., Reimann, J., Thal, D. R., Biermann, K., Evert, B. O., Lochmuller, H., Wanker, E. E., Schoser, B. G., Noegel, A. A. and Schroder, R. (2007). Pathological consequences of VCP mutations on human striated muscle, *Brain*, 130 (Pt 2): 381-93
48. Kimonis, V. E., Mehta, S. G., Fulchiero, E. C., Thomasova, D., Pasquali, M., Boycott, K., Neilan, E. G., Kartashov, A., Forman, M. S., Tucker, S., Kimonis, K., Mumm, S., Whyte, M. P., Smith, C. D. and Watts, G. D. (2008). Clinical studies in familial VCP myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia, *Am J Med Genet A*, 146A (6): 745-57
49. Mehta, S. G., Watts, G. D., McGillivray, B., Mumm, S., Hamilton, S. J., Ramdeen, S., Novack, D., Briggs, C., Whyte, M. P. and Kimonis, V. E. (2006). Manifestations in a family with autosomal dominant bone fragility and limb-girdle myopathy, *Am J Med Genet A*, 140 (4): 322-30
50. Watts, G. D., Wymer, J., Kovach, M. J., Mehta, S. G., Mumm, S., Darvish, D., Pestronk, A., Whyte, M. P. and Kimonis, V. E. (2004). Inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia is caused by mutant valosin-containing protein, *Nat Genet*, 36 (4): 377-81
51. Djamshidian, A., Schaefer, J., Haubenberger, D., Stogmann, E., Zimprich, F., Auff, E. and Zimprich, A. (2009). A novel mutation in the VCP gene (G157R) in a German family with inclusion-body myopathy with Paget disease of bone and frontotemporal dementia, *Muscle Nerve*, 39 (3): 389-91
52. Stojkovic, T., Hammouda el, H., Richard, P., Lopez de Munain, A., Ruiz-Martinez, J., Gonzalez, P. C., Laforet, P., Penisson-Besnier, I., Ferrer, X., Lacour, A., Lacomblez, L., Claeys, K. G., Maurage, C. A., Fardeau, M. and Eymard, B. (2009). Clinical outcome in 19 French and Spanish patients with valosin-containing protein myopathy associated with Paget's disease of bone and frontotemporal dementia, *Neuromuscul Disord*, 19 (5): 316-23
53. van der Zee, J., Pirici, D., Van Langenhove, T., Engelborghs, S., Vandenberghe, R., Hoffmann, M., Pusswald, G., Van den Broeck, M., Peeters, K., Mattheijssens, M., Martin, J. J., De Deyn, P. P., Cruts, M., Haubenberger, D., Kumar-Singh, S., Zimprich, A. and Van Broeckhoven, C. (2009). Clinical heterogeneity in 3 unrelated families linked to VCP p.Arg159His, *Neurology*, 73 (8): 626-32
54. Watts, G. D., Thomasova, D., Ramdeen, S. K., Fulchiero, E. C., Mehta, S. G., Drachman, D. A., Weihl, C. C., Jamrozik, Z., Kwiecinski, H., Kaminska, A. and Kimonis, V. E. (2007). Novel VCP mutations in inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia, *Clin Genet*, 72 (5): 420-6
55. Bersano, A., Del Bo, R., Lamperti, C., Ghezzi, S., Fagiolari, G., Fortunato, F., Ballabio, E., Moggio, M., Candelise, L., Galimberti, D., Virgilio, R., Lanfranconi, S., Torrente, Y., Carpo, M., Bresolin, N., Comi, G. P. and Corti, S. (2009). Inclusion body myopathy and frontotemporal dementia caused by a novel VCP mutation, *Neurobiol Aging*, 30 (5): 752-8

56. Viassolo, V., Previtali, S. C., Schiatti, E., Magnani, G., Minetti, C., Zara, F., Grasso, M., Dagna-Bricarelli, F. and Di Maria, E. (2008). Inclusion body myopathy, Paget's disease of the bone and frontotemporal dementia: recurrence of the VCP R155H mutation in an Italian family and implications for genetic counselling, *Clin Genet*, 74 (1): 54-60
57. Baker, M., Mackenzie, I. R., Pickering-Brown, S. M., Gass, J., Rademakers, R., Lindholm, C., Snowden, J., Adamson, J., Sadovnick, A. D., Rollinson, S., Cannon, A., Dwosh, E., Neary, D., Melquist, S., Richardson, A., Dickson, D., Berger, Z., Eriksen, J., Robinson, T., Zehr, C., Dickey, C. A., Crook, R., McGowan, E., Mann, D., Boeve, B., Feldman, H. and Hutton, M. (2006). Mutations in progranulin cause tau-negative frontotemporal dementia linked to chromosome 17, *Nature*, 442 (7105): 916-9
58. Cruts, M., Gijselinck, I., van der Zee, J., Engelborghs, S., Wils, H., Pirici, D., Rademakers, R., Vandenberghe, R., Dermaut, B., Martin, J. J., van Duijn, C., Peeters, K., Sciot, R., Santens, P., De Pooter, T., Mattheijssens, M., Van den Broeck, M., Cuijt, I., Vennekens, K., De Deyn, P. P., Kumar-Singh, S. and Van Broeckhoven, C. (2006). Null mutations in progranulin cause ubiquitin-positive frontotemporal dementia linked to chromosome 17q21, *Nature*, 442 (7105): 920-4
59. Gidaro, T., Modoni, A., Sabatelli, M., Tasca, G., Broccolini, A. and Mirabella, M. (2008). An Italian family with inclusion-body myopathy and frontotemporal dementia due to mutation in the VCP gene, *Muscle Nerve*, 37 (1): 111-4
60. Schroder, R., Watts, G. D., Mehta, S. G., Evert, B. O., Broich, P., Fliesbach, K., Pauls, K., Hans, V. H., Kimonis, V. and Thal, D. R. (2005). Mutant valosin-containing protein causes a novel type of frontotemporal dementia, *Ann Neurol*, 57 (3): 457-61
61. Daroszewska, A. and Ralston, S. H. (2005). Genetics of Paget's disease of bone, *Clin Sci (Lond)*, 109 (3): 257-63
62. Braun, R. J. and Zischka, H. (2008). Mechanisms of Cdc48/VCP-mediated cell death: from yeast apoptosis to human disease, *Biochim Biophys Acta*, 1783 (7): 1418-35
63. Forman, M. S., Mackenzie, I. R., Cairns, N. J., Swanson, E., Boyer, P. J., Drachman, D. A., Jhaveri, B. S., Karlawish, J. H., Pestronk, A., Smith, T. W., Tu, P. H., Watts, G. D., Markesbery, W. R., Smith, C. D. and Kimonis, V. E. (2006). Novel ubiquitin neuropathology in frontotemporal dementia with valosin-containing protein gene mutations, *J Neuropathol Exp Neurol*, 65 (6): 571-81
64. Neumann, M., Sampathu, D. M., Kwong, L. K., Truax, A. C., Micsenyi, M. C., Chou, T. T., Bruce, J., Schuck, T., Grossman, M., Clark, C. M., McCluskey, L. F., Miller, B. L., Masliah, E., Mackenzie, I. R., Feldman, H., Feiden, W., Kretzschmar, H. A., Trojanowski, J. Q. and Lee, V. M. (2006). Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis, *Science*, 314 (5796): 130-3

65. Cairns, N. J., Bigio, E. H., Mackenzie, I. R., Neumann, M., Lee, V. M., Hatanpaa, K. J., White, C. L., 3rd, Schneider, J. A., Grinberg, L. T., Halliday, G., Duyckaerts, C., Lowe, J. S., Holm, I. E., Tolnay, M., Okamoto, K., Yokoo, H., Murayama, S., Woulfe, J., Munoz, D. G., Dickson, D. W., Ince, P. G., Trojanowski, J. Q. and Mann, D. M. (2007). Neuropathologic diagnostic and nosologic criteria for frontotemporal lobar degeneration: consensus of the Consortium for Frontotemporal Lobar Degeneration, *Acta Neuropathol*, 114 (1): 5-22
66. Wehl, C. C., Temiz, P., Miller, S. E., Watts, G., Smith, C., Forman, M., Hanson, P. I., Kimonis, V. and Pestronk, A. (2008). TDP-43 accumulation in inclusion body myopathy muscle suggests a common pathogenic mechanism with frontotemporal dementia, *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 79 (10): 1186-9
67. Olive, M., Janue, A., Moreno, D., Gamez, J., Torrejon-Escribano, B. and Ferrer, I. (2009). TAR DNA-Binding protein 43 accumulation in protein aggregate myopathies, *J Neuropathol Exp Neurol*, 68 (3): 262-73
68. Taylor, J. P., Tanaka, F., Robitschek, J., Sandoval, C. M., Taye, A., Markovic-Plese, S. and Fischbeck, K. H. (2003). Aggresomes protect cells by enhancing the degradation of toxic polyglutamine-containing protein, *Hum Mol Genet*, 12 (7): 749-57
69. Ju, J. S., Fuentealba, R. A., Miller, S. E., Jackson, E., Piwnicka-Worms, D., Baloh, R. H. and Wehl, C. C. (2009). Valosin-containing protein (VCP) is required for autophagy and is disrupted in VCP disease, *J Cell Biol*, 187 (6): 875-88
70. Tresse, E., Salomons, F. A., Vesa, J., Bott, L. C., Kimonis, V., Yao, T. P., Dantuma, N. P. and Taylor, J. P. (2010). VCP/p97 is essential for maturation of ubiquitin-containing autophagosomes and this function is impaired by mutations that cause IBMPFD, *Autophagy*, 6 (2): 217-27
71. Isaacson, R. L., Pye, V. E., Simpson, P., Meyer, H. H., Zhang, X., Freemont, P. S. and Matthews, S. (2007). Detailed structural insights into the p97-Npl4-Ufd1 interface, *J Biol Chem*, 282 (29): 21361-9
72. Hoseki, J., Ushioda, R. and Nagata, K. (2010). Mechanism and components of endoplasmic reticulum-associated degradation, *J Biochem*, 147 (1): 19-25
73. Federovitch, C. M., Ron, D. and Hampton, R. Y. (2005). The dynamic ER: experimental approaches and current questions, *Curr Opin Cell Biol*, 17 (4): 409-14
74. Levine, T. and Rabouille, C. (2005). Endoplasmic reticulum: one continuous network compartmentalized by extrinsic cues, *Curr Opin Cell Biol*, 17 (4): 362-8
75. Gething, M. J. and Sambrook, J. (1992). Protein folding in the cell, *Nature*, 355 (6355): 33-45
76. Helenius, A., Marquardt, T. and Braakman, I. (1992). The endoplasmic reticulum as a protein-folding compartment, *Trends Cell Biol*, 2 (8): 227-31

77. Kaufman, R. J. (1999). Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls, *Genes Dev*, 13 (10): 1211-33
78. Kopito, R. R. (1997). ER quality control: the cytoplasmic connection, *Cell*, 88 (4): 427-30
79. Meyer, H. H., Wang, Y. and Warren, G. (2002). Direct binding of ubiquitin conjugates by the mammalian p97 adaptor complexes, p47 and Ufd1-Npl4, *EMBO J*, 21 (21): 5645-52
80. Ye, Y., Meyer, H. H. and Rapoport, T. A. (2001). The AAA ATPase Cdc48/p97 and its partners transport proteins from the ER into the cytosol, *Nature*, 414 (6864): 652-6
81. Ye, Y., Meyer, H. H. and Rapoport, T. A. (2003). Function of the p97-Ufd1-Npl4 complex in retrotranslocation from the ER to the cytosol: dual recognition of nonubiquitinated polypeptide segments and polyubiquitin chains, *J Cell Biol*, 162 (1): 71-84
82. Zhong, X., Shen, Y., Ballar, P., Apostolou, A., Agami, R. and Fang, S. (2004). AAA ATPase p97/valosin-containing protein interacts with gp78, a ubiquitin ligase for endoplasmic reticulum-associated degradation, *J Biol Chem*, 279 (44): 45676-84
83. Ye, Y., Shibata, Y., Kikkert, M., van Voorden, S., Wiertz, E. and Rapoport, T. A. (2005). Inaugural Article: Recruitment of the p97 ATPase and ubiquitin ligases to the site of retrotranslocation at the endoplasmic reticulum membrane, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102 (40): 14132-8
84. Hampton, R. Y. (2002). ER-associated degradation in protein quality control and cellular regulation, *Curr Opin Cell Biol*, 14 (4): 476-82
85. Tanaka, K., Suzuki, T., Hattori, N. and Mizuno, Y. (2004). Ubiquitin, proteasome and parkin, *Biochim Biophys Acta*, 1695 (1-3): 235-47
86. Shimura, H., Hattori, N., Kubo, S., Mizuno, Y., Asakawa, S., Minoshima, S., Shimizu, N., Iwai, K., Chiba, T., Tanaka, K. and Suzuki, T. (2000). Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase, *Nat Genet*, 25 (3): 302-5
87. Gelman, M. S. and Kopito, R. R. (2002). Rescuing protein conformation: prospects for pharmacological therapy in cystic fibrosis, *J Clin Invest*, 110 (11): 1591-7
88. Cheng, S. H., Gregory, R. J., Marshall, J., Paul, S., Souza, D. W., White, G. A., O'Riordan, C. R. and Smith, A. E. (1990). Defective intracellular transport and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis, *Cell*, 63 (4): 827-34
89. Meusser, B., Hirsch, C., Jarosch, E. and Sommer, T. (2005). ERAD: the long road to destruction, *Nat Cell Biol*, 7 (8): 766-72

90. Sifers, R. N. (2003). Cell biology. Protein degradation unlocked, *Science*, 299 (5611): 1330-1
91. Svedine, S., Wang, T., Halaban, R. and Hebert, D. N. (2004). Carbohydrates act as sorting determinants in ER-associated degradation of tyrosinase, *J Cell Sci*, 117 (Pt 14): 2937-49
92. Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C. and Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5, *J Gen Virol*, 36 (1): 59-74
93. Younger, J. M., Fan, C. Y., Chen, L., Rosser, M. F., Patterson, C. and Cyr, D. M. (2005). Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator as a model substrate to study endoplasmic reticulum protein quality control in mammalian cells, *Methods Mol Biol*, 301: 293-303
94. Tang, W. K., Li, D., Li, C. C., Esser, L., Dai, R., Guo, L. and Xia, D. (2010). A novel ATP-dependent conformation in p97 N-D1 fragment revealed by crystal structures of disease-related mutants, *EMBO J*:
95. Fernandez-Saiz, V. and Buchberger, A. (2010). Imbalances in p97 co-factor interactions in human proteinopathy, *EMBO Rep*, 11 (6): 479-85
96. Janiesch, P. C., Kim, J., Mouysset, J., Barikbin, R., Lochmuller, H., Cassata, G., Krause, S. and Hoppe, T. (2007). The ubiquitin-selective chaperone CDC-48/p97 links myosin assembly to human myopathy, *Nat Cell Biol*, 9 (4): 379-90

## ***ÖZGEÇMİŞ***

1986 yılında Niğde doğumlu olan Ahmet Uygur Örs 2004 yılında Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nde lisans eğitimine başlamıştır. 2008 yılında lisans eğitimini tamamladıktan sonra, aynı yıl Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Ana Bilim Dalı'nda lisansüstü eğitimine başlamıştır.