

İnsan p60-katanin Proteininin, Bitki RIC1 ve İnsan Homoloğu Kiaa1432 Proteinleri ile Etkileşiminin Tespiti & Etkileşimin Mikrotubuller Üzerinde Fonksiyonel Analizi

Program Kodu: 1002

Proje No: 115Z535

Proje Yürütücüsü:
Yrd. Doç. Dr. Şirin KORULU KOÇ

Bursiyer:
Ceren KURTOĞLU (5 ay)
İlke SELÇUK (5 ay)

Eylül 2016
İSTANBUL

ÖNSÖZ

p60-katanin, üzerinde en çok çalışılan mikrotubul kesici proteinlerden birisi olmasına rağmen bilinen regülatörleri, etkileşim partnerleri yok denecek kadar azdır. *Arabidopsis thaliana* bitkisinde yapılan çalışmalarda p60-katanin'in RIC1 proteini ile etkileştiği ve p60-katanin'in enzimatik aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir. Projede bu sonuçtan hareketle insan p60-katanin proteininin, bitki RIC1 ve insan homoloğu Kiaa1432 proteinleri ile fiziksel etkileşiminin tespiti ve etkileşimin mikrotubul kesimi bakımından fonksiyonel rolü incelenmiştir.

Projede ilk olarak ilgili proteinleri kodlayan cDNA'lar FLAG ve His eki içeren plazmidlere ayrı ayrı klonlanmışlardır: *Arabidopsis thaliana* p60-katanin ve RIC1 içeren plasmidler Prof. Ying Fu tarafından temin edilmiş olup kalıp olarak kullanılarak FLAG ve His ekli plazmidlere PCR klonlama yöntemiyle aktarılmışlardır. İnsan p60-katanin yürürlükte olan 114Z971 projesi kapsamında FLAG ekli olarak elde edilmiştir. Son olarak, insan Kiaa1432 cDNA'sı FLAG ekli plazmide klonlanmıştır. Klonlamayı takiben proteinler fiziksel etkileşim bakımından ko-immün çöktürme yöntemiyle test edilmişlerdir. Buna ilaveten, His ve FLAG ekli olarak klonlanan proteinlerin cDNA'larını içeren plazmidler farklı kombinasyonlar halinde hücre hatlarına aktararak olası etkileşimin mikrotubul ağına etkisi araştırılmıştır.

Yapılan analizlerin sonucunda insan p60-katanin'in *Arabidopsis thaliana* RIC1 ve bu proteinin insan homoloğu Kiaa1432 proteinleri ile fiziksel etkileşimine rastlanamamıştır.

Bu projeden sağlanan destekle 2 lisans öğrencisine burs imkanı sağlanmıştır. Bunun yanında proje kapsamında yapılan çalışmalar ile İstanbul Arel Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü lisans öğrencisi Nergis Kılıç için bir bitirme tezi oluşturulmuştur (Ek 3). Projede gerçekleştirilen çalışmalar 11. Uluslararası Protein Stabilizasyon kongresine poster olarak bursiyer İlke Selçuk tarafından sunulmuştur.

115Z535 nolu projemizi destekleyerek sunduğu maddi olanaklardan dolayı TÜBİTAK'a ve çalışmalarımızı gerçekleştirmemiz için sunduğu fiziki imkânlardan dolayı İstanbul Arel Üniversitesi'ne sonsuz teşekkürlerimizi sunarız.

İÇİNDEKİLER

TABLO LİSTESİ	6
ŞEKİL LİSTESİ	7
ÖZET	8
ABSTRACT	9
1. GİRİŞ	10
2. LİTERATÜR ÖZETİ	10
3. GEREÇ VE YÖNTEM	13
3.1 Gereç.....	13
3.1.1 Laboratuvar Cihazları.....	13
3.1.2 Hücre Hattı.....	13
3.1.3 Bakteri Suşu	13
3.1.4 Moleküler Klonlama.....	13
3.1.5 Bakteri Kültürü.....	14
3.1.6 Hücre Kültürü.....	14
3.1.7 Poliakrilamid Jel	15
3.1.8 Tampon ve Solüsyonlar	15
3.1.9 Vektörler	15
3.1.10Ticari Kitler.....	17
3.2 Yöntem	17
3.2.1 His ve FLAG ekli konstrakların hazırlanması	17
3.2.2 Ko-İmmünçöktürme yönteminin uygulanması ile RIC1 – p60-katanin, Kiaa1432 – p60-katanin Etkileşimlerinin <i>in vitro</i> Olarak Saptanması	20
3.2.3 Hücrelere aktarılan konstraklar sonrasında Mikrotubul ağlarındaki değişimlerin mikroskop yardımıyla gözlemlenmesi.....	23

4. BULGULAR	25
4.1 His ve FLAG ekli konstrakların hazırlanması	25
4.2 Ko-İmmünçöktürme yönteminin uygulanması ile RIC1 – p60-katanin, Kiaa1432 – p60-katanin Etkileşimlerinin in vitro Olarak Saptanması	28
4.3 Hücrelere aktarılan konstraklar sonrasında Mikrotubul ağlarındaki değışimlerin mikroskop yardımıyla gözlemlenmesi.....	30
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	33
6. KAYNAKLAR	34

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 3.1 : Projede kullanılan ticari kitler	17
Tablo 3.2 : Konstrakları His ve FLAG vektörlerine klonlamak için gereken primer dizileri	17
Tablo 3.3 : A.t. p60 klonlamak için kullanılan PCR bileşenleri ve PCR koşulları	18
Tablo 3.4 : A.t. RIC1 klonlamak için kullanılan PCR bileşenleri ve PCR koşulları	18
Tablo 3.5 : H.s. Kiaa1432 klonlamak için kullanılan PCR bileşenleri ve PCR koşulları	18
Tablo 3.6 : Kesim reaksiyon bileşenleri ve koşulları	19
Tablo 3.7 : Yapıştırma reaksiyon bileşenleri ve koşulları	19
Tablo 3.8 : Ko-Transfeksiyon reaksiyon koşulları ve aşamaları	21
Tablo 3.9 : Protein örneklerinin jele yüklenmesi için hazırlanan karışımın içeriği	22
Tablo 3.10 : İmmünfloresan için Ko-Transfeksiyon reaksiyon koşulları ve aşamaları	23

ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1 : RIC1, KTN1 (p60-katanin) aktivitesini <i>Arabidopsis thaliana</i> 'da tetikler	12
Şekil 2.2 : Kiaa1432 proteini için yapılan domain analiz sonucu	12
Şekil 3.1 : pcDNA™3.1/myc-His A vektörünün dairesel haritası	16
Şekil 3.2 : 3XFLAG-CMV™-10 vektörünün dairesel haritası	16
Şekil 4.1 : DNA ladder, 100 bp (A, B3) ve A.t. p60 (1572 bç) & A.t.RIC1 (675 bç) PCR ürünlerinin jel görüntüsü (B1, B2).	25
Şekil 4.2 : DNA ladder, 1kb (A, B1) ve H.s.Kiaa1432 (4296 bç) PCR ürünü jel görüntüsü (B2).	25
Şekil 4.3 : His-A.t.- p60-katanin Koloni PCR sonucunun jel görüntüsü	26
Şekil 4.4 : FLAG-A.t.- RIC1 Koloni PCR sonucunun jel görüntüsü.	26
Şekil 4.5 : FLAG-H.s.- Kiaa1432 Koloni PCR sonucunun jel görüntüsü	27
Şekil 4.6 : Dizileme sonuçlarının A.t.p60-katanin, A.t.RIC1 ve H.s.Kiaa1432 için kromatogram olarak gösterimi	27
Şekil 4.7 : Anti-FLAG antikoru ile çöktürülen lizatta anti-His antikoru ile Western blotlama sonucu	28
Şekil 4.8 : Anti-His antikoru ile çöktürülen lizatta anti-FLAG antikoru ile Western blotlama sonucu	29
Şekil 4.9 : A.t.p60-katanin + A.t.RIC1 için immünfloresan analiz sonucu	30
Şekil 4.10 : H.s.p60-katanin + H.s.Kiaa1432 için immünfloresan analiz sonucu	31
Şekil 4.11 : H.s.p60-katanin + A.t.RIC1 için immünfloresan analiz sonucu	32

ÖZET

Mikrotubuller ihtiyaç durumuna göre uzayıp–kısılabilen, yeniden organize olabilen dinamik yapılı polimerlerdir. Mikrotubul organizasyonu, bölünen hücrelerde mitoz, post-mitotik nöronlarda akson/dendrit yapılarının oluşumunda görevlidir. Mikrotubul organizasyonuna imkan sağlayan mekanizmalardan birisi Katanin gibi mikrotubul kesici proteinlerce kesilmeleridir. Katanin, *KATNA1* geni tarafından kodlanan ve enzimatik aktiviteye sahip p60, onun fonksiyonunu düzenleyen ve *KATNB1* geni tarafından kodlanan p80 alt birimlerinde oluşmaktadır.

Katanin'in bilinen regülatörleri, etkileşim partnerleri yok denecek kadar azdır. *Arabidopsis thaliana* bitkisinde yapılan çalışmalarda p60-katanin'in bir GTPase olan RIC1 proteini ile etkileştiği ve p60-katanin'in enzimatik aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir. Bu sonuçtan hareketle, önerilen proje ile insan p60-katanin proteininin, bitki RIC1 ve insan homoloğu Kiaa1432 proteinleri ile fiziksel etkileşiminin tespiti ve etkileşimin mikrotubul kesimi bakımından fonksiyonel açıdan aydınlatılması amaçlanmıştır.

Proteinlerin etkileşim bakımından incelenebilmesi adına ilk olarak bu proteinleri kodlayan cDNA'lar FLAG ve His eki içeren plazmidlere ayrı ayrı klonlanmışlardır. *Arabidopsis thaliana* p60-katanin ve RIC1 proteinleri Prof. Ying Fu tarafından temin edilmiş olup sadece ilgili plazmidlere aktarılmışlardır. İnsan p60-katanin yürürlükte olan 114Z971 projesi kapsamında FLAG ekli olarak elde edilmiş olup insan Kiaa1432 proteinini kodlayan cDNA klonlanmıştır. Klonlamayı takiben proteinler fiziksel etkileşim bakımından ko-immün çöktürme yöntemiyle test edilmiştir. Son olarak, His ve FLAG ekli olarak klonlanan proteinlerin cDNA'larını içeren plazmidler farklı kombinasyonlar halinde hücreye verilmek suretiyle olası etkileşimin mikrotubul ağına etkisi araştırılmıştır.

Yapılan analizlerin sonucunda insan p60-katanin'in *Arabidopsis thaliana* RIC1 ve bu proteinin insan homoloğu Kiaa1432 proteinleri ile fiziksel etkileşimine rastlanamamıştır.

Anahtar Kelimeler: Katanin, RIC1, Kiaa1432, Mikrotubul, Akson –Dendrit Dallanması

ABSTRACT

Microtubules are dynamic polymers and depending on the need of the cell they can be re-organized by assembly and disassembly phases. In dividing cells, microtubule dynamics are essential for mitosis; however in post-mitotic neurons microtubule dynamics have role in the formation of axon/dendrite structures. One of the mechanisms that have role in microtubule reconfiguration is microtubule severing proteins such as Katanin. Katanin is composed of two subunits, p60-katanin encoded by *KATNA1* gene and p80-katanin encoded by *KATNB1* gene.

There are a few proteins identified so far that physically interact with p60-katanin. It has been shown that RIC1, a GTPase protein interacts with p60-katanin in *Arabidopsis thaliana* and promotes severing activity of p60-katanin. Therefore, the aim of the proposed study is to identify the physical interaction between human p60-katanin and plant RIC1 protein and its human homologue Kiaa1432 protein and furthermore, to reveal the consequences of the interactions in terms of p60-katanin's microtubule severing activity.

To this aim, the first goal is to identify the physical interaction between these proteins. For this purpose, cDNA of each protein was cloned into either FLAG or His tagged plasmid. Prof. Ying Fu kindly provided *Arabidopsis thaliana* p60-katanin and RIC1 constructs, therefore these cDNAs were sub-cloned into relevant plasmids. FLAG tagged human p60-katanin cDNA would be readily cloned as a part of my current project 114Z971, yet, human Kiaa1432 was cloned. Afterwards, proteins were tested for any physical interaction by co-immunoprecipitation procedure. Finally, His and FLAG tagged plasmid constructs were transferred into the cells in different combinations to further analyze the function of potentially interacting proteins on the microtubule structure.

Results indicated no physical interaction between human p60-katanin and *Arabidopsis thaliana* RIC1 and its human homologue Kiaa1432.

Keywords: Katanin, RIC1, Kiaa1432, Mikrotubul, Axon –Dendrite Branching

1. GİRİŞ

p60-katanin, üzerinde en çok çalışılan mikrotubul kesici proteinlerden birisi olmasına rağmen bilinen regülatörleri, etkileşim partnerleri yok denecek kadar azdır. Mevut proje ile p60-katanin ve Kiaa1432 etkileşiminin aydınlatılması, p60-katanin'in mikrotubul kesiminin regülasyonunun anlaşılmasına önemli katkılar sunduğundan kritiktir. Zira mikrotubullerin kesilme derecesi, bir hücrenin morfolojik özelliklerini sağlamada önemli olduğu gibi, mikrotubul iskeletinin regülasyon dışı kesilmesi de hücreyi ölüme götürecektir bir mekanizma da oluşturabilir.

Buna istinaden önerdiğimiz bu 1002 Hızlı Destek projesi (115Z535) ile amacımız:

İlk olarak bitkilerde tespit edilen p60-katanin – RIC1 proteinleri arasındaki fiziksel etkileşiminin insan homologları arasında da var olup olmadığının araştırılmasıydı. Bitkilerde yapılan çalışmada, RIC1'in p60-katanin'in mikrotubul kesme fonksiyonunu tetiklediği gösterilmiştir. Buradan yola çıkarak, proje kapsamında amaçlanan diğer bir çalışma da RIC1'in insan homologu olan Kiaa1432 proteininin p60-katanin üzerinde benzer bir etki gösterip göstermediğinin aydınlatılmasıydı. Benzer şekilde, bitki RIC1 proteininin insan p60-katanin proteini üzerinde olası etkisi de incelenmiştir.

p60-katanin ve Kiaa1432'nin protein – protein düzeyindeki etkileşimlerine yönelik literatürde tek bir yayın dahi mevcut olmayıp, mevcut proje ile bu veriler **ilk kez** tarafımızca literatüre sunulacaktır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

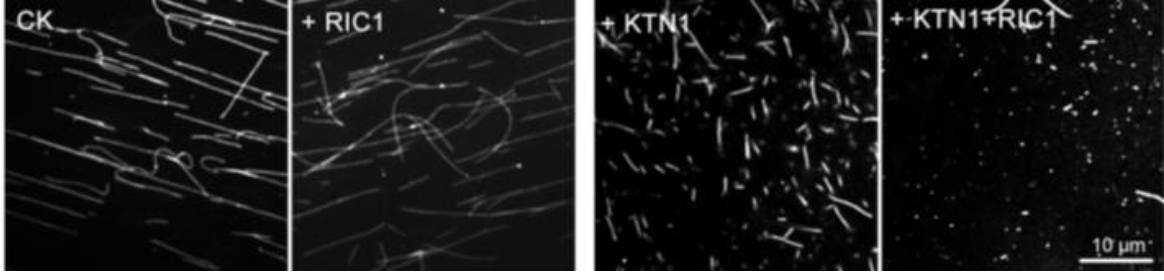
Ökaryotik hücrelerde hücre iskeletini oluşturan en önemli yapı, mikrotubullerdir. Hücrenin Ökaryotik hücrelerde hücre iskelet elemanlarını oluşturan polimer yapılı en önemli proteinlerden biri mikrotubullerdir. Mikrotubullerin hücre içerisinde sahip oldukları görevlerin başında hücrenin şeklinin kazanılması, hücre içi kargo taşınımı, hücre bölünmesi gelmektedir. Mikrotubuller alfa ve beta tubulin hetero-dimerlerinin birleşmesi (polarizasyonu) ya da ayrışması (depolarizasyonu) aşamalarıyla, ihtiyaç durumuna göre uzayıp kısalabilen dinamik bir yapıya sahiptirler (Cheeseman ve Desai, 2008). Mikrotubullerin bu dinamik yapıları bölünen hücrelerde mitoz mekiğinin oluşumunda, sonrasında ise kromozomların kardeş hücreler arasında eşit olarak paylaşılmasında hayati öneme sahiptir. Bölünme özelliğini yitirmiş ve ileri derecede farklılaşmış nöronlarda ise mikrotubullerin daha durağan oldukları görülmektedir. Nöronlarda mikrotubuller akson ve dendritlerin oluşmasında, uzamasında, hedefe yönlendirilmesinde ve dallanmasında önemli görevlere sahiptirler (Conde ve Caceres, 2009; Karabay ve ark. 2004).

Mikrotubuller, mitotik hücrelerde gözlemlendiği haliyle sentrozomla etkileşim halinde bulunabileceği gibi (Quarby vd., 2000; Quarby ve Lohret., 1999), nöronlarda gözlemlendiği haliyle serbest olarak da bulunabilirler. Serbest mikrotubullerin oluşumunda görev alan mekanizmalardan birisi, mikrotubullerin enzimatik reaksiyonlarla kesilmesidir. Mikrotubullerin kesim işleminde görevli enzimlerden tanımlanmış ikisi: katanin ve spastin adı verilen ATPaz'lardır (Roll-Mecak ve McNally, 2010).

Katanin en iyi karakterize edilmiş mikrotubul kesim enzimi olup adını Japon samuraylarının kılıcından, yani Katana'dan alır (McNally ve Vale, 1993). Katanin iki alt üniteden oluşmaktadır: *KATNA1* geni tarafından kodlanan p60-katanin ve *KATNB1* geni tarafından kodlanan p80-katanin. p60-katanin enzimatik aktiviteden sorumlu birim iken; p80-katanin, p60-katanin'ın regülasyonunda ve lokalizasyonunda görev alır (Hartman ve Vale, 1999; Quarby, 2000; McNally ve ark., 2000). Katanin, nöronlarda yoğun olarak sentrozomda bulunur ki sentrozomdan doğan mikrotubullerin akson ve dendritlere taşınması için sentrozomdan katanin gibi mikrotubul kesici proteinlerce kesilmesi gerekmektedir. Buna ilaveten, katanin akson ve dendritlerde de bulunur ve sentrozomal olmayan mikrotubulleri, akson ve dendritler boyunca kesmek suretiyle yeni dallar oluşturulmasında görevlidir (Baas ve ark., 2005; Yu, Korulu ve ark., 2008).

Katanin, *Arabidopsis thaliana* gibi yüksek yapılı bitkilerde de benzer görevlere sahiptir. Bitki hücre duvarının yapısını oluşturan selüloz fibrillerinin dizilim yönünü mikrotubuller belirler (Cyr ve Palevitz, 1995). Bitkide p80-katanin homologuna rastlanmamış olup p60-katanin'in mikrotubullerle doğrudan etkileşimi ko-sedimentasyon deneyleriyle gösterilmiştir (Mellet ve ark., 2003). Katanin'in özellikle bitkideki kortikal mikrotubullerin organizasyonunda görevli olduğu gösterilmiştir, ancak tam mekanizması aydınlatılamamıştır (Stoppin-Mellet ve ark., 2007).

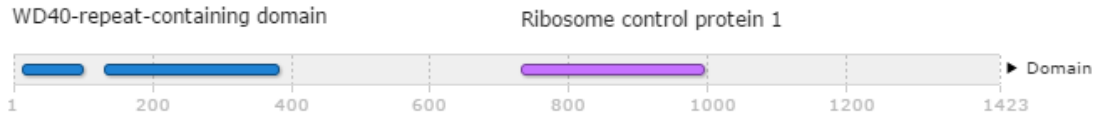
Lin ve arkadaşlarının (2013) *Arabidopsis thaliana* bitkisiyle gerçekleştirdikleri çalışmada RIC1 proteininin bitki p60-katanin ile fiziksel olarak etkileştiği ve bu etkileşimin p60-kataninin mikrotubul kesme fonksiyonunu tetiklediği hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak gösterilmiştir (Şekil 1). RIC1 proteini CRIB motifi içeren ve özellikle küçük ROP GTPaz (Rho GTPaz'ın bitki versiyonu) ile GTP-bağlı formda etkileşen bir proteindir (Wu ve ark., 2001). RIC1, *Arabidopsis thaliana*'da yapraklarda epidermal hücre morfolojisinin oluşumunda kritik bir role sahiptir. RIC1, kortikal mikrotubullerle ilişkili olup, burada mikrotubul sabitleyici olarak görev alır (Fu ve ark., 2005).



Şekil 2.1. RIC1, KTN1 (p60-katanin) aktivitesini *Arabidopsis thaliana*'da tetikler.

Şekilde RIC1'in tek başına ifade edildiği hücrelerde mikrotubul ağının kontrol grubu ile benzerlik gösterdiği, KTN1 ekprese eden hücrelerde mikrotubullerin kesilmek suretiyle küçüldüğü, KTN1 + RIC1'i beraber ifade edildiği hücrelerde ise mikrotubullerin daha küçük parçalara kesildiği görülmektedir (Lin ve ark., 2013).

Kiaa1432, RIC1 proteininin insan homoloğu olup CIP150, Connexin 43-Interacting Protein 150, Protein RIC1 Homoloğu olarak da literatürde yer almaktadır. Kiaa1432, 1423 amino asit içeren takriben 159 kDa büyüklüğünde bir membran proteindir. Literatürde bu proteinle ilgili çok veri olmamakla birlikte yaptığım dizi analizlerinde Ribosome_control_1, WD40_repeat ve WD40/YVTN_repeat-like domainlerinden oluştuğu görülmüştür (Şekil 2). Yapılan diğer bir analizde ise (<http://www.genecards.org/index.php?path=/GenesLikeMe>) Kiaa1432'nin içerdiği motifler bakımından yüksek bir skorla *KATNB1* (p80-katanin) ile benzerlik gösterdiği görülmüştür ki bu da Kiaa1432'nin p60-katanin ile etkileşme olasılığını güçlendiren bir ön veri niteliğindedir.



Şekil 2.2. Kiaa1432 proteini için yapılan domain analiz sonucu.

(<http://www.ebi.ac.uk/interpro/protein/Q4ADV7>).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Gereç

3.1.1 Laboratuvar Cihazları

- PCR
- Otoklav
- Su banyosu
- Pipetler
- Mikrosantrifüj
- Soğutmalı santrifüj
- Terazî
- Class II kabin
- CO2 inkübatörü
- Spektrofotometre
- pH metre
- -80 oC buzdolabı
- Rotatör
- Buzdolabı

3.1.2 Hücre Hattı

Projede, RFL-6 hücre hattı kullanılmıştır.

3.1.3 Bakteri Suşu

Escherichia coli DH5α strain [F-, ϕ80dlacZ_M15, _(lacZYA-argF)U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(rk-, mk+), phoA, supE44, λ-, thi-1, gyrA96, relA1]

3.1.4 Moleküler Klonlama

- 25mM MgCl₂ (NEB)
- 2mM dNTP Mix (NEB)
- 100bp , 1kb DNA Ladder Mix (NEB)
- 6x DNA Loading Dye (NEB)
- Agarose Low EEO (Applichem)
- OneTaq polymerase 5u/μl (NEB)
- Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (NEB)
- 10X Taq Buffer (NEB)
- HindIII-HF® Restriction Enzyme (NEB)
- XhoI Restriction Enzyme (NEB)

- KpnI-HF® Restriction Enzyme (NEB)
- 10X CutSmart™ Buffer Restriction Enzyme (NEB)
- T4 Ligase (NEB)
- 10X Ligation Buffer (NEB)
- Tris Base (BDH Laboratory)
- EDTA (Merck)
- SYBR Safe DNA Stain (Invitrogen)
- Molecular Biology grade Etil Alkol (Fiedel-de Haën)
- Primerler (Alpha DNA, Sentromer)

3.1.5 Bakteri Kültürü

- Ampicillin (Sigma-Aldrich)
- CaCl₂·2H₂O (Merck)
- PIPES (Acros)
- Glycerol (Fluka)
- Yeast Extract (Merck)
- Agar (Merck)
- Tryptone (BDH Laboratory)
- NaCl (Fluka)

3.1.6 Hücre Kültürü

- Hams F12-K 1X (Lonza)
- L-Glutamine solution, 200mM (LifeTech)
- Non-Essential Amino Acids 100X (Lonza)
- Fetal Bovine Serum (LifeTech)
- Penicilin/Streptomycin solution (100X) (LifeTech)
- Trypsin/EDTA 0,25/0,02 solution (LifeTech)
- Phosphate Buffered Saline (PBS) (LifeTech)
- 25 cm², 75cm² Tissue Culture Flasks (Sarstedt)
- 6-well culture plate (Sarstedt)
- 30 cm Cell Scraper (isolab)
- 5 ml, 10ml, 25ml Serological pipettes (Sarstedt)
- 20ml Syringes (Set Inject)
- 0.22 µm syringe filters (Millex)
- Octa (FLAG) Antibody (Santa Cruz)
- Tubulin conjugated Antibody (Novus)
- His-Tag Antibody (Cell Signaling)

3.1.7 Poliakrilamid Jel

Poliakrilamid jeller ve transfer membranları invitrogen' den hazır olarak temin edilmiştir (iBLOT Stack ve Bis/Tris).

3.1.8 Tampon ve Solüsyonlar

10X TBE tamponu

10X TBE tamponu, distile su içerisinde, 900mM Tris Base, 900mM Borik asit ve 20 mM EDTA kimyasallarından oluşmaktadır. 0,5X TBE tampon DNA jeli hazırlanmasında ve tank tamponu olarak kullanılmıştır.

CaCl₂ Solüsyonu

CaCl₂ çözeltisi, kimyasal olarak kompetent *E.coli* hücrelerini hazırlamak için kullanılmıştır. Hazırlanışı: Distile su içerisinde 60mM CaCl₂, 10mM PIPES ve %15 gliserol çözündürülüp, pH 6,4'e ayarlanmış ve çözelti 0,2 µm filtreden geçirilmiştir.

LB besiyeri

10 gr tripton, 5 gr maya ekstraktı ve 10 gr NaCl 1L suda çözündürülüp, 15 dakika 121 °C de sterilize edilmiştir. Seleksiyon yapmak için ampisilin eklenmiştir.

LB agar besiyeri

10 gr tripton, 5 gr maya ekstraktı, 10 gr NaCl ve 15 gr agar 1L suda çözündürülüp, 15 dakika 121 °C de sterilize edilmiştir. Seleksiyon yapmak için ampisilin eklenmiştir. Petri kaplarına yaklaşık 30 ml dökülüp soğutulmuştur.

RFL-6 kültür besiyeri

F12K içersine %20 FBS, 2 mM L-Glutamine eklenip, 0,2 µm filtreden geçirilerek sterilize edilmiştir.

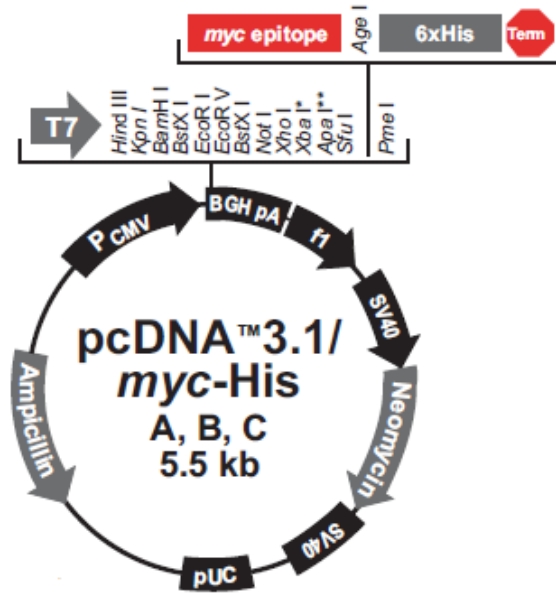
RFL-6 dondurma besiyeri

F12K içersine %20 FBS, 2 mM L-Glutamine ve %10 DMSO eklenip, 0,2 µm filtreden geçirilerek sterilize edilmiştir.

3.1.9 Vektörler

pcDNATM3.1/myc-His A

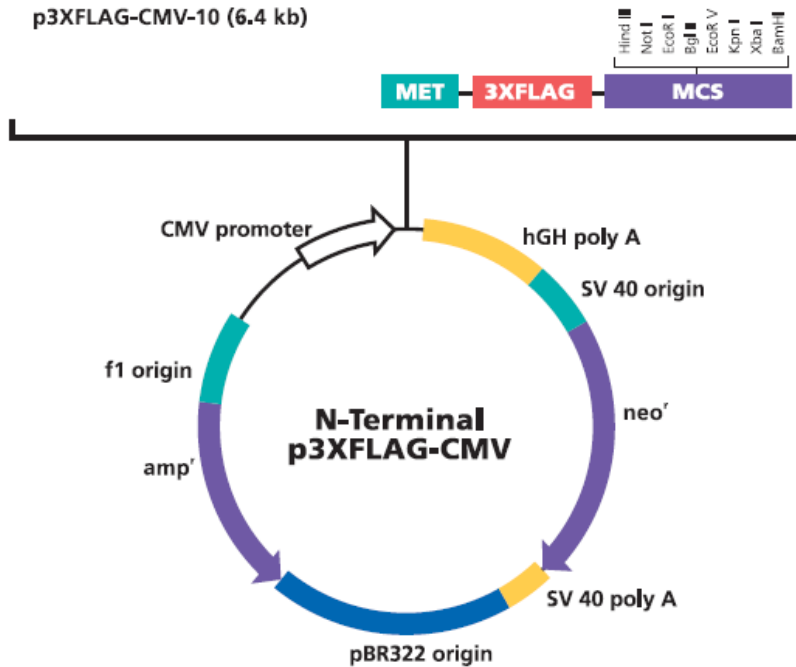
pcDNATM3.1/myc-His A vektörü içersine gerek *Arabidopsis thaliana* gerek ise *Homo sapiens* p60-katanin cDNA'ları klonlanmıştır. Vektörün His eki olup, haritası aşağıda gösterilmiştir (Şekil 3.1) (ThermoFischer, V80020).



Şekil 3.1. pcDNA™ 3.1/myc-His A vektörünün dairesel haritası.

3XFLAG-CMV™-10

3XFLAG-CMV™-10 vektörü içerisinde *Arabidopsis thaliana* RIC1 ve *Homo sapiens* Kiaa1432 cDNA'ları klonlanmıştır. Vektörün FLAG eki olup, haritası aşağıda gösterilmiştir (Şekil 3.2) (Sigma Aldrich, E7658).



Şekil 3.2. 3XFLAG-CMV™-10 vektörünün dairesel haritası.

3.1.10 Ticari Kitler

Projede kullanılan deneysel kitler Tablo 3.1’de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. Projede kullanılan ticari kitler

Kit	Firma
NucleoSpin® Plasmid	MN, 740588
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	MN, 740609
NucleoBond Midi Plasmid Kit	MN, (740410)
Lipofectamine 3000	Thermo Fischer, L3000
Mammalian Cell Extraction Kit	Biovision, K269-500
Protein A ve G Magnetic Bead	NEB, Cell Signalling
Amplified Opti-4CN Substrate Kit	BIO-RAD, 1708238

3.2 Yöntem

3.2.1 His ve FLAG ekli konstrakların hazırlanması

Arabidopsis thaliana p60-Katanin’in pcDNA3.1/myc-His vektörüne klonlanması

Homo sapiens p60-katanin, yürütücüsü olduğum, yürürlükte olan 114Z971 numaralı proje kapsamında hazırlanmış olup bu proje kapsamında kullanılmıştır. Klonlama aşamaları aşağıda detayları verildiği şekilde olduğundan bu raporda bahsedilmeyecektir.

Aşağıda detaylı olarak Prof.Dr. Ying Fu tarafından temin edilen *Arabidopsis thaliana* p60-katanin ve RIC1 cDNA’larının His ve FLAG ekli vektöre klonlanmaları ile *Homo sapiens* Kiaa1432 cDNA’sının FLAG ekli vektöre klonlanması anlatılmıştır.

a. PCR ile ilgili bölgelerin çoğaltılması:

p60-katanin’i temin edilen vektörden çıkarıp ilgili His vektörüne klonlamak için Tablo 3.2’ de gösterilen ve restriksiyon enzim bölgeleri içeren primerler tasarlanmıştır. Gerekli PCR reaksiyon içerik ve koşulları aşağıda, tablolar halinde bilginize sunulmuştur (Tablo 3.3, 3.4, 3.5). PCR reaksiyonları için Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (NEB, M0491) kullanılmıştır. DNA Ladder olarak ise 100bp ve 1kb DNA Ladder (NEB) tercih edilmiştir.

Tablo 3.2. Konstrakları His ve FLAG vektörlerine klonlamak için gereken primer dizileri

konstraklar	Primer Dizisi
A.t. p60-His	At-p60- Forward: 5'- GCG <u>AAG CTT</u> ATG GTG GGA AGT AGT AAT -3' At-p60- Reverse: 5' – GAG <u>CTC GAG</u> TAA AGC AGA TCC AAA CTC -3'
A.t. RIC1-FLAG	At-RIC1-Forward: 5'- ATA <u>AAG CTT</u> ATGGCGACGACAATG-3' At-RIC1-Reverse: 5'- ATA <u>GGT ACC</u> CTC AGA TAA TAT CGT TAC -3'
Hs-Kiaa1432-FLAG	Hs-Kiaa1432-Forward: 5'- GCG <u>GAA TTC</u> ATG TAT TTT CTG AGC GGC -3' Hs-Kiaa1432-Reverse: 5'- GAG <u>GGT ACC</u> TT TAA GGA CAC AGA ACA-3'
<u>KpnI</u> (GGT ACC), <u>XhoI</u> (CTC GAG), <u>HindIII</u> (AAG CTT), <u>EcoRI</u> (GAATTC)	

Tablo 3.3. A.t. p60 klonlamak için kullanılan PCR bileşenleri ve PCR koşulları

Bileşenler	Miktarı	Basamaklar	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
Kalıp DNA	200 ng	Başlangıç Denatürasyonu	98°C	30 sn	1
MgCl ₂	4mM				
Tampon	1X	Denatürasyon	98°C	5 sn	35
dNTP	0,2 mM	Eşleşme	68°C	20 sn	
Forward Primer	0,5 µM				
Reverse Primer	0,5 µM	Sentez	72°C	30 sn	
Enzim (Q5)	1 birim				
Su	50 µl'ye kadar	Son Sentez	72°C	2 dk	1
DMSO	%1				

Tablo 3.4. A.t. RIC1 klonlamak için kullanılan PCR bileşenleri ve PCR koşulları

Bileşenler	Miktarı	Basamaklar	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
Kalıp DNA	200 ng	Başlangıç Denatürasyonu	98°C	30 sn	1
Tampon	1X	Denatürasyon	98°C	5 sn	
dNTP	0,2 mM	Eşleşme	64°C	20 sn	35
Forward Primer	0,5 µM				
Reverse Primer	0,5 µM	Sentez	72°C	30 sn	
Enzim (Q5)	1 birim				
Su	50 µl'ye kadar	Son Sentez	72°C	2 dk	

Tablo 3.5. H.s. Kiaa1432 klonlamak için kullanılan PCR bileşenleri ve PCR koşulları

Bileşenler	Miktarı	Basamaklar	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
Kalıp DNA	200 ng	Başlangıç Denatürasyonu	98°C	30 sn	1
Tampon	1X	Denatürasyon	98°C	5 sn	
dNTP	0,2 mM	Eşleşme	65°C	30 sn	35
Forward Primer	0,5 µM				
Reverse Primer	0,5 µM	Sentez	72°C	2 dk	
Enzim (Q5)	1 birim				
Su	50 µl'ye kadar	Son Sentez	72°C	2 dk	

PCR sonucu elde edilen ürünler %1'lik agaroz jelde görüntülenmiş (Şekil 4.1, 4.2) sonrasında PCR clean-up Gel extraction Kit (MACHEREY-NAGEL, 740609.50) kullanılarak saflaştırılmıştır.

b. Enzim kesim reaksiyonu

Saflaştırılan PCR ürünleri bir sonraki aşamada enzim kesim reaksiyonuna maruz bırakılmıştır. Benzer şekilde PCR ürününün içine yerleştirileceği pcDNA3.1/myc-His ve 3XFLAG-CMV™-10 ekspresyon plazmidleri de aynı enzimlerle kesim reaksiyonuna maruz bırakılmıştır (Tablo 3.6).

Tablo 3.6. Kesim reaksiyon bileşenleri ve koşulları

Bileşenler	Miktarı	Sıcaklık → Süre
Kalıp DNA (PCR ürünü ya da plazmid)	1µg	37°C → 30 dk
Tampon	1X	
Restriksiyon enzimi 1	20 birim	60°C → 20 dk
Restriksiyon enzimi 2	20 birim	
H2O	50 µl'ye kadar	
Proje süresince KpnI, XhoI, HindIII, EcoRI enzimleri kullanılmıştır.		

Kesim reaksiyonu sonrasında hem PCR ürünleri hem de pcDNA3.1/myc-His ve 3XFLAG-CMV™-10 ekspresyon plazmidleri tekrardan PCR clean-up Gel extraction Kit kullanılarak ayrı ayrı saflaştırılmış, saflaştırma sonrası ligasyon aşamasına geçilmiştir.

c. Yapıştırma aşaması (ligasyon)

Bir sonraki aşama ise aynı enzimlerle kesilen PCR ürünü ve pcDNA3.1/myc-His ve 3XFLAG-CMV™-10 ekspresyon plazmidlerinin yapıştırılması ve konstrakların eldesidir. Yapıştırma için gerekli koşullar Tablo 3.7'de bilginize sunulmuştur.

Tablo 3.7. Yapıştırma reaksiyon bileşenleri ve koşulları

Bileşenler	Miktarı	Sıcaklık → Süre
pcDNA3.1/myc-His ya da 3XFLAG-CMV™-10	50 ng	Oda sıcaklığı → 1 saat
A.t.p60 ya da A.t.RIC1 ya da H.s. Kiaa1432	94 ng (1:7 oranı)	
T4 ligase	400 birim	65°C → 10 dk
Tampon	1X	
H2O	20 µl'ye kadar	

d. Transformasyon

Ligasyon işlemini takiben aşağıda sunulan transformasyon protokolü kullanılarak His-A.t.p60-katanin, FLAG-RIC1 ve FLAG-Kiaa1432 plazmidleri kompetent hücrelere (One Shot® MAX Efficiency® DH5α™-T1R Competent Cells) aktarıldı. Prosedürün başarısı plazmidlerin Ampisilin (Amp) direnç geninden faydalanarak test edilmiştir. Ampisilin varlığında hazırlanan LB-Agar kültür kaplarına ekimi yapılan hücrelerden elde edilen kolonilerin her biri koloni-PCR

ile test edilmiştir. Aşağıda transformasyon prosedürü ve koloni PCR sonuçları bilginize sunulmuştur (Şekil 4.3, 4.4, 4.5).

Transformasyon:

- -80°C'den çıkarılan kompetent hücrelerin (30µl) buzda çözülmesi sağlandı.
- Lligasyon sonucu elde edilen plazmidlerin her birinden 3µl alınıp hücrelerin içine eklendi ve tüp 30 dakika buzda bekletildi.
- Tüp 40 saniye süreyle 42°C'de bekletilip 2 dakika süreyle buza geri kondu.
- Tüp içine 250µl LB ilave edildi ve hücreler 1 saat süre ile 37°C'de hafif hızda çalkalandı.
- Çalkalama sonunda hücrelerin 80µl'si Amp içeren LB-Agar platalere ekildi ve gece boyunca 37°C'de inkübe edildi.

Seçilen kolonilerin kalıp olarak kullanıldığı PCR (Koloni PCR) sonucunda, seçilen koloniler gece boyunca Amp içeren sıvı LB içerisinde çoğaltılıp NucleoSpin® Plasmid izolasyon kiti (MN, 740588.50) ile plazmid izolasyonu yapıldı ve dizilemeye gönderildi. Dizileme sonucuna göre seçilen pozitif koloniler sıvı besiyerinde çoğaltıldı, midi plazmit izolasyon kiti (NucleoBond® Xtra Midi) ile yüksek konsantrasyon ve hacimlerde elde edildi.

3.2.2 Ko-İmmünçöktürme yönteminin uygulanması ile RIC1 – p60-katanin, Kiaa1432 – p60-katanin Etkileşimlerinin *in vitro* Olarak Saptanması

Deneyler süresince total protein ekstraksiyonu için Mammalian Cell Extraction Kit (BioVision) kullanılmıştır. İlk olarak klonlanan plazmidler hücrelere transfekte edilmesi için seçilen transfeksiyon bileşenleri şu şekilde kararlaştırılmıştır:

1. A.t.p60 (1 µg) + A.t.RIC1 (1 µg)
2. H.s.p60 (1 µg) + H.s. Kiaa1432 (1 µg)
3. H.s.p60 (1 µg) + A.t.RIC1 (1 µg)

Bu amaç doğrultusunda Lipofectamine 3000 adlı lipozom tabanlı transfeksiyon kiti önerildiği şekilde kullanılmıştır (Tablo 3.8). Transfeksiyon reaksiyonu 1.000.000 hücre ile 6 kuyucuklu hücre kültürü kaplarında gerçekleştirilmiştir. Her reaksiyon yeterli protein eldesi için 4 kez tekrarlanmıştır. Transfeksiyon sonrası 48 saat sonunda total protein ekstraksiyonu yapılmış (mammalian protein extraction kit), burdan bir miktar ayrılmış ve **input** olarak isimlendirilmiştir. Geri kalan lizatlar ile Ko-immünçöktürme deneyine başlanmıştır.

Tablo 3.8. Ko-Transfeksiyon reaksiyon koşulları ve aşamaları

1 (A)	Lipofectamine 3000 Reagent	6 µl / kuyucuk başına
	Opti-MEM	125 µl / kuyucuk başına
2 (B)	DNA #	2 µg / kuyucuk başına (her plazmid 1 µg olacak şekilde)
	Opti-MEM	125 µl / kuyucuk başına
	P3000 Reagent	4 µl / kuyucuk başına
3	A ve B tüplerindeki kimyasallar eşit oranda (130'ar µl) karıştırıldı ve 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.	
4	5 dakika sonunda karışım 1 gün önceden 6lı hücre kaplarına alınan hücrelerin üzerine damlalar halinde ilave edildi ve 2 günlük bekleme süresi sonunda sonuçlar analiz edildi.	

Ko-immünoçöktürme

- Tüp içerisinde yer alan manyetik boncuklar 30 saniye vortekslelendikten sonra her bir reaksiyon için 50'şer µL alınıp tüplere aktarıldı.
- Elde edilen lizatlar ile manyetik boncuklar 30 dakika +4°C'de karıştırıldı, manyetik raf yardımıyla mevcut lizattan arındırılan boncuklar atıldı, deneye ön temizlik aşamasından geçen lizatlar ile devam edildi.
Lizatlar ve primer antikorların +4°C'de gece boyu rotasyon halinde karışmaları sağlandı. Mouse anti-FLAG ile çöktürülecek tüplere (FLAG-Kiaa1432 ve FLAG-RIC1'in çöktürülmesi amaçlanmıştır) mouse anti-FLAG antikor solüsyonu (2 µg antikor) eklendi. Negatif kontrol amacıyla lizat ve mouse IgG'den oluşan bir reaksiyon kuruldu.
- Ertesi gün tüp içerisinde yer alan manyetik boncuklar 30 saniye vortekslelendikten sonra PBS-Tween20 (0.1%) (PBS-T) ile yıkanarak her bir reaksiyon için 50'şer µL alınıp tüplere aktarıldı. Rotator yardımıyla +4°C'de 1 saat boyunca lizat+antikor+manyetik boncuk karışımının dönmesi sağlandı.
- Bağlanan proteinler manyetik alan yardımıyla bağdanmayanlardan uzaklaştırıldı ve ardından 3 kere 200 µL PBS-T ile yıkama işlemleri gerçekleştirildi.
- Son yıkamanın ardından boncuk:antikor:protein kompleksleri 100 µL PBS-T de karıştırılarak yeni tüplere aktarıldı.
- Elüsyon için kompleksler PBS-T den uzaklaştırıldı ve 20 µL elüsyon tamponunda (50 mM Glycine, pH 2.8) rotasyon ile 2 dk boyunca çözüldü. Boncuklardan ayrılan proteinler manyetik raf ile boncuklar tutularak çekildi ve yeni tüplere aktarıldı.
- Elde edilen proteinler SDS-PAGE ve Western blot yönteminde kullanıldı.

Western blotlama deneyi

Western blot analizi, elektroforez ve transfer cihazını içeren “Bolt Welcome Pack A IBLOT, Invitrogen” sistemiyle yapılmıştır. Ko-immünöçöktürme ile elde edilen her bir hücre lizatının western blot analizinde jele yüklenmesi için Tablo 3.9’da belirtilen ölçülerde bir karışım hazırlanmıştır.

Tablo 3.9. Protein örneklerinin jele yüklenmesi için hazırlanan karışımın içeriği

Örnek Miktarı (µl)	LSD Sample Buffer (4X) µl	Sample Reducing Agent (10X) (µl)	dH ₂ O(µl)	Total Hacim (µl)
20	10	4	16	40

Hazırlanan örnek karışımları 70°C’de 10 dakika boyunca proteinlerin denatüre edilmesi için tutulmuş ve sonra karışımlar buzun üzerine yerleştirilmiştir.

Protein örnekleri ve protein ladder, hazır 4-12% bis-tris gradiyent jele yüklenmiş, 1X MES koşma tamponunda 165V’da 30 dakika yürütülmüştür. Daha sonra jel kasetten çıkarılmış, kuru transfer için transfer cihazına yerleştirilmiş ve membrana aktarılması için 7 dakikalık bir program uygulanmıştır. Cihazdan çıkarılan membran, 1X PBS-T içine konulmuş, 5 dakika boyunca 2 kez PBS-T ile yıkanmıştır. Daha sonra membran bloklama için, %5’lik süttezu çözeltisinde 1 saat boyunca sallayıcıda bırakılmıştır. Bloklamadan sonra membran, 2 kere 5 dakika boyunca 1XPBS-T ile yıkanmıştır.

Primer antikor olarak ko-immünöçöktürmede mouse anti-flag ile çöktürülen lizatlarda rabbit anti-His kullanılmıştır. Sekonder antikor olarak ise kolorimetrik görüntüleme kitinin içerisinde bulunan HRP konjuge edilmiş olan “Goat-anti-rabbit” antikorunu kullanılmıştır.

Primer antikor 1:250 dilusyon olacak şekilde, sekonder antikor ise 1:5000 dilusyon olacak şekilde 1XPBS-T ve BSA (5 ve 1%, sırasıyla) kullanılarak hazırlanmıştır. Membran, primer antikor dilusyonu ile +4°C’de gece boyunca sallayıcıda inkübe edilmiştir. Daha sonra membran, 3 kere 1XPBS-T ile 5 dakika boyunca yıkanmıştır. Membran, sekonder antikor dilusyonu ile yine 1 saat oda sıcaklığında sallayıcıda inkübe edilmiştir. Daha sonra membran, 3 kere 5 dakika boyunca 1XPBS-T ile yıkanmıştır.

Protein görüntülemesi “Amplified Opti-4CN Detection Kit, Bio-Rad” kullanılarak yapılmıştır. Western blot analizi sonucu Şekil 4.7’da sunulmaktadır.

Ko-immünöçöktürme çift yönlü olarak tekrarlanmış olup ikinci sette rabbit anti-His ile çöktürülen lizatlarda Western blotlamada primer antikor olarak mouse anti-FLAG kullanılmıştır. Sekonder

antikoru olarak ise kolorimetrik görüntüleme için HRP konjuge edilmiş olan “Goat-anti-mouse” antikoru kullanılmıştır (Şekil 4.8).

3.2.3 Hücrelere aktarılan konstraklar sonrasında Mikrotubul ağlarındaki değişimlerin mikroskop yardımıyla gözlemlenmesi

Hücrelerin lameller üzerinde büyütülmesi ve transfeksiyon

Hücreler, 12’li hücre kültür kaplarının içine yerleştirilen lameller üzerinde büyütülmüşlerdir. İmmünohistokimyasal analiz amaçlı olarak her bir lamele 10 x 104 hücre 200 µl besiyeri içerisinde ekilmiştir. Hücrelerin yüzeye tutunması için 37°C, %5 CO2 ortamında 2 saat beklenmiş, sonrasında kültür kapları 1ml olacak şekilde besiyeriyile doldurulmuştur. 24 saat sonrasında ise hücreler transfeksiyon işlemine tabi tutulmuşlardır (Tablo 3.10). Transfeksiyon reaksiyonları aşağıdaki şekilde planlanmıştır.

1. A.t.p60 (0.5 µg) + A.t.RIC1 (0.5 µg)
2. H.s.p60 (0.5 µg) + H.s. Kiaa1432 (0.5 µg)
3. H.s.p60 (0.5 µg) + A.t.RIC1 (0.5 µg)

Tablo 3.10. İmmünfloresan için Ko-Transfeksiyon reaksiyon koşulları ve aşamaları

1 (A)	Lipofectamine 3000 Reagent	3 µl / kuyucuk başına
	Opti-MEM	50 µl / kuyucuk başına
2 (B)	DNA #	1 µg / kuyucuk başına (her plazmid 0.5 µg olacak şekilde)
	Opti-MEM	50 µl / kuyucuk başına
	P3000 Reagent	2 µl / kuyucuk başına
3	A ve B tüplerindeki kimyasallar eşit oranda (55'er µl) karıştırıldı ve 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.	
4	5 dakika sonunda karışım 1 gün önceden 12’li hücre kaplarında lameller üzerine ekimi yapılan hücrelerin üzerine damlalar halinde ilave edildi ve 2 günlük bekleme süresi sonunda sonuçlar analiz edildi.	

Hücrelerin sabitlemesi

İmmünohistokimyasal analizler için hücreler transfeksiyon sonrası 37°C, %5 CO2 ortamında kültüre edilmiş ve 2. günün sonunda metanol ile sabitlemiştir.

- Sabitleme işlemi için öncelikle besiyerleri vakum yardımıyla uzaklaştırılmıştır.

- Kùltür kabının her bir kuyucuğuna -20°C'de bekletilmiş Matanol (%100) doldurulmuş ve hùcre kabı 10 dakika sùresince -20°C'de bekletilmiştir.
- Sabitleme işlemi sonrasında hùcrelerden metanol uzaklaştırılmış olup, hùcreler 1XPBS ile 3 kez 5'er dakikalık sùrelerle yıkanmışlar ve immùnositokimyasal boyama aşamasına geçilmiştir.

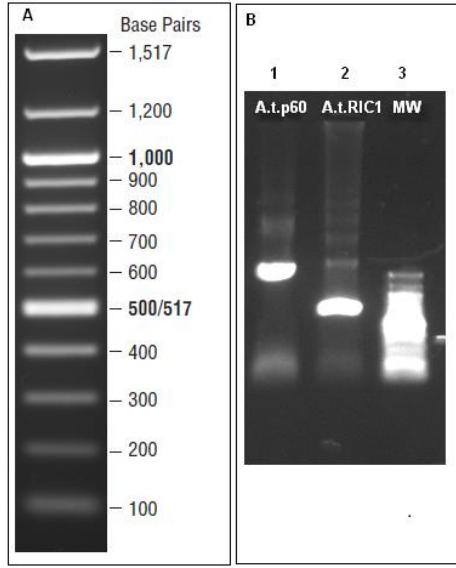
İmmünositokimyasal boyama

- Hùcreler PBS 'den arındırılmış ve 1 saat sùreyle oda sıcaklığında bloklama işlemine maruz bırakılmışlardır. Bloklama solùsyonu olarak 1XPBS içerisinde hazırlanan %10 Goat Serum, 10 mg/ ml BSA karışımı kullanılmıştır.
- Antikorlar tek tùp içerisinde 1XPBS ile seyreltilerek kullanılmışlardır: rabbit anti-His (1:50; A.t. ve H.s. p60-katanin boyaması için); mouse anti-flag (1:50; A.t.RIC1 ve H.s. Kiaa1432 boyaması için); Antikor karışımı kullanmadan önce 4°C'de, 10.000 rpm'de 10 dakika santrifùj edilmiştir. Hazırlanan primer antikor karışımı lameller ùzerine yerleştirilmış ve hùcrelerin 4°C'de, gece boyu bu karışıma maruz kalması sağlanmıştır.
- Ertesi gùn primer antikor karışımları hùcrelerden uzaklaştırılmış olup, hùcreler 3 kez 5'er dakikalık PBS yıkamasına tabi tutulmuştur.
- Yıkamalar sonrası hùcreler bloklama solùsyonu içerisinde 1 saat sùreyle oda sıcaklığında ikinci bloklama işlemine maruz bırakılmıştır.
- Bloklama solùsyonu uzaklaştırıldıktan sonra hùcrelerin ùzerine PBS ile seyreltilen ikincil antikorlar eklenmiştir. İkincil antikor uygulaması 1 saat sùreyle 37°C'de, karanlıkta yapılmıştır.
 - Goat Anti Rabbit 647 (1:1000) → kırmızı işıma verecek olup A.t. ve H.s. p60-katanin varlığını gösterecektir
 - Goat Anti Mouse 488 (1:1000) → yeşil işıma verecek olup A.t.RIC1 ve H.s. Kiaa1432 varlığını gösterecektir.
 - tubulin konjuge antikor 647 (1:50). → mor işıma verecek olup tubulin (mikrotubul) boyamasını gösterecektir..
- Sekonder antikor karışımları hùcrelerden uzaklaştırılıp, hùcreler 3 kez 5'er dakikalık PBS yıkamasına tabi tutulmuştur.
- Lameller mounting medium ilavesi sonrası lam ùzerine yerleştirilmış ve immùnositokimyasal analize hazır hale gelmişlerdir.
- Analizler, konfokal mikroskop kullanılarak İstanbul Teknik Ùniversitesi, Molekùler Biyoloji-Biyoteknoloji ve Genetik Araştırmalar Merkezi'nde gerçekteştirilmiştir. Sonuçlar aşağıda sunulmuştur (şekil 4.9, 4.10, 4.11).

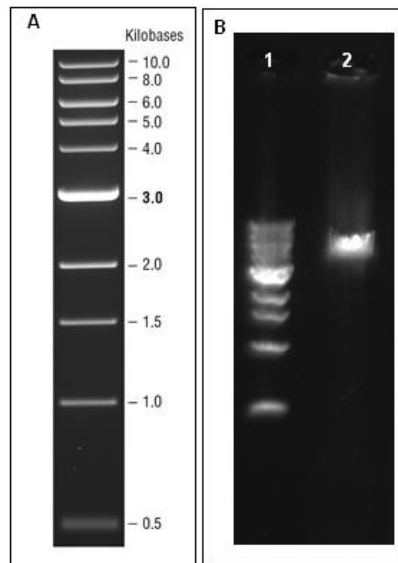
4. BULGULAR

4.1 His ve FLAG ekli konstrakların hazırlanması

Restriksiyon enzim bölgeleri içerecek şekilde tasarlanan primerler ile başarılı şekilde elde edilen PCR reaksiyonları ile deneylere devam edilmiştir. PCR sonucu elde edilen ürünler %1'lik agaroz jelde her bir DNA konstrağı için görüntülenmiştir (Şekil 4.1, 4.2). PCR reaksiyonları sonrasında PCR clean-up Gel extraction Kit (MACHEREY-NAGEL, 740609.50) kullanılarak saflaştırılmış ve PCR bileşenlerinden temizlenmeleri sağlanmıştır.



Şekil 4.1. DNA ladder, 100 bp (A, B3) ve A.t. p60 (1572 bç) & A.t.RIC1 (675 bç) PCR ürünlerinin jel görüntüsü (B1, B2).



Şekil 4.2. DNA ladder, 1kb (A, B1) ve H.s.Kiaa1432 (4296 bç) PCR ürünü jel görüntüsü (B2).

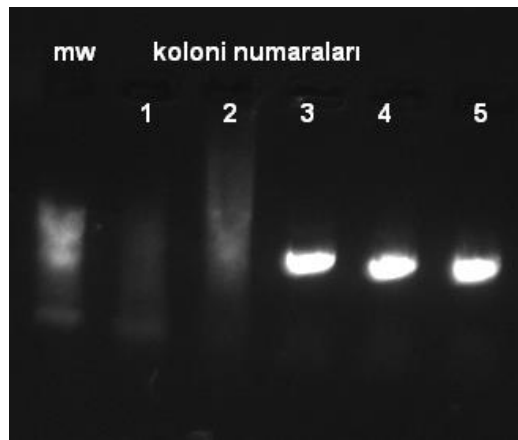
Safılaştırılan PCR ürünleri ilgili enzimlerle (Proje süresince KpnI, XhoI, HindIII, EcoRI enzimleri kullanılmış olup enzim kombinasyonları konstraklara göre değişiklik göstermiştir) restriksiyon reaksiyonuna tabi tutulmuştur. Restriksiyon koşulları Tablo 3.6'da bilginize sunulmuştur.

Restriksiyon reaksiyonunda aynı enzim ikilisi ile kesilen PCR ürün ve plazmid çiftlisi (RIC1, Kiaa1432 için 3XFLAG-CMV™-10 plazmidi, p60-katanin için pcDNA™3.1/myc-His A plazmidi) Tablo 3.7'de bilginize sunulan koşullarda yapıştırma reaksiyonuna tabi tutulmuştur.

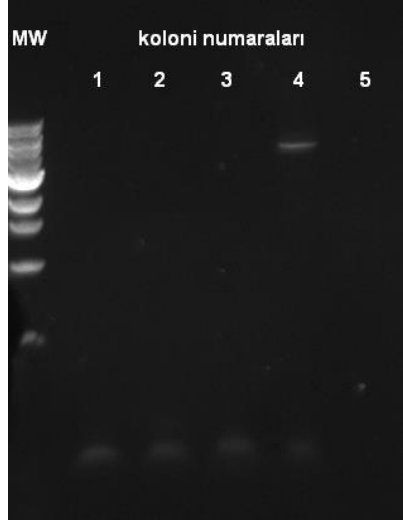
Yapıştırma reaksiyonunun başarısı bölüm 3.2.1-(d)'de detaylı protokolü sunulan transformasyon reaksiyonu ile kontrol edilmiştir. LB-Agar kültür kapları üzerinde ampisilin varlığında büyüyen koloniler koloni PCR ile ön taramaya tabi tutulmuş pozitif çıkan koloniler dizilemeye yollanmıştır. Örnek koloni – PCR sonuçları aşağıda bilginize sunulmuştur (Şekil 4.3, 4.4, 4.5). Dizilemede olumlu görülen kolonilerle deneylere devam edilmiştir. Dizileme sonuçlarının kromatogram örnekleri de Şekil 4.6'da bulunabilir.



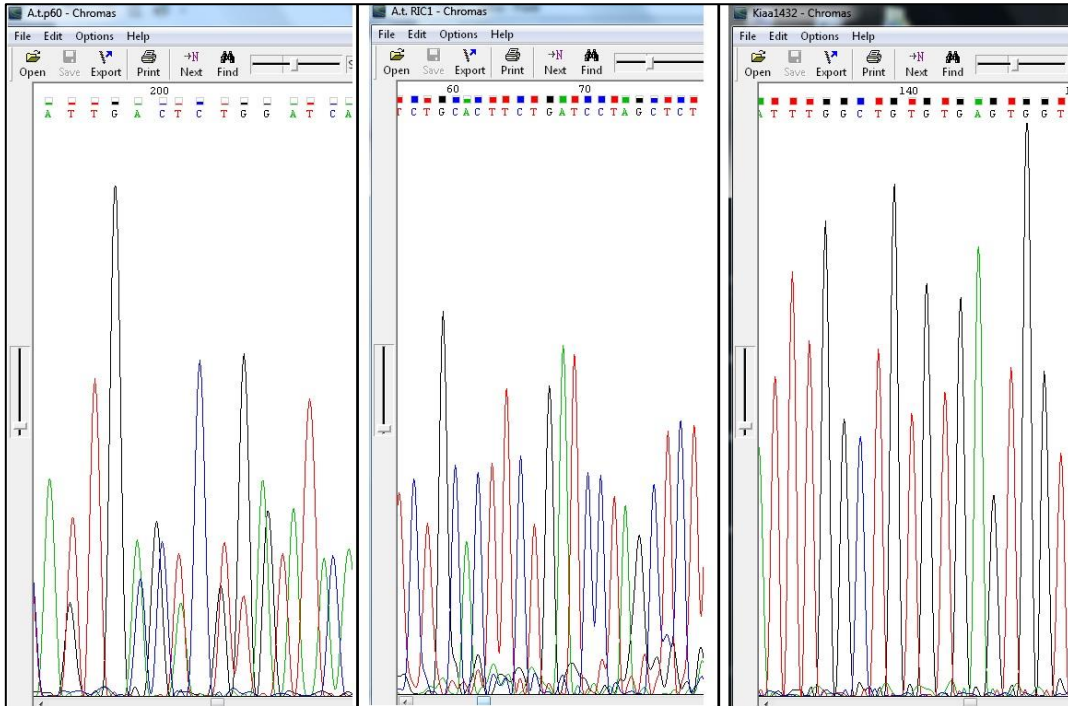
Şekil 4.3. His - A.t.- p60-katanin Koloni PCR sonucunun jel görüntüsü



Şekil 4.4. FLAG - A.t.- RIC1 Koloni PCR sonucunun jel görüntüsü



Şekil 4.5. FLAG - H.s.- Kiaa1432 Koloni PCR sonucunun jel görüntüsü

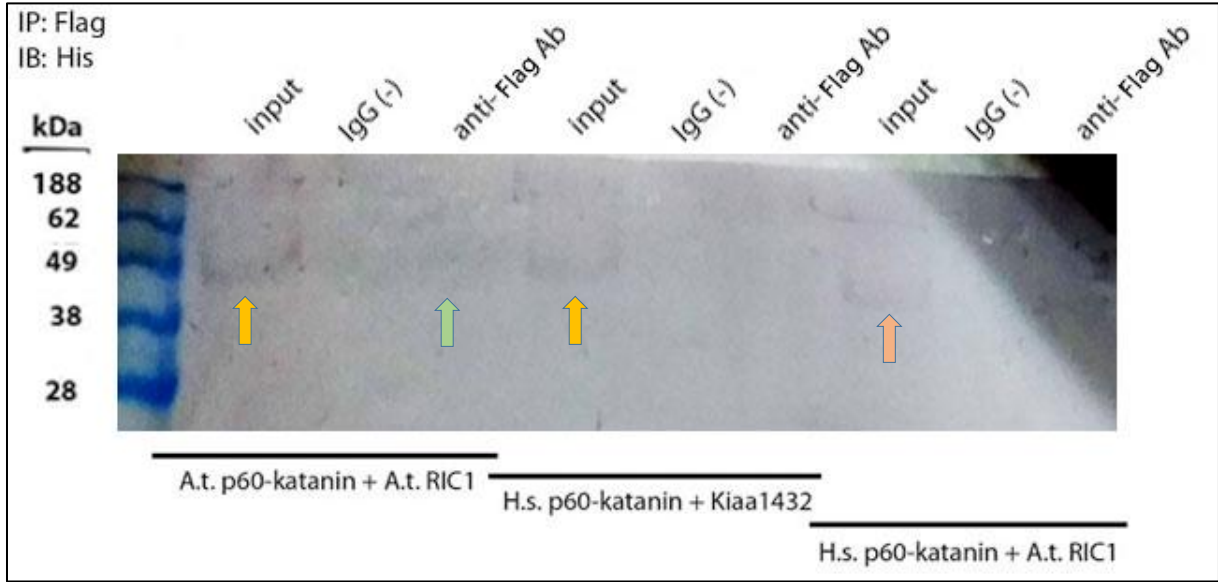


Şekil 4.6. Dizileme sonuçlarının His-A.t.p60-katanin, FLAG-A.t.RIC1 ve FLAG-H.s.Kiaa1432 için kromatogram olarak gösterimi

Bu proje kapsamında hazırlanan His-A.t.p60-katanin, FLAG-A.t.RIC1 ve FLAG-H.s.Kiaa1432 ile yürütücülüğünü yaptığım 114Z971 numaralı TÜBİTAK projesinde elde edilen His-H.s.p60-katanin kontraktlarıyla ko-immünoçöktürme (bölüm 4.2) ve immünfloresan (bölüm 4.3) deneylerine geçilmiştir.

4.2 Ko-İmmünçöktürme yönteminin uygulanması ile RIC1 – p60-katanin, Kiaa1432 – p60-katanin Etkileşimlerinin *in vitro* Olarak Saptanması

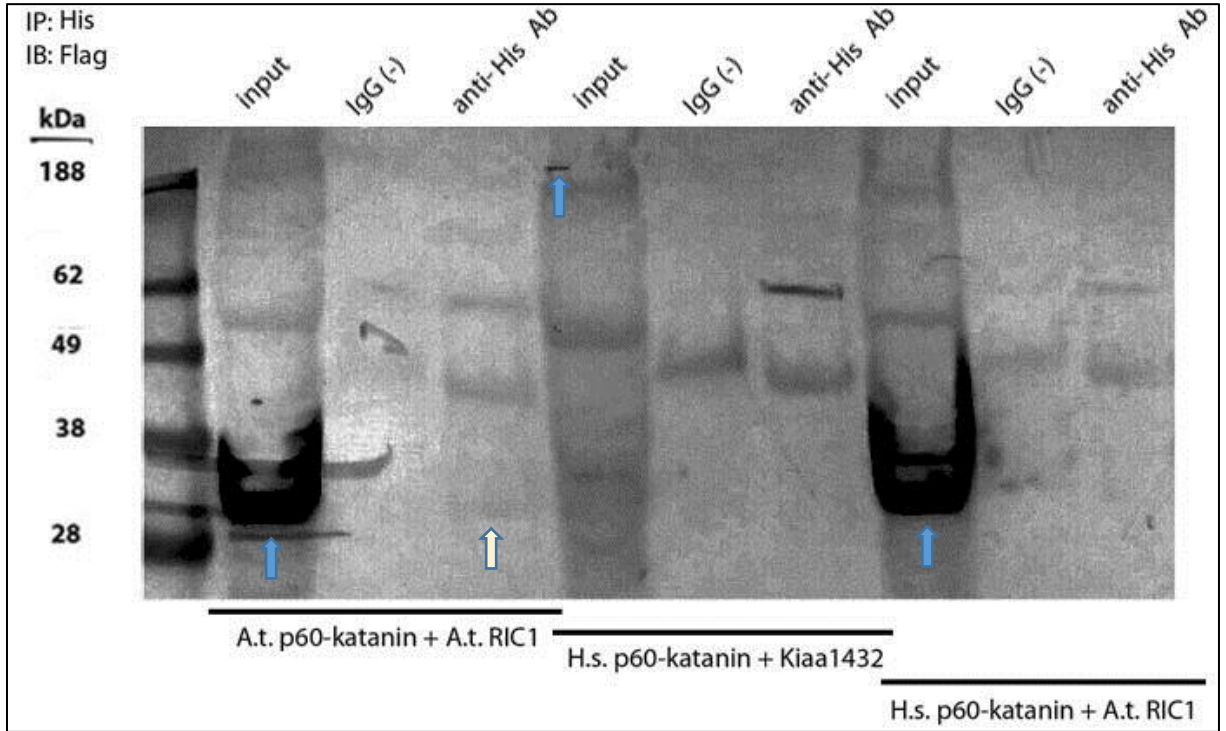
Projenin bu aşamasında His ve FLAG ekleri yardımıyla yukarıda tasarlanan konstraklardan elde edilen proteinlerin birbirleriyle olan etkileşimleri *in vitro* olarak ko-immünçöktürme yönteminden faydalanılarak araştırılması planlanmıştır. Bölüm 3.2.2’de detaylı olarak protokol bilginize sunulmuştur. Prosedür çift yönlü olarak icra edilmiştir. İlk kısımda FLAG antikoru varlığında (RIC1 ve Kiaa1432’yi çöktürmek suretiyle) çöktürülen lizat içerisinde His-ekli protein (A.t. ve H.s. p60-katanin) varlığı araştırılırken (Şekil 4.7); ikinci kısımda His antikoru varlığında çöktürülen lizat (A.t. ve H.s. p60-katanin) içerisinde FLAG-ekli protein (RIC1 ve Kiaa1432) varlığı araştırılmıştır (Şekil 4.8).



Şekil 4.7. Anti-FLAG antikoru ile çöktürülen lizatta anti-His antikoru ile Western blotlama sonucu

Şekil 4.7’de input ile ifade edilen örnekler, immünçöktürmeye tabi tutulmayan total protein lizatlarıdır. Her deneysel set için ko-immünçöktürme öncesi bir miktar total protein ayrılmış olup deneyde bir nevi pozitif kontrol görevi görmektedir. Bu kuyucuklarda bant olması halinde diğer kuyucuklardaki bantlar yorumlanabilecektir. IgG ile gösterilen örnekler ise negatif kontrol olup mouse anti-FLAG ile çöktürülen deneylerde mouse IgG (Şekil 4.7), rabbit anti-His ile çöktürülen deneylerde rabbit IgG seçilmiştir (Şekil 4.8). IgG kuyucuklarındaki bant varlığı spesifik olmayan bağlanmalara işaret edecektir. anti-FLAG Ab ile ifade edilen kuyucuklarda ise bu antikor ile ko-immünçöktürme işlemine tabi tutulan lizatlar yer almaktadır. Bu kuyucuktaki pozitif bant FLAG ve His ekli proteinlerin etkileşimine işaret edecektir. Sonuç olarak Şekil 4.7 ve Şekil 4.8 birbirini doğrular nitelikte olmalıdır ki deney anlamlılık kazansın.

Bu bilgiler ışığında bakıldığında, Şekil 4.7'de input kuyucuklarında silik de olsa bantlar görülmektedir (turuncu ok ile gösterilmiştir), ki bu da mevcut protein lizatının His-ekli H.s. ve A.t. p60 içerdiğini doğrulamaktadır. IgG ile işaretli kuyucuklara bakıldığında bant gözlemlenmemesi spesifik olmayan bağlanmaların reaksiyonumuzda olmadığını göstermektedir. Bu doğrultuda bakıldığında A.t.p60 + A.t.RIC1 reaksiyonunda silik de olsa bir bant izlenirken (yeşil ok, bu etkileşimin varlığı literatürde zaten mevcuttur, Lin ve ark., 2013), H.s.p60 + H.s. Kiaa1432 ve H.s.p60 + A.t.RIC1 reaksiyonlarında ilgili yerlerde bant gözlemlenememiştir.

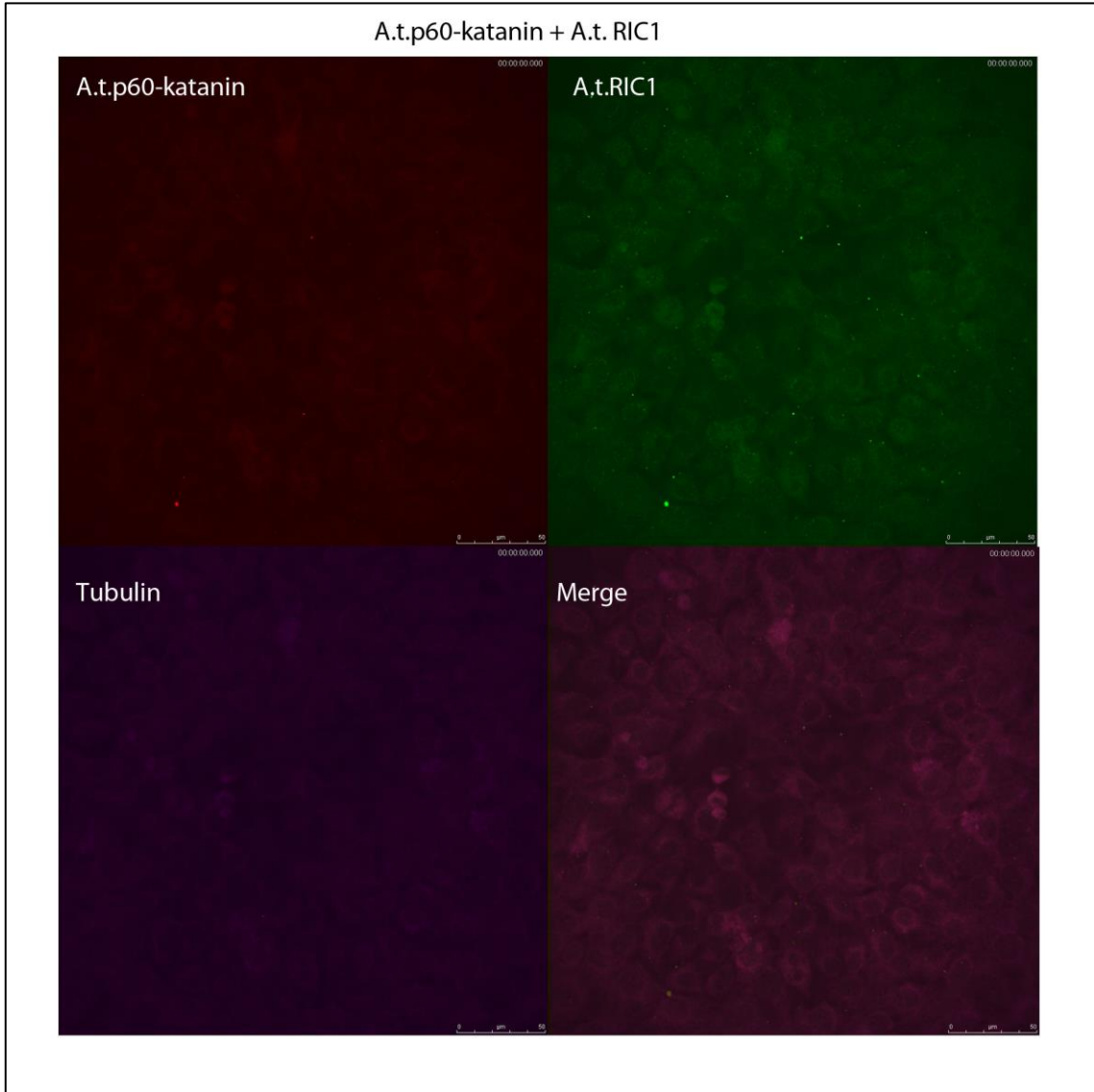


Şekil 4.8. Anti-His antikoruna ile çöktürülen lizatta anti-FLAG antikoruna ile Western blotlama sonucu

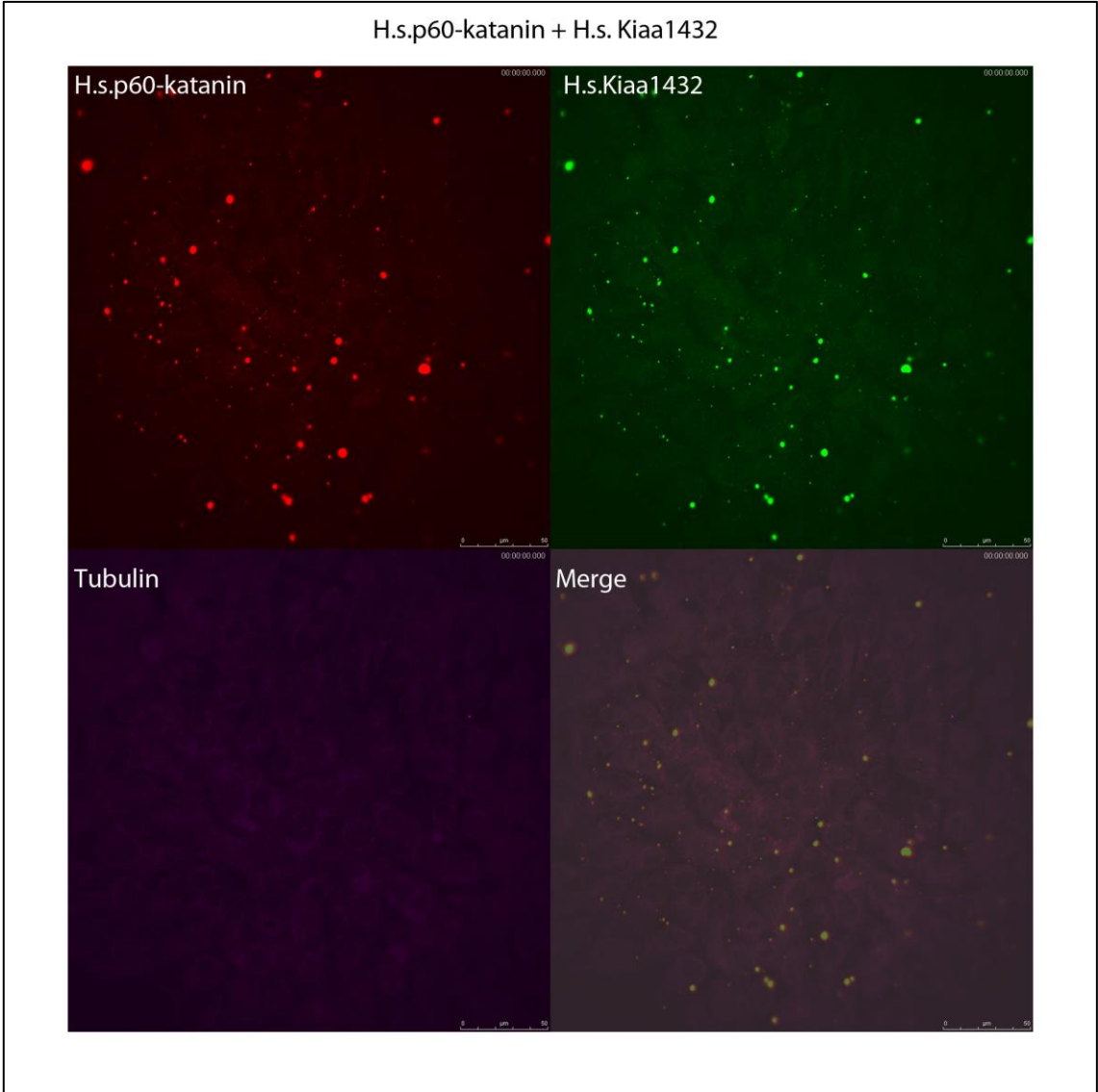
Benzer olarak Şekil 4.8 incelendiğinde input kuyucuklarında bantlar görülmektedir (mavi ok ile işaretlenmiştir). Bu bantlar mevcut protein lizatının FLAG ekli H.s.Kiaa1432 ve A.t. RIC1 içerdiğini doğrulamaktadır. Kiaa1432'nin büyük bir protein olması sebebiyle (~150 kDa) kısmen transfer olduğunu gördük. IgG ile işaretli kuyucuklara bakıldığında gözlemlenen bantların benzer yerlerde olması rabbit IgG ile lizatların spesifik olmayan bir etkileşim verdiğine işaret etmektedir. Deneysel kuyucuklardaki bantlar yorumlanırken IgG ile aynı seviyedeki bantlar dikkate alınmayacaktır, bu bantlar antikorun ağır ve hafif zincirleri olarak yorumlanabilir. Bu doğrultuda bakıldığında A.t.p60 + A.t.RIC1 reaksiyonunda Şekil 4,7'ye benzer şekilde silik de olsa bir bant izlenirken (sarı ok), H.s.p60 + H.s. Kiaa1432 ve H.s.p60 + A.t.RIC1 reaksiyonlarında ilgili yerlerde bant gözlemlenememiştir.

4.3 Hücelere aktarılan konstraklar sonrasında Mikrotubul ağlarındaki değişimlerin mikroskop yardımıyla gözlemlenmesi

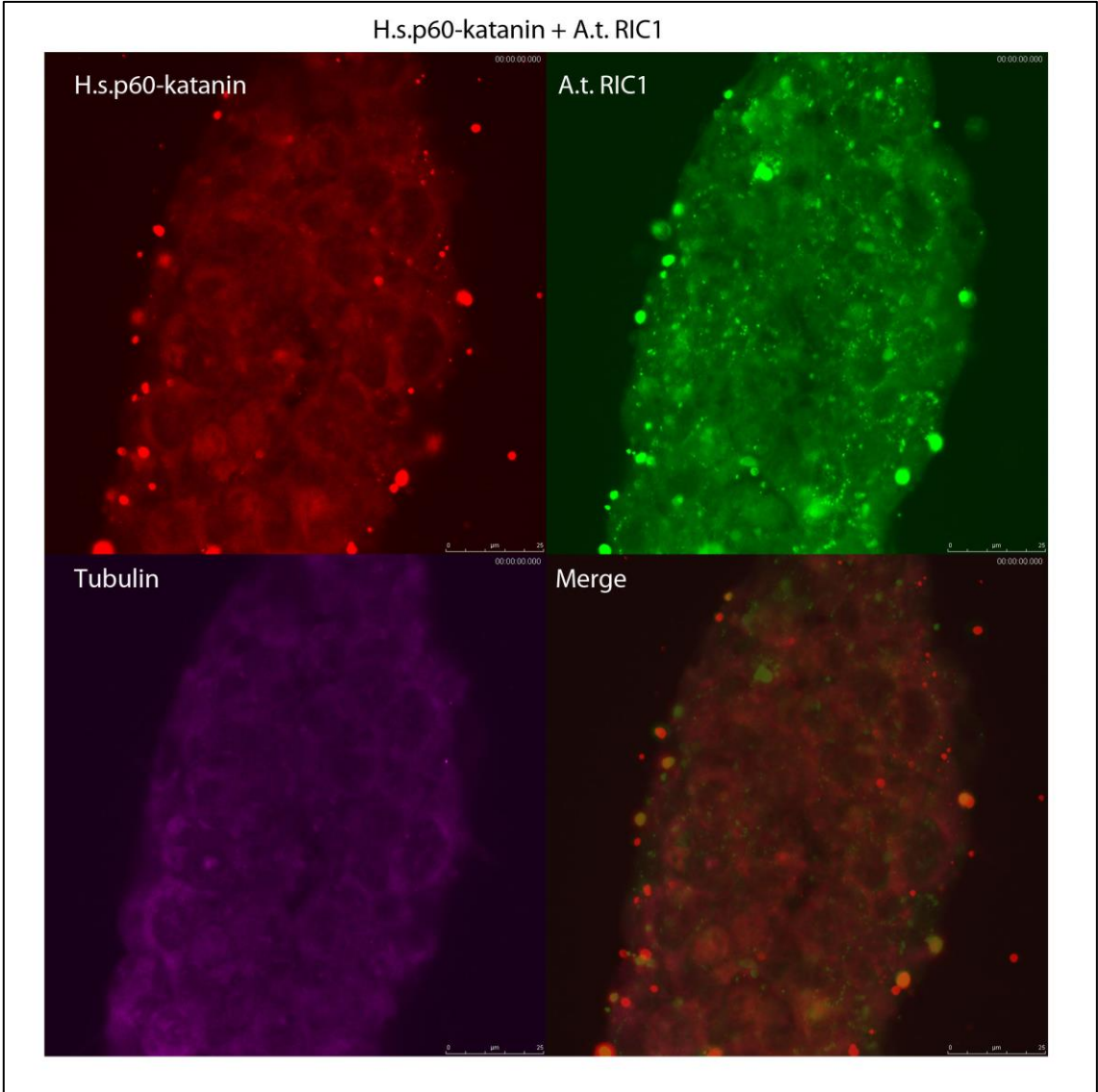
Projenin son aşamasında His ve FLAG ekleri yardımıyla yukarıda tasarlanan konstraklardan elde edilen proteinlerin birbirleriyle olan etkileşimleri ve bu etkileşimin mikrotubul ağları üzerindeki değişimlerinin mikroskop yardımıyla gözlemlenmesi amaçlanmıştır. Her ne kadar ko-immünöktürme ile herhangi bir etkileşim tespit edilemese de immünfloresan analizler iki kez tekrarlanmış (destek alınan kurumdaki mikroskop arızası nedeniyle optimizasyon sayısı iki ile sınırlandırılmak durumunda kalınmıştır), ancak başarılı bir immünfloresan boyama elde edilememiştir. Özellikle tubulin boyamaları mikrotubul ağındaki değişimi incelemek için yeterli olmamıştır. Sonuçlar Şekil 4.9, 4.10, 4.11’de bilginize sunulmuştur.



Şekil 4.9. A.t.p60-katanin + A.t.RIC1 için immünfloresan analiz sonucu



Şekil 4.10. H.s.p60-katanin + H.s.Kiaa1432 için immünfloresan analiz sonucu



Şekil 4.11. H.s.p60-katanin + A.t.RIC1 için immünfloresan analiz sonucu

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Katanin'in bilinen regölatörleri, etkileşim partnerleri yok denecek kadar az olması sebebiyle önerilen proje ile insan p60-katanin proteininin, bitki RIC1 ve insan homoloğu Kiaa1432 proteinleri ile fiziksel etkileşiminin tespiti ve etkileşimin mikrotubul kesimi bakımından fonksiyonel açıdan aydınlatılması amaėlanmıőı idi. Yapılan analizlerin sonucunda insan p60-katanin'in *Arabidopsis thaliana* RIC1 ve bu proteinin insan homoloğu Kiaa1432 proteinleri ile fiziksel etkileşimine rastlanamamıőıtır.

6. KAYNAKLAR

1. Baas, P. W., Qiang, L. 2005. "Neuronal microtubules: when the MAP is the roadblock". *Trends in Cell Biology*, 15(4), 183-187.
2. Cheeseman, I. M., Desai A., 2008. "Molecular architecture of the kinetochore microtubule interface". *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9,33-46.
3. Conde, C., Caceres, A., 2009. "Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites". *Nat Rev Neurosci*, 10(5): 319-332.
4. Cyr, R.J. ve Palevitz, B.A., 1995. "Organization of cortical microtubules in plant cells". *Current Opinion in Cell Biology.*, 7, 65–7.
5. Fu, Y., Gu, Y., Zheng, Z., Wasteneys, G., Yang, Z., 2005. "Arabidopsis interdigitating cell growth requires two antagonistic pathways with opposing action on cell morphogenesis". *Cell*, 120(5), 687-700.
6. Karabay, A., Yu, W., Solowska, J. M., Baird, D. H., and Baas, P. W., 2004. "Axonal Growth Is Sensitive to The Levels of Katanin, a Protein That Severs Microtubules" *J. Neurosci.*, 24, 5778-5788.
7. Lin, D., Cao, L., Zhou, Z., Zhu, L., Ehrhardt, D., Yang, Z., Fu, Y., 2013. "Rho GTPase signaling activates microtubule severing to promote microtubule ordering in Arabidopsis". *Curr Biol.*, 23(4), 290-7.
8. McNally, K. P., Bazirgan, O. A., ve McNally, F. J., 2000. "Two domains of p80 katanin regulate microtubule severing and spindle pole targeting by p60 katanin". *J. Cell Sci.*, 113, 1623-1633.
9. McNally, K.P., Bazirgan, O.A., ve McNally, F.J., 2000. "Two domains of p80 katanin regulate microtubule severing and spindle pole targeting by p60 katanin". *J. Cell Science.*, 113, 1623-1633.
10. Mellet, V., Gaillard, J., Vantard, M., 2003. "Plant Katanin, a microtubule severing protein". *Cell Biology International*, 27, 279.
11. Stoppin-Mellet, V., Gaillard, J., Timmers, T., Neumann, E., Conway, J., Vantard, M., 2007. "Arabidopsis katanin binds microtubules using a multimeric microtubule-binding domain". *Plant Physiol Biochem.* 45(12), 867-77.

12. Quarmby, L., 2000. "Cellular Samurai: katanin and the severing of microtubules. Cellular Samurai: katanin and the severing of microtubules". *J Cell Sci*, 113, 2821-2827.
13. Quarmby LM, Lohret TA., 1999. "Microtubule severing". *Cell Motil Cytoskeleton*, 43, 1-9.
14. Roll-Mecak, A., McNally, F.J., 2010. "Microtubule severing enzymes". *Curr. Opin. Cell Biol.*, 22(1), 96-103.
15. Wu, G., Gu, Y., Li, S., Yang, Z., 2001. "A genome-wide analysis of Arabidopsis Rop-interactive CRIB motif-containing proteins that act as Rop GTPase targets". *Plant Cell.*, 13(12), 2841-56.
16. Yu, W., Qiang, L., Solowska, J. M., Karabay, A., Korulu, S., Baas, P. W., 2008. "The Microtubule-severing Proteins Spastin and Katanin Participate Differently in the Formation of Axonal Branches". *Mol Biol Cell.* 19(4), 1485-98.

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Yürütücüsü:	Yrd. Doç. Dr. ŞİRİN KORULU KOÇ
Proje No:	115Z535
Proje Başlığı:	İnsan P60-Katanin Proteininin, Bitki Ric1 ve İnsan Homoloğu Kiaa1432 Proteinleri İle Etkileşiminin Tespiti & Etkileşimin Mikrotubuller Üzerinde Fonksiyonel Analizi
Proje Türü:	1002 - Hızlı Destek
Proje Süresi:	12
Araştırmacılar:	
Danışmanlar:	
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	İSTANBUL AREL Ü. FEN EDEBİYAT F. MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK B.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	15/07/2015 - 15/07/2016
Onaylanan Bütçe:	29500.0
Harcanan Bütçe:	29499.96
Öz:	<p>Mikrotubuller ihtiyaç durumuna göre uzayıp?kısalabilen, yeniden organize olabilen dinamik yapıları polimerlerdir. Mikrotubul organizasyonu, bölünen hücrelerde mitoz, post-mitotik nöronlarda akson/dendrit yapılarının oluşumunda görevlidir. Mikrotubul organizasyonuna imkan sağlayan mekanizmalardan birisi Katanin gibi mikrotubul kesici proteinlerce kesilmeleridir. Katanin, KATNA1 geni tarafından kodlanan ve enzimatik aktiviteye sahip p60, onun fonksiyonunu düzenleyen ve KATNB1 geni tarafından kodlanan p80 alt birimlerinde oluşmaktadır.</p> <p>Katanin'in bilinen regülatörleri, etkileşim partnerleri yok denecek kadar azdır. Arabidopsis thaliana bitkisinde yapılan çalışmalarda p60-katanin'in bir GTPase olan RIC1 proteini ile etkileştiği ve p60-katanin'in enzimatik aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir. Bu sonuçtan hareketle, önerilen proje ile insan p60-katanin proteininin, bitki RIC1 ve insan homoloğu Kiaa1432 proteinleri ile fiziksel etkileşiminin tespiti ve etkileşimin mikrotubul kesimi bakımından fonksiyonel açıdan aydınlatılması amaçlanmıştır.</p> <p>Proteinlerin etkileşim bakımından incelenebilmesi adına ilk olarak bu proteinleri kodlayan cDNA'lar FLAG ve His eki içeren plazmidlere ayrı ayrı klonlanmışlardır. Arabidopsis thaliana p60-katanin ve RIC1 proteinleri Prof. Ying Fu tarafından temin edilmiş olup sadece ilgili plazmidlere aktarılmışlardır. İnsan p60-katanin yürürlükte olan 114Z971 projesi kapsamında FLAG ekli olarak elde edilmiş olup insan Kiaa1432 proteinini kodlayan cDNA klonlanmıştır. Klonlamayı takiben proteinler fiziksel etkileşim bakımından ko-immün çöktürme yöntemiyle test edilmiştir. Son olarak, His ve FLAG ekli olarak klonlanan proteinlerin cDNA'larını içeren plazmidler farklı kombinasyonlar halinde hücreye verilmek suretiyle olası etkileşimin mikrotubul ağına etkisi araştırılmıştır.</p> <p>Yapılan analizlerin sonucunda insan p60-katanin'in Arabidopsis thaliana RIC1 ve bu proteinin insan homoloğu Kiaa1432 proteinleri ile fiziksel etkileşimine rastlanamamıştır.</p>
Anahtar Kelimeler:	Katanin, RIC1, Kiaa1432, Mikrotubul, Akson ?Dendrit Dallanması
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır
Projeden Yapılan Yayınlar:	1- Identification of the Interaction between Human p60-katanin and Kiaa1432 Protein & Functional Analysis of the Interactions on Microtubules (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Poster Sunum),