



**İNSAN P53 TUMÖR SÜPRESÖR PROTEİNİ İLE İNSAN APRATAKSİN,
SACM1L VE METAP1 PROTEİNLERİ ARASINDAKİ
PROTEİN-PROTEİN ETKİLEŞİMLERİNİN
ORTAYA ÇIKARTILMASI**

Kübra DURMUŞ

TIBBİ BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Ahmet KOÇ**

Yüksek Lisans Tezi - 2020

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

**İNSAN P53 TÜMÖR SÜPRESÖR PROTEİNİ İLE İNSAN APRATAKSİN,
SACM1L VE METAP1 PROTEİNLERİ ARASINDAKİ PROTEİN-PROTEİN
ETKİLEŞİMLERİNİN ORTAYA ÇIKARTILMASI**

KÜBRA DURMUŞ

**Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Ahmet KOÇ**

Bu Araştırma TÜBİTAK Tarafından 1001 Projesi,
117Z990 Proje numarası ile desteklenmiştir.

**MALATYA
2020**

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	vi
ABSTRACT.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
TABLolar DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. TP53 Geni ve p53 Proteini.....	2
2.2. p53'ün Yapısı	4
2.3. p53'ün Düzenlenmesi	5
2.4. Aprataksin Geni.....	8
2.5. SACM1L Geni	10
2.6. METAP1 Geni.....	11
2.7. Protein-Protein Etkileşimi.....	12
3. MATERYAL VE METOT	14
3.1. Materyal	14
3.1.1. Kullanılan Malzemeler.....	14
3.1.2. Kullanılan Laboratuvar Ekipmanları	16
3.1.3. Kullanılan Kitler	17
3.1.4. Çalışmada Kullanılan Ortam ve Malzemenin Temizliği	17
3.1.5. Çalışmada Kullanılan Vektörler	17
3.2. Metot.....	19
3.2.1. Kompetent Hücre Hazırlanması	20
3.2.2. Plazmitlerin Çoğaltılması ve Seçici Ortamın Hazırlanması	20
3.2.3. p53 Geninin Amplifikasyonu ve Jel Elektroforezi	21
3.2.4. Gateway Klonlama	22
3.2.5. Maya Transformasyonu	23
3.2.6. Protein Aktivite Testleri.....	25
3.2.7. Hücre Kültürü Teknikleri.....	27
3.2.8. Protein ile İlgili Teknikler	28
3.2.9. İstatiksel Analiz	30

4. BULGULAR	31
4.1. Maya İkili Hibrit Sistemi İçin Gerekli Moleküler Klonlama Çalışmaları	31
4.1.1. Lentiviral Vektörlerden p53 PCR Ürünü, APTX, SACM1L ve METAP1 Genlerinin Maya İkili Hibrit Vektörlerine Alt Klonlanması	32
4.1.2. p53, APTX, SACM1L ve METAP1 Genlerinin pDONR-221 Vektörüne Klonlanması ve <i>E.Coli</i> 'ye Transformasyonu.....	33
4.1.3. pDONR-221 Vektörüne klonlanan p53, APTX, SACM1L, METAP1 Genlerinin Maya İkili Hibrit Vektörlerine Klonlanması ve <i>E.Coli</i> 'ye Transformasyonu.....	34
4.2. Dizi Analizi	36
4.3. Klonlamalar ile Oluşturulan Plazmitlerdeki Genlerin İfadeleme Analizleri	36
4.4. Protein İnteraksiyon Analizleri: LacZ aktivite tespiti	39
4.4.1. Maya İkili Hibrit Transformantlarında Beta Galaktozidaz Aktivite Analizi	41
4.4.2. Mav203 Hücrelerindeki Transformantların Raporter Gen Aktivite Analizleri	41
4.4.3. Co-IP Yöntemiyle Etkileşim Gösteren Proteinlerin Bulunması / Teyit Edilmesi	44
5. TARTIŞMA	47
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	50
KAYNAKLAR	51
EKLER	51
EK-1. Özgeçmiş	55
EK.2. Etik Kurul Kararı.....	56

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimin boyunca derin bilgisi ve tecrübelerinden faydalandığım, laboratuvarında çalışmaktan büyük mutluluk ve gurur duyduğum değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ahmet KOÇ'a ve Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalının saygıdeğer hocalarına,

Tez çalışmalarında 117Z993 nolu proje kapsamında maddi destek sağlayan TÜBİTAK'a,

Değerli ve samimi dostluklarıyla her zaman yanımda olan ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen, laboratuvarında birlikte güzel zamanlar geçirdiğim Selcen SEZER, Kübranur KORKMAZ ve Özge ARSLAN'a,

Yoğun çalışmalarım sırasında desteklerini ve sabırlarını esirgemeyen her zaman arkamda olan sevgili anne ve babama, hayatımın her alanında beni destekleyen hayat arkadaşım Mustafa TÜRKMEN'e

Sonsuz sevgilerimi sunar, teşekkür ederim.

Kübra DURMUŞ

ÖZET

İnsan p53 Tümör Süpresör Proteini ile İnsan Aprataksin,SACM1L ve METAP1 Proteinleri Arasındaki Protein-Protein Etkileşimlerinin Ortaya Çıkartılması

Amaç: p53 transkripsiyon faktörü; hücre döngüsünün durması, DNA onarımı ve apoptoz gibi birçok biyolojik fonksiyonlarda görev almaktadır. p53 aktivitesi, post-translasyonel modifikasyonlar dahil birçok faktör tarafından düzenlenir. Daha önce yapılan ön çalışmada, heterolog maya sistemindeki insan p53 aktivitesini düzenleyen antioksidan genlerin bulunması için antioksidan genleri bulunmayan 109 farklı mutant taranmıştır. Bu tarama kapsamında üç tanesinin (Δ hnt3, Δ sac1 ve Δ map1), yabancı tip hücrelere kıyasla daha düşük p53 aktivitesi gösterildiği bulunmuştur. Bu genlerin insan homologlarının (APTX, SACM1L ve METAP1) p53 regülasyonunda rol oynamaları muhtemeldir. Tez çalışması dahilinde p53 ile insan APTX, SACM1L ve METAP1 proteinleri arasındaki protein-protein etkileşimlerinin tespit edilmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot: p53 ve hedef proteinler arasındaki protein-protein etkileşimlerini incelemek için maya ve insan hücre kültür modelleri kullanılmıştır. Maya ikili hibrit sistemi ve Co-IP tekniklerinden faydalanılarak protein-protein etkileşimlerinin analizleri yapılmıştır.

Bulgular: Maya ikili hibrit ile ilgili deneylerde protein interaksiyonlarının belirlenebilmesi için LacZ raportör geninden faydalanılarak analizler yapılmıştır. Analiz sonucunda p53 içeren transformantlar ile kontrol grubu transformantlar arasında p53-APTX transformantında anlamlı farklılık olduğu görülmüştür ($p < 0.05$). Daha sonra yapılan Co-IP deneylerinde, normal büyüme şartlarındaki MCF 10A hücrelerindeki p53 ile hedef genler arasında Western Blot analizi ile direkt bir etkileşim saptanamamıştır.

Sonuç: Analizler sonucunda sadece APTX' in p53 proteini ile etkileştiğini göstermektedir. Bununla birlikte, bu etkileşim MCF 10A hücrelerinde normal büyüme koşulları altında Co-IP deneyleri ile belirlenememiştir.

Anahtar Kelimeler: APTX, kanser, METAP1, p53, protein-protein etkileşimi, SACM1L

ABSTRACT

Elucidation of Protein-Protein Interactions Between Human p53 Tumor Suppressor and The Human Aprataxin, SACM1L and METAP1 Proteins

Aim: : The p53 transcription factor is involved in many biological functions such as cell cycle arrest, DNA repair, and apoptosis. P53 activity is regulated by many factors, including post translational modifications. In a preliminary study, 109 different yeast mutants without antioxidant genes were screened to find antioxidant genes that regulate human p53 activity in the heterologous yeast system. Within the scope of this screening, three of them (Δ hnt3, Δ sac1 and Δ map1) were found to have lower p53 activity compared to wild type cells. Human homologs of these genes (APTX, SACM1L and METAP1) are likely to play a role in the p53 regulation. The aim of this thesis is to determine the protein-protein interactions between p53 and human Aprataxin, SACM1L and METAP1 proteins.

Material and Method: Yeast and human cell culture models were used to study protein protein interactions between p53 and target proteins. Yeast two hybrid system and Co-IP techniques were used to analyze protein-protein interactions.

Results: In assays on yeast two hybrid, analyzes were made using the LacZ reporter gene to determine protein interactions. As a result of the analysis, it was observed that there was a significant difference in p53-APTX transformant between p53 containing transformants and control group transformants ($p < 0.05$). In the subsequent Co-IP experiments, under normal growth conditions, direct interaction between p53 in MCF 10A cells and target genes was not detected as a result of Western Blot analysis.

Conclusion: Our results suggest that only APTX interacts with p53 protein. However, this interaction was not be able to confirmed by the Co-IP experiments under normal growth conditions in MCF 10A cells.

Key words: APTX, cancer, METAP1, p53, protein-protein interaction, SACM1L.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

°C	: derece (santigrad)
µl	: mikrolitre
5-FOA	: 5-fluorotik asit
AOA	: Ataksi okülomotor apraksi
APT	: Aprataksin
cDNA	: Komplementer deoksiribo nükleik asit
Co-IP	: Ko-İmmünopresptasyon
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
His	: Histidin
kDa	: Kilodalton
Leu	: Lösin
M	: Molar
Met	: Metiyonin
METAP1	: Metiyonin aminopeptidaz 1
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
mRNA	: Mesajcı ribonükleik asit
mtDNA	: Mitokondriyal Deoksiribo Nükleik Asit
nm	: Nanometre
OD	: Optik yoğunluk
ONPG	: Orto-Nitrofenil-β-Galaktozid
PBS	: Fosfat tamponlu salin
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR-Polimerase chain reaction)
PEG	: Polietilen Glikol

PPE	: Protein-Protein Etkileşimi
RNA	: Ribo Nükleik Asit
RT PCR	: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SACM1L	: SAC1 benzeri Fosfatidilinositid Fosfataz
SDS PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat–Poliakrilamid Jel Elektroforez
Trp	: Triptofan
UP	: Ultra saf su
Ura	: Urasil
Y2H	: Maya İkili Hibrit
YNB	: Maya Nitrojen Bazı
YPD	: Maya özütü Peptonlu Dekstroz

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No.	Sayfa No.
Şekil 2.1. p53 yolağı.....	3
Şekil 2.2. Tetramerik p53'ün DNA'ya bağlanması	4
Şekil 2.3. p53 proteininin genel yapısı.....	5
Şekil 2.4. MDM2'nin p53'ü düzenlemesi	6
Şekil 2.5. p53 apoptoz yolağı	8
Şekil 2.6. Aprataksin genom yapısı	9
Şekil 2.7. Aprataksin proteinin DNA'ya bağlanması.....	10
Şekil 2.8. METAP1 protein yapısı.....	12
Şekil 3.1. pDEST22 vektörünün haritası.....	18
Şekil 3.2. pDEST32 vektörünün haritası.....	18
Şekil 3.3. pDONR221 vektörünün haritası.....	19
Şekil 3.4. pLX304-Blast-V5 vektörünün haritası	19
Şekil 4.1. PCR ürünü p53'ün jel görüntüsü.....	32
Şekil 4.2. pDONR221 vektörüne klonlanan genlerin restriksiyon enzimleriyle kesim sonucu jel görüntüsü.....	34
Şekil 4.3. pDEST32 ve pDEST22 plazmitine klonlanmış genlerin restriksiyon enzimleriyle kesim sonucu jel görüntüsü.	36
Şekil 4.4. Maya transformantlarındaki gen ifadelerinin RT-PCR sonuçları.	38
Şekil 4.5. Protein etkileşim durumuna göre LacZ İfadelenme profili	40
Şekil 4.6. X-Gal analiz sonuçları	40
Şekil 4.7. Sıvı ortamda büyütülen hücrelerdeki LacZ aktivite ölçüm sonuçları	41
Şekil 4.8. Transformantların YNB besiyerinde büyüme analizleri	43
Şekil 4.9. Co-IP analiz sonuçları	46

TABLULAR DİZİNİ

Tablo No.	Sayfa No.
Tablo 3.1. Kimyasal listesi.....	14
Tablo 3.2. Cihaz listesi	16
Tablo 3.3. Kit listesi.....	17
Tablo 4.1. p53 primer dizileri.....	31
Tablo 4.2. p53 amplifikasyonu için PCR koşulları	31
Tablo 4.3. Real Time PCR primer bilgileri.....	37
Tablo 4.4. Real Time PCR çalışma koşulları.....	37



1. GİRİŞ

İnsan p53 proteini tetramerik bir transkripsiyon faktörüdür ve ilk keşfedilmesinden bu yana kanser biyolojisindeki rolü her geçen gün artmaktadır. Tümör süpresör p53 proteini; hücre döngüsü kontrolünü, DNA tamir yollarının aktivasyonunu ya da kontrollü hücre ölümü yollarını aktive ettiği bilinmektedir (1,2). p53 ile etkileşim gösteren proteinler p53 aktivitesini pozitif ya da negatif yönden kontrol edilmesini sağladığı için farklı biyokimyasal yapıdaki protein-protein interaksiyonları p53 fonksiyonları bakımından önemli bir rol oynamaktadır (3).

Daha önce yapılmış olan maya tabanlı ön çalışmada HNT3, SAC1 ve MAP1 genlerinin p53 aktivitesi için gerekli olduğu tespit edilmiştir. Bu üç genin insan homologlarının (APTX, SACM1L ve METAP1) p53 regülasyonunda rol oynamaları muhtemeldir ve her bir gen hücre içerisinde farklı göreve sahip olmaktadır. Bu genlerden insan Aprataksin proteinin görevi, genotoksik strese karşı hücreleri korumaktadır (4). İnsan SACM1L, endoplazmik retikulumda lokalize olup fosfoinozid fosfataz olarak görev yaparak PtdIns3-P ve PtdIns4-P türlerini hidrolize etmektedir (5). İnsan METAP1 geni ise; mayada MAP1 genine benzer şekilde ko-translasyonel olarak yeni sentezlenen proteinlerin N-terminalindeki metiyonin amino asidini uzaklaştıran bir metiyonin aminopeptidaz enzimini kodlamaktadır (6). Gueven ve ark (2004) tarafından yapılan bir çalışmada Aprataksin ile p53'ün Co-IP deneylerinde beraber çöktükleri gösterilmiştir fakat bu konuda daha ileri bir araştırma yapılmamıştır (7). Diğer iki genin (METAP1 ve SACML1) insan ya da diğer memeli sistemlerinde p53 proteini ile bilinen bir ilişkisi bulunmamaktadır.

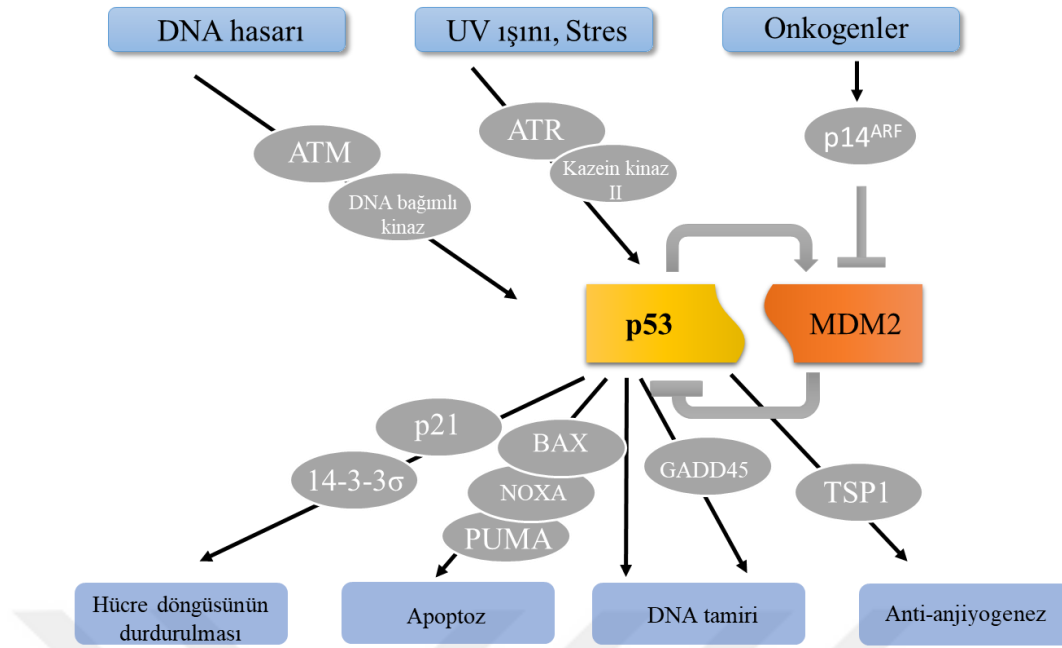
Bu nedenle tez çalışmamızda maya ve insan hücre kültür modeli kullanılarak insan p53 proteini ile her bir protein arasında muhtemel olan protein-protein etkileşimlerinin tespit edilmesi amaçlanmıştır. İlgili genlerin/proteinlerin p53 proteini ile ilişki olması halinde p53 regülasyonu için yeni sinyal iletim yolları tespit edilmiş olacaktır. Bu durum özellikle p53 yapısında mutasyon taşımayan fakat p53 yolağı ile ilgili kanser oluşumlarının mekanizmalarını anlamak için yol gösterici olabilir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. TP53 Geni ve p53 Proteini

p53, 1979 yılında SV40 DNA tümör virüsü büyük T antijeni ile ilişkili bir protein olarak tanımlanıp birçok kanser türünde çok fazla ekspresyona uğramasından dolayı p53'ün öncelikle proto-onkojen olduğu düşünülmüştür (1). Daha sonra p53'ün onkojenik özelliklerinin proteindeki mutasyonlardan kaynaklandığı ve p53'ün aslında tümör baskılayıcı özellik gösterdiği anlaşılmıştır (2). p53 proteininin tümör baskılayıcı rolü ortaya konulduktan sonra, p53 proteinini kodlayan gen *TP53* olarak adlandırılmıştır (9).

İnsan genomunda 17p13.1 bölgesinde yer alan TP53 geni, insanda bulunan en önemli tümör baskılayıcılarından biridir (10). TP53 proteininin bugüne kadar 15 izoformu bulunmaktadır. Bu izoformların ağırlıkları 3.5 ile 43.7 kDa arasında değişmektedir. Normal bir hücrede TP53 tarafından kodlanan p53 proteini düşük seviyede bulunmaktadır. Ancak DNA hasarı, onkojen aktivasyonu, telomer kısalması, hipoksi, ribozom/endoplazmik retikulum stresi ve viral enfeksiyon gibi durumlarda indüklenmekte ve böylece p53 ekspresyonu artmaktadır (11). TP53 geni, p53 proteininin gen transkripsiyonu, DNA onarımı, hücre döngüsü, genomik stabilite, kromozomal segregasyon, yaşlanma ve apoptoz (kontrollü hücre ölümü) dahil olmak üzere çeşitli hücresel süreçlerde rol oynamaktadır (3) (Şekil 2.1). p53, bu işlevlerini ya transkripsiyon faktörü olarak ilgili genlerin transkripsiyonlarını düzenleyerek ya da diğer proteinler ile veya doğrudan DNA ile fiziksel olarak etkileşerek gerçekleştirmektedir (12).



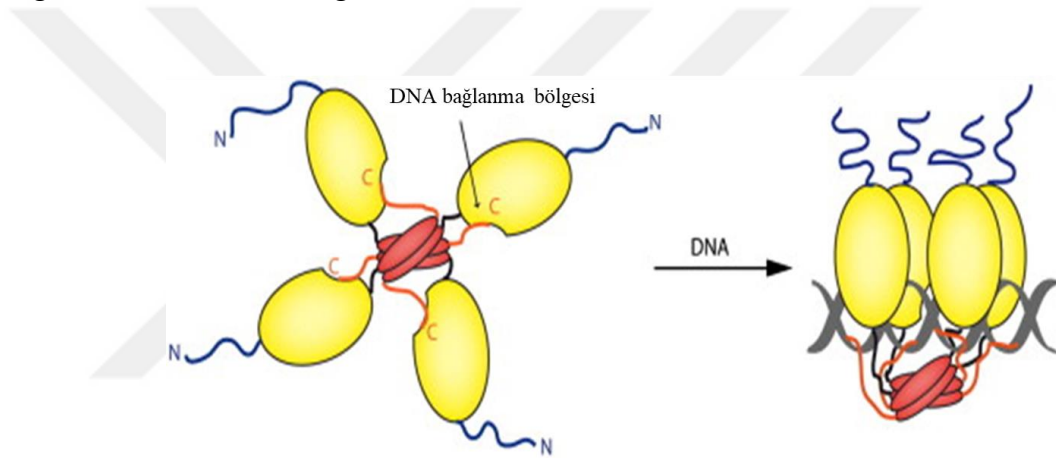
Şekil 2.1. p53 yolağı

p53 proteini birçok çeşitli sinyal yollarını indükleyebilen bir transkripsiyon faktörü olarak bilinmektedir. Biyoinformatik analiz ile 100'den fazla genin p53 tarafından düzenlendiği ve genomda 4000'den fazla potansiyel p53 bağlanma bölgesinin bulunduğu tespit edilmiştir. p53, transkripsiyon faktörü olmasının yanında aynı zamanda DNA replikasyonu, transkripsiyonu ve onarımında yer alan birkaç proteine de bağlanmaktadır (13,14).

Tüm kanser türlerinin %50'sinden fazlasında somatik p53 mutasyonu görülmektedir. Tümörleşen hücrelerde mutant p53'ün sentezi, normal hücrelerde olan p53 sentezinden daha fazla gerçekleştirerek büyümeyi ve bölünmeyi tetikleyen faktörlerin miktarını arttırmaktadır (15). Büyüme ve bölünme faktörlerinin tümör hücrelerindeki kontrolsüz artışıyla tümör hücresi daha hızlı ve kontrolsüz bir biçimde bölünmektedir. Bu nedenle p53, kanser biyolojisinde birçok araştırmacının dikkatini çekmiştir ve çeşitli kanser tedavilerinin geliştirilmesine yol açmıştır. Bu tedavilerden sadece biri klinik kullanım için onaylanmıştır. Bu tedavi yöntemi, adenovirüs vektörü ile gen terapisinin uygulanmasını içerip 2003'ten beri Çin'de kullanılmaktadır ancak diğer ülkelerde kullanılmamaktadır (16). İnsan karsinomlarında p53'ün öneminin açığa çıkması, p53 sinyal yolağını düzenleyen moleküllerin detaylı araştırılmasına neden olmuştur.

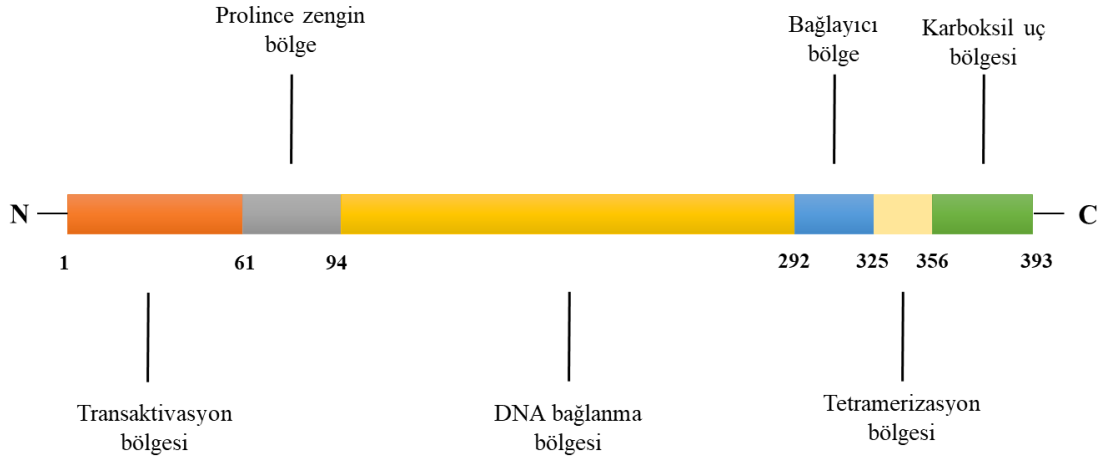
2.2. p53'ün Yapısı

p53, 393 aminoasitten oluşan bir çekirdek proteindir. 11 ekson ve 10 intronu bulunmaktadır. Aktif halde homotetramer yapıda bulunan insan p53 proteini, N-terminal transaktivasyon bölgesi, proline zengin bölge, sekans spesifik DNA bağlanma bölgesi, bağlayıcı bölge, tetramerizasyon bölgesi ve karboksil uç bölgelerini içermektedir (17) (Şekil 2.2). Bu bölgelerin her birinin farklı işlevleri bulunmaktadır. Transaktivasyon bölgesi, transkripsiyonun aktivasyonu ile p53'ün fonksiyonel ve yapısal stabilizasyonunu sağlamaktadır. Sekans spesifik DNA bağlanma bölgesi DNA'nın minör oluğundaki pentamer GGGCA konsensüs dizilerine bağlanmaktadır. Tetramerizasyon bölgesi protein-protein etkileşimlerine yardımcı olup p53'ün DNA'ya bağlanmasını kararlı hale getirmektedir (18,19).



Şekil 2.2. Tetramerik p53'ün DNA'ya bağlanması (18)

p53 mutasyonlarının %95'i DNA bağlanma bölgesinde (genellikle missense mutasyonları) meydana gelmesi nedeniyle proteinin DNA bağlama özelliğini kaybetmesine neden olmaktadır. Bu mutasyonlar ve ortaya çıkan amino asitler, p53 proteinin karboksil ucu da olmak üzere diğer fonksiyonel bölgeleri değiştirebilecek anormal protein konformasyonlarına neden olabilmektedir. Bu durum kanser gelişiminde kritik bir olay olduğundan araştırmacılar p53'ün transaktivatör fonksiyonuna odaklanmıştır (20,21).



Şekil 2.3. p53 proteininin genel yapısı

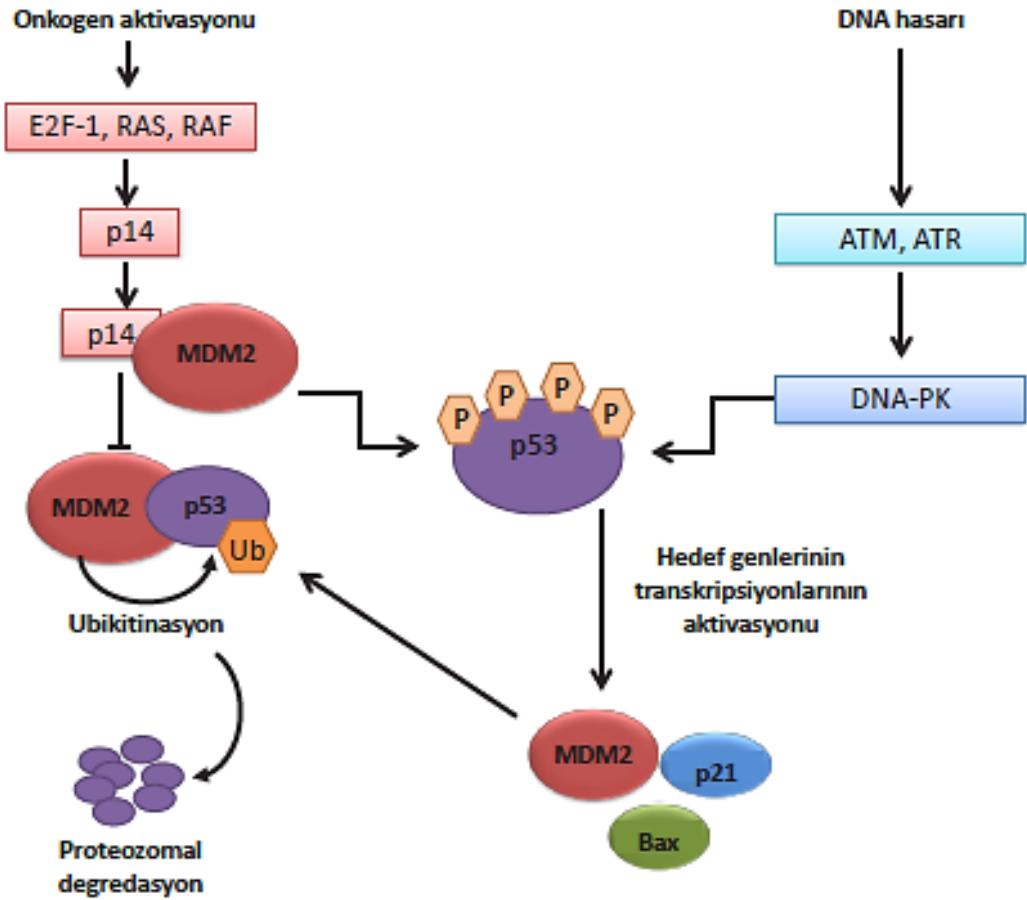
2.3. p53'ün Düzenlenmesi

p53 proteinin yarı ömrünün kısa olması nedeniyle normal hücrelerde düşük seviyede bulunmaktadır. p53 yolağında bir ya da birkaç stres sinyallerinin görülmesi halinde p53 proteinin kimyasal modifikasyonu (asetilasyon, fosforilasyon, metilasyon vb) ve yarılama ömrünün uzadığı belirtilmiştir. Hücrelerde p53 aktivitesinin kontrolü birçok farklı mekanizma sayesinde gerçekleşmektedir. Bu mekanizmalar arasında en etkin olanı p53 proteinin stabilitesinin kontrol altında tutulmasıdır ve bu durum MDM2 proteini tarafından sağlanmaktadır (22). MDM2 proteini bir negatif regülatör olarak p53 seviyesini kontrol altında tutan önemli bir protein olmaktadır (23). Kromozom 12'nin (12q15) üzerinde yer alan MDM2 proteini, p53 proteinin amino ucuna bağlanmaktadır. Daha sonra p53 proteinin transkripsiyonel aktivitesini inhibe ederek proteozom aracılığıyla parçalanmasını sağlamaktadır. Böylelikle p53'ün normal hücre içerisindeki seviyesi düşük tutulmaktadır. p53 molekülünün aktif hale geçmesi halinde kendisinin transkripsiyonunu da etkilemekte ve transkripsiyon faktör rolü artmaktadır (24).

p53 çekirdek proteini olup çekirdeğe giriş için çekirdek traslokasyon dizisine sahip olduğu bilinmektedir (25). Çekirdekte aktivite gösteren p53 sitoplazmada yıkılmaktadır. Bu durum MDM2'nin çekirdeğe girip p53 proteinine bağlandıktan sonra sitoplazmaya taşınarak proteazomlar tarafından parçalanmasıyla gerçekleşmektedir. Hücre içindeki p53'ün stabilizasyonu hücre döngüsü kontrolünde oldukça önemlidir. p53 kendi transkripsiyonel aktivasyonunu etkilerken kendisini parçalamasına neden

olan MDM2'nin transkripsiyonel aktivasyonunu da etkilemektedir. p53 ve MDM2 birbirlerinin oto-regülatörlüğünü yapmaktadır (26).

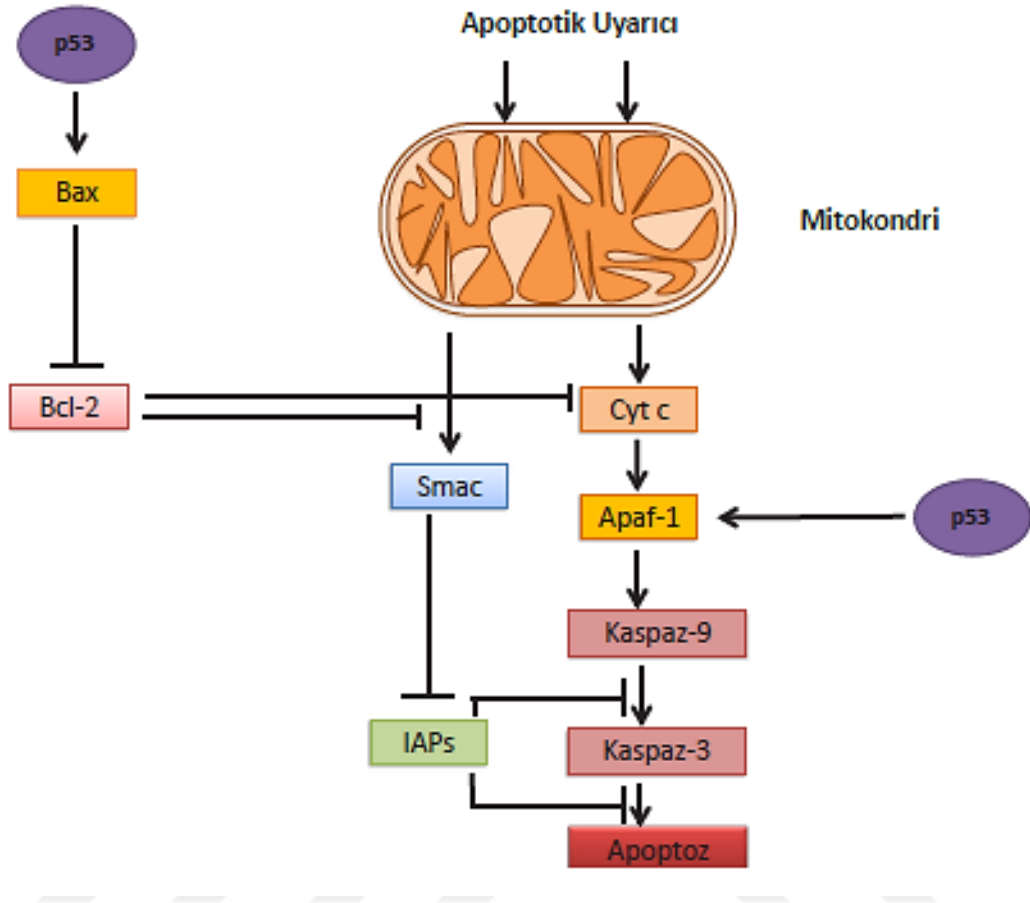
p53 ve MDM2 hücrel fosfoproteinlerdir. Birçok fosforilasyon bölgelerini içermektedirler. DNA üzerinde meydana gelen hasarın p53'ün N-terminalinde bulunan 15 aminoasidin fosforilasyonuna sebep olmasıyla p53-MDM2 ilişkisinin zayıfladığı görülmüştür (27). DNA bağımlı protein kinazlar, ATM ve ATR'nin, DNA hasarına tepki olarak p53 aktivitesinin düzenlenmesinde rol oynadığı bilinmektedir. p53 proteini DNA hasar sonrası aktif hale geçerek nükleusta birikmektedir. p53, DNA hasar sonucu uyarılan ATM proteini tarafından Ser15'ten fosforillenmektedir. ATM'ye oranla biraz daha yavaş uyarılan ATR ise fosforillenmiş Ser15'i devamlı fosforilleyerek p53'ün saatlerce aktif kalmasını sağlamaktadır. DNA-bağımlı protein kinaz ise hem p53'ü hem de MDM2'yi fosforlayarak p53-MDM2 ilişkisinin kurulmasını ve MDM2'nin inhibitör etkisini ortadan kaldırmaktadır (28).



Şekil 2.4. MDM2'nin p53'ü düzenlemesi (29)

DNA hasarı sonrasında bu hasarlar kinazlar tarafından tanınmakta ve kinaz aracılı p53 aktivasyonu sağlanmaktadır. Aktivasyonu artan p53 proteini, p21 geninin transkripsiyonunu aktive ederek p21 siklin bağımlı kinazları inhibe etmesi sonucunda hücre döngüsü durdurulmaktadır. Aynı zamanda DNA replikasyonu için gerekli olan DNA polimerazın engellenmesini sağlayarak hücre döngüsünü S fazına geçmeden durdurmaktadır. p21 özellikle Cdk2 ile ilişkili bir siklin/Cdk inhibitörü olmakla beraber hücre döngüsünü negatif yönde regüle etmektedir (30).

p53 proteinin hücre döngüsünü regüle etmesinin yanında, DNA tamir mekanizmasını ve apoptozu başlatma rolüne de sahip olmaktadır. p53 DNA hasarı sonrasında p21 proteinin artması sonucunda hücre döngüsünü G1 evresinde durdururken, bu aşamada GADD45 geninin transkripsiyonunu arttırarak hücrenin genomik DNA'sında meydana gelen hasarın onarılması için vakit kazanmaktadır (31) (32). DNA tamirinin başarılı geçmesi durumunda DNA'nın kırık uçları tamamlandıktan sonra p53 aktivasyonu azalmış olup hücre döngüsü kaldığı yerden devam edecektir. DNA hasarı hücrenin tamir mekanizmasının onarabileceği kapasitenin üzerinde ise hücre döngüsüne devam edilmeyip hücre apoptozu yönlendirilmektedir. Apoptoz sırasında p53'ün hedefleri arasında hücre yüzeyindeki Tümör Nekroz Reseptör ailesinin bir üyesi olan Fas reseptörlerini ve mitokondrial membran aralığından sitokrom-c salınımını uyarılmaktadır. p53, hedef genlerinden biri olan pro-apoptotik Bax'ın transkripsiyonunu aktive etmektedir. Mitokondriden sitokrom-c salınımını engelleyen Bcl-2 dimerleri yerine Bax-Bcl2 heterodimerinin oluşmasıyla mitokondri porları kapatılamamakta ve sitokrom-c mitokondriden sitoplazmaya salınmaktadır. Sitoplazmaya salınan sitokrom-c Apaf-1'e bağlanarak Kaspaz-9'un da katıldığı apoptozom yapısı oluşturmaktadır. Kaspazlar aktif hale geçerek apoptozun başlaması için gereken sinyali oluşturmaktadır. Böylelikle hücrenin programlı hücre ölümü gerçekleşmektedir (33).



Şekil 2.5. p53 apoptoz yolağı (29)

2.4. Aprataksin Geni

İnsan Aprataksin proteini, genotoksik strese karşı hücreleri korumakla görevlidir. *APTX*, genomun 9p21.1 üzerinde yer almakla birlikte hem çekirdek hem de nükleolusta bulunan bir proteindir. Yapılan çalışmalar hücrelerin hem nükleer hem de sitoplazmik aprataksine sahip olduğunu belirtmiştir. *APTX*, mitokondriyal DNA'nın (mtDNA) onarımında da görev almaktadır. *APTX*'in ekspresyonundaki veya işlevindeki bozuklukların mitokondriyal disfonksiyona ve oksidatif strese yol açmasında önemli rol oynadığı tespit edilmiştir (4). Beyin, böbrek, omurilik ve kaslar dahil olmak üzere çeşitli dokularda üretilmektedir. Kodlanan protein, hasar oluşan DNA bölgesinin onarımı için nükleotid bağlama aktivitesiyle DNA zincirindeki kırıkları modifiye etmektedir. Bu gendeki mutasyonlar ataksi okülomotor apraksi (AOA) ile ilişkilendirilmiş ve bu

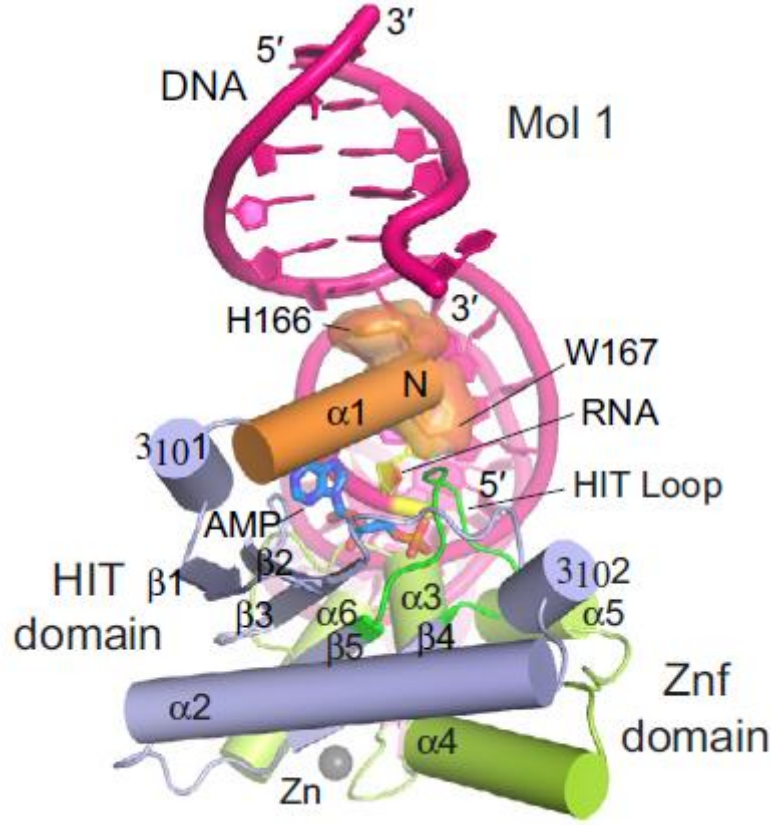
hastalardan alınmış hücrelerde DNA tek zincir kırığı tamirinden sorumlu olan PARP-1, XRCCR1 ve p53 proteinleri ile etkileşime girdiği tespit edilmiştir (7).

APTX proteini N-terminal FHA bölgesi, merkezde katalitik histidin triad (HIT) bölgesi ve çinko parmak motifine sahip bir C-terminal bölgesiyle üç farklı bölümden oluşmaktadır. FHA bölgesi; hücre içi sinyal transdüksiyonu, transkripsiyon, protein taşınması, DNA onarımı ve protein yıkımı dahil olmak üzere bir dizi işlemde yer alan proteinlerle ilişkili bir fosfopeptid etkileşim alanıdır. HIT bölgesi, histidin triad motifindeki bir mutasyonla ortadan kaldırılan adenilat hidrolaz aktivitesinden sorumlu olduğu bilinmektedir. APTX C-terminal bölgesi ise DNA bağlanma kapasitesine sahip olup çinko parmak motifinin DNA bağlanması için önem taşımaktadır (34).



Şekil 2.6. Aprataksin genom yapısı (34)

APTX genindeki mutasyonlar 1988'de tanımlanan AOA, nörolojik bir bozukluğa yol açmaktadır. APTX eksikliği aynı zamanda Ataksi'de koenzim Q10 (CoQ10) eksikliğine sebep olup, klinik olarak Parkinson benzeri çoklu sistem atrofisi ile de ilişkilendirilmiştir. AOA1 mutasyonları APTX'in HIT ve çinko parmak bölgelerinden meydana geldiği bildirilmiştir. APTX genindeki mutasyonlar, aprataksin proteinini düzensizleştirmekte ve kararsız ürünler üretmektedir. Yapılan çalışmalar sonucunda aprataksinin, DNA onarımında yer alan bir dizi protein ile etkileşmesiyle genotoksik strese karşı hücrel cevabı etkilediği gösterilmektedir (7).



Şekil 2.7. Aprataksin proteininin DNA'ya bağlanması (34).

2.5. SACM1L Geni

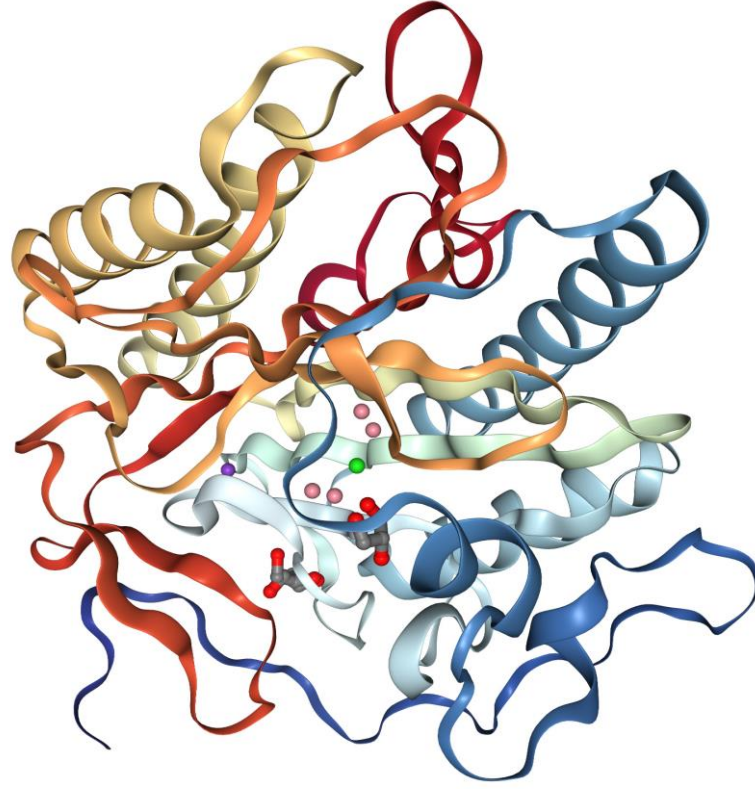
SACM1L (SAC1 benzeri Fosfatidilinositid Fosfataz) geni, endoplazmik retikulumda lokalize olan ve fosfatidilinositol 3-fosfat, fosfatidilinositol 4-fosfat ve fosfatidilinositol 3,5-fosfatı hidrolize eden bir fosfoinositid fosfataz olarak işlev gören integral membran proteinini kodlamaktadır (35). SAC1, hem N- hem de C-terminal bölgeleriyle sitozolde bulunan 587 aminoasitlik bir transmembran proteinidir. İnsan SACM1L geni 3p21.3 kromozomunda lokalize olmakla beraber, 21 eksondan oluşmakta ve hemen hemen tüm doku tiplerinde eksprese edilmektedir. Golgi membranlarında ve mitotik iğlerin organizasyonunda da rol oynadığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Fosfoinositid fosfatazların aktin hücre iskeleti organizasyonu, vezikül alışverişi, bazı proteinlerin aktivasyonu, maya ve hayvanlarda sinyal iletimi gibi çok çeşitli hücresel süreçlerin düzenleyicisi olduğu gösterilmiştir (36). Son zamanlarda, SAC1'in N-terminal sitoplazmik alanının memeli hücrelerinde golgi lokalizasyonuna katkıda bulunduğu bildirilmiştir. Maya ve memeli hücrelerinde SAC1'in silinmesi golgi

morfolojisi ve fonksiyonunda değişikliklere yol açmaktadır. Bu genin farelerde nakavt edilmesinin ardından embriyonik ölümlerin gerçekleştiği görölmüştür (5).

2.6. METAP1 Geni

Metiyonin aminopeptidazlar (METAP) tüm canlı hücrelerde temel enzim olup hücredeki yeni sentezlenmiş peptitlerden başlatıcı metiyonini çıkarmaktadır (37). Tip 1 ve tip 2 olmak üzere iki METAP izoformu bulunmaktadır. Prokaryotlar tek bir METAP izoformu ifade ederken ökaryotlar hem METAP1 hem de METAP2'yi ifade etmektedir. İnsan METAP1, N-terminalinde çinko parmağı ve C-terminalinde katalitik bir bölgeye sahip iki alandan oluşmaktadır. Genomda 4p23 üzerinde lokalizedir. Ko-translasyonel protein olgunlaşmasının temel bir yolu olan N-terminal metiyonin eksizyonunu katalize etmektedir. Çinko parmak alanının, METAP1'in ribozomlar üzerinde uygun fonksiyonel hizalamasını koruduğu ve *in vivo* normal fonksiyonu için önemli olduğu tespit edilmiştir. Sadece METAP genini eksprese eden bakterilerde METAP'ın nakavt edilmesi veya spesifik inhibasyonu ölümcül sonuçlara sebep olduğu tespit edilmiştir. METAP1'in mayada delesyona uğraması sonucunda ise ciddi bir yavaş büyüme fenotipi görölmüştür (38).

METAP1 inhibitörlerinin farklı kanser hücre hatlarında G2/M fazında duraklamaya sebep olduğu ve apoptozu tetiklediği gösterilmiştir (6). p53'ün dahil olduğu hücre döngüsü ve apoptoz gibi mekanizmalarda METAP1'in rolü bilinmesine rağmen, METAP1'in p53 ile doğrudan etkileşimini araştırmak için araştırmalar yapılmamıştır.



Şekil 2.8. METAP1 protein yapısı (39).

2.7. Protein-Protein Etkileşimi

Biyolojik fonksiyonlarımızın büyük bir çoğunluğu, çok yönlü bir biyomolekül olan proteinlerin aktiviteleriyle sağlanmaktadır. Metabolik yollar, sinyal iletimi yolları, gen ekspresyonu ve hücre-hücre etkileşimi dahil olmak üzere tüm hücrel aktiviterin gelişimini sürdüren protein-protein etkileşimleri birçok biyolojik süreçte yer almaktadır. Protein-protein etkileşimleri, belirli alanların yüzey motifleri yoluyla iki veya daha fazla proteinlerin arasındaki fiziksel etkileşim olarak tanımlanabilmektedir. Protein-protein etkileşimleri; enzimlerin kinetik özelliklerinin modifikasyonuna, substrat yönlendirmesine, proteinin aktif ve inaktivitesine, proteinin regülasyonuna, mikro moleküllerin bağlanmasına ve aynı zamanda proteinlerin etkileşimlerini değiştirerek proteinin özgüllüğünü kaybetmesine neden olabilmektedirler. Bu durum, fosforilasyon, metilasyon, asetilasyon ve ubiquitinasyon gibi proteinlerde, protein konformasyonunu değiştirerek veya inhibitör proteinden ayrılma yoluyla hedef proteini aktive eden veya etkisiz hale getiren biyokimyasal değişikliklerin bir sonucu olarak ortaya çıkabilmektedir. Proteinin diğer proteinlerle etkileşim ağının tanımlanması, bazı

fizyolojik olaylara yol açan biyo-moleküler yolların aydınlatılması ve birçok hastalığın tedavisi için umut verici bir yaklaşım olmuştur (40).

'Genomun koruyucusu' olarak adlandırılan p53, insan kanserlerinin çoğunda mutasyona uğramaktadır. Bu nedenle p53'ün yeniden aktifleştirilmesi kanser tedavisine yeni bir kapı açmıştır. p53-MDM2 arasındaki etkileşimin engellenmesi, klinik çalışmalarda birçok yeni molekül modülatörlerinin geliştirilmesine sebep olmuştur. Birçok araştırma çalışması, çeşitli hücrel süreçlerde tümör baskılayıcı p53 protein etkileşim ağlarının aydınlatılmasına odaklanmaktadır (41).

Protein-protein etkileşimlerinin (PPE) analizi; *in vivo*, *in vitro* ve silika olmak üzere üç kategoride sınıflandırılmaktadır. PPE'de en sık kullanılan *in vivo* teknik maya ikili hibrit (Y2H) yöntemidir. Bu yöntemde etkileşim gösterdiği düşünülen iki protein bölgesi Y2H plazmitine dahil edilmektedir. Birinci bölge, DNA'nın bağlanmasına yardımcı olan DNA bağlanma bölgesini içermektedir. İkinci bölge, spesifik DNA'nın transkripsiyonunun aktivasyonunda yer alan aktivasyon alanını bulundurmaktadır. Bu iki bölge belirli raportör genin transkripsiyonu için gerekli olmaktadır. Protein-protein etkileşimlerinin analizi için kullanılan bir diğer yöntem ise *in vitro* teknik olan ko-immünopresipitasyondur (Co-IP). Protein A/G afinite boncuklarıyla birlikte hedef proteine spesifik bir antikor kullanılarak, spesifik proteinlerle etkileşime giren molekülleri tanımlamak için uygun bir yöntem olmaktadır (35).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Malzemeler

Çalışmada kullanılan kimyasalların tamamı moleküler biyoloji için uygun saflıktadır.

Tablo 3.1. Kimyasal listesi

Kimyasal	Üretici	Kimyasal	Üretici
Proteinaz K	Qiagene	KCl	Merck
Amonyum asetat	Panreac Applichem	Methanol	Sigma
Trisma Base	Sigma	Asetik asit	Sigma
NaCl	Panreac Applichem	EtBr	Sigma
EDTA	Panreac Applichem	HCl	IsoLab
Na ₂ HPO ₄	Panreac Applichem	Ampisilin	Panreac Applichem
NaH ₂ PO ₄	Panreac Applichem	Kanamisin	Panreac Applichem
MgCl ₂	Sigma	Gentamisin	Panreac Applichem
Beta-mercaptopetanol	Panreac Applichem	Tris-HCl	Fisher Sci.
ONPG	Thermo	Gliserol	Panreac Applichem
LB	Merck	Kolera toksini	Sigma
LB Agar	Merck	Hepes	Sigma
Kloroform	Sigma	Poliklonal antikor	Sigma
DMSO	Fisher Sci.	NaOH	Panreac Applichem
Pen/Strep.	Gibco	Etil Alkol	Sigma
DMEM F:12	Sigma	İzoamil alkol	Sigma
FBS	Gibco	Fenol	Sigma
Tripsin-EDTA	Capricorn	AccuPOL DNAPol	AMPLIQON
PBS	NutriCulture	1 kb DNA marker	Thermo
Agaroz	Fisher Sci.	PageRuler protein ladder	Thermo

L-histidine	Sigma-Aldrich	L-methionine	Sigma-Aldrich
L-leucine	Sigma-Aldrich	L-lysine	Sigma-Aldrich
Uracil	Sigma-Aldrich	Adenine	Sigma-Aldrich
Amonyum persulfat (APS)	Panreac Applichem	Coomassive brilliant blue R-250	Panreac Applichem
Yeast extract	Panreac Applichem	Lityum asetat	Sigma
SDS	Panreac Applichem	Akrilamid	Panreac Applichem
Bis-akrilamid	Panreac Applichem	Peptone	Panreac Applichem
TEMED	Panreac Applichem	PVDF membran	Panreac Applichem
Restriksiyon Endonükleaz Enzimleri	Thermo	Pierce ECL (Western Blotting substrat)	Thermo
Polietilen glikol (PEG)	Sigma	PageRuler protein ladder	Thermo
AccuPOL DNA Polimeraz	AMPLIQON	1 kb DNA marker	Thermo

3.1.2. Kullanılan Laboratuvar Ekipmanları

Tablo 3.2. Cihaz listesi

Cihaz	Marka
Terazi	Kern
Hassas terazi	Shimadzu
Isıtmalı Manyetik karıştırıcı	IKA, VWR
Vorteks	VWR
Isı kontrollü çalkalamalı inkübatör	VWR
Mikrosantrifüj	VWR
Soğutmalı santrifüj	Nüve
pH ölçer	Hanna
SDS elektroforez ekipmanları	BIORAD, VWR
Güç kaynakları	VWR
Jel görüntüleme cihazı- G:Box	Syngene
Su banyosu	Nüve
İnkübatör	Nüve
-80 buz dolabı	Thermo Scientific
Distile deiyonize su ünitesi	Millipore
Otoklav	Nüve
Soğutmalı inkübatör	Nüve
-20 °C derin dondurucu	Uğur, Arçelik
PCR	Biorad
Spektrofotometre	Termo
Nanodrop	Biospec
Mikrodalga fırın	Vestel
Mikroskop	Olympus
Floresan spektrofotometresi	Nüve

3.1.3. Kullanılan Kitler

Tablo 3.3. Kit listesi

Kit adı	Firma adı
Plazmid DNA izolasyon kit	Thermo Scientific GeneJET Plasmid Miniprep Kit
cDNA sentez kiti	Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit
RT PCR için syber green	Ampliçon
Maya ikili hibrit kit	Thermo Fisher Scientific ProQuest™ Two-Hybrid System
Jel ekstraksiyonu kit	Thermo Fisher Scientific GeneJET Gel Extraction Kit
Co-IP kit	Thermo Fisher Scientific Pierce™ Co-Immunoprecipitation Kit -

3.1.4. Çalışmada Kullanılan Ortam ve Malzemenin Temizliği

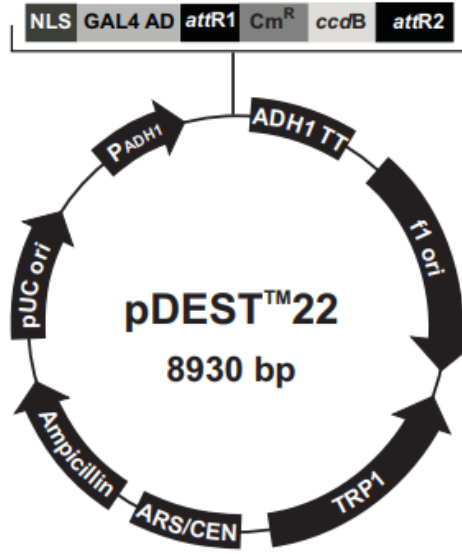
Isıya dayanıklı bütün cam malzemeler, pipet uçları, ependorflar, santrifüj tüpleri, bakteri kültür ortamları, maya kültür ortamları, bazı stok solüsyonlar 121°C'de 20 dakika (1.02 atm basınçta) otoklavda steril edilmiştir.

Çalışmaya başlanmadan önce ortam ve pipetmenler %70'lik alkol ile temizlenmiştir. Hücre kültürü kabini her hafta periyodik olarak temizlenip, kabinin kullanılmadığı zamanlarda UV lamba kullanılarak kabin içi sterilizasyon sağlanmıştır. Çalışmaya başlamadan en az yarım saat önce laminar flow açılarak çalışma ortamının sterilizasyonu gerçekleştirilmiştir.

3.1.5. Çalışmada Kullanılan Vektörler

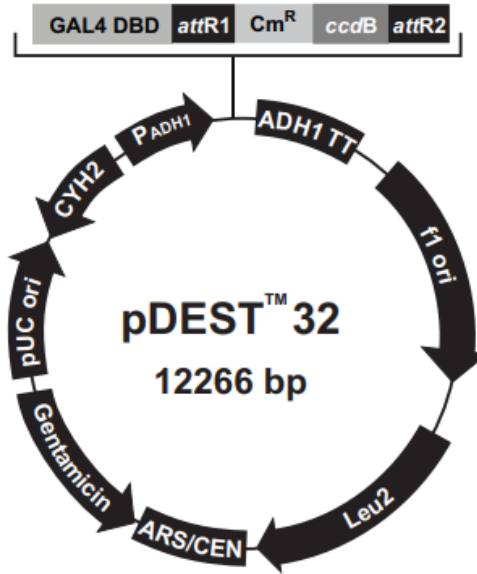
Klonlama amaçlı kullanılan pDEST22, pDEST32 vektörü İnvitrogen'den Yeast Two Hybrid (Y2H) kit ile birlikte satın alınmıştır (Şekil 3.1, Şekil 3.2) pDONR, plx304APTX, plxSACM1L, plx304METAP1 vektörleri ise Dharmacon'dan temin edilmiştir (Şekil 3.3, Şekil 3.4).

pDEST22



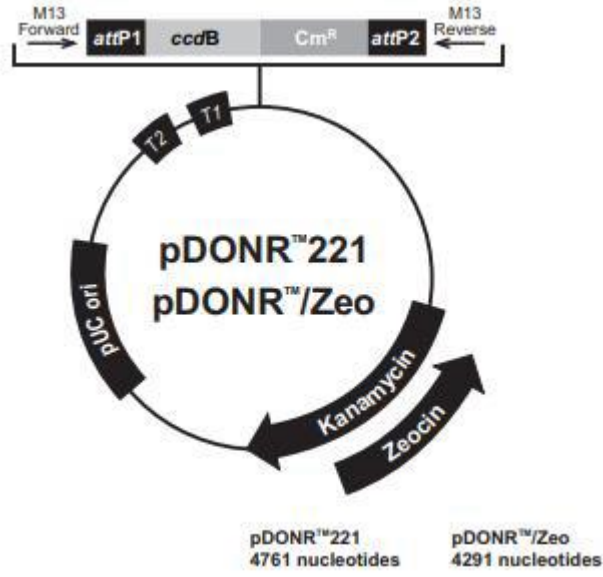
Şekil 3.1. pDEST22 vektörünün haritası

pDEST32



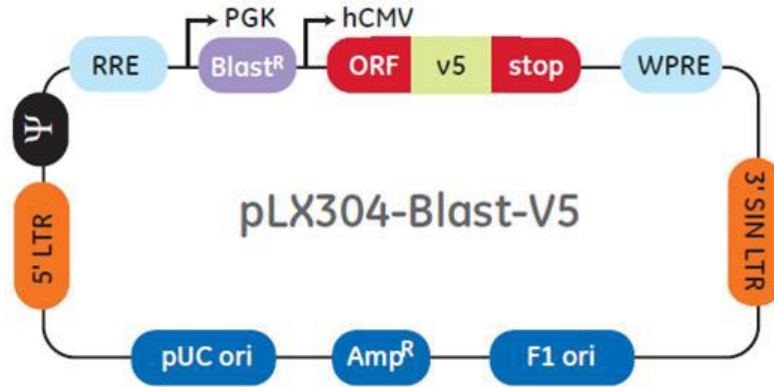
Şekil 3.2. pDEST32 vektörünün haritası

pDONR221



Şekil 3.3. pDONR221 vektörünün haritası

pLX304- Blast-V5



Şekil 3.4. pLX304-Blast-V5 vektörünün haritası

3.2. Metot

Deneylere başlanmadan önce gerekli olan plazmitlerin (pDONR, pDEST22, pDEST32) büyütülebilmesi için *E.coli* (TOP10, DB3.1) türü kompetent hale getirilmiştir.

3.2.1. Kompetent Hücre Hazırlanması

-80°C'de stok halde bulunan *E.coli* (*TOP10*, *DB3.1*) hücreleri 5 ml LB besiyerine ekim yapılarak 37°C'de çalkalamalı etüvde bir gece inkübe edilmiştir. Daha sonra gecelik kültür, 100 ml SOB [2% tripton, 0.5% maya özütü, 0.05% NaCl, 1% Mg solüsyon (1 M MgCl₂ plus MgSO₄)] besiyeri içerisine transfer edilerek, OD₆₀₀ değeri 0.5 ile 0.6 aralığına gelinceye kadar çalkamalı inkübatörde 37°C'de inkübasyonu sağlanmıştır. 4000x g'de 5 dakika santrifüj ile hücreler çöktürmüştür. Pellet haldeki hücrelere soğuk 5 ml CMG (50 mM CaCl₂ plus MgCl₂) tamponu eklenerek hücreler çözülmüştür. Buz üzerinde 5 dk bekletilen hücreler 4000x g'de 5 dk santrifüj edilerek süpernatat uzaklaştırılmıştır. Pellet hücrelere tekrar CMG tamponu eklenerek hücreler çözümlenmesi sağlanmış ve buz üzerinde 5 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında 150 µl DMSO ilave edilerek karıştırılmıştır ve tekrar 5 dk buzda bekletildikten sonra her bir ependorf tüpüne 100 µl eklenerek -80°C'ye kaldırılmıştır.

3.2.2. Plazmitlerin Çoğaltılması ve Seçici Ortamın Hazırlanması

Bakteri Transformasyonu

pDONR, pDEST32, pDEST22, plx304 APTX, plx304 SACM1L ve plx304 METAP1 plazmitlerinin çoğaltılması için -80°C'de muhafaza edilen kompetent hücrelerin üzerine 1 µl plazmit DNA buz üzerinde eklenip karıştırılmıştır. 42°C'de 1 dakika (ısı şoku) bekletildikten sonra hücrelerin üzerine 100 µl SOC (% 2 tripton, % 0.5 maya özütü, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ ve 20 mM glikoz) eklenmiştir. 37°C'de 30 dakika inkübe edildikten sonra plazmitlerdeki (pDONR-kanamisin, plx304-ampisilin, pDEST32-gentamisin ve pDEST22-ampisilin) antibiyotik direnç genine göre seçici LB agar içeren petrilere hücreler ekilmiştir. 37°C'de 12 saat boyunca hücrelerin büyümesi için inkübasyona bırakılmıştır.

Plazmit DNA İzolasyonu

Küçük miktarlarda plazmit DNA izolasyonu için GeneJET Plasmid Miniprep Kit'den faydalanılmıştır. Kit protokolüne göre hücreye uygun antibiyotik içeren 5 ml LB besiyerine transformasyonu gerçekleşmiş hücrelerden tek koloni ekimi yapılarak bir gece 37°C'de çalkalamalı inkübatörde inkübasyonu gerçekleştirilmiştir. Kültür 3500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra üstte kalan süpernatant uzaklaştırılmıştır. Elde edilen bakteri peleti ile protokole uygun şekilde yapılan aşamalardan sonra DNA

elüe edilmiştir. Elüe edilen DNA'nın konsantrasyonu Nanodrop ile ölçümü yapılmış ve plazmitler -20°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.3. p53 Geninin Amplifikasyonu ve Jel Elektrofrez

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

p53 geninin Amplifikasyonu için pc DNA3 flag p53 plazmiti kalıp olarak kullanılmıştır. İleri ve geri primerleri, gateway rekombinasyon sekanslarına (ileri primer için attB1 ve geri primer için attB2) uygun bir şekilde ile tasarlanmıştır. Tasarlanan primerlerin saç tokası yapısı oluşturmamasına, Tm sıcaklıklarının birbirine yakın olmasına ve nükleotitlerin dağılımının mümkün olduğunca eşit olmasına dikkat edilmiştir. Her bir primer 0.2 µM konsantrasyonunda olmakla beraber 1X Ammonium tamponu (Ampliçon) (Tris-HCl pH 8.5, (Na₄)₂SO₄, 15mM MgCl₂, %1 Tween 20), her biri için 0.2 µM dNTP ve 1 ünite AccuPol DNA polimeraz (Ampliçon) kullanılmıştır. PCR reaksiyonun toplam hacmi 50 µl olacak şekilde hazırlanmıştır. PCR programı ve döngü sayısı primerlere ve kalıp DNA kaynağına göre değişiklik göstermiştir. PCR sonuçları agaroz jelde görüntülenmiş ve istenilen bant jelden geri kazanılmıştır.

DNA Agaroz Jel Elektrofrez

DNA elektrofrez için yatay jeller kullanılmıştır ve 90 V elektrik akımında yaklaşık 1 saat örnekler yürütülmüştür. Elektrofrez tamponu olarak 1X TAE tampon kullanılmıştır. Agaroz jelle son konsantrasyonu 0.5 µg/ml olacak şekilde etidyum bromür ilave edilmiştir. DNA izleme boyası olarak bromfenol mavisi kullanılmıştır. Çalışmada genellikle %0.8 ile %1 arasındaki konsantrasyonda agaroz jel hazırlanmıştır. Elektrofrezde ayrılan DNA fragmentlerinin büyüklüklerinin belirlenmesi için farklı büyüklüklerde DNA belirteçleri kullanılmıştır. Elektrofrez sonuçlarını G:Box görüntüleme cihazında görüntülenerek fotoğrafları çekilmiştir.

Agaroz Jelden DNA Pürifikasyonu

İstenilen DNA bantları cihaz ile görüntüledikten sonra agaroz jelden kesilerek jelden çıkarılmış ve DNA jel ekstraksiyon kiti kullanılarak DNA elüe edilmiştir. DNA miktarı ve temizliğinin kontrolü için 260 ve 280 nm dalga boyundaki absorbansları alınmıştır.

3.2.4. Gateway Klonlama

Maya ikili hibrit sistemi için Gateway klonlama tekniği ile uyumlu olan ProQuest Two-Hybrid System tercih edilmiştir. Kitin duyarlı olması, gerekli klonlamaların kolayca yapılabilmesi ve protein-protein interaksyonu için ilave kontrol unsurlarının bulunması tercih nedeni olmuştur. Bu Gateway klonlama sistemi BP ve LR reaksiyonu olmak üzere iki reaksiyondan oluşmaktadır. Gateway klonlama yöntemiyle insan p53 geni GAL4 transkripsiyon faktörünün DNA bağlanma bölgesini (DBD) taşıyan pDEST32 plazmitine, APTX, SACM1L ve METAP1 genleri ise GAL4 un aktivasyon domainini (AD) içeren pDEST22 plazmitine ayrı ayrı klonlanması amaçlanmıştır.

BP Reaksiyonu

Gateway klonlamanın ilk basamağı olan BP reaksiyonu, attB1 ve attB2 bölgelerini tanıyıp BP rekombinasyon reaksiyonunu gerçekleştirebilmesi için pDONR221 vektörü kullanılmıştır. Hedef genler her iki bölgedeki 'att' rekombinasyon sekansları pDEST22/pDEST32 plazmitlerine uyumlu olabilmesi için ilk önce BP rekombinasyon reaksiyonu kurulmuştur. Protokolde belirtildiği şekilde ilgili genlerin pDONR221 vektörüne klonlanması gerçekleştirilmiştir. BP reaksiyonu için 10 µl toplam hacim olacak şekilde; 2 µl pDONR221 vektör, 2 µl kalıp DNA, 4 µl BP reaksiyon tamponu, 2 µl BP klonaz enzim karışımı kullanılmış ve 3 saat 25°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Reaksiyona 2 µl proteinaz K ilave edilerek 10 dk 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübe edilen BP reaksiyonu *E.coli* (TOP10) kompetent hücrelerine transforme edilerek plazmit izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen plazmitlerin doğruluğunu teyit etmek için restriksiyon kesim enzimleriyle reaksiyon kurulmuştur.

LR Reaksiyonu

BP reaksiyon sonucunda elde edilen plazmitler, restriksiyon enzimleriyle beklenen DNA fragmentleri görüldükten sonra Gateway'in ikinci basamağı olan LR reaksiyonu kurulmuştur. Bu aşamada ilgili genlerin pDONR221 plazmitinden pDEST22/pDEST32 plazmitlerine aktarımı yapılmıştır. Buna göre toplam hacim 10 µl olacak şekilde; 2 µl pDEST22/pDEST32 vektör, 2 µl kalıp DNA, 4 µl LR reaksiyon tamponu, 2 µl LR klonaz enzim karışımı bir gece 25°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Reaksiyona 2 µl proteinaz K ilave edilerek 10 dk 37°C'de inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonrasında LR reaksiyonu *E.coli* (TOP10) kompetent hücrelerine transforme edilip vektörlerin antibiyotik direnç genlerine göre uygun besiyerleri hazırlanıp hücre ekilimi yapılmıştır. Seçici besiyerinde büyüyen hücrelerden tek koloni alınıp çoğaltılarak plazmit izolasyonu yapılmıştır. LR reaksiyonunun doğruluğunu teyit etmek için gerekli restriksiyon kesim enzimleriyle reaksiyon kurulmuştur.

Restriksiyon Endonükleaz Enzimleri ile DNA'nın Kesilmesi

Restriksiyon endonükleaz enzimleri ile önerilen tamponlar kullanılarak 10 µl toplam hacimde reaksiyon kurularak 37°C'de 1 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra kesim sonuçları agaroz jel elektroforezi ile 1 saat 90 V yürütülmüş, ilgili genlerin hedef vektörlere klonlanmasını doğrulamak için değerlendirilmiştir.

Dizi Analizi

Maya ikili hibrit sistemi plazmitlerine klonlanan bütün genler ilgili firmanın önerdiği sekanslama primerleri kullanılarak her iki yönden sekans analizinin yapılması için gönderilmiştir.

3.2.5. Maya Transformasyonu

İlgili genlerin klonlandığı vektörler Mav203 maya hattına (*MAT α* , *leu2-3,112*, *trp1-901*, *his3 Δ 200*, *ade2-101*, *gal4 Δ* , *gal80 Δ* , *SPAL10::URA3*, *GAL1::lacZ*, *HIS3UAS GAL1::HIS3@LYS2*, *can1R*, *cyh2R*) standart lityum asetat yöntemiyle transformasyonu gerçekleştirilmiştir. Kullanılan maya hattı ProQuest Two-Hybrid System kiti ile temin edilmiştir.

Mav203 hücresi 10 ml YPD besiyerine OD₆₀₀: 0.5-0.7 olana kadar 37°C'de çalkalamalı inkübatörde inkübe edilmiştir. Büyüyen hücreler 5 dk 3000 rpm'de santrifüj edilerek hücreler çöktürülmüştür. Üstte kalan sıvı uzaklaştırılıp pellet hücrelere 1 ml 1X LiOAc-TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0.1 M Lityum asetat pH 7.5) çözeltisi eklenerek hücreler süspanse edilmiştir. 5 dk 3000 rpm'de santrifüj edildikten sonra süpernatant atılmıştır. Pellet hücrelerin üzerine 100 µl 1X LiOAc-TE eklenip yeniden süspanسیون hale getirilerek 1 saat 30°C'de inkübe edilmiştir. 100 µl hücrelerin üzerine 2 µl DNA ve 5 µl ssDNA eklenip iyice karıştırıldıktan sonra 30°C'de 30 dk inkübe edilmiştir. 700 µl PEG mix solüsyonu (% 40 PEG, 1X TE ve 1X LiOAc) ilave edilip iyice karıştırıldıktan sonra 1 saat 30 ° C'de tekrar inkübe edilmiştir. Daha sonra 42°C su banyosunda 15 dk ısı şoku ile inkübe edilen hücrelerden PEG solüsyonunu

uzaklaştırmak için 4000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilmiştir. Pelet 100 µl UP su ile yeniden süspansiyon haline getirilip seçici YNB agar petrisi üzerine yayılmıştır. 30°C'de inkübe edildikten sonra daha fazla çalışma için +4°C'de muhafaza edilmiştir. Maya hücrelerine plazmit transfer edildikten sonra hücreler gerekli olan seçici ortamda büyütülerek total RNA izolasyonu yapılmıştır.

Maya Hücrelerinde RNA izolasyonu

Maya hücrelerine plazmit transfer edildikten sonra hücreler gerekli olan seçici ortamda büyütülmüş ve total RNA izolasyonu yapılmıştır. Seçici besiyerinde büyütülen hücreler 5000 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırılmıştır. Pelete 25 µl SETH (0.32 M Sükroz, 10 mM EDTA, 20 mM Tris pH 7.5, 0.5 mg / ml heparin) ve hidroklorik asitle yıkanmış cam boncuklar eklenilmiştir. 5 dk vortekslenmesinin ardından buz üzerinde bekletilmiştir. 250 µl soğuk TNESH (50 mM tris pH 7.5, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, % 1 SDS, 0.5 mg / ml heparin) ilave edilmiştir. 500 µl 65°C'de ısıtılmış fenol ilave edilip 5 dk 65°C su banyosunda aralıklı olarak çalkalanarak inkübe edilmiştir. 4000 rpm'de 3 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant yeni bir tüpe transfer edilerek iki kez daha sıcak fenol muamelesi yapılmıştır. Daha sonra fenol/kloroform ile bir kez ekstrakte edilmiştir. 2.5 hacimde EtOH ilave edilerek -80°C'de 1 saat bekletilmiştir. 10 dakika 4000 rpm'de 4°C'de santrifüj edilip pelet bir kez soğuk %70'lik EtOH ile yıkanmıştır. Daha sonra pelet 50 µl RNaz içermeyen su içerisinde çözülmüştür. RNA konsantrasyonu ve saflığı OD₂₆₀ ve OD₂₈₀ spektrofotometrik ölçümleri yapılmıştır.

cDNA Sentezi

LR ürünü maya transformantların (MaV203) RNA izolasyonundan sonra, cDNA sentez protokolü RevertAid First Strand cDNA Synthesis kiti kullanılarak iki ana aşamada gerçekleştirilmiştir. İlk aşamada RNA preparatlarından genomik DNA uzaklaştırılmıştır. İzole edilmiş total RNA 1 µg, 10X MgCl₂ 'lü reaksiyon tamponu 1 µl, DNazI 1 µl ve RNaz içermeyen ultra saf su ile 10 µl'ye tamamlanmıştır. 37°C'de 30 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda 1 µl 50 mM EDTA ilave edilip 65°C'de 10 dk inkübasyonu sağlanmıştır. Hazırlanan RNA, ters transkriptaz için bir kalıp olarak kullanılmıştır. İkinci aşamada steril ependorf tüpüne 10 µl kalıp RNA, 1 µl Oligo (dT)₁₈ primer ve 1 µl su (nükleaz içermeyen) ilave edildikten sonra yavaşça karıştırılıp kısa bir santrifüj yapılmıştır. 65°C'de 10 dk inkübe edildi. Buz üzerinde soğutulup kısa bir

santrifüjden sonra tekrar buz üzerinde alınmıştır. Daha sonra 4 µl 5X reaksiyon tamponu, 1 µl RiboLock RNaz İnhibitörü, 2 µl 10 mM dNTP karışımı ve 1 µl ReverdAid M-MuLV RT eklenerek toplam hacim 20 µl'ye çıkarılmıştır. Hafifçe karıştırılıp kısa santrifüj yapılmıştır. Hazırlanan solüsyon 42°C'de 60 dk inkübe edilmiştir. Son olarak reaksiyon 70°C'de 5 dk bekletildikten sonra -20°C'de bir haftadan az bir süre saklanmış veya doğrudan PCR uygulamalarında kullanılmıştır.

RT-PCR

Klonlama ile oluşturulan genlerin ifade analizi için her bir gene uygun tasarlanmış PCR primerleri kullanılarak transformantlardaki genlerin ifade edilip edilmediği real-time PCR ile incelenmiştir. Daha önce elde ettiğimiz cDNA'lar kalıp olarak kullanılmış ve miktarlarının optimizasyonu yapılmıştır. RT-PCR çalışmaları 15 µl son hacimde olacak şekilde 7.5 µl master mix (SYBR Green ROX), 100 µM ileri ve geri primerlerinden 1.5 µl, kalıp DNA 1.5 µl ve 4.5 µl dH₂O kullanılmıştır. RT-PCR tepkimesi her bir örnek için 40 döngü şeklinde uygulanarak her bir örnek üçer replika şeklinde incelenmiştir. StepOne software v2.3 (Applied Biosystems [AB] Foster City,CA) sistem ile yürütülen örneklerin analizi yapılmıştır.

3.2.6. Protein Aktivite Testleri

LacZ Aktivite Tespiti: X-Gal Testi

İfade edilen LacZ (beta galaktozidaz) geni farklı yöntemlerle tespit edilebilmektedir. Kantitatif olmayan ve sadece güçlü interaksyonları görebileceğimiz X-Gal yöntemiyle protein-protein etkileşimi incelenmiştir. Y2H kitiyle birlikte gelen kontrol grupları ile birlikte hedef gruplar test edilmiştir. Bunun için sıvı seçici besiyerinde (-Leu,-Trp) büyütülen hücreler santrifüj edilip üstte kalan sıvı uzaklaştırılmıştır. Üzerine 500 µl Z-tampon (0.06 M Na₂HPO₄.7H₂O, 0.04 M NaH₂PO₄H₂O, 0.01 M KCl, 0.05 M β-mercaptoethanol) çözeltisi eklenip hücreler süspansiyon hale getirilmiştir. Solüsyon hacminin yarısı kadar tüpe cam boncuk ilave edilmiştir. Her bir tüp 10 dk boyunca (30 saniye vorteks, 30 saniye buz) vorteks ile karıştırılmıştır. Daha sonra hücre debrisisi çöktürülerek üstte kalan sıvı yeni tüplere aktarılmıştır. Her bir tüpe 20 µl X-Gal solüsyonu (20 µg/µl) eklendikten sonra 1 saat 30°C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında oluşan mavi renk protein etkileşimi olarak yorumlanmıştır.

β-Galaktozidaz Aktivite Ölçümü

X-Gal testindeki örnekler kantitatif ölçüm yapmaya uygun bir substrat olan ONPG (o-nitrophenyl-beta-D-galactosidaz) kullanılarak incelenmiştir. Bunun için seçici besiyerinde büyütülen her transformantdan üçer koloni seçilerek sıvı besiyerinde inkübasyona bırakılıp OD₆₀₀ değerleri 0.4-0.5 aralığına gelinceye kadar hücreler büyütülmüştür. Her bir kültürden üçer replika olacak şekilde 100 µl alınıp üzerine 500 µl Z tamponu eklenerek vorteks ile karıştırılmıştır. Örnekler 30 dk 30°C’de inkübe edildikten sonra Z tampon içerisinde çözünmüş olan ONPG substratından (4 mg/ml) 150 µl eklenerek 30°C’de 30 dk (sarı renk oluşumu görülene kadar) inkübe edilmiştir. Sarı renk oluşumu görülünce 400 µl 1.5 M Na₂CO₃ (oda sıcaklığında) eklenerek reaksiyon durdurulmuştur. 96 well platede kuyucuklara eklenerek 420 nm’de absorbansları alınmıştır.

Raportör Gen Aktivite Testi/Transformantların Karakterizasyonu

Beta galaktozidaz analizlerini teyit etmek için maya ikili hibrit hücrelerinin ilave raportör gen özelliğinden faydalanılmıştır. MaV203 hücrelerinde *LacZ* geninin haricinde *URA3* geni ve *HIS3* genlerinin promoter bölgelerinde de GAL4 bağlanma bölgeleri mevcuttur. Normalde urasil ve histidin için okzotrof olan bu hücreler GAL4 promotoru üzerinden aktive edildiklerinde *LacZ* ifadesine ilave olarak *HIS3* ve *URA3* genlerini de ifade etmekte ve böylece histidin ve urasil için prototrof hale gelmektedir. Bu durumdan yararlanılarak her bir transformanttan üç farklı koloni alınarak sentetik besiyerine (-*ura*, -*his*) hücrelerin ekimi yapılmıştır. Transformant hücreler 30°C’de inkübasyona bırakılıp GAL4 aktivasyon durumları incelenmiştir.

5-FOA Testi

Seçici besiyerinde etkileşim gösteren proteinlerin tayinini yapmak için kullanılan bir başka yöntem 5-FOA (5-fluorotrik asit) kullanımudur. 5-FOA bileşiğinin kullanılmasıyla bileşiği, toksik olan 5-florourasile dönüştürüp hücrenin büyümesini inhibe etmektedir. Buna bağlı olarak transforme hücrelerin protein etkileşimlerini gözlemlemek amacıyla %0.2’lik 5-FOA içeren besiyerleri hazırlanarak hücreler ekimi yapılmıştır. 30°C’de inkübasyona bırakılıp aktivasyon durumları incelenmiştir.

3.2.7. Hücre Kültürü Teknikleri

Çalışmada Kullanılan Hücre Hattı

Hücre hattı olarak yabancı tip p53 taşıyan, transform olmamış immortalize normal meme epitel hücresi MCF 10A kullanılmıştır.

Hücre Kültürü Medyumunun Hazırlanması

Hücre kültürü medyumu 25 mM HEPES, %5 FBS (fetal bovin serum), 20 ng/ml epidermal büyüme faktörü, 500 ng/ml hidrokortizon, 100 ng/ml kolera toksini, 10 µg/ml insülin ve penisilin/streptomisin içeren DMEM: F-12 (1:1) besiyeri hazırlanmıştır. Tüm bileşenler 0.22 µm steril filtreden süzülerek steril edilmiştir. Hazırlanan medyum +4°C’de saklanmıştır.

Hücre Hattının Başlatılması

-80°C dolabında muhafaza edilen hücre hatlarının büyütülmesi için -80°C den çıkarılan hücreler 37°C’de ısıtılmış ve hızlı bir şekilde çözümleri gerçekleştirilmiştir. Çözünen hücreler hazırlanan medyuma alınarak 1000 rpm’de 5 dk santrifüj edilmiş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Oluşan pelet medyum ile çözülmüş ve flasklara hücre ekim yapılmıştır. Her bir flask etiketlenip 37°C, %5 CO₂ içeren inkübatöre koyulmuştur.

Hücrelerin Pasajlanması

Hücreler buldukları yüzeyi %80-90 oranında kaplayınca içerisindeki eski medyum uzaklaştırılmıştır. Hücreler steril PBS ile yıkandıktan sonra 25 cm² flasklar için 2 ml Tripsin-EDTA eklenip 37°C’de etüvde 5 dk bekletilmiştir. Hücrelerin yüzeyden ayrılıp ayrılmadığı mikroskop ile kontrol edilmiştir. Hücrelerin yüzeyden ayrıldığı görüldükten sonra yüzen hücreler yavaşça pipetlenip falkon tüpüne aktarılmıştır. Üzerine dört katı kadar (yaklaşık 8 ml) besiyeri eklenip 1000 rpm’de 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant atılıp, hücreler istenilen hücre sayısına göre yeni flasklara dağıtılmıştır ve üzerine 5 ml taze besiyeri konulmuştur. Flasklar etiketlenip 37°C, %5 CO₂ içeren etüve bırakılmıştır.

Hücre Ekstraktının Hazırlanması

Hücreler ekildiği flaskı %80-90 kapladıkları zaman flasklardan eski medyum uzaklaştırıp steril PBS ile yıkaması yapılmıştır. 25 cm² flasklar için 2 ml Tripsin-EDTA ile tripsinizasyon yapılmıştır. Hücreler yüzeyden ayrılınca falkon tüplere alınıp 6 ml PBS eklenerek 1000 rpm'de 5 dk santrifüj ile hücreler çöktürülmüştür. Santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırılmış ve pelete lizis tamponu eklenerek vorteks ile karıştırılmıştır. Buz üzerinde 15 dk inkübe edildikten sonra ara ara karıştırılmıştır. Arından 15 dk 13000 rpm'de santrifüj yapılarak süpernatant ayrı bir ependorfa alınmıştır. Kalan lizat -80°C dondurucuda muhafaza edilmiştir.

Hücrelerin -80°C'de Saklanması

Hücreler bölüm 3.2.7.4'de verilen prosedüre göre kaldırılıp süpernatant uzaklaştırılmıştır. Daha sonra son hacim 1 ml olacak şekilde %10 DMSO ve %90 besiyeri içerisinde süspanse edilerek kriyojenik tüplerine konulmuş ve etiketlenip -80°C buzdolabına kaldırılmıştır. Uzun süreli depolama için sıvı azot tankına aktarılması gerekmektedir.

3.2.8. Protein ile İlgili Teknikler

SDS PAGE

Elektroforez aparatları ve cam levhalar distile su ve %70'lik etanol ile temizlenmiştir. İlk olarak ayırma jeli (%30 bisacrilamid, %10 SDS, %10 APS, TEMED, 1.5 M Tris pH: 8.8, UP su) hazırlanarak, üst kısımda 3 cm boşluk kalacak şekilde dökülmüştür. Daha sonra hemen üzerine %90 izopropanol ilave edilerek hava kabarcığı oluşumu engellenmiştir. Yaklaşık 30-40 dk jelin polimerizasyonu için beklenmiştir. Jel polimerize olduktan sonra izopropanol jelden uzaklaştırılmıştır. Üzerine yığma jeli (%30 bisacrilamid, %10 SDS, %10 APS, TEMED, 1 M Tris pH: 6.8, UP su) hazırlanmış ve örnekleri yükleyebileceğimiz kuyu oluşturabilmek için tarak yerleştirilmiştir. Yığma jelinin polimerizasyonundan sonra tarak çıkarılmıştır. Daha sonra hazırlanan jeller tank içine yerleştirilmiştir. Örneklerin yüklenmesi, protein ekstraksiyonu Lizis buffer ile yapıldığı için örnekler protein miktarları belirlendikten sonra yaklaşık 20-40 ng olacak şekilde sample buffer ve bromofenol mavisi ile karıştırılarak kuyucuklara yüklemesi gerçekleştirilmiştir. İlk kuyuya 5 µl protein büyüklük belirteci (marker) yüklenmiştir. Jelin yürütülmesi, 0.1 (w/v) SDS içeren 1X

Running Buffer ile tank doldurarak (orta kısım ve alt kısım) her jele 0.4 amper akım gelecek şekilde yaklaşık 90 dakika yürütülmüştür.

Western Blot

Proteinlerin transferi için PVDF (millipore) membranlar kullanılmıştır. Kısaca, jeller cam levhalar arasından dikkatlice çıkarılıp, üst kısımdaki yığma jeli kesilerek jelden uzaklaştırılmış ve jel 1X Running tamponunda yıkanmıştır. Whatman 3MM kağıt ve PVDF membranlar jel ile aynı boyutlarda kesilerek hazırlanmıştır. Whatman filtre kağıtları transfer tamponunda 5 dk bekletilmiştir. Daha sonra üzerine önce metanolde sonra transfer tamponunda 5 dk bekletilen PVDF membranı yerleştirilmiştir. Running tamponunda yıkaması yapılmış olan jel, PVDF membran üzerine konulup üzerine tekrar whatman filtre kağıtları eklenmiştir. Bu sırada hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilmiştir. Daha sonra Whatman kağıdı, jel, membran, Whatman kağıdı olacak şekilde hazırlanan sandviç Transfer Blot kasetine (Thermo) yerleştirilerek 25 mA 25 V'da 7 dk transfer işlemi gerçekleştirilmiştir.

Proteinlerin transfer olduğu PVDF membranlar ilk olarak 20 ml (%5 (w/v) yağsız süt tozu ve %0.1 (v/v) Tween-20 içeren 1X TBS) çözeltisinde 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Daha sonra membran süt tozunda primer antikor ile +4°C'de bir gece inkübasyona bırakılmıştır.

Primer antikor muamelesinde kalan membran 10 dakikalık sürelerle 3 kez yıkanmış ve bunun için %0.1 (v/v) Tween-20 içeren 1X TBS kullanılmıştır. Membran sekonder antikor ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildikten sonra tekrar 10 dakikalık sürelerle 3 kez yıkama yapılmıştır.

Membranlar 1-2 dakika arasında ECL sistemi Pierce ECL (Western Blotting Substrate-Thermo) substratla muamele edilmiştir. Reagent A ve Reagent B çözeltilerinden ayrı ayrı 1.5 ml alınarak membran üzerine uygulanmıştır. Ardından G:Box görüntüleme cihazına geçilerek membran görüntüsü alınmıştır.

CO-IP

Co-IP deneyleri için daha önce elde edilmiş olan ve p53 ile etkileştiği düşünülen V5 epitoplarına entegre SACM1L, APTX ve METAP1 genlerini stabil olarak ifade eden MCF 10A hücre hatları kullanılmıştır. Her bir hücre hattından lizat elde edilmesinin ardından bir kısmı ayrılarak "input" olarak adlandırılmış ve daha sonra western blot deneylerinde pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Co-IP deneyinin

gerçekleştirilmesi için ise ticari olarak satın alınmış olan Pierce Co-İmmunopresipitasyon Kiti içerisinde yer alan resin içerikli kolonlara p53 antikoru bağlanması sağlanmıştır. Kolona özgül olarak bağlanmayan proteinlere ait sonuçların elimine edilmesi amacıyla pre-clear (ön-temizleme) safhasından geçirilen lizatlar bu kolonlarla inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından kolona bağlanmayan kısım ayrılarak “bağlanmayan lizat” olarak isimlendirilmiştir. Kolona bağlanan lizat kısmı ise kitle yer alan tampon kullanılarak elüsyon aşamasından geçirildikten sonra elde edilen örnek “IP-p53” olarak adlandırılmıştır. Co-IP deneyini takiben ise western blot analizi kullanılarak p53 ile olası bağlanma hedefleri arasında etkileşimin gösterilmesi amaçlanmıştır.

3.2.9. İstatiksel Analiz

Beta-galaktosidaz analizi sonucunda örnekler OD_{405}/OD_{600} verileri (hücre sayısına göre normalize edilmiş değerler) ANOVA testi kullanılarak analiz edilmiştir. Analiz sonucunda etkileşim göstermesi beklenen hedef transformantlar ve kontrol transformantlar arasında analiz yapılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Maya İkili Hibrit Sistemi İçin Gerekli Moleküler Klonlama Çalışmaları

Gateway klonlama yöntemiyle insan p53 geni GAL4 transkripsiyon faktörünün DNA bağlanma bölgesini taşıyan pDEST32 plazmitine klonlanması sağlanmıştır. APTX, SACM1L ve METAP1 genleri ise GAL4'un aktivasyon domainini içeren pDEST22 plazmitine ayrı ayrı klonlanma işlemleri gerçekleştirilmiştir. Klonlamalar İnvitrogen ProQuest™ Two-Hybrid System ticari kitinden faydalanılarak yapılmıştır.

p53 geninin Amplifikasyonu

p53 geninin ileri ve geri primerleri GeneRunner programı kullanılarak gateway rekombinasyon (attB1/attB2) sekanslarıyla tasarlanıp Iontek firmasından sipariş edilmiştir (Tablo 4.1). p53 genini gateway rekombinasyon sekanslarıyla klonlanabilmesi için kalıp DNA (pc DNA3 flag p53) kullanılarak PCR reaksiyonu kurulmuş ve p53 geni çoğaltılmıştır (Tablo 4.2).

Tablo 4.1. p53 primer dizileri

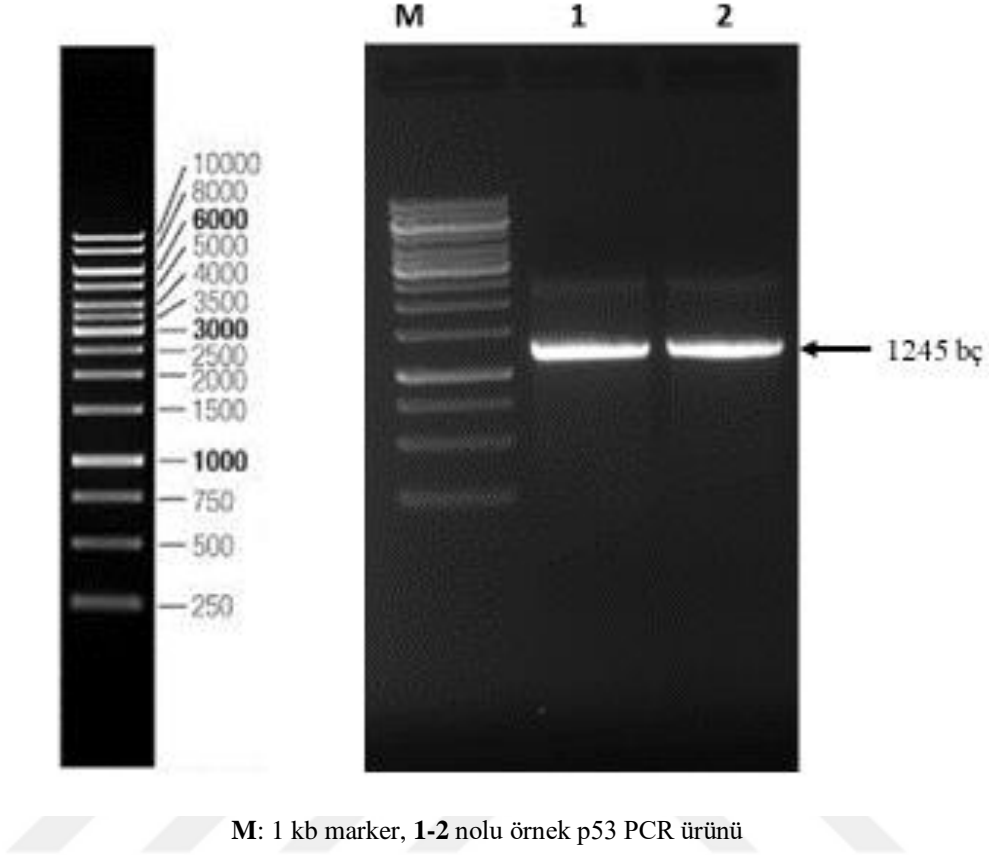
İleri primer dizisi	5' GGGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TTC (ATG) ACTTGTTGGCGACTGTCC
Geri primer dizisi	5' GGGG AC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTT TTA**CTGTGTGTTGAGGGGTG

Tablo 4.2. p53 amplifikasyonu için PCR koşulları

Denatürasyon	Eşleşme	Uzama	∞		
95°C	95°C	55°C	72°C	72°C	12°C
3'	30"	30"	2"	5'	

Elektroforez için 1X TAE tampon ile %8'lik agaroz jel hazırlanmıştır. PCR ürünü jele yüklendikten sonra 1 saat 90 V'da yürütülmüştür. Jel elektroforezinde

beklenen aralıkta (1245 bç) görüldükten sonra jelden ekstraksiyonu yapılmıştır (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. PCR ürünü p53'ün jel görüntüsü

PCR ürünü olan p53, jel elektroforezinde beklenen aralıkta görüldükten sonra bistüri yardımıyla jelden kesilerek jel ekstraksiyon kitiyle elde edilip konsantrasyon ölçümü yapılmıştır.

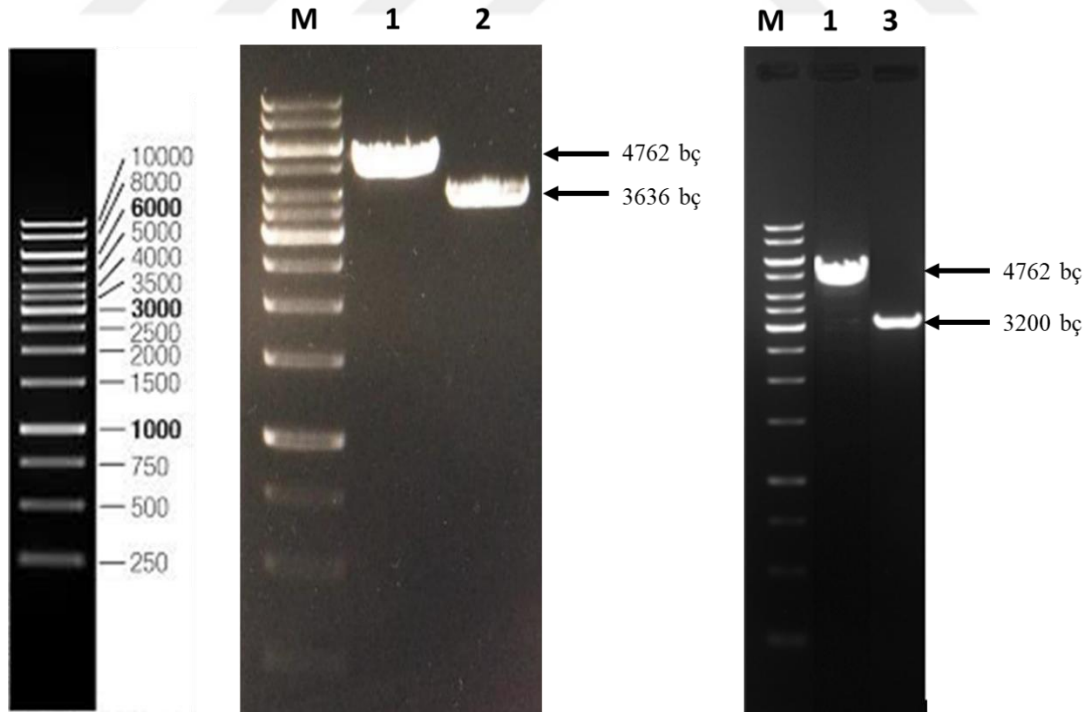
4.1.1. Lentiviral Vektörlerden p53 PCR Ürünü, APTX, SACMIL ve METAP1 Genlerinin Maya İkili Hibrit Vektörlerine Alt Klonlanması

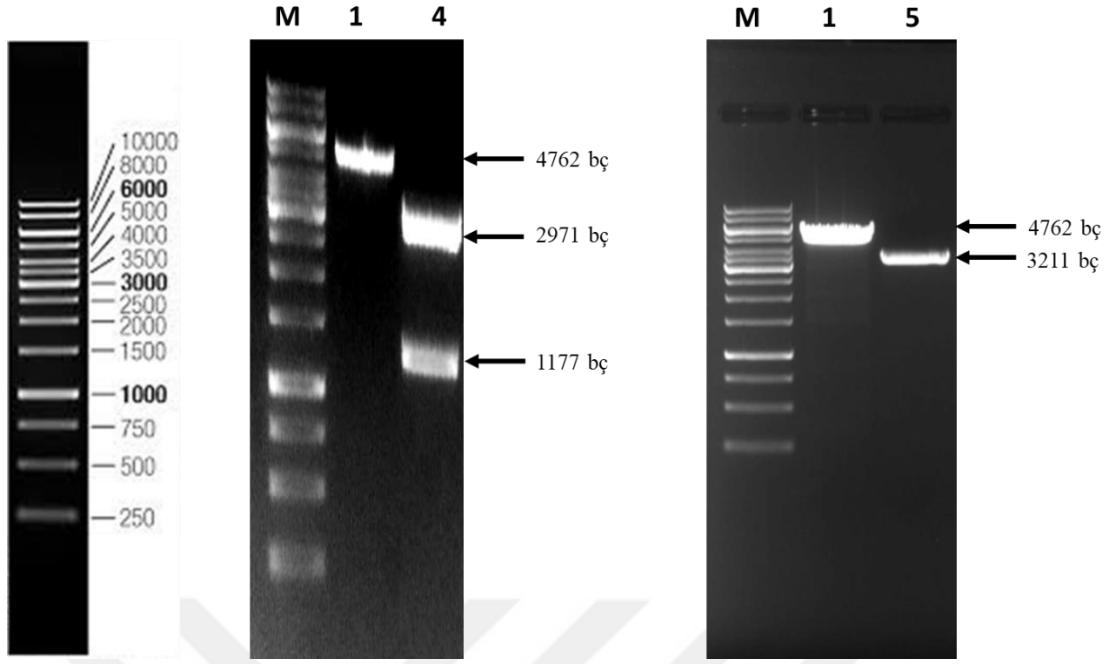
BP ve LR reaksiyonu olmak üzere iki ana aşamadan oluşan gateway klonlama sistemiyle ilgili genler maya ikili hibrit vektörlerine klonlanmıştır. Bu amaçla BP Clonase II Enzyme Mix ve LR Clonase II Enzyme Mix içeren ProQuest™ Two-Hybrid System kitinden yararlanılmıştır. Üretici firma protokolüne göre Gateway'in birinci aşaması olan BP reaksiyonu kurulmuştur.

4.1.2. p53, APTX, SACM1L ve METAP1 Genlerinin pDONR-221 Vektörüne Klonlanması ve *E.Coli*'ye Transformasyonu

PCR sonucu oluşan bantlar, jelden geri kazanılarak klonlanmaya hazır hale getirilmiştir. Kit protokolüne göre ilgili genler pDONR-221 vektörüne BP Clonase II Mix ile reaksiyonu kurulmuştur. Her bir reaksiyon ürünü competent *E.Coli TOP10* hücrelerine transforme edilmiştir. Kanamisin içeren LB agarlı petriyeler hazırlanmıştır. Bu petriyelere transformasyon yapılmış bakterilerin ekimi yapılarak bir gece 37°C'de inkübe edilmiştir. Oluşan koloniler ilgili genleri içeren pDONR-221 vektörüne sahip hücrelerdir. Her bir petride oluşan kolonilerden tek koloni ekimi yapılarak kanamisinli LB sıvı besiyerine ekimi yapılmıştır ve hücreler çoğaltılmıştır. Plazmit DNA izolasyon kiti kullanılarak plazmit DNA izolasyonu yapılmıştır. Klonlamayı tespit etmek için restriksiyon enzimleri ile kesim reaksiyonları kurulmuştur.

pDONR221: ApaI, pDONR221-p53: ApaI, pDONR221-APTX: ApaI, pDONR221-SACM1L: XbaI/ApaI, pDONR221-METAP1: ApaI restriksiyon enzimleriyle kesilerek klonlama teyit edilmiştir. Kesim sonuçları agaroz jelde yürütülmüş ve jel elektroforezinde beklenen aralıklar görülmüştür (Şekil 4.2).





M: 1 kb marker, 1: pDONR221, 2: pDONR-p53 3: pDONR221-APT_X, 4: pDONR221-SACM1L, 5: pDONR221-METAP1

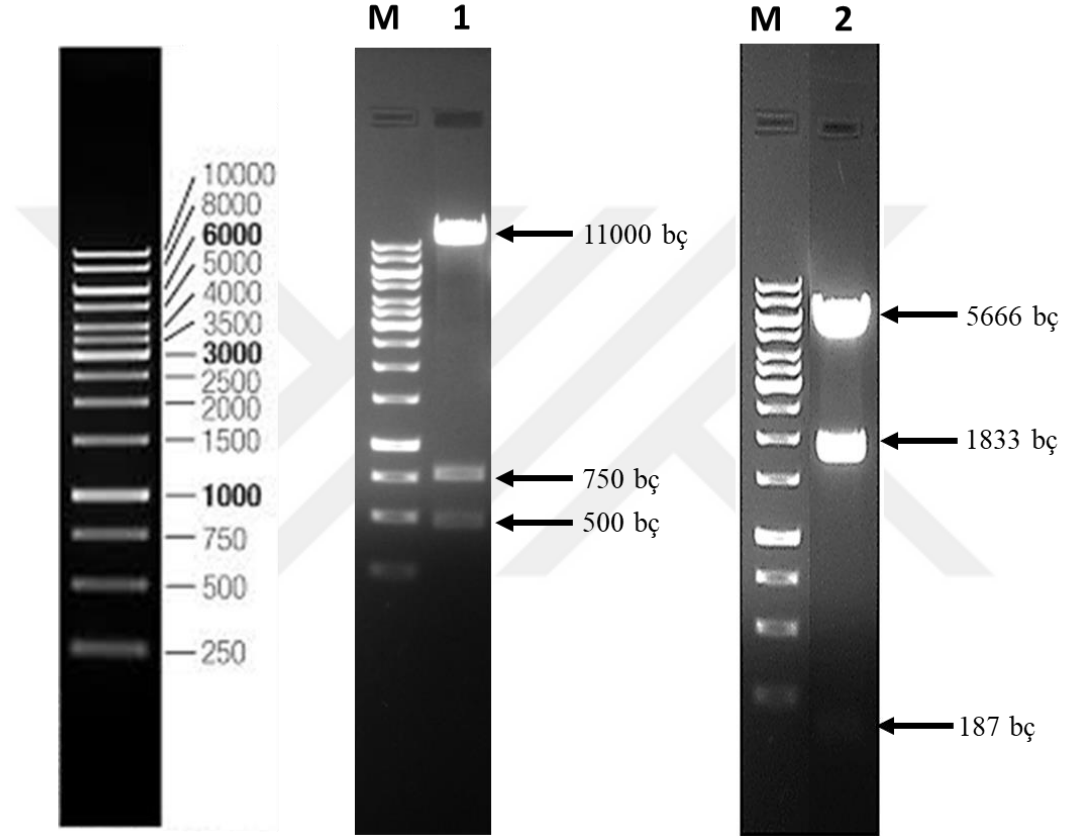
Şekil 4.2. pDONR221 vektörüne klonlanan genlerin restriksiyon enzimleriyle kesim sonucu jel görüntüsü.

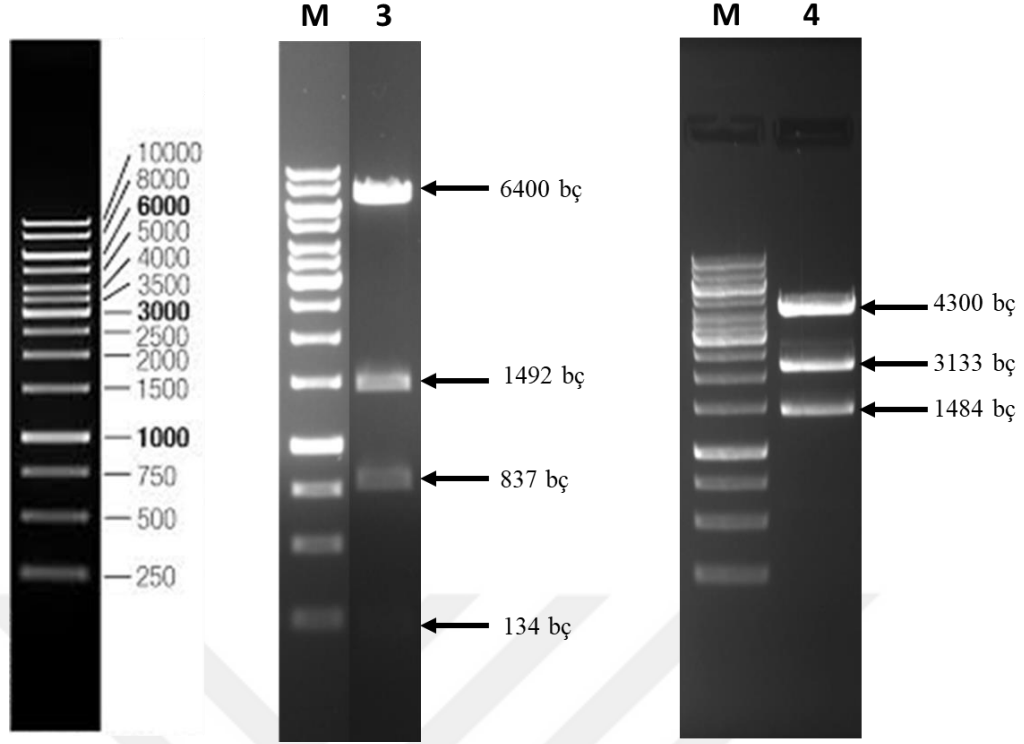
4.1.3. pDONR-221 Vektörüne klonlanan p53, APT_X, SACM1L, METAP1 Genlerinin Maya İkili Hibrit Vektörlerine Klonlanması ve *E.Coli*'ye Transformasyonu

pDONR-221 vektörüne klonlanan p53, APT_X, SACM1L, METAP1 genleri fonksiyonel aktivitesinin belirleneceği maya ikili hibrit vektörlerine (pDEST22/pDEST32) alt klonlanması gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla pDONR-221 vektörüne klonlanan genler ile Gateway'in ikinci aşaması LR Clonase II Mix ile reaksiyon kurulmuştur. Bu yöntem ile insan p53 geni GAL4 transkripsiyon faktörünün bağlanma bölgesini taşıyan pDEST32 plazmitine klonlanmıştır. APT_X, SACM1L ve METAP1 genleri ise GAL4'un aktivasyon domainini içeren pDEST22 plazmitine ayrı ayrı reaksiyonu kurularak klonlanmıştır. Her bir reaksiyon ürünü competent *E.Coli* TOP10 hücrelerine transforme edilmiştir. pDEST32 plazmiti gentamisin içeren LB agarlı besiyerine, pDEST22 plazmiti ise ampisilin içeren LB agarlı besiyerine transformasyonu yapılmış olup bakterilerin ekimi yapılarak bir gece 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Oluşan koloniler ilgili LB sıvı besiyerine tek koloni ekimi yapılarak hücreler çoğaltılmıştır. Plazmit DNA izolasyonu kiti kullanılarak plazmit

DNA izolasyonu yapılmış olup restriksiyon enzimleriyle reaksiyon kurularak teyit edilmiştir.

pDEST32-p53: SacI/NcoI, pDEST22-APTX: XbaI/SacI, pDEST22-SACM1L: XhoI/NdeI, pDEST22-METAP1: EcoRV restriksiyon enzimleriyle reaksiyonu kurulmuştur. Kesim sonuçları agaroz jelde yürütülerek beklenen DNA fragmentleri jel elektroforezinde görülmüştür (Şekil 4.3).





M: 1 kb marker, 1: pDEST32-p53, 2: pDEST22-APTX, 3: pDEST22-SACM1L 4: pDEST22-METAP1

Şekil 4.3. pDEST32 ve pDEST22 plazmitine klonlanmış genlerin restriksiyon enzimleriyle kesim sonucu jel görüntüsü.

4.2. Dizi Analizi

Maya ikili hibrit sistemi plazmitlerine klonlanan bütün genler ilgili firmanın önerdiği sekanslama primerleri kullanılarak her iki yönden sekans analizi yapılmıştır. Bütün genlerin klonlanmış oldukları analiz sonucunda teyit edilmiştir.

4.3. Klonlamalar ile Oluşturulan Plazmitlerdeki Genlerin İfadeleme Analizleri

İlgili genlerin klonlandığı vektörler Mav203 maya hücre hattına standart lityum asetat yöntemiyle transforme edilmiştir. Maya hücrelerine plazmit transfer edildikten sonra hücreler gerekli olan seçici ortamda büyütülüp total RNA izolasyonu yapılmıştır. RNA izolasyonu sonrasında RevertAid First Strand cDNA Synthesis kiti ile cDNA sentezi yapılmıştır. Daha sonra her bir gen için dizayn edilmiş PCR primerleriyle her bir transformantdaki genin ifade edilip edilmediği real-time PCR ile incelenmiştir. RT-PCR tepkimesi her bir örnek için 40 döngü şeklinde uygulanmış olup her bir örnek üç replika şeklinde incelenmiştir. PCR döngü koşulları Tablo 4.4 ve primer bilgileri Tablo 4.3'de

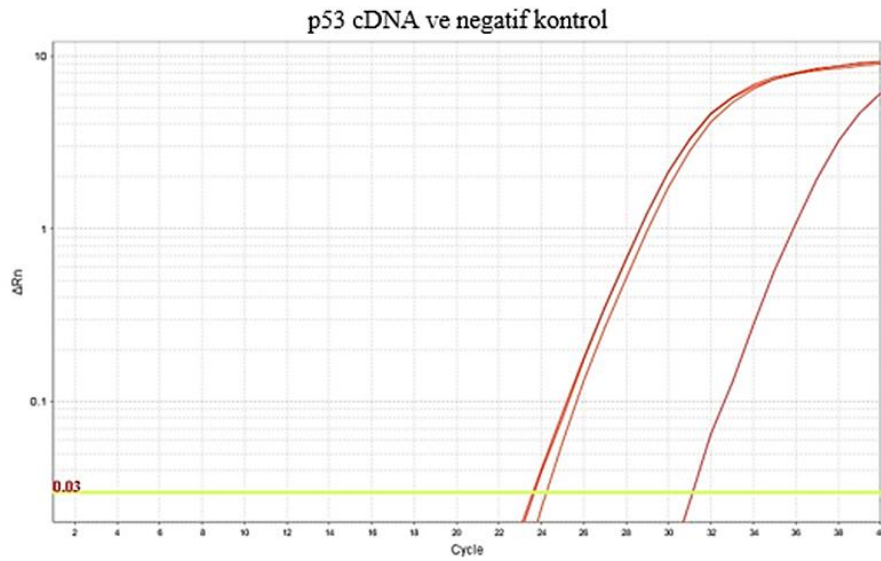
gösterilmiştir. Hedef genlerin cDNA'larının RT-PCR sonucu Şekil 4.4'te belirtilmiştir. RT-PCR sonuçlarına göre klonlanması yapılan bütün genlerin maya hücreleri içerisinde transkripsiyona uğradığı görülmektedir.

Tablo 4.3. Real Time PCR primer bilgileri

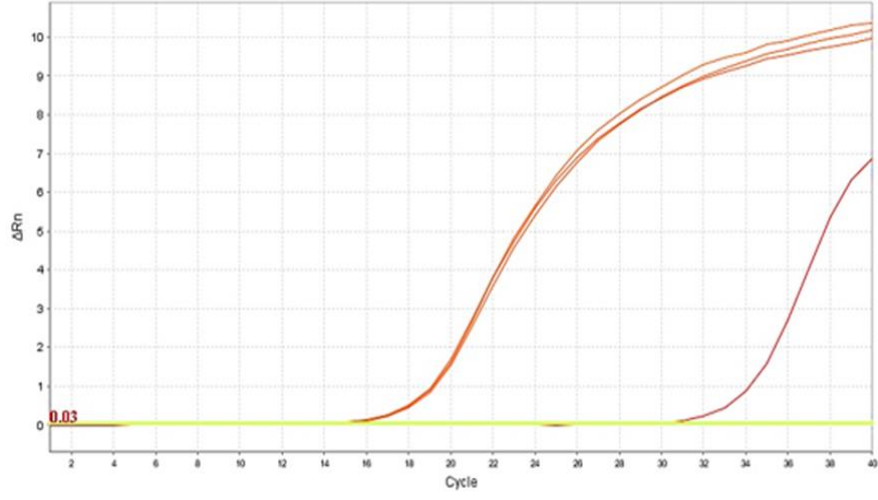
Primerin Adı	Primer Dizisi
RT-p53 R	CAGCATCAAATCATCCATTGCTTG
RT-APT X R	CTTCAGACTGGAAATGGAGGTCCACGG
RT-SACM1L R	GTGACAGCTGAAGGAGGAACATC
RT-METAP1 R	CTCTAGCAAGCCTACATAACAAGTC

Tablo 4.4. Real Time PCR çalışma koşulları

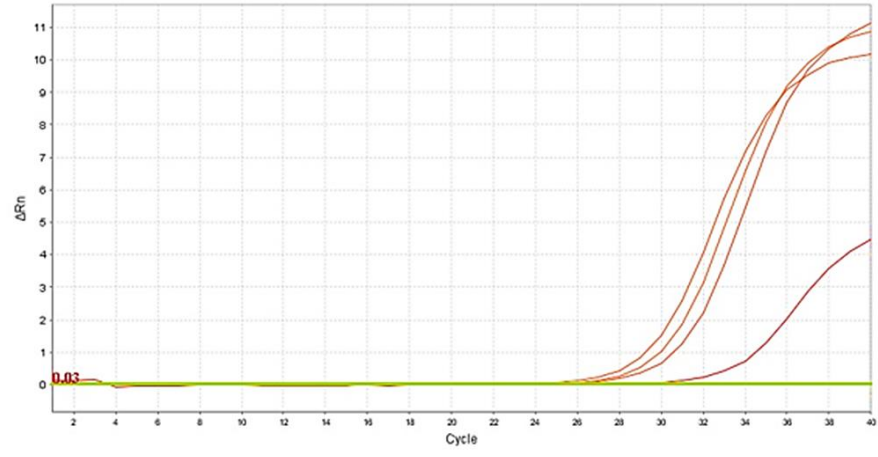
Faz	Zaman	Isı	Döngü
Başlangıç ısıtılması	10 dk	95°C	1 döngü
Denatürasyon	20 sn	95°C	40 döngü
Annealing	45 sn	59°C	
Elongasyon	15 sn	95°C	
Erime eğrisi	1 dk	60°C	



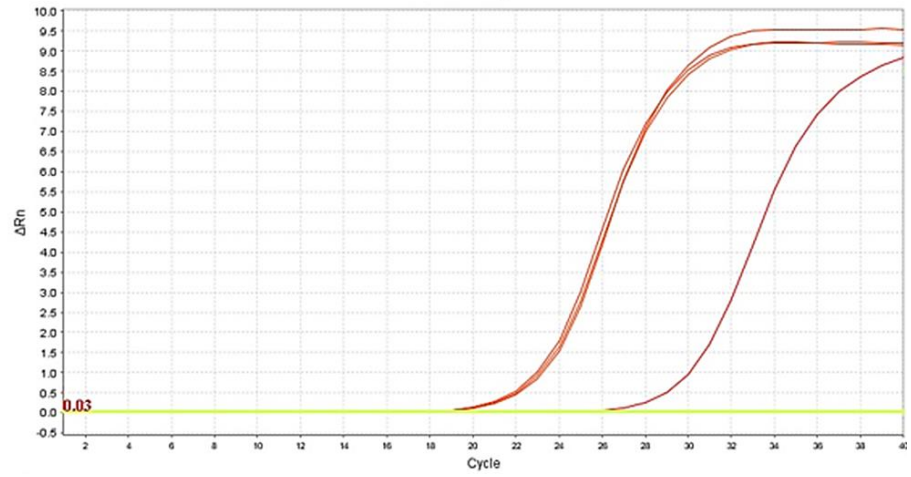
Aprataksin cDNA ve negatif kontrol



SACMIL cDNA ve negatif kontrol



METAP1 cDNA ve negatif kontrol



Şekil 4.4. Maya transformantlarındaki gen ifadelerinin RT-PCR sonuçları.

4.4. Protein İnteraksiyon Analizleri: LacZ aktivite tespiti

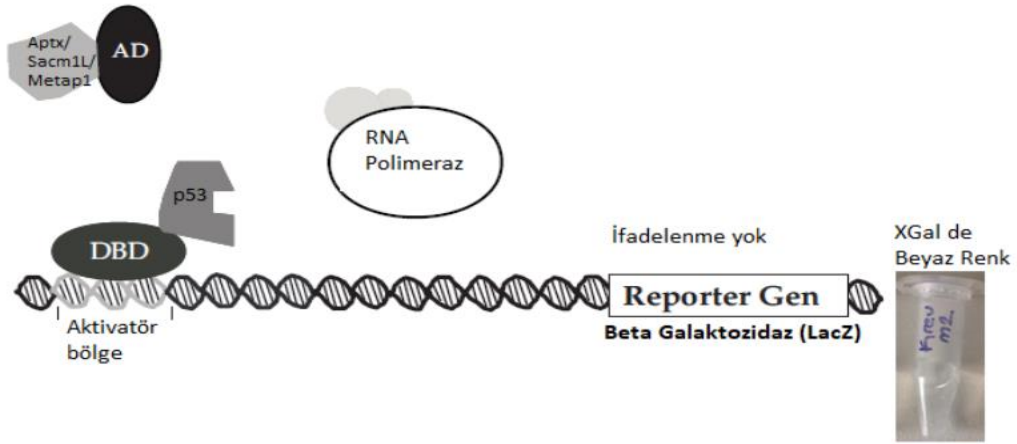
Maya ikili hibrit kapsamında gerekli klonlamalar tamamlanmış olup insan p53 geni pDEST32 GAL DBD plazmitine, diğer üç gen (APTX, SACM1L ve METAP1) ise pDEST22 GAL4 AD plazmitine klonlanması gerçekleştirilmiştir. p53 proteini ile diğer proteinler arasındaki etkileşim LacZ ifadesine paralel olarak, X-Gal substratının mavi renk oluşturmasıyla analiz edilmiştir. Şekil 4.5'de ifade edildiği gibi maya ikili hibrit sisteminde p53 proteini ile diğer proteinlerin etkileşim göstermemesi durumunda reporter gen aktivitesi olmaz (a). Eğer test edilen proteinler arasında etkileşim var ise kullanılan strateji gereği LacZ reporter geninin ifade edilmesi gerekmektedir (b). Buna bağlı olarak bölüm 3.2.6.1'de belirtildiği şekilde analizler yapılmıştır. Kontrol grubunda olan 7. tüpte mavi renk oluşumu gözlenmiştir (Şekil 4.6). p53 proteini ile GAL4 DNA bağlanma bölgesi füzyonu tek başına maya hücrelerinde *LacZ* genini ifade etmek için yeterli olduğu tespit edildi. Analizler aşağıdaki transformantlar ile gerçekleştirildi.

Transformantlar

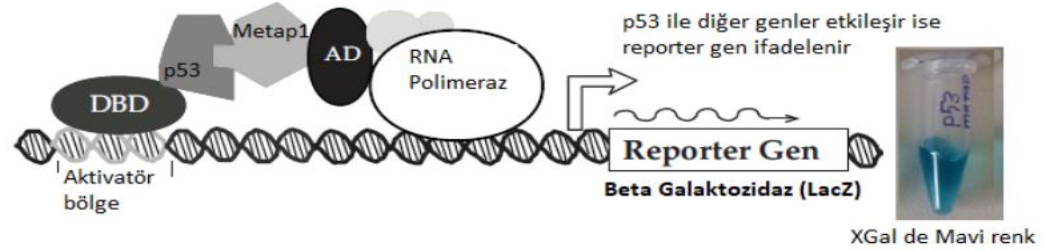
- 1) pEXP32-Krev1 ile pEXP22-RalGDS-WT
- 2) pEXP32-Krev1 ile pEXP22-RalGDS-M1 (Pozitif kontrol)
- 3) pEXP32-Krev1 ile pEXP22-RalGDSS-M2 (Negatif kontrol)
- 4) pDEST32-p53 ile pDEST22-APTX
- 5) pDEST32-p53 ile pDEST22-SACM1L
- 6) pDEST32-p53 ile pDEST22-METAP1
- 7) pDEST32-p53 ile pDEST22
- 8) pDEST32 ile pDEST22

**Kontrol plazmitleri firma tarafından sağlanmıştır.*

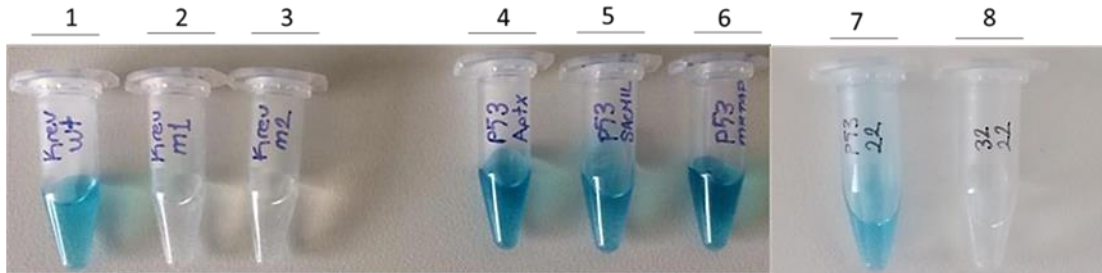
a)



b)



Şekil 4.5. Protein etkileşim durumuna göre LacZ İfadeleme profili

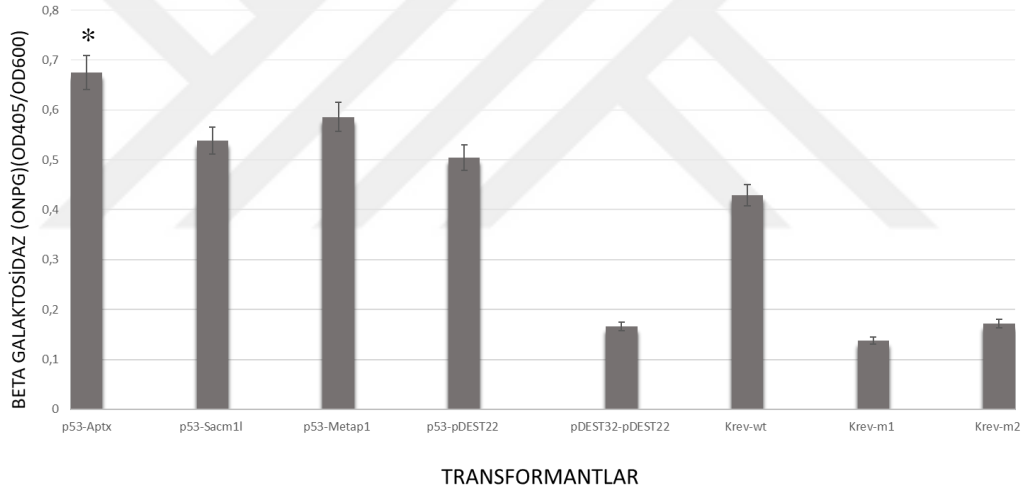


Maya ikili hibrit sistemiyle insan p53 proteini ile insan APTX, SACM1L ve METAP1 proteinleri arasındaki etkileşim. Mavi renk ilgili proteinlerin etkileşim gösterdiği anlamına gelmektedir. Tüplerin üzerindeki numaralar transformant numarasını göstermektedir. 7. Tüpte p53 geni (GAL4 proteinin DNA bağlanma bölgesiyle füzyon halinde) boş pDEST22 plazmidi ile aynı hücelere verilmiştir ve mavi renk oluşmuştur.

Şekil 4.6. X-Gal analiz sonuçları

4.4.1. Maya İkili Hibrit Transformantlarında Beta Galaktozidaz Aktivite Analizi

X-Gal substratının mavi renk oluşturmasıyla analiz edilmesinin ardından nedeniyle aynı örnekler kantitatif ölçüm yapmaya uygun bir substrat olan ONPG (o-nitrophenyl - beta-D-galactosidaz) kullanılarak tekrar incelenmiştir. Örneklerle prosedüre uygun şekilde muamele edildikten sonra 405 nm’de spektrofotometrik ölçümleri yapıp OD₄₀₅ / OD₆₀₀ verilerinin istatistiksel analizi yapılmıştır. Analiz sonucunda etkileşim göstermesi beklenen hedef transformantlar ve kontrol transformantlar arasında yalnızca p53-APT_X transformantında anlamlı bir fark olduğu diğer hedef proteinler arasında anlamlı bir fark olmadığı sonucuna varılmıştır (Şekil 4.7).



*: Kontrolde fark anlamlı ($p < 0,05$)

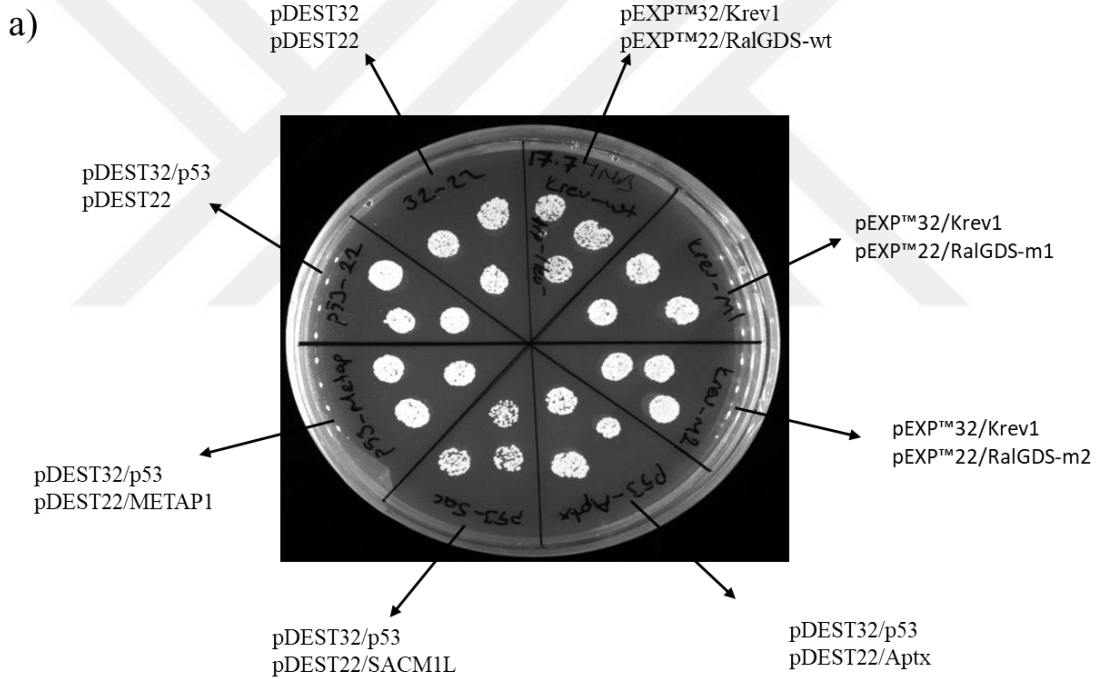
Şekil 4.7. Sıvı ortamda büyütülen hücrelerdeki LacZ aktivite ölçüm sonuçları

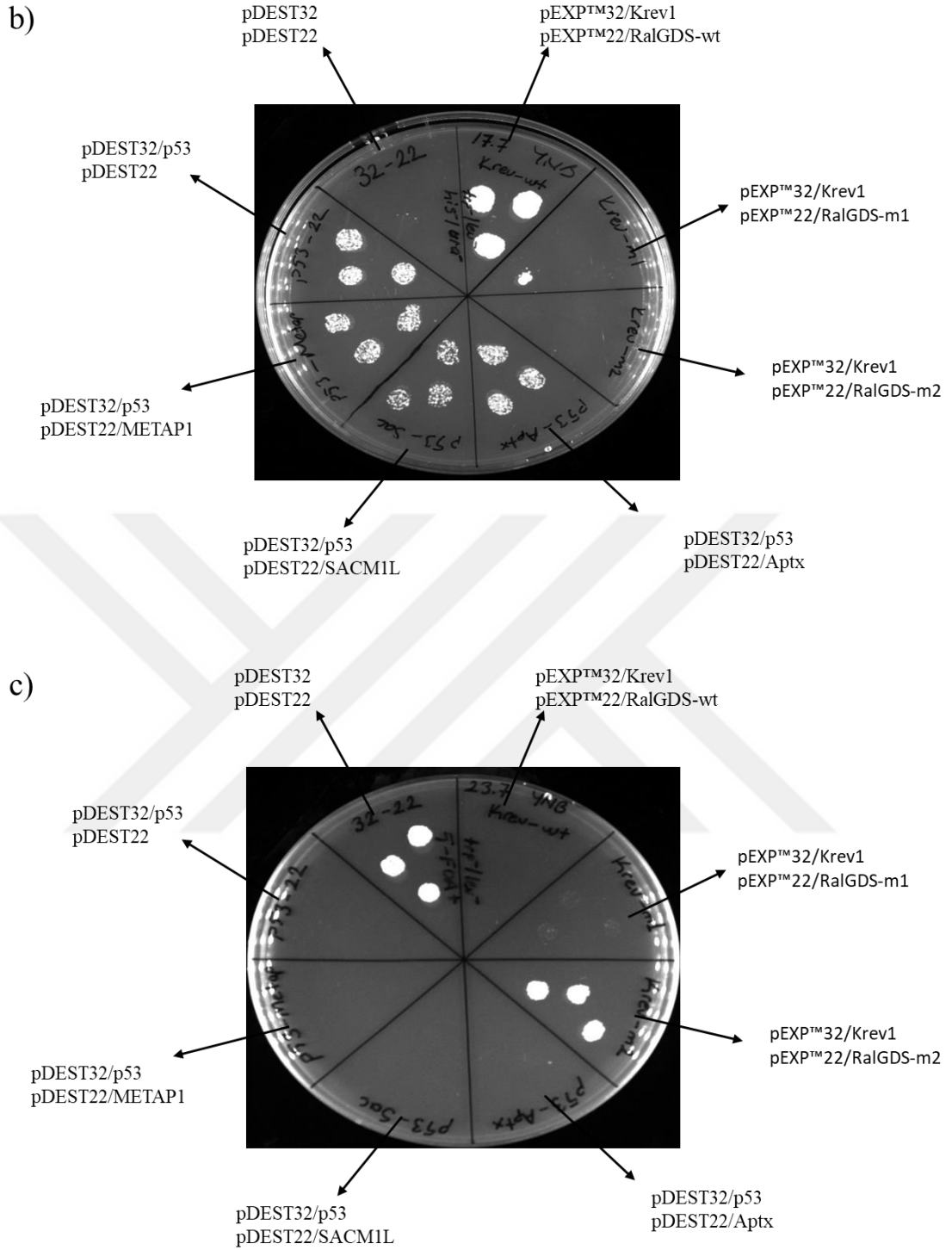
4.4.2. MaV203 Hücrelerindeki Transformantların Raporter Gen Aktivite Analizleri

MaV203 hücrelerinde *LacZ* geninin haricinde *URA3* geni ve *HIS3* genlerinin promoter bölgelerinde de GAL4 bağlanma bölgeleri mevcut olduğu bilinmektedir. Bu durumdan faydalanılarak MaV203 hücrelerine ikili plazmit transformasyonları yapılmıştır. Uygun seçici besiyerinde oluşan kolonilerden üç tanesi seçilip, urasil ve

histidin aminoasidini içermeyen sentetik besiyerine kontrol grubuyla birlikte hedef transformantları içeren hücrelerin ekimi yapılmıştır. Şekil 4.8'de görüldüğü gibi bütün hücreler kontrol petrisinde büyüdüğü halde (Şekil 4.8 a), sadece GAL4 aktivasyonu yapabilen kolonilerin urasilsiz ve histidinsiz ortamda büyüdüğü gözlenmiştir (Şekil 4.8b). Hücrelerin büyüme profilleri ile LacZ analizleri birbirini doğrular mahiyette sonuçlar üretmiş ve pDEST32 p53 GAL4 DBD içeren bütün transformantların büyüdüğü görülmüştür.

Seçici besiyerinde etkileşim gösteren proteinlerin tayini yapmak için kullanılan başka bir yöntem ise 5-FOA kullanımıdır. Transforme hücreler urasil aminoasidi olmaksızın %0,2'lik 5-FOA içeren besiyerine ekimi yapılmış olup etkileşim gösterdiği düşünülen proteinlere ait deney gruplarında büyüme gözlenmemiştir (Şekil 4.8 c).





a) YNB, -Leu, -Trp (kontrol), b) YNB, -Leu, -Trp, -His, -Ura, c) YNB, -Leu, -Trp, +5-FOA

Şekil 4.8. Transformantların YNB besiyerinde büyüme analizleri

4.4.3. Co-IP Yöntemiyle Etkileşim Gösteren Proteinlerin Bulunması / Teyit Edilmesi

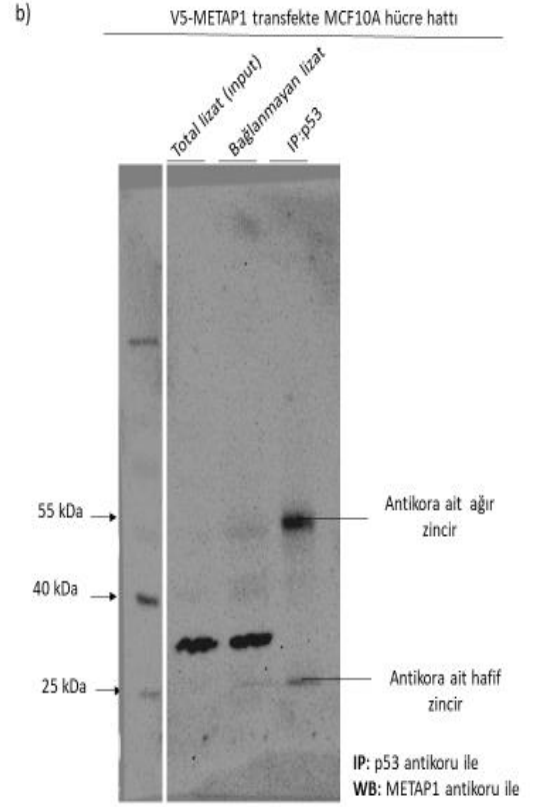
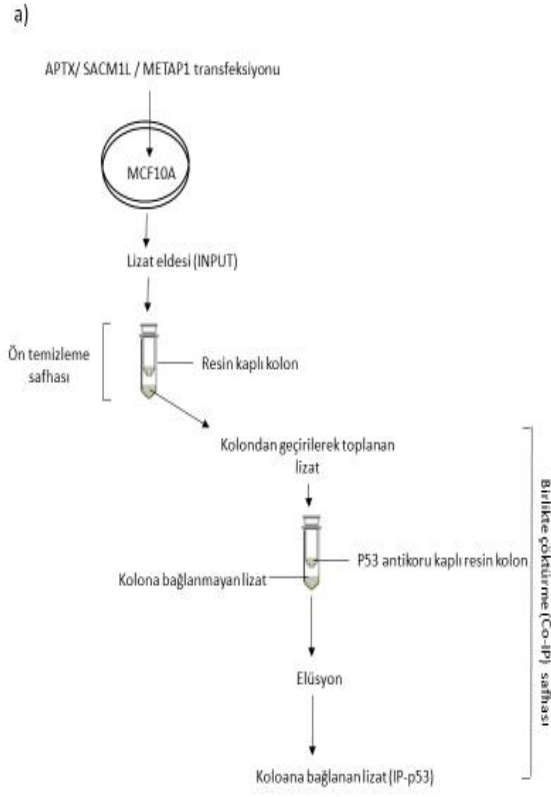
Co-IP deneyleri için p53 ile etkileşim gösterdiği düşünülen V5 epitoplarına entegre APTX, SACM1L ve METAP1 genlerini stabil olarak ifade eden MCF 10A hücre hatları kullanılmıştır. Her bir hücre hattından lizat elde edilmesinin ardından bir kısmı ayrılarak “input” olarak adlandırılmış ve daha sonra western blot deneylerinde pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Co-IP deneylerinin gerçekleştirilebilmesi için ticari olarak satın alınmış olan Pierce Co-İmmunopresipitasyon Kiti kullanılmıştır. Kit içerisinde yer alan resin içerikli kolonlara p53 antikorunun bağlanması sağlanmıştır. Kolona özgül olarak bağlanmayan proteinlere ait sonuçların elimine edilmesi amacıyla pre-clear (ön-temizleme) safhasından geçirilen lizatlar bu kolonlarla inkübe edilmiştir (Şekil 4.9a). İnkübasyonun ardından kolona bağlanmayan kısım ayrılarak “bağlanmayan lizat” olarak isimlendirilmiştir. Kolona bağlanan lizat kısmı ise kütte yer alan tampon kullanılarak elüsyon aşamasından geçirilmiş olup elde edilen örnek “IP-p53” olarak adlandırılmıştır. Co-IP deneyini takiben ise western blot analizi kullanılarak p53 ile olası bağlanma hedefleri arasında etkileşimin gösterilmesi amaçlanmıştır. Her bir membrana protein için ayrı primer antibody kullanılmış ve membranlar sekonder antibody ile muamele edildikten sonra ECL yardımıyla görüntülenmesi sağlanmıştır. METAP1 proteini (Şekil 4.9 b) APTX proteini (Şekil 4.9 c) ve SACM1L (Şekil 4.9 d) proteini için analiz yapılmıştır.

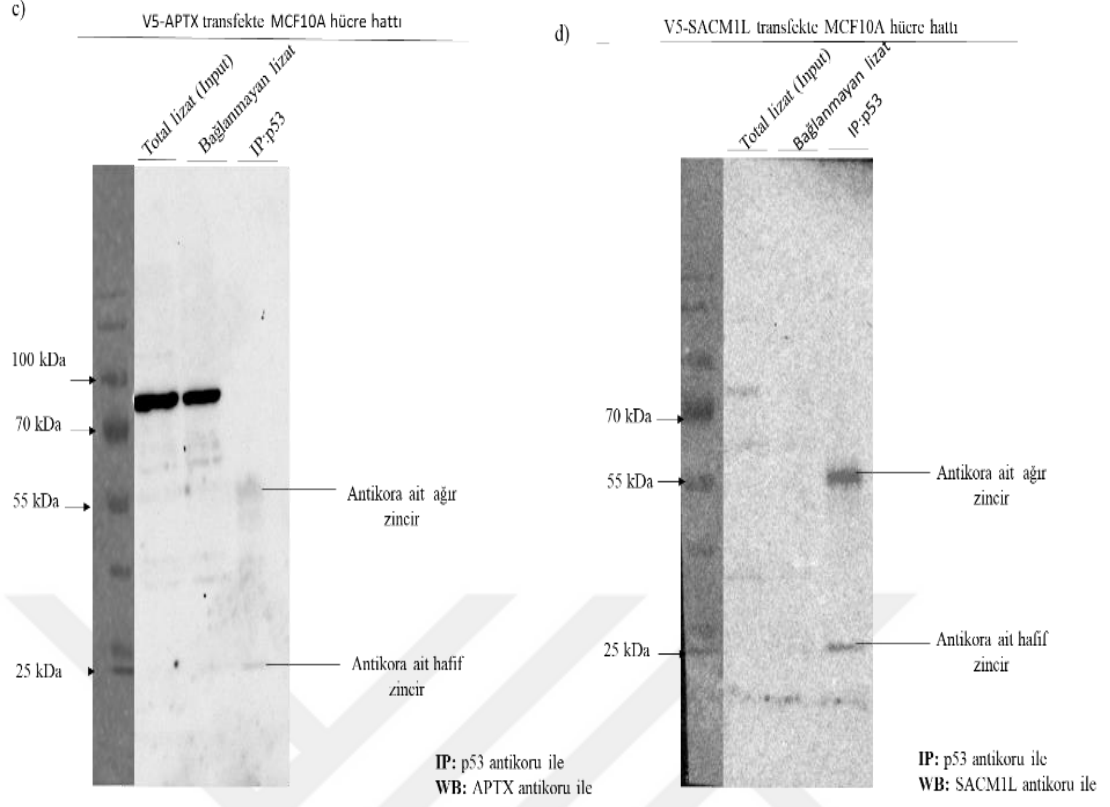
Co-IP deneyi için resin kaplı kolonlar p53 antikoruna ile kaplanmıştır. Deney sonucunda elde edilen örneklerin METAP1 antikoruna ile western blot analizi yapılmıştır. Analiz sonucunda input ve bağlanmayan lizat olarak adlandırılan örneklerde beklenen 43 kDa’da bant gözlemlenirken IP:p53 olarak adlandırılan örnekte bir bant belirlenememiştir.

APTX ile transfekte edilen hücre hattında gerçekleştirilen IP:p53 örneklerinde APTX antikoruna ile western blot analizi sonucunda IP:p53 örneğinde beklenen 47 kDa’da bant gözlemlenememiştir.

SACM1L ile transfekte edilen hücre hattında gerçekleştirilen IP:p53 örneğinde beklenen 66 kDa’da her hangi bir bant belirlenememiştir. IP:p53 örneğinde 55 ve 25 kDa hizasında gözlemlenen bantların ise deneyde kullanılan antikorun hafif ve ağır zincirlerine ait olduğu belirlenmiştir. Yapılan deney sonucunda deneyin

gerçekleştirildiği koşullarda APTX, SACM1L, METAP ile p53 arasında direk bir etkileşime ait veriye rastlanılmamıştır.





a) Gerçekleştirilen p53 etkileşimine dayalı Co-IP analizine ait diyagram. **b)** V5-METAP1 vektörü ile western blot görüntüsü. **c)** V5-APTX vektörü ile western blot görüntüsü **d)** V5-SACM1L vektörü ile western blot görüntüsü.

Şekil 4.9. Co-IP analiz sonuçları

5. TARTIŞMA

p53 proteininin ilk keşfinden bu yana kanser biyolojisindeki rolü her geçen gün artmaktadır. p53 transkripsiyon faktörü olup, hedef proteinleri aktive ederek hücre döngüsünün durmasını, DNA tamiri veya kontrollü hücre ölümü olmak üzere çeşitli hücresel süreçlerde görev almaktadır (15). Hücrelerde p53 aktivitesini kontrol eden birçok mekanizma olmasına karşın redoks kontrol mekanizması fazla çalışılmamıştır. Daha önce yapılmış ön çalışmada maya (*Saccharomyces cerevisiae*) uyumlu bir p53-raportör sistemi kullanılarak p53 aktivitesini etkileyen antioksidan genlerin bulunması için maya sisteminde genetik bir tarama yapılmıştır. Bu tarama kapsamında antioksidan genleri olmayan 109 farklı mutant hücrede p53 aktivitesinin seviyesi ölçülmüştür. Yabancıl tip maya hatlarına göre daha düşük p53 aktivitesi gösteren üç maya antioksidan gen mutantı tespit edilmiştir (HNT3, SAC1 ve MAP1). Bu üç genin insan homologlarının (APTX, SACM1L ve METAP1) p53 regülasyonunda rol oynamaları muhtemeldir. APTX ile p53'ün Co-IP deneylerinde beraber çöktükleri gösterilmiştir fakat bu konuda daha ileri bir araştırma yapılmamıştır. p53'ün diğer iki genin (METAP1 ve SACML1) insan ya da diğer memeli sistemlerinde p53 proteini ile daha önceden tanımlanmış bir ilişkisi bulunmamaktadır. METAP1 ve SACM1L genleri/proteinleri ile p53 sinyal iletim yolağı arasında bir ilişki olması durumunda p53 regülasyonu için yeni genler/proteinler tespit edilmiş olacaktır. Bu durum özellikle p53 yapısında mutasyon taşımayan fakat p53 yolağı ile ilgili kanser oluşumlarının mekanizmalarını anlamaya ışık tutabilir.

Tez süresi boyunca maya ve insan hücre kültür modeli kullanılarak insan p53 proteini ile her bir protein arasında muhtemel olan protein-protein interaksyonu tespit edilmesi amaçlanmıştır.

Hücreleri genotoksik strese karşı koruyan insan APTX proteininin mtDNA onarımında önemli rol oynadığı, APTX defektlerinin mitokondriyal disfonksiyonuna ve oksidatif strese yol açtığı tespit edilmiştir (7). APTX geninin mutasyonu sonucunda oluşan AOA1 hastalarında yüksek seviyelerde DNA hasarı, antioksidan potansiyeli oluşturabilen düşük CoQ10 seviyeleri belirlenmiştir. AOA1 hastalarının daha fazla genomik instabilite ve kanser geliştirme eğilimi olduğu belirlenmiştir (42,43). Daha önce yapılan bir çalışmada AOA1 hastalarından alınmış hücrelerde DNA tek kırığı tamirinden sorumlu olan PARP-1, XRCC1 ve p53 proteinleriyle etkileşim gösterdiği

tespit edilmiş ve Co-IP deneyleri ile p53-APTX ilişkisi gösterilmiştir (7). Aprataksin-p53 ilişkisi bakımından literatürde Nuri Gueven ve arkadaşları haricinde başka çalışma bulunamamıştır.

Diğer bir gen insan SACM1L, ER da lokalize olup fosfoinozotid fosfataz olarak görev yaparak Ptdlns3-p ve Ptdlns4-P türlerini hidrolize etmektedir (44). Meme kanseri hücre hattı MDA MB231'de mutant formda bulunan p53'ün susturulmasıyla, SACM1L'in mRNA ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir ancak SACM1L-p53 arasında fonksiyonel bir ilişki tanımlanmamıştır (45).

İnsan METAP1 geni ise; maya MAP1 genine benzer şekilde ko-translasyonel olarak yeni sentezlenen proteinlerin N-ucundaki metiyonin amino asidini uzaklaştıran bir metiyonin aminopeptidaz enzimini kodlamaktadır (6). METAP1 inhibitörlerinin farklı kanser hücre hatlarında G2/M fazında duraklamaya sebep olduğu ve apoptozu tetiklediği gösterilmiştir. METAP1'in p53'ün yer aldığı hücre döngüsü ve apoptoz gibi mekanizmalarda rol oynadığı bilinmekle beraber p53 ile doğrudan ilişkisi araştırılmamıştır.

Bu çalışmada, insan p53 geni ile hedef genler arasında protein-protein etkileşimini tespit etmek için iki yöntem kullanılmıştır. İlk olarak maya ikili hibrit (Y2H) yöntemi ile protein interaksiyonlarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu yöntem canlı maya hücrelerinde etkileşim gösteren proteinlerin saptanmasında kullanılmaktadır. Yem (bait) ve av (prey) adı verilen iki protein arasındaki etkileşim, spesifik medyada büyümeyi sağlayan belirteç geni veya renk oluşum reaksiyonunu aktive etmektedir. Maya ikili hibrit sistemi, maya harici proteinlerde sıklıkla kullanıldığı, protein-protein etkileşimlerini tanımlamak için kullanılan maya tabanlı bir sistemdir. Çalışmamızda maya ikili hibrit sistemi için Gateway klonlama tekniği ile uyumlu olan ProQuest Two-Hybrid System kiti tercih edilmiştir. Kitin duyarlı olması, gerekli klonlamaların kolayca yapılabilmesi ve protein-protein interaksiyonu için ilave kontrol unsurlarının bulunması tercih nedeni olmuştur. İlk başta Gateway klonlama yöntemiyle insan p53 geni GAL4 transkripsiyon faktörünün DNA bağlanma bölgesini (DBD) taşıyan pDEST32 plazmitine; APTX, SACM1L ve METAP1 genlerinin ise GAL4 un aktivasyon domainini (AD) içeren pDEST22 plazmitine ayrı ayrı klonlanması gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen bu klonlamalar dizi analizi ve RT-PCR ile teyit edilmiştir. p53 ve hedef genlerin MaV203 maya hattına ikili transformasyonu yapılmasından sonra protein interaksiyonlarının belirlenebilmesi için LacZ belirteç geninden faydalanılmıştır. İlk

olarak ilgili transformantlarla, LacZ ekspresyonuna paralel olarak, X-Gal substratının mavi renk oluşturmasına analiz edilmiştir. Daha sonra aynı örneklerle kantitatif ölçüm yapmaya uygun bir substrat olan ONPG kullanılarak Beta-galaktozidaz aktivite analizi gerçekteştirilmiştir. Örneklerin OD₄₀₅ / OD₆₀₀ verileri ANOVA testi kullanılarak analiz edilmiş ve analiz sonucunda etkileşim göstermesi beklenen hedef transformantlar ve kontrol transformantlar arasında anlamlı bir fark olmadığı sonucuna varılmıştır. p53 plazmitinin (pDEST32-p53 GAL4 DBD) olduğu bütün transformantlarda eşit LacZ aktivitesi ölçülmüştür. Yani p53 proteini GAL4 AD ile füzyon halindeyken potansiyel partner proteinler olmadan da LacZ geninin ifadesini sağlayabildiği görülmüştür. N-terminal tarafında GAL4 DNA bağlanma bölgesiyle füzyon halinde olan p53 proteini (pDEST32-p53 GAL4 DBD) maya hücrelerindeki GAL4 promotörü altındaki LacZ genini ifade edebilmiştir. Bu durum muhtemel GAL4-DBD ile hedef DNA bölgesine bağlanan p53 proteinin, kendi intrinsik transkripsiyon aktivasyon özelliğine bağlı olarak GAL4 AD 'e ihtiyaç duymadan gerçekteşen bir LacZ ifadesini düşündürmektedir. Beta galaktozidaz analizlerini teyit etmek için maya ikili hibrit hücrelerinin ilave bir özelliğinden faydalanıp aynı transformantlara raporter gen aktivite testi yapılmıştır. Test sonucu ile elde edilen analizlerini destekler nitelikte kontrol grubu ile aralarında anlamlı fark olmadığı görülmüştür.

İnsan p53 geni ile hedef genler arasında protein-protein etkileşimini tespit etmek için kullandığımız ikinci yöntem ise Co-IP'dir. Co-IP, hedef proteine bağlı proteinleri dolaylı şekilde yakalama amacıyla hedef proteinin spesifik antikörleri kullanılarak fizyolojik olarak ilgili protein-protein etkileşimlerini tanımlamak için uygun bir tekniktir. Co-IP deneyleri için daha önce elde edilmiş olan ve p53 ile etkileştiği düşünülen APTX, SACM1L ve METAP1 genlerini stabil olarak ifade eden MCF 10A hücre hatları kullanılmıştır. Co-IP deneyinin gerçekteştirilmesi için ise ticari olarak satın alınmış olan Pierce Co-İmmunopresipitasyon Kiti içerisinde yer alan resin içerikli kolonlara p53 antikörü sabitlenmiştir. Kolona sabitlenen p53 antikörü ilgili genleri içeren hücre lizatlarıyla inkübe edilip kit protokolü uygulanmıştır. Daha sonra p53 ile etkileşim gösterme durumu Western blotlama ile analiz edilmiştir. Analiz sonucunda normal büyüme şartlarındaki MCF 10A hücrelerinde p53 ile ilgili genlerin arasında direkt bir etkileşime ait veri saptanamamıştır. İlgili genlerin etkileşimlerini daha net belirtebilmek için MCF 10A hücrelerini strese soktuktan sonra benzer analizler yapılabilir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Mutant haldeki p53 tümör süpresör proteini, yüksek mutasyon sıklığı ve kanser oluşumunu tetiklemesindeki kritik rolü nedeniyle anti kanser tedavisi için öncelikli bir hedef haline gelmiştir. Genom bütünlüğünü doğrudan veya dolaylı olarak etkileyen stres koşulları, p53 aktivasyonuna yol açmaktadır. Hücre döngüsünün durması, DNA onarımı veya apoptozdan sorumlu genlerinin ekspresyonu sonucunda kanser oluşumu ve ilerlemesi, p53 geni sayesinde baskılanmaktadır. Daha önce yapılan maya tabanlı ön çalışmada p53 aktivitesini etkileyen antioksidan genler araştırılmış ve üç maya antioksidan gen mutantının (HNT3, SAC1 ve MAP1), p53 aktivitesini etkilediği tespit edilmiştir. Bu üç genin insan homologları (APTX, SACM1L ve METAP1) maya ve insan hücre kültür modeli kullanılarak insan p53 proteini ile muhtemel olan protein-protein interaksyonu tespit edilmesi amaçlanmıştır.

Maya ve insan hücre kültürlerinde, belirlenen üç genin insan homologları (APTX, SACM1L ve METAP1) ile p53 proteini arasındaki olası protein-protein interaksyonunun tespit edilmesi amaçlanmıştır.

Maya ikili hibrit yöntemi kullanılarak gerçekleştirilen protein-protein etkileşim analizlerinde etkileşim göstermesi beklenen hedef transformantlar ve kontrol transformantlar arasında p53-APTX transformantında anlamlı bir fark olduğu diğer hedef proteinler arasında anlamlı bir fark olmadığı sonucuna varılmıştır. Co-IP analizlerinde ise daha önce yapılmış olan bir çalışmada p53-APTX ilişkisi gösterilmesine karşın; normal büyüme şartları altındaki MCF 10A hücrelerinde gerçekleştirilen çalışmamızda, p53 ile hedef genlerin arasında direkt bir etkileşim gözlemlenememiştir.

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar göz önünde bulundurularak, insan p53 proteini ile hedef proteinler arasında direkt olarak protein-protein etkileşimi olmadığı görülmüştür. Olası etkileşimleri daha net belirleyebilmek için stres şartları altında ilgili genleri içeren hücrelere, benzer analiz ve deneylerin yapılmasına ihtiyaç vardır. Bu deneyler sonucunda p53 protein yolağı ile etkileşimde olduğu bulunan genlerin p53 yolağını nasıl modüle ettiği, p53 hedef genlerinin aktivasyon durumları, apoptoz, hücre döngüsü ve hücre bölünmesi incelenerek yeni proteinler tanımlanabilir ve p53 regülasyonu için yeni yollar önerilmesine yol gösterici olabilir.

KAYNAKLAR

- 1 Lane DP, Crawford LV. T antigen is bound to a host protein in SY40-transformed cells. *Nature* 1979, 278: 261–3.
- 2 Lane DP. The Guardian of the Genome: p53. *Nature* 1992, 358: 15–6.
- 3 Zilfou JT, Lowe SW, Joerger AC. Tumor Suppressive Functions of p53. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009, 1: 1-12.
- 4 Sykora P, Croteau DL, Bohr VA, Wilson DM. Aprataxin localizes to mitochondria and preserves mitochondrial function. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011,108: 7437–42.
- 5 Wang J, Chen J, Enns CA, Mayinger P. The First Transmembrane Domain of Lipid Phosphatase SAC1 Promotes Golgi Localization. *PlosOne* 2013, 8:1-9.
- 6 Hu X, Addlagatta A, Lu J, Matthews BW, Liu JO. Elucidation of the function of type 1 human methionine aminopeptidase during cell cycle progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006, 103: 18148-53.
- 7 Gueven N, Becherel OJ, Kijas AW. Aprataxin , a novel protein that protects against genotoxic stress. *Human Molecular Genetics* 2004, 13 :1081–93.
- 8 Lane DP. p53, guardian of the genome. *Nature* 1992, 108: 15-16.
- 9 Levine AJ, Finlay CA, Hinds PW, Drive M, Carolina N. P53 is a Tumor Suppressor Gene Commentary. *Cell* 2004, 116: 67–69.
- 10 Joruz SM, Bourdon J. p53 Isoforms : Key Regulators of the Cell Fate Decision. *Cold Spring Harbor Laboratory Perspectives in Medicines* 2016, 39: 1-20.
- 11 Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature* 2000, 408: 307–10.
- 12 Meek DW. Tumour suppression by p53 : a role for the DNA damage response?. *Nat Rev Cancer* 2009, 9: 714–23.
- 13 Hainaut P, Hollsteln M. p53 and Human Cancer: The First Ten Thousand Mutations. *Cancer Research* 2000, 81-137.
- 14 Lu X. p53: A heavily dictated dictator of life and death. *Current Opinion in Genetics & Develeopment* 2005, 15: 27-33.
- 15 Duffy MJ, Synnott NC, Crown J. Mutant p53 as a target for cancer treatment. *Eur J Cancer* 2017, 83: 258–65.
- 16 Olivier M, Hollstein M, Hainaut P. TP53 Mutations in Human Cancers: Origins,

- Consequences, and Clinical Use. *Cold Spring Harbor Laboratory Perspectives in Medicines* 2010, 2: 1–17.
- 17 Khazanov N, Levy Y. Sliding of p53 along DNA can be modulated by its oligomeric state and by cross-talks between its constituent domains. *J Mol Biol* 2011, 408: 335–55.
 - 18 Retzlaff M, Rohrberg J, Küpper NJ, Lagleder S, Bepperling A, Manzenrieder F. The Regulatory Domain Stabilizes the p53 Tetramer by Intersubunit Contacts with the DNA Binding Domain. *J Mol Biol* 2013, 425: 144–55.
 - 19 Joerger AC, Fersht AR. Structural Biology of the Tumor Suppressor p53. *Annual Review of Biochemistry* 2008, 77: 557-82.
 - 20 Harris CC. Structure and Function of the p53 Tumor Suppressor Gene: Clues for Rational Cancer Therapeutic Strategies. *Journal of the National Cancer Institute* 1996, 88: 1442-55.
 - 21 Chen Y, Dey R, Chen L. Article Crystal Structure of the p53 Core Domain Bound to a Full Consensus Site as a Self-Assembled Tetramer. *Struct Des* 2010, 18: 246–56.
 - 22 Lahav G, Rosenfeld N, Sigal A, Geva-Zatorsky N, Levine AJ, Elowitz MB, Alon U. Dynamics of the p53-Mdm2 feedback loop in individual cells. *Nature Genetics* 2004, 36: 147–50.
 - 23 Ashcroft M, Vousden KH. Regulation of p53 stability. *Oncogene* 1999, 18: 7637–43.
 - 24 Kastan MIB, Zhan Q, El-deiry WS, Carrier F, Jacks T, Walsh WV, Plunkett BS, Vogelstein B, Fornace AJ. A Mammalian Cell Cycle Checkpoint Pathway Utilizing p53 and GADD45 Is Defective in Ataxia-Telangiectasia. *Cell* 1992, 71: 587–97.
 - 25 Vousden KH, Woude GF Vande. The ins and outs of p53. *Nature Cell Biology* 2000, 2: 178–80.
 - 26 Roth J, Dobbstein M, Freedman DA, Shenk T, Levine AJ. Nucleo-cytoplasmic shuttling of the hdm2 oncoprotein regulates the levels of the p53 protein via a pathway used by the human immunodeficiency virus rev protein. *The Embo Journal* 1998, 17: 554–64.
 - 27 Moll UM, Petrenko O. The MDM2-p53 Interaction. *Molecular Cancer Research* 2003, 1: 1001–8.

- 28 Freedman DA, Wu L, Levine AJ. Functions of the MDM2 oncoprotein. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 1999, 55: 96–107.
- 29 Baran Y, Kanser Moleküler Biyolojisi. İçinde: Kucuksayan H, Akca H (editörler). *Tümör baskılayıcı genler*, 4. Baskı Ankara, Kısayol Yayıncılık, 2018 151-160.
- 30 Kastan MB, Canman CE, Leonard CJ. P53, cell cycle control and apoptosis: Implications for cancer. *Cancer and Metastasis Reviews* 1995, 14: 3–15.
- 31 Zhan Q, Carrier F, Fornace AJ. Induction of Cellular p53 Activity by DNA-Damaging Agents and Growth Arrest. *Molecular And Cellular Biology* 1993, 13: 4242–50.
- 32 Agarwal ML, Agarwal A, Taylor WR, Stark GR. p53 controls both the G2 / M and the G1 cell cycle checkpoints and mediates reversible growth arrest in human fibroblasts. *Cell Biology* 1995, 92: 8493–7.
- 33 Wang X, Simpson ER, Brown KA. p53: Protection against Tumor Growth beyond Effects on Cell Cycle and Apoptosis. *Cancer Research* 2015, 75: 5001-7.
- 34 Tumbale P, Schellenberg MJ, Mueller GA, Fairweather E, Watson M, Little NJ, Krahn J, Waddell I, London RE, Williams RS. Mechanism of APTX nicked DNA sensing and pleiotropic inactivation in neurodegenerative disease. *The EMBO Journal* 2018, 37: 1–17.
- 35 NCBI Gene: SACM1L SAC1 like phosphatidylinositide phosphatase [Homo sapiens (human)]
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/22908> 7 Nisan 2020.
- 36 Pahuja KB, Wang J, Blagoveshchenskaya A. Phosphoregulatory protein 14-3-3 facilitates SAC1 transport from the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015, 112: 199–206.
- 37 Chen S, Vetro J A, Chang YH. The Specificity in vivo of two distinct methionine aminopeptidase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2002, 398: 87-93.
- 38 Kishor C, Arya T, Reddi R, Chen X, Saddanapu V, Marapaka AK, Gumpena R, Ma D, Liu JO, Addlagatta A. Identification , biochemical and structural evaluation of species-specific inhibitors against Type I methionine aminopeptidases. *J. Med. Chem.* 2013, 56: 5295–5305.
- 39 SİnoBiological: METAP1 Protein Overview: Sequence, Structure, Function and

Protein Interaction

<https://www.sinobiological.com/resource/metap1/proteins>. 7 Nisan 2020.

- 40 Keskin O, Gursoy A, Ma B, Nussinov R, Aviv T. Principles of Protein – Protein Interactions : What are the Preferred Ways For Proteins To Interact ? *Chem. Rev.* 2008, 108: 1225–1244.
- 41 Moscetti I, Cannistraro S, Bizzarri AR. Surface Plasmon Resonance Sensing of Biorecognition Interactions within the Tumor Suppressor p53 Network *Sensors(Basel)* 2017, 17: 1-18
- 42 Dimauro S, Hirano M. Coenzyme Q deficiency and cerebellar ataxia associated with an aprataxin mutation. *American of Neurology* 2005, 64: 539–42.
- 43 Ber I Le, Dubourg O, Benoist J, Mochel F, Koenig M, Brice A, Lombes A, Dürr A. Muscle coenzyme Q10 deficiencies in ataxia with oculomotor apraxia. *American of Neurology* 2007, 68: 295–8.
- 44 Kuusk A, Boyd H, Chen H, Ottmann C. Papers Small-molecule modulation of p53 protein-protein interactions. *Biological Chemistry* 2019, 10: 1437-4315.
- 45 Girardini JE, Napoli M, Piazza S, Rustighi A, Marotta C, Radaelli E, Capaci V, Jordan L, Quinlan P, Thompson A, Mano M, Rosato A, Crook, T, Scanziani E, Means AR, Lozano G, Schneider C, Sal GD. A Pin1/Mutant p53 Axis Promotes Aggressiveness in Breast Cancer. *Cancer Cell* 2011, 20: 79–91.

EKLER

EK-1. Özgeçmiş

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Kübra Durmuş

Doğum Yeri : Malatya

Doğum Tarihi : 01.01.1994

İletişim : kubradurmus44@gmail.com


Eğitim Bilgileri

2017-2020: İnönü Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Yüksek Lisans

2013-2017: Uşak Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik, Lisans

EK.2. Etik Kurul Kararı

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÖNETİM KURULU KARARI

OTURUM TARİHİ	OTURUM SAYISI	TOPLANTI SAYISI
21.11.2018	50	2018/50-09-01
<p>Enstitümüz Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı yüksek lisans programı öğrencilerinden tez konuları belirlenen Kübra DURMUŞ, Yılmaz SUSUZ ile Salman KOÇ'un tez çalışmaları için etik kurul onayına gerek olmadığına ilişkin Anabilim Dalı Başkanlığının 06.11.2018 tarih ve E.84999 sayılı teklif yazısı ile 31.10.2018 tarihli ortak doktora tez sınav tutanağı görüşüldü.</p> <p>Yapılan görüşmelerden sonra; Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı yüksek lisans programı öğrencilerinden Kübra DURMUŞ, Yılmaz SUSUZ ile Salman KOÇ'un tez çalışmalarında, etik kurul kararı gerektirecek insan yada hayvan unsurları içermediğinden etik kurul onayına gerek olmadığına ilişkin tekliflerin kabulüne, konunun ilgili Anabilim Dalı Başkanlığına bildirilmesine oybirliği ile karar verildi.</p>		
		

BAŞKAN	Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ Enstitü Müdürü	İmza
--------	------------------------------------------	------

ÜYELER

Dr. Öğr. Üyesi Zekeriya ÇALIŞKAN Müdür Yardımcısı	İmza	Prof.Dr. Rukuye AYLAZ Üye	İmza
Dr. Öğr. Üyesi Mustafa CANBOLAT Müdür Yardımcısı	İmza	Dr. Öğr. Üyesi Narin SADIKOĞLU Üye	İmza
Prof. Dr. Davut ÖZBAĞ Üye	İmza	RAPORTÖR Sultan ÖZKAN Enstitü Sekreter V.	İmza