



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KERATİ NOSİT FARKLILAŞMASINDA ROL
ALAN RESEPTÖRLE ETKİLEŞEN SERİN
TREONİN KİNAZ 4 (RIPK4) VE KERATİN 14
(KRT14) PROTEİNLERİ ARASINDAKİ
ETKİLEŞİMİN ARAŞTIRILMASI**

Ceren SÜMER

DOKTORA TEZİ

Dr. Öğr. Üyesi Tuba DİNÇER

TRABZON-2018



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KERATİ NOSİT FARKLILAŞMASINDA ROL
ALAN RESEPTÖRLE ETKİLEŞEN SERİN
TREONİN KİNAZ 4 (RIPK4) VE KERATİN 14
(KRT14) PROTEİNLERİ ARASINDAKİ
ETKİLEŞİMİN ARAŞTIRILMASI**

Ceren SÜMER

DOKTORA TEZİ

Dr. Öğr. Üyesi Tuba DİNÇER

TRABZON-2018

ONAY

Bu tez Doktora Tezi Standartlarına Uygun Bulunmuştur

Prof. Dr. Ersan KALAY

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı

Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Doktora öğrencisi Ceren SÜMER'in hazırladığı "KERATİNOSİT FARKLILAŞMASINDA ROL ALAN RESEPTÖRLE ETKİLEŞEN SERİN TREONİN KİNAZ 4 (RIPK4) ve KERATİN 14 (KRT14) PROTEİNLERİ ARASINDAKİ ETKİLEŞİMİN ARAŞTIRILMASI" başlıklı tez KTÜ Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman Dr. Öğr. Üyesi Tuba DİNÇER

Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

Dr. Öğr. Üyesi Tuba DİNÇER

Prof. Dr. Ersan KALAY

Doç. Dr. İsmail ABİDİN

Prof. Dr. Çetin KOCAEFE

Prof. Dr. Uygur Halis TAZEBAY

Tarih: / /2018

Bu tez KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun .../.../.... tarih ve ... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Ersan KALAY

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzu standartlarına uygun olarak yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarda patent ve telif haklarımı ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

...../...../.....

Ceren SÜMER

İthaf

Doktora tezimi, bana daima inanan, destek ve cesaret veren, umutsuz anlarımda bir pırıltı yaratan ve sonsuz sevgi gösteren çok kıymetli aileme ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışmamın gerçekleştirilmesinde değerli bilgi ve tecrübelerini paylaşan, her sorun yaşadığımda yol gösteren, yardımlarını, hoşgörüsünü ve güvenini esirgemeyen, en umutsuz anımda elimden tutan, samimiyetini esirgemeyen değerli tez danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Tuba DİNÇER'e teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Tüm eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, yardımlarını, desteğini ve katkılarını esirgemeyen, bu çalışmamın gerçekleşmesini mümkün kılan Anabilim Dalı Başkanımız sayın Prof. Dr. Ersan KALAY'a sonsuz teşekkür ederim. Eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen sayın hocalarım Prof. Dr. Figen CELEP EYÜPOĞLU'na, Dr. Öğr. Üyesi Bayram TORAMAN'a, Dr. Öğr. Üyesi Gökhan YILDIZ'a teşekkür ederim. Çalışmalarımın ilerlemesinde yardım ve katkılarda bulunan sayın hocam Doç. Dr. İsmail ABİDİN'e teşekkür ederim.

En zor ve stresli zamanlarımda motive edici desteklerini hissettiren, doktora eğitimimin her aşamasında yardımlarını esirgemeyen, zorlu süreçleri paylaştığım, birlikte çalışmaktan keyif aldığım, bana aile gibi olan ve daha fazla başarılı olacaklarına inandığım çok değerli arkadaşlarım Arş. Gör. Gülden BUDAK'a, Arş. Gör. Ceren SARI'ya, Arş. Gör. İdris ER'e, Asiye Büşra BOZ ER'e en içten ve samimi teşekkürlerimi sunarım. Şefkatini esirgemeyen Uzm. Tülay KÖSEAHMET'e, desteklerini esirgemeyen sevgili diğer bölüm arkadaşlarıma tüm samimiyetimle teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca her kararımdaya desteklerini hep arkamda hissettiren, sahip olduğum her şeyi borçlu olduğum, iyiyi, doğruyu, saygıyı ve sevgiyi öğreten, şefkatini hiçbir koşulda esirgemeyen, emeklerini asla ödeyemeyeceğim her şeyden kıymetli değerli annem Nurhayat SÜMER, babam Kutay SÜMER ve kardeşim Hasan Cemre SÜMER'e en içten ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu araştırmayı 6717 kodlu proje ile destekleyen Karadeniz Teknik Üniversitesi BAP Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim.

Ceren SÜMER

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
BEYAN	
İthaf	
TEŞEKKÜR	
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
RESİMLER DİZİNİ	xi
KISALTMA, SİMGE ve FORMÜLLER DİZİNİ	xii
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	4
4.1. Deri	4
4.2. Epidermis ve Epidermal Farklılaşma	4
4.2.1. Epidermal Homeostazi	6
4.2.2. Epidermal Farklılaşmanın Temel Regülatörü p63	7
4.3. Ektodermal Gelişim Bozuklukları: Bartsocas Papas Sendromu	8
4.4. Reseptörle Etkileşen Protein Kinaz Ailesi	10
4.4.1. RIPK4 ve Fonksiyonu	11
4.5. Hücre İskelet Bileşeni: Keratin Ailesi	14
4.5.1. Keratin 14	16
5. GEREÇ ve YÖNTEM	19
5.1. Gereç	19
5.1.1. Kimyasallar	19
5.1.2. DNA ve Protein Markırlar	20
5.1.3. Antikorlar	20
5.1.3.1. Primer Antikorlar	20
5.1.3.2. Sekonder Antikorlar	21
5.1.4. Kitler	21
5.1.5. Cihazlar	21

5.1.6. Sarf Malzemeler	22
5.1.7. Bakteri Suşları	23
5.1.8. Kullanılan Vektörler	23
5.1.9. Solüsyon, Tampon ve Besiyerleri	24
5.1.9.1. Bakteri İçin Kullanılan Besiyerleri	24
5.1.9.2. Bakteri İndüklemeye Kullanılan Ajanlar	24
5.1.9.3. Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Çözeltiler	25
5.1.9.4. Protein yürütme (SDS-PAGE) Solüsyonları	25
5.1.9.5. İmmüno blot Solüsyonları	26
5.1.9.6. İmmüno presipitasyonda Kullanılan Solüsyonlar	27
5.1.9.7. İmmüno floresanda Kullanılan Solüsyonlar	29
5.1.9.8. Memeli Hücre Kültüründe Kullanılan Solüsyonlar	29
5.1.9.9. Transfeksiyon Solüsyonları	29
5.1.9.10. GST Pull Down için Kullanılan Solüsyonlar	30
5.2. Yöntem	31
5.2.1. RIPK4 ve KRT14 Genlerinin Klonlanması	31
5.2.1.1. RNA izolasyonu	32
5.2.1.2. RNA'dan cDNA Sentezi	32
5.2.1.3. Spektrofotometrik Yöntemle DNA ve RNA'nın Kantitatif ve Kalitatif Analizi	33
5.2.1.4. KRT14'ün PCR ile Çoğaltılması	33
5.2.1.5. DNA Analizleri için Agaroz Jel Elektroforezi	34
5.2.1.6. Çoğaltılan KRT14'ün Jelden Pürifikasyonu	35
5.2.1.7. KRT14 Giriş Vektörünün Oluşturulması	35
5.2.1.8. KRT14 Ekspresyon Vektörlerinin Oluşturulması	36
5.2.1.9. KRT14 Klonlarının Dizilenmesi	37
5.2.2. Bakteri Kültür Teknikleri	38
5.2.2.1. E coli DH5α Suşuna Plazmit (Vektör) Transformasyonu	38
5.2.2.2. Bakteriden Plazmit İzolasyonu	38
5.2.2.3. Bakterilerin IPTG ve L-Arabinos ile İndüklenmesi	39
5.2.2.4. Bakterilerin Patlatılması	40
5.2.3. Hücre Kültürü Teknikleri	40
5.2.3.1. Hücrelerin Çözülmesi	40

5.2.3.2. Hücrelerin Pasajlanması	40
5.2.3.3. Hücrelerin Dondurulması	41
5.2.3.4. HEK293 Hücrelerinin Kalsiyum Fosfat Yöntemi ile Transfeksiyonu	41
5.2.3.5. HeLa Hücrelerinin Dreamfect Yöntemi İle Transfeksiyonu	41
5.2.4. Protein Analiz Yöntemleri	42
5.2.4.1. Hücre Lizatı Eldesi	42
5.2.4.2. BCA Testi ile Protein Konsantrasyonunun Ölçülmesi	42
5.2.4.3. İmmüno blot Yöntemi	43
5.2.5. İmmünopresipitasyon Yöntemi	45
5.2.5.1. Protein G Agaroz Boncukların Hazırlanması	45
5.2.5.2. Hücre Lizatının Ön Temizliği	46
5.2.5.3. İmmünopresipitasyon Yöntemi	46
5.2.5.4. Endojen İmmünopresipitasyon Yöntemi	46
5.2.6. İmmüno floresan Yöntemi	47
5.2.7. GST Pull Down Yöntemi	48
5.2.7.1. Bakteri Lizatının Hazırlanması	48
5.2.7.2. GST Trap Boncukların Hazırlanması	48
5.2.7.3. Pull Down Yöntemi	49
6. BULGULAR	50
6.1. RIPK4 ve KRT14 Ekspresyon Vektörlerinin Oluşturulması	50
6.2. KRT14'ün RIPK4 ve RIPK4 Domainleri ile Etkileşiminin Belirlenmesi	50
6.2.1. RIPK4'ün Kinaz Aktivitesinin KRT14 ile Etkileşimine Etkisinin Araştırılması	52
6.2.2. RIPK4 ve KRT14 Etkileşiminin Endojen Olarak Gösterilmesi	53
6.3. RIPK4 ve KRT14 Proteinlerinin Hücre İçi Yerleşimlerinin Belirlenmesi	55
6.3.1. RIPK4 ile KRT14'ün Hücre İçi Birlikte Yerleşimlerinin ve RIPK4'ün Kinaz Aktivitesinin Yerleşime Etkisinin Belirlenmesi	56
6.3.2. RIPK4'ün Domainleri ile KRT14'ün Hücre İçi Birlikte Yerleşimlerinin Belirlenmesi	57
6.4. RIPK4 ve KRT14'ün Etkileşiminin in vitro Pull Down Yöntemiyle Gösterilmesi	59
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	60
8. KAYNAKLAR	67
9. ÖZGEÇMİŞ	77

TABLULAR DİZİNİ

Tablo		Sayfa
Tablo 1	cDNA sentezi için hazırlanan kalıp-primer karışımı	32
Tablo 2	cDNA sentez reaksiyonu içeriği	33
Tablo 3	KRT14 cDNA larının oluşturulmasında kullanılan primer çifti	34
Tablo 4	Pwo enzimi için kullanılan PCR koşulları	34
Tablo 5	Gateway Sistemi BP reaksiyonu içeriği	35
Tablo 6	Gateway Sistemi LR reaksiyonu içeriği	36
Tablo 7	RIPK4 ve KRT14'ün LR reaksiyonu ile klonlandığı varış vektörleri	36
Tablo 8	KRT14 giriş ve ekspresyon vektörlerinin dizilenmesinde kullanılan primerler	37
Tablo 9	Dizileme reaksiyonu için PCR karışımı	37
Tablo 10	SDS-PAGE ayırma jeli içeriği	43
Tablo 11	SDS-PAGE yükleme jeli içeriği	44

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil		Sayfa
Şekil 1	Epidermisin yapısı	6
Şekil 2	Embriyogenez boyunca epidermisin gelişiminin şematik gösterimi	7
Şekil 3	Aslan Tip Multiple Pterygium sendromlu (Bartsocas-Papas sendromu) hasta resmi	9
Şekil 4	RIPK4 üzerinde tanımlanan mutasyonların şematik gösterimi	9
Şekil 5	RIP kinaz ailesi üyesi proteinleri ve fonksiyonel bölgelerinin şeması	11
Şekil 6	RIPK4 yabanıl tip ve nakavt fare fenotipinin karşılaştırılması.	12
Şekil 7	Keratinlerin yapısal şeması	15
Şekil 8	Keratin döngüsünün şematik olarak gösterimi	15
Şekil 9	Heterodimer oluşturmuş insan KRT5 ve KRT14 proteinlerinin ve fonksiyonel bölgelerinin şeması	16
Şekil 10	İnsan RIPK4 proteininin fonksiyonel bölgelerinin ve klonlanan domainlerinin şematik olarak gösterilmesi	31
Şekil 11	İnsan KRT14 proteininin ve fonksiyonel bölgelerinin şeması	33
Şekil 12	IP sonucunda bulunan RIPK4 ve KRT14'ün etkileşim şeması	54

RESİMLER DİZİNİ

Resim		Sayfa
Resim 1	RIPK4 ve domainleri ile KRT14 etkileşiminin immünoresipitasyon yöntemiyle gösterilmesi	52
Resim 2	RIPK4 K51R ve KRT14 etkileşiminin immünoresipitasyon ile gösterilmesi	53
Resim 3	RIPK4 ve KRT14 etkileşiminin endojen immünoresipitasyon ile gösterilmesi	54
Resim 4	RIPK4, RIPK4'ün domainleri, RIPK4 K51R ve KRT14'ün hücrel yerleşimlerinin immünofloresan yöntemiyle analizi	56
Resim 5	RIPK4 ve RIPK4 K51R ile KRT14'ün hücre içi birlikte yerleşiminin immünofloresan ile analizi	57
Resim 6	RIPK4 domainleri ve KRT14'ün hücre içi birlikte yerleşiminin immünofloresan ile analizi	58
Resim 7	RIPK4 ve KRT14'ün doğrudan etkileşiminin GST-pull down yöntemiyle gösterilmesi	59

KISALTMA, SİMGE ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

APS	Amonyum persülfat
BPS	Bartsocas-Papas Sendromu
Cy3	Cyanin 3
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DVL2	Dishvelled 2
EBS	Epidermolizis Bullosa Simplex
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Etilden diamin tetra asetik asit
FBS	Fetal bovin serum
FL	Full length-tam uzunlukta
g	Gram
GST	Glutasyon S transferaz
HaCaT	İnsan keratinosit hücre hattı
HEK293	İnsan embriyonik böbrek hücre hattı
HeLa	Henrietta Lacks servikal kanser hücre hattı
His	Histidin
IB	İmmünoblot
IF	İmmünfloresan
IKK	İnhibitör Kappa β kinaz
IP	İmmünopresipitasyon
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
IRF6	İnterferon regülatör faktörü 6
kDa	Kilodalton
KRT5	Keratin 5
KRT14	Keratin 14
LB	Luria Bertani
M	Molar
MA	Moleküler ağırlık
NaPPi	Sodyum pirofosfat

NaVan	Sodyum orthovanadate
NF$\kappa$$\beta$	Nüklear faktör kappa β
NP-40	Nonidet P-40
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
Pen	Penisilin
PD	Pull down
PFA	Paraformaldehit
PKP1	Plakophilin 1
PMSF	Fenilmetilsülfonil florür
PPS	Popliteal Pterygium Sendromu
RIP	Reseptör ile etkileşen protein kinaz
RIPK4	Reseptörle Etkileşen Serin Treonin Kinaz
RNA	Ribonükleik asit
Ser/Thr	Serin/treonin kinaz
Strep	Streptomisin
TGFβ	Transforme edici büyüme faktörü β
TNFR1	Tümör nekroz faktör reseptör 1
TRAF	TNF reseptör ilişkili faktörler
WNT	Wingless-Type MMTV Integration Site Family
Simgeler	
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
Δ	Delta
κ	Kappa
μ	Mikro
μm	Mikron
Formüller	
NaCl	Sodyum klorür
NAF	Sodyum florür

1. ÖZET

Keratinosit Farklılaşmasında Rol Alan Reseptörle Etkileşen Serin Treonin Kinaz 4 (RIPK4) ve Keratin 14 (KRT14) Proteinleri Arasındaki Etkileşimin Araştırılması

Epidermal farklılaşma dış çevreye karşı koruyucu bir bariyer görevi sağlayan epidermin oluşumu için gereklidir. Eksikliği epidermal farklılaşma bozuklukları ile ilişkilendirilmiş RIPK4 proteininin bu süreçteki fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir. RIPK4'ün epidermal farklılaşmadaki rolünün belirlenmesine yönelik yapılan çalışmalarımız kapsamında insan keratinosit cDNA kütüphanesi RIPK4'ün yem olarak kullanıldığı büyük ölçek maya ikili hibrit yöntemiyle taranmıştır. Tarama sonucunda epidermal farklılaşmada kritik bir öneme sahip olan RIPK4'ün epidermin bazal tabaka markörü olan KRT14 proteini ile etkileştiği ön verisine ulaşılmıştır. Bu ön veri bu iki proteinin bu süreçte hücrel bir fonksiyonu yerine getirmek için bir araya gelebileceği hipotezini ortaya çıkarmıştır. Bu çalışma ile amaçlanan maya ikili hibrit sonucunda elde edilen RIPK4-KRT14 etkileşiminin immünopresipitasyon, immünofloresan ve in vitro pull down yöntemleri kullanılarak doğrulanması ve detaylı olarak analiz edilmesidir. İmmünopresipitasyon deney sonuçlarımız, RIPK4'ün KRT14 ile etkileştiğini doğrulamakla birlikte, bu etkileşimin RIPK4'ün N terminalinde bulunan kinaz domaini üzerinden gerçekleştiğini gösterdi. RIPK4'ün KRT14 ile sitoplazmada ve belirgin olarak çekirdeği saran yapıda birlikte yerleştiğini ortaya çıkaran immünofloresan deney sonuçlarımız ise iki protein arasında tanımladığımız etkileşimi destekler nitelikteydi. Bunun yanında, bakteride ürettirilen RIPK4 ve KRT14 proteinlerini kullanarak gerçekleştirdiğimiz in vitro pull down analizi, bu iki proteinin aracı bir protein olmadan da etkileştiğini ortaya çıkardı. Sonuçlarımız ile epidermal farklılaşma sürecinin iki önemli proteini RIPK4 ve KRT14'ün etkileştiği ilk kez gösterilmiş oldu.

Anahtar Sözcükler: GST pull down, immünofloresan, immünopresipitasyon, KRT14, RIPK4

2. SUMMARY

Investigation of Interactions Between Receptor Interacting Serine/Threonine Protein Kinase 4 (RIPK4) and Keratin 14 (KRT14) Proteins That Have A Role in Keratinocyte Differentiation

Epidermal differentiation is required for generation of epidermis that provides a protective barrier against environment. The function of RIPK4 gene, whose deficiency is associated with severe epidermal differentiation related abnormalities, is not fully known yet. Thereby, to investigate the role of RIPK4 in epidermal differentiation, human keratinocyte cDNA library was screened with large scale yeast two hybrid using RIPK4 kinase domain as a bait and it was found that RIPK4 interacted with KRT14 which is a basal layer marker of epidermis. Identified interaction between RIPK4 and KRT14 raised the hypothesis that these two proteins might come together to perform a cellular function during epidermal differentiation process. The aim of this study is to verify and analyse the RIPK4-KRT14 interaction obtained from yeast two hybrid assay by using immunoprecipitation, immunofluorescence and in vitro pull down methods in detail. Our immunoprecipitation assay results showed that RIPK4 interacted with KRT14 and this interaction was mediated by the kinase domain located at the N terminus of RIPK4. The results of immunofluorescence assay, which showed the co-localization of RIPK4 and KRT14 in the cytoplasm particularly on the structure surrounding the nucleus, supported the interaction result identified by immunoprecipitation assay. Additionally, in vitro pull down analysis that was performed by using the RIPK4 and KRT14 proteins produced in bacteria revealed that the interaction between RIPK4 and KRT14 was direct. With our results the interaction between RIPK4 and KRT14, which are the two important proteins of epidermal differentiation, was demonstrated for the first time.

Keywords: GST pull down, immunofluorescence, immunoprecipitation, KRT14, RIPK4

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Epidermis; mekanik travmalara, kimyasal ajanlara ve patojenlere karşı koruyucu bir bariyerdir. Bu bariyerin devamlılığı bazal tabakadaki hücrelerin çoğalarak bazal tabakayı oluşturması, hücre döngüsünden çekilerek yukarıya doğru göç ederek farklılaşması ve en sonunda ölümlere uğraması arasındaki hassas bir denge olan epidermal homeostazi ile sağlanır. Epidermal homeostazi ve farklılaşmadaki bozukluklar ektodermden köken alan organlarda gelişimsel anomalilerle sonuçlanır (1). Eksikliğinde epidermal farklılaşmanın bozulduğu RIPK4 proteininin kinaz domaininde bulunan mutasyonların proteinin kinaz aktivitesini etkileyerek şiddetli ektodermal yapısal anomalilerle karakterize Bartsocas Papas sendromuna neden olduğu ilk defa bölümümüzdeki çalışmalarla ortaya çıkarılmıştır (2). RIPK4'ün epidermal farklılaşmadaki rolünün moleküler mekanizmasının aydınlatılmasına katkı sağlamak amacıyla RIPK4'ün kinaz domaini yem olarak kullanılarak insan keratinosit cDNA kütüphanesinin tarandığı maya ikili hibrit çalışmamız (BAP 9749) epidermin bazal tabaka markörü olan KRT14'ün RIPK4 ile etkileştiği ön verisini ortaya çıkarmıştır. RIPK4 ve KRT14'ün etkileştiğine dair herhangi bir veri bulunmamasıyla birlikte epidermal farklılaşma sürecinin ana transkripsiyon faktörü olan p63 hem *KRT14* hem de *RIPK4* genlerinin ekspresyonlarını indüklemektedir (3, 4). RIPK4 ve KRT14'ün her ikisi de epidermin bazal tabakasında ifade edilmektedir. Bunun yanısıra, RIPK4 ve KRT14'ün bir dezmozomal protein olan PKP1 ile etkileştiği birbirinden bağımsız çalışmalarda gösterilmiştir (5, 6). Tüm bu veriler RIPK4 ve KRT14'ün epidermal farklılaşma esnasında birlikte çalışabileceğine işaret etmektedir.

Projemiz ile amaçlanan KRT14 ve RIPK4 arasında maya ikili hibrit çalışmasıyla bulduğumuz etkileşim ön verisinin doğrulanması ve detaylı olarak analiz edilmesidir. Bu amaca yönelik olarak, KRT14 ve RIPK4 arasındaki bu etkileşimin memeli hücrelerinde immünopresipitasyon (IP) ile doğrulanması ve etkileşimden sorumlu RIPK4 domaininin belirlenmesi ilk hedefimizdir. İkinci aşamayı IP sonucumuzu desteklemek amacıyla iki proteinin hücre içi yerleşiminin immünofloresan (IF) yöntemi ile incelenmesi oluştururken son olarak da iki protein arasındaki etkileşimin doğrudan olup olmadığının bakteri hücrelerinde ürettirilen RIPK4 ve KRT14 proteinleri ile gerçekleştirilen in vitro pull down yöntemiyle analiz edilmesi hedeflenmiştir.

4. GENEL BİLGİLER

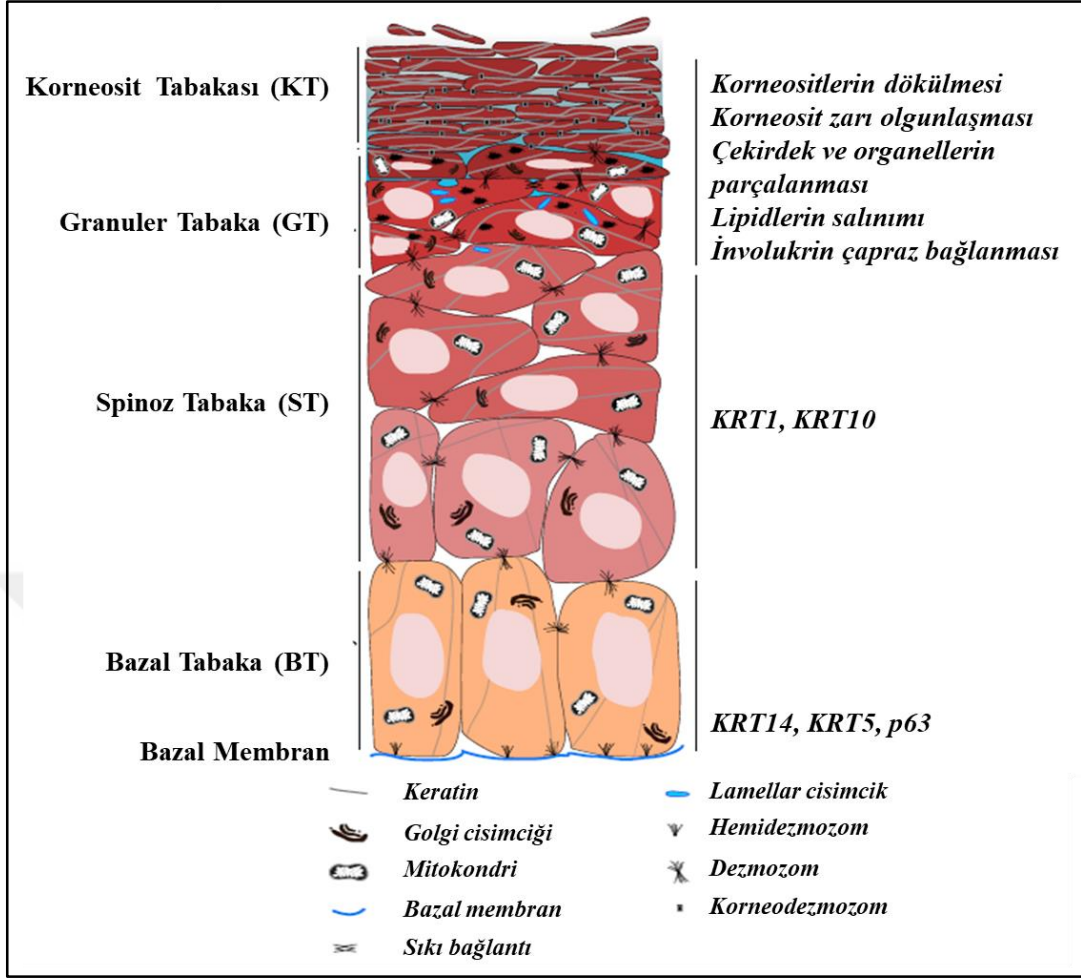
4.1. Deri

Su kaybı, yaralanma ve enfeksiyonlara karşı vücudu koruma görevi gören deri, bazal membranın ayırdığı epidermis ve dermis katmanlarından oluşur. Bazal membranın altında bulunan ve çoğunlukla fibroblastların oluşturduğu dermis içerdiği kollajen ve elastik fibrilleri sayesinde deriye elastikliğini veren yapıdır. Hüresel içerik olarak % 90'dan fazlasını keratinositlerin oluşturduğu epidermis ise çok katlı epitel doku olup vücudun bariyer görevini üstlenir. Bol miktarda keratin filamanı içerdiğinden “keratinosit” olarak adlandırılan bu hücreler “epidermal hücre” olarak da adlandırılır (7, 8).

4.2. Epidermis ve Epidermal Farklılaşma

Epidermis vücudun su kaybının enegellenmesinin yanısıra vücudu fiziksel, kimyasal ve patojen gibi dış çevreden gelen tehditlere karşı koruyan bir bariyerdir. Dış faktörlere maruz kalarak yıpranan epidermisin fonksiyonunu sürdürmesi için sürekli olarak yenilenmesi gerekmektedir. Epidermisin sürekliliği bazal tabakada bulunan epidermal kök hücrelerin sürekli çoğalabilme özelliğiyle sağlanır. Bazal tabakaya yerleşik halde bulunan epidermal kök hücreler dermisten gelen sinyalleri aldıktan sonra asimetrik hücre bölünmesi geçirerek yavru kök hücrelere ve geçici çoğalan hücrelere (Transit amplifying cells) dönüşür. Bazal tabakanın hücreleri morfolojik olarak sütun biçimli olup dezmozom ve adherens bağlantılar yoluyla komşu hücrelerle hücreler arası bağlantılar oluşturur. Bölünme kapasitesi olan bazal tabaka hücreleri; p63, KRT5 (Keratin 5) ve KRT14 proteinlerini ifade eder. Bazal tabakanın geçici çoğalan hücreleri, sınırlı bölünme kapasitesine sahip olup bazal tabakayı oluşturan birkaç hücre bölünmesinin ardından hücre döngüsünden çekilir, yukarıya doğru göç ederken farklılaşmaya başlar. Bazal tabakadan ayrılıp yukarıya doğru göç eden bu hücreler ilk olarak spinoz tabakayı oluşturur. Spinoz tabakaya yerleşik keratinositler bazal tabaka keratinositlerinden morfolojik olarak farklı olup daha yassı görünümündedir. Spinoz tabakada KRT5/14 ekspresyonu düşerken başka bir keratin çifti olan KRT1 (Keratin 1) ve KRT10 (Keratin 10) proteinlerinin ekspresyonu başlar. Spinoz tabakanın üst kısımlarında keratinositler yapısal bir protein olan involucrini ve bir enzim olan transglutaminazı ekspres etmeye başlar. Bu iki protein epidermal farklılaşmanın ileri safhalarında epidermisin en üst tabakasında bariyer görevi gören korneosit hücrelerinin

zarının (korneosit zarı) oluşumuna katılır. Spinoz tabakanın hemen üstünde daha yassı keratinositlerden oluşan granüler tabaka bulunur. Bu tabakada, dezmozomal hücre-hücre bağlantılarına epidermal bariyerin oluşumuna katkı sağlayan sıkı bağlantılar eklenir. Granüler tabakanın adını aldığı keratohyalin granüllerinden bir kısmı filagrin proteinini içerir. Filagrin, korneosit zarının yapısına katılarak keratin filamanlarının paketlenmesinde ve epidermin su içeriğinin korunmasında rol alır. Daha küçük granüller ise korneosit zarının diğer bir bileşeni olan lorikrin içerir. Granüler tabaka bu bileşenlerin yanında lamellar cisimcik adı verilen lipid veziküllerini de bünyesinde bulundurur. Bu lipid vezikülleri granüler tabaka boşluğuna salınarak korneosit zarının olgunlaşmasında görev alır. Ayrıca granüler tabaka hücrelerinde keratin ve involucrin proteinleri transglutaminaz enzimleri tarafından birbirlerine çapraz bağlanarak korneosit zarının olgunlaşmasına katılır. Farklılaşma süreci; çekirdek ve organellerini kaybetmiş, metabolik olarak inaktif yalnızca keratin taşıyan ölü hücrelerin meydana getirdiği korneosit tabakasının ve korneosit zarının olgunlaşması ile sonlanır. Keratinositlerin korneositlere dönüşme süreci iki ila üç hafta sürmektedir. Daha sonra korneositler dökülerek alttan farklılaşarak gelen yeni keratinositlere yer açar (Şekil 1) (1, 9-13).



Şekil 1. Epiderminin yapısı (Eckhart'dan, 13)

4.2.1. Epidermal Homeostazi

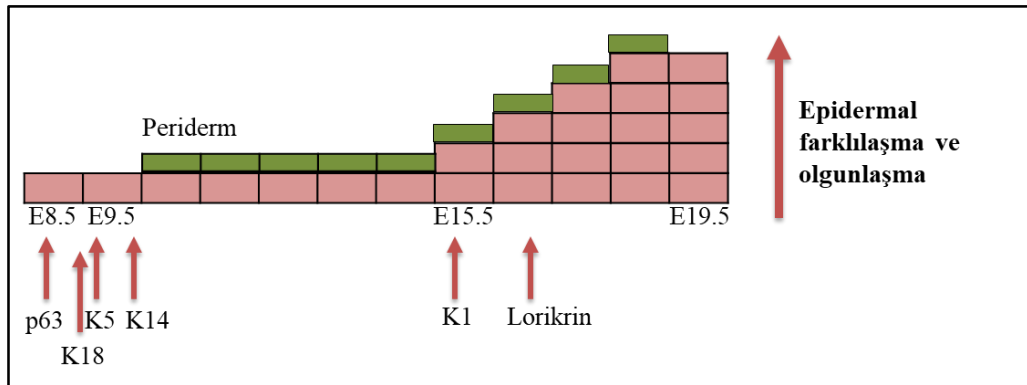
Embriyonik gelişim sürecinde epiderminin oluşması keratinositlerin çoğalması, farklılaşması ve ölümü arasındaki dengeye bağlıdır. Bu denge WNT (Wingless-Type MMTV Integration Site Family), TGF β (Transforme edici büyüme faktörü β), NF- $\kappa\beta$ (Nükleer faktör kapa β), PI3K (Fosfoinositid 3 kinaz) ve NOTCH gibi gelişimde önemli olan pek çok sinyal yolağı tarafından kontrol edilen epidermal homeostazis ile sağlanır (1, 14-19). Homeostatik dengenin bozulması şiddetli epidermal gelişme bozukluklarına bağlı konjenital anomaliler ile sonuçlanır (1, 11). Epidermal homeostazi düzenleyen söz konusu sinyal yolları epidermal farklılaşmanın ana regülatörü olan transkripsiyon faktörü p63 üzerinde kesişirler (20).

4.2.2. Epidermal Farklılaşmanın Temel Regülatörü p63

p63, aralarında yüksek homoloji gösteren üç genin (p53, p63 ve p73) oluşturduğu p53 ailesinin bir üyesi (21, 22) olup sadece çok katlı epitel dokuda ekspres olur. p63'den yoksun fareler epidermal farklılaşmayı gerçekleştiremezken, p63'ün tek katlı epitel hücrelerinde fazladan ekspres ettirilmesi epiderminin çok katlı tabakalarının oluşumuna neden olur. Olgun epiderminin farklılaşmış suprabazal tabaka keratinositlerinde p63'ün ekspresyonu düşer (23, 24).

p63; embriyonik gelişim boyunca epidermal farklılaşmayı başlatırken olgun epidermiste bazal tabaka ile sınırlı kalarak bazal keratinositlerin çoğalmasını düzenler (23).

Embriyogenez boyunca epidermis tek tabakalı yüzey ektoderminden gelişir (Şekil 2). Epidermal farklılaşma başlamadan önce yüzey ektodermine p63 ekspres olur (E8.5). Yüzey ektodermine ilk ekspres ettiği keratin ise KRT18 (keratin 18)'dir. Embriyogenezin E9.5 gününde epidermis hala tek tabakalı haldeyken KRT5/14 çifti birbiri ardına ekspres olmaya başlar. KRT14'den önce ekspres olan KRT5 keratin bütünlüğünü gelişimin bu aşamasında KRT18 ile atipik filament oluşturarak sağlar (21, 25). KRT18'in ekspresyonu çok katmanlı epiderminin oluşumu tamamlandıktan sonra tek tabakalı epitelde sınırlı kalır. Epidermal tabakalaşma E10 civarında peridermin oluşumu ile başlar. Periderm epiderminin çok katmanlı bariyeri oluşuncaya kadar embriyoyu dış çevreden koruyan tek katmanlı geçici bir bariyerdir. Epidermal olgunlaşma E15.5-19.5 arasında peridermin kaybolması, spinoz, granüler ve korneosit tabakaların oluşması ile gerçekleşir (Şekil 2) (21).



Şekil 2. Embriyogenez boyunca epiderminin gelişiminin şematik gösterimi

p63'ün farklı kırılma (splicing) sonucu oluşan transaktivasyon domaini içeren TAp63 ve içermeyen Δ Np63 α , β , γ izoformları bulunmaktadır (20). Δ Np63 formlarının gen aktivasyonundan sorumlu olduğunun gösterilmesi kırılma sonrası oluşan N terminal kısmında alternatif bir transaktivasyon domaini de olabileceğini göstermiştir (26). Δ Np63 α , epidermal gelişim esnasında ve olgun epidermin proliferatif bazal katmanında ekspres olan baskın p63 izoformudur (24).

Epidermal homeostazideki kilit rolüyle ilişkili olarak p63 heterozigot mutasyonlarının insanlarda el ve ayak malformasyonları, yarık damak/dudak anomalileri ve ektodermal displazi gibi epitel ilişkili yapıların etkilendiği en az altı farklı klinik bozukluğa neden olduğu bildirilmiştir. Bunlar ADULT (Acro-Dermato-Ungual-Lacrimal-Tooth, OMIM 103285), EEC (Ectrodactyly, Ectodermal Dysplasia, And Cleft Lip/Palate, OMIM 604292), Hay-Wells (OMIM 106260), LMS (Limb-mammary, OMIM 603543), OFC8 (Orofacial cleft 8, OMIM 129400), SHFM4 (Split-Hand/Foot Malformation 4, OMIM 603273) sendromlarıdır (27-29). $p63^{-/-}$ farelerde insan fenotipine benzer olarak epidermal farklılaşmanın gerçekleşemediği, kol/bacak anomalileri (arka bacakların tamamen eksikliği), dismorfik yüz ile kıl, diş ve meme bezlerinde gelişimsel defektler olduğu görülmüştür (24, 30, 31).

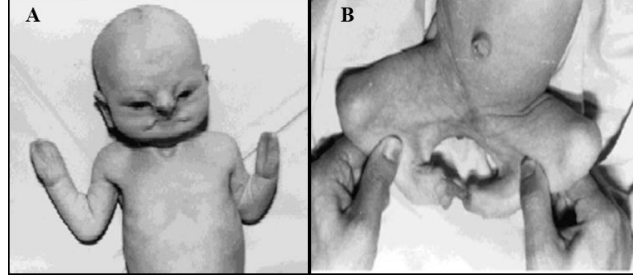
Transkripsiyon faktör p63'ün, özellikle Δ Np63 α formunun epidermal gelişim ve farklılaşmada kilit rolleri olan ve eksikliklerinde ciddi ektodermal gelişim bozuklukları görülen *RIPK4*, *KRT14*, *IKK α* (İnhibitör kappa B kinaz) ve *IRF6* (İnterferon regülatör faktörü 6) genlerinin transkripsiyonunu doğrudan düzenlediği gösterilmiştir (3, 4, 32-34).

4.3. Ektodermal Gelişim Bozuklukları: Bartsocas Papas Sendromu

Pterygium sendromları (PS), popliteal pterygium (dirsek ve dizlerde ağ yapısı) ve ektodermal yapısal anomaliler ile karakterize olan klinik ve genetik açıdan heterojen konjenital bozukluklardır. Bunların içinde en iyi bilineni otozomal dominant olan ve *IRF6* genindeki mutasyonların neden olduğu Popliteal Pterygium Sendromudur (PPS). PPS adını aldığı popliteal pterygiumun yanısıra yarık dudak/damak, kol/bacak ve genital anomaliler ile karakterizedir (35).

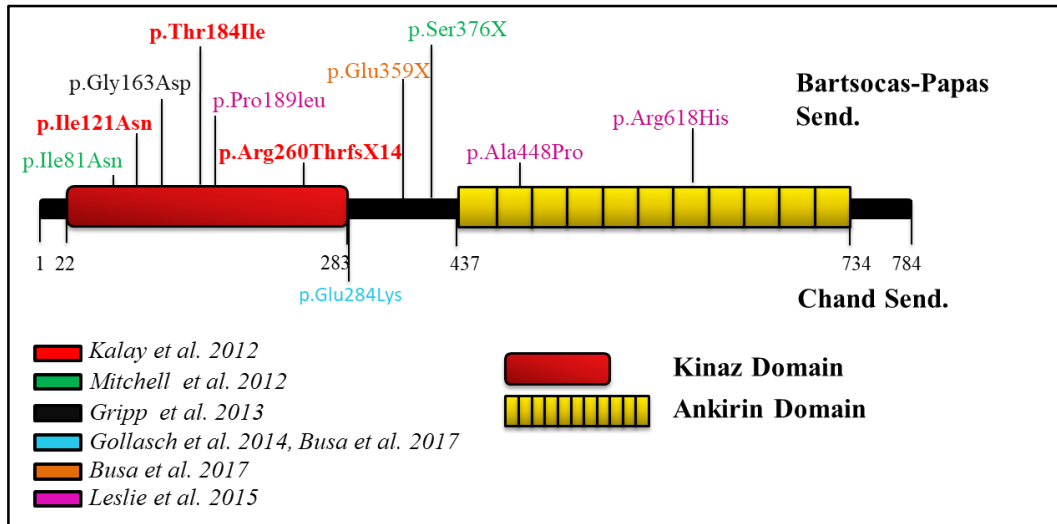
PS'nin otozomal resesif olan ölümcül formu Bartsocas Papas Sendromu (BPS), otozomal dominant formundan (PPS) daha şiddetli bir fenotip gösterir. BPS popliteal pterygiumun yanısıra yapışık göz kapağı, ağızda filiform (telsi) bantlar, yarık damak

dudak gibi kraniofasiyal anomaliler, kol ve bacak anomalileri, oral boşlukta darlık, kaş, kirpik ve tırnak eksikliği, el ve ayak parmakları arasında perde (sindaktili) ile karakterizedir (Şekil 3) (2, 35, 36).



Şekil 3. Aslan Tip Multiple Pterygium sendromlu (Bartsocas-Papas sendromu) hasta resmi. A) Kraniofasiyel ve el anomalileri, B) Popliteal pterygium (Aslan'dan, 36)

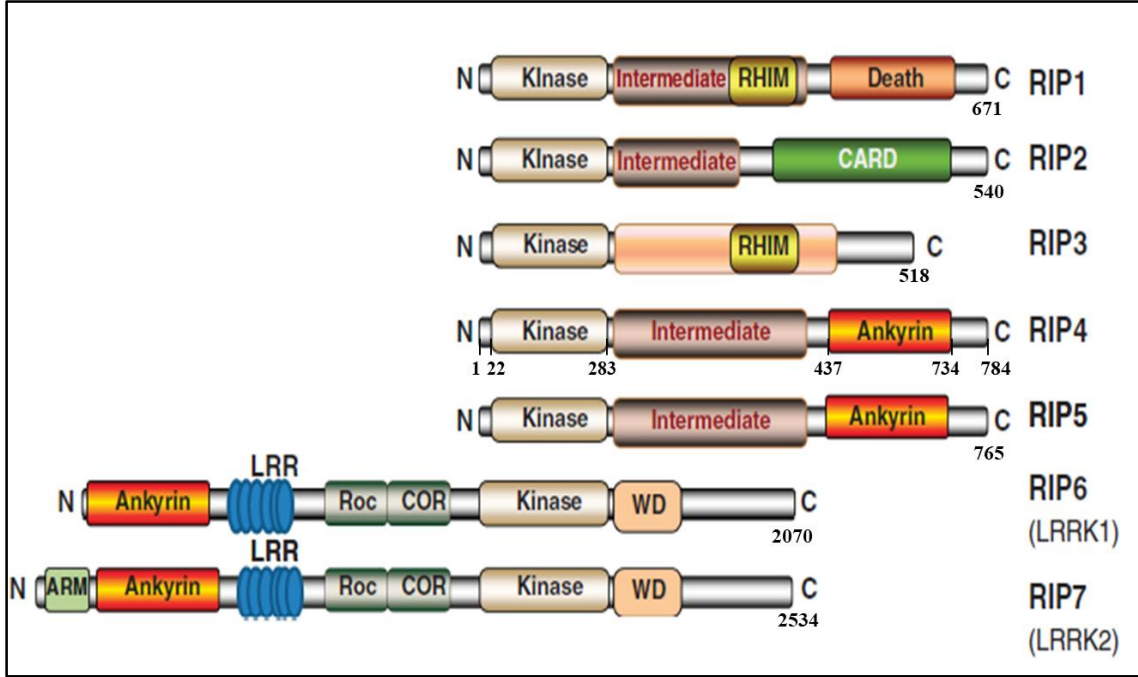
2010 yılında Anabilim Dalımız bünyesinde Bartsocas Papas sendromlu bireylere sahip üç ailede yapılan Genetik Haritalama çalışmaları sonucunda *RIPK4* geni BPS ile ilişkilendirilmiştir (2). Takip eden yıllarda *RIPK4* geni üzerinde farklı mutasyonlarda tanımlanmıştır (Şekil 4) (4, 35, 37, 38). Buna ilaveten *RIPK4*'ün kinaz domaininin hemen bitimindeki linker bölgede tespit edilen bir mutasyonun yapışık göz kapağı, seyrek ve kıvrırcık saç ve tırnak yokluğu ile karakterize ektodermal displazi grubuna ait CHAND sendromuna (OMIM 214350) neden olduğu da bilinmektedir (Şekil 4) (39).



Şekil 4. *RIPK4* üzerinde tanımlanan mutasyonların şematik gösterimi

4.4. Reseptörle Etkileşen Protein Kinaz Ailesi

RIP kinazlar serin/treonin (Ser/Thr) kinaz ailesinin bir üyesidir. Bu ailenin üyelerinin kinaz domainleri oldukça iyi korunmuş olup üyeler arasında yüksek derecede benzerlik gösterir (Şekil 5). RIP kinazlar hücre ölümü, DNA tamir mekanizması, inflamasyon ve hücre farklılaşması gibi birçok metabolik olayda rol almaktadır. RIP kinaz ailesi; RIP1, RIP2, RIP3, RIP4 (RIPK4), RIP5 (SgK288), RIP6 (LRRK1) ve RIP7 (LRRK2) olmak üzere 7 üyeden oluşur (40-43). RIP kinaz ailesinin tanımlanan ilk üyesi RIP1, TNF (Tümör nekroz faktör) sinyal yolağının bir bileşeni olup hücre ölümü ve inflamasyonda rol alır. RIP1'in ayrıca MAPK ve NF- κ B aktivasyonuna neden olduğu gösterilmiştir (40). RIP2 ise immün sistem bileşenlerinden olan NOD-benzeri reseptör sinyalleşmesinde kritiktir ve RIP1 gibi MAPK ve NF- κ B aktivasyonuna neden olur. Majör olarak nekrozda rol alan RIP3'ün ayrıca RIP1 ile etkileşip onu fosforilleyerek RIP1 ve TNFR1 (Tümör nekroz faktör reseptör 1) aracılı NF- κ B aktivasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (41, 42). RIP4-7'nin rolleri henüz tam olarak anlaşılammıştır. RIP4 (RIPK4) de RIP1 ve RIP2 gibi NF- κ B yolağını aktive etmektedir (41). Ayrıca RIPK4'ün epidermal farklılaşma için kritik bir öneme sahip olduğu bilinmektedir (44). RIP5'in overekspresyonunun hücreyi apoptoza yönelttiği gösterilmişse de fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir (45). Diğer RIP kinazların aksine lösince zengin tekrar bölgeleri içeren RIP6 ve RIP7'nin fonksiyonu bilinmemekle birlikte Parkinson hastalığının patogeneziyle ilişkili olduğu düşünülmektedir (42).



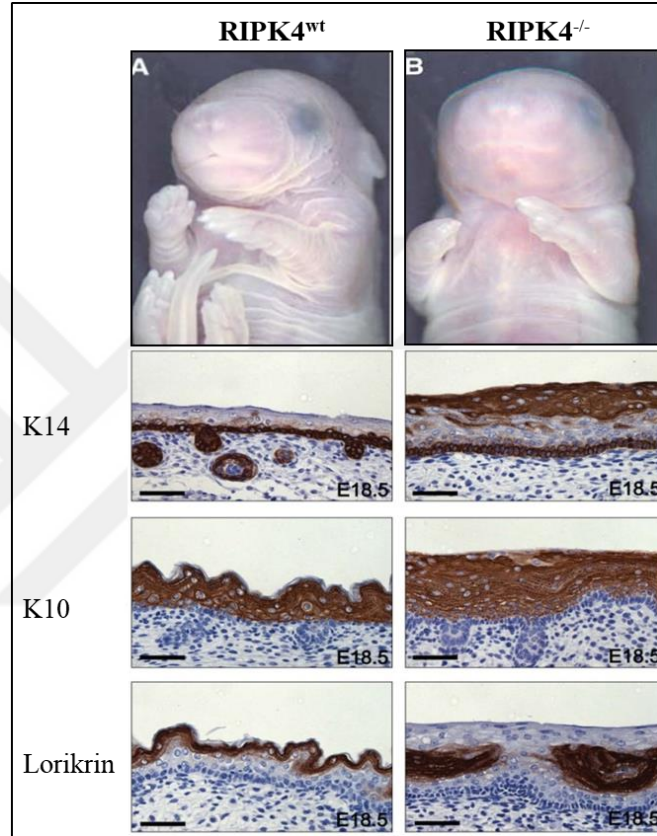
Şekil 5. RIP kinaz ailesi üyesi proteinleri ve fonksiyonel bölgelerinin şeması. Her proteinin altında aminoasit sayısı gösterilmiştir. RHIM: RIP Homotypic Interaction Motif (RIP Homotipik Etkileşim Motifi), CARD: Caspase Recruitment Domain (Caspaz Getiren domain), LRR: Leucine Rich Repeats (Lösence Zengin Tekrarlar), Roc/COR: Ras of complex proteins/C terminal of Roc, WD: WD40 tekrarları, ARM: Armadillo. (Humphries'den, 40)

4.4.1. RIPK4 ve Fonksiyonu

Reseptörle Etkileşen Protein Kinaz 4 (RIPK4), ilk olarak 2000 yılında bir maya ikili hibrit çalışmasında Protein kinaz C delta (PKC- δ) ile etkileştiği bulunmuş ve PKC delta-interacting protein kinaz (DIK) olarak adlandırılmıştır (46). Daha sonraki bir çalışmada PKC β ile etkileştiği gösterilerek “PKC-ilişkili kinaz (PKK)” olarak adlandırılmışsa da 2002 yılında Meylan ve arkadaşları bu proteini reseptör ile etkileşen protein kinaz (RIP) ailesinin bir üyesi olarak tanımlamış ve RIP4 olarak adlandırmıştır. Sonrasında pek çok çalışmada RIPK4 olarak kullanılmıştır (41, 47).

RIPK4, 784 amino asitten oluşan, 87 kDa moleküler ağırlığında, amino ucunda serin-treonin kinaz domaini ve karboksil ucunda 11 ankirin tekrarı bulunan bir proteindir. Kinaz domaini ve ankirin tekrarları arasında ise kaspazlar tarafından iki farklı yerden kesilebilen serin/treonince zengin bir ara bölge (linker/intermediate) bulunmaktadır (Şekil 5).

RIPK4^{-/-} fareler BPS fenotipine benzer özellikler göstermektedir (Şekil 6). Bu farelerde deri kıvrımlarının yabanıl tip farelere göre daha az olduğu, arka bacaklar ve kuyruğun kısa ve vücuda yapışık olduğu, burun, ağız, anüs gibi vücut deliklerinin ve özofagusun füzyonu gözlenmiştir. Oral boşlukların füzyonundan dolayı *RIPK4*^{-/-} fareler doğumdan hemen sonra boğularak ölmektedir (44, 48).



Şekil 6. *RIPK4* yabanıl tip ve nakavt fare fenotipinin karşılaştırılması. A) *RIPK4* yabanıl tip (wt) fare fenotipi. B) *RIPK4*^{-/-} fare fenotipi (Holland'dan, 44 ve De Groote'dan, 49)

RIPK4^{-/-} farelerin derisinde yapılan çalışmalarda, epidermal farklılaşmanın bozulduğu, epidermin tabakalarının kalınlaştığı görülmektedir (44, 48, 49). Ayrıca embriyonik gelişim esnasında epidermis tabakaları oluşuncaya dek embriyoyu korumada görevli olan tek tabakalı peridermin kaybolmadığı tespit edilmiştir (49-51). Yabanıl tip farelerde ekspresyonu yalnızca bazal tabaka ile sınırlı olan KRT14 proteini, *RIPK4*^{-/-} farelerde daha üst epidermal katmanlarda anormal bir ekspresyon paterni göstermektedir (Şekil 6) (44, 48, 49). *RIPK4*'ün özellikle deri gelişimi üzerindeki etkisini analiz etmek

amacıyla RIPK4'ün yalnızca keratinositlerde yok edildiği şartlı nakavt fareleri (*RIPK4^{EKO}*) oluşturulmuştur. Bu farelerin derileri incelendiğinde granüler katmanda bulunan ve bariyer görevi için kritik olan sıkı bağlantıların ve korneosit zar bileşeni olan lipid organizasyonunun bozulduğu dolayısıyla derinin içten-dışa bariyer özeliğinin kaybolduğu görülmüştür (50). Sonuç olarak, *RIPK4*'den yoksun farelerin derilerinde peridermin kaybolmadığı, supra-bazal katman hücrelerinde E-kaderin proteininin hücre-hücre yan (lateral) bağlantılardan ayrılıp peridermal hücre yüzeyine (apikal) yerleştiği gösterilmiştir. E-kaderinin bu anormal yerleşiminin, hücreleri yapışkan hale getirerek fare ve insanda *RIPK4* eksikliğinde görülen, ağız içi, özofagus gibi vücut boşluklarının yapışması ve dizardı ağlarının oluşması gibi fenotiplere neden olduğu öne sürülmüştür (49, 50).

RIPK4, farede çoğu dokuda ekspres olurken, epidermiste ekspresyonu epidermisin bazal ve suprabazal katmanlarında sınırlıdır (50, 52, 53). Ayrıca, *RIPK4*'ün hem farklılaşmış hem de farklılaşmamış keratinosit hücre hatlarında ekspres olduğu gözlemlenmiştir (50, 53). *RIPK4*'ün hücre lokalizasyonunu inceleyen çalışmalar *RIPK4*'ün yoğun olarak hücrenin sitoplazmasında yerleştiğini göstermekle birlikte (47, 53) psoriasis vulgaris hasta kesitlerinde (52) ve servikal skuamöz hücreli karsinom hastalarının epitel kesitlerinde (54) sitoplazmanın yanı sıra, çekirdekte de yerleştiği gösterilmiştir.

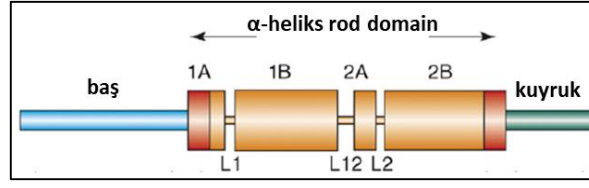
Bugüne kadar yapılan çalışmalarda *RIPK4*'ün IRF6, DVL2 (Dishevelled), LRP6, PKC δ , PKC- β , PKP1 (Plakophilin 1), MEKK2 (Mitojenle aktive olan protein kinaz kinaz), MEKK3, cIAP1/2, IKK α /IKK β ve TRAF 1,2,3,5 (TNF reseptör ilişkili faktörler), A20 (TNFAIP3, TNF α ile indüklenen protein 3), SCF $^{\beta}$ -TrCP ve STAT3 proteinleri ile etkileştiği gösterilmiştir (5, 41, 46, 47, 55-62). *RIPK4*'ün IRF6 ve PKP1 ile etkileşiminin epidermal farklılaşmanın düzenlenmesinde rol aldığı (5, 55), *RIPK4*'ün A20 ve DVL2 ile etkileşiminin ise proliferasyon ve farklılaşmayı düzenleyen WNT sinyal yolağını sırasıyla negatif ve pozitif olarak etkilediği gösterilmiştir (56, 60). *RIPK4*'ün PKC- β , MEKK2, MEKK3, cIAP1/2, IKK α /IKK β ve TRAF proteinleri ile etkileşimi aracılığıyla, yangı ve bağışıklığa özgü genlerin aktivasyonu, hücrelerin çoğalımı, sağ kalımı ve apoptoz gibi birçok süreci düzenleyen NF- κ B yolağını aktive ettiği gösterilmiştir (41, 57-59, 63). Dahası, *RIPK4*'ün kendisiyle etkileşerek kinaz domaini sayesinde kendisini fosforilediği de bilinmektedir (41, 61). Fosforile *RIPK4*'ün bir ubiquitin ligaz olan SCF $^{\beta}$ -TrCP ile

etkileşiminin ise RIPK4 bağımlı keratinosit hareketi ve iskelet organizasyonunun regülasyonunda önemli olduğu gösterilmiştir (61). Ayrıca yara iyileşme süreci esnasında TGF β , TNF ve IL-1 (İnterlökin-1) sitokinlerinin RIPK4'ün ekspresyonunu baskıladığı da bilinmektedir (41). RIPK4'ün çeşitli sitokinlerin ekspresyonunu uyararak PKC yolağı aracılığıyla ve STAT3 ile etkileşerek onun aktivasyonu yoluyla inflamasyonu düzenlediği de gösterilmiştir (48, 62, 64).

Tüm bu çalışmalara rağmen RIPK4'ün özellikle epidermal farklılaşma esnasındaki rolünün moleküler mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. Keratinositlerde RIPK4'ün etkileştiği diğer proteinleri belirleyerek epidermal farklılaşmadaki rolünün moleküler seviyede anlaşılmasına katkı sağlamak üzere Anabilim Dalımız bünyesinde Dr. Öğr. Üyesi Tuba DİNÇER'in yürütücülüğünde Karadeniz Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Koordinasyon Birimi tarafından desteklenen 9749 No'lu proje kapsamında RIPK4'ün kinaz domaini yem olarak kullanılarak insan keratinosit cDNA kütüphanesi büyük ölçek maya ikili hibrit yöntemi ile taranmış ve epidermal farklılaşmada önemli rolü olan KRT14 proteininin RIPK4 ile etkileştiği bulunmuştur.

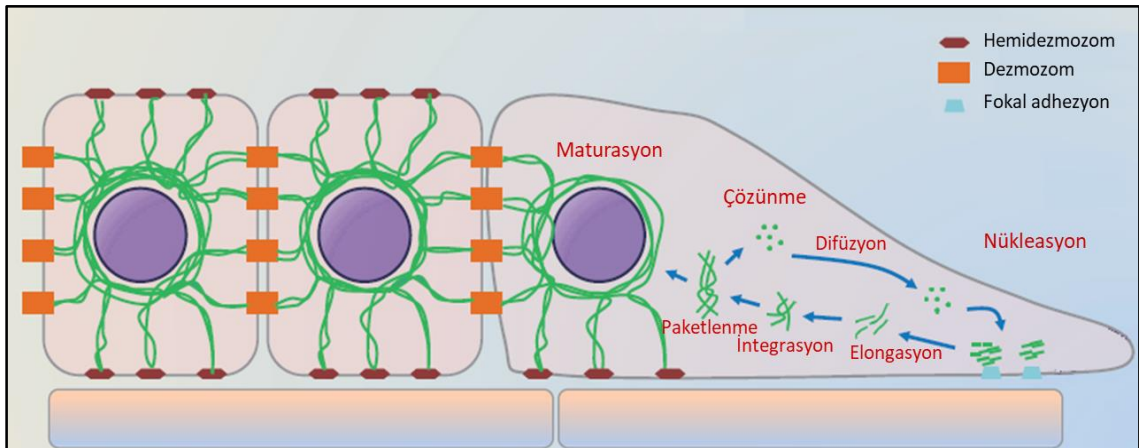
4.5. Hücre İskelet Bileşeni: Keratin Ailesi

Epitelin bütünlüğü hücrenin ara filaman iskeletini oluşturan farklı keratin setlerinin varlığına bağlıdır (25). Keratinler, sitoplazmik ara filamanların bir tipi olup epidermiste bulunan hücrelerin total protein içeriğinin % 80'ini oluşturur (65, 66). İnsanda ve farede bilinen 55 farklı keratin ekspresyonu epidermal farklılaşma ve fonksiyonunda çeşitli aşamaların belirteçidir (25, 67). Keratinler, biyokimyasal özelliklerine göre Tip I asidik (KRT9-KRT28) ve Tip II bazik (KRT1-KRT8 ve KRT71-KRT74) olmak üzere ikiye ayrılır (68). Tüm keratinlerin moleküler ağırlığı 40-70 kDa arasında değişmekte olup korunmuş üç parçadan (tripartite) oluşur. Tüm keratinler, N terminalinde bir baş domaini ve C terminalinde bir kuyruk domaini ve bu ikisi arasında filament oluşumundan sorumlu olan ve dört parça heliks bölgeden oluşan 310 amino asit uzunluğunda α -helikal rod domaininden oluşmaktadır (Şekil 7) (66).



Şekil 7. Keratinlerin yapısal şeması (Gu'dan, 66)

Tip I ve tip II keratinler epitel hücrelerde tek başlarına bulunmazlar. Tip I keratin molekülü Tip II keratin ile merkezi α -helikal rod domaini üzerinden etkileşerek zorunlu heterodimerleri oluşturur. Hücre tipine bağlı olarak, epitel dokularda farklı çift keratinler bir araya gelir. Tüm çok katlı yassı epiteller KRT5/KRT14 çiftini eksprese ederken tüm tek katlı yassı epiteller KRT8/KRT18 çiftini eksprese eder (69). Bu heterodimer keratin molekülleri baş domainleri ile kuyruk domainlerinin anti-paralel bir yerleşimde uç uca eklenmesiyle tetramerleri oluşturur. Çözünür heterodimer ve tetramerlerden oluşan keratin granülleri hücrenin periferinde plazma membranının fokal adhezyon kısımlarında nükleasyon denilen keratin filaman inşasını başlatır (68, 70). Keratin oligomerlerinin bir araya gelmesi sonucunda, partiküller büyümeye ve aktin bağımlı hareketle birlikte hücrenin merkezindeki çekirdeğe doğru harekete başlar (elongasyon). Uzayan bu keratin molekülleri periferel keratin ağı ile birleşir (integrasyon) ve çekirdeğe doğru paketlenerek taşınır. Sonrasında ya oligomerler yeniden çözünür (çözünme) ve yeni bir keratin döngüsü için yeniden kullanılmak üzere sitoplazmada difüzyon yoluyla hücre periferine geri döner (difüzyon) ya da paketlenen keratin filamanları çekirdek çevresinde sabit bir kafes oluşturmak üzere stabilize olur (maturasyon) (Şekil 8) (65, 67, 70, 71).

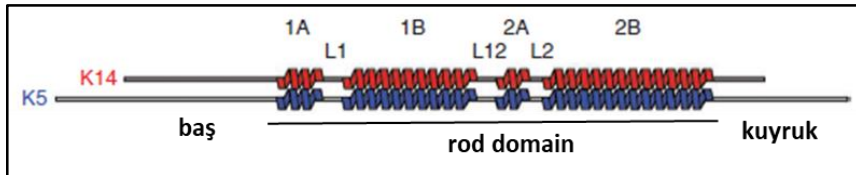


Şekil 8. Keratin döngüsünün şematik olarak gösterimi (Kim'den, 70)

Keratin ağının bu dinamik yapısı epitel hücrelerin fonksiyonlarını yerine getirmesi için gereklidir (72). Sitoplazmik ara filaman ağı ile epitel iskeleti oluşturarak epidermal hücre şeklini belirlemenin ve strese karşı epitel korumanın yanı sıra (25, 69) keratinler, hücre sinyalinde görev alan reseptör, adaptör ve kinaz gibi proteinlerle etkileşerek kompleks sinyalleşme platformları oluşturur. Böylelikle protein sentezi, hücre büyümesi, adhezyonu, polarizasyonu, migrasyonu, farklılaşması ve yara iyileşmesi gibi çeşitli hücresel süreçlerle ilişkili farklı sinyalleşme yollarına katılırlar (67, 69, 72). Örneğin hepatositlerin keratin çifti olan KRT8/18 TNFR2'ye bağlanarak apoptotik sinyalleşme kaskadını engeller. Diğer taraftan KRT17 hasarlı çok katlı epitelde sinyal molekülü 14-3-3σ'ya bağlanarak protein sentez ve hücre büyümesini düzenler (65, 73, 74). Keratin inşası yıkımı ve organizasyonunu düzenleyen sinyalleşme yolları ve mekanizmalar oldukça geniş olup fosforilasyon, O-glikolizasyon, sumolasyon, ubiquitinasyon, asetilasyon ve sistein oksidasyonu gibi farklı post translasyonel modifikasyonlar ile düzenlenmektedir (67, 72, 74).

4.5.1. Keratin 14

Tip I keratin ailesine ait olan Keratin 14 (K14, KRT14) (472 aa, 51.5 kDa) çok katlı epitelde bölünen bazal keratinositlere özgü bir markör olup sitoplazmada yerleşim gösterir. KRT14, tüm ara filaman ailesi üyelerinde olduğu gibi, filament oluşumundan sorumlu α-helikal rod domainine sahiptir. (Şekil 9) (68). Rod domaini sayesinde KRT5 ile etkileşerek heterodimer oluşturur ve epitel iskeletini yapılandırarak epidermal hücre şeklinin sürdürülmesine yardım eder (69). KRT14, bazal hücrelerin fonksiyonu ve gelişimi açısından oldukça önemlidir (68).



Şekil 9. Heterodimer oluşturmuş insan KRT5 ve KRT14 proteinlerinin ve fonksiyonel bölgelerinin şeması (Lee'den, 83)

KRT14 veya *KRT5* mutasyonları, epidermin bazal tabakasındaki hücrelerin sitolizine bağlı gelişen, kırılğan, kabarcıklı (blistering) ve kolay su toplayan deri ile

karakterize Epidermolizis Bullosa Simplex (EBS) ile ilişkilendirilmiştir (75). Ayrıca hemidezmozomal bir protein olan plektin mutasyonlarının da EBS'ye neden olduğu bilinmektedir (76) EBS'li hastalardan alınan keratinosit hücrelerinde keratin ağının bozulduğu ve KRT14 proteininin üretilmediği gösterilmiştir (77, 78). Keratin ağının bozulması EBS hastalarında bazal hücrelerin sitoplazmasında intra-epidermal kabarcıkların (blistering) oluşumuna, hücrelerin kırılğan hale gelmesine ve hücrelerin bazal laminadan kopmasına neden olmaktadır (1, 79). Bunun dışında, *KRT14*'deki heterozigot nonsense (anlamsız) mutasyonları deri, saç, tırnak, diş ve ter bezleri gibi ektodermal dokuların anormal gelişimine neden olan ektodermal displazinin nadir bir formu Naegeli-Franceschetti-Jadassohn syndrome/dermatopathia pigmentosa reticularis (NFJS/DPR) ile de ilişkilendirilmiştir (80).

KRT14^{-/-} farelerin de insanda olduğu gibi EBS fenotipi gösterdiği, epidermal farklılaşma ve epidermal bariyer oluşumu normal olmasına rağmen doğumdan 24-48 saat içinde deride şiddetli kabarcıklar nedeniyle öldüğü rapor edilmiştir (68, 81, 82). KRT14 proteinin eksiltildiği hücrelerde proliferasyonun azalması ve hücre döngüsünün ilerlemesinin durması KRT14'ün bazal laminadaki hücre proliferasyonunu aktive ettiğine işaret etmektedir (69).

Şimdiye kadar KRT14'ün KRT5 ile etkileşiminin epitel hücre şeklinin sürdürülmesinde (83), Plektin ve PKP1 ile etkileşimlerinin sırasıyla hemidezmozom ve dezmozom yapılarının oluşturulmasında (6, 84), vimentin ile etkileşiminin ise hücre göçünün düzenlenmesinde (85) rol aldığı gösterilmiştir. Ayrıca, KRT14'ün TRADD (TNFR1-ilişkili ölüm domain proteini) ile etkileştiği ve bu etkileşimin TNF-TNFR1 sinyalleşmesinde inhibitör olarak rol alabileceği öngörülmüştür (86). Diğer taraftan epidermal farklılaşma sürecinin ana regülatörlerinden olan p63'ün *KRT14* geninin enhansör bölgesine bağlanarak onun ekspresyonunu düzenlediği de bilinmektedir (3). *p63*^{-/-} farelerin derileri üzerinde yapılan çalışmada KRT14'ün ekspres olmadığı bildirilmiştir (23).

Epidermal farklılaşmanın temel transkripsiyon faktörü p63'ün RIPK4 ve KRT14'ün ekspresyonunu doğrudan indüklemesi, her iki proteinin de epidermin bazal tabakasında ekspres olması, dezmozomal bir protein olan PKP1 ile etkileşimde bulunması ve eksiklerinin farede ve insanda epidermal gelişim bozuklukları ile ilişkilendirilmiş

olması önceden tanımladığımız olası etkileşimin epidermal gelişim ve farklılaşma sürecindeki önemine işaret etmektedir. Dolayısıyla bu çalışma ile daha evvel maya ikili hibrit çalışmasında tarafımızca gösterilen RIPK4 'ün kinaz domaini ile KRT14'ün etkileşiminin doğrulanması, etkileşimden sorumlu domaininin belirlenmesi, bu iki proteinin hücre içi yerleşiminin analiz edilmesi ve aracı proteine gerek duymadan doğrudan etkileşip etkileşmediklerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaca ulaşmak için de immünopresipitasyon, immünofloresan ve in vitro pull down deney yaklaşımlarına başvurulmuştur.



5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Gereç

5.1.1. Kimyasallar

Agar	Merck, 1.016.130.500
Akrilamid/Bisakrilamid	Biorad, 1610146
Amonyum persülfat ((NH ₄) ₂ S ₂ O ₈)	Sigma, A9164
Ampisilin	Sigma, A9518-5G
Bactotripton	Conda, 1612
BCA protein konsantrasyonu ölçüm kiti	Thermo scientific, 23227
Beta merkaptoetanol	Merck, 8.057440.0250
Complete mini protease inhibitor	Roche, 04693159001
Deoksinukleotid trifosfat (dNTPs)	Promega, U1420
Di-potasyum fosfat (K ₂ HPO ₄)	Sigma, 1551128
Di-sodyum hidrojen fosfat (Na ₂ HPO ₄ . 2 H ₂ O)	Merck, M1065801000
Dithiothreitol (DTT- C ₄ H ₁₀ O ₂ S ₂)	Thermo scientific, R0861
DreamFect Gold Transfection Reagent	Ozbiosciences, DG81000
Dulbecco's Modified Eagle's medium	Thermo scientific, 41965-039
EDTA disodyum dihidrat (Na ₂ EDTA.2H ₂ O)	AppliChem, A2937.0500
Etidyum bromide (C ₁₂ H ₂₀ N ₃ Br)	Sigma, E-7637
Etil alkol (C ₂ H ₅ OH)	Mey, Türkiye
Fetal Bovine Serum	Merck, S0415
Glasiyel asetik asit (C ₂ H ₄ O ₂)	Merck, 1.00056.2500
GST trap boncuk	Chromotek, sta-20
HEPES (C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S)	Sigma, H0887
Hidroklorik asit (HCl)	Merck, 1.00314.2500
Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)	Sigma, I6758-1G
Kalsiyum klorür (CaCl ₂)	Merck, 910TA654681
Kanamisin	Sigma, 60615-5G
L-Arabinoz	Bioshop, ARB222.25
NP-40	Sigma, 74385
Orange G	Sigma, O-1625

Paraformaldehit ($\text{HO}(\text{CH}_2\text{O})_n\text{H}$)	Sigma, P6148
Penisilin/Streptomisin	Thermo scientific,15140-122
PMSF (Fenil metil sülfonil florid)	Sigma, 1741932998611
Potasyum hidrojen karbonat (KHCO_3)	AppliChem, A2375.1000
Proteaz Inhibitor Kokteyl tableti (PI)	Sigma, S8830
Protein G Agarose	Invitrogen, 15920-010
Proteinaz K	Promega, V3021
ProLong Gold Mounting Media (DAPI)	Thermo scientific, 36935
Pwo DNA Polimeraz	Roche, 11644947001
SeaKem® LE Agaroz	Lonza, 50004L
Sephdex®G-50	Sigma, S5897-25G
Sodyum fosfat dibazik (KH_2PO_4)	Sigma, NIST200B
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Merck, 822050
Sodyum florür (NaF)	Sigma, S7920
Sodyum hidroksit (NaOH)	Merck, 1.06462
Sodyum klorür (NaCl)	Merck, 1.01540.0500
Sodyum orthovanadate ($\text{NaVan-Na}_3\text{VO}_4$)	Sigma, S6508
Sodyum pirofosfat ($\text{NaPPi-Na}_4\text{O}_7\text{P}$)	Sigma, 446061347236111
Sodyum karbonat (Na_2CO_3)	Merck, 106392
Temed ($\text{C}_6\text{H}_{16}\text{N}_2$)	AppliChem, A1148.0100
Tris-Baz ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$)	AppliChem, A2264.1000
Tris-HCl ($\text{C}_4\text{H}_{12}\text{ClNO}_3$)	Merck, 1.01547.0.100
Triton X 100	Sigma, 9002-93-1
Tween20	J.T.Baker, 73-74
2- Propanol ($\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$)	Merck, 109634

5.1.2. DNA ve Protein Markırlar

100 bp DNA ladder	NEB, N3231L
Precision Plus Protein™ Dual Color Standards	Bio-Rad, 1610374

5.1.3. Antikorlar

5.1.3.1. Primer Antikorlar

Anti-GST-Rabbit Polyclonal	Santa Cruz, sc-459
----------------------------	--------------------

Anti-FLAG M2- Mouse Monoclonal	Sigma-Aldrich, F3165-1MG
Anti-KRT14 Mouse Monoclonal	Abcam, ab7800
Anti-RIPK4 Rabbit Polyclonal	Santa Cruz, sc-83320

5.1.3.2. Sekonder Antikorlar

Anti-Mouse-HRP	Bio-Rad, 170-5047
Anti-Rabbit-HRP	Bio-Rad, 170-5045
Anti-Mouse-Cy3	Abcam, ab97035
Anti-Rabbit- Alexa Fluor 488	Abcam, ab150061

5.1.4. Kitler

BigDye® Terminatör v3.1 Cycle Sequencing Kit	Thermofisher, 4337455
Clarity™ Western ECL Substrat	Bio-Rad, 1705060
E.Z.N.A.® Total RNA Kit	Omegabiotek, R6834-00
E.Z.N.A.® Endo-free Plasmid DNA Mini Kit	Omegabiotek, D6950-01
Gateway® BP Clonase® II Enzyme mix	Thermofisher, 11789-020
Gateway® LR Clonase® II Enzyme mix	Thermofisher, 11791-100
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN, 28704
SuperScript® III First System for RT-PCR	LifeTechnologies,18080-051

5.1.5. Cihazlar

Bulaşık Makinesi	Bosch, Almanya
Buzdolabı (+4°C)	Bosch, Almanya
Buz makinası	Hoshaizaki, Japonya
CO2'li Etüv	Heraeus, Almanya
Chemidoc Görüntüleme Sistemi	Bio-Rad, ABD
Çalkalayıcı inkübatör	GFL, Almanya
Derin dondurucular (-20°C)	Bosch, Almanya
Dikey elektroforez ve immünoblot sistemi	BIORAD, ABD
Distile su cihazı	GFL 2004, Almanya
Doğru akım güç kaynağı (300 volt)	Bio-Rad, ABD
Elektroporatör	Bio-Rad, ABD
ELISA Plate Okuyucu	Molecular Devices, ABD
Floresan mikroskop	Nikon E80, Japonya

Flow Sitometri	BD, ABD
Genetik Analiz Cihazı	3130, ABI
Hassas terazi	AHAUS, ABD
İnverted mikroskop	Nikon, Japonya
Jel görüntüleme sistemi	GelLogic2000, Kodak, ABD
Klas II steril kabin	Metisafe, Türkiye
Merdaneli karıştırıcı	Stuart, İngiltere
Manyetik karıştırıcı	IKA, ABD
Mikrosantrifüj	Thermo IEC, ABD
Mikrosantrifüj	Hettich, Almanya
Mikrodalga fırın	Arçelik MD554, Türkiye
Nanodrop® 2000 UV-Vis Spektrofotometre	Thermo, ABD
Orbital karıştırıcı	Nüve SL 350, Türkiye
Otoklav	Tutnauer 3150 ELV, İtalya
Pastör fırını	Memmert, Almanya
pH metre	Hanna, Portekiz
Sıcak su banyosu	Stuarti İngiltere
Sıvı azot tankı	Thermo Scientific, ABD
Sonikatör	Sonics-Vibracell, VCX500
Soğutmalı yüksek devirli santrifüj	Eppendorf 5804R, Almanya
Spektrofotometre	Eppendorf, Almanya
Termomikser	Eppendorf, Almanya
Termal Cyclor	Gene Amp 9700, ABD
Termal Cyclor	Techne TC512, İngiltere
Vakum pompası	Isolab, Fransa
Vorteks	IKA, ABD
Yatay elektroforez düzeneği	HU13, İngiltere
Yüksek devirli santrifüj	Eppendorf 5810, Almanya
Zaman ve hız ayarlı rotator	Stuart, İngiltere
-80 dondurucu	Thermo Scientific, ABD

5.1.6. Sarf Malzemeler

Çeşitli boyutlarda pipet uçları	Axygene, ABD
---------------------------------	--------------

Falkon Tüpler (15 ve 50 ml)	Isolab, Fransa
Kültür flaskı (25 ve 75 cm ²)	Corning, ABD
Mikrosantrifüj tüpler	Eppendorf, Almanya
Serolojik pipetler	Greiner Bio-One, Almanya
6 kuyucuklu plate	Corning, ABD
60 mm petri flask	Corning, ABD
100 mm plate	Corning, ABD

5.1.7. Bakteri Suşları

Çeşitli vektörlerin transformasyonu için *E. coli*'nin farklı suşlarından yararlanıldı. Gateway sisteminde insert içermeyen, boş plazmitlerin çoğaltılması için *ccdb*'ye dirençli olan DB3.1 bakteri suşu kullanılırken insert içeren, dolu tüm gateway vektörlerinin çoğaltılması için DH5 α suşu kullanıldı. His ve GST etiketli proteinlerin bakteride çoğaltılması için sırasıyla BL21-AI ve BL21-DE3 bakteri suşları kullanıldı.

DH5 α Genotipi

F- recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+) supE44 λ - thi-1 gyrA96 relA1

DB3.1 Genotipi

F- gyrA462 endA1 Δ (sr1-recA) mcrB mrr hsdS20(rB-, mB-) supE44 ara14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(Smr) xyl5 Δ leu mtl1

BL21-AI

F- ompT gal dcm lon hsdSB(rB-mB-) λ (DE3 [lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5]) [malB+]K-12(λ S)

BL21-DE3 Genotipi

fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] Δ hsdS λ DE3 = λ sBamHIo Δ EcoRI-B int::(lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21 Δ nin5

5.1.8. Kullanılan Vektörler

Memeli hücrelerinde ekspresyon için kullanılan p3xFLAG-CMV/DEST (FLAG), pDEST-27 (GST) vektörleri ve bakteri vektörü olan pDEST17 (His) ve pGEX-KG/DEST (GST) vektörleri Dr. Hannie Kremer'den (Department of Human Genetics- Radboud University Nijmegen Medical Centre, Hollanda) temin edilmiştir. Ayrıca, GST pull

down deneyinde kontrol vektör olarak kullanılmak üzere boş GST vektörü Prof. Dr. Ersan Kalay'dan (Karadeniz Teknik Üniversitesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı) temin edilmiştir. Bu boş GST vektörü; Kalay ve ark. tarafından rastgele seçilen TMC1 adlı gen dizisinin başına stop kodonu dizisi eklenip pGEX-KG/DEST vektörüne klonlanarak tasarlanmıştır.

5.1.9. Solüsyon, Tampon ve Besiyerleri

5.1.9.1. Bakteri İçin Kullanılan Besiyerleri

Luria Bertani (LB) Besiyeri

10 g tripton (Bacto), 5 g maya özütü (Bacto) ve 10 g sodyum klorür deiyonize distile su içerisinde çözüldü. pH 1N (NaOH) ile 7'e ayarlandı ve hacim 1 litreye tamamlandı. 1.2 atmosfer basınçta, 121 °C'da 20 dakika otoklavda steril edildi ve soğutuldu.

Luria Bertani Agar (LBA) Besiyeri

LB sıvı besiyerine % 1.5 oranında agar eklenerek hazırlandı. LB agar besiyeri 1.2 atmosfer basınçta, 121°C'de 20 dakika otoklavda steril edildi. Kullanılacağı zaman mikrodalganın defrost ayarında iyice eritildikten sonra sıcaklığı su banyosunda 55°C'ye getirildi. Çoğaltılacak vektörün antibiyotik seçiciliğine göre besiyerine 100 µg/mL ampisilin veya 50 µg/mL kanamisin eklendikten sonra 100 mm çapında petri kaplarına 10'ar mL olacak şekilde dağıtıldı.

5.1.9.2. Bakteri İndüklemeye Kullanılan Ajanlar

100 mM Stok IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside)

0.238 g IPTG tartılarak 10 mL steril su içinde çözüldü. 0.22 µm'lık filtreden geçirilerek steril edildi. 1 mL olacak şekilde tüplere dağıtılarak -20°C'de saklandı.

% 20 Stok L-Arabinoz

2 gram L-Arabinose tartılarak 10 mL steril çift distile suda çözüldü. 0.22 µm'lık filtreden geçirilerek steril edildi. 1 mL olacak şekilde tüplere dağıtılarak -20°C'de saklandı. Kullanılacağı zaman final konsantrasyon % 0.2 olacak şekilde kültüre eklendi.

5.1.9.3. Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Çözeltiler

50x Konsantre Tris-Asetat-EDTA (TAE) Tamponu

242 g Tris base (Tris base MA:121.14 g/mol) 800 mL deiyonize distile su içerisinde çözüldü. Çözelti üzerine 57 mL glasiyal asetik asit, 100 mL 0.5 M EDTA çözeltisi (pH:8.0) eklendikten sonra hacim 1000 mL'ye tamamlandı. Çalışma solüsyonu deiyonize su ile 1:50 oranında seyreltilerek kullanıldı.

Etidium Bromid Solüsyonu:

10 mg/mL olacak şekilde deiyonize su kullanılarak hazırlandı. Işıktan korunarak muhafaza edildi.

10X Orange G DNA Yükleme Tamponu

20 g sukroz 40 mL deiyonize distile su içerisinde çözüldü. 100 mg (0.1 g) Orange G yukarıdaki solüsyon içerisinde çözülerek son hacim dH₂O ile 50 mL'ye tamamlandı.

5.1.9.4. Protein yürütme (SDS-PAGE) Solüsyonları

1.5 M Tris-HCl (pH 8.8) (Ayırma Jel Tamponu)

36.33 g Tris (Tris-baz MA:121.14 g/mol) 180 mL deiyonize suda çözüldü, konsantre HCl ile pH 8.8 e ayarlanarak toplam hacim deiyonize su ile 200 mL'ye tamamlandı ve oda sıcaklığında saklandı.

0.5 M Tris-HCl (pH 6.8) (Yükleme Jel Tamponu)

6.057 g Tris (Tris baz MA:121.14 g/mol) 90 mL deiyonize distile suda çözüldü, konsantre HCl ile pH 6.8'e ayarlanarak toplam hacim deiyonize su ile 100 mL'ye tamamlandı ve oda sıcaklığında saklandı.

% 10 Sodyum Dodesil Sulfat (SDS)

10 g SDS (CH₃(CH₂)₁₁SO₄Na. MA:288.372 g/mol) 100 mL deiyonize distile suda çözülerek oda sıcaklığında saklandı.

10X Tris Glisin Tamponu

30.3 g Tris base (Tris base MA:121.14 g/mol), ve 144 g glisin (Glisin MA:75.07 g/mol) 1 litre deiyonize suda çözülerek oda sıcaklığında saklandı.

1 X SDS-PAGE Yürütme Tamponu

10X Tris-Glisin tamponu 1X olacak şekilde seyreltildi. İçerisine 10 mL % 10 luk SDS eklenerek son hacim 1 litreye tamamlandı.

% 10 Amonyum Persülfat (APS)

100 mg APS (MA: 228.18 g/mol) 1 mL deiyonize suda çözüldü. Solüsyon 4°C'de saklandı.

5X SDS-PAGE Yükleme Tamponu

Toplam hacim 10 mL'de final konsantrasyonları 0.25 M Tris-CI pH: 6.8, % 10 SDS % 50 Glyserol, % 0.01 Bromofenolblue olacak şekilde hazırlandı. -20 °C'de saklandı. Kullanmadan önce final konsantrasyonu 0.5 M olacak şekilde DTT eklendi.

% 40 Akrilamid\Bisakrilamid

29:1 oranında % 40 Akrilamid\Bisakrilamid solüsyonu kullanıldı (Biorad, 1610146) ve 4°C'de muhafaza edildi.

5.1.9.5. İmmüno blot Solüsyonları

10 X SDS-PAGE Transfer Tamponu

10X Tris-Glisin tamponu 1X olacak şekilde hazırlandı. İçerisine 200 mL Metanol eklenerek son hacim 1 litreye tamamlandı.

% 20 Tween 20

20 mL stok Tween 20 deterjanı, 80 mL deiyonize su içinde çözüldü ve 4 °C'de saklandı.

10X TBS Stoğu

24 g Tris HCl (MA:), 5.6 g Tris-base (MA:121.14 g/mol), 88 g NaCl (MA: 58.44 g/mol) 800 mL distile su içerisinde hazırlandı ve pH:12N HCl ile 7.6'ya ayarlandı.

1X TBST

10X TBS'den 50 mL alınarak 450 mL deiyonize su ile 1X TBS yapıldıktan sonra son konsantrasyon % 0.05 olacak şekilde % 20'lik Tween 20 solüsyonundan eklendi ve oda sıcaklığında saklandı.

5.1.9.6. İmmünopresipitasyonda Kullanılan Solüsyonlar

1 N Sodyum Hidroksit Çözeltisi

4 g sodyum hidroksit (NaOH MA: 39.99 g/mol) deiyonize distile su içerisinde çözüldü ve çözeltinin hacmi 100 mL'ye tamamlandı.

1 M Tris-Cl Tamponu

121,1 g Tris (Tris baz MA:121.14 g/mol) 800 mL deiyonize distile su içerisinde çözüldü. HCl çözeltisi ile pH'sı 7.5'e ayarlandıktan sonra hacmi 1 litreye tamamlandı. Tris-Cl tamponu otoklavda 121 °C'da 1.2 atmosfer basınç altında 20 dakika tutularak steril edildi.

5 M NaCl Çözeltisi

73.05 g NaCl (MA: 58.44 g/mol) tartılarak 250 mL deiyonize su içinde çözüldü ve oda sıcaklığında saklandı.

0.5 M EDTA Çözeltisi

37.2 g EDTA tartılarak deiyonize su içinde çözüldü. NaOH ile pH 8.0'a ayarlandı ve hacim 200 mL'ye tamamlandı. Oda sıcaklığında saklandı.

% 20 Triton X-100

20 mL Triton X-100 deterjanı 80 mL deiyonize su içinde çözüldü. Triton X 100'ün iyice çözülebilmesi için çözelti ısıtıldı ve 4 °C'de saklandı.

Fosfotaz İnhibitörleri

100X Sodyum Orthovanadate (200 mM) (NaVan)

3.68 g Na₃VO₄ (Na₃VO₄ MA: 183.91 g/mol) 90 mL steril çift distile su içinde çözüldü. 1N NaOH ile pH 10.0'a ayarlandı. Sarı renge dönüşen solüsyon renksiz olana kadar kaynatıldı. Oda sıcaklığına gelene kadar soğutulduktan sonra pH'sı tekrar kontrol edildi ve 10.0'a ayarlandı. Hacim 100 mL'ye tamamlandı ve alikotlanarak -20 °C'de saklandı. Çalışma konsantrasyonu 2mM olacak şekilde 100 kez lizis bufferda seyreltildi.

50X Sodyum Florür (1M) (NaF)

4.2 g NaF (NaF MA: 41.99 g/mol) 100 mL steril çift distile su içinde çözüldü. Solüsyon alikotlanarak -20 °C'de saklandı. Çalışma konsantrasyonu 20 mM olacak şekilde 50 kez lizis bufferda seyreltildi.

10X Sodyum PyroPhosphate (50 mM) (NaPPi)

1.115 g NaPPi (Na₄O₇P₂·10 H₂O MA: 444.06 g/mol) 50 mL steril çift distile su içinde çözüldü ve 4 °C'de saklandı. Çalışma konsantrasyonu 5 mM olacak şekilde 10 kez lizis bufferda seyreltildi.

Proteaz Inhibitörleri

100X PMSF (100 mM)

0.174 g PMSF (PMSF MA: 174.19 g/mol) 10 mL Ethanol içinde sulandırıldı. Solüsyon alikotlanarak -20 °C'de saklandı. Çalışma konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde 100 kez lizis bufferda seyreltildi.

10X Proteaz Inhibitör Kokteyli

Bir adet Proteaz Inhibitor Kokteyl tableti (PI) (Sigma S8830) 10 mL steril çift distile su içinde çözüldü ve -20 °C'de saklandı. Çalışma konsantrasyonu 1 X olacak şekilde 10 kez lizis bufferda seyreltildi.

TNTE Hücre Patlatma Tamponu

Son konsantrasyonları 50 mM Tris-Cl, pH: 7.4, 150 mM sodyum klorür, % 1 Triton X-100, 1 mM EDTA pH: 7.0, 5 mM NaPPi, 1x PI, % 10 gliserol, 2 mM NaVan, 20 mM NaF, 1 mM PMSF olacak şekilde solüsyonlar birleştirilerek hacim 10 mL'ye tamamlandı.

1X İmmünopresipitasyon Yıkama Tamponu

Son konsantrasyonları 50 mM Tris-Cl pH: 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA pH: 8.0, % 0.1 Triton X-100 olacak şekilde hazırlandı.

5.1.9.7. İmmüno Floresanda Kullanılan Solüsyonlar

% 4 Paraformaldehit Çözeltisi

4 gr paraformaldehit (PFA MA: 30.03) 80 mL PBS içerisinde 60 °C'de ısıtılarak çözüldü. pH 1N HCl ile 6.9'a ayarlandı. Son hacim 100 mL'ye tamamlandı ve 0,45 µm filtreden geçirilerek sterilize edildi.

İmmüno Floresan Bloklama Solüsyonu

Ticari olarak alınan keçi serumundan 1 mL, 9 mL 1X PBS içine konularak % 10 bloklama solüsyonu hazırlandı.

İmmüno Floresan Permeabilizasyon Solüsyonu

% 20 Triton X 100 stoğundan 100 µL alınıp 1X PBS ile 10 mL'ye tamamlanarak % 0.2'lik çalışma solüsyonu hazırlandı.

5.1.9.8. Memeli Hücre Kültüründe Kullanılan Solüsyonlar

% 10 FBS-DMEM-Pen/Strep Besiyeri

90 mL DMEM besiyerine 10 mL FBS ve % 1 pen/strep (100 U/mL pen-100 U/mL strep) eklenerek hazırlandı.

10X PBS Stoğu

2 g potasyum klorür (KCl, MA: 75 g/mol), 2 g potasyum fosfat monobazik (KH₂PO₄, MA: 136 g/mol), 80 g sodyum klorür (NaCl, MA: 58.44 g/mol), 11.5 g sodyum fosfat dibazik (Na₂HPO₄, MA: 142 g/mol) 1 L steril çift distile su içinde çözüldü. pH, 7.2'ye ayarlandı. Çalışma konsantrasyonu 1X olacak şekilde 10 kez seyreltilerek kullanıldı.

5.1.9.9. Transfeksiyon Solüsyonları

2X HEPES

0.8 g NaCl (MA: 58.44 g/mol), 0.027 g Na₂HPO₄.2H₂O (MA: 177,99 g/mol) ve 1.2 g HEPES (MA: 238.3 g/mol) 90 mL deiyonize distile su içinde çözüldü. pH, 0.5 N NaOH ile 7.05'e ayarlandı ve hacim 100 mL'ye tamamlandı. Solüsyon 0,25 mikron filtreden geçirilerek steril edildi ve 15 mL'lik falkonlara dağıtılarak -20 °C'de saklandı.

2.5 M CaCl₂

36.75 g CaCl₂ (MA: 147.02 g/mol) 100 mL steril çift distile su içinde çözüldükten sonra 0.25 mikron filtreden geçirilerek steril edildi. 15 mL'lik falkonlara dağıtılarak -20 °C'de saklandı.

5.1.9.10. GST Pull Down için Kullanılan Solüsyonlar

Bakteri Patlatma Tamponu

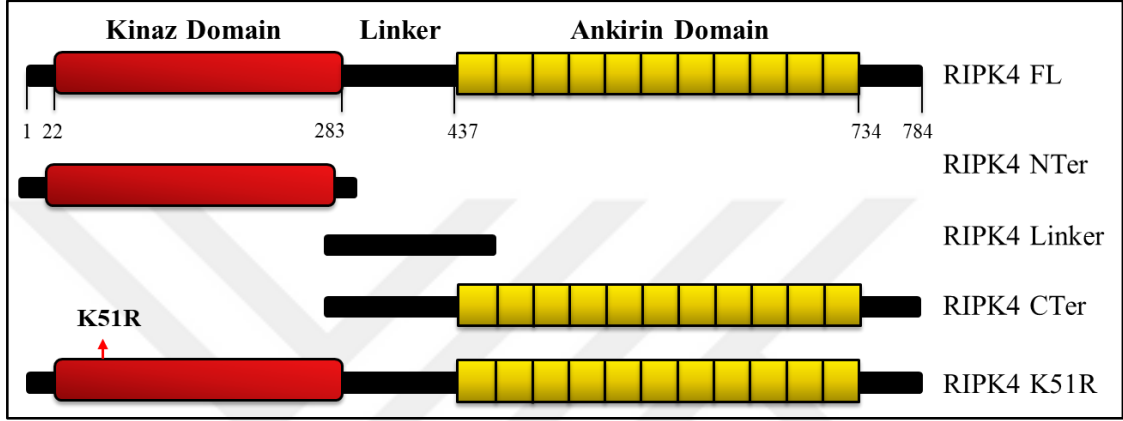
Son konsantrasyonları 10 mM Tris-Cl, pH: 7.5, 150 mM sodyum klorür, 0.5 mM EDTA pH: 7.0, % 0,5 NP-40, 1 mM PMSF, 1X PI (Sigma, S8830), 2 mM Na₃VO₄ olacak şekilde solüsyonlar birleştirildi ve hacim 10 mL'ye tamamlandı.



5.2. Yöntem

5.2.1. *RIPK4* ve *KRT14* Genlerinin Klonlanması

RIPK4 geni N terminalinde bulunan kinaz domaini, C terminalinde bulunan ankirin domaini ve bu iki domaini birbirine bağlayan linker domaininden oluşan *RIPK4* proteinini kodlamaktadır. (Şekil 10).



Şekil 10. İnsan *RIPK4* proteininin fonksiyonel bölgelerinin ve klonlanan domainlerinin şematik olarak gösterilmesi

Çalışmamızda kullanılan *RIPK4 FL* (tam uzunlukta, 87 kDa), *RIPK4*'ün N terminal domaininin 51. pozisyonunda lizinin arginine dönüşmesiyle kinaz aktivitesinin kaybolmasına neden olan *RIPK4 K51R* (Kinaz mutant formu), *RIPK4 N Ter* (kinaz domaini, 1-292 amino asitleri arası, 42 kDa), *RIPK4 Linker* (N Terminal ve C terminali bağlayan bölge, 278-438 amino asitleri arası, 27 kDa) ve *RIPK4 C Ter* (linker artı ankirin bölgeleri, 278-784 amino asitleri arası, 66 kDa) Gateway Klonlama Sistemi (ThermoFisher, ABD) kullanılarak uygun memeli ve bakteri vektörlerine daha önceden klonlanmıştır (Şekil 10) (87).

KRT14'ün tamamını klonlamak için aşağıdaki strateji uygulandı. Öncelikle HaCaT hücrelerinden elde edilen RNA'dan sentezlenen cDNA başında ve sonunda attB kuyukları olacak şekilde *KRT14*'e özgü primerler kullanılarak PCR ile çoğaltıldı. attB kuyukları içeren *KRT14* fragmanları Gateway Klonlama Sistemi kullanılarak giriş vektörlerine aktarıldıktan sonra uygun memeli ve bakteri ekspresyon vektörlerine klonlandı. Tüm bu işlemler aşağıda başlıklar halinde detaylı olarak verildi (5.2.1.1.-5.2.1.9).

5.2.1.1. RNA izolasyonu

HaCaT hücrelerinden EZNA Total RNA kiti kullanılarak RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Firmanın önerileri doğrultusunda 1×10^7 hücreyi geçmeyecek şekilde hücreler Tripsin/EDTA ile yüzeyden kaldırıldı ve hücre süspansiyonu RNaz olmayan tüpe aktarılarak 500 g'de beş dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırılarak 1000 μ L RNA solvent ajanı +20 μ L 2-merkaptoetanol olacak şekilde eklendi. Hücreler 25 gauge iğne ucu ile 10-15 kez homojenize edildi ve beş dakika oda sıcaklığında bekletildi. Sonrasında, 200 μ L kloroform eklendi, 20 saniye vorteksledi ve üç dakika oda sıcaklığında bekletildi. 4°C'de 13 000 g'de 15 dakika santrifüj edildikten sonra üst kısımda oluşan ve RNA'yı içeren renksiz faz temiz bir ependorfa aktarıldı. Süpernatana eşit hacimde % 70 etanol eklendi ve iyice vorteksledi. Örnek kolona aktarılarak oda sıcaklığında 10 000 g'de bir dakika santrifüj edildi. Kolon 500 μ L RNA wash buffer I ile yıkanarak 10 000 g'de 30 sn santrifüj edildi. Kolon temiz bir iki mL toplama tüpüne aktarıldı. iki defa 500 μ L RNA wash buffer II eklendi ve oda sıcaklığında 10 000 g'de bir dakika santrifüj edildi. Fazla alkolü uzaklaştırmak için kolon iki dakika yüksek devirde santrifüj edildi. Kolon 1.5 mL'lik temiz bir ependorfa transfer edildikten sonra RNA'yı ayırtırmak için kolonun merkezine 45-75 μ L DEPC ile muamele edilmiş su eklenerek oda sıcaklığında beş dakika bekletildi. 10 000 g'de bir dakika santrifüj edilerek RNA ependorf tüpe toplandı. RNA konsantrasyonu Nanodrop cihazı ile belirlendikten sonra, örnekler -70°C'ye kaldırıldı.

5.2.1.2. RNA'dan cDNA Sentezi

İzole edilen RNA'dan "Super Script III First Strand Synthesis System" kiti kullanılarak cDNA sentezlendi. Yöntem üretici firmanın önerdiği doğrultuda Tablo 1 ve Tablo 2'de belirtilen şekilde gerçekleştirildi.

Tablo 1. cDNA sentezi için hazırlanan kalıp-primer karışımı

Bileşenler	1 X Reaksiyon
2.5 μ g total RNA	2.7 μ L
50 mM oligodT	1 μ L
10 mM dNTP karışımı	1 μ L
DEPC-su	10 μ L'ye tamamlandı.

Yukarıdaki tabloda belirtildiği gibi hazırlanan karışım 65 °C’de beş dakika inkübe edildikten sonra en az bir dakika buza bekletildi.

Tablo 2. cDNA sentez reaksiyonu içeriği

Bileşenler	1 X Reaksiyon
10X RT bufer	2 µL
25 mM MgCl ₂	4 µL
0.1 M DTT	2 µL
RNaz OUT (40 U/ µL)	1 µL
SuperScript III RT (200 U/ µL)	1 µL

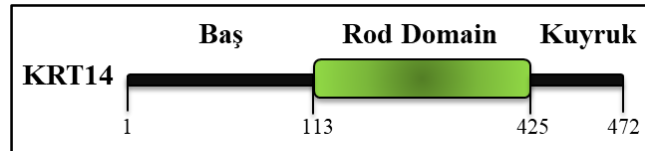
Tablo 2’ye göre hazırlanan cDNA sentez reaksiyonundan 10 µL Tablo 1’e göre hazırlanan RNA-primer karışımına eklendi ve nazıçke karıştırdı. Reaksiyon, Thermo cycler cihazı kullanılarak 50 °C’de 50 dakika, 85 °C’de beş dakika bir döngü olacak şekilde gerçekleştirildi. Sonrasında örnek buza alındı ve kalan RNA’yı uzaklaştırmak için 1 µL RNase H eklendi ve 20 dakika 37 °C’de inkübe edildi. Örnek -20 °C’de saklandı.

5.2.1.3. Spektrofotometrik Yöntemle DNA ve RNA’nın Kantitatif ve Kalitatif Analizi

DNA ve RNA moleküllerinin konsantrasyon ve saflığının belirlenmesi için NanoDrop cihazında 1 µL örnek OD260/OD280 değerlerinde ölçüldü.

5.2.1.4. *KRT14*’ün PCR ile Çoğaltılması

KRT14 geni baş ve kuyruk domainleri arasında kalan bir rod domaininden oluşmaktadır (Şekil 11).



Şekil 11. İnsan KRT14 proteininin ve fonksiyonel bölgelerinin şeması

Tam uzunlukta *KRT14*, dizinin başında ve sonunda uygun attB kuyrukları olacak şekilde Tablo 3’de belirtilen primer çifti ile Tablo 4’deki koşullarda Termal Cycler ile çoğaltıldı.

Tablo 3. *KRT14* cDNA larının oluşturulmasında kullanılan primer çifti

Primerin Adı	Primerin 5'-3' baz dizisi	Primer Banka No
<i>KRT14</i> attB1 Forward	ggggacaagtttgatacaaaaaagcaggcttc ATGACCACCTGCAG CCGCC	1037
<i>KRT14</i> attB2 Reverse	gggaccactttgtacaagaagctgggtc TCAGTTCTTGGTGCGA AGGACCTG	1039

*Koyu gösterilen bölge attB kısmıdır.

Tablo 4. Pwo enzimi için kullanılan PCR koşulları

PCR Karışımı I	
Kalıp DNA (700 ng)	8 µL
dNTP karışım (100 mM)	0.5 µL
Forward Primer (10 pmol/µL)	1.3 µL
Reverse Primer (10 pmol/µL)	1.3 µL
ddH ₂ O	1.4 µL
PCR Karışımı II	
Buffer (MgSO ₄) (25 mM)	2.5 µL
Pwo DNA polimeraz 5U/ µL	0.5 µL
ddH ₂ O	9.5µL

Tablo 4'e göre hazırlanan karışım I'den 12.5 µL karışım II üzerine eklendi. PCR reaksiyonu; başlangıç denatürasyonu 94 °C'de iki dakika; 15 döngü olacak şekilde 94 °C'de 15 sn denatürasyon, 65 °C'de 30 sn bağlanma, 72 °C iki dakika sentez, 72 °C altı dakika son sentez olacak şekilde hata oranı düşük Pwo DNA Polymeraz enzimi kullanılarak gerçekleştirildi.

5.2.1.5. DNA Analizleri için Agaroz Jel Elektroforezi

Analiz edilecek DNA molekülünün boyutuna göre % 0.8'lik ya da % 1'lik agaroz jel hazırlandı. 100 mL 1x TAE içerisinde % 0.8'lik jel için 0.8 g; % 1.5'luk jel için 1.5 g agaroz kaynatıldı ve sıcaklığı 55-60 °C'ye düştüğünde son konsantrasyonu 0.1-0.2 µg/mL olacak şekilde etidyum bromür eklendi. Agaroz jel yatay jel elektroforez kasetlerine döküldükten sonra donması beklendi. Agaroz jel donduktan sonra TAE tamponu içeren elektroforez tankına yerleştirildi. DNA örnekleri Orange G DNA yükleme tamponu ile karıştırılarak jele yüklendi. Elektroforez işlemi 60-100 V sabit direnç altında 30-45 dakika gerçekleştirildi. DNA bantları UV transillüminatör ile görüntülendi.

5.2.1.6. Çoğaltılan *KRT14*'ün Jelden Pürifikasyonu

KRT14 PCR ürününün tamamı % 1'lik agaroz jelde 100 volt akımda 1 saat yürütüldükten sonra Qiagen Gel Extraction Kit kullanılarak jelden temizlendi. DNA fragmenti agaroz jelden kesilerek darası alınmış temiz bir tüpe aktarıldı. Jel parçasının miktarı ölçüldükten sonra 100 mg jele yaklaşık 100 µL olacak oranda üç hacim Buffer QG eklendi. 50 °C'de 10 dakika inkübe edildi. Jel tamamen eriyinceye kadar iki-üç dakika da bir vortekslendi. Jel tamamen eriyince bir hacim izopropanol eklendi ve karıştırıldı. Karışım kitin sağladığı kolona aktarılarak 13 000 rpm'de bir dakika santrifüj edildi. Sırasıyla 500 µL QG Buffer, 750 µL PE buffer eklenerek 13 000 rpm'de bir dakika santrifüj edildi. Kolon temiz tüpe aktarıldıktan sonra 50 µL DNA elüsyon tamponu (10 mM Tris-Cl, pH 8,5) ile 13 000 rpm'de bir dakika santrifüj edilerek elüsyon yapıldı.

5.2.1.7. *KRT14* Giriş Vektörünün Oluşturulması

PCR ile çoğaltılan ve agaroz jelden elde edilen *KRT14*, Gateway pDONR201 donör vektörüne Tablo 5'deki koşullara göre BP reaksiyon ile yerleştirilerek *KRT14* içeren giriş vektörü oluşturuldu.

Tablo 5. Gateway Sistemi BP reaksiyonu içeriği

BP Karışımı	
PCR ürünü (25 ng/µL)	1 µL
Giriş vektörü (25 ng/µL)	1 µL
BP Clonase II enzim karışımı	0.5 µL
Toplam	2.5 µL

BP Klonlama reaksiyonu 25°C'de iki saat inkübasyondan sonra 0.35 µL Proteinaz K eklenerek 37°C'de 10 dakika bekletilmek suretiyle reaksiyon durduruldu.

BP reaksiyonu sonrasında *KRT14* için oluşturulan giriş vektörü DH5α'ya transforme edildi (*Bkz Başlık: 5.2.2.1*). Büyüyen bakterilerden birer koloni seçilerek 50 µg/mL Kanamisin içeren LB besiyerinde çoğaltıldıktan sonra plazmit izolasyonu yapıldı (*Bkz Başlık: 5.2.2.2*). *KRT14*'ün giriş vektörüne klonlandığını doğrulamak üzere vektör dizilendi (*Bkz Başlık 5.2.1.10*).

5.2.1.8. *KRT14* Ekspresyon Vektörlerinin Oluşturulması

KRT14 giriş vektörü oluşturulduktan ve dizi analizi ile doğrulandıktan sonra, giriş vektöründen Gateway LR reaksiyonu ile Tablo 6’da belirtilen koşullara göre farklı varış vektörlerine klonlanarak ekspresyon vektörleri oluşturuldu (Tablo 7). *RIPK4*, domainleri ve *KRT14*’ün klonlandığı varış vektörleri Tablo 7’de detaylı olarak gösterilmiştir.

Tablo 6. Gateway Sistemi LR reaksiyonu içeriği

LR Karışımı	
Giriş vektörü (25 ng/μL)	1 μL
Varış vektörü (25 ng/μL)	1 μL
LR Clonase II enzim karışımı	0.5 μL
Toplam	2.5 μL

LR reaksiyonu, 25°C’de dört buçuk saat inkübasyondan sonra 0.35 μL Proteinaz K eklenerek 37°C’de 10 dakika bekletilmek suretiyle reaksiyon durduruldu.

LR reaksiyonu sonrasında *KRT14* için oluşturulan ekspresyon vektörleri DH5α’ya transforme edildi (*Bkz Başlık: 5.2.2.1*). Büyüyen bakterilerden birer koloni seçilerek 100 μg/mL ampisilin içeren LB besiyerinde çoğaltıldıktan sonra plazmit izolasyonu yapıldı. (*Bkz Başlık: 5.2.2.2*) *KRT14*’ün ekspresyon vektörlerine klonlandığını doğrulamak üzere vektör dizilendi. (*Bkz Başlık 5.2.1.10*)

Tablo 7. *RIPK4* ve *KRT14*’ün LR reaksiyonu ile klonlandığı varış vektörleri

Vektörlerin hedefleri	Füzyon proteinler ve buldukları vektörler	Klonlanan gen
Memeli	3xFLAG, p3xFLAG-CMV/DEST	<i>RIPK4 FL</i> <i>RIPK4 N Ter</i> (Kinaz Domaini) <i>RIPK4 Linker</i> <i>RIPK4 C Ter</i> (Linker ve ankirin domaini)
Memeli	GST, pDEST-27	<i>KRT14</i>
Bakteri	GST, pGEX-KG/DEST	<i>KRT14</i>
Bakteri	His, pDEST17	<i>RIPK4 FL</i>

5.2.1.9. KRT14 Klonlarının Dizilenmesi

KRT14 vektörleri 0.2 µg pGEM plazmidi (3272 bp) ile birlikte % 0.8'lik agaroz jelde yürütüldü. Her bir dizileme reaksiyonuna konulacak kalıp DNA miktarı pGEM miktarına göre ayarlanarak yaklaşık 50-100 ng arasında olacak şekilde Tablo 8'de belirtilen primerler ile dizileme yapıldı.

Tablo 8. KRT14 giriş ve ekspresyon vektörlerinin dizilenmesinde kullanılan primerler

Primerin Adı	Primerin 5'-3' Baz Dizisi	Primer No
KRT14_1*_Forward_attB1	ggggacaagttgtaca metaagcaggcttcATGA CCACCTGCAGCCGCC	1037
KRT14_1419*_Reverse_attB2	ggggaccactttgtaca metaagctgggtcTCAGT TCTTGGTGCGAAGGACCTG	1039
KRT14_1174*_Forward	GAGCAGCAGAACCAGGAGTA	1104
KRT14_359*_Reverse	TGCATGGTCACCTTCTCACT	1105
KRT14_463*_Forward	CCGCACCAAGTATGAGACAG	1206
KRT14_714*_Reverse	CTGCATCTCCAGGTCAGCT	1207

*Sekansın başladığı baz sayısı

Dizileme reaksiyonu BigDye® Terminatör v3.1 Cycle Sequencing kitinin önerdiği şekilde Tablo 9'a göre gerçekleştirildi.

Tablo 9. Dizileme reaksiyonu için PCR karışımı

Bileşenler	1X Reaksiyon
BigDye	1 µL
5X Buffer	1.5 µL
Forward veya Reverse Primer (10 pmol/µL)	0.32 µL
Kalıp Vektör (50-100 ng)	1.5 µL
dH ₂ O	5.68 µL
Toplam	10 µL

Döngüsel dizileme reaksiyonu Applied Biosystems 9700 Thermocycler cihazında gerçekleştirildi. PCR koşulları; başlangıç denatürasyonu 96 °C'de iki dakika, denatürasyon 25 döngü olmak üzere 96 °C'de 15 saniye, bağlanma 50 °C'de 20 saniye, sentez 60 °C'de iki dakika olarak ayarlandı.

Dizileme sonucunda elde edilen PCR ürünleri Sephadex®G-50 ile firmanın önerdiği protokole göre saflaştırıldı. Saflaştırma esnasında 1 g Sephadex®G-50 tartılarak 12-13 mL dH₂O içerisinde çözüldü. Sonrasında kolonlar (Macherey-Nagel) toplama tüpleri üzerine alındı ve kolonlara 600 µL Sephadex®G-50 eklenerek 750 g'de iki buçuk dakika santrifüj edildi. Toplama tüpleri atıldı ve kolonlar 1.5 mL'lik ependorf tüplerin üzerine alındı. PCR ürünleri kolondaki Sephadex®G-50 üzerine sephadexin yapısını bozmadan, dikkatlice transfer edilerek 750 g'de beş dakika santrifüj edildi. Saflaştırılan PCR ürünleri 96 kuyulu platalere transfer edilerek ABI 3130 genetik analiz cihazına yüklendi ve dizileme işlemi gerçekleştirildi. Dizileme sonuçları Chromas 2.32 ve SeqScape® software v2.5 programları ile analiz edildi. Elde edilen veriler gen bankasından alınan referans *KRT14* (Ref Seq: NM_000526) dizisi ile karşılaştırıldı.

5.2.2. Bakteri Kültür Teknikleri

5.2.2.1. *E. coli* DH5α Suşuna Plazmit (Vektör) Transformasyonu

Inoue yöntemiyle daha önceden kompetan hale getirilen *E. Coli* suşu *DH5α* (87) 80 °C'den çıkarılarak buz üzerinde çözüldü. 0.5 µg plazmit 50 µL *DH5α* suşuna transfer edilerek beş dakika da bir hafifçe karıştırmak suretiyle 30 dakika buz üzerinde bekletildi. 42 °C'de 30 saniye ısı şokuna maruz bırakıldıktan sonra iki dakika boyunca buzda bekletildi. Bir mL LB besiyeri eklendikten sonra, örnekler 37 °C çalkalamalı inkübatörde 250 rpm hızında bir saat boyunca inkübe edildi. Süre sonunda örnekler 3000 rpm hızında beş dakika santrifüj edildi. Bir mL LB ile yıkanan örnekler beş dakika daha santrifüj edildi. Süpernatant döküldükten sonra bakteri pelleti üzerine 100 µL LB eklenerek iyice karıştırıldı. Örnekler, plazmitin içerdiği antibiyotik direncine bağlı olarak ya 50 µg/mL kanamisin ya da 100 µg/mL ampisilin içeren LB-Agar katı besiyeri içeren petrilere ekildi ve 37 °C'deki inkübatörde bir gece boyunca büyümeye bırakıldı.

5.2.2.2. Bakteriden Plazmit İzolasyonu

Transforme edilmiş ve petri kaplarında büyümeye bırakılmış bakterilerden tek bir koloni seçilerek kanamisin/ampisillin içeren LB besiyerine ekildi ve 37 °C'de 200 rpm hızında 12-16 saat arasında çalkalamalı inkübatörde büyütüldü. Plazmit izolasyonu EZNA endofree mini prep kitin kataloğunda önerdiği şekilde gerçekleştirildi. Gece boyunca büyütülmüş satüre kültür 10 000 g de bir dakika santrifüj edilerek hücreler çöktürüldü. Süpernatant döküldükten sonra pellet üzerine önce içinde RNaz A (10mg/µL)

bulunan Solüsyon I'den 250 µL eklenerek iyice süspanse edildi. 250 µL Solüsyon II eklenerek tüpler nazıkçe alt üst edildikten sonra berrak bir lizat elde edildi. Lizatlar iki-üç dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 125 µL N3 solüsyonu eklendi ve beyaz presipitatların oluşması için tüpler bir kaç kez alt üst edildi. Örnekler maksimum hızda 20 dakika santrifüj edilerek bu presipitatların iyice çökmesi sağlandı. antrifüj sonunda presipitata değmeden süpernatant temiz bir tüpe alındı ve hacmi ölçüldü. Lizat üzerine 1:1 oranında ETR Binding Solüsyonu eklendi ve tüp 10 defa alt üst edilerek karıştırıldı. Diğer taraftan plazmiti saflaştırmada kullanılacak kolonlara 100 µL 3M NaOH eklendi ve maksimum hızda oda sıcaklığında bir dakika santrifüj edilerek dengelendi. Sonrasında, 500 µL lizat kolonlara transfer edilerek maksimum devirde oda sıcaklığında bir dakika santrifüj edildi. Daha sonra kolonlara sırasıyla 500 µL ETR Wash Solüsyonu, 500 µL HBC Solüsyonu ve 700 µL DNA Wash solüsyonu eklendi ve kolonlar maksimum devirde santrifüjlenerek yıkandı. Kolonlar temiz tüplere transfer edilerek üzerlerine 50-100 µL elüsyon solüsyonu eklendi ve bir dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonrası maksimum devirde santrifüj edilerek plazmitin kolondan ayrılması sağlandı. Elde edilen plazmitlerden 2 µL % 0.8'lik agaroz jelde yürütüldükten sonra plazmit konsantrasyonları Nanodrop cihazında belirlendi. Örnekler -20°C'ye kaldırıldı.

5.2.2.3. Bakterilerin IPTG ve L-Arabinoz ile İndüklenmesi

Ekspresyon vektörü, IPTG ile indüklenecek kültür için BL21-DE3, L-Arabinoz ile indüklenecek kültür için BL21-AI *E. coli* suşuna transforme edildi. Transforme edilen kültürlerden seçilen koloniler sıvı kültürlerle aktarılıp bir gece büyümeye bırakıldı. Büyüyen sıvı kültürlerden alt kültür başlatmak üzere OD 600 değeri ölçülerek 0.2'ye ayarlandı. Bu alt kültür proteinin çözünür olmasını engelleyen inklüzyon cisimcikleri oluşumunu önlemek amacıyla düşük sıcaklıkta OD 0,4-0,6 arasında olana dek büyümeye bırakıldı. OD uygun değere gelince henüz indüklenmemiş kültürden 1,5 mL alınarak 5000 g'de beş dakika santrifüj edildi. Süpernatant iyice uzaklaştırılarak bakteri pelleti kültürün 0. saati olarak SDS-PAGE jelde yürütülmek üzere -80 °C'ye kaldırıldı. Geri kalan kültür 100-150 uM aralığında IPTG veya % 0.2 L-Arabinoz ile indüklenerek 20 °C'de çalkalamalı inkübatörde bekletildi. Belirlenen inkübasyon süreleri sonunda kültür 5000 g'de beş dakika santrifüj edildi. Süpernatant iyice uzaklaştırılarak bakteri pelleti daha sonra analiz edilmek üzere -80 °C'ye kaldırıldı.

5.2.2.4. Bakterilerin Patlatılması

Bakteriler patlatılacağı zaman pelletler -80 °C'den çıkarıldı. Pellet üzerine 200 µL % 0.5 NP-40 içeren bakteri patlatma tamponu eklenerek buz üzerinde 20 dakika orbital çalkalayıcı üzerinde bekletildi. Patlatma sonrası bakteriler % 50 amplitude, 10 saniye pulse, 50 saniye bekleme olacak şekilde üç döngü buz üzerinde sonike edildi. Sonikasyonun ardından bakteriler 15 000 g'de 20 dakika +4 °C'de santrifüj edilerek süpernatant toplandı ve temiz bir tüpe alındı.

5.2.3. Hücre Kültürü Teknikleri

Bu çalışmada, İmmünopresipitasyon deneylerinde insan embriyonik böbrek hücreleri olan HEK293 (ATCC® CRL-1573™) ve DKFZ'den hibe olarak alınan yetişkin immortal insan keratinosit hücre hattı olan HaCaT hücreleri ve immünofloresan deneylerinde servikal kanser hücrelerinden köken alan HeLa (ATCC® CCL-2™) hücre hatları kullanılmıştır. Tüm hücreler % 1 Penisilin ve streptomisin (Pen/Strep) içeren % 10 FBS-DMEM yüksek glikozlu besiyerinde 37 °C'de nemlendirilmiş % 5 CO₂ içeren doku kültürü inkübatöründe büyütülmüştür.

5.2.3.1. Hücrelerin Çözülmesi

Sıvı nitrojen tankından çıkarılan hücreler 37°C su banyosunda içinde az bir miktar buz kalacak şekilde çözüldü ve buz üzerine alındı. Çözülen hücreler üzerine büyüme medyumu olan soğutulmuş % 20 FBS, % 1 Pen/Strep içeren yüksek glukozlu DMEM besiyerinden eklendi ve 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant döküldükten sonra bir defa daha yıkama gerçekleştirildi. Sonrasında hücreler aynı besiyeri ile süspanse edildi ve T25'lik flaska ekildi. Ertesi gün besiyeri % 10 FBS ve % 1 Pen/Strep içeren DMEM ile değiştirildi.

5.2.3.2. Hücrelerin Pasajlanması

Hücreler yaklaşık % 80-90'lık konfluensiye ulaştığında pasajlandı. Pasajlanacak hücrelerin üzerinden öncelikle besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreler PBS ile yıkandı. T25 flaska 1 mL ve T75 flaska 3 mL olacak şekilde tripsin/EDTA (T/E) eklenerek inkübatöre kaldırıldı. Hücreler yüzeyden kalkana kadar T/E'ye maruz bırakıldı. Hücrelerin üzerine T/E reaksiyonunu sonlandırmak için T25'e 5 mL, T75'e 10 mL olacak şekilde % 10 FBS içeren besiyeri eklendi. Hücreler toplanarak temiz bir falkon tüpe aktarıldı ve 1200

rpm’de beş dakika santrifüj edildi. Hücre pelleti uygun hacimde besiyeri ile 1/5 ya da 1/10 oranında seyreltilerek temiz flaslara aktarıldı.

5.2.3.3. Hücrelerin Dondurulması

Dondurulması planlanan hücreler ilk etapta T/E ile yüzeyden kaldırıldı ve santrifüj edildi. Hücreler önceden soğutulmuş antibiyotik içermeyen % 10 FBS-DMEM besiyeri ile bir defa yıkandıktan sonra hücre pelleti 900 µL soğutulmuş % 20 FBS-DMEM içerisinde süspanse edildi. Hücreler 10 dakika buzda bekletildikten sonra 100 µL DMSO (% 10) eklenerek 10 dakika daha bekletildi. T25’den toplanan hücreler bir adet dondurma tüpünde, T75’den toplanan hücreler ise üç adet dondurma tüpünde donduruldu. Dondurulacak hücreler Mr. Frosty içinde -80 °C’de bir gün bekletildikten sonra uzun dönem saklamak için sıvı azot tankına transfer edildi.

5.2.3.4. HEK293 Hücrelerinin Kalsiyum Fosfat Yöntemi ile Transfeksiyonu

HEK293 hücrelerinin transfeksiyonu kalsiyum fosfat transfeksiyon metodu kullanılarak gerçekleştirildi (88). Ekspresyon vektörlerinin HEK293 memeli hücrelerine transfeksiyonu için altı kuyucuklu tabaklara yaklaşık % 30-40 konfluent olacak şekilde % 10 FBS içeren DMEM içine ekildi ve hücrelerin tutunması için bir gece bekletilmek üzere etüve kaldırıldı. 1-2 µg plazmit steril su ile 20 µL’ye tamamlandı. Diğer taraftan 2.5 M CaCl₂’den 10 µL alınarak son konsantrasyon 12.5 mM CaCl₂ olacak şekilde 70 µL steril distile suyun içinde seyreltildi. Final hacim 100 µL olacak şekilde 20 µL DNA-su karışımına 80 µL CaCl₂-su karışımı eklendi. DNA-CaCl₂ karışımı düşük hızda vortekslenirken üstüne damla damla 100 µL 2xHEPES eklenerek, toplam hacim 200 µL’ye tamamlandı. DNA- CaCl₂-HEPES karışımı 20 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 1.8 mL besiyeri içeren hücrelerin üzerine yavaşça damla damla eklendi. 18 saat sonra besiyeri Pen/Strep antibiyotiği içerecek şekilde değiştirildi. Transfeksiyondan 24 saat sonra IP analizi gerçekleştirildi.

5.2.3.5. HeLa Hücrelerinin Dreamfect Yöntemi İle Transfeksiyonu

HeLa Hücrelerinin transfeksiyonu Dreamfect ajanı kullanılarak üretici firmanın önerdiği şekilde gerçekleştirildi. Ekspresyon vektörlerinin HeLa memeli hücrelerine transfeksiyonu için altı kuyucuklu tabaklara önceden steril edilmiş 24x24 mm boyutlarında lameller konuldu. Lamellerin üzerine 1.5×10^5 - 3×10^5 arasında hücre % 10 FBS içeren DMEM besiyeri içine ekildi ve hücrelerin tutunması için bir gece bekletilmek

üzere etüve kaldırıldı. Ertesi gün transfeksiyondan önce kültür besiyeri 1.8 mL serumsuz (FBS içermeyen) besiyeri ile değiştirildi. Transfeksiyon için 100 µL serumsuz besiyeri içinde 1.5-2 ug plazmit olacak şekilde ayarlandı. Diğer taraftan 1:4 (DNA:Dreamfect) oranında transfeksiyon ajanı 100 µL serumsuz besiyeri içinde seyreltildi. DNA-DMEM karışımı Dreamfect-DMEM karışımı içine eklendikten sonra 15-20 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Dört-altı saat sonra kültürün besiyeri % 10 FBS, % 1 Pen/Strep içeren besiyeri ile değiştirildi.

5.2.4. Protein Analiz Yöntemleri

5.2.4.1. Hücre Lizatı Eldesi

Protein lizati elde edilecek hücreler öncelikle buz üzerine alındı. Hücrelerin üzerindeki besiyeri dikkatlice çekildikten sonra soğuk PBS ile yıkandı. Hücrelerin üzerine 50 mM Tris-Cl, pH: 7.4, 150 mM sodyum klorür, % 1 Triton X-100, 1 mM EDTA, 5 mM NaPpI, 1x PI, 2 mM NaVan, 20 mM NaF, 1 mM PMSF ve % 10 gliserol içeren TNTE patlatma tamponu eklendi. Hücreler 30 dakika boyunca orbital çalkalayıcı üzerinde bekletildi. Süre sonunda hücreler kazıyıcı ile temiz tüplere toplandıktan sonra buz üzerinde beş saniye pulse 25 saniye bekleme olmak üzere toplamda beş döngü sonikasyon gerçekleştirildi. Sonike edilen örnekler 4 °C'de 13000 g'de 15 dakika santrifüj edildi ve hücre lizati içeren süpernatant temiz tüpe aktarıldı. Daha sonra analiz edilmek üzere tüplere 5X yükleme tamponundan 1X olacak şekilde eklenerek -20 °C'ye kaldırıldı. Örneklerin daha uzun süre saklanmaları durumunda ise hücre lizati sonikasyon yapılmadan önce -80°C'ye kaldırıldı.

5.2.4.2. BCA Testi ile Protein Konsantrasyonunun Ölçülmesi

Elde edilen protein lizatının konsantrasyonu BCA protein konsantrasyonu ölçüm kiti (Thermo Scientific) kullanılarak firmanın önerdiği şekilde ölçüldü. Öncelikle konsantrasyonu bilinen BSA (2 mg/mL) standardından 25, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500 ve 2000 µg'lık dilüsyonlar hazırlandı. Hazırlanan her bir BSA standardı ile birlikte konsantrasyonu belirlenmek istenen protein lizatından 25'er µL 96 kuyucuklu tabağa replika olacak şekilde koyuldu. Kitin sağladığı solüsyon A'dan 50 kat ve Solüsyon B'den bir kat eklenerek hazırlanan çalışma solüsyonundan 200 µL örneklerin üzerine eklendi. Normalde rengi yeşil olan çalışma solüsyonu protein ile birleşince mora dönüşmektedir. Bu renk değişimi absorbansı 562 nm dalga boyunda plate okuyucuda ölçüldü. BSA

standartları kullanılarak OD değeri ve protein konsantrasyonuna dayalı bir standart eğrisi microsoft excel programında oluşturuldu. Konsantrasyonu araştırılan proteinin OD değeri bu standart eğrisi kullanılarak hesaplandı.

5.2.4.3. İmmüno blot Yöntemi

SDS-PAGE Jellerinin Hazırlanması

SDS-PAGE Jel Elektroforez CamLarının Hazırlanması

Kısa ve uzun camlar distile sudan geçirildikten sonra % 70 alkol ile iyice silindi. Temizlenen uzun ve kısa camlar birleştirilerek jel standına yerleştirildi.

SDS-PAGE Ayırma Jelinin Hazırlanması

RIPK4 ve KRT14'ün aynı jelde görüntülenebilmesi için ayırma jeli % 7.5 olarak belirlendi. SDS-PAGE jeli Tablo 10'da belirtildiği şekilde hazırlandıktan sonra yükleme jeli için yer ayıracak şekilde kısa camın yaklaşık bir cm altına gelene kadar döküldü. Ayırma jelinin hava ile temasının engellenmesi ve yüzeyinin düz olması için üzerine hemen izopropanol eklendi.

Tablo 10. SDS-PAGE ayırma jeli içeriği

Jel İçeriği	% 7.5
ddH ₂ O	2.73 mL
Akrilamid (% 40 acrylamid mix)	0.94 mL
1.5 M Tris-HCl pH 8.8	1.25 mL
% 10 SDS	0.05 mL
*% 10 APS	0.05 mL
TEMED	5 µL
Toplam	5 mL

*Taze hazırlanmalıdır.

SDS-PAGE Yükleme Jelinin Hazırlanması

Ayırma jeli polimerleştikten sonra (30-60 dakika), öncelikle jelin üzerindeki izopropanol döküldü ve distile su ile iyice yıkandı. Yükleme jeli Tablo 11'de belirtildiği şekilde hazırlandıktan sonra bir cm'lik boşluğa döküldü. 10 veya 15 kuyucuklu taraklar camlar arasına dikkatlice yerleştirildi. Polimerizasyon için 30-60 dakika bekledikten sonra nemli peçeteye sarılarak +4 °C'ye kaldırıldı.

Tablo 11. SDS-PAGE yükleme jeli içeriği

Malzemeler	% 5
ddH ₂ O	1.50 mL
Acrylamid (30%)	0.65 mL
0.5 M Tris-HCl pH 6.8	0.35 mL
10% SDS	25 µL
*10% APS	50 µL

*Taze hazırlanmalıdır.

SDS-PAGE Jel Elektroforezi

Örneklerin Yüklenmesi ve Yürütülmesi

-20 °C'den çıkarılan protein lizatlarının üzerine 5x yükleme tamponundan son konsantrasyonu 1x olacak şekilde eklenerek 99 °C'de beş-yedi dakika kaynatıldı. Kaynayan örnekler beş dakika yüksek devirde santrifüj edildi ve yüklemeye uygun hale getirildi. +4 °C'den çıkarılan jellerdeki taraklar çıkarılarak kuyular distile su ile iyice yıkandı. Jel yükleme standı içine yerleştirildikten sonra tank içerisine konuldu. Tank yürütme tamponu ile doldurulduktan sonra ilk kuyuda 1 µL protein markör (Biorad, 1610374) olmak üzere örneklerden 20-30 µL yükleme yapıldı. Jel öncelikle 75 Volt'da 15 dakika sonra 100 Volt'da 90-100 dakika yürütüldü.

İmmüno blotlama

SDS PAGE jelindeki örneklerin transferi için nitroselüloz membran kullanılarak ıslak blotlama yapıldı. Öncelikle bir spatula yardımı ile camlar birbirinden yavaş ve dikkatlice ayrıldı ve dengelenmesi için transfer tamponuna aktarıldı ve 10 dakika inkübe edildi. Diğer taraftan jel ile aynı büyüklükte olacak şekilde nitroselüloz membran kesilerek dengelenmesi için 45 °C'lik açıyla transfer tamponu içine konularak 10 dk inkübe edildi. Blotlama kasetinin siyah (anot) yüzüne önceden transfer tamponunda ıslatılmış bir adet sünger yatak ve iki adet ince üç mm whatman kağıdı yerleştirildi. Kağıdın üstüne jel hava kabarcığı kalmayacak şekilde dikkatlice yerleştirildi. Jelin üstüne membran dikkatlice yerleştirildikten sonra membranın üstüne iki adet ince 3 mm Whatman kağıdı ve bir adet ıslatılmış sünger yatak yerleştirilerek sandviç oluşturuldu. Kaset transfer tamponu içeren tanka anot (siyah) ve katot (kırmızı) tarafta olacak şekilde yerleştirildi. Transfer süresince karışması için tank içine magnetik karıştırıcı konuldu.

Transfer +4 °C’de 100 Voltta bir saat on beş dakika yapıldı. Transfer sonrasında membran kasetten çıkarılarak transferin olduğu yüzey işaretlendi ve TBS içine aktarıldı, üç kez beşer dakika yıkandıktan sonra % 5 yağsız süt tozu içeren bloklama tamponu içerisinde bir-iki saat oda sıcaklığında veya gece boyu +4 °C’de orbital karıştırıcıda inkübasyona bırakıldı. Bloklama sonrası FLAG antikoru % 2.5’lik yağsız süt tozu içerisinde 1/5000, GST antikoru % 2.5’lik yağsız süt tozu içerisinde 1/1000 olacak şekilde hazırlandı. Membran oda sıcaklığında en fazla iki saat inkübasyon süresi uzadığında da +4 °C’de orbital karıştırıcıda inkübasyona bırakıldı. Birincil antikor ile inkübasyonundan sonra membran beş kez beş dakika % 0.05’lik Tween 20 içeren TBS ile (TBST) ile çalkalanarak yıkandı. Daha sonra % 2.5’lik yağsız süt tozu içerisinde, Anti-FLAG primer antikoru için 1/5000 dilüsyonda HRP konjuge anti fare, Anti-GST antikoru için 1/8000 dilüsyonda HRP konjuge anti-rabbit sekonder antikor solüsyonu hazırlandı ve membran orbital çalkalayıcı üzerinde bir saat inkübe edildi. İkincil antikor ile inkübasyondan sonra membran tekrar beş kez beş dakika TBST ile yıkandı. Membran son bir kez TBS ile yıkandıktan sonra pens yardımıyla temiz bir kaba alındı. Membranı görüntüleyebilmek amacıyla 0.5 mL ECL solüsyonu (BioRad Clarity Western ECL bileşenleri 1:1 oranında karıştırıldı) ile üç dakika muamele edildi. BioRad Chemidoc Görüntüleme Cihazı yardımı ile membran görüntülendi ve analiz edildi.

5.2.5. İmmünopresipitasyon Yöntemi

RIPK4 ile KRT14’ün etkileşiminin IP ile analiz edilmesi amacıyla FLAG-RIPK4, FLAG-RIPK4 N Ter, FLAG-RIPK4 Linker, FLAG-RIPK4 C Ter ve FLAG-RIPK4 K51R ile GST-KRT14 ekspres eden plazmitler 100 mm platelerde HEK293 hücre hattı hücrelerine birlikte transfekte edildi. Transfeksiyondan 24 saat sonra 1 mL TNTE tamponu ile patlatılarak protein lizatı elde edildi. IP işlemine başlamadan önce 1 mL hücre lizatından her bir genin eksprese olup olmadığını kontrol edebilmemize olanak sağlayacak olan total protein analizi için 80 µL kadar ayrıldı.

5.2.5.1. Protein G Agaroz Boncukların Hazırlanması

Ticari olarak satın alınan G agaroz boncuklardan (Invitrogen, 15920-010) örnek başına kullanılacak boncuk miktarı üretici firmanın önerdiği şekilde hesaplanarak ucu kesik pipet ucu ile temiz bir tüpe aktarıldı. Boncukların üzerine 1 mL % 0.1 Triton X 100 içeren IP yıkama solüsyonu eklendi ve 1000 g’de bir dakika santrifüj ile çöktürüldü. Bu

yıkama işlemi toplam beş kez gerçekleştirildi ve boncuklar kullanılana kadar +4 °C'de bekletildi.

5.2.5.2. Hücre Lizatının Ön Temizliği

G agaroz boncukların bağlamak istediğimiz protein dışındaki proteinler ile özgül olmayan bağlanmasını önleyebilmek amacıyla protein lizatına 10 µL IgG kaplı boncuk eklendi. Hücre lizatı dönen karıştırıcıda bir saat süreyle +4 °C'de döndürüldü. Ön temizlik sonrası lizat 1000 g'de bir dakika santrifüj edilerek boncukların çöktürülmesi sağlandı. Çöken boncuklara değmeden süpernatant temiz bir tüpe alındı.

5.2.5.3. İmmünopresipitasyon Yöntemi

Ön temizliği yapılan lizata, 2-5 µg kadar anti-GST antikoruna eklenerek iki saat süreyle +4 °C'de döndürüldü. Böylelikle GST etiketi ile füzyon olan KRT14 proteini antikora bağlandı. İnkübasyon sonunda lizata önceden yıkanmış G protein boncuklardan 20 µL eklenerek iki saat süreyle +4 °C'de döndürüldü ve anti-GST antikoruna aracılığıyla GST-KRT14 proteini ve etkileştiği proteinler boncuklara çekildi. İnkübasyon bitiminde lizat 1000 g'de bir dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırıldı. Protein bağlı olan boncuklar IP yıkama solüsyonu ile beş defa yıkandı. Yıkamalar arasında 1000 g'de bir dakika santrifüj yapıldı. Son yıkamadan sonra her örneğe 2x protein yükleme tamponu koyularak beş dakika boyunca 99 °C'de kaynatıldı. Örnekler hızlı santrifüj işlemi sonrası boncuklardan ayrılan lizat immüno blot yöntemi ile analiz edilmek üzere SDS-PAGE jeline yüklendi. GST-KRT14'ün FLAG-RIPK4 ile etkileşerek boncuklara FLAG-RIPK4'ü getirip getirmediğinin tespiti için boncuklara çekilen proteinler anti-FLAG antikoruna ile immüno blot yöntemi kullanılarak analiz edildi. Daha sonra GST-KRT14'ün boncuklara eşit olarak bağlandığını gösterebilmek amacıyla aynı membran anti-GST antikoruna ile muamele edildi. Ayrıca, total protein lizatı da jele yüklenerek hücrelerde GST-KRT14 ve FLAG-RIPK4 proteinlerinin ekspresyonları sırasıyla anti-GST ve anti-FLAG antikorları ile immüno blot yöntemi kullanılarak analiz edildi.

5.2.5.4. Endojen İmmünopresipitasyon Yöntemi

RIPK4 ve KRT14 etkileşimini ayrıca bu iki proteinin endojen olarak ekspres olduğu keratinosit hücre hattı olan HaCaT hücrelerinde endojen olarak da göstermek üzere endojen IP gerçekleştirildi. Endojen IP deneyi için, HaCaT hücreleri koşul başına iki adet T75 flask içinde çoğaltıldı. Çoğalan hücreler TNTE patlatma tamponu ile patlatılarak

protein lizatı elde edildi. Elde edilen protein konsantrasyonu BCA testi ile analiz edilerek 0.5 mg proteine karşılık yaklaşık 1 µg antikor gelecek şekilde antikor miktarı hesaplandı. Koşul başına 1.7 mg protein için 2.8 µg anti-RIPK4 veya anti-FLAG (rabbit) antikorunu kullanıldı. IP işlemine başlamadan önce proteinlerin ekspres olup olmadığını belirlemek amacıyla bu protein lizatından 50 µL kadar total protein analizi için ayrıldı. Kalan lizatlara boncuklara bağlanan özgül olmayan bağlantıları yok etmek amacıyla % 0.1 Triton X 100 içeren tampon ile yıkanan 30 µL protein G boncuk ile 1 saat süreyle +4 °C'de ön-temizleme yapıldı. Ön temizliği yapılan lizata, endojen RIPK4 proteinini boncuklara bağlayabilmek amacıyla anti-RIPK4 antikorunu ve kontrol olarak anti-FLAG (rabbit) antikorunu ile gece boyunca +4 °C'de inkübasyon yapıldı. İnkübasyon sonunda lizata önceden yıkanmış ve % 0.1 BSA ile bloklanmış G protein boncuklardan 30 µL eklenerek iki saat süreyle +4 °C'de döndürüldü. İnkübasyon bitiminde protein bağlı olan boncuklar IP yıkama solüsyonu ile beş defa yıkandı. Son yıkamadan sonra lizat kolona geçirildi ve 0.1 M pH 2.5 glisin ile boncuklardan elüsyon yapıldı. Elüsyondan 30 µL SDS-PAGE jeline yüklendi ve RIPK4'ün endojen KRT14'ü çekip çekmediğini belirlemek için anti-KRT14 antikorunu ile blot yapıldı.

5.2.6. İmmüno Floresan Yöntemi

RIPK4 ve KRT14'ün hücre içinde birlikte yerleşimi IF yöntemi ile analiz edildi. HeLa hücreleri altı kuyucuklu tabaklara yerleştirilen lameller üzerinde FLAG-RIPK4 ve GST-KRT14 ekspres eden plazmitlerle tek başlarına veya birlikte transfekte edildi. Transfeksiyondan 24 saat sonra besiyeri uzaklaştırılarak aşağıdaki protokole göre IF gerçekleştirildi. Hücreler iki defa 1XPBS ile yıkandıktan sonra fiksasyon için % 4'lük PFA eklenerek 10 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. Süre sonunda kuyular beş defa 1XPBS ile yıkandı. Hücre membranında porlar açabilmek için kuyulara % 0.2 Triton X 100 içeren permeabilizasyon solüsyonu eklenerek beş dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Süre sonunda kuyular beş defa 1XPBS ile yıkandı. Primer antikorların yüzeye özgül olmayan bağlanmasını engelleyebilmek için hücreler % 10 FBS ile 60-75 dakika blokladı. Süre sonunda FLAG etiketi ile füzyon olan RIPK4 FL, RIPK4 N Ter, RIPK4 Linker, RIPK4 C Ter ve RIPK4 K51R için anti-FLAG antikorunu, 1/1250; GST etiketi ile füzyon olan KRT14 proteini için ise anti-GST antikorunu 1/500 oranında bloklama solüsyonu içinde hazırlandı ve 90 dakika inkübe edildi. Hücreler % 0.02 Triton X100 içeren 1X PBST ile beş defa yıkandı. Anti-FLAG antikorunu görüntülemek için

sekonder antikorlar anti-mouse Cy3 1/1500; anti-GST antikoruna için ise anti-rabbit Alexa Flour 488 1/1000 oranında hazırlanarak hücrelere eklendi ve 90 dakika inkübe edildi. Süre sonunda hücreler 1XPBST ile beş defa yıkandı. Diğer taraftan temiz lamalar hazırlandı ve üzerlerine örnek başına 1 damla olacak şekilde DNA boyası DAPI içeren ve floresan sinyali artırma etkisi olan DABCO solüsyonundan damlatıldı. Lameller kuyulardan dikkatle çıkarılarak lam üzerine hava kabarcığı kalmayacak şekilde kapatıldıktan sonra kurumaması bekledi. Sonrasında şeffaf oje ile lamellerin kenarı sabitlendikten sonra sinyalin gelişmesi için bir gece karanlıkta bekletildi. Floresan mikroskop ile uygun filtreler kullanılarak örnekler analiz edildi.

5.2.7. GST Pull Down Yöntemi

5.2.7.1. Bakteri Lizatının Hazırlanması

RIPK4 ve KRT14'ün in vitro'da birebir etkileşimini gösterebilmek amacıyla GST-pull down deneyi gerçekleştirildi. Pull down deneylerini gerçekleştirebilmek için RIPK4 6xHis ve KRT14 GST etiketi ile füzyon oluşturacak şekilde bakteri ekspresyon vektörlerine klonlanarak sırasıyla E. coli AI ve DE3 suşlarına transforme edildi. Transforme edilen bakteriler LB agar besiyerine ekildi. Ertesi gün seçilen koloniler LB sıvı besiyerine aktarıldıktan sonra His-RIPK4 L-arabinoz ve GST ve GST-KRT14 IPTG ajanlarıyla bakteride indüklendi. İndüklendikten dört saat sonra His-RIPK4, iki saat sonra GST ve GST-KRT14 bakteri pelleti toplandıktan sonra 1 mL TBS (25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.2) ile yıkandı. 10 mM Tris-Cl, pH: 7.5, 150 mM sodyum klorür, 0.5 mM EDTA pH: 7.0, 1 mM PMSF, 1X PI, 2 mM Na₃VO₄ ve % 0.5 NP-40 içeren bakteri patlatma tamponu eklenerek protein lizatı elde edildi. Lizat 10 sn pulse 50 sn bekleme üç döngü olacak şekilde sonike edildikten sonra yüksek devirde 15 dakika +4 °C'de santrifüj edildi. Pull down işlemine başlamadan önce 1 mL hücre lizatından her bir genin eksprese olup olmadığını kontrol edebilmek için 50 µL hücre lizatı üzerinde 1X olacak şekilde yükleme tamponu eklenerek analiz edilinceye kadar -20°C'de saklandı.

5.2.7.2. GST Trap Boncukların Hazırlanması

Ticari olarak satın alınan GST-Trap boncuklardan (Chromotek, sta-20) örnek başına 10 µL olacak şekilde 10 mM Tris-Cl pH 7.5, 150 mM NaCl ve 0.5 mM EDTA içeren tampon ile dört kez yıkandı. Yıkamalar 2500 g devirde iki dakika süreyle gerçekleştirildi. Boncuklar kullanılana kadar +4 °C'de bekletildi.

5.2.7.3. Pull Down Yöntemi

Bakteride ekspres olan GST ve GST-KRT14 proteinlerini GST-trap boncuklarına bağlamak amacıyla lizatlar, boncuklarla +4°C'de bir saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonrası lizat 2500 g devirde iki dk santrüfuj edildikten sonra GST-bağlı boncuklar yıkama tamponu ile +4 °C'de beş kez beş dakika boyunca yıkandı. Boncuklar yıkandıktan sonra etkileşimi analiz edilecek yem protein olan His-RIPK4 içeren bakteri lizatı boncuklara eklenerek bir saat boyunca +4 °C'de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra boncuklar +4°C'de beş kez beş dakika boyunca 10 mM Tris-Cl pH 7.5, 300 mM NaCl, 0.5 mM EDTA ve % 0.1 NP-40 içeren yıkama tamponu ile yıkandı. Boncuklar kolonlara geçirildikten sonra 0.2 M pH 2.5 glisin ile elüsyon yapıldı. Ayrıca kalan boncuklar üzerine 2X yükleme tamponu eklenerek SDS-PAGE ile analiz edildi. RIPK4'ün KRT14 ile etkileşmesi durumunda GST-KRT14 bağlanmış boncuklara His-RIPK4 çekileceğinden, His-RIPK4'ün varlığı anti-RIPK4 antikoru kullanılarak immüno blot yöntemi ile analiz edildi. Boncuklara GST-KRT14'ün eşit olarak bağlandığını doğrulamak amacıyla aynı membran anti-GST antikoru ile muamele edilerek analiz edildi. Ayrıca, füzyon proteinlerin pull down yapmadan önce hücre lizatında ekspresyonları, anti-GST ve anti-RIPK4 antikoları kullanılarak immüno blot yöntemi ile analiz edildi.

6. BULGULAR

6.1. *RIPK4* ve *KRT14* Ekspresyon Vektörlerinin Oluşturulması

Daha evvel *RIPK4*'ün kinaz domaini yem olarak kullanılarak yapılan büyük ölçekli maya ikili hibrit çalışması sonucunda karşılaşılan *KRT14* proteininin (52 kDa) *RIPK4* ile olan etkileşimini detaylı analiz etmek için *RIPK4* ve *KRT14*'ün uygun ekspresyon vektörlerine klonlanmasında Gateway klonlama stratejisi kullanıldı (ThermoFisher, ABD).

RIPK4, domainleri (*RIPK4 N Ter*, *RIPK4 Linker*, *RIPK4 C Ter*) ve kinaz mutant formu (*RIPK4 K51R*) uygun memeli ve bakteri vektörlerine daha önceden Gateway klonlama stratejisi ile klonlanmıştı (Tablo 7) (87).

KRT14, LR reaksiyonu ile bakteri ve memeli hücrelerinde ekspres ettirmek üzere farklı varış vektörlerine transfer edildi (Tablo 7). Maya ikili hibritten gelen etkileşim sonuçlarını, *in vitro* olarak doğrulamak amacıyla pull down deneylerinde kullanılmak üzere tam uzunlukta *KRT14*; GST ile füzyon oluşturacak şekilde bakteri varış vektörü pGEX-KG/DEST'e; memeli hücrelerinde etkileşimini analiz etmek amacıyla GST etiketi ile füzyon oluşturacak şekilde memeli varış vektörü pDEST-27'ye klonlandı. Oluşturulan bu plazmitler bakteriye transforme edilerek çoğaltıldı ve mini-prep izolasyon kiti kullanılarak bakteriden izole edildi. İzole edilen plazmitler Tablo 8'de belirtilen primerler ile sekanslanarak doğrulandı.

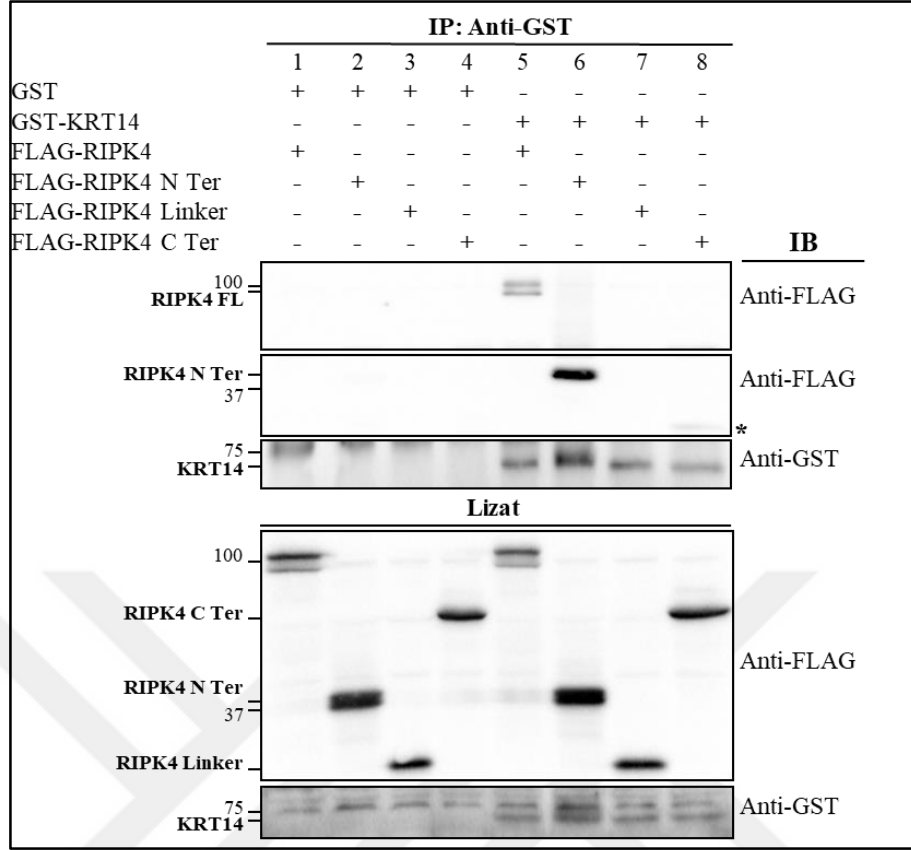
6.2. *KRT14*'ün *RIPK4* ve *RIPK4* Domainleri ile Etkileşiminin Belirlenmesi

RIPK4 ile *KRT14*'ün etkileşimini araştırmak amacıyla IP yöntemi gerçekleştirildi. Bu doğrultuda *RIPK4*'ün *KRT14* ile özgül olarak etkileştiğini araştırmak için FLAG-*RIPK4* ve domainleri (*RIPK4 N Ter*, *RIPK4 Linker*, *RIPK4 C Ter*) (Şekil 10) hem yalnızca GST ekspres eden boş vektör hem de GST-*KRT14* ekspres eden vektörle birlikte HEK293 hücrelerine transfekte edildi. Transfeksiyondan 24 saat sonra hücre lizatından GST-*KRT14*, anti-GST antikoru ile boncuklarda immünopresipite edildi ve komplekste FLAG-*RIPK4*'ün varlığı anti-FLAG antikoru kullanılarak gerçekleştirilen immüno blot ile analiz edildi.

IP sonucunda, Resim 1, 1. kuyuda negatif kontrolde görüldüğü üzere FLAG-*RIPK4*, boş GST vektörü ile etkileşmezken (Resim 1, 1. panel, 1. kuyu), GST-*KRT14* ile

etkileşim gösterdi (Resim 1, 1. Panel, 5. kuyu). KRT14 ile etkileşimden sorumlu RIPK4 domaininin belirlenmesi kapsamında GST-KRT14'ün RIPK4'ün N terminal kinaz domaini ile özgül olarak etkileştiği (Resim 1, 2. panel, 6. kuyu), RIPK4 Linker ve RIPK4 C terminal domainleri ile ise etkileşmediği (Resim 1, 2. panel, 7. ve 8. kuyular) gösterildi. IP esnasında GST-KRT14'ün boncuklara tüm koşullarda bağlandığı anti-GST antikorunu kullanılarak yapılan IB ile ispatlandı (Resim 1, 3. Panel, 5-8 arası kuyular). Hücre lizatında proteinlerin ekspresyonları, anti-FLAG ve anti-GST antikorları kullanılarak yapılan IB ile gösterildi (Resim 1, 4. ve 5. paneller).

Kendini fosforilleme özelliği olan RIPK4, geride yürüyen bant fosforile formu olmak üzere iki bant olarak görüntülendi (Resim 1, 4. panel. 1. ve 5. kuyular). Beklenildiği üzere RIPK4'ün kinaz domaini taşıyan N terminal bölgesi de membranda iki bant olarak görüntülendi (Resim 1, 4. panel, 2 ve 6. kuyular). Kinaz domaini taşımayan RIPK4 Linker ve RIPK4 C terminal domainleri ise tek bant olarak görüntülendi (Resim 1, 4. panel, 3-4 ve 7-8. kuyular).



Resim 1. RIPK4 ve domainleri ile KRT14 etkileşiminin immünopresipitasyon yöntemiyle gösterilmesi. GST-KRT14 anti-GST antikorunu kullanarak lizattan immünopresipite edildi ve sonrasında anti-FLAG ve anti-GST antikorlarıyla IB ile analiz edildi (Üst panel). Total protein lizatı anti-FLAG ve anti-GST antikorlarıyla IB ile analiz edildi (Alt panel). IP; İmmünopresipitasyon, IB; İmmünoblot. *: Özgül olmayan bant

6.2.1. RIPK4'ün Kinaz Aktivitesinin KRT14 ile Etkileşimine Etkisinin Araştırılması

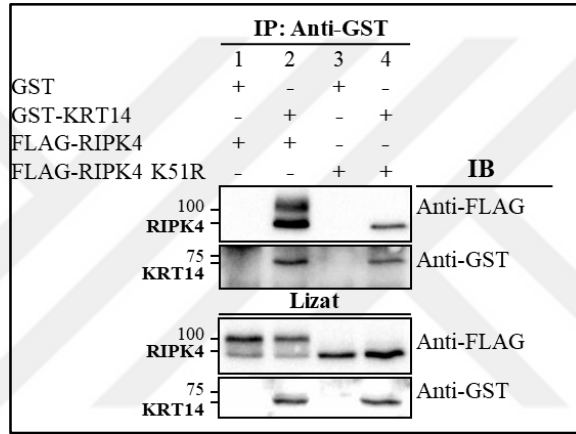
RIPK4-KRT14 etkileşiminde RIPK4'ün kinaz aktivitesinin önemini analiz etmek amacıyla IP gerçekleştirildi. Bu defa, RIPK4'ün kinaz aktivitesinin inaktif olduğu kinaz mutant formu FLAG-RIPK4 K51R, GST boş vektör veya GST-KRT14 ile HEK293 hücrelerinde birlikte ekspres edildi. Deneye pozitif kontrol olarak FLAG-RIPK4 de dahil edildi. Resim 1'de sonuçları gösterilen IP'ye benzer şekilde, GST-KRT14, anti-GST antikorunu ile boncuklarda immünopresipite edildi ve komplekste FLAG-RIPK4 ve FLAG-RIPK4 K51R proteinlerinin varlığı anti-FLAG antikorunu kullanılarak IB ile analiz edildi.

IP sonucunda, GST-KRT14'ün FLAG-RIPK4 gibi FLAG-RIPK4 K51R'ye de bağlandığı gözlenirken (Resim 2, 1. panel, 2 ve 4. kuyular), boş GST kaplı boncukların her iki proteine de bağlanmaması etkileşimlerin özgül olduğunu ispatladı (Resim 2, 1.

panel, 1 ve 3. kuyular). GST-KRT14'ün tüm koşullarda boncuklardaki varlığı boncukların anti-GST antikoru kullanılarak yapılan IB analizi ile doğrulandı (Resim 2, 2. Panel, 2. ve 4. Kuyular) Hücre lizatında proteinlerin ekspresyonları, anti-FLAG ve anti-GST antikoları ile analiz edilerek gösterildi (Resim 2, 3. ve 4. panel, 1-4 arası kuyular).

Kinaz aktivitesini kaybeden RIPK4 K51R membranda tek bant olarak görüntülendi (Resim 2, 4. kuyu).

Sonuç olarak RIPK4-KRT14 etkileşiminin RIPK4'ün kinaz aktivitesine bağlı olmadığı gösterilmiş oldu.

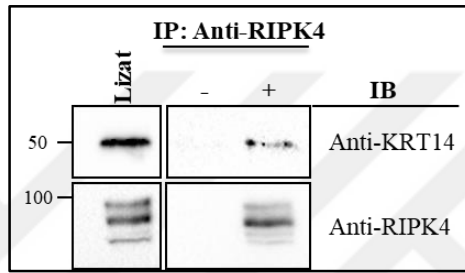


Resim 2. RIPK4 K51R ve KRT14 etkileşiminin immünopresipitasyon ile gösterilmesi. GST-KRT14, anti-GST antikoru kullanılarak immünopresipite edildi ve sonrasında anti-FLAG ve anti-GST antikolarıyla IB yapıldı (Üst panel). Total protein lizatına da hem anti-FLAG hem anti-GST antikolarıyla IB yapıldı (Alt panel). IP; İmmünopresipitasyon, IB; İmmünoblot.

6.2.2. RIPK4 ve KRT14 Etkileşiminin Endojen Olarak Gösterilmesi

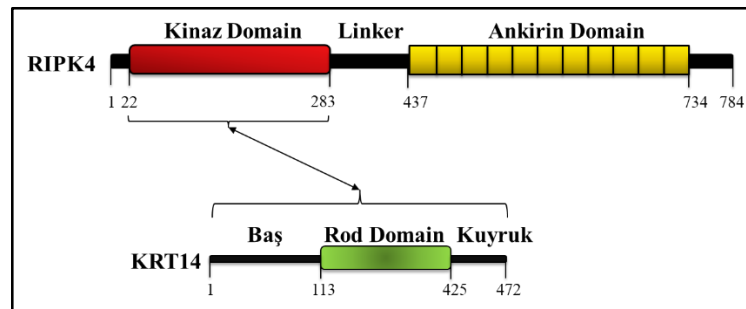
RIPK4 ve KRT14 proteinleri insan keratinosit hücre hattı olan HaCaT hücrelerinde endojen olarak ekspres olmaktadır (61, 89). Bundan yola çıkarak, RIPK4 ve KRT14 etkileşimini desteklemek adına, bu iki proteinin doğal hallerinde etkileşimlerini incelemek için proteinlere özgü antikolar kullanılarak HaCaT hücrelerinde endojen IP yöntemi uygulandı. IP deneyinde, RIPK4, anti-RIPK4 antikoru ile boncuklarda immünopresipite edildi ve komplekste KRT14'ün varlığı da anti-KRT14 antikoru kullanılarak yapılan IB ile analiz edildi. Etkileşimin özgüllüğü anti-RIPK4 yerine kullanılan anti-FLAG antikoru ile gerçekleştirilen IP ile kontrol edildi.

HaCaT hücrelerinde negatif kontrol olarak kullanılan anti-FLAG antikoru ile yapılan IP lizatı KRT14'ü getirmezken (Resim 3, sağ üst panel, eksi), anti-RIPK4 antikorunun getirmesi etkileşimin özgül olduğunu gösterdi (Resim 3, sağ üst panel, artı) . Boncuklarda RIPK4'ün varlığı, anti-RIPK4 ile gerçekleştirilen IB ile gösterildi (Resim 3; sağ alt panel). KRT14'ün ve RIPK4'ün lizattaki ekspresyonları anti-KRT14 ve anti-RIPK4 antikorları kullanılarak yapılan IB ile gösterildi (Resim 3, sol üst ve alt paneller). Bu sonuçla birlikte, endojen KRT14 ve RIPK4'ün etkileşimi keratinositlerde gösterilmiş oldu.



Resim 3. RIPK4 ve KRT14 etkileşiminin endojen immünopresipitasyon ile gösterilmesi. RIPK4, anti-RIPK4 antikorunu kullanılarak immünopresipite edildi ve sonrasında anti-KRT14 ve anti-RIPK4 antikorlarıyla IB yapıldı (Sağ üst ve alt panel) Total protein lizatında KRT14 ve RIPK4 ekspresyon seviyeleri anti-KRT14 ve anti-RIPK4 antikorlarıyla IB ile analiz edildi (Sol paneller). IP; İmmünopresipitasyon IB; İmmünoblot.

IP deneylerimizin sonucunda, RIPK4 ve KRT14'ün birbirleriyle etkileştiği ve bu etkileşimin RIPK4'ün N terminal kinaz domaini üzerinden olduğu, C terminal ve linker domainlerinin etkileşimde yer almadığı ve RIPK4'ün N terminalinde bulunan Ser/Thr kinaz aktivitesinin KRT14 ile etkileşiminde belirleyici olmadığı gösterildi (Şekil 12).



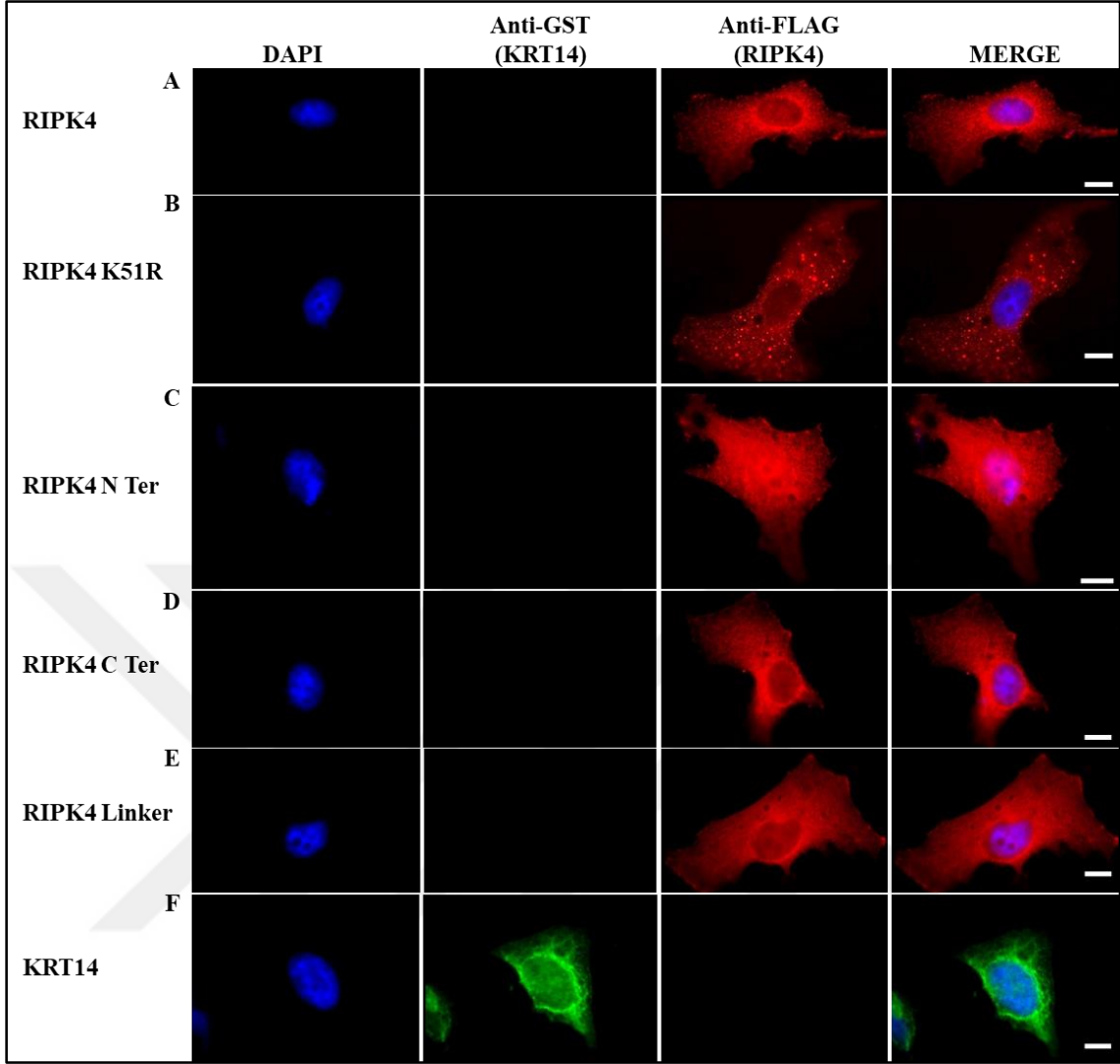
Şekil 12. IP sonucunda bulunan RIPK4 ve KRT14'ün etkileşim şeması

6.3. RIPK4 ve KRT14 Proteinlerinin Hücre İçi Yerleşimlerinin Belirlenmesi

IP ile etkileştiklerini gösterdiğimiz RIPK4 ve KRT14'ün hücre içi yerleşimlerini IF yöntemiyle tespit edebilmek amacıyla IP deneyinde kullandığımız vektörler; FLAG-RIPK4, RIPK4'ün domainleri, RIPK4 K51R ve GST-KRT14 ilk olarak ayrı ayrı HeLa hücrelerine transfekte edildi. Transfeksiyondan 24 saat sonra anti-FLAG ve anti-GST primer antikoları ve bu antikolara uygun Cy3 ve AlexaFlour 488 floresan işaretli sekonder antikoları kullanılarak IF analizi gerçekleştirildi.

IF sonucuna göre, tam uzunlukta RIPK4 tek başına ekspres ettirildiğinde yoğun olarak çekirdek çevresinde olmak üzere sitoplazmada yerleştiği gözlemlendi (Resim 4A). RIPK4 K51R tek başına ekspres ettirildiğinde ise yabancı tipten farklı olarak sitoplazmada dağınık büyük noktasal yapılarda yerleştiği, çekirdek etrafındaki yapıda yerleşmediği gözlemlendi (Resim 4B). RIPK4 N Ter domaini hücrede tek başına ekspres olduğunda ise tam uzunlukta RIPK4 gibi sitoplazmada dağınık olarak bulunmasının yanı sıra RIPK4'den farklı olarak çekirdeğin içerisinde de yerleşim gösterdi (Resim 4C). RIPK4 C Ter ve RIPK4 Linker domainleri tek başlarına ekspres olduklarında tam uzunlukta RIPK4'e benzer şekilde yoğun olarak çekirdek çevresinde olmak üzere sitoplazmada yerleşim gösterdiği gözlemlendi (Resim 4D-E).

KRT14 proteini tek başına ekspres ettirildiğinde ise, keratin filamanlarının hücresel lokalizasyonundan beklenildiği üzere (şekil 8) çekirdeği saran kafes benzeri yapının yanı sıra sitoplazmada dağınık ağsı yapılarda yerleşim gösterdi (Resim 4F).



Resim 4. RIPK4, RIPK4'ün domainleri, RIPK4 K51R ve KRT14'ün hüresel yerleşimlerinin immünofloresan yöntemiyle analizi. HeLa hücreleri FLAG-RIPK4, FLAG-RIPK4 K51R, FLAG-RIPK4 N Ter, FLAG-RIPK4 C Ter, FLAG-RIPK4 Linker ve GST-KRT14 ile ayrı ayrı transfekte edildi ve anti-FLAG (sekonder antikor: anti-mouse Cy3, kırmızı) ve anti-GST (sekonder antikor: anti-rabbit-AlexaFlour 488, yeşil) antikoruyla boyandı. DAPI: Mavi, çekirdek. Ölçek çubuğu= 10 µm.

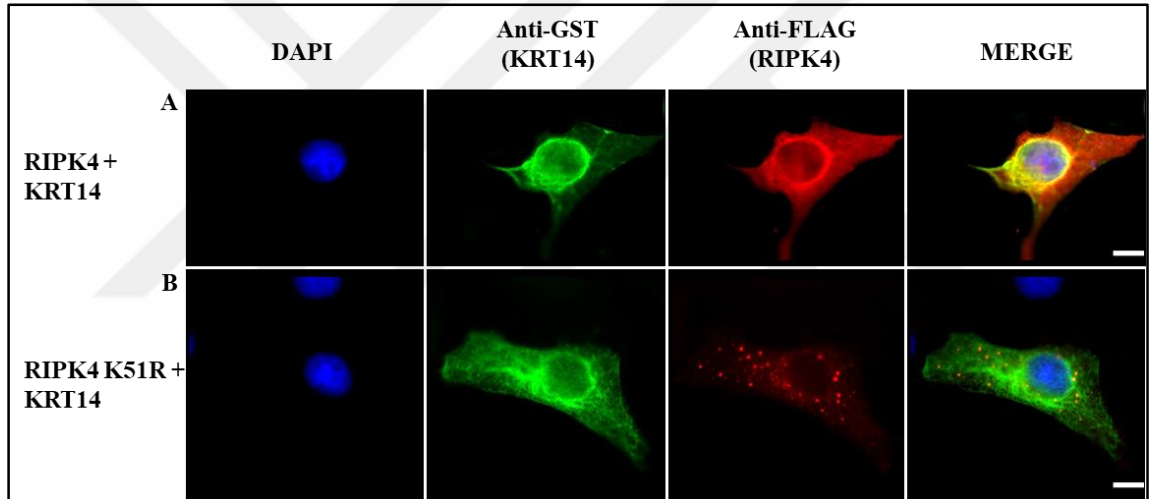
6.3.1. RIPK4 ile KRT14'ün Hücre İçi Birlikte Yerleşimlerinin ve RIPK4'ün Kinaz Aktivitesinin Yerleşime Etkisinin Belirlenmesi

RIPK4 ve KRT14'ün hücrede birlikte yerleşip yerleşmediğini IF yöntemiyle analiz edebilmek amacıyla FLAG-RIPK4, GST-KRT14 ile HeLa hücrelerinde birlikte ekspres ettirildi. Transfeksiyondan 24 saat sonra IF analizi gerçekleştirildi.

RIPK4 ve KRT14 birlikte ekspres ettirildiğinde sitoplazmada özellikle çekirdek çevresindeki kafes benzeri yapıda birlikte yerleşim gösterdi (Resim 5A).

IP deneyi sonucunda RIPK4 ve KRT14 etkileşiminin RIPK4'ün kinaz aktivitesine bağımlı olmadığı gösterilmişti. Kinaz aktivitesinin bu iki proteinin hücre içi birlikte yerleşimine etkisini analiz etmek amacıyla RIPK4 K51R ve KRT14 birlikte ekspres ettirildi.

RIPK4 K51R tek başına ekspres ettirildiğinde çekirdeği çevreleyen yapıdan ayrılıp sitoplazmada dağınık büyük noktasal yapılarda gösterdiği patern KRT14 ile birlikte ekspres olduğunda değişmedi. Bundan dolayı da, K51R, RIPK4-KRT14 yerleşiminde olduğu gibi KRT14 ile birlikte yerleşim göstermedi (Resim 5B).



Resim 5. RIPK4 ve RIPK4 K51R ile KRT14'ün hücre içi birlikte yerleşiminin immüno Floresan ile analizi. HeLa hücreleri FLAG-RIPK4, FLAG-RIPK4 K51R ve GST-KRT14 ile birlikte transfekte edildi ve anti-FLAG (sekonder antikor: anti-mouse Cy3, kırmızı) ve anti-GST (sekonder antikor: anti-rabbit-AlexaFlour 488, yeşil) antikoruyla boyandı. DAPI: Mavi, çekirdek. Ölçek çubuğu= 10 µm.

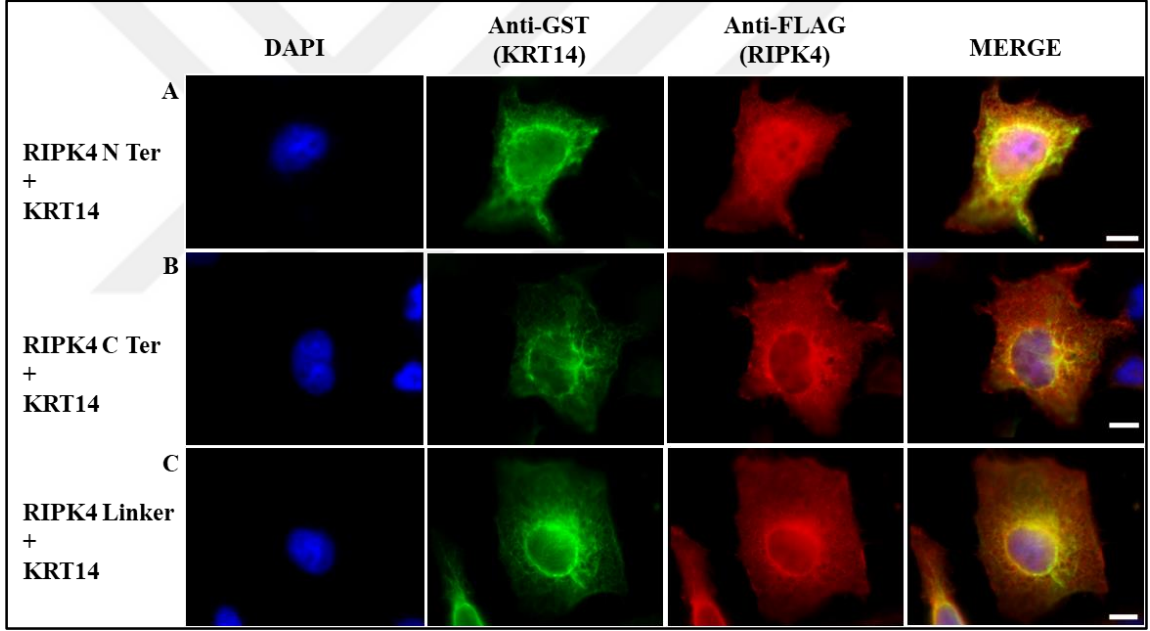
6.3.2. RIPK4'ün Domainleri ile KRT14'ün Hücre İçi Birlikte Yerleşimlerinin Belirlenmesi

RIPK4'ün domainleri ile KRT14 arasındaki etkileşimler IP ile analiz edilmiş, RIPK4'ün N Terminal kinaz domaininin KRT14 etkileşiminden sorumlu olduğu gösterilmişti. RIPK4'ün domainleri ile KRT14'ün hücrede birlikte yerleşimini IF

yöntemiyle analiz edebilmek amacıyla RIPK4'ün domainleri, GST-KRT14 ile HeLa hücrelerinde birlikte ekspres ettirildi. Transfeksiyondan 24 saat sonra IF analizi yapıldı.

Tek başına ekspres ettirildiğinde çekirdekte ve sitoplazmada yerleşim gösteren RIPK4 N Ter, KRT14 ile birlikte ekspres ettirildiğinde lokalizasyonunu değiştirmede ve IP sonuçlarıyla örtüşür şekilde KRT14 ile sitoplazmada ve çekirdeği saran kafes benzeri yapıda birlikte yerleşim göstermeye devam etti (Resim 6A).

RIPK4'ün C terminal ve Linker domainlerinin KRT14 ile etkileşmediği IP deneyi ile gösterilmişti. Aralarında etkileşim olmamasına rağmen RIPK4 C Ter ve Linker domainleri ile KRT14 birlikte ekspres ettirildiğinde KRT14 ile sitoplazmada ve belirgin olarak çekirdeği saran yapıda birlikte yerleşim gösterdi (Resim 6B,C).



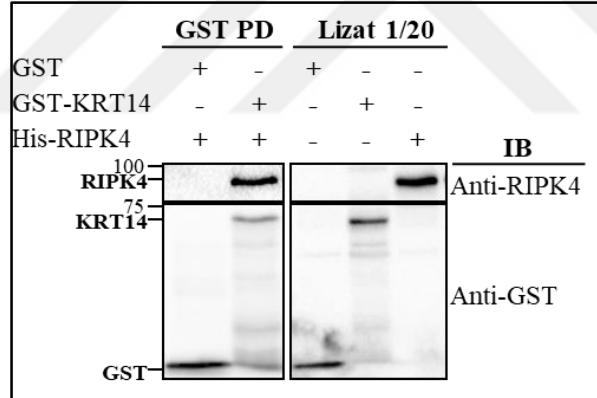
Resim 6. RIPK4 domainleri ve KRT14'ün hücre içi birlikte yerleşiminin immüno Floresan ile analizi. HeLa hücreleri FLAG-RIPK4 N Ter, FLAG-RIPK4 C Ter ve FLAG-RIPK4 Linker, GST-KRT14 ile birlikte transfekte edildi ve anti-FLAG (sekonder antikor: anti-mouse Cy3, kırmızı) ve anti-GST (sekonder antikor: anti-rabbit-AlexaFlour 488, yeşil) antikoruyla boyandı. DAPI: Mavi, çekirdek. Ölçek çubuğu= 10 µm.

6.4. RIPK4 ve KRT14'ün Etkileşiminin in vitro Pull Down Yöntemiyle Gösterilmesi

Bir sonraki aşamada RIPK4 ve KRT14'ün doğrudan etkileşip etkileşmediğini analiz etmek amacıyla GST-KRT14 ve His-RIPK4 ayrı ayrı bakteride ekspres ettirilerek in vitro GST-pull down deneyi gerçekleştirildi.

GST etiketli proteinler üzerinden His-RIPK4 protein lizatı geçirildikten sonra anti-RIPK4 ve anti-GST antikorları kullanılarak immünoiblot yapıldığında boş GST boncukların His-RIPK4 ile etkileşmediği, GST-KRT14 bağlı boncukların His-RIPK4 ile özgül olarak etkileştiği görüldü (Resim 7, sol üst panel). Boncuklara GST ve GST-KRT14'ün bağlandığı anti-GST antikorları kullanılarak gerçekleştirilen IB ile gösterildi (Resim 7, sol alt panel). Her iki proteinin ekspresyonu bakteri lizatında anti-RIPK4 ve anti-GST antikorlarıyla doğrulandı (Resim 7, sağ panel)

Bu deney ile RIPK4 ve KRT14 arasındaki etkileşimin aracı başka bir protein olmadan doğrudan gerçekleştiği gösterilmiş oldu.



Resim 7. RIPK4 ve KRT14'ün doğrudan etkileşiminin GST-pull down yöntemiyle gösterilmesi. Sol panel: GST etiketli proteinler GST-trap boncuklara bağlandı. GST bağlı boncuklar üzerinden His-RIPK4 protein lizatı geçirildi ve sonrasında anti-RIPK4 ve anti-GST antikorları kullanılarak IB yapıldı. Sağ panel: Total protein lizatı anti-GST ve anti-RIPK4 antikorlarıyla IB ile analiz edildi. PD; Pull down, IB; İmmünoiblot.

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Proteinler hücrel fonksiyonlarını diğer proteinlerle etkileşerek yerine getirir. Bundan dolayı proteinlerin fonksiyonlarının anlaşılmasında etkileşim ortaklarının belirlenmesi oldukça önemli ipuçları verir (90). Maya ikili hibrit yöntemi proteinlerin etkileşim ortaklarının tanımlanmasında oldukça sık kullanılan bir yöntemdir (91). Bu minvalde, bölümümüzde daha evvel gerçekleştirilen çalışmalar ile RIPK4'ün yem olarak kullanıldığı büyük ölçek maya ikili hibrit taraması sonucunda RIPK4'ün KRT14 ile etkileştiği önverisi bulunmuştu. Ancak, yanlış pozitiflik verebilme ihtimali olan maya ikili hibrit taraması sonuçlarının doğrulanması gerekmektedir (92). Dolayısıyla bu tez çalışması ile büyük ölçek maya ikili hibritten gelen bu sonucun doğrulanması ve RIPK4-KRT14 etkileşiminin detaylı olarak analiz edilmesi amaçlanmıştır. RIPK4'ün büyük bir protein olması ve büyük proteinlerin veriminin maya ikili hibritte düşük olmasından ötürü yalnızca RIPK4'ün kinaz domaini kullanılarak maya ikili hibrit gerçekleştirilmişti. Bundan dolayı, çalışmamızda ilk etapta memeli hücrelerinde tam uzunlukta RIPK4'ün KRT14 ile etkileşimi incelendi. Bu amaca yönelik olarak RIPK4-KRT14 etkileşimi, hem insan embriyonik böbrek hücre hattı olan HEK293'de söz konusu iki proteini fazladan ekspres ettirerek hem de immortal insan keratinosit hücre hattı olan HaCaT'da endojen RIPK4 ve KRT14 proteinleri kullanılarak IP yöntemi ile incelendi. Deneylerimizde, kolay transfekte olması ve dışarıdan verilen genlerin yüksek ekspresyonuna imkan sağlaması nedeniyle HEK293 hücre hattı tercih edildi. IP deneyi esnasında RIPK4, FLAG etiketi ile KRT14 de GST etiketi ile füzyon halde HEK293 hücrelerinde ekspres edildi. Özellikle FLAG ve GST füzyon etiketlerini seçmemizin nedeni daha önceki IP, IF ve IB deneylerimizde anti-FLAG ve anti-GST antikorlarının yüksek verim ve özgüllük göstermesiydi.

HEK293 hücrelerinde dışarıdan ekspres ettirilen RIPK4 ve KRT14'ün IP ile etkileştiğinin gösterilmesi maya ikili hibritten edinilen sonucu memeli hücrelerinde doğrulamış oldu (Resim 1). Aynı IP stratejisi, RIPK4'ün KRT14 ile etkileşiminden sorumlu domainlerinin bulunmasında ve kinaz aktivitesinin etkileşime etkisinin analizinde de uygulandı. Bu deneyin sonucunda RIPK4'ün KRT14 ile RIPK4'ün kinaz domaini taşıyan N terminali üzerinden etkileştiğini, C terminal ve Linker domainlerinin etkileşimde yer almadığı görüldü (Resim 1). Bulgularımızla benzer olarak daha evvel RIPK4'ün DVL2 (56) ve IKK α/β ile de kinaz domaini üzerinden etkileştiğinin bulunmuş

olması (58) N terminal domainin protein etkileşimleri için önemini ortaya çıkarmaktadır. Kinaz mutant RIPK4 K51R'in KRT14 ile etkileşmeye devam etmesi aralarındaki etkileşimin RIPK4'ün kinaz aktivitesinden bağımsız olduğunu gösterdi (Resim 2). Bizim bulgumuzla örtüşür şekilde daha evvel yapılan çalışmada RIPK4'ün BPS ile ilişkilendirilen kinaz inaktif mutantlarının (I121N, I81N ve T184I) RIPK4-IRF6 arasındaki etkileşimi bozmadığı gösterilmişti (93).

Çalışmamızın bir sonraki aşamasında, RIPK4 ve KRT14'ü fazladan ekspres ettirerek gerçekleştirdiğimiz IP deneyi sonucunda gösterdiğimiz etkileşim, RIPK4 ve KRT14'ün ekspres olduğu HaCaT hücrelerinde endojen RIPK4 ve KRT14'ü tanıyan antikolar ile yapılan IP ile de doğrulandı (Resim 3).

Proteinler hücresel bir fonksiyonu yerine getirmek amacıyla birbirleriyle etkileştiklerinde doğal olarak aynı hücresel kompartmanda bulunurlar. RIPK4 ve KRT14'ün hücrede birlikte yerleşimlerini göstermek, bu iki proteinin etkileştiğine yönelik bulgumuzu destekleyeceğinden iki proteinin hücresel yerleşimi IF yöntemiyle analiz edildi. IF deneyine IP deneyinde olduğu gibi RIPK4'ün tamamı yanında domainleri ve kinaz inaktif formu da dahil edildi. IF deneyinde, daha geniş bir sitoplazmaya sahip olmasından dolayı proteinlerinin yerleşiminin daha iyi analiz edilmesini sağlayan HeLa hücreleri tercih edildi. RIPK4'ün hücrede tek başına yerleşimi analiz edildiğinde, hücre içerisinde sitoplazmada dağılmış noktasal yapılarla birlikte yoğun olarak çekirdeği çevreleyen yapıda yerleştiği görüldü (Resim 4). IF sonucumuz RIPK4'ün HEK293T ve COS hücre hatlarında yerleşiminin analiz edildiği ve sitoplazmada dağınık noktasal yapılar olarak gösterildiği literatür bilgisiyle de uyum gösterdi (47, 55). Sonrasında RIPK4'ün domainleri ve kinaz mutant formunun yerleşimleri de analiz edildi. RIPK4 Linker ve C terminal, hücrede RIPK4 gibi, dağınık sitoplazma ve çekirdeği saran yapıda yerleşim gösterirken N terminal farklı bir şekilde çekirdekte de yerleşim gösterdi (Resim 4). Literatürde RIPK4'ün hücresel yerleşimi analiz edilmesine rağmen domainleri çalışılmamıştır (47, 55). Daha evvel RIPK4'ün C terminalinin başında muhtemel bir nükleer lokalizasyon sinyali olduğu ileri sürülmüştür (46). NLS (Nuclear Localization Signal) mapper (94) veritabanı kullanılarak gerçekleştirdiğimiz in silico analizler sonucunda, RIPK4'ün tüm domainlerinde muhtemel nükleer lokalizasyon sinyallerinin olabileceği görüldü. RIPK4'ün kinaz domaininin çekirdekte yerleşim göstermesi bize, bu domainin üzerindeki NLS sekansının proteinin çekirdeğe taşınmasında önemli

olabileceğine işaret etti. Ayrıca, keratinositlerin aşırı proliferasyonu ile karakterize psoriasis vulgaris hasta kesitleri (52) ve servikal skuamoz hücreli karsinom hastalarının epitel kesitlerinde (54) RIPK4'ün sitoplazmanın yanı sıra, çekirdekte de yerleştiği görülmüştür. Sonuçlarımız gözetildiğinde bu kesitlerde RIPK4'ün N terminal formunun baskın olup olmadığının araştırılmasının RIPK4'ün N terminal domaininin hücre proliferasyonu üzerine etkisinin anlaşılmasına katkı sağlayabileceğini düşünmekteyiz. Buna ilaveten proapoptotik bir sinyal sonucunda RIPK4'ün linker domaininden kaspazlar tarafından kesildiği ve kinaz domaininin C terminal domaininden ayrıldığı gösterilmiştir (41). Bağımsız kalan kinaz domaininin sitoplazmadaki fonksiyonundan farklı bir fonksiyonu gerçekleştirmek için, hücre proliferasyonu gibi, çekirdeğe gitmesi mümkündür. Bu sürecin incelenmesi RIPK4'ün daha evvel tanımlanmamış fonksiyonlarının belirlenmesi açısından önemlidir.

RIPK4'ün kinaz mutant formu K51R daha evvel gösterildiği gibi (55) çalışmamızda da sitoplazmada dağınık belirgin büyük noktasal yapılarda yerleşim gösterdi (Resim 4). RIPK4'ün otofosforilasyon aktivitesinin RIPK4'ün degradasyonu için önemli olduğu bilinmektedir (61). Gördüğümüz bu yerleşim paterni degradesi olamayan K51R'nin sitoplazmada bir araya gelerek akümüle olmasından kaynaklanıyor olabilir.

Diğer taraftan KRT14'ü hücrede tek başına ekspres ettirdiğimizde ise keratin filaman ağı yerleşiminden beklenildiği gibi (69, 85) sitoplazmada dağınık ağı yapıda ve yoğun olarak çekirdeği saran kafes benzeri yapıda yerleşim gösterdi (Şekil 8, Resim 4).

Proteinlerin hücre içi yerleşimlerini ayrı ayrı analiz ettikten sonra RIPK4 ve domainleri ile KRT14'ün hücre içinde birlikte yerleşip yerleşmediğini gösterebilmek amacıyla RIPK4 ve KRT14 HeLa hücrelerinde birlikte ekspres ettirildi. IF deneyi sonucu, IP sonucumuzla örtüşür nitelikte olup RIPK4 ve KRT14 sitoplazmanın yanı sıra çekirdeği saran kafes benzeri yapıda birlikte yerleşim gösterdi (Resim 5). Yine IP sonucumuzla örtüşür şekilde, RIPK4'ün N terminalinin çekirdeğe giden kısmının dışında sitoplazmada kalan kısmının da KRT14 ile birlikte yerleşim gösterdiği tespit edildi (Resim 6). Öte yandan, RIPK4'ün C terminali ve Linker domaini KRT14 ile IP sonuçlarına göre etkileşim göstermemesine rağmen IF deneyinde birebir aynı hücresel yerleşimi gösterdi (Resim 6). Domain analizi sonuçlarımız, RIPK4 ve KRT14'ün hücrede aynı

kompartmanda bulunsalar bile etkileşmediğini, aralarındaki etkileşim için RIPK4'ün kinaz domaininin gerekliliğini ortaya çıkardı. RIPK4 K51R ise sitoplazmada bulunan büyük noktalarda takılıp kaldığı için tam uzunlukta RIPK4'den farklı olarak KRT14 ile birlikte yerleşim göstermedi (Resim 5). RIPK4 K51R ve KRT14 aynı hücrel kompartmanda yer almasa bile, IP esnasında hücrelerin patlatılarak hücrel sınırların yıkılması bu iki proteinin lizatta bir araya gelmesine ve etkileşimlerine neden olduğu düşünülmektedir (Resim 2).

Memeli hücrelerinde gerçekleştirdiğimiz IP esnasında iki proteinin doğrudan veya bir kompleksin parçası olarak bir araya geldiğini ayırt etmek mümkün değildir. Başka bir deyişle iki proteinin etkileşimi komplekste bulunan aracı bir memeli proteinin yardımıyla gerçekleşebilir. Hedef proteinlerin memeli dışında böcek, maya ve bakteri gibi bir canlıda ayrı ayrı ekspres ettirilerek saflaştırılması ve etkileşimin bu proteinlerle çalışılması, etkileşimlerin doğrudan olduğunu gösterecektir. RIPK4'ün KRT14 ile arada başka aracı bir protein olmadan doğrudan etkileşip etkileşmediğini araştırmak üzere *in vitro* GST-Pull down yöntemi uygulandı. Bu deneyde, RIPK4 His etiketiyle, KRT14 ise GST etiketi ile füzyon olacak şekilde bakteri hücrelerinde ayrı ayrı ekspres ettirildi. GST-KRT14'ün yem olarak kullanıldığı deneyde, katı matriks olarak GST etiketine çok güçlü ve özgül bir şekilde bağlandığını önceki deneylerimizde gösterdiğimiz GST-trap boncukları kullanıldı. Deney sonucumuz bakteride ürettirilen RIPK4 ve KRT14'ün ökaryotlara özgü bir protein post-translasyonel modifikasyonu ya da aracı protein(ler) olmadan da direkt olarak etkileştiğini göstermiş oldu (Resim 7).

Çalışmamızla birlikte epidermin bazal katmanında birlikte ekspres olan RIPK4 ve KRT14'ün etkileşimi ilk kez gösterilmiş ve doğrulanmış oldu. Bundan sonraki süreçte ise bu iki proteinin hangi biyolojik fonksiyonu yerine getirmek için bir araya geldiğini tanımlamak önemlidir. Sürecin bu kısmında literatürün ve elimizdeki bulguların iyi değerlendirilerek kilit fonksiyonel analizlerin uygulanması gerekmektedir.

Epidermin oluşumu esnasında gerçekleşen bazal tabaka keratinositlerinin proliferasyonu, göçü ve farklılaşması gibi süreçlerde RIPK4 ve KRT14'ün işlevleri farklı yayınlarla gösterilmiştir (44, 52, 61, 69, 85, 95, 96). Bizim için önemli olan RIPK4 ve KRT14 birlikteliğinin bu süreçlere etkisini analiz etmektir.

RIPK4'ün varlığının mı yoksa yokluğunun mu proliferasyonu indüklediği veya RIPK4'ün gerçekten proliferasyonda önemli bir rolü olup olmadığı hala tam olarak net olmamakla birlikte RIPK4'ün proliferasyonu baskılayarak daha ziyade hücreyi farklılaşmaya yönlendirdiği bilinmektedir (52, 54, 95). Bunu destekler şekilde kronik bir eklem hastalığı olan Osteoartrit kondrositlerinde RIPK4'ü susturarak proliferasyonun arttığı tespit edilmiştir (95). İlave, RIPK4'ün eksikliğinin epidermal farklılaşma markörlerinin ekspresyonunu azalttığı gösterildiği yayınlar RIPK4'ün eksikliğinin epidermal farklılaşmanın ilerlemesini durdurup hücrelerin proliferatif bazal katman seviyesinde kalabileceğine işaret etmektedir (55). Diğer taraftan, mitotik olarak aktif bazal keratinositlerde ekspres olan KRT14'ün bu hücrelerin proliferasyonu için gerekli olduğu net bir şekilde bilinmektedir (69). Epidermin bazal hücreleri yukarıya doğru hareket edip farklılaşmaya başladığında KRT14/5 çiftinin ekspresyonu düşerken farklılaşma markörleri KRT1/10 çifti indüklenir. Bu süreç bazal hücrelerde hücre döngüsü ve proliferasyonun inhibisyonu ile sağlanır. KRT14 susturulduğunda proliferasyonun azaldığı, hücre döngüsünün geciktiği, epidermal farklılaşma markörlerinin arttığı görülmüştür (69). Bu bilgilerden yola çıkarak RIPK4'ün KRT14 ile etkileşerek KRT14'ün proliferatif potansiyelini sınırladığı, böylelikle epidermal farklılaşmayı tetiklediği düşünülebilir. RIPK4-KRT14 etkileşiminin bazal tabakanın hücre proliferasyonu ve epidermal farklılaşma üzerindeki etkisinin araştırılması ilk sırada yapılması gereken fonksiyonel analizlerden biri olarak öne çıkmaktadır.

HaCaT hücreleri medyumda kalsiyum olduğu sürece standart besiyeri ve FBS koşulları altında farklılaşmış hücre fenotipi sergilemektedir (97). Çalışmamızda kalsiyum içeren standart besiyeri kullandığımız için farklılaşmış keratinosit hücrelerinde RIPK4 ve KRT14'ün etkileşim içerisinde olduğu gösterilmiş oldu. (Resim 3). HaCaT hücreleri besiyerinden kalsiyum uzaklaştırılması ile proliferatif bazal hücrelere dönüştürülebilmektedir (97). Bazal tabaka fenotipine dönmüş hücrelere tekrar kalsiyum verilerek hücrelerin farklılaşması uyarılabilmektedir (97). Bazal hücrelerin farklılaşmış hücrelere dönüşme sürecinde RIPK4 ve KRT14'ün etkileşiminin incelenmesi bu iki proteinin farklılaşmanın hangi aşamasında bir araya geldiği hakkında bilgi verecektir. Ayrıca belirlenen farklılaşma kademelerinde RIPK4 ve KRT14'ün birlikte ya da ayrı ayrı hücrelerde eksiltilmesi ya da fazladan ürettirilmesi ile bu iki proteinin birlikteliğinin

hücre proliferasyonu ve farklılaşması üzerindeki etkisinin araştırılmasına katkı sağlayacaktır.

Literatür incelemesi, RIPK4 ve KRT14'ün birlikteliğinin keratinositlerin proliferasyonunun yanısıra göçünün düzenlenmesinde de önemli olabileceğini düşündürmektedir. Keratinositlerin büyümesi, adhezyonu, migrasyonu, farklılaşması ve tüm bu hücrel aktivitelere kullanıldığı yara iyileşmesi süreçleri, keratin ağının oldukça hareketli olan yapısı ile sağlanır (67, 72). Keratinlerin bu dinamiği üzerlerinde gerçekleşen çeşitli post translasyonel modifikasyonlar tarafından düzenlenir (67, 72, 74). Post translasyonel keratin modifikasyonları keratin hareketliliğini artırarak hücre adhezyonunun zayıflamasına ve epitel hücrelerin daha invaziv hale gelmesine neden olmaktadır (72). Keratin filamanlarına bağlanan kinazlar genellikle filamanların Ser/Thr ve bazen de Tyr (tirozin) rezidülerinden fosforilasyonlarını sağlayarak keratinlerin çözünür hale gelmesini ve yeniden organizasyonunu indüklemektedir (70, 74). Çeşitli veritabanlarında yaptığımız *in silico* analizlere göre KRT14'ün pek çok farklı kinaz tarafından Ser, Thr ve Tyr rezidülerinden fosforlanabileceği gözlenmiştir (Kinasephos, Phosphosite veritabanları) (98, 99). Dolayısıyla bir Ser/Thr kinaz olan RIPK4, KRT14 ile etkileşip onu fosforilleyerek keratin ağının çözülmesine ve dolayısıyla hücrelerin epidermal farklılaşma boyunca yukarıya doğru göçünün düzenlenmesinde rol alıyor olabilir. Bu hipotezi destekleyebilmek için ilk olarak RIPK4'ün KRT14'ü fosforilleyip fosforillemediğinin araştırılması sonrasında da RIPK4 ile KRT14 etkileşiminin keratinosit göçündeki rolünün incelenmesi oldukça önemlidir.

Göç eden hücrelerde çözünür hale gelen keratin filaman öncülleri aktin filamanlar üzerinde bir araya gelerek göç yönünde keratin filamanlarının oluşmasını böylelikle hücrenin hareket etmesini sağlar (71). Daha evvel, *RIPK4*^{-/-} farelerde F-aktin ağının bozulduğunun gösterilmesi RIPK4'ün aktin organizasyonunda rolü olduğuna işaret etmiştir (49, 50). Ayrıca RIPK4'ün degradasyonunu düzenleyen ubikülin ligaz SCF^{β-TrCP}'nin eksikliğinde, RIPK4 bağımlı aktin organizasyonundaki fazla aktivite, hücre hareketinin artmasına sebep olmuştur (61). Öte yandan, RIPK4 ve KRT14'ün ayrı ayrı çalışmalarla dezmozomların yapısına katılan bir protein olan PKP1 ile etkileştiği gösterilmiştir (5, 6). RIPK4 tarafından fosforillenerek epidermal farklılaşmayı uyarmanın yanında (5), PKP1'in aktin filamentleriyle etkileşimi, onun aktin organizasyonunun düzenlenmesine de katıldığına işaret etmektedir (100). Bu bilgiler bize RIPK4, KRT14

ve PKP1'in birlikte etkileşimlerinin aktin polimerizasyonu üzerinden hücre göçünü regüle edebileceğine işaret etmektedir. Etkileşimin detaylı olarak aktin organizasyonu ve hücre göçü açısından incelenmesi diğer bir araştırma konusu olmaya adaydır.

Sonuç olarak, çalışmamız kapsamında RIPK4 ve KRT14 proteinlerinin etkileşimleri ilk kez tanımlanmıştır. Literatür bilgileri ve kendi bulgularımız dikkate alındığında RIPK4 ve KRT14 etkileşiminin hem epidermisin bazal tabakasındaki keratinositlerin proliferasyonunda hem de bu hücrelerin yukarıya doğru göç ederek farklılaşması sürecinde önemli olduğunu düşünmekteyiz. Bulgularımızın farklı fonksiyonel deneylerle desteklenmesi RIPK4 ve KRT14 etkileşiminin bu süreçlerdeki rolünün aydınlatılmasına büyük katkı sağlayacaktır.



8. KAYNAKLAR

1. Lopez-Pajares V, Yan K, Zarnegar BJ, Jameson KL, Khavari PA (2013). Genetic pathways in disorders of epidermal differentiation. *Trends Genet* 29: 31-40.
2. Kalay E, Sezgin O, Chellappa V, Mutlu M, Morsy H, Kayserili H, Kreiger E, Cansu A, Toraman B, Abdalla EM, Aslan Y, Pillai S, Akarsu NA (2012). Mutations in RIPK4 cause the autosomal-recessive form of popliteal pterygium syndrome. *Am J Hum Genet* 90: 76-85.
3. Romano RA, Birkaya B, Sinha S (2007). A functional enhancer of keratin14 is a direct transcriptional target of deltaNp63. *J Invest Dermatol* 127: 1175-1186.
4. Mitchell K, O'Sullivan J, Missero C, Blair E, Richardson R, Anderson B, Antonini D, Murray JC, Shanske AL, Schutte BC, Romano RA, Sinha S, Bhaskar SS, Black GC, Dixon J, Dixon MJ (2012). Exome sequence identifies RIPK4 as the Bartsocas-Papas syndrome locus. *Am J Hum Genet* 90: 69-75.
5. Lee P, Jiang S, Li Y, Yue J, Gou X, Chen SY, Zhao Y, Schober M, Tan M, Wu X (2017). Phosphorylation of Pkp1 by RIPK4 regulates epidermal differentiation and skin tumorigenesis. *The EMBO Journal* 36: 1963-1980.
6. Hofmann I, Mertens C, Brettel M, Nimmrich V, Schnolzer M, Herrmann H (2000). Interaction of plakophilins with desmoplakin and intermediate filament proteins: an in vitro analysis. *J Cell Sci* 113: 2471-2483.
7. Hsu YC, Li L, Fuchs E (2014). Emerging interactions between skin stem cells and their niches. *Nat Med* 20: 847-856.
8. Alonso L, Fuchs E (2003). Stem cells of the skin epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 11830-11835.
9. Fuchs E (2008). Skin stem cells: rising to the surface. *J Cell Biol* 180: 273-284.
10. Fuchs E, Nowak JA (2008). Building epithelial tissues from skin stem cells. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 73: 333-350.
11. Blanpain C, Fuchs E (2009). Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10: 207-217.
12. Bikle DD, Xie Z, Tu C-L (2012). Calcium regulation of keratinocyte differentiation. *Expert Rev Endocrinol Metab* 7: 461-472.
13. Eckhart L, Lippens S, Tschachler E, Declercq W (2013). Cell death by cornification. *Biochim Biophys Acta* 1833: 3471-3480.

14. Chu EY, Hens J, Andl T, Kairo A, Yamaguchi TP, Briskin C, Glick A, Wysolmerski JJ, Millar SE (2004). Canonical WNT signaling promotes mammary placode development and is essential for initiation of mammary gland morphogenesis. *Development* 131: 4819-4829.
15. DasGupta R, Fuchs E (1999). Multiple roles for activated LEF/TCF transcription complexes during hair follicle development and differentiation. *Development* 126: 4557-4568.
16. Demehri S, Turkoz A, Kopan R (2009). Epidermal Notch1 loss promotes skin tumorigenesis by impacting the stromal microenvironment. *Cancer Cell* 16: 55-66.
17. Suzuki A, Itami S, Ohishi M, Hamada K, Inoue T, Komazawa N, Senoo H, Sasaki T, Takeda J, Manabe M, Mak TW, Nakano T (2003). Keratinocyte-specific Pten deficiency results in epidermal hyperplasia, accelerated hair follicle morphogenesis and tumor formation. *Cancer Res* 63: 674-681.
18. Yang L, Mao C, Teng Y, Li W, Zhang J, Cheng X, Li X, Han X, Xia Z, Deng H, Yang X (2005). Targeted disruption of Smad4 in mouse epidermis results in failure of hair follicle cycling and formation of skin tumors. *Cancer Res* 65: 8671-8678.
19. Zhang JY, Green CL, Tao S, Khavari PA (2004). NF-kappaB RelA opposes epidermal proliferation driven by TNFR1 and JNK. *Genes Dev* 18: 17-22.
20. Yoh K, Prywes R (2015). Pathway regulation of p63, a director of rpthelial cell fate. *Front Endocrinol (Lausanne)* 6: 51.
21. Koster MI, Roop DR (2004). The role of p63 in development and differentiation of the epidermis. *J Dermatol Sci* 34: 3-9.
22. Beretta C, Chiarelli A, Testoni B, Mantovani R, Guerrini L (2005). Regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p57Kip2 expression by p63. *Cell Cycle* 4: 1625-1631.
23. Koster MI, Kim S, Mills AA, DeMayo FJ, Roop DR (2004). p63 is the molecular switch for initiation of an epithelial stratification program. *Genes Dev* 18: 126-131.
24. Koster MI, Dai D, Marinari B, Sano Y, Costanzo A, Karin M, Roop DR (2007). p63 induces key target genes required for epidermal morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 3255-3260.
25. Lu H, Hesse M, Peters B, Magin TM (2005). Type II keratins precede type I keratins during early embryonic development. *Eur J Cell Biol* 84: 709-718.

26. Dohn M, Zhang S, Chen X (2001). p63 α and Δ Np63 α can induce cell cycle arrest and apoptosis and differentially regulate p53 target genes. *Oncogene* 20: 3193.
27. Thomason HA, Dixon MJ, Dixon J (2008). Facial clefting in Tp63 deficient mice results from altered Bmp4, Fgf8 and Shh signaling. *Dev Biol* 321: 273-282.
28. Kouwenhoven EN, Oti M, Niehues H, van Heeringen SJ, Schalkwijk J, Stunnenberg HG, van Bokhoven H, Zhou H (2015). Transcription factor p63 bookmarks and regulates dynamic enhancers during epidermal differentiation. *EMBO Rep* 16: 863-878.
29. Rinne T, Hamel B, Bokhoven Hv, Brunner HG (2006). Pattern of p63 mutations and their phenotypes—update. *Am J Med Genet A* 140A: 1396-1406.
30. Mills AA, Zheng B, Wang X-J, Vogel H, Roop DR, Bradley A (1999). p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. *Nature* 398: 708-713.
31. Yang A, Schweitzer R, Sun D, Kaghad M, Walker N, Bronson RT, Tabin C, Sharpe A, Caput D, Crum C, McKeon F (1999). p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature* 398: 714-718.
32. McDade SS, Henry AE, Pivato GP, Kozarewa I, Mitsopoulos C, Fenwick K, Assiotis I, Hakas J, Zvelebil M, Orr N, Lord CJ, Patel D, Ashworth A, McCance DJ (2012). Genome-wide analysis of p63 binding sites identifies AP-2 factors as co-regulators of epidermal differentiation. *Nucleic Acids Res* 40: 7190-7206.
33. Thomason HA, Zhou H, Kouwenhoven EN, Dotto GP, Restivo G, Nguyen BC, Little H, Dixon MJ, van Bokhoven H, Dixon J (2010). Cooperation between the transcription factors p63 and IRF6 is essential to prevent cleft palate in mice. *J Clin Invest* 120: 1561-1569.
34. Marinari B, Ballaro C, Koster MI, Giustizieri ML, Moretti F, Crosti F, Papoutsaki M, Karin M, Alema S, Chimenti S, Roop DR, Costanzo A (2009). IKK α is a p63 transcriptional target involved in the pathogenesis of ectodermal dysplasias. *J Invest Dermatol* 129: 60-69.
35. Leslie EJ, O'Sullivan J, Cunningham ML, Singh A, Goudy SL, Ababneh F, Alsubaie L, Ch'ng G-S, van der Laar IMBH, Hoogeboom AJM, Dunnwald M, Kapoor S, Jiramongkolchai P, Standley J, Manak JR, Murray JC, Dixon MJ (2015). Expanding the Genetic and Phenotypic Spectrum of Popliteal Pterygium Disorders. *Am J Med Genet A* 0: 545-552.

36. Aslan Y, Erduran E, Kutlu N (2000). Autosomal recessive multiple pterygium syndrome: A new variant? *Am J Med Genet* 93: 194-197.
37. Busa T, Jeraiby M, Clemenson A, Manouvrier S, Granados V, Philip N, Touraine R (2017). Confirmation that RIPK4 mutations cause not only Bartsocas-Papas syndrome but also CHAND syndrome. *Am J Med Genet A* 173: 3114-3117.
38. Gripp KW, Ennis S, Napoli J (2013). Exome Analysis in Clinical Practice: Expanding the Phenotype of Bartsocas–Papas Syndrome. *Am J Med Genet A* 161: 1058-1063.
39. Gollasch B, Basmanav FB, Nanda A, Fritz G, Mahmoudi H, Thiele H, Wehner M, Wolf S, Altmüller J, Nürnberg P, Frank J, Betz RC (2015). Identification of a novel mutation in RIPK4 in a kindred with phenotypic features of Bartsocas-Papas and CHAND syndromes. *Am J Med Genet A* 167: 2555-2562.
40. Humphries F, Yang S, Wang B, Moynagh PN (2015). RIP kinases: key decision makers in cell death and innate immunity. *Cell Death Differ* 22: 225-236.
41. Meylan E, Martinon F, Thome M, Gschwendt M, Tschopp J (2002). RIP4 (DIK/PKK), a novel member of the RIP kinase family, activates NF-kappa B and is processed during apoptosis. *EMBO Rep* 3: 1201-1208.
42. Zhang D, Lin J, Han J (2010). Receptor-interacting protein (RIP) kinase family. *Cell Mol Immunol* 7: 243-249.
43. Meylan E, Tschopp J (2005). The RIP kinases: crucial integrators of cellular stress. *Trends Biochem Sci* 30: 151-159.
44. Holland P, Willis C, Kanaly S, Glaccum M, Warren A, Charrier K, Murison J, Derry J, Virca G, Bird T, Peschon J (2002). RIP4 is an ankyrin repeat-containing kinase essential for keratinocyte differentiation. *Curr Biol* 12: 1424-1428.
45. Zha J, Zhou Q, Xu L-G, Chen D, Li L, Zhai Z, Shu H-B (2004). RIP5 is a RIP-homologous inducer of cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 319: 298-303.
46. Bhr C, Rohwer A, Stempka L, Rincke G, Marks F, Gschwendt M (2000). DIK, a novel protein kinase that interacts with protein kinase Cdelta. Cloning, characterization, and gene analysis. *J Biol Chem* 275: 36350-36357.
47. Chen L, Haider K, Ponda M, Cariappa A, Rowitch D, Pillai S (2001). Protein kinase C-associated kinase (PKK), a novel membrane-associated, ankyrin repeat-containing protein kinase. *J Biol Chem* 276: 21737-21744.

48. Rountree RB, Willis CR, Huyen D, Blumberg H, Bailey K, Dean Jr C, Peschon JJ, Holland PM (2010). RIP4 Regulates Epidermal Differentiation and Cutaneous Inflammation. *J Invest Dermatol* 130: 102-112.
49. De Groote P, Tran HT, Franssen M, Tanghe G, Urwyler C, De Craene B, Leurs K, Gilbert B, Van Imschoot G, De Rycke R, Guérin CJ, Holland P, Berx G, Vandenaabeele P, Lippens S, Vleminckx K, Declercq W (2015). A novel RIPK4–IRF6 connection is required to prevent epithelial fusions characteristic for popliteal pterygium syndromes. *Cell Death Differ* 22: 1012-1024.
50. Urwyler-Rosset C, Tanghe G, Leurs K, Gilbert B, De Rycke R, De Bruyne M, Lippens S, Bartunkova S, De Groote P, Niessen C, Haftek M, Vandenaabeele P, Declercq W (2018). Keratinocyte-specific ablation of RIPK4 allows epidermal cornification but impairs skin barrier formation. *J Invest Dermatol*.
51. Richardson RJ, Hammond NL, Coulombe PA, Saloranta C, Nousiainen HO, Salonen R, Berry A, Hanley N, Headon D, Karikoski R, Dixon MJ (2014). Periderm prevents pathological epithelial adhesions during embryogenesis. *J Clin Invest* 124: 3891-3900.
52. Jia KUN, Zhang YAN, Ma W, Zhang X, Sun Q (2015). Effect of interleukin-17 on receptor-interacting protein 4 expression and keratinocyte proliferation. *Exp Ther Med* 10: 374-378.
53. Adams S, Munz B (2010). RIP4 is a target of multiple signal transduction pathways in keratinocytes: implications for epidermal differentiation and cutaneous wound repair. *Exp Cell Res* 316: 126-137.
54. Liu D-Q, Li F-F, Zhang J-B, Zhou T-J, Xue W-Q, Zheng X-H, Chen Y-B, Liao X-Y, Zhang L, Zhang S-D, Hu Y-Z, Jia W-H (2015). Increased RIPK4 expression is associated with progression and poor prognosis in cervical squamous cell carcinoma patients. *Sci Rep* 5: 11955.
55. Kwa MQ, Huynh J, Aw J, Zhang L, Nguyen T, Reynolds EC, Sweet MJ, Hamilton JA, Scholz GM (2014). Receptor-interacting protein kinase 4 and interferon regulatory factor 6 function as a signaling axis to regulate keratinocyte differentiation. *J Biol Chem* 289: 31077-31087.
56. Huang X, McGann JC, Liu BY, Hannoush RN, Lill JR, Pham V, Newton K, Kakunda M, Liu J, Yu C, Hymowitz SG, Hongo JA, Wynshaw-Boris A, Polakis P,

- Harland RM, Dixit VM (2013). Phosphorylation of Dishevelled by protein kinase RIPK4 regulates Wnt signaling. *Science* 339: 1441-1445.
57. Bertrand MJM, Lippens S, Staes A, Gilbert B, Roelandt R, De Medts J, Gevaert K, Declercq W, Vandenabeele P (2011). cIAP1/2 Are Direct E3 Ligases Conjugating Diverse Types of Ubiquitin Chains to Receptor Interacting Proteins Kinases 1 to 4 (RIP1–4). *PLOS ONE* 6: e22356.
 58. Kim SW, Schifano M, Oleksyn D, Jordan CT, Ryan D, Insel R, Zhao J, Chen L (2014). Protein kinase C-associated kinase regulates NF-kappaB activation through inducing IKK activation. *Int J Oncol* 45: 1707-1714.
 59. Moran ST, Haider K, Ow Y, Milton P, Chen L, Pillai S (2003). Protein kinase C-associated kinase can activate NFkappaB in both a kinase-dependent and a kinase-independent manner. *J Biol Chem* 278: 21526-21533.
 60. Nakamura BN, Glazier A, Kattah MG, Duong B, Jia Y, Campo D, Shao L (2018). A20 regulates canonical wnt-signaling through an interaction with RIPK4. *PLOS ONE* 13: e0195893.
 61. Tanghe G, Urwyler-Rösselet C, De Groote P, Dejardin E, De Bock P-J, Gevaert K, Vandenabeele P, Declercq W (2018). RIPK4 activity in keratinocytes is controlled by the SCF β -TrCP ubiquitin ligase to maintain cortical actin organization. *Cell Mol Life Sci* 75: 2827-2841.
 62. Bae HC, Jeong SH, Kim JH, Lee H, Ryu W-I, Kim M-G, Son ED, Lee TR, Son SW (2018). RIP4 upregulates CCL20 expression through STAT3 signalling in cultured keratinocytes. *Exp Dermatol*.
 63. Muto A, Ruland J, McAllister-Lucas LM, Lucas PC, Yamaoka S, Chen FF, Lin A, Mak TW, Nunez G, Inohara N (2002). Protein kinase C-associated kinase (PKK) mediates Bcl10-independent NF-kappa B activation induced by phorbol ester. *J Biol Chem* 277: 31871-31876.
 64. Kwa MQ, Scholz GM, Reynolds EC (2016). RIPK4 activates an IRF6-mediated proinflammatory cytokine response in keratinocytes. *Cytokine* 83: 19-26.
 65. Bragulla HH, Homberger DG (2009). Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia. *J Anat* 214: 516-559.
 66. Gu L-H, Coulombe PA (2007). Keratin function in skin epithelia: a broadening palette with surprising shades. *Curr Opin Cell Biol* 19: 13-23.

67. Windoffer R, Beil M, Magin TM, Leube RE (2011). Cytoskeleton in motion: the dynamics of keratin intermediate filaments in epithelia. *J Cell Biol* 194: 669.
68. Fuchs E, Weber K (1994). Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease. *Annu Rev Biochem* 63: 345-382.
69. Alam H, Sehgal L, Kundu ST, Dalal SN, Vaidya MM (2011). Novel function of keratins 5 and 14 in proliferation and differentiation of stratified epithelial cells. *Mol Biol Cell* 22: 4068-4078.
70. Kim HJ, Choi WJ, Lee CH (2015). Phosphorylation and Reorganization of Keratin Networks: Implications for Carcinogenesis and Epithelial Mesenchymal Transition. *Biomol Ther (Seoul)* 23: 301-312.
71. Kölsch A, Windoffer R, Würflinger T, Aach T, Leube RE (2010). The keratin-filament cycle of assembly and disassembly. *J Cell Sci* 123: 2266.
72. Loschke F, Seltmann K, Bouameur JE, Magin TM (2015). Regulation of keratin network organization. *Curr Opin Cell Biol* 32: 56-64.
73. Kim S, Wong P, Coulombe PA (2006). A keratin cytoskeletal protein regulates protein synthesis and epithelial cell growth. *Nature* 441: 362.
74. Snider NT, Omary MB (2014). Post-translational modifications of intermediate filament proteins: mechanisms and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15: 163-177.
75. Lane EB (1994). Keratin diseases. *Curr Opin Genet Dev* 4: 412-418.
76. McLean WH, Pulkkinen L, Smith FJ, Rugg EL, Lane EB, Bullrich F, Burgeson RE, Amano S, Hudson DL, Owaribe K, McGrath JA, McMillan JR, Eady RA, Leigh IM, Christiano AM, Uitto J (1996). Loss of plectin causes epidermolysis bullosa with muscular dystrophy: cDNA cloning and genomic organization. *Genes Dev* 10: 1724-1735.
77. Chan Y, Anton-Lamprecht I, Yu QC, Jackel A, Zabel B, Ernst JP, Fuchs E (1994). A human keratin 14 "knockout": the absence of K14 leads to severe epidermolysis bullosa simplex and a function for an intermediate filament protein. *Genes Dev* 8: 2574-2587.
78. Batta K, Rugg EL, Wilson NJ, West N, Goodyear H, Lane EB, Gratian M, Dopping-Hepenstal P, Moss C, Eady RA (2000). A keratin 14 'knockout' mutation in recessive epidermolysis bullosa simplex resulting in less severe disease. *Br J Dermatol* 143: 621-627.

79. Shinkuma S, McMillan JR, Shimizu H (2011). Ultrastructure and molecular pathogenesis of epidermolysis bullosa. *Clin Dermatol* 29: 412-419.
80. Lugassy J, McGrath JA, Itin P, Shemer R, Verbov J, Murphy HR, Ishida-Yamamoto A, Digiovanna JJ, Bercovich D, Karin N, Vitsenshtein A, Uitto J, Bergman R, Richard G, Sprecher E (2008). KRT14 haploinsufficiency results in increased susceptibility of keratinocytes to TNF-alpha-induced apoptosis and causes Naegeli-Franceschetti-Jadassohn syndrome. *J Invest Dermatol* 128: 1517-1524.
81. Vassar R, Coulombe PA, Degenstein L, Albers K, Fuchs E (1991). Mutant keratin expression in transgenic mice causes marked abnormalities resembling a human genetic skin disease. *Cell* 64: 365-380.
82. Coulombe PA, Kerns ML, Fuchs E (2009). Epidermolysis bullosa simplex: a paradigm for disorders of tissue fragility. *J Clin Invest* 119: 1784-1793.
83. Lee C-H, Kim M-S, Chung BM, Leahy DJ, Coulombe PA (2012). Structural basis for heteromeric assembly and perinuclear organization of keratin filaments. *Nat Struct Mol Biol* 19: 707-715.
84. Bouameur JE, Favre B, Fontao L, Lingasamy P, Begre N, Borradori L (2014). Interaction of plectin with keratins 5 and 14: dependence on several plectin domains and keratin quaternary structure. *J Invest Dermatol* 134: 2776-2783.
85. Velez-delValle C, Marsch-Moreno M, Castro-Muñozledo F, Galván-Mendoza JJ, Kuri-Harcuch W (2016). Epithelial cell migration requires the interaction between the vimentin and keratin intermediate filaments. *Sci Rep* 6: 24389.
86. Inada H, Izawa I, Nishizawa M, Fujita E, Kiyono T, Takahashi T, Momoi T, Inagaki M (2001). Keratin attenuates tumor necrosis factor-induced cytotoxicity through association with TRADD. *J Cell Biol* 155: 415-426.
87. Boz AB (2016). RIPK4 ve PLAGL2 proteinlerinin Etkileşimlerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
88. Jordan M, Schallhorn A, Wurm FM (1996). Transfecting mammalian cells: optimization of critical parameters affecting calcium-phosphate precipitate formation. *Nucleic Acids Res* 24: 596-601.

89. Colombo I, Sangiovanni E, Maggio R, Mattozzi C, Zava S, Corbett Y, Fumagalli M, Carlino C, Corsetto PA, Scaccabarozzi D, Calvieri S, Gismondi A, Taramelli D, Dell'Agli M (2017). HaCaT Cells as a Reliable In Vitro Differentiation Model to Dissect the Inflammatory/Repair Response of Human Keratinocytes. *Mediators Inflamm* 2017: 7435621.
90. Lodish H BA, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, and Darnell J (2008). *Molecular Cell Biology*. 6th edition. New York: W. H. Freeman and Company, USA, 623-665.
91. Fields S, Song O-k (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340: 245.
92. Brückner A, Polge C, Lentze N, Auerbach D, Schlattner U (2009). Yeast two-hybrid, a powerful tool for systems biology. *International journal of molecular sciences* 10: 2763-2788.
93. Huang CS, Oberbeck N, Hsiao YC, Liu P, Johnson AR, Dixit VM, Hymowitz SG (2018). Crystal Structure of Ripk4 Reveals Dimerization-Dependent Kinase Activity. *Structure* 26: 767-777.
94. Kosugi S, Hasebe M, Tomita M, Yanagawa H (2009). Systematic identification of cell cycle-dependent yeast nucleocytoplasmic shuttling proteins by prediction of composite motifs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 10171-10176.
95. Zou L, Liu J, Lu H (2018). Influence of protein kinase RIPK4 expression on the apoptosis and proliferation of chondrocytes in osteoarthritis. *Mol Med Rep* 17: 3078-3084.
96. Adams S, Pankow S, Werner S, Munz B (2007). Regulation of NF-kappaB activity and keratinocyte differentiation by the RIP4 protein: implications for cutaneous wound repair. *J Invest Dermatol* 127: 538-544.
97. Wilson VG (2014). Growth and differentiation of HaCaT keratinocytes. *Methods Mol Biol* 1195: 33-41.
98. Huang HD, Lee TY, Tzeng SW, Horng JT (2005). KinasePhos: a web tool for identifying protein kinase-specific phosphorylation sites. *Nucleic Acids Res* 33: W226-229.

99. Hornbeck PV, Zhang B, Murray B, Kornhauser JM, Latham V, Skrzypek E (2015). PhosphoSitePlus, 2014: mutations, PTMs and recalibrations. *Nucleic Acids Res* 43: D512-520.
100. Hatzfeld M, Haffner C, Schulze K, Vinzens U (2000). The Function of Plakophilin 1 in Desmosome Assembly and Actin Filament Organization. *J Cell Biol* 149: 209-222.



9. ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Soyadı, Adı : SÜMER, Ceren

Uyruğu : T.C.

Doğum tarihi ve yeri: 17.05.1986, Maçka/TRABZON

E-Posta : cerensmr@gmail.com

Yazışma adresi : KTÜ SABE Tıbbi Biyoloji AD 61080 TRABZON

Tel : 0462 377 79 57

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora	: Karadeniz Teknik Üni. Sağlık Bilimleri Ens. Tıbbi Biyoloji AD	Halen
Yüksek Lisans	: Karadeniz Teknik Üni. Sağlık Bilimleri Ens. Tıbbi Biyoloji AD	2013
Lisans	: Karadeniz Teknik Üni. Biyoloji Bölümü	2009

AKADEMİK/MESLEKİ DENEYİMİ

Görevi	Kurum	Süre
Araştırma Görevlisi	KTÜ Tıbbi Biyoloji AB	2010-Halen
ERASMUS Staj Hareketliliği	Johannes Gutenberg Universität Mainz	2014

YABANCI DİL

İngilizce: YÖKDİL Sağlık Bilimleri; 90

ESERLER

Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında Basılan Bildiriler

1. Sümer C, Turgutalp H, Kalay E, Toraman B, Yücel B, Celep Eyüpoğlu F (2013). Glioblastoma Multiforme Etiyolojisinde IDH1 ve PTEN. XIII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Poster Bildiri, ss.149, Aydın.
2. Toraman B., Sümer C., Yorgancıoğlu G., Dinçer T., Tural Hesapçıoğlu S. , Bilginer S.Ç., Karakuş M., Kandil S., Kalay E (2015). Dengeli Resiprokal Translokasyonun

Segregasyonu Sonucu Meydana Gelen İki farklı Genetik Fenotip: Otizm Spektrum Bozukluğu ve Mental Retardasyon. XIV. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Poster Bildiri, ss.354, Muğla.

3. **Sümer C**, Boz AB, Er İ, Toraman B, Kalay E, Dinçer T (2017). Epidermal farklılaşmanın iki önemli proteini; reseptörle etkileşen serin-tireonin kinaz 4 (RIPK4) ve keratin 14 (KRT14)'ün etkileşiminin gösterilmesi. XV. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Sözlü Bildiri, ss.95, Muğla.
4. Sarı C, **Sümer C**, Celep Eyüpoğlu F (2017). Kafeik Asit Fenetil Ester (CAPE)'in farklı kolorektal kanser hücre hatları üzerindeki apoptotik etkileri. XV. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Sözlü Bildiri, ss.124, Muğla.

KURSLAR

1. Deney Hayvanları Kullanımı Kursu, Karadeniz Teknik Üniversitesi, 2015.
2. BD Accuri C6 Flow Sitometri Kullanıcı Eğitimi, KTÜ, 2014.
3. Konfokal Mikroskopi Teknikleri, Uygulamaları ve Gelişen Teknolojiler, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, 23-24 Eylül 2013.

BİLİMSEL KURULUŞLARA ÜYELİKLER:

2014 – Halen Tıbbi Biyoloji ve Genetik Derneği