



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**RIPK4 VE PLAGL2 PROTEİNLERİNİN
ETKİLEŞİMLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Asiye Büşra BOZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Yrd. Doç. Dr. Tuba DİNÇER

TRABZON-2016

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 çalışması ve yazımı aşamalarında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.



12.10/2016

Asiye Büşra BOZ

İthaf

*Yüksek lisans tezimi, yaptığım her işe dört elle sarılmamı sağlayan kardeşim Muhammet
Anıl BOZ'a ithaf ediyorum.*

TEŞEKKÜR

Çalışmam süresince engin bilgi ve tecrübesini paylaşmayı asla esirgemeyen, tüm samimi eleştirileriyle beni doğru yola yönlendiren, yolunda gitmeyen her şeyi anlayabilen ve tek bir cümlesiyle beni karanlıktan kurtarabilen, en umutsuz anlarda bile beni telkin edebilen, bana güvendiğini hissettiren ve güvenini boşa çıkarmaktan ölesiye korktuğum, öğrencisi olduğum için kendini şanslı hissettiğim, değerli danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Tuba DİNÇER'e sonsuz teşekkür ederim.

Yüksek lisansa başladığım ilk günden beri aynı çatı altında olduğumuz için bile kendimi şanslı hissettiğim, her ihtiyacım olduğunda engin bilgi ve tecrübesini paylaşmayı asla esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Ersan KALAY'a sonsuz teşekkürler ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgilerini ve tecrübelerini esirgemeyen değerli hocalarım Yrd. Doç. Dr. Bayram Toraman, Prof. Dr. Figen CELEP EYÜBOĞLU'na teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgilerini ve yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşlarım Arş.Gör. Gülden BUDAK, Arş.Gör.Dr. Burcu YÜCEL, Arş.Gör. Ceren SÜMER, Arş.Gör. Derya KAYA, Orhan SEZGİN, Pelin KÜÇÜK ve Adem YILDIRIM'a teşekkür ederim. Ayrıca Fatmagül YENİSEY ve Tülay KÖSEAHMET'e desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Manevi destekleri için arkadaşlarım Arş. Gör Cansu İLHAN, Arş. Gör Ayça KIRAN, Buket AYAR, Aslıhan Esra BİLDİRİCİ, Yağmur ASAN, Özlem KARADENİZ ve Esra YAZICI'ya teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan, varlığıyla huzur ve güven kaynağı olan, ben farkında olmadığım da bile beni düşünen Arş. Gör. İdris ER'e sonsuz teşekkür ederim.

Daima örnek aldığım amcam Mustafa BOZ'a ve ağabeyim Recai BOZ'a manevi desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen annem ve babam Fatma-İbrahim BOZ'a ve kardeşlerim Berkay Deniz ve Muhammet Anıl BOZ'a sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ONAY	
BEYAN	
İTHAF	
TEŞEKKÜR	
TABLolar DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ	xi
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	4
4.1. Deri	4
4.2. Epidermis	4
4.3. Epidermal Homeostazi	5
4.4. Reseptörle Etkileşen Protein Kinaz 4	10
4.5. RIPK4 ve WNT Yolağı	12
4.6. Pleimorfik Adenoma Gen Benzeri 2	13
4.7. PLAGL2 ve WNT Yolağı	14
5. MATERYAL ve YÖNTEM	16
5.1. Materyal	16
5.1.1. Büyük Ölçek Maya İkili Hibrit ile RIPK4'ün Etkileştiği Proteinlerin Belirlenmesi	16
5.1.2. Gereç	15
5.1.2.1. Kimyasallar	15
5.1.2.2. DNA markırlar	15
5.1.2.3. Antikorlar	19
5.1.2.3.1 Primer Antikorlar	19
5.1.2.3.2 Sekonder Antikorlar	19
5.1.3. Kitler	19
5.1.4. Cihazlar	20

5.1.5. Sarf Malzemeler	21
5.1.6. Bakteri Suşları	21
5.1.6.1. DH5α Genotipi	21
5.1.6.2. DB3.1 Genotipi	21
5.1.7. Maya Suşları	21
5.1.7.1. Y187 Genotipi	21
5.1.7.2. AH109 Genotipi	21
5.1.8. Kullanılan Vektörler	21
5.1.9. Solüsyon, Tampon ve Besiyerleri	22
5.1.9.1. Bakteri için Kullanılan Besiyerleri	22
5.1.9.2. Maya Kültürü için Kullanılan Besiyerleri ve Çözeltiler	23
5.1.9.3. Maya Transformasyonu İçin Gereken Çözeltiler	25
5.1.9.4. Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Çözeltiler	26
5.1.9.5. SDS Page-Western Blot Solüsyonları	27
5.1.9.6. İmmünpresipitasyonda Kullanılan Tamponlarİmmünfloresanda Kullanılan Tamponlar	29
5.1.9.7. İmmünofloresanda Kullanılan Tamponlar	31
5.2. Yöntem	32
5.2.1. Gateway Klonlama Sistemi Kullanılarak <i>RIPK4</i> ve <i>PLAGL2</i> Genlerinin Uygun Vektörlere Klonlanması	32
5.2.1.1. Gateway Klonlama Sistemi Hakkında Genel Bilgi	32
5.2.1.2. Giriş Klonu Oluşturmak Üzere <i>RIPK4</i> ve <i>PLAGL2</i> cDNA'larının PCR ile Çoğaltılması	34
5.2.1.2.1. <i>RIPK4</i> 'ün PCR Ürünün Oluşturulması	34
5.2.1.2.2. <i>PLAGL2</i> 'nin PCR Ürünün Oluşturulması	37
5.2.1.3. Gateway Sistemi BP Reaksiyonu ile <i>RIPK4</i> ve <i>PLAGL2</i> Giriş Vektörlerinin Oluşturulması	39
5.2.2 Bakteri Kültürü	41
5.2.2.1. Transformasyon için <i>Escherichia coli</i> Hücrelerinin Kompetan Hale Getirilmesi	41
5.2.2.2. <i>E coli</i> DH5α Suşuna Plazmid (Vektör) Transformasyonu	41
5.2.2.3. Bakteriden Plazmit İzolasyonu	42

5.2.3. Maya Teknikleri	43
5.2.3.1. Maya İkili Hibrit	43
5.2.3.2. Küçük Ölçek Maya Transformasyonu	44
5.2.3.3. Maya Eşleşmesi (Mating)	45
5.2.4. Hücre Kültürü Teknikleri	46
5.2.4.1. HEK293T ve HaCaT Hücrelerinin Çözülmesi	46
5.2.4.2. HEK293T ve HaCaT Hücrelerinin Pasajlanması	47
5.2.4.3. Hücrelerin Dondurulması	48
5.2.4.4. HEK293 Memeli Hücrelerinin Transfekte Edilmesi	48
5.2.4.4.1. Kalsiyum Fosfat Yöntemi ile Transfeksiyon	48
5.2.4.4.2. HaCaT Hücrelerinin Lipofektamin Yöntemi İle Transfeksiyonu	49
5.2.5. RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi	49
5.2.5.1. Hücreden RNA İzolasyonu	49
5.2.5.2. RNA'dan cDNA Sentezi	50
5.2.6. Spektrofotometrik Yöntemle DNA ve RNA'nın Kantitatif ve Kalitatif Analizi	51
5.2.7. DNA ve RNA Analizleri için Agaroz Jel Elektroforezi	51
5.2.8. DNA'nın Jelden Pürifikasyonu	51
5.2.9. <i>RIPK4</i> ve <i>PLAGL2</i> Klonlarının Dizilenmesi	52
5.2.10. Protein Analiz Yöntemleri	54
5.2.10.1. Hücrelerden Protein Lizatı Eldesi	54
5.2.10.2. Western Blot Yöntemi	54
5.2.10.2.1. SDS-PAGE Jellerinin Hazırlanması	54
5.2.10.2.2. SDS-PAGE Jellerinin Elektroforezi	55
5.2.10.2.3. Immunpresipitasyon	56
5.2.10.3.1. İmmünopresipitasyon Yöntemi (Teorik)	56
5.2.10.3.2. Protein Boncukların Hazırlanması	57
5.2.10.3.3. Ön temizlik (Pre-clearing)	58
5.2.10.3.4. İmmünopresipitasyon (IP) Yöntemi (Deneyisel)	58
5.2.10.4. İmmüno Floresan (IF) Yöntemi	58

6. BULGULAR	61
6.1. RIPK4 Ekspresyon Vektörlerinin Oluşturulması	61
6.2. <i>RIPK4</i> Giriş vektörlerinin Oluşturulması	61
6.3. <i>PLAGL2</i> Ekspresyon Vektörlerinin Oluşturulması	63
6.4. <i>PLAGL2</i> Giriş Vektörlerinin Oluşturulması	64
6.5. Maya İkili Hibrit	66
6.6. Memeli Hücrelerinde RIPK4 ve <i>PLAGL2</i> 'nin Etkileşimlerinin Gösterilmesi	69
6.7. RIPK4 ve <i>PLAGL2</i> Proteinlerinin Etkileşiminin İmmunopresipitasyon Yöntemi İle Gösterilmesi	70
6.8. RIPK4 ve <i>PLAGL2</i> Proteinlerinin Ko-Lokalizasyonunun İmmunfloresan Yöntemi İle Gösterilmesi	75
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	80
8. SONUÇ ve ÖNERİLER	87
9. KAYNAKLAR	89
10. ÖZGEÇMİŞ	95

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo		Sayfa
Tablo1.	SD medyum içerisinde bulunan aminoasitler	24
Tablo 2.	<i>RIPK4</i> cDNA larının oluşturulmasında kullanılan primerler	35
Tablo 3.	Pwo enzimi için kullanılan PCR kondisyonları	36
Tablo 4.	Oluşturulan <i>RIPK4</i> PCR ürünlerinin uzunlukları ve primer numaraları	36
Tablo 5.	<i>PLAGL2</i> cDNA larının oluşturulmasında kullanılan primerler	38
Tablo 6.	Oluşturulan <i>PLAGL2</i> PCR ürünlerinin uzunlukları ve primer numaraları	39
Tablo 7.	Gateway Sistemi BP reaksiyonu	39
Tablo 8.	Gateway Sistemi LR reaksiyonu	40
Tablo 9.	<i>RIPK4</i> ve <i>PLAGL2</i> 'nin LR reaksiyonu ile klonlandıkları varış vektörleri	40
Tablo 10.	Hücre kültüründe kullanılan flaskların yüzey alanları ve orantılı değerleri	48
Tablo 11.	Reaksiyon karışımı tablosu (cDNA sentez tablosu)	50
Tablo 12.	cDNA sentezi için hazırlanan primer karışımı listesi	51
Tablo 13.	<i>RIPK4</i> ve <i>PLAGL2</i> giriş vektörlerinin sekanslanmasında kullanılan primerler	53
Tablo 14.	Dizileme reaksiyonu için PCR karışımı	53
Tablo 15.	Ayırma Jeli İçeriği	55
Tablo 16.	Yükleme jeli içeriği	55
Tablo 17.	Maya ikili hibrit Eşleştirme (mating) koşulları	68

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil		Sayfa
Şekil 1.	Memeli derisi ve tabakaları	4
Şekil 2.	Epidermisin yapısı	5
Şekil 3.	Epidermal homeostazis	6
Şekil 4.	p63 ^{-/-} farelerin fenotipi	7
Şekil 5.	Hay Wells sendromu taşıyan hasta	7
Şekil 6.	Aslan Tip Multiple Pterygium sendromu taşıyan hasta	8
Şekil 7.	Ripk4 ^{+/-} fare fenotipi ve Ripk4 ^{-/-} fare fenotipi	9
Şekil 8.	Yabanıl tip ve RIPK4 ^{-/-} farelerin epidermislerindeki tabakalaşmanın karşılaştırılması	10
Şekil 9.	Bilinen RIP kinaz çeşitleri aktif bölgeleri	11
Şekil 10.	RIPK4 proteininin WNT sinyal yolağındaki rolü	13
Şekil 11.	PLAGL2 proteininin yapısı	13
Şekil 12.	PLAGL2'nin fazladan ekspresyonunun lamellipod oluşumunun arttırması	14
Şekil 13.	PLAGL2'nin WNT sinyal yolağını düzenlemesi	15
Şekil 14.	BP reaksiyon ile ilgililenen geni içeren PCR ürününün BP klonaz ile Donör vektöre aktarılarak giriş klonu oluşturulması.	33
Şekil 15.	LR reaksiyon ile Giriş klonunda bulunan ilgililenen genin Varış vektörüne aktarılarak Ekspresyon klonu oluşturulması	34
Şekil 16.	RIPK4 proteininin domainlerinin şematik olarak gösterilmesi	35
Şekil 17.	PLAGL2 proteininin domainlerinin şematik olarak gösterilmesi	37
Şekil 18.	Maya ikili hibrit çalışma prensibi	44
Şekil 19.	Mat a ve mat α cinsiyetlerine sahip haploit mayaların mating ile diploit olma süreci	45
Şekil 20.	İmmünopresipitasyon yöntemi	57
Şekil 21.	İmmünofloresan yöntemi	59
Şekil 22.	RIPK4 PCR ürünleri	61
Şekil 23.	RIPK4 giriş vektörleri	62
Şekil 24.	RIPK4 Ekspresyon vektörleri	63
Şekil 25.	PLAGL2 PCR ürünleri	64
Şekil 26.	PLAGL2 giriş vektörleri	65

Şekil 27.	<i>PLAGL2</i> ekspresyon vektörleri	66
Şekil 28.	Maya ikili hibrit sonuçları	68
Şekil 29.	Memeli hücrelerde RIPK4 ve domainlerinin ekspresyonlarının gösterilmesi	69
Şekil 30.	<i>PLAGL2</i> vektörlerinin ekspresyonlarının gösterilmesi	70
Şekil 31.	RIPK4 ve <i>PLAGL2</i> etkileşiminin immunopresipitasyon ile gösterilmesi-1-,	72
Şekil 32.	RIPK4 ve <i>PLAGL2</i> etkileşiminin immunopresipitasyon ile gösterilmesi-2-,	74
Şekil 33.	IP sonucu bulunan etkileşimin şeması	75
Şekil 34.	HaCaT hücrelerinde RIPK4 hücreSEL lokalizasyonunun hücreSEL lokalizasyonunun immünofloresan ile analizi	76
Şekil 35.	HaCaT hücrelerinde fazladan ekspres ettirilen <i>PLAGL2</i> 'nin hücre içi lokalizasyonunun immünofloresan ile gösterilmesi	76
Şekil 36.	HaCaT hücrelerinde <i>PLAGL2</i> ve RIPK4'ün hücreSEL yerleşimlerinin immünofloresan ile analizi	78
Şekil 37.	HaCaT hücrelerinde ekspres ettirilen RIPK4-FL ve <i>PLAGL2</i> -FL'nin farklı sitoplazmik yapılarıdaki birlikteliği	79
Şekil 38.	RIPK4 ve <i>PLAGL2</i> 'nin keratinosit farklılaşması esnasında etkileşimlerine yönelik geliştirilen model	86

KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

AD	Transkripsiyon aktive edici domain
Ade	Adenin
BAP	Bilimsel Araştırma Projeleri
B-Katenin	Cadherin-Associated Protein
LB	Luria Broth
cm	Santimetre
DBD	DNA bağlanma domaini
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum- Alman Kanser Araştırma Merkezi
DO	Drop Out
DVL2	Dishevelled
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
FL	Full lenght-Tam uzunlukta
FZD	Frizzled
GAL	Galaktozidaz
g	Gram
HaCaT	Erişkin İnsan Keratinosit Hücre Hattı
HEK293	Human Embriyonik Kidney293
His	Histidin
IF	İmmünfloresan
IKK	İnhibitör Kappa B kinaz
Ile	İzolösin
IP	İmmünpresipitasyon
IRF	Interferon regülör factor
kDa	Kilodalton
Leu	Lösin
M	Molar
Met	Metionin
NF-κB	Nüklear Faktör kappa B
NSC	Nöral Stem Cell-Nöral kök hücre

Pen	Penisilin
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PLAGL2	Pleimorfik Adenoma Gen Benzeri
RIPK4	Reseptörle Etkileşen Serin Treonin Kinaz
RNA	Ribonükleik asit
SD	Seçici Besiyeri
Ser	Serin
<i>S.cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Strep	Streptomisin
TE	Tris/EDTA
TGF-β	Transforming growth factor beta
Thr	Threonin
Trp	Triptofan
UAS	Upstream aktive edici sekans
Ura	Urasil
WNT	Wingless-Type MMTV Integration Site Family
Y2H	Maya ikili hibrit
YNB	Yeast Nitrogen Base
AZ	Ağır zincir
HZ	Hafif zincir

1. ÖZET

Reseptörle Etkileşen Serin Treonin Kinaz 4 (RIPK4) ve Pleimorfik Adenoma Gen Benzeri 2 (PLAGL2) Proteinlerinin Etkileşimlerinin Araştırılması

Epidermis, çoğalabilen tek kat bazal keratinositlerden ve bazal katmandan ayrılarak farklılaşma sürecine girmiş suprabazal keratinosit katmanlarından oluşmaktadır. Epidermiste bulunan bu tabakalaşma TGF-beta, WNT, Notch, PI3K ve NF-κB gibi gelişim biyolojisi için önemli yollar tarafından düzenlenmektedir. Daha önce Aslan Tip Multiple Pterygium sendromu ile ilişkilendirilen ve epidermal farklılaşmada yer aldığı gösterilen RIPK4'ün moleküler mekanizması tam olarak bilinmemektedir. RIPK4'ün epidermal farklılaşma sürecindeki rolünü aydınlatmaya yönelik olarak, yürütücülüğünü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Tuba DİNÇER'in yapmış olduğu KTÜ BAP tarafından desteklenen 9749 nolu proje kapsamında RIPK4 ile insan keratinosit cDNA kütüphanesi büyük ölçekli maya ikili hibrit ile taranmış ve sonucunda 16 proteinin RIPK4 ile etkileştiğine dair bilgi elde edilmiştir. Tespit edilen proteinlerden biri PLAGL2 isimli bir transkripsiyon faktörüdür. RIPK4 ve PLAGL2'nin WNT yolağında rol aldığı daha evvel gösterilmiş olması bu iki proteinin hücresel olaylarda birlikte çalışabileceğine dair ipucu vermektedir.

Tezin amacı, RIPK4- PLAGL2 etkileşimini *in-vivo* koşullarda küçük ölçekli maya ikili hibrit, sonrasında ko-immünopresipitasyon ve ko-immunofloresan yöntemleri ile doğrulamak ve bu etkileşimden sorumlu domainleri analiz etmektir.

Bu doğrultuda, küçük ölçekli maya ikili hibrit ile insan RIPK4 ve PLAGL2 proteinlerinin etkileştiği doğrulandı. İki proteinin memeli hücrelerinde de etkileştiği ve bu etkileşimin RIPK4'ün N terminal kinaz domaini ile PLAGL2'nin C terminal domaini üzerinden olduğu ayrıca, RIPK4'ün kinaz aktivitesinin etkileşim için gerekli olduğu gösterildi. İlave olarak, RIPK4'ün hücrede PLAGL2 ile birlikte ekspresyonunun PLAGL2'nin çekirdeğe lokalizasyonunu engelleyerek PLAGL2'yi sitoplazmada, hücre iskelet filamanları ve nokta benzeri yapılarda sabitlediği ve bu ko-lokalizasyondan RIPK4'ün kinaz aktivitesi ve C-terminalinin sorumlu olduğu gösterildi.

Anahtar Kelimeler: RIPK4, PLAGL2, Maya ikili hibrit, Ko-immünopresipitasyon

2. SUMMARY

Investigation of Receptor-Interacting Serine-Threonine Kinase 4 (RIPK4) and Pleimorphic Adenoma Gene-Like 2 (PLAGL2) Proteins Interaction

Epidermis is a stratified squamous epithelium, composed of a proliferating basal and differentiated suprabasal keratinocyte layers. Epidermal layers are under the control of different signaling pathways, such as TGF-beta, WNT, PI3K and NF-kB, that are important for development. RIPK4, which we have previously associated with Aslan Type Multiple Pterygium syndrome, regulates the epidermal differentiation. However, there is not enough information about the molecular mechanisms of RIPK4 in this process. Within the context of a BAP9749 Project that was conducted by Asst. Prof. Tuba DİNÇER and supported by KTU Scientific Reaserch Coordination Unit, RIPK4 interacting proteins were aimed to be identified to clarify the role of RIPK4 in epidermal differentiation. For this purpose, human keratinocyte cDNA library was screened by large scale yeast two hybrid system using RIPK4 as bait and sixteen proteins were identified. Among them, transcription factor PLAGL2 was chosen for further analyses since it was previously reported to have a role in WNT signaling pathway similar to the RIPK4.

Accordingly within the scope of this thesis; we aimed to verify the interaction of RIPK4 and PLAGL2 and identify the domains responsible for his interaction firstly in yeast with small scale yeast two hybrid system and secondly in mammalian cells by co-immunoprecipitation and co-immunoflourescence experiments.

In this context, initially the interaction between RIPK4 and PLAGL2 was shown with small scale yeast two hybrid in yeast. Then interaction of RIPK4 and PLAGL2 was verified in mammalian cells by co-immunoprecipitation experiment. Furthermore, N-terminal domain of RIPK4 with intact kinase activity and C-terminal domain of PLAGL2 were found to be responsive from this interaction. In addition immunoflourescence experiment showed that when RIPK4 and PLAGL2 co-expressed RIPK4 prevented nuclear trasnsport of PLAGL2 by keeping PLAGL2 in the cytoskeleton like gfilaments and cytoplasmic dot like structures and RIPK4's kinase activity and C-terminal domain was important for PLAGL2-RIPK4 cytoplasmic co-localization.

Key words: co-immunoprecipitation, PLAGL2, RIPK4, Yeast two hybrid

3.GİRİŞ ve AMAÇ

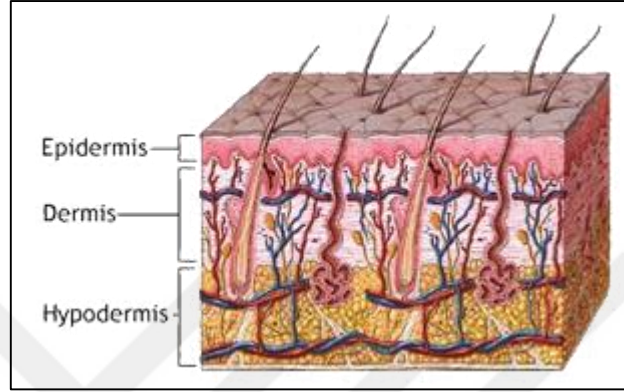
Dış çevreye karşı koruyucu bir bariyer oluşturan epidermis, çok katmanlı, yassı epitel bir dokudur. Epiderminin oluşumu ve sürekliliği en alttaki basal katmanda yer alan keratinosit kök hücrelerinin bir alttaki mesenşimal hücrelerden gelen sinyaller doğrultusunda çoğalmaları ve çoğalan hücrelerden bir kısmının farklılaşarak yukarı katmanlara çıkmasıyla sağlanır (1). Epidermal farklılaşma, birçok farklı genin farklı epidermis katmanında doğru zamanda ekspres edilmesini gerektiren karmaşık bir süreçtir. Epidermal homeostazis, epidermisi oluşturan keratinositlerin çoğalması, farklılaşması ve ölümünü düzenleyen süreçlerdeki hassas dengeyi tanımlar. Epidermal homeostazisteki bozukluklarla ilişkilendirilmiş düzensizlikler cilt hastalıkları, dudak damak yarıkları, kol ve bacak gelişim anomalileri, kanser ve yara iyileşmemesi gibi gelişimsel ve patolojik hastalıklardır. Bu hastalıkların moleküler mekanizmasının anlaşılması ve sonrasında bunlara karşı tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi amacıyla bu süreçlerde önemli rolü olan RIPK4 proteininin diğer proteinlerle etkileşiminin araştırılması işleyişi anlamak ve sonrasında teröpatik yaklaşımlar geliştirmek açısından önemlidir. Bu doğrultuda, daha evvel Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalımız bünyesinde Yard. Doç. Dr. Tuba DİNÇER'in yürüttüğü Karadeniz Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Koordinasyon Birimi tarafından desteklenen 9749 No'lu projesi kapsamında RIPK4 yem olarak kullanılmak suretiyle insan keratinosit cDNA kütüphanesi büyük ölçek maya ikili hibrit yöntemi ile tarandı ve PLAGL2'nin RIPK4 ile etkileştiğine dair ön veri elde edildi.

Bu çalışma ile amaçlanan, RIPK4' ün yem olarak kullanıldığı büyük ölçek maya ikili hibrit taraması sonucunda bulunan PLAGL2-RIPK4 etkileşimini ilk etapta *in-vivo* koşullarda küçük ölçek maya ikili hibrit ile mayada, sonrasında ise ko-immünopresipitasyon ve ko-immünofloresan yöntemleri ile memeli hücrelerinde doğrulamak ayrıca, bu etkileşimden proteinlerin hangi domainlerinin sorumlu olduğunu analiz etmektir. Bunlara ilaveten tezden elde edilen çıktıların, etkileşimin fonksiyonel öneminin araştırılacağı daha kapsamlı projeler için ön veri olarak kullanılması ve böylelikle bilimsel indeksi yüksek dergilerde yayınlanma ve yüksek bütçeli projelere başvuru sürecine katkıda bulunması amaçlanmaktadır.

4.GENEL BİLGİLER

4.1. Deri

Deri, memelilerde vücut yüzeyini kaplayan ve vücudu dış ortamdan ayıran bir örtüdür. Embriyonik yaşamda ektoderm ve mezodermden köken alan deri; epidermis, dermis ve hipodermis tabakalarından oluşur. (1) (Şekil 1)



Şekil 1. Memeli derisi ve tabakaları

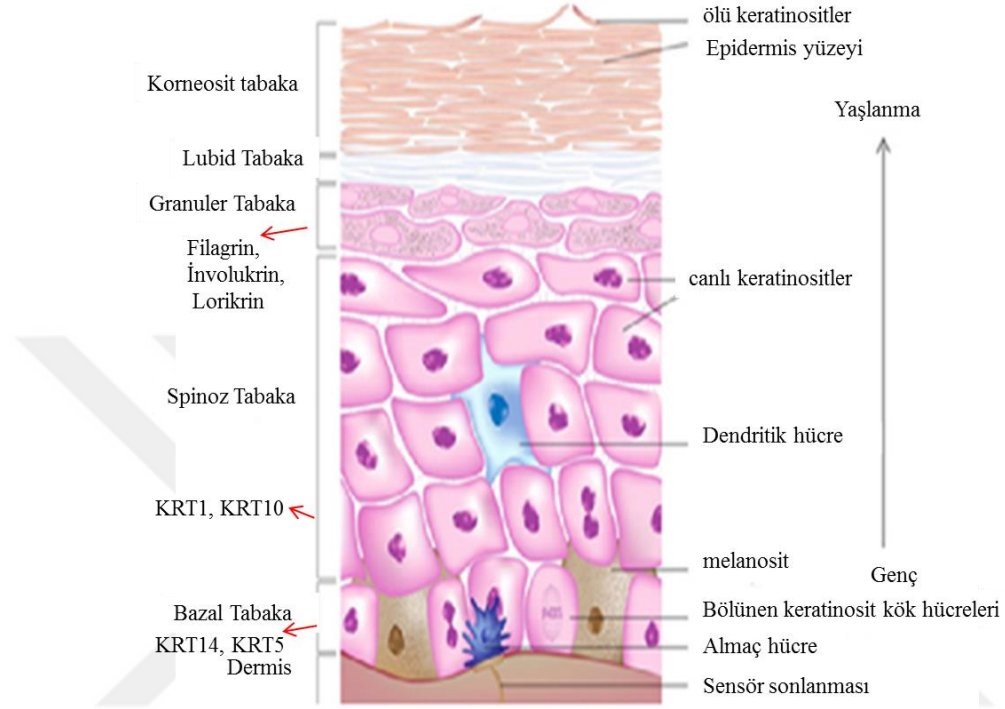
4.2. Epidermis

Epidermis vücut ile dış çevre arasında su geçirmeyen bir bariyer oluşturarak vücudun su kaybını engellerken, dışarıdan gelen her türlü fiziksel, kimyasal ve mikrobiyal tehditlere karşı vücudun ilk savunma hattını oluşturur.(1)

Epidermis hücreleri olgunlaşırken içlerinde keratin biriktirmeye başlar. Bu hücreler öldüklerinde içlerinde biriken keratin sayesinde su geçirmez bir bariyer oluştururlar. Epidermisin dış faktörlere çokça maruz kalması yıpranmasına yol açar. Yıpranan hücrelerin canlılığın sürdürülebilmesi için yenilenmesi gerekir ve bu yenilenme epidermal homeostazis denilen süreç ile gerçekleşir.(2)

Epidermis beş tabakalı bir yapıya sahiptir. Bu tabakalar aşağıdan yukarıya sırasıyla bazal tabaka, spinoz tabaka, granüler tabaka, lubid tabaka ve korneosit tabakasından oluşur. Dermisten köken alan keratinosit kök hücresi bölünerek bazal hücre havuzunu ya da üst katmanlara doğru göç ederek epidermis tabakalarını oluşturur. Keratinosit kök hücreleri ilk aşamada K5 ve K14 marker proteinlerini biriktirerek bazal tabaka hücrelerini oluştururlar. Hücreler farklılaşmaya devam ederken K5 ve K14 proteinlerinin ekspresyonu durur, bu proteinlerin yerini involukrin, K1 ve K10 proteinleri alır. İnvolukrin, K1 ve K10 proteinlerinin hücre içerisinde birikmesiyle

hücreler spinoz katmanı oluşturur. Hücrelerin içlerinde keratin filamanlarını bir arada tutan ve geç farklılaşma markörü olarak tanımlanan, fillagrin ve lorikrin proteinlerini biriktirmesi ile ise granüler tabaka oluşur. Daha sonra hücreler yavaş yavaş çekirdeklerini kaybederek korneosit tabakasını oluşturur (Şekil 2) (3).

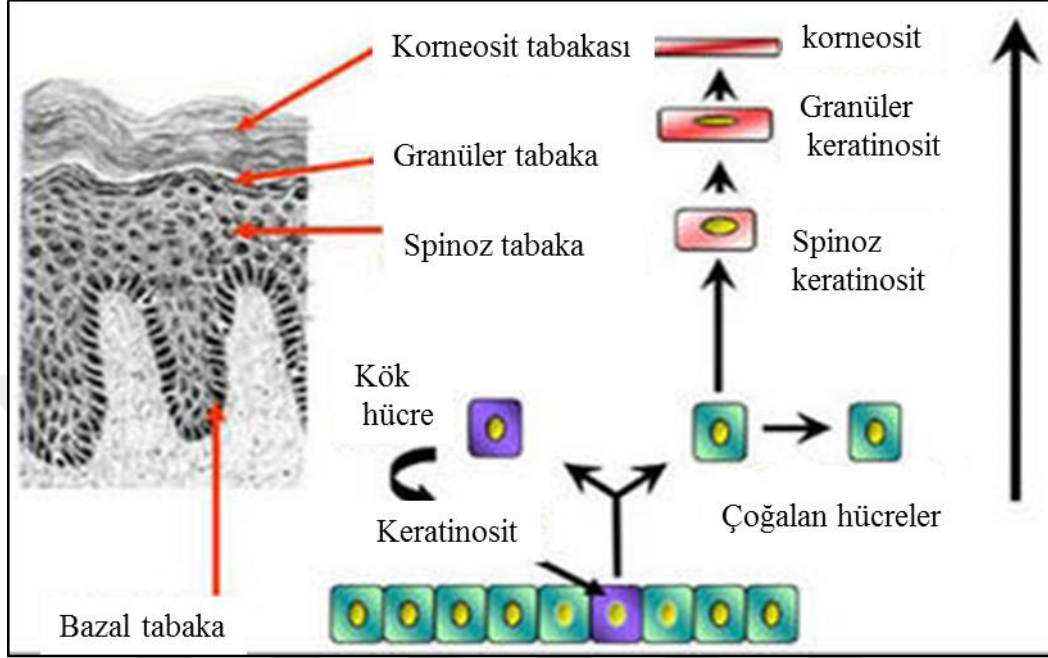


Şekil 2. Epidermin yapısı

4.3. Epidermal Homeostazi

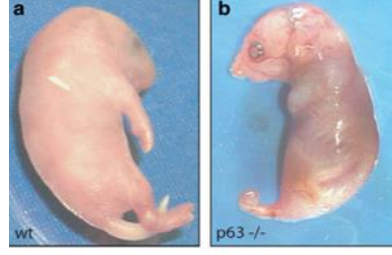
Epidermal homeostazi; deride yaralanma ya da yenilenme esnasında kaybedilen hücrelerin yeni hücreler ile yer değiştirmesi için epidermal kök hücrelerin bölünmesi ve farklılaşması sürecidir (4). Epidermin sürekliliği ise en alt bazal katmanında (basal layer) bulunan keratinosit kök hücrelerinin çoğalması ile mümkün olmaktadır. Sınırlı sayıda çoğalabilen bu hücreler epidermin üst tabakalarına doğru çıktıkça farklılaşır. Keratinositlerin bazal tabakadan ayrılması hücre bölünmesinin durup farklılaşma sürecinin başlamasını sağlar. En altta bulunan ve öncül hücrelerin oluşturduğu bazal katmanı aşağıdan yukarı doğru sırasıyla, spinüler katman, granüler katman ve farklılaşmasını tamamlamış çekirdeksiz stratum korneum katmanı takip eder. Keratinositlerin metabolik olarak inaktif hali korneosit olarak adlandırılır. Keratinositlerin korneositlere dönüşme süreci iki ila üç hafta sürmektedir. Daha sonra korneositler dökülerek alttan farklılaşarak gelen yeni keratinositlere yol açar.

Farklılaşma süreci, organel ile çekirdeklerin kaybı ve keratin yığılmasıyla karakterizedir (Şekil 2, 3) (4, 5). Bu süreçte, keratinosit çoğalması, farklılaşması ve ölümünde hassas bir denge vardır. Dengenin bozulması ise ciddi deri ve epidermal gelişme bozukluklarına bağlı konjenital anomaliler ile sonuçlanır (4-6).



Şekil 3. Epidermal homeostazis (7) (Boulter'den)

Epidermal homeostazis; TGF-beta, WNT, NOTCH, NF-kB ve PI3K sinyal yolları gibi gelişim biyolojisi için önemli olan çeşitli yollar tarafından düzenlenir (8-13). Bu düzenlenmede bir transkripsiyon faktör olan p63 (TP63) kilit rol oynar. p63 proteini p53, p73 tümör suppresör ailesinin bir üyesi olup sinyal yollarını düzenleyerek epidermal farklılaşmanın gerçekleşmesinde kilit rol oynar (14, 15). p63 indüklediği genler aracılığıyla deri tabakalaşma programını koordine ettiği gibi bazal katmanda bulunan öncül kök hücreleri apoptozdan koruyarak devamlılıklarını sağlamaktadır (16-18). p63'ün farklı kırılma (splicing) formları vardır. Bunlar TAP63, Δ Np63 α , β , γ dır. Bu formlardan Δ Np63 α izoformu epidermal gelişimin erken aşamasında ekspres olan ve epidermisin bazal katmanında bulunan baskın formudur (14, 19, 20).



Şekil 4. p63^{-/-} farenin fenotipi. A) p63 yabanıl tip fare, B) p63^{-/-} mutant fare (Mills'den) (21)

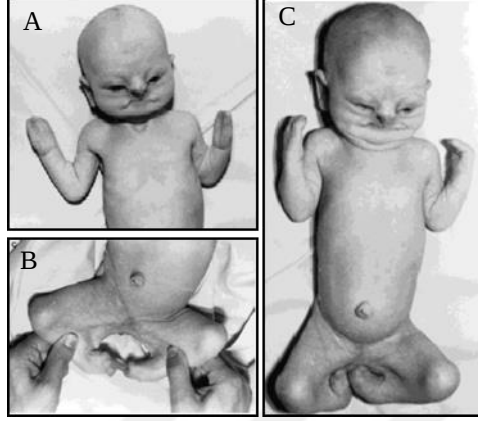
p63 proteinini üretemeyen transgenik fareler; ekstremitte kısalıkları, epidermal bozukluklar, kafa, yüz anormallikleri, kolların gelişmemesi gibi şiddetli gelişimsel kusurlar ile karakterize olup doğumu takiben ölmektedir (Şekil 4) (19, 21). İlâveten, bu farelerde, epiderminin neredeyse oluşmadığı, kıl folikülü, diş, süt ve tükürük bezleri gibi ektodermal uzantıların gelişmediği gösterilmiştir (21).



Şekil 5. Hay Wells sendromu taşıyan hasta (22) (Kouwenhoven'dan)

İnsanlarda tanımlanan p63 mutasyonlarının ise Hay Wells (OMIM: 106260) sendromu ile ilişkilendirildiği yapışık göz kapağı (ankiloblefaron), yarık dudak anomalileri, el ve ayak parmakları arasında perde gibi p63^{-/-} fare fenotipi ile benzer fenotip sergilediği gösterilmiştir (Şekil 5). Epidermal farklılaşma sürecinin ana regülatörlerinden olan p63 tarafından kontrol edilen hedef genlerin ve regülatör elementlerin belirlenmesi ve p63'ün iletişimde bulunduğu ağın tanımlanması amacıyla tüm genomda p63'ün bağlandığı DNA sekansları ve bu sekanslara sahip genler araştırılmıştır (22, 23). p63 bağlanma sekansları; Cocoon (koza) sendromu ile ilişkilendirilmiş NF-κB sinyal yolağının ana elemanlarından olan *IKK-alfa*, Popliteal Pitergiyum Sendromuna (OMIM: 119500) neden olan *IRF6*, Bartsocas Papas sendromuna neden olan *RIPK4* genlerinin regülatör kısımlarında (promoter) tanımlanmış ve *in-vivo* koşullarda da p63'ün bu genlerin transkripsiyonunu aktive ettiği gösterilmiştir (20, 24, 25).

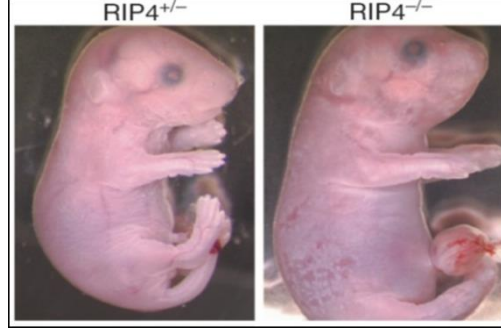
Aslan ve ark tarafından 2000 yılında bir Türk hastada Bartsocas-Papas sendromunun yeni bir varyantı olarak lethal bir hastalık olan, Aslan Tip Multiple Pterygium sendromu tanımlanmıştır.



Şekil 6. Aslan Tip Multiple Pterygium sendromu (Bartsocas-Papas sendromu) taşıyan hasta. A) Kranofasiyel anomaliler, B-C) Popliteal bölgede şiddetli pterygium (Aslan'dan) (26)

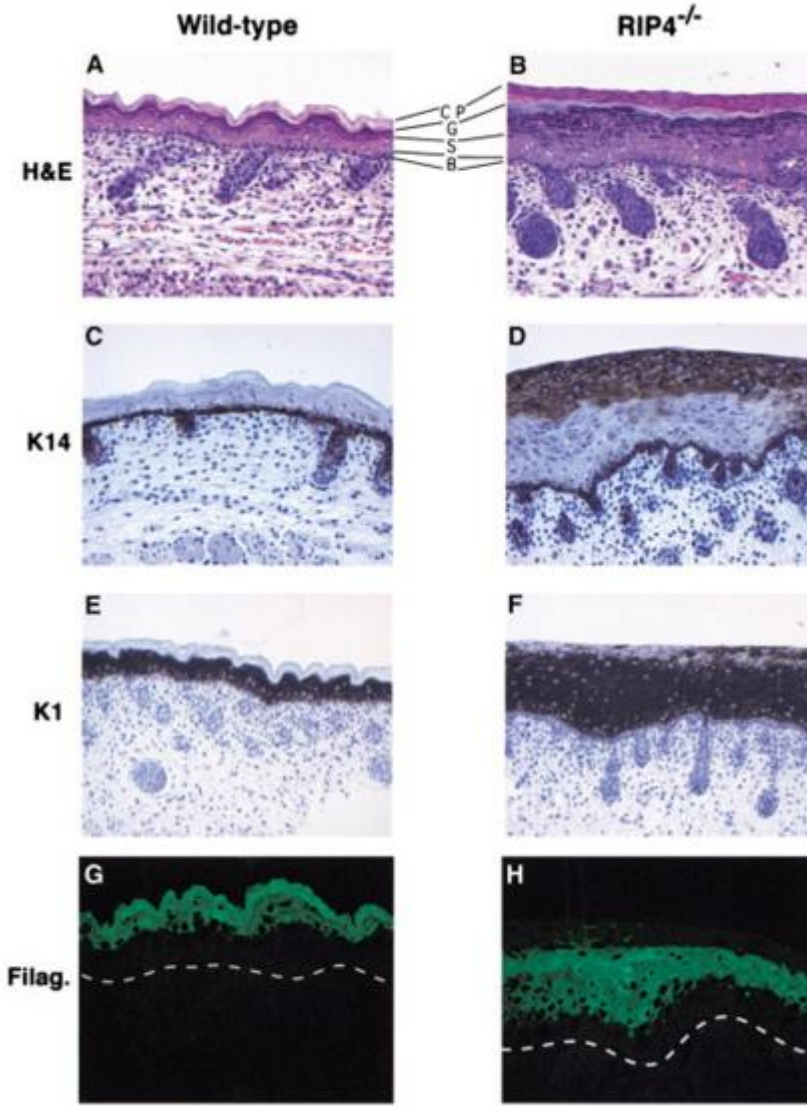
2012 yılında bölümümüzce aynı hastalığa sahip bir başka ailenin DNA'sı kullanılarak yapılan Genetik Haritalama çalışmaları sonucunda, *RIPK4* geninin serin-threonin kinaz korunmuş bölgesinde belirlenen, c.362T>A (p.Ile121Thr) bir aminoasit değişikliğine yol açarak, *RIPK4*'ün kinaz fonksiyonunu bozduğu ve epidermal homeostaziye etkileyen, otozomal yıkıcı bir hastalık olan dizardı ağı (popliteal pityerjium), yapışık göz kapağı (ankiloblefaron), çenede telsi bantlar (filiform bands), yarık dudak anomalileri, el ve ayak parmakları arasında perde (sindaktili) ile karakterize Bartsocas-Papas sendromuna (OMIM-263650) neden olduğu gösterilmiştir (Şekil 6) (25) (26).

Ripk4'ün *in-vivo* fonksiyonunu belirlemeye yönelik geliştirilen *Ripk4* nakavt farelerde (*Ripk4*^{-/-}) insan fenotipine benzer olarak ciddi deri kusurlarının olduğu, deri kıvrımlarının oldukça azaldığı, arka bacakları ve kuyruğun vücut boşluklarına yapıştığı, burun, ağız, anüs gibi vücut deliklerinin oluşmadığı, bundan dolayı farelerin nefes alamayıp doğum sonrası kısa bir süre içerisinde boğularak öldükleri belirtilmiştir (Şekil 7).



Şekil 7. *Ripk4*^{+/-} fare fenotipi ve *Ripk4*^{-/-} fare fenotipi (27) (Holland'dan)

Ripk4^{-/-} farelerin derisinde yapılan çalışmalarda, yabanıl tip farelerde ekspresyonu yalnızca bazal tabakada görülen ve bazal tabaka markörü olarak tanımlanan K14 proteininin, *Ripk4*^{-/-} farelerde bazal, granüler ve parakeratotik katmanlarda da anormal bir şekilde eksprese olduğu, yabanıl farelerde yalnızca spinoz tabakada eksprese olan K1 proteininin, *Ripk4*^{-/-} farelerde tüm katmanlarda eksprese olduğu, yabanıl tipte granular ve korneosit katmanında görülen FİLAGRİN'in ise spinoz ve granular katmanda eksprese olduğu fakat parakeratotik katmanda eksprese olmadığı gösterilmiştir. Böylece keratinosit farklılaşmasının gerçekleşmediği, spinüler ve granüler katmanların kalınlaştığı, çok katlı yassı keratinize epitelin ise hiç oluşmadığı gösterilmiştir. Bu durum, keratinositlerin fazla çoğalmasından ziyade, farklılaşma bozukluğu ile açıklanmıştır (Şekil 8) (28).



Şekil 8. Yabanıl tip ve *RIPK4*^{-/-} farelerin epidermislerindeki tabakalaşmanın karşılaştırılması. B:Bazal, S:spinüler, G:granüler, C:corneosit tabakası, P:Parakeratotik tabaka (Holland'dan) (27, 29)

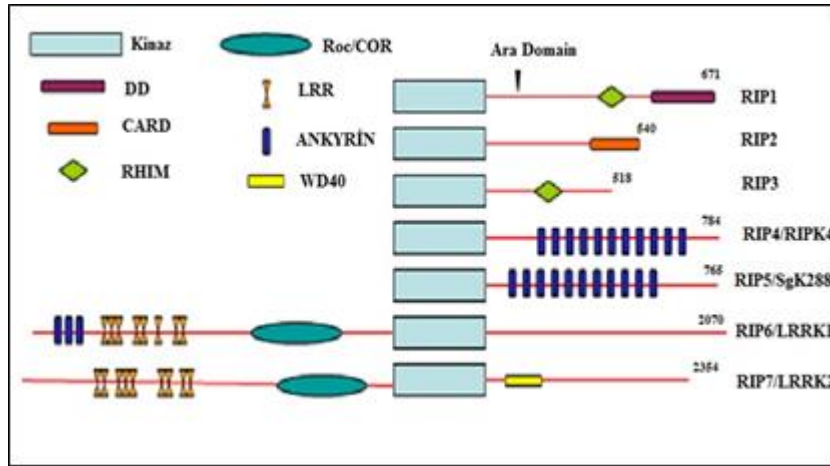
Ripk4, farelerde birçok dokuda eksprese olmakla birlikte, en fazla ekspresyonu epidermisin bazal ve suprabazal katmanlarında gösterip, bu hücrelerin çekirdek ve sitoplazmasında daha yoğun olarak sitoplazmasında lokalize durumdadır. Epidermisin dışarıya doğru ilerleyen katmanlarındaki Ripk4 ekspresyon düzeyi epidermal farklılaşma sürecine bağlı olarak azalmaktadır (28, 30, 31).

4.4. Reseptörle Etkileşen Protein Kinaz 4

p63'ün hedef geni, RIPK4 (Receptor Interacting serine-threonine Kinase 4) RIP kinaz familyasının bir üyesi olup, ilk olarak insan keratinosit hücre hatlarından (HaCaT) elde edilmiş cDNA kütüphanesi ile fare orijinli Protein Kinaz C delta'nın (PKCδ) kinaz

domaini arasındaki etkileşimin gösterildiği maya ikili hibrit (Y2H) taramasında klonlanmış ve PKC delta-interacting protein kinaz (DIK) olarak adlandırılmıştır (32).

RIPK4 proteini bir kinomdur. Kinomlar, protein kinaz domaini olan proteinlerdir ve kinaz domainlerindeki sekans benzerliklerine göre sınıflandırılırlar (29). Kinomların bir dalını da Reseptörle Etkileşen Protein Kinaz (Receptor Interacting Protein Kinase-RIP) ailesi oluşturmaktadır. RIP kinazların ortak özelliği; hepsinin serin-treonin kinaz aktivitesine sahip bir kinaz domaini bulundurmalarıdır (Şekil 9). Kinaz domainleri dışında her bir RIP proteininin sahip olduğu kendine özgü aktif bölgeleri bulunmaktadır (Şekil 5) (33) RIP kinaz ailesi; RIP1, RIP2, RIP3, RIP4 (RIPK4), RIP5 (SgK288), RIP6 (LRRK1) ve RIP7 (LRRK2) üyelerinden oluşmaktadır. İnsan ve farede eksprese oldukları dokulara göre hücre ölümü, DNA tamir mekanizması, inflamasyon ve hücre farklılaşması gibi birçok metabolik olayda rol almaktadırlar (33). Kinaz domainleri karşılaştırıldığında diğer RIPK'lar ile yaklaşık %30-40 arası amino asit benzerliği gösteren RIPK4'ün, RIPK1 ve RIPK2'de olduğu gibi sitokinlere cevap olarak yangı ve bağışıklığa özgü genlerin aktivasyonunun yanı sıra, farklı tip hücrelerde çoğalma, sağ kalım ve apoptoz gibi süreçleri düzenleyen NF-kB yolağını aktive ettiği gösterilmiştir (34).



Şekil 9. Bilinen RIP kinaz ailesinde tanımlanmış aktif bölgeler: Amino asit sayıları şeklin sağında belirtilmiştir. Kısaltmalar: ANK: ankirin, CARD: Caspase Recruitment Domain (Caspaz Getiren domain), DD: Death Domain (ölüm domaini), LRR:Leucine Rich Repeats (Lösine Zengin Tekrarlar), RHIM: RIP Homotypic Interaction Motif (RIP Homotipik Etkileşim Motifi), Rec/COR: Ras of complex proteins/C-terminal of Roc (Meylan'dan) (33).

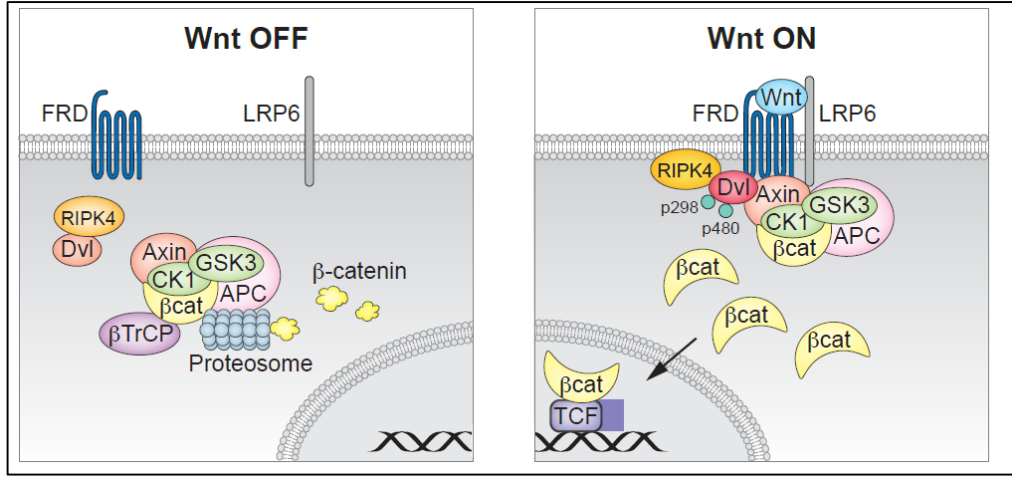
RIP kinaz ailesinin bir üyesi olan RIPK4, 784 amino asitten oluşan, 87 kDa moleküler ağırlıklı, amino ucunda serin-treonin kinaz domaini ve karboksil ucunda 11

ankrin tekrarı bulunan bir proteindir. Kinaz domaini ve ankyrin tekrarları arasında ise kaspazlar tarafından iki farklı yerden kesilebilen Ser/Tre'ince zengin bir ara bölge bulunmaktadır (30).

Proteinlerin, etkileştikleri proteinlerin bilinmesi o proteinlerin görev alabilecekleri sinyal yollarının anlaşılmasında fikir vermektedir. RIPK4'ün de etkileştiği bir çok protein bilinmektedir. Bunlardan bazıları PKC δ , PKC β , IRF6, DVL2 gibi proteinlerdir (32, 35-37). Bu proteinlerden IRF6 ve RIPK4'ün epidermal farklılaşmayı düzenlediği bilinen PKC sinyal yolağında görev yaptığı bilinmektedir (36). Benzer şekilde RIPK ve DVL2 proteininin etkileşiminde proliferasyon ve farklılaşmayı düzenleyen WNT sinyal yolağında görev aldığı gösterilmiştir (37). PKC δ ve PKC β 'nın RIPK4 ile etkileşiminin hangi yollar için önemli olduğu bilinmemektedir.

4.5. RIPK4 ve WNT Sinyal Yolağı

Organizmanın gelişimini farklı sinyal yolları oldukça hassas bir düzenleme ile kontrol ederler. Gelişim sürecinin önemli yollarından biri de WNT sinyal yolağıdır. WNT sinyal yolağının hücre büyümesi, hücre adezyonu, hücre hareketi, hücre polaritesi ve farklılaşmasını düzenleyerek pek çok dokunun embriyonik gelişiminde rol aldığı gösterilmiştir (38). WNT sinyal yolağının epidermal farklılaşma ve homeostazdaki rolü bilinmektedir (38) (39). WNT sinyal yolağının c-myc aracılığıyla bazal katmandaki hücrelerin proliferasyonunu düzenlemekte olduğu gösterilmiştir. (40). İlginç bir şekilde, epidermal farklılaşma için gerekli olan RIPK4'ün fazladan ekspres olduğu HEK293 hücre hatlarında DVL2 proteinini fosforilleyerek sitoplazmik β CATENİN'i stabilize ettiği ve çekirdeğe transferine yol açarak WNT duyarlı genlerin transkripsiyonunu sağladığı gösterilmiştir (37) (Şekil 10).



Şekil 10. RIPK4 proteininin WNT sinyal yolağındaki rolü (Huang'dan) (37)

KTÜ Bilimsel Araştırmalar Koordinasyon Birimi tarafından desteklenen, yürütücülüğünü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Tuba DİNÇER'in yaptığı Şubat 2012 yılı itibariyle başlayan 9749 numaralı proje kapsamında insan keratinosit cDNA kütüphanesi büyük ölçek maya ikili hibrit ile taranmış ve RIPK4'ün etkileştiği proteinleri kodlayan 16 adet farklı cDNA bulunmuştur. Söz konusu cDNA'ların kodladıkları proteinlerin arasında Pleimorfik Adenoma Gen Benzeri 2 adında bir protein farklı zorluk koşullarına sahip üç farklı taramada da karşımıza çıkmıştır.

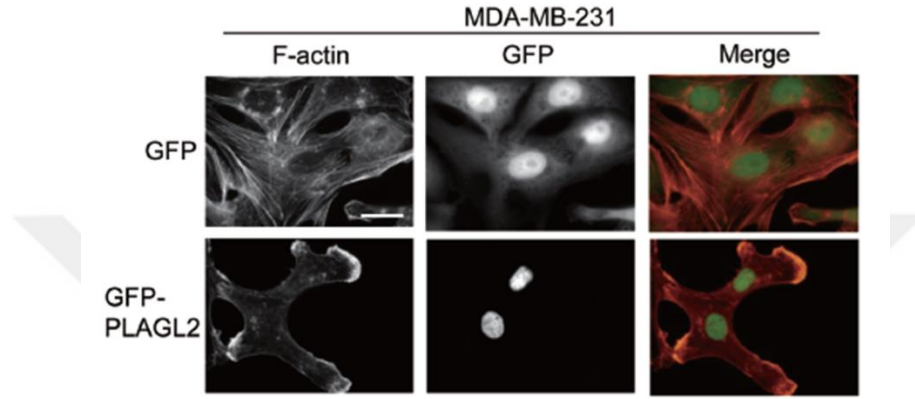
4.6. Pleimorfik Adenoma Gen Benzeri 2 (PLAGL2)

PLAGL2, N terminalinde çinko parmak motifine sahip bir transkripsiyon faktördür. PLAG ailesinin PLAG, PLAGL1 ve PLAGL2 olmak üzere üç üyesi vardır. Her üç protein de birbiri ile homoloji gösteren çinko parmak bağlanma domainine sahiptir. PLAGL1, tümör supresör aktivitesi olan bir gen iken (41), PLAGL2 ve PLAGL1 proto-onkogen adayı olarak bilinmektedir (42). PLAGL2, 496 aminoasitten oluşan, 54 kDa ağırlığında bir proteindir. N terminalinde DNA bağlanma özelliği bulunan altı tekrarlı çinko parmak (zinc finger) domaini, C terminalinde transkripsiyon aktivatör domaini ve bu iki domain arasında transkripsiyon represör domaini bulunur (Şekil 11) (43, 44).



Şekil 11. PLAGL2 proteininin yapısı

Endojen PLAGL2 proteini çekirdekte lokalize olmaktadır. PLAGL2'nin hücre migrasyonunu ve hücre iskeleti ile alakalı süreçleri düzenlediği bilinmektedir. MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında yapılan çalışmalarda PLAGL2'nin baskılandığında hücre içi stress liflerini ve fokal adezyonu arttırarak hücre migrasyonunu engellerken, fazladan ekspres olduğunda lamellipod oluşumunu tetikleyerek hücre migrasyonunu arttırdığı gösterilmiştir (Şekil 12) (29).

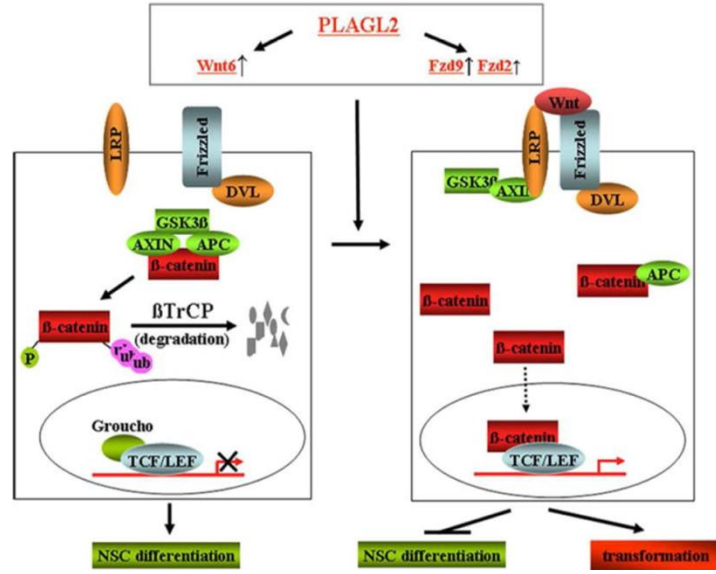


Şekil 12. PLAGL2'nin fazladan ekspresyonunun lamellipod oluşumunun arttırması (29)
(Sekiya'dan)

PLAGL2'nin fonksiyonunun daha iyi anlaşılması için yapılan transgenik fare deneylerinde *PLAGL2*^{-/-} nakavt farelerin yeterli büyüklüğe ulaşamadıkları, dolaşımda anormal kolesterol ve trigliserit düzeylerinin görülmesi gibi metabolik defektlere sahip oldukları, bağırsaklarında yağ emiliminin olmamasından dolayı doğduktan kısa bir süre sonra beslenememekten öldükleri gösterilmiştir (45).

4.7. PLAGL2 ve WNT Yolağı

PLAGL2'nin fazla ekspresyonunun, öncül nöronal kök hücrelerde (projenitör Neuronal Stem Cell -NSC) çoğalmayı indükleyerek farklılaşmayı baskıladığı ve bu etkiyi WNT sinyal yolağı bileşenleri WNT6, FZD9 ve FZD2 proteinlerinin ekspresyonlarını artırarak düzenlediği gösterilmiştir (Şekil 13) (46).



Şekil 13. PLAGL2'nin WNT sinyal yolağını düzenlemesi (46) (Zheng'den)

Hücrel fonksiyonların gerçekleştirilmesinde proteinlerin birbirleriyle olan etkileşimleri yer alır. Bu nedenle proteinlerin fonksiyonlarının belirlenmesinde proteinlerin birbirleriyle olan etkileşimlerinin analizi oldukça önemlidir. Proteinlerin kendi aralarında ya da DNA, RNA gibi farklı moleküllerle etkileşimlerini analiz etmeye yönelik *in vitro/in vivo* teknikler geliştirilmiştir. Çalışmamızda, RIPK4'ün yem olarak kullanıldığı büyük ölçek maya ikili hibrit taramasında karşımıza çıkan RIPK4-PLAGL2 etkileşimin doğrulanması ve etkileşimlerden etkilenen domainlerin belirlenebilmesi için küçük ölçek maya ikili hibrid yöntemi, immünpresipitasyon ve immünofloresan yöntemleri kullanılmıştır.

5. MATERYAL ve YÖNTEM

5.1. Materyal

5.1.1. Büyük Ölçek Maya İkili Hibrit ile RIPK4'ün Etkileştiği Proteinlerin Belirlenmesi

Büyük ölçek maya ikili hibrit taraması için RIPK4'ün kinaz domaini uygun maya vektörüne klonlanarak DKFZ firmasına gönderilmiştir. RIPK4 kinaz domaininin yem olduğu ve keratinosit insan cDNA kütüphanesinin av olarak kullanıldığı tarama, AH109 maya suşu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Taramada raportör gen olarak, beta-galaktozidaz, Histidine ve Adenine kullanılmıştır. RIPK4'ün kinaz domaini ile etkileşimi güçlü olan proteinleri seçmek özgül olmayanları elemek amacıyla HIS3 gen ürününün yarışmalı inhibitörü olan 3-AT üç farklı (0.4, 0.2 ve 0.1 mM) konsantrasyonda kullanılarak üç farklı tarama gerçekleştirilmiştir. DKFZ tarafından tüm etkileşim verileri, etkileşen proteinlerin etkileşim gücü ve özgüllüğü ile ilgili bir sınıflandırma yapılarak tarafımıza iletilmiştir. Bu sınıflandırmada; birden fazla karşılaşılan proteinler, bir kez elde edilen proteinler, maya ikili hibritte sıkça rastlanan aynı zamanda yapışkan olarak da ifade edilen yanlış pozitifler (şaperonlar, ısı şoku proteinleri gibi) ve son olarak da cDNA'ların bir kısmı protein kodlanmayan 3' UTR'ye (untranslated region) denk gelen muhtemel yanlış pozitifler olarak gruplandırılmıştır. Etkileşimi kuvvetli olan proteinleri seçmek için uygulanan 0.4 mM 3-AT ile yapılan ilk taramada; PLAGL2'ye (pleiomorphic adenoma gene like 2) iki kez rastlanmış, sekiz adet proteine ise bir kez rastlanmıştır. Ayrıca, cDNA'ları 3'UTR tarafından kodlanan yüksek olasılıkla yanlış pozitif olan yedi adet protein de tarafımıza bildirilmiştir. 0.2 mM 3-AT ile yapılan ikinci taramada; PLAGL2 ile yine iki kez karşılaşılmış ve 3-AT konsantrasyonu düştüğünden ilk taramadan gelmeyen etkileşimi düşük proteinler de taramada yakalanmış, bir kez karşılaşılan protein sayısı 16'ya çıkmıştır. İlaveten, yanlış pozitifliği muhtemel olan 15 adet protein de tarafımıza bildirilmiştir. Üçüncü taramada PLAGL2 ile tekrar iki kez karşılaşılmış bununla beraber bir kez etkileşen proteinlerin sayısı düşük 3-AT konsantrasyonundan dolayı artmıştır.

RIPK4'ün yem olarak kullanıldığı, farklı zorluk koşullarına sahip büyük ölçek maya ikili hibrit taramasında, PLAGL2 ile, her bir taramada iki kez olmak üzere toplamda altı kez karşılaşılmış ve akabinde yapılan literatür araştırmasında RIPK4 gibi, PLAGL2'nin de WNT yolağında yer aldığının gösterilmiş olması RIPK4 ve PLAGL2 etkileşiminin hücrel olaylar için önemli olabileceğine işaret etmektedir.

Bundan dolayı, çalışmamızda diğer proteinler arasından PLAGL2 seçilerek, RIPK4 ile etkileşimi detaylı olarak incelenmiştir. Bu kapsamda, büyük ölçek maya ikili hibrit sonuçları ilk olarak küçük ölçek maya ikili hibrit yöntemi ile mayada, immünopresipitasyon ve immünofloresan yöntemleriyle de memeli hücrelerinde doğrulanmış, ayrıca etkileşimden sorumlu olan domainler belirlenmiştir.

5.1.2. Gereç

5.1.2.1. Kimyasallar

3-Amino-1, 2, 4-triazol	Sigma, A8056
Adenin	Sigma, A9126
Agar	Merck, 1.016.130.500
Amonyumpersülfat ((NH ₄) ₂ S ₂ O ₈)	Sigma, A9164
Ampisilin	Sigma, A9518-5G
Arjinin (H ₂ NC(=NH)NH(CH ₂) ₃ CH(NH ₂)CO ₂ H)	Sigma, A1270000
Aspartik asit (HO ₂ CCH ₂ CH(NH ₂)CO ₂ H)	Sigma, 1043819
Bactotripton	Conda, 1612
Beta Merkapto Etanol	Merck, 8.057440.0250
Complete mini protease inhibitor	Roche, 04693159001
Deoksinukleotid triphosphates (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
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
Fenilalanin (C ₆ H ₅ CH ₂ CH(NH ₂)CO ₂ H)	Sigma P1150000
Fetal Bovine Serum	Merck, S0415
Glasiyel asetik asit (C ₂ H ₄ O ₂)	Merck, 1.00056.2500
Glukoz (C ₆ H ₁₂ O ₆)	Appllichem, A1422
GoTaq® Flexi DNA polimeraz	Promega, M8305
HEPES (C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S)	Sigma, H0887
Hidroklorik asit (HCl)	Merck, 1.00314.2500

Histidin ($C_6H_9N_3O_2$)	Sigma, 67520
Izolösin ($C_2H_5CH(CH_3)CH(NH_2)CO_2H$)	Sigma, I0460000
Kalsiyum Klorür ($CaCl_2$)	Merck, 910TA654681
Kanamisin	Sigma, 60615-5G
Lityumasetatdihidrat ($CH_3COOLi \cdot 2H_2O$)	Sigma, L6883
Lizin ($H_2N(CH_2)_4CH(NH_2)CO_2H \cdot HCl$)	Sigma, L0900000
Lösin ($(CH_3)_2CHCH_2CH(NH_2)CO_2H$)	Sigma, L0375000
Magnezyumsülfat ($MgSO_4$)	Merck, 1.058.861.000
Manganklorür ($MnCl_2$)	Sigma, 221279
Metionin ($CH_3SCH_2CH_2CH(NH_2)CO_2H$)	Sigma, M0960000
Orange G	Sigma, O-1625
Paraformaldehit ($HO(CH_2O)_nH$)	Sigma, P6148
Penisilin/Streptomisin	Thermo scientific, 15140-122
PMSF (Phenylmethylsulfonyl fluoride)	Sigma, 1741932998611
Polietilenglikol (PEG)	Sigma, 202444
Potasyum hidrojen karbonat ($KHCO_3$)	AppliChem, A2375.1000
Protein G Agarose	Invitrogen, 15920-010
Proteinaz K	Promega, V3021
SeaKem® LE Agaroz	Lonza, 50004L
Sephadex®G-50	Sigma, S5897-25G
Single stranded deoxyribonucleic acid	Sigma, D7656
Sodium Phosphate dibasic (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 (Na_3VO_4)	Sigma, S6508
Sodyum orto vanadate (Na_3VO)	Sigma, S6508
Sodyum Pyrophosphate ($NaPPi-Na_4O_7P$)	Sigma, 446061347236111
Sodyumkarbonat (Na_2CO_3)	Merck, 106392
Tirozin ($4-(HO)C_6H_4CH_2CH(NH_2)CO_2H$)	Sigma, T2900000
Treonin ($CH_3CH(OH)CH(NH_2)COOH$)	Sigma, T8375
Triptofan ($C_{11}H_{12}N_2O_2$)	Sigma, T2610000
Tris-Baz ($C_4H_{11}NO_3$)	AppliChem, A2264.1000

Tris-HCl (C ₄ H ₁₂ ClNO ₃)	Merck, 1.01547.0.100
Triton X 100	Sigma, 9002-93-1
Tween20	J.T.Baker, 73-74
Urasil (C ₄ H ₄ N ₂ O ₂)	Sigma, U0750
Valin ((CH ₃) ₂ CHCH(NH ₂)CO ₂ H)	Sigma, V0030000
X-α-GAL	Sigma, 16555-25g
Yeast extract	Merck, 1.037.530.500
Yeast nitrogen base	Sigma, Y1215

5.1.2.2. DNA markırlar

100 bp DNA ladder	NEB, N3231L
Gene ruler 1 kb DNA ladder	Thermo scientific, SM0311

5.1.2.3. Antikorlar

5.1.2.3.1. Primer Antikorlar

Anti-GFP- Rabbit Polyclonal	Abcam, ab290
Anti-Flag M2- Mouse Monoclonal	Sigma-Aldrich, F3165-1MG

5.1.2.3.2. Sekonder Antikorlar

Anti-Mouse-HRP	Bio-Rad, 170-5047
Anti-Rabbit-HRP	Bio-Rad, 170-5045
Anti-Mouse cyc3	Dianova, 115-165-166
Anti-Rabbit- Alexa fluor488	Invitrogen, A11012
Anti-Mouse-Alexa flüor 488	Invitrogen, A11001

5.1.3. Kitler

3130 POP-7™ Polymer	AppliedBiosystems, 4352759
SuperScript® III First System for RT-PCR	LifeTechnologies, 18080-051
E.Z.N.A.® Plasmid DNA Mini Kit I	Omegabiotek, D6943-01
E.Z.N.A.® Endo-free Plasmid DNA Mini Kit	Omegabiotek, D6950-01
Manual Perfect Pure™ RNA Blood Kit	5 Prime, 2302110
E.Z.N.A.® Total RNA Kit	Omegabiotek, R6834-00
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN, 28704
Gateway® BP Clonase® II Enzyme mix	Thermofisher, 11789-020
Gateway® LR Clonase® II Enzyme mix	Thermofisher, 11791-100

Lipofektamin 2000 reagent

İnvitrogen, 11668-027

5.1.4. Cihazlar

Yatay elektroforez düzeneği

HU13, İngiltere

Doğru akım güç kaynağı (3000 volt)

CONSORT E833, Belçika

Soğutmalı yüksek devirli santrifüj (1 adet)

Eppendorf 5804, Almanya

Yüksek devirli santrifüj (2 adet)

Eppendorf 5810, Almanya

Mikrosantrifüj

Thermo IEC, ABD

Vorteks

Nüve NM110, Türkiye

UV translüminatör

Vilbert Lourmat, Fransa

Jel görüntüleme sistemi

GelLogic 2000,Kodak, ABD

Otomatik pipet seti

Gilson, ABD

Hassas terazi

AHAUS, ABD

pH metre

Hanna, Portekiz

Spektrofotometre

Eppendorf, Almanya

Manyetik karıştırıcı

IKA, ABD

Buz makinesi

Scotmann, İngiltere

Mikrodalga fırın

Arçelik MD 554, Türkiye

Distile su cihazı

GFL 2004, Almanya

Derin dondurucu (-20)

Arçelik, Türkiye

Derin dondurucu (-86)

Thermo, ABD

Buzdolabı

Arçelik, Türkiye

Etüv

Memmert, Almanya

Termocycler

GeneAmp 9700, ABI, ABD

Termocycler

Techne Genius, İngiltere

Genetik analiz cihazı

3130 Genetic Analyzer, ABI

Termomikser (ısıtıcı blok)

Eppendorf, Almanya

Otoklav

Tutnauer 3150 ELV, İtalya

Nanodrop® 2000 UV-Vis Spektrofotometre

Thermo, ABD

Dikey elektroforez ve immünoblot sistemi

BIORAD, ABD

Chemiluminesans Görüntüleme Sistemi

BIORAD, ABD

5.1.5. Sarf Malzemeler

Çeşitli boyutlarda pipet uçları

Axygene, ABD

Mikrosantrifüj tüpler

Axygene, ABD

Falkon Tüpler (15 ve 50 ml)	Greiner Bio-One, Almanya
Kültür flaskı (25 ve 75 cm ²)	Corning, ABD
6 kuyucuklu plate	Corning, ABD
60 mm petri flask	Corning, ABD
Serolojik pipetler	Greiner Bio-One, Almanya
İki odacıklı lam	Thermo, ABD

5.1.6. Bakteri Suşları

Gateway sisteminde kullanılan ve *ccdb* giraz geni içeren plasmidlerin çoğaltılması için *ccdb*'ye dirençli olan *DB3.1* bakteri suşu kullanılırken diğer tüm vektörlerin çoğaltılmasında *DH5α* bakteri suşu kullanıldı.

5.1.6.1. DH5α Genotipi

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

5.1.6.2. DB3.1 Genotipi

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

5.1.7. Maya Suşları

Çalışmada *S.cerevisiae* suşları olan Y187 ve AH109 kullanıldı. Y187 ve AH109 Clontech'ten temin edildi.

5.1.7.1. Y187 Genotipi

MATα, *ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4Δ, met-, gal80Δ, MEL1, URA3: :GAL1UAS -GAL1TATA-lacZ*

5.1.7.2. AH109 Genotipi

MATα, *trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2 GAL1UAS-GAL1TATA-HIS3, GAL2UAS-GAL2TATA-ADE2, URA3 : : MEL1UAS-MEL1 TATA-lacZ*

5.1.8. Kullanılan Vektörler

Memeli hücrelerinde ekspresyon için kullanılan p3xFLAG-CMV/DEST ve pcDNA-Dest53 vektörleri, Dr. Hannie Keremer'den (Department of Human Genetics-Radboud University Nijmegen Medical Centre, Hollanda) temin edilmiştir.

Maya ikili hibrit için kullanılan pGBT9-Gateway ve pGAD424-Gateway vektörleri Alman Kanser Araştırma Merkezi'nden (German Cancer Research Center, DKFZ, Heidelberg, Almanya) temin edilmiştir.

5.1.9. Solüsyon, Tampon ve Besiyerleri

5.1.9.1. Bakteri için Kullanılan Besiyerleri

Luria Bertani (LB) Besiyer

Hazırlanışı:

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. Antibiyotik dirençli bakterilerin seçilimi için besiyerine sırasıyla 100 µg/ml ya da 50 µg/ml final konsantrasyonunda ampisilin ve kanamisin eklendi.

Luria Bertani Agar (LBA) Besiyeri

Hazırlanışı:

LB sıvı besiyerine %1.5 oranında agar eklenerek hazırlandı. LB agar besiyeri 1,2 atmosfer basınçta, 121°C'de 20 dakika otoklavda steril edildi ve soğutuldu. Kullanılacağı zaman mikrodalgada 90 wattta ısıtılarak sıvı hale getirildi. Antibiyotik dirençli bakterilerin seçilimi için 55°C su banyosunda tutulan besiyerine çoğaltılacak vektörün seçiciliğine göre 100 µg/ml veya 50 µg/ml final konsantrasyonda ampisilin veya kanamisin eklendi, 100 mm çapında petri kaplarına 20'şer ml dağıtıldı.

Bakteri Transformasyon Tamponu (TB Buffer)

Hazırlanışı:

10 mM PIPES (Pipes:302.37), 15 mM CaCl₂ (CaCl₂.2H₂O:110.98), 250 mM KCl (KCl:74.5513), bir miktar su ile çözüldü ve KOH ile pH 6,7'ye ayarlandı. Ardından final hacimde konsantrasyonu 55 mM olacak şekilde MnCl₂ (MnCl₂.4H₂O:197,91) eklendi. Çözelti 0,45 mm filtreden geçirilerek sterilize edildi.

SOB Super Optimal Broth (1 Lt)

Hazırlanışı:

20 g Tripton, 5 g yeast extract, 0,5 g NaCl, 0,186 g KCl son hacimde 1 litre olacak şekilde suda çözüldü ve pH 5N NaOH ile 7'ye ayarlandı. 1,2 atmosfer basınçta, 121 °C'da 20 dakika otoklavlandı. Sonrasında final hacimde konsantrasyonları 10 mM olacak şekilde MgSO₄ ve MgCl₂ eklendi.

5.1.9.2. Maya Kültürü için Kullanılan Besiyerleri ve Çözeltiler

YPAD (Yeast- Pepton-Adenin-Glukoz) Besiyerleri (1 Litre)

Hazırlanışı:

10 g maya özütü, 20 g pepton ve 0.1 g adenin distile su içerisinde çözülerek 900 ml'ye tamamlandı. Katı YPAD için YPAD'ye %1,5 oranında agar eklendi. Besiyeri 1,2 atmosfer basınçta, 121°C'da 20 dakika 1.2 atmosfer basınçta otoklav yapılarak steril edildi ve soğutulduktan sonra final konsantrasyonu % 2 olacak şekilde steril glukoz eklendi ve 100 mm çapındaki petri kaplarına döküldü. Oda sıcaklığında katılaşan besiyerleri 4 °C'da saklandı bir ayı geçmeyecek şekilde saklandı.

Sentetik Seçici (SD) /-ade -his -trp -leu Besiyeri (1 Litre)

Hazırlanışı:

6.7 g/L amino asit içermeyen maya azot kaynağı (yeast nitrogen base: YNB) ve 5 g/L amonyum sülfat ((NH₄)₂SO₄ 132,14 g/mol) yaklaşık 500 ml distile su içerisinde çözüldü. Üzerine adenin, histidin, triptofan, lösin dışında kalan Tablo 1'de belirtilen amino asit miktarlarını içeren amino asit karışımı (Drop Out: DO) eklendi. Distile su ile hacim 900 ml'e tamamlandı. Katı besiyeri için solüsyona %2'lik agar eklendi. Besiyeri 121°C'da 20 dakika 1.2 atmosfer basınçta otoklavda tutularak steril edildi. Otoklavlama işleminden sonra Glukoz solüsyonundan final konsantrasyonu %2 olacak şekilde eklendi. Konsantre olarak hazırlanan Adenin, Triptofan, Histidine ve Lösin gereken kondisyonlar için sonradan ilave edildi. Maya ikili hibrit deneylerinde RIPK4 ile etkileşimleri güçlü olan proteinleri seçmek ve özgül olmayan etkileşimleri elemek amacıyla HIS3 yarışmalı inhibitörü olan 3-amino-1, 2, 4-triazol (3-AT) otoklav sonrası final konsantrasyonu 0.4 mM olacak şekilde besiyerine eklendi. Besiyeri 10 cm' lik petrilere döküldü.

Tablo 1. SD medyum içerisinde bulunan aminoasitler

Aminoasit	Miktarı
Arginine HCl	0.02 g/lt
İsoleucine	0.03 g/lt
Lysine HCl	0.03 g/lt
Methionine	0.02 g/lt
Phenilalanine	0.05 g/lt
Threonine	0.2 g/lt
Tyrosine	0.03 g/lt
Uracil	0.02 g/lt
Valine	0.15 g/lt
Aspartik asit	0,1 g/lt

100x Konsantre Lösin (Leu) Çözeltisi (100 ml)

Hazırlanışı:

1 g Lösin deiyonize distile su içinde çözöldü ve çözöltinin hacmi 100 ml'ye tamamlandı. Çözölti 0.2 µm filtreden geçirilerek steril edildi

100x Konsantre Histidin (His) Çözöltisi (100 ml)

Hazırlanışı:

0.5 g Histidin deiyonize distile su içinde çözöldü ve çözöltinin hacmi 100 ml'ye tamamlandı. Çözölti 0.2 µm filtreden geçirilerek steril edildi.

100x Konsantre Triptofan (Trp) Çözöltisi (100 ml)

Hazırlanışı:

1 g Triptofan deiyonize distile su içinde çözöldü ve çözöltinin hacmi 100 ml'ye tamamlandı. Çözölti 0.2 µm filtreden geçirilerek steril edildi.

20X Konsantre Adenin-hemisülfat (Ade) Çözeltisi (100 ml)

Hazırlanışı:

0.4 g adenin deiyonize distile su içinde çözüldü ve çözeltinin hacmi 100 ml'ye tamamlandı. Çözelti 0.2 µm filtreden geçirilerek steril edildi.

Üç-Amino-1, 2, 4-triazole (3-AT) Çözeltisi (1 M)

Hazırlanışı:

0.84 g 3-AT (3-AT Mw: 84 g/mol) deiyonize distile su içinde çözüldü ve çözeltinin hacmi 10 ml'ye tamamlandı. Çözelti 0.2 µm filtreden geçirilerek steril edildi ve 1 ml'lik hacimlerde -20 °C'da saklandı.

Glukoz Çözeltisi (% 20)

Hazırlanışı:

100 g glukoz deiyonize distile su içinde çözüldü ve çözeltinin hacmi 500 ml'ye tamamlandı. Çözelti karamelleşmeyi engellemek için 105 °C'da 15 dakika 1.2 atmosfer basınçta otoklavda tutularak steril edildi.

5.1.9.3. Maya Transformasyonu İçin Gereken Çözeltiler

Lityum Asetat/PEG Çözeltisi

Hazırlanışı:

100 mM LiAc ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Li} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ Mw: 102 g/mol) ve %40 PEG TE içinde çözüldü. PEG'in çözülebilmesi için çözelti 37°C'ye kadar ısıtıldı. Çözelti 0.2 µm filtreden geçilerek steril edildi

Lityum Asetat/0.5xTE Çözeltisi

Hazırlanışı:

100 mM LiAc ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Li} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ Mw: 102 g/mol), 50 ml TE (10 mM Tris-Cl (pH: 7.5), 1mM EDTA) ve 50 ml deiyonize distile su ile hazırlandı. Çözelti 0.2 µm filtreden geçilerek steril edildi.

Potasyum Klorür Çözeltisi (2.5 M)

Hazırlanışı:

93,2 g potasyum klorür (KCl Mw: 74.55 g/mol) deiyonize distile su içerisinde çözüldü ve çözeltinin hacmi 500 ml'ye tamamlandı.

Sodyum Hidroksit Çözeltisi (2 N)

Hazırlanışı:

8 g sodyum hidroksit (NaOH Mw: 39.99 g/mol) deiyonize distile su içerisinde çözüldü ve çözeltinin hacmi 100 ml'ye tamamlandı.

Salmon Sperm DNA (ssDNA) Çözeltisi (5 mg/ml)

Hazırlanışı:

50 mg ssDNA 10 ml deiyonize distile su içerisinde çözüldü. Solüsyon küçük hacimlerde dağıtılarak -20 °C'da saklandı.

5.1.9.4. Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Çözeltiler

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

Hazırlanışı:

242 g Tris base (Tris base Mw:121.14 g/mol) deiyonize distile su içerisinde çözülerek hacmi 843 ml'ye tamamlandı. Çözelti üzerine 57 ml glasiyal asetik asit, 100 ml 0.5 M EDTA çözeltisi (pH:8.0) eklendi. Agaroz jel elektroforez deneylerinde 1:50 oranında seyreltilerek kullanıldı.

Etidyum Bromid Solüsyonu

Hazırlanışı:

10 mg/ml olacak şekilde deiyonize distile su kullanılarak hazırlandı. Karanlıkta muhafaza edildi.

10X Orange G DNA Yükleme Tamponu

Hazırlanışı:

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.

Tris-Cl Tamponu (1 M)

Hazırlanışı:

121,1 g Tris (Tris baz Mw:121.14 g/mol) 800 ml deiyonize distile su içerisinde çözüldü. 3 N 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. Tris/EDTA (TE) Tamponu

Hazırlanışı:

10 mM Tris-Cl (pH:8.0)) ve 1 mM EDTA (pH:8.0) deiyonize distile su kullanılarak pH: 8.0 olacak şekilde hazırlandı.

5.1.9.5. SDS Page-Western Blot Solüsyonları

1,5 M Tris-HCl pH 8.8 (Ayırma Jel Tamponu) (200 mL)

Hazırlanışı:

36,33 g Tris (Tris-baz Mw: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) (100 mL)

Hazırlanışı:

6,057 g Tris (Tris baz Mw: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) (20 mL)

Hazırlanışı:

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

10X Tris Glisin Tamponu

Hazırlanışı:

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

SDS-PAGE Yürütme Tamponu (1 L) (1 X)

Hazırlanışı:

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

SDS-PAGE Transfer Tamponu (1 L) (10 X)

Hazırlanışı:

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

%10 Amonyum Persülfat (APS) (1 mL)

Hazırlanışı:

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

5X SDS-PAGE Yükleme Tamponu (10 ml)

Hazırlanışı:

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

Hazırlanışı:

Biorad tarafından temin edilen solüsyon kullanıldı ve 4°C'de saklandı.

10X PBS Stoğu (1 L)

Hazırlanışı:

1.37 M NaCl (Mw:58.44 g/mol), 26.8 Mm KCl (Mw 74.56 g/mol), 0.1 M Na₂HPO₄, (Mw 141.96 g/mol) 17.6 mM KH₂PO₄ (Mw 136.09 g/mol) 800 ml distile su içerisinde hazırlandı ve pH:1N HCl ile 7.4'e ayarlandı.

PBS, % 0.05 Tween 20

Hazırlanışı:

10 ml 10 x PBS'ten ve 25 µl % 20'lik Tween 20 solüsyonundan alınarak toplam hacim deiyonize su ile 100 ml'e tamamlandı ve oda sıcaklığında saklandı.

5.1.9.6. Immünpresipitasyonda Kullanılan Tamponlar

%20 Triton-X 100

Hazırlanışı:

10 ml Triton X 100 deterjanının üzerine 40 ml deiyonize su koyularak son hacim 50 ml'e tamamlanır. Triton X 100 ün iyice çözülebilmesi için çözelti ısıtılır. Solüsyon 4°C de saklanır.

10X TNTE Hücre Patlatma Stok Tamponu (50 ml)

Hazırlanışı:

Son konsantrasyonları 0,5 M Tris-Cl, pH: 7.4, 1.5 M sodyum klorür,%5 Triton X 100, 10 mM EDTA olacak şekilde solüsyonlar birleştirilir hacim 50 ml'e tamamlanır.

1X TNTE Hücre Patlatma Tamponu

Hazırlanışı:

Son konsantrasyonları 1X TNTE Buffer, 5 mM NaPPi, 1x PI (roche), %10 gliserol (opsiyonel), 2 mM NaVan, 20 mM NaF, 1 mM PMSF olacak şekilde solüsyonlar bir araya getirilir

Fosfotaz İnhibitörler

100X Sodyum Orthovanadate (200 mM) (NaVan)

Hazırlanışı:

3.68 g Na_3VO_4 (Na_3VO_4 Mw: 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'a tekrar bakıldı ve 10.0'a ayarlandı. Hacim 100 ml'e tamamlandı. Hacim dağıtılarak -20°C 'de saklandı. Çalışma konsantrasyonu 2mM olacak şekilde 100 kez lizis bufferda seyreltildi.

50X Sodyum Florür (1M) (NaF)

Hazırlanışı:

4.2 g NaF (NaF Mw: 41,99 g/mol) 100 ml steril çift distile su içinde çözüldü. Hacim dağıtılarak -20°C 'de saklandı. Çalışma konsantrasyonu 20 mM olacak şekilde 50 kez lizis bufferda seyreltildi.

20X Sodyum PyroPhosphate (100 mM) (NaPPi)

Hazırlanışı:

4.44 g NaPPi (NaPPi Mw: 444.06 g/mol) 100 ml steril çift distile su içinde çözüldü. Solüsyon 4°C 'de saklandı. Çalışma konsantrasyonu 5 mM olacak şekilde 20 kez lizis bufferda seyreltildi.

100X PMSF (100 mM)

Hazırlanışı:

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

10X Proteaz İnhibitör Kokteyl:

Hazırlanışı:

Bir adet Complete Mini tablet 1 ml steril çift distile su içinde çözüldü ve -20°C 'de saklandı.

1X İmmünpresipitasyon Yıkama Tamponu

Hazırlanışı:

Son konsantrasyonları 50 mM Tris-Cl pH: 7.4, 0,15 M NaCl, 1 mM EDTA pH: 8.0, %0.1 Triton X100 olacak şekilde hazırlandı.

5.1.9.7. İmmünofloresanda Kullanılan Tamponlar

10 ml %4 Paraformaldehit Çözeltisi

Hazırlanışı:

4 gr paraformaldehit (PFA Mw: 30.03) 80 ml PBS içerisinde 60°C'de ısıtılarak çözülür. pH 1N HCl ile 6.9'a ayarlanır. Son hacim 100 ml'e tamamlanır ve 0,45 micron filtreden geçirilerek sterilize edilir. PFA çok toksik olduğundan solüsyon çeker ocakta hazırlanır.

10 ml %0,2 Triton X 100 Çözeltisi

Hazırlanışı:

100 µl % 20 Triton X 100 deiyonize distile su ile 10 ml'e tamamlanır.

10 ml %10 Keçi Serumı

Hazırlanışı:

Ticari olarak satın alınan keçi serumdan 1 ml alınır 9 ml PBS ile 10 ml'e tamamlanır.

5.1.9.8. Memeli Hücre Kültürü

100 ml %10 FBS-DMEM-Pen/Strep Besiyeri

Hazırlanışı:

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

Transfeksiyon Solüsyonları

2X HEPES:

Hazırlanışı:

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

2,5 M CaCl₂

Hazırlanışı:

36.75 g CaCl₂ (CaCl₂ Mw: 147.02 g/mol) 100 ml steril çift distile su içinde çözüldü. 0,25 mikron filtreden geçirilerek steril edildi. 15 ml'lik falkonlara dağıtılarak -20 °C'de saklandı.

5.2. Yöntem

5.2.1. Gateway Klonlama Sistemi Kullanılarak *RIPK4* ve *PLAGL2* Genlerinin Uygun Vektörlere Klonlanması

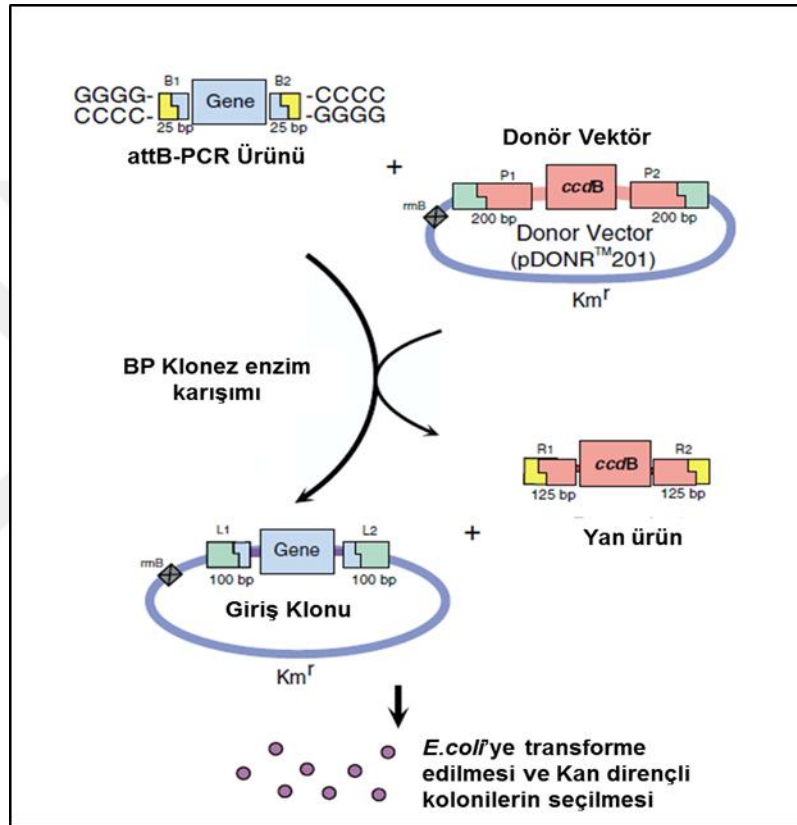
5.2.1.1. Gateway Klonlama Sistemi Hakkında Genel Bilgi

Gateway klonlama teknolojisi faj lambdanın litik ve lizogenik aktiviteleri esnasında kullandığı bölgeye özgül rekombinasyon sisteminin gen klonlanması için uyarlandığı yaygın kullanılan bir klonlama stratejisidir. Gateway sisteminde klonlamanın başarılı olduğu plazmidleri içeren bakteri klonları seçilirken *ccdB* geninden yararlanılır. *ccdB* gen ürünü DNA replikasyonu için kilit bir enzim olan DNA Giraz adı verilen bir enzimin aktivitesini blokladığından bakterilerin çoğalmasını ve koloni oluşturmalarını engeller.

Gateway sisteminde tüm boş vektörlerde *ccdB* geni bulunur. Klonlama aşamasında bölgeye özgü rekombinasyonla CCDB geni vektörden çıkartılarak yerine ilgilenilen gen yerleştirilir. Klonlamanın başarılı olması durumunda toksik CCDB gen ürünü üretilmediğinden bakteri çoğalıp koloni oluşturabilir.

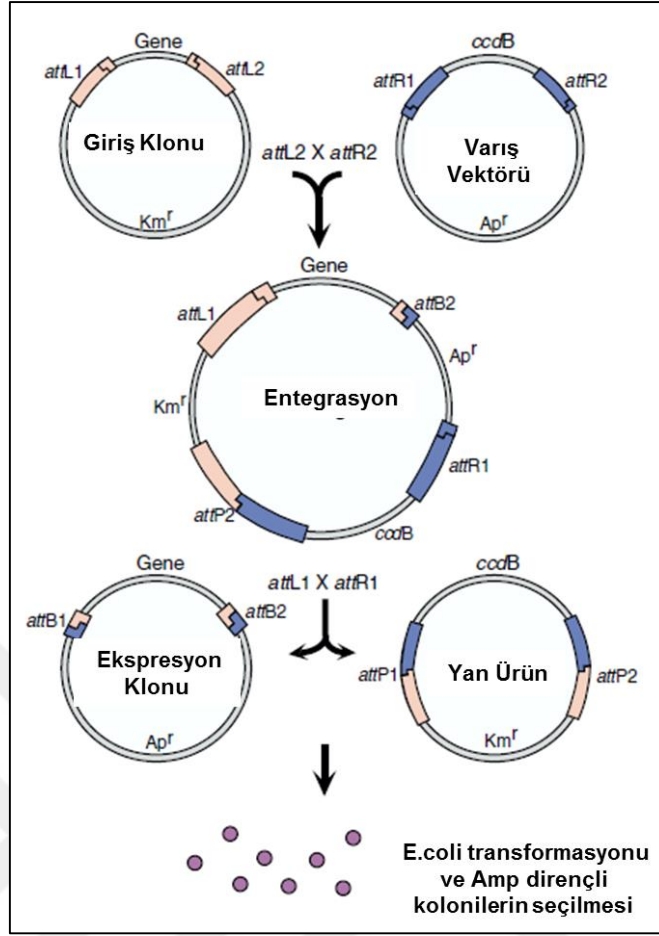
Gateway klonlama sistemi ile ilgilenilen genin ekspresyon vektörlerinin oluşturulması iki aşamada gerçekleştirilmektedir.

Birinci Aşama; BP reaksiyon: attB ve attP rekombinaz sekansları arasında gerçekleşen BP rekombinasyonuna dayalıdır. Birinci aşamada amaç, ilgilenilen genin Giriş (Entry) vektörüne yerleştirilmesidir. Bu doğrultuda, uçlarında attB1, 2 bölgeleri olacak şekilde uygun primerler ile Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR tekniği) kullanılarak çoğaltılan ilgili gen attP1, 2 sekansları içeren “donör vektör” ile BP klonaz enzimi varlığında inkübe edilir. Reaksiyon sonrasında ilgili genin, attL1,2 rekombinasyon sekansları ile çevrili olduğu bir “giriş klonu” oluşur.(Şekil14)



Şekil 14. BP reaksiyon ile ilgilenilen geni içeren PCR ürününün BP klonaz ile donör vektöre aktararak giriş klonu oluşturulması.

İkinci Aşama; LR reaksiyon: attL ve attR rekombinaz sekansları arasında gerçekleşen LR reaksiyonuna dayalıdır. İkinci aşamada, birinci aşamada BP reaksiyonu sonrasında elde edilen attL sekanslarına sahip giriş klonu, attR sekansları içeren “varış vektörüne” LR klonaz enzimi ile transfer edilir. Entegrasyon sonrasında ilgilenilen geni içeren attB sekansları ile çevrili “ekspresyon klonu” oluşur. BP reaksiyon ile giriş vektörüne klonlanan gen farklı amaçlarla kullanmak üzere farklı varış vektörlerine LR reaksiyon ile aktarılabilir.(Şekil 15)



Şekil 15. LR reaksiyon ile giriş klonunda bulunan ilgilenilen genin varış vektörüne aktararak ekspresyon klonu oluşturulması.

5.2.1.2. Giriş Klonu Oluşturmak Üzere *RIPK4* ve *PLAGL2* cDNA'larının PCR ile Çoğaltılması

PLAGL2 ve *RIPK4*'ün memeli ve maya hücrelerinde istenilen etiketlerle füzyon olacak şekilde ekspres edilebilmesi için attB1,2 sekanslarını içeren forward ve revers primerler İnvitrogenin Gateway sisteminin ürün kataloğunda önerildiği şekliyle tasarlanmıştır (Tablo 2, 5).

5.2.1.2.1. *RIPK4*'ün PCR Ürünün Oluşturulması

RIPK4 FL (Full Length) ve *RIPK4*'ün 51. pozisyonunda bir aminoasit değişikliğinin gerçekleşmesiyle kinaz aktivitesini kaybeden *RIPK4* K51R geninin pEF2 vektörü içinde bulunan cDNA'ları Genentech firmasından temin edilmiştir. Öncelikle, diğer klonlamalarda kalıp olarak kullanılacak pEF2 vektöründeki *RIPK4* FL ve *RIPK4* K51R dizileri *RIPK4*'e özgül primerler kullanılarak bölümümüzde bulunan Genetik Analizör cihazı ile dizilendi ve 2355 baz çiftine sahip, NM_020639.2 kodlu insan *RIPK4* cDNA'sı ile birebir örtüştüğü gösterildi.

RIPK4 geni N-terminalinde bulunan kinaz domaini, C-terminalinde bulunan ankrin domaini ve bu iki domaini birbirine bağlayan linker domaininden oluşmaktadır (Şekil 16). *RIPK4 FL*, *RIPK4 K51R*, *RIPK4 N ter* (kinaz domaini) ve *RIPK4 C-ter* (ankrin artı linker bölgeleri) bölgeleri dizilerinin başında ve sonunda uygun attB kuyrukları olacak şekilde Tablo 2 belirtilen primer çiftleri ile Tablo 3’de belirtildiği şekliyle Termal Cyclus ile amplifiye edildi.



Şekil 16. *RIPK4* proteininin domainlerinin şematik olarak gösterilmesi

Tablo 2. *RIPK4* cDNA larının oluşturulmasında kullanılan primerler

Primerin Adı	Primerin 5’-3’ baz dizisi	Primer Bank
<i>RIPK4 FL</i> ve <i>RIPK4 K51R</i> attB1 Forward	*ggggacaagtttgtaaaaaagcaggcttcattggagggcgacggcgggac	987
<i>RIPK4 FL</i> ve <i>RIPK4 K51R</i> attB2 Revers	*ggggaccactttgtacaagaaagctgggtcctaggtcttgcttcgccgcagg	992
<i>RIPK4 N Ter</i> attB1 Forward	*ggggacaagtttgtaaaaaagcaggcttcattggagggcgacggcgggac	987
<i>RIPK4 N Ter</i> attB2 Reverse	*ggggaccactttgtacaagaaagctgggtccgtcatcaggctttcacacagggtcc	1047
<i>RIPK4 Linker + Ankrin</i> attB1 Forward	*ggggacaagtttgtaaaaaagcaggcttcattggaaattacttctgaaaccgag	1101
<i>RIPK4 Linker+ Ankrin</i> attB2 Revers	*ggggaccactttgtacaagaaagctgggtcctaggtcttgcttcgccgcagg	992

(*Koyu gösterilen yerler attB kısımlarıdır.)

Tablo 3. Pwo enzimi için kullanılan PCR koşulları

PCR karışımı 1	
Kalıp DNA(250 ng)	0,5 µl
dNTP (100 mM)	0,5 µl
Forward primer (10 pmol/µl)	1 µl
Revers primer (10 pmol/µl)	1 µl
ddH ₂ O	9,5 µl
PCR karışımı 2	
Buffer (MgSO ₄) 25 mM	2,5 µl
Pwo DNA polimeraz 5U/ µl	0,2 µl
ddH ₂ O	9,8 µl

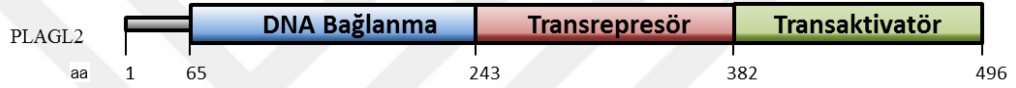
PCR koşulları; başlangıç denatürasyonu 94°C’de 4 dakika, 15 döngü olarak denatürasyon 94°C’de 30 sn, bağlanma 58°C’de 1 dakika, sentez 72°C 2 dakika, son sentez 72°C 6 dakika olacak şekilde hata oranı düşük Pwo DNA Polymeraz enzimi kullanılarak gerçekleştirildi. Oluşturulan RIPK4 PCR fragmanları Tablo 4’de verilmektedir.

Tablo 4. Oluşturulan RIPK4 PCR ürünlerinin uzunlukları ve primer numaraları

Primer Bank No	Forward-Reverse	PCR ürününün adı	PCR ürününün uzunluğu (bp)
987	F	<i>RIPK4 K51R</i>	2358
992	R		
987	F	<i>RIPK4 FL</i>	2358
992	R		
987	F	<i>RIPK4 N Term</i>	876
1047	R		
1101	F	<i>RIPK4 C Term</i>	1100
992	R		

5.2.1.2.2. *PLAGL2*'nin PCR Ürünün Oluşturulması

PLAGL2 geni çinko parmak domaini, transaktivatör domaini ve bu iki domainin arasında kalan represör domaininden oluşmaktadır (Şekil 17). *PLAGL2*'nin klonlanması için elimizde *PLAGL2* cDNA'sını içeren bir vektör olmamasından dolayı, klonlama esnasında keratinosit hücre hattından elde edilen cDNA PCR'da kalıp olarak kullanıldı. *RIPK4* klonlamasına benzer şekilde *PLAGL2*'nin tamamı (*FL-PLAGL2*), *PLAGL2*'nin çinko parmak domainini içeren N-terminal kısmı (*N-PLAGL2*), *PLAGL2* represör artı transaktivatör gen bölgelerini içeren C-terminal kısmı (*C-PLAGL2*) Tablo 5'te belirtilen primerler kullanılarak PCR ile çoğaltıldı. *PLAGL2*'yi çoğaltmak için kullanılan PCR reaksiyonu Tablo 3'te PCR sonrasında oluşturulan *PLAGL2* fragmanları Tablo 6'da belirtilmektedir.



Şekil 17. *PLAGL2* proteininin domainlerinin şematik olarak gösterilmesi

PLAGL2'nin çoğaltılması için kullanılan PCR kondisyonları; başlangıç denatürasyonu 94°C'de 4 dakika, 15 döngü denatürasyon 94°C'de 30 sn, bağlanma 58°C'de 1 dakika, sentez 72°C 2 dakika, ve son sentez 72°C 6 dakika olacak şekilde gerçekleştirildi.

Tablo 5. PLAGL2 cDNA larının oluşturulmasında kullanılan primerler

Primerin Adı	Primerin 5'-3' Baz Dizisi	Primer Bank
<i>PLAGL2 FL</i> att B1 Forward	*ggggacaagtttgtacaaaaagcaggcttcaccacattttcaccagcgcc	1034
<i>PLAGL2 FL</i> att B2 Reverse	*ggggaccactttgtacaagaaagctgggtcctactggaatgcttgatggaaacgag	1036
<i>PLAGL2 N</i> ter attB1 Forward	*ggggaccactttgtacaagaaagctgggtcctactggaatgcttgatggaaacgag	1034
<i>PLAGL2 N</i> ter attB2 Reverse	*ggggaccactttgtacaagaaagctgggtc ctagagcagctcctgcgagtg	1099
<i>PLAGL2 C</i> ter attB1 Forward	*ggggacaagtttgtacaaaaagcaggcttcgaagatcaagacagagcccgctg	1036
<i>PLAGL2 C</i> ter attB2 Reverse	*ggggaccactttgtacaagaaagctgggtcctactggaatgcttgatggaaacgag	1100

(*Koyu renkli kısımlar attB bölgeleridir).

Tablo 6. Oluşturulan *PLAGL2* PCR ürünlerinin uzunlukları ve primer numaraları

Primer Bank No	Forward-Reverse	PCR ürününün adı	PCR ürününün uzunluğu (bp)
1034	F	<i>PLAGL2 -FL</i>	1491
1036	R		
1034	F	<i>PLAGL2 N-Term</i>	741
1099	R		
1100	F	<i>PLAGL2 C-Term</i>	750
1036	R		

5.2.1.3. Gateway Sistemi BP Reaksiyonu ile *RIPK4* ve *PLAGL2* Giriş Vektörlerinin Oluşturulması

PCR ile çoğaltılan *RIPK4* ve *PLAGL2* agaroz jelde yürütüldü ve jelden izole edildi. Sonrasında Gateway pDONR201 donör vektörüne BP reaksiyon ile yerleştirilerek *RIPK4* ve *PLAGL2* içeren giriş vektörleri oluşturuldu. BP reaksiyon BP klonaz adı verilen enzim ile Tablo 7’de belirtilen koşullarda gerçekleştirildi.

Tablo 7. Gateway Sistemi BP reaksiyonu

BP Karışımı:	
PCR ürünü (25 ng/μl)	1μl
Donör (pDONR201) vektör (25 ng/μl)	1μl
BP Clonaz enzim karışımı	0.5 μl
Toplam	2.5 μl

BP Klonlama reaksiyonu 25°C’de 2 saat inkübe edildi. Her bir örneğe eklenen 0.35 μl Proteinaz K ile 37°C’de 10 dakika inkübasyonla reaksiyon sonlandırıldı.

BP reaksiyonu sonrasında *PLAGL2* ve *RIPK4* genleri için oluşturulan giriş vektörleri DH5α’ya transforme edildi (Bkz Başlık: 5.2.2.4). Büyüyen bakteri klonları 50 μg/ml Kanamisin içeren LB besiyerinde çoğaltıldıktan sonra bakteriden plazmid izole edildi. Giriş vektörlerinde istenilen *RIPK4* ve *PLAGL2* gen fragmanlarının olduğunu doğrulamak için vektörler dizilenerek teyit edildi. Sonrasında, *RIPK4* ve *PLAGL2* fragmanları giriş vektöründen LR reaksiyonu ile farklı varış vektörlerine klonlanarak

ekspresyon vektörleri oluşturuldu (Tablo 9). LR reaksiyonu Tablo 8’de belirtilen koşullarda gerçekleştirildi.

Tablo 8. Gateway Sistemi LR reaksiyonu

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

LR reaksiyonu 25°C’de 4.5 saat inkübe edildi. Reaksiyon her bir örneğe 0.35 μl Proteinaz K eklenmesi ve 37°C’de 10 dakika inkübe edilmesi ile sonlandırıldı. Daha sonra ekspresyon vektörleri bakteri transformasyon protokolü ile DH5α E.coli suşuna transforme edilerek 100 μg/ml ampicilin içeren LB besiyerinde büyütüldü. Tek bir koloni seçilerek, bu kültürden plazmid izole edildi. Ekspresyon vektöründe bulunan cDNA’lar sekanslanarak doğrulandı.

LR reaksiyon ile *RIPK4* ve *PLAGL2*’nin klonlandıkları maya ve memeli ekspresyon vektörleri Tablo 9’da detaylı olarak gösterilmektedir.

Tablo 9. *RIPK4* ve *PLAGL2*’nin LR reaksiyonu ile klonlandıkları varış vektörleri

Ekspresyon Vektörünün Hedefi		Füzyon Proteinler ve bulundukları vektörler	Klonlanan Genler
Maya	AH109 Mat a	GAL4-BD, pGBT9	<i>RIPK4 FL</i>
			<i>RIPK4 C Term</i> (linker ve ankrin domaini)
			<i>RIPK4 N Ter</i> (kinaz domaini)
	Y187 Mat α	GAL4-AD, pGAD424	<i>PLAGL2 FL</i>
			<i>PLAGL2 N Ter</i> (Çinko parmak domaini)
			<i>PLAGL2 C Term</i>
Memeli		GFP, pcDNA-Dest53	<i>PLAGL2 FL</i>
			<i>PLAGL2 N Ter</i> (Çinko parmak domaini)
			<i>PLAGL2 C Ter</i>
		FLAG etiketi, P3xFLAG-CMV/DEST	<i>RIPK4 FL</i>
			<i>RIPK4 C Ter</i> (linker ve ankrin domaini)
			<i>RIPK4 N Ter</i> (kinaz domaini)

5.2.2 Bakteri Kültürü

5.2.2.1. Transformasyon İçin Bakterilerin Kompetan Hale Getirilmesi

Inoue yöntemi kullanılarak transformasyonda kullanılacak bakteriler dışardan verilen vektörleri alabilmeye kompetan hale getirildi ve sonradan kullanılmak üzere 80°C de saklandı (47). *E.Coli* suşlarını Inoue yöntemiyle kompetan hale getirmek için istenilen bakteri stoğundan LB katı besiyerine öze ile yayma yapıldı ve 37°C'da bir gece boyunca inkübe edildi. Katı besiyerinde oluşan kolonilerden tek bir koloni alındı ve 10 ml LB agar besiyerine ekim yapılarak kültür 37°C'da bir gece büyütüldü. Ertesi gün satüre kültürden 8 ml alınarak 250 ml SOC (20mM Glukoz içeren SOB) sıvı besiyerine ekim yapıldı ve 17°C'da çalkalamalı inkübatörde üremeye bırakıldı. Kültür, OD600 0.4–0.6 arası bir değere eriştiğinde kompetan hücre hazırlamak üzere buza alındı ve buzda 10 dakika bekletildi daha sonra 4°C'de 2500xg 10 dakika santrifüj edilerek bakteriler çöktüldü. Çökelti 80 ml soğutulmuş TB transformasyon tamponu içerisinde süspanse edildi ve tekrar 15-20 dakika buz üzerinde bekletildi. Bakteriler 4 °C'da 2500xg 10 dakika santrifüj edildi. Bakteri pelleti 20 ml soğuk transformasyon tamponunda süspanse edildi. Ardından hücrelerin üzerine final hacimde %7 olacak şekilde DMSO eklendi ve 10 dakika buzda bekletildi. Hazırlanan hücreler ya direkt olarak transformasyonda kullanıldı ya da ileride kullanılmak üzere ependorflara dağıtılarak sıvı nitrojende dondurulduktan sonra -80°C'da saklandı.

5.2.2.2. *E coli DH5α* Suşuna Plazmid (Vektör) Transformasyonu

Transformasyon için önceden kompetan hale getirilmiş *DH5α* bakteri suşu - 80°C'den çıkarıldı ve buza transfer edildi. Transformasyon için 0.5 µg vektör karışımı 50 µl *DH5α* üzerine eklendi. Karışım 30 dakika buz üzerinde tutuldu ve ara sıra hafifçe karıştırıldı. İnkübasyon sonunda bakteri vektör karışımı 30 saniye 42°C'de ısı şokuna uğratıldı. Karışım tekrar 2 dakika buzda bekletildi. Her bir örneğe 1 ml S.O.C besiyeri eklendi. Örnekler 1 saat boyunca 37°C'de 250 rpm hızında çalkalamalı etüvde inkübe edildi. Sonrasında hücre süspansiyonu 3000 rpm 5 dakika santrifüj edildi ve hücre pelleti 1ml LB besiyeri ile yıkandı. İkinci santrifüjden sonra hücre pelletine 50 µl besiyeri eklendi ve hücreler vektörde bulunan antibiyotik direncine göre ya 50 µg/ml kanamisin ya da 100 µg/ml ampicilin içeren LB-Agar katı besiyerine ekildi. Petri tabaklar 37°C'de gece boyu inkübe edildi.

5.2.2.3. Bakteriden Plazmit İzolasyonu

Transforme edilmiş bakterilerden tek bir koloni seçilip LB-kanamisin/ampisillin besiyerine ekildi ve 37 °C de 200 rpm 12-16 saat arasında çalkalanarak büyütüldü.

Plazmit izolasyonu için EZNA endofree mini prep kit kullanıldı. Gece boyunca büyütülmüş satüre kültür 10000 g de 1 dakika santrifüj edilerek hücreler çöktürüldü. Süpernatant atıldı ve pellet RNaz A (10mg/μl) içeren soğutulmuş Solüsyon I içerisinde süspanse edildi. Sonrasında, 250 μl Solüsyon II eklenerek tüpler nazikçe alt üst edildi ve berrak bir lizat elde edildi. Lizatlar 2-3 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra N3 Solüsyonundan 125 μl eklendi ve tüpler bir kaç kez alt üst edilerek beyaz topaklar şeklinde görünen presipitatların oluşması sağlandı. Örnekler maksimum hızda 10 dakika santrifüj edildi. Beyaz presipitatdan almamaya özen göstererek süpernatant yeni bir tüpe alındı ve hacmi ölçüldü. Lizat üzerine 1:1 oranda ETR Binding Solüsyonu eklendi ve tüp 10 defa alt üst edilerek karıştırıldı. Plazmidi saflaştırmak için kullanılacak kolonlar 100 μl 3M NaOH eklenerek dengelendi. Kolonlar maksimum hızda oda sıcaklığında 1 dakika santrifüj edildikten sonra plazmidi içeren 500 μl süpernatant kolonlara transfer edildi ve kolonlar maksimum hızda oda sıcaklığında 1 dakika santrifüj edildi. Daha sonra kolondan sırasıyla 500 μl ETR Wash Solüsyonu, 500 μl HBC Solüsyonu ve 700 μl DNA Wash solüsyonu geçirildi. Kolonlar temiz tüplere transfer edilerek üzerlerine elüsyon solüsyonundan 50-100 μl eklendi ve 1 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra santrifüjle kolondan plazmid ayrıştırıldı. Elde edilen plazmitlerden 2 μl alınarak %0.8'lik agaroz jelde yürütüldü. Plazmid konsantrasyonları Nanodrop cihazında belirlendi. Örnekler -20°C'ye kaldırıldı.

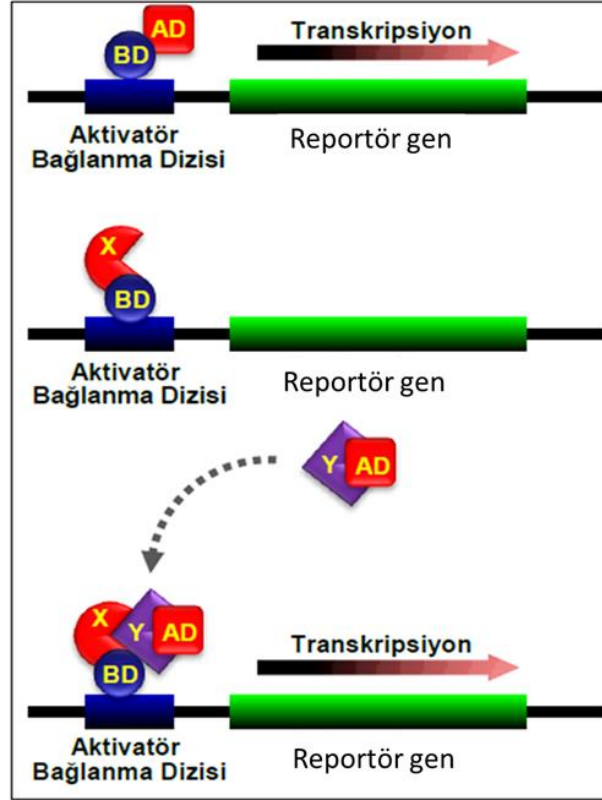
5.2.3. Maya Teknikleri

5.2.3.1. Maya İkili Hibrit

İkili-hibrid teknikleri, transkripsiyon aktivatör proteinlerinin fiziksel ve işlevsel olarak ayrılabilen iki farklı domaine sahip olmaları temeline göre geliştirilmiş olup protein-protein ya da protein-DNA etkileşimlerini (tekli-hibrid metodu) belirlemek amacıyla uygulanırlar. Proteinler arasındaki etkileşimleri belirlemeyi esas alan maya ikili-hibrid tekniği *Saccharomyces cerevisiae*'da kullanılmak üzere geliştirilen bir metottur. *S. cerevisiae* hem haploid hem de diploid yaşam döngüsüne sahip olup farklı eşey tipine sahip haploid hücreler eşleşerek diploid (α/a) maya hücrelerini oluştururlar. Maya ikili hibritte araştırılan proteinlerden biri α diğeri a tipinde ekspres ettirilir. Sonrasında haploid mayalar eşleştirilerek iki proteinin etkileşimi analiz edilir.

Maya ikili hibrit yöntemi taranan proteinin sayısına bağlı olarak büyük ya da küçük ölçek olmak üzere ikiye ayrılır. İlgilenilen proteinin cDNA kütüphaneleri tarafından kodlanan tüm proteinler ile etkileşiminin incelenmesi için büyük ölçek maya ikili hibrite başvurulurken, yalnızca iki proteinin etkileşiminin araştırılmasında küçük ölçek maya ikili hibrit uygulanır.

Genel olarak maya ikili hibrit sisteminde, fonksiyonu araştırılan protein (yem) BD (DNA bağlanma domaini) ile kimerik bir protein oluşturacak şekilde maya ekspresyon vektörüne klonlanır. Etkileşimi araştırılan gen ürünü de; büyük ölçek taramada cDNA kütüphanesi, küçük ölçekte etkileşimi araştırılan protein (av) AD (aktivasyon domaini) ile kimerik bir protein oluşturacak şekilde farklı bir maya ekspresyon vektörüne klonlanır. Her iki ekspresyon vektörü de genomunda BD'in tanıyıp, bağlandığı UAS (upstream aktive edici sekans) promotörü altında "Raportör Genlerin" (Reportör Gen, örn: LacZ geni, Ade, Trp, Leu gibi) bulunduğu bir maya hücresine transfer edilir. Maya hücresinde iki proteinin (yem-av) fiziksel olarak etkileşimi, birbirinden ayrı olan BD ve AD modüllerini tekrar bir araya getirir ve UAS sekansı altında yer alan raportör genlerin (Histidine, Beta Galaktozidaz, Adenine gibi) ekspresyonunu sağlar (Şekil 18). Raportör genin ekspresyonu mayada uygun seleksiyon koşulları (Beta-Gal'ın substratı X-Gal içeren Trp, Leu, His içermeyen medyumlar gibi) kullanılarak belirlenir (44, 48-50).



Şekil 18. Maya ikili hibrit çalışma prensibinde, X ve Y proteinlerinin etkileştiklerinde BD ve AD'nin bir araya gelerek transkripsiyonu başlatma prensibine dayanır. X:yem, Y:av, BD:DNA binding protein, AD:aktivating domain

Çalışmamız kapsamında daha evvel insan keratinosit kütüphanesinin büyük ölçek maya ikili hibrit taramasında belirlenen RIPK4 ve PLAGL2 etkileşimini küçük ölçek maya ikili hibrit ile doğrulamak amacıyla, RIPK4 geni DNA-BD ile PLAGL2 ise AD ile füzyon oluşturacak şekilde sırasıyla pGBT9 ve pGAD424 maya vektörlerine klonlandı. Küçük ölçek maya ikili hibriti gerçekleştirmek üzere DBD-RIPK4 vektörleri AH109 (mat a) suşuna, AD-PLAGL2 vektörleri ise Y187 (mat α) suşuna transforme edildi.

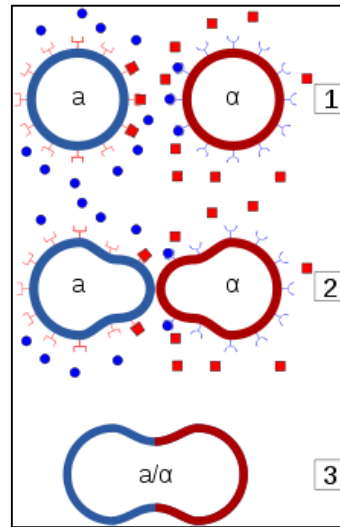
5.2.3.2. Küçük ölçek Maya Transformasyonu

Maya transformasyonu için önce mayalar plazmid DNA'larını alabilmeleri için kompetan hale getirildi. Bu amaç doğrultusunda -80°C den çıkarılan Y187 ve AH109 maya suşları öze yardımı ile YPAD-agar petriye yayılarak en az 2 gün büyütüldü. Daha sonra 10 ml YPAD'ye agar petrilerden alınan tek koloni ekilerek çalkalamalı inkübatörde 30°C de gece boyunca inkübe edildi. Ertesi gün kültür OD600=0.2, yaklaşık 1/10-1/20 dilüsyon, olacak şekilde dilüsyon yapılarak 50 ml YPAD'ye ekildi ve OD600 değeri 0.4-0.6 arasına gelene değin büyütüldü. İstenilen OD600 değerine ulaşan

maya hücreleri 2500 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi. Maya pelleti 40 ml TE de çözüldü ve 2500 rpm’de 10 dakika tekrar santrifüj edildi. Bu defa pellet 2 ml 100 mM LiAc/0.5 M TE solüsyonu içerisinde süspanse edildi ve 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. LiAc/TE solüsyonunda bulunan kompetan hale gelmiş hücrelerden her bir koşul için 150 µl alındı ve üzerlerine 1.5-4 ug DNA ve 10 µl (100 µg) salmon sperm DNA eklendi. Hücre-DNA solüsyonuna 700 µl PEG eklenerek 30°C 30 dakika dönen tekerlek inkübatöründe inkübe edildi. İnkübasyonun ardından 88 µl DMSO eklenip karıştırıldı. Örnekler 42°C derecede 7 dakika ısı şokuna maruz bırakıldı ve çöktürüldü (3000 rpm’de 5 dakika). Bir kez TE ile yıkandıktan sonra RIPK4’ün BD domain ile füzyon olduğu pGBT9 vektörü (triptofan okzotrofisini kurtaran) ve PLAGL2’nin AD ile füzyon olduğu pGAD24 vektörünü (lösin okzotrofisini kurtaran) içine alan maya hücreleri sırasıyla triptofan ve lösin bulunmayan SD-agar petriye yayıldı. Koloniler ortaya çıkıncaya değin 30°C’de 3 -4 gün inkübe edildi.

5.2.3.3. Maya Eşleşmesi (Mating)

S.cerevisiae, mat a ve mat α olmak üzere iki cinsiyete sahiptir. Her iki maya cinsiyetinin de kendilerine özgü feromonları vardır. Bu feromonlarla mat a ve mat α birbirlerini tanır ve birleşirler (Şekil 19).



Şekil 19. Mat a ve mat α cinsiyetlerine sahip haploit mayaların mating ile diploit olma süreci.

Mayada etkileşimi araştırılan proteinleri ekspres eden vektörler ayrı ayrı mat α ve mat a cinsiyetli haploid mayalara transforme edilir. Uygun koşullar sağlanarak farklı cinsiyetteki mayaların eşleşmesi üzerine bu iki protein diploid mayada beraber

ürettirilmiş olur. Eğer bu iki protein etkileşiyorsa maya genomuna yerleştirilmiş raportör genlerin ekspresyonunu sağlar.

Eşleşmeyi sağlamak için, transforme edilen mayalardan birer koloni seçilerek 50 µl TE içerisinde homojen hale getirildi. RIPK4 ve PLAGL2'yi ekspres eden haploit mayalar eşit hacimlerde (her birinden 10 ul) karıştırılarak YPAD-agar petriye ekildi. Hücreler 22°C de 2 gün büyütüldü. Bu süre zarfında oluşan diploit mayalar alınıp TE de tekrar homojen hale getirildi ve hem triptofan hem de lösin içermeyen SD-agar petriye ekildikten sonra 30°C de 3 gün büyütüldü. Çoğalan diploid maya hücreleri ikinci günün sonunda plazmidlerin seçilimi için Triptofan, Lösin içermeyen, raportörlerin aktivasyon analizi için Adenin ve Histine içermeyen ve diğer bir raportör olan β-Gal analizi için X-α-Gal içeren (reaksiyon sonrasında mavi renk oluşturur) ve özgül olmayan yanlış pozitifleri elimine etmek için de Histidin'in yarışmalı inhibitörü 3-AT içeren SD agar petriye alındı. Maya hücreleri, 30°C de 7 gün inkübe edildikten sonra büyümeleri ve renk oluşturmaları dikkate alınarak analiz edildi ve görüntülendi.

5.2.4. Hücre Kültürü Teknikleri

Çalışmamızda protein ekspresyonu, immunoblot ve immünopresipitasyon deneyleri sırasıyla HEK293 ve HaCaT hücre hatlarında gerçekleştirilmiştir. Tüm hücreler %1 Penisilin ve streptomisin (Pen/Stp) içeren %10 FBS-DMEM yüksek glükozlu besiyerinde 37°C'de nemlendirilmiş %5 CO₂ içeren doku kültürü inkübatöründe büyütülmüştür.

Çalışmalarımızda kullanılan HEK293 (ATCC® CRL-1573™) hücre hattının kökeni insan embriyonik böbrek hücreleridir ve ATCC'den satın alınmıştır. HaCaT hücre hattı ise yetişkin immortal insan keratinosit hücreleridir ve DKFZ'den hibe olarak alınmıştır.

5.2.4.1. HEK293T ve HaCaT Hücrelerinin Çözülmesi

Sıvı nitrojen tankı içerisinde saklanan hücreler sıvı nitrojenden çıkarılmadan önce, %20 FBS, 1%Pen/Stp-DMEM yüksek Glukoz içeren besiyeri hazırlandı ve soğutuldu. Hücre sıvı azottan çıkarıldı ve içerisinde bezelye büyüklüğünde buz parçası kalacak şekilde 37 °C su banyosunda çözüldü. Çözülen hücreler üzerine soğutulmuş %20 FBS-Pen/Stp-DMEM içeren besiyeri eklenerek 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant döküldü ve yıkama tekrarlandı. Son olarak hücreler %20 FBS ve %1

Pen/Stp içeren yüksek glukozlu DMEM içerisinde süspanse edilerek T25'lik flaska ekildi. Ertesi gün medyum %10 FBS DMEM Pen/Strp ile değiştirildi.

5.2.4.2. HEK293T ve HaCaT Hücrelerinin Pasajlanması

Hücreler tüm yüzey tabanını tamamen kaplamadan önce yaklaşık %80-90'lık konfluensiye sahip olduğunda pasajlandı. Pasajlanması planlanan hücrelerin üzerinden besiyeri uzaklaştırıldı ve PBS ile yıkandı. T25 flaska 1 ml ve T75 flaska 3 ml olacak şekilde tripsin/EDTA (T/E) eklenerek inkübatöre kaldırıldı. HEK293 hücreleri yaklaşık 1-2 dakika, HaCaT hücreleri ise 5-7 dakika T/E'ya maruz bırakıldı. Yüzeyden ayrılan hücrelerin üzerine T/E reaksiyonunu sonlandırmak amacıyla T25'e 3-4 ml, T75'e 10 ml olacak şekilde %10 FBS içeren besiyeri eklendi. Hücreler flasktan toplanarak falkon tüpe aktarıldı ve 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Hücre pelleti uygun hacimde besiyeri ile süspanse edildi ve flasklara aktarıldı. Pasajlanmalar esnasında Tablo 10'da belirtilen flask/tabak yüzey alanları, konfluensi ve hücre sayısı değerleri gözetildi.

Tablo 10. Hücre kültüründe kullanılan flaskların yüzey alanları ve önerilen hücre sayıları

Kullanılan flask tipi	Flask yüzey alanı (cm ²)	Ekim yoğunluğu	Konfluent Hücre yoğunluğu	Trypsin (ml 0.05% tripsin, 0.53 mM EDTA)
35mm	9	0.3 x 10 ⁶	1.2 x 10 ⁶	1
60mm	21	0.8 x 10 ⁶	3.2 x 10 ⁶	2
100mm	55	2.2 x 10 ⁶	8.8 x 10 ⁶	3
150mm	152	5.0 x 10 ⁶	20.0 x 10 ⁶	8
6-well	9	0.3 x 10 ⁶	1.2 x 10 ⁶	2
12-well	4	0.1 x 10 ⁶	0.4 x 10 ⁶	1
24-well	2	0.05 x 10 ⁶	0.2 x 10 ⁶	0.5
T-25	25	0.7 x 10 ⁶	2.8 x 10 ⁶	3
T-75	75	2.1 x 10 ⁶	8.4 x 10 ⁶	5
T-160	162	4.6 x 10 ⁶	18.4 x 10 ⁶	10

5.2.4.3. Hücrelerin Dondurulması

Dondurulması planlanan hücreler ilk etapta T/E solüsyonu ile toplanarak santrifüj edildi. Hücreler daha evvel soğutulmuş antibiyotik içermeyen %10 FBS-DMEM medyumunu ile bir kez yıkandı. T25'ten toplanan hücre pelleti 900 µl soğutulmuş %20 FBS-DMEM içerisinde süspanse edildi ve 10 dakika buzda bekletildikten sonra 100 µl DMSO (%10) eklenerek buzda 20 dakika daha bekletildi. T25'den toplanan hücreler bir adet dondurma tüpünde, T75'den toplanan hücreler ise üç adet dondurmali tüpünde donduruldu. Dondurulacak hücreler -70°C'de bir gün bekletildi sonrasında uzun dönem saklamak için sıvı azot tankına transfer edildi.

5.2.4.4. HEK293 Memeli Hücrelerinin Transfekte Edilmesi

5.2.4.4.1. Kalsiyum Fosfat Yöntemi ile Transfeksiyon

Memeli hücrelerine ekspresyon vektörlerini transfer etmek için (transfeksiyon) Tablo 10'da belirtildiği üzere, altı kuyucuklu tabaklar için 3x10⁵-5x10⁵ arasında hücre yaklaşık %30-40 konfluent olacak şekilde, %10 FBS içeren antibiyotiksiz DMEM besiyerine eklendi Yüzeye yapışmaları için hücreler doku kültürü inkübatöründe bir gün inkübe edildi.

HEK293 hücrelerinin transfeksiyonu için Kalsiyum Fosfat transfeksiyon metodu kullanılarak gerçekleştirildi (51). Transfeksiyon esnasında altı tabaklı petri tabaklarına %30-40 konfluent olacak şekilde 1.8 ml medyumda HEK293 ekildi. Her bir kondisyon için 1-2 µg plazmid DNA'sı 20 µl steril su içinde seyreltildi. Diğer taraftan 2.5 M CaCl_2 'den 10 µl alınarak 80 µl steril distile suyun içinde 10 kez seyreltildi. Final hacim 100 µl olacak şekilde 20 µl DNA-su karışımına 80 µl CaCl_2 -su karışımı eklendi. Sonrasında DNA- CaCl_2 karışımı düşük hızda vortekslenirken üstüne damla damla 100 µl 2xHEPES eklenerek, toplam hacim 200 µl'ye çıkartıldı. DNA- CaCl_2 -HEPES karışımı 20 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Ardından karışım DMEM-FBS içerisinde bulunan hücrelerin üzerine damla damla eklendi. 24 saat sonra medyum Pen/Stp antibiyotiği içeren medyumla değiştirildi. Transfeksiyondan 24 saat sonra protein ekspresyon analizi gerçekleştirildi.

5.2.4.4.2. HaCaT Hücrelerinin Lipofektamin Yöntemi İle Transfeksiyonu

HaCaT hücreleri immunofloresan deneyinde kullanılmak üzere 12 kuyucuklu tabak yüzey alanına sahip floresan için kullanılan iki odacıklı lamlara 5×10^5 hücre olacak şekilde 10% FBS içeren antibiyotiksiz DMEM besiyeri ile ekildi. Ertesi gün Lipofektamin-2000 ile üretici firmanın talimatları doğrultusunda transfeksiyon gerçekleştirildi. 1 µg DNA için 2 µl Lipofectamine 2000 ajanı kullanıldı. DNA ve ajan opti-MEM medyumunda seyreltildi. DNA ve Lipofektamine ajanı karıştırılıp 20 dakika inkübe edildikten sonra hücelere dağıtıldı. Transfeksiyondan 36-48 saat sonra hücreler sabitlenerek immünofloresan yöntemi gerçekleştirildi.

5.2.5. RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi

5.2.5.1. Hücreden RNA İzolasyonu

HaCaT hücre hattından RNA izolasyonu EZNA Total RNA kiti ile üretici firmanın talimatları doğrultusunda gerçekleştirildi. Önerildiği üzere 1×10^7 hücre sayısını aşmayacak şekilde hücreler Tripsin/EDTA ile yüzeyden kaldırıldı ve 1200 rpm de 5 dakika santrifüj yapılarak toplandı. Sonrasında hücre süspansiyonu RNaz olmayan tüpe aktarılacak şekilde 500g'de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Hücre sayısı 5×10^6 'den azsa 500µl, 5×10^6 - 1×10^7 , arasındaysa 1000µl+20 µl BME olacak şekilde RNA solvent ajanı eklenerek gri şırınga ucu ile 10-15 kez alıp verilerek homojenize edildi ve 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Sonrasında, 200 µl ($>5 \times 10^6$ - 1×10^7 hücre için) kloroform eklendi, 20 saniye vortekslendi ve 3 dakika oda

sıcaklığında bekletildi. 4°C’de 13.000xg’de 15 dakika santrifüj edildikten sonra üstteki faz temiz ependorfa aktarıldı. Süpernatana volümü kadar %70 etanol eklenerek, vortekslendi ve 2 ml toplama tüplü kolona aktarılarak oda sıcaklığında 10.000xg’de 1 dakika santrifüj edildi. Kolon 500 µl RNA yıkama solüsyonu kullanılarak yıkandı ve 10.000 g ‘de 30 sn santrifüj edildi. Kolon temiz bir 2 ml toplama tüpüne aktarıldı. 500 µl RNA yıkama buffer II eklendi ve oda sıcaklığında 10,000 g’de 1 dakika santrifüj edildi. Yıkama 500 µl RNA yıkama buffer II ile tekrarlandı ve aynı koşullarda santrifüj edildi. Fazla alkolü uzaklaştırmak için kolon boş olarak 2 dakika döndürüldü. Kolon 1,5ml’lik temiz birependorfa transfer edildi. RNA’yı ayrıştırmak için kolonun ortasına 45-75 µl DEPC ile muamele edilmiş su eklenerek oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi ve sonrasında 10.000 g’de 1 dakika santrifüj edilerek RNA tüpte toplandı. RNA konsantrasyonu Nanodrop cihazı ile belirlendikten sonra, örnekler -70°C’ye kaldırıldı.

5.2.5.2. RNA’dan cDNA Sentezi

İzole edilen RNA dan cDNA sentezi “Super Script III First Strand Synthesis System” kiti kullanılarak yapıldı. Yöntem üretici firmanın talimatları doğrultusunda Tablo 11 ve Tablo 12’de belirtildiği şekliyle gerçekleştirildi.

Tablo 11. Reaksiyon karışımı tablosu (cDNA sentez tablosu)

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

Yukarıdaki tablo gözetilerek hazırlanan karışım 65°C de 5 dakika inkübe edildikten sonra en az 1 dakika buzda bekletildi.

Tablo 12. cDNA sentezi için hazırlanan primer karışımı listesi

Bileşenler	1 X Reaksiyon
≈5 µg total RNA	8 µl
Primer (50 ng/ µl rastgele heksamerleri)	1 µl
10 mM dNTP karışımı	1 µl
DEPC- su	10 µl' ye tamamlanır.

Tablo 12’de belirtildiği şekliyle hazırlanan 10 µl’lik karışım, Tablo 11’de belirtildiği şekliyle hazırlanan RNA/primer karışımına eklendi. Nazikçe karıştırıldı ve cDNA sentezi için Thermo cycler kullanılarak 10 dakika 25°C de 50 dakika 50°C de, 5 dakika 85°C’de tek döngü olacak şekilde reaksiyon gerçekleştirildi. Sonrasında örnekler 1 µl RNase H eklendi ve 20 dakika 37°C de inkübe edildikten sonra -20°C de saklandı.

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

DNA ve RNA moleküllerinin miktar ve kalite tayinlerinde spektrofotometrik yöntemlerden yararlanıldı. Ölçümler NanoDrop cihazında 1 µl örnek kullanılarak yapıldı. DNA ya da RNA örneklerinin OD260/OD280 değerlerine bakılarak miktarları ve saflıkları belirlendi.

5.2.7. DNA ve RNA Analizleri için Agaroz Jel Elektroforezi

Analiz edilecek DNA ya da RNA moleküllerinin boyutuna göre 0,8 ya da 1.5 g agaroz 100 ml 1x TAE içerisinde kaynatılarak çözüldü. Çözeltinin sıcaklığı 55-60°C’ ye düştüğünde 0.1-0.2 µg/ml son konsantrasyonda etidyum bromür eklendi ve yatay jel kasetlerine döküldü. Agaroz jel donduktan sonra TAE tamponu içeren elektroforez tankına yerleştirildi. DNA örnekleri 5:1 oranında (DNA/Yükleme tamponu) 10x konsantre DNA yükleme tamponu ile karıştırılarak jele yüklendi. Elektroforez işlemi 60-100 V sabit direnç altında 30-45 dakikada tamamlandı. DNA bantları UV transillüminatör ile görünür hale getirildi ve fotoğrafları çekildi.

5.2.8. DNA’nın Jelden Pürifikasyonu

Amplifiye edilen *RIPK4* ve *PLAGL2* PCR ürünleri %0,8 lik jele yüklendi ve 100 volt doğru akım altında 1 saat yürütüldükten sonra Qiagen Gel Extraction Kit ile üretici firmanın talimatları doğrultusunda jelden temizlendi. Bu işlemde özetle temizlenmek istenen DNA fragmenti agaroz jelden kesildi ve tüpün darası alındıktan sonra jel parçasının miktarı belirlendi (100 mg jele yaklaşık 100 µl) ve 1 ölçek jele, 3 ölçek

Buffer QG eklendi. Jel tamamen eriyinceye kadar 2-3 dakika da bir vortekslenerek 50 °C de 10 dakika inkübe edildi. Tamamen eriyince 1 ölçek izoprapanol eklendi ve karıştırıldı. Karışım kolona aktararak 13000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi. Ardından 500µl QG Buffer eklenerek 13000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi. Kolon PE tamponu ile yıkanarak DNA elusyon bufferı ile temiz bir ependorfa elute edildi.

5.2.9. *RIPK4* ve *PLAGL2* Klonlarının Dizilenmesi

RIPK4 ve PLAGL2 vektörleri kantitatif ve kalitatif analiz yapılmasını sağlayan markör (NEB 100 bp DNA ladder) veya 0.2 µg pGEM plazmidi (3272 bç) ile birlikte %0.8’lik agaroz jelde yürütüldü. Markör ve pGEM miktarı gözetilerek her bir dizileme reaksiyonuna konulacak kalıp DNA miktarı yaklaşık 50-100 ng arasında olacak şekilde ayarlandı. RIPK4 ve PLAGL2 klonlarının dizilenmesinde Tablo 13’de belirtilen primerler kullanıldı.

Tablo 13. RIPK4 ve PLAGL2 giriş vektörlerinin sekanslanmasında kullanılan primerler

Primerin Adı	Primerin 5'-3' Baz Dizisi	Primer Bank
PLAGL2_1*_Forward_attB1	ggggacaagttgtacaaaaagcaggcttc atgaccacattttcaccagcgtcc	1034
PLAGL2_1488*_Reverse_attB2	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtcctactggaatgcttgatggaacgag	1036
PLAGL2_638*_Forward	acacaggccgtaaggacttc	1052
PLAGL2_335*_Reverse	gtgaggattccagagggtagc	1053
PLAGL2_1104*_Forward	aagcctgtctctctcatccg	1054
PLAGL2_403*_Reverse	tcttaccgcactcagagcag	1055
RIPK4_179*_Forward	caggagcgcagtgaggctttggaagaagccaag	485
RIPK4_2185*_Reverse	gctcgtcgaacaggtcaatg	484
RIPK4_1502*_Forward	gatgaggaccagtgagacgc	483
RIPK4_504*_Forward	acgggctgtcccactcgcatg	972
RIPK4_1*_Forward_attB1	ggggacaagttgtacaaaaagcaggcttcaggaggcgacggcgaggac	987
RIPK4_2352*_Reverse attB2	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtcctaggtcttgcttcgccgagg	992

*Kullanılarak belirtilen kısım sekansın başladığı baz sayısını göstermektedir.

Döngüsel dizileme reaksiyonu BigDye® Terminatör v3.1 Cycle Sequencing Kiti kullanılarak yapıldı. Bir reaksiyonluk karışım Tablo 14’da belirtildiği üzere hazırlandı.

Tablo 14. Dizileme reaksiyonu için PCR karışımı

PCR Karışımı	1X
BigDye	1.5 µl
5X Buffer	1 µl
İleri ya da Geri Primer (10 pmol/µl)	0.5 µl
Vektör (50-100 ng)	0.5 µl
dH2O	6.5 µl
Toplam	10 µl

Döngüsel dizileme reaksiyonu için Applied Biosystems 9700 Thermocycler cihazı kullanıldı. PCR koşulları; başlangıç denatürasyonu 96°C’de 2 dakika, 25 döngü olacak şekilde denatürasyon 96°C’de 15 sn, bağlanma 50°C 20 sn, Sentez 60°C’de 2 dakika olarak belirlendi. Döngüsel dizileme reaksiyonu sonucunda elde edilen PCR ürünleri Sephadex®G-50 ile aşağıdaki temizleme protokolü kullanılarak saflaştırıldı;

İlk olarak 1 g Sephadex®G-50 tartılarak 12- ml dH₂O içerisinde çözüldü ve çalışmaya başlamadan önce en az 30 dakika 4°C’de bekletildi. Ardından kolonlara 600 µl Sephadex®G-50 eklendi ve 750 g’de 2.5 dakika santrifüj edildi. Toplama tüplerindeki sıvı uzaklaştırıldı ve kolonlar 1.5 ml’lik ependorf tüplerin üzerine alındı. Döngüsel dizileme reaksiyonu ile çoğaltılan PCR ürünleri kolondaki Sephadex®G-50 üzerine dikkatlice eklenerek 750 g’de 5 dakika santrifüj edildi. Saflaştırılan PCR ürünleri 96 kuyulu platelere 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 *RIPK4* (Ref Seq: NM_014264.2) ve *PLAGL2* (Ref Seq: NM_002657.3) dizileri ile karşılaştırıldı.

5.2.10. Protein Analiz Yöntemleri

5.2.10.1. Hücrelerden Protein Lizatı Eldesi

Protein analizi yapılmak istenen hücreler, buza alındı ve +4°C’de soğutulmuş PBS ile dikkatlice yıkandı. Transfeksiyonun yapıldığı altı kuyucuklu tabaklarda bulunan hücrelerin üstüne proteaz ve fosfataz inhibitörlerinin eklendiği %0,5 Triton X100 içeren 250 µl TNTE patlatma tamponu eklendi ve 30 dakika buz üzerinde orbital çalkalayıcıda sallandı. Hücre kazıyıcı kullanılarak lisat ependorf tüplere aktarıldı ve 4°C’de 13.000 g’de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatant temiz ependorf tüpe aktarıldıktan sonra analiz edilmek üzere -20°C’ye kaldırıldı.

5.2.10.2. Western Blot Yöntemi

5.2.10.2.1. SDS-PAGE Jellerinin Hazırlanması

1. SDS-PAGE Jel Elektroforez Camlarının Hazırlanması

Camlar distile su ile yıkandı ve %70’lik etil alkol ile temizlendi. Temizlenen camlar jel standına yerleştirildi.

2. Ayırma Jelinin Hazırlanması

RIPK4 92 kDa ve PLAGL2 54 kDa moleküler ağırlığında olduklarından, her iki proteininde aynı jelde görüntülenebilmesi için ayırma jeli %7.5 olarak belirlendi. Uzun ve kısa camlar birleştirilerek jel hazırlama standına yerleştirildi. SDS-PAGE jeli için gereken ajanlar Tablo 15’de belirtildiği şekliyle hazırlandı. Ayırma jeli hazırlanıp,

yükleme jeline de yer ayırmak için, kısa camın yaklaşık 1 cm altına kadar döküldükten sonra ayırma jelinin hava ile temasının engellenmesi için izopropanol eklendi.

Tablo 15. Ayırma Jeli İçeriği

Malzemeler	%7.5
ddH ₂ O	2.73 ml
Acrylamid (40% acrylamid mix)	0.94 ml
1.5 M Tris-HCl pH 8.8	1.25 ml
10% SDS	50 µL
*10% APS	50 µL
TEMED	5 µL
Toplam	5 ml

*Taze hazırlanmalıdır.

3. Yükleme Jelinin Hazırlanması

Ayırma jeli polimerleştikten sonra (yaklaşık 1 saat), jelin üzerindeki izopropanol dökülerek uzaklaştırıldı ve bol suyla yıkandı. Tablo 16’da belirtildiği şekliyle hazırlanan yükleme jeli camlar arasında kalan 1 cm’lik boşluğa aktarıldı ve 10 kuyucuklu tarak camlar arasına yerleştirildi. Polimerizasyon için 30 -60 dakika beklendi.

Tablo 16. 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

5.2.10.2.2. SDS-PAGE Jellerinin Elektroforezi

1. Örneklerin Yüklenmesi ve Yürütülmesi

Örneklerin üzerine yükleme tamponu (5x) son konsantrasyonu 1x olacak şekilde eklendi ve 95°C’de 7 dakika kaynatıldı. Kuyucuklara protein marköründe 5 µl olmak üzere örneklerden 20-30 µl yüklendi. Jel ilk önce 75 Volt’da 10 dakika sonra 100 Volt’da yaklaşık 60-90 dakika yürütüldü.

2. Western Blotlama (Islak Blotlama)

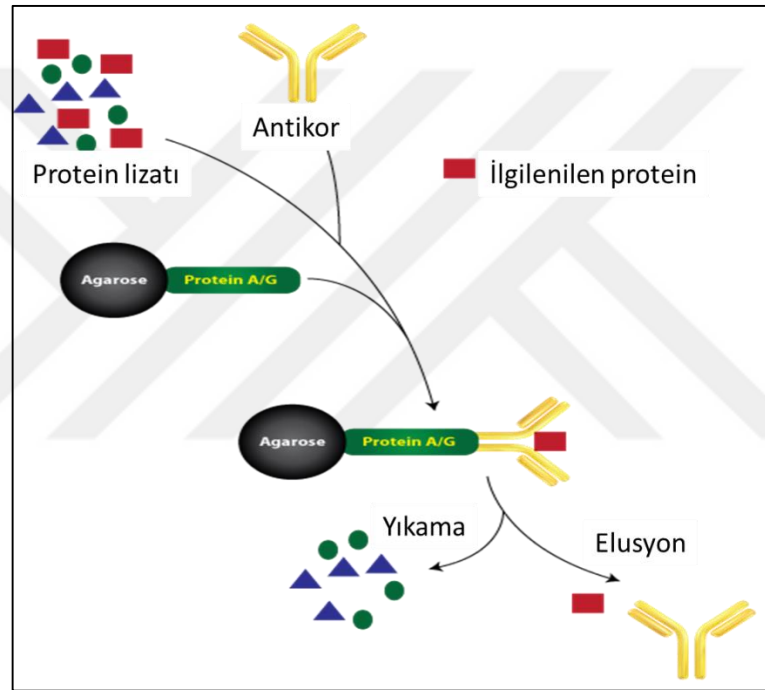
SDS PAGE jelinin membrana transferi için spatula yardımı ile camlar birbirinden yavaş ve dikkatlice ayrıldı ve blotlama öncesinde dengelenmesi için transfer tamponuna alındı. Bu esnada, jelle aynı büyüklükte PVDF membranı kesilerek soğutulmuş Metanol'de aktive edildi ve sonrasında transfer tamponuna alınarak dengelendi. Blotlama kasetinin siyah (anot) yüzüne önceden transfer tamponunda ıslatılmış bir adet sünger yatak ve iki adet ince 3 MM Whatman kağıdı yerleştirildi. Kağıdın üstüne önceden dengelenmiş jel hava kabarcığı kalmayacak şekilde yerleştirildi. Jelin üstüne dengelenmiş PVDF membranı yerleştirildi. Membranın üstüne bir adet ince 3MM Whatman kağıdı ve ıslatılmış sünger yerleştirilerek sandviç oluşturuldu. Kaset transfer tamponu içeren tanka anot (siyah) ve katot (kırmızı) tarafta olacak şekilde yerleştirildi. Transfer +4 °C'de 100 Voltta bir saat yapıldı. Transfer esnasında tank magnetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Transfer sonrasında membran kasetten çıkarıldı, transferin olduğu taraf işaretlendi, beş kez PBS ile yıkandıktan sonra bloklama tamponu eklenerek 1-2 saat oda sıcaklığında veya gece boyu +4 °C'de orbital karıştırıcıda inkübasyona bırakıldı. Bloklama solüsyon tipleri, primer antikor dilüsyonları ve inkübasyon zamanları antikorun ürün kataloğunda yer alan öneriler doğrultusunda hazırlandı. GFP antikor 1/2500 olacak şekilde %3 BSA ve Flag antikor 1/5000 olacak şekilde %3 lük yağsız süt tozu bloklama solüsyonunda seyreltildi. Birincil antikor inkübasyonundan sonra membran beş kez %0.5 lik Tween 20 içeren PBS ile (PBST) ile çalkalanarak yıkandı. Daha sonra membran bloklama solüsyonu içerisinde, Anti-Flag primer antikor için 1/5000 seyreltilmiş HRP konjuge anti fare, Anti-GFP antikor için 1/10000 HRP konjuge anti-tavşan ikincil antikor solüsyonu ile orbital karıştırıcıda yavaş hızda çalkalanarak 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Bu inkübasyondan sonra membran tekrar beş kez beş dakika orta hızda PBST içerisinde yıkandı. Membran son kez PBS ile yıkandıktan sonra pens ile kenarından tutularak temiz bir kaba aktarıldı. Işımayı saptamak için 0.5 ml ECL solüsyonu (BioRad ECL bileşenleri 1:1 oranında karıştırıldı) ile 1-2 dakika muamele edildi. BioRad Chemidoc Görüntüleme Cihazı yardımı ile membran görüntülendi ve analiz edildi.

5.2.10.3. Immünopresipitasyon

5.2.10.3.1. Immünopresipitasyon Yöntemi

Küçük ölçek afinite saflaştırma yöntemlerinden biri olan ve protein-protein etkileşimlerinin analizinde kullanılan immünopresipitasyon (IP) yöntemi, ilgilenilen

proteine özgül antikorlar kullanılarak ilgilenilen proteinle beraber etkileştiği proteinlerin katı matriks kullanılarak çöktürülmesi işlemidir. IP deneyinde, antikorlara Fc bölgesinden bağlanma kapasitesine sahip protein G kaplı agaroz boncukları, antijen-antikor kompleksinin bağlanabileceği katı matriksin oluşturulmasında kullanıldı. IP yönteminin temelinde ilgilenilen proteine özgül antikor kullanılarak, proteinin ve etkileştiği proteinlerin boncuklara bağlanması yer alır. Boncuklara bağlanan kompleksin protein jelinde yürütülmesi ve etkileştiği proteine özgü antikorların kullanılmasıyla gerçekleştirilen immüno blot yöntemiyle iki proteinin etkileştiği gösterilmiş olur (Şekil 20) (52).



Şekil 20. İmmünpresipitasyon yöntemi

5.2.10.3.2. Protein Boncukların Hazırlanması

Ticari olarak satın alınan G agaroz boncuklar (Roche) etanol veya PBS içerisinde süspanse olarak bulunduğu boncukların içerisinde bulunan koruyuculardan arındırılması ve hücrelerin patlatıldığı TNTE patlatma tamponunda dengelenmesi için, boncuklar IP Yıkama tamponu içerisinde dönen tekerlek şeklindeki çalkalayıcı üzerinde beş kez beşer dakika %0.1 TritonX100 içeren 1X TNTE ile 4°C de yıkandı. Yıkamalar arasında boncuklar 3000 g’de 1 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Boncuklara zarar vermemek amacıyla boncukların alınması ve dağıtılması esnasında pipet uçlarının uçları kesildi. Boncukların üretildiği firma tarafından 2-5 µg Antikor için 10-20 µl boncuk

önerildiğinden örnek başına gereken boncuk hacmi hesaplanarak, deneyde kullanılacak kadar boncuk deneyin yapıldığı gün yıkanarak hazır hale getirildi.

5.2.10.3.3. Ön temizlik (Pre-clearing)

G agaroz boncuklar yüksek bağlanma afinitesine sahiptir. Boncukların hücre lizatında bağlanması istenilen proteinin haricinde bir proteine bağlanmaması için antikör koymadan önce lizat boncuklarla inkübe edilir. Bu şekilde lizattan boncuklara özgül olmayan bir şekilde yüksek afinite gösteren proteinler temizlenmiş olur. Bu işleme IP'de ön temizlik (pre-clearing) adı verilir.

IP deneyi için, HEK293 hücre hatları FLAG-RIPK4, GFP-PLAGL2 ve domainlerini ekspres eden plazmidlerle tek başlarına ya da beraber transfekte edildi. IP için altı kuyucuklu tabağın aynı koşulda transfekte edilmiş iki replike kuyucuğu kullanıldı. Transfeksiyondan yaklaşık 40 saat sonra, her bir kuyucuğa 500 µl TNTE patlatma tamponu eklendi sonra bu lizatlar birleştirilerek 1 ml'e tamamlandı. IP'den önce 1 ml hücre lizatından 50 µl alınarak total protein analizi için ayrıldı. Geriye kalan lizata ön temizlik yapılmak üzere 20 µl boncuk eklendi ve dönen tekerlekte 30 dakika-1 saat süre ile düşük hızda 4°C de döndürüldü. Ardından 3000 g de 1 dakika santrifüj edildi. Çöken boncukların alınmamasına özen göstererek süpernatant temiz tüpe alındı.

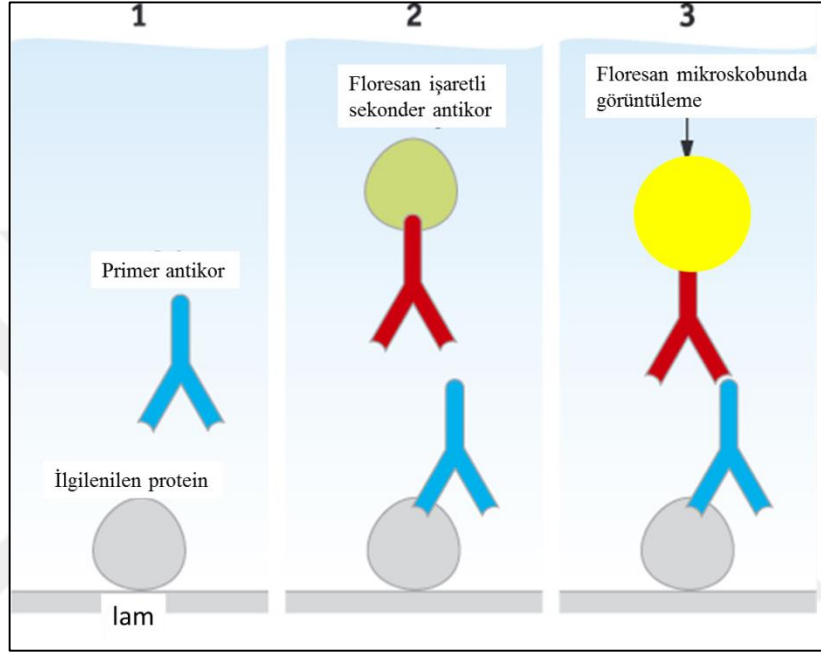
5.2.10.3.4. İmmünpresipitasyon (IP) Yöntemi

IP'den önce ön temizliği yapılan lizatların içerisine boncuklara bağlanması istenen proteine özgü antikordan 2-5 µg arası eklenerek dönen tekerlekte +4 °C da bir saat ya da gece boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonrası her bir örneğe önceden %0.1 TritonX100 içeren TNTE yıkama tamponunda dengelenmiş olan boncuklardan 20 µl eklendi ve tüpler dönen tekerlekte 4°C'de düşük hızda bir saat inkübe edildi. Ardından örnekler 3000 g'de 1 dakika santrifüj edilerek boncuklar toplandı. Boncuklar IP yıkama tamponu ile beş kez beşer dakika yıkandı. Yıkama işleminden sonra her bir örneğin üzerine 1:1 oranında 2x protein yükleme tamponu koyularak, 7 dakika 99°C de kaynatıldı. 3000 g'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra boncuklardan ayrılan süpernatant immunoblot yöntemi ile analiz edilmek üzere SDS-PAGE jeline yüklendi.

5.2.10.4. İmmünfloresan (IF) Yöntemi

İmmünfloresan (IF) yöntemi ilgilenilen proteinlerin hücredeki yerleşimlerinin gösterilmesinde kullanılan bir tekniktir. Bu yöntemde, ilk önce hücreler yapılarının bozulmaması için sabitlenir. Sonrasında sabitlenen hücrelerde antikörlerin geçebilmesi

için deterjan kullanılarak delikler oluşturulur. Antikorların zgl olmayan şekilde zemine bağlantısını engellemek için lamın yüzeyi bloklanır. Bloklandıktan sonra, ilk önce ilgilenilen proteinlere özgül primer antikorları ile inkübe edilir ve sonrasında da primer antikorları tanıyan farklı floresan proteinleri ile işaretli sekonder antikorlar kullanılarak proteinlerin hücre içi lokalizasyonları floresan mikroskop ile analiz edilir (şekil 21).



şekil 21. İmmünfloresan yöntemi

IF deneyinde, odacıklı lamlarda bulunan HaCaT hücreleri Flag RIPK4 ve GFP-PLAGL2 ekspres eden plazmidlerle transfekte edildi. Transfeksiyondan yaklaşık 30 saat sonra oda sıcaklığında bulunan PBS ile hücreler birkez yıkandı. Hücreler %4 PFA ile 10 dakika oda sıcaklığında tutularak fiksleendi. Fiksleme sonrasında beşer kez PBS ile yıkandı. Hücre membranında delikler oluşturmak için, hücreler PBS içerisinde bulunan %0.1 Triton X-100 solüsyonu ile 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi ve arkasından beşer kez PBS ile yıkandı. Primer antikor konulmadan evvel, hücreler PBS içerisinde %10'luk keçi serumu ile bloklandı. Beşer kez PBS ile yıkandıktan sonra %10 keçi serumu içerisinde anti-GFP 1/250, anti-Flag ise 1/300 oranında seyreltildi ve +4°C'de 2 saat inkübe edildi. Hücreler beşer kez PBS ile yıkandı. Sonrasında anti-Mouse Alexa Flour 488 1/250 oranında ve anti-rabbit cy3 sekonder antikorı 1/500 oranında olacak şekilde %10 keçi serumu içerisinde seyreltildi ve 60 dakika karanlıkta oda sıcaklığında

inkübe edildi. PBS ile beşer kez yıkandıktan sonra odacıklar lamdan dikkatlice özel aparat ile ayrıldı. Örneklerle bir buçuk damla DNA boyası DAPI'yi de içeren ve floresan sinyali artırma etkisi olan DABCO solüsyonu eklendi. Lamin üzerine lamel kapatıldıktan ve şeffaf oje ile kenarları sabitlendikten sonra sinyalin gelişmesi için karanlıkta bir gece bekletildi. Ertesi gün örnekler Floresan mikroskop ile uygun filtreler kullanılarak analiz edildi.



6. BULGULAR

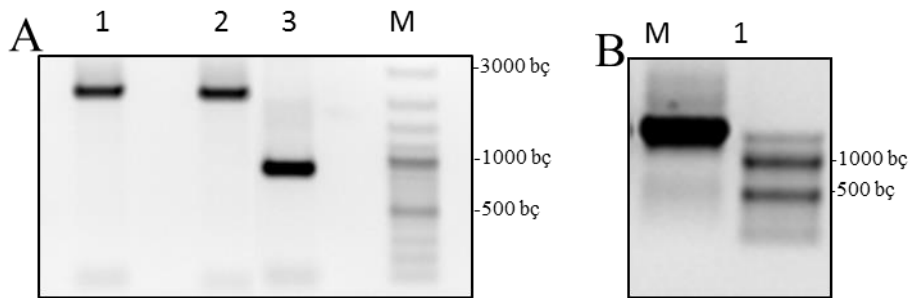
6.1. RIPK4 Ekspresyon Vektörlerinin Oluşturulması

Büyük ölçek maya ikili hibrit taraması, RIPK4'ün (91611 Da-2496 bp) büyük bir protein olması ve büyük proteinlerin maya ikili hibritte veriminin düşük olmasından dolayı, DKFZ firmasının önerisi üzerine, RIPK4'ün tamamı ile değil, Ser/Thr kinaz aktivitesinin olduğu N-terminal kinaz domaini (31.487 KDa-851 bp) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Bundan dolayı, maya ikili hibrit sonucunda ortaya çıkan proteinlerin RIPK4'ün tamamı ile etkileşiminin doğrulanması, ilaveten RIPK4'ün diğer domainlerinin de etkileşimdeki rollerinin belirlenmesi amacıyla, RIPK4'ün tamamı, RIPK4'ün N ve C-terminal domainleri, KR mutanları maya ve memeli ekspresyon vektörlerine Gateway sistemi kullanılarak klonlanmıştır.

6.2. RIPK4 Giriş vektörlerinin Oluşturulması

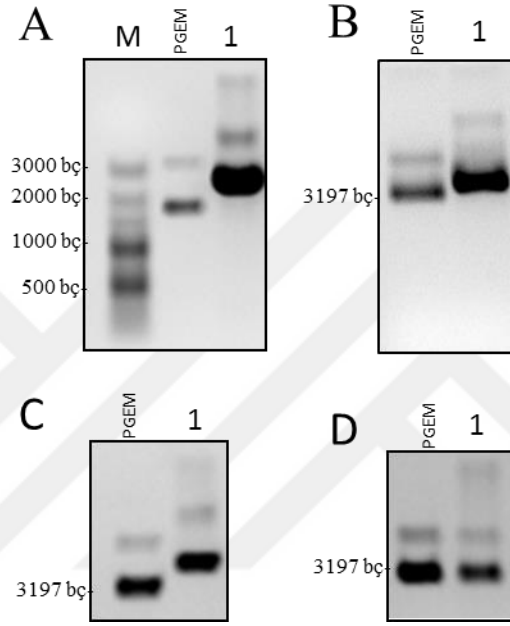
Ekspresyon vektörlerine aktarılmadan önce ilk etapta RIPK4 fragmanları pDONR201 donör vektörüne BP reaksiyon ile aktarıldı. Giriş klonu oluşturmak amacıyla, Genentech firmasından temin edilen pEF2 plazmidi içerisinde bulunan RIPK4 cDNA'sı, attB1, 2 ile çevrelenmiş RIPK4 özgül sekanslarının olduğu primerlerle PCR reaksiyonu ile çoğaltıldı ve RIPK4 FL ve K51R için 987/992, RIPK4 N ter için 987/1047, RIPK4 C ter (linker artı ankrin domaini) için 1101/992 numaralı primerler kullanıldı (Tablo 2) PCR fragmanları ile birlikte klonlamanın yapılacağı pDONR201 vektörü farklı agaroz jellerinde görüntülendi (Şekil 22).



Şekil 22. RIPK4 PCR ürünleri. A) 1: RIPK4 FL, 2: RIPK4 K51R, 3: RIPK4 N terminal, B) RIPK4 C terminal

Fragmanların ve vektörün konsantrasyonları markör kullanılarak belirlendikten sonra BP reaksiyonu ile RIPK4 gen fragmanları pDONR201 vektörüne transfer edildi.

Rekombinant vektörler *DH5a* suşuna transforme edilerek istenilen vektörü içeren Kanamisin dirençli bakteri kolonileri seçildi ve bu bakterilerden plazmid izolasyonu gerçekleştirildi. Plazmid izolasyonundan sonra pDONR201 vektörüne transfer edilen RIPK4 FL, K51R, N ve C terminal plazmidleri dizileme için konsantrasyon belirlemede referans olarak kullandığımız pGEM plazmidini ile beraber agaroz jele yüklenerek görüntülendi (Şekil 23).



Şekil 23. RIPK4 giriş vektörleri. A) 1: pDONR201-RIPK4 FL, B) 1: pDONR201-RIPK4 C ter, C) 1: pDONR201-RIPK4 K51R, D) 1: pDONR201-RIPK4 N ter, pGEM:3197 bp

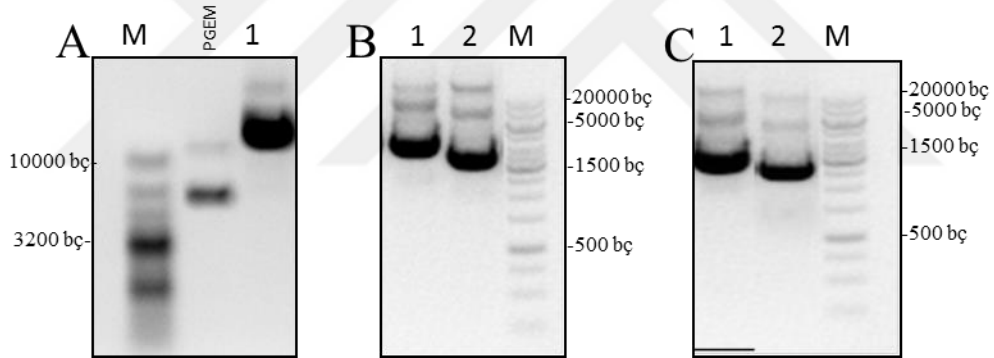
Şekilde gösterilen plazmidler pDONR giriş vektörüne klonlanan farklı RIPK4 gen fragmanlarının doğruluğu Tablo 13'te belirtilen primerler ile FL ve RIPK4 K51R için 1055/485/484/483/972/987/992, N terminal kinaz RIPK4 için 987/1047, RIPK4 C terminal (linker artı ankrin domain) için 1101/992 numaralı primerler kullanılarak dizilendi ve klonlar doğrulandı.

RIPK4'ün tamamı, N, C terminalleri ve kinaz mutant KR formu pDONR201 vektörüne klonlanıp, giriş klonları oluşturulduktan sonra, maya ve memeli hücrelerinde ekspres ettirmek üzere, attR rekombinasyon sekansları içeren varış vektörlerine LR reaksiyonu ile yerleştirildi.

Küçük ölçek maya ikili hibritte kullanılmak üzere RIPK4 ve domainleri GAL4 DNA bağlanma domaini ile füzyon oluşturacak şekilde, maya varış vektörü pGBT9'a

klonlandı. DH5 α suşuna transforme edildi. Ampisilin kullanılarak seçilen bakteri kolonilerinden plazmid saflaştırıldı.

RIPK4 maya vektörüne klonlandıktan sonra maya ikili hibrit analizinden elde edilen etkileşim sonuçlarını memeli hücrelerinde de göstermek amacıyla Giriş vektöründe (pDONR201) bulunan RIPK4, K51R, N-C terminal domainleri FLAG etiketi ile füzyon oluşturacak şekilde p3xFLAG-CMV/DEST varış vektörüne LR reaksiyonu ile transfer edildi. Rekombinant plazmidler bakteriye transforme edildi, ampisilin dirençli koloniler seçilerek plazmid purifikasyonu yapıldı. Plazmidler dizileme için konsantrasyon belirlemede referans olarak kullanılan pGEM ile birlikte agaroz jeline yüklenerek görüntülendi (Şekil 24). FL ve RIPK4 K51R ekspresyon vektörleri 1055/485/484/483/972/987/992, N terminal kinaz RIPK4 ekspresyon vektörü 987/1047, RIPK4 C terminal (linker artı ankrin domain) ekspresyon vektörü için 1101/992 numaralı primerler ile dizilenerek klonlar doğrulandı (Tablo13).



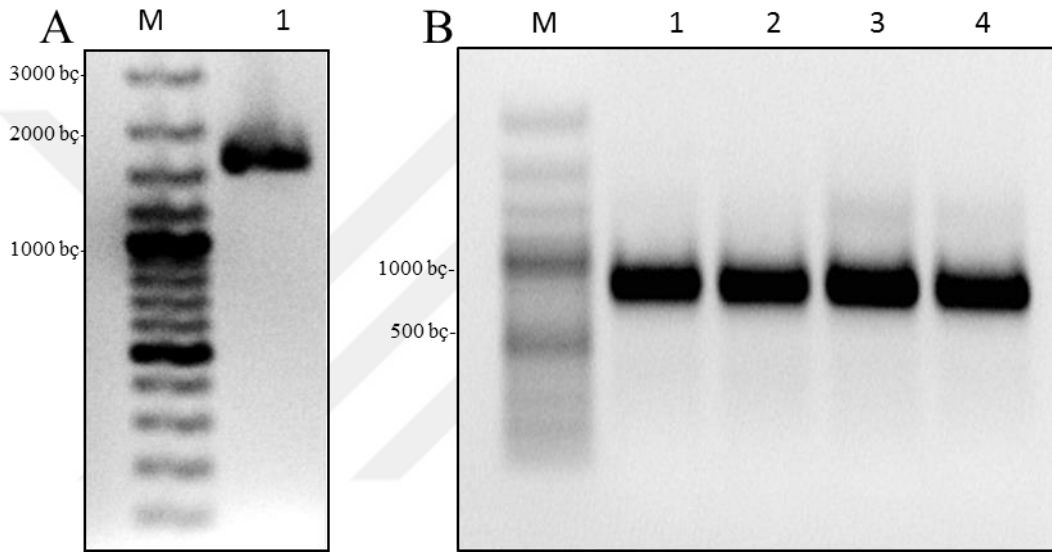
Şekil 24. RIPK4 ekspresyon vektörleri. A) 1: FLAG-RIPK4 FL, B) 1: FLAG-RIPK4 K51R, 2: FLAG- RIPK4 N ter, C) 1: FLAG-RIPK4 C ter, 2: BD- RIPK4 N ter, pGEM:3197 bp

6.3. PLAGL2 Ekspresyon Vektörlerinin Oluşturulması

RIPK4 N terminal'ün yem olarak kullanıldığı büyük ölçek maya ikili hibrit taraması sonucunda karşılaşılan PLAGL2 proteinini kodlayan cDNA analiz edildiğinde 1488 bç'lık PLAGL2 cDNA'sının C-terminalinin son 462 bç'lık kısmına denk geldiği görüldü. Bundan dolayı hem PLAGL2'nin hem de RIPK4'ün tamamının etkileşiminin doğrulanması, ilaveten PLAGL2'nin diğer domainlerinin de etkileşimdeki rollerinin belirlenmesi amacıyla PLAGL2'nin tamamı ve N, C-terminal domainleri maya ve memeli ekspresyon vektörlerine Gateway sistemi kullanılarak klonlandı.

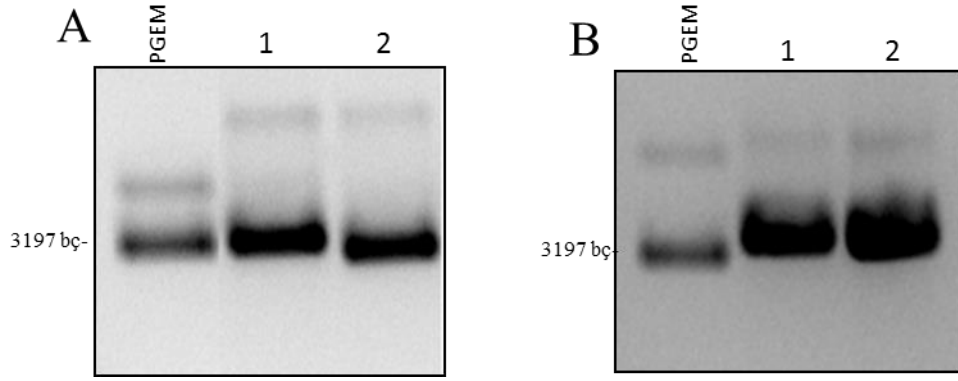
6.4. PLAGL2 Giriş Vektörlerinin Oluşturulması

Ekspresyon vektörlerine aktarılmadan önce ilk etapta PLAGL2 fragmanları pDONR201 donör vektörüne BP reaksiyon ile aktarıldı. giriş klonu oluşturmak amacıyla, ilk aşamada keratinosit hücrelerinden elde edilen RNA'dan cDNA sentezlendi ve attB 1, 2 sekanslarının çevrelediği PLAGL2'ye özgül sekanslarının olduğu Tablo 5'te belirtilen primerlerle; PLAGL2 FL için 1034/1036, PLAGL2 N-Ter için 1034/1099, PLAGL2 C-Ter için 1036/1100 numaralı primerler, çoğaltılan PLAGL2 fragmanları agaroz jelde görüntülendi (Şekil 25).



Şekil 25. A) *PLAGL2* PCR ürünleri. 1: *PLAGL2 FL*, B) 1-2: *PLAGL2 N ter*, 3-4: *PLAGL2 C ter*.

Fragmanların ve vektörün konsantrasyonları kantitatif markörle kıyaslanıp, göreceli olarak belirlendikten sonra RIPK4 gen fragmanları BP reaksiyonu ile pDONR201 vektörüne transfer edildi. Rekombinant vektörler *DH5α* suşuna transforme edilerek istenilen vektörü içeren Kanamisin dirençli bakteri kolonileri seçildi ve bu bakterilerden plazmid izolasyonu gerçekleştirildi. İzole edilen plazmidler, sekansta yükleme referansı olarak kullanılan pGEM plazmidi ile birlikte jelde görüntülendi (Şekil 26). Tablo 13'te belirtilen primerler ile pDONR giriş vektörüne klonlanan PLAGL2 FL için 1034/1089/1052/1053/1054/1055, PLAGL2 N ter için 1034/1099, PLAGL2 C-Ter için 1036/1100 primerleri ile klonlar sekanslanarak doğrulandı.

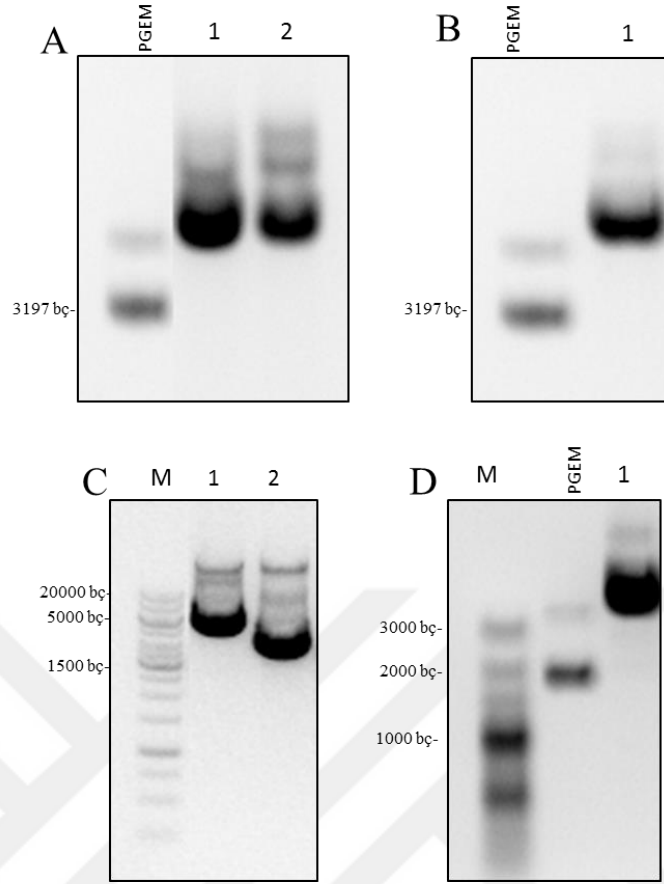


Şekil 26. PLAGL2 Giriş vektörleri. **A)** 1: pDONR201-PLAGL2 N Ter, 2: pDONR201-PLAGL2 C ter, **B)** 1: pDONR201-PLAGL2 FL (klon 1), pDONR201-PLAGL2 FL (klon 2), pGEM:3197 bp

PLAGL2'nin tamamı, N ve C terminalleri BP reaksiyonu ile pDONR201 vektörüne transfer edilerek giriş klonları oluşturulduktan sonra, LR reaksiyonu ile maya ve memeli hücrelerinde ekspres ettirmek üzere varış vektörlerine yerleştirildi.

Küçük ölçek maya ikili hibritte kullanılmak üzere PLAGL2 ve domainleri, GAL4 aktivating domaini ile füzyon oluşturacak şekilde maya varış vektörü pGAD424'e klonlandı.

PLAGL2'nin memeli hücrelerinde de maya ikili hibrit analizinden elde edilen etkileşim sonuçlarını göstermek amacıyla, PLAGL2 FLve N, C terminal domainleri GFP etiketi ile füzyon oluşturacak şekilde pcDNA/DEST53 varış vektörüne LR reaksiyonu ile entegre edildi. Rekombinant plazmidler bakteriye transforme edildi, ampisilin dirençli koloniler seçilerek plazmid purifikasyonu yapıldı ve pGEM ile birlikte agaroz jele yüklendi (Şekil 27). GFP varış vektörüne klonlanan, Tablo 13'te belirtilen, PLAGL2 FL için 1034/1089/1052/1053/1054/1055, N term PLAGL2 için 1034/1099, C-Term PLAGL2 için 1036/1100 primerleri kullanılarak klonlar doğrulandı.



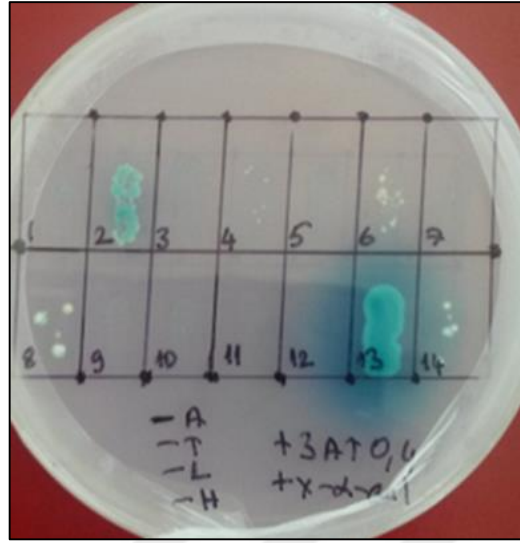
Şekil 27. PLAGL2 ekspresyon vektörleri. A) Memeli ekspresyon vektörleri; 1: GFP-PLAGL2 C Ter, 2: GFP- PLAGL2 N Ter, B) 1: GFP PLAGL2-FL, C) Maya ekspresyon vektörleri;1: AD- PLAGL2 C Ter, 2: AD-PLAGL2 N Ter, D) 1: AD-PLAGL2 FL, pGEM:3197 bp

6.5. Maya İkili Hibrit

Oluşturulan pGBT9 ve pGAD424 maya ekspresyon vektörleri Triptofan ve Lösin okzotrof Y187 ve AH109 maya suşlarına transforme edildi (Tablo 9). Triptofan kodlayan, GAL4 DNA bağlama domaini ile füzyon RIPK4 FL, K51R, N ve C ter vektörlerini içeren mayalar, triptofan içermeyen, Lösin kodlayan; GAL4 aktivasyon domaini ile füzyon, PLAGL2 FL, N ve C ter vektörlerini içeren mayalar ise Lösin içermeyen petrilere yayıldı ve koloniler belirene dek 3-5 gün boyunca inkübe edildi. Sonrasında transforme olmuş mayalardan seçilen haploit koloniler Tablo 17’te belirtilen koşullarda eşleştirildiler. Diploit mayalar X- α -GAL ve 0,4 mM 3-AT içeren SD besiyerinde (-Trp,-Leu,-Ade,-His) 7 gün boyunca inkübe edildi. Pozitif kontrol olarak deneye eklenen ve sürekli β -Galaktosidaz ekspres eden pCL1’in bulunduğu 13.koşulda beklenildiği üzere mayaların büyüdüğü ve mavi renk koloni verdiğinin görülmesi deney koşullarının uygun olduğunu gösterdi. Tüm eşleşmeler arasında yalnızca RIPK4 FL ve

PLAGL2 C ter'in bir arada ekspres edildiği ikinci koşulda, iki proteinin etkileşimi sonucunda raportör genlerin ekspres olmasından dolayı, belirgin bir büyüme ve mavi renk oluşumu görülürken diğer hiçbir koşulda etkileşim görülmedi. RIPK4 FL'ün tek başına olduğu 6.koşulda, PLAGL2 FL, PLAGL2 N ter ve Lamin ile birlikte ekspres edildiği sırasıyla 4, 8 ve 14. koşullarda belirgin bir büyüme olmamasına rağmen, birkaç kolonin büyümesi RIPK4 FL'ün az da olsa özgül olmayan bir şekilde raportörleri aktive ettiğini gösterdi. Bu koşulların dışında negatif kontrol olarak deneye dahil ettiğimiz RIPK4 ve PLAGL2'nin tek başlarına ya da Lamin proteiniyle birlikte eksprese edildikleri 5, 7, 9, 10, 11 ve 12. koşullarda da beklenildiği üzere büyüme görülmedi (Şekil 28).





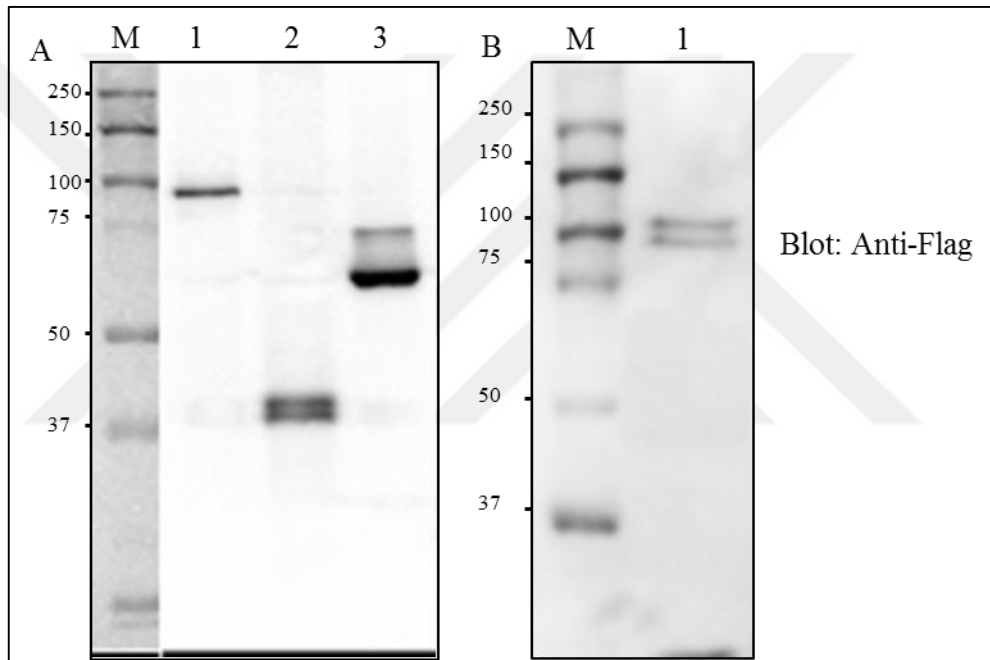
Şekil 28. Maya ikili hibrit sonuçları. Koşullar Tablo 17’de belirtilmiştir.

Tablo 17. Eşleşme (mating) koşulları

1	RIPK4 N Ter ve PLAGL2 C Ter
2	RIPK4 FL ve PLAGL2 C Ter
3	RIPK4 N Ter ve PLAGL2 FL
4	RIPK4 FL ve PLAGL2 FL
5	RIPK4 N Ter (negatif kontrol)
6	RIPK4 FL (negatif kontrol)
7	RIPK4 N Ter ve Lamin (negatif kontrol)
8	RIPK4 FL ve Lamin (negatif kontrol)
9	PLAGL2 C Ter (negatif kontrol)
10	PLAGL2 N Ter (negatif kontrol)
11	PLAGL2 C Ter ve Lamin (negatif kontrol)
12	PLAGL2 FL ve Lamin (negatif kontrol)
13	pCL1 (pozitif kontrol)
14	RIPK4 FL ve PLAGL2 N Ter

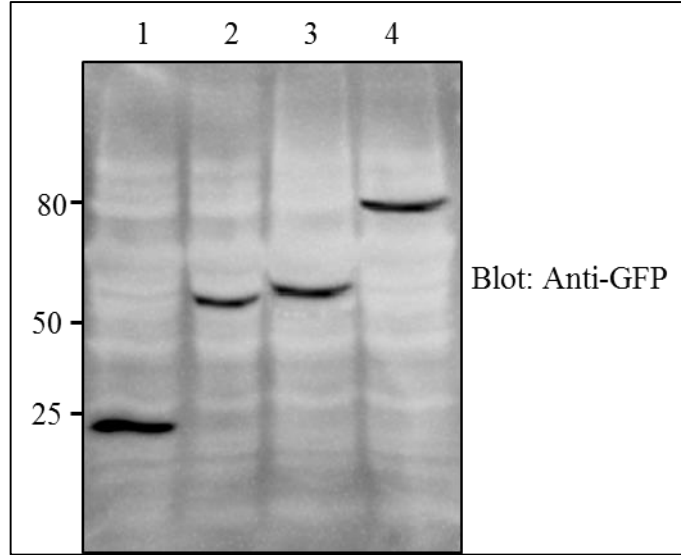
6.6. Memeli Hücrelerinde RIPK4 ve PLAGL2'nin Etkileşimlerinin Gösterilmesi

Bu doğrultuda ilk olarak HEK293 hücrelerinde klonlanan RIPK4 ve domainlerinin, ekspres edilip edilmediğini analiz etmek amacıyla, HEK293 hücreleri FLAG etiketiyle füzyon RIPK4 FL, RIPK4 K51R, RIPK4 N ve RIPK4 C terminal ekspresyon vektörleri ile transfekte edildi. Transfeksiyondan yaklaşık 40 saat sonra hücrelerden elde edilen protein lizatı poliakrilamit jelde yürütüldü ve proteinler membrana transfer edildi. Membran ilk olarak anti-FLAG (fare) primer antikorla daha sonra HRP konjuge anti-fare sekonder antikor ile inkübe edilerek görüntülendi (Şekil 29).



Şekil 29. Memeli hücrelerde RIPK4 ve domainlerinin ekspresyonlarının gösterilmesi. M: Precision Plus Protein Standart 250 kD, A) **1:** FLAG-RIPK4 K51R, **2:** FLAG- RIPK4 N Term, **3:** FLAG-RIPK4 C terminal, B) FLAG-RIPK4 FL

PLAGL2'nin ekspresyonunu analiz etmek amacıyla HEK293 hücreleri GFP etiketi ile füzyon PLAGL2 FL, N ve PLAGL2 C terminal ekspresyon vektörleri ile transfekte edildi. Transfeksiyondan 40 saat sonra hücrelerden elde edilen protein lizatları jelde yürütüldü, ardından membrana transfer edildi. Membran ilk olarak anti-GFP (tavşan) primer antikorla daha sonra HRP konjuge anti-tavşan sekonder antikor ile inkübe edildi ve görüntülendi. Marköre göre beklenil bantlar görüldü (Şekil 30).



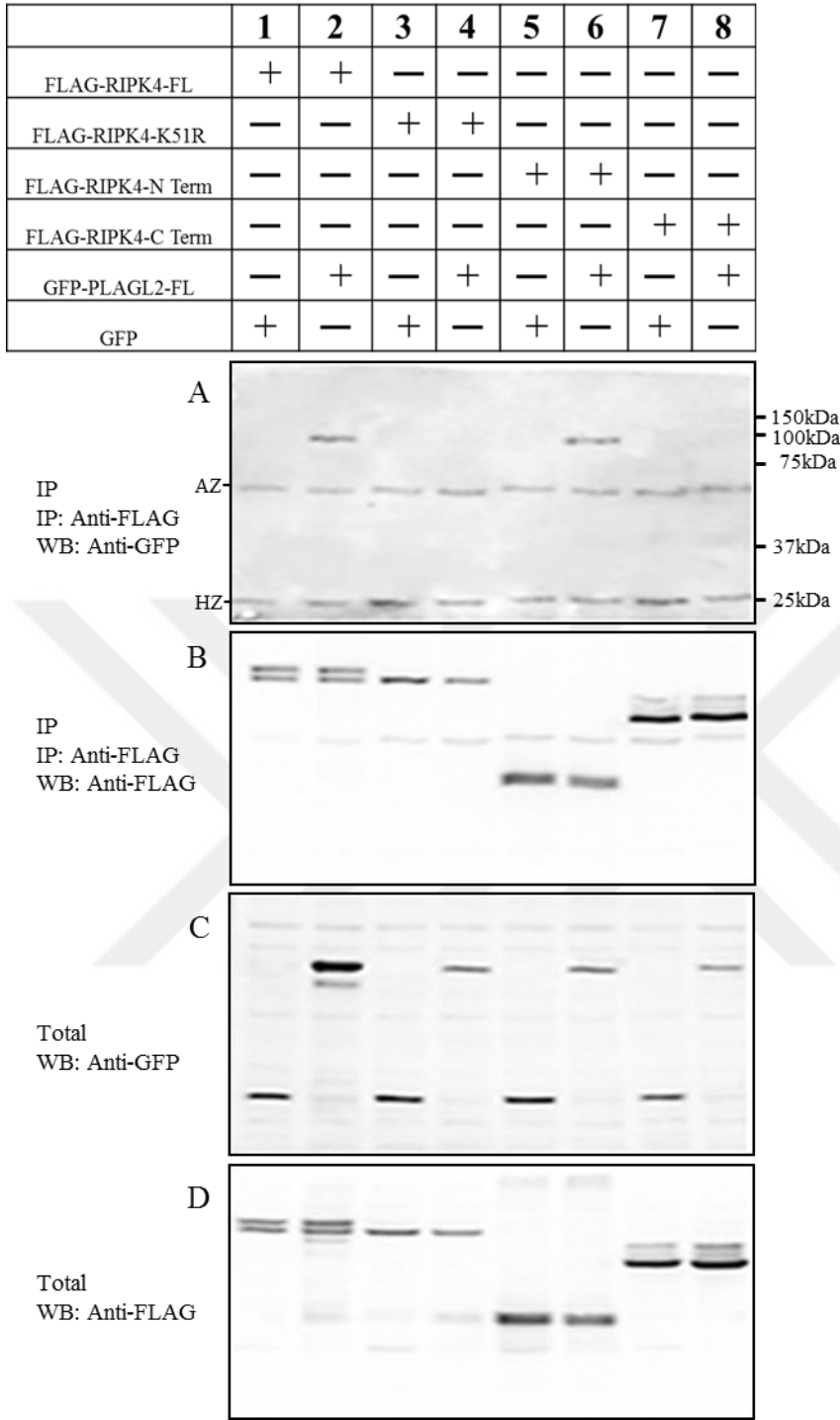
Şekil 30. PLAGL2 vektörlerinin ekspresyonlarının gösterilmesi. **1:** GFP **2:** GFP-PLAGL2 N Terminal, **3:** GFP-PLAGL2 C Terminal, **4:** GFP PLAGL2 FL

6.7. RIPK4 ve PLAGL2 Proteinlerinin Etkileşiminin İmmunopresipitasyon Yöntemi İle Gösterilmesi

RIPK4 ve PLAGL2'nin etkileşimlerini memeli hücrelerinde analiz etmek için RIPK4 ve domainleri, PLAGL2 proteinini ekspres eden vektörlerle birlikte şekil 26'da belirtilen kondisyonlarda HEK293 hücrelerine transfekte edildi. Transfeksiyondan yaklaşık 40 saat sonra hücreler TNTE hücre patlatma tamponu ile patlatılarak IP yapmak üzere hücre lizatu elde edildi. IP'den önce hücre lizatlarının bir kısmı total protein olarak yüklenmek üzere ayrıldı. Kalan lizatlara G agaroz boncuklar konuldu ve inkübe edilerek ön-temizleme yapıldı. Ön-temizlemeden sonra FLAG etiketi ile füzyon olan RIPK4 ve domainlerini boncuklarda çökertmek amacıyla anti-FLAG antikorlu lizata eklenerek FLAG-FL, K51R, N terminal ve RIPK4 C terminal proteinlerinin anti-FLAG antikoruna bağlanması sağlandı. Daha sonra lizata eklenen G agaroz boncukları ile anti-FLAG antikorlu aracılığıyla FLAG-FL, K51R, N terminal ve RIPK4 C terminal proteinlerinin, etkileştikleri proteinler ile birlikte boncuklara çökertilmesi sağlandı. RIPK4, PLAGL2 ile etkileştiği takdirde boncuklara PLAGL2'yi de taşıyacağından, GFP ile füzyon PLAGL2'nin boncuklardaki varlığını analiz etmek için, boncuklardaki kompleks, immunoblot yöntemi ile anti-GFP antikorlu kullanılarak analiz edildi (Şekil 31-A). Çıkan IP sonuçlarının doğruluğunu teyid etmek amacıyla; her transfeksiyon koşulunda FLAG etiketli RIPK4 proteinlerinin anti-FLAG antikorlu ile boncuklara bağlandığını göstermek için aynı membran bloklanarak bir kez de anti-FLAG antikorlu

ile analiz edildi. FL ve RIPK4 N ter'in -PLAGL2 FL'i boncuklara taşıdığı (Şekil 31-B-2. ve 6.kuyular), K51R ve RIPK4 C ter'in ise PLAGL2 FL'i boncuklara taşıyamadığı (Şekil 31-B-3. ve 8. kuyular) gösterildi. Şekil 31-B de görüleceği üzere anti-FLAG antikorlu ile RIPK4 FL (Şekil 31-B-1. ve 2. kuyular), RIPK4 K51R (Şekil 31-B- 3. ve 4. kuyular) RIPK4 N ter (Şekil 31- 5. ve 6. kuyular) ve -RIPK4 C ter (Şekil 31-B-7. ve 8. kuyular) proteinlerinin boncuklara çöktürüldüğü doğrulanmış oldu. Ayrıca, IP öncesinde total proteinlerin analizi için ayrılan lizat da jelle yüklenerek anti-GFP ve anti-FLAG antikorları ile analiz edildi (Şekil 31-Şekil C, D). FLAG ve GFP etiketli RIPK4 ve PLAGL2 proteinlerinin beklenildiği gibi ekspres oldukları gösterildi (Şekil 31).





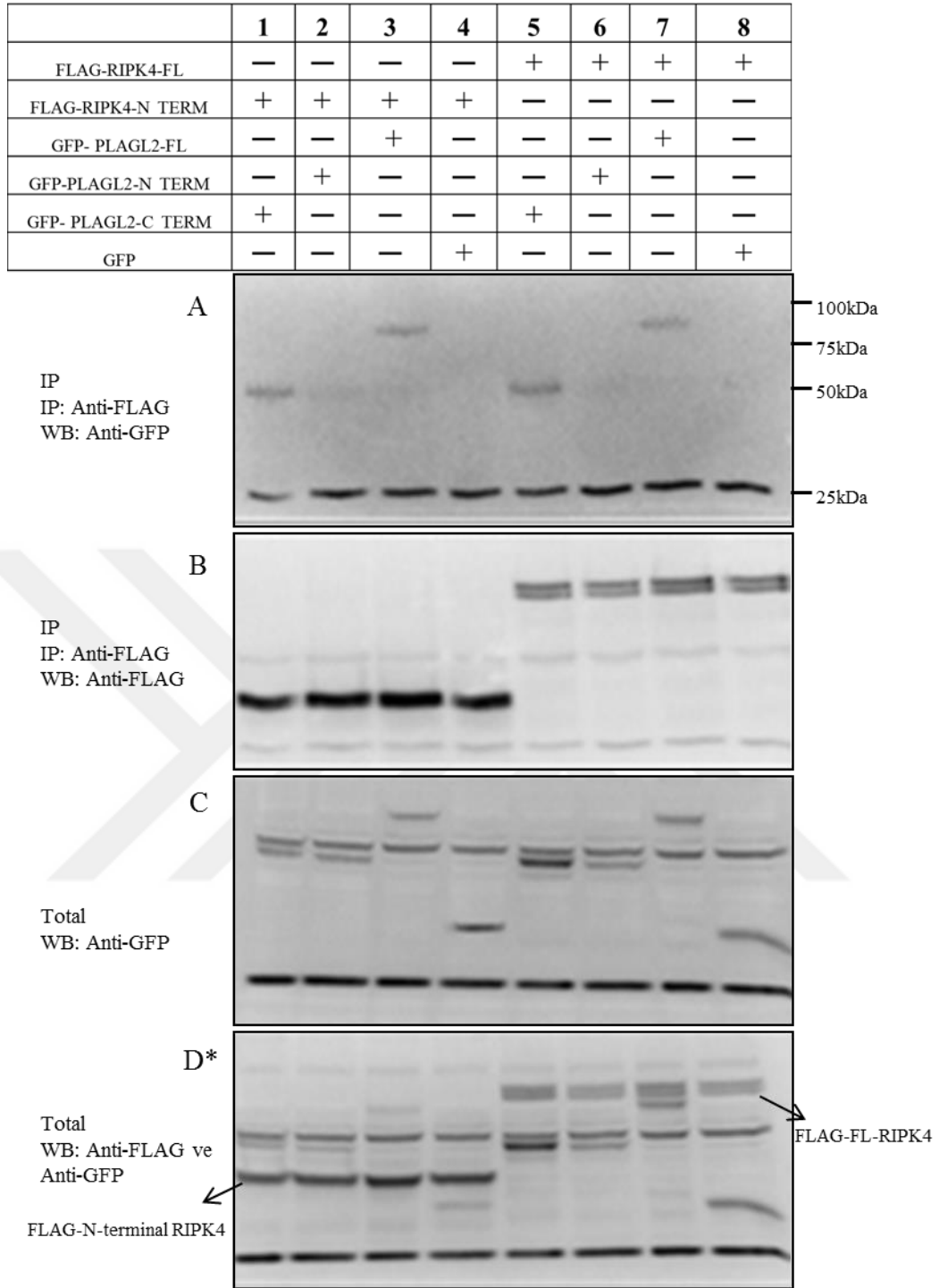
Şekil 31: RIPK4 ve PLAGL2 etkileşiminin immunopresipitasyon ile gösterilmesi-1-, A) IP-FLAG, Blot:GFP, B) IP-FLAG, Blot: FLAG, C) Total-Blot:GFP, D) Total-Blot: FLAG, AZ: Ağır zincir, HZ: Hafif zincir

Şekil 31’da sonuçları gösterilen IP deneyi ile FL RIPK4 ve PLAGL2’nin birbirleriyle etkileştiği (Şekil 31-A-2.kuyu) ve bu etkileşimin RIPK4 ün N terminal kinaz domaini (Şekil 31-A-6.kuyu) üzerinden olduğu, ayrıca RIPK4’ün N terminalinde

bulunan serin/treonin kinaz aktivitesinin etkileşim için gerekliiyken (Şekil 31-A-2.kuyu), C terminal domainin etkileşimde yer almadığı (Şekil 31-A-8.kuyu) gösterildi.

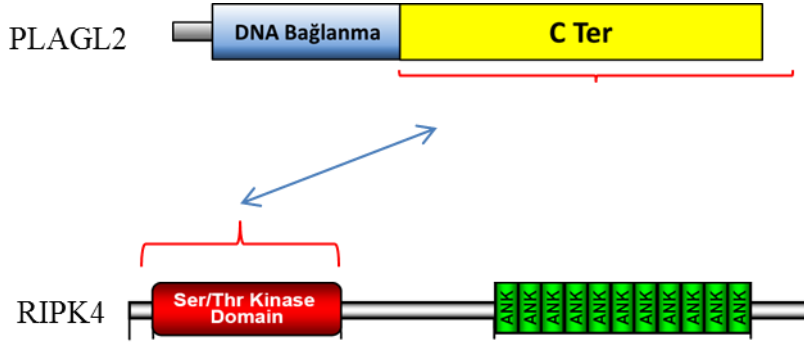
RIPK4'ün PLAGL2 ile etkileşiminden sorumlu olan domaini belirlendikten sonra bu defa RIPK4 ile etkileşimden sorumlu PLAGL2 domainin analizi için FLAG-FL, RIPK4 N terminal ile birlikte GFP- PLAGL2 FL, N ve C terminal proteinlerini ekspres eden vektörler HEK293 hücrelerine, Şekil 27'de belirtilen koşullar kullanılarak transfeke edildi. PLAGL2'nin hem RIPK4 FL (Şekil 32-A, 7.kuyu) hem de RIPK4 N terminal (Şekil 32-A,-3.kuyu) ile etkileştiği tekrar gösterilerek bir önceki IP deneyi doğrulanmış oldu. Bunun yanı sıra deney sonucunda RIPK4 FL ve N terminal proteininin PLAGL2'nin C terminal domaini ile (Şekil 32-A, 1. ve 5. kuyular) etkileşirken PLAGL2'nin N terminal domaini ile etkileşmediği (Şekil 32-A, 2. ve 6. kuyular) gösterildi. Çıkan IP sonuçlarının doğruluğunu ve FLAG etiketli RIPK4 proteinlerinin anti-FLAG antikoru ile boncuklara bağlandığını göstermek amacıyla, membran bloklanarak bir kez de anti-FLAG antikoru ile analiz edildi. Şekil 32, B'de görüldüğü üzere RIPK4 N terminal (Şekil 32-B, 1-4 arası kuyular) ve RIPK4 FL (Şekil 32-B, 5-8 arası kuyular) proteinlerinin transfeksiyon koşulları ile tutarlı bir şekilde anti-FLAG antikoru ile boncuklarda bulunduğu gösterildi. Ayrıca, total protein analizi için ayrılan lizatlardaki PLAGL2 ve RIPK4 proteinlerinin ekspresyonu sırasıyla anti-GFP ve anti-FLAG antikorları kullanılarak analiz edildi ve transfeksiyon koşulları ile bağlantılı bir şekilde expres oldukları gösterildi (Şekil 32 C ve D).

IP deneyleri sonucunda RIPK4'ün N-terminal kinaz domainin PLAGL2'nin C terminal domaini ile etkileştiği sonucuna varılmıştır (Şekil 33).



Şekil 32: RIPK4 ve PLAGL2 etkileşiminin immunopresipitasyon ile gösterilmesi-2- A) IP-FLAG, Blot:GFP, B) IP-FLAG, Blot: FLAG, C) Total-Blot: GFP, D) Total-Blot: FLAG,

*C’de görülen membran tekrar anti-GFP ile muamele edildiğinden membranda FLAG etiketli ve GFP etiketli proteinler aynı anda görülmektedir.



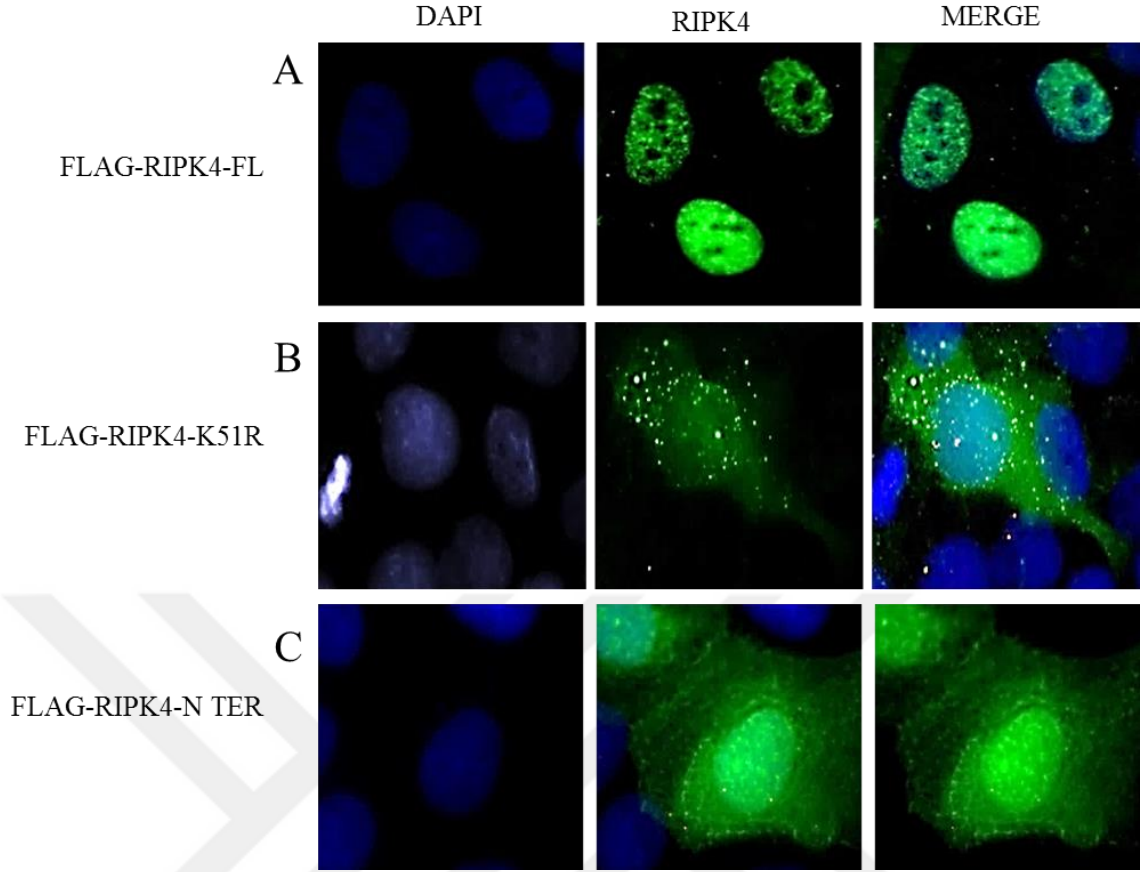
Şekil 33: IP sonucu bulunan etkileşimin şeması

6.8. RIPK4 ve PLAGL2 Proteinlerinin Ko-Lokalizasyonunun İmmüno Floresan Yöntemi İle Gösterilmesi

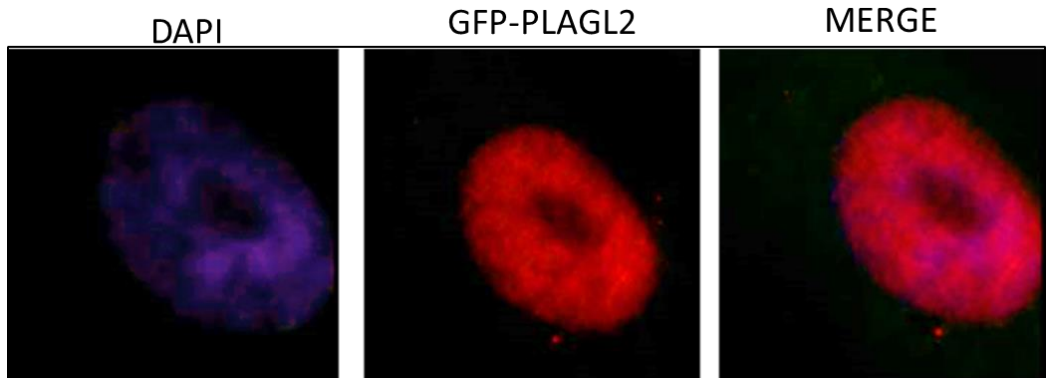
Maya ikili hibrit ve ko-immunopresipitasyon deneyleri ile gösterilen RIPK4 ve PLAGL2 etkileşiminin proteinlerin hücresel lokalizasyonlarına etkisi immüno floresan (IF) yöntemi kullanılarak analiz edildi.

RIPK4'ün yem olarak kullanıldığı maya ikili hibrit taraması insan keratinosit cDNA kütüphanesi kullanılarak yapıldığından, RIPK4 ve PLAGL2'nin ko-ekspres edildiği ve hücresel lokalizasyonlarının incelendiği IF deneyi immortal bir keratinosit hücre hattı olan HaCaT hücrelerinde gerçekleştirildi. Deney esnasında HaCaT hücreleri RIPK4 ve PLAGL2 ekspresyon vektörleri ile transfekte edildi. Transfeksiyondan 36 saat sonra hücreler fikslenip, permeabilize edildi ve bloklandı ve FL, K51R ve RIPK4 N terminal'ün analizleri için anti-FLAG, PLAGL2'nin analizi içinse anti-GFP antikorları ile inkübe edildi. Anti-FLAG antikoruna için Alexa Flour 488 (yeşil) anti-GFP-antikoruna içinse CY3 (kırmızı) sekonder antikorlar kullanıldı.

RIPK4 ve PLAGL2 proteinleri birlikte ekspres edilmeden evvel tek başlarına ayrı ayrı ekspres edilip hücresel lokalizasyonları analiz edildi. RIPK4 FL'in tek başına ekspres edildiğinde hücre içerisinde yoğun olarak çekirdekte lokalize olduğu gösterildi (Şekil 34-A). RIPK4 proteininin kinaz inaktif formu RIPK4 K51R hücrede ekspres olduğunda ise yabancı tipten farklı olarak çekirdeğe gitmediği, sitoplazmada nokta benzeri yapılarda lokalize olduğu gözlemlendi (şekil 34-B). RIPK4'ün N ter domaini tek başına ekspres olduğunda ise çekirdekle birlikte sitoplazmada sitoskelet benzeri yapılarda dağınık bir şekilde bulunduğu gözlemlendi (şekil 34-C). PLAGL2 proteini tek başına ekspres olduğunda ise tamamen çekirdekte lokalize oldu (şekil 35).



Şekil 34. HaCaT hücrelerinde RIPK4 hücresel lokalizasyonunun hücresel lokalizasyonunun immüno Floresan ile analizi. A) RIPK4 FL, B) RIPK4 K51R, C) RIPK4 N ter (DAPI: Mavi, çekirdek; Alexa Flour 488:Yeşil, RIPK4 N terminal)



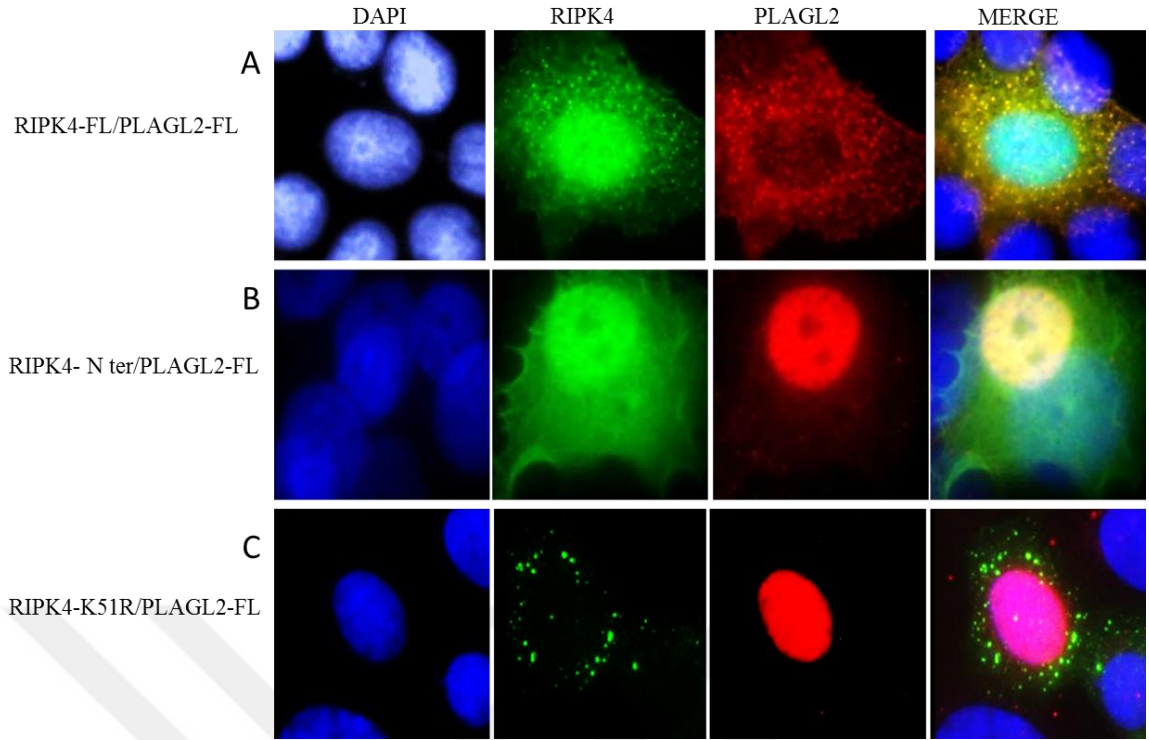
Şekil 35. HaCaT hücrelerinde fazladan ekspres ettirilen PLAGL2'nin hücre içi lokalizasyonunun immüno Floresan ile gösterilmesi. (DAPI: Mavi, çekirdek; cy3: Kırmızı: FL PLAGL2)

Bir sonraki aşamada; RIPK4 FL, K51R ve N ter hücrelerde PLAGL2 FL ile birlikte ekspres ettirildi. Tek başına ekspres olduğunda çekirdekte lokalize olan PLAGL2, RIPK4 FL ile birlikte ekspres edildiğinde, çekirdeğe gitmeyip

sitoplazmada RIPK4 ile birlikte noktasal sitoplazmik yapılarda yerleşim gösterdi (Şekil 36-A). RIPK4 tek başına ekspres olduğunda yalnızca çekirdekte yerleşim gösterirken, PLAGL2'nin varlığında bir kısmı çekirdekte kalmaya devam ederken diğer kısmı PLAGL2 ile birlikte sitoplazmada yerleşim gösterdi.

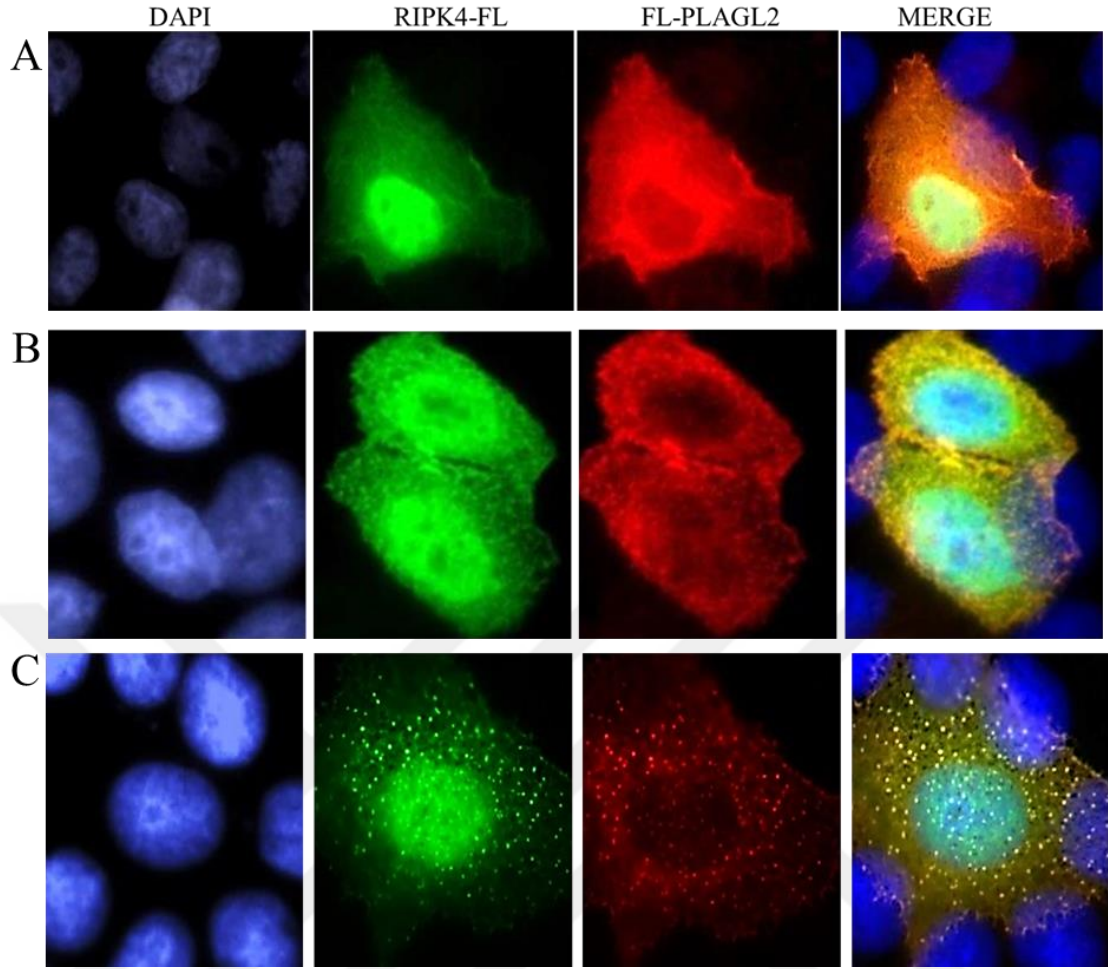
Hücrelerde, RIPK4 N ter ve PLAGL2 FL proteini birlikte fazladan ekspres ettirildiğinde ise, her iki proteinin de tek başlarına ekspres edildiklerindeki hücresel lokalizasyonu korudukları gözlemlendi. RIPK4 N ter hem çekirdekte hem sitoplazmada sitoiskelet benzeri yapılarda ve membranda bulunmaya devam ederken, PLAGL2 yalnızca çekirdekte lokalize olmaya devam etti. RIPK4 N ter ve PLAGL2 beraber ekspres edildiğinde, iki protein RIPK4 FL'den farklı olarak sitoplazmada değil çekirdekte beraber yerleşim gösterdi (Şekil 36-B).

RIPK4'ün kinaz aktivitesinin PLAGL2 ve RIPK4 etkileşimi için önemli olduğu IP deneyi ile gösterilmişti. Kinaz aktivitesinin iki proteinin hücresel yerleşimine etkisini analiz etmek amacıyla, RIPK4 K51R proteini ve PLAGL2 FL hücrelerde fazladan ekspres edilerek lokalizasyonları analiz edildi. İki protein birlikte ekspres edildiğinde ne PLAGL2 ne de RIPK4 K51R tek başına ekspres olduklarındaki lokalizasyonlarını değiştirmediler. PLAGL2 yine çekirdekte lokalize olurken RIPK4 K51R tamamen sitoplazmik nokta benzeri yapılarda lokalize olmaya devam etti. IP deneyinde görülen sonucu açıklar bir şekilde PLAGL2 ve RIPK4 K51R aynı hücresel kompartmanda lokalize olmadılar (Şekil 36-C).



Şekil 36. HaCaT hücrelerinde PLAGL2 ve RIPK4'ün hücresel yerleşimlerinin immüno Floresan ile analizi A) PLAGL2 FL ve RIPK4 FL B) RIPK4 N ter ve PLAGL2 FL C) PLAGL2 FL ve RIPK4 K51R (DAPI: Mavi, Çekirdek; Cy3: Kırmızı- FL PLAGL2; Alexa Flour 488: Yeşil, FLAG -RIPK4 FL)

RIPK4 ve PLAGL2 birlikte ekspres edildiklerinde ise birbirlerinin hücre içindeki lokalizasyonlarını değiştirmenin yanı sıra bazı spesifik bölgelerde ve yapılanmalarda da birlikte lokalize oldukları görüldü. Analiz edilen hücrelerde, RIPK4 ve PLAGL2 birlikte ekspres edildiklerinde, iki proteinin çekirdeği çevreleyen halkasal yapılarda ve bu yapılardan ağısı bir biçimde hücre membranına uzanan sitoskelet benzeri yapılarda birlikte lokalize oldukları görüldü (Şekil 37-A). Ayrıca hücre hücre temas noktalarında (Şekil 37-B) ve sitoplazmik noktasal yapılarda görüldüler (Şekil 37-C).



Şekil 37. HaCaT hücrelerinde ekspres ettirilen RIPK4 FL ve PLAGL2 FL'nin farklı sitoplazmik yapılardaki birlikteliği. A) Çekirdeği çevreleyen ve membrana uzanan sitoiskelet benzeri yapılarda B) Hücre-hücre kontak noktalarında C) Sitoplazmik noktasal yapılarda (DAPI: Mavi, Çekirdek: Cy3: Kırmızı, PLAGL2 FL, Alexa Flour 488: Yeşil, RIPK4 FL)

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Epidermis, memelileri dehidrasyon, mekanik stress ve enfeksiyondan koruyan çok katmanlı bir epitheldir. Epidermisin sürekli dış etkenlere maruz kalması sürekli yenilenmesini gerektirir. Epidermisin en alt tabakasında bulunan bazal tabaka hücreleri çoğalarak yenilenmeyi sağlar, sonrasında bu hücreler farklılaşarak üst katmanlara göç eder.

Yenilenme ve farklılaşma arasındaki denge yani epidermal homeostazi, gerekli genlerin doğru zamanda doğru yerde ekspresyonu ile mümkündür. Transkripsiyon faktör p63 epidermal homeostazi için gerekli gen ekspresyonlarının temel düzenleyicisidir (16). Kalay ve ark. tarafından bölümümüzde yapılan genetik haritalama çalışması sonucunda p63 ün hedef genlerinden biri olan *RIPK4* geni Aslan tip Multiple Pterygium sendromu ile ilişkilendirilmiştir (53). Bu çalışmada *RIPK4* geninin serin-threonin kinaz korunmuş bölgesinde belirlenen c.362T>A (p.Ile121Thr) mutasyonunun, *RIPK4*'ün kinaz aktivitesini bozarak keratinosit farklılaşma sürecindeki gelişimsel bozukluklar ile karakterize Aslan tip Multiple Pterygium sendromuna sebep olduğu gösterilmiştir (26). *RIPK4*'ün keratinosit farklılaşmasındaki rolü bilinmekle beraber sürecin altında yatan moleküler mekanizmalar bilinmemektedir.

İnsanda görülen kanserlerin %80'i epitel orijinlidir. Ayrıca, insan popülasyonunun %20'sinden fazlasında, epidermal farklılaşma bozuklukları ile ilişkilendirilen 100'den fazla deri hastalığı bulunmaktadır (2). Epidermal farklılaşma sürecinde *RIPK4* fonksiyonunun altında yatan moleküler mekanizmaların anlaşılması, farklılaşma bozukluğu neticesinde gelişen hastalıkların tanısı, tedavisi ve önlenmesi için katkı sağlayabilecek potansiyele sahiptir.

Bu kapsamda, Anabilim dalımız bünyesinde Yard. Doç. Dr. Tuba Dinçer tarafından yürütülen ve 2013 yılında başlayan BAP projesi ile *RIPK4*'ün yem olarak kullanıldığı insan keratinosit cDNA kütüphanesi büyük ölçekli maya ikili hibrit yöntemi ile tarandı. Tarama sonucunda *RIPK4* proteini ile özgül olarak etkileşen 16 farklı protein bulundu. Bu proteinlerin içerisinde *PLAGL2* isimli transkripsiyon faktörü ile iki kez karşılaşıldı. Buna ilaveten, *PLAGL2*'nin *RIPK4* gibi WNT sinyal yolağında rol alması *RIPK4* ile *PLAGL2* etkileşiminin fonksiyonel olarak anlamlı olabileceğini düşündürdü ve *PLAGL2* çalışılmak üzere seçildi. Büyük ölçek maya ikili hibritten elde edilen sonucun doğruluğunu kanıtlamak ve bu proteinlerde, etkileşimden sorumlu domainleri belirlemek amacıyla ilk etapta küçük ölçek maya ikili hibrit kullanıldı.

Sonrasında etkileşim memeli hücre hatlarında immünopresipitasyon ve immünoFloresan deneyleri ile doğrulandı ve analiz edildi.

Maya ikili hibrit taramalarında büyük proteinlerin veriminin düşük olmasından ötürü, 87 kDa olan RIPK4'ün N terminal kinaz domaini ile yapılan büyük ölçek maya ikili hibrit sonucunda karşılaşılan PLAGL2'yi kodlayan cDNA incelendiğinde PLAGL2'nin C terminalinde son 154 aa'lık kısmına denk geldiği görüldü. Büyük ölçek maya taramasında yakalanan etkileşimi doğrulamak ve analiz etmek amacıyla PLAGL2'nin tamamı (PLAGL2-FL, 1-496 aa), DNA bağlanma domainini içeren N-terminal bölgesi (1-243 aa) ve transkripsiyon represör ve aktivatör domainini içeren C-terminal bölgesi (234-496 aa) ile birlikte RIPK4-FL (1-784 aa) ve RIPK4-N-terminal (1-283 aa) uygun maya vektörlerine klonlanarak birbirleriyle etkileşimleri incelendi. Sonuç olarak, mayada RIPK4 FL'in, PLAGL2'nin C-terminal ile etkileştiği gösterilirken, PLAGL2 FL ya da PLAGL2 N terminali ile etkileşimi gösterilemedi. Büyük ölçek maya ikili hibritte gösterilen RIPK4 N terminal ve PLAGL2 etkileşiminin küçük ölçek ile gösterilemesinin nedeninin, küçük ölçek maya ikili hibritte kullanılan PLAGL2 C terminal (243-496 aa) ile büyük ölçekte karşılaşılan PLAGL2 C terminal (342-496 aa) arasındaki 100 aa'lık ilave bölgenin etkileşim üzerinde engelleyici etkisinden kaynaklanabileceği düşünüldü

RIPK4 ve PLAGL2 etkileşimi ilk olarak mayada yapılan çalışmalarımızla ortaya çıkartılmasına rağmen, memeli hücrelerine özgül proteinlerin (ara filamanlar gibi) ya da kompleks protein modifikasyonlarının basit bir ökaryot olan mayada bulunmamasından dolayı, insan RIPK4 ve PLAGL2 etkileşimini doğrulamak ve daha detaylı analiz etmek amacıyla, iki protein HEK293 ve HaCaT memeli hücre hatlarında fazladan ekspres ettirilerek, etkileşimleri incelendi. Memeli hücrelerinde yapılan IP ile mayada bulunan sonuç, RIPK4 FL ve PLAGL2 C terminal etkileşimi, tekrarlandı. İlaveten, RIPK4 FL ve PLAGL2'nin de birbirleriyle etkileşimi gösterildi. Ayrıca, bu etkileşimin RIPK4 ün N terminal kinaz domaini üzerinden olduğu, kinaz aktivitesinin etkileşim için gerektiği ve C terminal domainin ise etkileşimde rolü olmadığı gösterildi (Şekil 31, 32). PLAGL2'nin ise yalnızca C terminal domainin RIPK4 ile etkileşimden sorumlu olduğu, DNA bağlanma bölgesinin bulunduğu N terminal domainin ise etkileşimde rolü olmadığı gösterildi. Özetleyecek olursak, RIPK4 kinaz aktivitesinin bulunduğu N-terminal domaini üzerinden PLAGL2'nin C terminal domaini ile etkileştiği, RIPK4'ün kinaz aktivitesinin etkileşim için önemli olduğu sonucuna varıldı (Şekil 33). Mayada

göremediğimiz bazı etkileşimlerin, RIPK4 FL/FL-PLAGL2, ya da N terminal-RIPK4/PLAGL2 FL ve C terminal PLAGL2, memeli hücre hatlarında görülmesi, iki proteinin etkileşimine yardımcı olan memeli hücrelerine özgü aracı moleküllerin ya da translayon sonrası protein değişikliklerinin varlığından kaynaklandığı düşünüldü

Proteinler etkileşerek birbirlerinin hücresel lokalizasyonunu etkileyebilirler. Ayrıca, İki proteinin hücrede aynı kompartmanda bulunmaları hücresel bir fonksiyonu bir arada gerçekleştirdiklerine işaret edebilir. Bundan dolayı, maya ikili hibrit ve IP deneyleri ile etkileştiği doğrulanan RIPK4 ve PLAGL2 proteinlerinin, tek başlarına ve birlikte ekspres edildiklerinde, birbirlerinin hücresel lokalizasyonlarına olan etkilerini incelemek amacıyla, FL, kinaz mutant (K51R) ve N terminal RIPK4 hücrelerde hem tek başlarına hem de PLAGL2 ile birlikte ekspres edilerek, hücresel lokalizasyonları IF deneyi ile analiz edildi. RIPK4'ün keratinosit farklılaşmasında rol alması ve PLAGL2'nin, keratinosit kütüphanesi kullanılarak yapılan maya ikili hibrit taramasında ortaya çıkmasından dolayı, IF deneyi keratinosit hücre hattı olan HaCaT hücrelerinde gerçekleştirildi. HaCaT hücrelerinde RIPK4 ve PLAGL2 proteinleri hem tek başlarına hem de bir arada ekspres edilerek hücresel lokalizasyonları analiz edildi.

RIPK4 ve PLAGL2 proteinleri HaCaT hücrelerinde tek başlarına ekspres edilip hücresel lokalizasyonları analiz edildiğinde RIPK4 FL ve PLAGL2 FL'in tamamen çekirdekte yerleşik olduğu görüldü. Bu iki protein beraber ekspres edildiğinde ise RIPK4'ün bir kısmı yine çekirdekte bulunmaya devam ederken, diğer bir kısmı sitoplazmada PLAGL2 ile birlikte yerleşim gösterdi. Dikkat çekici bir şekilde, tek başına ekspres edildiğinde belirgin olarak çekirdekte bulunan PLAGL2, RIPK4'ün ekspres olduğu tüm hücrelerde tamamen sitoplazmada yerleşim gösterdi (Şekil 36). Tek başına ekspres olduklarında yalnızca çekirdek lokalizasyonu gösteren RIPK4 ve PLAGL2'nin birlikte ekspres olduklarında, sitoplazmaya yerleşiyor olmaları, maya ve IP deneylerini doğrular nitelikte olup, bu iki proteinin sitoplazmada hücresel bir fonksiyonu yerine getirmek için etkileştiklerine işaret etmektedir.

RIPK4 FL'ün yanı sıra PLAGL2 ile etkileşimden sorumlu RIPK4 N terminal'de tek başına ya da PLAGL2 ile birlikte ekspres edilerek birbirlerinin lokalizasyonuna etkileri araştırıldı. RIPK4 N terminal tek başına ekspres olduğunda, RIPK4 FL'te olduğu gibi çekirdekte lokalize olurken, RIPK4 FL'den farklı olarak sitoplazmada da görüldü. RIPK4 N terminal ile PLAGL2 birlikte ekspres olduğunda, proteinler birbirlerinin lokalizasyonu değiştirmediler ve tek başlarına ekspres oldukları zamanki

yerleşimlerini koruyarak, çekirdekte bulunmaya devam ettiler. IP deneyinde RIPK4 N terminal ile PLAGL2'nin etkileşimini göstermiştik. IF deneyinde sonucunda, RIPK4 N terminal ile PLAGL2'nin çekirdekte birlikte yerleşiminin gösterilmesi IP deney sonucu ile örtüşmektedir. Yabanıl tipte RIPK4 FL ve PLAGL2'nin sitoplazmada birlikte yerleşirken RIPK4 N terminal ve PLAGL2'nin çekirdekte yerleşim göstermeleri, RIPK4 N terminal ve PLAGL2 arasındaki etkileşimin fonksiyonel olarak anlamlı olmayabileceğini düşündürmektedir.

FL ve RIPK4 N terminal'ün yanı sıra, IP deneyinde PLAGL2 ile etkileşimde bulunmadığı gösterilen RIPK4 K51R de tek başına ve PLAGL2 ile birlikte ekspres edildi. Tek başına ekspres edildiğinde yalnızca sitoplazmik noktasal yapılarda lokalize olduğu, FL ya da N-terminalden farklı bir şekilde çekirdeğe hiç lokalize olmadığı görüldü. Bu sonuç kinaz aktivitesinin RIPK4'ün çekirdeğe gitmesi için gerekli olduğunu gösterdi. RIPK4 K51R ile PLAGL2 FLbirlikte ekspres edildiğinde PLAGL2 çekirdekte lokalize olmaya devam ederken, RIPK4 de sitoplazmik noktasal yerleşimini hiç değiştirmede. İki proteinin hücrede beraber yerleşim göstermemeleri IP sonucunu doğruladı. Bu sonuç, RIPK4'ün, ya PLAGL2'nin kendisini ya da PLAGL2 etkileşiminde rolü olan aracı bir proteini fosforlamasının PLAGL2'nin çekirdeğe gitmesinin engellenerek sitoplazmada tutulması için önemli olduğuna işaret etmektedir.

RIPK4 ve PLAGL2'nin birlikte ekspres olduklarında sitoplazmada yerleştikleri yapılar detaylı olarak incelendiğinde, iki hücre arasındaki temas noktalarında (Şekil 37-A), sitoplazmik noktasal yapılarda (Şekil 37-B) ve çekirdeği çevreleyerek sitoplazmadan hücre membranına uzanan hücre iskeleti benzeri yapılarda (Şekil 38-C) yerleşim gösterdiği gözlemlendi. Keratinositlerin yapılanmasında kilit rolü olan keratin ara filamanlarının belirgin olarak hücre çekirdeğini çevreleyip plazma membranına uzandıkları, hücre hücre kontak noktalarında ise dezmosom denilen yapılarda bulundukları bilinmektedir. Ayrıca, keratin farklılaşmasında keratin filamanları arasında bağlantıları sağlayan aracı proteinlerinde, filagrin gibi, sitoplazmada noktasal yapılarda yerleştikleri gösterilmiştir.

Ripk4^{-/-} farelerin derisinde yapılan çalışmalarda, yabanıl tip farelerde bazal tabaka markörü olarak tanımlanan K14 proteininin, bazal, granüler ve parakeratotik katmanlarda da anormal bir şekilde eksprese olduğu, yabanıl farelerde yalnızca spinoz tabakada bulunan K1 proteininin, tüm katmanlarda eksprese olduğu, yabanıl tipte granular ve korneosit katmanında görülen filagrinin ise spinoz ve granular katmanda

eksprese olduğu fakat parakeratotik katmanda eksprese olmadığı gösterilmiştir (27). PLAGL2 ve RIPK4'ün ara filaman benzeri yapılarda yerleşim göstermesi, RIPK4'ün PLAGL2 ile etkileşerek keratinosit farklılaşmasını ara filaman yapıları üzerinden düzenliyor olabileceğini düşündürmektedir. Bu çıkarımın doğrulanması için, ileriki çalışmalarda RIPK4 ve PLAGL2 ile birlikte hücreler keratinosit farklılaşma markörlerine (K1, K10, K14 ve filagrin gibi) karşı antikorlarla tekrar analiz edilmesi gerekmektedir.

Epidermis, kendini yenileyen katmanlı bir dokudur ve bazal katmanda bulunan keratinosit kök hücrelerinden köken alır. Çoğalan bazal katman hücreleri ya dikey olarak bölünür ve farklılaşarak yukarı katmanlara doğru göç eder ya da yatay olarak bölünür ve bazal katman kök hücre havuzunu korur. Keratinositlerin bazal katmandan üst katmanlara geçerken farklılaşmasını sağlayan keratin iskeletini (ara filamanlar) ve migrasyonunda önemli olan aktin iskeletini (mikrofilamanlar) düzenlemesi gerekir. Hücre migrasyonu küçük GTPaz olan Rho ailesinin (RhoA, Rac1, Cdc42) aktin hücre iskeletini düzenlenmesiyle gerçekleşir. Yapılan bir çalışmada hücre migrasyonunu tetikleyen Rac1 proteinin engellenmesinin keratinosit farklılaşmasını blokladığı gösterilmiştir (54). Ayrıca, Rho ailesinin alt ileticisi olan bir proteini hedefleyen miR-24 aktin hücre iskeletini düzenleyerek keratinosit farklılaşmasını aktive eder (55). RIPK4 ile etkileşimini gösterdiğimiz PLAGL2'nin ise, Rac1 aktivasyonunu indükleyerek aktin hücre iskeletini düzenlediği ve böylelikle hücre migrasyonunu tetiklediği gösterilmiştir (29). Bundan dolayı, sırasıyla keratin ve aktin filamanlarını düzenleyen RIPK4 ve PLAGL2 proteinlerinin etkileşiminin keratinosit farklılaşması esnasında ara filamanlar ve aktin filamanları arasında köprü görevini üstleniyor olması da mümkün olabilir.

Keratin farklılaşmasının kilit proteini p63 tarafından indüklendiği bilinen RIPK4'ün, keratinosit farklılaşmasındaki rolü tanımlanmış olmasına rağmen, PLAGL2'nin keratinosit farklılaşmasında yer aldığına dair literatürde henüz bir bilgi bulunmamaktadır. Ancak, yakın zamanda çıkan bir yayın ile PLAGL2'nin promotör/enhansör gen düzenleyici bölgelerinde korunmuş p63 bağlanma sekanslarına rastlanmış olması, PLAGL2'nin de keratinosit farklılaşma sürecine katkı sağlayabileceğine işaret etmektedir (56).

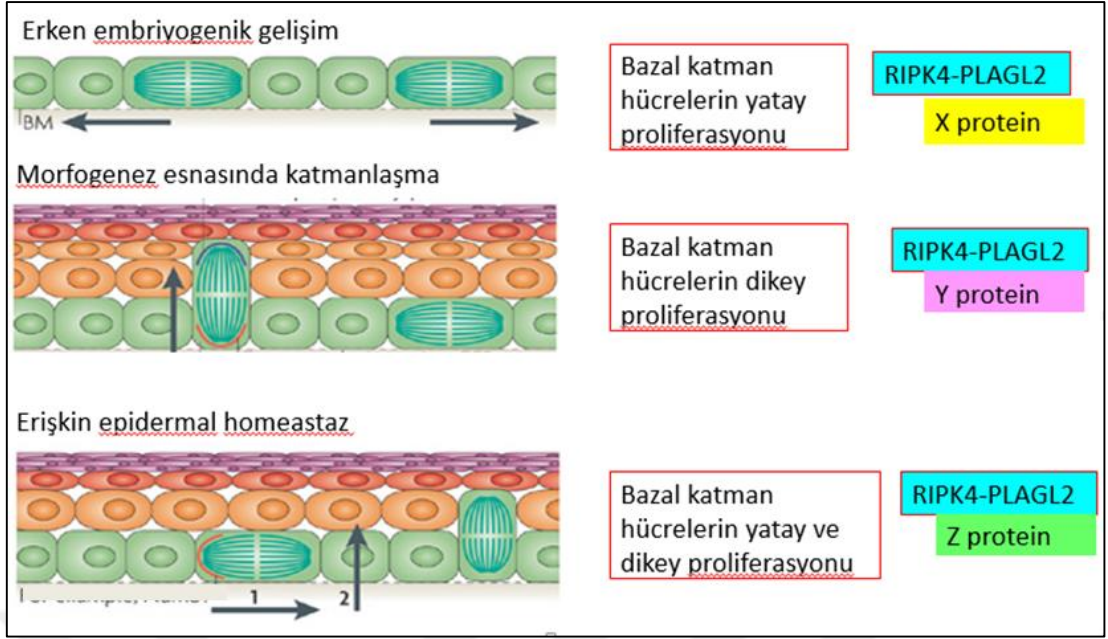
RIPK4 ve PLAGL2'nin sitoplazmik hücre iskeletleri ile olan bağlantılarının yanı sıra iki proteininde WNT sinyal yolağını aktive ettiği gösterilmiştir. Epidermal farklılaşmanın yer aldığı yara iyileşme sürecinde kaybedilen dokunun yerine konulması

için, bazal katmanda bulunan kök hücreler çoğalır, sonra da bu hücreler farklılaşıp, göç ederek epidermal dokuyu tamir eder. Bazal katmanda bulunan kök hücrelerinin çoğalmasında WNT sinyal yolağının c-Myc aracılığıyla hücre proliferasyonunu indüklediği gösterilmiştir (40). İki proteinin de WNT yolağını aktifleştirmesi, tanımladığımız RIPK4 ve PLAGL2 etkileşiminin farklılaşma dışında bazal katman hücrelerinin proliferasyonu esnasında da önemli olabileceğine işaret etmektedir.

Literatür araştırmamıza ve bulgularımıza dayanarak oluşturduğumuz hipotetik modelde, RIPK4 ve PLAGL2 etkileşiminin hem epiderminin en alt tabakasını oluşturan bazal hücrelerin yatay proliferasyonunda hem de bu hücrelerin farklılaşarak epiderminin üst tabakalarında doğru göç etme sürecinde önemli olduğunu düşünüyoruz. RIPK4-PLAGL2 etkileşimi bazal hücrelerde hücre proliferasyonunu indükleyen WNT yolağını aktive ederken, yukarı doğru dikey çoğalan hücrelerde farklılaşmayı ve göçü düzenleyerek keratinosit katmalarının oluşturulmasına katkı sağlamaktadır (Şekil 38).

Bu modele göre RIPK4 ve PLAGL2 epiderminin bazal ve üst tabakalarındaki farklı fonksiyonlarını farklı aracı proteinlerle kompleks oluşturarak gerçekleştirebilir. Örneğin, proliferasyon esnasında bu iki proteinin ortağı, WNT yolağındaki DVL2 proteini (RIPK4'ün DVL2 ile etkileşimi gösterilmiştir) olabilecekken, farklılaşma esnasında ise keratin, filagrin ya da plektin gibi hücre iskeletini düzenleyen bir başka protein olabilir (5, 37) (Şekil 38)

Sonuç olarak, çalışmamız kapsamında RIPK4 ve PLAGL2 proteinlerinin etkileşimleri ilk kez tanımlanmış olmakla birlikte bu etkileşimin epidermal gelişim için önemli olabileceğine dair ipuçları edinilmiştir. RIPK4 ve PLAGL2 etkileşiminin epidermal farklılaşmadaki rolünün aydınlatılması, epidermal homeostazinin yer aldığı her türlü doku/organ gelişiminin moleküler mekanizmasının daha iyi anlaşılmasına olanak vererek, süreçle ilgili bozukluklarla ilişkilendirilmiş hastalıklara karşı terapötik yaklaşımlar geliştirmesine katkı sağlayacaktır.



Şekil 38. RIPK4 ve PLAGL2'nin keratinosit farklılaşması esnasında etkileşimlerine yönelik geliştirilen model (Blanpain'den) (5).

8. SONUÇ ve ÖNERİLER

1. Yürütücülüğünü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Tuba Dinçer'in yapmış olduğu Karadeniz Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Koordinasyon Birimi tarafından desteklenen 9749 numaralı proje kapsamında büyük ölçek maya ikili hibrit yöntemiyle, RIPK4 N-terminal proteini yem olarak kullanılarak insan keratinosit cDNA kütüphanesi tarandı. Elde edilen verilere göre RIPK4'ün, etkileşimi henüz literatürde olmayan, 16 ayrı proteinle etkileştiği ve bu proteinlerden PLAGL2 isimli bir proteinin, RIPK4 gibi WNT sinyal yolağında rol almasından dolayı iki proteinin etkileşiminin hücresel olaylar için önemli olabileceği düşünülerek, PLAGL2 proteini aday protein olarak seçildi.
2. RIPK4'ün PLAGL2 proteini ile etkileşiminin araştırılmasını amaçlayan bu çalışma kapsamında, küçük ölçek maya ikili hibrit yöntemi ile RIPK4 FL ile PLAGL2 C terminal'in etkileşimi gösterilerek büyük ölçek maya ikili hibrit taramasından elde edilen sonuç doğrulanmış oldu.
3. RIPK4 ve PLAGL2 memeli hücrelerinde ekspres edilerek immünopresipitasyon yöntemiyle etkileşimin RIPK4 proteininin N terminal kinaz kısmı ile PLAGL2 proteininin C terminal kısmı üzerinden gerçekleştiği ve bu etkileşimin RIPK4 proteininin kinaz aktivitesine bağlı olduğu gösterildi.
4. İmmünofloresan yöntemi ile iki proteinin birlikte sitoplazmada lokalize olduğu, ve lokalizasyonun kinaz aktivitesine bağlı olduğu gösterildi.
5. RIPK4 PLAGL2 etkileşiminin ve lokalizasyonunun RIPK4'ün kinaz aktivitesine bağlı olması PLAGL2'nin RIPK4 tarafından fosforillenebileceği olasılığını gündeme getirmektedir. Bundan dolayı, PLAGL2'nin RIPK4'ün hedefi olup olmadığının *in vitro* kinaz deneyleri ile araştırılması ileriki çalışmalarla gerçekleştirilebilir.
5. PLAGL2 C terminal üzerinde bulunan transkripsiyon represör ve transkripsiyon aktivatör bölgelerinin RIPK4 ile etkileşimdeki rolünün daha iyi anlaşılabilmesi adına, her iki bölgenin de ayrı ayrı klonlanarak, immünpresipitasyon ve immünofloresan yöntemleriyle etkileşimin tekrar incelenmesi, etkileşimden sorumlu bölgenin belirlenmesi açısından önemlidir.
6. İki proteinin beraber lokalize olduğu yapılar incelendiğinde, çekirdek etrafında halka oluşturan, buradan sitoplazma ve membrana dağılan ağsı yapılar (Şekil 37-A) şeklinde görülen hücre iskeleti filamanlarına ait olabileceği düşünüldü. Bu yapıların

keratinosit hücrelere özgü ara filaman markörleri (KR14, 10 ,1 gibi) ya da aktin filaman markörleri (aktin) kullanılarak IF yöntemi ile tanımlanması gerekir.

7. Çalışmamızda RIPK4 ve PLAGL2'nin etkileşimi *in vivo* koşullarda gösterilmiştir. Ancak proteinlerin etkileşimlerinin direkt olup olmadığı bilinmemektedir. Bundan dolayı iki proteinin ayrı ayrı ekspres edilip saflaştırılması ve sonrasında *in vitro* da inkübe edilerek analiz edilmesi etkileşimin direkt ya da indirekt olup olmadığı hakkında fikir vermesi açısından önemlidir.
8. RIPK4'ün keratinosit farklılaşmasının kilit faktörü p63 proteini tarafından düzenlendiği daha önce gösterilmiştir. 2015 yılında yayımlanan bir makalede PLAGL2'nin gen regülasyon bölgesinde p63 proteininin bağlanma sekansı gösterilmiştir (56). Yapılacak ileriki çalışmalarla PLAGL2'nin ekspresyonunun p63 tarafından düzenlendiğinin gösterilmesi PLAGL2'nin keratinosit farklılaşmasında rol aldığına dair ipucu verecektir.
9. Bulgularımızda, PLAGL2 ve RIPK4 proteinlerinin etkileşerek birbirlerinin hücresel yerleşimlerini etkiliyor olmaları, RIPK4 proteini gibi, PLAGL2'nin de keratinosit farklılaşmasında rol alabileceğini düşündürmektedir. Bu kapsamda PLAGL2 fazla eksprese edilerek ve eksiltilerek epidermisin katmanlarına özgü farklılaşma markörleri kullanılarak yapılacak ekspresyon analiz deneyleri ile PLAGL2'nin de keratinosit farklılaşmasına etkisi aydınlatılabilir (57).
10. Son olarak, RIPK4 ve PLAGL2'nin ayrı ayrı WNT sinyal yolağını düzenledikleri bilinmekle beraber WNT sinyal yolağı üzerinde birlikte oluşturdukları etki bilinmemektedir. İki proteinin beraber ekspresyonunun ya da azaltılmalarının WNT sinyal yolağı üzerinde etkisinin analizi, WNT sinyal yolağının moleküler mekanizmasının anlaşılmasına katkı sağlayabilir.

9. KAYNAKLAR

1. SF. G,(MA) S (2000). Developmental Biology. 6 th.
2. Lopez-Pajares V, Yan KR, Zarnegar BJ, Jameson KL,Khavari PA (2013). Genetic pathways in disorders of epidermal differentiation. Trends in Genetics 29: 31-40.
3. Kopan R (2010). Developmental Biology-NOTCH signaling. 439-440.
4. Lopez-Pajares V, Yan K, Zarnegar BJ, Jameson KL,Khavari PA (2013). Genetic pathways in disorders of epidermal differentiation. Trends Genet 29: 31-40.
5. Blanpain C,Fuchs E (2009). Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin. Nat Rev Mol Cell Biol 10: 207-217.
6. McGrath JA, Eady, R.A., Pope, F.M. (2004). Rook's Textbook of Dermatology 7. Blackwell Publishing.
7. Boulter E, Estrach S, Errante A, Pons C, Cailleteau L, Tissot F, Meneguzzi G ,Feral CC (2013). CD98hc (SLC3A2) regulation of skin homeostasis wanes with age. Journal of Experimental Medicine 210: 173-190.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. Demehri S, Turkoz A, Kopan R (2009). Epidermal Notch1 loss promotes skin tumorigenesis by impacting the stromal microenvironment. Cancer Cell 16: 55-66.
12. DasGupta R,Fuchs E (1999). Multiple roles for activated LEF/TCF transcription complexes during hair follicle development and differentiation. Development 126: 4557-4568.
13. 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.
14. Laurikkala J, Mikkola ML, James M, Tummers M, Mills AA, Thesleff I (2006). p63 regulates multiple signalling pathways required for ectodermal organogenesis and differentiation. *Development* 133: 1553-1563.
 15. Rinne T, Clements SE, Lamme E, Duijf PH, Bolat E, Meijer R, Scheffer H, Rosser E, Tan TY, McGrath JA, Schalkwijk J, Brunner HG, Zhou H, van Bokhoven H (2008). A novel translation re-initiation mechanism for the p63 gene revealed by amino-terminal truncating mutations in Rapp-Hodgkin/Hay-Wells-like syndromes. *Hum Mol Genet* 17: 1968-1977.
 16. Truong AB, Kretz M, Ridky TW, Kimmel R, Khavari PA (2006). p63 regulates proliferation and differentiation of developmentally mature keratinocytes. *Genes Dev* 20: 3185-3197.
 17. 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 U S A* 104: 3255-3260.
 18. Deyoung MP, Ellisen LW (2007). p63 and p73 in human cancer: defining the network. *Oncogene* 26: 5169-5183.
 19. Yang A, Kaghad M, Wang Y, Gillett E, Fleming MD, Dotsch V, Andrews NC, Caput D, McKeon F (1998). p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol Cell* 2: 305-316.
 20. 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.
 21. Mills AA, Zheng B, Wang XJ, Vogel H, Roop DR, Bradley A (1999). p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. *Nature* 398: 708-713.
 22. Kouwenhoven EN, van Heeringen SJ, Tena JJ, Oti M, Dutilh BE, Alonso ME, de la Calle-Mustienes E, Smeenk L, Rinne T, Parsaulian L, Bolat E, Jurgelenaite R, Huynen MA, Hoischen A, Veltman JA, Brunner HG, Roscioli T, Oates E, Wilson M, Manzanares M, Gomez-Skarmeta JL, Stunnenberg HG, Lohrum M, van Bokhoven H, Zhou H (2010). Genome-wide profiling of p63 DNA-binding sites identifies an element that regulates gene expression during limb development in the 7q21 SHFM1 locus. *PLoS Genet* 6: e1001065.

23. Yang A, Zhu Z, Kapranov P, McKeon F, Church GM, Gingeras TR, Struhl K (2006). Relationships between p63 binding, DNA sequence, transcription activity, and biological function in human cells. *Mol Cell* 24: 593-602.
24. Marinari B, Moretti F, Botti E, Giustizieri ML, Descargues P, Giunta A, Stolfi C, Ballaro C, Papoutsaki M, Alema S, Monteleone G, Chimenti S, Karin M, Costanzo A (2008). The tumor suppressor activity of IKK α in stratified epithelia is exerted in part via the TGF- β antiproliferative pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 17091-17096.
25. 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.
26. 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.
27. Holland PM, Willis CR, Kanaly S, Glaccum MB, Warren AS, Charrier K, Murison JG, Derry JMJ, Virca GD, Bird TA, Peschon JJ (2002). RIP4 is an ankyrin repeat-containing kinase essential for keratinocyte differentiation. *Current Biology* 12: 1424-1428.
28. 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.
29. Sekiya R, Maeda M, Yuan H, Asano E, Hyodo T, Hasegawa H, Ito S, Shibata K, Hamaguchi M, Kikkawa F, Kajiyama H, Senga T (2014). PLAGL2 regulates actin cytoskeletal architecture and cell migration. *Carcinogenesis* 35: 1993-2001.
30. 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.
31. 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.

32. 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.
33. Meylan E, Tschopp J (2005). The RIP kinases: crucial integrators of cellular stress. *Trends Biochem Sci* 30: 151-159.
34. 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.
35. Luo Jing Chen KH, Manish Ponda, Annaiah Cariappa, David Rowitch‡ and Shiv Pillai§ (2001). Protein Kinase C-associated Kinase (PKK), a Novel Membrane-associated, Ankyrin Repeat-containing Protein Kinase.
36. Kwa MQ, Huynh J, Aw J, Zhang LY, 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. *Journal of Biological Chemistry* 289: 31077-31087.
37. 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.
38. Prunier C, Hocevar BA, Howe PH (2004). Wnt signaling: Physiology and pathology. *Growth Factors* 22: 141-150.
39. Lim X, Nusse R (2013). Wnt signaling in skin development, homeostasis, and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5.
40. Shi Y, Shu B, Yang RH, Xu YB, Xing BR, Liu J, Chen L, Qi SH, Liu XS, Wang P, Tang JM, Xie JL (2015). Wnt and Notch signaling pathway involved in wound healing by targeting c-Myc and Hes1 separately. *Stem Cell Research & Therapy* 6.
41. Enlund F, Persson F, Stenman G (2004). Molecular analyses of the candidate tumor suppressor gene, PLAGL1, in benign and malignant salivary gland tumors. *Eur J Oral Sci* 112: 545-547.
42. Landrette SF, Kuo YH, Hensen K, van Doorn-Khosrovani SBV, Perrat PN, Van de Ven WJM, Delwel R, Castilla LH (2005). Plag1 and Plagl2 are oncogenes that induce acute myeloid leukemia in cooperation with Cbfb-MYH11. *Blood* 105: 2900-2907.

43. Letunic I, Doerks T, Bork P (2015). SMART: recent updates, new developments and status in 2015. *Nucleic Acids Res* 43: D257-260.
44. Schultz J, Milpetz F, Bork P, Ponting CP (1998). SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 5857-5864.
45. Van Dyck F, Braem CV, Chen Z, Declercq J, Deckers R, Kim BM, Ito S, Wu MK, Cohen DE, Dewerchin M, Derua R, Waelkens E, Fiette L, Roebroek A, Schuit F, Van de Ven WJM, Shivdasani RA (2007). Loss of the PlagL2 transcription factor affects lacteal uptake of chylomicrons. *Cell Metabolism* 6: 406-413.
46. Zheng H, Ying H, Wiedemeyer R, Yan H, Quayle SN, Ivanova EV, Paik JH, Zhang H, Xiao Y, Perry SR, Hu J, Vinjamoori A, Gan B, Sahin E, Chheda MG, Brennan C, Wang YA, Hahn WC, Chin L, DePinho RA (2010). PLAGL2 regulates Wnt signaling to impede differentiation in neural stem cells and gliomas. *Cancer Cell* 17: 497-509.
47. Inoue H, Nojima H, Okayama H (1990). High-Efficiency Transformation of *Escherichia-Coli* with Plasmids. *Gene* 96: 23-28.
48. Waaijers S, Koorman T, Kerver J, Boxem M (2013). Identification of human protein interaction domains using an ORFeome-based yeast two-hybrid fragment library. *J Proteome Res* 12: 3181-3192.
49. Stynen B, Tournu H, Tavernier J, Van Dijck P (2012). Diversity in genetic in vivo methods for protein-protein interaction studies: from the yeast two-hybrid system to the mammalian split-luciferase system. *Microbiol Mol Biol Rev* 76: 331-382.
50. Annibale A, Coolen AC, Planell-Morell N (2015). Quantifying noise in mass spectrometry and yeast two-hybrid protein interaction detection experiments. *J R Soc Interface* 12: 0573.
51. Jordan M, Schallhorn A, Wurm FM (1996). Transfecting mammalian cells: Optimization of critical parameters affecting calcium-phosphate precipitate formation. *Nucleic Acids Research* 24: 596-601.
52. Simpson RJ, Adams PD, Golemis E (2009). Basic methods in protein purification and analysis : a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., vii, 436 p.
53. Aslan Y, Erduran E, Kutlu N (2000). Autosomal recessive multiple pterygium syndrome: a new variant? *Am J Med Genet* 93: 194-197.

54. McMullan R, Lax S, Robertson VH, Radford DJ, Broad S, Watt FM, Rowles A, Croft DR, Olson MF, Hotchin NA (2003). Keratinocyte differentiation is regulated by the Rho and ROCK signaling pathway. *Current Biology* 13: 2185-2189.
55. Amelio I, Lena AM, Viticchie G, Shalom-Feuerstein R, Terrinoni A, Dinsdale D, Russo G, Fortunato C, Bonanno E, Spagnoli LG, Aberdam D, Knight RA, Candi E, Melino G (2012). miR-24 triggers epidermal differentiation by controlling actin adhesion and cell migration. *Journal of Cell Biology* 199: 347-363.
56. 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.
57. Sandilands A, Sutherland C, Irvine AD, McLean WH (2009). Filaggrin in the frontline: role in skin barrier function and disease. *J Cell Sci* 122: 1285-1294.

11. ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Soyadı, Adı :BOZ, ASIYE BÜŞRA

Uyruğu : T.C.

Doğum tarihi ve yeri: 13/06/1989, TRABZON

Medeni hali : Bekar

E-Posta : assiyebusraboz@hotmail.com

Yazışma adresi : KTÜ SABE Tıbbi Biyoloji AD 61080 TRABZON

EĞİTİM BİLGİLERİ

Mezun Olduğu Kurumun Adı		Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	: KTÜ SABE Tıbbi Biyoloji AD	2013-
Lisans	: Cumhuriyet Üni. Moleküler Biyoloji ve Genetik,	2013
Lise	: Kanuni Anadolu Lisesi	2007

AKADEMİK/MESLEKİ DENEYİMİ

Görevi	Kurum	Süre(Yıl-Yıl)
1. Araştırma görevlisi	KTÜ SABE Tıbbi Biyoloji AD	2014-
2. Erasmus staj hareketliliği	University Hospital Clinic de Barcelona	2012

YABANCI DİL

İngilizce