

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

**DESMİN VE LAMİN B ETKİLEŞİMİNİN
ZEBRA BALIĞINDA ARAŞTIRILMASI**

Ecem Kural

**Tıbbi Biyoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

Ankara

2017

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

**DESMİN VE LAMİN B ETKİLEŞİMİNİN
ZEBRA BALIĞINDA ARAŞTIRILMASI**

Ecem Kural

Tıbbi Biyoloji Programı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Pervin Dinçer

Ankara

2017

ONAY SAYFASI

Desmin ve Lamin B Etkileşiminin Zebra Balığında Araştırılması

Ecem KURAL

Bu çalışma 03.01.2017 tarihinde jürimiz tarafından "Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Tezli Yüksek Lisans Programı" nda yüksek lisans olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:

Yard. Doç. Dr. Beril TALİM

(imza) 

Hacettepe Üniversitesi Çocuk Patoloji AD.

Tez Danışmanı:

Prof. Dr. Pervin DİNÇER

(imza) 

Hacettepe Üniversitesi Tıbbi Biyoloji AD.

Üye:

Prof. Dr. Y. Çetin KOCAEFE

(imza) 

Hacettepe Üniversitesi Tıbbi Biyoloji AD.

Üye:

Doç. Dr. Çağdaş SON

(imza) 

ODTÜ Biyoloji Anabilim Dalı

Üye:

Yard. Doç. Dr. Burcu HAYTA

(imza) 

Hacettepe Üniversitesi Tıbbi Biyoloji AD.

ONAY

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararıyla onaylanmıştır.


(imza)

Prof. Dr. Diclehan Orhan

Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

o Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir. (Bu seçenekle teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etmeniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, teziniz arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir)

o Tezimin/Raporumun 6.01.2019 tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç Kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum. (Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir)

o Tezimin/Raporumun.....tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.

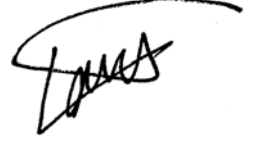
o Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi



06/01/2017

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Tez Danışmanının Prof. Dr. Pervin Dinçer danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.



Ecem Kural

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince bana yol gösteren ve tez çalışmamın bu aşamaya gelmesini sağlayan değerli hocam ve danışmanım Prof. Dr. Pervin Dincer'e, çalışmamı okuyarak değerli yorumlarını benimle paylaşan tez jüri üyeleri Prof. Dr. Çetin Kocaefe, Doç. Dr. Çağdaş Son, Yrd.Doç.Dr. Beril Talim ve Yrd.Doç.Dr. Burcu Hayta'ya teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasının gerçekleştirildiği Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda görev yapan ve eğitimime katkıda bulunan tüm hocalarıma, çalışanlarına, laboratuvar tekniklerini öğrenmeye yardımcı olan sevgili Gülsüm Kayman-Kürekçi'ye ve tüm bölüm arkadaşlarıma süreci bu kadar eğlenceli kıldıkları için teşekkür ederim.

Benden manevi desteklerini asla esirgemeyen sevgili annem ve babama, ve artık ailem olan dostlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Son olarak tez sürecinin her aşamasında sevgi, anlayış ve sabırla bana destek veren Fatih Mangıt'a teşekkürler!

ÖZET

Kural, E., Desmin ve Lamin B Etkileşiminin Zebra Balığında Araştırılması, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2017. Bu tez çalışmasında sitoplazmada yerleşim gösteren ve kas dokusuna özgül bir ara filament protein olan desmin ve çekirdek ara filament proteini olan lamin B arasındaki etkileşim, yabancı tip AB zebra balığında araştırılmıştır. Tez kapsamında yabancı tip zebra balıklarından protein izolasyonu yapılmış ve birlikte immünoçöktürme (*Co-IP*) metodu kullanılarak lamin B ve desmin arasındaki fiziksel etkileşim gösterilmiştir. İlave olarak, yabancı tip AB zebra balığı kas dokusundan alınan kesitlerde *proximity ligation assay (PLA)* tekniği kullanılarak bu platformda da desmin ve lamin B etkileşimi gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Desmin, lamin B, iskelet kası, zebra balığı, birlikte immünoçöktürme, protein protein etkileşimi.

Bu tez TÜBİTAK tarafından 214S174 projesi ile desteklenmiştir.

ABSTRACT

Kural, E., Investigation of Desmin and Lamin B Interaction Using Zebrafish Model, Hacettepe University Institute of Health Sciences, Master of Science Thesis in Medical Biology, Ankara, 2017. In this thesis the interaction between desmin, an intermediate filament protein located in cytoplasm and lamin B, intermediate filament protein of the nucleus was investigated using wild type AB zebrafish as a model organism. Within the scope of the thesis, proteins of interest were isolated from wild type AB zebrafish and a direct interaction was determined via co-immunoprecipitation. To confirm the results, *proximity ligation assay* was used in skeletal muscle sections of wild type AB zebrafish, and a direct interaction between desmin and lamin B was also shown in this technique.

Key words: Desmin, lamin B, skeletal muscle, zebrafish, co-immunoprecipitation, protein protein interaction.

This thesis was supported by TÜBİTAK (Project number: 214S174)

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Desmin	1
1.2 Laminler	1
1.3 Desmin ve Laminler Arasındaki Etkileşim	2
1.4 <i>DES</i> c.1289-2A>G Mutasyonu	3
1.5 Birlikte İmmünçöktürme (<i>Co-IP</i>) ve <i>Proximity Ligation Assay (PLA)</i>	3
1.6 Zebra Balığı	3
1.7 Amaç ve Kapsam	4
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1 İskelet Kasının Yapısı ve İşlevi	5
2.2 Desmin	5
2.3 Nükleer Lamina ve Laminler	7
2.4 LINC Kompleksi	9
2.5 Çekirdek Zarfı	10
2.6 Çekirdek Gözenek Kompleksi	10
2.7 <i>DES</i> c.1289-2A>G Mutasyonu	12

2.8 <i>Co-IP</i> ve <i>PLA</i>	13
2.9 Zebra Balığı	13
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	15
3.1 Gereçler ve Zebra Balıkları	15
3.1.1 Zebra Balıklarının Bakımı ve İdamesi	15
3.1.2 Protein İzolasyonu ve Miktar Tayini	15
3.1.3 <i>Co-IP</i>	16
3.1.4 SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (PAGE)	17
3.1.5 <i>Western Blot</i>	18
3.1.6 <i>PLA</i>	20
3.2. Yöntemler	21
3.2.1 Protein İzolasyonu	21
3.2.2 Protein Miktar Tayini	21
3.2.3 <i>Co-IP</i>	22
3.2.4 <i>Western Blot</i>	23
3.2.5 <i>PLA</i>	24
4. BULGULAR	27
4.1 Zebra Balığı Kas Dokusundan Protein İzolasyonu	27
4.2 <i>Co-IP</i> Deneyleri ve <i>Western Blot</i> Analizleri	27
4.2.1 Desmin <i>Co-IP</i>	27
4.2.2 Lamin B <i>Co-IP</i>	29
4.2.3 Nup214 <i>Co-IP</i>	31
4.3 <i>PLA</i>	32
5. TARTIŞMA	35
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	40
6.1 Sonuçlar	40

6.2 Öneriler

40

7. KAYNAKLAR

41

8. EKLER

9. ÖZGEÇMİŞ



SİMGELER VE KISALTMALAR

°C	Derece santigrat
nM	Nano metre
µm	Mikrometre
APS	Amonyum per sülfat
BCA	Bicinchoninic acid
BSA	Bovine serum albumin
Co-IP	<i>Co-Immunoprecipitation</i>
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DTT	<i>Dithiothreitol</i>
EGTA	<i>Ethylene glycol-bis-N,N,N',N'-tetraacetic acid</i>
KASH	<i>Klarsicht, ANC-1, Syne Homology</i>
kDa	Kilo dalton
LGMD	<i>Limb-girdle muscular dystrophy</i>
LINC	<i>Linker of nucleoskeleton and cytoskeleton</i>
MgCl₂	Magnezyum klorür
NaCl	Sodyum klorür
NESPRIN	<i>Nuclear envelope spectrin repeat proteins</i>
PAGE	<i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PFA	Paraformaldehit
PLA	<i>Proximity ligation assay</i>
SDS	Sodyum dodesil sülfat
TBS	<i>Tris buffered saline</i>

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Desmin yapılanmasının şematik görüntüsü..	6
2.2 Lamin proteinleri: Domain organizasyonu ve protein yapısı.	7
2.3. Lamin polimerlerinin şematik yapısı.	8
2.4 LINC kompleksinin yapısı ve desmin ile etkileşimi	10
2.5 Çekirdek gözenek kompleksinin yapısı.	11
Desmin ve lamin B proteinleri..	27
Desmin <i>Co-IP</i> .	29
Lamin B <i>Co-IP</i> .	30
Nup214 <i>Co-IP</i> ..	32
A, B Çekirdek etrafında (mavi) desmin-lamin B etkileşimi (kırmızı) ; C. Negatif kontrol	34

1. GİRİŞ

1.1. Desmin

Desmin kas hücrelerinin temel ara filament proteindir. 53kDa ağırlığındaki bu protein iskelet kası, kalp kası ve düz kasta ifade olur. Olgun iskelet kasında desmin, Z disklerde miyofibril yapılarını bir arada tutar ve miyofibrilleri sarkolemmaya bağlar (1). Desmin, bağlantılı olduğu diğer ara filament proteinleri ile ağ yapısı oluşturarak miyofibrillerin çekirdeğe, mitokondriye ve sarkolemmaya bağlantısını sağlayarak, kas hücresinin kasılması ve gevşemesi sırasında hücresel bütünlüğün korunmasını ve güç aktarımını kolaylaştırır (1,2). Desmin proteini 2q35'de yerleşim gösteren desmin geni (*DES*) tarafından kodlanmaktadır.

1.2 Laminler

Laminler, çekirdeğin ara filament proteinleridir. Hücrede çekirdek içerisinde, iç zara bağlı olarak konumlanmışlardır. Laminler, mitoz sırasında çekirdek zarfının yıkımında ve tekrar yapımında görev almakla beraber çekirdek gözenek kompleksinin çekirdek zarfına yerleşiminde de görevlidir. Lamin proteinleri çekirdeğe mekanik destek veren proteinlerdir. Kas hücreleri gibi mekanik olarak çok aktif olan hücrelerin çekirdekleri, kendilerini çevreleyen hücre iskeleti ile çok kuvvetli bir fiziksel etkileşime ve ardarda gelen mekanik strese dayanmak için güçlü bir yapısal desteğe ihtiyaç duyar. Çekirdek ve hücre iskeleti mekaniğinin bozulması ilerleyen süreçte kas dejenerasyonuna neden olur (3).

Laminler, lamin A, lamin B₁, lamin B₂ ve lamin C olmak üzere dört gruba ayrılırlar. Lamin A ve lamin C, lamin A geninin (*LMNA*) alternatif *splicing* ürünleridir. Canlılarda ağırlıklı olarak farklılaşmış dokularda ifade edilir. B tipi laminler tüm hücrelerde ifade edilmektedir (4). Lamin B₁, lamin B1 geninden (*LMNB1*) kodlanan temel lamin B proteindir (5). Lamin B₂ ise lamin B2 geninden (*LMNB2*) kodlanan lamin B proteini olup hücredeki rolü hakkında çok az veri mevcuttur.

1.3 Desmin ve Laminler Arasındaki Etkileşim

Desmin proteininin çekirdekte yer alan lamin A/C proteinleri ile *linkers of nucleocytoskeleton and cytoskeleton* (LINC) kompleksi aracılığıyla etkileşime girdiği bilinmektedir. LINC kompleksi genel olarak dört temel eleman içerir. Bunlar, laminler, çekirdek iç zar proteinleri, çekirdek dış zar proteinleri ve hücre iskeleti proteinleridir. Nesprin, SUN, Emerin, Plektin, Luma ve Lamin proteinleri LINC proteinlerinden bazılarıdır. LINC kompleksi nükleer lamina ile hücre iskeleti arasında fiziksel bir bağlantı kurar. İç çekirdek zarında yerleşim gösteren SUN proteinleri lamin A/C, Lamin B1 ve Lamin B2 ile etkileşim halindedir. SUN proteinleri aynı zamanda iç ve dış çekirdek zarları arasındaki alanda *nuclear envelope spectrin repeat* (NESPRIN) protein ailesi elemanları olan *nesprin 1* ve *nesprin 2* proteinleri ile de etkileşim halindedir. Nesprinler dış çekirdek zarından sitoplazmaya doğru uzanır ve genellikle aracı bir protein vasıtasıyla hücre iskeleti proteinlerine bağlanır (6). Bir hücre iskeleti proteini olan desmin, LINC kompleksine plektin proteini aracılığı ile bağlanarak çekirdek ve hücre iskeleti arasında mekanik bağlantı kurulmasını sağlar (7). Desmin ve lamin B etkileşiminin doğrudan ya da LINC kompleksi aracılığı ile olduğuna dair günümüz literatüründe hiç bir bilgi mevcut değildir (8,9).

Georgatos ve ark. 1987 yılında yaptıkları bir çalışmada (10) *in vitro* koşullarda desminin lamin B ye bağlandığını göstermiş ve bağlanma bölgesinin 413-434. amino asitler arasında yer aldığını belirtmiştir. Lockard ve Bloom (1993) (9) tarafından yayınlanan çalışmada ise elektron mikroskopisi ile desminin çekirdek gözenek kompleksinden içeri doğru uzandığı gösterilmiş ve çekirdek gözenek kompleksinin desmin-lamin B etkileşiminin gerçekleştiği yer olabileceği öngörülmüştür.

Lamin B, çekirdek gözenek kompleksi proteinlerinden biri olan Nup153 proteini aracılığıyla çekirdek gözenek kompleksine tutunur (4,11). Lamin B nin Nup153 ile etkileşimde olduğunun gösterilmesi (11,12) ve desminin çekirdek gözenek kompleksine kadar uzanması, desmin-lamin B

etkileşiminin çekirdek gözenek kompleksi arasından olduğu ihtimalini arttırmaktadır.

1.4 *DES* c.1289-2A>G Mutasyonu

LGMD2 tanısı alan bir ailede *DES* geninde c.1289-2A>G mutasyonu saptanmıştır. Mutasyon sonucunda desmin proteininin kuyruk domainine 16 aminoasit eklenmiştir. Eklenen 16 aminoasit, desminin lamin B'ye bağlanma domaini olarak belirlenen (10) bölgede yer almaktadır (13).

1.5 Birlikte İmmünçöktürme (*Co-IP*) ve *Proximity Ligation Assay (PLA)*

Protein-protein etkileşimlerinin araştırılmasında birlikte immünçöktürme yöntemi (*co-immunoprecipitation, Co-IP*) sıklıkla kullanılmaktadır. *Co-IP* tekniği, prensip olarak immünçöktürmeye benzeyen ancak antijenin, antijene bağlanan protein ya da ligandlarla beraber çöktürülmesine olanak veren yöntemdir.

PLA sistemi *in-situ Co-IP* olarak da bilinen bir yöntemdir. Birbirine 40 nm'den daha yakın mesafede bulunan proteinleri, işaretli problemler aracılığıyla tanıyarak, aralarında bir etkileşim olup olmadığını anlaşılmasını sağlayan bir tekniktir.

1.6 Zebra Balığı

Zebra balığı (*Danio rerio*) tropik bir balık türü olup bilim dünyasında gittikçe artan bir öneme sahiptir. Bunun nedeni, jenerasyon zamanının kısalığı, düşük maliyet, kolay bakım, embriyoların transparan olması ve gen manipülasyonlarının kolaylığıdır. Ayrıca doğurganlığın yüksek olması nedeniyle haftada 200-300 yumurta elde edilebilmesi, gelişimin hızlı olması ve önemli organların fertilizasyondan 24 saat sonra oluşması en büyük avantajlarındandır. Zebra balığı memeli model organizmalarına kıyasla insana daha uzak olmasına rağmen, iskelet kası ile ilişkili ortolog genlerin temel

işlevleri zebra balığı ile insan arasında korunmuştur (14). Birçok kas distrofisi modellenmiştir (15).

1.7 Amaç ve Kapsam

Georgatos ve ark. (10) ve Lockard ve ark. (9) tarafından *in vitro* yapılan çalışmalar, sırasıyla, desminin lamin B bağlanma domainine sahip olduğunu ve bu etkileşimin çekirdek gözenek kompleksi aracılığı ile gerçekleşmesinin olası olduğunu göstermiştir. 1993 yılından sonra literatürde bu konuyla ilgili bir araştırmaya rastlanmamıştır. Ardından Çetin ve ark. (13) tarafından LGMD2 tanısı almış hastaya ait kas dokusu biyopsi örnekleriyle yapılan çalışmada, *DES* geninde otozomal resesif olarak aktarılan bir mutasyon (*DES* c.1289-2A>G) tespit edilmiş ve mutasyonun desmin ifadesini değiştirmedeği gösterilmiştir. Mutasyon, mRNA'nın okunma çerçevesini bozmadan desmin proteinin kuyruk domaininde yer alan olası lamin B bağlanma bölgesine 16 amino asidin eklenmesine neden olmaktadır. Ayrıca, desminopati hastalarında görülen desmin mutasyonunun neden olduğu agregat birikimi hastada görülmemiştir. Hastaya ait kas dokusu örneği konfokal mikroskopi ile incelendiğinde sağlıklı bireylerde desmin-lamin B etkileşimi görülürken, hasta bireylerde etkileşim gözlenmemiştir. Çekirdek morfolojisi incelendiğinde, çekirdek yapısının korunmuş olduğunun tespit edilmesi, yapısal destek için pek çok protein olduğunu; ancak mutasyonun, desmin-lamin B etkileşimini bozarak hücrelerin mekanik iletisini yavaşlattığını ve uzun süreçte kas dejenerasyonuna ve kas yıkımına neden olduğunu düşündürmüştür.

Tüm bu bilgiler ışığında, desmin ve lamin B arasında doğrudan bir etkileşim olduğu hipotezi kurulmuş ve tez kapsamında desmin ve lamin B etkileşiminin *Co-IP* ve *PLA* teknikleri kullanılarak yabancı tip AB zebra balıklarında araştırılması hedeflenmiştir.

Gerçekleştirilen tez çalışması kapsamında yabancı tip AB zebra balıklarında desmin ve lamin B proteinlerinin doğrudan etkileşimde olduğu gösterilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 İskelet Kasının Yapısı ve İşlevi

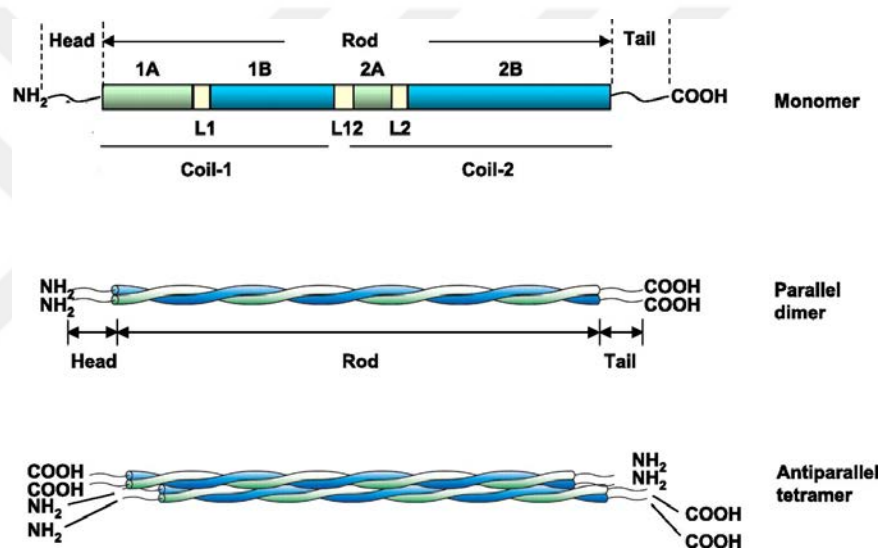
İskelet kası üç temel kas tipinden bir tanesidir ve istemli hareketlerden sorumludur. İskelet kası, ince iplik şeklinde sitoplazması olan ve plazma zarının hemen altında yerleşim gösteren çok çekirdekli kas liflerinin bir araya gelmesiyle oluşmaktadır.

Hücre sitoplazması içerisinde en küçük kasılma birimi olan miyofibriller bulunmaktadır. Miyofibril 1-2 µm çapında silindirik yapıya sahip olup sarkomer adı verilen küçük kasılabilir birimler içerir. Her sarkomer düzenli olarak yerleşim gösteren ince filamentler ve kalın filamentlerden oluşmaktadır. İnce filamentler, aktin ve aktinle ilişkili proteinlerden oluşur. Her filament bir ucundan sarkomerin sonunda bulunan Z disklerine bağlanırken diğer uçları sarkomerin ortasına doğru uzanarak, miyozinin kasa özgül izoformlarından oluşan kalın filamentler ile bir araya gelir. Kasılma esnasında meydana gelen sarkomer kısalması miyozin filamentlerinin aktin filamentleri içerisinde kayması ile gerçekleşir. Her miyofibril içerisinde yer alan binlerce sarkomerin seri ve senkronize bir şekilde kısalması iskelet kasının kasılma işlevini yerine getirmesini sağlar.

2.2 Desmin

Desmin kas hücrelerinin temel ara filament proteindir. 2q35'de yerleşim gösteren *DES* geni tarafından kodlanır. 53 kDa ağırlığında olan ve çizgili kasların Z-disklerinde yerleşim gösteren desmin, tip III ara filament proteindir. Desmin, miyofibriler Z-disk etrafında üç boyutlu bir yapı oluşturarak ve kasılabilir elemanları subsarkolemmal hücre iskeletine, çekirdeğe ve diğer organellere bağlayarak kasın hücre mimarisinin korunmasını sağlar (2). Desmin aynı zamanda kas hücresinin kasılıp gevşemesi esnasında hücresel bütünlüğün korunmasını sağlar ve güç aktarımını kolaylaştırır (1,2).

Tipik bir ara filament proteininde olduğu gibi desminde de amino ve karboksil uçlarında bulunan baş ve kuyruk domainleri ve bunların arasında oldukça korunmuş α -helikal *rod* domaini yer alır (16) (Şekil 2.1). Ara filamentler arasında boyut ve dizi farklılığı gösteren baş domaini desminde 84 aminoasit uzunluğundadır. Desmin kuyruk domaini %70 oranında heptat tekrarlarından yoksun rastgele yapılanmaya sahiptir. Kuyruk domaini desminin yapılanmasında, filament yapısının uzamasında ve korunmasında görevlidir (17,18). Ancak kuyruk domainin en önemli fonksiyonu hücre iskeleti proteinleriyle etkileşime girerek, sitoplazmik ara filament ağının oluşmasını sağlamaktır (19).



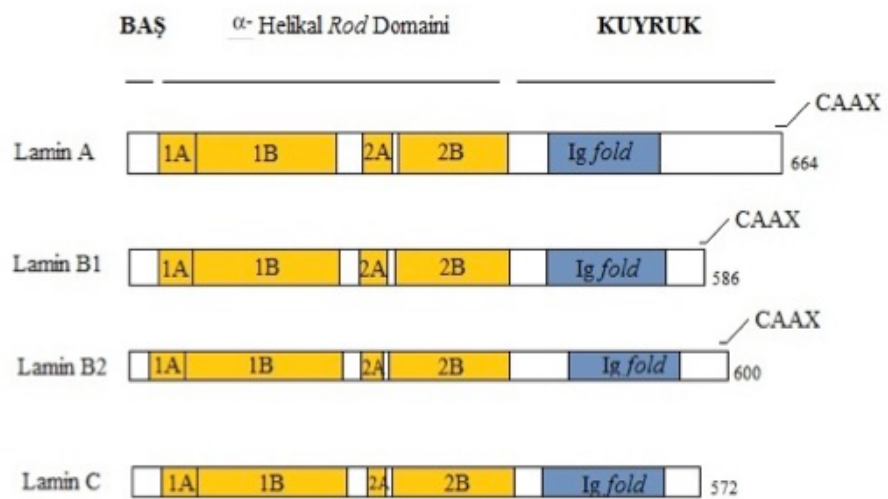
Şekil 2.1. Desmin yapılanmasının şematik görüntüsü. Desmin 4 segmentten oluşan (1A, 1B, 2A ve 2B) merkezi bir rod domaini ile amino ve karboksil domainlerinden oluşur. Bu domainlerin arasında 3 adet bağlayıcı (*linker*) domain (L1, L12 ve L2) bulunur. 2 monomer paralel bir şekilde bir araya gelerek dimer yapısını ve 2 dimer antiparalel şekilde bir araya gelerek tetramer yapısını oluşturur (Tang'dan uyarlanmıştır (2008) (20)).

Georgatos ve ark. tarafından yapılan (10) çalışmada desmin, trombin ve lizin-spesifik proteazlar aracılığı ile parçalanmış ve elde edilen desmin yan ürünlerinin lamin B'ye bağlanma afiniteleri değerlendirilmiştir. Afinitite kromatografisi ve *overlay assay* sonuçları desminin kuyruk domaininde yer alan 413-434. amino asitler arasında kalan bölgenin lamin B bağlanma bölgesi olduğunu göstermiştir (10).

2.3 Nükleer Lamina ve Laminler

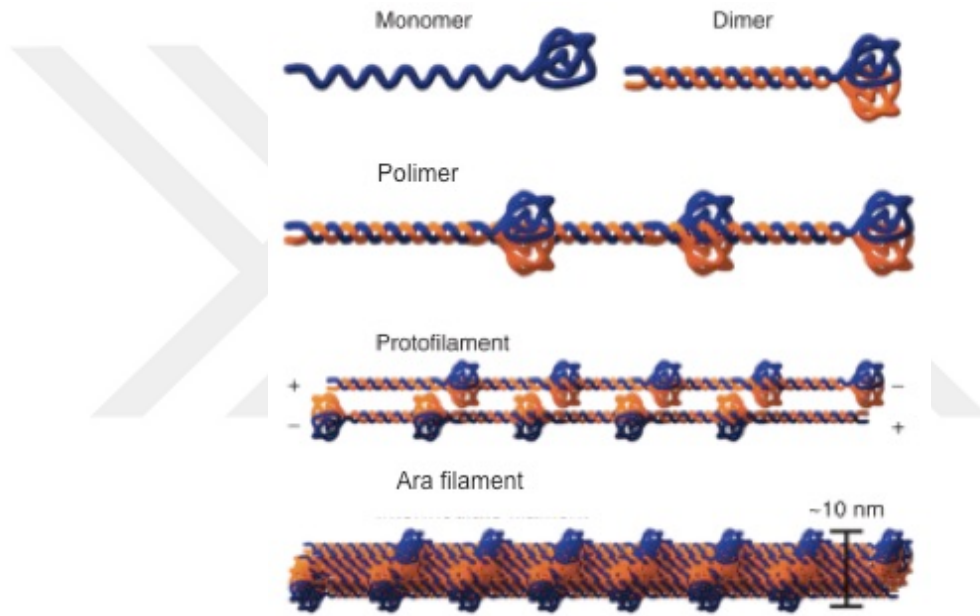
Nükleer lamina, çekirdek iç zarının hemen altında yer alan, hücrenin boyutu, mekanik stabilitesi ve çekirdek şeklinin korunmasına yardımcı protein ağıdır (21). Nükleer laminanın temel yapısal proteini laminlerdir (22).

Laminler çekirdeğin yapısal özellikleri açısından kritik öneme sahip tip V ara filament proteinleridir. Lamin A ve lamin B olmak üzere iki ana gruba ayrılır (Şekil 2.2). A-tipi laminler olan lamin A ve lamin C, *LMNA*'nın *alternatif-splicing* ürünleri iken, B-tipi laminlerden, lamin B₁ *LMNB1* ve lamin B₂ *LMNB2* 'den sentezlenmektedir. Ayrıca *LMNA*'nın, lamin C₂ ve lamin AΔ10 olarak bilinen, hücredeki fonksiyonları ve regülasyonu henüz tam olarak açıklanamamış iki adet *alternatif splicing* ürünü daha mevcuttur (23). A tipi laminlerin evrimsel süreçte B tipi laminlerden *exon-shuffling* aracılığı ile oluştuğu düşünülmektedir (24). Hutchison (2002) (4) B tipi laminlerin tüm hücre tiplerinde ifade olduğunu belirtmiştir. Buna karşılık A tipi laminler ağırlıklı olarak gelişimsel sürece bağlı olarak ifade olur (25).



Şekil 2.2 Lamin proteinleri: Domain organizasyonu ve protein yapısı. α -helikal rod domaini 1A,1B, 2A ve 2B olmak üzere 4 segmentten oluşur (sarı). Kuyruk domaini, çekirdek lokalizasyon sinyalini, immunoglobulin domainini (mavi) ve post transkripsiyonal modifikasyonlar sırasında farnesillenmiş korunmuş CAAX kutusunu taşır (Dittmer ve ark.'dan uyarlanmıştır (2011) (26)).

Laminler evrim süreci boyunca korunmuş proteinlerdir. Tıpkı diğer ara filament proteinleri gibi merkezi α -helikal *rod* domaini ile amino ve karboksil uçlarında yer alan baş ve kuyruk domainlerinden oluşur (25). *Rod* domaini oldukça korunmuştur (26,27). Laminler hücre içerisinde üst yapılanmaya giderken öncelikle lamin monomerleri bir araya gelerek merkezi *rod* domaini aracılığı ile dimer yapısını oluşturur. Dimer yapılar anti-paralel olarak bir araya gelir ve protofilament yapısını oluşturur. Üç-dört adet protofilamentin bir araya gelmesiyle yaklaşık 10 nm çapında ara filament yapısı oluşur (26) (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Lamin polimerlerinin şematik yapısı. Lamin dimerleri, iki monomerin α helikal *rod* domaini aracılığıyla bir araya gelmesi ile oluşur. Dimerlerin antiparalel organizasyonu ile polimer, iki polimerinin antiparalel organizasyonu ile protofilament ve 3-4 protofilamentin bir araya gelmesi ile ara filament yapısı oluşur (Dittmer ve ark.'dan uyarlanmıştır (2011) (26)).

Mitoz bölünme sırasında A tipi laminler çözünür halde bulunurken, B tipi laminler parçalanan çekirdek zarına bağlı durumdadırlar. B tipi laminlerin bölünme sırasında çekirdek zarına bağlı olmalarının iki nedeni olduğu düşünülmektedir. Bunlardan ilki, posttranslasyonel modifikasyonlar esnasında A tipi laminlerin karboksil ucunda bulunan sistein amino asitlerinin uzaklaştırılması nedeniyle, hücre zarı ile ilişki kurmalarının zor olduğu varsayımıdır. Bir diğer açıklama ise B tipi laminlerin çekirdek zarı ile

etkileşimlerinin çekirdek iç zarı proteinleri aracılığıyla güçlendiriliyor olmasıdır (2). Lamin B farnesillenirken, lamin A ve C'nin farnesillenmemesi de bu durumu açıklayan etkenlerden biri olabilir. Zira farnesilasyonun çekirdek iç zarı ve lamin B arasındaki etkileşimi güçlendirdiği düşünülmektedir (28).

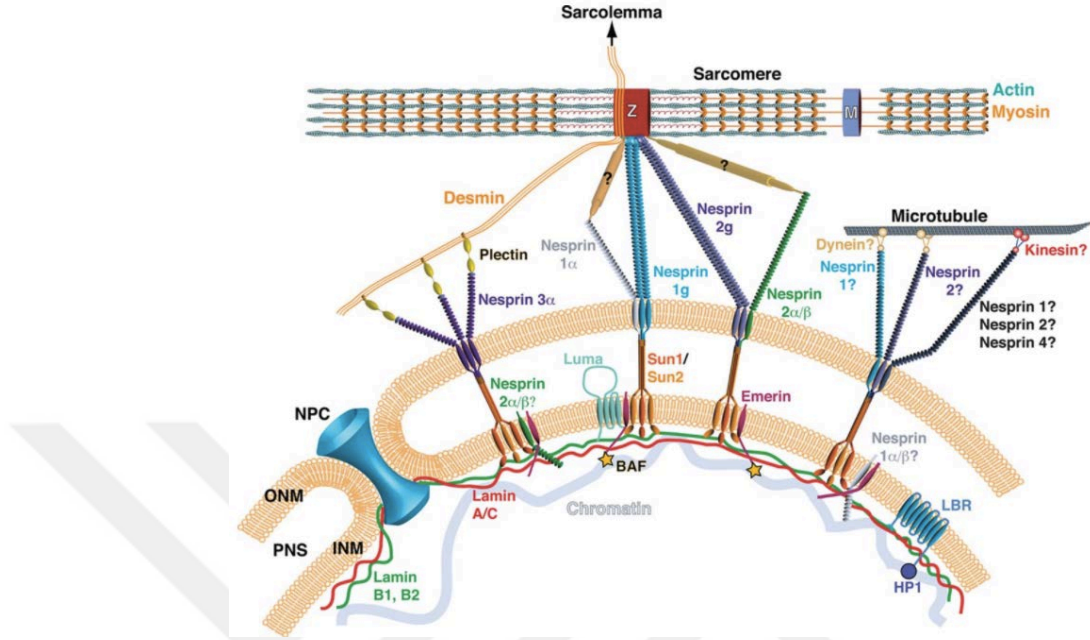
Laminlerin yapısal ve mekanik olmak üzere 2 temel görevi vardır. Yapısal görevleri arasında, çekirdek zarfının bütünlüğünün korunması, DNA replikasyonun düzenlenmesi, hücre büyümesinin ve bölünmesinin organizasyonu bulunmaktadır (25,27,29). Laminler aynı zamanda mekanotransdüksiyonda görev almaktadırlar (30,31). Farklı tip laminlerin hücre içerisinde farklı görevleri vardır. Örneğin, lamin A/C periferik sinir sisteminin ve iskelet sisteminin normal gelişiminde (32) ve çekirdek stabilitesinin korunmasında önemli bir yere sahiptir (33). B tipi laminlerin her birinin özgün görevleri tam olarak bilinmemekle birlikte fonksiyonel bir çekirdek laminasının oluşabilmesi için gereklilikleri gösterilmiştir (25).

2.4 LINC Kompleksi

LINC kompleksi çekirdek ve sitoplazma arasında fiziksel bağlantıyı kuran ve mekanik sinyallerin çekirdek zarfına doğrudan iletilmesini sağlayan bir protein kompleksidir (34).

LINC kompleksi genel olarak dört temel eleman içerir. Bunlar, laminler, çekirdek iç zar proteinleri, çekirdek dış zar proteinleri ve hücre iskeleti proteinleridir. Nesprin, SUN, Emerin, Plektin, Luma ve Lamin proteinleri LINC proteinlerinden bazılarıdır. İç çekirdek zarında yerleşim gösteren SUN proteinleri lamin A/C ile etkileşim halindedirler (35). SUN proteinleri aynı zamanda SUN domainleri aracılığı ile, iç ve dış çekirdek zarları arasındaki alanda, NESPRIN protein ailesi elemanları olan *nesprin 1* ve *nesprin 2* proteinlerinin KASH domainleri ile de etkileşim halindedir (36). Nesprinler dış çekirdek zarından sitoplazmaya doğru uzanır ve genellikle aracı bir protein vasıtasıyla hücre iskeleti proteinlerine bağlanır (6). Bir hücre iskeleti proteini olan desmin, LINC kompleksine plektin proteini aracılığı ile

bağlanarak çekirdek ve hücre iskeleti arasında mekanik bağlantı kurulmasını sağlar (7) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4 LINC kompleksinin yapısı ve desmin ile etkileşimi (Stroud ve ark.'dan uyarlanmıştır (2014) (6)).

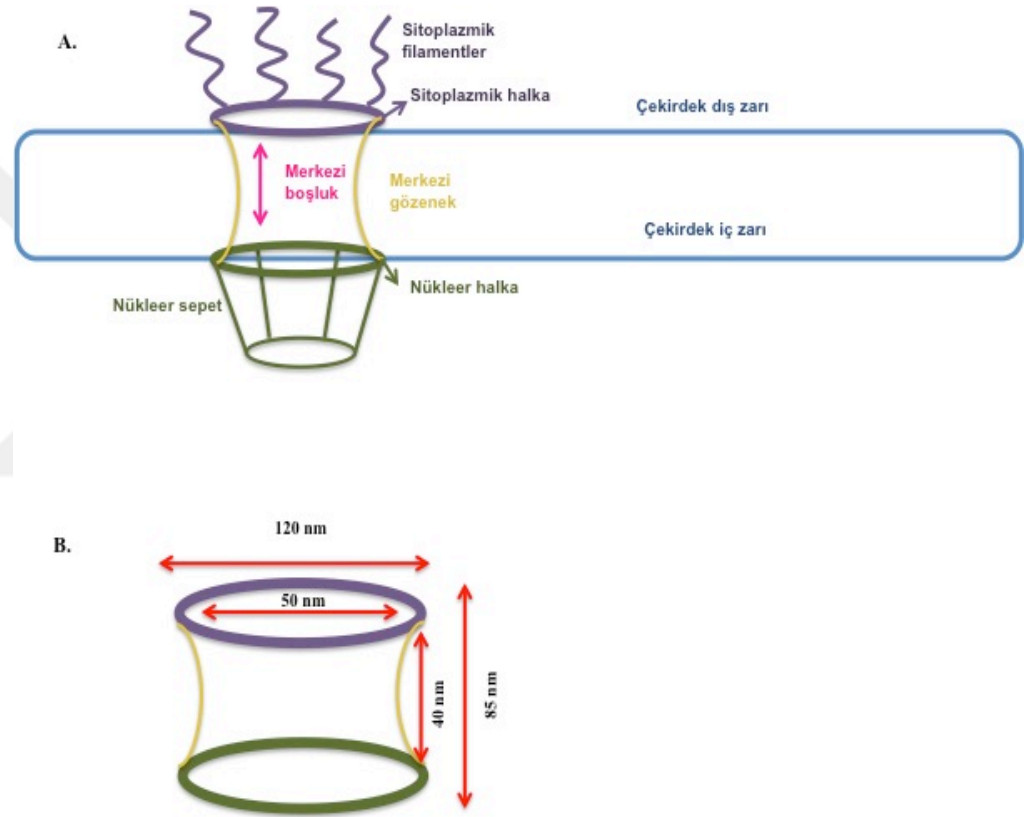
2.5 Çekirdek Zarfı

Çekirdek zarfı DNA'yı çevreleyen ve sitoplazmadan ayıran bir yapıdır. Çekirdek zarfı, çekirdek iç zarı ve çekirdek dış zarı olarak bilinen eş merkezli iki zar, zarlar arası boşluk, çekirdek gözenek kompleksi ve çekirdek laminasından oluşur (25,37). Zarf yapısı, çekirdek ve sitoplazma arasında, çekirdek gözenek kompleksi aracılığıyla seçici geçirgenliği sağlar (38).

2.6 Çekirdek Gözenek Kompleksi

Çekirdek gözenek kompleksi nükleoporin adı verilen, evrimsel olarak korunmuş yaklaşık 500 adet proteinden meydana gelmektedir (39,40). İnsanda tüm nükleoporinlerin bir arada olduğu bir çekirdek gözenek kompleksi yapısı yaklaşık 125 MDa ağırlığındadır (41). Merkezi ve periferal olmak üzere iki fonksiyonel bölgeden oluşan çekirdek gözenek kompleksi, çekirdek zarfı boyunca uzanır ve bu bölgelerde çekirdek iç zarı ve çekirdek

dış zarı kaynaşmış halde bulunur (39). Nükleoplazma ve sitoplazma arasındaki madde geçişinin neredeyse tamamı çekirdek gözenek kompleksi aracılığı ile olur. Çekirdek içerisine madde taşınımının yanı sıra çekirdek gözenek kompleksinin DNA tamiri, gen ifadesi, yaşlanma ve apoptoz gibi hücrel olaylarda da görev aldığı belirtilmiştir (42). Çekirdek gözenek kompleksinin merkezi bölgesi çekirdek zarfına gömülü halde bulunurken, periferel bölge sitoplazma ve çekirdeğin iç kısımlarına kadar uzanır (43) (Şekil 2.5).



Şekil 2.5 Çekirdek gözenek kompleksinin yapısı. A. Çekirdek gözenek kompleksi genel yapısı (Raices ve ark.'dan uyarlanmıştır (2012) (44)), B. Çekirdek gözenek kompleksinin boyutları (Maimon ve ark.'dan uyarlanmıştır (2012) (45)).

Çekirdek gözenek kompleksini oluşturan nükleoporinler 4 alt gruba ayrılırlar: membranı kateden proteinler, merkezi iskeleti (sitoplazmik ve nükleer halka) oluşturan proteinler, bağlayıcı (*linker*) proteinler ve fenilalanin-glisin (FG) grubu proteinler (43). Maya ve memelilerde 3 adet transmembran Nup (nucleoporin proteini) birlikte çekirdek gözenek

kompleksinin çekirdek zarfına yerleşmesini sağlayan sitoplazmik halkayı oluşturur (43). Merkezi iskeleti oluşturan yaklaşık 10 adet Nup ise sitoplazmik ve nükleoplazmik halkayı oluşturur (43). Merkezi iskelet yapısı türler arası korunmuş çekirdek gözenek kompleksi alt protein gruplarından oluşur ve çekirdek gözenek kompleksinin merkezinde yer alan ve çekirdek ile sitoplazma arasındaki madde taşınımının gerçekleştiği merkezi boşluğu korur (43). Merkezi gözeneğe bağlı olarak bulunan bir çok katlanmamış FG grubu Nup ise merkezi taşıma hattı üzerinde çekirdekten sitoplazmaya kadar uzanırlar (43). Son olarak bağlayıcı Nup'lar merkezi iskelet yapısı ve FG grubu Nup'lar arasında bağlantı kurulmasını sağlar (43).

Çekirdek gözenek kompleksi, çekirdek içi protein filamentleri (46–48) ve nükleer lamina ile (49,50) etkileşim halindedir. Nükleer lamina ve çekirdek gözenek kompleksi arasındaki etkileşimin FG grubu proteinlerinden biri olan Nup153 aracılığı ile olduğu gösterilmiştir (12). Nup153'ün aynı zamanda çekirdek gözenek kompleksinin yapılanması, çekirdek zarfına yerleşimi ve çekirdek proteinlerinin çekirdek içine taşınmasında görevli olduğu gösterilmiştir (51).

Protein-protein etkileşimlerini gösteren veri tabanlarından biri olan STRINGdb (*Search Tool for the Retrieval of Interacting proteins database*) incelendiğinde Nup153'ün bağlanma partnerlerinden birinin, bir diğer FG grubu proteini olan Nup214 olduğu tespit edilmiştir. Bu etkileşimi deneysel olarak gösteren bir yayın olmamakla birlikte *in silico* verilerde, Nup214 ve Nup153'ün etkileşimde oldukları görülmüştür.

2.7 DES c.1289-2A>G Mutasyonu

Çetin ve ark. (13) tarafından yapılan çalışmada LGMD2 tanısı alan bir ailede iki hasta bireyde *DES* geninde c.1289-2A>G mutasyonu saptanmıştır. Mutasyon sonucunda desmin proteininin kuyruk domainine 16 aminoasit eklenmiştir (13). Eklenen 16 aminoasit, 1987 yılında yayınlanan makalede (10) tanımlanmış olan desminin lamin B'ye bağlanma bölgesini (413-434. amino asitler) bozmaktadır. Desmin ve lamin B için konfokal mikroskopi

görüntüleri incelendiğinde sağlıklı bireylerde, çekirdekte desmin-lamin B etkileşimi gözlenirken, hasta kas biyopsisi incelendiğinde desmin ve lamin B'nin etkileşimde olmadığı gözlenmiştir (13).

2.8 Co-IP ve PLA

Protein-protein etkileşimlerinin araştırılması amacıyla immünçöktürme yöntemi sıklıkla kullanılmaktadır. İmmünçöktürme bir karışım içerisinde, antikor bağlama özelliğine sahip boncuklara tutunan özgül antikoları kullanarak, tek bir antijeni saflaştırmak üzere tasarlanmış bir yöntemdir. Bu yöntem, proteinlerin izole edilmesi ya da farklı proteinleri içeren bir karışım içerisinde hedef proteinin konsantrasyonunun yoğunlaştırılması için kullanılmaktadır. Öte yandan *Co-IP* tekniği, prensip olarak immünçöktürmeye benzeyen ancak antijenin, antijene bağlanan protein ya da ligandlarla beraber çöktürülmesine olanak veren ve protein-protein etkileşimlerinin belirlenmesinde kullanılan bir yöntemdir. *Co-IP* tekniği her protein-protein etkileşimi için farklı ve reaksiyon koşulları o etkileşime özgül olan bir tekniktir.

2.9 Zebra Balığı

Zebra balığı, (*Danio rerio*) sazangiller familyasına ait tropikal bir tatlı su balığıdır. İlk defa 1960'larda araştırmalarda kullanılmaya başlandıktan sonra, yaygın kullanım alanının getirdiği avantajla birlikte en popüler model organizmalardan biri haline gelmiştir. Zebra balığı üreme hızının yüksek olması, *ex-utero* gelişim gösteren şeffaf embriyolar ve kolay bakımı nedeniyle biyomedikal çalışmalar için oldukça çekici bir model haline gelmiştir. İnsana ait genlerden yaklaşık %70'i en azından bir adet zebra balığı ortoloğuna sahiptir (52). Pek çok gen zebra balığında duplike olarak bulunur. Bunlardan bir tanesi de desmin genidir. Desmin proteini, zebra balığında 55,7 kDa ağırlığındaki desmin a (*desma*) ve 54,2 kDa ağırlığında olan desmin b (*desmb*) olmak üzere iki kopya halinde bulunur (53). *Desma*, insana ait desmin geni ile %81 benzerlik gösterirken, *desmb* %83 oranında benzerdir (53). Yapılan çalışmalarda *desma*'nın zebra balığında yüksek oranda çizgili

kasta ifade olduğu, *desmb*'nin ise düz kasta ifade olduğu gösterilmiştir (P.Dinçer, yayınlanmamış veri).

Zebra balığında ortoloğu bulunan bir diğer gen distrofin proteinini kodlayan gendir. Memelilerde olduğu gibi, zebra balıklarında da gelişiminin erken döneminde distrofin ve distrofin ile ilişkili proteinler ifade edilmektedir (54). Bu proteinler zebra balığının kas stabilitesinin korunmasında önemlidir (55). Distrofin *null* zebra balığında fertilizasyon sonrası üçüncü günden itibaren kas dejenerasyonunun başladığı gösterilmiştir (56). Bu bilgiler ışığında zebra balığının kas hastalıkları için ideal bir model olduğu kanısına varılmış ve pek çok kas distrofisi zebra balığında modellenmiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1 Gereçler ve Zebra Balıkları

3.1.1 Zebra Balıklarının Bakımı ve İdamesi

Zebra balıkları Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma ve Uygulama Merkezi Zebra Balığı Araştırma Laboratuvarı'nda T.C Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı tarafından belirlenen hayvan refahı yönetmeliğine uygun olarak yetiştirilmiştir.

Deneyleerde kullanılan zebra balıkları herhangi bir mutasyon taşımayan yabancı tip AB balıklardır.

Tüm deneyleer Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulu'nun onayı alınarak (18.02.2014 tarihli 2014/01, Karar no: 2014/07-08) gerçekleştirilmiştir (Bkz., EK 1).

3.1.2 Protein İzolasyonu ve Miktar Tayini

Protein izolasyon tamponu (pH 7.4)

- Tris-HCl : 0.1M
- NaCl : 0.15M
- EGTA : 1mM
- NP-40 : %1
- Gliserol : %5
- MgCl₂ : 0.01M
- DTT : 5mM
- SDS : %2
- Triton-X : %0.25
- Proteaz inhibitörü tableti (Roche)

Diyaliz membranı (Thomas, *M.W. Cutoff* 12,000)

Diyaliz çözeltilisi

- Triton x-100 : %1
- Tris HCl (pH 7.2) : 20mM
- NaCl : 150mM
- MgCl₂ : 2 mM
- Proteaz inhibitör tableti (Roche)
- dH₂O

Dounce homojenizatör

Sonikatör (Sonics Vibra Cell, işlemci modeli VCX 130, prob modeli CV 18)

Bicinchoninic Acid (BCA) Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., NH, USA)

3.1.3 Co-IP

Manyetik tüplük (New England BioLabs)

Protein A/G manyetik boncuklar (Pierce™, Thermo Scientific)

Co-IP tamponu (pH 7.4)

- Tris-HCl : 0.1M
- NaCl : 0.15M
- EGTA : 1mM
- NP-40 : %1
- Gliserol : %5
- MgCl₂ : 0.01M
- SDS : %2
- Proteaz inhibitörü tableti (Roche)

Laemmlı yükleme tamponu (2x):

- SDS : %4
- Gliserol : %20
- Tris-HCl (pH 6.8) : 120mM
- dH₂O : 2.8 ml
- Brom-fenol mavisi : %0.02

Grant Bio PTR 25 mini rotator

Tavşan poliklonal anti-desmin (Sigma, d8281) (antikor, zebra balığında bulunan desma ve desmb proteinlerinin her ikisini de tanımaktadır).

Tavuk poliklonal anti-lamin B (Abcam, ab90169)

Keçi serumundan IgG (SIGMA, I5256)

3.1.4 SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi (PAGE)

% 10' luk ayırıcı jel:

- %30 Akrilamid / bisakrilamid : 1,7ml
- 1,5M Tris (pH 8,8) : 1,3 ml
- % 10 SDS : 0,05 ml
- % 10 amonyum persülfat (APS) : 0,05 ml
- TEMED : 0,005 ml
- Distile su : 2 ml

%5' lik toplayıcı jel:

- %30 Akrilamid / bisakrilamid : 0,83 ml
- 1M Tris (pH 6,8) : 0,63 ml
- % 10 SDS : 0,05 ml
- % 10 amonyum persülfat (APS) : 0,05 ml
- TEMED : 0,005 ml
- Distile su : 3,4 ml

3.1.5 Western Blot

Mini Protean II elektroforez seti (Bio-Rad)

Laemmli yükleme tamponu (2x):

- SDS : %4
- Gliserol : %20
- Tris-HCl (pH 6.8) : 120mM
- dH₂O : 2.8 ml
- Brom-fenol mavisi : %0.02

Precision Plus Protein™ Dual Color Standarts (mol wt 10,000-250,000 Da)
(Bio-Rad)

Yürütme tamponu (pH 8,3):

- Tris baz : 3,03 g
- Glisin : 14,4 g
- SDS : 1 g
- Distile su : 1 L

Yarı kuru elektroforetik transfer cihazı (Bio-Rad, *TransBlot Turbo Transfer System*)

Nitroselüloz membran (0,45µm kalınlığında) (Thermo Scientific)

Whatmann filtre kağıdı

Yarı kuru transfer tamponu (pH 8,3):

- Tris baz : 25 mM
- Glisin : 192 mM
- Metanol : %20
- Distile su

Ponceau S çözeltisi:

- %0,1 Ponceau S (Sigma)
- %5 Glasiyal asetik asit

Coomassie Blue çözeltisi:

- %0,025 *Coomassie Brilliant Blue R-250*
- %40 Metanol
- %7 Glasiyal asetik asit

Yıkama tamponu (1X TBS-T) (pH 7,4):

- | | |
|--------------|----------|
| • Trizma baz | : 48 mM |
| • NaCl | : 154 mM |
| • Tween-20 | : %0,1 |
| • Distile su | |

Bloklama tamponu:

- | | |
|-------------------|-------|
| • Yağsız süt tozu | : %5 |
| • %0,2 TBS-T | : %95 |

Primer antikorlar:

- Tavşan poliklonal Anti-Desmin (Sigma, d8281) (1:200) (zebra balığında bulunan desma ve desmb proteinlerinin her ikisini de tanımaktadır).
- Tavuk poliklonal Anti-Lamin B1 (Abcam, ab90169) (1:1000)

Sekonder antikorlar:

- Keçi Anti-Tavşan IgG (H+L) HRP konjuge (Invitrogen) (1:1000)
- Keçi Anti-Tavuk IgG (H+L) HRP konjuge (Novex) (1:5000)

SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific)

GeneGnome5 kemilüminesans görüntüleme cihazı (Syngene)

3.1.6 PLA

DuoLink In Situ Red Starter Kit (DUO92101)

Ted Pella,INC. Tissue-Tek OCT Medium

Leica CM1900 Kriyostat

Paraformaldehit, %4 (Sigma)

1X Tuzlu fosfat tamponu (PBS) pH 7,4

Triton X-100 (Sigma)

Tween 20 (Sigma)

Bovine Serum Albumin (BSA), 0,1 g/ml (Sigma)

Primer antikolar: tavşan poliklonal anti-desmin (Sigma, d8281) ve keçi anti-lamin B (Santa Cruz, sc 6216)

4', 6-diaminodino-2-fenilindol (DAPI), 1mg/ml

ProLong Gold Antifade Reagent (Invitrogen, P36930)

Pappen

Leica DMI4000 mikroskop

3.2. Yöntemler

3.2.1 Protein İzolasyonu

Yabani tip AB zebra balığı kas dokusundan protein izolasyonu yapılmıştır.

1. Su sıcaklığı düşürülerek bayıltılan zebra balıkları, başın omurgadan ayrılması suretiyle ötanazi yapıldıktan sonra kas dokusu ayrılmıştır.
2. Kas dokusu, porselen havanda sıvı azot kullanılarak toz haline getirilmiştir.
3. Toz halindeki dokular falkon tüpüne aktarılıp tartılmış ve tartılan doku miktarının iki katı kadar olan protein izolasyon tamponu içerisine alınmıştır.
4. *Dounce* homojenizatör kullanılarak ezilen örnekler +4°C'de, çalkalamalı vorteks üzerinde iki saat inkübe edilmiştir.
5. Örnek, buz üzerine alınıp sonikatör ile 10 saniyede bir 10 saniye süresince bekletilerek %50 amplitüdde, homojen olana dek parçalanmıştır.
6. Parçalanmış dokular +4 °C'de 15 dk. 14.000 rpm'de çöktürülmüştür.
7. Çöken hücre artıkları atılarak, proteinlerin bulunduğu üst faz yeni bir tüpe aktarılmıştır.
8. Diyaliz membranı içerisine alınan üst faz 16 saat süresince diyaliz çözeltisi içerisinde diyalize tabi tutularak DTT'nin uzaklaştırılması sağlanmıştır.

3.2.2 Protein Miktar Tayini

İzole edilen proteinlerin derişimleri *BCA Protein Assay Kit* (Thermo Fisher Scientific) kullanılarak ölçülmüştür.

1. %1 SDS kullanılarak kör çözelti hazırlanmıştır.
2. 2 mg/ml derişimindeki albümin standartları %1 SDS ile seyreltilerek 0,4 mg/ml, 0,8 mg/ml , 1,2 mg/ml , 1,5 mg/ml ve 1,8 mg/ml konsantrasyonlu standart çözeltiler hazırlanmıştır.
3. İzole edilen protein örnekleri %1 SDS ile 5 kat seyreltilmiştir.

4. Kit içerisinde yer alan A ve B çözeltileri 50:1 oranında karıştırılarak çalışma çözeltisi hazırlanmıştır.
5. Standart çözeltiler ve seyreltilen protein örnekleri üzerine 1'er ml çalışma çözeltisi eklenmiştir.
6. 37°C'de 30dk. inkübe edilmiştir.
7. Standart çözeltilerin *spectramax* cihazında 562nm dalga boyunda verdikleri absorbans değerleri ile standart eğri çizilmiştir.
8. Elde edilen değerler sulandırma faktörü olan 5 ile çarpılarak proteinin konsantrasyonu hesaplanmıştır.

3.2.3 Co-IP

1. İmmükompleks karışımı (protein lizatı (1000 µg), antikor (10 µg) ve *Co-IP* tampon), son konsantrasyonu 3 mg/ml protein içerecek şekilde, eppendorf tüp içerisinde döngüç üzerinde +4°C'de 18 saat inkübe edilmiştir.
2. Negatif kontrol olarak keçi IgG (10 µg), protein lizatı (1000 µg) ve *Co-IP* tamponu karışımın son konsantrasyonu 3 mg/ml protein olacak şekilde eppendorf tüp içerisinde döngüç üzerinde +4°C'de 18 saat inkübe edilmiştir.
3. 30 µl manyetik boncuk eppendorf tüpe alınmış ve *Co-IP* tamponu ile iki kez 1 dakika süresince yıkanmıştır.
4. Manyetik boncuklar, immükompleks üzerine eklenmiş ve oda sıcaklığında döngüç üzerinde 1 saat inkübe edilmiştir.
5. (-) antikor kontrolü olarak protein lizatı ve manyetik boncuklar, *Co-IP* tamponu ile, antikor eklenmeksizin, döngüç üzerinde oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir.
6. Manyetik boncuklara bağlı immükompleks manyetik tüplük aracılığı ile karışımdan ayrılmış ve elde edilen ilk süpernatant *flow through* olarak isimlendirilmiş ve ileride kullanılmak üzere muhafaza edilmiştir.
7. İmmükompleks ve manyetik boncuklar 3 dakika süresince iki kez *Co-IP* tamponu ile ve 2 dakika boyunca bir kez distile su ile yıkanmıştır.
8. Laemli yükleme tamponu kullanılarak immükompleks karışımındaki bileşenler birbirlerinden ayrılmıştır.

3.2.4 Western Blot

1. Poliakrilamid jel elektroforezi için kullanılan camlar %70'lik etanol ile temizlenmiş ve camlar üst üste konularak jel dökme aparatına yerleştirilmiştir.
2. %10'luk ayırıcı jel hazırlanmış ve camların arasına dökülmüştür. Jelin üzerine izopropil alkol eklenmiştir. Jel polimerleşince izopropil alkol dökülmüş ve jel distile su ile yıkanmıştır.
3. %5'lik toplayıcı jel hazırlanarak ayırıcı jelin üzerine dökülmüş ve 10 kuyucuklu tarak jelin üzerine yerleştirilmiştir.
4. Jel polimerleştikten sonra camlar elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Tank içerisine camların üzerini örtecek kadar yürütme tamponu konulmuş ve tarak jelden çıkarılmıştır. Kuyucuklar enjektör yardımı ile temizlenmiştir.
5. Toplam hacim 25 µl olacak şekilde 100 µg protein 1:1 oranında Laemmli yükleme tamponu ile muamele edildikten sonra 100 °C suyun içerisinde 4 dk. denatüre edilmiş ve ardından jele yüklenmiştir.
6. Örnekler toplayıcı jelden ayırıcı jele geçinceye kadar 80 V'ta 20dk. yürütülmüştür.
7. Protein ağırlık belirleyicisi takip edilerek 120V'ta yaklaşık 1.5 saat yürütmeye devam edilmiştir.
8. Yürütme işlemi tamamlandığında jel tanktan çıkarılmış ve toplayıcı jel kesilerek atılmıştır.
9. Jel, jel boyutlarında kesilmiş 9 adet whatmann kağıdı ve nitroselüloz membran 15 dk. süresince yarı kuru transfer tamponunda bekletilmiştir.
10. Yarı kuru transfer aletine sırasıyla 5 adet whatmann kağıdı, nitroselüloz membran, jel ve tekrar 4 adet whatmann kağıdı yerleştirilmiştir.
11. Yarı kuru transfer, 25V'ta 30 dakika yapılmıştır.
12. Transfer sonrasında jel *Coomassie Blue* çözeltisi ile membran ise *Ponceau S* çözeltisi ile boyanmıştır.
13. Ponceau S çözeltisi distile su ile temizlendikten sonra membran çalkalayıcı üzerinde 1x TBS-T içinde %5'lik süt tozu çözeltisi ile 1 saat inkübe edilerek bloklama işlemi yapılmıştır.

14. Bloklamanın ardından membran +4°C 'de çalkalayıcı üzerinde 1x TBS-T içinde %5'lik süt tozu çözeltisi ile hazırlanmış primer antikor solüsyonu ile 16 saat inkübe edilmiştir.
15. Membran çalkalayıcı üzerinde üç defa 10 dk. süresince 1x TBS-T ile yıkanmıştır.
16. Yıkama sonrasında membran oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde 1x TBS-T içinde %5'lik süt tozu çözeltisi ile hazırlanmış sekonder antikor solüsyonu ile 1 saat inkübe edilmiştir.
17. Membran çalkalayıcı üzerinde üç defa 10 dk. boyunca 1x TBS-T ile yıkanmıştır.
18. Görüntüleme kitinin içinde bulunan solüsyonlar 1:1 oranında karıştırılmış ve membran karanlık bir ortamda bu karışım ile 5dk. boyunca muamele edilmiştir.
19. *GeneGnome* kemilüminesans görüntüleme cihazı kullanılarak 3 dk.'lık poz süreleri ile fotoğraflar çekilmiştir.

3.2.5 PLA

1. Su sıcaklığı düşürülerek bayıltılan zebra balıkları, başın omurgadan ayrılması suretiyle öldürülmüş ve kas doku ayrılmıştır
2. Kas dokusu izole edilmiş, OCT *medium* içerisine yerleştirilmiş ve -80°C'de 16 saat bekletilmiştir.
3. Kriyostat aracılığı ile 7 µm kalınlığında kesitler alınmış ve 16 saat -80°C'de muhafaza edilmiştir.
4. Dondurucudan çıkarılan kesitler 30 dk. oda sıcaklığında kurutulduktan sonra, dokuların etrafı Pappen ile işaretlenmiştir.
5. Dokular oda sıcaklığında %4'lük PFA (paraformaldehit) çözeltisinde 10 dk. süresince bekletilerek dokunun lam üzerine fiksasyonu sağlanmıştır.
6. Fiksasyon sonrası PFA uzaklaştırılmış ve dokular iki kez 5 dk. 1x PBS ile yıkanmıştır.
7. Dokular oda sıcaklığında, 1x PBS içerisinde hazırlanmış %0,5 Triton X-100 permeabilizasyon çözeltisinde 10 dk. süresince bekletilmiştir.
8. Permeabilizasyon çözeltisi uzaklaştırıldıktan sonra, üç kez 5 dk. süresince 1x

PBS ile yıkama yapılmıştır.

9. Preparatlar üzerine kit içeriğinde yer alan bloklama çözeltisi eklenerek 37°C de nem çemberi içerisinde 2 saat süresince bekletilerek uygulanmıştır.
10. İlk primer antikör (anti-desmin, Sigma, d8281) kit içeriğinde yer alan sulandırma çözeltisi içerisinde 1:100 oranında sulandırılmış ve +4°C de preparatlar üzerinde 18 saat bekletilmiştir.
11. Üç kez 5 dk. kit içeriğinde yer alan tampon A ile yıkama yapılmıştır.
12. İkinci primer antikör (anti- Lamin B, Santa Cruz, sc 6216) kit içeriğinde yer alan sulandırma çözeltisi içerisinde 1:50 oranında sulandırılmış ve +4°C de preparatlar üzerinde 18 saat bekletilmiştir.
13. Kit içeriğinde yer alan tampon A ile üç kez 5 dk. yıkama yapılmıştır.
14. PLA problemleri (anti-keçi eksi ve anti-tavşan artı) kit içeriğinde yer alan antikör sulandırma çözeltisi içerisinde 1:5 oranında sulandırılmış ve 37 °C'de 2 saat süresince inkübe edilmiştir.
15. Tampon A kullanılarak üç kez 2 dakika süreyle yıkama yapılmıştır.
16. Kit içerisinde yer alan ligasyon çözeltisi içerisine 1:40 oranında ligaz eklenmiş ve 37 °C'de 1 saat süresince inkübe edilmiştir.
17. Tampon A kullanılarak iki kez 2 dakika süreyle yıkama yapılmıştır.
18. Polimeraz 1:80 oranında kit içerisinde yer alan amplifikasyon çözeltisi içerisine eklenmiş ve 37 °C'de 2 saat süresince inkübe edilmiştir.
19. Kit içerisinde yer alan 1xTampon B ile iki kez 10 dakika süresince yıkama yapılmıştır.
20. 0,01x Tampon B içerisinde 1 dakika süresince yıkama yapılmıştır.
21. 1x PBS ile 1:1000 oranında seyreltilmiş DAPI çözeltisi oda sıcaklığında 1 dk. süresince bekletilmiştir.
22. Dokular 1x PBS ile 5 dk. süresince yıkanmıştır.
23. Kesitlerin üzerine Prolong Gold Antifade çözeltisi damlatılarak lamel kapatılmış ve ışık görmeyecek şekilde -20 °C'de saklanmıştır.

Co-IP protokolü yalnızca desmin, lamin B ve Nup214 proteinleri için optimize edildiği için farklı her protein için yeniden optimizasyon gerekmektedir.



4. BULGULAR

4.1 Zebra Balığı Kas Dokusundan Protein İzolasyonu

Protein izolasyonu için 4.8 gr erişkin zebra balığı kas dokusu kullanılmıştır. İzolasyon sonrası *BCA* (bicinchoninic acid assay) analizi ile protein derişimi belirlenmiştir (22 mg/ml).

Desmin ve lamin B proteinlerinin total lizat içerisinde olup olmadıklarını göstermek amacı ile *western blot* analizi yapılmıştır. *Western blot* analizi, zebra balığı kasından elde edilen protein lizatı içinde desmin (desma ve desmb) ve lamin B proteinlerinin bulunduğunu göstermiştir. (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 Desmin ve lamin B proteinleri. 50kDa ağırlığındaki desmin ve 65kDa ağırlığındaki lamin B proteini total lizatta mevcuttur.

4.2 *Co-IP* Deneyleri ve *Western Blot* Analizleri

4.2.1 Desmin *Co-IP*

Desmin ve lamin B proteinlerinin etkileşimlerinin olup olmadığının gözlenmesi amacı ile *Co-IP* deneyleri gerçekleştirilmiştir.

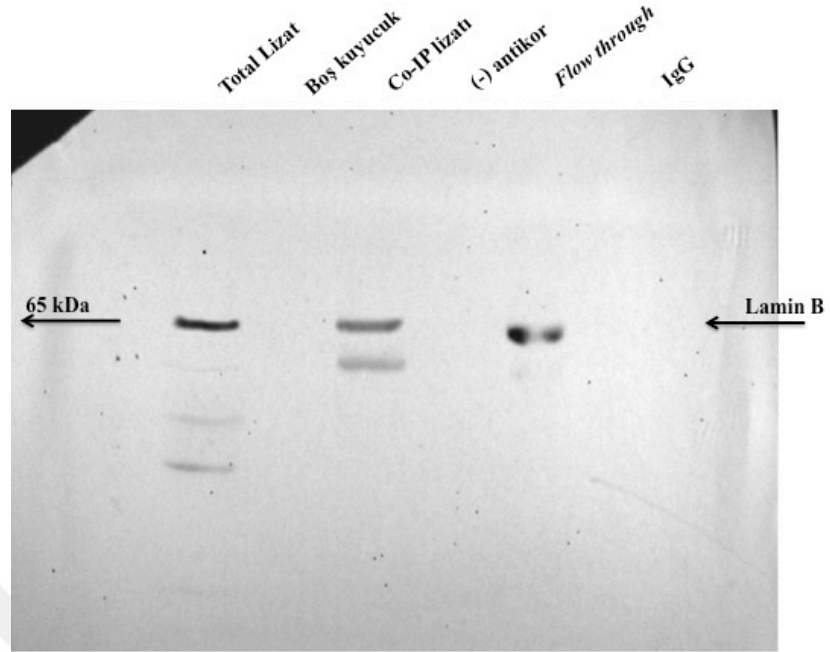
İlk deney düzeneğinde *Co-IP* için desmin proteinini tanıyan anti-desmin antikor (Sigma, d8281) kullanılmış ve *western blot* analizinde lamin B proteinini tanıyan anti-lamin B (Abcam, ab90169) antikor ile işaretleme yapılmıştır. *Co-IP* lizatında lamin B bandının doğru yerde olduğunu doğrulamak amacıyla kontrol olarak bir kuyucuğa total protein lizatı yüklenmiş ve kontrol bandı ve *Co-IP* bandının aynı yerde olduğu görülmüştür (Şekil 4.2).

Co-IP sırasında yalnızca antikorun manyetik boncuklara bağlandığını göstermek amacıyla, *Co-IP* protokolü eş zamanlı olarak antikor

uygulanmaksızın ((-) antikor kontrolü) yürütülmüş ve beklenildiği üzere *western blotta* bant gözlenmemesi manyetik boncuklara yalnızca antikorların bağlandığını doğrulamıştır (Şekil 4.2).

Co-IP ile çöktürülen proteinin, hedeflenen desmin proteini olduğunu doğrulamak amacıyla protein lizati, antikor yerine hedef protein olan desmine özgül olarak bağlanmayan keçi-IgG (Sigma, I5256) ile muamele edilmiştir (IgG kontrolü). Kontrol bandı ile aynı seviyede bant gözlenmemesi desmin ve desmine bağlı proteinlerin özgün olarak çöktüğünü göstermiştir (Şekil 4.2).

Co-IP protokolünde immünkompleks uzaklaştırıldıktan sonra, immünkomplekse katılmayan tüm proteinleri ve bağlanmayan antikorları içeren *flow through*, *Co-IP* sırasında antijen-antikor ve antijen-antijen bağlanma verimliliğinin gözlenmesi amacıyla kuyucuğa yüklenmiştir. Kontrol ve *Co-IP* bandına oranla zayıf olarak gözlenen bant *Co-IP* esnasında desmin antikoru ile desmin proteininin ve desmin proteini ile lamin B proteinin bağlanma verimliliğinin yüksek olduğunu göstermiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2 Desmin *Co-IP*. Total lizatta 65 kDa'da gözlenen lamin B proteini *Co-IP* lizatının yüklendiği kuyucukta da görülmüştür. Flow through lizatının yüklendiği kuyucukta gözlenen bandın silik olması *Co-IP* esnasında desmin antikoruna ile desmin proteini ve desmin proteini ile lamin B proteininin bağlanma verimliliğinin yüksek olduğunu göstermiştir. IgG örneğinin yüklendiği kuyucukta bant gözlenmemesi özgül olmayan etkileşimlerin olmadığını göstermektedir.

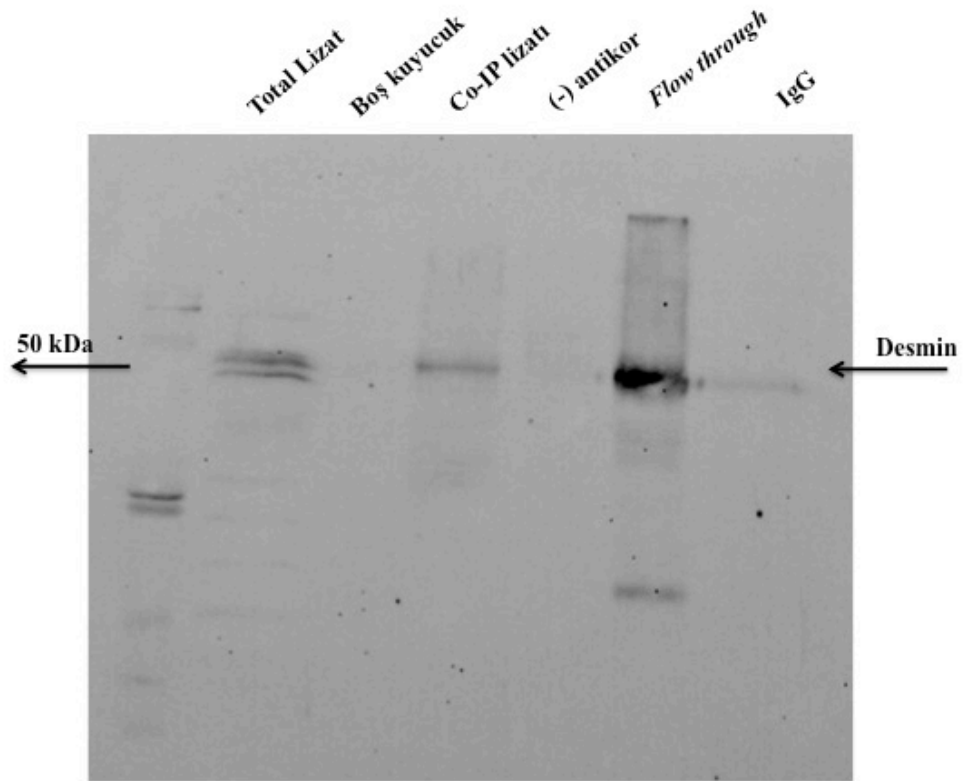
4.2.2 Lamin B *Co-IP*

İkinci deney düzeneğinde, sonuçları teyit etmek amacıyla ters yönlü olarak *Co-IP* tekrarlanmıştır. *Co-IP* için lamin B proteinini tanıyan anti-lamin B antikoruna (Abcam, ab90169) kullanılmış ve *western blot* analizinde desmin proteinini tanıyan anti-desmin (Sigma, d8281) antikoruna ile işaretleme yapılmıştır. *Co-IP* lizatında desmin bandının doğru yerde olduğunu teyit etmek amacıyla kontrol olarak tüm protein lizatı yüklenmiş ve kontrol bandı ve *Co-IP* bandının aynı yerde olduğu görülmüştür (Şekil 4.3).

Co-IP lizatının yüklendiği kuyucukta gözlenen desmin bandı, total lizat bandı ile aynı ağırlıktadır (50 kDa.). Bu durum desmin proteininin lamin B ile birlikte çöktüğünü göstermiştir. IgG örneğinin yüklendiği kuyucukta silik bant gözlenmiştir. Ancak bandın moleküler ağırlığı, total ve *Co-IP* lizatlarında gözlenen bantlardan daha düşük olduğu için bir sorun teşkil

etmemiştir. (-) antikor kuyucuğunda bant gözlenmemesi manyetik boncuklara yalnızca lamin B'yi tanıyan antikorun bağlandığını göstermiştir. *Flow through* lizatının yüklendiği kuyucukta ki desmin bandının kalın olması lamin B ye bağlanmayan desminlerin ortamda bulunduğunu göstermektedir.

Ters yönlü olarak tekrarlanan *Co-IP* deneyi de lamin B ve desmin arasında bir etkileşim olduğunu göstermiştir. (Şekil 4.3).



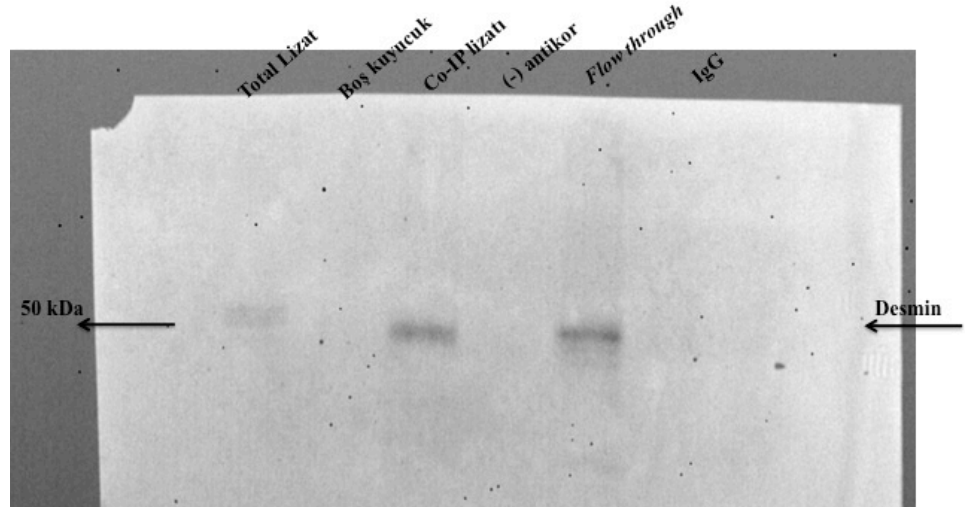
Şekil 4.3 Lamin B *Co-IP*. Total lizatta 50 kDa'da gözlenen desmin proteini *Co-IP* lizatının yüklendiği kuyucukta da görülmüştür. IgG örneğinin yüklendiği kuyucukta silik bant gözlenmiştir. Ancak bandın moleküler ağırlığı, total ve *Co-IP* lizatlarında gözlenen bantlardan daha düşük olduğu için bir sorun teşkil etmemiştir.

4.2.3 Nup214 Co-IP

Nup214 çekirdek gözenek kompleksinde sitoplazmik filamentlerde konumlanan bir proteindir. Desmin ile etkileşimde olup olmadığını gözlemek amacıyla *Co-IP* deneyi yapılmıştır. Bu deney için Nup214 proteinini tanıyan anti-nup214 antikorunu (NB100-2245) kullanılmış ve *western blot* analizinde desmin proteinini tanıyan anti-desmin (Sigma, d8281) antikorunu ile işaretleme yapılmıştır. *Co-IP* lizatında desmin bandının doğru yerde olduğunu teyit etmek amacıyla kontrol olarak tüm protein lizatı yüklenmiş ve kontrol bandı ile *Co-IP* bandının aynı yerde olduğu görülmüştür (Şekil 4.4).

Co-IP lizatının yüklendiği kuyucukta gözlenen desmin bandı, total lizat bandı ile aynı ağırlıktadır (50 kDa). Bu durum desmin proteininin Nup214 ile birlikte çöktüğünü göstermiştir. IgG örneğinin yüklendiği kuyucukta bant gözlenmemesi de desmin proteininin yalnızca Nup214 proteinine bağlanarak çöktüğünü göstermiştir. (-) antikor kuyucusunda bant gözlenmemesi manyetik boncuklara yalnızca Nup 214'ü tanıyan antikorun bağlandığını göstermiştir. *Flow through* lizatının yüklendiği kuyucuktaki desmin bandının zayıf olması Nup 214'e bağlanmayan desminlerin ortamda az miktarda, bağlananların ise daha yüksek miktarda olduğunu göstermiştir.

Co-IP deneyi Nup214 ve desmin arasında bir etkileşim olduğunu göstermiştir. (Şekil 4.4).



Şekil 4.4 Nup214 *Co-IP* . Kontrolde 50 kDa da gözlenen desmin proteini *Co-IP* lizatının yüklendiği kuyucukta da görülmüştür. *Flow through* lizatının yüklendiği kuyucukta gözlenen bandın zayıf olması *Co-IP* sırasında desmin proteini ile Nup214 proteinin bağlanma verimliliğinin yüksek olduğunu göstermiştir. IgG örneğinin yüklendiği kuyucukta bant gözlenmemesi desminin Nup214 proteinine bağlanarak çöktüğünü göstermektedir.

Desminin moleküler ağırlığı (55kDa), Nup 214'ün moleküler ağırlığına (214 kDa) oranla çok düşük olduğu için, yüksek moleküler ağırlığı olan Nup214'ün desminle birlikte çökmesi çok zordur. Bu nedenle ters *Co-IP* deneyi Nup214-desmin protein çifti için yapılamamıştır.

4.3 PLA

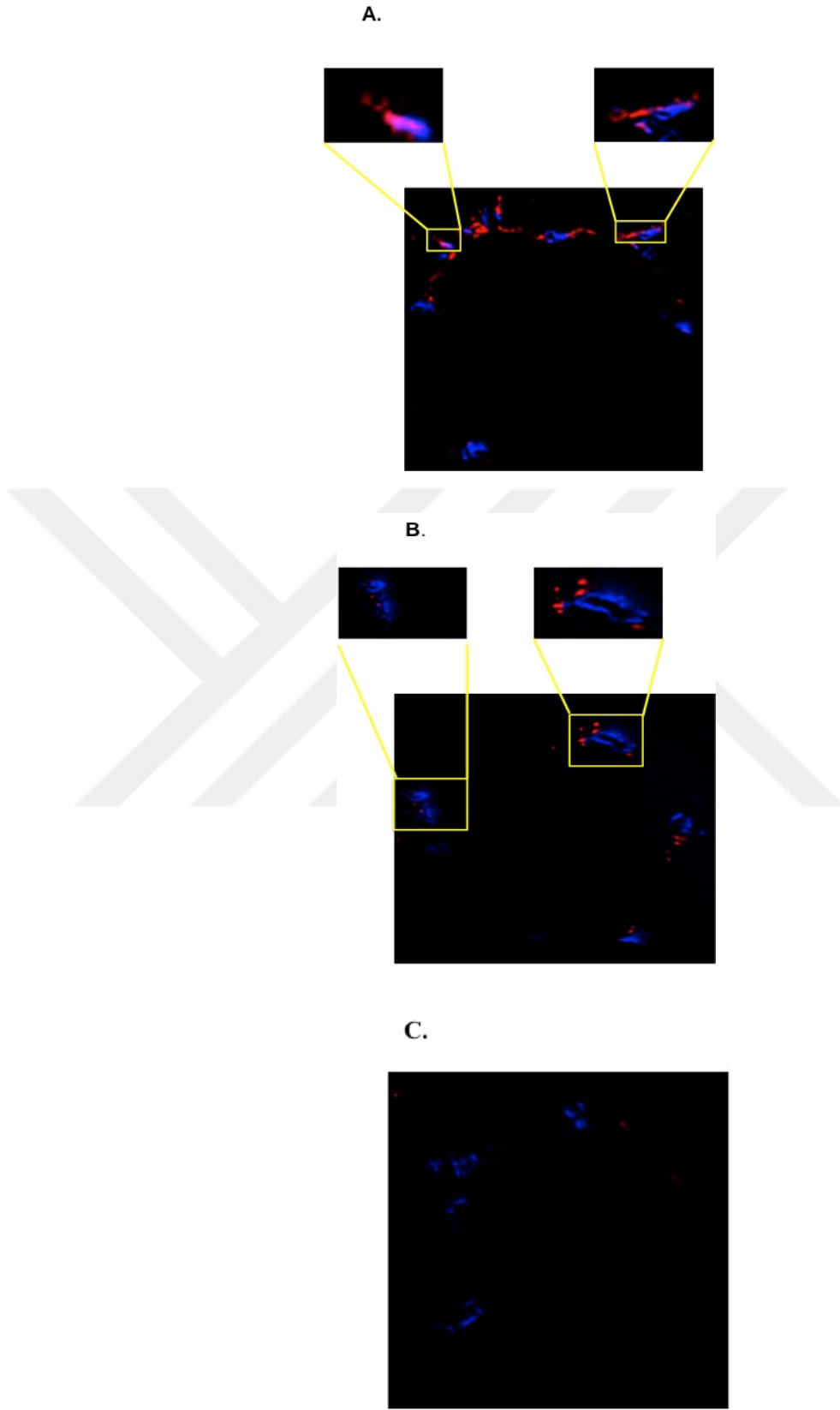
Co-IP deneylerinin sonuçlarını doğrulamak amacı ile DuoLink sistemi (Sigma, Duo92101) kullanılarak *PLA* yapılmıştır.

PLA için transversal ve longitudinal olarak yedi mikron kalınlığında kesilen zebra balığı çizgili kas kesitleri kullanılmıştır. Desmin ve lamin B proteinlerini tanıyan primer antikorlar (sırasıyla; Sigma, d8281; Santa Cruz, sc6216), *PLA* probu ile işaretli sekonder antikorlar aracılığı ile işaretlenmiş ve kesitler floresan mikroskop (Leica, DMI4000) kullanılarak görüntülenmiştir. Etkileşimin doğru yerde gerçekleştiğini tespit etmek amacı ile, DAPI boyaması yapılmıştır. Negatif kontrol olarak primer antikor ile

muamele edilmeyen, yalnızca sekonder antikor ile inkübe edilen kesitler kullanılmıştır.

PLA deneyi, *Co-IP* sonuçları ile uyumlu bir şekilde, desmin ve lamin B proteinleri arasındaki etkileşim doğrulanmış ve bu etkileşimin çekirdek etrafında gerçekleştiği belirlenmiştir (Şekil 4.5).





Şekil 4.5 A, B Çekirdek etrafında (mavi) desmin-lamin B etkileşimi (kırmızı)
; C. Negatif kontrol (Orjinal fotoğraflar için bkz. EK 2)

5. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında yabancı tip AB zebra balığı kas dokusunda desmin ve lamin B proteinlerinin, birbirleri ile doğrudan etkileşimde oldukları *Co-IP* ve *PLA* metotları ile gösterilmiştir.

Co-IP metodu iki proteinin etkileşiminin gösterilmesinde etkin olarak kullanılan ancak standardizasyonu çok güç olan bir metottur. *Co-IP* deneyleri için yüksek konsantrasyonlarda protein elde edilmesi gerekmektedir. Bu tez çalışmasında *Co-IP* deneyleri için protein izolasyonunun yapıldığı doku kas dokusudur. İskelet kasından protein izole etmek sert bir doku olması nedeni ile zordur. İlk olarak kas dokusunu parçalayacak kadar kuvvetli bir homojenizasyon yönteminin seçilmesi gerekmekte, ancak seçilen metodun hedef proteinin bulunduğu hücre kompartımanına zarar vermemesine özen gösterilmelidir. İkinci olarak kimyasal parçalama aşamasında kullanılacak deterjanın konsantrasyonu non-iyonik ya da iyonik olmasına bağlı olarak protein etkileşimlerini bozmayacak şekilde ayarlanmalıdır.

Desmin ve laminler pek çok protein ile etkileşim halinde oldukları için deterjan ve tuzlara karşı son derece dirençlidirler ve geleneksel metotlar kullanılarak izole edilmeleri oldukça zordur (57). Literatürde yapılan çalışmalarda desmin, laminler ve diğer ara filament proteinlerinin izolasyonunda üre (58–60) ya da yoğun SDS gibi denatüre edici ajanların kullanılması gerektiği belirtilmektedir (61). Ancak, herhangi bir protein SDS gibi güçlü bir iyonik deterjanla muamele edildiğinde 3 boyutlu yapısını kaybeder ve proteinin *Co-IP* gibi bir deney sisteminde kullanılmasını imkansız kılar. *Co-IP* için gerek güçlü bir homojenizasyon metodunun kullanılmaması ve gerekse SDS gibi güçlü bir iyonik deterjanının yüksek konsantrasyonlarda kullanılmaması, elde edilmesi gereken protein miktarını yetersiz kılmaktadır. Bunlara ek olarak, desmin ve lamin B gibi ara filament proteinleri uzun fibriller halinde olup çözelti içerisinde polimerize halde bulunurlar (61). Ayrıca, lamin proteinleri sistince zengin oldukları için agregasyona yatkındırlar. Bunlara ilaveten, her iki protein de hücrenin farklı kompartımanlarında buldukları için özellikle çekirdek proteinlerinin

izolasyonunda kullanılan çekirdek ayrıştırılması yöntemi bu iki proteinin birlikte izolasyonu için uygun bir metot değildir. Tüm bu güçlükler nedeniyle *Co-IP* için gereken protein miktarının eldesinde tüm izolasyon aşamalarının titizlikle standardize edilmesi gerekir.

Bu tez çalışmasında desmin ve lamin B proteinlerinin *Co-IP* için gereken miktarda (1 mg/ml) ve üç boyutlu yapılarının korunarak izole edilmesine olanak veren yeni bir izolasyon protokolü oluşturulmuştur. Klasik protokollerde kas dokusunun mekanik parçalanmasında kullanılan metotlardan farklı olarak oluşturulan protokolde, dokunun tamamen ezilene kadar sıvı azot varlığında seramik havanda dövülmesini takiben, *Dounce* homojenizatör ile ikinci kez parçalanmış ve son olarak doku homojen bir görünüm elde edilene kadar sonikasyona tabi tutulmuştur. Bu üç mekanik parçalama yöntemi için gereken etkin süreler de optimize edilmiştir. Kimyasal parçalama aşamasında ise en etkin deterjanlardan biri olan ancak izole edilecek olan proteinlerin üç boyutlu yapılarının korunduğu en ideal konsantrasyonun ayarlanmış olması gereken SDS, klasik protokollerde maksimum %0.5 oranında kullanılırken tez çalışmasında geliştirilen protokolde, kullanılan bu değer %2'dir. Bu oran belirlenirken, SDS konsantrasyonu %0.1 ile %5 aralığında değiştirilerek protein izolasyonu yapılmış ve proteinlerin üç boyutlu yapılarının zarar görmediği ancak protein konsantrasyonunun 1 mg/ml'den az olmadığı lizatın elde edildiği SDS konsantrasyonu (%2) dikkate alınmıştır (Bkz., Gereçler ve Yöntemler, S.15).

Desmin-lamin B *Co-IP* deneylerinin standardizasyonunda karşılaşılan en büyük problem, bu iki proteinin hücre içerisinde farklı kompartımanlarda yerleşim göstermeleri nedeniyle kontrol olarak hedef proteinin etkileşimde olduğu bilinen hiçbir proteinin kullanılamamasıdır. Ancak, *Co-IP* deneyi esnasında kullanılan farklı kontroller ile (1- Hedef proteinlerin özgül olarak kendilerini tanıyan antikora bağlanarak çöktüklerinin anlaşılması amacıyla antikor kullanılmadan yapılan kontrol *Co-IP*, 2- Hedef proteini tanıyan antikorun proteine özgül olarak bağlandığını göstermek için antikor yerine özgül olmayan IgG kullanılarak kurulan *Co-IP*, 3- Bağlanma etkinliğinin

anlaşılması için kullanılan *flow through* kontrolü) etkileşimin doğruluğunun güvenilirliği artırılmıştır (Bkz., Bulgular, S.27, Şekil 4.2) . Ayrıca, etkileşimi ters yönlü olarak tekrarlamak da *Co-IP* sonucunun güvenilirliğini artırmıştır (Bkz., Bulgular, S.28, Şekil 4.3). Ancak bu koşullar, organizmanın ve dokunun özellikleri ve hedef proteinlerin biyokimyasal yapılarındaki farklılıklar nedeniyle değişkenlik göstermektedir. Bundan dolayı *Co-IP* standardizasyonu her protein çiftine özgül olarak farklı optimizasyon koşullarını gerektirmektedir.

Desmin ve lamin B arasındaki etkileşime dair ilk bulgular Georgatos ve ark. tarafından (10) 1987 yılında sunulmuştur. Georgatos ve ark. iki farklı desmin türevi kullanarak yaptıkları protein bağlanma deneylerine istinaden desminin kuyruk domaininde yer alan 413-434. amino asitler arasındaki bölgeyi lamin B bağlanma domaini olarak tanımlamışlardır (10). Ancak protein bağlanma deneylerinde protein üç boyutlu yapısını kaybettiği için, etkileşimin *in vivo* koşullarda gerçekleşip gerçekleşmeyeceği bir soru işareti olarak kalmıştır.

Desmin ve lamin B'nin etkileşimde olabileceğini ifade eden başka bir çalışma 1993 yılında Lockard ve ark. tarafından gerçekleştirilmiştir (9). Çalışmada sıçan kalbinden alınan kas kesitleri elektron mikroskobu altında incelenmiş ve desminin sarkolemmadan çekirdeğe doğru uzandığı, lamin B'nin ise çekirdek iç zarına yakın yerleştiği tespit edilmiştir. Aynı çalışmada çift immüingold boyama sonuçları desminin çekirdek gözenek kompleksi merkezi boşluğuna doğru uzayarak lamin B'ye fiziksel olarak yaklaştığını göstermiştir.

Lamin A/C ve lamin B proteinlerinin çekirdek gözenek kompleksi bileşenlerinden Nup153 ile etkileşimde olduğu daha önce literatürde gösterilmiştir (12). Başka bir çalışmada laminler ve çekirdek gözenek kompleksi arasındaki etkileşimin çekirdek gözenek kompleksinin çekirdek zarfı üzerindeki yerleşimini korumak amacıyla gerçekleştiği belirtilmiştir (62). Nup153'ün aynı zamanda LINC kompleksi elemanı olan SUN1 proteini ile de etkileşim halinde olduğu ve bu etkileşimin de çekirdek gözenek

kompleksinin, çekirdek zarfı üzerindeki yerleşimini korumak amacıyla gerçekleştiği düşünülmüştür (35). Bu bilgilere ek olarak Nup153 ün FG (fenilalenin-glisin) tekrarlarınca zengin olduğu ve FG tekrarı taşıyan nükleoporinlerin, çekirdek ve sitoplazma arasında madde taşınımında görev aldığı belirtilmiştir (39,63). Ancak, Al-Haboubi ve ark. tarafından yayınlanan çalışmada (12) Nup153'ün karboksil ucu ve lamin B arasında gerçekleşen etkileşimin, her iki proteinin de farklı bağlanma partnerleriyle etkileşime girmesini kolaylaştırabileceği fikri öne sürülmüştür.

Tez çalışmasında desminin bir çekirdek gözenek kompleksi proteini olan Nup214 ile etkileşim halinde olduğu gösterilmiştir. Bu bulgu ile çekirdek gözenek kompleksinde sitoplazmik filamentler üzerinde yerleşim gösteren Nup214 proteininin desminin çekirdek gözenek kompleksi merkezine doğru yardımcı olabileceği öngörülmüştür (Bkz., Bulgular, S.30, Şekil 4.4).

Gerek tez çalışması kapsamında gösterilen Nup214 (Bkz., Bulgular, S.30, Şekil 4.4) ve desminin çekirdek gözenek kompleksinin sitoplazmik yüzeyinde etkileşimi, gerekse literatürde yer alan lamin B ve Nup153 arasındaki etkileşim (12), lamin B'nin çekirdek gözenek kompleksinin içine uzadığını ve burada desmin ile etkileşime girdiğini düşündürmüştür. Bu verilere ilaveten Nup153 ile Nup214 arasında fiziksel etkileşimin olduğuna dair deneysel bir veri olmamakla birlikte STRING veri tabanındaki *in silico* veriler Nup214 ve Nup153'ün etkileşimde olduklarına işaret etmektedir (Bkz., Genel Bilgiler, S.12).

Çetin ve ark. 2013 yılında yaptıkları çalışmada (13) desminin lamin B bağlanma domaini olarak tanımlanan bölgesine 16 amino asitin katılımına neden olan c.1289-2A>G mutasyonunu tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada hastada desmin-lamin B etkileşiminin bozulup bozulmadığını göstermek amacıyla yapılan çift immunfloresan boyama, konfokal mikroskopi ile görüntülendiğinde desmin ve lamin B'nin etkileşiminin olmadığı verisi elde edilmiştir. Bu tez çalışması kapsamında ise *Co-IP* metodu ile desmin ve lamin B proteinlerinin yabancı tip AB zebra balıklarında birbirleriyle etkileştikleri gösterilmiştir (Bkz., Bulgular, S.27, Şekil 4.2). İki

proteinin birbirlerine aralarında maksimum 40 nm olacak şekilde yaklaşımları durumunu analiz eden bir teknik olan *PLA* metodu kullanılarak yapılan çalışmada hücrede farklı kompartımanlarda yerleşmiş olan desmin ve lamin B proteinlerinin etkileşim için çekirdek çevresinde birbirlerine yaklaştıkları gösterilmiştir (Bkz., Bulgular, S.32, Şekil 4.5). Lamin B'nin çekirdek içerisinde, desminin ise sitoplazmada yerleşim gösteriyor olması, desmin-lamin B etkileşiminin *PLA* analizi sonucunda çekirdek etrafında gerçekleştiğinin gösterilmesi, Georgatos ve ark. tarafından 1987 yılında (10) yapılan *in vitro* çalışmada desmin proteininin kuyruk domaininde yer alan bölgede lamin B bağlanma domaini olduğunun keşfedilmesi ve 1993 yılında yapılan başka bir çalışmada (9) bu proteinlerden desminin sitoplazmadan, lamin B'nin ise çekirdek içinden çekirdek gözenek kompleksine doğru uzadıklarının gösterilmesi desmin ve lamin B'nin bir aracı protein olmaksızın doğrudan etkileştiklerine dair çok önemli veriler sağlamıştır. Ayrıca Nup153 ve lamin B arasındaki etkileşime dair literatürde yer alan bilgiler (12) ve tez çalışması kapsamında Nup 214 ve desmin arasında bir etkileşim olduğunun gösterilmesi (Bkz., Bulgular, S.30, Şekil 4.4) desmin ve lamin B'nin çekirdek gözenek kompleksi boşluğunda birbirleriyle etkileştikleri olasılığını daha da güçlendirmektedir. Bunlara ek olarak, desmin filamentlerinin boyu (~45 nm) ve esneyebilme niteliği (35nm-140nm) (64) göz önüne alındığında, çekirdek gözenek kompleksinin merkezi gözenegine doğru uzaması fiziksel olarak mümkün görünmektedir.

Tez kapsamında elde edilen bu veriler literatürde desmin ve lamin B'nin etkileşiminin doğrudan ya da LINC kompleksi aracılığıyla olduğuna dair bilgi eksikliğini gidererek, desmin-lamin B etkileşiminin doğrudan olduğunu göstermiş ve bu anlamda literatüre çok önemli bir katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

6.1 Sonuçlar

Yüksek lisans tez çalışması kapsamında elde edilen sonuçlar aşağıda belirtilmiştir.

- Biri çekirdekte biri sitoplazmada yerleşim gösteren iki protein için *Co-IP* deneyleri optimize edilerek desmin ve lamin B proteinlerinin *Co-IP* ile etkileşimlerinin gösterilmesine olanak sağlayan deneysel bir protokol oluşturulmuştur.
- Tez kapsamında geliştirilmiş olan *Co-IP* protokolü kullanılarak yabancı tip AB zebra balıklarında desmin ve lamin B proteinlerinin etkileşimde oldukları gösterilmiştir.
- *PLA* kullanılarak desmin ve lamin B arasındaki fiziksel etkileşim doğrulanmıştır.

6.2 Öneriler

Ara filament proteinleri gibi sıkı paketlenen, çözünebilir olmayan proteinlerle yapılan deneysel çalışmalarda daima proteinlerin biyokimyasal özellikleri göz önünde bulundurulmalı ve farklı deney yaklaşımları gözönüne alınmalıdır.

Tez çalışmasını takiben yapılabilecek çalışmalar aşağıda sıralanmıştır.

- “Desmin mutasyonunun protein işlevi üzerindeki etkisinin zebra balığı modelinde araştırılması” başlıklı TÜBİTAK 1001 projesi (214S174) kapsamında oluşturulan, *desma* proteininde (i) 16 amino asitlik insersiyonu taşıyan ve/veya (ii) lamin B bağlanma bölgesi bozulmuş zebra balıklarında, desmin ve lamin B arasında fiziksel bir etkileşim olmadığının gösterilmesi de bu tez çalışmasında elde edilen bulguları güçlendirecektir.

7. KAYNAKLAR

1. Lazarides E. Intermediate Filaments as Mechanical Integrators of Cellular Space. *Nature*. 1980;283:249–56.
2. Fuchs E, Weber K. Intermediate Filaments: Structure, Dynamics, Function and Disease. *Annu Rev Biochem*. 1994;63:345–82.
3. Lammerding J, Lee RT. The Nuclear Membrane and Mechanotransduction: Impaired Nuclear Mechanics and Mechanotransduction in Lamin A/C Deficient Cells. *Nucl Organ Dev Dis Novartis Found Symp*. 2005;264:264–78.
4. Hutchison CJ. Lamins: Building Blocks or Regulators of Gene Expression? *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002;3:848–58.
5. Sullivan T, Escalante-Alcalde D, Bhatt H, Anver M, Bhat N, Nagashima K, et al. Loss of A-type Lamin Expression Compromises Nuclear Envelope Integrity Leading to Muscular Dystrophy. *J Cell Biol*. 1999;147(5):913–9.
6. Stroud MJ, Banerjee I, Veevers J, Chen J. Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton Complex Proteins in Cardiac Structure, Function, and Disease. *Circ Res*. 2014;114:538–48.
7. Méjat A, Misteli T. LINC complexes in Health and Disease. *Nucleus*. 2010;1(1):40–52.
8. Kordeli E, Cartaud J, Nghiem HO, Changeux JP. The Torpedo Electrocite: A Model System For The Study of Receptor-Cytoskeleton Interactions. *J Recept Res*. 1987;7(1–4):71–88.
9. Lockard VG, Bloom S. Trans-cellular Desmin - Lamin B Intermediate Filament Network in Cardiac Myocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 1993;25:303–9.
10. Georgatos SD, Webert K, Geisler N, Blobel G. Binding of Two Desmin Derivatives to the Plasma Membrane and the Nuclear Envelope of Avian

- Erythrocytes: Evidence for a Conserved Site-Specificity in Intermediate Filament-Membrane Interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84:6780–4.
11. Smythe C, Jenkins HE, Hutchison CJ. Incorporation of the Nuclear Pore Basket Protein Nup153 into Nuclear Pore Structures is Dependent upon Lamina Assembly: Evidence from Cell-free Extracts of *Xenopus* Eggs. *EMBO J*. 2000;19(15):3918–31.
 12. Al-Haboubi T, Shumaker DK, Köser J, Wehnert M, Fahrenkrog B. Distinct Association of the Nuclear Pore Protein Nup153 with A- and B-type Lamins. *Nucleus*. 2011;2(5):1–10.
 13. Cetin N, Balci-Hayta B, Gundesli H, Korkusuz P, Purali N, Talim B, et al. A Novel Desmin Mutation Leading to Autosomal Recessive Limb-Girdle Muscular Dystrophy: Distinct Histopathological Outcomes Compared with Desminopathies. *J Med Genet*. 2013;50:437–43.
 14. Alexander MS, Kawahara G, Kho AT, Howell MH, Pusack TJ, Myers JA, et al. Isolation and Transcriptome Analysis of Adult Zebrafish Cells Enriched for Skeletal Muscle Progenitors. *Muscle Nerve*. 2011 May;43(5):741–50.
 15. Zu Y, Tong X, Wang Z, Liu D, Pan R, Li Z, et al. TALEN-mediated Precise Genome Modification by Homologous Recombination in Zebrafish. *Nat Methods*. 2013;10(4):329–31.
 16. Weber K, Geisler N. Intermediate Filaments: Structural Conservation and Divergence. *Ann N Y Acad Sci*. 1985;455:126–43.
 17. Herrmann H, Häner M, Brettel M, Müller SA, Goldie KN, Fedtke B, et al. Structure and Assembly Properties of the Intermediate Filament Protein Vimentin: the Role of its Head, Rod and Tail Domains. *J Mol Biol*. 1996;264:933–53.
 18. Heimburg T, Schuenemann J, Weber K, Geisler N. Specific Recognition of Coiled Coils by Infrared Spectroscopy: Analysis of the Three Structural Domains of Type III Intermediate Filament Proteins. *Biochemistry*.

- 1996;35:1375–82.
19. Rogers KR, Eckelt A, Nimmrich V, Janssen KP, Schliwa M, Herrmann H, et al. Truncation Mutagenesis of the non-alpha-helical Carboxyterminal Tail Domain of Vimentin Reveals Contributions to Cellular Localization but not to Filament Assembly. *Eur J Cell Biol.* 1995;66(2):136–50.
 20. Tang DD. Intermediate Filaments in Smooth Muscle. *Am J Cell Physiol.* 2008;294(4):869–78.
 21. Lammerding J, Fong LG, Ji JY, Reue K, Stewart CL, Young SG, et al. Lamins A and C but not Lamin B1 Regulate Nuclear Mechanics. *J Biol Chem.* 2006;281(35):25768–80.
 22. Shimi T, Pflughaar K, Kojima S, Pack C, Solovei I, Goldman AE, et al. The A- and B-type Nuclear Lamin Networks: Microdomains Involved in Chromatin Organization and Transcription. *Genes Dev.* 2008;22:3409–21.
 23. Gruenbaum Y, Foisner R. Lamins: Nuclear Intermediate Filament Proteins with Fundamental Functions in Nuclear Mechanics and Genome Regulation. *Annu Rev Biochem.* 2015;84:131–64.
 24. Stick R. The Gene Structure of *Xenopus* Nuclear Lamin A: A Model for the Evolution of A-type from B-type Lamins by Exon Shuffling. *Chromosoma.* 1992;101:566–74.
 25. Stuurman N, Heins S, Aebi U. Nuclear Lamins: Their Structure, Assembly, and Interactions. *J Struct Biol.* 1998;122:42–66.
 26. Dittmer T, Misteli T. The Lamin Protein Family. *Genome Biol.* 2011;12(222).
 27. Snider NT, Omary MB. Post-translational Modifications of Intermediate Filament Proteins: Mechanisms and Functions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15(3):163–77.
 28. Reddy S, Comai L. Recent Advances in Understanding the Role of Lamins in

- Health and Disease. *F1000Research*. 2016;5:2536.
29. Adam SA, Goldman RD. Insights into the differences between the A- and B-type nuclear lamins. *Adv Enzyme Regul*. 2012;52:108–13.
 30. Gerace L, Huber MD. Nuclear Lamina at the Crossroads of the Cytoplasm and Nucleus. *J Struct Biol*. 2012;177(1):24–31.
 31. Davidson PM, Lammerding J. Broken Nuclei-Lamins, Nuclear Mechanics, and Disease. *Trends Cell Biol*. 2014;24(4):247–56.
 32. Worman HJ, Courvalin JC. How do Mutations in Lamins A and C Cause Disease? *J Clin Invest*. 2004;113(3):349–51.
 33. Dahl KN, Ribeiro AJS, Lammerding J. Nuclear Shape, Mechanics, and Mechanotransduction. *Circ Res*. 2008;102:1307–18.
 34. Isermann P, Lammerding J. Nuclear Mechanics and Mechanotransduction in Health and Disease. *Curr Biol*. 2013;23:R1113-21.
 35. Liu Q, Pante N, Misteli T, Elsagga M, Crisp M, Hodzic D, et al. Functional Association of Sun1 with Nuclear Pore Complexes. *J Cell Biol*. 2007;178(5):785–98.
 36. Meinke P, Schirmer EC. LINC'ing form and function at the nuclear envelope. *FEBS Lett* [Internet]. 2015; Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014579315004688>
 37. Hutchison CJ, Alvarez-Reyes M, Vaughan OA. Lamins in Disease: Why Do Ubiquitously Expressed Nuclear Envelope Proteins Give Rise to Tissue-Specific Disease Phenotypes? *J Cell Sci*. 2001;114(1):9–19.
 38. Stoffler D, Fahrenkrog B, Aebi U. The Nuclear Pore Complex: From Molecular Architecture to Functional Dynamics. *Curr Opin Cell Biol*. 1999;11:391–401.
 39. Kabachinski G, Schwartz TU. The Nuclear Pore Complex - Structure and

- Function at a Glance. *J Cell Sci.* 2015;128:423–9.
40. Alber F, Dokudovskaya S, Veenhoff LM, Zhang W, Kipper J, Devos D, et al. The Molecular Architecture of the Nuclear Pore Complex. *Nature.* 2007;450(29):695–701.
 41. Reichelt R, Holzenburg A, Buhle EL, Jarnik M, Engel A, Aebi U. Correlation between Structure and Mass-Distribution of the Nuclear Pore Complex and of Distinct Pore Complex Components. *J Cell Biol.* 1990;110(4):883–94.
 42. Jahed Z, Soheilypour M, Peyro M, Mofrad MRK. The LINC and NPC Relationship – It’s Complicated! *J Cell Sci.* 2016;129:3219–29.
 43. Strambio-De-Castillia C, Niepel M, Rout MP. The Nuclear Pore Complex: Bridging Nuclear Transport and Gene Regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010;11:490–501.
 44. Raices M, D’Angelo MA. Nuclear Pore Complex Composition: A New Regulator of Tissue-Specific and Developmental Functions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012;13(11):687–99.
 45. Maimon T, Elad N, Dahan I, Medalia O. The human nuclear pore complex as revealed by cryo-electron tomography. *Structure.* 2012;20:998–1006.
 46. Franke WW, Scheer U. The Ultrastructure of the Nuclear Envelope of Amphibian Oocytes: A Reinvestigation - II. The Immature Oocyte and Dynamic Aspects. *J Ultrastructure Res.* 1970;30:317–27.
 47. Cordes VC, Reidenbach S, Köhler A, Stuurman N, Van Uriel R, Franke WW. Intranuclear filaments containing a nuclear pore complex protein. *J Cell Biol.* 1993;123(6(1)):1333–44.
 48. Galy V, Olivo-Marin JC, Scherthan H, Doye V, Rascalou N, Nehrbass U. Nuclear Pore Complexes in the Organization of Silent Telomeric Chromatin. *Nature.* 2000;403(6765):108–12.

49. Akey CW. Interactions and structure of the nuclear pore complex revealed by cryo-electron microscopy. *J Cell Biol.* 1989;109:955–70.
50. Goldberg MW, Allen TD. The Nuclear Pore Complex and Lamina: Three-Dimensional Structures and Interactions Determined by Field Emission In-lens Scanning Electron Microscopy. *J Mol Biol.* 1996;257:848–65.
51. Walther TC, Fornerod M, Pickersgill H, Goldberg M, Allen TD, Mattaj IW. The Nucleoporin Nup153 is Required for Nuclear Pore Basket Formation, Nuclear Pore Complex Anchoring and Import of a Subset of Nuclear Proteins. *EMBO J.* 2001;20(20):5703–14.
52. Howe K, Clark MD, Torroja CF, Torrance J, Berthelot C, Muffato M, et al. The Zebrafish Reference Genome Sequence and its Relationship to the Human Genome. *Nature.* 2013;496:498–503.
53. Ramsbacher C, Steed E, Boselli F, Ferreira R, Faggianelli N, Roth S, et al. Developmental Alterations in Heart Biomechanics and Skeletal Muscle Function in Desmin Mutants Suggest an Early Pathological Root for Desminopathies. *Cell Rep.* 2015;11:1564–76.
54. Bassett DI, Currie PD. The Zebrafish as a Model for Muscular Dystrophy and Congenital Myopathy. *Hum Mol Genet.* 2003;12(2):265–70.
55. Parsons MJ, Campos I, Hirst EM a, Stemple DL. Removal of Dystroglycan Causes Severe Muscular Dystrophy in Zebrafish Embryos. *Development.* 2002;129:3505–12.
56. Li M, Andersson-Lendahl M, Sejersen T, Arner A. Muscle Dysfunction and Structural Defects of Dystrophin-null Sapje Mutant Zebrafish Larvae are Rescued by Ataluren Treatment. *FASEB J.* 2016;28(4):1593–9.
57. Fu Y, Lv P, Yan G, Fan H, Cheng L, Zhang F, et al. MacroH2A1 Associates with Nuclear Lamina and Maintains Chromatin Architecture in Mouse Liver Cells. *Sci Rep.* 2015;5(17186).

58. Leung CL, Liem RKH. Isolation of Intermediate Filaments. *Curr Protoc Cell Biol.* 2006;
59. Vorgias CE, Traub P. Isolation, Purification and Characterization of the Intermediate Filament Protein Desmin from Porcine Smooth Muscle. *Prep Biochem.* 1983;13(3):227–43.
60. Georgatos SD, Blobel G. Lamin B Constitutes an Intermediate Filament Attachment Site at the Nuclear Envelope. *J Cell Biol.* 1987;105:117–25.
61. Gruenbaum Y, Medalia O. Lamins: the Structure and Protein Complexes. *Curr Opin Cell Biol.* 2015;32:7–12.
62. Guo Y, Zheng Y. Lamins Position the Nuclear Pores and Centrosomes by Modulating Dynein. *Mol Biol Cell.* 2015;26:3379–89.
63. Garcia A, Rodriguez Matas JF, Teresa M. Modeling of the Mechano-Chemical Behaviour of the Nuclear Pore Complex: Current Research and Perspective. *Integr Biol.* 2016;8:1011–21.
64. Kreplak L, Herrmann H, Aebi U. Tensile properties of single desmin intermediate filaments. *Biophys J.* 2008;94(7):2790–9.

8. EKLER

EK 1: Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzni



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

06100 Sıhhiye-Ankara
Telefon: 0 (312) 305 1000-1002 • Faks: 0 (312) 310-0500
www.etikkurul.hacettepe.edu.tr/index_trk.php

Sayı: 52338575 - 15

20 Şubat 2014

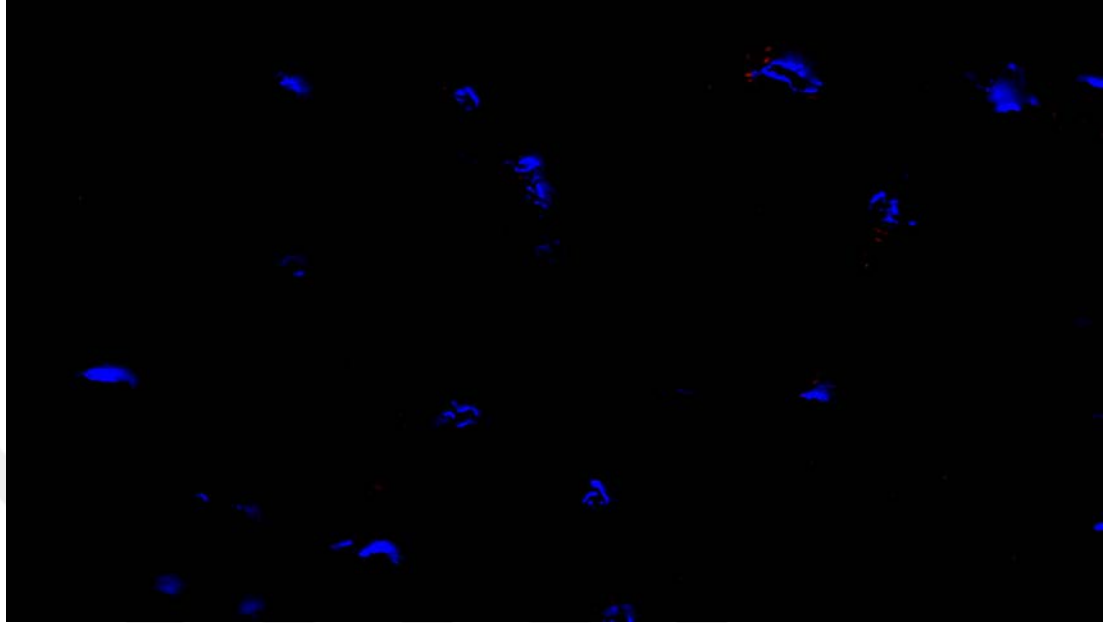
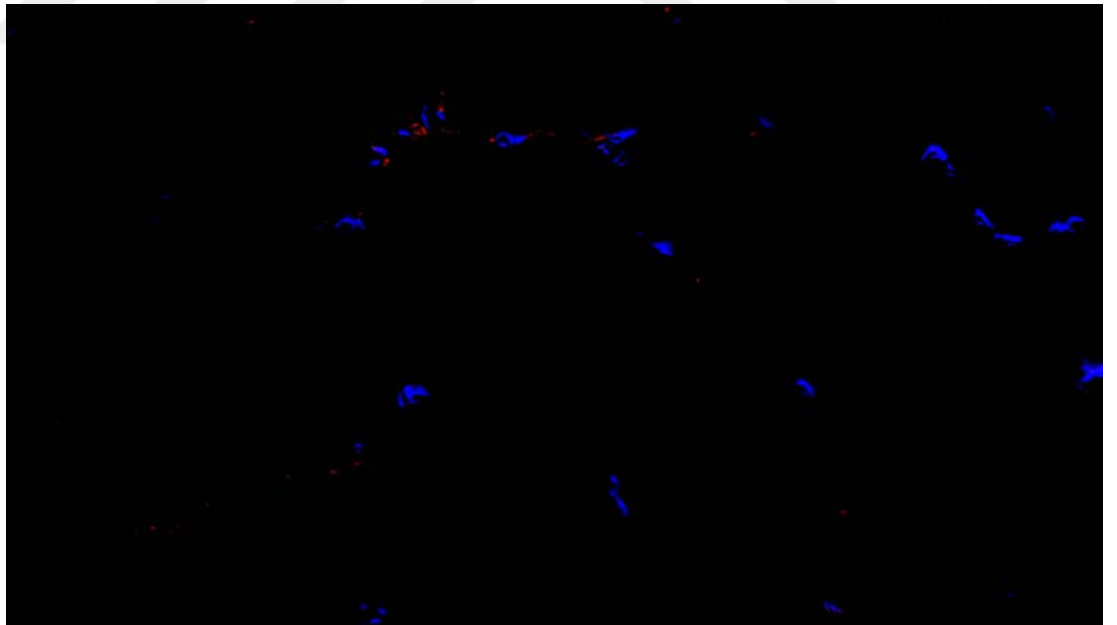
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL KARARI

TOPLANTI TARİHİ	: 18.02.2014 (SALI)
TOPLANTI SAYISI	: 2014/01
DOSYA KAYIT NUMARASI	: 2014/07
KARAR NUMARASI	: 2014/07-08
ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ	: Prof.Dr. Pervin DİNÇER
HAYVAN DENEYLERİNDEN SORUMLU ARAŞTIRMACI	: Prof.Dr. Pervin DİNÇER, Öğr. Gör. Burcu HAYTA, Doç.Dr. Özlen KONU, Gülsüm KAYMAN-KÖREKÇİ, Tülay ARAYICI
YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR	: Yrd.Doç.Dr.Beril TALİM, Prof.Dr. Sevim ERDEM-ÖZDAMAR, Prof.Dr. Petek KORKUSUZ ve Prof.Dr. Nuhan PURALI
ONAYLANAN HAYVAN TÜRÜ ve SAYISI	: Zebra balığı (Danio rerio) 4000 embriyo, 48 erişkin

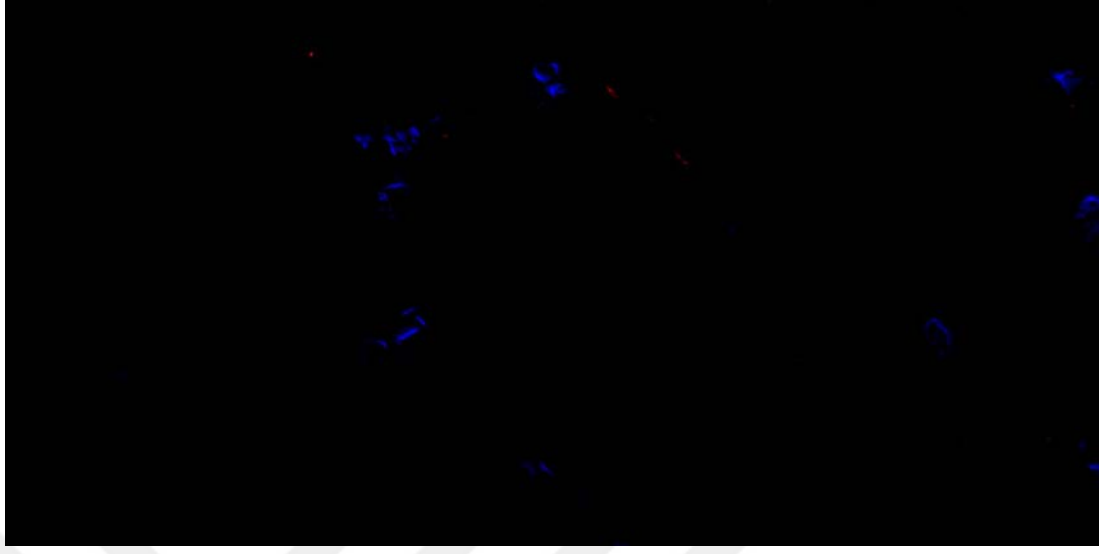
Üniversitemiz Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof.Dr. Pervin DİNÇER'in araştırma yürütücüsü olduğu 2014/07 kayıt numaralı "*Desmin Mutasyonunun Protein İşlevi Üzerindeki Etkisinin Zebra Balığı Modelinde Araştırılması*" isimli çalışma Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'ne göre uygun bulunarak oy birliği ile onaylanmasına karar verilmiştir.

Sorumlu araştırmacı deneylere başlangıç tarihini Etik Kurula bildirmekle yükümlüdür.

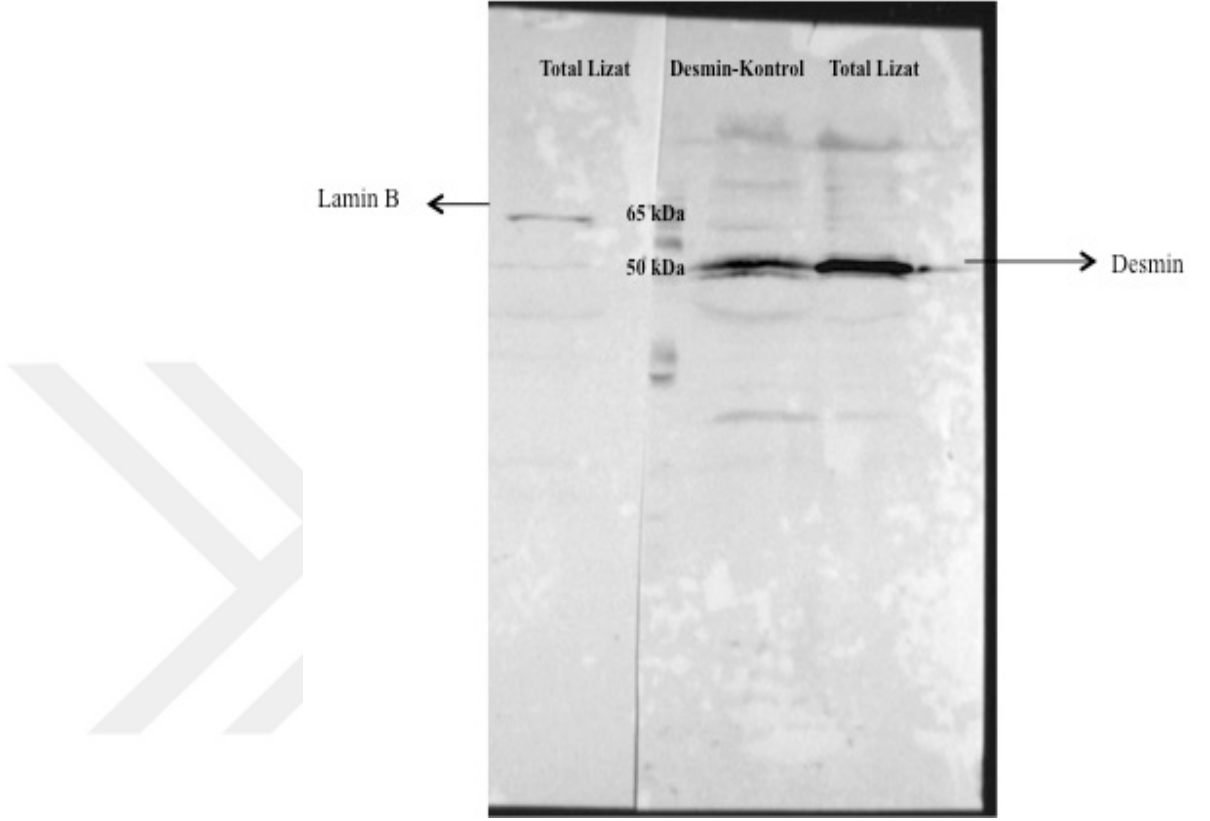
Prof. Dr. Sema ÇALIŞ
Etik Kurul Başkanı

EK 2: PLA Deneyi Sonuçları**A.****B.**

C.



Ek Şekil 1A, B Çekirdek etrafında (mavi) desmin-lamin B etkileşimi (kırmızı) ; C. Negatif kontrol

EK 3: Desmin ve Lamin B Proteinleri Kontrol *Western Blot* Görüntüleri**Ek Şekil 2** Lamin B ve desmin proteinleri

9. ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı: Ecem Kural

Doğum yeri ve tarihi: Ankara-1989

Uyruğu: T.C

İletişim Adresi ve Telefon: Yaşamkent Mahallesi, 3267. Cadde, Başkent 1 Sitesi, B blok, Daire 51, Yaşamkent-Ankara/ +905363715525

II- Eğitim

Yüksek Lisans, Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji

Anabilim Dalı 2014- 2017

Lisans, Hacettepe Üniversitesi, Biyoloji Bölümü 2007-2012

Gazi Anadolu Lisesi 2003-2007

III- Mesleki Deneyim

Desmin mutasyonunun protein işlevi üzerindeki etkisinin zebra balığı modelinde araştırılması (TUBITAK, 214S174), Bursiyer

IV- Bilimsel Faaliyetler

Yayınlar

Kural E, Kayman-Kürekci G, Koyunlar C, Dincer P. Hacettepe University Zebrafish Research Laboratory : Zebrafish Disease Modeling By Genome Editing Tools. FEBS J. 2016;283:116.

Kongre ve Sempozyumlar

Eylül 2014-Türkiye Moleküler Biyoloji Derneği 3. Uluslararası Kongresi

