T.C.

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MEME KANSERİ HÜCRE HATTI MDA-MB-231'İN ÇEKİRDEK PROTEOMUNUN SPLİT-TURBOID TEKNOLOJİSİ KULLANILARAK ÇALIŞMASI

Ebru DURUR

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Tıbbi Biyoloji Programı için Öngördüğü
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.

KOCAELİ
2024

T.C.

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MEME KANSERİ HÜCRE HATTI MDA-MB-231'İN ÇEKİRDEK PROTEOMUNUN SPLİT-TURBOID TEKNOLOJİSİ KULLANILARAK ÇALIŞMASI

Ebru DURUR

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Tıbbi Biyoloji Programı için Öngördüğü
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman: Prof. Dr. Murat KASAP

KOCAELİ

2024

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Tez Adı: Meme Kanseri Hücre Hattı MDA-MB-231'in Çekirdek Proteomunun Split-Turbo-ID Teknolojisi Kullanılarak Çalışması

Tez Yazarı: Ebru DURUR
Tez Savunma Tarihi:
Tez Danışmanı: Prof. Dr. Murat KASAP

Bu çalışma, sınav kurulumuz Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

SINAV KURULU ÜYELERİ		
ÜNVANI	ADI SOYADI	İMZA
BAŞKAN(ÜYE)		
DANIŞMAN		
ÜYE		

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

... /.... /20...
Prof. Dr. Sema Aşkın KEÇELİ
KOÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

Meme Kanseri Hücre Hattı MDA-MB-231'in Çekirdek Proteomunun Split-TurboID Teknolojisi Kullanılarak Çalışması

Hücre çekirdeği, genetik materyalin büyük bölümünü barındıran ve gen ekspresyonunu düzenleyerek hücresel aktiviteleri kontrol eden önemli bir organeldir. Nükleer DNA, çeşitli proteinlerle organize edilmiş yapılarla hücrenin işlevini destekleyecek şekilde korunur ve düzenlenir. Çekirdek, bu genetik bilgiyi korurken aynı zamanda birçok fizyolojik olayın gerçekleştiği dinamik bir merkezdir.

Organellerin proteomik çalışmaları, hücresel sinyal iletim yollarını ve hücresel işlevlerin moleküler temelini anlamak için kritik öneme sahiptir. Ancak organel proteom analizleri, zenginleştirilen protein fraksiyonlarında organelin gerçek bileşeni olmayan moleküllerin yer alması gibi zorluklarla karşılaşır. Ayrıca, farklı hücre tipleri ve dokular arasında organel bileşimindeki değişiklikler, analizlerde dikkate alınması gereken önemli unsurlardır. Organellerde yer alan birçok protein post-translasyonel modifikasyonlara uğradığı için bu modifikasyonların incelenmesi işlevsel analizler açısından önemlidir.

Bu çalışmada, çekirdek proteinlerinin biyotinilasyonu ve zenginleştirilmesi amacıyla Split TurboID biyotin ligaz teknolojisi kullanılarak yeni bir model hücre hattı oluşturulmuştur. Split TurboID, inaktif halde bulunan iki domainin (N-terminal ve C-terminal) rapamisin varlığında birleşerek aktif hale gelmesi ile yakınsal biyotin etiketlemesi gerçekleştirir. Bu sistem, FKBP ve FRB proteinlerini içeren füzyon proteinleri ile daha önceden tasarlanmıştır ve hücre içi biyotinilasyon kontrollü bir şekilde sağlanmıştır. Nükleer proteinlerin biyotinilasyonu, tetrasiklin-indüklenebilir bir sistem aracılığıyla kontrol edilerek çekirdek proteinlerinin enzimatik biyotinilasyonu gerçekleştirilmiştir.

MDA-MB-231 meme östrojen ve progesteron duyarsız triple negatif hücre hattı olup agresif seyreden meme kanseri hücrelerini temsil eder. Bu hücrelerde kontrollü gen ifadesi yapabilmek için TetR represör proteinini ifade etmelerini sağlama gerekir. Bu amaçla MDA-MB-231 hücrelerine TetR represör proteinini kodlayan pcDNA6/TR plazmiti transfekte edilmiş ve blasticin antibiytoiği ile seçilim yapılarak monklonal bir hücre hattı oluşturulmuştur. Elde edilen $TetR^{+}$ monoklonal hücre hattına bir sonraki adımda Split TurboID-N terminalini kodlayan pcDNA4/TO plazmiti transfekte edilmiş ve zeosin

varlığında seçilim yapılarak monoklonal bir hücre hattı oluşturulmuştur. Çalışmanın son aşamasında ise elde edilen $TetR^+$ ve $SplitTurboID\text{-}N\ terminal^+$ monoklonal hücre hattına Split TurboID-C terminalini kodlayan pcDNA3.1 plazmiti transfekte edilmiş, ve hücreler genetisin ile seçilime tabi tutularak monoklonal bir hücre hattı oluşturulmuştur. Oluşturulan bu hücre hattı Split-TurboID enziminin N-terminal domainini tetrasiklin kontrolünde ifade ederken C-ucunu sürekli ifade etmektedir. Ayrıca, biyotinilasyon aktivitesinin sıkı bir şekilde kontrol edilebilmesi için aktif enzim oluşumu rapamisin indüksiyonuna bağlanmıştır. Kısaca, tez kapsamında geliştirilen hücre hattında tetrasiklin ve rapamisin varlığında varlığında N-terminal ve C-terminal domainleri birleşerek aktif TurboID enzimini oluşturmuş, biyotin ve ATP'nin varlığında çekirdek proteinlerinin biyotinilasyonunu gerçekleştirmiştir. Bu biyotinilasyon işlemi, immün floresan ile doğrulanmış ve çekirdek lokalizasyonu gözlenmiştir. Böylece yeni bir model hücre hattı elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Split-TurboID, Tranfeksiyon, Biyotinilasyon, Çekirdek

ABSTRACT

Study of the Nuclear Proteome of the MDA-MB-231 Breast Cancer Cell Line Using Split-TurboID Technolog

The nucleus is an important organelle that houses the majority of genetic material and regulates cellular activities by controlling gene expression. Nuclear DNA is preserved and organized into structures with various proteins to support the function of the cell. While the nucleus safeguards this genetic information, it also serves as a dynamic hub where numerous physiological processes occur. Proteomic studies of organelles are critical for understanding cellular signaling pathways and the molecular basis of cellular functions. However, organelle proteomics face challenges, such as the presence of non-organelle-specific molecules in the enriched protein fractions. Additionally, variations in organelle composition between different cell types and tissues are important factors that must be considered in the analyses. Since many proteins within organelles undergo post-translational modifications, examining these modifications is essential for functional analyses.

In this study, a novel cell model was created using Split TurboID biotin ligase technology to biotinylate and enrich nuclear proteins. Split TurboID allowed proximity-based biotin labeling by the assembly of two inactive domains (N-terminal and C-terminal), which become active upon dimerization in the presence of rapamycin. This system was previously designed with fusion proteins containing FKBP and FRB proteins, enabling controlled intracellular biotinylation. Nuclear protein biotinylation was achieved by controlling the enzymatic biotinylation of nuclear proteins through a tetracycline-inducible system.

In the MDA-MB-231 cell line, a tetracycline-inducible model was created by transfecting with the pcDNA6/TR plasmid. The fusion protein containing the Split TurboID N-terminal domain was cloned into the pcDNA4/TO plasmid, enabling expression in the presence of tetracycline. Similarly, the fusion protein containing the Split TurboID C-terminal domain was cloned into the pcDNA3.1 plasmid, which was constitutively expressed in the cell. In the presence of tetracycline and rapamycin, the N-terminal and C-terminal domains combined to form the active TurboID enzyme, which biotinylated nuclear proteins in the presence of biotin and ATP. This biotinylation process was validated by

immunofluorescence microscopy analysis. Nuclear localization of the biotinylated proteins was observed indicating successful creation of a novel cellular model.

Keywords: Split-TurboID, Transfection, Biotinylation, Nucleus

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın tamamlanmasında desteklerini esirgemeyen birçok kişiye teşekkürlerimi sunmak istiyorum. Öncelikle, tez danışmanım Prof. Dr. MURAT KASAP a, bana sunduğu değerli rehberlik ve sürekli destek için en içten teşekkürlerimi iletiyorum. Onun bilgi birikimi ve deneyimleri, bu süreç boyunca bana rehberlik etti.

Bu süreçte sunduğu yönlendirmeler ve yapıcı eleştiriler için sevgili hocam Prof. Dr. GÜRLER AKPINAR'a teşekkür ederim.

Ayrıca, sevgili hocalarım Dr. Öğr. Üyesi Aylin KANLI'ya ve Dr. Öğr. Üyesi Banu İSKENDER'e, tüm süreç boyunca katkılarınız için teşekkür ederim.

Eğitim sürecim boyunca tüm bilgi birikimini aktarmaktan çekinmeyen ve bütün süreç boyunca tüm samimiyetiyle yanımda olan Dr. Mehmet SARIHAN'a içten teşekkür ederim. Bu süreçte tekrar benim yanımda olan ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen Tuğcan KORAK, Merve Gülsen BAL ALBAYRAK teşekkür ederim.

Birlikte bu yolda karşılaştığım arkadaşlarım Zeynep Sude KONGUR, Beyzanur ÇOBANOĞLU, Bengisu Rümeysa BARLAK, Elifcan KOCYİĞİT, Elif İlknur ŞAHİN, birçok şeyi birlikte atlattık birlikte konuştuk birlikte çözüm yolu bulduk bu yolda benimle olduğunuz için çok Teşekkür ederim

Canım Ailem, Annem BEHİCE DURUR, Babam NURİ DURUR ,Erkek Kardeşim AHMET DURUR Ve En iyi arkadaşım Sıdıka GÖNÜL her zaman yanımda olduğunuz ve bana güç verdiğiniz için teşekkür ederim. Sabrınız ve sürekli motivasyonunuz benim için büyük bir destek kaynağıydı. Sizlerin yardımları olmadan bu zorlu yolculukta ilerlemek çok daha güç olurdu.

Son olarak, bu çalışmanın hayata geçirilmesinde katkı sağlayan tüm akademik ve idari personele teşekkür ediyorum. Sunduğunuz kaynaklar ve destek, bu tezin oluşmasında önemli bir rol oynadı.

Hepinize teşekkür ederim.

ORİJİNALLİK BİLDİRİMİ

Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum "Meme Kanseri Hücre Hattı MDA-MB-231'in Çekirdek Proteomunun Split-TurboID Teknolojisi Kullanılarak Çalışması" başlıklı tezimde başka kaynaklardan yararlanılarak kullanılan yazı, bilgi, şekil, tablo ve diğer malzemeler kaynakları gösterilerek verilmiştir. Tezimde yer alan deneysel çalışmalar/araştırmalar bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yapılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir.,

Yukarıda belirtilen hususlar bir intihal programı (Turnitin vb.) kullanılarak test edilmiş olup, doğruluğunu beyan ederim.

..... / ..... / 20....

Ebru DURUR

İmza

İÇİNDEKİLER

ÖZET v
ABSTRACT vii
TEŞEKKÜR ix
ORİJİNALLİK BİLDİRİMİ x
SİMGELER VE KISALTMALAR xiii
1. GİRİŞ 1
1.1. Kanser 1
1.2. Meme Kanseri 1
1.3. Meme Kanserinin Moleküler Sınıflandırılması 2
1.4. Hücre Çekirdeği 3
1.5. Biyotinilasyon 4
1.6. TurboID Enzimi 6
1.7. Split TurboID Enzimi 7
2. AMAÇ 10
3. YÖNTEM 11
3.1. MDA-MB-231 Hücrelerinin Kültüre Edilmesi 13
3.2. pcDNA6/TR Vektör Sistemi 13
3.2.1. pcDNA6/TR Vektörü 13
3.2.2. pcDNA4/TO-FKBP-V5-Split TurboID N Vektörü 13
3.2.3. pcDNA3.1-HA-FRB-Split TurboID C-NLS Vektörü 14
3.3. Hücrelerin Çözülmesi 15
3.4. Hücrelerin Pasajlanması 15
3.5. Hücrelerin Dondurulması 16
3.6. Hücre Sayımı 16
3.7. MDA-MB-231 Hücre Hattında Ölüm Eğrisi Deneyi ve Blasticin ile Seçilim 17
3.8. MDA-MB-231 Hücre Hattında pcDNA6/TR Plazmidin Transfeksiyonu ve Stabil Hücre Hattının Oluşturulması 17
3.9. MDA-MB-231 TetR+ Hücre Hattına pcDNA4/TO-FKBP-V5-Split TurboID N - NLS Rekombinant Plazmitinin Transfeksiyonu ve Stabil Hücre Hattının Oluşturulması 18
3.10. MDA-MB-231-TetR+ Split TurboID Hücre Hattında Kill Curve Deneyi ve Genetisin ile Seçilim 19

3.11. MDA-MB-231-TetR+ _ pcDNA4/TO-FKBP-V5-Split TurboID-N –NLS Hücre Hattına pCDNA3.1- HA-FRB-Split TurboID C -NLS Rekombinant Plazmitin Transfeksiyonu ve Stabil Hücre Hattının Oluşturulması 19
3.11.1. Seri Dilüsyon Yöntemi Kullanılarak N- ve C-Terminal Domainleri Eksprese Eden Monoklonal MDA-MB-231 Hücre Hattı Geliştirilmesi 20
3.12. Split-TurboID N- ve C- Uçlarının İfadesi 21
3.13. Protein Özütlerinin Hazırlanması ve Bradford Yöntemi ile Konsantrasyonlarının Belirlenmesi 22
3.14. Bradford Yöntemi ile Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi 22
3.15. SDS-PAGE Poliakrilamid Jel Elektroforezi 22
3.16. Western Blotlama 24
3.17. İmmünfloresan Mikroskopi Yöntemi ile Split-TurboID N- ve C- uçlarının MDA-MB-231-TetR+-Split-TurboID-N-C Hücre Hattında Lokalizasyonlarının Doğrulanması 24
3.17.1. İmmünfloresan Deneyi Protokolü 24
3.18. *İn vitro* Biyotinilasyon ve Split TurboID Aktivitesinin Gösterilmesi 25
3.19. Protein Özütlerinin Hazırlanması 26
3.20. İmmünfloresan Mikroskopi ile Biyotinli Proteinlerin Çekirdekte Lokalize Olduğunun Gösterilmesi 26
4. BULGULAR 28
4.1. MDA-MB-231-TetR+ Hücre Hattının Oluşturulması 28
4.2. Blasticin ile Seçilim 29
4.3. MDA-MB-231-TetR+ Hücre Hattının Transfeksiyonu ve İndüksiyonu 29
4.4. Genetisin ile Seçilim 30
4.5. Split Turbo-ID Çekirdek Lokalizasyonu 32
5. TARTIŞMA 34
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER 37
7. KAYNAKLAR 38

SİMGELER VE KISALTMALAR

AmBic: Amonyum Bikarbonat

ATP: Adenozin Trifosfat

Da: Dalton

DMSO: Dimetilsülfoksit

DMEM: Dulbecco’s Modified Eagle Medium

DTT: Dithiothreitol

EDTA: Etilendiamintetraasetik Asit

FA: Formik Asit

FASP: Filtre Yardımlı Örnek Hazırlama

FBS: Fetal Bovin Serum

HA: Hemagglutin

IF: İmmünofloresan

KDa: Kilo Dalton

LB: Luria-Bertani

mL: Mililitre

mM: Milimolar

nM: Nanomolar

PBS: Fosfat Tamponlu Salin Çözeltisi

RIPA: Radyo immünopresipitasyon Tahlil Tamponu

SDS-PAGE: Sodyum Dodesil Sülfat – Poliakrilamid Jel Elektroforezi

TBS-T: Tris-Tamponlu Salin, 0.1% Tween 20

WB: Western Blot

ŞEKİLLER

Şekil 1.1 Meme Kanserinin Moleküler Sınıflandırılması..... 2
Şekil 1.2 MDA-MB231 Hücre Hattının Inverted Mikroskop Görüntüsü 3
Şekil 1.3 Biyotinilasyon Reaksiyon Gösterimi 5
Şekil 1.4 TurboID biyotin ligaz enzimi biyotinasyon reaksiyonu ve kullanıldığı örnek organizmalar 7
Şekil 1.5 Split-TurboID etiketleme reaksiyonunun gösterimi..... 9
Şekil 3.1 pcDNA6/TR Vektörün Sanal Klonlaması 13
Şekil 3.2 pcDNA4/TO-FKBP-V5-Split TurboID N Terminal-NLS Rekombinant Vektörün Sanal Klonlaması..... 14
Şekil 3.3 pcDNA3.1- HA-FRB-Split TurboID C-NLS Rekombinant Vektörün Sanal Klonlaması..... 15
Şekil 3.4 MDA-MB-231 TetR+_ pcDNA4/TO-FKBP-V5-Split TurboID-N –NLS hücre hattına pCDNA3.1- HA-FRB-Split TurboID C -NLS rekombinant plazmitin transfeksiyonu yapıldıktan sonra hücre hattına tek koloni düşürülmesi 21
Şekil 4.1 MDA-MB-231-TetR+ stabil hücre hattı oluşturulması..... 28
Şekil 4.2 MDA-MB-23-TetR+ Transfeksiyon ve Seçilim Sonrası Oluşan Kolonilerin Western Blot yöntemi 28
Şekil 4.3 MDA-MB-231-TetR+ Hücre Hattının Ölüm Eğrisi Deneyi Sonucunda Blasticin Antibiyotik Dozunun Belirlenmesi..... 29
Şekil 4.4 MDA-MB-231-TetR+Split-TurboID-N Hücre Hattının Western Blot Analizi 30
Şekil 4.5 MDA-MB-231-TetR+N Split TurboID Hücre Hattına pcDNA3.1-HA-FRB-Split TurboID-C-NLS Transfeksiyonu Sonucunda Geniticin ile Ölüm Eğrisi Protokolü..... 31
Şekil 4.6 MDA-MB-231-TetR+ Split TurboID - pcDNA3.1-HA-FRB-Split TurboID C-NLS protein ifadelerinin Western Blot görüntüsü 31
Şekil 4.7 MDA-MB-231-TetR+-N-C-Split-TurboID stabil hücre hattında, Split TurboID sisteminin çekirdek lokalizasyonu tetrasiklin Varlığı (+) ve Yokluğu (-) koşullarında değerlendirilmesi.. 32
Şekil 4.8 MDA-MB-231 TetR+ N-C Split TurboID stabil hücre hattında biyotinilasyon aktivitesinin belirlenmesi 33

TABLOLAR

Tablo 3.1 kullanılan çözeltiler ve içeriği 11
Tablo 3.2 Kullanılan Çözeltiler ve İçeriği 12
Tablo 3.3 Deneylerde Kullanılan Antikorlar ve Uygulama 12
Tablo 3.4 SDS-PAGE jellerinin hazırlanmasında kullanılan çözelti ve kimyasallar ve kullanılan miktarlar. 23
Tablo 3.5 Biyotinilasyon Reaksiyon Besiyerine Eklenen Komponentler 25

1. GİRİŞ

1.1. Kanser

Kanser, yaşamın her alanını önemli ölçüde etkileyen ve hayati risk taşıyan bir kronik hastalıktır (Liu ve Zheng, 2024) . Dünya genelinde kadınlarda en sık rastlanan kanser türü olan meme kanseri, gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde önemli bir sağlık sorununu oluşturur (Thill ve ark., 2024) . Genellikle kadınları etkilese de, nadir durumlarda erkeklerde de görülebilen bu hastalık, pek çok faktörle ilişkilidir (Abboah-Offei ve ark., 2024; Conte ve ark., 2024) . Genetik etkenler, hormonal değişiklikler, yaş, aile öyküsü, obezite, hormonal tedaviler ve radyasyon gibi çeşitli risk faktörleri, meme kanserini etkileyen önemli faktörlerdir (Ozkan, 2019). Meme kanseri, farklı hücre büyüme hızları ve yayılma yetenekleri gösteren çeşitli alt tiplerden oluşan bir hastalıktır. Bazı meme kanseri hücreleri yavaş büyüyebilir ve daha sonra vücudun diğer bölgelerine yayılabilirken, diğerleri daha agresif bir şekilde hızla büyüyerek ve yayılarak ilerler. Bu çeşitlilik nedeniyle, kadınların meme kanserinden ölümü genellikle hastalığın yaygın metastaz yapmasından kaynaklanır (Sharma ve ark., 2010). 2022 yılında meme kanseri, dünya genelinde 670.000 ölümle sonuçlanmış ve 185 ülkenin 157'sinde kadınlar arasında en sık görülen kanser türü olmuştur. Meme kanserlerinin yaklaşık yarısı, yaş ve cinsiyet dışında bilinen herhangi bir risk faktörü bulunmayan kadınlarda görülürken, vakaların %0,5-1'i erkeklerde ortaya çıkmaktadır . Bu veriler, meme kanserinin tüm ülkelerde yaygın bir halk sağlığı sorunu olduğunu göstermektedir (Jantre ve Mainkar, 2022).

1.2. Meme Kanseri

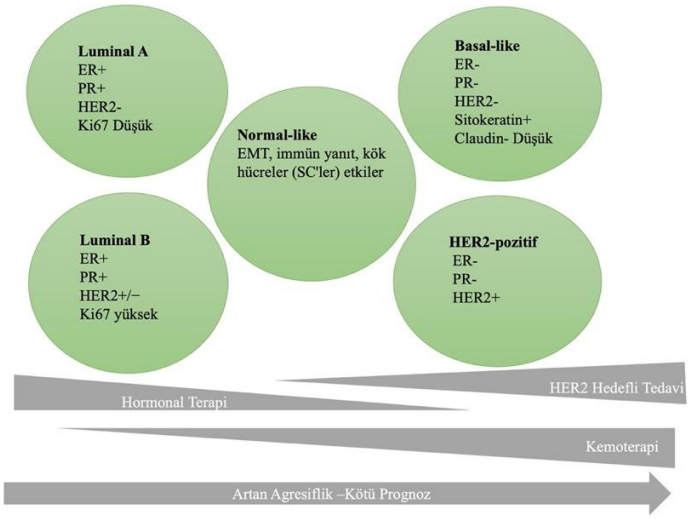
Meme kanserini sırası ile akciğer, kolon ve prostat kanserleri izlemektedir. Yüksek görünme oranının yanında, meme kanserleri ölüm nedenleri açısından %13,6 ile akciğer kanserinden sonra ikinci sırada yer almaktadır (Lukasiewicz ve ark., 2021).

Meme kanseri histopatolojik durumuna, kaynaklandığı doku tipine ve moleküler karakteristik özelliklerine göre farklı şekillerde sınıflandırılabilir. Meme kanseri meme bezlerinde, meme kanallarında, yağ dokusunda veya bağ dokusunda başlayabilir (Sharma ve ark., 2010). Meme dokusundaki kanalların epitel hücrelerinde (%85) veya lobüllerde (%15) meydana geldiği bilinmektedir (Özenver ve ark., 2024).Kanserin kaynaklandığı doku tipine

bakılarak yapılan sınıflandırma her ne kadar bilgi verici olsa da aynı doku tipinde farklı karakteristik özellikler taşıyan kanser tipleri nedeniyle yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle daha ayrıntılı sınıflandırma yöntemleri kullanılmaktadır. Son yıllarda, moleküler genetik tekniklerin gelişmesi ve kullanımına ulaşımın kolaylaşmış olması nedeni ile meme kanserleri moleküler yöntemler kullanılarak sınıflandırılmaya başlanmıştır (Yoneten ve ark., 2019). Bu sınıflandırma çalışmaları meme kanserinin heterojen formlarda oluşabildiğini göstermiştir. Meme kanserinin doğru tanısı ve tedavisi için doğru moleküler sınıflandırma yapılması gereklidir (Bertoli ve ark., 2015).

1.3. Meme Kanserinin Moleküler Sınıflandırılması

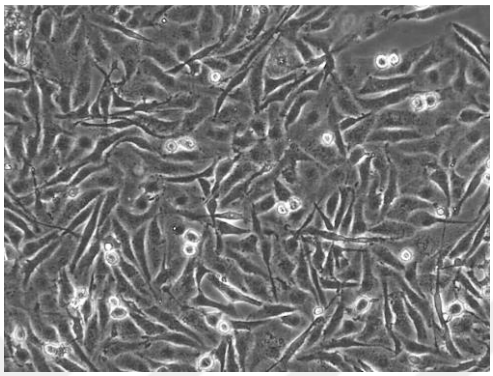
Meme kanserinin moleküler sınıflandırılması genellikle Östrojen reseptörü (ER), Progesteron reseptörü (PR), HER2 (İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 2) ve Ki67 protein seviyelerine bakılarak yapılmaktadır. Bu proteinlerin ifade düzeylerine göre meme kanseri, Lüminal A, Lüminal B HER2 negatif, Lüminal B HER2 pozitif, HER2 pozitif ve Triple negatif olmak üzere beş farklı alt tipe ayrılır (Russnes ve ark., 2017). Lüminal A'dan Triple negatif meme kanseri alt tipine doğru gidildikçe prognoz kötüleşmekte, sağ kalım oranları düşmekte ve tedaviye yanıt oranı azalırken, tümör invazyonu, metastatik potansiyel ve tedavi direnci gibi özellikler artış göstermektedir (Anderson, 2021) (Şekil 1.1).



Şekil 1.1 Meme Kanserinin Moleküler Sınıflandırılması (Russnes ve ark., 2017)

Triple-negatif meme kanserini temsil eden MDA-MB-231 hücre hattı, M.D. Anderson Kanser Merkezi'nde geliştirilmiş bir modeldir (Şekil 1.2). Bu hücreler, östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) ve HER2/neu onkoproteini açısından negatif olup agresif bir kanser türü olan triple-negatif meme kanserini modellemektedir. MDA-MB-

231 hücreleri, özellikle metastaz üzerine yapılan çalışmalarda kullanılmaktadır ve genetik olarak heterojen bir popülasyona sahip olmaları, kolay büyüme göstermeleri, genetik manipülasyona kolay yanıt vermeleri bu hücre hattı ile çalışılabilmesi için uygun bir model sunmaktadır (Cailleau ve ark.,1978) . Bu hücre hattı, meme kanseri araştırmalarında hastalığın agresif ve metastatik özelliklerini anlamak için önemli bir araçtır (Chavez ve ark., 2011).



Şekil 1.2 MDA-MB231 Hücre Hattının Mikroskop Görüntüsü

1.4. Hücre Çekirdeği

Hücre çekirdeği, hücrenin kontrol merkezi olup karmaşık hücresel olayların düzenlenmesinde kritik bir rol oynar. Çekirdek içinde bulunan proteinler, hücresel süreçlerin yönetilmesi, fizyolojk ve gelişimsel olayların düzenlenmesi gibi pek çok süreçlerde kritik roller üstlenmektedir (Lammerding,2013).Çekirdek proteinlerinde meydana gelen değişiklikler, meme kanserinin oluşumu ve gelişiminde rol oynayabilmektedir. Hücre çekirdeğindeki proteinlerin içeriğinde ve miktarında meydana gelebilecek değişiklikler, kanser hücrelerinin invaziv ve metastatik özellikler kazanması, immün sistemden kaçabilmesi ve kimliğinin değişimine neden olabilir (Nanninga, 2014).Meme kanserinde sıkça rastlanan genetik mutasyonlar, hücre büyüme ve bölünmeyi kontrol eden genlerde anormalliklere neden olabilir. Ayrıca, hücre çekirdeğinde bulunan hormon reseptörleri, özellikle östrojen reseptörü (ER) ve progesteron reseptörü (PR), meme kanseri hücrelerinin hormonlara verdiği yanıtı etkileyebilir. Bazı durumlarda, hücre çekirdeğindeki HER2 geninin kopya sayısında görülen artışlar , HER2 pozitif meme kanseri olarak bilinen meme kanseri alt tipinin ortaya çıkmasına ve tümörün agresif forma geçmesine katkıda bulunabilir (Miziak ve ark., 2023).

Meme kanserinde sıkça rastlanan genetik mutasyonlar, hücre büyüme ve bölünmesini kontrol eden genlerdeki anormalliklere sebep olabilir. Özellikle, BRCA1 ve BRCA2 gibi

tümör baskılayıcı genlerdeki mutasyonlar, meme kanseri riskini artırabilir. Ayrıca, hücre çekirdeğinde yer alan hormon reseptörleri, özellikle östrojen reseptörü (ER) ve progesteron reseptörü (PR), meme kanseri hücrelerinin hormonlara verdiği yanıtı etkileyebilir (Cui ve ark., 2007). Bu reseptörlerdeki anormallikler, meme kanseri tedavi stratejilerini etkileyen önemli faktörlerden biridir. Hücre proteomuna yönelik yapılan çalışmalarda, meme kanserinin moleküler düzeydeki karmaşıklığını anlamamıza yardımcı olabilir. Bu çalışmalar, kanser hücrelerindeki protein ifadesi profilini ve bu proteinler arasındaki etkileşimleri inceleyerek, hastalığın temel mekanizmalarını ortaya çıkarmayı amaçlar. Bu bağlamda, hücre proteomu analizi, özellikle meme kanseri hücrelerindeki spesifik protein değişikliklerini ve sinyal yollarını belirleyerek, potansiyel tedavi hedeflerini tanımlama konusunda önemli bilgiler sağlayabilir (Renz, 2020).

1.5. Biyotinilasyon

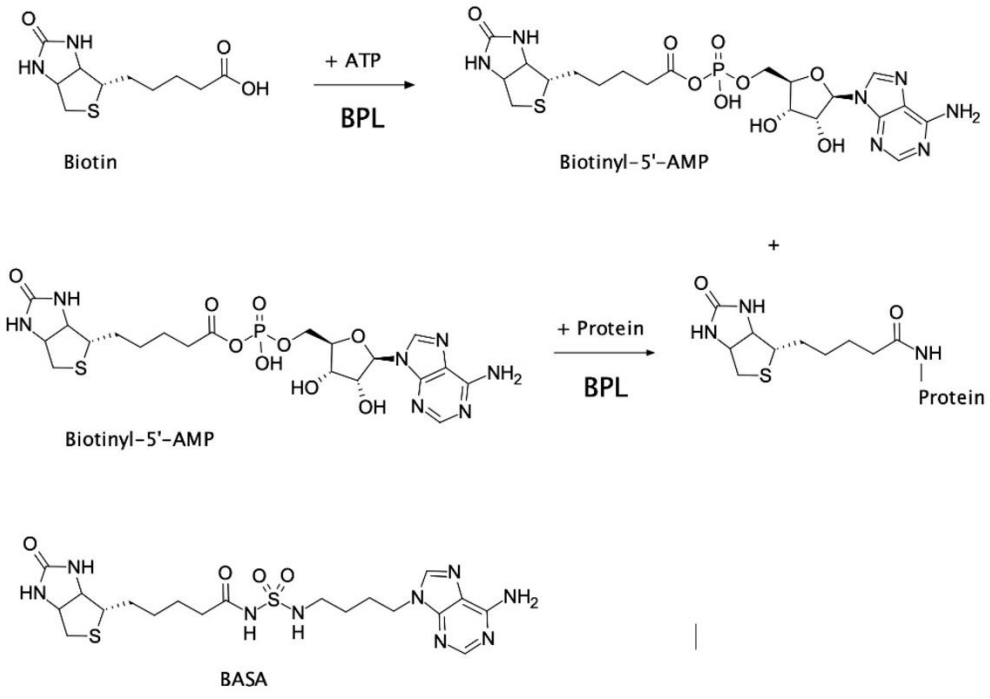
Biyotin, tiyofen halkası ile bağlanmış bir imidazol grubu ve valerik asit zincirinden oluşan, biyolojik süreçlerde önemli roller üstlenen bir moleküldür. Vitamin H veya B7 olarak da bilinen biyotin, özellikle karboksilaz enzimleri için koenzim olarak görev yapar (Karachaliou & Livaniou, 2024). Bu enzimler arasında; yağ asit sentezinde önemli bir rol oynayan asetil-CoA karboksilaz-1, bazı yağ asitlerinin ve besinlerin yıkımında görevli propiyonil-CoA karboksilaz, lösin metabolizmasında yer alan 3-metilkrotonil-CoA karboksilaz ve glikoneogenez sürecinde etkili olan pürivat karboksilaz bulunur (Sakurai-Yageta & Suzuki, 2024). Biyotin protein ligazı (BPL) tarafından katalize edilen protein biyotinilasyonu. Biyotin, reaksiyon ara maddesi olan biyotinil-5′-AMP'yi üretmek için ATP ile bağlanır. Biyotinil-5′-AMP, biyotinil kısmını biyotin kabul eden protein substratında bulunan belirli bir lizin kalıntısına kovalent olarak bağlamak için kullanılır (Hayes ve ark., 2020) (Şekil 1.3).

Biyotin, koenzim fonksiyonlarının ötesinde, histon biyotinilasyonu gibi post-translasyonel düzenlemelerde de yer alır. Histon biyotinilasyonu, gen ekspresyonu, DNA tamiri, kromatin düzenlenmesi, mitotik kondensasyon ve hücresel yaşam süresini etkileyen kritik süreçlerde önemlidir. Bunun yanı sıra, biyotin, asialoglikoprotein reseptör mRNA'sı gibi bazı RNA moleküllerinin transkripsiyon sonrası aktivitelerinin düzenlenmesinde de rol oynar (Kothapalli ve ark., 2005).

Biyotin, günümüzde moleküler biyoloji ve sağlık sektöründe geniş bir kullanım alanına sahiptir. saç dokularının yenilenmesi ve güçlenmesi ile sindirim sisteminin düzenlenmesine katkıları nedeniyle biyotin, kozmetik ve medikal uygulamalarda sıkça tercih

edilmektedir. Moleküler biyoteknoloji alanında ise biyotinin farklı bir özelliği öne çıkar: Avidin, streptavidin ve neutravidin proteinleriyle oluşturduğu doğada bilinen en güçlü non-kovalent bağlardan biri. Bu özellik, biyotini protein izolasyonu, moleküler işaretleme ve görüntüleme, immünohistokimyasal analizler, protein-protein etkileşimlerinin tespiti, DNA ve RNA izolasyonu, moleküler etiketleme ve dizi analizleri gibi pek çok araştırma alanında vazgeçilmez kılmaktadır (Patel ve ark., 2017).

Biyotinin düşük moleküler ağırlıklı yapısı, toksik bir özellik taşımaması, kolayca elde edilebilir olması, hedef moleküllerin yapısını ve aktivitesini bozmaması ile bağlanma reaksiyonlarının geri dönüşebilirliği, kullanımında önemli avantajlar sunmaktadır. Moleküllerin biyotinilasyonu genellikle enzimatik veya kimyasal yöntemlerle gerçekleştirilir. Kimyasal biyotinilasyon, biyotinin sulfo-NHS, TFP ester veya PEG4-alkalin gibi türevleriyle gerçekleştirilir. Bu yöntemlerde biyotin, genellikle proteinlere uzunluğu değişken aralayıcı gruplar yardımıyla konjüge edilir. Bu strateji, esneklik sağlaması ve bağlanma etkinliğini artırması nedeniyle yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Thermo Fisher Scientific, 2018).



Şekil 1.3 Biyotinilasyon Reaksiyon Gösterimi (Hayes ve ark., 2020)

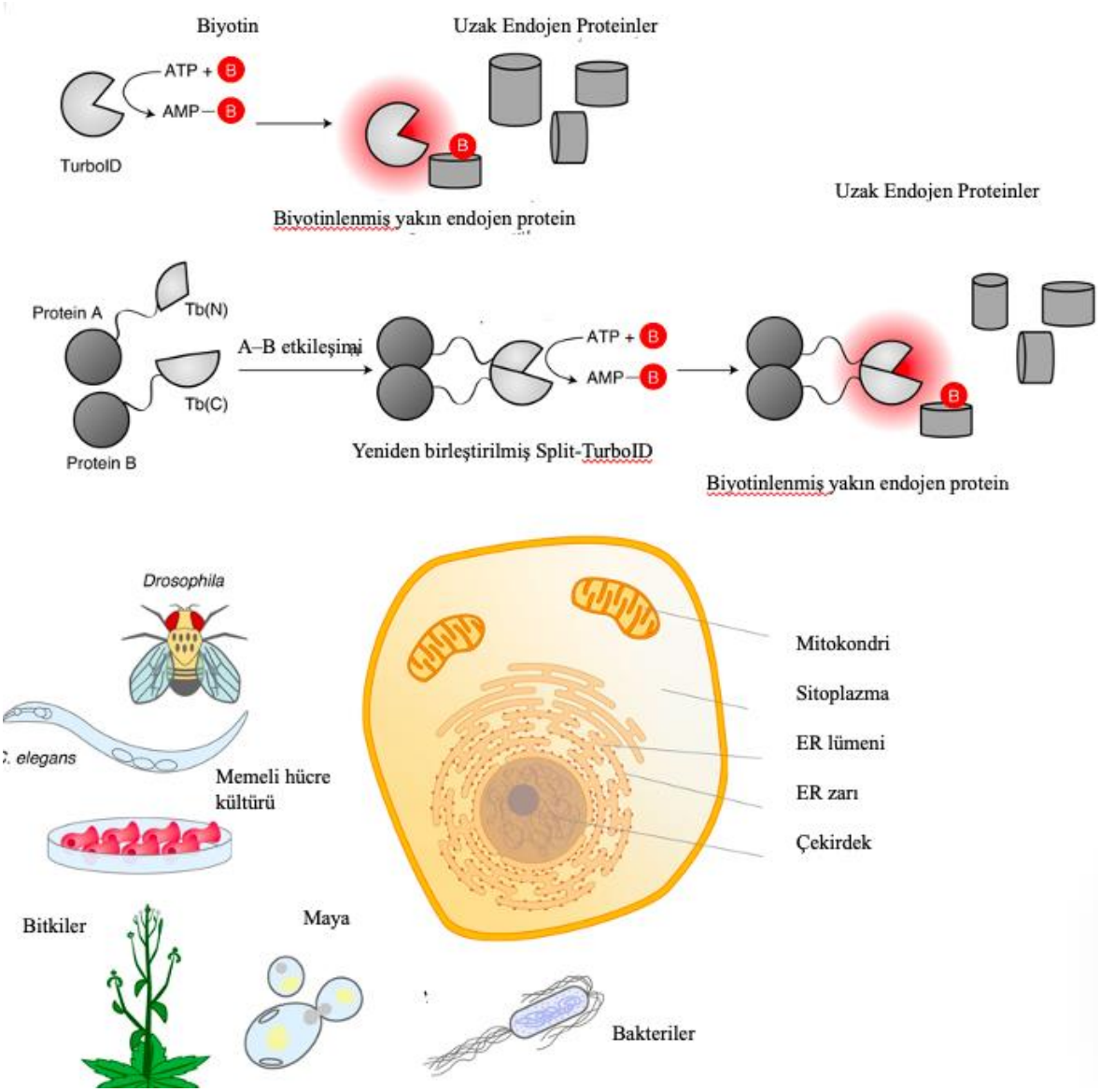
1.6. TurboID Enzimi

Yakınlık etiketleme (proximity labeling) yöntemleri, protein-protein etkileşimlerinin (PPI) analizinde önemli bir yenilik ortaya koymuştur. PPI'lerin aydılatılması hücresel metabolizmaların ve etkileşimlerin anlaşılmasında kritik rol oynar ve bunların tanımlanması protein fonksiyonlarını, biyolojik mekanizmaları ve hastalıkları anlamamıza yardımcı olur (Sears ve ark., 2019). PPI'lerin analizinde farklı yöntemler kullanılsa da son yıllarda sıklıkla başvurulan ve her gecen gün geliştirilen BioID (proximity-dependent biotin identification) yöntemi, belirli bir protein etkileşim ağındaki aday proteinleri tanımlamak için yaygın olarak kullanılmaktadır. BioID, Escherichia coli biotin protein ligazı BirA'nın mutasyona uğramış formunu (R118G) kullanarak, hedef proteine yakın proteinleri biyotinler ve bu proteinler zenginleştirilerek işlenir kütle spektrometrisi (MS) ile analiz edilerek tanımlanır (Branon ve ark., 2018). BioID, tek hücreli organizmalardan memeli hücrelerine, bitkilerden farelere kadar geniş canlısistemlerde kullanılabilmektedir ve birçok geliştirilmiş versiyonu mevcuttur (Kim ve ark., 2014) . Bu yöntem, biyotin takviyesi düzenlenebilen ve zaman kontrolü sağlayan bir sistemdir. Ayrıca hücresel ve canlı sistemler için toksisite oluşturmaz ve in vivo ortamlarda kullanım imkanı sunar (Roux ve ark., 2012).

BioID uygulamalarında ortamdaki biyotin miktarı reaksiyon hızını doğrudan etkiler. Ayrıca reaksiyon için ATP ve MgCl2 varlığı da gereklidir. Ancak enzimatik biyotinilasyonun en temel sorunu yavaş enzim kinetiğidir. Oldukça yavaş olan enzimatik reaksiyon için gerekli optimal inkübasyon süresi genellikle 15-18 saat arasındadır. Bu reaksiyonda biyotin, proteine kovalent bağlanarak proteine bağlı kalır ve biyotinilenen proteinler, işlenerek MS ile izole edilip analiz edilebilir (Cronan, 2005) .

TurboID, biyotin ligaz tabanlı etiketleme yöntemlerinin yavaş etiketleme kinetiklerini aşmak amacıyla geliştirilmiş bir biyotin ligazdır TurboID, 2018'deki ilk uygulamalarından bu yana büyük bir ilgi görmüştür. TurboID, hücre kültürlerinde yalnızca 10 dakika veya daha kısa sürede etiketleme yapabilen hızlı kinetiklere sahiptir, bu da biyolojik süreçlerin daha kısa sürede incelenmesini mümkün kılar (Branon ve ark., 2018). TurboID'nin hızlı kinetiği, özellikle dinamik ve kısa süreli protein etkileşimlerinin incelenmesinde önemli bir avantaj sağlamaktadır. Bu özellikler, Drosophila, melanogaster, Caenorhabditis elegans , maya ve bitkiler gibi daha düşük sıcaklıkta büyütülen organizmalarda yakınlık etiketleme uygulamalarının yapılmasına olanak tanımaktadır (Şekil 1.4). TurboID'nin bu geniş uygulama yelpazesi, model organizmalar kullanarak yapılan *in vivo* protein-protein

etkileşim analizlerinde biyotin ligaz temelli yöntemlerin etkinliğini büyük ölçüde artırmıştır (Cho, Branon, Udeshi, ve ark., 2020a).



Şekil 1.4 TurboID biyotin ligaz enzimi biyotinilasyon reaksiyonu ve kullanıldığı örnek organizmalar (Cho, Branon, Udeshi, ve ark., 2020a).

1.7. Split TurboID Enzimi

Split TurboID, klasik TurboID teknolojisinin bir türevi olup, protein-protein etkileşimlerini yüksek spesifik kontrol altında incelemek için geliştirilmiştir. Split TurboID'de, TurboID enzimi iki inaktif parçaya ayrılır ve bu parçalar ayrı ayrı hedef fragmentler ile birleştirilir (Cho, Branon, Rajeev, ve ark., 2020) . Hedef fragmentlerin etkileşimleri sonucunda bu parçalar yeniden bir araya gelerek TurboID'nin katalitik

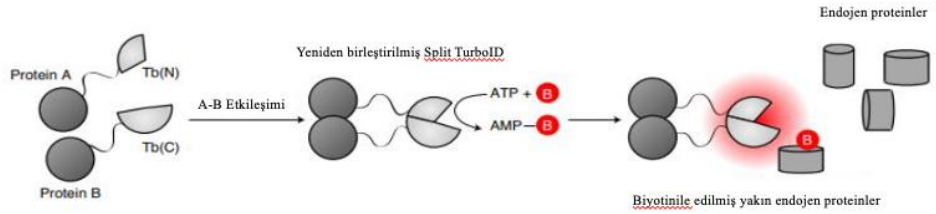
aktivitesini geri kazanır. Bu süreç, yalnızca etkileşim halinde olan proteinlerin yakın çevresindeki biyotinilasyonun gerçekleşmesini sağlar. Böylece, tam uzunluklu TurboID'ye kıyasla daha yüksek bir bölgesel özgüllük elde edilir (Cho, Branon, Udeshi, ve ark., 2020b).

Split TurboID, klasik BioID veya TurboID yöntemlerine göre birçok avantaj sunmaktadır. Birincisi, enzimin yeniden aktive olabilmesi için iki parçanın fiziksel etkileşimi gerektiğinden, biyotinilasyon yalnızca hedef proteinlerin etkileşimi olduğu durumlarda gerçekleşir. Rapamisin indüksiyonuna bağlı olarak FKBP (FK506 Binding Protein) ve FRB (FKBP Rapamycin Binding domain) proteinlerinin etkileşimini temel alır. Bu sistemde, iki parçalı biyotin ligaz olan Split TurboID'nin N-terminal ve C-terminal domainleri, sırasıyla FKBP ve FRB proteinlerine füzyonlanmıştır. Normal koşullarda inaktif durumda olan bu domainler, rapamisin varlığında FKBP ve FRB proteinlerinin güçlü bir şekilde bağlanmasıyla bir araya gelir ve aktif bir biyotin ligaz oluşturur. Aktifleşen Split TurboID, yakın çevresindeki proteinlerdeki lizin kalıntılarına biyotin ekler ve bu sayede belirli hücresel bölgelerde proteinlerin biyotinilasyonu gerçekleştirilir.(Cho, Branon, Rajeev, ve ark., 2020b) .

Split TurboID'nin geliştirilmesi, proteomik teknolojilerde önemli bir adım olarak kabul edilmektedir. Bu sistemin, yüksek spesifikliği ve kısa biyotinleme süreleri (<1 saat) ile önceki split biyotin ligaz sistemlerine kıyasla üstün performans gösterdiği bildirilmiştir. Sonuç olarak, Split TurboID, yalnızca protein-protein etkileşimlerini incelemekle kalmayıp, aynı zamanda organel temas bölgeleri ve spesifik hücresel süreçlerin dinamik analizinde güçlü bir araç olarak biyolojik araştırmalarda geniş uygulama alanları bulmaktadır (Cho, Branon, Udeshi, ve ark., 2020a).

Split-TurboID biyotin ligazı, iki ayrı inaktif domain (N-terminal ve C-terminal) formunda tasarlanmış ve belirli uyaranlar ile aktif hale gelen bir enzimdir. Sistem, rapamisin gibi moleküllerin yardımıyla FKBP ve FRB proteinlerini bir araya getirerek, bu domainlerin fiziksel olarak birleşmesini ve enzimatik aktivitenin başlamasını sağlar (Şekil 1.4) (Yang ve ark., 2021) .

Bu reaksiyon, yalnızca Split-TurboID domainlerinin birleştiği hedef bölgelerde spesifik olarak gerçekleşir, böylece hücresel işleyişe zarar vermeden belirli proteinlerin biyotinilasyonu sağlanır. Sistemin hızlı kinetiği ve düşük toksisite seviyesi, biyotinilasyon reaksiyonunun kısa sürede ve yüksek doğrulukla tamamlanmasına olanak tanır. Split-TurboID'nin bu özellikleri, nükleer proteomikler ve organel spesifik protein analizleri gibi çalışmalarda son derece güçlü ve hassas bir araç olarak kullanılmasını sağlar (Cho, Branon, Rajeev, ve ark., 2020b) .



Şekil 1.5 Split-TurboID etiketleme reaksiyonunun gösterimi. N- ve C- terminal domainleri ayrı iken inaktif formda olan TurboID enzimi, rapamisin ile indüklenen protein etkileşimi sayesinde aktif forma geçerek biyotinilasyon reaksiyonunun katalizleyebilmektedir(Cho, Branon, Udeshi, ve ark., 2020b).

2. AMAÇ

Hücre organel proteomlarının detaylı incelenmesi, hücresel sinyal iletim yollarını belirlemede kritik öneme sahip bir teknolojik ilerlemeyi temsil etmektedir. Ökaryotik hücrenin düzenleyici merkezi olan çekirdek, dinamik bir sistemdir ve çeşitli makromoleküllerin deposu olarak, hücrenin kaderini belirleyen sinyalleme süreçlerini modüle eder. Çekirdek proteinlerinin toplam hücresel proteinlerin yaklaşık %10-20'sini oluşturması, çekirdeğin birçok farklı işlevde yer aldığını göstermektedir (Narula ve ark., 2013). Ancak, çekirdek proteinlerinin sentezini, işlevini ve faaliyetlerini koordine eden moleküler bileşenler ve mekanizmalar hakkında hâlâ sınırlı bilgi bulunmaktadır. Bu çalışmanın amacı, çekirdek proteomunu daha net tanımlamak için yeni bir yaklaşım geliştirmektir (Conti ve Alessio, 2015; Narula ve ark., 2013).

Literatürde, çekirdek proteomu genellikle ticari kitler veya basit fraksiyonlama teknikleri aracılığıyla çalışılmaktadır. Ancak, bu metotlarda karşılaşılan teknik zorluklar, özellikle çekirdek ve sitoplazmik içeriğin etkileşimi, proteazların neden olduğu degradasyonlar ve hipotonik veya hipertonik tamponlar ile muamele edilen hücrelerde meydana gelen çekirdek zarının bozulması gibi sorunlar, çekirdek proteomunu incelemeyi zorlaştırmaktadır (Ayımugu ve ark., 2020; Lévy, 1988). Bu çalışmada, çekirdek proteinlerinin enzimatik biyotinilasyonu ve zenginleştirilmesi için Split TurboID biyotin ligaz enzimi kullanılmıştır. Yenilikçi bir yaklaşım olarak, hücre içinde Split TurboID enziminin N terminali tetrasiklin kontrolü altında ve C terminali sürekli olarak ifade edilmiştir. NLS sinyal dizileri eklenerek, bu proteinlerin çekirdeğe transferinin sağlanması ve FKBP ve FRB proteinleri aracılığıyla aktif Split TurboID'nin etkili bir şekilde oluşması başarılmıştır

Bu çalışma, bir meme kanseri hücre hattı olan MDA-MB-231 ‘de çekirdek proteomunda meydana gelen değişimleri ve moleküler mekanizmaları daha iyi anlamak için yeni bir model ortaya konulmasını ve bu alanda literatüre yeni katkıların sağlanmasını hedeflemiştir.

3. YÖNTEM

Tablo 3.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Katalog Numaraları

Kullanılan Kimyasal Ajan/Madde	Firma ve Katalog Numarası
Agaroz	Prona katalog numarası:094502PR
DMEM Besiyeri	Gibco katalog numarası:2436370
Tripsin/EDTA	Gibco katalog numarası:25200056
Blasticin	Gibco katalog numarası:R21001
Zeosin	Invitrogen katalog numarası:R25001
Genetisin	Gibco katalog numarası:10131035
Penisilin	Multicell katalog numarası:450201EL
L-Glutamin	Multicell katalog numarası:609065EL
Tetrasiklin İndirgenmiş FBS	Takara katalog numarası:631101
Tetrasiklin	Sıgma katalog numarası:T3258-25g
V5 Tag Antikoru	Invitrogen katalog numarası:R960-25
HA Tag Antikoru	Invitrogen katalog numarası:26183
Neon Transfeksiyon Kiti	Invitrogen katalog numarası:MPP100
Tripan Mavi Boyası	Sıgma katalog numarsı:T8154
Rapamasin	Bioshop katalog numarası:2C76369
Sekonder Anti-mouse:	BioRad katalog numarası:170-5047
Blotting Grade Blocker	BioRad katalog numarası:1706404
DAPI	SantaCruz katalog numarası:sc-3598
TritonX	BioRad katalog numarası:1610407
Formaldehit	Sigma katalog numarası:F-8775

Neutravidin-Texas Red	Thermo Scientific: A2665
PBS	Gibco katalog numarası:14190-094
Prestained Protein Ladder	Thermo katalog numarası:26616

Tablo 3.2 Kullanılan Çözeltiler ve İçeriği

KULLANILAN ÇÖZELTİLER	**İÇERİĞİ**
10X Yürüme Tamponu	25Mm Tris-HCI,192mM Glisin, %0.1 SDS
Fiksatif Solüsyonu	%40 Metanol, %10 Asetik asit,%50 Distile Su
Ponceau-S Boyası	1.5mM Ponceau S, 0.5ml Asetik Asit
10X TBS çözeltisi	25mM Tris-HCI, 150mM NaCI, pH 7.6: TBS-T Tamponu
Colloidal Commasie Mavisi Boya Solüsyonu	757mM Amonyum Sülfat,1.45mM Commassie blue,%20 Metanol,%10 Ortofosforik Asit
RIPA Tamponu	25mM TRris-HCI pH 7.6,150mM NaCI,%1NP-40,%1 Sodyum deoxycholate, %0.1 SDS
2D Rehidrasyon Tamponu	8M Üre,50mM DTT,%2 CHAPS, %0.2 Biolyte 3/10 Amfolit, %0.002 Bromofenol mavisi
6x Yürüme Tamponu	SDS indirgeyici tampon, 62.5mM Tris-HCL, pH 6.8, %20 Gliserol, %2 SDS, %5 βmerkaptoetanol
Transfer Tamponu	Tris, Glisin, %10 SDS , Metanol

Tablo 3.3 Deneylerde Kullanılan Antikorlar ve Uygulama

Deneylerde Kullanılan Antikorlar	**Uygulama**
V5 Tag Antikoru	IF: 1:100 WB:1.2000
HA Tag Antikoru	IF: 1:50 WB:1:1000
Sekonder Anti-mouse (FITC)	IF: 1:1000
Neutravidin-Texas Red	IF: 1:500
Anti-mouse -Texas Red	IF: 1:1000
TetR Monoklonal Antikor	WB: 1:1000

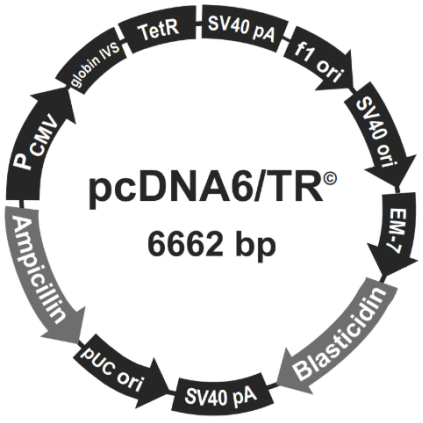
3.1. MDA-MB-231 Hücrelerinin Kültüre Edilmesi

MDA-MB-231 hücre hattı ATCC firmasından temin edilmiştir (https://www.atcc.org/products/htb-26). Laboratuvarımızda, firma tarafından önerilen koşullara uygun olarak çoğaltılmış ve gerekli saklama koşullarında saklanmıştır .

3.2. pcDNA6/TR Vektör Sistemi

3.2.1. pcDNA6/TR Vektörü

pcDNA6/TR vektörü, tetrasiklin kontrollü gen ekspresyon sistemlerinde kullanılan vektördür. Vektörde yer alan CMV (Cytomegalovirus) promoteri, TetR (tetrasiklin repressör) proteininin yüksek seviyede ve stabil şekilde ifadesini sağlar. TetR proteini, tetrasiklin veya türevleri (örn. doksisiklin) olmadığında TetO (tetrasiklin operatörü) dizilerine bağlanarak hedef genin ekspresyonunu baskılar. Ayrıca vektör, blasticidin direnç geni içerir ve bu özellik sayesinde transfekte edilen hücrelerin blasticin ile seçilmesini sağlar. pcDNA6/TR, tetrasiklin kontrollü sistemlerde (Tet-On veya Tet-Off) gen ekspresyonunu düzenlemek ve stabil hücre hatları oluşturmak için yaygın olarak kullanılır.

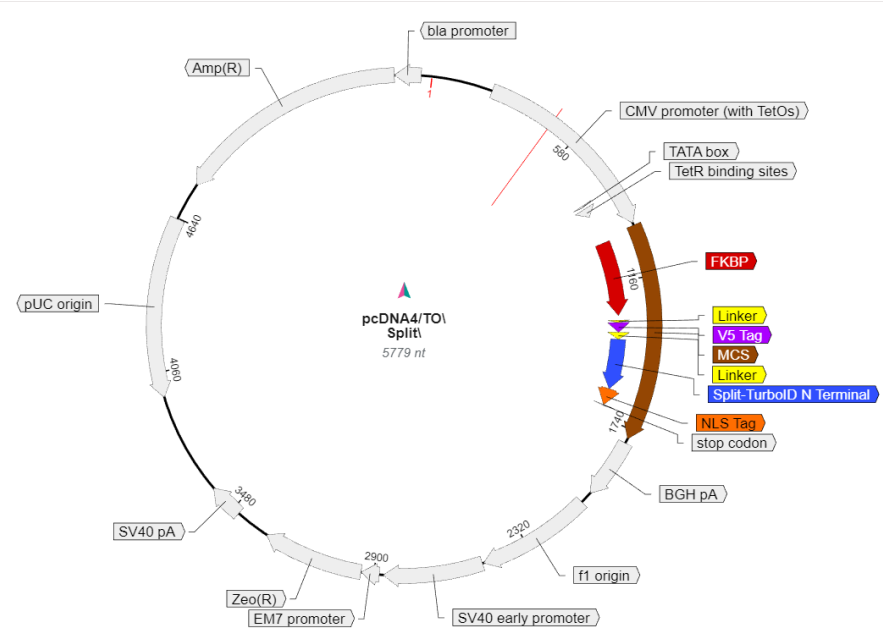


Şekil 3.1 pcDNA6/TR Vektörün Sanal Klonlaması

3.2.2. pcDNA4/TO-FKBP-V5-Split TurboID N Vektörü

Split-TurboID'nin N-terminal parçasının ekspresyonunu sağlamak üzere tasarlanan pcDNA4/TO-FKBP-V5-Split TurboID N vektörü, tetrasiklin-indüklenebilir gen ekspresyonunu mümkün kılan Tet-On sistemine dayanmaktadır. Bu sistem, tetrasiklin veya onun analoğu doksisiklinin varlığında Tet-On transaktivatörü (rtTA) tarafından Tetracycline Response Element (TRE) bölgesinden ayrılması yoluyla gen ekspresyonunu düzenler. TRE bölgesi, hedef genin sıkı ve kontrollü bir şekilde ekspresyonunu sağlarken, transkripsiyon

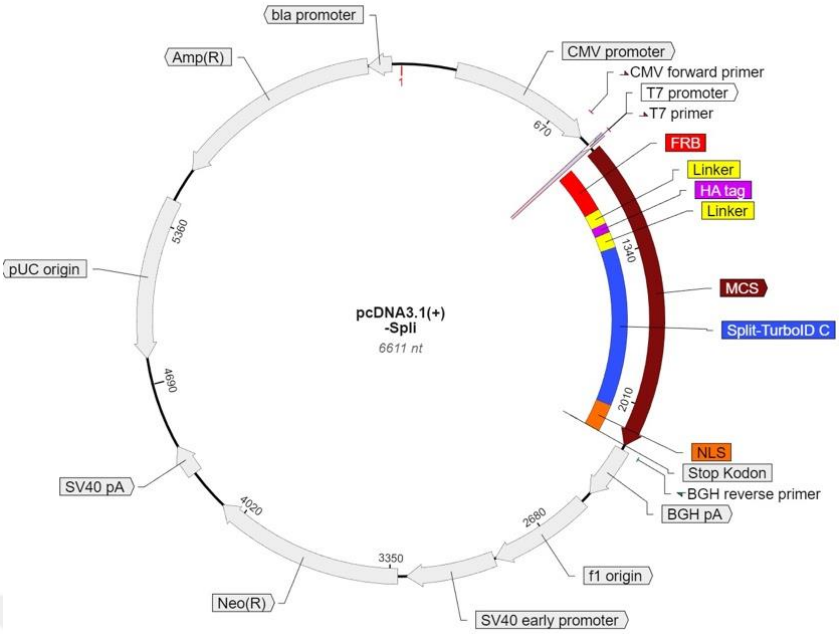
süreci bir CMV promotörü tarafından başlatılmaktadır (Şekil 3.2).Ayrıca, vektör, hücrelerin seçimi için 5 µg/mL Zeosin ile kullanılabilen bir zeosin direnç genini içermekte olup, bu özellik, yalnızca N-terminal parçasını başarılı bir şekilde ifade eden hücrelerin seçilmesine olanak tanır.



Şekil 3.2 pcDNA4/TO-FKBP-V5-Split TurboID N Terminal-NLS Rekombinant Vektörün Sanal Klonlaması

3.2.3. pcDNA3.1-HA-FRB-Split TurboID C-NLS Vektörü

Split-TurboID enziminin C-terminal parçasını ve nükleer lokalizasyon sinyalini (NLS) kodlayan bu vektör, pcDNA3.1 temelinde tasarlanmıştır. CMV promoteri tarafından kontrol edilen gen ekspresyonu, bu vektörde güçlü ve sürekli bir ifade sağlar. Vektör ayrıca, hücrelerin seçimi için genetisin direnci sağlayan bir gen içermektedir. Genetisin (400 µg/mL) kullanılarak C-terminal parçasını ifade eden hücreler seçilmiştir (Şekil 3.3)



Şekil 3.3 pcDNA3.1- HA-FRB-Split TurboID C-NLS Rekombinant Vektörün Sanal Klonlaması

3.3. Hücrelerin Çözülmesi

Hücrelerin çözülmesi için sıvı azot tankından çıkarılan vial, 37°C'lik su banyosunda hücreler %80 oranında çözülene kadar bekletilmiştir. Çözünme işlemi tamamlanmadan hemen önce steril koşullar altında hazırlanmış, tetrasiklin indirgenmiş FBS (%20 son konsantrasyonu olacak şekilde) ve yüksek glukoz (%4.5) içeren DMEM besiyeri ile süspanse edilmiştir. Hücre süspansiyonu daha sonra oda sıcaklığında 1500 xg hızında 10 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası üst sıvı dikkatlice uzaklaştırılmış ve oluşan hücre pelleti, %10 Tetrasiklin indirgenmiş FBS, 100 µg/ml Penisilin/Streptomisin, 2mM L-Glutamin ve 1 µg/ml Blasticin içeren DMEM besiyeri ile süspanse edilmiştir. Hazırlanan hücre süspansiyonu, 100mm'lik hücre kültür kaplarına aktarılmış ve 37°C'de, nemlendirilmiş %5 CO2 içeren inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır

3.4. Hücrelerin Pasajlanması

İnkübasyon sırasında kültür kaplarında büyüyen hücreler, yaklaşık %80 yoğunluğa ulaştıklarında, daha geniş bir alana geçmek üzere pasajlanmıştır. Bu işlemde, hücrelerden önce besiyeri uzaklaştırılmış ve ardından hücreler iki kez PBS solüsyonu ile yıkanmıştır. Yüzeye tutunan hücrelerin ayrılabilmesi için petri yüzeyine yaklaşık 1 ml Tripsin/EDTA (%0.05) çözeltisi eklenmiş ve hücreler 37°C'de 5 dakika boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda hücreler 10 ml PBS ile toplanmış ve steril bir 15ml falkon tüpe

aktarılmıştır. Hücre süspansiyonu, 1500 xg hızında oda sıcaklığında 10 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası üst sıvı atılmış, hücre pelleti taze hazırlanmış besiyeri ile süspanse edilerek yeni petri kültür kaplarına aktarılmıştır. Hücreler, 37°C'de nemlendirilmiş %5 CO2 ortamında inkübe edilmiştir

3.5. Hücrelerin Dondurulması

Uygun morfolojiye ve yoğunluğa sahip hücrelerin saklanması için %20 Tetrasiklin indirgenmiş FBS, %70 hücrelerin büyütüldüğü filtre edilmiş besiyeri ve %10 DMSO içeren bir dondurma besiyeri kullanılmıştır. Dondurma işlemi öncesinde hücreler iki kez PBS ile yıkanmıştır. Yüzeye tutunan hücrelerin ayrılması amacıyla %0,05 Tripsin-EDTA çözeltisi ile 37°C'de 5 dakika boyunca işlem yapılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda hücreler 10 ml PBS ile toplanarak steril 15ml falkon tüpe aktarılmış ve 1500 xg hızında oda sıcaklığında 10 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Üst sıvı uzaklaştırıldıktan sonra elde edilen hücre pelleti, hazırlanan dondurma besiyeri ile süspanse edilerek kriyotüplere aktarılmıştır. Etiketlenen kriyotüpler, kademeli bir donma süreci için Mr. Frosty dondurma kabına (Thermo scientific, ABD) yerleştirilmiş ve bir gece boyunca -80°C'de dondurulmuştur. Ertesi gün, uzun süreli saklama için kriyotüpler sıvı azot tankına transfer edilmiştir.

3.6. Hücre Sayımı

Hücre sayımı, Tripan mavi boyası kullanılarak Thoma sayım lamı ile gerçekleştirilmiştir. Canlı hücreler, yüksek moleküler ağırlığa sahip Tripan mavisini içlerine almadığından, boyayı içine alan hücreler ölü olarak kabul edilmiştir. Deneyde öncelikle hücreler besiyerinden uzaklaştırılmış ve üç kez PBS ile yıkanmıştır. Ardından, yüzeye tutunan hücrelerin ayrılması için yaklaşık 1 ml %0.05 Tripsin/EDTA çözeltisi petri yüzeyine homojenize edilerek eklenmiş ve hücreler 37°C'de 5 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda hücreler 10 ml PBS ile toplanarak steril bir Falkon tüpe aktarılmış ve 1500 xg'de oda sıcaklığında 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılmış ve hücreler 2 ml PBS ile çözülmüştür. Hücre süspansiyonundan 50 µl'lik bir kısım pipetle temiz bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılmış ve üzerine 250 µl Tripan mavi boyası eklenerek iyice süspanse edilmiştir. Karışımdan 10 µl alınarak Thoma sayım lamındaki sayım sahasına pipetlenmiş ve hücreler, Olympus CKX41 ters mikroskop kullanılarak görüntülenmiş, canlı hücrelerin sayımı gerçekleştirilmiştir.

3.7. MDA-MB-231 Hücre Hattında Ölüm Eğrisi Deneyi ve Blasticin ile Seçilim

Bu çalışmada, MDA-MB-231 hücre hattında blasticin antibiyotiği ile uygun konsantrasyonun belirlenmesi amacıyla ölüm eğrisi deneyi gerçekleştirilmiştir. Deneyin amacı, transfekte edilmeyen hücrelerin tamamen öldürülmesi için gerekli olan minimum blasticin konsantrasyonunu bulmak ve bu sayede transfekte edilmiş hücrelerin seçiliminde kullanılacak antibiyotik dozunu belirlemektir.

MDA-MB-231 hücreleri sıvı azottan çözülerek %10 FBS içeren DMEM ortamında birkaç pasaj boyunca çoğaltılmış, sağlıklı morfolojide ve logaritmik büyüme evresinde olacak şekilde 37°C ve %5 CO_2 koşullarında inkübe edilmiştir. Ölüm eğrisi deneyi için her bir kuyucuğa 40.000 hücre ekilerek 24 kuyucuklu bir plakaya hücre ekimi yapılmış ve hücrelerin yapışarak büyümesi için 24 saat inkübe edilmiştir. Blasticin antibiyotiğinin sırasıyla 0 µg/µl, 1 µg/µl, 3 µg/µl, 5 µg/µl, 7 µg/µl, 10 µg/µl ve 20 µg/µl konsantrasyonlarında seri dilüsyon yöntemiyle hazırlanmış medyumları kullanılmış, kontrol grubu için antibiyotik içermeyen ortam kullanılmıştır. Hücreler 37°C ve %5 CO_2 koşullarında inkübe edilerek düzenli olarak mikroskop altında takip edilmiş, 7 gün boyunca her gün izlenmiş ve bu süreçte medyum tazelemesi yapılmıştır.

3.8. MDA-MB-231 Hücre Hattında pcDNA6/TR Plazmidin Transfeksiyonu ve Stabil Hücre Hattının Oluşturulması

MDA-MB-231 hücre hattının pcDNA6/TR plazmidi ile transfeksiyonu, Neon Transfeksiyon sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İşlem sırasında, uygun yoğunluk ve morfolojiye sahip hücrelerden besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra hücreler üç kez PBS ile yıkanmış ve yüzeye tutunan hücrelerin kaldırılması için petri yüzeyine yaklaşık 1 ml %0.05 Tripsin/EDTA çözeltisi eklenerek hücreler 37°C'de 5 dakika süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından Tripsin/EDTA aktivitesi, tetrasiklin indirgenmiş FBS ile durdurulmuş ve hücreler sayılarak 1.0 x 10^6 hücre/ml yoğunluğa getirilip steril bir 15 ml Falkon tüpüne aktarılmıştır. Hücreler 1500 xg'de oda sıcaklığında 5 dakika santrifüj edildikten sonra üst sıvı uzaklaştırılmış ve elde edilen hücre pelleti iki kez PBS ile yıkanmıştır. Yıkama sonrası tekrar santrifüj edilen hücre pelleti, 100 µl Resuspansiyon Tampon R ile çözülmüş ve aynı anda Neon pipet istasyonundaki Neon tüpüne 3 ml Elektrolitik Tampon E2 eklenmiştir. Steril bir mikrosantrifüj tüpünde süspanse edilen hücrelerin üzerine uygun miktarda (30 ng) rekombinant plazmid DNA eklenmiş ve yavaşça pipetaj yapılarak karışım hazırlanmıştır. Bu karışım Neon tip pipete çekilmiş ve pipet

istasyonuna yerleştirilerek MDA-MB-231 hücreleri için optimize edilmiş bir sistemde, 1350 volt ve 15 milisaniyede kaydedilen protokol uygulanarak transfeksiyon gerçekleştirilmiştir. Transfekte edilen hücreler, önceden hazırlanmış, %10 tetrasiklin indirgenmiş FBS ve 2 mM L-Glutamin içeren antibiyotiksiz DMEM besiyeri ortamına aktarılmış ve hücreler 37°C'deki nemlendirilmiş %5 CO_2 inkübatöründe inkübe edilmiştir. Ertesi gün, besiyeri ortamına 100 µg/ml Penisilin/Streptomisin ve 1 µg/ml Blasticin antibiyotikleri eklenmiştir.

3.9. MDA-MB-231 TetR+ Hücre Hattına pcDNA4/TO-FKBP-V5-Split TurboID N - NLS Rekombinant Plazmitinin Transfeksiyonu ve Stabil Hücre Hattının Oluşturulması

pcDNA4/TO-FKBP-V5-Split TurboID N-NLS rekombinant plazmidi, laboratuvarımızda geliştirilmiş ve daha önce başka bir yüksek lisans tezi kapsamında kullanılmıştır (Ulusal Tez Merkezi, 847569 numaralı tez çalışması). Bu plazmid, TetR+ MDA-MB-231 hücre hattında nükleusa yönlendirilmiş Split-TurboID enziminin N-terminal bölgesinin ekspresyonunu sağlamak amacıyla kullanılmıştır. Transfeksiyon işlemi, Neon Transfeksiyon sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İlk olarak, TetR+ MDA-MB-231 hücreleri, tetrasiklinle indirgenmiş fetal inek serumu (FBS) içeren %10 DMEM ortamında uygun yoğunluğa ulaşana kadar kültür edilmiştir. Daha sonra hücreler tripsin ile kaldırılmış, PBS ile yıkanmış ve 1.0 x 10^6 hücre/ml yoğunluğunda resuspend edilerek Tampon R içerisinde süspanse edilmiştir. Hücre süspansiyonuna 30 µg plazmid eklenmiş ve Neon pipeti kullanılarak 1350 volt, 15 milisaniye parametrelerinde transfeksiyon gerçekleştirilmiştir. Transfekte edilen hücreler, uygun besiyeri ortamına aktarılmış ve 37°C, %5 CO_2 içeren inkübatöre yerleştirilmiştir.

TetR+ MDA-MB-231 hücrelerine pCDNA4/TO-FKBP-V5-Split TurboID N-NLS rekombinant plazmidi transfekte edildikten sonra, rekombinant plazmidi alan hücrelerin seçilmesi amacıyla kültür ortamına Zeosin (5 µg/µl) eklenmiştir. Hücreler, 37°C'de, %5 CO2 içeren nemli etüvde inkübe edilmiştir. Yaklaşık dört hafta süren seleksiyon sürecinin ardından, kültür kabının yüzeyinde gelişen hücre klonları, plastik silindirler kullanılarak 24 kuyucuklu kültür kaplarına aktarılmıştır. Hücreler burada çoğaltılmış ve sırasıyla 12 kuyucuklu ve 8 kuyucuklu kültür kaplarına alınmıştır. Daha sonra bu kaplarda büyüyen klonların protein ifadesi western blot deneyleri ile doğrulandıktan sonra pozitif koloni seçilerek bu koloni uygun şartlar altında kültür ortamına alınarak büyütülüp çoğaltılmıştır.

3.10. MDA-MB-231-TetR+ Split TurboID Hücre Hattında Kill Curve Deneyi ve Genetisin ile Seçilim

Split TurboID'nin N-terminal ucunu ifade eden MDA-MB-231-TetR+ _ pcDNA4/TO-FKBP-V5-Split TurboID-N –NLS hücre hattının aynı proteinin C-terminal ucunu da ifade edebilmesi için bu hücrelere C- ucunu eksprese eden plazmitin transfeksiyonu gerçekleştirilmiştir. Split TurboID'nin C-ucunu üzerinde taşıyan plazmit pcDNA3.1-HA-FRB-Split TurboID C NLS plazmiti olup laboratuarımızda yukarıda bahsi geçen tez kapsamında geliştirilmiştir. Bu plazmit konstraktında G418 direnç geni bulunmakta olup hücre seçilimi genetisin (G418) antibiyotiği ile gerçekleştirilmiştir. Bu nedenle seçilimin doğru bir şekilde gerçekleştirilebilmesi için uygun genetisin konsantrasyonunun belirlenmesi gerekmektedir. Bu amaçla aşağıda detayları verilen ölüm eğrisi deneyleri (kill curve) yapılmıştır.

Split TurboID'nin N-terminal domainini ifade eden MDA-MB-231-TetR+ hücreleri, sıvı azottan alınarak çözülmüş ve %10 FBS, P/S, glutamin, blasticin ve zeosin içeren DMEM besi ortamında 37°C ve %5 CO_2 koşullarında çoğaltılmış, en az iki pasaj yapılarak besi ortamına adaptasyonu sağlanmıştır. Ölüm eğrisi deneyi için her bir kuyucuğa yaklaşık 50.000 hücre ekilecek şekilde 12 kuyucuklu kültür kabına ekilen hücreler, yapışarak büyümeleri için 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Genetisin (G418) antibiyotiği için sırasıyla 0 µg/µl, 900 µg/µl, 450 µg/µl ve 225 µg/µl konsantrasyonlarında seri dilüsyon yöntemiyle hazırlanan kültür medyumları kullanılmış ve kontrol grubu olarak antibiyotik içermeyen ortam hazırlanmıştır. Hazırlanan genetisin solüsyonları her bir kuyucuğa eklenmiş, hücreler 37°C ve %5 CO_2 koşullarında inkübe edilmiş, her gün mikroskop altında gözlemlenmiş ve her 2-3 günde bir taze antibiyotik içeren ortamla medyum değiştirilmiştir. Deney, 7 gün boyunca sürdürülmüş ve bu süre zarfında hücrelerin hayatta kalma oranları genetisin konsantrasyonlarına bağlı olarak mikroskop altında izlenmiştir.

3.11. MDA-MB-231-TetR+ _ pcDNA4/TO-FKBP-V5-Split TurboID-N –NLS Hücre Hattına pCDNA3.1- HA-FRB-Split TurboID C -NLS Rekombinant Plazmitin Transfeksiyonu ve Stabil Hücre Hattının Oluşturulması

MDA-MB-231-TetR+-SplitTurboID-N hücrelerine Split-TurboID enziminin C ucunu ifade edebilmek için Neon Transfeksiyon Kiti ve üreticinin tavsiye ettiği protokol kullanılarak pcDNA3.1-HA-FRB-Split TurboID-C-NLS rekombinant plazmiti transfekte edilmiştir.

Transfekte edilen hücrelerin seçilimi için besiyerine, diğer bileşenlerin ve antibiyotiklerin yanı sıra Genetisin (400 µg/ml) antibiyotiği eklenmiştir. Hücreler, 37°C'de nemlendirilmiş %5 CO2 içeren etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Seçilim sürecinde, hücreler düzenli olarak PBS ile yıkanmış ve besiyeri değişimleri yapılmış, böylece ölü hücreler kültür ortamından uzaklaştırılmıştır. Yaklaşık 3 haftalık seçilim sürecinin sonunda, kültür kabı yüzeyinde oluşan hücre klonları plastik silindirler yardımıyla toplanmak istenmiş ancak oluşan koloni sayısının fazlalığı ve tek klon seçimine izin vermemesi nedeniyle, monoklonal stabil kolonlar elde edebilmek için Seri Dilüsyon Protokolü uygulanmıştır

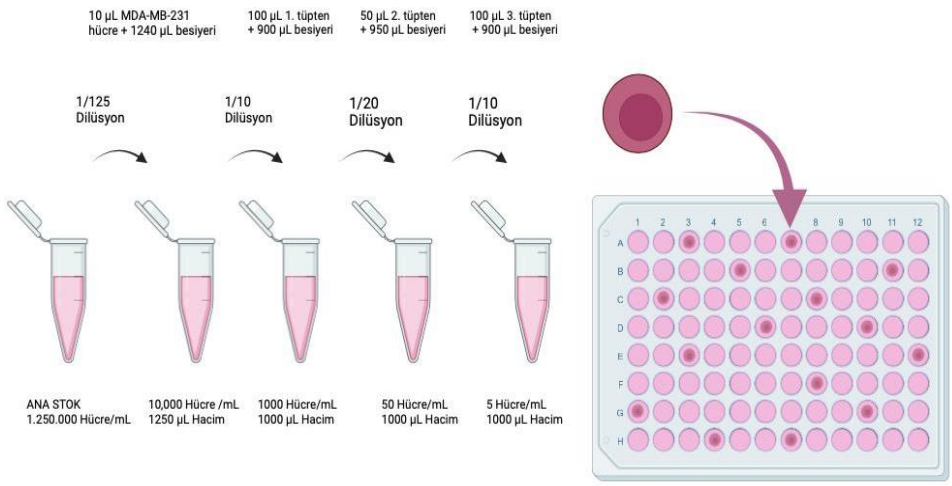
3.11.1. Seri Dilüsyon Yöntemi Kullanılarak N- ve C-Terminal Domainleri Eksprese Eden Monoklonal MDA-MB-231 Hücre Hattı Geliştirilmesi

MDA-MB-231 TetR+_ pcDNA4/TO-FKBP-V5-Split TurboID-N –NLS hücre Hattına pCDNA3.1- HA-FRB-Split TurboID C -NLS Rekombinant Plazmitin Transfeksiyonu yapıldıktan sonra hücre hattına tek koloni düşürmek için yapılan seri dilüsyon adımları hücre kültürü ortamındaki besiyeri, hücrelerin temizlenmesi amacıyla uzaklaştırıldıktan sonra hücreler üç kez PBS (Fosfat-Buffered Saline) solüsyonu ile yıkanmıştır. Hücrelerin yüzeyde tutunmasını engellemek için, yaklaşık 1 mL Tripsin/EDTA (%0.05) çözeltisi petri kaplarına homojen bir şekilde eklenmiş ve 37°C'de 4 dakika süreyle inkübe edilmiştir. Belirtilen sürenin sonunda, hücreler 10 mL PBS solüsyonu ile toplanarak steril Falcon tüpe aktarılmış ve 1500 xg'de 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında elde edilen üst sıvı atılmış ve hücre pelleti 2 mL PBS ile süspanse edilmiştir. Ardından, hücre sayımı için Tripan mavi boyası kullanılarak sayım gerçekleştirilmiştir. Başlangıçta MDA-MB-231 hücre hattının konsantrasyonu 1.250.000 hücre/mL olarak belirlenmiştir.

Hücre konsantrasyonunu seyreltmek amacıyla, belirli miktarlarda hücre süspansiyonu ve besiyeri kullanılarak seri dilüsyon işlemi gerçekleştirilmiştir. İlk olarak, 1. tüpe 10 µL hücre süspansiyonu eklenerek üzerine 1240 µL besiyeri eklenmiş ve bu işlem sonucunda 1/125 oranında bir dilüsyon elde edilmiştir. Bu tüpteki hücre sayısı 10.000 hücre/mL'ye düşürülmüştür. İkinci aşamada, 1. tüpten 100 µL alınarak üzerine 900 µL besiyeri eklenmiş ve 1/10 oranında bir dilüsyon yapılmıştır. Böylece bu aşamada hücre sayısı 1.000 hücre/mL'ye indirilmiştir. Üçüncü tüpte ise, ikinci tüpten 50 µL alınarak üzerine 950 µL besiyeri eklenmiş ve 1/20 oranında seyreltme gerçekleştirilmiştir; bu işlem sonucunda hücre sayısı 50 hücre/mL'ye düşmüştür. Son olarak, dördüncü tüpe üçüncü tüpten 100 µL alınıp üzerine 900 µL besiyeri eklenerek 1/10 oranında seyreltme yapılmış ve sonuçta 5

hücre/mL konsantrasyonuna ulaşılmıştır. Bu hesaplama sonucunda, 96 kuyulu plakanın bir kuyusuna yaklaşık 5 hücre yerleştirileceği öngörülmüştür (Şekil 3.4).Elde edilen bu dilüsyon, bir sonraki deneysel aşama için gerekli miktar ayrıldıktan sonra, kalan hücre süspansiyonu 96 kuyulu petri plakasına eklenmiş ve belirtilen koşullarda (37°C, %5 CO_2) inkübasyona alınmıştır.

Bu protokol ile her bir kuyucuğa tek bir hücre düşmesi sağlanmış ve klonlar önce 96 kuyucuklu kültür kaplarına, ardından büyüyen hücreler 24 kuyucuklu kültür kaplarına, sonrasında ise 5 cm'lik kültür kaplarına aktarılmıştır. Protein ifadesi doğrulanan kolonilerden, en yüksek protein ifadesine sahip olan koloni seçilerek bu koloniye MDA-MB-231-TetR+-Split-TurboID-N-C adı verilmiştir. Bu klon, Split-TurboID enziminin hem N hem de C uçlarını ifade edebilme kapasitesine sahiptir. Elde edilen koloni çoğaltılarak saklama işlemleri yapılmıştır.



Şekil 3.4 MDA-MB-231 TetR+_ pcDNA4/TO-FKBP-V5-Split TurboID-N –NLS hücre hattına pCDNA3.1- HA-FRB-Split TurboID C -NLS rekombinant plazmitin transfeksiyonu yapıldıktan sonra hücre hattına tek koloni düşürmek için yapılan seri dilüsyon adımları

3.12. Split-TurboID N- ve C- Uçlarının İfadesi

MDA-MB-231-TetR+-Split-TurboID-N-C hücre hattında Split-TurboID N-ucunun ekspresyonunu indüklemek için hücrelerin bulunduğu besi yerine final konsantrasyınu 1 µg/ml Tetrasiklin eklenmiş ve Tet-ON sistemi aktive edilmiştir. İndükleme işleminden sonra hücreler 24 saat boyunca %5 CO2 içeren 37°C'lik nemlendirilmiş etüvde inkübe edilmiştir. Split-TurboID C-ucu ise sürekli olarak eksprese edildiğinden, bu proteinin ifadesi için herhangi bir indüksiyon yapılmamıştır.

3.13. Protein Özütlerinin Hazırlanması ve Bradford Yöntemi ile Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Protein özütleri, aşağıda belirtilen adımlar izlenerek 2D Rehidrasyon Tamponu içerisinde hazırlanmış ve protein konsantrasyonları Bradford yöntemi ile ölçülmüştür. Öncelikle, hücrelerin bulunduğu besi yeri uzaklaştırıldıktan sonra hücreler üç kez PBS ile yıkanmış ve yüzeye tutunan hücrelerin ayrılması için 1 ml %0.05 Tripsin/EDTA çözeltisi petri yüzeyine homojen olarak eklenerek 37°C'de 4 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda hücreler 10 ml PBS ile toplanarak steril 15 ml Falkon tüpe alınmış ve 1500 xg 'de oda sıcaklığında 5 dakika santrifüj edilmiştir. Üst sıvı uzaklaştırıldıktan sonra, hücre pelleti 2D Rehidrasyon Tamponu ile süspanse edilmiş ve hücrelerin parçalanması için 0.2 mm paslanmaz çelik boncuklar kullanılarak Bullet Blender cihazı (NextAdvance, Troy, NY) ile parçalanmıştır. Elde edilen hücre süspansiyonu, boncuklardan kurtulmak ve protein özütünü elde etmek için 10,000 xg 'de, 4°C'de iki kez 10 dakika santrifüj edilmiş; süpernatant kısmı alınarak temiz bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır.

3.14. Bradford Yöntemi ile Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Elde edilen protein özütünün konsantrasyonu, Bradford yöntemi ile belirlenmiştir. Bu yöntem, proteindeki amino asitler, özellikle arjinin ile etkileşime girerek renk değişikliği oluşturur. Bu renk değişikliği, spektofotometrik cihazda 595 nm dalga boyunda ölçülerek protein konsantrasyonunun hesaplanmasını sağlar. Protein konsantrasyonları, sığır serum albümini (BSA) çözeltisinin farklı konsantrasyonlarına göre oluşturulan standart eğri üzerinden hesaplanmıştır.

Bradford Assay boyası (BioRad), 1:5 oranında seyreltilip filtre kağıdından geçirilerek kullanılmıştır. Protein örnekleri 1:20 oranında 2D Rehidrasyon Tamponu ile seyreltilmiş ve üzerine 980 µl Bradford boyası eklenmiştir. Kör solüsyon olarak, protein içermeyen tampon-boya karışımı kullanılmıştır. Örneklerin absorbansı 595 nm'de Nanodrop cihazı ile 3 kez ölçülmüş ve elde edilen değerler, BSA standart eğrisi kullanılarak protein konsantrasyonları belirlenmiştir.

3.15. SDS-PAGE Poliakrilamid Jel Elektroforezi

SDS-PAGE jellerinin hazırlanması için kullanılan cam plakalar, %70'lik etil alkol ile temizlenerek kasetlere yerleştirilmiştir. Belirtilen solüsyonlar ve miktarlara göre %12'lik ayırıcı jel ve %4'lük istifleme jeli hazırlanmıştır.

Hazırlanan %12'lik ayırıcı jel, pipet yardımıyla cam plakalar arasındaki 1 mm'lik boşluktan dikkatlice dökülmüştür. Jel yüzeyinin düzgün bir şekilde polimerleşmesi için üzerine yaklaşık 100 µl izopropanol eklenmiş ve jelin tamamen polimerleşmesi beklenmiştir. Polimerleşme tamamlandıktan sonra izopropanol su ile yıkanarak uzaklaştırılmıştır. Ardından %4'lük istifleme jeli dökülmüş ve 1.0 mm'lik kuyucuklu tarak yerleştirilmiştir, böylece jel polimerleşirken kuyucuklar oluşmuştur.

Tablo 3.4 SDS-PAGE jellerinin hazırlanmasında kullanılan çözelti ve kimyasallar ve kullanılan miktarlar.

%12'lik Ayırıcı Jel Solüsyonu İçeriği ve Miktarları	
1.5M Tris-HCL(pH 8.8)	2.5 ml
%10 SDS	100 µl
Distile Su	3.3 ml
%30 Akrilamid-Bis akrilamid	4ml
%10 APS	100µl
TEMED	5 µl
%4'lük İstifleme Jel Solüsyonu İçeriği ve Miktarları	
%30 Akrilamid-Bis akrilamid	670 µl
0.5M Tris-HCL(pH 6.8)	1.25 ml
Distile Su	3ml
%10 SDS	50 µl
%10 APS	50 µl
TEMED	5 µl

Hazırlanan jel, elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Protein örneklerinden 20 µg alınıp, 6X protein yükleme tamponu ile mikrosantrifüj tüpünde karıştırılmış ve 95°C'de 5 dakika inkübe edilerek proteinlerin denatüre edilmesi sağlanmıştır. Jelin ilk kuyucuğuna, eğer amaç moleküler ağırlık belirlemek veya protein kalitesini değerlendirmekse, renksiz (Thermo Fisher) marker protein standartları; Western Blot analizi yapılacaksa, önceden renklendirilmiş marker (Thermo Fisher) protein standartları yüklenmiştir. Analiz edilmesi planlanan protein örnekleri uygun sırayla kuyucuklara yüklenmiştir. Ardından, elektroforez tankı 1X Yürütme tamponu ile doldurulmuş ve sistem 180 Volt'ta çalıştırılarak jel 50 dakika boyunca yürütülmüştür. Süre bitiminde, SDS-PAGE jelinin görüntüsünü almak için jel cam plakalar arasından dikkatlice çıkarılmış ve en az 1 saat fiksatif solüsyonda çalkalayıcı üzerinde fikse edilmiştir. Fiksasyonun ardından, jel, Colloidal Coomassie Mavisi boya

çözeltisinde gece boyunca çalkalayıcı üzerinde bekletilmiştir. Protein bantlarının tamamı görüntülendiğinde, fazla boya distile su ile arındırılmıştır. Jelin görüntüsü VersaDoc 4000 MP görüntüleme cihazı ile alınmış ve kaydedilmiştir

3.16. Western Blotlama

Split-TurboID N- ve C- fragmentleri MDA-MB-231-TetR+-Split-TurboID-N-C hücre hattında ifade edildiğini doğrulamak için Western Blot analizleri gerçekleştirilmiştir. N- fragmentinin ifadesi V5 antikoru kullanılarak, C-fragmentinin ifadesi ise HA antikoru kullanılarak gösterilmiştir. Deneyde kullanılan filtre kağıtları, nitroselüloz membran ve jel transfer tamponu ile ıslatılmış, transfer kasetine sırasıyla filtre kağıdı, membran, jel ve tekrar filtre kağıdı yerleştirilip hava kabarcıkları giderilerek cihazda 25 voltta 30 dakika transfer gerçekleştirilmiştir; transferin doğruluğu Ponceau S boyası ile kontrol edilmiştir. Membran, %5 süt tozu içeren TBS-T tamponunda 1 saat bloklanmış, ardından 3 kez 10 dakika TBS-T ile yıkanmış ve birincil antikor (1:5000 dilüsyonda) içinde hazırlanarak gece boyunca 4°C'de inkübe edilmiştir. Gece boyu inkübasyonun ardından membran tekrar 3 kez 10 dakika TBS-T tamponunda yıkanmış, uygun dilüsyondaki ikincil antikorla 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiş ve bu işlem sonrası da 3 kez 10 dakika yıkanmıştır. Protein bantlarının görüntülenmesi için membran, BioRad ECL solüsyonu ile muamele edilerek X-ray filminde görüntü alınmıştır.

3.17. İmmünfloresan Mikroskopi Yöntemi ile Split-TurboID N- ve C- uçlarının MDA-MB-231-TetR+-Split-TurboID-N-C Hücre Hattında Lokalizasyonlarının Doğrulanması

Split-TurboID N- ve C- uçlarının MDA-MB-231-TetR+-Split-TurboID-N-C hücre hattında ifadeleri ve lokalizasyonlarının doğrulanması için Western Blotlama deneylerine ek olarak immünfloresan deneyleri gerçekleştirilmiştir. N- ucunun çekirdekteki ifadesi ve lokalizasyonu için V5 etiketine karşı, C- ucunun ise çekirdekteki ifadesi ve lokalizasyonu için HA etiketine karşı geliştirilmiş monoklonal antikorlar kullanılmıştır.

3.17.1. İmmünfloresan Deneyi Protokolü

Hücrelerin büyüme sırasında yerleştirildiği petri kabındaki coverslipler steril cımbızla alınarak 3 kez PBS solüsyonu ile yıkanmıştır. Hücrelerin coverslip üzerine fiksasyonu için %4 Formaldehit ile 20 dakika inkübe edilmiş, ardından 3 kez 5 dakika süreyle PBS ile yıkanarak fiksatifin sonlandırılması amacıyla hücreler 50 mM Amonyum Klorid ile 5 dakika muamele edilmiştir. Bu işlemi takiben hücreler 3 kez 5 dakika süreyle

PBS ile tekrar yıkanmış, permeabilizasyon için %0.5 Triton X-100 uygulanarak 2 dakika inkübe edilmiştir. Permeabilizasyon sonrası hücreler 3 kez 5 dakika süreyle PBS ile yıkanarak primer antikor uygulamasına geçilmiştir. Hedef proteinlerin lokalizasyonunu belirlemek amacıyla Anti-V5 etiket antikoru 1:100, Anti-HA etiket antikoru ise 1:50 dilüsyonda uygulanmış ve 1 saat inkübasyon sonrası hücreler 3 kez 5 dakika PBS ile yıkanmıştır. İkincil antikor olarak Anti-Mouse Texas Red 1:500 dilüsyonda kullanılmış ve 45 dakika karanlıkta inkübe edilmiştir; ardından hücreler 3 kez 5 dakika PBS ile yıkanmıştır. Çekirdeklerin görüntülenmesi için DAPI boyası (1:10000) kullanılarak 10 dakika karanlıkta inkübe edilen hücreler, PBS ve ultrasaf su ile temizlenmiş ve Prolong Diamond Antifade Mountant solüsyonu kullanılarak lam ve coverslip arasında kapatılmıştır. Hazırlanan hücrelerin görüntüleri Olympus CKX41 tersine mikroskop kullanılarak alınmıştır.

3.18. *İn vitro* Biyotinilasyon ve Split TurboID Aktivitesinin Gösterilmesi

MDA-MB-231-TetR+-Split-TurboID-N-C hücre hattında çekirdek proteinlerinin biyotinilasyonunu gerçekleştirmek amacıyla aşağıdaki biyotinilasyon reaksiyonları kurulmuştur.

Tablo 3.5 Biyotinilasyon Reaksiyon Besiyerine Eklenen Komponentler

GRUPLAR	**Besiyerine Eklenen Komponentler**
Biyotinilasyon grubu	• Tetrasiklin (0.1mg/ml) • Biyotin (0.5 mM) ve MgCl2 (5 mM) ve ATP (3 mM) • Rapamisin (100µM)
Negatif kontrol	• Biyotin (0.5 mM) ve MgCl2 (5 mM) ATP (3mM) Rapamasin(100µM)

Bu çalışmada, biyotinilasyon reaksiyonu deney ve negatif kontrol grupları için farklı bileşenler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Negatif kontrol grubunda biyotin (0.5 mM), ATP (3 mM) ve rapamisin (100 µM) eklenirken, biyotinilasyon grubuna biyotin (0.5 mM), $MgCl_2$ (5 mM), ATP (3 mM), rapamisin (100 µM) ve Tetrasiklin (0.1 mg/mL) eklenmiştir. Her iki grupta biyotinilasyon öncesi N Split Turboıd ekspresyonunun sağlanması için 24 saat önceden tetrasiklin ile indüklenmiştir. Hücreler 37°C ve %5 CO_2 koşullar altında etüvde bekletilmiştir . Bu sürenin sonunda ortamdaki besiyeri çekilerek ortam PBS ile yıkanmıştır. Sonrasında Tablo (3.5) da belirten koşullardaki besiyerleri ile 2 saat inkübasyona

bırakılmıştır. Bu süre boyunca biyotinilasyonun gerçekleşmesi beklenmiştir. 2 saat biyotinilasyon süresü sonrası hücreler üç kez PBS ile yıkanmış, ardından %0.05'lik Tripsin/EDTA çözeltisi kullanılarak yüzeyden ayrılmış ve PBS ile nötralize edilmiştir. Elde edilen hücre süspansiyonu steril 15 mL Falkon tüplere toplanmış ve 1500 xg 'de oda sıcaklığında 5 dakika santrifüj edilerek hücre pelletleri izole edilmiştir. Bu yöntem, biyotinilasyon reaksiyonunun etkinliğini değerlendirmek ve deney grubu ile negatif kontrol grubu arasındaki farklılıkları analiz etmek amacıyla uygulanmıştır.

3.19. Protein Özütlerinin Hazırlanması

Reaksiyon sonrası elde edilen hücre pelletleri, 300 µL RIPA tamponu ile süspanse edilmiştir. Hücre süspansiyonları, safe-lock mikrosantrifüj tüplerine aktarılmış (Eppendorf, ABD) ve üzerine 0.2 mm paslanmaz çelik boncuklar eklenerek Bullet Blender cihazı (NextAdvance, Troy, NY) ile parçalanmıştır. Boncukların uzaklaştırılması ve protein özütlerinin elde edilmesi için, lizatlar 10.000 xg hızda, 4°C'de 2 kez 10 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatant, temiz tüplere aktarılmıştır. Protein özütünün konsantrasyonu Bradford yöntemi ile ölçülmüş ve protein kalitesi SDS-PAGE analizi ile kontrol edilmiştir.

3.20. İmmünfloresan Mikroskopi ile Biyotinli Proteinlerin Çekirdekte Lokalize Olduğunun Gösterilmesi

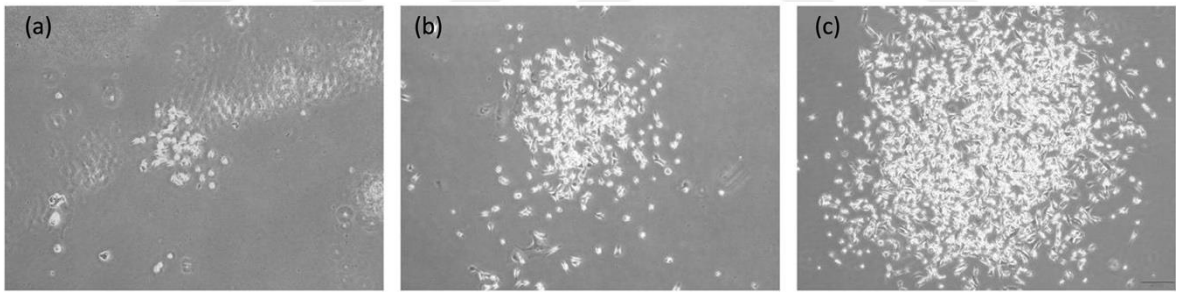
Split-TurboID tarafından MDA-MB-231-TetR+-Split-TurboID-N-C hücrelerinde biyotinilenen proteinlerin çekirdekte lokalize olduklarını göstermek amacıyla biyotinilasyon grubu ve negatif kontrol hücrelerinde aşağıdaki immünfloresan mikroskopi deneyleri gerçekleştirilmiştir. Coversliplerin hazırlanması ve hücre fiksasyonu için steril cımbızla petri kabı yüzeyine yerleştirilen coverslipler, 3 kez PBS ile yıkandıktan sonra %4 formaldehit ile 20 dakika inkübe edilmiştir. Bu işlemden sonra hücreler, 3 kez 5 dakika süreyle PBS ile yıkanmıştır. Fiksatifin etkisini sonlandırmak amacıyla hücreler 50 mM Amonyum Klorid ile 5 dakika inkübe edilip, ardından yine 3 kez 5 dakika süreyle PBS ile yıkanmıştır. Permeabilizasyon aşamasında, %0.5 Triton X-100 ile 2 dakika işlem yapılmış ve sonrasında 3 kez 5 dakika PBS ile yıkama yapılmıştır. Biyotinli proteinlerin lokalizasyonunu görmek için 1:1000 oranında dilüe edilmiş Neutravidin ile 1 saat inkübe edilip, 3 kez 5 dakika PBS ile yıkama yapılmıştır. Çekirdeklerin görüntülenebilmesi için DAPI (1:10.000) ile 10 dakika karanlıkta inkübe edilmiştir. Son olarak, coverslipler PBS ile yıkanmış, ultra saf su ile temizlenmiş ve Prolong Diamond Antifade Mountant solüsyonu ile lam ve coverslip

arasında kapatılmıştır. Hücrelerin görüntülemesi Olympus CKX41 ters mikroskopu ile yapılmıştır.

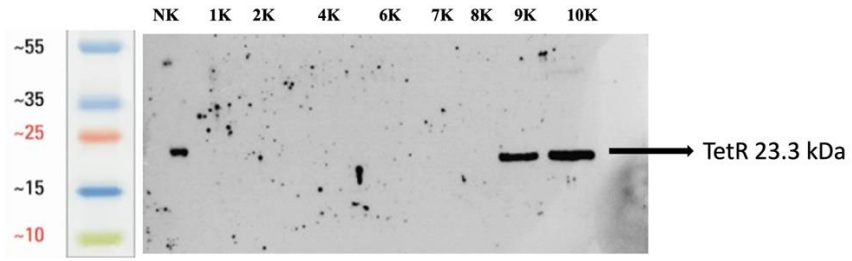
4. BULGULAR

4.1. MDA-MB-231-TetR+ Hücre Hattının Oluşturulması

Bu çalışmada, MDA-MB-231 hücre hattı sıvı azot ortamından çıkarılarak çözülmüş ve birkaç pasaj boyunca ilerletilmiştir. Morfolojik olarak iyi durumda olduğu gözlemlenen hücreler, Tripan mavisi ile boyanıp Thoma lamı ile sayılarak, transfeksiyon için yeterli hücre sayısına ulaşıldığı tespit edilmiştir (Şekil 4.1). Transfeksiyon işlemi hazırlanan pcDNA6/TR plazmiti, Neon Transfeksiyon sistemi ile MDA-MB-231 hücrelerine aktarılmıştır. Blasticin (50 µg/µl) kullanılarak, daha önce yapılmış olan ölüm eğrisi deney sonuçlarına göre uygun antibiyotik konsantrasyonu belirlenmiş ve MDA-MB-231 hücre hattında TetR+ pozitif koloni seçimi yapılmıştır. Western blotlama tekniği kullanılarak TetR monoklonal antikor ile gerçekleştirilen analiz sonucunda 9 ve 10 numaralı kolonilerde pozitiflik tespit edilmiştir. Onuncu koloni doğrulanmış ve çalışma bu hücre hattı ile devam ettirilmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.1 MDA-MB-231-TetR+ stabil hücre hattı oluşurken hücrenin a. 3. Günde meydana gelen kolonileşme ; b. 10. Gün kolonileşme; c. 17. Günde inverted mikroskop ile alınan görüntüler. Koloni oluşum süreci takip edilmektedir.



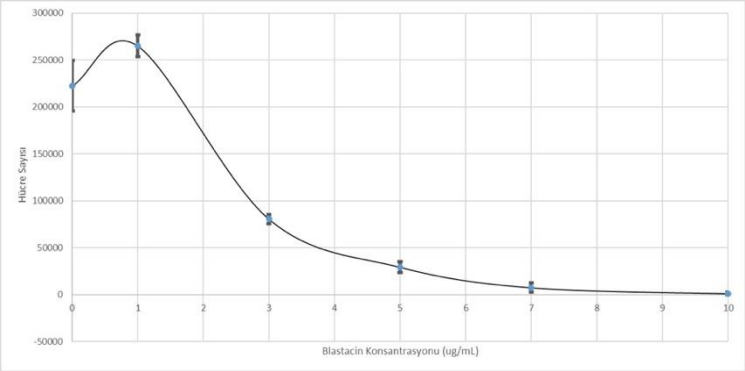
Şekil 4.2 MDA-MB-23-TetR+ Transfeksiyon ve Seçilim Sonrası Oluşan Kolonilerin Western Blot yöntemi Kullanılarak Jel Sıralaması: Protein marker, Negatif Kontrol, 1-Koloni, 2- Koloni 4-koloni, 6-koloni,7-koloni, 8-Koloni, 9-koloni, 10-koloni Taranması.

4.2. Blasticin ile Seçilim

MDA-MB-231 hücre hattına pcDNA6/TR plazmiti transfekte edildikten sonra, plazmiti almayan hücrelerin tamamen ortadan kaldırılması için 50 µg/mL blasticin içeren kültür ortamı kullanılmıştır. Transfeksiyon sonrası hücreler 48 saat boyunca toparlanması için inkübe edildikten sonra, blasticin uygulamasına başlanmıştır. Seçilim süreci boyunca, her 2-3 günde bir hücrelerin medyumu taze blasticin içeren besi yeri ile değiştirilmiştir. Seçilim sonucunda, sadece plazmidi başarıyla almış olan ve blasticin direncine sahip hücreler hayatta kalmış, geri kalan hücreler ise tamamen ölmüştür.

Blasticin konsantrasyonuna bağlı olarak hücrelerin hayatta kalma oranları ve morfolojik değişiklikleri gözlemlenmiştir. Deney süresi boyunca, düşük blasticin konsantrasyonlarında (3 µg/µl ve 5 µg/µl) hücrelerin bir kısmı hayatta kalırken, daha yüksek konsantrasyonlarda (7 µg/µl ve üzeri) hücre ölümlerinin belirgin şekilde arttığı görülmüştür. 20 µg/µl ve üzeri blasticin konsantrasyonlarında ise hücrelerin tamamının öldüğü tespit edilmiştir.

Deney sonuçlarına göre, MDA-MB-231 hücre hattı için optimum blasticin konsantrasyonu 1 µg/µl olarak belirlenmiştir. Bu konsantrasyonda, hücrelerin tamamının öldüğü gözlemlenmiştir. Bu nedenle, hücre transfeksiyonları sonrası yapılacak seçilim işlemlerinde 1 µg/µl blasticin kullanılması uygun bulunmuştur (Şekil 4.3).

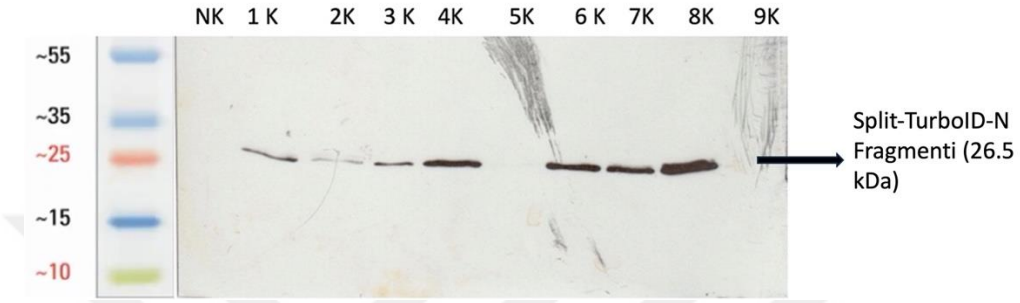


Şekil 4.3 MDA-MB-231-TetR+ Hücre Hattının Ölüm Eğrisi Deneyi Sonucunda Blasticin Antibiyotik Dozunun Belirlenmesi

4.3. MDA-MB-231-TetR+ Hücre Hattının Transfeksiyonu ve İndüksiyonu

Oluşturulan MDA-MB-231 TetR+ hücre hattının büyümesi gözlemlendikten sonra, pcDNA4/TO-FKBP-V5-Split TurboID N-NLS rekombinant plazmiti, Neon Transfeksiyon sistemi aracılığıyla bu hücre hattına transfekte edilmiştir. Zeosin (50 µg/µl)

kullanılarak seçilimi yapılan hücreler arasından tek koloni seçimi yapılarak stabil hücre hatları elde edilmiştir. Büyütülen koloniler, tetrasiklin ile indüklenmiş ve indüksiyondan 24 saat sonra protein ekstraktları elde edilmiştir. Eşit konsantrasyonlardaki örnekler, anti-V5 etiket antikoru kullanılarak Western blotlama ile analiz edilmiştir. Bu analizler sonucunda seçilen kolonilerin tamamında Split TurboID-N füzyon proteininin (26.5 kDa) indüksiyon sonrası ifadesi doğrulanmıştır. Doğrulanan koloniler arasından Koloni 4 ile çalışmaya devam edilmesine karar verilmiştir (Şekil 4.4).

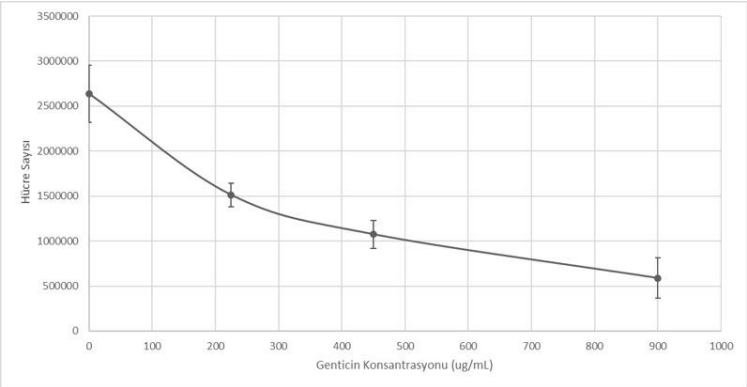


Şekil 4.4 MDA-MB-231-TetR+Split-TurboID-N Hücre Hattının Western Blot Analizi Jel Sıralaması: Protein marker, Negatif Kontrol, 1-Koloni, 2- Koloni, 3-Koloni, 4-Koloni, 5-Koloni, 6-Koloni, 7-Koloni, 8-Koloni, 9-Koloni tetrasiklin ile indüklenmiştir .Pozitif Koloni Doğrulanması Sağlanmıştır.

4.4. Genetisin ile Seçilim

MDA-MB-231-TetR+ Split TurboID hücre hattına pcDNA3.1-HA-FRB-Split TurboID C-NLS plazmiti transfekte edildikten sonra, transfekte edilmeyen hücrelerin eliminasyonu için 900 µg/µl konsantrasyonunda genetisin uygulanmıştır. Transfeksiyondan 48 saat sonra hücreler, 900 µg/µl genetisin içeren medyumda kültüre alınmış ve her 2-3 günde bir taze genetisin içeren medyumla değiştirilmiştir. Seçilim süreci yaklaşık 7-10 gün boyunca devam etmiş ve sadece plazmiti başarıyla almış olan genetisin dirençli hücreler hayatta kalmıştır.

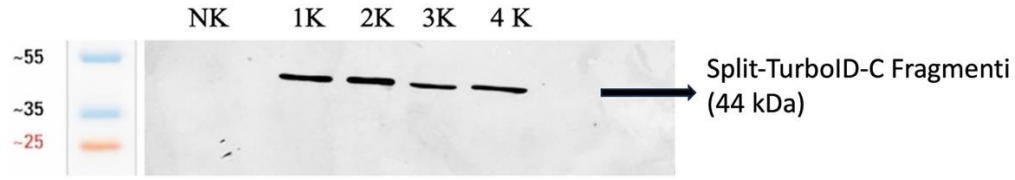
Bu deney sonucunda, MDA-MB-231-TetR+ Split TurboID hücre hattı için 900 µg/µl genetisin konsantrasyonu, transfekte edilmemiş hücrelerin tamamen ortadan kaldırılmasında etkili bulunmuştur (Şekil 4.5).



Şekil 4.5 MDA-MB-231-TetR+N Split TurboID Hücre Hattına pcDNA3.1-HA-FRB-Split TurboID-C-NLS Transfeksiyonu Sonucunda Geniticin ile Ölüm Eğrisi Protokolü Uygulanarak Antibiyotik Doğru Doz Miktarı Belirleme

Bu hücreler çoğaltılmış ve uygun koşullarda saklanmıştır. Koloni 4 hücrelerine, Neon Transfeksiyon sistemi ile pcDNA3.1-HA-FRB-Split TurboID C-NLS plazmiti transfekte edilmiş ve hücreler Genetisin (400 µg/ml) kullanılarak seçilime tabi tutulmuştur. Genetisin seçilim yapılabilmesi için önce MDA-MB-231-TetR+Split-TurboID-N Split hücre hattına seçilim yapılabilmesi için uygun doz miktarı için ölüm eğrisi (kill curve) deneyi yapılmış ve uygun doz miktarı belirlenmiştir. Seçilim sonrası elde edilen hücreler seri dilüsyon yöntemiyle tek koloni olarak izole edilerek stabil hücre hatları oluşturulmuştur.

Bu hücre hatlarında, tetrasiklin kontrolünde ifade edilen Split TurboID-N-NLS ve sürekli olarak ifade edilen Split TurboID C-NLS füzyon proteinlerinin varlığını doğrulamak amacıyla Western blotlama analizleri yapılmıştır. İlk olarak, tetrasiklin ile indüklenen hücrelerden elde edilen protein ekstraktları %12'lik SDS-PAGE jelinde yürütülerek protein profilleri analiz edilmiştir.

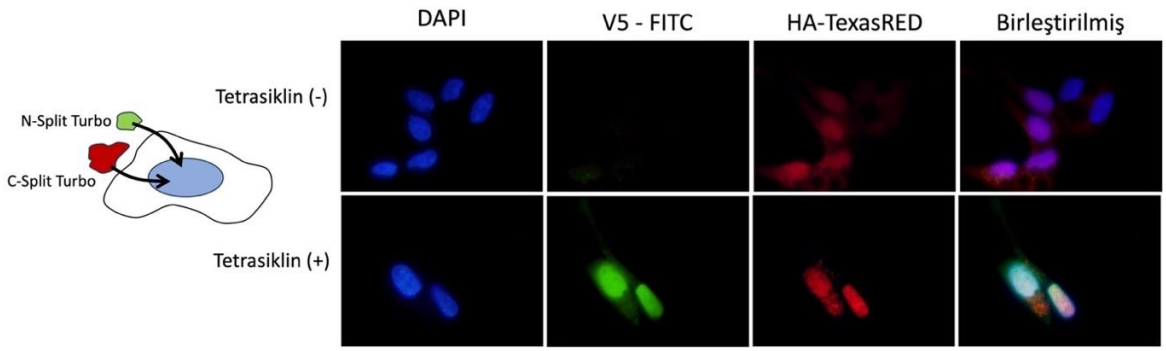


Şekil 4.6 MDA-MB-231-TetR+ Split TurboID - pcDNA3.1-HA-FRB-Split TurboID C-NLS protein ifadelerinin Western Blot görüntüsü. Jel Sıralaması: Protein marker, Negatif Kontrol, 1-koloni , 2-Koloni ,3-koloni,4-koloni Pozitif Koloni Doğrulanması

4.5. Split Turbo-ID Çekirdek Lokalizasyonu

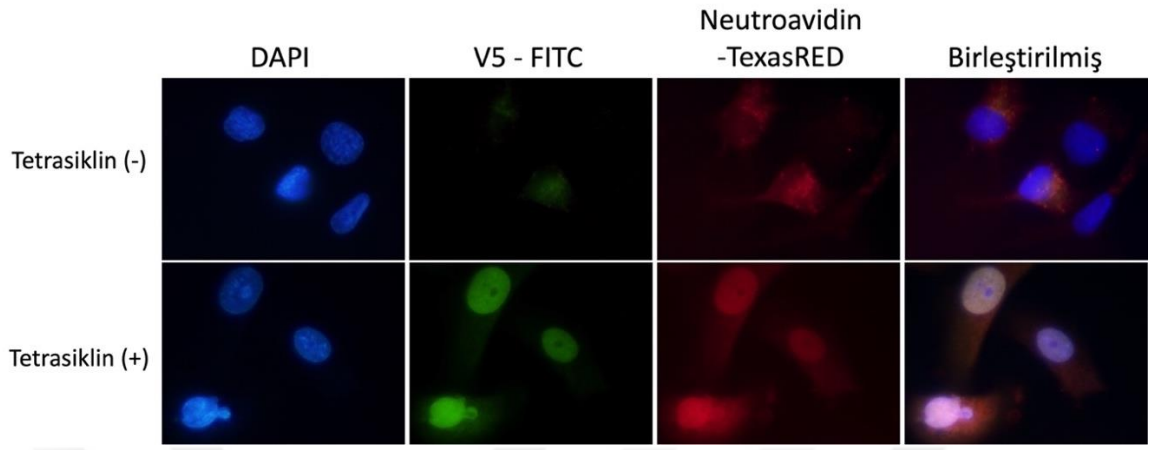
MDA-MB-231 TetR+ hücre hattında N- ve C- split TurboID proteinlerinin çekirdek lokalizasyonunu göstermek amacıyla immün floresan mikroskopi yöntemi kullanılmıştır. Hücreler öncelikle uygun kültür ortamında büyütülmüş ve %70-80 hücre yoğunluğuna ulaşıldığında deneysel işlemler metot kısmında belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir. V5 ve HA etiketlerine özgü birincil antikorlar kullanılarak, N- ve C- terminal Split TurboID parçalarının tanınması sağlanmış ve ardından TexasRed ve FITC floresanla etiketlenmiş sekonder antikorlar ile proteinler görüntülenmiştir (Şekil 4.7). Çekirdek yapısını belirlemek için hücrelerin çekirdekleri DAPI boyası ile boyanmış ve bu boya floresan mikroskobunda mavi renkte gözlemlenmiştir. Floresan mikroskop görüntülemeleri sonucunda, N- ve C- Split TurboID proteinlerinin belirgin şekilde çekirdekte lokalize olduğu tespit edilmiştir. Bu bulgular, söz konusu proteinlerin çekirdek içi biyolojik süreçlerde yer aldığını göstermekte ve bu proteinlerin işlevlerini çekirdek içinde yerine getirdiğine dair önemli kanıtlar sunmaktadır. Ayrıca, bu gözlemler, hücre içi lokalizasyonun, özellikle nükleer proteinlerin hücresel mekanizmalardaki rolünü anlamada kritik bir adım olduğunu ortaya koymuştur

Biyotinilasyon aktivitesinin değerlendirilmesi amacıyla, MDA-MB-231 TetR+ N-C Split TurboID stabil hücre hattında tetrasiklin varlığı (+) ve yokluğunda (-) biyotinilasyon süreçleri incelenmiştir. Tetrasiklin yokluğunda biyotinilasyon aktivitesine rastlanmazken, tetrasiklin varlığında V5-FITC (yeşil) ve NeutrAvidin-TexasRED (kırmızı) sinyalleri çekirdekte örtüşmektedir. Bu bulgular, biyotinilasyonun çekirdek bölgesine özgü olarak gerçekleştiğini ve bu süreçte Split TurboID sisteminin etkin bir şekilde çalıştığını doğrulamaktadır (Şekil 4.8).



Şekil 4.7 MDA-MB-231-TetR+-N-C-Split-TurboID stabil hücre hattında, Split TurboID sisteminin çekirdek lokalizasyonu tetrasiklin Varlığı (+) ve Yokluğu (-) koşullarında değerlendirilmesi. Tetrasiklin yokluğunda V5-FITC (N-terminal) ve HA-TexasRED (C-terminal) sinyalleri gözlenmezken, tetrasiklin varlığında her iki sinyalin çekirdekte lokalize olduğu ve örtüştüğü görülmektedir. Bu bulgular, Split

TurboID sisteminin Tetrasiklin-indüklenebilir bir şekilde aktive olarak çekirdeğe yönlendirildiğini ve çekirdek spesifik biyotinilasyon için etkin bir araç olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.8 MDA-MB-231 TetR+ N-C Split TurboID stabil hücre hattında biyotinilasyon aktivitesinin belirlenmesi tetrasiklin varlığı (+) ve yokluğunda (-) incelenmiştir. Tetrasiklin yokluğunda biyotinilasyon aktivitesi gözlenmezken, tetrasiklin varlığında V5-FITC (yeşil) ve NeutrAvidin-TexasRED (kırmızı) sinyalleri çekirdekte örtüşmektedir, biyotinilasyon aktivitesi çekirdeğe özgün olarak gerçekleştiği doğrulanmıştır.

5. TARTIŞMA

Tez çalışmamızda, nükleer proteomik araştırmalarında sıkça kullanılan geleneksel yöntemlerin sınırlamalarını aşmak amacıyla Split TurboID biyotin ligaz sistemine dayalı yenilikçi bir metodoloji denenerek yeni hücre hattı oluşturulmuştur. Literatürde yaygın olarak uygulanan çekirdek izolasyonu temelli teknikler, nükleer proteinlerin saflaştırılmasında değerli sonuçlar sağlamakla birlikte, bir dizi önemli sınırlamaya sahiptir (Cho, Branon, Rajeev, ve ark., 2020a). Bu yöntemler, çekirdek membranının fiziksel olarak parçalanmasını gerektirdiğinden, hücre içi bütünlüğü bozmakta ve bazı protein-protein etkileşimlerinin kaybına neden olmaktadır. Buna ek olarak, izolasyon sırasında oluşabilecek kontaminasyon, nükleer proteom analizlerinin doğruluğunu ve güvenilirliğini düşürmektedir (Stewart ve ark., 2018) .

Bu çalışmada, geleneksel izolasyon yöntemlerinin aksine in vivo ortamda hücre çekirdeğine özgü proteinlerin hedeflenmesi ve biyotinilasyon yoluyla zenginleştirilmesi sağlanmıştır (Chattopadhaya ve ark., 2006) . Bu süreçte, hücre içi homeostazı bozmayan ve toksik etkisi bulunmayan TurboID biyotin ligaz enziminin parçalı versiyonu olan Split TurboID kullanılmıştır. TurboID, hızlı katalitik aktivitesi ve düşük sıcaklıklarda bile çalışabilme özelliği ile literatürde biyotin ligaz tabanlı yöntemler arasında öne çıkan bir enzimdir (Cho, Branon, Rajeev, ve ark., 2020b) . Split versiyonunda, enzim iki ayrı parçaya bölünerek hedef proteinlerin biyotinilasyonu üzerinde daha kontrollü bir sistem oluşturulmuştur. Çalışmamızda bu iki parça, MDA-MB-231 TetR+ hücre hattında ifade edilmiştir; N-terminal tetrasiklin kontrollü olarak indüklenirken, C-terminal parça sürekli olarak ifade edilmektedir (Zhao ve ark., 2021) .

Split-TurboID sisteminde biyotinilasyon reaksiyonunun zamansal olarak tetiklenebilmesi, çalışmamızda önemli bir avantaj sağlamıştır. Bu mekanizmanın temelinde, Rapamisin'in aracılık ettiği FKBP (FK506 Binding Protein) ve FRB (FKBP Rapamycin-Binding Domain) proteinlerinin etkileşimi yer almaktadır (Guo ve ark., 2023) . Rapamisin, bu iki proteini yüksek afinite ile birbirine bağlayan bir küçük molekül olarak görev yapmaktadır. Split-TurboID sisteminin tasarımı gereği, biyotin ligaz enzimi iki ayrı inaktif parçaya (N-terminal ve C-terminal) bölünmüş durumdadır. Bu parçalar ayrı ayrı ifade edildiğinde biyolojik olarak inaktif kalmakta ve biyotinilasyon reaksiyonu başlamamaktadır. Ancak, Rapamisin'in eklenmesiyle FKBP ve FRB etkileşimi tetiklenir ve iki parçanın

mekansal olarak bir araya gelerek aktif bir biyotin ligaz enzimi oluşturması sağlanır (Yang ve ark., 2021) . Deneysel olarak, hücre hattının oluşturulmasının ardından yapılan Western Blot analizleriyle biyotinilasyon profilleri incelenmiştir. Pozitif çıkan koloniler üzerinden yapılan analizler, Split TurboID sisteminin çalıştığını ve biyotinilasyonun başarıyla gerçekleştiğini göstermektedir. Daha ileri analizlerde immunofloresan (IF) deneyleri gerçekleştirilmiş, biyotinilasyon reaksiyonunun lokalizasyonu belirlenmiştir. IF görüntülemelerinde biyotinilasyonun özellikle çekirdek bölgesinde yoğunlaştığı gözlemlenmiştir. Bu bulgu, Split TurboID sisteminin çekirdeğe özgü proteinleri yüksek doğrulukla hedefleyebildiğini ve biyotinilasyon sürecinin başarıyla yürütüldüğünü kanıtlamaktadır. Bu aynı zamanda, sistemin nükleer proteinlerin yerleşim ve lokalizasyon analizlerinde etkin bir şekilde kullanılabileceğini de göstermektedir (Kerbler ve ark., 2021) .

Bu metodolojinin geleneksel yöntemlere kıyasla sağladığı en önemli avantajlardan biri, çekirdek izolasyonuna gerek kalmaksızın hedef proteinlerin analiz edilebilmesidir. Geleneksel çekirdek izolasyonu yöntemleri zaman alıcı, maliyetli ve teknik açıdan karmaşıktır. Ayrıca, mekanik veya kimyasal izolasyon sırasında çekirdek proteinlerinin yapısal bütünlüğü bozulabilir ve hedef proteinlerin kaybı söz konusu olabilir (Andersen ve ark., 2005) . Çalışmamızda geliştirilen Split TurboID yöntemi sayesinde bu sınırlamaların üstesinden gelinmiştir. Hücre içerisinde çekirdek lokalizasyonunda biyotinilasyon gerçekleştirilmesi, nükleer proteom analizlerinde hem doğruluğu arttırmakta hem de deneysel süreçlerin hızlanmasına olanak tanımaktadır.

Bununla birlikte, bu yöntemin hücre içi toksisite oluşturmaması önemli bir avantajdır. Örneğin, peroksidaz temelli yakınlık etiketleme yöntemlerinde kullanılan H_2O_2 gibi reaktiflerin hücre üzerinde toksik etkisi bulunmaktadır (Roux ve ark., 2012). TurboID ve Split TurboID sistemlerinde ise biyotin ve ATP gibi doğal metabolitler kullanıldığı için hücresel toksisite oluşmamaktadır. Bu durum, Split TurboID sistemini canlı hücrelerde uzun süreli deneyler için ideal hale getirmektedir. Ayrıca, biyotinilasyon reaksiyonunun kısa sürede tamamlanabilmesi, dinamik protein-protein etkileşimlerinin zamansal çözünürlükle analiz edilmesini mümkün kılmaktadır (Branon ve ark., 2018).

Çalışmamızda kullanılan MDA-MB-231 TetR+ hücre hattı, bu yöntemin kanser hücre hatları gibi kompleks hücresel ortamlarda da etkin bir şekilde uygulanabileceğini göstermektedir. MDA-MB-231 hücreleri, özellikle üçlü negatif meme kanseri modellemesinde sıkça kullanılan bir hücre hattı olup, nükleer proteinlerin dinamik analizleri açısından önemli bir model sistem sunmaktadır. Bu bağlamda, Split TurboID

yöntemi, kanser araştırmalarında nükleer proteinlerin işlevsel analizine yönelik yeni bir araç olarak değerlendirilebilir (Qin ve ark., 2021).

Çalışmamızda Split TurboID sisteminin nükleer proteom analizlerinde geleneksel yöntemlere güçlü bir alternatif sunduğu gösterilmiştir. Bu yöntemin en önemli avantajlarından biri, hücre içi bütünlüğü bozmadan proteinlerin biyotinilasyonunu gerçekleştirmesidir. Geleneksel çekirdek izolasyonu yöntemleri, zaman alıcı olmalarının yanı sıra protein-protein etkileşimlerinin kaybolmasına neden olabilirken, Split-TurboID yöntemi bu sınırlamayı aşmaktadır (Sunna ve ark., 2022).

Ayrıca, biyotinilasyon reaksiyonunun zamansal olarak tetiklenebilir olması, dinamik protein etkileşimlerinin incelenmesinde önemli bir avantaj sunmaktadır. Bununla birlikte, Split-TurboID yönteminin bazı sınırlamaları da bulunmaktadır. Örneğin, biyotinilasyonun özgüllüğü, enzimin aktivasyon mekanizmasının etkinliği ile doğrudan ilişkilidir ve bu süreç farklı hücre hatlarında optimize edilmelidir (Samavarchi-Tehrani ve ark., 2020) . Çalışmamızda elde edilen sonuçlar, yöntemin başarılı bir şekilde çalıştığını göstermektedir; ancak nükleer proteinlerin fonksiyonel analizlerinin gerçekleştirilmesi, yöntemin daha ileri uygulamaları için önemlidir.

Gelecekte Split-TurboID sisteminin farklı kanser hücre hatlarında ve model organizmalarda uygulanarak, nükleer proteomun daha kapsamlı analizleri yapılabilir. Özellikle dinamik ve geçici protein-protein etkileşimlerinin incelenmesinde Split-TurboID sistemi, önemli bir araç olarak kullanılabilir. Ayrıca, yöntemin LC-MS/MS gibi ileri proteomik analizlerle desteklenmesi, biyotinilasyon profillerinin daha detaylı bir şekilde incelenmesini sağlayacaktır.

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Bu tez çalışması ile nükleer proteom analizlerinde kullanılabilecek özgün ve yüksek verimlilik sağladığı bulunan yeni bir yöntem kullanılarak yeni bir model hücre hattı oluşturulması hedeflenmiştir. burada yapılmak istenen çalışmada hücre yeni yöntemin kullanılarak oluşturulan çekirdeğe hedeflenmiş hücre hattının oluşmasını sağlamaktır.

Bu doğrultuda kullanılan Split TurboID biyotin ligaz enzimi ile gerçekleştirilen biyotinilasyon reaksiyonu ile nükleer proteinlerin etiketlenmesi (IF) immün floresan görüntülerinin alınması ile çekirdeğe hedeflenmesinin gösterilmesi daha önceden geliştirilmiş bu yöntem ile İlk olarak, farklı hücre hatlarına kolayca uyarlanabilir olması sayesinde geniş bir uygulama alanı sunmaktadır. Ayrıca, çok sayıda nükleer proteinin tanımlanmasına imkan tanıyarak, proteom analizlerinin yüksek verimlilikle gerçekleştirilmesine olanak sağlar. Bu sayede, nükleer proteinlerin kapsamlı bir şekilde zenginleştirilmesi ve analiz edilmesi mümkün olur.

Bu yaklaşım, organel proteomik çalışmalarında yeni bir çığır açarak diğer organel proteom çalışmalarına da kolayca adapte edilebilir. Yöntemin, hücre metabolizmasında bilinen bir bozulmaya yol açmaması ve toksik etkilerden arınmış olması, uygulama kolaylığını ve güvenilirliğini artırmaktadır. Bu özellikler, yöntemin sadece nükleer proteom çalışmalarında değil, aynı zamanda diğer organel proteom çalışmalarında da rahatlıkla kullanılabileceğini göstermektedir. Geniş kapsamlı nükleer protein tanımlama kapasitesiyle, hücrenin mikro çevresini daha derinlemesine incelemeyi ve hücresel işleyişi daha iyi anlamayı mümkün kılmaktadır. Ayrıca, karşılaştırmalı nükleer proteom analizlerinde kullanılarak, farklı hücre hatlarının işleyişi hakkında daha kapsamlı ve anlamlı yorumlar yapılabilmesine olanak tanımaktadır

7. KAYNAKLAR

Abboah-Offei, M., Bayuo, J., Salifu, Y., Afolabi, O. & Akudjedu, T. N. (2024). Experiences and perceptions of men following breast cancer diagnosis: a mixed method systematic review. *BMC Cancer*, *24*(1), 179. https://doi.org/10.1186/s12885-024-11911-9

Andersen, J. S., Lam, Y. W., Leung, A. K. L., Ong, S.-E., Lyon, C. E., Lamond, A. I. & Mann, M. (2005). Nucleolar proteome dynamics. *Nature*, *433*(7021), 77–83. https://doi.org/10.1038/nature03207

Anderson, D. H. (2021). *Biological Mechanisms and the Advancing Approaches to Overcoming Cancer Drug Resistance*. 1–22. https://doi.org/10.1016/b978-0-12-821310-0.00010-3

Ayımıgu, A., Sarıhan, M., Kasap, M. & Akpınar, G. (2020). Investigation of the Involvement of Parkin in Parkinson's Disease and Cancer by Monitoring the Changes in SH-SY5Y Cells at the Nuclear Proteome Level. *Anticancer Research*, *40*(6), 3169–3190. https://doi.org/10.21873/anticanres.14299

Bertoli, G., Cava, C. & Castiglioni, I. (2015). MicroRNAs: New Biomarkers for Diagnosis, Prognosis, Therapy Prediction and Therapeutic Tools for Breast Cancer. *Theranostics*, *5*(10), 1122–1143. https://doi.org/10.7150/thno.11543

Branon, T. C., Bosch, J. A., Sanchez, A. D., Udeshi, N. D., Svinkina, T., Carr, S. A., Feldman, J. L., Perrimon, N. & Ting, A. Y. (2018). Efficient proximity labeling in living cells and organisms with TurboID. *Nature Biotechnology*, *36*(9), 880–887. https://doi.org/10.1038/nbt.4201

Cailleau, R., Olivé, M. & Cruciger, Q. V. J. (1978). Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: Preliminary characterization. *In Vitro*, *14*(11), 911–915. https://doi.org/10.1007/bf02616120

Chattopadhaya, S., Tan, L. P. & Yao, S. Q. (2006). Strategies for site-specific protein biotinylation using in vitro, in vivo and cell-free systems: toward functional protein arrays. *Nature Protocols*, *1*(5), 2386–2398. https://doi.org/10.1038/nprot.2006.338

Chavez, K. J., Garimella, S. V. & Lipkowitz, S. (2011). Triple negative breast cancer cell lines: One tool in the search for better treatment of triple negative breast cancer. *Breast Disease*, *32*(1–2), 35–48. https://doi.org/10.3233/bd-2010-0307

Cho, K. F., Branon, T. C., Rajeev, S., Svinkina, T., Udeshi, N. D., Thoudam, T., Kwak, C., Rhee, H.-W., Lee, I.-K., Carr, S. A. & Ting, A. Y. (2020a). Split-TurboID enables contact-dependent proximity labeling in cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *117*(22), 12143–12154. https://doi.org/10.1073/pnas.1919528117

Cho, K. F., Branon, T. C., Rajeev, S., Svinkina, T., Udeshi, N. D., Thoudam, T., Kwak, C., Rhee, H.-W., Lee, I.-K., Carr, S. A. & Ting, A. Y. (2020b). Split-TurboID enables contact-dependent proximity labeling in cells. *BioRxiv*, 2020.03.11.988022. https://doi.org/10.1101/2020.03.11.988022

Cho, K. F., Branon, T. C., Udeshi, N. D., Myers, S. A., Carr, S. A. & Ting, A. Y. (2020). Proximity labeling in mammalian cells with TurboID and split-TurboID. *Nature Protocols*, *15*(12), 3971–3999. https://doi.org/10.1038/s41596-020-0399-0

Conte, L., Lupo, R., Lezzi, A., Mieli, M., Botti, S., Rubbi, I., Carvello, M., Giotta, F., Massafra, R., Vitale, E. & Nunzio, G. D. (2024). Knowledge and Misinformation About Breast Cancer Risk Factors, Symptoms, and Prevention Among Healthy and Affected Women: A Study on 2375 Italian Participants. *Healthcare*, *12*(21), 2126. https://doi.org/10.3390/healthcare12212126

Conti, A. & Alessio, M. (2015). Chapter Five Comparative Proteomics for the Evaluation of Protein Expression and Modifications in Neurodegenerative Diseases. *International Review of Neurobiology*, *121*, 117–152. https://doi.org/10.1016/bs.irn.2015.05.004

Cronan, J. E. (2005). Targeted and proximity-dependent promiscuous protein biotinylation by a mutant Escherichia coli biotin protein ligase. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *16*(7), 416–418. https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2005.03.017

Cui, Y., Koop, E. A., Diest, P. J. van, Kandel, R. A. & Rohan, T. E. (2007). Nuclear morphometric features in benign breast tissue and risk of subsequent breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, *104*(1), 103–107. https://doi.org/10.1007/s10549-006-9396-4

Guo, J., Guo, S., Lu, S., Gong, J., Wang, L., Ding, L., Chen, Q. & Liu, W. (2023). The development of proximity labeling technology and its applications in mammals, plants, and microorganisms. *Cell Communication and Signaling*, *21*(1), 269. https://doi.org/10.1186/s12964-023-01310-1

Hayes, A. J., Satiaputra, J., Sternicki, L. M., Paparella, A. S., Feng, Z., Lee, K. J., Blanco-Rodriguez, B., Tieu, W., Eijkelkamp, B. A., Shearwin, K. E., Pukala, T. L., Abell, A. D., Booker, G. W. & Polyak, S. W. (2020). Advanced Resistance Studies Identify Two Discrete Mechanisms in Staphylococcus aureus to Overcome Antibacterial Compounds that Target Biotin Protein Ligase. *Antibiotics*, *9*(4), 165. https://doi.org/10.3390/antibiotics9040165

Jantre, S. & Mainkar, P. M. (2022). *Smart Intelligent Computing and Applications, Volume 2, Proceedings of Fifth International Conference on Smart Computing and Informatics (SCI 2021)*. 355–368. https://doi.org/10.1007/978-981-16-9705-0_36

Karachaliou, C.-E. & Livaniou, E. (2024). Biotin Homeostasis and Human Disorders: Recent Findings and Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*, *25*(12), 6578. https://doi.org/10.3390/ijms25126578

Kerbler, S. M., Natale, R., Fernie, A. R. & Zhang, Y. (2021). From Affinity to Proximity Techniques to Investigate Protein Complexes in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(13), 7101. https://doi.org/10.3390/ijms22137101

Kim, D. I., KC, B., Zhu, W., Motamedchaboki, K., Doye, V. & Roux, K. J. (2014). Probing nuclear pore complex architecture with proximity-dependent biotinylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(24), E2453–E2461. https://doi.org/10.1073/pnas.1406459111

Kothapalli, N., Camporeale, G., Kueh, A., Chew, Y. C., Oommen, A. M., Griffin, J. B. & Zempleni, J. (2005). Biological functions of biotinylated histones. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *16*(7), 446–448. https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2005.03.025

Lammerding, J. (2013). Comprehensive Physiology. *Comprehensive Physiology*, *1*(2), 783–807. https://doi.org/10.1002/cphy.c100038

Lévy, S. (1988). Combination therapy for cardiac arrhythmias. *The American Journal of Cardiology*, *61*(2), A95–A100. https://doi.org/10.1016/0002-9149(88)90749-7

Liu, Y. & Zheng, Z. (2024). Understanding the global cancer statistics 2022: growing cancer burden. *Science China Life Sciences*, *67*(10), 2274–2276. https://doi.org/10.1007/s11427-024-2657-y

Lukasiewicz, S., Czeczelewski, M., Forma, A., Baj, J., Sitarz, R. & Stanisławek, A. (2021). Breast Cancer—Epidemiology, Risk Factors, Classification, Prognostic Markers, and Current Treatment Strategies—An Updated Review. *Cancers*, *13*(17), 4287. https://doi.org/10.3390/cancers13174287

Miziak, P., Baran, M., Błaszczak, E., Przybyszewska-Podstawka, A., Kałafut, J., Smok-Kalwat, J., Dmoszyńska-Graniczka, M., Kiełbus, M. & Stepulak, A. (2023). Estrogen Receptor Signaling in Breast Cancer. *Cancers*, *15*(19), 4689. https://doi.org/10.3390/cancers15194689

Nanninga, N. (2014). *Reference Module in Biomedical Sciences*. *Microbiology1492003*. https://doi.org/10.1016/b978-0-12-801238-3.02309-6

Narula, K., Datta, A., Chakraborty, N. & Chakraborty, S. (2013). Comparative analyses of nuclear proteome: extending its function. *Frontiers in Plant Science*, *4*, 100. https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00100

Özenver, N., Erkmen, Y., Boyalı, F., & Demirezer, Ö. (2024). Cytotoxicity screening and antioxidant capacity assessment of the inner perianth segments of 14 *Rumex* species grown in Türkiye. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi, 48*(2), 5–5. https://doi.org/10.33483/jfpau.1391998

Ozkan, M. (2019). *Breast Disease, Management and Therapies, Volume 2*. 705–727. https://doi.org/10.1007/978-3-030-16792-9_46

Patel, D. P., Swink, S. M. & Castelo-Soccio, L. (2017). A Review of the Use of Biotin for Hair Loss. *Skin Appendage Disorders*, *3*(3), 166–169. https://doi.org/10.1159/000462981

Qin, W., Cho, K. F., Cavanagh, P. E. & Ting, A. Y. (2021). Deciphering molecular interactions by proximity labeling. *Nature Methods*, *18*(2), 133–143. https://doi.org/10.1038/s41592-020-01010-5

Renz, M. (2020). In invasion assays, the breast cancer cell nucleus leads the way. *BMC Research Notes*, *13*(1), 480. https://doi.org/10.1186/s13104-020-05314-9

Roux, K. J., Kim, D. I., Raida, M. & Burke, B. (2012). A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells. *Journal of Cell Biology*, *196*(6), 801–810. https://doi.org/10.1083/jcb.201112098

Russnes, H. G., Lingjærde, O. C., Børresen-Dale, A.-L. & Caldas, C. (2017). Breast Cancer Molecular Stratification From Intrinsic Subtypes to Integrative Clusters. *The American Journal of Pathology*, *187*(10), 2152–2162. https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2017.04.022

Sakurai-Yageta, M. & Suzuki, Y. (2024). Molecular Mechanisms of Biotin in Modulating Inflammatory Diseases. *Nutrients*, *16*(15), 2444. https://doi.org/10.3390/nu16152444

Samavarchi-Tehrani, P., Samson, R. & Gingras, A.-C. (2020). Proximity Dependent Biotinylation: Key Enzymes and Adaptation to Proteomics Approaches*. *Molecular & Cellular Proteomics*, *19*(5), 757–773. https://doi.org/10.1074/mcp.r120.001941

Sears, R. M., May, D. G. & Roux, K. J. (2019). Enzyme-Mediated Ligation Methods. *Methods in Molecular Biology*, *2012*, 299–313. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9546-2_15

Sharma, G. N., Dave, R., Sanadya, J., Sharma, P. & Sharma, K. K. (2010). Various types and management of breast cancer: an overview. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, *1*(2), 109–126.

Stewart, M. P., Langer, R. & Jensen, K. F. (2018). Intracellular Delivery by Membrane Disruption: Mechanisms, Strategies, and Concepts. *Chemical Reviews*, *118*(16), 7409–7531. https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00678

Sunna, S., Bowen, C., Zeng, H., Rayaprolu, S., Kumar, P., Bagchi, P., Guo, Q., Duong, D. M., Bitarafan, S., Natu, A., Wood, L., Seyfried, N. T. & Rangaraju, S. (2022). Cellular proteomic profiling using proximity labelling by TurboID-NES in microglial and neuronal cell lines. *BioRxiv*, 2022.09.27.509765. https://doi.org/10.1101/2022.09.27.509765

Thill, M., Zahn, M., Welt, A., Nusch, A., Zaiss, M., Engelken, K., Kaltenecker, G., Ringwald, K., Gratzke, K., Dille, S., Kruggel, L., Jänicke, M., Schulz, H., Hagen, V., Fricker, R., Stickeler, E., Harbeck, N., Wöckel, A. & Decker, T. (2024). Head-to-head comparison of palbociclib and ribociclib in first-line treatment of HR-positive/HER2-

negative metastatic breast cancer with real-world data from the OPAL registry. *International Journal of Cancer*. https://doi.org/10.1002/ijc.35296

Yang, X., Wen, Z., Zhang, D., Li, Z., Li, D., Nagalakshmi, U., Dinesh-Kumar, S. P. & Zhang, Y. (2021). Proximity labeling: an emerging tool for probing in planta molecular interactions. *Plant Communications*, *2*(2), 100137. https://doi.org/10.1016/j.xplc.2020.100137

Yoneten, K. K., Kasap, M., Akpinar, G., Gunes, A., Gurel, B., & Utkan, N. Z. (2019). Comparative proteome analysis of breast cancer tissues highlights the importance of glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 and monoacylglycerol lipase in breast cancer metabolism. *Cancer Genomics & Proteomics*, *16*(5), 377-397. https://doi.org/10.21873/cgp.20143

Zhao, X., Bitsch, S., Kubitz, L., Schmitt, K., Deweid, L., Roehrig, A., Barazzone, E. C., Valerius, O., Kolmar, H. & Béthune, J. (2021). ultraID: a compact and efficient enzyme for proximity-dependent biotinylation in living cells. *BioRxiv*, 2021.06.16.448656. https://doi.org/10.1101/2021.06.16.448656

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı:	EBRU DURUR
Doğum Yeri ve Tarihi	
E-posta	
Eğitim Bilgileri	
Yabancı Dil Bilgileri	
Bildiriler	