

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BÖLÜNMÜŞ-TURBOID BİYOTİNİLASYON ENZİM TEKNOLOJİSİ
KULLANARAK ÇEKİRDEK PROTEİNLERİNİN SEÇİCİ
BİYOTİNİLASYONU İÇİN FÜZYON PROTEİNLERİN NÜKLEUSA
YÖNLENDİRİLMESİ VE DOĞRULANMASI**

Fatma Zehra ÖZEN

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

KOCAELİ

2023

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BÖLÜNMÜŞ-TURBOID BİYOTİNİLASYON ENZİM TEKNOLOJİSİ
KULLANARAK ÇEKİRDEK PROTEİNLERİNİN SEÇİCİ
BİYOTİNİLASYONU İÇİN FÜZYON PROTEİNLERİN NÜKLEUSA
YÖNLENDİRİLMESİ VE DOĞRULANMASI**

Fatma Zehra ÖZEN

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

Danışman: Prof. Dr. Murat KASAP

Bu Çalışma Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (Proje ID:3046)
Tarafından Desteklenmiştir

KOCAELİ

2023

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Tez Adı:Bölünmüş-TurboID Biotinilasyon Enzim Teknolojisi Kullanarak Çekirdek Proteinlerinin Seçici Biotinilasyonu İçin Füzyon Proteinlerin Nükleusa Yönlendirilmesi ve Doğrulanması

Tez Yazarı: Fatma Zehra ÖZEN

Tez Savunma Tarihi: 19.06.2023

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
DANIŞMAN (ÜYE)		
ÜYE		
ÜYE		

Onay

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

Bölünmüş-TurboID Biotinilasyon Enzim Teknolojisi Kullanarak Çekirdek Proteinlerinin Seçici Biotinilasyonu İçin Füzyon Proteinlerin Nükleusa Yönlendirilmesi ve Doğrulanması

Çekirdek hücrenin merkezinde bulunan, genetik bilgiyi saklayan, koruyan, kullanan ve bu yolla birçok hücresel olayı yöneten bir organeldir. Hücre içerisinde uç birleştirme, transkripsiyon, replikasyon ve DNA onarımı gibi birçok fizyolojik olayın gerçekleştiği oldukça önemli bir organeldir. Hücre içi organellerde bulunan proteinler, organellerin hücre içi görevlerini ve ilişkilerini dikte eden öğelerdir. Organel proteom çalışmaları ilgi duyulan organelin klasik hücre biyolojisi teknikleri kullanılarak izolasyonu ve izole edilen organelden hazırlanan zenginleştirilmiş protein özütlerinin tanımlanması prensibine dayanmaktadır. Literatürde çekirdek proteomu çalışmaları için kullanılan ticari kitler aracılığı ile basit fraksiyonlama teknikleri ya da densite gradyan santrifügasyonu yaklaşımları kullanılmaktadır. Ancak bu tür yaklaşımlarda bazı eksiklikler bulunmaktadır. Bu eksiklikler arasında (1) sitoplazmik protein kontaminasyonları (2) sitoplazmik proteaz kaynaklı protein degradasyonu gibi sorunlar söylenebilir. Yapılan bu çalışmada ise belirtilen eksikliklerin giderilmesi ve çekirdek proteomunun daha net çalışılabilmesi için farklı bir yaklaşım kullanılmıştır.

Bu yaklaşımda; çekirdek izolasyonuna gerek kalmadan çekirdek proteinlerinin enzimatik biyotinilasyon aracılığı ile biyotinile edilip zenginleştirilerek tanımlanması gerçekleştirilmiştir. Enzimatik biyotinilasyon amaçlı kullanılacak enzim modifiye edilmiş TurboID enzimi olup, Split TurboID (Bölünmüş TurboID) olarak bilinmektedir. Split TurboID, ayrı ayrı iken inaktif olan 8kDa'lık N-terminal domaini ve 27kDa'lık C-terminal domaininden oluşmaktadır. Biotin ligaz enzimine ait bu iki domain bir araya geldiğinde aktif enzim hale geçerek ortamda biyotin ve ATP varlığında yakınsal etiketleme ile proteinleri lizin aminoasitlerine bağlanarak biyotinile etmektedir. Enzime ait iki domainin etkileşimi ve aktif forma geçmesi için Rapamisin varlığında etkileşim sağlayan FKBP ve FRB proteinleri kullanılarak füzyon protein tasarımı yapılmıştır. Hücre içerisinde kontrollü biyotinilasyonun sağlanması için Split TurboID-N terminalini içeren füzyon protein pcDNA4/TO plazmiti içerisine klonlanmıştır. Bu sayede kültür ortamında tetrasiklin

varlığında Split TurboID-N füzyon protein ekspresyonu kontrollü bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Enzimin C terminalini içeren füzyon protein ise pcDNA3.1 plazmitine klonlanarak, hücre içerisinde sürekli protein ekspresyonunun gerçekleşmesi sağlanmıştır. Stabil HEK293T TetR+_Split TurboID –N-C hücrelerinde besi yeri ortamına, N terminalinin ekspresyonu için tetrasiklin, reaksiyon substratı olarak biyotin ve etkileşimi sağlaması için rapamisin kompotentlerinin eklenmesi ile eksprese edilen füzyon proteinler çekirdeğe yönlendirilerek biyotinyasyon reaksiyonunu gerçekleştirmişlerdir. Bu sayede nükleer proteinler biyotinyale edilmiş ve Streptavidin kaplı boncuklar kullanılarak zenginleştirilmiştir. Zenginleştirilen proteinler triptik kesim sonrası LC/MS-MS analizleri ile tanımlanmıştır.

Yapılan çalışmanın sonucunda 361 protein tanımlanmış, bu proteinlerden 302 adetinin çekirdek proteomu içerisinde bulunduğu yapılan GO (Gene Ontology) analizi ile tespit edilmiştir. Elde edilen sonuca göre geliştirilen bu yaklaşımın çekirdek proteom çalışmalarında yaklaşık %83.6 oranında verimlilikle çalıştığı gösterilmiştir.

Tez çalışması kapsamında geliştirilen bu yeni ve özgün yaklaşımda nükleer proteinlerin tanımlanması için biyotin ile etiketlenmesi ve streptavidin kaplı boncuklar ile zenginleştirilmesi başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar yapılan bu çalışmada uygulanan yaklaşımın çekirdek proteomu çalışmalarında yüksek verimlilikle kullanılabileceğini göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Biyotinyasyon, çekirdek proteomu, Bölünmüş TurboID biyotin ligaz enzimi

ABSTRACT

Directing and Validation of Fusion Proteins Into The Nucleus For Selective Biotinylation of Nuclear Proteins via Adaptation of Split-TurboID Biotinylation Enzyme Techonology

The nucleus is an organelle located at the center of the cell, which stores, preserves and uses genetic information and in this way manages many cellular events. It is a very important organelle in the cell where many physiological events such as splicing, transcription, replication and DNA repair take place. The proteins found in intracellular organelles are the elements that dictate the intracellular functions and relationships of the organelles. Organelle proteome studies are based on the isolation of the organelle of interest using classical cell biology techniques and the identification of enriched protein extracts prepared from the isolated organelle. In the literature, simple fractionation techniques or density gradient centrifugation approaches are used through commercial kits used for nuclear proteome studies. However, there are some shortcomings in these approaches such as Among these shortcomings, problems such as (1) cytoplasmic protein contaminations and (2) cytoplasmic protease-induced protein degradation can be mentioned. In this study, a different approach was used to eliminate the mentioned deficiencies and to study the nuclear proteome more clearly.

In this approach; the nuclear proteins were identified by biotinylated using by enzymatic biotinylation and enriched without the need for organelle isolation. Split TurboID consists of an 8kDa N-terminal domain and a 27kDa C terminal domain, which are inactive separately. When these two domains of the biotin ligase enzyme come together, they become an active enzyme and biotinylate proteins by proximal labeling in the presence of biotin and ATP. FKBP and FRB proteins, which interact in the presence of rapamycin, have been used to design a fusion protein for the interaction of the Split TurboID N- and C- terminal domains. The fusion protein containing the Split TurboID-N terminus was cloned into pcDNA4/TO plasmid to ensure controlled biotinylation in the cell. In this way, Split TurboID-N fusion protein expression was carried out in a controlled manner in the presence of tetracycline in the culture medium. The fusion protein containing the C-terminus of the enzyme was cloned into the pcDNA3.1 plasmid, resulting in continuous protein expression

in the cell. In stable HEK293T TetR+_Split TurboID –N-C cells, the fusion proteins expressed by adding tetracycline for the expression of the N-terminus, biotin as the reaction substrate and rapamycin components to provide the interaction, were directed to the nucleus and carried out the biotinylation reaction. In this way, nuclear proteins were biotinylated and enriched using Streptavidin coated beads. The enriched proteins were identified by LC/MS-MS analyzes after tryptic digestion.

As a result of the study, 361 proteins were identified, and it was determined by GO (Gene Ontology) analysis that 302 of these proteins were in the nuclear proteome. This approach, which was developed according to the results obtained, has been shown to work with an efficiency of approximately 83.6% in nuclear proteome studies.

In this new and unique approach developed within the scope of the thesis study, biotin labeling and enrichment with streptavidin-coated beads were successfully performed for the identification of nuclear proteins. The results obtained showed that the approach applied in this study can be used with high efficiency in nuclear proteome studies.

Keywords: Biotinylation, nuclear proteome, Split TurboID biotin ligase enzyme

TEŞEKKÜR

Lisans döneminde stajyer öğrenci olarak tanıştığım, sonrasında yüksek lisans serüvenimde danışman hocam olarak her zaman yanımda olan, tüm bilgi ve birikimlerini paylaşan ve bu yolda bana daimi rehberlik yapan değerli danışmanım Prof. Dr. Murat KASAP'a teşekkürlerimi sunarım. Öğrettiği tüm kazanımlar ve ilgisi ile yanımda olan değerli hocam Doç. Dr. Gürler AKPINAR'a teşekkür ederim. Yollarımız kesiştiği için çok şanslıyım, her zaman en değerli hocalarım olarak kalacaksınız.

Değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Aylin KANLI'ya, tüm bu süreç boyunca yardımlarını esirgemeyen ve yol göstermeye çalışan değerli büyüklerim Mehmet SARIHAN ve Merve Gülsen BAL ALBAYRAK'a teşekkür ederim.

Tüm sıkıntıları beraber yüklendiğimiz, çözüm arayışında birlikte kaybolduğumuz, yüksek lisans hayatımın bana kattığı en değerli dostlarım Elif AKINCI, Elifcan KOÇYİĞİT, Humeyra Şeyma ÜNLÜ ve Beliz ERDAL'a teşekkürü bir borç bilirim.

Eğitim hayatım boyunca tüm üzüntülerim ve sevinçlerimde daima yanımda olan, beni her koşulda destekleyen, benimle gurur duyduklarını bildiğim ve benim de onlarla gurur duyduğum değerli ailem babam Mehmet ÖZEN, annem Şerife ÖZEN, abilerim Hasan ve Hakan ÖZEN ve ablam Hatice ŞAHİN'e en kalbi teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamın gerçekleşmesinde sağladığı maddi destek için üniversitemizin Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne (Proje No: 3046) teşekkür ederim.

ORİJİNALLİK BİLDİRİMİ

Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Bölünmüş-TurboID Biyotininilasyon Enzim Teknolojisi Kullanarak Çekirdek Proteinlerinin Seçici Biyotininilasyonu İçin Füzyon Proteinlerin Nükleusa Yönlendirilmesi ve Doğrulanması” 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....

Fatma Zehra Özen

İmza

İÇİNDEKİLER

ÖZET	v
ABSTRACT	vii
TEŞEKKÜR.....	ix
ORİJİNALLIK BİLDİRİMİ	x
İÇİNDEKİLER.....	xi
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	xiv
ŞEKİLLER	xvi
TABLOLAR.....	xviii
1.GİRİŞ.....	2
1.1. Nükleus (Çekirdek).....	2
1.1. Organel Proteomlarını Çalışmanın Önemi	3
1.2. Nükleer Proteomun Çalışılmasının Önemi	3
1.3. Nükleer Proteom Çalışmalarında Kullanılan Deneysel Yaklaşımlar.....	5
1.4. Biyotin Yapısı ve Hücre İçi Görevleri	6
1.5. Biyotin Ligaz Enzimi ve Biyotiniasyon Reaksiyonu.....	7
1.6. TurboID ve Split TurboID Biyotin Ligaz Enzimleri	9
2.AMAÇ.....	12
3.MATERYAL METOD.....	14
3.1. Eksprese Edilecek Füzyon Protein Gen Dizilerinin ve Sanal Klonların Tasarımı 16	
3.2.1. pEX Plazmitlerinin XL1Blue Hücrelerine Elektrotansormasyonu.....	19
3.2.2. Hücrelerin Çoğaltımı ve Plazmitlerin İzolasyonu	19
3.3. Alt-klonlama ile Split-TurboID N- ve C- terminal Proteinlerini Kodlayan Rekombinant Klonların Oluşturulması	21
3.4. Hek293T TetR+ Hücrelerinin Kültüre Edilmesi	25
3.4.1. Hücrelerin Çözülmesi	25

3.4.6. HEK293T 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	29
3.4.7. Split-TurboID enzimin N ve C Uçlarının İfadelerinin Ve Lokalizasyonlarının Doğrulanması	32
3.4.7.1. Protein Özütlelerinin Hazırlanması ve Bradford Yöntemi İle Konsantrasyonlarının Belirlenmesi	32
3.4.7.2. SDS-PAGE Jel Elektroforezi	33
3.4.7.3. Western Blotlama Deneyleri	34
3.4.7.4. İmmünfloresan Mikroskopisi Yöntemi ile Split-TurboID N- ve C- uçlarının HEK293T-TetR+-Split-TurboID-N-C Hücre Hattında Lokalizasyonlarının Doğrulanması	35
3.4.8. Füzyon Protein Etkileşimlerinin Doğrulanması	37
3.5. Nükleer Proteinlerin Biyotinile Edilmesi	37
3.5.1. Hücre Kültüründe Biyotinyasyon Reaksiyonunu Kurulması	37
3.5.2. RIPA Tamponu İle Protein Özütlelerinin Hazırlanması	38
3.6. Biyotinile Proteinlerin Zenginleştirilmesi ve Zenginleştirilmenin Doğrulanması	39
3.6.1. İmmünfloresan mikroskopisi ile Biyotinile Proteinlerin Çekirdekte Lokalize Olduklarının Gösterilmesi	39
3.7. Zenginleştirilmiş Biyotinile Proteinlerin Tripsin Enzimi ile Kesimi ve LC-MS/MS Analizine Hazırlanması	40
3.8. Nano-Sıvı Kromatografi tabanlı Kütle Spektrometre (nLC-MS/MS) Analizi ile Proteinlerin Tanımlanması ve Etiketsiz Kantifikasyonu	41
3.9. nLC-MS/MS Veri Analizi ve Biyoinformatik Analizler	42
4.SONUÇLAR.....	43
4.1. Alt-Klonlama İle Rekombinant Plazmitlerin Oluşturulması	43
4.2. HEK293T-TetR+-Split-TurboID-N-C Stabil Hücre Hattının Oluşturulması ve Füzyon Proteinlerin Etkileşimlerinin Doğrulanması	45

4.3. Çekirdek Proteinlerinin Biyotinile Edilmesi ve Biyotinile Proteinlerin Zenginleştirilmesi	49
4.4. Triptik Kesim ve nLC-MS/MS Analizi	51
5.TARTIŞMA.....	52
6.SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	55
7.KAYNAKLAR.....	56
8.ÖZGEÇMİŞ	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
EKLER	58
EK-1. nLC-MS/MS analizleri sonucu elde edilen proteinler	58



SİMGELER ve KISALTMALAR

AmBic: Amonyum Bikarbonat

ATP: Adenozin Trifosfat

BSA: Bovin Serum Albümin

cGMP: Siklik Guanozin Monofosfat

Da: Dalton

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO: Dimetilsülfoksit

DTT: Dithiothreitol

Escherichia coli: *E. coli*

EDTA: Etilendiamintetraasetik Asit

FA: Formik Asit

FASP: Filtre Yardımlı Örnek Hazırlama

FBS: Fetal Bovin Serum

GO: Gene Ontology

HA: Hemagglutin

IF: İmmünofloresan

KDa: Kilo Dalton

LB: Luria-Bertani

mL: Mililitre

mM: Milimolar

MS: Kütle Spektrometresi

nLC-MS/MS: Nano Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometresi/Kütle Spektrometresi

nM: Nanomolar

PBS: Fosfat Tamponlu Salin Çözeltisi

PL: Proximity Labeling

RE: Restriksiyon Endonükleaz

RIPA: Radyoimmünopresipitasyon Tahlil Tamponu (Radioimmunoprecipitation assay buffer)

SDS-PAGE: Sodyum Dodesil Sülfat –Poliakrilamid Jel Elektroforezi

SOB: Süper Optimal Besiyer

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

WB: Western Blot



ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Hücre çekirdeği ve kısımları	2
Şekil 1.2. Birden fazla lokalizasyona sahip nükleer proteinlerin etkileşimli ağ çizimi (The Human Protein Atlas, https://www.proteinatlas.org/humanproteome/subcellular/nucleoplasm)	4
Şekil 1.3. Biotinin kimyasal gösterimi (National Center for Biotechnology Information, 2023).....	6
Şekil 1.4. Biotinilasyon reaksiyonu gösterimi (Hayes ve ark., 2020)	8
Şekil 1.5. TurboID biyotin ligaz enzimi biyotinyasyon reaksiyonu ve kullanıldığı örnek organizmalar (Cho ve ark., 2020b).....	10
Şekil 1.6. Split-TurboID etiketleme reaksiyonu gösterimi. N ve C domainleri ayrı iken inaktif formda olan TurboID enziminin, sağlanan protein etkileşimi ile aktif forma geçerek biyotinilasyon reaksiyonunun gerçekleştirmesi (Cho ve ark., 2020b)	11
Şekil 1.7. Kelvin Cho ve arkadaşlarının hazırladıkları füzyon proteinler ve ER-mitokondri Split-TurboID etkileşimi	11
Şekil 3.1. pcDNA4/TO-FKBP-V5-Split TurboID N Terminal-NLS rekombinant plazmitin sanal klonlaması	17
Şekil 3.2. pcDNA3.1- HA-FRB-Split TurboID C-NLS rekombinant plazmitin sanal klonlaması.....	18
Şekil 3.3. HEK293T TetR ⁺ hücre hattına pcDNA4/TO-FKBP-V5-Split TurboID N -NLS plazmitinin transfeksiyonu şematik gösterimi	27
Şekil 3.4. HEK293T TetR ⁺ _pcDNA4/TO-FKBP-V5-Split TurboID N-NLS hücre hattına pcDNA3.1- HA-FRB-Split TurboID C-NLS plazmitinin transfeksiyonu şematik gösterimi	29
Şekil 3.5. Tek koloni düşürmek için seri dilüsyon protokolü şematik gösterimi.....	30
Şekil 3.6. Seri dilüsyonları yapılan hücrelerin ilgili petrilere ekimlerinin yapılması	31
Şekil 3.7. Füzyon protein etkileşimlerinin doğrulanması çalışma grupları şematik gösterimi	37
Şekil 3.8. Biotinilasyon reaksiyonu grupları şematik gösterimi	38
Şekil 4.1. HindIII ve BamHI restriksiyon enzimleri ile kesilmiş FKBP-V5-Split TurboID N Terminal-NLS dizisini kodlayan DNA parçası ve pcDNA4/TO plazmiti.	43
Şekil 4.2. Rekombinant plazmit pcDNA4/TO-FKBP-V5-Split TurboID N -NLS koloni taranmasına ait agaroz jel elektroforez görüntüsü	44

Şekil 4.3. BamHI ve EcoRI restriksiyon enzimleri ile kesilmiş HA-FRB-Split TurboID C - NLS dizisini kodlayan DNA parçası ve pcDNA3.1 plazmiti. Jelin orta kısmına DNA moleküler ağırlık belirteci yüklenmiştir.	44
Şekil 4.4. Rekombinant plazmit pcDNA3.1- HA-FRB-Split TurboID C -NLS koloni taranmasına ait agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	45
Şekil 4.5. Split TurboID-N füzyon proteininin pcDNA4/TO-FKBP-V5-Split TurboID N Terminal-NLS transfekte edilmiş HEK293TetR+ hücrelerinde ifadesinin doğrulanması. .	46
Şekil 4.6. Protein özütlerinin SDS-PAGE jel görüntüsü.....	47
Şekil 4.7. Split TurboID-N ve Split TurboID- C protein ifadelerinin Western Blot görüntüsü.	47
Şekil 4.8. Split TurboID-N ve Split TurboID- C proteinlerinin hücre içi lokalizasyonlarının doğrulanması	48
Şekil 4.9. Rapamisin varlığında aktif Split TurboID oluşumunun görüntülendiği Western Blotlama görüntüsü	49
Şekil 4.10. Çekirdek proteinleri biyotinile olan ve olmayan hücrelerden hazırlanan proteinlere ait SDS-PAGE jel görüntüsü.....	50
Şekil 4.11. Zenginleştirme sonrası Western Blot görüntüsü	50
Şekil 4.12. Biotinilasyon reaksiyonunun lokalizasyonun IF ile görüntülenmesi	51

TABLÖLAR

Tablo 1.1. Biyoteknoloji alanındaki çalışmalarda kullanılan bazı biyotin ligaz enzimleri ve bilgileri	9
Tablo 3.1. Kullanılan kimyasallar, kitler ve enzimler	14
Tablo 3.2. Kullanılan çözeltiler ve içerikleri	15
Tablo 3.3. SDS-PAGE jel solüsyonları içerikleri ve miktarları	34
Tablo 3.4. Besiyeri ortamına eklenen kompotentlerin gösterildiği çalışma grupları.....	37
Tablo 3.5. HEK293T-TetR+-Split-TurboID-N-C hücre hattında çekirdek proteinlerinin biyotininilasyonunun gösterilmesi için yapılan deney tasarımı.....	38

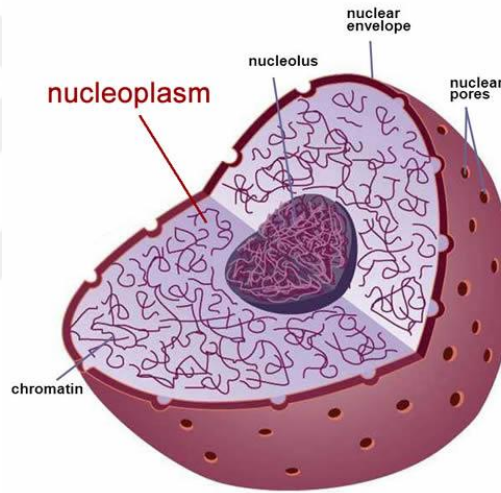


1. GİRİŞ

1.1. Nükleus (Çekirdek)

Nükleus (çekirdek), ökaryotik hücrelerde bulunan bir hücre organeli olup, ökaryotik hücrelerin prokaryotlardan ayırımın sağlanmasındaki en belirgin farklardan biridir. İçerisinde taşıdığı kromozomlar sayesinde hem genetik bilginin deposu hem de kontrol merkezidir. DNA replikasyonu, transkripsiyonu, RNA işlenmesi aşamaları çekirdek içerisinde gerçekleşmektedir (Lammerding, 2011; The Cell, Bölüm 8).

Nükleus; nükleus zarfı, kromatin, nükleolus ve nükleoplazma kısımlarından oluşmaktadır (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Hücre çekirdeği ve kısımları

Nükleus zarfı, sitoplazma ile çekirdek içeriğini ayırılmasını sağlamaktadır. Ayrıca gen ifadesinin ökaryotlara özgü mekanizmalarla düzenlenmesine izin vermektedir. Çift katlı fosfolipidlerden oluşarak nükleoplazma ve sitoplazma arasında bariyer görevi görür. İç ve dış çekirdek zarları, sitoplazma ve nükleoplazma arasındaki iletişimi sağlayan nükleer porlar sayesinde birleşmektedir. Bu porlar sitoplazma ve nükleus arasında protein ve RNA geliş gidişini seçici olarak kontrol etmektedir. İç zar yapısında çekirdeğe yapısal destek sağlayan ve kromatin tutunma bölgeleri oluşturan nükleer lamina bulunmaktadır (The Cell, Bölüm 8). Mitoz sırasında nükleus zarfı yıkımı gerçekleşir ve nükleer lamina dağılır. Bu dağılımda Lamin A ve Lamin C proteinleri nükleus zarfında ayrılarak sitoplazmada serbest

dimerler olarak bulunurken, Lamin B proteini küçük membran veziküllerine bağlı halde kalmaktadır (Dittmer ve ark.,2011; The Cell, Bölüm 8).

Kromatin, kromozomları oluşturan DNA ve protein kompleksidir. Hücrede gerçekleşen DNA transkripsiyonu, replikasyonu, onarımı veya rekombinasyonu süreçlerinde kromatin yapısında bazı değişiklikler meydana getirerek DNA'nın erişilebilir olmasını sağlamaktadır (Quina ve ark., 2006; Morales ve ark., 2001).

Nükleolus (çekirdekçik), en büyük nükleer organel olup ribozom alt birim biyogenezinin birincil bölgesidir. Ribozomal RNA'ların sentezlendiği, işlendiği ve ribozomların oluştuğu kısımdır. Ayrıca hücre döngüsünün işleyişi, mitozun düzenlenmesi, stres tepkisi ve çoklu ribonükleoproteinlerin biyogenezi süreçlerinde rol almaktadır (Dubois ve Boisvert, 2016).

Nükleoplazma, hücre çekirdeğini oluşturan bir tür protoplazmadır ve genetik materyali içeren hücredeki merkezi alandır. Yapılan araştırmalarda DNA replikasyonunda ve transkripsiyonunda rol oynayan proteinlerin büyük olasılıkla nükleoplazmanın çevresinde bulunduğu gösterilmiştir (Nanninga, 2014).

1.1. Organel Proteomlarını Çalışmanın Önemi

Hücre içi organellerde bulunan proteinler, organellerin görevleri ve işleyişleri hakkında bilgi vermektedir. Bunun yanı sıra organel proteinleri hücresel olaylar ve yapılar ile olan ilişkiler hakkında da bilgi sağlamaktadır. Başka bir ifade ile organel proteinleri, organellerin hücre içi görevlerini ve ilişkilerini dikte eden öğelerdir. Tüm doku ve hücre proteomları ile karşılaştırıldığında organel proteomları daha az karmaşık olup anlaşılabilirliği nispeten daha kolaydır. Organel proteomlarının daha iyi anlaşılması hücrelerin ve içerisinde bulundukları mikrodünyanın da daha iyi anlaşılmasına neden olmaktadır (Yates ve ark.,2005).

1.2. Nükleer Proteomun Çalışılmasının Önemi

Çekirdek hücrenin merkezinde bulunan, genetik bilgiyi barındıran ve DNA replikasyonu, transkripsiyonu, RNA işlenmesinde rol alırlar. Ayrıca karmaşık hücresel olayların düzenlenmesinde görev alırlar (Lammerding, 2011; The Cell, Bölüm 8). Hücre çekirdeğinde bulunan proteinlere nükleer protein adı verilmektedir. Bu proteinler karmaşık düzenleyici ağlar halinde etkileşerek hücresel gelişim ve fizyolojik süreçler sırasında görev almaktadır (Narula ve ark., 2013).

bilgi sağlamaktadır. Bu bilgiler doğrultusunda çekirdek proteomu çalışmasının organizmanın mevcut durumunu anlamada büyük öneme sahip olduğu anlaşılmaktadır.

1.3. Nükleer Proteom Çalışmalarında Kullanılan Deneysel Yaklaşımlar

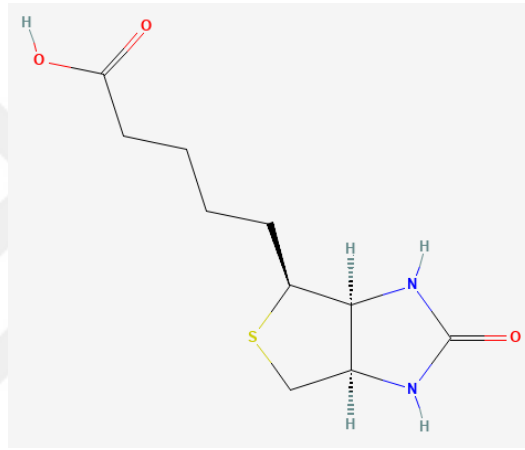
Hücre içi spesifik kompartmanların ve organellerin izolasyonu amaçlı geliştirilmiş çok sayıda zenginleştirme protokolü vardır. Bu protokoller genellikle alt-fraksiyonlama tabanlı yaklaşımları kullanmaktadırlar (Jung ve ark., 2003). Bu protokollerin ilk adımında hücreler genellikle mekanik, enzimatik ya da kimyasal tamponlar aracılığı ile parçalanırlar. Hücre lizatları hazırlanırken amaç hem organel içeriğini bozmamak hem de yüksek miktarda protein geri kazanımını sağlamaktır. Bu nedenle çoğu protokolda hidrofobik proteinlerin çözünürlüğünü artırabilmek için değişik deterjanlar kullanılmaktadır. Bir sonraki aşamada organellerin birbirlerinden ve sitoplazmik proteinlerden ayrıştırılması hedeflenir ve bu amaçla santrifügasyon uygulanır. Santrifügasyon, diferansiyel santrifügasyon şeklinde gerçekleştirilebileceği gibi densite gradyan santrifügasyonu şeklinde de gerçekleştirilebilir (Dreger, 2003).

Hücrelerden çekirdek izolasyonunun yapılabilmesi için kullanılan en popüler metot Blobel ve Potter tarafından 1966 yılında geliştirilmiştir (Blobel ve ark.,1966). Bu metotta çekirdek yüksek sedimentasyon hızı kullanılarak diğer komponentlerden ayrıştırılmaktadır. Literatürde var olan bu ve benzer metotlarda çekirdek izolasyonunu kısıtlayan bazı teknik zorluklar vardır. Örneğin, hipotonik çözeltilerde hücreler bekletilirken bekleme süresinin uzunluğu, mekanik hücre lizisinde sıcaklık kontrolünün zorluğu ve hücre lizatının ne kadar yıkanması ve temizlenmesi gerektiği gibi sorunlarla karşılaşılabilir. Yüksek derecede hipotonik tamponlar ile muamele edilen hücreler çekirdek zarının yıkılmasına neden olabileceği gibi hipertonic tamponlar da çekirdeğin buruşmasına ve izole edilen çekirdek hacminin, integritesinin ve protein içeriğinin değişmesine neden olmaktadır. Mekanik parçalama metotları kullanıldığında ise ortam sıcaklığının kontrol edilebilmesi adına çekirdek, sitoplazmik içerik ile daha uzun süre temas halinde tutulmakta ve sitoplazmada bulunan proteazlar, proteaz inhibitörleri varlığında dahi kısmi degradasyona neden olmaktadır (Hoffmann ve ark., 1978; Rickwood ve ark.,1997). Temiz ve saf nükleer protein ekstraktlarının hazırlanabilmesi için yapılan tekrarlı yıkamalar ise, tamponların içeriğindeki deterjanlar nedeni ile çekirdek zarında sızıntılara yol açabilmekte ve çekirdek proteomunun değişmesine neden olmaktadır (Graham ve ark., 2002). Çekirdek proteomu çalışılmasında yeni metotların geliştirilmesi ve bu gibi problemlerin önüne geçilebilmesi hücrenin

içerisinde bulunduğu durumu anlayabilme ve mevcut duruma hakim olabilme imkanı tanıyacaktır.

1.4. Biotin Yapısı ve Hücre İçi Görevleri

Biyotin tüm canlı organizmalarda bulunan bazı karboksilaz enzimleri için kofaktör görevi gören ve Vitamin B7, Vitamin H veya Koenzim R olarak da tanımlanan bir moleküldür. Biotin yapısında imidazol grubu ve valerik asit zinciri bulundurur ve bunlar birbirlerine tetrahidrotiyofen halkası ile bağlıdırlar. Biotinin kimyasal yapısı Şekil 1.3’de verilmiştir (Fairhead ve Howarth, 2015; National Center for Biotechnology Information, 2023<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Biotin>).



Şekil 1.3.Biotinin kimyasal yapısı (National Center for Biotechnology Information, 2023)

Biotinin sentezlenme amacı, onun bazı enzimlere iliştilmesi ve bu yolla bu enzimlerin bikarbonattaki CO₂’yu organik asitlere metabolit oluşturmak üzere transferini sağlamasıdır. Bunlar sitoplazmada bulunan ve yağ asit sentezinde görev alan asetil CoA karboksilaz enzimi; mitokondiride yer alan ve lösin metabolizmasında katalizleme görevi olan β -Metilkrotonil-CoA karboksilaz, yağ asitlerinin metabolizmasında rol alan propriyonil-CoA karboksilaz ve glukoneogenezde yer alan piruvat karboksilaz olarak tanımlanan enzimlerdir. (Kohanski, 2013; Zemplein ve ark., 2016). Özetle belirtmek gerekirse, hücrede fizyolojik şartlar altında biyotin kofaktör olarak kullanılmaktadır.

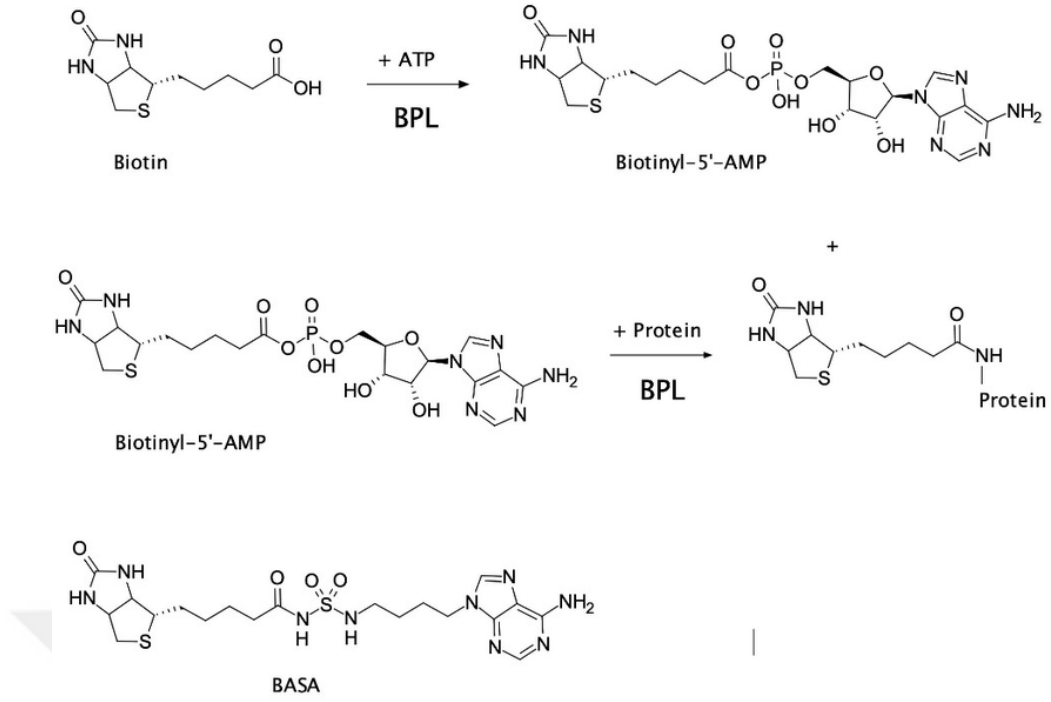
Ayrıca biyotin histon proteinlerine de bağlanarak kromatin biyolojisindeki işlevleri ortaya koymakta da yardımcı olmaktadır. İnsan histonlarında 11 histon bölgesi tanımlanmıştır. Bunlar; Histon H2A’da K13, K125, K127 ve K129; Histon H3’te K4, K9, K18 ve belki K23; Histon H4’te K8 ve K12 bölgeleridir. Örneğin Histon H4’te K12 bölgesinin biyotiniasyonu

gen baskılanmasında, DNA onarımında, heterokromatin yapılarında rol oynarak genomik stabiliteyi desteklediği kanıtlanmıştır. Histonların biyotiniasyonu geri dönüşümlü bir değişimdir. Bu görevlerinin yanında biyotin, cGMP, NF- κ B, Sp1 ve Sp3 ve reseptör tirozin kinazlar olarak tanımlanan sinyal moleküllerinin aracılığı ile gen ekspresyonu üzerinde de rol oynamaktadır. Ayrıca HepG2 hepatokarsinom hücrelerinde asialoglikoprotein reseptörünün ve sıçan hepatositlerinde propiyonil-CoA karboksilazın ekspresyonu biyotine bağlı olduğu olduğu kanıtlanarak biyotinin transkripsiyon sonrası seviyede gen ekspresyonunu etkilediği gösterilmiştir (Zemplein ve ark., 2016).

1.5. Biyotin Ligaz Enzimi ve Biyotiniasyon Reaksiyonu

Biyotiniasyon reaksiyonunun gerçekleşmesinde biyotin ligaz enzimleri görev almaktadır. Doğada organizmalarda biyotiniasyonu sağlayabilen, biyotini kofaktör olarak kullanabilen protein sayısının azlığından dolayı biyotin protein ligazların katalizlediği reaksiyonlar oldukça yüksek özgünlüğü sahip bir reaksiyon olup, evrim süresince korunmuştur. *E.coli* K12 suşuna ait olan BirA enzimi en iyi bilinen biyotin ligaz proteindir (Smith ve Cronan, 1999).

BirA enzim yapısında N terminal domain, merkezi katalitik domain ve C terminal domaini bulunan 35.5 kDa büyüklüğe sahip bir proteindir. BirA enzimi biotiniasyon işlemi süresinde üç farklı konformasyona girebilmektedir. Bunlar; boş olduğu konformasyon, biotini bağladığı konformasyon ve biyotin+ATP'yi bağlı tuttuğu konformasyondur. Yapılan çalışmalarda BirA enziminin önce biyotini bağladığı, sonra ATP ile etkileşerek biyotini-AMP adı verilen bir ara ürünü oluşturduğu gösterilmiştir. Biyotini-AMP kararsız bir karışık anhibrit molekül olmasına rağmen enzime bağlı kaldığı sürece hidrolize uğramaz. Bu ara ürüne, biyotini olacak bir protein yaklaştığında proteine ait biyotin alıcı domaini üzerinde bulunan lizin amino asidine ait epsilon-amino grubu, biyotin ile amid bağı oluşturarak, AMP'nin enzimin aktif bölgesinden ayrılmasını sağlar (Ingaramo ve Beckett, 2011; Hayes ve ark., 2020). Biyotiniasyon reaksiyonu gösterimi Şekil 1.4'de verilmiştir.



Şekil 1.4. Biotinilasyon reaksiyonu gösterimi (Hayes ve ark., 2020)

BirA sahip olduğu özgüllük nedeni ile *E.coli* içerisindeki sadece tek bir proteinin biyotinilasyona uğramasını sağlayabilmektedir. Bu özgüllüğü ortadan kaldırmak ve proteini daha geniş spektrumda biyotini edebilen bir protein haline sokabilmek için yönlendirilmiş evrim çalışmaları yapılmış ve geniş bir substrat spektrumu olan biotin ligaz enzimleri üretilmiştir. Bu çalışmalarda BirA enziminin özgül olarak tek bir proteini değil yakınına yaklaşan tüm proteinleri biyotinlenmesi amacı ile enzimin 118. Pozisyonundaki arjinin amino asidinin glisine dönüştürülmesi ile BirA* (promiscuous biotin ligase) enzimi geliştirilmiştir (Kyle ve ark., 2012). BirA* enziminin ise Biotinilasyon reaksiyonunda katalitik hızının düşüklüğünü iyileştirebilmek için yönlendirilmiş evrim ile Miniturbo ve TurboID Biotin ligaz enzimleri geliştirilmiştir (Branon ve ark., 2017).

Biyotin, geniş spektrumlu biyotin ligaz enziminin diğer proteinler üzerinde yapmış olduğu yakınsal biyotin etiketlemesi (proximity labelling) sayesinde protein-protein etkileşimleri, moleküler etiketleme, protein izolasyonu, organel-organel etkileşimlerinin çalışılması mümkün kılınmıştır. Yakınsal etiketleme tekniği kullanılarak mevcut organel proteom çalışmalarında kullanılan fraksiyonlama ve afinite saflaştırma yaklaşımlarının getirdiği safsızlıklar, organel zarar verme, elde edilen ürün yetersizliği gibi dezavantajların önüne geçmektedir. Biotinilasyon reaksiyonunun toksik etkiye sebep olmaması, hücrelerin sağladığı ATP'yi ve kolay elde edilebilir olan biyotini substrat olarak kullanarak yakınsal etiketleme yapması ile biyoteknolojik çalışmalarda kullanılmaktadır. Biyoteknoloji

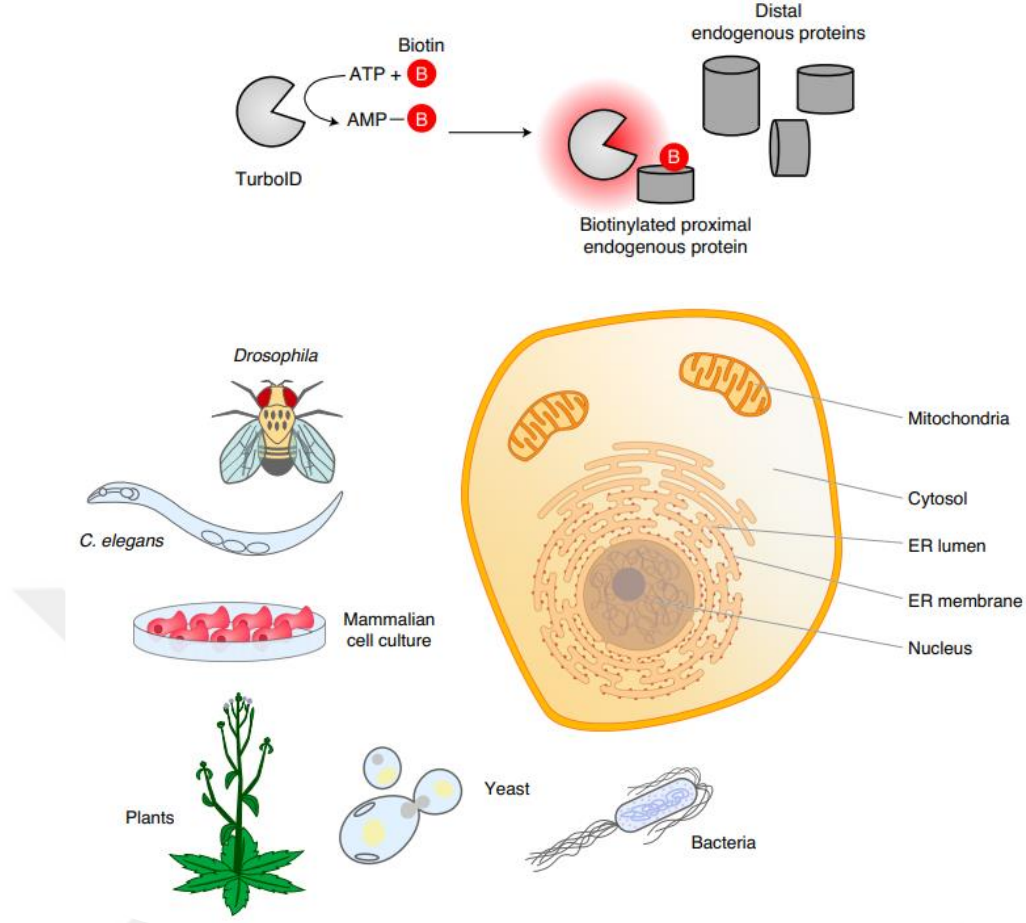
alanındaki çalışmalarda kullanılan bazı biyotin ligaz enzimleri ve bilgileri Tablo 1.1’de verilmiştir (Cho ve ark.,2020b).

Tablo 1.1. Biyoteknoloji alanındaki çalışmalarda kullanılan bazı biyotin ligaz enzimleri ve bilgileri

Metod	Substrat	Etiketleme Zamanı	Gösterilmiş Organeller	Model Organizma
APEX2	Biyotin fenol, hidrojen peroksit	<1 dakika	Sitozol, nükleus, mitokondriyal matris, mitokondriyal zarlar arası boşluk, ER lümen, ERM, OMM, Golgi	Memeli hücre kültürü, bakteri, maya, uçarlar, fare
BioID	Biyotin, ATP	18 saat	Sitozol, nükleus, ERM, mitokondriyal matris, mitokondriyal nükleotid, hücre yüzeyi, golgi	Memeli hücre kültürü, maya, uçarlar, bitki, fare
TurboID	Biyotin, ATP	<10 dakika	Sitozol, nükleus, ERM, ER lümen, mitokondriyal matriks, hücre yüzeyi, OMM	Memeli hücre kültürü, maya, uçarlar, bitki, solucan
Mini TurboID	Biyotin, ATP	<10 dakika	Sitozol, nükleus, ERM, ER lümen, mitokondriyal matriks, hücre yüzeyi	Memeli hücre kültürü, maya, uçarlar, bitki, solucan
Split BioID	Biyotin, ATP	18 saat	Sitozol, nükleus, ER-mitokondri iletişimi	Memeli hücre kültürü
Split TurboID	Biyotin, ATP	1 saat	Sitozol, nükleus, mitokondriyal matriks, ER lümen, ER-mitokondri iletişimi	Memeli hücre kültürü

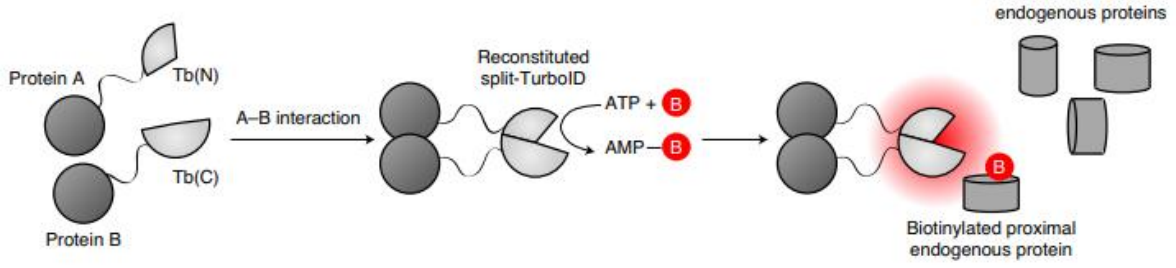
1.6. TurboID ve Split TurboID Biyotin Ligaz Enzimleri

Yönlendirilmiş evrim çalışmaları sayesinde üretilen TurboID biotin ligaz enzimi, 35kDa’luk boyutu, özgün olmayan yakınsal etiketleme ve 10 dakika gibi kısa bir inkübasyon süresinde aktivite sağlayabildiği için birçok çalışmada tercih edilmektedir. TurboID biyotin ligaz enzimi biyotiniasyon reaksiyonu ve kullanıldığı örnek organizmalar Şekil 1.5’de verilmiştir(Cho ve ark.,2020b).



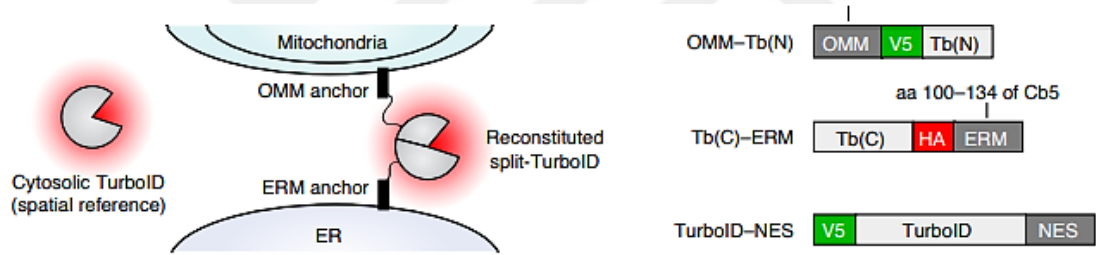
Şekil 1.5.TurboID biyotin ligaz enzimi biyotinyasyon reaksiyonu ve kullanıldığı örnek organizmalar (Cho ve ark., 2020b)

TurboID enzimi üzerinden geliştirilen Split TurboID (Bölünmüş TurboID) biyotin ligaz enzimi, aktif olmayan 8kDa'lık N-terminal ve 27kDa'lık C-terminal TurboID fragmanlarının birleşmesi sonucu oluşmaktadır. Her bir fragman, ayrı ayrı iken inaktif olmasına rağmen, bir araya geldiklerinde aktif bir biyotin ligaz enzimi oluşturmaktadırlar. Split TurboID enzimi ortamda biyotin ve ATP varlığında yakınsal etiketleme ile özgün olmayan şekilde proteinleri lizin aminoasitleri üzerinden biyotinile etmektedir. Split TurboID protein- protein etkileşimleri, organel-organel etkileşimleri ve membran-membran etkileşimlerinin çalışılmasına olanak vermektedir (Cho ve ark., 2020b). Split TurboID'nin çalışma mekanizması Şekil 1.6'da verilmiştir.



Şekil 1.6. Split-TurboID etiketleme reaksiyonu gösterimi. N ve C domainleri ayrı iken inaktif formda olan TurboID enziminin, sağlanan protein etkileşimi ile aktif forma geçerek biyotinilasyon reaksiyonunun gerçekleştirmesi (Cho ve ark., 2020b)

Kelvin Cho ve arkadaşlarının 2020 yılında yaptıkları çalışmada Split-TurboID ile ER ve mitokondriyal membran etkileşiminde rol alan proteinlerin biyotinilasyonunu sağlamış, biyotine edilen proteinleri kolon kromatografisi ile zenginleştirmiş ve kütle spektrometresi ile başarılı bir şekilde tanımlamıştır (Cho ve ark., 2020a). Çalışmalarında sitozolik TurboID enzimi pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Kelvin Cho ve arkadaşlarının hazırladıkları füzyon proteinleri ve ER-mitokondri Split-TurboID etkileşimi Şekil 1.7’de gösterilmiştir.



Şekil 1.7. Kelvin Cho ve arkadaşlarının hazırladıkları füzyon proteinler ve ER-mitokondri Split-TurboID etkileşimi

Biyotinilasyon çalışmalarının en etkin özelliklerinden biri elde edilen biyotinile proteinlerin avidin afinite kromatografisi aracılığıyla zenginleştirilebilmesidir. Doğada bilinen en güçlü kovalent olmayan etkileşim, biyotin ile avidin arasındaki etkileşimdir ($K_d = 1.3 \times 10^{-15}$ M at pH 5.0) (Jain ve Cheng, 2017). Avidinin yumurta akındaki varlığının keşfinden sonra başka organizmalardaki varlığı da gösterilmiştir. Özellikle *Streptomyces avidinii*’den elde edilen avidinin (streptavidin olarak adlandırılmaktadır) yumurta akından elde edilen avidine göre biyotini daha güçlü bağladığı bilinmektedir (Haginaka, 2012). Bu bağlanma sayesinde biyotinile proteinler afinite kromatografisi ile zenginleştirilebilmektedir.

2. AMAÇ

Hücre organel proteomlarının detaylı bir şekilde irdelenmesi hücrelerin içerisinde bulundukları durumların daha iyi anlaşılmasına ve hücresel olaylar hakkında yorum yapılabilmesine olanak sağlamaktadır.

Çekirdek hücre içerisinde kırılma, transkripsiyon, replikasyon ve DNA onarımı gibi birçok fizyolojik olayın gerçekleştiği oldukça önemli bir organel olmasına rağmen, birçok çalışmada çekirdek proteomu çalışmalarında bazı problemler ile karşılaşmaktadır. Bu problemler genellikle çekirdekteki proteinlerin zenginleştirme aşamasında ve diğer organel kirliliklerinde ayırıştırma aşamasında karşılaşılan zorluklardır. Bugüne kadar literatürde yapılan çalışmalarda, çekirdek proteomu ya ticari kitler aracılığı ile basit fraksiyonlama teknikleri ya da densite gradyan santrifügasyon yöntemi kullanılmaktadır. Literatürde var olan metotlarda karşılaşılan bir takım teknik zorluklar bulunmaktadır. Çalışma esnasında çekirdek ve sitoplazmik içeriğin uzun süre temas halinde bulunması, sitoplazmada bulunan proteazların (proteaz inhibitörü varlığında dahi) kısmi degradasyona neden olması, yüksek dereceli hipotonik veya hipertonic tamponlar ile muamele edilen hücrelerde çekirdek zarındabozunumlar meydana gelebilmekte veya çekirdeğin büzülmesi ile izole edilen çekirdek hacminin ve protein içeriğinin değişmesine sebebiyet vermesi gibi durumlar yaşanan teknik problemlere örnek olarak verilebilir (Hoffmann ve ark., 1978; Rickwood ve ark., 1997). Bu nedenle çekirdek proteomunu daha net tanımlayabilmek için farklı yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır.

Çalışmamızda bahsedilen dezavantajları ortadan kaldırmak için organel izolasyonu yapmadan çekirdek proteomunun çalışılabileceği yeni bir yaklaşım geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bu metodun temelinde çekirdek proteinlerinin enzimatik yolla biyotininasyonu ve zenginleştirilmesi sonrasında ise kütle spektrometresi ile tanımlanması yatmaktadır. Bu yaklaşım çekirdek proteomunun çalışılmasında ilk kez kullanılmıştır. Enzimatik biyotininasyonun gerçekleştirilmesi için Split TurboID biyotin ligaz enziminin yararlanılmıştır. Yenilikçi bir yaklaşım olarak hücre içerisinde Split-TurboID enziminin N terminali tetrasiklin kontrolü altında ve C terminali ise sürekli olarak ifade edilmiştir. İfade edilen her iki proteinin çekirdeğe transferini sağlayabilmek için proteinlere NLS sinyal dizileri eklenmiş, ayrıca bu proteinlerin çekirdekte etkili bir biçimde birleşerek aktif Split-TurboID oluşturabilmesi için FKBP ve FRB proteinleri N- ve C- protein uçlarına eklenmiştir.

Hücre besiyeri ortamına eklenen Tetrasiklin, Rapamisin ve biyotin ile biyotinitasyon reaksiyonunun gerçekleştirilmesi ve çekirdeğe yönlendirilmiş olan Split-TurboID fragmanları sayesinde çekirdek proteinlerinin kontrollü bir şekilde biyotinitale edilmesi hedeflenmiştir. Ardından biyotinitale proteinlerin streptavidin kaplı boncuklar ile zenginleştirilmesi ve LC-MS/MS analizleri yapılarak tanımlanması hedeflenmiştir.



3. MATERYAL METOD

Bu çalışmada kullanılan kimyasallar, kitler ve enzimler Tablo 3.1’de kullanılan çözeltiler ve içerikleri Tablo 3.2’de verilmiştir.

Tablo 3.1.Kullanılan kimyasallar, kitler ve enzimler

Kullanılan kimyasallar, kitler ve enzimler	Katalog Numarası
LB Broth agarlı	Sigma Lot:#SLCC0182
LB Broth	Sigma Lot: BCBN9308V
Ampicillin	Sigma EC200-709-7
Agaroz	Prona Lot:094502PR
GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Thermo Scientific #SMO311 Lot:00456176
QIAprep Spin Miniprep Plasmid Kit	QIAGEN Lot:151036440
QIAGEN Midiprep Plasmid Kiti	QIAGEN Cat:12145
EndoFree Plasmid Maxi Kit	QIAGEN Lot:151036440
Roche High Pure PCR Product Purification Kit	Roche Cat no:11732668001
FASP Protein Kesim Kiti	Expedeon, Lot:18B16001
DMEM Besiyeri	Gibco, Lot:2436370
Tetrasiklin indirgenmiş FBS (Tet Reduced FBS)	Takara Cat No:631101
PBS	Gibco, Lot:2436288
Trypsin/EDTA	Gibco, Ref:25200056
Penisilin/Streptomisin	Multicell, Cat:450201EL
L-Glutamin	Multicell Cat:609065EL
Blastasidin	Gibco, Cat:R21001
Zeosin	Invitrogen Cat:R25001
Geneticin	Gibco, Ref:10131035
Tetrasiklin	Sigma T3258-25g
Rapamisin	Bioshop Lot:2C76369
Tripan Mavi Boyası	Sigma T8154
Neon Transfeksiyon Kiti	Invitrogen Cat:MPP100
V5 Tag Antikoru	Invitrogen #R960-25
HA Tag Antikoru	Invitrogen #26183
Sekonder Anti-Mouse	BioRad
Streptavidin HRP	Thermo N100
Actin Antikoru	SantaCruz sc-69879
Blotting Grade Blocker	BioRad Cat:#1706404
Filtre kağıtları	BioRad Cat:1703969
DAPI	SantaCruz sc-3598

Texas Red	Vector SA-5006
Neutravidin- Texas Red	Thermo Scientific A2665
Triton X	BioRad Cat:1610407
Formaldehit	Sigma Lot:03SK3644
Prolong diamond Antifade Mountant	Invitrogen Lot:273656
HindIII Restriksiyon enzimi	Thermo Scientific #ER0501
BamHI Restriksiyon enzimi	Thermo Scientific #ER0051
10X R Buffer	Thermo Scientific #BR5
10X BamHI Buffer	Thermo Scientific #B57
T4 DNA Ligaz enzimi	Thermo Scientific EL0011
T4 DNA Ligaz Buffer	Thermo Scientific Lot:00806715
ATP	Thermo Scientific R0441
Dithiothreitol (DTT)	Bio-Rad Cat#161-0611
%100 Molecular grade Etil Alkol	Applichem Lot:4I010435
Prestained Protein Ladder	Thermo #26616

Tablo 3.2.Kullanılan çözeltiler ve içerikleri

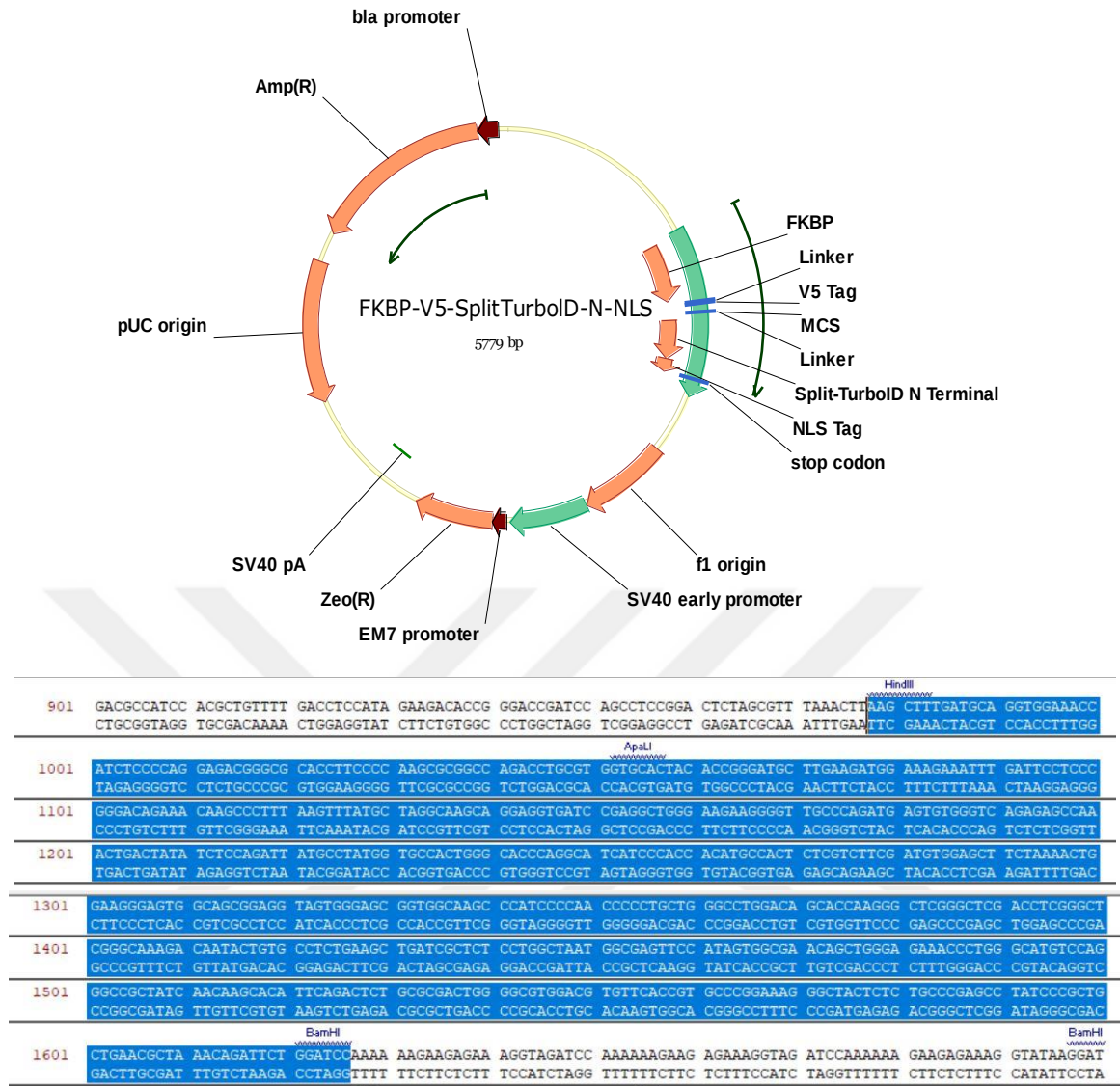
Kullanılan Çözeltiler	İçeriği
50X TAE tamponu	1 litre: 242 g Tris Base, 57.1 ml Glacial Asetik Asid, 18.61 g Disodyum EDTA, dH ₂ O
6X protein yükleme tamponu	0.5M Tris-HCl, %10SDS, Gliserol, β-merkaptotanol, bromofenol mavisi
10X yürüme tamponu	25Mm Tris-HCl,192mM Glisin, %0.1 SDS
Fiksatif solüsyonu	%40 Metanol, %10 asetik asit, %50 distile su
Colloidal Commassie Mavisi boya solüsyonu	757mM amonyum sülfat, 1.45mM Commassie blue, %20 metanol, %10 ortofosforik asit
10X TBS çözeltisi	25mM Tris-HCl, 150mM NaCl, pH 7.6: TBS-T tamponu
Ponceau S boyası	1.5mM Ponceau S, 0.5ml Asetik asit
RIPA tamponu	25 mM Tris•HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS
2D Rehidrayon Tamponu	8 M Üre, 50 mM DTT, %2 CHAPS, %0,2 Bio-Lyte 3/10 amfolit, %0.002 Bromofenol mavisi
Elüsyon tamponu	30mM biotin, %2 SDS, 300mM NaCl, 25mM Tris-HCl

3.1.Eksprese Edilecek Füzyon Protein Gen Dizilerinin ve Sanal Klonların Tasarımı

Çalışmada kullanılacak FKBP-V5-Split TurboID N -NLS ve HA-FRB-Split TurboID C - NLS füzyon proteinlerini kodlayan gen dizilerinin tasarımı için literatürde Western Blotlama ve immünfloresan deneyleri ile doğrulanmış olan füzyon protein tasarımları referans olarak alınmıştır (Cho ve ark., 2020a).

Split TurboID biyotin ligaz enziminin inaktif olan iki domainin etkileşimi ve aktif forma geçebilmeleri için FRB ve FKBP proteinlerinin Rapamisin ile etkileşim kurmasından yararlanılmıştır (Banaszynski ve ark., 2005). Enzimin N terminalinin ekspresyonunun ve lokasyonunun doğrulanması için V5 etiketi ilgili gen dizisine eklenmiştir. Benzer şekilde enzimin C terminaline ise HA (hemagglutinin) etiketi eklenmiştir. Hem Split TurboID domainlerinin hem de FRB ve FKBP proteinlerinin doğru katlanmalarını sağlayabilmek ve sterik engellemeleri ortadan kaldırabilmek için gen dizisinde uygun pozisyonlara esnek bağlantılar (GSGSGGSGSG; KGSGSTSGSG) eklenmiştir. Tasarlanan füzyon proteinlerin hücre içerisinde ifade edilebilmeleri sonrasında çekirdeğe yönlenebilmeleri için dizi uçlarına çekirdek lokalizasyon dizileri (NLS) eklenmiş ve gen dizilerinin sonuna eklenen dur kodonu (TAA) ile protein ifadesinin duracağı nokta belirlenmiştir. Tüm bu tasarım ve sanal klonlama işlemleri için Vector NTI ve Snapgene uygulamaları kullanılmıştır.

Yapmış olduğumuz tasarımda TurboID'nin N-terminal kısmının kontrollü bir şekilde ifade edilmesi, C-terminal kısmının ise sürekli bir şekilde ifade edilmesi hedeflenmiştir. Bu nedenle FKBP-V5-Split TurboID N-NLS dizisi bir Tet-ON ifade vektörü olan pCDNA4/TO içerisine ve HA-FRB-Split TurboID C Terminali-NLS dizisi ise pCDNA 3.1 vektörü içerisine klonlanmıştır. Şekil 3.1'de sanal klonlama pCDNA4/TO- FKBP-V5-Split TurboID N-NLS klonuna ait fiziksel harita, Şekil 3.2'de ise pCDNA3.1-HA-FRB-Split TurboID C-NLS klonuna ait fiziksel harita verilmiştir. Klonlamanın yapılabilmesi için HindIII ve BamHI restriksiyon enzimlerinden faydalanılmasına karar verilmiş ve bu enzimlere ait kesim bölgeleri sanal klonlara eklenmiştir.



Şekil 3.1.pcDNA4/TO-FKBP-V5-Split TurboID N Terminal-NLS rekombinant plazmitin sanal klonlaması

Tasarımı yapılan gen dizileri hizmet alımı kapsamında Eurofins firmasınca sentezlenmiş (<https://eurofinsgenomics.eu/>), sentezlenen diziler firma tarafından pEX vektörüne klonlanarak laboratuvarımıza gönderilmiştir. Sentez öncesinde firma tasarlanan gen dizilerini HEK293T-TetR+ (insan embriyonik böbrek hücre hattı-T) hücrelerinde ifade edileceği için GENEius yazılımı kullanılarak kodon optimizasyonuna tabi tutmuştur. Plazmitler 50µl steril ultra saf su içerisinde tarafımızca çözülerek sonraki deneylerimizde kullanılmak üzere -20°C’de saklanmıştır.

3.2.pEX Plazmitlerinin Amplifikasyonu ve Saflaştırılması

3.2.1. pEX Plazmitlerinin XL1Blue Hücrelerine Elektrottransformasyonu

Elektrottransformasyon için pEX-A128-FKBP-V5-Split TurboID N Terminal-NLS plazmitinden 263ng miktarda, pEX-A258- HA-FRB-Split TurboID C Terminal-NLS plazmitinden 208ng miktarda alınmış, *E. coli* XL1Blue elektrokompotent hücrelere aşağıda belirtilen protokole uygun olarak transforme edilmiştir.

Transformasyon protokolü;

- 1) 50 µl’lik %20 gliserol içeren kompetan *E. coli* XL1Blue hücre stoğu ile karıştırılan plazmit solüsyonuna Elektroporator cihazı yardımıyla (Eppendorf, Almanya) 1750 volt akım uygulanmıştır.
- 2) Aktarım yapılan hücreler üzerine 300µl SOB (super optimal broth) besi yeri eklendikten sonra hücreler 37 °C çalkalamalı inkübatörde 1 saat süresince inkübe edilmiştir.
- 3) Elde edilen transforme hücrelerin seçimlerinin yapılabilmesi için 50ug/mLoranında ampisilin içeren LB Agar besiyeri ortamlarına yayma ekimleri gerçekleştirilmiştir.

Hücreler 37°C etüvde koloni oluşumu için gece boyu bırakılmıştır.

3.2.2. Hücrelerin Çoğaltımı ve Plazmitlerin İzolasyonu

LB-agar-amp besi ortamında üreyen kolonilerden bir tanesi seçilerek, 37°C’deki çalkalamalı etüve 2 ml LB-amp besi yeri içerisine alınarak gece boyu üremeye bırakılmıştır. Ertesi gün, santrifügasyon ile çöktürülen hücre pelletlerinden plazmit izolasyonları QIAprep Spin Miniprep Plasmid Kit ile aşağıdaki protokol uygulanarak yapılmıştır.

- 1) Besiyerini uzaklaştırmak ve hücre pelletini elde etmek için 3550rpm 20 dakika oda sıcaklığında santrifüj yapılmıştır.
- 2) Hücre pelleti 250µl Resuspension Tamponu ile çözülerek steril mikrosantrifüj tüpe alınmıştır. Çözelti üzerine hücrelerin lizisini sağlamak amacı ile 250µl Lizis Tamponu P2 eklenmiş, mikrosantrifüj tüp 10 kez ters-düz edilerek enzim aktivitesi için 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- 3) İnkübasyon süresinden sonra enzim aktivitesi durdurmak için 350µl Nötralizasyon Tamponu N3 eklenmiş, mikrosantrifüj tüp 10 kez ters-düz edilerek 15000rpm 10 dakika oda sıcaklığında santrifüj yapılmıştır.
- 4) Süpernatant QIAprep 2.0 Spin Columns isimli kolon üzerine alınmıştır. Kolon, DNA'yı tutması ve diğer komponentleri atık olarak uzaklaştırması sistemine dayalı çalışmaktadır. Ardından 10000rpm oda sıcaklığında 1 dakika santrifüj yapılarak kolonun altında kalan tampon atıkları uzaklaştırılmıştır.
- 5) Kolon üzerine 500µl Bağlama Tamponu PB eklenmiş ve santrifüj yapılmıştır.
- 6) Kolon üzerine 750µl Yıkama Tamponu PE eklenmiş ve santrifüj yapılarak kolonun altında kalan tampon atıkları uzaklaştırılmıştır.
- 7) Kolon 1,5ml'lik yeni steril mikrosantrifüj tüpe alınmıştır. Elüsyon aşaması için kolon üzerine 50µl dH₂O eklenerek santrifüj yapılmıştır ve kolona tutunan DNA elde edilmiştir. Nanodropta (Nükleic acid) konsantrasyon ölçümleri yapılmıştır.

Saf plazmitlerin eldesinden sonra sipariş verilen gen dizilerinin uzunluğunun ve restriksiyon kesim bölgelerinin doğrulanması için her iki plazmitten 500ng kalıp kullanılarak HindIII ve BamHI restriksiyon enzimleri ile 37°C'de 4 saat kesime tabi tutulmuştur.

Kesim sonucunda elde edilen ürünler %1.5'lük Etidyum Bromürlü Agaroz jelde yürütülmüştür. Jelde oluşan bantlaşmaların uzunluğunu yorumlayabilmek için GeneRuler 1 kb DNA moleküler ağırlık belirteci kullanılmıştır.

Sonucunda doğrulanan plazmitler 1:1000 oranında ampisilin içeren 100ml LB Broth sıvı besiyeri içerisinde büyütülmüş ve QIAGEN Midiprep Plasmid Kiti ve protokolü ile plazmit izolasyonları aşağıdaki adımlar takip edilerek gerçekleştirilmiştir.

- 1) Besiyerini uzaklaştırmak ve hücre pelletini elde etmek için 3550 rpm 20 dakika 4°C'de santrifüj yapılmıştır.
- 2) Hücre pelleti 4ml Resuspension Tamponu P1 ile çözülmüş ve steril 15ml'lik falkon tüpe alınmıştır.

- 3) Falkon tüp içerisine 4ml Lizis Tampon P2 eklenmiş ve ters düz yapılarak 5 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır.
- 4) İnkübasyon sonrasında falkon tüp içerisine 4ml Nötralizasyon Tamponu P3 eklenmiş ve ters düz yapılarak homojenize edilerek 15 dakika buzda inkübe edilmiştir.
- 5) Süre bitiminde 20000xg 30 dakika 4°C’de santrifüj yapılmıştır. Bu esnada QIAGEN HP100 kolon 4ml Dengeleme Tamponu QBT ile dengelenmiştir.
- 6) Santrifüj sonrası süpernatantın tamamı şartlanan kolona eklenmiştir. Bu aşamada DNA’nın kolonu tutunması sağlanmaktadır.
- 7) Ardından kolon 2 kez 10ml Yıkama Tamponu ile yıkanmıştır.
- 8) Elüsyon için 5ml QF Tamponu kolondan geçirilmiş ve örnek steril falkon tüpe toplanmıştır.
- 9) Örnek üzerine 3.5ml saf izopropanol eklenerek 15000xg 30 dakika 4°C’de santrifüj yapılmıştır. DNA pelleti görülerek süpernatant uzaklaştırılmıştır.
- 10) Pellet üzerine 2ml %70’lik Molecular grade Etanol ilave edilmiş ve 15000xg 30 dakika 4°C’de santrifüj yapılmıştır.
- 11) Santrifüj sonrası DNA pelleti kurumaya bırakılmıştır. Elde edilen pellet 20µl ultra steril su ile çözülmüştür.

İzolasyon sonrasında Nanodrop ile plazmit konsantrasyonları ölçülmüştür.

3.3. Alt-klonlama ile Split-TurboID N- ve C- terminal Proteinlerini Kodlayan Rekombinant Klonların Oluşturulması

Hedeflenen pcDNA4/TO-FKBP-V5-Split TurboID N-NLS ve pcDNA3.1-HA-FRB-Split TurboID C-NLS rekombinant plazmitlerinin oluşturulması için ilk adım restriksiyon kesim bölgelerinden ilgili gen dizilerinin ve plazmitlerin kesime tabi tutulmasıdır.

pcDNA4/TO-FKBP-V5-Split-TurboID-N -NLS rekombinant plazmitinin oluşturulması için gerçekleştirilen alt-klonlama deneylerinde, ilgili gen bölgesi pEX klonlarından HindIII ve BamHI enzimleri ile kesilerek saflaştırılmış, sonrasında yine aynı enzimlerle kesilen pcDNA 4/TO vektörüne ligasyon yapılarak aktarılmıştır.

Öncelikle restriksiyon kesimlerinin gerçekleştirilmesi için ilgili gen dizisini içeren pEX-A128 plazmitinden ve hedeflenen pcDNA4/TO plazmitinden 500ng kalıp kullanılmıştır. İlk olarak HindIII restriksiyon enzimi ile kesim reaksiyonu kurulup 37°C Heatblock cihazında gece boyu inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası kesim ürünlerinin eldesi

ve BamHI restriksiyon enzimi ile kesiminin kurulabilmesi için Sodyum Asetat Çöktürmesi yapılmıştır. Bu protokolda sırasıyla;

- 1) Mikrosantrifüj tüp içerisindeki kesim ürünleri üzerine hacmi 90µl'ye tamamlayabilmek için distile su eklenip ardından 10µl 3M Sodyum Asetat eklenmiştir.
- 2) Mikrosantrifüj tüp üzerine 1.5ml çizgisine gelene kadar -20°C dolapta muhafaza edilen %100 Molecular grade Etil Alkol eklenerek -20°C dolapta 4 saat inkübe edilmiştir.
- 3) Süre bitiminde örnek 16000rpm 4°C'de 40 dakika santrifüj edilmiştir.
- 4) Süpernatant kısmı atılarak pellet üzerine %80 Molecular grade Etil Alkol eklenmiştir.
- 5) Tekrar santrifüj yapılmış ve süpernatant kısmı uzaklaştırılarak DNA pellet olarak elde edilmiştir.

Pelletler 17µl distile su ile çözülerek BamHI restriksiyon enzimi ile kesim reaksiyonu kurulmuş ve 37°C Heatblock cihazında gece boyu kesime tabi tutulmuştur.

İki restriksiyon kesiminin de tamamlanmasının ardından gen ürünlerinin eldesi için kesim ürünleri %1.5'lük Etidyum Bromursuz agaroz jelde ilgili gen ve plazmitin jelden geri kazanımın yapılabilmesi için referans kuyucukları da hazırlanarak yürütülmüştür. Referans kuyucuklarının olduğu agaroz jel kısmı bisturi ile kesilerek Etidyum Bromürlü solüsyonda 15 dakika inkübe edilmiş ve UV ışık altında görüntüsü alınmıştır (Şekil 4.1).

Sonucunda restriksiyon kesimlerinin doğruluğu kanıtlanmış ve jelden geri kazanım için uygun miktarda ürün eldesi Roche High Pure PCR Product Purification Kiti ve protokolu ile yapılmıştır. Protokol için aşağıdaki adımlar takip edilmiştir.

- 1) Geri kazanım yapılacak olan bantlar dikkatli bir şekilde bisturi yardımı ile kesilerek sterilmikrosantrifüj tüp içerisine alınmış ve hassas terazide tartılmıştır.
- 2) Mikrosantrifüj tüp içerisindeki jellerin üzerine 300µl Bağlama Tamponu eklenmiş ve 56°C Heatblock cihazında 12 dakika, her 2 dakikada bir ters-düz edilerek jel ile tampon homojenize edilmiştir.
- 3) Karışım üzerine 150µl izopropanol eklenerek kit içerisinde bulunan kolon üzerine alınmıştır.
- 4) Ardından 10000rpm 1 dakika oda sıcaklığında santrifüj edilerek kolon altında kalan kısım uzaklaştırılmıştır. DNA'nın kolona tutunması beklenmektedir.

- 5) Kolon üzerine 750µl Yıkama Tamponu eklenerek santrifüj yapılmıştır. Tekrar kolon üzerine 200µl Yıkama Tamponu eklenerek santrifüj tekrarlanmıştır.
- 6) Ardından kolon sterilmikrosantrifüj tüp üzerine alınarak 20µl ultra distile su eklenerek santrifüj tekrarlanmış ve DNA kolondan ayrılarak elde edilmiştir.

İlgili gen ürününün ve plazmitin restriksiyon enzimleri ile kesimlerinin tamamlanmasından ve jelden geri kazanımın yapılmasından sonra elde edilen ürünler tek bir mikrosantrifüj tüpte birleştirilmiş, ilgili gen ve plazmit DNA'sının pellet olarak elde edilmesi için SpeedVacsantrifüj cihazı kullanılarak suyun uzaklaştırılması sağlanmıştır. Ardından pelletin bulunduğu tüpe ligasyon kompetentleri eklenerek 16°C'de gece boyu inkübasyona bırakılmıştır.

Benzer şekilde, pCDNA3.1-HA-FRB-Split-TurboID C-NLS rekombinant plazmitinin oluşturulması için gerçekleştirilen alt klonlama deneylerinde, ilgili gen bölgesi pEX klonlarından BamHI ve EcoRI enzimleri ile kesilerek jelden geri kazanımları yapılmış, sonrasında yine aynı enzimlerle kesilen pCDNA 3.1 vektörüne ligasyonu gerçekleştirilmiştir.

Alt-klonlama deneylerinin başarısı seçilen rekombinant klonlardan izole edilen plazmitlerin klonlama deneylerinde kullanılan restriksiyon enzimleri ile kesilmesi ve doğru büyüklükte insörtlere agaroz jel elektroforezinde görülmesi ile doğrulanmıştır (Şekil 4.2 ve Şekil 4.4). Bu amaç doğrultusunda öncelikle ligasyon ürünlerinde 3 set olacak şekilde 3µl alınarak elektrotransformasyon ile *E.coli* XL1Blue elektrokompotent hücrelerine transformasyonu yapılmıştır. Elde edilen transforme hücrelerin seçimlerinin yapılabilmesi için 1:1000 oranında ampisilin içeren LB Agar besiyeri ortamlarına yayma ekimleri gerçekleştirilmiş ve 37°C etüvde koloni oluşumu için gece boyu bırakılmıştır. Rekombinant plazmitlerden pcDNA4/TO-FKBP-V5-Split TurboID N-NLS için oluşan kolonilerden 6 adet ve pcDNA3.1- HA-FRB-Split TurboID C-NLS için oluşan kolonilerden 3 adet seçilmiştir. Seçilen kolonilerin ampisilin içeren 2ml LB Broth sıvı besiyerine ekimi yapılarak 37°C çalkalayıcı etüvde gece boyu inkübe edilmiştir. Ardından QIAprep Spin Miniprep Kit ile plazmit izolasyonu yapılan kolonilerin ilgili gen dizilerinin içerip içermediği doğrulayabilmek için plazmitlerden 500ng kalıp kullanılarak ilgili restriksiyon kesim enzimleri ile kesime tabi tutulmuştur. Kesim ürünleri %1'lik EtBr'li Agaroz jelde yürütülmüş ve sonucunda rekombinant plazmitler doğrulanmıştır.

Rekombinant klonların doğrulanması sonrasında EndoFree PlasmidMaxiPrep kiti kullanılarak yüksek miktarda transfeksiyona hazır plazmit preparasyonları hazırlanmıştır. Bunun için doğrulanan kolonilerden birer adet seçilip 100ml'lik 1:1000 oranında ampisilin içeren LB Broth sıvı besiyerine ekim yapılarak 37°C çalkalayıcı etüvde gece boyu inkübe edilmiştir. Ertesi gün, santrifügasyon ile elde edilen hücre pelletlerinden EndoFree Plasmid MaxiPrep ile aşağıdaki protokol uygulanarak plazmit izolasyonu yapılmıştır.

- 1) Besiyerini uzaklaştırmak ve hücre pelletini elde etmek için çoğaltılan bakteriler 50ml'lik steril falkon tüpe toplanmış ve 3550rpm 20 dakika 4°C'de santrifüj yapılmıştır.
- 2) Hücre pelleti 10ml Resuspension Tamponu P1 ile çözülmüş ve 50ml'lik steril falkon tüpe alınmıştır.
- 3) Falkon tüp içerisine 10ml Lizis Tamponu P2 eklenmiş ve ters düz yapılarak 5 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır.
- 4) İnkübasyon sonrasında falkon tüp içerisine 10ml Nötralizasyon Tamponu P3 eklenmiş ve ters düz yapılmıştır.
- 5) Hazırlanan lizat, kit içerisinde çıkan QIA filter Maxi Cartridges filtreli kolon içerisine aktarılmıştır. Kolonun altında bulunan tıpa kapatılmış ve 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır.
- 6) Süre bitiminde hücre atıkların kolon üzerinde kalması sistemine dayanarak QIA Filter Plungers ile basınç uygulanarak lizat 50ml'lik steril falkon tüp içerisine filtre edilmiştir.
- 7) Falkon tüpe toplanan filtrelenmiş lizat üzerine endotoksinlerin uzaklaştırılması için 2.5ml ER Tampon eklenmiş ve ters düz edilerek 30 dakika buz üzerine inkübe edilmiştir.
- 8) Bekleme sırasında QIAGEN Tip filtreli kolon 10ml Dengeleme Tamponu QBT ile dengelenmiştir.
- 9) Şartlanan kolona inkübasyonu biten lizat eklenmiştir. Yer çekimi kuvveti ile akanlar atılmış, plazmit DNA'sının kolona tutunması sağlanmıştır.
- 10) Hücre atıkların uzaklaştırılması için kolon 2 defa 30ml QC Tampon ile yıkanmıştır.
- 11) Kolona tutunan plazmit DNA'sı 15ml Elüsyon Tampon QN ile 50ml'lik steril falkona toplanmıştır.
- 12) Elde edilen örnek üzerine 10ml izopropanol eklenerek 15000rpm 30 dakika 4°C'de santrifüj yapılmıştır.

- 13) Santrifüj sonrası supernatant uzaklaştırılmış ve DNA pellet olarak elde edilmiştir.
- 14) Pellet üzerine 5ml %70 Etil Alkol eklenmiş ve 15000rpm 10 dakika 4°C'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası supernatant uzaklaştırılmış ve DNA pellet olarak elde edilmiştir.
- 15) Elde edilen pellet uygun hacimde Endotoksin-free TE Tampon ile süspanse edilmiştir.

Konstrasyon ölçümü Nanodrop (Nücleic Acid programı) ile yapılmıştır.

3.4. Hek293T TetR+ Hücrelerinin Kültüre Edilmesi

HEK293T TetR+ hücre hattı ThermoScientific firmasından satın alınmış ve laboratuvarımızda firma tarafından tavsiye edilen koşullarda çoğaltılarak gerekli saklamaları alınmıştır. Bu hücreler tetrasiklin kontrolü altında protein ifadesine izin veren hücrelerdir. Bu hücrelerin kontrollü gen ifadesine izin verebilmesi için, hücreler TetR represör proteinini kodlayan pcDNA6/TR plazmiti ile transfekte edilmiş ve Blastasidin ile seçilimi yapılmıştır. Hücre kültürü deneylerinde kullanılan kimyasal maddeler ve kitler Tablo 3.1 ve Tablo 3.2'de verilmiştir.

3.4.1. Hücrelerin Çözülmesi

Saklama alınan hücrelerin çözülmesi için sıvı azot tankından çıkarılan vial 37°C'deki su banyosunda %80'i çözülünceye kadar tutulmuştur. Sonrasında hızlı davranılarak önceden steril bir falkon tüpte hazırlanmış %20 Tetrasiklini indirgenmiş FBS içeren yüksek glukozlu (%4.5) DMEM besiyeri ile süspanse edilmiştir. Ardından hücreler 1500xg'de oda sıcaklığında 5 dakika santrifüj edilmiştir. Üst sıvı atıldıktan sonra elde edilen hücre pelleti önceden hazırlanmış olan %10 Tetrasiklin indirgenmiş FBS, 100µg/ml Penisilin/Streptomisin, 2mM L-Glutamin, 5µg/ml Blastasidin içeren DMEM besiyerinde süspanse edilerek 100mm'lik hücre kültür kaplarına aktarılmıştır. Kültür kapları, 37°C'deki nemlendirilmiş %5 CO₂'li etüvde inkübasyona alınmıştır.

3.4.2. Hücrelerin Pasajlanması

İnkübasyon süresince kültür kaplarında büyüyen hücreler yaklaşık %80 yoğunluğa ulaştıklarında 3 kat daha geniş alana geçilecek şekilde pasajlanmıştır. Bu işlem için hücrelerden besi yeri uzaklaştırılmış ve hücreler 3 kez PBS solüsyonu ile yıkanmıştır.

Yüzeye tutunan hücrelerin kaldırılması için yaklaşık 1ml Tripsin/EDTA (% 0,05) çözeltisi petri yüzeyine eklenmiş ve 37°C'de 4 dakika süre ile inkübasyona alınmıştır. Süre sonunda hücreler 10ml PBS ile toplanarak steril falkon tüpe alınmış ve 1500xg'de oda sıcaklığında 5 dakika süresince santrifüj edilmiştir. Üst sıvı atılarak elde edilen hücre pelleti taze hazırlanan besiyeri ile süspanse edilip uygun yeni petri kültür kaplarına aktarılmıştır. Hücreler 37°C'deki nemlendirilmiş %5CO₂'li etüvde inkübasyona alınmıştır.

3.4.3. Hücrelerin Dondurulması

Uygun morfolojiye ve yoğunluğa sahip hücrelerden saklama alınması için %20 Tetrasiklin indirgenmiş FBS, %70 hücrelerin içerisinde büyüdükleri filtre edilmiş besiyeri, %10 DMSO içeren dondurma besiyeri kullanılmıştır. Dondurma işlemi için hücreler 3 kez PBS ile yıkanmıştır. Yüzeye tutunan hücrelerin kaldırılması için %0,05 Tripsin/EDTA çözeltisi ile 37°C'de 4 dakika süre ile muamele edilmiştir. İnkübasyon süresi bitiminde hücreler 10ml PBS solüsyonu ile toplanarak steril falkon tüpe alınmış ve 1500xg'de oda sıcaklığında 5 dakika santrifüj edilmiştir. Üst sıvı atılarak elde edilen hücre pelleti hazırlanan dondurma besiyeri ile süspanse edilmiş ve kriyotüplere alınmıştır. Etiketlenen kriyotüpler uygun donma ortamının sağlanabilmesi için Mr. Frosty dondurma kabına (Thermoscientific, ABD) alınarak bir gece boyunca -80C'de donmaya bırakılmış ve ertesi gün gerektiğinde kullanılmak üzere sıvı azot tankına aktarılmıştır.

3.4.4. Hücre Sayımı

Hücre sayımı için Tripan mavi boyasından yararlanılmıştır. Canlı hücreler yüksek moleküler ağırlığa sahip olan Tripan mavi boyasını içine almamaktadır. Boyayı içerisine alan hücreler ölü olarak kabul edilmektedir. Hücre sayımı için Thoma Sayım Lamı kullanılmıştır. Sayım işlemi için aşağıdaki adımlar izlenmiştir.

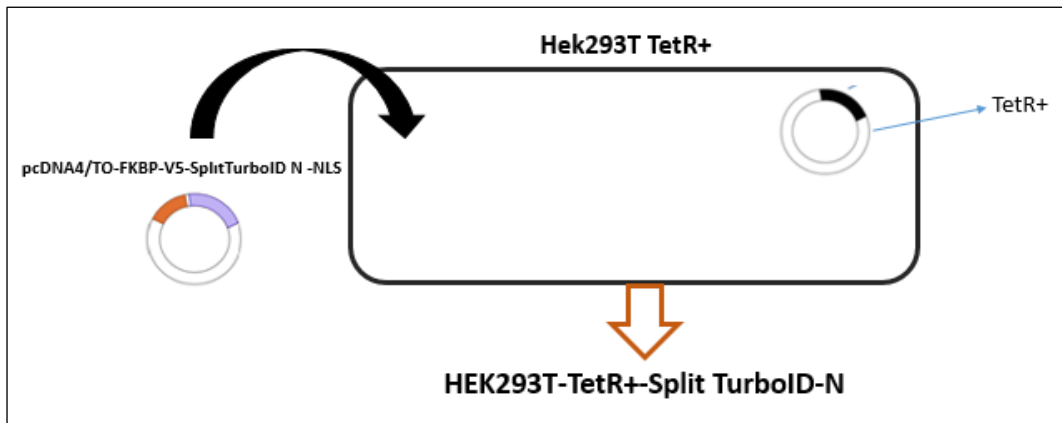
- 1) Hücreler besiyerinden uzaklaştırılmış ve 3 kez PBS ile yıkanmıştır.
- 2) Yüzeye tutunan hücrelerin kaldırılması için yaklaşık 1ml Tripsin/EDTA (%0,05) solüsyon homojenize olacak şekilde petri yüzeyine eklenmiş ve 37°C'de 4 dakika süre ile inkübasyona alınmıştır. Süre sonunda hücreler 10ml PBS solüsyonu ile toplanarak steril falkon tüpe alınmış ve 1500rpm oda sıcaklığında 5 dakika santrifüj edilmiştir.

- 3) Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılmış ve hücreler 2ml PBS solüsyonu ile çözülmüştür.
- 4) Ardından 50µl süspanse hücre pipet yardımıyla temiz bir mikrosantrifüj tüpe aktarılmıştır.
- 5) Mikrosantrifüj tüp üzerine 250µl Tripan mavi boyası eklenmiş ve hücreler ile boya iyice homojenize edilmiştir.
- 6) Karışımdan 10µl alınarak Thoma sayım lamında sayım sahasına aktarılmıştır.
- 7) Hücreler Olympus CKX41 inverted mikroskop ile görüntülenerek canlı hücrelerin sayımı gerçekleştirilmiştir.

Sayım sonunda 1 ml'deki hücre sayısı; thoma lamı içerisinde sayılan hücre sayısı, dilüsyon oranı ve 10000 çarpımı ile hesaplanmaktadır.

3.4.5. HEK293T TetR+ Hücre Hattına pcDNA4/TO-FKBP-V5-Split TurboID N-NLS Rekombinant Plazmitinin Transfeksiyonu ve Stabil Hücre Hattının Oluşturulması

HEK293T TetR+ hücrelerine pCDNA4/TO-FKBP-V5-Split TurboID N-NLS rekombinant plazmiti Neon Transfeksiyon sistemi kullanılarak üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda transfekte edilmiştir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. HEK293T TetR+ hücre hattına pcDNA4/TO-FKBP-V5-Split TurboID N-NLS plazmitinin transfeksiyonu şematik gösterimi

Neon transfeksiyon işlem için aşağıdaki protokol takip edilmiştir.

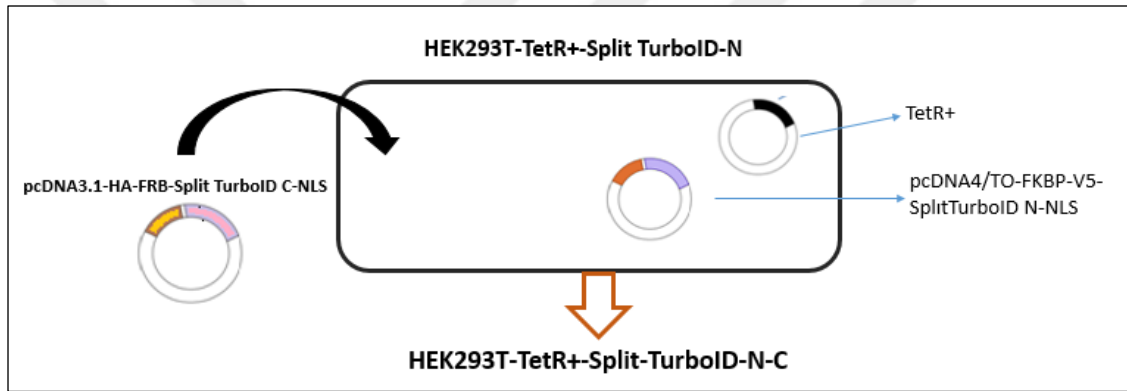
- 1) Uygun yoğunlukta ve morfolojide olan hücreler, besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra 3 kez PBS ile yıkanmıştır.
- 2) Yüzeye tutunan hücrelerin kaldırılması için yaklaşık 1ml Tripsin/EDTA (%0,05) çözeltisi petri yüzeyine eklenmiş ve 37°C’de 4 dakika süre ile inkübasyona alınmıştır.
- 3) İnkübasyon sonrası Tripsin EDTA aktivitesi Tetrasiklin indirgenmiş FBS ile durdurularak hücreler sayımı yapılmıştır. Sonucunda 1.3×10^7 hücre/ml olacak şekilde hücre ayrı bir steril 15ml’lik falkon tüpe alınmış ve 1500rpm oda sıcaklığında 5 dakika santrifüj edilmiştir. Üst sıvı atılarak elde edilen hücre pelleti 2 kez PBS solüsyonu ile yıkanmıştır.
- 4) Yıkamaların ardından tekrar santrifüj sonrası elde edilen hücre pelleti 100µl Resuspansiyon Tampon R ile çözülmüştür. Bu sırada pipet istasyonundaki Neon tüp içerisine 3ml Elektrolitik Tampon E2 konulmuştur.
- 5) Steril mikrosantrifüj tüpte süspanse edilen hücreler üzerine hazırlanan uygun miktardaki (30-50ng) rekombinant plazmit DNA’sı eklenmiş ve yavaşça pipetaj yapılarak homojenize edilmiştir.
- 6) Neon tip pipete takılarak plazmit-hücre karışımı çekilmiş ve pipet istasyonuna oturtularak Hek293T hücreleri için uygun olan programda transfeksiyon gerçekleştirilmiştir.
- 7) Transfekte edilen hücreler önceden hazırlanmış antibiyotiksiz besiyeri (%10 Tetrasiklin indüklenmiş FBS, 2 mM L-Glutamin içeren DMEM) ortamına alınmış ve ekim yapılarak 37°C’deki nemlendirilmiş %5 CO₂’li etüvde inkübasyona bırakılmıştır.
- 8) Ertesi gün besi yeri ortamına 100µg/ml Penisilin/Streptomisin, Blastasidin (5µg/ml) ve Zeosin (50µg/µl) antibiyotikleri eklenmiştir.

Tranfeksiyon sonrası rekombinant plazmiti alan hücrelerin seçiliminin sağlanabilmesi için besiyeri ortamına Zeosin (50µg/µl) eklenmiştir. Hücreler 37°C’deki nemlendirilmiş %5 CO₂’li etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Yaklaşık 3 haftalık bir seçim süreci sonrasında kültür kabı yüzeyinde oluşan hücre klonları plastik silindirler yardımı ile 24 kuyucuklu kültür kaplarına, burada çoğalan hücreler 2cm’lik kültür kaplarına ve orada büyüyen hücreler de 5cm’lik kültür kaplarına alınmıştır. Bu kaplarda çoğalan klonların protein ifadesi doğrulandıktan sonra doğrulanan kolonilerden bir tanesi (Koloni 3) seçilerek, bu koloniye

HEK293T-TetR+-SplitTurboID-N adı verilmiştir. Bu koloni Split-TurboID enzimin diğer domaini olan C ucunun transfeksiyonu için kültüre edilerek çoğaltılmıştır.

3.4.6. HEK293T 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

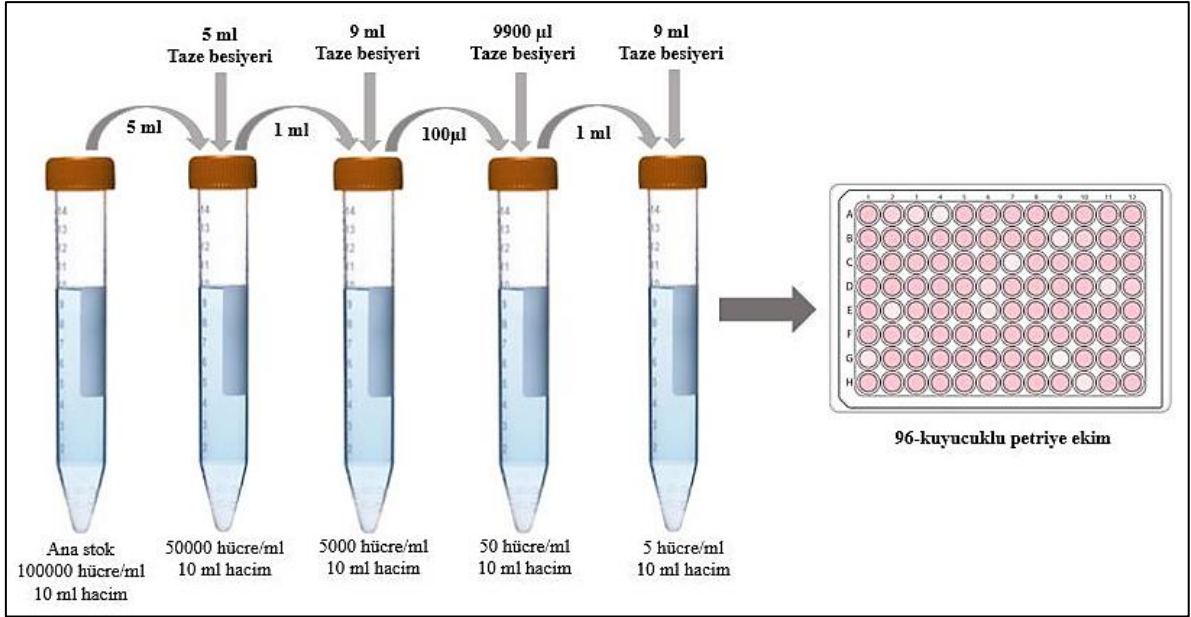
HEK293T-TetR+-SplitTurboID-N hücre hattında Split-TurboID enziminin C-ucunu ifade edebilmek için bu hücelere Neon Transfeksiyon Kiti ve üreticinin tavsiye ettiği protokol uygulanarak pcDNA3.1-HA-FRB-Split TurboID-C -NLS rekombinant plazmiti transfeke edilmiştir. Transfeksiyonun şematik gösterimi Şekil 3.4’de verilmiştir.



Şekil 3.4. HEK293T TetR+_pcDNA4/TO-FKBP-V5-Split TurboID N-NLS hücre hattına pcDNA3.1- HA-FRB-Split TurboID C-NLS plazmitinin transfeksiyonu şematik gösterimi

Transfekte edilen hücrelerin seçiliminin yapılabilmesi için besiyeri yerine diğer besiyeri komponentleri ve antibiyotiklerine ek olarak Genetisin (700µg/ml) antibiyotiği eklenmiştir. Hücreler 37°C’deki nemlendirilmiş %5 CO₂’li etüvde inkübasyona bırakılmıştır.

Hücrelerin seçimleri esnasında PBS ile yıkamalar ve besiyeri değişimleri yapılarak ölü hücreler kültür ortamında uzaklaştırılmıştır. Yaklaşık 3 haftalık bir seçim süreci sonrasında kültür kabı yüzeyinde oluşan hücre klonları plastik silindirler yardımı ile toplanmak istenmiş, ancak oluşan koloni sayısının çok fazla olması ve tek klon seçimine izin vermemesi nedeni ile monoklonal stabil kolonlar elde edebilmek için Seri Dilüsyon Protokolü aşağıdaki aşamalar takip edilerek gerçekleştirilmiştir. Ayrıca Şekil 3.5’de şematik gösterimi verilmiştir.



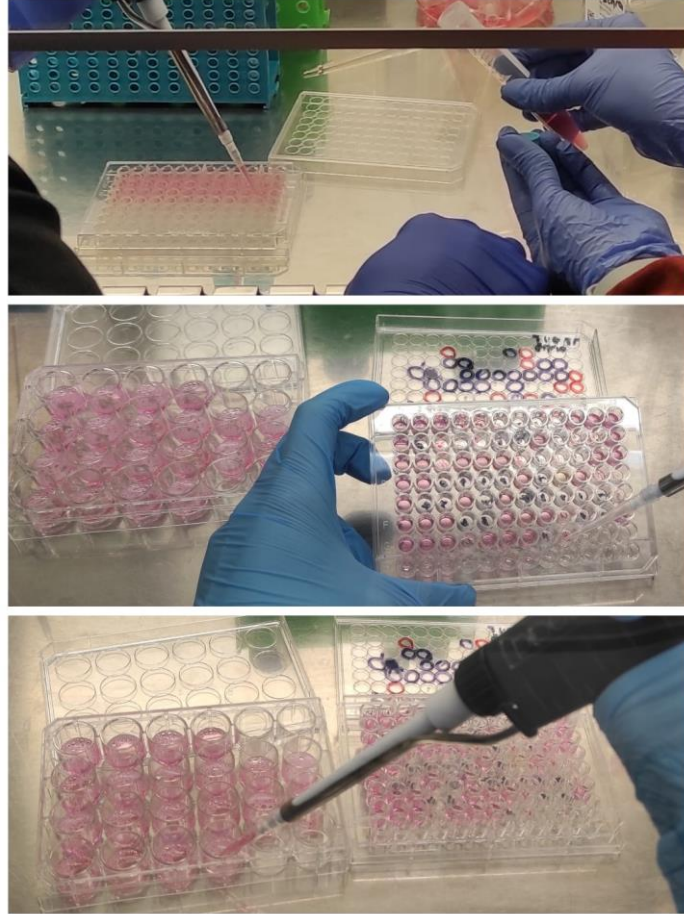
Şekil 3.5. Tek koloni düşürmek için seri dilüsyon protokolü şematik gösterimi

Tek koloni düşürmek için seri dilüsyon protokolü için aşağıdaki aşamalar takip edilmiştir.

- 1) Kültür ortamından besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra hücreler 3 kez PBS solüsyonu ile yıkanmıştır.
- 2) Yüzeye tutunan hücrelerin kaldırılması için yaklaşık 1ml Tripsin/EDTA (%0,05) solüsyonu homojenize olacak şekilde petri yüzeyine eklenmiş ve 37°C’de 4 dakika süre ile inkübasyona alınmıştır. Süre sonunda hücreler 10ml PBS solüsyonu ile toplanarak steril falkon tüpe alınmış ve 1500rpm oda sıcaklığında 5 dakika santrifüj edilmiştir.
- 3) Üst sıvı atılarak elde edilen hücre pelleti 2ml PBS solüsyonu ile süspanse edilmiştir. Ardından tripan blue boyası ile hücre sayımı yapılmıştır.
- 4) Ana stok için gerekli olan 100000 hücre/ml steril falkon tüpe alınarak 10ml’ye taze besiyeri eklenerek tamamlanmıştır.
- 5) Ana stoktan 5ml alınıp üzerine 5ml taze bersiyeri eklenerek 50000 hücre/ml elde edilmiştir.
- 6) Ardından 50000 hücre/ml içeren falkon tüpten 1ml alınıp 9ml taze besiyeri eklenerek 5000 hücre/ml elde edilmiştir.
- 7) Elde edilen 5000 hücre/ml içeren falkon tüpten 100µl alınıp 9900µl taze besiyeri eklenerek 50 hücre/ml elde edilmiştir. Bu oran ise 96-kuyucuklu petride 5hücre/kuyu olacak şekilde hesaplanmış ve bir sonraki dilüsyon için gerekli miktar ayrılarak kalan

hücreler 96-kuyucuklu petriye ekimi yapılmıştır. 37°C'deki %5 CO₂'li etüvde inkübasyona bırakılmıştır.

- 8) Son olarak 50hücre/ml içeren falkon tüpten 1ml alınıp 9ml taze besiyeri eklenerek 5hücre/ml elde edilmiştir. Bu oran ise 96-kuyucuklu petride 0.5hücre/kuyu olacak şekilde hesaplanmış ve 96-kuyucuklu petriye ekimi yapılmıştır. 37°C'deki %5 CO₂'li etüvde büyümeye bırakılmıştır.



Şekil 3.6.Seri dilüsyonları yapılan hücrelerin ilgili petrilere ekimlerinin yapılması

Hücre klonları seri dilüsyon yapılarak her bir kuyucuğa tek bir hücre düşmesi sağlanacak şekilde önce 96 kuyucuklu kültür kaplarına, burada çoğalan hücreler 24 kuyucuklu kültür kaplarına ve orada büyüyen hücreler de 5cm'lik kültür kaplarına alınmıştır (Şekil 3.6). Protein ifadesi doğrulanan kolonilerden en iyi protein ifadesi gözlemlenen koloni seçilerek, bu koloniye HEK293T-TetR+-Split-TurboID-N-C adı verilmiştir. Bu klon Split-TurboID enzimin hem N hem de C uçlarını ifade edebilmektedir. Elde edilen koloni çoğaltılarak saklamaları alınmıştır.

3.4.7. Split-TurboID enzimin N ve C Uçlarının İfadelerinin Ve Lokalizasyonlarının Doğrulanması

HEK293T-TetR+-Split-TurboID-N-C hücre hattında Split TurboID enziminin N ve C terminali füzyon proteinlerin ekspresyonlarının ve lokalizasyonlarının doğrulanması için gen dizisi tasarımı sırasında diziye eklenen V5 ve HA etiketlerinden yararlanılmıştır. Hem Western Blotlama hem de immünfloresan yöntemleri kullanılarak Split-TurboID N- ve C-uçlarının ifade edildikleri ve çekirdeğe lokalize oldukları doğrulanmıştır.

Split-TurboID N- ve C- uçlarının HEK293T-TetR+-Split-TurboID-N-C hücre hattında ifadesi

Split-TurboID N- ucunun HEK293T-TetR+-Split-TurboID-N-C hücre hattında ifadesi için hücrelerin bulunduğu besi yerine Tetrasiklin (0.1mg/ml) eklenmiş ve Tet-ON sisteminin açılması sağlanmıştır. İndükleme işleminden sonra hücreler 24 saat boyunca 37°C'deki %5 CO₂'li etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Split TurboID C-ucu sürekli olarak eksprese edildiği için bu proteinin ifadesinde herhangi bir indükleme işlemine gerek duyulmamıştır.

3.4.7.1. Protein Özütlerinin Hazırlanması ve Bradford Yöntemi İle Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Protein özütleri aşağıda verilen protokol takip edilerek 2D Rehidrasyon Tamponu içerisinde hazırlanmıştır. Elde edilen protein özütlerinin konsantrasyonu Bradford yöntemi kullanılarak ölçülmüştür.

Hücrelerden 2D Rehidrasyon Tamponu ile protein özütlerinin elde edilebilmesi için aşağıdaki adımlar sırasıyla takip edilmiştir.

- 1) Hücreler besi yeri uzaklaştırıldıktan sonra 3 kez PBS solüsyonu ile yıkanmıştır. Yüzeye tutunan hücrelerin petri kabından ayrılması için için yaklaşık 1ml Tripsin/EDTA (%0,05) solüsyon homojenize olacak şekilde petri yüzeyine eklenmiş ve 37°C'de 4 dakika süre ile inkübasyona alınmıştır. Süre sonunda hücreler 10ml PBS solüsyonu ile toplanarak steril falkon tüpe alınmış ve 1500rpm oda sıcaklığında 5 dakika santrifüj edilmiştir.
- 2) Üst kısım atılarak hücre pelleti 2D Rehidrasyon Tamponu ile süspanse edilmiştir ve 0.2mm paslanmaz çelik boncuklar ile Bullet Blender cihazı (NextAdvance, Troy, NY) kullanılarak parçalanmıştır.

- 3) Ardından boncuklardan kurtulmak ve protein özütünün elde edilmesi için 10000 rpm 4°C’de 2 kez 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısmı protein özütü olarak temiz bir mikrosantrifüj tüpe aktarılmıştır.

Elde edilen protein özütünün konsantrasyonu Bradford yöntemi ile belirlenmiştir. Bu yöntem için kullanılan boya, proteinlerin amino asit dizilerinin affinite gösterdiği amino asitlerle öncelikle arjinin olmak üzere etkileşime girerek renk değişimine sebebiyet vermektedir. Meydana gelen renk değişikliği ise spektrofotometrik okuyucuda 595 nm dalga boyunda protein örneğinin konsantrasyonunun belirlenmesini sağlamaktadır. Protein konsantrasyonunun hesaplanması, sığır serum albümin protein (BSA) çözeltisinin farklı konsantrasyonlarının absorbans değerleri baz alınması ile yapılmaktadır. Bu işlem için Bradford Assay boyası (BioRad) 1:5 oranında seyreltilip filtre kağıdından geçirilerek kullanılmaktadır. Protein örneği temiz ependorf içerisinde 1:20 oranında 2D Rehidrasyon tamponu ile seyreltilerek üzerine 980µl Bradford boyası eklenmiştir. Analiz için kör solüsyon olarak protein örneği içermeyen tampon- boya karışımı kullanılmıştır. Örneklerin absorbansı 595nm’de Nanodrop cihazı ile 3 tekrar olacak şekilde ölçülmüş ve BSA standart eğrisine göre konsantrasyonları belirlenmiştir.

3.4.7.2.SDS-PAGE Jel Elektroforezi

Jellerin hazırlanacağı camlar %70’lik etil alkol ile temizlenerek kasete yerleştirilmiştir. Tablo 3.3’de verilen solüsyonlar ve miktarları göz önüne alınarak %12’lik ayırıcı jel ve % 4’lük istifleme jeli hazırlanmıştır. Hazırlanan % 12’lik ayırıcı jel pipet ile iki cam arasındaki 1mm boşluktan dökülmüş ve jelin üst yüzeyinin düz bir şekilde polimerleşmesi için jel üzerine az miktarda (200µl) izopropanol pipet yardımıyla eklenmiş ve jelin polimerleşmesi için beklenilmiştir. Polimerleşme sonrası izopropanol su ile yıkanarak uzaklaştırılmış ve % 4’lük istifleme jeli dökülerek, jel üzerine 1.0mm’lik kuyucuklu tarak yerleştirilerek polimerleşme sürecinde kuyucukların oluşması sağlanmıştır.

Tablo 3.3. SDS-PAGE jel solüsyonları içerikleri ve miktarları

%12'lik Ayırıcı Jel solüsyonu içeriği ve miktarları	
Distile su	3.3 ml
1.5M Tris-HCl (pH 8.8)	2.5 ml
%30 Akrilamid-Bis akrilamid	4 ml
%10 SDS	100 µl
%10 APS	100 µl
TEMED	5 µl
%4'lük İstifleme Jel solüsyonu içeriği ve miktarları	
Distile su	3 ml
0.5M Tris-HCl (pH 6.8)	1.25 ml
%30 Akrilamid-Bis akrilamid	670 µl
%10 SDS	50 µl
%10 APS	50 µl
TEMED	5 µl

Hazırlanan jel elektroforez tankı içerisine yerleştirilmiştir. Örneklerden 20 µg kalıp olacak şekilde alınarak jele yüklenmek için 6X protein yükleme tamponu ile mikrosantrifüj tüp içerisinde karıştırılmış ve 95°C'de 5 dakika inkübe edilerek proteinlerin denatüre edilmesi sağlanmıştır. Jelin ilk kuyucuğuna eğer amaç sadece molekül ağırlık belirlemek veya protein kalitesi belirlemek ise renksiz marker protein standartları eğer Western Blot analizi yapmak ise önceden renklendirilmiş marker protein standartları yüklenmiştir. Analiz edilmesi planlanan protein örnekleri uygun sıralama ile kuyucuklara yüklendikten sonra elektroforez tankı 1X Yürüme tamponu ile doldurulmuş ve sistem 180 Voltta çalıştırılarak jel 50 dakika yürütülmüştür. Süre bitiminde SDS-PAGE jelinin görüntüsünün alınması için jel camlar arasından dikkatlice çıkartılmış ve fiksatif solüsyonunda minimum 1 saat çalkalayıcı üzerinde fikse edilmiştir. Ardından Colloidal Commassie Mavisi boya solüsyonu içerisinde gece boyu çalkalayıcı üzerinde bırakılmıştır. Jeller üzerinde protein bantlarının tamamı görüldükten sonra fazla boya distile su ile arındırılmıştır. Jellerin görüntüsü VersaDoc 4000 MP görüntüleme cihazı ile alınmış ve kaydedilmiştir.

3.4.7.3. Western Blotlama Deneyleri

Split-TurboID N- ve C- uçlarının HEK293T-TetR+-Split-TurboID-N-C hücre hattında ifade edildiklerini doğrulayabilmek için Western Blotlama analizleri yapılmıştır. Enzimin

N- ucunun ifadesi anti-V5 etiketine karşı geliştirilen antikor kullanılarak ve C ucunun ifadesi anti-HA etiketine karşı geliştirilen antikoru kullanılarak gösterilmiştir. Western Blotlama deneylerinde takip edilen deneysel aşamalar aşağıda verilmiştir.

Western Blot deneyi için örnekler %12'lik SDS-PAGE jelde yürütüldükten sonra aşağıdaki adımlar takip edilmiştir. Trans-Blot Turbo (BioRad) yarı-kuru transfer sistemi ile proteinlerin membrana transferi gerçekleştirilmiştir.

- 1) Kullanılan filtre kağıtları, nitroselüloz membran ve jel Transfer Tamponu ile ıslatılmıştır. Transfer kaset içerisine sırasıyla filtre kağıdı, membran, jel ve filtre kağıdı konulmuş ve üzerinden rulo ile geçilerek transferi engelleyebilecek hava kabarcıkları uzaklaştırılmıştır.
- 2) Transfer kaseti cihaza yerleştirilerek 25 voltta 30 dakika süre ile transfer gerçekleştirilmiş ve sonunda transferin gerçekleşip gerçekleşmediğini kontrol etmek için membran Ponceau S boyası ile boyanmıştır.
- 3) Ardından membran %5'lik Süt tozu içeren TBS-T tamponu içerisine alınarak 1 saat inkübe edilmiştir.
- 1) Bloklama sonrası membran 3 kez 10 dakika TBS-T tamponu ile yıkanmıştır.
- 2) Yıkamalar sonrası kullanılan birincil antikor TBS-T tamponu içerisinde uygun dilüsyonu ayarlanarak membran gece boyu 4°C'de birincil antikor inkübasyonuna bırakılmıştır.
- 3) Ertesi gün membran 3 kez 10 dakika TBS-T tamponu ile yıkanmıştır ve ikincil antikor TBS-T tamponu içerisinde uygun dilüsyonu ayarlanarak 1 saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır.
- 4) Antikor muameleleri sonrası 3 kez 10 dakika TBS-T tamponu ile membran yıkanmıştır.
- 5) Protein bantlarının görüntüsü alınmasında HRP enziminin X-ray film üzerinde görüntüsünün alınabilmesi için membran Biorad ECL ile muamele edilmiş ve görüntü alınmıştır.

3.4.7.4.İmmünfloresan Mikroskopisi Yöntemi ile Split-TurboID N- ve C- uçlarının HEK293T-TetR+-Split-TurboID-N-C Hücre Hattında Lokalizasyonlarının Doğrulanması

Split-TurboID N- ve C- uçlarının HEK293T-TetR+-Split-TurboID-N-C hücre hattında ifadelerinin doğrulanması ve lokalizasyonların belirlenebilmesi için Western Blotlama

deneylerine ek olarak İmmünfloresan deneyleri de yapılmıştır. Enzimin N- ucunun çekirdekte ifadesinin ve lokalizasyonunun görüntülenebilmesi için V5 etiketine karşı geliştirilmiş monoklonal bir antikoru ve C- ucunun çekirdekte ifadesinin ve lokalizasyonunun görüntülenebilmesi için HA etiketine karşı geliştirilmiş monoklonal bir antikoru kullanılmıştır.

Yapılan tüm İmmünfloresan deneyleri için kullanılan protokol ve antikorların ve malzemelerin listesi Tablo 3.1’de verilmiştir.

İmmünfloresan deneyi için aşağıdaki aşamalar takip edilmiştir.

- 1) Hücrelerin büyümesi sırasında petri kabının yüzeyine yerleştirilen coverslipler steril cımbız yardımı ile alınmış ve 3 kez PBS solüsyonu ile yıkanmıştır.
- 2) Hücrelerin coverslip üzerine fiksasyonu için %4'lük Formaldehit ile 20 dakika inkübe edilmiştir. Ardından 3 kez 5 dakika süre ile PBS ile yıkama yapılmıştır.
- 3) Fiksatifin sonlandırılması için 50mM Amonyum Klorid ile 5 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda 3 kez 5 dakika süre ile PBS ile yıkama yapılmıştır.
- 4) Ardından coversliplerin üzerine %0.5 Triton X-100 eklenmiş ve 2 dakika muamele edilmiştir. Sonrasında 3 kez 5 dakika süre ile PBS ile yıkama yapılmıştır.
- 5) Hedef proteinlerin lokalizasyonlarının belirlenmesi için Primer antikor uygulaması yapılmış ve 1 saat inkübe edilmiştir. Anti-V5 etiket antikor için 1:100 dilüsyon ve anti-HA etiket antikor için 1:50 dilüsyon kullanılmıştır. Süre bitiminde 3 kez 5 dakika süre ile PBS ile yıkama yapılmıştır.
- 6) Ardından Anti Mouse Texas Red 1:500 dilüe edilerek kullanılmış ve 45 dakika karanlıkta inkübe edilmiştir. Süre bitiminde PBS solüsyonu ile 3 kez 5 dakika süre ile yıkamalar yapılmıştır.
- 7) Çekirdeğin görüntülenebilmesi için DAPI (1:20000 oranında) kullanılarak 10 dakika karanlıkta muamele edilmiştir.
- 8) Son olarak coverslipler PBS ile yıkanıp, ultra saf su ile kirliliklerden uzaklaştırılarak Prolong diamond Antifade Mountant solüsyon ile lam-cover slip arasında hücreler olacak şekilde kapatılmıştır.

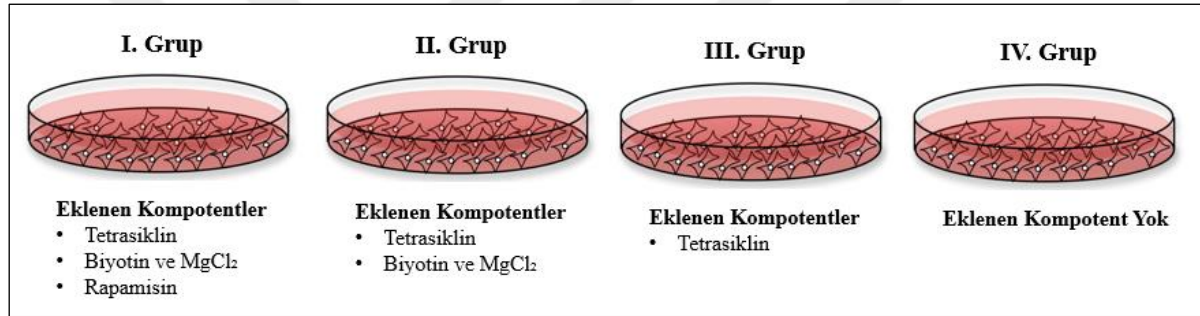
Olympus CKX41 inverted mikroskopta hücrelerin görüntüsü alınmıştır.

3.4.8. Füzyon Protein Etkileşimlerinin Doğrulanması

Füzyon protein tasarımlarında eklenen FKBP ve FRB proteinlerinin Rapamisin varlığında bir araya gelerek Split TurboID domainlerinin etkileşimini sağlayıp sağlamadığı ve istenilen aktif TurboID biyotin ligaz enziminin oluşumunu tetikleyip tetiklemediğini gösterebilmek için Tablo 3.4’de özetle sunulan ve Şekil 3.7’de gösterilen deneyler gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.4.Besiyeri ortamına eklenen kompotentlerin gösterildiği çalışma grupları

Komponentler	I.Grup	II.Grup	III.Grup	IV.Grup
Tetrasiklin (0.1mg/ml)	+	+	+	-
Biyotin (50uM) ve MgCl ₂ (500mM)	+	+	-	-
Rapamisin (100nM)	+	-	-	-



Şekil 3.7.Füzyon protein etkileşimlerinin doğrulanması çalışma grupları şematik gösterimi

Çalışma gruplarına belirtilen komponentler eklendikten sonra hücreler 24 saat boyunca 37°C’deki % 5 CO₂’li etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Ardından 2D Rehidrasyon tamponu içerisinde hücreler lizise uğratarak protein özütleri hazırlanmış ve Bradford yöntemi ile konsantrasyon tayini yapılmıştır. Hücrelerden elde edilen protein özütlerinden eşit miktarda protein alınarak %12’lik SDS-PAGE jelleri yürütülmüştür. Ardından Western Blotlama deneyi ile nitroselüloz membrana transferi yapılan protein örneklerinde Streptavidin-HRP konjugatı kullanılarak biyotininilasyon profilleri görüntülenmiştir.

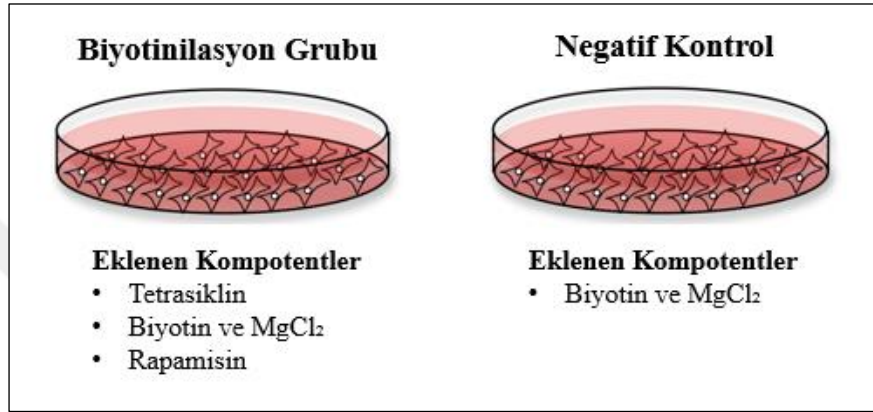
3.5.Nükleer Proteinlerin Biyotinile Edilmesi

3.5.1. Hücre Kültüründe Biyotininilasyon Reaksiyonunu Kurulması

HEK293T-TetR+-Split-TurboID-N-C hücre hattında çekirdek proteinlerinin biyotininilasyonunu gerçekleştirebilmek için Tablo 3.5’deözetle verilen ve Şekil 3.8’de gösterilen biyotininilasyon reaksiyonları kurulmuştur.

Tablo 3.5. HEK293T-TetR+-Split-TurboID-N-C hücre hattında çekirdek proteinlerinin biyotininilasyonunun gösterilmesi için yapılan deney tasarımı

Gruplar	Besiyerine Eklenen Kompotentler
Biyotininilasyon Grubu	• Tetrasiklin (0.1mg/ml) • Biyotin (50uM) ve MgCl₂ (500mM) • Rapamisin (100nM)
Negatif Kontrol	• Biyotin (50uM) ve MgCl₂ (500mM)



Şekil 3.8. Biyotininilasyon reaksiyonu grupları şematik gösterimi

Belirtilen kompotentlerin eklendiği Biyotininilasyon Grubu ve Negatif Kontrol hücreleri 24 saatlik inkübasyon süresinin sonunda 3 kez PBS solüsyonu ile yıkanarak Tripsin EDTA (%0.05) ile petri yüzeyinden kaldırılmıştır. Hücreler PBS solüsyonu ile steril falkon tüpler içerisine toplanarak 1500xg’de oda sıcaklığında 5 dakika santrifüj edilmiş ve hücre pelletleri elde edilmiştir.

3.5.2. RIPA Tamponu İle Protein Özütlelerinin Hazırlanması

Reaksiyon sonrası elde edilen hücre pelletleri 300µl RIPA tamponu ile süspanse edilmiştir. Hücreler süspansiyon sırasında safe-lock mikrosantrifüj tüplere alınmış ve üzerlerine 0.2mm paslanmaz çelik boncuklar eklenerek Bullet Blender cihazı (NextAdvance, Troy, NY) ile parçalanmıştır. Boncukları uzaklaştırmak ve protein özütlelerinin elde edilmesini sağlamak için lizatlar 10000xg 4°C’de 2 kez 10 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant kısımları temiz tüplere aktarılmıştır. Elde edilen protein özütünün konsantrasyonu Bradford yöntemi ile ölçülmüş ve SDS-PAGE analizi ile protein kalitesi kontrol edilmiştir.

3.6. Biyotinile Proteinlerin Zenginleştirilmesi ve Zenginleştirilmenin Doğrulanması

Biyotinilasyon grubu ve Negatif Kontrol hücrelerinden hazırlanan protein özütlerinden eşit miktarda alınarak öncesinde 2 defa RIPA tamponu ile yıkanmış streptavidin kaplı boncuklarla 4°C’de gece boyu inkübasyona bırakılmıştır. Ardından boncuklar iki kez RIPA tamponu, bir kez 1M KCl, bir kez 0.1M Na₂CO₃, bir kez içerisinde 2M üre bulunan 10mM Tris-HCl ve iki defa RIPA tamponu ile yıkanmıştır. Üzerine 100µl Elüsyon Tamponu (içeriği Tablo 3.2’de verilmiştir) eklenen boncuklar 95°C sıcaklıkta 5 dakika inkübe edilmiş ve biyotinile proteinlerin bulunduğu elüsyon fraksiyonu temiz bir mikrosantrifüj tüpüne alınmıştır.

Zenginleştirilmenin gerçekleştiğinin doğrulanması için Negatif Kontrol ve Biyotinilasyon Grubu fraksiyonlarından eşit hacim protein alınarak %12’lik SDS-PAGE jelde yürütüldükten sonra 1:3000 oranında dilue edilmiş Streptavidin-HRP konjugatı kullanılarak Western Blotlama deneyi yapılmıştır. Zenginleştirilmenin başarıyla gerçekleştirildiği görülmüştür.

3.6.1. İmmüfloresan mikroskopi ile Biyotinile Proteinlerin Çekirdekte Lokalize Olduklarının Gösterilmesi

Split-TurboID tarafından HEK293T-TetR+-Split-TurboID-N-C hücrelerinde biyotinile edilen proteinleri çekirdekte lokalize olduklarının gösterilmesi için Biyotinilasyon grubu ve Negatif Kontrol hücrelerinde detayları aşağıda verilen immüfloresan mikroskopi deneyleri yapılmıştır. Bu amaçla biyotini bağlayan Texas red-boyası konjuge edilmiş Neutravidin kullanılmıştır. Hücrelerin çekirdekleri ayrıca DAPI ile işaretlenmiş ve hücreler Olympus CKX41 inverted mikroskop kullanarak incelenmiştir.

Bu deney için aşağıdaki adımlar sırayla izlenmiştir.

- 1) Hücrelerin büyümesi sırasında petri kabının yüzeyine yerleştirilen coverslipler steril cımbız yardımı ile alınmış ve 3 kez PBS solüsyonu ile yıkanmıştır.
- 2) Hücrelerin coverslipler üzerine fiksasyonu için %4’lük Formaldehit ile 20 dakika inkübe edilmiştir. Ardından 3 kez 5 dakika süre ile PBS ile yıkama yapılmıştır.
- 3) Fiksatifin sonlandırılması için 50mM Amonyum Klorid ile 5 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda 3 kez 5 dakika süre ile PBS ile yıkama yapılmıştır.

- 4) Ardından coverslipler üzerine %0.5 Triton X-100 eklenmiş ve 2 dakika muamele edilmiştir. Sonrasında 3 kez 5 dakika süre ile PBS ile yıkama yapılmıştır.
- 5) Biotinilasyon reaksiyonunun lokalizasyonunun belirlenmesi için Neutravidin (1:1000 oranında) uygulaması yapılmış ve 1 saat inkübe edilmiştir. Süre bitiminde 3 kez 5 dakika süre ile PBS ile yıkama yapılmıştır.
- 6) Çekirdeğin görüntülenebilmesi için DAPI (1:20000) kullanılarak 10 dakika karanlıkta muamele edilmiştir.
- 7) Son olarak coverslipler PBS ile yıkanıp, ultra saf su ile kirliliklerden uzaklaştırılarak Prolong diamond Antifade Mountant solüsyon ile lam-cover slip arasında hücreler olacak şekilde kapatılmıştır.

Sonucunda hücreler Olympus CKX41 inverted mikroskop kullanarak incelenmiştir.

3.7. Zenginleştirilmiş Biotinile Proteinlerin Tripsin Enzimi ile Kesimi ve LC-MS/MS Analizine Hazırlanması

Biotinilasyon grubu ve Negatif Kontrol grubundan zenginleştirilen biotinile protein fraksiyonlarından eşit hacim de alınarak FASP Protein Kesim protokolü uygulanmıştır. Protokol için aşağıdaki adımlar takip edilmiştir.

- 1) FASP kesimi için Biotinilasyon grubu ve Negatif kontrol gruplarından eşit hacimde 50µl örnek üzerine 300µl 8M üre solüsyonu eklenerek özel mikrosantrifüj tüplere yerleştirilen 30 kDa'lık membran filtre üzerine aktarılmıştır.
- 2) 14000xg'de oda sıcaklığında 15 dakika santrifüj edilmiş ve filtre altında kalan kısım atılmıştır.
- 3) Filtre üzerine 200µl 8M üre solüsyonu eklenmiş ve tekrar santrifüj yapılmıştır.
- 4) İyodoasetamid (IAA) solüsyonu filtre üzerine eklenerek 20 dakika karanlıkta inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası santrifüj yapılmıştır.
- 5) Bu işlem sonrası örneklerin üzerine 3 kez 100µl 8M üre solüsyonu eklenmiş ve santrifüj tekrar edilmiştir.
- 6) Ardından yıkama adımı için 3 kez 100µl 50mM Amonyum Bikarbonat (AmBic) solüsyonu eklenerek santrifüj tekrarlanmıştır.
- 7) Filtre temiz mikrosantrifüj tüpe alınarak üzerine Tripsin enzimi ve 50mM AmBic solüsyonu (Çalışma grubu için; 1/8 ve Negatif kontrol grubu için; 1/16 oranında) eklenmiş ve 37°C'de gece boyu kesime tabi tutulmuştur.

- 8) Kesim sonrası örnekler 2 kez 40µl 50mM AmBic solüsyonu ve bir kez 50µl 0.5M NaCl solüsyonu santrifüj edilmiş ve peptitler temiz mikrosantrifüj tüp içerisine toplanmıştır.
- 9) SpeedVac santrifüj cihazı kullanılarak (Eppendorf, ABD) peptit örnekleri pellet haline getirilmiştir.

Kesim sonucunda elde edilen peptitler nLC-MS/MS analizi için 20µl %0,1'lik Formik Asit çözeltisi (FA) içerisinde çözülmüştür.

3.8. Nano-Sıvı Kromatografi tabanlı Kütle Spektrometre (nLC-MS/MS) Analizi ile Proteinlerin Tanımlanması ve Etiketsiz Kantifikasyonu

Peptitler, Q-Exactive kütle spektrometresine (Thermo Scientific, ABD) bağlı Ultimate 3000 RSLC nano sistemi (Dionex, Thermo Scientific, CA, ABD) kullanılarak nLC-MS/MS sistemi ile analiz edildi. Tüm sistem Xcalibur 4.0 yazılımı (Thermo Fisher Scientific, CA, ABD) aracılığıyla kontrol edildi. A (%0,1 FA) ve B (%80 Asetonitril + %0,1 Formik Asit) mobil fazları kullanılarak yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ayrımı yapıldı. Kesilmiş peptitler, bir tuzak (trap) kolonu üzerinden geçirilerek konsantre edildi ve tuzlardan arındırıldı. Daha sonra peptidler Acclaim PepMap RSLC C18 analitik kolonuna (75 µm x 15 cm x 2 µm, 100 Å çap, Thermo Scientific, CA, ABD) aktarılarak kromatografik ayrılma işlemine tabi tutuldu. Bu süreçte aşağıda özetlenen ayırma gradyanı kullanıldı. On dakika için %6 B, 60 dakika için %6-10 B, 150 dakika için %10-30 B, 40 dakika için %30-50 B, 20 dakika için %50-90, 10 dakika için %90, 10 dakika için %90-6 B ve 5 dakika için %6 B olacak şekilde 300 dakikalık toplam çalışma süresinde 300 nL/dakika akış hızıyla analizler gerçekleştirildi. Tam tarama MS1 spektrumları aşağıdaki parametrelerle elde edildi: çözünürlük 70.000, tarama aralığı 400-2000 m/z, hedef otomatik kazanç kontrolü (AGC) 3×E6, maksimum enjeksiyon süresi 60 ms, püskürtme voltajı 2.3 kV. MS/MS analizi, ilk on öncü iyonun seçilmesiyle veriye bağlı edinim yoluyla gerçekleştirilmiştir. Aşağıdaki parametrelerle çarpışma kaynaklı ayırışmadan (yüksek enerjili çarpışmalı ayırışma (higher-energy collisional dissociation- HCD)) oluşan MS2 analizi; çözünürlük 17.500, AGC 1E6; maksimum enjeksiyon süresi 100 ms, izolasyon penceresi 2.0 m/z normalleştirildi ve çarpışma enerjisi (NCE) 27 olacak şekilde gerçekleştirildi. Cihaz, her analizden önce standart bir pozitif kalibratör ile (LTQ Velos ESI Positive Ion Calibration Solution, Pierce, ABD) kalibre edildi.

3.9. nLC-MS/MS Veri Analizi ve Biyoinformatik Analizler

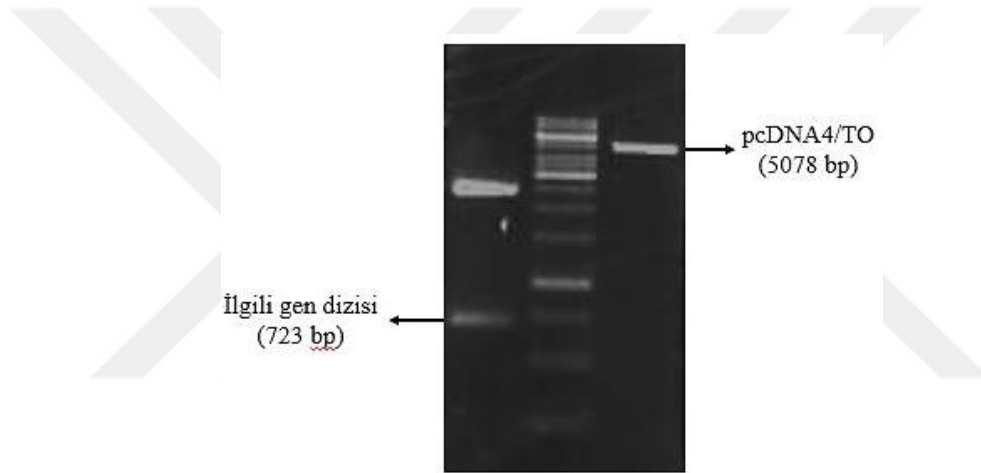
Ham verilerin analizi ve protein tanımlaması için Proteom Discoverer 2.5 yazılımı (Thermo Scientific, ABD) kullanıldı ve analizler sırasında aşağıdaki parametreler uygulandı; Peptit kütle toleransı 10 ppm, MS/MS kütle toleransı 0.2 Da, kütle doğruluğu 2 ppm, minimum peptit uzunluğu 6 amino asit, sabit değişiklikler sistein karbamidometilasyonu, kararsız değişiklikler metionin oksidasyonu ve asparajin deaminasyonu. Her protein için tanımlanan minimum özgün peptit sayısı 1 olarak alındı ve elde edilen veriler Uniprot veri tabanından elde edilen veri bankalarında tarandı. Tanımlanan proteinlerin lokalizasyonlarının tespiti için UniProt veri tabanı ve Gene Ontoloji analizleri ile proteinler lokalizasyonlarına göre kategorize edilmiştir.



4. SONUÇLAR

4.1. Alt-Klonlama ile Rekombinant Plazmitlerin Oluşturulması

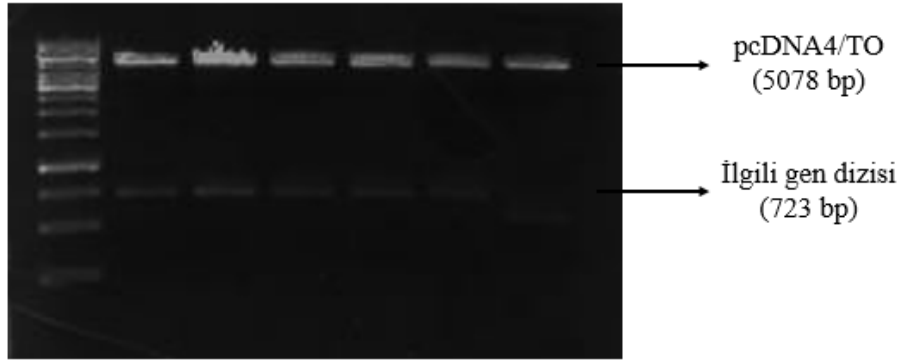
Sentezlenen gen dizilerinden pEX-A128- FKBP-V5-Split TurboID N -NLS plazmiti *E. coli*XL1Blue hücrelerine elektroporasyon yöntemi ile transforme edilmiş ve ampsilin varlığında oluşan koloniler sıvı besiyerine alınarak çoğaltılmış ve bu kolonilerden plazmit izolasyonu yapılmıştır. Hedeflenen pcDNA4/TO-FKBP-V5-Split TurboID N-NLS rekombinant plazmitinin oluşturulması için pcDNA4/TO plazmiti ve ilgili gen dizisi (FKBP-V5-Split TurboID N -NLS gen dizisi) HindIII ve BamHI restriksiyon enzimleri ile kesime tabi tutulmuş vektörlerin doğrulanması ve ilgili gen dizisi ile plazmitin jelden geri kazanımı için kesim ürünleri jelde yürütülmüştür (Şekil 4.1).



Şekil 4.1.HindIII ve BamHI restriksiyon enzimleri ile kesilmiş FKBP-V5-Split TurboID N Terminal-NLS dizisini kodlayan DNA parçası ve pcDNA4/TO plazmiti. Jelin orta kısmına DNA moleküler ağırlık belirteci yüklenmiştir.

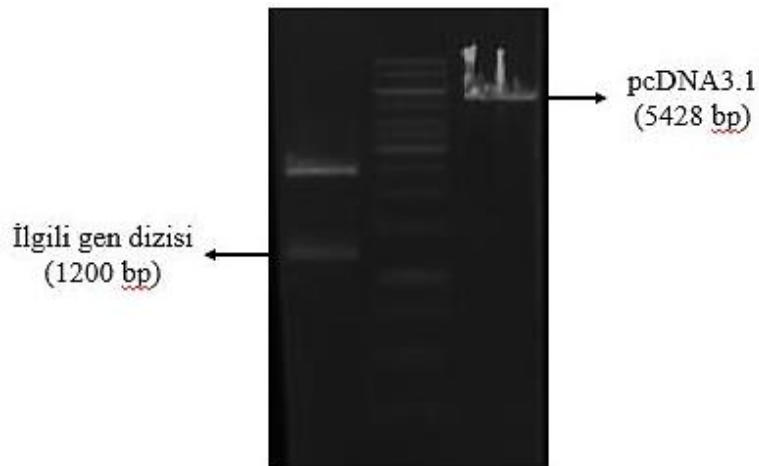
Kesimlerin tamamlanmasının ve jelden geri kazanılmasının ardından ilgili gen ve plazmit ürünü tek bir mikrosantrifüj tüp içerisine alınarak T4 DNA Ligaz enzimi ve diğer gerekli komponentler ile ligasyona tabi tutulmuştur. Ligasyon ürünleri *E. coli*XL1Blue elektrokompotent hücrelerine elektroporasyon yolu ile transforme edilmiş ve hücreler ampsilin varlığında seçilime bırakılmıştır. Kültür tabağı üzerinde büyüyen 6 adet koloni seçilmiş, sıvı besiyerine alınarak çoğaltılmış ve plazmit izolasyonları yapılmıştır. Ligasyonun doğrulanması için saflaştırılan plazmitler HindIII ve BamHI restriksiyon enzimleri ile kesime tabi tutulmuş ve kesim sonrası ürünler %1.5'lik etidyum bromür içeren bir agaroz jelde yürütülerek görüntülenmiştir. İlgili gen ve plazmit için uygun baz çifti aralıklarında bantlar görülmüş ve 5 adet rekombinant plazmit seçilerek doğrulanmıştır (Şekil 4.2). Doğrulan kolonilerden Koloni 2 seçilerek Ampisilin içeren 100ml besiyerinde

çoğaltılmış ve HEK293T TetR⁺ hücreleri transfeksiyon deneylerinde kullanılmak üzere Endotoxin-free plazmit preparasyonları hazırlanmıştır.



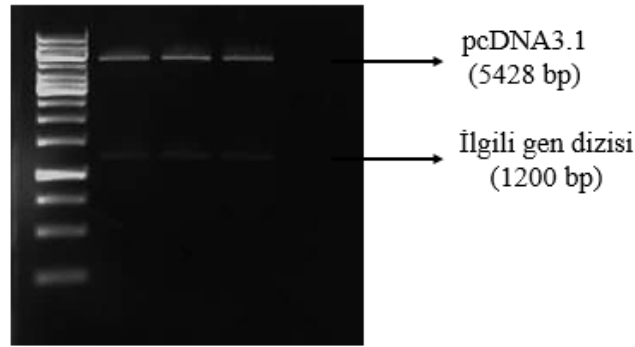
Şekil 4.2. Rekombinant plazmit pcDNA4/TO-FKBP-V5-Split TurboID N-NLS koloni taranmasına ait agaroz jel elektroforez görüntüsü

Enzimin diğer domaini olan C ucu için de benzer deneysel protokoller uygulanmıştır. Sipariş doğrultusunda elimiz ulaşan pEX-A258- HA-FRB-Split TurboID C-NLS plazmiti elektrokompetent *E. coli* XL1Blue hücrelerine elektroporasyon yoluyla transforme edilmiş ve ampisilin varlığında oluşan koloniler sıvı besiyerine alınarak çoğaltılmış ve bu kolonilerden plazmit izolasyonu yapılmıştır. Hedeflenen pcDNA3.1-HA-FRB-Split TurboID C-NLS rekombinant plazmitinin oluşturulması için pcDNA3.1 plazmiti ve ilgili gen dizisi (HA-FRB-Split TurboID C-NLS gen dizisi) BamHI ve EcoRI restriksiyon enzimleri ile kesime tabi tutulmuş vektörlerin doğrulanması ve ilgili gen dizisi ile plazmitin jelden geri kazanımı için kesim ürünleri jelde yürütülmüştür (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. BamHI ve EcoRI restriksiyon enzimleri ile kesilmiş HA-FRB-Split TurboID C-NLS dizisini kodlayan DNA parçası ve pcDNA3.1 plazmiti. Jelin orta kısmına DNA moleküler ağırlık belirteci yüklenmiştir.

Kesimlerin tamamlanmasının ve jelden geri kazanılmasının ardından ilgili gen ve plazmit ürünü tek birmikrosantrifüj tüp içerisine alınarak T4 DNA Ligaz enzimi ve diğer gerekli komponentler ile ligasyona bırakılmıştır. Ligasyon ürünleri *E. coli* XL1Blue elektrokompotent hücrelerine elektroporasyon yolu ile transforme edilmiş ve hücreler ampsilin varlığında seçilime bırakılmıştır. Kültür tabağı üzerinde büyüyen 3 adet koloni seçilmiş, sıvı besiyerine alınarak çoğaltılmış ve plazmit izolasyonları yapılmıştır. Ligasyonun doğrulanması için saflaştırılan plazmitler HindIII ve BamHI restriksiyon enzimleri ile kesime tabi tutulmuş ve kesim sonrası ürünler %1.5 etidyum bromür içeren bir agaroz jelde yürütülerek görüntülenmiştir. İlgili gen ve plazmit için uygun baz çifti aralıklarında bantlar görülmüş ve tüm klonlar doğrulanmıştır (Şekil 4.4). Doğrulanmış kolonilerden Koloni 2 seçilerek Ampisilin içeren 100ml besi yerinde çoğaltılmış ve sonraki transfeksiyon deneylerinde kullanılmak üzere Endotoxin-free plazmit preparasyonları hazırlanmıştır.

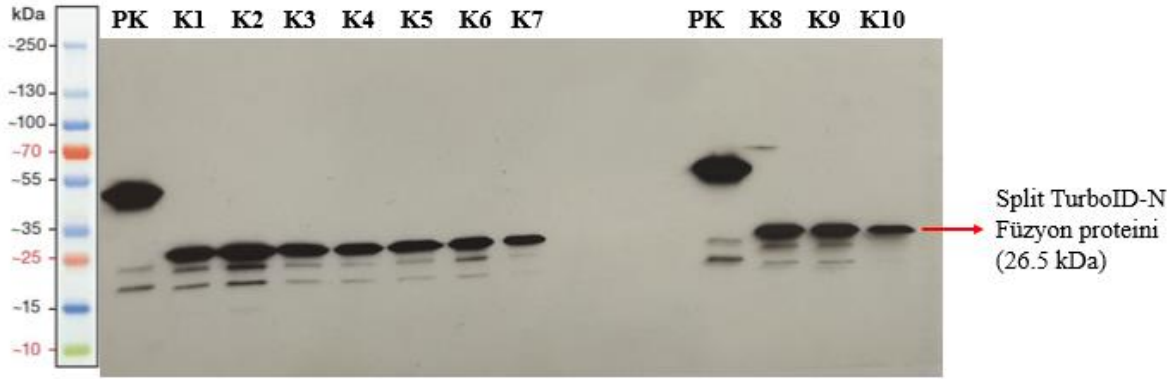


Şekil 4.4. Rekombinant plazmit pcDNA3.1-HA-FRB-Split TurboID C -NLS koloni taranmasına ait agaroz jel elektroforez görüntüsü

4.2. HEK293T-TetR+-Split-TurboID-N-CStabil Hücre Hattının Oluşturulması ve Füzyon Proteinlerin Etkileşimlerinin Doğrulanması

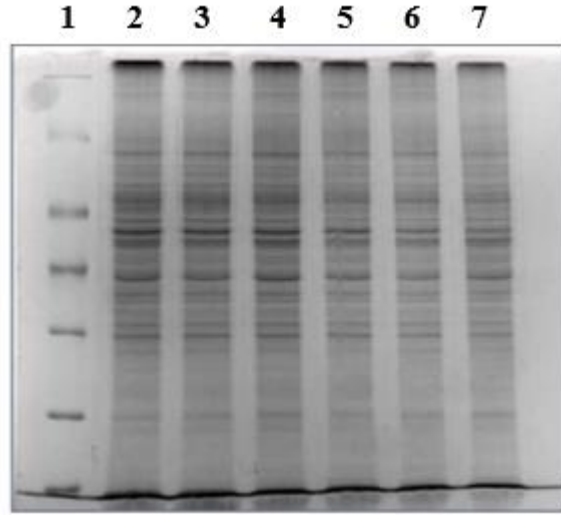
Çalışmada kullanılacak olan HEK293T TetR⁺ hücre hattı saklama alındığı sıvı azottan çıkartılıp çözölmüştür. Birkaç pasaj ilerletilen ve morfolojisinin iyi olduğu gözlemlenen hücreler Tripan mavisi ile muamele edildikten sonra Thoma lamı ile sayılmış, transfeksiyon için yeterli miktarda hücre olduğu görölmüştür. Hücre transfeksiyonu için hazırlanan pcDNA4/TO-FKBP-V5-Split TurboID N -NLS rekombinant plazmiti Neon Transfeksiyon sistemi ile HEK293T TetR⁺ hücre hattına transfekte edilmiştir. Ardından Zeosin (50µg/µl) ile seçilimi sağlanan hücrelerden tek koloni seçimi yapılarak stabil hücre hatları elde edilmiştir.

Büyütülen tek koloniler Tetrasiklin (0.1mg/ml) ile indüklendikten 24 saat sonra protein özütleri elde edilmiştir. Eşit konstrasyonlarda örnekler alınarak anti-V5 etiket antikoru kullanılarak Western Blotlama deneyi yapılmıştır. Bu deney sonucunda seçilen kolonilerin tamamında Split TurboID-N füzyon proteininin (26.5kda) indüksiyon sonrası ifadesi doğrulanmıştır (Şekil 4.5).



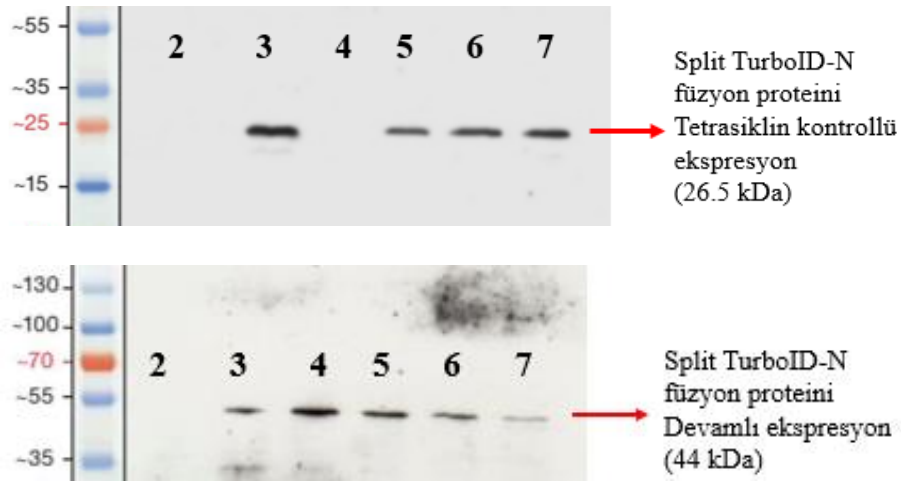
Şekil 4.5. Split TurboID-N füzyon proteininin pcDNA4/TO-FKBP-V5-Split TurboID N Terminal-NLS transfekte edilmiş HEK293TetR+ hücrelerinde ifadesinin doğrulanması. Şekil üzerinde PK-pozitif kontrol, K1-Koloni 1, K2-koloni 2, K3-Koloni 3, K4-Koloni 4, K5-Koloni 5, K6-Koloni 6, K7-Koloni 7, K8-Koloni 8, K9-Koloni 9, K10-Koloni 10 kısaltması anlamında kullanılmıştır.

Doğrulan kolonilerden Koloni 3 ile devam edilmesine karar verilmiş ve bu kolonideki hücreler çoğaltılmış ve gerekli saklamalar alınmıştır. Sonrasında Koloni 3 hücrelerine Neon Transfeksiyon sistemi kullanılarak pcDNA3.1- HA-FRB-Split TurboID C -NLS plazmiti transfekte edilmiş ve hücreler Genetisin (700µg/ml) ile seçilime tabi tutulmuştur. Seçilim sonrası sağlanan hücrelerden seri dilüsyon yolu ile tek koloni seçimi yapılarak stabil hücre hatları elde edilmiştir. Elde edilen kolonilerde tetrasiklin kontrolü altında ifade edilen Split TurboID-N NLS füzyon proteini vokesintisiz ifade edilen Split TurboID C-NLS füzyon proteininin ifadelerinin doğrulanması için Western Blotlama analizleri yapılmıştır. Öncelikle, tetrasiklin ile indüklenen hücrelerden hazırlanan protein özütleri %12'lik SDS-PAGE jelinde yürütülmüş ve protein profilleri kontrol edilmiştir (Şekil 4.6).



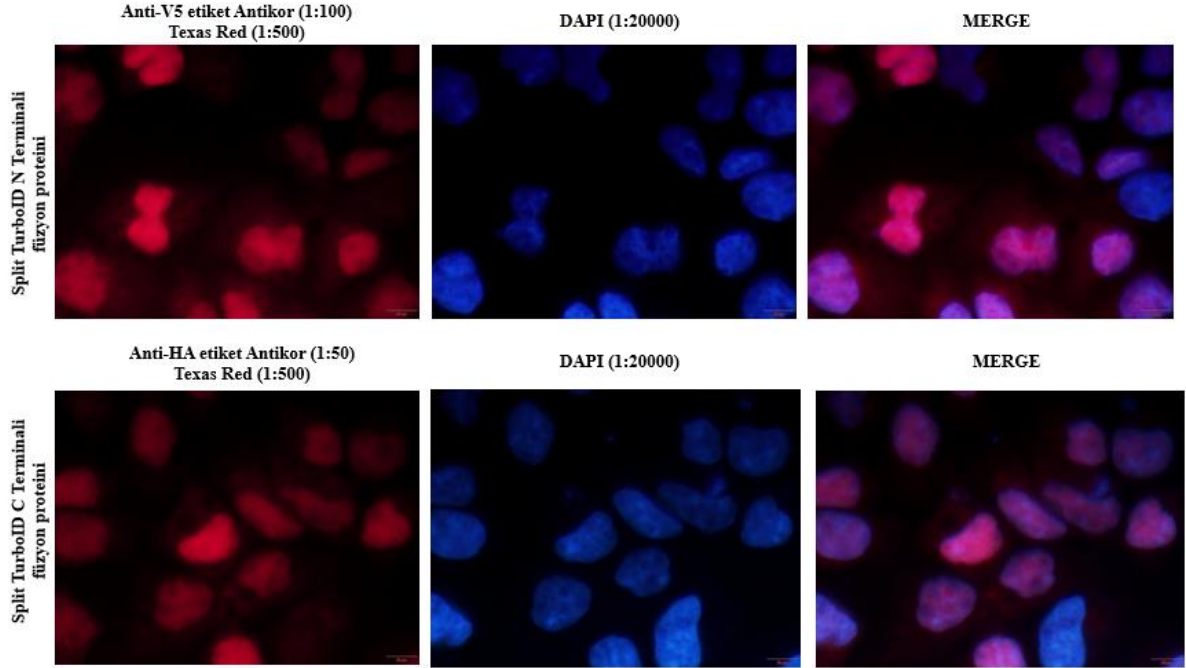
Şekil 4.6.Protein özütlerinin SDS-PAGE jel görüntüsü. (Jel sıralaması: 1-Protein marker, 2- Negatif Kontrol, 3-Pozitif Kontrol, 4- Koloni 2 tetrasiklin ile indüklenmemiş, 5- Koloni 2 tetrasiklin ile indüklenmiş, 6-Koloni 8 tetrasiklin ile indüklenmiş, 7- Koloni 11 tetrasiklin ile indüklenmiş hücrelerden alınan protein özütü örnekleri)

Western Blotlama deneyi sonucunda seçilen kolonilerin tamamında hem Split TurboID-N füzyon proteinin (26.5 kDa)ve Split TurboID-C füzyon proteinin (44 kDa)ifadesinin varlığı gösterilmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7.Split TurboID-N ve Split TurboID- C protein ifadelerinin Western Blot görüntüsü. Jel Sıralaması:1-Protein marker, 2-Negatif Kontrol, 3-Pozitif Kontrol, 4- Koloni 2 tetrasiklin ile indüklenmemiş, 5- Koloni 2 tetrasiklin ile indüklenmiş, 6-Koloni 8 tetrasiklin ile indüklenmiş, 7- Koloni 11 tetrasiklin ile indüklenmiş hücrelerden alınan protein özütü örnekleri

Eksprese edilen füzyon proteinlerin lokalizasyonlarının doğrulanması için İmmünfloresan mikroskopi analizleri yapılmıştır (Şekil 4.8).



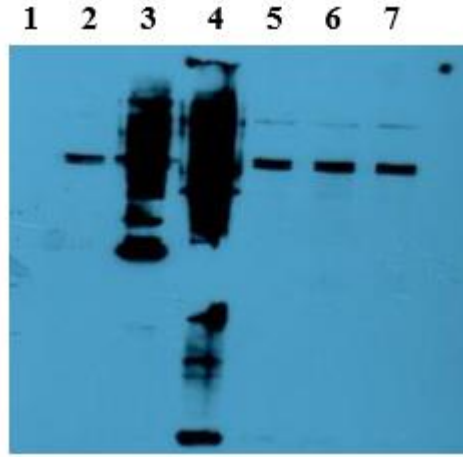
Şekil 4.8. Split TurboID-N ve Split TurboID- C proteinlerinin hücre içi lokalizasyonlarının doğrulanması

Elde edilen görüntüler Split TurboID-N ve Split TurboID- C füzyon proteinlerinin hücrenin çekirdeğinde lokalize olduğunu göstermiştir. Her iki proteine ait lokalizasyon görüntüsü DAPI boyası ile alınan görüntülerle birebir eşleşmiştir.

Füzyoz proteinlerin etkileşimlerinin doğrulanması

Aktif TurboID biyotin ligaz enziminin oluştuğunu ve Rapamisin yokluğunda sadece doğal biyotininilasyonun gerçekleştiğini gösterebilmek için hücre kültürü besiyeri ortamlarına Tablo 3.4’de ve Şekil 3.7’de gösterilen kompetentler eklenmiştir.

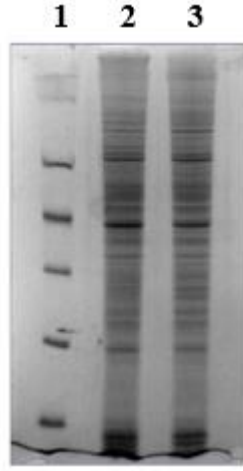
Hücrelerin eklenen kompetentler ile 24 saatlik inkübasyonu sonrasında hazırlanan protein özütleri ile gerçekleştirilen Western Blotlama deneyi Streptavidin-HRP konjugatı ile muamelesi ile gerçekleştirilmiştir. Deney sonucunda Rapamisinin eklendiği hücre kültüründe (I. Grup) arzu edilen biyotininle protein profilinin gözlemlendiği, diğer taraftan Rapamisinin eklenmediği hücre kültürlerinde (II.Grup, III.Grup, IV.Grup) sadece doğal biyotininilasyonun var olduğu görülmüştür (Şekil 4.9).



Şekil 4.9.Rapamisin varlığında aktif Split TurboID oluşumunun görüntülendiği Western Blotlama görüntüsü (Jel sıralaması; 1-Protein marker, 2-Negatif Kontrol, 3-Pozitif Kontrol, 4- I.Grup, 5- II.Grup, 6-III.Grup, 7-IV.Grup)

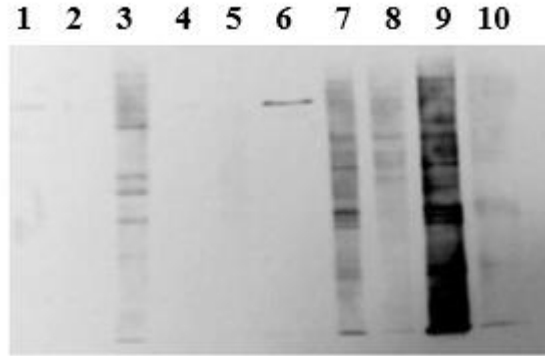
4.3. Çekirdek Proteinlerinin Biotinile Edilmesi ve Biotinile Proteinlerin Zenginleştirilmesi

Çekirdek proteinlerinin biotinile edilebilmesi için hücre kültüründe besiyeri ortamına Rapamisin, Tetrasiklin, Biotin ve $MgCl_2$ eklenmiştir. Doğal koşullarda hücrede meydana gelendoğal biotinile proteinlerin değerlendirme dışı bırakılabilinmesi için Negatif Kontrol hücre kültür ortamına Rapamisin ve Tetrasiklin eklenmemiş, yalnızca Biotin ve $MgCl_2$ eklenmiştir. Gerekli reaksiyon öğeleri eklendikten sonra hücreler 24 saat hücre kültürü etüvünde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası hücre pelletleri RIPA tamponunda lizize uğratarak protein özütleri hazırlanmıştır. Protein özütlerinin Bradford yöntemi ile konsantrasyon ölçümü yapıldıktan sonra protein kalitesinin kontrol edilmesi için %12'lik SDS-PAGE jeli yürütülmüştür (Şekil 4.10). Jele yüklenen protein miktarlarının eşit, kalitelerinin ise yüksek olduğu görülmüştür.



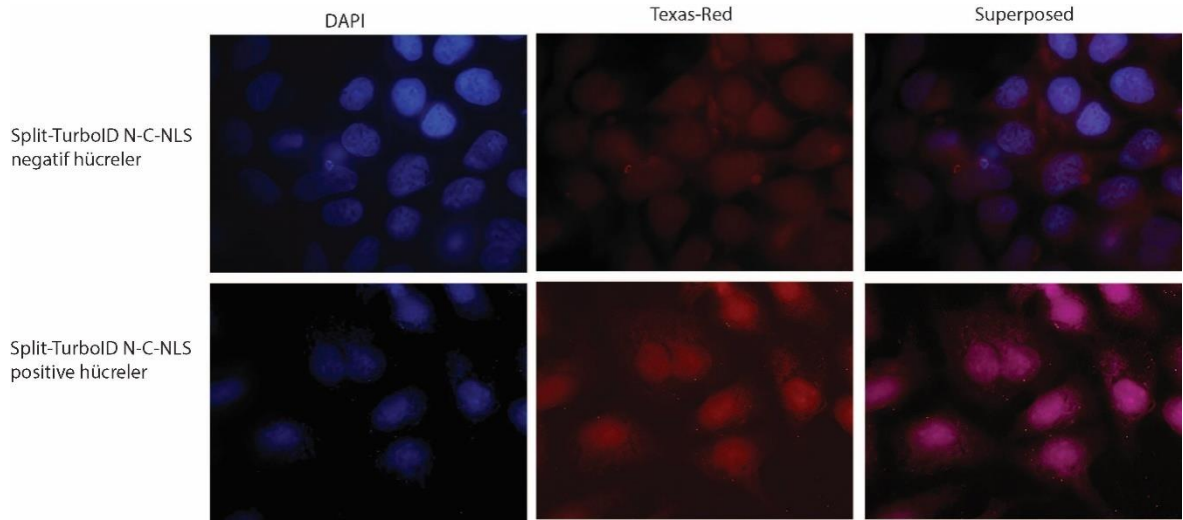
Şekil 4.10.Çekirdek proteinleri biyotinile olan ve olmayan hücrelerden hazırlanan proteinlere ait SDS-PAGE jel görüntüsü (Jel sıralaması; 1-Protein marker, 2-Biyotinilasyon grubu, 3- Negatif kontrol grubu)

Benzer şekilde yürütülen %12'lik SDS-PAGE jeli Western transferine tabi tutulmuş ve membran Streptavidin-HRP konjuagtı ile blotlanmıştır (Şekil 4.11).



Şekil 4.11.Zenginleştirme sonrası Western Blot görüntüsü (Jel sıralaması; 1-Protein marker, 2-Negatif Kontrol, 3-Pozitif Kontrol, 4-Negatif kontrol grubu protein özütü, 5- Negatif kontrol grubu boncuklara bağlanmayan fraksiyon, 6-Negatif kontrol grubu elüsyon fraksiyonu, 7-Biyotinilasyon grubu protein özütü, 8-Biyotinilasyon grubu boncuklara bağlanmayan fraksiyon, 9-Biyotinilasyon grubu elüsyon fraksiyonu, 10-Biyotinilasyon grubu boncukları)

Elde edilen sonuç, Rapamisin ve Tetrasiklin eklenmiş hücre kültürü örneklerinde yüksek miktarda biyotinilasyonun gerçekleştiğini göstermiştir. Aynı deney grupları ile yapılan immünfloresan mikroskopi deneyleri Western blotlamalarda görülen biyotinile proteinlerin çekirdekte lokalize olduklarını göstermektedir (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. Biotinilasyon reaksiyonunun lokalizasyonun IF ile görüntülenmesi

4.4. Triptik Kesim ve nLC-MS/MS Analizi

Biotinilasyon grubundan elde edilen biyotinile edilmiş, zenginleştirilmiş ve Negatif Kontrol grubundan biyotinile edilmemiş, zenginleştirilme protokolü uygulanmış fraksiyonlarından eşit hacimde alınarak bu fraksiyonlardaki proteinler tripsin kesimine tabi tutulmuştur. Elde edilen peptitler %0,1lik Formik Asit çözeltisi ile çözülmüş ve örnekler içerisindeki proteinler nHPLC LC-MS/MS sisteminde analiz edilerek tanımlanmıştır.

Tanımlanan proteinlerin lokalizasyon bilgileri için ücretsiz erişim sağlanabilen UniProt veri tabanı (<https://www.uniprot.org/>) ve (Gene Ontology) analizinden yararlanılmıştır. Split TurboID'nin aktif olarak biyotinile ettiği Biotinilasyon grubunda, negatif kontrol grubunda tanımlanan proteinlerin listeden elenmesi ile toplamda 361 adet protein tanımlanmıştır. Tanımlanan proteinlerin listesi EK-1'de verilmiştir. Bu proteinlerden 302 adetinin çekirdek proteomu içerisinde bulunduğu yapılan GO (Gene Ontology) analizi ile tespit edilmiştir.

5. TARTIŞMA

Organeller hücre içerisini kompartmanlara ayırarak hücredeki fonksiyonel karmaşayı önlemede ve özelleşmiş işlevlerin gerçekleştirilmesinde önemli rol oynamaktadırlar. Organellerin metabolik ayrıntılarını analiz edebilmek ve anlamak genel hücre dinamiğini yorumlayabilmek için oldukça önemlidir. Hücre içi organellerin dinamiği ve metabolik süreçleri analizi edilirken sıklıkla yararlanılan ve organelle özgü proteinler, organellerin hücre içerisinde görevler ve işleyişteki rolleri hakkında önemli bilgiler vermektedir. Bu proteinler, hücresel olayların anlamlandırılması ve hücrenin içerisinde bulunduğu mikrodünya hakkında yorum yapılabilmesi için araştırma çalışmalarında temel oluşturmaktadır (Yates ve ark.,2005).

Hücrenin merkezinde bulunan çekirdek organeli genetik bilgiyi korumak ve hücrenin hayatta kalmasını ve büyümesini sağlayan olayların düzenlenmesinde rol oynayan anahtar organelidir. Bu nedenle çekirdekte bulunan ve farklı hücresel işlevlerde rol alan nükleer protein içeriğinin doğru bir şekilde belirlenmesi hücre dinamiğinin anlaşılmasında oldukça önemlidir. Yapılan çalışmalarla hücre proteomunun yaklaşık %34'ünü çekirdek proteomunun oluşturduğu gösterilmiştir (The Human Protein Atlas). Nükleer proteinler hakkında bilgi sahibi olabilmek için daha verimli ve analiz gücü yüksek teknikler geliştirilmiştir ve geliştirilmeye devam etmektedir. Bu metotlarda çekirdek proteomu çalışmaları basit fraksiyonlama teknikleri ya da santrifügasyon yöntemi kullanılmaktadır. Bu teknikler nükleer proteomun içeriği hakkında bilgi vermelerine rağmen uygulanabilirlik konusunda önemli sorunlar barındırmaktadır. Bu problemlere sitoplazmik protein kontaminasyonları, sitoplazmik proteaz kaynaklı protein degradasyonu gibi sorunlar gibi örnekler verilebilir. Ayrıca deneyler sırasında kullanılan yüksek dereceli hipotonik veya hipertonic tamponlar nedeni ile hücrelerde çekirdek zarında bozunumlar meydana gelebilmekte veya çekirdeğin büzülmesi ile izole edilen çekirdek hacmi değişmekte, böylelikle protein içeriğinde varyasyonlar meydana gelebilmektedir. Bununla birlikte, kirlenici moleküllerden kaynaklanan safsızlıklar ve uzun deney süreçleri sırasında meydana gelen ürün kayıpları, biyolojik araştırmaların özgüllüğünü ve verimliliğini olumsuz olarak etkilemektedir (Hoffmann ve ark., 1978; Rickwood ve ark.,1997).

Çalışmamız kapsamında literatürde mevcut yöntemler ile yapılan nükleer proteom çalışmalarında sıklıkla karşılaşılan problemleri elimine etmek için yeni bir metot geliştirilmiştir. Kullanılan diğer yöntemlerde sıklıkla uygulanan çekirdek organelinin

izolasyonu çalışmalarının yerine kullandığımız yaklaşımda hücre içerisinde çekirdeğe özgü hedef proteinlerin etiketlenerek zenginleştirilmesi ve analizi gerçekleştirilmiştir. Bu hedef doğrultusunda hücrede bilinen bir toksik etkisi olmayan ve hücresel işleyişinde bilinen bir etkisi olmayan TurboID biyotin ligaz enziminin geliştirilmiş modifiye bir versiyonu olan Split TurboID biyotin ligaz enzimi kullanılmıştır. Bu enzimin N terminalini içeren füzyon protein HEK293T TetR⁺ hücrelerinde tetrasiklin kontrollü olarak ifade edilirken, enzimin C terminalini içeren füzyon protein ifade sürekli gerçekleşmektedir. Split TurboID enziminin aktif forma geçerek biyotiniasyon reaksiyonu gerçekleştirebilmesi için hücre besiyeri ortamına FKBP ve FRB proteinlerinin etkileşimini sağlayacak Rapamisin komponenti eklenmiştir. Dört farklı besiyeri içeriğine ait hücre gruplarında yapılan Western Blotlama deneyi ile hücrelerdeki biyotiniasyon profili Şekil 4.9'da gösterilmiştir. Buna göre hücrelerde Rapamisin eklendiği grupta (Grup I) istenilen biyotiniasyon profilinin gözlemlendiği, diğer gruplarda ise hücredeki doğal biyotiniasyon profili ile karşılaşıldığı gözlemlenmiştir. Bu sayede nükleer proteinlerin biyotinile edilmesi için Split TurboID enzimin aktif formuna geçmesinin Rapamisin kontrollü olarak gerçekleşeceği gösterilmiştir. Nükleer proteinlerin biyotiniasyonu ve zenginleştirilmesinde yapılan Western Blotlama deneyi ile Biyotiniasyon grubundaki biyotinile protein profilinin Negatif kontrol grubundan oldukça fazla olduğu görülmüştür (Şekil 4.11). Hücre gruplarında biyotiniasyon reaksiyonunun gerçekleştiği lokalizasyonu görüntüleyebilmek için yapılan IF deneyi ile Biyotiniasyon grubunda reaksiyonun çekirdekte lokalize olduğu ve yoğun şekilde gerçekleştiği görülmektedir (Şekil 4.12).

Zenginleştirilen biyotinile proteinler LC-MS/MS analizleri ile tanımlanmıştır. Ardından gerçekleştirilen biyoinformatik analizleri ile Negatif kontrol grubunda tanımlanan proteinlerin Biyotiniasyon grubundaki protein listesinden elenmiştir. Analizler sonucunda Biyotiniasyon grubunda toplam 361 protein tanımlanmıştır. Tanımlanan proteinlerin listesi EK-1'de verilmiştir. Bu çalışmada kütle spektrometresi ile ve biyoinformatik analizler sonucunda tanımlanan 361 proteinden 302 adetinin çekirdek proteomu içerisinde bulunduğu yapılan GO (Gene Ontology) analizi ile tespit edilmiştir. Elde edilen sonuca göre geliştirilen bu yaklaşımın çekirdek proteom çalışmalarında yaklaşık %83.6 oranında verimlilikle çalıştığı gösterilmiştir. Çekirdek proteomu içerisinde bulunmayan 59 protein ile, doğal biyotiniasyon ile zenginleştirme fraksiyonu dahil olmuş veya zenginleştirme esnasında kullanılan pozitif yüklü ve glikolize yapısından dolayı biyotinile olmayan proteinleri de

bağladığı bilinen Streptavidin sebebi ile analizlerde karşılaşılmış olabilmektedir (Luong ve Vashist., 2020).



6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Gerçekleştirilen bu tez çalışması ile çekirdek proteom çalışmalarında kullanılabilecek özgül ve yüksek verimlilik sağlayan bir yaklaşım geliştirilmiştir. Literatürde bulunan mevcut yaklaşımlarda karşılaşılan problemleri ortadan kaldırmak ve yüksek saflıkta nükleer protein zenginleştirilmesi sağlamak hedeflenmiştir. Bu doğrultuda kullanılan Split TurboID biyotin ligaz enzimi ile gerçekleştirilen biyotinyasyon reaksiyonu ile nükleer proteinlerin etiketlenmesi, streptavidin kaplı boncuklar ile zenginleştirilmesi ve LC-MS/MS analizi ile tanımlanması gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen bu yöntemin literatürdeki diğer yöntemlere kıyasla sahip olduğu bazı avantajları bulunmaktadır. Bunlar; geniş kullanım alanına sahip olması ile birçok hücre hattında kullanılabilir, çok fazla sayıda nükleer protein tanımlanmasına izin vermesi ile yüksek verimlilikte proteom çalışması yapılabilir, organel proteom çalışmalarına yeni bir yaklaşım geliştirilmesinde öncü olması ile geliştirilen bu yöntem diğer organel proteomları çalışmalarına uyarlanabilir, hücrede bilinen bir toksik etkiye sahip olmaması ve hücre içi metabolik yollarında bilinen bir etkisinin olması ile uygulanabilirliği artmaktadır. Belirtilen bu olumlu yönler sayesinde geliştirilen bu yaklaşım, çekirdek proteomu çalışmalarında tercih edilebilir ve birçok organel proteom çalışmasına uyarlanabilir niteliktedir. Ayrıca sunduğu geniş tanımlanabilen nükleer protein ile hücrenin içerisinde bulunduğu mikro dünyanın daha anlaşılabilir olması, yorumlama yapabilme imkanı sağlamıştır. Karşılaştırmalı nükleer proteom analizinde kullanılabilir ile farklı hücre hatlarındaki hücresel işleyiş hakkında yorum yapabilme imkanı vermektedir.

7. KAYNAKLAR

- Banaszynski, L. A., Liu, C. W., & Wandless, T. J. (2005). Characterization of the FKBP.rapamycin.FRB ternary complex. *Journal of the American Chemical Society*, 127(13), 4715–4721. <https://doi.org/10.1021/ja043277y>
- Blobel G. ve Potter VR. (1996). Nuclei from rat liver: isolation method that combines purity with high yield. *Science*. 1966; 154:1662–1665.
- Branon T.C, Ting A. Y., Sanchez AD., Udeshi N., Svinkina T., Carr S., Feldman J., Perrimon N., Ting A., (2017). Directed evolution of TurboID for efficient proximity labeling in living cells and organisms. *Nature Biotechnology*. doi:10.1101/196980.
- 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. (2020). Split-TurboID enables contact-dependent proximity labeling in cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(22), 12143–12154.
- 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>
- Dittmer, TA. & Misteli, T. (2011). The lamin protein family. *Genome Biol* 12, 222 (2011). <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-5-222>
- Dreger, M. (2003) Subcellular proteomics. *Mass Spectrom. Rev.*2003, 22, 27–56.
- Dubois, M. L., ve Boisvert, F. M. (2016). The Nucleolus: Structure and Function. *The Functional Nucleus*, 29–49. https://doi.org/10.1007/978-3-319-38882-3_2
- Fairhead M. ve Howarth M. (2015). Site-specific biotinylation of purified proteins using BirA. *Methods. Mol Bio*. doi:10.1007/978-1-4939-2272-7_12.
- Geoffrey M. Cooper. (2016) The Cell: A Molecular Approach. Chapter 8, Nükleus
- Haginaka, J. (2012). Chromatographic Separations and Analysis: Protein and Glycoprotein Stationary Phases. *Comprehensive Chirality Volume 8*, 2012, Pages 153-176. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-095167-6.00822-3>
- Hayes, A. J., Satiaputra, J., Sternicki, L. M., Paparella, A. S., Feng, Z., Lee, K. J., Rodriguez, B. B., Tieu, W., Eijkelkamp, B. A., Shearwin, K. E., Pukala, T. L., Abell, A. D., Booker, G. W., ve Polyak, S. W. (2020). Advanced Resistance Studies Identify Two Discrete Mechanisms in *Staphylococcus aureus* to Overcome Antibacterial Compounds that Target Biotin Protein Ligase. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 9(4), 165. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9040165>
- Hoffmann, P. ve Chalkley, R., (1978). Procedures for minimizing protease activity during isolation of nuclei, chromatin, and the histones. *Methods Cell Biol* 17, 1.
- Huber, L. A., Pfaller, K. ve Vietor, I. (2003). Organelle proteomics: implications for subcellular fractionation in proteomics. *Circ. Res*. 2003, 92, 962–968.
- Ingaramo, M.,& Beckett, D. (2011). Biotinylation, a post-translational modification controlled by the rate of protein-protein association. *The Journal of biological chemistry*, 286(15), 13071–13078. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.183624>
- Jain, A.,& Cheng, K. (2017). The principles and applications of avidin-based nanoparticles in drug delivery and diagnosis. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 245, 27–40. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.11.016>
- Jung, E., Heller, M., Sanchez, J. C., Hochstrasser, D. F., (2000). Proteomics meets cell biology: the establishment of subcellular proteomes. *Electrophoresis* 2000, 21,3369–3377

- Kohanski R.A. (2013). Biotinylation of Proteins, Editor(s): William J. Lennarz, M. Daniel Lane, *Encyclopedia of Biological Chemistry* (Second Edition), Academic Press. Pages 226-228, ISBN 9780123786319, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378630-2.00168-7>.
- Lammerding J. (2011). Mechanics of the nucleus. *Comprehensive Physiology*, 1(2), 783–807. <https://doi.org/10.1002/cphy.c100038>
- Luong, HT. ve Vashist, SK. (2020). Chemistry of Biotin–Streptavidin and the Growing Concern of an Emerging Biotin Interference in Clinical Immunoassays, *Acs Omega*. 5 (2020), 10–18.
- Morales, V., Giamarchi, C., Chailleux, C., Moro, F., Marsaud, V., Le Ricousse, S., ve Richard-Foy, H. (2001). Chromatin structure and dynamics: functional implications. *Biochimie*, 83(11-12), 1029–1039. [https://doi.org/10.1016/s0300-9084\(01\)01347-5](https://doi.org/10.1016/s0300-9084(01)01347-5)
- Narula, K., Datta, A., Chakraborty N. ve Chakraborty S. (2013). Comparative analyses of nuclear proteome: extending its function. *Plant Science*. Volume 4-2013. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00100>
- Nanninga, N. (2014). Cell structure, organization, bacteria and archae. *Biomedical Science*, 2014. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.02309-6>
- National Center for Biotechnology Information (2023). PubChem Compound Summary for CID 171548, Biotin. Retrieved May 23, 2023 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Biotin>.
- Quina, A. S., Buschbeck, M., ve Di Croce, L. (2006). Chromatin structure and epigenetics. *Biochemical pharmacology*, 72(11), 1563–1569. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2006.06.016>
- Rickwood, D., Messent, A. ve Patel, D., 1997. Isolation and characterization of nuclei and nuclear subfractions. *Subcellular Fractionation: A Practical Approach*. IRL Press, Oxford, p. 71.
- Smith A.C. ve Cronan J.E. (1999). The enzymatic biotinylation of proteins: a post-translational modification of exceptional specificity. *Trends in Biochemical Sciences*. doi:10.1016/S0968-0004(99)01438-3.
- The Human Protein Atlas, <https://www.proteinatlas.org/humanproteome/subcellular/nucleoplasm>
- Yates, J. R., Gilchrist, A., Howell, K. E. ve Bergeron, J. J., (2005). Proteomics of organelles and large cellular structures. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2005, 6, 702–714.
- Zempleni J, Wijeratne SSK, Kuroishi T ve diğ. (2012). *Advances in nutrition* an international review journal. Biotin. 3(2): 213–214.

EKLER

EK-1. nLC-MS/MS analizleri sonucu elde edilen proteinler

Çekirdek proteomuna dahil olan proteinler tablo üzerinde açık gri renk alt fonlu olarak verilmiştir.

Accession	Protein Tanımı	# Peptides	# Unique Peptides	MW [kDa]	Score Sequest HT: Sequest HT
O14654	Insulin receptor substrate 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IRS4 PE=1 SV=1	1	1	133,7	1,83
P16403	Histone H1.2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=H1-2 PE=1 SV=2	4	4	21,4	9,03
Q9H9B4	Sideroflexin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SFXN1 PE=1 SV=4	5	5	35,6	4,35
P36542	ATP synthase subunit gamma, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ATP5F1C PE=1 SV=1	2	2	33	2,41
P15880	40S ribosomal protein S2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS2 PE=1 SV=2	1	1	31,3	3,5
A0A3B3ITT5	60S ribosomal protein L29 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL29 PE=1 SV=1	1	1	18,5	2,36
A8MVX0	Rho guanine nucleotide exchange factor 33 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ARHGEF33 PE=2 SV=2	1	1	94,6	1,63
P68431	Histone H3.1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=H3C12 PE=1 SV=2	6	6	15,4	10,09
O00193	Small acidic protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SMAP PE=1 SV=1	1	1	20,3	2,31
P22695	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=UQCRC2 PE=1 SV=3	2	2	48,4	8,66
A0A2U3TZH3	Elongation factor 1-alpha OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EEF1A2 PE=1 SV=1	5	5	54,3	6,52

P16615	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ATP2A2 PE=1 SV=1	1	1	114, 7	1,72
P62805	Histone H4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=H4C16 PE=1 SV=2	4	4	11,4	9,3
P01019	Angiotensinogen OS=Homo sapiens OX=9606 GN=AGT PE=1 SV=3	1	1	53,1	0
A0A1B0GU47	CUB domain-containing protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CDCP2 PE=4 SV=1	1	1	59	0
P25705	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ATP5F1A PE=1 SV=1	5	5	59,7	4,52
P81605	Dermcidin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DCD PE=1 SV=2	2	2	11,3	6,92
Q8N2U0	Transmembrane protein 256 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TMEM256 PE=3 SV=1	1	1	11,7	2,77
P49368	T-complex protein 1 subunit gamma OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CCT3 PE=1 SV=4	1	1	60,5	1,64
Q7RTP0	Magnesium transporter NIPA1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NIPA1 PE=1 SV=1	1	1	34,5	3,21
P62942	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP1A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FKBP1A PE=1 SV=2	1	1	11,9	2,14
P05165	Propionyl-CoA carboxylase alpha chain, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PCCA PE=1 SV=4	1	1	80	1,93
Q9NVI7	ATPase family AAA domain-containing protein 3A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ATAD3A PE=1 SV=2	2	2	71,3	4,33
Q00325	Phosphate carrier protein, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SLC25A3 PE=1 SV=2	3	3	40,1	1,84
P13647	Keratin, type II cytoskeletal 5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KRT5 PE=1 SV=3	3	1	62,3	9,5
P46776	60S ribosomal protein L27a OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL27A PE=1 SV=2	1	1	16,6	4,08
Q16891	MICOS complex subunit MIC60 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IMMT PE=1 SV=1	1	1	83,6	1,65

A0A2R8Y5H9	Non-specific serine/threonine protein kinase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KSR1 PE=1 SV=1	1	1	103	0
P18124	60S ribosomal protein L7 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL7 PE=1 SV=1	3	3	29,2	6,52
P10809	60 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSPD1 PE=1 SV=2	1	1	61	6,81
P25398	40S ribosomal protein S12 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS12 PE=1 SV=3	1	1	14,5	0
P10599	Thioredoxin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TXN PE=1 SV=3	1	1	11,7	2,3
P84085	ADP-ribosylation factor 5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ARF5 PE=1 SV=2	1	1	20,5	2,16
Q9Y5M8	Signal recognition particle receptor subunit beta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SRPRB PE=1 SV=3	1	1	29,7	2,18
P78318	Immunoglobulin-binding protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IGBP1 PE=1 SV=1	1	1	39,2	1,71
H0YKD8	60S ribosomal protein L28 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL28 PE=1 SV=1	1	1	19,1	1,73
P00403	Cytochrome c oxidase subunit 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MT-CO2 PE=1 SV=1	1	1	25,5	0
Q96N66	Lysophospholipid acyltransferase 7 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MBOAT7 PE=1 SV=2	1	1	52,7	2,3
P26641	Elongation factor 1-gamma OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EEF1G PE=1 SV=3	1	1	50,1	2,05
Q9UNN8	Endothelial protein C receptor OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PROCR PE=1 SV=1	1	1	26,7	0
Q9UH90	F-box only protein 40 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FBXO40 PE=2 SV=2	1	1	79,7	0
A0A0A0MT26	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ATP1A3 PE=1 SV=1	1	1	133,2	3,07
O75964	ATP synthase subunit g, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ATP5MG PE=1 SV=3	1	1	11,4	1,95
Q5VWZ2	Lysophospholipase-like protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LYPLAL1 PE=1 SV=3	1	1	26,3	0

O75477	Erlin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ERLIN1 PE=1 SV=2	1	1	39,1	2,21
P82675	28S ribosomal protein S5, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MRPS5 PE=1 SV=2	1	1	48	0
P12236	ADP/ATP translocase 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SLC25A6 PE=1 SV=4	6	2	32,8	16,2
O00483	Cytochrome c oxidase subunit NDUFA4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NDUFA4 PE=1 SV=1	1	1	9,4	0
Q9NS69	Mitochondrial import receptor subunit TOM22 homolog OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TOMM22 PE=1 SV=3	2	2	15,5	8,12
Q96AA8	Janus kinase and microtubule-interacting protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=JAKMIP2 PE=1 SV=1	1	1	94,9	0
Q02543	60S ribosomal protein L18a OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL18A PE=1 SV=2	2	2	20,7	0
P09104	Gamma-enolase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ENO2 PE=1 SV=3	1	1	47,2	0
P21796	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=VDAC1 PE=1 SV=2	2	2	30,8	7,85
P11142	Heat shock cognate 71 kDa protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSPA8 PE=1 SV=1	2	1	70,9	6,61
Q7Z736	Pleckstrin homology domain-containing family H member 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PLEKHH3 PE=1 SV=2	1	1	85,3	0
Q9Y679	Lipid droplet-regulating VLDL assembly factor AUP1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=AUP1 PE=1 SV=2	1	1	45,8	2,13
P54886	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ALDH18A1 PE=1 SV=2	4	4	87,2	6,37
P49411	Elongation factor Tu, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TUFM PE=1 SV=2	5	5	49,5	9,27
Q96K37	Solute carrier family 35 member E1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SLC35E1 PE=1 SV=2	1	1	44,7	3,69
Q8WVM8	Sec1 family domain-containing protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SCFD1 PE=1 SV=4	1	1	72,3	7,9

P11387	DNA topoisomerase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TOP1 PE=1 SV=2	1	1	90,7	1,93
Q5T9A4	ATPase family AAA domain-containing protein 3B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ATAD3B PE=1 SV=1	1	1	72.5	0.00
P16402	Histone H1.3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=H1-3 PE=1 SV=2	3	3	22.3	0.00
O96008	Mitochondrial import receptor subunit TOM40 homolog OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TOMM40 PE=1 SV=1	1	1	37.9	0.00
P62917	60S ribosomal protein L8 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL8 PE=1 SV=2	1	1	28.0	2.25
P24539	ATP synthase F(0) complex subunit B1, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ATP5PB PE=1 SV=2	1	1	28.9	0.00
P26373	60S ribosomal protein L13 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL13 PE=1 SV=4	1	1	24.2	0.00
P17096	High mobility group protein HMG-I/HMG-Y OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HMGA1 PE=1 SV=3	1	1	11.7	0.00
Q05996	Zona pellucida sperm-binding protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ZP2 PE=1 SV=1	1	1	82.3	0.00
P12956	X-ray repair cross-complementing protein 6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=XRCC6 PE=1 SV=2	1	1	69,8	0
P10412	Histone H1.4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=H1-4 PE=1 SV=2	5	2	21,9	9,44
P33993	DNA replication licensing factor MCM7 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MCM7 PE=1 SV=4	1	1	81,3	0
P22087	rRNA 2'-O-methyltransferase fibrillarin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FBL PE=1 SV=2	2	2	33,8	0
P0C0S8	Histone H2A type 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=H2AC17 PE=1 SV=2	4	4	14,1	6,03
P26368	Splicing factor U2AF 65 kDa subunit OS=Homo sapiens OX=9606 GN=U2AF2 PE=1 SV=4	1	1	53,5	0
P23246	Splicing factor, proline- and glutamine-rich OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SFPQ PE=1 SV=2	2	1	76.1	1.77

P13010	X-ray repair cross-complementing protein 5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=XRCC5 PE=1 SV=3	1	1	82.7	0.00
A0A8I5KSH6	RNA helicase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DDX10 PE=1 SV=1	1	1	106,3	3,7
A0A8I5KNN2	RNA helicase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DDX21 PE=1 SV=1	6	6	89,9	7,53
A0A8I5KX72	NF-kappa-B-repressing factor OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NKRF PE=1 SV=1	1	1	88	3,29
A0A8Q3SIG1	Uncharacterized protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LOC400499 PE=4 SV=1	1	1	363,1	0
Q5VX52	Spermatogenesis-associated protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SPATA1 PE=2 SV=4	1	1	52,9	0
A0A8Q3SIS5	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=G6PD PE=4 SV=1	1	1	66,1	1,61
A0A8Q3SHM5	Golgin subfamily B member 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GOLGB1 PE=4 SV=1	1	1	10,9	0
Q5T3I0	G patch domain-containing protein 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GPATCH4 PE=1 SV=2	1	1	50.4	0.00
Q8NI36	WD repeat-containing protein 36 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=WDR36 PE=1 SV=1	1	1	105,3	0
M0QYS1	60S ribosomal protein L13a (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL13A PE=1 SV=2	2	2	24.2	3.87
J3KQE5	GTP-binding nuclear protein Ran (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RAN PE=1 SV=1	1	1	26.8	0.00
Q9UKV3	Apoptotic chromatin condensation inducer in the nucleus OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACIN1 PE=1 SV=2	1	1	151.8	1.78
P12235	ADP/ATP translocase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SLC25A4 PE=1 SV=4	4	1	33.0	4.63
Q05639	Elongation factor 1-alpha 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EEF1A2 PE=1 SV=1	6	6	50,4	10,99
Q92841	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX17 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DDX17 PE=1 SV=2	2	2	80,2	4,51
P19338	Nucleolin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NCL PE=1 SV=3	15	15	76,6	32,82

Q92945	Far upstream element-binding protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KHSRP PE=1 SV=4	2	2	73,1	2,43
P82979	SAP domain-containing ribonucleoprotein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SARNP PE=1 SV=3	2	2	23,7	5,36
Q15233	Non-POU domain-containing octamer-binding protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NONO PE=1 SV=4	6	6	54,2	9,87
P62826	GTP-binding nuclear protein Ran OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RAN PE=1 SV=3	2	2	24,4	7,44
Q13428	Treacle protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TCOF1 PE=1 SV=3	12	12	152	43,99
Q14839	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CHD4 PE=1 SV=2	1	1	217,9	0
P14618	Pyruvate kinase PKM OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PKM PE=1 SV=4	3	3	57,9	1,61
P06748	Nucleophosmin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NPM1 PE=1 SV=2	9	9	32,6	24,86
Q7L014	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX46 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DDX46 PE=1 SV=2	3	3	117,3	3,68
Q8IX01	SURP and G-patch domain-containing protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SUGP2 PE=1 SV=2	2	2	120,1	5,32
Q99848	Probable rRNA-processing protein EBP2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EBNA1BP2 PE=1 SV=2	2	2	34,8	5,79
O00571	ATP-dependent RNA helicase DDX3X OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DDX3X PE=1 SV=3	1	1	73,2	5,45
P51991	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPA3 PE=1 SV=2	1	1	39,6	4,52
Q00341	Vigilin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HDLBP PE=1 SV=2	1	1	141,4	2,29
P52292	Importin subunit alpha-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KPNA2 PE=1 SV=1	1	1	57,8	3,86
P25205	DNA replication licensing factor MCM3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MCM3 PE=1 SV=3	1	1	90,9	3,61
P60228	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF3E PE=1 SV=1	1	1	52,2	1,82

P63244	Receptor of activated protein C kinase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RACK1 PE=1 SV=3	1	1	35,1	0
P31943	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPH1 PE=1 SV=4	1	1	49,2	2,19
P51610	Host cell factor 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HCFC1 PE=1 SV=2	1	1	208,6	3,54
Q05639	Elongation factor 1-alpha 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EEF1A2 PE=1 SV=1	6	6	50.4	7.67
A8MXP9	Matrin-3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MATR3 PE=1 SV=1	1	1	99,9	4,93
A6NHR9	Structural maintenance of chromosomes flexible hinge domain-containing protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SMCHD1 PE=1 SV=2	1	1	226,2	7,3
Q9NYH9	U3 small nucleolar RNA-associated protein 6 homolog OS=Homo sapiens OX=9606 GN=UTP6 PE=1 SV=2	2	2	70,1	6,77
P0DP25	Calmodulin-3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CALM3 PE=1 SV=1	1	1	16,8	2,32
A0A2R8Y891	ATP-dependent 6-phosphofructokinase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PFKM PE=1 SV=1	1	1	96,8	0
Q8IWI9	MAX gene-associated protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MGA PE=1 SV=4	1	1	336	2,11
P62263	40S ribosomal protein S14 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS14 PE=1 SV=3	2	2	16,3	4,37
O94842	TOX high mobility group box family member 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TOX4 PE=1 SV=1	1	1	66,2	1,91
O00541	Pescadillo homolog OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PES1 PE=1 SV=1	1	1	68	1,88
P62306	Small nuclear ribonucleoprotein F OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SNRPF PE=1 SV=1	1	1	9,7	5,6
G8JLB6	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPH1 PE=1 SV=1	1	1	51,2	2,19
Q12788	Transducin beta-like protein 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TBL3 PE=1 SV=2	2	2	89	5,3
Q92804	TATA-binding protein-associated factor 2N OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TAF15 PE=1 SV=1	1	1	61,8	1,77

O43395	U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein Prp3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PRPF3 PE=1 SV=2	2	2	77,5	1,88
P46087	Probable 28S rRNA (cytosine(4447)-C(5))-methyltransferase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NOP2 PE=1 SV=2	4	4	89,2	12,65
P46781	40S ribosomal protein S9 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS9 PE=1 SV=3	1	1	22,6	0
A0A7I2V3S3	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF3E PE=1 SV=1	1	1	59,3	1,82
H7C2Q8	EBNA1 binding protein 2, isoform CRA_d OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EBNA1BP2 PE=1 SV=1	1	1	40,7	4,11
Q12830	Nucleosome-remodeling factor subunit BPTF OS=Homo sapiens OX=9606 GN=BPTF PE=1 SV=3	1	1	338,1	3,03
E9PR16	Nuclear pore complex protein Nup160 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NUP160 PE=1 SV=3	1	1	126,8	1,82
P62140	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-beta catalytic subunit OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PPP1CB PE=1 SV=3	1	1	37,2	2,12
Q14684	Ribosomal RNA processing protein 1 homolog B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RRP1B PE=1 SV=3	1	1	84,4	0
Q86T24	Transcriptional regulator Kaiso OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ZBTB33 PE=1 SV=2	1	1	74,4	2,61
Q15365	Poly(rC)-binding protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PCBP1 PE=1 SV=2	2	1	37,5	11,78
P42167	Lamina-associated polypeptide 2, isoforms beta/gamma OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TMPO PE=1 SV=2	4	4	50,6	4,74
P07910	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPC PE=1 SV=4	2	2	33,7	1,85
Q8WWH5	Pseudouridylate synthase TRUB1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TRUB1 PE=1 SV=1	1	1	37,2	0
P62913	60S ribosomal protein L11 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL11 PE=1 SV=2	2	2	20,2	5,24
M0R0C6	Far upstream element-binding protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KHSRP PE=1 SV=2	1	1	76,6	2,43

P22626	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPA2B1 PE=1 SV=2	1	1	37,4	5,16
P40938	Replication factor C subunit 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RFC3 PE=1 SV=2	1	1	40,5	2,91
P62424	60S ribosomal protein L7a OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL7A PE=1 SV=2	3	3	30	6,89
P31942	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPH3 PE=1 SV=2	1	1	36,9	6,5
P61978	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPK PE=1 SV=1	4	4	50,9	6,04
P07741	Adenine phosphoribosyltransferase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=APRT PE=1 SV=2	1	1	19,6	2,6
P52597	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPF PE=1 SV=3	1	1	45,6	5,48
Q9H040	DNA-dependent metalloprotease SPRTN OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SPRTN PE=1 SV=2	1	1	55,1	0
A6NDU8	RAB7A-interacting MON1-CCZ1 complex subunit 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RIMOC1 PE=1 SV=1	1	1	33,6	1,82
P06576	ATP synthase subunit beta, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ATP5F1B PE=1 SV=3	2	2	56,5	3,72
A6NEM2	Host cell factor 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HCFC1 PE=1 SV=2	1	1	213, 3	1,93
A0A499F HX9	DNA replication licensing factor MCM3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MCM3 PE=1 SV=1	1	1	91,9	3,61
O00567	Nucleolar protein 56 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NOP56 PE=1 SV=4	1	1	66	4,52
P38919	Eukaryotic initiation factor 4A-III OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF4A3 PE=1 SV=4	1	1	46,8	0
Q9Y6X9	ATPase MORC2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MORC2 PE=1 SV=2	1	1	117, 8	0
P63261	Actin, cytoplasmic 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACTG1 PE=1 SV=1	7	7	41,8	9,09

Q08211	ATP-dependent RNA helicase A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DHX9 PE=1 SV=4	6	6	140,9	8,86
Q01780	Exosome component 10 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EXOSC10 PE=1 SV=2	3	3	100,8	4,34
Q9Y5B9	FACT complex subunit SPT16 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SUPT16H PE=1 SV=1	1	1	119,8	2,06
P62195	26S proteasome regulatory subunit 8 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PSMC5 PE=1 SV=1	1	1	45,6	2,11
Q01469	Fatty acid-binding protein 5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FABP5 PE=1 SV=3	1	1	15,2	2,04
A0A7P0M RW0	Non-POU domain-containing octamer-binding protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NONO PE=1 SV=1	5	5	59,6	7,98
A0A804F 729	Pyruvate kinase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PKM PE=1 SV=1	1	1	65,9	1,61
P09651	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPA1 PE=1 SV=5	1	1	38,7	4,28
Q9Y4W2	Ribosomal biogenesis protein LAS1L OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LAS1L PE=1 SV=2	1	1	83	1,98
P04181	Ornithine aminotransferase, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=OAT PE=1 SV=1	1	1	48,5	0
P09622	Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DLD PE=1 SV=2	1	1	54,1	1,85
A0A0D9S F53	RNA helicase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DDX3X PE=1 SV=1	1	1	81,4	5,45
P68371	Tubulin beta-4B chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TUBB4B PE=1 SV=1	3	1	49,8	8,54
H7BY16	Nucleolin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NCL PE=1 SV=9	10	10	79,3	26,77
Q9UQE7	Structural maintenance of chromosomes protein 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SMC3 PE=1 SV=2	1	1	141,5	2,68
O43143	ATP-dependent RNA helicase DHX15 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DHX15 PE=1 SV=2	1	1	90,9	0
Q14240	Eukaryotic initiation factor 4A-II OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF4A2 PE=1 SV=2	2	2	46,4	3,79

P39880	Homeobox protein cut-like 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CUX1 PE=1 SV=3	1	1	164, 1	2,04
Q49A26	Cytokine-like nuclear factor N-PAC OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GLYR1 PE=1 SV=4	1	1	60,5	0
Q86U42	Polyadenylate-binding protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PABPN1 PE=1 SV=3	1	1	32,7	2,62
Q7Z4V5	Hepatoma-derived growth factor-related protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HDGFL2 PE=1 SV=1	1	1	74,3	2,91
Q9H583	HEAT repeat-containing protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HEATR1 PE=1 SV=3	1	1	242, 2	1,89
Q2TAY7	WD40 repeat-containing protein SMU1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SMU1 PE=1 SV=2	1	1	57,5	0
Q6KC79	Nipped-B-like protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NIPBL PE=1 SV=2	1	1	315, 9	1,88
Q9NXV6	CDKN2A-interacting protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CDKN2AIP PE=1 SV=3	1	1	61,1	2,04
P78527	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PRKDC PE=1 SV=3	3	3	468, 8	3,69
P52294	Importin subunit alpha-5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KPNA1 PE=1 SV=3	1	1	60,2	2,15
P17480	Nucleolar transcription factor 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=UBTF PE=1 SV=1	1	1	89,4	0
Q14980	Nuclear mitotic apparatus protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NUMA1 PE=1 SV=2	12	12	238, 1	38,57
Q15120	[Pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring)] kinase isozyme 3, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PDK3 PE=1 SV=1	1	1	46,9	2,22
Q8WWQ0	PH-interacting protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PHIP PE=1 SV=2	1	1	206, 6	3,64
Q96E14	RecQ-mediated genome instability protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RMI2 PE=1 SV=2	1	1	15,9	1,89
O75607	Nucleoplasmin-3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NPM3 PE=1 SV=3	1	1	19,3	3,85

Q58F21	Bromodomain testis-specific protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=BRDT PE=1 SV=4	1	1	107, 9	0
P07437	Tubulin beta chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TUBB PE=1 SV=2	4	2	49,6	10,69
Q02978	Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SLC25A11 PE=1 SV=3	1	1	34	3,96
A0A7I2V 4G0	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPA3 PE=1 SV=1	1	1	41,3	4,52
P49756	RNA-binding protein 25 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RBM25 PE=1 SV=3	1	1	100, 1	2,82
Q9UIF9	Bromodomain adjacent to zinc finger domain protein 2A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=BAZ2A PE=1 SV=4	1	1	211, 1	1,84
Q96T23	Remodeling and spacing factor 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RSF1 PE=1 SV=2	1	1	163, 7	0
A0A494C 108	Protein KRI1 homolog OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KRI1 PE=1 SV=1	1	1	83,2	3,16
A0A024R 4E5	High density lipoprotein binding protein (Vigilin), isoform CRA_a OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HDLBP PE=1 SV=1	1	1	141, 4	2,29
O75367	Core histone macro-H2A.1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MACROH2A1 PE=1 SV=5	1	1	39,2	2,62
Q3L8U1	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 9 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CHD9 PE=1 SV=2	1	1	325, 8	0
Q86XP3	ATP-dependent RNA helicase DDX42 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DDX42 PE=1 SV=1	1	1	102, 9	0
Q9H5V9	STING ER exit protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=STEEP1 PE=1 SV=1	1	1	25,6	0
Q14676	Mediator of DNA damage checkpoint protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MDC1 PE=1 SV=3	1	1	226, 5	1,87
Q02878	60S ribosomal protein L6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL6 PE=1 SV=3	2	2	32,7	1,61
A0A0G2JI W1	Heat shock 70 kDa protein 1B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSPA1B PE=1 SV=1	4	3	70,1	6,98

P22090	40S ribosomal protein S4, Y isoform 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS4Y1 PE=1 SV=2	1	1	29,4	2,53
C9JNU6	HIG1 domain family member 1A, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HIGD1A PE=4 SV=1	1	1	10,4	2,1
Q14739	Delta(14)-sterol reductase LBR OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LBR PE=1 SV=2	2	2	70,7	1,83
Q6P4A7	Sideroflexin-4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SFXN4 PE=1 SV=1	1	1	38	0
P62316	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SNRPD2 PE=1 SV=1	2	2	13,5	3,85
Q9H9B1	Histone-lysine N-methyltransferase EHMT1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EHMT1 PE=1 SV=4	1	1	141,4	2,79
P62241	40S ribosomal protein S8 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS8 PE=1 SV=2	1	1	24,2	1,62
Q76FK4	Nucleolar protein 8 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NOL8 PE=1 SV=1	1	1	131,5	2
Q9NWH9	SAFB-like transcription modulator OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SLTM PE=1 SV=2	1	1	117,1	3,97
Q9NY93	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX56 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DDX56 PE=1 SV=1	1	1	61,6	2,87
Q9NVP1	ATP-dependent RNA helicase DDX18 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DDX18 PE=1 SV=2	1	1	75,4	1,69
Q6STE5	SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily D member 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SMARCD3 PE=1 SV=1	1	1	55	3,43
P39023	60S ribosomal protein L3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL3 PE=1 SV=2	3	3	46,1	5,16
Q86YP4	Transcriptional repressor p66-alpha OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GATAD2A PE=1 SV=1	1	1	68	2,09
Q15424	Scaffold attachment factor B1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SAFB PE=1 SV=4	1	1	102,6	2,21

Q9NZI8	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IGF2BP1 PE=1 SV=2	3	3	63,4	3,05
E9PEM3	Run domain Beclin-1-interacting and cysteine-rich domain-containing protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RUBCN PE=1 SV=1	1	1	47,5	0
O60264	SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily A member 5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SMARCA5 PE=1 SV=1	3	3	121, 8	7,38
F5H5D3	Tubulin alpha chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TUBA1C PE=1 SV=1	2	2	57,7	4,94
Q7Z2T5	TRMT1-like protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TRMT1L PE=1 SV=2	1	1	81,7	2,48
Q9H0A0	RNA cytidine acetyltransferase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NAT10 PE=1 SV=2	3	3	115, 7	3,85
Q9H6R4	Nucleolar protein 6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NOL6 PE=1 SV=2	1	1	127, 5	3,22
P08670	Vimentin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=VIM PE=1 SV=4	4	4	53,6	6,01
S4R3H4	Apoptotic chromatin condensation inducer in the nucleus OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACIN1 PE=1 SV=1	2	2	145, 4	9,17
Q1ED39	Lysine-rich nucleolar protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KNOP1 PE=1 SV=1	1	1	51,6	2,83
Q9NW64	Pre-mRNA-splicing factor RBM22 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RBM22 PE=1 SV=1	1	1	46,9	2,02
O15381	Nuclear valosin-containing protein-like OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NVL PE=1 SV=1	3	3	95	8,97
Q8IZL8	Proline-, glutamic acid- and leucine-rich protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PELP1 PE=1 SV=2	1	1	119, 6	2,17
A0A5H1Z RQ2	RNA helicase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DDX17 PE=1 SV=2	2	2	80,4	2,2
Q13263	Transcription intermediary factor 1-beta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TRIM28 PE=1 SV=5	1	1	88,5	0

P62280	40S ribosomal protein S11 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS11 PE=1 SV=3	1	1	18,4	0
P51114	RNA-binding protein FXR1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FXR1 PE=1 SV=3	1	1	69,7	0
P23528	Cofilin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CFL1 PE=1 SV=3	1	1	18,5	7,67
Q12931	Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TRAP1 PE=1 SV=3	4	4	80,1	3,52
O60832	H/ACA ribonucleoprotein complex subunit DKC1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DKC1 PE=1 SV=3	3	3	57,6	14,53
M0R2Z9	SURP and G-patch domain-containing protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SUGP2 PE=1 SV=1	2	2	121,5	5,32
O76021	Ribosomal L1 domain-containing protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RSL1D1 PE=1 SV=3	6	6	54,9	7,28
P40429	60S ribosomal protein L13a OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL13A PE=1 SV=2	3	3	23,6	10,7
J3QQ67	60S ribosomal protein L18 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL18 PE=1 SV=1	2	2	21,8	2,56
Q8IY81	pre-rRNA 2'-O-ribose RNA methyltransferase FTSJ3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FTSJ3 PE=1 SV=2	3	3	96,5	3,49
P09874	Poly [ADP-ribose] polymerase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PARP1 PE=1 SV=4	7	7	113	8,05
Q15366	Poly(rC)-binding protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PCBP2 PE=1 SV=1	2	1	38,6	11,71
P46013	Proliferation marker protein Ki-67 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MKI67 PE=1 SV=2	7	7	358,5	18,59
O00231	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 11 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PSMD11 PE=1 SV=3	1	1	47,4	5,73
Q14566	DNA replication licensing factor MCM6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MCM6 PE=1 SV=1	1	1	92,8	0
Q6PJT7	Zinc finger CCCH domain-containing protein 14 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ZC3H14 PE=1 SV=1	2	2	82,8	3,97

Q00839	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPU PE=1 SV=6	6	6	90,5	8,46
P35232	Prohibitin 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PHB1 PE=1 SV=1	3	3	29,8	5,83
P53007	Tricarboxylate transport protein, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SLC25A1 PE=1 SV=2	1	1	34	2,09
Q13823	Nucleolar GTP-binding protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GNL2 PE=1 SV=1	1	1	83,6	3,81
A0A0C4D G89	RNA helicase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DDX46 PE=1 SV=1	2	2	117,4	3,68
P42345	Serine/threonine-protein kinase mTOR OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MTOR PE=1 SV=1	1	1	288,7	4,12
Q15061	WD repeat-containing protein 43 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=WDR43 PE=1 SV=3	1	1	74,8	1,91
A0A7I2Y QC0	Nucleophosmin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NPM1 PE=1 SV=1	8	8	35,7	12,29
P62979	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS27A PE=1 SV=2	3	3	18	0
Q13416	Origin recognition complex subunit 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ORC2 PE=1 SV=2	1	1	65,9	2,39
P36578	60S ribosomal protein L4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL4 PE=1 SV=5	1	1	47,7	6,03
B5MDF5	GTP-binding nuclear protein Ran OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RAN PE=1 SV=1	2	2	26,2	7,44
P02538	Keratin, type II cytoskeletal 6A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KRT6A PE=1 SV=3	4	1	60	10,87
A0A7I2Y QE1	Importin subunit alpha OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KPNA2 PE=1 SV=1	1	1	57,8	3,86
E7ETY2	Treacle protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TCOF1 PE=1 SV=1	10	10	152,2	38,02
P62753	40S ribosomal protein S6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS6 PE=1 SV=1	1	1	28,7	0
O75533	Splicing factor 3B subunit 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SF3B1 PE=1 SV=3	1	1	145,7	2,2

P51608	Methyl-CpG-binding protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MECP2 PE=1 SV=1	2	2	52,4	5,73
O00148	ATP-dependent RNA helicase DDX39A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DDX39A PE=1 SV=2	1	1	49,1	2,53
A0A0U1R RH7	Histone H2A OS=Homo sapiens OX=9606 PE=3 SV=1	2	2	18,5	4,38
Q14146	Unhealthy ribosome biogenesis protein 2 homolog OS=Homo sapiens OX=9606 GN=URB2 PE=1 SV=2	1	1	170, 4	1,77
F8VZQ9	SAP domain-containing ribonucleoprotein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SARNP PE=1 SV=1	2	2	24,1	3,75
P49959	Double-strand break repair protein MRE11 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MRE11 PE=1 SV=3	1	1	80,5	2,02
Q99623	Prohibitin-2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PHB2 PE=1 SV=2	3	3	33,3	7,8
C9K0J5	Ras association (RalGDS/AF-6) and pleckstrin homology domains 1, isoform CRA_b OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RAPH1 PE=1 SV=1	1	1	141, 1	0
Q13523	Serine/threonine-protein kinase PRP4 homolog OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PRPF4B PE=1 SV=3	1	1	116, 9	7,45
P45880	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=VDAC2 PE=1 SV=2	1	1	31,5	1,95
Q00653	Nuclear factor NF-kappa-B p100 subunit OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NFKB2 PE=1 SV=4	1	1	96,7	0
P05141	ADP/ATP translocase 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SLC25A5 PE=1 SV=7	7	3	32,8	35,8
Q5QJE6	Deoxynucleotidyltransferase terminal-interacting protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DNTTIP2 PE=1 SV=2	1	1	84,4	2,78
A0A804H I25	7-dehydrocholesterol reductase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DHCR7 PE=1 SV=1	1	1	56.3	0.00
Q3ZCQ8	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM50 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TIMM50 PE=1 SV=2	1	1	39.6	0.00
P35268	60S ribosomal protein L22 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL22 PE=1 SV=2	2	2	14.8	0.00

Q9BTC0	Death-inducer obliterator 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DIDO1 PE=1 SV=5	1	1	243. 7	0.00
Q9Y2R4	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX52 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DDX52 PE=1 SV=4	1	1	67.4	0.00
I3L0U5	Coiled-coil domain-containing protein 137 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CCDC137 PE=1 SV=1	1	1	33.5	2.10
Q13148	TAR DNA-binding protein 43 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TARDBP PE=1 SV=1	1	1	44.7	0.00
P61313	60S ribosomal protein L15 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL15 PE=1 SV=2	1	1	24.1	2.15
Q9BQG0	Myb-binding protein 1A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MYBBP1A PE=1 SV=2	2	2	148. 8	1.66
I3L3Y6	Unconventional myosin-Ic (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MYO1C PE=1 SV=1	1	1	19.5	0.00
Q13151	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPA0 PE=1 SV=1	1	1	30.8	0.00
Q15050	Ribosome biogenesis regulatory protein homolog OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RRS1 PE=1 SV=2	1	1	41.2	4.42
A0A0C4D GG9	DNA helicase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CHD4 PE=1 SV=1	1	1	220. 3	0.00
Q9BZE4	GTP-binding protein 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GTPBP4 PE=1 SV=3	1	1	73.9	0.00
D6REE5	Receptor of-activated protein C kinase 1 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RACK1 PE=1 SV=1	1	1	34.9	1.75
Q02880	DNA topoisomerase 2-beta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TOP2B PE=1 SV=3	1	1	183. 2	0.00
Q8IWA0	WD repeat-containing protein 75 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=WDR75 PE=1 SV=1	1	1	94.4	0.00
Q9UIG0	Tyrosine-protein kinase BAZ1B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=BAZ1B PE=1 SV=2	1	1	170. 8	0.00
P60709	Actin, cytoplasmic 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACTB PE=1 SV=1	4	4	41.7	5.46
Q68E01	Integrator complex subunit 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=INTS3 PE=1 SV=1	1	1	118. 0	0.00

Q5SRE5	Nucleoporin NUP188 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NUP188 PE=1 SV=1	1	1	195,9	1.74
O95503	Chromobox protein homolog 6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CBX6 PE=1 SV=1	1	1	43,9	0.00
A0A2R8YD14	40S ribosomal protein S24 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS24 PE=1 SV=1	1	1	19,2	1.80
Q14978	Nucleolar and coiled-body phosphoprotein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NOLC1 PE=1 SV=2	3	3	73,6	4,95
P0DMV8	Heat shock 70 kDa protein 1A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSPA1A PE=1 SV=1	5	4	70	8,92
P43243	Matrin-3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MATR3 PE=1 SV=2	1	1	94,6	4,93
Q14151	Scaffold attachment factor B2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SAFB2 PE=1 SV=1	1	1	107,4	0
Q13573	SNW domain-containing protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SNW1 PE=1 SV=1	1	1	61,5	0
O75683	Surfeit locus protein 6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SURF6 PE=1 SV=3	1	1	41,4	0
Q16666	Gamma-interferon-inducible protein 16 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IFI16 PE=1 SV=3	1	1	88,2	0
O14776	Transcription elongation regulator 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TCERG1 PE=1 SV=2	1	1	123,8	2,01
Q14692	Ribosome biogenesis protein BMS1 homolog OS=Homo sapiens OX=9606 GN=BMS1 PE=1 SV=1	1	1	145,7	0
O75694	Nuclear pore complex protein Nup155 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NUP155 PE=1 SV=1	1	1	155,1	0
Q9NR30	Nucleolar RNA helicase 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DDX21 PE=1 SV=5	6	6	87,3	13,27
O15226	NF-kappa-B-repressing factor OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NKRF PE=1 SV=2	1	1	77,6	3,29
P23497	Nuclear autoantigen Sp-100 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SP100 PE=1 SV=3	1	1	100,4	0
Q8NC51	Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SERBP1 PE=1 SV=2	1	1	44,9	0

P08238	Heat shock protein HSP 90-beta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSP90AB1 PE=1 SV=4	2	2	83,2	0
O75475	PC4 and SFRS1-interacting protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PSIP1 PE=1 SV=1	1	1	60,1	1,76
O75717	WD repeat and HMG-box DNA-binding protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=WDHD1 PE=1 SV=1	1	1	125, 9	0
P55201	Peregrin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=BRPF1 PE=1 SV=2	1	1	137, 4	0
Q6ZRS2	Helicase SRCAP OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SRCAP PE=1 SV=3	1	1	343, 3	0
Q13838	Spliceosome RNA helicase DDX39B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DDX39B PE=1 SV=1	1	1	49	3,17
Q96S94	Cyclin-L2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CCNL2 PE=1 SV=1	1	1	58,1	0
Q9NVD3	SET domain-containing protein 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SETD4 PE=1 SV=1	1	1	50,4	0
O75400	Pre-mRNA-processing factor 40 homolog A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PRPF40A PE=1 SV=2	1	1	108, 7	0
Q5TAX3	Terminal uridylyltransferase 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TUT4 PE=1 SV=3	1	1	185	0
O15391	Transcription factor YY2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=YY2 PE=2 SV=1	1	1	41,3	0
Q8NI27	THO complex subunit 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=THOC2 PE=1 SV=2	1	1	182, 7	2,35
Q9NUU7	ATP-dependent RNA helicase DDX19A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DDX19A PE=1 SV=1	1	1	53,9	0
Q8N108	Mesoderm induction early response protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MIER1 PE=1 SV=2	1	1	57,9	0
O00443	Phosphatidylinositol 4-phosphate 3-kinase C2 domain- containing subunit alpha OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PIK3C2A PE=1 SV=2	1	1	190, 6	0
Q86U86	Protein polybromo-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PBRM1 PE=1 SV=1	1	1	192, 8	0

Q92541	RNA polymerase-associated protein RTF1 homolog OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RTF1 PE=1 SV=4	1	1	80,3	1,84
Q5VYK3	Proteasome adapter and scaffold protein ECM29 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ECPAS PE=1 SV=2	1	1	204, 2	0
P57088	Transmembrane protein 33 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TMEM33 PE=1 SV=2	1	1	28	0
Q9Y4A5	Transformation/transcription domain-associated protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TRRAP PE=1 SV=3	1	1	437, 3	1,89
Q92522	Histone H1.10 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=H1-10 PE=1 SV=1	1	1	22,5	0
Q02078	Myocyte-specific enhancer factor 2A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MEF2A PE=1 SV=1	1	1	54,8	0
Q96P70	Importin-9 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IPO9 PE=1 SV=3	1	1	115, 9	0
Q09161	Nuclear cap-binding protein subunit 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NCBP1 PE=1 SV=1	1	1	91,8	0
Q9UHX1	Poly(U)-binding-splicing factor PUF60 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PUF60 PE=1 SV=1	1	1	59,8	0
P09429	High mobility group protein B1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HMGB1 PE=1 SV=3	2	2	24.9	0.00
Q93084	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ATP2A3 PE=1 SV=3	1	1	109. 2	0.00
Q9NW13	RNA-binding protein 28 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RBM28 PE=1 SV=3	1	1	85.7	1.80
Q8IZQ8	Myocardin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MYOCD PE=1 SV=1	1	1	101. 9	0.00
P49750	YLP motif-containing protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=YLPM1 PE=1 SV=4	1	1	241. 5	0.00
P07900	Heat shock protein HSP 90-alpha OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSP90AA1 PE=1 SV=5	1	1	84.6	0.00
O95400	CD2 antigen cytoplasmic tail-binding protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CD2BP2 PE=1 SV=1	1	1	37.6	0.00

Q9BVP2	Guanine nucleotide-binding protein-like 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GNL3 PE=1 SV=2	1	1	62.0	0.00
Q12888	TP53-binding protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TP53BP1 PE=1 SV=2	1	1	213.4	0.00
Q9NRZ9	Lymphoid-specific helicase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HELLS PE=1 SV=1	1	1	97.0	0.00
O60814	Histone H2B type 1-K OS=Homo sapiens OX=9606 GN=H2BC12 PE=1 SV=3	3	3	13.9	2.28
Q5UIP0	Telomere-associated protein RIF1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RIF1 PE=1 SV=2	1	1	274.3	0.00
P23396	40S ribosomal protein S3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS3 PE=1 SV=2	1	1	26.7	0.00
Q53HI1	Protein unc-50 homolog OS=Homo sapiens OX=9606 GN=UNC50 PE=1 SV=2	1	1	30.4	0.00
Q15022	Polycomb protein SUZ12 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SUZ12 PE=1 SV=3	1	1	83.0	0.00