

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

**AEBP1/ACLP'nin PROTEİN ETKİLEŞİM AĞININ PROTEOMİK  
ve BİYOİNFORMATİK YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

**Hasan Basri KILIÇ**

**Tıbbi Biyoloji Programı  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ANKARA**

**2020**

## TEŞEKKÜR

Birlikte çalıştığım her gün bana yeni şeyler öğreten, engin bilimsel bilgisini ve hayata dair geniş ufkunu sabırla benimle paylaşan danışmanım Prof. Dr. Çetin KOCAEFE'ye

Verdikleri önerilerle tez çalışmalarımı destekleyen değerli jüri üyelerim, Prof. Dr. Serap DÖKMECİ, Prof. Dr. Ayşe Elif ERSON-BENSAN, Doç. Dr. Burcu BALCI-HAYTA ve Doç. Dr. Nurhan ÖZLÜ'ye,

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nın saygıdeğer öğretim üyelerine, Ar. Gör. Tayfun Hilmi AKBABA, grup arkadaşım Duygu SEVİM ve tüm değerli çalışma arkadaşlarıma,

Son olarak bir yıl boyunca benimle birlikte yüksek lisans tezini yazan, birlikte yaptığımız her şeyden keyif aldığım, bana kazandırdığı pozitif alışkanlıklarla yanımda olmadığı anlarda bile beni olduğum insandan daha iyi birisine dönüştüren hayat arkadaşım Sıla GÜNEŞ'e,

En içten teşekkürü bir borç bilirim.

Bu tez kapsamında yapılan tüm çalışmalar Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'nin TAY-2018-17386 numaralı kapsamlı araştırma projesi tarafından desteklenmiştir.

## ÖZET

**Kılıç H. B., AEBP1/ACLP'nin Protein Etkileşim Ağının Proteomik ve Biyoinformatik Yöntemlerle Araştırılması. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2020.** Hücre dışı matriks (ECM) yapısı hücreleri mekanik kuvvetlere karşı bir arada tutarak dokulara yapısal destek kazandırır. Doku hasarı sonucunda ECM'de başta kolajenler olmak üzere geri dönüşsüz yapısal protein birikimi gözlenen patoloji fibrozis olarak isimlendirilir. Fibrozisin iskelet kası veya çeşitli diğer organlarda gerçekleşmesi geri dönüşsüz işlev kaybına yol açmaktadır. Fibrozis sürecinde görev alan düzenleyici proteinlerin aydınlatılması, bu patolojik sürecin yavaşlatılmasına yönelik önemli hedefler ortaya koyabileceği düşünülmektedir. *Adipocyte Enhancer Binding Protein 1 / Aortic Carboxypeptidase Like Protein (AEBP1/ACLP)* mutasyonlarının insanlarda daha esnek ve hasara açık bağ dokusu ile karakterize Ehlers-Danlos Sendromu ile ilişkisi bulunmuş ve bu proteininin kolajen organizasyonu ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür. Hücre farklılaşması ve fibrozis sürecinde ifadesinin arttığı bilinen AEBP1/ACLP'nin ECM olgunlaşması sürecinin bir düzenleyicisi olabileceği düşünülmektedir. İşlevi tam olarak bilinmeyen AEBP1/ACLP proteininin işlevsel ortaklıkları hakkında bilgiler de sınırlıdır. Protein-protein etkileşimlerinin yüksek ölçekli genom bilim araçları ve biyoinformatik analizlerle aydınlatılması proteinlere işlev atfetmek için önemli bir yaklaşımdır. Bu tez çalışmasında protein-protein etkileşimlerinin keşfi için kullanılan “*Proximity-Proteomics*” teknolojisi için gerekli deneysel araçların üretilmesi ve biyoinformatik yöntemlerle iskelet kasına ait transkriptom ve proteom verilerinde AEBP1/ACLP proteinini ifadesine yönelik veri madenciliği çalışmalarının yapılması planlanmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda AEBP1/ACLP'nin çevresindeki proteinlere kimyasal etiket ekleyebileceği deneysel araçlar hazırlanmıştır. Biyoinformatik analizlerle *in vitro* ve *in vivo* deneylerde matrizom proteinlerinin ifadesi transkriptom ve proteom düzeylerinde incelenmiştir. Farklı hücre gruplarında ve doku hasarlarında üretilen matrizom, kolajenler başta olmak üzere karşılaştırmalı şekilde analiz edilmiş, ifadesi ortak ve ayrılan gen listeleri elde edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** AEBP1/ACLP, Hücre Dışı Matriks, Fibrozis, Proteomiks, Bioinformatik

Bu tez kapsamında yapılan tüm çalışmalar Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'nin TAY-2018-17386 numaralı kapsamlı araştırma projesi tarafından desteklenmiştir.

## ABSTRACT

**Kiliç H.B. Investigating the Protein Interaction Network of AEBP1/ACLP Using Proteomics and Bioinformatics Tools. Hacettepe University Graduate School of Health Sciences, M.Sc. Thesis in Medical Biology, Ankara, 2020.** Extracellular Matrix (ECM) is the mechanical supportive structure for cells and tissues. Chronic damage may cause loss of ECM integrity that may result in fibrosis which is the progressive and irreversible accumulation of ECM proteins such as collagens. Fibrosis leads to loss of function in tissues and organs where it may develop likewise the skeletal muscle. Understanding the key regulators of this process may help to stop the progressive deterioration. Mutations in the *Adipocyte Enhancer Binding Protein 1 / Aortic Carboxypeptidase Like Protein (AEBP1/ACLP)* gene have been associated with Ehlers-Danlos Syndrome, characterized with increased elasticity in connective tissues that are vulnerable to physical damage. These findings point to the fact that AEBP1/ACLP may contribute to collagen organization. AEBP1/ACLP was observed to be upregulated in differentiation and fibrosis in the skeletal muscle along with ECM synthesis and organization. Thus it has been hypothesized that AEBP1/ACLP might be a mediator of fibrosis and ECM maturation process. Yet, neither the function nor the protein partners for AEBP1/ACLP has been defined. Identification of protein-protein interactions using high throughput technologies of a protein helps to understand its unknown function. In order to conduct such high-throughput proteomics analyses, proximity proteomics tools are developed and validated in this thesis work. Furthermore, AEBP1/ACLP expression was analyzed in transcriptome and proteom studies conducted in various skeletal muscle sample sets. These analyzes were directed to dissect out alterations in matrisome proteins in both *in vivo* and *in vitro* conditions. Differentially expressed common gene sets were identified in different cell and tissue types modeling regeneration and differentiation that pinpointed alterations of matrisome proteins.

**Keywords:** AEBP1/ACLP, Extracellular Matrix, Fibrosis, Proteomics, Bioinformatics

The studies that conducted under this thesis work was supported by Hacettepe University Scientific Research Unit with project number TAY-2018-17386.

## İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
<b>1. GİRİŞ</b>	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	3
2.1 Hücre Dışı Matrisin Özellikleri	3
2.1.1 Temel Matrizom ( <i>Core Matrisome</i> )	4
2.1.2 Matrizom İlişkili Proteinler ( <i>Matrisome-Associated Proteins</i> )	5
2.1.3 <i>AEBP1/ACLP</i> 'nin Matrizomdaki Yeri ve Önemi	7
2.2 İskelet Kası ECM Yapısı ve Özellikleri	9
2.2.1 İskelet Kası ECM'inde Salgılanan Faktörler	11
2.3 Proteomiks Teknolojileri	13
2.3.1 Hedefli Proteomiks Yaklaşımları	14
<b>3. GEREÇ ve YÖNTEM</b>	16
3.1 <i>In silico</i> Analiz Gereçleri ve Veri Setleri	16
3.1.1 <i>In silico</i> Analiz Gereçleri	16
3.1.2 <i>In silico</i> Analizlerde Kullanılan <i>In vivo</i> Transkriptom Veri Setleri	16
3.1.3 <i>In silico</i> Analizlerde Kullanılan <i>In vitro</i> Transkriptom Veri Setleri	16
3.1.4 <i>In silico</i> Analizlerde Kullanılan Proteom Veri Setleri	17
3.2 <i>In silico</i> Yöntemler	17
3.2.1 Transkriptom Analizleri	17
3.2.2 Proteom Analizleri	18
3.3 Islak Laboratuvar Gereçleri	18
3.3.1 DNA Klonlama	18

3.3.2 DNA Agaroz Jel Elektroforezi	20
3.3.3 Bakteri Kültürü	21
3.3.4 Hücre Kültürü	21
3.3.5 Biotinlenme Reaksiyonu ve İmmüfloresan Boyama	22
3.3.6 Protein İzolasyonu ve Kantitasyonu	23
3.3.7 Kapiller Nano-İmmünassay	23
3.4 Islak Laboratuvar Yöntemleri	23
3.4.1 DNA Klonlama	23
3.4.2 C2C12 ve OP9 Hücre Hattının Çoğaltılması	27
3.4.3 Biotinleme ve İmmüfloresan Boyama	29
3.4.4 Hücrelerden Protein İzolasyonu ve Kantitasyonu	31
3.4.5 Kapiller Nano-Immunoassay	31
<b>4. BULGULAR</b>	33
4.1 Klonlama ve Vektörlerin Hazırlanması	33
4.2 ACLP-HRP'nin Transfeksiyonu ve İmmüfloresan Boyama	36
4.3 ACLP-HRP ile biotinlenmenin kapiller nanoimmunoassay ile görüntülenmesi	47
4.4 Matrizomun Transkriptom ve Proteom Düzeyinde Analizi	49
4.4.1 Matrizomun Transkriptom Düzeyinde Analizi	49
4.4.2 Matrizomun Proteom Düzeyinde Analizi	59
<b>5. TARTIŞMA</b>	64
<b>6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER</b>	71
<b>7. KAYNAKÇA</b>	73
<b>8. EKLER</b>	
<b>EK-1:</b> C2C12 hücrelerinde transkriptomda 2 kat ve üzeri artış gösteren matrizom elemanları.	
<b>EK-2:</b> FAP hücrelerinde transkriptomda 2 kat ve üzeri artış gösteren matrizom elemanları.	
<b>EK-3:</b> In vivo modellerde hasar sonrasında ifadesi 2 kat ve üzerinde artış gösteren matrizom genleri.	
<b>EK-4:</b> C2C12 miyotüplerinde gerçekleştirilmiş olan sekretom çalışmasına ait proteom verileri.	

**EK-5:** İnsan primer miyoblastlarının miyotüplere dönüştürülmesinden elde edilen proteom çalışmasının matrizom analizi.

**EK-6:** Dijital Makbuz

**EK-7:** Turnitin Sonucu

**EK-8:** Etik Kurul Kararı

**9.ÖZGEÇMİŞ**

## SİMGELER VE KISALTMALAR

°C	Derece santigrad
ADAM	<i>A Disintegrin And Metalloprotease</i>
ADAMTS	<i>A Disintegrin And Metalloprotease With Thrombospondin Motifs</i>
BCA	<i>Bicinchoninic Acid</i>
bç	Baz çifti
cDNA	komplementer DNA
DLD	<i>Discoidin-Like Domain</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	<i>Dimethyl sulfoxide</i>
DNA	Deoksiribo Nükleik asit
dNTP	<i>Deoxynucleotide</i>
DTT	<i>Dithiothreitol</i>
ECM	Hücre Dışı Matriks
EDTA	Etilen Diamine Asetik Asit
FAP	<i>Fibro-Adipogenic Progenitors</i>
FCS	Fötal Sığır Serum
GAG	Glikozaminoglikan
HGF	<i>Hepatocyte Growth Factor</i>
IGF1	<i>Insulin-Like Growth Factor 1</i>
IL1 $\beta$	<i>Interleukin 1 Beta</i>
IL-6	<i>Interleukin 6</i>
IL-8	<i>Interleukin 8</i>



IL-15	<i>Interleukin 15</i>
kDa	kilo Dalton
LTBP	<i>Latent TGF<math>\beta</math>-binding Protein</i>
MgCl <sub>2</sub>	Magnezyum klorür
MMPs	Matris Metaloproteinazlar
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PDGFR $\alpha$	<i>Platelet-Derived Growth Factor Receptor A</i>
RNA	Ribo Nükleik asit
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
TGF $\beta$ 1	<i>Transforming growth factor beta 1</i>
TIMPs	<i>Tissue Inhibitors of Metalloproteinases</i>
Tris-HCl	<i>TRIS Hydrochloride</i>

## ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Matrizom yapısı ve elemanları	3
2.2. ACLP proteininin Discodin Domain Receptor (DDR) üzerinden homoloji modelleme çalışması.	9
2.3. İskelet kası yapısı.	10
2.4. ACLP-HRP füzyon proteininin biyotinleme reaksiyonu gerçekleştirmesi	15
3.1. pcDNA <sup>TM</sup> 4/TO/myc-6xHis A vektör haritası.	19
3.2. pCAG-HRP-TM vektör haritası.	20
4.1. pcDNA4A/TO/-Aebp1_myc-6xHis vektörün doğrulanması.	33
4.2. pcDNA4A/TO/-Aebp1_myc-6xHis vektörün doğrulanması. Aebp1-201 N-terminal kromotogram görüntüsü.	34
4.3. pcDNA4A/TO/-Aebp1_myc-6xHis vektörün doğrulanması. Aebp1-201 C-terminal kromotogram görüntüsü.	34
4.4. pcDNA4A/TO/-Aebp1_myc-6xHis vektörüne HRP füzyon peptidinin HA ve c-Myc epitoplarıyla birlikte eklenmesi.	34
4.5. pcDNA4A/TO/-Aebp1_HA-HRP-myc-6xHis klonlarının KpnI enzim kesimi ile doğrulanması %1'lik agaroz jel.	35
4.6. C2C12 hücrelerinde GFP ile transfeksiyon kontrolü, 10X büyüme.	36
4.7. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> uygulanmamış C2C12 hücrelerinde HA ve Streptavidin görüntüleri	37
4.8. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> uygulanmış C2C12 hücrelerinde HA ve Streptavidin görüntüleri	38
4.9. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> uygulanmamış C2C12 hücrelerinde c-Myc ve Streptavidin görüntüleri	39
4.10. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> uygulanmış C2C12 hücrelerinde HA ve Streptavidin görüntüleri,	40
4.11. c-Myc ve PDI eş boyaması.	41
4.12. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> uygulanmamış C2C12 hücrelerinde PDI ve Streptavidin görüntüleri	42
4.13. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> uygulanmış C2C12 hücrelerinde PDI ve Streptavidin görüntüleri	43
4.14. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> uygulanmış C2C12 miyotüp hücrelerinde PDI ve Streptavidin görüntüleri	44
4.16. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> uygulanmış C2C12 hücrelerinde GOLPH4 ve Streptavidin görüntüleri	45

4.17.	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> uygulanmış C2C12 hücrelerinde GOLPH4 ve Streptavidin görüntüleri	46
4.18.	C2C12 hücrelerinde anti-HA ve anti-Vinculin ile kapiller nano-immunoassay.	47
4.19.	OP9 hücrelerinde anti-HA ve anti-Vinculin ile kapiller nano-immünassay.	48
4.20.	C2C12 ve OP9 hücrelerinde Streptavidin-HRP ile kapiller nano-immünassay.	48
4.21.	C2C12 hücrelerinin farklılaşma sürecinde ifadesi 2 kat ve üzerinde artış sergileyen matrizom genlerinin transkriptom düzeyinde analizi.	51
4.22.	FAP hücreleri transkriptom düzeyinde matrizom analizi.	53
4.23.	Miyoblast C2C12 hücreleri ile fibroadipojenik öncül FAP hücrelerinin kolajen alt tipleri transkriptlerinin değişiminin karşılaştırılması.	54
4.24.	In vivo modellerde transkriptom düzeyinde matrizom analizi.	56
4.25.	İskelet kası kök hücre gruplarının geri dönüşümsüz hasara katkılarının karşılaştırılması.	59
4.26.	C2C12 miyotüplerinde proteom düzeyinde glikoproteinlerin analizi.	60
4.27.	C2C12 miyotüplerinde proteom düzeyinde kolajenlerin ve proteoglikanların analizi	60
4.28.	C2C12 miyotüplerinde kolajenlerin transkriptom düzeyindeki ifade değişimlerinin proteom düzeyindeki etkisi.	61
4.29.	İnsan primer miyoblastların miyotüplere farklılaşmasında ifadesi en çok değişen 14 protein.	62

## 1. GİRİŞ

Hücre dışı matriks (*Extracellular Matrix / ECM*) doku stromasına fiziksel destek sağlayarak dış etmenlerden korumasının yanı sıra; dokunun oluşumu, farklılaşma süreçlerinin düzenlenmesi ve homeostasisin idamesinde biyokimyasal ve yapısal olarak görev alır (1). Fizyolojik koşullarda ECM; kolajenler, elastinler, fibronektinler ve laminler gibi protein yapıları ve glikozaminoglikan'ların (GAG) proteinlere eklendiği proteoglikan yapıları ile kurulur. Bu yapısal elemanlardan oluşan sağlıklı bir ECM hücrelere sağladığı mekanik destekle doku bütünlüğünün fiziksel kuvvetler karşısında korunmasını sağlar (2). Dokuların ve organların fonksiyonlarını yerine getirmelerinde ECM yapısının bütünlüğü kadar esnekliğine de ihtiyaç duyulmaktadır.

Dokularda oluşan kronik hasar ile birlikte, oluşan hasarın tamiri sürecinde ECM elemanlarının sentezinin artması ve bu proteinlerinin geri dönüşümsüz bir birikimi sonucu dokunun fizyolojik koşullarla karşılaştırıldığında, esnekliğini kaybetmesi fibrozis olarak isimlendirilir (3–5). ECM elemanlarının geri dönüşümsüz bir biçimde birikmesi vücuttaki farklı dokularda, yaşamı tehdit eden boyutlara gelebilir. Akciğerde görülen idiopatik pulmoner fibrozis, böbrekte görülen tubulointerstisyel renal fibrozis organ yetmezliklerine ve ölüme neden olabilmektedir (3,6). Birçok farklı dokuda görülebilen fibrozisin ortak noktası ise kolajen birikimidir. Özellikle belirli kolajen alt tiplerinin birikimi dokuda geri dönüşsüz işlev kaybına yol açar (4).

Fibrozis sürecinde yapısal proteinlerin düzenlenmesi ECM'ye salınan enzimler aracılığı ile olur(4,7). Bu enzimler yapısal proteinlerin kırılması (*peptidase*) veya birbirlerine bağlanması (*cross-linking*) görevlerini yerine getirir. Fibrozis sürecinde ifade ve aktivite artışı sergileyerek ECM'in yeniden organize edilmesinde görev alan düzenleyici proteinlerin ilaç hedefi olabilecekleri öngörülmektedir (7).

Bu tez çalışmasının odağında bulunan *AEBPI/ACLP*'nin ECM olgunlaşması ve fibrozis ile ilişkili olduğu bilinmektedir (8–10). *ACLP* proteini N-terminalinde bulundurduğu sinyal peptid dizisi, diskodin benzeri kısım (DLD) ve C-terminalinde bulundurduğu karboksipeptidaz homolojisi gösteren *Carboxypeptidase Like Domain*

(CLD) içeren 1158 amino asitten oluşur (11). Çalışma grubumuz tarafından, iskelet kası fibrozisi ile ilişkilendirilmiş olan ACLP'nin iskelet kasında miyoblastların myotüplere dönüşümü sırasında ortama salgılandığı gösterilmiştir (12). Myotüp oluşumunun tamamlanması sonrası, ACLP ifadesi önemli ölçüde azalmaktadır (13,14). Morfogeneze eşlik eden ECM olgunlaşması süreci ve patolojik fibrozis gelişimi ile ACLP ifadesi artış göstermektedir. ACLP mutasyonları, insanlarda bağ dokusu esnekliği ile karakterize Ehlers-Danlos sendromu ile ilişkilendirilmiştir (15–18). *AEBP1/ACLP* genindeki mutasyonlar sonucunda kolajen organizasyonunun tamamlanamadığı saptanmıştır (16). Şimdiye dek yapılan çalışmalar ACLP proteininin görev aldığı süreçleri tanımlamakla birlikte bu proteinin işlevi bilinmemektedir.

Bir proteinin işlevlerini tanımlama sürecinde, etkileştiği protein partnerlerinin belirlenmesi görev aldığı süreç ve yolların aydınlatılmasında yardımcı olmaktadır. Şimdiye dek, ACLP proteinine ilişkin doğrudan kurulmuş bir etkileşim verisi yoktur. Yapılan çalışmalar ACLP'nin eksport sinyalinin varlığını ve ECM proteini olduğunu destekler bulgular vermesine rağmen, işlevi hakkında bilgi vermemiştir (8,11,16).

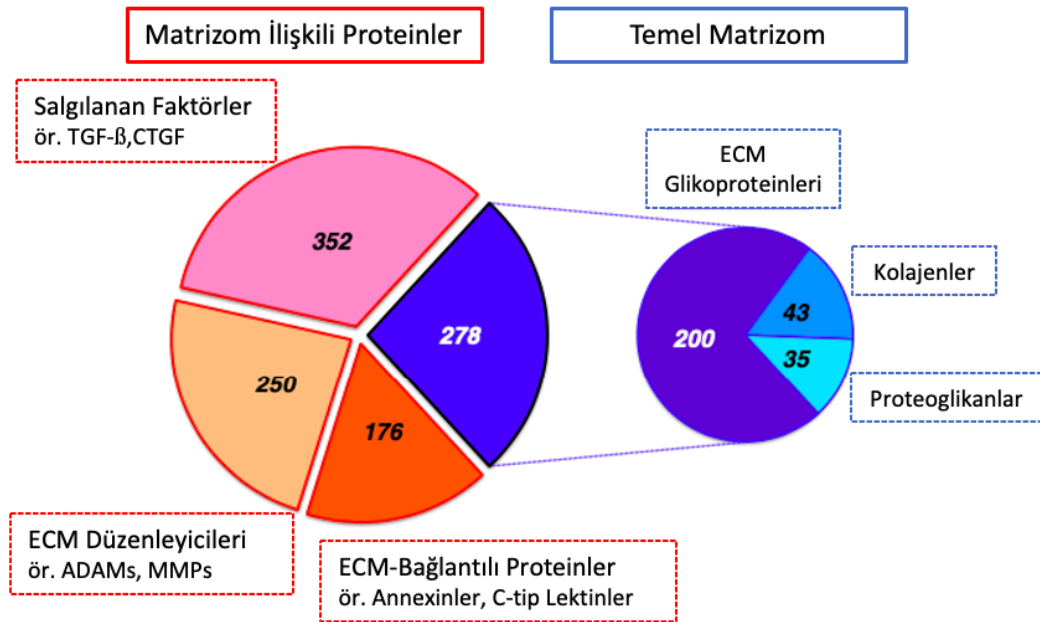
Proteinlerin etkileşim partnerlerini bulmak adına yapılan tanımlayıcı çalışmalar kütle spektrometresi ile hız kazanmıştır. Aday proteinlerin hedefli bir deney tasarımında antikorlar yardımıyla tek tek incelenmesi yerine hücrenin belirli bir durumdaki toplam protein ifadesinin bütüncül olarak incelendiği proteomiks yöntemi bu teknoloji sayesinde uygulamaya geçmiştir. Geçmiş yıllarda santral dogmanın ilk iki elemanı olan nükleik asitlere ait genomik ve transkriptomik yaklaşımlar yaşama dair bilgi edinme hızımızı önemli ölçüde arttırmıştır. Yüksek ölçekli proteomik yaklaşımlarla birlikte hücrede nihai olarak işlev gören biyomolekül olan proteinler bütüncül bir yaklaşımla tanımlanabilmektedir.

Bu tez çalışmasında, *AEBP1/ACLP*'nin işlevlerinin aydınlatılması amacıyla; ıslak laboratuvar çalışmalarıyla proteomik teknolojilerinden olan *proximity-proteomics* için gerekli deneysel gereçlerin hazırlanması, *in silico* analizlerle transkriptom ve proteom veri setlerinin de fizyolojik ve patolojik koşullarda ECM değişiminin incelenmesi amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 Hücre Dışı Matriksin Özellikleri

Hücre dışı matriks, (*Extracellular matrix*, ECM) hücreleri proteinler ve proteinlere bağlı polisakkaritlerle çevreyerek hücrelerin dokuları oluşturmasını sağlar. ECM'i oluşturan bu proteinler aynı zamanda hücre dışında su tutulmasını sağlar. Hücre dışı matriks yapısının içerdiği proteinlerin ve glikoproteinlerin çeşitleri ve su tutma kapasitesi dokunun ihtiyaçlarına göre farklılık gösterir. Farklı dokularda proteinler ve glikoproteinler dış kuvvetlere karşı hücreleri bir arada tutacak kadar güçlü ve dokunun işlevlerini yerine getirebilmesine yetecek kadar esnek olmalıdır (19). Dokularda, hücrelere sağladığı yapısal desteğin yanı sıra ECM; hücrelerin tutunması ve göç edebilmesi için iskele oluşumu, büyüme ve farklılaşma sinyallerinin iletimi gibi temel yaşamsal olayların gerçekleşmesi için de önemli görevler üstlenmektedir (20).



Şekil 2.1. Matrizom yapısı ve elemanları (21).

ECM proteinleri geçmişte yapılarına göre (22), protein ya da proteoglikanlar (23), kolajenler ve kolajen olmayanlar (24) gibi yapısal özelliklerine göre sınıflandırılmaya çalışılmıştır. Günümüzde daha kapsamlı bir sınıflama ile bu

yaklaşım terk edilmiş, yapısal olmayan, düzenleyici rolleri olan, sinyal iletiminde görev alan ve henüz görevi tam olarak aydınlatılamamış fakat ECM proteini olduğu bilinen yapılar da ECM proteinleri ile birlikte sınıflandırılmaya dahil edilmektedir. 2016 yılında yapılan bir çalışmada (21), 1037 genden sentezlenen ECM proteinleri *matrisome* ismi ile genel olarak isimlendirilip temelde *core matrisome* (temel matrizom) ve *matrisome associated proteins* (matrizom ilişkili proteinler) olarak sınıflandırılmıştır.

### 2.1.1 Temel Matrizom (*Core Matrisome*)

Temel matrizom yapısında bulunan elemanlar hücrelere yapısal destek sağlayan makromolekülleri içermektedir. Temel matrizom yapısında ECM'in yapısal proteinleri 3 alt başlıkta incelenebilir: 1. kolajenler, 2. proteoglikanlar, 3. ECM glikoproteinleri. Temel matrizom, literatürde ayrı ayrı yapılmış yapısal proteinlerin tamamını içermektedir.

Yapısal destek proteinlerini içinde ilk sırada gelen kolajenler, keşif sıralarına göre Roma rakamları ile isimlendirilmiş 28 alt tipi içermektedir. Bu polipeptidleri kodlayan 45 farklı gen olduğu bilinmektedir (25). Kolajenlerin ortak özelliği alfa heliks sekonder yapılarının oluşturduğu 3'lü heliks tersiyer yapısı oluşturmaları ve Gly-Pro-X yani glisin ve prolin amino asiti tekrarları içermeleridir (24). Kolajenler buldukları konumlara göre; fibriler, fibriler ile ilişkili (*FACIT*), bazal membran ilişkili, uzun zincirli, filamentöz, kısa zincirli, multipleksinler ve membran ilişkili (*MACIT*) olarak sınıflandırılmıştır. Farklı dokularda, dokunun ihtiyaçlarına cevap olacak şekilde farklı alt tip kolajenler sentezlenir. Kemik yapısının %80'inden fazlası tip-I kolajen'den oluşurken, eklem yapısında bu oran %50'ye düşmektedir (19). Yapı itibariyle ECM'den zengin dokulardan olan iskelet kasının kuru ağırlığının %10 kadarı kolajenlerden oluşmaktadır (26). İskelet kasında kolajen tip I, III, IV, V, VI, XII, XIII, XIV, XV, XVIII, XXII görülmektedir. Fibriler tip olan I ve III yaklaşık olarak eşit miktarda bulunarak iskelet kası kolajenlerinin %75'ini oluşturmaktadır (19,27).

Proteoglikanlar, yoğun olarak glikozaminoglikan (GAG) eklenmiş, genellikle hücre yüzeyine takılı bir şekilde bulunan protein yapılarıdır. GAG yapıları genellikle dallanma içermeyen, tekrarlı disakkarit yapılarından oluşan uzun polisakkarit

zincirleridir. Proteoglikan yapıları iskelet kası ve kemikte glikozil grupları eklenmiş yapıların kurulması için gereklidir. İskelet kasında ECM yapısının önemli bir kısmını özellikle dekorin, biglikan gibi *Small Leucine Rich Proteoglycans* (SLRPs) (çok miktarda lösin amino asitini içeren) küçük proteoglikanlar oluşturur (28). Proteoglikanların görevi yapısal destekle sınırlı kalmaz. Örnek olarak betaglikan bir *Transforming Growth Factor-Beta III* (TGFBR3) reseptörü olarak işlev görür (29,30). Proteoglikan yapılarına glikozil grupları ekleyen enzimlerde meydana gelen mutasyonlar, ECM'in yapı düzeninin bozulduğu, aşırı elastik cilt ile karakterize Ehlers-Danlos Sendromu (EDS) ile ilişkilendirilmiştir (31).

Kolajen olmayan glikoproteinler, hücre yüzeyinde bulunan; hücrenin bölünme farklılaşma, göç, hücre-hücre etkileşimi gibi temel işlevleri gerçekleştiren integrinler gibi protein yapıları ile etkileşen kısımları içermektedir. Hücrelerin doku ile fiziksel bağını sağlamasının yanı sıra sinyal iletiminde de görev alır. İçerdikleri Arg-Gly-Asp (RDG) tekrarları ile oluşturdukları hidrofobik loop yapıları glikoproteinlerinin işlevsel kısımlarını oluşturur. Laminin trimerleri ve fibronektin dimerleri bu yapılar arasında tüm dokularda ve özellikle iskelet kasında en çok bulunan ve en çok işlev gören yapılardır (20). Laminin heterotrimerlerinden Laminin-211 (Merosin) iskelet kasında bazal membrana özgüdür (32).

### 2.1.2 Matrizom İlişkili Proteinler (*Matrisome-Associated Proteins*)

Matrizom ilişkili proteinler kendi aralarında 3 alt başlıkta gruplanmaktadır: 1. Salgılanan faktörler, 2. ECM düzenleyicileri, 3. ECM bağlantılı proteinler.

ECM yapısında kolajen olan veya kolajen olmayan glikoproteinlerin oluşturduğu *core matrisome* yapısının kurulmasında ECM düzenleyicileri görev alır. Bu düzenleyici proteinler; ECM'in yapısal desteğini sağlayan *core matrisome* elemanlarının protein sentezi sonrası olgunlaşmasında, olgunlaşan proteinlerin birbirlerine kovalent bir şekilde bağlanmasında ve kırılmasında, görev alan proteaz işlevinde enzimlerdir. ECM yapısının kurulmasında önemli görev alan proteazlar 3 temel grupta incelenebilir; 1. Çinko metalloproteinazlar, 2. Sistein ve aspartat proteinazlar, 3. Serin proteinazlar (33).



Çinko metalloproteinazlar ailesi matriks metalloproteinazlar (MMPs), *A Disintegrin and Metalloprotease* (ADAMs) ve *A Disintegrin and Metalloprotease With Thrombospondin Motifs* (ADAMTS)'lerden oluşmaktadır. İnsanlarda tamamı endopeptidaz işlevi gören 23 farklı MMP bulunur. MMP'ler N-terminal sinyal dizisi, bir propeptid, katalitik kısım ve çinko bağlayan kısım bulundurur. MMP'ler ECM'e doğrudan salınabileceği gibi hücre yüzeyine de tutunmuş bir şekilde bulunabilir. MMP'ler kolajenlerin kırılmasında görev alırken MMP-2, *Pro-collagen C-proteinase enhancer-1 (PCOLCE)* geninin proteinini C-terminalinden kırarak olgunlaştırır. MMP-2 aynı zamanda ECM'de jelse yapıdaki kolajen IV, V ve elastini parçaladığı için gelatinase A, ve majör MMP'lerden olan MMP-9 gelatinase B olarak isimlendirilmiştir. Kolajen ve kolajen olgunlaşmasında görev alan proteinlere ek olarak, tropoelastin MMP-12, osteopontin MMP-2-3-7-9 gibi önemli ECM proteinleri MMP'lerce kırılabilir (34).

ADAM ve ADAMTS oluşturduğu adamalysin ailesi hücre zarında yerleşimli proteinazları içerir. 22 genden oluşan ADAM'ların yalnız 12'si aktif proteaz işlevi görmektedir. ADAM-9/10/17 kolajen olgunlaşmasında görev alırken, ADAMTS-1/4/5 gibi ADAMTS'ler proteoglikanları ve ADAMTS-2/3/5 ise prokolajen-I/III gibi majör kolajenleri olgunlaştırabilir.

Adamalysin ailesine ek olarak *astacin* metalloproteaz ailesi 6 üyeden oluşur. *Bone Morphogenic Protein 1* (BMP1) ve splicing varyantı olan *mammalian Tolloid* (mTLD) ve benzeri bir protein olan (mTLL1) prokolajenleri C-terminalinden kırarak olgunlaştırır.

11 farklı genden oluşan *Cathepsin* gen ailesi (B,C,F,H,K,L,O,S,V,X,W) sistein ve aspartat proteinazları oluşturur. Lizozomlarda bulunan katepsinler ECM'e salındıklarında ECM yapısının şekillenmesine katkıda bulunur. *Cathepsin B* doğrudan kolajen-XVIII üzerine etki edebileceği gibi, *Tissue Inhibitor of Metalloproteinase* (TIMP)'leri inaktivite ederek ortamdaki MMP aktivitesinin ve olgun kolajen miktarının artmasını sağlar.

ECM temel matrisom elemanları ECM düzenleyici elemanları sayesinde olgunlaştırılırken, ECM'e salınan salgı faktörleri ve sinyal molekülleri hem ECM *core*

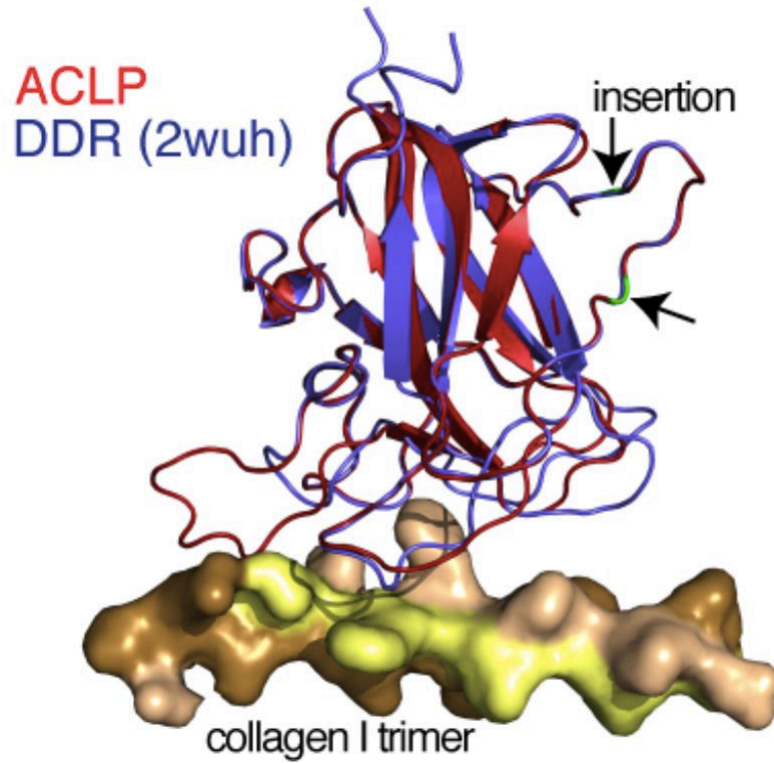
*matrisome* hem de ECM regülatör elemanlarının ne kadar üretileceğini belirler. ECM yapısının üretimini kontrol eden sinyal molekülleri arasında TGF- $\beta$ , CTGF, Wnt yolağı, *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *epidermal growth factor* (EGF) ve *fibroblast growth factor* (FGF) bulunmaktadır (5). VEGF ve FGF ECM'e salgılandıktan sonra heparan sülfat içeren proteoglikanlar tarafından tutulur ve ECM içinde depolanmış olur. Bu büyüme faktörlerinin, heperanaz gibi enzimlerce kesilerek ECM'den ayırmasıyla çözünebilir hale getirilen faktörler sinyal iletimi görevini başlatabilme yeteneği kazanır (35). Hücrelerden *Latency Associated Peptide* (LAP) olarak ECM'e salgılanan TGF- $\beta$ , hücre dışında *Latent TGF- $\beta$  Binding Protein* (LTBP)'lerce ECM yapısının içerisinde tutulur. ECM yapısının bozulması ile gelişen inflamasyon sonucunda ECM'de bulunan proteazlarla kırılarak aktive edilen TGF- $\beta$ , reseptörlerine bağlanarak SMAD2-3 'ün fosforile olmasını ve çekirdek içine girmesini sağlar. Oluşan SMAD 2-3-4 kompleks yapısı ECM yapısında önemli görevler alan *COL1A1*, *COL3A1*, *TIMP1* gibi genlerin transkripsiyonunu başlatır (7). ECM proteinlerinin fizyolojik koşullarda, dokuların oluşumu sırasında ortama salınan büyüme faktörleri hücrelerin ECM proteinlerini üretmeleri için gereken süreçleri başlatır. ECM yapısının sağlıklı bir şekilde kurulmasıyla, TGF- $\beta$ , FGF, VEGF gibi önemli büyüme faktörleri ECM yapısı içinde hapsedilir ve sessiz bir şekilde bekletilir. Dokuda meydana gelen hasarlarla birlikte, ECM yapısının tamirinde bu büyüme faktörleri yeniden aktive edilir ve sinyal iletimi süreci başlar.

### 2.1.3 AEBP1/ACLP'nin Matrizomdaki Yeri ve Önemi

Yapılan çalışmalarca ECM yapısına katıldığı bilinen ve kolajence zengin bölgelerde görülen (8,9) *Adipocyte Enhancer Binding Protein 1 / Aortic Carboxypeptidase Like Protein* AEBP1/ACLP N-terminalinde içerdiği thrombospondin tekrarları, kolajen bağlama özelliğine sahip diskodin bölgesi ve inaktif olduğu öne sürülen metalloproteinaz kısmından oluşur (16). İskelet kasında morfogenezle birlikte ECM yapısı kurulumu sırasında ACLP ifadesinin arttığı, miyoblastların miyotüplere farklılaşması sonrası ifadenin azaldığı görülmüştür. Bu gözlemlere paralel olarak ECM yapısındaki hasar sonucunda geri dönüşsüz ECM birikimi görülen fibrozis patolojisinde de ACLP'nin ifadesinin arttığı, akut iskelet kası hasar tamiri sürecinin tamamlanmasıyla ACLP ifadesinin azaldığı bilinmektedir.

Bu *in vitro* gözlemlere ek olarak genetiği değiştirilmiş fare modellerinde *AEBPI* -/- farelerin karın ön duvarının kapanmamış bir şekilde doğduğu gözlenmiştir (9). İnsanlarda ise *AEBPI* geninde görülen varyasyonların otozomal resesif kalıtım modeli ile aktarılarak Ehlers-Danlos Sendromu'nun (EDS) klasik benzeri tip 2 ile ilişkili olduğu gözlemlenmiştir (MIM: 618000) (15,17,18). Ehlers-Danlos Sendromu; bağ dokuda, eklemlerde, tendonlarda ve damarlarda çabuk yaralanmaların görülmesiyle ve bu dokuların sağlıklı bireylerdeki dokulara kıyasla daha esnek olmasıyla karakterizedir. Temel matrisom proteinlerinden olan *COL3A1*'de görülen varyasyonlar otozomal dominant kalıtımla vasküler tip EDS'ye (MIM:130050), *COL5A1*'de görülen varyasyonlar ise otozomal dominant kalıtım modeliyle kalıtılarak klasik EDS-I ile ilişkilendirilmiştir(MIM:130000)(18,36). (15–17,37). Bir ECM düzenleyicisi olan ve kolajenlerin enzimatik olarak olgunlaşmasında görev alan Tenascin-XB geninde (*TNXB*) görülen varyasyonlar ise otozomal resesif kalıtım modeliyle aktarılarak klasik benzeri EDS olarak isimlendirilen tip ile ilişkilendirilmiştir (MIM:606408) (31,38). Bu mutasyon sonucunda kolajen organizasyonunun doğru bir şekilde kurulamadığı gözlenmektedir. Bu gözlemler, EDS ile ilişkilendirilmiş olan *AEBPI* geninden üretilen ACLP proteininin de kolajen organizasyonu ve ECM yapısının kurulması ile ilgili görevler alabileceğini düşündürmektedir (15,17). 3 boyutlu yapısı bilinmeyen ACLP proteininin, diskodin bölgesi reseptörü (*Discodin Domain Receptor*) ile yapılan homoloji modelleme çalışması ACLP proteininin kolajen I homotrimer yapısı ile etkileşebileceğini göstermiştir(16).

Yakın zamanda ACLP proteini üzerine yayımlanmış olan çalışmada, hücre dışı salınımı sürecinde glikozillendiği tahmin edilen ACLP'nin Asp-519 ve Asp-913 amino asitlerinden glikozil grubu takılabileceği ve bu glikozil eklenme işleminin gerçekleşmemesi durumunda ACLP'nin hücrenin dışına çıkamadığı gösterilmiştir (16).



**Şekil 2.2.** ACLP proteininin *Discodin Domain Receptor* (DDR) üzerinden homoloji modelleme çalışması (16).

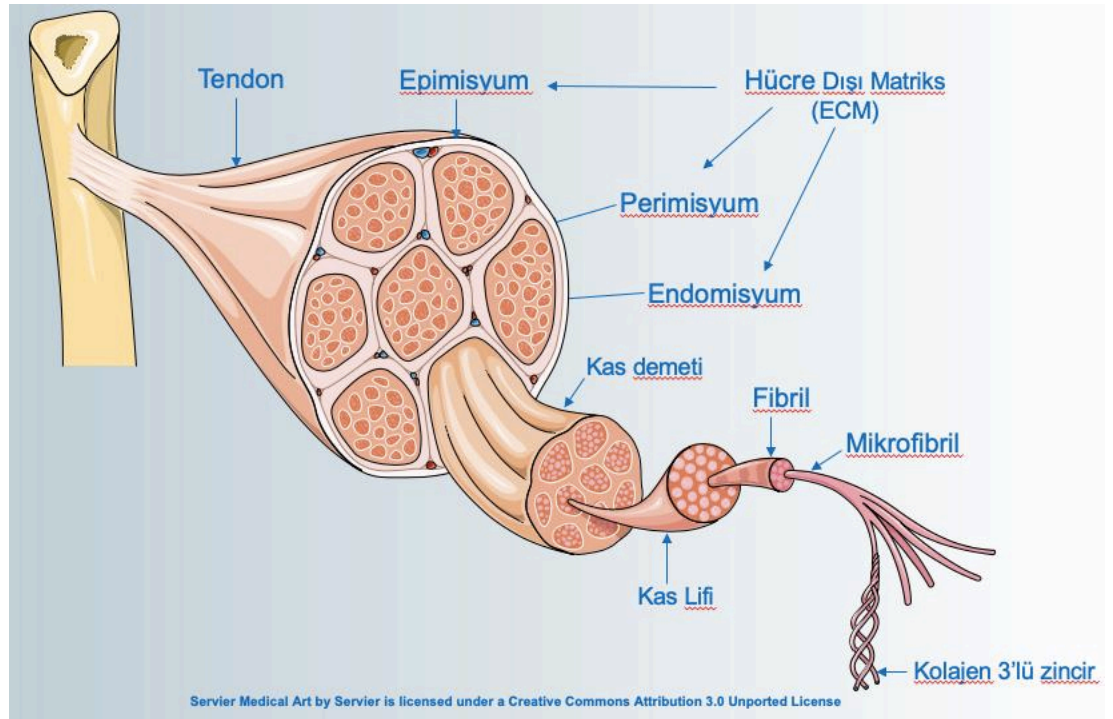
Bir ECM proteini olan ACLP'nin, fizyolojik ya da patolojik ECM oluşumu süreçlerinde ifadesinin arttığı, düz kas ve iskelet kasında ECM'in kurulmasında ve yeniden düzenlenmesinde görev aldığı gözlemlenmiştir(8,9,12). Bu gözlemler ışığında işlevi henüz aydınlatılmamış olan ACLP proteininin işlevlerini tanımlamak amacıyla ECM'den ve özellikle kolajenden zengin bir doku olan iskelet kası ve ilişkili ECM yapıları geçerli bir model olma özelliği göstermektedir.

## 2.2 İskelet Kası ECM Yapısı ve Özellikleri

İnsanlarda vücut kütlelerinin erkeklerde %40'ı, kadınlarda %30'u iskelet kasından oluşmaktadır (27). İskelet kasının temel görevi dik bir postür ve hareketi sağlamaktır. İskelet kası, kas liflerinin öncülleri olan tek çekirdekli miyoblast hücrelerinin füzyon ile birleşerek miyotüplere dönüşmesi (miyogenez) ile oluşur. Miyogenez sürecince tek çekirdekli, kas öncülü olan hücrelerin bir kısmı füzyon gerçekleştirilmeden sarkolema ve bazal membran arasına yerleşir. Mitotik olarak sessiz

olan bu hücreler satellit hücre (*satellite cells*) olarak isimlendirilir. Somatik kök hücre özelliği içeren satellit hücreler erişkinde kas hasar tamiri ve idamesinden sorumludur (39).

İskelet kasında bulunan kas lifleri bir arada tutularak kas demeti halini alır. Vücuda sağladığı bu fiziksel destek ve hareket süreçleri için gerekli dayanıklılığın sağlanması için iskelet kasında kas demetlerinin etrafı yoğun bir ECM yapısı ile çevrilidir. İskelet kası liflerinin etrafını çeviren ECM yapısı üç tabaka şeklinde incelenir; 1. Endomisyum, 2. Perimisyum, 3. Epimisyum (27) (Şekil 2.3).



**Şekil 2.3.** İskelet kası yapısı.(Bu şekil Servier Medical Art Commons Attribution 3.0 Unported License aracılığıyla yapılmıştır (<http://smart.servier.com>.)

Endomisyum yapısı iskelet kas liflerini çevreleyen ince bir bağ dokusudur. Çok çekirdekli miyotüp yapısının membranı olan sarkolemma ile temas halindedir. Kas demetlerinin bütünlüğünü sağlar ve üst üste duran kas liflerinin gerilim kuvvetini taşır. İçerisinde kas liflerine gereken biyomolekülerin iletimi için kılcal damarlar ve sinyal

iletimi için aksonları bulundurur. Endomisyum yapısı çoğunlukla kolajen I, III ve V'ten oluşur(5,40).

Perimisyum yapısı bireysel kas liflerinin kas demetlerini oluşturduğu kasılıp gevşeme görevini gerçekleştiren temel yapıdır. İçerisinde damarları ve sinir ağlarını bulundurur. Perimisyum miyofiberlerin oluşturduğu tendonlara ileterek hareketi sağlar. ECM yapısının önemli bir kısmını kolajen I, III ve bir SLRP olan dekorin oluşturur (27,28,40).

Epimisyum yapısı kasın etrafını çepeçevre saran, en kalın ve en güçlü tabakadır. Kaslarla birlikte tendonlar üzerinden kemiğe kadar uzanır. Tendonun kemiğe bağlandığı kısımda kalınlaşır. Kası besleyen damar ve sinirleri içinde toplar. Epimisyum yapısı büyük oranda kolajen I (5) ve az miktarda kolajen III'ten oluşur (41).

### 2.2.1 İskelet Kası ECM'inde Salgılanan Faktörler

Canlı bir hücrenin, hücre dışına salgıladığı bütün moleküller Makridakis tarafından *secretome* (sekretom) olarak isimlendirilmiştir (42). İskelet kası hücreleri tarafından üretilen ve salgılanan sitokinler veya diğer peptidlerin parakrin ya da endokrin şekilde hücreleri etkilemesi nedeniyle bu faktörlerin tamamı miyokin olarak isimlendirilmiştir. İskelet kası hücrelerin endokrin, parakrin ya da otokrin olarak birbirleriyle iletişim halinde olması ve miyokin üretme kapasitesi ile iskelet kası aktif bir endokrin organ olarak görülmüştür (43). Miyokinlerin, miyogenez, metabolik değişimlerin düzenlenmesi, inflamasyon gibi süreçlerde rol aldığı bilinmektedir (43–45). İskelet kası tarafından salgılanan miyokinler arasında *Interleukin-6, 8, 15* (IL-6, IL-8, IL-15), *Fibroblast Growth Factor-21* (FGF-21), *Brain Derived Neurotrophic Factor* (BDNF) gibi moleküllerin iskelet kasında hücre dışı sinyal iletiminde görev aldıkları bulunmuştur(44). İnflamasyon ve hematopoezdeki görevleri bilinen IL-6'nın (*Interleukin-6*), egzersizle birlikte iskelet kasından salınımı artar. Artan IL-6 otokrin ve parakrin bir sinyal olarak AMP kinazı (AMPK) ve/veya fosfotidilinozitol-3 kinazı (PI3K) aktive ederek glikoz alımını ve yağ oksidasyonunu artırır (46,47). İskelet kasında IL-15 ve BDNF yağ metabolizmasının hızlanmasına yardımcı olurken, IL-15'in anjiyogenez süreçlerinde görev aldığı bilinmektedir (44).

İskelet kasının oluşumu olan miyogenez sürecinde miyoblastlar miyotüplere dönüşürken, kasın gerekli esneklik ve dayanıklılığı kazanması için gereken ECM elemanlarının sentezleyip hücre dışına salgılar. İskelet kası ile ilgili 19 kütle spektrometrisi çalışmasının verilerinin incelendiği meta-analiz çalışmasında, miyogenez sürecinde sekretomda 130 proteinin anlamlı değişim gösterdiği belirtilmiştir (48). Bu proteinlerden 90'ı artarken 40 proteinin azaldığı bulunmuştur.

İskelet kası yapısının oluşmasında ve işlevinde temel matrisom elemanları sekretomun miktarca en fazla salgılanan alt grubudur. Kolajenler ise iskelet kasının kuru ağırlığının %1-10'luk kısmı oluşturabilir (28). Farklı dokuların ECM içeriğini tanımlamak amacıyla gerçekleştirilen bir meta-analiz çalışmasında iskelet kasındaki proteinlerin %60'ından fazlasının kolajenler olduğu, kolajen I ve III'ün yaklaşık olarak eşit oranda bulunduğu ve bu iki alt tipin toplam kolajenlerin 2/3'ünden fazlasını oluşturduğu gözlenmiştir (19). Fibriler kolajenlerden olan kolajen I ( $\alpha 1$ ), iskelet kası ECM'inde miktarca fazla görülen kolajenlerden II( $\alpha 1$ ), V ( $\alpha 1, \alpha 3$ ) VI( $\alpha 1$ ) ve XI ( $\alpha 1$ ) proteinleri miyogenezle birlikte anlamlı bir şekilde artış gösterir. İskelet kası ECM'inde miktar olarak çok fazla bulunan diğer bir fibriller kolajen olan III( $\alpha 1$ ) miyogenezle birlikte iskelet kası sekretomunda anlamlı azalış gösterir. Miyogenez sürecinde sekretomda yaygın bir kolajen artışı olmasına rağmen kolajen XVIII( $\alpha 1$ ) alt tipi de kolajen III( $\alpha 1$ ) gibi sekretomda anlamlı bir azalış göstermektedir (48,49).

Temel matrisomun bir diğer yapıtaşı olan proteoglikanlardan; perlekan, biglikan, dekorin, distroglikan, periostin, SPARC (*Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine*) proteinlerinin miyogenez sürecinde iskelet kası sekretomunda anlamlı bir şekilde arttığı gözlenmiştir. Bu proteinlerden perlekan ve biglikan aynı zamanda miyogenez sürecini kontrol eden TGF- $\beta$ 'ları kendilerine bağlayarak ortamda bulunan miktarını azaltır (48–50).

İskelet kasına atfedilmiş olan bir salgı organı olma özelliğini incelemek için de proteomiks teknolojileri kullanılabilir. İskelet kasının sinyal moleküllerini salgıladığı ve kendi ECM yapısını oluştururken ortama matrisom proteinlerini salgıladığı bilinmektedir (49,51). Bu süreçte görev alan hücresel kaynaklar iyi tanımlanmıştır. ECM oluşumu, kas yapısının gelişimi sürecinde myoblast/myotüp farklılaşması sırasında oluşturulabileceği gibi, iskelet kasında ECM oluşumu ve

fibrozis gelişiminden sorumlu bir stromal hücre topluluğu da tanımlanmıştır. *Fibro-adipogenic progenitor* (FAP) adı verilen stromal hücre topluluğu mezenkimal stromal kök hücre niteliği taşımaktadır (52). İskelet kasının kronik hasar sürecinde FAP hücreleri fibrozis gelişimi ve yağlı dejenerasyondan sorumludur.

### 2.3 Proteomiks Teknolojileri

İnsan genomunda 20.000'den fazla gen ve bu genlere ait 100.000'den fazla transkript olduğu bilinmektedir (53). Bu transkriptlerden sentezlenen protein sayısının proteinlerin uğradığı translasyon sonrası modifikasyonlar (*post-translational modifications-PTM*) ile birlikte 400.000 üzerinde farklı protein olabileceği tahmin edilmektedir (54,55). Kütle spektrometresi teknolojisinin proteinleri tanımlamak amacıyla kullanılmasıyla tek bir deney düzeneğinde proteinler tamamının incelendiği proteomiks araştırmaları mümkün hale gelmiştir (56).

Proteomiks için yapılan kütle spektrometresi çalışmalarında örneklerin öncesinde 2-D jel, sıvı kromatografi (*Liquid Chromatography-LC*) gibi yöntemlerle saflaştırılması ile örneklerin kantitatif olarak analizi mümkün hale geldi. Proteinlerin birbirlerine olan oranını hesaplamak için çeşitli algoritmalar geliştirilmiştir. Bir deney düzeneğinde gözlenen peptidlerin gözlenebilecek tüm peptidlere olan oranı olan *protein abundance index* (PAI) değerinden elde edilen  $10^{PAI-1}$  değeri *Exponentially Modified Protein Abundance Index* (emPAI) olarak hesaplanır(57). Kütle spektrometresinden elde edilen spektrumlara dayalı bir yöntem olan emPAI değerine alternatif olarak spektrum pik değerlerin oranlanması ile elde edilen *intensity-based absolute quantification method* (iBAQ) algoritması geliştirilmiştir(58). iBAQ algoritması proteom verilerinin kantitatif olarak incelenmesi için geliştirilmiş MaxQuant uygulaması ile birlikte kullanılabilir(59).

Herhangi bir etiketleme yönteminin kullanılmadığı “*Label-Free*” proteomik yaklaşımlar hücrenin bir durumda bulundurduğu proteinlerin tamamını incelemek amacıyla kullanıldığında farklı peptidlerin elde edilmesinde (*coverage*) yüksek oranda başarı sağladığı tespit edilmiştir. *Label-free* deney düzeneklerinin yüksek proteom derinliği sağlamasıyla kalitatif yaklaşımlar için uygun olduğu görülmüştür(60). Ancak kantitatif analizlerde *Tandem Mass Tag* (TMT) veya *isobaric tags for relative and*



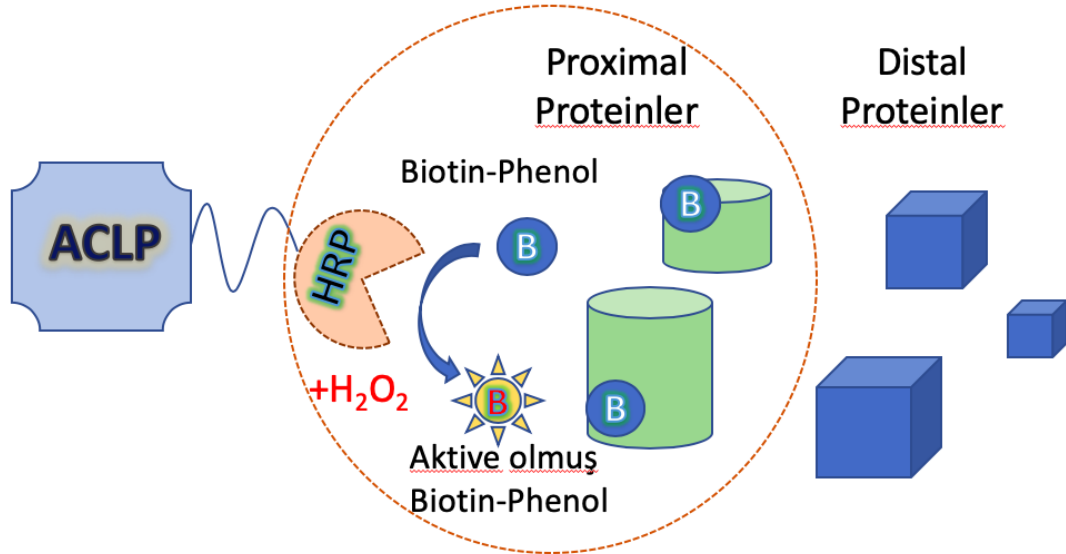
*absolute quantification* (iTRAQ) gibi yaklaşımlarının daha yüksek korelasyon değerleri elde ettiği ve daha doğru bir kantitasyon yapılmasını sağladığı bulunmuştur (60).

### 2.3.1 Hedefli Proteomiks Yaklaşımları

Bir etiketle birlikte yapılan proteomiks çalışmaları daha yüksek doğrulukla kantitatif analiz yapılmasının yanı sıra proteinlerin etkileşim partnerlerini tespit etmek için kullanılabilir. Bir hedef proteine (*bait*) eklenen enzimler aracılığıyla çevresindeki proteinlere biotin eklemesi ile hedef proteinin fiziksel olarak yakınında bulunan proteinler tespit edilebilmektedir. Bu deney düzeneğinde biotin eklenen protein grupları streptavidin aracılığıyla saflaştırılabilmektedir. Biotin ile streptavidin arasındaki güçlü etkileşim ( $K_d \sim 10^{-14}$  M) sayesinde; deterjanlar, tuzlar gibi çeşitli denatüre edici ajanlar kullanılarak örnekler saflaştırılabilmektedir. Etrafındaki proteinlere biotin ekleyen (*Biotin Protein Ligase*, BPL) enzimlerden olan *Bifunctional ligase/repressor* (BirA) enziminin *E. coli*'den elde edilmesi ile *Proximity Proteomics* çalışmaları hız kazanmıştır. BirA enzimi ATP varlığında biyotinlenme reaksiyonunu gerçekleştirir.

BPL enzimlerine alternatif olarak biyotinlenme işlemi oksidasyon reaksiyonu ile de gerçekleştirilebilir. Oksidasyon ile gerçekleştirilen biyotinleme reaksiyonu 1 ms'den kısa bir sürede tamamlanmaktadır. Biyoteknolojinin çeşitli alanlarında sıklıkla kullanılan *Horseradish Peroxidase C* (HRP) enzimi biyotinlenme reaksiyonlarını gerçekleştirmek için kullanılabilir. Biotin fenol halkası eklenmesi ile oluşturulan biotin-fenol molekülleri HRP tarafından  $H_2O_2$  varlığında oksitlenmektedir. Oluşan ara ürün 1 ms'den kısa bir sürede yakındaki proteinlerin tirozin amino asitlerine eklenmektedir. İçerisinde 4 adet disülfid bağı ve bir kalsiyum bağlanma bölgesi içeren HRP sitoplazmanın indirgeyici ortamında inaktif bir şekilde

bulunmaktadır. Endoplazmik retikulumun lümeni, golgi ve ECM'de aktif bir şekilde çalışabilmektedir.



**Şekil 2.4.** ACLP-HRP füzyon proteininin biyotinleme reaksiyonu gerçekleştirmesi.

Bu tez çalışması kapsamında ACLP'nin protein partnerlerinin tanımlanabilmesi için, ACLP'nin devamına HRP enziminin eklenilmesi planlanmıştır. Hücre dışında ve hücre içinde ER ve Golgide biyotinleme işlemi hidrojen peroksit varlığında gerçekleştirebilen HRP'nin, hücre dışı matrikste görev yapan ACLP proteininin parternelerinin keşfi için en uygun aday olduğuna literatürdeki bilgiler ışığında karar verilmiştir.

*In silico* çalışmalar ile çeşitli fizyoloji ve patoloji koşullarında ECM proteinlerinin ifadelerinin analiz edilmesi planlanmış ve bu koşullarda ACLP ile benzer bir ifade artışı gösteren proteinlere ait listelerin elde edilmesi hedeflenmiştir. ACLP ile benzer artış gösteren bu proteinlerin, ACLP'nin protein parterlerinden bir kısmını içermesi muhtemeldir. Yapılacak bu çalışmalar ACLP'nin protein partnerlerine dair önemli ön bilgileri sunma potansiyeline sahiptir.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1 *In silico* Analiz Gereçleri ve Veri Setleri

##### 3.1.1 *In silico* Analiz Gereçleri

- BRB-ArrayTools v4.6.1 Stable
- Peptide Shaker 2.0.0-beta
- SearchGUI 4.0.0-beta
- MaxQuant v1.6.16.0

##### 3.1.2 *In silico* Analizlerde Kullanılan *In vivo* Transkriptom Veri Setleri

1. (GSE73510) “Transcriptome analysis of tenotomy immobilized rat soleus muscle”: *Rattus Norvegicus*, tenetomi ile immobilize edilmiş bacakta inflamasyonsuz iskelet kası fibrozis modelinin zamana karşı incelenmesi.
2. (GSE469) “Temporal profiling in muscle regeneration.”: *Mus Musculus*, *Cardiotoxin* aracılıklı iskelet kası hasar modelinde yara iyileşmesinin zamana karşı incelenmesi.
3. (GSE1026) “Diaphragm, comparison of wild type and mdx mice, 7 to 112 Days (Porter lab)”: *Mus Musculus*, *Dmdmdx* fare modelinde diyafram kasında distrofinin zamana karşı incelenmesi.
4. (GSE3307) “Comparative profiling in 13 muscle disease groups”: *Homo Sapiens*, Doğuştan veya sonradan gelişen, kas veya sinir hasarı sonucu oluşan farklı hastalıklarda iskelet kası fibrozis modellerinin sağlıklı kontrollere karşı incelenmesi

##### 3.1.3 *In silico* Analizlerde Kullanılan *In vitro* Transkriptom Veri Setleri

1. (GSE989&990) Myogenic differentiation\_chip A&B: *Mus Musculus*, İskelet kasında bulunan satalit hücreleri modelleyen fare miyoblastları olan C2C12 hücrelerinde miyoblastların miyotüpe dönüşümlerinin zamana karşı analizi.

2. (GSE46492) Ethanol effect on myoblast differentiation: *Mus Musculus*, C2C12 hücrelerinin miyoblastlardan miyotüp oluşumununa etanolün etkisinin zamana karşı modeli, yalnızca etanol uygulanmamış hücrelerin analizi.
3. (GSE4694) Expression data from myogenesis: *Mus Musculus*, C2C12 hücrelerinin miyoblastlardan miyotüp oluşumunun zamana karşı incelenmesi.
4. (GSE89633) Three Distinct Cell Types Express Extracellular Matrix Proteins In Different Niches During Skeletal Muscle Fibrosis: *Mus Musculus*, *Fibro Adipogenic Progenitors* (FAP) hücrelerinin aktivasyonundan sonra gen ifadesinin değişimi.
5. (GSE92508) Profiling of mouse Fibro/adipogenic progenitors (FAPs) aging and activation upon skeletal muscle injury: *Mus Musculus*, *Fibro Adipogenic Progenitors* (FAP) hücrelerinin aktivasyonundan sonra gen ifadesinin değişimi.
6. (Yayımlanmamış) Grubumuzun ürettiği FAP hücrelerinin gen ifadesinin RNA-Seq ile analizi: *Mus Musculus*, *Fibro Adipogenic Progenitors* (FAP) hücrelerinin aktivasyonundan sonra gen ifadesinin değişimi.

### 3.1.4 *In silico* Analizlerde Kullanılan Proteom Veri Setleri

1. (PXD007527) C2C12 miyoblastlarının farklılaştırılıp miyotüpe dönüştürüldükten sonra 5. günde yapılmış sekretom çalışması.
2. (PXD018588) İnsan immortalize primer satelit hücrelerinin miyoblastlardan miyotüplere farklılaştırılarak elde edilen zamana karşı proteom verisi.

## 3.2 *In silico* Yöntemler

### 3.2.1 Transkriptom Analizleri

Transkriptom analizlerini gerçekleştirmek için yukarıda belirtilmiş olan RNA-seq veya mikroarray deneyleriyle elde edilmiş olan veri setleri BRB-ArrayTools v4.6.1-Stable ile analiz edildi. Ham veri seti 2 tabanında logaritması alınmamış veriler Log2 tabanında dönüştürüldü ve normalize edildi. Log2 tabanında ve normalize

edilmiş verilerle örnekler *principal component analysis* (PCA) ve *sample clustering* ile görselleştirildi. Bu yaklaşım aracılığıyla deneysel tekrarlar arasında sapma gösteren örnekler ayıklandı. Deneysel tekrarlarda tutarlılık gösteren örneklerle rastgele varyans t-testi uygulandı. P değeri eşiği 0.001 ve maksimum yanlış keşif oranı (*false discovery rate-FDR*) %1 olarak belirlendi. Oluşan gen listelerinde kat artış değeri eşik değeri olan 2 kat değişim gösteren genler seçildi. Belirlenen eşikleri geçen genlerden ECM ile ilişkili olan genleri bulmak için oluşan gen listesine matrisom projesi için oluşturulmuş insan ve fare gen listeleri (21) filtreleri uygulandı.

### 3.2.2 Proteom Analizleri

Seçilen deneylere ait veri setleri Peptide Shaker 2.0.0-beta programı aracılığıyla PRIDE veri tabanından indirildi. SearchGUI version [4.0.0 beta] ile MS/MS spektraları X!Tandem version X! Tandem Vengeance (2015.12.15.2) aracılığıyla tanımlandı (61) Protein ve peptid tanımlama süreçlerinde aksi belirtilmediği sürece varsayılan parametreler kullanıldı. Protein referans dizileri Uniprot referans proteomlarından *Mus musculus* (ProteomeID: UP000000589), *Homo sapiens* (ProteomeID: UP000005640) indirildi ve bu referans proteomlara *Bos taurus* tripsin amino asit dizisi eklendi. Protein tanımlama süreçlerinde tripsin ile kesilmiş protein dizilerinde maksimum 2 hatalı kesim kabul edildi. MS1 için 10.0 ppm ve MS2 için 0.5 Da hata payına izin verildi. Kütle spektrometresi sonuçlarından yola çıkarak Peptide Shaker 2.0.0-beta aracılığıyla peptidler ve proteinler %1 Yanlış Keşif Oranı (FDR) ile tahmin edildi

### 3.3 Islak Laboratuvar Gereçleri

#### 3.3.1 DNA Klonlama

PrimeStar HS DNA Polymerase (TaKaRa, R010B)

2x PrimeStar GC Buffer (TaKaRa, R010B)

dNTPs (Bioron, 110032)

NotI (NewEngland Biolabs, R0189L)

AgeI (NewEngland Biolabs, R0552L)

Buffer 2.1 (NewEngland Biolabs, B7200S)

T4 Ligase (Bioron, 402002)

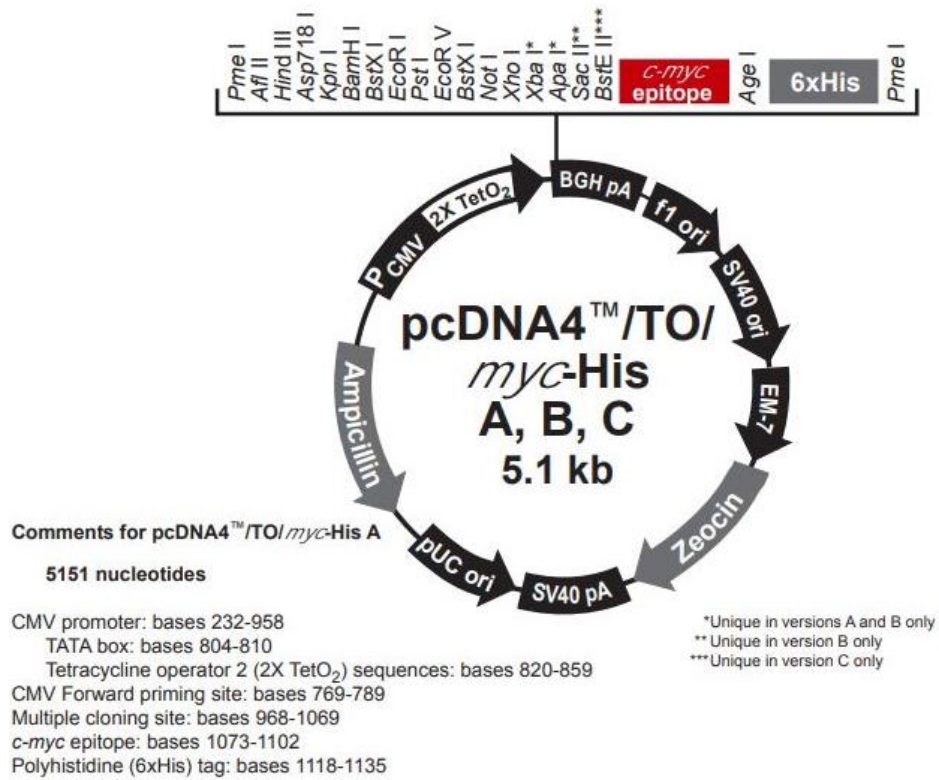
10 X T4 Ligase Buffer (Bioron, 402002)

QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN, 27106)

Plasmid Midi Kit (QIAGEN, 12145)

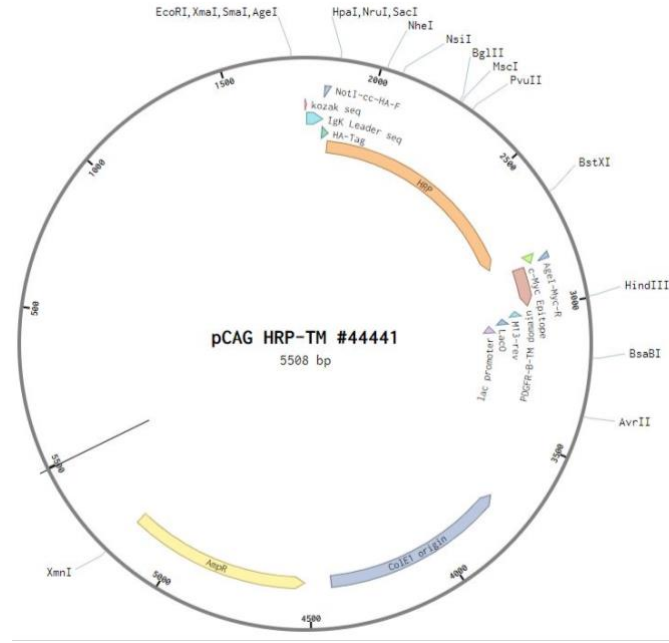
pcDNA™4/TO/*myc*-6xHis A (Invitrogen, V103020)

pCAG-HRP-TM (Addgene , #44441)



**Şekil 3.1.** pcDNA™4/TO/*myc*-6xHis A vektör haritası.

CMV ve BGH promotor bölgelerini içeren memeli protein ifade vektörü. DNA fragmanın okuma çerçevesinin devamına eklenmesi ile *c-myc* epitopunun ve 6 adet histidin amino asidini kodlar.



**Şekil 3.2.** pCAG-HRP-TM vektör haritası.

Horsradish Peroxidase (HRP) enzimi ve HRP'nin 5' ucunda HA-tag kodlayan DNA dizisini içeren vektör. HRP biyotininleme reaksiyonunu gerçekleştirirken HA-tag ile ilgilenilen proteinin ifadesinin miktarı ve lokalizasyonu takip edilebilmektedir.

### 3.3.2 DNA Agaroz Jel Elektroföresi

SeaKem® LE Agaroz, moleküler biyoloji kullanımı saflığında (Lonza, 50002)

Tris-asetat-EDTA (TAE) tamponu (pH: 8.0):

Glasiyal asetik asit (Merck, A6283)	1,14ml
Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O (Merck, 324503)	0,5M
Tris-Base (Sigma, T1503)	2M

Yükleme tamponu:

Gliserol (Merck)	5,5ml
1X TAE tampon	4,5ml
Orange G boya (Merck)	0,01gr
Etidyum bromür (Sigma):	10mg/ml distile su

Moleküler ağırlık belirleyicileri:

100bp DNA Ladder (Jena Biosciences, M-214L)

1 kb DNA Ladder (Promega, G5711)

### 3.3.3 Bakteri Kültürü

Kompetan DH5a bakteri suşu

Mix & Go! *E.coli* Transformation Kit (Zymo, T3001)

Sıvı LB besiyeri (pH=7,0-7,5):

Tripton (AppliChem, 403682.1210) 10gr

Maya özütü (AppliChem, A1552,1000) 5gr

NaCl (Sigma, S9888) 5gr

dH<sub>2</sub>O ile toplam hacim 1 litreye tamamlanır ve otoklavlanır.

Katı LB besiyeri:

Agar, bakteriyoloji kullanımı saflığında (AppliChem, A0949)

%1,5 agar içeren sıvı LB besiyeri otoklavlanır

Ampisilin (Ampisina IV flakon)

Otoklavlanmış tahta kürdan

15 mL Yuvarlak tabanlı steril tüp

### 3.3.4 Hücre Kültürü

C2C12 fare myoblast hücre hattı

OP9 fare fibroblast hücre hattı

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Biowest L0103)

Fötal Sığır Serum (FCS) (Biowest S181H)

L-Glutamine (Biowest X0550)



Trypsin-EDTA (Biowest L0930)

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) (Biowest L0615)

Penicilin/Streptomycin (Biowest L0022)

Trypan Blue (Biological Industries BI, 03-102-1B)

FuGENE® HD Transfection Reagent (E2311, Promega)

### **3.3.5 Biotinlenme Reaksiyonu ve Immünfloresan Boyama**

PLL, (Poly-L-Lysine) (Sigma-Aldrich, 1524)

1X PBS (Phosphate buffered saline) (pH: 7,4) (Sigma, P2194)

Trolox (Millipore, 648471)

Biyotiyil-Tyramide (Tocris, 6241)

Hydrogen Peroxide 30% (w/w) (Sigma-Aldrich, H1009)

Rabbit polyclonal anti-cMyc tag antibody (Abcam, ab9106)

Rabbit polyclonal anti-GOLPH4 antibody, (Abcam, ab28049)

Mouse monoclonal anti-PDI antibody (Abcam, ab2792)

Mouse monoclonal anti HA-tag antibody, (SantaCruz, sc7392)

Goat anti-mouse IgG (H+L), Alexa Fluor 488 conjugated (Invitrogen, R37120)

Goat anti-mouse IgG (H+L), Alexa Fluor 568 conjugated (Invitrogen, A-11004)

Goat anti-rabbit IgG (H+L), Alexa Fluor 488 conjugated (Invitrogen, A27034)

Goat anti-rabbit IgG (H+L), Alexa Fluor 568 conjugated (Invitrogen, A-11011)

%4 PFA (paraformaldehyt)

Metanol (Isolab, 947.046)

BSA (Thermo Scientific, B14)

Streptavidin, Alexa Fluor 488 conjugated (Invitrogen, S32354)

ProLong™ Gold Antifade Mountant with DAPI (Invitrogen, P36935)

### 3.3.6 Protein İzolasyonu ve Kantitasyonu

RIPA tamponu içeriği:

- Tris-HCl, 5mM, pH 8.0
- NP-40, %1(v/v)
- Sodium deoxycholate, %0,5(w/v)
- SDS, %0,1(w/v)
- NaCl, 150mM
- Dithiothreitol (DTT), 1mM

cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail (Roche, 11697498001)

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

Micro BCA™ Protein Assay Kit (Thermo Scientific #23235)

The SpectraMax® M2 Microplate Reader (Molecular Devices)

### 3.3.7 Kapiller Nano-Immünassay

ProteinSimple WES otomatize western blot sistemi (ProteinSimple 004–600)

12-230 kDa Wes Separation 8x25 Capillary Cartridges (ProteinSimple SM-W004-1)

12-230 kDa Standart Pack (ProteinSimple PS-ST01-8)

Anti-mouse Detection Module (ProteinSimple DM-002)

Mouse monoclonal anti-Vinculin antibody, (R&D, MAB6896)

Pierce™ High Sensitivity Streptavidin-HRP (ThermoScientific, 21130)

## 3.4 Islak Laboratuvar Yöntemleri

### 3.4.1 DNA Klonlama

*Aebp1/ACLP* genine ait Aebp1-201 transkriptinin (ENST00000223357.8) pcDNA™4/TO/*myc*-6xHis A plasmidine aktarılması için C2C12 hücrelerinin

mRNA'larından oligo d(T)'ler ile sentezlenilmiş cDNA aracılığıyla 5' ucunda *KpnI*, 3' ucunda *NotI* olan primerlerle stop kodonunu içermeyecek şekilde Aebp1-201 transkripti Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile çoğaltıldı.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR):

2X PrimeStar GC Buffer	25 µL
dNTPs (herbirinden 2,5 mM)	4 µL
Primer Forward (10 pmol)	1,5 µL
Primer Reverse (10 pmol)	1,5 µL
C2C12 cDNA	1 µL
PrimeStar HS DNA Polymerase (5U/µL)	0,5 µL

Reaksiyon Koşulları

98°C	2"	
98°C	10"	} x30 döngü
68°C	2'	
72°C	2'	

Enzim Kesimi İle Yapışkan Uçların Hazırlanması:

DNA (Aebp1\_201 / pcDNA<sup>TM</sup>4/TO/myc-6xHis A)

10x Buffer 2.1	1X
<i>KpnI</i> (5U/µL)	2,5 Ünite
<i>NotI</i> (5U/µL)	2,5 Ünite
dH <sub>2</sub> O	son hacim 20 µL

37°C'de 1 gece inkübasyona bırakılır.

### DNA Ligasyon Reaksiyonu

10 X T4 Ligasyon Reaksiyonu	1 µL
T4 Ligase (10 U/µL)	1 µL
Insert DNA	X µL
Vektör DNA	Y µL
dH <sub>2</sub> O	10 µL'ye tamamlanır.

(X:Y DNA molar oranı 1:3)

16°C'de 1 gece inkübasyona bırakılır.

### Ligasyon Ürünlerinin Kompetan Bakterilere Transformasyonu

Katı LB agar ile hazırlanmış 1X Ampicillin içeren petri kapları en az 2 saat önce 37°C kuru etüve ısınması için bırakılır. *E.Coli* DH5α şuşu ve Mix&Go Kompetan hazırlama kiti ile hazırlanmış -80°C'de saklanılan tüpler buz kabı içine alınır. Buz kabı içerisinde tüplere 1-2 µL ligasyon ürünü yavaşça pipet ile karıştırılarak eklenilir. Tek bir hareket ile tüp aşağıya doğru sallanır ve hemen buzun içine alınır. Bakteriler 5 dakika buz üzerinde bekletilir. Bakteriler hızlıca 37°C'ye getirilmiş olan petri üstüne cam boncuklar yardımı ile aseptik yöntemlere dikkat edilerek yayılır. Bir gece beklemesi için 37°C kuru etüve ters bir biçimde bırakılır.

Petri üzerinde görülen koloniler otoklavlanmış tahta kürdan vasıtasıyla içerisinde vektörün direnç genine uygun 1X direnç antibiyotiği eklenmiş 1 mL sıvı LB içeren 15 mL'lik yuvarlak tabanlı tüplere alınır. Çoğalmaları için 8-10 saat boyunca 37°C'de dakikada 225 tur dönen çalkalayıcıya alınır. Çoğalan bakterilerden *QIAprep Spin Miniprep Kit* yardımıyla plasmid izolasyonu gerçekleştirildi.

İzole edilen plasmidlerin insert içerip içermediğinin kontrolü amacıyla plasmidlerden 200 ng *KpnI* enzimi ile kesilip %1 agaroz jelde görüntülendi. Insert içeren plasmidler DNA dizi analizi yöntemi ile kontrol edildi.

DNA Dizi Analizi Reaksiyonu:		Reaksiyon Koşulları
Plasmid DNA (1000ng/μl)	X μL	94°C 5'
Primer (3,3pmol/μl)	1 μL	94°C 15''
BigDye Terminator v3.1	1 μL	50°C 15''
5X BigDye Buffer	2 μL	60°C 4'
dH <sub>2</sub> O	10μL'ye tamamlanır	60°C 1'

} x25 döngü

Dizi analizi reaksiyonundan sonra PCR ürünlerinin tuzla çöktürme yöntemi ile saflaştırıldı:

1. 1,5ml'lik eppendorf tüplere alınan ürünlerin üzerine toplam hacmin 1/10'u miktarında 3M NaOAc ve 2,5 kat soğuk %100 etanol eklendi ve -80°C'de en az yarım saat inkübe edildi.
2. İnkübasyondan sonra maksimum hızda (14000 rpm) 20 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda sıvı faz atıldı.
3. Pelletin üzerine en az 100 μL %70 oranında soğuk etanol ilave edildi, tüpün altına vurarak peletin yerinden kalkması sağlandı.
4. Maksimum hızda 20 dakika santrifüj edildi sıvı faz atıldı ve pelet 37°C kuru etüve 5 dakika kurutuldu.
5. Peletin üzerine 20μl formamid karıştırılarak ilave edildi ve pelet çözüldü.

Örnekler 96 kuyulu sekans plate'ine aktarıldı ve PCR cihazında 98°C'de 10 dakika inkübasyonla denatüre edildi. Denatürasyon sonrası plate hızla soğuk metal plakalar arasına alınıp 5 dakika soğutuldu. Saflaştırılmış ve denatüre edilmiş örnekleri içeren plate, fluorimetrik DNA fragman analizi cihazına yüklendi (Applied Biosystems ABI 3110 Genetic analyzer).

pcDNA4A/TO/-Aebp1\_myc-6xHis vektörü elde edilip doğrulandıktan sonra biyotin ekleme işlemimi yerine getirmesi amacıyla HRP (horse raddish peroxidase) Aebp1/ACLP'nin okuma çerçevesinin devamı olacak şekilde C-terminalinin devamına

eklenilmesi planlandı. pCAG-HRP-TM, HRP'nin önündeki HA-tag'i de beraberinde alacak ve stop kodonunu almayacak şekilde *NotI* ve *AgeI* enzim bölgelerini içeren primerler tasarlandı. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile bölge çoğaltıldı.

#### Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR):

2X PrimeStar GC Buffer	25 µL
dNTPs (herbirinden 2,5 mM)	4 µL
Primer Forward (10 µM)	1,5 µL
Primer Reverse (10 µM)	1,5 µL
pCAG-HRP-TM (1 ng/µL)	1 µL
PrimeStar HS DNA Polymerase (5U/µL)	0,5 µL

#### Reaksiyon Koşulları

98°C	10"	} x30 döngü
68°C	1'10"	
72°C	2'	

HA-HRP, *NotI* ve *AgeI* enzimleri ile pcDNA4A/TO/-Aebp1\_myc-6xHis vektörüne klonlandı. Sekans analizi ile Aebp1-201'in N-terminaline eklenen HA-tag-HRP ve devamında c-Myc tag- 6x His vektörün içerdiği stop kodonuna kadar okuma çerçevesinde olduğu doğrulandı.

### 3.4.2 C2C12 ve OP9 Hücre Hattının Çoğaltılması

%10 FCS + %1 L-Glutamine + %1 Penicilin/Streptomycin içeren DMEM ile büyüme ortamı hazırlanması:

5 mL FCS + 1 mL L-Glutamine + 1 mL Penicilin/Streptomycin, 50 mL'lik tüp içine eklendikten sonra son hacim 50 mL olacak şekilde DMEM eklenir.

%90 FCS + %10 DMSO ile 1 mL dondurma ortamında  $1 \times 10^6$  hücre bulunduran tüp sıvı azot tankından çıkartılıp 37°C su banyosunda dondurma ortamının tamamen

çözülmesi beklendi. Çözülen hücreler, önceden 3 mL büyüme ortam eklenmiş olan 15ml'lik falkon tüp içerisine alındı. 400g de 5dk santrifüjlendi. Hücre peleti üzerindeki dondurma ve büyüme ortamı uzaklaştı, pelet üstüne tekrar 8 mL büyüme ortamı eklendi. Büyüme ortamında çözülen hücreler steril filtreli kapaklı T75 hücre kültürü şişesine ekildi. Hücreler 37°C %5 CO2 etüvde %50 gün aşırı büyüme ortamı değiştirilerek yoğunluğu geçmeyecek şekilde çoğaltıldı. Yoğunluk %50'ye ulaşıktan sonra T75 kabın içindeki çoğalma ortamı uzaklaştırıldı. Hücreler DPBS ile 2 defa yıkandıktan sonra 3ml Tripsin-EDTA eklenilip 37°C %5 CO2 etüvde 5dk bekletildi. Gözle görülür bir şekilde yüzeyden ayrılan hücrelerin zerinde eşit hacimde çoğalma ortamı ekleyerek Tripsin-EDTA inaktivasyonu sağlandı. Hücre süspansiyonun eşit bir şekilde karıştığından emin olmak için al ver yapılarak hücrelerin zeminden ayrılması ve eşit dağılması sağlandı. Ekim için gereken hücre sayısını belirlemek için hücreler trypan blue ile 1:5 oranında karıştırılıp hematocytometer ile sayıldı. Sayım işlemi sonrası 24 kuyulu plakalara, kuyu başına 50.000 hücre olacak şekilde ekildi.

#### Poly-L-Lysine (PLL) ile slaytların kaplanması:

1. PLL 0.1 µg/µL olacak hücre kültürüne uygun dH<sub>2</sub>O içinde istenilen miktarda hazırlanır.
2. Aseptik ortamda yüzeylere 1,0 mL/ 25 cm<sup>2</sup> oranında eklenir.
3. PLL'in eşit dağılması için yavaşça plate sallanır ve 5 dakika beklenir.
4. Inkübasyon sonunda PLL aspire edilir ve yüzey dH<sub>2</sub>O ile yıkanır.
5. Hücreler ekilmeden önce en az 2 saat boyunca yüzey kurumaya bırakılır.

#### FuGENE® HD ile gen transferi:

1. 24-kuyulu plate içine PLL kaplı slaytlar alındı ve üstlerine 50.000 hücre/kuyu 400 µL içinde ekildi.
2. Transfeksiyon yapılacak kuyu adedi başına 25 µL FCS içermeyen DMEM, 0,5 µg DNA, 1,5 µL FuGENE sırayla eklenildi ve pipet ile 15 kere al ver yaparak karıştırıldı.
3. Hazırlanan karışım oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi.

4. Karışım her kuyuya eşit olarak dağıtıldı. Kuyuya eklerken 1-2 defa pipetle al ver yapıldı.
5. Plate 10 dakika 70 rpm'de orbital shaker üzerinde bekletildi.
6. Hücreler 37°C %5 CO2 etüvde 24 saat inkübe edildikten sonra gen transfer ortamı uzaklaştırılıp kuyu başına 500 uL taze büyüme ortamı eklendi.

### 3.4.3 Biotinleme ve İmmunofloresan Boyama

Biotinleme deneyleri için kullanılacak, Biotin-Phenol (BP), Hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) , Trolox solüsyonları deneylerden hemen önce taze bir biçimde hazırlandı.

#### 100 X (10 mM) Biotin-Phenol Hazırlanması

0,5 mg Biotin-Phenol 140 µL DMSO içerisinde çözülür.

Hücrelere eklenilmeden önce 5 dakika boyunca buz üzerinde 20 saniyelik aralıklarla 130 W 20 kHz frekansında %50 genliklerle sonike edilerek iyice çözünmesi sağlanır.

#### 100 X (100 mM) Hidrojen Peroksit Hazırlanması:

%30 (w/w) Hidrojen Peroksit	5 µL
1 X PBS	495 µL

#### 100 X (1M) Trolox Hazırlanması:

0,025 g Trolox 1 mL 1X PBS içerisinde çözülür. Vorteks ile karıştırılır.

#### Biyotinenme Reaksiyonu ve İmmünfloresan Boyama:

1. 100X Biotin-Phenol'den kuyu başına 5 µL olarak pipetle al ver yaparak son konsantrasyon 100 µM/kuyu olacak şekilde eklenildi.
2. Biotinlenmenin hedeflendiği kuyulara H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulandı, eşit dağılım için plate yavaşça çalkalandı ve 1 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.



3. İnkübasyon sonunda tüm kuyulardan büyüme ortamı uzaklaştırıldı ve 1X Trolox ile 3'er dakikalık periyotlarda 5 defa yıkandı.
4. Hücrelerin fiksasyonu için %4 PFA içeren PBS kuyulara eklendi ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi.
5. İnkübasyon sonunda PFA uzaklaştırıldı ve 1x PBS ile 2 defa yıkandı.
6. Permabilizasyon için önceden -20°C'de soğutulan metanol hücrelerin üzerlerine eklendi ve 5 dakika -20°C'de inkübe edildi.
7. Metanol uzaklaştırılıp hücreler 1x PBS ile 2 defa yıkandı.
8. Hücrelerin üzerine %3 BSA içeren PBS eklenilip 1 saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
9. Streptavidin-Alexa Fluor 488 %3 BSA içeren PBS içerisinde 1:1000 oranında çözülüp hücrelerin üzerlerine eklendi ve 1 saat karanlıkta oda sıcaklığında inkübe edildi.
10. Hücreler 1x PBS ile 5 dakikalık aralıklarla 3 defa yıkandı.
11. Primer antikolar aşağıda belirtilen konsantrasyonlarda %3 BSA içeren PBS'te çözülüp hücelere eklendi, karanlıkta 4°C'de bir gece inkübe edildi.

Rabbit polyclonal anti-cMyc tag antibody \_\_\_\_\_ (1:200)

Rabbit polyclonal anti-GOLPH4 antibody \_\_\_\_\_ (1:400)

Mouse monoclonal anti-PDI antibody \_\_\_\_\_ (1:100)

Mouse monoclonal anti HA-tag antibody, \_\_\_\_\_ (1:50)

12. Hücreler 1x PBS ile 5 dakikalık aralıklarla 3 defa yıkandı.
13. Tekli boyamalar ve eş boyamalar için kullanılan primer antikolarla uygun olarak sekonder antikolar 1:1000 oranında %3 BSA içeren PBS'te çözülüp hücelere eklendi. 1 saat karanlıkta 4°C'de inkübe edildi.
14. Hücreler 1x PBS ile 5 dakikalık aralıklarla 3 defa yıkandı.
15. ProLong Antifade ile hücrelerin bulunduğu slaytlar kapatıldı.

### 3.4.4 Hücrelerden Protein İzolasyonu ve Kantitasyonu

1. Biotinlenme reaksiyonu sonrasında tüm kuyulardan büyüme ortamı uzaklaştırıldı ve 1X Trolox ile 3'er dakikalık periyotlarda 5 defa yıkandı.
2. Hücreler 1X PBS ile bir defa daha yıkandı.
3. Hücrelerin üzerine 1X proteinaz inhibitörü içeren RIPA tamponu eklendi. Pipetle al ver yapılarak hücreler kaldırıldı.
4. RIPA içerisindeki hücreler buz üzerinde 3 dakika boyunca 130W, 20kHz frekans ve %50 genlikte 20 saniye sonunda 20 saniye ara verilerek sonike edildi.
5. Sonikasyon sonunda hücreler +4°C'de 18.000g'de 30dk santrifüj edildi.
6. Santrifüj sonunda sıvı faz yeni ependorfa aktarıldı.
7. BCA analizi yapılana kadar örnekler -80°C'de saklandı.

#### Micro BCA™ Protein Assay Kit ile Protein Kantitasyonu

1. -80°C'de saklanmış örnekler buz üzerinde eritildi.
2. Örnekler %0,5 SDS ile 1:50 oranında seyreltildi. Her örnek için üç kuyu, her kuyu için 100µl dilüe edilmiş örnek ile ölçüm yapıldı.
3. 2mg/ml Albumin %0,5 SDS ile seyreltilerek standartlar hazırlandı.
4. Ölçüm yapılacak her kuyu için 50µl MA + 48 µl MB + 2 µl MC reaktifi olacak biçimde Working Reagent (WR) hazırlandı.
5. 100µl örnek + 100µl WR 96 kuyulu plakaya yüklendi. Ve 37°C'de 120dk inkübe edildi.
6. SpectraMax® M2 cihazı kullanılarak, 560 nm dalga boyunda ölçüm yapıldı.

### 3.4.5 Kapiller Nano-Immunoassay

ProteinSimple markasının WES cihaz modeline ait otomatize sistemin standart protokolü takip edildi.

Standart paket içinde bulunan solüsyonların hazırlanması

1. 400mM DTT solüsyonu: Şeffaf tüpün içersinde toz halinde bulunan DTT üzerinde 40µl distile su eklendi.
2. Floresan içeren 5X MasterMix: Pempe tüpün içersindeki tozun üzerine hazırlanmış olan DTT'den 20µl, 10X Örnek Hazırlama Tamponunundan 20µl eklendi.
3. Biotinlenmiş Protein Ladder: Beyaz tüpün içersindeki tozun üzerine 16µl distile su, 2µl 10X örnek tamponu ve 2µl 400mM DTT solüsyonu eklendi.
4. Örneklerin son konsantrasyonunu eşitlemek için 10X örnek tamponu 1:100 distile su ile seyreltilerek 0,1X örnek tamponu ile örnekler seyreltildi.
5. Örneklerin son konsantrasyonu 0,8mg/ml ve 1X Floresan MasterMix içerecekleri şekilde dilüsyon gerçekleştirildi.
6. Biotinlenmiş Protein Ladder ve örnekler vorteks ile karıştırıldı. Denatürasyon için 95°C 5dk inkübe edilen örnekler mikrosantrifüjle üç saniye 2000 rpm ile çevrilip hızlıca buzun içine gömülerek soğutuldu.

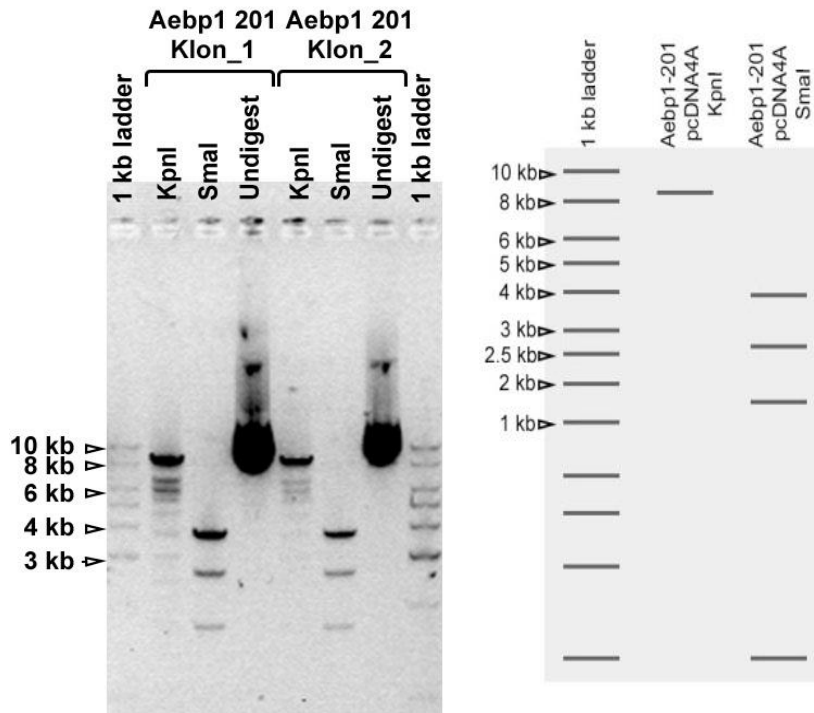
Detection paket içindeki bileşenler hazırlandı;

1. Primer antikorlar antikor seyreltici 2 solüsyonu ile istenilen konsantrasyona dilüe edildi. Her bir kuyu için son hacmi 10µl olacak şekilde primer antikor dilüsyonları hazırlandı.
2. Sekonder antikorlar, primer antikotun elde edildiği türe uygun detection modül içinden seçildi. HRP işaretli sekonder antikordan kuyu başına 10µl kullanıldı.
3. Görüntülemenin gerçekleşebilmesi için detection modül içinden çıkan 200µl Luminol-S solüsyonu üzerine 200µl Peroksit solüsyonu steril bir ependorf içinde karıştırılıp her kuyuda 15 µl olacak şekilde eklendi.
4. 12-230 kDa protein seperasyonu yapabilen 25 kuyucuklu plakanın belirtilen kuyucuklarına yukarıda hazırlanmış olan, biyotinlenmiş protein ladder, örnekler aynı hizaya, primer antikor, sekonder antikor, luninol-peroksit karışımı sırasıyla yüklendi.
5. Plaka 2000 g'de kuyucuklarda hava baloncuğu kalmayana kadar santrifüj edildi.
6. Kapiller kartuş ve örneklerin yüklendiği 25 kuyucuklu plaka cihaza yerleştirildi.

## 4. BULGULAR

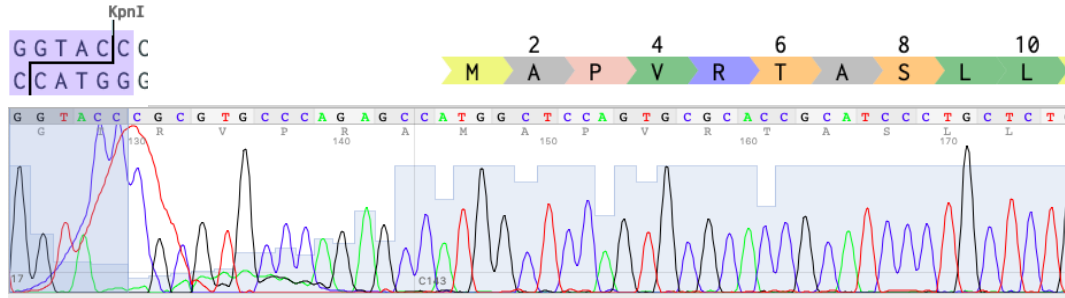
### 4.1 Klonlama ve Vektörlerin Hazırlanması

PCR ile çoğaltılan Aebp1-201 transkriptine ait okuma çerçevesi (ENSMUST00000102923.9) *KpnI* (5') ve *NotI* (3') enzimleri ile kesilerek jel saflaştırması yapıldı. Aynı enzimlerle kesilen pcDNA4/TO/*c-Myc*-6xHis vektör iskeletine T4 ligaz enzimi ile (3:1 PCR fargmanı:vektör oranında) ligasyon reaksiyonu gerçekleştirildi. Ligasyon ürünü Zymo Mix&Go! Kiti ile hazırlanmış kompetan DH5 $\alpha$  bakterilerine transforme edildi. Tek koloni olarak izole edilen farklı bakteri klonlarından miniprep ile plasmid izole edildi ve insert'in varlığını doğrulamak için *KpnI* ve *SmaI* enzimleri ile kesildi. Kesim ürünleri ve kesilmemiş plasmidler %1 agaroz jelde analiz edildi (Şekil 4.1).

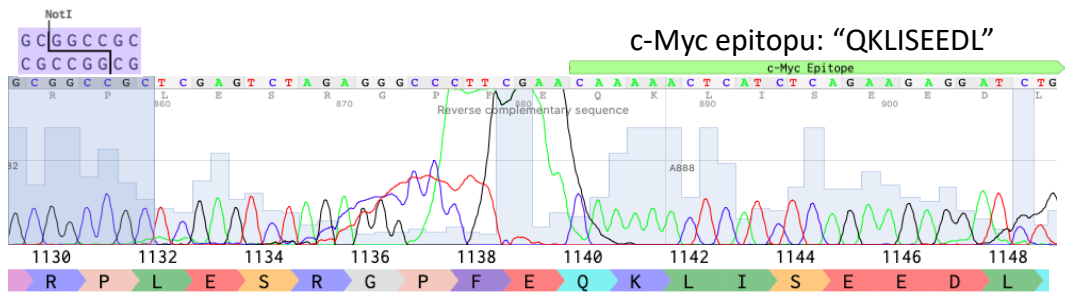


Şekil 4.1. pcDNA4A/TO/-Aebp1\_myc-6xHis vektörün doğrulanması.

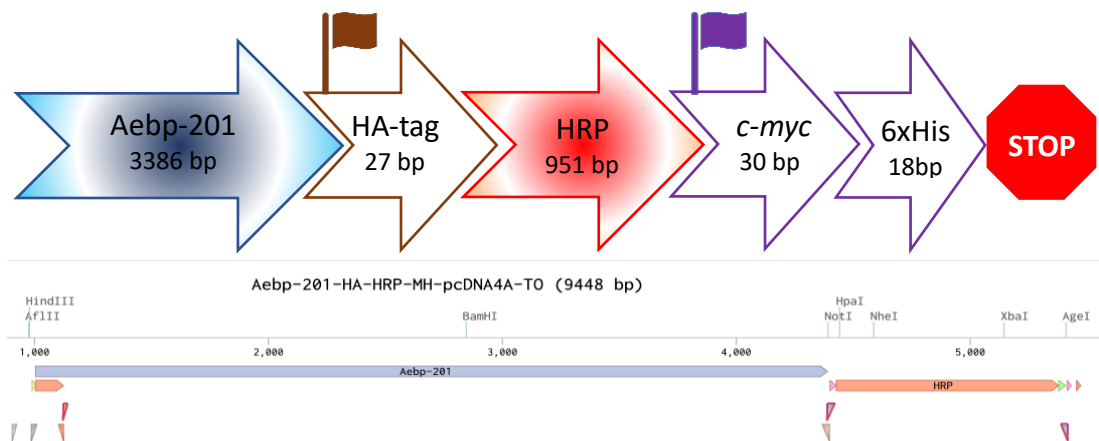
Aebp1-201'i içerdği doğrulanan pcDNA4A/TO/-Aebp1\_myc-6xHis vektörlerinin nükleotid dizilimi DNA dizi analizi yöntemi ile incelendi. Rekombinant vektörlerin içerdği Aebp1-201 dizisinde bir baz değişimi (mutasyon) olmadığı ve okuma çerçevesinin Aebp1-201'e ek olarak *c-Myc* epitopunu içerdği doğrulandı.



**Şekil 4.2.** pcDNA4A/TO/-Aebp1\_myc-6xHis vektörün doğrulanması. Aebp1-201 N-terminal kromotogram görüntüsü.



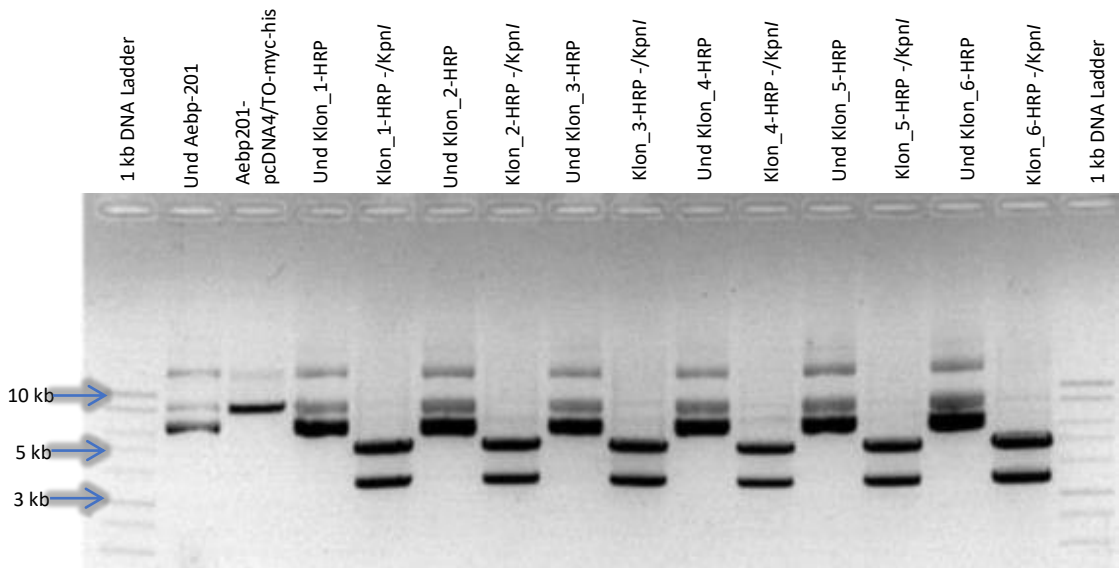
**Şekil 4.3.** pcDNA4A/TO/-Aebp1\_myc-6xHis vektörün doğrulanması. Aebp1-201 C-terminal kromotogram görüntüsü.



**Şekil 4.4.** pcDNA4A/TO/-Aebp1\_myc-6xHis vektörüne HRP füzyon peptidinin HA ve *c-Myc* epitoplarıyla birlikte eklenmesi.

Aebp1-201 transkriptinin pcDNA4A/TO/c-myc-6x His vektörüne aktarıldığı ve okuma çerçevesinin vektöre ait c-myc epitopuna kadar uzandığı DNA dizi analizi ile doğrulandıktan sonra Aebp1-201 transkriptine HRP enziminin füzyon peptidi olarak eklendi.

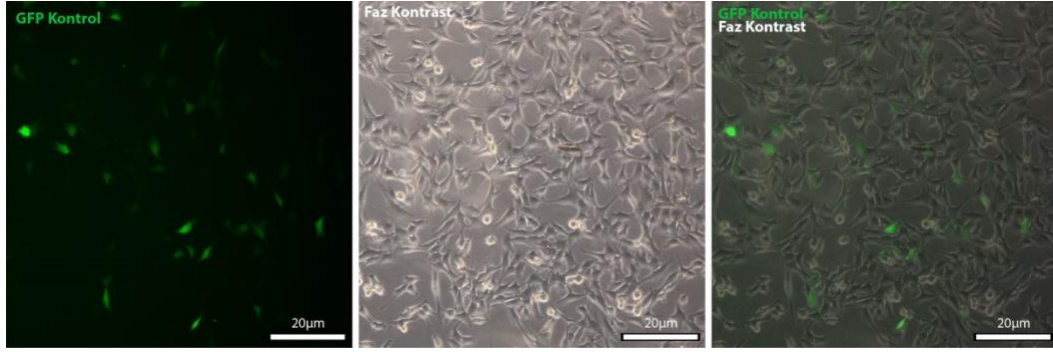
pCAG-HRP-TM vektörünün içerdiği HA-HRP-cMyc bölgesi *NotI* – *AgeI* kesim bölgeleri içeren primerler aracılığıyla çoğaltılarak Aebp1-201 içeren vektöre klonlandı. Aebp1-201 vektöründe 1 ve Aebp1-HRP vektöründe iki kesim bölgesi içeren *KpnI* enzimi ile klonlar doğrulandı (Şekil 4.5).



**Şekil 4.5.** pcDNA4A/TO/-Aebp1\_HA-HRP-myc-6xHis klonlarının *KpnI* enzim kesimi ile doğrulanması %1'lik agaroz jel.

Enzim kesimi ile doğrulanmış olan klonlara DNA dizi analizi yapıldı. Klonlarda HA-HRP-cMyc dizisinin Aebp1-201'in okuma çerçevesinin 3' oryantasyonunda yerleşim gösterdiği doğrulandı.

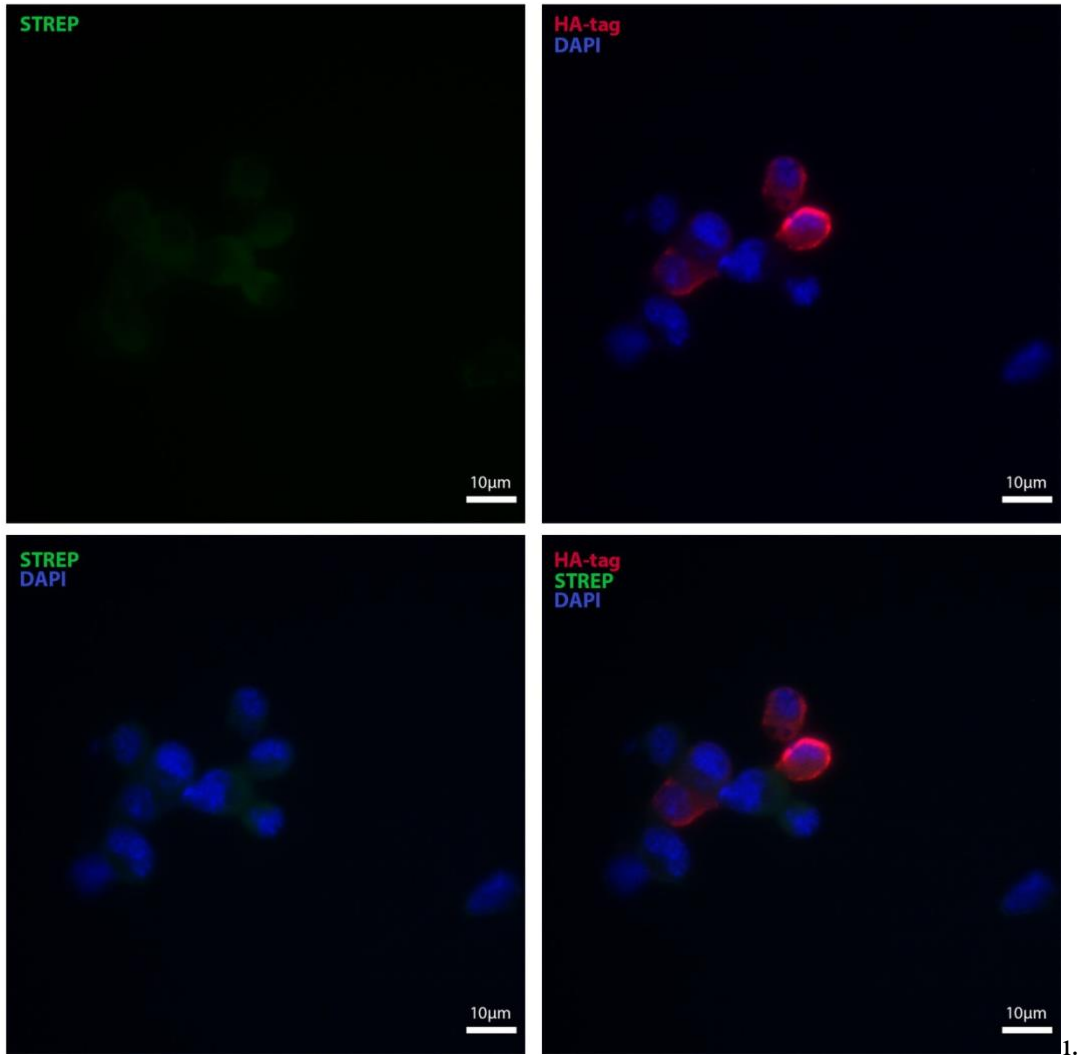
## 4.2 ACLP-HRP'nin Transfeksiyonu ve İmmünofloresan Boyama



**Şekil 4.6.** C2C12 hücrelerinde GFP ile transfeksiyon kontrolü, 10X büyüme.

Aebp1-201-HA-HRP-cMyc içeren vektörler C2C12 ve OP-9 hücre hatlarına FuGENE HD aracılığıyla transfekte edildi. Transfeksiyon başarısının kontrolü için eGFP-C1 kontrol vektörü kullanıldı (GenBank: U55763.1) (62). Transfeksiyon başarısı %50'nin üzerinde saptandı (şekil 4.6).

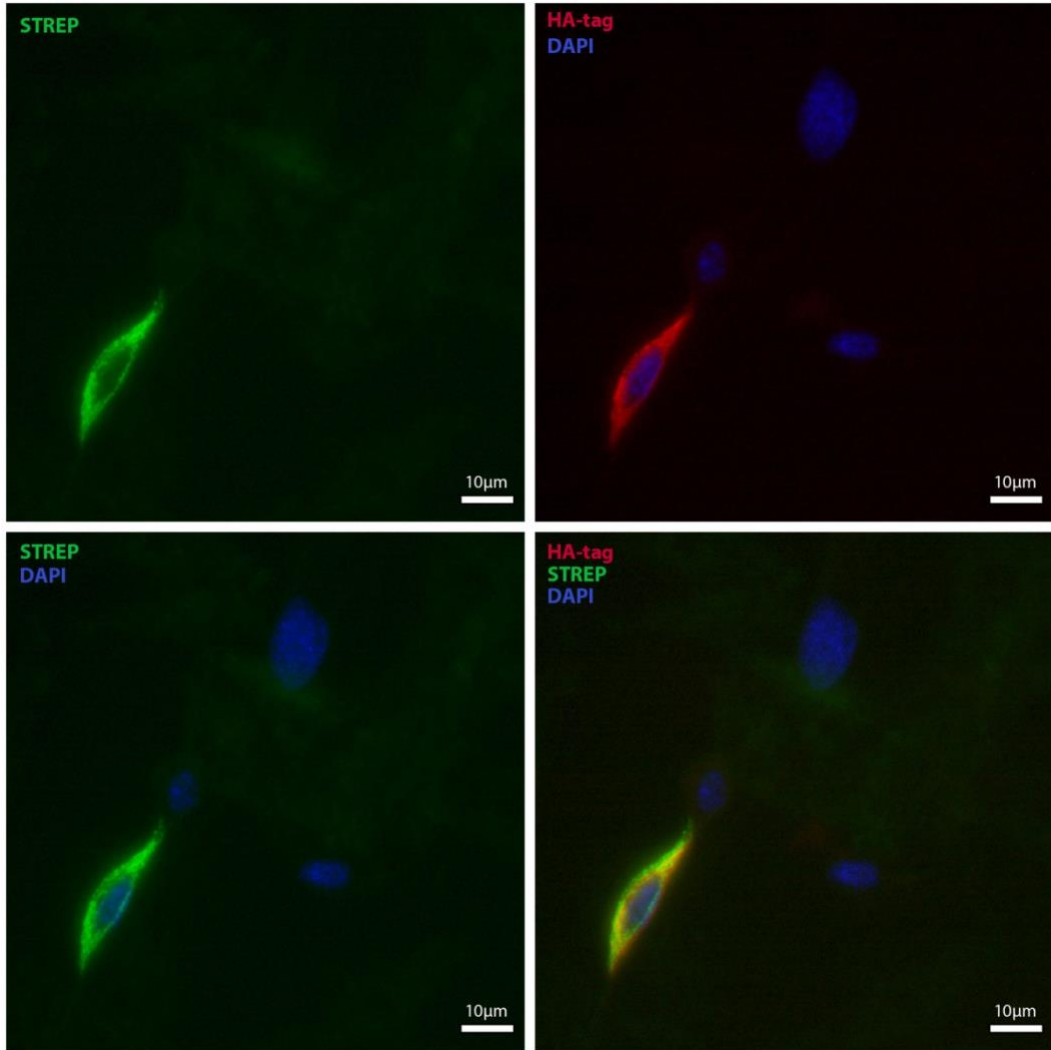
Transfeksiyon sağlanan C2C12 hücreleri transfeksiyondan 24 saat sonra PBS ile iki kere yıkandı ve 1 dakika Biotin-Fenol ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulandı. Biotinlenmenin doğrulanması için streptavidin, ACLP'nin lokasyonunun gözlenmesi için HA ve c-Myc, hücrede ER ve Golgi görüntülemek için PDI ve GOLPH4 ile immünofloresan boyamalar yapıldı.



**Şekil 4.7.** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulanmamış C2C12 hücrelerinde HA ve Streptavidin görüntüleri, 63X büyütme.

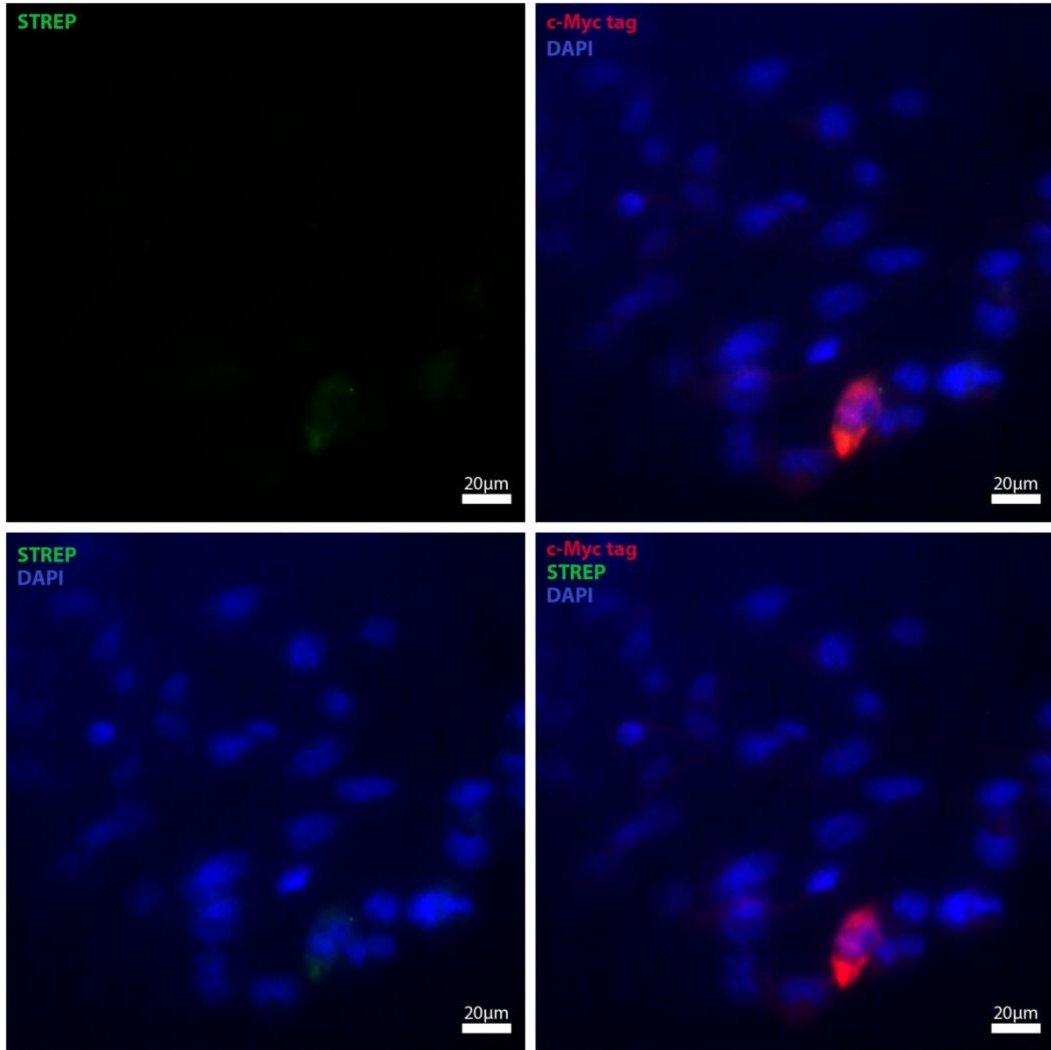
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulanmamış hücrelerde anti-HA antikoruna ile immun boyama sonucu pozitif hücreler gözlemlendi. Bu hücrelerde ve komşu hücrelerde Streptavidin ile konjuge olan yeşil boyama gözlemlenmedi. Yapılan boyamalar sonucunda gen transferinin başarılı olduğu, transfekte edilen plasmidin kimerik ACLP-HRP protein ifadesini etkili bir şekilde sağladığı tespit edildi. Aynı mikroskopik sahada bulunan hücrelerde spesifik HA boyaması ve ACLP-HRP ifadesi görülmemesi ise bu ifadenin spesifik olduğunu göstermiştir (Şekil4.7).





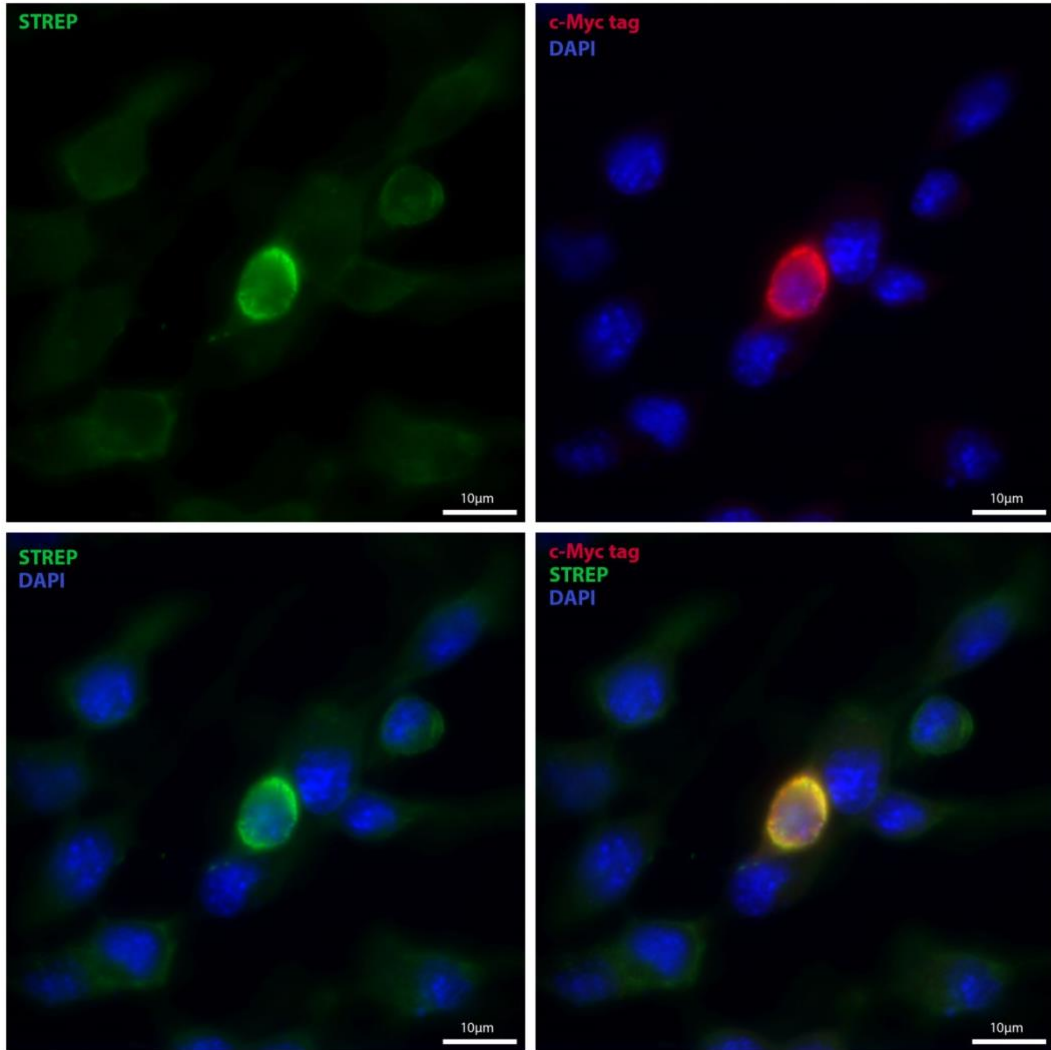
**Şekil 4.8.** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulanmış C2C12 hücrelerinde HA ve Streptavidin görüntüleri, 63X büyütme.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulanan hücrelerde anti-HA antikoruna ile immün boyama sonucu pozitif hücrelerin streptavidin ile de boyandığı gözlemlendi (Şekil 4.8). Bu boyama sonucunda HA ile boyanmış olan ACLP-HRP'nin ifade edildiği hücre içi lokalizasyonlarda Streptavidin boyaması tespit edildi. HRP'nin disülfid bağları nedeniyle hücre içerisinde sitoplazmada değil ER veya Golgi içerisinde bulunduğu bilinmesi ile hem ACLP-HRP ifadesinin hem de biyotininlenmiş olan proteinlerin hücresel lokalizasyonunun ER ve veya Golgi olabileceğine işaret etmiştir.



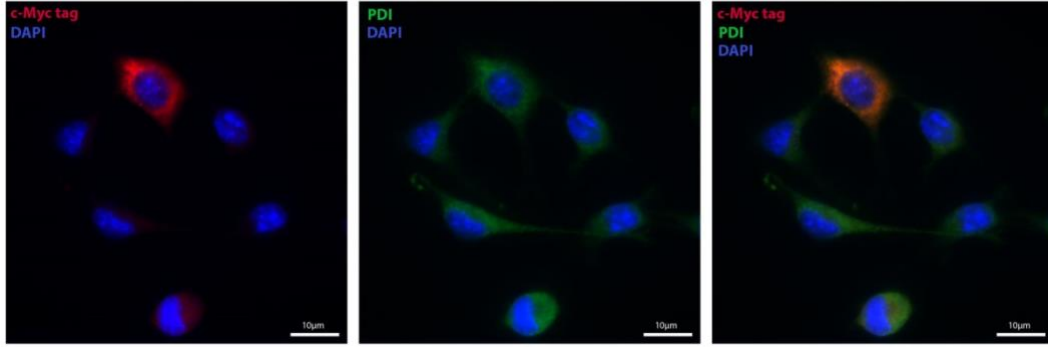
**Şekil 4.9.** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulanmamış C2C12 hücrelerinde c-Myc ve Streptavidin görüntüleri, 63X büyütme.

ACL P-HRP füzyon proteininin bir diğer epitopu olan c-Myc epitopuna yönelik anti-Myc antikoru ile yapılan boyamalarda HA epitopu ile benzer görüntüler elde edildi (Şekil 4.9). c-Myc epitopunun boyanması ile elde edilmiş olan ACL P-HRP ifadesi, transfeksiyonun başarılı olduğunu ve elde edilmek istenilen ACL P-HRP kimerik protein yapısının hücreler tarafından üretilebildiğini tekrar doğrulamıştır.



**Şekil 4.10.** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulanmış C2C12 hücrelerinde HA ve Streptavidin görüntüleri, 100X büyütme.

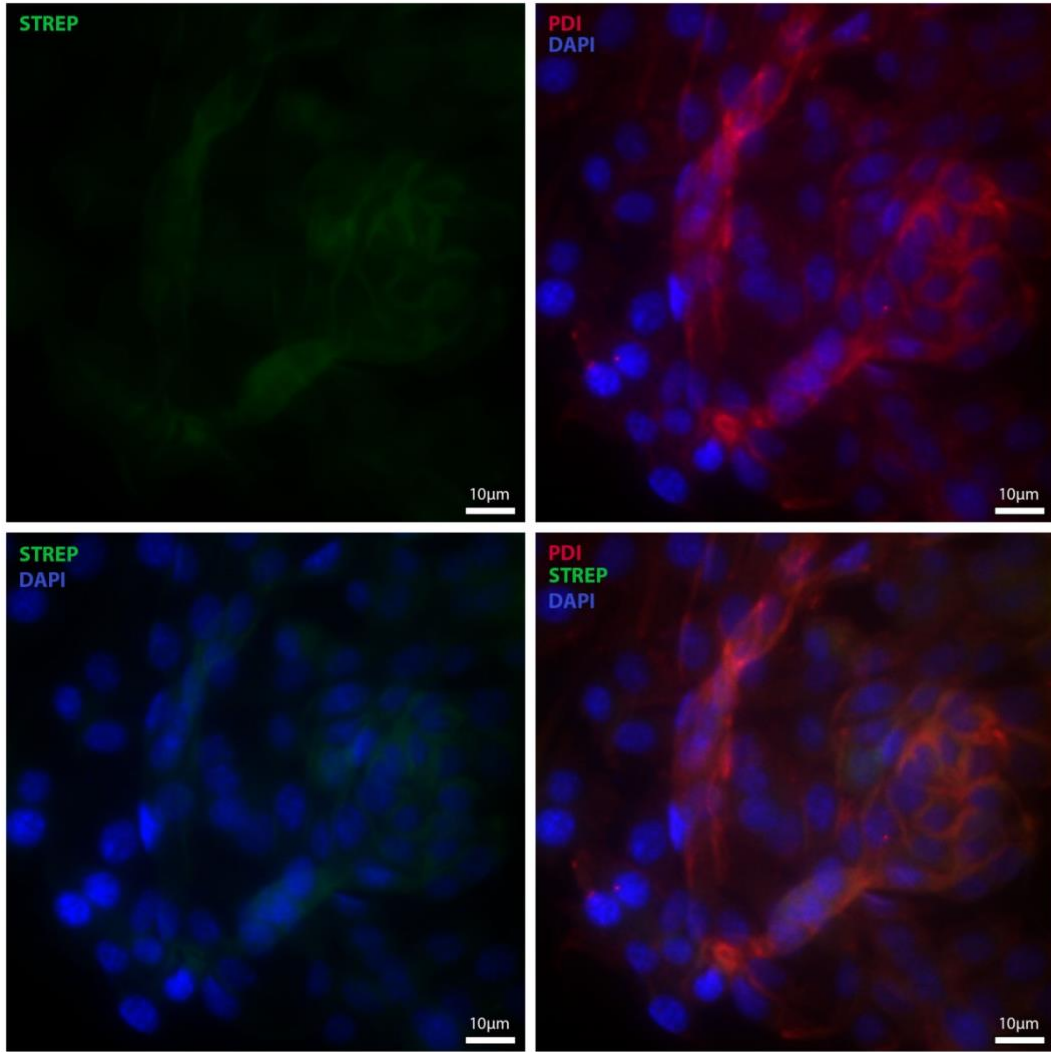
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulanan hücrelerde c-Myc ile boyanmış hücrelerin Streptavidin ile de boyandığı gözlemlendi . Sahada tek bir ACLP-HRP sentezlediği görülen hücre olmasına rağmen çevresindeki hücrelerde de biyotinlenme olduğu gözlemlendi. ACLP-HRP ifadesinin bulunduğu lokalizasyonlarla üst üste görüntü veren Streptavidin, biyotinlenmenin hücre içerisinde ER ve/veya Golgi içerisinde olduğunu düşündürmektedir. Aynı sahada bulunan hücrelerin, ACLP-HRP ifadesi doğrulanmış olan hücre kadar olmasa da benzer ancak daha az parlak bir Streptavidin boyaması göstermesi, biyotinlenmiş olan ACLP'nin olası protein partnerlerinin hücre dışına çıktığına işaret edebileceği düşünülmüştür (Şekil 4.10)..



**Şekil 4.11.** c-Myc ve PDI eş boyaması.

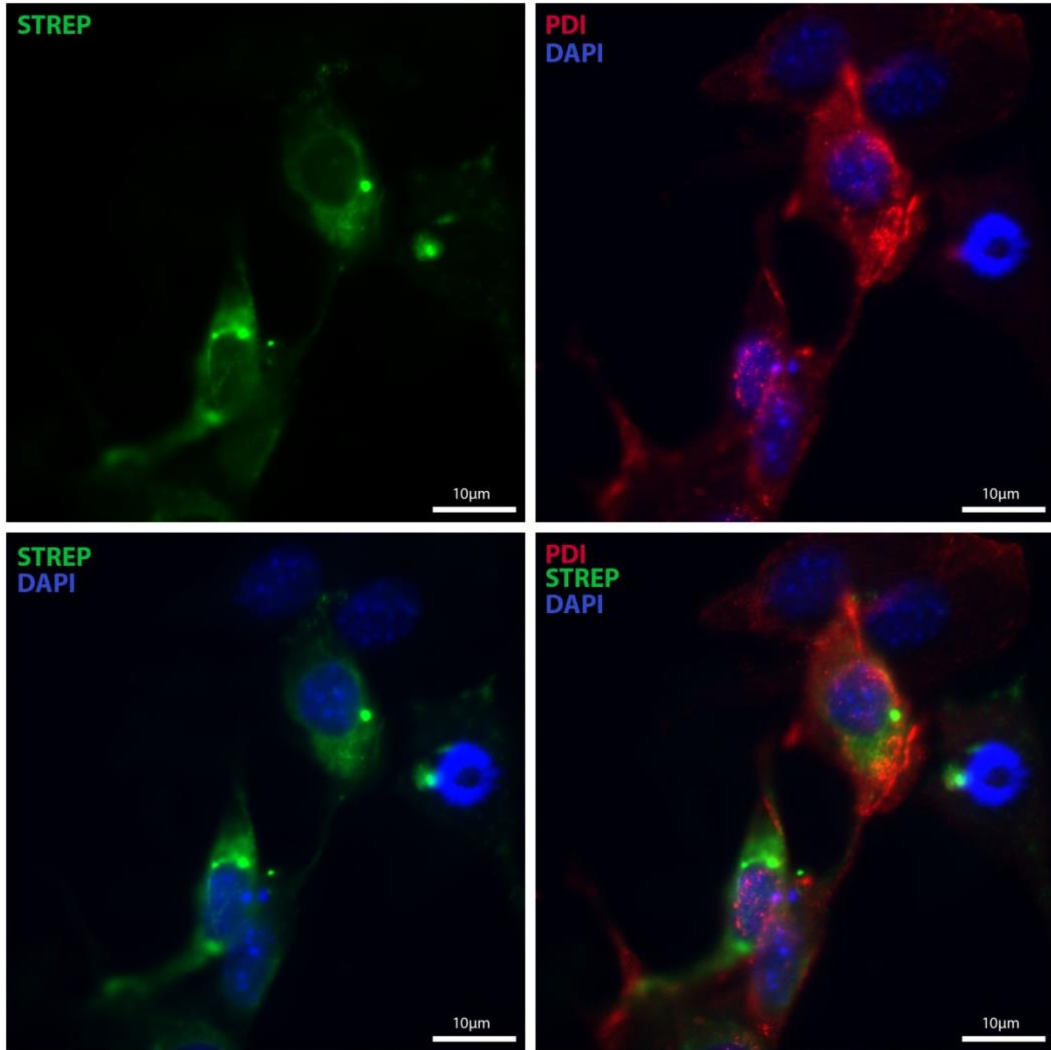
Hücrenin dışına çıktığı bilinen ACLP'nin ER lokalizasyonuna özgü bir protein olan PDI ile eş lokalizasyonda boyama sergilediği gözlemlendi. ACLP-HRP'nin gözlemlenmesine yardımcı olan olan c-Myc boyaması, daha önce gerçekleştirilmiş olan HA ve c-Myc boyamalarına benzer bir görüntü verdiği saptandı. Transfekte olmuş hücrelerin ACLP-HRP ifadesini sağladığı, ortamda bulunan ancak transfekte olmadığı görülen hücrelerin ise kırmızı boyama vermediği gözlemlendi. Buna karşın tüm hücrelerde PDI ile birlikte yeşil boyama gözlemlendi. ACLP-HRP pozitif hücrelerde PDI ile c-Myc görüntüleri üst üste çakıştırılarak incelendiğinde eş yerleşimin işareti olarak kırmızı ve yeşil renklerin bir arada olduğu bölgeler turuncu olarak görüldü (Şekil 4.11).

ACLP 'nin ER ile eş lokalizasyon göstermesi sonrasında biyotinin hücre lokalizasyonunu tanımlamak amacıyla streptavidin ile boyanmış hücrelerde ER ve golgi eş boyamaları yapıldı.



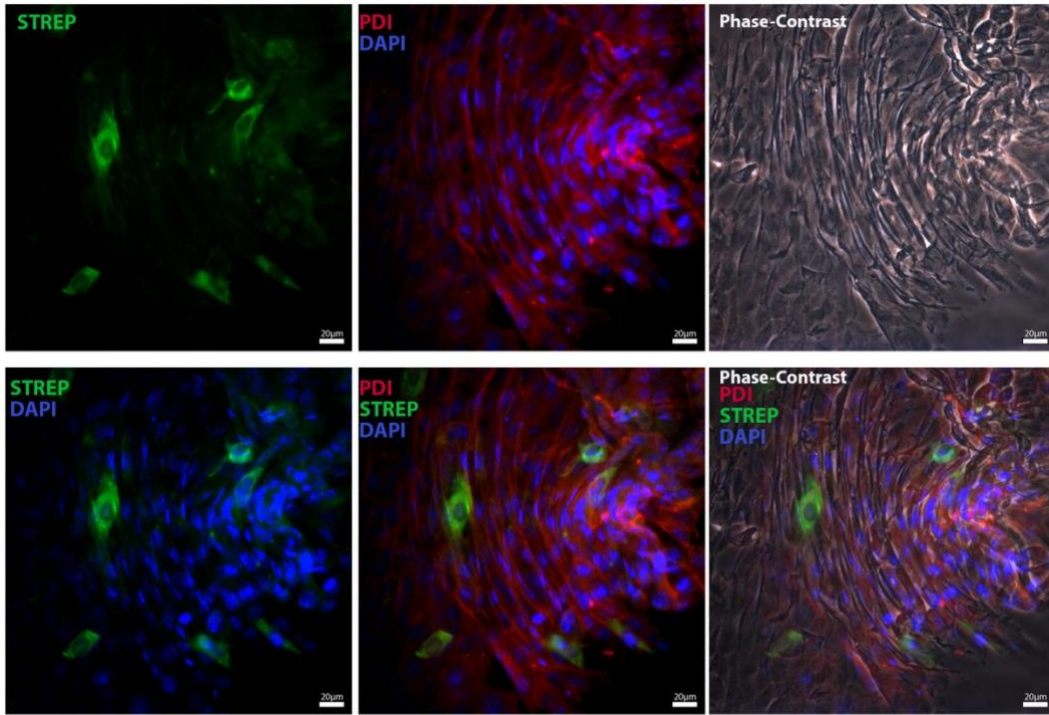
**Şekil 4.12.** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulanmamış C2C12 hücrelerinde PDI ve Streptavidin görüntüleri, 63X büyütme.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulanmamış hücrelerde spesifik bir boyama gözlemlenmedi (Şekil4.12). Bu sonuçlar, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulanacak hücrelerde boyama görülmesi halinde, görülen floresan boyamanın spesifik olduğunun anlaşılabilmesi için negatif kontrol olarak kullanıldı.



**Şekil 4.13.** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulanmış C2C12 hücrelerinde PDI ve Streptavidin görüntüleri, 100X büyütme.

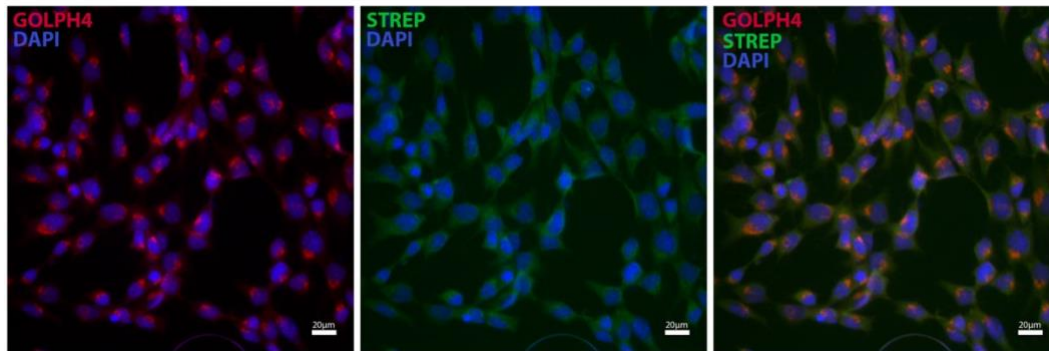
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> varlığında biyotinlenmiş hücreler tespit edildi (Şekil.4.13). Biyotinlenme ile ER boyaması arasında, HA ve c-Myc ile streptavidin arasında görülen eş boyama görülemedi.



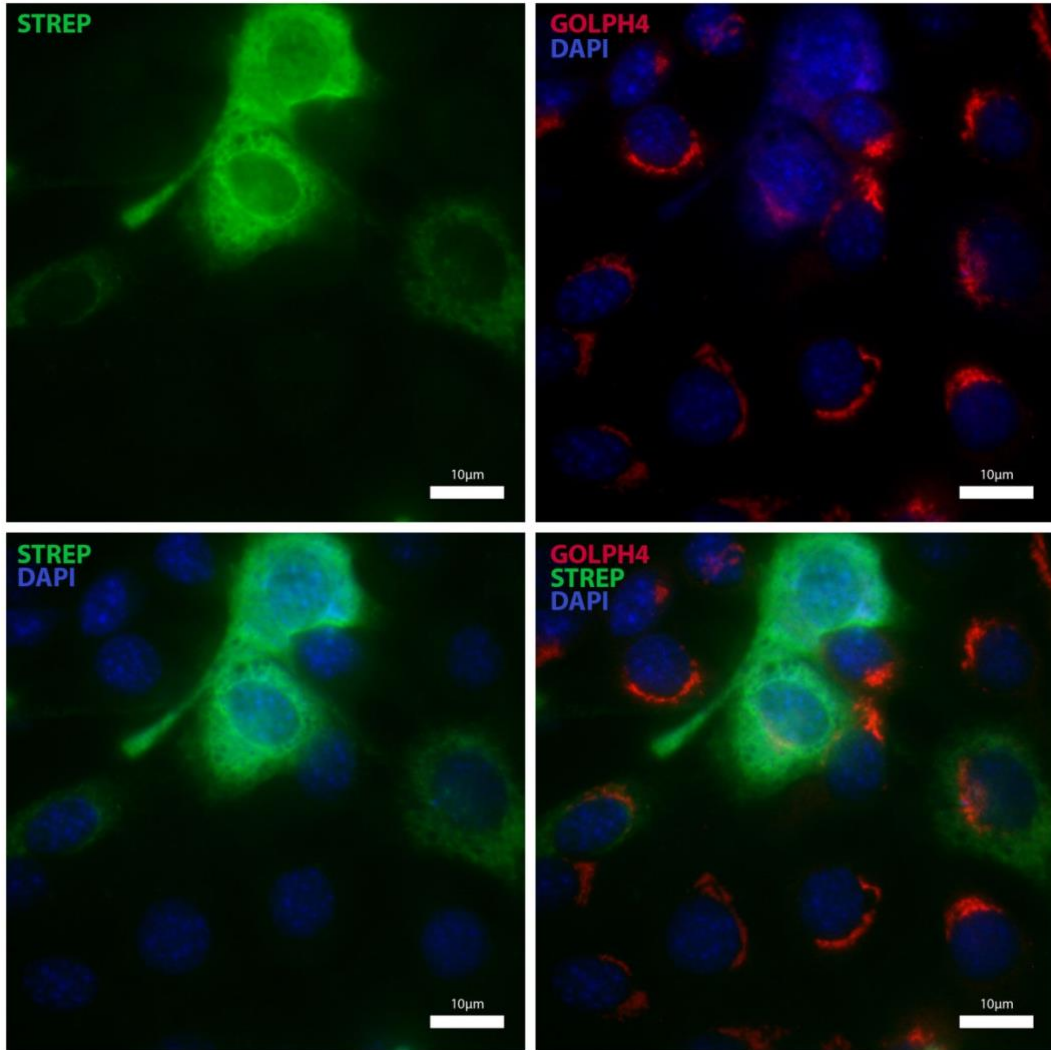
**Şekil 4.14.** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulanmış C2C12 miyotüp hücrelerinde PDI ve Streptavidin görüntüleri, 40X büyütme.

Miyoblastlardan miyotüplere farklılaşan C2C12 hücrelerinde yapılmış olan biyotinlenme sonrası Streptavidin ve PDI görüntülerinde miyotüplerde biyotinlenme olduğu ancak ER boyaması ile eşleşme olmadığı sonucuna varıldı (Şekil 4.14).

Biyotinlenmenin golgi ile eş lokalizasyonunun olup olmadığını görmek amacıyla Streptavidin ve GOLPH4 eş boyaması yapıldı. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulanmamış hücrelerde yüksek ışıkta non-spesifik silik bir arka plan gözlemlendi (Şekil 4.15).



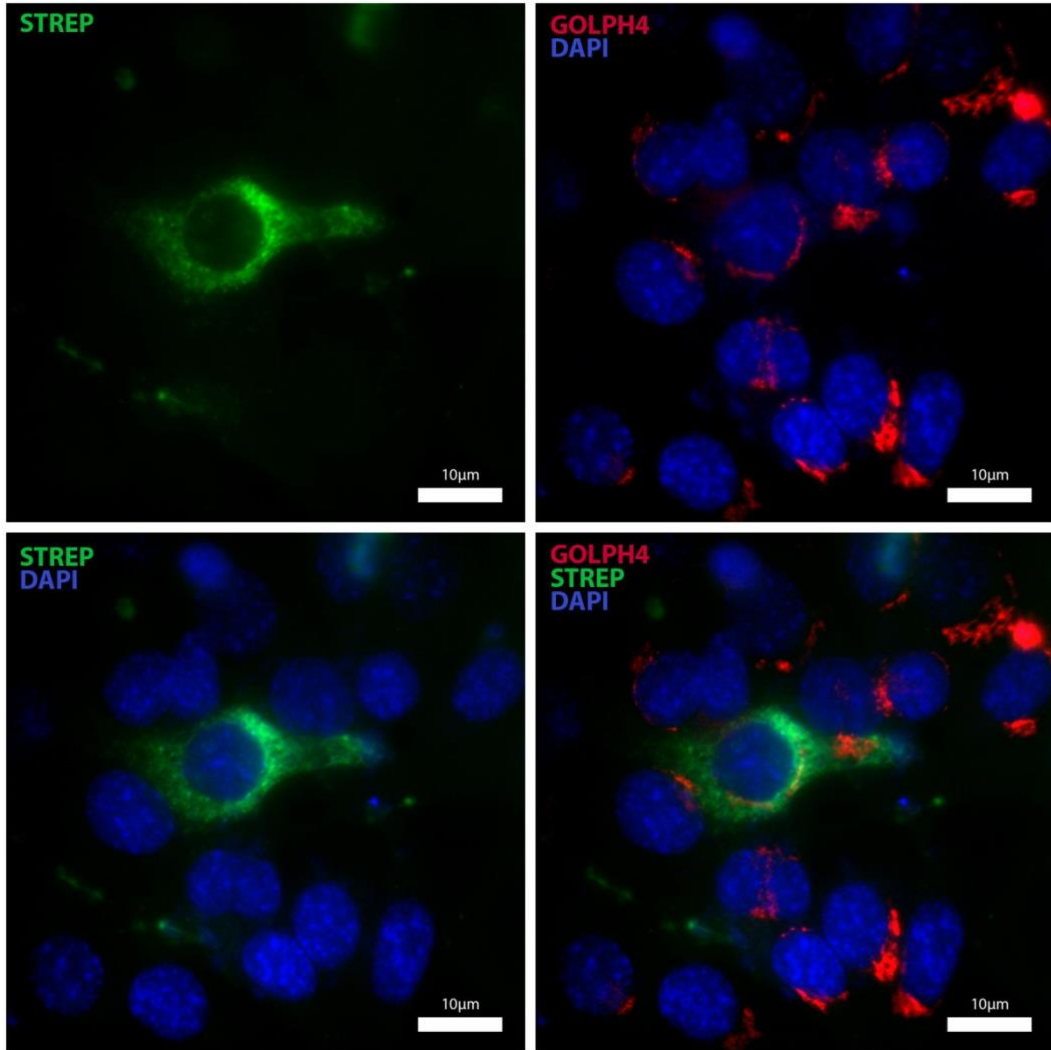
**Şekil 4.15.** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulanmamış C2C12 hücrelerinde GOLPH4 ve Streptavidin görüntüleri, 40X büyütme.



**Şekil 4.16.** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulanmış C2C12 hücrelerinde GOLPH4 ve Streptavidin görüntüleri, 100X büyütme.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulanmış hücrelerde hücre boyunca perinükleer spesifik streptavidin görüntüleri elde edildi. Ancak bu sonuçlarda ACLP-HRP ve ER arasında görülmüş olan eş yerleşim durumu gözlemlenmedi (Şekil 4.16).



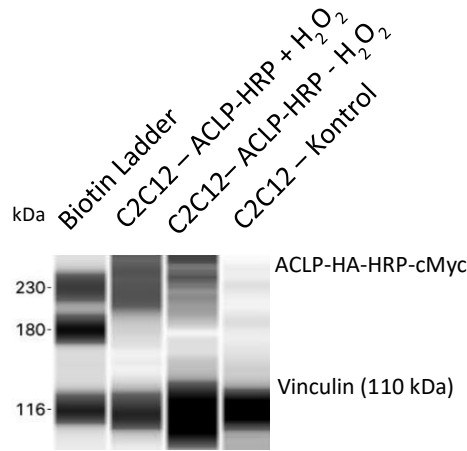


Şekil 4.17. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulanmış C2C12 hücrelerinde GOLPH4 ve Streptavidin görüntüleri, 100X büyütme.

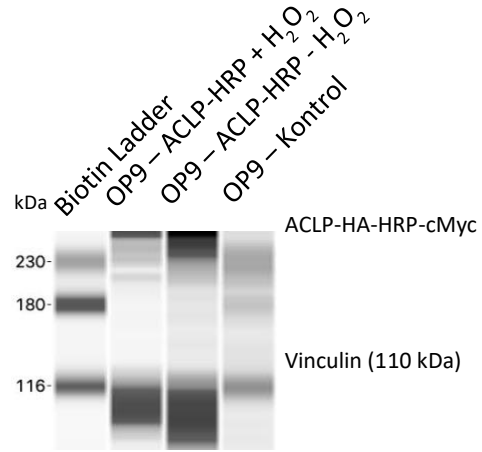
Benzer bir şekilde tekrarlanan deneylerde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulanmış hücrelerde spesifik streptavidin görüntüleri elde edilmiş olmasına rağmen ACLP-HRP ve ER arasında görülmüş olan eş yerleşim durumu ACLP-HRP'nin biyotinlediği proteinler ve Golgi arasında gözlemlenmedi (Şekil 4.17).

### 4.3 ACLP-HRP ile biotinlenmenin kapiller nano-immunoassay ile görüntülenmesi

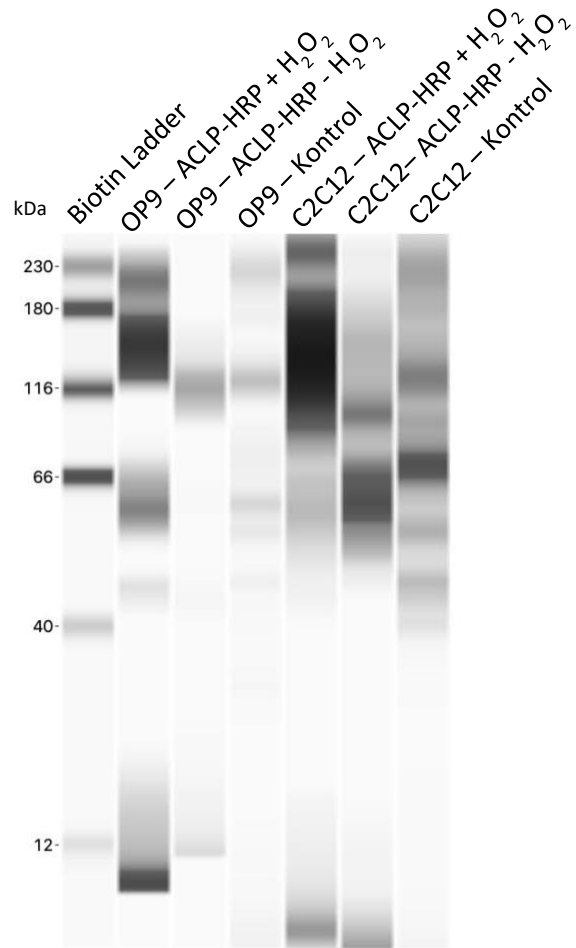
Transfeksiyon sonrası biyotinlenmenin immünfloresan olarak görüntülediği C2C12 hücrelerinde lamellerin kuyucuklardan çıkartılmasından sonra kalan hücreler RIPA buffer içerisinde toplanarak protein izolasyonu ve kantitasyonu yapıldı. İzole edilen proteinler kapiller nano-immunoassay tekniği ile incelendi (Şekil 4.18) Yapılan çalışmada, ACLP'nin görüntülenmesi için transgen üzerinde yerleşimli HA epitopunu hedefleyen anti-HA tag primer antikoru, internal kontrol amacıyla ise anti-vinculin antikoru kullanıldı. Glikozillenmiş formunun 180 kDa ve üzerinde birden fazla bant verdiği bilinen ACLP'nin transgen yapısında bulunan HA-HRP ve c-Myc ile birlikte en az 40 kDa daha ağır olacağı ve 230 kDa üzerinde yerleşim sergilemesi beklenmektedir. Yapılan çalışmada ayrıştırma ortamının limitlerinde olmakla birlikte (12-230 kDa) 230 kDa üzerinde immünreaktif bir bant gözlenmiştir. Transfeksiyon yapılmamış (negatif kontrol) hücrelerden elde edilen protein örneklerinde bu bant gözlenmemiştir.



**Şekil 4.18.** C2C12 hücrelerinde anti-HA ve anti-Vinculin ile kapiller nano-immunoassay.



**Şekil 4.19.** OP9 hücrelerinde anti-HA ve anti-Vinculin ile kapiller nano-immunoassay.



**Şekil 4.20.** C2C12 ve OP9 hücrelerinde Streptavidin-HRP ile kapiller nano-immunoassay.

C2C12 hücrelerinden elde edilen proteinlerle gerçekleştirilen deney transfeksiyon uygulanan OP9 hücre proteinleri kullanılarak tekrar edildi (Şekil 4.19). C2C12 hücre proteinlerinde gözlenen ve ACLP-HRP füzyon proteinine atfedilen immünreaktif banttı bir miktar daha ağır gözlenen bir ACLP-HRP bandı görüldü.

İmmünfloresan deneyleri ile biyotinleme yaptığı doğrulanıan ACLP-HRP'nin biyotinleme kapasitesi kapiller nano-immunoassay ile gözlendi (Şekil 4.20). Özellikle 100- 180 kDa ağırlık arasında kalan ve streptavidin-HRP ile yoğun etkileşim sergileyen bir sürüntü (*smear*) izlendi. Bu sürüntü H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulanmamış transfekte örnek proteinlerinde ve negatif kontrol örneklerinde gözlenmedi.

#### 4.4 Matrizomun Transkriptom ve Proteom Düzeyinde Analizi

##### 4.4.1 Matrizomun Transkriptom Düzeyinde Analizi

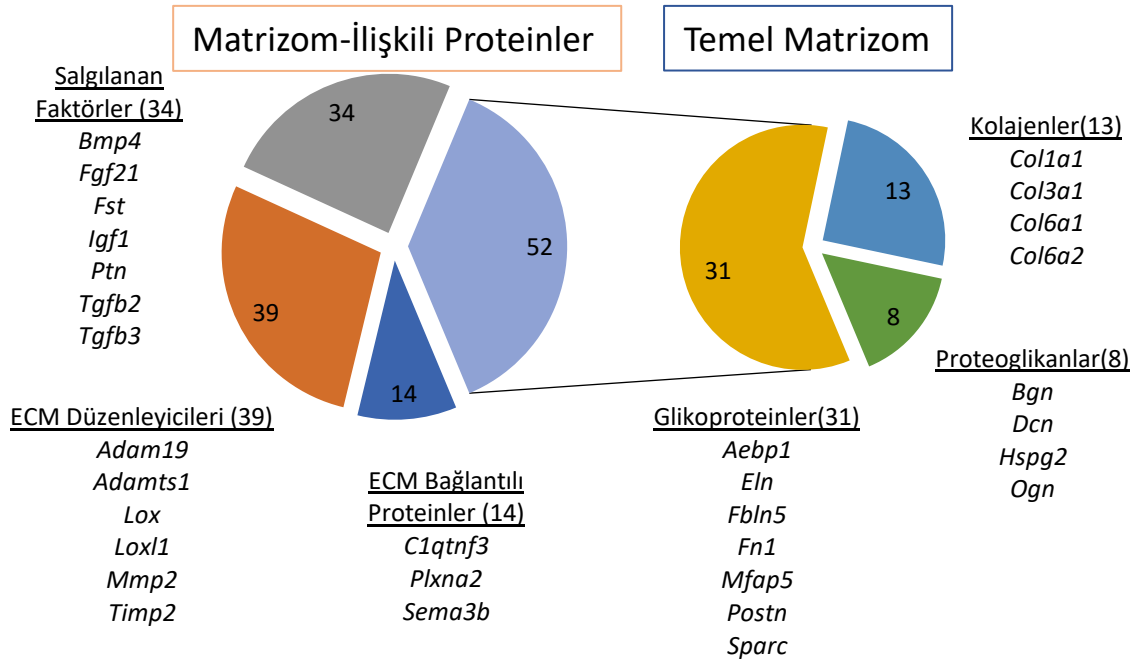
Hastalıkta ve sağlıkta matrizom gelişimi ve oluşumuna ilişkin sürecin bütüncül analizi için iskelet kası gelişimini ve hastalıklarını modelleyen deney verileri iskelet kası matrizomu analizi için kullanılmıştır. İskelet kasında bulunan ve iskelet kasının post natal dönemde büyüme ve gelişmesini sağlayan MuSCs (*Muscle Stem Cells*) veya diğeri ismi ile satelit hücreler bulunmaktadır. Bu hücreler miyoblastlardan miyotüplere farklılaşırken fonksiyonları için gerekli olan ECM yapısını sentezlerler. Bu durum iskelet kasında fizyolojik olarak ECM'in oluşmasını modellemek ve sağlıklı fizyolojide iskelet kası ECM elemanlarını bulmak amacıyla C2C12 hücreleri üzerinden incelenmiştir.

İskelet kasında büyüme ve gelişme için satelit hücrelerden üretilen ECM sağlıklı fizyolojiyi temsil ederken, iskelet kasında gerçekleşen kronik hasar sonucunda ECM elemanlarının geri dönüşümsüz bir şekilde birikiminin olduğu fibrozis oluşmaktadır. İskelet kasında hasar ile birlikte aktive olan FAP (*fibro/adipogenic progenitor*) hücrelerinin bu patolojinin oluşumuna katkı sağladığı bilinmekte olup bu hücrelerden üretilen matrizom fibrozis patolojisinin bir modeli olarak ele alınmıştır.

Transkriptom analizleri gerçekleştirilirken tüm *in vitro* ve *in vivo* modellerde istatistiksel olarak anlamlı olarak ifade edilen gen listeleri oluşturulmuştur. Bu gen listelerinde matrizoma ait genler seçilerek matrizom transkriptomu listeleri

oluşturulmuştur. Matrizom transkriptomunda 2 kat ve üzeri artış gösteren genler seçilerek, deney düzeneklerinde ECM oluşumunda rol alan matrisom elemanları tespit edilmeye çalışılmıştır. Bu listeler hazırlanırken farklı türlerden ve deney platformlarından elde edilmiş veriler birbirleriyle kantitatif olarak değil kalitatif olarak karşılaştırıldı. Böylelikle aynı örüntüyü takip eden genlerin, tür ve deney farklılıklarına rağmen ECM oluşumunda ortak olarak görülebilecek genlerin bulunması amaçlandı.

C2C12 miyoblast hücreleri iskelet kası gelişimi ve hasar tamirini hücre düzeyinde modellemek amacıyla kullanılan embriyo kaynaklı hücre hatlarıdır. Yüksek serum koşullarında çoğalmakta, serum açlığı ve yüksek yoğunlukta ise miyojenik farklılaşma programını tetikleyerek çok çekirdekli miyotüplere farklılaşabilmektedir (63). C2C12 hücrelerinin miyotüplere farklılaşma sürecinde transkriptom gözlemlerinin yapıldığı üç farklı deneye ait verilerle gerçekleştirilen analiz sonucunda C2C12 matrisomunda istatistiksel olarak anlamlı olan ve 2 kattan fazla artış gösteren 139 gene ait transkript saptanmıştır (Ek-1). Bu analiz ile fizyolojik koşullarda miyotüp çevresindeki ECM'nin oluşumuna miyoblastların katkısının saptanması hedeflenmiştir. Saptanan genlerden 52'sinin temel matrisom proteinlerini sentezlediği bulunmuştur. Literatür bilgisiyle paralel olarak, bu süreçte belirgin ölçüde fibriler kolajen artışı gözlenmiştir. İskelet kasında miktar olarak öne çıkan fibriler kolajen tipi Col1a1, Col11a3'ün yanı sıra tip VIa1 ve VIa2 gibi görece daha az olduğu bilinen kolajenlerin de anlamlı bir şekilde artışı gözlenmiştir. Miyoblastların miyotüplere farklılaşma sürecinde ECM'lerini oluştururken; kolajen Ia1, IIIa1, Iva2 ve 5, Va1 ve 3, VIa 1 ve 2, VIIIa1, XIIa1, XVIa1, XVIIIa1 ve XXIIIa1 alt tiplerini sentezlediği saptanmıştır.



**Şekil 4.21.** C2C12 hücrelerinin farklılaşma sürecinde ifadesi 2 kat ve üzerinde artış sergileyen matrizom genlerinin transkriptom düzeyinde analizi.

Temel matrizomun bir diğer önemli grubu proteoglikanlardan sekizi anlamlı artış göstermiştir (brevikan, biglikan, chondroadherin-like, dekorin, hyaluronan and proteoglycan link protein 4 (Hapln4), perlekan (heparan sulfate proteoglycan 2-Hspg2), osteoglisin, proline arginine-rich end leucine-rich repeat -Prelp). Bu proteoglikanlardan biglikan, dekorin ve perlekanın iskelet kasındaki yapısal işlevi daha önce tanımlanmıştır.

Miyoblastların miyotüplere farklılaşması sırasında ECM'ini oluşturan 31 glikoprotein anlamlı artışı saptanmıştır. *Aebp1*'in de C2C12 hücrelerinde sağlıklı ECM'inde artış sergilediği saptanmıştır. *Aebp1*/ACLP eksikliğinde bağ dokuda kolajen organizasyonunun kurulmasında problem olduğu öne sürülmüş olduğundan, kolajenlerin anlamlı artış gösterdiği bir durumda pozitif korelasyon göstererek artış sergilemesi, bu süreçte oynadığı rol bakımından önemli bir gözlemdir. *Aebp1*'e ek olarak fibronektin, elastin, fibulin, fibrillin, laminin, matrillin, periostin, SPARC ve tenascin c gibi glikoproteinlerin arttığı görülmüştür. Yapısal görevlerde rol aldığı bilinen bu proteinlerin yanı sıra ECM'de TGF- $\beta$  bağlayıcı özelliği bilinen *Ltbp4*, IGF'leri ECM'de tutan *Igfbp-3,4,5*'in arttığı gözlenmiştir. Bu faktörlerin iskelet kasının yapısal gelişimi için önemli olduğu bilinmektedir. Büyüme faktörü bağlama

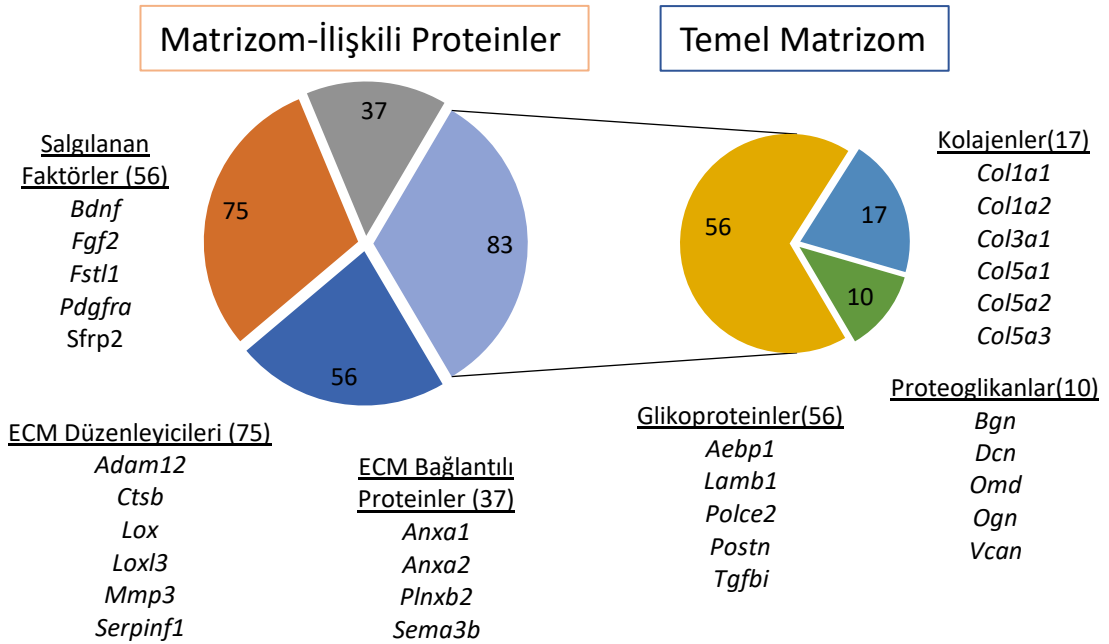
kapasitesi olan proteinlerin bu alt tiplerinin iskelet kasında anlamlı olarak arttığı saptanmıştır.

Temel matrisom proteinlerinin olgunlaşmasını ve matrisomun kurulmasını sağlayan ECM düzenleyici proteinleri sentezleyen 39 transkriptin de artışı görülmüştür. Adam ailesinden yalnızca Adam 19, Adamts ailesinden 1, 2, 4, 5, 16 ve Adamts benzeri proteinlerden 1 ve 5'in ifadesi anlamlı bir şekilde artmıştır. Kolajenlerin lizil amino asitlerini oksitlenmesini sağlayarak kolajen olgunlaşmasında rol alan Lox, Lox benzeri 1-2 ve prokolajen lizin, 2-oxoglutarat 5-dioksigenaz 2 (Plod2) genlerine ait transkriptlerin artışı görülmüş ve bu proteinlerin iskelet kasından sentezlendiği bilinen kolajen alt tiplerini modifiye edebileceği düşünülmüştür. Mmp ailesinden 2, 10, 11, 12, 14, 15 ve Mmpleri ve özellikle Mmp-2'yi inhibe eden Timp2'nin arttığı görülmüştür.

Temel matrisomun ve ECM regülatörlerinin üretim ve salgı süreçlerini düzenleyen 34 myokin geninde artış görülmüştür. Bu faktörlerden iskelet kası gelişimindeki rolü bilinen; folistatin, insülin benzeri büyüme faktörleri Igf-1 ve 2, transforme edici büyüme faktörü olan Tgf- $\beta$  2 ve 3'ün artışı, bu miyokinlerin iskelet kası ECM gelişiminde önemli rol oynadığını göstermektedir.

Miyojenik karakteri olan C2C12 hücrelerinden farklı olarak kronik hasar ve fibrozis durumunda aktive olarak çoğalan, iskelet kası mezenkimal stromal hücre topluluğu olan fibro-adipojenik hücreler de (FAP) aktive olduktan sonra gösterdikleri transkriptom değişimi matrisom penceresinden incelenmiştir. Bu çerçevede C2C12 hücreleri iskelet kasında sağlıklı fizyolojiyi temsil ederken FAP hücreleri fibrozis patolojisini *in vitro* modellemektedir. Analiz sonucunda görece C2C12'den daha fazla matrisom transkripti ve daha fazla sayıda gen saptanmıştır (Ek-2). Bu durum iki temel nedenle açıklanmaya çalışılmıştır: 1. FAP hücrelerinin fibroblast benzeri karakter göstererek aktive olduğu ortamda ECM'in oluşmasında önemli görevler alması, 2. bu verilerin eldesinde C2C12 gözlemlerinde kullanılan mikrodizin (*microarray*) teknolojisi yerine RNA-Seq teknolojisinin saptanan transkript sayısını artırdığı düşünülebilir.

FAP hücrelerinde gerçekleştirilmiş olan çalışmada temel matrizomun tamamında C2C12 hücrelerine kıyasla daha fazla gen saptanmıştır. C2C12 hücrelerinden salgılanan kolajenlerin neredeyse tamamı FAP hücrelerinde de anlamlı artış sergilemektedir. C2C12 hücrelerinden farklı olarak fibriler tipte kolajen olan kolajen Ia2'nin anlamlı artışı yalnızca FAP hücrelerinde görülmüştür (Şekil 4.22).



**Şekil 4.22.** FAP hücreleri transkriptom düzeyinde matrizom analizi.

Proteoglikan sentezi kapasitesi olarak C2C12 hücrelerinden farklı olarak aspirin, podokan, osteoglisin ve osteomodilinlerin sentezinde anlamlı bir artış bulunmuştur. Bu proteoglikanların fibrozis sürecinde myoblast fizyolojisine kıyasla daha az elastik ECM'in oluşumuna katkı verdiği şeklinde yorumlanabilir.

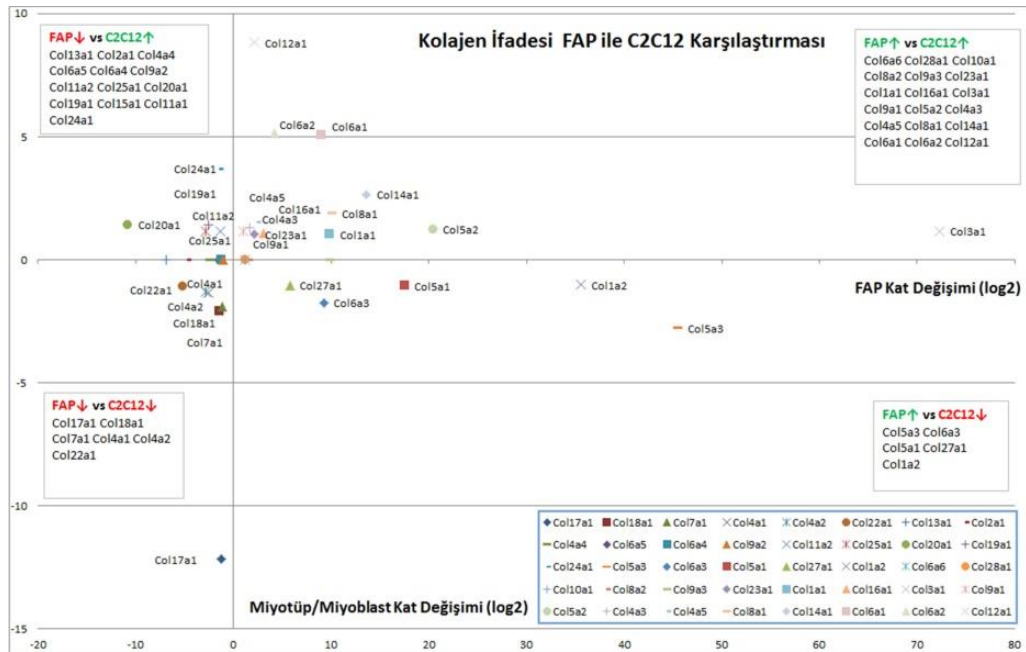
Glikoproteinlerden *Aebp1*'in de FAP hücrelerinde arttığı görülmektedir. Bu bulgu ile ECM sentezinin olduğu durumlarda *Aebp1*'in de arttığı ve sentezlenen ECM'in kurulmasında görev aldığı hipotezini destekler niteliktedir. *Aebp1* dışında sentezleinde anlamlı artış olan glikoproteinlerde *Tgf-β* induced, *Igfbp4-5-6-7*, pro-kolajen c- peptidaz enhancer (*Pcolce*) 1-2 gibi ECM düzenlenmesini regüle ettiği bilinen faktörler saptanmıştır.



ECM'e salınan temel matrizom proteinlerindeki artışın bir benzeri ECM düzenleyicilerinde de görülmüştür. Adam ailesinde 8, 9, 12, 19, 23, Mmp ailesinde bulunan 3, 4, 8, 9, 14, 19, 23, 24 gibi farklı Mmplerin salgılandığı saptanmıştır. Birçok farklı temel matrizom proteinini sentezleyen FAP hücrelerin bu proteinlerin işlenmesi için gerekli olan 75 farklı ECM düzenleyicisini sentezlediği görüşmüştür.

FAP hücrelerinden salgılanan 56 farklı salgı faktörü ve bunlar içinde FAP markerı olduğu bilinen *platelet derived growth factor alpha* (Pdgfra) gözlenmiştir. Hücrelerin çoğalması ve farklılaşmasında görev alan Hgf, Egf-like 8, Fgf-2, 7, 10 gibi büyüme faktörleri salgısal proteinler arasında inflamasyonla ilişkili olduğu bilinen çeşitli kemokin ve sitokin molekülleri öne çıkmaktadır.

C2C12 ve FAP hücrelerinin ECM artışı ile birlikte çeşitli kolajen alt tiplerini ürettiği gözlemlenmiştir. ACLP'nin kolajen organizasyonu ile ilişkili olduğunun düşünülmesi ve kolajenlerin özellikle iskelet kası ECM yapısında önemli bir yer tutması nedeniyle iskelet kasında hasar tamirinde rol aldığı bilinen bu iki hücre popülasyonunu tarafından üretilen kolajenler birbirleriyle kıyaslanmıştır (Şekil 4.23).



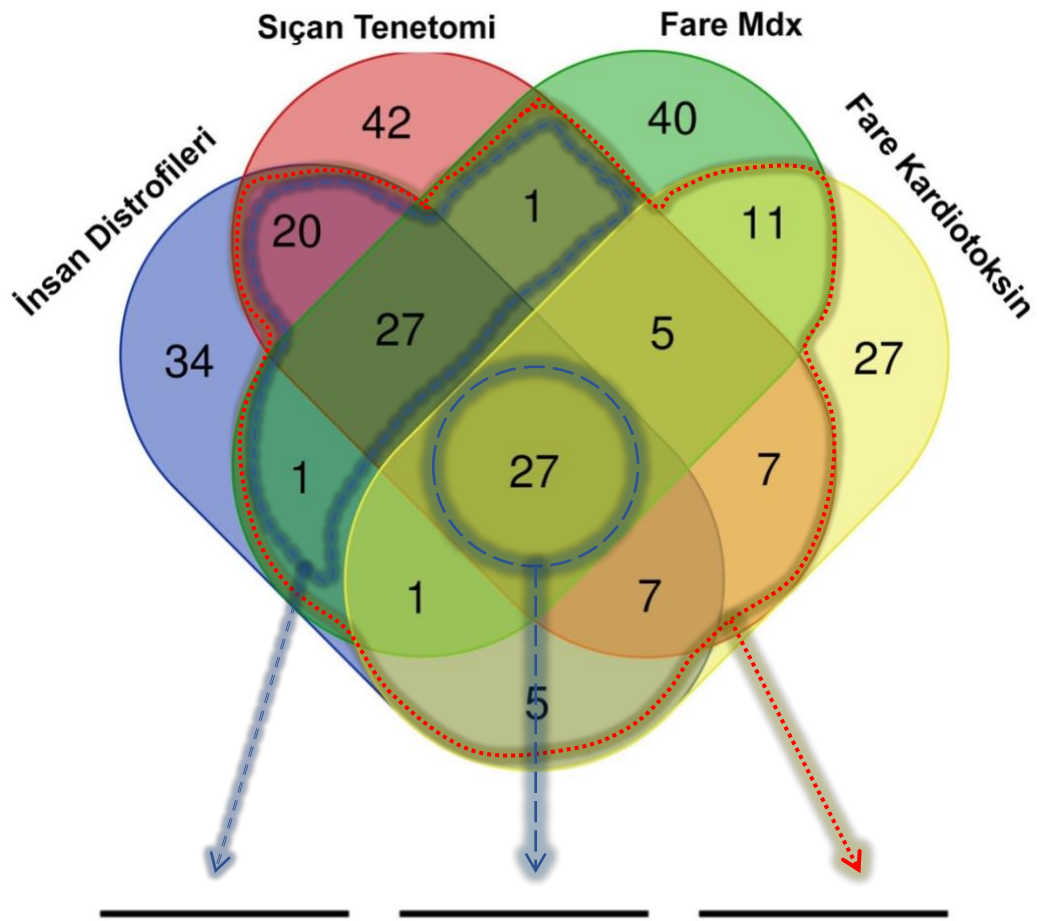
**Şekil 4.23.** Miyoblast C2C12 hücreleri ile fibroadipojenik öncül FAP hücrelerinin kolajen alt tipleri transkriptlerinin değişiminin karşılaştırılması.

Fibrozis gelişiminin kolajen birikimi ile karakterizedir. Sağlıklı iskelet kası fizyolojisinde de kolajen artışı görülmesine rağmen dokudaki elastik yapı korunmaktadır. Bu bilgiler ışığında patolojik süreçte artış sergileyen farklı kolajen alt tiplerinin varlığı ve ifade değişimleri incelenmiştir. Bu şekilde değişim sergileyen olası kolajen alt tiplerinin fizyolojik süreçte ifadesi sorgulanmıştır. Karşılaştırılan iki hücre popülasyonunda 5 farklı kolajen alt tipinin iskelet kası farklılaşma fizyolojisini modelleyen C2C12 hücresinde azalma sergilerken FAP hücrelerinde artış gözlenmiştir. Bunlar arasında; Col1a2, Col5a3 gibi iskelet kasında yüksek miktarda görüldüğü bilinen ancak miyoblastların miyotüplere farklılaşması ile ifadesi azalan kolajen alt tiplerinin ifadesinin FAP hücrelerinde 30 kat ve üzeri miktarda arttığı gözlemlenmiştir. Bu bulgu, saptanan kolajen alt tiplerinin fibrozis ile gelişen, fizyolojiye kıyasla elastik niteliği azalmış ve sertleşmiş doku yapısının kurulmasının temel nedeni olabileceğini desteklemektedir.

Hücresele modellerle fizyolojik ve patolojik matrisom sürecinin incelenmesi sonrasında ele alınan *in vivo* modellerde gen listeleri hazırlandı. *In vivo* modellerle fibrozisin modellenmesi amacıyla;

- Tenotomi sürecine eşlik eden ve inflamasyon sergilemeyen iskelet kası fibrozis modeli
- DMD hastalığının fare modeli olan *Dmd<sup>mdx</sup>* diyafram kasında fibrozis gelişimi incelenmesi
- Kas distrofisi tanılı hasta biyopsilerinde transkriptom incelemesi veri setleri kullanılmıştır.

Bu grupların yanı sıra kardiyotoksin ile oluşturulmuş akut kas hasarı modeli fibrozis ile sonuçlanmayan hasar tamiri modeli olarak ele alınmıştır. (Şekil 4.24)



Geri Dönüşümsüz Hasar (49 gen)		Tüm Gruplarda Ortak (27 gen)		En Az 2 Grupta Ortak(112 gen)	
<i>Adam15</i>	<i>Igfbp2</i>	<i>Anxa2</i>	<i>Lamb1</i>	<i>Col1a1</i>	<i>Adam10</i>
<i>Adamts12</i>	<i>Loxl1</i>	<i>Bgn</i>	<i>Lox</i>	<i>Col1a2</i>	<i>Adam15</i>
<i>Aebp1</i>	<i>Lum</i>	<i>Cilp2</i>	<i>Matn2</i>	<i>Col4a1</i>	<i>Bmp1</i>
<i>Col11a1</i>	<i>Igfbp7</i>	<i>Col18a1</i>	<i>Postn</i>	<i>Col4a2</i>	<i>Loxl1</i>
<i>Col14a1</i>	<i>Lama4</i>	<i>Col3a1</i>	<i>Serpina3n</i>	<i>Col6a1</i>	<i>Mmp12</i>
<i>Col16a1</i>	<i>Mfap2</i>	<i>Col5a1</i>	<i>Serpine1</i>	<i>Col6a2</i>	<i>Mmp14</i>
<i>Ctgf</i>	<i>Mfap4</i>	<i>Col5a2</i>	<i>Serpinh1</i>	<i>Aebp1</i>	<i>Mmp2</i>
<i>Ctsk</i>	<i>Timp2</i>	<i>Col6a3</i>	<i>Srpx</i>	<i>Ctgf</i>	<i>Mmp3</i>
<i>Eln</i>	<i>Pcsk5</i>	<i>Ctsb</i>	<i>Tgfbi</i>	<i>Fbln1</i>	<i>Timp2</i>
<i>Fgl2</i>	<i>Ptn</i>	<i>Fbln2</i>	<i>Thbs2</i>	<i>Fn1</i>	<i>Igf2</i>
<i>Fst</i>	<i>Tnxb</i>	<i>Fbn1</i>	<i>Timp1</i>	<i>Igfbp2</i>	<i>Sfrp2</i>
<i>Hspg2</i>	<i>Sparc</i>	<i>Fstl1</i>	<i>Tnc</i>	<i>Ltbp2</i>	<i>Tgfb1</i>
<i>Mmp2</i>	<i>Wisp2</i>	<i>Igf1</i>	<i>Vcan</i>	<i>Mfap5</i>	<i>Tgfb3</i>
<i>Pcolce</i>		<i>Igfbp4</i>		<i>Wisp2</i>	

**Şekil 4.24.** In vivo modellerde transkriptom düzeyinde matrizom analizi.

( $p < 0.001$ ,  $FC > 2$ )

İskelet kasında gerçekleşen hasarın ardından tamir sürelerinde 4 farklı deney grubu ve 3 farklı türe ait örnekler bir arada incelenmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı bulunan ( $p < 0.001$ ), iki kat ve üzeri kat artışı gösteren transkriptlere ait gen listeleri oluşturulmuştur (Ek-3). ECM artışı ile karakterize olan bu *in vivo* model gruplarının hepsinde ortak artış sergileyen 27 gen tespit edilmiştir. Bu genlerin tüm gruplarda artışının olması, iskelet kasında ECM yapısının tamiri için bu gen ürünlerinin elzem olduğunu ve oluşacak yeni ECM yapısının temel taşları olduğuna işaret etmektedir. Tüm veri setlerinde ortak ifade artışı sergileyen Col3a1, Col5a1, Col5a2 gibi fibriler kolajenler, Biglikan, Fibrilin, Fibülin, Matrilin, Periostin ve Versikan proteoglikanlarının yeniden kurulacak ECM yapısındaki temel matrizom için elzem olduğu anlaşılmıştır.

İskelet kasında ECM'in yeniden kurulurken ortaya çıkan düzenleyici faktörler arasında bir kolajen modifiye edici enzim olan lizil oksidaz (Lox) ve MMP inhibitörü olan Timp1'in sentezlenen temel matrizom genlerinin modifikasyonunu düzenlemek konusunda iskelet kası ECM oluşumunda yaygın bir etkiye sahip olduğu anlaşılmıştır.

İskelet kasının gelişiminde önemli görevler aldığı bilinen folistatin benzeri protein-1 (Fstl1) ve İnsülin benzeri büyüme faktörü-1 (Igf1) tüm gruplarda anlamlı artış gösteren iki miyokin olmuştur. Etkilerinin yaygın olduğu ve iskelet kası hücrelerinin bölünmesi için elzem olduğu bilinen bu iki miyokinin tüm gruplarda ortak olarak artmış olması bu deney gruplarında görülen ECM birikimi ve hücre bölünmesini destekler niteliktedir.

ECM artışı sergilediği bilinen deney grupların en az ikisinde artış gösteren 112 gen saptanmıştır. İskelet kası matrizom yapısının yeniden kurulması için farklı türlerde ortaklık gösteren bu 112 gen, iskelet kası ECM yapısında bulunan proteinlerin *in vivo* gen listesi olarak ele alınabilir. Bu gen listesinde 6 proteoglikan, 15 kolajen 38 glikoprotein olarak toplam 59 temel matrizom geni saptanmıştır. 28 ECM düzenleyici gen bu temel matrizom proteinlerini modifiye ederken, 17 salgılanan faktörün de bu süreçlerin hücre sinyal iletimi düzeyinde kontrolünü sağlayabileceği görülmüştür.

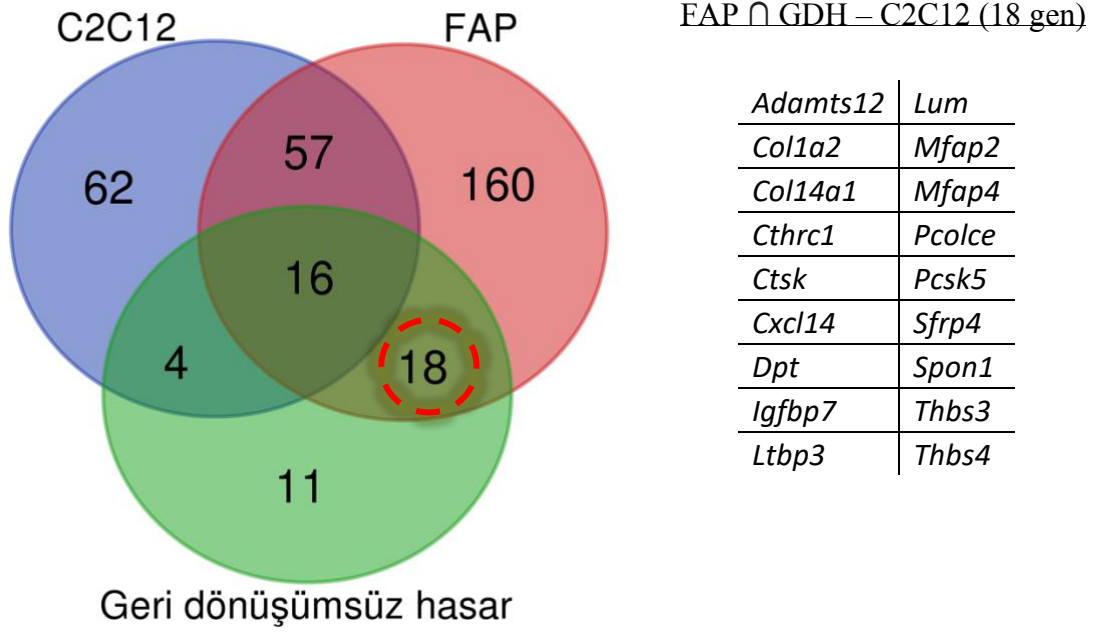
Bu 112 genden ECM oluşumunun fibrozis ile sonuçlanmadığı kardiyotoksin aracılıklı hasar modeline ait sonuçlar çıkartıldığında kalan 49 genin iskelet kası

fibrozisin tedavi stratejilerinde aday hedef gen olma potansiyeli olduğu düşünülmektedir. Fibrozisin karakteristik özelliği olan kolajen artışı bu 49 genden 3'ü proteoglikan, 9'u kolajen, 22'si glikoprotein olarak 34 temel matrizom geni ve 9 ECM düzenleyicisi ve 6 salgılanan faktör olarak bulunmuştur. Bu grupta spesifik olarak bulunan fibriler kolajen Col1a2, bazal membran oluşumunda görev alan Col4a1,4a2 ve bunlara ek olarak mikrofibrillerin oluşumunda üçlü heteroheliks yapısı gösteren kolajen VI'ya ait Col6a1 ve Col6a2 gibi önemli kolajen yapıları bu grupta ayırt edici olarak gözlenmiştir.

Geri dönüşümsüz hasar ve ECM birikimi ile ilişkilendirilebilecek bu grupta Aebp1'in de yer alıyor olması, Aebp1'in ECM'in yeniden organize edilmesinde önemli görevler üstlenebileceğine işaret etmektedir. Aebp1'e ek olarak elastin, SPARC, laminin alfa-4, mikrofibril ilişkili protein 2 ve 4 gibi çeşitli glikoproteinler ve perlekan, osteoglisin, luminikan gibi iskelet kası için önemli proteoglikanlar bu grupta yer almaktadır.

İskelet kasında fibrozis patolojisinde görüldüğü tahmin edilen bu temel matrizom elemanlarını modifiye edebileceği tahmin edilen 9 ECM düzenleyicisi fibrozis patolojisinin yavaşlatılması ve durdurulması için aday ilaç hedefi olarak değerlendirilebilir. Adam 15, Adamts 12, Lox-benzeri 1, Mmp 2 enzimlerinin ayırt edici olarak bu grupta öne çıkmaktadır.

Salgılanan faktörlerden *Secreted Frizzled Related Protein 4*, Sfrp4 ve Frzb geninden üretilen Frizzled-ilişkili protein'in arttığı görülmüştür.



**Şekil 4.25.** İskelet kası kök hücre gruplarının geri dönüşümsüz hasara katkılarının karşılaştırılması.

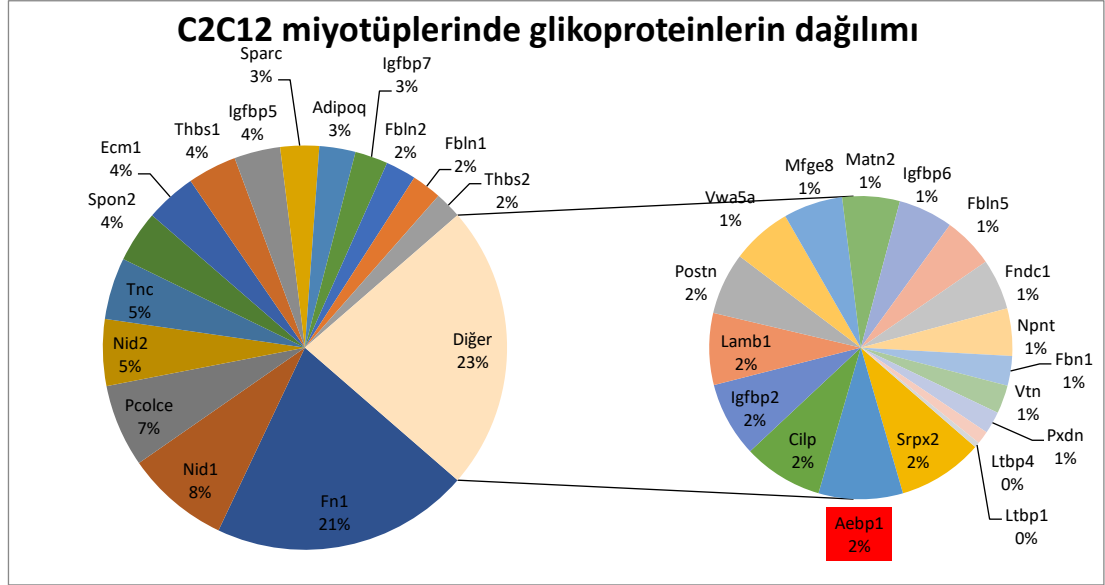
İskelet kasında fibrozis gelişiminde önemli rol oynadığı düşünülen *fibro/adipogenic progenitor* (FAP) hücreleri ve iskelet kasında büyüme ve gelişmenin devamını sağladığı düşünülen iskelet kası kök hücreleri/satelit hücreler (MuSCs) olarak isimlendirilen iki farklı hücre grubu ile geri dönüşümsüz hasar arasındaki ilişki gen listeleri üzerinden karşılaştırılmıştır (Ek 1-2-3). C2C12 hücreleri fizyolojiyi ve sağlıklı iyileşmenin modeli olarak ele alınmış ve yalnızca 4 gen bu liste ile özgül olarak kesişmiştir. Buna karşın C2C12 hücrelerinde anlamlı olarak artış göstermeyen ancak FAP hücrelerinde artışı tespit edilen 18 gen bulunmuştur. *Col1a2*, *Pcolce*, *Adamts12*, *Ltbp3* gibi ECM için önemli genlerin C2C12 hücrelerinin iyileşme sürecinde fizyolojik ECM yapısından değil, FAP hücrelerinin ortama salgıladığı ve fibrozis patolojisi ile sonuçlanan ECM birikimine katkı sunabileceği düşünülmektedir (Şekil 4.25).

#### 4.4.2 Matrizomun Proeom Düzeyinde Analizi

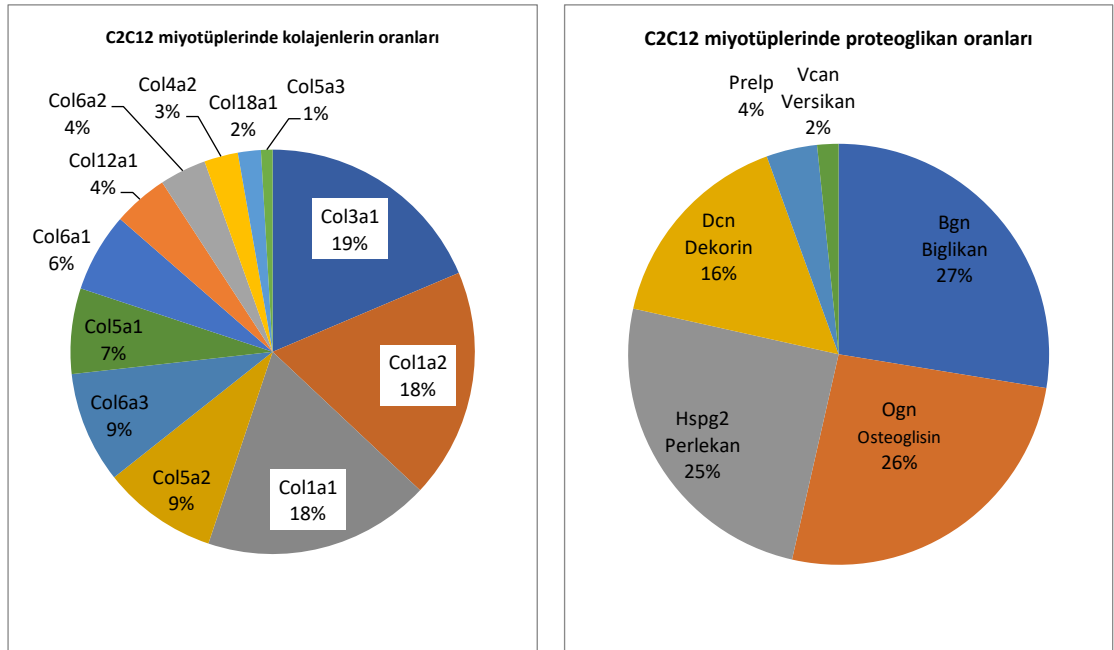
İskelet kasında transkriptom düzeyinde elde edilen bilgilerin protein düzeyinde doğrulanması amacıyla C2C12 miyotüpleri hücre dışı (salgılanan) proteomdan elde edilmiş sekretom çalışması (PXD007527) ve insan primer miyoblastların miyotüplere

farklılaşması sürecini gözlemleyen (PXD018588) proteom veri setleri analiz edilmiştir.

C2C12 hücrelerinde yapılan çalışmalar sonucunda bu hücrelere ait matrisom proteinleri (kolajen, proteoglikan ve glikoprotein yapıları) emPAI değerleri üzerinden hedefli ve nicel olarak analiz edilmiştir (Ek-4).



Şekil 4.26. C2C12 miyotüplerinde proteom düzeyinde glikoproteinlerin analizi.

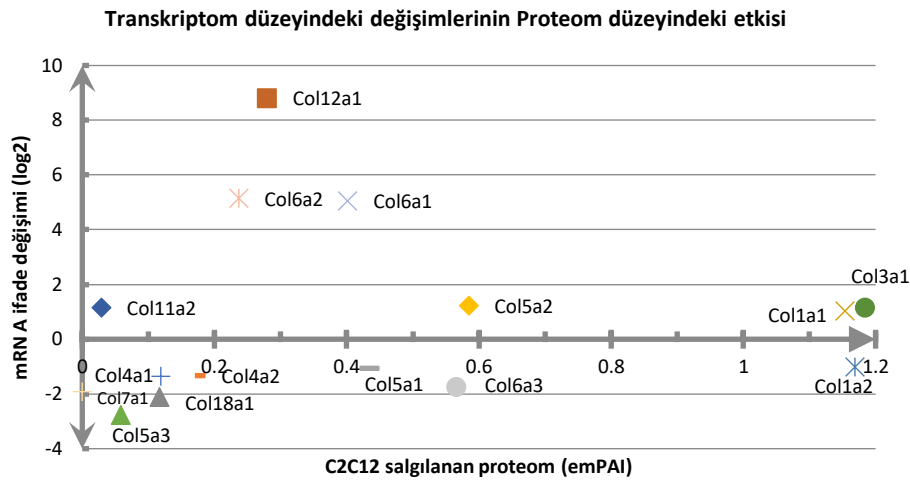


Şekil 4.27. C2C12 miyotüplerinde proteom düzeyinde kolajenlerin ve proteoglikanların analizi

C2C12 hücrelerin sekretom yapısında bulunan glikoproteinlerin oranları kıyaslandığında fibronektin-1 proteininin %21 oranla öne çıktığı görülmektedir. Nidojen-1, Nidojen-2, Pcolce, Tenascin C gibi iskelet kasında varlığı bilinen proteinlerin glikoproteinler arasında önemli bir yer tuttuğu görülmüştür. Aebp1'in de salgılanan glikoproteinlerin %2'sini oluşturduğu saptanmıştır (Şekil 4.26).

C2C12 hücrelerinde kolajenlerin proteom düzeyinde karşılaştırıldığında literatürde bulunan iskelet kasındaki kolajenlerin oranı ile benzer bir tablo sergilediği gözlenmiştir. Fibriler kolajenler içinde sınıflanan kolajen Ia1 ve Ia2'in eşit oranda bulunarak toplam kolajenlerin %36'sını, kolajen IIIa1'in ise %19'unu oluşturduğu görülmüştür. Böylelikle bu üç tip kolajenin C2C12'den salgılanan kolajenlerinin %55'ini oluşturduğu gözlenmiştir (Şekil 4.27).

C2C12 sekretomunda altı proteoglikanın öne çıktığı görülmüştür. Biglikan, ostoglisin, perlekan ve dekorin proteoglikanların %94'ünü oluşturmaktadır. Bu proteoglikanların, iskelet kası ECM yapısında bulunduğu literatürde bildirilmiştir (64).



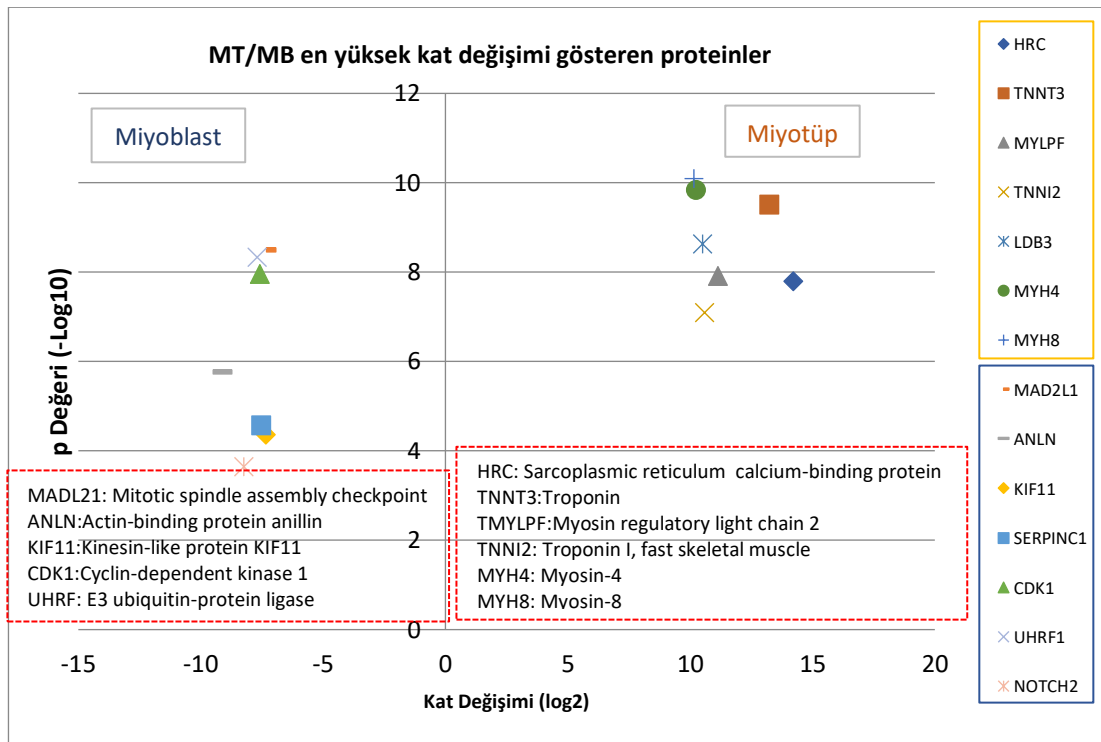
**Şekil 4.28.** C2C12 miyotüplerinde kolajenlerin transkriptom düzeyindeki ifade değişimlerinin proteom düzeyindeki etkisi.

C2C12 sekretomunda gerçekleştirilmiş proteom çalışması ile bu hücrelerle yapılmış transkriptom çalışması kolajenler perspektifinde bir araya getirildiğinde proteom düzeyinde en yüksek düzeyde ifade edilen fibriler kolajenlerin transkriptom düzeyinde ifadesinin stabil olduğu görülmüştür. İki farklı hücre tipinde kolajen ifade karşılaştırılmasında öne çıkan 5 farklı kolajen alt tipinden Col5a3 C2C12 proteomunda



en az bulunan kolajenler içinde saptanmıştır. Bu gözlem, fizyolojik koşullarda Col5a3'ün iskelet kasında miktarının sınırlı olduğu, fibrozis ile birlikte arttığı ve bu artışın FAP hücreleri kaynaklı olabileceğini protein düzeyinde ortaya konmuştur. Buna karşın farklılaşma ile mRNA düzeyinde ifadesi azalan Colla2'nin yine de miyotüplerdeki kolajenlerin önemli bir kısmını oluşturduğu görülmüştür (Şekil 4.28.).

Proteom ve transkriptom çalışmalarının bir araya getirilmesiyle Colla2'nin iskelet kasında farklılaşma ile mRNA düzeyinin azalmasına karşın miyotüplerde protein düzeyinin yüksek miktarda gözlemlendiği anlaşılmıştır. *In vivo* deney gruplarında yapılan analizlerde, geri dönüşüm hasarın olduğu grupta görülen Colla2'nin iskelet kasında hasarla birlikte aktive olan FAP hücrelerinden sentezlenebileceği hipotezini desteklemektedir.



**Şekil 4.29.** İnsan primer miyoblastların miyotüplere farklılaşmasında ifadesi en çok değişen 14 protein.

C2C12 sekretomunda bulunan verilerin kıyaslanması amacıyla insan iskelet kası proteom verilerini içeren bir veri seti analiz edilmiştir. Miyoblastların zamana karşı miyotüplere farklılaşmasından elde edilen bu proteom çalışmasında miyoblastlar ile dördüncü günü iBAQ değerleri ile karşılaştırılmıştır (Ek-5). Veri setinde

farklılaşmanın incelenmesi için anlamlı olarak değişim gösteren proteinlerden kat değişimi en yüksek olan proteinler kıyaslandığında miyoblastlardan miyotüplere farklılaşan hücrelerde MADL21 (*Mitotic Spindle Assembly Checkpoint 21*), CDK1 (*Cyclin Dependent Kinase-1*) gibi hücre bölünmesi ile ilişkili proteinlerin en çok azalış gösteren proteinler olduğu bulunmuştur. Miyoblastlardan miyotüplere farklılaşan hücrelerde ifadesi en çok artan proteinin Sarkoplazmik retikulum kalsiyum bağlayıcı protein olduğu ve devamında troponin, miyozin 4/8 gibi iskelet kası proteinlerin olduğu gözlenmiştir. Bu bilgiler ışığında bu deneyde gerçekleştirilmiş olan farklılaşma süreci gözlenmiştir (Şekil 4.29).

Farklılaşma takibinde protein nicel protein içeriğini incelenen bu proteom veri setinde yer alan matrizom proteinleri filtrelenerek incelenmiştir. İfadesi 2 kat üzerinde değişim sergileyen 29 matrizom bileşeni saptanmıştır. İnsan primer miyoblastlarıyla gerçekleştirilmiş olan bu çalışma özellikle hücre içi proteomuna odaklanmış ve salgılanan proteinlerin saptanmasına yönelik bir deney tasarımı gözetilmemiştir. Bu yönü ile C2C12 hücrelerinde gerçekleştirilen çalışmadan önemli kurgusal farklılıklar sergilemektedir İnsan proteomundan elde edilmiş olan bu verilerde transkriptom ve C2C12 sekretomu ile uyumlu olarak MFAP5, IGFBP5, TGFB1'in ortak anlamlı artışı gözlenmiştir.

## 5. TARTIŞMA

Farelerde *Aebp1* geninden Aebp-201 transkripti ile sentezlenen ACLP proteininin N-terminalinde bulundurduğu sinyal dizisi ile hücreden salgılandığı bilinmekle beraber ECM oluşum ve gelişiminde yapısal veya işlevsel rol oynadığı tahmin edilmektedir. Literatürde kolajen organizasyonu (8,16) ile ilişkili olabileceği tahmin edilen ACLP'nin homozigot mutant fare modelinde embriyolojik dönemde abdominal duvarın kapanmaması (9), insanlarda AEBP1 geninde görülen mutasyonların, bağ dokuda aşırı esneklik ve kolay hasarlanmaların görüldüğü Ehlers-Danlos Sendromu ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir (16,17). Bölümümüzde yapılmış olan iskelet kası hasar modelinde iyileşme sürecinde ACLP ifadesinin arttığı ve iyileşmenin tamamlanmasıyla ifadesinin azaldığı bulunmuştur (12). *in vitro* çalışmalarda, miyoblast, fibroblast ve pre-adiposit karakterindeki mezenkimal kök hücre gruplarında farklılaşma ve uyarılma sürecinde ACLP ifadesinin arttığı gözlemlenmiştir (14). Bölümümüzde gerçekleştirilmiş olan bu çalışmaların ışığında ACLP'nin ECM oluşumu ile ilişkisinin olduğu hipotezi kurulmuş ve desteklenmiştir. Ancak literatürde ACLP'nin işlevine dair hipotezler kurulmuş olsa da ıslak laboratuvar çalışmalarıyla aydınlatılabilmemiş yapısal veya biyokimyasal bir işlevi bilinmemektedir (8,13,65).

Proteinlerin işlevlerinin tanımlanması amacıyla etkileşim ortaklarının tanımlanması değerlidir ve kütle spektrometresi teknolojisinin gelişimi ile hız kazanmıştır (66). Aday proteinlerin biyotin transferaz aktivitesine sahip enzimlerle kimerik yapılar oluşturarak yakın komşuluklarındaki proteinlere biotin eklemesi yöntemiyle saflaştırılabilmeleri ve kütle spektrometresi ile tanımlanabilmesi amaca uygun bir deneysel yaklaşımdır (56,66–68). *E. coli*'den elde edilmiş olan biotin-ligaz enzimleri ile başlayan bu çalışmalarda, APEX ile daha hızlı ve yüksek oranda biyotinlenme elde edilebileceği bulunmuş (58,69), HRP'nin ise en az APEX kadar başarılı olduğu ve sitoplazma gibi indirgeyici ortamlarda biyotinleme yapmadığı gösterilmiştir (70–72). Hücre dışında gerçekleştirilecek biyotinleme çalışmaları için en başarılı sonucu HRP'nin verdiği gözlemlenmiştir (70,71).

İşlevi bilinmeyen ACLP proteininin günümüzde tanımlayıcı teknolojik yöntemler içinde en geçerli deneysel yaklaşımlardan biri ile protein etkileşim

ortaklarının bulunması hedeflenmiştir. Bu tez çalışmasında, bu amaca uygun ve gereken laboratuvar gereçlerinin hazırlanma çalışmaları tamamlanmıştır. Hazırlanmış olan vektörlerin ACLP ve HRP ifadesini sağladığı ve HRP'nin biotinlenme başarısı immünfloresan ve immünblot çalışmalarıyla işlevsel olarak doğrulanmıştır. C2C12 hücrelerinde gerçekleştirilen immünfloresan çalışmalarında ACLP'nin ifadesi ACLP'ye eklenilmiş olan HA ve c-Myc işareti ile doğrulanmıştır. ACLP'nin hücre içerisindeki görüntüsünde çekirdek yerleşiminin bulunmadığı gösterilmiştir. ACLP-HRP'nin biyotlenme reaksiyonunu gerçekleştirdiği Streptavidin afinitesi ile doğrulanmıştır. Biotinlenme ve ACLP ifadesine ait görüntüler üst üste incelendiğinde bir eş yerleşim sergilediği gözlenmiştir. İçerdiği dört disülfid bağı ve bir kalsiyum bağlama bölgesi ile HRP'nin sitoplazmada aktif olmadığı, hücre içerisinde ancak ER ve golgide aktif olabileceği bilinmektedir (56). Bu bilgiler ve gözlemler ACLP'nin hücre içinde sitoplazmada bulunmadığını ve ER aracılığıyla hücre dışına taşınabileceğine işaret etmektedir. Bu gözlemin doğrulanması amacıyla ACLP ve ER eş boyaması gerçekleştirilmiştir. Mikroskopik incelemelerde ACLP ve ER görüntülerinin üst üste çakıştığı gözlemlenmiştir. ER ve golgideki biotinlenmenin tespit edilmesi amacıyla yapılan boyamalarda biotinlenmenin ve ER boyaması arasında, ER ve ACLP boyamalarında görülen üst üste çakışma gözlemlenmemiştir. Bu gözlemin aydınlatılması amacıyla; boyamaların görüntülenmesinin konfokal mikroskop ile yapılması, ACLP ifadesinin zamana karşı yapılması, ER üzerinden hücre dışına çıktığı düşünülen ACLP'nin Brefeldin A, Thapsigargin gibi ER'dan hücre dışına taşınımı engelleyen kimyasal ajanlarla muamele edilen hücrelerde tekrarlanması gibi farklı yaklaşımlar denenmelidir. Golgi ve biyotlenmenin eş boyaması çalışmasında golgide bir boyama saptanamamıştır. Bu gözlem, yukarıda sıralanmış olan koşullarda gerçekleştirilecek çalışmalarla aydınlatılmaya ihtiyaç duymaktadır. Immunofloresan çalışmalarında ACLP-HRP'nin C2C12 hücrelerinde biyotlenme başarısı tespit edilmiştir. Bir başka hücre hattı olan OP9 hücreleri GFP ifadesi içerdiği ve biyotlenme, streptavidine eklenmiş olan 488 nm'de (yeşil) ışımaya veren florofor ile tespit edildiği için bu çalışmalar OP9 hücre hatlarında gerçekleştirilmemiştir.

ACLP-HRP'nin biyotlenme başarısının doğrulanması amacıyla C2C12 ve OP9 hücrelerinde ACLP ifadesi ve biyotlenme kapiller nano-immunoassay ile analiz

edilmiştir. Literatürde yaklaşık olarak 150-180 kDa arasında ağırlığı olduğu western blot çalışmalarıyla tespit edilmiş olan ACLP'nin glikozillendiği ve bu nedenle birden fazla ve beklenen ağırlığından daha yüksek immünreaktif bant verdiği saptanmıştır (16,65). ACLP'nin devamına eklenilmiş olan HA-HRP-cMyc'nin 40 kDa'dan ağır olduğu ve oluşturulan kimerik proteinin 190-220 kDa civarında immünreaktif bant veya bantlar vereceği tahmin edilmiştir. İmmunofloresan deneylerin gerçekleştirildiği hücre kültürü kabı kuyularından toplanılmış olan C2C12 hücrelerinde kontrol hücrelere görülmeyen, 200 kDa'dan ağır birden fazla immünreaktif bant görülmüştür. Bu bantların ACLP-HRP olduğu düşünülmektedir. OP9 hücrelerinde ise bu bantların C2C12 hücrelerine göre daha ağır olduğu görülmüştür. Bu farklılığın iki farklı hücre tipinde gerçekleşmiş olabilecek başta glikozilasyon olmak üzere farklı post translasyonel modifikasyonlardan kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Deneyin gerçekleştirildiği kapiller nano-immunoassay teknolojisinin protein transfer kapasitesinin 12-230 kDa arasında olması ve ACLP-HRP'nin ağırlığının 220 kDa ve üzerinde olmasından dolayı bu deneylerden elde edilen sonuçların yorumlanmasını güçleştirmiştir. Kapiller sistem yerine SDS-PAGE arkasından wet-transfer yöntemiyle ile gerçekleştirilecek western blot deneyleri ile ACLP-HRP'nin protein düzeyinde ifadesi doğrulanabilir. Gerçekleşen biyotinleme sonuçlarını bu sistem ile bakıldığı zaman H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eklenmiş deneylerde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eklenmeyen ve ACLP-HRP'nin transfekte edilmediği örneklerle göre biyotinlenmenin olduğu saptanmıştır. OP9 hücrelerinde 116-180 kDa, C2C12 hücrelerinde 80-200 kDa arasında görülen sürüntü (*smear*) görüntüsünü söz konusu ağırlıkta biyotinlenmenin gerçekleştiğini göstermektedir. Yine bu çalışmada sürüntü görüntüsünden daha ağır bir bant olarak görülen kısmın ACLP-HRP kimerik proteinine ait olabileceği düşünülmektedir. Biotinlenme çalışmalarında, biyotinleyici enzim ve ilgilene protein yapısının kendi kendisini biyotinleme kapasitesinin yüksek olduğu bilinmektedir. Bu nedenle diğer biyotinlenen yapılardan daha ağır ve tek başına gözlenen bandın ACLP-HRP'ye ait olması muhtemeldir. Bu gözlemlerin doğrulanması amacıyla deneylerin SDS-PAGE ile gerçekleştirilecek western blot çalışmalarıyla tekrar edilmesi bir alternatif olabilir.

Bu tez kapsamında yapılmış olan *in silico* çalışmalarla iskelet kasının transkriptom ve proteom düzeyinde analiz edilmesi hedeflenmiş ve veri setlerinde AEBP1/ACLP'in ifadesi aranmıştır.

Transkriptom çalışmalarında yapılan analizlerinde normalizasyon ve logaritmik dönüşümler yapıldıktan sonra analizi gerçekleştirilecek deneyin içerisindeki gruplarla *principle component analysis* (PCA) ve hiyerarşik gruplamalar yapıp deneyde aykırı değerler (*outlier*) ayıklanmıştır. Aykırı değerlerin ayıklanması ile deneylerde gruplardaki ayrışmanın pozitif yönde arttığı saptanmıştır. Gruplara göre karşılaştırmalar yapıp anlamlı olarak bulunan genlerden matrizom genleri listesi yapılmıştır. Matrizom genlerinde iki kat ve üzeri artış gösteren genler anlamlı olarak kabul edilmiştir. Bu genlerin seçilen koşullarda ECM yapısını oluşturmak üzere ifade olacağı öngörülmüştür.

Yapılan transkriptom analizleri, *in vitro* ve *in vivo* olarak ayrılabilir. *In vitro* grupta iskelet kasında bulunan 2 farklı somatik kök hücre grubu analiz edilmiştir. İskelet kası kök hücresi olan satelit hücreler farklılaşma ve hasar tamirini modellemek amacıyla kullanılmıştır. Miyoblastların miyotüplere dönüşürken ortama salgıladıkları ECM yapısı kaslarda endomisyum perimisyum ve epimisyum yapısını oluşturmaktadır. Bu yapılar iskelet kasının mekanik kuvvetlerle, kasılıp gerilmelere karşı yeterince kuvvet uygulayacak kadar güçlü, sağlıklı bir şekilde işlevine devam etmesine izin verecek kadar da esnek bir ECM yapısı oluşturur. İskelet kasında oluşan kronik hasar sonrasında sentezlenen ECM elemanlarının geri dönüşümsüz bir biçimde birikmesi ile fibrozis oluşur. Fibrozis oluşumunda kronik hasarla birlikte olan FAP hücrelerinin görev aldığı bilinmektedir. Bu nedenle TGFbeta ile aktive edilmiş FAP hücrelerinin transkriptom analizi, *in vitro* grupta patolojik süreci temsil etmek üzere incelenmiştir. Yapılan analizlerle bu iki hücre grubunda 2 kat ve üzerinde anlamlı artış gösteren gen listeleri elde edilmiştir. C2C12 hücrelerinin transkriptom düzeyinde matrizomunun incelenmesiyle artışı gösteren 139, FAP hücrelerinde 251 farklı gen saptanmıştır. FAP hücrelerin fibroblast benzeri karakterde olması daha fazla ECM yapısı sentezlemesine yardımcı olabileceği gibi deneyler arasındaki yöntem farklılıkları da bu sonuca yol açmış olabileceği tahmin edilebilir. C2C12 hücreleri ile yapılan çalışmalar *microarray* ile FAP hücreleri ile yapılan çalışmalar RNA-Seq platformuyla yapılmıştır. Hibridizasyon yöntemi ile sonuçlara ulaşılan *microarray*'lerde her gen için eşit sayıda *probe* olmaması, bazı genler için *probe* olmaması gibi faktörlerden dolayı bu farkın oluşması da muhtemeldir. Bu gen setlerinin oluşturulması ile iskelet kasında fizyolojik farklılaşma ve patolojik uyarım

sürecinde ortama salınan matrisom elemanları bu iki kök hücre grubu için ayrı ayrı belirlenmiştir.

İskelet kasında hasar modeli olan dört farklı deney grubu *in vivo* ECM oluşumunu incelemek amacıyla analiz edilmiştir. Çeşitli kas distrofisi hastalarından alınan biyopsilerle gerçekleştirilmiş çalışmada yapısal bir proteinin eksikliği sonucunda oluşan kas hasarının sağlıklı kontrollere göre ifade oranları ele alınmıştır. DMD kas distrofisi hastalığının doğal fare modeli olan *mdx* modelinde aynı genetik kusur başka bir türde gözlenmektedir. Bir üçüncü tür olarak sıçanlarda gerçekleştirilmiş olan tendon kesisi ile hareketsizleştirme modeline ait transkriptom verisi analiz edilmiştir. Bu üç veri grubu iskelet kasında görülen geri dönüşümsüz hasarın transkriptom düzeyindeki etkilerinin üç farklı türde incelenmesini sağlamıştır. Bu bakış açısıyla üç farklı memeli türde ortak olarak ifadesi anlamlı artan genlerin iskelet kasında fibrozisi oluşmasında önemli bir yer tuttuğu düşünülmüştür. Bu gruplara ek olarak farelerde kardiyotoksin aracılığıyla oluşan hasara ait bir transkriptom veri seti analiz edilmiştir. Bu deneyde oluşan hasar kronik nitelikte olmayıp, fibrozisle sonuçlanmadan tam iyileşme sergilemektedir. Kas lifi zarlarının bir fosfolipaz kokteyli olan kardiyotoksin ile yıkılarak kas hasarı oluşturulan bu modelde sentezlenen ECM yapıları geri dönüşümsüz bir şekilde birikmemekte ve dokuda fibrozis görülmemektedir. Bu dört grupta ortak 27 gen görülmesi, ECM yapısının yeniden kurulduğu her durumda bu genlere ait proteinlerin elzem olarak ECM oluşumunda görev almakta olduğunu göstermektedir. Bu 4 gruptan en az ikisinde bulunan 112 (ortak) gen ise, deneysel ve kurgu ve gözlem tekniği farklarına rağmen, bu ortak genlerin iskelet kası ECM yapısı için önemli olduğuna işaret etmektedir. Dört farklı işlevsel grupta sınıflandırılan bu 112 gen içinde kardiyotoksin hasarı ile gözlenen genler çıkarıldığında fibrozis ile doğrudan ilişkilendirilebilecek 49 gen saptanmıştır. Bu genlerin geri dönüşümsüz ECM birikimine eşlik ettiği kanaatine varılmıştır. Geri dönüşümsüz hasara eşlik ettiği düşünülen bu genler *in vitro* deney verilerinde incelendiğinde 49 genden 16'sının ortak olarak hem C2C12 farklılaşması hem de FAP aktivasyonu ile sentezlenmekte olduğu anlaşılmıştır. Buna karşın geri dönüşümsüz hasara eşlik eden 18 genin ayırt edici olarak yalnızca FAP hücrelerinin aktivasyonu ile artış sergilediği saptanmıştır. Bu bilgiler ışığında geri dönüşümsüz hasarda görülen 49 genin iskelet kasında bulunan satelit hücrelerden değil FAP

hücrelerinden dokuya salgılanabileceği öngörülmüştür. Bu grupta yer alan Colla2 ve Coll4a1'nin fibroziste sürecinde esnekliğini kaybetmiş doku fenotipine neden olan kolajenler olabileceğini düşündürmektedir. Yine bu grupta özgül olarak yer alan Adamts 12, Ctsk, Pcolce gibi ECM modifiye edici enzimler fibrozis için potansiyel ilaç hedefi olarak değerlendirilebilir. Sfrp4, Cxcl12 gibi sinyal molekülleri ve Igfbp7 ve Ltbp3 gibi sinyal moleküllerini ECM'de tutan proteinler ise, fibrozisin yavaşlatılması veya durdurulması için yeni hedefler olarak değerlendirilebilir.

Aebp1'in geri dönüşümsüz hasar grubunda yer alan yapısal proteinlere eşlik etmesi, patolojik koşullarda ECM oluşumu için önemine işaret etmekle birlikte, protein etkileşim ortaklarının aydınlatılması ve işlevinin tanımlanması ile fibrozis için aday hedef protein olarak değerlendirilmesi mümkün olacaktır.

Bu tez kapsamında yapılmış olan proteom çalışmalarında C2C12 miyoblastlarından elde edilmiş olan salgı proteomu ya da diğer adı ile sekretom ile C2C12 hücrelerinin matrisom yapısı proteom düzeyinde incelenmiştir. Gözlemler, literatürdeki verilere benzer şekilde en yüksek nicel içeriğe sahip proteinlerin kolajenler olduğunu ve fibriler yapıdaki kolajenlerin toplam kolajenlerin %55'ini oluşturmakta olduğu anlaşılmıştır. C2C12 hücrelerinde glikoproteinler arasında fibrilin 1 toplam glikoproteinlerin %21'ini oluşturduğu görülmüştür. Aebp1'in de bu grupta yer aldığı ve toplam glikoproteinlerin %2'sini oluşturduğu tespit edilmiştir. C2C12 hücrelerinde elde edilmiş transkriptom verileri proteom verileriyle kıyaslandığında ortaya çıkan verilerin yüksek korelasyon göstermeyebildiği görülmüştür. Proteom çalışmalarında proteinlerin hücre dışında birikmesi buna karşın transkriptlerin hücre içerisinde devamlı bir şekilde yapılıp yıkılması bu farkı açıklayabilecek sebeplerden birisidir. Proteom çalışmalarının devamında insan primer miyoblastlardaki farklılaşma veri setinde, verilerin tutarlılığı hücre içi proteom için tespit edilmiş ancak matrisom elemanları bu veri setinde bulunamamıştır. Bu veri seti hazırlanırken örneklerin filtreden geçirilerek hazırlanmasının, C2C12 hücrelerinde olduğu gibi salgılanan proteinlerin hücrelerin olduğu ortamdan toplanmamasının matrisom elemanlarının kaybuna yol açtığı düşünülmektedir. Bu veri setinde yapılan incelemelerle oluşan gen listelerinde anlamlı olarak ifadesi artan MFAP5, IGFBP5, TGFB1 gibi genler bulunmuştur. Ancak ortaya çıkan sonucun transkriptom verilerinde



olduğu gibi bütüncül bir analize yardımcı olmayacağı düşünülerek bu çalışmalar bir araya getirilmemiştir. Bu veri seti proteom çalışmalarında amaca yönelik doğru örnek hazırlamanın önemine işaret etmektedir. Farklı RNA moleküllerinin biyokimyasal yapısı benzer olup hücre içerisinde sitoplazmada bulunan mRNA moleküllerinin transkriptom analizinin verisi olması hücre dışı matris çalışmaları için özel bir deneysel yaklaşıma gerek duymamaktadır. Ancak proteom çalışmalarında her bir proteinin farklı biyokimyasal yapısı ve de ECM proteinlerinin hücre dışına salgılanıyor olması bu çalışmalarda örnek hazırlama basamağının önemini ortaya koymaktadır.

## 6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu tez çalışması kapsamında gerçekleştirilmiş olan ıslak laboratuvar çalışmaları sonucunda;

- Aebp-201 transkripti memeli ifade vektörüne klonlanmıştır.
- Aebp1-201'in okuma çerçevesine HA-HRP-cMyc dizilerini içeren fragman eklenmiş ve ACLP-HRP füzyon yapısı oluşturulmuştur.
- ACLP-HRP kimerik protein yapısının bulunduğu çevrede biyotinleme reaksiyonunu gerçekleştirebildiği immünfloresan ve kapiller nano-immunoassay yöntemleriyle işlevsel olarak doğrulanmıştır.
- ACLP ifadesi ve biyotinlemenin lokalizasyonunun benzer olduğu gözlenmiştir.
- Dört disültit bağı içeren ve indirgen ortamlarda biyotinleme yapmayan HRP'nin hücre içinde ER ve Golgi lokalizasyonunda başarı ile biyotinleme yaptığı gözlenmiştir.
- ACLP ve ER eş boyamasında transfeksiyonun 24. saatinde ACLP'nin hücre içi lokalizasyonunun ER ile uyumlu olduğu gözlenmiştir.

Bu tez çalışması kapsamında gerçekleştirilmiş olan *in silico* çalışmalar sonucu;

Transkriptom analizleri ile:

- *In vitro* deneylere ait veri setlerinde gerçekleştirilen analizlerde iskelet kasında büyüme, gelişme ve hasar tamirinde görev aldığı bilinen myoblast modeli (C2C12) ve primer FAP hücre transkriptomunda matrizom analiz edilmiştir.
- Bu iki kök hücre topluluğunda FAP aktivasyonunun geri dönüşümsüz ECM birikimiyle sonuçlandığı bilinmektedir. Bu iki grup hücrenin sentezlediği kolajenler kıyaslandığında beş kolajen alt tipinin (Col1a2, Col5a1, Col5a3, Col6a3, Col27a1) FAP hücrelerinde artış sergilerken C2C12 hücrelerinde azaldığı saptanmıştır.
- İskelet kası hasar tamirinin, *in vivo* modellerinde gerçekleştirilen analizlerde iskelet kası hasar tamirinde farklı türler ve deneylerde matrizom yapısına katılan 27 ortak olarak genin artış sergilediği saptanmıştır. Bu genlerin iskelet

kasında ECM yapısının yeniden kurulmasında elzem olduğu hipotezini desteklemektedir.

- *In vivo* veri setleri, iskelet kası hasar tamirinde yeniden kurulan ECM yapısını 112 yapısal genin temsil ettiği ortaya konmuştur.
- Bu 112 gen içinde, 49u fibrozis ile sonuçlanan deney gruplarda anlamlı artış sergilerken tam iyileşme sergileyen akut hasar modelinde değişim göstermediği anlaşılmıştır. Bu buğular, söz konusu 49 gene ait proteinlerin geri dönüşümsüz fibrozis ile sonuçlanan ECM birikimi ile ilişkili olabileceğine işaret etmektedir.
- Geri dönüşümsüz hasardan sorumlu olarak saptanan ve 49 genden oluşan bu grup *in vitro* gruplarda incelendiğinde 16 gen hem C2C12 hem de FAP hücrelerinde artış sergilerken, 18 gen ise yalnızca FAP hücrelerinde anlamlı artış sergilemektedir. Bu durum, bu genlere ait proteinlerin fibrozisle doğrudan ilişkili olabileceği hipotezini ortaya koymaktadır. Özgül olarak C2C12 hücrelerinde artış sergileyen gen sayısı 4'tür.

Proteom düzeyinde yapılmış olan çalışmalarla:

- C2C12 hücrelerinden salgılanan proteom nitel ve nicel olarak incelenmiş ve salgısal glikoproteinlerin %2'sini Aebp1'nin oluşturduğu saptanmıştır.
- Transkriptom ve proteom çalışmaları bir araya getirilerek iskelet kasında ifade olan kolajen alt tiplerindeki mRNA seviyesindeki artışın protein seviyesine olan etkisi incelenmiştir. Kolajen Ia1, Ia2 ve IIIa1'in ifadelerinin artış sergilememekle beraber proteomda nicel olarak en çok görülen (%75) kolajen tipleri olduğu bulunmuştur. Buna karşın (mRNA düzeyinde?) en çok artış gösteren kolajen XIIa1'in ise protein düzeyinde bu üç kolajen kadar yer almadığı saptanmıştır.
- İnsan primer kas hücrelerinden elde edilmiş olan proteom veri setinde, ifadesi en çok değişen proteinlerin incelenmesiyle miyoblast hücrelerinin miyotüplere dönüşüm süreci gözlenmiştir. Bu veri setini ortaya koyan çalışmada takip edilen örnek izolasyonu ve işleme süreçleri öncelikli olarak hücre içi proteinlerini gözlemek üzere kurgulanmıştır. Bu nedenle veri seti matrisoma ait (hücre dışı) proteinleri kısıtlı ölçüde içermektedir.

## 7. KAYNAKÇA

1. Frantz C, Stewart KM, Weaver VM. The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci.* 2010;123(24):4195–200.
2. Alberts B, editor. *Molecular Biology of the Cell.* 6th ed. Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC; 2015. 1035–1089 p.
3. Meng X, Nikolic-Paterson DJ, Lan HY. TGF- $\beta$ : the master regulator of fibrosis. *Nat Rev Nephrol* [Internet]. 2016 Apr 25;12:325. Available from: <https://doi.org/10.1038/nrneph.2016.48>
4. Wynn T. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol* [Internet]. 2008 Jan;214(2):199–210. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/path.2277>
5. Mahdy MAA. Skeletal muscle fibrosis: an overview. *Cell Tissue Res.* 2019;375(3):575–88.
6. Rockey DC, Darwin Bell P, Hill JA. Fibrosis-a common pathway to organ injury and failure. *N Engl J Med.* 2015;372(12):1138–49.
7. Bonnans C, Chou J, Werb Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15(12):786–801.
8. Ith B, Wei J, Yet SF, Perrella MA, Layne MD. Aortic carboxypeptidase-like protein is expressed in collagen-rich tissues during mouse embryonic development. *Gene Expr Patterns.* 2005;5(4):533–7.
9. Layne MD, Yet S-F, Maemura K, Hsieh C-M, Bernfield M, Perrella MA, et al. Impaired Abdominal Wall Development and Deficient Wound Healing in Mice Lacking Aortic Carboxypeptidase-Like Protein. *Mol Cell Biol.* 2001;21(15):5256–61.
10. Teratani T, Tomita K, Suzuki T, Furuhashi H, Irie R, Nishikawa M, et al. Aortic carboxypeptidase-like protein, a WNT ligand, exacerbates nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Invest.* 2018;128(4):1581–96.
11. Layne MD, Endege WO, Jain MK, Yet SF, Hsieh CM, Chin MT, et al. Aortic carboxypeptidase-like protein, a novel protein with discoidin and carboxypeptidase-like domains, is up-regulated during vascular smooth muscle cell differentiation. *J Biol Chem.* 1998;273(25):15654–60.
12. Özdemir C. Kas dokusu tamirinde çözünebilir faktörlerin gen ifadesinin incelenmesi. Hacettepe Üniversitesi; 2010.
13. Abderrahim-Ferkoune A, Bezy O, Astri-Roques S, Elabd C, Ailhaud G, Amri EZ. Transdifferentiation of preadipose cells into smooth muscle-like cells: Role of aortic carboxypeptidase-like protein. *Exp Cell Res.* 2004;293(2):219–28.
14. Sevim D. Adipocyte Enhancer Binding Protein 1 (Aebp1) Gen İfadesini Düzenleyen Faktörlerin Araştırılması. Hacettepe Üniversitesi; 2019.
15. Hebebrand M, Vasileiou G, Krumbiegel M, Kraus C, Uebe S, Ekici AB, et al. A biallelic truncating AEBP1 variant causes connective tissue disorder in two

- siblings. *Am J Med Genet Part A*. 2019;179(1):50–6.
16. Vishwanath N, Monis WJ, Hoffmann GA, Ramachandran B, DiGiacomo V, Wong JY, et al. Mechanisms of aortic carboxypeptidase-like protein secretion and identification of an intracellularly retained variant associated with Ehlers–Danlos syndrome. *J Biol Chem* [Internet]. 2020 Jul 10;295(28):9725–35. Available from: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.RA120.013902>
  17. Syx D, De Wandele I, Symoens S, De Rycke R, Hougrand O, Voermans N, et al. Bi-Allelic *aebp1* mutations in two patients with ehlers-danlos syndrome. *Hum Mol Genet*. 2019;28(11):1853–64.
  18. Ritelli M, Cinquina V, Venturini M, Pezzaioli L, Formenti AM, Chiarelli N, et al. Expanding the clinical and mutational spectrum of recessive AEBP1-related classical-like Ehlers-Danlos syndrome. *Genes (Basel)*. 2019;10(2):1–14.
  19. McKee TJ, Perlman G, Morris M, Komarova S V. Extracellular matrix composition of connective tissues: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep* [Internet]. 2019 Dec 22;9(1):10542. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41598-019-46896-0>
  20. Rozario T, DeSimone DW. The extracellular matrix in development and morphogenesis: A dynamic view. *Dev Biol* [Internet]. 2010;341(1):126–40. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.10.026>
  21. Naba A, Clauser KR, Ding H, Whittaker CA, Carr SA, Hynes RO. The extracellular matrix: Tools and insights for the “omics” era. *Matrix Biol* [Internet]. 2016;49:10–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.matbio.2015.06.003>
  22. Engel J, Matthias C. The Extracellular Matrix: an Overview. In: Mecham RP, editor. *Methods in Cell Biology* [Internet]. 1st ed. Springer US; 2011. p. 1–39. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091679X17301668>
  23. Heath DE, Cooper SL. The development of polymeric biomaterials inspired by the extracellular matrix. *J Biomater Sci Polym Ed* [Internet]. 2017;28(10–12):1051–69. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/09205063.2017.1297285>
  24. Mouw JK, Ou G, Weaver VM. Extracellular matrix assembly: A multiscale deconstruction. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(12):771–85.
  25. Birk DE, Brückner P. Collagens, Suprastructures, and Collagen Fibril Assembly. In: Mecham RP, editor. *Biology of Extracellular Matrix*. 1st ed. Springer US; 2011. p. 77–115.
  26. Light N, Champion AE. Characterization of muscle epimysium, perimysium and endomysium collagens. *Biochem J*. 1984;219(3):1017–26.
  27. Csapo R, Gumpenberger M, Wessner B. Skeletal Muscle Extracellular Matrix – What Do We Know About Its Composition, Regulation, and Physiological Roles? A Narrative Review. *Front Physiol*. 2020;11(March):1–15.
  28. Gillies AR, Lieber RL. Structure and function of the skeletal muscle

- extracellular matrix. *Muscle and Nerve*. 2011;44(3):318–31.
29. Couchman JR, Pataki CA. An Introduction to Proteoglycans and Their Localization. *J Histochem Cytochem*. 2012;60(12):885–97.
  30. Bilandzic M, Stenvers KL. Betaglycan: A multifunctional accessory. *Mol Cell Endocrinol* [Internet]. 2011;339(1):180–9. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030372071100222X>
  31. Seidler DG, Faiyaz-UI-Haque M, Hansen U, Yip GW, Zaidi SHE, Teebi AS, et al. Defective glycosylation of decorin and biglycan, altered collagen structure, and abnormal phenotype of the skin fibroblasts of an Ehlers-Danlos syndrome patient carrying the novel Arg270Cys substitution in galactosyltransferase I ( $\beta$ 4GalT-7). *J Mol Med*. 2006;84(7):583–94.
  32. Holmberg J, Durbeej M. Laminin-211 in skeletal muscle function. *Cell Adhes Migr*. 2013;7(1):111–21.
  33. Ricard-Blum S, Vallet SD. Proteases decode the extracellular matrix cryptome. *Biochimie* [Internet]. 2016;122:300–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2015.09.016>
  34. Cawston TE, Young DA. Proteinases involved in matrix turnover during cartilage and bone breakdown. *Cell Tissue Res*. 2010;339(1):221–35.
  35. Kim SH, Turnbull J, Guimond S. Extracellular matrix and cell signalling: The dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. *J Endocrinol*. 2011;209(2):139–51.
  36. Callewaert B, Malfait F, Loeys B, De Paepe A. Ehlers-Danlos syndromes and Marfan syndrome. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2008;22(1):165–89.
  37. Nuytinck L, Freund M, Lagae L, Pierard GE, Hermanns-Le T, De Paepe A. Classical Ehlers-Danlos syndrome caused by a mutation in type I collagen. *Am J Hum Genet*. 2000;66(4):1398–402.
  38. Mao JR, Bristow J. The Ehlers-Danlos syndrome: On beyond collagens. *J Clin Invest*. 2001;107(9):1063–9.
  39. Chargé SBP, Rudnicki MA. Cellular and Molecular Regulation of Muscle Regeneration. *Physiol Rev* [Internet]. 2004;84(1):209–38. Available from: <http://10.0.4.128/physrev.00019.2003>
  40. Kovanen V. Intramuscular extracellular matrix: Complex environment of muscle cells. *Exerc Sport Sci Rev*. 2002;30(1):20–5.
  41. Riso E-M, Kaasik P, Seene T. Remodelling of Skeletal Muscle Extracellular Matrix: Effect of Unloading and Reloading. In: Travascio F, editor. *Composition and Function of the Extracellular Matrix in the Human Body*. 1st ed. Rijeka: InTech; 2016. p. 45–68.
  42. Makridakis M, Vlahou A. Secretome proteomics for discovery of cancer biomarkers. *J Proteomics* [Internet]. 2010;73(12):2291–305. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874391910002058>
  43. Pedersen BK, Åkerström TCA, Nielsen AR, Fischer CP. Role of myokines in exercise and metabolism. *J Appl Physiol* [Internet]. 2007 Sep;103(3):1093–8.

Available from:

<https://www.physiology.org/doi/10.1152/japplphysiol.00080.2007>

44. Yoon JH, Kim J, Song P, Lee TG, Suh PG, Ryu SH. Secretomics for skeletal muscle cells: A discovery of novel regulators? *Adv Biol Regul* [Internet]. 2012;52(2):340–50. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2212492612000516>
45. Eckardt K, Görgens SW, Raschke S, Eckel J. Myokines in insulin resistance and type 2 diabetes. *Diabetologia* [Internet]. 2014 Jun 28;57(6):1087–99. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00125-014-3224-x>
46. Febbraio MA, Hiscock N, Sacchetti M, Fischer CP, Pedersen BK. Interleukin-6 Is a Novel Factor Mediating Glucose Homeostasis During Skeletal Muscle Contraction. *Diabetes* [Internet]. 2004 Jul 1;53(7):1643–8. Available from: <http://diabetes.diabetesjournals.org/cgi/doi/10.2337/diabetes.53.7.1643>
47. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. 2014 Oct 1;6(10):a016295–a016295. Available from: <http://cshperspectives.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a016295>
48. Hartwig S, Raschke S, Knebel B, Scheler M, Irmeler M, Passlack W, et al. Secretome profiling of primary human skeletal muscle cells. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics* [Internet]. 2014 May;1844(5):1011–7. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1570963913002951>
49. Florin A, Lambert C, Sanchez C, Zappia J, Durieux N, Tieppo AM, et al. The secretome of skeletal muscle cells: A systematic review. *Osteoarthritis Cartilage* [Internet]. 2020;28(1):100019. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2665913119300226>
50. Grube L, Dellen R, Kruse F, Schwender H, Stühler K, Poschmann G. Mining the Secretome of C2C12 Muscle Cells: Data Dependent Experimental Approach to Analyze Protein Secretion Using Label-Free Quantification and Peptide Based Analysis. *J Proteome Res*. 2018;17(2):879–90.
51. Eckel J. Skeletal Muscle: A Novel Secretory Organ. In: Eckel JBT-TCS and OC, editor. *The Cellular Secretome and Organ Crosstalk* [Internet]. Academic Press; 2018. p. 65–90. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128095188000039>
52. Uezumi A, Fukada S, Yamamoto N, Takeda S, Tsuchida K. Mesenchymal progenitors distinct from satellite cells contribute to ectopic fat cell formation in skeletal muscle. *Nat Cell Biol* [Internet]. 2010 Feb 17;12(2):143–52. Available from: <http://www.nature.com/articles/ncb2014>
53. Pertea M. The Human Transcriptome: An Unfinished Story. *Genes* (Basel) [Internet]. 2012 Jun 29;3(3):344–60. Available from: <http://www.mdpi.com/2073-4425/3/3/344>
54. Ponomarenko EA, Poverennaya E V, Ilgisonis E V, Pyatnitskiy MA, Kopylov AT, Zgoda VG, et al. The Size of the Human Proteome: The Width and Depth. *Int J Anal Chem* [Internet]. 2016/05/19. 2016;2016:7436849. Available

from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27298622>

55. Kumar D, Bansal G, Narang A, Basak T, Abbas T, Dash D. Integrating transcriptome and proteome profiling: Strategies and applications. *Proteomics* [Internet]. 2016;16(19):2533–44. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/pmic.201600140>
56. Samavarchi-Tehrani P, Samson R, Gingras A-C. Proximity Dependent Biotinylation: Key Enzymes and Adaptation to Proteomics Approaches. *Mol Cell Proteomics* [Internet]. 2020 May;19(5):757–73. Available from: <http://www.mcponline.org/lookup/doi/10.1074/mcp.R120.001941>
57. Ishihama Y, Oda Y, Tabata T, Sato T, Nagasu T, Rappsilber J, et al. Exponentially modified protein abundance index (emPAI) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein. *Mol Cell Proteomics*. 2005 Sep;4(9):1265–72.
58. Arike L, Valgepea K, Peil L, Nahku R, Adamberg K, Vilu R. Comparison and applications of label-free absolute proteome quantification methods on *Escherichia coli*. *J Proteomics* [Internet]. 2012;75(17):5437–48. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874391912004861>
59. Cox J, Mann M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol* [Internet]. 2008;26(12):1367–72. Available from: <https://doi.org/10.1038/nbt.1511>
60. Megger DA, Pott LL, Ahrens M, Padden J, Bracht T, Kuhlmann K, et al. Comparison of label-free and label-based strategies for proteome analysis of hepatoma cell lines. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics* [Internet]. 2014;1844(5):967–76. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1570963913002896>
61. Craig R, Beavis RC. TANDEM: matching proteins with tandem mass spectra. *Bioinformatics* [Internet]. 2004 Jun 12;20(9):1466–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14976030>
62. Cormack BP, Valdivia RH, Falkow S. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* [Internet]. 1996;173(1 Spec No):33–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8707053>
63. Yaffe D, Saxel O. A myogenic cell line with altered serum requirements for differentiation. *Differentiation* [Internet]. 1977;7(3):159–66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/558123>
64. Hartwig S, Raschke S, Knebel B, Scheler M, Irmeler M, Passlack W, et al. Secretome profiling of primary human skeletal muscle cells. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics* [Internet]. 2014;1844(5):1011–7. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1570963913002951>
65. Layne MD, Yet SF, Maemura K, Hsieh CM, Liu X, Ith B, et al. Characterization of the mouse aortic carboxypeptidase-like protein promoter reveals activity in differentiated and dedifferentiated vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 2002;90(6):728–36.



66. Rao VS, Srinivas K, Sujini GN, Kumar GNS. Protein-Protein Interaction Detection: Methods and Analysis. *Int J Proteomics* [Internet]. 2014;2014:1–12. Available from: <https://www.hindawi.com/archive/2014/147648/>
67. Li Y, Qin H, Ye M. An overview on enrichment methods for cell surface proteome profiling. *J Sep Sci* [Internet]. 2020 Jan 30;43(1):292–312. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jssc.201900700>
68. Branon TC, Bosch JA, Sanchez AD, Udeshi ND, Svinkina T, Carr SA, et al. Efficient proximity labeling in living cells and organisms with TurboID. *Nat Biotechnol* [Internet]. 2018 Oct 1;36(9):880–7. Available from: <http://www.nature.com/articles/nbt.4201>
69. Hung V, Udeshi ND, Lam SS, Loh KH, Cox KJ, Pedram K, et al. Spatially resolved proteomic mapping in living cells with the engineered peroxidase APEX2. *Nat Protoc* [Internet]. 2016 Mar 11;11(3):456–75. Available from: <http://www.nature.com/articles/nprot.2016.018>
70. Loh KH, Stawski PS, Draycott AS, Udeshi ND, Lehrman EK, Wilton DK, et al. Proteomic Analysis of Unbounded Cellular Compartments: Synaptic Clefts. *Cell* [Internet]. 2016 Aug;166(5):1295-1307.e21. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867416309916>
71. Li J, Han S, Li H, Udeshi ND, Svinkina T, Mani DR, et al. Cell-Surface Proteomic Profiling in the Fly Brain Uncovers Wiring Regulators. *Cell* [Internet]. 2020 Jan;180(2):373-386.e15. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867419313911>
72. Li H, Qiu T, Cao Y, Yang J, Huang Z. Pre-staining paper chromatography method for quantification of ??-aminobutyric acid. *J Chromatogr A*. 2009;1216(25):5057–60.