

USP32 proteinin hücre içi lokasyonunun belirlenmesi

Proje No: 108S408

Y. Doç.Dr. A.Elif Erson

MAYIS 2010
ANKARA

Önsöz

Meme kanseri hücrelerinde pek çok somatik genetik değişiklik sonucu bozulan farklı yolaklar bulunmaktadır. Bu yolakların hangileri olduğunun anlaşılması, kanserin başlangıç ve ilerleme aşamalarının daha iyi anlaşılması için şarttır. Bu proje kapsamında amacımız, 17q23 kromozom bölgesi üzerinde bulunan bugüne kadar karakterize edilmemiş USP32 (ubikuitine has proteaz 32) proteinin hücre içindeki lokalizasyonunu incelemesiydi. USP32 proteinin önemi ise, bulunduğu kromozom bölgesinin meme kanseri hastalarında amplifikasyona uğramasındandır. Laboratuvarımızda ürettiğimiz diğer veriler de bu genin, hem meme kanseri hastalarında hem de meme kanseri hücre hatlarında aşırı ifade edildiğini göstermiştir. 108S408 kodlu bu hızlı destek projesi, ODTÜ Biyoloji Bölümü'nde yürütölmüş ve TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir.

İçindekiler

Önsöz.....	2
Özet	5
Abstract.....	6
Giriş/Genel Bilgiler.....	6
Gereç ve Yöntemler	9
HeLa Hücrelerinin Büyütülmesi	9
USP32 Yapılarının Klonlanması ve Transfeksiyonu.....	9
Boyama ve Mikroskop Analizleri.....	9
Florosan Koruma Analizi	10
Bulgular	11
USP32 farklı domenlerini içeren GFP füzyon gen klonlanması.....	11
Mikroskop analizleri.....	13
Florosan koruma analizi	13
USP32 parçalarının lokalizasyonu.....	16
Elde ettiğimiz bulgular, USP32 proteinin Golgiye lokalize olduğunu göstermiştir.	19
Tartışma/Sonuç.....	20
Referanslar.....	22

Tablo ve Şekil Listeleri

Tablo 1: BODIPY konsantrasyon ve yıkama koşulları.....	18
Şekil 1: USP32 domenleri ve klonlanan yapılar.	11
Şekil 2: USP32 ve pEGFP'nin <i>NotI</i> ve <i>Sall</i> kesim sonrası jel elektroforezi.....	12
Şekil 3: USP32 lokalizasyonu.....	13
Şekil 4: USP32-1 yapısı ve floresan koruma testi.	14
Şekil 5: USP32-2 yapısı ve floresan koruma testi.	15
Şekil 6: USP32-6 yapısı ve floresan koruma testi.	16
Şekil 7: Parça-USP32-GFP lokalizasyonu.	16
Şekil 8: USP32 lokalizasyonu (100X).	17
Şekil 9: Farklı BODIPY konsantrasyonları optimizasyonu.....	18
Şekil 10: USP32-GFP'nin Golgi'ye lokalizasyonu (100X).....	19

Özet

Hücre içinde gerçekleştirilen önemli translasyon sonrası modifikasyonlardan biri de ubikuitinasyondur. Ubikuitinin proteinlere eklenmesi kadar çıkartılmasının da protein stabilitesinin değiştirilmesi gibi önemli etkileri vardır. Bu proje kapsamında amacımız henüz karakterize edilmemiş olan bir ubikuitin proetazın (USP32) hücre içi lokalizasyonunun belirlenmesiydi. Bu amaca ulaşmak için öncelikle USP32 farklı domen ve bölgelerini içeren üç farklı GFP füzyon proteini klonlandı. Bu yapılar floresan koruma analizi ile test edildi. HeLa hücrelerinde digitonin muamelesi sonrasında sadece C terminal yapının hücre içinde serbest bulunduğu gösterildi. 100X analizlerde ise tüm uzunluktaki ve C-terminal yapıların Golgi'de buldukları gösterildi. Golgi ise BODIPY-TR ile boyandı. Sonuç olarak, USP32 proteininin lokalizasyonu Golgi olarak belirlenmiş ve iki farklı yöntemle de doğrulanmıştır.

Anahtar kelimeler: USP32, lokalizasyon, Golgi

Abstract

One of the important post-translational modifications in cells is ubiquitination. Removal of ubiquitin from target proteins is as important as ubiquitin addition to proteins as both can affect protein stability. In this project, we aimed to better understand such a deubiquitination enzyme, USP32 (Ubiquitin specific protease 32) in terms of its cellular localization. To reveal where USP32 is found in cells, we created 3 overlapping constructs fused to GFP. These partial constructs were analyzed by florescent protection assay in which the cells are treated with a detergent and GFP signal loss is observed if the GFP fused protein is free in cells. Initially we have shown that full USP32-GFP is not free in cells. In this project, the very C terminal cloned fragment also was free in cells whereas the first and the second N terminal constructs were still bound in cells. When we investigated GFP signal with higher magnification, we detected signals around the nucleus. Since this pattern suggested Golgi localization, we further used a Golgi specific dye, BODIPY, to co-localize both signals. Indeed after the optimization of Golgi staining, we have observed that both GFP signal of full length USP32 and BODIPY overlapped. Therefore, based on all observations we concluded that USP32 is localized to Golgi in cells.

Keywords: USP32, localization, Golgi

Giriş/Genel Bilgiler

Homeostaz, sinyal iletimi, aktivasyon yollarında önemli olan translasyon sonrası modifikasyonlardan biri de ubikuitinasyondur. Hedef proteinlere ubikuitin ekleyen enzim sistemleri her geçen gün daha iyi anlaşılmalıya başlamışken, hedef proteinlerden ubikuitini çıkartan ve bu işlemi tersine çeviren enzimler pek bilinmemektedir. Laboratuvarımızda çalışmakta olduğumuz USP32 (Ubikuitin spesifik proteaz 32), meme kanserinde önemli olabileceğini düşündüğümüz bir protein olup, bu konuda tamamlanmış bir TÜBİTAK kariyer projesi (104S241) de mevcuttur. Tamamlayıcı nitelikli olan bu hızlı destek projesinde amacımız, USP32'nin hücre içerisindeki lokalizasyonunu anlamaktır. Hücre içerisindeki lokalizasyonun anlaşılması, proteinin olası görevlerinin anlaşılmasına katkı sağlayacaktır.

Bugüne kadar laboratuvarımızda tamamlanan TÜBİTAK projesi kapsamında USP32 proteini hakkında ilginç bulgular elde ettik. USP32 geni, 17q23 kromozom bantı üzerinde bulunmaktadır (PAULDING, 2003). Bu bölge meme kanseri hastalarında sıklıkla amplifiye olan bir bölge olup (SINCLAIR, 2003), içerdikleri genler bakımından da oldukça zengin bir bölgedir (COUCH, 1999, ERSON, 2001). Tamamlanmış projede meme kanseri hücre USP32-GFP füzyon genini klonlanamıştık. USP32 (4,8 kb) büyük bir cDNA ve büyük bir proteindir (1604 aa). Bu füzyon proteinin hücre içerisindeki yerinin kabaca anlaşılması için yapılan çalışmalarda FPP (Fluorescence Protease Protection) tabanlı bir yol izlendi (LORENZ, 2006). pEGFP vektörüne klonlanan USP32 geni, HeLa hücrelerine geçici olarak transfekte edildi. Hücrelerde ifade edilen füzyon proteini gözlemlendikten sonra (20X), hücreler digitonin ile muamele edildi. Amacımız, membranda oluşacak deliklerden proteinin çıkıp çıkmayacağını görmektir. Hücre içerisinde serbest olan bir protein bu oluşan deliklerden hücre dışına çıkacağından, floresan mikroskopla gözlemlenen sinyalde azalma tespit edilmesi gerekirken, hücre içerisinde her hangi bir yere bağlı olan bir proteinin sinyalinde azalma olmaması gerekmektedir. Bu deneye göre ilk sonuçlarımız, sadece GFP vektörü ile transfekte edilmiş hücrelerde digitonin sonrası GFP sinyali azalırken, USP32-GFP sinyalinde bir azalma olmadığı yönünde olmuştu.

Şimdiki amacımız ise elimizdeki kaynakları (klonlanmış tam uzunlukta USP32 ve pEGFP vektörü) kullanarak bu hızlı destek projesiyle, proteinin hangi bölgesinin hücre içerisindeki lokalizasyonda rolü olduğunu anlamak ve mikroskop analizlerimizi detaylandırarak daha yüksek büyütme gücünde (40X ve 100X) görüntüler almaktır. Bu sebeplerle, USP32 kod dizini kodladıkları domen yapılarına göre parçalara bölünerek klonlandı ve pEGFP vektörü ile aynı okuma çerçevesine yerleştirildi. Bu yapılar HeLa

hücrelerine geçici bir şekilde transfekte edildi ve bu yapıların hücre içerisindeki lokalizasyonları farklı magnifikasyonlarda incelendi.

Gereç ve Yöntemler

HeLa Hücrelerinin Büyütülmesi

HeLa hücreleri Şap Enstitüsü'nden satın alındı ve %10 serum içeren DMEM ortamında %5 CO₂'de büyütüldü.

USP32 Yapılarının Klonlanması ve Transfeksiyonu

USP32-1 yapısının pEGFPN1 vektörüne klonlanması için *XhoI* ve *Apal* enzim sitelerini içeren primerler kullanıldı (F: 5'-CCGCTCGAGATGGGTGCCAAGGAGTCAC-3', R: 5'-GGGCCCTGGCT CCCTTTTCTGTGGG AAC-3'). USP32-2 ve USP32-3 yapılarının pEGFPN1 vektörüne klonlanması için ise *Sall* ve *NotI* enzim sitelerini içeren primerler kullanıldı. USP32-II-F: 5'-ACGCGTCTCGACTAATAACAAC CAGTGTTTGCT-3', USP32-2-R: 5'-ATAAGAATGCGGCCGCTTAGAGGCTGGGGCGATTCTT-3' ve USP32-3-F: 5'-ACGCGTC GACTCCTGTGTCTCCAATTTTCAGCT-3', USP32-3-R: 5'-ATAAGAATGCGGCCGCTTACTG TAACACACAGTACTTT-3'. PCR ürünleri ve vektör primerlerle eklenen enzimlerle kesildi ve pEGFP içine klonlandı. Hizmet alımı ile gerçekleştirilen dizin analizi sonrası, tranfeksiyon için HeLa hücreleri büyütüldü. Yaklaşık 300,000–400,000 hücre sayılarak 6 kuyulu plakalara ekildi. Hücreler plaka yüzeyinin yaklaşık olarak %80'ini kapladığında 6:2, Fugene HD:DNA oranlarıyla transfekte edildiler. Transfeksiyonlarda 2 µg *USP32-GFP* yapıları ve 2 µg pEGFP boş vektörü kullanıldı.

Boyama ve Mikroskop Analizleri

Transfeksiyondan 20-24 saat sonra, HeLa hücreleri önerilen BODIPY-TR (Molecular probes) (3-5 µM) konsantrasyonları ile boyandı (PBS/HEPES içinde). 30 dakikalık (4°C) inkübasyon sonrasında hücreler PBS/HEPES ile yıkandı. Hücreler yine 30 dakikada bu kez 37°C 'de taze DMEM ile inkübe edildi. Son kez KHM tampon çözeltisi (110 mM CH₃COOK,

20 mM HEPES ve 2 mM MgCl₂) ile yıkandıktan sonra mikroskop (ZEISS LSM 510-Merkez Lab, ODTÜ) ile incelendiler. GFP ölçümü için lazer argon lambası (488 nm), BODIPY-TR için ise yeşil helium-neon lambası (543 nm) kullanıldı.

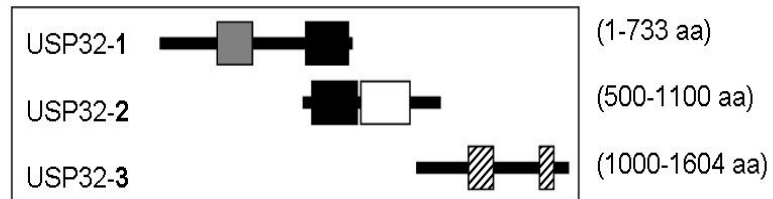
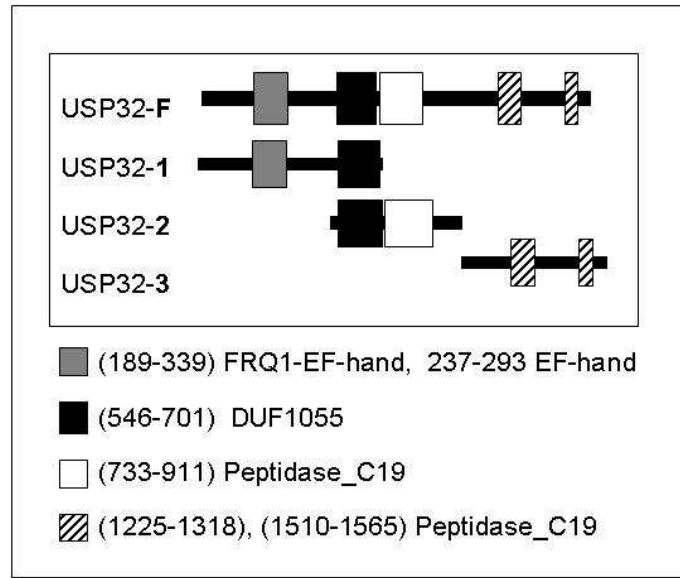
Florosan Koruma Analizi

Transfeksiyondan 20-24 saat sonra, hücreler 3 kez KHM tampon çözeltisinde (110 mM CH₃COOK, 20 mM HEPES and 2 mM MgCl₂) ve oda sıcaklığında yıkandı. Yine oda sıcaklığında 20 µM digitonin deterjanı ile inkübe edilen hücrelerin (LORENZ, 2006) deterjan öncesi ve sonrası mikroskop analizleri yapıldı (20X) (ZEISS LSM 510-Merkez lab, ODTÜ).

Bulgular

USP32 farklı domenlerini içeren GFP füzyon gen klonlanması

USP32 proteinine ait farklı domen yapılarını içerecek dizinler (3 adet) için uygun klonlama primerleri tasarlandı. Bu primerler GFP proteini ile füzyon oluşturacak şekilde ve okuma çerçevesi bozulmayacak şekilde tasarlandı (Primer 3 programı ve manuel olarak). Primerler aynı zamanda klonlamanın sağlanabilmesi için farklı kesim enzim sitelerini ve bu enzimlerin kesim verimini arttıracak ek dizinler de içerdiler. Tasarlanan primerlerle oluşturulan yapılar ve bu yapılardaki domen bilgileri Şekil 1'de gösterilmektedir.

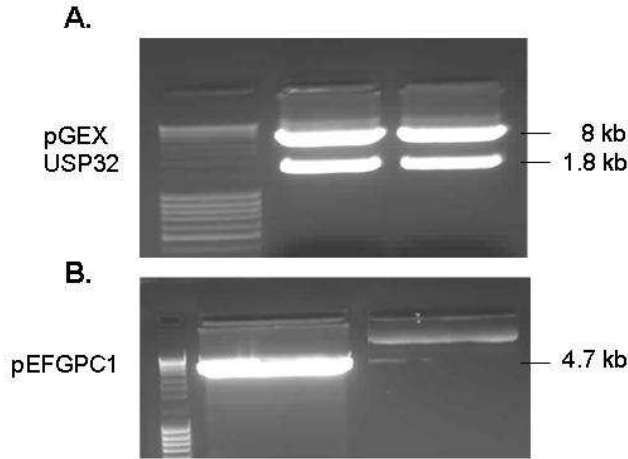


Şekil 1: USP32 domenleri ve klonlanan yapılar. 1604 aa uzunluğundaki proteinde 189-339 aa arası: EF-hand domeni, 546-701 aa arası: DUF (Domain of unknown function, bu domenin görevi bilinmemektedir), 733-911 aa arası: peptidaz domeni, 1225-1318 ve 1510-1565 aa arası ise peptidaz domeni. F: (Full) Tüm uzunluktaki USP32 proteini; 1,2,3 ise klonlanan kısmi parçaları göstermektedir.

Bu parçaların klonlanması için izlenen yol şöyle özetlenebilir:

(Örnek teşkil etmesi bakımından sadece USP32-2 (1,8 kb) için sonuçlar sunulmaktadır)

USP32-2 yapısına mahsus olmak üzere küt uç ligasyonu yapılmıştır. Diğer yapılar küt enzim ligasyonu ile okuma çerçevesi bozulacağından PCR ile çoğaltılarak klonlanmıştır. Tüm uzunluktaki USP32'yi içeren pGEX vektörü ve boş pEGFP vektörü *NotI* ve *Sall* ile kesildi, S1 nükleaz ile uçları küt hale getirildi (Şekil 2).

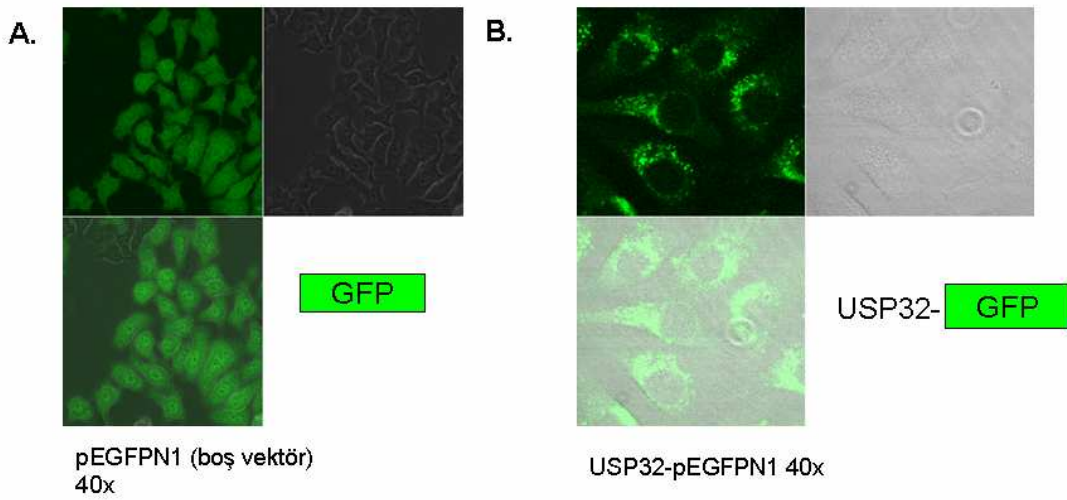


Şekil 2: USP32 ve pEGFP'nin *NotI* ve *Sall* kesim sonrası jel elektroforezi. **A.** USP32 dizinini içeren pGEX vektörü bu iki enzimle kesildi. Klonlanacak parça USP32-2 yapısını oluşturacak 1.8 kb'lik bir bölgedir. **B.** *NotI* ve *Sall* ile kesilen pEGFP vektörü de agaroz jelde yürütülerek izole edildi.

Kesilen vektörler alkalın fosfotaz ile defosforilize edildi, ethanol ve sodyum acetat ile temizlendikten sonra ligasyon reaksiyonu başlatıldı. Bu aşamada farklı USP32-2 ve pEGFP oranları denendi. 5:1, 8:1, 10:1 oranları arasında 10:1 de yaklaşık 40 koloni gözlemlendi. Bunlardan seçilenler büyütüldü, plazmid izolasyonu yapıldı. Okuma çerçevesini de dikkate alarak, içinde mutasyon barındırmayan plazmidler bulundu. Plazmidler, gerekli sayıda primer kullanılarak (yaklaşık primer başına 500 baz okundu) dizin analizi ile doğrulandıktan sonra gliserol stok da alınarak miniprep yapılarak, ileriki aşamalara hazır hale getirildi.

Mikroskop analizleri

Tüm uzunluktaki (4,8 kb) USP32-GFP proteini HeLa hücrelerine transfekte edilerek floresan mikroskop ile (40X) gözlemlendi (Şekil 3A ve 3B). Şekil 3A'da boş pEGFP vektörünün hücre içinde homojen dağılımı gözlemlenirken, USP32 içeren pEGFP transfeksiyonu sonucunda hücrelerde çekirdek etrafında bir lokalizasyon olduğu gözlemlenmektedir (Şekil 3B).

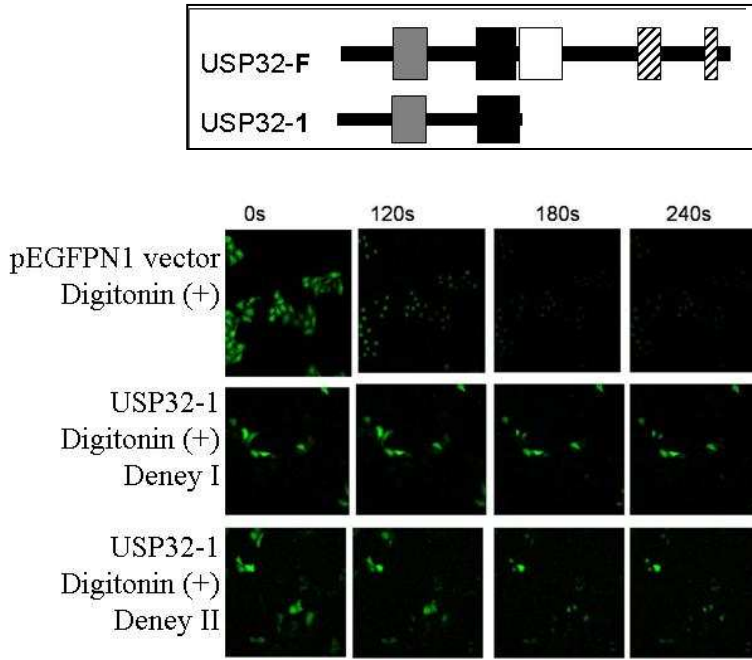


Şekil 3: USP32 lokalizasyonu. **A.** Boş pEGFP vektörüne ait üç görüntü: floresan (sol üst), ışık mikroskop sonuçları (sağ üst) ve üst üste bindirilmiş görüntü (sol alt) olarak sunulmaktadır (40X). **B.** USP32 klonlanmış pEGFP vektörü transfeksiyonu sonrası ifade sonuçları. Üç görüntü: floresan (sol üst), ışık mikroskop sonuçları (sağ üst) ve üst üste bindirilmiş görüntü (sol alt) olarak sunulmaktadır (40X).

Florosan koruma analizi

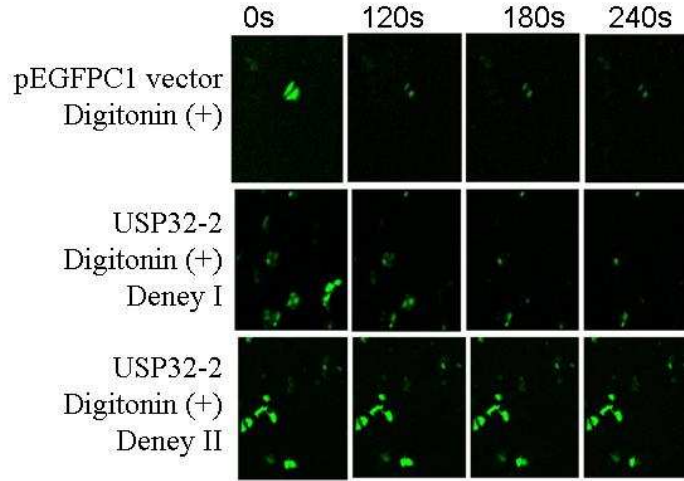
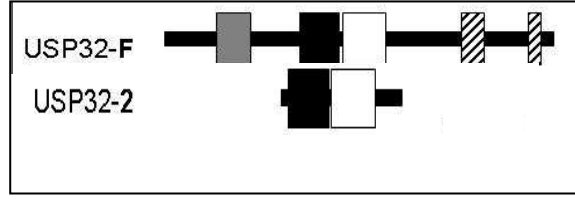
1, 2 ve 3 kodlu parçalar için öncelikle floresan koruma testi gerçekleştirildi. Transfeksiyon sonrası hücreler 20 μ M digitonin ile muamele edilerek, GFP sinyalinin hücre içinde kalıp kalmayacağı incelendi. Bunun amacı ise proteinin (veya parçasının) hücre içinde bir yapıya bağlı olup olmadığının anlaşılmasıdır. Eğer protein sitoplazmada serbest halde ise, digitonin ile açılan deliklerden dışarı sızarak GFP sinyali kaybolur (LORENZ, 2006). Proje önerisinde, digitonin ile geçirgen hale gelen hücre zarından tüm uzunluktaki USP32'nin hücre dışına çıkamadığı sonucunu sunmuştuk. Bu proje kapsamında üretilen USP32

parçaları için de aynı deney tekrarlandı. Böylelikle proteinin hangi bölgelerinin lokalizasyon için önemli olabileceği incelendi. Şekil 4'de de görüldüğü gibi boş vektör sinyali 180 saniye içinde hücre dışına çıkmakta ancak USP32-1 yapısı ise digitonin ile delinmiş hücrelerden dışarı çıkmamıştır.



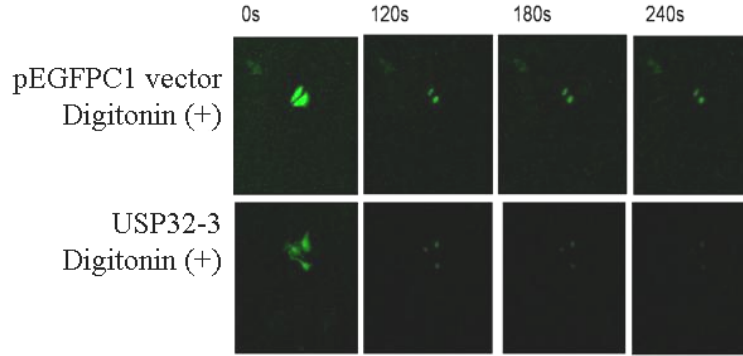
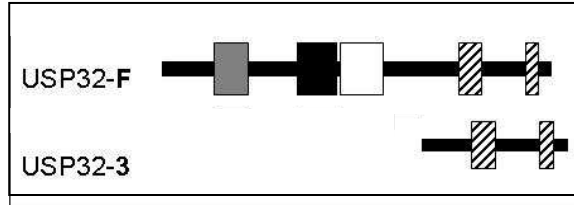
Şekil 4: USP32-1 yapısı ve floresan koruma testi. İlk satırda boş vektör sinyalinin 180 saniye içinde hücre dışına çıktığı görülmektedir. USP32-1 yapısı ise digitonin ile delinmiş hücrelerden dışarı çıkamadı.

Şekil 5'de de görüldüğü gibi boş vektör sinyali 180 saniye içinde hücre dışına çıkmakta ancak USP32-2 yapısı ise digitonin ile delinmiş hücrelerden dışarı çıkamamıştır.



Şekil 5: USP32-2 yapısı ve floresan koruma testi. İlk satırda boş vektör sinyalinin 120 saniye sonrasında önemli bir miktarda azaldığı görülmektedir. USP32-2 yapısı ise digitonin ile delinmiş hücrelerden dışarı çıkamadı.

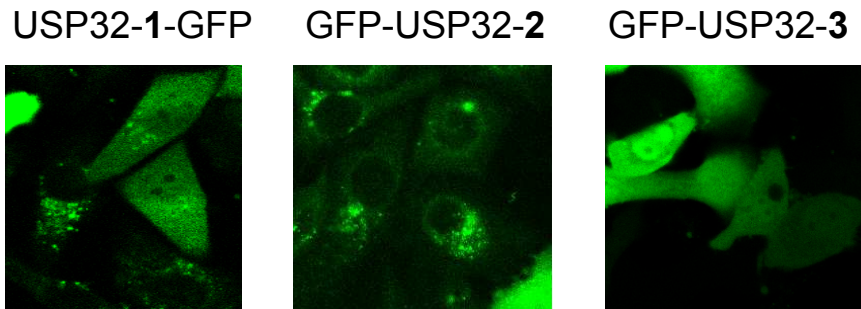
Ancak son yapı olan USP32-3 için sonuç farklı oldu. Şekil 6'da da görüldüğü gibi boş vektör sinyali 120 saniye içinde hücre dışına çıkmakta, USP32-3 yapısı da digitonin ile delinmiş hücrelerden oldukça hızlı bir şekilde dışarı çıkmıştır. Bu da hücre içerisindeki lokalizasyon sinyalinin bu bölgede olmadığını, bu parçanın sitoplazmada serbest olduğunu göstermiştir.



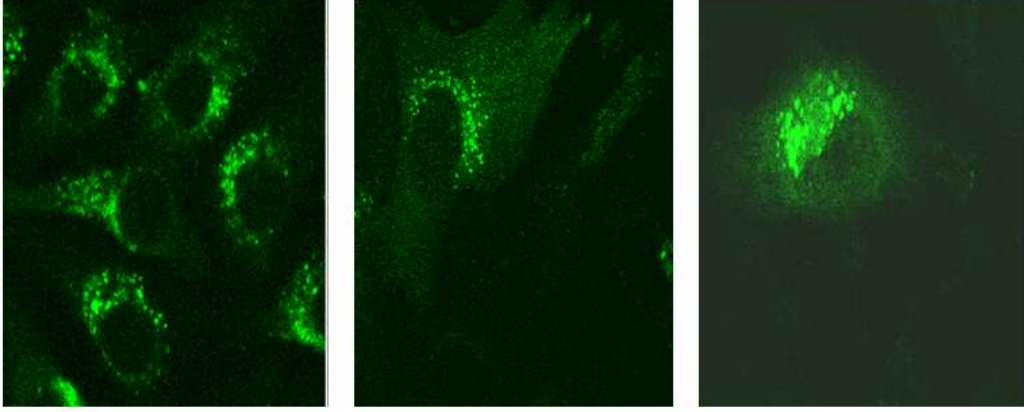
Şekil 6: USP32-6 yapısı ve floresan koruma testi. İlk satırda boş vektör sinyalinin 180 saniye içinde hücre dışına çıktığı görülmektedir. USP32-3 yapısı da digitonin ile delinmiş hücrelerden dışarı çıkabilmiştir.

USP32 parçalarının lokalizasyonu

Bu sonuçlardan sonra USP32 parçalarına ve tüm uzunlukta USP32'ye ait daha yüksek büyütme resimleri alındı (100X) (Şekil 7 ve 8).



Şekil 7: Parça-USP32-GFP lokalizasyonu. USP32-1-GFP, GFP-USP32-2 ve GFP-USP32-3 yapılarının mikroskopik analizleri (100X).

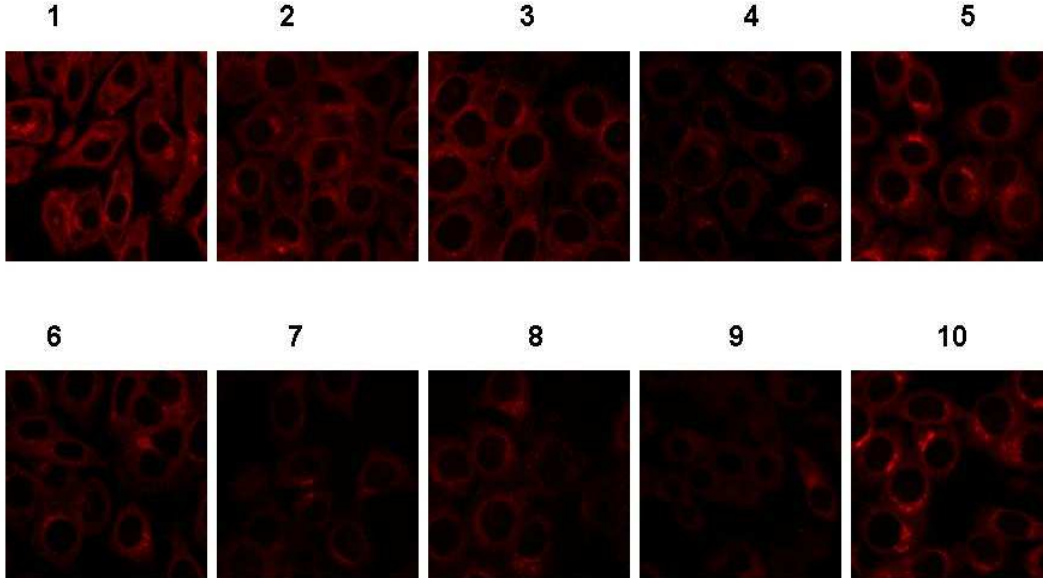


Şekil 8: USP32 lokalizasyonu (100X). Tüm uzunluktaki USP32-GFP proteinine ait lokalizasyon.

Şekil 7 ve 8'de ilk defa hücrelerden elde edilen GFP sinyalinin çekirdek etrafında toplandığı gözlemlenmiştir. Böylesi bir boyama ise Golgi lokalizasyonunu çağrıştırdığı için Golgiye has bir boya olan BODIPY-TR ile hücrelerin boyama koşulları optimize edilmiştir (Tablo 1 ve Şekil 9). Hücrelerde Golginin düzgün boyanabilmesi için boya konsantrasyonu ve boyama sonrasındaki yıkama aşamalarının optimizasyonu gerekmiştir. Farklı konsantrasyonlar sonucunda 3 μ M boyanın en uygun koşul olduğuna karar verilmiştir.

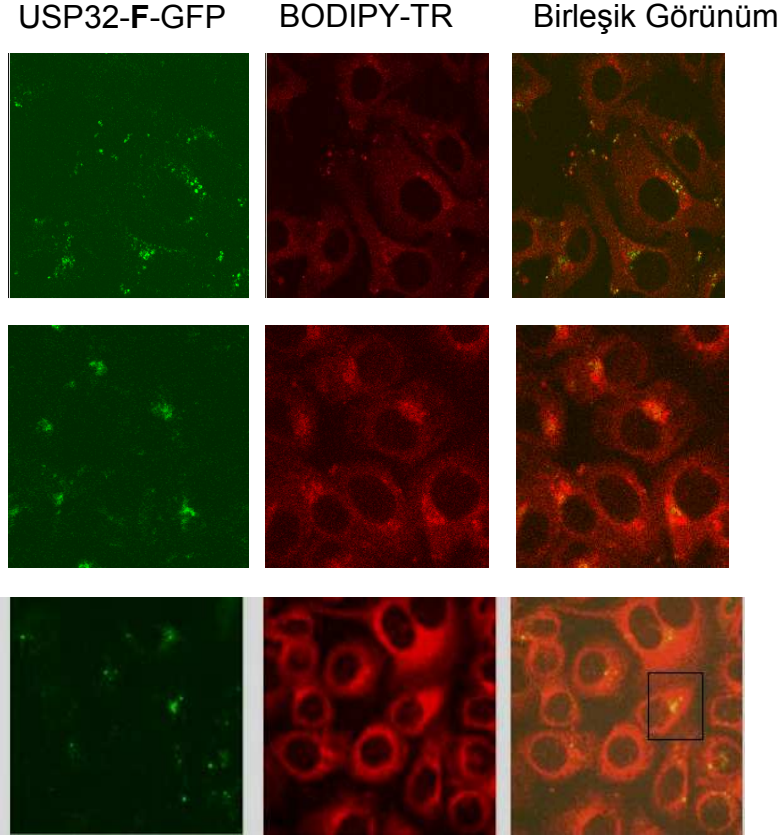
Deney Sırası	BODIPY konsantrasyonu	Yıkama Koşulları
1	5 μ M	3 X
2	5 μ M	> 3X
3	2.5 μ M	3 X
4	2.5 μ M	> 3X
5	1.25 μ M	3 X
6	1.25 μ M	> 3X
7	0.9 μ M	3 X
8	0.9 μ M	> 3X
9	3 μ M	3 X
10	3 μ M	> 3X

Tablo 1: BODIPY konsantrasyon ve yıkama koşulları.



Şekil 9: Farklı BODIPY konsantrasyonları optimizasyonu. 1-10 arası örnekler arasında en iyi boyama koşulları 10. resimdeki 3 μ M ve sonrasında 5-6 yıkama olarak belirlendi.

Bu optimizasyon sonrasında tüm uzunluktaki USP32-GFP ile transfekte edilen hücreler aynı anda BODIPY-TR ile boyandı ve elde edilen görüntüler üst üste bindirildi (Şekil 10) ve her iki sinyalin de örtüştüğü gözlemlendi.



Şekil 10: USP32-GFP'nin Golgi'ye lokalizasyonu (100X). GFP ve BODIPY boyama sonuçları ayrı ayrı elde edilip, örtüştürülmüş hali en sağdaki kolonda sunulmaktadır.

Elde ettiğimiz bulgular, USP32 proteinin Golgiye lokalize olduğunu göstermiştir.

Tartışma/Sonuç

Ubikuitine has proteazların Golgideki rolleri yeni anlaşılmaya başlanmıştır. Bu tip enzimlerin, proteinlerin Golgi üzerinden dağıtımları esnasında (PIPER, 2007), ve Golgi membranı dinamiğinde (MEYER, 2005, WANG, 2004) düzenleyici rolleri oldukları düşünülmektedir. Bu bulgulara verilebilecek bir örnek Ubp3p enzimidir. Ubp3p'nin endoplasmik retikulum-Golgi arasındaki vesikül trafiğini düzenleyen COPI ve II komplekslerinin regülasyonundan sorumlu olduğu gösterilmiştir (COHEN, 2003, COHEN, 2003).

Bu hızlı destek projesi kapsamında USP32 proteinin lokalizasyonu da Golgi olarak belirlenmiştir. Ön verilerimiz tüm USP32-GFP'nin hücre içinde serbest bulunmadığını göstermişti. Hızlı destek projesi kapsamında sorduğumuz soru, proteinin nerede bulunduğuydu. Bu soruyu cevaplayabilmek için öncelikle USP32 (1604 aa) proteini üç örtüşen GFP füzyon parça halinde klonlandı. Klonlar dizin analizi ile doğrulandı ve geçici olarak HeLa hücrelerine aktarıldı. Öncelikle parçalar halinde klonlanan USP32-GFP füzyon proteinleri floresan koruma analizi ile incelendi. Digitonin muamelesi sonucunda ilk iki yapının hala hücre içinde bir yere bağlı olduğu, 3. yapının ise serbest olduğu bilgisi elde edildi. Bu veriler mikroskop sonuçları ile de birleştirildiğinde N terminal yapıların (1 ve 2) Golgiye has bir lokalizasyon motifi içerdiği anlaşılmaktadır. Bu esnada Golgi lokalizasyonunu doğrulamak için Golgiye has bir boya olan BODIPY kullanıldı. Boyama optimizasyonu sonucunda 3 µM BODIPY boya konsantrasyonu ve 5-6 yıkamanın en iyi Golgi boyama koşulları olduğu tespit edildi. Tüm uzunluktaki GFP-USP32'nin Golgi lokalizasyonu gösterilmiştir.

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda Golgi lokalizasyonunu sağlayan korunmuş bir amino asit motifi bulunamamıştır. Bundan sonraki çalışmalarda hangi bölgenin bu sinyali içerdiğinin anlaşılması için 1. ve 2. yapılar daha ufak yapılar halinde klonlanarak, minimal bir bölge belirlenmesi ve daha sonrasında da bu bölgedeki amino asitlerin hedefli mutageniz

alışmaları ile değiştirerek, lokalizasyondan sorumlu amino asitlerin belirlenmesi mümkün olacaktır. nemli bir aşama da USP32'nin Golgi'de ne yaptığının anlaşılması olacaktır.

Referanslar

- COHEN, M., Stutz, F., Belgareh, N., Haguenaer-Tsapis, R., Dargemont, C.. Ubp3 requires a cofactor, Bre5, to specifically de-ubiquitinate the COPII protein, Sec23. *Nat Cell Biol* 5 (7), 661-667 (2003).
- COHEN, M., Stutz, F., Dargemont, C.,. Deubiquitination, a new player in Golgi to endoplasmic reticulum retrograde transport. *J Biol Chem* 278 (52), 51989-51992 (2003).
- COUCH, F., Wang, X., Wu, G., Qian, J., Jenkins, R., James, C.,. Localization of PS6K to chromosomal region 17q23 and determination of its amplification in breast cancer. *Cancer Res* 59 (7), 1408-1411 (1999).
- ERSON, A., Niell, B., DeMers, S., Rouillard, J., Hanash, S., Petty, E2001. Overexpressed genes/ESTs and characterization of distinct amplicons on 17q23 in breast cancer cells. *Neoplasia* 3 (6), 521-526 (2001).
- LORENZ, H., Hailey, D., Wunder, C., Lippincott-Schwartz, J.,. The fluorescence protease protection (FPP) assay to determine protein localization and membrane topology. *Nat Protoc* 1 (1), 276-279 (2006).
- MEYER, H.H.,. Golgi reassembly after mitosis: the AAA family meets the ubiquitin family. *Biochim Biophys Acta* 1744 (2), 108-119 (2005).
- PAULDING, C.A., Ruvolo, M., Haber, D.A.,. The Tre2 (USP6) oncogene is a hominoid-specific gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (5), 2507-2511 (2003).
- PIPER, R.C., Luzio, J.P.,. Ubiquitin-dependent sorting of integral membrane proteins for degradation in lysosomes. *Curr Opin Cell Biol* 19 (4), 459-465 (2007).
- SINCLAIR, C., Rowley, M., Naderi, A., Couch, F.,. The 17q23 amplicon and breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 78 (3), 313-322 (2003).
- WANG, Y., Satoh, A., Warren, G., Meyer, H.H.,. VCIP135 acts as a deubiquitinating enzyme during p97-p47-mediated reassembly of mitotic Golgi fragments. *J Cell Biol* 164 (7), 973-978 (2004).

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje No: 108S408
Proje Başlığı: USP32 proteinin hücre içi lokasyonunun belirlenmesi
Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar: Y.Doç.Dr.A.Elif Erson
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: ODTÜ Biyoloji Bölümü
Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi:
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 01/05/2009-01/05/2010
Öz (en çok 70 kelime) Ubikuitinin proteince eklenmesi kadar çıkartılmasının da protein stabilitesinin değiştirilmesi gibi önemli etkileri vardır. Bu proje kapsamında amacımız bir ubikuitin proteaz olan USP32'nin hücre içi lokalizasyonunun belirlenmesiydi. Öncelikle USP32 farklı domen ve bölgelerini içeren farklı GFP füzyon proteinleri klonlandı. Bu yapılar floresan koruma analizi ve floresan mikroskopi ile incelendi. 100X analizlerde tüm uzunluktaki yapıların Golgi'de buldukları gösterildi. Sonuç olarak, USP32 proteininin lokalizasyonu Golgi olarak belirlenmiş ve iki farklı yöntemle de doğrulanmıştır.
Anahtar Kelimeler: ubikuitin, USP32, Golgi
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu mu? Evet <input type="checkbox"/> Gerekli Değil <input checked="" type="checkbox"/> Fikri Ürün Bildirim Formu'nun tesliminden sonra 3 ay içerisinde patent başvurusu yapılmalıdır.

Projeden Yapılan Yayınlar:

Akhavantabasi S, Akman HB, Sapmaz A, Keller J, Petty EM, Erson AE. USP32 is an active, membrane-bound ubiquitin protease overexpressed in breast cancers. Mamm Genome. [Epub ahead of print] 2010 Jun 13. PMID: 20549504