

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AŞIRI DEK2 İZOFORMU İFADESİNİN HS-27A HÜCRE
BİYOLOJİSİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

AHMET KALAYCI
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

GEBZE

2022

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AŞIRI DEK2 İZOFORMU İFADESİNİN HS-27A HÜCRE
BİYOLOJİSİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

AHMET KALAYCI
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMANI
PROF. DR. AYTEN KANDİLCİ

GEBZE
2022

T.R.
GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

**INVESTIGATION EFFECT OF OVEREXPRESSED
DEK2 ISOFORM ON HS-27A CELL BIOLOGY**

AHMET KALAYCI
A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE
DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

THESIS SUPERVISOR
PROF. DR. AYTEN KANDILCI

GEBZE
2022

GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 07/07/2022 tarih ve 2022/34 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 28/07/2022 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Ahmet KALAYCI'nın tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : Prof. Dr. Ayten KANDİLCİ

ÜYE

: Doç. Dr. Özlem AKKAYA

ÜYE

: Dr. Öğr. Üyesi Zihni Onur ÇALIŞKANER

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun

...../...../..... tarih ve/..... sayılı kararı.

ÖZET

DEK proteini DNA tamiri dahil birçok hücrel süreçte yer alan ve bazı solid kanser türlerinde aşırı ifade gösteren bir onkoproteindir. *DEK* geni, alternatif kırılmayla iki farklı *DEK* izoformunu kodlamaktadır. DEK izoform-1 (DEK1) hücrel süreçlerdeki rolü araştırılsa bile, DEK izoform-2 (DEK2) detaylı olarak incelenmemiştir.

Tez kapsamında, HS-27A hücrelerinde retroviral transdüksiyon yöntemiyle, N-terminal bölgesine Myc ya da Flag epitopu eklenmiş DEK1 ve DEK2 proteinlerinin kalıcı aşırı ifadesi sağlandı. Protein lokalizasyon analizi, DEK1'in çekirdekte konumladığı, DEK2'ninse çekirdeğe ek olarak bu hücrelerin yaklaşık %90'unda Nucleophosmin-1 ile örtüşen agregatlar oluşturduğunu gösterdi. Bu hücrelerde doxorubicin ile DNA hasarı oluşturuldu. HS-27A MycDEK1 veya MycDEK2 hücrelerinin kontrol (HS-27A-GFP) hücrelerinden daha fazla γ H2AX DNA hasar sinyali oluşturduğunu belirlendi. Ancak, doxorubicin uzaklaştırıldıktan 24 saat sonra DEK2 hücrelerindeki DNA hasar seviyesinin kontrol ve DEK1 hücrelerine göre daha yüksek seviyede olduğu tespit edildi ($p<0,05$). RT-qPCR analiz sonuçları, *DEK2*'nin düşük seviyede olmakla birlikte farklı hücrelerde ifade edildiğini gösterdi. Meme, kolon, akciğer, tiroid, karaciğer, over, prostat ve böbrek gibi farklı kanser türlerinde (normal $n=3$, tümör $n=9$) *DEK1* ve *DEK2* seviyesi analiz edildi. Normal dokuya kıyasla, *DEK1* ifadesi meme kanserinde ortalama 137 kat, kolon kanserinde ise ortalama 24 kat artış gösterdi ($p<0,05$). *DEK2* ifadesiyse bu tümör dokularında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık göstermedi.

Elde ettiğimiz sonuçlar; *DEK2*'nin *DEK1* den farklı olarak çoğunlukla çekirdekçikte lokalize olduğunu; indüklenen çift iplikli DNA hasarının *DEK2* hücrelerinde daha uzun süre tamir edilmeden kaldığını; normal veya tümör dokularında *DEK1* ve *DEK2* ifade seviyesinin dokuya göre farklılık gösterdiğini ortaya koymaktadır. Bu tez çalışması TÜBİTAK tarafından KBAG 118Z765 numaralı 1001 projesi ile desteklenmiştir.

Anahtar Kelimeler: DEK izoform-1, DEK izoform-2, γ H2AX, Doxorubicin, HS-27A.

SUMMARY

DEK protein is an oncoprotein involved in many cellular processes, including DNA repair and overexpressed in some solid cancers. DEK gene encodes two different DEK isoforms by alternative splicing. Although DEK isoform-1 (DEK1) in cellular processes has been investigated, DEK isoform-2 (DEK2) has not been studied in detail.

In this thesis, persistent overexpression of DEK1 and DEK2 proteins with a Myc or Flag epitope at the N-terminus were expressed by the retroviral method in HS-27A cells. DEK1 and DEK2 protein location was found in nucleus, but DEK2 protein also in nucleolus by overlapping Nucleophosmin-1 in approximately 90% cells. Doxorubicin induced DNA damage analysis showed that DEK1 and DEK2 cells produced more γ H2AX DNA damage signals than control cells. However, 24 hours after doxorubicin removal, DEK2 cells showed higher signal than control and DEK1 cells ($p<0.05$). RT-qPCR analysis showed low level of DEK2 expression in different cells. Breast, colon, lung, thyroid, liver, ovarian, prostate and kidney tissues were analysed to DEK1 and DEK2 expression in cancer (normal $n=3$, tumor $n=9$). Compared to normal tissue, DEK1 level increased 137-fold in breast cancer and 24-fold in colon cancer ($p<0.05$). Whereas no statistically significant difference at DEK2 expression was found.

Our results show that; DEK2 is mostly localized in the nucleolus, unlike DEK1; DNA damage remain unrepaired for longer in DEK2 cells; expression level of DEK1 and DEK2 can be differ in normal or tumor tissues. This study was supported by the Scientific and Technological Research Council of Turkey (TÜBİTAK) 1001 Grant (KBAG 118Z765).

Key Words: DEK isoform-1, DEK isoform-2, γ H2AX, Doxorubicin, HS-27A.

TEŞEKKÜR

Tüm yüksek lisans eğitimimin başından sonuna kadar maddi-manevi her türlü desteği ve “AŞIRI DEK2 İZOFORMU İFADESİNİN HS-27A HÜCRE BİYOLOJİSİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI” başlıklı tez çalışmamda gerekli tüm imkanları fazlasıyla bana sunan değerli danışmanım Prof. Dr. Ayten Kandilci’ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

En başından itibaren, çalışmalarımda yardımını hiç esirgemeyen ve tüm bilgi ve deneyimlerini aktararak her zaman dostlukla destek veren, aynı ekipte olmaktan büyük mutluluk duyduğum Emrah Özçelik’e, aynı yardım ve desteği hiçbir zaman esirgemeyen değerli ekip arkadaşlarım Büşra Çelik ve Açelya Avcı’ya, İrfan Baki Kılıç ve Dilan Yoleri’ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Aynı laboratuvarı paylaştığımız ve gerektiğinde her türlü desteği sağlayan Tazebay lab ekibine teşekkürlerimi iletmekten mutluluk duyarım.

Bütün hayatım boyunca her zaman arkamda duran, benim bugüne gelmemi sağlayan, her türlü zorluk ve başarıda benim yanımda olan, her zaman cesaret veren canım aileme en içten minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak, hep zaman destek olan ve dostluklarıyla cesaret veren değerli arkadaşlarım Sercan Çekdemir, Mecbure Nur Akça, Hülya Aydın ve Büneyan Tüzün’e teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
TABLolar DİZİNİ	xvi
1. GİRİŞ	1
2. DNA HASARI	2
2.1. Hücrede DNA Hasar Cevabı (DHC) Mekanizmaları	3
2.1.1. Hücre Döngüsünün Kontrolü	4
2.1.2. DNA Tamiri	5
2.1.2.1. Nükleotid Eksizyon Onarımı (NER)	6
2.1.2.2. Baz Eksizyon Onarımı (BER)	7
2.1.2.3. Hatalı Eşleşme Tamiri	7
2.1.2.4. DNA Çift İplik Kırığı Tamiri	7
2.2. γ H2AX ve Düzenlenmesi	9
3. HEMATOPOEZ	13
3.1. Kemik İliği Mikroçevresi	14
3.2. Mezenkimal Kök Hücreler	15
4. DEK PROTEİNİ	16
4.1. DEK Proteinin Fonksiyonları	17
4.2. DEK ve DNA Hasar Cevabı	18
4.3. DEK İzofomları	19
5. MATERYAL ve YÖNTEM	21
5.1. Materyal	21
5.2. Yöntem	25
5.2.1. Hücre Kültürü	25
5.2.2. RT-PCR	25
5.2.2.1. RNA İzolasyonu	25

5.2.2.2. cDNA Sentezi	26
5.2.2.3. PCR	26
5.2.2.4. qPCR	27
5.2.3. Transfeksiyon	28
5.2.4. Transdüksiyon	28
5.2.5. FACS ile İnfekte Hücrelerin Seçilimi	28
5.2.6. Akım Sitometrisi ile GFP-pozitif Hücre Analizi	29
5.2.7. İmmünofloresan Boyama	29
5.2.8. DNA Hasarının Oluşturulması	31
5.2.8.1. Doxorubicinin Hazırlanması	31
5.2.8.2. Doxorubicin Uygulaması	31
5.2.8.3. Hücredeki DNA Hasarının Gözlenmesi İçin İmmünofloresan Boyama	32
5.2.8.4. Konfokal Mikroskopu ve Görüntü Analizi	32
5.2.9. Western Blot Yöntemi ile Protein Analizi	33
5.2.9.1. Protein İzolasyonu	33
5.2.9.2. Protein Miktarının Belirlenmesi	33
5.2.9.3. SDS PAGE Jel Elektroforezi	34
5.2.9.4. Proteinlerin Membrana Transferi	35
5.2.9.5. Antikor Uygulaması	35
5.2.9.6. Kemiluminisan Membran Görüntüleme	36
5.2.10. Hücre İçi Protein Konumun Belirlenmesi	36
5.2.11. DEK ve Nucleophosmin Birlikte Konum Analizi	36
5.2.12. İnsan Kanser ve Normal Doku cDNA Panel Analizi	37
5.2.13. İstatistiksel Analiz	37
6. BULGULAR	38
6.1. DEK1 VE DEK2 İfadesinin Farklı Hücre Hatlarında Gösterilmesi	38
6.2. HS-27A Hücre Hattında Ektopik Olarak Kalıcı Aşırı DEK1 ve DEK2 İfadesinin Oluşturulması	41
6.3. DEK1 ve DEK2 Protein Hücre İçi Lokalizasyonunun Belirlenmesi	44
6.4. DEK2 Proteini ile Çekirdekçik Biyobelirteci Olan Nucleophosmin-1'in Birlikte-lokalizasyonunun Gösterilmesi	45
6.5. DEK İzoformlarının DNA Hasar ve Tamir Mekanizmaları Üzerindeki Etkisi	46

6.5.1. DNA Hasarının Oluşturulması	46
6.5.2. DNA Hasarı Sonrası Değişen γ H2AX Odak Yoğunluğunun Tespiti	47
6.5.3. Ařırđ DEK1 ve DEK2 İfade Eden Hücreslerin Hasar Tamir Oranlarının Analizi.	49
6.6. Farklı İnsan Tumor Dokularında Değişen DEK1 ve DEK2 Seviyesinin Analizi	50
7. SONUÇLAR ve TARTIşMA	53
KAYNAKLAR	57
ÖZGEÇMİş	63
EKLER	64

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler ve</u>	<u>Açıklamalar</u>
<u>Kisaltmalar</u>	
53BP1	: P53-bağlayıcı protein 1
ACTB	: Actin-Beta
AML	: Akut Myeloid Lösemi
APS	: Amonyum persülfat
ATM	: Ataxia telangiectasia–mutated kinase
ATR	: Ataxia telangiectasia and Rad3 related
BER	: Base excision repair
BRCA1	: Breast cancer type 1
BRCA2	: Breast cancer type 2
BSA	: Bovine Serum Albumin
CD8	: Cytotoxic T cell
cDNA	: Tamamlayıcı DNA
CHK1	: Checkpoint kinase 1
CHK2	: Checkpoint kinase 2
CK2	: Casein kinase 2
CO ₂	: Karbondioksit
CTCF	: Corrected total cell fluorescence
CXCL12	: Stromal-Cell-Derived Factor 1
CXCR4	: C-X-C Chemokine Receptor Type 4
DEK1	: DEK izoform-1
DEK2	: DEK izoform-2
DHC	: DNA hasar cevabı
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
Doxo	: Doxorubicin
dsDNA	: Çift iplikli DNA
E2F1	: Transcription Factor E2F1
E2F3	: Transcription Factor E2F3

EDTA	: Ethylenediaminetetraacetic Acid
Exo1	: Ekzonükleaz 1
FACS	: Fluorescence-Activated Cell Sorting
FBS	: Fetal Bovine Serum
GAPDH	: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GFP	: Green Flourescent Protein
H2AX	: Histon 2AX
H ₂ O	: Su
HCl	: Hidroklorik Asit
HKH	: Hematopoietik Kök Hücre
HPV	: Human papillomavirus
HR	: Homolog rekombinasyon
HSPGs	: Heparan sulfate-type proteoglycans
IL-8	: Interlökin 8
kDa	: Kilodalton
MHC	: Major Histocompatibility Complex
ml	: Mililitre
MMR	: Mismatch repair
MRN	: DNA hasarı sensör kompleksi
mRNA	: Mesajcı Ribonükleik Asit
MYC	: Myc Proto-onkoprotein
NBS1	: Nijmegen breakage syndrome 1
NER	: Nucleotide excision repair
NF-Y	: Nüklear transkripsiyon faktör-Y
NHEJ	: Non-homologous end joining
NK	: Doğal Öldürücü Hücreler
p21	: Sikline bağlı kinaz inhibitörü 1
p53	: Tümör protein 53
PARP1	: Poly [ADP-ribose] polymerase 1
PBS	: Phosphate Buffered Saline
PFA	: Paraformaldehit
PI3K	: Phosphoinositide 3-kinases
PIKK	: Phosphatidylinositol 3-kinase-related kinases

PP2A	: Protein fosfotaz 2A
PP4C	: Protein fosfotaz 4C
Rb	: Retinoblastoma
RNA	: Ribonükleik Asit
RNS	: Reaktif azot türevleri
ROS	: Reaktif oksijen türevleri
RPA	: Replication Protein A
RPMI 1640	: Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium
RT-qPCR	: Real Time Polymerase Chain Reaction
SAP	: DNA bağlanma motifi
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
shRNA	: Short Hairpin RNA
ssDNA	: Tek ipikli Deoksiribonükleik Asit
TBS	: Tris Buffered Saline
UV	: Ultraviyole
YY1	: Transcription factor Yin Yang 1
γ H2AX	: Fostorile Histon 2AX

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: DNA hasarı sonrası uyarılan hücresel mekanizmalar.	4
2.2: DNA hasarı sonrası hücre döngüsü kontrol mekanizması.	5
2.3: Farklı kaynaklı DNA hasar ajanlarının oluşturduğu DNA hasar türleri ve hasar sonrası devreye giren ilgili DNA tamir mekanizmalarının özet olarak gösterimi.	6
2.4: Çift iplik kırığı tamirinde hücre döngüsünün bulunduğu fazına göre homolog rekombinasyon (HR) ve homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ) tamirinin şematik olarak gösterimi.	9
2.5: MRN kompleksi (MRE11-RAD50-NBS1) ile bir γ H2AX odağının yapısı.	11
3.1: Hematopoetik hücre gelişimi.	13
3.2: Hematopoetik kök hücre gelişimine destek sağlayan kemik iliği mikroçevresi.	14
4.1: DEK proteininin domainleri.	17
6.1: <i>DEK1</i> ve <i>DEK2</i> mRNA'larının şematik olarak gösterimi.	38
6.2: 7 farklı hücre hattında <i>DEK1</i> , <i>DEK2</i> ve <i>GAPDH</i> ifadesinin RT-PCR yöntemi ile gösterimi.	39
6.3: RT-qPCR yöntemiyle 7 farklı hücre hattında <i>DEK1</i> ve <i>DEK2</i> ifadesinin analizi.	40
6.4: MIGR1 vektörünün haritası.	41
6.5: FACS ile hücre seçilimi sonrası GFP-pozitif hücrelerin analizi.	42
6.6: RT-qPCR sonucu ile edilen aşırı <i>DEK1</i> ve <i>DEK2</i> ifade eden hücrelerin kontrol grubu <i>DEK1</i> (endojen) seviyesine göre kat farkı.	43
6.7: Western blot yöntemi ile hücrelerin ektopik aşırı MycDEK1 ve MycDEK2 ifadesinin protein seviyesinde gösterimi.	43
6.8: İmmünofloresan yöntem kullanılarak HS-27A hücrelerinde ektopik DEK izoformlarının hücre içi lokalizasyonlarının gösterilmesi.	44

6.9:	HS-27A hücrelerinde immünofloresan yöntemle hem NPM1 hem de Myc antikorları ile çift boyama sonucunda, NPM1 ve DEK izoformlarının birlikte-lokalizasyonunun gösterilmesi.	45
6.10:	24 saat 0,05 μ M doxorubicin (doxo) uygulaması ile oluşturulmuş DNA hasarı sonrası, HS-27A hücrelerinde γ H2AX odak yoğunluğunun immünofloresan boyama ile belirlenmesi.	47
6.11:	DNA hasar seviyesinin 50 ila 100 arasında HS-27A hücrelerinin γ H2AX yoğunluğunun ortalamsını alınarak karşılaştırılması.	48
6.12:	HS-27A hücrelerinde 24 saat doxo uygulaması sonucunda oluşan DNA hasarına oranla, hasar tamirinin ortalama γ H2AX floresan yoğunluğu ile analizi.	49
6.13:	cDNA-doku panel örneklerinin RT-qPCR ile yöntemiyle yöntemiyle analizi.	51
6.14:	RT-qPCR ile yöntemiyle analiz edilen cDNA-doku panel örneklerinin tümör dokudaki ortalama kat farkı.	52

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa</u>
5.1: Hücre hatları.	21
5.2: Plazmitler.	21
5.3: Antikorlar.	21
5.4: Kimyasallar.	22
5.5: Kitler.	23
5.6: Sarf, plastik ve cam malzemeler.	23
5.7: Cihazlar.	24
5.8: İmmünofloresan boyamada kullanılan antikorlar ve kullanım oranları.	31
5.9: SDS PAGE için kullanılan poliakrilamid jel içeriği ve miktarları.	34
6.1: Ektopik DEK izoformlarının hücresel lokalizasyonları.	46

1. GİRİŞ

Günümüzde DNA üzerinde hasar oluşturan ve birçok farklı kaynaktan gelen faktöre maruz kalmaktayız. DNA hasarına ultraviyole ışınma, kimyasal ve radyoaktif ajanlar gibi çevresel faktörlerin yanı sıra hücrel streste sebep olabilmektedir [Chatterjee and Walker, 2017]. Buna karşın, hücre karşılaştığı DNA hasarını kontrol altında tutmada oldukça başarılıdır. Genomu karalı halde tutmak için çeşitli DNA hasar cevapları geliştirmiştir. Bu süreç hasarın tamirine yönelik ilgili tamir mekanizmasının başlamasına sebep olurken, hücre döngüsü gibi bir dizi hücre içi düzenlemeyi de içermektedir. Hasarın boyutuna göre hücrenin hasara karşı cevabı bazen hücrenin kontrollü ölümüne öncülük etmektedir [Jackson and Bartek, 2009].

DEK geni ilk defa akut miyeloid lösemi (AML) hastalarında 6. ve 9. kromozomları arasında meydana gelen t(6;9) translokasyonu sonucunda oluşan DEK-NUP124 (CAN) füzyon partneri olarak keşfedilmiştir [von Lindern et al., 1992]. *DEK*, kromatin yeniden düzenleme, histon modifikasyonu, hücre proliferasyonu ve farklılaşması, DNA tamiri, RNA kırılması (splicing) gibi birçok hücrel süreçle ilişkilendirilmiştir [Riveiro-Falkenbach and Soengas, 2010], [Privette Vinnedge et al., 2013]. *DEK* proteininin bilinen iki izoformu bulunmaktadır. *DEK* geni tarafından kodlanan tüm aminoasitleri içeren (full length) ve 375 amino asit uzunluğunda olan izoform (*DEK* isoform-1; *DEK1*) *DEK* olarak tanımlanmıştır ve literatürde ağırlıklı olarak bu izoform araştırılmıştır. Öte yandan, *DEK* izoform-2 (*DEK2*) proteininin yukarıda bahsedilen hücrel süreçlerde *DEK1*'e benzer fonksiyon gösterip göstermediği araştırılmamıştır.

Yapılan çalışmalarda *DEK* proteininin çift iplikli DNA kırıklarının tamirinde fonksiyon gösterdiği bulunmuştur [Smith et al., 2017]. Ayrıca bir onkogen olan *DEK*'in farklı tümörlerdeki aşırı ifadesi tümör oluşumu ile ilişkilendirilmiştir [Teng et al., 2018], [Riveiro-Falkenbach and Soengas, 2010]. Bu tez çalışmasında, *DEK1* ve *DEK2* izoformlarının ifadesi ve fonksiyonları karşılaştırılmıştır. Her iki izoformun hücredeki lokalizasyonlarının farklılık gösterdiği; mRNA seviyelerinin hücre hatlarında, sağlıklı dokularda ve tümörlü dokularda benzer olmadığı; doxorubicin ile oluşturulmuş çift iplikli DNA kırığı sinyalinin *DEK2*'yi aşırı ifade eden hücrelerde daha uzun süre kaldığı tespit edilmiştir.

2. DNA HASARI

DNA her hücrede bulunan kalıtsal materyaldir. Çift iplikli yapısı ile oldukça dayanıklıdır. Fakat DNA çevresel ve hücrel koşullara maruz kalmaktadır. Buna rağmen hücre DNA stabilizesini korumakta oldukça başarılıdır. DNA üzerinde oluşacak herhangi bir hata hücre için hayati bir önem taşımaktadır. Dolayısıyla DNA bütünlüğünü korumak hücrenin sağ kalımı ile doğru orantılıdır. DNA hasarının tespiti ve onarımı için hücrede birçok mekanizma rol almaktadır.

DNA hasarı hücre içi ve hücre dışından gelen faktörlerle oluşabilir. Örneğin hücrenin yaşamsal döngüsünün vazgeçilmez bir adımı olan DNA replikasyonu sırasında topoizomeraaz aktivitesinin bir sonucu olarak DNA hasarı oluşabilir [Chatterjee and Walker, 2017]. Ayrıca hücrenin maruz kaldığı bazı kimyasallar, DNA yapısına etki ederek ağır hasarlara sebep olabilir. Bu gibi durumlarda hücre, DNA hasarının etkilerini azaltmak ve ölümcül sonuçlarından kaçınmak için hücre döngüsü, DNA hasarı tamiri ve hücre ölümü gibi yolları aktive ederek hızla cevap oluşturur [Jackson and Bartek, 2009].

DNA hasarları, tek bir bazda, bir DNA bölgesinde veya DNA ipliklerinin bütünlüğünü kaybetmesi şeklinde çeşitlenmektedir. Hasar sonrası DNA tamir mekanizmaları devreye girerek hasarın düzeltilmesi hedeflenir. Hasar olduğu zaman DNA kararlılığını korumak için farklı DNA hasar cevabı (DHC) oluşmaktadır. DHC hasar tespitinin hemen ardından hücre döngüsü, metabolizma kontrolü, kromatin düzenlenmesi ve apoptoz gibi birçok mekanizmanın düzenlenmesinde önemli rol oynar [Pilie et al., 2019].

Çift iplik kırığı ile oluşan DNA hasarları diğer hasar türlerine nazaran biraz daha karmaşıktır. Hücre için daha ölümcüldür ve hızla düzeltilmeleri gerekmektedir. Hasar oluşuktan sonra DNA tamirinin iki yolu vardır. Hasar ya homolog olmayan uç birleşmesi (Non-homologous end joining; NHEJ) ile kırılmış iki uc doğruluk gözlenmeksizin birleştirilerek onarılır ya da homolog rekombinasyon (HR) ile kırık bölgesinin kardeş kromatitdeki homologundan faydalanılarak yüksek doğrulukla tamir edilir [Chatterjee and Walker, 2017].

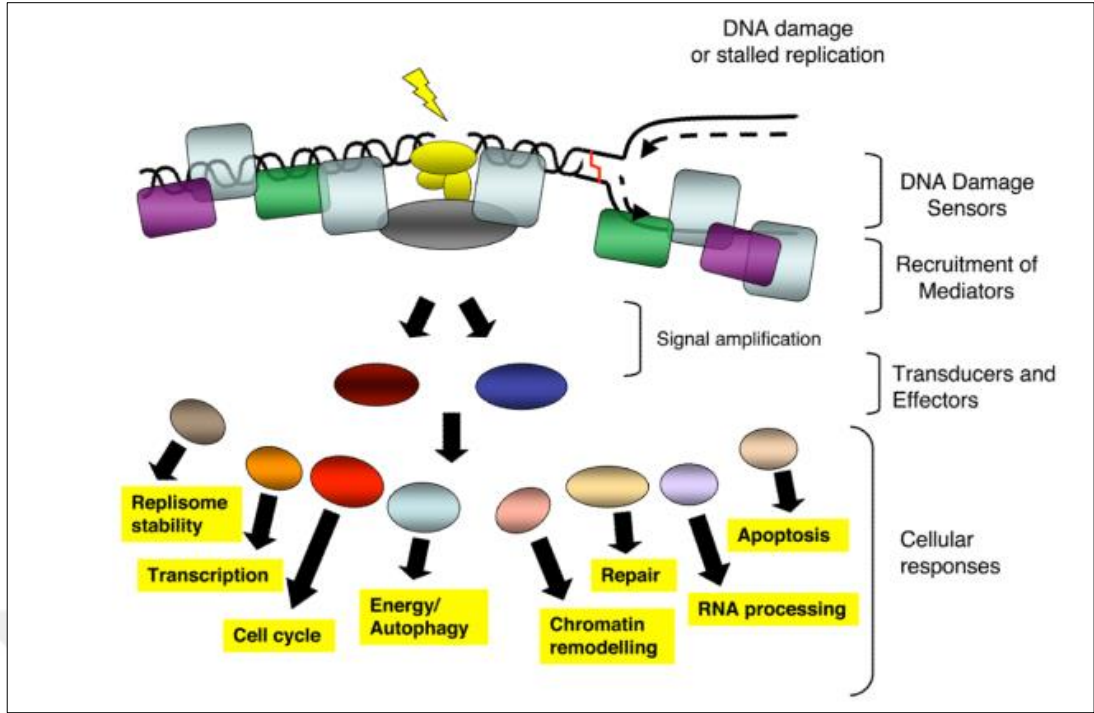
Hücre her zaman DHC'yi başarılı bir şekilde yönetemeyebilir. Bu durum genellikle kanser başta olmak üzere birçok hastalığa yol açabilen, genomik kararlılığı sağlayan yolların etkin çalışmaması ile ilişkilendirilmektedir. Birçok kanserde

DNA onarımı, DNA hasar toleransı ve DHC yolları bozulur. Bu da genomik kararsızlığa sebep olarak kanser gelişimini desteklemektedir [Bouwman and Jonkers, 2012], [Ghosal and Chen, 2013], [Wolters and Schumacher, 2013].

Hücredeki endojen kaynaklı hasarların birçoğu hücresel süreçler sırasında meydana gelir. Hücre metabolizması ile meydana gelen reaktif oksijen türevleri (ROS) ve reaktif azot türevleri (RNS) hücrede meydana getirdiği oksidatif stres sonucunda DNA'da tek veya çift zincir kırığına sebep olabilir. Eksojen kaynaklı hasarlar ise (birçok çevresel kaynaktan maruz kalınan, iyonlaştırıcı radyasyonlar (X ışınları), kozmik radyasyon, mutajenik kimyasallar ve ultraviyole (UV) gibi faktörler) DNA kırığı veya baz eşleşme hatalarına sebep olmaktadır [Chatterjee and Walker, 2017], [Jackson and Bartek, 2009]. Hücrenin çoğunlukla maruz kaldığı hasar tek zincirli DNA kırığıdır. Bu durum çift iplik kırığı ile karşılaştırıldığında daha az zararlı olsa da çoğunlukla bu hasar çift iplik kırığına dönüşebilmektedir [Tubbs and Nussenzweig, 2017].

2.1. Hücrede DNA Hasar Cevabı (DHC) Mekanizmaları

DNA hasarı hücre için olumsuz ve toksik bir etki oluşturmaktadır. Hasarın varlığının tespit etmek ve bu hasara yanıt verebilmek için hücreler çeşitli mekanizmalar geliştirmiştir. Hasar tespiti sonucu, kromatin yeniden düzenleme, DNA tamiri, hücre döngüsünün düzenlenmesi, apoptoz, transkripsiyon gibi hücresel cevapların biri veya daha fazlası oluşabilir [Pilie et al., 2019]. Şekil 2.1'de DNA hasarına karşı verilen DNA hasar cevapları modellenmiştir [Jackson and Bartek, 2009].



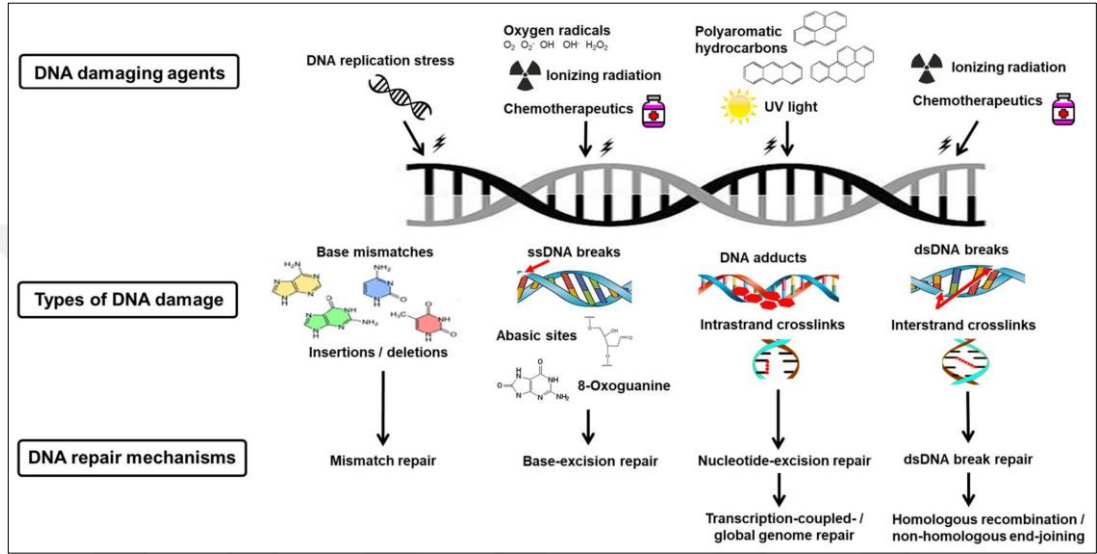
Şekil 2.1: DNA hasarı sonrası uyarılan hücresel mekanizmalar.

2.1.1. Hücre Döngüsünün Kontrolü

DNA hasarı oluşması hücre döngüsünün düzenlenmesini gerektirmektedir. Hasarın hücre tarafından tanımlanması hücre döngüsünün kontrol noktalarında aktivasyon ile sonuçlanmaktadır. Özellikle fazlasıyla DNA çift iplik kırığı oluştuğunda hasarın tamir edilebilmesi için hücre döngüsünün durdurulması veya yavaşlatılması hayati önem taşımaktadır [Gomez and Hergovich, 2016].

DHC olarak üç farklı hücre döngüsü kontrol noktası hedef alınır. Bunlar G1/S, intra-S fazı ve G2/M kontrol noktalarıdır. ATM (ataxia telangiectasia–mutated kinase) ve ATR (Ataxia telangiectasia and Rad3 related), DNA hasarı yanıtının ana sensör kinazlarındandır. DNA hasarı tamiri için yolları başlatmada öncülük etmenin yanı sıra, hücre döngüsünü kontrol altına almak için önemli rol oynarlar. ATM-CHK2 yolağı çift iplik kırığı DNA hasarının kontrolü, ATR/CHK1 yolağı ise durmuş replikasyon çatalları (stalled replication forks), hantal DNA eklentili (bulky DNA base adducts) hasarlarda, hücre döngüsünün kontrol noktalarını aktive eder. Kısaca, DNA hasarına takiben, ATM/ATR hücre döngüsünü durdurmak için bir dizi fosforilasyonu başlatır. Ayrıca bu fosforilasyon yolağında p53 tümör baskılayıcı proteininin aktivasyonu gerçekleşir ve hücre döngüsünün kontrolüne aracılık eder.

DNA hasarının tamiri için hasarın türüne göre onarım mekanizması değişiklik gösterebilmektedir. DNA üzerinde radyoaktif ışımlar, ultraviyole ışınlar, replikasyon hataları, stres veya reaktif oksijen türevlerinin (ROS) birikmesi gibi nedenler çeşitli DNA hasarlarını meydana getirmektedir [Chatterjee and Walker, 2017]. Şekil 2.3'te farklı DNA hasarlarında hücrenin kullandığı hasar tamir mekanizmaları gösterilmiştir [Helena et al., 2018].



Şekil 2.3: Farklı kaynaklı DNA hasar ajanlarının oluşturduğu DNA hasar türleri ve hasar sonrası devreye giren ilgili DNA tamir mekanizmalarının özet olarak gösterimi.

2.1.2.1. Nükleotid Eksizyon Onarımı (NER)

DNA üzerinde ultraviyole ışınları veya ROS gibi etkenler tarafından hacimli (bulky) yapılar oluşmaktadır. Bu tür hasarın onarımı, o bölgedeki bir kısım birikmiş nükleotidin bölgeden uzaklaştırılması prensibine dayanmaktadır. Hasar tamiri sürecinde ilk olarak hasarlı bölge tanınır ve hasarlı bölge kesilerek çıkartılır. Sonrasında ise çıkartılan bölge polimeraz aktivitesi ile yeniden sentezlenir. Sentezlenen DNA parçası ana DNA'ya ligaz aktivitesi ile bağlanır. Böylece hasarlı DNA tamiri gerçekleşmiş olur [Gomez and Hergovich, 2016],[Iyama and Wilson, 2013].

2.1.2.2. Baz Eksizyon Onarımı (BER)

DNA'daki baz hatalarının, abazik bölgelerin ve tek iplik kırıklarının onarım mekanizmasıdır. Tek iplik kırıkları poli-ADP-riboz (PAR) zincirlerinin oluşumunu katalize eden PARP1 tarafından tespit edilir. Hasarlı bölgedeki baz, DNA glikosilazları tarafından kesilir ve ardından polimeraz β ile kesilen bölge sentezlenir. XRCC1- ligaz III aktivesi ile de DNA ipliği üzerinde oluşan çentik birleştirilir [Gomez and Hergovich, 2016],[Iyama and Wilson, 2013].

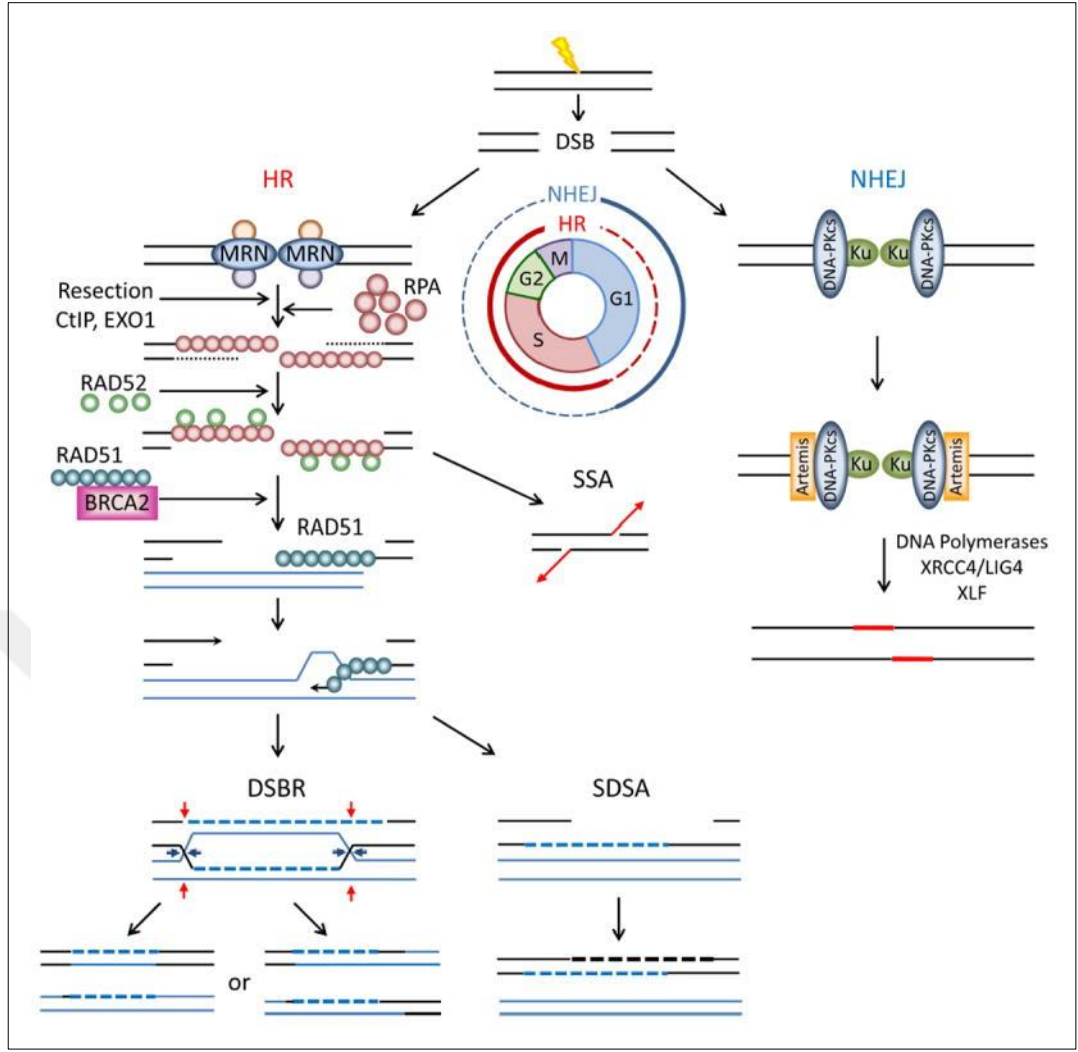
2.1.2.3. Hatalı Eşleşme Tamiri

Hatalı eşleşmiş bir baza sahip olan DNA'nın tamiri hatalı eşleşme tamir (Mismatch Repair; MMR) mekanizması ile sağlanır. Hata MSH2 içeren kompleksler tarafından tanınır. MLH1/3 ve PMS1/2 kompleksleri tanımlanan bölgeye gelerek tamir için uygun ortam hazırlarlar. PMS2 ve MLH3 endonükleaz aktivitesi ile hasarlı bölgede kesik oluşturulur. Kesik bölgesi eksonükleaz Exo1 tarafından açılır ve DNA polimeraz δ ile yeniden sentezlenir. Ligaz I ile DNA ipliği üzerinde kalan çentikler birleştirilerek hasar tamir edilir [Gomez and Hergovich, 2016],[Iyama and Wilson, 2013].

2.1.2.4. DNA Çift İplik Kırığı Tamiri

Hasar bölgesinde DNA iki ipliğinden kırılarak, DNA bütünlüğünü kaybetmektedir. Bu durumda iki serbest DNA ucu oluşur. Hücreler, bu tip sorunla başa çıkmak için 2 ayrı hasar tamir mekanizmasına sahiptir. Bunlardan biri, kırık uçların hızla Ku70/Ku80 heterodimeri korunarak DNA-PK aktifleşmesi sonucunda homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ) tamiridir [Fattah et al., 2010]. Diğeri ise ATM veya ATR tarafından kırığın olduğu bölgenin işaretlenerek koruma altına alındığı ve kardeş kromatitdeki homolog DNA bölgesinin referans olarak kullanıldığı homolog rekombinasyon (HR) tamiridir [Goodarzi and Jeggo, 2013],[Gomez and Hergovich, 2016],[Iyama and Wilson, 2013]. Şekil 2.4'de tamir mekanizmalarının akışı şematik olarak gösterilmiştir [Iyama and Wilson, 2013].

Homolog rekombinasyon, yüksek doğrulukta DNA tamirini sağlamaktadır ve sadece kardeş kromatidin erişilebilir olduğu S ve G2 fazında gerçekleşir [Goodarzi and Jeggo, 2013]. DNA kırığının olduğu bölgede, histon varyantı olan H2AX hızla ATM veya ATR tarafından fosforillenir ve γ H2AX olarak isimlendirilen fosforlanmış H2AX homolog rekombinasyon ile DNA tamiri başlaması için sinyal oluşturur. Bu sinyal ile kırık DNA bölgesini saran CtIP-MRN kompleksi (MRE11-RAD50-NBS1), DNA uçlarına tutunarak, DNA'nın 5' ucundan nükleotit çıkarımını başlatır. Ardından Exo1 ekzonükleaz tarafından DNA'nın bir ipliğinin kırpılması devam eder. Tek iplik olarak kalan DNA (ssDNA) hızla sindirilmemesi için RPA proteinleri ile sarılarak korumaya alınır. BRCA2 proteininin aracılık etmesi ile RPA kaplı ssDNA'da RPA proteini, invazyonu için gerekli RAD51 ile değiştirilir. Kardeş kromatitden gelen homolog bölge açılarak, RAD51 ile kaplı hasarlı DNA ile eşleştirilir. Sonrasında homolog olan bu ssDNA kalıp olarak kullanılarak, hasarlı DNA'nın eksik kısmı tamamlanır. Böylece, hasarlı DNA bölgesi tamamlanır ve yüksek doğrulukla hasar tamir edilmiş olur [Scully et al., 2019],[Goodarzi and Jeggo, 2013],[Mimitou and Symington, 2008].



Şekil 2.4: Çift iplik kırığı tamirinde hücre döngüsünün bulunduğu fazına göre homolog rekombinasyon (HR) ve homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ) tamirinin şematik olarak gösterimi.

2.2. γ H2AX ve Düzenlenmesi

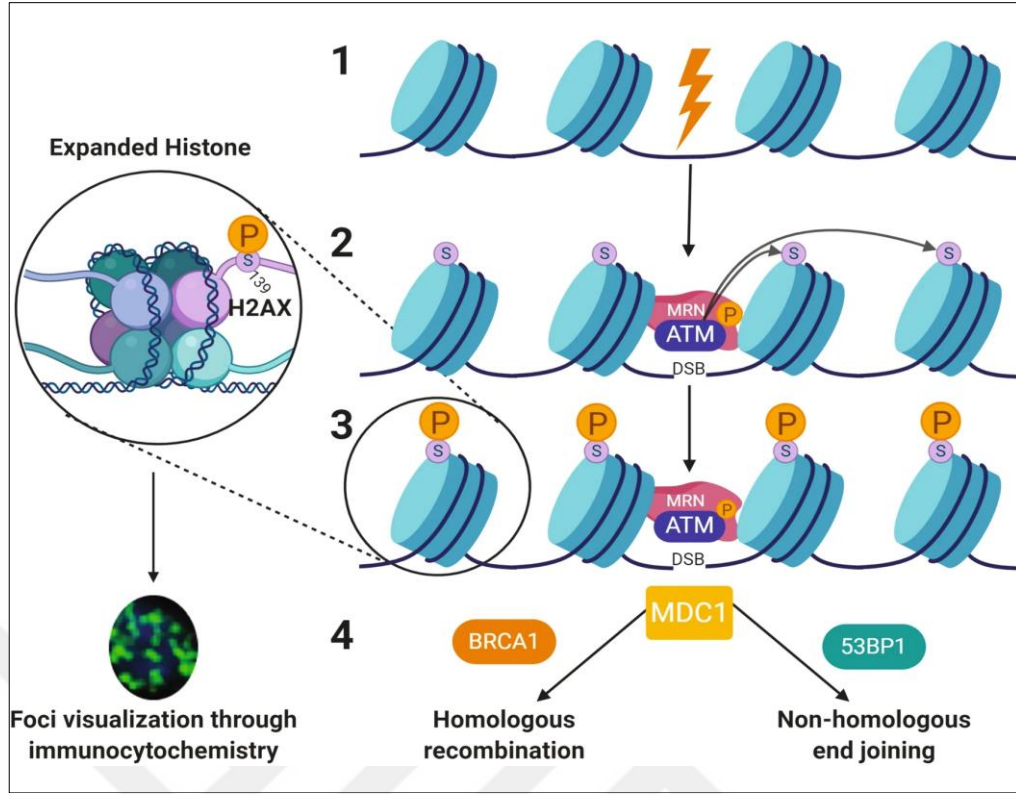
Hücrelerin DNA hasarına karşı hızlı bir cevabı olarak histon modifikasyonları yer almaktadır. Histon proteinlerinden H2A varyantı olan H2AX, DNA kırığı hasarında fosforile edilerek olarak hasar cevabına öncülük etmektedir. Kromatin üzerinde H2A histon proteinlerinin yaklaşık %2-25'ini oluşturmaktadır [Rogakou et al., 1998].

DNA'da çift iplik kırılması gerçekleştiğinde, H2AX'in serin 139. amino asidinin (Ser 139) fosforilasyonu, kromatin üzerinde gamma-H2AX (γ H2AX) odaklarını oluşturmaktadır. Her bir kırık bir γ H2AX odağını karşılık geldiğinden

hasar tespiti için tercih edilen güvenilir biyobelirteç olarak düşünülmektedir [Sedelnikova et al., 2002].

DNA kırığının oluşmasıyla, H2AX fosforilasyonuna, PIKK (phosphoinositide-3-kinase-related protein kinase) ailesinden olan ATM (ataxia telangiectasia–mutated kinase), ATR (Ataxia telangiectasia and Rad3 related) ve DNA-PKcs kinazları öncülük etmektedir. Ayrıca bu PIKK kinazları, birçok hücre sağ kalımı ve hücre ölümü gibi hücrel süreçleri aktive etmede görev almaktadırlar [Paull et al., 2000]. Benzer substrat ve fonksiyona sahip olsalar da, aktivasyonları temel olarak farklı koşullar altında gerçekleşmektedir. ATM, hücredeki normal fizyolojik koşullar altında gerçekleşmiş veya kızılötesi radyasyonu gibi doğrudan DNA kırığı oluşumlarında sorumlu ana kinaz olarak görev almaktadır. Fakat metabolik stres ile ilişkili birçok DNA kırığı hasarında ATR görev almaktadır. DNA-PKcs ise çok daha az sayıda fosforilasyondan görevliken genellikle homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ) tamirinde rol oynamaktadır [Mah et al., 2010], [Maréchal and Zou, 2013].

γ H2AX odakları DNA'nın erişilebilir kalması için önemli olan kromatin modifikasyonunu sağlamaktadır. Böylece DHC ve DNA onarım faktörlerinin hasar bölgesine ulaşımı için uygun ortamı oluşturmaktadır. Bu durum H2AX fosforilasyonuna bağlıdır ve nükleer odak oluşumu 53BP1, BRCA1, NBS1, RAD50 ve RAD51 gibi tamir ile ilişkili moleküllerin γ H2AX ile birlikte-lokalizasyonu (co-localization) ile desteklenmektedir. Ayrıca bu odaklar, kromatinin şekline hasar onarımı için destek vermiş olur. Her ne kadar bir γ H2AX odağı hasarın miktarı ile doğrudan ilişkili olsa da, diğer moleküllerin burada konumlanıp birikmesi aynı oranda gerçekleşmeyebilir [Mah et al., 2010]. Şekil 2.5'te γ H2AX odağı şematik olarak ifade edilmiştir [Noubissi et al., 2021].



Şekil 2.5: MRN kompleksi (MRE11-RAD50-NBS1) ile bir γ H2AX odağının yapısı.

Hasarın tamiri sonucunda γ H2AX miktarında azalma olmaktadır. Bu azalış bir çift iplik kırığının tamamen onarılmasının ne zaman tamamladığını göstermese de, hasar tamiri sonrası gerçekleşen bir sonuçtur [Mah et al., 2010]. Hasar onarımında Protein fosfataz 2A (PP2A) ve protein fosfataz 4C (PP4C) γ H2AX'i defosforile etmektedir [Mah et al., 2010], [Chowdhury et al., 2008], [Keogh et al., 2006].

γ H2AX oranının azalışı her zaman DNA hasar tamirden sonra aynı şekilde olmayabilir. DNA hasarının şiddeti ile doğru orantılı artan γ H2AX miktarı, yüksek dozda hasara maruz kalmış hücrede, hasar sonrası büyük ölçüde aynı kalmaktadır. Fakat hasar tamiri sonucunda total γ H2AX miktarı çok değişmese bile, γ H2AX odaklarında belirgin azalma gerçekleşmektedir. Bu da γ H2AX kaybının öncelikli olarak DNA kırığının olduğu bölgelerde gerçekleştiğini düşündürmektedir [Mah et al., 2010], [Bouquet et al., 2006].

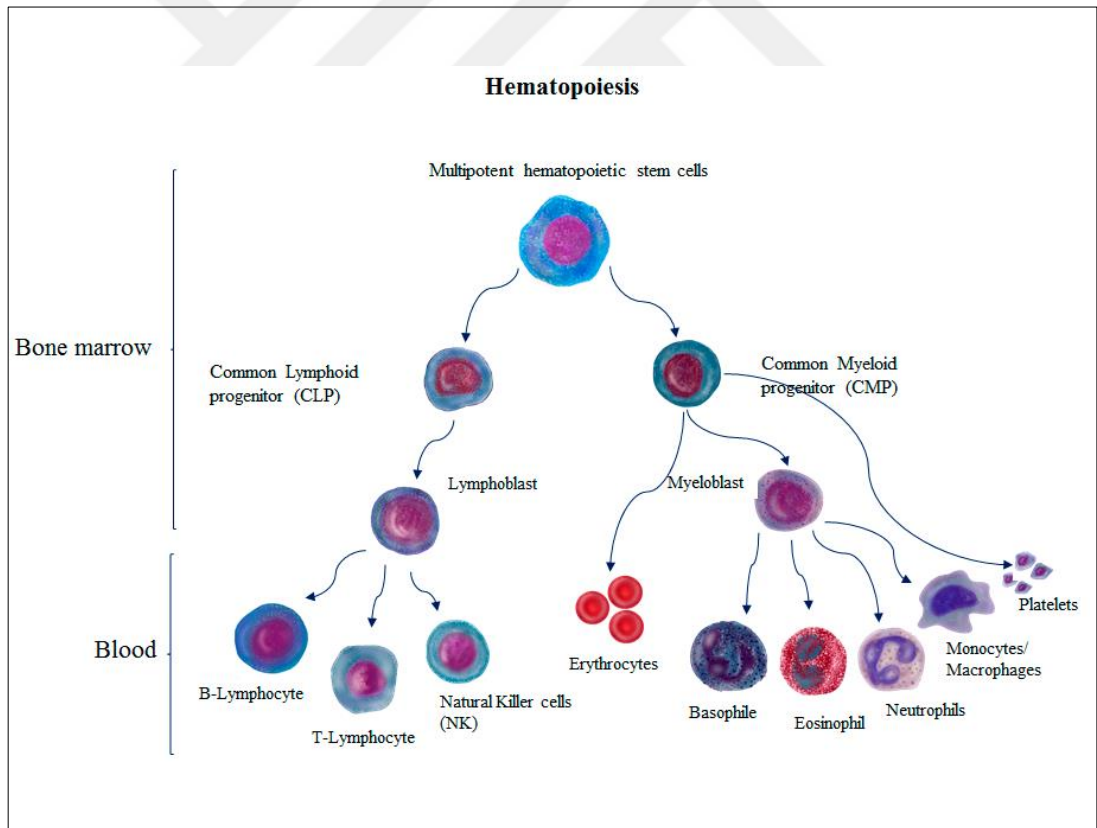
Kanser tedavisinde kullanılan replikasyon inhibitörleri, çapraz bağlama ajanları ve topoizomeraz inhibitörleri gibi bazı ilaçlar replikasyon ve transkripsiyonel stres ile DNA'da çift iplik kırığına sebep olabilirler. Kamptotesin dahil olmak üzere DNA topoizomeraz I inhibitörleri, ağırlıklı olarak S-faz hücrelerinde H2AX

fosforilasyonunu tetiklerken, doxorubicin, etoposid ve mitoksantron gibi DNA topoizomera II inhibitörleri, hücre döngüsünün tüm fazlarında, özellikle G1 sırasında γ H2AX üretir. Bu tarz ajanlar tarafından oluşturulan DNA kırıkları doğrudan olmayan hücre stresine dayalı H2AX fosforilasyonu, ATR ve DNA-PKcs'lere üzerinden gerçekleşir [Mah et al., 2010], [Podhorecka et al., 2010].



3. HEMATOPOEZ

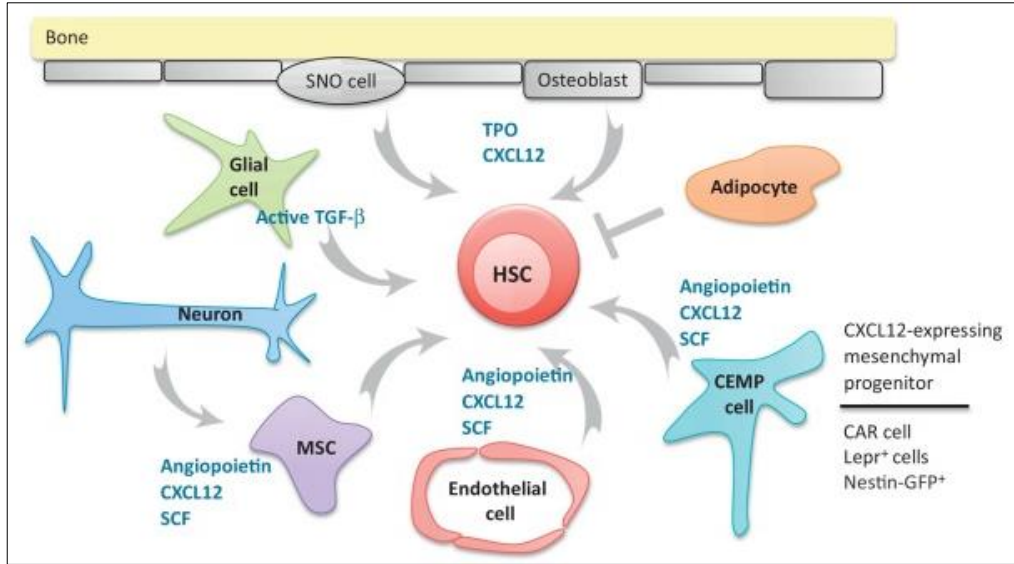
Hematopoietik kök hücre (HKH), kendini sürekli yenileme kabiliyetine sahip ve tüm kan hücre tiplerine farklılaşabilen hücrelerdir. HKH çoğalma ve farklılaşması sonucunda lenfoid, miyeloid ve eritroid serideki kan hücreleri oluşur. Vücudumuzda günde yaklaşık bir trilyon kan hücresi üretilir. Bu hücreler miyeloid kökenli megakaryositler, eritrositler, mast hücreleri, granülositler (bazofiller, nötrofiller, eozinofiller) ve monosit/makrofaj hücrelerini; lenfoid kökenli T ve B lenfositlerinin yanı sıra doğal öldürücü hücreleri, dendritik hücreler ve plazma hücrelerini içerir. Bu hücrelerin üretimi fetal gelişimin erken döneminde karaciğer ve dalakta gerçekleşirken, insanlarda gelişimin beşinci haftasından sonra bu görevi sadece kemik iliği üstlenir [Hoffman and Marcellino, 2020]. Şekil 3.1’de hematopoietik kök hücre gelişimi şematik olarak gösterilmiştir [Alomari et al., 2019].



Şekil 3.1: Hematopoietik hücre gelişimi.

3.1. Kemik İliği Mikroçevresi

Kemik iliği, HKH'lerin yerleşim merkezini oluşturmaktadır. HKH'ler tek başında kemik iliğini oluşturmazlar ve gelişimlerine destek olan bir kemik iliği mikroçevresi (nich) içinde bulunurlar. Bu mikroçevre, HKH'lere eşlik eden çeşitli hücre gruplarından oluşur. Bu birlikte yaşam HKH'ler için oldukça önem taşımaktadır. Ayrıca bu mikro çevre yeterli sayıda kök hücrenin çoğalması ve farklılaşması için gerekli sinyalleri oluşturmaktan da sorumludur. Mikroçevreyi oluşturan çeşitli hücreler (osteolineage hücreleri, endotelial hücreler, mezenkimal hücreler ve stromal hücreler) tarafından ifade edilen stromal hücre-kaynaklı faktör 1'i (stromal cell-derived factor 1; CXCL12) kontrollü şekilde çevreye sunarlar. CXCL12, HKH'lerde ifade edilen CXC kemokin reseptörü 4 (CXCR4) aktivasyonunu sağlayarak, hücre göçünü sağlayan fosfatidil-3-kinaz (PI3K), fosfolipaz C ve mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) dahil çeşitli sinyal yollarını aktive etmektedir [Perry and Li, 2007], [Anthony and Link, 2014],[Hoffman and Marcellino, 2020], [Janssens et al., 2018]. Şekil 3.2'de kemik iliği mikro çevresi şematik olarak ifade edilmiştir [Anthony and Link, 2014].



Şekil 3.2: Hematopoetik kök hücre gelişimine destek sağlayan kemik iliği mikroçevresi.

3.2. Mezenkimal Kök Hücreler

Kemik iliği stromasında bulunan mezenkimal kök hücreler, bağ dokuda bulunan yağ, kemik, kıkırdak, kas gibi hücrelere farklılaşabilen kök hücrelerdir. Kemik iliğinde hematopoetik olmayan çeşitli hücrelere farklılaşıp, hematopoetik kök hücreler ve hematopoez için yardımcı rol oynayan stromal hücreler arasında yer almaktadırlar. Bu hücreler immünolojik olmayan, MHC II^{negatif}, CD40^{negatif}, CD80^{negatif}, CD86^{negatif} hücrelerdir. Ayrıca hematopoetik olmayan bu hücreler CD34, CD45 ve CD14 gibi hematopoetik belirteçler bakımından negatiftir [Hoffman and Marcellino, 2020], [Via et al., 2012].



4. DEK PROTEİNİ

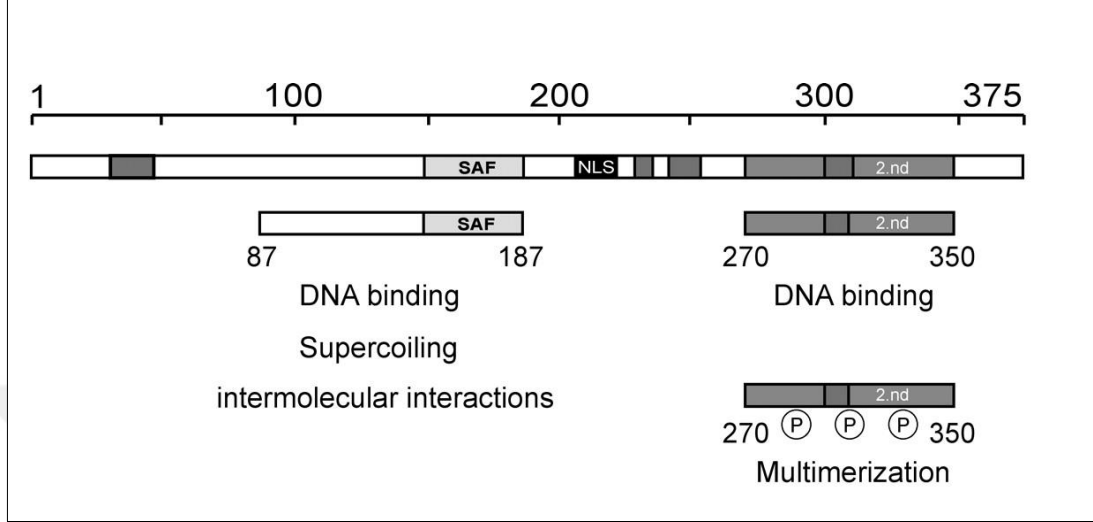
DEK 6p22.3 kromozom bölgesinde yerleşim gösteren, 375 aminoasitlik bir protein kodlamaktadır. 43 kDa kütleyle sahip *DEK* proteini, SAP bölgesi, C-Terminalinde bulunan DNA'ya bağlanma ve multimerizasyon bölgelerine sahiptir. Ayrıca nükleer yerleşim sinyali (nuclear localization signal; NLS) sahip olan *DEK* genellikle hücre çekirdeğinde bulunmaktadır [Kappes et al., 2004a], [Waldmann et al., 2003]. *DEK*'in fonksiyonel bölgeleri Şekil 4.1'de şematik olarak gösterilmiştir [Bohm et al., 2005].

DEK ilk olarak 6. ve 9. kromozomları arası t(6;9) translokasyonu sonucunda NUP124 (CAN) ile oluşturduğu anormal *DEK-CAN* füzyonunun partneri olarak akut miyeloid lösemi (AML) hastalarında tanımlanmıştır [von Lindern et al., 1992]. Daha sonra yapılan çalışmalar, deri, karaciğer, meme, over, beyin, mesane, kolon gibi farklı tümörlerde *DEK* geninin aşırı ifade edildiğini göstermiştir [Carro et al., 2006], [Han et al., 2009], [Kappes et al., 2011], [Kondoh et al., 1999], [Kroes et al., 2000], [Orlic et al., 2006], [Sanchez-Carbajo et al., 2003].

DEK geninin transkripsiyonal olarak düzenlenmesi kendi promotor bölgesindeki 170 ve 135 pozisyonlarda sırasıyla NF-Y ve YY1 faktörleri tarafından gerçekleştirilmektedir [Sitwala et al., 2002]. Ayrıca human papillomavirus (HPV)-pozitif kanser hücrelerinde Retinoblastoma (Rb) proteinini negatif olarak düzenleyen E7 onkogeninin *DEK* transkripsiyonunu arttırdığı bilinmektedir [Wise-Draper et al., 2005]. Carro ve arkadaşlarının yaptığı bir diğer çalışmada, ise *DEK* geninin transkripsiyon başlama bölgesinde E2F bağlanma bölgesi olduğu ve CDC6 ve CDC25A bölgesine spesifik bağlanma gösteren E2F3 transkripsiyon faktörünün *DEK* promotoruna bağlandığı gösterilmiştir. Dolayısıyla, Rb tarafından negatif olarak düzenlenen E2F faktörü direk olarak *DEK* ifadesini düzenlemektedir [Carro et al., 2006].

Yapısal olarak *DEK*, 4 ayrı uzun aspartik/glutamik asit dizisi bulundurmasına rağmen bazik (pI=8.69) bir proteindir. *DEK* DNA'da helix-turn-helix motifine bağlanmayı sağlayan korunmuş Sap/Actinus/PARP-box (SAP-kutusu) bölgesi taşımaktadır. Bir diğer DNA bağlanma bölgesi ise C-terminal bölgesinde bulunmaktadır [Kappes et al., 2004b]. *DEK*'in ayrıca, supercoiled ve 4 yollu DNA şeklindeki (cruciform) kromatin bölgelerine yapı-spesifik olarak bağlandığı

gösterilmiştir [Waldmann et al., 2003]. Ayrıca supercoiled DNA'ya DEK bağlanması, pozitif supercoiled topolojisinde değişime neden olmaktadır [Waldmann et al., 2002].



Şekil 4.1: DEK proteininin domainleri.

4.1. DEK Proteinin Fonksiyonları

DEK, SAP motifi ile DNA'ya bağlanabilen ve bunun yanında birçok farklı hücresel sürecin düzenlenmesinde fonksiyon gösteren bir proteindir. Kromatin düzenlemesi, histon modifikasyonu, hücre proliferasyonu, farklılaşması, DNA tamiri, RNA kırılımı gibi mekanizmalar DEK proteininin dahil olduğu bazı hücresel süreçlerdir [Capitano and Broxmeyer, 2017], [Riveiro-Falkenbach and Soengas, 2010], [Privette Vinnedge et al., 2013].

DEK proteini kromatin yapısına katılan non-histon bir proteindir ve histon modifikasyonunda rol almaktadır. Heterokromatin bütünlüğünde önemli rol oynayan DEK, bu görevi H3K9'u 3 kez metilleyen KMT1 A/B enzimini pozitif olarak desteleyerek ve böylece H3K9me3 post-translasyonel modifikasyonun gerçekleşmesinde rol oynayarak sağlar [Kappes et al., 2011], [Maison and Almouzni, 2004]. Ayrıca DEK ifadesinin susturulması H3K9me3 modifikasyonunda önemli ölçüde azalmaya sebep olmaktadır. Bu durum, heterokromatin bütünlüğünün sağlanmasında DEK ifadesinin önemli yere sahip olduğunu göstermektedir [Kappes et al., 2011], [Saha et al., 2013].

DEK proteininin fonksiyonu post-translasyonel modifikasyonlara bağı olarak farklılık göstermektedir. DEK'in fosforilasyonu casein kinase 2 (CK2) tarafından düzenlenir. CK2 ile fosforilasyonu DEK'in histon etkileşimini ve DNA'ya bağlanma eğilimini azaltır [Sawatsubashi et al., 2010], [Kappes et al., 2004a]. Ayrıca fosforlanmamış DEK dimer oluşturur ve kromatine bağı kalır [Sawatsubashi et al., 2010]. DEK'in poly(ADP-ribosyl)asyonu Poly(ADP-ribose) polimeraz (PARP)1 tarafından gerçekleşir. Bu modifikasyon ise DEK'in kromatinden ayrılması ve apoptoz sırasında birikimi ile ilişkilendirilir, [Gamble and Fisher, 2007], [Kappes et al., 2008]. DEK asetilasyonu ise DNA bağlanma etkinliğini azaltmakla birlikte mRNA'dan intronların ayrılma mekanizmasında yer almasını sağlamaktadır [Cleary et al., 2005], [Soares et al., 2006].

DEK'in aynı zamanda makrofajlar tarafından hücre dışına salındığı bilinmektedir. Salınım yapan hücrelerde CK2 ile fosforlanan ve PARP1 ile poli(ADP-ribosil)lenen DEK, DNA bağlanma etkinliğinde azalma göstererek kromatinden ayrılır. Apoptoza uğrayan hücrelerde poli(ADP-ribosil)e uğrayan DEK pasif olarak hücre dışına salınır [Kappes et al., 2004a], [Kappes et al., 2008]. Aktif salınımı ise interleukin (IL)-8 ile uyarılmış makrofajlar tarafından golgi aygıtından bağımsız olarak hem direkt olarak hem de ekzozom içinde gerçekleşmektedir. Makrofajlar tarafından hücre dışına salınan DEK, nötrofillerin, CD8⁺ T lenfositlerin ve NK hücrelerinin hedef konuma göçünü sağlayan bir kemoatraktan olarak fonksiyon görmektedir [Mor-Vaknin et al., 2006].

Ayrıca Saha ve arkadaşları yaptıkları in vitro çalışmalarda, hücre dışına salınan DEK'in komşu hücreler tarafından hücre içine alındığını göstermişlerdir. Doğal olarak pozitif yüklü (78-222 aminoasitleri arası) DEK'in, hücre içine alınırken negatif yüklü heparan sulfate-type proteoglycans (HSPGs) membran proteinleri ile etkileşerek aktif olarak endositoza uğradığı rapor edilmiştir [Saha et al., 2013].

4.2. DEK ve DNA Hasar Cevabı

Çift iplikli DNA kırığı oluştuğunda, çift iplik DNA hasar sensörü olan ataxia telangiectasia mutated (ATM) kinaz fosforillenerek (pATM) aktifleşmektedir. Aktif formda olan pATM tarafından fosforillenen H2AX (γ H2AX) ile DNA hasar odakları oluşmakta ve hasar onarım mekanizmaları başlatılmaktadır [Stucki et al., 2005],

[Bakkenist and Kastan, 2003]. DNA kırığı oluştuğu zaman DEK'ten yoksun hücrelerde, pATM seviyesi güçlü bir şekilde artsa dahi γ H2AX seviyesinde belirgin bir artış gözlenmemektedir. Bu durum, DHC olarak γ H2AX seviyesini etkilediği için DEK efektif bir γ H2AX odak oluşumuna aracılık ettiği düşünülmektedir [Smith et al., 2017].

DNA hasar onarımı için ihtiyaç duyulan BRCA1, CtIP ve MRN kompleksi γ H2AX aktivasyonunu pozitif olarak desteklemektedir. Bu faktörler öncelikle kırık bölgesinde MRN kompleksinde yer alan nükleaz aktivitesi ile tek iplikli 3' DNA kuyruğu oluşturulur. RPA ile korunan bu tek iplikli DNA kuyruğu RAD51 flamentleri ile kaplanarak homolog rekombinasyonda iplik invazyonuna hazırlanır [Ceccaldi et al., 2016]. Yapılan çalışmalar homolog rekombinasyon tabanlı DNA onarımında DEK'in, RPA ile korunmuş 3' DNA kuyruğuna RAD51 yüklenmesinde doğrudan veya dolaylı bir rol oynadığını göstermektedir. Çünkü DEK'ten yoksun hücrelerde RAD51 yüklenmesi gecikmeli olarak tamamlanabilmektedir [Smith et al., 2017]. Ayrıca bu hücreler ile yapılan birlikte-immünöktürme (co-immunoprecipitation; co-IP) deneylerinde, RAD51 ile DEK'in direk olarak bağlandıkları gösterilmiştir. BRCA1 ile ise aynı direkt etkileşim söz konusu değildir [Smith et al., 2017].

Ayrıca çift iplik DNA kırığı onarımının bir başka önemli yolu olan homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ)'de optimal DNA-PK kinaz aktivitesi için DEK'in gerekli olduğu, DEK'ten yoksun hücrelerde ise NHEJ yolunun baskılandığı bildirilmektedir [Kavanaugh et al., 2011].

4.3. DEK İzoformları

Alternatif kırılma sonucunda DEK proteinin iki izoformu oluşmaktadır. Genel olarak DEK proteini olarak adlandırılan *DEK* geninin tüm ekzonlarının ifade edildiği izoformu 375 aminoasit uzunluğundadır (DEK isoform-1; DEK1; Ensembl transcript ID: ENST00000652689.1) [Web 1, 2022]. DEK izoform-2 (DEK2) proteini ise 341 aminoasit uzunluğundadır ve N-terminal bölgesindeki 3. ekzonun tamamını (49-82. aminoasitleri) içermemektedir (Ensembl transcript ID: ENST00000244776.11) [Web 1, 2022]. DEK'le ilgili olarak izoform ayırt etmeksizin yapılan çalışmalar tam uzunluktaki ve baskın olarak ifade edilen DEK1 proteinini temsil etmektedir. Bu sayede, DEK1 proteininin yapı ve fonksiyonları hakkında oldukça kapsamlı bilgiler

bulunmaktadır. Ancak *DEK* geninin alternatif kırılma ürünü olan DEK2 proteini için yapı ve fonksiyonlarının incelendiği fazla araştırma bulunmamaktadır. Dolayısıyla DEK1 ve DEK2 proteinleri karşılaştırıldığı zaman, benzer veya farklı özellik gösterip göstermediği henüz belirsizliğini korumaktadır.



5. MATERİYAL ve YÖNTEM

5.1. Materyal

Tablo 5.1: Hücre hatları.

Ürün	Katalog Numarası	Firma
HS-27A		Dr. Gerard Grosveld
293T		Dr. Gerard Grosveld

Tablo 5.2: Plazmitler.

Ürün	Katalog Numarası	Firma
MIGR1		Dr. Gerard Grosveld
Retrovirüs Paketleme Plazmitleri		Dr. Gerard Grosveld

Tablo 5.3: Antikorlar.

Ürün	Katalog Numarası	Firma
tavşan anti-insan gH2AX	2577	Cell Signalling Technologies
tavşan anti-insan H2AX	7631	Cell Signalling Technologies
fare anti-Myc	2276	Cell Signalling Technologies
tavşan anti-Myc	2278	Cell Signalling Technologies
tavşan anti-human DEK	13962	Cell Signalling Technologies
tavşan anti-insan GAPDH	5174	Cell Signalling Technologies
fare anti-insan NPM1	32-5200	Invitrogen
anti-tavşan Alexa Flour 555	4409	Cell Signalling Technologies
anti-fare Alexa Flour 647	4410	Cell Signalling Technologies
anti-tavşan HRP-Konjuge	7074	Cell Signalling Technologies
anti-fare HRP-Konjuge	7076	Cell Signalling Technologies

Tablo 5.4: Kimyasallar.

Ürün	Katalog Numarası	Firma
RPMI 1640 Medium	52400025	Gipco
DMEM	41966029	Gipco
PBS	15140122	Gipco
FBS	10270106	Gipco
Trypsin	25300054	Gipco
DMSO	BP231-100	Fisher
Penisilin/Streptomisin	15140122	Gipco
TriPure Isolation Reagent	1667157001	Roche
Kloroform	24216-2.5L-R	Sigma-Aldrich
2-propanol	109634	Merck
Etanol	9200525000	Isolab
Metanol	106009	Merck
RedSafe	21141	Intron
Polybrene	H-9268	Sigma-Aldrich
Paraformaldehid (PFA)	P6148-1KG	Sigma-Aldrich
Triton 100-X	T8787-100ML	Sigma-Aldrich
BSA	A2153-10G	Sigma-Aldrich
VectaShield Mounting Medium	H-1200	Vector Laboratories
Doksorubisin	D1515	Sigma-Aldrich
NaCl	S7653-250G	Sigma-Aldrich
Tris Base	T1503-1KG	Sigma-Aldrich
NP-40	A1694,0250	Applichem
Sodium Deoxycholate	D6750-10G	Sigma-Aldrich
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	L3771-100G	Sigma-Aldrich
proteaz/fosfataz inhibitörü	78440	Thermo Scientfic
LDS Sample Buffer	B0008	Invitrogen
Reducing Agent	B0009	Invitrogen
%40 Akrilamid	1248ML500	Neofroxx
Ammonium Peroxodisulfate (APS)	1012010500	Merck
TEMED	8027ML100	Merck
PageRuler	26619	Thermo Scientfic
Yürütme Solüsyonu	161-0732	Biorad
Glisin	A1067	ApplieChem
Tris Buffered Saline (TBS)	1706435	Biorad
Tween20	P9416-50ML	Sigma Aldrich
Yağsız Süt Tozu	A0830	ApplieChem

Tablo 5.5: Kitler.

Ürün	Katalog Numarası	Firma
High Capacity cDNA Reverse Transcription	4368814	Applied Biosystems
GoTag Green Master Mix	M7122	Promega
Power SYBR Green PCR Master Mix	4368706	Applied Biosystems
kalsiyum fosfat transfeksiyon kiti	E1200	Promega
Pierce BCA Protein Assingment	23227	Thermo Scientfic
ECL	K-12045-D50	Advansta
TissueScan Cancer Survey cDNA Array 96-I	CSRT301	Origene

Tablo 5.6: Sarf, plastik ve cam malzemeler.

Ürün	Katalog Numarası	Firma
96 kuyulu reaksiyon plakası (qPCR)	4346907	Applied Biosystems
Yapışkan Film	4306311	Applied Biosystems
6 kuyulu plaka	92006	TPP
Petri (100×20 mm)	93100	TPP
Flask 25/75/150 cm ²	90026/90076/90151	TPP
Thoma Lamı	I.075.03.002	Isolab
Countes Slides	Nanoentek	NE-EVS-50
Mr. Frosty	5100-0001	Nalgene
Kriyoboks	616001	NEST
Kriyotüp	607101	NEST
Falkon 15ml / 50ml	510015 / 510050	Capp
Şırınga ucu filtre (0.45 µm)	99745	TPP
Şırınga ucu filtre (0.22 µm)	99722	TPP
Ependorf Tüp 0,6 ml /1,5 ml	MCT-060-C / MCT-150-C	Axygen
Ependorf Tüp (PCR 0,2 ml)	PCR-02-C	Axygen
Pipet ucu (1000 µl)	5130150	Capp
Pipet ucu (200 µl)	5030090	Capp
Pipet ucu (20 µl)	315016	NEST
Pipet ucu (10 µl)	314016	NEST
Serolojik Pipet	SP-05-C, 10-C, 25-C, 50-C	Capp
Parafilm	058.01.001	Isolab
Nitroselüloz Membran	1620112	Biorad

Tablo 5.7: Cihazlar.

Ürün	Katalog Numarası	Firma
Konfokal Mikroskobu	LSM 880	Zeiss
One Step Plus Real Time PCR Sistemi	4376600	Applied Biosystems
FACS Jazz	655487	BD
Flow Cytometry	Accuri C6 Plus	BD
Termal Cycler	Trio 48	Biometra
Chemidoc Imaging Systems	c600	Azure
Chemidoc XRS+ Imaging Systems	721BR04545	Biorad
Transblot Tranfer Sistemi	1704150	Biorad
Çalkalayıcı	S2025-B-230V	Labnet International
Multi rötor	Multi RS-60	Biosan
CO2 İnkübatör	HF90	Heal Force
Nanodrop	NanoDrop Lite	Thermo Scientific
Etüv	466-3510	VWR
Varioskan	3001-1571	Thermo Scientific
Floresan mikroskobu	Eclipse Ti-S	Nikon
Sıvı azot tankı	LS4800	Taylor Wharton
Inverted mikroskobu	Eclipse TS100	Nikon
Ters Floresan mikroskobu	Eclipse 80i	Nikon
Işık mikroskobu	Eclipse, E100	Nikon
Vorteks	62203001	Isolab
Mikro Santrifüj	1-14	Sigma
Santrifüj	NF 400R	Nüve
Sonikasyon Cihazı	B450	Branson
Hassas terazi	I.602.32.001	Isolab

5.2. Yöntem

5.2.1. Hücre Kültürü

Kullanılan hücrelerin kültür inkübasyonları ideal yaşam ortamlarında (%5 CO₂ ve 37°C'de) yapıldı. Belli doygunluğa ulaşan hücreler ise pasajlama yapılarak alt kültüre edildi. Hücre pasajı sırasında hücreler öncelikle PBS (15140122, Gipco) ile yıkandı. %0.05 1X Trypsin (25300054, Gipco) ile kısa süre 37°C'de bekletilerek hücrelerin bulunduğu yüzeye tutunmaları bozuldu. Trypsin inhibasyonu için %10 FBS (10270106, Gipco) içeren taze besiyeri üzerlerine eklendi. Santrifüj ile hücreler çöktürüldü ve üzerlerinde kalan süpernatant uzaklaştırıldı. Hücreler trypan blue (T6146-25G, Sigma) yardımı ile sayıldı. Kullanılan hücrenin ekim yapılacağı yüzeye uygun sayıda olacak şekilde %10 FBS (10270106, Gipco), %1 penisilin/streptomisin (15140122, Gipco) içeren ilgili taze besiyeri (büyüme besiyeri) ile ekildi. HS-27A hücre hattı için Hepes ve L-glutamine içeren RPMI 1640 (52400025, Gipco) besiyeri kullanıldı. Hücreler 37°C'de inkübasyona bırakıldı.

Hücrelerin stoklanması için kültüre edilen hücreler alt kültüre edilme yoğunluklarına ulaştıkları zaman bulundukları yüzeyden, aynı alt kültürleme yapar gibi kaldırıldı. Sonrasında santrifüj edilen hücrelerden süpernatant uzaklaştırıldı. Hücreler 1 ml %10 DMSO (BP231-100, Fisher) içeren FBS (10270106, Gipco) içerisinde çözüldüler. Hızlıca kryo tüpe aktarılan hücreler, izopropanol içeren aracı bir kutu ile -80°C'ye kaldırıldılar. İzopropanol sayesinde kademeli derece düşüşü ile donan hücreler bir gün sonra -196°C nitrojen tankına uzun süreli saklamak için kaldırıldı.

5.2.2. RT-PCR

5.2.2.1. RNA İzolasyonu

Kültüre edilen hücreler PBS ile yıkandı. Sonrasında Trypsin ile 37°C'de yüzeyden kalkmaları sağlandı. Trypsin inhibasyonu için %10 FBS (10270106, Gipco) içeren taze besiyeri üzerlerine eklendi. Hücreler Trypan Blue (T6146-25G, Sigma) yardımı ile faz kontrast mikroskobu altında sayıldı. Yaklaşık 1,5 milyon hücre temiz

bir falkona aktarıldı. Santrifüj ile çöktürülen hücreler 5 ml soğuk PBS ile bir kez yıkandı ve tekrar çöktürüldü. Hücre pelletleri 1 ml Trizol (1667157001, Roche) ile çözüldü ve üzerlerine 0,2 ml kloroform eklendi. 3 dakika oda sıcaklığında inkübasyon sonrası 4°C'de 14000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası oluşan 3 fazın en üst şeffaf fazı dikkatlice yeni tübe alındı. Örneklerin üzerine 0,5 ml saf izopropanol eklendi ve birkaç kez alt üst ederek karışması sağlandı. Örnekler 4°C'de 14000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve pellet %75 etanol ile yıkandı. Örnekler 4°C'de 14000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet kurumaya bırakıldı. Pellet 30 µl RNase free su ile çözülüp, konsantrasyonları nanodrop ile ölçüldü.

5.2.2.2. cDNA Sentezi

Elde edilen RNA ile, random primer içeren High Capacity cDNA Reverse Transcription Kiti (4368814, Appliedbiosystems) kullanılarak sentez reaksiyonu gerçekleştirildi. Reaksiyon karışımı içeriği; 2 µl RT Buffer, 2 µl Random Primer, 0.8 µl dNTP, 1 µl Reverse Transcriptase, 1 µl RNase Inhibitor, 3,2 µl dH₂O, 10 µl (500 ng/10 µl) RNA, total 20 µl hacimde hazırlandı. Reaksiyon koşulu, kite uygun olarak 25°C'de 10 dakika, 37°C'de 120 dakika, 85°C'de 5 dakika uygulandı. Örnekler reaksiyon sonunda -20 °C'de saklandı.

5.2.2.3. PCR

PCR reaksiyonu için GoTag Green Master Mix kiti (M7122, Promega) kullanıldı. Kullanılan reaksiyonda cDNA kalıplarına bağlanan primer çiftleri; *DEK1* için ileri primer 5'-GTCTCATCGTGGAAGGCAAG-3', geri primer 5'-GTGCCTGGCCTGTTGTAAAG-3; *DEK2* için ileri primer 5'-TCCGAGAAAGAACCCGAAAT-3', geri primer 5'-CTGCCCCCTTTCCTTTTTCCT-3'; *GAPDH* için ileri primer 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3', geri primer 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3' olarak tasarlandı. PCR koşulları *DEK1* için 95°C'de 3 dakika, sonrasında 29 döngü 95°C'de 15 saniye, 57°C'de 1 dakika; *DEK2* için 95°C'de 3 dakika, sonrasında 33 döngü 95°C'de 15 saniye, 57°C'de 1 dakika;

GAPDH için 95°C’de 3 dakika sonrasında, 25 döngü 95°C’de 30 saniye, 47°C’de 30 saniye, 72°C’de 30 saniye, tek döngü 72°C’de 10 dakika uygulandı. Toplam 20 µl hacimde, 10 µl GoTag, kalıp DNA olarak cDNA sentezi sonucunda elde edilen ve DNase free su ile 1:1 oranında sulandırılan örneklerden 2 µl ve 10 µM primerden 0,6 µl kullanıldı. Ayrıca pozitif kontrol olarak, DEK izoformlarının cDNA’sı klonlanmış 0,1 ng MSCV-FlagDEK1-IRES-GFP ve MSCV-FlagDEK2-IRES-GFP plazmitleri ile PCR reaksiyonu kuruldu.

PCR ürünlerini görüntülemek için öncelikle %3’luk agaroz jel TAE tanponu ile içerisine son konsantrasyonu 1X olacak şekilde 20000x RedSafe (21141, İntron) ekleyerek hazırlandı. Örneklerin bir miktarı eşit hacimlerde jele yüklenerek elektrik akımı ile yürütüldü. PCR ürünleri, görüntüleme cihazı (c600, Azure) kullanılarak görüntülendi.

5.2.2.4. qPCR

Hücrelerde DEK seviyesini karşılaştırmalı olarak analiz etmek için gerçek zamanlı PCR metodu Power SYBR™ Green PCR Master Mix (4368706, Applied Biosystems) kiti kullanıldı. İlgili genlerin primer çiftleri; *DEK1* için ileri primer 5’-GTCTCATCGTGGAAGGCAAG-3’, geri primer 5’-GTGCCTGGCCTGTTGTAAAG-3; *DEK2* için ileri primer 5’-ATGTCCGCCTCGGCCCCTG-3’, geri primer 5’-CTGCCCCTTTCCTTTTTCCT-3’; *GAPDH* için ileri primer 5’-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3’, geri primer 5’-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3’ olarak tasarlandı. PCR koşulları 95°C’de 3 dakika, sonrasında 45 döngü 95°C’de 15 saniye, 57°C’de 30 saniye, 72°C’de 1 dakika olarak uygulandı. Gerçek zamanlı olarak elde edilen Δ RN/Cycle grafiği baz alınarak her bir kuyuda ilgili gene ait bir çoğalma gerçekleşip gerçekleşmediği tespit edildi. Ayrıca PCR reaksiyonu takiben Çözünme Eğrisi (Melting Curve) döngüsü uygulanarak her bir kuyu için elde edilen ürünlerin ilgili gene ait olup olmadığı tespit edildi. Her örnek için 3 tekrarlı reaksiyonlar kuruldu ve Ct (Treshold Cycle) değerlerin aritmetik ortalaması kullanıldı. Farklı örnekler arasında göreceli olarak DEK1 ve DEK2 seviyesi, $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ formülü ile hesaplandı. Hesaplamada normalizatör olarak GAPDH örneklerinin Ct değerleri kullanıldı.

5.2.3. Transfeksiyon

293T hücreleri yaklaşık 3,5 milyon olacak şekilde 10 cm petriye ekildi ve bir gün taze %10 FBS ve %1 Penisilin/Streptomisin içeren DMEM (41966029, Gipro) besiyerinde inkübe edildi. İnkübasyon sonunda hücrelerin besiyeri 55°C'de 1 saat inaktive edilmiş %10 FBS ve ayrıca %1 Penisilin/Streptomisin içeren taze hazırlanmış 5 ml DMEM besiyeri ile değiştirildi. Hücreler 3 saat 37°C %10 CO₂ ortamında inkübe edildi. Transfeksiyon karışımı, Promega kalsiyum fosfat transfeksiyon kiti (E1200, Promega) kullanılarak hazırlandı. Karışımda DEK geninin klonlandığı MIGR1 (MSCV-IRES-GFP, MSCV-MycDEK1-IRES-GFP, MSCV-MycDEK2-IRES-GFP) vektör plazmiti 10 µg, Gag/Pol plazmiti 4 µg, VsV-G plazmiti 2 µg kullanıldı. Elde edilen karışım 293T hücrelerine uygulandı ve hücreler 37°C %10 CO₂ 'de 18 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücreler 1 kez PBS ile yıkandı ve taze inaktive FBS içerikli hazırlanan besiyeri ile değiştirildi. Hücreler 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücrelerin virüs içeren besiyerleri toplandı ve 0,22 µm filtreden geçirildi.

5.2.4. Transdüksiyon

T-25 flask içerine ekilmiş 500 bin HS-27A hücresi bir gün 37°C %10 CO₂ ortamında inkübe edildi. Hücrelerin üzerinde eski besiyerleri çekildi ve bir kez PBS ile yıkandı. Toplanan ve filtre edilen virüs besiyerlerine, 8 µg/ml konsantrasyonunda polybrene eklendi. Karışım HS-27A hücreleri üzerine bırakıldı ve infekte olamaya başlaya hücreler 37°C %10 CO₂ ortamında 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücreler bir kez PBS ile yıkandı ve besiyerleri %10 FBS, %1 Penisilin/Streptomisin içine taze RPMI 1640 besiyeri ile değiştirildi. 37°C %10 CO₂ ortamında inkübasyona kaldırıldı.

5.2.5. FACS ile İnfekte Hücrelerin Seçilimi

Retrovirüs ile infekte olan hücreler GFP-pozitif hücrelerdir. İnfeksiyon sonrası yeteri kadar büyüyen hücreler toplanarak bir kez PBS ile yıkandı. Hücreler 0,45 µm filtreden geçirilmiş ayrıştırma medyumunda (%2 BSA ve 4mM EDTA içeren PBS)

Çözüldü. GFP-pozitif hücrelerin seçilimi için akım sitometrisi tabanlı floresan aktive hücre ayırıştırma (FACS) (FacsJazz, BD) sistemi kullanıldı. FACS ile GFP-pozitif hücreler, GFP-negatif hücrelerden ayırıştırılarak, soğuk FBS içeren bir tüpte toplandı. Seçilen GFP-pozitif hücreler büyümeleri için %10 FBS, %1 Penisilin/Streptomisin içine taze RPMI 1640 besiyeri ekildi ve 37°C %10 CO₂ ortamında inkübasyona kaldırıldı.

5.2.6. Akım Sitometrisi ile GFP-pozitif Hücre Analizi

Seçilimi yapılan ve kültür ortamında büyütülen hücreler yıkanarak toplandı. Hücreler bir kez soğuk PBS ile yıkandı ve temiz soğuk 1 ml PBS içerisinde çözüldü. Örnekler, BD Accuri C6 akım sitometrisi cihazında FL1-A kanalı kullanılarak geçirildi. Hücre popülasyonunda pozitif ve negatif hücre kapısını belirlemek için GFP-negatif (infekte edilmemiş HS-27A) hücreleri kullanıldı. GFP sinyaline göre popülasyondaki hücre yoğunlukları belirlendi.

5.2.7. İmmünofloresan Boyama

Steril lamel üzerine ekilmiş hücreler kültür ortamından alındı. Örneklerin içinde bulunduğu besiyerili ortam uzaklaştırıldı. Örnekler PBS yıkandı. Hücrelerin fiksasyonu için pH 'sı 6,9 olan %4 PFA (P6148-1KG, Sigma-Aldich) içeren PBS ile oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edildi. Fiksasyon sonrası rnekler PBS ile yıkandı. Hücre geçirgenliği arttırmak için devamında rnekler %0,5 Triton 100-X (T8787-100ML, Sigma-Aldich) içeren PBS ile oda sıcaklığında 20 dakika çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. Inkübasyon sonrası rnekler PBS ile yıkandı. Devamında, %2 BSA (A2153-10G, Sigma-Aldrich) içeren PBS bloklama solüsyonu olarak 1 saat oda sıcaklığında ve çalkalayıcı üzerinde uygulandı. Sonrasında bloklama solüsyonu uzaklaştırılarak, %1 BSA içerinde ilgili primer antikor ilgili oranında hücrelere uygulandı. Örnekler gece boyu 4°C'de çalkalayıcı üstünde inkübe edildi.

Ertesi sabah, antikor uygulaması uzaklaştırıldı ve %1 BSA içeren PBS ile yıkandı. Örneklere %1 BSA içerinde ilgili florofoer bağlı sekonder antikor ilgili oranında 1 saat oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde ve karanlık ortamda hücrelere

uygulandı. Bu adımdan sonraki tüm uygulamalarda örneklerin olabildiğince ışığa maruz kalmamalarına özen gösterildi.

İkinci bir primer ve sekonder antikör uygulaması yapılan örnekler için; örnekler %1 BSA içeren PBS ile yıkandı. Yıkama sonrası ise ikinci kez pH 'sı 6,9 olan %4 PFA ile 5 dakika oda sıcaklığında hücreler inkübe edildi. Fiksasyon sonrası örnekler %1 BSA içeren PBS ile yıkandı. Devamında, ikinci kez %2 BSA içeren PBS bloklayıcı solüsyonu olarak 30 dakika oda sıcaklığında ve çalkalayıcı üzerinde uygulandı. Sonrasında bloklayıcı solüsyonu uzaklaştırılarak, %1 BSA içeren ilgili primer antikör ilgili oranda hücrelere 1 saat oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde uygulandı. Devamında örnekler ve %1 BSA içeren PBS ile yıkandı ve %1 BSA içeren ilgili florofor bağlı sekonder antikör ilgili oranda 1 saat oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde hücrelere uygulandı.

Antikör uygulaması tamamlanan tüm örnekler için; tüm uygulamalar ardından örnekler 6 kez distile su ile yıkandı. 6 kuyulu petri içine bulunan örnekler lamel ile kuyu içerisinden çıkartılarak kurumaları sağlandı. Kuruyan örnekler, bir damla VectaShield Mounting Medium (H-1200, Vector Lab.) solüsyonu damlatılmış lam üzerine, hücreler lam ve lamel arasında kalacak şekilde kapatıldı ve lamellerin etrafı bir oje yardımı ile lama sabitlenmesi sağlandı. Örnekler 4°C'de ve karanlık ortamda saklandı.

Bu teknikte, PBS ile yıkandı ve %1 BSA içeren PBS ile yıkandı, şeklinde belirtilen tüm PBS yıkama uygulamasında, bir kez beklemeksizin PBS veya belirtildiyse %1 BSA içeren PBS ile yıkaması devamında ise 5 dakika çalkalayıcı üzerinde PBS veya belirtildiyse %1 BSA içeren PBS yıkaması şeklinde uygulandı. Kullanılan ilgili antikör bilgileri ise Tablo 5.8'de verilmiştir.

Tablo 5.8: İmmünofloresan boyamada kullanılan antikorlar ve kullanım oranları.

Kullanılan primer antikor	Kullanım oranı
Tavşan anti-insan γ H2AX (2577, Cell Signalling Technologies)	1:1000
Fare anti-Myc (2276, Cell Signalling Technologies)	1:1000
Tavşan anti-Myc (2278, Cell Signalling Technologies)	1:1000
Fare anti-human NPM1 (32-5200, invitrogen)	1:400
Kullanılan florofor bağlı sekonder antikor	Kullanım oranı
Anti-tavşan Alexa Flour 555 (4409, Cell Signalling Technologies)	1:500
Anti-fare Alexa Flour 647 (4410, Cell Signalling Technologies)	1:500

5.2.8. DNA Hasarının Oluşturulması

5.2.8.1. Doxorubicinin Hazırlanması

DNA hasarı oluşturmak için 0,05 uM doxorubicin (doxo) (D1515, Sigma-Aldrich) kullanıldı. Öncelikle toz halindeki doxorubicin 1 M olacak şekilde steril su ile çözüldü. Oluşturulan ana stok, 20 mM konsantrasyona sulandırıldı. Son konsantrasyon 0,05 uM olması için her 1 ml büyüme (%10 FBS, %1 Penisilin/Streptomisin içine taze RPMI 1640) besiyerine 2,5 ul 20 mM doxorubicin verildi.

5.2.8.2. Doxorubicin Uygulaması

Hücreler 3 grup olacak şekilde, içerlerinde steril (alkol ve ateşten geçirilmiş) lamel bulunan 6 kuyulu petrilere 200 bin hücre ekildi. 24 saat inkübasyonlarının ardından hücrelerin mevcut besiyerleri değiştirildi. Birinci grup hücreler, kontrol grubu olarak seçildi ve hücrelere steril su (doxo çözücüsü; diğer gruplara uygulanan doxo hacmi kadar) karıştırılmış taze büyüme besiyeri verildi. İkinci ve üçüncü grup hücrelere ise son konsantrasyonu 0,05 uM doxo olacak şekilde büyüme besiyerlerine eklenerek hücrelere verildi ve 24 saat büyüme koşullarında (37°C %10 CO₂ ortamında) inkübe edildi. Böylece doxo gruplarında DNA hasarı oluşturulmuş oldu.

İnkübasyon sonunda, birini kontrol grubu ve ikinci 24 saat doxo uygulanmış grup, hücre kültürü ortamında alınarak, immunofloresan boyama tekniği uygulandı. Hasar sonrası DNA hasar tamirinin izleneceği üçüncü grup hücrelere ise doxo içeren besiyerleri uzaklaştırılarak bir kez PBS yıkması ardından, taze büyüme besiyeri verildi. Bu grup hücrelerde 24 saat büyüme koşullarında inkübasyonuna devam edildi. İnkübasyon sonunda ise hücrelere immünofloresan boyama tekniği uygulandı.

5.2.8.3. Hücredeki DNA Hasarının Gözlenmesi İçin İmmünofloresan Boyama

Kültür ortamındaki inkübasyonu tamamlanan hücreler immünofloresan boyama bölümünde anlatıldığı gibi boyandı. İlk grup primer ve sekonder antikor olarak tavşan anti-insan γ H2AX (2577, Cell Signalling Technologies) antikorunu 1:1000 oranında ve anti-tavşan Alexa Flour 555 (4409, Cell Signalling Technologies) antikorunu 1:500 oranında kullanıldı. İkinci grup primer ve sekonder antikorunu olarak ise fare anti-Myc (2276, Cell Signalling Technologies) antikorunu 1:1000 oranında ve anti-fare Alexa Flour 647 (4410, Cell Signalling Technologies) antikorunu 1:500 oranında kullanıldı. Örnekler konfokal mikroskobu ile görüntülenmek üzere hazır hale getirildi.

5.2.8.4. Konfokal Mikroskobu ve Görüntü Analizi

İmmünofloresans boyaması yapılan örnekler konfokal mikroskobu (Zeiss LSM 880) kullanılarak 4 kanalda görüntülendi. Kullanılan kanallar, GFP için Ar 488nm 25mW lazeri, DAPI ışması için Diode 405nm 0.2-0.8mW lazeri, Alexa Flour 555 için Ar 514nm 25mW lazeri, Alexa Flour 647 içinse HeNe 633nm 5mW lazeri kullanıldı. Arkaplan ışmasını engellemek için, Myc-negatif hücre grubu ile kontrollü bir şekilde görüntüleme ayarları yapıldı. Her örnek için 7 adet Z-katmanı (Z-Stack) görüntülendi. Görüntüleme sonrasında kaydedilen örneklerin 7 Z-katmanı Zen 3.0 Blue Edition yazılımının maximum intensity projection metodu ile birleştirildi.

Elde edilen görüntülerin Alexa Flour 555 ile boyanmış γ H2AX yoğunluğunun analizi, ImageJ yazılımı ile gerçekleştirildi. Bu yazılım kullanılarak, öncelikle Alexa Flour 647 ile boyanmış Myc görüntülerinden, gerekli ayarlamalar ve eşik (threshold)

değerleri uygulanarak, Myc pozitif alanlar belirlendi. Bu bölgelerden ölçüm alalını nükleus ile sınırlandırmak için DAPI boyamasının sınırları ImageJ yazılımında bulunan partikül analizi ile belirlendi. γ H2AX görüntüsünde ise belirlenen nükleus alanları ölçüldü. Her Myc pozitif hücrenin γ H2AX yoğunluğu ayrı ayrı kaydedildi. Total doğrulanmış total hücre flüoresansı (corrected total cell fluorescence; CTCF (=intensity - Alan x arkaplan)) hesabı ile her hücrenin floresan yoğunluğu hesaplandı.

5.2.9. Western Blot Yöntemi ile Protein Analizi

5.2.9.1. Protein İzolasyonu

Protein izolasyonu yapmak için kültür ortamında büyütülen her örnek hücreden yaklaşık 3 milyon hücre ayrıldı. Ayrılan hücreler 4°C'de 1500 rpm de santrifüj edildi. Çöken hücrelerin üzerinden süpernatant (üst sıvı) uzaklaştırıldı. Hücreler yıkamak için 5 ml soğuk PBS ile çözüldü ve 4°C'de 1500 rpm de santrifüj edildi. Yıkama sonrası çöktürülen hücrelerin süpernatantı uzaklaştırıldı. Önceden hazırlanmış Ripa solüsyonuna (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 8), %1 NP-40, %0,5 Sodium Deoxycholate, %0,1 SDS) final konsantrasyonu 1X olacak şekilde 100X proteaz/fosfataz inhibitörü kokteyli (78440, Thermo Scientific) eklendi. Her hücre pelleti, 100 ul inhibitör eklenmiş ripa solüsyonunda iyice çözüldü ve vorteksleildi. Sonrasında örnekler 30 dakika buz üzerinde inkübe edildi. İnkübasyon sırasında her 10 dakikada bir vorteksleme işlemi tekrar edildi. İnkübasyon sonrası örnekler, 2 kez arasında 15 saniye bekleme ile 15 saniye sonike edildi. İşlem sonrası örnekler 4°C'de 14000 rpm de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant temiz bir tüpe aktarılarak protein izolasyonu tamamlandı.

5.2.9.2. Protein Miktarının Belirlenmesi

Her örnekten elde edilen bir miktar protein 1:10 oranında sulandırıldı. Protein miktarının belirlenmesinde BCA kitinin (23227, Thermo Scientific) BSA standartları ayrıca örnek olarak kullanıldı. BSA standartlarından ve protein örnek sulandırılmalarından 2 tekrarlı olacak şekilde 96 kuyulu plakada her bir kuyuya 25 ul

örnek konuldu. Kitle birlikte gelen A ve B çözeltileri sırasıyla 1:50 oranında karıştırıldı ve her bir kuyuya 200 ul eklenerek örneklerle karıştırıldı. Karanlık ortam sağlanan plaka 37°C’de çalkalayıcı üzerinde 30 dakika inkübe edildi. Örnekler 562 nm’lik absorbans değerinde ölçüm alınarak protein miktarları belirlendi.

5.2.9.3. SDS PAGE Jel Elektroforezi

Toplanan proteinler toplam hacim 20 ul olacak şekilde, 20 ug protein, 5 ul 4X LDS sample buffer (B0008, invitrogen) ve 2 ul 10X Sample Reducing Agent (B0009, invitrogen) karıştırıldı. 20 ul den az hacime sahip örnekler distile su ile tamamlandı. Her örnek 70°C’de 10 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası örnekler yüklemeye hazır hale geldi.

Örnekleri yürütmek için %12’lik akrilamid konsantrasyonuna sahip bis-tris poliakrilamid jel kullanıldı. Bir adet jel için %40’lık 37.5:1 akrilamid:bisakrilamid (1248ML500, Neofroxx) çözeltisi son konsantrasyonu %12 olacak şekilde hazırlandı. SDS PAGE jelinin içeriği kullanılan miktarlarla birlikte Tablo 5.9’da gösterilmiştir. Yürütme ve yükleme jel arasında düz bir hiza olması için yürütme jeli donması beklenirken izopropanol kullanıldı. Hazırlanan jel yürütme tankına yerleştirildi ve tank 1X’e sulandırılmış yürütme solüsyonu (161-0732, Biorad) dolduruldu. Örnekler 20 ul hacimle jel kuyularına yüklendi ve önce 50V akımda 5 dakika, sonra yaklaşık 1,5 saat 100V akımda yürütüldü.

Tablo 5.9: SDS PAGE için kullanılan poliakrilamid jel içeriği ve miktarları.

Yürütme (Running) Jeli içeriği (%12 Poliakrilamid)		Hizalama (Stacking) Jeli içeriği (%4 Poliakrilamid)	
Distile Su	2,1 ml	Distile Su	3,1 ml
%40 Akrilamid	1,5 ml	%40 Akrilamid	0,5 ml
1,5M Tris-HCl (pH:8,8)	1,3 ml	0,5M Tris-HCl (pH:6,8)	1,3 ml
%10 SDS	50 µl	%10 SDS	50 µl
%10 APS	50 µl	%10 APS	50 µl
TEMED	5 µl	TEMED	5 µl

5.2.9.4. Proteinlerin Membrana Transferi

Transferde kullanılacak nitroselüloz membran (1620112, Biorad) aktifleşmesi için 5 dakika transfer solüsyonu (25 mM Tris, 192 mM glicin, 10% metanol) içerisinde bekletildi. Yürümesi tamamlanan jelin üzerine, transblot (170-4155, Biorad) sistemine uygun şekilde aktifleştirilmiş membran dikkatlice konuldu. Sisteme yerleştirilen örnekler 25 dakika 25V akımda transferi edildi.

5.2.9.5. Antikor Uygulaması

1X olacak şekilde sulandırılmış TBS (1706435, Biorad) içerisinde 1:1000 oranında Tween20 (P9416-50ML, Sigma Aldrich) çözünmüş TBS-T solüsyonu hazırlandı. Transfer edilen membran, TBS-T içerisinde çözünmüş %5 yağsız süt tozu (A0830, ApplieChem) ile 1 saat oda sıcaklığında roteyter inkübe edildi. İnkübasyon sonrası membranlar ilgili primer antikorun ilgili oranında (1:1000 oranında fare anti-Myc (2276, Cell Signalling Technologies), 1:1000 oranında tavşan anti-insan DEK (13962, Cell Signalling Technologies), 1:1000 oranında tavşan anti-insan H2AX (7631, Cell Signalling Technologies), 1:1000 oranında tavşan anti-insan γ H2AX (2577, Cell Signalling Technologies)) TBS-T içerisinde çözünmüş %5 yağsız süt tozu ile sulandırılarak 4°C’de rotor kullanılarak gece boyu inkübe edildi. Ertesi sabah, primer antikor içeren solüsyon uzaklaştırılarak, 3 kez oda sıcaklığında rotor kullanılarak 10 dakika TBS-T solüsyonu ile yıkandı. Yıkama sonrası, membranlar rotor kullanılarak oda sıcaklığında 1 saat ilgili sekonder antikor ilgili oranda (1:3000 oranında HRP-konjuge anti-fare (7076, Cell Signalling Technologies), 1:3000 oranında HRP-konjuge anti-tavşan (7074, Cell Signalling Technologies)) TBS-T içerisinde çözünmüş %5 yağsız süt tozu ile sulandırılarak inkübe edildi. Sonrasında 3 kez oda sıcaklığında rotor kullanılarak 10 dakika TBS-T solüsyonu ile yıkandı. Membranlar kemiluminisan görüntüleme ile görüntülendi. Ardından aynı şekilde antikor uygulamaları arasında yıkama yapılarak önce primer 1: 2000 oranında tavşan anti-human GAPDH (5174, Cell Signalling Technologies) antikoru sonra sekonder :3000 oranında HRP-konjuge anti-tavşan (7074, Cell Signalling Technologies) antikoru ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi ve devamında aynı şekilde 3 kez TBS-T ile yıkanan membranlar görüntülendi.

5.2.9.6. Kemiluminisan Membran Görüntüleme

Kemiluminisan görüntülemede kullanılmak üzere ECL kitinin (K-12045-D50, Advansta) önerdiği gibi görüntüleme solüsyonu hazırlandı. Her membran için 0,5 ml solüsyon membran üzerine damla damla yayıldı. 3 dakika karanlık ortamda bekletilen membran üzerinden fazla ECL uzaklaştırılarak cihazına yerleştirildi ve ImageLab 5.2.1 programı ile görüntülendi.

5.2.10. Hücre İçi Protein Konumun Belirlenmesi

Kültür ortamında büyütülen hücrelerden 200 bin hücre sayılarak, 6 kuyulu plaka içerisine konulan, alkol ve ateş ile steril edilmiş lamel üzerine ekildi. Bir gün kültür ortamında inkübe edilen hücreler alınarak, daha önce immünofloresan boyama bölümünde anlatıldığı gibi boyandı. Myc epitoplü DEK proteininin konumun belirlenmesi için ilk primer antikor uygulamasında, 1:1000 oranında tavşan anti-myc (2278, Cell Signalling Technologies) antikorü kullanıldı. Devamında sekonder antikor uygulamasında ise 1:500 oranında anti-tavşan Alexa Flour 555 (4409, Cell Signalling Technologies) antikorü kullanıldı. Tek protein hedef alındığı için başka bir antikor uygulaması yapmadan, distile su ile yıkama ve mounting medium ile örneğı kapatma aşamalarına geçerek boyama tamamlandı. Sonrasında konfokal mikroskobu ile ilgili lazer kullanılarak örnekler görüntülendi. 7 adet Z-katmanı kullanılarak alınan görüntüler, Zen 3.0 Blue Edition yazılımı kullanılarak, maximum intensity projection metodu ile katmanlar birleştirildi.

5.2.11. DEK ve Nucleophosmin Birlikte Konum Analizi

Protein konumun belirlenme bölümünde anlatıldığı gibi hücre örnekleri hazırlandı. Devamında immünofloresan boyama bölümünde anlatıldığı gibi hücreler boyandı. İlk grup primer ve sekonder antikor olarak 1:1000 oranında tavşan anti-myc (2278, Cell Signalling Technologies) antikorü ve 1:500 oranında anti-tavşan Alexa Flour 555 (4409, Cell Signalling Technologies) antikorü kullanıldı. İkinci grup primer ve sekonder antikor olarak fare 1:400 oranında fare anti-human NPM1 (32-5200, Invitrogen) ve 1:500 oranında anti-fare Alexa Flour 647 (4410, Cell Signalling

Technologies antikorı kullanıldı. Tamamlanan örnekler konfokal mikroskobu ile 7 Z-katmanı alınarak görüntülendi ve Zen 3.0 Blue Edition programı ile maximum intensity projection metodu kullanılarak katmanlar birleştirildi.

5.2.12. İnsan Kanser ve Normal Doku cDNA Panel Analizi

Farklı kanser ve normal dokularda değişen gen ifadesinin analizi için TissueScan Cancer Survey cDNA Array 96-I (Origene, Rockville, MD, USA) paneli kullanılarak gerçek zamanlı PCR reaksiyonu gerçekleştirildi. PCR reaksiyonu için Sybr Green I (4368706, Applied Biosystems) boyası, DEK1 için ileri primer 5'-GTCTCATCGTGGAAGGCAAG-3', geri primer 5'-GTGCCTGGCCTGTTGTAAAG-3', DEK2 için ileri primer 5'-ATGTCCGCCTCGGCCCTG-3', geri primer 5'-CTGCCCCTTTCCTTTTTCCT-3' ve ACTB için ileri primer 5'-CAGCCATGTACGTTGCTATCCAGG-3' geri primer 5'-AGGTCCAGACGCAGGATGGCATG-3' dizileri kullanıldı. Reaksiyon koşulları ise 95°C'de 3 dakika, sonrasında 45 döngü 95°C'de 15 saniye, 57°C'de 30 saniye, 72°C'de 1 dakika uygulandı. Reaksiyon sonunda çözünme eğrisi analizi ile özgün ürün tespiti gerçekleştirildi. Birden fazla tekrarı olan örneklerin belirlenen eşik değerine göre Ct değerlerinin ortalaması kullanıldı. Normalizatör olarak ACTB Ct değerleri kullanılarak, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülü ile DEK1 ve DEK2 ifadesinin göreceli seviyesi hesaplandı. İstatistiksel analiz için reaksiyon sonunda tespit edilemeyen örnekler sıfır olarak kabul edildi.

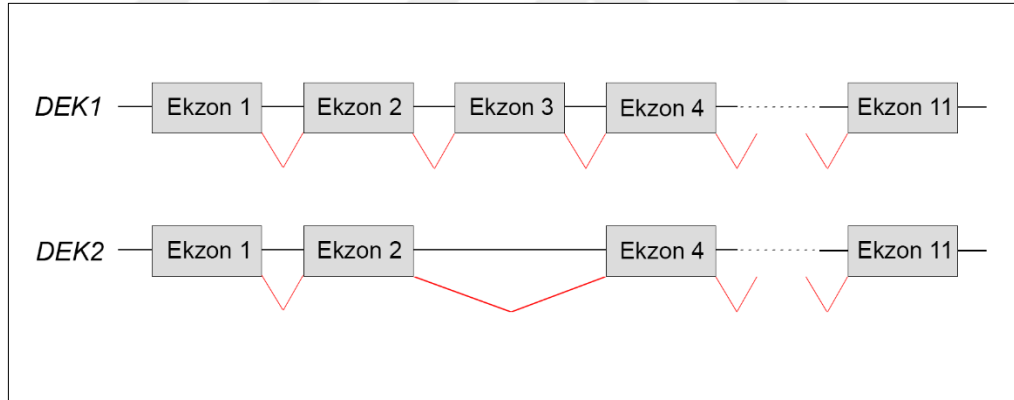
5.2.13. İstatistiksel Analiz

Yapılan tekrarlı çalışmalara GraphPad Prism 8.0.1 programı ile çalışmanın türüne göre Man Whitney U test veya Two Way Anova uygulanmıştır. P-değeri 0,05'ten küçük karşılaştırmalar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlılık p-değerine göre (*: 0,05>p>0,01, **: 0,01>p>0,001, ***: 0,001>p>0,0001, ****: 0,0001>p, ns:p>0,05) ile ifade edilmiştir.

6. BULGULAR

6.1. DEK1 VE DEK2 İfadesinin Farklı Hücre Hatlarında Gösterilmesi

DEK geninin hücresel ifadesini mRNA düzeyinde analiz edebilmek için öncelikle *DEK* izoformlarına özgün bağlanan oligonükleotit primer tasarımı yapıldı. *DEK* izoform-2 (*DEK2*) ifadesi, *DEK* izoform-1 (*DEK1*) olgun mRNA'sından ekzon3 bakımından yoksun olarak ifade edilmektedir (Şekil 6.1). Bu doğrultuda izoformlara özgün tasarlanan primerlerde, *DEK1* olgun mRNA'sı için ekzon3 bölgesi (*DEK2*'de olmayan ekzon bölgesi), *DEK2* olgun mRNA'sı için ekzon2 ve ekzon4 birleşim bölgesi hedef alındı. PCR reaksiyonunda ürün eldesi için kullanılan primer çiftinin ters primeri ise farklı bir ekzon üzerindeki bölge hedef alınarak tasarlandı.

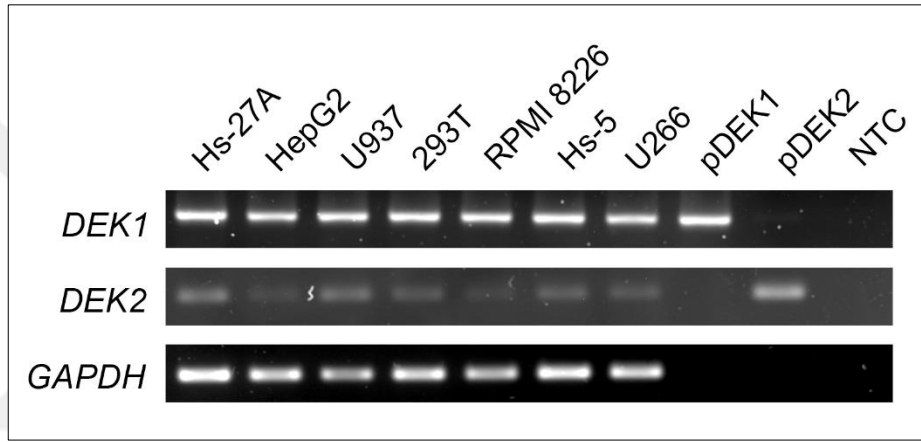


Şekil 6.1: *DEK1* ve *DEK2* mRNA'larının şematik olarak gösterimi.

Tasarlanan primer çiftleri ile elde edilen PCR ürünlerinin ilgili izoforma özgünlüğünün kontrolü için PCR reaksiyonlarında ek olarak kalıp DNA olarak, *DEK1* cDNA'sı klonu içeren (MSCV-FlagDEK1-IRES-GFP) ve *DEK2* cDNA'sı klonu içeren (MSCV-FlagDEK2-IRES-GFP) plazmitleri ayrı reaksiyonlarda pozitif kontrol olarak kullanıldı. *DEK1* ve *DEK2* primer çiftleri ile ayrı tüplerde gerçekleştirilen reaksiyonlar sonucunda elde edilen ürünler agaroz jel elektroforezi uygulanarak görüntülendi. Sonuç olarak, MSCV-FlagDEK1-IRES-GFP (pDEK1) örneğinde *DEK1* ürün boyutu gözlenirken, MSCV-FlagDEK2-IRES-GFP (pDEK2)

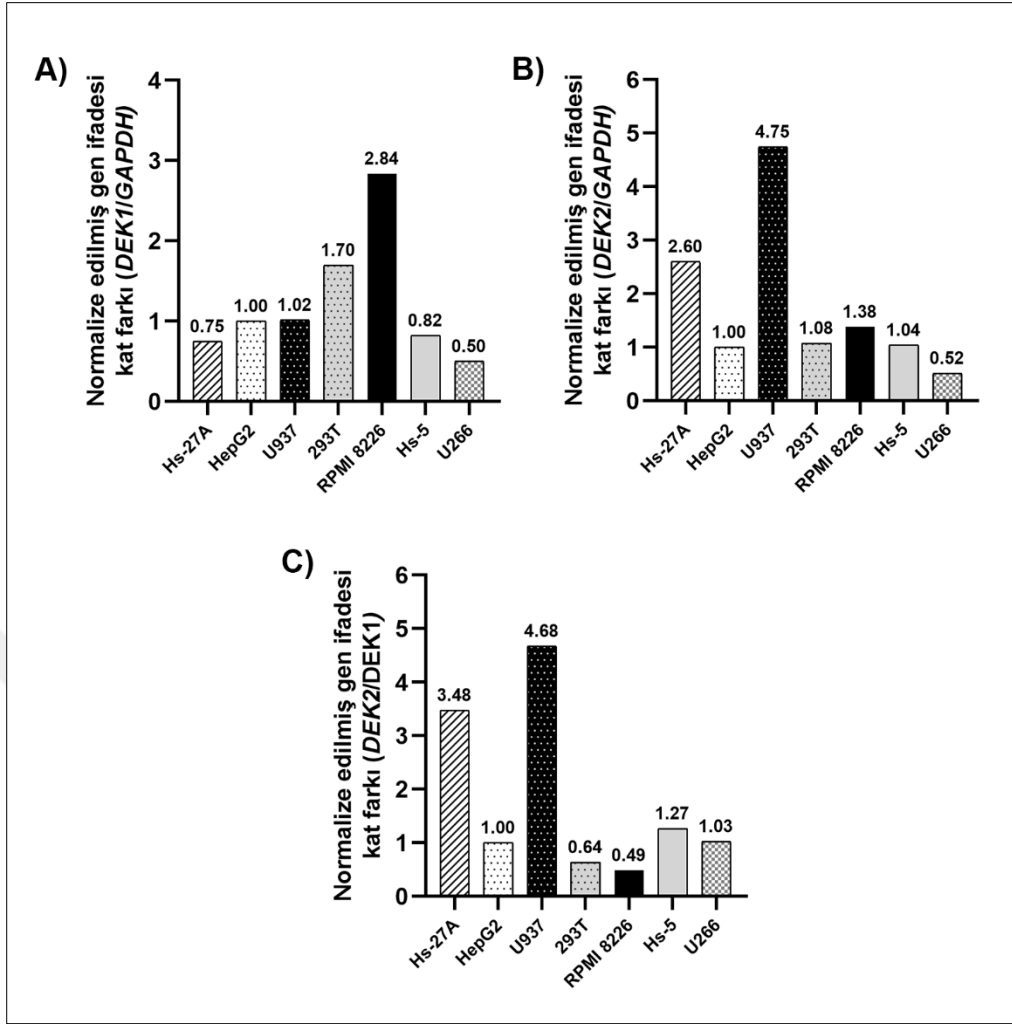
örneğinde DEK2 ürün boyutu gözlemlendi (Şekil 6.2). Bu primer çiftlerinin, DEK izoform ifadelerini göstermek için uygun olduğu sonucuna ulaşıldı.

Aynı primer çiftleri ile HepG2 (insan karaciğer kanseri hücresi), HS-27A (insan kemik iliği stroma hücresi), U937 (insan monosit hücresi), U266 (insan plazma hücresi), RPMI 8226 (insan plazma hücresi), Hs5 (insan kemik iliği stroma hücresi), 293T (insan embriyonik böbrek hücresi) hücre hatlarından elde edilen cDNA'lar ile PCR reaksiyonu gerçekleştirildi. Sonuç olarak, bahsi geçen tüm hücre hatlarının hem *DEK1* hem de *DEK2*'yi aynı anda ifade ettiği sonucuna ulaşıldı (Şekil 10).



Şekil 6.2: 7 farklı hücre hattında *DEK1*, *DEK2* ve *GAPDH* ifadesinin RT-PCR yöntemi ile gösterimi. pDEK1 ve pDEK2 pozitif kontrol olarak kullanılan plazmitleri ifade etmektedir. NTC negatif kontrolü göstermektedir.

Aynı hücre örnekleri kullanılarak RT-qPCR yöntemi ile hücrelerin gen ifadelerin göreceli olarak karşılaştırması yapıldı. Normalizasyonu *GAPDH* ifadesine göre yapılan analiz sonucunda en yüksek *DEK1* ifadesi RPMI 8226 hücre hattında (Şekil 6.3A), en yüksek *DEK2* ifadesi ise U937 hücre hattında (Şekil 6.3B) olduğu bulgusuna ulaşıldı. Ayrıca normalizasyonu *DEK1* ifadesine göre yapılan analiz sonucunda ise HS-27A ve U937 hücre hatlarında *DEK1*'e oranla *DEK2* seviyesinin daha yüksek olduğu bulgusuna ulaşıldı (Şekil 6.3C).

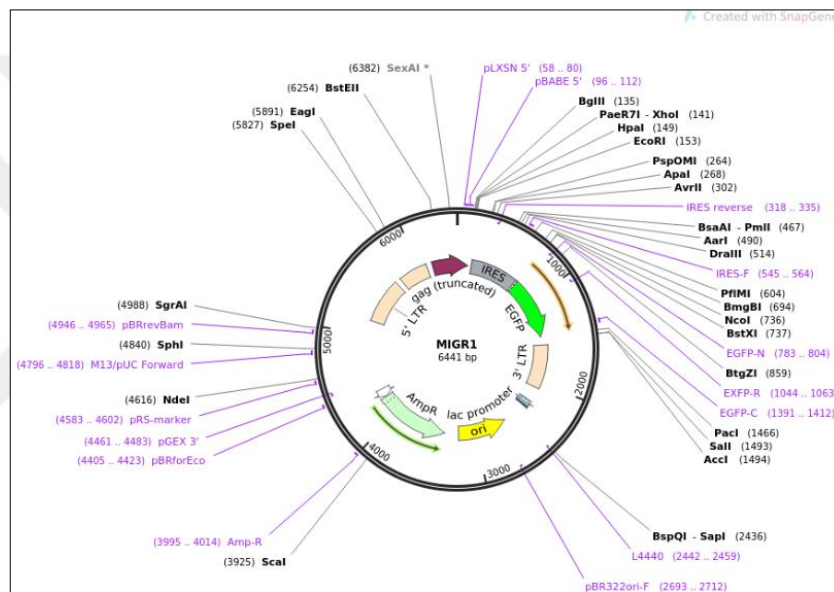


Şekil 6.3: RT-qPCR yöntemiyle 7 farklı hücre hattında *DEK1* ve *DEK2* ifadesinin analizi. A) *GAPDH* seviyesine oranla *DEK1* ifadesinin hücre hatları arasında kat farkı. B) *GAPDH* seviyesine oranla *DEK2* ifadesinin hücre hatları arasında kat farkı. C) *DEK1* seviyesine oranla *DEK2* ifadesinin hücre hatları arasında kat farkı.

Tüm sonuçlar ele alındığı zaman, HS-27A ve U937 hücre hattında, gen ifadesi bakımından *DEK2* seviyesinin kullanılan diğer hücre hatlarına göre yüksek olduğu ve bu hücre hatlarında *GAPDH* seviyesinden bağımsız olarak, *DEK1* seviyesine oranla *DEK2* seviyesi kullanılan diğer hücre hatlarından oldukça yüksek olduğu sonucuna ulaşıldı.

6.2. HS-27A Hücre Hattında Ektopik Olarak Kalıcı Aşırı DEK1 ve DEK2 İfadesinin Oluşturulması

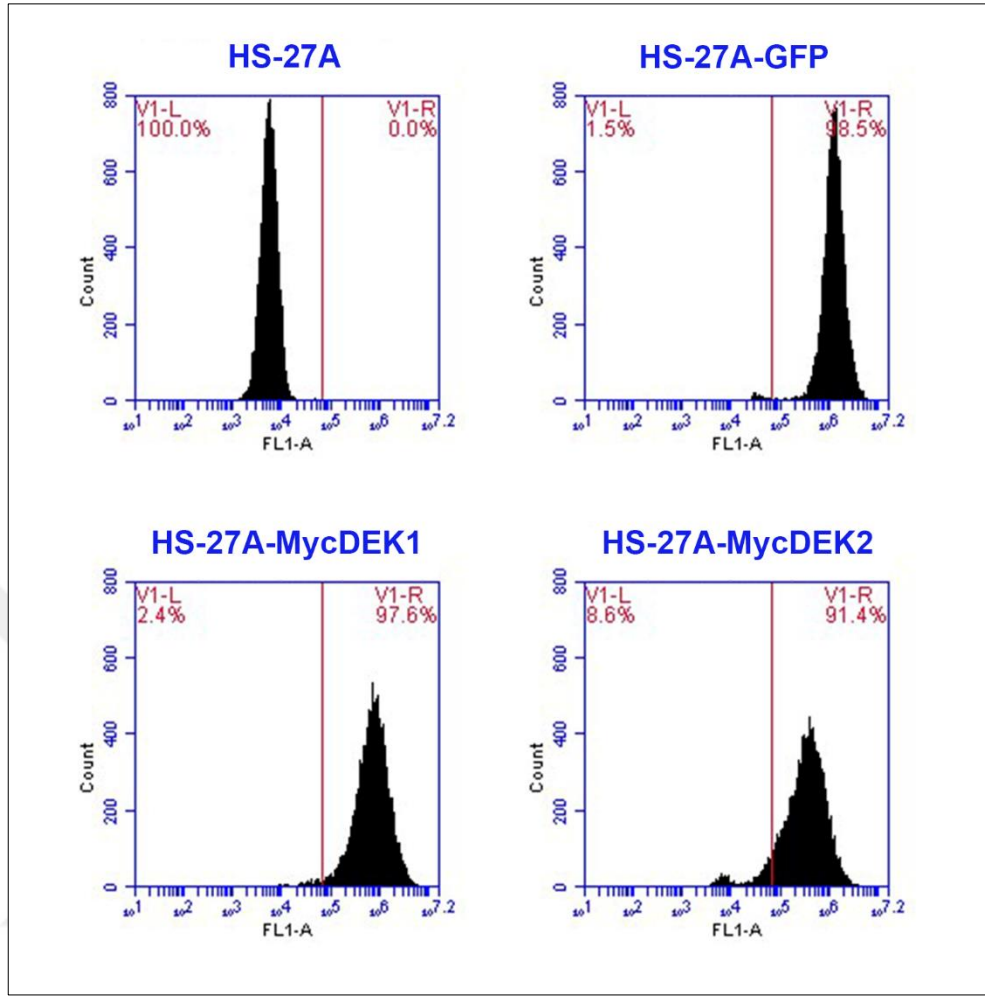
Hücrelerin ektopik olarak kalıcı gen ifadesini sağlamak için retroviral yöntem kullanıldı. Kullanılan retroviral memeli ekspresyon vektörünün (MIGR1) haritası Şekil 6.4’de gösterilmiştir [Web 2, 2022]. Bu çalışmada, klonlaması MIGR1 vektörüne yapılmış olan N-terminalinde Myc epitopu bağlı DEK1 (MSCV-MycDEK1-IRES-GFP) ve DEK2 (MSCV-MycDEK2-IRES-GFP) vektörleri hücrelerde kalıcı gen ifadesi için kullanıldı.



Şekil 6.4: MIGR1 vektörünün haritası.

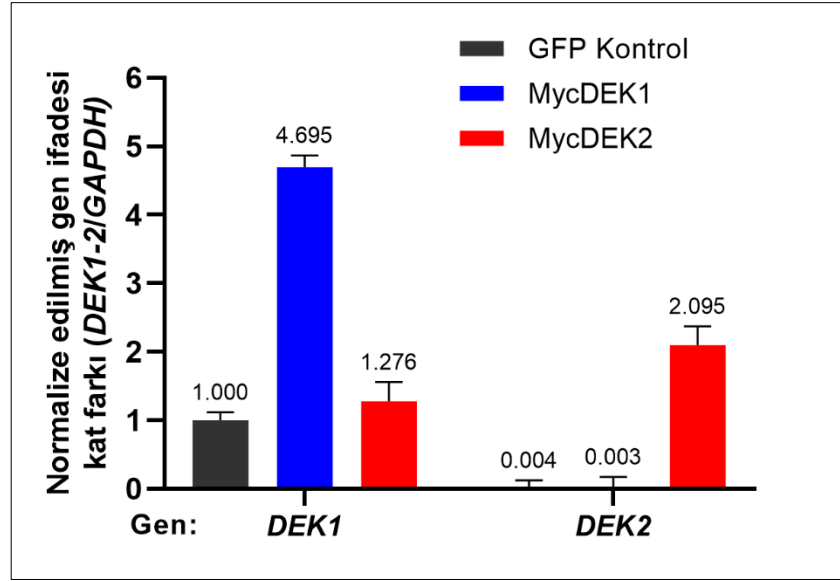
Retrovirüs üretimi için 293T hücreleri retroviral vektörler ile transfekte edildi. Transfeksiyon sonrası toplanan virüsler ile HS-27A hücreleri infekte edildi. Enfeksiyon verimliği, floresan mikroskopu altında GFP ışıması yapan hücrelerin varlığı ile gözlemlendi. Görece düşük olduğu düşünülen hücre popülasyonunun seviyesini arttırmak için hücre seçimi yapılmasına karar verildi.

Hücre seçilimi, akım sitometrisi tabanlı floresan hücre ayırıştırması (Fluorescence-activated cell sorting; FACS) kullanılarak, belli seviyenin üstündeki GFP pozitif hücrelerin ayırıştırılması ile gerçekleştirildi. Ayırıştırma sonrası, seçilen hücreler kültür ortamında bir süre büyütüldükten sonra akım sitometrisi kullanılarak GFP pozitif hücre popülasyonunun en az %90 olduğu tespit edildi (Şekil 6.5).



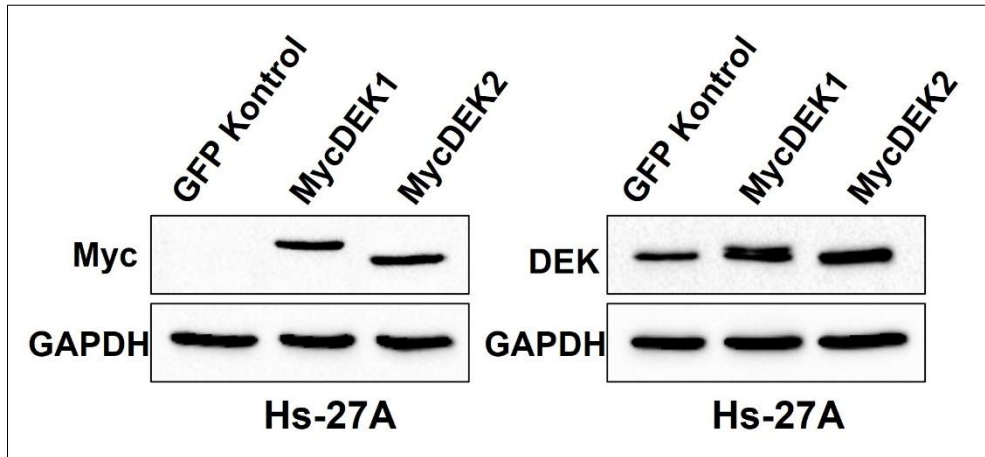
Şekil 6.5: FACS ile hücre seçilimi sonrası GFP-pozitif hücrelerin analizi. HS-27A (infekte edilmemiş) hücrelerin analiz ile belirlenen kapının solu GFP-negatif, sağ ise GFP-pozitif hücre popülasyonunu göstermektedir.

Seçilimi tamamlanan hücrelerde DEK izoformlarının aşırı ifadesini göstermek için hücrelerden toplanan RNA örnekleri ile RT-qPCR analizi gerçekleştirildi. Sonuç olarak mRNA düzeyinde, hücrenin endojen *DEK1* ifadesine göre, *DEK1* ifadesinin yaklaşık 4,5 kat, *DEK2* ifadesinin ise yaklaşık 2 kat arttığı bulgusu elde edildi (Şekil 6.6).



Şekil 6.6: RT-qPCR sonucu ile edilen aşırı *DEK1* ve *DEK2* ifade eden hücrelerin kontrol grubu *DEK1* (endojen) seviyesine göre kat farkı.

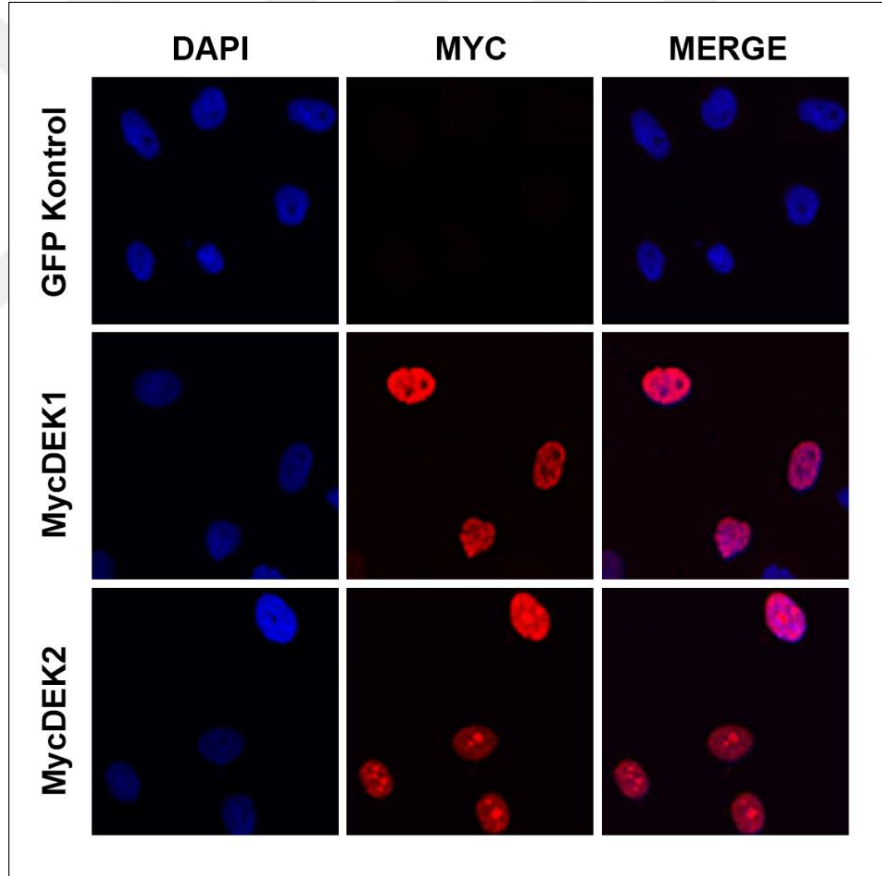
Artan mRNA ifadesinin, protein ifadesi üzerine etkisini görmek için bu protein örnekleri toplandı. Elde edilen protein örnekleriyle western blot tekniği kullanılarak protein analizi yapıldı. Sonuç olarak, DEK izoformlarının (MycDEK1 ve MycDEK2) protein düzeyinde ektopik olarak ifade edildiği ve bu hücrelerin total DEK miktarının endojen DEK miktarına göre arttığı gösterildi (Şekil 6.7).



Şekil 6.7: Western blot yöntemi ile hücrelerin ektopik aşırı MycDEK1 ve MycDEK2 ifadesinin protein seviyesinde gösterimi. Sol: Myc antikoru, sağ: DEK antikoru uygulamasını göstermektedir. GAPDH yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır.

6.3. DEK1 ve DEK2 Protein Hücre İçi Lokalizasyonunun Belirlenmesi

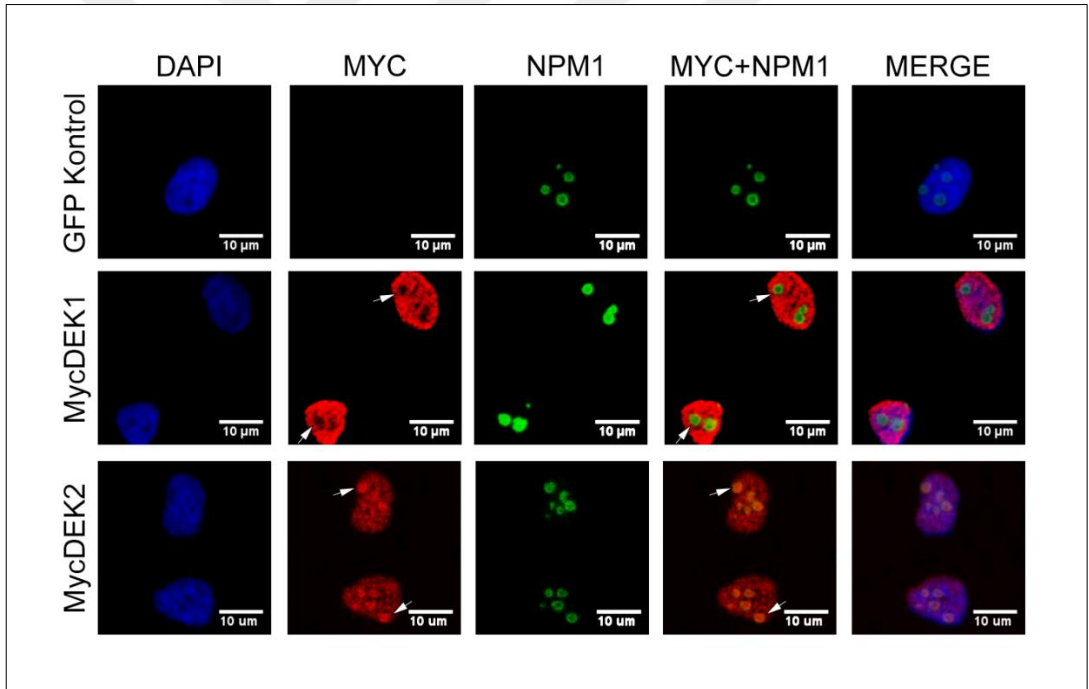
Ektopik olarak aşırı DEK1 ve DEK2 ifade eden HS-27A hücreleri, Myc antikoru ile immünofloresan olarak boyandı. Boyama sonrası floresan ışına konfokal mikroskobu ile görüntülendi. DAPI floresan boyası DNA'da bazı nükleik asit bölgelerine kuvvetli olarak bağlanarak çekirdeğin konumunu göstermektedir [Chazotte, 2011]. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda MycDEK1, DAPI görüntüsü ile örtüşerek, genel olarak hücre çekirdeğinde yayılım gösterirken, MycDEK2 yine hücre çekirdeğinde yayıldığı fakat çekirdek içinde bazı konumlarda agregatlar oluşturduğu görüldü (Şekil 6.8).



Şekil 6.8: İmmünofloresan yöntem kullanılarak HS-27A hücrelerinde ektopik DEK izoformlarının hücre içi lokalizasyonlarının gösterilmesi. Myc antikoru DEK izoformlarını, DAPI ise hücre çekirdeğini göstermektedir.

6.4. DEK2 Proteinini ile Çekirdekçik Biyobelirteci Olan Nucleophosmin-1'in Birlikte-lokalizasyonunun Gösterilmesi

Hücre çekirdekçigi, çekirdek içerisinde zarsız bir yapıda bulunduğu bilinmektedir [Trinkle-Mulcahy, 2018]. Nucleophosmin-1 (NPM1) proteini ise hücre içerisinde yoğunlukla çekirdekçikte bulunmaktadır [Borer et al., 1989]. Bu bilgiden yola çıkarak, MycDEK2 proteinin hücre çekirdeğinde agregat oluşturduğu bölgelerin hücre çekirdekçigi olup olmadığı göstermek için hem Myc hem de NPM1 ile immünofloresan boyama yapıldı. Boyama sonrası örnekler konfokal mikroskobu ile görüntülendi. Sonuç olarak MycDEK2 proteini, çekirdekte diffüz yayılıma ek olarak NPM1 lokalizasyonu ile örtüşerek çekirdekçikte lokalize olduğunu sonucuna ulaşıldı (Şekil 6.9).



Şekil 6.9: HS-27A hücrelerinde immünofloresan yöntemle hem NPM1 hem de Myc antikolları ile çift boyama sonucunda, NPM1 ve DEK izoformlarının birlikte-lokalizasyonunun gösterilmesi. Ok ucu NPM1 ile örtüşen çekirdekçik lokalizasyonunu göstermektedir.

DEK izoformlarının hücre popülasyonunda ne oranda çekirdekçikte lokalizasyon gösterdiğini analiz etmek MycDEK1 ve MycDEK2 ifade eden HS-27A hücreleri ve benzer şekilde laboratuvarımızda oluşturulmuş N-Terminaline Flag

epitopu bağılı FlagDEK1 ve FlagDEK2 ifade eden HS-27A hücreleri kullanılarak çekirdekçikte lokalize olma oranı hesaplandı. Bu hesaplama için öncelikle hücreler immüno Floresan yöntemle boyandı ve Floresan ışığa takip edilerek, her hücre grubu için hücre popülasyonundan rastgele en az 100 hücre sayıldı. Sayılan bu hücre grupları içinde, Myc veya Flag epitoplu DEK izoformları bakımından çekirdekçikte lokalizasyon gösteren hücre sayıları not edildi. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, oransal olarak DEK1 proteini oldukça az hücrede çekirdekçikte lokalizasyonu gözlenirken, DEK2 proteini oldukça fazla hücrede çekirdekçikte lokalizasyon gösterdiği sonucuna ulaşıldı (Tablo 6.1).

Tablo 6.1: Ektopik DEK izoformlarının hücresel lokalizasyonları.

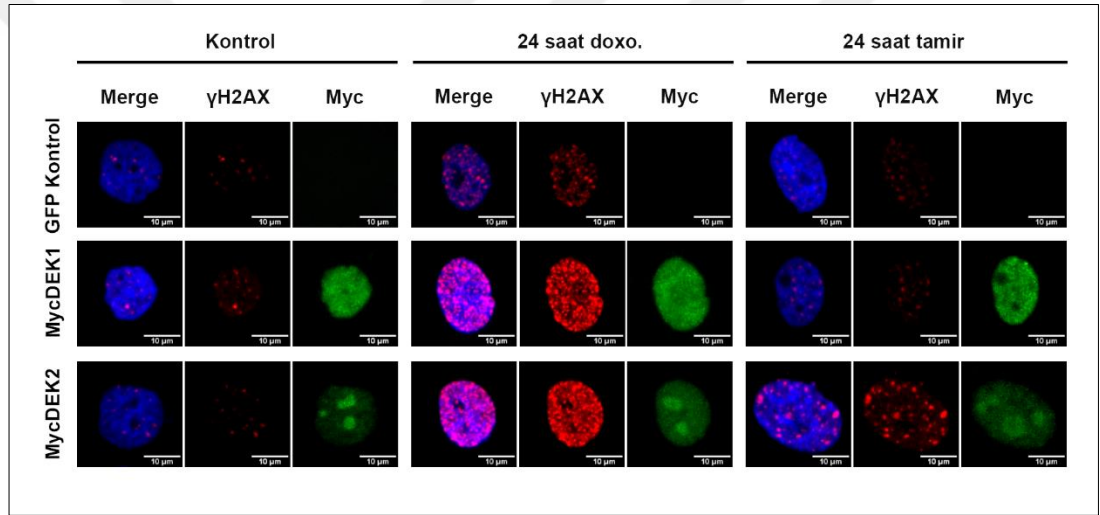
HS-27A Hücresi	Total Hücre Sayısı	Nüklear Lokalizasyon (% Hücre sayısı)	Nüklear Agregat (% Hücre sayısı)
MycDEK1	135	89,9	10,3
MycDEK2	147	1,3	98,6
FlagDEK1	216	100	0
FlagDEK2	183	20,7	79,2

6.5. DEK İzoformlarının DNA Hasar ve Tamir Mekanizmaları Üzerindeki Etkisi

6.5.1. DNA Hasarının Oluşturulması

DNA üzerindeki hasarlar genomik istikrarsızlığa sebep olmaktadır. Bir kemoterapi ilacı olarak kullanılan doxorubicin, DNA Topoizomerez II'yi inhibe ederek replikasyon stresi oluşturmakta ve hücre metabolizmasını etkileyerek reaktif oksijen türevlerinin (ROS) oluşmasına sebep olmaktadır. Bu durumun DNA üzerinde çift iplik kırığına sebep olduğu ise bilinmektedir [Chatterjee and Walker, 2017]. DNA hasarı olduğu zaman bir histon proteini olan H2AX fosforillenmesi gerçekleşmekte ve hasar bölgesinde γ H2AX odakları oluşmaktadır [Mah et al., 2010]. Bu çalışmada çift zincir DNA kırığı oluşturmak için 0,05 μ M doxorubicin (doxo) kullanıldı. Hücrelere 24 saat boyunca doxo uygulandı. Doxo uygulaması sonrası, bir grup hücreden doxo uzaklaştırılarak 24 saat taze büyüme besiyerinde

inkübasyonu sağlandı. Örnekler immüno Floresan olarak boyandı ve hiç doxo uygulanmamış (kontrol grubu), 24 saat doxo uygulanmış (DNA hasarı grubu) ve doxo uygulamasından sonra 24 saat büyüme besiyerinde inkübe edilmiş (DNA tamiri grubu) hücreleri konfokal mikroskobu ile görüntülendi. DNA hasarı grubu hücrelerde doxo uygulaması sonunda DNA hasar belirtici olan γ H2AX odak yoğunluğu kontrol grubuna göre oldukça yükselirken, DNA tamiri grubu hücrelerde hasarın tamiri ile γ H2AX odak yoğunluğunun azaldığı gözlemlendi. Sonuç olarak, 0.05 μ M doxo uygulamasının efektif DNA hasarına sebep olduğu, artan γ H2AX odakları ile ortaya konuldu. Doxo uzaklaştırıldıktan sonra ise, DNA tamirinin gerçekleşmesi sonucunda γ H2AX odaklarının azaldığı gösterildi (Şekil 6.10).

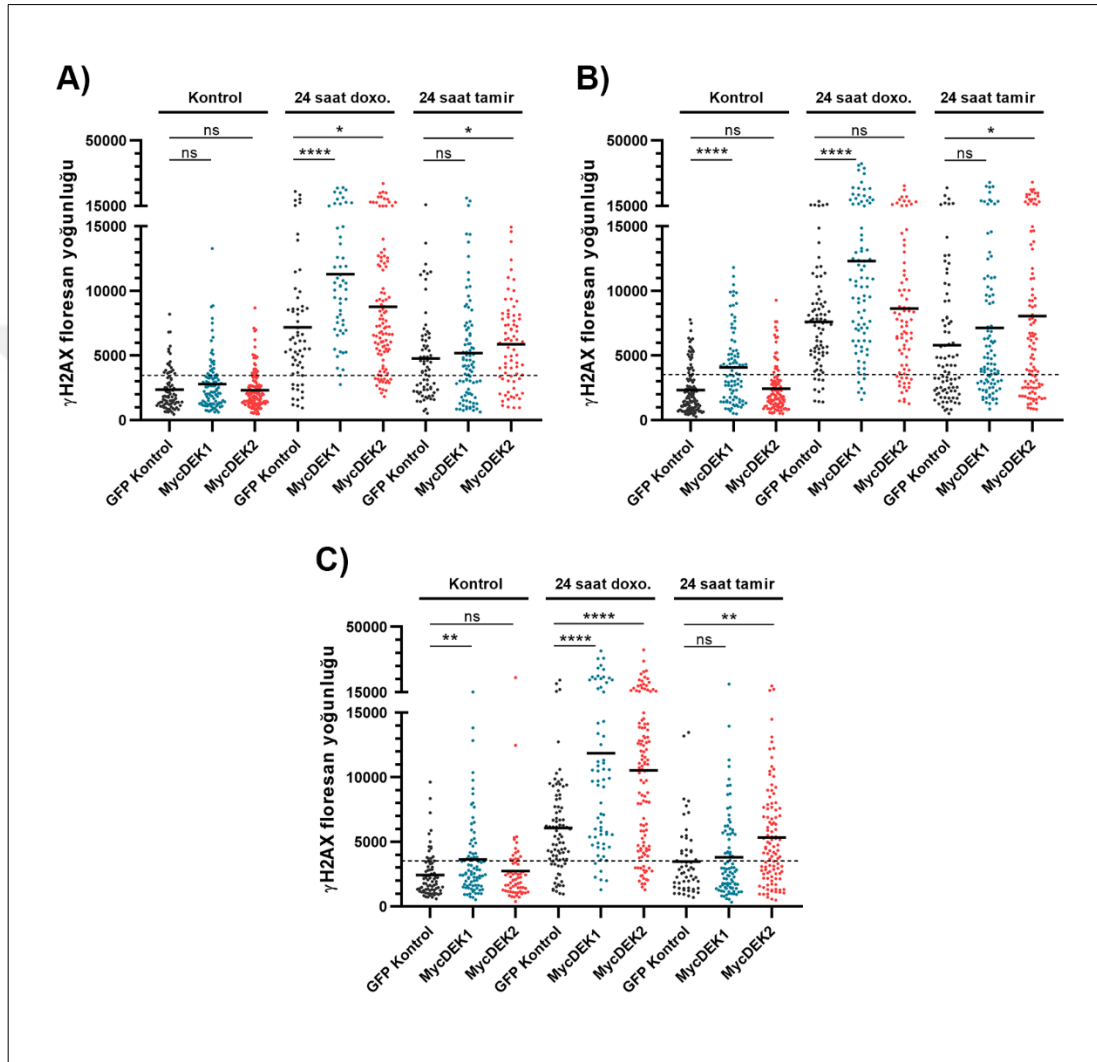


Şekil 6.10: 24 saat 0,05 μ M doxorubicin (doxo) uygulaması ile oluşturulmuş DNA hasarı sonrası, HS-27A hücrelerinde γ H2AX odak yoğunluğunun immüno Floresan boyama ile belirlenmesi. Kontrol: doxo uygulanmamış; 24 saat doxo.: doxo uygulamasından hemen sonra; 24 saat tamir: doxo uzaklaştırıldıktan 24 saat sonra, boyanıp konfokal mikroskobu ile görüntülenmiş hücre gruplarını temsil etmektedir.

6.5.2. DNA Hasarı Sonrası Değişen γ H2AX Odak Yoğunluğunun Tespiti

İmmüno Floresan olarak boyanan DNA hasarı hücre gruplarında 50 ila 100 arasında Myc-pozitif hücrenin γ H2AX floresan yoğunluğu ölçüldü. Gruplardaki her bir hücrenin floresan yoğunluğunun aritmetik ortalaması o grubun hasar seviyesi olarak kabul edildi. Bu deney birbirinden bağımsız olarak 3 kez tekrar edildi. Sonuç olarak, 24 saat doxo uygulaması sonucunda hem DEK1 hem de DEK2 hücrelerinde

kontrol (HS-27A-GFP) hücrelerine göre daha yüksek γ H2AX sinyali oluştu. Doxo uzaklaştırıldıktan 24 saat sonunda ise DNA tamiri sonucunda, γ H2AX sinyali DEK1 hücrelerinde kontrol grubu ile benzer seviyeye inerken, DEK2 hücrelerindeki γ H2AX sinyali azalışı daha az olduğu tespit edildi (Şekil 6.11).

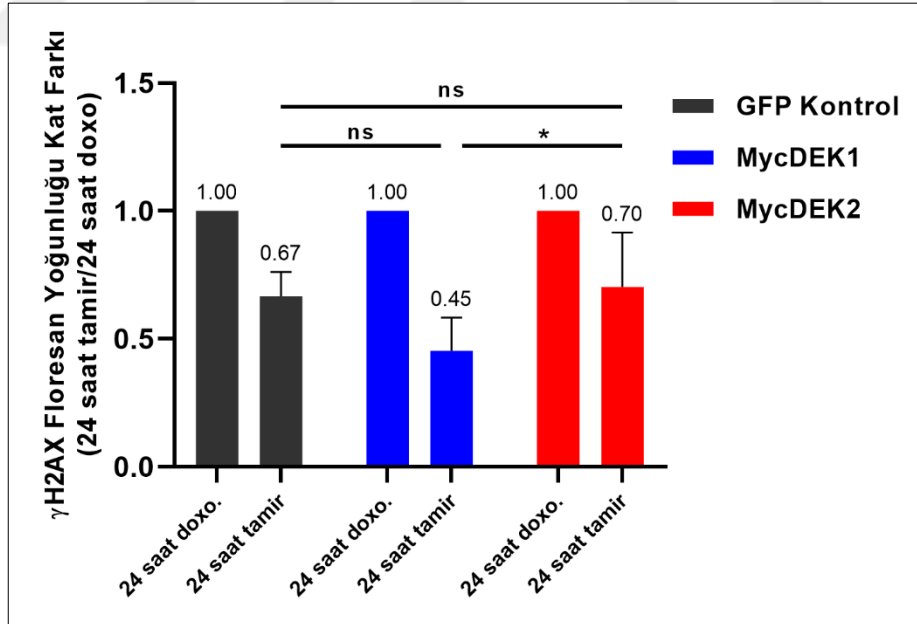


Şekil 6.11: DNA hasar seviyesinin 50 ila 100 arasında HS-27A hücresinin γ H2AX yoğunluğunun ortalamasını alınarak karşılaştırılması. 3 bağımsız tekrar ile sonuçlar desteklenmiştir. A) 1. bağımsız deney sonucu, B) 2. bağımsız deney sonucu C) 3. bağımsız deney sonucu. Tüm bağımsız deneylerde, Mann Whitney U-test ile istatistiksel olarak anlamlılık hesaplanmıştır.

6.5.3. Aşırı DEK1 ve DEK2 İfade Eden Hücrelerin Hasar Tamir Oranlarının Analizi.

Elde edilen hasar seviyeleri kullanılarak, her örneğin 24 saat tamir sonrası seviyesinin 24 saat hasar sonrası seviyesine bölünmesi (24 saat tamir seviyesi/24 saat doxo seviyesi) ile DNA tamiri sonundaki hasar seviyesi hesaplandı. 3 bağımsız deneyin ortalaması alındığı zaman, aşırı MycDEK1 ifade eden HS-27A hücrelerinin, aşırı MycDEK2 ifade eden HS-27A hücrelerine göre istatistiksel olarak anlamlı seviyede ve daha yüksek oranda DNA onarımı gerçekleştirdiği görüldü. Fakat aşırı MycDEK2 ifade eden HS-27A hücrelerinde kontrol grubuna göre anlamlı fark tespit edilmedi (Şekil 6.12).

Sonuç olarak, kontrol grubu hücrelere göre aşırı MycDEK1 ve MycDEK2 daha fazla hasar oluşumuna sebep olsa bile, aşırı MycDEK1, hücrelerde oluşan hasarın aynı sürede daha yüksek oranda tamir edilmesini sağlamıştır. Tüm sonuçlar ele alındığında, DEK1'in DNA tamirinde olası bir rol oynadığı, fakat DEK2'nin benzer etkiyi göstermeyerek DEK1'den farklı davrandığı sonucuna ulaşılmıştır.

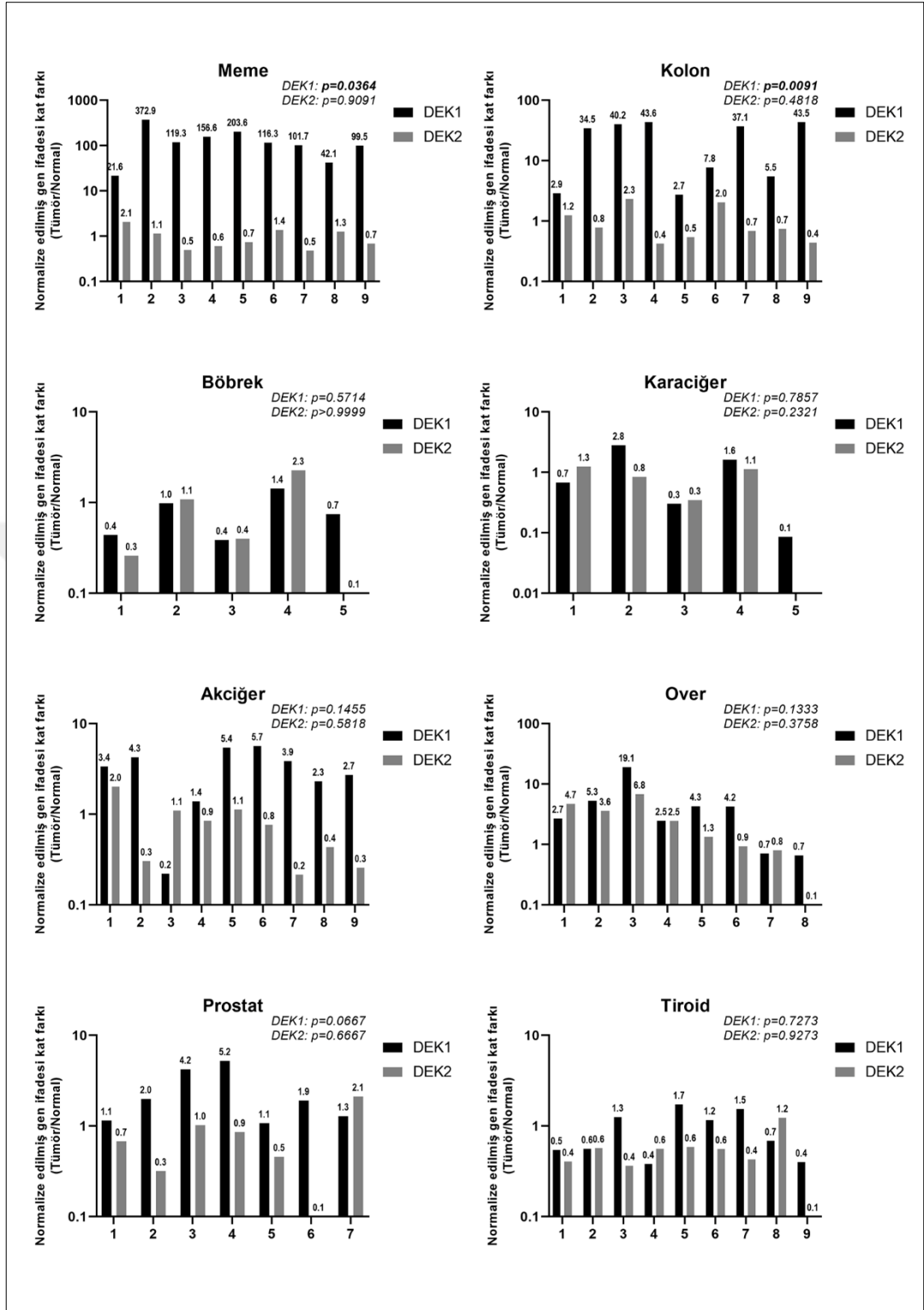


Şekil 6.12: HS-27A hücrelerinde 24 saat doxo uygulaması sonucunda oluşan DNA hasarına oranla, hasar tamirinin ortalama γ H2AX floresan yoğunluğu ile analizi. 3 bağımsız deneyin ortalaması Two Way Anova ile istatistiksel olarak analiz edilmiştir (hata barları $\pm$ standart sapmayı göstermektedir).

6.6. Farklı İnsan Tümör Dokularında Değişen DEK1 ve DEK2 Seviyesinin Analizi

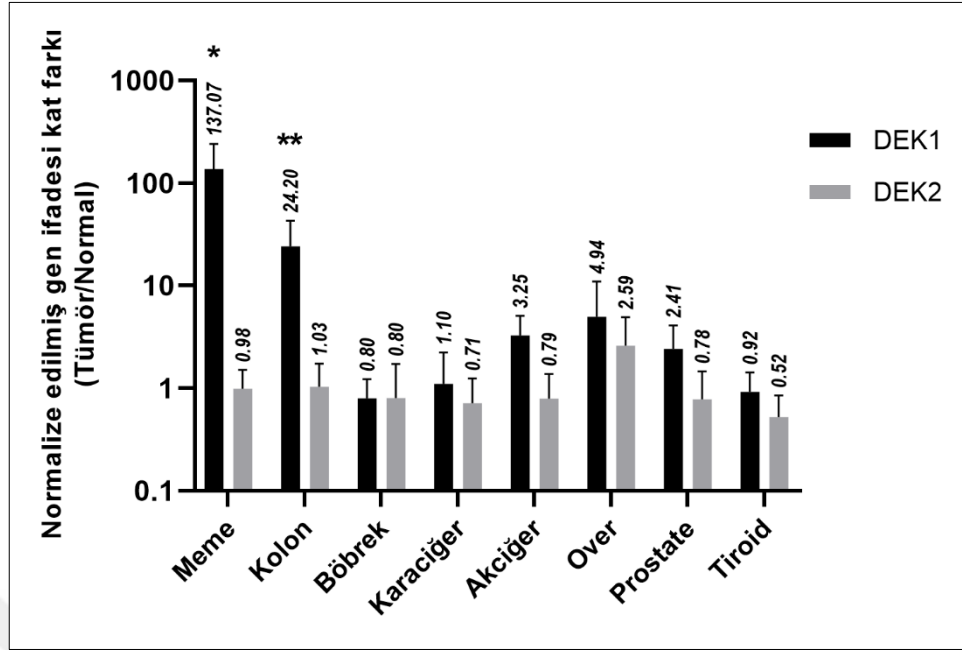
İnsan normal ve tümör dokularında, değişen *DEK1* ve *DEK2* seviyesinin tespiti için TissueScan Cancer Survey cDNA Array 96-I (Origene, Rockville, MD, USA) paneli kullanıldı. *DEK1* ve *DEK2* ifadesi özgün primer çiftleri kullanılarak RT-qPCR yöntemi ile analiz edildi. Çalışmada *Actin-Beta* (*ACTB*) ifadesi normalizatör olarak kullanıldı. *DEK1* ve *DEK2* ifadesinin analizi için bağımsız iki tekrarın ortalaması kullanıldı. Kullanılan panel 8 farklı dokuya ait farklı insanlardan alınmış cDNA örneklerini içermektedir. Her doku için 3 farklı insana ait normal ve 9 farklı insana ait tümör örneği bulunmaktadır. Her doku için PCR reaksiyonunda efektif olarak çalışan normal ve tümör doku örnekleri kullanılarak, *DEK1* ve *DEK2* seviyesi göreceli olarak karşılaştırıldı. Elde edilen sonuçlar ile, tüm dokularda hem *DEK1* ve hem de *DEK2* seviyesi aynı doku türünde farklı örneklerde farklı seviyelerde olduğu ve *DEK1* ifadesinin meme ve kolon tümör dokularında anlamlı seviyede arttığı görüldü (Şekil 6.13). *DEK1* ifadesindeki bu artışın, meme kanserinde 137, kolon kanserinde ise 24 kat arttığı görüldü (Şekil 6.14)

Sonuç olarak, yapılan çalışma doğrultusunda, *DEK1* ifadesinin meme ve kolon kanserinde anlamlı seviyede arttığı görüldü. Fakat *DEK2* ifadesinde, kullanılan 8 farklı kanser türündeki hiçbir tümör dokusunda, normal dokuya göre anlamlı bir artış veya azalış tespit edilemedi.



Şekil 6.13: cDNA-doku panel örneklerinin RT-qPCR ile yöntemiyle yöntemiyle analizi. Panel meme, kolon, böbrek, karaciğer, akciğer, over, prostat ve tiroid dokularından alınmış sağlıklı (n=3) ve tümör (n=9) cDNA örneklerini içermektedir.

DEK1 ve DEK2 ifadesi 2 bağımsız cDNA panelin ortalaması alınarak hesaplanmıştır. Bazı örnekler erime eğrisi (melting curve) analizi sonucunda verilerden çıkartılmıştır. Logaritmik olarak sunulan grafiklerdeki barlar, normal dokuya oranla tümör dokusundaki kat farkını ifade etmektedir. Kat farkı Mann Whitnet U-test kullanılarak istatistiksel olarak p değeri hesaplanmıştır.



Şekil 6.14: RT-qPCR ile yöntemiyle analiz edilen cDNA-doku panel örneklerinin tümör dokudaki ortalama kat farkı. Grafikteki dikey değerleri logaritmik artış ile gösterilmiştir. Mann Whitnet U-test kullanılarak istatistiksel olarak p değeri hesaplanmıştır (hata barları $\pm$ standart sapmayı göstermektedir).

7. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

DEK proteini, DNA tamiri dahil birçok hücrel süreçle ilişkilendirilen ve bazı solid kanser türlerinde aşırı ifadesi ile tanımlanmış bir onkoproteindir [Riveiro-Falkenbach and Soengas, 2010], [Privette Vinnedge et al., 2013]. *DEK* geni bilinen 2 farklı izoformu kodlamaktadır ve bu izoformlar DEK izoform-1 (DEK1) ve DEK izoform-2 (DEK2) proteinlerini ifade etmektedir. DNA tamiri ve birçok farklı hücrel süreç DEK1 proteini ile ilişkilendirilse de, DEK2 proteini detaylı olarak incelenmemiştir.

DEK2 proteini DEK1 proteininden farklı olarak ekzon 3 bakımından eksik 341 aminoasit uzunluğundaki bir *DEK* izoformudur. Yapısal olarak 34 aminoasitlik bir fark olsa bile, DEK1 proteinindeki DNA'ya bağlanma bölgesi ve multimerize bölgesi DEK2 proteininde de korunmuştur. Fakat bu özellikler bakımından DEK2'nin aynı özellikleri gösterdiği henüz kanıtlanmamıştır.

Bu çalışmada, DEK1 izoformu ile karşılaştırılarak, DEK2 izoformunun DNA tamiri ve bazı epitel kökeni kanser türlerinde üzerinde etkisinin gösterilmesi amaçlanmıştır. Çalışmamız doğrultusunda ilk önce farklı hücrelerde DEK1 ve DEK2 ifadesi, izoformlara özgün olarak tasarlanmış primer çiftleri ile tespit edildi. Bu çalışmada kullanılan tüm hücrelerde eş zamanlı olarak hem *DEK1* hem de *DEK2*'nin ifade edildiği tespit edildi. *DEK2* ifadesinin *DEK1*'e oranla HS-27A ve U937 hücrelerinde göreceli olarak daha fazla olduğu sonucuna ulaşıldı. Bu doğrultuda, DEK2 izoformunun DNA tamiri üzerindeki etkisinin analizini yapabilmek için HS-27A hücrelerinde N-terminaline Myc epitopu eklenmiş DEK1 ve DEK2 izoformunun aşırı ifadesi, MIGR1 retroviral vektörü (MSCV-IRES-GFP) yardımıyla sağlandı.

Elde edilen hücrelerin RNA örnekleri analiz edildiği zaman endojen DEK2 ifadesinin DEK1 ifadesine göre oldukça düşük kaldığı (yaklaşık 250 kat) görüldü. DEK izoformlarının aşırı ifadesi sağlanan HS-27A hücrelerinde ise endojen *DEK1*'e oranla *DEK1* seviyesinin 4,5 kat, *DEK2* seviyesinin 2 kat arttığı gösterildi. Western blot yöntemi ile bu hücrelerde DEK1 ve DEK2'nin ektopik olarak protein düzeyinde ifade edildiği N-terminalinde bulunan Myc epitopu hedef olarak gösterildi.

DEK1 proteinin genel olarak çekirdekte lokalize olan nükleer bir proteindir [Waldmann et al., 2004]. Farklı olarak ise hücre dışına DEK salgılayan makrofaj hücrelerinde, DEK proteini hücre sitoplazmasında da bulunabileceği tespit edilmiştir

[Mor-Vaknin et al., 2006]. Bu çalışmada HS-27A hücrelerinde hem DEK1'in hem de DEK2'in protein lokalizasyonunun tespiti amaçlandı. Bu doğrultuda MycDEK1 ve MycDEK2 ifadesi sağlanan HS-27A hücrelerinde Myc epitopu hedef alınarak konfokal mikroskobu ile proteinlerin hücresel lokalizasyonu incelendi. Yapılan bu çalışma ile MycDEK1 ve MycDEK2 proteininin hücre çekirdeğinde lokalize olduğu gözlemlendi. Ancak MycDEK2 proteininin çekirdek lokalizasyonuna ek olarak, çekirdek içerisinde bazı konumlarda agregat oluşturduğu ve bu agregatların NPM1 ile örtüşen lokalizasyon sergilediği görüldü. DEK2'nin NPM1 ile birlikte lokalizasyonu, DEK2'nin çekirdekçikte de yoğun olarak lokalize olduğunu gösterdi. Bu bulgular ile DEK1 ve DEK2'nin hücre içi lokalizasyonlarında farklı eğilimler olabildiği sonucuna ulaşıldı.

DNA çift iplik kırığı tamirinde DEK1 proteinin etkisi bilinmektedir. DNA hasar aldıktan sonra H2AX hızla ATM veya ATR tarafından fosforillenerek γ H2AX odakları oluşmaktadır. Bu süreç hasar tamiri için gereklidir [Goodarzi and Jeggo, 2013]. DNA topoizomerez II DNA replikasyonunda DNA sentezinin gerçekleşebilmesi için DNA'yı yeniden şekillendirerek açılmasını sağlamaktadır. Açılmayan replikasyon çatalları, DNA replikasyonunun durmasına sebep olarak, hücre stresine sebep olmaktadır [Gaillard et al., 2015]. Kanseri ilacı olarak kullanılan doxorubicin bir DNA topoizomerez II inhibitörüdür ve hücrenin replikasyon stresine girmesine sebep olur. Bu stres durumu ise hücre DNA'sında çift iplik kırıkları ile sonuçlanır [Mah et al., 2010]. Bu tez çalışmasında çift iplik kırığı oluşturmak için 0,05 μ M doxorubicin kullanıldı. Aşırı DEK1 ve DEK2 ifade eden hücrelerde DNA hasarı oluşturuldu. DNA hasarı sonucunda γ H2AX odakları oluştu. Her bir γ H2AX odağı bir DNA hasarına karşılık gelmektedir [Mah et al., 2010]. Böylece γ H2AX odaklarının yoğunluğu ile hasarın şiddeti gözlemlendi. Dikkat çekici olarak DEK1 ve DEK2 hücrelerinde kontrole göre daha fazla DNA hasarı oluştu. Bu durum hem aşırı DEK1'in hem de aşırı DEK2'nin DNA hasarına karşı hücreyi daha hassaslaştırdığını düşündürmektedir.

DEK'ten yoksun hücrelerde yapılan çalışmalarda, oluşturulan DNA hasarında, γ H2AX odak sinyalinde anlamlı bir azalış görülürken [Smith et al., 2017], bu tez çalışmasında hem DEK1'in hem de DEK2'nin aşırı ifadesinin, tam tersi olarak anlamlı bir artış sergilediği görüldü. Dolayısıyla DNA hasarına bağlı γ H2AX odak

sinyalindeki bu artışın, DEK1 ve DEK2 izoformları ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.

Hasar tamirinde DEK2 proteinin etkisini analiz edebilmek için hem aşırı DEK1 hem de aşırı DEK2 proteini ifade eden hücrelerde değişen γ H2AX odak yoğunluğu karşılaştırıldı. Daha önce DEK geninin susturulması ile DNA tamiri boyunca γ H2AX yoğunluğunun hasar sonrası azalmasında gecikme yaşadığı gösterilmiştir [Kappes et al., 2008]. Bizim çalışmamız aşırı DEK1 ifade eden hücrelerin, 24 saat DNA tamiri sonunda kontrol grubu hücrelere benzer bir γ H2AX yoğunluğunu seviyesine geldiğini gösterdi. Dolayısıyla DEK1 aşırı ifadesinin, DEK geninin susturulmasına ters olarak, DNA tamirinde başarılı bir etki göstermesi tutarlıdır. Ayrıca bu tez çalışması ile aşırı DEK2 ifadesinin DNA tamirinde hem kontrol grubu hem de aşırı DEK1 ifade eden hücrelere göre anlamlı seviyede geri kaldığı sonucuna ulaşıldı. Bu sonuç ise laboratuvarımızda yürütülen, endojen DEK ifadesinin susturulup sadece ektopik DEK2 ifadesinin sağlandığı hücrelerle elde ettiği DNA tamiri sonuçları ile de tutarlıdır [Özçelik et al., 2022]. DNA tamir oranlarına bakıldığı zaman ise aşırı DEK1 ifade hücrelerinin aşırı DEK2 ifade hücrelere göre DNA tamirinde istatistiksel olarak anlamlı seviyede daha başarılı olduğu görüldü. Sonuç olarak, DEK2'nin DNA tamiri sürecinde DEK1 gibi davranmadığı sonucuna ulaşıldı.

Kanserde değişen DEK1 ve DEK2 ifadesi 8 farklı kanser türünde analiz edildi. Bu çalışmada meme, kolon, böbrek, karaciğer, akciğer, over, prostat ve tiroid bezinin normal ve tümör doku örneklerinin cDNA'ları kullanıldı. TissueScan Cancer Survey cDNA Array 96-I (Origene, Rockville, MD, USA) paneli tarafından sağlanan bu örneklerde normal dokuya göre tümörde değişen gen ifadesine mRNA düzeyinde bakıldı. Sonuç olarak, istatistiksel olarak anlamlı seviyede, DEK1 ifadesinin meme kanserinde 137 kat ($p=0,0364$), kolon kanserinde ise 24 kat ($p=0,0091$) arttığı bulgusuna ulaşıldı. Dikkat çekici olarak, akciğer, over ve prostat kanserinde artış, böbrek kanserinde ise azalış gözlenirse bile anlamlı düzeyde bir fark tespit edilmedi. DEK2 ifadesinde ise over kanserinde artış, böbrek, karaciğer, akciğer, prostat ve tiroid bezi kanserinde azalış gözlemlendi. Fakat DEK2 ifadesi için hiçbir kanserde türünde anlamlı bir değişim tespit edilmedi. Düşük örnek sayısına rağmen, meme ve kolon kanserlerinde elde ettiğimiz artan DEK1 ifadesi sonucuyla tutarlı olarak, bu kanser türleri DEK aşırı ifadesi ile ilişkilendirilmiştir [Lin et al., 2013], [Yang et al.,

2021]. Bu çalışmada kullanılan herhangi bir kanser türünde, *DEK2* ifadesi için anlamlı bir değişim gözlenmedi. Bu kanser türlerindeki değişimin daha net bir tespiti için daha fazla örnek sayısı ile çalışmanın daha kararlı sonuçlar verebileceği düşünülmektedir.

Özetle, bu tez çalışması *DEK2* ifadesinin DNA tamiri üzerindeki etkisini ve bazı epitel kökenli kanser türlerindeki ifadesinin nasıl değiştiğini ortaya koymayı amaçlamıştır. Sonuç olarak ise *DEK2*'nin, *DEK1*'den farklı lokalizasyonda da bulunabileceğini, DNA tamiri sürecinde *DEK1*'den farklı davranış sergilediğini ve normal veya tümör dokularında *DEK1* ve *DEK2* seviyesinin dokuya göre farklılık gösterdiğini ortaya koymaktadır. Bu tez çalışması TÜBİTAK tarafından KBAG 118Z765 numaralı 1001 projesi ile desteklenmiştir.



KAYNAKLAR

Alomari M., Almohazey D., Almoftly S.A., Khan F.A., Al Hamad M., Ababneh D., (2019), "Role of Lipid Rafts in Hematopoietic Stem Cells Homing, Mobilization, Hibernation, and Differentiation", *Cells*, 8(6):630, 1-11.

Anthony B.A., Link D.C., (2014), "Regulation of hematopoietic stem cells by bone marrow stromal cells", *Trends in Immunology*, 35, 32-37.

Bakkenist C.J., Kastan M.B., (2003), "DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation", *Nature*, 421, 499-506.

Bohm F., Kappes F., Scholten I., Richter N., Matsuo H., Knippers R., Waldmann T., (2005), "The SAF-box domain of chromatin protein DEK", *Nucleic Acids Research*, 33, 1101-1110.

Borer R.A., Lehner C.F., Eppenberger H.M., Nigg E.A., (1989), "Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm", *Cell*, 56, 379-390.

Bouquet F., Muller C., Salles B., (2006), "The Loss of γ H2AX Signal is a Marker of DNA Double Strand Breaks Repair Only at Low Levels of DNA Damage", *Cell Cycle*, 5, 1116-1122.

Bouwman P., Jonkers J., (2012), "The effects of deregulated DNA damage signalling on cancer chemotherapy response and resistance", *Nature Reviews Cancer*, 12, 587-598.

Capitano M.L., Broxmeyer H.E., (2017), "A role for intracellular and extracellular DEK in regulating hematopoiesis", *Current Opinion in Hematology*, 24, 300-306.

Carro M.S., Spiga F.M., Quarto M., Di Ninni V., Volorio S., Alcalay M., Muller H., (2006), "DEK Expression is controlled by E2F and deregulated in diverse tumor types", *Cell Cycle*, 5, 1202-1207.

Ceccaldi R., Rondinelli B., D'Andrea A.D., (2016), "Repair Pathway Choices and Consequences at the Double-Strand Break", *Trends Cell Biol*, 26, 52-64.

Chatterjee N., Walker G.C., (2017), "Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis", *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 58, 235-263.

Chazotte B., (2011), "Labeling nuclear DNA using DAPI", *Cold Spring Harbor Protocols*, 2011, pdb.prot5556.

Chowdhury D., Xu X., Zhong X., Ahmed F., Zhong J., Liao J., Dykxhoorn D.M., Weinstock D.M., Pfeifer G.P., Lieberman J., (2008), "A PP4-Phosphatase Complex Dephosphorylates γ -H2AX Generated during DNA Replication", *Molecular Cell*, 31, 33-46.

Cleary J., Sitwala K.V., Khodadoust M.S., Kwok R.P., Mor-Vaknin N., Cebrat M., Cole P.A., Markovitz D.M., (2005), "p300/CBP-associated factor drives DEK into

interchromatin granule clusters", *Journal of Biological Chemistry*, 280, 31760-31767.

Fattah F., Lee E.H., Weisensel N., Wang Y., Lichter N., Hendrickson E.A., (2010), "Ku Regulates the Non-Homologous End Joining Pathway Choice of DNA Double-Strand Break Repair in Human Somatic Cells", *PLOS Genetics*, 6, e1000855.

Gaillard H., García-Muse T., Aguilera A., (2015), "Replication stress and cancer", *Nature Reviews Cancer*, 15, 276-289.

Gamble M.J., Fisher R.P., (2007), "SET and PARP1 remove DEK from chromatin to permit access by the transcription machinery", *Nature Structural & Molecular Biology*, 14, 548-555.

Ghosal G., Chen J., (2013), "DNA damage tolerance: a double-edged sword guarding the genome", *Translational Cancer Research*, 2, 107-129.

Gomez V., Hergovich A., (2016). "Cell-Cycle Control and DNA-Damage Signaling in Mammals". In: I. Kovalchuk, O. Kovalchuk, Editors, "Genome Stability", Academic Press.

Goodarzi A.A., Jeggo P.A., (2013). "The Repair and Signaling Responses to DNA Double-Strand Breaks". In: T. Friedmann, J.C. Dunlap, S.F. Goodwin, Editors, "Advances in Genetics", Academic Press.

Han S., Xuan Y., Liu S., Zhang M., Jin D., Jin R., Lin Z., (2009), "Clinicopathological significance of DEK overexpression in serous ovarian tumors", *Pathology International*, 59, 443-447.

Helena J.M., Joubert A.M., Grobbelaar S., Nolte E.M., Nel M., Pepper M.S., Coetzee M., Mercier A.E., (2018), "Deoxyribonucleic Acid Damage and Repair: Capitalizing on Our Understanding of the Mechanisms of Maintaining Genomic Integrity for Therapeutic Purposes", *International Journal of Molecular Sciences*, 19.

Hoffman R., Marcellino B.K., (2020). "Bone Marrow Microenvironment in Health and Disease". In: M. Zaidi, Editors, "Encyclopedia of Bone Biology", Academic Press.

Iyama T., Wilson D.M., (2013), "DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells", *DNA Repair*, 12, 620-636.

Jackson S.P., Bartek J., (2009), "The DNA-damage response in human biology and disease", *Nature*, 461, 1071-1078.

Janssens R., Struyf S., Proost P., (2018), "The unique structural and functional features of CXCL12", *Cellular & Molecular Immunology*, 15, 299-311.

Kappes F., Damoc C., Knippers R., Przybylski M., Pinna L.A., Gruss C., (2004a), "Phosphorylation by protein kinase CK2 changes the DNA binding properties of the human chromatin protein DEK", *Molecular and Cellular Biology*, 24, 6011-6020.

Kappes F., Fahrner J., Khodadoust M.S., Tabbert A., Strasser C., Mor-Vaknin N., Moreno-Villanueva M., Burkle A., Markovitz D.M., Ferrando-May E., (2008), "DEK is a poly(ADP-ribose) acceptor in apoptosis and mediates resistance to genotoxic stress", *Molecular and Cellular Biology*, 28, 3245-3257.

Kappes F., Khodadoust M.S., Yu L., Kim D.S., Fullen D.R., Markovitz D.M., Ma L., (2011), "DEK expression in melanocytic lesions", *Human Pathology*, 42, 932-938.

Kappes F., Scholten I., Richter N., Gruss C., Waldmann T., (2004b), "Functional domains of the ubiquitous chromatin protein DEK", *Molecular and Cellular Biology*, 24, 6000-6010.

Kavanaugh G.M., Wise-Draper T.M., Morreale R.J., Morrison M.A., Gole B., Schwemberger S., Tichy E.D., Lu L., Babcock G.F., Wells J.M., Drissi R., Bissler J.J., Stambrook P.J., Andreassen P.R., Wiesmuller L., Wells S.I., (2011), "The human DEK oncogene regulates DNA damage response signaling and repair", *Nucleic Acids Research*, 39, 7465-7476.

Keogh M.C., Kim J.A., Downey M., Fillingham J., Chowdhury D., Harrison J.C., Onishi M., Datta N., Galicia S., Emili A., Lieberman J., Shen X., Buratowski S., Haber J.E., Durocher D., Greenblatt J.F., Krogan N.J., (2006), "A phosphatase complex that dephosphorylates gammaH2AX regulates DNA damage checkpoint recovery", *Nature*, 439, 497-501.

Kondoh N., Wakatsuki T., Ryo A., Hada A., Aihara T., Horiuchi S., Goseki N., Matsubara O., Takenaka K., Shichita M., Tanaka K., Shuda M., Yamamoto M., (1999), "Identification and characterization of genes associated with human hepatocellular carcinogenesis", *Cancer Research*, 59, 4990-4996.

Kroes R.A., Jastrow A., McLone M.G., Yamamoto H., Colley P., Kersey D.S., Yong V.W., Mkrdichian E., Cerullo L., Leestma J., Moskal J.R., (2000), "The identification of novel therapeutic targets for the treatment of malignant brain tumors", *Cancer Letter*, 156, 191-198.

Lin L., Piao J., Gao W., Piao Y., Jin G., Ma Y., Li J., Lin Z., (2013), "DEK over expression as an independent biomarker for poor prognosis in colorectal cancer", *BMC Cancer*, 13, 366.

Mah L.J., El-Osta A., Karagiannis T.C., (2010), " γ H2AX: a sensitive molecular marker of DNA damage and repair", *Leukemia*, 24, 679-686.

Maison C., Almouzni G., (2004), "HP1 and the dynamics of heterochromatin maintenance", *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5, 296-304.

Maréchal A., Zou L., (2013), "DNA damage sensing by the ATM and ATR kinases", *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5, a012716.

Mimitou E.P., Symington L.S., (2008), "Sae2, Exo1 and Sgs1 collaborate in DNA double-strand break processing", *Nature*, 455, 770-774.

Mor-Vaknin N., Punturieri A., Sitwala K., Faulkner N., Legendre M., Khodadoust M.S., Kappes F., Ruth J.H., Koch A., Glass D., Petruzzelli L., Adams B.S.,

Markovitz D.M., (2006), "The DEK nuclear autoantigen is a secreted chemotactic factor", *Molecular and Cellular Biology*, 26, 9484-9496.

Noubissi F.K., McBride A.A., Leppert H.G., Millet L.J., Wang X., Davern S.M., (2021), "Detection and quantification of γ -H2AX using a dissociation enhanced lanthanide fluorescence immunoassay", *Scientific Reports*, 11, 8945.

Orlic M., Spencer C.E., Wang L., Gallie B.L., (2006), "Expression analysis of 6p22 genomic gain in retinoblastoma", *Genes Chromosomes Cancer*, 45, 72-82.

Özçelik E., Kalaycı A., Çelik B., Avcı A., Akyol H., Kılıç İ.B., Güzel T., Çetin M., Öztürk M.T., Çalışkaner Z.O., Tombaz M., Yoleri D., Konu Ö., Kandilci A., (2022), "Doxorubicin induces prolonged DNA damage signal in cells overexpressing DEK isoform-2", *bioRxiv*, 2022.2006.2003.494677.

Paull T.T., Rogakou E.P., Yamazaki V., Kirchgessner C.U., Gellert M., Bonner W.M., (2000), "A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage", *Current Biology*, 10, 886-895.

Perry J.M., Li L., (2007), "Disrupting the Stem Cell Niche: Good Seeds in Bad Soil", *Cell*, 129, 1045-1047.

Pilie P.G., Tang C., Mills G.B., Yap T.A., (2019), "State-of-the-art strategies for targeting the DNA damage response in cancer", *Nature Reviews Clinical Oncology*, 16, 81-104.

Podhorecka M., Skladanowski A., Bozko P., (2010), "H2AX Phosphorylation: Its Role in DNA Damage Response and Cancer Therapy", *Journal of Nucleic Acids*, 2010.

Privette Vinnedge L.M., Kappes F., Nassar N., Wells S.I., (2013), "Stacking the DEK: from chromatin topology to cancer stem cells", *Cell Cycle*, 12, 51-66.

Riveiro-Falkenbach E., Soengas M.S., (2010), "Control of tumorigenesis and chemoresistance by the DEK oncogene", *Clinical Cancer Research*, 16, 2932-2938.

Rogakou E.P., Pilch D.R., Orr A.H., Ivanova V.S., Bonner W.M., (1998), "DNA Double-stranded Breaks Induce Histone H2AX Phosphorylation on Serine 139*", *Journal of Biological Chemistry*, 273, 5858-5868.

Saha A.K., Kappes F., Mundade A., Deutzmann A., Rosmarin D.M., Legendre M., Chatain N., Al-Obaidi Z., Adams B.S., Ploegh H.L., Ferrando-May E., Mor-Vaknin N., Markovitz D.M., (2013), "Intercellular trafficking of the nuclear oncoprotein DEK", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110, 6847-6852.

Sanchez-Carbayo M., Socci N.D., Lozano J.J., Li W., Charytonowicz E., Belbin T.J., Prystowsky M.B., Ortiz A.R., Childs G., Cordon-Cardo C., (2003), "Gene discovery in bladder cancer progression using cDNA microarrays", *The American Journal of Pathology*, 163, 505-516.

Sawatsubashi S., Murata T., Lim J., Fujiki R., Ito S., Suzuki E., Tanabe M., Zhao Y., Kimura S., Fujiyama S., Ueda T., Umetsu D., Ito T., Takeyama K., Kato S., (2010),

"A histone chaperone, DEK, transcriptionally coactivates a nuclear receptor", *Genes & Development*, 24, 159-170.

Scully R., Panday A., Elango R., Willis N.A., (2019), "DNA double-strand break repair-pathway choice in somatic mammalian cells", *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20, 698-714.

Sedelnikova O.A., Rogakou E.P., Panyutin I.G., Bonner W.M., (2002), "Quantitative detection of (125)IdU-induced DNA double-strand breaks with gamma-H2AX antibody", *Radiation Research*, 158, 486-492.

Sitwala K.V., Adams K., Markovitz D.M., (2002), "YY1 and NF-Y binding sites regulate the transcriptional activity of the dek and dek-can promoter", *Oncogene*, 21, 8862-8870.

Smith E.A., Gole B., Willis N.A., Soria R., Starnes L.M., Krumpelbeck E.F., Jegga A.G., Ali A.M., Guo H., Meetei A.R., Andreassen P.R., Kappes F., Vinnedge L.M., Daniel J.A., Scully R., Wiesmuller L., Wells S.I., (2017), "DEK is required for homologous recombination repair of DNA breaks", *Scientific Reports*, 7, 44662.

Soares L.M., Zanier K., Mackereth C., Sattler M., Valcarcel J., (2006), "Intron removal requires proofreading of U2AF/3' splice site recognition by DEK", *Science*, 312, 1961-1965.

Stucki M., Clapperton J.A., Mohammad D., Yaffe M.B., Smerdon S.J., Jackson S.P., (2005), "MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks", *Cell*, 123, 1213-1226.

Teng Y., Lang L., Jauregui C.E., (2018), "The Complexity of DEK Signaling in Cancer Progression", *Current Cancer Drug Targets*, 18, 256-265.

Trinkle-Mulcahy L., (2018). "Nucleolus: The Consummate Nuclear Body". In: C. Lavelle, J.-M. Victor, Editors, "Nuclear Architecture and Dynamics", Academic Press.

Tubbs A., Nussenzweig A., (2017), "Endogenous DNA Damage as a Source of Genomic Instability in Cancer", *Cell*, 168, 644-656.

Via A.G., Frizziero A., Oliva F., (2012), "Biological properties of mesenchymal Stem Cells from different sources", *Muscles, Ligaments and Tendons Journal*, 2, 154-162.

von Lindern M., Fornerod M., van Baal S., Jaegle M., de Wit T., Buijs A., Grosveld G., (1992), "The translocation (6;9), associated with a specific subtype of acute myeloid leukemia, results in the fusion of two genes, dek and can, and the expression of a chimeric, leukemia-specific dek-can mRNA", *Molecular and Cellular Biology*, 12, 1687-1697.

Waldmann T., Baack M., Richter N., Gruss C., (2003), "Structure-specific binding of the proto-oncogene protein DEK to DNA", *Nucleic Acids Research*, 31, 7003-7010.

Waldmann T., Eckerich C., Baack M., Gruss C., (2002), "The ubiquitous chromatin protein DEK alters the structure of DNA by introducing positive supercoils", Journal of Biological Chemistry, 277, 24988-24994.

Waldmann T., Scholten I., Kappes F., Hu H.G., Knippers R., (2004), "The DEK protein--an abundant and ubiquitous constituent of mammalian chromatin", Gene, 343, 1-9.

Wise-Draper T.M., Allen H.V., Thobe M.N., Jones E.E., Habash K.B., Munger K., Wells S.I., (2005), "The human DEK proto-oncogene is a senescence inhibitor and an upregulated target of high-risk human papillomavirus E7", Journal of Virology, 79, 14309-14317.

Wolters S., Schumacher B., (2013), "Genome maintenance and transcription integrity in aging and disease", Frontiers in Genetics, 4, 19.

Yang M.Q., Bai L.L., Wang Z., Lei L., Zheng Y.W., Li Z.H., Huang W.J., Liu C.C., Xu H.T., (2021), "DEK is highly expressed in breast cancer and is associated with malignant phenotype and progression", Oncology Letters, 21, 440.

Web 1, (2022),
https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000124795;r=6:18223860-18264548, (Eriřim Tarihi: 27.06.2022).

Web 2, (2022), <https://www.addgene.org/27490/>, (Eriřim Tarihi: 04.09.2022).

ÖZGEÇMİŞ

Ahmet KALAYCI, 2013 yılında Gebze Teknik Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümünde başladığı lisans eğitimini 2018 yılında tamamladı. Aynı yıl Güz döneminde Gebze Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. Yüksek lisans eğitimi sırasında TÜBİTAK 1001 projesinde proje asistanı olarak görev alan Ahmet KALAYCI, 2021 Güz döneminden itibaren, Gebze Teknik Üniversitesi'ndeki yüksek lisans eğitimine eş zamanlı olarak, İstinye Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda araştırma görevlisi kadrosunda görevine devam etmektedir.

EKLER

EK A: Tez Çalışması Kapsamında Yapılan Yayınlar

Özçelik E., Kalaycı A., Çelik B., Avcı A., Akyol H., Kılıç I.B., Çakar T., Çetin M., Tuzlakoglu Öztürk M., Çalışkaner Z.O., Kandilci A., (2021), “High level of DEK isoform-2 delays recovery from doxorubicin induced DNA damage”, The 45th FEBS Congress, Ljubljana/Slovenia, 3-8 July 2021 (FEBS 2021)

Kalaycı A., Özçelik E., Kandilci A., (2021), “DEK izoform-2 aşırı ifadesinin DNA tamirindeki rolünün araştırılması”, GTÜ FBE 5. Lisansüstü Araştırmalar Sempozyumu, Kocaeli/Gebze/Türkiye, 10-11 Haziran 2021

Özçelik E., Kalaycı A., Çelik B., Kandilci A., (2019), “Heterodimerization, secretion and expression patterns of DEK isoforms 1 and 2”, Turkish Journal of Biology., 43(5 Suppl), 1–132.

EK B: Telif Hakkı Bulunan Şekiller İçin Alınan İzinler

Tablo B1.1: Telif hakkı bulunan şekiller için alınan izinler.

Şekil No.	Lisans Tarihi	Lisans No.	Telif Sahibi
2.1	1.09.2022	5380190648999	Springer Nature
2.2	1.09.2022	5380200416091	Elsevier
2.3	1.09.2022	Creative Commons (CC)	MDPI
2.4	1.09.2022	5380181387380	Elsevier
2.5	1.09.2022	Creative Commons (CC)	Springer Nature
3.1	1.09.2022	Creative Commons (CC)	MDPI
3.2	1.09.2022	5380210108267	Elsevier
4.1	1.09.2022	Creative Commons (CC)	Oxford University Press