

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DEK3 İZOFORMUNUN FONKSİYONEL ANALİZİ

AÇELYA AVCI
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

GEBZE
2022

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DEK3 İZOFORMUNUN FONKSİYONEL ANALİZİ

AÇELYA AVCI

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

FUNCTIONAL ANALYSIS OF DEK3 ISOFORM

AÇELYA AVCI

**A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE**

DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND GENETIC

THESIS SUPERVISOR
PROF. DR. AYTEN KANDİLCİ

GEBZE
2022



YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU

GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 30/06/2022 tarih ve 2022/33 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 28/07/2022 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Açelya Avcı'nın tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI)

: Prof. Dr. Ayten Kandilci

ÜYE

: Doç. Dr. Özlem Akkaya

ÜYE

: Dr. Öğr. Üyesi Zihni Onur Çalışkaner

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun

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

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

DEK, DNA'ya bağlanabilen, çekirdekte lokalize olan, hücre migrasyon ve proliferasyonunda etkili olduğu bilinen bir proteindir. Literatürde DEK genin kodladığı tam protein dizisine sahip olan DEK-izoform 1 (DEK1) ağırlıklı olarak araştırılmıştır. Ancak *DEK* geninin, alternatif mRNA kırılması ile oluşan ve ifade düzeyi DEK1'den oldukça düşük olan DEK-izoform 2'yi (DEK2) de kodladığı da bilinmektedir. Laboratuvarımızda yürüttüğümüz henüz yayınlanmamış araştırmalarımız *DEK*'in alternatif kırılma ile *DEK3* olarak adlandırdığımız farklı bir izoform daha oluşturduğunu göstermiştir. Bu tez çalışmasında, DEK1'de bulunan 253-348 arasındaki amino asitleri içermeyen bu DEK3 izoformunun fonksiyonel özellikleri diğer iki izoformla karşılaştırılarak araştırılmıştır. Bu amaçla, HS-27A kemik iliği hücre hattında Flag etiketi eklenmiş DEK izoformları retroviral yöntemle kalıcı olarak aşırı ifade ettirilmiştir. İmmünofloresan boyamayla DEK3'ün DEK1'e benzer olarak çekirdekte yaygın boyanma gösterdiği tespit edilmiştir. Yara kapanma (wound healing) deneyleri, kontrol hücrelerine kıyasla DEK1 (p değeri: 0.034) ve DEK2 (p değeri: 0.0006) izoformlarının aşırı ifadesinin hücre migrasyonunu azalttığını, DEK3 izoformununsa fark oluşturmadığını göstermiştir. Proliferasyon deneyleri, her üç izoformun da DEK3'te daha belirgin olarak, kontrole kıyasla hücre çoğalmasında hafif oranda ve istatistiksel olarak anlamlı seviyede yavaşlattığını (DEK1 p değeri: 0.0011; DEK2 p değeri: 0.002) ve bununla uyumlu olarak, üç izoformun da hücre döngüsünün G₂/M evresinde birikmeye (arrest) sebep olduğunu, göstermiştir. Son olarak, kullandığımız deneysel koşullarda üç izoformun da HS-27A hücrelerinden Western blot yöntemiyle tespit edilebilecek düzeyde salgılanmadığı tespit edilmiştir.

Özetle, bu tez çalışmasında DEK3 izoformu ilk kez tanımlanmıştır. Sonuçlarımız DEK izoformlarının HS-27A hücrelerinin migrasyonu ve çoğalmasında farklı etkilere sahip olduğunu, DEK'in 253-348 arasındaki amino asit bölgesinin varlığının özellikle migrasyonu yavaşlatıcı etkiye sahip olduğunu göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: DEK, DEK-izoformları, HS-27A, Alternatif Kırılma.

SUMMARY

DEK localizes in the nucleus, binds to DNA and affects cell migration and proliferation. DEK-isoform 1 (DEK1; called DEK), which has the complete protein sequence encoded by the gene, has been heavily investigated. However, it is also known that the *DEK* gene encodes DEK-isoform 2 (DEK2), which is formed by alternative mRNA splicing and has a much lower expression level than DEK1. Our as-yet unpublished research has shown another *DEK* mRNA isoform, which we call *DEK3*. In this thesis, the functional properties of DEK3 isoform, which does not contain amino acids 253-348 in DEK1 were investigated. For this purpose, flag-tagged DEK isoforms were stably overexpressed in the HS-27A bone marrow cell line by retroviral method. Immunofluorescence staining showed that DEK3 diffusely locates in the nucleus, similar to DEK1. Overexpression of DEK1 and DEK2 isoforms reduced cell migration compared to control cells (DEK1 p value: 0.034; DEK2 p value: 0,0006), whereas DEK3 isoform made no difference. In addition, all three isoforms slowed cell proliferation slightly and statistically significantly (DEK1 p value: 0.0011; DEK2 p value: 0.002) compared to control. Consistently, all isoforms caused arrest in the G₂/M phase of the cell cycle. Finally, we found that all isoforms were not secreted from HS-27A cells at a level detectable by Western blot method.

DEK3 isoform was described for the first time in this thesis. We showed that DEK isoforms have different effects on the migration and proliferation of HS-27A cells, and the presence of amino acid region 253-348 of DEK reduces migration.

Key Words: DEK, DEK-Isoforms, HS-27A, Alternative Splicing.

TEŞEKKÜR

Lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, her zaman tereddütsüz fikrini alabildiğim, deneysel süreçlerde ve değerlendirme aşamasında her konuşma sonrası ufkumun genişlemesini sağlayan değerli hocam Prof. Dr. Ayten Kandilci'ye özverisinden, sabrından ve emeklerinden dolayı teşekkür ederim.

Laboratuvarda olduğum süre boyunca tecrübelerini ve bilgilerini benimle paylaşmaktan çekinmeyen hocam Emrah Özçelik'e, arkadaşlıkları sayesinde zorlu süreçleri daha kolay geçirdiğim laboratuvar arkadaşlarım başta Büşra Çelik olmak üzere, Ahmet Kalaycı, İ. Baki Kılıç, Dilan Yoleri ve Hasan Akyol'a, tüm deneysel süreçlerde ve tez yazım sürecinde verdiği desteklerden dolayı Kübra Hacıbeyoğlu ve Hilal Civelek'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tanıştığımız günden beri maddi ve manevi destekleri ile her zaman yanımda olan ve bunu sürekli hissettiren değerli arkadaşlarım Büşra Nur Çevik ve Mihriban Aydoğan Gemici'ye sonsuz teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemin en büyük mimarı olan annem ve babam başta olmak üzere tüm aileme tüm saygım ve sevgimle teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak, varlığı ile bana güç veren, her zaman en çıkılmaz sandığım karanlıklardan çıkmam için beni yüreklendiren, taşa takıldığımda elimden tutup kaldıran eşim Tayfun Yaşar'a göstermiş olduğu sabır ve sevgisinden dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
TABLolar DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	2
2.1. Hematopoez	2
2.1.1. Hematopoezde Mikroçevre	3
2.2. Ökaryot Hücrelerde Protein Sentezi	7
2.2.1. Transkripsiyon	7
2.2.2. Translasyon	9
2.2.3. Alternatif Transkript Üretimi	10
2.2.3.1. Alternatif Kırılma	12
2.3. DEK Proteini	15
3. MATERYAL	20
4. METOT	24
4.1. GFP ⁺ Hücrelerin FACS Ayırıştırılması	24
4.1.1. Hücre Kültürü ve Hücrelerin Saklanması	24
4.1.2. Ayırıştırılan GFP ⁺ Hücrelerin Acuri C6 Akış Sitometri Cihazı ile Kontrolü	25
4.1.3. Ayırıştırılan Hücrelerin Mycoplasma Testi	25
4.2. Western Blot	26
4.2.1. Total Protein İzolasyonu	26
4.2.2. Protein Konsantrasyonun Belirlenmesi	26

4.2.3. SDS Jel Elektroforezi	27
4.2.4. Proteinlerin Membrana Transferi ve Antikor Uygulanması	27
4.2.5. Membranın Görüntülenmesi	28
4.3. İmmünfloresan Deneyi (İmmunositokimya)	28
4.4. Yara Kapanma Deneyi	29
4.5. Proliferasyon Deneyi	30
4.5.1. Hücrelerden Absorbans Elde Edilmesi	30
4.5.2. Absorbans Değerlerinin Analizi	30
4.6. Hücre Döngüsü Analizi	31
4.7. Hücre Besiğinde DEK3 İzoforunun Araştırılması	31
4.7.1. Hücre Ekimi ve Besiğinin Konsantre Edilmesi	31
4.7.2. DEK3 İzoforunun Besiğinde Western Blot ile Analizi	32
4.7.3. Ticari ELISA Kiti ile Besiğinde DEK İzoforlarının Araştırılması	33
4.8. İstatistiksel Analiz	35
5. BULGULAR	36
5.1. DEK3 İzoforunun Diğer DEK İzoforları ile Karşılaştırılması	36
5.2. DEK İzoforlarının Western Blot Analizi	36
5.3. DEK İzoforlarının Lokalizasyonunun Belirlenmesi	38
5.4. DEK İzoforlarının Aşırı İfadesinin Migrasyonuna Etkisinin Araştırılması	40
5.5. DEK İzoforlarının Hücre Çoğalmasına Etkisi	41
5.6. DEK İzoforlarının Hücre Döngüsü Etkisinin İncelenmesi	42
5.7. DEK İzoforlarının Hücre Dışına Salgılanmasının Western Blot ve ELISA Yöntemi Kullanılarak Araştırılması	44
6. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	48
KAYNAKÇA	52
ÖZGEÇMİŞ	62
EKLER	63

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler ve</u> <u>Kisaltmalar</u>	<u>Açıklamalar</u>
A	: Ribozomun A Bölümü
ABCE1	: ATP-bağlayıcı kasket
ADKA/ASMA	: Alfa-düz kas aktini
AML	: Akut Miyeloid Lösemi
APA	: Alternatif Poliadenilasyon
CD	: Cluster of Differentiation
CD146	: Melanoma Cell Adhesion Molecule (MCAM)
CK2	: Casein Kinase 2
CLP	: Common Lymphoid Progenitor
CM	: Conditioned Medium
CMP	: Common Myeloid Progenitor
CO2	: Karbondioksit
CTNNA3	: Katenin Alfa-3
CXCL	: C-X-C motif Chemokine Ligand
CXCR	: C-X-C motif Chemokine Receptor
DEK1	: DEK İzofom 1
DEK2	: DEK İzofom 2
DEK3	: DEK İzofom 3
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DSE	: Down Stream Element
E	: Ribozomun E bölgesi
ECM	: Extracellular Matrix
E2F	: E2 Transkripsiyon Faktörü
ERR	: Östrojen İlgili Reseptör
FACS	: Fluorescence-Activated Cell Sorting

FBS	: Fetal Bovine Serum
FD1	: Flag Etiketli DEK İzofom 1
FD2	: Flag Etiketli DEK İzofom 2
FD3	: Flag Etiketli DEK İzofom 3
Flag	: Flag Epitop Etiketi
GFP	: Green Flourescent Protein
GTF	: Genel Transkripsiyon Faktörleri
H ₂ O	: Su
HKH	: Hematopoietik Kök Hücre
IGFBP-3	: İnsülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein-3
IL1	: İnterlökin 1
IL1 β	: İnterlökin 1 β
IL-6	: İnterlökin-6
IL-8	: İnterlökin-8
IRES	: İnternal ribozom bağlama bölgesi
JIA	: Juvenile Idiopathic Arthritis
kDa	: Kilodalton
KK	: Kapalı Kompleks
KRas	: Kirsten Rat Sarcoma Virus
LİF	: Lösemi inhibitör faktörü
MKH	: Mezenkimal Kök Hücre
ml	: Mililitre
μ l	: Mikrolitre
m ⁷ G	: 7-metilguanozin
miRNA	: Mikro RNA
MÖH	: Multipotent Öncü Hücre
mRNA	: Mesajcı Ribonükleik Asit
NAP-2	: Nucleosome Assembly Protein-2
NETs	: Neutrophil Extracellular Traps
NI	: Non-Infected
NUP214	: Nükleer Por Kompleksi 214

OLÖH	: Ortak lenfoid öncül hücre
OMÖH	: Ortak myeloid öncü hücre
P	: Ribozomun peptidil bölgesi
PAP	: Poli(A) Polimeraz
PAS	: Poli(Adenilasyon) Sinyali
DPBS	: Phosphate Buffered Saline
PBP	: Platelet Basic Protein
Pen/Strep	: Penisilin/Streptomisin Antibiyotikleri
PFA	: Paraformaldehit
PI	: Propidium Iodide
Rb	: Retinoblastoma Protein
rRNA	: Ribozomal RNA
RNA Pol	: RNA Polimeraz
RNAP	: RNA Polimeraz
Rrn3	: RNA polimeraz I-Spesifik Transkripsiyon Başlatma Faktörü
SAF/SAP	: Scaffold Attachment Factor
SDF-1	: Stromal Cell Derived Factor 1
SEH	: Sinüzoidal endotel hücreleri
snRNA	: Küçük nükleer RNA
snRNP	: Küçük Nükleer Ribonükleoprotein
TBB	: Translasyon Başlatma Bölgesi
TBS	: Tris Buffered Saline
TBP	: TATA-Bağlama Proteini
TF	: Transkripsiyon Faktörü
TGF- β	: Transforming Growth Factor Beta
TMB	: 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
TNF α	: Tumor Necrosis Factor Alpha
tRNA	: Transfer RNA
U2AF	: U2 Yardımcı Faktör
UK	: Uzama Kompleksi
UTR	: Untranslated Region

VCAM	:	Vascular Cell Adhesion Molecule
VE-kaderin	:	Vasküler Endotelyal Kaderin
VLA-4	:	Very Late Antigen-4
WST-1	:	Water Soluble Tetrazolium Salt-1



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No:	Sayfa
2.1: Kan hücrelerinin oluşum süreci.	3
2.2: HKH nişinde endosteal ve endosteal olmayan (vasküler) hücre çeşitleri.	4
2.3: Splaysozomun olgun bir mRNA üretime kadar gerçekleştirdiği adımlar.	13
2.4: DEK proteini fonksiyonel domainleri ve modifikasyon bölgelerinin şekilsel gösterimi.	16
2.5: DEK proteinin regülasyon ve fonksiyonel mekanizmalarının özeti	17
5.1: DEK izoformlarının ekzon dizilimini.	36
5.2: FACS analizi ve Mycoplasma test sonucu.	37
5.3: Western Blot analizi sonucunda Flag ve GAPDH boyaması yapılan protein örneklerinin görüntüsü.	38
5.4: Anti-Flag Antikoru ve Alexa-555 sekonder antikoru ile boyanan (kırmızı) HS-27A hücrelerinin konfokal mikroskobu ile alınan görüntüsü.	39
5.5: Migrasyon deneyi sonuçları.	41
5.6: Hücre proliferasyon deneyi sonuçları.	42
5.7: Hücre döngüsü analiz sonuçları.	43
5.8: Hücre döngüsü analizinin grafiksel gösterimi.	44
5.9: rhIL8 ile uyarılan ve uyarılmayan hücrelerin 0. ve 18. Saat görüntüleri	45
5.10: rhIL8 ile uyarımı yapılan ve yapılmayan örneklerin Western Blot ile değerlendirme sonucu	46
5.11: rhIL8 ile uyarımı yapılan ve yapılmayan örneklerin ELISA kiti değerlendirme sonucu.	47

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa</u>
3.1: Kullanılan Cihazlar.	20
3.2: Kullanılan Sarf Malzemeleri.	21
3.3: Kullanılan Kitler ve Kimyasallar Listesi.	22
3.4: Hücre Kültürü İçin Kullanılan Malzemeler.	23
3.5: Kullanılan Hücre Hattı.	23
3.6: Kullanılan Primer ve Sekonder Antikorlar.	23
3.7: Kullanılan Çözeltiler.	23
4.1: Mycoplasma Testi PCR Basamakları.	26

1. GİRİŞ

DEK proteini (6;9) (p23;q34) translokasyonu ile akut miyeloid lösemnin bir alt tipinde keşfedilmiş bir proto-onkogendir [von Lindern et al., 1992]. DEK gelişmiş tüm ökaryotlarda korunmuş ve çekirdekte lokalize olan bir proteindir [Waldmann et al., 2004], [Kappes et al., 2001]. DEK proteininin sekans spesifik olarak DNA'ya bağlandığını gösteren çalışmalar bulunsada DNA bağlanmasında çoğunlukla süper sarmal ya da dört-yollu bağlantı DNA'yı tercih ettiğı gösterilmiştir [Fu et al., 1997], [Waldmann et al., 2003]. DEK'in hücre içerisinde migrasyon, proliferasyon ve hücre döngüsü ile ilişkili olduğı pek çok çalışmada bildirilmiştir [Feng et al., 2017], [Xu et al., 2017], [Zhang et al., 2016].

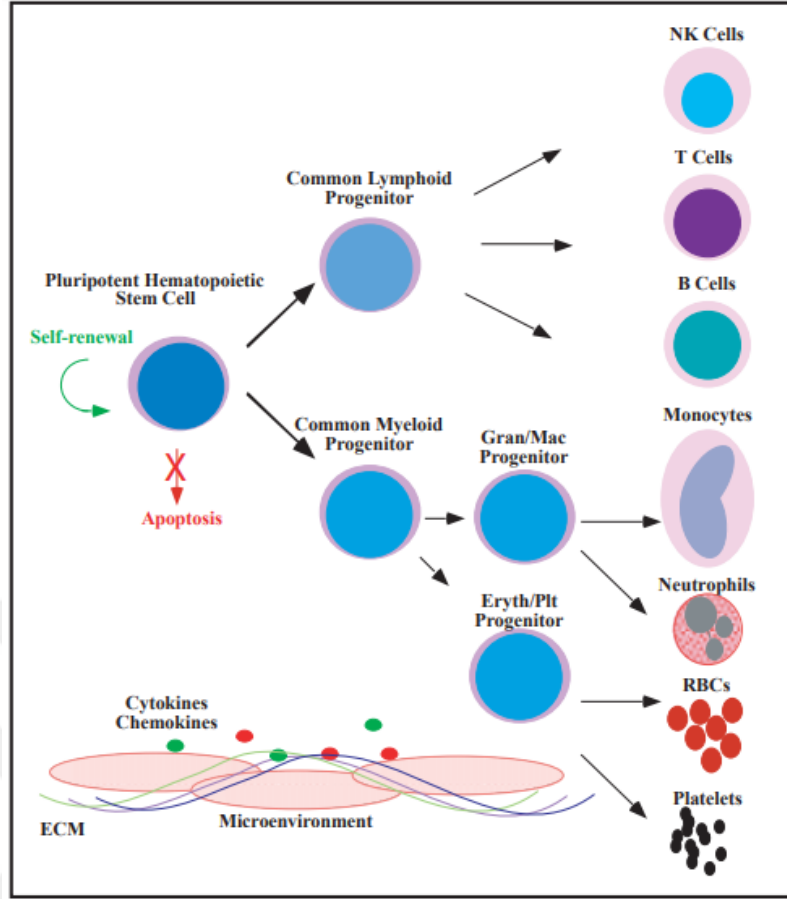
Literatürde DEK olarak tanımlanan DEK izoform 1 (DEK1) dışında bilinen ikinci bir izoformu (DEK2) daha bulunmaktadır [Datta A. and Trama J., 2014]. DEK2 aşırı ifadesinin hepatoselüler karsinoma hücre hatlarında proliferasyonu ve migrasyonu arttırdığı bildirilse de izoformun sağlıklı hücrelerde etkisi detaylı olarak araştırılmamıştır [Yu et al., 2016].

Laboratuvarımızda yapılan çalışmalar sırasında DEK proteinin alternatif kırılma ile üretilen üçüncü bir izoformu (DEK3) bulunduğı gösterilmiştir. Bu tez çalışmasında DEK3 izoformunun kemik iliğı stroma hücre hattında (HS-27A) lokalizasyonu, migrasyon ve proliferasyon üzerindeki etkisi, hücre döngüsü üzerindeki etkisi ve salgılanıp salgılanmadığı araştırılmıştır. Ayrıca yapılan çalışmalar sırasında DEK1 ve DEK2 izoformu da kullanılarak izoformlar arasındaki farklılıklar belirlenmiştir.

2.LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Hematopoez

Kan hücrelerinin üretilmesini ifade eden hematopoez, birincil olarak hematopoietik organlar olan kemik iliği ve timus bezinde gerçekleşir. Kemik iliğinde hematopoietik kök hücrelerin (HKH), timusta kemik iliğinden türevlenen T- öncül hücrelerinin çoğalıp farklılaşması sonucunda kan hücreleri oluşturulur [Savino et al., 2005]. Kendini yenileme ve tüm kan hücrelerine dönüşebilme potansiyeline sahip HKH'ler organizmanın yaşamı boyunca hematopoietik sistemin korunmasını sağlar [Bernitz et al., 2016]. Hematopoez sürecinde, hücre içi ve/veya dışı bir uyararla kemik iliğinde bulunan HKH'lerin oluşturduğu multipotent öncül hücreler (MÖH), ortak miyeloid öncül hücre (OMÖH) veya lenfoid öncül hücre (OLÖH)'lerin üretilmesini sağlar. ÖMOH'ler çeşitli transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu ile trombositlerin, eritrositlerin, granülositlerin ve monositlerin üretilmesini sağlarken, ÖLOH'lerden B ve T lenfositleri ve doğal katil hücrelerin üretilmesi ve kan dolaşımına katılması sağlanır (Şekil 2.1), [Smith, 2003]. Tamamen farklılaşmış olan bu hücrelerin yaşam süresi de oldukça farklıdır; bu süre hafıza-B lenfositlerinde (memory B cells) yıllar, nötrofillerde ise sadece birkaç günle sınırlıdır [Lemischka, 2001], [Scharf et al., 2020], [Smith, 2003].

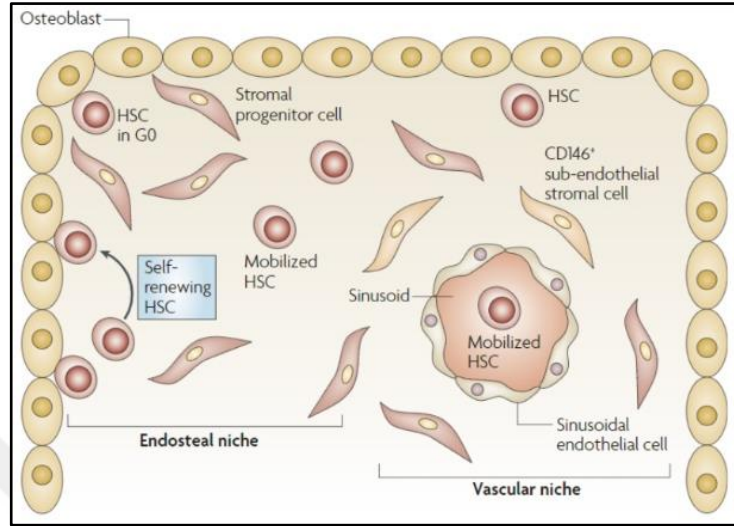


Şekil 2.1: Kan hücrelerinin oluşum süreci. NK; Doğal Katil Hücreleri, RBCs; Kırmızı Kan hücreleri, ECM; Hücreler arası matris.

2.1.1. Hematopoezde Mikroçevre

Hematopoez, stromal hücrelerin, hematopoietik hücrelerin ve hücreler arası matriksin birleşiminden oluşan kemik iliği mikroçevresinde gerçekleşir [Karadağ ve ark., 2017]. Kemik iliğinde hematopoietik kök hücre çeşitleri, onlara özel 'niş' adı verilen, fizyolojik değişimlerini destekleyecek mikroçevre içerisinde korunurlar. Kemik iliği nişi, HKH'lerin ve öncül hücrelerin yoğunlukla bulunduğu, mobilizasyon, hücrel farklılaşma ve kendini yenileme aktivitelerinin düzenlendiği mikroçevredir [Lucas, 2021], [Yu and Scadden, 2016]. Kemik iliği nişi içerisinde ise iki baskın niş bulunmaktadır. Bunlardan ilki olan ve iç kemik yüzeyine yakın bulunan endosteal niş, osteoblastik soy hücrelerine (pre-osteoblast, olgun osteoblast, osteosit) ek olarak, mezenkimal stroma hücreleri ve osteoklast hücrelerinden oluşurken; vasküler niş ise

sinüzoidal endotelial hücreleri, perisitleri ve miyelinlenmeyen Schwann hücrelerini içermektedir (Şekil 2.2), [Le et al., 2018], [Uccelli et al., 2008].



Şekil 2.2: HKH nişinde endosteal ve endosteal olmayan (vasküler) hücre çeşitleri. HSC; hematopoietik kök hücreleri.

Kemik iliği stroması içerisinde bulunan hücrelerden mezenkimal kök hücreler (MKH), fibroblast benzeri morfolojiye sahip olan, yağ hücresi, kıkırdak doku ve kemiğe farklılaşma kapasitesine sahip heterojen bir hücre popülasyonunu ifade eder [Uccelli et al., 2008]. MKH'ler hematopoietik hücrelerden yüzey işaretçisi olan CD34 ve CD45 yokluğu ile seçilebilirler. Ayrıca, miyofibroblast, nöron ve endotel hücrelerin ifade ettiği bazı belirteçleri (α -düz kas aktini, nestin ve çeşitli integrin formları gibi) de ifade ederler [Ding et al., 2011].

Mezenkimal hücre çeşitlerinden bir diğeri olan osteoblastlar, genellikle kemiğin zarında (periost) ve endosteal yüzeyinde bulunurlar ve kemik oluşumundan sorumludurlar. İskelet mimarisinin oluşumunda ve sürdürülmesinde merkezi rol oynayan bu hücreler, kemik matrisinin birikimini, kemik rezorbsiyonuna neden olan osteoklastların aktivitelerini ve bu hücrelerin farklılaşmalarını düzenlerler. Osteoblastlar, osteoid olarak bilinen karmaşık kemik matris proteinlerini üretmek üzere özelleşmiş hücreler olsa da farklılaşmasını tamamlamamışlardır. Bu hücreler öncül hücrelerden farklılaştıkça kolajen yapıda olan ve olmayan proteinleri salgırlar [Mackie, 2003]. Kolajen çeşidi olan ve kemik matrisinin ana proteini olan Tip I Kolajen

kemik minarellerinin toplandığı yapıyı sağlarken, lösin-zengin tekrarlı dizilerden oluşan protein çekirdeğine sahip proteoglikanlar (dekorin, biglikan, fibromodulin) büyüme faktörlerinin düzenlenmesi ve matris organizasyonu gibi görevleri alırlar. Bir diğer kolajen yapıda olmayan proteinler olan glikoproteinler (alkalen fosfataz, osteonektin, fibrilin ve tetranektin gibi) osteoblastik gelişimin çeşitli evrelerinde üretilirler. Bu proteinler, hücre-matris etkileşimlerinde ve hücre proliferasyonunda düzenleyici etki gösterirler [Robey, 2002].

Diğer bir mezenkimal hücre çeşidi olan endotel hücreler ya da sinüzoidal endotel hücreleri (SEH), kemik iliğinde bulunan vasküler nişi sınırlarlar. SEH'ler miyeloablasyondan sonra kök ve progenitör hücrelerin yeniden üretimini ve soya bağlı (lineage-dependent) progenitör hücrelerin farklılaşması için uygun bir ortam sağlar. Dolayısıyla, endotel hücreler hematopoezin yeniden oluşturulmasında görev alır. Ancak bu modülasyonun endotel hücrelerde hangi moleküler yolları kullanarak gerçekleştirdiği bilinmemektedir. Endotel hücrelerin, hematopoietik kök ve öncül hücrelerin homeostazının düzenlediği bir mekanizma olarak, spesifik endotel hücre kökenli parakrin trofojenler olarak tanınan anjiyokrin üretimi gösterilebilir. [Kobayashi et al., 2010]. Endotel hücreler ayrıca insülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein-3 (IGFBP-3) salgılayarak HKH'lerin genişlemesini ve büyümesini teşvik eder. Bu hücrelerin megakaryosit hücreleri (MÖH'lerden farklılaşan kan hücreleri) ile doğrudan teması ise VE-kaderin veya VLA-4/VCAM yolağı ile trombosit olgunlaşmasını, salınmasını ve hayatta kalmasını düzenler [Shiozawa et al., 2008].

Hematopoezin önemli bir diğer anahtar oyuncusu, doğrudan hem kendileri hem de ürettikleri bileşenler ile sürece katkıda bulunan fibroblastlardır. Stromal kökenli fibroblastlar alfa-düz kas aktin (ADKA/ASMA) stres ipliklerini, CD44 ve hücre yüzey membran adezyon reseptörlerini (VLA-1 ve VLA-5) ifade ederken hematopoietik belirteçleri (CD14, CD34, CD45) ifade etmezler. Bu hücreler ayrıca laminin, proteoglikanlar, çeşitli kolajen tipleri (Tip I, III ve IV) ve fibronektin gibi hücre dışı bileşenleri de üretirler. Ayrıca, fibroblast hücreleri sitokin üretiminde önemli bir kaynaktır ve hematopoezi pozitif ve negatif yönde regüle edebilmektedir. İnsan kemik iliği fibroblastları, aynı zamanda, granülosit ve makrofaj koloni oluşturucu hücrelerin hücre-hücre etkileşimleri ve IL-1 ve IL-1 β aracılığıyla koloni stimüle edici faktör (CSF) salınımını kontrol eder ve böylece proliferasyonu düzenler. Hematopoezin dengede

kalmasına IL-6 ve lösemi inhibitör faktörü (LIF) salgılayarak katkıda bulunurlar [Rougier et al., 1996]. Yapılan bir çalışmada, insan serumunun, kültürlenmiş kemik iliği fibroblastlarında IL-6 salgısını arttırdığı bulunmuştur [Guba et al., 1992]. Başka bir çalışmada ise IL-1 α , TGF β , TNF- α ve IL-1 β sitokinlerinin kemik iliği fibroblastlarının LIF mRNA seviyesini arttırdığı bulunmuştur [Wetzler, 1991].

Bu tez çalışması kapsamında kullanılan HS-27A hücreleri sağlıklı kemik iliği stroma hücre hattıdır. Bu hücre hattı Roecklein ve Torok-Storb tarafından oluşturulmuş HS-27 hücre hattının bir alt klonudur. Kemik iliği stromal hücrelerin hematopoez üzerindeki etkisi araştırılmak üzere 27 adet klon tasarlanmış, bu hücreler insan papilloma virüsü E6/E7 genlerini içeren rekombinant bir retrovirüs ile ölümsüzleştirilmiştir [Roecklein and Torok-Storb, 1995]. E6 proteini tümör baskılayıcı bir protein olan ve hücre döngüsü sırasında DNA hasarı oluşması durumunda hücrenin S fazına girmesini engelleyen p53 proteinine bağlanır ve yapısını bozar. E7 proteini ise hiperfosforile olmuş retinoblastoma proteinini (Rb) inhibe eder. Rb ise transkripsiyonel aktivasyonu ve baskılanmayı sağlayan E2F'i bağlar, böylece hücre döngüsünün ilerlemesi durdurulur. Böylece bu hücrelerde, SV40 büyük T antijeninin sebep olduğu önemli bir şekilsel ve işlevsel değişimi olmadan hücreler ölümsüzleştirilmiştir [Kent & Leone, 2019]. Li ve ark. tarafından yapılan fare çaprazlama çalışmalarında, HS-27A hücrelerinin hematopoietik hücreler ile doğrudan temas ederek göç ettiği, hematopoietik öncü (progenitor) hücrelerin yayılımı çoğalmasına olanak tanıdığı gösterilmiştir. Yine bu çalışmada yamanma (engraftment) için önemli bir sinyal olan CD146'nın da HS-27A hücrelerinde çok fazla olduğu gösterilmiştir [Li et al., 2013]. HS-27A'nın mikroçevrede "parke taşı alanı" (cobblestone area) olarak adlandırılan ve erken hematopoietik öncül hücreleri tarafından oluşturulan, stromal tabakanın altında en az beş hücreden oluşan kolonilerin oluşmasını destekler [de Haan & Ploemacher, 2002], [Graf et al., 2002]. HS-27A hücreleri, bir başka insan kemik iliği stroma hücre hattı olan HS-5 ile kıyaslandığında, büyüme faktörlerini düşük seviyelerde, vasküler hücre yapışma molekülü 1 (VCAM1)'i yüksek seviyelerde salgılar [HS-27A, ATCC]. Monositlerden, HS-27A hücreleri ile uyarılması sonucu, CXCL7 geninin kısa ürünleri olan PBP ve NAP-2'yi salgılandığı gösterilmiştir. Bir kemokin çeşidi olan bu peptitlerin de kemik iliği mikroçevresinde spesifik bir görevi olabileceğini bildirilmiştir [Pillai et al., 2006]. Bir

başka çalışmada, HS-27A hücrelerinin CD146⁺ olduğu ve bu hücrelerin monositlerle birlikte hematopoietik düzenleme ile ilgili genlerin ifadesini arttırdığı gözlemlenmiştir [Iwata, Sandstrom, et al., 2014]. Yine 2014 yılında yayınlanan başka bir raporda, CD318⁺/CD146⁺ HS-27A hücrelerinin kök hücre nişi ile ilişkili olan anjiyotensin, osteopontin ve SDF-1 gibi proteinlerin ifadesini sağladığı ve birincil CD146⁺ hücreleri ile benzer olduğu gösterilmiştir [Iwata, Torok-Storb, et al., 2014].

2.2. Ökaryot Hücrelerde Protein Sentezi

2.2.1. Transkripsiyon

DNA'da kodlanan genetik bilgi iki önemli süreç ile işlevsel ürünlere dönüştürülür. Bu süreçlerden ilki olan transkripsiyon, genetik bilginin çeşitli RNA'lar aracılığıyla ribozomlara iletilmesini ifade eder. Transkripsiyon prokaryotlarda daha basit iken gelişmiş organizmalarda daha karmaşıktır ve sıkı bir şekilde kontrol edilir [Deutschman, 2005]. Transkripsiyon süreci üç farklı ana RNA molekülü tarafından kontrol edilir [Stent, 1966]. Bunlardan ilki protein sentezi makinesinde görev alan ribozomal RNA (rRNA)'dır. rRNA büyük ve küçük alt birim olmak üzere iki kısımdan oluşur ve küçük alt birim türleri arasında 9S (yaklaşık 640 nükleotid)'ten 18S (yaklaşık 1870 nükleotid)'e kadar değişkenlik gösterirken, büyük alt birim 12S (yaklaşık 1230 nükleotid)'ten 28S (4800 nükleotid)'e kadar değişkenlik gösterebilir [Brimacombe and Stiege, 1985]. İkinci RNA çeşidi olan transfer RNA (tRNA) ise protein sentezinde mesajı taşıyan RNA'dan gelen bilgiye göre uygun amino asidi taşıyan, yaklaşık 100 nükleotid uzunluğunda olan RNA türüdür [Stent, 1966]. Son olarak da boyutu değişkenlik gösteren, protein sentezi sırasında amino asitler eklenmesi için şablon olan mesajcı RNA (mRNA) genom bilgisini taşır [Franco and Koutmou, 2022], [Singer and Leder, 1966].

Transkripsiyonda RNA çeşitleri dışında, RNA polimerazlar (RNA Pol) adı verilen DNA-bağımlı enzimler görev alır. Deniz kestanesi çekirdeklerinden izole edilerek bulunan RNA Pol I, Pol II ve Pol III ökaryotik transkripsiyonda merkezidir [Girbig et al., 2022], [Roeder and Rutter, 1969]. Ribozomal RNA'ların sentezinden sorumlu RNA Pol I çekirdekte bulunurken, Pol II çekirdekte bulunur ve mRNA'ların sentezinden

sorumludur. Diğer önemli polimeraz olan Pol III ise, hücrede hem çekirdekte hem de sitoplazmada bulunur ve tRNA, U6 küçük nükleer RNA (snRNA) ya da 5S RNA gibi kısa (yaklaşık 70-340 nükleotidlik) RNA'ları sentezler. Pol III tarafından üretilen RNA'lar küçük olmasına rağmen hücre içerisinde bulunan RNA havuzundaki olgun RNA'ların %80-90'ını oluşturur [Girbig et al., 2022], [Palazzo and Lee, 2015].

Transkripsiyon süreci genel olarak üç önemli adımdan oluşmaktadır: başlangıç, uzama ve sonlandırma. Transkripsiyonu başlatan polimeraza bağlı olarak değişiklikler olsa da transkripsiyonun aşamaları üç polimeraz için de aynıdır. Başlangıç aşamasında RNA polimerazlar (RNAP) genel transkripsiyon faktörleri (GTF) tarafından 'promotör' adı verilen spesifik DNA bölgesine konumlandırılır. GTF'ler polimeraz çeşidine bağlı olarak değişir. Başlangıç aşamasında insan RNA Pol I enzimi için RRN3 ve TATA-bağlama protein (TBP) örnek verilebilirken; RNA Pol II için Transkripsiyon başlama faktörü IIB (TFIIB), TFIID, TFIIE, TFIIIF, TFIIH ve arabulucu (mediator); RNA Pol III için de TFIIA, TFIIB ve TFIIIC faktörleri örnek verilebilir [Cramer, 2019], [Girbig et al., 2022]. GTF ve RNAP'ın bağlanarak oluşturduğu komplekse "kapalı kompleks (KK)" adı verilir. RNAP promotor bölgesinde bazlar arasındaki hidrojen bağlarını eriterek "açık kompleks"i oluşturur, RNA polimeraz açılan bölgeden 9-10 baz çifti uzunluğunda bir RNA-DNA hibriti sentezler [Agapov et al., 2022], [Girbig et al., 2022]. RNAP senteze devam ettikçe DNA üzerinde hareket eder, açılan ve sentezi tamamlanan bölge ise yeniden kapanır ve RNAP "uzama kompleksi (UK)" ni oluşturur. UK promotör bölgeden uzaklaşırken, kompleks uyumsuz nükleotitlerin eklenmesi ile kendiliğinden veya hücre içi duraklama sinyallerinin tanınması ile geçici olarak durur [Agapov et al., 2022]. RNAP ilerleme yönünün tersine doğru hareket eder, bu bekleme genellikle RNAP'ın katalitik domaini aracılığıyla RNA'nın 3' ucundan iki adet nükleotidin hidrolitik aktivite ile çıkarılması ile sonuçlanır [Yuzenkova and Zenkin, 2010]. Hatalar onarıldıktan sonra uzama devam eder. Uzama sırasında başlangıçtan farklı olarak, yardımcı protein ya da faktörlerin varlığına ihtiyaç duyulmaz, çekirdek RNAP tek başına uzamayı gerçekleştirebilir [Yamaguchi, 2013]. Sonlandırma aşamasında ise UK destabilize olur, RNAP DNA şablonundan uzaklaşır, yeni üretilen RNA salınır ve RNAP ya transkripsiyonu yeniden başlatır ya da hücre içerisindeki RNAP havuzunda yerini alır. Sonlandırma ile antisens RNA'ların üretilmesi önlenir ve bu sayede anormal gen ifadeleri önlenmiş olur [Girbig et al., 2022], [Richard and Manley, 2009]. RNA Pol I ve

RNA Pol II uzun transkriptler üretmeleri sebebiyle dış etkenlere daha çok bağlı iken, ürettiği transkriptlerin kısa olması sebebiyle içerdiği motif diziler ile RNA Pol III doğrudan sonlandırmayı gerçekleştirebilir. Dışa bağımlı şekilde sonlandırma yapan Pol I ve Pol II ürettikleri uzun transkriptlerin erken salınımının engellenmesi açısından avantaj sağlar. Ürünlerin uzun olması sebebiyle RNAP'lar Pol III'e kıyasla daha fazla sonlandırma motifi ile karşılaşacaklardır [Girbig et al., 2022]. Sonuç olarak sonlandırma gerçekleştikten sonra yeni sentezlenen RNA'lar serbest, tek zincirli oligonükleotitler olarak ortama salınır [Deutschman, 2005].

2.2.2. Translasyon

İkinci süreç olan translasyon ise, temel olarak RNA ve ribozomların iş birliği ile amino asitlerin birbirine bağlandığı ve peptit zincirini oluşturduğu süreci ifade eder. Ökaryotlarda çekirdek içerisinde üretilen mRNA'lar proteine dönüştürülmek üzere çekirdekten salınır. Translasyon da transkripsiyonda olduğu gibi üç farklı ana aşamadan oluşur; başlama, uzama ve sonlandırma. Ökaryot hücrelerde translasyon başlaması pek çok farklı mekanizma ile gerçekleştiği son zamanlarda bilinse de m⁷G (7-metilguanozin) - başlık bağımlı tarama ve IRES (internal ribozom bağlama bölgesi) bağımlı başlatma en çok bilinen mekanizmalardır [Hershey et al., 2012]. m⁷G-başlık, mRNA'nın proteine dönüştürülme sürecinde çekirdek içerisindeki başlık bağlama kompleksi ve sitoplazmada yer alan eIF4 gibi kompleks ve protein faktörlerine bağlanma alanı oluşturarak önemli fonksiyonel süreçlerin düzenlenmesinde görev alır [Ramanathan et al., 2016]. m⁷G-başlık bağımlı taramada, 40S–Met-tRNA_i kompleksi m⁷G-başlıklı mRNA'nın 5' ucundan bağlanır. Daha sonra bu kompleks bir metiyonin amino asitini kodlayan AUG kodonunu bulana kadar taramaya devam eder. Ribozomun 60S alt birimi 40S başlatma kompleksine bağlanır ve böylece uzama fazına girebilen 80S başlatma kompleksini oluşturulur [Hershey et al., 2012]. Bu reaksiyon için en az on iki başlatma faktörü aracılık eder [Hinnebusch and Lorsch, 2012]. IRES bağımlı başlatma ise viral mRNA'ların translasyonu için kullanılır. Örneğin poliovirüs ile enfeksiyon sırasında viral proteinaz 2A ifade edilir, bu enzim translasyon başlatma faktörü ve başlık bağlama kompleksinin parçası olan eIF4G'yi parçalar ve kesilmiş eIF4G IRES aracılı translasyonda görev alır. RNA'nın 5' ucunda bulunan kodlanmayan

bölge viral RNA'ya ribozomları almak için hücre içerisindeki kanonik olan ve olmayan faktörlerle etkileşen IRES RNA ikincil yapılarını içerir. Bu ikincil yapılara ribozomlar doğrudan bağlanarak translasyonun başlamasını sağlar [Semler and Waterman, 2008]. Translasyonun uzama aşaması, translasyon uzama faktörü eEF1A'ya guanozin trifosfatın (GTP) bağlanmasıyla aktifleşip aminoasıl tRNA'ya bağlanması ve bu üçlü kompleksin ribozomun A (aminoasıl tRNA bağlama bölgesi) bölgesine ulaşması ile başlar. Ardından GTP hidroliz olur, eEF1A salınır ve sıradaki amino asiti taşıyan aminoasıl tRNA ribozomun A bölgesine yerleşir. Peptit bağının oluşturulması sırasında A ve P (peptidil) bölgelerinde bulunan tRNA'lar sırasıyla P ve E (çıkış) bölgelerine kayarlar. P bölgesinden E bölgesine geçen tRNA ise yeni tRNA A bölgesine eklendiğinde ribozomdan çıkar ve tRNA havuzuna tekrar dahil olur. Bu döngü mRNA boyunca yeni ilgili amino asiti taşıyan tRNA'nın A bölgesine eklenmesi ile devam eder [Dever et al., 2018]. mRNA'nın içerdiği durdurma kodonu translasyon sonlandırma faktörleri eRF1 ve eRF3 ile GTP'nin kompleks oluşturarak tanınması ile olur. Durdurma kodonu tanındıktan ve GTP hidrolize olduktan sonra eRF1'in içerdiği GGQ motifi P bölgesine hareket eder, bu hareket buradaki tRNA'nın bağlı kalmasını sağlayan ester bağını hidrolize eder ve konformasyonel değişim ile peptit zincirinin salınmasını sağlar. ATP bağlamayı sağlayan kaset proteini ABCE1, 80S kompleksinde 60S (büyük alt birim)'i uzaklaştırır ve sonlandırma kompleksi çözülmüş olur [Fritz and Boris-Lawrie, 2015], [Hellen, 2018]. Böylece üretilen peptit katlanmalar ve translasyon sonrası modifikasyonlar (PTM) ile işlevsel hale dönüştürülmek üzere hücrede içerisinde hareket eder.

2.2.3. Alternatif Transkript Üretimi

İnsan genomundaki yaklaşık 20.000 genden üretilen protein sayısı yaklaşık 250.000-1.000.000 aralığındadır. Gelişmiş ökaryotlardaki fonksiyon çeşitlenmesi gen sayısından daha çok kodlanan transkript sayısı ve bu transkriptlerdeki transkripsiyonel, transkripsiyon sonrası ve translasyon seviyesindeki değişikliklerle ilişkilendirilir. Alternatif olarak oluşan transkriptler ve proteinler alternatif transkripsiyonun

başlatılmasından, alternatif poliadenilasyondan (APA), alternatif translasyonun başlatılmasından veya alternatif kırılma (splicing)'dan kaynaklı olabilir.

Alternatif transkripsiyon başlatılması, ilk ekzonlarında ya da çevrilmeyen bölgenin (untranslated region, UTR) uzunluğunda ve dizisinde farklılıklar olan transkriptlerin üretilmesini sağlar. Birinci ekzonların alternatif olarak kullanılması N-terminali farklı olan ve farklı okuma çerçevelerine sahip proteinlerin oluşturulmasına olanak sağlar [de Klerk and 't Hoen, 2015]. Yapılan bir çalışmada alternatif promotörden üretilen CTNNA3 izoformları rapor edilmiştir, yine aynı raporda bu izoformların işlevsel olarak (kolon kanserinde hücre-hücre yapışmasını yenileyememe) farklılığı olduğu gösterilmiştir [Goossens et al., 2007]. Alternatif transkriptler farklı 5'-UTR bölgeleri içerebilir, bu da hem translasyonun düzenlenmesinde ve kontrolünde hem de ilgili proteinlerin üretilmesinde önemlidir [Barbosa et al., 2013]. Alternatif promotör ve transkripsiyon başlama bölgelerinin seçimi için kromatin yapısının değiştirilmesi ve hücre ya da dokuya özel transkripsiyon faktörleri ile yapılan düzenleme olmak üzere iki önemli mekanizmadan bahsedilebilir [de Klerk and 't Hoen, 2015].

Çokça araştırılmış bir transkripsiyon sonrası modifikasyon olan poliadenilasyon, normal ve stresli koşullarda mRNA'nın lokalizasyonunu, stabilizasyonunu ve translasyonunu etkiler. mRNA için poliadenilasyon ve bölünme bölgeleri, 3'-UTR'da bulunan cis- elementleri tarafından tanınır. Poli(A) sinyali (PAS), poliadenilasyonun ve bölünmenin yerini belirlemede en önemli etkidir. Bölünme bölgesinin 15-30 nükleotid yukarı akış yönünde PAS ve 14-70 nükleotid aşağı akış yönünde de aşağı akış elemanı (DSE) bulunur. PAS'ın yukarı akış elemanları (USE) ise yardımcı poliadenilasyon faktörlerinin bağlanmasında görev alır [Danckwardt et al., 2008]. Bu elemanların tamamı trans-etkili faktörler aracılığıyla bölünme bölgesini tanımlarlar. 3' ucu işlemesi iki adımda gerçekleşir. İlk olarak 3' ucunun ayrılması için pre-mRNA'lar sentezlenirken aynı zamanda RNAPII'den salınırlar. İkinci olarak, bölünme bölgesinden Poli(A) polimeraz (PAP) aracılığıyla poli(A) kuyruğu oluşturulur [Sadek et al., 2019]. Ökaryotlarda bulunan çoğu gen birden fazla PAS içerir. Alternatif poliadenilasyon olarak adlandırılan mekanizmada PAS ve bölünme sayısının fazlalığı 3'-UTR kısmında farklılıkları bulunan transkript izoformlarını oluşturabilir [Tian et al., 2005]. Bu izoformlar da hücre içinde bağlanan protein veya mikro RNA (miRNA)'ların

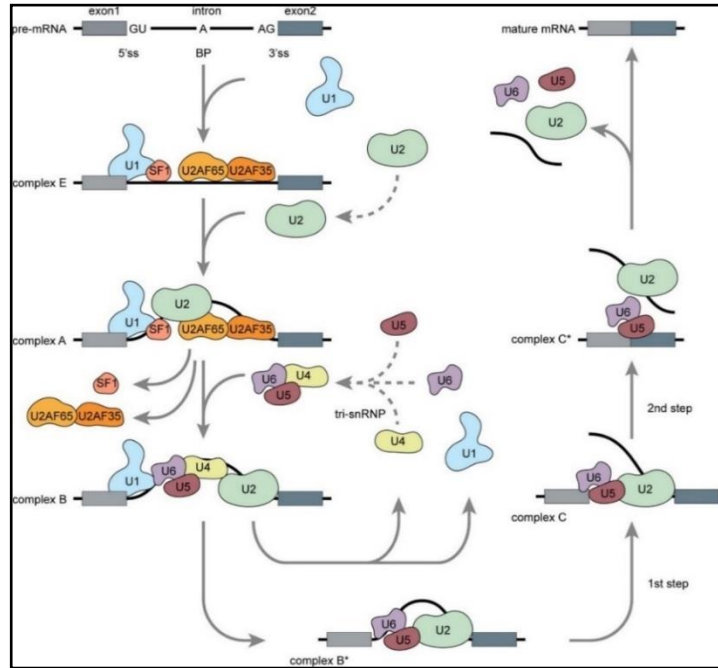
bağlama bölgesinde farklılıklar sergilediği için fonksiyonel olarak da farklılaşabilirler [Ogorodnikov et al., 2016].

Çoğu ökaryotik organizmada bir mRNA'dan bir protein üretildiği bilinse de son yıllarda yapılan çalışmalarda alternatif translasyon başlatma bölgeleri (TBB) sayesinde farklı protein izoformlarının oluştuğu bildirilmiştir. Ayrıca, farklı TBB aracılığıyla üretilen izoformların virüs kaynaklı enfeksiyon oluşumunda ve çeşitli kanserlerde rol aldığı raporlanmıştır [Lazaris-Karatzas et al., 1990], [Ventoso et al., 2001]. Bu mekanizma ile var olan mRNA'lar kullanılarak doğrudan protein seviyesinde dış uyaranlara karşı hızlı bir cevap oluşturulur. Kullanılan alternatif translasyon başlatma mekanizmaları 5'-başlık tanıma bağımlı ve bağımsız modelleri içerir. Bunlara örnek olarak alternatif başlık tanıma, mRNA metilasyonu olabilir. Ayrıca ribozomun doğrudan translasyon üzerindeki düzenleyici etkisi de son yıllarda araştırılmıştır [James and Smyth, 2018]. 5'-başlık tanıma bağımlı modelde, ökaryotik başlatma faktörü-3 (eIF3) kompleksinin yer aldığı bildirilmiştir. eIF3'ün seçici olarak hücrede proliferasyon ve büyümede görev alan mRNA'ların 5'-UTR bölgelerinden bağlayarak translasyon seviyesinde kontrol uyguladığı bulunmuştur. Ayrıca, yapılan derin sekanslama ile bu kompleksin 500'e yakın transkripte spesifik şekilde bağlandığı gösterilmiştir [A. S. Y. Lee et al., 2015]. Başlık bağımsız modellerde ise, en yoğun çalışılan viral mRNA'larda tanımlanan IRES'dir. Virüsler translasyon komplekslerini ele geçirirken, başlık bağımlı translasyonu engeller. Viral IRES'ler başlık bağımsız translasyon başlatma yetenekleri ile karakterize edilir [Pelletier & Sonenberg, 1988].

2.2.3.1. Alternatif Kırpılma

Alternatif transkript oluşturmada alternatif kırpılma en yaygın olan mekanizmadır. Kırpılma ile benzer gen sayısına sahip insan ve fare genomunda alternatif transkript sayısı farklılık göstermektedir. İnsan genlerinin %95'in üstünde alternatif kırpılma gözlemlenirken, farede bu oran %63 olarak rapor edilmiştir [de Klerk & 't Hoen, 2015], [Y. Lee and Rio, 2015]. Alternatif kırpılma pre-mRNA ekzonların farklı kombinasyon şeklinde birleştirilmesini ve böylece daha az mRNA ile daha fazla protein üretilmesini ve dış uyaranlara daha hızlı yanıt verilmesini sağlar. İnsanlarda ekzon uzunluğu ortalama olarak 137 nükleotitten oluşur [Hawkins, 1988].

Protein kodlayan bu bölgeler yaklaşık binlerce nükleotit uzunluğundaki intron bölgeleri arasında sıralanmıştır [Deutsch and Long, 1999]. mRNA’da bulunan intron bölgelerin kesilmesini sağlayan büyük ve çok proteinli bir kompleks olan splaysozom, yeni sentezlenen mRNA üzerinde ekzon bölgeleri tanır ve intron bölgeleri uzaklaştırır. Splaysozom beş adet küçük nükleer ribonükleoprotein (snRNP, U1, U2, U4, U5 ve U6) ve çeşitli proteinlerden oluşan multimegadalton ribonükleoprotein kompleksidir [Black et al., 2019], [Will and Lührmann, 2011]. Splaysozom yeni üretilen mRNA’nın ekzonlar üzerinde bulunan üç farklı dizi elemanını tanıyarak toplanmaya başlar. Bu elemanlar 5’ eklenme yeri, 3’ eklenme yeri ve dallanma noktasıdır. Öncelikle U1 snRNP ekzonun 5’ eklenme bölgesine bağlanır, sonrasında ekleme faktörü 1 (SF1) dallanma bölgesine bağlanır, bu önceki bağlanmalar ile U2 yardımcı faktör (U2AF)’ün kolay bir şekilde 3’ eklenme bölgesine bağlanmasını sağlar. Bu protein ve ekzon birleşimi erken kompleks (E kompleks) adını alır. SF1’in U2 snRNP ile yer değiştirmesi ekleme reaksiyonunu gerçekleştirir, kompleks ise presplicesomal A kompleksi adını alır. Kompleks içerisinde bulunan daha fazla faktörün alımı ve/veya değişimi ile A kompleksi, intronları kesen ve ekzonları bir transesterifikasyon tepkimesiyle birbirine yapıştıran B kompleksine dönüşür (Şekil 2.3.) [Kelemen et al., 2013], [Ren et al., 2021].



Şekil 2.3: Splaysozomun olgun bir mRNA üretilene kadar gerçekleştirdiği adımlar.

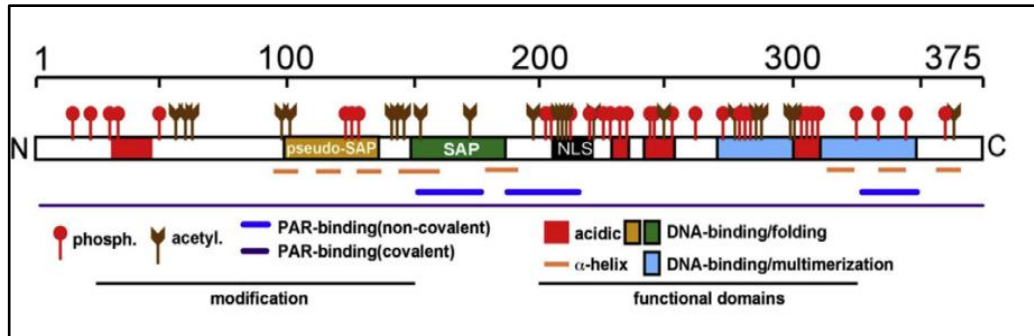
Splaysozom aracılığıyla üretilen protein izoformlarının etkisi çoğunlukla bir izoformun aşırı ifadesi ya da ifadenin susturulması yoluyla araştırılmıştır. Bu deneylerde kanserli dokularda ya da kanser hücreleri ile önemli ilişkisi bulunan hücre çoğalması/proliferasyonu incelenmiştir [Kelemen et al., 2013]. Normal şartlar altında sağlıklı hücreler çeşitli proteinlerle (p53 ya da pRb gibi) hücre döngüsü üzerine etki eder ve hücrelerin aşırı çoğalmasını engeller. Ancak, katı tümörler sık sık genetik değişikliklere gider ve bu baskılayıcı genlerin kaybolmasını sağlar [Coltri et al., 2019]. Dolayısıyla, kanser hücrelerinde artan bir splaysozom aktivitesinden bahsedilebilir [Oltean and Bates, 2014]. Örnek olarak, epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR)'nün alternatif kırılma ile oluşan bir izoformu 4. ekzon bölgesini içermez ve bu izoform yumurtalık, glioma ve prostat kanserlerinde gözlemlenmektedir [Wang et al., 2011]. Yine bir başka örnek olarak da bir ardışık sinyal yolağı üyesi olan KRAS örnek verilebilir. Normal şartlarda hücre farklılaşmasında, hücre göçünde ve çoğalmasında önemli role sahip olan bu proteinin kolon kanseri ile güçlü bir ilişki içinde olan iki alternatif ek varyantının (KRAS 4A ve 4B) bulunduğu bildirilmiştir [Abubaker et al., 2009]. Alternatif kırılma varyantlarının bir diğer etkisi ise hücre döngüsü üzerinedir. Yapılan bir çalışmada östrojen ile ilgili reseptör β (ERR β)'nin alternatif izoformlarının hücre döngüsü üzerinde farklı etkilere sahip olduğu, ERR β sf (kısa form) ve ERR β 2 izoformlarından kısa formun G₁ kontrol noktasını p21 proteini aracılığıyla kontrol ettiği gösterilmiştir. Yine aynı çalışmada, ERR β 2 olmadığı durumda, ERR β 'in sentetik agonisti olan DY131 ile uyarılmış G₂/M tutulmasının tersine çevrildiği ve buna p21 uyarılması ve G₁ tutulmasının eşlik ettiği gösterilmiştir [Heckler and Riggins, 2015]. Alternatif kırılma translasyon sonrasında modifikasyon yaparak ya da protein-protein etkileşim alanını değiştirerek bir proteinin hücre içi lokalizasyonunu değiştirebilir. Lokalizasyon değişiminde proteinler genellikle yeni işlevler kazanır. Örnek olarak, *LIPIN* geni alternatif bir ekzonun eklenmesi ile nükleer ve sitoplazmik izoformlar oluşturur. Nükleer izoform hücrede transkripsiyon faktörü olarak görev alırken, sitoplazmada bulunan izoform ise fosfatidat fosfataz aktivitesi gösterir [Csaki & Reue, 2010], [Kelemen et al., 2013]. Ayrıca lokalizasyon değişmesine bağlı olarak, alternatif kırılma ile üretilen izoformların salgılanma durumları da değişebilir. Örneğin alternatif kırılma ile eritropoietin reseptörünün salgılanan bir formu üretilir. Bu reseptör tam uzunluktaki diğer izoform ile rekabet ettiğinde kana salgılanır ve son-

dönem (end-stage) böbrek hastalarının anemi iyileşmesinde en önemli geciktirici faktörlerden olan eritropoietin direncine katkıda bulunur [Khankin et al., 2010].

2.3. DEK Proteini

DEK proteini (6;9) (p23;q34) translokasyonu ile karakterize edilen akut miyeloid lösemnin bir alt tipinde, DEK'i kodlayan dizinin çoğunluğunun, nükleer por kompleksi proteini NUP214 (ya da CAN) ile füzyonu sonucu tanımlanmıştır [M. et al., 1990], [M. et al., 1992]. Kendi sınıfının tek üyesi olan DEK, histon olmayan, DNA'ya bağlanabilen, hücre sağ kalımı için önemli süreçlerde rol alan, gelişmiş tüm ökaryotlarda oldukça korunmuş çok fonksiyonlu bir proteindir [Waldmann et al., 2004]. Literatürde yer alan araştırmaların çoğunluğu DEK olarak ifade edilen, alternatif kırılmaya uğramamış ve tam uzunlukta olan izoform-1 (DEK1) üzerine yapılmıştır. DEK1'in uzunluğu 375 amino asitten oluşmaktadır [Kappes, Scholten, et al., 2004]. DEK1, DNA'ya bağlanmasını sağlayabilen iki bilinen domain içerir [Hua et al., 2009]. İlk domain olan "Scaffold Attachment Factor" (SAP-kutusu) domaini proteinlerin genellikle N- veya C- terminal bölgesinde bulunurken, DEK proteinin merkezine yakın (149-187. amino asitler arasında) noktada bulunur [Aravind and Koonin, 2000], [Hua et al., 2009]. SAP-kutusu korunmuş 35 amino asitten oluşan ve DNA'ya bağlanmayı sağlayan diziyi ifade eder [Aravind and Koonin, 2000]. Bir diğer DNA bağlayıcı domain olan yapay-SAP (pseudo-SAP) domaininin (87-187.amino asitleri arası) ise DNA ile DEK'in etkileşiminden sorumlu olduğu bilinmektedir. Buna örnek olarak moleküller arası ve içi etkileşimleri aracılığıyla büyük nükleoprotein komplekslerin üretilmesi verilebilir [Waldmann et al., 2002]. Ayrıca yapılan diğer çalışmalar ile pseudo-SAP kutusunun süper sarmal, krusiform (haç biçiminde) ya da bozulmuş/biçimsiz DNA'ya bağlandığı gösterilmiştir [Waldmann et al., 2003]. Pseudo-SAP ve SAP kutusu domaini dışında DEK proteinin C-terminal bölgesinde de bir DNA ekileşim alanı bulunur. Bu alan, protein kazein kinaz (CK2) ile fosforilasyonu ile kontrol edilen ve DEK'in multimerizasyonu için stimülasyon ile sonuçlanan DNA bağlama görevini düzenler [de Albuquerque Oliveira et al., 2018]. Ayrıca yapılan dizi analizlerinde DEK'in 205-221. amino asitlerin arasında nükleer lokalizasyon sinyali (NLS) içerdiği gösterilmiştir. Bu sinyal karyoferin α gibi NLS reseptörleri tarafından tanınır [Devany et al., 2004], [Teng et al., 2018]. Şekil 2.4.'te

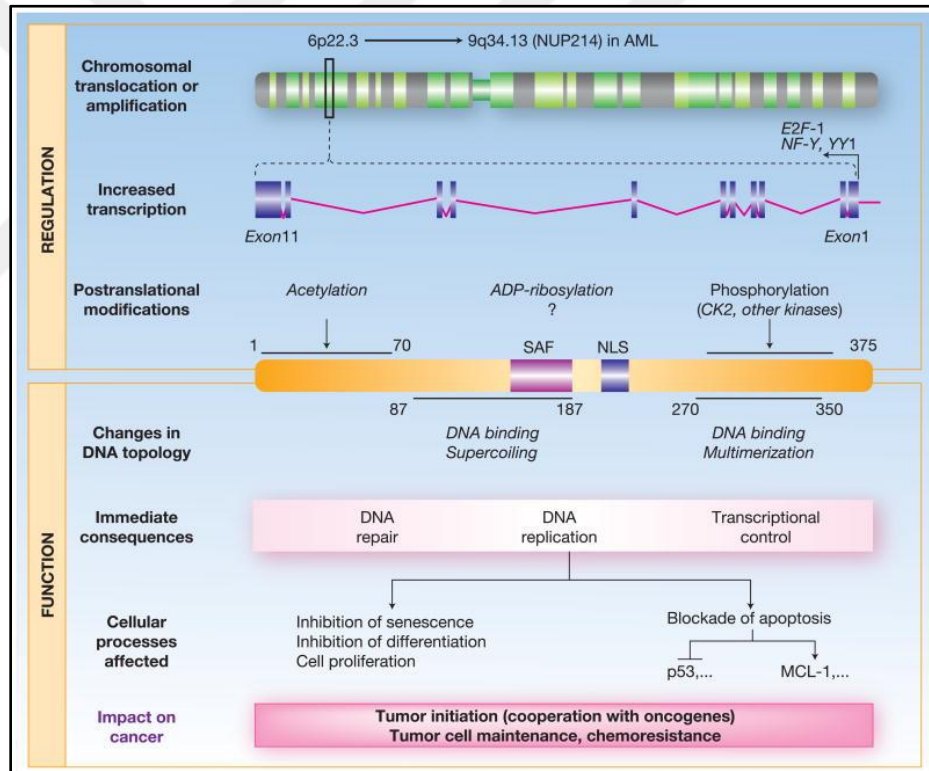
DEK proteinin bilinen fonksiyonel bölgeleri ve uğradığı translasyon sonrası modifikasyonları gösterilmiştir [de Albuquerque Oliveira et al., 2018].



Şekil 2.4: DEK proteini fonksiyonel domainleri ve modifikasyon bölgelerinin şekilsel gösterimi.

DEK proteininin aktivitesi post translasyonel modifikasyonlar (PTM) ile kontrol edilir. Hem *in vivo* hem de *in vitro* çalışmalarda CK2'nin DEK fosforilasyonunda görev aldığı, fosforilasyon bölgelerinin C-terminal bölgesinde kümелendiği gösterilmiştir. Fosforile olan DEK'in kromatine bağlanmayı zayıflattığı, defosforile DEK'in ise kromatine bağlı kaldığı gösterilmiştir. Ayrıca bu bilgiyle tutarlı olarak, bu fosforilasyonun hücre döngüsü süresince miktarının değiştiği fakat G₁ fazında görece daha fazla olduğu belirtilmiştir [Kappes, Damoc, et al., 2004]. Bir diğer PTM ise ölen hücrelerde arttığı bilinen poli(ADP-ribozil)asyonudur. DEK, poli(ADP-riboz) polimeraz 1 (PARP1) ile bağlanmaktadır ve böylece DNA tamirine yardımcı olabileceği bildirilmiştir [Gamble & Fisher, 2007]. DEK'in poli(ADPribozil)asyonunun, DNA lezyonlarının tamir edilmesini sağladığı ve hücreleri genotoksik ajanlardan koruduğu gösterilmiştir. Poli(ADP ribosile edilmiş) DEK, kromatin ve hücreden salınabilir ve otoimmün hastalığı olanların eklem sıvısında bulunan otoantikörler bu serbest modifiye DEK'i tanıyabilir [Kappes et al., 2008]. DEK'in DNA'ya bağlanma afinitesi ayrıca asetilasyon ile de kontrol edilir. DEK N-terminalinde bulunan ilk 70 amino asit içerisindeki lizin rezidülerinden asetile olur. Asetilasyon ile DEK'in DNA elementlerine olan bağlanma afinitesi azalır, asetilasyonun kaldırılması engellendiğinde ise çekirdekte farklı yapısal ve fonksiyonel bileşenleri ya da domainleri içeren interkromatin granül kümeleri içerisinde DEK'in birikmesine neden olur [Bogolyubov and Parfenov, 2008], [Cleary et al., 2005].

DEK transkripsiyonel olarak bilinen üç farklı transkripsiyon faktörü ile kontrol edilir. DEK'in promotör analizlerinde transkripsiyon başlama bölgesinde Nükleer Faktör-Y (NF-Y) ve Ying Yang-1 (YY1) transkripsiyon faktörleri için bağlanma bölgesi içerdiği gösterilmiştir [Sitwala et al., 2002]. NF-Y kanser ve hücre proliferasyonu ile ilişkilendirilirken, YY1 hücresel ve viral gen ekspresyonunu düzenler. Ayrıca DEK viral E7 onkogeni tarafından transkripsiyonel olarak aktive edilebilir. E7 ise proteozomal degradasyon ile Retinablastom proteininin (Rb) negatif düzenleyici faktördür [Wise-Draper et al., 2005]. Son olarak da kanser hücre hatlarında DEK promotörünün E2F-1 transkripsiyon faktörüyle bağlandığı gösterilmiştir. Kanser-ilişkili E2F-1 aktivasyonunun aynı zamanda DEK'in mRNA'sının da üretilmesini içerebileceği belirtilmiştir (Şekil 2.5.) [Carro et al., 2006], [Riveiro-Falkenbach and Soengas, 2010].



Şekil 2.5: DEK proteinin regülasyon ve fonksiyonel mekanizmalarının özeti

AML hastalarında keşfedilmesinin ardından yapılan çalışmalarda, DEK'in ilk olarak juvenile romatoid artirit (JIA) hastalarının sinoviyal sıvılarında keşfedilmesinin ardından, diğer otoimmün hastalıklar olan sarkoidoz ve sistemik lupus eritematoz

hastalık belirtilerini gösteren hastaların serumunda da otoantijen olarak görev aldığı bildirilmiştir [Dong et al., 1998], [Sierakowska et al., 1993].

Sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda DEK'in çekirdekte bir milyondan fazla kopyası bulunan bir protein olduğu, içerdiği SAP kutusu ile kromatine bağlanabildiği ve H2A-H2B histon dimeri ile ek protein-protein etkileşimini sağlayabileceği belirtilmiştir. Hücre döngüsü sırasında DEK miktarının azalmaması ve lokalizasyonunun değişmemesi de DEK'in hücre döngüsü sırasında kromatine bağlı olduğunu göstermiştir [Kappes et al., 2001].

DEK'in HIV-2 enhancer bölgesinde bulunan peri-ets (pets) bölgesine sekans spesifik olarak bağlandığı birkaç çalışma ile belirtilse de son zamanlarda yapılan çalışmalarda DEK'in daha çok süper sarmal ya da dört-yollu bağlantı DNA (four-way junction DNA)'ya bağlanmayı tercih ettiği gösterilmiştir [Fu et al., 1997], [Waldmann et al., 2003]. DEK'in aynı zamanda RNA ile ilişkisi keşfedildikten sonra splayozom başlatıcı yardımcı faktör olan U2AF'nin 3' birleştirme bölgesini tanımasına aracılık ettiği gösterilmiştir. Yine aynı çalışmada serin rezidüleri fosforile olan DEK'in intron çıkarılması için gerekli olduğu ancak splayozom kompleksinin oluşması için gerekli olmadığı gösterilmiştir [Mendes Soares et al., 2006].

Mor-Vaknin ve ark. tarafından yapılan çalışmada nükleer bir protein olan DEK'in makrofaj türevli monositlerin (MDM) farklılaştırılması sırasında eksozomlar aracılığıyla ya da serbest formda hücreden salındığı ve klinik örneklerle bakıldığında ise DEK'in aktif olarak juvenil artirit hastalarının sinoviyal sıvısında da olduğu gösterilmiştir [Mor-Vaknin et al., 2006]. DEK'in salgılanmasında fosforilasyonundan sorumlu olan CK2'nin gerekli olduğu ve bir kemoatraktant olan IL-8 (İnterlökin-8)'in varlığının DEK salgısını arttırdığı bulunmuştur. Salgılanması için spesifik bir dizisi olmamasına rağmen, DEK'in tıpkı IL-8 gibi kemokinlerde bulunan ELR motif içerdiği, DEK'in de bir kemoatraktant olarak davrandığı ve nötrofil, CD8⁺ T-hücreleri ve CD56⁺ doğal katil hücrelerinin migrasyonunda görevli olduğu gösterilmiştir [Mor-Vaknin et al., 2006]. ELR motif, CXCR2 and CXCR1 reseptörleri aracılığıyla kemotaksiste rol almaktadır [Strieter et al., 1995].

DEK'in aynı zamanda hücre proliferasyonu ve hücre döngüsünde de yer aldığı da bildirilmiştir. Glioblastoma hücre hatları ile yapılan çalışmada DEK proteinin susturulması ile hem hücre proliferasyonunda azalma olduğu hem de hücrelerin

G₀/G₁ fazında kaldığı gözlemlenmiştir [Feng et al., 2017]. Serviks kanser hücreleri kullanılarak yapılan çalışmada da DEK'in susturulmasıyla hücre proliferasyonu, migrasyonu ve invazyonu ile ilişkili olan Wnt/ β -catenin yolağının bozulduğu ve hücrelerde proliferasyonun inhibe olduğu gösterilmiştir [Xu et al., 2017]. DEK doğrudan hücre proliferasyonu üzerine etkili olduğu kadar diğer protein ve protein yollarını da etkiler. Zhang ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada DEK'in vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF)'nü aktive ederek hem hücre proliferasyonunu hem de migrasyonunu arttırdığı raporlanmıştır [Zhang et al., 2016].

Literatürde tam uzunlukta olan (375 amino asit) birinci DEK izoformu dışında, 49-82 amino asitleri arasındaki bölgesi eksik olan bir alternatif kırılma varyantı tanımlanmıştır [Privette Vinnedge et al., 2013], [Teng et al., 2018]. İkinci izoformda eksik olan bölgenin DEK'in DNA pozitif süper sarmalı oluşturmak için önemli olduğu bildirilmiştir. Literatürde izoform-2 ile ilgili çok bilgi bulunmasa da hepatoselüler karsinom (HCC) hastalarında yapılan çalışmada bu izoformun fonksiyonu kısmen tanımlanmıştır. Bu çalışmada hasta örnekleri ve hücre hatları kullanılarak DEK'in onkogenik rolü araştırılmıştır. DEK1 ifadesi kısa saç tokası RNA (short hairpin RNA, shRNA) aracılığıyla baskılandığında, tümöröjeniteyi ve metastazı baskıladığı ancak düşük-invasiv etkiye sahip olan HCC hücre hattında DEK izoformları aşırı ifade ettirildiğinde ise, birinci izoform daha fazla olmak üzere, proliferasyonun arttığı gösterilmiştir. Yine aynı çalışmada, izoformlar arasında fark olmamakla birlikte, izoform ve kontrol hücreleri kıyaslandığında migrasyon kapasitesinin de arttığı raporlanmıştır [L. Yu et al., 2016].

Laboratuvarımızda yapılan klonlama çalışmaları sırasında DEK'in alternatif kırılma ile üçüncü bir izoform (DEK3) daha oluşturduğu gösterilmiştir. Alternatif kırılma sonucu üretilen izoformların hücre içerisinde farklı görevlerde rol alabildiği ve hatta lokalizasyonunu değiştiği rapor edilmiştir [Kelemen et al., 2013]. DEK1 proteinin doku çeşidine, sağlıklı ya da kanserli doku ve hücre hatlarında hücresel önemli süreçlerden olan migrasyon, proliferasyon, hücre döngüsü ve salgılanmada önemli düzenleyici rolü olduğu gösterilmiştir. Ancak DEK3'ün bu süreçlerdeki etkisi araştırılmamıştır. Bu tez çalışmasında DEK1, DEK2 ve DEK3 izoformlarının aşırı ifade edildiği HS2-7A kemik iliği hücreleri kullanılarak, bu hücrelerde üç izoformun etkileri karşılaştırılmıştır.

3. MATERYAL

Tablo 3.1: Kullanılan Cihazlar.

Ürün	Firma	Katalog Numarası
Chemi Doc XRS+	Biorad	721BR04545
CO ₂ İnkübatör	Heal Force	HF90
Çalkalayıcı	Labnet	S2025-B-230V
Etüv	VWR	466-3510
Flow Sitometri	BD	Accuri C6
Isıtıcı blok	Benchmark	BSH1002-E
Işık mikroskobu	Nikon	Eclipse, E100
Konfokal Mikroskop	Zeiss	LSM880
Laminar Akım Kültür Kabini	Cryste	Puricube 1200
Micropipet Seti	Gilson	F167300
Mini PROTEAN Tetra Cell	BioRad	165-8004
Mini Santrifüj	Hitachi	CT15RE
Multi rötör	Biosan	Multi RS-60
Pipet Tabancası (Gilson)	Capp	CAPP PA-100
Professional TRIO Thermocycler	Biometra	846-070-723
Santrifüj	Labogene	ScanSpeed 1580R
Santrifüj	Sigma	1-14
Sıvı azot tankı	Taylor Wharton	LS4800
Sonikasyon Cihazı	Branson	BBR02110512
Su banyosu	Wisd Lab. Ins.	0400702135J036
Transblot Transfer Sistemi	Biorad	170-4155
BOLT BIS TRIS %10 Western Blot Sistemi	Thermo Fisher	NW0010A
Ters Işık mikroskobu	Nikon	Eclipse TS100
Multiscan FC	Thermo Scientific	357-701180
Varioskan	Thermo Scientific	3001-1571
Worteks	VWR International	444-1372

Tablo 3.2: Kullanılan Sarf Malzemeleri.

Ürün	Firma	Katalog Numarası
6 / 96 kuyulu plaka	TPP	92006 / 92096
Amicon Ultra-4 Filtre	Millipore	UFC801024
Amicon Ultra-15 Filtre	Millipore	UFC901024
Eppendorf Tüp	Axygen	MCT-060-C, MCT-150-C
Falkon 15 / 50 ml	Capp	510015 / 510050
Filtre/Cell Strainer (40µm)	BD	352340
Filtreli Pipet ucu	Nest	314016, 315016, 312012
Flask 25 / 75 cm ²	TPP	90026 / 90076
Hazır Western Blot BOLT Jel	Invitrogen	NW00100BOX
Hazır Western Blot Jeli	Biorad	456-1034
Kriyotüp	Nest	607001
Lam SuperFrost® Menzel	Thermo Scientific	10118091
Lamel (22x22m)	Isolab	075.00.003
Mr. Frosty	Nalgene	5100-0001
Nitroselüloz Membran	Biorad	1620112
Parafilm	Isolab	058.01.001
Pipet ucu	Nest	301006, 302106, 303206
PVDF Membran	Biorad	1620177
Serolojik Pipet	Capp	SP-02-C, 05-C, 10-C,25-C
Şırınga ucu filtre (0.22 µm)	TPP	99722
Şırınga ucu filtre (0.45 µm)	TPP	99745
Thoma Lamı	Isolab	I.075.03.002
Western Blot Mini Jel Tank	Thermo Scientific	A25977
Western Blot Transfer Modül	Thermo Scientific	B100
Yapışkan Film	Applied Biosystems	4306311

Tablo 3.3: Kullanılan Kitler ve Kimyasallar Listesi.

Ürün	Firma	Katalog Numarası
4X Laemmli SDS Tamponu	Biorad	161-0747
4X Bolt LDS Tamponu	Thermo Scientific	BT0007
10X Denatürasyon Tamponu	Thermo Scientific	BT0009
10X TBS	Biorad	1706435
10X Yürütme Tamponu	Biorad	161-0732
20X Transfer Tamponu	Thermo Scientific	BT0006
20X MES Yürütme Tamponu	Thermo Scientific	BT0002
Absolut Etanol	Isolab	9.200.262.500
Beta-mercaptoethanol	Applchem	A1108.0100
BSA	Sigma-Aldrich	A2153-10G,50G
EDTA	Sigma-Aldrich	E5134-500G
Isopropanol	Isolab	9610232500
Kemiluminisan (ECL)	Advansta	K-12045-D50
Marker	Thermo Scientific	26616
Metanol	Sigma-Aldrich	32213-2.5L
MycoPlasma Detection Kit	İntron	25237
NaCl	Sigma-Aldrich	S7653-250G
NP-40	Applchem	A1694,0250
Paraformaldehid (PFA)	Sigma-Aldrich	P6148-1KG
DPBS	Gibco	14190094
Pierce BCA Pro.Ass.Kit.	Thermo Scientific	23227
Proteaz/Fosfataz	Ambion	2551G
Proteaz İnhibitör	Sigma-Aldrich	11873580001
SDS	Sigma-Aldrich	L3771-100G
Sodium Chloride	Sigma-Aldrich	S7653-250G
Sodium deoxycholate	Sigma-Aldrich	D6750-10G
Sodium Phosphate Di.	Sigma-Aldrich	S7907-100G
TBS	Bio-Rad	1706435
Triton X-100	Isolab	I.602.32.001
Tween-20	Sigma Aldrich	P9416-100ML
Vectashield Mounting Medyum	VectorLab	H-1200
WST-1	Roche	5015944001

Tablo 3.4: Hücre Kültürü İçin Kullanılan Malzemeler.

Ürün	Firma	Katalog Numarası
DMSO	Thermo Fisher Scientific	BP231-100
FBS	Gibco	10270106
IL-8	R&D	208-IL-010/CF
DPBS	Gibco	14190094
Penicilin/Streptomycin	Gibco	15140122
RPMI 1640 Medium	Gibco	52400025
Tryphan Blue	Invitrogen	T10282
Trypsin	Gibco	25300054

Tablo 3.5: Kullanılan Hücre Hattı.

Hücre Hattı	Firma	Katalog Numarası
HS-27A	ATCC	CRL-2496™

Tablo 3.6: Kullanılan Primer ve Sekonder Antikorlar.

	Hedef	Host	Firma	Katalog Numarası
Primer	Anti-İnsan Flag	Fare	SIGMA	SLCD3524
	Anti-İnsan GAPDH	Tavşan	CST	5174S
Sekonder	Anti-Fare IgG (HRP-bağlı)	At	CST	7076S
	Anti-Tavşan IgG (HRP-bağlı)	Keçi	CST	7074S
	Anti-Fare IgG Fab2 Alexa Flour 555	Fare	CST	4409S

Tablo 3.7: Kullanılan Çözeltiler

Çözelti	İçerik
RIPA Liziz Tamponu	150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl [pH 8], %1 NP-40, %0.5 Sodium Deoxycholate, %0.1 SDS
10X Transfer Tamponu	250ml; 36g Glycine, 7.55g Trizma Base
Yürütme Jeli (%12 Poliakrilamid Jel)	%40 Akrilamid (1.5ml), 1.5M Tris-HCl (pH:8,8, 1.3 ml), %10 SDS (50 µl), %10 APS (50 µl), TEMED (5 µl), distile su (2,1 ml)
Yükleme Jeli (%4 Poliakrilamid Jel)	%40 Akrilamid (0.5 ml), 0.5M Tris-HCl (pH:6,8, 1.3 ml), %10 SDS (50 µl), %10 APS (50 µl), TEMED (5 µl), distile su (3,1 ml)
Dondurma Solüsyonu	%10 DMSO, %90 FBS

4. METOT

Laboratuvarımızda daha önce MSCV-IRES-GFP (MIG, Addgene, 27490) içeren retrovirüs plazmitine Flag epitopu ile füzyon olacak şekilde DEK İzofom 1 (FD1), DEK İzofom 2 (FD2) ve DEK İzofom 3 (FD3) cDNA'ları klonlanmıştır. MIG plazmitleri ve retrovirüs paketleme plazmitleri (VSVg, Gag/Pol) kullanılarak elde edilen retrovirüslerle, DEK izoformlarını kalıcı olarak ifade eden HS-27A-FD1-GFP, HS-27A-FD2-GFP ve HS-27A-FD3-GFP hücreleri elde edilmiştir. Aynı zamanda, negatif kontrol olarak, insert içermeyen (boş) MIG retrovirüsü kullanılarak da HS27A-GFP hücreleri oluşturulmuştur. Bu tez çalışmasında, bu hücre hatları kullanılmıştır.

4.1. GFP⁺ Hücrelerin FACS Ayırıştırılması

4.1.1. Hücre Kültürü ve Hücrelerin Saklanması

Daha önce dondurma tüplerinin içerisinde stoklanan parental HS-27A hücreleri [HS27A-Noninfected (NI)] ve HS-27A- GFP, HS-27A-FD1, HS-27A-FD2, HS-27A-FD3 hücreleri su banyosunda 90 saniye bekletildikten sonra laminar akımlı biyogüvenlik kabine alındı. Her hücre hattı isimleriyle etiketlenen falkonların içerisine yavaşça aktarıldı. Ardından hücrelerin içerisinde bulunduğu dondurma besiyerinin içerisindeki DMSO miktarını (DMSO, Thermo Fisher, BP231-100) azaltmak amacıyla toplamda 12 ml taze tamamlanmış RPMI 1640 besiyeri (%10 FBS, 25 mM HEPES, 2.05 mM L-glutamin, %1 Pen/Strep) yavaşça ve karıştırılarak eklendi ve 1200 rpm' de 6 dakika santrifüj edildi. Pellet hafifçe karıştırıldı, 5 ml taze RPMI 1640 besiyeri ile çözüldü ve içerisinde 10 ml taze RPMI 1640 besiyeri bulunan T75 flasklara aktarıldı. Hücreler 37°C sıcaklık ve %5 CO₂ sağlayan inkübatörde inkübe edildi. 24 saat sonra hücrelerin üzerinde bulunan besiyeri dikkatlice vakum iğnesi ile çekildi ve 15 ml taze RPMI 1640 besiyeri eklendi. Hücreler yeterli sayıya ulaştığında, GFP-pozitif (GFP⁺) olan hücreler akım sitometrisi (Flow cytometry; BD FACS Jazz Flow Cytometer cihazı) kullanılarak ayırıştırıldı. Bunun için, hücrelerden 10 µl örnek alındı ve 10 µl Tripan Mavisi (Invitrogen, T10282) boyası ile karıştırıldıktan sonra Countess Cell Counter

(Invitrogen) cihazı ya da hemositometre ile sayıldı. Her hücre hattı 1×10^6 / ml olacak şekilde, 2 mM EDTA ve %2 FBS içeren DPBS ile sulandırıldı. Sulandırma sonrasında 3 ml hücre 'polypropylen' tüplere aktarıldı. GFP⁺ hücreler 1ml dondurulmuş FBS üzerine toplandı. Ayırıştırma [Fluorescence-activated cell sorting (FACS)] işlemi sonrasında hücreler 5 dakika 1500 rpm'de santrifüj edildi, pellet taze besiyeri ile çözüldü ve uygun konsantrasyonda T25 flakslara ekildi.

FACS sonrasında GFP⁺ olarak ayırıştırılmış HS-27A-GFP, HS-27A-FD1, HS-27A-FD2 ve HS-27A-FD3 hücreleri ortalama 30 milyon hücre olacak kadar çoğaltıldı ve her bir tüpte (kriyotüp; cryotube) ~3 milyon hücre olacak şekilde, dondurma medyumunda içerisinde hücre dondurma kaplarında (Freezing Container, Nalgene® Mr. Frosty)-80°C' de 24 saat donduruldu ve ertesi gün tüpler sıvı nitrojen tankına aktarıldı.

4.1.2. Ayırıştırılan GFP⁺ Hücrelerin Acuri C6 Akış Sitometri Cihazı ile Kontrolü

BD FACS Jazz Akış Sitometri cihazı ile ayırıştırılan hücreler çoğaltıldıktan sonra Acuri C6 Flow sitometri cihazı ile analiz edildi. Bunun için hücreler toplandı ve her hücre hattından 5×10^5 hücre analiz edildi. Her hücre hattının %95 üzerinde pozitif olduğu teyit edildi (Şekil 5.2.).

4.1.3. Ayırıştırılan Hücrelerin Mycoplasma Testi

Ayırıştırılıp GFP analizi yapılan hücre hatlarının her birinden $1,1 \times 10^5$ hücre alındı ve E-Myco Plus Mycoplasma PCR Tespit Kiti (Intron, 25237) kullanılarak *Mycoplasma* türleri ile kontaminasyonun olup olmadığına bakıldı. Hücreler ependorf tüpe alındıktan sonra 13.000 rpm'de 15 saniye santrifüj edildi. Süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı, pellet 1 ml steril DPBS ile çözüldü. Bu yıkama işlemi iki kere tekrarlandı. Pellet 100 µl steril DPBS ile sulandırıldı ve 95 °C'de 10 dakika inkübe edildi ve 2 dakika 13.000 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant yeni bir ependorfa aktararak kullanılabilecek kadar -20 °C'de saklandı. Test gerçekleştirileceği zaman örnek sayısına ek olarak, bir adet pozitif kontrol için bir adet de negatif kontrol için primer ve diğer PCR reaksiyon

içerikleri bulunan tüpler (kit tarafından sağlanan) buz üzerine alındı. Daha sonra tüplere 15 µl dH₂O ve daha önce kaynatma metoduyla toplanan DNA örneklerinden 5 µl eklendi (Negatif kontrol için 19 µl dH₂O, pozitif kontrol için de 18 µl dH₂O, 1 µl kit tarafından sağlanan pozitif kontrol DNA). Ardından örnekler Professional TRIO Thermocycler (Biometra) cihazına yerleştirildi. Kullanılan reaksiyon adımları aşağıdaki gibidir (2.,3. ve 4. basamaklar 35 kere tekrar edilmiştir.):

Tablo 4.1: Mycoplasma Testi PCR Basamakları.

Adım	Sıcaklık	Süre
1	94 °C	1 dakika
2	94 °C	30 saniye
3	58 °C	20 saniye
4	72 °C	1 dakika
5	72 °C	5 dakika
6	4 °C	∞

4.2. Western Blot

4.2.1. Total Protein İzolasyonu

Hücre pelletleri 100 µl RIPA liziz tamponu ile çözüldü ve buz üzerinde 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası her örnek 15 saniye sonike edildi, 30 saniye buz üzerinde bekletildi ve tekrar 15 saniye sonike edildi. Sonikasyon sonrasında tüpler 13.000 rpm'de 10 dakika +4°C'de santrifüj edildi ve süpernatantlar, protein miktar tayini yapılmak üzere 6 µl bir tüpe ve her örnek için ayrı ayrı etiketlenmiş ikişer tüpe dağıtıldı. Örnekler daha sonra kullanılmak üzere -80 °C' ye kaldırıldı.

4.2.2. Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Protein tayini için Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fischer, 23227) kullanıldı. Bunun için her kuyuya 200 µl hazırlanan çalışma solüsyonu (50 birim A

solüsyonu: 1 birim B solüsyonu) eklendi. Daha sonra kuyulara 25 µl standart ya da 25 µl 1:10 oranında sulandırılmış örnek yüklendi. Her kuyuya pipetaj yapıldı ve plaka 37 °C'de 30 dakika 80 rpm'de çalkalanarak inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 562 nm'de ve 700 nm'de VarioScan (Thermo Scientific, 3001-1571) cihazında ölçüm alındı. Ölçüm sonuçları Microsoft Excel kullanılarak hesaplandı.

4.2.3. SDS Jel Elektroforezi

30 µg protein, yükleme Boyası (10:1 Oranında Laemni Buffer ve β-merkaptoethanol) ile karıştırıldı, yükleme hacmi dH₂O ile tamamlandı ve hazırlanan örnekler 95 °C'de 5 dakika denatüre edildikten sonra %12'lik SDS- poliakrilamid jel kullanılarak Mini PROTEAN Tetra Cell Sistemi (Bio-Rad, 165-8004)'nde, 1X Yürütme Tamponu kullanılarak (10X tampondan sulandırıldı, Bio-Rad, 161-0732), ilk 5 dakika 80V olacak şekilde, yürütme boyasının içerdiği belirteçler tamamen jelden çıkana kadar yürütüldü.

4.2.4. Proteinlerin Membrana Transferi ve Antikor Uygulaması

Yürütme sırasında 1X Transfer Tamponu hazırlandı. Yürütme sonrası jel tanktan çıkarıldı ve hızlıca distile sudan geçirildi. Jelin dışında bulunan camlar bir aparat yardımıyla jele zarar vermeden açıldı. Jel tekrar dikkatlice distile sudan geçirildi. Daha sonra Wattmann Kağıtları arasına jel üstte membran altta olacak şekilde jel yerleştirildi ve hazırlanan sandviç transfer kasetine aktarıldı. Transfer işlemi Trans-Blot Turbo Tranfer Sistemi (Bio-Rad, 170-4155)'nde 25 dakika 25V'da gerçekleştirildi. Transfer sonrası membran 50 ml'lik kanonik uçlu santrifüj tüpüne aktarıldı. Membran 5 dakika boyunca %0,01 TBS-T (Tween-20, SIGMA, P9416-100ML; TBS, Bio-Rad, 1706435) solüsyonu ile çalkalayıcı üzerinde yıkandı.

Membran, içerisinde %5 BSA (Sigma-Aldrich, A2153-10G, 50G) içeren TBS-T solüsyonu ile oda sıcaklığında bir saat çalkalayıcı üzerinde blokladı. Bloklama sonrası membran üzerine %5 BSA içeren TBS-T solüsyonu içerisinde primer antikor olarak Anti-Flag (M2, Mouse, SIGMA, F1804, 1:1000) eklendi, membran gece boyunca

çalkalayıcı üzerinde +4°C’de inkübe edildi. Ertesi gün membran üç kere 7’şer dakika %0,01 TBS-T ile yıkandı ve Anti-Mouse IgG (CST, 1:3000) sekonder antikoru ile bir saat oda sıcaklığında %5 BSA içeren TBS-T içerisinde inkübe edildi. İnkübasyon sonunda membran üç kere 7’şer dakika TBS-T ile yıkandı ve görüntülendi. Daha sonra aynı membrana anti-GAPDH (D16H11) (Rabbit mAb, CST, 5174S, 1:3000) antikoru bir saat oda sıcaklığında uygulandı. Ardından membran üç kere 7’şer dakika TBS-T ile yıkandı ve Anti-Rabbit IgG (CST, 7074S, 1:3000) sekonder antikoruyla bir saat oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. Yıkamalar sonrası membran tekrar görüntülendi.

4.2.5. Membranın Görüntülenmesi

Membranların görüntülenmesi için üreticinin tavsiye ettiği şekilde görüntülemeden hemen önce WesternBright ECL Kemilüminesans HRP Substrat (Advansta, K-12045-C20) kitinin içerisinde bulunan 1 ve 2 numaralı solüsyonlar 1:1 oranında karıştırıldı, membranın tüm yüzeyi kaplanacak şekilde damla damla eklendi. Membran karanlıkta 2-3 dakika inkübe edildi. Ardından fazla olan ECL solüsyonu toplandı ve membran Chemi Doc XRS+ (Biorad, 721BR04545) cihazı kullanılarak görüntülendi. Görüntüler daha sonra Image Lab (Bio Rad) programı kullanılarak düzenlendi.

4.3. İmmunfloresan Deneyi (İmmunositokimya)

HS27A-GFP, HS27A-FD1, HS27A-FD2 ve HS27A-FD3 hücreleri, 4×10^5 / kuyu olacak şekilde (6 kuyucuklu plakaya) ekildi. Ekim yapılmadan önce her kuyu için 22x22 cm boyutundaki lameller teknik etanolden (%99,5) ve ardından hızlıca ateşten geçirildi. Lameller 6-kuyulu plakanın içerisine kondu, ardından hücreler kuyulara ekildi. Hücreler 37°C sıcaklık ve %5 CO₂ sağlayan inkübatörde 24 saat inkübe edildi. 24. saat sonunda hücrelerin üzerindeki besiyeri çekildi ve kuyular 3 kere 1X DPBS ile (1 kere hızlı yıkama, 2 kere 5’er dakikalık yıkama) çalkalayıcı üzerinde yıkandı. Yıkama sonrası her kuyuya %4 Paraformaldehit (PFA, Sigma-Aldrich, P6148-1KG) eklendi ve

plaka 20 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Ardından yine kuyular 3 kere (1 kere hızlı yıkama, 2 kere 5'er dakikalık yıkama) çalkalayıcı üzerinde yıkandı. Ardından hücreler 500 µl %0.5 Triton X-100 (Isolab, I.602.32.001) içeren DPBS ile 20 dakika oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. Kuyular tekrar 3 kere yıkandı ve her kuyu 500 µl %2 BSA içeren DPBS ile oda sıcaklığında 1 saat çalkalayıcı üzerinde bloklandı. Bloklama sonrası her kuyu 500 µl 1:500 oranında % 1 BSA içeren DPBS ile sulandırılmış Anti-Flag (M2, Mouse, SIGMA, F1804) antikoru ile gece boyunca +4 °C'de inkübe edildi. Ertesi gün primer antikor çekildi ve hücreler % 1 BSA içeren DPBS ile 3 kere çalkalayıcı üzerinde yıkandı. Yıkamanın ardından, %1 BSA içeren DPBS ile 1:500 oranında sulandırılmış olan Alexa Flour 555 (Mouse, kırmızı floresan, CST, 4409S) sekonder antikoru ile (500 µl) 1 saat oda sıcaklığında karanlıkta (çalkalayıcı üzerinde) inkübe edildi. Kuyular ampul su ile 6 kere yıkandı. Yıkama adımı bittikten sonra her lamel sırasıyla kaldırıldı, kurutuldu ve üzerine 13 µl Vectashield Mounting Medium (VectorLab, H-1200) eklenen lamaların üzerine kapatıldı. Preparatların kenarları şeffaf tırnak cilası ile kapatıldı ve örnekler +4 °C'ye görüntülemek üzere kaldırıldı.

Preparatlar Zeiss LSM880 Konfokal Mikroskobu (63X objektif, immersiyon yağı ile) görüntülendi ve elde edilen fotoğraflar Adobe Photoshop CS6 ile düzenlendi.

4.4. Yara Kapanma Deneyi

Hücreler, deney günü %60-70 yoğunlukta olacak şekilde çoğaltıldı. Deney günü hücreler sırasıyla 1:2 oranında seri sulandırma yapılarak son konsantrasyon $2,5 \times 10^5$ hücre/ml (12.500 hücre/50 µl) olacak şekilde sulandırıldı ve "Ibidi Culture-Insert 2 Well in µ-Dish 35 mm (Ibidi, 81176)" kültür kabı içerisinde bulunan eklentinin her iki tarafına da 12.500 hücre/50 µl (pipetaj ile homojenize edildikten sonra) ekildi. Hücreler 24 saat CO₂ inkübatöründe inkübe edildi. İnkübasyon sonrası besiyeri mikropipet ile çekildi, steril pens ile köşesinden tutularak kültür kabının eklentisi çıkarıldı. Kültür kabı 2 ml 1X DPBS ile yıkandı. Kültür kabının içerisine 2 ml %5 FBS ve %1 Pen/Strep içeren RPMI 1640 besiyeri eklendi. İnsert çıkarıldıktan sonra oluşan hat 0., 12., 24., 48. ve 60. saatlerde Nikon Eclipse Ti-S inverted mikroskobu (4X) ile

görüntülendi. Belirlenen her saatte her örnek için 3 ayrı alandan fotoğraf çekildi. Her saat için, fotoğraflar Image-J programı ile yapılan alan analizinde kullanıldı.

4.5. Proliferasyon Deneyi

4.5.1. Hücrelerden Absorbans Elde Edilmesi

Sayılan hücreler sırasıyla önce 5×10^5 canlı hücre/ml ve $1,2 \times 10^5$ canlı hücre /4,8ml ($\sim 5000/200\mu\text{l}$) olacak şekilde sulandırıldı. Sulandırmalar sonrası her hücre hattından örnek alınıp hemositometre kullanarak sayım yapıldı. Son sayım sonrası her hücre hattından 96-kuyulu plakaya 5000 hücre/kuyu olacak şekilde üçer replika olarak ekildi. 0.günden itibaren her gün kuyulara 20 μL Water Soluble Tetrazolium Salt (WST-1, Roche, 5015944001) eklendi, üçer kere pipetaj yapıldı. Ardından hücreler 37°C sıcaklık ve %5 CO_2 sağlayan inkübatörde 4 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda kuyulara üçer kere daha pipetaj yapıldı, oluşan baloncuklar ateşten geçirilen enjektör iğnesi yardımıyla patlatıldı ve 96-kuyulu plakaların VarioScan cihazında, 450 nm ve 690 nm dalga boyunda absorbans değeri ölçüldü. Bu işlem 0 ile 5. gün arasında her gün için tekrarlandı.

4.5.2. Absorbans Değerinin Analizi

Her kuyu için A_{450} 'de elde edilen değerden A_{690} 'da elde edilen değer çıkarıldı ve bu değerden de sadece medyumdan elde edilen triplike A_{450} değerlerinin ortalaması çıkarıldı. Her örnek triplike çalışıldığı için, elde edilen üç değer ortalaması alındı ve her hücre hattının kendi içindeki 0.gün değerine bölünerek, her gün için "0.güne göre" kat farkı hesaplandı. Üç bağımsız deneyden elde edilen verilerin ortalaması kullanılarak, Prism GraphPad yazılımıyla istatistiksel analiz yapıldı.

4.6. Hücre Döngüsü Analizi

Hücreler $7,5 \times 10^4$ /ml olacak şekilde sulandırıldı. Sulandırılan hücreler her gün için iki adet olmak üzere 8 adet 6-kuyulu plakaya $1,5 \times 10^5$ /kuyu olacak şekilde ekildi, kuyuların hacmi 4 ml'ye tamamlandı. Hücre döngüsü analizi için 1, 3, 4 ve 5. günde hücreler toplandı. Bunun için önce hücrelerin üzerinden besiyeri çekildi, kuyular 1 ml 1X DPBS ile yıkandı. Kuyulara yüzeyin tamamını kaplaması için damla damla 200 µl 1X Trypsin (Gibco, 25300054) enzimi eklendi, kuyular 3 dakika 37°C ' de inkübe edildi. Kuyulara 500 µl taze tamamlanmış besiyeri eklendi, yüzey yıkandı, hücre ve besiyeri içeren solüsyon 1,5 ml hacimli mini santrifüj tüplerine aktarıldı. Tüpler 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Pellet 1 ml soğuk 1X DPBS ile çözüldü, tüpler $+4^\circ\text{C}$ 'de 1200 rpm' de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı, hücreler vortekslenirken 1 ml %70 EtOH (Isolab, 920.026.2500-2.5L) damla damla tüplere eklendi, 30 dakika $+4^\circ\text{C}$ 'de inkübe edildi. Tüpler 3000 rpm'de 10 dakika $+4^\circ\text{C}$ 'de santrifüj edildi. Bu aşamada etil alkolün etkisi ile pellet hareketli olduğu için süpernatant dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı. Pellet 1X DPBS ile çözüldü ve 3000 rpm'de 5 dakika $+4^\circ\text{C}$ ' de santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı, tüplere 100 µl (finalde 20 µg/ml olacak şekilde) DPBS-T (%0.1 Triton-X-100) içerisinde RNase A (Thermo Scientific, EN0531) eklendi. Hücreler 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Ardından finalde 20 µg/ml olacak şekilde DPBS-T (%0.1 Triton-X-100) içerisinde PI (Invitrogen, P3566) boyası eklendi. Hücreler 10 dakika karanlıkta oda sıcaklığında inkübe edildi. Boya eklenen hücreler ve boyasız kontrol hücreleri Acuri C6 Flow Sitometri cihazı ile 1., 3., 4. ve 5. günlerde analiz edildi, elde edilen sonuçlar ModFit LT 5.0 programı kullanılarak analiz edildi ve düzenlendi.

4.7. Hücre Besiyesinde DEK3 İzoformunun Araştırılması

4.7.1. Hücre Ekimi ve Besiyesinin Konsantre Edilmesi

HS-27A-GFP, HS-27A-FD1, HS-27A-FD2 ve HS-27A-FD3 hücrelerinden besiyeri toplamak amacıyla; her hücre hattından 4 adet T75 flaska $1,2 \times 10^6$ hücre ekildi. 24.

saatte hücrelerin ters ışık mikroskopunda homojen şekilde dağıldığı kontrol edildi. 48. saatte hücrelerin ters ışık mikroskopunda 4X ve 10X objektif ile fotoğrafları çekildi. Ardından besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreler oda sıcaklığındaki 3 ml 1X DPBS ile üç kere yıkandı. Her flaska 7,5 ml serum içermeyen (sadece %1 pen/strep içeren) RPMI 1640 besiyeri eklendi. Ve hücreler inkübatöre kaldırıldı. Rekombinant insan İnterlökin-8 (rhIL-8)'i ile uyarılacak hücrelere ise final konsantrasyon 10 ng/ml olacak şekilde rhIL-8'i içeren besiyeri eklendi. Hücreler 18 saat inkübe edildikten sonra medyumlar toplandı. Medyum toplama işleminden önce ters ışık mikroskobu ile her gruptan bir flaskın 4X ve 10X büyütmede fotoğrafı çekildi. Her grupta, medyum toplanan flasklardan birinin üzerine daha sonra total protein izolasyonu yapmak üzere taze serum içermeyen RPMI 1640 besiyeri eklendi. Toplanan medyumlar 1600 rpm'de 7 dakika 4°C' de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası besiyerleri Amicon-15 ultra santrifüj tüplerine aktarıldı. 14 ml besiyeri için 140 µl 1X Proteaz İnhibitörü (Sigma-Aldrich, 11873580001) eklendi. Ardından santrifüj tüpleri 3600g'de 40 dakika 4°C' de santrifüj edildi. Santrifüj ardından konsantre olan besiyerleri (~200 µl) Amicon-4 ultra santrifüj tüplerine aktarıldı ve 1X DPBS ile hacim olarak 2 ml'e tamamlandı. Tüpler tekrar 3600g'de 40 dakika +4°C'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası konsantre besiyerleri 1,5 ml'lik santrifüj tüplerine aktarıldı ve -80°C'ye kaldırıldı.

4.7.2. DEK3 İzoformunun Besiyerinde Western Blot ile Analizi

Hücre lizatından elde edilen ve hücre medyumlarının konsantre edilmesiyle elde edilen proteinler BOLT BIS TRIS %10 (Thermo Fisher, NW0010A) sistemi kullanılarak jelde yürütüldü. Bunun için önce medyum örneklerinin 30 µl veya 10 µl'si 10X Sample Buffer ve 4X Yükleme Boyası ile karıştırıldı. Lizat örnekleri için de 20 µg protein yine 10X Sample Buffer ve 4X Yükleme Boyası ile karıştırıldı. Lizat örnekleri için yükleme hacmi dH₂O ile tamamlandı. Hazırlanan örnekler 70 °C'de 10 dakika denatüre edildi. Örnekler denatüre olurken, 1X Bolt MES ya da MOPS SDS Yürütme Tamponu (Thermo Fischer, B0002) hazırlandı. Jel tanka yerleştirildi ve sızıntı olmadığı kontrol edildikten sonra tank 1X yürütme tamponu ile dolduruldu. Örnekler kuyulara yüklendi ve 10 dakika 80V'da, 90 dakika 100V'da yürütüldü.

Yürütme işlemi bittikten sonra “BOLT BIS TRIS %10 WELCOME PK” sistemi kullanılarak ıslak transfer gerçekleştirildi. Bunun için sırasıyla kullanılacak olan PVDF (Biorad, 1620177) membran 1 dakika saf metanol içerisinde bekletildi. Membranı sıkıştırmak için kullanılacak olan filtre kâğıdı ve sünger pedler 1X Transfer Tamponu (Thermo Fischer, BT0006) ile ıslatıldı. Transfer kasetinin içerisine sünger pedler, filtre kağıtları ve membranlar sırasıyla yerleştirildi. Kaset tanka yerleştirildikten sonra, tank 1X Transfer Tamponu ile dolduruldu ve 1 saat 20V’da transfer gerçekleştirildi. Transfer sonrası membran 1 kere 5 dakika % 0.1 1X TBS-T ile yıkandı. Yıkama sonrası membran %5 BSA ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Ardından membran anti-Flag (M2, Mouse, SIGMA, 1804, 1:2000) ve GAPDH (D16H11, Rabbit, CST, 5174S, 1:3000) antikorları ile %5 BSA içeren TBS-T solüsyonu içerisinde gece boyu 4 °C’de, ya da 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Ardından membran daha önce tanımlandığı şekilde yıkandı.

Membranların görüntülenmesi için üreticinin tavsiye ettiği şekilde görüntülemeyden hemen önce WesternBright ECL Kemilüminesans HRP Substrat (Advansta, K-12045-C20) kitinin içerisinde bulunan 1 ve 2 numaralı solüsyonlar 1:1 oranında karıştırıldı, membranın tüm yüzeyi kaplanacak şekilde damla damla aktarıldı. Membran karanlıkta 2-3 dakika inkübe edildi. Ardından fazla olan ECL solüsyonu toplandı ve membran Chemi Doc XRS+ (Biorad, 721BR04545) cihazı kullanılarak görüntülendi. Görüntüler daha sonra Image Lab (Bio Rad) programı kullanılarak düzenlendi.

4.7.3. Ticari ELISA Kiti ile Besiyesinde DEK İzofomlarının Araştırılması

HS-27A-GFP, FD1, FD2 ve FD3 hücrelerinin medyumlarında DEK protein varlığı ayrıca Flag-Etiketli Protein ELISA Kit (Biovision, 4700-100) kullanılarak araştırıldı. Bu amaçla, hücreler 1.2×10^6 hücre/T-75 flask olacak şekilde 4 adet kültür kabına ekildi. 48. saatte hücrelerin 4X ve 10X büyütmede Nikon Eclipse Ti-S ters ışık mikroskopunda fotoğrafları çekildikten sonra, hücrelerin üzerindeki besiyeri çekildi, 3 ml 1X DPBS ile yüzey yıkandı. Yıkama sonrası rhlL8 uygulanmayacak kültür kaplarına 7,5 ml taze serum içermeyen (sadece %1 pen/strep içeren) besiyeri eklendi ve inkübatöre

kaldırıldı. rhIL-8 uygulanacak hücrelere ise kültür kaplarının içerisinde finalde 10 ng/ml IL-8 olacak şekilde serum içermeyen besiyeri eklendi ve hücreler 18 saat inkübe edildi. Medyumlar yukarıda anlatıldığı gibi Amicon-15 ve Amicon-4 ultra santrifüj tüpleri ile toplandı. Medyumları toplanan kültür kaplarından her hücre ve koşuldan birer adetinin üzerine taze serum içermeyen besiyeri eklendi (hücre lizatı elde etmek için). Medyumlar iki tüpe aktarıldı. Tüplerden biri ELISA deneyi için kullanıldı (protein üçüncül yapılarında bozulmanın minimumda olması için dondur-çöz yapılmadı), diğeri daha sonra kullanılmak üzere denatüre edilmeden -80°C'ye kaldırıldı. Kullanılacak olan medyum Western Blot analizinde kullanmadan önce 1:5 veya 1:10 oranında sulandırıldı.

Hücre lizatından protein elde etmek için de üzerlerine besiyeri eklenen kültür kapları biyogüvenlik kabinine alındı, hücrelerin üzerindeki besiyeri vakumlu iğne ile çekildi. Hücrelerin bulunduğu yüzey 1X DPBS ile yıkandı ve 1X Tripsin ile 3 dakika 37°C'de inkübe edildi. Ardından taze tamamlanmış besiyeri eklenen hücreler toplandı, çöktürüldü. Her örnekten 2,5x10⁶/ml hücre mini santrifüj tüpüne alındı. Tüpler 10000g'de 2 dakika çöktürüldü. Süpernatant uzaklaştırıldı, pellet 1X DPBS içerisinde vortekslenerek çözüldü. Hücreler toplamda 2 dakika (30 saniye aralıklarla) sonike edildi ve 10 dakika 10000g'de santrifüj edildi. Süpernatant toplandı, örnekler ELISA'da kullanılmak üzere 1:20 oranında sulandırıldı.

ELISA için DYKDDDDK standartları hazırlandı. Kit içerisinde temin edilen Flag standartı dH₂O kullanılarak 0 (S0), 256 (S1), 640 (S2), 1600 (S3), 4000 (S4) ve 10000 (S5) ng/ml olacak şekilde hazırlandı. Plakanın kuyularına 50 µl standart, sulandırılmış medyum veya lizat örneği eklendi. Ardından 50 µl konjugat çalışma solüsyonu (12 µl HRP-konjugat stok solüsyonu 7,5 ml konjugat tamponu içerisine eklendi) ve 50 µl antikor solüsyonu (kit içerisinde, kullanıma hazır) eklendi. Plakanın üzeri plaka kapatıcı film ile kapatıldı ve oda sıcaklığında 1 saat çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. Kuyuların içeriğinin tamamı uzaklaştırıldı, 5 kere 1X Yıkama Tamponu ile yıkandı. Her kuyuya 100 µl TMB Sübstrat solüsyonu eklendi, plaka oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde 23 dakika inkübe edildi. S0 standardının eklendiği kuyuya OD₆₅₀ ölçümü yapıldı, kuyulara 100 µl durdurma solüsyonu eklendi ve hızlıca OD₄₅₀ ölçümü alındı.

4.8. İstatistiksel Analiz

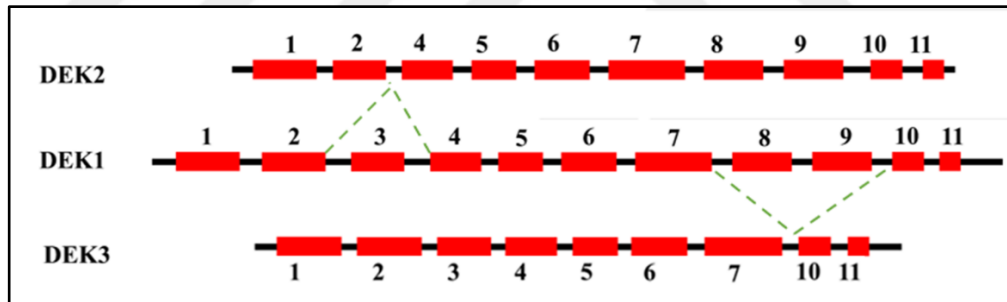
Yapılan deneylerde elde edilen sonuçlar GraphPad Prism 8.0 programı kullanılarak analiz edildi. Yara kapanma deneyinde ve proliferasyon deneyinde (growth curve) 2-way ANOVA testi, ELISA deneyinde Student's T-Test kullanıldı ve $P<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



5. BULGULAR

5.1. DEK3 İzoformunun Diğer DEK İzoformları ile Karşılaştırılması

DEK3 izoformu, literatürde DEK olarak tanımlanan DEK1 izoformu ile karşılaştırıldığında DEK1 izoformunda bulunan 253-348 amino asit rezidülerini içermemektedir. “Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)” ile yapılan karşılaştırma da DEK3 ile eşleşen bir transkript bulunmamaktadır (Şekil A1.1). İzoformlar arası çıkan bölge şekil 5.1’ de gösterilmektedir. DEK3 izoformunda bulunmayan 95 amino asitlik bölge, DEK’in fosforilasyon bölgelerini yoğunlukla içermektedir [Kappes, Damoc, et al., 2004]. Bu bölgenin CK2 gibi kinazlar ile fosforilasyonu DEK’in multimerizasyonunu sağladığı bilinmektedir. Bu bölge aynı zamanda moleküller arası ve kromatin ile etkileşim için oldukça önemlidir [Kappes, Scholten, et al., 2004].

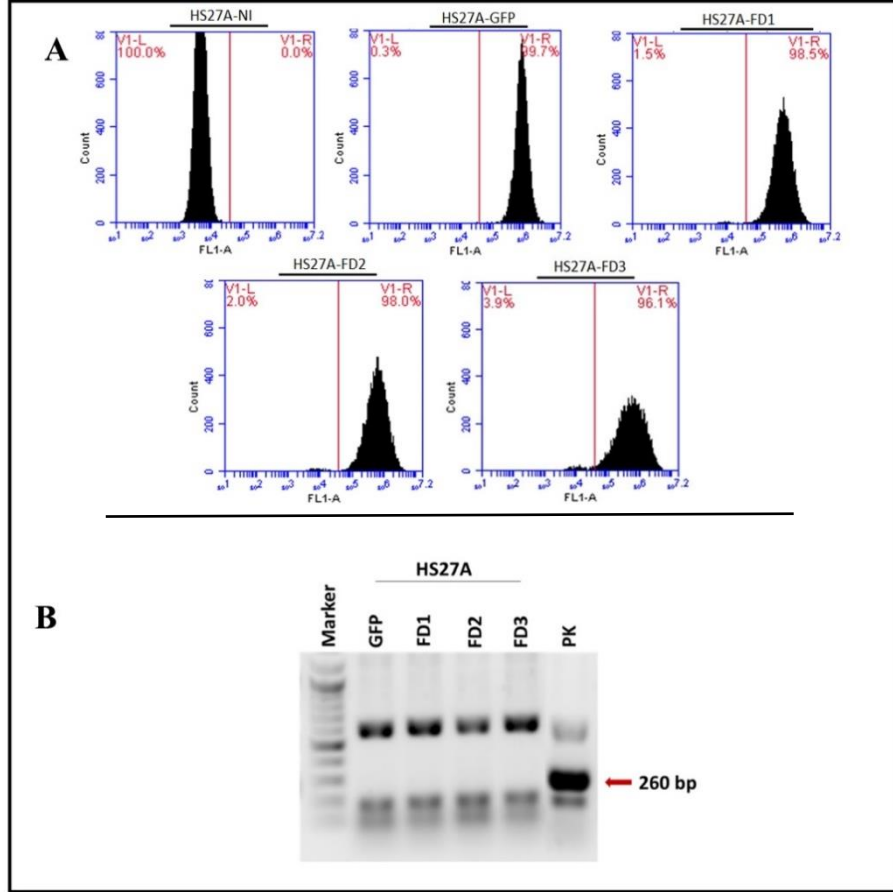


Şekil 5.1: DEK izoformlarının ekzon dizilimini. DEK1: DEK İzoform 1; DEK2: DEK İzoform 2; DEK3: DEK İzoform 3.

5.2. DEK İzoformlarının Western Blot Analizi

Laboratuvarımızda daha önce MSCV-IRES-GFP (MIG) içeren plazmitler aracılığıyla, retroviral yöntem kullanılarak DEK izoformları HS27A sağlıklı kemik iliği stroma hücrelerinde kalıcı olarak aşırı ifade ettirilmişti. Bu hücreler, kullanılan vektör sayesinde yeşil floresan protein (Green fluorescent protein; GFP) ve ayrıca, N-terminalinde Flag belirteci (N-DYKDDDDK-C) olan DEK izoformlarını üretir. Bu tez

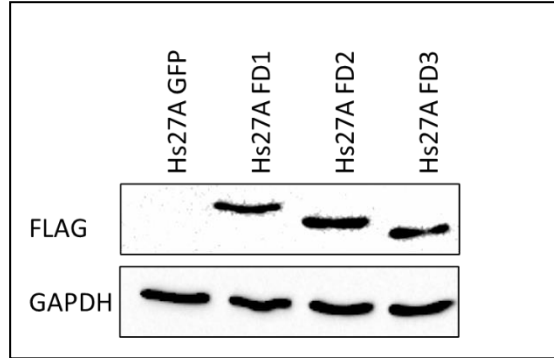
çalışmasında hücreler deneylerde kullanılmadan önce bir kere daha GFP proteini temel alınarak FACS ile ayrıştırıldı ve ayrıştırma sonrasında hücrelerin %95'ten yüksek oranda GFP⁺ olduğu saptandı (FD1 %98.5; FD2 %98; FD3 %96.1) (Şekil 5.2A). Ayrıştırılan hücreler Mycoplasma kontaminasyonu açısından test edildi, kontamine olmadığı gösterildikten sonra (Şekil 5.2B) hücreler stoklandı.



Şekil 5.2: FACS Analizi ve Mycoplasma Test Sonucu. Retroviral yöntem kullanılarak transdükte edilen HS27A hücrelerinin FACS ile seçilmesi ardından yapılan Acuri analiz sonuçları (A). Mycoplasma kontrolü yapılan hücrelerin agaroz jelde görüntülenmesi (B). (NI: Parental (transfekte edilmemiş hücre), GFP: HS-27A-GFP kontrol. FD1: Flag etiketli DEK1 izoformunu aşırı ifade eden hücre (HS-27A-FD1). FD2: Flag etiketli DEK2 izoformunu aşırı ifade eden hücre (HS-27A-FD2). FD3: Flag etiketli DEK3 izoformunu aşırı ifade eden hücre (HS-27A-FD3), PK: Pozitif Kontrol.

Hücreler FACS ile analiz edildikten sonra, DEK izoformlarının aşırı ifadesi Western blot yöntemiyle doğrulandı. Her izoform ve kontrol için anti-Flag ve yükleme kontrolü için GAPDH antikoru kullanılarak analiz yapıldı. Aynı konsantrasyonda yükleme yapılan örneklerin kontrol yükleme antikoru ile karşılaştırıldığında

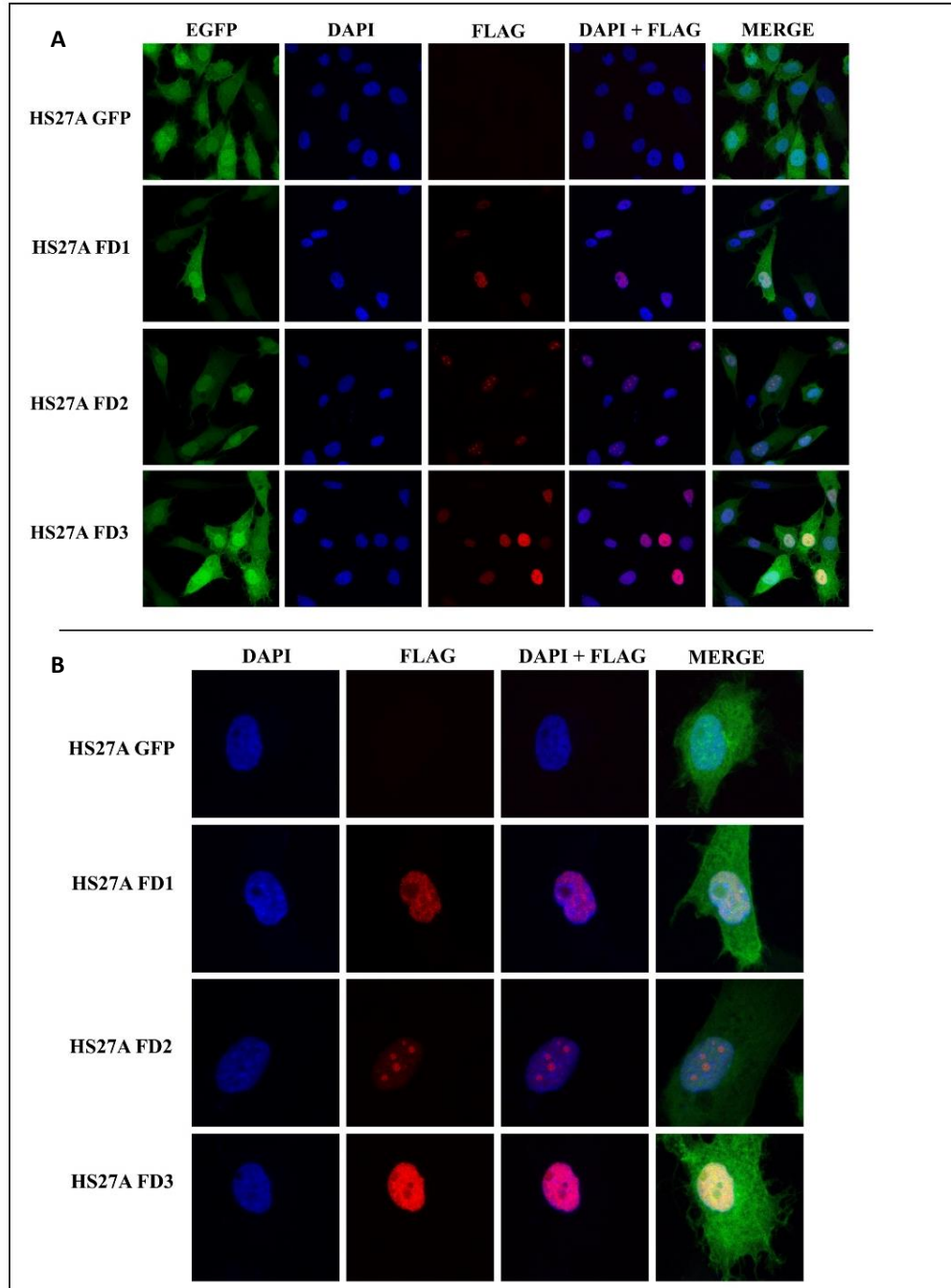
izoformların hepsinin benzer oranda ifade edildiği gösterildi. Bu analiz sayesinde izoformlarda bulunmayan amino asit bölgelerine bağlı olarak izoformlar arasındaki kütle farkı da gösterildi (Şekil 5.3).



Şekil 5.3: Western Blot analizi sonucunda Flag ve GAPDH boyaması yapılan protein örneklerinin görüntüsü.

5.3. DEK İzoformlarının Lokalizasyonunun Belirlenmesi

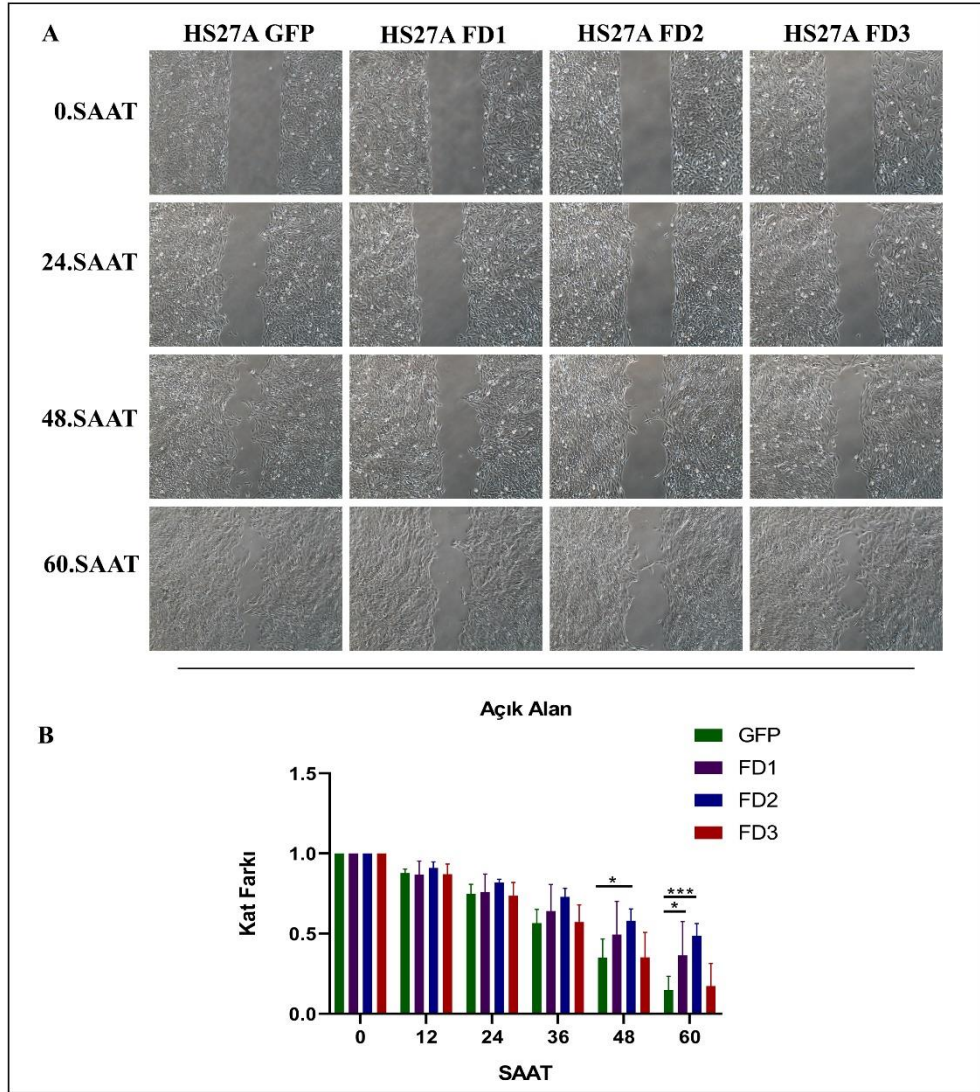
DEK proteinin literatürde kromatine bağlı şekilde ya da eksozomlar aracılığıyla salgılandığı bildirilmiştir [Mor-Vaknin et al., 2006]. Alternatif kırılma ile oluşan izoformların fonksiyonel farklılıklar sergilediği ve hücre içi lokalizasyonunun değişebildiği bilinmektedir [Kelemen et al., 2013]. DEK'in hücre içi lokalizasyonunun izoformlar arasında farklılık gösterip göstermediğini tespit etmek amacıyla immünofloresan boyama yapıldı. DEK1 izoformunun çoğunlukla kromatine bağlı olarak bulunduğu ve çekirdekte lokalize olduğu gösterilmiştir [Mor-Vaknin et al., 2006], [Waldmann et al., 2003]. Anti-Flag antikoru ile indirekt olarak yapılan immünofloresan boyama sonucunda, DEK1 izoformunun literatür ile tutarlı olarak çekirdekte lokalize olduğu, DEK2 izoformunun çekirdekçik olduğu tahmin edilen bölgede yoğun olmak üzere çekirdekte bulunduğu, DEK3'ün ise DEK1 gibi çekirdek içerisinde yaygın bir şekilde bulunduğu gösterilmiştir (Şekil 5.4).



Şekil 5.4: Anti-Flag antikoru ve Alexa-555 sekonder antikoru ile boyanan (kırmızı) HS27A hücrelerinin konfokal mikroskobu ile alınan görüntüsü (63X, A). Tek hücre için yakınlaştırılmış görüntü (63X, B). Mavi: DAPI ile çekirdek boyaması. Yeşil: GFP.

5.4. DEK İzoformlarının Aşırı İfadesinin Hücre Migrasyonuna Etkisinin Araştırılması

Daha önce DEK1 izoformunun aşırı ifadesinin çeşitli sağlıklı ve kanser hücrelerinde migrasyonu arttırdığı gösterilmiştir. DEK1 ve DEK2 izoformunu içeren bir çalışmada her iki izoformun da karaciğer kanser hücre hattında aşırı ifadesinin hücre migrasyonunu arttırdığı bulunmuştur [Yu et al., 2016]. Kanser hücre hattı olmayan ancak immortalize edilmiş HS-27A hücrelerinde DEK izoformlarının hücre migrasyonunu etkileyip etkilemediğini belirlemek amacıyla, yara kapanma (wound healing) deneyi gerçekleştirildi. Hücreler yara iyileşmesini tespit etmek için özel kültür kaplarına ekildi, kültür kabını doldurmalarının ardından proliferasyonun durması için serum oranı azaltılmış (%5) besiyeri eklendi ve hücrelerin arasında boşluk oluşturuldu. Ardından 0., 12., 24., 48., ve 60. saatlerde ters ışık mikroskobu ile boşluk olan alanın 3 ayrı bölgesinin görüntüsü alınarak Image-J programı ile analiz edildi. Analiz sonucunda, kontrol HS-27A-GFP hücrelerinin ve FD3 hücrelerinin yarayı daha hızlı kapattığı (migrasyonlarının daha iyi olduğu), buna karşı FD1 ve FD2 hücrelerinin ise migrasyonlarının yavaşladığı ve yarayı daha geç kapattıkları tespit edildi (Şekil 5.5) Elde edilen sonuçlar, DEK1 ve DEK2'nin C-ter bölgesinde bulunan ancak DEK3 izoformunda bulunmayan 253-348 arasındaki amino asit bölgesinin migrasyonu baskılandığını göstermektedir.



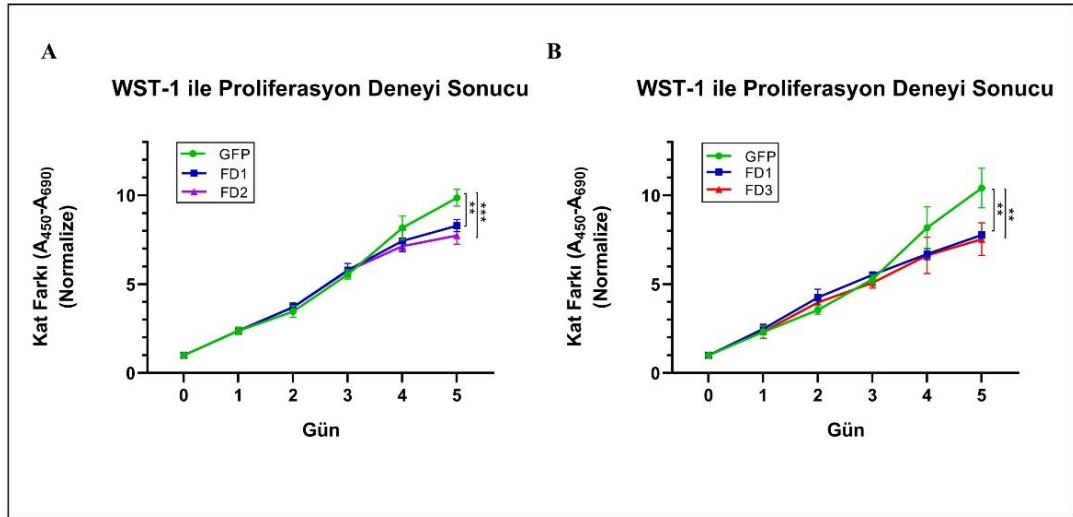
Şekil 5.5: Migrasyon Deneyi Sonuçları. 0., 24., 48. Ve 60. saatlerde Nikon Eclipse Ti-S ters ışık mikroskobu ile alınan görüntüler (A). Her hücre hattı için aynı saate ait 3 görüntü ortalaması kullanılarak hazırlanan Image-J analiz sonuçları.

Grafik 3 bağımsız deneyden elde edilen, her saatte 3 ayrı alanın ortalamasını göstermektedir. GraphPad Prism kullanılarak 2- way ANOVA testi yapıldı (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

5.5. DEK İzoformlarının Hücre Çoğalmasına Etkisi

DEK proteinin pek çok kanser türünde aşırı ifade edildiği, bu ifade artışının birden fazla primer hücre ve hücre hattında çoğalma kapasitesini arttırdığı belirtilmiştir [Feng et al., 2017], [Xu et al., 2017], [Yang et al., 2020], [Zhang et al., 2016]. Aynı zamanda yine hepatoselüler karsinoma hücre hattında ektopik olarak DEK1 ve DEK2 izoformunun aşırı ifadesinin de hücre çoğalma kapasitesini arttırdığı

gösterilmiştir [Yu et al., 2016]. Bu veriler doğrultusunda, DEK izoformlarının HS-27A hücrelerinin çoğalmasına olan etkisini incelemek amacıyla, hücrelerin çoğalması 6 gün boyunca takip edildi. Üç bağımsız deney sonucunda, kontrol HS-27A-GFP hücreleri ile kıyaslandığında DEK1, DEK2 ve DEK3 hücrelerinin aşırı ifadesinin proliferasyon kapasitesini düşürdüğü tespit edildi. DEK2 ve DEK3 izoformlarının hücre çoğalmasını DEK1 hücrelerinden daha fazla baskıladığı belirlendi (Şekil 5.6A ve 5.6B). Özetle, DEK2’de N-terminalinde eksik olan bölge hem migrasyonu hem de proliferasyonu yavaşlatırken, DEK3’te bulunmayan amino asit bölgesi proliferasyonu yavaşlatmakta ancak migrasyona etki göstermemektedir.

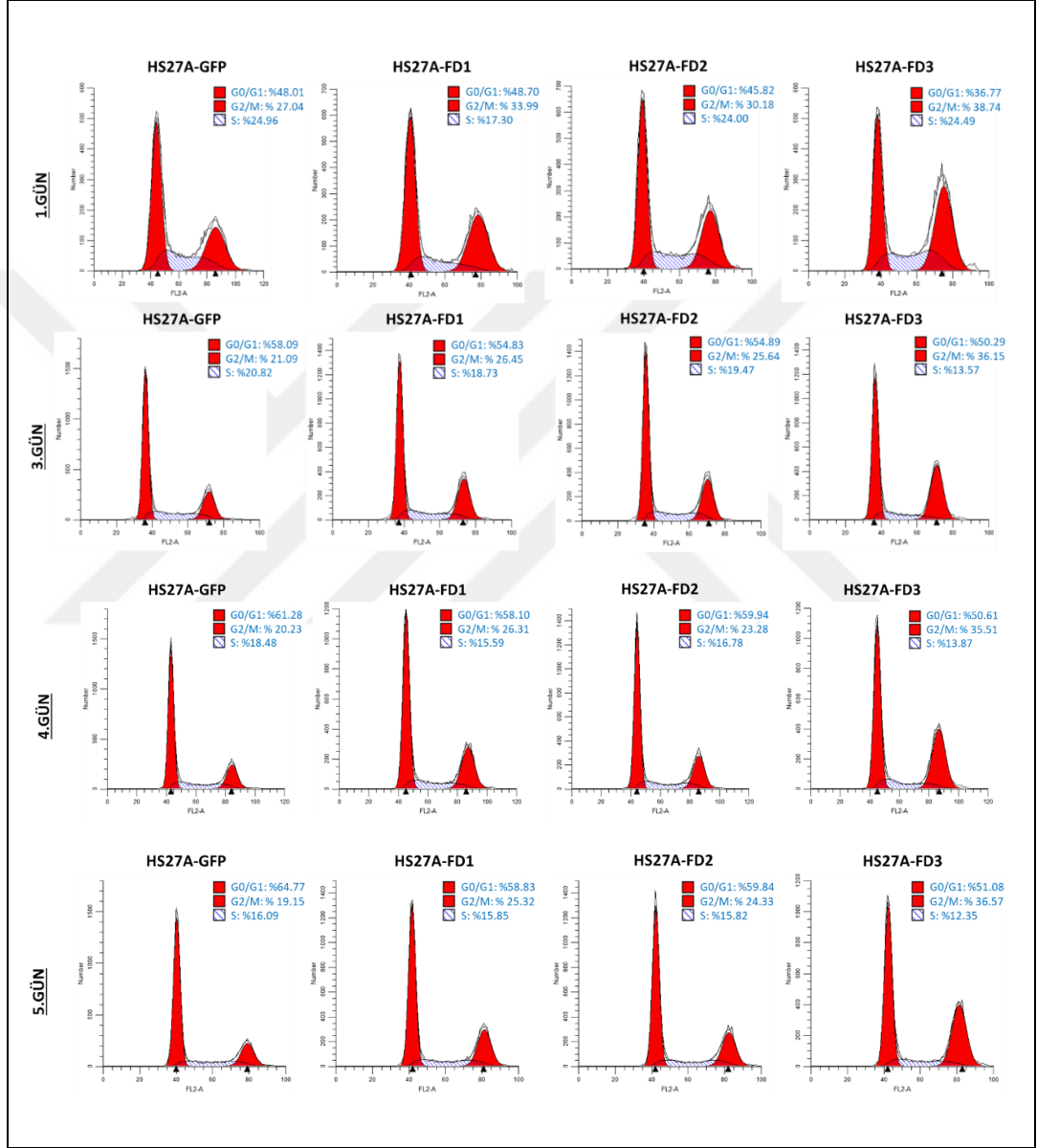


Şekil 5.6: Hücre Proliferasyon Deneyi Sonuçları. Hücreler 5000 hücre/kuyu ve üçlü tekrar olarak ekildi, elde edilen absorbans değerlerinin ortalaması alındı ve sonuçlar her hücre hattının 0. gün değerine bölünerek üç bağımsız (A) ve dört bağımsız tekrar sonucu (B) için kat farkı olarak hesaplandı. Sonuçlar 2-Way ANOVA kullanılarak analiz edilmiştir (*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001).

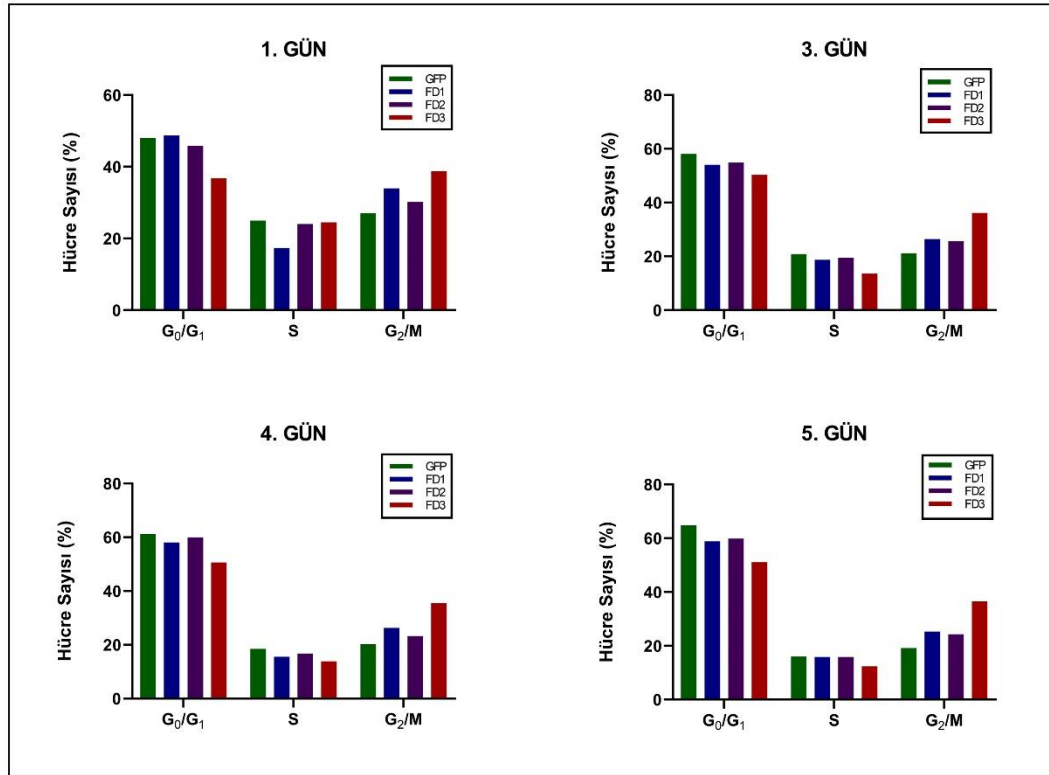
5.6. DEK İzoformlarının Hücre Döngüsüne Etkisinin İncelenmesi

DEK3 izoformunun hücre çoğalması üzerindeki yavaşlatıcı etkisinin hücre döngüsünde değişikliğe yol açıp açmadığının tespiti için hücre döngüsü analizi gerçekleştirildi. Hücre döngüsü analizinde, hücre içerisindeki nükleotitleri boyayan PI boyama yöntemi ve Acuri C6 Flow sitometri cihazı kullanıldı. Hücredeki ribonükleik asitlerin boyanmasını engellemek için, PI boyama öncesi hücrelere RNase A

uygulandı. Hücre döngüsü, proliferasyon deneyinde olduğu gibi 1., 3., 4. ve 5. günde analiz edildi. Analiz sonucunda tüm DEK izoformlarının hücre döngüsünün G₂/M fazında yığılmaya (arrest) sebep olduğu; bu yığılmanın DEK3 ifade eden hücrelerde daha fazla bulunduğu tespit edildi (Şekil 5.7 ve Şekil 5.8).



Şekil 5.7: Hücre döngüsü analiz sonuçları.



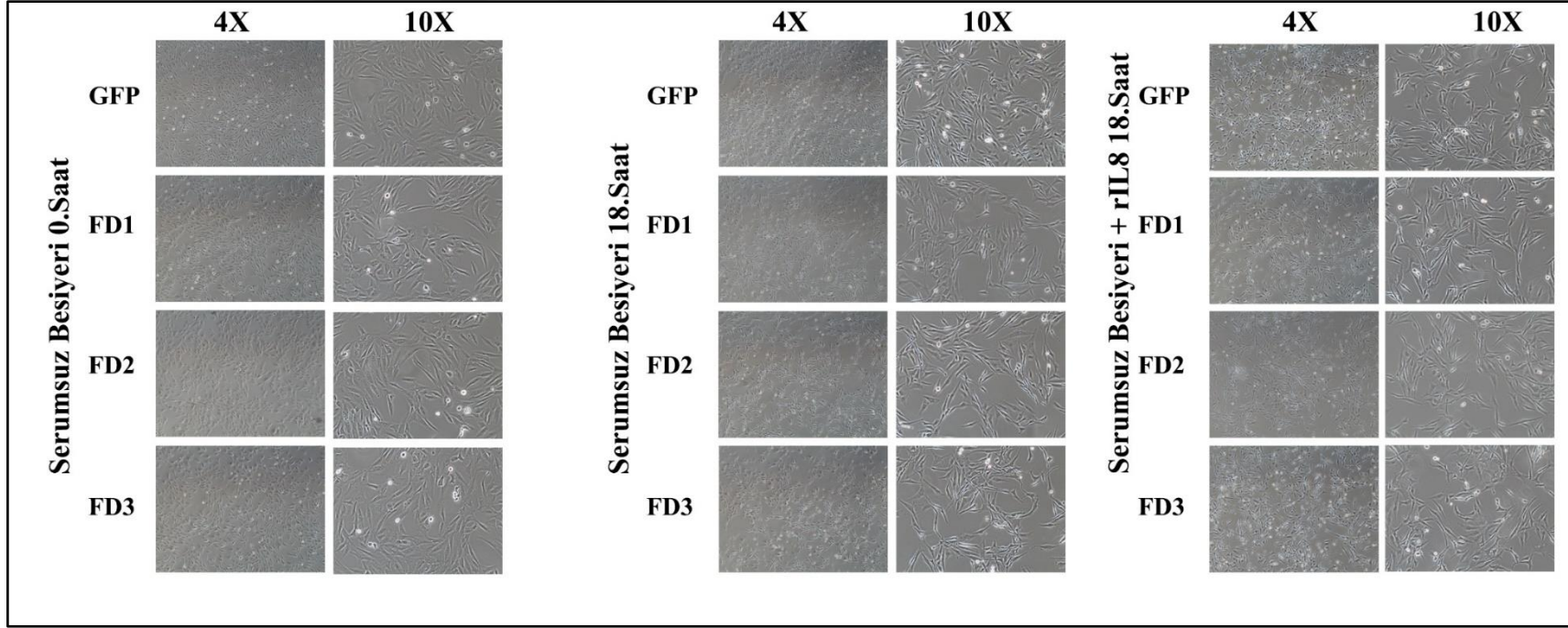
Şekil 5.8: Hücre döngüsü analizinin grafiksel gösterimi.

5.7. DEK İzoformlarının Hücre Dışına Salgılanmasının Western Blot ve ELISA Yöntemi Kullanılarak Araştırılması

Literatürde DEK1 izoformu ile ilgili yapılan çalışmalarda DEK1 inflamasyon bölgesinde otoantikor profilinin ana bileşeni olarak tanımlanmış, daha sonrasında yapılan çalışmalarda ise DEK1'in özellikle juvenil idiopatik artirit hastalarından alınan sinoviyal sıvıda bulunduğu gösterilmiştir [Sierakowska et al., 1993]. Ayrıca, DEK1'in inflamasyonda görevli hücreler için kemoatraktan olarak görev aldığı, IL-8 ile stimüle edilebilen ve serbest formda ya da ekzozomlar aracılığıyla MDM hücrelerinden salgılandığı gösterilmiştir [Mor-Vaknin et al., 2006]. İlave olarak, salgılanan DEK1 proteinin hematopoietik kök hücrelerin regülasyonunda görev aldığı da bildirilmiştir [Capitano et al., 2019]. Bu çalışmalar, DEK1'in çekirdekte DNA'ya bağlanarak gerçekleştirdiği görevlerine ek olarak, salgılanma yoluyla da fonksiyon gösterdiğini ve hem inflamasyonda hem de regülatör olarak kan hücrelerinin üretiminde rol alabileceğini vurgulamaktadır. DEK1 izoformunun spesifik bir salgılanma sinyaline sahip olmaması fakat IL-8 uyarımı ile salgısının artmasından yola çıkılarak, bu tez

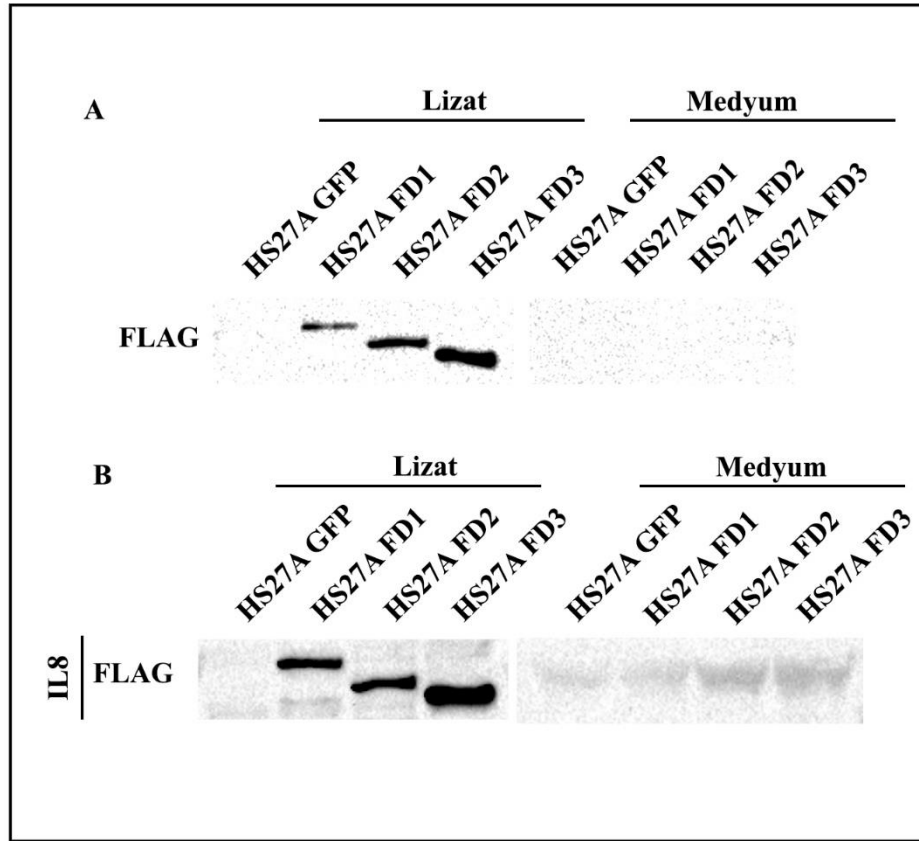
alışmasında DEK izoformalarının HS-27A hücrelerinden de salgılanıp salgılanmadığı IL-8 varlığında ve yokluğunda Western Blot ve ELISA yöntemiyle araştırılmıştır. Bunun için serum içermeyen besiyerinde 18 saat inkübe edilen kontrol ve FD1, FD2, FD3 hücrelerinin besiyerleri Amicon Ultra-15 ve Amicon Ultra-4 filtreleri ile konsantre edildi. Besiyerleri toplanmadan öncesinde ve sonrasında hücrelerin ters ışık mikroskobunda (4X ve 10X objektif ile) fotoğrafları çekildi ve hücrelerin canlılıkları konfirme edildi (Şekil 5.9).





Şekil 5.9: rhIL8 ile uyarılan ve uyarılmayan hücrelerin 0. ve 18. saat görüntüleri. Görüntüler Nikon Eclipse Ti-S ters ışık mikroskobu kullanılarak 4X ve 10X objektif ile görüntülendi.

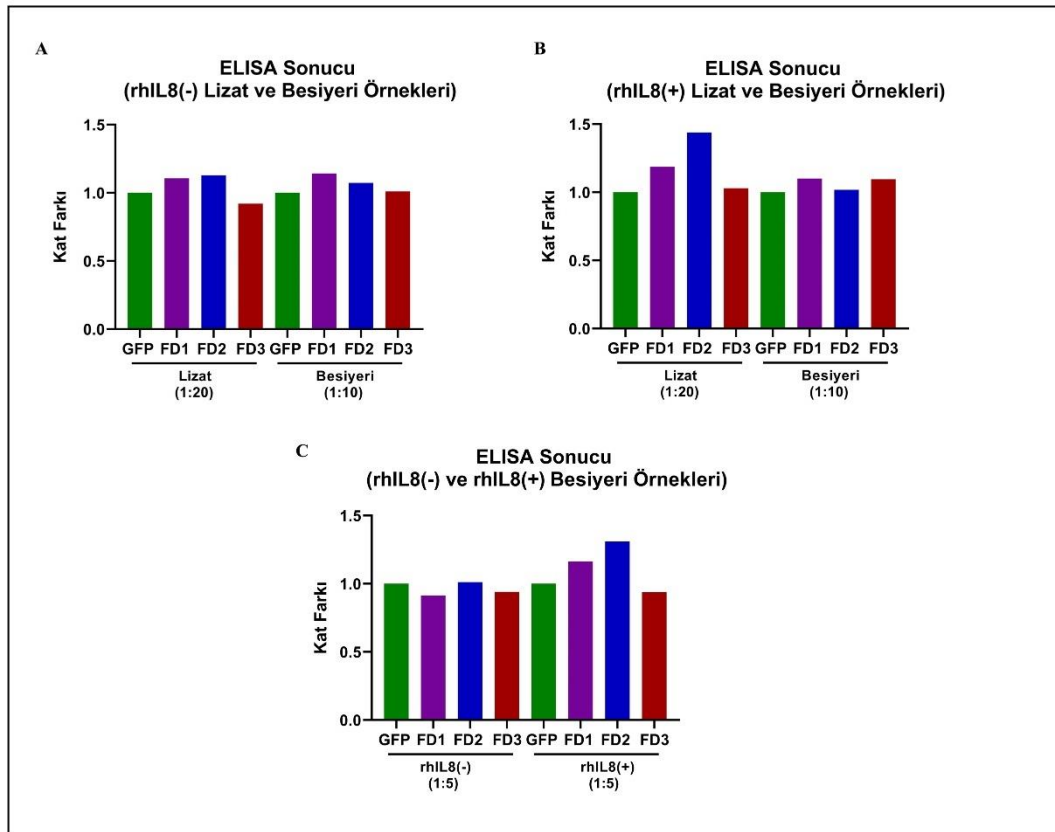
Besiyeri toplanan hücrelerden aynı zamanda total protein izolasyonu da gerçekleştirildi. Western Blot analizlerinde IL-8 ile stimüle edilen veya edilmeyen deney grubunun hücre lizatı örneklerinde DEK izoformlarının varlığı tespit edilmesine rağmen, bu hücrelerin konsantre besiyerilerinde DEK izoformları Western blot yöntemiyle tespit edilebilecek düzeyde bulunmamaktaydı (Şekil 5.10A ve Şekil 5.10B).



Şekil 5.10: rhIL-8 ile uyarımı yapılan ve yapılmayan örneklerin Western Blot ile değerlendirme sonucu. IL-8 ile uyarılmayan (A) ve uyarılan (B) hücrelerden konsantre edilen besiyeri örneklerinin ve lizat örneklerinin Western Blot analizi sonuçları.

Ayrıca, hücre lizatları ve konsantre edilen besiyerleri ELISA kiti (Biovision) kullanılarak da analiz edildi. ELISA deneylerinde besiyeri örnekleri aynı şekilde konsantre edilirken, hücre lizatı örnekleri kitin önerdiği şekilde toplandı ve 1:20 oranında sulandırıldı. Konsantre besiyeri örnekleri 1:10 veya 1:5 oranında sulandırılarak test edildi. Yapılan deneyde lizat sulandırmaları (1:20) ve 1:10 besiyeri

sulandırmalarında kontrole (HS-27A-GFP) kıyasla izoform ifade eden hücreler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenemedi (Şekil 5.11). Besiyeri grubunda 1:5 sulandırma yapıldığında ise, kontrole ((HS-27A-GFP) kıyasla, IL-8 varlığında DEK1 izoform salgısının arttığı gözlemlendi. Benzer şekilde DEK2 izoformunun da salgılandığı ancak DEK3 izoformunun salgılanmadığı görüldü. İzoformların 1:5 oranında sulandırmalarını içeren deney sadece 1 kez yapılabildiği için istatistik analizi gerçekleştirilemedi. Her ne kadar HS-27A hücrelerinden DEK1 ve DEK2'nin IL-8 varlığında düşük oranda da olsa salgılandığı gösterilmiş olsa da deneylerin tekrar edilerek bu sonucun desteklenmesi gerekmektedir (Şekil 5.11C).



Şekil 5.11: rhIL8 ile uyarımı yapılan ve yapılmayan örneklerin ELISA Kiti ile değerlendirme sonucu. rhIL8 ile uyarılmayan lizat (1:20 sulandırma) ve besiyeri (1:10 sulandırma) örneklerinin kat farkı (A). rhIL8 ile uyarılan lizat (1:20 sulandırma) ve besiyeri (1:10 sulandırma) örneklerinin kat farkı (B). rhIL-8 ile uyarılan ve uyarılmayan besiyeri örneklerinin (1:5 sulandırma) kat farkı (C). Elde edilen sonuçlar her deney grubunun kontrol (HS-27A-GFP) grubuna bölünerek kat farkı olarak gösterildi.

6. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

DEK proteini 375 amino asitten oluşan (43kDa) kromatine bağlanabilen ve bilinen enzimatik bir aktiviteye sahip olmayan bir proteindir [Privette Vinnedge et al., 2013]. Literatürde DEK olarak tanımlanan DEK proteinin birinci izoformu (DEK1), proliferasyon, migrasyon, hücre döngüsü, transkripsiyon, DNA hasar tamiri ve translasyon gibi pek çok önemli hücresel süreçler ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca gerek salgılanan DEK'in gerekse endojen DEK'in hematopoezde ve hematopetik kök hücrelerin düzenlenmesinde önemli rolü olduğu bildirilmiştir [Capitano et al., 2019], [Chen et al., 2021]. DEK'in literatürde bilinen ikinci izoformu (DEK2), birinci izoformdan farklı olarak 49-82 amino asitlerin olduğu bölgeyi içermez. Bu tez çalışmasında DEK'in bilinen bu iki izoformu dışında alternatif kırılma ile oluşan üçüncü bir izoformu (DEK3) olduğu ve bu izoformun C-terminal bölgesinde 253-348. amino asitleri arasındaki 95 amino asitlik bölgeyi içermediği gösterilmiştir. Yine bu tez kapsamında, DEK3 izoformunun fonksiyonel özellikleri ve diğer izoformlar ile arasında bulunan farklılık ve benzerlikler incelenmiştir. DEK'in hematopoezde bilinen etkilerinin kemik iliği mikroçevresindeki etkisini anlamlandırabilmek üzere immortalize edilmiş kemik iliği stromal hücre hattı HS-27A model olarak kullanılmıştır. Deneyler gerçekleştirilmeden önce DEK izoformlarının HS-27A hücrelerinde retroviral yöntemle ayrı ayrı kalıcı olarak ifadesi sağlandı (Emrah Özçelik). Bu tez kapsamında bu hücre hatları FACS ile GFP belirteci kullanılarak saflaştırıldı ve hücre hatları %95'in üzerinde GFP⁺ olacak şekilde elde edilerek çoğaltıldı ve izoformların ifadesi Western Blot ve immunofloresan boyama kullanılarak doğrulandı.

HS-27A hücre hattı insan papilloma virüsü E6/E7 genlerini içeren rekombinant bir retrovirüs ile ölümsüzleştirilmiştir (immortalized) [Roecklein & Torok-Storb, 1995]. Modifiye ettiğimiz ve DEK izoformlarını kalıcı olarak ifade ettiğimiz bu hücrelerde yaptığımız immünfloresan boyama sonucunda DEK izoformlarının hücrede DNA boyası olan DAPI ile çakıştığı, izoformların çekirdekte lokalize olduğu gösterildi. Ancak ilginç olarak, DEK1 ve DEK3 izoformu hücre çekirdeğinde yaygın olarak lokalize olurken, DEK2 izoformu çekirdek içinde hem

yaygın hem de küçük kümeler-agregatlar halinde bulunmaktaydı. Laboratuvarımızda yapılan eş zamanlı çalışmalarda bu agregatların çekirdek içi organel-benzeri yapı olan çekirdekçik olduğu gösterilmiştir (Emrah Özçelik, Ahmet Kalaycı ve Hasan Akyol; yayınlanmamış veri). Her üç izoformda da NLS bulunurken ve DEK2 izoformunun N-terminal bölgesinden çıkan 34 amino asitlik bölgede 3 adet asetilasyon bölgesi dışında özel bir domain ve PTM bölgesi bulunmamaktadır ([Mor-Vaknin et al., 2011]. DEK2'nin çekirdekte sergilediği bu yoğunlaşma, çıkan bölgede asetilasyon dışında özel rezidülerin bulunabileceği ya da üçüncül katlanmanın değişmesi yolu ile çekirdek içinde küme oluşturmaya sebep olabileceğini düşündürmektedir. DEK3 izoformunda eksilen bölgede pek çok fosforilasyon ve asetilasyon bölgesi ve multimerizasyonu sağlayan domainin bir kısmı bulunmasına rağmen [Mor-Vaknin et al., 2011], bu bölgenin ve bu bölgede gerçekleşen PTM'lerin eksikliği hücrede içerisinde protein lokalizasyonunda bir değişikliğe sebep olmamıştır.

DEK1'in özellikle kanser dokularında ve hücre hatlarında migrasyonu arttırdığı bilinmektedir. Bu çalışmada da DEK1'in aşırı ifadesinin sağlıklı kemik iliği mikroçevresinde nasıl bir etkisi olduğu incelendi. Yapılan deneylerde 48. saatten itibaren DEK2 izoformunun kontrol hücrelerine kıyasla daha yavaş migrasyon sergilediği, 60. saatte ise bu farkın daha da belirginleştiği gösterildi. DEK1 izoformu, 60. saatte DEK2 izoformu ile benzer sonuç göstererek kontrole kıyasla yavaş migrasyon gerçekleştirse de DEK3 izoformu hücre migrasyonunu istatistiksel olarak anlamlı düzeyde etkilemedi. Literatürde hepatoselüler karsinom hücre hatlarında DEK1 ve DEK2 izoformunun aşırı ifadesinin migrasyonu arttırdığı bildirilse de [Yu et al., 2016], bu tezde HS-27A hücreleriyle elde ettiğimiz sonuçlar, DEK1 ve DEK2 izoformunun aşırı ifadesinin immortalize kemik iliği stroma hücrelerinin migrasyonunu yavaşlattığını göstermektedir. Ayrıca bahsedilen çalışmada kullanılan DEK izoformlarını aşırı ifade eden hücrelerin pozitiflik oranının ve hücrelerin inkübe edildiği besiyeri içerisindeki serum oranının bilinmeyişi iki çalışma arasında karşılaştırma yapılmasını zorlaştırmaktadır. DEK1 ve DEK2 izoformlarında bulunan, sadece DEK3 izoformunda çıkmış olan 253-348. amino asitlerini içeren bölgenin varlığının migrasyon kapasitesinin artışına karşı koruyucu bir özellik gösterdiğini düşündürmektedir. Sonuç olarak buradaki verilerimiz, DEK izoformlarının migrasyona

etkisinin hücresel içerikle ve multimerizasyon domainin bir kısmını kapsayan 253-348. amino asitlerini içermesi ile ilişkili olarak değişebileceğini göstermektedir.

DEK1'in migrasyon kadar araştırılan bir diğer özelliği de hücre proliferasyonu üzerindeki etkisidir. Literatürde DEK1'in aşırı ifadesi hücre proliferasyonunu arttırırken, DEK1'in baskılanması proliferasyonu yavaşlatmaktadır [Privette Vinnedge et al., 2011]. Bu tez çalışmasında, DEK1, DEK2 ve DEK3 izoformları ile gerçekleştirilen deneylerde, literatürde diğer doku ve hücre hatlarında belirtilen etkilerden farklı olarak, DEK izoformlarının HS-27A hücrelerinin proliferasyonunu istatistiksel olarak anlamlı derecede baskıladığı gösterilmiştir. Hücre proliferasyonu çok faktörlü, uzun bir süreçtir. Proliferasyon süresince proteinler arası etkileşimler meydana gelir. DEK proteininin multimerizasyon bölgesi ise hem DEK-DEK interaksyonunu hem de diğer proteinlerle olan interaksyonu etkiler. Dolayısıyla, DEK3 hücrelerinde daha kuvvetli görülen proliferasyondaki baskılanma, DEK3 izoformunda meydana gelen olası multimerizasyon domain bozukluğu/eksikliği nedeniyle olabilir.

Hücre proliferasyonunu takiben DEK izoformlarının hücre döngüsü üzerindeki etkisi araştırıldı. Elde edilen sonuçlarda kontrol hücrelerine (HS-27A-GFP) kıyasla tüm DEK izoformlarının özellikle 4. ve 5. günde net olarak gözlenen şekilde G₂/M fazında tutulma/yığılmaya yol açtığını göstermektedir. Literatürde DEK1 proteinin Wnt/ β -catenin'in hedef moleküllerinden biri olan siklin D1 ile etkileştiği bildirilmiştir [Privette Vinnedge et al., 2015]. Siklin D1, CDK4/6 kompleksi ile etkileşerek hücrelerin G₁ fazından S fazına geçmesini sağlamaktadır [Qie and Diehl, 2016]. Burada elde edilen sonuçta hücrelerin G₂/M fazında biriktiği gözlemlense de DEK izoformlarının diğer siklinlere ve CDK'lar ile etkileşimi hakkında yapılacak araştırmalara zemin hazırlamıştır.

Son olarak yapılan DEK izoformlarının salgılanma durumunu incelemek için hücrelerin kültür yapıldığı serum içermeyen besiyerleri konsantre edildi ve aynı hücrelerden total protein izolasyonu yapılarak örnekler Western Blot yöntemiyle analiz edildi. Hücre lizati yüklenen kuyularda DEK izoformları tespit edilebilirken, konsantre edilmiş besiyerinde bant tespit edilemedi. Daha önce yapılan çalışmalarda IL-8'in DEK1 proteininin hücreden salgılanmasını arttırdığı rapor edilmiştir [Mor-Vaknin et al., 2006]. Bu verilere dayanarak, serum içermeyen besiyerinde hücreler 18 saat boyunca rekombinant insan IL-8'i ile uyarıldılar. Sonrasında hücre besiyerleri

konsantre edildi ve hücrelerden total protein izolasyonu gerçekleştirildi. Western Blot analizi yapıldığında, lizatlarda DEK izoformları tespit edildi ancak konsantre besiyeri örneklerinde tespit edilebilir düzeyde bant gözlemlenemedi. DEK1 izoformu oldukça çok çalışılsa da DEK2 izoformunun hepatoselüler karsinom hastalarından alınan örneklerde çok az ifade edildiği gösterilmiştir [Yu et al., 2016]. Ayrıca DEK2 izoformunu içeren ilk raporda DEK2 izoformu idrarda ELISA yöntemi ile gösterilmiştir [Datta A and Trama J., 2014]. Bu tez çalışmasında, ELISA yöntemiyle elde edilen ancak tekrar edilmesi gereken ilk bulgularımız, HS-27A hücrelerinden DEK1 ve DEK2'nin IL-8 varlığında düşük miktarda da olsa salgılandığını ancak DEK3'ün salgılanmadığını göstermektedir. DEK3'te eksik olan amino asit bölgesi çoğunlukla DEK1'de fosforile olan amino asitleri kapsamaktadır. DEK1 proteinin fosforilasyonunun DNA'ya afinitesini azalttığı, defosforilasyonunun da DNA bağlanma afinitesini arttırdığı bildirilmiştir [Kappes, Damoc, et al., 2004]. Dolayısıyla DEK3 izoformu daha az fosforilasyon bölgesi içerdiğinden kromatine bağlı kalıp salgılanmıyor olabilir.

Özetle bu tez çalışmasında, daha önce tanımlanmamış olan ve DEK3 olarak adlandırdığımız DEK izoformunun fonksiyonel olarak diğer iki izoformdan farklılık gösterdiğini bulduk. Elde ettiğimiz veriler, bu farklılıkların altında yatan moleküler mekanizmaların anlaşılmasını hedefleyecek gelecek projelere de yön verecek, DEK proteininin işlevlerinin, izoformları dikkate alınarak daha detaylı anlaşılmasına katkıda bulunacaktır.

KAYNAKÇA

Abubaker J., Bavi P., Al-Haqawi W., Sultana M., Al-Harbi S., Al-Sanea N., Abduljabbar A., Ashari L. H., Alhomoud S., Al-Dayel F., Uddin S., Al-Kuraya K. S., (2009), "Prognostic significance of alterations in KRAS isoforms KRAS-4A/4B and KRAS mutations in colorectal carcinoma", *The Journal of Pathology*, 219(4), 435–445.

Agapov A., Olina A., Kulbachinskiy A., (2022), "RNA polymerase pausing, stalling and bypass during transcription of damaged DNA: from molecular basis to functional consequences", *Nucleic Acids Research*, 50(6), 3018.

Aravind L., Koonin E. V., (2000), "SAP- a putative DNA-binding motif involved in chromosomal organization", *Trends in Biochemical Sciences*, 25(3), 112–114.

Barbosa C., Peixeiro I., Romão L., (2013), "Gene Expression Regulation by Upstream Open Reading Frames and Human Disease", *PLOS Genetics*, 9(8), e1003529.

Bernitz J. M., Kim H. S., MacArthur B., Sieburg H., Moore, K., (2016), "Hematopoietic Stem Cells Count and Remember Self-Renewal Divisions", *Cell*, 167(5), 1296-1309.

Black A. J., Gamarra J. R., Giudice J., (2019), "More than a messenger: Alternative splicing as a therapeutic target", *Biochimica et Biophysica Acta. Gene Regulatory Mechanisms*, 1862(11–12).

Bogolyubov D., Parfenov V., (2008), "Structure of the insect oocyte nucleus with special reference to interchromatin granule clusters and cajal bodies", *International Review of Cell and Molecular Biology*, 269, 59–110.

Brimacombe R., Stiege W., (1985), "Structure and function of ribosomal RNA", *Biochemical Journal*, 229(1), 1.

Capitano M. L., Mor-Vaknin N., Saha A. K., Cooper S., Legendre M., Guo H., Contreras-Galindo R., Kappes F., Sartor M. A., Lee C. T., Huang X., Markovitz D. M., Broxmeyer, H. E., (2019), "Secreted nuclear protein DEK regulates hematopoiesis through CXCR2 signaling," *Journal of Clinical Investigation*, 129(6), 2555–2570.

Carro M. S., Spiga F. M., Quarto M., di Ninni V., Volorio S., Alcalay M., Müller H., (2006), "DEK Expression is controlled by E2F and deregulated in diverse tumor types", *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 5(11), 1202–1207.

Cleary J., Sitwala K. v., Khodadoust M. S., Kwok R. P. S., Mor-Vaknin N., Cebrat M., Cole P. A., Markovitz, D. M., (2005), "p300/CBP-associated factor drives DEK into interchromatin granule clusters", *The Journal of Biological Chemistry*, 280(36), 31760–31767.

Coltri P. P., dos Santos M. G. P., da Silva G. H. G., (2019), "Splicing and cancer: Challenges and opportunities", Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA, 10(3), e1527.

Cramer P., (2019), "Organization and regulation of gene transcription", Nature, 573(7772), 45–54.

Csaki L. S., Reue K., (2010), "Lipins: Multifunctional Lipid Metabolism Proteins", Annual Review of Nutrition, 30, 257.

Danckwardt S., Hentze M. W., Kulozik A. E., (2008), "3' end mRNA processing: molecular mechanisms and implications for health and disease", The EMBO Journal, 27(3), 482–498.

Datta A., Trama J., (2014), "Detection of a specific DEK isoform as a urine-based biomarker for bladder cancer", U.S. Patent, US20120196305A1.

de Albuquerque Oliveira A. C., Kappes F., Martins D. B. G., de Lima Filho J. L., (2018), "The unique DEK oncoprotein in women's health: A potential novel biomarker", Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie, 106, 142–148.

de Haan G., Ploemacher R., (2002), "The cobblestone-area-forming cell assay", Methods in Molecular Medicine, 63, 143–151.

de Klerk E., 't Hoen P. A. C., (2015), "Alternative mRNA transcription, processing, and translation: insights from RNA sequencing", Trends in Genetics, 31(3), 128–139.

Deutsch M., Long M., (1999), "Intron-exon structures of eukaryotic model organisms", In Nucleic Acids Research, 27, 15.

Deutschman C. S., (2005), "Transcription" Critical Care Medicine, 33(12 Suppl).
Devany M., Kotharu N. P., Matsuo H., (2004), "Solution NMR structure of the C-terminal domain of the human protein DEK", Protein Science : A Publication of the Protein Society, 13(8), 2252–2259.

Dever T. E., Dinman J. D., Green R., (2018), "Translation Elongation and Recoding in Eukaryotes" Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 10(8).

Ding D. C., Shyu W. C., Lin S. Z., (2011), "Mesenchymal stem cells", Cell Transplantation, 20(1), 5–14.

Dong X., Michelis M. A., Wang J., Bose R., DeLange T., Reeves W. H., (1998), "Autoantibodies to DEK oncoprotein in a patient with systemic lupus erythematosus and sarcoidosis", Arthritis and Rheumatism, 41(8), 1505–1510.

Feng T., Liu Y., Li C., Li Z., Cai H., (2017), "DEK proto-oncogene is highly expressed in astrocytic tumors and regulates glioblastoma cell proliferation and apoptosis",

Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine, 39(7), 1–10.

Franco M. K., Koutmou K. S., (2022), “Chemical modifications to mRNA nucleobases impact translation elongation and termination”, *Biophysical Chemistry*, 285, 106780.

Fritz S., Boris-Lawrie K., (2015), “The RNPs of eukaryotic translation control”, *Trends in Cell and Molecular Biology*, 10, 105–130.

Fu G. K., Grosveld G., Markovitz D. M., (1997), “DEK, an autoantigen involved in a chromosomal translocation in acute myelogenous leukemia, binds to the HIV-2 enhancer”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(5), 1811–1815.

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(6), 548–555.

Girbig M., Misiaszek A. D., Müller C. W., (2022), “Structural insights into nuclear transcription by eukaryotic DNA-dependent RNA polymerases”, *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*.

Goossens S., Janssens B., Vanpoucke G., de Rycke R., Hengel J., Roy F., (2007), “Truncated isoform of mouse alphaT-catenin is testis-restricted in expression and function”, *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 21(3), 647–655.

Graf L., Iwata M., Torok-Storb B., Richard T., Zouaoui Boudjeltia K., Piagnerelli M., Vanhaeverbeek M., (2002), “Gene expression profiling of the functionally distinct human bone marrow stromal cell lines HS-5 and HS-27a”, *Blood*, 100(4), 1509–1511.

Guba S. C., Sartor C. I., Gottschalk L. R., Ye-Hu J., Mulligan T., Emerson, S. G., (1992), “Bone Marrow Stromal Fibroblasts Secrete Interleukin-6 and Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor in the Absence of Inflammatory Stimulation: Demonstration by Serum-Free Bioassay, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, and Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction”, *Blood*, 80(5), 1190–1198.

Hawkins J. D., (1988), “Nucleic Acids Research A survey on intron and exon lengths”, *Nucleic Acids Research*, 11, 16(21).

Heckler M. M., Riggins R. B., (2015), “ERR β splice variants differentially regulate cell cycle progression”, *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 14(1), 31–45.

Hellen C. U. T., (2018), “Translation Termination and Ribosome Recycling in Eukaryotes”, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(10).

Hershey J. W. B., Sonenberg N., Mathews M. B., (2012), "Principles of translational control: an overview", Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 4(12), a011528–a011528.

Hinnebusch A. G., Lorsch J. R., (2012), "The mechanism of eukaryotic translation initiation: new insights and challenges", Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 4(10).

Hua Y., Hu H. G., Peng X. L., (2009), "Progress in studies on the DEK protein and its involvement in cellular apoptosis", Science in China, Series C: Life Sciences, 52(7), 637–642.

Iwata M., Sandstrom R. S., Delrow J. J., Stamatoyannopoulos J. A., Torok-Storb B., (2014), "Functionally and phenotypically distinct subpopulations of marrow stromal cells are fibroblast in origin and induce different fates in peripheral blood monocytes", Stem Cells and Development, 23(7), 729–740.

Iwata M., Torok-Storb B., Wayner E. A., Carter W. G., (2014), "CDCP1 identifies a CD146 negative subset of marrow fibroblasts involved with cytokine production", PloS One, 9(10).

James C. C., Smyth J. W., (2018), "Alternative mechanisms of translation initiation: An emerging dynamic regulator of the proteome in health and disease", Life Sciences, 212, 138–144.

Kappes F., Burger K., Baack M., Fackelmayer F. O., Gruss, C., (2001), "Subcellular Localization of the Human Proto-oncogene Protein DEK", Journal of Biological Chemistry, 276(28), 26317–26323.

Kappes F., Damoc C., Knippers R., Przybylski M., Pinna L. A., Gruss C., (2004), "Phosphorylation by protein kinase CK2 changes the DNA binding properties of the human chromatin protein DEK", Molecular and Cellular Biology, 24(13), 6011–6020.

Kappes F., Fahrer J., Khodadoust M. S., Tabbert A., Strasser C., Mor-Vaknin N., Moreno-Villanueva M., Bürkle 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(10), 3245–3257.

Kappes F., Scholten I., Richter N., Gruss C., Waldmann T., (2004), "Functional Domains of the Ubiquitous Chromatin Protein DEK", Molecular and Cellular Biology, 24(13), 6000–6010.

Karadağ A., Altinok B., Özkan T., Hekmatshoar Y., (2017), "Kemik İliği Stroması: Hücreleri ve Mikroçevresi", Ankara Sağlık Hizmetleri Dergisi, 16(2), 51–62.

Kelemen O., Convertini P., Zhang Z., Wen Y., Shen M., Falaleeva M., Stamm S., (2013), "Function of alternative splicing", Gene, 514(1), 1–30.

Kent L. N., Leone G., (2019), "The broken cycle: E2F dysfunction in cancer", *Nature Reviews. Cancer*, 19(6), 326–338.

Khankin E. v., Mutter W. P., Tamez H., Yuan H. T., Karumanchi S. A., Thadhani R., (2010), "Soluble erythropoietin receptor contributes to erythropoietin resistance in end-stage renal disease", *PloS One*, 5(2).

Kobayashi H., Butler J. M., O'Donnell R., Kobayashi M., Ding B. sen, Bonner B., Chiu, V. K., Nolan D. J., Shido K., Benjamin L., Rafii S., (2010), "Angiocrine factors from Akt-activated endothelial cells balance self-renewal and differentiation of haematopoietic stem cells", *Nature Cell Biology*, 12(11), 1046–1056.

Lazaris-Karatzas A., Montine K. S., Sonenberg N., (1990), "Malignant transformation by a eukaryotic initiation factor subunit that binds to mRNA 5' cap", *Nature*, 345(6275), 544–547.

Le P. M., Andreeff M., Lokesh Battula V., (2018), "Osteogenic niche in the regulation of normal hematopoiesis and leukemogenesis", *Haematologica*, 103(12), 1945–1955.

Lee A. S. Y., Kranzusch P. J., Cate J. H. D., (2015), "eIF3 targets cell-proliferation messenger RNAs for translational activation or repression", *Nature*, 522(7554), 111–114.

Lee Y., Rio D. C., (2015), "Mechanisms and Regulation of Alternative Pre-mRNA Splicing", *Annual Review of Biochemistry*, 84, 291–323.

Lemischka I., (2001), "Stem cell dogmas in the genomics era", *Reviews in Clinical and Experimental Hematology*, 5(1), 15–25.

Li X., Marcondes A. M., Ragoczy T., Telling A., Deeg H. J., (2013), "Effect of intravenous coadministration of human stroma cell lines on engraftment of long-term repopulating clonal myelodysplastic syndrome cells in immunodeficient mice", *Blood Cancer Journal*, 3(4).

Lucas D., (2021), "Structural organization of the bone marrow and its role in hematopoiesis", *HHS Public Access. Curr Opin Hematol*, 28(1), 36–42.

von Lindern M., Poustka, A. Lerach H., Grosveld G. (1990). "The (6;9) chromosome translocation, associated with a specific subtype of acute nonlymphocytic leukemia, leads to aberrant transcription of a target gene on 9q34", *Molecular and cellular biology*, 10(8), 4016–4026.

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(4), 1687–1697.

Mackie E. J., (2003), "Osteoblasts: novel roles in orchestration of skeletal architecture", *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 35(9), 1301–1305.

Mendes Soares L. M., Zanier K., Mackereth C., Sattler M., Valcárcel J., (2006), "Intron removal requires proofreading of U2AF/3' splice site recognition by DEK", *Science*, 312(5782), 1961–1965.

Mor-Vaknin N., Kappes F., Dick A. E., Legendre M., Damoc C., Teitz-Tennenbaum S., Kwok R., Ferrando-May E., Adams B. S., Markovitz D. M., (2011), "DEK in the synovium of patients with juvenile idiopathic arthritis: characterization of DEK antibodies and posttranslational modification of the DEK autoantigen", *Arthritis and Rheumatism*, 63(2), 556–567.

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(24), 9484–9496.

Ogorodnikov A., Kargapolova Y., Danckwardt S., (2016), "Processing and transcriptome expansion at the mRNA 3' end in health and disease: finding the right end", *Pflugers Archiv : European Journal of Physiology*, 468(6), 993–1012.

Oltean S., Bates D. O., (2014), "Hallmarks of alternative splicing in cancer", *Oncogene*, 33(46), 5311–5318.

Palazzo A. F., Lee E. S., (2015), "Non-coding RNA: what is functional and what is junk?", *Frontiers in Genetics*, 6(JAN).

Pelletier J., Sonenberg N., (1988), "Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA", *Nature*, 334(6180), 320–325.

Pillai M. M., Iwata M., Awaya N., Graf L., Torok-Storb B., (2006), "Monocyte-derived CXCL7 peptides in the marrow microenvironment", *Blood*, 107(9), 3520.

Privette Vinnedge L. M., Benight N. M., Wagh P. K., Pease N. A., Nashu M. A., Serrano-Lopez J., Adams A. K., Cancelas J. A., Waltz S. E., Wells S. I., (2015), "The DEK oncogene promotes cellular proliferation through paracrine Wnt signaling in Ron receptor-positive breast cancers", *Oncogene*, 34(18), 2325–2336.

Privette Vinnedge, L. M., Kappes, F., Nassar, N., Wells, S. I., (2013), "Stacking the DEK: from chromatin topology to cancer stem cells." *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 12(1), 51–66.

Privette Vinnedge L. M., McClaine R., Wagh P. K., Wikenheiser-Brokamp K. A., Waltz S. E., Wells S. I., (2011), "The human DEK oncogene stimulates β -catenin signaling, invasion and mammosphere formation in breast cancer", *Oncogene*, 30(24), 2741–2752.

Qie S., Diehl J. A., (2016), "Cyclin D1, cancer progression, and opportunities in cancer treatment", *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, 94(12), 1313–1326.

Ramanathan A., Robb G. B., Chan S. H., (2016), "mRNA capping: biological functions and applications", *Nucleic Acids Research*, 44(16), 7511.

Ren P., Lu L., Cai S., Chen J., Lin W., Han F., (2021), "Alternative Splicing: A New Cause and Potential Therapeutic Target in Autoimmune Disease", *Frontiers in Immunology*, 12, 3284.

Richard P., Manley J. L., (2009), "Transcription termination by nuclear RNA polymerases", *Genes & Development*, 23(11), 1247–1269.

Riveiro-Falkenbach E., Soengas M. S., (2010), "Control of tumorigenesis and chemoresistance by the DEK oncogene", *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 16(11), 2932–2938.

Robey P. G., (2002), "Bone Matrix Proteoglycans and Glycoproteins", Second Edition, *Principles of Bone Biology*, Academic Press.

Roecklein B. A., Torok-Storb B., (1995), "Functionally distinct human marrow stromal cell lines immortalized by transduction with the human papilloma virus E6/E7 genes", *Blood*, 85(4), 997–1005.

Roeder R. G., Rutter W. J., (1969), "Multiple forms of DNA-dependent RNA polymerase in eukaryotic organisms", *Nature*, 224(5216), 234–237.

Rougier F., Dupuis F., Denizot Y., (1996), "Human bone marrow fibroblasts--an overview of their characterization, proliferation and inflammatory mediator production", *Hematology and Cell Therapy*, 38(3), 241–246.

Sadek J., Omer A., Hall D., Ashour K., Gallouzi I. E., (2019), "Alternative polyadenylation and the stress response", *Wiley Interdisciplinary Reviews. RNA*, 10(5).

Savino W., Smaniotto S., Dardenne M., (2005), "Hematopoiesis", *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 567, 167–185.

Scharf P., Broering M. F., da Rocha G. H. O., Farsky S. H. P., (2020), "Cellular and Molecular Mechanisms of Environmental Pollutants on Hematopoiesis", *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 6996, 21(19), 6996.

Semler B. L., & Waterman M. L., (2008), "IRES-mediated pathways to polysomes: nuclear versus cytoplasmic routes", *Trends in Microbiology*, 16(1), 1–5.

Shiozawa Y., Havens A. M., Pienta K. J., Taichman R. S., (2008), "The bone marrow niche: habitat to hematopoietic and mesenchymal stem cells, and unwitting host to molecular parasites", *Leukemia*, 22(5), 941–950.

Sierakowska H., Williams K. R., Szer I. S., Szer W., (1993), "The putative oncoprotein DEK, part of a chimera protein associated with acute myeloid leukaemia, is an autoantigen in juvenile rheumatoid arthritis", *Clinical and Experimental Immunology*, 94(3), 435–439.

Singer M. F., Leder P., (1966), "Messenger RNA: an evaluation", *Annual Review of Biochemistry*, 35, 195–230.

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(57), 8862–8870.

Smith, C., (2003), "Hematopoietic Stem Cells and Hematopoiesis", *Cancer control : journal of the Moffitt Cancer Center*, 10(1), 9–16.

Stent G. S., (1966), "Genetic transcription", *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 164(995), 181–197.

Strieter R. M., Polverini P. J., Kunkel S. L., Arenberg D. A., Burdick M. D., Kasper J., Dzuiba J., van Damme J., Walz A., Marriott D., Chan S. Y., Roczniak S., Shanafelt A. B., (1995), "The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis", *The Journal of Biological Chemistry*, 270(45), 27348–27357.

Teng Y., lang L., Jauregui C. E., (2018), "The Complexity of DEK Signaling in Cancer Progression", *Current Cancer Drug Targets*, 18(3), 256–265.

Tian B., Hu J., Zhang H., Lutz C. S., (2005), "A large-scale analysis of mRNA polyadenylation of human and mouse genes", *Nucleic Acids Research*, 33(1), 201–212.

Uccelli A., Moretta L., Pistoia V., (2008), "Mesenchymal stem cells in health and disease", *Nature Reviews. Immunology*, 8(9), 726–736.

Ventoso I., Blanco R., Perales C., Carrasco L., (2001), "HIV-1 protease cleaves eukaryotic initiation factor 4G and inhibits cap-dependent translation", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(23), 12966.

Waldmann T., Baack M., Richter N., Gruss C. (2003) "Structure-specific binding of the proto-oncogene protein DEK to DNA", *Nucleic Acids Research*, 31(23), 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", *The Journal of Biological Chemistry*, 277(28), 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), 1–9.

Wang H., Zhou M., Shi B., Zhang Q., Jiang H., Sun Y., Liu J., Zhou K., Yao M., Gu J., Yang S., Mao Y., Li Z., (2011), "Identification of an exon 4-deletion variant of epidermal growth factor receptor with increased metastasis-promoting capacity", *Neoplasia* (New York, N.Y.), 13(5), 461–471.

Wetzler M., Talpaz M., Lowe D. G., Baiocchi G., Gutterman J. U., Kurzrock R., (1991), "Constitutive expression of leukemia inhibitory factor RNA by human bone marrow stromal cells and modulation by IL-1, TNF-alpha, and TGF-beta", *Exp Hematol*, 19, 347–351.

Will C. L., Lührmann R., (2011), "Spliceosome structure and function", *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(7), 1–2.

Wise-Draper T. M., Allen H. v., Thobe M. N., Jones E. E., Habash K. B., Münger 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(22), 14309–14317.

Xu X., Zou L., Yao Q., Zhang Y., Gan L., Tang L., (2017), "Silencing DEK downregulates cervical cancer tumorigenesis and metastasis via the DEK/p-Ser9-GSK-3 β /p-Tyr216-GSK-3 β / β -catenin axis", *Oncology Reports*, 38(2), 1035–1042.

Yamaguchi Y., (2013), "Transcription Elongation, Mechanisms", *Encyclopedia of Systems Biology*, 2221–2224.

Yu L., Huang X., Zhang W., Zhao H., Wu G., Lv F., Shi L., Teng, Y. (2016). "Critical role of DEK and its regulation in tumorigenesis and metastasis of hepatocellular carcinoma", *In Oncotarget*, 7,18.

Yu V. W. C., Scadden D. T., (2016), "Hematopoietic Stem Cell and Its Bone Marrow Niche", *Current topics in developmental biology*, 118, 21–44.

Yuzenkova Y., Zenkin N., (2010), "Central role of the RNA polymerase trigger loop in intrinsic RNA hydrolysis", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(24), 10878–10883.

Zhang Y., Liu J., Wang S., Luo X., Li Y., Lv Z., Zhu J., Lin J., Ding L., Ye Q., (2016), "The DEK oncogene activates VEGF expression and promotes tumor angiogenesis and

growth in HIF-1 α -dependent and -independent manners”, Oncotarget, 7(17), 23740–23756.

Web1, (2022), <https://www.atcc.org/products/crl-2496>, (Eriřim Tarihi: 25/05/2022)



ÖZGEÇMİŞ

Lise eğitimini Hacı Hatice Bayraktar Anadolu Lisesi'nde tamamlayan Açelya Avcı lisans eğitimine Gebze Teknik Üniversitesi'nde 2014 yılında başladı. 2019 yılında Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü- Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı ve yüksek lisans eğitimi sırasında TÜBİTAK 1001 projesinde proje asistanı olarak çalıştı. Aynı zamanda TÜBİTAK-2210/A bursiyeri olan Açelya Avcı, aynı bölümde eğitime devam etmektedir.



EKLER

Ek A: DEK3 İzoformunun ENSEMBL Veritabanındaki Transkriptler ile Karşılaştırılması



Şekil A1.1: DEK izoformların BLAST ile karşılaştırılması.

EK B: DEK İzoformlarının Amino Asit Dizileri

DEK1:
MSASAPAAEGEGTPTQPASEKEPEMPGPREESEEEEEDEDEEEEEEEKEKSLIVEGKREKKKVE
RLTMQVSSLQREPFTIAQGKGQKLCEIERIHFFLSKKKTDELRLNLHKLLYNRPGLTVSSLKKNVGQ
FSGFPFEKGSVQYKKKEEMLKKFRNAMLKSICEVLDLERSGVNSELVKRILNFLMHPKPSGKPLP
KSKKTCGSGSKKERNSSGMARKAKRTKCEILSDSSSDEDEKKNKEESSDDEDKESEEEPPKKT
AKREKPKQKATSKSKSVKSANVKKADSSTTKKNQNSSKKESESEDSSDDEPLIKLKKPPTDEEL
KETIKLLASANLEEVMTMKQICKKVYENPTYDLTERKDFIKTTVKELIS

DEK2:
MSASAPAAEGEGTPTQPASEKEPEMPGPREESEEEEEDEDEEEEEEEKGKGQKLCEIERIHFFLS
KKKTDELRLNLHKLLYNRPGLTVSSLKKNVGQFSGFPFEKGSVQYKKKEEMLKKFRNAMLKSICEV
LDLERSGVNSELVKRILNFLMHPKPSGKPLPKSKKTCGSGSKKERNSSGMARKAKRTKCEILSD
ESSSDEDEKKNKEESSDDEDKESEEEPPKKTAKREKPKQKATSKSKSVKSANVKKADSSTTKKN
QNSSKKESESEDSSDDEPLIKLKKPPTDEELKETIKLLASANLEEVMTMKQICKKVYENPTYDLT
ERKDFIKTTVKELIS

DEK3:
MSASAPAAEGEGTPTQPASEKEPEMPGPREESEEEEEDEDEEEEEEEKEKSLIVEGKREKKKVE
RLTMQVSSLQREPFTIAQGKGQKLCEIERIHFFLSKKKTDELRLNLHKLLYNRPGLTVSSLKKNVGQ
FSGFPFEKGSVQYKKKEEMLKKFRNAMLKSICEVLDLERSGVNSELVKRILNFLMHPKPSGKPLP
KSKKTCGSGSKKERNSSGMARKAKRTKCEILSDSSSDEDEKKNKEESSDDEDKESEEEVYENY
PTYDLTERKDFIKTTVKELIS

Şekil B1.1: DEK İzoformlarının amino asit dizileri.

Ek C: Tez Çalışması Kapsamında Yapılan Yayınlar

Özçelik E., Kalaycı A., Çelik B., Avcı A., Akyol H., Kılıç İ.B., Çakar T., Çetin M., Tuzlakoglu Öztürk M., Çalışkaner Z.O., Tombaz M., Yoleri D., Konu Ö., Kandilci A., “Doxorubicin induces prolonged DNA damage signal in cells overexpressing DEK isoform-2.” (Preprint: bioRxiv 2022.06.03.494677; doi: <https://doi.org/10.1101/2022.06.03.494677>, PLOS One; değerlendirme aşamasında)

Avcı A., Özçelik E., Kalaycı A., Kandilci A., (2022), “DEK3 İzoformunun Hücre Migrasyonu Üzerine Etkisinin Araştırılması”, 6. GTÜ Fen Bilimleri Lisansüstü Araştırmalar Sempozyumu, Gebze, Kocaeli, Türkiye, 1-2 Haziran

