

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DEK-2 İZOFORMUNUN KLONLANMASI VE
FONKSİYONEL ANALİZİ

EMRAH ÖZÇELİK
DOKTORA TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

GEBZE
2023

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DEK-2 İZOFORMUNUN KLONLANMASI VE
FONKSİYONEL ANALİZİ

EMRAH ÖZÇELİK
DOKTORA TEZİ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMANI
PROF. DR. AYTEN KANDİLCİ

GEBZE
2023

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

CLONING AND FUNCTIONAL ANALYSIS OF
DEK-2 ISOFORM

EMRAH ÖZÇELİK

A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF
DOCTOR OF PHILOSOPHY

DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

THESIS SUPERVISOR
PROF. DR. AYTEN KANDILCI

GEBZE

2023



DOKTORA JÜRİ ONAY FORMU

GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 19/01/2023 tarih ve 2023/4 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 24/01/2023 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Emrah ÖZÇELİK'in tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : Prof. Dr. Ayten KANDİLCİ

ÜYE

: Prof. Dr. Sema Sırma EKMEKÇİ

ÜYE

: Prof. Dr. Tamer YAĞCI

ÜYE

: Doç. Dr. Özlen Konu KARAKAYALI

ÜYE

: Doç. Dr. Fatma AYDINOĞLU

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun

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

ÖZET

Bilinen iki izoformu olan (DEK isoform-1 (DEK1) ve DEK isoform-2 (DEK2)) DEK onkoproteini, hücre çekirdeğinde kromatine bağlı olarak bulunmaktadır. Vücut hücrelerinin büyük çoğunluğunda yoğun olarak eksprese olan ve 375 amino asit içeren DEK1'den farklı olarak, *DEK1*'in alternatif kırılmasıyla oluşan ve 341 amino asit içeren DEK2'de 49-82 amino asitleri bulunmamaktadır. DEK1'in DNA replikasyonu, DNA tamiri, mRNA işlenmesi, transkripsiyonel düzenleme, hücre çoğalması, hücre farklılaşması ile ilgili rollerine dair çok sayıda araştırma bulunmakla birlikte, DEK2'nin benzer fonksiyonları olup olmadığı bilinmemektedir. Bu tezde, DEK izoformlarının fonksiyonlarını araştırmak için epitop (Myc veya Flag) etiketli DEK izoformlarını retroviral vektörle HS-27A hücrelerinde kalıcı olarak, ya da 293T hücrelerinde geçici olarak ifade ettik. Birlikte çöktürme (Co-IP) deneyiyle, 293T hücrelerinde DEK1'in kendisiyle dimer oluşturduğunu, DEK1'in DEK2'ye zayıf olarak bağlandığını, ancak DEK2'nin DEK2'ye bağlanmadığını gösterdik. HS-27A hücrelerinde, ektopik DEK2'nin hem çekirdek hem de çekirdekçikte lokalize olduğunu gösterdik. DEK2'yi aşırı ifade ettirdiğimiz HS-27A hücrelerinde endojen DEK'i baskıladık ve bu hücrelerin doksorubisinle indüklenen DNA hasarına verdiği cevabı immunofloresan yöntemle inceledik. Bulgularımız, hasar sonrası 24 saatlik iyileşme periyodunda DEK2 hücrelerinde DNA hasar belirteci olan fosforile-H2AX (γ H2AX) sinyalinin, kontrol hücrelerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yoğun olduğunu gösterdi. Parental HS-27A hücrelerini 24 saat doksorubisinle uyardığımızda, endojen *DEK2* mRNA seviyesinin hasar sırasında 3,7-kat arttığı ancak 24 saatlik iyileşme periyodunda seviyesinin azaldığını tespit ettik. Bu sonuçlar, fizyolojik koşullarda *DEK2*'nin DNA hasarıyla ifadesinin arttığını ve iyileşme sürecinde tekrar azaldığını; DEK1 ve DEK2'nin hücredeki ifade dengesinin bozulmasının DNA hasarı sinyalini uzattığını göstermektedir.

Bu tez çalışması TÜBİTAK-118Z765 ve TÜBİTAK-216Z006 projeleriyle desteklenmiştir.

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

SUMMARY

DEK mainly locates on the chromatin in the nucleus. Alternatively spliced DEK isoform-2 (DEK2) encodes a 341 amino acids long protein lacking the residues between 49-82 that is different from the DEK (DEK1), which encodes 375 amino acids. Although the DEK1 functions in variety of cellular processes including the DNA replication and repair, splicing, transcription, differentiation and proliferation, it is not known whether DEK2 has similar functions. Here we expressed epitope (Myc or Flag) tagged DEK isoforms permanently in HS-27A cells or transiently in 293T cells with retroviral vector to investigate their functions. By co-immunoprecipitation (Co-IP) experiment, we showed that DEK1 forms a self-dimer in 293T cells, it binds weakly to DEK2, but DEK2 does not form self-dimer. We showed that ectopic DEK2 is localized in both nucleus and nucleolus. When we suppressed endogenous DEKs in HS-27A cells in which we overexpressed DEK2, we found that the DNA damage marker phosphorylated-H2AX (γ H2AX) signal was significantly higher in DEK2 cells than in control cells during the 24-hour recovery period after doxorubicin treatment. Additionally, doxorubicin treatment of parental HS-27A cells showed that the endogenous *DEK2* mRNA level was increased by 3.7-fold during treatment, but it was decreased during the 24-hour recovery period. These results suggest that expression of endogenous *DEK2* increases with DNA damage and decreases again during the healing process, and the disruption of the expression balance of *DEK1* and *DEK2* in the cell prolongs the DNA damage signal.

This thesis work was supported by TÜBİTAK-118Z765 and TÜBİTAK-216Z006 projects.

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

TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışmamın her anında ve adımında akademik ve sosyal hayatta hiçbir zaman maddi ve manevi destek ve yardımlarını esirgemeyen, okutan, öğreten ve nihayet bu seviyelere getiren değerli öğretmenim, hocam sayın Prof. Dr. Ayten Kandilci'ye sonsuz teşekkür ederim.

Başta, tez çalışmam boyunca her zaman yapıcı olan, desteklerini hep hissettiğim, saygıdeğer hocalarım, Prof. Dr. Sema Sırma Ekmekçi ve Prof. Dr. Tamer Yağcı olmak üzere, tez savunmamda yer alan tüm jüri üyeleri hocalarıma çok teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım sırasında samimi desteklerini her zaman her anlamda hissettiğim ve aynı anda aynı düşüncede kendimi bulabildiğim dostlarım, Ahmet Kalaycı, Ömer Güllülü, Zihni Onur Çalışkener ve merhum Muhammed Hamit Ekinci'ye yürekten teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım sırasında bana her daim destek olan, zaman harcayan, emek veren, değerli arkadaşlarım; Merve Tuzlakoglu Öztürk, Büşra Çelik, Açelya Yaşar, İrfan Baki Kılıç, Dilan Yoleri, Abdullah Abdul Wahhed, Hüseyin Gül, Sinem Gül, Hilal Civelek, Kübra Hacıbeyoğlu'na ve yardımlarını esirgemeyen tüm MBG ailesine teşekkür ederim.

Bütün hayatım süresince benim yanımda olan, ilk adımdan itibaren yürüdüğüm yolda tüm aksaklıklarda desteğini bulabildiğim canım annem Şehriban Özçelik ve babam Şükrü Özçelik'e, her koşulda yanımda olan ablalarım Aynur Özçelik ve Fatma Şen'e, eşime bana ve en önemlisi oğlumuzla kol kanat olan annem Ayşe Yazıcı'ya ve babam Kemal Yazıcı'ya, dostluklarının boyutunu sözle ifade edemeyeceğim beni benden daha iyi anlayabilen canım arkadaşlarım, Burcu Çimen Beşikçioğlu, Hüseyin Erdinç Beşikçioğlu ve Ersin Fidan'a çok teşekkür ederim.

Son olarak, tamamen sıfırdan başlayarak tüm zorlukları, tüm acıları, başarısızlıkları ve başarıları, kayıpları ve kazanımları her şeyi birlikte göğüslediğim, beraber büyüdüğüm, kocaman yüreği ve sevgisi ile hep yanımda olan değerli eşim Eda Yazıcı Özçelik'e ve onunla yeniden büyüdüğüm, bütün duyguları baştan tattığım, sarılmalara doyamadığım, sevgisini iliklerime kadar hissettiğim, canım oğlum Kıvanç Özçelik'e sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xv
TABLolar DİZİNİ	xviii
1. GİRİŞ	1
2. KEMİK İLİĞİ VE KEMİK İLİĞİ MİKROÇEVRESİ	3
3. DNA HASARI, DNA HASAR CEVABI VE DNA HASAR ONARIMI	8
3.1. DNA Hasarı	8
3.2. DNA Hasar Cevabı	12
3.2.1. DNA Hasar Sensörleri	12
3.2.2. DNA Hasar Aracıları	15
3.2.3. DNA Hasar Eftörleri	15
3.3. DNA Onarımı Mekanizmaları	16
3.3.1. Doğrudan Onarım (Direct Repair; DR)	16
3.3.2. Baz Ekzisyon Onarımı (Base Excision Repair; BER)	16
3.3.3. Nükleotid Eksizyon Onarımı (Nucleotide Excision Repair; NER)	16
3.3.4. Hatalı Eşleşme Onarımı (Mismatch Repair; MMR)	17
3.3.5. Zincirler Arası Çapraz Bağ (Intercrosslink; ICLs) Onarımı	17
3.3.6. Çift İplik Kırığı (Double Strand Breaks; DSBs) Onarımı	18
3.3.6.1. Tek Zincir Eşleşmesi (Single Strand Annealing; SSA)	19
3.3.6.2. Mikrohomoloji Aracılı Uç Birleştirme (Microhomology Mediated End Joining; MMEJ)	19
3.3.6.3. Homolog Olmayan Uç Birleştirme (Non-Homologous End Joining; NHEJ)	19
3.3.6.4. Homolog Rekombinasyon (Homologous Recombination; HR)	20
4. DEK PROTEİNİ	21

4.1. DEK Proteinin Yapısı, Hücre Biyolojisi ve Kanserdeki Rolü	21
4.2. DEK'in Diğer Proteinlerle Etkileşimi	23
4.3. DEK'in DNA Tamirindeki Rollerini	24
4.4. DEK İzofomları	25
5. MATERYAL	26
6. YÖNTEM	34
6.1. Hücre Kültürü	34
6.2. Total RNA İzolasyonu	34
6.3. cDNA Sentezi	35
6.4. Agaroz Jel Elektrofrezini	35
6.5. DEK1 ve DEK2 İzofomlarının Klonlanması	35
6.5.1. Primer Tasarımı	35
6.5.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	36
6.5.3. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması	37
6.5.4. PCR Ürünlerinin pGEM-T Easy Vektörüne Yerleştirilmesi	37
6.5.5. PCR Ürünlerinin 3'Ucuna A Bazı Eklenmesi	38
6.5.6. Ligasyon	38
6.5.7. Kompetan Hücre Hazırlanması	38
6.5.8. Transformasyon	39
6.5.9. Bakterilerden Stok Alınması	39
6.5.10. Bakteri Stoklarının Yeniden Çoğaltılması	40
6.5.11. Plazmit İzolasyonu	40
6.5.12. Restriksiyon Enzim Kesimi	40
6.5.13. DNA Dizi Analizi	40
6.5.14. Yönlendirilmiş Mutagenesi	41
6.5.15. Alt Klonlama	42
6.5.15.1. Vektörlerin Restriksiyon Enzimi ile Kesilmesi	42
6.5.15.2. Vektör ve Hedef cDNA'ların Agaroz Jelden İzolasyonu	43
6.5.15.3. Defosforilasyon	43
6.5.15.4. Ligasyon	43
6.5.16. Hedef cDNA'ların Vektördeki Yönünün Belirlenmesi	44
6.6. Hücre Hatlarına Gen Transferi	44
6.6.1. Transfeksiyon	44
6.6.2. Retroviral Transdüksiyon	44

6.6.3. Lentiviral Transdüksiyonla <i>DEK</i> İfadesinin Baskılanması	45
6.7. Hücrelerin Seçilimi	46
6.7.1. FACS ile Hücrelerin Ayrıştırılması	46
6.7.2. Antibiyotik Seçilimi	46
6.8. Revers-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) Analizi	47
6.8.1. Primer Tasarlanması	47
6.8.2. Semikantitatif RT-PCR	47
6.8.3. Kantitatif RT-PCR (RT-qPCR)	48
6.9. Protein İzolasyonu ve Western Blot Yöntemiyle Protein Analizi	50
6.9.1. Total Protein İzolasyonu ve Miktarının Belirlenmesi	50
6.9.2. Western Blot	50
6.10. Birlikte Çöktürme Yöntemi (Co-IP)	51
6.11. İmmunofloresan Boyama (IF)	51
6.12. Doksorubisin Uygulaması	52
6.13. İstatistiksel Analiz	53
7. BULGULAR	54
7.1. DEK İzofomlarının Klonlanması	54
7.2. DEK İzofomlarının İfadesinin Western Blot Yöntemi ile Doğrulanması	59
7.3. DEK İzofomları Arasındaki Etkileşimin Belirlenmesi	59
7.4. HS-27A Hücrelerinde DEK İzofomlarının İfadesinin Sağlanması	60
7.5. HS-27A Hücrelerinde DEK İzofomlarının İfadesinin Doğrulanması	62
7.6. HS-27A Hücrelerinde DEK İzofomlarının Hücre İçi Lokalizasyonlarının Belirlenmesi	63
7.7. HS-27A Hücrelerinde DEK İfadesinin Baskılanması	64
7.8. HS-27A Hücrelerinde DNA Hasarı Oluşturmak İçin Kullanılacak Doksorubisin Konsantrasyonunun Belirlenmesi	68
7.9. HS-27A Hücrelerinde DNA Hasar Tamiri Sırasında Zamana Bağlı Olarak Endojen DEK1 ve DEK2 İfadesinin Seviyesinin Belirlenmesi	69
7.10. DEK2 İzofomunun DNA Hasarı ve DNA Hasar Tamirindeki Etkisinin Belirlenmesi	70
8. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	72

KAYNAKLAR
ÖZGEÇMİŞ
EKLER

74
81
82



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler ve</u> <u>Kisaltmalar</u>	<u>Açıklamalar</u>
53BP1	: P53-bağlayıcı protein 1
AML	: Akut Myeloid Lösemi
ATM	: Ataxia telangiectasia–mutated kinase
ATR	: Ataxia telangiectasia and Rad3 related
BER	: Base excision repair
BRCA1	: Breast cancer type 1
BRCA2	: Breast cancer type 2
BSA	: Bovine Serum Albumin
cDNA	: Tamamlayıcı DNA
CHK1	: Checkpoint kinase 1
CHK2	: Checkpoint kinase 2
CK2	: Casein kinase 2
CO ₂	: Karbondioksit
CTCF	: Corrected total cell fluorescence
CXCL12	: Stromal-Cell-Derived Factor 1
CXCR4	: C-X-C Chemokine Receptor Type 4
DEK1	: DEK izoform-1
DEK2	: DEK izoform-2
DDR	: DNA Damage Response
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
Doxo	: Doksorubisin
dsDNA	: Çift iplikli DNA
E2F	: Transcription Factors E2Fs
EDTA	: Ethylenediaminetetraacetic Acid
Exo1	: Ekzonükleaz 1
FACS	: Fluorescence-Activated Cell Sorting
FBS	: Fetal Bovine Serum

GAPDH	: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GFP	: Green Flourescent Protein
H2AX	: Histon 2AX
H ₂ O	: Su
HCl	: Hidroklorik Asit
HSCs	: Hematopoietic stem cells
HPV	: Human papillomavirus
HR	: Homolog rekombinasyon
IF	: Immunoflourescence
IL-8	: Interlökin 8
IPTG	: Isopropyl β -d-1-thiogalactopyranoside
IRES	: Internal Ribosomal Entry Site
kDa	: Kilodalton
LB	: Luria-Bertani broth
LTR	: Long terminal repeat
ml	: Mililitre
MMR	: Mismatch repair
MRN	: DNA hasarı sensör kompleksi
MSCs	: Mesenchymal Stem Cells
mRNA	: Mesajcı Ribonükleik Asit
NBS1	: Nijmegen breakage syndrome 1
NER	: Nucleotide excision repair
NF-Y	: Nüklear transkripsiyon faktör-Y
NHEJ	: Non-homologous end joining
OD	: Optical density
p53	: Tümör protein 53
PARP1	: Poly [ADP-ribose] polymerase 1
PBS	: Phosphate Buffered Saline
PFA	: Paraformaldehit
PI3K	: Phosphoinositide 3-kinases
PIKK	: Phosphatidylinositol 3-kinase-related kinases
PP2A	: Protein fosfotaz 2A
PP4C	: Protein fosfotaz 4C

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

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: Fare kemik iliğinde anatomik olarak tanımlanmış hematopoietik kök hücre nişlerinin ana özellikleri.	4
2.2: Kemik iliği mikroçevresinin kompartmanları ve bileşenleri.	6
3.1: DNA hasar cevabı ağı.	9
3.2: Doksorubisin-DNA kompleksinin yapısı.	11
3.3: DNA hasar cevabında ATM ve ATR yolağının şematik gösterimi.	14
3.4: DSBs onarımında yer alan alternatif DNA onarım mekanizmaları.	18
4.1: DSBs onarımında yer alan alternatif DNA onarım mekanizmaları.	21
4.2: DEK'in DNA'nın HR yoluyla onarımında hangi basamaklarda rol alabileceğinin şematik olarak gösterilmesi.	25
6.1: Nokta, delesyon ve insersiyon mutasyonu için primer tasarımı stratejisinin şematik gösterimi.	36
7.1: PCR sonucu elde edilen FlagDEK1 ve MycDEK1 cDNA'larının agaroz jel görüntüsü.	54
7.2: pGEM-T Easy vektörüne klonlanan FlagDEK1 ve MycDEK1 cDNA'larının EcoRI restriksiyon enzimi kesimi sonrası agaroz jel görüntüsü.	55
7.3: Yönlendirilmiş mutagenез ile DEK1 cDNA'sı içeren plazmitlerden DEK2 cDNA'sını içeren plazmitlerin çoğaltılması sonrası elde edilen ürünlerin agaroz jel görüntüsü.	56
7.4: FlagDEK2 ve MycDEK2 cDNA'larını içeren vektörlerin EcoR1 restriksiyon enzimi kesimi sonrası agaroz jel görüntüsü.	57
7.5: Alt klonlama ile FlagDEK1, MycDEK1, FlagDEK2 ve MycDEK2 cDNA'larını içeren MIGR1 plazmitinin EcoR1 ve Pac1 restriksiyon enzimleri ile kesimi sonrası agaroz jel görüntüsü.	58
7.6: 293T hücrelerinde Flag ve Myc epitopu ekli DEK izoformlarının protein düzeyinde ifadesinin westernblot yöntemiyle doğrulanması.	59
7.7: 293T hücrelerinde birlikte ifade ettirilen epitop ekli DEK izoformlarının birlikte çöktürme yöntemiyle etkileşimin belirlenmesi.	60

7.8:	FACS ile ayrıştırıldıktan sonra FlagDEK1 ve FlagDEK2 hücrelerindeki GFP pozitif hücre oranının analizi.	61
7.9:	FACS ile ayrıştırıldıktan sonra MycDEK1 ve MycDEK2 hücrelerindeki GFP pozitif hücre oranının analizi.	62
7.10:	HS-27A hücrelerinde ektopik FlagDEK1, FlagDEK2, MycDEK1 ve MycDEK2 ifadesinin mRNA düzeyinde RT-qPCR yöntemiyle doğrulanması.	63
7.11:	HS-27A hücrelerinde ektopik FlagDEK1, FlagDEK2, MycDEK1 ve MycDEK2 ifadesinin protein düzeyinde western blot yöntemiyle doğrulanması.	63
7.12:	HS-27A-MycDEK1 ve HS-27A-MycDEK2 hücrelerinin ikili-IF analizinin 40X konfokal mikroskobu ile elde edilen görüntüleri.	64
7.13:	shRNA içeren lentiviral vektörler ile infekte edilen HS-27A hücrelerinin 3 kez (10. gün) puromycin antibiyotiği seçilimi sonrası mikroskop görüntüleri.	65
7.14:	shDEK+FlagDEK1, shDEK+FlagDEK2, shDEK+GFP ve sh-Neg.+GFP hücrelerinde DEK1 ve DEK2 mRNA seviyesinin RT-qPCR yöntemiyle belirlenmesi.	66
7.15	shDEK+GFP, shDEK+FlagDEK1 ve shDEK+FlagDEK2 hücrelerinde DEK ifadesinin IF yöntemiyle analizinin 40X konfokal mikroskobu ile elde edilen görüntüleri.	67
7.16	shNeg.+GFP, shDEK+GFP ve shDEK+FlagDEK2 hücrelerinde DEK'in protein düzeyinde ifadesinin western blot yöntemiyle doğrulanması.	67
7.17	Parental HS-27A hücrelerinde 0,2 μ M veya 0,05 μ M doksorubisin uygulaması sonrası IF analizinin 40X konfokal mikroskobu ile elde edilen görüntüleri.	68
7.18	Farklı sürelerde 0,05 μ M doksorubisin uygulanarak DNA hasarı oluşturulan HS-27A hücrelerinde endojen DEK1 ve DEK2'nin mRNA düzeyinde ifade seviyesinin RT-qPCR yöntemiyle analizi.	69
7.19	sh-Neg+GFP, shDEK+GFP ve shDEK+FlagDEK2 hücrelerinde doksorubisin uygulaması sonrası IF analizinin 40X konfokal mikroskobu ile elde edilen görüntüleri.	70

7.20 sh-Neg+GFP, shDEK+GFP ve shDEK+FlagDEK2 hücrelerinde 71
doksorubisin uygulaması sonrası konfokal mikroskobu
görüntülerindeki γ H2AX floresan yoğunluğunun Image-j yazılımı ile
yapılan analiz sonuçları.



TABLolar DİZİNİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa</u>
5.1: Hücre hatları.	26
5.2: Bakteri suşları	26
5.3: Plazmitler.	26
5.4: Primerler.	27
5.5: Retriksiyon enzimleri.	28
5.6: Antikorlar.	28
5.7: Kimyasallar.	28
5.8: Kitler.	30
5.9: Sarf, plastik ve cam malzemeler.	31
5.10: Cihazlar.	32
5.11: Çözeltiler.	33
6.1: FlagDEK1 ve MycDEK1 PCR karışımları ve koşulları.	37
6.2: pGEM-T Easy vektörü ve PCR ürünlerinin ligasyonu için kullanılan reaksiyon karışımı.	38
6.3: Yönlendirilmiş Mutagenez için kullanılan PCR karışımları ve koşulları.	41
6.4: Restriksiyon enzim kesimi reaksiyon karışımları.	42
6.5: Alt klonlamada kullanılan ligasyon reaksiyonu karışımları	43
6.6: Semikantitatif RT-PCR reaksiyon karışımları ve koşulları	48
6.7: Kantitatif RT-PCR (RT-qPCR) reaksiyon karışımları ve koşulları.	49

1. GİRİŞ

DEK proteini, 375 aminoasitten oluşan, 43kDa boyuta sahip ve ilk olarak akut myeloid lösemi (AML) hastalarında CAN proteini ile füzyon halinde tanımlanmış, büyük oranda hücre çekirdeğinde lokalize ve fakat hücre dışına da salgılanabilen bir proteindir [von Lindern et al., 1992]. DNA'ya bağlandığı bilenen DEK, C-terminal bölgesindeki fosforilasyon sonucunda DNA'dan ayrılır ve dimer veya multimer yapılar oluşturur [Kappes et al., 2004b]. DNA'dan ayrılan DEK proteini, transkripsiyon, genom stabilitesinin korunması ve DNA tamiri gibi birçok fonksiyonda yer alır [Ivanauskiene et al., 2014], [Sawatsubashi et al., 2010], [Smith et al., 2017]. DEK'in hematopoezde, immün sistemde görevli bazı hücrelerin inflamasyon bölgesine yönelmesinde, mRNA işlenmesinde, DNA replikasyonunda ve kromatin topolojisinin düzenlenmesinde rol aldığı bildirilmiştir [Broxmeyer et al., 2013], [Logan et al., 2015], [Pease et al., 2015], [Waldmann et al., 2002]. Ayrıca, DEK'in hücre dışına salınarak otoimmün antijen oluşturduğu da gösterilmiştir [Mor-Vaknin et al., 2006]. DEK ifadesi, E2F transkripsiyon faktörlerinin (E2F) pozitif kontrolü altındadır. *DEK* geninin birçok kanser türünde aşırı ifade edildiği, ayrıca bir tümör baskılayıcı protein olan cellular tumor antigen p53'ün (p53) destabilizasyonu ile de kanser hücrelerinde apoptozun inhibisyonunu sağlayarak kanser oluşumunda rol oynadığı bildirilmiştir [Carro et al., 2006], [Wise-Draper et al., 2006].

DEK proteinin bilinen iki izoformu DEK1 ve DEK2 bulunmaktadır. DEK1 proteininin kanser oluşumunun yanında hücre biyolojisinde de birçok yönden etkili olduğu bilinmektedir. DEK2'ye yönelik ilk çalışmada, hem DEK1'in hem de DEK2'nin hepatoselüler karsinoma hücrelerinin göçünü arttırdığı gösterilmiştir [Hashimoto et al., 2016]. DEK1'in DNA replikasyonu, DNA tamiri, mRNA işlenmesi, transkripsiyonel düzenleme, hücre çoğalması, bazı hücre tiplerinin farklılaşması ile ilgili rolleri olabileceği konusunda çok sayıda çalışma olmasına rağmen, bu proteinin bilinen iki izoformunun birbirleri ile etkileşiminin olup olmadığı, lokalizasyonlarının farklılık gösterip göstermediği ve DEK1'in rol aldığı DNA tamir mekanizmasında DEK2'nin de etkin olup olmadığı bilinmemektedir.

Bu tez önerisi kapsamında, iki DEK izoformunun, HS-27A insan stroma hücre hatlarından elde edilecek cDNA'lardan klonlanarak ekspresyon vektörlerine aktarılması ve DEK1 ve DEK2'nin 293T hücrelerinde geçici transfeksiyonu

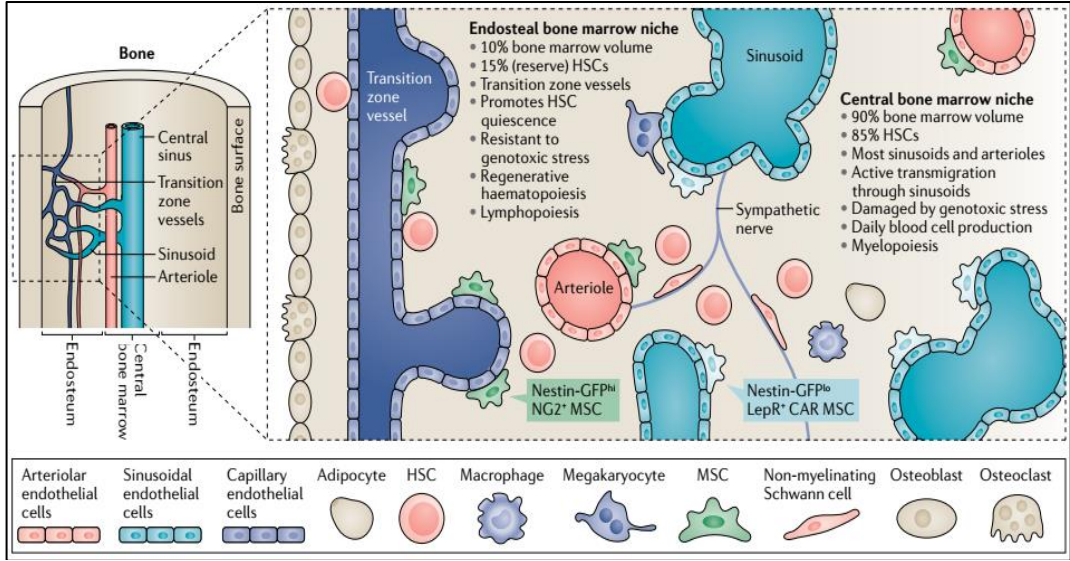
yapıldıktan sonra immunopresipitasyon (co-immunoprecipitation, (Co-IP)) yöntemiyle bu iki izoformun kendileri ve birbirleri ile etkileşimlerinin olup olmadığı araştırıldı. Elde edilen bulgular, DEK2'nin kendisiyle etkileşime girmediği ve herhangi bir homodimer yapısı oluşturmadığını, DEK1 ile DEK2 arasında ise güçlü bir etkileşim olmasa da zayıf bir etkileşimle heterodimer yapısı oluştuğunu gösterdi. DEK1 ve DEK2'nin HS-27A hücrelerinde kalıcı ifadesi sağlandıktan sonra, immünofloresan (IF) boyama sonuçlarında DEK2'nin DEK1'den farklı olarak çekirdek ve çekirdekçikte lokalize olduğu görüldü. Dek-knockout fare hücrelerinde oluşturulan DNA hasarı sonucunda, hasar tamiri için DNA kırık bölgelerine yerleşen fosforile H2AX'in (γ H2AX), DEK yokluğunda bu kırık bölgelerine yeterli düzeyde yerleşmediği tespit edilmiştir [Kavanaugh et al., 2011]. Bu bilgi doğrultusunda, tez kapsamında doksorubisinle uyarılan çift iplikli DNA hasarında oluşan γ H2AX sinyalini DEK1 ve DEK2'nin etkileyip etkilemediği de incelenmiştir. Bu amaçla, HS-27A hücrelerinde sh-RNA aracılığıyla endojen DEK1 ve DEK2 ifadesi baskılanıp ardından ektopik olarak Flag epitopu ekli DEK2'nin retroviral vektör aracılığıyla yeniden kalıcı olarak ifade ettirildiği HS-27A-shDEK+FlagDEK2 (shDEK+FlagDEK2) hücreleri elde edildi. Ardından bu hücrelerde doksorubisin inkübasyonu ile DNA hasarı oluşturularak, DNA hasar sonucunda hasar yerinin belirlenmesinden sorumlu γ H2AX'in kırık bölgelerine yerleşim miktarı IF yöntemiyle belirlendi. Yapılan analizlerde, shDEK+FlagDEK2 hücrelerinde γ H2AX sinyalinin yoğunluğu, kontrol grubu HS-27A-shDEK+GFP (shDEK+GFP) hücrelerinden istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek bulundu. Ek olarak, parental HS-27A hücrelerinde, endojen *DEK2* mRNA seviyesinin 24 saatlik hasar sürecinde 3,7 kata ulaştığı ve 24 saatlik tamir sonrasında bu oranın ancak 2,1'e indiği görülürken, *DEK1* mRNA seviyesinin ise 24 saatlik hasar sürecinde ancak 1,5 kata ulaştığı ve 24 saatlik tamir sonrasında bu oranın 1,25 kata düştüğü belirlendi. Özetle, elde ettiğimiz sonuçlar, ektopik DEK2'nin DEK1 yokluğunda doksorubisinin neden olduğu DNA hasar sinyalini uzattığını göstermektedir. Gelecekte DEK2'nin DNA tamirine yönelik etkilerinin daha detaylı araştırılması, DEK proteininin hücre biyolojisindeki rolünü daha net anlamamıza ışık tutacaktır.

2. KEMİK İLİĞİ VE KEMİK İLİĞİ MİKROÇEVRESİ

Kemik iliği için kapalı bir ortam sağlayan kemik, kortikal ve trabeküler kemik, kıkırdak, hemopoetik ve bağ dokularından oluşan bir organdır. Trabeküler kemik (süngerimsi kemik), hematopoetik kemik iliği, yağ içeren ilik veya kan damarları ile dolu ince kemik plakalarından oluşan bir kafesten oluşur [Gurkan and Akkus, 2008], [Zhao et al., 2012]. Kemik iliği, canlı organizma için temel multipotent öncü hücreleri barındıran, kemiklerin boşluklarında bulunan yumuşak dokudur. Kemik iliği, yetişkin sıçanlarda vücut ağırlığının yaklaşık %3'ünü, köpeklerde yaklaşık %2'sini ve insanlarda yaklaşık %5'ini oluşturur [Gurkan and Akkus, 2008], [Travlos, 2006].

Erişkinlerde vücuttaki periferik kemiklerin orta diyafizer kısımlarında yer alan ilik dokusu çoğunlukla sarımsı bir renk veren yağ dokusundan (yağlı ilik) oluşur. Eksenel ve uzun kemiklerin merkezi boşluklarında bulunan kemik iliği, trabeküler kemik ağ örgüsü içine serpiştirilmiş vasküler sinüslerle çevrili hematopoietik doku adalarından ve yağ hücrelerinden oluşur. Hematopoietik doku, yüksek heme kromojen içeriği nedeniyle iliğe (kırmızı kemik iliği) kırmızımsı bir renk verir. Kırmızı kemik iliğinde yağ dokusu, hematopoietik doku ile değişken fakat kabaca eşit oranlarda bir arada bulunur [Gurkan and Akkus, 2008].

Kemik iliğinde anatomik olarak farklı en az iki hematopoietik kök hücrelerinin (hematopoietic stem cells; HSCs) nişi vardır. Bunlar, iç kemik iliğinde bulunan merkezi niş ve kemik yüzeyine yakın olan endosteal niştir (Şekil 2.1). Merkezi niş, kemik iliği hacminin %90'ından fazlasını oluşturan, sinüzoidlerin ve arteriyollerin yoğun olduğu ve HSCs'in %85'ini barındıran bir bölgedir. Çok daha küçük bir niş (kemik iliği hacminin %10'undan daha az) olan endosteal niş, HSCs'ce nispeten zengindir (tüm HSCs'in yaklaşık %15'i) ve tüm geçiş bölgesi damarlarını içerir [Gurkan and Akkus, 2008], [Mendez-Ferrer et al., 2020].



Şekil 2.1: Fare kemik iliğinde anatomik olarak tanımlanmış hematopoietik kök hücre nişlerinin ana özellikleri.

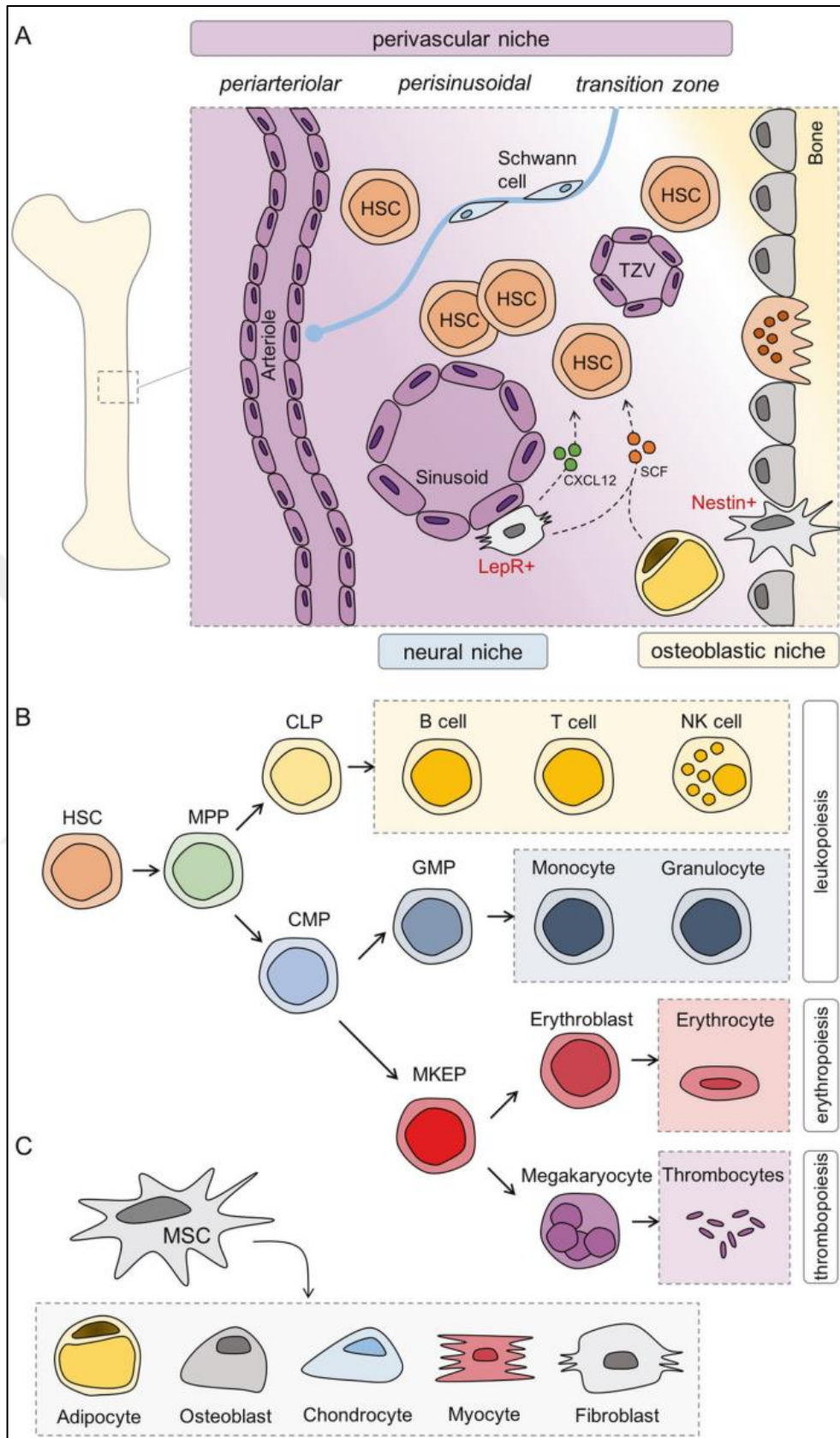
Hematopoez, HSCs'in farklılaşarak kandaki elementlerin (monositler, makrofajlar, nötrofiller, eozinofiller, eritroblastlar, eritrositler, megakaryositler, trombositler) yenilenmesi ifade eder. Hematopoezin gerçekleştiği yer ise damarların, kemik ve stromal hücrelerin, hematopoietik hücrelerin ve bu hücreler arası boşlukların oluşturduğu ve kemik iliği ve kemik iliği mikroçevresidir [Lucas, 2021].

Önceleri kemik iliğinde sadece hematopoezi sağlayan hematopoietik hücrelerin var olduğu ve üretildiği düşünülse de Friedenstein ve ark. yetişkin kemik iliğini toplayıp uygun yöntemlerle tek hücreli ilik süspansiyonu elde ederek, süspansiyondan hematopoietik hücreleri ayırdıktan sonra kalan hücreleri hücre kültüründe birkaç gün bekletmişlerdir. Hücre kültüründeki inkübasyon sonunda plastiğe yapışık, fibroblastik görünen ve aktif olarak çoğalan hücreler gözlemlenmiştir [Friedenstein et al., 1968]. Böylece ilk defa kemik iliğinde hematopoietik hücrelerin yanısıra güçlü osteojenik potansiyele sahip bir hücre popülasyonu tanımlamışlardır [Derubeis and Cancedda, 2004], [Lucas, 2021], [Mendez-Ferrer et al., 2020].

Friedenstein ve ark. çalışmalarından sonra farklı çalışmalarla, multipotent yetişkin progenitör hücreler, mezenkimal kök hücreler (mesenchymal stem cells; MSCs), kemik iliği stromal kök hücreler ve mezodermal progenitör hücreler olarak da belirtilen kemik iliği stroma hücrelerinin (bone marrow stromal cells; BMSCs) uygun şekilde indüklenmeleri halinde, hücrenin orjinal dokulardan "alışılmıştın dışında" farklılaşmaya maruz kalabileceğini gösterilmiştir. Sonuç olarak yapılan çalışmalar

ışığında, kemik iliği stroma hücresinin, farklı dönüşüm aşamalarındaki hücreleri içeren çok heterojen bir popülasyonu temsil ettiği ortaya konmuştur [Derubeis and Cancedda, 2004], [Lucas, 2021], [Mendez-Ferrer et al., 2020]. Bu popülasyonun içerisinde Sempatik sinirler, Schwann hücreleri, adipositler, osteoblastlar, osteositler, osteoblastik öncüler ve çeşitli fibroblast türleri dahil olmak üzere hematopoietik olmayan MSCs'den köken alan birçok başka stroma (hematopoetik olmayan) hücre türü bulunur (Şekil 2.2) [Lucas, 2021], [Zinngrebe et al., 2020].





Şekil 2.2: Kemik iliği mikroçevresinin kompartmanları ve bileşenleri.

Roecklein ve Torok-Storb tarafından kemik iliği stromasında MSCs'den türevlenen farklı fonksiyonlara sahip olabilecek kemik iliği stroma hücreleri insan papilloma virüs E6/E7 genleri içeren virüsler aracılığıyla ölümsüzleştirilerek 27 hücre hattı klonu tasarlanmıştır. Bu klonlardan dört tanesi HS-5, HS-21, HS-23 ve HS-27 hücre hatları fibroblastik morfolojiye sahip ve kemik iliği mikroçevresinin farklı fonksiyonlara sahip bileşenleri olarak değerlendirilmiştir [Roecklein and Torok-Storb, 1995].

Bu tez çalışmasında kullanılan HS-27A hücre hattı, HS-27 hücre hattının bir alt klonudur. HS-27A, "blanket" hücreleri olarak betimlenen, büyük, düzleştirilmiş çokgen şekilli ve komşu hücrelerle çok sayıda hücreler arası teması olan hücrelerdir. HS-27A hücre hattı, büyüme faktörlerini zayıf şekilde salgılar ve ortak kültürlerde izole hematopoetik progenitör hücrelerin çoğalmasını desteklemez. Benzer şekilde, HS-27A hücrelerinin büyütüldüğü kültür ortamındaki besiyerinin, miyeloid kolonilerin büyümesini desteklemediği görülmüştür [Adamo et al., 2020], [Web 1, 2022].

HS-27A, vasküler hücre adezyon molekülü olan VCAM-1'i ve diğer bir adezyon molekülü olan E-selektini nispeten yüksek seviyelerde ifade eder. Bunun yanında MSCs için bir belirteç olarak görülen ve ekspresyonunun multipotent hücre karakteristiği ile bağlantılı olduğu düşünülen CD146 yüzey proteini, HS-27A hücreleri tarafından güçlü bir şekilde ifade edilir. HS-27A hücrelerinde CD146 protein ifadesinin yüksek olduğu popülasyonun, CD146 protein ifadesinin düşük olduğu popülasyon ile kıyaslandığında embriyogenezde hematopoetik hücrelerin göçünü sağlayan, yetişkinlerde ise anjiyogenezde önemli rolü olan C-X-C motif chemokine 12 (CXCL12) proteinini, hem de CXCL12 gibi anjiyogenezde önemli rolü olan büyüme faktörü Angiopoietin 1'in ifadesinin önemli ölçüde arttığı belirtilmiştir [Barreiro et al., 2002], [Covas et al., 2008], [Pillai et al., 2010], [Russell et al., 2010], [Zhao et al., 2012].

3. DNA HASARI, DNA HASAR CEVABI VE DNA HASAR ONARIMI

3.1. DNA Hasarı

DNA ilk olarak 1869'da atılan cerrahi bandajların irinlerinde mikroskopik bir madde keşfeden İsviçreli doktor Friedrich Miescher tarafından izole edildi ve hücre çekirdeğinde bulunduğu için "nüklein" adı verildi. 1878'de Albrecht Kossel, "nüklein" in protein olmayan bileşeni olan nükleik asidi izole etti [Dahm, 2008].

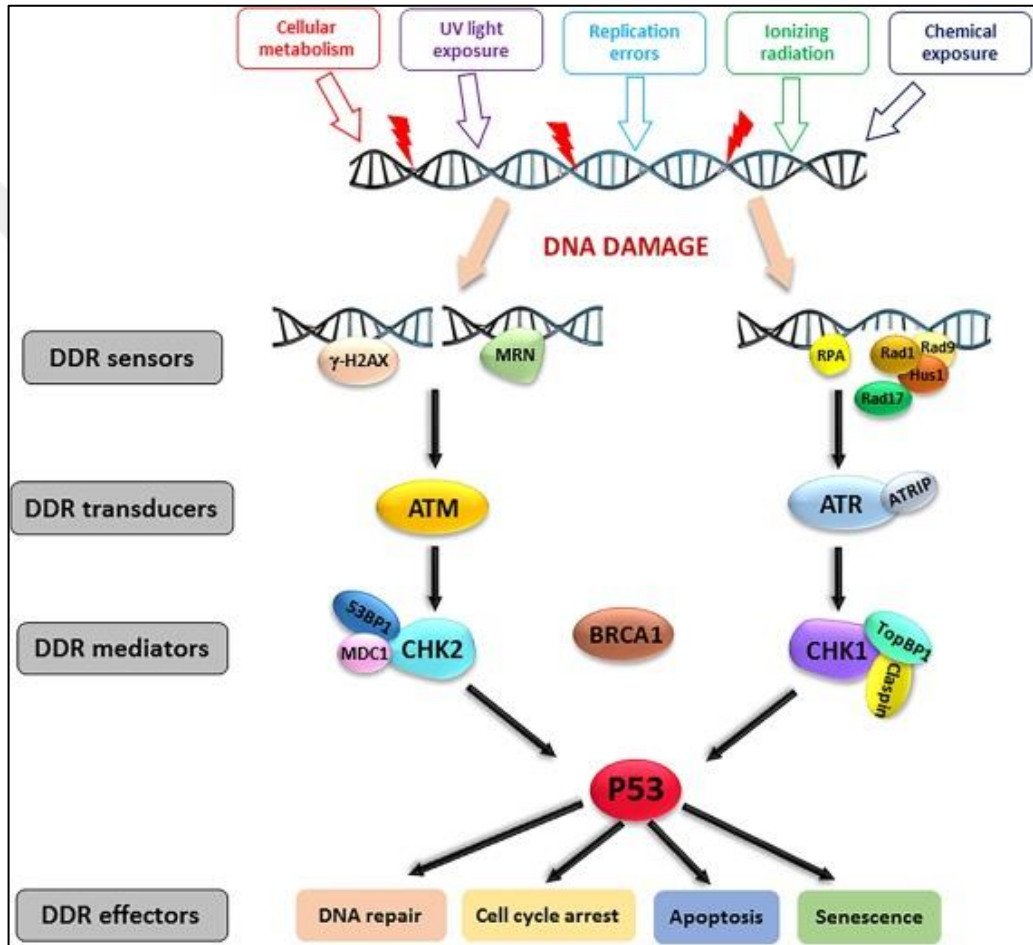
Bu tarihten sonra DNA üzerinde çalışmalar yoğunlaştı. 1928'de Griffith'in bakterilerin genetik bilgiyi transformasyon yoluyla aktarabildiğini göstermesinin ardından, 1940-1952 yılları arasında, Avery ve arkadaşlarının çalışması genetik bilgiyi taşıyan molekülün DNA olduğunu ortaya çıkarıdı. Aynı zaman aralığında Erwin Chargaff ise "Chargaff Kuralı" olarak adlandırdığı DNA'daki nükleotit içeriğinde Guanin miktarının sitozin miktarına, adenin miktarının da timin miktarına eşit olduğunu gösterdi. 1952 yılında, Rosalind Franklin'in gözetiminde çalışan bir yüksek lisans öğrencisi olan Raymond Gosling, DNA'nın X-ray difraksiyon fotoğrafını çekti ve Rosalind Franklin DNA yapısının çift sarmal yapıda olduğunu öne sürdü. Aynı fotoğraf üzerinde çalışan James Watson, Francis Crick ve Maurice Wilkins DNA'nın yapısını çözdüler ve 1962'de Franklin'in ölümünden sonra Nobel Fizyoloji ve Tıp Ödülü'nü aldılar [Avery et al., 1944], [Watson, 2014], [Web 2, 2023], [Web 3, 2023].

Genetik bilgi, DNA'daki nükleotitlerin doğrusal dizisinde taşınır. DNA'nın en önemli özelliği, G-C ve A-T baz çiftleri arasındaki hidrojen bağları ile bir arada tutulan genellikle çift sarmal şeklinde birbiri etrafında dolanmış iki polinükleotid zincirinden oluşmasıdır. Genetik bilginin kopyalanması, bir DNA sarmalının tamamlayıcı bir sarmalın oluşumu için şablon olarak kullanılmasıyla gerçekleşir. Bir organizmanın DNA'sında depolanan genetik bilgi, organizmanın sentezleyeceği tüm RNA moleküllerinin ve proteinlerinin bilgisini içerir [Alberts, 2017], [Watson, 2014].

Genetik materyalimizin hasar görmesi, hem genetik bilgiyi güvenilir bir şekilde gelecek nesillere aktarma yeteneğimiz hem de kendi hayatta kalmamız için devam eden bir tehdittir [Ciccia and Elledge, 2010].

DNA hasarı tüm hücrel organizmalarda mevcuttur ve neredeyse bütün canlı hücrelerdeki genetik materyal olan DNA, yaşamın temel birimidir. Bu nedenle,

DNA'nın bütünlüğü ve kararlılığı yaşam için esastır. DNA durağan değil daha ziyade dinamik bir yapıdır ve bu nedenle hücre içinden ve hücre dışından DNA'ya zarar veren ajanlar tarafından saldırıya uğramaktadır. Endojen hasarlar, reaktif oksijen türlerinin veya metabolik yan ürünlerin ve DNA metabolizmasının neden olduğu hasarlardır; eksojen hasarlar ise radyasyon, toksinler, kimyasallar ve mikroorganizmalar gibi dış etkenlerin neden olduğu hasarlardır (Şekil 3.1) [Cimprich and Cortez, 2008], [Jackson and Bartek, 2009].



Şekil 3.1: DNA hasar cevabı ağı.

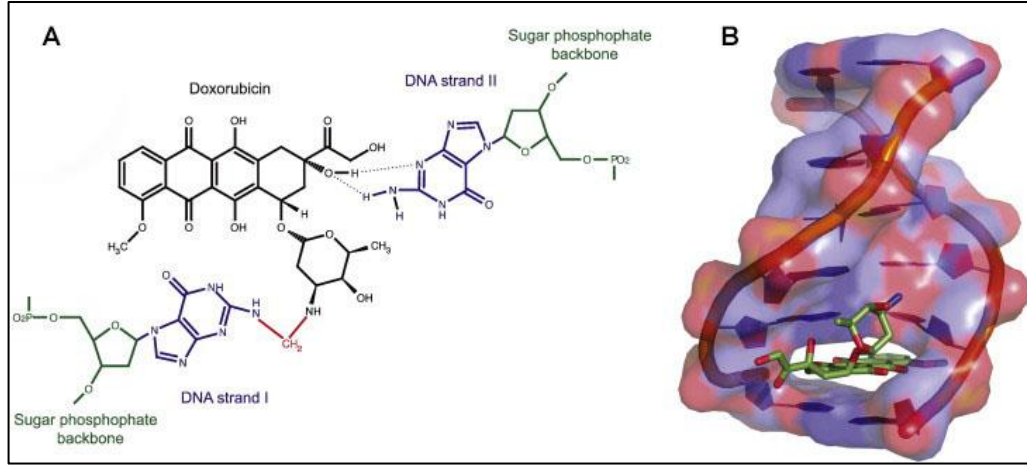
Genomik bütünlüğü korumak için DNA çevresel ajanların neden olduğu veya DNA metabolizması sırasında kendiliğinden oluşan hasarlardan korunmalıdır. Spontane DNA değişiklikleri, DNA replikasyonu sırasında dNTP'nin yanlış birleşmesinden, deaminasyonun neden olduğu DNA bazları arasındaki karşılıklı dönüşümden, DNA depürinasyonunu takiben DNA bazlarının kaybindan ve alkilasyon ile DNA bazlarının modifikasyonundan kaynaklanabilir. Ek olarak, oksitlenmiş DNA

bazları ve DNA kırılmaları, normal hücrel metabolizmadan türetilen reaktif oksijen türleri (ROS) tarafından üretilebilir. Toplamda, her hücrede günde 10^5 'e yakın spontan DNA lezyonu olabileceği tahmin edilmektedir [Cimprich and Cortez, 2008], [Hoeijmakers, 2009], [Jackson and Bartek, 2009].

Çevresel DNA hasarı, fiziksel veya kimyasal kaynaklar tarafından üretilebilir. Fiziksel genotoksik ajanlara örnek olarak güneş ışığından gelen iyonlaştırıcı radyasyon (IR) ve ultraviyole (UV) ışık verilebilir. Bu DNA hasar kaynakları da hücre başına günde 10^5 'e kadar DNA lezyonunu (pirimidin dimerleri ve 6-4 foto ürün) indükleyebilir [Branzei and Foiani, 2005], [Lord and Ashworth, 2012].

Kanser kemoterapisinde kullanılan kimyasal maddeler de çeşitli DNA lezyonlarına neden olabilir. Örneğin, metil metansülfonat gibi alkile edici maddeler ve temozolomid, alkil gruplarını DNA bazlarına bağlarken, mitomisin C, sisplatin, psoralen ve nitrojen mustard gibi çapraz bağlama ajanları, aynı DNA sarmalının veya farklı DNA sarmallarının bazları arasında kovalent bağlar oluştururlar. Bir başka grup kimyasal olan topoizomeraz I veya II'yi inhibe eden topoizomeraz inhibitörleri, kamptotesin ve etoposid ise, topoizomeraz-DNA kovalent komplekslerini yakalayarak tek zincir DNA kırıklarının (Single Strand Breaks; SSBs) veya çift zincir DNA kırıklarının (Double Strand Breaks; DSBs) oluşumunu indükler. Sigara kullanımı ve uzun havayolu seyahatleri gibi davranışsal tercihlere bağlı olarak akciğer ve diğer dokularda DNA'da çeşitli bileşiklerin oluşumuna ve oksidatif hasara neden olabilmektedir [Branzei and Foiani, 2005], [Ciccia and Elledge, 2010], [Hoeijmakers, 2009], [Jackson and Bartek, 2009], [Lord and Ashworth, 2012].

Bu tez çalışmasında DEK2'nin DNA hasarı ve tamiri ile ilişkisini araştırmak amacıyla hücrelerde DSBs oluşturmak için doksorubisin kullanılmıştır. Doksorubisin (adriamisin olarak da adlandırılır), antrasiklinler adı verilen benzer yapılara sahip bir bileşik sınıfına aittir. Doksorubisin, katı tümörlerin ve akut lösemilerin tedavisinde yaygın olarak kullanılan en önemli kanser önleyici kemoterapötik ilaçlardan biridir. Doksorubisin gibi antrasiklin ilaçları çoğunlukla, DNA küçük oluğunda oturan bir veya daha fazla şeker parçası tarafından bir tarafta sabitlenmiş, komşu DNA baz çiftleri arasında tercihen araya giren düzlemsel moleküllerdir (Şekil 3.2), [Yang et al., 2014].



Şekil 3.2: Doksorubisin-DNA kompleksinin yapısı. (A) Doksorubisin formaldehit aracılığıyla DNA'nın bir sarmalındaki guaninle (kırmızıyla gösterilen) kovalent bir bağ yaparken, karşıt sarmalda ise guaninle hidrojen bağları oluşturur. (B) Doksorubisinin DNA'ya interkalasyon yapısı.

Doksorubisin etkisi için belirlenen modellerden birisi, topoizomeraz II zehirlenmesini içerir, bu da klinik olarak ilgili ilaç konsantrasyonlarında çift sarmallı DNA kırılmaları ve hücre ölümüyle sonuçlanır [Gewirtz, 1999], [Thorn et al., 2011].

Bir DNA interkalatörü olarak doksorubisin, muhtemelen doksorubisin ve guanin arasındaki spesifik hidrojen bağı oluşumundan dolayı bitişik GC baz çiftlerini içeren interkalasyon bölgesini tercih eder. Doksorubisin-DNA eklentilerinin oluşumunun, DNA hasar tepkilerini aktive ettiği ve topoizomeraz II'den bağımsız olarak hücre ölümünü indüklediği de gösterilmiştir [Forrest et al., 2012], [Swift et al., 2006]. Ayrıca, doksorubisin kaynaklı serbest radikal salınımı, oksidatif strese neden olarak DNA hasarına ve hücre ölümüne neden olabilir [Thorn et al., 2011].

Doksorubisin tedavisi, serbest radikallerin oluşumuna ve oksidatif metabolizmadaki artışa ek olarak seramid düzeylerini de yükseltir. Seramid, büyümenin durdurulması, apoptoz ve yaşlanma dahil olmak üzere çeşitli hücresel süreçlerde yer alan bir sfingosin ve bir yağ asidinden oluşan bir lipit molekülüdür [Senchenkov et al., 2001].

İnterkalasyon yoluyla doksorubisin, transkripsiyonel olarak aktif kromatinden histon tahliyesini de indükleyebilir. Sonuç olarak, doksorubisine maruz kalan hücrelerde DNA hasar tepkisi, epigenom ve transkriptom düzensizleşir [Pang et al., 2013].

3.2. DNA Hasar Cevabı

Mayadan insanlara kadar birçok organizmada iyi korunmuş olan DNA hasar yanıtı (DNA Damage Response; DDR), sinyal iletimini, hücre döngüsü düzenlemesini, DNA onarımını, replikasyon baypas mekanizmalarını ve apoptozu kapsayan işlevsel olarak karmaşık bir ağdır. DDR yolu, sensörler/dönüştürücüler, araçlar ve efektörlerden oluşan bir sinyal iletim yoludur. DDR, DNA hasarını algılayan erken fosforilasyon güdümlü sinyal kaskadları tarafından başlatılır ve çeşitli aracı sinyal proteinleri tarafından düzenlenir. Bu proteinler, sonunda ya hasarlı DNA'yı onarmak ya da hasar onarılmaz haldeyse hücre ölümünü başlatmak için hücre döngüsünü durdurarak hücre kaderini belirlemek üzere aşağı akış efektörlerini etkinleştirir [Ciccia and Elledge, 2010], [Majidinia et al., 2017].

3.2.1. DNA Hasar Sensörleri

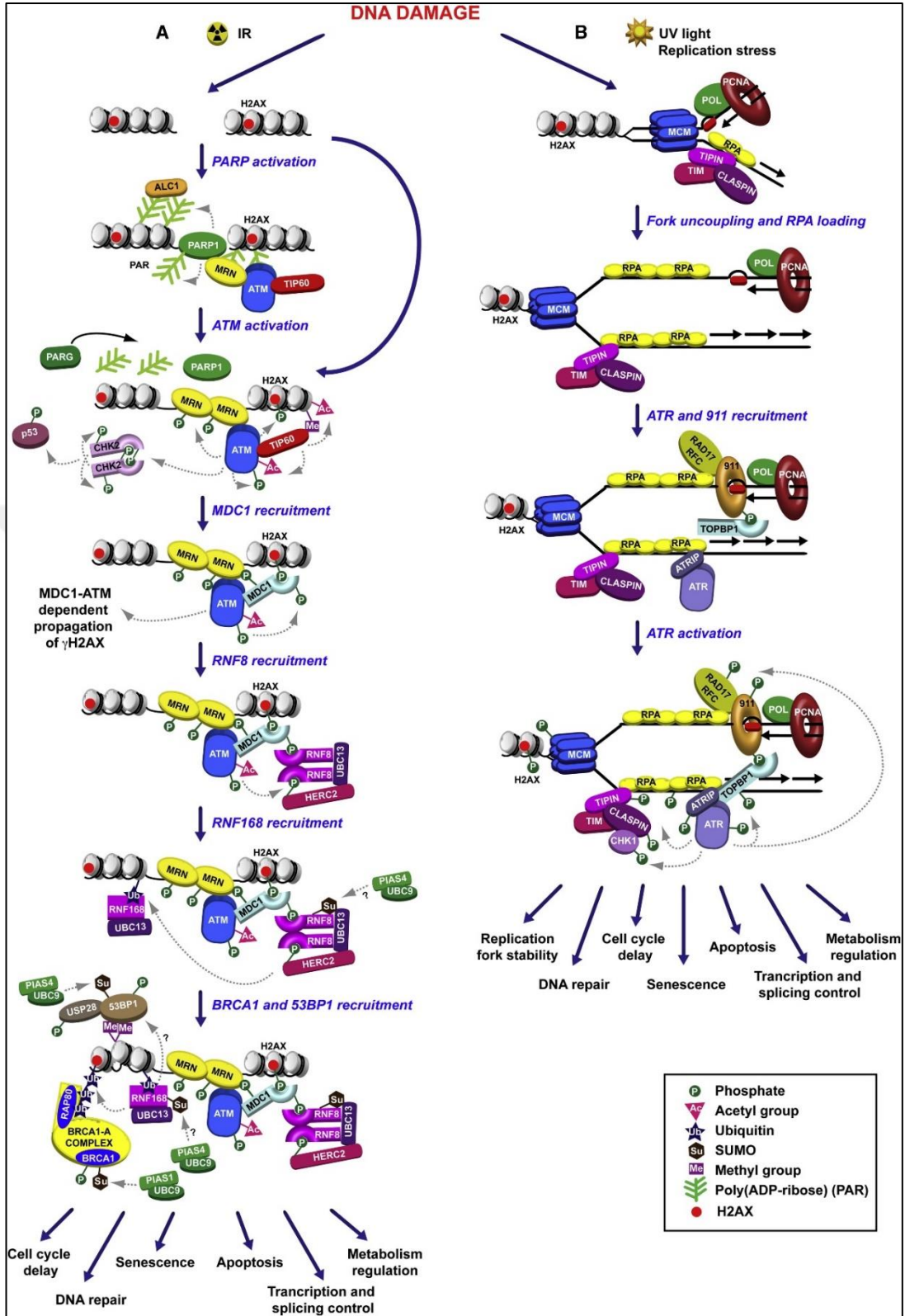
Genomun düzgün bir şekilde korunması için, DNA'daki boşluklar (gaps), çentikler (nicks), SSBs, DSBs ve DNA replikasyonunu önleyen sayısız değişiklik dahil olmak üzere tüm DNA yapısal hasar biçimleri tanınmalıdır. Farklı DNA hasarı türlerinin sensörleri ve sinyal dönüştürücüleri olarak işlev gören temel birkaç moleküler kompleks vardır. Bunlardan en önemlileri ve üzerinde en çok çalışılanlar fosfatidilinositol 3-kinaz ile ilgili kinazlar (PIKKs) grubuna giren mutasyona uğramış Ataxia-telanjiectazi kinaz (ATM), Ataksi telanjiectazi ve Rad3 ile ilişkili kinaz (ATR) ve DNA'ya bağımlı protein kinaz (DNA-PK) proteinleridir [Jackson and Bartek, 2009], [Majidinia et al., 2017], [Zhou and Elledge, 2000].

DSBs, ATM'yi kırık DNA moleküllerine çeken MRE11-RAD50-NBS1 (MRN) aracı kompleksi tarafından tanınır. Bu nedenle, DSBs'e yanıt olarak, aktif olmayan dimer yapıdaki ATM birbirinden ayrılıp fosforillenerek aktifleşir. Ardından ATM yolaktaki aşağı basamaklarda görev alan proteinleri fosforilleyerek onları da aktive eder. ATM kinazları ayrıca DNA onarımı ve hücre döngüsü kontrol noktalarının induksiyonunun düzenlenmesinde yer alan Chk2, p53 ve Breast cancer type 1 susceptibility protein (BRCA1) proteinlerini de fosforilleyerek aktive eder. DNA hasarı onarılamaz haldeyse p53'ün aktivasyonu sonucu apoptoz yolağı devreye girer

(Şekil 3.3A) [Ciccia and Elledge, 2010], [Lord and Ashworth, 2012], [Riley et al., 2008], [Sancho and Ouchi, 2015].

DNA replikasyonu sırasında DNA polimerazların ilerlemesiyle DNA zincirinde bir gerilim oluşur. Replikasyonun düzgün ilerlemesi için oluşan bu gerilim helikaz enzimlerinin DNA'yı çözmesiyle giderilir. DNA'nın çözülmesiyle oluşan tek zincirli DNA yapısına RPA proteinleri bağlanır. Hücre içi veya hücre dışı etkenlerden dolayı replikasyon sırasında replikasyon çatalında bir duraksama olursa tek zincirli DNA'ya bağlı RPA proteinleri tarafından ATR-interacting protein (ATRIP) aracılığıyla ATR'nin bölgeye gelmesi sağlanır. Daha sonra ATR aktive olur ve aktif ATR'nin yolaktaki başka proteinleri aktive etmesi ile Chk1 kinazları fosforile edilir ve hücre döngüsü kontrolünü başlatır. Böylece genomik stabilite korunmaya çalışılır (Şekil 3.3B) [Broustas and Lieberman, 2014], [Liao et al., 2018], [Majidinia et al., 2017], [Marechal and Zou, 2015], [Yan et al., 2014].

DNA replikasyonundaki rolüne ek olarak DNA topoisomerase II binding protein 1 (TopBP1) protein kompleksi de diğer bir DNA hasarı sensörüdür. Bu kompleks ATR'nin kinaz aktivitesini artıran bir domain içerir. Böylece hücre döngüsünün kontrolüne katkıda bulunur (Şekil 3.3B) [Wardlaw et al., 2014], [Zhang et al., 2014].



Şekil 3.3: DNA hasar cevabında ATM ve ATR yolağının şematik gösterimi.

Bir başka DNA hasar sensörü olan DNA-PK, DSBs oluşumunda indüklenir ve ardından otofosforilasyon ile aktive olur. Kendi aktivasyonundan sonra diğer substratların da fosforilasyonunu sağlayarak homolog olmayan uç birleştirme (Non-Homologous End Joining; NHEJ) aracılığıyla DSBs onarımında önemli bir rol oynar [d'Adda di Fagagna, 2014], [Majidinia et al., 2017].

3.2.2. DNA Hasar Aracıları

DNA hasarına karşı oluşturulan cevapta araçlar olarak adlandırılan proteinler, ATM ve ATR kinazlarının cevap yolağında alt basamakta yer alan efektör kinazlar ile arasındaki etkileşimleri indükler. Ayrıca yolda yer alan efektör olmayan diğer protein ve protein komplekslerinin hasar bölgesine toplanması için adeta bir iskele görevi görürler. DNA hasarı üzerine ATM, ATR ve DNA-PK, Ser-139 üzerindeki histon varyantı H2AX'i fosforile eder. H2AX'in fosforilasyonu sonrası Mdc1 proteini hasar bölgesine gelerek ATM ile bağlanır, ardından hem bölgedeki diğer H2AX'ler fosforillenir hem de fosforile H2AX'lerin defosforilasyonu önlenir. Mdc1 ve γ H2AX ayrıca IR kaynaklı odakların (IRIF) üretimine yol açarak, diğer birkaç proteinin, hasar bölgesine gelmesini kolaylaştırır. Bu proteinlerden biri olan bir E3 ubiquitin ligazı γ H2AX'i ubiquitinlemesi sonrasında tumor suppressor p53-binding protein 1 (53BP1) ve BRCA1 kompleksi oluşturularak DNA tamiri ve hücre döngüsü kontrolü yollarının başlatılması sağlanır (Şekil 3.3) [Ciccia and Elledge, 2010], [Kumar and Cheok, 2014], [Majidinia et al., 2017], [Nastasi et al., 2020], [Zhou and Elledge, 2000].

3.2.3. DNA Hasar Efektörleri

Son yıllarda ATM ve ATR odaklı çalışmalarla UV veya IR gibi DNA hasar ajanlarına yanıt olarak 700'den fazla proteinin fosforile olduğu ve DNA hasar cevabında bir şekilde yer aldığı gösterildi. Elde edilen bulgular, bu proteinlerin bir kısmının DNA replikasyonuna katkıda bulunan, replikasyon çatalı stabilitesini sağlayan ve DNA replikasyonunun yavaşlatılması ile ilgili proteinler olduğunu göstermiştir. Bu proteinlerin diğer bir önemli kısmı da DNA hasarına karşı koymak için birçok lezyon tipine özgü onarım mekanizmalarında yer alan proteinleri

içermektedir [Ciccia and Elledge, 2010], [Majidinia et al., 2017], [Matsuoka et al., 2007].

3.3. DNA Onarımı Mekanizmaları

3.3.1. Doğrudan Onarım (Direct Repair; DR)

İmidazol karboksamid (dakarbazin) ve temozolomid gibi kemoterapötik ajanların neden olduğu baz hasarlarında DR onarım mekanizması kullanılır. Bu onarım temel olarak zarar görmüş bir bazın çıkarılması veya yeniden yapımı olmaksızın doğal durumuna doğrudan çevrilmesidir. Bu şekilde onarılan DNA hasarı, fotolizazlarla fotoreaktivasyon, O6-metilguanin DNA metiltransferaz ile O-metilasyonu ve AlkB protein ailesi tarafından N-metil gruplarının oksidatif demetilasyonunu içermektedir [Nastasi et al., 2020], [Sedgwick, 2004].

3.3.2. Baz Eksizyon Onarımı (Base Excision Repair; BER)

Enzimatik aktivite, oksidasyon, deaminasyon ve alkilasyon nedeniyle oluşan modifikasyonlarda ve hidroksil radikallerine maruz kalınmasıyla glikosil bağlarının zayıflamasıyla oluşan sarmal olmayan distorsiyonlu lezyonlar ve abazik bölgelerdeki baz eksizyonu durumunda BER mekanizması devreye girer. BER yardımıyla, bir apürinik/apirimidinik endonükleaz tarafından ortaya çıkan abazik bölgeler SSBs oluşturur. Bu SSBs değiştirilen nükleotidlerin sayısına bağlı olarak kısa veya uzun yama onarım mekanizması tarafından onarılır. Öncelikle DNA polimeraz β DNA sentezini yapar, sonrasında kısa yama BER'de DNA ligaz III ve X-ışını onarım çapraz tamamlayıcı protein 1 (XRCC1), uzun yama BER'de ise DNA ligaz I yardımıyla hasar onarılır [Krokan and Bjoras, 2013], [Nastasi et al., 2020].

3.3.3. Nükleotid Eksizyon Onarımı (Nucleotide Excision Repair; NER)

NER onarım yolu, UV, kemoterapi ve ROS'un sebep olduğu DNA sarmalını bozan lezyonları, baz modifikasyonları, hacimli eklentileri, DNA sarmal içi çapraz

bağları ve timidin dimerleri gibi DNA hasar tiplerinde kullanılır. NER, GG-NER ve TC-NER olarak adlandırılan iki farklı yolağa sahiptir. GG-NER'de, önce XPC–RAD23B–Centrin2 kompleksi aracılığıyla hasar tespit edilir, sonrasında XPA, RPA, TFIIH, XPB ve XPD, hasarlı DNA'yı stabilize eder. Bu aşamadan sonra, yapıya özgü endonükleazlar olan XPG ve ERCC1-XPF, 30 ila 50 nükleotid içeren hasarlı DNA fragmanını keserek çıkarır. Son olarak, tek sarmaldaki boşluklar DNA polimerazlar tarafından doldurulur ve yeni oluşan DNA fragmanı, DNA ligaz III-XRCC1 ve DNA ligaz I tarafından kapatılır. TC-NER'de ise bir genin aktif transkripsiyonu sırasında hasar tespit edilir ve UVSSA, USP7 ve CSB proteinleri yardımıyla RNA polimeraz II durdurularak, XPA, RPA, TFIIH gibi faktörlerin hasar bölgesine gelmesi sağlanır. Sonraki aşamalarda GG-NER'deki basamaklarla hasar onarılır [Ciccina and Elledge, 2010], [Iyama and Wilson, 2013], [Krokan and Bjoras, 2013], [Spivak, 2015].

3.3.4. Hatalı Eşleşme Onarımı (Mismatch Repair; MMR)

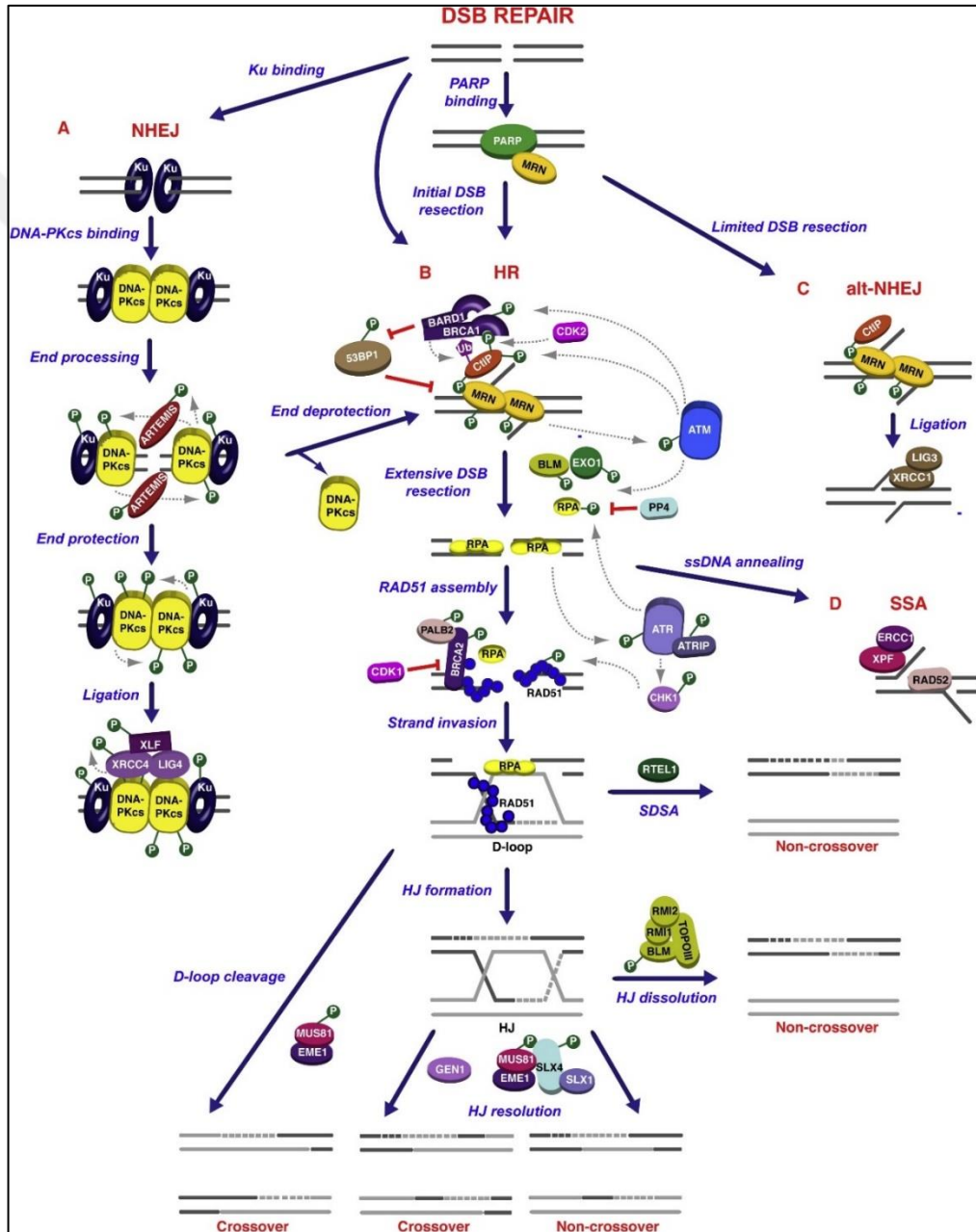
ROS ve reaktif nitrojen türleri veya DNA replikasyonu sırasında baz-baz uyumsuzlukları gibi hücre içi problemlerden kaynaklanan nükleotid yanlış eşleşmelerini düzeltilmesini sağlayan MMR, MUTS α , MUTS β ve MUTL α tarafından hatalı eşleşmeleri tanır. Daha sonra PCNA, RCF, Pol δ , ve EXO1'in aktiviteleri sonucu hatalı eşleşme düzeltilir ve ligaz I'in boşluğu kapatmasıyla onarım tamamlanır [Nastasi et al., 2020], [Pang et al., 2013], [Pecina-Slaus et al., 2020].

3.3.5. Zincirler Arası Çapraz Bağ (Intercrosslink; ICLs) Onarımı

Hücre dışı bazı alkilleyici ajanlar veya hücre içi nitröz asit gibi aldehitler karşılıklı DNA zincirlerinde iki nükleotitin kovalent olarak bağlanmasına neden olarak DNA'da hasara yol açarlar. Bu durum ICLs onarım mekanizmasıyla düzeltilir. Fanconi anemia (FA) çekirdek kompleksinin önderliğinde birçok faktör hasarlı bölgede toplanarak translezyon sentezinin gerçekleşmesi sağlanır. Bu işlem sonrası oluşan DSBs son olarak homolog rekombinasyon (HR) ile onarılır [Ciccina and Elledge, 2010], [Hashimoto et al., 2016], [Nastasi et al., 2020].

3.3.6. Çift İplik Kırığı (Double Strand Breaks; DSBs) Onarımı

DNA hasarında en çok zarar verici olarak görülen DSBs en az dört bağımsız mekanizma kullanılarak onarılır. Bunlar, Tek Zincir Eşleşmesi (SSA), Mikrohomoloji Aracılı Uç Birleştirme (MMEJ veya alt-NHEJ), NHEJ ve HR onarım mekanizmalarıdır (Şekil 3.4) [Ciccia and Elledge, 2010].



Şekil 3.4: DSBs onarımında yer alan alternatif DNA onarım mekanizmaları.

3.3.6.1. Tek Zincir Eşleşmesi (Single Strand Annealing; SSA)

Tekrar dizileri yakınındaki DSBs onarımında SSA mekanizması kullanılır. Böyle bölgelerde tek zincirli DNA yapıları oluşması durumunda bu yapılara bağlanan ERCC1, XPF ve Rad59'un aracılığıyla homolog tekrarların birbirine yapışması sağlanır ve “non-crossover” şekilde DSBs tamiri gerçekleştirilir (Şekil 3.4D) [Bhargava et al., 2016], [Ciccica and Elledge, 2010].

3.3.6.2. Mikrohomoloji Aracılı Uç Birleştirme (Microhomology Mediated End Joining; MMEJ)

DSBs sonucu oluşan DNA uçlarına öncelikle Poly [ADP-ribose] polymerase 1 (PARP-1) proteini bağlanarak Mre11/Rad50/Nbs1 (Mre11) kompleksinin kırık bölgede toplanmasını sağlar. Daha sonra DSBs etrafındaki mikrohomoloji (MH) bölgelerini açığa çıkarmak için CtIP/Mre11 kompleksleri bölgeye gelir ve açığa çıkarılan MH'ler yapışarak homolog olmayan kuyrukların oluşumunu indükler. Bunlar daha sonra Pol θ tarafından sentezlenir, fazlalıklar XPF/ERCC1 nükleaz tarafından çıkarılır ve Ligaz I ve III ile boşluklar kapatılarak onarım tamamlanır (Şekil 3.4C), [Ciccica and Elledge, 2010], [Nastasi et al., 2020].

3.3.6.3. Homolog Olmayan Uç Birleştirme (Non-Homologous End Joining; NHEJ)

NHEJ, kırık DNA uçlarını tanıyan ve bağlayan Ku70-Ku80 heterodimer kompleksi tarafından başlatılır. Ku70-Ku80 kompleksi DNA uçlarına yüksek afiniteye sahiptir ve DNA'ya bağlandıktan sonra DNA uçlarını hizalar. DNA uçlarında tek zincir fazlalıkları varsa buralar ya DNA polimerazlarının aktivitesiyle doldurur veya nükleazlar tarafından kesilir. Daha sonra, XRCC4/DNA ligaz IV ligasyon kompleksi, DNA uçlarını birleştirerek DNA onarımını tamamlar (Şekil 3.4A) [Scully et al., 2019].

3.3.6.4. Homolog Rekombinasyon (Homologous Recombination; HR)

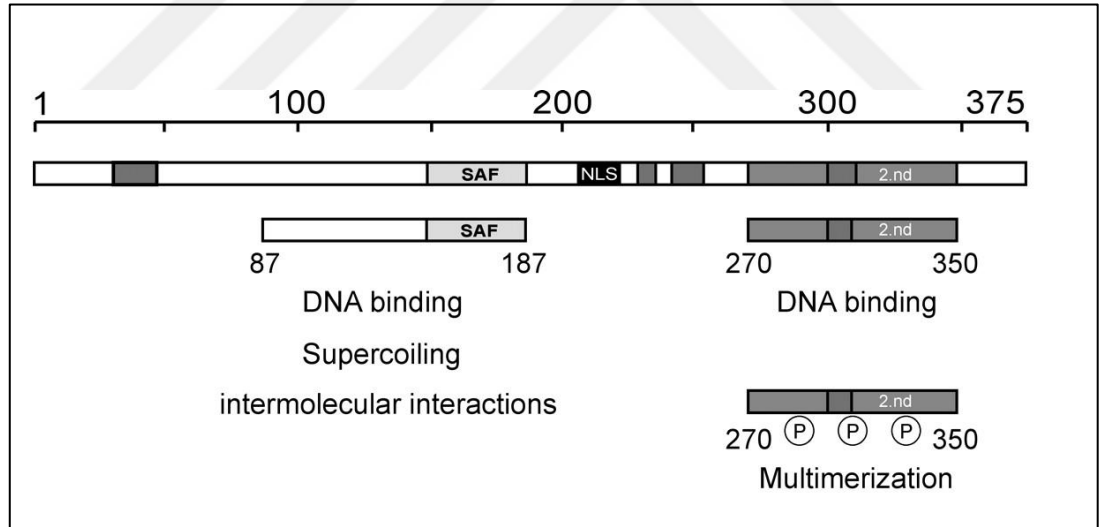
HR onarımı, kardeş kromatitlerin kalıp olarak kullanıldığı bir mekanizma olduğu için hücre döngüsünün S fazı ve G2 fazı ile sınırlıdır. HR onarımı MRN kompleksinin kırık oluşan bölgeye gelmesiyle başlatılır ve çift zincir kırık onarımı veya sentez bağımlı zincir birleştirilmesi yoluyla yapılır. MRN kompleksi, CtIP ve EXO1'in hasar bölgesinde toplanmasının ardından oluşan tek zincir yapısı RPA proteinleriyle kaplanır. Daha sonra Breast cancer type 2 susceptibility protein (BRCA2) aracılığıyla bölgeye gelen Rad51, RPA proteinlerinin yerini alır. Sonrasında, "Holiday Junction (HJ)" yapısı oluşursa çift zincir kırık onarımı yoluyla, oluşmazsa da sentez bağımlı zincir birleştirilmesi yoluyla HR onarımı tamamlanır (Şekil 3.4B) [Ciccia and Elledge, 2010], [Nastasi et al., 2020], [Scully et al., 2019], [West, 2003].

4. DEK PROTEİNİ

4.1. DEK Proteinin Yapısı, Hücre Biyolojisi ve Kanserdeki Rolü

DEK proteini, 6p22.3 kromozom bölgesinde yerleşmiş olan *DEK* geninin ürünüdür (Riveiro-Falkenbach and Soengas, 2010). DEK proteini ilk olarak AML hastalarında görülen 6. ve 9. kromozomlar arası translokasyon (t(6;9)) sonucunda NUP214 (CAN) proteini ile füzyon halinde tanımlanmıştır [von Lindern et al., 1992].

İnsanda bulunan DEK proteini 375 aminoasitten oluşan, 43 kDa boyuta sahip, genellikle hücre çekirdeğinde lokalize, SAP box DNA bağlanma bölgesi ve C-terminal DNA bağlanma bölgesi olarak adlandırılan iki domaine sahip nüklear bir fosfoproteindir. Şekil 4.1’de DEK proteininin yapısı şematik olarak gösterilmiştir [Bohm et al., 2005], [Carro et al., 2006], [Kappes et al., 2004b], [Oancea et al., 2010].



Şekil 4.1: DEK proteininin yapısının şematik gösterimi.

Bu iki bölge aracılığıyla DNA’ya bağlanan DEK proteini, histon asetil transferaz enziminin aktivitesini bozarak transkripsiyon baskılayıcı, AP2- α proteininin DNA’ya bağlanmasını sağlayarak ise transkripsiyon indükleyici olarak iki yönlü işleve sahiptir [Logan et al., 2015], [Oancea et al., 2010].

Proteinde bulunan fosforilasyon bölgelerinin çoğu, CK2 kinazı tarafından fosforile edilen C-terminal domeninde bulunur. Fosforile edilmiş DEK dimerize olma

veya multimerize olma eğiliminde iken, defosforillenmiş DEK DNA'ya bağlama eğilimi gösterir. Bu bulgular DEK proteininin fosforillenerek DNA'dan ayrıldığını ve transkripsiyonel aktivatörlerin ve represörlerin DNA'ya bağlanmasına izin vererek transkripsiyonu etkilediğini göstermektedir [Kappes et al., 2004b].

DEK proteininin kanser oluşumu dışında normal hücre çoğalması ve farklılaşması gibi farklı fonksiyonları da olduğu ortaya konulmuştur [Broxmeyer et al., 2013], [Sanden and Gullberg, 2015]. Örneğin, DEK'in hematopoetik öncü hücrelerin çoğalmasına, sağlıklı bir şekilde yaşamlarını sürdürmelerine veya farklılaşma kapasitesinin düzenlemesine ilişkin rolleri olduğu gösterilmiştir [Broxmeyer et al., 2013], [Koleva et al., 2012], [Logan et al., 2015].

Ayrıca, DEK proteininin bilinen herhangi bir enzimatik aktivitesi olmamasına rağmen RNA, DNA, kromatin ve ilişkili proteinlerle etkileşerek transkripsiyonu, mRNA işlenmesini, DNA replikasyonunu, DNA tamirini ve kromatin topolojisini etkilediği bilinmektedir [Alexiadis et al., 2000], [Hollenbach et al., 2002], [Pease et al., 2015], [Waldmann et al., 2002].

DEK proteini, normal koşullarda büyük oranda hücre çekirdeğinde lokalize olsa da DNA hasarı, apoptoz ve inflamasyon durumlarında hücre dışı bölgeye salınımı yapılabilmektedir. Hücre dışındaki DEK'in kemo-atraktan fonksiyonlar göstererek immün sistemde görevli bazı hücrelerin inflamasyon bölgesine yönelmesinde rol aldığı bildirilmiştir [Broxmeyer et al., 2013], [Logan et al., 2015]. Hücre dışına salındığında, DEK proteinin otoimmün antijen oluşturduğu ve juvenile rheumatoid arthritis ve diğer inflamatuvar hastalıklarda anahtar rollere sahip olabileceği de gösterilmiştir [Mor-Vaknin et al., 2006].

DEK proteini, yüksek oranda korunan SAP-box ve C-terminal DNA bağlama bölgeleri yoluyla tercihe bağlı olarak krusiform ve süperhelik DNA yapılarına bağlanarak DNA'da pozitif superdönüm yapsını indükler [Logan et al., 2015], [Smith et al., 2017], [von Lindern et al., 1992]. Ek olarak, DEK proteini kısa DNA fragmanlarına bağlanır ve bu fragmanları birbirine bağlayarak DNA zincir bağlanmasını destekler [Waldmann et al., 2003]. DEK'in fosforilasyonu DNA'ya bağlanma affinitesini azaltan bir faktördür [Kappes et al., 2004a]. Bir çalışmada yapılan kromatin çöktürme deneyinde DEK'in yüksek oranda ifade edilen genlerin transkripsiyon başlangıç bölgelerinde toplandığı gösterilmiştir [Sanden et al., 2014]. Ayrıca DEK RNA'ya da bağlanarak RNA işlenmesini değiştirebilmektedir [Soares et al., 2006].

DEK proteininin aktif olarak çoğalan ve kötü huylu tümörlerde daha fazla eksprese olduğu, hücre farklılaşması, apoptoz ve senesens gibi önemli olaylarda rol alarak çeşitli kanser türlerinde tümör oluşumunu desteklediği gösterilmiştir [Carro et al., 2006], [Sanden et al., 2014], [Wise-Draper et al., 2009]. DEK proteininin kanser oluşumunda rolü olan E2F ve p53 proteini ile de ilişkili olduğu gösterilmiştir. *DEK* geni ifadesi, E2F'in *DEK* geni promotoruna bağlanarak DEK proteini ifadesini arttırmasıyla pozitif olarak düzenlenmektedir. DEK proteinin fazla eksprese olması p53 proteininin destabilize olmasına neden olmaktadır ve böylece kanser hücrelerinde meydana gelen p53 bağımlı apoptozu inhibe ederek onkogenik etki göstermektedir [Carro et al., 2006], [Wise-Draper et al., 2006].

DEK proteininin hepatoselüler karsinom, beyin kanseri, kolon kanseri, prostat kanseri, melanoma, mesane kanseri, retinoblastom, göğüs kanseri, larinks kanseri gibi birçok kanser türünde aşırı ifade edildiği bildirilmiştir [Broxmeyer et al., 2013], [Carro et al., 2006], [Pease et al., 2015]. Yüksek seviyede DEK ifadesinin tümör oluşumu önündeki apoptoz ve senesens gibi engelleri kaldırdığı ve tümörlü hücrelerin yaşamasına katkı sağladığı düşünülmektedir [Broxmeyer et al., 2013], [Riveiro-Falkenbach and Soengas, 2010]. Yapılan bazı çalışmalarda *DEK* geni ortadan kaldırılmış farelerin dışarıdan etkilerle indüklenen tümör oluşumuna daha az açık olduğu ve DEK'in kanser tedavisinde bir hedef olabileceği bildirilmiştir [Wise-Draper et al., 2009].

4.2. DEK'in Diğer Proteinlerle Etkileşimi

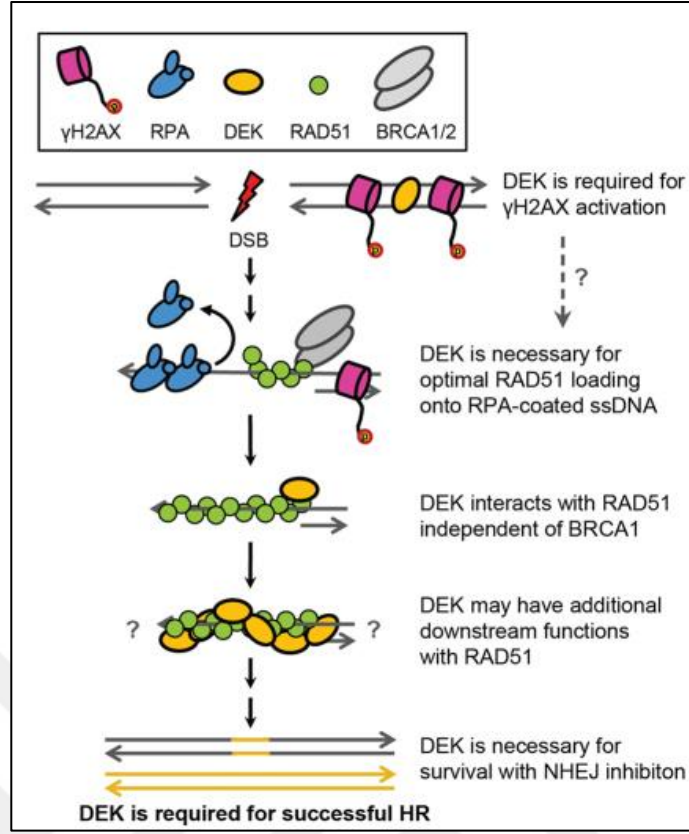
DEK bir fosfoproteindir, özellikle C-terminal bölgesinde yer alan bölgelerdeki fosforillenme etkisiyle DNA ve kendine bağlanma özellikleri değişkenlik göstermektedir. DEK proteinin fosforillenerek dimer veya multimer yapılar oluşturduğu ve böylece DNA'dan ayrılarak transkripsiyonel aktivatör ve represörlerinin bu bölgelere bağlanabildiği bilinmektedir [Kappes et al., 2004a], [Kappes et al., 2004b].

DEK proteininin Daxx ve HADCII proteinleri ile fiziksel interaksiyona girdiği bu yolla histon deasetilasyonuna neden olarak transkripsiyonel represyonda rol aldığı bildirilmiştir. DEK, CK2 ile interaksiyona girerek ATP varlığında fosforillenir bunun sonucunda aktif kromatinlere bağlanan H3.3'ün kromatine bağlanmasını limitleyerek

yine bazı genlerin susturulmasında ve genom stabilitesinin arttırılmasına katkı sağlar [Ivanauskiene et al., 2014]. DEK in AP-2 α 'nın da bulunduğu bir kompleks içinde yer aldığı ve DEK'in AP-2 α 'nın transaktivasyon aktivitesini artırarak sadece transkripsiyonel baskılanmada değil transkripsiyonun aktivasyonunda da görev aldığı belirtilmiştir [Sawatsubashi et al., 2010]. Bunların yanında DEK'in SR proteinlerle etkileşimi olduğu ve EJC'nin (Exon-exon Junction Complex) içinde yer aldığı bildirilmiştir [Le Hir et al., 2001], [McGarvey et al., 2000]. Son zamanlarda DEK'in HR'de rol aldığı ve HR ile ilişkili bir protein olan Rad51 ile de fiziksel bir interaksiyonun olduğu gösterilmiştir [Smith et al., 2017].

4.3. DEK'in DNA Tamirindeki Rollerini

Yapılan bir çalışmada *DEK* geni susturulan kanser hücrelerinin DNA hasarına yol açan ajanlara karşı hassasiyet göstermesi ve DNA hasarının göstergesi olarak γ H2AX ve FANCD2 ifadesinin ortaya çıkması, DEK proteininin DNA tamirinde rolü olabileceğini düşündürmüştür [Kappes et al., 2008], [Khodadoust et al., 2009]. Bunun üzerine DEK ifadesi kapatılmış (knockout) fare embryonik fibroblast hücrelerinde yapılan deneylerde de benzer sonuçlar görülmüş ve bu hücrelerde NHEJ mekanizması sorunlu olan hücre profili gözlemlenmiştir. Bu sonuçlara dayanarak, DEK ve DNA hasarı sinyal yolağı arasında bir bağlantı olduğu ve DEK'in DNA tamirine katkı sağladığı ileri sürülmüştür [Kavanaugh et al., 2011]. Ayrıca DEK'in DNA replikasyon stresini azalttığı gösterilmiştir [Deutzmann et al., 2015]. Bu bulgularla birlikte IR yoluyla oluşan DNA çift zincir kırıklarınının HR yoluyla tamirinde DEK'in γ H2AX aktivasyonunda gerekli olduğu ve aynı zamanda HR'de görevli bir protein olan Rad51 ile de fiziksel olarak interaksiyonda bulunduğu gösterilmiştir (Şekil 4.2) [Smith et al., 2017].



Şekil 4.2: DEK'in DNA'nın HR yoluyla onarımında hangi basamaklarda rol alabileceğinin şematik olarak gösterilmesi.

4.4. DEK İzoformları

DEK genin alternatif kırılma yoluyla oluşturulan tanımlanmış iki farklı transkript varyantı bulunmaktadır. Bu transkript varyantlarından ilki *DEK* geninde bulunan tüm ekzonları içeren transkript varyant 1'in ifadesiyle 375 aminoasit uzunluğunda DEK1 üretilir. Alternatif kırılma ile oluşan transkript varyant 2, transkript varyant 1'de bulunan 3. ekzon bakımından yoksundur ve bu varyantın ifadesi sonucu üretilen DEK2, DEK1'de bulunan 49-82 arasında aminoasit dizisini içermeyen 341 aminoasit uzunluğundadır [Web 4, 2022].

Literatürde DEK ile ilişkili çalışmaların büyük çoğunluğu DEK1 ile yapılmış çalışmalardır, ancak Le Yu ve ark. yaptığı çalışmada hem DEK1'in hem de DEK2'nin hepatoselüler karsinoma hücrelerinin göçünü arttırdığı gösterilmiştir [Hashimoto et al., 2016].

5. MATERYAL

Tablo 5.1: Hücre hatları.

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

Tablo 5.2: Bakteri suşları.

Ürün	Katalog Numarası	Firma
<i>Escherichia coli</i> DH5 α		Dr. Merve Tuzlakoğlu Öztürk

Tablo 5.3: Plazmitler.

Ürün	Katalog Numarası	Firma
MIGR1		Dr. Gerard Grosveld
Retroviral Paketleme Plazmitleri		Dr. Gerard Grosveld
pGFP-C-shLenti-shDEK	TL313507	Origene
Lentiviral Paketleme Plazmitleri		Dr. Gerard Grosveld
MIGR1-FlagDEK1		
MIGR1-MycDEK1		
MIGR1-FlagDEK2		
MIGR1-MycDEK2		

Tablo 5.4: Primerler.

Ürün	Primer Dizisi
Flag-Tag-Forward	ATGGACTACAAAGACGATGACGACAAGTCCGCCTCGGCCCTG
Myc-Tag-Forward	ATGGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGTCCGCCTCGGCCCTGCTG
DEK-Full-Length-Reverse	TCAAGAAATTAGCTCTTTTACAG
Site-Direct-DEK2-Forward	GGAGGAAAAAGGAAAGGGGCAGAACTTTGTGA
Site-Direct-DEK2-Reverse	GCCCCTTTCCTTTTTCTCCTCCTCCTCCTCCT
DEK1-Forward	GTCTCATCGTGGAAGGCAAG
DEK1-Reverse	GTGCCTGGCCTGTTGTAAAG
DEK2-Forward	TCCGAGAAAGAACCCGAAAT
DEK2-Forward-2	ATGTCCGCCTCGGCCCTG
DEK2-Reverse	CTGCCCTTTCCTTTTTCT
GAPDH-Forward	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC
GAPDH-Reverse	GAAGATGGTGATGGGATTC

Tablo 5.5: Restriksiyon enzimleri.

Ürün	Katalog Numarası	Firma
EcoRI	R3101S	New England Biolabs
PacI	R0547S	New England Biolabs
rSAP	M0371S	New England Biolabs

Tablo 5.6: Antikorlar.

Ürün	Katalog Numarası	Firma
Mouse α -human DEK	610948	BD
Mouse α -Flag M2	F1804	Sigma-Aldrich
Mouse α -Flag M2	8146	Cell Signalling Technologies
Mouse α -Myc	2276	Cell Signalling Technologies
Rabbit α -Myc	2278	Cell Signalling Technologies
Rabbit α -human γ H2AX	2577	Cell Signalling Technologies
Rabbit α -human GAPDH	5174	Cell Signalling Technologies
Mouse α -human NPM1	32-5200	Invitrogen
Goat α -mouse Alexa Flour 555	4409	Cell Signalling Technologies
Goat α -rabbit Alexa Flour 555	4413	Cell Signalling Technologies
Goat α -mouse Alexa Flour 647	4410	Cell Signalling Technologies
Goat α -mouse HRP-linked	7076	Cell Signalling Technologies
Goat α -rabbit HRP-linked	7074	Cell Signalling Technologies

Tablo 5.7: Kimyasallar.

Ürün	Katalog Numarası	Firma
Agaroz	35-1010	peqGOLD
Amfisilin	A0166	Sigma-Aldrich
Kanamisin	K0254	Sigma-Aldrich
Pepton	4122592	Biolife
Maya Ekstraktı	4122202	Biolife
Agar (Bakteriyolojik)	4110302	Biolife
RPMI 1640 Medium	52400025	Gibco
DMEM	41966029	Gibco
PBS	15140122	Gibco
FBS	10270106	Gibco
Trypsin	25300054	Gibco
DMSO	BP231-100	Fisher
EDTA	E5134-500G	Sigma-Aldrich
Tryphan Blue	T10282	Invitrogen
Penisilin/Streptomisin	15140122	Gibco

Tablo 5.7: Devam.

Ürün	Katalog Numarası	Firma
Polybrene	H-9268	Sigma-Aldrich
Puromisin	540411	Sigma-Aldrich
Doksozobisin	D1515	Sigma-Aldrich
TriPure Isolation Reagent	1667157001	Roche
RedSafe	21141	Intron
Kloroform	24216-2.5L-R	Sigma-Aldrich
2-propanol	109634	Merck
Etanol	9200525000	Isolab
Gene Ruler 100bp	SM0321	Thermo Scientific
Gene Ruler 1kb	SM0311	Thermo Scientific
Metanol	106009	Merck
NaCl	S7653-250G	Sigma-Aldrich
Tris Base	T1503-1KG	Sigma-Aldrich
NP-40	A1694,0250	AppliChem
Sodium Deoxycholate	D6750-10G	Sigma-Aldrich
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	L3771-100G	Sigma-Aldrich
Protease/Phosphatase Inhibitor	78440	Thermo Scientific
LDS Sample Buffer	B0008	Invitrogen
Reducing Agent	B0009	Invitrogen
%40 Akrilamid	1248ML500	Neofroxx
Ammonium Peroxodisulfate (APS)	1012010500	Merck
TEMED	8027ML100	Merck
PageRuler	26619	Thermo Scientific
Yürütme Solüsyonu (10X)	161-0732	Biorad
Glisin	A1067	AppliChem
Tris Buffered Saline (TBS)	1706435	Biorad
Tween-20	P9416-50ML	Sigma Aldrich
BSA	A2153-10G	Sigma-Aldrich
Yağsız Süt Tozu	A0830	AppliChem
Parafomaldehid (PFA)	P6148-1KG	Sigma-Aldrich
Triton 100-X	T8787-100ML	Sigma-Aldrich
VectaShield Mounting Medium	H-1200	Vector Laboratories
Beta-mercaptoethanol	A1108.0100	AppliChem
ECL	32132	Thermo Scientific
ECL	K-12045-D50	Advansta

Tablo 5.8: Kitler.

Ürün	Katalog Numarası	Firma
High Capacity cDNA Reverse Transcription	4368814	Applied Biosystems
GoTag Green Master Mix	M7122	Promega
PfuUltra II Fusion DNA Polymerase	600670	Agilent
Power SYBRGreen PCR MasterMix	4368706	Applied Biosystems
ProFection® Mammalian Transfection System	E1200	Promega
Pierce BCA Protein Assingment	23227	Thermo Scientific



Tablo 5.9: Sarf, plastik ve cam malzemeler.

Ürün	Katalog Numarası	Firma
96 kuyulu reaksiyon plakası (qPCR)	4346907	Applied Biosystems
Yapışkan Film	4306311	Applied Biosystems
6 kuyulu plaka	92006	TPP
Petri (100×20 mm)	93100	TPP
Filtre/Cell Strainer (40µm)	352340	BD
Flask 25/75/150 cm ²	90026/90076/90151	TPP
Thoma Lamı	I.075.03.002	Isolab
Lam SuperFrost® Menzel	10118091	Thermo Scientific
Lamel (22x22m)	075.00.003	Isolab
Countes Slides	NE-EVS-50	Nanoentek
Mr. Frosty	5100-0001	Nalgene
Kriyoboks	616001	NEST
Kriyotüp	607101	NEST
Falkon 15ml / 50ml	510015 / 510050	Capp
Şırınga ucu filtre (0.45 µm)	99745	TPP
Şırınga ucu filtre (0.22 µm)	99722	TPP
Ependorf Tüp 0,6 ml /1,5 ml	MCT-060-C/150-C	Axygen
Ependorf Tüp (PCR 0,2 ml)	PCR-02-C	Axygen
Pipet ucu (1000 µl)	5130150	Capp
Pipet ucu (200 µl)	5030090	Capp
Pipet ucu (20 µl)	315016	NEST
Pipet ucu (10 µl)	314016	NEST
Serolojik Pipet	SP-05/10/25/50-C	Capp
Parafilm	058.01.001	Isolab
Hazır Western Blot Jeli	456-1034	Biorad
Nitroselüloz Membran	1620112	Biorad
PVDF Membran	1620177	Biorad
Parafilm	058.01.001	Biorad

Tablo 5.10: Cihazlar.

Ürün	Katalog Numarası	Firma
Konfokal Mikroskop	LSM 880	Zeiss
Canlı Hücre Görüntüleme ve Floresan Mikroskop	DMI8	Leica
ZOE Floresan Hücre Görüntüleyici	1450031	Biorad
One Step Plus Real-Time PCR	4376600	Applied Biosystems
FACS Jazz	655487	BD
Flow Cytometry	Accuri C6 Plus	BD
Thermal Cycler	Trio 48	Biometra
Chemidoc Imaging Systems	c600	Azure
Chemidoc XRS+ Imaging Systems	721BR04545	Biorad
Transblot Tranfer Sistemi	1704150	Biorad
Çalkalayıcı	S2025-B-230V	Labnet International
Çalkalayıcı	RS-60	Biosan
Heat blok	BSH1002-E	Benchmark
Multi rötor	Multi RS-60	Biosan
CO2 İnkübatör	HF90	Heal Force
Laminar Akım Kültür Kabini	Puricube 1200	Cryste
Su banyosu	0400702135J036	Wisd Lab. Ins.
Nanodrop	NanoDrop Lite	Thermo Scientific
Etüv	466-3510	VWR
Varioskan	3001-1571	Thermo Scientific
Floresan mikroskop	Eclipse Ti-S	Nikon
Sıvı azot tankı	LS4800	Taylor Wharton
Inverted mikroskop	Eclipse TS100	Nikon
Ters Floresan mikroskobu	Eclipse 80i	Nikon
Işık mikroskobu	Eclipse, E100	Nikon
Mikro pipet	F167300	Gilson
Pipetör	PA-100	Capp
Vorteks	62203001	Isolab
Mikro Santrifüj	1-14	Sigma
Soğutmalı Falcon Santrifüj	NF 400R	Nüve
Ependorf Santrifüj Cihazı	1-14	Sigma
Soğutmalı Ependorf Santrifüj Cihazı	CT-15RE	Hitachi
Sonikasyon Cihazı	B450	Branson
Hassas terazi	I.602.32.001	Isolab

Tablo 5.11: 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 (250 ml)	36g Glisin, 7.55g Trizma Base 250 ml ddH ₂ O içinde çözüldü
Yürütme Jeli (%12 / 5 ml)	%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), ddH ₂ O (2,1 ml)
Ayrırma Jeli (%4 / 5 ml)	%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), ddH ₂ O (3,1 ml)
Dondurma Solüsyonu	%10 DMSO, %90 FBS
50X Tris-acetate-EDTA (TAE) (1L)	242g Tris, 37.2g EDTA, 57.1 ml Glacial Asetik Asit 1L ddH ₂ O içinde çözüldü
Luria-Bertani (LB) besiyeri (500 ml)	5g NaCl, 5g pepton ve 2,5g maya ekstraktı 500 ml ddH ₂ O içinde çözüldü
LB Agar (250 ml)	2,5g NaCl, 2,5g pepton, 1,25g maya ekstraktı ve 3,75g bacto agar 250 ml ddH ₂ O içinde çözüldü
Gliserol (%80 / 50 ml)	40 ml %100 gliserole 10 ml ddH ₂ O eklendi
0,5M PIPES (pH:6,7 / 10 ml)	1,51g PIPES 250 ml ddH ₂ O içinde çözüldü *pH 5M KOH ile ayarlandı
Inoue Tamponu (100 ml)	2 ml 0.5 M PIPES (pH 6.7), 1,088g MnCl ₂ .4H ₂ O, 0,22g CaCl ₂ .2H ₂ O ve 1.865g KCl 100 ml ddH ₂ O içinde çözüldü
TBS-T (% 0,1 / 1L)	1 ml Tween-20 1L TBS içinde çözüldü
DPBS-T (%1 / 100 ml)	1 ml Triton-X 100 ml DPBS içinde çözüldü
1.5 M Tris-HCl (pH:6,8/8,8) (50 ml)	9.085 g Tris 50 ml ddH ₂ O içinde çözüldü
APS (% 10 / 1m)	0.1 g amonyum persülfat 1 ml ddH ₂ O içinde çözüldü
Strip Tamponu (pH: 2,2 / 200 ml)	3g glisin, 0,2g SDS ve 2 ml Tween-20 200 ml ddH ₂ O içinde çözüldü
Bloklama Sol. (WB) (%5 / 50 ml)	2,5 g BSA 50 ml TBS-T içinde çözüldü
Bloklama Sol. (IF) (%2 / 50 ml)	1 g BSA 50 ml PBS-T içinde çözüldü

6. YÖNTEM

6.1. Hücre Kültürü

Tez çalışmasında insan epitelyal embriyonik böbrek 293T hücre hattı ve insan kemik iliği stroma HS-27A hücre hattı kullanılmıştır. 293T hücre hattı, %10 FBS ve %1 penicillin/streptomycin içeren DMEM besiyeri içinde 37 °C sıcaklık ve %5 CO₂ sağlayan inkübatörde kültüre edildi. HS-27A hücreleri ise aynı koşullarda RPMI 8226 besiyeri kullanılarak kültüre edildi. Hücreler %80-90 civarında yoğunluğa ulaştıklarında alt kültürlenme ile kültürün devam etmesi sağlandı. Uzun süreli saklama için hücreler uygun sayı ve hacimde %10 DMSO içeren FBS ile çözüldü ve kriyotüplere aktarıldı. Kriyotüpler isopropanol içeren hücre dondurma kabına alınarak -80 °C'de bir gün bekletildi ve sonrasında sıvı azot tankında depolandı. Saklama sonrasında tekrar kullanılmak istenen hücreler sıvı azot tankından alınarak çözdürüldü ve 15 ml'lik falkon tüpe aktarıldı. Hücrelerin üzerine yavaş yavaş 20 ml taze besiyeri eklendi ve 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilip DMSO'lu besiyeri uzaklaştırıldı. Hücre pelleti taze besiyeri ile çözüldü ve yukarıda anlatıldığı şekilde kültüre edildi.

6.2. Total RNA İzolasyonu

Hücre kültüründe çoğaltılan hücrelerden total RNA izolasyonu yapıldı. Bunun için, $1,5 \times 10^6$ canlı hücre toplanarak 1000 rpm'de 10 dakika +4 °C'de santrifüj edildi. Hücreler 5 ml soğuk DPBS ile yıkandıktan sonra pellet 1ml Trizol ile karıştırılıp 1,5 ml'lik ependorf tüplere alındı. Tüplere 0,2 ml kloroform eklenerek yaklaşık 3 dakika oda sıcaklığında bekletildi ve 14000 rpm'de 15 dakika +4 °C'de santrifüj edildi. Tüplerde oluşan 3 katmandan üstteki şeffaf katman yeni tüplere aktarıldı ve üzerine 0,5 ml %100'lük isopropanol eklenerek 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Örnekler 14000 rpm'de 10 dakika +4 °C'de santrifüj edildi ve ardından pellet 2 kez %75'lik etanol ile yıkandı. Etanolün tamamen uzaklaşması için oda sıcaklığında kurutulan pelletin üzerine 30 µl RNase içermeyen su eklenerek homojenize edildi. Örneklerin konsantrasyonu Nonodrop ile ölçüldü ve A260/A230 oranının da yaklaşık 2 olduğu tespit edildi. Bu örnekler daha sonra kullanılmak üzere -80 °C'de saklandı.

6.3. cDNA Sentezi

Total RNA izolasyonu sonrası 500 ng RNA örneği, High capacity cDNA Reverse Transcriptase Kiti ve önerdiği yöntem kullanılarak cDNA'ya çevrildi. Reaksiyon için 25 °C'de 10 dakika, 37 °C'de 120 dakika ve 85 °C'de 5 dakika termal döngü koşulları kullanıldı. Reaksiyon sonrasında cDNA örnekleri -20 °C'de saklandı.

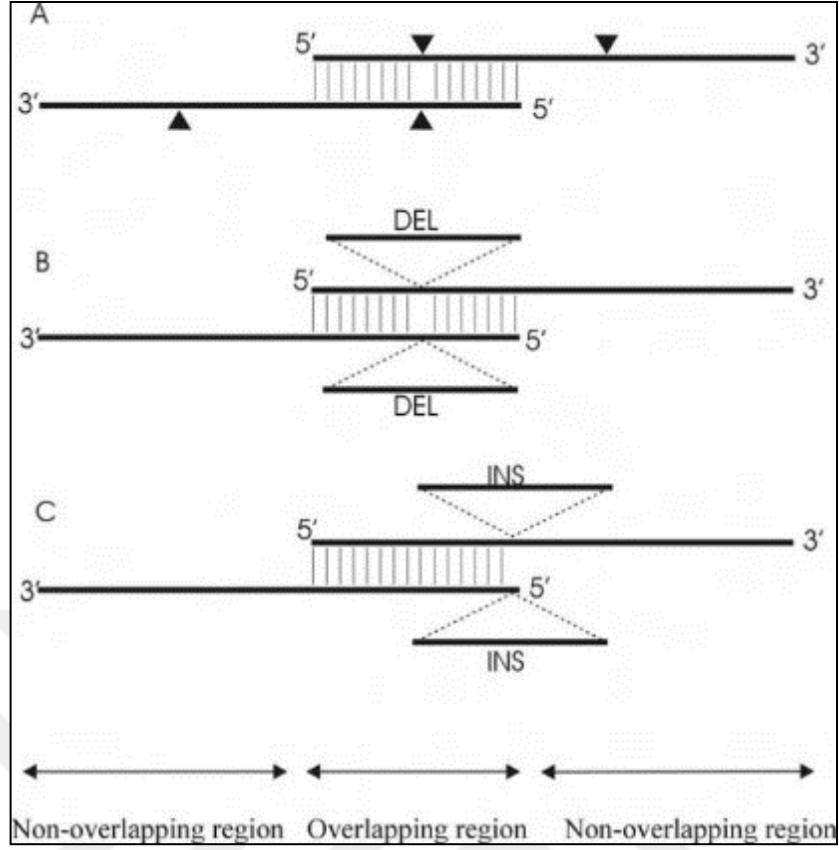
6.4. Agaroz Jel Elektroforezi

DNA ve RNA örneklerini görüntülemek için agaroz jel elektroforezi yöntemi kullanıldı. Bunun için, kullanılacak yürütme tankının hacmine ve jelin yüzdesine (%1-3) göre gerekli agaroz miktarı 1X TAE tamponu içerisinde mikrodalga fırında eritildi. Hazırlanan jele 1X olacak şekilde 20000X RedSafe nükleik asit boyama solüsyonundan eklendi ve yürütme tankına döküldü. Jel donduktan sonra örnekler eşit miktarda jele yüklenip 1X TAE tamponu içerisinde uygun elektrik akımı ve sürede yürütülerek görüntüledi.

6.5. DEK1 ve DEK2 İzofomlarının Klonlanması

6.5.1. Primer Tasarımı

MIGR1 vektörüne klonlanan DEK1 ve DEK2 izofomlarının hücrelerde protein ekspresyonu sonrasında farklı antikorlar ile ayırt edilebilmesi için izofomların N-terminal bölgelerine Flag veya Myc epitoplarının eklenmesi hedeflendi. Bu amaçla, DEK cDNA dizisinin tamamını (full-length) N-terminal bölgesinde Flag veya Myc epitop dizisini de içerecek şekilde PCR ile çoğaltacak uygun primerler tasarlandı. Ayrıca, yönlendirilmiş mutagenез yöntemi ile DEK2 cDNA dizisinde delesyona uğrayan kısmı DEK1 cDNA dizisinden çıkaracak ve ligasyonu kolaylaştırmak amacıyla üst üste çakışacak (overlap) primerler tasarlandı (Şekil 6.1) [Liu and Naismith, 2008].



Şekil 6.1: Nokta, delesyon ve insersiyon mutasyonu için primer tasarımı stratejisinin şematik gösterimi.

Primerlerin kalite kontrolü için MFEprimer-3.1 programı kullanıldı. Kullanılan primerler ve dizileri materyal kısmında Tablo 5.4'te verilmiştir.

6.5.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

DEK1 izoformunun N-terminal bölgesine Flag veya Myc epitopu ekli (FlagDEK1/MycDEK1) klonların oluşturulması için önceden tasarlanan uygun primerlerle PCR yapıldı. FlagDEK1 ve MycDEK1'in çoğaltıldığı PCR reaksiyonda kalıp olarak HS-27A hücrelerinden elde edilen cDNA'lar kullanıldı. Kullanılan PCR karışımları ve uygulanan PCR koşulları Tablo 6.1'de belirtilmiştir.

Tablo 6.1: FlagDEK1 ve MycDEK1 PCR karışımları ve koşulları.

PCR Karışımı		PCR Koşulları		
Kimyasal	Miktar	Sıcaklık	Süre	Döngü
dH ₂ O	38,15 µl	95 °C	3 dk	1
10X Pfu Buffer	5,00 µl	95 °C 50 °C 72 °C	1 dk	40
dNTPs (10 mM each)	1,25 µl		1 dk	
Flag-Tag/Myc-Tag Forward Primer (10 µM)	0,80 µl		1 dk 30 sn	
DEK Full-Length Reverse Primer (10 µM)	0,80 µl	72 °C	10 dk	1
Pfu Polymerase	1,00 µl			
cDNA	3,00 µl			

6.5.3. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması

PCR ile çoğaltılan FlagDEK1 ve MycDEK1 cDNA'ları sonraki basamaklarda kullanılmak üzere PCR Clean-Up kiti ve önerdiği yöntem kullanılarak saflaştırıldı.

6.5.4. PCR Ürünlerinin pGEM-T Easy Vektörüne Yerleştirilmesi

PCR sonucu elde edilen FlagDEK1 ve MycDEK1 cDNA'larının ekspresyon vektörüne klonlanmadan önce aracı bir vektör olan ve birçok ekspresyon vektörüne alt klonlama yapmak için uygun restriksiyon enzim kesim bölgelerine sahip olan pGEM-T Easy vektörüne klonlanması kararlaştırıldı. pGEM-T Easy vektörünün özelliği olan TA klonlama yapılması amacıyla, öncelikle PCR ürünlerinin 3' ucuna Adenin (A) bazı eklendi. Bu aşamadan sonra, A bazı eklenmiş PCR ürünleri pGEM-T Easy vektörü ile ligasyon reaksiyonuna bırakıldı.

6.5.5. PCR Ürünlerinin 3'Ucuna A Bazı Eklenmesi

PCR deneylerinde kullanılan Pfu Polymerase enziminin çoğaltılan PCR ürünlerinin 3'ucuna A bazı ekleme özelliği olmadığından, PCR sonucu elde edilen FlagDEK1 ve MycDEK1 cDNA'ları saflaştırılıp A bazı ekleme reaksiyonu kuruldu. PCR ürünlerine A bazı eklemek için 200-300 ng saflaştırılmış PCR ürünü ile 5µl 2X GoTaq® Green Master Mix solüsyonu ve gerekli miktarda dH₂O kullanılarak 10 µl karışım hazırlandı ve 70°C'de 30 dakika inkübe edildi.

6.5.6. Ligasyon

PCR Ürünlerine A bazı eklendikten sonra karışımın 2 µl'si ligasyon reaksiyonu için kullanıldı. Ligasyon reaksiyonu pGEM-T Easy Vector System I kitinin önerisine göre Tablo 6.2'deki gibi kuruldu. Ligasyon reaksiyonları 4°C'de gece boyu inkübasyona bırakıldı.

Tablo 6.2: pGEM-T Easy vektörü ve PCR ürünlerinin ligasyonu için kullanılan reaksiyon karışımı.

Kimyasal	Miktar (Örnek / Pozitif Kontrol / Negatif Kontrol)
2X Rapid Ligasyon Tamponu	5 µl
Vektör (pGEM-T Easy)	1 µl (50 ng)
T4 Ligaz	1 µl (3 units)
Insert DNA (FlagDEK1 veya MycDEK1 / Pozitif Kontrol / Negatif Kontrol)	2 µl (40-60 ng) / 1µl (4 ng) /-----
dH ₂ O	10 µl'ye tamamlanır

6.5.7. Kompetan Hücre Hazırlanması

Donmuş haldeki stoklanmış *Escherichia coli* DH5α suşu çözdüldü ve 2 adet 3 ml'lik Luria-Bertani sıvı besiyerine (LB) 100'er µl aktararak gece boyu çalkalamaya bırakıldı. Ardından bakteri solüsyonları birleştirildi ve 5 ml'si 500 ml LB'ye inoküle

edilerek yaklaşık 3 saat 37 °C'de çalkalamaya bırakıldı. Bu süre içinde yarım saatte bir optik yoğunluk (OD) değeri ölçüldü ve bu değer 0,55'e ulaştığında inkübasyon sonlandırıldı. Sonrasında 20 dakika kadar oda sıcaklığında bekletilen bakteriler 4000 rpm'de 13 dakika +4 °C'de santrifüj edildi. Bu aşamadan sonra çalışmalar buz üzerinde gerçekleştirildi. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet 80 ml Inoue Buffer ile çözüldü. Bakteri solüsyonu tekrar 4000 rpm'de 10 dakika +4 °C'de santrifüj edildi ve supernatant yeniden uzaklaştırıldı. Kalan pelletler toplamda 40 ml Inoue Buffer ile çözüldü ve üzerine 3 ml DMSO eklendi. Elde edilen bakterili karışım 500 µl olacak şekilde ependorflara dağıtıldıktan sonra sıvı azotta ani donması sağlandı ve sonra kullanılmak üzere -80 °C'ye kaldırıldı.

6.5.8. Transformasyon

Ligasyon ürünleri gece boyu inkübasyon sonrası *E. coli* DH5α kompetan bakteri suşuna transformasyon yöntemiyle aktarıldı. 10 µl'lik ligasyon ürünü ikiye bölünerek her bir örneğin üzerine 50 µl kompetan bakteri eklendi. Karışım 30 dakika buz üzerinde bekletildikten sonra 42 °C'de 2 dakika ısı şokuna maruz bırakılıp tekrar 5 dakika buz üstünde bekletildi. Daha sonra karışımın üzerine 1 ml LB eklendi ve 37 °C'de 1 saat çalkalanarak bakteriler çoğaltıldı. Son olarak çoğalan bakteriler ampisillin, IPTG ve X-Gal içeren LB agar üzerine yayma yöntemiyle ekilerek gece boyu 37 °C'de koloni oluşturmaları beklendi. Oluşan kolonilerden bir miktarı seçilerek 3 ml antibiyotikli (ampisillin) LB içine alınarak 37 °C'de gece boyu çoğalması beklendi.

6.5.9. Bakterilerden Stok Alınması

Transformasyon sonrasında LB içinde çoğalan bakteriler daha sonra kullanılmak amacıyla stoklandı. Bakterileri stoklamak için, 625 µl bakteri örneği alınarak 375 µl %80 gliserol ile karıştırılıp kriyotüplere aktarıldıktan sonra -80 °C'de saklandı.

6.5.10. Bakteri Stoklarının Yeniden oğaltılması

Stok bakterileri çoğaltmak amacıyla, -80 °C’de saklanan bakterilerden steril çubuklar ile kazıma yöntemiyle uygun miktarda alınıp 3 ml antibiyotikli (ampicillin) LB içinde çözdürülerek 37 °C’de gece boyu çoğaltıldı. Kkl plazmit izolasyonu için bu miktarda bakteri kullanıldı. Ortalekli plazmit izolasyonu için ise 3 ml LB’de çoğaltılan bakteriler 150 ml LB içine aktarılarak bir gece daha 37 °C’de gece boyu çoğaltıldı.

6.5.11. Plazmit İzolasyonu

LB içerisinde çoğaltılan bakterilerden kkl plazmit izolasyonu için NucleoSpin® Plasmid kiti, ortalekli plazmit izolasyonu için NucleoBond Xtra Midi EF kiti venerdiği yöntem kullanılarak plazmit izolasyonu yapıldı.

6.5.12. Restriksiyon Enzim Kesimi

İzole edilen plazmitlerde istenilen cDNA dizilerinin varlığı, EcoRI restriksiyon enzim kesimi ile tespit edildi. Restriksiyon enzim kesimi için; 1 µg plazmit DNA, 1 µl (20nite/µl) EcoRI enzimi, 3 µl 10X CutSmart Buffer kullanılarak elde edilen karışım dH₂O ile 30 µl’ye tamamlandı ve 37 °C ’de 30 dakika inkübe edildi. Sonrasında bu karışıma 6 µl 6X yükleme boyası eklenerek reaksiyonun durması sağlandı. Elde edilen karışımdan 10 µl’lik kısmı %1’lik agaroz jele yüklenerek yürütüldü ve görüntülendi.

6.5.13. DNA Dizi Analizi

Restriksiyon enzimi ile kesilen plazmitlerde istenilen cDNA dizisinin varlığı tespit edildikten sonra bu plazmitlerin ticari firmalar aracılığıyla dizilenmesi sağlandı. DNA sekanslaması yaptırılan plazmitlerden gelen sonuçlar FinchTV ve BioEdit Sequence Alignment Editor programları kullanılarak analiz edildi.

6.5.14. Yönlendirilmiş Mutagenез

Yönlendirilmiş mutagenезde FlagDEK1 ve MycDEK1 cDNA'larını içeren vektörler (pMIGR1-FlagDEK1/pMIGR1-MycDEK1) kalıp olarak kullanıldı. Uygun primerler kullanılarak PCR ile DEK2'de bulunmayan kısım delesyona uğratıldı. Böylece FlagDEK2 ve MycDEK2 cDNA'larını içeren vektörler (pMIGR1-FlagDEK2/pMIGR1-MycDEK2) elde edildi. Yönlendirilmiş mutagenез için optimize edilen PCR karışımları ve koşulları Tablo 6.3'te belirtilmiştir.

Tablo 6.3: Yönlendirilmiş Mutagenез için kullanılan PCR karışımları ve koşulları.

PCR Karışımı		PCR Koşulları		
Kimyasal	Miktar	Sıcaklık	Süre	Döngü
dH ₂ O	19 µl	95 °C	5 dk	1
10X Pfu Buffer	2,5 µl	55 °C	1 dk	18
dNTPs (10 mM each)	1 µl	68 °C	5-10 dk	
Site-Direct-DEK2-Forward (10 µM)	0,5 µl	95 °C	1 dk	
Site-Direct-DEK2-Reverse (10 µM)		68 °C	10 dk	1
Pfu Polymerase				
pMIGR1-FlagDEK1 / pMIGR1-MycDEK1 (20 ng)	0,5 µl			

PCR reaksiyonu sonrasında, kalıp olarak kullanılan stabilitesi yüksek vektörler, yönlendirilmiş mutagenез ile elde edilen plazmitlerin transformasyonunu negatif etkilememesi için DpnI restriksiyon enzimi ile kesilerek degrades edildi. Bunun için; 20 µl PCR ürününe 5 µl CutSmart Buffer ve 1 µl DpnI enzimi eklenerek karışım 37 °C'de 2 saat inkübe edildi. Sonrasında bu karışıma 2 µl 10X T4 Ligaz Buffer ve 1 µl T4 Ligaz enzimi eklenerek 16 °C'de gece boyu ligasyona bırakıldı. Ligasyon sonrası önceden bahsedildiği şekilde transformasyon, plazmit izolasyonu ve restriksiyon enzim kesimi deneyleri uygulandıktan sonra içinde istenilen cDNA dizisini bulduran plazmitlerin sekans analizi yapıldı.

6.5.15. Alt Klonlama

PCR ve yönlendirilmiş mutagenез deneyleri sonunda pGEM-T Easy veya MIGR1 vektörüne klonlanan ve sekans analizi sonrası DNA dizileri doğrulanan FlagDEK1, MycDEK1, FlagDEK2 ve MycDEK2 cDNA'ları hedef genlerin memeli hücrelerinde kalıcı olarak eksprese edilebilmesi için MIGR1 plazmitine alt klonlama ile aktarıldı.

6.5.15.1. Vektörlerin Restriksiyon Enzimi ile Kesilmesi

Alt klonlama yapabilmek için öncelikle boş MIGR1 ve FlagDEK1, MycDEK1, FlagDEK2 ve MycDEK2 cDNA'larını içeren vektörler, iki vektörde de bulunan fakat FlagDEK1, MycDEK1, FlagDEK2 ve MycDEK2 cDNA dizilerinde bulunmayan EcoR1 restriksiyon enzim kesim bölgesinden EcoR1 enzimi ile kesildi. Vektör enzim kesim reaksiyonları Tablo 6.4'teki gibi gerçekleştirildi.

Tablo 6.4: Restriksiyon enzim kesimi reaksiyon karışımları.

Boş MIGR1 EcoR1 kesimi		Hedef cDNA içeren vektör EcoR1 kesimi	
Kimyasal	Miktar	Kimyasal	Miktar
Vektör	1,65 µg	Vektör	4 µg
EcoR1 (20 u/µl)	1 µl	EcoR1 (20 u/µl)	3 µl
10X CutSmart Buffer	5 µl	10X CutSmart Buffer	5 µl
dH ₂ O	50 µl'ye tamamlandı	dH ₂ O	50 µl'ye tamamlandı

37 °C'de 30 dakika bekletilen enzim kesim reaksiyonlarının tamamı önceden bahsedildiği gibi %0,8'lik agaroz jelde yürütüldü.

6.5.15.2. Vektör ve Hedef cDNA'ların Agaroz Jelden İzolasyonu

Restriksiyon enzim kesimi sonrasında doğru boyutlara sahip olan vektör ve hedef cDNA'lar Gel Extraction kiti ve önerdiği yöntemle jelden izole edildi ve nanodrop ile miktarı ölçüldü.

6.5.15.3. Defosforilasyon

Vektör DNA'sı tek enzim ile kesildiğinden self-ligasyon ihtimaline karşı defosforile edildi. Bu işlem için, jelden izole edilen 200 µg MIGR1 vektörü, 2 µl CutSmart Buffer, 1 µl rSAP enzimi ve dH₂O ile 20 µl'lik defosforilasyon reaksiyonu kuruldu. 37 °C'de 30 dakika inkübasyon sonrası rSAP enziminin deaktivasyonu için solüsyon 65 °C'de 15 dakika daha inkübe edildi.

6.5.15.4. Ligasyon

Defosforilasyon sonrası NEBio Calculator™ programı yardımıyla 7:1 oranında hedef cDNA ve vektör DNA miktarları hesaplanarak ligasyon reaksiyonu Tablo 6.5'teki gibi kuruldu.

Tablo 6.5: Alt klonlamada kullanılan ligasyon reaksiyonu karışımları.

	Hedef cDNA	Ligasyon Kontrol
10X T4 DNA Lig.Buf.	2 µl	2 µl
Vektör (MIGR1)	50 ng	50 ng
T4 Ligaz	1 µl	1 µl
Insert DNA	60 ng	-
dH ₂ O	20 µl'ye tamamlandı	20 µl'ye tamamlandı

6.5.16. Hedef cDNA'ların Vektördeki Yönünün Belirlenmesi

Alt klonlamada tek enzim kesimi ile bir vektörden diğerine hedef DNA dizilerinin aktarımı yapıldığında dizilerin yönünün %50 oranında ters olma ihtimali olmaktadır. Bu yüzden MIGR1 vektörüne klonlanan epitop ekli DEK cDNA dizilerin yönünü belirlemek için; elde edilen plazmitler epitop ekli DEK cDNA dizisini ve MIGR1 vektörünü sadece bir bölgeden kesen Pac1 restriksiyon enzimi ile önceden bahsedildiği gibi kesildi ve agaroz jel elektroforezi ile görüntülendi.

Alt klonlama sonrasında da içinde istenilen cDNA dizisini bulunduran plazmitler; pMIGR1-FlagDEK1, pMIGR1-MycDEK1, pMIGR1-FlagDEK1 ve pMIGR1-MycDEK1'in dizileme analizi yapıldı.

6.6. Hücre Hatlarına Gen Transferi

6.6.1. Transfeksiyon

293T hücrelerinin transfeksiyonu için kalsiyum-fosfat yöntemi kullanıldı. Transfeksiyondan bir gün önce 4×10^6 hücre 10 cm'lik petrilere ekildi. Transfeksiyondan 3 saat önce hücrelerin üzerinden eski besiyeri uzaklaştırıldı ve 10 ml taze besiyeri eklendi. Transfekte edilmek istenen plazmitlerden uygun miktarlarda (10-20 μ g) kullanılarak Promega kalsiyum-fosfat transfeksiyon kitinin önerdiği metot uygulandı. Transfeksiyondan 48 saat sonra hücreler ters floresan mikroskopla görüntülenerek transfeksiyonun etkinliği gözlemlendi.

6.6.2. Retroviral Transdüksiyon

Retroviral ekspresyon vektörleri, içerisinde bulunan LTR dizileri sayesinde, virüs infeksiyonu sonrasında hücrelerin genomuna yerleşerek hücre bölünmesi ile oluşan yeni hücrelere de aktarılırlar. Bu sayede retroviral ekspresyon vektörü içerisinde cDNA dizisi bulunan hedef proteinin hücrede kalıcı olarak ifade edilmesi sağlanır.

Retrovirüslerin üretilmesi için 293T hücre hattı kullanıldı. Bu amaçla; 4 μ g Gag/Pol (paketleme plazmiti), 2 μ g VsV-G (paketleme plazmiti) ve 10 μ g hedef

insörtü içeren (GFP Only/FlagDEK1/MycDEK1/FlagDEK2/MycDEK2) MIGR1 plazmitleri ile elde edilen karışım kalsiyum-fosfat yöntemiyle 293T hücrelerine transfekte edildi. Virüs üretimi için yapılan transfeksiyonda inaktive edilmiş FBS (55 °C’de 1 saat) içeren besiyeri kullanıldı. Transfeksiyondan 18 saat sonra hücreler 5 ml 1X DPBS ile iki defa yıkandı ve 5 ml taze besiyeri eklendi. Hücreler 24 saat daha inkübe edildi. İnkübasyon sonunda virüs içeren besiyeri enjektör ile toplanıp 0,45 µm’lik filtreden geçirildikten sonra HS-27A hücrelerinin infeksiyonu için kullanıldı. Ayrıca 293T hücrelerine tekrar taze besiyeri verilerek yeniden virüs üretmesi için 24 saat daha inkübe edildi.

Retrovirüs infeksiyondan bir gün önce 5×10^5 HS-27A hücresi T-25 flasklara ekildi. Ertesi gün hücreler 5 ml 1X DPBS ile yıkandıktan sonra, üzerlerine 8 µg/µl polybrene içeren 5 ml virüslü besiyerinden eklendi. Bu işlem 2 veya 3 gün daha tekrar edilerek infeksiyon oranı artırıldı. Sonrasında hücreler akım sitometrisi (Fluorescence Associated Cell Sorting; FACS) ile ayrıştırılmadan önce kültüre edilerek yeterli miktarda çoğalması sağlandı.

6.6.3. Lentiviral Transdüksiyonla *DEK* İfadesinin Baskılanması

DEK izoformlarının hücre içindeki fonksiyonunu ayrı ayrı anlamak amacıyla, DEK1 ve DEK2’yi ektopik olarak aşırı ifade ettiğimiz HS-27A-FlagDEK1, HS-27A-FlagDEK2 ve kontrol HS-27A-GFP hücreleri, Origene firmasından temin edilen ve DEK mRNA’sının 1000-1028 bazları arasında bulunan “GCCAGTGCTAACTTGGAAGAAGTCACAAT” dizisini hedefleyen pGFP-C-shLenti (shDEK-B) (EK A) lentiviral vektör ile transdükte edildi. Lentivirüslerin oluşturulması için; 6 µg GPI-R (paketleme plazmiti), 2 µg RTR-2 (paketleme plazmiti), 2 µg VSV-G (paketleme plazmiti) ve 10 µg pGFP-C-shLenti (shDEK-B) plazmitleri ile elde edilen karışım kalsiyum-fosfat yöntemiyle 293T hücrelerine transfekte edildi. 6.6.2’de belirtildiği şekilde elde edilen lentivirüsler, hücrelerin infeksiyonu için kullanıldı. Böylece transdüksiyon sonrasında, endojen DEK1 izoformu büyük oranda baskılanmış ancak DEK2 izoformunu aşırı ifade eden hücreler elde edildi.

6.7. Hücrelerin Seçilimi

6.7.1. FACS ile Hücrelerin Ayırıştırılması

MIGR1 plazmiti seçici özellik olarak Green Fluorescent Protein'i (GFP) kodlayan cDNA dizisinde içermektedir. GFP, vektöre klonlanmış olan hedef proteinden plazmitte bulunan Internal Ribosomal Entry Site (IRES) dizisi sayesinde ayrı olarak sentezlenmektedir. MIGR1 retroviral vektörü ile infekte olmuş hücreler GFP ifadesi ile ayırt edilebilmektedir. FACS yöntemi floresan protein işaretli hücreleri ayırıştırmak için sık kullanılan bir yöntemdir.

FACS yöntemi ile GFP pozitif hücrelerin ayırıştırılması amacıyla; infekte olmuş hücreler kültürde çoğaltıldıktan sonra ayırıştırma solüsyonunda (%2 BSA ve 4 mM EDTA içeren DPBS) çözüldü ve filtreden geçirildi. Hücreler FACS cihazından geçirildikten sonra GFP pozitif hücreler donmuş FBS içeren falkon tüp içerisine toplandı. Hücreler DPBS ile yıkandıktan sonra önceden anlatıldığı gibi hücre kültüründe çoğalması sağlandı.

6.7.2. Antibiyotik Seçilimi

Kullanılan lentiviral vektörlerde seçici özellik olarak hem GFP'yi kodlayan cDNA dizisi hem de puromycin antibiyotiği direnç geni bulunmaktadır. Retrovirüs enfeksiyonu sonrası FACS ile GFP pozitif hücreler seçildiğinden pGFP-C-shLenti vektörü bulunan hücrelerin seçilmesi için GFP seçici özellik olarak kullanılmadı. Bu yüzden diğer bir seçici özellik olan puromycin antibiyotik direnci kullanıldı. Bu amaçla öncelikle gerekli antibiyotik dozunun belirlenmesi için kontrol olarak infekte olmamış parental HS-27A hücrelerine besiyeri içerisinde 0.5, 1, 1.5, 2, 3 ve 4 µg/ml konsantrasyonlarında puromycin uygulandı. Hücrelerin 1-1.5 µg/ml dozlarda 7 gün içinde tamamen öldükleri tespit edildi. Bu doz denemesinin ardından pGFP-C-shLenti vektör transdüksiyonu yapılmış hücrelere 1.25 µg/ml puromycin verilerek 10 gün boyunca seçim yapılması sağlandı.

6.8. Revers-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) Analizi

6.8.1. Primer Tasarlanması

Hücrelerde mRNA düzeyinde *DEK* gen ifadesinin seviyesini belirlemek amacıyla RT-PCR yapıldı. Bu amaçla, ilk olarak DEK izoformlarına özgün primer dizileri tasarlandı. Hücrelerde izoform mRNA'ları, olgun olmayan mRNA sentezi sonrası alternatif kırılma yoluyla oluşturulur, bu nedenle mRNA dizisi birbirine benzerlik göstermektedir. DEK2 mRNA'sı DEK1 mRNA'sından ekzon3 bakımından eksiktir. Bu bilgiler doğrultusunda DEK1'e özgün primer ekzon3 (DEK2'de eksik olan ekzon) içerisinde bir bölgeyi hedef alarak tasarlandı. DEK2'ye özgün primer ise DEK1'de birbirinden uzak, fakat DEK2'de birleşmiş olan ekzon2 ve ekzon4'ün birleştiği kısmı hedef alarak tasarlandı. Tasarlanan primerler ve dizileri materyal kısmında Tablo 4'te belirtilmiştir.

6.8.2. Semikantitatif RT-PCR

Hücrelerdeki DEK izoformlarını kodlayan mRNA seviyesini semikantitatif olarak görmek amacıyla bu mRNA'lara özgün olarak tasarlanan primerler ile RT-PCR yapıldı. Ayrıca, primerlerin özgünlüğünün denetlenmesi için pMIGR1-FlagDEK1 ve pMIGR1-FlagDEK2 plazmitleri kalıp olarak kullanılarak PCR yapıldı. PCR reaksiyon karışımları ve PCR koşulları Tablo 6.6'da verilmiştir. PCR sonucu elde edilen DNA örnekler %1'lik agaroz jel elektroforezi görüntülenerek analiz edildi.

Tablo 6.6: Semikantitatif RT-PCR reaksiyon karışımları ve koşulları.

PCR Karışımı (DEK1/DEK2/GAPDH)		PCR Koşulları (DEK1/DEK2/GAPDH)		
Kimyasal	Miktar	Sıcaklık	Süre	Döngü
2X GoTaq Green Master Mix	10 µl	95 °C	3dk	1
Forward Primers (10 µM): DEK1-forward/ DEK2-forward/ GAPDH-forward	0,6 µl	95 °C 57/57/47 °C 72 °C	15/15/30sn 1dk/1dk/ 30sn 30sn	29/33/25
Reverse Primers (10 µM): DEK1-reverse/ DEK2- reverse/ GAPDH- reverse	0,6 µl			
cDNA-Plazmit DNA	2 µl (250 ng µl-0,1 ng/µl)			
dH2O	6,8 µl	72 °C	10dk	1

6.8.3. Kantitatif RT-PCR (RT-qPCR)

Hücrelerdeki DEK izoformlarını kodlayan mRNA seviyesinin kantitatif olarak belirlenmesi amacıyla RT-qPCR deneyi yapıldı. Örnekler 3 tekrarlı olarak çalışıldı. Deneyde kullanılan reaksiyon karışımı ve PCR koşulları Tablo 6.7’de verilmiştir.

Tablo 6.7: Kantitatif RT-PCR (RT-qPCR) reaksiyon karışımları ve koşulları.

PCR Karışımı (DEK1/DEK2/GAPDH)		PCR Koşulları (DEK1/DEK2/GAPDH)		
Kimyasal	Miktar	Sıcaklık	Süre	Döngü
Power SYBRTM Green PCR Master Mix	10 µl	95 °C	3dk	1
Forward Primers (10 µM): DEK1-forward/ DEK2-forward/ GAPDH-forward	0,6 µl	95 °C 57 °C 72 °C	15 sn 30sn 1 dk	45
Reverse Primers (10 µM): DEK1-reverse/ DEK2- reverse/ GAPDH- reverse	0,6 µl			
cDNA	2 µl (250 ng/ µl)			
dH2O	6,8 µl			

RT-qPCR reaksiyonu sonucunda DEK1, DEK2 ve referans olarak kullanılan GAPDH için ayrı elde edilen “Ct (threshold cycle)” değerlerinin aritmetik ortalaması alındı. Sonrasında her bir örnekteki DEK1 veya DEK2 Ct değerinden aynı örneğin GAPDH Ct değeri çıkarılarak ΔCt değeri hesaplandı. Ardından her bir örneğin ΔCt değerinden, kalibratör olarak belirlenen kontrol örneğinin (HS-27A-GFP-shNeg) ΔCt değeri çıkarılarak $\Delta\Delta Ct$ değeri hesaplandı. $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ formülü kullanılarak DEK1 ve DEK2 mRNA seviyesi kalibratöre göre göreceli olarak belirlendi ve kat değişimi olarak hesaplandı.

6.9. Protein İzolasyonu ve Western Blot Yöntemiyle Protein Analizi

6.9.1. Total Protein İzolasyonu ve Miktarının Belirlenmesi

Protein izolasyonu için; kültürde çoğaltılan hücreler toplandı ve 4 °C'de 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı uzaklaştırılıp pellet 10 ml soğuk 1X DPBS'te çözüldü. Bu işlem 1 kez daha tekrarlandı. Sonrasında pellet (4×10^6 hücre için) 150 µl RIPA Tampon ve 1,5 µl 100X Halt™ Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail içeren solüsyon içinde çözüldü. Bu solüsyon 30 saniye arayla 2 kez 15 saniye sonike edildikten sonra 30 dakika buz üstünde bekletildi ve bekleme sırasında birkaç kez vorteks yapıldı. Süre sonunda karışım 4 °C'de 13000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı toplanarak yeni epeforfa alındı. Protein miktarları Pierce BCA Protein Assay kitinin önerdiği metot ile ölçüldü. Örnekler daha sonra kullanılmak üzere -80 °C'de saklandı.

6.9.2. Western Blot

Protein Jel Elektroforezi için %12'lik Bis-Tris Poliakrilamid jel veya %10'luk Biorad TGX Mini Protean hazır jel kullanıldı. Örneklerin her birinden 20-30 µg alınıp 5 µl 4X LDS Sample Buffer ve 2 µl 10X Sample Reducing Agent ile karıştırıldı ve dH₂O ile 20 µl'ye tamamlandı. Hazırlanan örnekler 70° C'de 10 dakika inkübe edildikten sonra jele yüklendi ve Biorad 1X yürütme tamponu içerisinde 100 voltta, yaklaşık 90 dakika yürütüldü. Proteinlerin boyutlarını belirlemek için Thermo protein ladder da örneklerle birlikte yürütüldü.

Proteinleri jelden membrana transfer etmek için nitroselüloz membran kullanıldı. Öncelikle membran 1X Transfer tamponu ile 5 dakika boyunca ıslatılıp aktive edildi. Sonrasında 1X Transfer tamponu ile ıslatılan Watman kağıtları arasına yerleştirilen membran ve jel Bio-Rad TransBlot© Transfer sistemine konuldu ve 25 voltta 25 dakika süreyle transfer işlemi gerçekleştirildi. Transfer sonrası membran 50 ml'lik falkon içerisine konularak 1-2 kez TBS-T ile yıkandıktan sonra 1 saat bloklama solüsyonu içerisinde rötorda çevrildi. Ardından membran 1:1000 oranında bloklama solüsyonu ile sulandırılan primer antikor ile gece boyu +4 °C'de rötorda çevrildi.

Membran oda ısısında 3 kez 5'er dakika TBS-T solüsyonu ile yıkandı ve 3:10000 oranında bloklama solüsyonu ile sulandırılan sekonder antikor ile oda ısısında 1 saat rötorda çevrildi. Tekrar 3 kez 5'er dakika TBS-T solüsyonu ile yıkanan membran kemiluminisan solüsyonu ile muamele edilerek Biorad Chemi Doc XRS+ görüntüleme cihazında Image Lab. 4.0.1 programı kullanılarak görüntülendi.

6.10. Birlikte Çöktürme Yöntemi (Co-IP)

DEK izoformlarının fizyolojik olarak kendileri ve birbirleri ile interaksyonu olup olmadığını anlamak için birlikte çöktürme yöntemi kullanıldı. Bu amaçla, 293T hücrelerinde uygun plazmitler transfekte edildi. Transfeksiyondan 48 saat sonra Active-Motif Co-IP Universal Kitinin önerdiği metot uygulandı. Kısaca hücreler PBS/Inh Buffer ile yıkandıktan sonra kazınarak toplandı. +4 °C'de 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj sonrası pellet 100 µl Complete Whole-Cell Lysis Buffer ile çözülerek buz üstünde 30 dakika bekletildi. Hücre lizatları +4 °C'de 14000g de 10 dakika santrifüj edilerek üst sıvı toplandı ve 2 µl'si input olarak ayrıldı. Kalan kısmına 2 µg Flag antikor ekendi ve Complete Co-IP/Wash Buffer ile toplam hacim 500 µl'ye tamamlandı. Örnekler +4 °C'de 4 saat rötorda çevrildikten sonra 25 µl magnetic bead eklenerek +4 °C'de 1 saat daha rötorda çevrildi. Magnetik beadler magnet yardımıyla 500 µl Complete Co-IP/Wash Buffer ile 4 kez yıkandıktan sonra 20 µl Elution Bufferda çözüldü. Örnekler 70 °C'de 10 dakika ve 95 °C'de 2 dakika bekletildikten sonra tekrar magnete yerleştirildi ve kalan sıvıların hepsi alınarak IP örneği olarak jele yüklendi. Örnekler önceden bölüm 6.9.2.'de anlatıldığı gibi western blot yöntemiyle analiz edildi.

6.11. İmmunofloresan Boyama (IF)

Öncelikle 6 kuyulu plaka içinde önceden steril edilmiş lamel üzerine 2×10^5 hücre ekildi. 24 saat sonra hücreler 1X DPBS ile yıkandı ve %4 paraformaldehit ile oda sıcaklığında 20 dakika fikse edildi. Fiksasyon sonrası 2 kez 1X DPBS ile yıkanan hücreler %0,5 Triton-X içeren 1X DPBS ile 15 dakika boyunca permeabilize edildi. 1X DPBS ile yeniden yıkama sonrasında %2 BSA içeren 1X DPBS ile oda sıcaklığında 1 saat bloklama yapılan hücreler %1 BSA içeren 1X DPBS içerisinde

uygun oranlarda sulandırılmış primer antikor ile gece boyu +4 °C'de çalkalayıcıda inkübe edildi. Ardından %1 BSA içeren 1X DPBS ile yıkanan hücreler, floresan özellikli %1 BSA içeren 1X DPBS ile uygun oranlarda sulandırılmış sekonder antikorla oda sıcaklığında 1 saat bekletildi. Distile su ile 4-5 defa yıkanan hücreler DAPI boyası içeren Vectashield kapama solüsyonu ile lam üzerine kapatıldı. Hücreler iki farklı antikor ile boyanacaksa ilk primer ve sekonder antikor uygulaması sonrasında %4 paraformaldehit ile 5 dakika tekrar fikse edilip oda sıcaklığında 30 dakika bloklandı. Daha sonra hücreler oda sıcaklığında 1 saat ikinci primer antikor ile inkübe edildikten sonra sekonder antikor, yıkama ve kapatma uygulaması yapıldı. Hazırlanan örnekler Zeiss LSM 880 konfokal mikroskopu ile görüntülendi. Elde edilen görüntüler Zeiss Zen 3.0 Blue Edition ve ImageJ programları ile analiz edildi.

6.12. Doksorubisin Uygulaması

Öncelikle DNA Hasarı oluşturulacak hücrelerde kullanılacak Doksorubisin miktarı belirlendi. Bu amaçla, IF kısmında anlatıldığı gibi hücreler 6 kuyulu plakalara ekildi. 24 saat sonra hücrelerin üzerindeki besiyeri 0,2 µM veya 0,05 µM final konsantrasyona sahip doksorubisin içeren besiyeri ile değiştirildi. 24 saatlik doksorubisin uygulamasından sonra hücreler DPBS ile yıkandı ve IF deneyi uygulanarak uygun olan ilaç dozu belirlendi. Uygun olan ilaç dozu belirlendikten sonra yine IF kısmında anlatıldığı gibi hücreler 6 kuyulu plakalara ekildi. 24 saat sonra hücrelerin üzerindeki besiyeri 0,05 µM final konsantrasyona sahip doksorubisin içeren besiyeri ile değiştirildi. 24 saatlik doksorubisin uygulamasından sonra hücreler DPBS ile yıkandı. Bu aşamadan sonra 24 saat DNA hasarı sonrası analiz edilmek istenen hücrelere IF deneyi uygulandı. Hasar sonrası 24 veya 48 saatlik DNA hasarı tamir kapasitesi izlenecek hücrelerin üzerine ise taze besiyeri verilerek bu sürelerde inkübasyona bırakıldı ve sonrasında IF deneyi uygulandı.

Doksorubisin uygulamasının hücrelerdeki DEK1 ve DEK2 ekspresyon seviyesini zaman içinde nasıl etkilediğini anlamak amacıyla hücreler 1,2 milyon/15 ml olacak şekilde T75 flasklara ekildi. Bu hücrelere 0, 6, 12, 18, ve 24 saatlik sürelerle 0,05 µM final konsantrasyonunda doksorubisin uygulaması yapıldıktan sonra önceden anlatıldığı gibi RNA izolasyonu ve cDNA sentezi yapıldı. Bu cDNA'lar kullanılarak RT-qPCR deneyi ile DEK1 ve DEK2 ekspresyon seviyesi belirlendi.

6.13. İstatistiksel Analiz

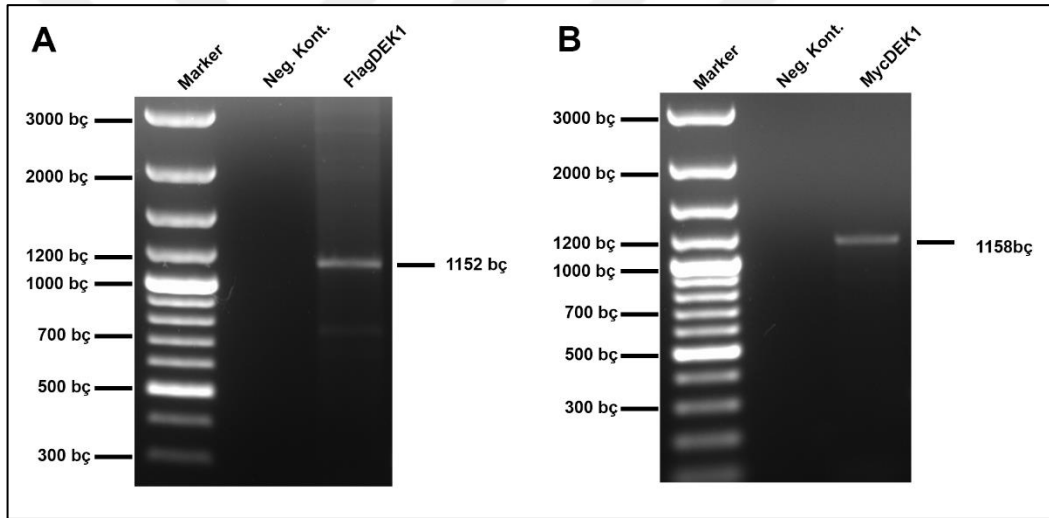
Bütün deneylerden elde edilen sonuçların istatistik analizleri GraphPad Prism 8.0.1 programı kullanılarak yapıldı. Verilerin türüne göre Two-way ANOVA Tukey's multiple comparisons testi veya Paired t-test istatistik analizleri kullanıldı. P değeri 0,05 'in altında olan değerler anlamlı kabul edildi (ns: anlamlı değil; *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001).



7. BULGULAR

7.1. DEK İzoformlarının Klonlanması

Yöntem kısmında belirtildiği gibi DEK1 cDNA'sını çoğaltmak amacıyla yapılan PCR reaksiyonlarında HS-27A hücrelerinden elde edilen cDNA'lar veya MIGR1-DEK plazmiti kalıp olarak kullanıldı. FlagDEK1 cDNA dizisi için “Flag-Tag Forward” ve “DEK Full-Length Reverse”; MycDEK1 dizisi için “Myc-Tag Forward” ve “DEK Full-Length Reverse”; primer çiftleri kullanılarak yapılan PCR sonucu elde edilen DNA fragmentlerinin doğru uzunluklarda olduğu agaroz jel görüntüleri ile tespit edildi (Şekil 7.1).

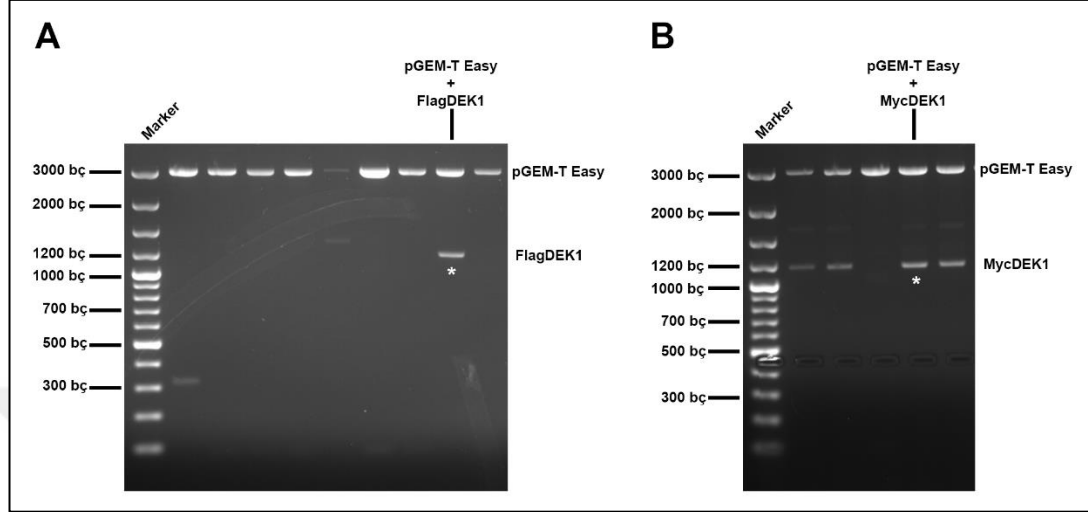


Şekil 7.1: PCR sonucu elde edilen FlagDEK1 ve MycDEK1 cDNA'larının agaroz jel görüntüsü. (A) FlagDEK1 cDNA'sı (1152 bç). (B) MycDEK1 cDNA'sı (1158 bç). Marker; Thermo GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder, Neg.Kont; Negatif Kontrol.

pGEM-T Easy vektörü, TA klonlama özelliğiyle PCR ürünlerini restriksiyon enzimi ile kesmeye ihtiyaç duymadan klonlama yapılabilen ve birçok ekspresyon vektörüne alt klonlama yapmak için uygun restriksiyon enzim kesim bölgelerine sahip bir klonlama vektörüdür. Bu yüzden ilk aşamada elde edilen epitop ekli DEK1 cDNA'larının pGEM-T Easy vektörüne klonlanması kararlaştırıldı.

Bu amaçla, PCR ile çoğaltılan epitop ekli DEK1 cDNA dizileri saflaştırılıp 3' uçlarına A bazı eklendikten sonra pGEM-T Easy vektörüne klonlandı. Elde edilen plazmitler pGEM-T Easy vektörünün çoklu klonlama bölgesinin her iki tarafında da

bulunan EcoRI restriksiyon enzim kesim bölgesinden EcoRI enzimi ile kesilip agaroz jelde yürütüldü. Böylece epitop ekli DEK1 cDNA dizisini içeren plazmitler belirlendi (Şekil 7.2).



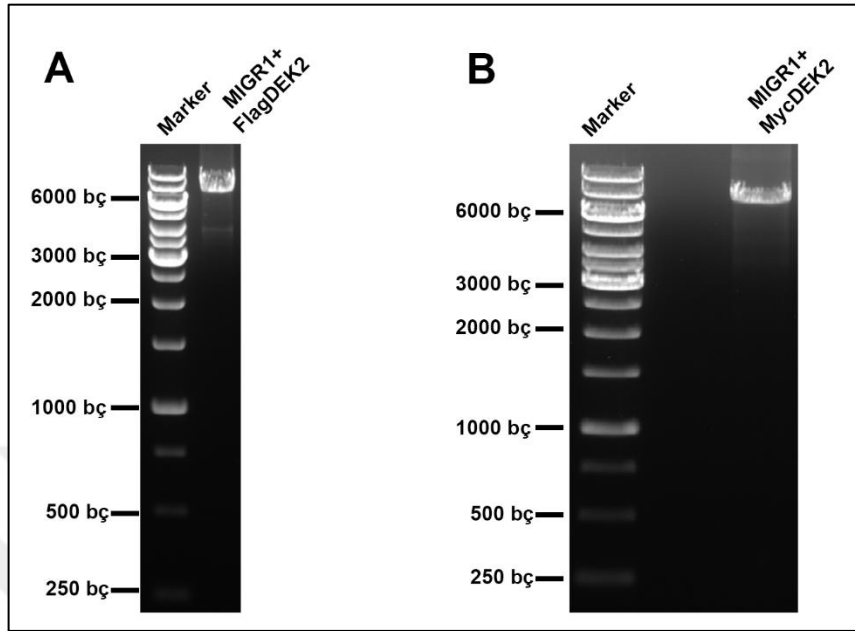
Şekil 7.2: pGEM-T Easy vektörüne klonlanan FlagDEK1 ve MycDEK1 cDNA'larının EcoRI restriksiyon enzimi kesimi sonrası agaroz jel görüntüsü. (A) FlagDEK1 cDNA'sı. (B) MycDEK1 cDNA'sı. Marker; Thermo GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder, *; sekanslamaya gönderilen plazmitler.

EcoRI enzim kesimi sonrası epitop ekli DEK1 cDNA'sını içeren plazmitlerin DNA dizilemesi yaptırıldı. Dizileme sonrası gelen sonuçlar FinchTV ve Bioedit programları kullanılarak analiz edildi. Yapılan analiz sonucunda FlagDEK1 ve MycDEK1 dizileri doğrulandı ve DNA dizisi doğrulanan plazmitler kullanılarak sonraki deneylere devam edildi.

Klonlama deneyleri sırasında HS-27A hücrelerinden elde edilen cDNA'nın kalıp olarak kullanıldığı PCR deneylerinde yeterli miktarda DEK2 cDNA'sı çoğaltılamadı. Bu yüzden DEK2 klonlarını oluşturmak için yönlendirilmiş mutagenез yönteminin kullanılmasına karar verildi. Yönlendirilmiş mutagenез için yapılan PCR deneyinde FlagDEK2 cDNA'sını çoğaltmak için FlagDEK1 cDNA'sını içeren vektör, MycDEK2 cDNA'sını çoğaltmak için MycDEK1 cDNA'sını içeren vektör kalıp olarak kullanıldı.

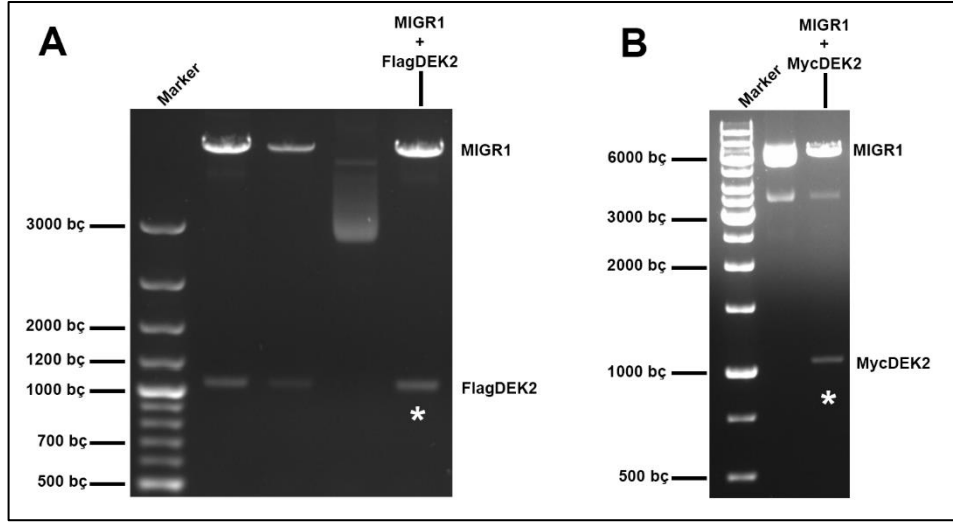
DEK2 cDNA dizisinde delesyona uğrayan kısmı (Ekzon 3), DEK1 cDNA dizisinden çıkaracak şekilde tasarlanan "Site-Direct DEK2-Forward" ve "Site-Direct DEK2-Reverse" primerleri ile yapılan PCR sonucunda elde edilen DNA

fragmentlerinin doğru uzunluklarda olduğu agaroz jel görüntüleri ile tespit edildi (Şekil 7.3).



Şekil 7.3: Yönlendirilmiş mutagenез ile DEK1 cDNA'sı içeren plazmitlerden DEK2 cDNA'sını içeren plazmitlerin çoğaltılması sonrası elde edilen ürünlerin agaroz jel görüntüsü. (A) MIGR1+FlagDEK2 DNA fragmanı. (B) MIGR1+MycDEK2 DNA fragmanı. Marker; Thermo GeneRuler 1kb/100 bp Plus DNA Ladder.

PCR ile çoğaltılan plazmitler öncelikle ligasyon reaksiyonuna tabi tutuldu. Ligasyon ürünleri kompetan *E. coli* DH5 α bakterilerine transforme edildi. Transforme bakteriler çoğaltıldı ve bu bakterilerden plazmit izole edildi. Elde edilen plazmitler EcoRI enzimi ile kesilip agaroz jelde yürütüldü. Böylece epitop ekli DEK2 cDNA dizisini içeren plazmitler belirlendi (Şekil 7.4).



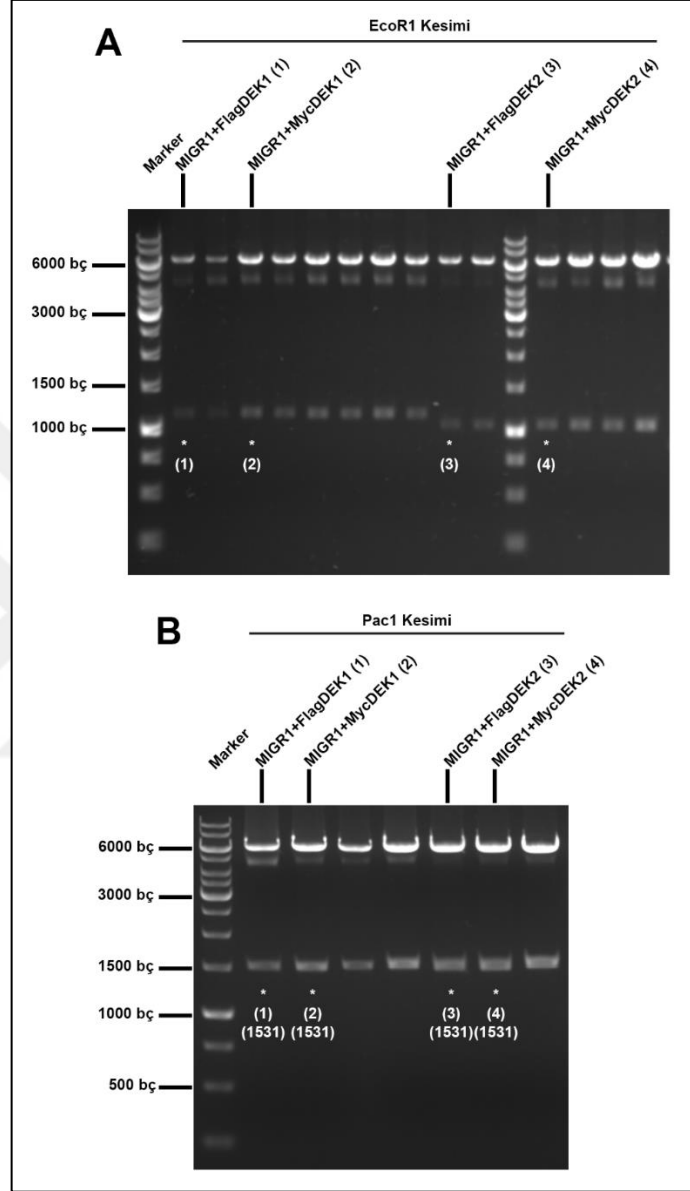
Şekil 7.4: FlagDEK2 ve MycDEK2 cDNA'larını içeren vektörlerin EcoRI restriksiyon enzimi kesimi sonrası agaroz jel görüntüsü. (A) FlagDEK2 cDNA'sı. (B) MycDEK2 cDNA'sı. Marker; GeneRuler 1kb/100 bp Plus DNA Ladder, *; sekanslamaya gönderilen plazmitler.

EcoRI enzim kesimi sonrası epitop ekli DEK2 cDNA'sını içeren plazmitlerin DNA dizilemesi yaptırıldı. Dizileme sonrası gelen sonuçlar FinchTV ve Bioedit programları kullanılarak analiz edildi. Yapılan analiz sonucunda FlagDEK2 ve MycDEK2 dizileri doğrulandı ve DNA dizisi doğrulanan plazmitler kullanılarak sonraki deneylere devam edildi.

DNA dizisi doğrulanan plazmitler kullanılarak FlagDEK1, MycDEK1, FlagDEK2 ve MycDEK2 cDNA'ları memeli hücrelerinde ifade edilebilmesi için, alt klonlama ile MIGR1 vektörüne aktarıldı. Klonlama deneylerinde elde edilen DNA dizisi doğrulanmış epitop ekli DEK1 ve DEK2 cDNA'ları EcoRI enzim kesimi ile çıkarılarak yine aynı enzimle kesilen MIGR1 plazmiti ile ligasyon yapıldı. Ligasyon ürünleri kompetan *E. coli* DH5 α bakterilerine transforme edildi. Transforme bakteriler çoğaltıldı ve bu bakterilerden plazmit izole edildi. Elde edilen plazmitlerin epitop ekli DEK1 ve DEK2 cDNA'larını içerip içermediğini tespit etmek amacıyla EcoRI enzim kesimi ve bu cDNA'ların yönlerinin doğruluğunu belirlemek amacıyla da PacI enzim kesimi yapılarak agaroz jelde yürütüldü. Böylece epitop ekli DEK1 ve DEK2 cDNA dizisini doğru yönde içeren plazmitler belirlendi (Şekil 7.5).

Elde edilen epitop ekli DEK1 ve DEK2 cDNA'sını içeren plazmitlerin DNA dizilemesi yaptırıldı. Dizileme sonuçları FinchTV ve BioEdit Sequence Allignment Editor programları kullanılarak analiz edildi. Yapılan analiz sonucunda FlagDEK,

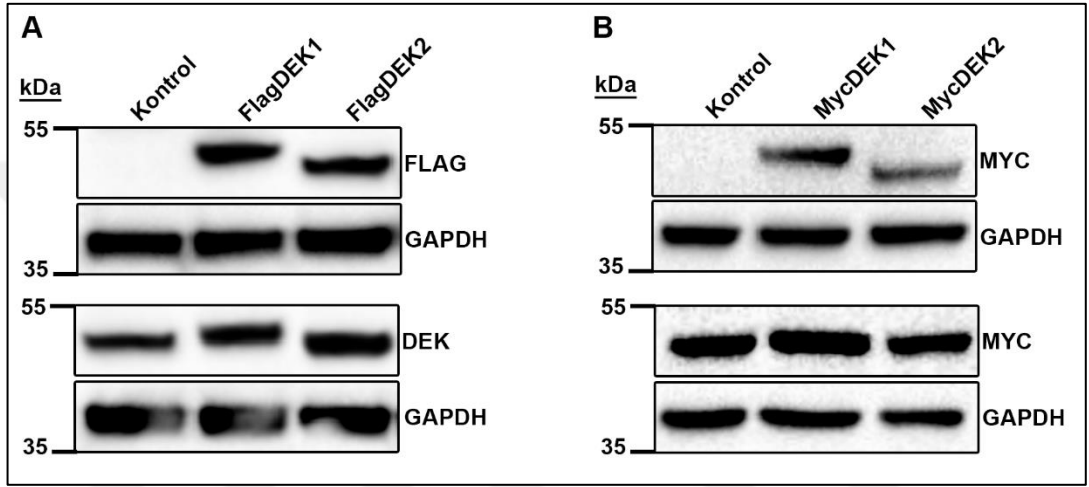
MycDEK1, FlagDEK2 ve MycDEK2 cDNA dizileri doğrulandı (EK B, EK C, EK D ve EK E). DNA dizisi doğrulanan plazmitler kullanılarak sonraki deneylere devam edildi.



Şekil 7.5: Alt klonlama ile FlagDEK1, MycDEK1, FlagDEK2 ve MycDEK2 cDNA'larını içeren MIGR1 plazmitinin EcoR1 ve Pac1 restriksiyon enzimleri ile kesimi sonrası agaroz jel görüntüsü. (A) EcoR1 enzim kesimi sonrası FlagDEK1, MycDEK1, FlagDEK2 ve MycDEK2 cDNA fragmanlarının agaroz jel görüntüsü. (B) Pac1 enzim kesimi sonrası FlagDEK1, MycDEK1, FlagDEK2 ve MycDEK2 cDNA fragmanlarının agaroz jel görüntüsü. Marker; GeneRuler 1kb DNA Ladder, *; FlagDEK1, MycDEK1, FlagDEK2 ve MycDEK2 cDNA dizisini doğru yönde içeren ve dizileri doğrulanan plazmitler.

7.2. DEK İzoformlarının İfadesinin Western Blot Yöntemi ile Doğrulanması

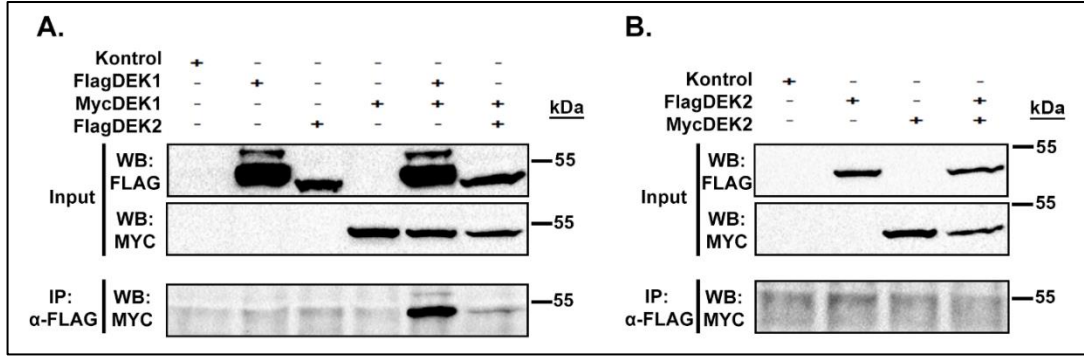
Epitop eklenen DEK izoformlarının protein düzeyinde ifadesinin kontrolü için 293T hücrelerine geçici ifade sağlayan transfeksiyon yapıldı. Transfeksiyondan 72 saat sonra bu hücrelerden total protein izole edildi ve western blot yöntemiyle protein ifadesi anti-Flag, anti-Myc ve anti-DEK antikorları kullanılarak doğrulandı (Şekil 7.6).



Şekil 7.6: 293T hücrelerinde Flag ve Myc epitoplu ekli DEK izoformlarının protein düzeyinde ifadesinin western blot yöntemiyle doğrulanması. Eşit yüklemeyi göstermek için anti-GAPDH antikor kullanılmıştır. Kontrol; Transfekte edilmemiş parental 293T hücre lizatı.

7.3. DEK İzoformları Arasındaki Etkileşimin Belirlenmesi

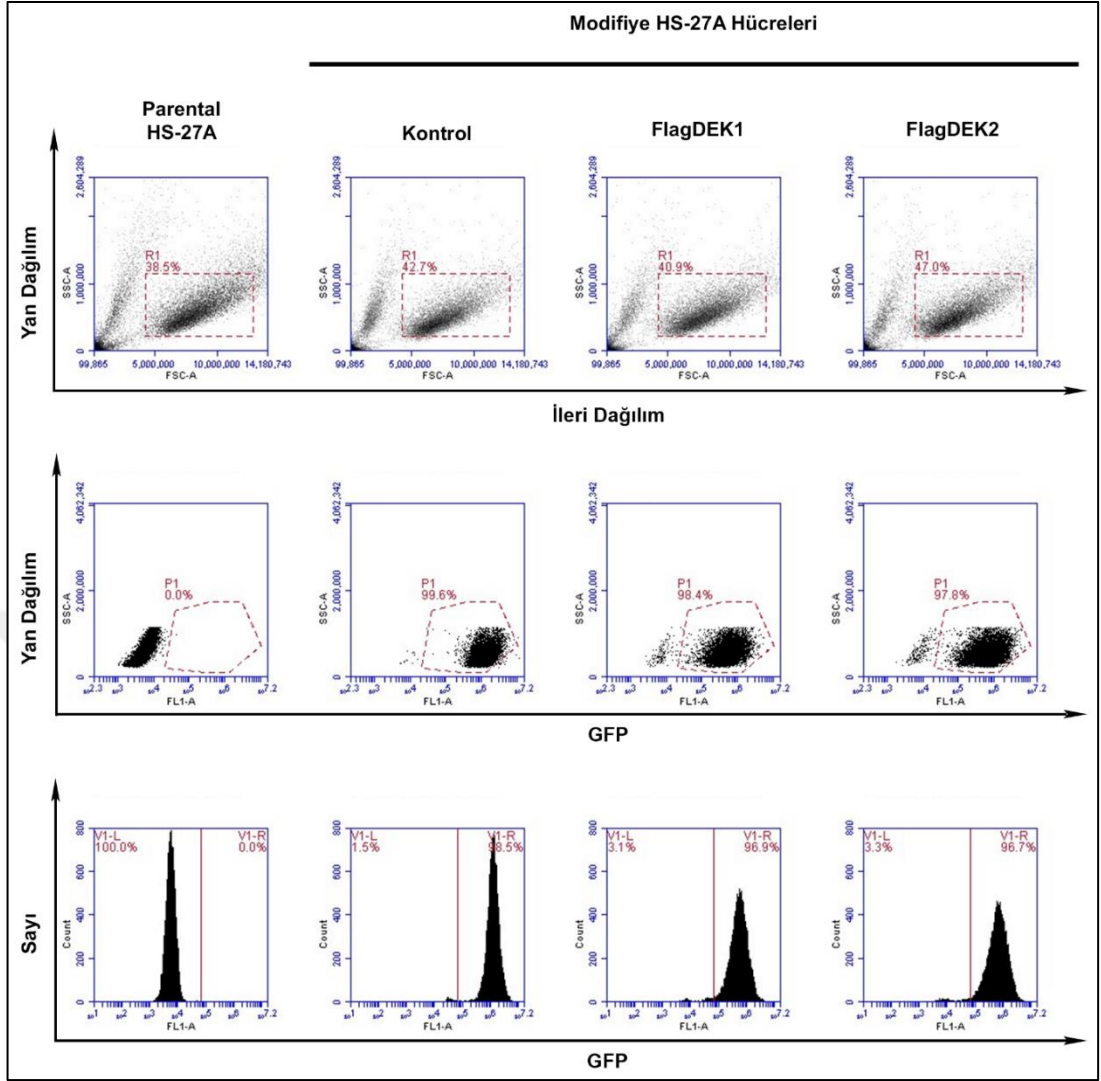
DEK1 ve DEK2 proteinleri arasında etkileşim olup olmadığını tespit etmek amacıyla yapılan birlikte çöktürme deneyi sonucunda, literatürde önceden bilindiği gibi DEK1 izoformunun kendisiyle etkileşime girerek homodimer/multimer yapısı oluşturduğu görüldü. DEK2 izoformununsa tespit edilebilir düzeyde homodimer oluşturmadığı belirlendi. DEK1 ve DEK2 izoformu arasında oldukça zayıf heterodimer yapısı oluşturduğu belirlendi. Birlikte çöktürme deneyinde kontrol olarak, parental hücreler ve deneyde kullanılan tüm plazmitlerin tek tek bulunduğu hücre grupları kullanılarak, spesifik olmayan bir etkileşimin olmadığı da gösterildi. (Şekil 7.7).



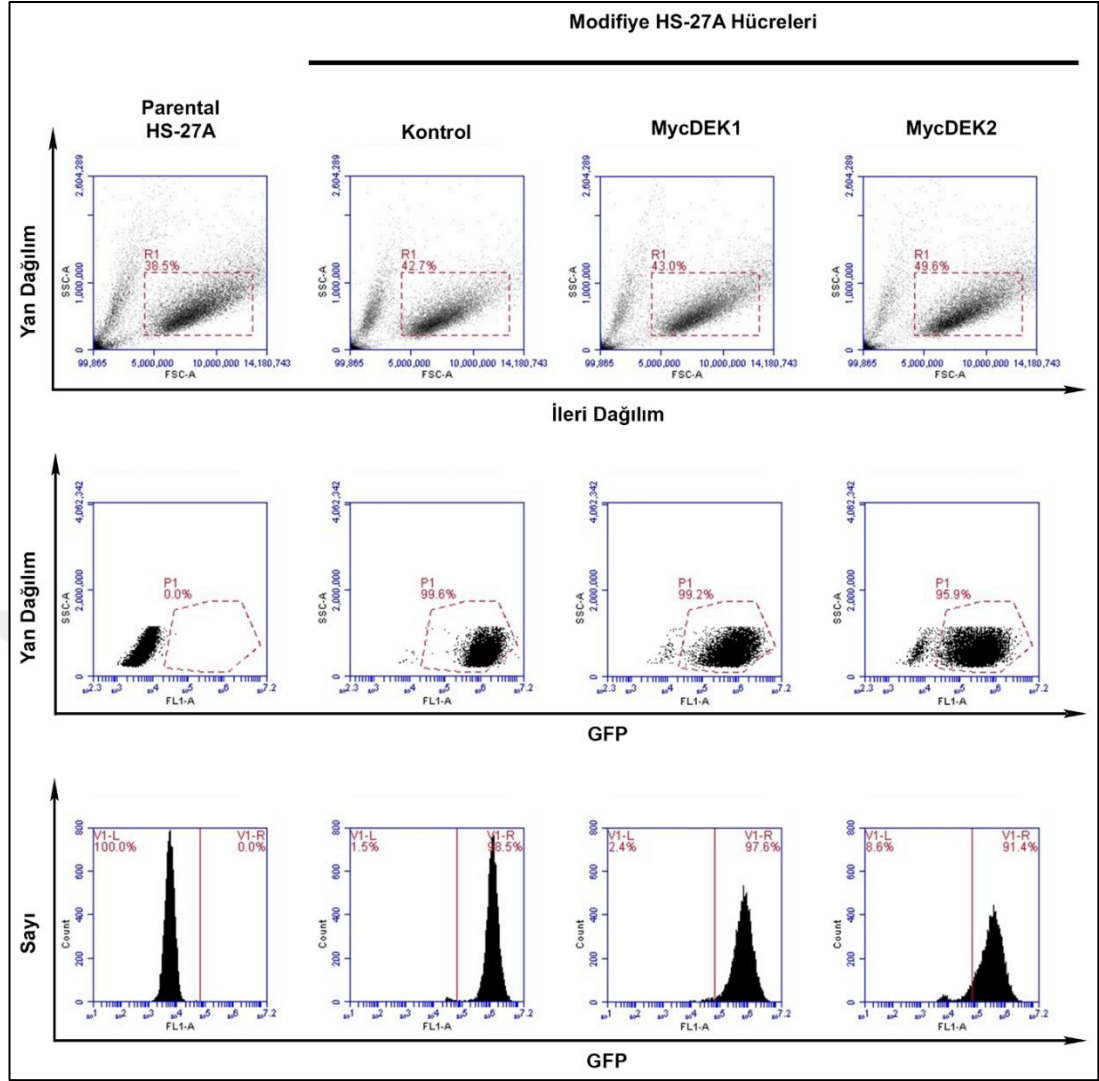
Şekil 7.7: 293T hücrelerinde birlikte ifade ettirilen epitop ekli DEK izoformlarının birlikte çöktürme yöntemiyle etkileşimin belirlenmesi. (A) DEK1:DEK1 ve DEK1:DEK2 etkileşimlerini göstermektedir. (B) DEK2:DEK2 etkileşimini göstermektedir.

7.4. HS-27A Hücrelerinde DEK İzoformlarının İfadesinin Sağlanması

MIGR1 retroviral ekspresyon vektörüne klonlanmasının ardından, epitop ekli DEK izoformlarının fonksiyonlarını araştırmak amacıyla HS-27A hücrelerinde kalıcı olarak aşırı ifadesi sağlamak amacıyla hücreler ayrı ayrı olacak şekilde, pMIGR1-FlagDEK1, pMIGR1-MycDEK1, pMIGR1-FlagDEK2, pMIGR1-MycDEK2 ve kontrol olarak pMIGR1-GFP vektörleri kullanılarak elde edilen Retro virüslerle infekte edildi. İnfeksiyondan 72 saat sonra GFP-pozitif hücreler FACS ile ayrıştırıldı. Hücre kültüründe çoğaltılan bu hücrelerin tekrar edilen FACS analizi sonucunda GFP-pozitif hücre oranının %90'ın üzerinde olduğu tespit edildi ve sonraki deneylerde bu hücreler kullanıldı (Şekil 7.8 ve 7.9).



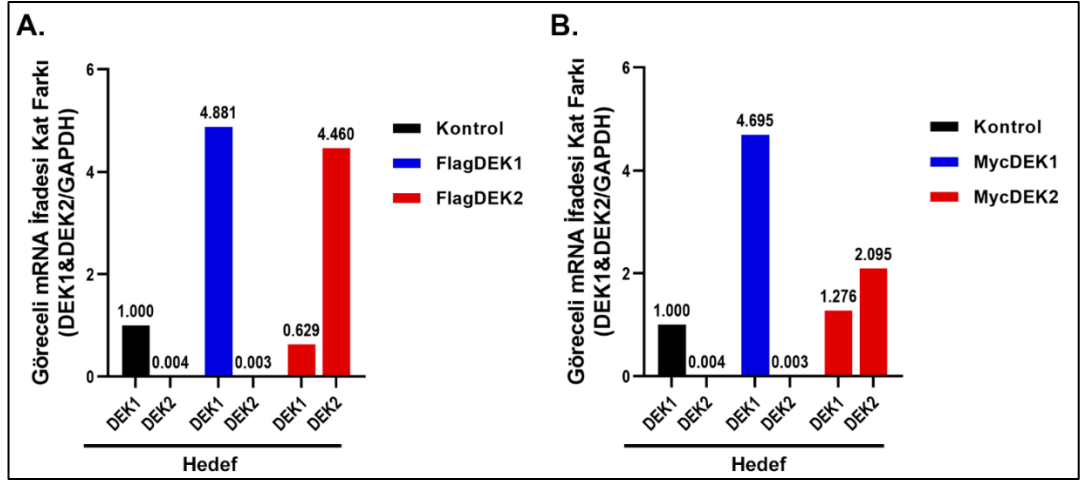
Şekil 7.8: FACS ile ayrıştırıldıktan sonra FlagDEK1 ve FlagDEK2 hücrelerindeki GFP pozitif hücre oranının analizi.



Şekil 7.9: FACS ile ayrıştırıldıktan sonra MycDEK1 ve MycDEK2 hücrelerindeki GFP pozitif hücre oranının analizi.

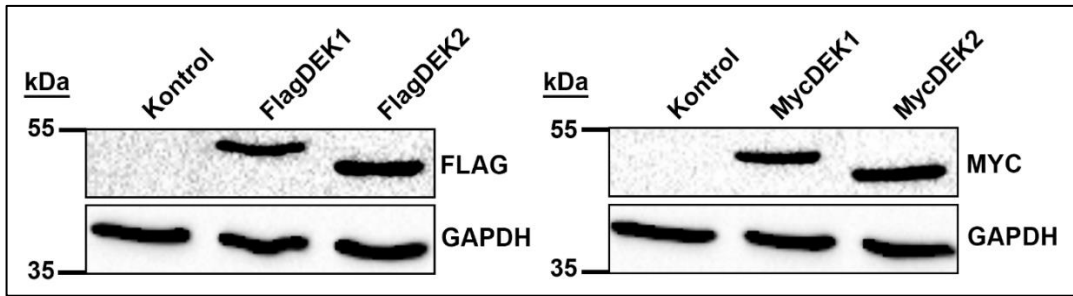
7.5. HS-27A Hücrelerinde DEK İzoformlarının İfadesinin Doğrulanması

FACS ile ayrıştırılan GFP-pozitif hücrelerdeki epitop ekli DEK izoformlarının ifadesini mRNA düzeyinde doğrulamak amacıyla DEK1 ve DEK2'ye özgün primerlerle yapılan RT-qPCR analizi sonucunda, FlagDEK1, FlagDEK2 ve MycDEK1 ifadesinin endojen DEK1 ifadesine göre yaklaşık olarak 4 kat arttığı, MycDEK2 ifadesinin de 2 kat artış gösterdiği belirlendi (Şekil 7.10).



Şekil 7.10: HS-27A hücrelerinde ektojik FlagDEK1, FlagDEK2, MycDEK1 ve MycDEK2 ifadesinin mRNA düzeyinde RT-qPCR yöntemiyle doğrulanması. Örnekler GAPDH'e göre normalize edilmiştir. Kontrol; pMIGR1-GFP vektörü ile infekte edilmiş HS-27A hücre örnekleri.

mRNA düzeyinde ektojik olarak ifade edildiği gösterilen FlagDEK1, MycDEK1, FlagDEK2 ve MycDEK2 proteinlerinin anti-Flag ve anti-Myc antikorları kullanılarak Western blot yöntemiyle protein düzeyinde ifadesinin doğrulanması yapıldı (Şekil 7.11).

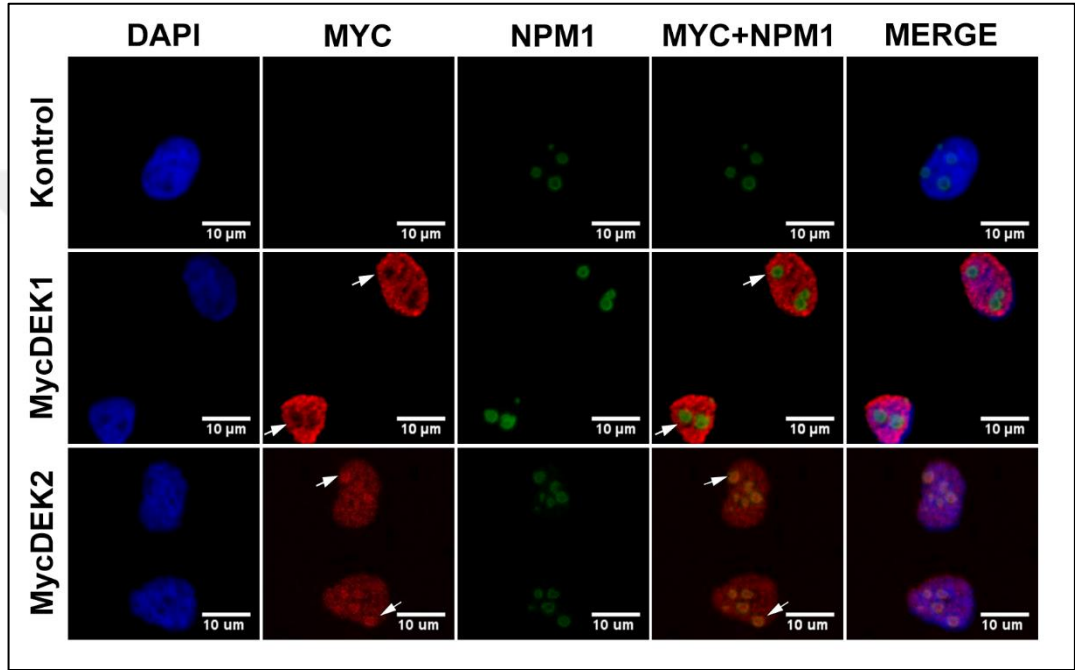


Şekil 7.11: HS-27A hücrelerinde ektojik FlagDEK1, FlagDEK2, MycDEK1 ve MycDEK2 ifadesinin protein düzeyinde western blot yöntemiyle doğrulanması. Eşit yüklemeyi göstermek için anti-GAPDH antikoru kullanılmıştır. Kontrol; pMIGR1-GFP vektörü ile infekte edilmiş HS-27A hücre lizatları.

7.6. HS-27A Hücrelerinde DEK İzoformlarının Hücre İçi Lokalizasyonlarının Belirlenmesi

DEK izoformlarının hücredeki lokalizasyonunu belirlemek amacıyla IF analizi yapıldı. IF çalışmalarında DEK1'in literatürle uyumlu olarak hücre çekirdeğinde

lokalize olduğu görüldü (Şekil 7.12). İlginç olarak, IF görüntülerinde DEK2'nin hücre çekirdeğinde kondense olarak belli bir bölgede yoğunlaştığı gözlemlendi. Bu gözlem neticesinde DEK2'nin hücre çekirdeğinde çekirdekçik yapısında lokalize olabileceği düşünüldü. DEK2'nin çekirdekçikte lokalize olup olmadığını anlamak amacıyla, çekirdekçik belirteci olarak kullanılan NPM1 proteini ile DEK2'nin ikili boyaması yapıldı. Elde edilen IF görüntülerinde DEK2'nin NPM1 proteini ile birlikte lokalize olduğu tespit edildi (Şekil 7.12).

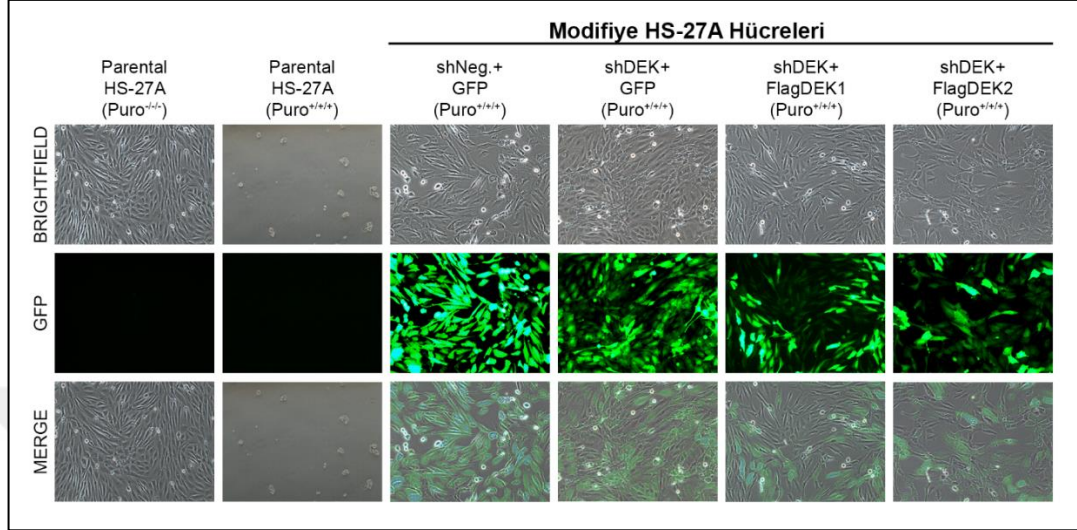


Şekil 7.12: HS-27A-MycDEK1 ve HS-27A-MycDEK2 hücrelerinin ikili-IF analizinin 40X konfokal mikroskobu ile elde edilen görüntüleri. γ H2AX kırmızı, NPM1 yeşil ve DAPI ile hücre çekirdeği mavi renkte boyanmıştır. Kontrol; HS-27A-GFP hücreleri.

7.7. HS-27A Hücrelerinde *DEK* İfadesinin Baskılanması

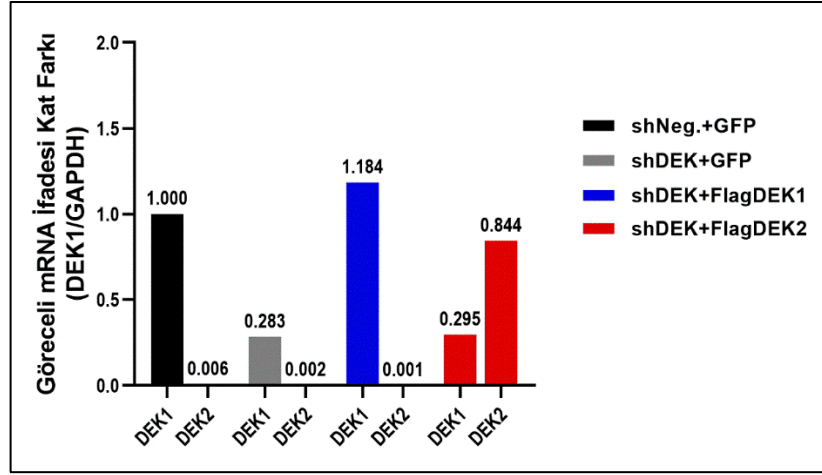
FlagDEK1 ve FlagDEK2'yi kalıcı olarak ifade eden HS-27A-FlagDEK1 ve HS-27A-FlagDEK2 ve kontrol HS-27A-GFP hücreleri, DEK'e özgün shRNA ve kontrol olarak da hücrede herhangi bir endojen RNA'yı hedeflemeyen sh-RNA (sh-Negatif (sh-Neg)) içeren lentiviral vektörler ile infekte edildi. Enfeksiyon sonrasında lentiviral vektörde bulunan puromycin antibiyotikğine direnç özelliği sayesinde shRNA'yı kalıcı olarak ifade eden hücreler puromycin uygulanarak seçildi. Puromycin seçilimi sonrası

alınan ters-floresan mikroskop görüntülerinde kontrol olarak kullanılan ve lentivirüsle infekte edilmemiş parental HS-27A hücrelerinin tamamen öldüğü, buna karşın sh-RNA ile infekte olan hücrelerin canlılığını koruduğu görüldü (Şekil 7.13).



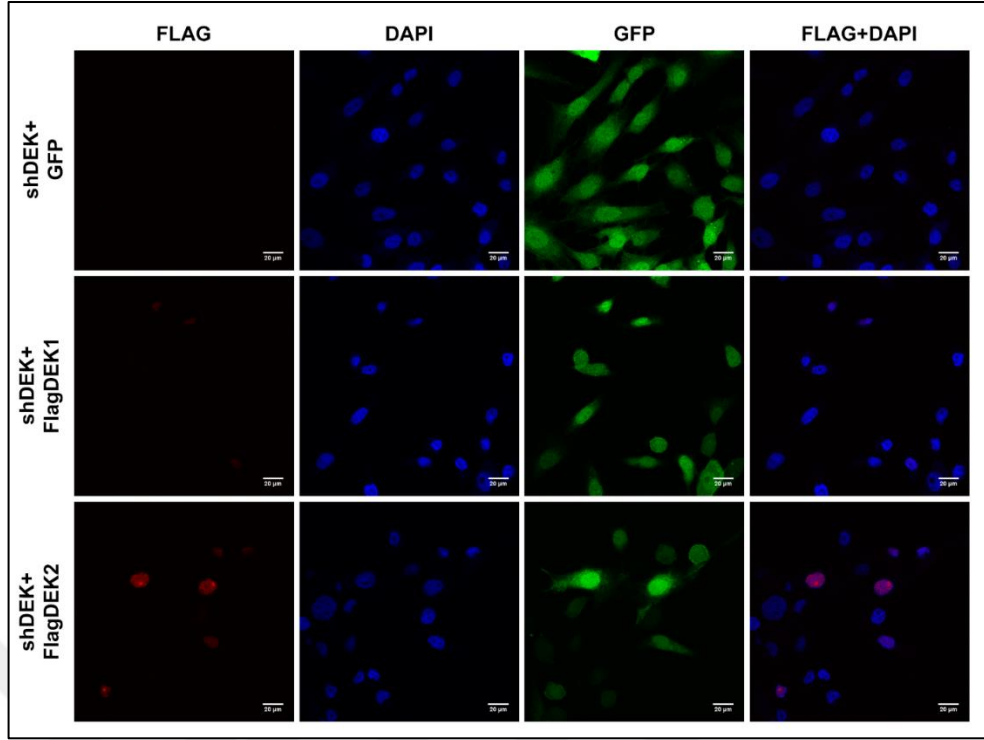
Şekil 7.13: shRNA içeren lentiviral vektörler ile infekte edilen HS-27A hücrelerinin 3 kez (10. gün) puromycin antibiyotiği seçilimi sonrası mikroskop görüntüleri.

Puromycin seçilimi sonrasında HS-27A-shDEK+FlagDEK1 (shDEK+FlagDEK1), HS-27A-shDEK+FlagDEK2 (shDEK+FlagDEK2), HS-27A-shDEK+GFP (shDEK+GFP) ve HS-27A-sh-Neg.+GFP (sh-Neg+GFP) hücrelerindeki DEK ifadesi RT-qPCR yöntemiyle analiz edildi. Elde edilen sonuçlar, endojen DEK1 ve DEK2 ifadesinin shDEK+GFP hücrelerinde yaklaşık %75 baskılandığını, shDEK+FlagDEK1 hücrelerindeyse kontrol shNeg+GFP hücrelerine benzer düzeyde DEK1 ifadesi olduğu ve son olarak da shDEK+FlagDEK2 hücrelerinde ise DEK2 ifadesinin endojen DEK1 seviyesine benzer düzeyde arttığı belirlendi (Şekil 7.14).



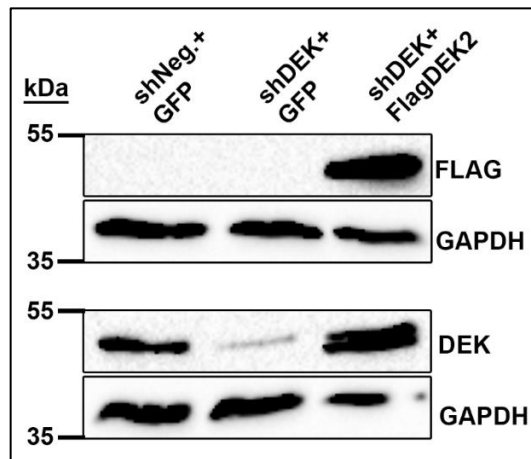
Şekil 7.14: shDEK+FlagDEK1, shDEK+FlagDEK2, shDEK+GFP ve sh-Neg.+GFP hücrelerinde DEK1 ve DEK2 mRNA seviyesinin RT-qPCR yöntemiyle belirlenmesi.

Puromycin seçilimi sonrasında shDEK+FlagDEK1, shDEK+FlagDEK2, shDEK+GFP ve sh-Neg.+GFP hücrelerindeki DEK ifadesi ayrıca immüno Floresan (IF) yöntemiyle analiz edildi. mRNA düzeyinde shDEK+FlagDEK1 hücrelerinde DEK1 ifadesinin her ne kadar kontrol hücreleri kadar ifade edildiği görülse de IF analizi sonucunda protein düzeyinde ifadenin oldukça az olduğu görüldü (Şekil 24). Bu sonucun shDEK'in DEK1 üzerindeki translasyonel baskısının DEK2'ye göre daha etkili oluşundan kaynaklanabileceği düşünüldü. Özet olarak, kullandığımız bu yöntemde, IF analizleri dikkate alındığında, endojen DEK'in baskılandığı hücrelerde ektopik FlagDEK1 ifadesi sağlanamasa da ektopik FlagDEK2 ifadesi sağlanabildi (Şekil 7.15).



Şekil 7.15: shDEK+GFP, shDEK+FlagDEK1 ve shDEK+FlagDEK2 hücrelerinde DEK ifadesinin IF yöntemiyle analizinin 40X konfokal mikroskobu ile elde edilen görüntüleri. Flag kırmızı ve DAPI ile hücre çekirdeği mavi renkte boyanmıştır. Hücrelerde kalıcı olarak ifade edilen viral vektörlerin varlığı belirteç protein GFP ile yeşil ile gösterilmiştir.

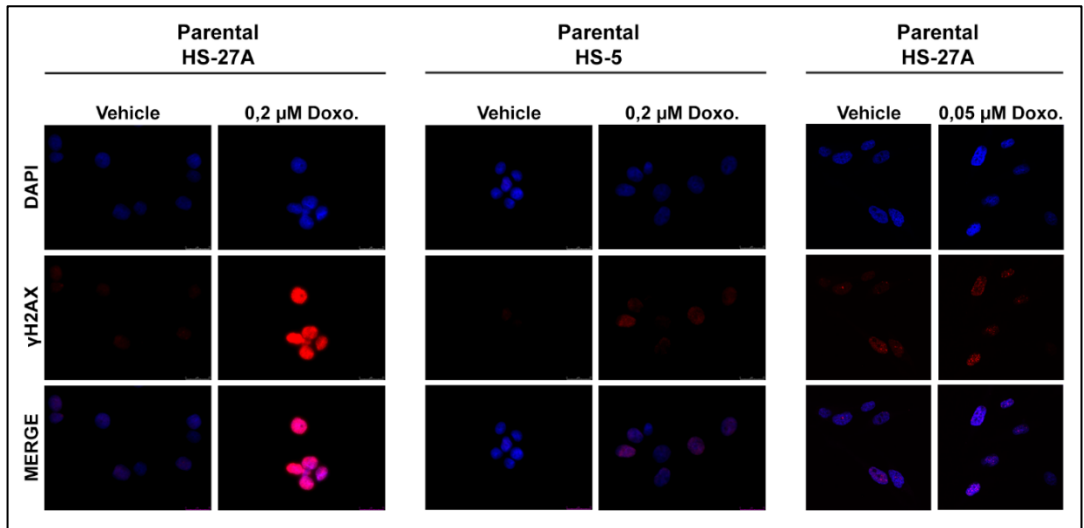
shDEK+FlagDEK2 hücrelerinde western blot yöntemiyle de anti-Flag antikorunu kullanılarak protein ifadesinin doğrulanması yapıldı (Şekil 7.16).



Şekil 7.16: shNeg.+GFP, shDEK+GFP ve shDEK+FlagDEK2 hücrelerinde DEK'in protein düzeyinde ifadesinin western blot yöntemiyle doğrulanması. Eşit yüklemeyi göstermek için anti-GAPDH antikorunu kullanılmıştır.

7.8. HS-27A Hücrelerinde DNA Hasarı Oluşturmak İçin Kullanılacak Doksorubisin Konsantrasyonunun Belirlenmesi

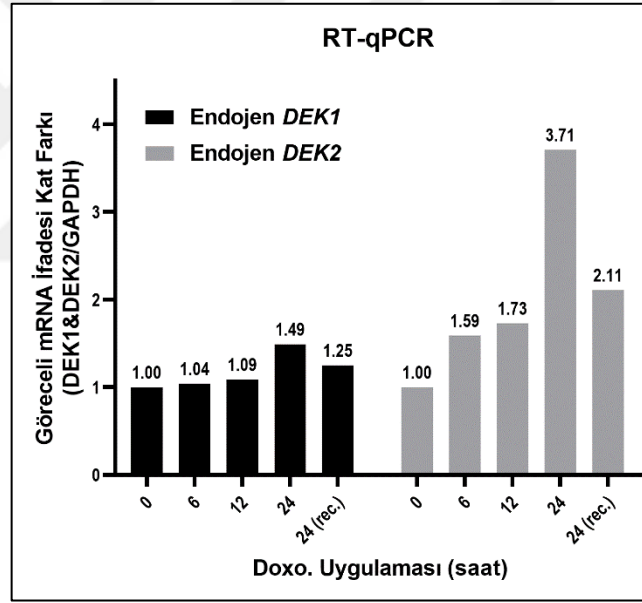
DNA tamir mekanizmasında DEK2'nin fonksiyonel olup olmadığını anlamak amacıyla insan stroma hücre hatlarından HS-27A hücreleri kullanıldı. Önceden yapılan bir çalışmada farklı bir insan stroma hücresi olan HS-5 hücrelerinde DNA hasarı oluşturmak için 0,05 ve 0,2 μM konsantrasyonlarda 24 saat boyunca doksorubisin uygulaması yapılmıştır [Tang et al., 2018]. HS-27A hücrelerinde de bu dozların etkisini test etmek amacıyla, öncelikle parental HS-27A hücreleri 0,2 μM doksorubisin ile 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası IF yöntemiyle bu hücrelerde DNA hasarı sonucu oluşan γH2AX (fosforile olmuş H2AX) miktarı analiz edildi. Deney sonrası, 0,2 μM doksorubisin dozunun HS-27A hücrelerinde oldukça yoğun miktarda γH2AX boyanmasına neden olduğu tespit edildi (Şekil 7.17). Bu dozda doksorubisin uygulamasının analizi ve analiz sonrası yorumu zorlaştıracağı için, HS-27A hücrelerinde 0,05 μM (24 saat) doksorubisin uygulaması gerçekleştirilmesine karar verildi ve elde edilen sonuçlar bu doz sonrası oluşan γH2AX boyanmasının analize uygun düzeyde olduğunu gösterdi (Şekil 7.17). Bu sonuçlar doğrultusunda, ilerleyen deneylerde 0,05 μM doksorubisin uygulaması kullanıldı.



Şekil 7.17: Parental HS-27A hücrelerinde 0,2 μM veya 0,05 μM doksorubisin uygulaması sonrası IF analizinin 40X konfokal mikroskobu ile elde edilen görüntüleri. γH2AX kırmızı ve DAPI ile hücre çekirdeği mavi renkte boyanmıştır. Vehicle; doksorubisin uygulanmamış hücreler.

7.9. HS-27A Hücrelerinde DNA Hasar Tamiri Sırasında Zamana Bağlı Olarak Endojen DEK1 ve DEK2 İfadesinin Seviyesinin Belirlenmesi

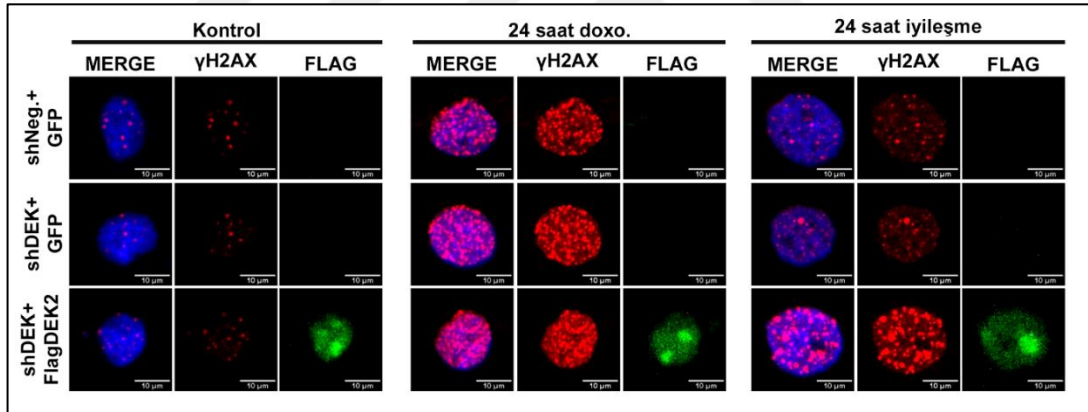
Parental HS-27A hücrelerinde DNA hasarı oluşumu sırasında zamana bağlı olarak endojen DEK1 ve DEK2 mRNA'sının nasıl etkilendiğini anlamak amacıyla farklı sürelerde (0, 6, 12, 18 ve 24. saatler) doksorubisin uygulaması yapılan hücrelerin mRNA'sı RT-qPCR yöntemiyle analiz edildi. RT-qPCR analizi sonucunda, DEK2 mRNA seviyesinin hasar sürecinde zamanla artarak 24 saatlik DNA hasarı sonrasında 3,7 kata ulaştığı ve 24 saatlik tamir süreci sonrasında bu artışın yarıya indiği görüldü. DEK1 mRNA seviyesinin ise 24 saatin sonunda ancak 1,5 kat arttığı ve 24 saatlik tamir sonrasında ise bu artışın 1,25 kata düştüğü görüldü (Şekil 7.18).



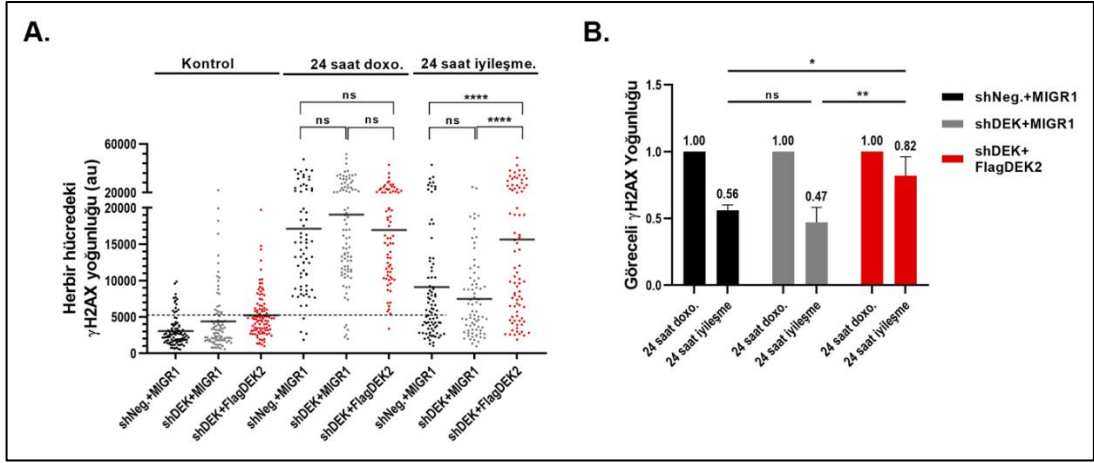
Şekil 7.18: Farklı sürelerde 0,05 μ M doksorubisin uygulanarak DNA hasarı oluşturulan HS-27A hücrelerinde endojen DEK1 ve DEK2'nin mRNA düzeyinde ifade seviyesinin RT-qPCR yöntemiyle analizi.

7.10. DEK2 İzofromunun DNA Hasarı ve DNA Hasar Tamirindeki Etkisinin Belirlenmesi

Sh-Neg.+GFP, shDEK+GFP ve shDEK+FlagDEK2 hücrelerinde doksorubisin uygulaması sonucunda meydana gelen DNA hasarını tespit etmek amacıyla, hücreler önce 24 saat 0,05 μ M doksorubisin ile inkübe edildi, ardından doksorubisin uzaklaştırıldı ve aynı hücreler normal büyüme besiyerinde 24 saat daha kültür edilerek DNA hasarını onarmaları için süre tanındı. Bu zaman dilimlerinde hücreler fikse edilerek IF yöntemiyle analiz edildi (Şekil 7.19). Konfokal mikroskopla alınan IF boyama görüntüleri, hücrelerdeki γ H2AX floresan yoğunluğunu hesaplamak amacıyla Image-j programı kullanılarak analiz edildi. Yapılan analiz sonucunda 24 saatlik hasarın ardından 24 saatlik tamir sonrası shDEK+FlagDEK2 hücrelerindeki γ H2AX yoğunluğunun hem sh-Neg.+GFP hem de shDEK+GFP hücrelerine göre istatistiksel olarak daha fazla olduğu belirlendi (Şekil 7.20).



Şekil 7.19: sh-Neg+GFP, shDEK+GFP ve shDEK+FlagDEK2 hücrelerinde doksorubisin uygulaması sonrası IF analizinin 40X konfokal mikroskobu ile elde edilen görüntüleri. γ H2AX kırmızı, Flag yeşil ve DAPI ile hücre çekirdeği mavi renkte boyanmıştır. Kontrol; doksorubisin uygulanmadan, 24 saat doxo.; 24 saat doksorubisin uygulamasından hemen sonra, 24 saat tamir; 24 saatlik doksorubisin uygulamasının ardından 24 saat iyileşmeye bırakıldıktan sonra, IF uygulanan hücreleri temsil etmektedir.



Şekil 7.20: sh-Neg+GFP, shDEK+GFP ve shDEK+FlagDEK2 hücrelerinde doksorubisin uygulaması sonrası konfokal mikroskobu görüntülerindeki γ H2AX floresan yoğunluğunun Image-j yazılımı ile yapılan analiz sonuçları. Floresan yoğunluğunun gruplar arası istatistikleri Graphpad Prism 8.0.1 programı kullanılarak Two-Way Anova yöntemiyle değerlendirilmiştir ($P < 0,05$).

8. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

İlk kez AML hastalarında CAN proteini ile füzyon yapması sonucunda tespit edilen ve proto-oncogen olarak tanımlanan DEK proteini 375 amino asit uzunluğunda, büyük ölçüde hücre çekirdeğinde lokalize bir fosfoproteindir [Carro et al., 2006], [von Lindern et al., 1992]. Birçok solid kanser tipinde aşırı ifade edilmesinin yanında DEK proteini, hücre proliferasyonu, transkripsiyonun düzenlemesi, DNA replikasyonu ve DNA onarımı gibi hücresel süreçlerde rol almaktadır [Broxmeyer et al., 2013], [Sanden and Gullberg, 2015]. *DEK* geninin ifadesi, hücre döngüsünde anahtar bir role sahip olan E2F transkripsiyon faktörünün kontrolü altındadır. Ayrıca tümör baskılayıcı p53 proteinin stabilizasyonunu bozarak apoptoz mekanizmasının sekteye uğramasıyla da ilişkilendirilmiştir [Carro et al., 2006], [Wise-Draper et al., 2006]. *DEK* genin transkripsiyonu sonrası iki farklı izoform DEK1 ve DEK2 ifade edilmektedir. Tam uzunluktaki DEK1'in fonksiyonları ile çok sayıda çalışma olmasına rağmen, DEK2'nin DEK1 ile aynı fonksiyonel özellikleri paylaşıp paylaşmadığı bilinmemektedir.

Daha önce DEK1'in homodimer oluşturduğu gösterilmiştir [Kappes et al., 2004a]. Tez çalışmada birlikte çöktürme yöntemiyle (Co-IP) DEK1'in homodimer oluşturduğunu doğruladık. İlginç olarak, DEK1'in homodimer oluşturmasını sağlayan multimerizasyon bölgesini içermesine rağmen, daha az sayıda DEK2 ve DEK1 molekülünün etkileşimde olduğunu ve DEK2'nin homodimer oluşturmadığını saptadık. Bu sonuçlar, DEK2'de eksik olan 49-82 aminoasit dizisinin, ne gibi post-translasyonel modifikasyonlar veya konformasyonel değişikliklere yol açtığının ve bunların sonuçlarının neler olabileceğinin belirlenmesinin önemini göstermektedir.

Çekirdekçik, hücre çekirdeğinde bulunan membransız organel olarak nitelendirilen büyük bir hücre altı yapıdır. Çekirdekçik temel olarak ribozom biyosentezinden sorumludur, fakat nucleolar detention center (DC) bölgesiyle hücrenin strese karşı cevabında ve RNA-protein komplekslerinin oluşturduğu sinyal tanıma partiküllerinin oluşumunda da görevlidir [O'Sullivan et al., 2013], [Olson and Dundr, 2015]. Çalışmamız kapsamında, literatürde daha önceden de bilindiği gibi DEK1'in çekirdek içinde difüze bir şekilde lokalize olduğunu gördük. Bu çalışmayla ilk kez DEK2'nin az miktarda çekirdekte, yoğun olarak çekirdekçikte lokalize olduğunu gösterdik. DEK2'nin rRNA'larla, DC bölgesindeki proteinlerle veya

ribozom biyosentezi ile olan ilişkilerinin araştırılması DEK2'nin hücre için önemli olan bu fonksiyonlardaki rolünü ortaya çıkaracaktır ve DEK2'nin nükleolar stres aracılı bazı hastalıklarda hedef olabileceğini düşündürmektedir.

DNA hasarı tüm hücrel organizmalarda mevcuttur ve neredeyse bütün canlı hücrelerdeki genetik materyal olan DNA, yaşamın temel birimidir ve bütünlüğü ve kararlılığı yaşam için esastır, bu yüzden DNA hasarının onarımı hücrenin yaşamı için vazgeçilmez bir mekanizmadır. DNA'da oluşan DSBs sonrası hücrede ATM proteini H2AX'i fosforile eder, böylece hasar bölgesi işaretlenir ve hasar onarımında görevli diğer proteinlerin bölgeye gelişi sağlanır. Bu proteinlerden biri olan bir E3 ubiquitin ligazı γ H2AX'i ubiquitinlemesi sonrasında 53BP1 ve BRCA1 kompleksi oluşturularak DNA tamiri ve hücre döngüsü kontrolü yolları başlatılır [Ciccia and Elledge, 2010], [Nastasi et al., 2020]. Yaptığımız çalışmada doksorubisin uygulaması sonrasındaki onarım sürecinde endojen DEK'in susturulduğu, ektojik DEK2'nin ifade ettirildiği hücrelerde ve ayrıca laboratuvarımızda yürütülen bir başka çalışmada endojen DEK baskılanmaksızın sadece DEK2'nin aşırı ifade ettirildiği hücrelerde de γ H2AX sinyalinin yoğunluğu hem DEK'in susturulduğu hem de DEK1'i aşırı ifade eden hücrelerden istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek kaldı [Kalaycı A., 2022]. Bu sonuçlar, ektojik DEK2 ifadesinin, doksorubisinin neden olduğu DNA hasarında, hasar sinyalini uzattığını göstermektedir. Bu sonuçlar doğrultusunda, DNA hasarı sonrası H2AX'i fosforile eden ve hasarın onarımı sonrası defosforile eden proteinler ile DEK2'nin arasındaki ilişkilerin ortaya çıkarılması γ H2AX sinyalinin düzenlenmesindeki yolların aydınlatılmasında katkı sağlayacaktır.

Özetle, bu tez çalışmasından elde ettiğimiz bulgularla, DEK1 ve DEK2'nin zayıf bir etkileşim gösterdiğini, DEK2'nin DEK1'den farklı olarak homodimer yapısı oluşturmadığını ve çekirekçikte de lokalize olduğunu, kemoteröpatik bir ilaç olan dokorubisin uygulaması sonrası DEK2 ifadesinin daha fazla arttığını ve DEK2'nin DNA hasarı tamirinde DEK1'den farklı etki gösterdiğine dair kanıtlar sunduk.

Bu tez çalışması TÜBİTAK-KBAG 118Z765 ve TÜBİTAK-KBAG 216Z006 numaralı projeler tarafından desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

Adamo A., Delfino P., Gatti A., Bonato A., Takam Kamga P., Bazzoni R., Ugel S., Mercuri A., Caligola S., Krampera M., (2020), "HS-5 and HS-27A Stromal Cell Lines to Study Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cell-Mediated Support to Cancer Development", *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 584232.

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Morgan D., Raff M., Roberts K., Walter P., (2017), "Molecular Biology of the Cell", 6th Edition, New York City, Garland Sciences.

Alexiadis V., Waldmann T., Andersen J., Mann M., Knippers R., Gruss C., (2000), "The protein encoded by the proto-oncogene DEK changes the topology of chromatin and reduces the efficiency of DNA replication in a chromatin-specific manner", *Genes & Development*, 14, 1308-1312.

Avery O.T., Macleod C.M., McCarty M., (1944), "Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types: Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III", *Journal of Experimental Medicine*, 79, 137-158.

Barreiro O., Yanez-Mo M., Serrador J.M., Montoya M.C., Vicente-Manzanares M., Tejedor R., Furthmayr H., Sanchez-Madrid F., (2002), "Dynamic interaction of VCAM-1 and ICAM-1 with moesin and ezrin in a novel endothelial docking structure for adherent leukocytes", *Journal of Cell Biology*, 157, 1233-1245.

Bhargava R., Onyango D.O., Stark J.M., (2016), "Regulation of Single-Strand Annealing and its Role in Genome Maintenance", *Trends in Genetics*, 32, 566-575.

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

Branzei D., Foiani M., (2005), "The DNA damage response during DNA replication", *Current Opinion in Cell Biology*, 17, 568-575.

Broustas C.G., Lieberman H.B., (2014), "DNA damage response genes and the development of cancer metastasis", *Radiation Research*, 181, 111-130.

Broxmeyer H.E., Mor-Vaknin N., Kappes F., Legendre M., Saha A.K., Ou X., O'Leary H., Capitano M., Cooper S., Markovitz D.M., (2013), "Concise review: role of DEK in stem/progenitor cell biology", *Stem Cells*, 31, 1447-1453.

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

Ciccia A., Elledge S.J., (2010), "The DNA damage response: making it safe to play with knives", *Molecular Cell*, 40, 179-204.

Cimprich K.A., Cortez D., (2008), "ATR: an essential regulator of genome integrity", *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9, 616-627.

Covas D.T., Panepucci R.A., Fontes A.M., Silva W.A., Jr., Orellana M.D., Freitas M.C., Neder L., Santos A.R., Peres L.C., Jamur M.C., Zago M.A., (2008), "Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146+ perivascular cells and fibroblasts", *Experimental Hematology*, 36, 642-654.

d'Adda di Fagagna F., (2014), "A direct role for small non-coding RNAs in DNA damage response", *Trends in Cell Biology*, 24, 171-178.

Dahm R., (2008), "Discovering DNA: Friedrich Miescher and the early years of nucleic acid research", *Human Genetics*, 122, 565-581.

Derubeis A.R., Cancedda R., (2004), "Bone marrow stromal cells (BMSCs) in bone engineering: limitations and recent advances", *Annals of Biomedical Engineering*, 32, 160-165.

Deutzmann A., Ganz M., Schonenberger F., Vervoorts J., Kappes F., Ferrando-May E., (2015), "The human oncoprotein and chromatin architectural factor DEK counteracts DNA replication stress", *Oncogene*, 34, 4270-4277.

Forrest R.A., Swift L.P., Rephaeli A., Nudelman A., Kimura K., Phillips D.R., Cutts S.M., (2012), "Activation of DNA damage response pathways as a consequence of anthracycline-DNA adduct formation", *Biochemical Pharmacology*, 83, 1602-1612.

Friedenstein A.J., Petrakova K.V., Kurolesova A.I., Frolova G.P., (1968), "Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues", *Transplantation*, 6, 230-247.

Gewirtz D.A., (1999), "A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin", *Biochemical Pharmacology*, 57, 727-741.

Gurkan U.A., Akkus O., (2008), "The mechanical environment of bone marrow: a review", *Annals of Biomedical Engineering*, 36, 1978-1991.

Hashimoto S., Anai H., Hanada K., (2016), "Mechanisms of interstrand DNA crosslink repair and human disorders", *Genes and Environment*, 38, 9.

Hoeijmakers J.H., (2009), "DNA damage, aging, and cancer", *The New England Journal of Medicine*, 361, 1475-1485.

Hollenbach A.D., McPherson C.J., Mientjes E.J., Iyengar R., Grosveld G., (2002), "Daxx and histone deacetylase II associate with chromatin through an interaction with core histones and the chromatin-associated protein Dek", *Journal of Cell Science*, 115, 3319-3330.

Ivanauskiene K., Delbarre E., McGhie J.D., Kuntziger T., Wong L.H., Collas P., (2014), "The PML-associated protein DEK regulates the balance of H3.3 loading on chromatin and is important for telomere integrity", *Genome Research*, 24, 1584-1594.

Iyama T., Wilson D.M., 3rd, (2013), "DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells", *DNA Repair*, 12, 620-636.

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

Kalaycı A. (2022), "Aşırı DEK2 İzoformu İfadesinin HS-27A Hücre Biyolojisine Etkilerinin Araştırılması", Yüksek Lisans Tezi, Gebze Teknik Üniversitesi.

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

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

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

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

Khodadoust M.S., Verhaegen M., Kappes F., Riveiro-Falkenbach E., Cigudosa J.C., Kim D.S., Chinnaiyan A.M., Markovitz D.M., Soengas M.S., (2009), "Melanoma proliferation and chemoresistance controlled by the DEK oncogene", *Cancer Research*, 69, 6405-6413.

Koleva R.I., Ficarro S.B., Radomska H.S., Carrasco-Alfonso M.J., Alberta J.A., Webber J.T., Luckey C.J., Marcucci G., Tenen D.G., Marto J.A., (2012), "C/EBPalpha and DEK coordinately regulate myeloid differentiation", *Blood*, 119, 4878-4888.

Krokan H.E., Bjoras M., (2013), "Base excision repair", *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5, a012583.

Kumar R., Cheok C.F., (2014), "RIF1: a novel regulatory factor for DNA replication and DNA damage response signaling", *DNA Repair*, 15, 54-59.

Le Hir H., Gatfield D., Izaurralde E., Moore M.J., (2001), "The exon-exon junction complex provides a binding platform for factors involved in mRNA export and nonsense-mediated mRNA decay", *EMBO Journal*, 20, 4987-4997.

Liao H., Ji F., Helleday T., Ying S., (2018), "Mechanisms for stalled replication fork stabilization: new targets for synthetic lethality strategies in cancer treatments", *EMBO Reports*, 19.

Liu H., Naismith J.H., (2008), "An efficient one-step site-directed deletion, insertion, single and multiple-site plasmid mutagenesis protocol", *BMC Biotechnology*, 8, 91.

Logan G.E., Mor-Vaknin N., Braunschweig T., Jost E., Schmidt P.V., Markovitz D.M., Mills K.I., Kappes F., Percy M.J., (2015), "DEK oncogene expression during normal hematopoiesis and in Acute Myeloid Leukemia (AML)", *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 54, 123-131.

Lord C.J., Ashworth A., (2012), "The DNA damage response and cancer therapy", *Nature*, 481, 287-294.

Lucas D., (2021), "Structural organization of the bone marrow and its role in hematopoiesis", *Current Opinion in Hematology*, 28, 36-42.

Majidinia M., Sadeghpour A., Mehrzadi S., Reiter R.J., Khatami N., Yousefi B., (2017), "Melatonin: A pleiotropic molecule that modulates DNA damage response and repair pathways", *Journal of Pineal Research*, 63.

Marechal A., Zou L., (2015), "RPA-coated single-stranded DNA as a platform for post-translational modifications in the DNA damage response", *Cell Research*, 25, 9-23.

Matsuoka S., Ballif B.A., Smogorzewska A., McDonald E.R., 3rd, Hurov K.E., Luo J., Bakalarski C.E., Zhao Z., Solimini N., Lerenthal Y., Shiloh Y., Gygi S.P., Elledge S.J., (2007), "ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage", *Science*, 316, 1160-1166.

McGarvey T., Rosonina E., McCracken S., Li Q., Arnaout R., Mientjes E., Nickerson J.A., Awrey D., Greenblatt J., Grosveld G., Blencowe B.J., (2000), "The acute myeloid leukemia-associated protein, DEK, forms a splicing-dependent interaction with exon-product complexes", *Journal of Cell Biology*, 150, 309-320.

Mendez-Ferrer S., Bonnet D., Steensma D.P., Hasserjian R.P., Ghobrial I.M., Gribben J.G., Andreeff M., Krause D.S., (2020), "Bone marrow niches in haematological malignancies", *Nature Reviews Cancer*, 20, 285-298.

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 Cell Biology*, 26, 9484-9496.

Nastasi C., Mannarino L., D'Incalci M., (2020), "DNA Damage Response and Immune Defense", *International Journal of Molecular Sciences*, 21.

O'Sullivan J.M., Pai D.A., Cridge A.G., Engelke D.R., Ganley A.R., (2013), "The nucleolus: a raft adrift in the nuclear sea or the keystone in nuclear structure?", *Biomolecular Concepts*, 4, 277-286.

Oancea C., Ruster B., Henschler R., Puccetti E., Ruthardt M., (2010), "The t(6;9) associated DEK/CAN fusion protein targets a population of long-term repopulating hematopoietic stem cells for leukemogenic transformation", *Leukemia*, 24, 1910-1919.

Olson M.O.J., Dundr M., (2015). "Nucleolus: Structure and Function". Encyclopedia Of Life Sciences, "eLS".

Pang B., Qiao X., Janssen L., Velds A., Groothuis T., Kerkhoven R., Nieuwland M., Ovaas H., Rottenberg S., van Tellinghen O., Janssen J., Huijgens P., Zwart W., Neefjes J., (2013), "Drug-induced histone eviction from open chromatin contributes to the chemotherapeutic effects of doxorubicin", *Nature Communication*, 4, 1908.

Pease N.A., Wise-Draper T., Privette Vinnedge L., (2015), "Dissecting the Potential Interplay of DEK Functions in Inflammation and Cancer", *Journal of Oncology*, 2015, 106517.

Pecina-Slaus N., Kafka A., Salamon I., Bukovac A., (2020), "Mismatch Repair Pathway, Genome Stability and Cancer", *Frontiers in Molecular Biosciences*, 7, 122.

Pillai M.M., Yang X., Balakrishnan I., Bemis L., Torok-Storb B., (2010), "MiR-886-3p down regulates CXCL12 (SDF1) expression in human marrow stromal cells", *PLoS One*, 5, e14304.

Riley T., Sontag E., Chen P., Levine A., (2008), "Transcriptional control of human p53-regulated genes", *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9, 402-412.

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

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, 997-1005.

Russell K.C., Phinney D.G., Lacey M.R., Barrilleaux B.L., Meyertholen K.E., O'Connor K.C., (2010), "In vitro high-capacity assay to quantify the clonal heterogeneity in trilineage potential of mesenchymal stem cells reveals a complex hierarchy of lineage commitment", *Stem Cells*, 28, 788-798.

Sancho S.C., Ouchi T., (2015), "Cell Differentiation and Checkpoint", *International Journal of Cancer and Clinical Research*, 1.

Sanden C., Gullberg U., (2015), "The DEK oncoprotein and its emerging roles in gene regulation", *Leukemia*, 29, 1632-1636.

Sanden C., Jarvstrat L., Lennartsson A., Brattas P.L., Nilsson B., Gullberg U., (2014), "The DEK oncoprotein binds to highly and ubiquitously expressed genes with a dual role in their transcriptional regulation", *Molecular Cancer*, 13, 215.

Sawatsubashi S., Murata T., Lim J., Fujiki R., Ito S., Suzuki E., Tanabe M., Zhao Y., Kimura S., Fujiyama S., Ueda T., Umetsu D., Ito T., Takeyama K., Kato S., (2010), "A histone chaperone, DEK, transcriptionally coactivates a nuclear receptor", *Genes & Development*, 24, 159-170.

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

Sedgwick B., (2004), "Repairing DNA-methylation damage", *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5, 148-157.

Senchenkov A., Litvak D.A., Cabot M.C., (2001), "Targeting ceramide metabolism-- a strategy for overcoming drug resistance", *Journal of the National Cancer Institute*, 93, 347-357.

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

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

Spivak G., (2015), "Nucleotide excision repair in humans", *DNA Repair (Amst)*, 36, 13-18.

Swift L.P., Rephaeli A., Nudelman A., Phillips D.R., Cutts S.M., (2006), "Doxorubicin-DNA adducts induce a non-topoisomerase II-mediated form of cell death", *Cancer Research*, 66, 4863-4871.

Tang H., Shu M., Dai B., Xu L., Dong B., Gao G., Chen X., (2018), "DNA damage response-initiated cytokine secretion in bone marrow stromal cells promotes chemoresistance of myeloma cells", *Leukemia & Lymphoma*, 59, 2220-2226.

Thorn C.F., Oshiro C., Marsh S., Hernandez-Boussard T., McLeod H., Klein T.E., Altman R.B., (2011), "Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects", *Pharmacogenetic Genomics*, 21, 440-446.

Travlos G.S., (2006), "Normal structure, function, and histology of the bone marrow", *Toxicol Pathol*, 34, 548-565.

von Lindern M., Fornerod M., Soekarman N., van Baal S., Jaegle M., Hagemeyer A., Bootsma D., Grosveld G., (1992), "Translocation t(6;9) in acute non-lymphocytic leukaemia results in the formation of a DEK-CAN fusion gene", *Baillière's Clinical Haematology*, 5, 857-879.

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

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

Wardlaw C.P., Carr A.M., Oliver A.W., (2014), "TopBP1: A BRCT-scaffold protein functioning in multiple cellular pathways", *DNA Repair*, 22, 165-174.

Watson J.D., Gann A., Baker T.A., Levine M., Bell S.P., Losick R., Harrison S.C. (2014), "Molecular Biology of the Gene", 7th Edition, New York, Cold Spring Harbor.

West S.C., (2003), "Molecular views of recombination proteins and their control", *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4, 435-445.

Wise-Draper T.M., Allen H.V., Jones E.E., Habash K.B., Matsuo H., Wells S.I., (2006), "Apoptosis inhibition by the human DEK oncoprotein involves interference with p53 functions", *Molecular and Cellular Biology*, 26, 7506-7519.

Wise-Draper T.M., Mintz-Cole R.A., Morris T.A., Simpson D.S., Wikenheiser-Brokamp K.A., Currier M.A., Cripe T.P., Grosveld G.C., Wells S.I., (2009), "Overexpression of the cellular DEK protein promotes epithelial transformation in vitro and in vivo", *Cancer Research*, 69, 1792-1799.

Web 1, (2022), <https://www.atcc.org/products/crl-2496>, (Eriřim Tarihi: 27.11.2022)

Web 2, (2023), <http://scarc.library.oregonstate.edu/coll/pauling/dna/index.html>, (Eriřim Tarihi: 03.01.2023)

Web 3, (2023), <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1962/summary/>, (Eriřim Tarihi: 03.01.2023)

Web 4, (2022), https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000124795;r=6:18223860-18264548, (Eriřim Tarihi: 17.11.2022)

Yan S., Sorrell M., Berman Z., (2014), "Functional interplay between ATM/ATR-mediated DNA damage response and DNA repair pathways in oxidative stress", *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71, 3951-3967.

Yang F., Teves S.S., Kemp C.J., Henikoff S., (2014), "Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics", *Biochimica et Biophysica Acta*, 1845, 84-89.

Zhang P., Wei Y., Wang L., Debeb B.G., Yuan Y., Zhang J., Yuan J., Wang M., Chen D., Sun Y., Woodward W.A., Liu Y., Dean D.C., Liang H., Hu Y., Ang K.K., Hung M.C., Chen J., Ma L., (2014), "ATM-mediated stabilization of ZEB1 promotes DNA damage response and radioresistance through CHK1", *Nature Cell Biology*, 16, 864-875.

Zhao E., Xu H., Wang L., Kryczek I., Wu K., Hu Y., Wang G., Zou W., (2012), "Bone marrow and the control of immunity", *Cellular & Molecular Immunology*, 9, 11-19.

Zhou B.B., Elledge S.J., (2000), "The DNA damage response: putting checkpoints in perspective", *Nature*, 408, 433-439.

Zinngrebe J., Debatin K.M., Fischer-Posovszky P., (2020), "Adipocytes in hematopoiesis and acute leukemia: friends, enemies, or innocent bystanders?", *Leukemia*, 34, 2305-2316.

ÖZGEÇMİŞ

Emrah Özçelik lisans eğitimini 2005-2010 yılları arasında Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nde tamamladı. 2015 yılında Gebze Teknik Üniversitesi (GTÜ), Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda yüksek lisansını bitirdi. Hemen ardından aynı bölümde doktora çalışmalarına başladı. Emrah Özçelik, 2013 yılından bu yana GTÜ, Temel Bilimler Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünde araştırma görevlisi olarak çalışmalarını sürdürmektedir.



	610	620	630	640	650	660
Consensus	CCTTCTGGCA	AACCATTGCC	GAAATCTAAA	AAAACCTGTA	GCAAAGGCAG	TAAAAAGGAA
FlagDEK1 cds	CCTTCTGGCA	AACCATTGCC	GAAATCTAAA	AAAACCTGTA	GCAAAGGCAG	TAAAAAGGAA
DEK1 cds	CCTTCTGGCA	AACCATTGCC	GAAATCTAAA	AAAACCTGTA	GCAAAGGCAG	TAAAAAGGAA

	670	680	690	700	710	720
Consensus	CGGAACAGTT	CTGGAATGGC	AAGGAAGGCT	AAGCGAACCA	AATGTCCTGA	AATTCTGTCA
FlagDEK1 cds	CGGAACAGTT	CTGGAATGGC	AAGGAAGGCT	AAGCGAACCA	AATGTCCTGA	AATTCTGTCA
DEK1 cds	CGGAACAGTT	CTGGAATGGC	AAGGAAGGCT	AAGCGAACCA	AATGTCCTGA	AATTCTGTCA

	730	740	750	760	770	780
Consensus	GATGAATCTA	GTAGTGATGA	AGATGAAAAG	AAAAACAAGG	AAGAGTCTTC	AGATGATGAA
FlagDEK1 cds	GATGAATCTA	GTAGTGATGA	AGATGAAAAG	AAAAACAAGG	AAGAGTCTTC	AGATGATGAA
DEK1 cds	GATGAATCTA	GTAGTGATGA	AGATGAAAAG	AAAAACAAGG	AAGAGTCTTC	AGATGATGAA

	790	800	810	820	830	840
Consensus	GATAAAGAAA	GTGAAGAGGA	GCCACCAAAA	AAGACAGCCA	AAAGAGAAAA	ACCTAAACAG
FlagDEK1 cds	GATAAAGAAA	GTGAAGAGGA	GCCACCAAAA	AAGACAGCCA	AAAGAGAAAA	ACCTAAACAG
DEK1 cds	GATAAAGAAA	GTGAAGAGGA	GCCACCAAAA	AAGACAGCCA	AAAGAGAAAA	ACCTAAACAG

	850	860	870	880	890	900
Consensus	AAAGTACTTT	CTAAAAGTAA	AAAATCTGTG	AAAAGTGCCA	ATGTTAAGAA	AGCAGATAGC
FlagDEK1 cds	AAAGTACTTT	CTAAAAGTAA	AAAATCTGTG	AAAAGTGCCA	ATGTTAAGAA	AGCAGATAGC
DEK1 cds	AAAGTACTTT	CTAAAAGTAA	AAAATCTGTG	AAAAGTGCCA	ATGTTAAGAA	AGCAGATAGC

	910	920	930	940	950	960
Consensus	AGCACCACCA	AGAAGAATCA	AAACAGTTCC	AAAAAAGAAA	GTGAGTCTGA	GGATAGTTCA
FlagDEK1 cds	AGCACCACCA	AGAAGAATCA	AAACAGTTCC	AAAAAAGAAA	GTGAGTCTGA	GGATAGTTCA
DEK1 cds	AGCACCACCA	AGAAGAATCA	AAACAGTTCC	AAAAAAGAAA	GTGAGTCTGA	GGATAGTTCA

	970	980	990	1000	1010	1020
Consensus	GATGATGAAC	CTTTAATTAA	AAAGTTGAAG	AAACCCCTTA	CAGATGAAGA	GTTAAAGGAA
FlagDEK1 cds	GATGATGAAC	CTTTAATTAA	AAAGTTGAAG	AAACCCCTTA	CAGATGAAGA	GTTAAAGGAA
DEK1 cds	GATGATGAAC	CTTTAATTAA	AAAGTTGAAG	AAACCCCTTA	CAGATGAAGA	GTTAAAGGAA

	1030	1040	1050	1060	1070	1080
Consensus	ACAATAAAGA	AATTACTGGC	CAGTGCTAAC	TTGGAAGAAG	TCACAATGAA	ACAGATTTGC
FlagDEK1 cds	ACAATAAAGA	AATTACTGGC	CAGTGCTAAC	TTGGAAGAAG	TCACAATGAA	ACAGATTTGC
DEK1 cds	ACAATAAAGA	AATTACTGGC	CAGTGCTAAC	TTGGAAGAAG	TCACAATGAA	ACAGATTTGC

	1090	1100	1110	1120	1130	1140
Consensus	AAAAAGGTCT	ATGAAAATTA	TCCTACTTAT	GATTTAACTG	AAAGAAAAGA	TTTCATAAAA
FlagDEK1 cds	AAAAAGGTCT	ATGAAAATTA	TCCTACTTAT	GATTTAACTG	AAAGAAAAGA	TTTCATAAAA
DEK1 cds	AAAAAGGTCT	ATGAAAATTA	TCCTACTTAT	GATTTAACTG	AAAGAAAAGA	TTTCATAAAA

	1150	1160	1170	1180	1190	
Consensus	ACAAGTGTAA	AAGAGCTAAT	TTCTTCAAAT	CACTAGTGAA	TTTCGCCCCC	CC
FlagDEK1 cds	ACAAGTGTAA	AAGAGCTAAT	TTCTTCAAAT	CACTAGTGAA	TTTCGCCCCC	CC
DEK1 cds	ACAAGTGTAA	AAGAGCTAAT	TTCTTCAAAT	CACTAGTGAA	TTTCGCCCCC	CC

Şekil B1.2: pMIGR1-FlagDEK1 cDNA'sı dizileme analizi 601-1192 bazları arası sonuçları. Consensus; 4 farklı primer ile dizileme sonuçlarının hizalaması ile oluşan dizi, FlagDEK1 cds; FlagDEK1'in protein kodlayan cDNA dizisi, DEK1 cds; insan DEK genin DEK1 proteinini kodlayan cDNA dizisi, sonlanma kodonu mor ve EcoRI kesim bölgesi sarı ile işaretlenmiştir.

EK C: pMIGR1-MycDEK1 Dizileme Analizi

	10	20	30	40	50	60
Consensus	TCTCTCGAGG	TTAACGAATT	CGATT	ATGCA	ACAAAAACTC	ATCTCAGAAG
MycDEK1 cds	-----	-----	-----	ATGCA	ACAAAAACTC	ATCTCAGAAG
DEK1 cds	-----	-----	ATG	-----	-----	-----
	70	80	90	100	110	120
Consensus	CGCCTCGGCC	CCTGCTGCGG	AGGGGGAGGG	AACCCCCACC	CAGCCC CGGT	CCGAGAAAAG
MycDEK1 cds	CGCCTCGGCC	CCTGCTGCGG	AGGGGGAGGG	AACCCCCACC	CAGCCC CGGT	CCGAGAAAAG
DEK1 cds	CGCCTCGGCC	CCTGCTGCGG	AGGGGGAGGG	AACCCCCACC	CAGCCC CGGT	CCGAGAAAAG
	130	140	150	160	170	180
Consensus	ACCCGAAATG	CCCGGTCCCA	GAGAGGAGAG	CGAGGAGGAA	GAGGACGAGG	ACGACGAGGA
MycDEK1 cds	ACCCGAAATG	CCCGGTCCCA	GAGAGGAGAG	CGAGGAGGAA	GAGGACGAGG	ACGACGAGGA
DEK1 cds	ACCCGAAATG	CCCGGTCCCA	GAGAGGAGAG	CGAGGAGGAA	GAGGACGAGG	ACGACGAGGA
	190	200	210	220	230	240
Consensus	GGAGGAGGAG	GAGGAAAAAG	AAAAGAGTCT	CATCGTGGAA	GGCAAGAGGG	AAAAGAAAAA
MycDEK1 cds	GGAGGAGGAG	GAGGAAAAAG	AAAAGAGTCT	CATCGTGGAA	GGCAAGAGGG	AAAAGAAAAA
DEK1 cds	GGAGGAGGAG	GAGGAAAAAG	AAAAGAGTCT	CATCGTGGAA	GGCAAGAGGG	AAAAGAAAAA
	250	260	270	280	290	300
Consensus	AGTAGAGAGG	TTGACAATGC	AAGTCTCTTC	CTTACAGAGA	GAGCCATTTA	CAATTGCACA
MycDEK1 cds	AGTAGAGAGG	TTGACAATGC	AAGTCTCTTC	CTTACAGAGA	GAGCCATTTA	CAATTGCACA
DEK1 cds	AGTAGAGAGG	TTGACAATGC	AAGTCTCTTC	CTTACAGAGA	GAGCCATTTA	CAATTGCACA
	310	320	330	340	350	360
Consensus	AGGAAAGGGG	CAGAACTTT	GTGAAATTGA	GAGGATACAT	TTTTTTCTAA	GTAAGAAGAA
MycDEK1 cds	AGGAAAGGGG	CAGAACTTT	GTGAAATTGA	GAGGATACAT	TTTTTTCTAA	GTAAGAAGAA
DEK1 cds	AGGAAAGGGG	CAGAACTTT	GTGAAATTGA	GAGGATACAT	TTTTTTCTAA	GTAAGAAGAA
	370	380	390	400	410	420
Consensus	AACCGATGAA	CTTAGAAATC	TACACAAACT	GCTTTACAAC	AGGCCAGGCA	CTGTGCCTC
MycDEK1 cds	AACCGATGAA	CTTAGAAATC	TACACAAACT	GCTTTACAAC	AGGCCAGGCA	CTGTGCCTC
DEK1 cds	AACCGATGAA	CTTAGAAATC	TACACAAACT	GCTTTACAAC	AGGCCAGGCA	CTGTGCCTC
	430	440	450	460	470	480
Consensus	ATTAAGAAG	AATGTGGGTC	AGTTCAGTGG	CTTTCCATT	GAAAAAGGAA	GTGTCCAATA
MycDEK1 cds	ATTAAGAAG	AATGTGGGTC	AGTTCAGTGG	CTTTCCATT	GAAAAAGGAA	GTGTCCAATA
DEK1 cds	ATTAAGAAG	AATGTGGGTC	AGTTCAGTGG	CTTTCCATT	GAAAAAGGAA	GTGTCCAATA
	490	500	510	520	530	540
Consensus	TAAAAAGAAG	GAAGAAATGT	TGAAAAAATT	TAGAAATGCC	ATGTTAAAGA	GCATCTGTGA
MycDEK1 cds	TAAAAAGAAG	GAAGAAATGT	TGAAAAAATT	TAGAAATGCC	ATGTTAAAGA	GCATCTGTGA
DEK1 cds	TAAAAAGAAG	GAAGAAATGT	TGAAAAAATT	TAGAAATGCC	ATGTTAAAGA	GCATCTGTGA
	550	560	570	580	590	600
Consensus	GGTTCTTGAT	TTGGAGAGAT	CAGGTGTA	TAGTGA	ACTA	GTGAAGAGGA
MycDEK1 cds	GGTTCTTGAT	TTGGAGAGAT	CAGGTGTA	TAGTGA	ACTA	GTGAAGAGGA
DEK1 cds	GGTTCTTGAT	TTGGAGAGAT	CAGGTGTA	TAGTGA	ACTA	GTGAAGAGGA

Şekil C1.1: pMIGR1-MycDEK1 cDNA'sı dizileme analizi 1-600 bazları arası sonuçları. Consensus; 4 farklı primer ile dizileme sonuçlarının hizalaması ile oluşan dizi, MycDEK1 cds; MycDEK1'in protein kodlayan cDNA dizisi, DEK1 cds; insan *DEK* genin DEK1 proteinini kodlayan cDNA dizisi, başlangıç kodonu yeşil, Flag dizisi kırmızı ve EcoRI kesim bölgesi sarı ile işaretlenmiştir.

	610	620	630	640	650	660
Consensus	CTTAATGCAT	CCAAAGCCTT	CTGGCAAACC	ATTGCCGAAA	TCTAAAAAAA	CTTGTAGCAA
MycDEK1 cds	CTTAATGCAT	CCAAAGCCTT	CTGGCAAACC	ATTGCCGAAA	TCTAAAAAAA	CTTGTAGCAA
DEK1 cds	CTTAATGCAT	CCAAAGCCTT	CTGGCAAACC	ATTGCCGAAA	TCTAAAAAAA	CTTGTAGCAA

	670	680	690	700	710	720
Consensus	AGGCAGTAAA	AAGGAACGGA	ACAGTTCTGG	AATGGCAAGG	AAGGCTAAGC	GAACCAAATG
MycDEK1 cds	AGGCAGTAAA	AAGGAACGGA	ACAGTTCTGG	AATGGCAAGG	AAGGCTAAGC	GAACCAAATG
DEK1 cds	AGGCAGTAAA	AAGGAACGGA	ACAGTTCTGG	AATGGCAAGG	AAGGCTAAGC	GAACCAAATG

	730	740	750	760	770	780
Consensus	TCCTGAAATT	CTGTCAGATG	AATCTAGTAG	TGATGAAGAT	GAAAAGAAAA	ACAAGGAAGA
MycDEK1 cds	TCCTGAAATT	CTGTCAGATG	AATCTAGTAG	TGATGAAGAT	GAAAAGAAAA	ACAAGGAAGA
DEK1 cds	TCCTGAAATT	CTGTCAGATG	AATCTAGTAG	TGATGAAGAT	GAAAAGAAAA	ACAAGGAAGA

	790	800	810	820	830	840
Consensus	GTCTTCAGAT	GATGAAGATA	AAGAAAGTGA	AGAGGAGCCA	CCAAAAAAGA	CAGCCAAAAG
MycDEK1 cds	GTCTTCAGAT	GATGAAGATA	AAGAAAGTGA	AGAGGAGCCA	CCAAAAAAGA	CAGCCAAAAG
DEK1 cds	GTCTTCAGAT	GATGAAGATA	AAGAAAGTGA	AGAGGAGCCA	CCAAAAAAGA	CAGCCAAAAG

	850	860	870	880	890	900
Consensus	AGAAAAACCT	AAACAGAAAG	CTACTTCTAA	AAGTAAAAAA	TCTGTGAAAA	GTGCCAATGT
MycDEK1 cds	AGAAAAACCT	AAACAGAAAG	CTACTTCTAA	AAGTAAAAAA	TCTGTGAAAA	GTGCCAATGT
DEK1 cds	AGAAAAACCT	AAACAGAAAG	CTACTTCTAA	AAGTAAAAAA	TCTGTGAAAA	GTGCCAATGT

	910	920	930	940	950	960
Consensus	TAAGAAAGCA	GATAGCAGCA	CCACCAAGAA	GAATCAAAC	AGTTCCAAA	AAGAAAGTGA
MycDEK1 cds	TAAGAAAGCA	GATAGCAGCA	CCACCAAGAA	GAATCAAAC	AGTTCCAAA	AAGAAAGTGA
DEK1 cds	TAAGAAAGCA	GATAGCAGCA	CCACCAAGAA	GAATCAAAC	AGTTCCAAA	AAGAAAGTGA

	970	980	990	1000	1010	1020
Consensus	GTCTGAGGAT	AGTTCAGATG	ATGAACCTTT	AATTA AAAAG	TTGAAGAAAC	CCCCTACAGA
MycDEK1 cds	GTCTGAGGAT	AGTTCAGATG	ATGAACCTTT	AATTA AAAAG	TTGAAGAAAC	CCCCTACAGA
DEK1 cds	GTCTGAGGAT	AGTTCAGATG	ATGAACCTTT	AATTA AAAAG	TTGAAGAAAC	CCCCTACAGA

	1030	1040	1050	1060	1070	1080
Consensus	TGAAGAGTTA	AAGGAAACAA	TAAAGAAATT	ACTGGCCAGT	GCTAACTTGG	AAGAAGTCAC
MycDEK1 cds	TGAAGAGTTA	AAGGAAACAA	TAAAGAAATT	ACTGGCCAGT	GCTAACTTGG	AAGAAGTCAC
DEK1 cds	TGAAGAGTTA	AAGGAAACAA	TAAAGAAATT	ACTGGCCAGT	GCTAACTTGG	AAGAAGTCAC

	1090	1100	1110	1120	1130	1140
Consensus	AATGAAACAG	ATTTGCAAAA	AGGTCTATGA	AAATTATCCT	ACTTATGATT	TAAC TGAAAG
MycDEK1 cds	AATGAAACAG	ATTTGCAAAA	AGGTCTATGA	AAATTATCCT	ACTTATGATT	TAAC TGAAAG
DEK1 cds	AATGAAACAG	ATTTGCAAAA	AGGTCTATGA	AAATTATCCT	ACTTATGATT	TAAC TGAAAG

	1150	1160	1170	1180	1190	1200
Consensus	AAAAGATTTC	ATAAAAAACAA	CTGTAAAAGA	GCTAATTTCT	TGAATCACTA	GTGAATTCG
MycDEK1 cds	AAAAGATTTC	ATAAAAAACAA	CTGTAAAAGA	GCTAATTTCT	TGA-----	-----CG
DEK1 cds	AAAAGATTTC	ATAAAAAACAA	CTGTAAAAGA	GCTAATTTCT	TGA-----	-----CG

Şekil C1.2: pMIGR1-MycDEK1 cDNA'sı dizileme analizi 601-1200 bazları arası sonuçları. Consensus; 4 farklı primer ile dizileme sonuçlarının hizalaması ile oluşan dizi, MycDEK1 cds; MycDEK1'in protein kodlayan cDNA dizisi, DEK1 cds; insan DEK genin DEK1 proteinini kodlayan cDNA dizisi, sonlanma kodonu mor ve EcoRI kesim bölgesi sarı ile işaretlenmiştir.

EK D: pMIGR1-FlagDEK2 Dizileme Analizi

	10	20	30	40	50	60
DEK1 cds	-----	-----	-----	-----	-----	-----TC
Consensus	TCGAGGTTAA	CGAATTCGAT	TATCGACTAC	AAAGACGATG	ACGACAAATC	CGCCTCGGCC
FlagDEK2 cds	-----	-----	-----	-----	-----	-----TC
DEK2 cds	-----	-----	-----	-----	-----	-----TC
	70	80	90	100	110	120
DEK1 cds	CCTGCTGCGG	AGGGGGAGGG	AACCCCCACC	CAGCCCGCGT	CCGAGAAAGA	ACCCGAAATG
Consensus	CCTGCTGCGG	AGGGGGAGGG	AACCCCCACC	CAGCCCGCGT	CCGAGAAAGA	ACCCGAAATG
FlagDEK2 cds	CCTGCTGCGG	AGGGGGAGGG	AACCCCCACC	CAGCCCGCGT	CCGAGAAAGA	ACCCGAAATG
DEK2 cds	CCTGCTGCGG	AGGGGGAGGG	AACCCCCACC	CAGCCCGCGT	CCGAGAAAGA	ACCCGAAATG
	130	140	150	160	170	180
DEK1 cds	CCCGGTCCCA	GAGAGGAGAG	CGAGGAGGAA	GAGGACGAGG	ACGACGAGGA	GGAGGAGGAG
Consensus	CCCGGTCCCA	GAGAGGAGAG	CGAGGAGGAA	GAGGACGAGG	ACGACGAGGA	GGAGGAGGAG
FlagDEK2 cds	CCCGGTCCCA	GAGAGGAGAG	CGAGGAGGAA	GAGGACGAGG	ACGACGAGGA	GGAGGAGGAG
DEK2 cds	CCCGGTCCCA	GAGAGGAGAG	CGAGGAGGAA	GAGGACGAGG	ACGACGAGGA	GGAGGAGGAG
	190	200	210	220	230	240
DEK1 cds	GAGGAAAAAG	AAAAGAGTCT	CATCGTGAA	GGCAAGAGGG	AAAAGAAAAA	AGTAGAGAGG
Consensus	GAGGAAAAAG	-----	-----	-----	-----	-----
FlagDEK2 cds	GAGGAAAAAG	-----	-----	-----	-----	-----
DEK2 cds	GAGGAAAAAG	-----	-----	-----	-----	-----
	250	260	270	280	290	300
DEK1 cds	TTGACAATGC	AAGTCTCTTC	CTTACAGAGA	GAGCCATTTA	CAATTGCACA	AGGAAAGGGG
Consensus	-----	-----	-----	-----	-----	--GAAAGGGG
FlagDEK2 cds	-----	-----	-----	-----	-----	--GAAAGGGG
DEK2 cds	-----	-----	-----	-----	-----	--GAAAGGGG
	310	320	330	340	350	360
DEK1 cds	CAGAAACTTT	GTGAAATTGA	GAGGATACAT	TTTTTCTAA	GTAAGAAGAA	AACCGATGAA
Consensus	CAGAAACTTT	GTGAAATTGA	GAGGATACAT	TTTTTCTAA	GTAAGAAGAA	AACCGATGAA
FlagDEK2 cds	CAGAAACTTT	GTGAAATTGA	GAGGATACAT	TTTTTCTAA	GTAAGAAGAA	AACCGATGAA
DEK2 cds	CAGAAACTTT	GTGAAATTGA	GAGGATACAT	TTTTTCTAA	GTAAGAAGAA	AACCGATGAA
	370	380	390	400	410	420
DEK1 cds	CTTAGAAATC	TACACAAACT	GCTTTACAAC	AGGCCAGGCA	CTGTGTCCCT	ATTAAGAAG
Consensus	CTTAGAAATC	TACACAAACT	GCTTTACAAC	AGGCCAGGCA	CTGTGTCCCT	ATTAAGAAG
FlagDEK2 cds	CTTAGAAATC	TACACAAACT	GCTTTACAAC	AGGCCAGGCA	CTGTGTCCCT	ATTAAGAAG
DEK2 cds	CTTAGAAATC	TACACAAACT	GCTTTACAAC	AGGCCAGGCA	CTGTGTCCCT	ATTAAGAAG
	430	440	450	460	470	480
DEK1 cds	AATGTGGGTC	AGTTCAGTGG	CTTCCATT	GAAAAAGGAA	GTGTCCAATA	TAAAAAGAAG
Consensus	AATGTGGGTC	AGTTCAGTGG	CTTCCATT	GAAAAAGGAA	GTGTCCAATA	TAAAAAGAAG
FlagDEK2 cds	AATGTGGGTC	AGTTCAGTGG	CTTCCATT	GAAAAAGGAA	GTGTCCAATA	TAAAAAGAAG
DEK2 cds	AATGTGGGTC	AGTTCAGTGG	CTTCCATT	GAAAAAGGAA	GTGTCCAATA	TAAAAAGAAG
	490	500	510	520	530	540
DEK1 cds	GAAGAAATGT	TGAAAAAATT	TAGAAATGCC	ATGTTAAAGA	GCATCTGTGA	GGTCTTTGAT
Consensus	GAAGAAATGT	TGAAAAAATT	TAGAAATGCC	ATGTTAAAGA	GCATCTGTGA	GGTCTTTGAT
FlagDEK2 cds	GAAGAAATGT	TGAAAAAATT	TAGAAATGCC	ATGTTAAAGA	GCATCTGTGA	GGTCTTTGAT
DEK2 cds	GAAGAAATGT	TGAAAAAATT	TAGAAATGCC	ATGTTAAAGA	GCATCTGTGA	GGTCTTTGAT

Şekil D1.1: pMIGR1-FlagDEK2 cDNA'sı dizileme analizi 1-540 bazları arası sonuçları. DEK1 cds; insan *DEK* genin DEK1 proteinini kodlayan cDNA dizisi, Consensus; 4 farklı primer ile dizileme sonuçlarının hizalaması ile oluşan dizi, FlagDEK2 cds; FlagDEK2'nin protein kodlayan cDNA dizisi, DEK1 cds; insan *DEK* genin DEK2 proteinini kodlayan cDNA dizisi, başlangıç kodonu yeşil, Flag dizisi kırmızı, DEK2'de kırılan bölge turkuvaz ve EcoRI kesim bölgesi sarı ile işaretlenmiştir.

	550	560	570	580	590	600
DEK1 cds	TTGGAGAGAT	CAGGTGTAAA	TAGTGAAC	GTGAAGAGGA	TCTTGAATTT	CTTAATGCAT
Consensus	TTGGAGAGAT	CAGGTGTAAA	TAGTGAAC	GTGAAGAGGA	TCTTGAATTT	CTTAATGCAT
FlagDEK2 cds	TTGGAGAGAT	CAGGTGTAAA	TAGTGAAC	GTGAAGAGGA	TCTTGAATTT	CTTAATGCAT
DEK2 cds	TTGGAGAGAT	CAGGTGTAAA	TAGTGAAC	GTGAAGAGGA	TCTTGAATTT	CTTAATGCAT
	610	620	630	640	650	660
DEK1 cds	CCAAAGCCTT	CTGGCAAACC	ATTGCCGAAA	TCTAAAAAAA	CTTGTAGCAA	AGGCAGTAAA
Consensus	CCAAAGCCTT	CTGGCAAACC	ATTGCCGAAA	TCTAAAAAAA	CTTGTAGCAA	AGGCAGTAAA
FlagDEK2 cds	CCAAAGCCTT	CTGGCAAACC	ATTGCCGAAA	TCTAAAAAAA	CTTGTAGCAA	AGGCAGTAAA
DEK2 cds	CCAAAGCCTT	CTGGCAAACC	ATTGCCGAAA	TCTAAAAAAA	CTTGTAGCAA	AGGCAGTAAA
	670	680	690	700	710	720
DEK1 cds	AAGGAACCGA	ACAGTCTTGG	AATGGCAAGG	AAGGCTAAGC	GAACCAAATG	TCCTGAAATT
Consensus	AAGGAACCGA	ACAGTCTTGG	AATGGCAAGG	AAGGCTAAGC	GAACCAAATG	TCCTGAAATT
FlagDEK2 cds	AAGGAACCGA	ACAGTCTTGG	AATGGCAAGG	AAGGCTAAGC	GAACCAAATG	TCCTGAAATT
DEK2 cds	AAGGAACCGA	ACAGTCTTGG	AATGGCAAGG	AAGGCTAAGC	GAACCAAATG	TCCTGAAATT
	730	740	750	760	770	780
DEK1 cds	CTGTCAGATG	AATCTAGTAG	TGATGAAGAT	GAAAAGAAAA	ACAAGGAAGA	GTCTTCAGAT
Consensus	CTGTCAGATG	AATCTAGTAG	TGATGAAGAT	GAAAAGAAAA	ACAAGGAAGA	GTCTTCAGAT
FlagDEK2 cds	CTGTCAGATG	AATCTAGTAG	TGATGAAGAT	GAAAAGAAAA	ACAAGGAAGA	GTCTTCAGAT
DEK2 cds	CTGTCAGATG	AATCTAGTAG	TGATGAAGAT	GAAAAGAAAA	ACAAGGAAGA	GTCTTCAGAT
	790	800	810	820	830	840
DEK1 cds	GATGAAGATA	AAGAAAGTGA	AGAGGAGCCA	CCAAAAAAGA	CAGCCAAAAG	AGAAAAACCT
Consensus	GATGAAGATA	AAGAAAGTGA	AGAGGAGCCA	CCAAAAAAGA	CAGCCAAAAG	AGAAAAACCT
FlagDEK2 cds	GATGAAGATA	AAGAAAGTGA	AGAGGAGCCA	CCAAAAAAGA	CAGCCAAAAG	AGAAAAACCT
DEK2 cds	GATGAAGATA	AAGAAAGTGA	AGAGGAGCCA	CCAAAAAAGA	CAGCCAAAAG	AGAAAAACCT
	850	860	870	880	890	900
DEK1 cds	AAACAGAAAG	CTACTTCTAA	AAGTAAAAAA	TCTGTGAAAA	GTGCCAATGT	TAAGAAAGCA
Consensus	AAACAGAAAG	CTACTTCTAA	AAGTAAAAAA	TCTGTGAAAA	GTGCCAATGT	TAAGAAAGCA
FlagDEK2 cds	AAACAGAAAG	CTACTTCTAA	AAGTAAAAAA	TCTGTGAAAA	GTGCCAATGT	TAAGAAAGCA
DEK2 cds	AAACAGAAAG	CTACTTCTAA	AAGTAAAAAA	TCTGTGAAAA	GTGCCAATGT	TAAGAAAGCA
	910	920	930	940	950	960
DEK1 cds	GATAGCAGCA	CCACCAAGAA	GAATCAAAC	AGTTCCAAAA	AAGAAAGTGA	GTCTGAGGAT
Consensus	GATAGCAGCA	CCACCAAGAA	GAATCAAAC	AGTTCCAAAA	AAGAAAGTGA	GTCTGAGGAT
FlagDEK2 cds	GATAGCAGCA	CCACCAAGAA	GAATCAAAC	AGTTCCAAAA	AAGAAAGTGA	GTCTGAGGAT
DEK2 cds	GATAGCAGCA	CCACCAAGAA	GAATCAAAC	AGTTCCAAAA	AAGAAAGTGA	GTCTGAGGAT
	970	980	990	1000	1010	1020
DEK1 cds	AGTTCAGATG	ATGAACCTTT	AATTA AAAAG	TTGAAGAAAC	CCCCTACAGA	TGAAGAGTTA
Consensus	AGTTCAGATG	ATGAACCTTT	AATTA AAAAG	TTGAAGAAAC	CCCCTACAGA	TGAAGAGTTA
FlagDEK2 cds	AGTTCAGATG	ATGAACCTTT	AATTA AAAAG	TTGAAGAAAC	CCCCTACAGA	TGAAGAGTTA
DEK2 cds	AGTTCAGATG	ATGAACCTTT	AATTA AAAAG	TTGAAGAAAC	CCCCTACAGA	TGAAGAGTTA
	1030	1040	1050	1060	1070	1080
DEK1 cds	AAGGAAACAA	TAAAGAAATT	ACTGGCCAGT	GCTAACTTGG	AAGAAGTCAC	AATGAAACAG
Consensus	AAGGAAACAA	TAAAGAAATT	ACTGGCCAGT	GCTAACTTGG	AAGAAGTCAC	AATGAAACAG
FlagDEK2 cds	AAGGAAACAA	TAAAGAAATT	ACTGGCCAGT	GCTAACTTGG	AAGAAGTCAC	AATGAAACAG
DEK2 cds	AAGGAAACAA	TAAAGAAATT	ACTGGCCAGT	GCTAACTTGG	AAGAAGTCAC	AATGAAACAG
	1090	1100	1110	1120	1130	1140
DEK1 cds	ATTTGCAAAA	AGGTCTATGA	AAATTATCCT	ACTTATGATT	TAAGTAAAAG	AAAAGATTTT
Consensus	ATTTGCAAAA	AGGTCTATGA	AAATTATCCT	ACTTATGATT	TAAGTAAAAG	AAAAGATTTT
FlagDEK2 cds	ATTTGCAAAA	AGGTCTATGA	AAATTATCCT	ACTTATGATT	TAAGTAAAAG	AAAAGATTTT
DEK2 cds	ATTTGCAAAA	AGGTCTATGA	AAATTATCCT	ACTTATGATT	TAAGTAAAAG	AAAAGATTTT
	1150	1160	1170	1180	1190	
DEK1 cds	ATAAAAACAA	CTGTAAAAGA	GCTAATTTCT	TGA-----	-----	-----
Consensus	ATAAAAACAA	CTGTAAAAGA	GCTAATTTCT	TGAATCACT	AGTGAATTC	GC-----
FlagDEK2 cds	ATAAAAACAA	CTGTAAAAGA	GCTAATTTCT	TGA-----	-----	-----
DEK2 cds	ATAAAAACAA	CTGTAAAAGA	GCTAATTTCT	TGA-----	-----	-----

Şekil D1.2: pMIGR1-FlagDEK2 cDNA'sı dizileme analizi 1-540 bazları arası sonuçları. DEK1 cds; insan *DEK* genin DEK1 proteinini kodlayan cDNA dizisi, Consensus; 4 farklı primer ile dizileme sonuçlarının hizalaması ile oluşan dizi, FlagDEK2 cds; FlagDEK2'nin protein kodlayan cDNA dizisi, DEK1 cds; insan *DEK* genin DEK2 proteinini kodlayan cDNA dizisi, sonlanma kodonu mor ve EcoRI kesim bölgesi sarı ile işaretlenmiştir.

EK E: pMIGR1-MycDEK2 Dizileme Analizi

	10	20	30	40	50	60
DEK1 cds	-----	ATG	-----	-----	-----	TCC GCCTCGGCC
Consensus	TAACGAATTC	GATTATG	GAA CAAAACTCA	TCTCAGAAGA	GGATCTG	TCC GCCTCGGCC
MycDEK2 cds	-----	ATG	GAA CAAAACTCA	TCTCAGAAGA	GGATCTG	TCC GCCTCGGCC
DEK2 cds	-----	ATG	-----	-----	-----	TCC GCCTCGGCC
	70	80	90	100	110	120
DEK1 cds	CTGCTGCGGA	GGGGGAGGGA	ACCCCCACCC	AGCCC CGCTC	CGAGAAAGAA	CCCGAAATGC
Consensus	CTGCTGCGGA	GGGGGAGGGA	ACCCCCACCC	AGCCC CGCTC	CGAGAAAGAA	CCCGAAATGC
MycDEK2 cds	CTGCTGCGGA	GGGGGAGGGA	ACCCCCACCC	AGCCC CGCTC	CGAGAAAGAA	CCCGAAATGC
DEK2 cds	CTGCTGCGGA	GGGGGAGGGA	ACCCCCACCC	AGCCC CGCTC	CGAGAAAGAA	CCCGAAATGC
	130	140	150	160	170	180
DEK1 cds	CCGGTCCCAG	AGAGGAGAGC	GAGGAGGAAG	AGGACGAGGA	CGACGAGGAG	GAGGAGGAGG
Consensus	CCGGTCCCAG	AGAGGAGAGC	GAGGAGGAAG	AGGACGAGGA	CGACGAGGAG	GAGGAGGAGG
MycDEK2 cds	CCGGTCCCAG	AGAGGAGAGC	GAGGAGGAAG	AGGACGAGGA	CGACGAGGAG	GAGGAGGAGG
DEK2 cds	CCGGTCCCAG	AGAGGAGAGC	GAGGAGGAAG	AGGACGAGGA	CGACGAGGAG	GAGGAGGAGG
	190	200	210	220	230	240
DEK1 cds	AGGAAAAAG	AAAGAGTCTC	ATCGTGGAAAG	GCAAGAGGGA	AAAGAAAAA	GTAGAGAGGT
Consensus	AGGAAAAAG	-----	-----	-----	-----	-----
MycDEK2 cds	AGGAAAAAG	-----	-----	-----	-----	-----
DEK2 cds	AGGAAAAAG	-----	-----	-----	-----	-----
	250	260	270	280	290	300
DEK1 cds	TTGACAATGCA	AGTCTCTTCC	TTACAGAGAG	AGCCATTTAC	AATTGCACAA	GGAAGGGGC
Consensus	-----	-----	-----	-----	-----	-GAAAGGGGC
MycDEK2 cds	-----	-----	-----	-----	-----	-GAAAGGGGC
DEK2 cds	-----	-----	-----	-----	-----	-GAAAGGGGC
	310	320	330	340	350	360
DEK1 cds	AGAAACTTTG	TGAAATTGAG	AGGATACATT	TTTTTCTAAG	TAAGAAGAAA	ACCGATGAAC
Consensus	AGAAACTTTG	TGAAATTGAG	AGGATACATT	TTTTTCTAAG	TAAGAAGAAA	ACCGATGAAC
MycDEK2 cds	AGAAACTTTG	TGAAATTGAG	AGGATACATT	TTTTTCTAAG	TAAGAAGAAA	ACCGATGAAC
DEK2 cds	AGAAACTTTG	TGAAATTGAG	AGGATACATT	TTTTTCTAAG	TAAGAAGAAA	ACCGATGAAC
	370	380	390	400	410	420
DEK1 cds	TTAGAAATCT	ACACAAACTG	CTTTACAACA	GGCCAGGCAC	TGTGTCTCTCA	TTAAAGAAGA
Consensus	TTAGAAATCT	ACACAAACTG	CTTTACAACA	GGCCAGGCAC	TGTGTCTCTCA	TTAAAGAAGA
MycDEK2 cds	TTAGAAATCT	ACACAAACTG	CTTTACAACA	GGCCAGGCAC	TGTGTCTCTCA	TTAAAGAAGA
DEK2 cds	TTAGAAATCT	ACACAAACTG	CTTTACAACA	GGCCAGGCAC	TGTGTCTCTCA	TTAAAGAAGA
	430	440	450	460	470	480
DEK1 cds	ATGTGGGTCA	GTTCAAGTGC	TTTCCATTG	AAAAAGGAAG	TGTCCAATAT	AAAAAGAAGG
Consensus	ATGTGGGTCA	GTTCAAGTGC	TTTCCATTG	AAAAAGGAAG	TGTCCAATAT	AAAAAGAAGG
MycDEK2 cds	ATGTGGGTCA	GTTCAAGTGC	TTTCCATTG	AAAAAGGAAG	TGTCCAATAT	AAAAAGAAGG
DEK2 cds	ATGTGGGTCA	GTTCAAGTGC	TTTCCATTG	AAAAAGGAAG	TGTCCAATAT	AAAAAGAAGG
	490	500	510	520	530	540
DEK1 cds	AAGAAATGTT	GAAAAAATTT	AGAAATGCCA	TGTTAAAGAG	CATCTGTGAG	GTTCTTGATT
Consensus	AAGAAATGTT	GAAAAAATTT	AGAAATGCCA	TGTTAAAGAG	CATCTGTGAG	GTTCTTGATT
MycDEK2 cds	AAGAAATGTT	GAAAAAATTT	AGAAATGCCA	TGTTAAAGAG	CATCTGTGAG	GTTCTTGATT
DEK2 cds	AAGAAATGTT	GAAAAAATTT	AGAAATGCCA	TGTTAAAGAG	CATCTGTGAG	GTTCTTGATT

Şekil E1.1: pMIGR1-MycDEK2 cDNA'sı dizileme analizi 1-540 bazları arası sonuçları. DEK1 cds; insan *DEK* genin DEK1 proteinini kodlayan cDNA dizisi, Consensus; 4 farklı primer ile dizileme sonuçlarının hizalaması ile oluşan dizi, MycDEK2 cds; MycDEK2'nin protein kodlayan cDNA dizisi, DEK2 cds; insan *DEK* genin DEK2 proteinini kodlayan cDNA dizisi, başlangıç kodonu yeşil, Flag dizisi kırmızı, DEK2'de kırılan bölge turkuvaz ve EcoRI kesim bölgesi sarı ile işaretlenmiştir.

	550 560 570 580 590 600
DEK1 cds	TGGAGAGATC AGGTGTAAT AGTGAAC TAGAAGAGGAT CTTGAATTTC TTAATGCATC
Consensus	TGGAGAGATC AGGTGTAAT AGTGAAC TAGAAGAGGAT CTTGAATTTC TTAATGCATC
MycDEK2 cds	TGGAGAGATC AGGTGTAAT AGTGAAC TAGAAGAGGAT CTTGAATTTC TTAATGCATC
DEK2 cds	TGGAGAGATC AGGTGTAAT AGTGAAC TAGAAGAGGAT CTTGAATTTC TTAATGCATC

	610 620 630 640 650 660
DEK1 cds	CAAAGCCTTC TGGCAAACCA TTGCCGAAAT CTAATAAAAC TTGTAGCAAA GGCAGTAAAA
Consensus	CAAAGCCTTC TGGCAAACCA TTGCCGAAAT CTAATAAAAC TTGTAGCAAA GGCAGTAAAA
MycDEK2 cds	CAAAGCCTTC TGGCAAACCA TTGCCGAAAT CTAATAAAAC TTGTAGCAAA GGCAGTAAAA
DEK2 cds	CAAAGCCTTC TGGCAAACCA TTGCCGAAAT CTAATAAAAC TTGTAGCAAA GGCAGTAAAA

	670 680 690 700 710 720
DEK1 cds	AGGAACGGAA CAGTCTGGA ATGGCAAGGA AGGCTAAGCG AACCAATGT CTTGAATTTC
Consensus	AGGAACGGAA CAGTCTGGA ATGGCAAGGA AGGCTAAGCG AACCAATGT CTTGAATTTC
MycDEK2 cds	AGGAACGGAA CAGTCTGGA ATGGCAAGGA AGGCTAAGCG AACCAATGT CTTGAATTTC
DEK2 cds	AGGAACGGAA CAGTCTGGA ATGGCAAGGA AGGCTAAGCG AACCAATGT CTTGAATTTC

	730 740 750 760 770 780
DEK1 cds	TGTCAGATGA ATCTAGTAGT GATGAAGATG AAAAGAAAA CAAGGAAGAG TCTTCAGATG
Consensus	TGTCAGATGA ATCTAGTAGT GATGAAGATG AAAAGAAAA CAAGGAAGAG TCTTCAGATG
MycDEK2 cds	TGTCAGATGA ATCTAGTAGT GATGAAGATG AAAAGAAAA CAAGGAAGAG TCTTCAGATG
DEK2 cds	TGTCAGATGA ATCTAGTAGT GATGAAGATG AAAAGAAAA CAAGGAAGAG TCTTCAGATG

	790 800 810 820 830 840
DEK1 cds	ATGAAGATAA AGAAAGTGAA GAGGAGCCAC CAAAAAAGC AGCCAAAAGA GAAAAACCTA
Consensus	ATGAAGATAA AGAAAGTGAA GAGGAGCCAC CAAAAAAGC AGCCAAAAGA GAAAAACCTA
MycDEK2 cds	ATGAAGATAA AGAAAGTGAA GAGGAGCCAC CAAAAAAGC AGCCAAAAGA GAAAAACCTA
DEK2 cds	ATGAAGATAA AGAAAGTGAA GAGGAGCCAC CAAAAAAGC AGCCAAAAGA GAAAAACCTA

	850 860 870 880 890 900
DEK1 cds	AACAGAAAGC TACTTCTAAA AGTAAAAAAT CTGTGAAAAG TGCCAATGTT AAGAAAGCAG
Consensus	AACAGAAAGC TACTTCTAAA AGTAAAAAAT CTGTGAAAAG TGCCAATGTT AAGAAAGCAG
MycDEK2 cds	AACAGAAAGC TACTTCTAAA AGTAAAAAAT CTGTGAAAAG TGCCAATGTT AAGAAAGCAG
DEK2 cds	AACAGAAAGC TACTTCTAAA AGTAAAAAAT CTGTGAAAAG TGCCAATGTT AAGAAAGCAG

	910 920 930 940 950 960
DEK1 cds	ATAGCAGCAC CACCAAGAAG AATCAAAAACA GTTCCAAAA AGAAAGTGAG TCTGAGGATA
Consensus	ATAGCAGCAC CACCAAGAAG AATCAAAAACA GTTCCAAAA AGAAAGTGAG TCTGAGGATA
MycDEK2 cds	ATAGCAGCAC CACCAAGAAG AATCAAAAACA GTTCCAAAA AGAAAGTGAG TCTGAGGATA
DEK2 cds	ATAGCAGCAC CACCAAGAAG AATCAAAAACA GTTCCAAAA AGAAAGTGAG TCTGAGGATA

	970 980 990 1000 1010 1020
DEK1 cds	GTTTCAGATGA TGAACCTTTA ATTA AAAAAGT TGAAGAAACC CCCTACAGAT GAAGAGTTAA
Consensus	GTTTCAGATGA TGAACCTTTA ATTA AAAAAGT TGAAGAAACC CCCTACAGAT GAAGAGTTAA
MycDEK2 cds	GTTTCAGATGA TGAACCTTTA ATTA AAAAAGT TGAAGAAACC CCCTACAGAT GAAGAGTTAA
DEK2 cds	GTTTCAGATGA TGAACCTTTA ATTA AAAAAGT TGAAGAAACC CCCTACAGAT GAAGAGTTAA

	1030 1040 1050 1060 1070 1080
DEK1 cds	AGGAAACAAT AAAGAAATTA CTGGCCAGTG CTAACCTGGA AGAAGTCACA ATGAAACAGA
Consensus	AGGAAACAAT AAAGAAATTA CTGGCCAGTG CTAACCTGGA AGAAGTCACA ATGAAACAGA
MycDEK2 cds	AGGAAACAAT AAAGAAATTA CTGGCCAGTG CTAACCTGGA AGAAGTCACA ATGAAACAGA
DEK2 cds	AGGAAACAAT AAAGAAATTA CTGGCCAGTG CTAACCTGGA AGAAGTCACA ATGAAACAGA

	1090 1100 1110 1120 1130 1140
DEK1 cds	TTTGCAAAA GGTCTATGAA AATTATCCTA CTTATGATT AACTGAAAGA AAAGATTCA
Consensus	TTTGCAAAA GGTCTATGAA AATTATCCTA CTTATGATT AACTGAAAGA AAAGATTCA
MycDEK2 cds	TTTGCAAAA GGTCTATGAA AATTATCCTA CTTATGATT AACTGAAAGA AAAGATTCA
DEK2 cds	TTTGCAAAA GGTCTATGAA AATTATCCTA CTTATGATT AACTGAAAGA AAAGATTCA

	1150 1160 1170 1180 1190 1200
DEK1 cds	TAAAAACAAC TGTAAGAGAG CTAATTTCTTGA-----
Consensus	TAAAAACAAC TGTAAGAGAG CTAATTTCTTGAATCACTAG TGAATTCGC CCCCCCCT
MycDEK2 cds	TAAAAACAAC TGTAAGAGAG CTAATTTCTTGA-----
DEK2 cds	TAAAAACAAC TGTAAGAGAG CTAATTTCTTGA-----

Şekil E1.2: pMIGR1-MycDEK2 cDNA'sı dizileme analizi 1-540 bazları arası sonuçları. DEK1 cds; insan *DEK* genin DEK1 proteinini kodlayan cDNA dizisi, Consensus; 4 farklı primer ile dizileme sonuçlarının hizalaması ile oluşan dizi, MycDEK2 cds; MycDEK2'nin protein kodlayan cDNA dizisi, DEK2 cds; insan *DEK* genin DEK2 proteinini kodlayan cDNA dizisi, başlangıç kodonu yeşil, Flag dizisi kırmızı, DEK2'de kırılan bölge turkuvez ve EcoRI kesim bölgesi sarı ile işaretlenmiştir.

EK F: Tez Çalışması Kapsamında Yapılan Yayınlar

Ozcelik E., Kalayci A., Celik B., Avcı A., Akyol H., Kilic I.B., Guzel T., Cetin M., Ozturk M.T., Caliskaner Z.O., Tombaz M., Yoleri D., Konu O., Kandilci A., (2022), "Doxorubicin induces prolonged DNA damage signal in cells overexpressing DEK isoform-2", PLoS One, 17, e0275476.

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

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

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

Özçelik E., Kandilci A., (2017), "Cloning of DEK Protein Isoforms to Retroviral Expression Vectors", Gebze Technical University Post Graduate Research Symposium and Publicity Days 2017, 17-18 May 2017.

EK G: Telif Hakkı Bulunan Şekiller İçin Alınan İzinler

Tablo G1.1: Telif hakkı bulunan şekiller için alınan izinler.

Şekil No.	Lisans Tarihi	Lisans No.	Telif Sahibi
Şekil 2.1	31.01.2023	5479311498501	Springer Nature
Şekil 2.2	31.01.2023	Creative Commons (CC)	Springer Nature
Şekil 3.1	31.01.2023	5479320465693	Elsevier
Şekil 3.2	31.01.2023	Creative Commons (CC)	Elsevier
Şekil 3.3	31.01.2023	5479320758283	Elsevier
Şekil 3.4	31.01.2023	5479320758283	Elsevier
Şekil 4.1	31.01.2023	Creative Commons (CC)	Oxford University Press
Şekil 4.2	31.01.2023	Creative Commons (CC)	Springer Nature
Şekil 6.1	31.01.2023	Creative Commons (CC)	Springer Nature