

T.C  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KEMİK İLİĞİ MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİNDE  
PKNOX2 PROTEİNİN ATM VE RNF8 PROTEİNLERİ İLE  
ETKİLEŞİMLERİNİN İNCELENMESİ**

**Neslihan DÖNMEZ**

**Kök Hücre Programı**

**Yüksek Lisans Tezi**

**ANKARA**

**2019**



T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KEMİK İLİĞİ MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİNDE  
PKNOX2 PROTEİNİN ATM VE RNF8 PROTEİNLERİ İLE  
ETKİLEŞİMLERİNİN İNCELENMESİ**

**Neslihan DÖNMEZ**

**Kök Hücre Programı**

**Yüksek Lisans Tezi**

**TEZ DANIŞMANI**

**Doç. Dr. Ayşen GÜNEL ÖZCAN**






**ANKARA**

**2019**

## ONAY SAYFASI

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
KEMİK İLİĞİ MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİNDE PKNOX2 PROTEİNİN ATM VE RNFB  
PROTEİNLERİ İLE ETKİLEŞİMLERİNİN İNCELENMESİ  
Öğrenci: Neslihan DÖNMEZ  
Danışman: Doç. Dr. Ayşen (GÜNEL) ÖZCAN

Bu tez çalışması 26.08.2019 tarihinde jürimiz tarafından "Kök Hücre Programı" nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	Prof. Dr. Duygu UÇKAN ÇETİNKAYA Hacettepe Üniversitesi	(imza) 
Tez Danışmanı:	Doç. Dr. Ayşen (GÜNEL) ÖZCAN Hacettepe Üniversitesi	(imza) 
Üye:	Doç. Dr. Betül ÇELEBİ SALTIK Hacettepe Üniversitesi	(imza) 
Üye:	Dr. Öğr. Üy. Neşe ÜNVER Hacettepe Üniversitesi	(imza) 
Üye:	Prof. Dr. Erkan YILMAZ Ankara Üniversitesi	(imza) 

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

19 Eylül 2019

  
Prof. Dr. Diclehan Arhan  
Enstitü Müdürü

## YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan "**Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge**" kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricinde YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. <sup>(1)</sup>
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 6 ay ertelenmiştir. <sup>(2)</sup>
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. <sup>(3)</sup>

19.09.2019

  
Neslihan DÖNMEZ

<sup>1</sup>"Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge"

- (1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.
- (2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internette paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.
- (3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, tezin yapıldığı kurum tarafından verilir \*. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü veya fakültenin uygun görüşü üzerine üniversite yönetim kurulu tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir. Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

\* Tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.

## ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Doç. Dr. Ayşen GÜNEL ÖZCAN danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığımı beyan ederim.

*Neslihan DÖNMEZ*

19/09/2019



## TEŞEKKÜR

Tez çalışmam sırasında kıymetli bilgi, birikim ve tecrübeleri ile bana yol gösterici olan hocam Sayın Doç. Dr. Ayşen Günel Özcan'a sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Kök Hücre Merkezi Laboratuvarlarının bütün imkanlarından sorunsuzca faydalanmamızı sağlayan ve her zaman destekleyici olan Prof. Dr. Duygu Uçkan Çetinkaya'ya, tez çalışmam esnasında Ko-IP ve Western blotlama deneyleri başta olmak üzere, çalışmalarımda rehberlik eden Uzm. Bio. Özge Burcu Şahan'a, FACS Aria II akım sitometri cihazını kullanmamıza olanak sağlayan Temel Onkoloji Anabilim Dalına, Prof. Dr. Güneş Esendağlı'ya, akım sitometri analizlerinde yardımları için Uzm. Bio. İrem Akar'a ve Floresan mikroskop görüntüleri için Doç. Dr. Naciye Dilara Zeybek'e teşekkürlerimi arz ederim.

Kök Hücre Merkezi çalışanları, Selma Erdel, Özlem Küçükbayrak, Hülya Koç ve Engin Özçelik'e ve her zaman yanımda olan arkadaşlarım Dilara Dalkıran, Berna Alkan ve Aynura Mammadova başta olmak üzere, Esra Koçak, Ayşenur Gök, Naz Şerifoğlu, Melis Temel, Mustafa Furkan Keleş'e ve diğer doktora ve yüksek lisans arkadaşlarıma en içten teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her anında yanımda olan canım aileme, anneme, babama ve biricik kardeşlerime, bu süreç boyunca da her zaman benimle oldukları için, onların sayesinde ben olduğum için çok teşekkür ederim.

Bu yolculuğa birlikte başladığımız, en iyi arkadaşıma, canım babama, her şey için ayrıyeten teşekkürü bir borç bilirim.

Ve son olarak, hayat arkadaşım, eşim İhsan Murat Dönmez'e, varlığı için en samimi teşekkürlerimi sunuyorum.

## ÖZET

**Dönmez, N., Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücrelerinde PKNOX2 Proteininin ATM ve RNF8 ile Etkileşimlerinin İncelenmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kök Hücre Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2019.** Son araştırmalar transkripsiyon faktörü PKNOX2'nin tümör baskılayıcı bir protein olduğunu ve Fanconi anemisi hastalarının kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerinde (Kİ-MKH'lerinde) azaldığını göstermiştir. Günel-Özcan grubunun yayınlanmamış çalışmasında PKNOX2 ko-immunopresipitasyon sonrası proteom analiz listesinde PKNOX2'nin etkileştiği proteinler arasında ATM ve RNF8 proteinlerinin düşük 'coverage' değeri ile saptanmış olması PKNOX2'nin DNA onarım yolağında rol oynayabileceğini düşündürmüştür. Bu çalışmanın amacı bu hipotezi test etmek için, PKNOX2 proteini ile ATM ve RNF8 proteinlerinin etkileşimini doğrulamak ve bu etkileşimin DNA hasarı ile durumunu Kİ-MKH'lerinde araştırmaktır. Etkileşimlerin doğrulanması için Kİ-MKH'lerine PKNOX2 overekspresyon plazmidi elektroporasyon ile aktarıldı ve protein izolasyonu sonrası, ko-immunopresipitasyon ve Western blotlama yapıldı. Ko-IP sonrası Western Blot analizleriyle PKNOX2 ile ATM etkileşimi doğrulanırken, IgG *heavy chain* kirliliği olabileceği değerlendirilmesi PKNOX2 ile ATM veya RNF8 etkileşiminin varlığı in situ proximity ligation assay (PLA) ile gerçekleştirilmiştir. PLA yöntemiyle bu etkileşimlerin hem sitoplazma hem çekirdek içinde olduğu saptanmıştır. DNA hasarı durumunda etkileşimleri incelemek için  $\gamma$ -irradiye edilen Kİ-MKH'lerde DNA hasarı olduğu akım sitometri yöntemiyle doğrulanmıştır. PI boyaması ile yapılan akım sitometri analizlerinde hücre döngüsü piklerinde keskin ayrışma olmadığından kesin sonuca varılamamakla birlikte DNA hasarına uğrayan hücrelerin G2 fazında tutuklandığı bulunmuştur.  $\gamma$ -irradiyasyon ile DNA hasarına uğrayan hücrelerde PLA, PKNOX2 ile ATM etkileşimini gösterememiştir ancak PKNOX2-RNF8 etkileşimi artmıştır. Sonuç olarak PKNOX2 transkripsiyon faktörünün ATM ve RNF8 ile etkileştiği literatürde ilk kez olarak gösterildi. DNA hasarı ile etkileşimlerdeki değişim daha ileri çalışmalar ile doğrulanmalıdır.

**Anahtar Kelimeler:** PKNOX2, ATM, RNF8, Kİ-MKH, PLA



## ABSTRACT

**Donmez, N., Investigation of PKNOX2 Protein Interactions with ATM and RNF8 in Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells, Hacettepe University Graduate School Health Sciences Stem Cell Program Master Thesis, Ankara, 2019.** Recent research has shown that the transcription factor PKNOX2 is a tumor suppressor protein and decreases in bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BM-MSCs) of Fanconi anemia patients. In the previous unpublished study of Günel-Özcan Group, it was suggested that PKNOX2 may play a role in the DNA repair pathway due to the low 'coverage' of ATM and RNF8 proteins in the proteome analysis list obtained after PKNOX2 co-immunoprecipitation. The aim of this study was to confirm the interaction of PKNOX2 protein with ATM and RNF8 proteins in order to investigate the DNA damage and status of this interaction in BM-MSCs. To confirm the interactions, the PKNOX2 overexpression plasmid was transferred to BM-MSCs by electroporation, protein isolation was performed from these cells and, co-immunoprecipitation and Western blotting were performed. While PKNOX2 and ATM interaction was confirmed by Western Blot analysis after co-IP, PKNOX2 and ATM or RNF8 interactions was also confirmed by in situ proximity ligation assay (PLA) due to IgG heavy chain contamination possibility. These interactions were determined by PLA method both in the cytoplasm and in the nucleus. In order to examine the changes in the interactions with DNA damage, DNA damage was detected by flow cytometry in  $\gamma$ -irradiated. In the flow cytometry analyses performed with PI staining, it was thought that the cells damaged DNA were arrested in the G2 phase, although it was not possible to conclude that there was no sharp dissociation in the cell cycle peaks. In situ proximity ligation assay did not detect PKNOX2 and ATM interaction in  $\gamma$ -irradiated cells but increase in PKNOX2-RNF8 interaction was observed. In conclusion, it was shown for the first time in the literature that PKNOX2 transcription factor interacts with ATM and RNF8. Changes in interactions with DNA damage should be confirmed by further studies.

**Keywords:** PKNOX2, ATM, RNF8, BM-MSC, PLA

## İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	iv
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xiv
TABLolar	xvi
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	<b>3</b>
2.1. Kök Hücreler ve Mezenkimal Kök Hücreler	3
2.2. PBX/Knotted 1 Homeobox 2 (PKNOX2)	4
2.3. Ataxia-Telangiectasia Mutated (ATM)	6
2.4. Ring Finger Protein 8 (RNF8)	7
2.5. Protein-Protein Etkileşimlerinin İncelenmesinde Kullanılan Metotlar	9
2.5.1. Proximity Ligation Assay	12
2.5.2. Ko-immunopresipitasyon	14
2.6. Çalışmanın Amacı	14
<b>3. GEREÇLER VE YÖNTEMLER</b>	<b>16</b>
3.1. Çalışmada Kullanılan Örnekler	16
3.2. Mezenkimal Kök Hücre Kültürü	16
3.3. PKNOX2 overekspresyonunda Kullanılan Plazmidler: PKNOX2-pCMV6	17
3.3.1. PKNOX2-pCMV6 ve pCMV6-entry Plazmidlerinin Bakteride Çoğaltılması ve İzolasyonu	18
3.4. Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücrelere PKNOX2-pCMV6 ve pCMV6-entry Plazmidlerinin Elektroporasyon Yöntemi ile Geçici Transfeksiyonu	19
3.5. Elektroporasyon Sonrası Protein İzolasyonu	20

3.6. Protein Konsantrasyonunun Hesaplanması	20
3.7. Total Protein Eldesi Sonrası SDS-PAGE Jel Yürütme ve Western Blotlama	20
3.8. Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücrelerde İmmunopresipitasyon Yöntemi ile PKNOX2 Proteinin ATM ve RNF8 Proteinleri ile Etkileşimlerinin İncelenmesi	21
3.8.1. İmmunopresipitasyon ile Çöktürülen Proteinlerin Western Blotlama ile Analizi	22
3.9. $\gamma$ H2AX Proteininin FITC Konjuge Edilmiş Spesifik Antikoru ile İşaretlenerek DNA Hasar Cevabının Akım Sitometri Yöntemi ile Analizi	22
3.10. Mezenkimal Kök Hücrelerde PKNOX2-ATM ve PKNOX2-RNF8 Etkileşimlerinin <i>Proximity Ligation Assay</i> ile Araştırılması	23
<b>4. BULGULAR</b>	25
4.1. Mezenkimal Kök Hücrelerde PKNOX2 Overekspresyonunun Doğrulanması	25
4.2. Ko-immünopresipitasyon yöntemi ile PKNOX2 ile ATM Proteininin Etkileşiminin Araştırılması	26
4.3. Ko-immünopresipitasyon Yöntemi ile RNF8 Proteinin Etkileşiminin Araştırılması	27
4.4. <i>In situ Proximity Ligation Assay</i> Yöntemi ile PKNOX2 ile ATM Proteininin Etkileşiminin Araştırılması	28
4.5. <i>In situ Proximity Ligation Assay</i> Yöntemi ile PKNOX2 ile RNF8 Proteininin Etkileşiminin Araştırılması	29
4.6. DNA hasarı sonrası <i>In situ Proximity Ligation Assay</i> Yöntemi ile PKNOX2 ile ATM ve RNF8 Proteininin Etkileşiminin Araştırılması	35
4.6.1. $\gamma$ -İrradyasyon Sonrası DNA Hasar Cevabının Tespiti	35
4.6.2. $\gamma$ -İrradyasyon Sonrası <i>In situ Proximity Ligation Assay</i> Yöntemi ile PKNOX2 ile ATM Proteininin Etkileşiminin Araştırılması	38
4.6.3. $\gamma$ -İrradyasyon Sonrası <i>In situ Proximity Ligation Assay</i> Yöntemi ile PKNOX2 ile RNF8 Proteininin Etkileşiminin Araştırılması	40
4.7. Mezenkimal Kök Hücrelerde PKNOX2 Overekspresyonu Sonrası Yapılan Proteom ile PKNOX2 ile Etkileşen Proteinlerin Biyoinformatik Araçlar Kullanılarak Değerlendirilmesi	43

<b>5. TARTIŞMA</b>	48
<b>6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER</b>	53
<b>7. KAYNAKLAR</b>	54
<b>8. EKLER</b>	
Ek 1. Etik Kurul	
Ek 2. Orjinallik Raporu	
Ek 3. Dijital Makbuz	
<b>9. ÖZGEÇMİŞ</b>	

## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>A-NHEJ</b>	: <i>Alternative Non – homolog end joining</i>
<b>ATM</b>	: <i>Ataxia- Telangiectasia Mutated</i>
<b>ATR</b>	: <i>Ataxia Telangiectasia And Rad3-Related Protein</i>
<b>BARD1</b>	: <i>BRCA1 Associated RING Domain 1</i>
<b>BRCA1</b>	: <i>Breast Cancer Type 1 Susceptibility Protein</i>
<b>CCDC98</b>	: <i>Abraxas 1, BRCA1 A Complex Subunit</i>
<b>C-NHEJ</b>	: <i>Classical Non – homolog end joining</i>
<b>DNA-PK</b>	: <i>DNA-Dependent Protein Kinase</i>
<b>FA</b>	: <i>Fanconi Anemi</i>
<b>FANCD2</b>	: <i>Fanconi Anemia Complementation Group D2</i>
<b>FHA</b>	: <i>Fork Head Associated</i>
<b>HOX</b>	: <i>Homeobox</i>
<b>IP</b>	: <i>İmmünopresipitasyon</i>
<b>IR</b>	: <i>İrradyasyon</i>
<b>JMJD1C</b>	: <i>Jumonji Domain Containing 1C</i>
<b>JMJD2A</b>	: <i>Jumonji C Domain-Containing Histone Demethylase 3A</i>
<b>Ki-MKH</b>	: <i>Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücre</i>
<b>Ko-IP</b>	: <i>Ko-immunopresipitasyon</i>
<b>L3MBTL2</b>	: <i>L3MBTL Histone Methyl-Lysine Binding Protein 2</i>
<b>MDC1</b>	: <i>Mediator Of DNA Damage Checkpoint 1</i>
<b>MKH</b>	: <i>Mezenkimal Kök Hücre</i>
<b>mTOR</b>	: <i>Mechanistic Target Of Rapamycin Kinase</i>
<b>NHEJ</b>	: <i>Non – homolog end joining</i>
<b>NuRD ATPase CHD4</b>	: <i>Chromodomain Helicase DNA Binding Protein 4</i>
<b>PALB2</b>	: <i>Partner And Localizer Of BRCA2</i>
<b>PBX1</b>	: <i>Pre-B-Cell Leukemia Transcription Factor 1</i>
<b>PKNOX1</b>	: <i>Pbx/Knotted1 Homeobox1</i>
<b>PKNOX2</b>	: <i>Pbx/Knotted1 Homeobox2</i>
<b>PLA</b>	: <i>Proximity Ligation Assay</i>

<b>RAD51</b>	: <i>BRCA1/BRCA2-Containing Complex, Subunit 5</i>
<b>RAP80</b>	: <i>Ubiquitin Interaction Motif Containing 1</i>
<b>RCA</b>	: <i>Rolling Circle Amplification</i>
<b>RING</b>	: <i>Really Interesting New Gene</i>
<b>RNF8</b>	: <i>Ring Finger 8</i>
<b>RNF168</b>	: <i>Ring Finger Protein 168</i>
<b>ROS</b>	: <i>Reaktif oksijen türleri</i>
<b>UBC13</b>	: <i>E2 Ubiquitin-Conjugating Enzyme N</i>
<b>TALE</b>	: <i>Three Aminoacid Loop Extension</i>
<b>TRF2</b>	: <i>Telomeric Repeat Binding Factor 2</i>
<b>53BP1</b>	: <i>Tumor Protein P53 Binding Protein 1</i>

## ŞEKİLLER

<b>Şekil</b>	<b>Sayfa</b>
<b>2.1.</b> Proximity Ligation Assay prensibini anlatan Diyagram	13
<b>2.2.</b> Ko-immunopresipitasyon prensibini anlatan diyagram.	15
<b>3.1.</b> PKNOX2-DDK overekspresyon vektörü.	18
<b>4.1.</b> Mezenkimal Kök Hücrelerde PKNOX2 overekspresyonu sonrası transfeksiyon doğrulanması	25
<b>4.2.</b> Ko-immünopresipitasyon yöntemi ile PKNOX2 ile ATM protein etkileşimlerine bakılan Western Blot sonuçları.	26
<b>4.3.</b> Ko-immunopresipitasyon yöntemi ile PKNOX2 ile RNF8 proteinin etkileşimine bakılan western blot sonuçları.	28
<b>4.4.</b> ATM: PKNOX2 etkileşiminin incelendiği Duolink PLA testinin a) floresan mikroskop (Olympus IX73) görüntüleri b) Image J programında iki farklı alanın sayımının ortalamasını gösteren grafik.	30
<b>4.5.</b> RNF8-PKNOX2 etkileşiminin incelendiği Duolink PLA testinin Leica DMI6000B mikroskop görüntüleri (a,c,d) ve Image J programında üç farklı alanın sayımının ortalamasını gösteren grafik.	33
<b>4.6.</b> Leica DM6B mikroskobu kullanılarak RNF8-PKNOX2 etkileşiminin incelendiği Duolink PLA testinin görüntüleri (a, c,d) ve Image J programında dört farklı alanın sayımının ortalamasını gösteren grafik.	34
<b>4.7.</b> $\gamma$ irradie edilen (TR) hücreler ile kontrol grubu (UNTR) hücreleri (HUSCS-D15) arasındaki $\gamma$ -H2AX düzeyinin akım sitometrik analizi	36
<b>4.8.</b> a $\gamma$ - irradie (TR) Kİ-MKH hücrelerin (HUSCS-D15) hücre döngüsü akım sitometri analizleri.	37
<b>4.9.</b> b. PI ile boyanmış FITC-gamaH2AX antikoru içermeyen $\gamma$ - irradie olmayan (UNTR) Kİ-MKH'lerin (HUSCS-D15) hücre döngüsü akım sitometri analizleri.	37
<b>4.10.</b> c. $\gamma$ irradasyon ile hücre döngüsü değişimi ve gamaH2AX artışının aynı dot blot üzerinde, $\gamma$ - irradie olmayan (UNTR) ve olan (TR) Kİ-MKH'lerde karşılıklı analizleri	38
<b>4.11.</b> $\gamma$ -İrradyasyon ile DNA hasarı oluşturulmuş Kİ-MKH'lerinde ATM:PKNOX2 etkileşiminin tespiti için <i>Duolink</i> PLA testinin görüntüleri	39
<b>4.12.</b> $\gamma$ -İrradyasyon ile DNA hasarı oluşturulmuş hücrelerinde RNF8-PKNOX2 etkileşiminin incelendiği <i>Duolink</i> PLA testinin Leica DMI6000B mikroskop görüntüleri (a,c,d) ve Image J programında üç farklı alanın sayımının ortalamasını gösteren grafik.	41

- 4.13.**  $\gamma$ -İrradyasyon ile DNA hasarı oluşturulmuş Kİ-MKH Hücrelerinde RNF8-PKNOX2 etkileşiminin tespiti için yapılan Duolink PLA testinin Leica DM6B mikroskop görüntüleri (a,c,d) ve Image J programında dört farklı alanın sayımının ortalamasını gösteren grafik. 42
- 4.14.** PKNOX2 proteom listesinin PANTHER analizi 44
- 4.15.** PKNOX2-Proteom Listesinin PANTHER GO-Biyolojik Fonksiyon Analizi 46
- 5.1.** DNA hasarı durumunda PKNOX2-ATM ve PKNOX2-RNF8 arasında oluşan etkileşimlerin olasılıklı illüstrasyonları 52



**TABLolar**

<b>Tablo</b>		<b>Sayfa</b>
<b>2.1.</b>	Protein – protein etkileşimlerinde kullanılan metotlar; avantaj ve dezavantajları	10
<b>3.1.</b>	DMF10 ortam içeriği	17
<b>5.1.</b>	PKNOX2, ATM ve RNF8 proteinlerinin PKNOX2 ko-immünopresipitasyonu sonrası yapılan proteom analiz değerleri	51

## 1. GİRİŞ

Mezenkimal kök hücreler, kendini yenileyebilme özelliğinin yanı sıra immün baskılayıcı özelliğinin bulunması ve tedavi amaçlı kullanılmasında daha az risk içermesinden dolayı önemi günden güne artan bir kök hücre grubudur. Bunun yanı sıra kemik iliğinde, hematopoetik hücrelerin mikroçevresini oluşturması nedeniyle hastalıklı mikroçevrenin fizyopatogeneze olan katkısını incelemek ve kök hücrelerde protein etkileşimlerini incelemek için de önemli bir kaynaktır (1). Daha önceki TÜBİTAK1001 ve AB COST aksiyonu proje destekleri (TÜBİTAK 110S021, 214Z033 ve AB COST BM0805) ile gerçekleştirilen Günel-Özcan grubunun çalışmalarında Fankoni anemisi bulunan hasta ve sağlıklı grupların kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinde HOX kofaktörlerinden PKNOX2 ifadesinde anlamlı bir farklılık saptanmıştır (2).

PBX/Knotted1 Homeobox 2 (PKNOX2), HOX transkripsiyon faktörlerinin özgünlüğünde rol oynayan kofaktörlerden TALE (*Three amino loop extension*) *homeodomein* grubunda yer alır (3). PKNOX2'nin paralogu olan PKNOX1'in fonksiyonları hakkında yeterli bilgi bulunmasına rağmen PKNOX2'nin hücrel fonksiyonları çok iyi bilinmemektedir (3). PKNOX2 diğer adıyla PREP2, 11. kromozomdan kodlanan bir transkripsiyon faktörüdür. PKNOX1 ile PKNOX2 birbirine benzer bölgeleri olduğu gibi kendilerine özgü kısımları da saptanmıştır. PKNOX2, 463 aminoasitten oluşurken PKNOX1, 436 aminoasittir (4). PKNOX1 ile PKNOX2'nin homeodomain (HD) kısımları %94 benzerlik gösterir ancak bütünsel protein benzerlikleri sadece %52'dir (4). Bu iki paralog transkripsiyon faktörünün N-ucu bölgeleri kendilerine özgüdür. Northern blotlama yöntemi çalışmaları ile kalp, beyin, iskelet kası ve yumurtalıkta PKNOX2'nin ifadesi yüksek düzeyde saptanırken, plasenta, akciğer, pankreas, prostat, testis ve ince bağırsakta daha düşük mRNA ifadeleri tespit edilmiştir (4).

TÜBİTAK1001-214Z033 nolu proje kapsamında, ko-immunopresipitasyon (ko-IP) sonrası PKNOX2 ile protein-protein etkileşimleri proteomiks analizleri ile saptanmıştır. Bu tez kapsamında, proteomiks analizleri sonucu elde edilen PKNOX2 ile etkileşen protein listesinden ATM ve RNF8 proteinlerinin PKNOX2 ile etkileşimlerinin doğrulanması ve bu etkileşimlerin DNA hasarı koşulunda Ki-

MKH'lerinde araştırılması amaçlanmıştır. ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) proteini genel olarak DNA hasarı cevabı ve hücre döngüsü kontrol noktaları yolağında görev alır (5, 6). ATM proteininin S fazı kontrol noktasında etkileşime girdiği proteinlerden biri de Fanconi Anemisi yolağı proteinlerinden FANCD2 proteindir. FANCD2 proteini diğer ATM substratları ile birçok altyapılı protein kompleksi oluşturarak hasar görmüş DNA'ya bağlanır ve S fazında DNA replikasyonunu inhibe eder (7).

RNF8 (Ring Finger Protein 8) proteini ise bir ubiquitin ligaz olup FHA (Forkhead-associated) domaini ile fosforlanmış TQXF motifli MDC1 (Mediator of DNA Damage Checkpoint 1) kümeleriyle etkileşimde bulunarak, H2AX ve H2A histonlarının ubiquitinleşmesini, RAP80-BRCA1 kompleksinin oluşmasını sağlar ve hasar görmüş çift zincir kırığı olan bölgenin onarımını güçlendirir (8).

Proteomiks analizleri sonucu PKNOX2 ile etkileşimi saptanan 219 proteinden ATM ve RNF8 proteininin seçilmesinin sebebi ATM ve RNF8'in çift iplik kırıklarında önemli rollerinin olmasıdır (5-8). Fanconi anemisinde DNA tamir mekanizmalarından oluşan çapraz bağları onaran yolda bozukluk mevcuttur. Dolayısıyla genom bozuk ortamda PKNOX2'in gen ifadenmesini bozulması sonucu ATM ve RNF8 ile etkileşimlerinde değişiklikler olabilir ve bu değişimler Fanconi anemisi fizyopatogenezi için önemli olabilir. Ancak, Ko-IP sonrası kütle spektrometri analizlerinde, ATM ve RNF8'in tanımlayan *coverage* değerleri düşük olduğundan dolayı (sırası ile 5.79 ve 7.22) daha ileri fonksiyonel araştırmalar yapılmadan önce ATM ve RNF8'in PKNOX2 etkileşiminin kesinleştirilmesi gerekmektedir. Bu amaçla, sağlıklı kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinde (Kİ-MKH) *Proximity Ligation Assay* ile *in situ* olarak ve ko-IP sonrası Western blotlama ile PKNOX2'nin ATM ve RNF8 ile etkileşimlerinin incelenmesi ve DNA hasarı ile bu etkileşimlerin durumunun belirlenmesi hedeflenmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kök Hücreler ve Mezenkimal Kök Hücreler

Kök hücreler vücuttaki diğer hücre türlerinden farklıdır. Tüm kök hücreler, kaynaklarına bakılmaksızın, iki genel özelliğe sahiptir:

- 1) Bölünerek kendilerini yenileyebilirler;
- 2) Farklılaşmamışlardır ancak farklılaşma potansiyeline sahiptirler (9).

Kök Hücreler, farklılaşma potansiyelleri ve elde edildikleri kaynaklara göre kategorize edilebilirler. Örneğin; morula aşamasındaki embriyonik kök hücreler, embriyonik ve ekstra-embriyonik yapıları oluşturabilir bu nedenle bu hücreler totipotent hücrelerdir (10). İmplantasyon sonrası iç hücre kütesinden elde edilen embriyonik kök hücreler özelleşmiş kültür şartlarında çoğalabilir ve üç germ tabakasındaki hücrelere farklılaşma özelliğini devam ettirebilir ve pluripotenttir (10, 11). Erişkin kök hücreler doku kök hücreleri olarak isimlendirilir ve fetal dönem dahil yaşamın tüm aşamalarında dokulardan elde edilir. Erişkin/Doku kök hücreleri multipotent özelliktedir ve elde edildikleri dokunun kaynak aldığı germ yaprağından oluşabilecek hücrelere farklılaşabilir.

İnsan mezenkimal kök hücresi (MKH), ektoderm ve endodermden köken alan plastik yapışkan hücrelerdir ve diğer mezenkimal soylara (kemik, kırık ve yağ dokuya) farklılaşabilirler. Ayrıca, özel kültür koşulları altında, MKH'ler, hepatositler, nöronlar, pankreas hücreleri, kalp kası hücreleri veya astrositler gibi mezodermal olmayan soylara farklılaşabilmektedir (12-14). Uluslararası hücresel terapi topluluğuna göre (ISSCT; International Society of Stem Cell Therapy), multipotent MKH'ler şu üç kriteri karşılamalıdır:

- 1) plastik tutunma
- 2) (farklılaşma kümesi) CD105, CD73 ve CD90 ekspresyonu ve CD45, CD34, CD14 / CD11b, CD79a / CD19 ve insan lökosit antijeni (HLA) sınıf II'nin ifade eksikliği
- 3) osteoblastlara, kondroblastlara veya adipositlere farklılaşma yeteneği (15).

Mezenkimal kök hücreler birçok farklı kaynaktan elde edilebilir. Amniyotik sıvı, göbek kordonu, göbek kordonu kanı, kemik iliği, dental pulpa ve deri mezenkimal kök hücre kaynağı olarak örnek gösterilebilir (16, 17).

İlk olarak 1976'da Friedenstein tarafından keşfedilen Kemik İliği-Mezenkimal Kök Hücreler (Kİ-MKH), 1987'de farklılaşmamış MKH'ler olarak tanımlanmıştır (18, 19). MKH'ler kemik iliğinde hematopoetik kök hücrelerin mikroçevresinde bulunan ve hematopoezin sağlıklı gerçekleşebilmesi önemli destek görevi olan hücrelerdir (1). Diğer mezenkimal kök hücre kaynaklarıyla kıyaslandığında, elde edilmeleri, ağır anestezi kullanımı içeren acı verici bir prosedür gerektirirken; hücre verimi, uzun ömürlülük ve farklılaşma potansiyelleri, donör yaşı ile azalır (20). Diğer kaynaklardan elde edilen MKH'lere kıyasla, Kİ-MKH'ler daha önce yaşlanır (20, 21). Bununla birlikte, Kİ-MKH'lerin diğer hücre kaynaklarına (adipoz, göbek kordonu kaynaklı MKH) göre ikiye katlanma sayıları (*doubling number*) en düşüktür ve göreceli olarak ileri pasajlara gelme potansiyeli daha azdır (22, 23).

## 2.2. PBX/Knotted 1 Homeobox 2 (PKNOX2)

PKNOX2, alfa heliksleri 1 ve 2 arasındaki, 3 amino asit uzantısı ile karakterize edilen Üç Amino asit Döngü Uzatma (*Three aminoacid loop extension*, TALE) homeodomain protein sınıfına aittir. TALE ailesi PBX (PBX1-4), MEIS (MEIS1-3) ve PKNOX (PKNOX1-2) 'den oluşmaktadır. TALE protein ailesi, korunmuş bir DNA bağlama bölgesini paylaşan (prolin, tirozin, prolin içeren üç aminoasidin yer aldığı) sekansa özgü transkripsiyon faktörleridir ve büyüme, farklılaşma ve hücre ölümünde temel roller oynarlar. Ayrıca bu transkripsiyon faktörleri tümör gelişiminde de görev üstlenir (24-27).

PKNOX2 diğer adıyla PREP2'nin 11. kromozomunda bulunur ve MEINOX alt ailesine bağlı, PKNOX1 (PREP1) paraloğu olan bir transkripsiyon faktörüdür (3). Northern blotlama yöntemi çalışmaları ile kalp, beyin, iskelet kası ve yumurtalıkta PKNOX2'nin ifadesi yüksek düzeyde saptanırken, plasenta, akciğer, pankreas, prostat, testis ve ince bağırsakta daha düşük mRNA ifadeleri tespit edilmiştir (4). 472 amino asidden oluşan PKNOX2'nin (NCBI erişim no: NP\_071345.2) tahmini moleküler ağırlığı

52 kDa'dur. Günel-Özcan grubunun yayınlanmamış verilerinde de, insan Kİ-MKH'lerinde PKNOX2'nin shRNA ile sessizleştirme deneyleri 25 kDa, 45 kDa, 55 kDa, 70 kDa ve 100 kDa olmak üzere 5 farklı izoform varlığına işaret etmektedir (Günel-Özcan A, TUBİTAK 1001-214Z033 proje final raporu, 2018). Bunun yanı sıra, fare embriyo dokularında, PKNOX2 proteininin 5 farklı izoformu tanımlanmıştır (28). Bunlardan 3'ü C-ucu PKNOX2 antikoru ile çekirdekte tespit edilirken, diğer iki izoform N-ucu spesifik antikoruyla çekirdek ve sitoplazmada bulunmuştur. C-ucu PKNOX2 antikoru ile tespit edilen izoformların iki tanesi 62 kDa diğeri ise 47 kDa büyüklüğündedir. N-ucu PKNOX2 antikoru ile tespit edilen izoformların ise büyüklükleri 25 kDa ve 62 kDa şeklindedir (28). PKNOX2, PKNOX1 gibi nükleer lokalizasyon sinyali taşımadığından PBX1 ile heterodimer yaparak çekirdeğe yerleşir. PKNOX1 ile PKNOX2'nin homeodomain (HD) kısımları %94 benzerlik gösterir ancak bütünsel protein benzerlikleri sadece %52'dir (4). Bu iki paralog transkripsiyon faktörünün N-ucu bölgeleri kendilerine özgüdür. PBX1 ile PKNOX1 veya PKNOX2 proteinleri N-ucundan heterodimer oluşturmaktadır. PKNOX2-PBX1 yapısının, PKNOX1-PBX1 heterodimerizasyon yapısına göre daha hızlı ayrıldığı tespit edilmiştir (4).

Günel-Özcan grubunun daha önce yaptıkları çalışmada, Fankoni anemi (FA) hastalarının Kİ-MKH'lerinde sağlıklı Kİ-MKH'lere göre PKNOX2 mRNA düzeyleri arasında anlamlı derecede azalma saptanması, genomik kararsız kemik iliği nişinin PKNOX2 regülasyonunun bozulmasına yol açabileceğini düşündürmüştür (2). PKNOX2'nin protein etkileşimleri de araştırılmış ve PKNOX2 ile ko-immunopresipitasyon sonrası yapılan kütle-spektrometri ile elde edilen proteom analizlerinde Kİ-MKH'lerde 219 proteinin PKNOX2 ile etkileşime girdiği belirlenmiş ancak bunların ancak 28'i tekrarlı analizlerde saptanmıştır. Yapılan gen ontoloji zenginleştirme analizleri PKNOX2'nin etkileştiği proteinlerin bazılarının *non homolog end joining* (NHEJ) DNA onarımı ile ilişkili olabileceğini ortaya koymuş ve genomik kararsız kemik iliği nişinde PKNOX2'nin regülasyonunun bozulmasının NHEJ-ilişkili gen ifadenmesini tetikleyebileceği çıkarımı yapılmıştır (2). Başka bir çalışmada ise PKNOX2'nin mide kanserinde tümör oluşumuna etkisi incelenmiş ve ilk defa

PKNOX2'nin, apoptozisin indüklenmesi, hücre döngüsünün inhibisyonu ve hücre büyümesinin inhibisyonu gibi görevleri olabileceği mide kanserinde gösterilmiştir (29). Bu bilgiler ışığında, PKNOX2 regülasyonunun bozulması FA gibi kemik iliği yetmezliğinde ya da kanser patogenezinde önemli olabilir.

### 2.3. Ataxia-Telangiectasia Mutated (ATM)

ATM geni 1995 yılında tanımlanmıştır ve mutasyonları serebellar dejenerasyon, immün sistem defektleri ve kanser yatkınlığı ile karakterize nadir bir hastalık olan Ataksi-telenjektazi (A-T) hastalığına yol açar (6, 30-33). 3056 amino asit'den oluşan insan ATM proteininin (Gen bankası erişim no: AAB65827.1) tahmini moleküler ağırlığı 350.7 kDa'dır.

ATM tarafından kodlanan protein, fosfatidilinositol 3-kinaz benzeri serin / treonin protein kinaz ailesinin (PIKK'ler) bir üyesidir. Bu protein ailesinin diğer üyeleri arasında ATR, DNA-PKcs, mTOR ve ATX / hSMG-1 bulunur (6, 34). ATM, PIKK protein kinaz ailesinin diğer üyeleri gibi, substratlarını glutaminin takip ettiği serin veya treonin üzerinden fosforile eder (35, 36). ATM, bir fosfoinositid 3,4-kinase (PI3K) domain, bir FAT (FRAP, ATR, TRAP) ve bir FAT karboksi terminali (FAT-C) domaini içerir ve bundan ötürü PIKK ailesinin diğer üyeleri ile benzer özelliklere sahiptir (37).

Tek partikül elektron mikroskopik analiz, ATM'nin yaklaşık 115 Å kadar büyük bir *head domainine* ve buradan çıkıntı yapan 75-140 Å boyutunda uzun bir "kol" yapısına sahip olduğunu ortaya koymaktadır (38). ATM'nin genel şekli, ATM ile aynı protein kinaz ailesine mensup DNA-PKcs'ye benzer olduğu söylenebilir (39).

Hücreler IR'ye maruz kaldıklarında ATM proteininin miktarı değişmez ancak ATM'nin protein kinaz aktivitesinin DNA hasarına maruz kalmanın ardından 2-3 kat arttığı immuno-çökeltme (IP) kinaz analizler sonucu ortaya çıkmıştır (40-43). Buna ek olarak, IR ile oluşturulan DNA hasarı, ATM'nin fosforlanmasını artırır (44, 45).

ATM, DNA çift zincir kırıklarında baş rol oyuncusu olarak görev alır. DNA çift zincir kırığı olduğunda, MRE11- RAD50 – NBS1 (MRN) kompleksi, çift zincir kırık alanına yerleşir (46). IR, ATM serin-1981'in otoposforilasyonuna neden olur ve bu fosforilasyon sonrası dimer ayrışma ve hücresel ATM kinaz aktivitesi etkin hale gelir

(44). Bundan sonra, ATM, çift zincir kırıkları alanına konumlanır ve substratlarını fosforlayarak çift zincir kırığı tamiri sinyal yolağının devam etmesini sağlar (6).

ATM ayrıca DNA onarımıyla ilgili olmayan ancak insülin sinyali gibi, hücre homeostazının korunmasında rol oynayan nükleer ve sitoplazmik sinyal kaskadlarının aktivasyonuna aracılık eder (47). ATM, hematopoetik kök hücre sağkalımı sırasında da aktive edilir (48, 49).

ATM aktivasyonu ayrıca, mitofaji yoluyla kusurlu mitokondriyi ortadan kaldırmaya yardımcı olarak mitokondriyal fizyoloji ve işlevi de etkiler, böylece ROS metabolizması ile mitokondriyal disfonksiyon arasında bir bağlantı sağlar (50). Ataksi telanjiektazili bireylerden elde edilen fibroblastlar ve sağlıklı fibroblastlar ile yapılan bir çalışmada, hasta grupta, sağlıklı gruba kıyasla, ROS düzeylerinin daha yüksek olduğu ve hasta grubun oksidatif strese daha duyarlı oldukları tespit edilmiştir (48, 51). Bu durum, ATM'nin, hücreleri oksidatif hasardan korurken, aynı zamanda düşük endojen ROS seviyelerini de sabit tutmakta görevli olduğunu göstermektedir.

ATM aktivasyonunun, interlökin 8 (IL-8) aracılığıyla, hücre göçüne ve invazyona yardımcı olduğu gösterilmiş ve bunun sonucu olarak ATM'nin tümör oluşumunu destekleyici olduğu düşünülmüştür (52). Her ne kadar tümörigenezi desteklemede ATM'nin rolü olduğuna dair kanıtlar mevcut olsada, tümörigenezin erken döneminde, ATM sinyalleri, aktif onkogenlere ve tümör ilerlemesine karşı bir bariyer olarak fonksiyon görmektedir (53-55). Bu durum ATM'nin tümörigenezde çift etkiye sahip olabileceğini ortaya çıkarmıştır.

#### **2.4. Ring Finger Protein 8 (RNF8)**

RNF8, sınıf III ubiquitin bağlayıcı enzimler ile etkileşen, RING domaini içeren bir protein olarak tanımlanmıştır (56). RNF8 geni, 485 amino asitten oluşan (erişim no: NP\_003949.1) tahmini 55.5 kDa moleküler ağırlığında bir proteini kodlar. Bu protein N-ucunda Forkhead-associated domain ve C ucunda RING domainini içermektedir. FHA domaini, protein-protein etkileşiminden sorumlu iken; RING domaini ubiquitin ligaz aktivitesini üstlenir.



RNF8'in ana fonksiyonu, çift zincir kırığı sinyalizasyonunun iletimidir (57). Çift zincir kırığı, IR ya da reaktif oksijen türleri gibi dış ya da iç uyaranlar varlığında ilk olarak Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN) kompleksi tarafından algılanır ve ATM hasarlı bölgede konumlanmaya başlar. Otofosforilasyon sonrası aktif hale gelen ATM, histon H2A'nın varyantı H2AX'i C-ucundan fosforlar ve  $\gamma$ -H2AX oluşur (58-60). Etkileşimde bulunduğu MDC1 proteini,  $\gamma$ -H2AX yapısını tanır (56, 58). Ardından, ATM tarafından fosforlanan MDC1, RNF8'in FHA domaini aracılığıyla tanınır ve RNF8'in hasarlı bölgeye toplanması gerçekleşir. Ancak RNF8 proteininin H2A ile iletişime girmesi katlanmamış (*unfolded*) kromatinler arasından mümkün olmayabilir. Bu durumda; RNF8, kromatin yoğunluğunun kaybolmasını sağlayan NuRD ATPase CHD4 molekülünün çevresinde yoğunlaşarak RNF8'in H2A ile etkileşebilir (8, 57-66). UBC13-RNF8 etkileşimi sayesinde H2A'nın mono ubikitinasyonu gerçekleşir (8, 57, 61-67). Aynı zamanda RNF8, ATM tarafından fosforlanmış L3MBTL2'nin poliubikitinasyonunu sağlar (68). Ubikitinleşmiş L3MBTL2, RNF168'i bölgeye çeker ve H2AX poliubikitinleşir (68, 69). Bunların yanı sıra, MDC1'in JMD1C demetilaz yardımıyla RNF8-UBC13 tarafından poliubikitinleşmesi, RAP80 tarafından algılanır ve RAP80, CCDC98 aracılığıyla BRCA1-BARD1 kompleksinin çift zincir kırık bölgesinde toplanmasını sağlar (70-76). Bundan sonra, tamir mekanizmasında, BRCA1'in aşağısında yer alan PALB2 yer alır ve PALB2, RAD51'in hasarlı bölgede toplanmasına sebep olur. Bu durumda, hasarlı bölgede yoğunlaşan RAD51 rekombinaz, homolog DNA ipliklerinin değişimini katalize ederek, çift zincir kırıklarında kullanılan tamir mekanizmalarından biri olan Homolog Rekombinasyonun (HR) devreye girmesini sağlar (77).

RNF8, aynı zamanda, JMJD2A'nın poliubikitinasyonu sonrası degrade olmasında rol oynar. Degrade olan ubikitinleşmiş JMJD2A demetilaz, 53BP1 ile metillenmiş H3/H4 etkileşimine öncülük eder. Metillenmiş H3/H4 ile 53BP1 proteininin hasarlı bölgede birleşmesi, çift zincir kırıklarının tamirinde görev alan diğer bir seçenek olan NHEJ mekanizmasının çalışmasına neden olur (78-82).

RNF8, çift zincir kırığı sinyalizasyonuna ek olarak ultraviyole (UV) ile indüklenmiş tek zincir kırığının tamir mekanizmasında da görev alır. Bu durumda; RNF8 ve UbcH5c etkileşime girerek DNA hasar durumunda yıkıma uğrayan p12'nin

ubikitinleşmesine ve ardından da p12'nin yıkımına neden olarak genom korunmasında rol oynar (83).

RNF8 proteinin rol oynadığı bir diğer proses ise telomer ucu kararlılığının korunması ve hücre döngüsü sürecinin düzenlenmesidir. Yapılan çalışmalar sonucunda, RNF8'in E3 ligaz aktivitesi ile, A-NHEJ aracılı telomer füzyonunu bastırarak ve telomerlerde kohezyonun zamanında rezolüsyonunu sağlayarak telomer ucu kararlılığının korunmasında önemli bir rol oynadığı ortaya konulmuştur. Ancak eğer telomer, *shelterin* kompleksinin bir parçası olan TRF2'nin depleasyonu sonucu zaten açılmamışsa, RNF8, telomer füzyonunu ve bununla birlikte üretilen genomik kararsızlığı indükleyen C-NHEJ mekanizmasının devreye girmesine sebep olabileceği de saptanmıştır (84-86). RNF8, mitoz ve sitokinezde önemli bir görev alarak düzgün bir şekilde hücre bölünmesinin gerçekleşmesini ve genom kararlılığının devamını sağlamaktadır. RNF8'in bu işlevinde kusur olması sonucu başarılı bir şekilde sitokinez gerçekleşmez ve bu durum, çok çekirdekli hücrelerin oluşması ve genom kararsızlığı ile sonuçlanır (87-89).

Bunların yanı sıra, RNF8'in tümör oluşumda farklı roller üstlendiği yapılan çalışmalar sonucu görülmüştür. Bir taraftan, RNF8 eksikliğinde farelerde tümör oluşumu gözlemlenirken diğer yandan RNF8'in, Twist ve ER $\alpha$  transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunda rol üstlenerek meme kanseri hücrelerinde büyümeyi artırdığı ve metastaza sebebiyet verdiği ortaya çıkmıştır (90-92). Kısacası, RNF8, normal hücrelerde genom kararlılığını korumada önemli bir rol üstlenerek, tümör oluşumunu engellerken, hasta hücrelerde genom kararsızlığını arttırmış ve tümör oluşumunu pozitif yönde etkilemiştir.

## 2.5. Protein-Protein Etkileşimlerinin İncelenmesinde Kullanılan Metotlar

Elektrostatik kuvvetleri ve hidrofobik etkileri içeren iki veya daha fazla protein molekülü arasında kurulan yüksek özgüllüğe sahip fiziksel temaslar olan protein-protein etkileşimlerini araştırmanın birçok yöntemi vardır. Her bir yaklaşımın, özellikle yöntemin duyarlılığı ve özgüllüğüne bağlı olarak, kendi güçlü ve zayıf yönleri bulunmaktadır (93).

**Tablo 2.1.** Protein – protein etkileşimlerinde kullanılan metotlar; avantaj ve dezavantajları

Metot	Özet	Avantajları	Dezavantajları
Ko-immünopresipitasyon	Bu yaklaşım, agaroz ya da magnetik boncuklara konjuge bir antikor ile total hücre lizati içindeki bir antijen arasındaki reaksiyona dayanmaktadır (94).	Proteinler doğal yapılarında bulunurlar. Transkripsiyon sonrası değişiklikleri gösterir. Kütle spektrometresi analizi gibi tekniklerle uyumludur. Nispeten ucuzdur.	Birincil antikorların mevcut olması gerekir. Geçici etkileşimleri yakalamak güçtür. Protein kompleksleri yıkama sırasında kaybedilebilir. <i>False</i> pozitif sonuç elde edilebilir.
l-Azidohomoalanin (AHA)	Yeni sentezlenmiş proteinler toksik olmayan bir metiyonin analog bileşiği ile etiketlenmiştir (95, 96).	<i>In vivo</i> , toksik olmayan ve seçici etiketleme yapıyor. Ucuzdur. Proteinler kendi doğal şartlarındadır. Kolaytespit edilebilir. Diğer yaklaşımlarla uyumludur (Örneğin kütle spektrometresi).	Hücrelerin metiyonin açlığı olması gerekir
Kararlı izotop etiketlemesi (Stable-isotope labelling by amino acids in cell culture - SILAC-)	İlgilenilen proteinler, proteini ağırlaştırıcı stabil, radyoaktif olmayan izotoplarla etiketlenir. Kütle farkları daha sonra kütle spektrometresi analizi ile tespit edilir (97).	<i>In vivo</i> . Radyoaktif olmayan etiketleme. Güçlü bir yöntemdir. Yüksek verimlilik vardır. Diğer tekniklerle birleştirilebilir (örneğin, sıvı kromatografi)	Kütle spektrometresi ile eşleştirilmesi gerekmektedir. Özel ortam gereklidir.
İkili Hibrid Sistemi	Bilinen iki proteinin DNA bağlama alanına (BD) ve transkripsiyon faktörünün transkripsiyonel aktivasyon alanına (AD) füzyonu temelli yöntem. Proteinler daha sonra, bir raportör genin yukarıdaki transkripsiyonel aktivatörün spesifik DNA bağlanma bölgesini içeren bir maya suşu içinde birlikte ekspres edilir (98).	Güçlü ve kullanıcı dostu bir yöntem. Yüksek verimlilikle düşük maliyetlidir.	<i>False</i> pozitif. <i>Bait</i> proteinleri toksik olabilir. Genler otomatik aktivasyona girebilirler.
<i>Fluorescence Recovery After Photobleaching</i> FRAP	Bir floresan proteinin motilite özellikleri, ilgilenilen bir bölgeyi foto-ağartmadan sonra ölçülür. Protein hareketliliğindeki değişiklikler diğer proteinlerle ilişkilendirme ile ilişkili olabilir (99, 100).	Hücre içi protein hareketliliğini tespit edebilir. Proteinler canlı hücrelerde test edilebilir	Özel enstrümantasyon gereklidir. Sıcaklık kontrol edilmelidir. Protein-protein etkileşimi için çok spesifik değil.
<i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i> FRET	Canlı ya da sabitlenmiş hücreler arasındaki mesafe 10 nm içerisinde olduğunda protein-protein etkileşimlerinin saptanmasında kullanılır. İlgilenilen proteinlerin fluroforlarla konjuge edilmesi gerekir (101).	Çok hassas ve spesifiktir. <i>In vivo</i> çalışmaları destekler. Etkileşimin yeri hakkında bilgi verebilir.	Tag, ilgilenilen proteinlerin yerini, konformasyonunu ve fonksiyonunu değiştirebilir. Az ifade edilen proteinler için uygun değildir. Sinyal kirliliğinin varlığı görülebilir.
Metot	Özet	Avantaj	Dezavantajları

**Tablo 2.1. (Devamı ) Protein – protein etkileşimlerinde kullanılan metotlar; avantaj ve dezavantajları**

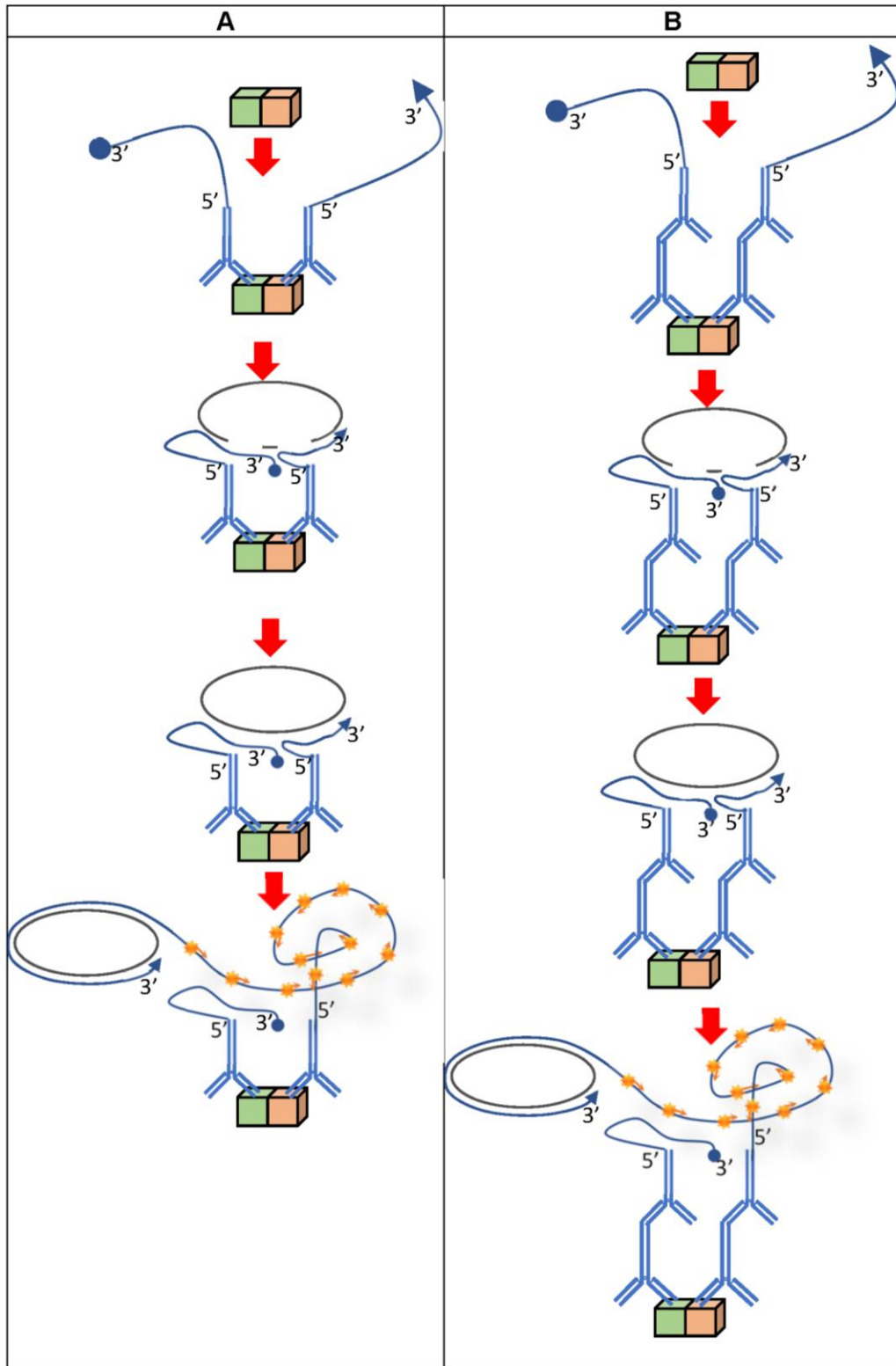
<i>Fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM)</i>	Prob floresanstaki değişim, dinamik protein-protein etkileşimleri hakkında bilgi veren floresanın ömrü boyunca izlenir. Genellikle FRET analizi ile birleştirilir (102).	Sinyal kirliliği göstermez. Sadece hücre ortamındaki değişikliklerden etkilenir. FRET popülasyonundaki bir artışı çözebilir ve gerçek zamanlı olarak bir veya daha fazla etkileşime giren proteini izleyebilir.	Pahalıdır. Özel ekipman gerektirir. Fikse edilmiş hücreler için güvenilir değildir.
<i>Bioluminescence resonance energy transfer (BRET)</i>	Protein-protein etkileşiminin tespiti, bir floresan proteini ile konjuge edilme sonrası lusiferaz aktivitesine dayanır (103, 104).	Hem hücre kültüründe hem de derin dokuda tespit. Gerçek zamanlı iki renkli ölçümü destekler. Yanlış negatif sonuçlarda azalma görülür.	Doku analizinde ışık zayıflaması vardır. Özel ekipman ve uzmanlık gerekli. Zayıf protein-protein etkileşimleri derin dokularda kaybolur.
<i>NMR spectroscopy</i>	Her atomun nükleer manyetik özelliklerini kullanarak protein kompleksinin atomik düzeyde belirlenmesine dayanan farklı yaklaşımların bir araya getirilmesidir (105, 106).	Yüksek çözünürlüklü yaklaşımdır. Zayıf protein-protein etkileşimleri tespit edilir. Sıvı veya kristalize edilmiş protein ile uyumludur. Fonksiyonel analizlerle birleştirilebilir.	<sup>13</sup> C / <sup>15</sup> N rekombinant proteinlerin üretimi, spesifik ortamlar, konaklar ve maliyet ile sınırlıdır. Tanımlanabilir sistemlerde boyut sınırlamaları mevcuttur.
<i>X-ray crystallography</i>	Kompleksin moleküler ve atomik yapısının tanımlanması için kullanılır (105).	Yüksek çözünürlüklü mikroskopidir. Enzim konformasyonel değişikliklerini çözümler.	Özel ekipman gerekli. Proteinlerin kristalize edilmesi gerekir. İşlevsel konformasyon ve zayıf protein-protein etkileşimleri kaybolabilir.
<i>Single particle electron microscopy</i>	Kristallografiyi ve kristalografik olmayan teknikleri içeren bir dizi farklı projeksiyonun ortalamalarını kullanarak protein komplekslerinin doğal konformasyonlarında tanımlanmasını sağlar (107).	Atomik seviyede protein kompleksleri için yüksek çözünürlüklü tekniklerdir. Düşük / orta çözünürlük için hızlı bir uygulamadır.	Pahalıdır. Küçük moleküller için uygun değildir. Görüntü alma ve işlem yapma çok karmaşıktır.
<i>Peptide array technology</i>	Bir proteinin peptid sekansları, selüloz zarı üzerinde sentezlenir, bu daha sonra etkileşimin spesifik alanlarını tespit etmek için bir rekombinant protein ile problemlenir (108-111).	Protein-protein etkileşimlerinde yer alan belirli amino asidi tanımlayabilecektir. Güçlü teknik. SPOT peptid sentezine imkan tanır.	Pahalı ekipman ve reaktiflerdir. Bir proteinin rekombinant formda olması gerekir. İmmobilize protein, kendi doğal konformasyonunda değildir ve 25 mer' den kısa peptidlerle sınırlıdır. Kısa doğrusal peptid motiflerini tanıyan proteinlere uygulanabilir.
<i>Proximity ligation assay</i>	Protein-protein etkileşimleri saptanabilir; DNA moleküllerine dönüştürülür, daha sonra PCR veya floresans mikroskopisi kullanılarak analiz edilir (112).	<i>Ternary</i> yapısı tespit edebilir. Az miktarda protein örneği gerektirir. Proteinler doğal durumlarında bulunurlar.	Etkileşimin saptanmasını iki protein arasındaki bağlayıcının uzunluğuna bağlıdır. Antikor arka-plan problemleri görülebilir.
Diğer biyofiziksel teknikler	Yüzey plazmon rezonansı, izotermal titrasyon kalorimetrisi, mikro ölçekli termoforez ve analitik ultrasentrifügasyon dahil biyomoleküllerin yapı, fonksiyon ve özelliklerini incelemek için mevcut tekniklerdir.	Rekombinant proteinler arasındaki etkileşimlerin karakterizasyonunu sağlar. Proteinler arasındaki etkileşimlerin kesinliğini ve / veya kinetiğini nicel olarak değerlendirmeyi kolaylaştırır.	Özelleştirilmiş ekipman gerekir. Mikroto miligram miktarında rekombinant proteinlerin başarılı bir şekilde saflaştırılması gerekir. Geçici etkileşimler kaybolabilir.

### 2.5.1. Proximity Ligation Assay

*Proximity Ligation Assay* (PLA), ilk kez 2002 yılında Fredriksson ve arkadaşları tarafından tanımlandı (113). Günümüzde, gelişmiş ve kesin protein analizi amacıyla kullanılan immünofluoresan temelli bir bir method haline gelmiştir (113, 114).

PLA tekniği, bir proteinin farklı epitoplarına veya bir kompleks içindeki yakın iki proteine (30-40 nm aralıklarla) bağlanan bir çift oligonükleotit konjuge edilmiş antikordan yararlanılarak geliştirilmiştir.

Bu metodun uygulanmasında iki farklı yöntem mevcuttur; birinci yöntemde doğrudan primer antikor konjugasyonu, diğesinde ise ikincil konjugatlarla etkileşimin tespiti sağlanır (Şekil 2.1). Doğrudan PLA yönteminde, kısa DNA oligonükleotitlerine konjuge olan iki primer antikor, bir hedef molekülü veya etkileşimli molekülleri bağlanır. Daha sonra bağlayıcı oligonükleotitler olarak adlandırılan iki ek DNA ipliği tanıtılır. Antikorlar üzerindeki iki DNA zinciri, iki bağlayıcı oligonükleotidi bağlayarak dairesel, tek zincirli bir DNA molekülünün oluşumuna yol açar. Oluşturulan DNA dairesinde, antikor konjuge DNA problemlerinden biri, amplifikasyon için primer görevi görür ve buna *rolling circle amplifikasyon* (RCA) denir. Sonuç olarak, DNA polimeraz eklenerek, uzun bir DNA ürünü oluşur. RCA'nın sonlandırılmasından sonra, aynı dizinin konkatamerik tekrarları, bir mikroskop altında görselleştirilebilen ve nicelendirilebilen çoklu saptama fluorezan oligonükleotitleri ile hibritleşir (115). Dolaylı PLA şekli için de aynı prensip geçerlidir ancak bu yöntemde modifiye edilmemiş primer antikorlar, oligonükleotitlerle konjuge olmuş sekonder antikorlar aracılığı ile tespit edilir.



**Şekil 2.1.** Proximity Ligation Assay Prensiğini Anlatan Diyagram

a) Doğrudan PLA    b) Dolaylı PLA

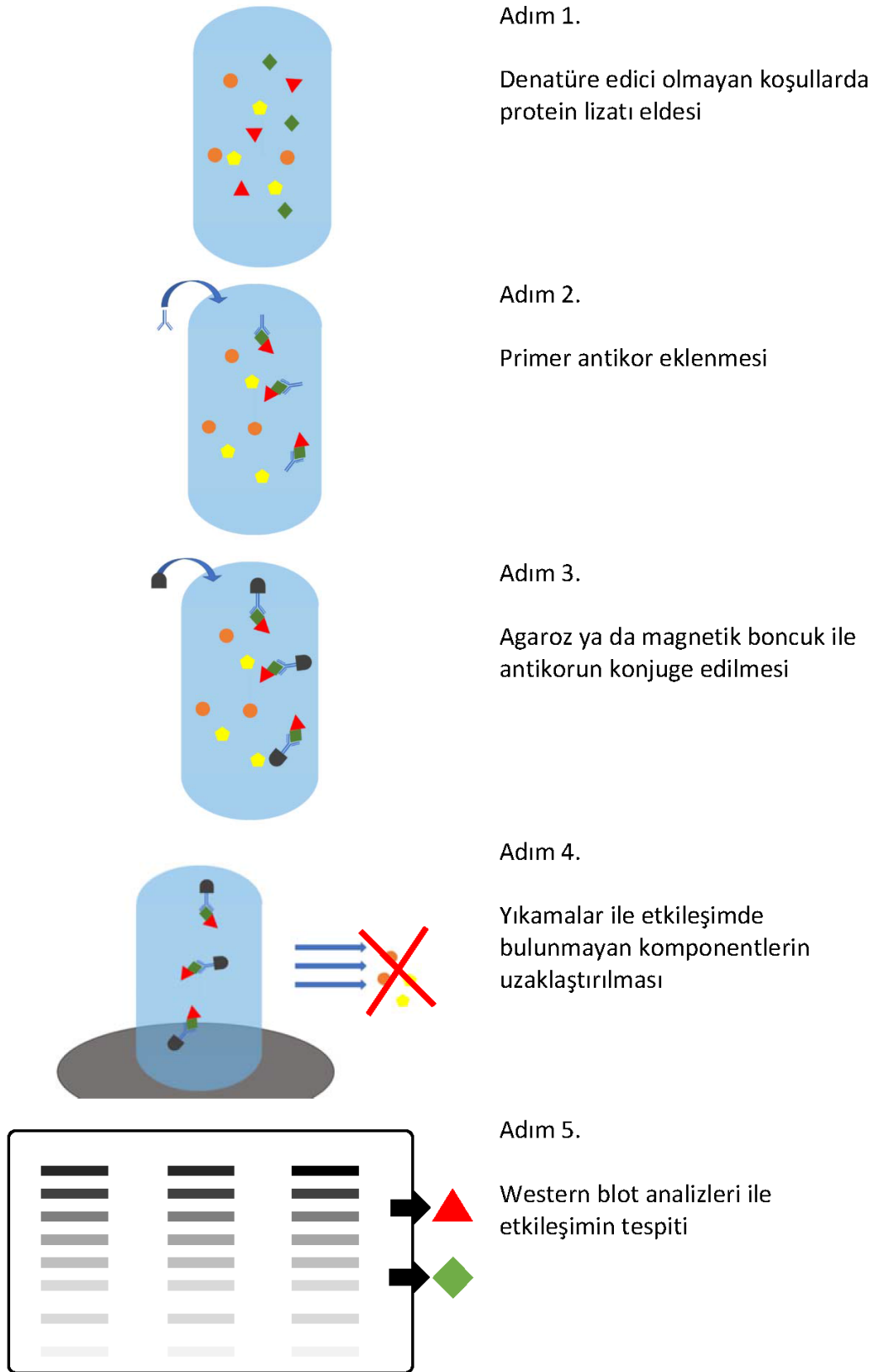
### 2.5.2. Ko-immunopresipitasyon

Ko-immunopresipitasyon, immüno-çökeltme temelli olması dolayısıyla, herhangi bir immüno-çökeltme tekniğinde olduğu gibi antijen-antikor özgüllüğü / etkileşimi prensibine dayanır.

Ko-IP tekniğinin prensibinde, hücre denatüre edici olmayan koşullar altında lizis edildiğinde birçok hücre içi protein-protein etkileşimi korunur. Etkileşimi incelenen hedef proteini (*bait*), örneğin protein X, agaroz veya magnetik boncuklar içinde stabilize edilmiş spesifik antikoruyla yakalanabilir. Başka bir protein varsa, etkileştiği protein (*prey*), örneğin protein Y, *ex vivo* olarak protein X'a bağlanır, protein X - protein Y kompleksi daha sonra antikor tarafından birlikte çöktülebilir. Daha sonra, protein Y'nin araştırılmasıyla protein X -protein Y etkileşimini doğrulanabilir veya protein X'in yeni etkileşimleri keşfedebilir (Şekil 2.2).

### 2.6. Çalışmanın Amacı

Son araştırmalar transkripsiyon faktörü PKNOX2'nin tümör baskılayıcı bir protein olduğunu ve Fanconi anemisi hastalarının kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerinde (Kİ-MKH'lerinde) azaldığını göstermiştir. Günel-Özcan grubunun yayınlanmamış çalışmasında PKNOX2 ko-immunopresipitasyon sonrası proteom analiz listesinde PKNOX2'nin etkileştiği proteinler arasında ATM ve RNF8 proteinlerinin düşük '*coverage*' değeri ile saptanmış olması PKNOX2'nin DNA onarım yolağında rol oynayabileceğini düşündürmüştür. Bu çalışmanın amacı bu hipotezi test etmek için, PKNOX2 proteini ile ATM ve RNF8 proteinlerinin etkileşimini Kİ-MKH'lerinde *Proximity Ligation Assay* ile *in situ* olarak ve ko-IP sonrası Western blotlama ile *in vitro* olarak doğrulamak ve bu etkileşimlerin DNA hasarı ile ilişkisini araştırmaktır.



**Şekil 2.2.** Ko-immunopresipitasyon prensibini anlatan diyagram.



### 3. GEREÇLER VE YÖNTEMLER

#### 3.1. Çalışmada Kullanılan Örnekler

Bu çalışma, Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onayı alınarak gerçekleştirilmiştir (Etik Kurul Karar No: GO 17/941, 05/12/2017). Çalışmada sağlıklı erkek donör kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinde daha önceki çalışmalar için izolasyonu ve karakterizasyonu yapılmış (Cagnan I ve ark, 2018) dört farklı örneğin (HUSCS – D02, HUSCS – D07, HUSCS – D15, HUSCS – D11) dondurulmuş stok hücreleri kullanılmıştır.

#### 3.2. Mezenkimal Kök Hücre Kültürü

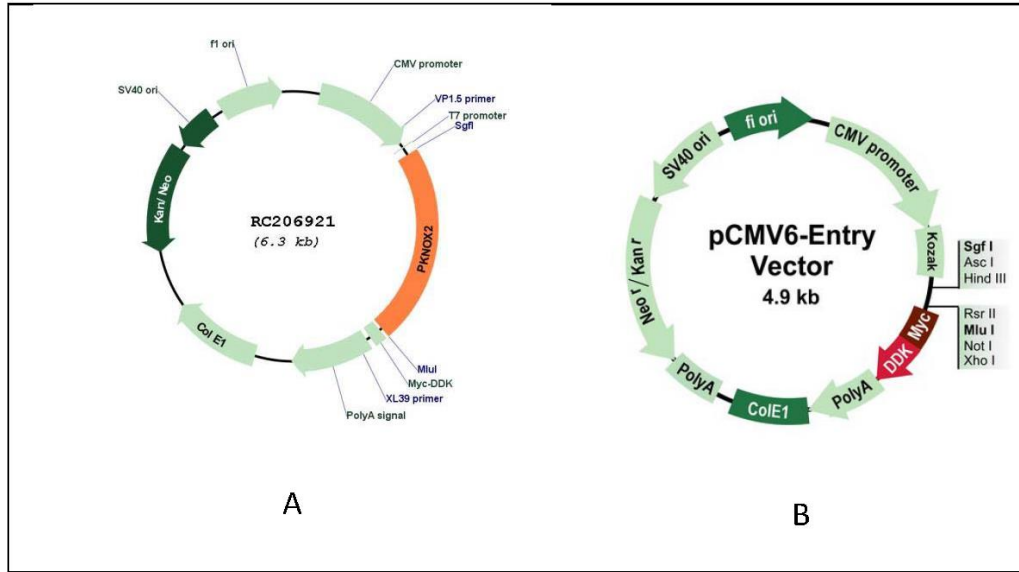
2. pasaj (P2) ve 3. pasaj (P3) Kemik iliği Mezenkimal kök hücre örnekleri sıvı azot tankından buz üzerine alınarak hücre kültürü karantina labına götürüldü ve 37 °C sıcak suya alınarak 1 dakikada bir parça buz kalana kadar çözünmesi sağlanıp laminar flow içerisinde, falkon tüplerinde DMF10 ortamı (Tablo 1.1) ile karıştırıldı, 1500 rpm 5 dakika santrifüj edilip supernatant kısmı döküldükten sonra hücre çökeltisi DMF10 besiyeri ile çözülerek, tripan mavisi ile sayım yapıldı ve 3000 hücre/cm olacak şekilde T25 ya da T75 flasklara ekildi. 3 gün sonra Mikoplazma test kiti kullanılarak (EZ-PCR Mycoplasma Detection Kit, katalog no: 20-700-20, biological industries) mikoplazma testi yapıldı ve mikoplazma negatif çıkan örnekler normal hücre kültürü laboratuvarına aktarıldı. Bundan sonra hücreler 3 günde bir DMF10 ortamı ile tazelenerek takip edildi. 80% konfluensiye ulaşan hücrelere pasajlama yapıldı. Pasajlama işlemi sırasında besiyeri atılarak, hücreler PBS ile yıkandıktan sonra tripsin ile muamele gördü ve 7 dakika 37°C %5 karbondioksit kontrollü inkübatörde bekletildi, mikroskopta hücrelerin kalkması kontrol edildikten sonra, hücreler falkon tüplere pipet yardımı ile aktarılarak üzerlerine tripsin miktarının iki katı kadar besiyeri DMF10 eklenerek 1500 rpm 5 dk santrifüj edildi, üstteki besiyeri atıldıktan sonra hücreler belli bir miktar DMF10 ile çözüldü ve 1.5 mL *ependorf* tüplerde 1:1 oranda tripan mavisi ile hücre solüsyonu karıştırılarak hemositometreye ekildi ve hücre sayımı yapıldıktan sonra yeni flasklara ekilerek pasajlama işlemi gerçekleştirildi.

**Tablo 3.1.** DMF10 ortam içeriği

Madde ve yüzdesi	Katalog (Kat) no ve Firma adı
%10 oranında fetal buzağı serumu	Kat no: 10270106, Gibco by Life technologies, ABD
%1 penisilin/streptomisin	Kat no: A 2213, Merck Millipore, Almanya
%1 L-glutamin	Kat no: K 0283, Biochrom, İngiltere
%60 DMEM-LG	Kat no: 316000-083, Gibco, İngiltere
%40 MCDB201	Sigma Aldrich, Almanya

### 3.3. PKNOX2 overekspresyonunda Kullanılan Plazmidler: PKNOX2-pCMV6

MKH'lere PKNOX2 genini taşıyan PKNOX2-pCMV6 plazmidler veya boş plazmidler (pCMV6-Entry) elektroporasyon ile transfekte edildi (OriGene, ABD; Şekil 3.1A-B). Her iki vektörde fi ori (faj orijini; replikasyon ve tek iplikli DNA'nın faj partikülleri içerisine paketlenmesi için gereklidir), SV40 ori (memeli hücreleri için replikasyon orijini), kanr/Neor (antibiyotik seleksiyon kaseti; E. coli de kanamisine ve memeli hücrelerinde neomisine karşı direnç sağlar), ColE1 (Colicin E1), CMV (cytomegalovirus) promotoru, Kozak sekansı (memeli hücrelerinde protein ifadesini sağlar) ve MYC/DDK tag (open reading frame –ORF- ürününün anti-DDK antikoru tarafından tanınmasını ve saflaştırılmasını sağlar) içermektedir. Ayrıca PKNOX2-pCMV6 plazmidi 18 aminoasid dizinli MYC/DDK tag'ı ile füzyon oluşturan insan PKNOX2 cDNA ORF'i içermektedir (Şekil 3.1A). pCMV6-Entry plazmidi 4.9 kb ve PKNOX2-pCMV6 plazmidi ise 6.3 kb büyüklüğündedir.



**Şekil 3.1.** PKNOX2-DDK overekspresyon vektörü. A) İnsan PKNOX2 (NM\_022062) cDNA ORF Clone taşıyan ekspresyon vektörü ve, B) pCMV6-Entry boş vektörünün plazmid haritaları (OriGene).

### 3.3.1. PKNOX2-pCMV6 ve pCMV6-entry Plasmidlerinin Bakteride Çoğaltılması ve İzolasyonu

JM109 *E. coli* kompetan hücrelerine PKNOX2 overekspresyon deneylerinde kullanılan plazmidler aktararak bu plazmidlerin çoğaltılması sağlandı. Kompetan hücreleri ile 100 ng plazmid DNA'sı *ependorf* tüplerde karıştırıldı ve 30 dakika buz üzerinde inkübe edildi. Bundan sonra hücre:plazmid karışımı bir dakika boyunca 42°C de heat-shock edildi ve tekrar buz üzerinde 5 dakika bekletildi. Isı şoku sonrası, bu karışım 1.5 ml LB-broth içerisine alındı ve 37°C de bir saat inkübe edildi. Bakteri kültürleri bir dakika boyunca 6800 xg santrifüj edildi ve üstteki sıvı atıldı ve 25 µg/ml kanamisinli LB-agara ekildi. Gece boyunca 37°C de inkübasyon sonrası LB-agar'lar üzerinde büyüyen kolonilerden tek koloni alınarak kanamisin (25 µg/ml) içeren LB (falkon tüpte 1:5 oranında LB olacak şekilde) içine inoküle edilip 37°C orbital çalkalayıcıda gece boyunca inkübasyona bırakıldı. Daha sonra, bu bakteri kültürlerinden 200 µl alınıp kanamisin (25 µg/ml) içeren LB (100 ml) içine ekilip 37°C

de gece boyu orbital çalkalayıcıda inkübe edildi. Bu hücrelerden *EndoFree Plasmid Maxi Kit* (kat no: 12362, Qiagen, ABD) izolasyon kiti ile plazmid DNA'sı üretici firma tarafından sağlanan protokole göre saflaştırıldı.

#### **3.4. Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücrelere PKNOX2-pCMV6 ve pCMV6-entry Plazmidlerinin Elektroporasyon Yöntemi ile Geçici Transfeksiyonu**

Hücrelere elektroporasyon yöntemi ile plazmid aktarımı *Neon Transfection System* (Thermo Fisher Scientific, ABD) ile gerçekleştirildi. Bunun için önce, P4 mezenkimal kök hücre kültüründe hücrelerinin %70 yüzeyi kapladığı gözlemledikten sonra tripsinizasyon işlemi ile hücreler kaldırıldı, santrifüj sonrası *supernatant* atılarak PBS ile hücre çökeltisi (*pellet*) süspanse hale getirildi ve hücre sayımı gerçekleştirildi.  $1 \times 10^6$  hücre olacak şekilde, üç ayrı 15 mL konik tabanlı tüpe (PKNOX2:MKH, pCMV6:MKH, MKH) hücreler dağıtıldı ve santrifüjlenerek (1500 rpm, 5 dk) hücre kültür ortamı uzaklaştırıldı.

Hücrelerin santrifüjlenmesi esnasında, Neon Tüp 3 mL Elektrolitik Buffer ile doldurularak (10 uL pipet tip kullanılıyor ise Buffer E, 100 uL pipet tip kullanılıyor ise Buffer E2) Neon Pipet İstasyonuna yerleştirildi. Bu işlem sırasında, PKNOX2-pCMV6 ve pCMV6-entry plazmidlerinden 12,5 ug kadar alınarak PKNOX2:MKH ve pCMV6:MKH olarak etiketlenmiş 1,5 mL konik tabanlı santrifüj tüplere konuldu.

15 mL tüplerde bulunan hücreler (100 ul-plazmid uL) resüspanسیون buffer ile süspanse edildi. Süspanse olan hücreler PKNOX2-pCMV6 veya pCMV6-entry plazmidini bulunan 1.5 mL'lik tüpe aktarıldı ve pipetlendi. Neon pipet, çalışılacak ölçülerdeki uca takıldı ve 1.5 mL'lik tüpte bulunan plazmid-hücre karışımı köpük oluşturmadan alındı. Neon pipet önceden Neon pipet istasyonuna yerleştirilen Neon tüpe konumlandırıldı ve 990 V, 40 ms, 2 pulse ile elektroporasyon gerçekleştirildi. Her bir elektroporasyon sonrası hücreler antibiyotiksiz DMF10 içeren 6 kuyucuklu plağın iki kuyucuğuna eşit olarak dağıtıldı. Hücrelerin besiyeri 1 gün sonra antibiyotikli DMF10 ortamı ile değiştirildi. Kontrol grubu olarak elektroporasyon işlemine tabi tutulmayan MKH ve PKNOX2 geni taşımayan boş pCMV6 vektörü kullanıldı.

### 3.5. Elektroporasyon Sonrası Protein İzolasyonu

DMF10 ortamı içerisindeki MKH'ler iki kez buz üstünde soğutulmuş PBS ile yıkandı. Buz üzerinde, 1X proteaz inhibitör kokteyli (kat no: P2714-1BTL, Sigma-Aldrich) içeren Lizis Tamponu (Origene, ABD) 20 dk inkübasyona bırakıldı. Lizatlar hücre kazıyıcı ile (*kat no: 4460600N Orange Scientific*) ile toplandı. 14000 xg 4 °C'de 5 dk 1.5 mL'lik tüplerde Eppendorf 5810-R (Eppendorf, Almanya) cihazında santrifüjlendi. Üstteki sıvı yeni bir tüpe aktarıldı ve kullanılabildiği kadar -80°C'de saklandı.

### 3.6. Protein Konsantrasyonunun Hesaplanması

Pierce BCA Protein Assay kiti (kat no: 23225, Thermo Scientific, ABD) protokolü uygulanarak protein konsantrasyonları belirlendi. BSA standartları; 2 mg/ml, 1.2 mg/ml, 0.8 mg/ml, 0.4 mg/ml, 0.2 mg/ml, 0.1 mg/ml ve 0 mg/ml olarak hazırlandı ve 1X proteaz inhibitör kokteyli (kat no: P2714-1BTL, Sigma-Aldrich) içeren *Lizis Buffer* (Origene, ABD) ile kit içinde mevcut olan 2 mg/mL BSA proteini seyreltilerek istenilen standart konsantrasyonları elde edildi. Bundan sonra, reagent B: reagent A, 1:50 olacak şekilde çalışma solüsyonu hazırlandı. Hazırlanan standartlar ve örnekler bu solüsyon ile 1:20 dilüsyona tabi tutuldu ve 37 °C 30 dakika inkübe edildikten sonra NanoDrop ND-1000 spektrofotometre ile her bir standarda göre absorbans değerleri ölçüldü ve elde edilen standart eğriye göre örneklerin konsantrasyonu saptandı.

### 3.7. Total Protein Eldesi Sonrası SDS-PAGE Jel Yürütme ve Western Blotlama

%10 TGX *Stain-Free FastCast Acrylamide* kit (kat no: 161-0183, Bio-Rad, ABD) kullanılarak, Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) ile total protein lizatının ayrılması sağlandı. Her kuyucuğa 30 µg protein lizatı yüklendi. Konsantrasyonu en düşüğe göre kuyucuğa yüklenecek toplam hacim miktarı belirlendi ve final hacmi su ile tamamlandı. Protein lizatı karışımı ile 2-merkaptotanol içeren 4x *Laemmli Buffer* (kat no: 161-0747, Bio-Rad) 1X olacak şekilde seyreltildi ve

hazırlanan örnekler 5 dk, 100°C'de kaynatıldı. Örnekler ile birlikte *PageRuler Plus Prestained Protein Ladder* (kat no: 26619, ThermoFisher Scientific) jele yüklendi. *Bio-Rad PowerPac Basic* cihazı ile oda sıcaklığında *stacker* kısmı geçene kadar 60 volt sonra ise 110 Voltta yürütülmeye devam edildi. Yürütme işlemi sonrası kaset çıkartılarak jelin tarak kısımları kesildi ve jel hazır hale getirildi. *Trans-Blot Turbo Blotting* sistemi (Bio-Rad, ABD) kullanılarak PVDF membranına jel transfer edildi. Transfer edilen membran 1 saat boyunca oda sıcaklığında %5 süt tozu ile bloklama sonrası gece boyu +4°C çalkalayıcı üzerinde anti-PKNOX2 (1:250 dilüsyon; Santa Cruz Biotechnology; katalog no: 101857), anti-ATM (1:1000, Invitrogen; kat no: MA1-23152) veya anti-RNF8 (1:100 dilüsyon; Santa Cruz Biotechnology; kat no: 271462) primer antikorumla ile inkübasyona bırakıldı. Sekonder olarak HRP işaretli 1:1000 dilüsyon ile keçi-anti-fare IgG antikorumla kullanıldı. Yükleme kontrolü olarak ise anti-B-AKTİN (1:2500 dilüsyon; *Cell Signaling Technology*) primer antikoru kullanıldı. Peroksidaz aktivitesi, firmanın protokolü uygulanarak *WesternBright Sirius Chemiluminescent Detection Kit* (kat no:K-12043-C20, Advansta) aracılığıyla ölçüldü ve ProteinSimple FC3 cihazıyla görüntülendi.

### **3.8. Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücrelerde İmmunopresipitasyon Yöntemi ile PKNOX2 Proteinin ATM ve RNF8 Proteinleri ile Etkileşimlerinin İncelenmesi**

PKNOX2 overekspresyonu sonrası immunopresipitasyon (IP) için manyetik Protein A/G boncukları (Pierce Protein A/G Beads cat no: 88802, Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanıldı. Her hücre lizatından 60 µg olacak şekilde protein alındı, 1X *Lizis buffer proteinaz inhibitör* kokteyl tampon solüsyonu ile final hacmi 475 µl'ye tamamlandı. Üzerine 25 µl A/G boncuk koyarak +4°C'de 30 dakika *Bio RS-24 Mini-Rotator* (BioSan, Letonya) üzerinde inkübe edildi. Tüpler manyetik standla alınarak üstteki sıvı (*supernatant*) yeni temiz tüplere aktarıldı. Böylelikle örnekler boş magnetik boncuklar ile inkübe edilerek spesifik olmayan bağlanmaları indirgenmiş oldu. *Supernatant* aktarılan tüplere 10µl PKNOX2, ATM ya da RNF8 primer antikoru eklenerek +4°C'de 4 saat mini-rotator ile karıştırılarak inkübe edildi. Daha sonra,

tüplere 50 µl A/G boncuk eklendi ve gece boyunca +4°C'de *mini-rotator* üzerinde inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün, her örnek üç kez 500 uL 1X yıkama solüsyonu (OriGene, ABD) ile yıkanarak yıkama işlemi tamamlandı. Yıkama basamakları sonrası 25 µl %5 β-merkaptoetanol içeren 2X SDS-PAGE (%5 β-merkaptoetanol içeren) solüsyonunu (OriGene, ABD) eklenilerek örnekler 5 dakika boyunca kaynayan suda inkübe edildi. Kaynama işlemi sonrası, manyetik boncuklardan ayrıştırılarak *Western blot*lama yapılmak üzere -80°C kaldırıldı ya da direk olarak *Western blot* analizleri için %10 SDS-PAGE jeline yüklendi.

### **3.8.1. Immunopresipitasyon ile Çöktürülen Proteinlerin Western Blotlama ile Analizi**

%10 SDS-PAGE jeline yürütülen proteinler, *Trans-Blot Turbo Blotting* sistemi (BioRad) kullanılarak PVDF membranına transfer edildi. Transfer edilen membran, 1 saat boyunca oda sıcaklığında %5 süt tozu ya da *Clean-Blot IP Detection* Kit (ThermoFisher Scientific) içinden çıkan bloklama solüsyonu ile bloklama işlemine tabi tutulduktan sonra gece boyu +4°C'de çalkalayıcı üzerinde anti-PKNOX2 (1:250 dilüsyon; Santa Cruz Biotechnology; kat no: 101857) veya anti-ATM (1:1000 invitrogen; katalog no: MA1-23152) veya anti-RNF8 (1:100 dilüsyon; Santa Cruz Biotechnology; katalog no: 271462) primer antikorları ile inkübe edildi. Sekonder olarak HRP işaretli 1:1000 dilüsyon ile keçi-anti-fare IgG antikorları ya da *Clean-Blot IP Detection* Kit (kat no:21232, ThermoFisher Scientific) içinden çıkan deteksiyon solüsyonu 1:200 dilüsyon ile kullanıldı. Peroksidaz aktivitesi *WesternBright Sirius Chemiluminescent Detection* Kit (kat no: K-12043-C20, Advansta) ile üretici firmanın önerdiği protokol kullanılarak ProteinSimple FC3 cihazı aracılığıyla görüntülendi.

### **3.9. γH2AX Proteininin FITC Konjuge Edilmiş Spesifik Antikoru ile İşaretlenerek DNA Hasar Cevabının Akım Sitometri Yöntemi ile Analizi**

Kültür ortamındaki hücrelere tripsinizasyon işlemi uygulandı. Hücre sayımı yapıldıktan sonra hücreler eşit miktarda ikiye bölünerek yarısı T75 hücre kültür kabına, diğer yarısı ise 25 gy 7 dk γ- ışınına (GammaCell 3000 Elan, USA) maruz

bırakıldı ve T75 hücre kültür kabına ekildi. 6 saat sonra hücreler tripsin yapılarak toplandı ve 1 ml besiyeri ile süspansiyon edildi. Hücre süspansiyonu, 4,5 ml soğuk %1 metanol içermeyen PBS'te çözünmüş formaldehit solüsyonu içinde 6 mL'lik bir polipropilen tüpe pasteur pipeti ile aktarıldı ve 15 dakika boyunca buz üzerinde bekletildi. Oda sıcaklığında 4 dakika 300 g'de santrifüjlendi ve hücre pelleti 4,5 mL PBS'te süspansiyon edildi. Süspansiyon 1. adımdaki gibi tekrar santrifüjlendi ve hücre pelleti 0,5 mL PBS'te süspansiyon edildi, pastör pipeti ile 4,5 mL %70 etanol içeren bir tüpe aktarıldı. Hücreler 2 saat, -20 °C'de %70 etanolde saklandı ve daha sonra süspansiyon, oda sıcaklığında 4 dakika boyunca 200 g'de santrifüjlendi ve etanol uzaklaştırıldı. Hücre çökeltisi (*pellet*) 2 mL BSA-T – PBS çözeltisinde süspansiyon edildikten sonra oda sıcaklığında 4 dakika boyunca 300 g'de santrifüjlendi, üstteki sıvı uzaklaştırıldı ve hücreler tekrar 2 mL BSA-T – PBS içinde süspansiyon haline getirildi. 5 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra oda sıcaklığında 4 dakika boyunca 300 g'de santrifüjlenerek üstteki sıvı uzaklaştırılıp hücreler 1 µg γH2AX primer antikoru içeren 100 µL BSA – T – PBS çözeltisinde süspansiyon edildi. Kurumayı önlemek için tüpler kapatılıp 4 ° C'de gece boyunca inkübe edildikten sonra, ilk olarak 2 mL BSA – T – PBS eklenip oda sıcaklığında 4 dakika 300 g'de santrifüjlenerek yıkama yapıldı. Daha sonra, 5 mL BSA – T – PBS ilave edildi ve 2 dakika sonra 300 g'de oda sıcaklığında 4 dakika santrifüjlenerek ikinci yıkama yapıldı. Hücreler 1 mL *propidium iodide* (PI) boyama solüsyonunda süspansiyon edilip karanlıkta oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi (116). Örneklerin analizi, BD FACSAria-II cihazında yapıldı.

### 3.10. Mezenkimal Kök Hücrelerde PKNOX2-ATM ve PKNOX2-RNF8

#### Etkileşimlerinin *Proximity Ligation Assay* ile Araştırılması

PKNOX2'nin ATM ve RNF8 ile etkileşimleri *in situ* olarak immünfloresan tekniği temelli *DUOLink Proximity Ligation Assay* ile yapıldı. Bunun için *Duolink in situ Orange Starter* (Sigma-Aldrich, ABD) kiti kullanıldı ve firmanın belirttiği protokol uygulandı. Etkileşimi incelemek için örneklerin deney planı, γ- ışınlamaya tabii tutulmuş Kİ-MKH örnekleri, γ- ışınlamaya tabii tutulmamış Kİ-MKH örnekleri ve kontrol amaçlı sadece anti-PKNOX2, anti-ATM ve anti-RNF8 antikorlarını içerecek şekilde deney planı

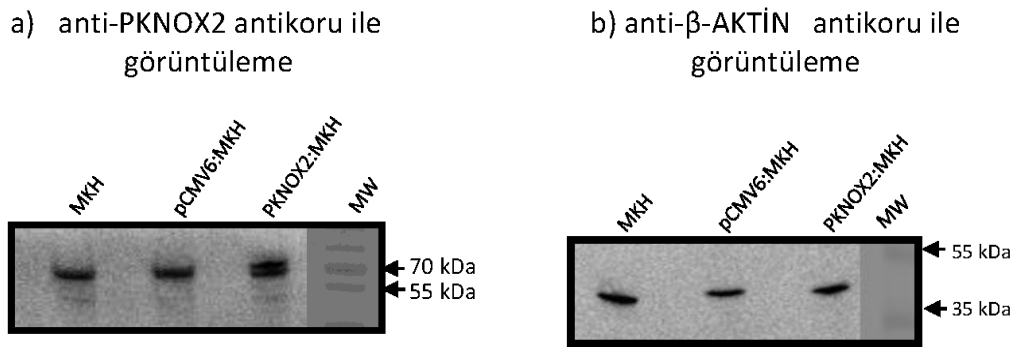


yapıldı. Sekizli *chamber-slide* (Nunc Lab-Tek, Thermo Fisher Scientific) kullanılarak belirlenen örnekler her bir kuyucuğa 7000 hücre olacak şekilde ekildi ve 24 saat sonra PLA *duolink assay* başlatıldı. Bu aşamada, kit protokolü takip edilerek örnekler üzerine bloklama solüsyonu eklenildi, optimum koşullarda inkübasyon sağlandıktan sonra bloklama solüsyonu uzaklaştırıldı ve anti-PKNOX2 (1:50 dilüsyon; invitrogen; katalog no: PA5-65032), anti-ATM (1:100; invitrogen; katalog no: MA1-23152) ve anti-RNF8 (1:25 dilüsyon; santa cruz biotechnology; katalog no: 271462) uygun tamponlar ile seyreltikten sonra örnekler ile muamele edildi. RNF8 için gece boyunca primer antikor inkübasyonu sağlanırken ATM için 2 saat inkübasyon olması optimum şartlar olarak kararlaştırıldı. İnkübasyon sonrası örnekler de 2 kez 5 dakika olacak şekilde yıkama işlemi yapıldı. *Minus ve Plus* PLA problemleri 1:5 oranında kit içinden çıkan antikor dilüsyon tamponu ile seyreltildi ve örneklerle uygulandı. 1 saat boyunca 37 °C inkübasyonu gerçekleştikten sonra 1x *Wash buffer A* ile iki kez 5 dakika yıkama gerçekleştirildi ve 5X ligasyon stoğunun 1:5 oranında dilüsyonu gerçekleştirilerek 1X *ligasyon* solüsyonu elde edildi ve 1X *ligasyon* solüsyonu ile ligaz enzimi 1:40 oranında seyreltilerek karışım örneklerle uygulandı. Örnekler 30 dakika 37°C inkübe edildikten sonra 1x *wash buffer A* ile tekrar iki kez 2 dakika yıkandı ve 1:5 oranında dilüsyonu olmuş amplifikasyon stoku ile 1:80 oranında seyreltilmiş polimeraz karışımı örneklerle eklendi. 100 dakika 37 °C inkübe edildikten sonra 2 kez 10 dk süreyle 1x *wash buffer B* ile yıkandı ve son olarak 0.01x *wash buffer B* ile 1 dakika yıkama yapıp örnekler kit içerisinde bulunan kapatma (*mounting*) ortamında 15 dakika bekletildi ve Olympus IX73 ve Leica DMI6000B ve Leica DM6B floresan mikroskop ile görüntülendi. Elde edilen görüntüler ImageJ yazılımı kullanılarak analiz edildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Mezenkimal Kök Hücrelerde PKNOX2 Overekspresyonunun Doğrulanması

Elektroporasyon yöntemiyle, pCMV6-Entry, PKNOX2:pCMV6 plazmidleri aktarılan mezenkimal kök hücrelerden ve kontrol mezenkimal kök hücre örneklerinden elde edilen total protein lizatlarıyla yapılan Western blotlama sonucu anti-PKNOX2 antikoru ile işaretlenmiş olan membranda PKNOX2:pCMV6 plazmidini aktarılmış MKH örneklerinde DDK-PKNOX2 füzyon proteinine karşılık gelen 70 kDa hemen üzerinde bir bant ile birlikte 70 kDa'da belirgin, 55 kDa ve 55kDa altında silik bantlar görülmüştür (Şekil 4.1). PKNOX2:pCMV6 plazmidini aktarılmış MKH örneklerinde 70 kDa hemen üzerinde görülen bu bantın DDK füzyon edilmiş PKNOX2 proteini olduğu söylenebilir. pCMV6-Entry boş plazmidini aktarılan ve işleme tabii tutulmamış MKH örneklerinde 70 kDa'da bant gözlemlenmiştir. Benzer şekilde, 55 kDa hizasında ve 55kDa altında silik bantlar bu örneklerde görülmüştür.



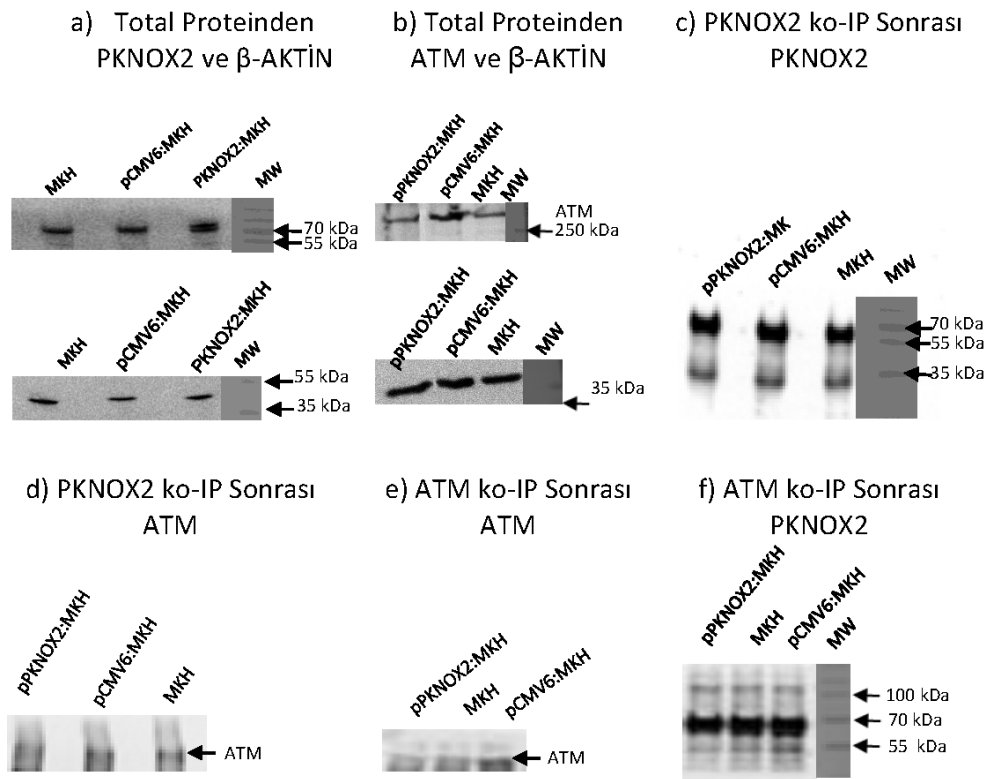
**Şekil 4.1.** Mezenkimal Kök Hücrelerde PKNOX2 overekspresyonu sonrası transfeksiyon doğrulanması

a) anti-PKNOX2 antikoru ile görüntüleme

b) anti- $\beta$ -AKTİN antikoru ile görüntüleme En sağdaki kuyucuğa moleküler ağırlık (MW) belirteci yüklenmiştir.

## 4.2. Ko-immünopresipitasyon yöntemi ile PKNOX2 ile ATM Proteininin Etkileşiminin Araştırılması

ATM ile PKNOX2 etkileşiminin araştırılması için PKNOX2 ile Ko-immünopresipitasyon sonrası ATM ve ATM ile Ko-immünopresipitasyon (ko-IP) sonrası PKNOX2 varlığı Western Blotlama ile belirlenmiştir. PKNOX2 ile yapılan ko-IP ile çöken proteinler ile yapılan Western blotlamada PKNOX2 antikor ile PKNOX2 proteininin çöktüğü (total proteinden yapılan Western blotlama görüldüğü gibi 70 kDa seviyesinde bant gözlemlenmesi ile) saptanmıştır (Şekil 4.2a ve c).



**Şekil 4.2.** Ko-immünopresipitasyon yöntemi ile PKNOX2 ile ATM protein etkileşimlerine bakılan Western Blot sonuçları.

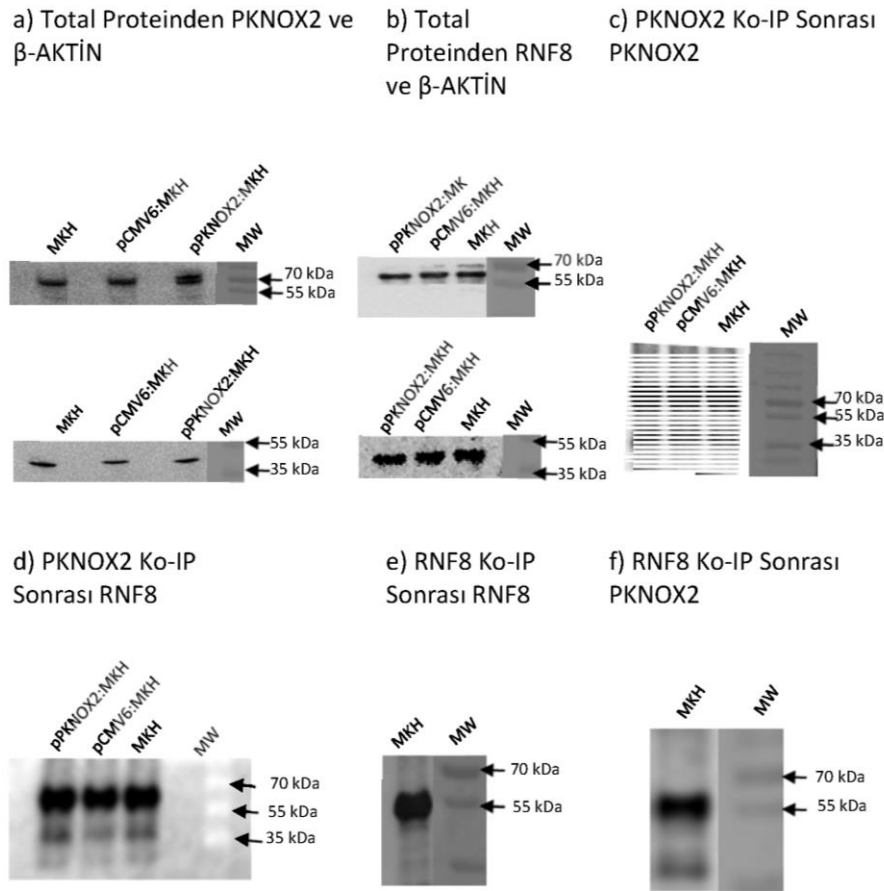
a) Üst membran PKNOX2 antikor ile işaretlenmiş, alt membran  $\beta$ -AKTİN antikor ile işaretlenmiştir, b) Üst membran ATM antikor ile işaretlenmiş, alt membrane  $\beta$ -AKTİN antikor ile işaretlenmiştir c) PKNOX2 antikor ile ko-IP sonrası western blot membranı PKNOX2 antikor ile işaretlenmiş, d) PKNOX2 antikor ile ko-IP sonrası western blot membranı ATM antikor ile işaretlenmiş, e) ATM antikor ile ko-IP sonrası western blot membranı ATM antikor ile işaretlenmiş, f) ATM antikor ile ko-IP sonrası western blot membranı PKNOX2 antikor ile işaretlenmiş En sağdaki kuyucuğa moleküler ağırlık (MW) belirteci yüklenmiştir.

PKNOX2 ile yapılan co-IP sonrası, ATM proteinin varlığı da western blot membranında total proteindeki gibi 250 kDa üzerinde bant gözlenmesi ile tespit edilmiştir (Şekil 4.2b ve d). pCMV6-Entry örneğinde ATM protein bantının en yoğun olduğu gözlemlenmiştir. ATM co-IP sonrası western blot membranında PKNOX2 antikoru ile işaretleme ile 100kDa, 70 kDa ve 55 kDa bantlar gözlemlenmiştir (Şekil 4.2f) ve ilginç olarak hem 70 kDa'lık hem 55 kDa'lık bant boş vektörü (pCMV6) taşıyan MKH örneklerinde en yoğun iken pPKNOX2 plazmidini taşıyan MKH örneklerinde yoğunluk göreceli daha azdır. Bant yoğunluğundaki benzer durum ATM co-IP sonrası western blot membranının ATM antikoru ile işaretlenmesinde de saptandı (Şekil 4.2e). Sonuç olarak pCMV6 boş vektörü taşıyan MKH'lerden ATM antikoru ile daha fazla PKNOX2 presipitasyonu olmuştur. pPKNOX2 taşıyan MKH'lerde ATM antikoru ile hem ATM presipitasyonunun hem PKNOX2'nin ko-presipitasyonunun daha az olması dikkat çekicidir.

### **4.3. Ko-immünopresipitasyon Yöntemi ile RNF8 Proteinin Etkileşiminin**

#### **Araştırılması**

RNF8 ile PKNOX2 etkileşiminin araştırılması için PKNOX2 ile Ko-immünopresipitasyon sonrası RNF8 ve RNF8 ile Ko-immünopresipitasyon sonrası PKNOX2 varlığı western blotlama ile incelenmiştir. PKNOX2 ile yapılan Ko-IP sonrası, protein çöktisinde önce PKNOX2 proteini varlığı total protein western blotlarında saptandığı gibi 70 kDa seviyesinde bant gözlenmesi ile belirlenmiştir (Şekil 4.3a ve c). PKNOX2 ile yapılan Ko-IP sonrası, RNF8 protein düzeyi western blotlama ile incelenmiş ve total proteinden RNF8 ekspresyonu incelendiğinde görülen bant ile aynı büyüklükte, 55 kDa ile 70 kDa arasında bant tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra 30 kDa civarında IgG hafif zincir büyüklüğüne karşılık gelen bir bant daha saptanmıştır (117). RNF8 Ko-immünopresipitasyon sonrası western blotlama membranı hem RNF8 antikoru hem de PKNOX2 antikoru ile işaretlendiğinde 55 kDa büyüklüğünde bant saptanmıştır (Şekil 4.3 e ve f). Bu bant IgG heavy chain ağırlığına karşılık gelmektedir.



**Şekil 4.3.** Ko-immunopresipitasyon yöntemi ile PKNOX2 ile RNF8 proteinin etkileşimine bakılan western blot sonuçları.

a) Üst membran PKNOX2 antikoruna ile işaretlenmiş, alt membran ise  $\beta$ -AKTİN antikoruna ile işaretlenmiştir. b) Üst membran RNF8 antikoruna ile işaretlenmiş, alt membran  $\beta$ -AKTİN antikoruna ile işaretlenmiştir. c) PKNOX2 antikoruna ile ko-IP sonrası western blot membranını PKNOX2 antikoruna ile işaretlenmiş, d) PKNOX2 antikoruna ile ko-IP sonrası western blot membranını RNF8 antikoruna ile işaretlenmiş, e) RNF8 antikoruna ile ko-IP sonrası western blot membranını RNF8 antikoruna ile işaretlenmiş, f) RNF8 antikoruna ile ko-IP sonrası western blot membranını PKNOX2 antikoruna ile işaretlenmiş. En sağdaki kuyucuğa moleküler ağırlık (MW) belirteci yüklenmiştir.

#### 4.4. *In situ Proximity Ligation Assay* Yöntemi ile PKNOX2 ile ATM

##### Proteininin Etkileşiminin Araştırılması

Her bir kuyucuğa 10000 hücre olacak şekilde (HUSCS-D11) 8'li *chamber slide*'lara ekilen Ki-MKH'ler %4 paraformaldehit ile fikse edildikten sonra, *mouse* anti-ATM ve *rabbit* anti-PKNOX2 ile iki saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Kontrol grubu olarak ise sadece *mouse* anti-ATM (Şekil 4.4.a) ve sadece *rabbit* anti-PKNOX2

(Şekil 4.4.b) antikorları ile inkübe edilen kuyucuklar kullanıldı. İnkübasyon sonrası her bir kuyucuk *duolink* problemleri ile inkübe edildi. Çekirdek boyaması ise DAPI ile gerçekleştirildi.

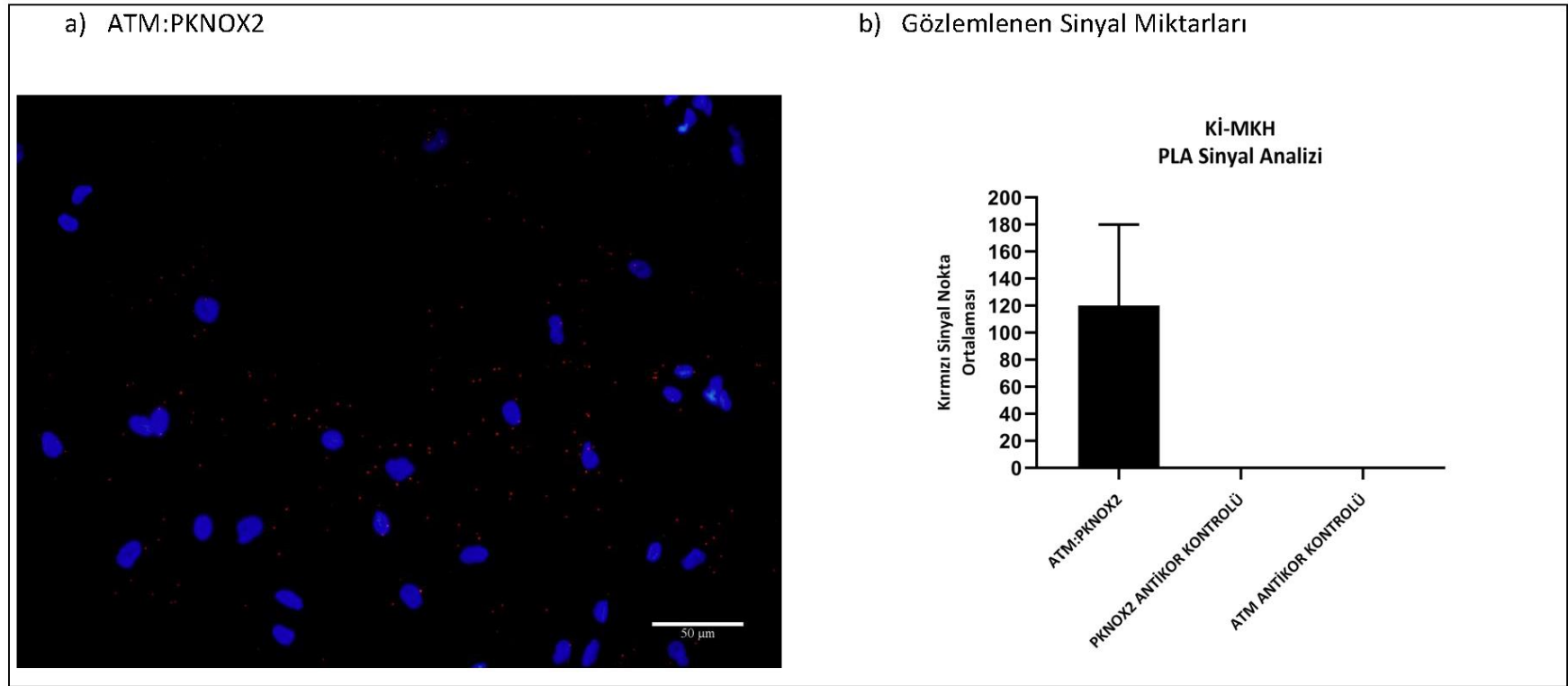
Deney sonucunda; Olympus IX73 ile 20X büyütme ile görüntü alındı. Alınan görüntülerde ATM:PKNOX2 etkileşiminin incelendiği kuyucukta (Şekil 4.4a) kırmızı sinyal noktaları gözlemlenirken, kontrol gruplarında (Şekil 4.4.c ve 4.4.d) kırmızı sinyal noktalarına rastlanmadı. ATM ve PKNOX2 etkileşimi çekirdekte görülebildiği gibi, sitoplazmada daha yoğun olarak tespit edilmiştir.

#### **4.5. *In situ Proximity Ligation Assay* Yöntemi ile RNF8**

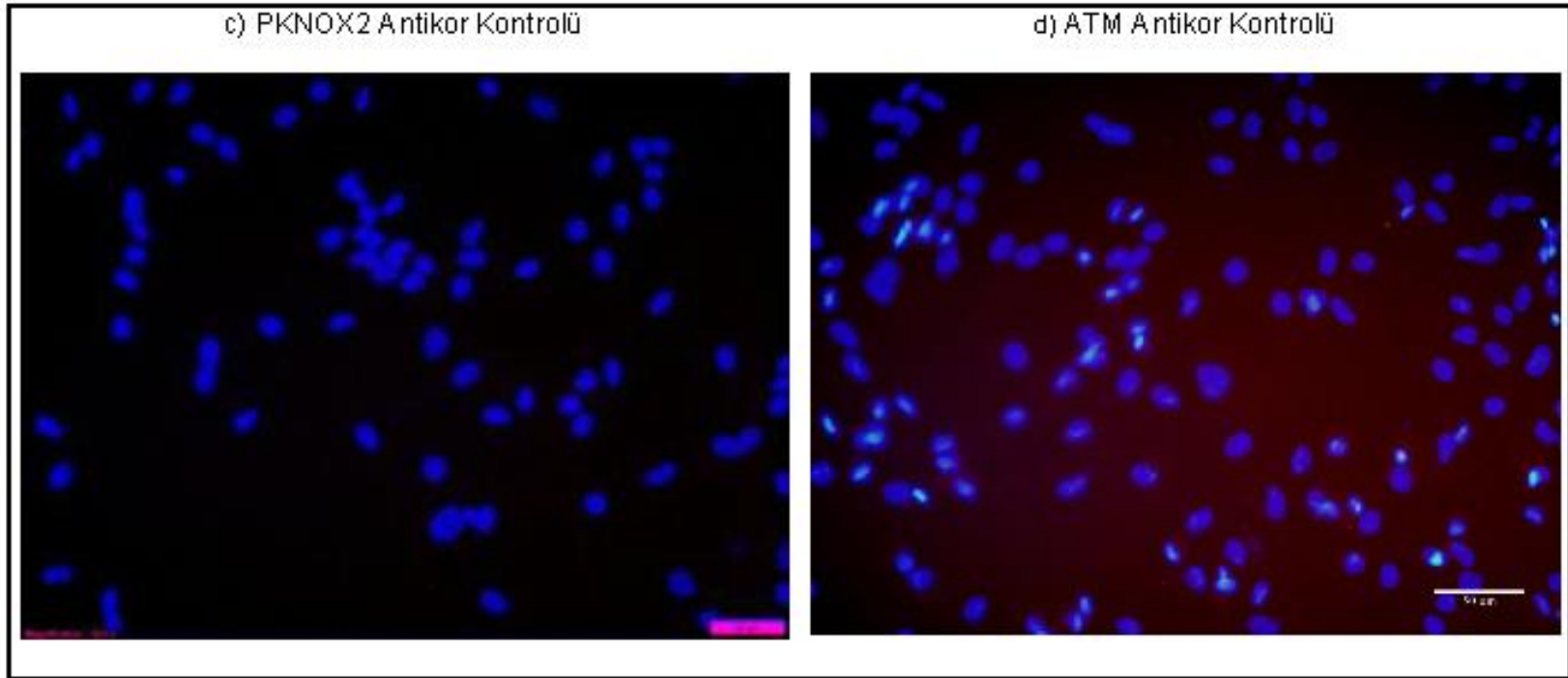
##### **Proteininin Etkileşiminin Araştırılması**

Her bir kuyucuğa 10000 hücre olacak şekilde (HUSCS-D07) 8'li *chamber slide*'lara ekilen Ki-MKH'ler %100 metanol ile fikse edildikten sonra, *mouse* anti-RNF8 ve *rabbit* anti-PKNOX2 ile gece boyunca +4°C'de inkübasyona bırakıldı (Şekil 4.5). Kontrol grubu olarak ise sadece *mouse* anti-RNF8 (Şekil 4.5.c) ve sadece *rabbit* anti-PKNOX2 (Şekil 4.5.d) antikorları ile inkübe edilen kuyucuklar kullanıldı. İnkübasyon sonrası her bir kuyucuk *duolink* problemleri ile inkübe edildi. Çekirdek boyaması DAPI ile gerçekleştirildi.

Deney sonucunda; Leica DMI6000B mikroskobu ile 20X büyütme ile görüntü alındı. Alınan görüntülerde RNF8:PKNOX2 etkileşiminin incelendiği kuyucukta (Şekil 4.5.a) ve kontrol gruplarında da (Şekil 4.5.b ve Şekil 4.5.c) kırmızı sinyal noktaları gözlemlendi. RNF8 ve PKNOX2 etkileşimi çekirdekte görülebildiği gibi, sitoplazmada da yoğun olarak tespit edilmiştir.



**Şekil 4.4.** ATM: PKNOX2 etkileşiminin incelendiği Duolink PLA testinin a) floresan mikroskop (Olympus IX73) görüntüleri b) Image J programında iki farklı alanın sayımının ortalamasını gösteren grafik.

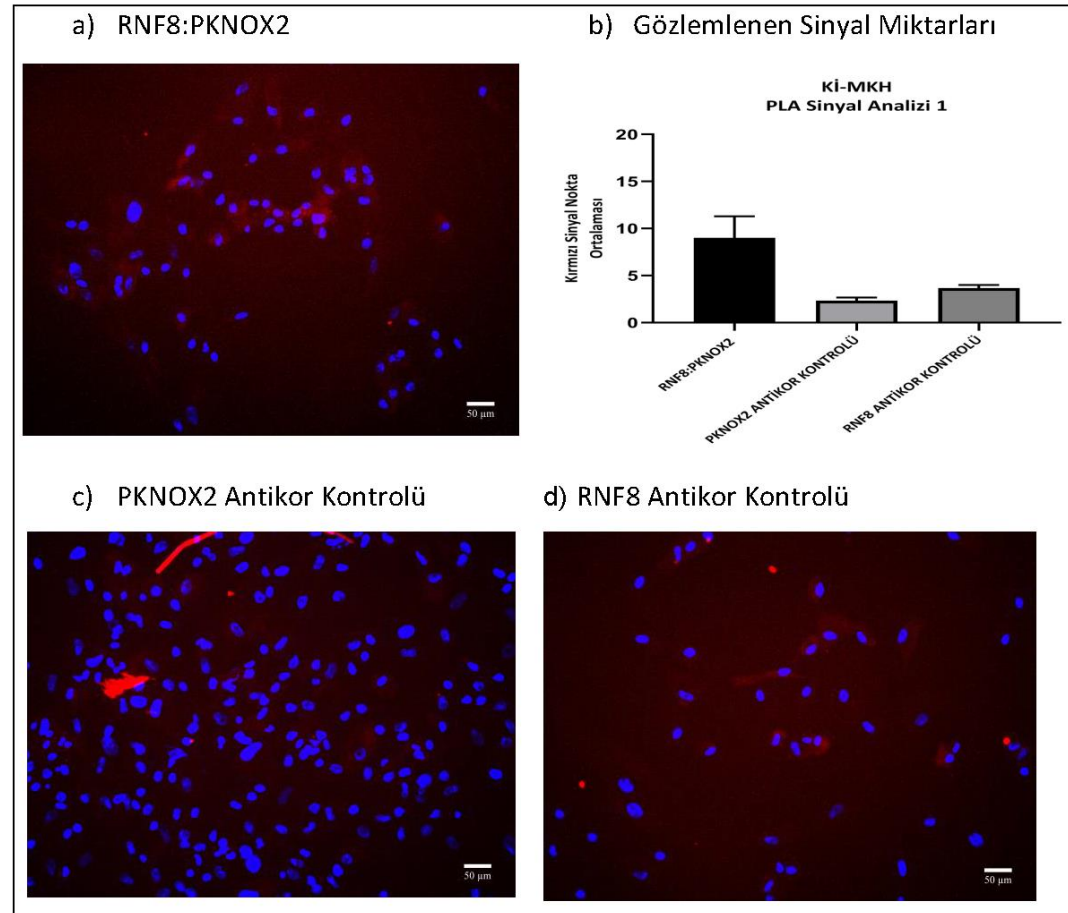


**Şekil 4.4(Devam).** ATM: PKNOX2 etkileşiminin incelendiği Duolink PLA testinin floresan mikroskop (Olympus IX73) görüntüleri.

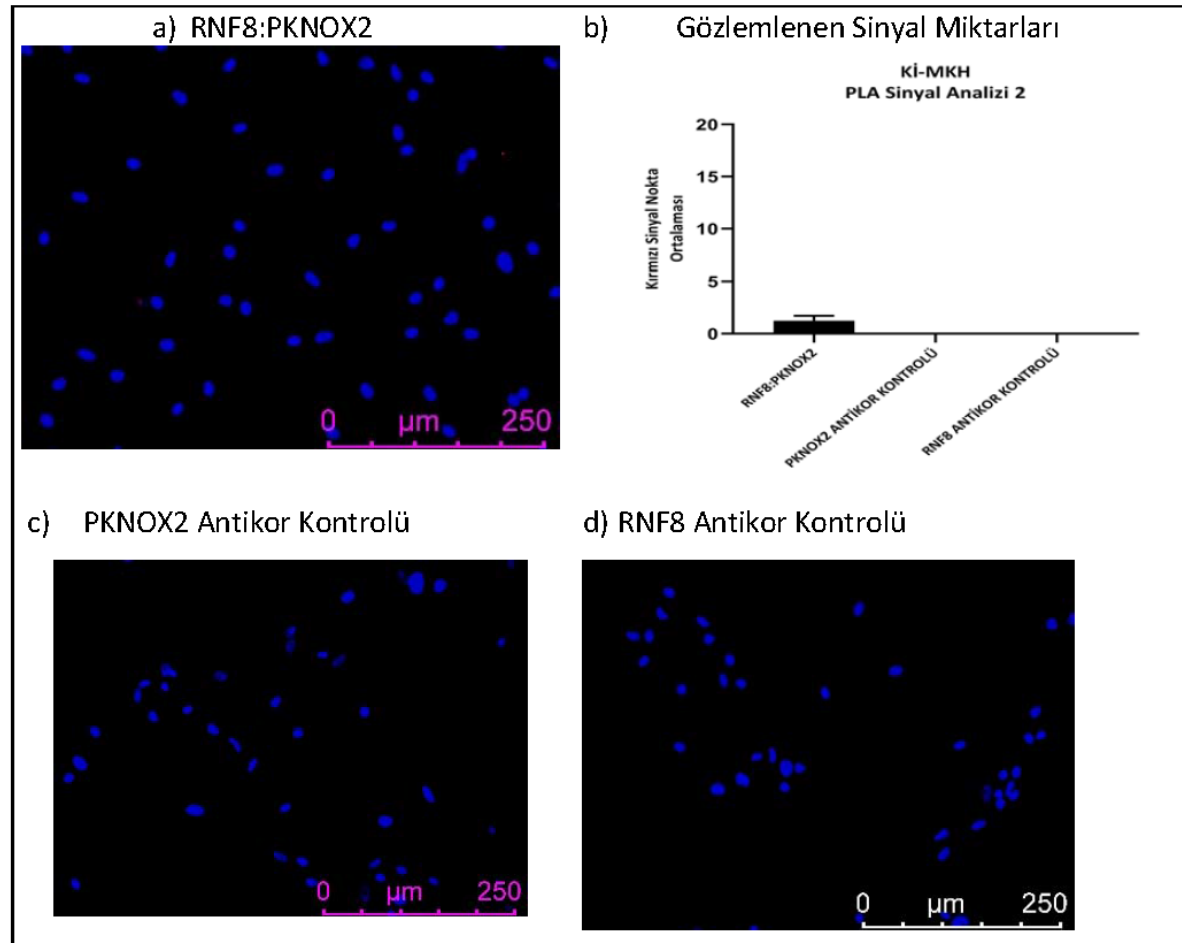


PKNOX2 kontrol grubunda artifakt olarak değerlendirilen kalıntılar gözlemlenirken, RNF8 kontrol grubunda PKNOX2 kontrol grubuna göre daha az olmak kaydı ile boya kalıntıları tespit edilmiştir.

Deney sonucunda Leica DM6B mikroskobu ve Leica BSC 7000T kamerası ile alınan sonuçlara göre hem kontrol gruplarında hem de RNF8 ve PKNOX2 etkileşimlerinin incelendiği Kİ-MKH'lerde kırmızı sinyal noktaları gözlemlenmemiştir. Bu durum RNF8 ile PKNOX2'nin görüntünün bir gün sonra alınması sebebi ile *slide*'ların solmuş olabileceğini de düşündürmüştür (Şekil 4.6)



**Şekil 4.5** RNF8-PKNOX2 etkileşiminin incelendiği Duolink PLA testinin Leica DMI6000B mikroskop görüntüleri (a,c,d) ve Image J programında üç farklı alanın sayımının ortalamasını gösteren grafik.



**Şekil 4.6.** Leica DM6B mikroskobu kullanılarak RNF8-PKNOX2 etkileşiminin incelendiği Duolink PLA testinin görüntüleri (a, c,d) ve Image J programında dört farklı alanın sayımının ortalamasını gösteren grafik.

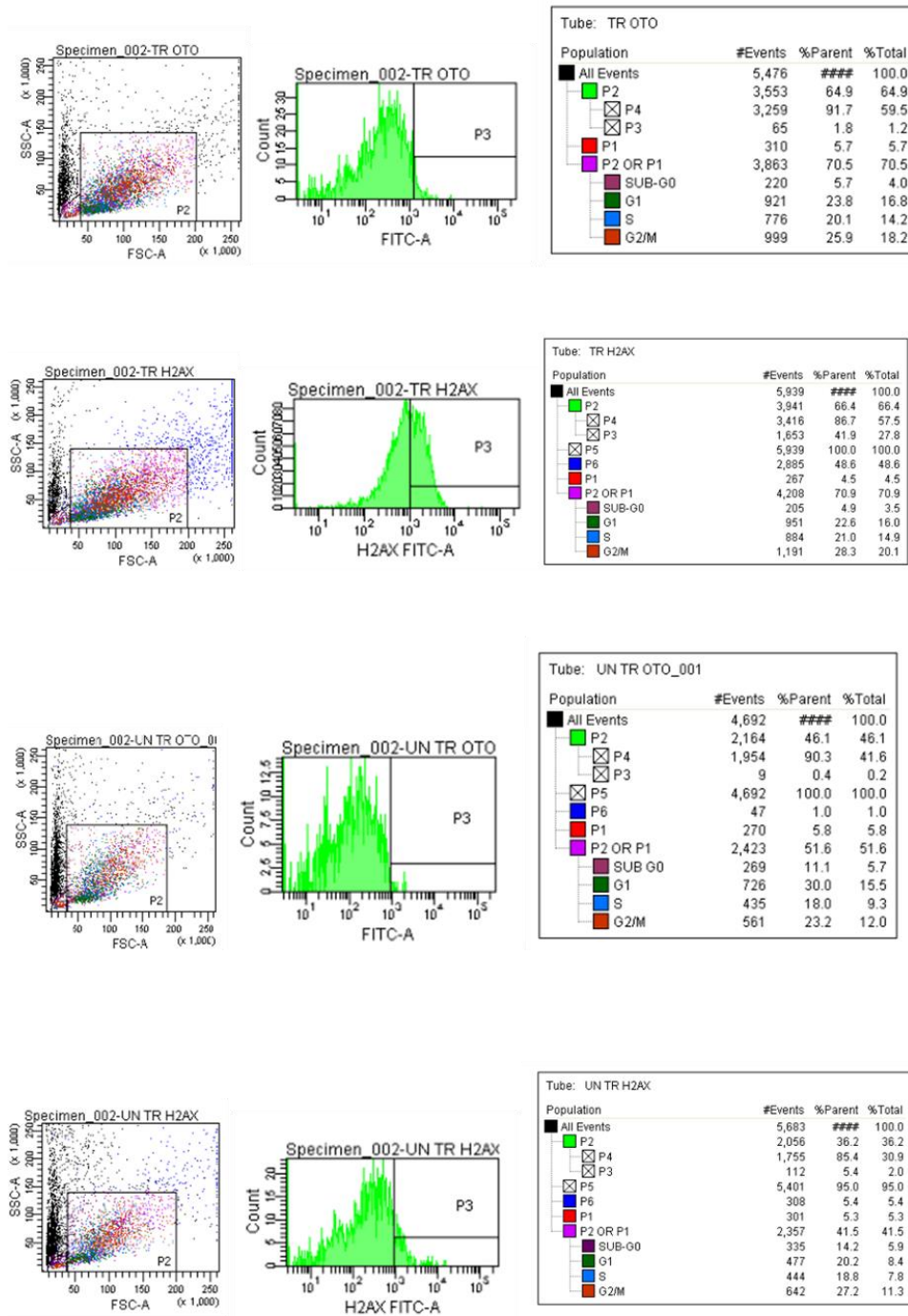
#### 4.6. DNA hasarı sonrası *In situ Proximity Ligation Assay* Yöntemi ile PKNOX2 ile ATM ve RNF8 Proteininin Etkileşiminin Araştırılması

##### 4.6.1. $\gamma$ -İrradyasyon Sonrası DNA Hasar Cevabının Tespiti

Akım sitometri analizlerine göre  $\gamma$ - ışını ile muamele görmüş hücrelerin kontrolü olan FITC konjuge edilmiş  $\gamma$ -H2AX antikoru ile boyanmamış otofloresan hücre grubunda %1,8 popülasyon FITC için pozitif sonuç verirken;  $\gamma$ -H2AX antikoru ile muamele görmüş hücre grubu %41,9 FITC pozitif popülasyonu göstermektedir (Şekil 4.7). Bunun yanı sıra  $\gamma$ - ışını ile muamele görmemiş kontrol grubu için otofluoresan ışına %0,4 popülasyon olarak görülürken %5,4 popülasyon  $\gamma$ -H2AX için pozitifdir. Sonuç olarak  $\gamma$ - ışını ile muamele edilmiş ve edilmemiş hücre grupları arasında H2AX'in fosforile formu  $\gamma$ -H2AX protein düzeyinde yaklaşık olarak %34 bir fark saptanmıştır.

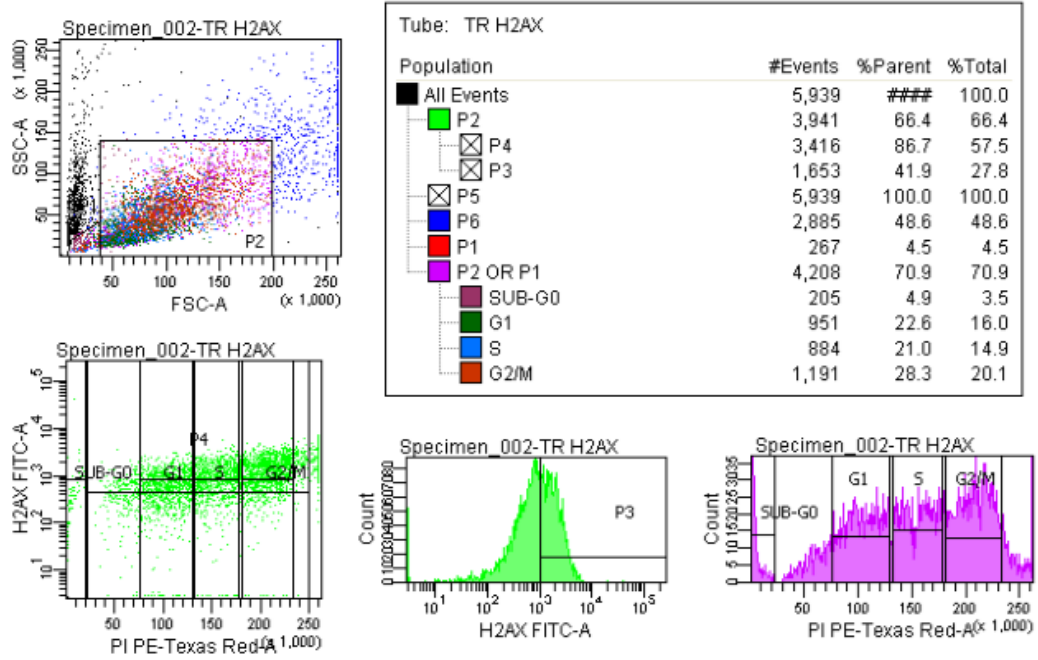
X- irradiye (TR) ve kontrol (UNTR) Kİ-MKH'leri PI boyaması ile hücre döngüsü fazlarında bulunan popülasyonlar incelendiğinde hücre döngüsü fazlarının ayrımı çok belirgin değildi. X- irradiye edilmiş grupta G1 fazına karşılık gelebileceği düşünülen popülasyon %22,6 iken; kontrol grubunda bu oran %20,2 olarak saptanmıştır (Şekil 4.8). G2 fazı  $\gamma$ - irradiye grupta %28,3, kontrol grubunda ise %27,2 'dir (Şekil 4.9).

Gama irradiasyon ile hücre döngüsü değişimi ve gamaH2AX'deki artışı aynı dot blot üzerinde incelendiğinde hasar görmüş hücrelerde (TR-H2AX) kontrol grubuna kıyasla (UNTR-H2AX) G2 fazına doğru bir kayma gözükmemektedir (Şekil 4.10).



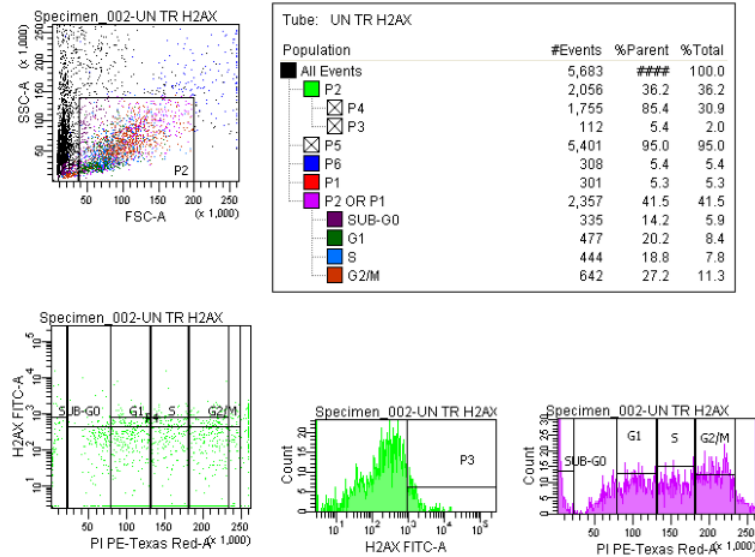
**Şekil 4.7.**  $\gamma$  irradiye edilen (TR) hücreler ile kontrol grubu (UNTR) hücreleri (HUSCS-D15) arasındaki  $\gamma$ -H2AX düzeyinin akım sitometrik analizi

TR  $\gamma$ - irradiye örnekleri, UN TR kontrol örneklerini göstermektedir. OTO otofloresansı, H2AX ise  $\gamma$ -H2AX floresansının olduğu hücre sayısını vermektedir. OTO tüplerinde hücre döngüsü analizlerini yapabilmek için PI boyası bulunmaktadır.



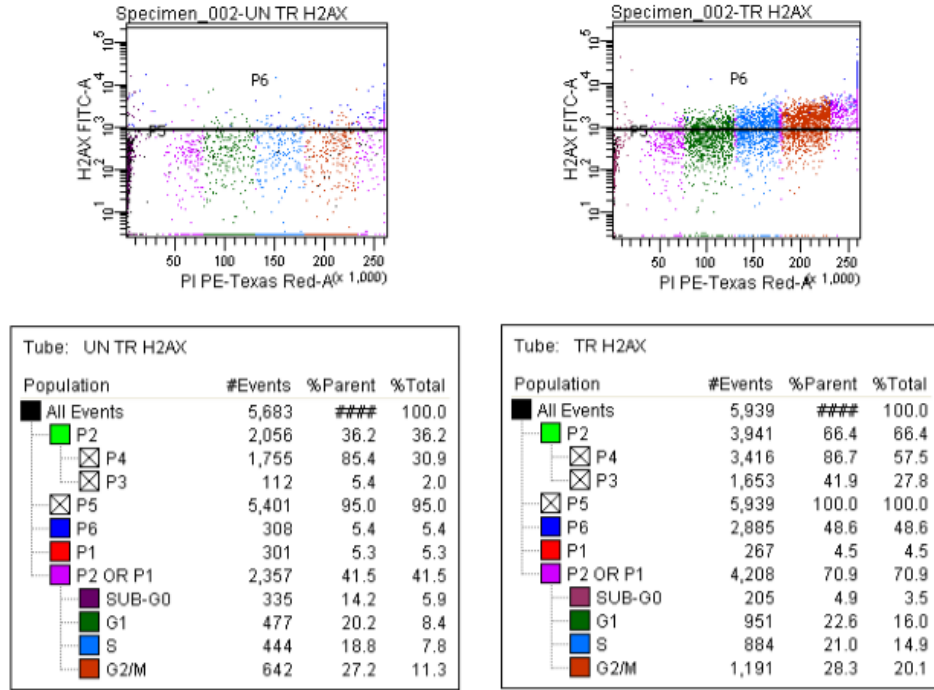
**Şekil 4.8.**  $\gamma$ -irradiye (TR) Ki-MKH hücrelerin (HUSCS-D15) hücre döngüsü akım sitometri analizleri.

TR  $\gamma$ -irradiye örnekleri, UN TR kontrol örneklerini göstermektedir. DNA'ya bağlanan PI boyasının maksimum floresan emisyonu 615-620 nm'dir ve PE/Texas Red kanalında saptanmaktadır.



**Şekil 4.9.** PI ile boyanmış FITC-gamaH2AX antikorunu içermeyen  $\gamma$ -irradiye olmayan (UNTR) Ki-MKH'lerin (HUSCS-D15) hücre döngüsü akım sitometri analizleri.

TR  $\gamma$ -irradiye örnekleri, UN TR kontrol örneklerini göstermektedir.

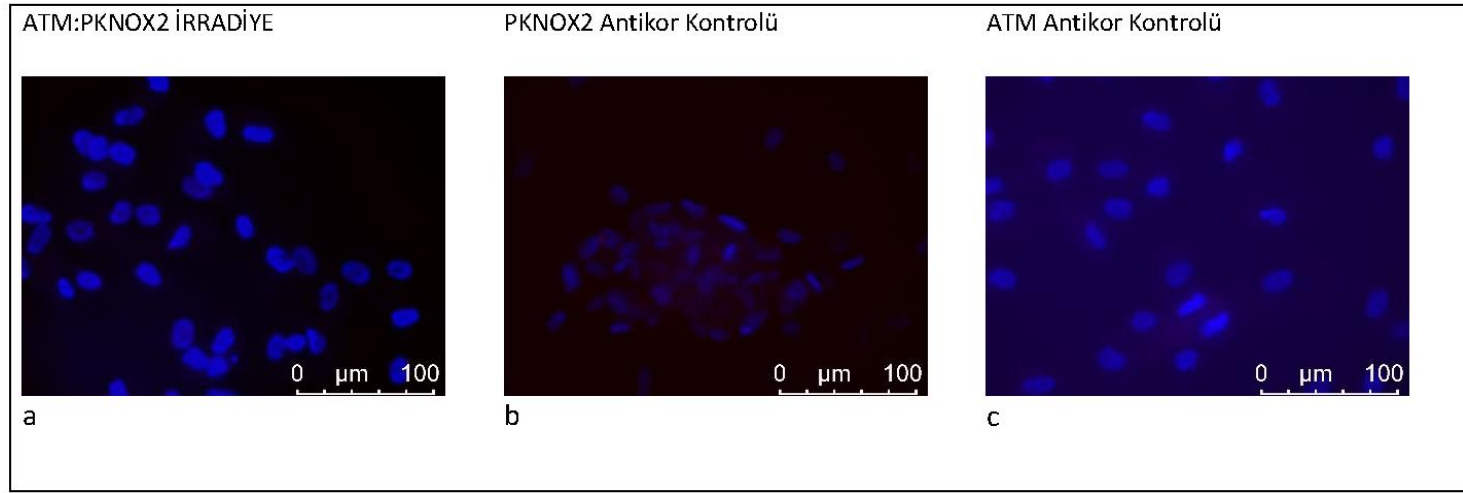


**Şekil 4.10.**  $\gamma$  irradyasyon ile hücre döngüsü değişimi ve gamaH2AX artışının aynı dot blot üzerinde,  $\gamma$ - irradiye olmayan (UNTR) ve olan (TR) Ki-MKH'lerde karşılıklı analizleri

#### 4.6.2. $\gamma$ -İrradyasyon Sonrası *In situ Proximity Ligation Assay* Yöntemi ile PKNOX2 ile ATM Proteininin Etkileşiminin Araştırılması

Her bir kuyucuğa 10000 hücre olacak şekilde (HUSCS-D15) 8'li *chamber slide*'lara  $\gamma$ -İrradiye edilmiş ve edilmemiş Ki-MKH'ler ekildi. %4 paraformaldehit ile fikse olduktan sonra, *mouse* anti-ATM ve *rabbit* anti-PKNOX2 ile dört saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı (Şekil 4.11.a). Kontrol grubu olarak ise sadece *mouse* anti-ATM (Şekil 4.11.c) ve sadece *rabbit* anti-PKNOX2 (Şekil 4.11.b) antikorları ile inkübe edilen kuyucuklar kullanıldı. İnkübasyon sonrası her bir kuyucuk *duolink* problemleri ile inkübe edildi. Çekirdek boyaması DAPI ile gerçekleştirildi.

Deney sonucunda; Leica DM6B mikroskobu ve Leica BSC 7000T kamerası ile, 40X büyütülerek görüntü alındı. Elde edilen görüntülerde ATM-PKNOX2 etkileşiminin incelendiği kuyucukta (Şekil 4.11.a) ve kontrol gruplarında (Şekil 4.11.b ve 4.11.c) kırmızı sinyal noktalarına rastlanmadı.



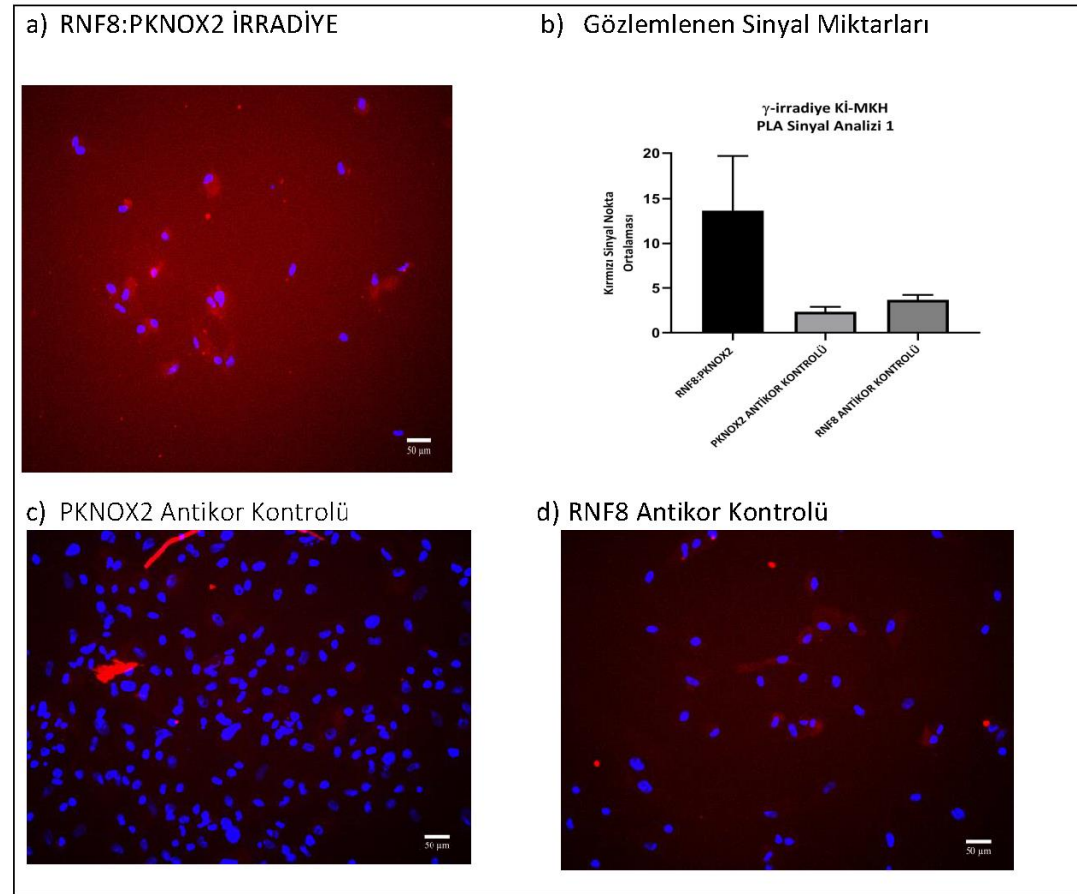
**Şekil 4.11.**  $\gamma$ -İrradyasyon ile DNA hasarı oluşturulmuş K1-MKH'lerinde ATM:PKNOX2 etkileşiminin tespiti için *Duolink* PLA testinin görüntüleri



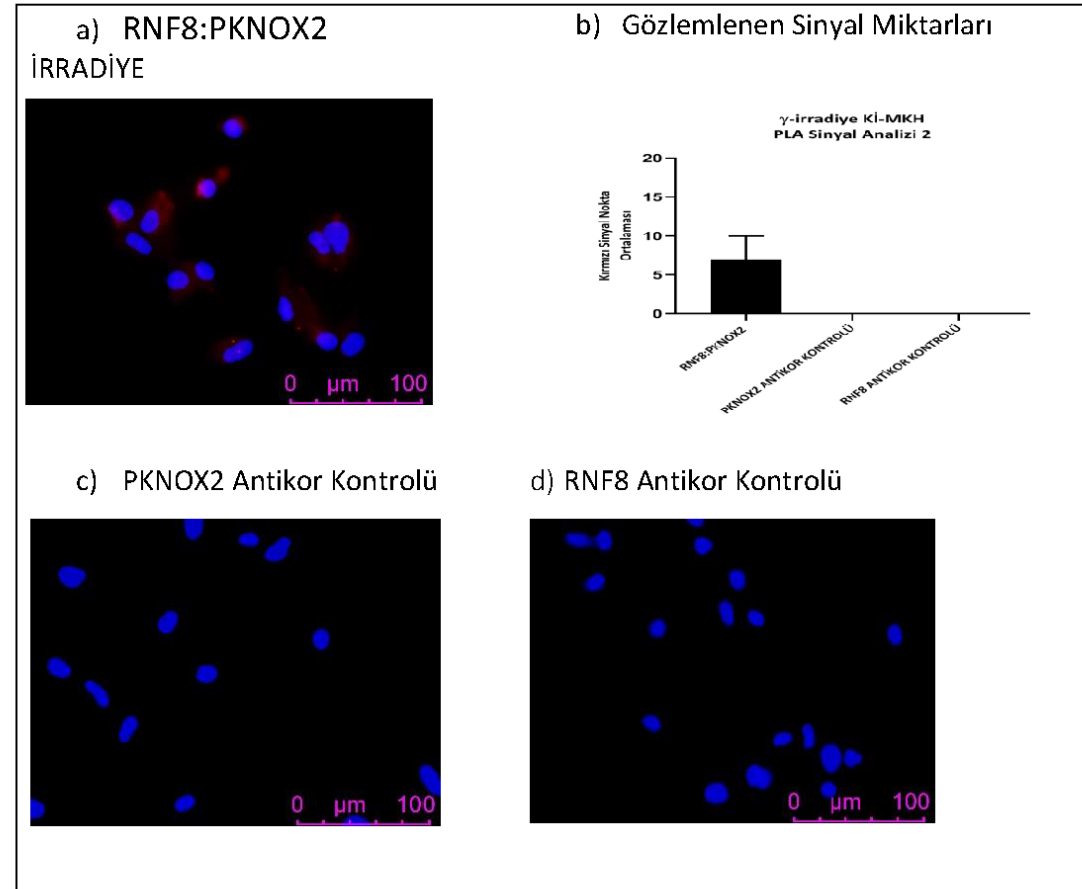
#### 4.6.3. ̳-İrradyasyon Sonrası *In situ Proximity Ligation Assay* Yöntemi ile PKNOX2 ile RNF8 Proteininin Etkileşiminin Araştırılması

Her bir kuyucuğa 10000 hücre olacak şekilde (HUSCS-D07) 8'li *chamber slide*'lara ̳-İrradiye edilmiş Ki-MKH'ler ekildi. %100 metanol ile fikse olduktan sonra, *mouse* anti-RNF8 ve *rabbit* anti-PKNOX2 ile overnight +4°C'de inkübasyona bırakıldı . Kontrol grubu olarak ise sadece *mouse* anti-RNF8 ve sadece *rabbit* anti-PKNOX2 antikorları ile inkübe edilen kuyucuklar kullanıldı. İnkübasyon sonrası her bir kuyucuk *duolink* problemleri ile inkübe edildi. Çekirdek boyaması DAPI ile gerçekleştirildi.

Deney sonucunda; Leica DMI6000B mikroskobu kullanılarak, 20X büyütme ile elde edilen görüntülerde; RNF8:PKNOX2 etkileşiminin incelendiği kuyucukta (Şekil 4.12.a) kırmızı sinyal noktaları gözlemlendi; ancak RNF8 antikor kontrol grubunda daha belirgin olmak üzere az sayıda arka plan kırmızı sinyal noktaları da mevcuttu (Şekil 4.12.c ve 4.12.d). Leica DM6B mikroskobu ve Leica BSC 7000T kamerasında 40X büyütme ile elde edilen görüntülerde; RNF8:PKNOX2 etkileşiminin incelendiği kuyucuklarda (Şekil 4.13.a) kırmızı sinyal noktaları gözlemlenirken, kontrol gruplarında (Şekil 4.13.c ve 4.13.d) arka plan kırmızı sinyal noktalarına rastlanmadı.



**Şekil 4.12.**  $\gamma$ -irradiasyon ile DNA hasarı oluşturulmuş hücrelerinde RNF8-PKNOX2 etkileşiminin incelendiği *Duolink* PLA testinin Leica DMI6000B mikroskop görüntüleri (a,c,d) ve Image J programında üç farklı alanın sayımının ortalamasını gösteren grafik.



**Şekil 4.13.**  $\gamma$ -İrradyasyon ile DNA hasarı oluşturulmuş KI-MKH Hücrelerinde RNF8-PKNOX2 etkileşiminin tespiti için yapılan Duolink PLA testinin Leica DM6B mikroskop görüntüleri (a,c,d) ve Image J programında dört farklı alanın sayımının ortalamasını gösteren grafik.

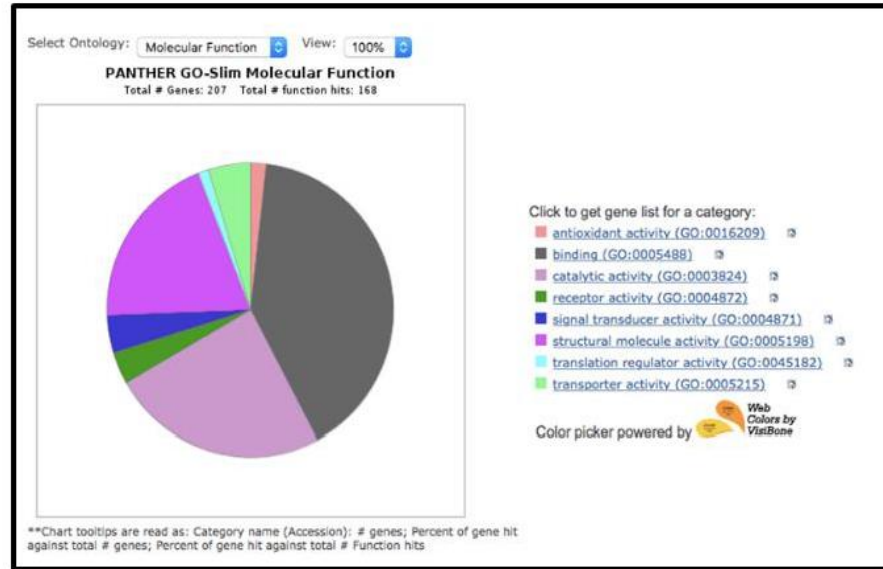
#### 4.7. Mezenkimal Kök Hücrelerde PKNOX2 Overekspresyonu Sonrası Yapılan Proteom ile PKNOX2 ile Etkileşen Proteinlerin Biyoinformatik Araçlar Kullanılarak Değerlendirilmesi

PKNOX2 fused DDK ile birlikte immüno-çökeltmiş protein örneklerinin kütle spektrometresi analizi, 219 proteinin PKNOX2 ile etkileşime girdiğini ortaya koymuştu (2,28). Bu proteom listesinde DNA hasarına cevapta görev alan iki proteinin (ATM ve RNF8) PKNOX2 proteinin ile etkileşiminin doğrulanması sonrası gelecek çalışmalar için Biyoinformatik araçlar ile analizler yapılmış ve Hasar durumunda görev alan başka proteinlerin olup olmadığı incelenmiştir. PANTHER programı (124) ile yapılan GO zenginleştirme moleküler fonksiyon analizi, listedeki proteinlerin 168'sini moleküler fonksiyonlarını belirleyebilmiş ve bunların antioksidan aktivitesine, bağlanma, katalitik aktivitesine, reseptör aktivitesine, sinyal iletimi (*transducer*) aktivitesine, yapısal protein aktivitesine, translasyon düzenleyici aktivitesine ve transporter aktivitesine sahip olduğunu göstermiştir (Şekil 4.14a). *Binding* moleküler fonksiyonuna daha detaylı incelendiğinde kalsiyum-iyon bağlanma, kromatin bağlanma, lipid bağlanma, nükleik asit, nükleotid bağlanma, protein bağlanma aktivitesine sahip 68 protein olduğu saptanmıştır (Şekil.4.14b). Nükleik asit *binding* daha detaylı incelendiğinde DNA ve RNA bağlanması olmak üzere 19 nükleik asit bağlanması (Şekil 4.14c), DNA bağlanması incelendiğinde ise 1'i hasar görmüş DNA bağlanması olmak üzere 9 DNA bağlanmasına sahip protein belirlenmiştir (Şekil 4.14d).

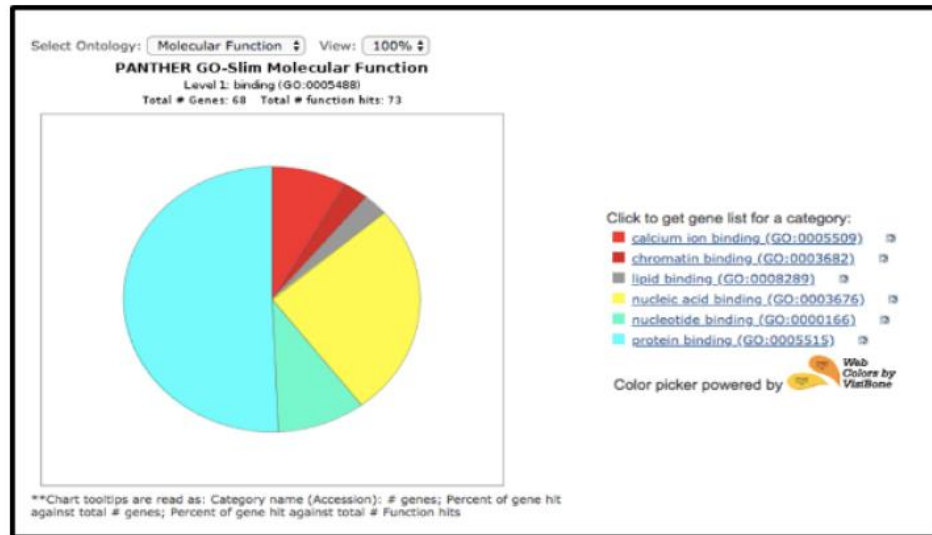
PANTHER programında yapılan GO-Slim Biyolojik Proses analizinde, biyolojik adhezyon, biyolojik düzenleme, hücreyel komponentlerin organizasyonu ve biyogenez, hücreyel ve gelişimsel proses, immün-sistem prosesi, lokalizasyon, lokomosyon, metabolik proses, multiselüler organizma prosesi ve uyarıya yanıt süreçlerinde görevli proteinler tespit edilmiştir. Bunlar içerisinde uyarıya cevapta görev alan proteinlerin detaylı incelenmesi sonucu, bakterilere karşı savunma yanıtı, immün yanıt, biyotik uyarıya karşı yanıt, dış uyarıya karşı yanıt ve strese karşı yanıt olmak üzere 5 farklı alanda uyarıya cevabın sınıflandırıldığı gösterilmiştir. Strese

tepkide rol oynayan on protein tespit edilmiştir ve bu proteinler arasında ATM proteini bulunmaktadır (Şekil.4.15).

a)



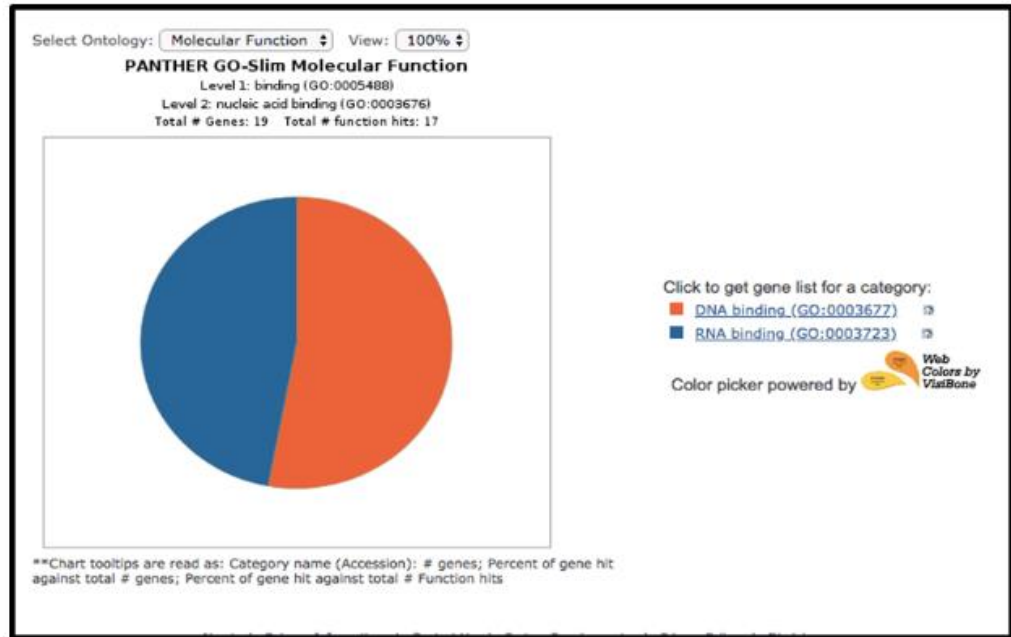
b)



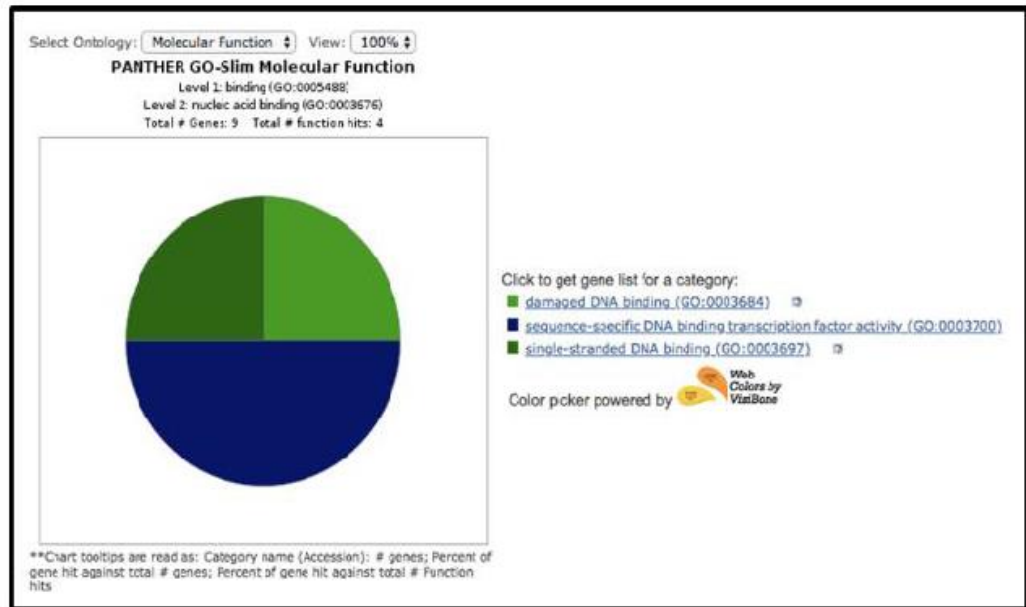
Şekil 4.14. PKNOX2 proteom listesinin PANTHER analizi

a) Moleküler Fonksiyon grafiği b) *Binding* grafiği

c)



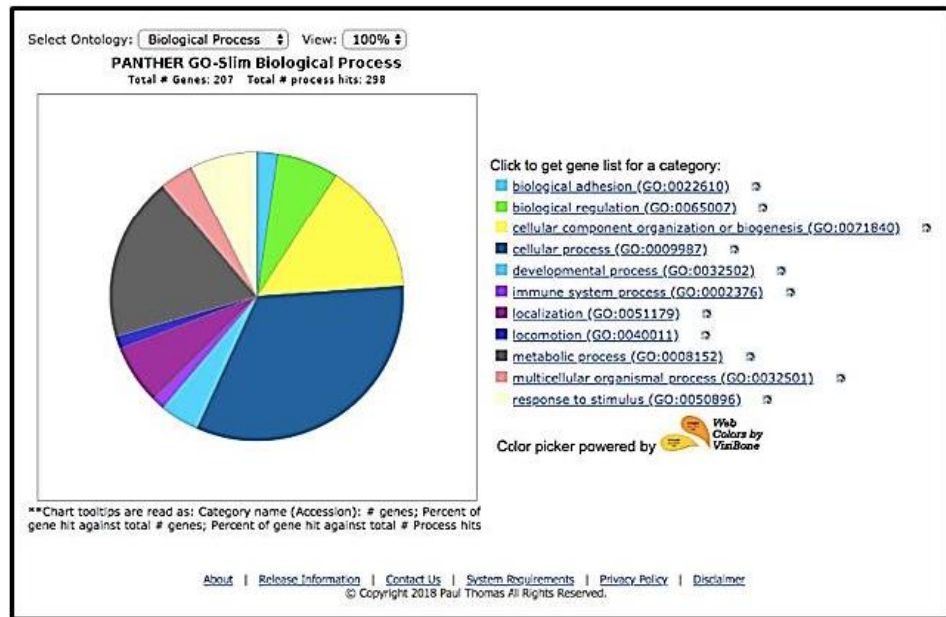
d)



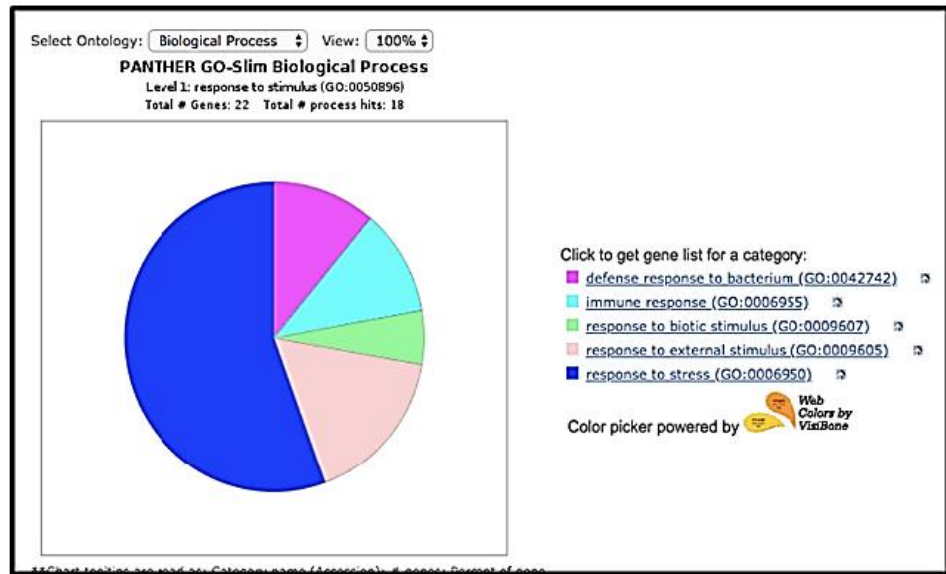
**Şekil 4.14. (Devamı) PKNOX2 proteom listesinin PANTHER analizi**

c) Nükleik asit *binding* grafiği d) DNA *binding* grafiği

a)



b)



Şekil 4.15. PKNOX2-Proteom Listesinin PANTHER GO-Biyolojik Fonksiyon Analizi

a) Biyolojik proses grafiği b) *response to stimulus* grafiği

c)

<input type="checkbox"/>	1.	<a href="#">HUMAN HGNC=11179 UniProtKB=P00441</a>	SOD1	Superoxide dismutase [Cu-Zn] SOD1 ortholog	SUPEROXIDE DISMUTASE [CU-ZN] (PTHR10003:SF58)	oxidoreductase	Homo sapiens
<input type="checkbox"/>	2.	<a href="#">HUMAN HGNC=20187 UniProtKB=Q96BY7</a>	ATG2B	Autophagy-related protein 2 homolog B ATG2B ortholog	AUTOPHAGY-RELATED PROTEIN 2 HOMOLOG B (PTHR13190:SF20)	-	Homo sapiens
<input type="checkbox"/>	3.	<a href="#">HUMAN HGNC=7151 UniProtKB=Q9BYG8</a>	GSDMC	Gasdermin-C GSDMC ortholog	GASDERMIN-C (PTHR16399:SF21)	-	Homo sapiens
<input type="checkbox"/>	4.	<a href="#">HUMAN HGNC=795 UniProtKB=Q13315</a>	ATM	Serine-protein kinase ATM ortholog	SERINE-PROTEIN KINASE ATM (PTHR11139:SF72)	non-receptor serine/threonine protein kinase nucleic acid binding nucleotide kinase	Homo sapiens
<input type="checkbox"/>	5.	<a href="#">HUMAN HGNC=10420 UniProtKB=P23396</a>	RPS3	40S ribosomal protein S3 RPS3 ortholog	40S RIBOSOMAL PROTEIN S3 (PTHR11760:SF35)	ribosomal protein	Homo sapiens
<input type="checkbox"/>	6.	<a href="#">HUMAN HGNC=3775 UniProtKB=Q06787</a>	FMR1	Synaptic functional regulator FMR1 ortholog	SYNAPTIC FUNCTIONAL REGULATOR FMR1 (PTHR10603:SF4)	RNA binding protein	Homo sapiens
<input type="checkbox"/>	7.	<a href="#">HUMAN HGNC=9955 UniProtKB=Q04206</a>	RELA	Transcription factor p65 ortholog	TRANSCRIPTION FACTOR P65 (PTHR24169:SF1)	P53-like transcription factor Rel homology transcription factor nucleic acid binding	Homo sapiens
<input type="checkbox"/>	8.	<a href="#">HUMAN HGNC=29331 UniProtKB=Q9HCE0</a>	EPG5	Ectopic P granules protein 5 homolog ortholog	ECTOPIC P GRANULES PROTEIN 5 HOMOLOG (PTHR31139:SF4)	-	Homo sapiens
<input type="checkbox"/>	9.	<a href="#">HUMAN HGNC=16753 UniProtKB=P30041</a>	PRDX6	Peroxioredoxin-6 ortholog	PEROXIREDOXIN-6 (PTHR43503:SF4)	peroxidase	Homo sapiens
<input type="checkbox"/>	10.	<a href="#">HUMAN HGNC=2555 UniProtKB=Q13620</a>	CUL4B	Cullin-4B ortholog	CULLIN-4B (PTHR11932:SF65)	ubiquitin-protein ligase	Homo sapiens

**Şekil 4.15 (Devam).** PKNOX2-Proteom Listesinin PANTHER GO-Biyolojik Fonksiyon Analizi c) response to stress listesi



## 5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, PKNOX2 proteini ile ATM ve RNF8 proteinlerinin etkileşimlerinin incelenmesi amacıyla Ko-immünopresiptasyon ve *in situ proximity ligation assay* (PLA) deneyleri yapıldı.

PKNOX2-ATM ve PKNOX2-RNF8 etkileşimlerine Ko-immünopresipitasyon yöntemi ile de araştırmak için CMV promotörü altında *PKNOX2* ifadesinin artmasını sağlayan pPKNOX2 *overekspresyon* plazmidi ve kontrol olarak PKNOX2 geni taşımayan pCMV6-Entry plazmidi elektroporasyon ile Kİ-MKH'lerine aktarılmıştır ve pPKNOX2 aktarılan Kİ-MKH'lerinden elde edilen total protein lizatlarında PKNOX2 protein ifadesinin arttığı western blot membranlarında 70 kDa'nın üzerinde kalın bant görülmesi ile saptanmıştır. Buna karşın, pCMV6-Entry plazmidi taşıyan Kİ-MKH'lerin total protein lizatlarında bu bant görülmemiştir. Aynı zamanda üç ayrı örnekte de 70 kDa büyüklüğünde bant tespit edilmiştir.

PKNOX2 proteini saptamasında kullanılan *mouse-anti-PKNOX2* (Santa Cruz Biotechnology, cat no:sc-101857) antikorunun özellikleri incelendiğinde PKNOX2 bantının 50 ile 80 kDa arasında tespit edildiği gösterilmiştir. PKNOX2 geninin 14 tane transkriptinin olduğu literatürde belirtilmektedir. Bunun yanı sıra Günel-Özcan 'nın 214Z033 no.lu projesinin TÜBİTAK raporunda da PKNOX2 bantının 70 kDa büyüklüğünde olduğu gösterilmiştir. 70 kDa üzerinde görülen bant ise DDK *fused* PKNOX2 olarak düşünülmüştür çünkü Myc-DDK büyüklük olarak 2.2 kDa'na denk gelen yapıdadır.

Total protein lizatlarından western blotlama yapılması sonucunda, total protein kullanılarak PKNOX2 ko-immünopresipitasyonunun sonucunda western blotunda ATM antikoruna 350 kDa ATM proteininin varlığına işaret etmiştir ve literatür ile uyumludur. Ayrıca, PKNOX2 proteinine western blotlama ile bakıldığında 15 dakika *exposure* süresinin fazla olduğu ortaya çıkmış daha kısa sürelerde sonuç alınabileceği gözükümüştür. RNF8 antikoruna ile 55 kDa ile 70 kDa arasında bant görülmüş ancak *ladder* (protein molekül ağırlık belirteci) üzerinde bu iki bant çok yakın olduğu için tam olarak molekül ağırlığı tespit edilememiştir. Bu iki bantın birbirinden ayrışması için ilave deneyler yapılmış ancak sonuç değişmemiştir. Moleküler ağırlığı 56 kDa olan

RNF8 proteini, IgG ağır zinciri ile (yaklaşık 50 kDa;) çok yakın olması sebebiyle arkaplan (*background*) görüntü alınıp alınmadığı konusunda şüphe doğurmuştur (118). Ayrıca bu yöntem ile etkileşimin doğrudan mı yoksa dolaylı mı olduğu ve etkileşimde olan proteinlerin lokalizasyonu anlaşılamamaktadır. Bu nedenlerden dolayı *in situ proximity ligation assay* (PLA) yöntemi ile protein-protein etkileşimleri incelenmiştir.

Gerçekleştirilen PLA deneyleri sonucunda PKNOX2 ile ATM arasında bir ilişki olduğu gözlemlenmiştir ancak irradyasyon ile DNA hasarına uğrayan hücrelerde etkileşimin gözlemlenememiş olması başka soruları gündeme taşımaktadır. DNA hasarı sonucu ATM fosforilasyonu nedeniyle etkileşim ortadan kalkıyor olabilir ya da etkileşim fosforile ATM'ye kayıyor olabilir ve test için kullanılan antikorun fosforile formu tanımaması nedeniyle etkileşim tespit edilemeyebilir. Deneyler arasında geçen zamanda antikorlar ve kit özgünlüğünün azalmış olabileceği düşünüldüğünden amplifikasyon süresi artırılarak PLA yönteminin tekrarlanması uygun olacaktır.

Kİ-MKH'ler ile DNA hasarına uğramış Kİ-MKH'ler kıyaslandığında PKNOX2-RNF8 etkileşiminin hasar ile arttığı söylenebilir. Diğer taraftan, teknik kontrol olarak kullanılan sadece PKNOX2 antikorunun bulunduğu ve sadece RNF8 antikorunun bulunduğu kuyucuklarda da artifakt kalıntılara rastlanması yıkamanın artırılması gerektiğini ve yıkama için bir optimizasyon çalışmasına gidilmesi gerektiğini göstermiştir.

PKNOX2-ATM etkileşiminin ko-immünopresipitasyon ile araştırılması deneylerinde PKNOX2 Ko-IP sonrası ATM düzeyine bakıldığında en fazla PKNOX2 geni taşımayan pCMV6-Entry örneğinde görülmüştür; bu durum elektroporasyonun bir etkisi olarak düşünülebilir çünkü elektroporasyon hücrede stres yaratarak ROS etkisi ile DNA hasarına sebebiyet verebilir ve bu durumda etkileşim artmış olabilir. PKNOX2 plazmidi aktarılan örneklerde ise bu durumun görülmemesi PKNOX2'nin strese karşı koruyucu rol oynayabileceğini düşündürmüştür. Bu durumu gözlemek için  $\gamma$ -irradiye olmuş hücrelerde Ko-IP yapılabilir ve etkileşimin DNA hasarı ile artıp artmadığı daha net ortaya konabilir; ancak hücrelerin transfeksiyon sonrası yeterince strese girdikleri için aynı zamanda  $\gamma$ -ışınlamaya dayanamayacağı düşünülmüştür. Bu sebeple öncesinde herhangi bir overekspresyona gerek duymadan da etkileşimi bize

amplifiye ederek gösterebilecek olan PLA yöntemi ile deney düzeneği oluşturulmuştur. *Proximity ligation* analizinin öncesinde numune saflaştırmasına gerek olmaması, sinyali amplifiye edebildiği için herhangi bir overekspresyon gerektirmemesi, ELISA'nın özgüllüğünü ve PCR'nin ürün güvenilir sonuçlarına duyarlılığını kullanması, etkileşimin varlığı durumunda lokalizasyon tayini yapılabilmesi bu tekniğin avantajlarını oluşturmaktadır. Probda kullanılan antikorun kalitesine büyük ölçüde bağımlı olması, partiye özgü antikor performansına bağlı olarak sonuçlarda potansiyel değişimin gözükmesi, spesifik olmayan oligonükleotit ligasyonu nedeniyle arka-plan sinyali vermesi, oligonükleotidlerin antikora kovalent konjugasyonu zor ve zaman alıcı olabilmesi gibi eksi tarafları da mevcuttur. PLA tekniği, çok çeşitli numune tipleri için uygundur ve mutasyona özel hedefli tedavilerin geliştirilmesinde yardımcı olabilir. Negatif yönlerini ortadan kaldırmak amaçlı ticari kit kullanılmış ve bu kitin ışına verdiği dalga boyları 554 nm eksitasyon, 570 nm'de emisyon olarak belirtilmiştir. PLA tekniği ile yapılan deneyler sonucu  $\gamma$ -irradiye Kİ-MKH'lerde etkileşim araştırılmıştır ancak negatif sonuç alınması deneyin tekrarının gerekli olduğunu ortaya koymuştur. Kit üretici firması Zeiss filtre Cy 3'ü önermekle birlikte bizim görüntü aldığımız mikroskopların filtreleri de ışımının dalga boyuna uygundur (Olympus IX73 filtre küpü U-FGW, Leica DMI6000B filtre küpü N2.1 ve Leica DM6B filtre küpü +TX2) .

$\gamma$ -irradiasyon ile DNA hasar deneylerinde ise  $\gamma$ -irradiye edilmiş hücrelerde (TR) kontrol hücrelerine (UnTR) göre  $\gamma$ -H2AX miktarı çok yükselmiştir. H2AX nukleozomdaki histon oktomerinin bileşeni olan H2A proteininin bir varyantıdır ve DNA çift kırıklarında ATM gibi kinazlar tarafından fosforillenir. Fosforillenen bu protein ( $\gamma$ -H2AX) DNA onarım proteinlerinin hasar bölgesine toplanmasını sağlayan ilk basamaktır.  $\gamma$ -H2AX'in akım sitometri veya immunfloresan mikroskopta gösterilmesi DNA hasarının oluştuğunu gösterir (119).  $\gamma$ -irradiye edilen Kİ-MKH'lerde  $\gamma$ -H2AX düzeyinin artması DNA çift iplik kırıklarının olduğuna işaret etmiştir.

Bunun yanı sıra hücre döngüsü analizleri incelenmiş ve irradiye edilmiş hücrelerde kontrol hücrelerine göre G2 fazına doğru bir kayma gözlemlenmiştir. Bu durum G2 fazında hücre döngüsünün tutuklanmasının olabileceğini göstermiştir.

Literatüre incelediğimizde de,  $\gamma$ -irradiasyonun G2/M fazında hücre döngüsünün tutuklanmasına sebep olduğu gösterilmiştir (120).

Hücre döngüsünde senkronizasyon yapılmadığı için pikler net oluşmamıştır. Hücrelerin senkronizasyonu kolşisin kullanılarak hücrelerin M fazında tutuklanması ile gerçekleştirilir (121). Bu nedenle ileride yapılacak çalışmalarda hücreler kolşisin ile M fazında tutuklanıp, sonrasında kolşisin ortamdan uzaklaştırılarak hücrelerin hepsinin aynı anda hücre döngüsüne girmesi sağlanarak senkronizasyon yapılması durumunda daha net hücre döngüsü pikleri elde edilebilir. Ayrıca, PI boyasına göre daha spesifik olan BrdU kullanılarak ve daha fazla hücre sayılarak deneylerin gerçekleşmesi pikleri daha net olarak ortaya çıkarabilir.

PKNOX2 ile etkileşen proteom listesinin DNA hasarı ile ilgili proteinlerin ortaya çıkarılması üzerine PANTHER programı ile GO-zengileştirme analizinde ATM ve RNF8'in DNA hasarında rol oynayan proteinler arasında olduğu görülmüştür (122). ATM ve RNF8 proteinlerinin proteom analizlerinde *coverage* değeri sırası ile 5,79 ve 7,22'dir (Tablo 5.1). Proteom analiz sonuçlarında *coverage* değeri bulunan tüm peptidlerdeki amino asitlerin sayısının bütün protein dizisindeki toplam amino asit sayısına bölünmesi ile hesaplanan yüzde kapsamını gösterir ve *coverage* değeri ne kadar yüksek ise araştırılan hedef protein etkileşim varlığı o kadar yüksektir (123).

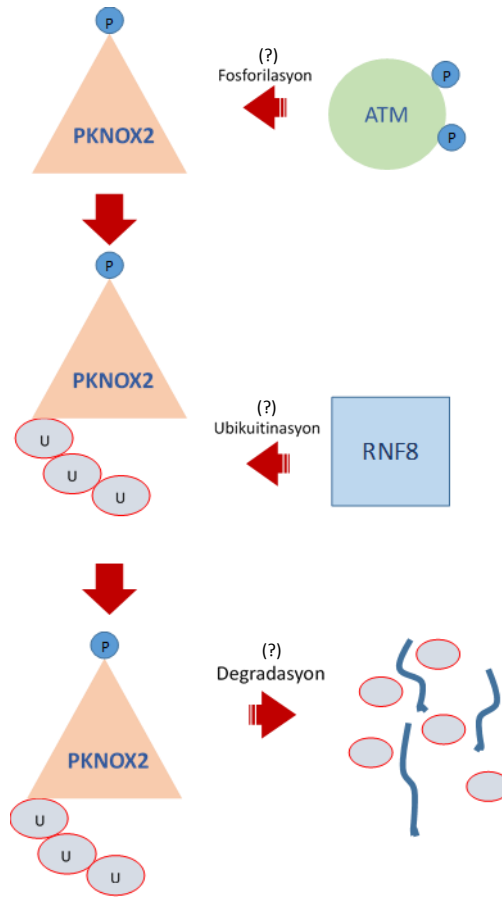
**Tablo 5.1.** PKNOX2, ATM ve RNF8 proteinlerinin PKNOX2 ko-immünopresipitasyonu sonrası yapılan proteom analiz değerleri

Description	$\Sigma$ Coverage	$\Sigma$ # Proteins	$\Sigma$ # Unique Peptides	$\Sigma$ # Peptides	$\Sigma$ # PSMs	# AAs	MW [kDa]	calc. pI
PKNOX2*	13,56	3	4	4	20	472	52,0	4,88
PKNOX2**	17,58	11	7	8	38	472	52,0	4,88
ATM	5,79	13	1	17	25	3056	350,5	6,81
RNF8	7,22	3	2	3	4	485	55,5	7,33

Proteom analizleri için iki kere okuma yapılmıştır. \* işareti ilk okumayı (RUN1) \*\*işareti ikinci okumayı (REPLICATE1) ifade etmektedir. ATM ve RNF8 proteinleri tek okumada saptanırken, PKNOX2 proteini her iki okumada da saptanmıştır.

Bu sonuçlar ışığında; PKNOX2'nin Ko-IP proteom analizinde *coverage* değerleri düşük olmasına ATM ve RNF8 ile etkileşimleri hem ko-IP sonrası western blotlama

hem de PLA testleri ile gösterilmiştir. PLA, bu etkileşimlerin lokalizasyonunun sitoplazma ve çekirdekte olabileceğine işaret etmektedir. PKNOX2 transkripsiyon faktörünün DNA hasar tepkisinde, fosfo-ATM ile fosforlanma sonrası, RNF8 tarafından ubiquitinasyona uğrayarak degrade olabileceği şeklinde bir yolak izlenebileceği düşünülmüş (Şekil 5.1) ancak DNA hasarı ile etkileşimlerde değişim olup olmadığının kesinleştirilmesi için tekrarlı ve gen susturma deneyleri gibi daha ileri fonksiyonel çalışmalara gerek olduğu belirlenmiştir.



**Şekil 5.1.** DNA hasarı durumunda PKNOX2-ATM ve PKNOX2-RNF8 arasında oluşan etkileşimlerin olasılıklı illüstrasyonları

## 6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

- PKNOX2 proteininin western blot analizlerinde 70 kDa ,55 kDa büyüklüğünde ve 55 kDa'nın altında olmak üzere üç bant saptanmıştır.
- PKNOX2 overekspresyonu ile ATM ifadelenmesi azalmaktadır.
- PKNOX2'nin ATM ile etkileşimde olduğu PKNOX2 antikoru ile ko-IP yöntemi ve de PLA yöntemi ile saptandı. ATM ile ko-IP sonrası yapılan western blot analizlerinde ise boş plazmid (pCMV6) taşıyan MKH örneklerinde ATM antikoru ile PKNOX2 ko-presipitasyonu pPKNOX2 taşıyan MKH örneklerine göre daha fazlaydı.
- PKNOX2 antikoru veya RNF8 antikoru ile yapılan ko-IP çalışmaları RNF8'in molekül ağırlığının IgG *heavy chain* ağırlığına yakın olması ve bant yoğunluklarının fazla olması nedeni ile şüpheli sonuç verdi. Ancak PKNOX2'nin RNF8 ile etkileşimde olduğu ise PLA yöntemi ile *in situ* olarak saptandı.
- DNA hasarı durumunda, PKNOX2, ATM tarafından fosforile edilerek, bu işaretlenme sonucu RNF8 ile etkileşim oluşuyor ve RNF8 proteininin PKNOX2 proteinini ubiquitinleştirmesi sonucu protein degradasyonu gerçekleşiyor olabileceğini düşündürmüştür. Bu durum, hücrelerin stres durumunda PKNOX2'nin görev aldığına işaret ediyor olabilir.
- Ki-MKH'lerde  $\gamma$ -irradiyasyon ile DNA hasarı belirteci  $\gamma$ -H2AX düzeyinde artış saptandı ve hücre döngüsü analizlerinde G2/M fazında tutuklanma olabileceği gözlemlendi. Ancak hücre döngüsü pikleri birbirinden net bir şekilde ayrılmadığı için deneyin hücre senkronizasyonu sonrası BrdU kullanılarak tekrar yapılması önerilir.
- DNA hasarı durumunda PKNOX2 ATM etkileşimi PLA yöntemi ile gösterilemedi. Deneylerin amplifikasyon süresi optimize edilerek tekrarlanması ve fosfo-ATM antikoru kullanılması önerilir.

## 7. KAYNAKLAR

1. Ding DC, Shyu WC, Lin SZ. Mesenchymal stem cells. *Cell Transplant*. 2011;20(1):5-14.
2. Çağnan I. Hox and Tale Transcription Factors in Fanconi Anemia Bone-Marrow Mesenchymal Stem Cells: Gene Expression and Protein Interactions. 2018.
3. Imoto I, Sonoda I, Yuki Y, Inazawa J. Identification and characterization of human PKNOX2, a novel homeobox-containing gene. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;287(1):270-6.
4. Fognani C, Kilstrup-Nielsen C, Berthelsen J, Ferretti E, Zappavigna V, Blasi F. Characterization of PREP2, a paralog of PREP1, which defines a novel sub-family of the MEINOX TALE homeodomain transcription factors. *Nucleic Acids Res*. 2002;30(9):2043-51.
5. Guleria A, Chandna S. ATM kinase: Much more than a DNA damage responsive protein. *DNA Repair*. 2016;39:1-20.
6. Shiloh Y. ATM and related protein kinases: Safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(3):155-68.
7. Taniguchi T, Garcia-Higuera I, Xu B, Andreassen PR, Gregory RC, Kim ST, et al. Convergence of the Fanconi anemia and ataxia telangiectasia signaling pathways. *Cell*. 2002;109(4):459-72.
8. Kolas NK, Chapman JR, Nakada S, Ylanko J, Chahwan R, Sweeney FD, et al. Orchestration of the DNA-damage response by the RNF8 ubiquitin ligase. *Science*. 2007;318(5856):1637-40.
9. Kolios G, Moodley Y. Introduction to Stem Cells and Regenerative Medicine. *Respiration*. 2013;85(1):3-10.
10. Choo A, Ngo AS, Ding V, Oh S, Kiang LS. Autogeneic feeders for the culture of undifferentiated human embryonic stem cells in feeder and feeder-free conditions. *Methods Cell Biol*. 2008;86:15-28.
11. Hiew VV, Simat SFB, Teoh PL. The Advancement of Biomaterials in Regulating Stem Cell Fate. *Stem Cell Rev Rep*. 2018;14(1):43-57.
12. Liras A. Future research and therapeutic applications of human stem cells: general, regulatory, and bioethical aspects. *J Transl Med*. 2010;8:131.
13. Lv FJ, Tuan RS, Cheung KM, Leung VY. Concise review: the surface markers and identity of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2014;32(6):1408-19.
14. Wei X, Yang X, Han ZP, Qu FF, Shao L, Shi YF. Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy. *Acta Pharmacol Sin*. 2013;34(6):747-54.
15. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.
16. Mosna F, Sensebe L, Krampera M. Human bone marrow and adipose tissue mesenchymal stem cells: a user's guide. *Stem Cells Dev*. 2010;19(10):1449-70.

17. Pappa KI, Anagnou NP. Novel sources of fetal stem cells: where do they fit on the developmental continuum? *Regen Med.* 2009;4(3):423-33.
18. Friedenstein AJ. Precursor Cells of Mechanocytes. *Int Rev Cytol.* 1976;47:327-59.
19. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Gerasimov UV. Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell Tissue Kinet.* 1987;20(3):263-72.
20. Berebichez-Fridman R, Gomez-Garcia R, Granados-Montiel J, Berebichez-Fastlicht E, Olivos-Meza A, Granados J, et al. The Holy Grail of Orthopedic Surgery: Mesenchymal Stem Cells-Their Current Uses and Potential Applications. *Stem Cells Int.* 2017.
21. Cheng HY, Ghetu N, Wallace C, Wei F, Liao S. The impact of mesenchymal stem cell source on proliferation, differentiation, immunomodulation and therapeutic efficacy. *J Stem Cell Res Ther.* 2014;4(10.4172):2157-7633.1000237.
22. Cagliani J, Grande D, Molmenti EP, Miller EJ, Rilo HLR. Immunomodulation by Mesenchymal Stromal Cells and Their Clinical Applications. *J Stem Cell Regen Biol.* 2017;3(2).
23. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Kluter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells.* 2006;24(5):1294-301.
24. Brendolan A, Ferretti E, Salsi V, Moses K, Quaggin S, Blasi F, et al. A Pbx1-dependent genetic and transcriptional network regulates spleen ontogeny. *Development.* 2005;132(13):3113-26.
25. Capellini TD, Di Giacomo G, Salsi V, Brendolan A, Ferretti E, Srivastava D, et al. Pbx1/Pbx2 requirement for distal limb patterning is mediated by the hierarchical control of Hox gene spatial distribution and Shh expression. *Development.* 2006;133(11):2263-73.
26. Qin P, Haberbusch JM, Zhang ZP, Soprano KJ, Soprano DR. Pre-b cell leukemia transcription factor (PBX) proteins are important mediators for retinoic acid-dependent endodermal and neuronal differentiation of mouse embryonal carcinoma P19 cells. *J Biol Chem.* 2004;279(16):16263-71.
27. Shah N, Wang JJ, Selich-Anderson J, Graham G, Siddiqui H, Li X, et al. PBX1 Is a Favorable Prognostic Biomarker as It Modulates 13-cis Retinoic Acid-Mediated Differentiation in Neuroblastoma. *Clinical Cancer Research.* 2014;20(16):4400-12.
28. Haller K, Rambaldi I, Daniels E, Featherstone M. Subcellular localization of multiple PREP2 isoforms is regulated by actin, tubulin, and nuclear export. *J Biol Chem.* 2004;279(47):49384-94.
29. Zhang L, Li WL, Cao L, Xu JY, Qian Y, Chen HR, et al. PKNOX2 suppresses gastric cancer through the transcriptional activation of IGFBP5 and p53. *Oncogene.* 2019;38(23):4590-604.
30. Lavin MF, Shiloh Y. The genetic defect in ataxia-telangiectasia. *Annu Rev Immunol.* 1997;15:177-202.
31. Savitsky K, Barshira A, Gilad S, Rotman G, Ziv Y, Vanagaite L, et al. A Single Ataxia-Telangiectasia Gene with a Product Similar to Pi-3 Kinase. *Science.* 1995;268(5218):1749-53.



32. Savitsky K, Sfez S, Tagle DA, Ziv Y, Sartiel A, Collins FS, et al. The Complete Sequence of the Coding Region of the Atm Gene Reveals Similarity to Cell-Cycle Regulators in Different Species. *Hum Mol Genet.* 1995;4(11):2025-32.
33. Shiloh Y. ATM: ready, set, go. *Cell Cycle.* 2003;2(2):116-7.
34. Goodarzi AA, Block WD, Lees-Miller SP. The role of ATM and ATR in DNA damage-induced cell cycle control. *Prog Cell Cycle Res.* 2003;5:393-411.
35. Kim ST, Lim DS, Canman CE, Kastan MB. Substrate specificities and identification of putative substrates of ATM kinase family members. *J Biol Chem.* 1999;274(53):37538-43.
36. O'Neill T, Dwyer AJ, Ziv Y, Chan DW, Lees-Miller SP, Abraham RH, et al. Utilization of oriented peptide libraries to identify substrate motifs selected by ATM. *J Biol Chem.* 2000;275(30):22719-27.
37. Bosotti R, Isacchi A, Sonnhammer EL. FAT: a novel domain in PIK-related kinases. *Trends Biochem Sci.* 2000;25(5):225-7.
38. Llorca O, Rivera-Calzada A, Grantham J, Willison KR. Electron microscopy and 3D reconstructions reveal that human ATM kinase uses an arm-like domain to clamp around double-stranded DNA. *Oncogene.* 2003;22(25):3867-74.
39. Leuther KK, Hammarsten O, Kornberg RD, Chu G. Structure of DNA-dependent protein kinase: implications for its regulation by DNA. *EMBO J.* 1999;18(5):1114-23.
40. Banin S, Moyal L, Shieh S, Taya Y, Anderson CW, Chessa L, et al. Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science.* 1998;281(5383):1674-7.
41. Canman CE, Lim DS, Cimprich KA, Taya Y, Tamai K, Sakaguchi K, et al. Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science.* 1998;281(5383):1677-9.
42. Chan DW, Gately DP, Urban S, Galloway AM, Lees-Miller SP, Yen T, et al. Lack of correlation between ATM protein expression and tumour cell radiosensitivity. *Int J Radiat Biol.* 1998;74(2):217-24.
43. Lakin ND, Weber P, Stankovic T, Rottinghaus ST, Taylor AM, Jackson SP. Analysis of the ATM protein in wild-type and ataxia telangiectasia cells. *Oncogene.* 1996;13(12):2707-16.
44. Bakkenist CJ, Kastan MB. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature.* 2003;421(6922):499-506.
45. Kozlov S, Gueven N, Keating K, Ramsay J, Lavin MF. ATP activates ataxia-telangiectasia mutated (ATM) in vitro. Importance of autophosphorylation. *J Biol Chem.* 2003;278(11):9309-17.
46. Uziel T, Lerenthal Y, Moyal L, Andegeko Y, Mittelman L, Shiloh Y. Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage. *EMBO J.* 2003;22(20):5612-21.
47. Yang DQ, Kastan MB. Participation of ATM in insulin signalling through phosphorylation of eIF-4E-binding protein 1. *Nat Cell Biol.* 2000;2(12):893-8.

48. Ito K, Hirao A, Arai F, Matsuoka S, Takubo K, Hamaguchi I, et al. Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature*. 2004;431(7011):997-1002.
49. Maryanovich M, Oberkovitz G, Niv H, Vorobiyov L, Zaltsman Y, Brenner O, et al. The ATM-BID pathway regulates quiescence and survival of haematopoietic stem cells. *Nat Cell Biol*. 2012;14(5):535-41.
50. Valentin-Vega YA, Maclean KH, Tait-Mulder J, Milasta S, Steeves M, Dorsey FC, et al. Mitochondrial dysfunction in ataxia-telangiectasia. *Blood*. 2012;119(6):1490-500.
51. Reichenbach J, Schubert R, Schindler D, Muller K, Bohles H, Zielen S. Elevated oxidative stress in patients with ataxia telangiectasia. *Antioxid Redox Signal*. 2002;4(3):465-9.
52. Chen WT, Ebel ND, Stracker TH, Xhemalce B, Van Den Berg CL, Miller KM. ATM regulation of IL-8 links oxidative stress to cancer cell migration and invasion. *Elife*. 2015;4.
53. Bartkova J, Horejsi Z, Koed K, Kramer A, Tort F, Zieger K, et al. DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature*. 2005;434(7035):864-70.
54. Gorgoulis VG, Vassiliou LVF, Karakaidos P, Zacharatos P, Kotsinas A, Liloglou T, et al. Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature*. 2005;434(7035):907-13.
55. Halazonetis TD, Gorgoulis VG, Bartek J. An oncogene-induced DNA damage model for cancer development. *Science*. 2008;319(5868):1352-5.
56. Ito K, Adachi S, Iwakami R, Yasuda H, Muto Y, Seki N, et al. N-Terminally extended human ubiquitin-conjugating enzymes (E2s) mediate the ubiquitination of RING-finger proteins, ARA54 and RNF8. *Eur J Biochem*. 2001;268(9):2725-32.
57. Huen MS, Grant R, Manke I, Minn K, Yu X, Yaffe MB, et al. RNF8 transduces the DNA-damage signal via histone ubiquitylation and checkpoint protein assembly. *Cell*. 2007;131(5):901-14.
58. Harper JW, Elledge SJ. The DNA damage response: ten years after. *Mol Cell*. 2007;28(5):739-45.
59. Kim JE, Minter-Dykhouse K, Chen J. Signaling networks controlled by the MRN complex and MDC1 during early DNA damage responses. *Mol Carcinog*. 2006;45(6):403-8.
60. Yan J, Jetten AM. RAP80 and RNF8, key players in the recruitment of repair proteins to DNA damage sites. *Cancer Lett*. 2008;271(2):179-90.
61. Larsen DH, Poinsignon C, Gudjonsson T, Dinant C, Payne MR, Hari FJ, et al. The chromatin-remodeling factor CHD4 coordinates signaling and repair after DNA damage. *J Cell Biol*. 2010;190(5):731-40.
62. Luijsterburg MS, Acs K, Ackermann L, Wiegant WW, Bekker-Jensen S, Larsen DH, et al. A new non-catalytic role for ubiquitin ligase RNF8 in unfolding higher-order chromatin structure. *EMBO J*. 2012;31(11):2511-27.
63. Mailand N, Bekker-Jensen S, Faustrup H, Melander F, Bartek J, Lukas C, et al. RNF8 ubiquitylates histones at DNA double-strand breaks and promotes assembly of repair proteins. *Cell*. 2007;131(5):887-900.

64. Polo SE, Kaidi A, Baskcomb L, Galanty Y, Jackson SP. Regulation of DNA-damage responses and cell-cycle progression by the chromatin remodelling factor CHD4. *EMBO J.* 2010;29(18):3130-9.
65. Stucki M, Clapperton JA, Mohammad D, Yaffe MB, Smerdon SJ, Jackson SP. MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. *Cell.* 2005;123(7):1213-26.
66. Wang B, Elledge SJ. Ubc13/Rnf8 ubiquitin ligases control foci formation of the Rap80/Abraxas/Brc1/Brcc36 complex in response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(52):20759-63.
67. Plans V, Scheper J, Soler M, Loukili N, Okano Y, Thomson TM. The RING finger protein RNF8 recruits UBC13 for lysine 63-based self polyubiquitylation. *J Cell Biochem.* 2006;97(3):572-82.
68. Nowsheen S, Aziz K, Aziz A, Deng M, Qin B, Luo K, et al. L3MBTL2 orchestrates ubiquitin signalling by dictating the sequential recruitment of RNF8 and RNF168 after DNA damage. *Nat Cell Biol.* 2018;20(4):455-64.
69. Campbell SJ, Edwards RA, Leung CC, Neculai D, Hodge CD, Dhe-Paganon S, et al. Molecular insights into the function of RING finger (RNF)-containing proteins hRNF8 and hRNF168 in Ubc13/Mms2-dependent ubiquitylation. *J Biol Chem.* 2012;287(28):23900-10.
70. Kim H, Chen JJ, Yu XH. Ubiquitin-binding protein RAP80 mediates BRCA1-dependent DNA damage response. *Science.* 2007;316(5828):1202-5.
71. Sobhian B, Shao GZ, Lilli DR, Culhane AC, Moreau LA, Xia B, et al. RAP80 targets BRCA1 to specific ubiquitin structures at DNA damage sites. *Science.* 2007;316(5828):1198-202.
72. Strauss C, Goldberg M. Recruitment of proteins to DNA double-strand breaks: MDC1 directly recruits RAP80. *Cell Cycle.* 2011;10(17):2850-7.
73. Strauss C, Halevy T, Macarov M, Argaman L, Goldberg M. MDC1 is ubiquitylated on its tandem BRCT domain and directly binds RAP80 in a UBC13-dependent manner. *DNA Repair (Amst).* 2011;10(8):806-14.
74. Wang B, Matsuoka S, Ballif BA, Zhang D, Smogorzewska A, Gygi SP, et al. Abraxas and RAP80 form a BRCA1 protein complex required for the DNA damage response. *Science.* 2007;316(5828):1194-8.
75. Watanabe S, Watanabe K, Akimov V, Bartkova J, Blagoev B, Lukas J, et al. JMJD1C demethylates MDC1 to regulate the RNF8 and BRCA1-mediated chromatin response to DNA breaks. *Nat Struct Mol Biol.* 2013;20(12):1425-33.
76. Yan J, Kim YS, Yang XP, Li LP, Liao G, Xia F, et al. The ubiquitin-interacting motif-containing protein RAP80 interacts with BRCA1 and functions in DNA damage repair response. *Cancer Res.* 2007;67(14):6647-56.
77. Zhang F, Bick G, Park JY, Andreassen PR. MDC1 and RNF8 function in a pathway that directs BRCA1-dependent localization of PALB2 required for homologous recombination. *J Cell Sci.* 2012;125(Pt 24):6049-57.

78. Fradet-Turcotte A, Canny MD, Escibano-Diaz C, Orthwein A, Leung CC, Huang H, et al. 53BP1 is a reader of the DNA-damage-induced H2A Lys 15 ubiquitin mark. *Nature*. 2013;499(7456):50-4.
79. Mallette FA, Mattioli F, Cui G, Young LC, Hendzel MJ, Mer G, et al. RNF8- and RNF168-dependent degradation of KDM4A/JMJD2A triggers 53BP1 recruitment to DNA damage sites. *EMBO J*. 2012;31(8):1865-78.
80. Panier S, Boulton SJ. Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(1):7-18.
81. Taira N, Nihira K, Yamaguchi T, Miki Y, Yoshida K. DYRK2 is targeted to the nucleus and controls p53 via Ser46 phosphorylation in the apoptotic response to DNA damage. *Mol Cell*. 2007;25(5):725-38.
82. Yamamoto T, Nihira NT, Yogosawa S, Aoki K, Takeda H, Sawasaki T, et al. Interaction between RNF8 and DYRK2 is required for the recruitment of DNA repair molecules to DNA double-strand breaks. *FEBS Lett*. 2017;591(6):842-53.
83. Zhang SF, Zhou YJ, Sarkeshik A, Yates JR, Thomson TM, Zhang ZT, et al. Identification of RNF8 as a Ubiquitin Ligase Involved in Targeting the p12 Subunit of DNA Polymerase delta for Degradation in Response to DNA Damage. *J Biol Chem*. 2013;288(5):2941-50.
84. Hsiao SJ, Smith S. Sister telomeres rendered dysfunctional by persistent cohesion are fused by NHEJ. *J Cell Biol*. 2009;184(4):515-26.
85. Peuscher MH, Jacobs JJ. DNA-damage response and repair activities at uncapped telomeres depend on RNF8. *Nat Cell Biol*. 2011;13(9):1139-45.
86. Rai R, Li JM, Zheng H, Lok GT, Deng Y, Huen MS, et al. The E3 ubiquitin ligase Rnf8 stabilizes Tpp1 to promote telomere end protection. *Nat Struct Mol Biol*. 2011;18(12):1400-7.
87. Chahwan R, Gravel S, Matsusaka T, Jackson SP. Dma/RNF8 proteins are evolutionarily conserved E3 ubiquitin ligases that target septins. *Cell Cycle*. 2013;12(6):1000-8.
88. Plans V, Guerra-Rebollo M, Thomson TM. Regulation of mitotic exit by the RNF8 ubiquitin ligase. *Oncogene*. 2008;27(10):1355-65.
89. Yoshioka T, Kimura M, Saio M, Era S, Okano Y. Plk1 is negatively regulated by RNF8. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;410(1):57-61.
90. Lee HJ, Li CF, Ruan D, Powers S, Thompson PA, Frohman MA, et al. The DNA Damage Transducer RNF8 Facilitates Cancer Chemoresistance and Progression through Twist Activation. *Mol Cell*. 2016;63(6):1021-33.
91. Li L, Guturi KKN, Gautreau B, Patel PS, Saad A, Morii M, et al. Ubiquitin ligase RNF8 suppresses Notch signaling to regulate mammary development and tumorigenesis. *J Clin Invest*. 2018;128(10):4525-42.
92. Wang S, Luo H, Wang C, Sun H, Sun G, Sun N, et al. RNF8 identified as a co-activator of estrogen receptor alpha promotes cell growth in breast cancer. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2017;1863(6):1615-28.
93. Hayes S, Malacrida B, Kiely M, Kiely PA. Studying protein-protein interactions: progress, pitfalls and solutions. *Biochem Soc Trans*. 2016;44(4):994-1004.

94. Rao VS, Srinivas K, Sujini GN, Kumar GN. Protein-protein interaction detection: methods and analysis. *Int J Proteomics*. 2014;2014:147648.
95. Best MD. Click chemistry and bioorthogonal reactions: unprecedented selectivity in the labeling of biological molecules. *Biochemistry*. 2009;48(28):6571-84.
96. Kiick KL, Saxon E, Tirrell DA, Bertozzi CR. Incorporation of azides into recombinant proteins for chemoselective modification by the Staudinger ligation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(1):19-24.
97. Mann M. Functional and quantitative proteomics using SILAC. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7(12):952-8.
98. Brückner A, Polge C, Lentze N, Auerbach D, Schlattner U. Yeast two-hybrid, a powerful tool for systems biology. *International journal of molecular sciences*. 2009;10(6):2763-88.
99. Hardy LR. Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP) with a Focus on F-actin. *Current protocols in neuroscience*. 2012;61(1):2.17. 1-2.. 2.
100. Ishikawa-Ankerhold HC, Ankerhold R, Drummen GP. Advanced fluorescence microscopy techniques—Frap, Flip, Flap, Fret and flim. *Molecules*. 2012;17(4):4047-132.
101. Shrestha D, Jenei A, Nagy P, Vereb G, Szöllösi J. Understanding FRET as a research tool for cellular studies. *International journal of molecular sciences*. 2015;16(4):6718-56.
102. Sun Y, Day RN, Periasamy A. Investigating protein-protein interactions in living cells using fluorescence lifetime imaging microscopy. *Nature protocols*. 2011;6(9):1324.
103. Dragulescu-Andrasi A, Chan CT, De A, Massoud TF, Gambhir SS. Bioluminescence resonance energy transfer (BRET) imaging of protein–protein interactions within deep tissues of living subjects. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011;108(29):12060-5.
104. Pflieger KD, Eidne KA. Illuminating insights into protein-protein interactions using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Nature methods*. 2006;3(3):165.
105. Perkins JR, Diboun I, Dessailly BH, Lees JG, Orengo C. Transient protein-protein interactions: structural, functional, and network properties. *Structure*. 2010;18(10):1233-43.
106. Vaynberg J, Qin J. Weak protein–protein interactions as probed by NMR spectroscopy. *Trends in biotechnology*. 2006;24(1):22-7.
107. Cheng Y. Single-particle cryo-EM at crystallographic resolution. *Cell*. 2015;161(3):450-7.
108. Collins PE, Grassia G, Colleran A, Kiely PA, Ialenti A, Maffia P, et al. Mapping the interaction of B cell leukemia 3 (BCL-3) and nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) p50 identifies a BCL-3-mimetic anti-inflammatory peptide. *J Biol Chem*. 2015;290(25):15687-96.
109. Katz C, Levy-Beladev L, Rotem-Bamberger S, Rito T, Rüdiger SG, Friedler A. Studying protein–protein interactions using peptide arrays. *Chemical Society Reviews*. 2011;40(5):2131-45.
110. Kiely PA, Baillie GS, Lynch MJ, Houslay MD, O'Connor R. Tyrosine 302 in RACK1 is essential for insulin-like growth factor-I-mediated competitive binding of PP2A and  $\beta$ 1

- integrin and for tumor cell proliferation and migration. *J Biol Chem*. 2008;283(34):22952-61.
111. O'Connor C, Lohan F, Campos J, Ohlsson E, Salomè M, Forde C, et al. The presence of C/EBP $\alpha$  and its degradation are both required for TRIB2-mediated leukaemia. *Oncogene*. 2016;35(40):5272.
  112. Weibrecht I, Leuchowius K-J, Clausson C-M, Conze T, Jarvius M, Howell WM, et al. Proximity ligation assays: a recent addition to the proteomics toolbox. Expert review of proteomics. 2010;7(3):401-9.
  113. Fredriksson S, Gullberg M, Jarvius J, Olsson C, Pietras K, Gústafsdóttir SM, et al. Protein detection using proximity-dependent DNA ligation assays. *Nature biotechnology*. 2002;20(5):473.
  114. Leuchowius KJ, Weibrecht I, Söderberg O. In situ proximity ligation assay for microscopy and flow cytometry. *Current protocols in cytometry*. 2011;56(1):9.36. 1-9.. 15.
  115. Söderberg O, Gullberg M, Jarvius M, Ridderstråle K, Leuchowius K-J, Jarvius J, et al. Direct observation of individual endogenous protein complexes in situ by proximity ligation. *Nature methods*. 2006;3(12):995.
  116. Huang X, Darzynkiewicz Z. Cytometric assessment of histone H2AX phosphorylation. *DNA Repair Protocols: Springer*; 2006. p. 73-80.
  117. Majidi J, Aghebati Maleki L, Kazemi T, Abdolizadeh J, Dadashi S, Eyvazi S, et al. Polyclonal antibody production against mouse purified IgG2a towards use in basic research. *Research in Molecular Medicine*. 2016;4(1):30-5.
  118. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. *Immunobiology: the immune system in health and disease: Current Biology London*; 1996.
  119. Kuo LJ, Yang L-X.  $\gamma$ -H2AX-a novel biomarker for DNA double-strand breaks. *In vivo*. 2008;22(3):305-9.
  120. Alghamian Y, Alchamat GA, Murad H, Madania A. Effects of  $\gamma$ -radiation on cell growth, cell cycle and promoter methylation of 22 cell cycle genes in the 1321NI astrocytoma cell line. *Advances in medical sciences*. 2017;62(2):330-7.
  121. Achille V, Mantelli M, Arrigo G, Novara F, Avanzini MA, Bernardo ME, et al. Cell-cycle phases and genetic profile of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells expanded in vitro from healthy donors. *Journal of cellular biochemistry*. 2011;112(7):1817-21.
  122. Mi H, Muruganujan A, Huang X, Ebert D, Mills C, Guo X, et al. Protocol update for large-scale genome and gene function analysis with the PANTHER classification system (v. 14.0). *Nature protocols*. 2019;14(3):703.
  123. Meyer B, Papatirou DG, Karas M. 100% protein sequence coverage: a modern form of surrealism in proteomics. *Amino acids*. 2011;41(2):291-310.

## 8. EKLER

### Ek 1. Etik Kurul



T.C.  
**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ**  
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 16969557 -- 1750

Konu : ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

**Toplantı Tarihi** : 19 ARALIK 2017 SALI  
**Toplantı No** : 2017/27  
**Proje No** : GO 17/941 (Değerlendirme Tarihi: 05.12.2017)  
**Karar No** : GO 17/941- 27

Üniversitemiz Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kök Hücre Bilimleri Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç. Dr. Ayşen Günel ÖZCAN' ın sorumlu araştırmacı olduğu, Prof. Dr. Duygu Uçkan ÇETİNKAYA, Özge Burcu ŞAHAN ile birlikte çalışacakları ve Neslihan AYHAN' ın yüksek lisans tezi olan, GO 17/941 kayıt numaralı, "**Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücrelerinde PKNOX2 Proteininin Atm ve RNF8 Proteini ile Etkileşiminin İncelenmesi**" başlıklı proje önerisi araştırmanın gerekece, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup, etik açıdan uygun bulunmuştur.

- |   |  |
|---|--|
| 1. Prof. Dr. Nurten AKARSU (Başkan)     | 10 Prof. Dr. Oya Nuran EMİROĞLU (Üye)      |
| 2. Prof. Dr. Sevda F. MÜFTÜOĞLU (Üye)   | 11 Yrd. Doç. Dr. Özay GÖKÖZ (Üye)          |
| 3. Prof. Dr. M. Yıldırım SARI (Üye)     | 12. Doç. Dr. Gözde GİRGİN (Üye)            |
| 4. Prof. Dr. Necdet SAĞLAM (Üye)        | 13. Doç. Dr. Fatma Visal OKUR (Üye)        |
| 5. Prof. Dr. Hatice Doğan BUZOĞLU (Üye) | 14. Doç. Dr. Can Ebru KURT (Üye)           |
| 6. Prof. Dr. R. Köksal ÖZGÜL (Üye)      | 15. Yrd. Doç. Dr. H. Hüsrev TURNAGÖL (Üye) |
| 7. Prof. Dr. Ayşe Lale DOĞAN (Üye)      | 16. Öğr. Gör. Dr. Müge DEMİR (Üye)         |
| 8. Prof. Dr. Elmas Ebru YALÇIN (Üye)    | 17. Öğr. Gör. Dr. Meltem ŞENGELEN (Üye)    |
| 9. Prof. Dr. Mintaze Kerem GÜNEL (Üye)  | 18. Av. Meltem ONURLU (Üye)                |

Evrakın elektronik imzalı suretine <https://belgedogrufama.hacettepe.edu.tr> adresinden f0535501-706f-49b0-939b-c4d4be8ef09c kodu ile erişebilirsiniz. Bu belge 5070 sayılı Elektronik İmza Kanunu'na uygun olarak Güvenli Elektronik İmza ile imzalanmıştır.

Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu  
06100 Sıhhiye-Ankara  
Telefon: 0 (312) 305 1082 • Faks: 0 (312) 310 0580 • E-posta: goetik@hacettepe.edu.tr

Ayrıntılı Bilgi için:

## Ek 2. Orjinallik Raporu

### Neslihan Dönmez Kök Hücre Yüksek lisans tezi

#### ORIJINALLIK RAPORU

% <b>2</b>	% <b>1</b>	% <b>0</b>	% <b>2</b>
BENZERLIK ENDEKSI	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

#### BİRİNCİL KAYNAKLAR

<b>1</b>	<b>Submitted to Hacettepe University</b> Öğrenci Ödevi	<% <b>1</b>
<b>2</b>	<b>Submitted to Erciyes Üniversitesi</b> Öğrenci Ödevi	<% <b>1</b>
<b>3</b>	<b>dspace.cuni.cz</b> İnternet Kaynağı	<% <b>1</b>
<b>4</b>	<b>Submitted to TechKnowledge Turkey</b> Öğrenci Ödevi	<% <b>1</b>
<b>5</b>	<b>www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080</b> İnternet Kaynağı	<% <b>1</b>
<b>6</b>	<b>Submitted to Ankara University</b> Öğrenci Ödevi	<% <b>1</b>
<b>7</b>	<b>jfas.ege.edu.tr</b> İnternet Kaynağı	<% <b>1</b>
<b>8</b>	<b>pure.uva.nl</b> İnternet Kaynağı	<% <b>1</b>
<b>9</b>	<b>www.nature.com</b> İnternet Kaynağı	<% <b>1</b>



### Ek 3. Dijital Makbuz



## Dijital Makbuz

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Neslihan Dönmez  
Ödev başlığı: Neslihan Dönmez Kök Hücre Yükse...  
Gönderi Başlığı: Neslihan Dönmez Kök Hücre Yükse...  
Dosya adı: kapak\_ve\_ana\_b\_l\_m-Neslihan\_D\_...  
Dosya boyutu: 2.74M  
Sayfa sayısı: 54  
Kelime sayısı: 9,845  
Karakter sayısı: 65,965  
Gönderim Tarihi: 18-Eyl-2019 02:48PM (UTC+0300)  
Gönderim Numarası: 1175055810



## 9. ÖZGEÇMİŞ

Neslihan DÖNMEZ

Genetik Mühendisi, Biyomühendis  
MSc, Kök Hücre



Çankırı, Türkiye



0531-563-1326



ayhaneslihan0725@gmail.com



### Eğitim

09.2018 – Devam Ediyor	Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Hukuk Fakültesi – Hukuk	Halen
09.2016 – 09.2019	Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü – Kök Hücre Programı, MSc	3.34/4.00 Ankara, Türkiye
09.2013 – 06.2016	Yeditepe Üniversitesi Mühendislik Fakültesi – Genetik ve Biyomühendislik	75/100 İstanbul, Türkiye
09.2009 – 06.2013	Yeditepe Üniversitesi Mühendislik Fakültesi – Gıda Mühendisliği	---- İstanbul, Türkiye
09.2007 – 09.2009	Orta Doğu Teknik Üniversitesi İktisadi ve İdari Bilimler Fakültesi - İktisat	---- Ankara, Türkiye
09.2002 – 06.2006	Çankırı Süleyman Demirel Fen Lisesi Sayısal Bilimler	4.53/5.00 Çankırı, Türkiye

## Seminer ve Eđitimler

2019	<b>Katılım Sertifikası</b> <i>Hacettepe Üniversitesi, II. Lisansüstü Öğrenciler İçin Bilimsel Yayın ve Sunum Çalıştayı</i>	Ankara, Türkiye
2019	<b>Eğitim Belgesi</b> <i>Hacettepe Üniversitesi Çalışanların İş Sağlığı ve Güvenliği Eđitimi</i>	Ankara, Türkiye
2017	<b>Teşekkür Belgesi</b> <i>Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi (PEDI-STEM) Veri Bankalarında Transkriptom Analiz Araçları, Eđitici</i>	Ankara, Türkiye
2016	<b>Katılım Belgesi</b> <i>Kök Hücre Günü 2016 Toplantısı</i>	Ankara, Türkiye

## Başarılar

2018	<b>Akademik Poster Çalışması</b> <i>EMBO Workshop Poster &amp; Bildirim Yayını Günel-Özcan A, Ayhan N, Şahan Ö, Caglan I, Warashe K, Uckan-Cetinkaya Duygu. PKNOX2 Proteomics reveals novel interactions with ATM and RPS3 in bone marrow-derived mesenchymal stem cells. EMBO WORKSHOP, RNA and Genome Maintenance, Mainz, Almanya, 10-13 October 2018</i>	Mainz, Almanya
------	--	----------------

## Yabancı Dil

2016	<b>Yabancı Dil Sınavı</b>	77,5/100
2017	<b>YÖKDİL</b>	85/100