

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**İSKELET KASI HÜCRELERİNDE DESMİN'İN NÜKLEER
PROTEİN ORTAKLARININ ARAŞTIRILMASI**

İnci Deniz YILMAZ

**Tıbbi Biyoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ANKARA
2026**

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**İSKELET KASI HÜCRELERİNDE DESMİN'İN NÜKLEER
PROTEİN ORTAKLARININ ARAŞTIRILMASI**

İnci Deniz YILMAZ

**Tıbbi Biyoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Rukiye Pervin DİNÇER**

**ANKARA
2026**

**İSKELET KASI HÜCRELERİNDE DESMİN'İN NÜKLEER PROTEİN ORTAKLARININ
ARAŞTIRILMASI**

Öğrenci: İnci Deniz Yılmaz

Danışman: Prof. Dr. Pervin Rukiye Dinçer

Bu tez çalışması 31.07.2026 tarihinde jürimiz tarafından "Tıbbi Biyoloji Programı" ında yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: *Prof. Dr. Yunus Kasım Terzi*
Başkent Üniversitesi

Tez Danışmanı: *Prof. Dr. Pervin Rukiye Dinçer*
Hacettepe Üniversitesi

Üye: *Prof. Dr. Yusuf Çetin Kocaefe*
Hacettepe Üniversitesi

Üye: *Prof. Dr. Ayşen Günel Özcan*
Hacettepe Üniversitesi

Üye: *Doç. Dr. Basri Gülbakan*
Hacettepe Üniversitesi

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

13 Ağustos 2026

Prof. Dr. Müge YEMİŞCİ ÖZKAN
Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA ve FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kâğıt) 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 haricince 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. ⁽¹⁾
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 6 ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾

13/08/2026

İnci Deniz YILMAZ

¹“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 internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkânı 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 vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, tezin yapıldığı kurum tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan iş birliği 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 Sisteminde 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, Prof. Dr. Pervin Rukiye DİNÇER danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

İnci Deniz YILMAZ

TEŞEKKÜR

Değerli danışman hocam Prof. Dr. Pervin Rukiye Dinçer'e, yüksek lisans eğitimim boyunca bana sunduğu destek, rehberlik ve yol göstericiliği için en içten teşekkürlerimi sunarım. Değerli görüş ve geri bildirimleriyle tezimin gelişmesine katkı sağlayan jüri üyelerim Prof. Dr. Ayşen Günel Özcan, Prof. Dr. Yunus Kasım Terzi, Prof. Dr. Fatma Visal Okur, Prof. Dr. Yusuf Çetin Kocaefe, Doç. Dr. Basri Gülbakan ve Doç. Dr. Süreyya Özcan Kabasakal'a ayrı ayrı teşekkür ederim.

Bu süreçte desteklerini ve motivasyonlarını her zaman yanımda hissettiğim yüksek lisans arkadaşlarım Yasemin Göktürk, Mehmet Emre Özkan ve Emre Nalbant'a çok teşekkür ederim. Birlikte çalışma fırsatı bulduğum için kendimi şanslı hissettiğim değerli çalışma grubu arkadaşlarım Selin Saydam, Iqra Majoka, Ecem Kural Mangıt ve Tolga Mansuroğlu'na da içten teşekkürlerimi sunarım. Desteğiniz, güzel dilekleriniz ve dostluğunuz sayesinde zorlandığım ve tökezlediğim anlarda yeniden ayağa kalkıp devam etme gücünü buldum.

Eğitim sürecim boyunca bilgi birikimleri, bilimsel bakış açıları ve değerli katkılarıyla gelişimime destek olan Anabilim Dalımızın tüm öğretim üyelerine teşekkür ederim. Deneysel çalışmalarım sırasında karşılaştığım güçlüklerde yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Hani Alotaibi, Dr. Tayfun Hilmi Akbaba, Dr. Evrim Aksu Mengeş, Hasan Basri Kılıç ve Dr. Sezen Güntekin Ergün'e; sabırları, anlayışları ve yol göstericilikleri için çok teşekkür ederim.

Son olarak, bu sürecin her aşamasında maddi ve manevi olarak en büyük destekçim olan sevgili aileme; bana duydukları güven, gösterdikleri sabır ve koşulsuz sevgileri için sonsuz teşekkür ederim. Kendimi yorgun, kaygılı veya umutsuz hissettiğim her an yanımda olan, beni sabırla dinleyen ve destekleyen sevgili dostum Mehmet'e de tüm kalbimle teşekkür ederim. Bu uzun yolculuğu sizlerin sevgisi ve desteği sayesinde tamamlayabildim.

ÖZET

Yılmaz, D., İskelet Kası Hücrelerinde Desmin'in Nükleer Protein Ortaklarının Araştırılması, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2026. Desmin, kas hücrelerinde miyofibrillerin hizalanması ve kuvvet iletiminde görev yapan tip III ara filament proteinidir. Çekirdekte de bulunabilmesi, yapısal görevlerinin yanı sıra çekirdek içi süreçlerde rol alabileceğini düşündürmektedir. Bu tez çalışmasında, Desmin'in iskelet kası hücrelerindeki nükleer etkileşim ağının ve kromatin organizasyonu ile olası ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır. İnsan LHCN-M2 ve fare C2C12 hücreleri; RNA dizileme veri analizi, polimeraz zincir reaksiyonu, hücresel fraksiyonlama, Western blot, immün çöktürme ve kütle spektrometrisi yöntemleriyle incelenmiştir. Desmin'in Nkx2.5 ve SMYD1 ile ilişkisini araştıran hedefe yönelik yaklaşımların sınırlı kalması üzerine çalışma, nükleer Desmin etkileşim ağının proteomik olarak belirlenmesine yönlendirilmiştir. Desmin'in nükleer fraksiyonda bulunduğu ve nükleer protein ortaklarıyla birlikte çöktürüldüğü doğrulanmıştır. İmmün çöktürme–kütle spektrometrisi analizinde Desmin 47,5 kat, Vimentin ise 159 kat zenginleşmiştir. Aday proteinler; log₂FC, istatistiksel anlamlılık, peptit-spektrum eşleşmesi, özgün peptit sayısı, IP/IgG oranı ve bağımsız veri setlerinden elde edilen kanıtları birleştiren birleşik skorla değerlendirilmiş; TMPO, RANBP2, HNRNPU, NUP153, DDX5 ve EEF1A1 doğrulama için önceliklendirilmiştir. Karşılıklı IP–WB analizlerinde TMPO ve DDX5'in Desmin ile birlikte çöktürülmesi, aynı protein komplekslerinde bulunabileceklerini desteklemiştir. Adayların nükleer zarf, nükleer por kompleksi ve RNA metabolizmasıyla ilişkili olması, Desmin'in çekirdek içi protein ağlarına katılabileceğini düşündürmektedir. RNaz A uygulaması sonrasında anlamlı değişim saptanmamış; ancak EEF1A1 ve HNRNPA2B1'de RNA aracılı ilişki olasılığıyla uyumlu azalma eğilimleri gözlenmiştir. Sonuç olarak bu çalışma, Desmin'in nükleer etkileşim ağını ortaya koymuş; nükleer mimari, nükleositoloplazmik taşınma ve RNA ilişkili protein ağlarındaki olası rolünü destekleyen bulgular sağlamıştır.

Anahtar Kelimeler: Desmin, nükleer por kompleksi, nükleositoloplazmik taşınma, protein–protein etkileşimleri, proteomik, RNA metabolizması.

ABSTRACT

Yilmaz, D., Investigation of Nuclear Protein Partners of Desmin in Skeletal Muscle Cells, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences, Medical Biology Program, Master's Thesis, Ankara, 2026. Desmin is a type III intermediate filament protein involved in myofibrillar alignment and force transmission in muscle cells. Its presence in the nucleus suggests that it may participate in intranuclear processes in addition to its structural functions. This thesis aimed to characterize the nuclear interaction network of Desmin in skeletal muscle cells and investigate its potential association with chromatin organization. Human LHCN-M2 and mouse C2C12 cells were analyzed using RNA-sequencing data analysis, polymerase chain reaction, cellular fractionation, Western blotting, immunoprecipitation, and mass spectrometry. Because targeted approaches investigating the associations of Desmin with Nkx2.5 and SMYD1 yielded limited results, the study was redirected toward proteomic characterization of the nuclear Desmin interaction network. Desmin was confirmed to be present in the nuclear fraction and to co-precipitate with nuclear protein partners. In immunoprecipitation–mass spectrometry analysis, Desmin and Vimentin were enriched 47.5-fold and 159-fold, respectively. Candidate proteins were evaluated using a composite score integrating log₂FC, statistical significance, peptide-spectrum matches, unique peptide count, IP/IgG ratio, and evidence from independent datasets; TMPO, RANBP2, HNRNPU, NUP153, DDX5, and EEF1A1 were prioritized. Reciprocal IP–WB analyses demonstrated the co-precipitation of TMPO and DDX5 with Desmin, supporting their possible presence within the same protein complexes. The association of these candidates with the nuclear envelope, nuclear pore complex, and RNA metabolism suggests that Desmin may participate in intranuclear protein networks. RNase A treatment produced no statistically significant changes; however, EEF1A1 and HNRNPA2B1 showed decreasing trends consistent with possible RNA-mediated associations. Overall, this study characterized the nuclear interaction network of Desmin and provided evidence supporting its association with nuclear architecture, nucleocytoplasmic transport, and RNA-related protein networks.

Keywords: Desmin, nuclear pore complex, nucleocytoplasmic transport, protein–protein interactions, proteomics, RNA metabolism.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA ve FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	xiii
ŞEKİLLER	xxii
TABLolar	xxiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Kas Hücrelerinde Ara Filamentler ve Desmin	5
2.2. Desmin'in Moleküler Yapısı	7
2.3. Desmin'in Nükleer İşlev Potansiyeli	8
2.4. Çekirdek Zarfı, Nükleer Lamina ve LINC Kompleksi	11
2.5. Nükleer Por Kompleksi ve Nükleositoplazmik Taşınma	13
2.6. SMYD1 ve Kas Farklılaşması	15
2.7. RNA-seq, Korelasyon ve İşlevsel Zenginleştirme Analizleri	17
2.8. Protein Etkileşimlerinin Araştırılmasında İmmün Çöktürme ve Kütle Spektrometrisi	18
2.9. RNA Metabolizmasıyla İlişkili Nükleer Protein Ağları	20
2.9.1. HNRNPU ve HNRNPA2B1	21
2.9.2. DDX5	22
2.9.3. KHDRBS1 (SAM68)	22
2.9.4. EEF1A1	23
2.10. Proteomik Verilerde Aday Proteinlerin Önceliklendirilmesi	23
2.11. Tez Çalışmasının Temel Aldığı Hipotez ve Amaçlar	24
3. GEREÇ ve YÖNTEMLER	26
3.1. Gereçler	26
3.1.1. Hücre kültürü	26

3.1.2. Protein İzolasyonu ve Miktar Tayini	26
3.1.3. RNA İzolasyonu ve <i>Complementary DNA</i> (cDNA) Sentezi	27
3.1.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	27
3.1.5. qPCR	28
3.1.6. Agaroz Jel Elektroforezi	28
3.1.7. İmmün Çöktürme (IP)	28
3.1.8. Western Blot (WB) Analizi	29
3.2. Yöntem	31
3.2.1. Hücre Kültürü ve Miyojenik Farklılaştırma	31
3.2.2. Toplam RNA İzolasyonu ve Kalite Kontrolü	32
3.2.3. cDNA Sentezi	33
3.2.4. Konvansiyonel PCR ve Primer Optimizasyonu	33
3.2.5. Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR (qPCR)	35
3.2.6. RNA-seq Veri İşleme ve Biyoinformatik Analiz	35
3.2.7. Nükleer ve Sitoplazmik Fraksiyonlama	36
3.2.8. BCA Protein Analizi	37
3.2.9. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) ve Western Blot Analizi	38
3.2.10. Membran <i>Strip</i> Protokolü	41
3.2.11. İmmün Çöktürme (IP)	41
3.2.12. Kütle Spektrometrisi (LC-MS/MS) Analizi	43
3.2.13. Aday Proteinlerin Önceliklendirilmesi ve Korelasyon Analizleri	49
4. BULGULAR	52
4.1. C2C12 hücrelerinde <i>Nkx2.5</i> Gen İfadesinin Değerlendirilmesi	52
4.2. RNA-seq ve Proteomik Verilerin Bütünleştirilmesi ile <i>Des</i> İlişkili Aday Çekirdek Proteinlerinin Belirlenmesi	59
4.3. Nükleer ve Sitoplazmik Fraksiyonlama İşleminin Optimizasyonu	64
4.4. Fraksiyonlama İşleminin Western Blot Analizi ile Doğrulanması	66
4.5. SMYD1 Antikor Optimizasyonu	69
4.6. Desmin IP Deneyleri	71
4.7. C2C12 Hücrelerinde Nükleer Fraksiyonlama ve Doğrulama	72

4.8. C2C12 Miyotüp Hücrelerinde Nükleer Desmin IP-MS Analizi ve Aday Proteinlerin Belirlenmesi	74
4.9. C2C12 Miyotüp Hücrelerinde RNaz Uygulamalı Nükleer Desmin IP-MS Analizi	77
4.10. C2C12 Miyotüp Nükleer Desmin IP-MS Veri Seti Temel Alınarak Aday Etkileşim Proteinlerinin Belirlenmesi ve Destekleyici Veri Setleriyle Değerlendirilmesi	78
4.10.1. Aday Protein Listesinin Oluşturulması	78
4.10.2. Çapraz Veri Seti Karşılaştırmasına Dayalı Kanıt Düzeyleri	79
4.10.3. Grup Bazlı Bulgular	80
4.10.4. RNaz-duyarlılık analizi	85
4.10.5. Birleşik Skor ile İlk Tarama Amaçlı Altı Aday Proteinin Seçimi ve Korelasyon Analizi	86
4.11. Karşılıklı Co-IP ile Öncelikli Adayların Bağımsız Doğrulanması	95
5. TARTIŞMA	98
5.1. C2C12 Hücrelerinde <i>Nkx2.5</i> Gen İfadesinin Değerlendirilmesi	98
5.2. Çalışma Stratejisinin Değiştirilmesi ve RNA-seq Analizine Yönelinmesinin Değerlendirilmesi	99
5.3. SMYD1'in Aday Protein Olarak Belirlenmesinin Değerlendirilmesi	101
5.4. C2C12 Miyotüp Nükleer Desmin IP-MS Bulgularının Değerlendirilmesi	104
5.5. Desminin Nükleer Zarf ve Nükleer Por Kompleksi ile İlişkisi	106
5.6. Birleşik Skor ile Seçilen Aday Proteinlerin Değerlendirilmesi	108
5.6.1. HNRNPU ve DDX5: RNA Bağlayıcı Aday Proteinler	109
5.6.2. EEF1A1: Üç Veri Setiyle Desteklenen Aday	110
5.6.3. Aday Proteinler Arasındaki Korelasyonların Değerlendirilmesi	111
5.6.4. Türler Arasında Ortak Olarak Saptanan Aday Proteinler	111
5.7. Öncelikli Aday Proteinlerin Karşılıklı IP-WB ile doğrulanması	112
5.8. Tez Çalışmasının Sınırlılıkları	113
5.9. Genel Değerlendirme	114
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	116
6.1. Sonuçlar	116
6.2. Öneriler	118

7. KAYNAKLAR	121
8. EKLER	136
EK-1. Turnitin Dijital Makbuz	
EK-2. Turnitin Orijinallik Raporu	
EK-3. Ek Sonuçlar	
9. ÖZGEÇMİŞ	146

SİMGELER ve KISALTMALAR

%	Yüzde
±	Artı/eksi
× g	Görelî santrifüj kuvveti
≤	Küçük veya eşit
≥	Büyük veya eşit
°C	Santigrat derece
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
µM	Mikromolar
A260/A280	260 ve 280 nm’de ölçülen absorbanların oranı
ACN	Asetonitril
ADARB1	RNA’ya özgü adenzin deaminaz B1
adj. p	Düzeltilmiş p-değeri
AnimalTFDB	<i>Animal Transcription Factor Database</i>
AP	<i>Affinity purification</i>
AP–MS	<i>Affinity purification–mass spectrometry</i>
APS	Amonyum persülfat
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenzin trifosfat
BCA	<i>Bicinchoninic Acid Assay</i>
bFGF	<i>Basic Fibroblast Growth Factor</i>
BH	Benjamini–Hochberg yöntemi

BHK21/C13	Bebek hamster böbreği kökenli hücre hattı
BSA	Sığır serum albümini
C2C12	Fare iskelet kası miyoblast hücre hattı
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
CER I	<i>Cytoplasmic Extraction Reagent I</i>
CER II	<i>Cytoplasmic Extraction Reagent II</i>
ChIP	<i>Chromatin immunoprecipitation</i>
ChIP-seq	<i>Chromatin immunoprecipitation sequencing</i>
CO₂	Karbondiyoksit
Co-IP	<i>Co-immunoprecipitation</i>
CRAPome	<i>Contaminant Repository for Affinity Purification</i>
CRM1 / XPO1	<i>Chromosome Region Maintenance 1 / Exportin 1</i>
Ct	<i>Cycle threshold</i>
CTCF	<i>CCCTC-binding factor</i>
D0	Farklılaşma öncesi miyoblast evresi
D1	Farklılaşmanın 1. günü
D2	Farklılaşmanın 2. günü
D3	Farklılaşmanın 3. günü
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
DDX17	DEAD-box helikaz 17
DDX21	DEAD-box helikaz 21
DDX3X	DEAD-box helikaz 3, X-bağılantılı
DDX5	DEAD-box helikaz 5
DEAD	Aspartat–glutamat–alanin–aspartat
DES	Desmin geni

DESeq2	RNA-seq sayım verilerinin diferansiyel ifade analizi için kullanılan paket
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksinükleozit trifosfat
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
EEF1A1	Ökaryotik translasyon uzama faktörü 1 alfa 1
EGTA	Etilen glikol-bis(β -aminoetil eter)-N,N,N',N'-tetraasetik asit
EIF2S1 / eIF2α	Ökaryotik translasyon başlatma faktörü 2 alfa alt birimi
EIF4A2	Ökaryotik translasyon başlatma faktörü 4A2
ERM	Ezrin–radiksin–moezin protein ailesi
EtBr	Etidyum bromür
FA	Formik asit
FastQC	Yüksek verimli dizileme verileri için kalite kontrol yazılımı
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FDR	<i>False Discovery Rate</i>
FG	Fenilalanin–glisin
FT	<i>Flow-through</i>
GAPDH	Gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz
gDNA	Genomik DNA
GDP	Guanozin difosfat

GO	<i>Gene Ontology</i>
GRCm38.p6	Genome Reference Consortium fare genom derlemesi 38, yama 6
GTP	Guanozin trifosfat
H₂O	Su
hEGF	<i>Human Epidermal Growth Factor</i>
HeLa S3	İnsan serviks kanseri kökenli hücre hattı
HISAT2	<i>Hierarchical Indexing for Spliced Alignment of Transcripts 2</i>
hnRNP	Heterojen nükleer ribonükleoprotein
HNRNPA0	Heterojen nükleer ribonükleoprotein A0
HNRNPA2B1	Heterojen nükleer ribonükleoprotein A2/B1
HNRNPA3	Heterojen nükleer ribonükleoprotein A3
HNRNPF	Heterojen nükleer ribonükleoprotein F
HNRNPH1	Heterojen nükleer ribonükleoprotein H1
HNRNPM	Heterojen nükleer ribonükleoprotein M
HNRNPU / SAF-A	Heterojen nükleer ribonükleoprotein U / Scaffold Attachment Factor A
HPLC	<i>High-Performance Liquid Chromatography</i>
HRP	<i>Horse radish peroksidase</i>
Hsp60	Isı şoku proteini 60
IF	<i>Intermediate filament</i>
IFT57	İntraflagellar taşıma proteini 57
IgG	İmmüoglobulin G
ILF3 / NF90	İnterlökin artırıcı-bağlayıcı faktör 3 / Nükleer faktör 90

IP	İmmün çöktürme
IP/IgG	İmmün çöktürme örneğinin IgG kontrolüne göre bolluk oranı
IP-MS	<i>Immunoprecipitation-mass spectrometry</i>
IP-WB	<i>Immunoprecipitation-Western blot</i>
kDa	Kilodalton
KH	<i>K homology</i>
KHDRBS1 / SAM68	KH RNA bağlanma domeni içeren, sinyal iletimiyle ilişkili protein 1 / Src-associated in mitosis 68
KO	<i>Knockout</i>
LAD	<i>Lamina-Associated Domain</i>
LAP2	<i>Lamina-Associated Polypeptide 2</i>
LC-MS/MS	<i>Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry</i>
LHCN-M2	Ölümsüzleştirilmiş insan iskelet kası miyoblast hücre hattı
LINC	<i>Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton</i>
limma	<i>Linear Models for Microarray Data</i>
LMNB1	Lamin B1 geni
lncRNA	<i>Long non-coding RNA</i>
log₂FC	Log ₂ tabanında kat değişimi
M	Molar
M199	<i>Medium 199</i>
m⁶A	N ⁶ -metiladenozin
mg	Milligram
MgCl₂	Magnezyum klorür

miRNA	MikroRNA
mL	Millilitre
mM	Milimolar
mRNA	Haberci RNA
mRNP	Haberci ribonükleoprotein kompleksi
MS	<i>Mass Spectrometry</i>
MS/MS	<i>Tandem Mass Spectrometry</i>
MSN	Moezin
MYND	<i>Myeloid, Nervy and DEAF-1</i>
NaCl	Sodyum klorür
nano-LC	<i>Nano-Liquid Chromatography</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NE-PER	<i>Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents</i>
NER	<i>Nuclear Extraction Reagent</i>
NES	<i>Nuclear Export Signal</i>
ng	Nanogram
Nkx2.5	<i>NK2 homeobox 5</i>
NLS	<i>Nuclear Localization Signal</i>
nm	Nanometre
NP-40	<i>Nonidet P-40</i>
NPC	<i>Nuclear Pore Complex</i>
NS	<i>Not Significant</i>
NTC	<i>No-Template Control</i>
NUP / Nups	Nükleoporin / nükleoporinler
NUP153	Nükleoporin 153

NUP214	Nükleoporin 214
NUP358 / RANBP2	Nükleoporin 358 / RAN-bağlayıcı protein 2
NUP88	Nükleoporin 88
NXF1	<i>Nuclear RNA Export Factor 1</i>
NXT1	<i>Nuclear Transport Factor 2-Like Export Factor 1</i>
PBS	Fosfat tamponlu salin
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
pH	Hidrojen iyonu aktivitesinin negatif logaritması
PLA	<i>Proximity Ligation Assay</i>
PLEC	Plektin
pre-mRNA	Öncül haberci RNA
pri-miRNA	Birincil mikroRNA
PSM	<i>Peptide-Spectrum Match</i>
PVDF	Poliviniliden diflorür
QC	<i>Quality Control</i>
qPCR	<i>Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction</i>
RAN	<i>Ras-related nuclear protein</i>
RBP	<i>RNA-Binding Protein</i>
RIP	<i>RNA Immunoprecipitation</i>
RNA	Ribonükleik asit
RNA-seq	<i>RNA Sequencing</i>
RNaz	Ribonükleaz
RNP	Ribonükleoprotein
rpm	Dakikadaki devir sayısı
rRNA	Ribozomal RNA

RT-PCR	<i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
s	Saniye
S/MAR	<i>Scaffold/Matrix Attachment Region</i>
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat–poliakrilamid jel elektroforezi
SET	<i>Su(var)3-9, Enhancer-of-zeste and Trithorax</i>
skNAC	<i>Skeletal muscle-specific nascent polypeptide-associated complex alpha</i>
SMYD1	<i>SET and MYND Domain-Containing Protein 1</i>
SRA	<i>Sequence Read Archive</i>
STRING	<i>Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins</i>
SUMO	<i>Small Ubiquitin-Like Modifier</i>
SUN	<i>Sad1 and UNC-84 domain-containing protein</i>
TAD	<i>Topologically Associating Domain</i>
TBS-T	Tris tamponlu salin–Tween 20
TCF23	Transkripsiyon faktörü 23
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamin
TMPO	Timopoietin; LAP2 izoformlarını kodlayan gen
Tris-HCl	Tris(hidroksimetil)aminometan hidroklorür
tRNA	Taşıyıcı RNA
TRUBA	TÜBİTAK Türk Ulusal Bilim e-Altyapısı
TÜBİTAK	Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu
U	Enzim aktivite birimi

UHPLC	<i>Ultra-High-Performance Liquid Chromatography</i>
V	Volt
VIM	Vimentin geni
WB	<i>Western blot</i>
YBX3	Y-box bağlayıcı protein 3
α	<i>Alpha</i>
β	<i>Beta</i>
β-MCE	Beta-merkapttoetanol
ρ	Spearman korelasyon katsayısı

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Desmin'in yapısal organizasyonunun şematik gösterimi.	8
3.1. Peptitleri ayırmada kullanılan Full MS/dd-MS2 parametreleri.	46
3.2. LC-MS/MS analizi öncesinde triptik peptitlerin ayrıştırılmasında kullanılan nano-sıvı kromatografisi (nano-LC) gradyanı.	46
3.3. C2C12 Miyotüp Nükleer Desmin IP-MS verilerinin analizi ve aday protein önceliklendirme iş akışı.	49
4.1. <i>Nkx2.5</i> primerleri için gerçekleştirilen PCR optimizasyonu.	55
4.2. C2C12 hücrelerinde <i>Nkx2.5</i> gen ifadesinin qPCR analizi.	56
4.3. İlk kullanılan ve alternatif olarak tasarlanan <i>Nkx2.5</i> primer setleri ile gerçekleştirilen PCR analizlerinden elde edilen amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezi.	57
4.4. Referans çalışmada kullanılan primer seti ile gerçekleştirilen PCR analizlerinden elde edilen amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezi.	58
4.5. PRJNA89011 RNA-seq veri setinde C2C12 hücre farklılaşmasına bağlı gen ifade değişimi analizi.	61
4.6. PRJNA89011 veri setinde C2C12 hücre farklılaşmasına bağlı gen ifade değişiminin volkan grafiği.	62
4.7. PRJNA89011 RNA-seq veri setinde <i>Des</i> ile yüksek korelasyon gösteren genlerin GO biyolojik süreç analizi.	62
4.8. PRJNA328159 ve PRJNA89011 RNA-seq veri setlerinde <i>Des</i> ile yüksek korelasyon gösteren ortak genlerin Venn diyagramı.	63
4.9. Desmin ile ilişkili aday çekirdek proteinlerinin proteomik ve transkriptomik analizlerle belirlenmesi.	64
4.10. LHCN-M2 miyoblast hücrelerinde nükleer fraksiyonun Lamin B1 ve Emerin belirteçleri kullanılarak doğrulanmasına ait Western blot analizi.	66
4.11. LHCN-M2 miyoblast hücrelerinde fraksiyonlamanın Lamin B1 ve GAPDH belirteçleri ile doğrulanmasına ait Western blot analizi.	67
4.12. LHCN-M2 miyoblast hücrelerinde Desmin'in nükleer ve sitoplazmik fraksiyonlardaki dağılımını gösteren Western blot analizi.	67

4.13. LHCN-M2 miyoblast hücrelerinden elde edilen (T175 V10) sitoplazmik ve nükleer fraksiyonlarda Hsp60 ifadesinin Western blot analizi.	68
4.14. LHCN-M2 miyoblast hücrelerinde SMYD1 antikorunun optimizasyonuna yönelik Western blot analizi.	69
4.15. LHCN-M2 hücrelerinden farklılaşmanın 24., 48. ve 96. saatlerinde elde edilen toplam protein örneklerinde SMYD1 proteininin Western blot analizi.	70
4.16. LHCN-M2 miyoblast hücrelerinden elde edilen nükleer ve sitoplazmik protein fraksiyonlarının Western blot analizi.	71
4.17. Desmin IP'sinin Western blot analizi.	71
4.18. NE-PER Nükleer ve Sitoplazmik Ekstraksiyon Kiti kullanılarak fraksiyonlanan C2C12 miyotüp hücrelerinden elde edilen sitoplazmik ve nükleer protein örneklerinin Western blot analizi.	73
4.19. NE-PER Nükleer ve Sitoplazmik Ekstraksiyon Kiti kullanılarak fraksiyonlanan C2C12 miyotüp hücrelerinden elde edilen sitoplazmik ve nükleer protein örneklerinin Western blot analizi.	74
4.20. C2C12 Nükleer Desmin IP-MS verilerinin analizi ve aday protein önceliklendirme iş akışı.	75
4.21. C2C12 miyotüp hücrelerinden elde edilen nükleer ve sitoplazmik fraksiyonların Western blot analizi.	77
4.22. Birleşik skor ile seçilen altı aday proteinin log ₁₀ bolluk değerleri üzerinde Pearson (sol) ve Spearman (sağ) korelasyon matrisleri.	91
4.23. C2C12 Miyotüp Nükleer Desmin IP-MS analizinde belirlenen aday proteinler arasındaki STRING protein-protein etkileşim ağı.	94
4.24. TMPO-Desmin için karşılıklı Co-IP ve WB analizi.	96
4.25. DDX5-Desmin için karşılıklı Co-IP ve WB analizi.	97
5.1. Nükleer zarf bileşenleri ile sitoplazmik hücre iskeleti arasındaki yapısal bağlantıların şematik gösterimi.	102
5.2. C2C12 hücrelerinde SMYD1'in farklılaşma sürecindeki hücresel yerleşimi ve protein ifadesi.	103
5.3. C2C12 hücrelerinde miyojenik farklılaşma süresince SMYD1(m-Bop) protein ifadesinin Western blot ile değerlendirilmesi.	103

TABLOLAR

Tablo	Sayfa
3.1. <i>Nkx2.5</i> amplifikasyonu için PCR reaksiyon karışımı.	34
3.2. BCA Analizi için standart çözeltilerin hazırlanışı.	37
3.3. LC-MS/MS analizi öncesinde Desmin IP1, IP2 ve IgG kontrol örneklerinden elde edilen peptit derişimleri.	44
4.1. PCR optimizasyonları sırasında gerçekleştirilen uygulamaların özeti.	59
4.2. C2C12 hücre farklılaşması sırasında <i>Des</i> geni ile korelasyon gösteren genlerin belirlenmesine yönelik gerçekleştirilen RNA-seq veri analizi iş akışının özeti.	60
4.3. LHCN-M2 miyoblast hücrelerinde farklı hücre miktarları ve tampon hacimleri kullanılarak gerçekleştirilen nükleer ve sitoplazmik fraksiyonlama optimizasyonunda elde edilen protein konsantrasyonları.	65
4.4. C2C12 miyotüp örneklerinde farklı tampon hacimleri kullanılarak elde edilen nükleer ve sitoplazmik protein konsantrasyonları.	73
4.5. C2C12 miyotüp hücrelerinde Nükleer Desmin IP-MS analizi sonucunda tanımlanan aday proteinler.	76
4.6. C2C12 Miyotüp Nükleer Desmin IP-MS analizinde belirlenen aday proteinlerin biyolojik işlevleri ve kanıt düzeylerine göre sınıflandırılması.	82
4.7. Aday proteinler için RNaz duyarlılık analizi.	86
4.8. Birleşik skor yöntemiyle 21 aday proteinin sıralanması ve ilk altı aday proteinin seçimi.	88
4.9. Seçilen altı aday proteinin zenginleşme doğrulaması.	90
4.10. Seçilen 6 aday protein arasında Pearson korelasyon katsayıları.	91
4.11. Pearson korelasyon katsayısı $\geq 0,98$ olan protein çiftleri.	92
4.12. EEF1A1 için ham verilerden hesaplanan kontrastlara dayalı RNaz duyarlılık analizi.	93

1. GİRİŞ

İskelet kası; fiziksel hareket, postür ve solunum gibi yaşamsal işlevler için temel bir organdır. Bununla birlikte; glikoz alımı ve depolanması, amino asit rezervi ve myokin salgısı yoluyla tüm vücut metabolik homeostazının ana düzenleyicisi olarak tanımlanmaktadır (1) . Bu nedenle iskelet kası, literatürde vücudun en büyük metabolik organı olarak kabul edilmektedir (2). İskelet kası yüksek derecede organizeli bir doku olarak sarkomer, sitoskeleton, ekstrasellüler matriks ve nöromusküler bileşenlerin koordinasyonu ile kasılma-gevşeme, kuvvet ve hareket üretir (3). Bu ağın önemli bir parçası olan Desmin ise ara filament (*intermediate filaments*, IF) protein ailesinin kasa özgü bir üyesidir (4). Hücrede sarkomer organizasyonu, miyofibrillerin hizalanması ve kuvvet iletiminin sürdürülmesinde görev alan yapısal bir hücre iskeleti bileşeni olarak görev almaktadır (5,6)

Desmin'in kalp ve iskelet kasında en bol bulunan sitoplazmik ara filament proteini olması, literatürde uzun yıllar boyunca araştırmaların ağırlıklı olarak bu proteinin yapısal işlevlerine odaklanmasına neden olmuştur (7). Ancak son yıllarda elde edilen bulgular, Desmin'in yalnızca sitoplazmada görev yapan bir yapısal protein olmadığını ortaya koymuştur. Hem *in silico* analizler hem de deneysel çalışmalar, Desmin'in çekirdeğe girebildiğini göstermiştir (8). Bu gözlemi destekler şekilde, Desmin proteininde nükleer yerleşim sinyalleri (*nuclear localization signal*, NLS) ve nükleer çıkış sinyalleri (*nuclear export signal*, NES) bulunduğu, dolayısıyla çekirdek ile sitoplazma arasında taşınmaya uygun bir yapıya sahip olduğu bildirilmiştir (8). Nitekim insan iskelet miyoblastları ve epitel hücrelerinde Desmin'in çekirdek içerisinde bulunduğu gösterilmiştir (9) Ayrıca Desmin'in Lamin B1 ve nükleer por kompleksi proteinleri (nükleoporinler, *Nups*) ile etkileşime girmesi, çekirdeğe girişinin rastlantısal bir olaydan ziyade özgül bir nükleositoplazmik taşıma mekanizması aracılığıyla gerçekleşebileceğini düşündürmektedir (9,10).

Erken dönem çalışmalarda ara filamentlerin gen ifadesi ve kromatin organizasyonunda rol alabileceği fikri, bu proteinlerin nükleer bileşenlerle etkileşime girebilmesi ve DNA'ya bağlanabilen bazı düzenleyici faktörlerle yapısal ve işlevsel benzerlik göstermeleri üzerinden ortaya atılmıştır (11). Bu fikir, ileriki yıllardaki çalışmalarla laminler ve lamin olmayan ara filamentler için deneysel zemin

kazanmıştır. Özellikle laminlerin epigenetik düzenleyici komplekslerle etkileşime girdiği ve kromozomların çekirdek içerisindeki mekânsal organizasyonunun belirlenmesinde önemli rol oynadığı gösterilmiştir (12,13). Bu bağlamda Desmin ve Lamin B1 arasında fiziksel etkileşimin Zebra balığı kas dokusunda karşılıklı birlikte immün çöktürme ile gösterilmiş olması dikkat çekicidir (10). Desmin ile nükleer lamina arasındaki bu ilişki, ara filamentlerin nükleer süreçlerde aktif rol oynayabileceği görüşünü desteklemektedir. Nitekim Desmin'in nükleer lamina bileşenleriyle etkileşimi yalnızca Lamin B1 ile sınırlı değildir. Kardiyomiyositlerde Desmin'in Lamin A/C ile bağlantı kurarak sitoplazmik mekanik sinyallerin çekirdeğe iletilmesinde görev aldığı ve kromatin organizasyonunu etkileyebilen dinamik bir mekanotransdüksiyon sistemi oluşturduğu gösterilmiştir (14). Bu ağın bütünlüğünün bozulmasının kromatin organizasyonunu ve gen ifade örüntülerini de etkileyebileceği bildirilmiştir (7)

Desmin'in nükleer süreçlerle ilişkilendirilebileceği düşüncesi, yalnızca nükleer yerleşime değil, aynı zamanda gelişimin çok erken evrelerinde ortaya çıkan ifade örüntüsüne de dayanmaktadır. Desmin hem somitte hem kalpte en erken görülen miyogenik belirteçlerden biridir (14). Desmin ifadesi bilinen tüm kas proteinlerinden (MyoD ailesi üyeleri dahil) önce başlar (15). Ayrıca embriyonik kök hücrelerden türetilmiş kardiyak progenitör hücrelerde Desmin'in çekirdekte bulunduğu gözlenmiştir(16). Embriyonik gelişim ve erişkin kök/progenitör hücrelerdeki bu ifade örüntüsü Desmin'in yalnızca bir ara filament proteini olmadığını aynı zamanda hücrel organizasyonda rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte gelişimin erken evrelerindeki Desmin ifadesinin neye hizmet ettiği netleştirilmiş değildir (14).

Bununla birlikte, mevcut bulgular Desmin'in çekirdekte bulunabileceğini ve bazı nükleer yapılarla ilişki kurabileceğini göstermesine rağmen, proteinin çekirdek içerisindeki moleküler işlevi açıklığa kavuşturulamamıştır (15–20). Özellikle iskelet kası hücrelerinde Desmin'in hangi nükleer protein komplekslerine katıldığı, bu komplekslerin kromatin organizasyonu ve gen ifadesinin düzenlenmesiyle ilişkili olup olmadığı ve Desmin'in bu süreçlere doğrudan mı yoksa farklı protein ve nükleik asit bileşenleri aracılığıyla mı katkıda bulunduğu bilinmemektedir. Dolayısıyla

araştırmaya neden olan temel problem, Desmin'in iskelet kası hücrelerindeki nükleer etkileşim ağının ve bu ağın olası işlevsel sonuçlarının henüz tanımlanmamış olmasıdır.

Bu bilgiler doğrultusunda tez çalışmasının temel hipotezi, Desmin'in iskelet kası hücrelerinde çekirdek içi protein komplekslerine katılarak kromatinle doğrudan veya dolaylı ilişki kurabileceği ve gen düzenleyici süreçlere katkıda bulunabileceği yönünde oluşturulmuştur. Hipotezin ilk olarak belirli bir genomik bölge üzerinden sınanması amacıyla, kardiyak progenitör hücrelerde Desmin ile ilişkisi daha önce gösterilmiş olan *Nkx2.5* hedef gen olarak seçilmiştir (16). Bu kapsamda *Nkx2.5* ifadesinin C2C12 fare iskelet kası hücrelerinde doğrulanması ve ardından Desmin'in *Nkx2.5* geninin düzenleyici bölgeleriyle olası ilişkisinin kromatin immünopresipitasyonu temelli yaklaşımlarla değerlendirilmesi planlanmıştır.

Ancak C2C12 hücrelerinde *Nkx2.5* ifadesinin güvenilir ve özgül biçimde doğrulanamaması nedeniyle, çalışmanın temel hipotezi korunmakla birlikte bu hipotezin değerlendirilmesinde kullanılan araştırma stratejisi yeniden düzenlenmiştir. Belirli bir hedef gen bölgesinden hareket etmek yerine, Desmin'in çekirdek içerisindeki protein ortaklarının tanımlanmasına yönelinmiştir. Bu yaklaşımın temelinde, Desmin ile ilişkili transkripsiyon faktörlerinin, kromatin düzenleyici proteinlerin veya diğer nükleer proteinlerin belirlenmesi durumunda, bu proteinlerin bilinen işlevleri ve hedef bölgeleri üzerinden Desmin–kromatin ilişkisinin daha sonraki çalışmalarda araştırılabileceği düşüncesi yer almaktadır. Böylece hedef bölge odaklı yaklaşımdan, Desmin'in nükleer etkileşim ağının keşfedilmesine dayalı daha kapsamlı bir yaklaşıma geçilmiştir.

Bu tez çalışmasının temel amacı, Desmin'in iskelet kası hücrelerindeki nükleer etkileşim ortaklarını belirlemek ve bu ortakların işlevlerinden hareketle Desmin'in kromatin organizasyonu, gen düzenlenmesi ve diğer çekirdek içi süreçlerle olası bağlantılarını açıklayabilecek moleküler yolları ortaya koymaktır. Bu amaç doğrultusunda insan LHCN-M2 ve fare C2C12 iskelet kası hücreleri kullanılmış; Desmin'in nükleer protein fraksiyonundaki varlığı hücresel fraksiyonlama ve Western blot analizleriyle değerlendirilmiştir. Desmin'in olası nükleer işlevleri, başlangıçta *Nkx2.5* ve SMYD1 üzerinden aday temelli yaklaşımlarla araştırılmış; daha sonra nükleer Desmin immün çöktürme ve kütle spektrometrisi analizleriyle proteinin

etkileşim ortakları tarafsız biçimde belirlenmiştir. Elde edilen adaylar bağımsız proteomik veri setleriyle karşılaştırılmış, ayrıca seçilen proteinlerin Desmin ile ilişkilerinde RNA'nın olası aracılığı RNaz uygulanan ve uygulanmayan immünopresipitasyon örnekleri üzerinden değerlendirilmiştir.

Çalışmanın kapsamı, Desmin'in doğrudan DNA'ya bağlandığının veya belirli kromatin bölgelerinde yer aldığının gösterilmesinden çok, böyle bir ilişkiye aracılık edebilecek nükleer protein ağının tanımlanmasına odaklanmaktadır. Bu nedenle tez kapsamında elde edilen verilerin, Desmin'in doğrudan bir DNA-bağlayıcı protein olarak tanımlanmasını sağlaması değil; proteinin nükleer zarf, nükleer por kompleksi, nükleositoplazmik taşıma, RNA metabolizması ve gen düzenleyici süreçlerle olası bağlantılarının araştırılabileceği aday moleküler mekanizmaları ortaya koyması amaçlanmıştır. Bu yönüyle çalışma, Desmin'in bilinen yapısal işlevlerinin ötesindeki çekirdek içi rollerinin anlaşılması ve gelecekte gerçekleştirilecek hedefe yönelik doğrulama çalışmaları için bilimsel bir temel oluşturmayı hedeflemektedir.

2. GENEL BİLGİLER

Hayvan hücrelerinde hücre iskeleti, hücrenin en karmaşık ve işlevsel anlamda çok yönlü yapılardan biridir. Hücre bölünmesi, hücre içi taşınma, kuvvet iletimi ve dış kuvvetlere yanıt gibi birçok süreçte rol alır. Bu işlevleri gerçekleştiren üç temel ara filament sistemi bulunmaktadır. Bunlar aktin filamentleri, mikrotübüller ve ara filamentlerdir (21). Bu üç filament sistemi, birbirinden farklı moleküler yapılara, hücre içi yerleşimlere ve mekanik özelliklere sahip olmasına karşın, hücrenin mimarinin korunmasında ve hücrenin değişen koşullara uyum sağlamasında koordineli biçimde çalışır (21,22). Ara filamentler; kararlılıkları, kendilerine özgü mekanik özellikleri ve hücre tipine özgü ifade örüntüleri, aktin filamentleri ve mikrotübüllerden ayrılmaktadır (23,24). Ara filament ağı, sitoplazma ve çekirdeğin mekanik dayanıklılığını arttırmanın yanı sıra sinyal iletimi ve stres yanıtı gibi süreçlere de katılır (23,24). Özellikle hücre tipine özgü ifade profilleri nedeniyle dokulara özgü mekanik özelliklerin belirlenmesinde kritik rol oynarlar (23). Kas hücrelerinde bu ağın en önemli bileşenlerinden biri, tip III ara filament proteinlerinden olan Desmin'dir (25).

2.1. Kas Hücrelerinde Ara Filamentler ve Desmin

Kas hücreleri, sürekli veya tekrarlayan mekanik kuvvetlere maruz kalan özelleşmiş hücrelerdir. İskelet kasında kasılma sırasında oluşan kuvvetin miyofibrillerden sarkolemmaya, hücre dışı matrise ve tendonlara etkili ve düzenli biçimde iletilmesi gerekir (26). Bu mekanik organizasyonda Desmin, kalp, iskelet ve düz kas hücrelerindeki ara filament ağının temel bileşenlerinden biri olarak görev yapar. Sarkoplazmada Z-disklerini çevreleyen ara filament ağı içerisinde konumlanan Desmin, miyofibrillerin hizalanmasının korunmasına ve kasılma-gevşeme döngüsü sırasında oluşan kuvvetin hücre boyunca dağıtılarak iletilmesine katkı sağlar (5,6).

Desmin'in kas gelişimi ve homeostazındaki önemini gösteren en güçlü kanıtlardan biri, proteinin yokluğunda veya işlev kaybında kas oluşumu ve sürdürülmesinde belirgin bozulmaların ortaya çıkmasıdır (15). Desmin olmayan (*null*) farelerde ciddi kas mimarisi bozulması, miyofibrillerin yanlış hizalanması, anormal mitokondri organizasyonu ve kas dokusunda dejenerasyon meydana gelir (27). *DES* genindeki mutasyonlar ile Desmin ilişkili proteinlerdeki bozukluklar kardiyomiyopati ve miyopatiye yol açmaktadır (28). Mutant Desmin proteinleri çoğu durumda normal

ara filament ağını oluşturmaz. Bunun sonucunda çözünmeyen granülo-filamentöz materyal ve sitoplazmik agregatlar birikir ve hücre içi ağın organizasyonu bozulur (28,29). İşlevsel çalışmalar, Desmin ile ilişkili patogenezin yalnızca protein agregasyonu ile sınırlı olmadığını göstermektedir. Desmin ağındaki bozulma; sarkomer dışı ara filament organizasyonunu ve protein-protein etkileşimlerini aksatmanın yanı sıra mitokondri işlevlerini ve protein kalite kontrolünü de etkilemektedir (30). Desmin'deki bozulmalara bağlı bu geniş klinik spektrum, Desmin'in hücrede çok sayıda yapısal ve düzenleyici işleve sahip olduğunu göstermektedir.

Desmin'in önemli işlevlerinden biri, mitokondri homeostazının korunmasına aracılık etmesidir (31). Kas hücrelerinin enerji talebini karşılayabilmek için mitokondriler, sarkomerlere komşu yerleşim gösterir (31). Dolayısıyla kas hücrelerinde enerji dağıtımı yalnızca difüzyon ile değil, iyi organize olmuş mitokondri ağına da dayanmaktadır (32). Bu organizasyonda Desmin kaybı veya mutasyonu mitokondri dağılımını bozmaktadır (33). Desmin-mitokondri ilişkisi oksidatif stresle çift yönlü görünmektedir. Desmin bozukluğu mitokondri hasarını tetikleyebilirken, mitokondri stresi ve hipoksik stres de Desmin'in modifikasyonuna ve yanlış katlanmasına yol açabilmektedir (34).

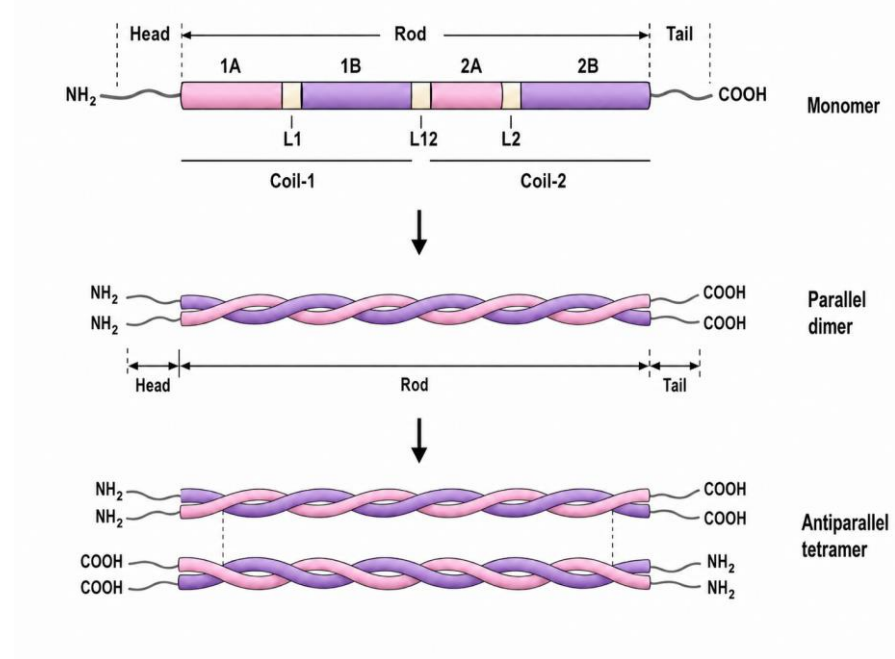
Desmin'in bir diğer önemli rolü mekanotransdüksiyondur. Myospryn, calcineurin ve gerilmeye duyarlı transkripsiyon faktörü CARP ile ilişkisi bu rol için mekanistik dayanak sağlamaktadır (35). Kas hücrelerinde başlıca mekanosensör yapılar olarak kabul edilen kostamerler, mekanik yükün sarkomer, sarkolemma ve hücre dışı matris arasında iletilmesinde ve bu yükün hücresel yanıtlara dönüştürülmesinde görev alır (36). Bu çerçevede Desmin'in mekanik yüklenmeye adaptasyondaki önemi, Desmin eksikliği bulunan kaslarda gözlenen bozulmuş işlevsel adaptasyon bulgularıyla da desteklenmektedir (37). Bu nedenle Desmin, egzersiz, yüklenme, hasar ve yeniden yapılanma sırasında kasın yapısal ve işlevsel uyumunda rol alan önemli bir proteindir (37).

Bu çok yönlü işlevler, Desmin'in yalnızca mekanik destek sağlayan bir ara filament proteini olmadığını, aynı zamanda kas hücresinin yapısal bütünlüğü ile

düzenleyici süreçlerinin koordinasyonuna katkıda bulunan dinamik bir protein olduğunu göstermektedir.

2.2. Desmin'in Moleküler Yapısı

İnsan Desmin proteini 470 amino asitten oluşur ve yaklaşık 53.5 kDa moleküler ağırlığa sahiptir (31). Desmin, diğer ara filament proteinlerinde olduğu gibi, amino-terminalde yer alan bir baş bölgesi ile karboksil-terminalde bulunan bir kuyruk bölgesinden ve bu iki uç bölge arasında uzanan korunmuş, amfipatik özellikteki α -sarmal rod domeninden oluşmaktadır (Şekil 2.2). Merkezi rod domeini, Desmin monomerlerinin dimer ve daha yüksek düzeyli filamentöz yapılar oluşturmada temel rol oynamaktadır (38). Buna karşılık, helikal olmayan baş ve kuyruk bölgeleri filamentlerin polimerizasyonu, yeniden düzenlenmesi ve hücre içindeki doğru lokalizasyonunun sağlanmasına katkıda bulunur. Özellikle amino ucu baş domeini filament oluşumu için gereklidir, karboksil ucu kuyruk domeinin ise lateral protein etkileşimleri ve ara filament ağının uzaysal organizasyonunda rol oynadığı bilinmektedir (39). Örneğin Desmin'in kuyruk domeinin desmozomal bağlantı proteini olan desmoplakin ile etkileşime geçtiği bilinmektedir (40). Nitekim Desmin kuyruk bölgesinde veya desmoplakinin karboksil ucunda bulunan, kalıtsal kardiyomiyopati ile ilişkili mutasyonların desmoplakin-Desmin etkileşimini bozabildiği bildirilmiştir. Bu bulgular, Desmin kuyruk domeininin yalnızca filament organizasyonunda değil, aynı zamanda hücresel bağlantı kompleksleriyle kurduğu protein-protein etkileşimlerini de sağladığını göstermektedir (40). Baş ve kuyruk bölgeleri, translasyon sonrasında çeşitli modifikasyonlara uğrayabilmekte ve bu modifikasyonlar filament dinamiğini etkilemektedir (7). Desminin bu modüler yapısı, proteinin yalnızca bir mekanik destek elemanı olmadığını gösterir (31).



Şekil 2.1. Desmin'in yapısal organizasyonunun şematik gösterimi. Desmin monomeri, amino ucu baş bölgesi ile karboksil ucu kuyruk bölgesi arasında yer alan merkezi rod domeininden oluşmaktadır. Rod domeini; 1A, 1B, 2A ve 2B olarak adlandırılan dört α -helikal segment içerirken, bu segmentler L1, L12 ve L2 bağlayıcı bölgeleriyle birbirinden ayrılmaktadır. İki Desmin monomerinin paralel doğrultuda birleşmesiyle dimer oluşur; iki dimerin antiparalel biçimde bir araya gelmesi ise tetramer yapısının meydana gelmesini sağlar (Görsel uyarlanmıştır (41)).

2.3. Desmin'in Nükleer İşlev Potansiyeli

Ara filament proteinlerinin yalnızca sitoplazmada görev aldığı görüşü, laminlerin özelliklerinin keşfiyle literatürde giderek zayıflamıştır. Bununla birlikte lamin olmayan ara filament proteinlerinin de belirli bağlamlarda çekirdekte bulunabildiği keşfedilmiştir (12,42–44). 1980'ler ve 1990'lar boyunca birçok çalışma, sitoplazmik IF ağlarının çekirdek yüzeyine kadar uzandığını ve nükleer lamina ile süreklilikle ilişki kurduğunu göstermiştir(43,44). Karaciğer epitel hücrelerinde sitokeratin ve vimentin ağlarının nükleer lamina filamentlerine bağlandığı, hatta nükleer bölgedeki IF'lerin lamina ağıyla iç içe görüldüğü ortaya konmuştur (45). Aynı dönemde Stromer ve Bendayan, düz kas hücrelerinde anti-Desmin antikoru ve protein A-kolloidal altın işaretlemesine dayalı immünogold elektron mikroskopisi kullanarak Desmin'in nükleer zara uzanarak nükleer zarfla bağlantı kurduğunu

gözlemlemişlerdir(45). Bu çalışmalar çerçevesinde IF–çekirdek bağlantısının; hücre yüzeyi, sitoplazma ve çekirdek arasında bilgi iletimi ve olası nükleositoplazmik taşınım ile ilişkili olabileceği literatürde belirtilmiştir (44,46). Desmin’in çekirdek ile ilişkili olabileceğine yönelik ilk bulgulardan biri Kamei tarafından 1986 yılında bildirilmiştir. Bu çalışmada tavuk taşığında elde edilen desmine karşı geliştirilen AC54 monoklonal antikorunun, BHK21/C13 hücrelerinde sitoplazmik ara filament ağının yanı sıra çekirdek içerisindeki granüler yapıları da işaretlediği gösterilmiştir (19). Söz konusu bulgu, Desmin’in veya Desmin ile antijenik benzerlik gösteren yapıların çekirdekte bulunabileceğine ilişkin erken bir immünohistokimyasal gözlem olarak önemlidir. Desmin’in çekirdek ile ilişkisi yalnızca çekirdek içindeki yerleşimi üzerinden değil, sitoplazmik Desmin filament ağı ile nükleer zarf arasındaki yapısal devamlılık üzerinden de araştırılmıştır. Georgatos ve Blobel, Lamin B’nin sitoplazmik ara filamentlerin nükleer zarfa bağlanmasında bir tutunma bölgesi oluşturabileceğini göstermiştir (47). Bu sonuçlar, Desmin filament ağı ile nükleer lamina arasında fiziksel ve mekanik bir bağlantı bulunabileceğini destekler niteliktedir. Desmin ile Lamin B1 arasındaki ilişki, grubumuz tarafından incelenmiştir. Zebra balığı iskelet kası kesitlerinde yapılan *Proximity Ligation Assay – PLA*, bu iki proteinin hücre içinde birbirine çok yakın konumlandığını göstermiştir. Ayrıca zebra balığında gerçekleştirilen karşılıklı immün çöktürme (*Co-IP*) deneyleri ise Desmin ve Lamin B1’nin aynı protein kompleksi içinde yer aldığını doğrulamıştır. Grubumuz tarafından canlı doku düzeyinde elde edilen bu sonuçlar, sitoplazmik desmin filamentlerinin nükleer lamina ile bağlantı kurabildiğine yönelik önceki morfolojik ve *in vitro* bulguları güçlü bir şekilde desteklemektedir (10,48). Grubumuzun yakın zamanda gerçekleştirdiği çalışmalarda, Desmin’in insan iskelet kası hücreleri çekirdeğinde de bulunduğu ve çekirdek yerleşiminin miyojenik farklılaşmanın erken evrelerinde daha belirgin hale geldiği gösterilmiştir (49,50). Desmin’in çekirdekte sürekli olarak bulunmaması, ancak belirli farklılaşma evrelerinde nükleer düzeyinin artması, bu lokalizasyonun yapısal bir birikimden çok geçici ve düzenleyici bir işlevle ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Benzer bir evreye özgü lokalizasyon kardiyak progenitör hücrelerde de bildirilmiştir. Fuchs ve ekibi, Desmin’in erken kardiyak progenitör hücrelerin sınırlı bir bölümünde çekirdekte bulunduğunu, hücrelerin olgunlaşmasıyla birlikte nükleer Desmin düzeyinin azaldığını ve olgun

kardiyomiyositlerde nükleer Desmin'in saptanmadığını göstermiştir (16). Dolayısıyla Desmin'in nükleer yerleşimi, hem iskelet kası hem de kalp kası gelişimi sırasında erken farklılaşma dönemlerine özgü geçici bir düzenleyici pencereyi temsil ediyor olabilir. Desmin'in çekirdekte bulunabileceğinin gösterilmesi, proteinin burada hangi moleküler işlevleri üstlendiği sorusunu gündeme getirmiştir. Tip III ara filament proteinlerinin nükleik asitlerle etkileşim potansiyelini inceleyen biyokimyasal çalışmalar, bu proteinlerin özellikle G-dörtlü yapıları içeren, guanin bakımından zengin tek zincirli DNA bölgelerine bağlanabildiğini göstermiştir (20,51). Vimentin için ayrıca tekrarlayan DNA dizileri ve nükleer matriks bağlanma bölgeleriyle kompleks oluşumu gösterilmiştir (52). Bu çalışmalar, Desmin'in kromatin veya DNA ile etkileşime girebilecek biyokimyasal özelliklere sahip olduğunu desteklemektedir. Ancak bu deneylerin büyük ölçüde in vitro koşullarda gerçekleştirilmiş olması nedeniyle, bulgular Desmin'in canlı hücrelerde belirli gen bölgelerine doğrudan bağlandığını tek başına göstermemektedir (11,20,52).

Desmin'in gen düzenlenmesiyle ilişkili olabileceğine dair ilk işlevsel bulgular miyogenik farklılaşma çalışmalarından elde edilmiştir. Desmin ifadesinin baskılanmasının miyoblast füzyonunu engellediği ve MyoD ile myogenin gibi temel miyogenik düzenleyicilerin ifade örüntülerini bozduğu gösterilmiştir (53). Bu sonuç, Desmin'in yalnızca farklılaşma sonucunda sentezlenen yapısal bir protein olmadığını, aynı zamanda miyogenik programın ilerlemesi için gerekli hücresel süreçlere katkıda bulunan bir protein olduğunu düşündürmektedir. Ancak bu çalışma, Desmin'in *MyoD1* veya *Myog* genlerinin düzenleyici bölgeleriyle doğrudan etkileştiğine dair kanıt sunmamakta; Desmin kaybının miyogenik düzenleyici ağ üzerinde dolaylı etkiler oluşturduğunu göstermektedir.

Desmin'in amino-terminal bölgesinin erken kardiyak farklılaşmadaki önemi de çeşitli çalışmalarda ortaya konmuştur. Amino-terminaldeki ilk 48 amino asidi uzaklaştırılmış Desmin proteininin, Desmin'in bulunmadığı iskelet kası hücrelerinde miyoblast füzyonunu kısmen düzeltebildiği, ancak kardiyomiyogenez ve düz kas gelişimini olumsuz etkilediği gösterilmiştir (18). Daha sonraki çalışmalarda ise Desmin'in amino uç bölgesinde bulunan ve fosforilasyona uğrayabilen Ser6, Ser7 ve Ser8 rezidülerinin kardiyomiyosit farklılaşması ve miyofibril organizasyonu için kritik olduğu; bu kalıntıların alanin ile değiştirilmesinin kardiyak farklılaşmayı belirgin

şekilde bozduğu bildirilmiştir (54). Bu bulgular, Desmin'in amino ucu bölgesinin yalnızca filament oluşumu açısından değil, erken kardiyak farklılaşmayı düzenleyen hücresel süreçler açısından da önemli olduğunu göstermektedir. Desmin'in aşırı ifade edilmesinin erken mezodermal belirteç *brachyury* ile kardiyak transkripsiyon faktörü *Nkx2.5*'in ifadesini artırdığı ve kardiyomiyosit farklılaşmasını desteklediği bildirilmiştir (17). Buna karşılık desminin amino-terminal bölgesindeki değişiklikler ve işlevsel serin kalıntılarının mutasyonu, erken *Nkx2.5* ifadesinin azalması ve kardiyomiyogenezin bozulmasıyla ilişkilendirilmiştir. Dolayısıyla bu çalışmalar, Desmin'in *Nkx2.5* proteininin aktivitesini doğrudan düzenlediğinden çok, *Nkx2.5* geninin erken dönemdeki ifadesini ve *Nkx2.5* ile ilişkili kardiyak farklılaşma programını etkilediğini göstermektedir (17,18,54).

Desmin'in nükleer işlevine ilişkin en doğrudan kanıtlardan biri Fuchs ve ekibi tarafından 2016 yılında sunulmuştur. Çalışmada Desmin'in kardiyak progenitör hücrelerin çekirdeğine geçici olarak girdiği, saflaştırılmış çekirdek ve kromatin fraksiyonlarında bulunduğu gösterilmiştir. Kromatin immün çöktürme analizlerinde Desmin'in *Nkx2.5* geninin düzenleyici bölgeleriyle ilişkili olduğu; gen raportör analizlerinde ise bu düzenleyici bölgelerin transkripsiyon aktivitesini arttırabildiği belirlenmiştir. Ayrıca Desmin'in *Nkx2.5* düzenlenmesinde görev alan transkripsiyon faktörlerini içeren protein komplekslerinin bir bileşeni olduğu ve Desmin eksikliğinin *Nkx2.5* ifadesinde azalmaya yol açtığı bildirilmiştir (16). Bununla birlikte çalışmanın yazarları, Desmin'in DNA'ya doğrudan bağlanması ile DNA'ya bağlı transkripsiyon faktörleri aracılığıyla ilgili bölgelere taşınması arasında kesin bir ayırım yapılamadığını belirtmiştir. Bu nedenle Desmin'in klasik bir DNA bağlayıcı transkripsiyon faktörü olarak tanımlanmasından çok, transkripsiyon faktörü komplekslerinin oluşumuna, kromatin üzerinde kararlı hale gelmesine veya düzenleyici bölgelerin mekânsal organizasyonuna katkıda bulunan yardımcı bir nükleer düzenleyici ya da iskele proteini olarak değerlendirilmesi daha uygun görünmektedir (16).

2.4. Çekirdek Zarfı, Nükleer Lamina ve LINC Kompleksi

Ökaryotik hücre çekirdeği, iç ve dış nükleer membranlardan oluşan çift katlı bir nükleer zarfla çevrilidir. Dış nükleer membran endoplazmik retikulumla devamlılık gösterirken, iç nükleer membran kendine özgü membran proteinleri ve nükleer lamina

ile ilişkilidir (55). Nükleer zarf yalnızca çekirdek ile sitoplazma arasında fiziksel bir sınır oluşturmaz; kromatin organizasyonu, gen ifadesi, DNA onarımı ve mekanik sinyal iletimi gibi süreçlere de katılır (55,56).

Nükleer lamina, iç nükleer membranın altında bulunan ve başlıca lamin proteinlerinden oluşan filamentöz bir ağıdır(55) Laminler yapısal olarak ara filament ailesinin üyeleridir. A tipi laminler Lamin A ve Lamin C'den, B tipi laminler ise Lamin B1 ve Lamin B2'den oluşmaktadır (57). Lamin ağı çekirdeğin mekanik dayanıklılığını arttırmakta, nükleer por komplekslerinin konumlanmasına katkıda bulunmakta ve kromatinin çekirdek içerisindeki mekânsal organizasyonunu etkilemektedir (57,58).

Nükleer lamina ile ilişkili genom bölgeleri lamin ilişkili domenler (*Lamina-Associated Domains – LADs*) olarak adlandırılmaktadır (56). Bu bölgeler çoğunlukla düşük transkripsiyon aktivitesi gösteren heterokromatin alanlarını içermekle birlikte, lamin–kromatin ilişkileri hücre tipi ve farklılaşma evresine göre değişebilmektedir (56,58). Bu nedenle nükleer laminanın yalnızca kromatini sabitleyen pasif bir yapı olmadığı, gelişimsel ve çevresel sinyallere göre yeniden düzenlenen işlevsel bir nükleer organizasyon sistemi olduğu kabul edilmektedir (55,56). Sitoplazmik hücre iskeleti ile nükleer lamina arasındaki fiziksel bağlantı, büyük oranda LINC kompleksi tarafından sağlanır (59). Bu kompleks, iç nükleer membrandaki SUN proteinleri ile dış nükleer membrandaki nesprin proteinlerinin nükleer zarlar arası boşlukta etkileşime girmesiyle oluşur (59). Sitoplazmik bölgeleri aktin filamentlerine, mikrotübüllere ve ara filamentlere bağlanan nesprinler sayesinde LINC kompleksi, kas hücrelerinde çekirdeklerin miyotüp boyunca doğru dağılmasında, çekirdek şeklinin korunmasında ve sarkomer organizasyonunun düzenlenmesinde kritik bir rol oynamaktadır (60).

Desmin filamentlerinin plektin ve nesprinler gibi bağlantı proteinleri aracılığıyla çekirdek çevresindeki yapılara bağlanması, Desmin–LINC–Lamin ekseninin oluşmasını sağlayabilir. Bu eksen, kasılma sırasında oluşan kuvvetlerin çekirdeğe iletilmesi ve çekirdeğin mekanik özelliklerinin hücresel koşullara göre düzenlenmesi için yapısal bir temel sunmaktadır (60). Örneğin kardiyomiyositlerde gerçekleştirilen bir çalışmada Desmin ve LINC kompleksinin bir bileşeni olan nesprin-3 ortadan kaldırıldığında, mikrotübüller çekirdek üzerine baskı uygulayarak nükleer membranın içeri doğru katlanmasına yol açmıştır (60). Bu yapısal bozulmaya DNA

hasarı, genom organizasyonunun kaybı ve kapsamlı transkripsiyon değişiklikleri eşlik etmiştir. Bu bulgular LINC veya lamin bileşenlerinin çekirdek konumlanması, kromatin organizasyonu ve kas işlevinin sürdürülmesindeki önemini göstermektedir.

2.5. Nükleer Por Kompleksi ve Nükleositoplazmik Taşınma

Nükleer por kompleksleri, iç ve dış nükleer membranların birleştiği bölgelerde bulunan büyük makromoleküler yapılardır (61,62). Nükleer por kompleksleri, yaklaşık 30 farklı nükleoporin proteininin çoklu kopyalarının bir araya gelmesiyle oluşur ve çekirdek ile sitoplazma arasındaki seçici ve çift yönlü moleküler taşınımı düzenlemektedir (61,62). Nükleer por kompleksi; sitoplazmik filamentler, merkezî taşıma kanalı, iç halka yapıları ve çekirdek tarafındaki nükleer sepet olmak üzere farklı yapısal bölgelerden oluşmaktadır (61). Su, iyonlar gibi küçük moleküller nükleer porlardan pasif olarak geçebilirken, büyük proteinler ile ribonükleoprotein komplekslerinin taşınması çoğunlukla importin ve eksportin gibi nükleer taşıma reseptörleri aracılığıyla gerçekleşmektedir. Taşınımın yönü, çekirdekte RAN-GTP ve sitoplazmada RAN-GDP'nin baskın olduğu RAN GTPaz döngüsü tarafından belirlenmektedir (62) Nükleer porun seçici geçirgenlik bariyeri, fenilalanin-glisin tekrarları içeren FG-nükleoporinler tarafından oluşturulmaktadır. Taşıma reseptörleri bu tekrarlarla geçici etkileşimler kurarak merkezî kanaldan geçmektedir (61,62). Nükleoporinler ayrıca kromatin organizasyonu, gen ifadesinin düzenlenmesi, RNA metabolizması, mRNA'nın çekirdekten sitoplazmaya taşınması (*export*) ve DNA hasar yanıtı gibi çekirdek içi süreçlerde de görev alabilmektedir (62–65).

Desmin'in belirli hücresel koşullarda çekirdek içerisinde bulunabildiğinin gösterilmesi, proteinin nükleer por kompleksi üzerinden taşınma olasılığını akla getirmektedir. Kardiyak progenitör hücrelerde Desmin'in geçici olarak çekirdek içerisinde bulunduğu ve *Nkx2.5* gen bölgesiyle ilişkili transkripsiyon faktörü komplekslerine katıldığı bildirilmiştir (16). Desmin'in amino asit dizisinde iki olası nükleer yerleşim sinyali (NLS) tanımlanmıştır; bu bölgelerin bozulmasının ve importin- α/β yolunun baskılanmasının nükleer Desmin düzeyini azalttığı gösterilmiştir (66). Bu sonuçlar, Desmin'in çekirdeğe girişinde en azından kısmen karyoferin aracılı bir taşıma mekanizmasının rol oynayabileceğini düşündürmektedir (66).

Desmin yaklaşık 53,5 kDa moleküler ağırlığa sahiptir ve hücre içerisinde dimer, tetramer ve daha yüksek düzeyli filamentöz yapılar oluşturabilmektedir (31,34). Bu durum Desmin'in çekirdek içerisine hangi moleküler formda geçtiği sorusunu gündeme getirmektedir (9). Bununla birlikte Desmin'in nükleer por kompleksinden monomerik, oligomerik veya filament oluşturmamış çözünür bir formda geçip geçmediği henüz deneysel olarak belirlenmemiştir. Grubumuz, Desmin'in hidrofobik koşullarda yüzeyindeki hidrofobik bölgeleri daha belirgin hâle getirebildiğini göstermiş ve amfipatik yapısının nükleoporinlerle etkileşim kurarak nükleer porun seçici bariyerinden geçmesine katkı sağlayabileceğini öne sürmüştür (9).

Nükleer por kompleksinin yanı sıra, nükleer zarf ile laminler ve kromatin arasındaki bağlantının kurulmasında lamina ilişkili proteinler de görev almaktadır (67). Bu proteinlerden biri olan lamina ilişkili polipeptit 2 (LAP2), *TMPO* geninin alternatif pre-mRNA kırılması sonucunda oluşan farklı izoformlardan meydana gelmektedir (67). LAP2 β iç nükleer membranda bulunan bir transmembran proteiniyken, LAP2 α membrana bağlı olmayan ve çekirdek iç bölgesinde yer alan bir izoformdur (67). LAP2'nin Lamin B1 ve mitotik kromozomlarla etkileştiği ve geç anafaz sırasında kromozomlarla çoğu laminden daha erken ilişki kurduğu gösterilmiş; bu bulgular LAP2'nin mitoz sonrası nükleer zarfın yeniden oluşumunun erken basamaklarında görev alabileceği şeklinde yorumlanmıştır (68). LAP2 α 'nın nükleoplazmik Lamin A/C ve retinoblastoma proteinleriyle ilişkili olduğu; retinoblastoma-E2F yolu üzerinden hücre döngüsünün ilerlemesi ve farklılaşmanın düzenlenmesine katkıda bulunduğu literatürde belirtilmiştir (69,70).

Nükleer zarf ve lamina ile ilişkili bu proteinlerin yanında, nükleer por kompleksinin farklı yapısal bölgelerinde yer alan nükleoporinler de nükleositoplazmik taşınmanın yanı sıra çeşitli çekirdek içi süreçlerde görev yapmaktadır. NUP153, nükleer por kompleksinin çekirdek tarafında bulunan nükleer sepet yapısının başlıca bileşenlerinden biridir (61,62). NUP153'ün kromatin mimarisinde görev alan CTCF ve kohezin proteinleriyle etkileşime girerek, bu proteinlerin düzenleyici genom bölgelerine bağlanmasını kolaylaştırdığı gösterilmiştir (61). Bu bulgular, NUP153'ün nükleositoplazmik taşınmadaki asli görevinin ötesinde, kromatin organizasyonu ve gen ifadesinin düzenlenmesinde de kritik roller üstlenebileceğine işaret etmektedir (61).

NUP358 olarak da bilinen RANBP2 (*RAN binding protein 2*), nükleer por kompleksinin sitoplazmik filamentlerinde yer alan büyük bir nükleoporindir (61,71). Bu protein; nükleer taşıma reseptörleri, RAN GTPaz sistemi ve mRNA'nın çekirdekten sitoplazmaya taşınmasını sağlayan NXF1 (*Nuclear RNA Export Factor 1–NXT1(p15)*) kompleksiyle doğrudan etkileşime girer (61,65,71). Yapılan deneysel çalışmalar, RANBP2/NUP358'in nükleer por üzerinde NXF1–p15 kompleksi için kritik bir kenetlenme bölgesi oluşturarak mRNA'nın çekirdekten sitoplazmaya taşınmasının etkin şekilde gerçekleşmesini sağladığını ortaya koymuştur (65).

Nükleer por kompleksinin sitoplazmik yüzünde konumlanan NUP214 (*Nucleoporin 214*), fenilalanin-glisin zengin (FG) tekrarları içeren bir nükleoporindir (61,65). Bu proteinin, başlıca nükleer dışa taşıma reseptörlerinden biri olan CRM1 (*Chromosome Region Maintenance 1; Exportin 1, XPO1*) ile etkileşime girerek CRM1'e bağımlı proteinlerin çekirdekten sitoplazmaya taşınmasının etkin şekilde gerçekleşmesini sağladığı gösterilmiştir (72). Bu doğrultuda NUP214, nükleer porun sitoplazmik tarafına aktarılan kargoların dışa taşınma sürecinde kritik bir kenetlenme istasyonu olarak görev yapmaktadır (72).

Nükleer por kompleksi bileşenlerinin önemli bir kısmının yalnızca moleküler taşınımında değil, kromatin organizasyonu, RNA işlenmesi ve gen ifadesinin düzenlenmesi gibi çekirdek içi süreçlerde de görev aldığı bilinmektedir (61–64). Bu nedenle nükleoporinlerle ilişkili protein ağlarının tanımlanması, nükleer düzenleyici mekanizmaların anlaşılması açısından önem taşımaktadır. NUP153'ün nükleer sepet bölgesinde, NUP214 ve NUP88'in ise nükleer porun sitoplazmik tarafında yer alması ve bu proteinlerin Desmin ile ilişkili olduğuna yönelik bulgular, Desmin'in nükleer por kompleksinin farklı bölgelerinde bulunan birden fazla nükleoporinle aynı etkileşim ağı içinde yer alabileceğini düşündürmektedir (9,66).

2.6. SMYD1 ve Kas Farklılaşması

SMYD1 (*SET and MYND domain-containing protein 1*), başlıca kalp ve iskelet kasında ifade edilen, proteinlerin lizin rezidülerinin metilasyonunu katalizleyen bir metiltransferazdır (73,74). SMYD ailesinin karakteristik yapısında katalitik SET domeni, araya giren çinko parmak yapısındaki MYND domeini tarafından iki bölüme ayrılmaktadır. SMYD1'in lizin metiltransferaz aktivitesi SET domeini tarafından

yürütülürken, MYND domeini ise PXLXP motifini barındıran proteinlerle etkileşime girerek substratların enzime bağlanmasına katkı sağlar (73,74). Nitekim SMYD1'deki MYND domeininin işlevselliğini yitirmesi, skNAC ile olan etkileşimi ortadan kaldırmakta ve bu proteinin SMYD1 aracılığıyla metillenmesini engellemektedir (74).

SMYD1, ilk olarak m-Bop adıyla, kalp gelişimi için gerekli olan ve histon deasetilazlara bağımlı biçimde transkripsiyonu baskılayabilen bir protein olarak tanımlanmıştır (75,76). Daha sonra SMYD1'in, kalp ve iskelet kasına özgü bir transkripsiyon faktörü olan skNAC ile fiziksel olarak etkileşime girdiği gösterilmiştir (76). SMYD1'in skNAC'ı lizin 1975 rezidüsünden metilleyebildiği ve bu metilasyonun miyoglobin geninin transkripsiyonunun aktivasyonu için gerekli olduğu bildirilmiştir (74). Bu bulgu, SMYD1'in histonların yanında histon dışı proteinleri de metilleyebildiğini ve bağlama göre transkripsiyon aktivasyonuna da katkıda bulunabildiğini göstermektedir (74).

SMYD1'in işlevleri çekirdekteki transkripsiyon ilişkili düzenlemeyle sınırlı değildir; proteinin çizgili kas hücrelerinde sarkomerik M-çizgisinde konumlandığı ve miyozinle fiziksel olarak etkileşime girdiği gösterilmiştir (77). Bu etkileşimin kesintiye uğraması, kalp kası ile hızlı kasılan iskelet kası liflerinde kalın filamentlerin ve sarkomerlerin düzgün biçimde organize olmasını engeller (77). Dolayısıyla mevcut bulgular; SMYD1'in çekirdekte gen ifadesini düzenlerken, sitoplazmada ise miyozin organizasyonu ve sarkomer bütünlüğünü sağlayan çok işlevli bir protein olduğunu ortaya koymaktadır (74,77).

SMYD1 kaybının, hem in vitro miyoblast farklılaşmasını hem de embriyonik iskelet kası gelişimini sekteye uğrattığı gösterilmiştir (78). Örneğin C2C12 hücrelerinde bu proteinin baskılanması miyoblast füzyonunu ve miyotüp gelişimini zayıflatırken; koşullu *SMYD1 KO (conditional knockout)* yapılan farelerde kas lifi sayısının azaldığı ve kasa özgü gen ifadelerinin değiştiği belirlenmiştir (78). Söz konusu veriler, SMYD1'in miyojenik farklılaşmanın farklı basamaklarında kritik roller üstlendiğini ortaya koymaktadır (78).

SMYD1'in, erken kalp gelişiminde hücrel mekanizmaya ve moleküler çevreye bağlı olarak hem pozitif hem de negatif yönlü gen düzenleyici işlevler sergileyebildiği bildirilmiştir. Bu doğrultuda proteinin, kardiyak progenitör hücrelerle

ilişkili *Isl1* (*ISL LIM homeobox 1*) ifadesini arttırırken *Anf* (*Atrial natriuretic factor*) geninin ifadesini baskılaması, SMYD1'in farklı moleküler kompleksler içerisinde değişken düzenleyici roller üstlenebildiğine işaret etmektedir (74,79).

SMYD1'in hücre içi dağılımı miyojenik farklılaşma boyunca değişmektedir. C2C12 miyoblastlarında hem çekirdek hem de sitoplazmada bulunan SMYD1'in, farklılaşmanın ilerleyen evrelerinde sitoplazmik ve sarkomerik yapılarda belirginleştiği gösterilmiştir (78,80,81). Bunun yanında, farklı deneysel modeller arasında yerleşim farklılıkları görülebilmektedir; örneğin zebra balığı miyoblastlarında SMYD1 izoformlarının erken dönemde ağırlıklı olarak sitoplazmada, olgun kas liflerinde ise M-çizgisinde bulunduğu bildirilmiştir (82). SMYD1 protein düzeyinin farklılaşmamış miyoblastlarda oldukça düşük olduğu ve farklılaşma sürecinde belirgin biçimde arttığı Western blot (WB) analizleriyle gösterilmiştir (78). SMYD1'in farklılaşma süreci ilerledikçe sitoplazmik ve sarkomerik yapılarda daha belirgin hale gelmesi, proteinin kas hücresinin yapısal protein ağırlarıyla ilişki kurabileceğini düşündürmektedir (77,80,82).

2.7. RNA-seq, Korelasyon ve İşlevsel Zenginleştirme Analizleri

RNA dizileme, hücre veya dokulardaki transkriptlerin geniş ölçekte belirlenmesini sağlayan yüksek verimli bir yöntemdir (83). RNA-seq analizlerinde kalite kontrolünün ardından okumalar referans genomu veya transkriptoma hizalanmakta, gen düzeyindeki okuma sayıları hesaplanmakta ve gruplar arasındaki ifade farklılıkları istatistiksel olarak değerlendirilmektedir (83). RNA-seq verileri genlere hizalanan okuma sayılarından oluştuğundan, gruplar arasındaki gen ifadesi farklılıklarının analizinde bu veri yapısına uygun istatistiksel modeller kullanılmaktadır (84). DESeq2, sayım verilerini negatif binom dağılımıyla modellemekte ve dağılım ile kat değişimi tahminlerini düzenleyerek gruplar arasındaki gen ifadesi farklılıklarının daha güvenilir biçimde belirlenmesini sağlamaktadır (84).

Miyojenik farklılaşma gibi zamana bağlı süreçlerde bir hedef genle benzer gen ifade örüntüsü gösteren genler korelasyon analizleriyle belirlenebilmektedir (83). Spearman korelasyon katsayısı, değişkenlerin sıralamaları üzerinden hesaplandığından doğrusal olmak zorunda olmayan monoton ilişkilerin

değerlendirilmesine uygundur(85). Bununla birlikte korelasyon, doğrudan düzenleme veya nedensellik kanıtı olarak değerlendirilmemelidir (85).

Gen ve protein listelerinin işlevsel olarak sınıflandırılmasında *Gene Ontology* ve *Reactome* gibi bilgi kaynaklarından yararlanılmaktadır. *Gene Ontology*, gen ürünlerine ilişkin bilgileri biyolojik süreç, moleküler işlev ve hücresel bileşen olmak üzere üç temel ontoloji altında standartlaştırılmış bir biçimde sunmaktadır (86). *Reactome* ise insan proteinlerini moleküler reaksiyonlar ve biyolojik yollarla ilişkilendiren, uzmanlar tarafından küratörlüğü ve hakem değerlendirmesi yapılan bir yolak bilgi kaynağıdır (87).

AnimalTFDB 4.0, hayvan türlerine ait transkripsiyon faktörleri ve transkripsiyon kofaktörlerine ilişkin kapsamlı sınıflandırma ve anotasyon bilgileri sunan bir veri tabanıdır (88). Veri tabanında 183 hayvan genomuna ait transkripsiyon faktörleri ve transkripsiyonel kofaktörler sınıflandırılmış; ayrıca gen listelerinin toplu olarak sorgulanmasına olanak sağlayan bir arama işlevi geliştirilmiştir (88). Bu tez kapsamında *AnimalTFDB* 4.0, Desmin ile korelasyon gösteren genler arasında transkripsiyon faktörü veya transkripsiyon kofaktörleri olarak sınıflandırılan genlerin belirlenmesinde kullanılmıştır.

2.8. Protein Etkileşimlerinin Araştırılmasında İmmün Çöktürme ve Kütle Spektrometrisi

Proteinler, hücre içerisinde sıklıkla dinamik protein ağları ve çok proteinli kompleksler halinde işlev görür. Birlikte immün çöktürme (*co-IP*), hedef proteine özgü bir antikor ile Protein A/G'ye bağlı boncuklar veya reçine kullanılarak hedef proteinin ve onunla ilişkili proteinlerin hücre lizatından birlikte izole edilmesine dayanan bir yöntemdir (89). İmmün çöktürmenin kütle spektrometrisiyle (*mass spectrometry, MS*) birleştirilmesi, hedef proteinle ilişkili proteinlerin geniş ölçekte ve nicel olarak belirlenmesinde kullanılmaktadır (90). Son yıllarda kütle spektrometrisi teknolojilerinin duyarlılık, çözünürlük ve analiz hızı bakımından gelişmesiyle birlikte immünopresipitasyon-kütle spektrometrisi (IP-MS), protein etkileşim ağlarının incelenmesinde yaygın olarak kullanılan bir yaklaşım hâline gelmiştir (91). IP-MS; RNA bağlayıcı proteinler, transkripsiyon faktörleri, iyon kanalı düzenleyicileri ve hücre iskeleti bileşenleriyle ilişkili protein komplekslerinin araştırılmasında başarıyla

uygulanmıştır (92–95). Yöntem, önceden belirlenmiş birkaç adayla sınırlı kalmadan hedef proteinle aynı kompleks içerisinde bulunan çok sayıda proteinin tanımlanmasına olanak sağlamaktadır. Ayrıca IP-MS'in önemli avantajlarından biri, düşük bolluktaki protein etkileşimlerini dahi saptayabilmesidir (90). IP-MS analizinde IP ile elde edilen proteinler proteolitik enzimlerle peptitlere ayrılmakta, sıvı kromatografisiyle ayrıştırılmakta ve ardışık kütle spektrometrisiyle analiz edilmektedir. Elde edilen peptit fragmentasyon verileri protein veri tabanlarıyla karşılaştırılarak örnekte bulunan proteinler tanımlanmakta; etiketsiz kantitatif analizlerde ise deney ve kontrol gruplarındaki göreceli protein bollukları peptit sinyal yoğunlukları üzerinden karşılaştırılabilmektedir (90).

İmmün çöktürme ile belirlenen protein etkileşimlerinin doğrulanmasında kullanılan yaklaşımlardan biri ters yönlü immün çöktürme (*reverse Co-IP*) yöntemidir (96). Bu yaklaşımda başlangıçta hedef protein için kullanılan antikor yerine, etkileşim gösterdiği düşünülen aday proteine karşı geliştirilen antikor kullanılarak immün çöktürme gerçekleştirilir ve hedef proteinin birlikte çöküp çökmediği değerlendirilir. Protein etkileşimlerinin her iki yönden doğrulanması amacıyla ise karşılıklı (*reciprocal*) *Co-IP* yaklaşımı uygulanabilir. Bu yaklaşımda hem hedef protein hem de aday protein antikorları kullanılarak gerçekleştirilen immün çöktürme deneyleriyle etkileşimin karşılıklı olarak doğrulanması amaçlanır (96). Böylece immün çöktürme ve kütle spektrometrisi analizleriyle belirlenen aday protein etkileşimleri daha güvenilir biçimde doğrulanabilmektedir (97).

Afinite saflaştırması (*affinity purification- AP*) sırasında bazı proteinler hedef proteinle özgül bir etkileşim kurmaksızın boncuklara, antikora veya diğer deney bileşenlerine bağlanarak özgül olmayan arka plan sinyali oluşturabilmektedir (98). CRAPome çalışmasında keratinler, aktin ve tübülün gibi hücre iskeleti proteinleri, ribozom proteinleri, translasyon faktörleri, histonlar ve şaperon özellikli proteinlerin negatif kontrol deneylerinde sık saptanabildiği gösterilmiştir (98). CRAPome, farklı AP-MS çalışmalarına ait negatif kontrol sonuçlarını bir araya getirerek aday proteinlerin arka plan bağlanma sıklıklarının değerlendirilmesine ve olası özgül olmayan etkileşimlerin puanlanmasına olanak sağlayan bir veri kaynağıdır (98).

2.9. RNA Metabolizmasıyla İlişkili Nükleer Protein Ağları

RNA polimeraz II tarafından sentezlenen pre-mRNA molekülleri; olgunlaşma sürecinde 5' uç *capping*, kırpılma ve 3' uç kesimi ve poliadenilasyon basamaklarından geçmektedir (99). Olgunlaşan mRNA molekülleri, proteinlerle bir araya gelerek oluşturdıkları haberci ribonükleoprotein (mRNP) kompleksleri halinde, nükleer por kompleksi (NPC) aracılığıyla sitoplazmaya taşınır (100). Aslında mRNA'lar, daha transkripsiyon aşamasından itibaren çok sayıda RNA bağlayıcı proteinler ve RNA metabolizmasında görev alan proteinlerle birlikte paketlenmeye başlar. Bu komplekslerin yapısı mRNA'nın işlenmesi ve çekirdekten sitoplazmaya taşınması boyunca dinamik olarak değişir (100).

RNA molekülleri yalnızca genetik bilginin aktarılmasında görev alan ara ürünler değil, aynı zamanda çekirdek içerisinde çok sayıda proteinin bir araya gelmesini sağlayan yapısal ve düzenleyici bileşenler olarak da işlev görebilmektedir. Özellikle pre-mRNA, uzun kodlamayan RNA'lar (*lncRNA*) ve diğer nükleer RNA türleri; RNA bağlayıcı proteinler, transkripsiyon faktörleri, kromatin düzenleyici proteinler ve RNA işlenmesinde görev alan çok sayıda faktörün aynı moleküler kompleks içerisinde bir araya gelmesine aracılık edebilmekte, birden fazla protein için bağlanma bölgeleri sağlayarak bu komplekslerin oluşumunda yapısal bir iskele (*scaffold*) görevi de üstlenebilmektedir (101). Bu nedenle çekirdek içindeki bazı protein-protein etkileşimleri doğrudan gerçekleşirken, bazıları ortak bir RNA molekülü üzerinden dolaylı olarak kurulmaktadır. RNA'nın bu tür çok proteinli komplekslerin oluşumu ve kararlılığındaki rolü, kromatin organizasyonu, transkripsiyon, RNA işlenmesi ve nükleositoplazmik taşınma gibi birçok düzenleyici süreç açısından önem taşımaktadır (100,102).

Protein komplekslerinde RNA'nın yapısal katkısının değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan yaklaşımlardan biri, hücre lizati veya saflaştırılmış protein komplekslerinin ribonükleaz (RNaz) ile işlenmesidir (103) RNaz uygulaması sonucunda RNA aracılığıyla bir arada tutulan protein komplekslerinin tamamen veya kısmen dağılması, ilgili etkileşimlerin RNA aracılı olabileceğini düşündürmektedir. Buna karşılık protein-protein etkileşimlerinin RNaz uygulamasından etkilenmemesi, etkileşimin doğrudan proteinler arasında gerçekleştiğine işaret edebilir (93,103)

Bununla birlikte RNaz uygulaması sonrasında gözlenen değişiklikler, RNA'nın yalnızca fiziksel bir köprü görevi görmesinden değil, protein komplekslerinin konformasyonunu veya kararlılığını etkilemesinden de kaynaklanabileceğinden, bu yaklaşım tek başına doğrudan RNA bağlanmasının kesin kanıtı olarak değerlendirilmemelidir (104). Bu nedenle RNaz duyarlılık analizleri, protein komplekslerinde RNA'nın katkısını araştırmaya yönelik tamamlayıcı deneysel yaklaşımlar arasında yer almaktadır.

2.9.1. HNRNPU ve HNRNPA2B1

Heterojen nükleer ribonükleoprotein U (HNRNPU) veya diğer adıyla *Scaffold Attachment Factor A* (SAF-A), nükleer matrisle ilişkili olup hem DNA hem de RNA bağlama yeteneğine sahip bir proteindir (102). Literatürdeki çalışmalar, HNRNPU'nun DNA ve RNA için farklı bağlanma domeinleri içerdiğini ve hücre içinde her iki nükleik asit türüyle de eş zamanlı etkileşime girebildiğini ortaya koymuştur (102). Örneğin, HNRNPU'nun RNA bağlama özelliğinin, uzun kodlamayan bir RNA olan *Xist* (*X-inactive specific transcript*) molekülünün işlevsiz X kromozomu üzerinde tutulması için elzem olduğu bildirilmiştir (105). Bunun yanı sıra, fare hepatositlerinde gerçekleştirilen HNRNPU *KO* çalışmaları; kromatin kompartmanlarında, topolojik ilişkili domeinlerin (*TAD*) sınırlarında ve uzun mesafeli kromatin etkileşimlerinde belirgin değişimlere yol açtığını göstermiştir (106). Bu veriler bir bütün olarak değerlendirildiğinde HNRNPU, üç boyutlu genom mimarisinin korunmasında kritik rol oynayan yapısal bir nükleer matris bileşeni olarak öne çıkmaktadır (106). Ayrıca, HNRNPU'nun DNA, RNA ve çeşitli nükleer proteinlerle eş zamanlı etkileşebilmesi, HNRNPU'nun çekirdek içerisinde kromatin ve ribonükleoprotein komplekslerinin uzaysal organizasyonuna katkı sağlayan yapısal bir iskele (scaffold) işlevi görebileceğini düşündürmektedir (107,108).

Heterojen nükleer ribonükleoprotein ailesinin bir diğer üyesi olan heterojen nükleer ribonükleoprotein A2/B1 (HNRNPA2B1) ise temel olarak RNA bağlayıcı bir protein olarak işlev görür (109). HNRNPA2B1'in N^6 -metiladenozin (m^6A) modifikasyonu içeren nükleer RNA moleküllerine bağlandığı, bazı birincil mikroRNA'ların (*pri-miRNA*) işlenmesine katkıda bulunduğu ve alternatif kırılma süreçlerini düzenlediği gösterilmiştir (109). Arsenit ile oluşturulan hücresel stres

koşullarında HNRNPA2B1'in stres granülleriyle ilişkili olduğu ve bu granüllerin parçalanma dinamiklerini etkilediği gösterilmiştir (110).

2.9.2. DDX5

Diğer adıyla p68 olarak da bilinen *DEAD-box helikaz 5* (DDX5), DDX17 ile aynı alt ailede yer alan ATP bağımlı bir DEAD-box RNA helikazıdır (111). Bu doğrultuda DDX5/Dbp2 alt ailesi üyeleri, temel olarak RNA ve ribonükleoprotein (RNP) komplekslerinin yapısal olarak yeniden düzenlenmesinden sorumlu moleküllerdir (111). Literatürdeki çalışmalar DDX5'in öncül mRNA (pre-mRNA) işlenmesi, alternatif kırılma (*alternative splicing*), mikroRNA (miRNA) olgunlaşması, ribozom biyogenezi ve transkripsiyonla ilişkili düzenleme gibi oldukça geniş bir hücresel süreç yelpazesinde aktif görevler üstlendiğini ortaya koymuştur (111).

DDX5 ile yakın homologu olan DEAD-box helikaz 17 (DDX17)'nin, hücresel farklılaşma esnasında transkripsiyon, mikroRNA işlenmesi ve alternatif kırılma programlarını eş güdümlü olarak düzenlediği gösterilmiştir (112). Yapılan bir çalışmada, DDX5 ve DDX17'nin, heterojen nükleer ribonükleoprotein H/F (hnRNP H/F) proteinleri ile iş birliği yaparak miyoblastlara özgü alternatif kırılma programlarının yürütülmesinde birlikte rol aldığı gösterilmiştir (112). Aynı çalışmada, miyojenik farklılaşma sürecinde DDX5 ve DDX17 ekspresyon seviyelerindeki düşüşün, alternatif kırılma profilindeki karakteristik değişimlerle doğrudan ilişkili olduğu belirlenmiştir. Bu bulgular DDX5 ve DDX17'nin, miyojenik farklılaşma sırasında gen ifadesi ile RNA işleme mekanizmaları arasındaki koordinasyonu sağlayan işlevsel köprüler olduğunu göstermektedir (112).

2.9.3. KHDRBS1 (SAM68)

KHDRBS1 (*KH RNA Binding Domain Containing, Signal Transduction Associated 1*), diğer adıyla SAM68, KH domeini içeren RNA bağlayıcı bir proteindir. Alternatif kırılma, RNA metabolizması, transkripsiyonun düzenlenmesi ve sinyal iletimi gibi çok sayıda hücresel süreçte görev almaktadır. SAM68'in miyojenik farklılaşma sırasında alternatif kırılma programlarının düzenlenmesine katkıda bulunduğu ve çeşitli transkripsiyon faktörleriyle birlikte çalıştığı gösterilmiştir. Bunun

yanında kromatin düzenleyici kompleksler ve RNA işleme mekanizmaları arasında işlevsel bağlantılar kurabildiği bildirilmektedir (113).

2.9.4. EEF1A1

Ökaryotik translasyon uzama faktörü 1 alfa 1 (EEF1A1)'in temel görevi, translasyon uzaması sırasında aminoasit-tRNA moleküllerini GTP'ye bağımlı olarak ribozoma taşımaktır (114). Hücrelerde yüksek bollukta bulunan bu faktör, ayrıca F-aktin ve β -aktin mRNA'sına eş zamanlı bağlanarak β -aktin mRNA'sının hücre çıkıntılarında konumlandırılmasına katkıda bulunur (114).

AP-MS deneylerinde bazı proteinler boncuklara, afinite reaktiflerine veya diğer matris bileşenlerine özgül olmayan şekilde bağlanarak arka plan sinyali oluşturabilmektedir (98). Negatif kontrol örneklerinde sık saptanan bu arka plan proteinlerinin değerlendirilmesi amacıyla CRAPome veri tabanı geliştirilmiştir (98). Bazı nicel etkileşim proteomiği çalışmalarında EEF1A1, CRAPome'da bulunması nedeniyle arka plan değerlendirmesine alınan proteinlerden biri olarak bildirilmiştir (115). Bununla birlikte EEF1A1'in yüksek bollukta bulunan veya CRAPome'da yer alan bir protein olması, belirli bir IP-MS deneyinde mutlaka özgül olmayan bir kontaminant olduğu anlamına gelmez; deneysel negatif kontrollerdeki düzeyi ayrıca değerlendirilmelidir (98,115).

2.10. Proteomik Verilerde Aday Proteinlerin Önceliklendirilmesi

IP-MS analizlerinde aday proteinlerin değerlendirilmesi, yalnızca deney örneğinde saptanmış olmalarına veya tek bir ölçüte dayandırılmamalıdır. Deney ve negatif kontrol grupları arasındaki nicel zenginleşme, istatistiksel anlamlılık, peptit ve spektral sayım düzeyindeki kanıt, tekrarlar arasındaki tutarlılık ve proteinin kontrol deneylerinde görülme sıklığı birlikte değerlendirilebilmektedir (116,117). Bu ölçütlerin birlikte kullanılması, özgül olarak zenginleşen adayların arka plan bağlayıcılarından ayrılmasına ve deneysel doğrulama için önceliklendirilmesine katkı sağlamaktadır (116,117).

Farklı ölçüm birimlerine ve dinamik değer aralıklarına sahip değişkenlerin tek bir birleşik skor (*composite score*) altında doğrusal olarak birleştirilebilmesi için öncelikle ortak bir ölçeğe indirgenmeleri gerekmektedir (118). Bu doğrultuda min–

maks normalizasyonu, her değişkenin önceden belirlenmiş bir aralığa (genellikle 0–1) dönüştürülmesini sağlarken; eşit ağırlıklandırma stratejisi, her bir ölçütün nihai birleşik skora eşit oranda katkıda bulunmasını sağlar (118). Birleşik skorlama sonucunda elde edilen aday sıralamalarının seçilen ağırlık katsayılarından doğrudan etkilenebilmesi nedeniyle, farklı ağırlıklandırma senaryolarının karşılaştırılması, oluşturulan sıralamanın sağlamlığının (*robustness*) ve kararlılığının değerlendirilmesinde yararlı bir yaklaşımdır (118). Birleşik skorlar istatistiksel anlamlılığın yerine geçen testler değil, birden fazla kanıtı bir araya getirerek adayları sıralamaya yönelik araçlardır (118).

Proteinlerin örnekler arasındaki birlikte değişim örüntüleri korelasyon analiziyle değerlendirilebilmektedir. Pearson korelasyon katsayısı iki değişken arasındaki doğrusal ilişkiyi, Spearman korelasyon katsayısı ise sıralamalara dayalı monoton ilişkiyi ölçmektedir (85). Proteomik bolluk değerlerinin geniş ve çarpık bir dağılım göstermesi durumunda, istatistiksel analizlerden önce logaritmik dönüşüm uygulanabilmektedir (119). Çok sayıda protein çifti için ayrı testlerin gerçekleştirilmesi yanlış pozitif sonuç olasılığını artırdığından, Benjamini–Hochberg yöntemi yanlış keşif oranını kontrol etmek amacıyla kullanılmaktadır (120). Bununla birlikte, korelasyon analizi protein bolluklarının birlikte değişimini göstermekle birlikte, proteinlerin aynı kompleks içinde bulunduğunu veya aralarında doğrudan bir etkileşim olduğunu tek başına kanıtlamamaktadır (85).

2.11. Tez Çalışmasının Temel Aldığı Hipotez ve Amaçlar

Mevcut literatür birlikte değerlendirildiğinde, Desmin’in yalnızca sitoplazmik bir ara filament proteini olmadığı; çekirdekte yer alarak transkripsiyon faktörleri ve kromatin düzenleyici proteinleri içeren komplekslere katılabileceği, bu yolla kromatin organizasyonu ve gen ifadesinin düzenlenmesiyle doğrudan veya dolaylı olarak ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Bu doğrultuda tez çalışmasının temel hipotezi, Desmin’in iskelet kası hücrelerinde çekirdek içi protein komplekslerine katılarak kromatinle ilişki kurabileceği ve gen düzenleyici süreçlere katkıda bulunabileceği yönünde oluşturulmuştur. Hipotezin ilk olarak belirli bir genomik bölge üzerinden sınanması amacıyla, kardiyak progenitör hücrelerde Desmin ile ilişkisi daha önce bildirilmiş olan *Nkx2.5*, hedef gen olarak seçilmiştir. Bu kapsamda öncelikle *Nkx2.5*

ifadesinin C2C12 hücrelerinde doğrulanması, ardından Desmin kromatin immünopresipitasyonu ile *Nkx2.5* düzenleyici bölgesinde olası Desmin zenginleşmesinin araştırılması hedeflenmiştir.

C2C12 hücrelerinde *Nkx2.5* ifadesinin güvenilir ve özgül biçimde doğrulanamaması nedeniyle temel hipotez değiştirilmemiş, yalnızca bu hipotezi değerlendirmek için kullanılan araştırma stratejisi yeniden düzenlenmiştir. Belirli bir hedef gen bölgesinden hareket etmek yerine, Desmin'in nükleer etkileşim ortaklarının tanımlanmasına yönelinmiştir. Bu stratejinin temelinde, Desmin ile ilişkili transkripsiyon faktörlerinin, kromatin düzenleyicilerinin veya diğer nükleer proteinlerin belirlenmesi durumunda, bu proteinlerin bilinen işlevleri üzerinden Desmin–kromatin ilişkisinin daha sonra hedefe yönelik çalışmalarla araştırılabileceği düşüncesi yer almaktadır. Bu çerçevede, nükleer Desmin etkileşim ağının aydınlatılmasıyla Desmin'in hangi düzenleyici yollarla ilişkili olabileceğinin belirlenmesi ve kromatin çalışmalarında kullanılabilecek daha uygun hedef bölgelerin ortaya çıkarılması amaçlanmıştır. Bu strateji değişikliği, Desmin'in kromatinle olası ilişkisini araştırarak ana amacı koruyarak, hedef bölge odaklı yaklaşımdan protein ortağı keşfine dayalı bir yaklaşıma geçilmesini ifade etmektedir.

Bu doğrultuda çalışmanın temel amacı, Desmin'in iskelet kası hücrelerindeki nükleer etkileşim ortaklarını belirlemek ve bu ortakların işlevlerinden hareketle Desmin'in kromatin organizasyonu, gen düzenlenmesi ve diğer nükleer süreçlerle ilişkili olası moleküler mekanizmaların ve biyolojik yolların aydınlatılmasına katkıda bulunmaktır.

3. GEREÇ ve YÖNTEMLER

3.1. Gereçler

3.1.1. Hücre kültürü

- Ölümsüzleştirilmiş insan iskelet miyoblast hücre hattı LHCN-M2 (*Applied Biological Materials* kat# T0756)
- Fare iskelet kası hücre hattı (C2C12) (ATCC)
- *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, (DMEM), *high glucose* (Capricorn Scientific kat# DMEM-HPSTA)
- *Medium-199* (Capricorn Scientific)
- *Fetal Bovine Serum* (FBS) (Capricorn Scientific kat# M199-A)
- At serumu (Biowest kat# S0910)
- İnsülin (Sigma-Aldrich kat# 91077C)
- Fetuin (Sigma-Aldrich kat# F2379)
- *Human Epidermal Growth Factor* (hEGF) (Gibco kat# PHG0311)
- *Basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF) (Gibco kat# PHG0024)
- Deksametazon (Sigma-Aldrich kat# D4902)
- Amfoterisin B (Biowest kat# P4030)
- Penisilin/streptomisin (Biowest kat# L0018)
- 1x Tripsin-EDTA (Capricorn Scientific kat# TRY-3B)
- *Phosphate Buffered Saline* (PBS) (Invitrogen kat# 00-3002)
- Dimetilsülfoksit (DMSO) (Santa Cruz kat# sc-202581)

3.1.2. Protein İzolasyonu ve Miktar Tayini

- 1X Tripsin-EDTA (Capricorn)
- NE-PER Nükleer ve Sitoplazmik Ekstraksiyon Kiti (*Thermo Fisher Scientific* kat#78833)* ile Fraksinasyon İşlemi:
- CER I (*Cytoplasmic Extraction Reagent I*)

- CER II (*Cytoplasmic Extraction Reagent II*)
- NER (*Nuclear Extraction Reagent*)
- 25x Proteaz inhibitörü (*Thermo Fisher Scientific* kat# 88266)

*Üretici protokolüne uygun olarak uygulanmıştır.

- Soğutmalı santrifüj (+4°C) (*Eppendorf* kat# 5430 R)
- *Pierce™ BCA (Bicinchoninic Acid) Protein Assay Kit* (ThermoFisher Scientific kat# 23225)
- *SPECTRA max M2* (Molecular Devices Ref# MD-M5)

3.1.3. RNA İzolasyonu ve *Complementary DNA* (cDNA) Sentezi

- Trizol (AppliChem kat# A4051)
- Soğutmalı santrifüj (+4°C) (*Eppendorf* kat# 5430 R)
- Nanodrop spektrofotometre (*Thermo Fischer Scientific* Ref# ND-1000)
- High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems kat# 4368814)

3.1.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

- PCR kit (*Procomcure Biotech* kat# PCCSKU1001)
- dNTP mix (GeneAll kat# 509-020)
- *Forward/reverse primer*, 10 mM (Bioligo Biyoteknoloji Araştırma ve Geliştirme Şirketi)
- *SimpliAmp Thermal Cycler* (Applied Biosystems Ref# A24812)
- Primer Bilgileri 10 mM (Bioligo Biyoteknoloji Araştırma ve Geliştirme Şirketi):
- Forward Primer1: CCCAAGTGCTCTCCTGCTTT
- Reverse Primer1: CATCCGTCTCGGCTTTCTCC (ürün uzunluğu: 148 bp)
- Forward primer 2: AAGTGCTCTCCTGCTTTCCC;
- Reverse Primer2: ACTTGTAGCGACGGTTCTGG (ürün uzunluğu 337 bp)
- Forward primer 3: GGCCTCGGGGACTTGAACACC

- Reverse primer 3: CGCACTCACTTTAATGGGAAG (ürün uzunluğu: 440 bp)

3.1.5. qPCR

- GoTaq qPCR 2x Master Mix (Promega kat# A6001)
- Rotor-Gene 6000 (Corbett Life Science)

3.1.6. Agaroz Jel Elektroföresi

- Agaroz (Condalab kat# 8100.11)
- 1x Tris-asetat-*Ethylene diamine tetra acetic acid* (EDTA) tamponu, pH 8,0
- 6x yükleme boyası-*Orange G*
- EtBr (Etidyum bromür) (*Sigma*)
- *DNA ladder* (100 bp) (GeneDireX kat# DM003-R500)

3.1.7. İmmün Çöktürme (IP)

- Manyetik tüplük (*New England BioLabs*)
- Protein A/G manyetik boncuklar (*Pierce™, Thermo Scientific*)
- *Dynabeads* Protein G Boncukları (*Invitrogen, Thermo Scientific*)
- *Co-IP* Tamponu (pH 7.4) içeriği:
 - Tris-HCl: 0.1 M
 - NaCl: 0.15 M
 - EGTA: 1 mM
 - NP-40: %1
 - Gliserol: %5
 - MgCl₂: 0.01 M
 - SDS: %2
- Proteaz inhibitör tableti (Roche)
- *Laemmli* Yükleme Tamponu (2X) içeriği:

- o SDS: %4
- o Gliserol: %20
- o Tris-HCl (pH 6.8): 120 mM
- o dH₂O: 2.8 mL
- o Brom-fenol mavisi: %0.02
- *Grant Bio* PTR 25 mini döngü
- Tavşan poliklonal anti-Desmin antikoru (Sigma, d8281)
- Keçi serumundan IgG (negatif kontrol) (SIGMA, I5256)
- Tavşan poliklonal anti-LAP2 (TMPO) antikoru (Abcam, kat#5162)
- Tavşan monoklonal anti-DDX5 antikoru (Abcam, ab26730)
- Clean-blot IP Detection Regagent (HRP) (Thermo Fisher Scientific, kat#21230)

3.1.8. Western Blot (WB) Analizi

- %40 Akril-bisakril (Akrilamid: Sigma-Aldrich kat# A9099, Bisakrilamid Applichem kat# A1096-0250)
- SDS (Merck Millipore kat# 8.17034)
- Amonyum persülfat (APS) (Sigma-Aldrich kat# 16531JH)
- N, N, N', N'-tetrametil etilendiamin (TEMED)
- Tris-baz (Amresco-Avantor Science Central kat# MDTC61-233-RR)
- Glisin (Sigma-Aldrich kat# G7126)
- Metanol (Merck Millipore kat# 106009)
- *Mini Protean* II elektroforez seti (Bio-Rad)
- *BLUeye Prestained Protein Ladder* (GeneDireX kat# PM007-0500)
- Yarı kuru elektroforetik transfer cihazı (Bio-Rad, TransBlot Turbo Transfer System)
- Nitro selüloz membran (0,45 µm) (Thermo Scientific)

- Polyvinylidene difluoride (PVDF) membran (0,45 µm kalınlığında) (Sigma-Aldrich kat# IPVH00010)

- Ponceau S çözeltisi (Thermo Scientific kat# P7170)
- Tween-20 (ISO-LAB Chemicals kat# 960,151)
- Yağsız Süt Tozu (Pinar)
- Whatman filtre kağıdı
- GeneGnome5 kemilüminesans görüntüleme sistemi (Syngene Ref# ELE2116)

Yürütme Tamponu (pH 8,3)

- Tris baz: 3,03 g
- Glisin: 14,4 g
- SDS: 1 g
- Distile su: 1 L

Yarı Kuru Transfer Tamponu (pH 8,3)

- Tris baz: 25 mM
- Glisin: 192 mM
- Metanol: %20
- Distile su
- Coomassie Blue Çözeltisi
- Coomassie Brilliant Blue R-250: %0,025
- Metanol: %40
- Glasiyal asetik asit: %7

Yıkama Tamponu (1X TBS-T, pH 7,4)

- Trizma baz: 48 mM
- NaCl: 154 mM
- Tween-20: %0,1
- Distile su

Bloklama Tamponu:

- Yağsız süt tozu: %5
- TBS-T: %0,2

Primer Antikorlar:

- Tavşan poliklonal Anti-Desmin (Sigma, D8281) 1/1000
- Keçi poliklonal Anti-Emerin (Santa Cruz, sc-25284) 1/2000
- Fare monoklonal Anti-GAPDH (MAB5718) 1/3000
- Tavşan poliklonal Anti-SMYD1 (Abcam, ab181372) 1/3000
- Keçi poliklonal Anti-Lamin B1 (Santa Cruz, sc6216) 1/3000
- Fare monoklonal Anti-Hsp60 (4B9/89) 1/500
- Tavşan poliklonal anti-LAP2 (TMPO) antikoru (Abcam, kat#5162)
- 1/2500 • Tavşan monoklonal anti-DDX5 antikoru (Abcam, ab26730) 1/10000

Sekonder Antikorlar:

- Keçi Anti-Fare IgG (H+L) (G21040) 1/2000
- Keçi Anti-Keçi IgG (H+L) (A16054) 1/3000
- Keçi Anti-Tavşan IgG (H+L) (G21234) 1/5000

Substrat:

- SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate
(Thermo Scientific)

3.2. Yöntem

3.2.1. Hücre Kültürü ve Miyojenik Farklılaştırma

Fare kökenli C2C12 miyoblastları ile ölümsüzleştirilmiş insan iskelet kası miyoblast hücre hattı LHCN-M2, 37 °C sıcaklıkta ve %5 CO₂ içeren nemlendirilmiş inkübatör koşullarında kültüre edilmiştir.

LHCN-M2 hücrelerinin çoğaltılmasında kullanılan büyüme ortamı, yüksek glikoz içeren DMEM ile Medium-199'un 4:1 oranında birleştirilmesiyle hazırlanmıştır. Bu bazal ortama %20 FBS, 25 µg/mL fetuin, 0,5 ng/mL bFGF, 5 ng/mL hEGF, 0,2 µg/mL deksametazon, 5 µg/mL insülin ve %1 penisilin/streptomisin

eklenmiştir. C2C12 hücrelerinin büyüme ortamında ise yüksek glikozlu DMEM, %10 FBS ve %1 penisilin/streptomisin kullanılmıştır.

Kültür yüzeyinin yaklaşık %85–90'ı hücrelerle kaplandığında, miyojenik farklılaşmanın başlatılması amacıyla büyüme ortamı uzaklaştırılmış ve hücreler düşük serum içeren farklılaşma ortamına geçirilmiştir. Her iki hücre hattı için farklılaşma ortamı; yüksek glikozlu DMEM, %2 at serumu ve %1 penisilin/streptomisin içerecek biçimde hazırlanmıştır. Farklılaşma sürecinde ortaya çıkan hücresel ve morfolojik değişiklikler ışık mikroskobu altında düzenli olarak izlenmiştir.

C2C12 hücrelerine ait örnekler RNA analizlerinde kullanılmak üzere farklılaşma ortamına geçiş öncesinde miyoblast evresinde ve farklılaşmanın belirlenen günlerinde toplanmıştır (D0, D1, D2 ve D3). Protein deneylerinde kullanılmak üzere toplanan LHCN-M2 hücreleri, miyoblast evresindeyken izolasyon yapılmıştır. C2C12 hücrelerinde gerçekleştirilen nükleer protein izolasyonu ve immünopresipitasyon deneyleri için, araştırma grubumuzun önceki çalışmasında Desmin ile DAPI sinyalleri arasındaki en yüksek eş yerleşimin farklılaşmanın 28. saatinde belirlenmiş olması dikkate alınmıştır. Bu doğrultuda C2C12 hücreleri, farklılaşma ortamına alındıktan 28 saat sonra toplanarak protein izolasyonunda kullanılmıştır.

Uzun süreli saklama için hücreler, FBS ve DMSO'nun sırasıyla %90 ve %10 oranlarında bulunduğu dondurma ortamında süspanse edilmiştir. Hazırlanan hücre süspansiyonu kriyotüplere dağıtılmış ve dondurma işleminin ardından tüpler –196 °C'deki sıvı azot tankına aktarılmıştır.

3.2.2. Toplam RNA İzolasyonu ve Kalite Kontrolü

C2C12 hücrelerinde gen ifade analizlerinde kullanılacak toplam RNA, TRIzol reaktifi kullanılarak fenol-kloroform esaslı yöntemle izole edilmiştir. Hücreler kültür kabında 1× PBS ile yıkandıktan sonra her örneğe 1 mL TRIzol eklenmiş ve hücrelerin tamamen parçalanması sağlanmıştır.

Faz ayrımını başlatmak için lizatlara, kullanılan TRIzol hacminin beşte biri kadar kloroform eklenmiştir. Tüpler karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 3 dakika bekletilmiş ve 4 °C'de 13.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj

sonrasında RNA'yı içeren üst sulu faz, ara faza temas edilmeden RNaz içermeyen yeni tüplere alınmıştır.

Sulu fazdaki RNA, her örneğe 500 µL izopropanol eklenerek çöktürülmüştür. Örnekler oda sıcaklığında 10 dakika bekletildikten sonra 4 °C'de 13.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda oluşan RNA pelletine zarar vermeden süpernatant uzaklaştırılmıştır.

RNA pelletleri 1 mL %70 etanol ile yıkandıktan sonra örnekler 4 °C'de 7.500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Etanolün uzaklaştırılmasını takiben tüpler, pelletlerin aşırı kurumasına izin verilmeden, kalan etanolün buharlaşması için yaklaşık 15 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Her RNA pelleti 15 µL nükleaz içermeyen su içerisinde çözülmüş ve çözünmenin tamamlanması amacıyla örnekler 1 saat buz üzerinde tutulmuştur.

İzolasyon sonunda RNA miktarı ve saflığı NanoDrop spektrofotometre ile belirlenmiştir. Saflık değerlendirmesinde 260 ve 280 nm dalga boylarında ölçülen absorbans değerlerinden hesaplanan A260/A280 oranı kullanılmıştır. Miktar ve saflık bakımından uygun bulunan RNA örnekleri cDNA sentezine alınmıştır.

3.2.3. cDNA Sentezi

cDNA sentezi, *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Her örnek için toplam reaksiyon hacmi 20 µL olacak şekilde hazırlanmıştır. Reaksiyon karışımı; 2 µL 10× RT Buffer, 0,8 µL 25× dNTP Mix, 2 µL 10× Random Primer, 1 µL *Reverse Transcriptase* ve 4,2 µL nükleaz-free sudan oluşan toplam 10 µL master mix içermiştir. Hazırlanan master mix PCR tüplerine dağıtılmış ve her tüpe 10 µL RNA örneği eklenmiştir.

cDNA sentezi termal döngü cihazında sırasıyla 25 °C'de 10 dakika, 37 °C'de 120 dakika ve 85 °C'de 5 dakika olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen cDNA örnekleri -20°C'de saklanmış ve PCR/qPCR analizlerinde kullanılmıştır.

3.2.4. Konvansiyonel PCR ve Primer Optimizasyonu

cDNA sentezinin ardından, *Nkx2.5* genine ait primerlerin optimizasyonu klasik PCR yöntemi ile yapılmıştır. Standart PCR reaksiyon karışımı toplam 15 µL hacimde

hazırlanmıştır. Her reaksiyon için 8 µL nükleaz-free su, 1,5 µL 10× PCR tamponu, 1,5 µL MgCl₂, 0,6 µL dNTP karışımı, 0,6 µL forward primer, 0,6 µL reverse primer, 0,12 µL Taq DNA polimeraz ve 2,08 µL cDNA örneği kullanılmıştır. Negatif kontrol reaksiyonlarında cDNA yerine nükleaz-free su eklenmiştir.

PCR optimizasyonu sürecinde, cDNA örneklerinin yanı sıra genomik DNA (gDNA) da kalıp olarak reaksiyona dahil edilmiştir. Genomik DNA kullanımı; primer çiftlerinin hedef bölgeyi çoğaltma verimliliğini belirlemek, olası gDNA kaynaklı amplifikasyonları izlemek ve primer özgüllüğünü test etmek amacıyla tercih edilmiştir. Bu sayede, cDNA örneklerinde elde edilen bantların doğrudan hedef transkriptte ait olup olmadığı, negatif kontrol ve genomik DNA reaksiyonlarından alınan sonuçlarla karşılaştırmalı olarak doğrulanmıştır. Optimizasyon sürecinde primer çiftine ve elde edilen bant profiline bağlı olarak primer bağlanma sıcaklığı, MgCl₂ konsantrasyonu, DMSO eklenmesi ve primer konsantrasyonu gibi parametreler değiştirilmiştir (Tablo 3.1.)

PCR reaksiyonları, başlangıç denatürasyonu (*initial denaturation*), döngüsel denatürasyon (*cycle denaturation*), primer bağlanması (*annealing*), uzama (*extension*), son uzama (*final extension*) ve bekletme (*hold*) basamaklarından oluşan termal döngü programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Başlangıç denatürasyonu 95 °C’de 4 dakika uygulanmıştır. Ardından amplifikasyon döngülerinde denatürasyon 95 °C’de 30 saniye, primer bağlanması 60 °C’de 30 saniye ve uzama 72 °C’de 30 saniye olacak şekilde yürütülmüştür. Döngülerin tamamlanmasının ardından son uzama basamağı 72 °C’de 2 dakika uygulanmış ve reaksiyon ürünleri 4 °C’de bekletilmiştir.

Tablo 3.1. *Nkx2.5* amplifikasyonu için PCR reaksiyon karışımı.

Reaktifler	Konsantrasyon	Hacim
10x Buffer	10x	1,5 µL
MgCl ₂	25 mM	1 µL
dNTP Mix (2,5 mM)	2,5 mM	0,6 µL
Forward Primer	10 µM	0,6 µL
Reverse Primer	10 µM	0,6 µL
Taq Polimeraz	5 U/µL	0,12 µL
Nükleaz içermeyen su	-	8,58 µL
DNA/cDNA (100 ng)	100 ng	2 µL
Toplam hacim		15 µL

3.2.5. Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR (qPCR)

Nkx2.5 ve *GAPDH* primer optimizasyonlarının ardından qPCR analizi gerçekleştirilmiştir. qPCR reaksiyonları toplam 10 µL hacimde hazırlanmıştır. Her bir reaksiyon için 5 µL GoTaq qPCR karışımı, 0,5 µL *forward primer* (10 µM), 0,5 µL *reverse primer* (10 µM), 3 µL nükleaz içermeyen su ve 1 µL seyreltilmiş cDNA örneği kullanılmıştır. Analizlerde *Nkx2.5* hedef gen olarak, *GAPDH* ise referans gen olarak değerlendirilmiştir. qPCR analizlerinde kullanılacak uygun kalıp cDNA miktarını belirlemek ve reaksiyon koşullarını *Nkx2.5* ile *GAPDH* primer çiftleri için standardize etmek amacıyla cDNA örnekleri 1:1, 1:10 ve 1:100 oranlarında hazırlanarak test edilmiştir. Bu değerlendirme sonucunda, her iki primer çifti için amplifikasyon performansı, Ct değerleri ve erime eğrisi profilleri birlikte incelenmiştir. En uygun koşullar deneylerde kullanılmıştır. Amplifikasyon 40 döngü boyunca yürütülmüş, her döngüde denatürasyon, primer bağlanması ve uzama basamakları uygulanmıştır. Başlangıç denatürasyonu 95 °C’de 4 dakika uygulanmıştır. 95 °C’de 30 saniye döngüsel denatürasyon, 60 °C’de 30 saniye primer bağlanması ve 72 °C’de 30 saniye uzama basamakları ile yürütülmüştür.

3.2.6. RNA-seq Veri İşleme ve Biyoinformatik Analiz

Desmin ile korelasyon gösteren genlerin belirlenmesi amacıyla NCBI SRA veri tabanından PRJNA328159 ve PRJNA89011 numaralı RNA-seq veri setleri seçilmiştir. Ham veriler *FastQC* ile kalite kontrolünden geçirilmiştir. Okumalar HISAT2 yazılımı kullanılarak GRCm38.p6 referans genomuna hizalanmıştır. Gen düzeyinde okuma sayıları *FeatureCounts* ile elde edilmiştir. Gen ifade değişimi analizi *DESeq2* paketi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Korelasyon katsayısı $\geq 0,90$ seçilmiştir. Desmin geni ile yüksek korelasyon gösteren genler Spearman korelasyon analizi ile belirlenmiştir. Elde edilen gen listeleri Gene Ontology analizine tabi tutulmuş ve biyolojik süreçler ile moleküler işlevler açısından sınıflandırılmıştır. Ayrıca Des ile yüksek korelasyon gösteren genlerin transkripsiyon faktörü veya transkripsiyonun düzenleyicisi olup olmadığı *AnimalTFDB* v4.0 veri tabanı kullanılarak sınıflandırılmıştır. Tüm RNA-seq biyoinformatik analizleri TÜBİTAK Türk Ulusal Bilim e-Altyapısı (TRUBA) üzerinde yürütülmüştür.

3.2.7. Nükleer ve Sitoplazmik Fraksiyonlama

Nükleer ve sitoplazmik fraksiyonlama deneyleri öncesinde, NE-PER kitinde kullanılacak tampon hacimlerinin belirlenmesi amacıyla hücre peleti hacmine dayalı optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Optimizasyon çalışmalarına öncelikle LHCN-M2 hücre hattında başlanmış, elde edilen uygun koşullar daha sonra C2C12 hücrelerine uygulanmıştır. Tampon hacimleri üretici firmanın önerileri doğrultusunda hücre peleti hacmi esas alınarak belirlenmiştir.

Nükleer ve sitoplazmik protein fraksiyonları, üretici firmanın önerileri doğrultusunda NE-PER *Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents* kiti kullanılarak elde edilmiştir. Hücreler ilk olarak $500 \times g$ 'de 5 dakika santrifüj edilerek pellet hâline getirilmiştir. Hücre pelleti PBS ile yıkanmış, süpernatant dikkatlice uzaklaştırılmış ve pellet mümkün olduğunca kuru bırakılmıştır. Pellet hacmine uygun miktarda buz soğukluğundaki *Cytoplasmic Extraction Reagent I* (CER I), üretici tarafından belirtilen hacim tablosuna göre eklenmiştir. Örnekler 15 saniye yüksek hızda vortexlenmiş ve 10 dakika buz üzerinde inkübe edilmiştir. Ardından, buz soğukluğundaki *Cytoplasmic Extraction Reagent II* (CER II) örnekler eklenmiş; örnekler 5 saniye vortexlenerek 1 dakika buz üzerinde bekletilmiş ve tekrar 5 saniye vortexlenmiştir. Daha sonra örnekler, 4°C 'de maksimum hızda yaklaşık $16.000 \times g$ 'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen üst faz sitoplazmik ekstrakt olarak önceden soğutulmuş yeni tüplere aktarılmıştır.

Santrifüj sonrası elde edilen pellet, nükleer fraksiyonun ekstraksiyonu amacıyla buz soğukluğundaki *Nuclear Extraction Reagent* (NER) içerisinde süspanse edilmiştir. Örnekler 15 saniye vortexlenmiş ve toplam 40 dakika boyunca buz üzerinde inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresince, her 10 dakikada bir örnekler 15 saniye vortex işlemi uygulanmıştır. İnkübasyon sonunda örnekler 4°C 'de maksimum hızda yaklaşık $16.000 \times g$ 'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Üst faz nükleer ekstrakt olarak önceden soğutulmuş yeni tüplere alınmıştır. Elde edilen sitoplazmik ve nükleer ekstraktlar analiz edilinceye kadar -80°C 'de saklanmıştır. Tüm fraksiyonlama işlemleri buz üzerinde gerçekleştirilmiş ve protein yıkımını önlemek amacıyla reaktiflere kullanım öncesinde $1 \times$ proteaz inhibitör kokteyli ilave edilmiştir.

3.2.8. BCA Protein Analizi

Hücre lizatlarından elde edilen örneklerin protein derişimleri, Pierce BCA Protein Assay Kit kullanılarak kolorimetrik olarak belirlenmiştir. Ölçümlerde standart eğrinin oluşturulması amacıyla sığır serum albümini esaslı altı farklı konsantrasyon ile protein içermeyen bir kör örnek hazırlanmıştır. Standart çözeltilerin hacimleri ve son konsantrasyonları Tablo 3.2.3'te sunulmuştur.

Ölçüm aralığına uygun absorbans değerleri elde edebilmek amacıyla bilinmeyen protein örnekleri %1 SDS ile 1:10 oranında seyreltilmiştir. Standartlar, kör örnek ve seyreltilmiş protein örnekleri 96 kuyucuklu plakaya üçer teknik tekrar hâlinde aktarılmıştır.

BCA çalışma çözeltisi, kit içerisinde bulunan A ve B reaktiflerinin 50:1 hacim oranında birleştirilmesiyle taze olarak hazırlanmıştır. Her kuyucuğa 200 µL çalışma çözeltisi eklenmesinin ardından plaka 600 rpm'de 30 saniye çalkalanmış ve renk gelişimi için 37 °C'de 30 dakika bekletilmiştir.

İnkübasyon tamamlandıktan sonra kuyucukların absorbansı *SpectraMax* cihazında 560 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Bilinmeyen örneklerin protein konsantrasyonları, BSA standartlarına ait absorbans değerlerinden oluşturulan standart eğri üzerinden hesaplanmış ve başlangıçtaki seyreltme katsayısı dikkate alınarak düzeltilmiştir.

Tablo 3.2 BCA Analizi için standart çözeltilerin hazırlanışı.

	BSA Standart (Sığır serum albümini)	%1 SDS	Son Konsantrasyon
	Blank	50 µL	
Standart 1	100 µg/mL _ _	47,5 µL	2,5 µL
Standart 2	200 µg/mL	45 µL	5 µL
Standart 3	500 µg/mL	37,5 µL	12,5 µL
Standart 4	800 µg/mL _ _	30 µL	20 µL
Standart 5	1200 µg/mL	20µL	30 µL
Standart 6	2000 µg/mL _	-	50 µL

3.2.9. SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE) ve Western Blot Analizi

Protein örneklerinin moleküler ağırlıklarına göre ayrılması ve hedef proteinlerin ifade düzeylerinin belirlenmesi amacıyla sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektrofrez (SDS-PAGE) ve WB analizleri gerçekleştirilmiştir. Elektrofrez uygulamalarında %12'lik ayırıcı jel ve %5'lik toplayıcı jel kullanılmıştır.

Jel ve Tampon Çözeltilerin Hazırlanması

Proteinlerin elektroforetik olarak ayrılması amacıyla %12 ayırıcı jel ile %5 toplayıcı jel hazırlanmıştır. Ayırıcı jel çözeltisi; 3 mL %40 akrilamid/bisakrilamid, 3 mL 1,5 M Tris-HCl tamponu (pH 8,8), 120 µL %10 SDS ve 5,1 mL distile su bir araya getirilerek hazırlanmıştır. Jel polimerizasyonunun başlatılması için karışıma dökümden hemen önce 120 µL %10 amonyum persülfat ve 12 µL TEMED eklenmiştir.

Toplayıcı jel hazırlanırken 0,5 mL %40 akrilamid/bisakrilamid çözeltisi, 1,25 mL 1 M Tris-HCl tamponu (pH 6,8), 50 µL %10 SDS ve 3,1 mL distile su kullanılmıştır. Bu çözeltiye polimerizasyon öncesinde 50 µL %10 APS ile 5 µL TEMED ilave edilmiştir. APS ve TEMED'in eklenmesinin ardından jel çözeltileri, polimerizasyon başlamadan gecikmeksizin döküm işleminde kullanılmıştır.

Jel dökümünde kullanılacak cam plakalar öncelikle %70 etanol ile temizlenmiş, kurutulmuş ve *Mini-PROTEAN II* dikey elektrofrez sisteminin döküm aparatına yerleştirilmiştir. Hazırlanan ayırıcı jel çözeltisi, toplayıcı jel için yeterli hacim bırakılacak şekilde cam plakalar arasına aktarılmıştır. Ayırıcı jelin üst yüzeyinin düz biçimde oluşması ve oksijenle temasının sınırlandırılması amacıyla jel çözeltisinin üzerine izopropanol eklenmiştir. Polimerizasyonun tamamlanmasının ardından izopropanol uzaklaştırılmış ve jel yüzeyi distile su ile temizlenmiştir. Daha sonra toplayıcı jel çözeltisi ayırıcı jelin üzerine dökülmüş, örnek kuyucuklarının oluşturulması amacıyla tarak yerleştirilmiş ve jel tamamen polimerleşinceye kadar oda sıcaklığında bekletilmiştir.

SDS-PAGE işlemlerinde kullanılan yürütme tamponu, 3,03 g Tris baz, 14,4 g glisin ve 1 g SDS'nin distile su içerisinde çözülmesiyle hazırlanmış ve çözeltinin

toplam hacmi 1 L'ye tamamlanmıştır. Yaklaşık pH 8,3 değerine sahip bu tampon, protein örneklerinin jel boyunca elektroforetik olarak yürütülmesinde kullanılmıştır.

Elektroforez sonrasında proteinlerin membrana aktarılması için kullanılan yarı kuru transfer tamponu, son konsantrasyonları 25 mM Tris baz, 192 mM glisin ve %20 metanol olacak şekilde hazırlanmıştır. Transfer öncesinde jel, membran ve filtre kâğıtları bu tampon içerisinde dengelenmiştir.

Membranların antikor inkübasyonları arasındaki yıkama basamaklarında kullanılmak üzere 1× TBS-T çözeltisi hazırlanmıştır. Bu tamponun bileşiminde 48 mM Trizma baz, 154 mM NaCl ve %0,1 Tween-20 bulunmuş ve çözeltinin pH değeri 7,4'e ayarlanmıştır. Özgül olmayan antikor bağlanmasını azaltmak amacıyla kullanılan bloklama çözeltisi ise 1× TBS-T içerisinde %5 oranında yağsız süt tozu çözülerek hazırlanmıştır.

Protein Örneklerinin Hazırlanması ve Elektroforez

Her örnekten analize alınacak protein miktarı belirlendikten sonra lizatlar 2× *Laemmli* yükleme tamponu ile karıştırılmıştır. Proteinlerin denatürasyonu için örnekler 100 °C sıcaklıkta 4 dk ısıtılmıştır ardından jel kuyucuklarına yüklenmiştir. Hedef proteinlerin moleküler büyüklüklerinin belirlenebilmesi için örneklerle birlikte önceden boyanmış protein belirteci (*ladder*) kullanılmıştır.

Elektroforez başlangıcında proteinlerin toplayıcı jel içerisinde yoğunlaşması için düşük voltaj olan 80V uygulanmıştır. Örneklerin ayırıcı jele geçmesinin ardından voltaj, 120 V'a artırılmış ve protein belirteci izlenerek yeterli ayırım elde edilinceye kadar yürütme işlemine devam edilmiştir.

Yarı Kuru Transfer ve Bloklama İşlemi

Elektroforetik ayırım sonrasında proteinler, yarı kuru transfer sistemi kullanılarak 0,45 µm gözenek çapına sahip nitroselüloz veya PVDF membrana aktarılmıştır. PVDF membran kullanılan deneylerde membran, transfer öncesinde metanol ile aktive edilmiş ve ardından transfer tamponunda dengelenmiştir. Jel, membran ve filtre kâğıtları transfer tamponunda ıslatıldıktan sonra yarı kuru transfer kasetine uygun yönde ve aralarında hava kabarcığı kalmayacak biçimde yerleştirilmiştir.

Transfer işlemi tamamlandıktan sonra membran üzerindeki toplam protein dağılımı *Ponceau S* boyamasıyla kontrol edilmiştir. Görüntüleme sonrasında boya, membranın TBS-T ile yıkanmasıyla uzaklaştırılmıştır.

Primer ve Sekonder Antikor İnkübasyonları

Membran üzerinde özgül olmayan antikor bağlanmasını azaltmak amacıyla, membranlar %5 yağsız süt tozu içeren TBS-T içerisinde oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir. Bloklama basamağı tamamlandıktan sonra membranlar, hedef proteinlere özgü primer antikorlarla gece boyunca inkübe edilmiştir. Primer antikor çözeltileri bloklama tamponu içerisinde hazırlanmış ve membranlar yaklaşık 16 saat süreyle 4 °C’de çalkalama altında tutulmuştur. Desmin tayininde tavşan poliklonal anti-Desmin antikor 1:1000, Emerin tayininde keçi poliklonal anti-Emerin antikor 1:2000 ve GAPDH tayininde fare monoklonal anti-GAPDH antikor 1:3000 oranında kullanılmıştır. SMYD1 için tavşan poliklonal anti-SMYD1 antikor 1:3000, Lamin B1 için keçi poliklonal anti-Lamin B1 antikor 1:3000 ve Hsp60 için fare monoklonal anti-Hsp60 antikor 1:500 oranında seyreltilmiştir.

Primer antikorlarla inkübasyonun ardından, bağlanmamış antikorların uzaklaştırılması amacıyla membranlar 1× TBS-T ile oda sıcaklığında üç kez yıkanmıştır. Her yıkama basamağı 10 dakika sürdürülmüştür. Daha sonra membranlar, kullanılan primer antikorun üretildiği türe uygun HRP-konjuge sekonder antikorlarla oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir. Tavşan kökenli primer antikorların saptanmasında keçi anti-tavşan IgG (H+L) 1:5000, keçi kökenli primer antikorların saptanmasında keçi anti-keçi IgG (H+L) 1:3000 ve fare kökenli primer antikorların saptanmasında keçi anti-fare IgG (H+L) 1:2000 oranında hazırlanmıştır.

Sekonder antikor inkübasyonu sonrasında membranlar, özgül olmayan bağlanmanın ve fazla sekonder antikorun uzaklaştırılması için yeniden 1× TBS-T ile yıkanmıştır. Bu aşamada da üç ardışık yıkama yapılmış ve her bir yıkama 10 dakika uygulanmıştır.

Kemilüminesans Görüntüleme

Protein bantlarının görüntülenmesi için *SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate* kullanılmıştır. Görüntüleme substratını hazırlamak üzere kit

içerisinde yer alan iki reaktif 1:1 oranında karıştırılmış ve membran bu karışım ile karanlık ortamda 5 dakika inkübe edilmiştir. Protein bantları *GeneGnome5* kemilüminesans görüntüleme sistemi kullanılarak görüntülenmiş; uygun sinyal yoğunluğunu elde etmek amacıyla yaklaşık 3 dakikalık pozlama süreleri uygulanmıştır.

Nükleer ve sitoplazmik fraksiyonlama deneylerinde fraksiyonların saflığını değerlendirmek amacıyla Lamin B nükleer fraksiyon belirteci olarak, GAPDH ve Hsp60 ise sitoplazmik fraksiyon belirteçleri olarak kullanılmıştır.

3.2.10. Membran *Strip* Protokolü

Western blot analizlerinde aynı membranın yeniden kullanılabilmesi amacıyla strip işlemi uygulanmıştır.

Strip Tamponu Bileşimi (Toplam 25 mL):

- %10 SDS: 5 mL
- Tris-HCl (pH 6.8): 3.125 mL
- β -Merkaptoetanol (β -MCE): 200 μ L
- dH₂O: Hacim 25 mL'ye tamamlanacak şekilde

Strip işlemi öncesinde tampon taze hazırlanmıştır.

Membranlar 50 °C'de 30 dakika *strip* tamponunda inkübasyona bırakılarak antikorlar uzaklaştırılmıştır. Takiben yeniden bloklandıktan sonra farklı bir hedef proteinin belirlenmesi amacıyla uygun primer antikor ile işleme alınmıştır.

3.2.11. İmmün Çöktürme (IP)

Araştırma grubumuzun önceki çalışmasında, C2C12 hücrelerinde Desmin ve DAPI sinyalleri arasındaki en yüksek eş yerleşim katsayısının farklılaşmanın 28. saatinde elde edilmesi (Pearson $r = 0,70$) nedeniyle (48), nükleer Desmin ile ilişkili protein komplekslerinin yakalanma olasılığını artırmak amacıyla, C2C12 hücrelerinde gerçekleştirilen IP deneylerinde, bu zaman noktası tercih edilmiştir.

RNaz uygulanacak her nükleer protein örneğine 1,5 μ L RNaz A (stok konsantrasyonu: 10 mg/mL; son konsantrasyon: 0,06 mg/mL, toplam 15 μ g RNaz

A/örnek) eklenmiş ve örnekler 4 °C’de düşük hızda döndürülerek 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. RNaz uygulanmayan kontrol örnekleri ise enzim eklenmeden aynı koşullarda bekletilmiştir. İnkübasyonun ardından örnekler 14.000 ×g’de 10 dakika santrifüjlenmiş ve elde edilen süpernatantlar immün çöktürme deneylerinde kullanılmıştır.

İmmün çöktürme deneylerinde kullanılacak protein lizatları, IP tamponu ile seyreltilerek son protein konsantrasyonu yaklaşık 3 mg/mL olacak şekilde ayarlanmıştır. Her reaksiyonda eşit miktarda protein kullanılmış ve hedef proteinin çöktürülmesi amacıyla örnekler 10 µg anti-Desmin antikoru eklenmiştir. Negatif kontrol grubunda ise anti-Desmin antikoru yerine aynı miktarda kontrol IgG kullanılmıştır. Hazırlanan karışımlar, antijen–antikor komplekslerinin oluşmasını sağlamak amacıyla 4 °C’de yaklaşık 18 saat boyunca düşük hızda döndürülerek inkübe edilmiştir.

Her örnek için 30 µL Protein A/G manyetik boncuk kullanılmıştır. Boncuklar reaksiyona eklenmeden önce IP tamponu ile iki kez yıkanmış, ardından antikör ve protein lizatı içeren karışımlara aktarılmıştır. İmmünkomplekslerin boncuklara bağlanması için örnekler oda sıcaklığında 1 saat boyunca döndürülerek inkübe edilmiştir. Antikorsuz boncuk kontrolünde ise protein lizatı, IP tamponu ve manyetik boncuklar aynı koşullarda birlikte inkübe edilmiştir.

İnkübasyonun sonunda tüpler manyetik ayırıcıya yerleştirilmiş ve boncuklara bağlanmayan proteinleri içeren sıvı faz yeni tüplere aktarılmıştır. Bu fraksiyon akış geçişi (*flow-through*) olarak saklanmıştır. Boncuklara bağlı immünkompleksler, özgül olmayan bağlanmaları azaltmak amacıyla IP tamponu ile iki kez yıkanmış ve son yıkama distile su kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Yıkama işlemlerinin ardından boncuklara bağlı proteinlerin elüe edilmesi için örnekler 2× *Laemmli* yükleme tamponu eklenmiştir.

Karşılıklı (*Reciprocal*) İmmün Çöktürme

Desmin ile etkileşim potansiyeli yüksek olan aday proteinler arasından, nükleer zarf proteinlerini temsil eden TMPO (LAP2) ile RNA bağlayıcı protein grubunu temsil eden DDX5 seçilmiş ve Desmin ile etkileşimleri karşılıklı immün çöktürme deneyleri

ile doğrulanmıştır. Karşılıklı Co-IP deneylerinde, Bölüm 3.2.11'de açıklanan IP protokolü esas alınmış; Desmin antikoru yerine hedef proteinlere özgü antikorlar kullanılmıştır. Bu deneylerde, Bölüm 3.1.8'de tanımlanan Co-IP tamponu %2 SDS eklenmeden hazırlanmıştır.

Her reaksiyonda protein konsantrasyonu yaklaşık 3 mg/mL'ye ayarlanmış C2C12 miyotüp lizatları kullanılmıştır. TMPO-IP reaksiyonlarına 10 µg anti-TMPO, DDX5-IP reaksiyonlarına ise 10 µg anti-DDX5 antikoru eklenmiştir. Her deneyde özgül olmayan bağlanmayı değerlendirmek amacıyla uygun IgG kontrolü (Sigma I5256), çöktürme sonrasında bağlanmadan kalan proteinleri değerlendirmek amacıyla akış geçişi (*flow-through*, *FT*) ve primer antikor içermeyen boncuk kontrolü (*no-antibody control*, *NTC*) paralel olarak yürütülmüştür. *Dynabeads* Protein G Boncukları deneyde kullanılmıştır.

TMPO ve DDX5-IP deneyleri iki ayrı uygulamada gerçekleştirilmiştir. İlk uygulamada hem özgül IP hem de IgG kontrol örneklerinde belirgin Desmin sinyali gözlenmesi üzerine deney koşulları yeniden düzenlenmiştir. İkinci uygulamada yeni ve son kullanma tarihi geçerli Protein A/G manyetik boncuklar kullanılmış, Co-IP tamponuyla gerçekleştirilen yıkama sayısı ikiden üçe çıkarılmış ve protein birliktelikleri her iki yönde değerlendirilmiştir. Bu kapsamda Desmin-IP örneklerinde TMPO veya DDX5, TMPO- ve DDX5-IP örneklerinde ise Desmin proteini WB ile araştırılmıştır.

Antijen–antikor kompleksleri 4 °C'de düşük hızda döndürülerek 18 saat inkübe edilmiş; ardından her örneğe 30 µL Protein A/G manyetik boncuk eklenerek oda sıcaklığında 1 saat inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Boncuklar Co-IP tamponuyla 4 kez ve son olarak distile suyla yıkanmış; boncuklara bağlı immünkompleksler 2× Laemmli yükleme tamponu ile elüe edilmiştir. FT fraksiyonları ayrı tüplerde saklanmış ve WB analizinde immün çöktürme verimliliğinin değerlendirilmesi amacıyla kullanılmıştır.

3.2.12. Kütle Spektrometrisi (LC-MS/MS) Analizi

C2C12 hücrelerinden elde edilen Desmin çöktürme (IP1, IP2) ve IgG kontrol örnekleri proteomik analiz amacıyla TÜBİTAK UME Biyoanaliz Laboratuvarı'na gönderilmiştir

Triptik Peptit Hazırlanması:

Proteomik analiz çalışmaları kapsamında, 1 mg liyofilize RapiGest SF tozu, %0,1 (w/v) son konsantrasyon elde edilecek şekilde 1 mL 50 mM amonyum bikarbonat içerisinde çözülmüştür. Elde edilen bu çözeltiden, IP örneklerine 100 µL eklenmiş ve vorteksenerek homojenizasyon sağlanmıştır. Protein örneklerine, 5 mM son konsantrasyonda olacak şekilde Dithiothreitol (DTT) ilave edilmiş ve örnekler 60 °C sıcaklıkta 30 dakika boyunca bekletilmiştir. Oda sıcaklığına soğutulan örnekler, proteinlerin alkillenmesi amacıyla 15 mM son konsantrasyonda iyodoasetamid eklenmiş ve 30 dakika boyunca karanlık ortamda bekletilmiştir. Enzimatik sindirim işlemi için örnekler 1 µg *Trypsin Lys-C* (50 mM amonyum bikarbonat içerisinde) enzimi ilave edilmiş ve 37 °C’de gece boyu inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Enzimatik parçalama işleminin ardından, RapiGest SF’in hidrolizi için örnekler yaklaşık %0,5 (pH < 2) son konsantrasyonda yüksek saflıkta formik asit (FA) eklenmiştir. Karışım, 37 °C’de 30 dakika daha inkübasyona bırakılmıştır. Asit muamelesi görmüş örnekler, hidroliz yan ürünlerinin uzaklaştırılması amacıyla 13.000 rpm hızda 10 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatant, yeni mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır. Hazırlanan örneklerin peptit derişimleri Pierce™ Quantitative Peptide Assay (Kat. No. 23275) kullanılarak belirlenmiştir. Peptit derişimleri 0,5 mg/mL olacak şekilde ayarlanmış ve örnekler LC-MS/MS analizinde kullanılmak üzere HPLC viallerine aktarılmıştır (Tablo 3.3.).

Tablo 3.3. LC-MS/MS analizi öncesinde Desmin IP1, IP2 ve IgG kontrol örneklerinden elde edilen peptit derişimleri. Peptit derişimleri *Pierce™ Quantitative Peptide Assay* yöntemi ile belirlenmiştir.

Tablo 2: Peptit derişimleri

Numune Adı	Peptit derişimi (mg/ml)
IP1	1,09
IP2	1,03
IgG	0,91

Kromatografik Ayırıştırma ve MS/MS Analizi:

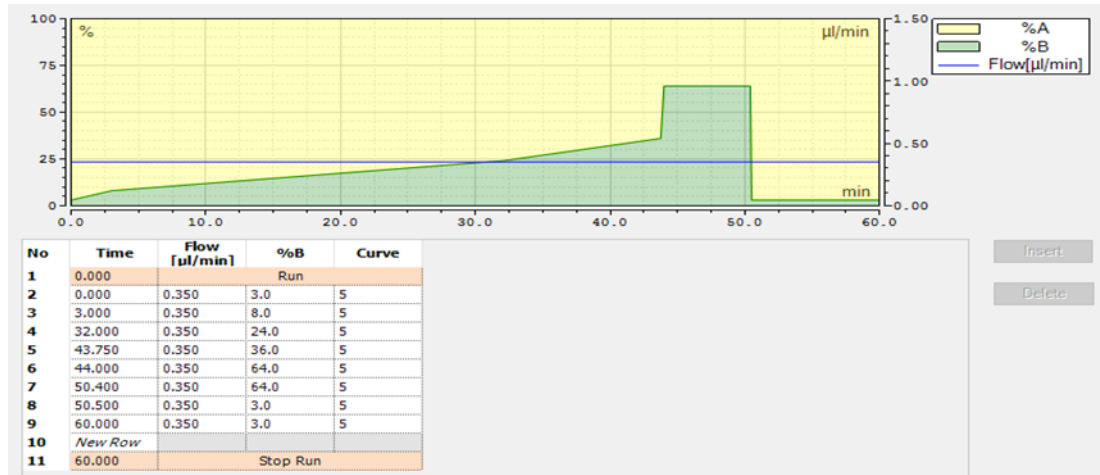
Örneklerin LC-MS/MS analizi ve protein tanımlama işlemleri aşağıda belirtilen protokole uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Analizlerde; *Thermo Scientific™ UltiMate™ 3000 RSLCnano ultra* yüksek performanslı sıvı kromatografisi (UHPLC) sistemi ve *Thermo Scientific™ Easy-Spray™* iyon kaynağı ile donatılmış *Thermo Scientific™ Q Exactive™* HF kütle spektrometresi kullanılmıştır. Analiz öncesinde cihazın kalibrasyon ayarları optimize edilmiştir. Elde edilen triptik peptitler, MS/MS analizi öncesinde hidrofobiklik özelliklerine göre ters faz sıvı kromatografisi ile ayırıştırılmıştır. Örnekler öncelikle bir tuzak kolonda (*PepMap NEO*, C18, 5 µm, 100Å, 300 µm i.d. x 5 mm) tutulmuş; ardından nano pompa aracılığıyla oluşturulan asetonitril gradyanı ile tuzak kolondan ayrılan peptitler, analitik kolona (*Easy-Spray* ES902 RSLC C18, 2 µm, 100Å, 75 µm x 25 cm) aktarılmıştır. Ayrım işlemi, 40 °C kolon sıcaklığında, 350 nL/dk akış hızında ve 60 dakikalık ters faz kromatografisi gradyanı uygulanarak hidrofobik etkileşimler prensibiyle tamamlanmıştır. Nano-LC kolonuna 5 µL peptit örneği yüklenmiştir. Mobil faz A; %0,1 formik asit (FA) içeren 98:2 (v/v) H₂O:ACN çözeltisinden, Mobil faz B ise %0,1 FA içeren 98:2 (v/v) ACN:H₂O çözeltisinden hazırlanmıştır. Uygulanan nano-LC metodu Şekil 3.3'te sunulmuştur.

Analizlerde kullanılan *Q Exactive* HF-X kütle spektrometresi (*Thermo Fisher Scientific*, Bremen, Almanya), veri toplama işlemiyle aynı gün temizlenmiş ve Tune (Versiyon 2.9) cihaz kontrol yazılımı aracılığıyla kalibre edilmiştir. İyonizasyon parametreleri; püskürtme voltajı 2 kV, 'funnel' RF seviyesi 40 ve kapiler sıcaklığı 270 °C olacak şekilde optimize edilmiştir. Veri toplama sürecinde uygulanan Full MS/dd-MS² (*Data-Dependent Acquisition*) parametrelerine ait detaylar Şekil 3.1'de sunulmuştur.

Properties of Full MS / dd-MS² (

General	
Runtime	0 to 60 min
Polarity	positive
Default charge :	2
Inclusion	—
Exclusion	—
Tags	—
Full MS	
Resolution	60,000
AGC target	3e6
Maximum IT	45 ms
Scan range	350 to 1400 m/z
dd-MS² / dd-SIM	
Resolution	15,000
AGC target	1e5
Maximum IT	22 ms
Loop count	12
TopN	12
Isolation window	1.3 m/z
Fixed first mass	100.0 m/z
(N)CE / stepped nce	28
Spectrum data t	Centroid
dd Settings	
Minimum AGC t	4.50e2
Intensity thresh	2.0e4
Apex trigger	—
Charge exclusio	unassigned, 1
Peptide match	preferred
Exclude isotope	on
Dynamic exclus	30.0 s

Şekil 3.1. Peptitleri ayırmada kullanılan Full MS/dd-MS2 parametreleri.



Şekil 3.2. LC-MS/MS analizi öncesinde triptik peptitlerin ayrıştırılmasında kullanılan nano-sıvı kromatografisi (nano-LC) gradyanı. IP örneklerinden elde edilen triptik peptitler, ters faz C18 kolon üzerinde 60 dakikalık asetonitril gradyanı kullanılarak hidrofobiklik özelliklerine göre ayrıştırılmıştır. Mobil faz B oranının zamanla artırılmasıyla farklı hidrofobiklikteki peptitlerin kolondan ardışık olarak elüe olması sağlanmış ve peptitler kütle spektrometresine aktarılmıştır.

LC–MS/MS verilerinin işlenmesi ve analizi:

Sequest HT arama algoritmasına sahip *Proteome Discoverer 3.2* yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Desmin IP ve IgG negatif kontrol örneklerinden elde edilen spektral veriler, UniProt Mus musculus (Taxonomy ID:10090) protein veritabanına karşı analiz edilmiştir. Protein tanımlamalarında peptit ve protein düzeyinde %1 yanlış keşif oranı (*False Discovery Rate*, $FDR \leq 0,01$) eşiği uygulanmış, kantitatif karşılaştırmalar ise *Proteome Discoverer 3.2'nin Minora Feature Detector / MaxLFQ* modülü kullanılarak etiketsiz (label-free) yoğunluk temelli yöntemle gerçekleştirilmiştir. *Sequest HT* analizinde öncül iyon kütle toleransı 10 ppm, fragment iyon kütle toleransı ise 0,6 Da olarak belirlenmiştir.

Kalite Kontrol:

Analize başlamadan önce kalite kontrol (QC) örneği olarak 1000 ng *Thermo Scientific Pierce™ HeLa Protein Digest Standard* (Kat. No. 88329) yüklenmiştir. Bu standart, HeLa S3 hücrelerinden elde edilmiş, LysC ve tripsin ile parçalanmış karmaşık bir peptit karışımı olup LC-MS/MS sistem performansının, kromatografik ayrımın ve protein tanımlama kalitesinin doğrulanması amacıyla kullanılmıştır.

Proteomik (IP-MS) Veri Analizi:

C2C12 Desmin IP-MS veri seti, iki biyolojik tekrarın her biri için iki teknik tekrar içeren Desmin immünopresipitasyon örnekleri (toplam dört Desmin IP ölçümü) ile bir biyolojik IgG izotip kontrol örneğinin iki teknik tekrarından (toplam iki IgG kontrol ölçümü) oluşmaktadır.

Desmin IP örnekleri ile IgG izotip kontrol örnekleri arasındaki protein zenginleşme farklılıkları limma R paketi r versiyon kullanılarak analiz edilmiştir. Elde edilen p değerleri Benjamini–Hochberg yöntemi (p.adjust fonksiyonu, stats paketi) ile çoklu test düzeltilmesine tabi tutulmuş ve düzeltilmiş p değeri ($adj.p < 0,05$) istatistiksel anlamlılık eşiği olarak kabul edilmiştir.

Limma analizi ile belirlenen 192 anlamlı protein, IP-MS çalışmalarında sık görülen arka plan proteinlerini elemek amacıyla filtrelenmiştir. Filtreleme ölçütleri: en az iki özgün peptit ile tanımlanmış olma, IP/IgG zenginleşme oranının 2'den büyük olması ve biyolojik tekrarlar arasında tutarlı zenginleşme gösterme. Arka plan proteinlerinin değerlendirilmesinde CRAPome veritabanı referans alınmış; bu

veritabanında yüksek frekansta rapor edilen proteinler aday değerlendirmesinde dikkatli yorumlanmıştır (98). Bu ölçütleri karşılayan 21 protein aday listesini oluşturmuştur. Biyolojik tekrar sayısının sınırlı olması nedeniyle bu ölçütler kesin istatistiksel eşikler olarak değil, aday proteinlerin önceliklendirilmesini destekleyen ölçütler olarak değerlendirilmiştir.

IP/IgG oranı, Desmin IP ve IgG kontrol örneklerine ait ham protein bolluk değerlerinin oranı kullanılarak hesaplanmıştır. Limma analizi ile elde edilen $\log_2FC$ değerlerinin yönü ve büyüklüğü, ham protein bolluklarından hesaplanan IP/IgG oranları ile karşılaştırılarak tutarlılığı değerlendirilmiştir.

RNaz uygulamalı C2C12 Miyotüp Nükleer Desmin IP-MS analizinde, RNaz uygulanmış ve uygulanmamış Desmin IP örnekleri arasındaki farklılıklar yine limma paketi kullanılarak değerlendirilmiştir. RNaz kontrastı aşağıdaki şekilde tanımlanmıştır:

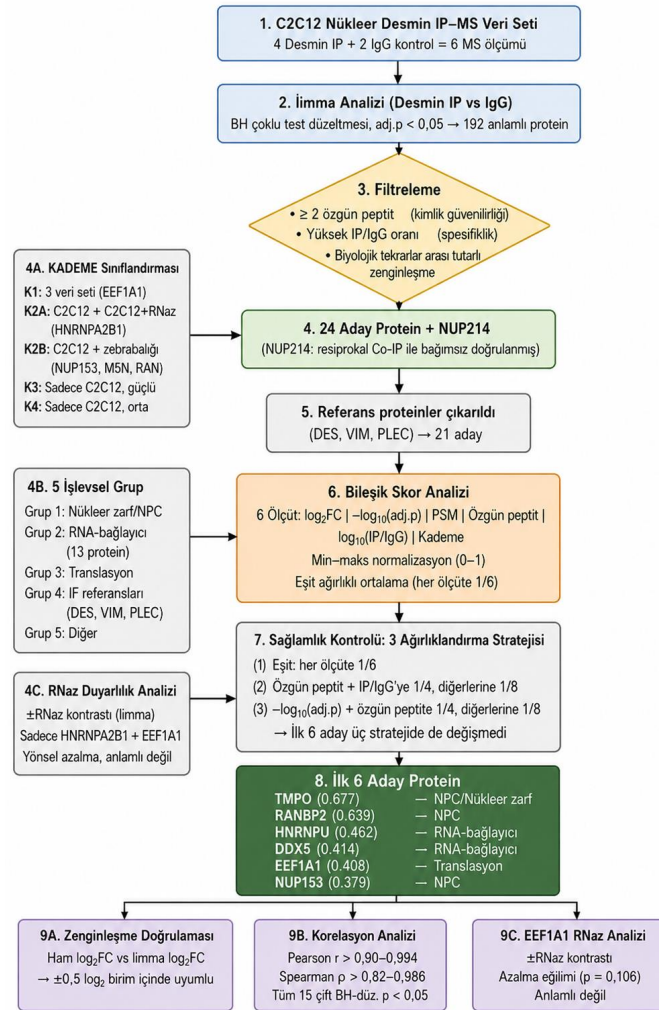
$$\log_2FC(RNaz) = \log_2(IP(Desmin)) - \log_2(IP(RNaz-Desmin))$$

Bu tanıma göre pozitif $\log_2FC(RNaz)$ değeri, RNaz uygulaması sonrasında protein bolluğunun azalmasını ve dolayısıyla RNA'ya bağımlı etkileşim olasılığını; negatif değer ise RNaz uygulamasından etkilenmeyen ve RNA'dan bağımsız, potansiyel doğrudan protein-protein etkileşimini göstermektedir. Anlamlılık ölçütü olarak $adj.p < 0,05$ ve $|\log_2FC| > 1$ eşikleri kullanılmıştır. Eksik bolluk değeri bulunan örneklerde, aynı deney koşuluna ait diğer IgG teknik tekrarındaki değer kullanılarak eksik gözlem tamamlanmıştır. RNaz uygulamalı analiz, aday proteinlerin Desmin ile etkileşimlerinin RNA'ya bağımlı mı yoksa RNA'dan bağımsız mı gerçekleştiğini değerlendirmek amacıyla gerçekleştirilmiştir.

Protein tanımlamalarının güvenilirliğini değerlendirmek amacıyla özgün peptit sayısı ve peptit-spektrum eşleşmesi (PSM) değerleri dikkate alınmıştır. Özgün peptit sayısı ilgili proteini tanımlayan farklı peptit dizilerinin sayısını, PSM ise bu peptitlerin MS analizinde kaç kez tanımlandığını ifade etmektedir.

3.2.13. Aday Proteinlerin Önceliklendirilmesi ve Korelasyon Analizleri

Deneyssel doğrulama için öncelikli aday proteinlerin belirlenmesinde, çoklu kanıtları tek bir ölçütte birleştiren birleşik skor yaklaşımı kullanılmıştır. Aday proteinlerin belirlenmesi ve önceliklendirilmesinde izlenen analiz iş akışı Şekil 3.3'te özetlenmiştir.



Şekil 3.3. C2C12 Miyotüp Nükleer Desmin IP-MS verilerinin analizi ve aday protein önceliklendirme iş akışı. C2C12 nükleer desmin IP-MS veri setinden (4 IP + 2 IgG kontrol) başlayarak, limma analizi (adj.p < 0.05, FDR kontrolü) ile 192 istatistiksel olarak anlamlı protein saptandı. Aday kalite filtresi (≥ 2 özgün peptit, yüksek IP/IgG oranı ve biyolojik tekrarlar arasında tutarlı zenginleşme) uygulanarak 21 öncelikli aday protein elde edildi; NUP214, zebra balığı kas dokusunda gerçekleştirilen Desmin-Lamin B1 iki yönlü Co IP-MS analizinden elde edilen bağımsız destekleyici kanıt nedeniyle birleşik aday listesine dahil edilmiştir. Referans proteinlerin (DES, VIM, PLEC) çıkarılması ve altı ölçütlü birleşik skorun (üç ağırlıklandırma stratejisiyle sağlamlık kontrolü dahil) uygulanmasıyla ilk 6 aday belirlenmiştir.

Deneysel doğrulama için öncelikli aday proteinlerin belirlenmesinde, çoklu kanıtları tek bir ölçütte birleştiren birleşik skor yaklaşımı kullanılmıştır. Birleşik skor hesaplamasında altı değişken birlikte değerlendirilmiştir: limma analizi ile elde edilen $\log_2FC$ değeri, $-\log_{10}(adj.p)$, peptit-spektrum eşleşmesi (PSM) sayısı, özgün peptit sayısı, $\log_{10}(IP/IgG \text{ oranı})$ ve çapraz veri seti karşılaştırmasına dayalı kanıt düzeyleri (Kademe).

Referans proteinler (DES, VIM ve PLEC) değerlendirme dışı bırakıldıktan sonra kalan aday proteinler için her değişken min–maks normalizasyonu ile 0–1 aralığına dönüştürülmüş ve altı değişkenin eşit ağırlıklı ortalaması alınarak nihai birleşik skor hesaplanmıştır. Çapraz veri seti karşılaştırmasına dayalı kanıt düzeylerini temsil eden Kademe değişkenine sırasıyla; KADEME 1 (üç veri setinde ortak tanımlanma)=3,0, KADEME 2A/2B (iki veri setinde tanımlanma)=2,5, KADEME 3 (tek veri setinde güçlü kanıt)=1,5 ve KADEME 4 (tek veri setinde orta düzey kanıt)=1,0 olacak şekilde kademe puanları atanmıştır. Bu puanlar, kanıt düzeyi arttıkça puanın artması ilkesine göre atanmış; komşu kademeler arasındaki farklar, destekleyen veri seti sayısındaki artışa karşılık gelecek şekilde belirlenmiştir.

Birleşik skor yaklaşımının sağlamlığını değerlendirmek amacıyla üç farklı ağırlıklandırma stratejisi uygulanmış ve ilk altı adayın değişmediği doğrulanmıştır: tüm ölçütlere eşit ağırlık (her ölçüte 1/6), özgün peptit sayısı ve $\log_{10}(IP/IgG)$ ölçütlerine diğer dört ölçütün iki katı ağırlık (bu iki ölçüte 1/4, diğerlerine 1/8), $-\log_{10}(adj.p)$ ve özgün peptit sayısı ölçütlerine diğer dört ölçütün iki katı ağırlık (bu iki ölçüte 1/4, diğerlerine 1/8).

Birleşik skor, aday proteinlerin deneysel doğrulama amacıyla önceliklendirilmesini kolaylaştırmak için geliştirilmiş bir sıralama ölçütüdür ve istatistiksel anlamlılığın yerine geçen bir ölçüt olarak değerlendirilmemiştir.

Önceliklendirilen aday proteinler arasındaki birlikte değişim örüntülerini incelemek amacıyla korelasyon analizi gerçekleştirilmiştir. Bu analiz, aday proteinlerin seçimi için değil, protein bollukları arasındaki ilişkilerin keşifsel olarak değerlendirilmesi amacıyla uygulanmıştır. Protein bolluk değerleri geniş bir dinamik aralık gösterdiğinden analiz öncesinde $\log_{10}$ dönüşümü uygulanmıştır. Doğrusal ilişkiler Pearson, sıralamaya dayalı ilişkiler ise Spearman korelasyon katsayıları

kullanılarak deęerlendirilmiřtir. Çoklu karřılařtırmalardan kaynaklanan Tip I hata olasılıęını kontrol etmek amacıyla p-deęerlerine Benjamini–Hochberg dűzeltmesi uygulanmıřtır. Korelasyon analizi altı LC-MS/MS ۆlçümü űzerinden gerçekteřtirilmiř olmakla birlikte, bu ۆlçümler yalnızca űç baęımsız biyolojik ۆrneęe ait teknik tekrarları içerdięinden BH-dűzeltilmiř p-deęerleri keřifsel amaçla yorumlanmıřtır.

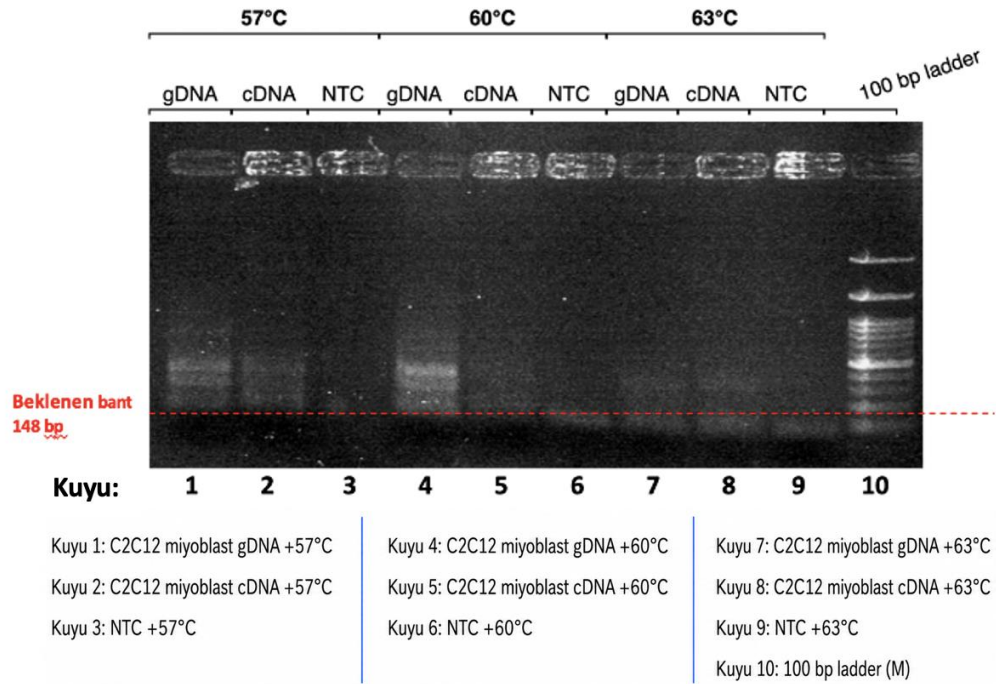
4. BULGULAR

4.1. C2C12 hücrelerinde *Nkx2.5* Gen İfadesinin Değerlendirilmesi

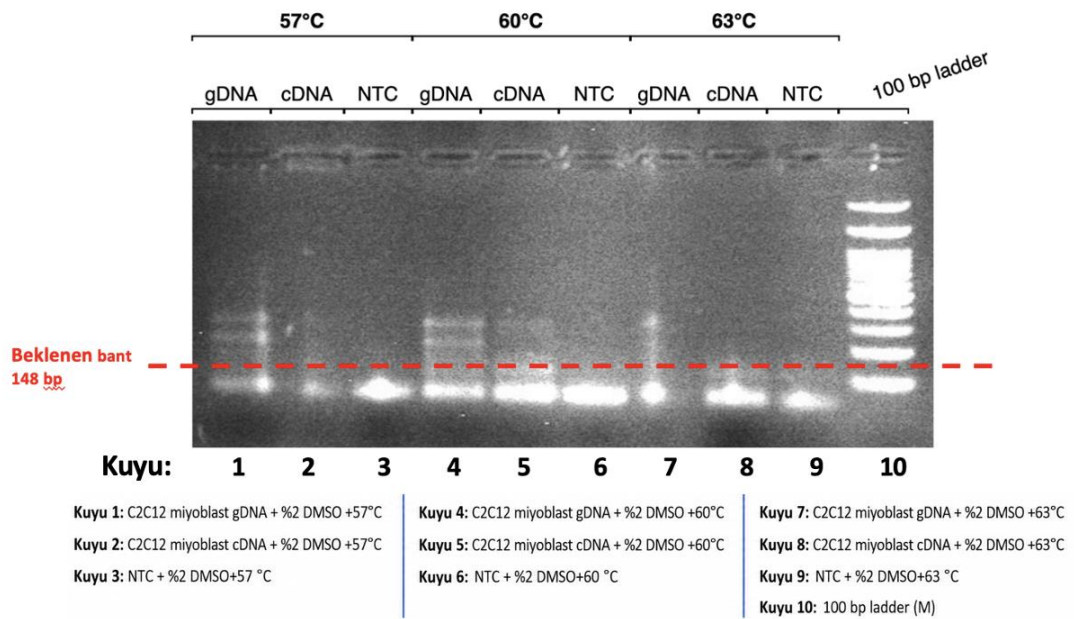
C2C12 hücrelerinde *Nkx2.5* (*Nk2 homebox 5*) gen ifadesi RT-PCR ve gerçek zamanlı kantitatif PCR (qPCR) yöntemleri ile değerlendirildi. C2C12 miyoblastlarından ve farklılaşmanın birinci, ikinci, üçüncü günlerinden elde edilen RNA örneklerinden sentezlenen cDNA kullanılarak RT-PCR analizleri gerçekleştirildi.

İlk kullanılan *Nkx2.5* primer çifti (Tablo 4.1, Primer Seti 1) ile gerçekleştirilen RT-PCR analizlerinde beklenen amplifikasyon ürününe ek olarak primer-dimer ve/veya özgül olmayan amplifikasyon bantları gözlenmiştir. Bu nedenle PCR koşullarını iyileştirmek amacıyla bağlanma sıcaklığı (57, 60 ve 63 °C), reaksiyon karışımına %2 DMSO ilavesi, primer konsantrasyonu ve MgCl₂ konsantrasyonu optimize edildi. Ancak gerçekleştirilen tüm optimizasyonlara rağmen primer-dimer ve/veya özgül olmayan amplifikasyon ürünleri devam etti ve özgül amplifikasyon elde edilemedi (Şekil 4.1).

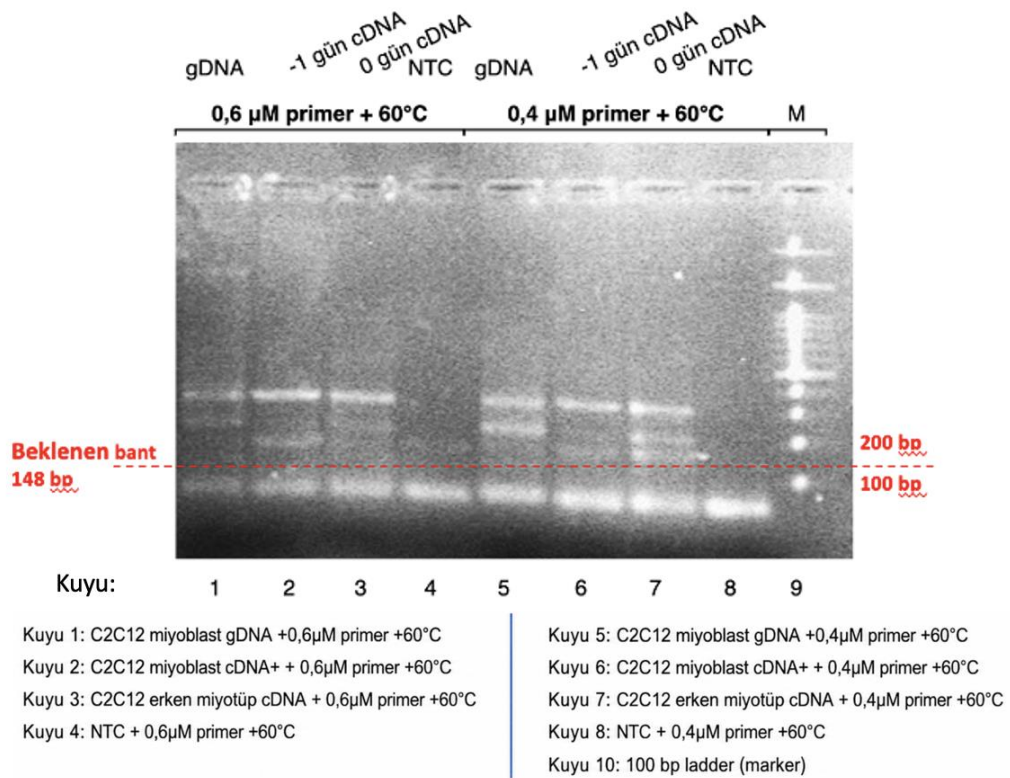
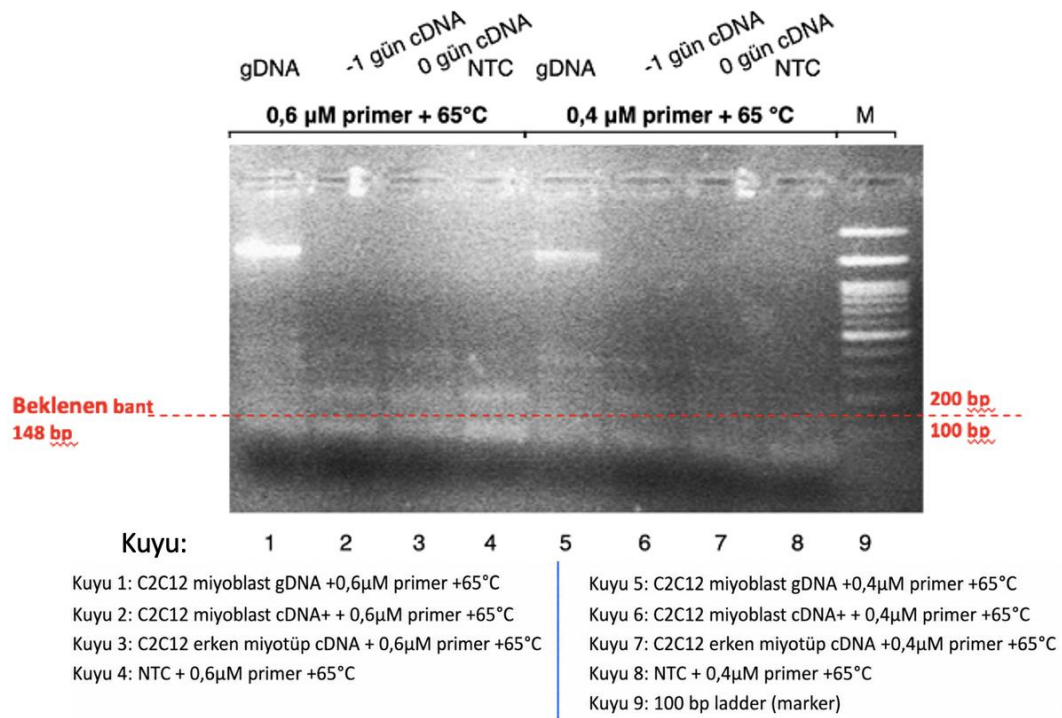
(A)



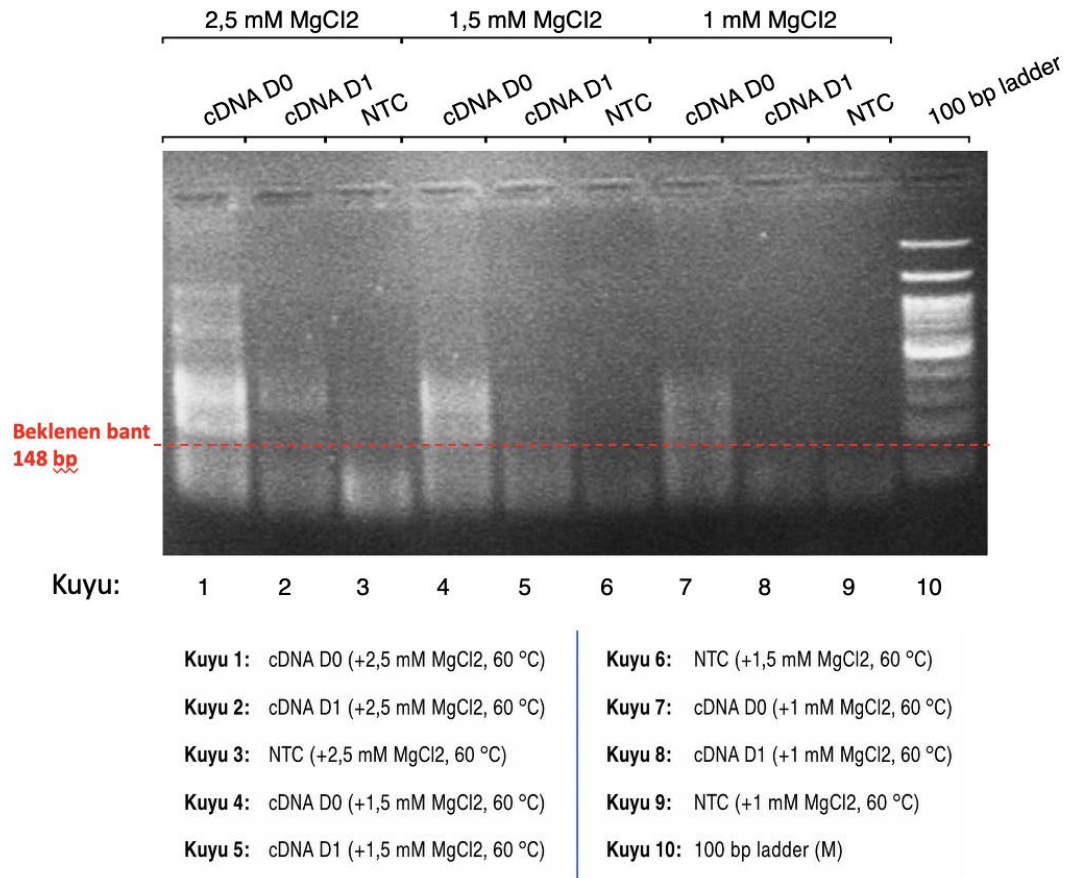
(B)



(C)



(D)

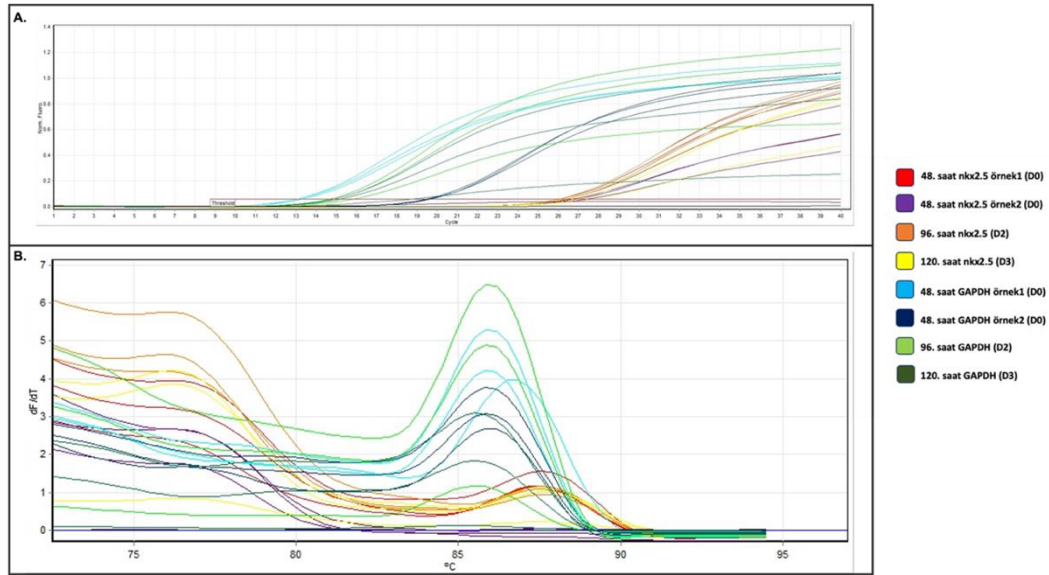


Şekil 4.1. *Nkx2.5* primerleri için gerçekleştirilen PCR optimizasyonu. (A) PCR analizleri 57, 60 ve 63 °C bağlanma sıcaklıklarında gerçekleştirilmiştir. Her sıcaklık için sırasıyla miyoblast hücrelerine ait genomik DNA (gDNA), cDNA ve negatif kontrol (NTC) örnekleri yüklenmiştir. (B) Aynı PCR koşulları reaksiyon karışımına %2 DMSO ilave edilerek tekrarlanmıştır. (C) PCR analizleri 60 °C bağlanma sıcaklığında iki farklı primer konsantrasyonu (her primer için 0,6 µM ve 0,4 µM) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Her iki primer konsantrasyonu için sırasıyla miyoblast hücrelerine ait genomik DNA (gDNA), miyoblast (D0) cDNA'sı, farklılaşmanın 1, 2 ve 3. günlerine (D1, D2 ve D3) ait C2C12 cDNA örnekleri ve negatif kontrol (NTC) analiz edilmiştir. Kullanılan moleküler belirteç 100 bp olarak işaretlenmiştir. (D) Özgül olmayan bant oluşumunu önlemek amacıyla örneklerde kullanılan MgCl₂ miktarı değiştirilmiştir. 60 °C bağlanma sıcaklığında sırasıyla C2C12 cDNA örnekleri ve negatif kontrol (NTC) yer almaktadır.

qPCR analizlerinde proliferasyon döneminde toplanan iki bağımsız D0 miyoblast örneği ile farklılaşmanın 2. ve 3. günlerinden elde edilen D2 ve D3 miyotüp

örnekleri kullanıldı. D0 örnekleri bağımsız biyolojik örnekler olarak değerlendirilmiş, her örnek *Nkx2.5* ve *GAPDH* primerleri ile üç teknik tekrar halinde analiz edilmiştir.

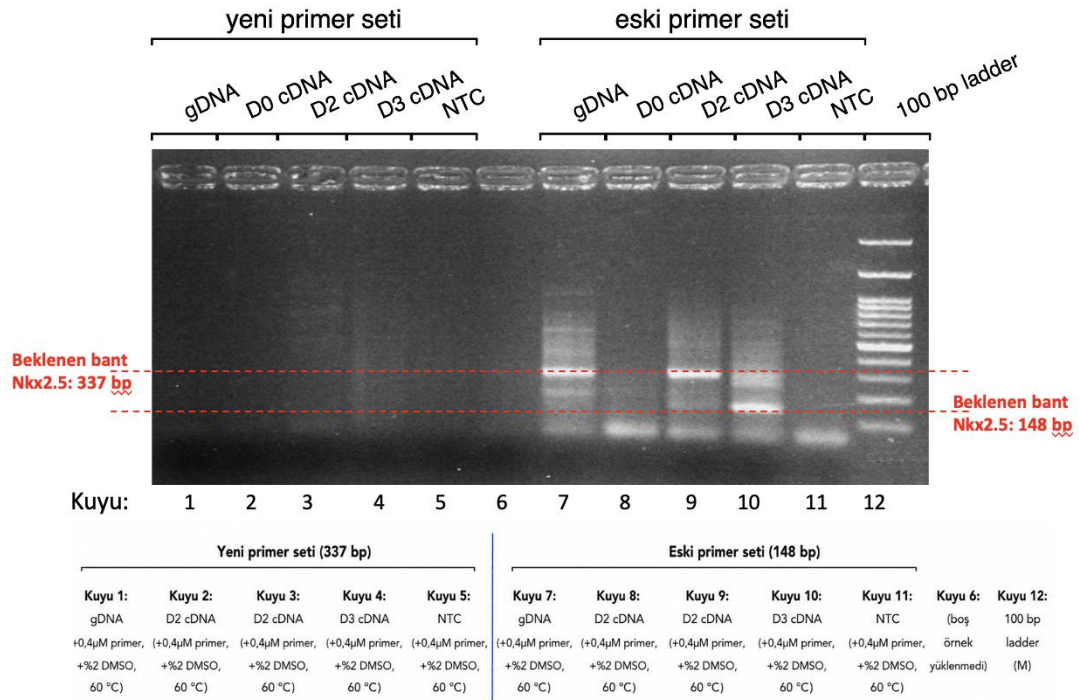
qPCR analizlerinde referans gen olarak kullanılan *GAPDH*, yaklaşık 13-16 Ct aralığında belirgin amplifikasyon göstermiş ve erime eğrisinde tek pik oluşturmıştır. Buna karşılık *Nkx2.5* amplifikasyonu 26-27 Ct aralığında gerçekleşmiş ($\Delta Ct \approx 11-13$) ve erime eğrisinde birden fazla pik gözlenmiştir. Ayrıca qPCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde beklenen 148 bp bandına ek olarak düşük molekül ağırlıklı bantlar saptanmış olup, bu bulgu erime eğrisindeki çoklu piklerle uyumlu bulunmuştur (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. C2C12 hücrelerinde *Nkx2.5* gen ifadesinin qPCR analizi. (A) Miyoblast (D0) ve farklılaşmış miyotüp (D2 ve D3) örneklerinden elde edilen cDNA'larda *Nkx2.5* ve referans gen *GAPDH* için elde edilen amplifikasyon eğrileri. (B) Aynı örneklere ait erime (*melting*) eğrileri. *GAPDH* için tek pik gözlenirken, *Nkx2.5* amplifikasyonunda birden fazla erime piki saptanmış olup bu durum özgül olmayan amplifikasyon ve/veya primer-dimer oluşumu ile uyumludur.

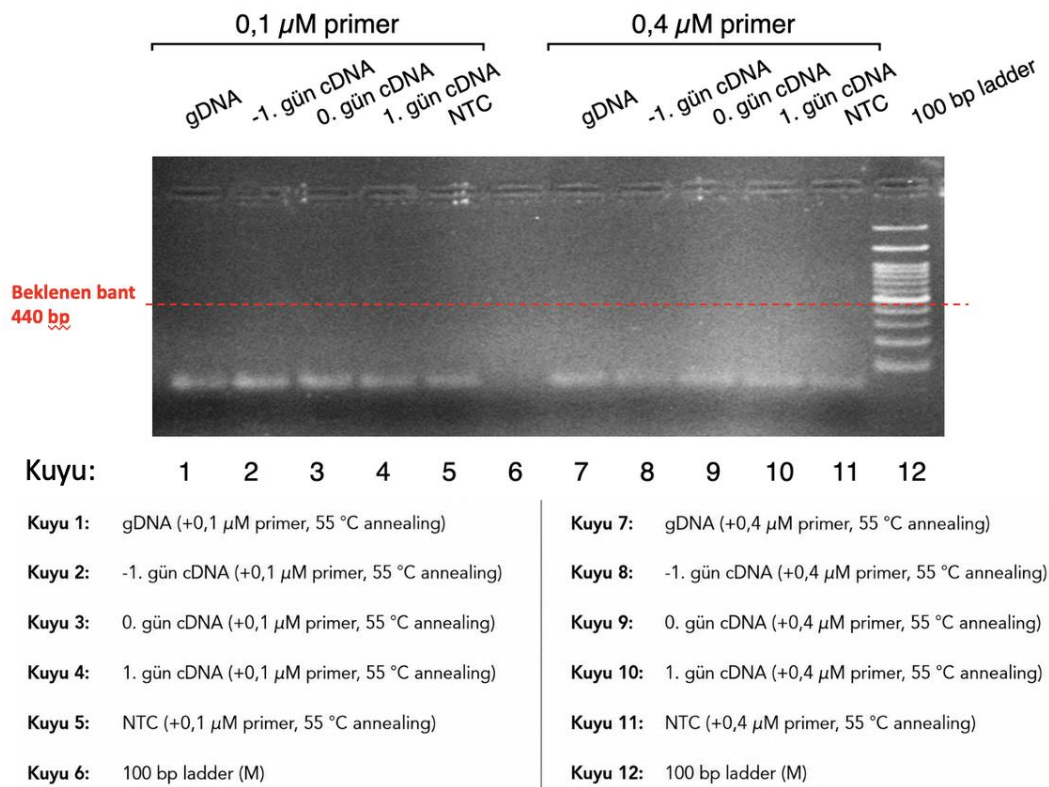
İlk primer seti ile özgül amplifikasyon elde edilememesi üzerine alternatif olarak tasarlanan ikinci primer çifti (Tablo 4.1, Primer Seti 2) farklı bağlanma sıcaklıkları ve reaksiyon koşullarında test edilmiştir. Ancak yapılan optimizasyonlara rağmen beklenen 337 bp büyüklüğünde amplifikasyon ürünü elde edilememiştir. İlk ve ikinci primer setlerinin karşılaştırılmasında, ilk primer setinde özgül olmayan

amplifikasyon ürünlerinin devam ettiği, ikinci primer setinde ise amplifikasyon oluşmadığı gözlenmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. İlk kullanılan ve alternatif olarak tasarlanan *Nkx2.5* primer setleri ile gerçekleştirilen PCR analizlerinden elde edilen amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezi. PCR analizleri %2 DMSO içeren reaksiyon karışımı kullanılarak ve 60 °C bağlama sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Her iki primer seti için üç farklı C2C12 cDNA örneği, genomik DNA (gDNA) ve negatif kontrol (NTC) analiz edilmiştir. 100 bp DNA moleküler ağırlık belirtecidir. İlk primer setinde özgül olmayan amplifikasyon ürünleri gözlenirken, alternatif primer seti ile beklenen büyüklükte amplifikasyon ürünü elde edilememiştir.

Bunun üzerine, C2C12 hücrelerinde Nkx2.5 transkriptinin daha önce bildirildiği bir çalışmada kullanılan primer seti (Tablo 4.1, Primer Seti 3) test edilmiştir (51). Bu primerlerle gerçekleştirilen PCR analizlerinde de, farklı primer konsantrasyonları ve bağlanma sıcaklıklarında beklenen 440 bp büyüklüğünde özgül amplifikasyon ürünü elde edilememiştir. Bunun yerine örneklerde ve negatif kontrolde düşük molekül ağırlıklı özgül olmayan bantlar gözlenmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Referans çalışmada kullanılan primer seti ile gerçekleştirilen PCR analizlerinden elde edilen amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezi. Primer çifti iki farklı primer konsantrasyonunda (0,1 μ M ve 0,4 μ M) ve 55 °C bağlanma sıcaklığında test edilmiştir. Her primer konsantrasyonu için sırasıyla genomik DNA (gDNA), farklılaşma besiyerine alınmadan bir gün önceki miyoblast cDNA'sı (-1. gün), farklılaşmanın 0. gününe ait cDNA, farklılaşmanın 1. gününe ait cDNA ve negatif kontrol (NTC) örnekleri analiz edilmiştir. Beklenen ampikon büyüklüğü 440 bp'dir. M: 100 bp DNA moleküler ağırlık belirtecidir. Beklenen büyüklükte özgül amplifikasyon ürünü gözlenmemiş, örneklerde ve negatif kontrolde düşük molekül ağırlıklı özgül olmayan bantlar saptanmıştır.

Yapılan tüm optimizasyon ve primer denemelerine rağmen C2C12 hücrelerinde *Nkx2.5* için güvenilir ve özgül bir amplifikasyon ürünü elde edilememiştir (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. PCR optimizasyonları sırasında gerçekleştirilen uygulamaların özeti.

Primer Seti	Hedef Ürün (bp)	Optimizasyonlar	Sonuç
Forward Primer1: CCCAAGTGCTCTCCTGCTTT Reverse Primer1: CATCCGTCTCGGCTTTCTCC	148	Bağlanma sıcaklığı (57, 60, 63 ve 65 °C), %2 DMSO, primer miktarı (0,6 ve 0,4 µL), MgCl ₂ miktarı (2,5, 1,5 ve 1 mM)	Güvenilir ve özgül amplifikasyon elde edilemedi
Forward primer 2: AAGTGCTCTCCTGCTTTCCC; Reverse Primer2: ACTTGTAAGCGACGGTCTGG	337	Bağlanma sıcaklığı (55 ve 60 °C), %2 DMSO, primer miktarı (0,1 , 0,2 ve 0,4 µM)	Amplifikasyon elde edilemedi
Forward primer 3: GGCGTCGGGGACTGAACACC Reverse primer 3: CGCACTCACTTTAATGGGAAG	440	Bağlanma sıcaklığı (55, 60 ve 65 °C), primer miktarı (0,1 ve 0,4 µM)	Amplifikasyon elde edilemedi

Sonuç olarak, C2C12 hücrelerinde *Nkx2.5* transkripti güvenilir ve özgül olarak saptanamamıştır. qPCR analizlerinde elde edilen yüksek Ct değerleri (26–27) ve erime eğrisinde gözlenen çoklu pikler, hedef transkriptin düşük düzeyde bulunduğunu ve güvenilir amplifikasyon sağlanamadığını göstermektedir. Bu nedenle çalışmanın sonraki aşamalarında alternatif bir deneysel yaklaşıma geçilmiştir.

4.2. RNA-seq ve Proteomik Verilerin Bütünleştirilmesi ile *Des* İlişkili Aday Çekirdek Proteinlerinin Belirlenmesi

C2C12 hücrelerinde *Nkx2.5* gen ifadesinin güvenilir düzeyde tespit edilememesi nedeniyle, başlangıçta planlanan kromatin immün çöktürme (ChIP) deneylerine geçilememiştir. Bu doğrultuda çalışma yeniden planlanmış ve Desmin ile ilişkili olası çekirdek proteinlerini belirlemek amacıyla öncelikle kamuya açık IP ve Co-IP veri setleri araştırılmıştır. Ancak bu amaç için uygun bir veri setine ulaşılamamıştır. Bunun üzerine, *Des* ile benzer ifade dinamikleri gösteren aday proteinlerin belirlenmesi amacıyla C2C12 hücrelerinin farklılaşma sürecini kapsayan RNA-seq veri setleri NCBI Sequence Read Archive (SRA) veri tabanında taranmıştır.

Tarama sonucunda PRJNA328159 ve PRJNA89011 proje numaralı veri setleri analiz için seçilmiştir. Ham RNA-seq verileri yeniden analiz edilerek kalite kontrolü,

referans genoma hizalama, gen düzeyinde sayım, gen ifade değişimi analizi, *Des* ile korelasyon analizi ve gen ontolojisi (GO) analizleri gerçekleştirilmiştir (Tablo 4.2). Analizler, TÜBİTAK Türk Ulusal Bilim e-Altyapısı (TRUBA) üzerinde gerçekleştirilmiştir.

Tablo 4.2. C2C12 hücre farklılaşması sırasında *Des* geni ile korelasyon gösteren genlerin belirlenmesine yönelik gerçekleştirilen RNA-seq veri analizi iş akışının özeti.

Analiz Basamağı	Kullanılan araç/kaynak	Detay
Veri Kalite Kontrolü	FastQC	Ham RNA-seq okuma verilerinin kalite skorları, baz kompozisyonu, GC içeriği, adaptör kontaminasyonu ve olası teknik sorunlar FastQC raporları kullanılarak değerlendirilmiş; verilerin sonraki analiz basamakları için uygunluğu doğrulanmıştır.
Referans genom ve anotasyon dosyasının seçimi	GENCODE M23/GRCm38.p6	Fare genomuna ait GRCm38.p6 referans genomu ve bu genome uyumlu GENCODE M23 anotasyon dosyası kullanılmıştır.
Okumaların referans genoma hizalanması	HISAT2	Ham okuma verileri, HISAT2 aracı kullanılarak fare referans genomuna hizalanmış ve her bir okumanın genom üzerindeki olası konumu belirlenmiştir.
Gen ifadesinin miktarlandırılması	FeatureCounts	Hizalanmış okuma verileri kullanılarak anotasyon dosyasında tanımlı gen bölgelerine karşılık gelen okuma sayıları belirlenmiştir.
Gen ifade değişimi analizi	DESeq2	Farklılaşma sürecindeki farklı zaman noktaları arasında anlamlı ifade değişikliği gösteren genler belirlenmiştir.
<i>Des</i> ile korelasyon analizi	Spearman Korelasyon Testi	<i>Des</i> geni ile diğer genlerin ifade düzeyleri arasındaki ilişki Spearman korelasyon testi ile değerlendirilmiş; <i>Des</i> ile yüksek korelasyon gösteren genler belirlenmiştir.
Gen Ontolojisi analizi	GO Analizi	<i>Des</i> ile yüksek korelasyon gösteren genlerin yer aldığı biyolojik süreçler, moleküler işlevler ve hücrel bileşenler Gene Ontology terimleri kullanılarak analiz edilmiştir.

Her iki veri setinde de gen ifade değişimi analizi *DESeq2* ile gerçekleştirilmiştir. PRJNA89011 veri seti gen ifade değişiminin görselleştirilmesi (Şekil 4.5 ve Şekil 4.6) ile GO analizinde (Şekil 4.7), PRJNA328159 veri seti ise iki veri seti arasında ortak genlerin belirlenmesi amacıyla Venn diyagramı analizinde (Şekil 4.8) kullanılmıştır.

Her iki veri setine aynı filtreleme kriterleri uygulanmıştır (Spearman korelasyon katsayısı $\geq 0,90$, protein kodlayan genler, kas ilişkili genler ve farklılaşmaya bağlı ifade değişikliği gösteren genler). Analiz sonucunda her iki veri setinde de *Des* ile yüksek korelasyon gösteren iki ortak gen (*Ybx3* ve *Tcf23*) belirlenmiştir (Şekil 4.8). Ayrıca *Des* ile yüksek korelasyon gösteren kas ilişkili genler, *AnimalTFDB* v4.0 veri tabanı kullanılarak transkripsiyon faktörü ve transkripsiyon düzenleyicisi özellikleri açısından incelenmiş; bu genlere ait GO biyolojik işlev analizi sonuçları Şekil 4.7'da sunulmuştur.

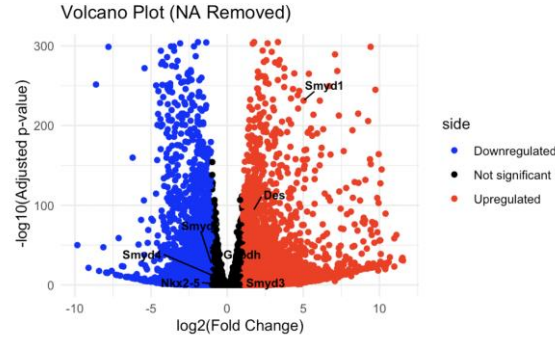
deseq2_non_differentiated_to_differentiated							
gene_id	baseMean	log2FoldChange	lfcSE	stat	pvalue	padj	gene_name
ENSMUSG00000000001.4	1466.39583078343	-0.866739919571118	0.0564525588413618	-15.3534213038377	3.3598934586015e-53	4.69492512886935e-52	GnaI3
ENSMUSG00000000003.15	0	NA	NA	NA	NA	NA	Pbsn
ENSMUSG000000000028.15	238.327839744176	-2.8202327966213	0.126753562102029	-22.249732077361	1.13468509667939e-109	3.63823848415691e-108	Cdc45
ENSMUSG000000000031.16	28275.968212164	5.0793624227977	0.181916777481943	27.9213522419716	1.46907611698447e-171	8.67776191882913e-170	H19
ENSMUSG000000000037.16	2.64393357926195	-3.54636763727262	1.14618213465886	-3.09406989520749	0.00197430967966557	0.00428958000031193	Scml2
ENSMUSG000000000049.11	42.165638409396	-0.483150983545559	0.308497014814333	-1.56614476103226	0.117314731166186	0.181614503213382	Apoh
ENSMUSG000000000056.7	614.423405964468	1.67781141142189	0.0906224028713804	18.5143116741585	1.58307149735817e-76	3.25029884011493e-75	Narf

Şekil 4.5. PRJNA89011 RNA-seq veri setinde C2C12 hücre farklılaşmasına bağlı gen ifade değişimi analizi. *DESeq2* analizi sonucunda farklılaşma sürecinde ifade düzeyi değişen temsili genler gösterilmektedir. Pozitif $\log_2$ fold change ($\log_2FC$) değerleri farklılaşmış hücrelerde artan, negatif $\log_2FC$ değerleri ise azalan gen ifadesini göstermektedir.

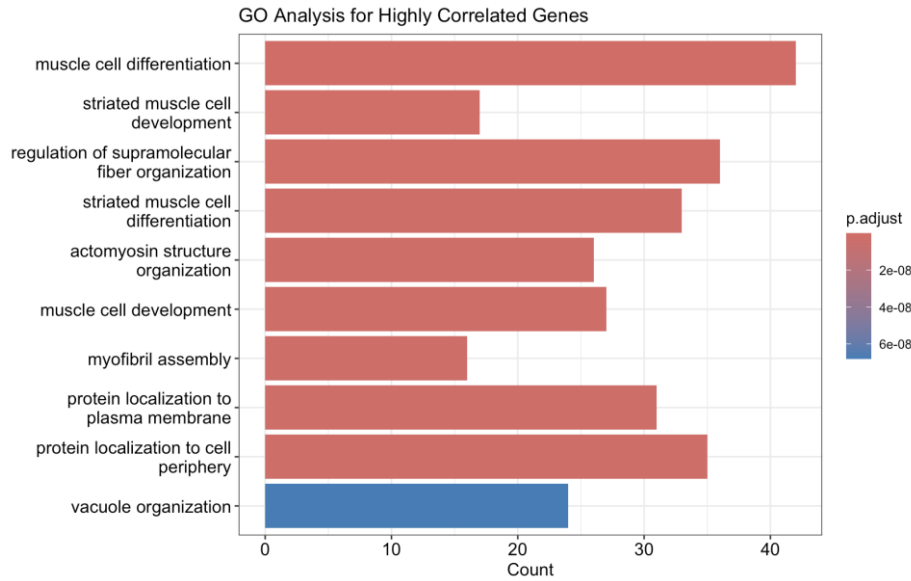
RNA-seq analizlerinin ardından, çalışma grubumuz tarafından daha önce yabanıl tip zebra balığı kas dokusunda gerçekleştirilen Desmin–Lamin B1 Co IP–MS verileri yeniden değerlendirilmiştir (9). Co IP-MS analizinde Desmin ve/veya Lamin B1 ile birlikte zenginleşen, özellikle çekirdek ilişkili proteinler incelenmiş ve elde edilen proteomik veriler RNA-seq analiz sonuçları ile bütünleştirilmiştir. Her iki veri kaynağında ortak olarak öne çıkan proteinler, veri yakınsaması (*convergence*) yaklaşımı temel alınarak aday proteinler olarak belirlenmiştir.

Bu değerlendirme sonucunda SMYD1 (SET and MYND domain-containing protein 1), hem Co IP-MS analizinde Desmin-Lamin B1 ile birlikte zenginleşmesi hem de RNA-seq analizinde *Des* ile anlamlı pozitif korelasyon göstermesi ($\rho = 0,80$; $p = 0,021$) nedeniyle öncelikli aday protein olarak seçilmiştir. Ayrıca SMYD1'in kasa özgü ifade göstermesi ve çekirdekte metiltransferaz aktivitesine sahip olması adaylığını destekleyen ek özellikler olarak değerlendirilmiştir. SMYD1'in *Des* ile korelasyon katsayısı ($\rho = 0,80$), yüksek korelasyon için belirlenen $\geq 0,90$ eşiğinin altında olmakla

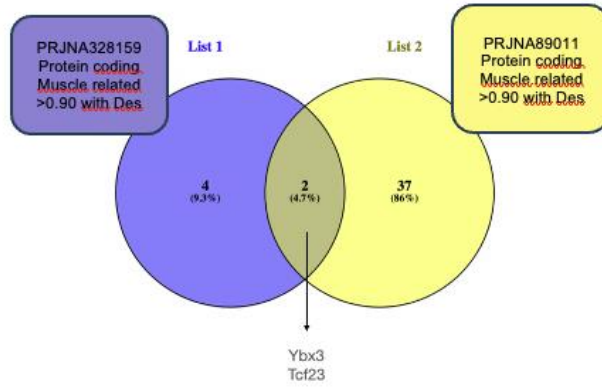
birlikte istatistiksel olarak anlamlıdır ($p_{adj} = 0,020$). Bu nedenle SMYD1'in seçimi yalnızca korelasyon analizine değil, proteomik ve transkriptomik verilerin birlikte değerlendirilmesine dayanmaktadır.



Şekil 4.6. PRJNA89011 veri setinde C2C12 hücre farklılaşmasına bağlı gen ifade değişiminin volkan grafiği. *DESeq2* analizi sonucunda farklılaşmaya bağlı olarak anlamlı gen ifade değişikliği gösteren genler $\log_2$ kat değişimi ($\log_2FC$) ve istatistiksel anlamlılık düzeylerine göre gösterilmiştir. *GAPDH*, farklılaşma sürecinde anlamlı gen ifade değişikliği göstermemesi nedeniyle karşılaştırma amacıyla grafikte referans gen olarak işaretlenmiştir.



Şekil 4.7. PRJNA89011 RNA-seq veri setinde *Des* ile yüksek korelasyon gösteren genlerin GO biyolojik süreç analizi. *Des* geni ile Spearman korelasyon katsayısı $\geq 0,90$ olan genlerin moleküler işlevleri Gen Ontolojisi (*Gene Ontology, GO*) analizi ile değerlendirilmiştir. Grafikte her bir GO terimi için zenginleşen gen sayısı ve istatistiksel anlamlılık düzeyi sunulmaktadır. Çubuk uzunluğu ilgili GO teriminde yer alan gen sayısını, renk skalası ise zenginleşmenin istatistiksel anlamlılığını göstermektedir.



Şekil 4.8. PRJNA328159 ve PRJNA89011 RNA-seq veri setlerinde *Des* ile yüksek korelasyon gösteren ortak genlerin Venn diyagramı. Her iki veri setinde aynı filtreleme kriterleri uygulanarak *Des* geni ile Spearman korelasyon katsayısı $\geq 0,90$ olan, protein kodlayan, kas ilişkili ve farklılaşmaya bağlı ifade değişikliği gösteren genler karşılaştırılmıştır. Ardından *AnimalTFDB* v4.0 veri tabanı kullanılarak transkripsiyon faktörü veya transkripsiyon düzenleyicisi olarak sınıflandırılan genler değerlendirilmiştir. Her iki veri setinde ortak olarak belirlenen genler *Ybx3* (Y-box binding protein 3) ve *Tcf23* (Transcription factor 23)'tür. Bu genler proteomik analizlerle desteklenmemeleri nedeniyle sonraki aday önceliklendirme aşamasına dahil edilmemiştir.

A.

Fraction 3										
Accession	Description	LC	Protein	Unique	Peptide	PSM	# AAs	MW [kDa]	calc. pI	
Q6DC49	Tubulin alpha chain OS=Danio rerio GN=tuba83 PE=2 SV=1 - [Q6DC49_DANRE]	15,33	8	1	5	22	450	50,0	5,06	
F1R5A5	Keratin 5 OS=Danio rerio GN=kt5 PE=1 SV=1 - [F1R5A5_DANRE]	6,95	10	1	5	12	561	58,7	5,41	
A0A0R4IVAB	Sarcoplumenin (Fragment) OS=Danio rerio GN=sf PE=1 SV=1 - [A0A0R4IVAB_DANRE]	19,33	4	4	6	10	388	44,4	6,21	
Q6IQJ2	Tubulin beta chain OS=Danio rerio GN=zgc153264 PE=1 SV=1 - [Q6IQJ2_DANRE]	18,88	10	4	6	10	445	49,8	4,89	
F1QJUE3	Ubiquinol-cytochrome c reductase core protein 1 OS=Danio rerio GN=ugrc1 PE=1 SV=1 - [F1QJUE3_DANRE]	10,93	1	2	4	10	503	55,4	7,18	
B6JMZ1	UDP-glucose pyrophosphorylase 2a OS=Danio rerio GN=ugp2a PE=1 SV=1 - [B6JMZ1_DANRE]	13,81	4	2	5	8	507	56,8	8,46	
Q6PC95	Tubulin alpha chain OS=Danio rerio GN=tuba82 PE=1 SV=1 - [Q6PC95_DANRE]	11,14	2	0	3	8	449	50,1	5,15	
Q6P969	Elongation factor 1-alpha OS=Danio rerio GN=eef1a1a PE=1 SV=1 - [Q6P969_DANRE]	8,66	9	1	4	8	462	50,3	9,07	
F1QQW9	Elongation factor 1-alpha (Fragment) OS=Danio rerio GN=sidney-370b.1 PE=1 SV=1 - [F1QQW9_DANRE]	7,04	2	2	3	6	483	53,6	9,74	
F1QD09	SET and MYND domain-containing 1a OS=Danio rerio GN=smyle1a PE=1 SV=1 - [F1QD09_DANRE]	11,34	3	2	3	9	485	54,5	7,46	

Fraction 5										
Accession	Description	LC	Protein	Unique	Peptide	PSM	# AAs	MW [kDa]	calc. pI	
O93409	Myt2 protein OS=Danio rerio GN=myt2a PE=1 SV=1 - [O93409_DANRE]	49,11	5	8	9	25	169	18,9	4,73	
Q6BEH2	Adenylate kinase isoenzyme 1 OS=Danio rerio GN=aki1 PE=1 SV=1 - [Q6BEH2_DANRE]	46,39	1	5	10	21	194	21,4	8,00	
Q6POG6	Myosin, light chain 1, alkali; skeletal, fast OS=Danio rerio GN=myl1 PE=1 SV=1 - [Q6POG6_DANRE]	48,95	13	3	9	18	190	20,9	4,77	
Q9IBU7	Fast skeletal muscle myosin light polypeptide 3 OS=Danio rerio GN=myt3 PE=1 SV=1 - [Q9IBU7_DANRE]	30,46	7	2	5	12	151	16,8	4,55	
Q7ZUY3	Histone H2AX OS=Danio rerio GN=h2afx PE=2 SV=3 - [Q7ZUY3_DANRE]	37,32	20	1	5	10	142	15,0	10,74	

B.

gene_id	spearman_cor	p_value	padj	gene_name
ENSMUSG00000055027.17	0.866666666666667	0.00268141517103888	0.0281548592959083	Smyd1

Şekil 4.9. Desmin ile ilişkili aday çekirdek proteinlerinin proteomik ve transkriptomik analizlerle belirlenmesi. (A) Daha önce yabancı tip zebra balığı kas dokusunda gerçekleştirilen Desmin–Lamin B Co-IP deneyine ait kütle spektrometrisi verilerinin yeniden değerlendirilmesi sonucunda, Desmin ile birlikte zenginleşen proteinlerin bir kısmı gösterilmektedir. Kapsama (*coverage*), peptit sayısı ve özgün peptit sayısı dikkate alınarak SMYD1 ve Histon H2AX aday proteinler olarak belirlenmiştir. (B) PRJNA89011 RNA-seq veri setinde gerçekleştirilen Spearman korelasyon analizinde *Smyd1* geninin *Des* geni ile pozitif korelasyon gösterdiği belirlenmiştir ($\rho = 0,80$; $p = 0,020681$; $padj = 0,020155$). Bu korelasyon katsayısı, yüksek korelasyon için belirlenen $\geq 0,90$ eşiğinin altında olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlıdır ve proteomik bulgularla birlikte değerlendirilerek SMYD1 öncelikli aday protein olarak seçilmiştir.

Bu bulgu doğrultusunda, Desmin ile SMYD1 arasındaki olası etkileşimin araştırılmasına yönelik deneysel çalışmalara geçilmiştir.

4.3. Nükleer ve Sitoplazmik Fraksiyonlama İşleminin Optimizasyonu

SMYD1'in hem sitoplazmada hem de çekirdekte yerleşimi nedeniyle, yalnızca çekirdek içi protein etkileşimlerinin değerlendirilebilmesi amacıyla Co-IP deneylerinden önce hücreler çekirdek ve sitoplazmik fraksiyonlara ayrılmıştır. Bu amaçla NE-PER Nükleer ve Sitoplazmik Ekstraksiyon Kiti kullanılmıştır.

Fraksiyonlama işleminden önce, farklı hücre sayılarında yeterli protein verimi elde edilebilmesi amacıyla kit protokolü optimize edilmiştir. Optimizasyon çalışmalarına insan miyoblast hücre hattı LHCN-M2 ile başlanmış, elde edilen

sonuçlar doğrultusunda aynı yaklaşım fare miyoblast hücre hattı C2C12'ye uygulanmıştır.

Elde edilen nükleer ve sitoplazmik fraksiyonların protein konsantrasyonları BCA yöntemi ile belirlenmiş ve sonuçlar Tablo 4.3'te sunulmuştur. Protein konsantrasyonlarının kullanılan hücre sayısı ve tampon hacmine bağlı olarak değiştiği görülmüştür. En yüksek protein verimi yaklaşık 15 milyon hücre kullanılarak gerçekleştirilen fraksiyonlamada elde edilmiştir. Bu nedenle sonraki deneylerde yaklaşık 15 milyon hücre ve bu koşullar için optimize edilen tampon hacimleri kullanılmıştır.

Tablo 4.3. LHCN-M2 miyoblast hücrelerinde farklı hücre miktarları ve tampon hacimleri kullanılarak gerçekleştirilen nükleer ve sitoplazmik fraksiyonlama optimizasyonunda elde edilen protein konsantrasyonları. V: NE-PER kit protokolünde önerilen tampon hacmini ifade etmektedir. 10V, 20V ve 50V değerleri kullanılan tampon hacminin protokole önerilen hacme göre ayarlandığını göstermektedir.

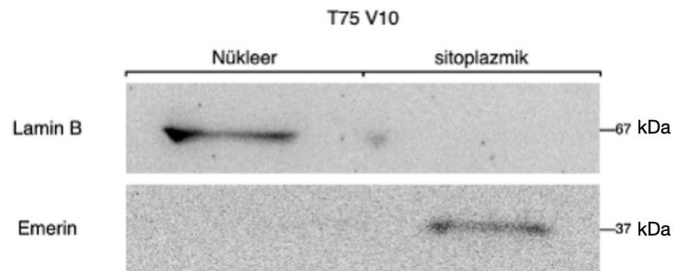
Örnek İsmi	Konsantrasyon(mg/ml)	Hücre Miktarı
T75 10V sit	5,6	~3 milyon hücre
T75 10V nuc	7,8	~3 milyon hücre
T175 50V sit	1,369	~6 milyon hücre
T175 50V nuc	0,195	~6 milyon hücre
T175 10V sit	3,33	~5,5 milyon hücre
T175 10V nuc	2,22	~5,5, milyon hücre
T175 20V sit	3,45	~5,5 milyon hücre
T175 20V nuc	0,77	~5,5 milyon hücre
T75 20V sit	6,7	~15 milyon hücre (6 T75 kullanıldı)
T75 20V nuc	3,7	~15 milyon hücre (6 T75 kullanıldı)
T75 10V sit	6,22	~3 milyon hücre
T75 10V nuc	3,2	~3 milyon hücre

Elde edilen nükleer ve sitoplazmik fraksiyonların protein konsantrasyonları BCA yöntemi ile belirlenmiştir. Analiz sonucunda, protein konsantrasyonlarının kullanılan hücre sayısı ve uygulanan tampon hacmine bağlı olarak değiştiği gözlenmiştir. Yaklaşık 15 milyon hücre kullanılarak gerçekleştirilen fraksiyonlamada sitoplazmik ve nükleer fraksiyonlarda sırasıyla 6,7 mg/mL ve 3,7 mg/mL protein

konsantrasyonu elde edilmiştir. Bu koşullar, sonraki Co-IP deneyleri için yeterli miktarda nükleer ve sitoplazmik protein sağladığından, izleyen fraksiyonlama deneylerinde yaklaşık 15 milyon hücre ve optimizasyon sonucunda belirlenen tampon hacimleri kullanılmıştır.

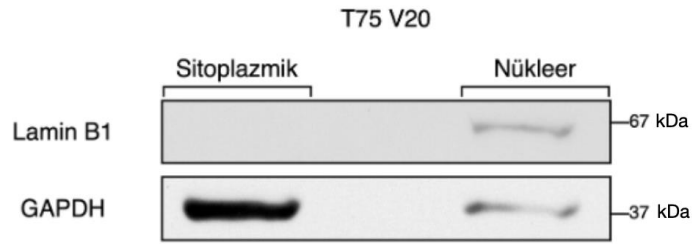
4.4. Fraksiyonlama İşleminin Western Blot Analizi ile Doğrulanması

Elde edilen nükleer ve sitoplazmik protein fraksiyonları, fraksiyonlamanın doğrulanması amacıyla WB yöntemi ile analiz edilmiştir. Başlangıçta nükleer belirteç olarak Emerin, sitoplazmik belirteç olarak ise GAPDH kullanılmıştır. Ancak Emerin proteini beklenenin aksine sitoplazmik fraksiyonda tespit edilmiş, nükleer fraksiyonda ise saptanmamıştır (Şekil 4.10). Buna karşın Lamin B1 yalnızca nükleer fraksiyonda gözlenmiş ve güvenilir bir nükleer belirteç olarak değerlendirilmiştir. Bu nedenle sonraki deneylerde nükleer belirteç olarak Lamin B1 kullanılmıştır.

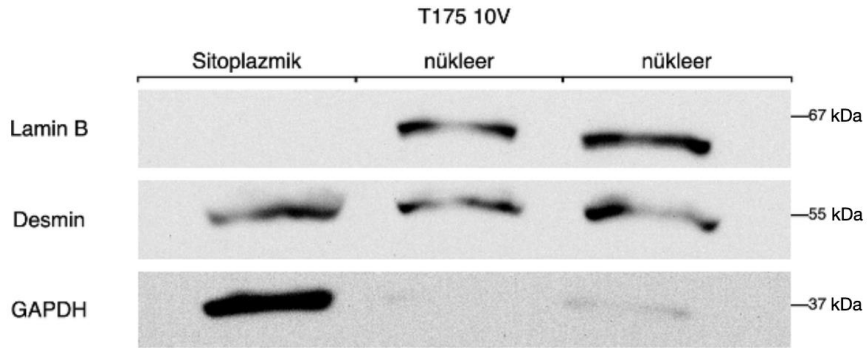


Şekil 4.10. LHCN-M2 miyoblast hücrelerinde nükleer fraksiyonun Lamin B1 ve Emerin belirteçleri kullanılarak doğrulanmasına ait Western blot analizi. NE-PER kiti ile elde edilen nükleer ve sitoplazmik protein fraksiyonları Lamin B1 (67 kDa) ve Emerin (37 kDa) antikorları ile analiz edilmiştir. Lamin B1 yalnızca nükleer fraksiyonda saptanırken, Emerin beklenenin aksine sitoplazmik fraksiyonda gözlenmiştir.

Lamin B1'in nükleer belirteç olarak kullanıldığı doğrulama deneylerinde, Lamin B1 yalnızca nükleer fraksiyonda, GAPDH ise ağırlıklı olarak sitoplazmik fraksiyonda saptanmıştır (Şekil 4.11). Desmin proteini hem sitoplazmik hem de nükleer fraksiyonda saptanmış olup, bu bulgu Desmin'in nükleer protein etkileşimlerinin araştırılmasına yönelik sonraki deneyler için temel oluşturmuştur (Şekil 4.12).

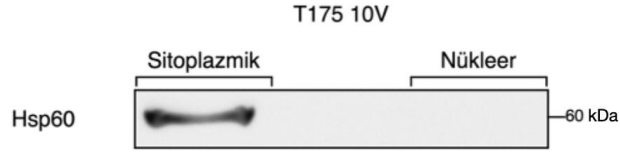


Şekil 4.11. LHCN-M2 miyoblast hücrelerinde fraksiyonlamanın Lamin B1 ve GAPDH belirteçleri ile doğrulanmasına ait Western blot analizi. Nükleer belirteç olarak Lamin B1 (67 kDa), sitoplazmik belirteç olarak GAPDH (37 kDa) kullanılmıştır. Lamin B1 yalnızca nükleer fraksiyonda, GAPDH ise ağırlıklı olarak sitoplazmik fraksiyonda saptanmıştır.



Şekil 4.12. LHCN-M2 miyoblast hücrelerinde Desmin'in nükleer ve sitoplazmik fraksiyonlardaki dağılımını gösteren Western blot analizi. Fraksiyonlamanın doğrulanması amacıyla nükleer belirteç olarak Lamin B1 (67 kDa), sitoplazmik belirteç olarak GAPDH (37 kDa) kullanılmıştır. Desmin (≈ 53 kDa) hem sitoplazmik hem de nükleer fraksiyonda saptanmıştır. Lamin B1 yalnızca nükleer fraksiyonda gözlenirken, GAPDH ağırlıklı olarak sitoplazmik fraksiyonda saptanmıştır. Desmin'in teorik moleküler ağırlığı 53,5 kDa olup, kullanılan antikorun tanıdığı bant 50–55 kDa aralığında gözlenebilmektedir.

GAPDH'nin nükleer fraksiyonda da düşük düzeyde saptanması nedeniyle, sitoplazmik fraksiyonun doğrulanması için daha özgül bir belirteç olarak Hsp60 proteini kullanılmıştır.

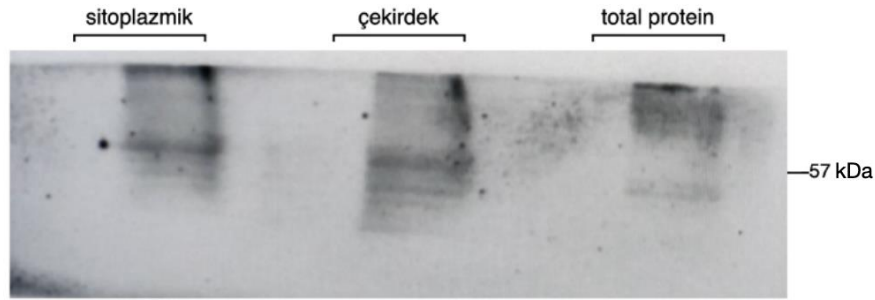


Şekil 4.13. LHCN-M2 miyoblast hücrelerinden elde edilen (T175 V10) sitoplazmik ve nükleer fraksiyonlarda Hsp60 ifadesinin Western blot analizi. Sitoplazmik belirteç olarak kullanılan Hsp60 (60 kDa) yalnızca sitoplazmik fraksiyonda tespit edilmiş, nükleer fraksiyonda ise bant gözlenmemiştir.

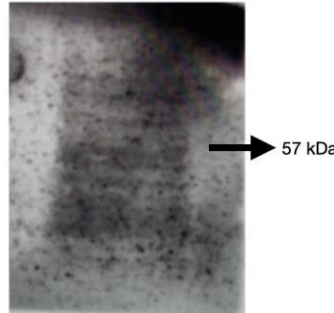
4.5. SMYD1 Antikor Optimizasyonu

Fraksiyonlama deneylerinin optimizasyonunun ardından, SMYD1 proteininin Western blot yöntemi ile güvenilir şekilde saptanabilmesi amacıyla antikor optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda primer antikor dilüsyonu, bloklama koşulları ve membran tipi gibi deneysel parametreler karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar aşağıda sunulmuştur.

A.



B.



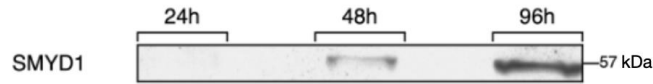
Şekil 4.14. LHCN-M2 miyoblast hücrelerinde SMYD1 antikorunun optimizasyonuna yönelik Western blot analizi. (A) Sitoplazmik, nükleer ve toplam protein örneklerinde SMYD1 antikoruna ile gerçekleştirilen Western blot analizi. (B) SMYD1'in beklenen moleküler ağırlığına karşılık gelen bölgenin büyütülmüş görünümü. Özgül bir bant gözlenmemiştir.

Şekil 4.14'da gösterildiği üzere, ilk WB analizinde beklenen moleküler ağırlıkta özgül bir SMYD1 bandı saptanmamıştır. Bunun üzerine primer antikor dilüsyonu (1:5000'den 1:1000'e), bloklama koşulu (%5 süt yerine %5 BSA) ve membran tipi (nitroselüloz yerine PVDF) değiştirilerek analizler tekrarlanmıştır. Ancak bu optimizasyonlara rağmen özgül bir SMYD1 bandı elde edilememiştir. Aynı membranlarda GAPDH yükleme kontrolünün beklenen şekilde saptanması, Western blot analizlerinin teknik olarak başarılı olduğunu göstermiştir.

Bunun ardından, SMYD1 ifadesi gösterdiği bilinen C2C12 miyoblast hücrelerinde de Western blot analizi gerçekleştirilmiş, ancak benzer şekilde beklenen moleküler ağırlıkta özgül bir SMYD1 bandı gözlenmemiştir.

Son olarak, SMYD1 protein düzeyinin farklılaşma sürecine bağlı olarak değişebileceği göz önünde bulundurularak, LHCN-M2 hücrelerinden farklılaşmanın 24., 48. ve 96. saatlerinde elde edilen toplam protein örnekleri analiz edilmiştir (Şekil 4.15). SMYD1 proteini 24. saatte saptanamazken, 48. saatte zayıf, 96. saatte ise belirgin düzeyde gözlenmiştir. Bunun üzerine 96 saat farklılaştırılmış LHCN-M2 hücrelerinde nükleer ve sitoplazmik fraksiyonlama gerçekleştirilmiş ve elde edilen fraksiyonlar Western blot ile analiz edilmiştir. SMYD1 proteini sitoplazmik fraksiyonda saptanırken, nükleer fraksiyonda gözlenmemiştir (Şekil 4.15).

(A)



(B)

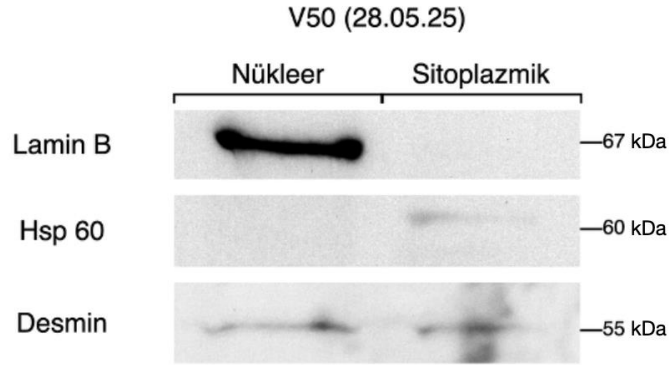


Şekil 4.15. LHCN-M2 hücrelerinden farklılaşmanın 24., 48. ve 96. saatlerinde elde edilen toplam protein örneklerinde SMYD1 proteininin Western blot analizi. (A) SMYD1 proteini 24. saatte saptanamazken, 48. saatte zayıf düzeyde, 96. saatte ise belirgin düzeyde saptanmıştır. (B) Farklılaşmanın 96. saatinde elde edilen nükleer ve sitoplazmik fraksiyonların Western blot analizi. SMYD1 proteini yalnızca sitoplazmik fraksiyonda saptanmıştır.

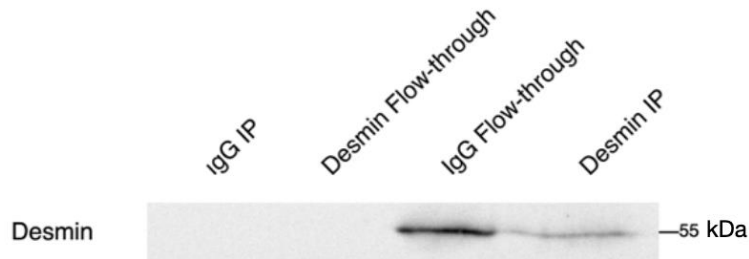
SMYD1 proteini yalnızca sitoplazmik fraksiyonda saptandığından, bu protein ile ilgili deneylere devam edilmemiştir. Çalışmanın sonraki aşamasında Desmin'in nükleer etkileşim ağının belirlenmesi amacıyla nükleer Desmin IP ve kütle spektrometrisi analizlerine geçilmiştir.

4.6. Desmin IP Deneyleri

Gereç ve Yöntem bölümünde (Bölüm 3.2.11) ayrıntıları verilen IP işlemi, LHCN-M2 miyoblast hücrelerinden elde edilen nükleer protein fraksiyonları kullanılarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.16. LHCN-M2 miyoblast hücrelerinden elde edilen nükleer ve sitoplazmik protein fraksiyonlarının Western blot analizi. Lamin B1 (67 kDa) ve Hsp60 (60 kDa) belirteçleri kullanılarak fraksiyonlama doğrulanmış, Desmin (~53 kDa) proteininin nükleer ve sitoplazmik fraksiyonlardaki varlığı gösterilmiştir.



Şekil 4.17. Desmin IP'sinin Western blot analizi. Desmin antikoruna ile gerçekleştirilen IP örneğinde Desmin bandı tespit edilmiş, buna karşılık flow-through fraksiyonunda Desmin sinyali gözlenmemiştir. IgG kontrol örneğinde ise Desmin bandı saptanmamıştır.

LHCN-M2 miyoblast hücrelerinden izole edilen nükleer ve sitoplazmik fraksiyonların saflığı, fraksiyona özgü belirteç proteinlerin Western blot analizi ile değerlendirilmiştir (Şekil 4.16). Nükleer belirteç Lamin B1'nin yalnızca nükleer fraksiyonda, sitoplazmik belirteç Hsp60'ın ise yalnızca sitoplazmik fraksiyonda saptanması, fraksiyonlamanın başarılı şekilde gerçekleştirildiğini göstermektedir. Aynı

analizde Desmin proteini hem nükleer hem de sitoplazmik fraksiyonlarda tespit edilmiştir (Şekil 4.16).

Desmin'in nükleer fraksiyondaki olası etkileşim ortaklarını belirlemek amacıyla, elde edilen nükleer protein özütlerine Desmin antikoru kullanılarak manyetik boncuk temelli IP uygulanmıştır. IP'nin başarısı, kütle spektrometrisi analizinden önce Western blot yöntemi ile değerlendirilmiştir (Şekil 4.17). Desmin IP örneğinde Desmin bandı belirgin olarak tespit edilirken, *flow-through* (akış geçişi) örneğinde Desmin sinyali gözlenmemiştir. Ayrıca, IgG izotip kontrol (*mock IP*) örneğinde Desmin bandı saptanmamıştır. Bu bulgular, Desmin'in immünopresipitasyon ile başarıyla zenginleştirildiğini göstermektedir. Elde edilen Desmin IP ve IgG IP elüatları, Desmin ile birlikte çöken nükleer proteinlerin tanımlanması amacıyla kütle spektrometrisi (MS) analizine gönderilmiştir.

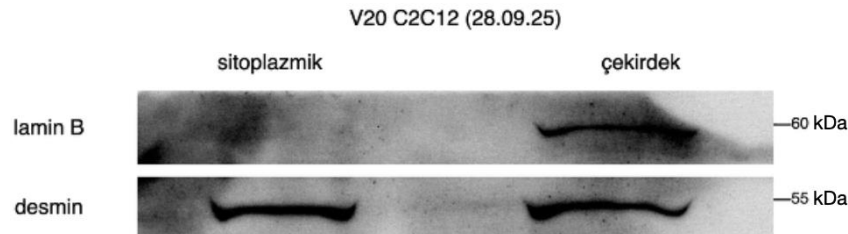
4.7. C2C12 Hücrelerinde Nükleer Fraksiyonlama ve Doğrulama

LHCN-M2 hücrelerinde gerçekleştirilen IP deneylerinin başarıyla doğrulanmasına rağmen, elde edilen nükleer protein miktarı IP sonrası kütle spektrometrisi (IP-MS) analizi için yeterli olmamıştır. LHCN-M2 hücre hattının sınırlı proliferasyon kapasitesi nedeniyle sonraki deneylerde daha yüksek proliferasyon kapasitesine sahip C2C12 fare iskelet kası hücre hattı kullanılmıştır. C2C12 hücreleri, grubumuzun Desmin'in çekirdek içi ifadesine ilişkin önceki bulguları doğrultusunda, farklılaşmanın erken evresini temsil eden 28. saatte toplanarak IP deneylerinde kullanılmıştır (50).

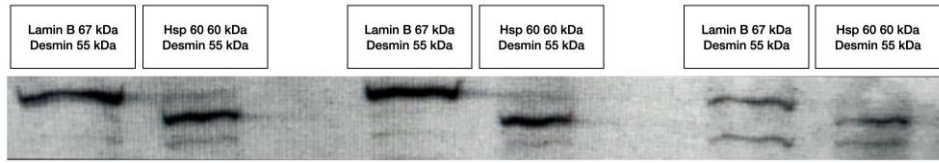
Tablo 4.4. C2C12 miyotüp örneklerinde farklı tampon hacimleri kullanılarak elde edilen nükleer ve sitoplazmik protein konsantrasyonları. V40, V50 ve V60 ifadeleri, hücre peleti hacmine göre uygulanan tampon hacimlerini göstermektedir. Hücre miktarları, önceki fraksiyonlama optimizasyonlarında belirlenen hücre peleti–tampon hacmi ilişkisi esas alınarak yaklaşık olarak hesaplanmıştır.

Örnek	Konsantrasyon (mg/ml)	Hücre Miktarı
V40 nuc miyotüp	4,170	~10 milyon hücre
V40 sit miyotüp	7,924	~10 milyon hücre
V50 nuc miyotüp	3,632	~10 milyon hücre
V50 sit miyotüp	6,060	~10 milyon hücre
V60 nuc miyotüp	3,032	~10 milyon hücre
V60 sit miyotüp	5,337	~10 milyon hücre

Nükleer fraksiyonlarda protein konsantrasyonları 1,176–4,170 mg/mL, sitoplazmik fraksiyonlarda ise 3,860–7,924 mg/mL arasında değişmiştir. Genel olarak sitoplazmik fraksiyonlarda elde edilen protein konsantrasyonlarının nükleer fraksiyonlara kıyasla daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Elde edilen protein miktarları, IP deneylerinde kullanılmak üzere yeterli bulunmuştur.



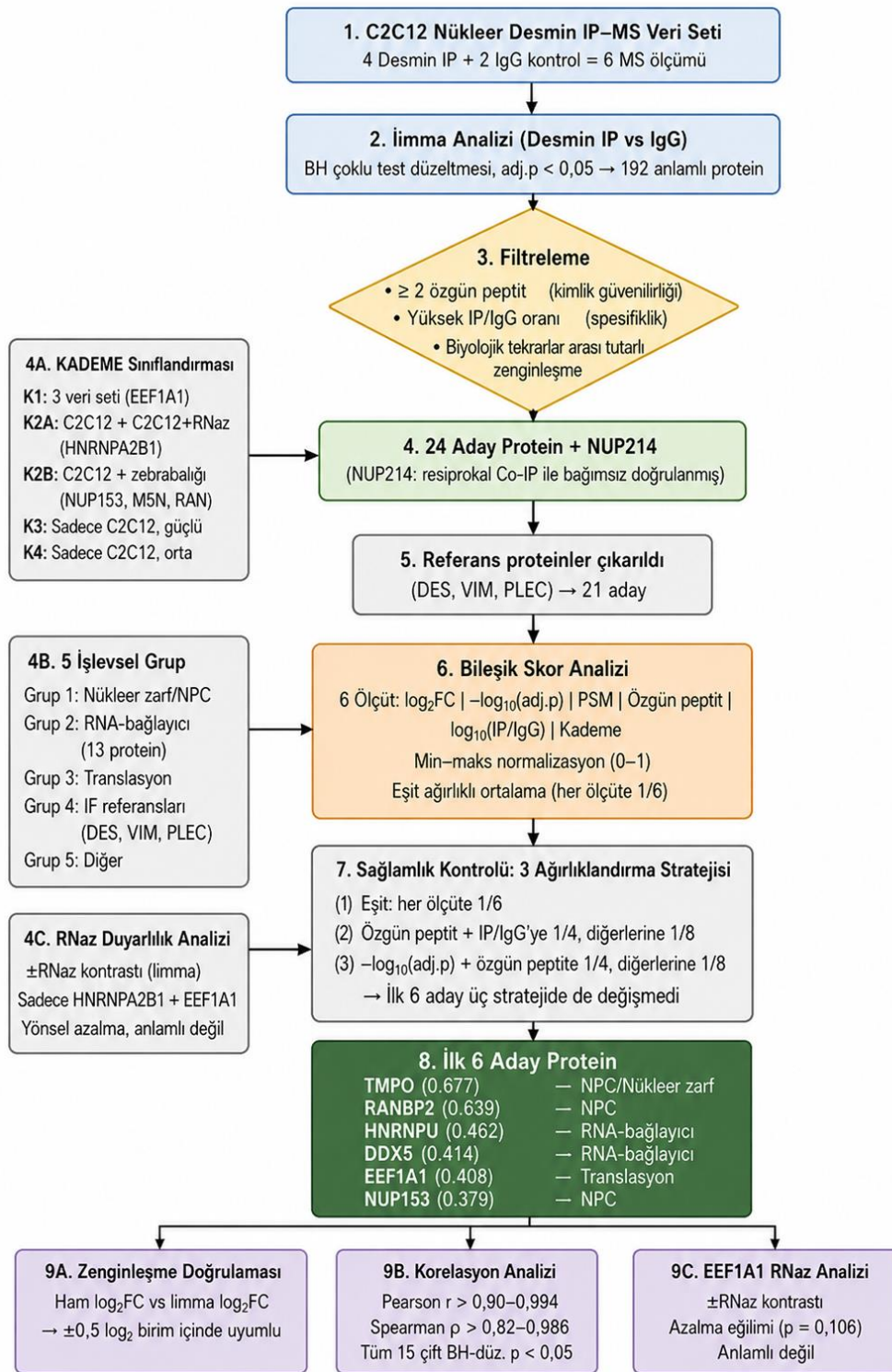
Şekil 4.18. NE-PER Nükleer ve Sitoplazmik Ekstraksiyon Kiti kullanılarak fraksiyonlanan C2C12 miyotüp hücrelerinden elde edilen sitoplazmik ve nükleer protein örneklerinin Western blot analizi. Nükleer belirteç olarak kullanılan Lamin B1 (67 kDa) proteini yalnızca nükleer fraksiyonda tespit edilmiş olup, fraksiyonlamanın başarılı şekilde gerçekleştirildiğini göstermektedir. Desmin proteini hem sitoplazmik hem de nükleer fraksiyonlarda gözlenmiştir. Sitoplazmik belirteç olarak kullanılan Hsp60 proteini ise bu analizde belirgin olarak tespit edilememiştir.



Şekil 4.19. NE-PER Nükleer ve Sitoplazmik Ekstraksiyon Kiti kullanılarak fraksiyonlanan C2C12 miyotüp hücrelerinden elde edilen sitoplazmik ve nükleer protein örneklerinin Western blot analizi. Nükleer belirteç olarak kullanılan Lamin B1 (67 kDa) yalnızca nükleer fraksiyonda, sitoplazmik belirteç Hsp60 (60 kDa) ise yalnızca sitoplazmik fraksiyonda tespit edilmiştir. Bu dağılım, fraksiyonlama işleminin başarılı şekilde gerçekleştirildiğini göstermektedir. Desmin (~53 kDa) proteini ise hem sitoplazmik hem de nükleer fraksiyonlarda tespit edilmiştir.

4.8. C2C12 Miyotüp Hücrelerinde Nükleer Desmin IP-MS Analizi ve Aday Proteinlerin Belirlenmesi

Desmin'in nükleer etkileşim ortaklarını belirlemek amacıyla, farklılaşmanın erken dönemindeki (28. saat) C2C12 miyotüplerinden elde edilen nükleer proteinler kullanılarak Desmin IP gerçekleştirildi. Deney, iki biyolojik Desmin-IP örneği (IP1 ve IP2) ile bir IgG izotip kontrolü kullanılarak yürütüldü. IP öncesinde tüm örneklerin protein derişimleri 3 mg/mL'ye eşitlendi. LC-MS/MS analizi öncesinde peptit derişimleri Pierce™ Quantitative Peptide Assay yöntemi ile ölçülmüş ve IP1, IP2 ve IgG kontrolü için sırasıyla 1,09, 1,03 ve 0,91 mg/mL olarak belirlenmiştir. Daha sonra tüm örneklerin peptit derişimleri eşitlenerek LC-MS/MS analizine alınmıştır (Tablo 4.5). Desmin IP-MS verilerinin analiz süreci ve aday proteinlerin önceliklendirilmesinde izlenen iş akışı Şekil 4.20'de özetlenmiştir.



Şekil 4.20. C2C12 Nükleer Desmin IP-MS verilerinin analizi ve aday protein önceliklendirme iş akışı. Yöntemler bölümünde (Şekil 3.3) sunulan analiz iş akışı, sonraki bulguların değerlendirme sırasının izlenmesini kolaylaştırmak amacıyla bu bölümde yeniden sunulmuştur. Şekil, C2C12 nükleer Desmin IP-MS verilerinin istatistiksel analizinden başlayarak aday kalite filtreleri, birleşik skor hesaplaması ve deneysel doğrulamaya kadar izlenen analitik süreci özetlemektedir.

Desmin IP ve IgG kontrol örneklerinden elde edilen LC-MS/MS verileri analiz edilerek güvenilir protein tanımlamaları elde edilmiştir. Protein tanımlamalarında yanlış keşif oranı (*false discovery rate, FDR*) $\leq 0,01$ eşiği uygulanmış ve bu kriteri karşılayan proteinler kantitatif karşılaştırmalara dâhil edilmiştir. LC-MS/MS sistem performansının değerlendirilmesi amacıyla analiz edilen HeLa kalite kontrol (*QC*) örneğinde, $FDR \leq 0,01$ eşiğinde toplam 3412 protein ve 19.946 peptit grubu güvenilir şekilde tanımlanmıştır. Desmin IP ve IgG kontrol örneklerinin karşılaştırılması sonucunda ise Desmin IP örneklerinde zenginleşen aday nükleer proteinler belirlenmiştir (Tablo 4.5).

Tablo 4.5. C2C12 miyotüp hücrelerinde Nükleer Desmin IP-MS analizi sonucunda tanımlanan aday proteinler. Tabloda proteinlere ait *Gene ID*, gen sembolü, ilişkili *Reactome* yolu, özgün peptit sayısı, IP/IgG bolluk oranı ve p değerleri gösterilmektedir. Tabloya $p \leq 0,1$ olan proteinler dahil edilmiştir.

Ensembl Gene ID	Gene Symbol	Gene ID	Reactome Path	WikiPathways	# Protein Pathw	Abundance Ratio: (IP) / (I - T)	Abundance Ratio P-Value: (IP) / (I - T)	Abundance ratio_incl_IP/IgG	-T/Abund
ENSMUSG000000026193	Fln1	G5E8B8; mmu:142 Cell surface Inter- Focal adhesion: PI			22	6,606	0,140611319	47,34216353	
ENSMUSG000000035086	Becn1	mmu:56208; O885 Ub-specific proces			3	0,301	0,058085498	2,397321978	
ENSMUSG000000032231	Anxa2	mmu:12306; P073 Neutrophil degran Prostaglandin synt			4	3,244	0,117603184	24,27041787	
ENSMUSG000000026728	Vim	mmu:22352; O087 Striated Muscle Cc Striated muscle co			8	19,376	0,125533831	159,565434	
ENSMUSG000000026864	Hspa5	mmu:14828; O356 Antigen Presentati Mapk signaling pa			3	3,81	0,092454136	27,14950364	
ENSMUSG000000025278	Flnb	E9QNV9; mmu:281 ISG15 antiviral me			1	3,066	0,121154667	21,83161508	
ENSMUSG000000028225	Actg1	mmu:11465; P025 Platelet degranula Striated muscle co			30	1,681	0,102970793	12,12724996	
ENSMUSG000000032226	Rarb2	E9QW01; mmu:19 Separation of Sisy			20	16,136	0,130132056	82,61130694	
ENSMUSG000000015656	Hspa8	mmu:15481; P081 Neutrophil degran TGF-beta receptor			16	3,28	0,063105175	22,8420358	
ENSMUSG000000035783	Acta2	mmu:11475; P039 Formation of the c Striated muscle co			5	3,848	0,13450413	28,43972738	
ENSMUSG000000047675	Rps8	mmu:20116; P090 L13a-mediated tra Cytoplasmic ribosc			13	3,796	0,11397606	27,56012954	
ENSMUSG00000001424	Snd1	mmu:56463; Q3TT			0	2,974	0,100501429	21,90581144	
ENSMUSG000000019961	Tmpt	B2RU89; Q61028;			0	67,163	0,092146199	1490,03412	
ENSMUSG000000037742	Eef1a1	mmu:13627; P101 Neutrophil degran Translation factor			6	2,339	0,065331801	15,38048347	
ENSMUSG000000032399	Rpl4	mmu:67891; Q9CY L13a-mediated tra Cytoplasmic ribosc			12	11,374	0,066092595	77,09959495	
ENSMUSG000000029622	Arcp1b	mmu:11867; Q9CR Regulation of actin B cell receptor sigi			5	4,418	0,043773863	29,87759205	
ENSMUSG00000004501	Dpsl3	mmu:22240; Q621 CRMPs in Sema3A			1	29,16	0,08240322	161,0433456	
ENSMUSG000000074129	Rpl13a	mmu:22121; P192 L13a-mediated tra Cytoplasmic ribosc			11	9,84	0,001141217	61,65265981	
ENSMUSG000000017820	Tgm2	mmu:21817; O885			0	25,809	0,102570222	117,9735711	
ENSMUSG000000020372	Rack1	mmu:14694; P253 Regulation of TNF TNF-alpha NF-kB s			7	1,279	0,094379538	8,798986613	
ENSMUSG000000026043	Col3a1	mmu:12825; P081 ECM proteoglycan Focal adhesion: PI			15	17,69	0,142553128	84,55030511	
ENSMUSG000000059248	Septin9	A2AGU2; A2AGU4;			0	2,006	0,047612081	13,73975133	
ENSMUSG000000029614	Rpl6	mmu:19988; P479 L13a-mediated tra Cytoplasmic ribosc			12	5,422	0,136939635	40,73148989	
ENSMUSG000000026421	Csrp1	mmu:13007; P973	Mecp2 and associ		1	2,578	0,11260011	19,30180334	
ENSMUSG000000047215	Rpl9	mmu:20005; P514 L13a-mediated tra Cytoplasmic ribosc			12	7,065	0,028305048	47,70405324	
ENSMUSG000000062647	Rpl7a	mmu:27176; P129	Cytoplasmic ribosc		1	21,161	0,102798695	158,7747375	
ENSMUSG000000022048	Dpsl2	mmu:12934; O085 Recycling pathway Mechanisms assoc			3	11,96	0,047423716	89,80212852	
ENSMUSG000000057666	Gapdh	A6H6A8; mmu:144 Glycolysis; Glucon Glycolysis and gluc			3	1,932	0,069747464	13,81823901	
ENSMUSG000000024236	Sul1	E9QD83; mmu:225	Androgen receptor		1	17,48	0,081267828	174,4188574	
	Srm1	E9QNW8; mmu:51 mRNA Splicing - l1 mRNA processing			7	6,76	0,058832574	44,98343602	
ENSMUSG000000023004	Tuba1b	mmu:22143; P052 COP1-dependent G			24	3,129	0,146577746	23,94602986	

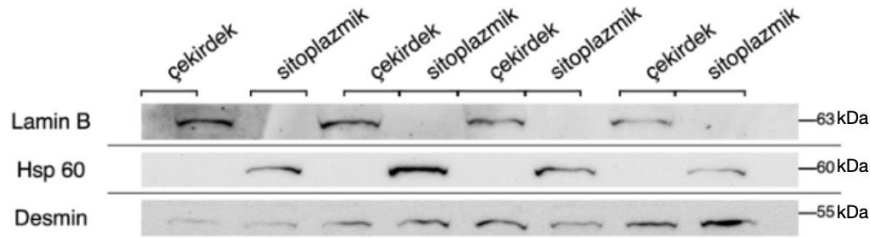
Protein bolluk değerleri kullanılarak hesaplanan IP/IgG zenginleşme oranları, Desmin'in kontrol grubuna göre 47.5 kat, Vimentin'in ise 159 kat zenginleştiğini gösterdi. Bu sonuçlar, IP'nin hedef proteini etkin biçimde zenginleştirdiğini ve ara filament ağına ait bilinen ilişkili proteinlerin birlikte çöktüğünü desteklemektedir.

Aday proteinlerin önceliklendirilmesinde en az iki özgün peptit tanımlanmaları, IP/IgG zenginleşme oranının iki katın üzerinde olması, istatistiksel analiz sonuçları, biyolojik ve teknik tekrarlar arasındaki tutarlılık ile biyolojik işlevleri birlikte değerlendirildi. Bu kriterler doğrultusunda Thymopoietin (TMPO veya LAP2 (*Lamina-associated polypeptide 2*)), Nucleoporin 153 (NUP153), Nucleoporin 358

(NUP358 veya RANBP2 (*RAN-binding protein 2*)), DEAD-box helicase 5 (DDX5) ve Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U (HNRNPU) proteinleri, Desmin'in öncelikli aday nükleer etkileşim ortakları olarak değerlendirilmiştir.

Bu değerlendirme, C2C12 miyotüp nükleer Desmin IP–MS verilerinin ilk aday taramasını oluşturmaktadır. Aynı veri seti, sonraki bölümde limma tabanlı istatistiksel analiz, çoklu test düzeltmesi ($\text{adj.p} < 0,05$) ve çapraz veri setlerinden elde edilen destekleyici kanıtlar birlikte değerlendirilerek daha kapsamlı bir önceliklendirmeye tabi tutulmuş ve sonuçlar Tablo 4.7'de sunulmuştur

4.9. C2C12 Miyotüp Hücrelerinde RNaz Uygulamalı Nükleer Desmin IP–MS Analizi



Şekil 4.21. C2C12 miyotüp hücrelerinden elde edilen nükleer ve sitoplazmik fraksiyonların Western blot analizi. Örnekler NE-PER Nükleer ve Sitoplazmik Ekstraksiyon Kiti kullanılarak fraksiyonlanmıştır. Nükleer belirteç olarak Lamin B1 (67 kDa), sitoplazmik belirteç olarak Hsp60 (60 kDa) ve hedef protein olarak Desmin (~53 kDa) analiz edilmiştir. Lamin B1'nin yalnızca nükleer fraksiyonlarda, Hsp60'ın ise yalnızca sitoplazmik fraksiyonlarda tespit edilmesi, dört örnekte de fraksiyonlamanın başarılı şekilde gerçekleştirildiğini göstermektedir. Desmin proteini tüm örneklerde hem nükleer hem de sitoplazmik fraksiyonlarda tespit edilmiştir.

RNaz uygulamalı Desmin IP–MS deneylerinde kullanılacak nükleer fraksiyonların saflığı Western blot analizi ile doğrulanmıştır (Şekil 4.21). Lamin B1 yalnızca nükleer fraksiyonda, Hsp60 yalnızca sitoplazmik fraksiyonda saptanırken, Desmin her iki fraksiyonda da gözlenmiştir. Bu bulgular fraksiyonlamanın başarılı olduğunu göstermektedir. RNaz uygulanmış ve uygulanmamış Desmin IP örneklerinden elde edilen LC-MS/MS verileri, Desmin ile birlikte çöken proteinlerin RNA aracılı etkileşimlerini değerlendirmek amacıyla analiz edilmiştir.

4.10. C2C12 Miyotüp Nükleer Desmin IP–MS Veri Seti Temel Alınarak Aday Etkileşim Proteinlerinin Belirlenmesi ve Destekleyici Veri Setleriyle Değerlendirilmesi

Desmin ile ilişkili aday proteinlerin belirlenmesinde temel veri kaynağı olarak C2C12 Desmin IP–MS veri seti kullanılmıştır. Bu veri setinden elde edilen bulgular, C2C12 Desmin IP–MS $\pm$ RNaz ve zebrabalığı Desmin-Lamin B1 Co-IP–MS veri setleriyle karşılaştırılarak aday proteinler destekleyici kanıtlar açısından değerlendirilmiştir.

4.10.1. Aday Protein Listesinin Oluşturulması

C2C12 Miyotüp Nükleer Desmin IP–MS veri seti, iki biyolojik Desmin IP örneğinin iki teknik tekrarı (toplam dört Desmin IP ölçümü) ile bir biyolojik IgG kontrol örneğinin iki teknik tekrarından (toplam iki IgG kontrol ölçümü) oluşmaktadır. Toplam altı LC-MS/MS ölçümünden elde edilen veriler aday proteinlerin belirlenmesi, IP/IgG zenginleşme oranlarının hesaplanması, birleşik skor analizinin oluşturulması ve örnek bazlı korelasyon analizlerinde kullanılmıştır.

Desmin IP ile IgG kontrol grupları arasındaki protein zenginleşme farklılıkları limma yöntemi kullanılarak analiz edilmiştir. Düzeltilmiş p-değeri $< 0,05$ olan 192 anlamlı protein belirlenmiştir. Bu liste, IP–MS çalışmalarında sık görülen arka plan proteinlerini uzaklaştırmak amacıyla filtrelendi. Kalan proteinler işlevsel özellikleri ve farklı veri setlerinden elde edilen destekleyici kanıtlar birlikte değerlendirilerek önceliklendirildi ve aday protein listesi oluşturuldu (Tablo 4.6).

Protein bolluk değerlerinden yararlanılarak her protein için IP/IgG zenginleşme oranı hesaplandı. Aday seçiminde özgün peptit sayısı ile IP/IgG zenginleşme oranı birlikte değerlendirildi. Biyolojik tekrar sayısının sınırlı olması nedeniyle bu ölçütler kesin seçim eşikleri olarak değil, aday proteinlerin önceliklendirilmesini destekleyen kriterler olarak kullanılmıştır.

Tablo 4.7'de verilen IP/IgG zenginleşme oranı ve özgün peptit sayıları, C2C12 Miyotüp Nükleer Desmin IP–MS analizinin ham verilerinden hesaplanmıştır.

EEF1A1 (*Eukaryotic Elongation Factor 1 Alpha 1*), yüksek hücresel bolluğu nedeniyle IP–MS çalışmalarında sıklıkla tanımlanan bir translasyon faktörüdür

(98,121) Buna rağmen üç bağımsız veri setinde (C2C12 Miyotüp Nükleer Desmin IP–MS, C2C12 Miyotüp Nükleer Desmin IP–MS $\pm$ RNaz, Zebra Balığı Kas Dokusu Desmin–Lamin B1 Co-IP–MS) ortak olarak saptanan tek aday protein olması dikkat çekicidir. Yüksek bolluğu bu bulgunun tek başına özgül bir Desmin etkileşimini kanıtlamasa da, aktin sitoskeletonin düzenlenmesi, mRNA taşınması ve hücresel stres yanıtındaki bilinen görevleri Desmin ile biyolojik olarak anlamlı bir ilişki olasılığını desteklemektedir.

4.10.2. Çapraz Veri Seti Karşılaştırmasına Dayalı Kanıt Düzeyleri

Aday proteinler, farklı veri setlerinden elde edilen destekleyici kanıtların kapsamına göre dört kademedede sınıflandırılmıştır.

KADEME 1 (üç veri seti tarafından desteklenen adaylar): Üç veri setinde ortak olarak saptanan tek protein EEF1A1 olmuştur. Ancak EEF1A1'in hücrede yüksek bollukta bulunması ve IP–MS çalışmalarında sık görülen bir arka plan proteini olması nedeniyle bu bulgu tek başına özgül bir Desmin etkileşimini göstermemektedir.

KADEME 2A (C2C12 Miyotüp Nükleer Desmin IP–MS ve C2C12 Miyotüp Nükleer Desmin IP–MS $\pm$ RNaz ile desteklenen adaylar): HNRNPA2B1, her iki C2C12 veri setinde de Desmin IP örneklerinde IgG kontrolüne göre anlamlı zenginleşme göstermiştir. Bu bulgu, HNRNPA2B1'i öncelikli doğrulama adaylarından biri olarak öne çıkarmaktadır.

KADEME 2B (C2C12 Miyotüp Nükleer Desmin IP–MS ve Zebra Balığı Kas Dokusu Desmin–Lamin B1 Co-IP–MS ile desteklenen adaylar): NUP153 ve MSN, sırasıyla nup153 ve msna ortologları aracılığıyla hem memeli hem de zebrabalığı veri setlerinde saptanmıştır. Bu bulgu, söz konusu proteinlerin türler arasında korunmuş olası Desmin etkileşim adayları olduğunu düşündürmektedir.

Bu çalışmada aday proteinler, mevcut kanıt düzeylerine göre öncelikli, orta öncelikli ve düşük öncelikli doğrulama adayları olarak sınıflandırılmıştır. Bu sınıflandırma; bağımsız veri setlerinde tekrarlanabilirlik, istatistiksel destek, biyolojik uygunluk ve bağımsız doğrulama bulguları birlikte değerlendirilerek oluşturulmuştur. Bu yaklaşım, sonraki bölümlerde proteinlerin biyolojik öneminin sistematik olarak değerlendirilmesinde temel alınmıştır.

4.10.3. Grup Bazlı Bulgular

Nükleer zarf/NPC Kümesi (Grup 1)

TMPO'nun iç nükleer membranda yer alması ve nükleer lamina organizasyonunda görev yapması, Desmin ile çekirdek zarfı arasındaki olası ilişki açısından dikkat çekicidir.

RANBP2 (NUP358), nükleer por kompleksinin (NPC) sitoplazmik filamentlerinde yer alan temel nükleoporinlerden biridir. C2C12 Miyotüp Nükleer Desmin IP–MS analizinde aday protein olarak belirlenmiştir. RANBP2'nin işlevsel ortağı olan RAN da C2C12 Miyotüp Nükleer Desmin IP–MS ve Zebra Balığı Kas Dokusu Desmin–Lamin B1 Co-IP–MS veri setlerinde saptanmıştır. RAN, RANBP2, NUP214 ve NUP153 bulguları birlikte değerlendirildiğinde, Desmin'in nükleer por kompleksi ve nükleositoplazmik taşınmada görev alan proteinlerle ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

NUP153, hem C2C12 Miyotüp Nükleer Desmin IP–MS hem de Zebra Balığı Kas Dokusu Desmin–Lamin B1 Co-IP–MS veri setlerinde saptanarak türler arasında desteklenen nükleoporin adaylarından biri olarak belirlenmiştir. Ayrıca NUP214, Desmin IP'sinde saptanmış ve Desmin-Lamin B1 Co-IP deneylerinde bağımsız olarak doğrulanmıştır. NUP214 IP'si sonrasında Western blot analizinde Desmin'in gösterilmesi, bu ilişkiyi IP–MS bulgularından bağımsız olarak desteklemektedir. RANBP2, NUP153, NUP214 ve RAN proteinlerinin birlikte değerlendirilmesi, Desmin'in nükleer por kompleksi ile ilişkili proteinlerle bağlantılı olabileceğini düşündürmektedir.

TMPO, RANBP2, NUP153 ve bağımsız yöntemlerle doğrulanan NUP214, öncelikli doğrulama adayları olarak değerlendirilmiştir.

RNA-Bağlayıcı Protein Kümesi (Grup 2)

Bu grup, 13 protein ile aday listesinde en geniş işlevsel kümeyi oluşturmaktadır. Grup; hnRNP ailesi (HNRNPA2B1, HNRNPU, HNRNPM, HNRNPA0, HNRNPA3, HNRNPF ve HNRNPH1), DEAD-box RNA helikazları (DDX3X, DDX5, DDX17 ve DDX21) ile KH (K homology) domeni içeren RNA-bağlayıcı proteinleri (KHDRBS1/SAM68 ve ILF3) kapsamaktadır. Bu gruptaki

proteinler ağırlıklı olarak pre-mRNA işlenmesi, mRNA taşınması ve RNA metabolizması ile ilişkili işlevlerde görev almaktadır (100,109,111–113)

HNRNPA2B1, iki bağımsız C2C12 veri setinde saptanması nedeniyle bu grup içinde öncelikli doğrulama adayı olarak değerlendirilmiştir. Buna karşın DDX5, DDX17, KHDRBS1 ve HNRNPU mevcut kanıt düzeyleri dikkate alındığında orta öncelikli doğrulama adayları olarak değerlendirilmiştir.

Translasyon ve Translasyon Dışı İşlevlerle İlişkili Proteinler (Grup 3):

Bu grup, translasyonda görev alan proteinleri içermektedir. EEF1A1, üç veri setinde ortak olarak saptanan tek aday proteindir (KADEME 1). Bununla birlikte, yüksek hücresel bolluğu nedeniyle IP–MS çalışmalarında sık görülen bir arka plan proteini olduğundan, biyolojik öneminin hedefe yönelik doğrulama çalışmalarıyla desteklenmesi gerekmektedir. Bu grupta ayrıca EIF4A2 ve EIF2S1 de aday proteinler arasında yer almaktadır. Her iki proteinin de Desmin ile birlikte zenginleşmesi, Desmin'in translasyon ve hücresel stres yanıtı ile ilişkili süreçlerle bağlantılı olabileceğini düşündürmektedir.

EEF1A1, EIF4A2 ve EIF2S1 mevcut kanıt düzeyleri dikkate alındığında düşük öncelikli doğrulama adayları olarak değerlendirilmiştir. Özellikle EEF1A1 üç veri setinde ortak olarak saptanmasına rağmen yüksek hücresel bolluğu nedeniyle biyolojik öneminin hedefe yönelik doğrulama çalışmalarıyla desteklenmesi gerekmektedir.

Ara filament referans proteinleri (Grup 4): IP'nin hedef proteini olan Desmin ile heteropolimer ortağı Vimentin ve ara filament ağını diğer hücre iskeleti yapılarına bağlayan Plectin birlikte saptanmıştır. Bu proteinlerin birlikte zenginleşmesi, Desmin ara filament ağının immüno-presipitasyon sırasında başarılı şekilde çöktürüldüğünü göstermektedir. Bu nedenle söz konusu proteinler biyolojik aday proteinler olarak değil, immüno-presipitasyonun başarısını gösteren iç kalite kontrol (referans) proteinleri olarak değerlendirilmiştir.

Tablo 4.6. C2C12 Miyotüp Nükleer Desmin IP–MS analizinde belirlenen aday proteinlerin biyolojik işlevleri ve kanıt düzeylerine göre sınıflandırılması.

Gen	Biyolojik işlev	log ₂ FC	adj.p	PSM	IP/IgG oranı	Özgün peptit	Kanı düzeyi Kademe
Grup 1 — Nükleer zarf / nükleer por kompleksi (NPC)							
TMPO (LAP2)	Lamina ilişkili polipeptit2 (LAP2); Lamin B1 ile etkileşerek nükleer lamina organizasyonu ile kromatinin çekirdek zarfına bağlanmasında görev alan yapısal proteindir.	+8.15	2.6×10^{-13}	28	269,6	13	Kademe 3, güçlü
RANBP2 (Nup358)	Ran-bağlayıcı protein 2 (NUP358); nükleer por kompleksinin (NPC) sitoplazmik filamentlerini oluşturan, SUMO E3 ligaz aktivitesine sahip ve nükleositoplazmik taşınmada görev alan nükleoporindir.	+5.54	1.4×10^{-7}	46	56,8	25	Kademe 3, güçlü
NUP153	Nükleoporin 153; NPC'in nükleer sepet (<i>nuclear basket</i>) bölgesinde yer alan, kromatin organizasyonu ile RNA–protein komplekslerinin (RNP) nükleositoplazmik taşınmasında görev yapan nükleoporindir.	+5.36	1.7×10^{-5}	5	36,5	3	Kademe 2B, güçlü
NUP214	Nükleoporin 214; nükleer por kompleksinin sitoplazmik filamentlerinde yer alan FG-nükleoporindir. RANBP2 (NUP358) ile birlikte nükleositoplazmik taşıma ve mRNA taşınmasında görev alır.	- †	--	--	-	-	Doğrulandı (zebra balığı kas dokusunda NUP214 IP → Desmin WB)
RAN	RAN (Ran GTPase): GTP-bağlayıcı nükleer protein; nükleositoplazmik taşınmanın temel düzenleyicisi olup RANBP2/NUP358 ile işlevsel olarak etkileşir.		$p \leq 0,1^*$		5,25	4	Kademe 2B (IP-MS + Co-IP/MS)
Grup 2 — RNA-bağlayıcı proteinler (hnRNP / DDX / KH ailesi)							
HNRP U (SAF-A)	Heterojen nükleer ribonükleoprotein U (SAF-A); iskelet/matriks bağlanma bölgesi (S/MAR) ile ilişkili, kromatin organizasyonu, RNA bağlanması ve çekirdek mimarisinin korunmasında görev alan RNA-bağlayıcı proteindir.	+5.95	2.4×10^{-7}	10	55,2	3	Kademe 3, güçlü
DDX3X	DEAD-box RNA helikazı; mRNA'nın çekirdekten sitoplazmaya taşınması, translasyonun başlatılması ve stres granülü oluşumunda görev alır.	+5.52	2.5×10^{-6}	7	108,55	5	Kademe 3, güçlü
ILF3 (NF90)	Interlökin artırıcı-bağlayıcı faktör 3 (NF90); çift iplikli RNA bağlayıcı protein olup mRNA kararlılığı, translasyon ve antiviral yanıtta görev alır.	+5.29	5.8×10^{-6}	8	72,84	4	Kademe 3, güçlü
DDX5 (p68)	DEAD-box RNA helikazı; pre-mRNA kırılması (splicing), transkripsiyon sonrası düzenleme ve ribozom biyogeneğinde görev alır.	+4.69	2.7×10^{-5}	15	29,6	4	Kademe 3, güçlü
HNRP A2 B1	Heterojen nükleer ribonükleoprotein A2/B1; alternatif kırılma, mRNA taşınması ve mRNA kararlılığının düzenlenmesinde görev alır. Kas hücrelerinde miyofibrillere taşınacak mRNA'ların yerleşiminde rol oynadığı bildirilmiştir.	+4.65	2.2×10^{-4}	2	18,11	1	Kademe 2A
HNRP M	Heterojen nükleer ribonükleoprotein M; alternatif kırılmanın düzenlenmesinde görev alır ve miyoblast farklılaşması sırasında kasa özgü transkriptlerin işlenmesine katkı sağlar.	+4.11	2.8×10^{-4}	9	39,48	4	Kademe 3, güçlü
KHDRBS1 (SAM68)	KH (K homology) domeni içeren RNA-bağlayıcı protein (SAM68); sinyal iletimine bağlı alternatif kırılmayı düzenler ve miyogenez sırasında kasa özgü genlerin ifadesinde rol oynar.	+4.43	2.9×10^{-4}	5	48,22	2	Kademe 3, güçlü

Tablo 4.6(Devam). C2C12 Miyotüp Nükleer Desmin IP–MS analizinde belirlenen aday proteinlerin biyolojik işlevleri ve kanıt düzeylerine göre sınıflandırılması.

Gen	Biyolojik işlev	log ₂ FC	adj.p	PSM	IP/IgG oranı	Özgün peptit	Kanı düzeyi Kademe
HNRNP A0	Heterojen nükleer ribonükleoprotein A0; stres yanıtı sırasında belirli mRNA'ların kararlılığını düzenleyen RNA-bağlayıcı proteindir.	+4.41	3.9×10^{-4}	2	2675,45	1	Kademe 3, güçlü
DDX17 (p72)	DEAD-box RNA helikazı; DDX5'in işlevsel paralogu olup alternatif kırılma, transkripsiyon sonrası düzenleme ve miyojenik genlerin pre-mRNA işlenmesinde görev alır.	+3.27	0.002	18	27,05	5	Kademe 3, güçlü
DDX21	DEAD-box RNA helikazı; ribozomal RNA (rRNA) işlenmesi, ribozom biyogenezi ve nükleolar RNA metabolizmasında görev alır.	+3.96	0.002	3	1345,11	1	Kademe 3, güçlü
HNRNP F	Heterojen nükleer ribonükleoprotein F; G-zengin RNA dizilerine bağlanarak alternatif kırılma ve mRNA işlenmesini düzenler.	+3.41	0.004	5	2060,86	1	Kademe 3, güçlü
HNRNP H1	Heterojen nükleer ribonükleoprotein H1; G-zengin RNA dizilerine bağlanarak alternatif kırılma ve RNA metabolizmasının düzenlenmesinde görev alır.	+3.39	0.004	5	27,05	1	Kademe 3, güçlü
HNRNP A3	Heterojen nükleer ribonükleoprotein A3; mRNA taşınması, alternatif kırılma ve RNA metabolizmasının düzenlenmesinde görev alır.	+2.67	0.015	8	15,31	2	Kademe 4, orta
Grup 3 — Translasyon ve translasyon dışı işlevlerle ilişkili proteinler							
EIF4A2	Ökaryotik translasyon başlatma faktörü 4A-II; DEAD-box RNA helikazı olup <i>cap</i> -bağımlı translasyonun başlatılmasında görev alır.	+3.90	0.003	3	38,1547	2	Kademe 3, güçlü
EEF1A1	Ökaryotik uzama faktörü 1 alfa 1; protein sentezindeki temel görevinin yanı sıra aktin sitokeletinin düzenlenmesi, mRNA taşınması ve hücrel stres yanıtı gibi translasyon dışı işlevlerde de rol alır.	+2.76	0.007	28	8,4	6	Kademe 1 (üçlü kanıt)
EIF2S1 (eIF2α)	Ökaryotik translasyon başlatma faktörü 2'nin alfa alt birimi; entegre stres yanıtı sırasında protein sentezinin küresel düzeyde düzenlenmesinde görev alır.	+2.96	0.007	7	19,044	4	Kademe 4, orta
Grup 4 — Ara filament referans proteinleri							
VIM (Vimentin)	Vimentin; Desmin ile heteropolimer oluşturabilen Tip III ara filament proteindir. Ara filament ağının pozitif kontrol proteini olarak değerlendirilmiştir.	+5.81	2.7×10^{-8}	52	159,56	16	Kademe 3
PLEC (Plektin)	Desmini hücre membranına ve diğer sitoskeletal yapılara bağlayan, plakin ailesine ait iyi tanımlanmış bir çapraz bağlayıcı proteindir. Deneyin teknik başarısını destekleyen kontrol proteinlerden biridir.	+4.41	2.4×10^{-7}	233	60,14	93	Kademe 3
DES (Desmin)	Çalışmanın hedef (baıt) proteini olup IP'de beklediği gibi zenginleşmiştir. Deneyin başarılı şekilde gerçekleştirildiğini doğrulayan iç kontrol proteini olarak değerlendirilmiştir.	+4.54	6.6×10^{-6}	57	47,52	16	Kademe 3
Grup 5 — ERM (Ezrin–Radixin–Moesin) ailesi ve kortikal iskelet proteinleri							
MSN (Moesin)	Hücre membranı ile aktin iskeleti arasında bağlantı sağlayan ERM ailesi proteindir.	+2.02	0.048	20	10,64	9	Kademe 2B, güçlü

Tablo 4.6’da sadeleştirilmiş aday protein listesi (21 aday protein ve bağımsız olarak doğrulanmış NUP214), limma analizi sonuçları ile birlikte özgün peptit sayısı, IP/IgG oranı, biyolojik tekrarlar arasındaki tutarlılık ve biyolojik uygunluk ölçütleri dikkate alınarak oluşturulmuş ve biyolojik işlevleri ile destekleyici kanıt düzeylerine göre sınıflandırılmıştır.

Tablodaki nicel değerler, aday proteinlerin belirlenmesinde temel veri kaynağı olarak kullanılan C2C12 Miyotüp Nükleer Desmin IP–MS veri setinden (Desmin IP–IgG kontrolü; limma ile gerçekleştirilen protein zenginleşme analizi) elde edilmiştir. $\log_2FC$, logaritmik (baz 2) kat değişimini; adj.p, Benjamini–Hochberg yöntemi ile düzeltilmiş p-değerini; PSM, peptit-spektrum eşleşmesi sayısını göstermektedir. IP/IgG oranı ve özgün peptit sütunları ise, aynı C2C12 Desmin IP–MS analizinin ham verilerinden elde edilmiş olup limma analizinden farklı bir hesaplama yaklaşımına dayanmaktadır. Bu nedenle söz konusu değerler yalnızca bu veri setinde yer alan proteinler için verilmiş, veri setinde bulunmayan proteinler ise "—" ile gösterilmiştir. PSM, bir peptidin MS/MS analizinde kaç kez tanımlandığını gösterirken, özgün peptit sayısı yalnızca ilgili proteine özgü farklı peptit dizilerinin sayısını ifade eder. Dolayısıyla PSM, protein tanımlamasının tekrarlanabilirliği ve göreceli bolluğu hakkında bilgi sağlarken, özgün peptit sayısı tanımlamanın özgüllüğünü ve güvenilirliğini destekleyen tamamlayıcı bir ölçüttür.

Aday proteinler, C2C12 Miyotüp Nükleer Desmin IP–MS veri setinden elde edilen bulguların C2C12 Miyotüp Nükleer Desmin IP–MS $\pm$ RNaz ve Zebra Balığı Kas Dokusu Desmin–Lamin B1 Co-IP–MS veri setleriyle karşılaştırılması sonucunda elde edilen destekleyici kanıt düzeyine göre sınıflandırılmıştır. KADEME 1, üç veri setinde desteklenen adayları; KADEME 2A, C2C12 Miyotüp Nükleer Desmin IP–MS ve C2C12 Miyotüp Nükleer Desmin IP–MS $\pm$ RNaz veri setlerinde desteklenen adayları; KADEME 2B, C2C12 Miyotüp Nükleer Desmin IP–MS ve Zebra Balığı Kas Dokusu Desmin–Lamin B1 Co-IP–MS veri setlerinde desteklenen adayları; KADEME 3, yalnızca C2C12 Miyotüp Nükleer Desmin IP–MS veri setinde güçlü kanıtla belirlenen adayları; KADEME 4 ise yalnızca C2C12 Miyotüp Nükleer Desmin IP–MS veri setinde orta düzey kanıtla belirlenen adayları göstermektedir. Satır renkleri kanıt düzeylerini göstermektedir: sarı, KADEME 1 (EEF1A1); açık kahverengi, KADEME 2A (HNRNPA2B1); açık yeşil, KADEME 2B; gri, referans proteinler

(DES, VIM ve PLEC). K: Kademe. †NUP214, C2C12 miyotüp nükleer Desmin IP–MS analizinde kullanılan aday protein seçim ölçütlerini karşılamamıştır. Buna karşın, zebra balığı kas dokusunda gerçekleştirilen Desmin–Lamin B1 ters yönlü Co-IP deneylerinden elde edilen bağımsız doğrulayıcı kanıt nedeniyle birleşik aday listesine dahil edilmiştir. Bu bulgu, NUP214 ile Desmin'in aynı protein kompleksi içerisinde yer alabileceğini desteklemektedir. Bu nedenle NUP214 için C2C12 miyotüp nükleer Desmin IP–MS analizine ait $\log_2FC$ ve $adj.p$ değerleri bulunmamaktadır. NUP214, zebra balığında gerçekleştirilen Co IP–Western blot deneylerinde doğrulanmış olması nedeniyle Tablo 4.7'de değerlendirilmiştir.

Mevcut kanıt düzeyleri birlikte değerlendirildiğinde, nükleer zarf/nükleer por kompleksi proteinleri (TMPO, RANBP2, NUP153 ve bağımsız olarak doğrulanan NUP214) ile HNRNPA2B1 öncelikli doğrulama adayları olarak öne çıkmıştır. DDX5, DDX17, KHDRBS1 ve HNRNPU orta öncelikli doğrulama adayları olarak değerlendirilirken, EEF1A1, EIF4A2 ve EIF2S1 ise ön doğrulama adayları olarak sınıflandırılmıştır. Bu sınıflandırma, aday proteinlerin hedefe yönelik doğrulama çalışmalarında önceliklendirilmesi için sistematik bir çerçeve sunmaktadır.

4.10.4. RNaz-duyarlılık analizi

C2C12 Miyotüp Nükleer Desmin IP–MS $\pm$ RNaz veri setinde, Desmin ile ilişkilerin RNA aracılı olup olmadığını değerlendirmek amacıyla RNaz uygulanmayan (–RNaz) ve RNaz uygulanan (+RNaz) Desmin IP grupları karşılaştırılmıştır. Kontrast, $\log_2FC_RNaz = \log_2(IP_Desmin) - \log_2(IP_RNaz_Desmin)$ olarak tanımlanmıştır. Bu tanıma göre pozitif $\log_2FC_RNaz$ değerleri, RNaz uygulaması sonrasında protein sinyalinin azaldığını ve ilişkinin en azından kısmen RNA aracılı olabileceğini göstermektedir. RNaz uygulaması sonrasında belirgin bir sinyal kaybı oluşmadığını ve ilişkinin RNA aracılı olmayan bir etkileşimle uyumlu olabileceğini düşündürmektedir.

RNaz kontrastı analizinde hiç bir protein $adj. p < 0,05$ ve $|\log_2FC| > 1$ eşiklerini karşılamamıştır. Bu nedenle RNaz kontrastından elde edilen değişimler yalnızca keşifsel gözlem olarak değerlendirilmiş, istatistiksel anlamlılık kanıtı olarak yorumlanmamıştır. Bununla birlikte, IgG kontrolüne göre anlamlı düzeyde zenginleşen dokuz proteinden HNRNPA2B1, EEF1A1, IFT57 ve ADARB1'de RNaz uygulaması sonrasında Desmin IP sinyalinde azalma yönünde bir eğilim gözlenmiştir.

Bu gözlemler, bağımsız biyolojik tekrarlarla doğrulanmayı gerektiren keşifsel bulgular olarak değerlendirilmiştir.

Aday listesinde yer alan HNRNPA2B1 ve EEF1A1, C2C12 Miyotüp Nükleer Desmin IP–MS $\pm$ RNaz veri setinde de saptandıkları için RNaz duyarlılık karşılaştırmasına dâhil edilebilmiştir. Kalan 19 aday protein ise bu veri setinde tespit edilmediğinden değerlendirilememiştir. Her iki proteinde de pozitif $\log_2FC_RNaz$ değeri elde edilmesi, RNaz uygulaması sonrasında Desmin IP örneklerindeki sinyalin azalma eğiliminde olduğunu göstermektedir (Tablo 4.8). Ancak düzeltilmiş p-değerlerinin anlamlılık eşiğinin üzerinde kalması nedeniyle bu bulgular RNA aracılı bir etkileşimin istatistiksel olarak desteklendiğini göstermemektedir. Buna karşın, HNRNPA2B1 ve EEF1A1'de gözlenen sinyal azalması eğilimi, Desmin ile ilişkilerinde RNA'nın katkısı olabileceğine işaret eden keşifsel bir gözlem olarak değerlendirilmiştir.

Tablo 4.7. Aday proteinler için RNaz duyarlılık analizi. Aday proteinler arasında yalnızca HNRNPA2B1 ve EEF1A1, C2C12 Miyotüp Nükleer Desmin IP–MS $\pm$ RNaz veri setinde de saptandıkları için analize dahil edilmiştir. IP–IgG kontrastı, RNaz uygulanmayan koşullarda Desmin IP'nin IgG kontrolüne göre zenginleşmesini; $\pm$ RNaz kontrastı ise RNaz uygulanmayan ve uygulanan Desmin IP örnekleri arasındaki farkı (IP_Desmin – IP_RNaz_Desmin; $\log_2$ ölçekte) göstermektedir. Pozitif $\log_2FC_RNaz$ değerleri RNaz uygulaması sonrasında Desmin IP sinyalinde azalma eğilimini, negatif değerler ise RNaz uygulamasından belirgin olarak etkilenmeyen bir örüntüyü göstermektedir. NS (Not Significant), istatistiksel olarak anlamlı olmayan sonuçları ifade etmektedir (adj. p > 0,05).

Gen	$\log_2FC$ (IP vs IgG)	adj. p (IP vs IgG)	$\log_2FC$ ($\pm$ RNaz)	adj.p ($\pm$ RNaz)	RNaz sonrası sinyal eğilimi
HNRNPA2B1	+5.00	5.96×10^{-4}	+3.44	0.123	Azalma (NS)
EEF1A1	+5.05	3.81×10^{-4}	+1.85	0.505	Azalma (NS)

4.10.5. Birleşik Skor ile İlk Tarama Amaçlı Altı Aday Proteinin Seçimi ve Korelasyon Analizi

Bölüm 4.10.1'de tanımlanan 21 aday protein arasından, deneysel doğrulama öncesinde ilk tarama için altı aday protein seçilmiştir. Bu seçim, tek bir değerlendirme ölçütüne dayanmak yerine çoklu kanıtların birlikte değerlendirilmesi esas alınarak

gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda, aday protein taramasında kullanılan C2C12 Miyotüp Nükleer Desmin IP–MS veri setinden (Bölüm 4.10.1) elde edilen altı ölçüt; limma analizine ait $\log_2FC$ değeri, $-\log_{10}(\text{düzeltilmiş } p \text{ değeri})$, peptit-spektrum eşleşmesi (PSM) sayısı, özgün peptit sayısı, $\log_{10}(\text{IP/IgG oranı})$ ve çapraz veri seti kanıt düzeyi (Kademe) tek bir birleşik skor altında birleştirilmiştir.

Birleşik skor hesaplanırken, referans proteinler olan DES, VIM ve PLEC analiz dışında bırakılmış ve kalan 21 aday protein değerlendirmeye alınmıştır. Ölçekleri birbirinden farklı olan altı ölçütün karşılaştırılabilir hâle getirilmesi amacıyla her biri min–maks normalizasyonu ile 0–1 aralığına dönüştürülmüştür. Daha sonra normalize edilen ölçütlerin eşit ağırlıklı ortalaması alınarak her protein için birleşik skor hesaplanmıştır. Her ölçüte 1/6 ağırlık verilmiştir. IP/IgG oranı ise Desmin IP ve IgG kontrol örneklerine ait protein bolluk değerlerinden hesaplanmış, analizde $\log_{10}$ dönüşümü uygulanarak kullanılmıştır.

Çapraz veri setlerinden elde edilen kanıt düzeyi, Kademe değişkeni aracılığıyla sayısallaştırılmıştır. Üç veri setinde ortak olarak desteklenen KADEME 1 proteinlerine 3,0; iki veri setinde desteklenen KADEME 2A ve KADEME 2B proteinlerine 2,5; tek veri setinde güçlü kanıtla belirlenen KADEME 3 proteinlerine 1,5; tek veri setinde orta düzey kanıtla belirlenen KADEME 4 proteinlerine ise 1,0 puan atanmıştır. Bu değerler de diğer ölçütlerde olduğu gibi normalizasyon işlemine tabi tutularak birleşik skora dâhil edilmiştir.

Birleşik skor yaklaşımının sağlamlığını değerlendirmek amacıyla üç farklı ağırlıklandırma stratejisi uygulanmış ve sonuçlar karşılaştırılmıştır. İlk stratejide tüm ölçütlere eşit ağırlık verilmiştir (her ölçüte 1/6). İkinci stratejide özgün peptit sayısı ile $\log_{10}(\text{IP/IgG oranı})$ ölçütlerine diğer dört ölçütün iki katı ağırlık verilmiştir (bu iki ölçüte 1/4, diğerlerine 1/8). Üçüncü stratejide ise istatistiksel anlamlılık [$-\log_{10}(\text{adj.p})$] ile özgün peptit sayısı ölçütlerine diğer dört ölçütün iki katı ağırlık verilmiştir (bu iki ölçüte 1/4, diğerlerine 1/8). Her üç modelde de en yüksek birleşik skora sahip ilk altı proteinin değişmemesi, aday sıralamasının farklı ağırlıklandırma stratejilerine karşı kararlı olduğunu ve sıralamanın tek bir ölçütün baskın etkisiyle oluşmadığını göstermiştir.

Tablo 4.8. Birleşik skor yöntemiyle 21 aday proteinin sıralanması ve ilk altı aday proteinin seçimi.

Sıra	Protein	Skor	Grup	log ₂ FC	adj.p	PSM	Özgün peptit	IP/IgG*	Kademe
1	TMPO	0,677	NPC	+8,15	$2,6 \times 10^{-13}$	28	13	269,6	K3
2	RANBP2	0,638	NPC	+5,54	$1,4 \times 10^{-7}$	46	25	56,8	K3
3	HNRNPU	0,462	RBP	+5,95	$2,4 \times 10^{-7}$	10	3	55,2	K3
4	DDX5	0,414	RBP	+4,69	$2,7 \times 10^{-5}$	15	4	29,6	K3
5	EEF1A1	0,408	Trans	+2,76	0,007	28	6	8,4	K1
6	NUP153	0,379	NPC	+5,36	$1,7 \times 10^{-5}$	5	3	36,5	K2B
7	DDX3X	0,340	RBP	+5,52	$2,5 \times 10^{-6}$	7	5	59,94	K3
8	MSN	0,323	ERM	+2,02	0,048	20	9	5,19	K2B
9	ILF3	0,319	RBP	+5,29	$5,8 \times 10^{-6}$	8	4	47,95	K3
10	HNRNPA0	0,310	RBP	+4,41	$3,9 \times 10^{-4}$	2	1	5,22†	K3
11	HNRNPA2B1	0,295	RBP	+4,65	$2,2 \times 10^{-4}$	2	1	9,07†	K2A
12	HNRNPF	0,282	RBP	+3,41	0,004	5	1	13,80†	K3
13	DDX21	0,280	RBP	+3,96	0,002	3	1	17,50†	K3
14	DDX17	0,268	RBP	+3,27	0,002	18	5	12,07	K3
15	HNRNPM	0,263	RBP	+4,11	$2,8 \times 10^{-4}$	9	4	22,43	K3
16	KHDRBS1	0,245	RBP	+4,43	$2,9 \times 10^{-4}$	5	2	27,41	K3
17	EIF4A2	0,208	Trans	+3,90	0,003	3	2	18,70	K3
18	HNRNPH1	0,189	RBP	+3,39	0,004	5	1	14,87	K3
19	RAN	0,169	NPC	—	—	8	4	2,67	K2B
20	EIF2S1	0,156	Trans	+2,96	0,007	7	4	10,00	K4
21	HNRNPA3	0,131	RBP	+2,67	0,015	8	2	7,85	K4

* IP/IgG oranı, Desmin IP ve IgG kontrol örneklerine ait ham protein bolluk değerlerinin ortalamaları kullanılarak hesaplanmıştır (Bölüm 4.10.5.1). † işareti bulunan adaylarda bir veya daha fazla tekrarda eksik değer bulunduğundan, IP/IgG oranı yalnızca mevcut veriler üzerinden hesaplanmıştır.

Tablo 4.8'de, birleşik skora göre ilk altı sırada yer alan proteinler TMPO (0,677), RANBP2 (0,638), HNRNPU (0,462), DDX5 (0,414), EEF1A1 (0,408) ve NUP153 (0,379) olmuştur. İşlevsel sınıflandırmaya göre bu adaylar üç nükleer por kompleksi (NPC) proteini (TMPO, RANBP2 ve NUP153), iki RNA-bağlayıcı protein (HNRNPU ve DDX5) ile bir translasyon faktörü (EEF1A1) olmak üzere üç grupta toplanmaktadır.

Birleşik skor sıralamasında NPC proteinleri üst sıralarda yer almıştır. Bu durum, nükleoporin adaylarının RNA-bağlayıcı proteinlere kıyasla daha yüksek IP/IgG oranları ve daha güçlü istatistiksel destek göstermesinden kaynaklanmaktadır. Buna karşın, EEF1A1 üç veri setinin tamamında ortak olarak saptanan tek KADEME 1 proteini olmasına rağmen, hücrede doğal olarak yüksek bollukta bulunması nedeniyle IgG kontrol örneklerinde de yüksek düzeyde tespit edilmiştir. Bu nedenle EEF1A1, IP/IgG oranı görece düşük olmasına rağmen diğer değerlendirme ölçütleriyle birlikte değerlendirildiğinde birleşik skor sıralamasında beşinci sırada yer almıştır.

Seçilen altı aday proteinin zenginleşme doğrulaması

Seçilen altı proteinin Desmin zenginleşmesini doğrulamak amacıyla, aday protein taramasında kullanılan C2C12 Miyotüp Nükleer Desmin IP–MS veri setinin ham protein bolluk değerlerinden örnek bazında IP/IgG oranları ve ham log₂FC değerleri hesaplanmıştır. HNRNPU, DDX5 ve NUP153 için bir IgG kontrol örneğine ait bolluk değerinin eksik olması nedeniyle, ilgili değer aynı biyolojik tekrara ait diğer IgG kontrol ölçümü kullanılarak tamamlanmıştır.

Tablo 4.9. Seçilen altı aday proteinin zenginleşme doğrulaması.

Protein	Ortalama IgG	Ortalama IP	IP/IgG oranı	log ₂ FC (ham)	log ₂ FC (limma)
TMPO	33.143	8.933.982	269,6	+8,07	+8,15
RANBP2	167.360	9.501.278	56,8	+5,83	+5,54
HNRNPU	44.800	2.474.393	55,2	+5,79	+5,95
NUP153	30.739	1.120.478	36,5	+5,19	+5,36
DDX5	28.522	843.104	29,6	+4,89	+4,69
EEF1A1	4.580.776	38.520.236	8,4	+3,07	+2,76

Tablo 4.9'da görüldüğü üzere, ham protein bolluk değerlerinden hesaplanan log₂FC değerleri, Bölüm 4.10.1'de limma analiziyle elde edilen log₂FC değerleriyle büyük ölçüde uyumludur. İki yaklaşım arasındaki fark tüm proteinlerde $\pm 0,5$ log₂ birimin altında kalmıştır. Bu bulgu, ham verilerden hesaplanan zenginleşme değerlerinin limma analizinden elde edilen sonuçlarla tutarlı olduğunu göstermektedir.

Seçilen proteinler arasında EEF1A1, +3,07'lik ham log₂FC değeriyle en düşük zenginleşmeyi göstermiştir. Bunun nedeni, proteinin IgG kontrol örneklerinde de yüksek bollukta saptanmasıdır. Bu nedenle, IP örneklerinde mutlak bolluğu yüksek olmasına rağmen IP/IgG oranı diğer aday proteinlere göre daha düşük kalmıştır. Bu gözlem, Bölüm 4.10.2'de özetlenen literatür bilgileriyle uyumludur.

Bununla birlikte, altı aday proteinin tamamı hem ham log₂FC hem de IP/IgG oranları bakımından Desmin IP'sinde belirgin zenginleşme göstermiştir.

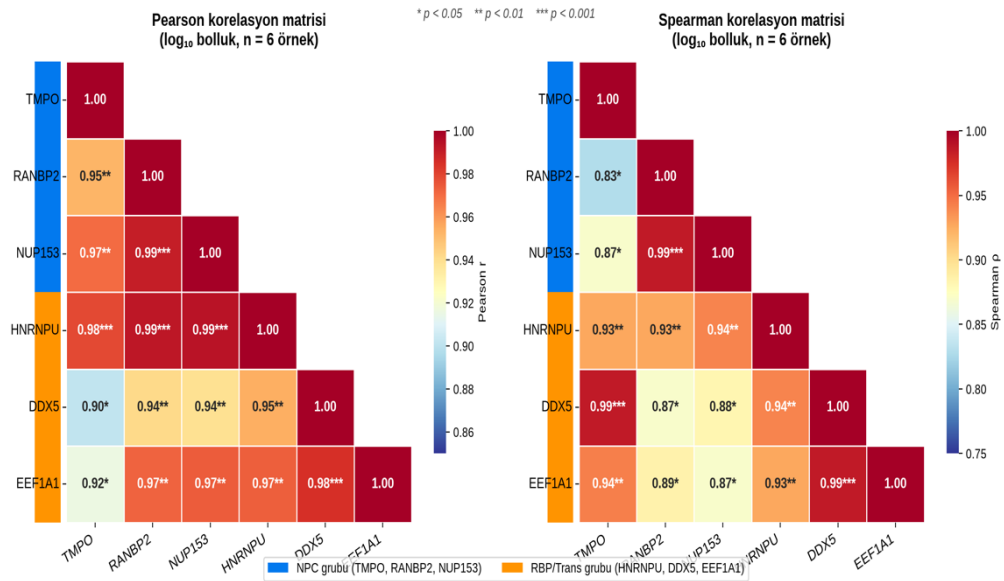
Korelasyon analizi

Seçilen altı aday proteinin Desmin IP'sindeki örnek bazlı bolluk değişimlerinin birbiriyle ilişkisini değerlendirmek amacıyla, protein bolluk değerleri arasında Pearson ve Spearman korelasyon analizleri yapılmıştır. Bolluk değerleri 10^4 – 10^8 aralığında geniş bir dağılım gösterdiğinden, analiz öncesinde log₁₀ dönüşümü uygulanmıştır. Çoklu karşılaştırmalardan kaynaklanan yanlış pozitif sonuç olasılığını azaltmak amacıyla p-değerlerine Benjamini–Hochberg (BH) düzeltmesi uygulanmıştır. Ancak korelasyon analizi, teknik tekrarları da içeren altı LC-MS/MS ölçümü üzerinden gerçekleştirilmiş ve bu ölçümler yalnızca üç bağımsız biyolojik örneği temsil ettiğinden, BH-düzeltilmiş p-değerleri doğrulayıcı değil, keşifsel nitelikte yorumlanmıştır.

Tablo 4.10. Seçilen 6 aday protein arasında Pearson korelasyon katsayıları.

	TMPO	RANBP2	EEF1A1	HNRNPU	DDX5	NUP153
TMPO	1,00	0,95***	0,97***	0,98***	0,90*	0,92*
RANBP2		1,00	0,97***	0,99***	0,94**	0,99***
EEF1A1			1,00	0,97***	0,99***	0,97***
HNRNPU				1,00	0,96**	0,99***
DDX5					1,00	0,94**
NUP153						1,00

*** BH ile düzeltilmiş $p < 0,001$; ** BH ile düzeltilmiş $p < 0,01$; * BH ile düzeltilmiş $p < 0,05$. Pearson korelasyon katsayıları 0,901–0,994 aralığında hesaplanmıştır. Korelasyon analizi teknik tekrarları da içeren altı LC-MS/MS ölçümü üzerinden gerçekleştirilmiş olup, BH-düzeltilmiş p -değerleri yalnızca üç bağımsız biyolojik örneği temsil eden verilerden elde edildiği için keşifsel nitelikte yorumlanmıştır.



Şekil 4.22. Birleşik skor ile seçilen altı aday proteinin log₁₀ bolluk değerleri üzerinde Pearson (sol) ve Spearman (sağ) korelasyon matrisleri. Korelasyon katsayıları ve anlamlılık düzeyleri hücre içlerinde gösterilmiştir. Mavi: nükleer por kompleksi (NPC) grubu (TMPO, RANBP2, NUP153), turuncu: transkripsiyon sonrası düzenleme grubu (HNRNPU, DDX5, EEF1A1).

Korelasyon analizinde, seçilen altı aday proteinin bolluk profilleri arasında Pearson ($r = 0,901-0,994$) ve Spearman ($\rho = 0,829-0,986$) analizlerinde yüksek

düzeyde pozitif korelasyonlar gözlenmiştir. Her iki analiz yöntemi benzer korelasyon örüntüsü ortaya koymuştur. En yüksek korelasyon katsayılarına sahip protein çiftleri Tablo 4.12'de özetlenmiştir. Bununla birlikte, korelasyon analizi teknik tekrarları da içeren altı LC-MS/MS ölçümü üzerinden gerçekleştirilmiş ve bu ölçümler yalnızca üç bağımsız biyolojik örneği temsil ettiğinden, sonuçlar keşifsel olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca aday proteinlerin tamamı Desmin IP örneklerinde IgG kontrolüne göre ortak zenginleşme gösterdiğinden, gözlenen korelasyonların ortak zenginleşme örüntüsünden etkilenmiş olabileceği göz önünde bulundurulmuştur.

Tablo 4.11. Pearson korelasyon katsayısı $\geq 0,98$ olan protein çiftleri.

Protein çifti	Pearson r	Spearman ρ	Protein sınıfları
HNRNPU – NUP153	0,994	0,941	RBP + NPC
RANBP2 – HNRNPU	0,992	0,928	NPC + RBP
RANBP2 – NUP153	0,990	0,986	İki nükleoporin
EEF1A1 – DDX5	0,985	0,986	Translasyon + RNA işlenmesi
TMPO – HNRNPU	0,979	0,928	Nükleer zarf + RBP

Tablo 4.11'de Pearson korelasyon katsayısı $\geq 0,98$ olan protein çiftleri gösterilmektedir. En yüksek korelasyon HNRNPU ile NUP153 arasında gözlenmiştir ($r = 0,994$; $\rho = 0,941$). Bunu sırasıyla RANBP2–HNRNPU ($r = 0,992$; $\rho = 0,928$), RANBP2–NUP153 ($r = 0,990$; $\rho = 0,986$), EEF1A1–DDX5 ($r = 0,985$; $\rho = 0,986$) ve TMPO–HNRNPU ($r = 0,979$; $\rho = 0,928$) protein çiftleri izlemiştir. Pearson ve Spearman analizlerinde benzer korelasyon örüntülerinin gözlenmesi, seçilen aday proteinlerin örnekler arasında benzer bolluk değişim profilleri sergilediğini göstermektedir. Bununla birlikte, aday proteinlerin tamamının Desmin IP örneklerinde IgG kontrolüne göre ortak zenginleşme göstermesi nedeniyle bu ortak örüntü kısmen ortak zenginleşmeden kaynaklanıyor olabilir. Bu nedenle korelasyon sonuçları tek başına bağımsız bir protein kompleksine üyeliğin veya doğrudan protein–protein etkileşiminin kanıtı olarak değerlendirilmemelidir.

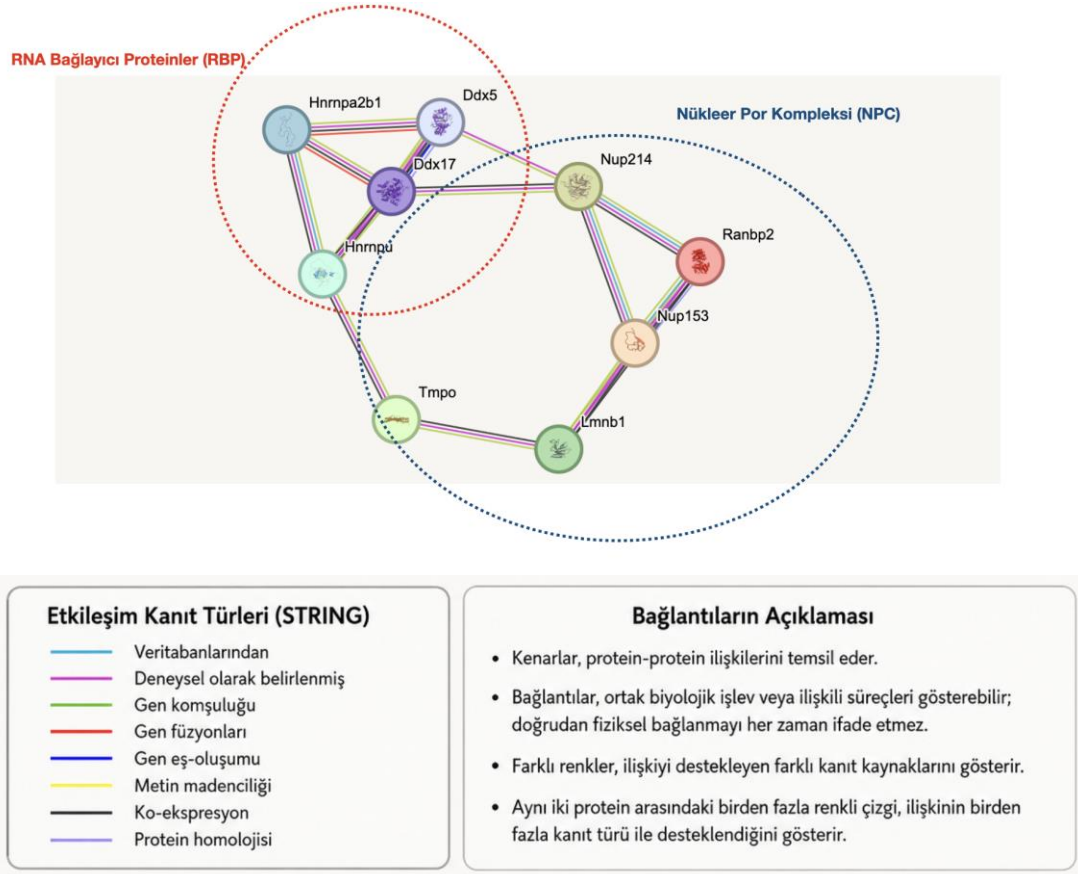
EEF1A1 için RNaz-duyarlılık analizi

Seçilen altı aday proteinden yalnızca EEF1A1, Bölüm 4.10.4'te kullanılan C2C12 Miyotüp Nükleer Desmin IP–MS ± RNaz veri setinde RNaz duyarlılığının değerdendirilebilmesi için yeterli bolluk verisine sahiptir. RANBP2 bu veri setinde tanımlanmış olmakla birlikte bolluk değerdeleri güvenilir bir değerdendirme yapmaya yeterli değildir. Diğer dört aday protein (TMPO, HNRNPU, DDX5 ve NUP153) ise bu veri setinde saptanmamıştır. Bu nedenle, EEF1A1 için ham protein bolluk değerdelerinden hesaplanan kontrastlar Tablo 4.13'te sunulmuş ve elde edilen sonuçlar Bölüm 4.10.4'teki limma analizleriyle karşılaştırılmıştır.

Tablo 4.12. EEF1A1 için ham verilerden hesaplanan kontrastlara dayalı RNaz duyarlılık analizi.

Kontrast	log ₂ FC (ham)	p (ham t- test)	log ₂ FC (limma)	adj.p (limma)	Sonuç
IP vs IgG	+4,91	0,034	+5,05	3,81×10 ⁻⁴	Desmin IP'de anlamlı zenginleşme
IP vs IP+RNaz	+1,28	0,108	+1,85	0,505	RNaz sonrası azalma eğilimi; istatistiksel olarak anlamlı değil

Tablo 4.12'de görüldüğü üzere, EEF1A1 Desmin IP örneklerinde IgG kontrolüne göre anlamlı düzeyde zenginleşmiştir (ham analiz: log₂FC = +4,91; p = 0,034). RNaz uygulaması sonrasında EEF1A1 bolluğu ortalama 315.899'dan 130.240'a düşmüş (yaklaşık 2,4 kat azalma) ve buna karşılık gelen ham log₂FC değeri +1,28 olarak hesaplanmıştır. Bununla birlikte, bu değışim istatistiksel olarak anlamlı değildir (p = 0,108). Ham verilerden elde edilen sonuçlar, limma analiziyle hesaplanan kontrastlarla yön bakımından uyumludur (log₂FC = +1,85; adj.p = 0,505). Her iki analizde de RNaz uygulaması sonrasında EEF1A1 bolluğunda azalma yönünde bir değışim gözlenmiş, ancak bu değışim istatistiksel anlamlılık düzeyine ulaşmamıştır.



Şekil 4.23. C2C12 Miyotüp Nükleer Desmin IP-MS analizinde belirlenen aday proteinler arasındaki STRING protein-protein etkileşim ağı. Ağ, birleşik skor analizinde önceliklendirilen aday proteinlere ek olarak RNA bağlayıcı proteinleri daha kapsamlı temsil etmek amacıyla HNRNPA2B1 ve DDX17 ile önceki çalışmalarımızda Desmin ile karşılıklı Co-IP yöntemiyle doğrulanmış LMNB1 ve NUP214 proteinlerini içerecek şekilde oluşturulmuştur. STRING analizi, Homo sapiens protein veritabanı kullanılarak yüksek güven düzeyi (combined score $\geq 0,700$) esas alınarak gerçekleştirilmiştir. Kesikli elipsler, işlevsel alt modülleri görsel olarak belirtmek amacıyla eklenmiştir.

STRING analizi, aday proteinlerin nükleer por kompleksi (RANBP2, NUP153 ve NUP214), nükleer lamina/iç nükleer zar (TMPO ve LMNB1) ile RNA bağlayıcı proteinler (HNRNPU, HNRNPA2B1, DDX5 ve DDX17) olmak üzere üç işlevsel alt modülde kümelendiğini göstermektedir. RNA bağlayıcı proteinler ile nükleer lamina ve nükleer por kompleksi modülleri arasında doğrudan yüksek güvenli etkileşim bulunmamakla birlikte, bu modüller STRING ağı içerisinde dolaylı bağlantılarla ilişkilidir (Şekil 4.23).

4.11. Karşılıklı Co-IP ile Öncelikli Adayların Bağımsız Doğrulanması

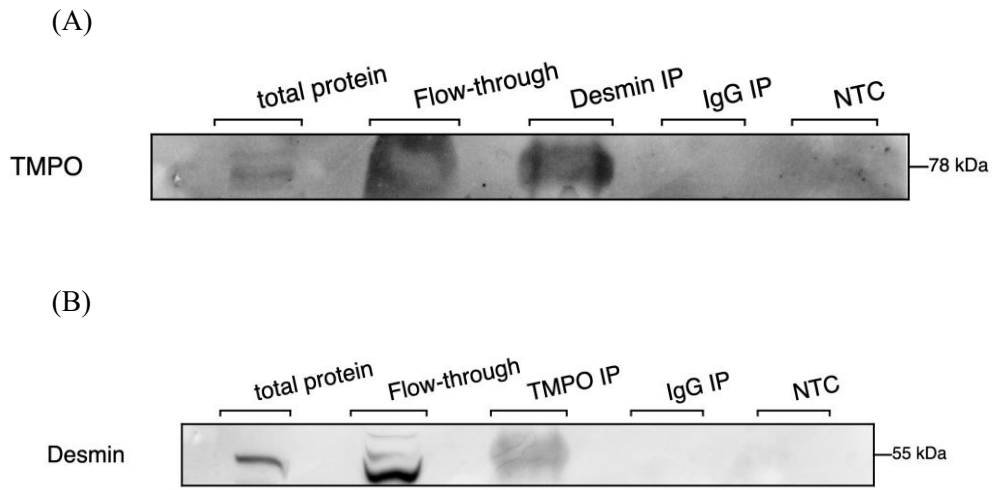
TMPO (LAP2) ve DDX5, farklı işlevsel protein gruplarını temsil etmeleri nedeniyle hedefe yönelik doğrulama deneyleri için seçilmiştir. İlk aşamada ters yönlü IP–WB yaklaşımı uygulanmış; TMPO ve DDX5’e özgü antikorlarla gerçekleştirilen immün çöktürme sonrasında elde edilen fraksiyonlarda Desmin varlığı Western blot ile değerlendirilmiştir. İlk deneyde hem hedef proteine ait IP fraksiyonlarında hem de IgG kontrolünde belirgin Desmin sinyali gözlenmiştir (Ek şekil 8.8). Bu nedenle ilk deney, aday proteinlerin Desmin ile etkileşimini özgül olarak doğrulamak açısından yeterli bulunmamış ve deney koşullarının optimizasyonu yapılarak deneyler tekrarlanmıştır.

İlk deneyde kullanılan Protein A/G manyetik boncukların uzun süre saklanmış olması ve kullanım öncesinde topaklanmış görünümde olması nedeniyle, deney yeni manyetik boncuklar kullanılarak tekrarlanmıştır. Ayrıca Co-IP tamponuyla gerçekleştirilen yıkama sayısı ikiden dörde çıkarılmıştır. Optimizasyonun ardından deney karşılıklı IP–WB yaklaşımıyla sürdürülmüştür. Bu amaçla, TMPO ve DDX5 immün çöktürme örneklerinde Desmin; karşılıklı olarak Desmin immün çöktürme örneklerinde ise TMPO ve DDX5 proteinleri Western blot ile analiz edilmiştir. Böylece aday proteinlerin Desmin ile aynı protein komplekslerinde bulunması her iki immün çöktürme yönünde değerlendirilmiştir.

Deneylerde özgül olmayan bağlanmayı değerlendirmek amacıyla IgG kontrol IP ve primer antikor içermeyen boncuk kontrolü kullanılmıştır. İmmün çöktürme sonrasında boncuklara bağlanmayarak süpernatantta kalan proteinlerin değerlendirilmesi amacıyla akış geçişi (*flow-through*, FT) da analize dâhil edilmiştir. Desmin’in yaklaşık 53 kDa’da bulunması ve IP antikorunun ağır zinciriyle yaklaşık 50–55 kDa aralığında çakışabilmesi nedeniyle, Desmin Western blot analizlerinde *Clean-Blot IP Detection Reagent* (HRP) kullanılmıştır.

TMPO için gerçekleştirilen ters Co-IP analizinde, TMPO-IP örneğinde yaklaşık 53 kDa düzeyinde Desmin bandı saptanmıştır (Şekil 4.28). Bununla birlikte FT fraksiyonunda da belirgin Desmin sinyalinin bulunması, lizattaki Desmin’in yalnızca bir bölümünün TMPO ile birlikte çöktürüldüğünü ve proteinin önemli bir kısmının süpernatantta kaldığını göstermektedir. Karşı yönde gerçekleştirilen Desmin-

IP sonrasında ise TMPO yaklaşık 78 kDa düzeyinde saptanmış; ancak FT fraksiyonunda da TMPO sinyali gözlenmiştir. Tekrarlanan deneyde IgG kontrolünde belirgin Desmin sinyalinin gözlenmemesi, ilk deneyde gözlenen IgG sinyalinin kullanılan manyetik boncuklar veya yıkama koşulları gibi teknik etkenlerden kaynaklanmış olabileceğini düşündürmektedir. Her iki immün çöktürme yönünde de TMPO ve Desmin'in birlikte saptanması, bu proteinlerin aynı protein kompleksi içerisinde bulunabileceğini desteklemektedir. Bununla birlikte, FT fraksiyonlarında her iki proteine ait sinyalin gözlenmesi, immün çöktürme veriminin sınırlı kaldığını göstermektedir.

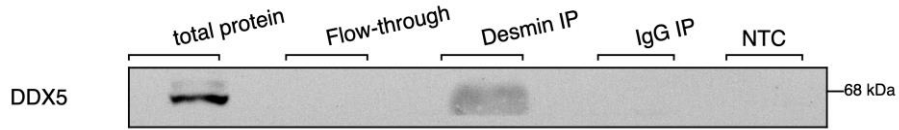


Şekil 4.24. TMPO-Desmin için karşılıklı Co-IP ve WB analizi. (A) Soldan sağa doğru; total protein, Desmin IP akış geçişi (*Flow through-FT*), Desmin IP, IgG IP ve antikorsuz boncuk kontrolü (NTC) örnekleri gösterilmektedir. TMPO proteini total protein, FT ve Desmin IP örneklerinde bant vermektedir. (B) Soldan sağa doğru; total protein, TMPO IP akış geçişi (*Flow through-FT*), TMPO IP, IgG IP ve antikorsuz boncuk kontrolü (NTC) örnekleri gösterilmektedir. Desmin proteini total protein, FT ve TMPO IP örneklerinde belirgin bant vermektedir.

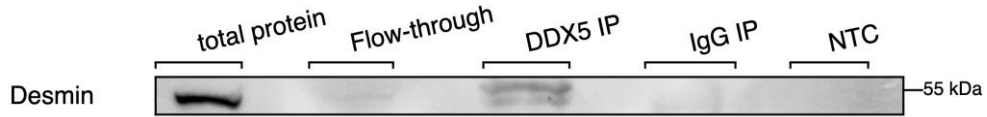
DDX5 için gerçekleştirilen karşılıklı IP-WB analizlerinde, Desmin-IP örneğinde DDX5 proteini belirgin olarak saptanmış ve FT fraksiyonunda DDX5 sinyali gözlenmemiştir. Ters yönde gerçekleştirilen DDX5-IP analizinde ise Desmin total protein ve DDX5-IP örneklerinde belirgin olarak saptanmıştır. DDX5-IP'ye ait FT fraksiyonunda çok silik bir Desmin bandının bulunması, lizattaki Desmin'in küçük bir bölümünün çöktürme sonrasında süpernatantta kaldığını göstermektedir. IgG-IP

örneğindeki çok silik Desmin sinyali düşük düzeyli özgül olmayan bağlanma veya arka plan sinyaliyle ilişkili olabilir. Boncuk kontrolünde bant gözlenmemesi ise bu sinyalin manyetik boncuklara doğrudan özgül olmayan bağlanmadan kaynaklanmadığını desteklemektedir. Bulgular birlikte değerlendirildiğinde, Desmin ve DDX5'in her iki yönde birlikte çöktürülebilmesi, bu proteinlerin aynı kompleks içerisinde bulunabileceğini desteklemektedir.

(A)



(B)



Şekil 4.25. DDX5-Desmin için karşılıklı Co-IP ve WB analizi. (A) Soldan sağa doğru; total protein, Desmin IP akış geçişi (*Flow through-FT*), Desmin IP, IgG IP ve antikorsuz boncuk kontrolü (NTC) örnekleri gösterilmektedir. DDX5 proteini total protein ve Desmin IP örneklerinde bant vermektedir. (B) Soldan sağa doğru; total protein, DDX5 IP akış geçişi (*Flow through-FT*), DDX5 IP, IgG IP ve antikorsuz boncuk kontrolü (NTC) örnekleri gösterilmektedir. Desmin proteini total protein ve DDX5 IP örneklerinde belirgin bant vermektedir. FT ve IgG IP örneklerinde ise silik Desmin bantları gözlenmiştir.

5. TARTIŞMA

5.1. C2C12 Hücrelerinde *Nkx2.5* Gen İfadesinin Değerlendirilmesi

Bu tez çalışması kapsamında, kas hücrelerine özgü bir ara filament proteini olan Desmin'in yalnızca yapısal bir sitoplazmik protein olmadığı, aynı zamanda çekirdek ilişkili protein ağlarında da rol alabileceği hipotezi değerlendirilmiştir. Desmin'in çekirdek içerisinde saptanması, nükleer yerleşim ve nükleer eksport sinyalleri taşıması ile nükleer lamina ve nükleer por kompleksi bileşenleriyle etkileşebildiğinin gösterilmiş olması, proteinin nükleer süreçlerde de işlev görebileceğini düşündürmektedir (8–10,19,50–52,122,123). Çalışma grubumuzun önceki çalışmalarında da Desmin'in Lamin B1 ile biyokimyasal olarak etkileştiği, *Proximity Ligation Assay* ile iki proteinin hücre içerisinde yakın yerleşim gösterdiği ve erken miyojenik farklılaşma sırasında insan iskelet kası hücrelerinde çekirdekte bulunduğu ortaya konmuştur (8,10,49,50). Bu bulgular, Desmin'in çekirdek organizasyonu ve gen düzenlenmesiyle ilişkili süreçlerde rol alabileceği yönündeki hipotezi desteklemiştir.

Bu nedenle çalışmanın ilk aşamasında, Desmin'in kromatin ile ilişkisini araştırmak amacıyla hedef gen olarak *Nkx2.5* seçilmiştir. Bu seçim, Fuchs ve arkadaşlarının kardiyak progenitör hücrelerde Desmin'in transkripsiyon faktörü kompleksleriyle etkileşerek *Nkx2.5* ifadesini etkilediğini gösteren çalışmasına dayanmaktadır (16). Her ne kadar *Nkx2.5* temel olarak kardiyak gelişimle ilişkili bir transkripsiyon faktörü olsa da, sınırlı sayıdaki çalışma C2C12 hücreleri ve bazı iskelet kası progenitörlerinde de düşük düzeyde ifade edilebildiğini göstermiştir (124–128). Bu nedenle başlangıçta C2C12 hücrelerinde *Nkx2.5* ifadesinin doğrulanması ve ardından Desmin ChIP deneyleri ile *Nkx2.5* promotör bölgesindeki olası zenginleşmenin araştırılması planlanmıştır.

Ancak C2C12 hücrelerinde gerçekleştirilen konvansiyonel PCR ve qPCR analizlerinde *Nkx2.5* için güvenilir ve özgül bir amplifikasyon elde edilememiştir. Öncelikle tez kapsamında tasarlanan primer çifti optimize edilmiş; farklı bağlanma sıcaklıkları, MgCl₂ konsantrasyonları, primer konsantrasyonları ve DMSO koşulları denenmesine rağmen primer-dimer oluşumu ve özgül olmayan amplifikasyon devam etmiştir. qPCR analizlerinde sinyalin geç döngülerde ortaya çıkması, erime eğrilerinde

birden fazla pik bulunması ve agaroz jel analizlerinde primer-dimer bantlarının görülmesi, hedef transkript düzeyinin düşük olabileceğini veya amplifikasyonun özgül olmadığını düşündürmüştür.

İlk primer çiftinin tasarımından kaynaklanabilecek olası sorunları değerlendirmek amacıyla ikinci bir primer çifti geliştirilmiş ve benzer optimizasyonlar gerçekleştirilmiştir. Bununla birlikte özgül ve tekrarlanabilir bir amplifikasyon yine elde edilememiştir. Son aşamada literatürde kullanılan *Nkx2.5* primerleri de test edilmiş, ancak bu primerlerle de deney koşullarımızda beklenen performans sağlanamamıştır. Böylece kullanılan üç farklı primer yaklaşımına rağmen C2C12 hücrelerinde *Nkx2.5* ifadesi güvenilir biçimde doğrulanamamıştır.

Çalışmanın önemli metodolojik sınırlılıklarından biri, *Nkx2.5*'i yüksek düzeyde ifade eden bir pozitif kontrol örneğinin bulunmamasıdır. Embriyonik kalp dokusu veya *Nkx2.5* ifadesi doğrulanmış kardiyak hücrelerin kullanılması, primerlerin hedef bölgeyi başarıyla çoğaltabildiğinin deneysel olarak gösterilmesini sağlayabilirdi. Buna karşın İnsan Protein Atlası ve UniProt verileri de *Nkx2.5* ifadesinin esas olarak kardiyak dokuda bulunduğunu, iskelet kasındaki ifadenin ise düşük düzeyli ve gelişimsel bağlama bağımlı olabileceğini göstermektedir (129,130).

Bu bulgular birlikte değerlendirildiğinde, C2C12 hücrelerinde *Nkx2.5* ifadesi güvenilir biçimde gösterilemediğinden Desmin ile gerçekleştirilecek ChIP deneylerine devam edilmesi uygun görülmemiştir. Ayrıca *Nkx2.5* dışında Desmin'in doğrudan düzenlediği gösterilmiş başka bir hedef genin literatürde bulunmaması nedeniyle, çalışmanın bu aşamasında yöntemsel yaklaşım değiştirilmiş; Desmin'in kromatin üzerindeki olası bağlanma bölgelerini araştırmak yerine çekirdek içerisindeki protein etkileşim ağlarının biyoinformatik ve proteomik yöntemlerle belirlenmesine odaklanılmıştır.

5.2. Çalışma Stratejisinin Değiştirilmesi ve RNA-seq Analizine Yönelinmesinin Değerlendirilmesi

Desmin uzun yıllar boyunca yalnızca sitoplazmik ara filament ağının temel bileşeni olarak değerlendirilmiştir (7). Bununla birlikte son yıllarda yapılan çalışmalar, Desmin'in çekirdekle ilişkili olabileceğini ve mekanik destek sağlamanın ötesinde hücresel sinyal iletimi, mekanotransdüksiyon ve gen ifadesinin düzenlenmesi gibi

süreçlerde de rol alabileceğini göstermektedir (14,35). Nükleer zarf proteinleriyle etkileşebilmesi ve çekirdek çevresinde yerleşmesi, Desmin'in kromatin organizasyonu ile dolaylı ilişkiler kurabileceğini düşündürmektedir (8,10,45). Ancak Desmin'de transkripsiyon faktörlerine özgü diziye spesifik DNA bağlanma motifleri tanımlanmamıştır (131). Ayrıca Fuchs ve arkadaşlarının çalışmaları, Desmin'in promotör bölgeleriyle ilişkisini göstermiş olmakla birlikte, ChIP yönteminin bu ilişkinin doğrudan DNA bağlanması mı yoksa protein kompleksleri aracılığıyla mı gerçekleştiğini ayırt edemediğini ortaya koymuştur (16). Bu nedenle Desmin'in DNA ile doğrudan değil, protein ortakları aracılığıyla dolaylı ilişki kurduğu varsayımı benimsenmiştir.

Bu doğrultuda öncelikle Proteome Central ve NCBI veri tabanlarında kamuya açık Desmin IP ve Co-IP proteomik veri setleri araştırılmış, ancak iskelet kasına ait uygun açık erişimli veri bulunamamıştır. Bu nedenle doğrudan proteomik veri madenciliği yerine, deneysel olarak önceliklendirilecek aday proteinlerin belirlenmesi amacıyla RNA-seq tabanlı bir ko-ifade yaklaşımı uygulanmıştır. Bu yaklaşım, Desmin ile benzer ifade dinamikleri gösteren genlerin ortak biyolojik süreçlerde yer alma olasılığına dayanmaktadır (48,50,132,133).

Bu amaçla C2C12 hücrelerinde miyojenik farklılaşmayı içeren iki bağımsız RNA-seq veri seti (PRJNA328159 ve PRJNA89011) analiz edilmiştir. Kalite kontrol, referans genoma hizalama, gen sayımı, diferansiyel gen ifadesi, Des ile korelasyon ve işlevsel zenginleştirme analizleri TRUBA altyapısında gerçekleştirilmiştir. Her iki veri setinde Des ile Spearman korelasyon katsayısı $\geq 0,90$ olan ortak genler belirlendikten sonra, transkripsiyon düzenlenmesiyle ilişkili adayların seçimi için *AnimalTFDB* v4.0 veri tabanı kullanılmıştır.

Bu analiz sonucunda *YBX3* ve *TCF23* her iki veri setinde ortak adaylar olarak belirlenmiştir (Şekil 4.8). Ancak bu proteinler, çalışma grubumuzun zebra balığında gerçekleştirdiği Desmin–Lamin B1 Co-IP/MS analizlerinde Desmin ile ilişkili proteinler arasında yer almamıştır. Bu nedenle aday seçiminde yalnızca birlikte ifade analizi değil, mevcut proteomik bulgular ve aday proteinlerin biyolojik işlevleri de birlikte değerlendirilmiştir. *YBX3*'ün RNA metabolizması ve miyogenin ifadesinin düzenlenmesinde, *TCF23*'ün ise miyoblast farklılaşmasının kontrolünde görev aldığı

bilinmesine rağmen (78,134), proteomik olarak doğrulanmamış olmaları nedeniyle öncelikli deneysel adaylar olarak seçilmemiştir.

Buna karşılık SMYD1, hem RNA-seq analizlerinde *Des* ile benzer ifade dinamikleri göstermesi hem de çalışma grubumuzun önceki proteomik analizlerinde Desmin ile ilişkili proteinler arasında yer alması nedeniyle öncelikli aday protein olarak belirlenmiştir. Kas gelişimi ve miyojenik farklılaşmadaki bilinen işlevleri ile hem çekirdekte hem de sitoplazmada bulunması, SMYD1'i Desmin'in olası nükleer işlevlerinin araştırılması açısından güçlü bir aday haline getirmiştir.

5.3. SMYD1'in Aday Protein Olarak Belirlenmesinin Değerlendirilmesi

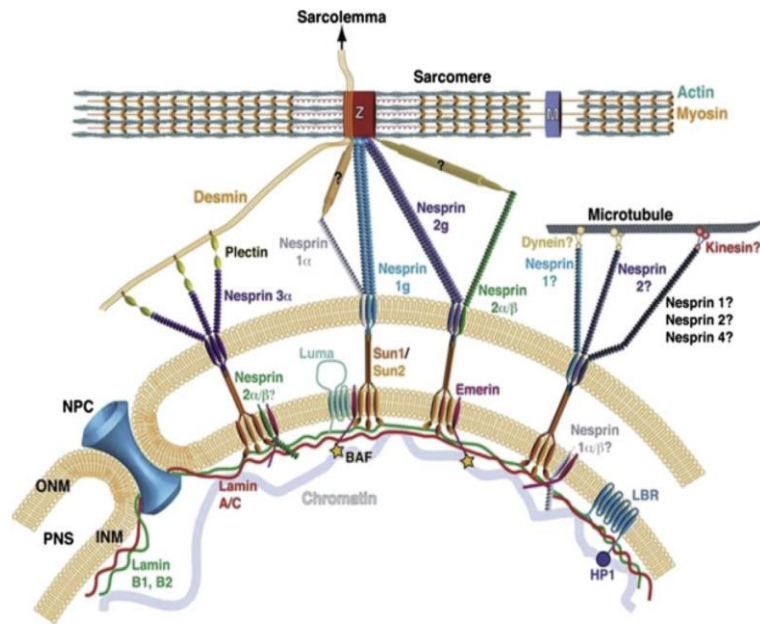
SMYD1 kas gelişimi ve miyojenik farklılaşmada görev alan lizine özgü bir metiltransferazdır. RNA-seq analizlerinde *Des* ile benzer ifade dinamikleri göstermesi ve çalışma grubumuzun önceki zebra balığı Desmin–Lamin B1 Co-IP-MS analizlerinde Desmin ile ilişkili proteinler arasında yer alması nedeniyle, Desmin'in olası nükleer işlevlerinin araştırılması açısından güçlü bir aday protein olarak değerlendirilmiştir. Bu doğrultuda Desmin ve SMYD1'in aynı protein kompleksinde bulunup bulunmadığını araştırmak amacıyla Co-IP deneyleri planlanmıştır. Böyle bir birlikteliğin gösterilmesi, Desmin'in SMYD1 ile ilişkili transkripsiyon komplekslerinde yer alabileceğini ve kromatin düzenlenmesinde dolaylı bir rol üstlenebileceğini düşündürebilirdi.

Ancak hem Desmin'in hem de SMYD1'in sitoplazmada bulunması, total hücre lizatı ile gerçekleştirilecek Co-IP deneylerinde saptanacak olası etkileşimin çekirdeğe özgü olup olmadığının yorumlanmasını güçleştirmektedir. Bu nedenle deneyler öncesinde hücrelerin nükleer ve sitoplazmik fraksiyonlara ayrılması hedeflenmiş, NE-PER fraksiyonlama protokolü optimize edilmiş ve elde edilen fraksiyonlar Western blot ile değerlendirilmiştir.

Fraksiyonlama analizlerinde Lamin B1 yalnızca nükleer fraksiyonda saptanarak nükleer izolasyonun başarılı olduğunu göstermiştir. Buna karşın Emerin beklenen şekilde nükleer fraksiyonda belirgin olarak tespit edilememiştir. Emerin'in nükleer zarfın integral membran proteini olması nedeniyle fraksiyonlama sırasında membran parçalarıyla birlikte sitoplazmik fraksiyona taşınabilmesi bu durumu açıklayabilir. Nükleer zarf bileşenleri ile sitoplazmik hücre iskeleti arasındaki yapısal

bağlantılar Şekil 5.1'de şematik olarak gösterilmiştir. Bu nedenle nükleer fraksiyonun doğrulanmasında daha güvenilir bir belirteç olarak Lamin B1 kullanılmıştır.

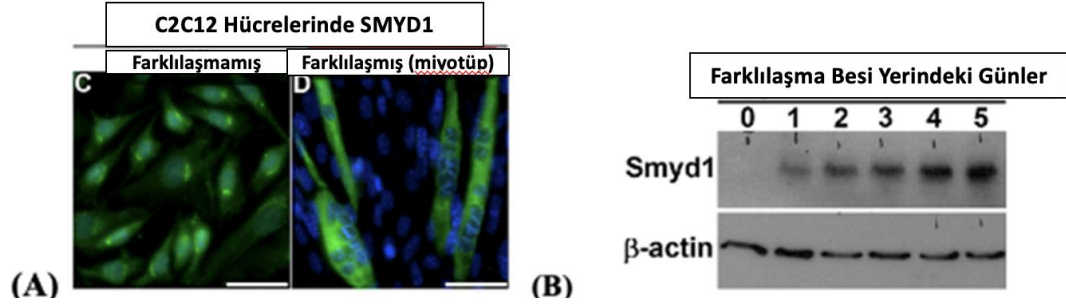
Benzer şekilde GAPDH'in nükleer fraksiyonda zayıf düzeyde saptanması başlangıçta olası sitoplazmik kontaminasyonu düşündürmüş olsa da, GAPDH'in çeşitli hücresel stres koşullarında çekirdeğe taşınabildiği bilinmektedir (135–137). Bu nedenle sonraki deneylerde sitoplazmik belirteç olarak Hsp60 kullanılmıştır. Elde edilen bulgular, fraksiyonlama yönteminin sonraki analizlerde kullanılabilecek yeterlilikte olduğunu göstermiştir.



Şekil 5.1. Nükleer zarf bileşenleri ile sitoplazmik hücre iskeleti arasındaki yapısal bağlantıların şematik gösterimi. Nükleer zarf; dış ve iç nükleer membran, nükleer por kompleksleri ve bunların altında yer alan nükleer laminadan oluşmaktadır. İç nükleer membranda bulunan Emerin, laminler, kromatinle ilişkili proteinler ve LINC kompleksi ile etkileşirken; Lamin B1, nükleer lamina ağının temel bileşenlerinden biridir. Dış nükleer membranın endoplazmik retikulum ile süreklilik göstermesi ve nükleer zarın LINC kompleksi aracılığıyla sitoplazmik hücre iskeletine bağlanması, fraksiyonlama sırasında nükleer zarla ilişkili membran fragmanlarının sitoplazmik ekstrakta kısmen taşınmasına neden olabilmektedir. Görsel, Sweet ve ark. (2017)'den uyarlanmıştır (138).

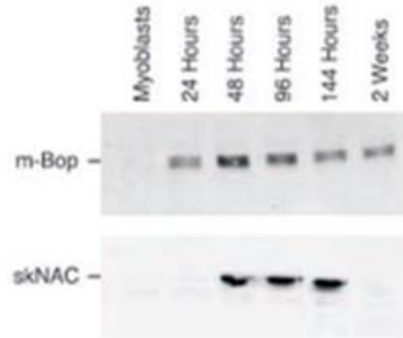
Fraksiyonlama yöntemi belirlendikten sonra SMYD1 proteininin Western blot ile gösterilebilmesi için optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. C2C12 hücrelerinde güvenilir bir SMYD1 bandı elde edilememesi üzerine LHCN-M2 hücrelerinde

farklılaşmanın farklı evreleri incelenmiştir. Önceki çalışmalar, SMYD1'in erken miyoblast evresinde düşük düzeyde bulunduğunu, farklılaşmanın ilerlemesiyle birlikte protein miktarının arttığını ve yerleşimin sitoplazmaya kaydığını göstermektedir (Şekil 5.2 ve Şekil 5.3).



Şekil 5.2. C2C12 hücrelerinde SMYD1'in farklılaşma sürecindeki hücresel yerleşimi ve protein ifadesi.

İmmüno Floresan görüntülerde SMYD1'in farklılaşmamış miyoblastlarda ağırlıklı olarak çekirdekte, farklılaşmış miyotüplerde ise baskın olarak sitoplazmada bulunduğu görülmektedir. Western blot analizinde ise SMYD1 protein düzeyinin farklılaşma süresince arttığı ve özellikle miyotüp evresinde belirgin hale geldiği gösterilmiştir. Görsel, Nagandla ve ark. (2016)'dan uyarlanmıştır (78).



Şekil 5.3. C2C12 hücrelerinde miyojenik farklılaşma süresince SMYD1(m-Bop) protein ifadesinin Western blot ile değerlendirilmesi. SMYD1 proteininin (çalışmada eski adı olan m-Bop olarak belirtilmiştir) miyoblast evresinde saptanmadığı veya çok düşük düzeyde bulunduğu, farklılaşmanın 24. saatten itibaren arttığı ve ileri zaman noktalarında yüksek düzeyde ifade edildiği görülmektedir. Alt panelde yer alan skNAC, miyojenik farklılaşmanın belirteci olarak sunulmuştur. Görsel, Sims ve ark. (2002)'den uyarlanmıştır (76).

Çalışmamızda SMYD1 proteini 24. saatte saptanamamış, 48. saatte zayıf, 96. saatte ise belirgin olarak gözlenmiştir. Bu bulgular literatürde bildirilen ifade profili ile uyumludur. Bununla birlikte, 96. saatte gerçekleştirilen fraksiyonlama analizlerinde SMYD1 yalnızca sitoplazmik fraksiyonda saptanmış, nükleer fraksiyonda gösterilememiştir. Bu durum, erken farklılaşma döneminde nükleer SMYD1 düzeyinin Western blot ile saptanamayacak kadar düşük, ileri farklılaşma döneminde ise proteinin ağırlıklı olarak sitoplazmada bulunduğunu düşündürmektedir. Bu nedenle başlangıçta oluşturulan Desmin–SMYD1 hipotezi mevcut deneysel sistemde doğrudan test edilememiştir.

Bu bulgular, Desmin–SMYD1 etkileşiminin mevcut deneysel koşullarda değerlendirilmesini mümkün kılmamıştır. Bu nedenle çalışmanın sonraki aşamasında tek bir aday protein üzerine odaklanmak yerine, Desmin ile birlikte çekirdekte bulunan proteinlerin kapsamlı olarak belirlenmesi amacıyla nükleer IP ve kütle spektrometrisi yaklaşımına geçilmiştir.

5.4. C2C12 Miyotüp Nükleer Desmin IP–MS Bulgularının Değerlendirilmesi

SMYD1 proteininin erken farklılaşma dönemlerinde Western blot ile güvenilir biçimde saptanamaması, Desmin-SMYD1 etkileşiminin hedefe yönelik olarak değerlendirilmesini sınırlandırmıştır. Bu nedenle, tek bir aday protein üzerinden ilerlemek yerine, Desmin'in çekirdekte ilişkili olduğu proteinlerin kapsamlı olarak belirlenmesi amacıyla IP ve kütle spektrometrisi (IP/MS) yaklaşımına geçilmiştir. Bu amaçla, hücreler nükleer ve sitoplazmik fraksiyonlara ayrılmış; ardından nükleer fraksiyondan Desmin IP'si gerçekleştirilerek birlikte çöken proteinler LC-MS/MS yöntemiyle analiz edilmiştir.

Nükleer fraksiyonlama ve Desmin IP çalışmalarına öncelikle insan iskelet kası kökenli LHCN-M2 miyoblast hücrelerinde başlanmıştır. İnsan hücrelerinin tercih edilmesindeki amaç, Desmin'in olası nükleer işlevlerini doğrudan insan iskelet kası bağlamında değerlendirebilmektir.

LHCN-M2 hücrelerinden elde edilen nükleer ve sitoplazmik fraksiyonlarda Lamin B1'nin yalnızca nükleer fraksiyonda, Hsp60'ın ise yalnızca sitoplazmik fraksiyonda saptanması, fraksiyonlamanın başarılı olduğunu göstermiştir. Desmin'in

her iki fraksiyonda da bulunması ise proteinin hem sitoplazmik hem de nükleer protein havuzunda yer aldığını desteklemiştir. Ardından gerçekleştirilen Desmin IP'sinde Desmin-IP örneğinde belirgin Desmin sinyali elde edilirken, flow-through fraksiyonunda Desmin bandının görülmemesi hedef proteinin büyük oranda çökeldiğini göstermiştir. IgG kontrolünde sinyal saptanmaması ise kullanılan IP koşullarının özgüllüğünü desteklemiştir.

Bununla birlikte, LHCN-M2 hücre hattının sınırlı proliferasyon kapasitesi nedeniyle elde edilen toplam nükleer protein miktarı, hem biyolojik tekrarların artırılmasını hem de LC-MS/MS analizi için gerekli örnek miktarının elde edilmesini güçleştirmiştir. Bu nedenle sonraki aşamada C2C12 fare iskelet kası hücre hattına geçilmiştir. Bu değişiklik, LHCN-M2 hücrelerinde fraksiyonlama veya immünopresipitasyonun başarısız olmasından değil, proteomik analiz için yeterli miktarda nükleer protein elde edebilmek amacıyla yapılmıştır.

C2C12 hücrelerinde kullanılacak farklılaşma zamanı, araştırma grubumuzun önceki çalışmasında elde edilen bulgulara göre belirlenmiştir. Söz konusu çalışmada Desmin'in çekirdekte en yüksek oranda bulunması farklılaşmanın 28. saatinde gözlenmesi nedeniyle (50), nükleer Desmin ile ilişkili protein komplekslerinin yakalanma olasılığını artırmak amacıyla hücreler bu zaman noktasında toplanmıştır.

C2C12 hücrelerinde fraksiyonlama yeniden optimize edilmiş ve Lamin B1 ile Hsp60 belirteçleri kullanılarak doğrulanmıştır. Desmin'in her iki fraksiyonda da saptanması, proteinin hem sitoplazmik hem de nükleer fraksiyonda bulunduğunu desteklemiştir. Bu doğrulamanın ardından iki bağımsız biyolojik tekrardan elde edilen nükleer fraksiyonlarda Desmin immünopresipitasyonu gerçekleştirilmiş ve Desmin ile birlikte çöken protein kompleksleri LC-MS/MS ile analiz edilmiştir.

Analiz sonucunda Desmin'in IgG kontrolüne göre 47,5 kat, Desmin'in iyi tanımlanmış ara filament etkileşim ortaklarından biri olan Vimentin'in ise yaklaşık 159 kat zenginleşmiş olarak saptanması, immünopresipitasyon yaklaşımının hedef proteini ve ilişkili protein komplekslerini başarıyla zenginleştirdiğini göstermektedir (139,140) Özellikle Vimentin'in yüksek düzeyde zenginleşmiş olarak saptanması, elde edilen proteomik verilerin biyolojik güvenilirliğini destekleyen önemli bir iç kontrol niteliğindedir.

Aday proteinlerin belirlenmesinde yalnızca Desmin-IP örneklerindeki zenginleşme oranı dikkate alınmamış; proteinlerin istatistiksel anlamlılığı, özgün peptit sayısı, biyolojik tekrarlar arasındaki tutarlılığı ve bilinen biyolojik işlevleri birlikte değerlendirilmiştir. Ayrıca aday proteinler, C2C12 miyotüplerinden elde edilen nükleer Desmin-IP/MS veri seti, aynı hücre modelinde RNaz A uygulaması ile gerçekleştirilen Desmin-IP/MS analizi ve daha önce zebra balığı kas dokusundan elde edilen Desmin-IP/MS verileri ile karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Böylece, belirli proteinlerin Desmin ile ilişkisinin farklı deneysel koşullarda ve farklı model sistemlerinde tekrar gözlenip gözlenmediği değerlendirilmiştir.

5.5. Desminin Nükleer Zarf ve Nükleer Por Kompleksi ile İlişkisi

IP-MS analizinde en yüksek düzeyde zenginleşen adaylardan biri olan TMPO/LAP2 ($\log_2FC = +8,15$; $\text{adj.p} = 2,6 \times 10^{-13}$; 28 PSM), iç nükleer membran ve nükleer lamina ile ilişkili bir proteindir (141). TMPO'nun nükleer zarf organizasyonu ve DNA temelli transkripsiyonun düzenlenmesindeki görevleri dikkate alındığında, Desmin'in nükleer zarf çevresindeki protein ağlarıyla ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Bu bulgu, Desmin'in Lamin B1 ile etkileşimini gösteren önceki çalışmalarla birlikte değerlendirildiğinde, Desmin'in nükleer lamina ve nükleer zarf bileşenleriyle doğrudan veya dolaylı ilişkiler kurabileceğini desteklemektedir.

RANBP2/NUP358 ($\log_2FC = +5,54$; $\text{adj.p} = 1,4 \times 10^{-7}$; 46 PSM) ve NUP153 de dikkat çeken aday proteinlerdir. RANBP2, nükleer por kompleksinin sitoplazmik filamentlerinde görev alan bir nükleoporin iken, NUP153 nükleer sepet bölgesinin temel bileşenlerinden biridir (63,142). NUP153'ün hem C2C12 hem de zebra balığı veri setlerinde saptanması, bu proteini türler arasında doğrulanmış önemli bir aday hâline getirmektedir. Bu iki proteinin nükleer por kompleksinin farklı bölgelerinde yer alması, Desmin'in tek bir nükleoporin yerine nükleer por kompleksinin farklı yapısal bileşenleriyle ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.

Aday proteinler arasında yer alan RAN da bu açıdan dikkat çekicidir. RAN, RANBP2 ile işlevsel olarak ilişkili küçük bir GTPazdır ve nükleositol plazmik taşınmanın temel düzenleyicilerinden biridir (143,144). Hem C2C12 miyotüp hücrelerinden elde edilen nükleer IP-MS analizinde hem de Zebra Balığı Kas Dokusu Desmin–Lamin B1 Co-IP–MS proteomik veri setinde saptanması nedeniyle

KADEME 2B sınıfında değerlendirilmiştir. Desmin IP'sinde RAN'ın da zenginleşmiş olarak saptanması, TMPO, RANBP2 ve diğer nükleoporin adaylarıyla birlikte değerlendirildiğinde, Desmin'in nükleer taşınma mekanizmalarıyla ilişkili bir protein ağı içerisinde yer alabileceğini düşündürmektedir.

Buna ek olarak, NUP214 IP- C2C12 Nükleer Desmin IP-MS analizinde aday seçim ölçütlerini karşılamamış olmasına rağmen, zebra balığında gerçekleştirilen Desmin-Lamin B1 ters yönlü Co-IP deneyleri ile Desmin ile ilişkisi iki yönlü olarak doğrulanmıştır. NUP214 de RANBP2 gibi nükleer por kompleksinin sitoplazmik filamentlerinde bulunan bir FG-nükleoporindir ve nükleositoplazmik taşınmada görev almaktadır (145).

Bu bulgular laboratuvarımızın önceki çalışmalarıyla da uyumludur (10). Desmin-Lamin B1 etkileşimi temel alınarak NUP153 ve NUP214 daha önce Desmin'in nükleer por kompleksi ile ilişkili aday ortakları olarak önerilmişti. Ardından zebra balığı iskelet kasından elde edilen Desmin IP-MS verilerinde (PXD047121) NUP214, NUP153 ve NUP88 yeniden tanımlanmış; hidrofobiklik analizleri Desmin'in konformasyonel değişiklikler geçirerek FG-nükleoporinlerle etkileşime girebileceği olasılığını ortaya koymuştur (50). Bununla birlikte, Desmin üzerinde grubumuz tarafından daha önce tanımlanan işlevsel nükleer yerleşim sinyalleri (NLS) ve aktif çekirdek taşınmasının gösterilmiş olması, bu çalışmada RANBP2 ve NUP153 gibi nükleer por kompleksi bileşenlerinin Desmin ile ilişkili aday proteinler olarak belirlenmesiyle birlikte değerlendirildiğinde, Desmin'in çekirdeğe kontrollü olarak taşınan ve çekirdekte özgül protein ağlarıyla ilişki kurabilen bir protein olabileceğini desteklemektedir (66). TMPO, RANBP2 ve NUP153'ün birlikte değerlendirilmesi, Desmin'in yalnızca nükleer lamina ile değil, nükleer por kompleksiyle de ilişkili daha geniş bir nükleer organizasyon ağı içerisinde yer alabileceğini düşündürmektedir.

Bu nedenle TMPO, RANBP2 ve NUP153, Desmin'in nükleer zarf ve nükleer por kompleksiyle ilişkisini destekleyen güçlü adaylar olarak değerlendirilebilir. Buna karşılık HNRNPU, DDX5 ve EEF1A1 ise Desmin'in çekirdek içerisindeki RNA metabolizması ve nükleer protein ağlarıyla ilişkili olabileceğini düşündüren aday proteinlerdir. Bu proteinlerin olası rolleri bir sonraki bölümde ayrıntılı olarak tartışılmıştır.

5.6. Birleşik Skor ile Seçilen Aday Proteinlerin Değerlendirilmesi

Desmin-IP/MS analizinde tanımlanan 21 aday protein arasından, deneysel doğrulama için $\log_2FC$, istatistiksel anlamlılık, peptit-spektrum eşleşmesi (PSM) sayısı, özgün peptit sayısı, IP/IgG oranı ve çapraz veri seti karşılaştırmasına dayalı verileri değerlendiren birleşik skor yaklaşımı kullanılarak altı aday protein seçilmiştir. Bu adaylar TMPO, RANBP2, HNRNPU, NUP153, DDX5 ve EEF1A1'dir. TMPO'nun birleşik skor sıralamasında ilk sırada yer alması ve Desmin'in daha önce gösterilmiş Lamin B1 etkileşimiyle biyolojik olarak uyumlu bir aday olması, bu proteinin öncelikli doğrulama hedeflerinden biri olarak değerlendirilmesini desteklemiştir.

İşlevsel olarak değerlendirildiğinde bu proteinler üç grupta toplanmaktadır: nükleer zarf ve nükleer por kompleksi ile ilişkili proteinler (TMPO, RANBP2 ve NUP153), RNA-bağlayıcı proteinler (HNRNPU ve DDX5) ve translasyon uzama faktörü EEF1A1. Bu dağılım, Desmin'in çekirdekte yalnızca nükleer mimariyle değil, RNA metabolizması ve transkripsiyon sonrası düzenleme süreçleriyle de ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.

Aday proteinlerin sıralaması, farklı analiz yaklaşımlarıyla tutarlı sonuçlar vermiştir. Ham bolluk değerlerinden hesaplanan $\log_2FC$ değerleri ile limma analizi sonucunda elde edilen $\log_2FC$ değerleri büyük ölçüde uyumlu bulunmuş, ayrıca üç farklı ağırlıklandırma stratejisinde de aynı altı aday protein seçilmiştir. Bu bulgular, aday seçiminin tek bir ölçüte bağlı olmadığını ve birleşik skor yaklaşımının güvenilirliğini desteklemektedir.

Bunun yanında, C2C12 Nükleer Desmin IP-MS verilerinde RNA metabolizması ile ilişkili proteinlerin belirgin biçimde zenginleştiği dikkati çekmektedir. Bu proteinler arasında hnRNP ailesinden HNRNPU, HNRNPA2B1, HNRNPM, HNRNPA0, HNRNPA3, HNRNPF ve HNRNPH1; DEAD-box RNA helikaz ailesinden DDX3X, DDX5, DDX17 ve DDX21 ile KHDRBS1 (SAM68) ve ILF3 bulunmaktadır. Bu proteinlerin pre-mRNA işlenmesi, RNA taşınması, mRNA kararlılığı, alternatif kırılma ve transkripsiyon sonrası düzenleme gibi süreçlerde görev aldığı bilinmektedir. Ayrıca, miyogenez sırasında MyoD ve MyoG mRNA'larının düzenlenmesinde de önemli roller üstlendikleri bildirilmiştir. Desmin ile birlikte bu kadar geniş bir RNA-bağlayıcı protein grubunun zenginleşmesi,

Desmin'in miyojenik farklılaşma sırasında RNA metabolizması ve transkripsiyon sonrası düzenleme süreçlerine katılan protein ağlarıyla ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Bu durum, Desmin'in RNA moleküllerine doğrudan bağlanmasından ziyade, RNA-bağlayıcı proteinler aracılığıyla ribonükleoprotein komplekslerine katılıyor olabileceği olasılığını da gündeme getirmektedir.

Bu nedenle, RNA metabolizması ile ilişkili proteinler arasından birleşik skor sıralamasında üst sıralarda yer alan HNRNPU, DDX5 ve EEF1A1, Desmin'in olası nükleer işlevleri açısından öne çıkan adaylar olarak değerlendirilmiş ve bir sonraki bölümde ayrıntılı olarak tartışılmıştır.

5.6.1. HNRNPU ve DDX5: RNA Bağlayıcı Aday Proteinler

Birleşik skor yaklaşımıyla seçilen RNA-bağlayıcı aday proteinler arasında HNRNPU ve DDX5 öne çıkmaktadır. HNRNPU; nükleer matris organizasyonu, kromatin mimarisi, pre-mRNA işlenmesi ve RNA taşınması gibi birçok nükleer süreçte görev alan çok işlevli bir RNA-bağlayıcı proteindir. Desmin ile birlikte zenginleşmesi, Desmin'in çekirdek içerisinde RNA metabolizması ve nükleer organizasyonla ilişkili protein komplekslerinde yer alabileceğini düşündürmektedir.

DDX5 ise DEAD-box RNA helikaz ailesinin önemli üyelerinden biridir. Transkripsiyonun düzenlenmesi, alternatif kırılma, ribonükleoprotein komplekslerinin yeniden düzenlenmesi ve miyojenik farklılaşmada görev almaktadır. DDX5'in birleşik skor analizinde üst sıralarda yer alması, Desmin'in RNA işlenmesi ve kas hücre farklılaşmasıyla ilişkili protein ağlarıyla bağlantılı olabileceğini desteklemektedir.

Her iki proteinin de RNaz uygulamalı C2C12 Nükleer Desmin IP–MS $\pm$ RNaz veri setinde değerlendirilememesi nedeniyle, Desmin ile ilişkilerinin RNA aracılı mı yoksa doğrudan protein–protein etkileşimine mi dayandığı mevcut verilerle ortaya konulamamaktadır. Bu nedenle DDX5, ters yönlü Co-IP ile bağımsız olarak doğrulanmıştır (Şekil 4.25). Buna karşın, HNRNPU'nun Desmin ile etkileşiminin RNA aracılı olup olmadığı henüz değerlendirilmemiştir. Bu nedenle, HNRNPU antikoru kullanılarak RNaz uygulamalı ters yönlü Co-IP deneylerinin gerçekleştirilmesi bir sonraki doğrulama basamağını oluşturmaktadır.

Birleşik skor analizinde ilk altı aday arasında yer almamakla birlikte, HNRNPA2B1 de dikkat çekici bir RNA-bağlayıcı protein olarak değerlendirilmiştir. C2C12 miyotüplerinden elde edilen nükleer Desmin IP–MS analizinde kontrol örneğine göre yaklaşık 18 kat zenginleşmiş, RNaz uygulaması sonrasında ise Desmin IP örneklerindeki bolluğunda azalma eğilimi gözlenmiştir. Bu değişim, HNRNPA2B1 ile Desmin arasındaki ilişkinin kısmen RNA aracılı olabileceğini düşündürmektedir. Ancak düzeltilmiş p değerinin anlamlılık sınırının üzerinde olması nedeniyle bu yorum kesin olarak desteklenememektedir. HNRNPA2B1'in miyojenik farklılaşmadaki bilinen işlevi, bu proteinin gelecekte yapılacak doğrulama çalışmalarında yeniden değerlendirilmesini gerekli kılmaktadır (145)

HNRNPU, DDX5 ve HNRNPA2B1'e ilişkin bulgular birlikte değerlendirildiğinde, Desmin'in çekirdekte RNA metabolizması ile ilişkili protein ağlarıyla işlevsel bağlantılar kurabileceği görülmektedir. Bu nedenle RNA-bağlayıcı proteinler, Desmin'in olası nükleer işlevlerini açıklamada önemli adaylar olarak öne çıkmaktadır.

5.6.2. EEF1A1: Üç Veri Setiyle Desteklenen Aday

EEF1A1, üç bağımsız veri setinde ortak olarak saptanan tek aday protein olması nedeniyle öne çıkmaktadır. Temel görevi translasyon uzama faktörü olarak protein sentezine katılmak olmakla birlikte, aktin hücre iskeletinin düzenlenmesi, mRNA taşınması ve stres granülü oluşumu gibi translasyon dışı işlevlere de sahiptir (114,121)

Bununla birlikte, EEF1A1 IP–MS çalışmalarında yüksek hücresel bolluğu nedeniyle sıklıkla arka plan proteini olarak tanımlanmakta ve CRAPome veritabanında da yaygın olarak bildirilmektedir (98). Bu nedenle elde edilen bulgular yorumlanırken olası arka plan katkısı dikkate alınmıştır. Nitekim EEF1A1, üç bağımsız veri setinde ortak olarak saptanan tek protein olmasına rağmen, IgG kontrol örneklerinde de yüksek düzeyde bulunması nedeniyle görece düşük bir IP/IgG oranı göstermiş ve birleşik skor sıralamasında beşinci sırada yer almıştır.

RNaz uygulaması sonrasında EEF1A1'in Desmin IP örneklerindeki bolluğu azalmış olmakla birlikte, bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($\log_2FC = +1,85$;

adj.p = 0,505). Bu nedenle, ilişkinin RNA aracılı olabileceği olasılığı mevcut verilerle doğrulanamamaktadır.

Buna rağmen, EEF1A1'in üç bağımsız veri setinde ortak olarak saptanması, bu ilişkinin yüksek hücresel bolluğun ötesinde biyolojik bir karşılığı olabileceğini düşündürmektedir. Bu nedenle EEF1A1, ileri doğrulama çalışmaları için öncelikli adaylardan biri olarak değerlendirilmiştir.

5.6.3. Aday Proteinler Arasındaki Korelasyonların Değerlendirilmesi

Birleşik skor yaklaşımıyla seçilen aday proteinler arasında gerçekleştirilen Pearson korelasyon analizi, bu proteinlerin Desmin-IP örneklerinde genel olarak benzer bolluk profilleri sergilediğini göstermiştir. Bu durum, aday proteinlerin Desmin ile ilişkili ortak biyolojik süreçlerde veya aynı protein ağları içerisinde yer alabileceğini düşündürmektedir.

Bununla birlikte, aday proteinlerin tamamının Desmin-IP örneklerinde IgG kontrollerine göre zenginleşmiş olması, gözlenen korelasyonların ortak zenginleşme eğiliminden kısmen etkilenmesine neden olabilir. Bu nedenle Pearson ve Spearman korelasyon analizleri, protein bollukları arasındaki birlikte değişimi ortaya koymakta, ancak doğrudan fiziksel protein–protein etkileşimini veya aynı protein kompleksinde bulunduklarını göstermemektedir. Bu ilişkilerin doğrulanabilmesi için ters Co-IP ve *proximity ligation assay* (PLA) gibi hedefe yönelik doğrulama yöntemlerine ihtiyaç vardır.

Bu bulgular, Desmin'in çekirdekte tek tek proteinlerle değil, birbiriyle ilişkili protein ağlarıyla bağlantılı olabileceğini desteklemektedir.

5.6.4. Türler Arasında Ortak Olarak Saptanan Aday Proteinler

Zebra balığı Tam Hücre Lizatı Desmin–Lamin B1 Co-IP–MS veri seti ile C2C12 miyotüp hücrelerinden elde edilen nükleer Desmin verilerinin karşılaştırılması, bazı aday proteinlerin farklı omurgalı modellerinde tekrar saptandığını göstermiştir. Bunlar arasında EEF1A1'in zebra balığındaki ortologları (eef1a1a, eef1a1b ve eef1a111) ile NUP153 öne çıkmaktadır. NUP153'ün hem memeli hem de zebra balığı veri setlerinde belirlenmiş olması, Desmin ile ilişkisinin evrimsel olarak korunmuş olabileceğini düşündürmektedir.

Benzer şekilde, EEF1A1'in üç bağımsız veri setinde ortak olarak saptanması, yüksek hücresel bolluğuna rağmen Desmin ile ilişkisinin farklı deneysel sistemlerde tutarlı biçimde gözlemlendiğini göstermektedir. Bu bulgu, EEF1A1'in Desmin ile ilişkili protein ağına korunmuş bileşenlerinden biri olabileceğini düşündürmektedir.

5.7. Öncelikli Aday Proteinlerin Karşılıklı IP-WB ile doğrulanması

Birleşik skor yaklaşımı sonucunda önceliklendirilen TMPO ve DDX5 proteinlerinin Desmin ile birlikteliği, karşılıklı IP-WB deneyleriyle değerlendirilmiştir. TMPO ve DDX5'in farklı işlevsel protein gruplarını temsil etmesi, bu adayların doğrulama amacıyla seçilmesinde etkili olmuştur. TMPO, iç nükleer zar ve nükleer lamina organizasyonu ile ilişkili bir protein iken DDX5; RNA işlenmesi, alternatif kırılma ve ribonükleoprotein komplekslerinin yeniden düzenlenmesinde görev alan bir RNA helikazıdır. Bu nedenle söz konusu deneyler, Desmin'in hem nükleer zarf hem de RNA metabolizmasıyla ilişkili protein ağlarıyla bağlantısını değerlendirmek açısından önem taşımaktadır.

TMPO için gerçekleştirilen karşılıklı IP-WB analizlerinde, TMPO-IP örneğinde yaklaşık 53 kDa düzeyinde Desmin bandı saptanmıştır. Benzer şekilde, Desmin-IP sonrasında gerçekleştirilen WB analizinde TMPO yaklaşık 78 kDa düzeyinde belirgin bir bant vermiştir. Her iki yönde de hedef proteinlerin birlikte çöktürülmesi, Desmin ve TMPO'nun aynı protein kompleksi içerisinde bulunabileceğini desteklemektedir. İki WB analizinde total protein kuyucuğunda bant vardır. Bununla birlikte, TMPO-IP deneyinde Desmin'in ve Desmin-IP deneyinde TMPO'nun FT fraksiyonlarında da belirgin olarak saptanması, lizattaki proteinlerin yalnızca bir bölümünün IP sırasında çöktürülebildiğini göstermektedir. Bu bulgu, TMPO ve Desmin'in aynı protein kompleksi içerisinde bulunabileceği olasılığını dışlamamakla birlikte çöktürme veriminin sınırlı olduğunu ve deney koşullarının optimizasyon gerektirdiğini düşündürmektedir. Bu kapsamda antikor ve boncuk miktarı, lizat konsantrasyonu, inkübasyon süresi, yıkama koşulları ve tamponun deterjan içeriği yeniden değerlendirilebilir.

DDX5 için gerçekleştirilen IP-WB analizlerinde ise Desmin-IP örneğinde DDX5 proteininin saptanması ve FT fraksiyonunda belirgin bir DDX5 bandı gözlenmemesi, DDX5'in Desmin içeren protein kompleksleriyle birlikte etkin biçimde

çöktürüldüğünü düşündürmektedir. Ters yönde gerçekleştirilen DDX5-IP-WB analizinde Desmin proteininin DDX5-IP örneğinde belirgin olarak saptanması, bu bulguyu karşılıklı olarak desteklemiştir. DDX5-IP deneyine ait FT fraksiyonunda ve IgG-IP örneğinde yalnızca çok silik Desmin bantlarının bulunması, sırasıyla çöktürme sonrasında süpernatantta kalan düşük miktardaki proteine ve düşük düzeyde özgül olmayan bağlanmaya işaret edebilir.

5.8. Tez Çalışmasının Sınırlılıkları

Bu çalışmanın en önemli sınırlılıklarından biri, C2C12 Miyotüp Nükleer Desmin IP-MS analizinin iki biyolojik tekrardan oluşan bir veri seti üzerinden gerçekleştirilmiş olmasıdır. Bu nedenle aday proteinlerin belirlenmesinde biyolojik tekrar sayısının sınırlı olması istatistiksel gücü azaltmış ve özellikle düşük bollukta bulunan proteinlerin değerlendirilmesini güçleştirmiş olabilir. Ayrıca, Desmin IP grubu iki biyolojik tekrar içerirken, IgG kontrol grubu yalnızca bir biyolojik tekrar (iki teknik tekrar) ile temsil edilmiştir. Teknik tekrarlar ölçüm hassasiyetini artırsa da biyolojik varyasyonu yansıtmaz. Bu nedenle deneysel tasarımdaki biyolojik tekrar sayısındaki dengesizlik, gruplar arasındaki istatistiksel karşılaştırmaların istatistiksel gücünü ve sonuçların yorumlanabilirliğini sınırlamaktadır.

İkinci olarak, RNA aracılı etkileşimleri değerlendirmek amacıyla oluşturulan C2C12 Miyotüp Nükleer Desmin IP-MS $\pm$ RNaz veri seti, istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar vermemesi nedeniyle aday proteinlerin belirlenmesinde ana proteomik veri seti olarak kullanılmamıştır. Bununla birlikte, HNRNPA2B1 ve EEF1A1 gibi bazı aday proteinlerde RNaz uygulaması sonrasında gözlenen değişimler biyolojik açıdan dikkat çekici bulunmuş ve ön değerlendirme amacıyla tartışılmıştır. Ayrıca, oluşturulan 24 proteinlik aday listenin yalnızca iki üyesi (HNRNPA2B1 ve EEF1A1) bu veri setinde de saptanmış, RNaz uygulaması öncesi ve sonrası karşılaştırmaya olanak sağlayan veri ise yalnızca EEF1A1 için elde edilebilmiştir. Bu nedenle RNA aracılı etkileşimler sınırlı sayıda aday protein üzerinden değerlendirilebilmiştir ve elde edilen bulgular kesin kanıtlar olarak değil, ileri çalışmalarla doğrulanması gereken ön gözlemler olarak yorumlanmalıdır.

Üçüncü olarak, karşılıklı IP-WB deneylerinde TMPO ve DDX5 için farklı sınırlılıklar gözlenmiştir. TMPO-IP deneyinde IgG kontrolünde belirgin Desmin

sinyali saptanmamasına karşın, FT fraksiyonunda yoğun Desmin bandının bulunması, lizattaki Desmin'in yalnızca bir bölümünün TMPO ile birlikte çöktürülebildiğini ve immün çöktürme veriminin sınırlı kaldığını göstermektedir. DDX5-IP deneyinde ise FT fraksiyonunda ve IgG kontrolünde çok silik Desmin sinyalleri gözlenmiştir. Bu sinyaller, az miktarda Desmin'in çöktürme sonrasında süpernatantta kalması ve düşük düzeyli özgül olmayan bağlanma veya arka plan sinyaliyle ilişkili olabilir. Bununla birlikte, IP-MS analizinde TMPO'nun yaklaşık 270 kat, DDX5'in ise yaklaşık 30 kat zenginleşmiş olarak saptanması ve her iki proteinin Desmin ile karşılıklı olarak birlikte çöktürülebilmesi, bu proteinlerin Desmin ile aynı protein kompleksleri içerisinde bulunabileceğini desteklemektedir.

Dördüncü bölümde sunulan korelasyon analizi yalnızca üç örnek (iki biyolojik Desmin IP ve bir IgG kontrol) üzerinden hesaplanmıştır. Bu nedenle Pearson ve Spearman korelasyon katsayıları yalnızca keşifsel amaçlı olarak değerlendirilmeli ve bağımsız protein kompleksi üyeliğinin kanıtı olarak yorumlanmamalıdır. Aday proteinlerin tamamının Desmin IP örneklerinde IgG kontrollerine göre zenginleşmiş olması, gözlenen pozitif korelasyon örüntüsüne katkıda bulunmuş olabilir.

5.9. Genel Değerlendirme

Çalışmanın başlangıcındaki hipotez, Desmin'in çekirdek içerisinde kromatin organizasyonu ve gen ifadesinin düzenlenmesinde görev alan transkripsiyon faktörleri, kromatin düzenleyicileri veya DNA-bağlayıcı proteinlerle ilişkili olabileceği yönündeydi. Ancak nükleer Desmin IP-MS analizlerinde bu hipotezi doğrudan destekleyen güçlü aday proteinler saptanamamıştır. Buna karşılık, TMPO, RANBP2 ve NUP153 gibi nükleer zarf ve nükleer por kompleksi ile ilişkili proteinler ile HNRNPU ve DDX5 başta olmak üzere RNA metabolizması ve transkripsiyon sonrası düzenleme süreçlerinde görev alan proteinlerin belirgin biçimde zenginleştiği görülmüştür. Ayrıca EEF1A1, üç bağımsız veri setinde ortak olarak saptanan tek aday protein olarak öne çıkmıştır.

Bu bulgular, Desmin'in çekirdek içerisindeki olası işlevinin doğrudan DNA-bağlayıcı proteinler veya klasik transkripsiyon faktörleri aracılığıyla değil, nükleer organizasyon, nükleositol plazmik taşıma ve RNA metabolizmasıyla ilişkili protein ağları üzerinden gerçekleşebileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, mevcut

bulgular Desmin'in kromatin ile ilişki kurma olasılığını dışlamamaktadır. Aksine, elde edilen veriler bu ilişkinin doğrudan DNA bağlayıcı ortaklar yerine nükleer zarf, nükleer por kompleksi, nükleer matris ve RNA bağlayıcı protein ağları aracılığıyla dolaylı olarak kurulabileceğine işaret etmektedir.

Bu çalışma, Desmin'in çekirdekteki olası işlevlerine ilişkin yeni aday proteinleri ve olası bir etkileşim ağını ortaya koymuştur. Özellikle TMPO, RANBP2, NUP153, HNRNPU ve DDX5, Desmin'in nükleer zarf-nükleer por kompleksi ile RNA metabolizması arasındaki olası işlevsel bağlantısını destekleyen güçlü adaylar olarak öne çıkmaktadır. EEF1A1 ise üç bağımsız veri setinde ortak olarak saptanması nedeniyle dikkat çekici bir aday olmakla birlikte, yüksek hücresel bolluğu nedeniyle elde edilen bulgular temkinli değerlendirilmelidir.

Elde edilen bulgular, Desmin'in nükleer etkileşim ağını sistematik olarak ortaya koyan ilk kapsamlı proteomik çalışmalardan birini temsil etmekte ve nükleer zarf, nükleer por kompleksi ile RNA metabolizması arasında olası işlevsel bağlantılar bulunduğunu düşündürmektedir. Genel olarak bu çalışma, Desmin'in çekirdekteki olası işlevlerinin nükleer mimari, nükleositoplazmik taşınma ve RNA metabolizması ile ilişkili protein ağları üzerinden şekillenebileceğini ortaya koyan yeni bir kavramsal çerçeve sunmaktadır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

6.1. Sonuçlar

Bu tez kapsamında elde edilen sonuçlar aşağıda maddeler halinde özetlenmiştir:

1. Bu çalışmada Desmin'in yalnızca sitoplazmik ara filament ağına ait yapısal bir protein olarak değil, aynı zamanda nükleer protein fraksiyonunda da bulunan bir protein olarak değerlendirilmesi gerektiği gösterilmiştir.

2. *Nkx2.5* için gerçekleştirilen PCR ve qPCR optimizasyonlarında primer tasarımı, bağlanma sıcaklığı, MgCl₂, DMSO ve primer konsantrasyonu değiştirilmesine rağmen özgül amplifikasyon sağlanamamış; qPCR analizlerinde çoklu erime pikleri gözlenmesi nedeniyle C2C12 hücrelerinde *Nkx2.5* ifadesi güvenilir biçimde doğrulanamamıştır.

3. C2C12 hücrelerinde miyojenik farklılaşma sürecine bağlı olarak Desmin ifade düzeyindeki değişimle benzer ifade profili gösteren genleri belirlemek amacıyla RNA-seq veri setleri analiz edilmiştir. Bu kapsamda PRJNA328159 ve PRJNA89011 veri setlerinde Des ile korelasyon gösteren genler Spearman korelasyon analizi ile değerlendirilmiş ve aynı filtreleme kriterleri uygulandığında, her iki veri setinde ortak olarak Des ile yüksek korelasyon gösteren genlerin *Ybx3* ve *Tcf23* olduğu belirlenmiştir. Ancak bu genler, Desmin–Lamin B1 Co-IP/MS proteomik verileriyle desteklenmediğinden sonraki aday önceliklendirme aşamasına dahil edilmemiştir.

4. Zebra balığı proteomik verileri ve RNA-seq analizleri doğrultusunda SMYD1 öncelikli aday protein olarak belirlenmiş; ancak Western blot ile güvenilir biçimde doğrulanamamıştır.

5. C2C12 hücrelerinde gerçekleştirilen nükleer/sitoplazmik fraksiyonlama deneylerinde Lamin B1'nin yalnızca nükleer fraksiyonda, Hsp60'ın ise yalnızca sitoplazmik fraksiyonda saptanması, fraksiyonlama işleminin başarıyla gerçekleştirildiğini doğrulamıştır. Aynı deneylerde Desmin'in hem sitoplazmik hem de nükleer fraksiyonlarda tespit edilmesi, bu proteinin yalnızca sitoplazmik ara filament ağı ile sınırlı olmadığını, nükleer protein fraksiyonunda da bulunduğunu göstermiş ve nükleer yerleşim potansiyelini desteklemiştir.

6. C2C12 hücrelerinde gerçekleştirilen nükleer Desmin IP-MS analizlerinde Desmin'in IgG kontrole göre 47.5 kat, Desmin'in bilinen ara filament ağı ortaklarından Vimentin'in ise yaklaşık 159 kat zenginleşmiş olarak saptanması, IP sisteminin hedef proteini ve ilişkili protein ağını zenginleştirebildiğini göstermiştir.

7. C2C12 nükleer Desmin IP-MS analizleri sonucunda 21 aday protein belirlenmiş ve bunlar beş işlevsel grupta sınıflandırılmıştır. Tabloya karşılaştırma amacıyla Desmin, Vimentin ve Plektin referans proteinleri de eklenmiştir. Bu adaylar arasından log₂FC, istatistiksel anlamlılık, PSM sayısı, özgün peptit sayısı, IP/IgG oranı ve çapraz veri seti kanıt düzeyini içeren birleşik skor yaklaşımı kullanılarak deneysel doğrulama için altı aday protein seçilmiştir: TMPO, RANBP2, HNRNPU, NUP153, DDX5 ve EEF1A1. Bu proteinlerin nükleer zarf/nükleer por kompleksi (TMPO, RANBP2, NUP153) ve RNA metabolizması (HNRNPU, DDX5) ile ilişkili olması, Desmin'in çekirdek içi süreçlerle bağlantılı olabileceğini düşündürmektedir. EEF1A1 ise üç veri setinde ortak saptanan tek aday proteindir.

8. Birleşik skor ile seçilen aday proteinler arasında yüksek düzeyde korelasyon gözlenmiş, bu durum aday proteinlerin ortak protein ağlarında yer alabileceğini düşündürmüştür.

9. Farklı ağırlıklandırma stratejilerinde aynı altı aday proteinin seçilmesi, birleşik skor yaklaşımının sağlamlığını desteklemiştir.

10. NUP153'ün hem C2C12 nükleer Desmin IP-MS analizinde hem de Zebra balığı Tam Hücre Lizatı Desmin-Lamin B1 Co-IP-MS veri setinde saptanması, Desmin ile ilişkili bazı nükleer por kompleksi bileşenlerinin türler arasında korunmuş olabileceğini düşündürmektedir. Bu bulgu, zebrabalığında Desmin ile ilişkisi Co-IP ile gösterilen NUP214 verisiyle birlikte değerlendirildiğinde, Desmin'in nükleer por kompleksinin farklı bileşenleriyle ilişkili olabileceğini desteklemektedir. Ayrıca, Desmin üzerinde daha önce tanımlanan işlevsel nükleer yerleşim sinyalleri ile bu çalışmada belirlenen RANBP2 ve NUP153 gibi nükleer por kompleksi bileşenleri birlikte değerlendirildiğinde, Desmin'in çekirdeğe kontrollü olarak taşınan ve çekirdekte özgül protein ağlarıyla ilişki kurabilen bir protein olabileceği desteklenmiştir.

11. C2C12 Nükleer Desmin IP–MS $\pm$ RNaz’da, RNaz uygulanmayan ve RNaz uygulanan Desmin-IP örnekleri karşılaştırılarak Desmin ile ilişkili proteinlerin RNA aracılı etkileşim gösterip göstermediği değerlendirilmiştir. RNaz analizinde istatistiksel anlamlılık eşiğini karşılayan aday protein saptanmamış olmakla birlikte, özellikle EEF1A1 ve HNRNPA2B1’de RNaz sonrası sinyal azalmasına işaret eden yönsel eğilimler gözlenmiştir. RNaz analizi, birleşik skor değerlendirmesi ve farklı veri setlerinden elde edilen bulgular birlikte değerlendirildiğinde EEF1A1, Desmin’in RNA ile ilişkili nükleer işlevleri açısından öncelikli aday protein olarak öne çıkmıştır.

12. Genel olarak bu tez, Desmin’in çekirdekte nükleer zarf, nükleer por kompleksi ve RNA metabolizması ile ilişkili protein ağlarında yer alabileceğini destekleyen ilk kapsamlı proteomik bulguları sunmakta ve Desmin’in çekirdek içi işlevlerine yönelik yeni bir moleküler çerçeve önermektedir.

6.2. Öneriler

Bu tez çalışmasının kapsamını genişletmek ve elde edilen bulguları desteklemek amacıyla aşağıdaki çalışmalar önerilmektedir:

1. *Nkx2.5* primerlerinin çalışma etkinliğinin doğrulanması amacıyla, *Nkx2.5* ifadesi gösteren kalp kası/kardiyak hücrelerden elde edilmiş cDNA örneklerinin PCR ve qPCR analizlerinde pozitif kontrol olarak kullanılması önerilmektedir. Bu yaklaşım, C2C12 hücrelerinde amplifikasyonun elde edilememesinin primer performansından mı yoksa düşük *Nkx2.5* ifadesinden mi kaynaklandığının ayırt edilmesini sağlayacaktır.

2. Desmin’in miyojenik farklılaşma sürecindeki nükleer yerleşim dinamiklerinin belirlenmesi amacıyla, farklılaşmanın farklı evrelerinde nükleer/sitoplazmik fraksiyonlama ve Western blot analizleri ile nükleer ve sitoplazmik Desmin düzeyleri karşılaştırılmalıdır. Bulgular, immüno Floresan/konfokal mikroskopi ile doğrulanarak Desmin’in çekirdek çevresi ve çekirdek içi yerleşimi kantitatif olarak değerlendirilmelidir.

3. C2C12 Nükleer Desmin IP–MS analizlerinin daha yüksek biyolojik tekrar sayısı ile tekrarlanması önerilmektedir. Biyolojik tekrar sayısının artırılması, aday proteinlerin daha güvenilir şekilde belirlenmesini, istatistiksel gücün artırılmasını ve

özellikle RNaz uygulaması gibi karşılaştırmalı analizlerde gözlenen değişimlerin daha sağlıklı değerlendirilmesini sağlayacaktır. Ayrıca bu yaklaşım, özgül Desmin etkileşimlerinin arka plan proteinlerinden daha güvenilir biçimde ayırt edilmesine katkı sağlayacaktır.

4. C2C12 nükleer Desmin IP–MS analizlerinde belirlenen aday proteinlerin Desmin ile etkileşimleri, hedefe yönelik doğrulama deneyleri ile daha kapsamlı olarak araştırılmalıdır. Bu tez kapsamında nükleer zarf proteinlerini temsil eden LAP2/TMPO ile RNA-bağlayıcı protein grubunu temsil eden DDX5 için gerçekleştirilen doğrulama çalışmalarının, birleşik skor analizinde öne çıkan diğer aday proteinlere (RANBP2, NUP153, HNRNPU ve EEF1A1) de genişletilmesi önerilmektedir. Bu amaçla ters yönlü Co-IP, Western blot, immüno Floresan/konfokal mikroskopi ve/veya *proximity ligation assay* (PLA) gibi tamamlayıcı yöntemlerden yararlanılabilir.

5. Özellikle RNA bağlayıcı aday proteinler (DDX5, DDX17, HNRNPU, HNRNPA2B1 ve EEF1A1) için, Desmin ile etkileşimlerin RNA bağımlılığının değerlendirilmesi amacıyla ilgili antikolar kullanılarak RNaz uygulamalı ters yönlü Co-IP deneylerinin gerçekleştirilmesi önerilmektedir.

6. Desmin'in RNA metabolizmasındaki olası işlevinin değerlendirilmesi amacıyla RNA immünopresipitasyonu (RIP) ve hedefe yönelik RNA analizleri gerçekleştirilmeli; DDX5, DDX17, HNRNPU ve EEF1A1 gibi RNA bağlayıcı aday proteinlerin Desmin–RNA etkileşimlerindeki işlevsel katkıları baskılama veya aşırı ifade modelleri kullanılarak değerlendirilmelidir..

7. Desmin'in olası nükleer işlevlerinin değerlendirilmesi amacıyla, Desmin ifadesinin baskılandığı veya aşırı ifade edildiği hücre modelleri oluşturulmalıdır. Bu modellerde, öncelikli aday proteinlerin hücre içi yerleşimi ve ifade düzeylerindeki değişiklikler incelenerek Desmin'in nükleer organizasyondaki olası rolü araştırılabilir. Özellikle TMPO/LAP2'nin Desmin düzeyindeki değişikliklere verdiği yanıtın değerlendirilmesi, nükleer lamina ile ilişkili işlevlerin aydınlatılmasına katkı sağlayabilir. Ayrıca, Desmin'in baskılanması veya aşırı ifade edilmesinin hücrede hangi genlerin ifade düzeylerini etkilediği RNA-seq gibi transkriptomik yaklaşımlarla araştırılabilir.

8. SMYD1 proteininin Western blot ile doğrulanamamış olması nedeniyle, Desmin-SMYD1 ilişkisinin daha duyarlı deneysel yaklaşımlarla yeniden değerlendirilmesi önerilmektedir. Bu amaçla, ileri farklılaşma evrelerinde SMYD1 IP'si, daha yüksek duyarlılığa sahip antikörlerle Western blot analizleri ve sitoplazmik fraksiyonda Co-IP çalışmaları gerçekleştirilebilir.

9. NUP153'ün hem C2C12 hem de zebrabalığı veri setlerinde saptanması, Desmin'in nükleer por kompleksi ile ilişkisinin türler arasında korunmuş olabileceğini düşündürmektedir. Bu ilişkinin işlevsel olarak doğrulanması amacıyla, zebrabalığı desmin mutant modellerinde NUP153, NUP214 ve RANBP2'nin ifade düzeyleri ve hücresel yerleşimlerinin incelenmesi önerilmektedir. Buna ek olarak, TMPO, RANBP2 ve NUP153 gibi öncelikli aday proteinlerin Desmin'in nükleer yerleşimi ve nükleositoplazmik taşınmasındaki olası rolleri, baskılama veya aşırı ifade modelleri kullanılarak işlevsel olarak araştırılabilir.

10. Bu tez kapsamında Desmin'in kromatin ile doğrudan ilişkisi değerlendirilememiştir. Bu nedenle, aday proteinlerin doğrulanmasının ardından Desmin'in kromatin üzerindeki olası bağlanma bölgelerinin ChIP-seq gibi genom çapında yaklaşımlarla araştırılması önerilmektedir. Bu çalışmalar, Desmin'in kromatin ile doğrudan etkileşim kurup kurmadığının ve transkripsiyonun düzenlenmesindeki olası rolünün ortaya konulmasına katkı sağlayabilir.

11. *DES* genindeki hastalığa neden olan mutasyonların Desmin'in nükleer etkileşim ağını nasıl etkilediğinin araştırılması önerilmektedir. Bu amaçla, hastalıkla ilişkili *DES* mutasyonlarını taşıyan hücre modellerinde veya hasta biyopsi örneklerinde nükleer Desmin yerleşimi ile TMPO, RANBP2, NUP153, HNRNPU ve DDX5 gibi birleşik skor analizinde üst sıralarda yer alan proteinlerle etkileşimlerinin karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi, Desmin'in nükleer işlev kaybının hastalık patogenezindeki olası rolünün aydınlatılmasına katkı sağlayabilir.

Bu tezde tanımlanan aday proteinlerin doğrulanması ve işlevsel olarak karakterize edilmesi, Desmin'in çekirdekteki rolünün nükleer mimari, nükleositoplazmik taşınma ve RNA metabolizması ile ilişkili protein ağları bağlamında daha ayrıntılı olarak anlaşılmasına ve desminopatilerin moleküler mekanizmalarının aydınlatılmasına katkı sağlayacaktır.

7. KAYNAKLAR

1. Argilés JM, Campos N, Lopez-Pedrosa JM, Rueda R, Rodriguez-Mañas L. Skeletal Muscle Regulates Metabolism via Interorgan Crosstalk: Roles in Health and Disease. *J Am Med Dir Assoc.* 2016 Sep 1;17(9):789–96. doi:10.1016/J.JAMDA.2016.04.019/ASSET/5F6848C2-7487-4840-B7BF-75170D59CEFA/MAIN.ASSETS/GR4.JPG PubMed PMID: 27324808.
2. Son Y, Paton CM. Lipid metabolic features of skeletal muscle in pathological and physiological conditions. *Lipid Signaling and Metabolism.* 2020 Jan 1;359–83. doi:10.1016/B978-0-12-819404-1.00018-X
3. Mukund K, Subramaniam S. Skeletal muscle: A review of molecular structure and function, in health and disease. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 2020 Jan 1;12(1):e1462. doi:10.1002/WSBM.1462 PubMed PMID: 31407867.
4. Vlachakis D, Tsilafakis K, Kostavasili I, Kossida S, Mavroidis M. Unraveling Desmin's Head Domain Structure and Function [Internet]. 2024. doi:10.3390/cells13070603
5. Fuchs E, Weber K. Intermediate filaments: Structure, dynamics, function, and disease. *Annu Rev Biochem.* 1994 Jul 1;63(Volume 63, 1994):345–82. doi:10.1146/ANNUREV.BI.63.070194.002021/CITE/REFWORKS PubMed PMID: 7979242.
6. Small J V., Gimona M. The cytoskeleton of the vertebrate smooth muscle cell. *Acta Physiol Scand.* 1998 Dec 1;164(4):341–8. doi:10.1046/J.1365-201X.1998.00441.X PubMed PMID: 9887957.
7. West G, Sedighi S, Agnetti G, Taimen P. Intermediate filaments in the heart: The dynamic duo of desmin and lamins orchestrates mechanical force transmission. *Curr Opin Cell Biol.* 2023 Dec 1;85:102280. doi:10.1016/J.CEB.2023.102280 PubMed PMID: 37972529.
8. Kural Mangit E, Boustanabadimaralan Düz N, Dinçer P. A cytoplasmic escapee: desmin is going nuclear. *Turkish Journal of Biology.* 2021 Jan 1;45(6):711–9. doi:10.3906/biy-2107-54
9. Mangit EK, Cevheroğlu O, Dinçer P. Desmin's conformational modulation by hydrophobicity. *Turkish Journal of Biochemistry.* 2024 Apr 1;49(2):236–43. doi:10.1515/TJB-2023-0220/ASSET/GRAPHIC/J_TJB-2023-0220_FIG_003.JPG
10. Kural-Mangit E, Dinçer PR. Physical evidence on desmin-lamin B interaction. *Cytoskeleton (Hoboken).* 2021 Jan 1;78(1):14–7. doi:10.1002/CM.21651 PubMed PMID: 33475247.

11. Traub P, Shoeman RL. Intermediate Filament Proteins: Cytoskeletal Elements with Gene-Regulatory Function? *Int Rev Cytol.* 1994 Jan 1;154(C):1–103. doi:10.1016/S0074-7696(08)62198-1 PubMed PMID: 8083030.
12. Gruenbaum Y, Foisner R. Lamins: Nuclear intermediate filament proteins with fundamental functions in nuclear mechanics and genome regulation. *Annu Rev Biochem.* 2015 Jun 2;84(Volume 84, 2015):131–64. doi:10.1146/ANNUREV-BIOCHEM-060614-034115/CITE/REFWORKS PubMed PMID: 25747401.
13. Vahabikashi A, Adam SA, Medalia O, Goldman RD. Nuclear lamins: Structure and function in mechanobiology. *APL Bioeng.* 2022 Mar 1;6(1). doi:10.1063/5.0082656/2820300 PubMed PMID: 35146235.
14. Tsikitis M, Diokmetzidou A, Liakopoulos P, Karipidou M, Kokkinopoulos I, Vatsellas G, et al. Molecular insights into the role of desmin intermediate filament network in chromatin landscape, cardiomyocyte differentiation, and maturation. *Cell Death & Disease* 2025 16:1. 2025 Oct 16;16(1):723-. doi:10.1038/s41419-025-08056-3 PubMed PMID: 41102149.
15. Capetanaki Y, Milner DJ, Weitzer G. Desmin in Muscle Formation and Maintenance: Knockouts and Consequences. *Cell Struct Funct.* 1997;22(1):103–16. doi:10.1247/CSF.22.103 PubMed PMID: 9113396.
16. Fuchs C, Gawlas S, Heher P, Nikouli S, Paar H, Ivankovic M, et al. Desmin enters the nucleus of cardiac stem cells and modulates Nkx2.5 expression by participating in transcription factor complexes that interact with the nkx2.5 gene. *Biol Open.* 2016 Feb 15;5(2):140–53. doi:10.1242/BIO.014993 PubMed PMID: 26787680.
17. Hofner M, Höllrigl A, Puz S, Sary M, Weitzer G. Desmin stimulates differentiation of cardiomyocytes and up-regulation of brachyury and nkx2.5. *Differentiation.* 2007;75(7):605–15. doi:10.1111/J.1432-0436.2007.00162.X PubMed PMID: 17381547.
18. Höllrigl A, Puz S, Al-Dubai H, Kim JU, Capetanaki Y, Weitzer G. Amino-terminally truncated desmin rescues fusion of des^{-/-} myoblasts but negatively affects cardiomyogenesis and smooth muscle development. *FEBS Lett.* 2002 Jul 17;523(1–3):229–33. doi:10.1016/S0014-5793(02)02995-2 PubMed PMID: 12123837.
19. Kamei H. A monoclonal antibody to chicken gizzard desmin that recognizes intermediate filaments and nuclear granules in BHK21/C13 cells. *Cell Struct Funct.* 1986;11(4):367–77. doi:10.1247/CSF.11.367 PubMed PMID: 3791429.
20. Tolstonog G V., Li G, Shoeman RL, Traub P. Interaction In Vitro of Type III Intermediate Filament Proteins with Higher Order Structures of Single-Stranded DNA, Particularly with G-Quadruplex DNA.

- <https://home.liebertpub.com/dna>. 2005 Feb 7;24(2):85–110. doi:10.1089/DNA.2005.24.85 PubMed PMID: 15699629.
21. Hohmann T, Dehghani F. The Cytoskeleton—A Complex Interacting Meshwork. *Cells* 2019, Vol 8, Page 362. 2019 Apr 18;8(4):362. doi:10.3390/CELLS8040362
 22. Seetharaman S, Etienne-Manneville S. Cytoskeletal Crosstalk in Cell Migration. *Trends Cell Biol.* 2020 Sep 1;30(9):720–35. doi:10.1016/J.TCB.2020.06.004 PubMed PMID: 32674938.
 23. Etienne-Manneville S. Cytoplasmic Intermediate Filaments in Cell Biology. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2018 Oct 6;34:1–28. doi:10.1146/ANNUREV-CELLBIO-100617-062534 PubMed PMID: 30059630.
 24. Tanuj Sapra K, Medalia O. Bend, Push, Stretch: Remarkable Structure and Mechanics of Single Intermediate Filaments and Meshworks. *Cells* 2021, Vol 10, Page 1960. 2021 Aug 2;10(8):1960. doi:10.3390/CELLS10081960 PubMed PMID: 34440729.
 25. Hnia K, Ramspacher C, Vermot J, Laporte J. Desmin in muscle and associated diseases: beyond the structural function. *Cell Tissue Res.* 2015 Jun 4;360(3):591–608. doi:10.1007/S00441-014-2016-4 PubMed PMID: 25358400.
 26. Bloch RJ, Gonzalez-Serratos H. Lateral force transmission across costameres in skeletal muscle. *Exerc Sport Sci Rev.* 2003 Apr;31(2):73–8. doi:10.1097/00003677-200304000-00004 PubMed PMID: 12715970.
 27. Milner DJ, Weitzer G, Tran D, Bradley A, Capetanaki Y. Disruption of muscle architecture and myocardial degeneration in mice lacking desmin. *J Cell Biol.* 1996 Sep 1;134(5):1255–70. doi:10.1083/JCB.134.5.1255 PubMed PMID: 8794866.
 28. Maggi L, Mavroidis M, Psarras S, Capetanaki Y, Lattanzi G. Skeletal and Cardiac Muscle Disorders Caused by Mutations in Genes Encoding Intermediate Filament Proteins. *International Journal of Molecular Sciences* 2021, Vol 22, Page 4256. 2021 Apr 20;22(8):4256. doi:10.3390/IJMS22084256 PubMed PMID: 33923914.
 29. Takegami N, Mitsutake A, Mano T, Shintani-Domoto Y, Unuma A, Yamaguchi-Takegami N, et al. The Myocardial Accumulation of Aggregated Desmin Protein in a Case of Desminopathy with a de novo DES p.R406W Mutation. *Internal Medicine.* 2023 Oct 1;62(19):2883–7. doi:10.2169/INTERNALMEDICINE.0992-22 PubMed PMID: 36792195.
 30. Clemen CS, Herrmann H, Strelkov S V., Schröder R. Desminopathies: pathology and mechanisms. *Acta Neuropathol.* 2013 Jan;125(1):47–75. doi:10.1007/S00401-012-1057-6 PubMed PMID: 23143191.

31. Agnetti G, Herrmann H, Cohen S. New roles for desmin in the maintenance of muscle homeostasis. *FEBS J.* 2022 May 1;289(10):2755–70. doi:10.1111/FEBS.15864 PubMed PMID: 33825342.
32. Glancy B, Balaban RS. Energy metabolism design of the striated muscle cell. *Physiol Rev.* 2021 Oct 1;101(4):1561–607. doi:10.1152/PHYSREV.00040.2020/ASSET/IMAGES/LARGE/PHYSREV.00040.2020_F010.JPEG PubMed PMID: 33733879.
33. Milner DJ, Mavroidis M, Weisleder N, Capetanaki Y. Desmin Cytoskeleton Linked to Muscle Mitochondrial Distribution and Respiratory Function. *Journal of Cell Biology.* 2000 Sep 18;150(6):1283–98. doi:10.1083/JCB.150.6.1283 PubMed PMID: 10995435.
34. Moneo-Corcuera D, Viedma-Poyatos Á, Stamatakis K, Pérez-Sala D. Desmin Reorganization by Stimuli Inducing Oxidative Stress and Electrophiles: Role of Its Single Cysteine Residue. *Antioxidants* 2023, Vol 12, Page 1703. 2023 Aug 31;12(9):1703. doi:10.3390/ANTIOX12091703
35. Capetanaki Y, Papathanasiou S, Diokmetzidou A, Vatsellas G, Tsikitis M. Desmin related disease: a matter of cell survival failure. *Curr Opin Cell Biol.* 2015 Feb 1;32:113–20. doi:10.1016/J.CEB.2015.01.004 PubMed PMID: 25680090.
36. Mathes S, Vanmunster M, Bloch W, Suhr F. Evidence for skeletal muscle fiber type-specific expressions of mechanosensors. *Cell Mol Life Sci.* 2019 Aug 1;76(15):2987–3004. doi:10.1007/S00018-019-03026-3 PubMed PMID: 30701284.
37. Joanne P, Hovhannisyan Y, Bencze M, Daher MT, Parlakian A, Toutirais G, et al. Absence of Desmin Results in Impaired Adaptive Response to Mechanical Overloading of Skeletal Muscle. *Front Cell Dev Biol.* 2021 Jul 15;9:662133. doi:10.3389/FCELL.2021.662133/TEXT
38. Goldman RD, Cleland MM, Murthy SNP, Mahammad S, Kuczmarski ER. Inroads into the structure and function of intermediate filament networks. *J Struct Biol.* 2012 Jan;177(1):14–23. doi:10.1016/J.JSB.2011.11.017 PubMed PMID: 22120848.
39. Eriksson JE, He T, Trejo-Skalli A V., Härmälä-Braskén AS, Hellman J, Chou YH, et al. Specific in vivo phosphorylation sites determine the assembly dynamics of vimentin intermediate filaments. *J Cell Sci.* 2004 Feb 29;117(Pt 6):919–32. doi:10.1242/JCS.00906 PubMed PMID: 14762106.
40. Lapouge K, Fantao L, Champiaud MF, Jaunin F, Frias MA, Favre B, et al. New insights into the molecular basis of desmoplakin- and desmin-related cardiomyopathies. *J Cell Sci.* 2006 Dec 1;119(Pt 23):4974–85. doi:10.1242/JCS.03255 PubMed PMID: 17105773.

41. Tang DD. Intermediate filaments in smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2008 Apr;294(4). doi:10.1152/AJPCELL.00154.2007 PubMed PMID: 18256275.
42. Coulombe PA, Pineda CM, Jacob JT, Nair RR. Nuclear roles for non-lamin intermediate filament proteins. *Curr Opin Cell Biol*. 2024 Feb 1;86:102303. doi:10.1016/J.CEB.2023.102303 PubMed PMID: 38113712.
43. Stewart M. Intermediate filaments: structure, assembly and molecular interactions. *Curr Opin Cell Biol*. 1990 Feb 1;2(1):91–100. doi:10.1016/S0955-0674(05)80037-7 PubMed PMID: 2183847.
44. Goldman RD, Goldman AE, Green KJ, Jones JC, Jones SM, Yang HY. Intermediate Filament Networks: Organization And Possible Functions Of A Diverse Group Of Cytoskeletal Elements. *J Cell Sci*. 1986 Feb 1;1986(Supplement_5):69–97. doi:10.1242/JCS.1986.SUPPLEMENT_5.5 PubMed PMID: 3308919.
45. Stromer MH, Bendayan M. Immunocytochemical identification of cytoskeletal linkages to smooth muscle cell nuclei and mitochondria. *Cell Motil Cytoskeleton*. 1990;17(1):11–8. doi:10.1002/CM.970170104 PubMed PMID: 2225086.
46. Djabali K. Cytoskeletal proteins connecting intermediate filaments to cytoplasmic and nuclear periphery. *Histol Histopathol*. 1999;14(2):501–9. doi:10.14670/HH-14.501 PubMed PMID: 10212812.
47. Lockard VG, Bloom S. Trans-cellular desmin-lamin B intermediate filament network in cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 1993 Mar;25(3):303–9. doi:10.1006/JMCC.1993.1036 PubMed PMID: 8510171.
48. Kural E. Desmin ve Lamin B Etkileşimin Zebra Balığında Araştırılması. Hacettepe University. 2017.
49. Nilüfer Düz. The Investigation of Mechanoregulatory Role of Desmin. Hacettepe Üniversitesi. 2024.
50. Kural Mangıt E. Desminin çekirdeğe taşınımının potansiyel mekanizmalarının araştırılması [Internet]. 2024 Feb 6 [cited 2024 Jun 4]. Available from: <https://openaccess.hacettepe.edu.tr/xmlui/handle/11655/34775>
51. Wang Q, Tolstonog G V., Shoeman R, Traub P. Sites of Nucleic Acid Binding in Type I–IV Intermediate Filament Subunit Proteins†. *Biochemistry*. 2001 Aug 28;40(34):10342–9. doi:10.1021/BI0108305 PubMed PMID: 11513613.
52. Tolstonog G V., Mothes E, Shoeman RL, Traub P. Isolation of SDS-stable complexes of the intermediate filament protein vimentin with repetitive, mobile, nuclear matrix attachment region, and mitochondrial DNA sequence elements from cultured mouse and human fibroblasts. *DNA Cell Biol*. 2001;20(9):531–54. doi:10.1089/104454901317094954 PubMed PMID: 11747605.

53. Li H, Choudhary SK, Milner DJ, Munir MI, Kuisk IR, Capetanaki Y. Inhibition of desmin expression blocks myoblast fusion and interferes with the myogenic regulators MyoD and myogenin. *J Cell Biol.* 1994;124(5):827–41. doi:10.1083/JCB.124.5.827 PubMed PMID: 8120103.
54. Höllrigl A, Hofner M, Stary M, Weitzer G. Differentiation of cardiomyocytes requires functional serine residues within the amino-terminal domain of desmin. *Differentiation.* 2007 Sep 1;75(7):616–26. doi:10.1111/J.1432-0436.2007.00163.X PubMed PMID: 17381546.
55. Briand N, Collas P. Lamina-associated domains: peripheral matters and internal affairs. *Genome Biology* 2020 21:1. 2020 Apr 2;21(1):85-. doi:10.1186/S13059-020-02003-5 PubMed PMID: 32241294.
56. Nair A, Khanna J, Kler J, Ragesh R, Sengupta K. Nuclear envelope and chromatin choreography direct cellular differentiation. *Nucleus.* 2025;16(1). doi:10.1080/19491034.2024.2449520 PubMed PMID: 39943681.
57. Sobo JM, Alagna NS, Sun SX, Wilson KL, Reddy KL. Lamins: The backbone of the nucleocytoskeleton interface. *Curr Opin Cell Biol.* 2024 Feb 1;86. doi:10.1016/J.CEB.2023.102313 PubMed PMID: 38262116.
58. Wong X, Melendez-Perez AJ, Reddy KL. The Nuclear Lamina. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2022 Feb 1;14(2). doi:10.1101/CSHPERSPECT.A040113 PubMed PMID: 34400553.
59. McGillivray RM, Starr DA, Luxton GWG. Building and breaking mechanical bridges between the nucleus and cytoskeleton: Regulation of LINC complex assembly and disassembly. *Curr Opin Cell Biol.* 2023 Dec 1;85:102260. doi:10.1016/J.CEB.2023.102260 PubMed PMID: 37857179.
60. Heffler J, Shah PP, Robison P, Phyo S, Veliz K, Uchida K, et al. A Balance Between Intermediate Filaments and Microtubules Maintains Nuclear Architecture in the Cardiomyocyte. *Circ Res.* 2020 Jan 31;126(3):E10–26. doi:10.1161/CIRCRESAHA.119.315582 PubMed PMID: 31822208.
61. Lin DH, Hoelz A. The Structure of the Nuclear Pore Complex (An Update). *Annu Rev Biochem.* 2019 Jun 20;88:725–83. doi:10.1146/ANNUREV-BIOCHEM-062917-011901 PubMed PMID: 30883195.
62. Wente SR, Rout MP. The nuclear pore complex and nuclear transport. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010;2(10). doi:10.1101/CSHPERSPECT.A000562 PubMed PMID: 20630994.
63. Kadota S, Ou J, Shi Y, Lee JT, Sun J, Yildirim E. Nucleoporin 153 links nuclear pore complex to chromatin architecture by mediating CTCF and cohesin binding. *Nature Communications* 2020 11:1. 2020 May 25;11(1):2606-. doi:10.1038/s41467-020-16394-3 PubMed PMID: 32451376.

64. Folz H, Nino CA, Taranum S, Caesar S, Latta L, Waharte F, et al. SUMOylation of the nuclear pore complex basket is involved in sensing cellular stresses. *J Cell Sci.* 2019 Apr 1;132(7):jcs224279. doi:10.1242/JCS.224279 PubMed PMID: 30837289.
65. Forler D, Rabut G, Ciccarelli FD, Herold A, Köcher T, Niggeweg R, et al. RanBP2/Nup358 provides a major binding site for NXF1-p15 dimers at the nuclear pore complex and functions in nuclear mRNA export. *Mol Cell Biol.* 2004 Feb 1;24(3):1155–67. doi:10.1128/MCB.24.3.1155-1167.2004 PubMed PMID: 14729961.
66. Kural Mangit E, DiNçEr P. Identification and Functional Analysis of Dual Nuclear Localization Signals on Desmin. *ACS Omega.* 2026 Feb 10;11(5):7257–68. doi:10.1021/ACSOMEGA.5C07336/ASSET/IMAGES/LARGE/AO5C07336_0005.JPEG
67. Dechat T, Gotzmann J, Stockinger A, Harris CA, Talle MA, Siekierka JJ, et al. Detergent-salt resistance of LAP2alpha in interphase nuclei and phosphorylation-dependent association with chromosomes early in nuclear assembly implies functions in nuclear structure dynamics. *EMBO J.* 1998 Aug 17;17(16):4887–902. doi:10.1093/EMBOJ/17.16.4887 PubMed PMID: 9707448.
68. Foisner R, Gerace L. Integral membrane proteins of the nuclear envelope interact with lamins and chromosomes, and binding is modulated by mitotic phosphorylation. *Cell.* 1993 Jul 2;73(7):1267–79. doi:10.1016/0092-8674(93)90355-T PubMed PMID: 8324822.
69. Naetar N, Hutter S, Dorner D, Dechat T, Korbei B, Gotzmann J, et al. LAP2 α -binding protein LINT-25 is a novel chromatin-associated protein involved in cell cycle exit. *J Cell Sci.* 2007 Mar 1;120(5):737–47. doi:10.1242/JCS.03390 PubMed PMID: 17284516.
70. Dorner D, Gotzmann J, Foisner R. Nucleoplasmic lamins and their interaction partners, LAP2alpha, Rb, and BAF, in transcriptional regulation. *FEBS J.* 2007 Mar;274(6):1362–73. doi:10.1111/J.1742-4658.2007.05695.X PubMed PMID: 17489094.
71. Kassube SA, Stuwe T, Lin DH, Antonuk CD, Napetschnig J, Blobel G, et al. Crystal structure of the N-terminal domain of Nup358/RanBP2. *J Mol Biol.* 2012 Nov 9;423(5):752–65. doi:10.1016/J.JMB.2012.08.026 PubMed PMID: 22959972.
72. Hutten S, Kehlenbach RH. Nup214 is required for CRM1-dependent nuclear protein export in vivo. *Mol Cell Biol.* 2006 Sep;26(18):6772–85. doi:10.1128/MCB.00342-06 PubMed PMID: 16943420.

73. Sirinupong N, Brunzelle J, Ye J, Pirzada A, Nico L, Yang Z. Crystal structure of cardiac-specific histone methyltransferase SmyD1 reveals unusual active site architecture. *J Biol Chem.* 2010 Dec 24;285(52):40635–44. doi:10.1074/JBC.M110.168187 PubMed PMID: 20943667.
74. Zhu L, Brown MA, Sims RJ, Tiwari GR, Nie H, Mayfield RD, et al. Lysine Methyltransferase SMYD1 Regulates Myogenesis via skNAC Methylation. *Cells* 2023, Vol 12, Page 1695. 2023 Jun 22;12(13):1695. doi:10.3390/CELLS12131695 PubMed PMID: 37443729.
75. Gottlieb PD, Pierce SA, Sims RJ, Yamagishi H, Weihe EK, Harriss J V., et al. Bop encodes a muscle-restricted protein containing MYND and SET domains and is essential for cardiac differentiation and morphogenesis. *Nature Genetics* 2002 31:1. 2002 Apr 1;31(1):25–32. doi:10.1038/ng866 PubMed PMID: 11923873.
76. Sims RJ, Weihe EK, Zhu L, O'Malley S, Harriss J V., Gottlieb PD. m-Bop, a Repressor Protein Essential for Cardiogenesis, Interacts with skNAC, a Heart- and Muscle-specific Transcription Factor. *Journal of Biological Chemistry.* 2002 Jul 19;277(29):26524–9. doi:10.1074/JBC.M204121200 PubMed PMID: 12011100.
77. Just S, Meder B, Berger IM, Etard C, Trano N, Patzel E, et al. The myosin-interacting protein SMYD1 is essential for sarcomere organization. *J Cell Sci.* 2011 Sep 15;124(Pt 18):3127–36. doi:10.1242/JCS.084772 PubMed PMID: 21852424.
78. Nagandla H, Lopez S, Yu W, Rasmussen TL, Tucker HO, Schwartz RJ, et al. Defective myogenesis in the absence of the muscle-specific lysine methyltransferase SMYD1. *Dev Biol.* 2016 Feb 1;410(1):86–97. doi:10.1016/J.YDBIO.2015.12.005 PubMed PMID: 26688546.
79. Wang X, Liu K, Wang X, Liu X. Multidimensional Regulatory Mechanisms and Targeting Strategies of the eEF1 Family in RNA Virus Infection. *Viruses* 2025, Vol 17, Page 682. 2025 May 7;17(5):682. doi:10.3390/V17050682 PubMed PMID: 40431694.
80. Berkholz J, Eberle R, Boller K, Munz B. siRNA-mediated inhibition of skNAC and Smyd1 expression disrupts myofibril organization: Immunofluorescence and electron microscopy study in C2C12 cells. *Micron.* 2018 May 1;108:6–10. doi:10.1016/J.MICRON.2018.02.009 PubMed PMID: 29499397.
81. Berkholz J, Michalick L, Munz B. The E3 SUMO ligase Nse2 regulates sumoylation and nuclear-to-cytoplasmic translocation of skNAC-Smyd1 in myogenesis. *J Cell Sci.* 2014;127(Pt 17):3794–804. doi:10.1242/JCS.150334 PubMed PMID: 25002400.

82. Li H, Xu J, Bian YH, Rotllant P, Shen T, Chu W, et al. Smyd1b_tv1, a Key Regulator of Sarcomere Assembly, Is Localized on the M-Line of Skeletal Muscle Fibers. *PLoS One*. 2011 Dec 9;6(12):e28524. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0028524 PubMed PMID: 22174829.
83. Conesa A, Madrigal P, Tarazona S, Gomez-Cabrero D, Cervera A, McPherson A, et al. A survey of best practices for RNA-seq data analysis. *Genome Biol*. 2016 Jan 26;17(1):13. doi:10.1186/S13059-016-0881-8 PubMed PMID: 26813401.
84. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*. 2014 Dec 5;15(12). doi:10.1186/S13059-014-0550-8 PubMed PMID: 25516281.
85. Schober P, Schwarte LA. Correlation Coefficients: Appropriate Use and Interpretation. *Anesth Analg*. 2018 May 1;126(5):1763–8. doi:10.1213/ANE.0000000000002864 PubMed PMID: 29481436.
86. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet*. 2000 May;25(1):25–9. doi:10.1038/75556 PubMed PMID: 10802651.
87. Jassal B, Matthews L, Viteri G, Gong C, Lorente P, Fabregat A, et al. The reactome pathway knowledgebase. *Nucleic Acids Res*. 2020 Jan 8;48(D1):D498–503. doi:10.1093/NAR/GKZ1031 PubMed PMID: 31691815.
88. Shen WK, Chen SY, Gan ZQ, Zhang YZ, Yue T, Chen MM, et al. AnimalTFDB 4.0: a comprehensive animal transcription factor database updated with variation and expression annotations. *Nucleic Acids Res*. 2023 Jan 6;51(D1):D39–45. doi:10.1093/NAR/GKAC907 PubMed PMID: 36268869.
89. Lin JS, Lai EM. Protein–protein interactions: Co-immunoprecipitation. *Methods in Molecular Biology*. 2017;1615:211–9. doi:10.1007/978-1-4939-7033-9_17/SAVE-RESEARCH PubMed PMID: 28667615.
90. Guard SE, Ebmeier CC, Old WM. Label-free immunoprecipitation mass spectrometry workflow for large-scale nuclear interactome profiling. *Journal of Visualized Experiments*. 2019 Nov 1;2019(153). doi:10.3791/60432 PubMed PMID: 31789314.
91. Trinkle-Mulcahy L, Boulon S, Lam YW, Urcia R, Boisvert FM, Vandermoere F, et al. Identifying specific protein interaction partners using quantitative mass spectrometry and bead proteomes. *Journal of Cell Biology*. 2008 Oct 20;183(2):223–39. doi:10.1083/JCB.200805092 PubMed PMID: 18936248.

92. Hara T, Honda K, Shitashige M, Ono M, Matsuyama H, Naito K, et al. Mass Spectrometry Analysis of the Native Protein Complex Containing Actinin-4 in Prostate Cancer Cells. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2007 Mar 1;6(3):479–91. doi:10.1074/MCP.M600129-MCP200 PubMed PMID: 17151021.
93. Li Y, Collins M, An J, Geiser R, Tegeler T, Tsantilas K, et al. Immunoprecipitation and mass spectrometry defines an extensive RBM45 protein–protein interaction network. *Brain Res*. 2016 Sep 15;1647:79–93. doi:10.1016/J.BRAINRES.2016.02.047 PubMed PMID: 26979993.
94. Quick AP, Wang Q, Philippen LE, Barreto-Torres G, Chiang DY, Beavers D, et al. SPEG (Striated Muscle Preferentially Expressed Protein Kinase) Is Essential for Cardiac Function by Regulating Junctional Membrane Complex Activity. *Circ Res*. 2017 Jan 6;120(1):110–9. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.309977 PubMed PMID: 27729468.
95. Smaczniak C. Immunoprecipitation-Mass Spectrometry (IP-MS) of Protein-Protein Interactions of Nuclear-Localized Plant Proteins. *Methods Mol Biol*. 2023;2698:163–81. doi:10.1007/978-1-0716-3354-0_11 PubMed PMID: 37682475.
96. Free RB, Hazelwood LA, Sibley DR. Identifying Novel Protein-Protein Interactions Using Co-Immunoprecipitation and Mass Spectroscopy. *Current protocols in neuroscience / editorial board, Jacqueline N Crawley . [et al]*. 2009;0 5(SUPPL. 46):Unit. doi:10.1002/0471142301.NS0528S46 PubMed PMID: 19170023.
97. Pintacuda G, Lassen FH, Hsu YHH, Kim A, Martín JM, Malolepsza E, et al. Genoppi is an open-source software for robust and standardized integration of proteomic and genetic data. *Nat Commun*. 2021 Dec 1;12(1). doi:10.1038/S41467-021-22648-5 PubMed PMID: 33972534.
98. Mellacheruvu D, Wright Z, Couzens AL, Lambert JP, St-Denis NA, Li T, et al. The CRAPome: a contaminant repository for affinity purification-mass spectrometry data. *Nat Methods*. 2013 Aug;10(8):730–6. doi:10.1038/NMETH.2557 PubMed PMID: 23921808.
99. Jurado AR, Tan D, Jiao X, Kiledjian M, Tong L. Structure and function of pre-mRNA 5'-end capping quality control and 3'-end processing. *Biochemistry*. 2014 Apr 1;53(12):1882–98. doi:10.1021/BI401715V PubMed PMID: 24617759.
100. Müller-Mcnicoll M, Neugebauer KM. How cells get the message: dynamic assembly and function of mRNA-protein complexes. *Nat Rev Genet*. 2013 Apr;14(4):275–87. doi:10.1038/NRG3434 PubMed PMID: 23478349.

101. Hirose T, Fujiwara N, Ninomiya K, Yamamoto T, Nakagawa S, Yamazaki T. Architectural RNAs: blueprints for functional membraneless organelle assembly. *Trends Genet.* 2025 Oct 1;41(10):919–33. doi:10.1016/J.TIG.2025.05.007 PubMed PMID: 40514312.
102. FACKELMAYER FO, DAHM K, RENZ A, RAMSPERGER U, RICHTER A. Nucleic-acid-binding properties of hnRNP-U/SAF-A, a nuclear-matrix protein which binds DNA and RNA in vivo and in vitro. *Eur J Biochem.* 1994;221(2):749–57. doi:10.1111/J.1432-1033.1994.TB18788.X PubMed PMID: 8174554.
103. Wang M, Ma T, Wang H, Liu J, Chen Y, Shim WB, et al. The RNA binding protein FgRbp1 regulates specific pre-mRNA splicing via interacting with U2AF23 in *Fusarium*. *Nature Communications* 2021 12:1. 2021 May 11;12(1):2661-. doi:10.1038/s41467-021-22917-3 PubMed PMID: 33976182.
104. Norseen J, Thomae A, Sridharan V, Aiyar A, Schepers A, Lieberman PM. RNA-dependent recruitment of the origin recognition complex. *EMBO Journal.* 2008 Nov 19;27(22):3024–35. doi:10.1038/EMBOJ.2008.221/FIGURES/7 PubMed PMID: 18946490.
105. Hasegawa Y, Brockdorff N, Kawano S, Tsutui K, Tsutui K, Nakagawa S. The matrix protein hnRNP U is required for chromosomal localization of Xist RNA. *Dev Cell.* 2010;19(3):469–76. doi:10.1016/J.DEVCEL.2010.08.006 PubMed PMID: 20833368.
106. Fan H, Lv P, Huo X, Wu J, Wang Q, Cheng L, et al. The nuclear matrix protein HNRNPU maintains 3D genome architecture globally in mouse hepatocytes. *Genome Res.* 2018 Feb 1;28(2):192–202. doi:10.1101/GR.224576.117 PubMed PMID: 29273625.
107. Podgornaya OI. Nuclear organization by satellite DNA, SAF-A/hnRNPU and matrix attachment regions. *Semin Cell Dev Biol.* 2022 Aug 1;128:61–8. doi:10.1016/J.SEMCDB.2022.04.018 PubMed PMID: 35484025.
108. Xiao R, Tang P, Yang B, Huang J, Zhou Y, Shao C, et al. Nuclear matrix factor hnRNP U/SAF-A exerts a global control of alternative splicing by regulating U2 snRNP maturation. *Mol Cell.* 2012 Mar 9;45(5):656–68. doi:10.1016/J.MOLCEL.2012.01.009 PubMed PMID: 22325991.
109. Alarcón CR, Goodarzi H, Lee H, Liu X, Tavazoie S, Tavazoie SF. HNRNPA2B1 Is a Mediator of m(6)A-Dependent Nuclear RNA Processing Events. *Cell.* 2015 Sep 10;162(6):1299–308. doi:10.1016/J.CELL.2015.08.011 PubMed PMID: 26321680.

110. Wang X, Fan X, Zhang J, Wang F, Chen J, Wen Y, et al. hnRNPA2B1 represses the disassembly of arsenite-induced stress granules and is essential for male fertility. *Cell Rep.* 2024 Feb 27;43(2). doi:10.1016/J.CELREP.2024.113769 PubMed PMID: 38363675.
111. Xing Z, Ma WK, Tran EJ. The DDX5/Dbp2 subfamily of DEAD-box RNA helicases. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2019 Mar 1;10(2). doi:10.1002/WRNA.1519 PubMed PMID: 30506978.
112. Dardenne E, PolayEspinoza M, Fattet L, Germann S, Lambert MP, Neil H, et al. RNA helicases DDX5 and DDX17 dynamically orchestrate transcription, miRNA, and splicing programs in cell differentiation. *Cell Rep.* 2014 Jun 26;7(6):1900–13. doi:10.1016/J.CELREP.2014.05.010 PubMed PMID: 24910439.
113. Shi DL, Grifone R. RNA-Binding Proteins in the Post-transcriptional Control of Skeletal Muscle Development, Regeneration and Disease. *Front Cell Dev Biol.* 2021 Sep 20;9. doi:10.3389/FCELL.2021.738978 PubMed PMID: 34616743.
114. Mateyak MK, Kinzy TG. eEF1A: thinking outside the ribosome. *J Biol Chem.* 2010 Jul 9;285(28):21209–13. doi:10.1074/JBC.R110.113795 PubMed PMID: 20444696.
115. Celis-Gutierrez J, Blattmann P, Zhai Y, Jarmuzynski N, Ruminski K, Grégoire C, et al. Quantitative Interactomics in Primary T Cells Provides a Rationale for Concomitant PD-1 and BTLA Coinhibitor Blockade in Cancer Immunotherapy. *Cell Rep.* 2019 Jun 11;27(11):3315–3330.e7. doi:10.1016/J.CELREP.2019.05.041 PubMed PMID: 31189114.
116. Morris JH, Knudsen GM, Verschueren E, Johnson JR, Cimermanic P, Greninger AL, et al. Affinity purification-mass spectrometry and network analysis to understand protein-protein interactions. *Nat Protoc.* 2014 Nov 27;9(11):2539–54. doi:10.1038/NPROT.2014.164 PubMed PMID: 25275790.
117. Keilhauer EC, Hein MY, Mann M. Accurate Protein Complex Retrieval by Affinity Enrichment Mass Spectrometry (AE-MS) Rather than Affinity Purification Mass Spectrometry (AP-MS). *Molecular & Cellular Proteomics.* 2015 Jan 1;14(1):120–35. doi:10.1074/MCP.M114.041012 PubMed PMID: 25363814.
118. OECD, Union E, European Commission JRC. Handbook on Constructing Composite Indicators: Methodology and User Guide. Handbook on Constructing Composite Indicators: Methodology and User Guide. 2008 Aug 21. doi:10.1787/9789264043466-EN

119. Hutchings C, Dawson CS, Krueger T, Lilley KS, Breckels LM. A Bioconductor workflow for processing, evaluating, and interpreting expression proteomics data. *F1000Res*. 2023;12:1402. doi:10.12688/F1000RESEARCH.139116.1/DOI PubMed PMID: 38021401.
120. Benjamini Y, Hochberg Y, Benjamini Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J R Stat Soc Series B Stat Methodol*. 1995 Jan 1;57(1):289–300. doi:10.1111/J.2517-6161.1995.TB02031.X
121. Vera M, Pani B, Griffiths LA, Muchardt C, Abbott CM, Singer RH, et al. The translation elongation factor eEF1A1 couples transcription to translation during heat shock response. *Elife*. 2014;3:e03164. doi:10.7554/ELIFE.03164 PubMed PMID: 25233275.
122. Krupkova O, Loja T, Redova M, Neradil J, Zitterbart K, Sterba J, et al. Analysis of nuclear nestin localization in cell lines derived from neurogenic tumors. *Tumour Biol*. 2011;32(4):631–9. doi:10.1007/S13277-011-0162-9 PubMed PMID: 21340483.
123. Kumeta M, Yoshimura SH, Harata M, Takeyasu K. Molecular mechanisms underlying nucleocytoplasmic shuttling of actinin-4. *J Cell Sci*. 2010 Apr 1;123(7):1020–30. doi:10.1242/JCS.059568 PubMed PMID: 20197409.
124. Kasahara H, Bartunkova S, Schinke M, Tanaka M, Izumo S. Cardiac and extracardiac expression of Csx/Nkx2.5 homeodomain protein. *Circ Res*. 1998 May 18;82(9):936–46. doi:10.1161/01.RES.82.9.936 PubMed PMID: 9598591.
125. Proksch S, Bel A, Puymirat E, Pidial L, Bellamy V, Peyrard S, et al. Does the human skeletal muscle harbor the murine equivalents of cardiac precursor cells? *Mol Ther*. 2009;17(4):733–41. doi:10.1038/MT.2009.6 PubMed PMID: 19223868.
126. Fredericks S, Degens H, McKoy G, Bainbridge K, Collinson PO, Coulton G, et al. Effect of denervation on the content of cardiac troponin-T and cardiac troponin-I in rat skeletal muscle. *Clin Biochem*. 2007 Mar;40(5–6):423–6. doi:10.1016/J.CLINBIOCHEM.2006.12.008 PubMed PMID: 17303103.
127. Varshney A, Manickam N, Orchard P, Tovar A, Zhang Z, Feng F, et al. Population-scale skeletal muscle single-nucleus multi-omic profiling reveals extensive context specific genetic regulation. *bioRxiv*. 2023 Dec 15. doi:10.1101/2023.12.15.571696 PubMed PMID: 38168419.
128. Riazi AM, Lee H, Hsu C, Van Arsdell G. CSX/Nkx2.5 Modulates Differentiation of Skeletal Myoblasts and Promotes Differentiation into Neuronal Cells in Vitro. *Journal of Biological Chemistry*. 2005 Mar 18;280(11):10716–20. doi:10.1074/JBC.M500028200 PubMed PMID: 15653675.

129. Tissue expression of NKX2-5 - Summary - The Human Protein Atlas [Internet]. [cited 2026 Jul 4]. Available from: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000183072-NKX2-5/tissue>
130. NKX2-5 - Homeobox protein Nkx-2.5 - Homo sapiens (Human) | UniProtKB [Internet]. [cited 2026 Jul 4]. Available from: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P52952/entry#expression>
131. DES Gene - GeneCards [Internet]. [cited 2026 Jul 5]. Available from: <https://www.genecards.org/card/DES>
132. Yin W, Mendoza L, Monzon-Sandoval J, Urrutia AO, Gutierrez H. Emergence of co-expression in gene regulatory networks. *PLoS One*. 2021 Apr 1;16(4):e0247671. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0247671 PubMed PMID: 33793561.
133. Savino A, Provero P, Poli V. Differential Co-Expression Analyses Allow the Identification of Critical Signalling Pathways Altered during Tumour Transformation and Progression. *Int J Mol Sci*. 2020 Dec 2;21(24):1–23. doi:10.3390/IJMS21249461 PubMed PMID: 33322692.
134. Huynh HT, Shcherbinina E, Huang HC, Rezaei R, Sarshad AA. Biochemical Separation of Cytoplasmic and Nuclear Fraction for Downstream Molecular Analysis. *Curr Protoc*. 2024 May 1;4(5). doi:10.1002/CPZ1.1042 PubMed PMID: 38767195.
135. Jayaguru P, Mohr S. Nuclear GAPDH: Changing the fate of Müller cells in diabetes. *J Ocul Biol Dis Infor*. 2011 Jun 29;4(1–2):34–41. doi:10.1007/S12177-012-9085-Y/METRICS
136. Sohn JY, Kwak HJ, Rhim JH, Yeo EJ. AMP-activated protein kinase-dependent nuclear localization of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase in senescent human diploid fibroblasts. *Aging*. 2022;14(1):4–27. doi:10.18632/AGING.203825 PubMed PMID: 35020602.
137. Hara MR, Cascio MB, Sawa A. GAPDH as a sensor of NO stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2006 May 1;1762(5):502–9. doi:10.1016/J.BBADIS.2006.01.012 PubMed PMID: 16574384.
138. Sweet ME, Taylor MRG, Mestroni L. Diseases of the Nuclear Membrane. *Cardioskeletal Myopathies in Children and Young Adults*. 2017 Jan 1;233–48. doi:10.1016/B978-0-12-800040-3.00012-1
139. Costa ML, Escalera R, Cataldo A, Oliveira F, Mermelstein CS. Desmin: molecular interactions and putative functions of the muscle intermediate filament protein. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2004;37(12):1819–30. doi:10.1590/S0100-879X2004001200007 PubMed PMID: 15558188.

140. Mücke N, Wocjan T, Jacquier M, Herrmann H, Portet S. A general mathematical model for the in vitro assembly dynamics of intermediate filament proteins. *Biophys J*. 2022 Mar 15;121(6):1094–104. doi:10.1016/j.bpj.2022.02.001 PubMed PMID: 35124070.
141. thymopoietin - NCBI - NLM [Internet]. [cited 2026 Jun 29]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/gene/21917/>
142. Ranbp2 - E3 SUMO-protein ligase RanBP2 - Mus musculus (Mouse) | UniProtKB [Internet]. [cited 2026 Jun 29]. Available from: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q9ERU9/entry>
143. Wang J, Zhuo Z, Chen M, Zhu J, Zhao J, Zhang J, et al. RAN/RANBP2 polymorphisms and neuroblastoma risk in Chinese children: a three-center case-control study. *Aging*. 2018 Apr 1;10(4):808–18. doi:10.18632/AGING.101429 PubMed PMID: 29706609.
144. Villa Braslavsky CI, Nowak C, Gorlich D, Wittinghofer A, Kuhlmann J. Different structural and kinetic requirements for the interaction of Ran with the Ran-binding domains from RanBP2 and importin- β . *Biochemistry*. 2000 Sep 26;39(38):11629–39. doi:10.1021/BI001010F/ASSET/IMAGES/LARGE/BI001010FF00002.JPEG PubMed PMID: 10995230.
145. Zhang J, Sheng H, Zhang L, Li X, Guo Y, Wang Y, et al. Bta-miR-206 and a Novel lncRNA-lncA2B1 Promote Myogenesis of Skeletal Muscle Satellite Cells via Common Binding Protein HNRNPA2B1. *Cells*. 2023 Apr 1;12(7). doi:10.3390/CELLS12071028 PubMed PMID: 37048101.

8. EKLER

EK-1. Turnitin Dijital Makbuz



Dijital Makbuz

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

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen:	İNCİ DENİZ YILMAZ
Ödev başlığı:	inci deniz yılmaz YL Tez
Gönderi Başlığı:	İSKELET KASI HÜCRELERİNDE DESMİN NÜKLEER PROTEİN ORT...
Dosya adı:	nciDenizY_Imaz_TEZ.pdf
Dosya boyutu:	28.21M
Sayfa sayısı:	171
Kelime sayısı:	52,533
Karakter sayısı:	254,513
Gönderim Tarihi:	12-Ağu-2026 12:17ÖS (UTC+0300)
Gönderim Numarası:	3011497033

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İSKELET KASI HÜCRELERİNDE DESMİN NÜKLEER
PROTEİN ORTAKLARININ ARAŞTIRILMASI

İnci Deniz YILMAZ

Tıbbi Biyoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANKARA
2026

Copyright 2026 Turnitin. Tüm hakları saklıdır.

EK-2. Turnitin Orijinallik Raporu

İSKELET KASI HÜCRELERİNDE DESMİN NÜKLEER PROTEİN ORTAKLARININ ARAŞTIRILMASI

ORJİNAL LİK RAPORU

%**10**
BENZERLİK ENDEKSİ

%**7**
İNTERNET KAYNAKLARI

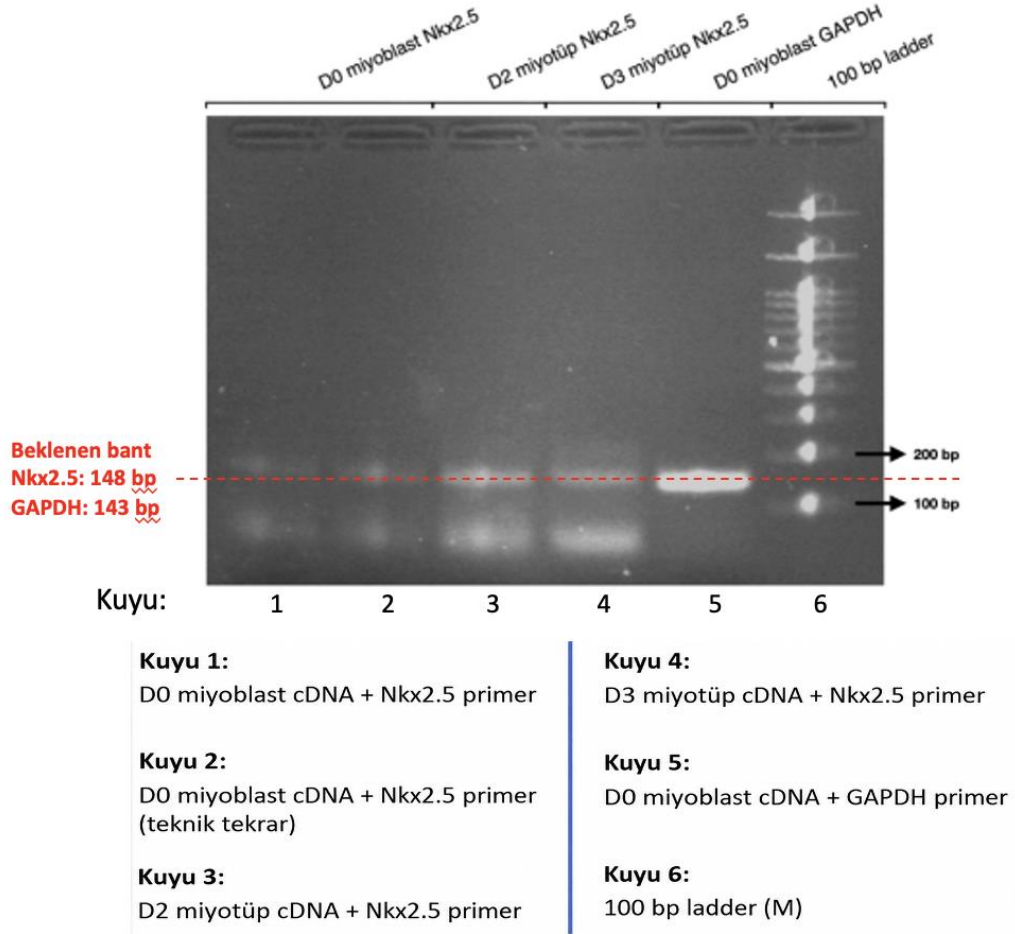
%**6**
YAYINLAR

%**3**
ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

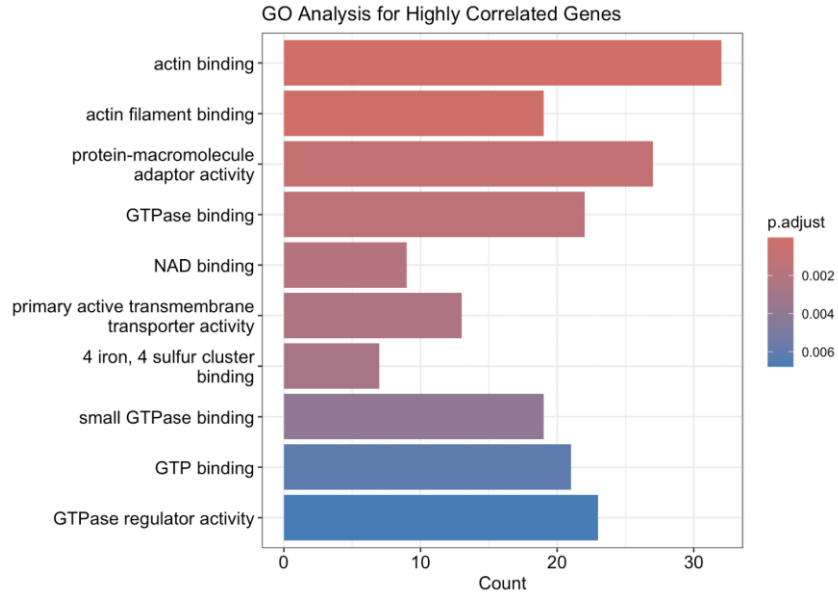
BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Hacettepe University Öğrenci Ödevi	%2
2	www.researchgate.net İnternet Kaynağı	%1
3	openaccess.hacettepe.edu.tr İnternet Kaynağı	%1
4	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	<%1
5	panel.bidgecongress.org İnternet Kaynağı	<%1
6	abis-files.erciyes.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
7	www.egitimyayinevi.com İnternet Kaynağı	<%1
8	Dursun, Jency. "Silybum Marianum Bitki Ekstraktının Antioksidan ve Sars-Cov-2'ye Karşı Antiviral Aktivitelerinin in Vitro Modeller İle Belirlenmesi", Marmara Üniversitesi (Turkey), 2024 Yayın	<%1
9	Bekmezci, Mustafa. "İl İnsan Teknoloji Etkilesiminin Çalışanların is Güvencesizliği ve Özel İy Olusları Üzerine Etkisine Yönelik bir Arastırma.", Marmara Üniversitesi (Turkey), 2024 Yayın	<%1
10	cf68248-342d-4d7a-b13b-10b5ed8dfa09.filesusr.com İnternet Kaynağı	<%1
11	dergipark.org.tr İnternet Kaynağı	<%1
12	Kiliç, Bilge. "Anoreksia nervosa ve bulimia nervosa yeme bozukluklarında kantitatif eeg interhemisferik koherans bulguları.", Üzküdar University (Turkey) Yayın	<%1
13	Tunç, Ece. "Obsesif kompulsif bozukluğa yönelik çıkarımsal akıl yürütme perspektifinden bir inceleme: Çıkarımsal karmaşa, korkulan benlik, algılanan	<%1

EK-3. Ek Sonuçlar



Ek Şekil 8.1. C2C12 hücrelerinden farklı zaman noktalarında elde edilen cDNA örneklerine ait *Nkx2.5* qPCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü. İlk iki hat, farklılaşma besiyerine alınmadan önce (48. saat öncesi) elde edilen miyoblast cDNA örneklerini; üçüncü ve dördüncü hatlar sırasıyla 96. ve 120. saat örneklerini göstermektedir. GAPDH (48. saat) pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Moleküler ağırlık belirteci 100 bp olarak işaretlenmiştir. Beklenen *Nkx2.5* ampikon büyüklüğü 148 bp'dir.



Ek Şekil 8.2. PRJNA89011 RNA-seq veri setinde *Des* ile yüksek korelasyon gösteren genlerin GO moleküler işlev analizi. *Des* geni ile Spearman korelasyon katsayısı $\geq 0,90$ olan genlerin moleküler işlevleri Gen Ontolojisi (*Gene Ontology*, GO) analizi ile değerlendirilmiştir. Grafikte her bir GO terimiyle ilişkili gen sayısı ve zenginleşmenin istatistiksel anlamlılık düzeyi sunulmaktadır. Çubuk uzunluğu ilgili moleküler işlev teriminde yer alan gen sayısını, renk skalası ise düzeltilmiş p-değerini (*p.adjust*) göstermektedir.

(A)

Muscle Related TF

Ensembl Id	Entrez ID	Symbol	Alias	Full name	Species
ENSMUSG00000030189	56449	Ybx3	Yb2; CsdA; Dpba; MSY3; MSY4; dbpA; oxyR	Y box protein 3	Mus_musculus
ENSMUSG00000019768	13982	Esr1	ER; ERa; ESR; Estr; EstrA; Nr3a1; ERalpha; ER-alpha	estrogen receptor 1 (alpha)	Mus_musculus
ENSMUSG00000010175	19130	Prox1	PROX-1; A230003G05Rik	prospero homeobox 1	Mus_musculus
ENSMUSG00000031734	16373	lrx3	Al894186	Iroquois related homeobox 3	Mus_musculus
ENSMUSG00000051367	-	Six1	-	-	Mus_musculus
ENSMUSG00000052616	320022	Terb1	Ccdc79; BB085179; 4930532D21Rik	telomere repeat binding bouquet formation protein 1	Mus_musculus
ENSMUSG00000032744	56198	Heyl	Hey3; Hrt3; hesr3; bHLHb33	hairly/enhancer-of-split related with YRPW motif-like	Mus_musculus
ENSMUSG00000006642	69852	Tcf23	Out; bHLHa24; 2010002O16Rik	transcription factor 23	Mus_musculus
ENSMUSG00000034161	20289	Scx	Scf; Bhlha41; BB114693	scleraxis	Mus_musculus

(B)

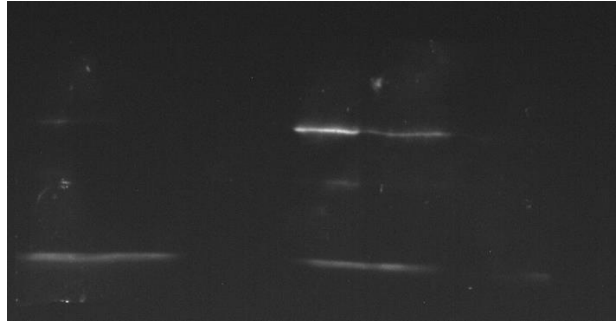
Muscle related Cofactors

Ensembl Id	Entrez ID	Symbol	Alias	Full name	Species
ENSMUSG00000052374	11472	Actn2	1110008F24Rik	actinin alpha 2	Mus_musculus
ENSMUSG00000008855	15184	Hdac5	HD5; Hdac4; mHDA1; A426555; mKAA0600	histone deacetylase 5	Mus_musculus
ENSMUSG00000022105	19645	Rb1	Rb; pRb; Rb-1; pp105; p110-RB1	RB transcriptional corepressor 1	Mus_musculus
ENSMUSG00000001552	16480	Jup	PG; Ctrng; D930025P04Rik	junction plakoglobin	Mus_musculus
ENSMUSG00000002812	-	Fili	-	-	Mus_musculus
ENSMUSG00000018909	109689	Arb1	AW208571; 1200006I17Rik; G430100A01Rik	arrestin, beta 1	Mus_musculus
ENSMUSG000000037032	11785	Apb1	Rir; Fe65	amyloid beta (A β) precursor protein-binding, family B, member 1	Mus_musculus
ENSMUSG000000038763	116904	Alpk3	MAK; Midori; AW319487; mKAA1330; D330016D04	alpha-kinase 3	Mus_musculus
ENSMUSG000000056770	52690	Setd3	D12Erd771e; 2610102I01Rik; 2610305M23Rik; 6030490B17Rik	SET domain containing 3	Mus_musculus
ENSMUSG000000028949	66993	Smardc3	BAF60C; 1500001J14Rik; 2210409C08Rik	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily d, member 3	Mus_musculus
ENSMUSG000000015149	64383	Sirt2	Sirt2; SIRT2L2; 5730427M03Rik	sirtuin 2	Mus_musculus

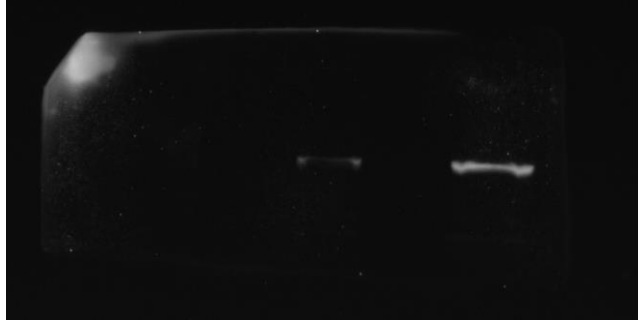
Ek Şekil 8.3. PRJNA89011 RNA-seq veri setinde *Des* ile yüksek korelasyon gösteren transkripsiyon faktörleri ve kofaktörlerin AnimalTFDB 4.0 veri tabanı kullanılarak sınıflandırılması. *Des* geni ile Spearman korelasyon katsayısı $\geq 0,90$ olan genler, *AnimalTFDB* 4.0 veri tabanındaki anotasyonlarına göre transkripsiyon faktörü veya transkripsiyonel kofaktör olarak sınıflandırılmıştır. (A) Kas biyolojisiyle ilişkili transkripsiyon faktörleri. (B) Kas biyolojisiyle ilişkili transkripsiyonel kofaktörler. Tablolarda genlere ait Ensembl kimliği, Entrez kimliği, gen sembolü, alternatif adlar, tam ad ve tür bilgileri gösterilmektedir.



Ek Şekil 8.4. Şekil 4.12’de sunulan Western blot analizine ait işlenmemiş görüntüsü. LHCN-M2 miyoblast hücrelerinden elde edilen nükleer ve sitoplazmik fraksiyonlarda Desmin’in dağılımı ile fraksiyonlamanın doğrulanmasında kullanılan Lamin B1 ve GAPDH sinyallerinin ham görüntüsü gösterilmektedir. Lamin B1 yaklaşık 67 kDa’da nükleer fraksiyonda, GAPDH yaklaşık 37 kDa’da ağırlıklı olarak sitoplazmik fraksiyonda, Desmin ise yaklaşık 53 kDa’da her iki fraksiyonda saptanmıştır. Görüntü üzerinde herhangi bir kontrast, kırpma veya dijital düzenleme uygulanmamıştır.



Ek Şekil 8.5. Şekil 4.17’de sunulan Desmin IP–Western blot analizine ait kırpılmamış görüntü. Desmin antikoru ile gerçekleştirilen immün çöktürme sonrasında IP, akış geçişi (*flow-through*, FT) ve IgG kontrol fraksiyonlarında Desmin varlığı Western blot ile değerlendirilmiştir. Desmin bandı IP örneğinde saptanırken, FT ve IgG kontrol örneklerinde belirgin Desmin sinyali gözlenmemiştir. Görüntü, membranın analiz edilen bölgesinin kırpılmamış hâlini göstermektedir.

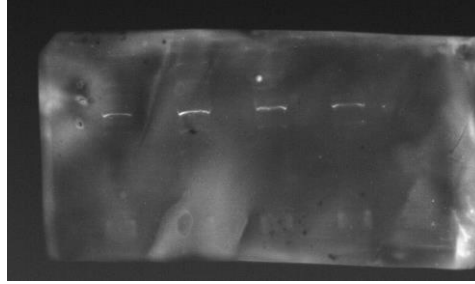


Ek Şekil 8.6. Şekil 4.15’te sunulan SMYD1 Western blot analizine ait kırılmamış görüntü. LHCN-M2 hücrelerinden farklılaşmanın 24., 48. ve 96. saatlerinde elde edilen toplam protein örneklerinde SMYD1 düzeyleri değerlendirilmiştir. SMYD1 sinyali 24. saatte saptanmazken, 48. saatte zayıf, 96. saatte ise belirgin olarak gözlenmiştir. Görüntü, membranın analiz edilen bölgesinin kırılmamış hâlini göstermektedir.

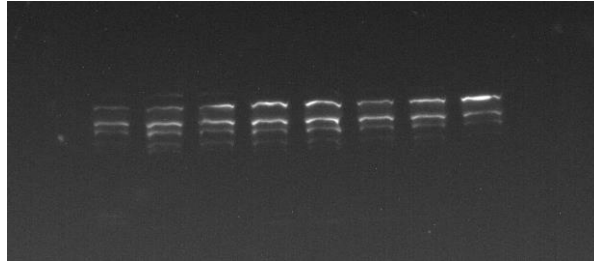
(A)



(B)

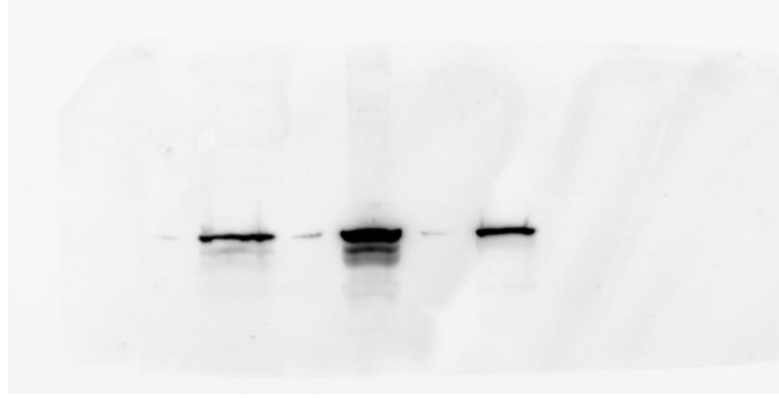


(C)

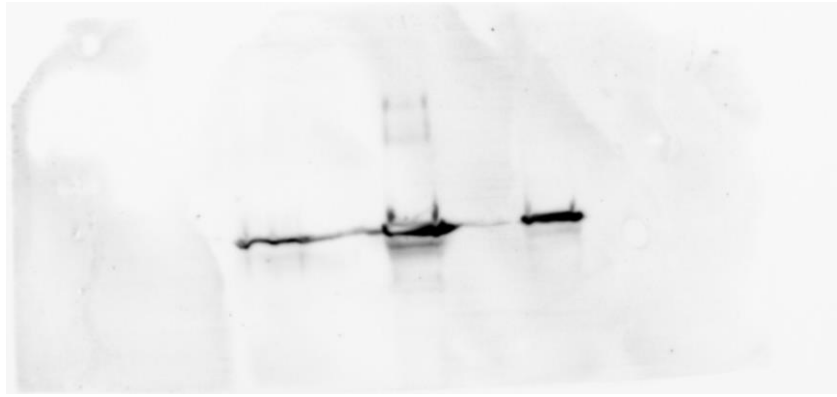


Ek Şekil 8.7 Şekil 4.21’de sunulan C2C12 miyotüp hücrelerine ait fraksiyonlama Western blot analizlerinin kırılmamış görüntüleri. NE-PER Nükleer ve Sitoplazmik Ekstraksiyon Kiti kullanılarak elde edilen nükleer ve sitoplazmik fraksiyonlar, üç ayrı membranda analiz edilmiştir. **(A)** Sitoplazmik belirteç Hsp60’ın yaklaşık 60 kDa’daki sinyali, **(B)** nükleer belirteç Lamin B1’in yaklaşık 67 kDa’daki sinyali ve **(C)** Desmin’in yaklaşık 53–55 kDa aralığındaki sinyali gösterilmektedir. Lamin B1’in nükleer, Hsp60’ın ise sitoplazmik fraksiyonlarda saptanması fraksiyonlamanın başarılı olduğunu desteklemiştir. Desmin her iki fraksiyonda da gözlenmiştir. Desmin membranında hedeflenen moleküler ağırlığın altında izlenen ek bantlar, hedef proteinle uyumlu olmadıkları için özgül olmayan sinyal olarak değerlendirilmiş ve analize dâhil edilmemiştir. Optimizasyon deneyleri sırasında protein izolasyon koşulları ve primer antikor konsantrasyonuna bağlı olarak Desmin’de zaman zaman çift bant görünümü elde edilmiştir.

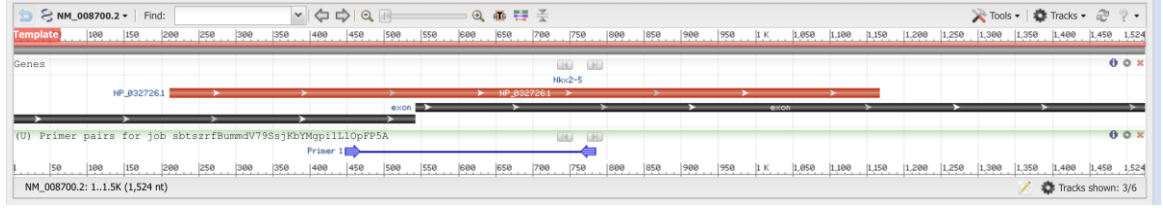
(A)



(B)



Ek Şekil 8.8. TMPO ve DDX5 ile gerçekleştirilen ilk ters yönlü IP–WB deneylerinde Desmin’in değerlendirilmesi. TMPO ve DDX5’e özgü antikorlarla gerçekleştirilen immün çöktürme sonrasında elde edilen fraksiyonlarda Desmin varlığı Western blot ile analiz edilmiştir. **(A)** DDX5-IP deneyine ait membran görüntüsü. Kuyular sırasıyla boş kuyu, DDX5 akış geçişi (*flow-through*, FT), boş kuyu, DDX5-IP, boş kuyu, IgG-IP, boş kuyu ve primer antikor içermeyen boncuk kontrolü (NTC) şeklinde yüklenmiştir. DDX5-FT, DDX5-IP ve IgG-IP örneklerinde belirgin Desmin sinyali gözlenmiştir. **(B)** TMPO-IP deneyine ait membran görüntüsü. Örnekler, aralarında boş kuyular bırakılarak NTC, TMPO-FT, TMPO-IP ve IgG-IP sırasıyla yüklenmiştir. TMPO-FT, TMPO-IP ve IgG-IP örneklerinin tümünde Desmin bandı saptanmıştır. Her iki deneyde IgG kontrolünde belirgin Desmin sinyali gözlenmesi nedeniyle bu ilk uygulama özgüllük açısından yeterli kabul edilmemiş ve deney koşulları optimize edilerek tekrarlanmıştır. Boş kuyularda görülen düşük yoğunluklu sinyaller, yükleme sırasında komşu kuyulardan kaynaklanan hafif kontaminasyonla ilişkilendirilmiş ve değerlendirmeye alınmamıştır.



Primer pair 1

	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	AAGTGCTCTCCTGCTTTCCC	Plus	20	448	467	59.96	55.00	4.00	0.00
Reverse primer	ACTTGTAGCGACGGTTCTGG	Minus	20	784	765	60.04	55.00	4.00	1.00
Product length	337								

Products on intended targets

>NM_008700.2 Mus musculus Nk2 homeobox 5 (Nkx2-5), mRNA

product length = 337
 Forward primer 1 AAGTGCTCTCCTGCTTTCCC 20
 Template 448 467
 Reverse primer 1 ACTTGTAGCGACGGTTCTGG 20
 Template 784 765

Ek Şekil 8.9. *Nkx2-5* primer çiftinin *NCBI Primer-BLAST* ile değerlendirilmesi. *Mus musculus Nkx2-5* transkriptine (NM_008700.2) yönelik primer çiftinin transkript üzerindeki bağlanma konumları ve beklenen amplicon bölgesi gösterilmiştir. Primer-BLAST analizinde forward ve reverse primerlerin hedef dizi üzerindeki yerleşimleri, yönleri, başlangıç/bitiş pozisyonları, erime sıcaklıkları (Tm), GC içerikleri ve tamamlayıcılık özellikleri değerlendirilmiştir. Primer çiftinin *Nkx2-5* transkripti üzerinde yaklaşık 337 bp uzunluğunda bir amplicon oluşturmasının beklendiği belirlenmiştir.

9. ÖZGEÇMİŞ