

T. C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KSERODERMA PİGMENTOZUM GRUP E PROTEİNİ ve
KOMPLEKSLERİNİN SAFLAŞTIRILMASI
ve
NÜKLEOTİD EKSİZYON TAMİR MEKANİZMASINDAKİ
İŞLEVLERİNİN BELİRLENMESİ**

Dr. Gülnihal KULAKSIZ

Biyokimya Programı
DOKTORA TEZİ

ANKARA

2006

T. C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KSERODERMA PİGMENTOZUM GRUP E PROTEİNİ ve
KOMPLEKSLERİNİN SAFLAŞTIRILMASI
ve
NÜKLEOTİD EKSİZYON TAMİR MEKANİZMASINDAKİ
İŞLEVLERİNİN BELİRLENMESİ**

Dr. Gülnihal KULAKSIZ

Biyokimya Programı
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Nazmi Özer

ORTAK DANIŞMAN
Prof. Dr. Aziz Sancar

ANKARA
2006

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne:

Bu çalışma jürimiz tarafından Biyokimya Programında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri başkanı: Prof. Dr. Mesude İşcan
Ortadoğu Teknik Üniversitesi



Danışman: Prof. Dr. Nazmi Özer
Hacettepe Üniversitesi



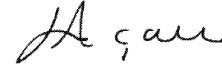
Üye: Prof. Dr. A. Nilgün Sümer
Hacettepe Üniversitesi



Üye: Prof. Dr. Kevser Pişkin Özden
Hacettepe Üniversitesi



Üye: Prof. Dr. N. Leyla Açıan
Hacettepe Üniversitesi



ONAY:

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Hakan S. Örer

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca gerek bilimsel, gerekse etik yönden ilgi ve yardımlarını esirgemeyen danışmanım Prof. Dr. Nazmi Özer'e, tez çalışmalarım sürecindeki tüm destek ve yardımlarından dolayı ikinci danışmanım Prof. Dr. Aziz Sancar'a teşekkür ederim. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde çalıştığım sürece Ana Bilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Kamer Kılınç'a, tez hazırlama sürecindeki yardımlarından dolayı tez izleme komitesi üyesi hocalarım Prof.Dr. İ.Hamdi Ögüş'e, Prof.Dr. Leyla Açıkan'a ve katkılarından dolayı diğer tüm öğretim üyelerine teşekkürlerimi sunarım.

Tez araştırma projesini birlikte yürüttüğümüz Dr. Joyce T. Reardon'a, yardımlarından dolayı tüm Sancar laboratuvarı çalışanlarına, tez hazırlığım sürecinde antikor ve rekombinant plazmidleri sağlayan Dr. Xiong ve Dr. Linn'e katkılarından ötürü teşekkürlerimi sunarım.

Bütün eğitimim boyunca her zaman desteklerini yanımda hissettiğim aileme teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmanın gerçekleşmesi için maddi destek sağlayan TÜBİTAK Bilim Adamı Yetiştirme Grubu'na teşekkür ederim.

Bu çalışma, North Carolina Üniversitesi, Biyokimya ve Biofizik Ana Bilim Dalı'nda, TÜBİTAK'ın desteğiyle gerçekleştirilmiştir.

ÖZET

Kulaksız G, Kseroderma Pigmentozum Grup E Proteini ve Komplekslerinin Saflaştırılması ve Nükleotid Eksizyon Tamir Mekanizmasındaki İşlevlerinin Belirlenmesi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Doktora Tezi, Ankara, 2006. Kseroderma Pigmentozum (XP) ultraviyole ışığa hassasiyet ve deri kanserlerinde artış, bazı hastalarda da nörolojik bulgular ile karakterize bir sendromdur. XPA-G genlerindeki mutasyonlar nükleotid eksizyon tamir mekanizması işlev bozukluğuyla seyreden XP'ye neden olmaktadır. Diğer alt grupların aksine XPE gen ürününün nükleotid eksizyon tamir mekanizmasındaki ve tümörden koruyucu işlevi tartışmalıdır. XPE'li hastalarda ultraviyole ışığa hassasiyet az olmasına rağmen deri kanserleri sıklığının yüksek olması dikkat çekicidir. XPE'ye "ultraviyole ışık tarafından hasarlanmış DNA'ya bağlanan protein"i (UV-DDB) kodlayan genin küçük alt birimindeki (UV-DDB2, XPE) mutasyonların neden olduğu bulunmuştur. UV-DDB2 (XPE) proteininin nükleotid eksizyon tamir mekanizmasında hasarın tanınması basamağında rol oynayabileceği düşünülmüştür. UV-DDB2 hücrede 4 formda bulunabilmektedir: UV-DDB2 monomeri olarak, UV-DDB1 ile UV-DDB heterodimeri şeklinde, UV-DDB1 ve E3 ubikuitin ligaz olarak işlev gördüğü belirlenmiş Cullin 4A ile kompleks oluşturarak, ve bu sonuncuya COP9 düzenleyici protein kompleksinin de eklenmesi ile UV-DDB/Cullin 4A/COP9 süper kompleksi halinde. Çalışmamızda XPE proteini ve hücrede oluşturduğu farklı protein komplekslerinin rekombinant olarak üretilerek saflaştırılması, hasarlı DNA'ya bağlanma özelliklerinin değerlendirilerek nükleotid eksizyon tamir mekanizmasında hasarın tanınması basamağındaki işlevinin aydınlatılması amaçlandı.

DDB2 proteinin UV-DDB heterodimerinde hasara bağlanan esas alt birim olduğu, Cullin 4A/ UV-DDB, COP9/Cullin 4A/UV-DDB süper komplekslerinin ise *in vitro* olarak hasarlı DNA'ya bağlanmada UV-DDB heterodimeriyle benzer özellikler gösterdiği saptandı.

Anahtar kelimeler: Nükleotid eksizyon tamiri, Kseroderma Pigmentozum, UV-DDB2, XPE, UV-DDB.

Destekleyen Kurumlar: TÜBİTAK, H.Ü.B.A.B. Tez Destekleme (05T11102006).

ABSTRACT

Kulaksiz G., Investigating the Role of Xeroderma Pigmentosum Complementation Group E Protein and Its Complexes on Nucleotide Excision Repair. Hacettepe University Institute of Health Sciences, Ph.D. Thesis in Biochemistry, Ankara, 2006. Xeroderma pigmentosum (XP) is a syndrome characterized by photosensitivity and increased sunlight induced skin cancer frequency, in some cases with neurological abnormalities. Mutations in XPA-G genes cause XP with defective nucleotide excision repair pathway. However, the exact role of XPE gene product in the nucleotide excision repair mechanism and on tumor prevention is controversial. XPE patients show mild photosensitivity although they have increased risk of skin cancers. Mutations in the small subunit (XPE, UV-DDB2) of “ultraviolet-damaged DNA binding protein” (UV-DDB) cause XPE. XPE protein is implicated in damage recognition step of nucleotide excision repair. In the cell, UV-DDB2 protein exists in 4 forms: as a UV-DDB2 monomer, UV-DDB heterodimer with UV-DDB1, a complex with Cullin 4A which has been shown functioning as an E3 ligase, and as a complex containing a regulatory COP9 signalosome complex. In this study, we purified UV-DDB2 (XPE) and its various complexes and investigated the damage binding properties to better define the role of XPE in the damage recognition step on human nucleotide excision repair.

We found that DDB2 has intrinsic binding activity to UV-damage. Cullin 4A/UV-DDB and COP9/Cullin 4A/UV-DDB super complexes containing DDB1-DDB2 (UV-DDB) heterodimer, show similar binding properties with UV-DDB heterodimer in an *in vitro* system.

Key words: Nucleotide Excision Repair, Xeroderma Pigmentosum, UV-DDB2, XPE, UV-DDB.

Supported by TÜBİTAK and H.U.B.A.B., Ph.D. Thesis Grant (05T11102006).

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER	xiv
TABLolar	xvii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Nükleotid eksizyon tamir mekanizması	4
2.2. Nükleotid eksizyon tamir mekanizmasının bozuk olduğu genetik geçişli sendromlar	10
2.2.1. Kseroderma pigmentozum	10
2.2.2. Cockayne sendromu	11
2.2.3. Trikotiyodistrofi	12
2.3. UV-ışığının neden olduğu DNA hasarına bağlanan protein (UV-DDB)	12
2.3.1. UV-DDB'nin hücre içindeki lokalizasyonu	13
2.3.2. UV-DDB'nin bağlandığı DNA hasarları	13
2.3.3. UV-DDB'nin hücredeki işlevleri	15
2.3.3.i UV-DDB'nin nükleotid eksizyon tamir mekanizmasındaki işlevleri	15
2.3.3.ii. UV-DDB'nin kromatin modellenmesindeki işlevleri	16
2.3.3.iii. UV-DDB'nin transkripsiyondaki işlevleri	17
2.3.3.iv. UV-DDB'nin tümör oluşumunu engelleyici rolü	17
2.3.3.v. UV-DDB'nin hücre döngesindeki işlevleri	18
2.3.3.vi. UV-DDB'nin olası diğer işlevleri	18
2.4. Ubikuitin proteazom sistemi (UPS)	19

2.5.	COP9 (CSN) sinyalozum kompleksi	21
3.	GEREÇLER VE YÖNTEMLER	24
3.1.	Gereçler	24
3.2.	Bakülovirüs / böcek hücre sisteminde rekombinant protein üretimi için yapılan çalışmalar	25
3.3.	İnsan embriyonik böbrek 293T (HEK293T) hücre hatlarında rekombinant protein üretimi için yapılan çalışmalar	30
3.4.	“Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)” deneyleri	34
4.	BULGULAR	36
4.1.	Bakülovirüs / böcek hücre sistemlerinde DDB1, DDB2, UV-DDB proteinlerinin çok miktarda üretilmesi, saflaştırılması ve bu proteinlerin özelliklerinin belirlenmesi	36
4.1.1.	İnsan DDB1 proteininin <i>Spodoptera frugiperde</i> (sf21) böcek hücre hatlarında çok miktarda üretilmesi ve saflaştırılması	36
4.1.1.i.	İnsan DDB1 proteininin <i>Spodoptera frugiperde</i> (sf21) böcek hücre hatlarında çok miktarda üretimi	36
4.1.1.ii.	DDB1 rekombinant proteininin saflaştırılması	37
4.1.2.	His.DDB2.Flag proteininin <i>Tricoplusia ni</i> yumurta (High-Five) hücre hatlarında çok miktarda üretilmesi ve saflaştırılması	47
4.1.2.i.	His.DDB2.Flag proteininin <i>Tricoplusia ni</i> yumurta (High-Five) hücre hatlarında çok miktarda üretilmesi	47
4.1.2.ii..	His.DDB2.Flag rekombinant proteininin saflaştırılması	48
4.1.3.	UV-DDB’nin <i>Spodoptera frugiperde</i> (sf21) hücre hatlarında çok miktarda üretimi ve saflaştırılması	50
4.1.3.i.	UV-DDB rekombinant proteininin sf21 hücre hatlarında çok miktarda üretimi	50
4.1.3.ii.	UV-DDB rekombinant heterodimerinin saflaştırılması	51

4.1.4.	Bakülovirüs / böcek hücre sisteminden saflaştırılmış DDB1 ve Flag-DDB2'nin 50 baz çifti uzunluğunda tek pirimidin pirimidin (6–4) ışın ürünü içeren çift zincirli DNA parçasına bağlanma özelliklerinin EMSA yöntemi ile incelenmesi	51
4.2.	İnsan embriyonik böbrek 293T (HEK293T) hücre hatlarında DDB ile ilgili rekombinant protein üretimi için yapılan çalışmalar	55
4.2.1.	İnsan Flag-Cullin 4A proteininin HEK293T hücre hatlarında çok miktarda üretilmesi ve UV-DDB proteini ile birlikte saflaştırılması	55
4.2.1.i.	İnsan Flag-Cullin 4A gen parçasının memeli pcDNA3 vektörüne klonlanması	55
4.2.1.ii.	Flag-Cullin 4A rekombinant proteininin HEK293T hücrelerinde çok miktarda üretilmesi	61
4.2.1.iii.	Flag-Cullin 4A, DDB1 ve DDB2 proteinlerinin saflaştırılması	62
4.2.2.	İnsan Flag-DDB2 proteininin HEK293T hücre hatlarında çok miktarda üretiminin sağlanarak DDB2/DDB1/Cul4A/COP9 sinyalizom kompleksi ile birlikte saflaştırılması	62
4.2.2.i.	İnsan Flag-DDB2 gen parçasının memeli pcDNA3 vektörüne klonlanması	62
4.2.2.ii.	Flag-DDB2 rekombinant proteininin HEK293T hücrelerinde çok miktarda üretilmesi	68
4.2.2.iii.	Flag-DDB2 ve kompleks oluşturduğu DDB1, Cul4A, COP9 proteinlerinin saflaştırılması	69
4.3.	UV-DDB, Cullin 4A / UV-DDB, COP9 / Cullin4A / UV-DDB süper komplekslerinin 50 baz çifti uzunluğunda tek pirimidin pirimidon (6–4) ışın ürünü içeren çift zincirli DNA'ya bağlanma özelliklerinin EMSA yöntemi ile incelenmesi	70

5.	TARTIŞMA	72
6	KAYNAKLAR	79
7.	EKLER	92
7.1.	Neubauer hemositometresi ile hücrelerin sayılması	92
7.2.	Centricon-30 filtrenin çalışma prensibi	92

SİMGELER ve KISALTMALAR

ALP	Alkalen fosfataz
ATP	Adenozin trifosfat
bç	Baz çifti
BEVS	Bakülovirüs ekspresyon vektör sistemi
BRCA1	Breast Cancer 1, early onset (meme kanseri 1, erken başlangıç)
BSA	Sığır serum albümini
c-AMP	Siklik adenozin monofosfat
CAND1	<u>C</u> ullin <u>A</u> ssociated and <u>N</u> edylation - <u>D</u> issociated protein 1 (Cullin'le ilgili, nedilasyon olduğunda ayrıışan protein)
CH	Cullin Homoloji
CP	Çekirdek parçacık
CPD	Siklobutan Pirimidin Dimeri
CBP / p300	c-AMP Regulated Enhancer Binding Protein (CBP) / p300 (c-AMP tarafından düzenlenen bağlanmayı artırıcı protein / p300)
CS	Cockayne sendromu
CSA, CSB	Cockayne sendromu grup A, B
CDT1	Cell division cycle - 10 dependent transcript (Hücre bölünmesi döngüsüne bağımlı transkript-10)
CSN1-8	COP9 (CSN) alt birimi 1-8
Cul	Cullin
Cul4A	Cullin 4A
DMEM	<u>D</u> ulbecco's <u>M</u> odified <u>E</u> agles <u>M</u> edium
DNA pol	DNA (Deoksiribonükleik asit) polimeraz
DUB	Ubikuitinsizleştirici enzim
E1	Ubikuitin aktive edici enzim
E2	Ubikuitin bağlayıcı enzim
E3	Ubikuitin ligaz

eIF3	Ökaryotik translasyon inisiasyon faktörü 3
EMSA	<u>E</u> lectrophoretic <u>M</u> obility <u>S</u> hift <u>A</u> ssay
ERCC1	<u>E</u> xcision <u>R</u> epair <u>C</u> ross- <u>C</u> omplementing <u>R</u> odent Repair Deficiency, complementation group 1 (Kemirgenlerde tamir eksikliğini çapraz tamamlayıcı, tamamlayıcı grup 1)
FBS	Fötal dana serumu
h / h	hacim / hacim
H-5	<i>Trichoplusia ni</i> yumurta hücresi
HEK293T	İnsan embriyonik böbrek hücresi
hHR23B	UV-eksizyon tamir protein RAD23 homolog B (insan)
ISWI	<u>I</u> mitation <u>S</u> witch
kb	Kilobaz
kDa	Kilodalton
MPN	<u>m</u> pr1p, <u>p</u> ad1p, <u>N</u> -terminal (mpr1p ve pad1p genlerinin N-Uçlarında bulunan ortak bölge)
MOI	<u>M</u> ultiplicity <u>O</u> f <u>I</u> nfection
NBT / BCIP	Nitro blue tetrazolium / 5-bromo-4-kloro-3 indolil fosfat
NEB	New England Biolabs restriksiyon tamponu
NEDD8	<u>N</u> eural Precursor Cell <u>E</u> xpressed, <u>D</u> evelopmentally <u>D</u> own-regulated gene 8 (Nöral öncül hücrelerde ifadelenen, gelişimsel olarak aşağıdüzenlenmiş gen 8)
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PBS	<u>P</u> hosphate <u>B</u> uffered <u>S</u> aline (Tuzlu Fosfat Tamponu)
PCI	<u>P</u> roteazom, <u>C</u> OP9 sinyalizom, <u>I</u> nisiasyon faktörü 3 (ortak bölge)
PCNA	Prolifere edici nükleer antijen
PIC 1-3	Preinsizyon kompleksi 1-3
PS	Penisilin-Streptomisin
pfu / ml	plaque forming unit (plak oluşturan ünite) / ml
RAD23	UV-eksizyon tamir proteini

RNA	Ribonükleik asit
RNA pol	RNA polimeraz
Roc1	<u>R</u> ing of <u>C</u> ullin's <u>1</u> (Cullin'lerin "RING-finger" proteini 1)
RP	Düzenleyici parçacık
RPA	Replikasyon proteini A
S-200	Superdex 200
SDS	Sodyum dodesil sülfat
Sf21	<i>Spodoptera frugiperde</i> yumurta hücresi
STAGA	(SPT3-TAF _{II} 31-GCN5L asetilaz) Transkripsiyon koaktivatörü ve histon asetil transferaz kompleksi
SWI/SNF	Yeast mating type <u>s</u> witching / <u>s</u> ucrose <u>n</u> on <u>f</u> ermenting (Bira mayası eşlenimi tipi değiştirimi / Sükrozu kullanamayan protein kompleksi)
TFIIH	Transkripsiyon faktörü IIH
TTD	Trikotiyodistrofi
TTD-A	Trikotiyodistrofi grup A
Ub	Ubikuitin
UCH	Ubikuitin C-terminal hidrolaz
UPS	Ubikuitin proteazom sistemi
UV	Ultraviyole
UV-DDB	<u>U</u> ltraviole <u>t</u> <u>D</u> amaged- <u>D</u> N <u>A</u> - <u>B</u> inding protein, UV-ışığının neden olduğu DNA hasarına bağlanan protein
UV-DDB1	<u>U</u> ltraviole <u>t</u> <u>D</u> amaged- <u>D</u> N <u>A</u> - <u>B</u> inding protein-1, UV-ışığının neden olduğu DNA hasarına bağlanan proteinin büyük alt birimi
UV-DDB2	<u>U</u> ltraviole <u>t</u> <u>D</u> amaged- <u>D</u> N <u>A</u> - <u>B</u> inding protein-2, UV-ışığının neden olduğu DNA hasarına bağlanan proteinin küçük alt birimi
XP	Kseroderma pigmentozum
XPA-G, V	Kseroderma pigmentozum grup A-G
WD40	Triptofan-Aspartat tekrarları (40 aminoasitlik bölgede)

ŞEKİLLER

Şekil		Sayfa
2.1.	İnsanda nükleotid eksizyon tamir mekanizması	8
2.2.	UV-ışığının neden olduğu iki DNA lezyonu	14
2.3.	Ubikuitin proteazom sistemi	20
2.4.	26S protezom sistemi ve bölümleri	22
3.1.	“Flag” epitopuna karşı antikör-afinite kromatografisinin prensibi	28
3.2.	Klonlanmak istenen gen parçasının plazmid DNA içerisine yerleştirilmesi ve bu işlem sonucu oluşan rekombinant DNA’nın bakteri hücrelerine aktarılması	31
3.3.	Ekspresyon vektörüne klonlanmış ve hücre içine aktarılmış genden çok miktarda protein üretilmesi	32
4.1.	Rekombinant DDB1 proteininin % 10’luk SDS-PAGE’de “Coomassie blue” boyaması ile gösterilmesi	38
4.2.A-B.	Rekombinant DDB1 virüsü ile enfekte hücre lizatının P11 fosfocellüloz kolonuna uygulanmasını takiben elde edilen fraksiyonların protein içeriğinin % 10’luk SDS-PAGE’de “Coomassie blue” boyaması ile gösterilmesi	39
4.3.	DEAE-Sepharose kolonu ile saflaştırma işlemi sonrası elde edilen fraksiyonların % 10’luk SDS-PAGE’de yürütülerek protein bantlarının “Coomassie blue” boyaması ile belirlenmesi	41
4.4.A.	DEAE-Sepharose kolonu ile saflaştırma işlemi sonrası elde edilen fraksiyonların % 10’luk SDS-PAGE’de yürütülerek “Coomassie blue” boyası ile görüntülenmesi	42
4.4.B.	DEAE-Sepharose kolonu ile saflaştırma işlemi sonrası elde edilen fraksiyonların % 10’luk SDS-PAGE’de yürütülerek “Coomassie blue” boyası ile görüntülenmesi (Şekil 4.4. A’nın devamı)	43
4.5.A.	Superdex 200 kolonu ile saflaştırma işlemi sonrası elde	

	edilen fraksiyonlarda DDB1 proteininin % 10'luk SDS-PAGE'de yürütülerek gümüş boyaması ile görüntülenmesi	44
4.5.B.	Superdex 200 kolonu ile saflaştırma işlemi sonrası elde edilen fraksiyonlarda DDB1 proteininin % 10'luk SDS-PAGE'de yürütülerek gümüş boyaması ile görüntülenmesi (Şekil 4.5. A'nın devamı)	45
4.6.	Superdex 200 kolonu ile saflaştırma sırasında elde edilen fraksiyonların UV-absorbansının FPLC'de görüntülenmesi	46
4.7.	DDB1'in saflaştırılma basamaklarında elde edilen proteinlerin "Coomassie blue" boyaması ile gösterilmesi	47
4.8.	Rekombinant DDB2 proteininin % 10'luk SDS-PAGE'de yürütüldükten sonra "Coomassie blue" boyası ile gösterilmesi (A) ve protein ekspresyonunun "Western blotting" ile gösterilmesi (B)	50
4.9.	Rekombinant UV-DDB proteininin % 10'luk SDS-PAGE'de "Coomassie blue" boyaması ile gösterilmesi	52
4.10.	Bakülovirüs / böcek hücre sisteminden saflaştırılmış DDB1 ve Flag-DDB2'nin 50 bç uzunluğunda tek pirimidin pirimidon (6 – 4) ışın ürünü içeren çift zincirli DNA parçasına bağlanma özelliklerinin EMSA yöntemi ile incelenmesi	53
4.11.	Bakülovirüs / böcek hücre sisteminden saflaştırılmış Flag-DDB2'nin 50 bç uzunluğunda tek pirimidin pirimidon (6 – 4) ışın ürünü içeren çift zincirli DNA parçasına bağlanma özelliklerinin ve anti-DDB2 antikoru ile oluşturduğu "supershift" in EMSA yöntemi ile incelenmesi	54
4.12.	Flag-Cul4A PCR ürününün % 1'lik agaroz-TBE jelinde etidyum bromür ile boyanarak görüntülenmesi	56
4.13.	Vektör ve insert DNA'nın göreceli molar derişimlerinin belirlenmesi amacı ile % 0.7'lik agaroz-TBE jelde yürütülmesi ve etidyum bromür ile boyanması	57
4.14.	Flag-Cul4A / pcDNA3 içeren kolonilerin belirlenmesi için	

	miniprep ürünlerinin <i>EcoRV</i> – <i>Not1</i> enzimleriyle kesilmesi	59
4.15.	Miniprep ürünlerinin <i>nde1</i> ile sindirilmesi sonrası %1’lik agaroz-TBE jelde yürütülüp, etidyum bromür ile boyanarak görüntülenmesi	60
4.16.	Flag-Cul4A’nın ekspresyonu sonrası saflaştırılan Cul4A /DDB1/DDB2 kompleksinin %10’luk SDS-PAGE’de gümüş boyama ile (A) ve Cul4A ekspresyonunun “Western blotting” ile (B) belirlenmesi	63
4.17.	Flag-DDB2 PCR ürününün % 1’lik agaroz-TBE jelinde etidyum bromür ile boyanarak görüntülenmesi	64
4.18.	Vektör ve insert DNA’ nin % 1’lik agaroz-TBE jelde yürütülerek etidyum bromür ile boyanarak göreceli molar oranlarının belirlenmesi	66
4.19.	Flag-DDB2 / pcDNA3 içeren kolonilerin belirlenmesi için miniprep ürünlerinin <i>Xho1</i> – <i>BamH1</i> enzimleriyle kesilmesi.	67
4.20.	Miniprep ürünlerinin <i>Xba1</i> ve <i>EcoRV</i> ile sindirilmesi sonrası % 1’lik agaroz-TBE jelde yürütülüp, etidyum bromür ile boyanarak görüntülenmesi	68
4.21.	Flag-DDB2 ekspresyonundan sonra DDB2/DDB1/Cul4A /COP9 kompleksinin izolasyonu	69
4.22.	COP9/Cul4A/UV-DDB, Cul4A/UV-DDB ve UV-DDB komplekslerinin 50 bç’lik tek pirimidin-pirimidon (6-4) ışın ürünü içeren çift zincir DNA’ya bağlanma özellikleri	71
7.1.	Neubauer hemositometre düzeneği	92
7.2.	Centricon-30 filtrenin çalışma prensibi	93

TABLÖLAR

Tablo		Sayfa
2.1.	İnsanda nükleotid eksizyon tamir mekanizmasının substratları	5
2.2.	Nükleotid eksizyon tamir mekanizmasından sorumlu altı tamir faktörünün özellikleri ve görevleri.	6
2.3.	UV-DDB'nin bağlandığı DNA hasarları ve bu hasarlara ilgisi	15

1. GİRİŞ

Genomik DNA iç ve dış etkenlerin etkisiyle sürekli olarak hasara uğramaktadır. Oluşan DNA hasarlarının tamiri organizmada çeşitli tamir mekanizmaları ile gerçekleştirilmektedir. Bunlar arasında “Nükleotid Eksizyon Tamiri” bilinen en genel tamir mekanizmasıdır. Bu mekanizmada hasarlı DNA bölgesi tanınarak hasarı içeren bölge oligonükleotid parçası şeklinde çıkartılmakta, DNA zincirinde oluşan boşluk doğru bazlarla doldurulmaktadır (1-3).

Nükleotid eksizyon tamir mekanizması, özellikle ultraviyole (UV) ışığının neden olduğu DNA hasarları başta olmak üzere, kanserojen olduğu belirlenmiş pek çok DNA hasarının tamirinden sorumludur (4-8). Tamir mekanizmasının etkin bir şekilde çalışmasıyla insanlarda, mutasyonların neden olduğu kanser, yaşlanma, nörodejeneratif ve kalıtsal bozukluklar gibi zararlı etkilerden (3) korunmak ve mutasyonların sonraki nesillere aktarılmasını önlemek mümkün olmaktadır.

Nükleotid eksizyon tamir mekanizmasında rol oynayan proteinleri kodlayan genlerin mutasyonları “kseroderma pigmentozum (XP), Cockayne sendromu (CS) ve trikotiyodistrofi (TTD)” isimli genetik geçişli üç sendroma neden olmaktadır. Bu sendromlar oldukça nadir görülmelerine rağmen eksizyon tamirinin çalışma mekanizmasını ve önemini ortaya koymak açısından önemlidir. UV ışığına hassasiyet (fotosensitivite) adı geçen her üç sendromda ortak bulgudur. Kseroderma pigmentozumda diğer sendromlardan farklı olarak deri ve iç organ kanserlerinin görülme sıklığı çok artmıştır (1-3,9).

XP’de nükleotid eksizyon tamir mekanizması bozukluğu ile birlikte olan yedi komplemantasyon grubu tanımlanmıştır (XPA-G) (1-3,9). Bu sendromlardan XPE’de UV ışığına hassasiyet çok az olmasına rağmen deri kanserleri sıklığının yüksek olması dikkat çekicidir (10). XPE mutant hücrelerde “UV ışığının neden olduğu DNA hasarına bağlanan protein (UV-DDB)”in aktivite gösterememesi (11-13) XPE ve UV-DDB arasındaki ilişkiyi ortaya koymuştur (10).

UV-DDB’nin 127 kDa (UV-DDB1) ve 48 kDa (UV-DDB2)’luk iki alt birimden oluştuğu gösterilmiştir (14). XPE’li hastalarda yalnızca UV-DDB2 geninde mutasyonların varlığı gösterildiğinden (11), XPE geni UV-DDB2 olarak kabul edilmektedir (10).

Nükleotid eksizyon tamir mekanizması proteinleri hücre içinde genellikle eser miktarda bulunmaktadır (15). Buna karşın UV-DDB'nin hücrede bu proteinlere göre oldukça yüksek oranda bulunması (14) nükleotid eksizyon tamir mekanizması dışında farklı rolleri olabileceğini düşündürmüştür (15). UV-DDB1 ve XPE'nin (UV-DDB2) ubikuitinasyon için hedefleri belirleyen Cullin 4A (Cul4A) ile ilişkili olduğu bulunmuştur (16). Cul4A'nın UV-DDB heterodimeri ve onunla etkileşime giren DNA tamiri ve hücre döngüsü proteinlerini hedefleyebileceği düşünülmektedir (16). UV-DDB2'nin hasarın tanınması basamağında işlevi olabileceğinin düşünülmesi, bu proteinle etkileşimde olan Cul4A'nın da nükleotid eksizyon tamirinde, özellikle de hasarın tanınması basamağında işlevi olabileceğini düşündürmektedir (16).

XPE proteininin (UV-DDB2) ayrıca UV ışığına maruziyet sonrası ubikuitin ligaz aktivitesini düzenleyen COP9 (CSN) sinyalozum kompleksi ile de etkileşimi olduğu saptanmıştır. XPE proteini, UV-DDB1, Cul4A ve COP9 kompleksi ile birlikte süper kompleks oluşturmaktadır. Hücre UV ışığına maruz kaldığında UV-DDB1/UV-DDB2/Cul4A kompleksinin COP9 kompleksinden ayrılarak kromatine bağlandığı belirtilmektedir. Bu şekilde UV-DDB kompleksinin kromatinde tamir faktörlerinin hasarlı DNA bölgesine ulaşabilmesini kolaylaştırabileceği düşünülmüştür (17). COP9 kompleksinin nükleotid eksizyon tamir mekanizmasındaki olası işlevi de henüz aydınlatılmamıştır.

UV-DDB alt birimlerinin ayrıca tümör oluşumunun önlenmesinde (18), transkripsiyonda (19), gelişimde (20), hücre döngüsünde (21) ve viral enfeksiyonlarda (22) rol oynayabileceği belirtilmektedir.

UV-DDB heterodimerinin UV ışığının neden olduğu DNA hasarlarına yüksek ilgi ile bağlandığı saptanmıştır (11,23); ancak bu bağlanmanın esas olarak hangi alt birimi tarafından gerçekleştirildiği, bağlanma için UV-DDB kompleksinin gerekli olup olmadığı tartışmalıdır (24-26). Her iki alt birimin birbirleriyle kompleks halinde bulunması alt birimlerin ayrı ayrı saflaştırılmasını güçleştirmektedir. XPE proteininin ayrı olarak, UV-DDB1 alt birimi ile heterodimer halinde, Cul4A ve COP9 kompleksiyle oluşturduğu süper komplekslerin nükleotid eksizyon tamir mekanizmasındaki rolü de henüz tam olarak aydınlatılmamıştır.

Bu çalışmanın amacı genel olarak insan hücrelerinin DNA hasarına karşı davranışının moleküler mekanizmalarının aydınlatılmasına katkıda bulunmaktır. Çalışmada, nükleotid eksizyon tamir mekanizmasında rol oynadığı düşünülen UV-DDB'nin hasarlı DNA'ya bağlanma aktivitesinden esas olarak alt birimlerinden hangisinin ve / veya hangilerinin sorumlu olduğunu belirlemek, hücrede dört formda bulunan XPE proteininin; serbest haldeyken, UV-DDB1 ile UV-DDB kompleksi halindeyken, Cul4A ve COP9 kompleksleriyle süper kompleks oluşturduğunda hasarlı DNA'ya bağlanma özelliklerinin belirlenmesi, böylece nükleotid eksizyon tamir mekanizmasında hasarın tanınma basamağında bu süper komplekslerin rolünün aydınlatılması amaçlandı.

Çalışmada XPE ve UV-DDB1 alt birimleri ayrı ayrı ve heterodimer kompleksi olarak böcek hücre hatlarında çok miktarda üretilip saflaştırıldı ve pirimidin pirimidon (6-4) ışın ürününe bağlanma özellikleri değerlendirildi. Ayrıca UV-DDB/Cul4A, UV-DDB/Cul4A/COP9 sinyalozum süper kompleksleri memeli hücre hatlarından elde edilerek pirimidin pirimidon (6-4) ışın ürününe bağlanma özellikleri incelendi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Nükleotid Eksizyon Tamir Mekanizması

Memeli hücresi farklı DNA hasarları için farklı DNA tamir mekanizmalarını kullanmaktadır. Eksizyon tamiri, hasarlı bazın serbest baz olarak çıkarıldığı “Baz Eksizyon Tamiri” ve hasarlı bazın oligonükleotid parçaları olarak çıkarıldığı “Nükleotid Eksizyon Tamiri” mekanizmaları olarak iki grupta incelenir. Baz eksizyon tamir mekanizması ile daha çok alkilleyici ve oksitleyici ajanların oluşturduğu hasarlar tamir edilmektedir. Nükleotid eksizyon tamir mekanizmasının ise özellikle UV ışığının neden olduğu DNA hasarları başta olmak üzere çok çeşitli DNA hasarlarının tamirinden sorumlu olduğu bulunmuştur (1-7). Bunlar arasında deri kanserlerinde rol oynayan pirimidin pirimidon (6-4) ışın ürünleri ve siklobutan pirimidin dimerleri (CPD), akciğer kanserinden sorumlu olduğu bilinen benzo[a]piren guaninin oluşturduğu DNA hasarları sayılmaktadır. Ayrıca polisiklik karsinojenler, asetilaminofluoren guaninin oluşturduğu DNA hasarları, kanser tedavisinde kullanılan bazı ajanların oluşturduğu DNA hasarları da bu mekanizma ile onarılmaktadır (1,3,27,29-30). Nükleotid eksizyon tamir mekanizmasının aynı zamanda okside edici ve alkilleyici ajanlarla oluşan küçük baz lezyonlarının tamirinde, baz eksizyon tamir mekanizmasının yeterli olmadığı hallerde de etkili olduğu belirlenmiştir (27-30)(Tablo 2.1).

Nükleotid eksizyon tamir mekanizması, transkribe olan DNA’da daha hızlı çalışır. Buna “transkripsiyona kenetlenmiş tamir mekanizması” denir (1-3,27). Bu yolla, transkribe olan DNA, transkribe olmayan DNA’ya göre daha hızlı tamir edilmektedir (8).

Eksizyon tamirinin basamaklarının, ilgili protein ve genler tam olarak korunmamakla birlikte bütün canlı türlerinde aynı olduğu gösterilmiştir (5,31-32). Eksizyon tamiri sırasında DNA’daki hasarlı bazın oligonükleotid parçaları olarak çıkartılıp bu bölgenin doğru bazlarla doldurulması ve oluşan çentiğin ligasyonla kapatılması ana prensiptir (30).

İnsanlarda genel genom tamirinden esas olarak 6 tamir faktörünün (eksizyon nükleaz) sorumlu olduğu bulunmuştur (Kseroderma pigmentozum grup A (XPA), proteini, Replikasyon proteini A (RPA), Kseroderma pigmentozum grup C (XPC)

Tablo 2.1. İnsanda nükleotid eksizyon tamir mekanizmasının substratları (Kaynak 27 ve 29'dan Türkçeleştirilerek ve değiştirilerek alınmıştır).

Nükleotid Eksizyon Tamir Mekanizmasının Substratları	
Nükleotid eksizyon tamir mekanizmasının ana substratları	Pirimidin pirimidon (6-4) ışın ürünleri ¹ Siklobutan-timin dimerleri ¹ 2-Asetilaminofluoren ¹ Benzo[a]piren diol epoksit ¹ Sisplatin 1-2-d(GpG) ¹ Psoralen tek eklentisi ¹ Psoralen zincirler arası çapraz bağları ¹
Nükleotid eksizyon tamir mekanizması ile onarılan diğer DNA hasarları	8-oksoguanin ² Timin glikol ² Üre artığı ² O ⁶ -Metil guanin ² N ⁶ -Metil adenin ² A:G ³ G:G ³

¹ Belirtilen DNA hasarları sınırlı da olsa yanlış eşleşim tamir mekanizması ile, ² büyük olmayan eklentiler baz eksizyon tamir mekanizması ile, O⁶-Metil guanin ve N⁶-Metil adenin ayrıca alkil transferaz sistemi ile, ³yanlış eşleşmiş baz çiftleri ise yanlış eşleşim tamiri ile de tamir edilmektedir

proteini, Transkripsiyon faktörü IIH (TFIIH), Kseroderma pigmentozum grup G proteini (XPG), Kseroderma pigmentozum grup F proteini (“Excision Repair Cross-Complementing Rodent Repair Deficiency, complementation group 1” (ERCC1) proteini ile kompleks halde) (XPF.ERCC1)).

Altı eksizyon nükleazın özellikleri ve görevleri Tablo 2.2’de özetlenmiştir (15,30).

Genel olarak mekanizma:

1. Hasarın tanınması,
2. Çift yönlü kesme (insizyon),
3. Oligonükleotid parçanın kesip çıkartılarak (eksizyon) uzaklaştırılması,
4. Tamir bölgesinde oluşan boşluğun DNA polimeraz I tarafından doldurulması,
5. Ligasyon basamaklarından oluşmaktadır (30).

Bu basamaklar arasında hasarın tanınması basamağı en önemli basamağı oluşturmaktadır.

Tablo 2.2. Nükleotid eksizyon tamir mekanizmasından sorumlu altı tamir faktörünün özellikleri ve görevleri (15,30).

Tamir faktörleri	Özellikleri ve Görevi
XPA proteini	Çinko parmak motifi bulundurur. DNA'ya bağlanma ve hasarın tanınmasında işlev görür.
RPA	DNA'ya bağlanma ve hasarın tanınmasında, ayrıca replikasyonda işlev görür.
XPC proteini	DNA'ya bağlanma ve hasarın tanınmasında ve moleküler çöpçatan olarak işlev görür. Yalnızca GGR'de rol oynar. UV-eksizyon tamir proteini (RAD23) insan homoloğu B (hHR23B) proteini ile kompleks oluşturur.
TFIIH	Altı alt birimden oluşmaktadır. XPB ve XPD alt birimleri helikaz aktivitesine sahiptir. Çift zincir DNA'nın çözünmesinde, nükleotid eksizyon tamiri sırasında kinetik olarak yanlışları düzeltici olarak işlev görür. DNA bağımlı helikaz ve genel transkripsiyon faktörü olarak çalışır.
XPG proteini	Endonükleaz yapısındadır, 3' yönünden keser.
XPF.ERCC1 kompleksi	Endonükleaz yapısındadır, 5' yönünden keser. Ayrıca rekombinasyonda da rol oynar.

Tamir faktörleri normalde hasarlı olan veya olmayan DNA'ya bağlanma özelliği göstermektedir. Bu nedenle eksizyon tamir mekanizmasının hasarı hissedip tanıyarak hasarlı olan DNA'da tamiri gerçekleştirirken, hasarlı olan / olmayan DNA ayrımını da yapabilmesi gerekmektedir (33). Bu güne kadar XPA ve RPA proteinlerinin veya XPC.hHR23B kompleksinin hasarı tanıma yeteneği olduğunu öne süren, pek çok çalışma bulunmaktadır (34-36). Bununla birlikte son çalışmalar RPA, XPA, ve genellikle TFIIH ile kompleks oluşturan XPC proteinlerinden herhangi birinin hasarlı DNA'ya rasgele sırayla bağlandığını ve bu proteinlerden birinin bağlanmasının diğerlerinin de bağlanmasını kooperatif bir mekanizma ile artırdığı yönündedir (37). Kooperatif bağlanma ile kısmen sağlanan hasara özgüllük 6 alt birime sahip TFIIH'nin kinetik olarak yanlışları düzeltme (kinetic proofreading) özelliği ile arttırılmaktadır. Bu dört proteinin bağlanması ile oluşan kapalı kompleks, o bölgede DNA hasarı bulunmuyorsa TFIIH'nin alt üniteleri olan ve XPB ve XPD helikazlar yardımıyla DNA'dan ayrılır. DNA, hasar içeriyorsa bu durumda ATP hidrolizi ile XPB ve XPD çift zincir DNA'daki hasar içeren bölgedeki yaklaşık 20-25 nükleotidlik kısmı çözerek burada bir tamir kabarcığı oluşturur. Bu olay, kapalı kompleksteki bütün bileşenlerde konformasyonel değişikliklere neden olmakta ve nispeten dayanıklı bir kompleks olan preinsizyon kompleksi 1 (PIC 1) oluşmaktadır. XPG proteini, TFIIH'nin ATP hidrolizi aktivitesini kullanarak XPC'nin bölgeden ayrılmasıyla komplekse katılmakta, böylece preinsizyon kompleksi 2 (PIC 2) meydana gelmektedir. XPF.ERCC1 komplekse katıldıktan sonra (preinsizyon kompleksi 3, PIC 3) ilk olarak hasarın 3' yönündeki $6. \pm 3$. fosfodiester bağından XPG, daha sonra da 5' yönündeki $12. \pm 5$. fosfodiester bağından XPF.ERCC1 proteinleri kesme işlemini gerçekleştirmektedir. Oluşan 24-32 nükleotidlik oligomer, kesme işlemi sonrası bölgeden ayrılırken oluşan boşluk tamir sentezi proteinleri replikasyon proteini C / prolifer edici nükleer antijen ve DNA polimeraz ϵ / δ tarafından doldurulmaktadır. Son olarak DNA ligaz 1 ile ligasyon gerçekleşmektedir (Şekil 2.1) (30,38). Özet olarak hasara özgüllük, kinetik olarak yanlışların düzeltilmesi (kinetic proofreading), moleküler çöpçatanlık (molecular matchmaking) ve kooperatif bağlanma ile sağlanmaktadır (30,37,38).

Transkripsiyona kenetlenmiş tamir mekanizması seksenli yıllarda tanımlanmıştır (8,39). Bu mekanizma ile aktif olarak transkribe olan DNA zincirinde

bulunan hasarlar tamir edilmektedir. Transkripsiyona kenetlenmiş tamir mekanizması, transkripsiyonun uzamasını durduran DNA hasarlarının tamirinden sorumludur (30,39,40).

İnsanda DNA kromatin şeklinde paketlenmiştir ve eksizyon tamirinin gerçekleşmesini engellemektedir (30,41-43). Transkribe olan genlerde kromatin yapısı açılmıştır. Transkribe olmayan genin RNA polimeraz (RNAP)’a etkisi yokken transkripsiyonu olan zincir, RNAP’ın ilerlemesini engellemektedir (44-46). RNA polimeraz’ın o bölgede durmuş olması bu açık yapının sürekliliğini sağlamaktadır. Böylece transkripsiyonu durduran DNA hasarı, daha hızlı bir şekilde ve kromatinin engelleyici etkisi olmadan onarılmaktadır (30).

Transkripsiyona kenetlenmiş tamir mekanizmasında hasarın tanınması hariç diğer basamakların aynı olduğu belirtilmektedir (30). Transkripsiyona kenetlenmiş tamir mekanizması XPC proteini hariç diğer tamir faktörleri (47), Cockayne sendromu grup A ve B (CSA, CSB) proteinlerinin (45,48,49) varlığını gerektirmektedir.

CSB proteini, insanda DNA bağımlı ATPaz özelliği göstermektedir (50). CSB proteininin kromatin modellenmesinde rol oynadığı belirlenmiş olan SWI/SNF (yeast mating type switching / sucrose non fermenting) ailesi içinde yer aldığı belirlenmiştir (51,52). Ayrıca, CSB proteininin XPA, XPG, TFIIH, RNAP II, CSA proteinleri gibi pek çok protein ile etkileşim içinde olduğu saptanmıştır (50,53-55). CSB proteini, RNAP II’nin doğal transkripsiyon sırasında ilerlemesini sağlayan translokaz aktivitesine sahiptir (56). Bununla birlikte durmuş RNAP’nin üçlü kompleksini bozmamaktadır (50). CSB proteininin bu özellikleri ve tamir faktörleriyle etkileşimi dolayısıyla transkripsiyona kenetlenmiş tamir mekanizmasında aktif rol oynadığı düşünülmektedir. CSA proteini WD40 (Tryptofan-Aspartat) tekrarları içermekte (57) ve CSB proteini (53), COP9 kompleksi (17) ile etkileşime girmektedir. CSA ve CSB proteinlerinin transkripsiyonu tamir mekanizmasına nasıl kenetlediği henüz tam olarak bilinmemektedir.

Transkripsiyona kenetlenmiş tamir mekanizmasının, hasarın daha hızlı tamirini sağladığı, böylece hasar nedeniyle durmuş transkripsiyonun hücre için öldürücü etkisinden hücreyi koruduğu düşünülmektedir. Lezyonun daha hızlı tamir edilmesi, transkripsiyonun durmasına bağlı zararlı etkileri en aza indirmektedir (15).

2.2. Nükleotid eksizyon tamir mekanizmasının bozuk olduğu genetik geçişli sendromlar

Nükleotid eksizyon tamir proteinlerinden herhangi birini kodlayan genlerdeki mutasyonlar, nadir görülen, resesif geçişli üç sendromla sonuçlanmaktadır. Bu sendromlar, kseroderma pigmentozum (XP), Cockayne sendromu (CS), trikotiyodistrofi (TTD) olarak isimlendirilmişlerdir. Bu sendromlardan üçünde de UV ışığına hassasiyet ortak klinik bulgu olmakla birlikte, XP’de diğerlerinden farklı olarak deri kanserleri sıklığında artışın da görülmesi dikkat çekicidir. CS ve TTD’de farklı derecelerde nörolojik ve gelişimsel anormallikler görülmektedir. TTD’de UV ışığına hassasiyetin yanı sıra sülfürden yoksun çabuk kırılan saçlar ve iktiyozis gözlenir (3,15).

Hücre füzyon çalışmalarında XP için sekiz komplemantasyon grubu (XPA-G, XPV) tanımlanmıştır. Bunlardan 7 tanesi nükleotid eksizyon tamir mekanizmasında bozuklukla seyrederken (XPA-G), birinde (XPV) DNA polimeraz eta enziminin bozuk olduğu bulunmuştur (1,58). CS için iki (CSA, CSB) ve TTD içinse üç (TTD-A, XPB, XPD) komplemantasyon grubu tanımlanmaktadır. Bu gruplardan her biri adı geçen proteini kodlayan genlerdeki mutasyonlar sonucu oluşan sendromları ifade etmektedirler. XPB, XPD ve XPG mutasyonları genetik olarak XP ve CS sendromlarıyla çakışma göstermektedir. Nükleotid eksizyon tamir mekanizmasındaki bozukluklar klinik olarak heterojenite göstermektedirler (3, 15).

2.2.1. Kseroderma pigmentozum

Kseroderma pigmentozum grup A-G genlerindeki mutasyonlar nükleotid eksizyon tamir mekanizmasında bozuklukla seyreden otozomal resesif geçişli “kseroderma pigmentozum” sendromuna neden olmaktadır. XP’de genetik heterojenite yanında klinik olarak da heterojenite gözlenmektedir. Heterozigotlar genellikle asemptomatiktir. Homozigotlarda ise semptom ve bulguların derecesi değişken olmakla birlikte güneş ışığına karşı artmış hassasiyet, ciltte güneş ışığına maruz kalan bölgelerde ve gözlerde ilerleyici değişiklikler gözlenmektedir. Bu dejeneratif değişiklikler ise genellikle kanserle sonuçlanmaktadır (1,3,9,15). XP’li hastalarda ciltte güneş gören bölgelerde çiller, pigmentasyon artışı, telenjiektaziler, atrofik bulgular, aktinik keratoz, keratoakantom, anjiom ve fibrom gibi iyi huylu

lezyonlara çok sık rastlanmaktadır. Bu hastalarda deri kanserleri sıklığı normal popülasyona göre 10.000 kattan daha fazla gözlenmektedir (58). Ayrıca iç organ kanserleri sıklığında da yaklaşık 10 kat artış olduğu rapor edilmektedir. Gözlerde konjunktivit, keratit, göz kapaklarında atrofi ve ilerleyen dönemlerde de bu bölgelerin neoplazmları sık olarak gözlenmektedir. Hastaların yaklaşık % 18’inde nörolojik anormalliklerin görüldüğü belirtilmektedir. Parşömen kağıdı benzeri cilt (kseroderma) ve çillerin varlığı (pigmentoza) XP için karakteristiktir. Mikrosefali, primer nöronal dejenerasyon, mental gelişmede gecikme, motor aktivitelerde bozukluk, hipo / arefleksi, ilerleyici sensörinöral sağırılık XP’de görülen nörolojik bozukluklar arasında sayılabilir. İlerleyici mental kayıp, seksüel gelişimde kayıp, cücelik (dwarfism) de XP’de klinik olarak gözlenebilir. XPF gibi nükleotid eksizyon tamirinin daha az kaybolduğu alt gruplarda nörolojik anomalilerin de daha az görüldüğü bildirilmektedir (1,3,9,15).

XPA, XPB, XPD ve XPG grubundaki hastalarda nükleotid eksizyon tamir mekanizmasındaki bozukluk oldukça ciddi seyretmektedir. XPC ve XPE’li hastalarda ise transkripsiyona kenetlenmiş tamir mekanizması normaldir (1,3,9,15). Bu hastalarda UV ışığına hassasiyet diğer komplementasyon gruplarına göre daha azdır ve nörolojik anomalilere de rastlanmamaktadır. XPE’li hastaların UV ışığına hassasiyetlerinin az olmasına ve cilt bulgularının oldukça hafif seyretmesine rağmen hastalarda cilt kanserleri sıklığı normal popülasyona göre daha yüksektir (10). Eksizyon tamir mekanizmasındaki azalma da normal kişilerdekinin % 50’si olarak saptanmıştır (60,61).

2.2.2. Cockayne sendromu

Cockayne sendromu grup A ve B genlerinden herhangi birindeki mutasyonlar transkripsiyona kenetlenmiş tamir mekanizmasında bozuklukla seyreden otozomal resesif geçişli “Cockayne sendromu”na (CS) neden olmaktadır. CS erken yaşlanma sendromları arasında kabul edilmektedir. Bu hastalarda UV ışığına karşı hassasiyet görülmesine rağmen cilt kanserleri sıklığında artış gözlenmemektedir. Kısa boy, kuş benzeri dar bir yüz şekli, katarakt, optik atrofi, pigmenter retinopati gibi göz bulguları CS’nin önemli klinik bulgularıdır. Ayrıca mikrosefali, işitme kaybı, kas tonusunda azalma, bazal ganglionlarda kalsifikasyonların görülmesi, psikomotor

gelişimde gecikme, önemli nörolojik bulgular olarak dikkat çekmektedir (3,15).

2.2.3. Trikotiyodistrofi

Trikotiyodistrofi A genindeki mutasyonlar “trikotiyodistrofi sendromu”na (TTD) neden olmaktadır. Ayrıca, XPB ve XPD genlerindeki mutasyonlar da TTD bulgularına neden olabilmektedir. TTD, sülfürden yoksun kırılğan saçlar, iktiyozis, fizik ve mental anomalilerle karakterizedir. Hastalarda iktiyozis bulunmaması durumunda bile sülfürden yoksun saçların varlığı TTD varlığı için yeterli kabul edilmektedir. TTD’de ektoderm ve nöroendodermden köken alan organlarda anomaliler göze çarpmaktadır. Mental gerilik, spastisite, hiperrefleksi, tremor ve ataksi gibi CS’dekine benzer kayıplar, fertilitede azalma, kısa boy, iskelet anomalileri ve nöron miyelin yapısında bozukluklar TTD’de gözlenen diğer bulgulardır (3,15).

2.3. UV ışığının neden olduğu DNA hasarına bağlanan protein (UV-DDB)

Chu ve Chang (1988) ilk olarak iki XPE hastasında UV ışığının neden olduğu DNA hasarına bağlanan proteinin (UV-DDB) aktivitesinin olmadığını göstermişlerdir (11). Bu proteinin daha önce Feldberg ve Groisman’ın plasentadan saflaştırdıkları proteinle aynı olduğu anlaşılmıştır (62).

Keeney ve diğ. (1993) UV-DDB’yi HeLa hücrelerinden saflaştırmışlar ve proteinin 127 kDa (UV-DDB1, p127) ve 48 kDa’luk (UV-DDB2, XPE, p48) 2 alt birimden oluşan heterodimer bir yapıda olduğunu belirlemişlerdir (14). UV-DDB1’in 1140 amino asitten oluştuğu ve geninin insanda 11q12-q13’de yer aldığı, UV-DDB2’nin ise 428 amino asitten oluştuğu ve geninin 11p12-p13’de bulunduğu gösterilmiştir (63-65). XPE’li hastalarda UV-DDB aktivitesi bozuk olan kişilerde yalnızca UV-DDB2 geninde mutasyonların varlığı gösterildiğinden (11) XPE, UV-DDB2 olarak kabul edilmektedir (10). XPE’de UV-DDB1’e ait mutasyon ise tanımlanamamıştır.

UV-DDB1’in pek çok ökaryotik organizmada evrimsel olarak yüksek oranda korunduğu belirtilmektedir. Bununla birlikte UV-DDB2’nin homologlarının yalnızca bazı memeli türlerinde bulunduğu belirtilmektedir (10). Cırtlak sıçanlarda (hamster) ise UV-DDB2 geninin bulunduğu ancak DNA metilasyonu nedeniyle susturulduğu

saptanmıştır (25). Ayrıca farklı dokularda UV-DDB2 geninin ifadenmesinin de farklı seviyelerde gerçekleştiği belirtilmektedir (10).

Her iki alt ünite de kromatinin yeniden organizasyonunda rol oynadığı düşünülen WD40 tekrarları içermektedir (10,19,66).

2.3.1. UV-DDB'nin hücre içindeki lokalizasyonu

Sağlıklı hücrelerde UV-DDB1 sitoplazmada ve çekirdekte bulunmaktadır. UV-DDB2 ise çekirdekte lokalizasyon göstermektedir. UV ışığını takiben UV-DDB1 derişimi çekirdekte artmakta, XPE mutant hücrelerinde ise bu artış gözlenmemektedir. Bu nedenle UV-DDB2 alt biriminin UV-DDB1'in çekirdeğe taşınmasında rol oynadığı düşünülmektedir (10,19,67). DDB diğer tamir faktörlerine göre hücrede daha yüksek seviyelerde (10^5 kopya/hücre) bulunmaktadır (14). Bu da UV-DDB'nin nükleotid eksizyon tamir mekanizması dışında başka işlevleri de olabileceğini düşündürmektedir (15).

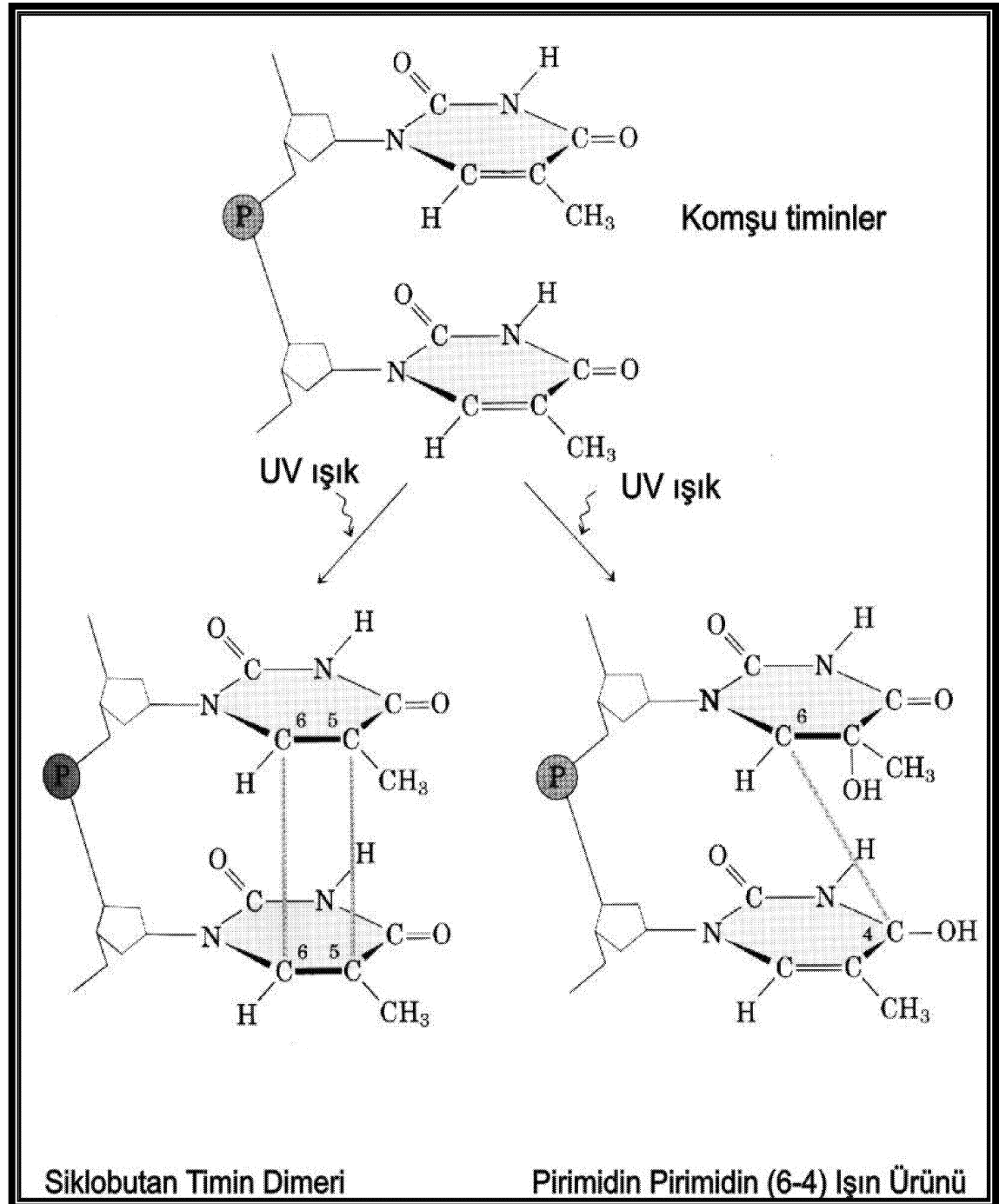
2.3.2. UV-DDB'nin bağlandığı DNA hasarları

UV ışık, genetik yapıyı hasara uğratan çevresel etkenler arasında önemli yer tutmaktadır. DNA ve RNA'daki pürin ve pirimidin bileşenlerinde değişiklikler, atipik kromozomların oluşumu, DNA tamir sentezinin indüklenmesi ve hatta hücre ölümü UV ışığının hücrede meydana getirdiği hasarlar arasında sayılmaktadır (15).

UV ışığına maruziyet sonrası önemli iki DNA hasarı oluşmaktadır. Bunlardan en sık görüleni siklobutan pirimidin dimerleri (CPD)'dir. Bu hasar aynı DNA zincirindeki komşu iki pirimidinin 5. ve 6. C'ları arasında bağ oluşumu sonucu meydana gelir. Pirimidin pirimidon (6-4) ışın ürünlerinde ise genellikle aynı DNA zincirindeki komşu pirimidinler arasında 6. ve 4.C'lar arasında bağ oluşmaktadır (Şekil 2.2) (15,68). Pirimidin pirimidon (6-4) ışın ürünleri CPD'lere göre daha az oranda oluşmaktadır. Bu iki DNA hasarının kanser oluşumunda rol oynayan esas UV ışın ürünleri olduğu kabul edilmektedir. Bunların dışında dayanıksız sitozin hidrat, pürin ürünleri, bölgesel DNA denatürasyon bölgeleri, DNA-protein çapraz bağları ve tek zincir kırıkları UV ışık sonucu oluşan diğer DNA hasarlarıdır (15).

UV-DDB heterodimeri özellikle UV ışığının oluşturduğu DNA hasarına hasarsız DNA'ya göre çok daha yüksek bir ilgi ile bağlanmaktadır. Bunun yanı sıra

sisplatin, nitrojen mustard, sedef hastalığı tedavisinde kullanılan psöralen tarafından oluşturulan DNA hasarları, baz içermeyen (abazik) bölgeler gibi çok çeşitli DNA hasarlarına da bağlanabildiği rapor edilmiştir (Tablo 2.3) (9,10,14,23,69,70).



Şekil 2.2. UV ışığının neden olduğu iki DNA lezyonu. Soldaki şekil CPD'lerin, sağdaki şekil ise pirimidin pirimidon (6-4) ışın ürünlerinin oluşumunu şematize etmektedir (Kaynak 68'den Türkçeleştirilerek alınmıştır).

Tablo 2.3. UV-DDB'nin bağlandığı DNA hasarları ve bu hasarlara ilgisi (+, UV-DDB'nin hasara bağlandığını, + sayısının artması ise hasara ilgisinin de arttığını göstermektedir) (Kaynak 9'dan Türkçeleştirilerek alınmıştır).

DNA hasarı	UV-DDB'nin hasara ilgisi
Pirimidin pirimidon(6-4) ışın ürünü	+++
Trans, syn CPD	++
Abazik bölge	++
Cys, syn CPD	+
Sisplatin eklentisi	+
Nitrojen mustard eklentisi	+
Tek zincirli DNA	+
4-Nitrokinolin oksit eklentisi	+

2.3.3. UV-DDB'nin hücredeki işlevleri

2.3.3.i. UV-DDB'nin nükleotid eksizyon tamir mekanizmasındaki işlevleri

DDB kompleksinin nükleotid eksizyon tamir mekanizmasındaki işlevi tartışmalıdır. XPE geninde mutasyon bulunduran XPE'li hastalarda eksizyon tamirinde yaklaşık % 50 oranında azalma olduğu rapor edilmiştir (15,71,72). XPE mutant hücrelerine saflaştırılmış UV-DDB'nin mikroenjeksiyonu bu hücrelerdeki nükleotid eksizyon tamir mekanizmasındaki hasarı düzeltmektedir (71). Gen susturulması nedeniyle UV-DDB2 aktivitesinin görülmediği kemirgen hücre hatlarında insan UV-DDB2'sinin ektopik olarak ekspresyonu, bu hücrelerde CPD'lerin eksizyon ile tamirini arttırmaktadır (73).

Hücre çekirdeğine bölgesel olarak UV radyasyonu verildiğinde ortamda XPC proteininin bulunmadığı durumda bile UV-DDB çekirdekte birikmektedir (74). Bu bulgular DDB kompleksinin nükleotid eksizyon tamir mekanizmasında özellikle hasarın tanınması basamağında rol oynayabileceğini desteklemektedir (10).

XPE hücre hatlarında yapılan hücreden yoksun ekstraktlarda eksizyon tamirinin bozuk olduğu rapor edilmiştir (15,71,72). Bununla birlikte UV-DDB'nin tepkime ortamına eklenmesi bu bozukluğu düzeltmemekte, yüksek dozlarda ise eksizyon tamir mekanizmasının etkinliğini azaltmaktadır (75). UV ışığı uygulamasını takiben nükleotid eksizyon tamir mekanizması sürecinin 36 saat içinde tamamlanmasına rağmen, UV-DDB protein seviyelerinin maksimum düzeye 48 saat sonra ulaşması (24), UV-DDB'nin bu mekanizmada esas rolü oynayamayacağı tezini güçlendirmiştir. Bu proteinin nükleotid eksizyon tamir mekanizmasının ana eksizyon nükleaz faktörlerinden biri olarak kabul edilemeyeceği rapor edilmiştir (38).

UV-DDB'nin çeşitli DNA hasarlarına yüksek ilgiyle bağlandığı bilinmekle birlikte hangi alt biriminin DNA bağlayıcı ana birim olduğu da tartışmalıdır. Hwang ve diğ. (1998), DNA hasarına bağlanma için UV-DDB2'nin aktive ettiği UV-DDB1'in hasara bağlanan ana alt birim olduğunu bildirmişlerdir (25). UV-DDB ve UV-DDB1'den zenginleştirilmiş fraksiyonlarda ayrı ayrı yapılan DNA "footprinting" çalışmalarında 2 farklı "footprint" gözlenmiştir (23). Fujiwara ve diğ. (1999) her iki alt birimin DNA - protein kompleksinde bulunduğunu öne sürmektedirler (70). Nichols ve diğ. de (2000) UV-DDB kompleksi ile hasara bağlanmanın gerçekleştiğini belirtmektedirler (24). Bu bulgulardan farklı olarak Fitch ve diğ. ise (2003) UV-DDB2 alt biriminin hasarlı DNA'ya afinitesinin yüksek olduğunu öne sürmüşlerdir (26). DNA'ya bağlanma için her iki alt birimin gerekip gerekmediği, her iki alt birimin DNA-protein kompleksi içinde bulunup bulunmadığı, yahut bir tek alt birimin bağlanması durumunda bu bağlanma için diğer alt birimin ortamda varlığının gerekip gerekmediği soruları henüz yanıt beklemektedir.

2.3.3.ii. UV-DDBB'nin kromatin modellenmesindeki işlevleri

Nükleotid eksizyon tamir mekanizmasının gerçek substratının kromatin olması, nükleozom yapısının tamir sürecinde düzenleyici olarak rol oynadığını düşündürmektedir. DNA tamir sürecinde kromozomun yeniden modellenmesi gereklidir. Kromozomun modellenmesi sürecinde DNA-histon etkileşimi ya SWI/SNF2, ISWI (imitation switch) gibi çeşitli komplekslerle ya da histonların kovalent modifikasyonu (asetilasyon, fosforilasyon, metilasyon ve ubikuitinasyon

vb.) gerçekleşir (76-79).

UV-DDB2'nin histonda asetillenme yapan histon asetil transferaz ailesinden “c-AMP Regulated Enhancer Binding Protein / p300 (CBP/p300)” ile (80); UV-DDB1 ve UV-DDB2'nin ise transkripsiyon koaktivatörü ve histon asetil transferaz kompleksi SPT3-TAF_{II}31-GCN5L asetilaz (STAGA) ile ilişkisi olduğu belirtilmektedir (81). UV-DDB2 yapısında yer alan WD40 tekrarları kromatinin yeniden yapılanması için gerekli olan protein ailesindeki WD40 tekrarlarıyla uyum göstermektedir (66). UV-DDB'nin kromatinin modellenmesinde rol oynayan proteinlerle etkileşimi (80,81) ve Cul4A ile ilişkisi (16), DDB heterodimerinin DNA tamiri sürecinde kromatinin yeniden modellenmesinde rol oynayabileceği hipotezini desteklemektedir.

2.3.3.iii. UV-DDB'nin transkripsiyondaki işlevleri

Bazı XPE hastalarında transkripsiyon faktörü E2F1'in tetiklediği transkripsiyonun gerçekleşmediği belirtilmektedir (19). UV-DDB2'nin E2F1 ile ve transkripsiyon ko-aktivatör özelliği de olan CBP/p300 ve STAGA kompleksi ile ilişkisi transkripsiyonda da rolü olabileceğine işaret etmektedir (80,81).

DNA hasarına cevap olarak hücrelerde p53 fosforile olmakta ve proteazomal yıkıma dirençli hale gelmektedir. Bu da hücre döngüsünü durduran, DNA tamir mekanizmalarında rol oynayan ve apoptoza neden olan genlerin transkripsiyonunu arttırmaktadır (82,83).

p53'ün UV-DDB2'nin transkripsiyon-düzenleyici bölgesiyle etkileşime girerek UV-DDB2'nin transkripsiyonunu ve CPD'lerin tamirinde rol oynayan nükleotid eksizyon tamir mekanizmasının etkinliğini arttırdığı rapor edilmiştir (84). UV-DDB2'nin geri beslemeli bir mekanizmayla p53'ün kararlılığını sağladığı düşünülmektedir (85). XPE hücrelerinde normal hücrelere göre UV ışığını takiben p53'ün aktivasyonunun azaldığı rapor edilmiştir. Bu da hücreleri apoptoza dirençli hale getirmektedir (85,86).

UV-DDB1'in ayrıca kuvvetli transkripsiyon aktivatörü olduğu bilinen Hepatitis B virüsü X proteini ile de etkileşime girdiği bildirilmektedir (87).

2.3.3.iv. UV-DDB'nin tümör oluşumunu engelleyici rolü

XPE'li hastalarda, diğer XP gruplarına göre daha ılımlı fotosensitivite gözlenmekle birlikte, deri kanserleri sıklığının, normal kişilere göre yüksek olduğu bulunmuştur (10). İlgi çekici olarak XPE geninin “knockout” edildiği farelerde yalnızca cilt kanserleri değil aynı zamanda iç organ kanserleri sıklığı da artmaktadır. UV-DDB'nin tümör önleyici etkisinin olduğu, bu işlevini nükleotid eksizyon tamir mekanizması dışında başka yollar üzerinden gerçekleştirdiği düşünülmektedir (18). Hücre siklusunun transkripsiyon sırasında durmasında ve apoptozda rol oynayan p53, UV-DDB2'nin transkripsiyonunu ve CPD'lerin tamirinde rol oynayan nükleotid eksizyon tamirinin etkinliğini arttırmaktadır (26,84). UV-DDB2 seviyesi transkripsiyonel olarak ve muhtemelen p53'den bağımsız bir mekanizma ile tümör baskılayıcı BRCA1 (Breast cancer 1, early onset) tarafından da aktive edilmektedir (88,89). UV-DDB2'nin UV ışığına maruziyet sonrası p53 seviyesini kararlı tutma özelliğinin olduğu düşünülmektedir (85,90).

2.3.3.v. UV-DDB'nin hücre döngüsündeki işlevleri

Ubikuitin proteazom sistemi hücre döngüsünün ilerlemesi ve transkripsiyonun düzenlenmesinde çok önemli rol oynamaktadır. UV-DDB'nin, ubikuitinasyon için gerekli hedefleri belirleyen E3 ubikuitin ligaz ailesinden olan Cul4A ile ilişkili olduğu bulunmuştur (16). Cullin'lerin, hücre döngüsünün düzenleyici proteinleri olduğu düşünülmektedir. Cullin bağımlı E3 ubikuitin ligazlar evrimsel olarak korunmuş N-uç bölgeleri aracılığıyla doğrudan veya adaptör bir protein yardımıyla özgüllük oluşturan bir faktöre bağlanmakta, bu şekilde özgül substratı çekmektedir (91,92).

UV-DDB'nin ayrıca UV ışık sonrası ubikuitin ligaz aktivitesini düzenleyen COP9 (CSN) sinyalozum kompleksi içinde de yer aldığı rapor edilmiştir. UV ışık sonrası sinyalozum kompleksinden ayrılan UV-DDB1/UV-DDB2/Cul4A kompleksinin kromatine bağlandığı belirtilmektedir. UV-DDB1'in transkripsiyona kenetlenmiş tamir mekanizmasında yer alan CSA proteini ile de COP9 sinyalozum kompleksi ile birlikte kompleks oluşturması dikkat çekicidir (17).

2.3.3.vi. UV-DDB'nin olası diğer işlevleri

UV-DDB'nin ayrıca bazı viral enfeksiyonların patogeneğinde (87,93) ve Alzheimer hastalığında nöronal dejenerasyonda (94) rol oynayabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte DDB'lerin işlevleri henüz tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır.

2.4. Ubikuitin proteazom sistemi (UPS)

Hücrede proteinlerin uygun zamanda ve etkin olarak yıkımı hücrelerin normal işlevlerinin devamı için gereklidir. Ökaryotlarda hücre içi proteinlerin yıkımı iki yolla gerçekleşir: Hücre zarına kenetlenmiş ve uzun ömürlü proteinler hücre lizozomlarında ATP'den bağımsız bir mekanizma ile yıkılırlar. Bunun aksine, yanlış sentezlenmiş, anormal proteinlerin veya hücre döngüsünde gereksinim duyulmayan, işlevlerini tamamlamış diğer kısa ömürlü proteinlerin yıkımı sitozolde, ATP varlığında gerçekleşir. Memeli sitozolünde benzer bir çok sistem bulunmakla birlikte en bilineni parçalanması gereken proteini “ubikuitin” adı verilen kısa bir polipeptit kullanarak işaretleyen “ubikuitin proteazom sistemi (UPS)”dır (68,95,96). Düzenleyici proteinlerin ubikuitin aracılı yıkımı hücre döngüsünün ilerlemesi, sinyal iletimi, transkripsiyonun düzenlenmesi, reseptörlerin “aşağıdüzetlenimi (down regülasyon)” ve endositoz gibi önemli olaylarda çok büyük rol oynamaktadır. Ayrıca DNA tamirinde, immün cevap gelişiminde, programlı hücre ölümünde de rol oynadığı düşünülmektedir. Ubikuitin aracılı yıkımdaki anormallikler, maligniteler dahil pek çok patolojinin gelişiminde rol oynamaktadır (97).

Ubikuitin, ökaryotların tüm hücrelerinde yer alan, evrimsel olarak büyük oranda korunmuş 76 amino asitten oluşan bir polipeptiddir. Bu polipeptid, üç enzim içeren bir ardışık etkileşim ile proteinlere kovalent olarak bağlanmaktadır. İlk olarak ubikuitinin karboksil grubu “ubikuitin aktive edici enzim (E1)”in sistein kalıtına yüksek enerjili tiyoester bağıyla ATP bağımlı bir mekanizma ile bağlanır. Daha sonra yüksek enerjili bir bağla ubikuitin “ubikuitin bağlayıcı” bir ikinci enzim (E2) üzerindeki tiyole E2 enzimi aracılığıyla aktarılır. Bu enzim de (E2) üzerindeki ubikuitinin karboksil grubu ile hedef proteindeki lizinlerin ϵ -amino grubunu, izopeptid bağı oluşturmak üzere bağlar. “Ubikuitin ligaz (E3)” adı verilen üçüncü bir enzim grubunun ise E2 ile birlikte ubikuitinasyon için hedeflenecek proteinin

bölgeleri aracılığıyla bir tür küçük “RING-finger” proteini olan “ROC (Ring of Cullins)” proteinlere bağlanarak işlev görmektedirler (99,100).

Bütün Cullin’ler 120 kDa’luk CAND1 (Cullin Associated and Nedylation - Dissociated protein 1) adı verilen bir protein tarafından kontrol edilmektedirler. CAND1 işlevsel E3 komplekslerinin oluşmasını engellemektedir (101).

Cullin’lerin karboksil uçlarına ubikuitin benzeri küçük proteinler (Neural Precursor Cell Expressed, Developmentally Down-regulated gene 8, (NEDD8)) kovalent olarak bağlanmaktadır. Bu işlem “nedilasyon” olarak isimlendirilmektedir. Cullin’in nedilasyonu olduğunda CAND1 proteini Cullin’lerden ayrılmakta, işlevsel E3-substrat kompleksleri oluşabilmektedir. Böylece Cullin’lerin aracılık ettiği ubikuitinlenme ve yıkım gerçekleşmektedir. Ubikuitinlenmiş substrat protein proteazomda yıkıldığında COP9 sinyalozum kompleksi denilen 8 alt birime sahip protein kompleksi konjuge olmuş NEDD8’i ortamdan ayırmakta, böylece CAND1 yeniden Cullin’lere bağlanabilmektedir. Bu düzenlenme temel Cul-ROC kompleksi için hız kısıtlayıcı temel basamağı oluşturmaktadır (101,103,104).

Memelilerde birbirleriyle yakın ilişkili 2 tip Cul4 bulunmaktadır (Cul4A ve Cul4B). Cul4A geninin işlevinin yitirilmesi *Caenorhabditis elegans* embriyolarında DNA replikasyonunda artış, DNA replikasyonuna izin veren “CDT1 (Cell division cycle - 10 dependent transcript)”’in birikimi ile sonuçlanmaktadır. Bu da Cul4’ün DNA replikasyonu ve genomik kararlılığın kontrolünde işlevi olduğunu düşündürmektedir (105). DNA hasarına yanıt olarak UV-DDB1 direkt olarak “CDT1”i Cul4A-ROC1 ligaza ubikuitinlenme için çağırır (106). Cul4 geninin bulunmaması fare embriyoları için yaşamla bağdaşmamaktadır. Cul4’ün bu nedenle erken embriyonik gelişim sürecinde rol oynadığı belirtilmektedir (107). Cul4A’nın primer hepatosellüler karsinomalarda (108) ve meme kanserlerinde (109) artmış miktarda üretilmesi nedeniyle malignitelerle ilişkili olduğu da gösterilmiştir.

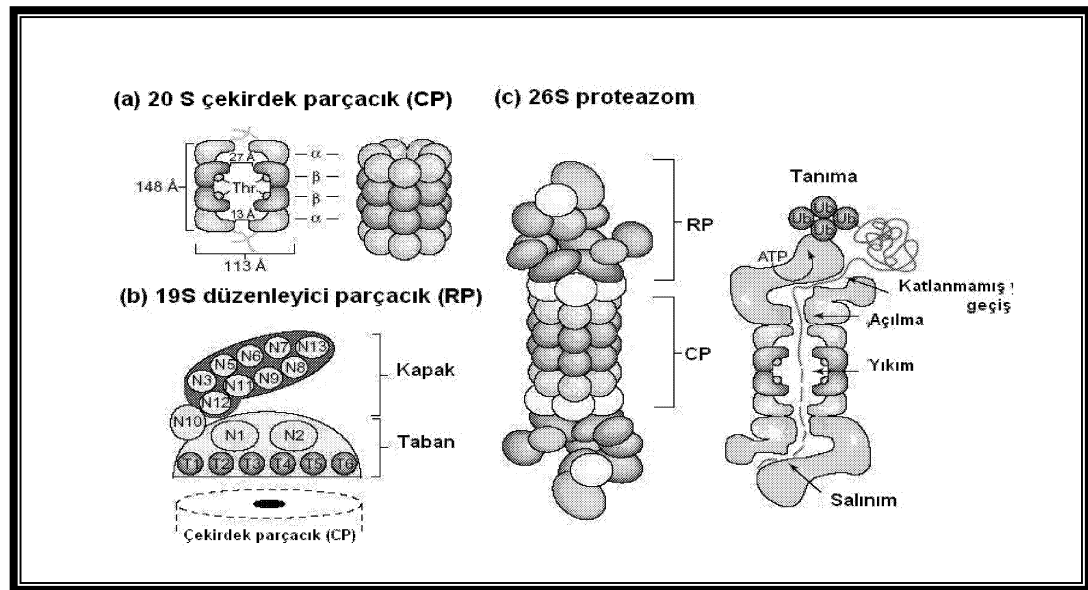
Çalışmalar UV-DDB1, UV-DDB2 ve XPC proteinlerinin, Cul4A’nın aracılık ettiği ubikuitinasyon yolu ile yıkıldığını göstermiştir (110,111). Cul4A’nın DDB heterodimeri ve onunla etkileşime giren DNA tamiri ve hücre döngüsü proteinlerini hedefleyebileceği düşünülmektedir (16). DDB heterodimerinin hasarın tanınması basamağında işlevi olabileceğinin düşünülmesi, bu proteinle etkileşimde olan

Cul4A'nın da nükleotid eksizyon tamirinde, özellikle de hasarın tanınması basamağında işlevi olabileceğini düşündürmektedir (16).

2.5. COP9 (CSN) sinyalozum kompleksi

COP9 kompleksi evrimsel yönden ubikuitin proteazom sistemi ile paralel olarak korunmuş protein kompleksidir. İlk olarak su teresinde (*Arabidopsis*) tanımlanmış olan COP9 kompleksinin bu canlılarda fotomorfogenezisin düzenleyicisi olduğu belirlenmiştir (112). Ökaryotlarda ise hücresel ve gelişimsel olaylara katıldığı düşünülmektedir. Bu kompleksin alt birimlerinin 26S proteazom kompleksi ve ökaryotik translasyon inisiasyon faktörü 3 (eIF3) ile ilişkili olduğu bulunmuştur.

COP9 kompleksi 450-550 kDa'luk bir protein kompleksidir. Altısı PCI (Proteazom, COP9 sinyalozum, İnisiyasyon faktörü 3), ikisi MPN (mpr1p, pad1p, N-terminal) bölgesi içeren sekiz alt birimden (COP9 sinyalozum alt birimi 1-8, (CSN1-8)) oluşmaktadır. Alt birimler insanda, meyve sineğinde (*Drosophila*), farede, su teresinde korunmuştur. Memelilerde CSN7, CSN7a ve CSN7b isimli iki benzer gen tarafından kodlanmaktadır. PCI ve MPN bölgelerinin hem COP9 alt birimlerinde, hem de 26S proteazom kompleksi ve eIF3'de bulunması oldukça ilgi çekicidir. 26S proteazom sistemi 20S'lik katalitik çekirdek parçacık (CP) ve 19S düzenleyici parçacıklardan (RP) oluşmaktadır (Şekil 2.4) (112,113). Kapak kısmı 19S'lik RP'nin



Şekil 2.4. 26S proteazom sistemi ve bölümleri (Kaynak 113'den Türkçeleştirilerek alınmıştır).

dış kısmında yer alır ve ubikuitinlenmiş proteinlerin katalitik çekirdek parçacığına gönderilip yıkılması için gereklidir (112).

Çalışmalar MPN bölgesinin, içinde metalloproteinaz motifi içerdiğini göstermiştir. Bu motif NEDD8 - Cullin kompleksinin COP9 kompleksinden ve ubikuitin substratın proteazomdan ayrılmasını sağlayan katalitik bir merkez oluşturmaktadır (112).

COP9'un bir çok Cul üzerindeki de-nedilasyon yapıcı etkisi, ROC1 ve Cul'lerle doğrudan etkileşimi olması nedeniyle Cul bazlı E3 ubikuitin ligazların genel düzenleyicileri olduğunu göstermektedir. Farklı Cul'leri içeren farklı E3 ligazların da bu yolla yıkılan pek çok hücre döngüsünü düzenleyici proteini etkilediği düşünülürse COP9'un hücredeki rolünün önemi anlaşılabilir (112).

Amaçlar:

Bu çalışmanın amacı genel olarak insan hücrelerinin DNA hasarına karşı davranışının moleküler mekanizmalarının aydınlatılmasına katkıda bulunmaktır.

Çalışmada iki soruya yanıt aranmaktadır:

1. UV-DDB'nin hasarlı DNA'ya bağlanma aktivitesinden esas olarak alt birimlerinden hangisinin ve/veya hangilerinin sorumlu olduğunu belirlemek,
2. Hücrede dört formda bulunan XPE (UV-DDB2) proteininin, serbest haldeyken, UV-DDB1 ile UV-DDB kompleksi halindeyken, Cul4A ve COP9 kompleksleriyle süper kompleks oluşturduğunda hasarlı DNA'ya bağlanma özelliklerinin belirlenmesi, böylece nükleotid eksizyon tamir mekanizmasında hasarın tanınma basamağında işlev görebileceği düşünülen bu süper komplekslerin rolünün aydınlatılmasını sağlamak.

Bu amaçla UV-DDB alt birimleri ayrı ayrı ve heterodimer kompleksi olarak böcek hücre hatlarında çok miktarda üretilip saflaştırıldı ve pirimidin pirimidon (6-4) ışın ürününe bağlanma özellikleri değerlendirildi. Ayrıca, UV-DDB/Cul4A, UV-DDB/Cul4A/COP9 sinyalozum süper kompleksleri memeli hücre hatlarından elde edilerek pirimidin pirimidon (6-4) ışın ürününe bağlanma özellikleri incelendi.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Gereçler

Deneyler sırasında kullanılan akrilamid, bisakrilamid, agar, glasiyal asetik asit, Tween 20, “Dulbecco’s Modified Eagles Medium” (DMEM), Fötal Dana Serum (Fetal Bovine Serum, FBS) Sigma’dan, izopranolol, metanol Merck’den, Grace’ in böcek besi yeri, ve Tuzlu Fosfat Tamponu (Phosphate buffered saline, PBS), Penisilin-Streptomisin (PS) 100 x, tripsin ise Gibco’dan temin edildi.

Proteinlerin bağlı molekül kütlelerini (M_r) belirlemek için New England Biolabs’a ait “Prestained Protein Marker” (6-175 kDa aralığında) ve jel yükleme boyası, DNA için ise Promega’ya ait “1kb DNA ladder” ve jel yükleme boyası kullanıldı.

Gen klonlama için gerekli pcDNA3 vektörü ve Platinum® *Pfx* DNA polimeraz (*Thermococcus sp.* DNA polimerazı) Invitrogen’den, restriksiyon tamponları (New England Biolabs’a ait restriksiyon tamponu (NEB)) ve enzimleri, 100 x sığır serum albümini (Bovine Serum Albumin, BSA; 10 mg/ml) New England Biolabs’dan, Karides Alkalen Fosfatazi (ALP) (kat. no: 1758250) ve Hızlı DNA Bağlama Kiti (Rapid Ligation Kit, kat. no: 1635379) Roche’dan temin edildi. PCR saflaştırma kiti (QIAquick PCR Purification Kit, katalog no: 28104), Miniprep kiti (QIAprep Spin Miniprep Kit, katalog no: 27104), Maksiprep kiti (Qiagen Qiafilter Midi-Maxi Kit, katalog no: 12163) Qiagen’e aitti. “Western blotting” için Amersham’a ait “Hybond 20 cm x 30 cm nitrosellüloz membran”, Sigma’ya ait “Flag” antikor ve Promega’ya ait nitro blue tetrazolium / 5-bromo-4-kloro-3-indolil fosfat (NBT / BCIP) renk tanımlama sistemi (kat. no: W3940) kullanıldı. UV-DDB1’e, UV-DDB2’ye ve Cul4A’ya karşı antikorlar Dr. Xiong’dan (North Carolina Üniversitesi, Lineberger Kanseri Merkezi)’den temin edildi. UV-DDB1-pBac/PAK8 rekombinant virüsü Dr. S. Linn’den (California Üniversitesi, Berkeley), His.UV-DDB2.Flag-p2Bac rekombinant virüsü ve 50 baz çiftlik (bç) DNA substratları ise Dr. J. T. Reardon’dan temin edildi.

Saflaştırma işlemi sırasında P11 Fosfocellüloz (Whatman), DEAE-Sepharose (GE-Healthcare), Superdex 200 10/300 GL (S-200; GE-Healthcare), “Anti-Flag (M2) antibody affinity resin” (Sigma), “Flag” peptidi (Sigma) kullanıldı.

Protein derişiminin ölçümü için Bradford yöntemine dayalı olarak ölçüm yapan Bio-Rad protein ölçüm kitinden (Bio-Rad protein assay kit II, kat. no: 500-0002) yararlanıldı. Ayrıca proteinler ve BSA standartları % 10'luk SDS-PAGE'de yürütülerek ayrıştırıldıktan sonra, gümüş boyası ile boyanarak, "Image Quant 5.2" sistemi ile de (GE Healthcare) proteinlerin derişimleri ve göreceli oranları belirlendi.

Deneyler sırasında PCR için Perkin-Elmer Gene Amp 2400, spektrofotometrik ölçümler için Shimadzu UV1601, santrifugasyon için Sorwall RC 3C plus, Sorvall RC 5C plus (du Pont), iletkenlik ölçümü için "Fisher Scientific 09-328" geniş aralık iletkenlik ölçüm sistemi, sonikasyon için "Sonic Dismembrator", bazı saflaştırma basamaklarında AKTA FPLC sistemi kullanıldı.

"Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)" deneylerinde görüntüleme ve ölçüm için "Storm 860" ve "Image Quant 5.2" (GE Healthcare) paket programından yararlanıldı.

3.2. Bakülovirüs / böcek hücre sisteminde rekombinant protein üretimi için yapılan çalışmalar

İnsan UV-DDB1, UV-DDB2 proteinleri ve UV-DDB kompleksi bakülovirüs ekspresyon vektör sisteminde (BEVS) çok miktarda üretilerek saflaştırıldı. BEVS'de ilgilenilen gen, bakülovirüs promotörü içeren taşıyıcı vektöre klonlandıktan sonra ana virüsün genomuna "homolog rekombinasyonla" yerleştirilmektedir. Böcek hücre hatları, elde edilen bu rekombinant virüsle enfekte edilerek hücre hatlarında çok miktarda rekombinant protein üretimi sağlanmaktadır. Böcek hücre hatlarının rekombinant protein üretilmesi için kullanılması; kolaylığı, ucuz olması, bu hücre hatlarında proteinlerin doğru katlanmasına ve fizyolojik olarak gerçekleşen pek çok posttranslasyonel modifikasyona izin vermesi yönünden tercih edilmektedir (114,115).

Bu çalışmada

1. İnsan UV-DDB1,

2. İnsan His.UV-DDB2.Flag,

3. İnsan UV-DDB proteinleri bakülovirüs / böcek hücre sisteminde çok miktarda üretildi ve saflaştırıldı.

İnsan UV-DDB1 rekombinant proteini *Spodoptera frugiperde* (sf21) böcek

hücre hatlarında çok miktarda üretildi ve Nichols ve diğ.lerinin yöntemi (24) değiştirilerek saflaştırıldı. Bu amaçla 2.5×10^8 sf21 hücresi 2.5 ml UV-DDB1-pBac/PAK8 virüsü ile enfekte edildi (“Multiplicity of Infection” (MOI); hücre başına düşen ortalama virüs sayısı: 10) ve hücre hatları 48 saat süreyle 27°C’de inkübe edilerek UV-DDB1 proteininin çok miktarda üretilmesi sağlandı. Hücreler toplanarak hücre zarları sonikasyonla parçalandı. Elde edilen lizat önce P11 fosfosellüloz kolonuna uygulandı., Fraksiyonlardan alınan örnekler % 10’luk SDS-poliakrilamid jel elektroforezine (SDS-PAGE)’e yüklendi ve yürütüldü. Protein bantları “Coomassie brilliant blue R-250” ile boyandı. Bu şekilde UV-DDB1 içeren örnekler belirlendi. Bu örnekler toplanarak sırasıyla DEAE-Sepharose kolonuna uygulandı. Kolondan UV-DDB1, 35 ml 50-600 mM fosfat tamponu (belirtilen molaritede fosfat tamponu pH 7.5, 1 mM dTT, % 10 (h / h) gliserol) ile lineer gradient uygulanarak elüe edildi. Ardından, UV-DDB1 içeren örnekler toplanıp deriştirildikten sonra Superdex 200 kolonuna uygulandı. Her aşamada elde edilen örnekler % 10’luk SDS-PAGE’de yürütüldü ve protein bantları “Coomassie brilliant blue R-250” ve / veya gümüş boyama yöntemi ile boyandı. Bu şekilde UV-DDB1 içeren örnekler belirlendi. Süperdex 200 kolonu sonrası UV-DDB1 içeren örnekler toplandı ve “Amicon-30” filtresi kullanılarak deriştirildi. Protein miktarları Bradford yöntemine dayalı Bio-Rad protein ölçüm kiti ile belirlendi.

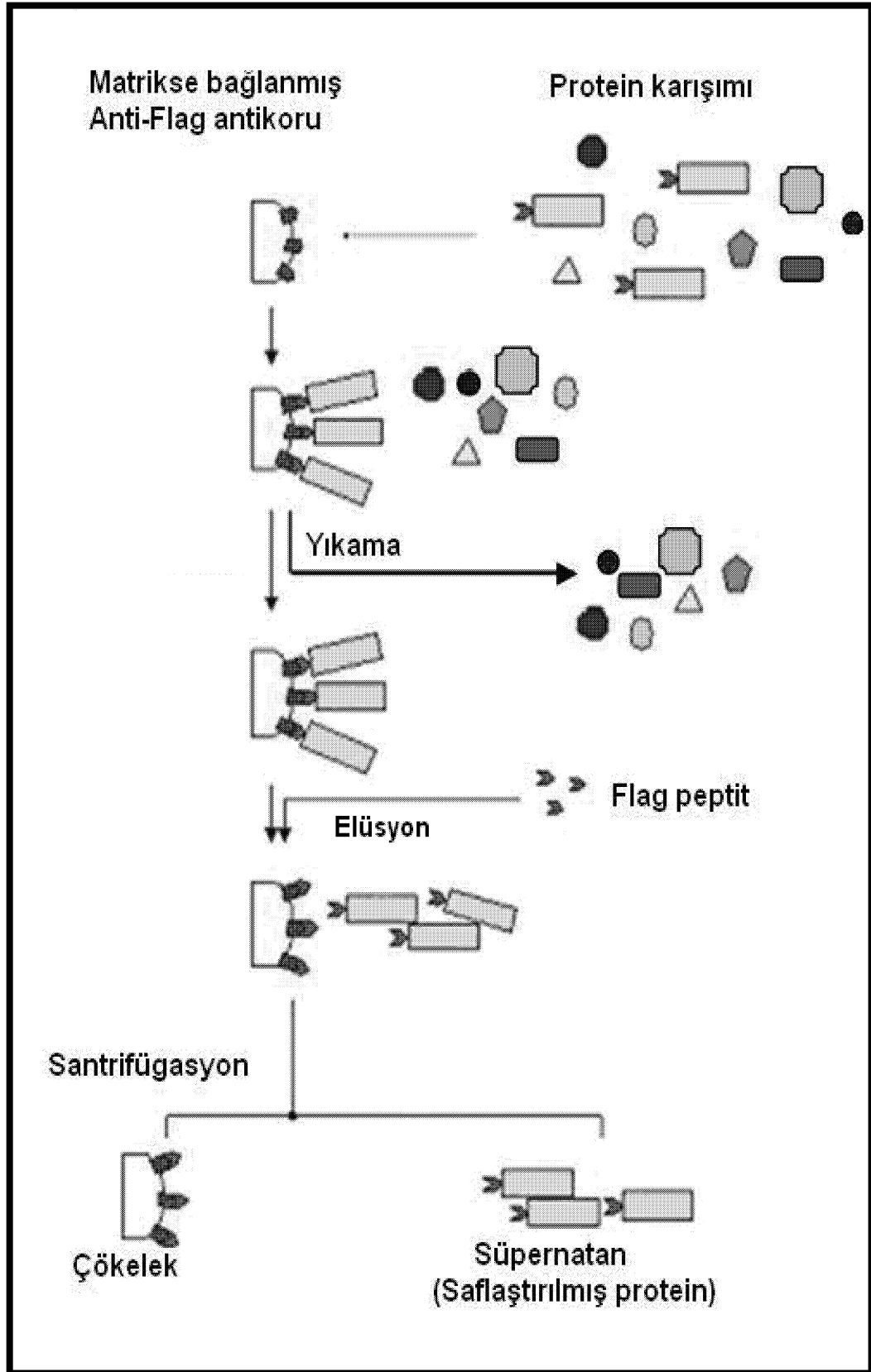
Rekombinant His.UV-DDB2.Flag proteininin ve UV-DDB proteinlerinin çok miktarda üretimi *Tricoplusia ni* yumurta (High-Five) (H-5) hücre hatlarında gerçekleştirildi. Proteinler, “Flag” etiketine karşı oluşturulmuş antikor - afinite kolonu yöntemi kullanılarak saflaştırıldı. Bu yöntemde ilgilenilen proteinin uç bölgesine “Flag” adı verilen sekiz amino asitlik (AspTyrLysAspAspAspAspLys) immünojenik özellikte ve suda çözünebilir küçük bir protein eklenmektedir. Suda çözünmeyen bir matrikse de “Flag” proteinine karşı oluşturulmuş “anti-Flag” antikorlar kovalent olarak bağlanarak reçine oluşturulmaktadır. Protein karışımı, bu reçineyi içeren kolondan geçirildiğinde “Flag” işaretli protein, “anti-Flag” antikorunu bulunduran reçineye bağlanmaktadır. Reçineye bağlanmayan proteinler yıkanarak uzaklaştırıldıktan sonra “Flag” işaretli protein”, “Flag” peptid içeren elüsyon tamponuyla saf olarak elde edilir. “Flag” peptid, “Flag” işaretli protein ile yarışmaya

girerek hedef proteinin matriksten ayrılmasını sağlamaktadır. “Flag” işaretli proteinlerle etkileşime giren diğer proteinler de proteine bağlı olarak bu şekilde proteinle birlikte saflaştırılabilir. Flag etiketinde tripsinojen ön dizisinin bulunması enterokinazla muamele edilerek saflaştırma sonrası etiketin proteinden uzaklaştırmasına olanak vermektedir. Etiketle işaretlemeye dayalı antikör-afinite kolon kromatografisi proteinin tanımlanmasını kolaylaştırmakta ve tek basamakta saflaştırmaya olanak vermektedir (116) (Şekil 3.1).

Çalışmada rekombinant His.UV-DDB2.Flag proteini elde etmek için, 2 ml His.UV-DDB2.Flag-p2Bac ile enfekte edilmiş 2×10^8 “High Five” hücrelerinde (MOİ: 10) rekombinant UV-DDB2 proteininin üretimi sağlandıktan sonra hücreler toplandı. Hücre zarı zar parçalama tamponu ile (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 10 mM β -gliserofosfat, % 10 (h / h) gliserol, % 1 Tween 20, % 0.1 NP-40, 1 mM Na_3VO_4 , 1 mM NaF) parçalandı ve soğuk odada buzda 30 dakika süreyle inkübe edildi. On kez 50 Watt’da sonike edildikten sonra (10 sn bekleme, 50 sn sonikasyon) 10 dakika daha buzda soğuk odada inkübe edildi. Böylece hücre zarları parçalanarak hücre lizatı elde edildi. Lizat 16 000 x g’de 30 dakika süreyle santrifüj edildi. Süpernatant alındı. UV-DDB2 proteininin ekspresyonu “Western blotting” ile kontrol edildi.

UV-DDB2 proteini, “Flag” epitopuna karşı antikör-afinite kromatografisi ile saflaştırıldı. Elde edilen hücre lizatına (16 000 x g süpernatantı) 250 μ l “Flag” reçinesi eklendi, +4°C’de 16 saat süre ile karıştırıcıda bırakılarak reçineye bağlanması sağlandı. Ardından reçine çöktürüldü ve yüksek tuz derişimindeki (1 M NaCl) tamponla yıkandı. Bu şekilde, reçineye özgül olarak bağlanmayan proteinlerin uzaklaştırılması amaçlandı. “Flag” peptid içeren elüsyon tamponu ile (100 μ g / ml “Flag” peptid, TBS ve % 10 (h / h) gliserol) UV-DDB2 proteini indirildi. Elüat % 10’luk SDS-PAGE’de yürütüldü. Proteinin ekspresyonu “Western blotting” ile, elüsyon sonrası elde edilen protein bantları ise “Coomassie blue” boyaması ile belirlendi. Protein derişimleri Bio-Rad protein ölçüm kiti kullanılarak saptandı.

UV-DDB2 ve onunla birlikte elüe edilen diğer proteinler North Carolina



Şekil 3.1. “Flag” epitopuna karşı antikor-afinite kromatografisinin prensibi.

Üniversitesi “Proteomics Core Facility”de kütle spektrofotometrisi (Mass spectrometry) ile test edildi. Diğer proteinler DNA’ya bağlanma özelliği olmayan “ısı şoku” proteinleri olarak saptandı.

Western blotting

SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi



Proteinlerin nitrosellüloz membrana transfer edilmesi



Özgül olmayan bağlanmayı önlemek amacıyla % 5 yağsız
süt tozu içeren TBST tamponu (150 mM NaCl, 20 mM
Tris-HCl pH 7.5, % 0.5 Tween 20) ile inkübasyon



TBST tamponu ile yıkama



Proteine veya içerdiği füzyon proteinine özgül primer antikor ile inkübasyon.



TBST tamponu ile yıkama



Anti Ig G içeren antikor-enzim konjüгатı (ikincil antikor) ile inkübasyon



TBST tamponu ile yıkama



NBT / BCIP sistemi ile renk değişiminin gözlenerek protein ekspresyonunun
görüntülenmesi.

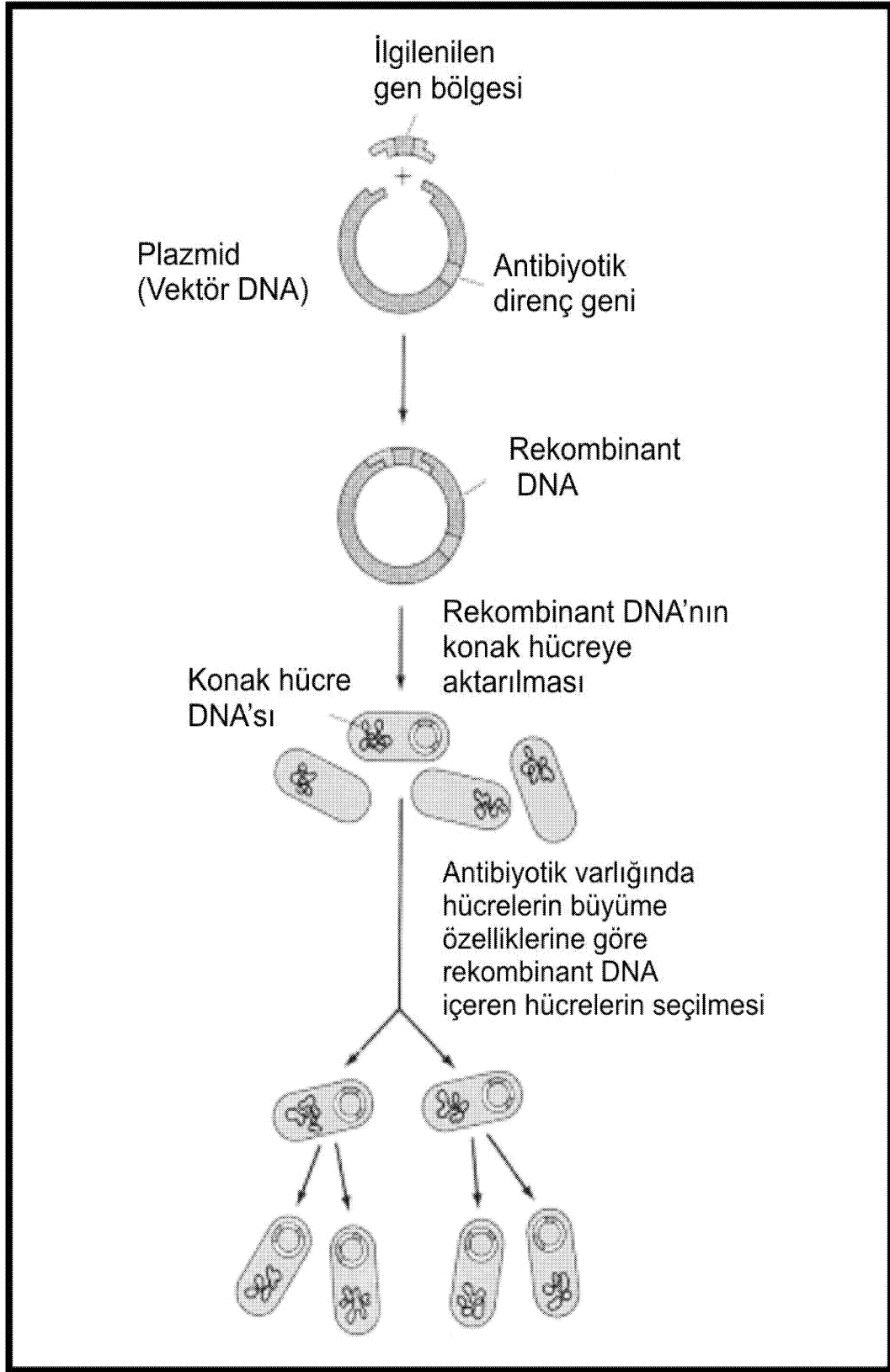
UV-DDB proteininin çok miktarda üretilmesi ve saflaştırma basamakları UV-DDB2 proteinininkine benzer şekilde gerçekleştirildi. Farklı olarak sf21 hücre hatları UV-DDB1-pBac/PAK8 ve His.UV-DDB2.Flag-p2Bac virüsleriyle aynı anda enfekte edildi. 2.5×10^8 sf21 hücresi, 1.25 ml UV-DDB1-pBac/PAK8 (yaklaşık MOİ: 5) ve 1.25 ml His.UV-DDB2.Flag-p2Bac (MOİ: 5) rekombinant virüsleriyle aynı anda enfekte edildi.

3.3. İnsan embriyonik böbrek 293T (HEK293T) hücre hatlarında rekombinant protein üretimi için yapılan çalışmalar

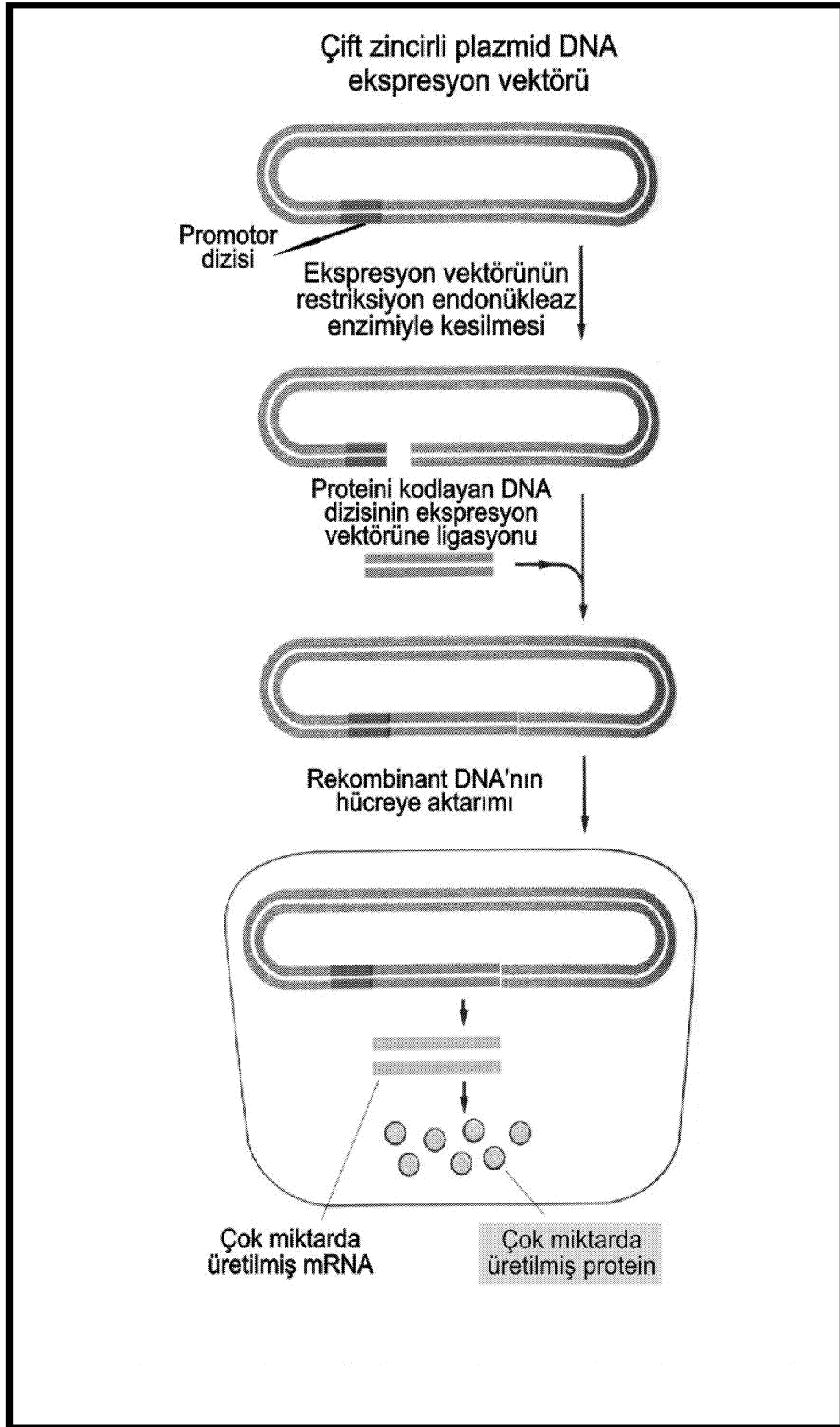
İnsan UV-DDB2 ve Cul4A genleri, bu genlerin 5' yönlerinde "Flag" epitopu eklenecek şekilde memeli pcDNA3 vektörüne ayrı ayrı klonlandı. Elde edilen rekombinant plazmidler, HEK293T hücrelerine aktararak proteinlerin çok miktarda üretilmesi sağlandı. Rekombinant Flag-Cul4A'nın çok miktarda üretildiği hücre hatları Cul4A/UV-DDB1/UV-DDB2 süper kompleksinin elde edilmesinde kullanıldı. Rekombinant Flag-UV-DDB2'nin çok miktarda üretildiği hücre hatları ise UV-DDB2/UV-DDB1/Cul4A/COP9 süper kompleksinin elde edilmesinde kullanıldı. Proteinler, Flag-UV-DDB2-His proteini ile benzer yöntemle "Flag" epitopuna karşı antikor-afinite kromatografisi uygulanarak saflaştırıldı. Farklı olarak reçine 1 M tuz yerine 150 mM tuz içeren tamponla yıkandı.

Gen klonlamasının prensibi: Gen klonlaması, istenilen geni taşıyan DNA parçasının vektöre bağlanması sonucu elde edilen rekombinant DNA'ların uygun bir konağa aktarılmasıdır. Bu amaçla, önce ilgilenilen gen bölgesi PCR ile çoğaltılır. Restriksiyon endonükleazlar kullanılarak kesilir. Bunun sonucunda, geni içeren birçok tipik DNA parçası elde edilir. Bu işlem, plazmid adı verilen halkasal bakteri DNA'sıyla yinelenir. Ardından, ilgilenilen geni taşıyan DNA parçasıyla açılmış bakteri plazmidini karıştırılır. Son olarak, insan ve bakteri DNA parçacıkları DNA ligaz ile yeniden bir araya getirilerek (rekombine edilerek) insan geni içeren yeni bir plazmid oluşturulur. Rekombinant DNA plazmidini bir kez yapıldıca hücre hatlarına yerleştirilerek protein oluşturması sağlanır. Bu yöntemle "transfeksiyon" denir. Böylece çok miktarda rekombinant protein üretimini sağlanır (Şekil 3.2, 3.3) (117,118).

İnsan Flag-Cullin 4A gen parçasının memeli pcDNA3 vektörüne klonlanması amacıyla ilk olarak 2280 baz çiftlik hCul4A cDNA'sı 5'-ucuna "Flag" epitopu, 5' ve 3' uçlarına sırasıyla *EcoRV* ve *NotI* restriksiyon endonükleaz kesim bölgelerini içerecek şekilde primer dizileri düzenlenerek polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltıldı. PCR ürünleri *EcoRV* ve *NotI* restriksiyon endonükleazları ile kesildikten sonra Qiagen PCR saflaştırma kiti ile saflaştırıldı. Memeli pcDNA3 vektörü de aynı restriksiyon enzimleri ile kesilerek saflaştırılmış PCR ürününün bağlanması için



Şekil 3.2. Klonlanmak istenen gen parçasının plazmid DNA içerisine yerleştirilmesi ve bu işlem sonucu oluşan rekombinant DNA'nın bakteri hücrelerine aktarılması (Kaynak 117'den Türkçeleştirilerek alınmıştır).



Şekil 3.3. Ekspresyon vektörüne klonlanmış ve hücre içine aktarılmış genden çok miktarda protein üretilmesi (Kaynak 117'den Türkçeleştirilerek alınmıştır).

uygun yapışkan uçlar meydana getirildi. pcDNA3 vektörü ve Cul4A gen parçası “Roche hızlı DNA kiti” kullanılarak, T4 ligaz enzimiyle birleştirildi. Kit için gerekli basamaklar takip edilerek elde edilen ligasyon karışımları *E. coli* DH10B hücresine aktarıldı. Karışım buzda 30 dakika süreyle inkübe edildikten sonra 90 sn 42°C’de bırakıldı ve yeniden 2 dakika buzda inkübe edildikten sonra ampicillinli Luria Bertoni agar (ampicillinli LB agar; 10 gr / L tripton, 5 gr / L maya ekstraktı, 10 gr / L NaCl, 15 gr / L agar, pH 7.3 ve son derişimi 50 mg / L olan ampicillin) içeren petrilere aktarıldı. Petriler 16 saat süreyle 37°C’de inkübe edildi. İlk ve ikinci tepkime karışımının aktarıldığı petrilerdeki plazmid içeren kolonileri belirlemek amacıyla 2.5 ml ampicillinli LB (ampicillinli LB; 10 gr / L tripton, 5 gr / L maya ekstraktı, 10 gr / L NaCl, pH 7.3 ve son derişimi 50 mg / L olan ampicillin) içeren kültür tüplerinde kültür başlatıldı. Her bir koloni ayrı bir kültür tüpünde 37°C’de çalkalayıcıda 8 saat süreyle büyütüldü. Hücreler 14 000 x g’de 1 dakika süreyle santrifüj edilerek çöktürüldü. Süpernatant atıldı. Plazmid, “Qiagen miniprep kit”i ve kit içindeki tamponlar kullanılarak izole edildi. Flag-Cul4A - pcDNA3 rekombinant plazmidini içeren hücreleri belirlemek için miniprep ürününün 7 µl’si *EcoRV* ve *NotI* ile kesildi. Tepkime karışımını % 1’lik agaroz-TBE jele yüklendi, yürütüldü ve etidyum bromür ile boyanarak görüntülendi. 5.5 ve 2.3 kilobazlık sindirim ürünlerinin gözlenmesi pcDNA3 içindeki Cul4A’nın varlığını gösterdi. Ayrıca, yine 7 µl miniprep ürünü kullanılarak *NdeI* enzimiyle de ikinci bir kesim yapıldı ve sindirim ürünleri agaroz jelde yürütüldü. Böylece Cul4A gen parçasının pcDNA3 vektörüne doğru yönde yerleştiği doğrulandı. Plazmid DNA, klonlanan DNA dizisinin doğruluğu ve mutasyon içerip içermediği North Carolina Üniversitesi “Sequencing Facility” ye gönderilerek test edildi.

Bu şekilde elde edilmiş ve doğru dizeyi içeren rekombinant plazmidler, daha yüksek derişimlerde plazmid elde etmemizi sağlayan “Qiagen midi/maksiprep kiti” kullanılarak çoğaltıldı ve elde edilen plazmidin derişimi spektrofotometrede 260 nanometrede ölçülerek belirlendi.

Flag-Cul4A rekombinant proteininin HEK293T hücrelerinde çok miktarda üretilmesi için öncelikle Flag-Cul4A içeren pcDNA3 vektörünün HEK293T memeli hücre hatlarına transfeksiyonu kalsiyum fosfat çöktürme tekniği ile sağlandı. Hücreler, 48 saat süre ile inkübatörde inkübe edildi, ardından petri kaplarındaki

besiyeri çekildikten sonra bir kez PBS ile yıkandı. Hücrelerin toplanması, hücre zarlarının parçalanması ve saflaştırma basamakları 3.2’de Flag-UV-UV-DDB2-His için yapılarına benzer şekilde gerçekleştirildi. Ancak reçinenin yıkanmasında TBS tamponu (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.5) kullanıldı. Cul4A proteini ve birlikte elüe olan protein bantları gümüş boyama yöntemi ile boyandı. Cul4A’nın ekspresyonu ise “Western blotting” yöntemi ile belirlendi (Şekil 4.16.B).

Elüattaki UV-DDB1-UV-DDB2-Cul4A derişimi, proteinlerin ve BSA standartlarının % 10’luk SDS-PAGE’de yürütülerek ayrıştırılmasından sonra gümüş boyası ile boyanarak, “Image Quant 5.2” sistemi ile göreceli oranları belirlendi.

İnsan Flag-UV-DDB2 gen parçasının memeli pcDNA3 vektörüne klonlanması amacıyla ilk olarak Flag-UV-DDB2 cDNA’sı 5’-ucuna “Flag” epitopu, 5’ ve 3’ uçlarına sırasıyla *Bam*H1 ve *Xho*1 restriksiyon endonükleaz kesim bölgelerini içerecek şekilde PCR ile çoğaltıldı. PCR ürünleri *Bam*H1 ve *Xho*1 restriksiyon endonükleazları ile kesildikten sonra agaroz jelde yürütüldü ve jelden kesim yapıldıktan sonra saflaştırıldı. Memeli pcDNA3 vektörü de aynı restriksiyon enzimleri ile kesilerek saflaştırılmış PCR ürününün bağlanması için uygun yapışkan uçlar meydana getirildi. Sonraki basamaklar, Flag-Cul4A’nın pcDNA3 vektörüne klonlanması, rekombinant Flag-Cul4A üretilmesi ve saflaştırılması basamakları ile benzer basamaklar takip edilerek gerçekleştirildi. Farklı olarak klonlama aşamasında rekombinant plazmid içeren miniprep ürünlerini belirlemek için *Bam*H1 ve *Xho*1 enzimleri, gen parçasının yönünü doğrulamak için de *Xba*1 ve *Eco*RV enzimleri kullanıldı.

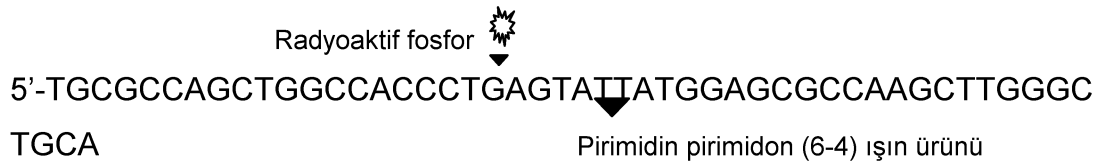
3.4. “Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)” deneyleri

EMSA, protein-DNA kompleksinin natif PAGE’de serbest DNA parçaları veya çift zincirli oligonükleotidlere göre daha yavaş hareket etmesi esasına dayanır. Protein (hücreden ya da çekirdekten elde edilen lizat) ilk önce radyoaktif işaretli protein bağlanma bölgesi bulunduran DNA parçası ile inkübe edilmekte, tepkime ürünleri natif PAGE’de yürütülerek analiz edilmektedir. DNA’ya bağlanma varsa serbest DNA’dan daha yavaş yürüyen bant görülmektedir. DNA’ya bağlandığı düşünülen protein, kendine özgün antikor ile inkübe edilip aynı işlem tekrarlanırsa bu durumda protein-antikor-DNA kompleksi daha da yavaş seyreden bir bant olarak

gözlenir (super shift). Bu yöntem, DNA-protein interaksiyonlarının gösterilmesi, farklı stoikiyometri ve konformasyondaki proteinlerin ayrıştırılmasına olanak vermekte, kinetik ve termodinamik parametreler bu yolla ölçülebilmektedir (119,120).

Çalışmada, EMSA deneylerinde 50 baz çiftlik, ortasında tek bir pirimidin pirimidon (6-4) ışın ürünü bulunan, çift zincir DNA kullanıldı. Substrat, 6 oligonükleotid parçasının birleştirilmesi ile elde edildi, hasarın 5' yönündeki dördüncü fosfodiester bağı radyoaktif olarak P³² ile işaretlendi.

Kullanılan DNA dizisi:



EMSA deneyleri için tepkime karışımı son derişimi 0.08 fmol / µl-0.33 fmol / µl DNA, 0.33 µg / µl BSA, 1 x EMSA tamponu (20 mM Hepes-KOH pH: 7.9, 26.7 mM KCl, 2.13 mM MgCl₂, 0.13 mM dTT, 0.067 mM EDTA) ve farklı derişimlerde protein içermekteydi.

Her bir EMSA için yalnızca DNA içeren, ancak protein içermeyen (-) kontrol hazırlandı.

Bütün deneyler en az 3 kez tekrar edilerek doğruluğu test edildi. Tepkime karışımı 30°C'de 30 dakika süreyle sıcak su banyosunda inkübe edildikten sonra son derişimi % 8 (hacim/hacim (h / h)) olacak şekilde gliserol eklendi. Ardından örnekler 25 mA'de ön yürütme uygulanmış % 5'lik natif jel elektroforezine tabi tutuldu. Jel kurutuldu, otoradyografik olarak ya da "Phosphorimager " ile görüntülendi. Elde edilen bantlar "Storm 860" system ve "Image Quant 5.2" Software (GE Healthcare) kullanılarak analiz edildi. Bağlanma, bağlanmış radyoaktif DNA'nın toplam radyoaktif DNA'ya oranlanması ile hesaplandı.

4. BULGULAR

4.1. Bakülovirüs / böcek hücre sistemlerinde UV-DDB1, UV-DDB2, UV-DDB proteinlerinin çok miktarda üretilmesi, saflaştırılması ve bu proteinlerin özelliklerinin belirlenmesi

4.1.1. İnsan UV-DDB1 proteininin *Spodoptera frugiperde* (sf21) böcek hücre hatlarında çok miktarda üretimi ve saflaştırılması

4.1.1.i. İnsan UV-DDB1 proteininin *Spodoptera frugiperde* (sf21) böcek hücre hatlarında çok miktarda üretimi

sf21 hücre hatlarının büyütülmesi ve devamlılığının sağlanması için, T75 kaplarda büyütülmüş sf21 hücre hatları besi yeri aspire edildikten sonra $2-5 \times 10^4$ hücre / cm^2 olacak şekilde seyreltilti. Üzerine taze besi yeri (% 10 FBS içeren Grace'in böcek besi yeri) eklenerek 27°C 'de inkübe edildi. Hücrelerin sayılması hemositometre kullanılarak mikroskopta gerçekleştirildi (Bkz. Ek 1).

UV-DDB1 virüsünün çoğaltılması için 100 mm çapındaki petri kabına 2.5×10^6 sf21 (*Spodoptera frugiperde* yumurta hücresi) hücresi ekildi ve taze besi yeri eklenerek 27°C 'lik inkübatörde inkübe edildi. Sonraki gün hücreler UV-DDB1-pBac/PAK8 içeren 200 μl rekombinant virüsle enfekte edildi. 48 saat süreyle 27°C 'de inkübe edildikten sonra hücreler besi yeriyle birlikte 50 ml'lik falkon tüpe toplandı. 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Virüs içeren (10^9 "plaque forming unit/ml" (pfu/ml) virüs) süpernatant alındı.

sf21 hücrelerin süspansiyonda büyütülmek üzere "spinner" kabına alınması ve hücrelerin süspansiyona uyumunun sağlanması için % 80-90 yoğunlukta sf21 içeren T75 kaplardaki hücreler toplandı, sayıldı ve 5×10^5 hücre / ml, besi yeri olacak şekilde 100 ml'lik "spinner" kabına alındı (son hacim 100 ml). 27°C 'lik karıştırılmalı inkübatörde sabit hızda karıştırılarak hücreler büyütüldü. Üç-beş gün sonra, hücreler 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek toplandı ve sayıldı. Hücre sayısı $1-2 \times 10^6$ hücre / ml'ye ulaştığında hücreler 500 ml'lik "spinner" kabına alındı, taze besi yeri eklenerek çoğaltıldı ve 250 milyon hücreye ulaşması sağlandı. Besi yeri taze besi yeri ile değiştirildi.

UV-DDB1 rekombinant proteininin sf21 hücrelerinde çok miktarda üretilmesi amacıyla ilk olarak sf21 hücreleri UV-DDB1-pBac/PAK8 rekombinant virüsüyle enfekte edildi. 2.5×10^8 sf21 hücresi içeren 250 ml kültür, 2.5 ml UV-DDB1 rekombinant virüsü (10^9 pfu / ml) ile enfekte edildi (MOİ: 10). Hücreler 48 saat 27°C'lik karıştırmalı inkübatörde sabit hızda karıştırılarak inkübe edildi. Bu şekilde UV-DDB1 proteininin çok miktarda üretilmesi sağlandı. Ardından hücreler 2500 rpm'de 10 dakika süreyle çevrilerek çöktürüldü. Çökelek - 80°C'de saklandı.

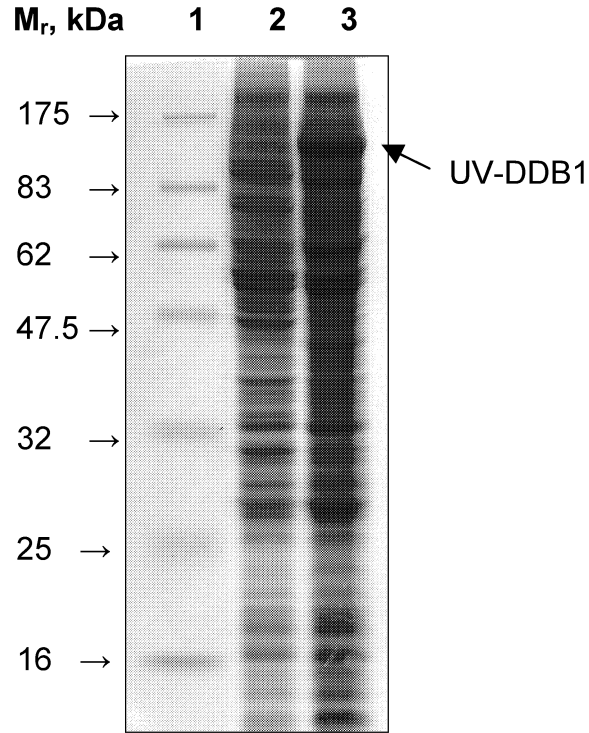
4.1.1.ii. UV-DDB1 rekombinant proteininin saflaştırılması

Rekombinant virüsle enfekte edildikten sonra toplanıp - 80°C'de saklanan hücreler daha sonra 15 ml 57 mM fosfat tamponu, 1mM dTT içeren tamponda çözüldü. 10 kez 50 Watt'da sonike (10 sn sonikasyon, 50 sn bekleme) edildi. Daha sonra üzerine son derişimi % 10 (h / h) olacak şekilde gliserol eklendi. Bu şekilde elde edilmiş hücre lizatı ve UV-DDB1 virüsü ile enfekte edilmemiş hücre hatlarından elde edilen hücre lizatındaki protein derişimi Bio-Rad protein ölçüm kiti kullanılarak belirlendi. Eşit miktarda protein içerecek şekilde UV-DDB1 virüsü ile enfekte olan ve olmayan hücre lizatı % 10'luk SDS-PAGE'de yürütüldü, protein bantları "Coomassie blue" boyası ile boyandı (Şekil 4.1). Böylece UV-DDB1 proteininin çok miktarda üretilip üretilmediği kontrol edildi.

UV-DDB1'in saflaştırma basamaklarında PDG tamponu (50 mM fosfat tamponu pH 7.5, 1 mM dTT, % 10 (h / h) gliserol) kullanıldı.

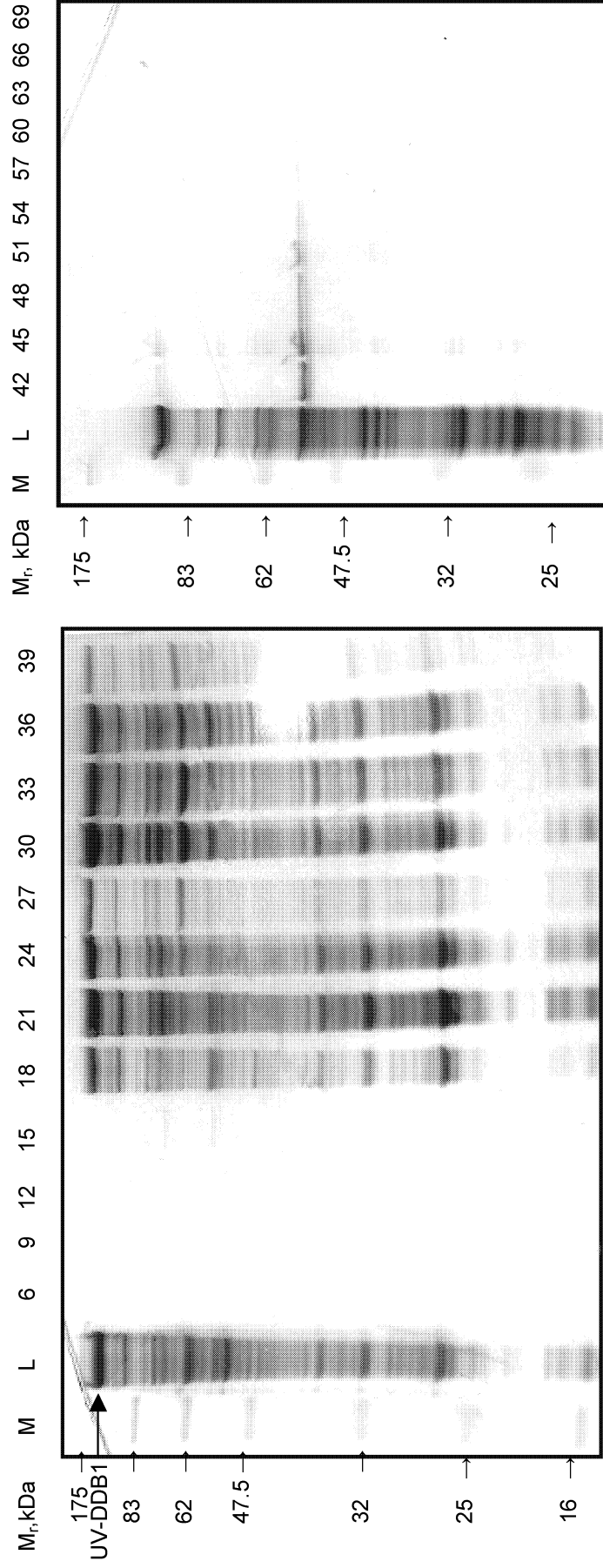
Hücre lizatı ilk olarak P11 fosfosellüloz kolonuna uygulandı. Lizat "Acrodisc 0,2 µl" filtreden geçirildikten sonra ultrasantrifüjde 30 000 x g'de 30 dakika santrifüj edilerek süpernatant alındı. Örnek (sf21 hücre lizatının 30 000 x g süpernatantı: 10 ml) Whatman P11 fosfosellüloz kolonuna (1.6 cm x 10 cm) uygulandı. Kolon, 10 kolon hacmi 50 mM PDG tamponu ile dengelendi. Örnek kolondan 30 ml 50 mM PDG tamponu ile elüe edildi. Uygulama ve elüsyon sırasında akış hızı 1 ml / dakika tutuldu. Örnek yüklenir yüklenmez 500 µl'lik fraksiyonlar toplanmaya başlandı. Fraksiyonlardan onar µl alınarak % 10'luk SDS-PAGE'e yüklendi ve yürütüldü. Fraksiyonlardaki protein bantları "Coomassie blue" boyası kullanılarak boyandı. Bunun için jel oda sıcaklığında ve karıştırıcıda 2 saat süreyle boyama solüsyonunda (% 40 metanol, % 10 glasiyal asetik asit, % 0.5 (gr / h) "Coomassie brilliant blue

R-250”) boyandı. Ardından 12 saat süreyle boya açma çözeltisinde (% 50 metanol, % 10 asetik asit, % 1.5 gliserol) tutularak protein bantları görünür hale getirildi. Bu şekilde UV-DDB1 içeren fraksiyonlar tespit edildi. UV-DDB1 içeren P11 Fosfosellüloz fraksiyonları (yaklaşık 11.5 ml) bir sonraki kolona yüklenmek üzere toplandı (Şekil 4.2.A-B).



Şekil 4.1. Rekombinant UV-DDB1 proteininin % 10'luk SDS-PAGE'de "Coomassie blue" boyaması ile gösterilmesi. Örneklere jel yükleme boyası eklenerek % 10'luk SDS-PAGE'de yürütülmüş, protein bantları "Coomassie blue" boyası ile boyanmıştır. 1. kuyucuk: "Prestained protein marker"; 2. kuyucuk: Rekombinant UV-DDB1 virüsü ile enfekte edilmemiş sf21 hücre lizati (100 µg); 3. kuyucuk: Rekombinant UV-DDB1 virüsü ile enfekte edilmiş hücre lizati (100 µg). Çok miktarda üretilmiş UV-DDB1 proteini okla gösterilmiştir. Standart proteinlerin bağıl molekül kütleleri sol yanda gösterilmiştir.

P11 fosfosellüloz kolonundan elde edilmiş UV-DDB1 içeren örnekler daha sonra DEAE-Sepharose kolonuna uygulandı. Kolonun hazırlanması için 7 ml DEAE-Sepharose, 1 cm x 10 cm'lik kolona yüklendi. 10 yatak hacmi kadar distile su ile yıkandıktan sonra 200 ml 50 mM PDG tamponu ile dengelendi. Yıkama ve dengeleme sırasında akış hızı 1 ml / dakika tutuldu. Örnek (11.5 ml) kolona yüklendi ve kolon 11.5 ml 50 mM PDG ile yıkandı. Yükleme ve yıkama sırasında akış hızı 0.5 ml / dakika tutuldu. Kolondan UV-DDB1, 35 ml 50-600 mM fosfat tamponu



A.

Şekil 4.2.A-B. Rekombinant UV-DDB1 virüsü ile enfekte hücre lizatının P11 fosfositüloz kolonuna uygulanmasını takiben elde edilen fraksiyonların protein içeriğinin % 10'luk SDS-PAGE'de "Coomassie blue" boyaması ile gösterilmesi. Üstte belirtilen fraksiyonlardan onar ul alınarak jel yükleme boyası eklenmiş, örnekler % 10'luk SDS-PAGE'e yüklenerek yürütülmüş, jeldeki proteinler daha sonra "Coomassie blue" boyası ile boyanmıştır 1. kuyucuklar: "Prestained protein marker" (M); 2. kuyucuklar: Rekombinant UV-DDB1 ile enfekte hücre lizatı (L); Diğer kuyucuklar: Üzerlerinde belirtilen fraksiyonlara ait protein bantları. Standart proteinlerin bağl molekül kütleleri sol yanda gösterilmektedir.

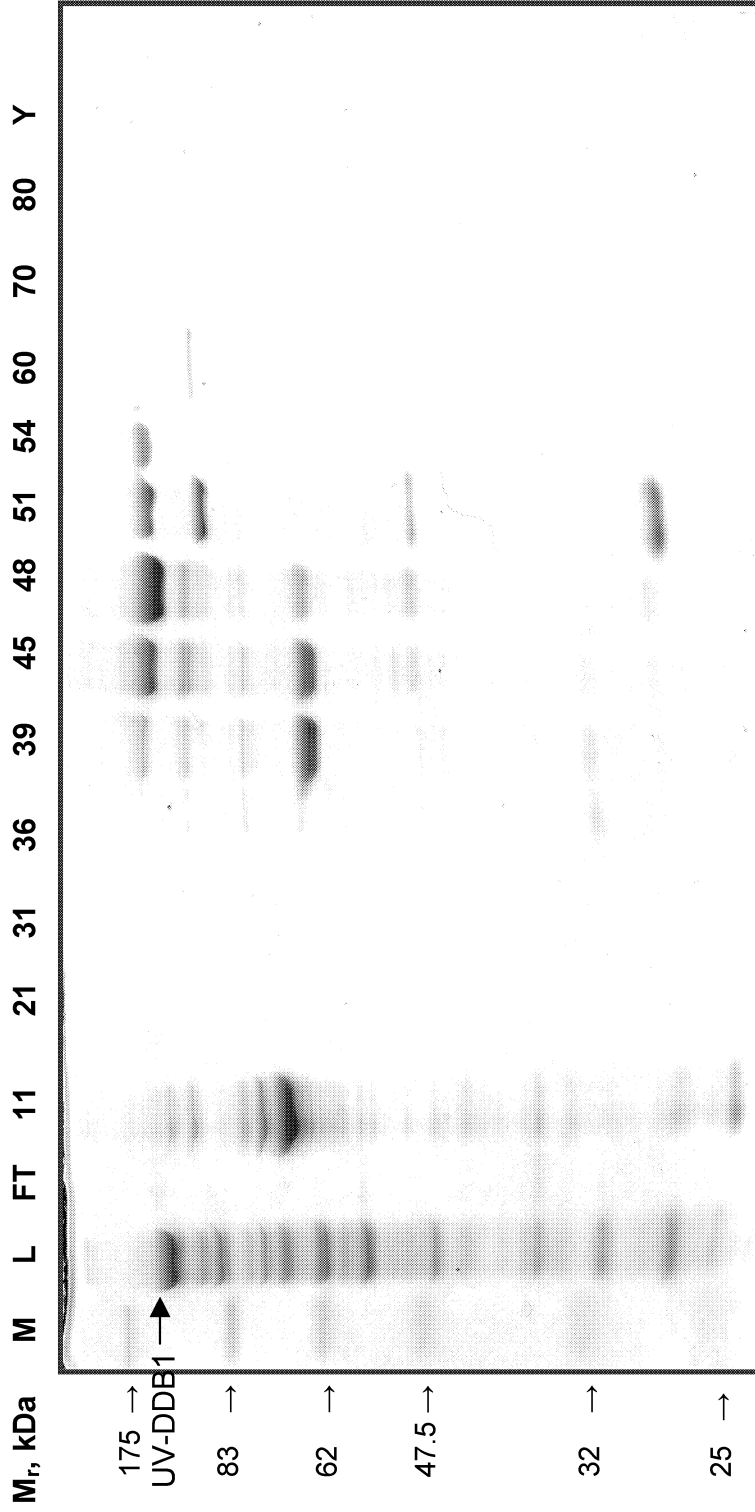
(belirtilen molaritede fosfat tamponu pH 7.5, 1 mM dTT, % 10 (h / h) gliserol) ile lineer gradient uygulanarak elüe edildi. Örneklerden onar µl alındı, UV-DDB1 içeren örnekler fosfosellüloz kolonunda uygulanan yöntemle belirlenerek toplandı (Şekil 4.3, 4.4.A-B). Aynı zamanda her onuncu fraksiyonun iletkenliği iletkenlik ölçer ile ölçüldü. UV-DDB1'in 190-290 mM'lık tuz derişiminde elüe olduğu bulundu.

DEAE-Sepharose kolonu sonrası elde edilmiş UV-DDB1 içeren örnek Amicon'un "Centricon 30" filtresi kullanılarak deriştirildi (Bkz. Ek. 2). Bunun için UV-DDB1 içeren DEAE-Sepharose elüatından 500 µl alınarak "Centricon 30" filtresi ile 170 µl'ye deriştirildi.

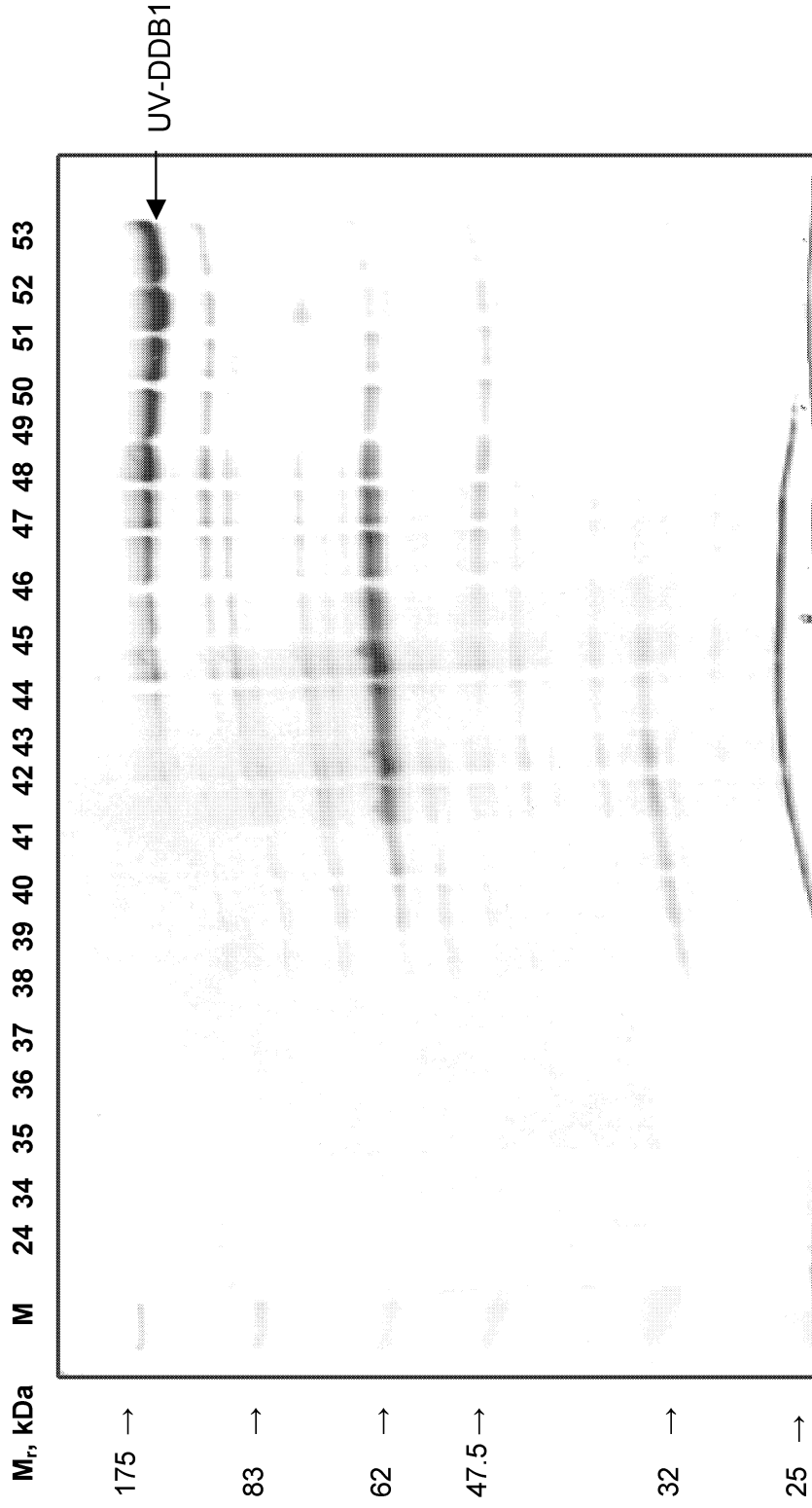
DEAE-Sepharose kolonu sonrası deriştirilmiş UV-DDB1 içeren örnek S-200 kolonuna uygulandı. S-200 kolonu (1 cm x 30 cm), 8 kolon hacmi 100 mM PDG tamponu ile yıkanarak dengelendi. Örnek (100 µl) yüklendikten sonra 150 µl'lik fraksiyonlar halinde toplanmaya başlandı. Elüsyon aynı tamponla yapıldı. Örneklerden onar µl alınarak % 10'luk SDS-PAGE'e yüklendi ve yürütüldü. Protein bantları gümüş boyama yöntemi ile boyandı. Bunun için jeldeki proteinler 1 saat süreyle oda sıcaklığında karıştırıcıda 125 ml metanol, 30 ml glasiyal asetik asit, 125 µl formaldehit içeren 250 ml'lik çözeltide fikse edildi. Daha sonra % 50'lik (h / h) etanol ile 3 x 20 dakika süreyle yıkandı. Sodyum tiyosülfat içeren çözelti içerisinde 1 dakika tutuldu. Daha sonra gümüş nitrat içeren çözeltide oda sıcaklığında 20 dakika tutularak jelin boyanması sağlandı. Ardından distile suyla yıkanarak sodyum karbonat ve sodyum tiyosülfat içeren çözeltide görünürleştirildi, boya açma çözeltisinde 20 dakika bırakıldı. Bu şekilde protein bantları boyandıktan sonra UV-DDB1 içeren fraksiyonlar belirlendi ve birleştirildi. Şekil 4.5.A-B'de S-200 çıktısının SDS-PAGE görüntüsü görülmektedir. Şekil 4.6'da ise fraksiyonlara ait UV-absorbanslar (280 nm) görülmektedir.

UV-DDB1 içeren S-200 çıktısı (2ml) daha sonra Amicon'un "Centricon 30" filtresi kullanılarak 270 µl'ye deriştirildi.

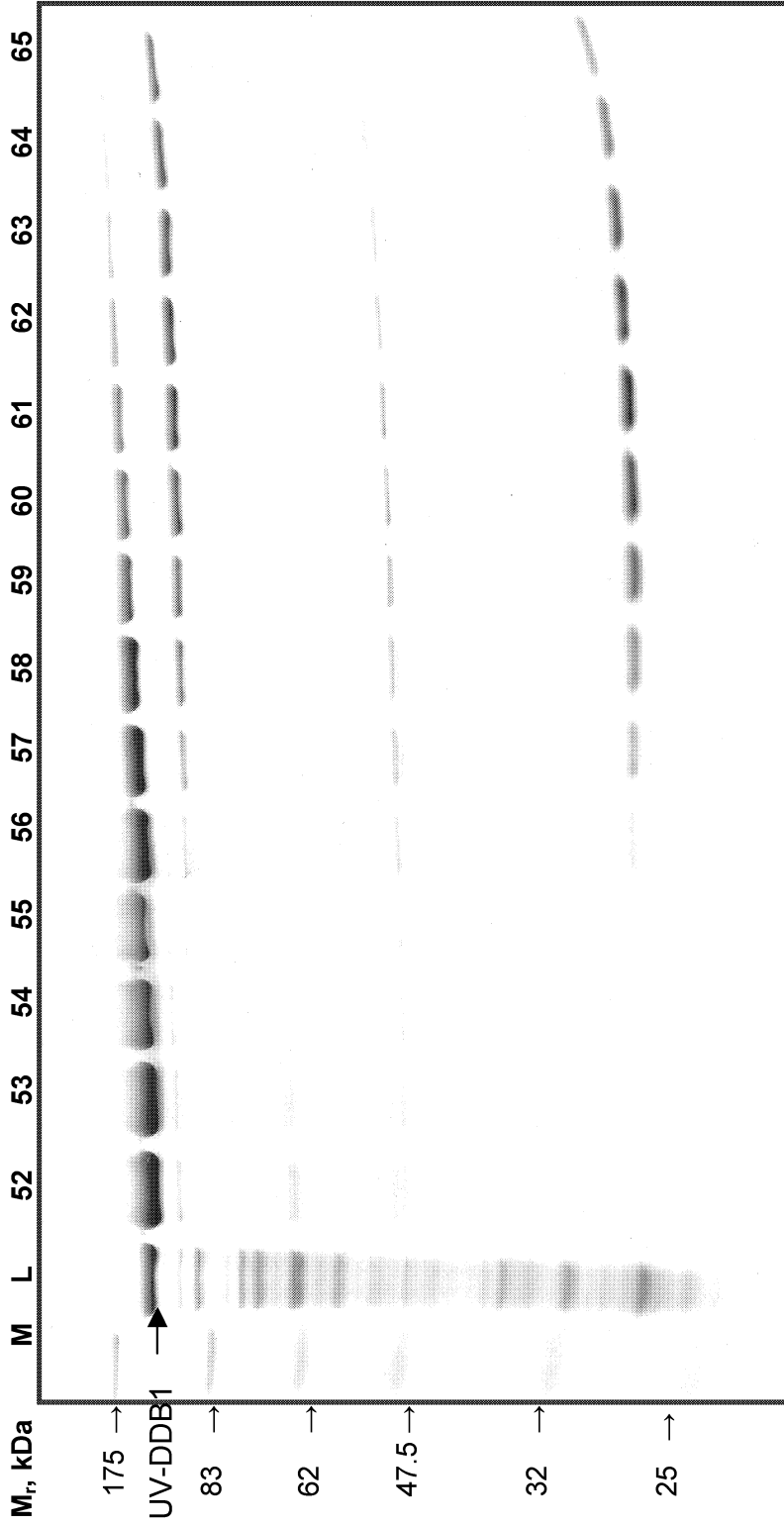
Protein miktarı 95 ng / µl olarak tespit edildi. UV-DDB1 proteininin saflaştırma basamaklarında elde edilen proteinler % 10'luk SDS-PAGE'de tek jelde yürütülerek elde edilen proteinler "Coomassie blue" boyası ile boyandı (Şekil 4.7).



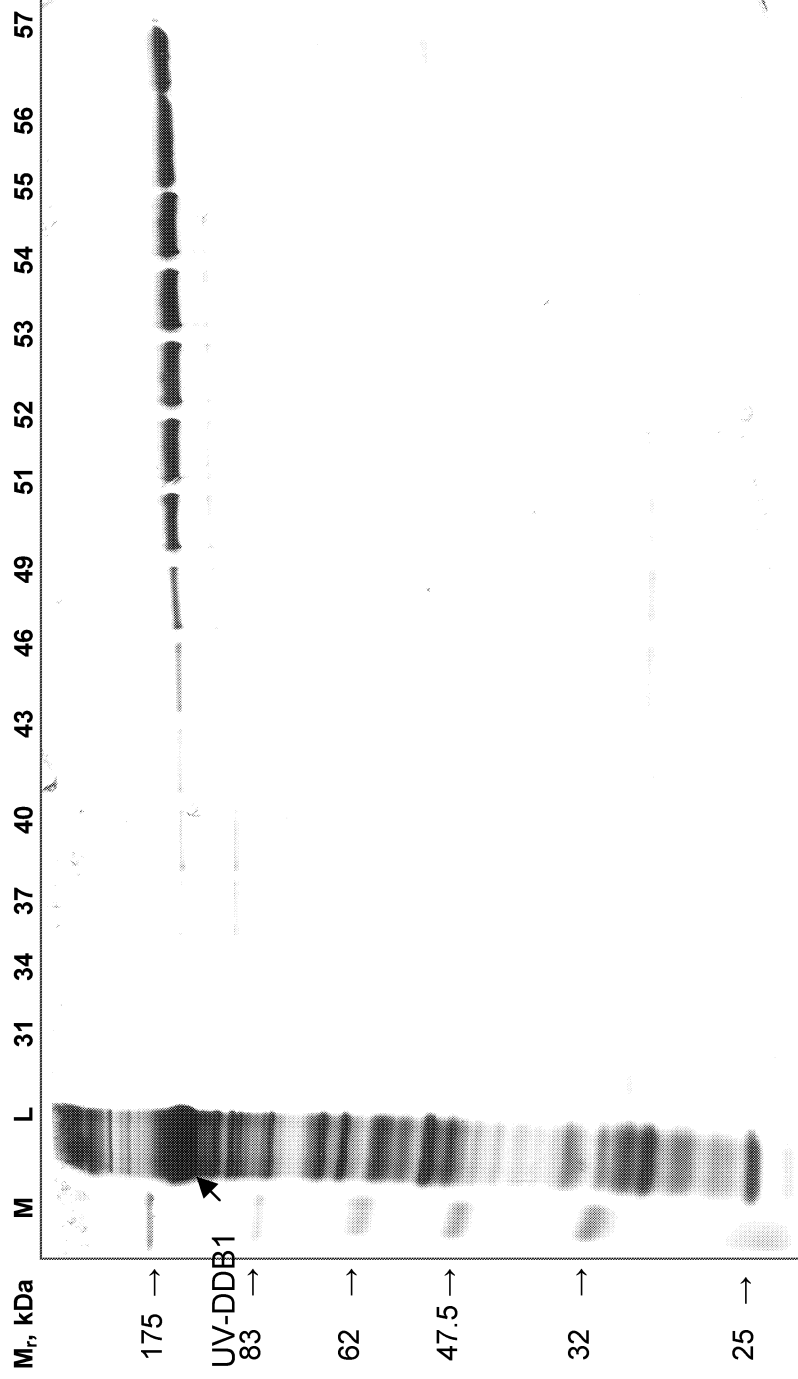
Şekil 4.3. DEAE-Sepharose kolonu ile saflaştırma işlemi sonrası elde edilen fraksiyonların % 10'luk SDS-PAGE'de yürütülerek protein bantlarının "Coomassie blue" boyaması ile belirlenmesi. Üstte belirtilen fraksiyonlardan onar µl alınarak jel yüklemeye boyası eklenmiş, örnekler % 10'luk SDS-PAGE'e yüklenerek yürütülmüştür. Jeldeki proteinler daha sonra "Coomassie blue" boyası ile boyanmıştır. Soldan sağa 1. kuyucuk: "Prestained protein marker" (M); 2. kuyucuk: Rekombinant UV-DDB1 ile enfekte hücre lizatu (L); 3. kuyucuk: Kolona tutunmadan gelen (Flow through, FT); Son kuyucuk: Yıkama (Y); Diğer kuyucuklar: Üstte belirtilen fraksiyonlara ait protein çıktıları. Standart proteinlerin bağıl molekül kütleleri sol yanda gösterilmektedir.



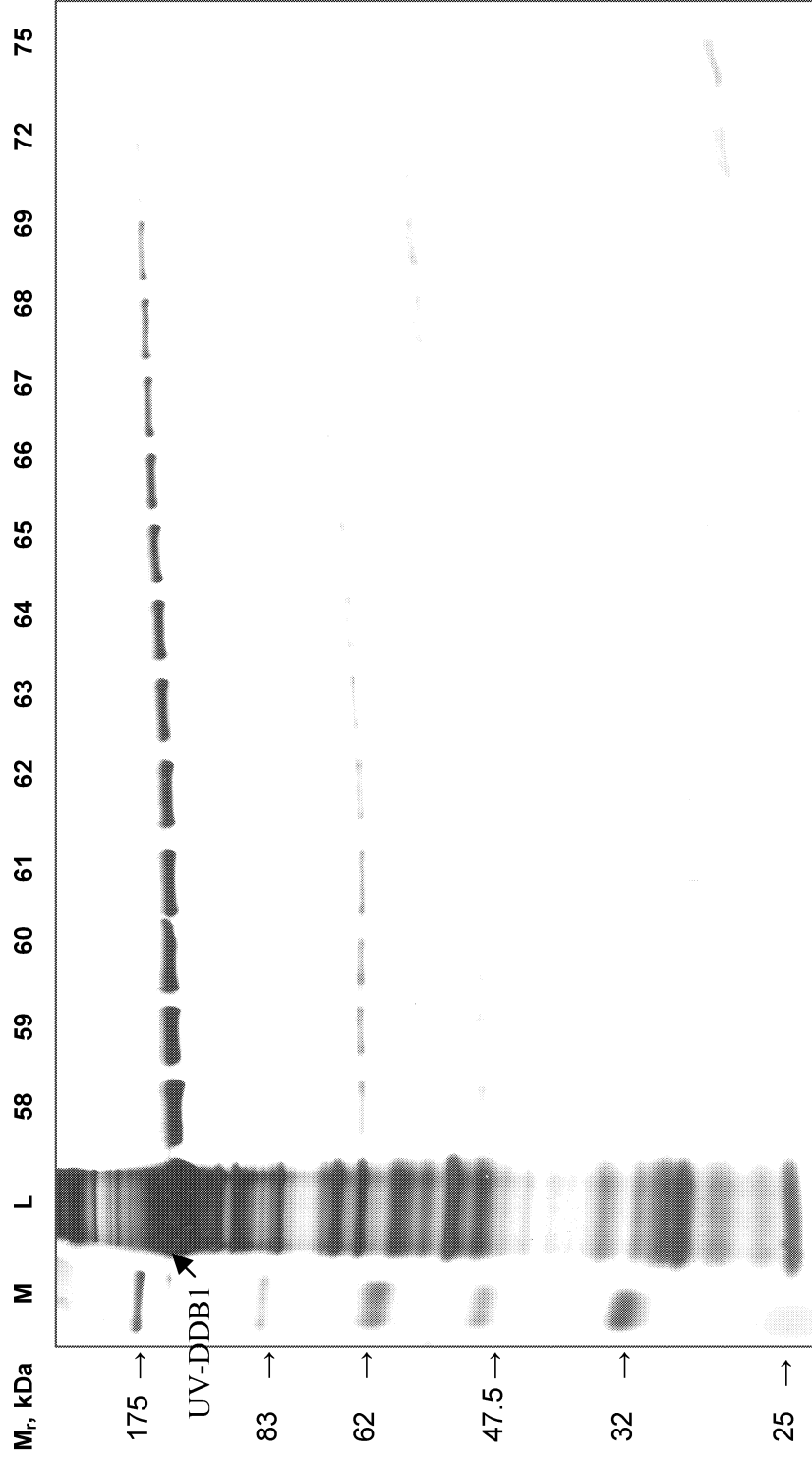
Şekil 4.4.A. DEAE-Sepharose kolonu ile saflaştırma işlemi sonrası elde edilen fraksiyonların % 10'luk SDS-PAGE'de yürütülerek "Coomassie blue" boyası ile görüntülenmesi. Soldan sağa 1. kuyucuk: "Prestained protein marker" (M); Diğer kuyucuklar: Üstte belirtilen fraksiyonlara ait protein çıktıları. Standart proteinlerin bağl molekül kütleleri sol yanda gösterilmektedir.



Şekil 4.4.B. DEAE-Sepharose kolonu ile saflaştırma işlemi sonrası elde edilen fraksiyonların % 10'luk SDS-PAGE'de yürütülerek "Coomassie blue" boyası ile boyanması (Şekil 4.4.A'nın devamı). Soldan sağa 1. kuyucuk: "Prestained protein marker" (M); 2.kuyucuk: Rekombinant UV-DDB1 ile enfekte hücre lizatı (L); Diğer kuyucuklar: Üstte belirtilen fraksiyonlara ait protein çıktıları. Standart proteinlerin bağl molekül kütleleri sol yanda gösterilmiştir.

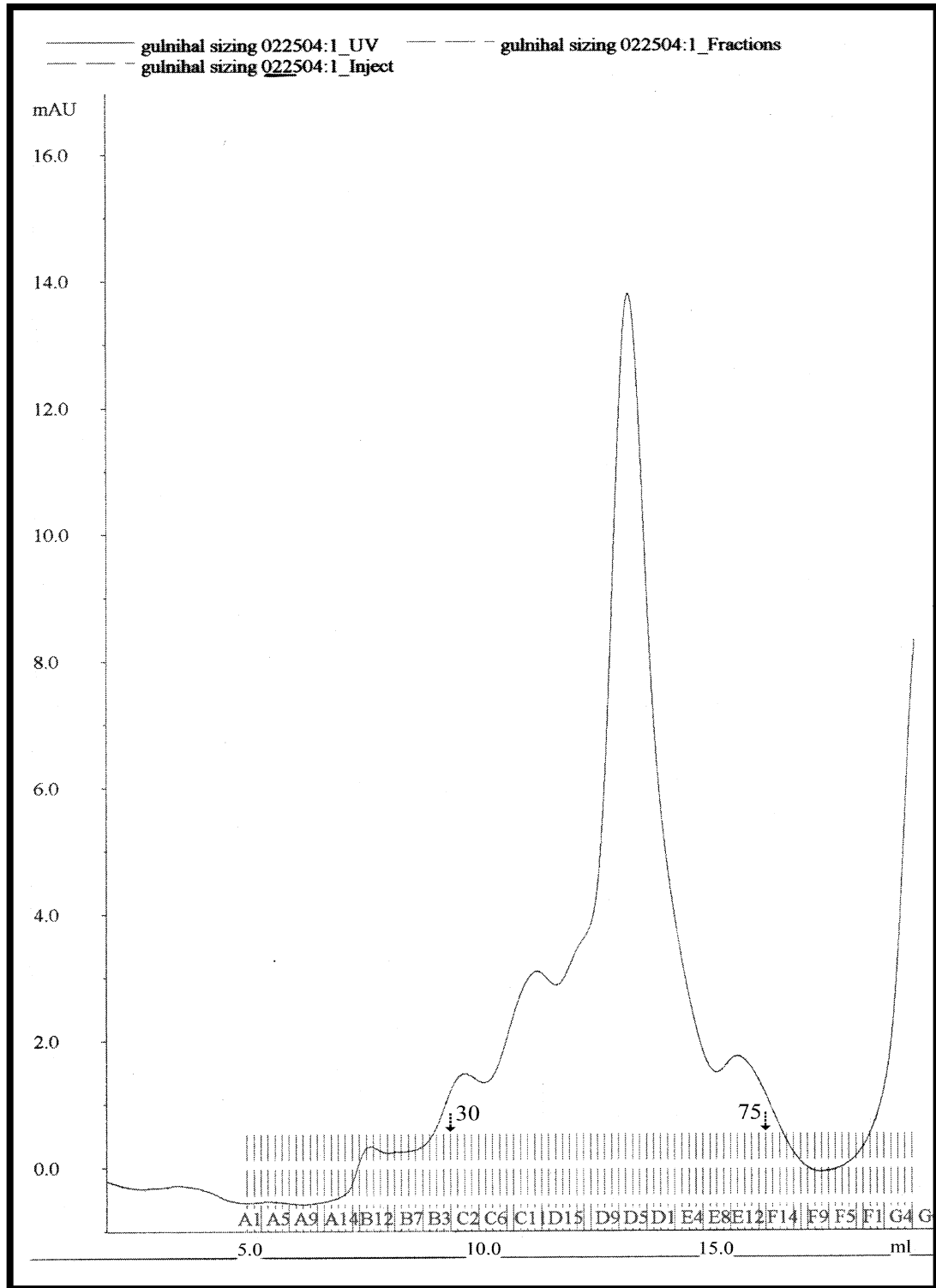


Şekil 4.5.A. Superdex 200 kolonu ile saflaştırma işlemi sonrası elde edilen fraksiyonlarda UV-DDB1 proteininin % 10'luk SDS-PAGE'de yürütülerek gümüş boyaması ile görüntülenmesi. Soldan sağa 1. kuyucuk: "Prestained protein marker" (M); 2. kuyucuk: Rekombinant UV-DDB1 ile enfekte hücre lizatı (L); Diğer kuyucuklar: üstte onar µl örnek yüklenen fraksiyonların numaraları ile gösterilmektedir. Standart proteinlerin bağlı molekül kütleleri sol yanda gösterilmektedir.

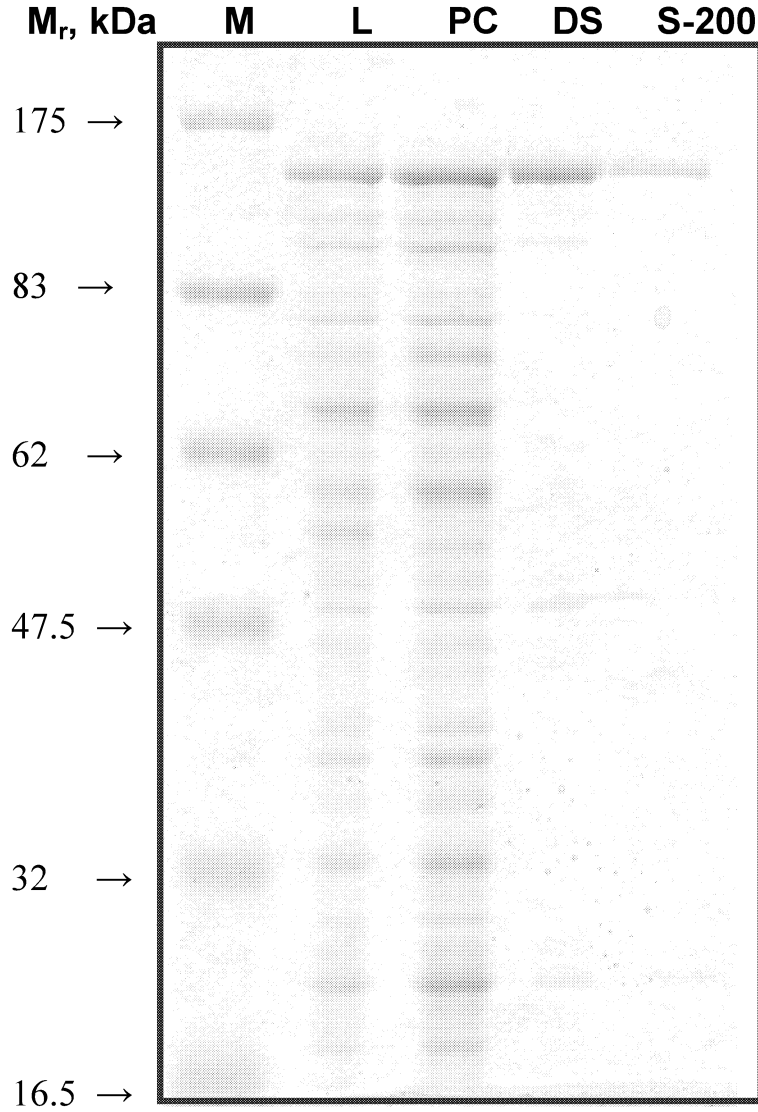


Şekil 4.5.B. Superdex 200 kolonu ile saflaştırma işlemi sonrası elde edilen fraksiyonlarda UV-DDB1 proteininin % 10'luk SDS-PAGE'de yürütülerek gümüş boyaması ile görüntülenmesi (Şekil 4.5. A'nın devamı). Soldan sağa 1. kuyucuk: "Prestained protein marker" (M); 2.kuyucuk: Rekombinant UV-DDB1 ile enfekte hücre lizatı (L); Diğer kuyucuklar üstte onar ül örnek yüklenen fraksiyonların numaraları ile gösterilmektedir. Standart proteinlerin bağlı molekül kütleleri sol yanda gösterilmektedir.

Şekil 4.6'da ise fraksiyonlara ait UV absorbanslar görülmektedir.



Şekil.4.6. Superdex 200 kolonu ile saflaştırma sırasında elde edilen fraksiyonların UV-absorbansının FPLC’de görüntülenmesi. Mavi çizgi 280 nanometredeki UV-absorbansı, kırmızı çizgiler FPLC’deki fraksiyon tüplerini temsil etmektedir. Altta 30. ve 75. fraksiyona denk gelen bölgeler oklarla belirtilmiştir.



Şekil 4.7. UV-DDB1’in saflaştırılma basamaklarında elde edilen proteinlerin “Coomassie blue” boyaması ile gösterilmesi. UV-DDB1’in saflaştırma basamaklarında elde edilen proteinlerin % 10’luk SDS – PAGE’de yürütüldükten sonra “Coomassie Blue” ile boyanması sonucu elde edilen bantlar görülmektedir. Standart proteinlerin bağıl molekül kütleleri sol yanda gösterilmektedir. 1. kuyucuk: Rekombinant UV-DDB1 ile enfekte hücre lizatı (L) (10 µg); 2. kuyucuk: Fosfocellüloz çıktısı (PC) (9 µg); 3. kuyucuk: DEAE-Sephacrose çıktısı (DS)(1.3 µg); 4. kuyucuk: S-200 çıktısı (S-200) (1µg).

4.1.2. His.UV-DDB2.Flag proteininin *Tricoplusia ni* yumurta (High-Five) hücre hatlarında çok miktarda üretilmesi ve saflaştırılması

4.1.2.i. His.UV-DDB2.Flag proteininin *Trihoplusia ni* yumurta (High-Five) hücre hatlarında çok miktarda üretilmesi

His.UV-DDB2.Flag-p2Bac rekombinant virüsünün çoğaltılması için 4.1.1.i’ de anlatıldığı şekilde “spinner” kabında hazırlanmış ve 100 ml besi yeri

içinde bulunan 1×10^8 sf21 hücresi 0.5 ml His.UV-DDB2.Flag-p2Bac rekombinant virüsü ile enfekte edildi. Hücreler 48 saat süreyle 27°C'lik karıştırmalı inkübatörde sabit hızda karıştırılarak inkübe edildi. Ardından 2000 rpm'de 5 dakika süreyle santrifüj edildi. Virüs içeren süpernatant (10^9 pfu / ml) alındı.

“High-five” hücre hatlarının büyütülmesi ve çoğaltılması için T75 kapta büyütülmüş % 80-90 yoğunluğa erişmiş “High-five” hücre hatları ($7-8 \times 10^4$ hücre / cm^2) besi yeri çekildikten sonra 1 : 10, 1 : 15 oranında seyreltilerek ve taze besi yeri (%10 FBS içeren Grace'in böcek besi yeri) eklenerek 27°C'de inkübatörde inkübe edildi. Hücreler % 80-90 yoğunluğa eriştiğinde T225 kaplara aktarıldı ve 27°C'de inkübatörde yeniden % 80-90 yoğun olana kadar büyümeleri beklendi. Ardından sayılarak 2.5×10^6 hücre / petri olacak şekilde 150 mm çapındaki petri kaplarına ekildi. Taze besi yeri eklenerek 27°C'lik inkübatörde 2×10^7 hücre / petri olana kadar beklendi. Enfekte edilecekleri gün besi yerleri taze besi yeri ile değiştirildi.

His.UV-DDB2.Flag rekombinant proteininin “High-Five” hücre hatlarında çok miktarda üretilmesi için “High-five” hücreleri His.UV-DDB2.Flag-p2Bac rekombinant virüsü ile enfekte edildi. Bu amaçla, besi yeri değiştirilmiş “High-five” hücresi içeren petrilere 200 μl / petri olacak şekilde His.UV-DDB2.Flag-p2Bac rekombinant virüsü damla damla eklendi ve karıştırıldı (yaklaşık MOİ: 10). Toplam 2×10^8 hücre 2 ml virüsle enfekte edildi. Enfeksiyon yapıldığı gün her bir petri 2×10^7 “High-five” hücresi içermekteydi. Hücreler 48 saat süreyle 27°C inkübatörde inkübe edildi. Böylece rekombinant UV-DDB2 proteininin çok miktarda üretimi sağlandı.

4.1.2.ii. His.UV-DDB2.Flag rekombinant proteininin saflaştırılması

Hücreler petrilere kazınarak alındı. 2500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek 50 ml'lik konikal tüplere toplandı. Bir kez 50 ml PBS tamponunda çözülüp ve 2500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Pellet 15 ml parçalama tamponunda (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 10 mM β -gliserofosfat, % 10 (h / h) gliserol, % 1 Tween 20, % 0.1 NP-40, 1 mM Na_3VO_4 , 1 mM NaF) çözülüp ve soğuk odada buzda 30 dakika süreyle inkübe edildi. On kez 50 Watt'da sonike edildikten sonra (10 sn bekleme, 50 sn sonikasyon) 10 dakika daha buzda soğuk odada inkübe edildi. Böylece hücre zarları parçalanarak hücre lizatı elde edildi. Lizat $16\,000 \times g$ 'de

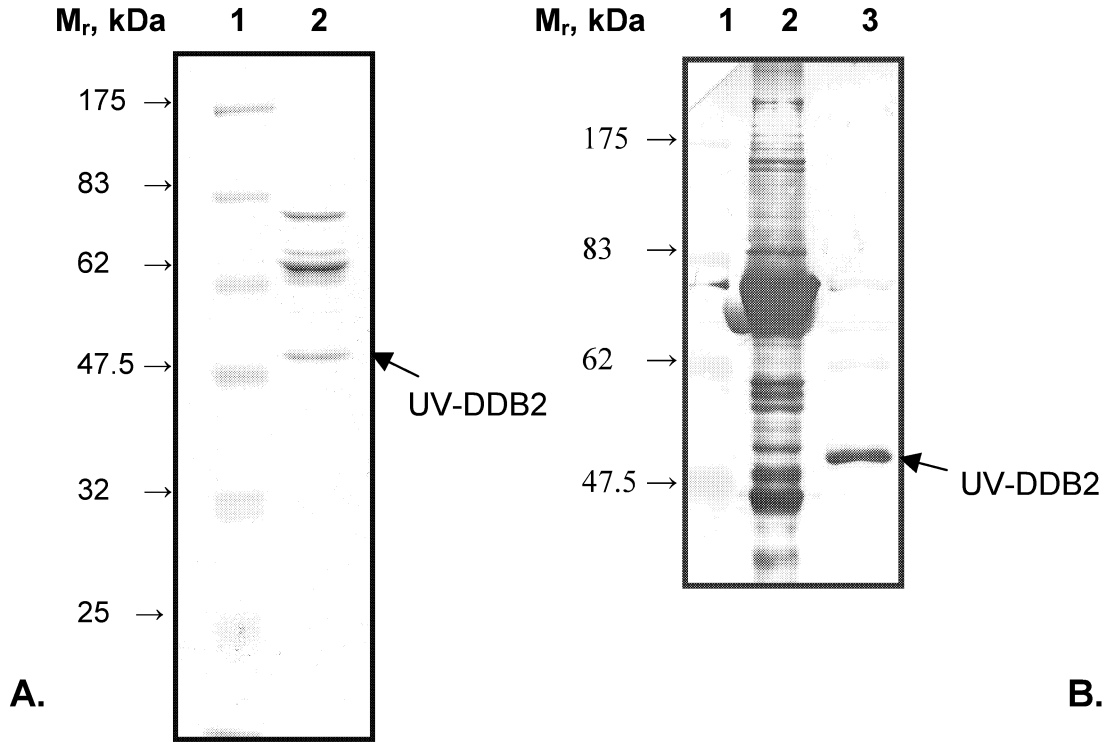
30 dakika süreyle santrifüj edildi. Süpernatant alındı.

Bu şekilde hazırlanmış hücre lizatına 250 µl 1 : 1 oranında TBS (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.5) ile dengelenmiş “Flag” reçinesi (Flag (M2) Affinity Gel) eklendi. Örnekler, +4°C’de 16 saat süreyle karıştırıcıda inkübe edilerek UV-DDB2’nin reçineye bağlanması sağlandı. Ardından reçine 2000 rpm’de 5 dakika süreyle soğuk odada çöktürüldü. 1 M NaCl içeren 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) ile bir kez, 500 mM NaCl içeren 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) ile 2 kez, TBS (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.5) içeren tamponla 1 kez yıkandıktan sonra proteinler, 100 µg / ml “Flag” peptid, TBS ve % 10 (h / h) gliserol içeren elüsyon tamponuyla indirildi. Elde edilen elüat % 10’luk SDS-PAGE’e yüklendi.

His-UV-DDB2-Flag proteini ve kolon matriksi ile interaksyona giren diğer proteinler 4.1.1.ii’de tarif edildiği şekilde “Coomassie blue” boyası ile boyandı (Şekil 4.8.A). Hem lizattaki, hem de elüattaki UV-DDB2 proteininin ekspresyonu “Western blotting” ile kontrol edildi (Şekil 4.8.B). Bunun için önce elüattaki proteinler nitrosellüloz membrana yarı kuru aktarma yöntemi (semi-dry transfer) ile aktarıldı (0.14 A, 85 dakika.). Membran, % 5 süt tozu içeren TBST (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.5, % 0.5 Tween 20) tamponu ile 90 dakika bloke edildikten sonra aynı tampon ile yıkandı. Ardından membran, “Flag” antikoru içeren TBST tamponu ile oda sıcaklığında 2 saat karıştırıcıda inkübe edildi (farede üretilmiş “Flag” antikoru, 1 / 4000 seyreltme, Sigma). Üç kez 10 dakika TBST tamponu ile yıkama yapıldıktan sonra membran 90 dakika süreyle oda sıcaklığında 1 / 5000 seyreltilmiş, farede üretilmiş “Flag” ikincil antikoruna (Sigma) tabi tutuldu. TBST tamponla yıkama sonrası protein ekspresyonunun varlığı NBT / BCIP renk tanıma sistemi (Promega) ile test edildi.

Protein miktarı 20 ng / ml olarak ölçüldü.

UV-DDB2 ve onunla birlikte elüe edilen diğer proteinler DNA’ya bağlanma özelliği olmayan “Isı şoku” proteinleri olarak saptandı.



Şekil 4.8. Rekombinant UV-DDB2 proteininin % 10'luk SDS-PAGE'de yürütüldükten sonra "Coomassie blue" boyası ile boyanması (A) ve protein ekspresyonunun "Western blotting" ile gösterilmesi (B). A. Rekombinant UV-DDB2 proteininin % 10'luk SDS-PAGE'de "Coomassie blue" boyası ile gösterilmesi. 1. kuyucuk: "Prestained protein marker"; 2. kuyucuk: Flag-UV-DDB2'nin Anti-Flag (M2) afinite reçinesi kullanılarak saflaştırılması (Kuyucuğa 1 µg protein yüklenmiştir). Bakülovirüs ile enfekte edilmiş High-Five böcek hücrelerinden saflaştırılan proteinler % 10'luk SDS-PAGE'de "Coomassie blue" ile boyanmıştır. *: "Isı şoku" proteini olarak belirlenmiştir. B. UV-DDB2 protein ekspresyonunun "Western blotting" ile gösterilmesi. UV-DDB2 proteini 5' ucundan "Flag" işaretli olduğundan, bu proteinin ekspresyonu hücre lizatının % 10'luk SDS-PAGE'de yürütülmesini takiben "Flag" epitopuna karşı "Western blotting" yapılarak test edilmiştir. 1. kuyucuk: "Prestained protein marker"; 2. kuyucuk: 80 kDa ağırlığında "Flag" epitopu ile işaretli (+) kontrol; 3. kuyucuk: 20 µl rekombinant UV-DDB2 virüsü ile enfekte edilmiş hücre lizatı. UV-DDB2 proteininin ekspresyonu sağ yanda okla gösterilmektedir. Standart proteinlerin bağıl molekül kütleleri sol yanda gösterilmiştir.

4.1.3. UV-DDB'nin *Spodoptera frugiperde* (sf21) hücre hatlarında çok miktarda üretimi ve saflaştırılması

4.1.3.i. UV-DDB rekombinant proteininin *Spodoptera frugiperde* (sf21) hücre hatlarında çok miktarda üretimi

UV-DDB proteininin sf21 hücre hatlarında çok miktarda üretmek için 4.1.1.i' deki basamaklar uygulanarak hazırlanmış 2.5×10^8 sf21 hücresi, 1.25 ml UV-DDB1-pBac/PAK8 (yaklaşık MOİ: 5) ve 1.25 ml His-UV-DDB2.Flag-p2Bac

(MOİ: 5) rekombinant virüsleriyle aynı anda enfekte edildi. Hücreler 48 saat süreyle 27°C’lik inkübatörde inkübe edildi.

4.1.3.ii. UV-DDB rekombinant heterodimerinin saflaştırılması

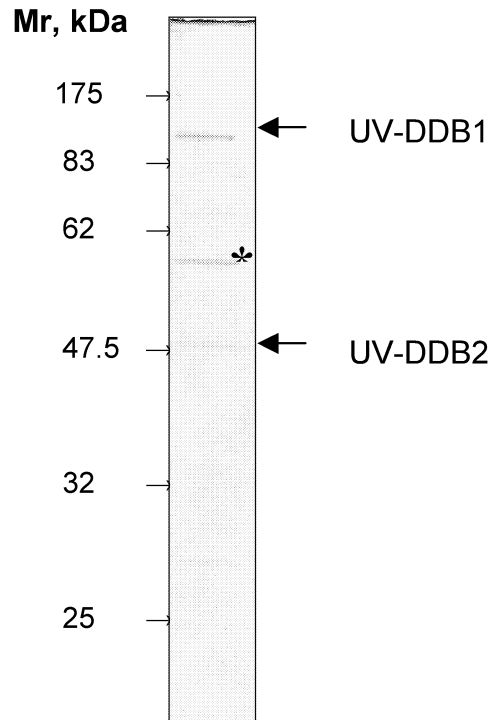
Hücreler her biri yaklaşık 125 ml olacak şekilde 250 ml’lik konikal tüplere alındı, oda sıcaklığında 2500 rpm’de 10 dakika santrifüj edilerek toplandı. Bir kez yüzer ml PBS tamponu eklenerek 2500 rpm’de 10 dakika süreyle santrifüj edildi, süpernatant atıldı. Konikal tüplerden biri daha sonra kullanılmak üzere -80°C’ ye kaldırıldı. Diğer ise 14 ml parçalama tamponunda (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 10 mM β -gliserofosfat, % 10 (h / h) gliserol, % 1 Tween 20, % 0.1 NP-40, 1 mM Na_3VO_4 , 1 mM NaF) çözüldü, 15 ml’lik falkon tüpe alındı ve soğuk odada buzda 30 dakika süreyle inkübe edildi. On kez 50 Watt’da sonike (10 sn bekleme, 50 sn sonikasyon) edildikten sonra 10 dakika daha buzda soğuk odada inkübe edildi. 16 000 x g’ de 30 dakika süreyle santrifüj edildi. Süpernatant alındı.

Elde edilen hücre lizatına TBS ile 1 : 1 oranında dengelenmiş Flag reçinesi (400 μ l) eklendi. Örnekler, +4°C’de 16 saat süreyle karıştırıcıda inkübe edildi. Ardından reçine 2000 rpm’de 5 dakika süreyle soğuk odada çöktürüldü. 1 M NaCl içeren 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) ile bir kez, 500 mM NaCl içeren 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) ile 2 kez, TBS içeren tamponla 1 kez yıkandıktan sonra 100 μ g / ml “Flag” peptid, TBS ve % 10 (h / h) gliserol içeren elüsyon tamponuyla UV-DDB elüe edildi. Elde edilen elüat % 10’luk SDS-PAGE’e yüklendi. Elüattaki protein bantları “Coomassie blue” boyası ile boyandı (Şekil 4.9).

Protein derişimi 13.5 ng / μ l olarak ölçüldü. 1 μ l elüat 5 ng UV-DDB1 ve 2.5 ng UV-DDB2 içermekteydi.

4.1.4. Bakülovirüs / böcek hücre sisteminden saflaştırılmış UV-DDB1 ve Flag-UV-DDB2’nin 50 baz çifti uzunluğunda tek pirimidin pirimidon (6–4) ışın ürünü içeren çift zincirli DNA parçasına bağlanma özelliklerinin EMSA yöntemi ile incelenmesi

Bakülovirüs / böcek hücre sisteminde çok miktarda üretilerek saflaştırılmış UV-DDB1 ve UV-DDB2 proteinlerinin ve UV-DDB1 + UV-DDB2 karışımının 50 bç’lik tek pirimidin pirimidon (6-4) ışın ürünü içeren DNA’ya bağlanma özellikleri



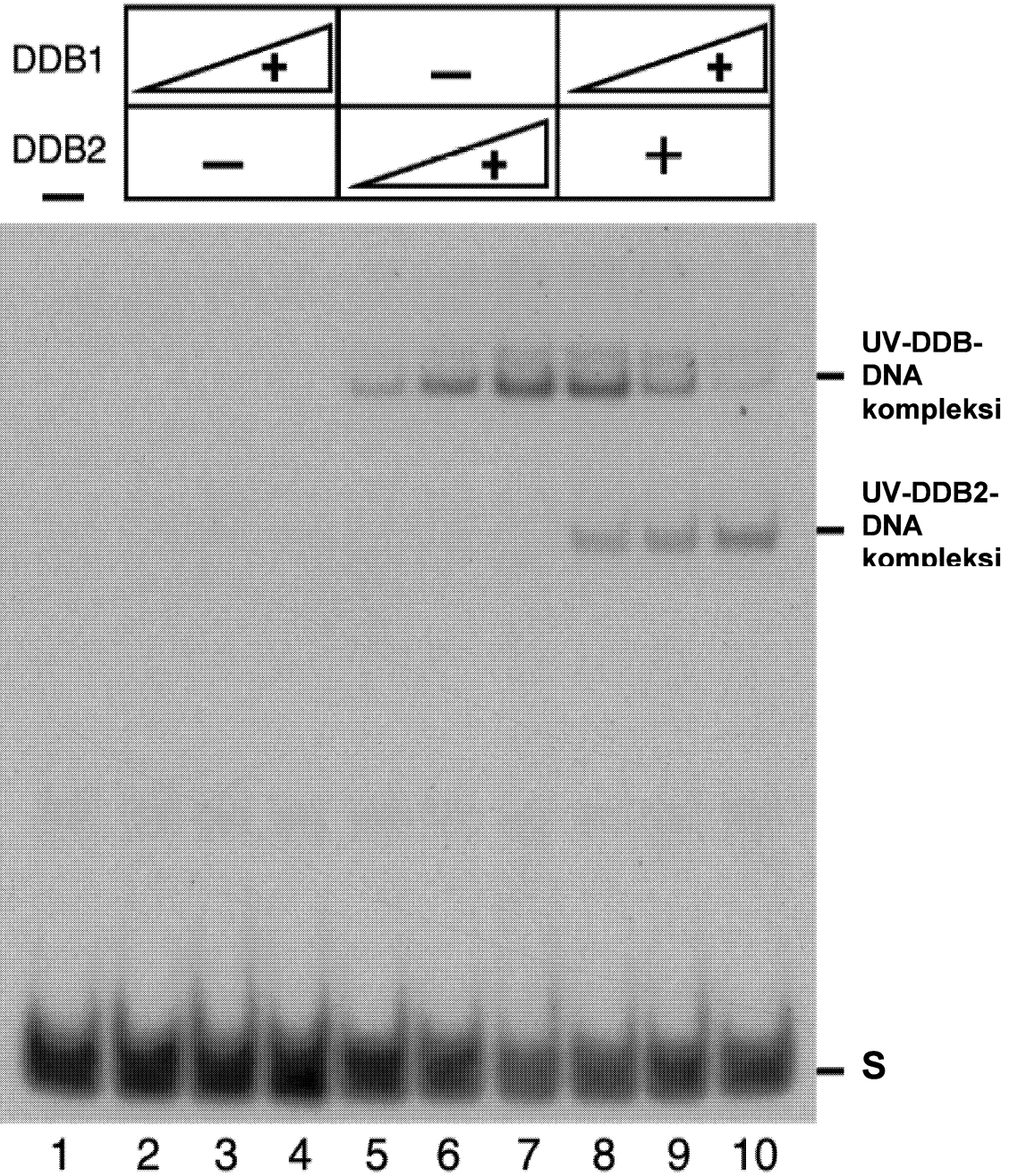
Şekil 4.9. Rekombinant UV-DDB proteininin % 10'luk SDS-PAGE'de "Coomassie" boyaması ile gösterilmesi. UV-DDB (UV-DDB1 + Flag.UV-DDB2.His)'nin "Anti-Flag (M2) afinite reçinesi" kullanılarak saflaştırma sonrası çıktısı (Kuyucuğa 0.6 µg protein yüklenmiştir). Standart proteinlere ait moleküler ağırlıklar sol yanda gösterilmiştir. UV-DDB1 ve UV-DDB2 proteinlerine ait bantlar oklarla gösterilmiştir. *: "Isı şoku" proteinini göstermektedir.

EMSA ile incelendi (Şekil 4.10).

UV-DDB'nin UV-DDB1 alt biriminin deneyin yapıldığı derişim sınırlarında DNA substratına bağlanmadığı saptandı. UV-DDB'nin hasarlı DNA'ya bağlandığı belirlendi. UV-DDB2'nin ise tek olarak hasarlı DNA'ya bağlanma özelliği gösterdiği saptandı.

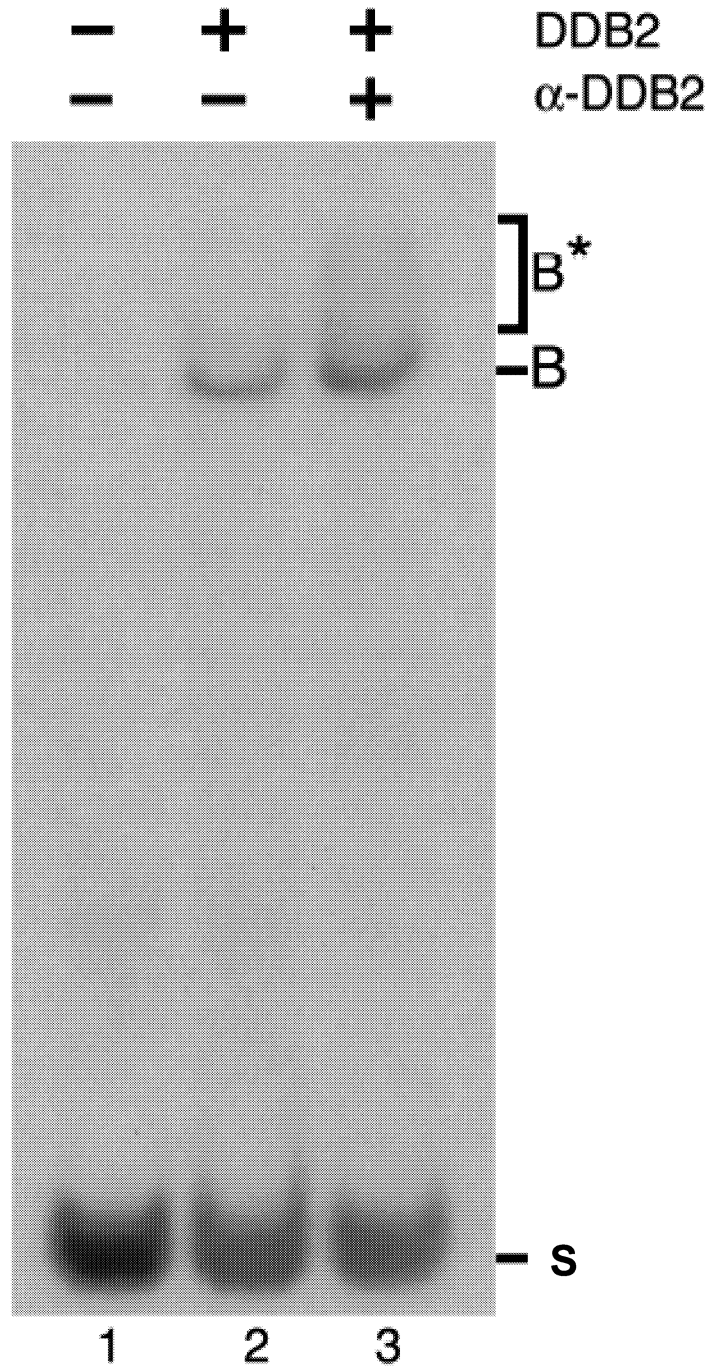
UV-DDB2'nin hasarlı DNA'ya bağlanması UV-DDB'ye göre daha yavaş seyreden bir bant olarak dikkati çekmektedir. Sabit miktarda UV-DDB2'nin bulunduğu reaksiyon koşullarında ortama artan derişimlerde UV-DDB1 eklendiğinde yavaş seyreden bandın daha aşağıya inişi de UV-DDB2'nin intrinsek bağlanma özelliği olduğunu doğrulamaktadır (Şekil 4.10).

UV-DDB2'ye karşı antikor UV-DDB2'nin bulunduğu tepkime ortamına eklendiğinde "supershift" in görülmesi de bu bulguyu desteklemektedir (Şekil 4.11).



Şekil 4.10. Bakülovirüs / böcek hücre sisteminden saflaştırılmış UV-DDB1 ve Flag-UV-DDB2'nin 50 bp uzunluğunda tek Pirimidin pirimidon (6 – 4) ışın ürünü içeren çift zincirli DNA'ya bağlanma özelliklerinin EMSA yöntemi ile incelenmesi.

UV-DDB2'nin serbest formu DNA'ya bağlanmaktadır. Serbest (S) ve proteine bağlı DNA'nın ayrılması amacıyla DNA-protein kompleksleri natif poliakrilamid jelde yürütülmüş ve otoradyogram ile görüntülenmiştir. Üstte yer alan üçgenler artan protein miktarını göstermektedir. 1. kuyucuk: protein yok, 2-4. kuyucuklar sırasıyla 30, 60, 120 nM UV-DDB1; 4-7. kuyucuklar sırasıyla 1, 2, 4 nM UV-DDB2; 8-10. kuyucuklar 4 nM UV-DDB2 + 30, 60, 120 nM UV-DDB1.



Şekil 4.11. Bakülovirüs / böcek hücre sisteminden saflaştırılmış Flag-UV-DDB2'nin 50 bp uzunluğunda tek Pirimidin pirimidon (6 – 4) ışın ürünü içeren çift zincirli DNA parçasına bağlanma özelliklerinin ve α -anti-UV-DDB2 antikoru ile oluşturduğu “supershift”in EMSA yöntemi ile incelenmesi.

UV-DDB2-DNA kompleksi (B) ile UV-DDB2 antikorusunun oluşturduğu “supershift”in (B*) gösterilmesi. 1. kuyucukta yalnızca DNA bulunmaktadır. 2. kuyucuk: Substrat ile inkübe edilmiş UV-DDB2 (4nM), 3. kuyucukta ise UV-DDB2 (4 nM) + α -antiUV-DDB2 antikoru + substrat inkübe edildikten sonra natif jel elektroforezinde yürütülmüştür.

4.2. İnsan embriyonik böbrek 293T (HEK293T) hücre hatlarında DDB ile ilgili rekombinant protein üretimi için yapılan çalışmalar

4.2.1. İnsan Flag-Cullin 4A proteininin HEK293T hücre hatlarında çok miktarda üretilmesi ve UV-DDB proteini ile birlikte saflaştırılması

4.2.1.i. İnsan Flag-Cullin 4A gen parçasının memeli pcDNA3 vektörüne klonlanması

İnsan Flag-Cullin 4A gen parçasının memeli pcDNA3 vektörüne klonlanması amacıyla ilk olarak 2280 baz çiftlik hCul4A cDNA'sı N-ucuna "Flag" epitopu eklenecek şekilde primer dizileri düzenlenerek polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltıldı. Flag-Cul4A geninin çoğaltılmasında kullanılan primer dizileri 5' - GATCGATATCAGGATGGACTACAAGGACGACGATGACAAGGCGGAC GAGGCCCCGCGG, 5' - GATCGCGGCCGCTCAGGCCACGTAGTGGTACTG nükleotid dizileridir (Altı çizili bölgeler sırasıyla *EcoRV* ve *NotI* restriksiyon endonükleaz kesim bölgelerini içermektedir).

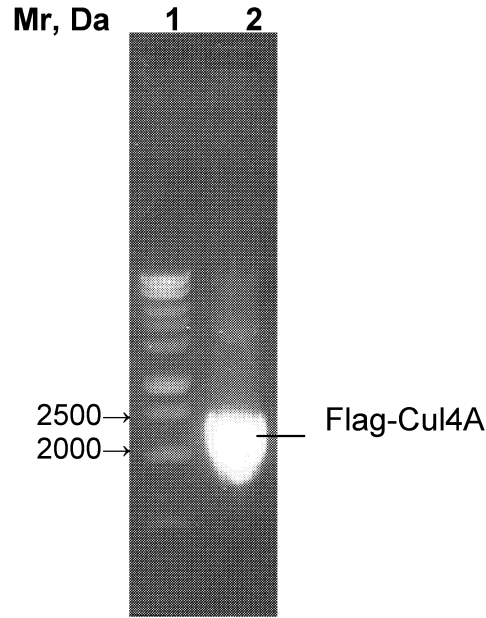
Herbir PCR tepkime karışımı, son derişimi 200 ng DNA, 0.3 μ M dNTP, 0.3 μ M "Forward" ve 0.3 μ M "Reverse" primer, 1 x "Enhancer" çözelti, 1 mM MgSO₄, 2.5 U *Pfx* polimeraz içermektedir.

Polimeraz zincir tepkimesi;

94 °C'de	2 dakika		30 döngü
94 °C'de	15 saniye		
58°C'de	30 saniye		
68°C'de	2 dakika 15sn		
68°C'de	10 dakika		
+4°C'de	∞		

olarak gerçekleştirildi.

Çoğaltılan DNA ürünü daha sonra % 1'lik agaroz-TBE jelinde yürütülerek ve etidyum bromür ile boyanarak görüntülendi (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. Flag-Cul4A PCR ürününün % 1'lik agaroz-TBE jelinde etidyum bromür ile boyanarak görüntülenmesi. 1. kuyucuk, 4 µl 1 kb'lık "marker"; 2. kuyucuk, PCR ürünü (490 ng). "Marker" ve PCR ürünü jel yükleme boyası ile karıştırılarak agaroz-TBE jele yüklenmiştir.

PCR ile çoğaltılan ürünler daha sonra Qiagen PCR saflaştırma kiti ve kit içindeki tamponlar kullanılarak saflaştırıldı. Bunun için PCR ürünü hacminin 5 katı kadar hacimde kit içindeki PB tamponu eklenerek karıştırıldı ve kolona yüklendi. Oda sıcaklığında 13 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Altta kalan sıvı döküldü. PE tamponu (0.75 ml) eklenerek 13 000 rpm'de 1 dakika süreyle yeniden santrifüj edildi ve filtrat atıldı. Kolon, boş olarak 1 dakika süreyle yeniden 13 000 rpm'de santrifüj edildikten sonra kolon 1.7 ml'lik temiz bir Eppendorf tüp içine yerleştirildi ve kolon üzerine 40 µl distile su eklenerek oda sıcaklığında 1 dakika süreyle beklendi. PCR ürünü 13 000 rpm'de 1 dakika süreyle santrifüj edilerek saflaştırıldı.

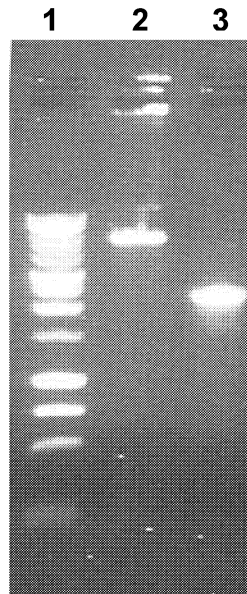
Flag-Cul4A cDNA'sının pcDNA3 vektörüyle ligasyonu için PCR ürünü önce *EcoRV* ve *NotI* enzimleriyle 37°C'de 16 saat süreyle inkübe edilerek kesildi.

Tepkime karışımı 25 µl DNA (3.1 µg), 20 U *EcoRV*, 20 U *NotI*, NEB3 tamponu (son derişimi 10 mM NaCl, 5 mM Tris-HCl, pH 7.9, 1 mM MgCl₂, 0.1 mM dTT), BSA (son derişimi 0.1 mg / ml) olacak şekilde hazırlandı. Örneğin tamamı Qiagen PCR saflaştırma kiti ile saflaştırıldı ve saflaştırılmış PCR ürünleri 50 µl distile su ile indirildi. PCR ürününün derişimi spektrofotometrede 260 nm de 59.5 ng / µl olarak ölçüldü.

pcDNA3 memeli hücre vektörünün Flag-Cul4A ile ligasyonu için hazırlanması amacıyla 1 µg vektör DNA, *EcoRV* ve *NotI* ile 37°C su banyosunda 16 saat süreyle inkübe edilerek kesildi. Tepkime karışımı (20 µl) 1 µg pcDNA3, BSA (son derişimi 0.1 mg / ml), 10 U *EcoRV*, 10 U *NotI*, NEB3 tamponu içermekteydi. Tepkime karışımı daha sonra 80°C’de 20 dakika inkübe edilerek enzimlerin inaktivasyonu sağlandı. Tepkimeye ALP tamponu (son derişimi 50 mM Tris-HCl, pH 8.5, 5 mM MgCl₂) ve 2 U karides ALP (Roche) eklenerek 37°C’de 40 dakika süreyle inkübe edildikten sonra enzim, karışımın 65°C’de 20 dakika inkübe edilmesi ile inaktive edildi.

Vektör (pcDNA3) ve insert DNA’nın (Flag-Cul4A) göreceli molar derişim oranlarının belirlenmesi için, ligasyon tepkimesi için hazırlanan pcDNA3 vektörü ve Cul4A cDNA’sı % 0.7’lik agaroz - TBE jelde (137 V, 1 saat) yürütüldü (Şekil 4.13) Böylece vektör (pcDNA3 vektörü) ve insert (Flag-Cul4A cDNA’sı) oranı yaklaşık 1/3 ve 1/6 olacak şekilde “Roche Rapid DNA Ligation Kiti” kullanılarak ligasyon karışımı hazırlandı. Ayrıca insert içermeyip yalnızca vektör içeren üçüncü bir karışım da aynı şekilde hazırlandı.

Tepkime karışımı oda sıcaklığında 35 dakika, ardından buzda 5 dakika süreyle inkübe edildi.



Şekil 4.13. Vektör ve insert DNA’nın göreceli molar derişimlerinin belirlenmesi amacı ile % 0.7’lik agaroz-TBE jelde yürütülmesi ve etidyum bromür ile boyanması. 1. kuyucuk, 1 kb’lık “marker”, 2 µl; 2. kuyucuk, pcDNA3 vektörü (100 ng); 3. kuyucuk, Flag-Cul4A (119 ng).

Vektör ve insert DNA'nın ligasyonu için tepkime koşulları:

Tepkime karışımı	1^a	2^b	3^c
Vektör DNA (50 ng/ µl), µl	1	1	1
Insert DNA (59.5 ng/ µl), µl	1.1	2.2	-
5 x Seyreltme tamponu, µl	2	2	2
Distile su, µl	5.9	4.8	7
2 x T4 tamponu, µl	10	10	10
T4 ligaz, µl	1	1	1
Toplam, µl	21	21	2

^a. Tepkime karışımı 1'de vektör – insert oranı yaklaşık 1 / 3'tür.

^b. Tepkime karışımı 2'de vektör – insert oranı yaklaşık 1 / 6 'dır.

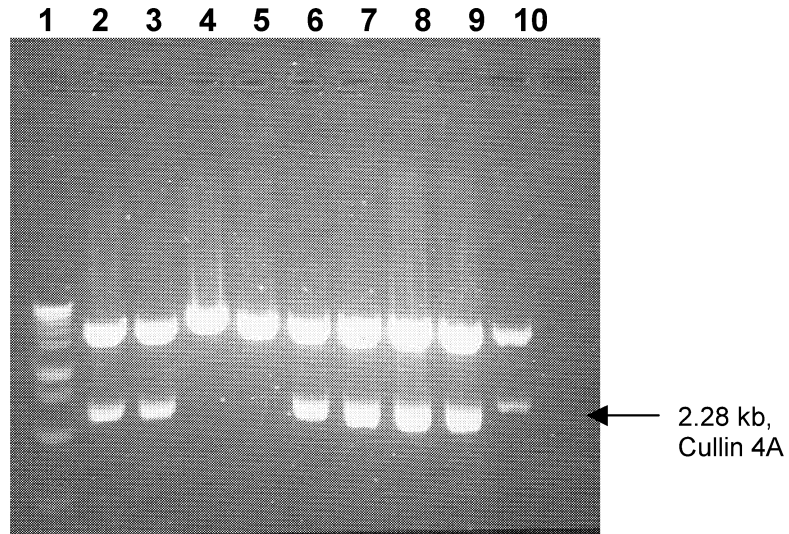
^c. Tepkime karışımı 3 insert DNA içermeyip yalnızca vektör DNA içermektedir.

İlk ve ikinci ligasyon karışımının her birinden 1.25 µl alınarak ayrı ayrı 50 µl *E. coli* DH10B hücrelerine aktarıldı. Karışım buzda 30 dakika süreyle inkübe edildikten sonra 90 sn 42°C'de bırakıldı ve yeniden 2 dakika buzda inkübe edildikten sonra ampicillinli Luria Bertoni agar (ampicillinli LB agar; 10 gr / L tripton, 5 gr / L maya ekstraktı, 10 gr / L NaCl, 15 gr / L agar, pH 7.3 ve son derişimi 50 mg / L olan ampicillin) içeren petrilere aktarıldı. Petriler 16 saat süreyle 37°C'de inkübe edildi.

İlk ve ikinci tepkime karışımının aktarıldığı petrillerdeki plazmid içeren kolonileri belirlemek amacıyla 2.5 ml ampicillinli LB (ampicillinli LB; 10 gr / L tripton, 5 gr / L maya ekstraktı, 10 gr / L NaCl, 15 gr / L agar, pH 7.3 ve son derişimi 50 mg / L olan ampicillin) içeren kültür tüplerinde kültür başlatıldı. Her bir koloni ayrı bir kültür tüpünde 37°C'de çalkalayıcıda 8 saat süreyle büyütüldü. Hücreler 14 000 x g'de 1 dakika süreyle santrifüj edilerek çöktürüldü. Süpernatant atıldı. Plazmidin izolasyonu için "Qiagen miniprep kit"i ve kit içindeki tamponlar kullanıldı. Bunun için hücre çökeleği 0.1 mg / ml RNaz A içeren 250 µl P1 tamponunda çözüldü. Üzerine 250 µl P2 parçalama tamponu eklenerek bir kaç kez alt üst edildi. Ardından 350 µl N3 tamponu eklenerek yeniden hızlıca 4-5 kez alt üst edilerek karıştırıldı. Hücre lizatı oda sıcaklığında 13 000 rpm'de 10 dakika süreyle santrifüjlendi. Süpernatant alındı, kit içindeki kolona yüklendi ve kolon 13 000

rpm'de 1 dakika süreyle santrifüj edildi. Filtrat atıldı. Kolon 0.5 ml PB tamponuyla ve 0.75 ml PE tamponuyla aynı santrifügasyon yöntemi kullanılarak yıkandı. Kolon daha sonra 1.7 ml'lik temiz bir Eppendorf tüp içine yerleştirildi. Kolon üzerine 50 µl distile su eklenerek oda sıcaklığında 1 dakika beklendi. Kolon 13 000 rpm'de 1 dakika süreyle santrifüj edilerek plazmid DNA indirildi.

Flag-Cul4A / pcDNA3 içeren hücreleri belirlemek için miniprep ürününün 7 µl'si *EcoRV* ve *Not1* ile 37°C'de 2 saat süre ile inkübe edilerek kesildi. Tepkime karışımı her bir miniprep ürünü için 7 µl plazmid DNA, 5 U *EcoRV*, 5 U *Not1*, NEB 3 tamponu, BSA (son derişimi 0.1 mg / ml) içermektedir. Tepkime karışımının tamamına (20 µl) 4 µl jel yükleme boyası eklenerek % 1'lik agaroz-TBE jele yüklendi, yürütüldü ve etidyum bromür ile boyanarak görüntülendi (Şekil 4.14).

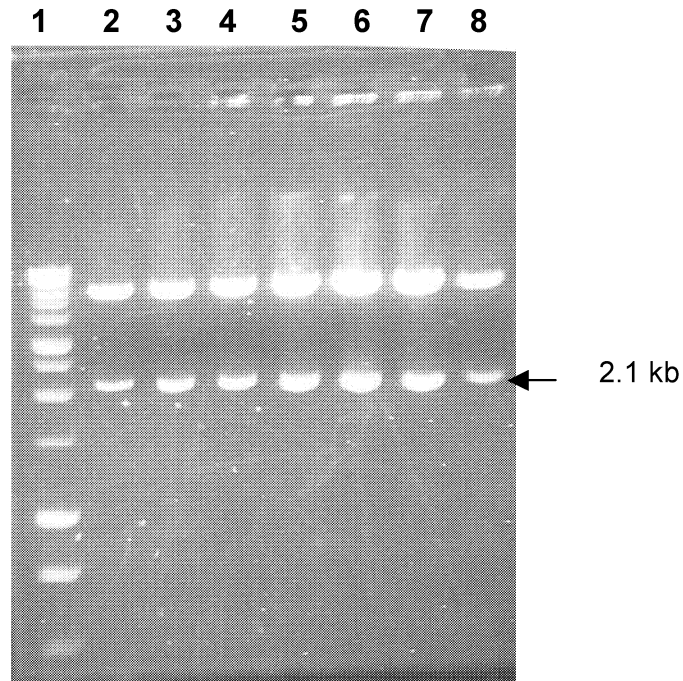


Şekil 4.14. Flag-Cul4A/pcDNA3 içeren kolonilerin belirlenmesi için miniprep ürünlerinin *EcoRV* – *Not1* enzimleriyle kesilmesi. Örnekler % 1'lik agaroz-TBE jelde yürütülmüş, etidyum bromür ile boyanarak görüntülenmiştir. 1. kuyucuk: 1 kb'lık "marker" (2.5 µl) ; 2-11. kuyucuklar: Seçilmiş kolonilere ait sindirim ürünleri. 2-3, 6-10. örnekler Flag.Cul4A-pcDNA3 plazmidini içermektedirler.

pcDNA3 icindeki Cul4A'nın yönünün doğruluğunu test etmek için ikinci bir grup enzimden faydalanıldı. Bu amaçla vektör ve insert DNA içinde birer kesim noktası bulunan *Nde1* enzimi seçildi. Tepkime koşulları 7 µl miniprep ürünü, 5 U *Nde1*, NEB 4 tamponu (son derişimi 5 mM potasyum asetat, 2 mM Tris asetat pH 7.9, 1 mM Magnezyum asetat, 0.1 mM dTT), BSA (son derişimi 0.1 mg / ml) olacak şekilde hazırlandı. Örnekler 37°C'de 3 saat inkübe edildikten sonra % 1'lik agaroz-

TBE jele yüklenerek yürütüldü ve etidyum bromür ile boyandı ve görüntülendi (Şekil 4.15).

Ardından plazmid DNA, klonlanan DNA dizisinin doğruluğu ve mutasyon içerip içermediği North Carolina Üniversitesi “Sequencing Facility” ye gönderilerek test edildi.



Şekil 4.15. Miniprep ürünlerinin *Nde*I ile sindirilmesi sonrası % 1’lik agaroz-TBE jelde yürütülüp, etidyum bromür ile boyanarak görüntülenmesi. 1. kuyucuk, 2.5 µl 1 kb’lık “marker”; 2.-8. kuyucuklar sırasıyla Şekil 4.14’deki 2.-3., 6.-10. örneklerin *Nde*I ile kesilmesi sonrası DNA ürünleri (20 µl örnek + 4 µl jel yükleme boyası). Bütün örneklerin rekombinant Cul4A plazmidini içerdiği doğrulandı.

Flag-Cullin 4A / pcDNA3 plazmidini daha sonra maksiprep ile çoğaltıldı. Bunun için Flag-Cul4A / pcDNA3 plazmidini içeren *E. coli* hücre kültürünün 250 µl’si 2 ml ampicillinli LB’de 37°C’de 8 saat süreyle çalkalayıcıda inkübe edildi. 100 ml ampicillinli LB, büyütülen kültürün 250 µl’si ile inoküle edildi ve yeni kültür başlatıldı. 37°C’de 16 saat süre çalkalayıcıda hücreler çoğaltıldıktan sonra +4°C’de 4500 rpm’de 15 dakika süreyle santrifüj edildi (Sorvall RC 3C plus). Hücrelerden plazmidin izole edilmesi amacıyla “Qiagen Qiafilter Maxi kit”i ve tamponları kullanıldı. Bakteriyel çökelek, kit içindeki 10 ml P1 tamponunda çözülür. Üzerine 10 ml P2 tamponu eklenerek 4-5 kez altüst edildi. Oda sıcaklığında 5 dakika inkübe

edildikten sonra lizat üzerine 10 ml soğutulmuş tampon 3 eklendi, hızlıca karıştırıldı ve karışım Qiafilter kartuş içine dökülerek yeniden oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. Inkübasyon sırasında “Qiagen Tip 500”, 10 ml QBT tamponu ile dengelendi. Qiafilter kartuş içindeki lizat “Qiagen Tip 500”e uygulandı ve reçineye girişi beklendi. Ardından “Qiagen Tip 500” 2 kez 30 ml QC tamponu ile yıkandı ve 15 ml QF tamponu ile elüe edildi. DNA, 10.5 ml izopropanolol ile çöktürüldü. Sorvall RC 5B’de 14 000 rpm’de +4°C’de 30 dakika süreyle santrifuj edildi. Çökelek 5 ml oda sıcaklığındaki %70’lik (h / h) etanol ile yıkandı ve yeniden +4°C’de 14 000 rpm’de santrifüj edildikten sonra çökelek 10 dakika kurumaya bırakıldı ve 500 µl distile su ile çözüldü. Elde edilen DNA derişimi spektrofotometrik yöntemle 0.82 µg / µl olarak ölçüldü.

4.2.1.ii. Flag-Cullin 4A rekombinant proteininin HEK293T hücrelerinde çok miktarda üretilmesi

Flag-Cul4A rekombinant proteininin HEK293T hücrelerinde çok miktarda üretilmesi için öncelikle Flag-Cul4A içeren pcDNA3 vektörünün HEK293T memeli hücre hatlarına kalsiyum fosfat çöktürme tekniği ile transfeksiyonu sağlandı.

HEK293T hücrelerinin transfeksiyon işlemi için hazırlanması amacıyla T225 kapta büyütülmüş % 70-80 yoğunluğa erişmiş 293T hücre hatlarının besiyeri (% 10 FBS ve % 1 oranında penisilin ve streptomisin içeren “DMEM”) aspire edilip bir kez PBS’le yıkandıktan sonra 2 ml tripsin ile hücrelerin kap yüzeyinden ayrılması sağlandı. Hücreler daha sonra sayılarak 2.5 milyon / petri kabı (150 mm çap) olacak şekilde petri kaplarına aktarıldı. Besi yeri içeren petrilere 24 saat süreyle 37°C’de, % 5 CO₂ varlığında inkübe edildi.

Flag-Cul4A içeren pcDNA3 vektörünün HEK293T memeli hücre hatlarına kalsiyum fosfat çöktürme tekniği ile transfeksiyonu için 22.5 µg plazmid DNA ve 200 µl 2.5 M CaCl₂, son hacim 2 ml olacak şekilde hazırlandı. Bu karışım, 2 ml 2 x HEBS çözeltisine (140 mM NaCl, 1.5 M Na₂HPO₄, 50 mM HEPES pH 7.05) damla damla eklendi. Oluşan tepkime karışımı 8 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 2.5 milyon HEK293T içeren petrilere aktarıldı. 10-12 saat 37°C’de, % 5 CO₂ varlığında inkübe edildikten sonra besiyerleri değiştirildi. Hücreler 48 saat

süre ile aynı koşullarda inkübe edildi. Böylece Flag-Cul4A rekombinant proteininin çok miktarda üretimi sağlandı.

Hücreler, 48 saat sonra inkübatörden alındı, besiyeri çekildikten sonra bir kez PBS ile yıkandı. Her bir petri kabı üzerine 1.5 ml parçalama tamponu (50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 10 mM β -gliserofosfat, %10 gliserol (h / h), % 1 Tween 20, % 0.1 NP-40, 1 mM Na_3VO_4 , 1 mM NaF) eklendikten sonra hücre zarının parçalanması için petriler soğuk odada 30 dakika süreyle inkübe edildi. Hücreler daha sonra 15 ml'lik falkon tüpe toplanarak 14 000 rpm'de +4°C'de 30 dakika süreyle santrifuj edildi. Süpernatant temiz falkon tüpe alındı.

4.2.1.iii. Flag-Cullin 4A, UV-DDB1 ve UV-DDB2 proteinlerinin saflaştırılması

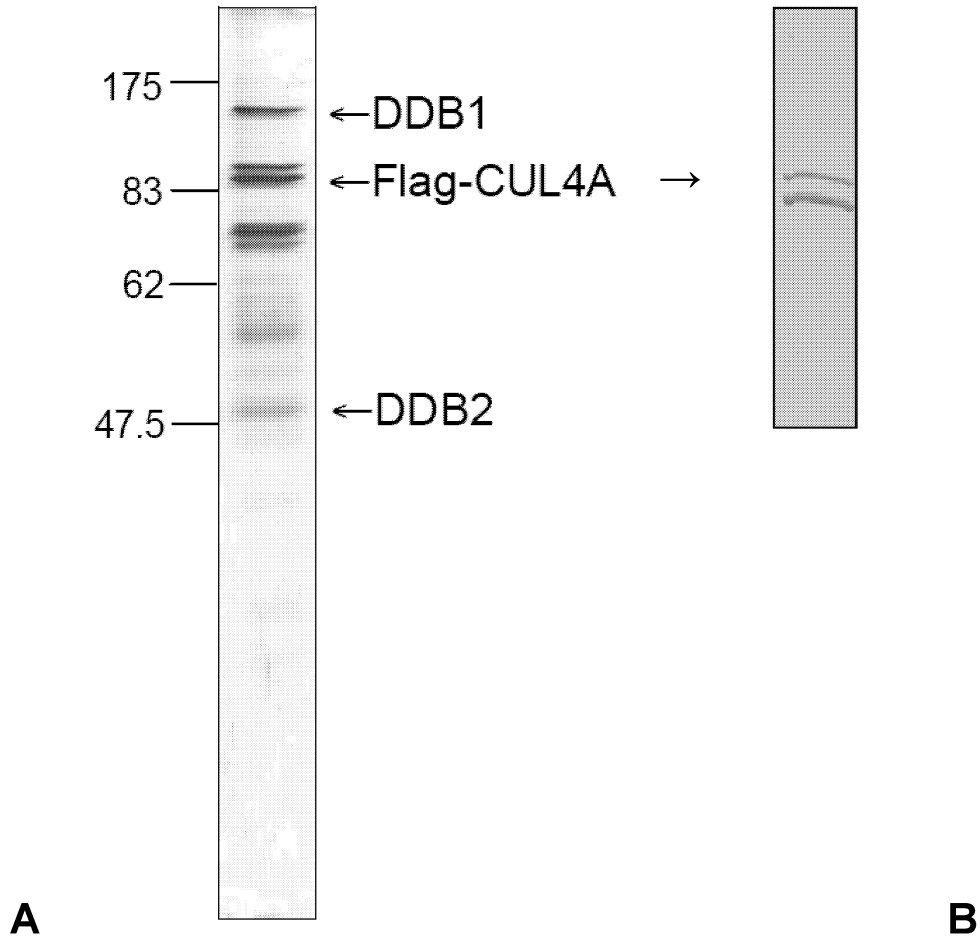
Elde edilen lizata TBS ile 1 : 1 dengelenmiş 200 μl "Flag" reçinesi eklendi. Örnekler, +4°C'de 16 saat süreyle çalkalayıcıda inkübe edildikten sonra soğuk odada 2000 rpm'de 5 dakika süreyle santrifüjlenerek reçine çöktürüldü. Çöktürülen reçine TBS içeren tamponla 3 kez yıkandıktan sonra (15 ml x 3 kez) elüsyon tamponuyla (100 μg / ml "Flag" peptid ve % 10 (h / h) gliserol içeren TBS) Cul4A, UV-DDB1, UV-DDB2 proteinleri elüe edildi. Elde edilen elüat % 10'luk SDS-PAGE'e yüklendi ve yürütüldü. Cul4A proteini ve birlikte elüe olan protein bantları gümüş boyama yöntemi ile boyandı (Şekil 4.16.A). Cul4A'nın ekspresyonu ise hücre lizatından ve elüattan "Western blotting" yöntemi ile belirlendi (Şekil 4.16.B).

Elüattaki protein derişimi 76 ng / μl olarak belirlendi. Elüatın 1 μl 'si 26 ng Cul4A, 7.5 ng UV-DDB1 ve 0.5 ng UV-DDB2 içermekteydi.

4.2.2. İnsan Flag-UV-DDB2 proteininin HEK293T hücre hatlarında çok miktarda üretiminin sağlanarak UV-DDB2/UV-DDB1/Cul4A/COP9 sinyaloza kompleksini ile birlikte saflaştırılması

4.2.2.i. İnsan Flag-UV-DDB2 gen parçasının memeli pcDNA3 vektörüne klonlanması

İnsan Flag-UV-DDB2 geninin memeli pcDNA3 vektörüne klonlanması için ilk olarak Flag-UV-DDB2 cDNA'sı N-ucuna "Flag" epitopu eklenecek şekilde primer dizileri düzenlenerek PCR ile çoğaltıldı. Flag-UV-DDB2 geninin



Şekil 4.16. Flag-Cul4A'nın ekspresyonu sonrası saflaştırılan Cul4A/UV-DDB1/UV-DDB2 kompleksinin % 10'luk SDS-PAGE'de gümüş boyama ile (A) ve Cul4A ekspresyonunun "Western blotting" ile (B) gösterilmesi. A. Cul4A/UV-DDB1/UV-DDB2 içeren "Flag" afinite kromatografisi çıktısının % 10'luk SDS-PAGE sonrası gümüş boyası ile boyanması (Kuyucuğa 1.1µg protein yüklenmiştir), B. Flag-Cul4A protein ekspresyonunun % 10'luk SDS-PAGE sonrası "Western blotting" ile gösterilmesi (20 µl örnek) Cul4A için görülen 2 bant proteinin nedile ve non-nedile formunu göstermektedir.

çoğaltılmasında kullanılan primer dizileri 5' -GATCGGATCCAGGATGGACT ACAAGGACGACGATGACAAGGCTCCCAAGAAACGCCCAG, 5' - GATC CTCGAGTCACTTCCGTGTCCTGGCTTC nükleotid dizileridir (Altı çizili bölgeler sırasıyla *Bam*H1 ve *Xho*I restriksiyon endonükleaz kesim bölgelerini göstermektedir).

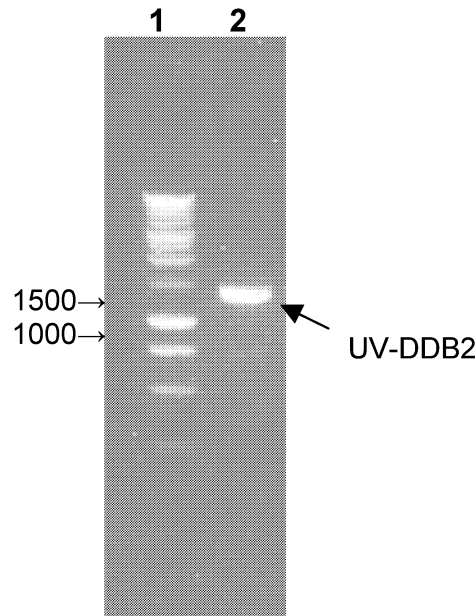
Herbir PCR tepkime karışımı, son derişimi 200 ng DNA, 0.3 µM dNTP, 0.3 µM "Forward" ve 0.3 µM "Reverse" primer, 1 x "Enhancer" çözeltisi, 1 mM MgSO₄, 2.5 U *Pfx* polimeraz içermektedir.

Polimeraz zincir tepkimesi koşulları :

95 °C’de	2 dakika	
94 °C’de	15 saniye	} → 30 döngü
55°C’de	30 saniye	
68°C’de	1.5 dakika	
68°C’de	10 dakika	
+4°C’de	∞	

olarak gerçekleştirildi.

Çoğaltılan DNA ürünü daha sonra % 1’lik agaroz-TBE jelinde yürütüldü ve etidyum bromür ile boyanarak görüntülendi (Şekil 4.17). PCR ile çoğaltılan ürünler daha sonra 4.2.1.i’deki saflaştırma basamakları takip edilerek Qiagen PCR saflaştırma kiti kullanılarak 50 µl distile su saflaştırıldı.



Şekil 4.17. Flag–UV-DDB2 PCR ürününün % 1’lik agaroz-TBE jelinde etidyum bromür ile boyanarak görüntülenmesi. 1. kuyucuk: 2 µl 1 kb’lık “marker”; 2. kuyucuk: 160ng DNA.

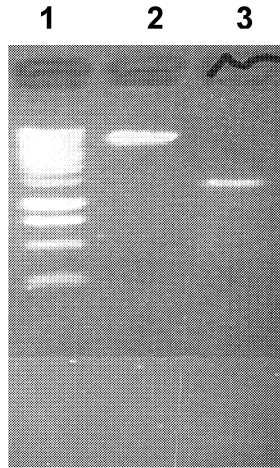
Flag-UV-DDB2 cDNA’sının pcDNA3 vektörüyle birleştirilmesi için, önce PCR ürünü *Bam*H1 ve *Xho*1 enzimleriyle 37°C’de 16 saat süreyle inkübe edilerek kesildi. Flag-UV-DDB2 için tepkime karışımı 1.2 µg DNA, 10 U *Bam*H1, 10 U *Xho*1, *Bam*H1 tamponu (New England Biolabs, son derişim 15 mM NaCl, 1 mM Tris-HCl pH 7.9, 1 mM MgCl₂, 0.1 mM dTT), BSA (son derişim 0.1 mg / ml)

olacak şekilde hazırlandı (son tepkime hacmi 100 µl). Örneğin tamamı % 1'lik agaroz-TBE jele yüklendi (100 µl tepkime karışımı + 20 µl yükleme boyası) 103 V'da 2.5 saat süreyle yürütüldükten sonra jelden kesim yapılarak UV-DDB2 cDNA'sı Qiagen jel saflaştırma kiti ve kit içindeki tamponlar kullanılarak saflaştırıldı. Bunun için, kesilen jel parçası 1.7 ml'lik Eppendorf tüpe alındı, üzerine ağırlığının 3 katı hacimde olacak şekilde (her bir mg jel için 3 µl tampon) kit içindeki QG tamponu eklendi. 37°C su banyosunda 10 dakika süreyle inkübe edilerek jelin tamamen erimesi sağlandı. Üzerine 1 hacim izopropanolol eklenerek karıştırıldı. Karışım, kit içindeki kolona yüklendikten sonra 13 000 rpm'de oda sıcaklığında 1 dakika süreyle santrifüj edildi. Üzerine yeniden 0.5 ml QG tamponu eklenerek aynı koşullarda tekrar santrifüj edildikten sonra kolon üzerine 0.75 ml PE tamponu eklendi ve aynı santrifügasyon yöntemi kullanılarak yıkandı. Kolon boş olarak 1 dakika süreyle 13 000 rpm'de santrifüj edildi. Böylece örnekteki PE tamponunun tamamen uzaklaştırılması sağlandı. Kolon temiz bir Eppendorf tüp içine yerleştirildi. Kolon üzerine 50 µl distile su pipetlendi, 1 dakika süreyle oda sıcaklığında inkübe edildi, 13 000 x g'de santrifüj edildi. Böylece saflaştırılmış PCR ürününün Eppendorf tüpte birikmesi sağlandı.

pcDNA3 memeli hücre vektörünün Flag-UV-DDB2 ile ligasyonu için, vektör DNA, *Xho*1 ve *Bam*H1 ile 37°C'de 16 saat süreyle inkübe edilerek kesildi. Tepkime karışımı 2.1 µg pcDNA3, BamH1 tamponu, BSA (son derişimi 0,1 mg / ml), 10 U *Xho*1, 10 U *Bam*H1 içermekteydi. Tepkime karışımı daha sonra % 1'lik agaroz-TBE jele yüklendi. 120 V'da 4 saat süreyle yürütüldükten sonra jelden kesim yapıldı ve Qiagen jel saflaştırma kiti ile saflaştırıldı. Elüsyon 40 µl distile su ile yapıldı.

Vektör (pcDNA3) ve insert DNA'nın (Flag-UV-DDB2) göreceli molar derişim oranlarının belirlenmesi için ligasyon tepkimesi için hazırlanan pcDNA3 vektörü tepkime karışımı ve UV-DDB2 cDNA'sı % 1'lik agaroz-TBE jelde (137 V, 1 saat) yürütüldü (Şekil 4.18).

Vektör ve insert DNA'nın ligasyonu için "Roche DNA Rapid Ligation Kiti" ve kullanıldı.



Şekil 4.18. Vektör ve insert DNA' nin % 1'lik agaroz-TBE jelde yürütülerek etidyum bromür ile boyanarak göreceli molar oranlarının belirlenmesi. 1. kuyucuk: 1 kb'lık "marker"; 2 μ l , 2. kuyucuk: pcDNA3 vektörü (87 ng); 3. kuyucuk: Flag-UV-DDB2 (40 ng).

Vektör ve insert DNA'nın ligasyonu için tepkime koşulları:

<u>Tepkime karışımı</u>	<u>1^a</u>	<u>2^b</u>	<u>3^c</u>
Vektör DNA (43.5 ng / μ l) , μ l	1	1	1
Insert DNA (20 ng / μ l), μ l	1	2	-
5 x Sulandırma tamponu, μ l	2	2	2
Distile su, μ l	6	5	7
2 x T4 tamponu, μ l	10	10	10
T4 ligaz, μ l	1	1	1
Toplam, μ l	21	21	21

^a. Tepkime karışımı 1'de vektör – insert oranı yaklaşık 1 / 3'tür.

^b. Tepkime karışımı 2'de vektör – insert oranı yaklaşık 1 / 6'dır.

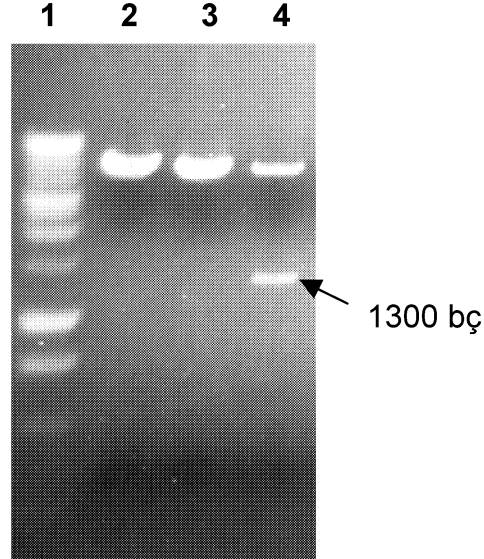
^c. Tepkime karışımı 3 insert DNA içermeyip yalnızca vektör DNA içermektedir.

Tepkime karışımları oda sıcaklığında 35 dakika, ardından buzda 5 dakika süreyle inkübe edildi.

İlk ve ikinci ligasyon karışımının her birinden 2 μ l alınarak ayrı ayrı 100 μ l *E. coli* DH10B hücrelerine aktarıldı. Karışım buzda 30 dakika süreyle inkübe

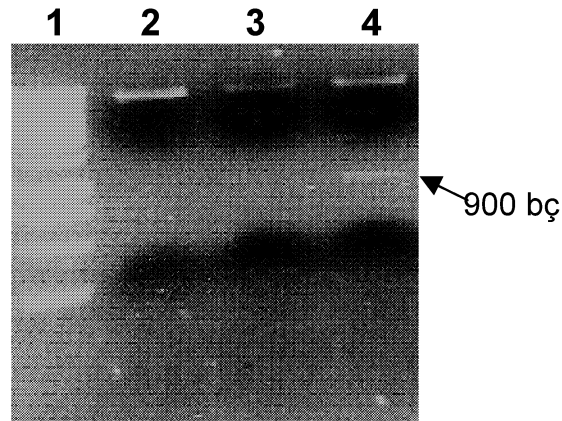
edildikten sonra 90 sn 42°C’de bekletildi ve yeniden 2 dakika buzda inkübe edildikten sonra ampisillinli LB içeren 100 mm çapındaki petrilere aktarıldı. Petriler 16 saat süreyle 37°C’de inkübe edildi.

İlk ve ikinci tepkime karışımının aktarıldığı petrillerdeki Flag-UV-DDB2 / pcDNA3 plazmidini içeren kolonileri belirlemek amacıyla 2.5 ml ampisillinli LB içeren kültür tüplerinde kültür başlatıldı. Her bir koloni ayrı bir kültür tüpünde 37°C’de çalkalayıcıda 8 saat süreyle büyütüldü. Hücreler oda sıcaklığında 13 000 x g’de 1 dakika süreyle santrifüj edilerek çöktürüldü. Süpernatant atıldı. Plazmidin izolasyonu için Qiagen miniprep kiti kullanıldı (Bkz 4.2.1.i). Flag-UV-DDB2 / pcDNA3 içeren hücreleri belirlemek için miniprep ürününün 10 µl’si *Xho*I ve *Bam*HI ile 37°C’de 2 saat süre ile inkübe edilerek kesildi. Tepkime karışımı her bir miniprep ürünü için 10 µl plazmid DNA, 15 U *Xho*I, 15 U *Bam*HI, *Bam*HI tamponu, BSA (son derişimi 0.1 mg / ml) içermektedir. Örneğin tamamı (20 µl) 4 µl jel yükleme boyası eklenerek %1’lik agaroz-TBE jelle yüklendi ve yürütüldü, etidyum bromür ile boyanarak görüntülendi (Şekil 4.19).



Şekil 4.19. Flag-UV-DDB2 / pcDNA3 içeren kolonilerin belirlenmesi için miniprep ürünlerinin *Xho*I - *Bam*HI enzimleriyle kesilmesi. Örnekler % 1’lik agaroz-TBE jelle yürütülmüş, etidyum bromür ile boyanarak görüntülenmiştir. 1. kuyucuk: 1 kb’lık “marker”; 2-4. kuyucuklar: farklı kolonilere ait kesim ürünleri. 4. kuyucuktaki örnek Flag-UV-DDB2/pcDNA3 plazmidini içermektedir.

pcDNA3 içindeki Flag-UV-DDB2'nin yönünün doğruluğunu test etmek için ikinci bir grup enzimden faydalanıldı. Bu amaçla vektör ve insert DNA içinde birer kesim noktası bulunan *Xba*I ve *Eco*RV enzimleri seçildi. İlk deneyde pozitif sonuç veren miniprep ürünleri ile *Xba*I ve *Eco*RV ile kesim yapıldı. Tepkime koşulları son derişimi NEB 2 tamponu (son derişimi 5 mM NaCl, 1 mM Tris-HCl pH 7.9, 1 mM MgCl₂, 0.1 mM dTT), 5 U *Xba*I, 5 U *Eco*RV, BSA (son derişimi 0.1 mg / ml) olacak şekilde hazırlandı. Örnekler 37°C'de 12 saat inkübe edildikten sonra % 1.25'lik agaroz-TBE jele yüklenerek yürütüldü ve etidyum bromür ile boyanarak görüntüledi (Şekil 4.20).



Şekil 4.20. Miniprep ürünlerinin *xba*I ve *Eco*RV ile sindirilmesi sonrası % 1.25'lik agaroz-TBE jelde yürütülüp, etidyum bromür ile boyanarak görüntülenmesi. 1. kuyucuk: 2.5 µl 1kb'lık "marker"; 2-4. kuyucuklar: sırasıyla Şekil 4.19'daki örneklerin *Xba*I-*Eco*RV ile kesilmesi sonrası DNA ürünleri. 4. kuyucuktaki örnek Flag-UV-DDB2/pcDNA3 plazmidini içermektedir.

Flag-UV-DDB2 geninin dizisinin doğruluğu ve mutasyon olup olmadığı North Carolina Üniversitesi "Sequencing Facility"ye gönderilerek test edildi.

Flag-UV-DDB2 / pcDNA3 plazmidinin maksiprep kiti ile çoğaltılması 4.2.1.i'deki basamaklar izlenerek gerçekleştirildi. Elde edilen DNA derişimi spektrofotometrede 260 nm'de ölçüldü ve miktarı 0.83 µg / µl olarak bulundu.

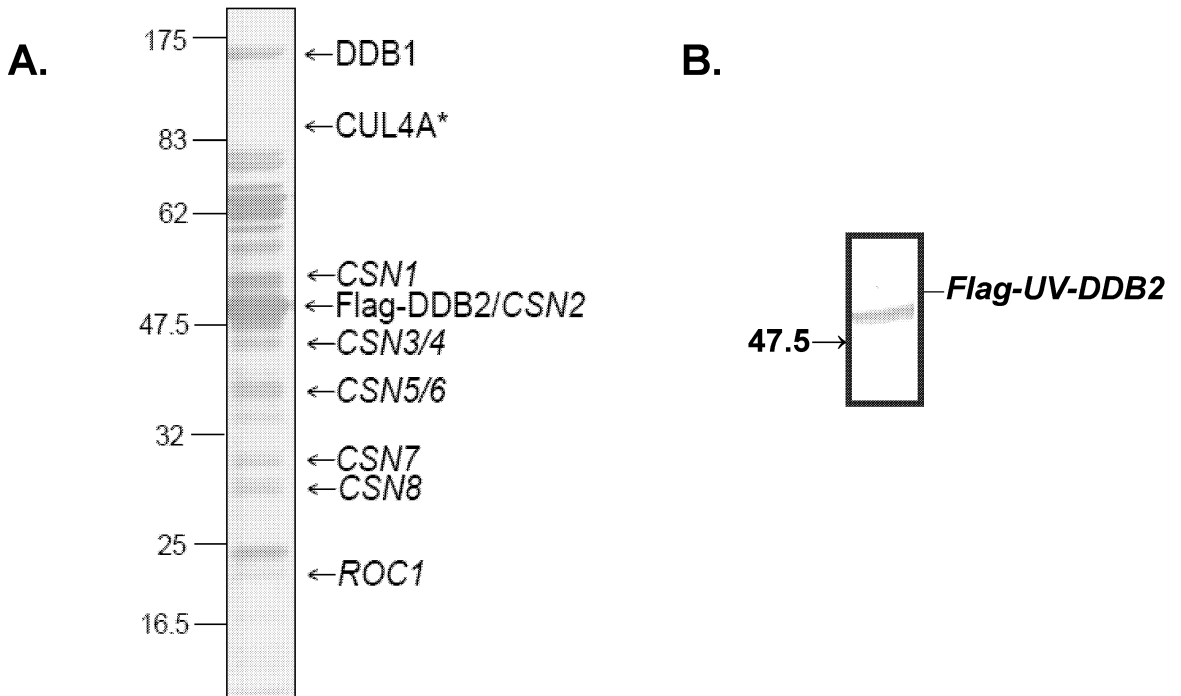
4.2.2.ii. Flag-UV-DDB2 rekombinant proteininin HEK293T hücrelerinde çok miktarda üretilmesi

Flag-UV-DDB2 rekombinant proteininin HEK293T hücrelerinde çok miktarda üretilmesi 4.2.1.ii'deki basamaklar izlenerek gerçekleştirildi.

4.2.2.iii. Flag-UV-DDB2 ve kompleks oluşturduğu UV-DDB1, Cul4A, COP9 proteinlerinin saflaştırılması

HEK293T hücrelerinin toplanması ve hücre zarlarının parçalanması 4.2.1.iii'deki basamaklar takip edilerek gerçekleştirildi.

Elde edilen hücre lizatı 15 ml'lik konikal tüpe alındı, üzerine TBS ile 1 : 1 dengelenmiş 200 µl "Flag" reçinesi eklendi. Örnekler, +4°C' de 16 saat süreyle karıştırıcıda inkübe edilerek proteinin reçineye bağlanması sağlandı. Ardından reçine 2000 rpm'de 5 dakika süreyle soğuk odada santrifüjlenerek çöktürüldü, 15 ml TBS ile 3 kez yıkandıktan sonra 100 µg / ml "Flag" peptid, TBS, % 10 (h / h) gliserol içeren elüsyon tamponuyla edildi. Elde edilen elüat % 10'luk SDS-PAGE'e yüklendi ve yürütüldü. UV-DDB2 proteini ve UV-DDB2 ile etkileşime giren proteinler gümüş boyası ile boyandı. UV-DDB2 ekspresyonu "Western blotting" yöntemi ile gösterildi (Şekil 4.21).



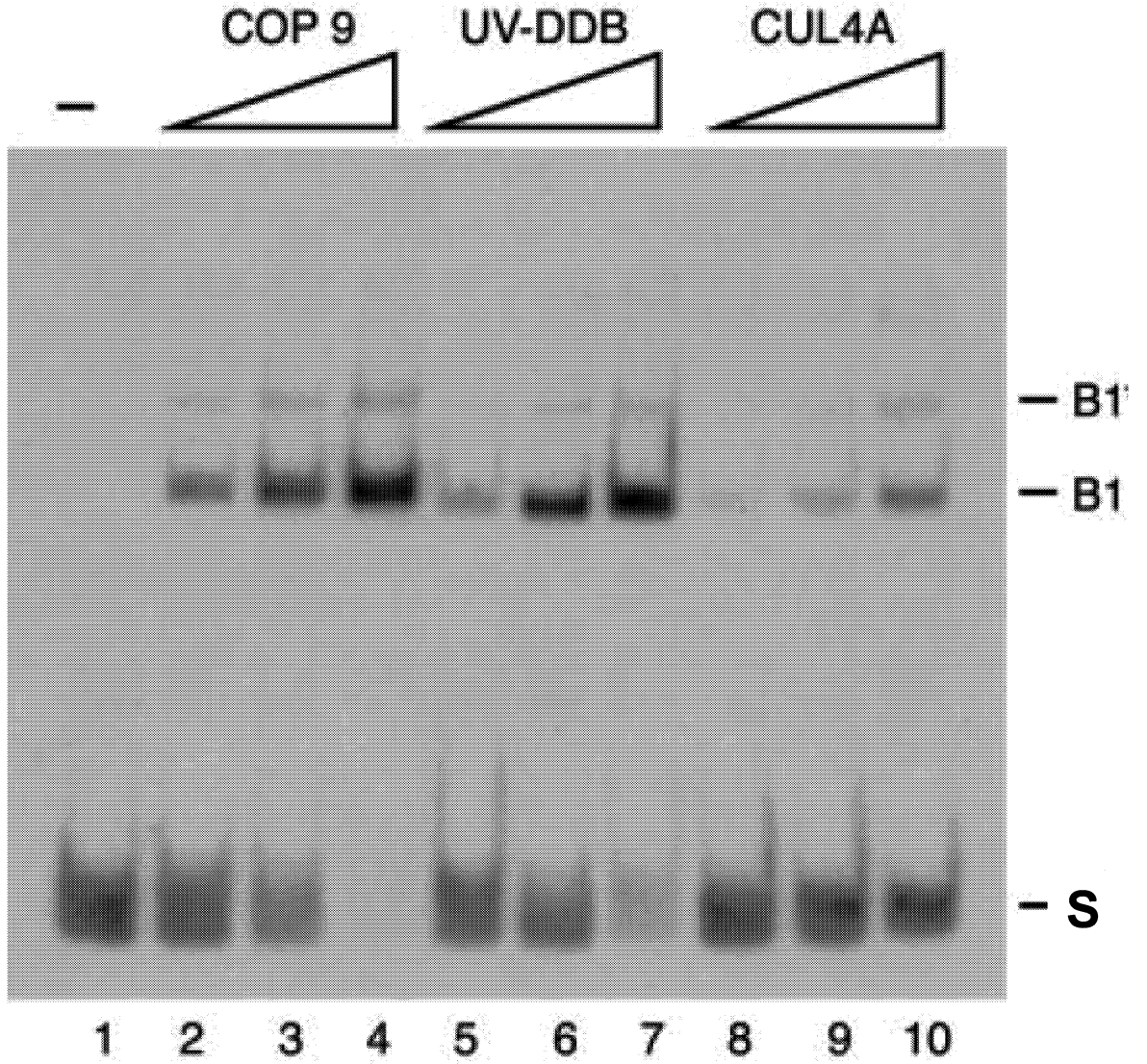
Şekil 4.21. Flag-UV-DDB2 ekspresyonundan sonra UV-DDB1/UV-DDB2/Cul4A/COP9 kompleksinin izolasyonu **A.** UV-DDB1/UV-DDB2/Cul4A/COP9 kompleksinin % 10'luk SDS-PAGE sonrası "Coomassie blue" boyaması ile gösterilmesi (Kuyucuğa 2.5 µg protein yüklenmiştir). COP9 kompleksine ait bileşenler sağ yanda gösterildi. Cul4A varlığı jelde görüntülenmemekle birlikte Cullin 4A antikorunu kullanarak "Western blotting" ile doğrulandı. Örnek 0.64 µg UV-DDB/COP9 kompleksi içermektedir. **B.** Flag-UV-DDB2 gen ekspresyonunun % 10'luk SDS-PAGE sonrası Western blotting ile gösterilmesi. 20 µl elüat ve 4µl jel yükleme boyası karıştırılarak kuyucuğa yüklendi. Standart proteinlere ait molekül ağırlıklarının yeri şeklin sol yanında gösterilmektedir.

Protein miktarı 250 ng / µl olarak ölçüldü. 1 µl elüat 64 ng UV-DDB/COP9 kompleksi içermekteydi.

4.3. UV - DDB, UV – DDB / Cul4A, UV – DDB / Cul4A / COP9 süper komplekslerinin 50 baz çifti uzunluğunda tek pirimidin pirimidon (6–4) ışın ürünü içeren çift zincirli DNA'ya bağlanma özelliklerinin EMSA yöntemi ile incelenmesi

UV-DDB, UV-DDB/Cul4A, UV-DDB/Cul4A/COP9 süper komplekslerinin 50 bp'lik, tek pirimidin pirimidon (6-4) ışın ürünü içeren DNA'ya bağlanma özellikleri EMSA ile test gösteren edildiğinde protein derişimi ile artan oranda ve UV-DDB heterodimeri ile aynı davranışı bağlanma özellikleri gözlemlendi (Şekil 4.22).

Bu süper kompleksler yapılarında çok farklı proteinler bulundurdıklarından bu proteinlerin bağlanmaları durumunda farklı bandlar oluşturan DNA-protein kompleksleri oluşması beklemekteydik. Bu da ne COP9'un ne de Cul4A kompleksinin DNA ile dayanıklı bir kompleks oluşturmadığını göstermektedir.



Şekil 4.22. COP9/Cul4A/UV-DDB, Cul4A/UV-DDB ve UV-DDB komplekslerinin 50 bp'lik tek pirimidin-pirimidin (6-4) ışın ürünü içeren çift zincir DNA'ya bağlanma özellikleri. COP9 ve Cul4A kompleksleri ile yapılan DNA bağlanma çalışmaları UV-DDB ile yapılanlarla aynı özellikleri göstermektedir. EMSA deneyleri 50 bp'lik tek pirimidin-pirimidin (6-4) ışın ürünü içeren çift zincir DNA ve serbest UV-DDB, COP9, Cullin 4A kompleksleri ile yapılmıştır. DNA-protein kompleksi natif poliakrilamid jelde yürütülerek serbest (S) ve bağlı (B) DNA ayrılmıştır. B1, UV-DDB kompleksini göstermekteyken, B1* iki farklı UV-DDB molekülünün aynı DNA molekülüne bağlanması ile ortaya çıkmaktadır. Üstteki üçgenler artan miktarda protein miktarlarını göstermektedir. 2-4. kuyucuklar 0.2 - 0.8 nM COP9, 5-7. kuyucuklar 0.1 - 0.4 nM UV-DDB, 8-10.kuyucuklar 1.1 - 4.4 nM Cul4A içermektedir.

5. TARTIŞMA

Kseroderma pigmentozum, fotosensitivite ve UV ışığının tetiklediği deri kanserlerinde artışla karakterize genetik geçişli nadir bir sendromdur. Kseroderma pigmentozum'un nükleotid eksizyon tamir mekanizmasında bozuklukla seyreden 7 alt grubu (XPA-G) bulunmaktadır. Bu sendromlardan XPE'ye DDB2 (XPE) genindeki mutasyonların neden olduğu bulunmuştur. Nükleotid eksizyon tamir mekanizmasında rol alan XPA, XPB, XPC, XPD, XPF ve XPG proteinlerinin bu mekanizmada rol oynayan esas eksizyon nükleazlar olduğu bilinmektedir (1,3,9,15). Bununla birlikte DDB2'nin nükleotid eksizyon tamir mekanizmasındaki ve tümörlerden korunmadaki rolü tartışmalıdır.

DDB2, UV ışığının neden olduğu DNA hasarına bağlanan protein (UV-DDB) kompleksinin küçük alt birimidir. UV-DDB, DDB1 ve DDB2 olmak üzere iki alt birimden oluşan heterodimer yapıdadır (10). Özellikle pirimidin pirimidon (6-4) ışın ürünü olmak üzere çok çeşitli DNA hasarlarına yüksek ilgi ile bağlanmaktadır (9,10,14,23,69,70). Bu özelliği nedeniyle UV-DDB'nin nükleotid eksizyon tamir mekanizmasında hasarın tanınması basamağında rol oynayabileceği düşünülmektedir (10).

XPE geni nakavt edilmiş farelerde yalnızca deri kanserlerinin değil, aynı zamanda her hangi bir kanserojene maruziyet olmaksızın çok çeşitli diğer kanser türlerinin de geliştiği saptanmıştır. Oysaki XPA geni nakavt edilmiş farelerde nükleotid eksizyon tamir mekanizması çok bozulmuştur ve XPA geni nakavt edilmiş farelerde UV ışığa maruziyet sonrası deri ve göz kanserleri sıklığı çok artmıştır, fakat iç organlarda spontan olarak gelişen tümörlere rastlanmamaktadır (15,121). Bu da XPE (DDB2) proteininin tümörden koruyucu etkisinin esas olarak nükleotid eksizyon tamir mekanizması yoluyla mı, yahut başka yollar üzerinden mi olduğu sorusunu akla getirmektedir (18).

XPE'nin nükleotid eksizyon tamir mekanizmasındaki işlevleri konusunda yapılan çalışmalar farklı sonuçlar vermiştir. Bu proteinin nükleotid eksizyon tamir mekanizmasında işlev gördüğünü düşündüren çalışmalar yanında (71,73,74,80), esas işlevinin nükleotid eksizyon tamir mekanizması üzerinden olmadığını düşündüren çalışmalar da (17-19,84-86) bulunmaktadır.

XPE'li hastalarda nükleotid eksizyon tamir mekanizmasında yaklaşık % 50 azalma olduğu belirtilmektedir (15,71,72). Yapılan çalışmalarda XPE hücre hatlarında CPD'lerin tamirinin normal hücre hatlarına göre azalmış olduğu, pirimidin pirimidon (6-4) ışın ürünleri tamirinin ise normale yakın olduğu bildirilmektedir (80). XPE hücre hatlarına DDB2'nin mikroenjeksiyonu ise DNA tamir bozukluğunu düzeltmektedir (71). Benzer şekilde, DDB2 geninin işlevsel olmadığı "Chinese Hamster Ovary (CHO)" hücrelerinde de CPD'lerin etkin olarak tamir edilemediği saptanmıştır. DDB2'nin rekombinant olarak çok miktarda üretildiği kemirgen hücrelerinde CPD'lerin tamirinin arttığı, UV ışığının neden olduğu mutasyonların ise azaldığı belirtilmektedir (73).

DDB2 mRNA seviyelerinin p53'e bağımlı olduğu, UV ışığını takiben DDB2 mRNA ve protein seviyelerinin arttığı belirlenmiştir. p53 -/- hücreler yanında XPE hücrelerinde de eksizyon tamir mekanizmasının bozuk olduğu belirtilmektedir (26,84).

DDB2'nin, hasarı tanıma basamağında işlevsel olan XPA ve XPC proteinlerinden bağımsız olarak UV ışığının neden olduğu hasar bölgesine erkenden gidip biriktiğini öne sürülmüştür (122). Bazı araştırmacılara göre ise XPC'nin hasar bölgesine birikimi DDB2 bağımlı olarak gerçekleşmektedir (123,124). UV-DDB heterodimerinin XPC'nin ubiquitinasyonuna neden olduğu, bunun da XPC'nin nükleotid eksizyon tamir mekanizmasındaki etkinliğini arttırdığı belirtilmektedir. (111,123)

Bu bulgular DDB2'nin, nükleotid eksizyon tamir mekanizmasında, özellikle de bu mekanizmada kritik olduğu kabul edilen hasarlı DNA bölgesine bağlanma ve tanınması aşamasında işlevi olduğunu düşündürmektedir.

Bununla birlikte, DDB2'nin transkripsiyonda (19,80,81), hücre siklusunda (21), DNA hasarı kontrol noktalarının denetiminde (16,17,19,80,81), apoptozda (84-86) ve kromatin modellenmesinde (10,80,81) rol oynayan, tümör baskılayıcı özelliği de (18,85,89,90) olan çok işlevli bir protein olduğunu destekleyen pek çok çalışma bulunmaktadır. Bu araştırmacılar, DDB2'nin nükleotid eksizyon tamir mekanizmasında etkin işlevi olmadığını öne sürmektedirler. XPE'li hastalarda fotosensitivitenin diğer XP hastalarına göre çok daha hafif seyretmesi (90), bazı çalışmalarda nükleotid eksizyon tamir mekanizmasının normal hücre hatlarıyla aynı

oranda etkin olduğunu belirten çalışmaların da bulunması bu bulguyu desteklemektedir (90). *In vitro* olarak nükleotid eksizyon tamir mekanizması UV-DDB'ye ihtiyaç duymamakta, hatta UV-DDB eklendiğinde bu mekanizmanın etkinliği azalmaktadır (75). Aynı şekilde DDB2 gen susturumunun olduğu CHO hücre hatlarında pirimidin pirimidon (6-4) ışın ürünlerinin etkin bir şekilde tamir edildiği belirtilmektedir (125). XPE hücre hatlarında CPD'lerin tamirinin azaldığını belirten çalışmaların yanında normal hücrelerle aynı oranda tamir edildiğini belirten çalışmalar da bulunmaktadır (126).

UV-DDB, hücrede nükleotid eksizyon tamir mekanizmasında işlev gören diğer tamir faktörlerine göre daha yüksek oranlarda bulunmaktadır. Bu da UV-DDB'nin nükleotid eksizyon tamir mekanizması dışında farklı işlevleri olabileceğini düşündürmektedir (15). DDB2'nin transkripsiyon faktörü E2F1 (19), transkripsiyon koaktivatörleri CBP/p300 ve STAGA ile (80,81) ilişkili olduğu bulunmuştur. Son iki proteinin aynı zamanda kromatin modellenmesinde rol oynadığı belirtilmektedir.

XPE hücreleri UV ışığına bağlı hücre ölümüne dirençli bulunmuştur. DDB2 proteini ve p53 proteinleri birbirlerinin seviyelerini düzenlemektedir. DDB2 +/- hücrelerde bazal ve indüklenmiş p53 seviyesi normal hücrelere göre daha düşük bulunmuştur. Bu da apoptozda azalmaya neden olmaktadır (85).

DDB2'nin ayrıca Cul4A kompleksi (16) ve COP9 sinyalozum kompleksi (17) ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Cul4A kompleksi XPC, DDB2 gibi proteinlerin ubiquitinlenmesi, hedeflenmesi ve yıkımında rol oynamaktadır (110,111). UV ışığını takiben UV-DDB/Cul4A kompleksinin COP9'dan ayrılarak kromatinle yakın ilişkiye geçtiği rapor edilmektedir. Bu da XPE'nin çoklu işlevleri olabileceğini düşündürmektedir (17).

DDB2'nin kompleks oluşturduğu yeni proteinlerin tanımlanması ve DDB2 / protein kompleksleriyle ilgili yeni çalışmalar DDB2, DDB1, UV-DDB heterodimerinin ve bu proteinlerin Cul4A, COP9 sinyalozum kompleksi ile birlikte nükleotid eksizyon tamir mekanizmasındaki işlevlerinin araştırılması gerekliliğini ortaya koymaktadır. Bundan dolayı bu çalışmada, DDB2'nin ve DDB2'nin içinde bulunduğu komplekslerin saflaştırılması ve nükleotid eksizyon tamir mekanizmasında kritik basamak olan hasarın tanınması basamağı için gerekli olduğu belirlenmiş hasarlı DNA'ya bağlanma özelliklerinin değerlendirmesi amaçlanmıştır.

UV-DDB'nin hasarlı DNA'ya bağlanma özellikleri ile ilgili pek çok çalışma bulunmakla birlikte alt birimlerinden birinin mi veya yalnızca UV-DDB heterodimerinin mi intrinsik bağlanma özelliği olduğu konusunda fikir birliği bulunmamaktadır. Hwang ve diğ. (25), DDB1 alt biriminin hasara bağlanan esas birim olduğunu rapor etmiştir. DDB2'nin katalitik olarak aktive ettiği DDB1'in (vur ve kaç mekanizması) DNA'ya bağlanma özelliği gösterdiğini, DDB2'nin ise bağlanma aktivitesi için sınırlayıcı özellikte olduğunu belirtmişlerdir. Araştırmacılara göre DDB2, DDB1 ile etkileşime girerek DDB1'i aktive etmekte, ardından DDB1 DNA hasarına bağlanmaktadır. DDB2, DDB1 ile kompleks yaparak DNA-DDB1 kompleksi içinde bulunabilir.

Shiyanov ve diğ. DNA protein kompleksi içinde 2 alt birimin de var olduğunu immünpresipitasyon ile göstermiş, ancak hangi alt birimin esas olarak DNA hasarına bağlandığı sorusuna açıklık getirememiştir (16).

Fujiwara ve diğ. de 30 bç'lik pirimidin pirimidon (6-4) ışın ürünü içeren hasarlı DNA'ya UV-DDB'nin heterodimer olarak bağlandığını belirtmekte, ancak hangi alt birimin esas olarak bağlanma özelliği olduğu sorusuna kesin bir açıklama getirmemektedir (70).

Fitch ve diğ. ise DDB2 alt biriminin hasarlı DNA'ya afinitesinin yüksek olduğunu öne sürmüşlerdir (26).

Bu çelişkili sonuçlar nedeniyle çalışmada DDB1, DDB2 alt birimleri ayrı ayrı saflaştırılarak, tek pirimidin pirimidon (6-4) ışın ürünü içeren çift zincirli DNA parçasına bağlanma özellikleri incelendi. DDB1 ve DDB2 polipeptidlerinin ayrı ayrı hasar içeren DNA substratı ile bağlanma özellikleri incelendiğinde, DDB1 alt biriminde deneyi gerçekleştirdiğimiz konsantrasyonlarda DNA'ya bağlanma gözlenmedi. İlgi çekici olarak DDB2'nin ise DNA substratına bağlandığı (B2) görüldü. Reaksiyon karışımına artan derişimde DDB1 eklendiğinde yavaş ilerleyen bandların kaybolduğu, jelde bu bantlara göre daha hızlı hareket eden yeni bantların (B1) oluştuğu gözlemlendi. B1'in UV-DDB'de oluşan bandlarla aynı hızda yürüdüğü saptandı (Şekil 4.1.11). B2'lerin jelde oldukça yavaş yürümesi nedeniyle her hangi bir kontaminasyon problemine karşı DDB2 antikoru ile "supershift" yapıldı. B2'nin DDB2 antikoru varlığında "supershift" oluşturduğu saptandı (Şekil 4.1.12). Anti-DDB2 antikoru ile "supershift"ın gösterilmesi ve DDB2 elüatındaki diğer

proteinlerin dizi analizleri ile kontrol edilmesi DDB2'nin hasarlı DNA'ya bağlanan esas alt birim olduğunu, bağlanma özelliğinin kontaminasyona bağlı olmadığını göstermekteydi. İlgi çekici olarak DDB2 proteini EMSA'da UV-DDB kompleksinden daha yavaş ilerleyen bantlar oluşturmakta idi. DDB2'nin hücre içinde homodimer yapıda olabileceği rapor edilmektedir (127). EMSA'da yavaş ilerleyen bantların DDB2'nin oligomerizasyonu nedeniyle veya DDB2'nin izoelektrik noktasının (pI: 9.6) UV-DDB'ye göre (pI: 5.1) daha yüksek olmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

Çalışmamızın bir parçası olarak eksizyon tamirini hücre ekstraktlarında değerlendiren in vitro eksizyon deneylerinde de DDB1, DDB2 veya UV-DDB süper komplekslerinin nükleotid eksizyon tamir mekanizmasının etkinliğini anlamlı olarak artırmadığı bulundu (Veriler gösterilmemiştir). Bu da UV-DDB'nin nükleotid eksizyon tamir mekanizmasında etkin bir rolü olmadığını göstermekteydi.

UV-DDB'nin alt birimlerinin ayrı ayrı, yahut heterodimer olarak diğer proteinlerle çoklu kompleksler oluşturabileceği belirtilmektedir (14,16,17). UV-DDB'nin, hücre siklusunun düzenleyicisi olduğu kabul edilen ve ubikuitin ligaz özelliği olan Cul4A ile kompleks oluşturduğu saptanmıştır. Cul4A'nın, UV-DDB'nin etkileşime girdiği, DNA tamiri ve hücre siklusunda işlev gören proteinleri hedeflemeye yardımcı olabileceği düşünülmüştür (16). COP9 kompleksi ise UV-DDB/Cul4A kompleksinin düzenleyicisi olarak kabul edilmektedir. XPE hastalarından birinden elde edilen fibroblastlara COP9/Cul4A/UV-DDB süper kompleksinin mikroenjeksiyonu UV ışığının indüklediği tamir sentezindeki bozukluğu düzeltmektedir (17). COP9 kompleksinin CSA proteini ile de DDB2'dekine benzer bir çoklu kompleks oluşturduğu, ancak UV ışığına maruziyet sonrası bu kompleks içindeki COP9 tarafından farklı şekilde kontrol edildiği belirtilmektedir. Bu da COP9 kompleksinin nükleotid eksizyon tamir mekanizmasındaki işlevlerinin çok önemli olabileceğine işaret etmektedir (17)

UV-DDB ve alt birimlerinin ayrı ayrı eksizyon tamir mekanizmasında etkin işlevi olmamakla birlikte XPE proteinin oluşturduğu çoklu komplekslerin bu mekanizmadaki işlevi tam olarak belirlenmemiştir. Cul4A/UV-DDB, COP9/Cul4A/UV-DDB süper komplekslerinin nükleotid eksizyon tamir mekanizmasında hasarın tanınması basamağındaki işlevleri tam olarak

belirlenmediğinden, çalışmada UV-DDB/Cul4A ve UV-DDB/Cul4A/COP9 süper komplekslerinin hasarlı DNA'ya bağlanma özellikleri incelenmesi amaçlandı.

Shiyanov ve diğ., Cul4A/UV-DDB kompleksinin hasarlı DNA'ya yüksek ilgiyle bağlandığını rapor etmişlerdir (16). Groisman ve diğ., COP9/Cul4A/UV-DDB kompleksinin kısmi olarak saflaştırıldığında DNA'ya bağlandığını belirtmişler, ancak hangi proteinlerin bu kompleks içinde olduğu sorusuna açıklık getirememişlerdir (17). Bizim çalışmamızda, UV-DDB'nin alt birimleri ve UV-DDB ile yapılan deneylerin ardından Cul4A/UV-DDB ve COP9/Cul4A/UV-DDB süper komplekslerinin pirimidin pirimidon (6-4) ışın ürününe bağlanma özelliklerinin belirlenmesi amacıyla EMSA yapıldı.

Çalışmamızda ilgi çekici olarak, Cul4A/UV-DDB kompleksinin EMSA'da UV-DDB ile aynı hızda ilerleyen bantlar oluşturduğu belirlendi (Şekil 4.2.11). Bu sonuç, Cul4A/UV-DDB kompleksinin hasarlı DNA'ya yüksek ilgiyle bağlandığını öne süren Shiyanov ve diğ.den (16) farklı bulundu.

COP9/Cul4A/UV-DDB süper kompleksi de benzer özellikler gösterdi (Şekil 4.2.11). Groisman ve diğ. (17) bu kompleksin kısmi olarak DNA'ya bağlanma özelliği gösterdiğini belirtmekle birlikte hangi proteinlerin bağlandığı sorusuna açıklık getirmemişti. Bu süper kompleksler yapılarında pek çok farklı protein bulundurduklarından bu proteinlerin bağlanmaları durumunda farklı bantlar oluşturan DNA-protein kompleksleri oluşmasını beklenmeliydi. Oysaki Cul4A ve COP9 süper kompleksleri ile yapılan jel retardasyon deneylerinden elde edilen bantların jelde UV-DDB ile elde edilen bantlar ile aynı olduğu bulundu. Bu da ne COP9'ın ne de Cul4A kompleksinin DNA ile dayanıklı bir kompleks oluşturmadığını göstermektedir. Buna göre UV-DDB'nin Cul4A ve COP9 kompleksindeki diğer proteinlerle dinamik bir dengede olduğu, DNA-protein kompleksi oluşurken bu kompleksten ayrıldığı düşünülebilir. Bir diğer olasılık da bu komplekslerin başlangıçtaki DNA-protein kompleksinin içinde bulunması, kompleks EMSA jeline girerken DNA-UV-DDB kompleksinden ayrılmasıdır. Her iki olasılık da COP9, Cul4A komplekslerinin DNA ile dayanıklı bir kompleks oluşturmadığını göstermektedir.

Sonuçlarımız, DDB2 proteininin UV-DDB heterodimerinin UV ışığının oluşturduğu DNA hasarına bağlanan ana alt birim olduğunu göstermektedir.

UV-DDB ve Cul4A, Cul4A/COP9 ile oluşturduğu sũper kompleksler EMSA’da hasarlı DNA’yla aynı özellikte bantlar oluşturmaktadır. Çalışmamızın devamı olarak DDB2 ve adı geçen proteinlerle yapılan eksizyon deneylerinde gerek DDB2, gerekse oluşturduğu komplekslerin nũkleotid eksizyon tamir mekanizmasının etkinliğini arttırıcı etkinliği ise saptanmamıştır. Sonuçlar, UV-DDB’nin hasarlı DNA’ya bağlanma özelliği olduğunu göstermekle birlikte in vitro olarak nũkleotid eksizyon tamir mekanizmasında doğrudan işlev görmediği, daha çok sinyal iletimi, DNA hasarı kontrol noktaları, apoptoz, kromatin modellenmesi gibi farklı yolaklar üzerinden tũm r baskılayıcı özelliğe sahip olduğu görüşünü desteklemektedir. Bu nedenle, gerek XPE (UV-DDB2) proteininin, gerekse oluşturduğu protein komplekslerinin bu yolaklar üzerindeki işlevlerini araştırmaya yönelik çalışmalara ağırlık verilmesi yararlı olacaktır.

6. KAYNAKLAR

1. Friedberg, E.C., Walker GC, Siede W. DNA Repair and Mutagenesis'de, ASM press, Washington D.C., s. 24-25, 1995
2. Orren, D.K., Sancar, A., New discoveries in the enzymology of DNA repair, Cancer Rev., 7, 5-27, 1987.
3. de Boer, J., Hoeijmakers H.J., Nucleotide excision repair and human syndromes. Carcinogenesis, 21(3), 453-460, 2000.
4. Sancar, A., Mechanisms of DNA excision repair, Science, 266(23), 1954-1956, 1984.
5. Huang, J.C., Svoboda, D.L., Reardon, J.T., Sancar, A., Human nucleotide excision nuclease removes thymine dimers from DNA by incising the 22nd phosphodiester bond 5' to the bond and the 6th phosphodiester bond 3' to the photodimer, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 89, 3664-3668, 1992.
6. Cooper, G.M., The Cell, A Molecular Approach'da, ASM press, Washington D.C., s. 192-199, 2000.
7. Bessho, T., Mu, D., Sancar, A., Initiation of DNA interstrand crosslink repair in humans: the nucleotide excision repair system makes dual incisions 5' to the crosslinked base and removes a 22-28 nucleotide - long damage - free strand, Mol. Cell, 17, 6822-6830, 1997.
8. Bohr, V.A., Smith, C.A., Okumoto, D.S., Hanawalt, P.C., DNA repair in an active gene: removal of pyrimidine dimers from the DHFR gene of CHO cells is much more efficient than in the genome overall. Cell, 40 (2): 359-369, 1985.
9. Bootsma, D., Kraemer, K.H., Cleaver, J.E. ve Hoeijmakers, J.H.J., Nucleotide excision repair syndromes: xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy. The Genetic Basis of Human Cancer (Vogelstein and k.w. Kinzler eds.)'de, McGraw-Hill Book Co., New York, s. 677-689, 1998.
10. Tang, J., Chu, G., Xeroderma pigmentosum group E and UV-damaged DNA binding protein. DNA Repair. 1, 601-616, 2002.

11. Chu, G., Chang, E., Xeroderma pigmentosum group E cells lack a nuclear factor that bind to damaged DNA. *Science* 242, 564-567, 1988.
12. Kataoka, H., Fujiwara, Y., (1991). UV-damage specific DNA binding protein in xeroderma pigmentosum complementation group E, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 175, 1139-1143, 1991.
13. Keeney, S.N., Wein, H., Linn, S., Biochemical heterogeneity in xeroderma pigmentosum group E, *Mutat. Res.*, 273, 49-56, 1992.
14. Keeney, S., Chang, G.J., Linn, S., Characterization of a human DNA damage binding protein implicated in xeroderma pigmentosum E, *J. Biol. Chem.*, 268(28), 21293-21300, 1993.
15. de Boer, J., Hoeijmakers, J.H.J., Cleaver, J.E. ve Kraemer, K.H., *The Metabolic Basis of Inherited Diseases*. (Eds. Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S. ve Valler, D.) Mc Graw Hill, New York, Vol: 3, 28, 690-692, 2001.
16. Shiyanov, P., Nag, A., Raychaudhuri, P., Cullin 4A associates with the UV-damaged DNA-binding protein DDB, *J. Biol. Chem.*, 274(50), 35309-12, 1999.
17. Groisman, R., Polanowska, J., Kuraoka, I., Sawada, J., Saijo, M., Drapkin Rkisselev, A.F., Tanaka, K., Nakatani, Y, The ubiquitin ligase activity in the DDB2 and CSA complexes is differentially regulated by the COP9 signalosome in response to DNA damage, *Cell*, 113, 357-67, 2003.
18. Yoon, T., Chakraborty, A., Franks, R., Vali, T., Kiyokawa, H., Rachaudri, P., Tumor-prone phenotype of the DDB2-deficient mice, *Oncogene*, 13;24(3), 469-478, 2005.
19. Shiyanov, P., Hayes, S.A., Donepudi, M., Nichols, A.F., Linn, S., The naturally occurring mutants of DDB are impaired in stimulating nuclear import of the p125 subunit and E2F1-activated transcription., *Mol. Cell. Biol.*, 19(7), 4935-4943, 1999.

20. Takata, T., Yoshida, H., Yamaguchi, M., Sakaguchi, K., *Drosophila* damaged DNA binding protein 1 is an essential factor for development. *Genetics*, 168(2), 855-65.
21. Nag, A., Bondar, T., Shiv, S., Raychaudhuri, P., The xeroderma pigmentosum group E gene product DDB2 is a specific target of Cullin 4A in mammalian cells, *Mol. Cell. Biol.*, 21 (20), 6738-6747, 2001.
22. Bontron, S., Lin-Marq, N., Strubin, M., Hepatitis B virus X associated with UV-DDB1 induces cell death in the nucleus and is functionally antagonized by UV-DDB2, *J. Biol. Chem.*, 277(41), 38847-38854, 2002.
23. Reardon, J.T., Nichols, A.F., Keeney, S., Smith, C.A., Taylor, J.S., Linn, S., Sancar, A., Comparative analysis of binding of human damaged DNA binding protein (XPE) and *Escherichia Coli* damage recognition protein (UvrA) to the major ultraviolet photoproducts: T[c,s]T, T[t,s]T, T[6-4T]T, and T[Dewar]T. *J. Biol. Chem.*, 268 (28), 21301-21308, 1993.
24. Nichols, A.F., Itoh, T., Graham, J.A., Liu, W. et al., Human damage specific DNA binding protein p48. Characterization of XPE mutations and regulation following UV radiation, *J. Biol. Chem.*, 275 (28), 21422-428, 2000.
25. Hwang, B.J., Toering, S., Francke, U., Chu, G., p48 activates a UV-damaged DNA binding factor and is defective in xeroderma pigmentosum group E cells that lack the binding activity, *Mol. Cell. Biol.*, 18, 4391-99, 1998.
26. Fitch, M.E., Cross, I.V., Ford, J.E., p53 responsive nucleotide excision repair gene products p48 and XPC, but not p53, localize to sites of UV- irradiation- induced DNA damage, *in vivo*, *Carcinogenesis*, 24, 843-850, 2003.
27. Sancar, A., DNA excision repair, *Annu. Rev. Biochem.*, 65, 43-81, 1996.
28. Reardon, J.T., Bessho, T., Kung, H.C., Balton, P.H., Sancar, A. In vitro repair of oxidative DNA damage by human nucleotide excision repair system: possible explanation for neurodegeneration in xeroderma pigmentosum patients, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 94, 9463-9468, 1997.

29. Petit., C., Sancar, A., Nucleotide excision repair: From E. Coli to man, *Biochimie*, 81, 15-25, 1999.
30. Sancar, A., Reardon, J.T., Nucleotide excision repair in E.Coli and Man, *Advences in Protein Chemistry*, 69, 43-71, 2004.
31. Sancar, A., Rupp, W.D., A novel repair enzyme: Uvr ABC excision nuclease of *Esherishia Coli* cuts a DNA strand on both sides of the damaged region, *Cell*, 33, 249-260, 1983.
32. Öğrünç, M., Becker, D.F., Ragsdale, S.W., Sancar, A., Nucleotide excision repair: from E. Coli to man, *Biochimie*, 81, 15-25, 1998.
33. Branum, M.E., Reardon, J.T., Sancar, A., DNA repair excision nuclease attacks undamaged DNA. A potential source of spontaneous mutations, *J. Biol. Chem.*, 6, 276(27), 25421-25426, 2001.
34. Sugasawa, K., N.G., J.M., Masutani, C., Iwai, S. ve ark. Xeroderma pigmentosum group C protein complex is the initiator of global genome nucleotide excision repair, *Mol. Cell.*, 2(2), 223-232, 1998.
35. Wakasugi, M., Sancar., A., Order of assembly of human DNA repair excision nuclease, *J. Biol. Chem.*, 25, 274(26), 18759-18768, 1999.
36. Sugasawa, K., Okamoto, T., Shimizu, Y., Masutani, C., Iwai, S., Hanoaka, F., A multistep damage recognition mechanism for global genomic nucleotide excision repair, *Genes Dev.*, 1, 15(5), 507-521, 2001.
37. Reardon, J.T., Sancar, A., Thermodynamic cooperativity and kinetic proofreading in DNA damage recognition and repair, *Cell Cycle*, 3 (2), 141-144, 2004.
38. Sancar, A., Lindsey-Boltz, L.A., Unsal-Kacmaz, K., Linn, S., Molecular Mechanism of Mammalian DNA repair and DNA damage checkpoint, *Annu. Rev. Biochem.*, 73, 39-85, 2004.
39. Mellon, I., Bohr, V.A., Smith, C.A., Hanawalt, P.C. Preferential DNA repair of an active gene in human cells, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 83 (23), 8878-8882, 1986.

40. de Laat, W., Jaspers, N.G.J., Hoeijmakers, J.H.J., Molecular mechanisms of nucleotide excision repair, *Genes & Development*, 13 (7), 768-785, 1999.
41. Smerdon, M.J., Conconi, A., Modulation of DNA damage and DNA repair in chromatin, *Prog. Nuc. Acid Res. Mol. Biol.*, 62, 227-255, 1999.
42. Hara, R., Mo, J., Sancar, A., DNA damage in the nucleosome core is refractory to repair by human excision nuclease, *Mol. Cell Biol.*, 20, 9173-9181, 2000.
43. Thoma, F., Repair of UV-lesions in nucleosome intrinsic properties and remodeling, *DNA Repair (Amst)*, 4(8), 855-69, 2005.
44. Mu, D., Sancar, A., Model for XPC independent Transcription coupled repair of pyrimidine dimers in humans, *J. Biol. Chem.*, 272 (12), 7570-7573, 1997.
45. Hanawalt, P.C., Subpathways of nucleotide excision repair and their regulation, *Oncogene*, 21, 8949-8956, 2002.
46. Mei Kwei, J.S., Kuraoka, I., Horibata, K., Ubukata, M., Blockage of RNA polymerase II at a cyclobutane pyrimidine dimer and 6-4 photoproduct, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 320 (4), 1133-1138, 2004.
47. Venema, J., Mullenders, L.H.F., Natarajan, A.T., van Zeeland, A.A., Mullenders, L.H., The residual repair capacity of xeroderma pigmentosum complementation group C fibroblasts is highly specific for transcriptionally active DNA, *Nucleic Acids Res.*, 18, 443-448, 1990.
48. Friedberg, E.C., Relationships between DNA repair and transcription, *Annu. Rev. Biochem.*, 65, 15-42, 1996.
49. Venema, J., Mullenders, L.H.F., Natarajan, A.T., van Zeeland, A.A., Mullenders, L.H., The genetic defect in Cockayne syndrome is associated with a defect in repair of UV-induced DNA damage in transcriptionally active DNA, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 87, 4707-4711, 1990.
50. Selby, C.P., Sancar, A., Human transcription repair coupling factor CSB/ERCC6 is a DNA stimulated ATPase but not a helicase and does not disrupt the ternary transcription complex of stalled RNA polymerase II, *J. Biol. Chem.*, 272, 1885-1890, 1997.

51. Eisen, J.A., Sweder, K.S., Hanawalt, P.C., Evolution of the SNF2 family of proteins: subfamilies with distinct sequences and functions, *Nucleic Acids Res.*, 23, 2715–2723, 1995.
52. Citterio, E., Van Den Boom, V., Schnitzler, G., Kanaar, R., Bonte, E., Kingston, R.E., Hoeijmakers, J.H., Vermeulen, W., ATP-dependent chromatin remodeling by the Cockayne syndrome B DNA repair-transcription-coupling factor, *Mol. Cell Biol.*, 20, 7643–7653, 2000.
53. Henning, K.A., Li, L., Iyer, N., McDaniel, L.D., Reagan, M.S., Legerski, R., Schultz, R.A., Stefanini, M., Lehmann, A.R., Mayne, L.V., Friedberg, E.C., The Cockayne syndrome group A gene encodes a WD repeat protein that interacts with CSB protein and a subunit of RNA polymerase II TFIIH, *Cell*, 82, 555–564, 1995.
54. Iyer, N., Reagan, N.S., Wu, K.J., Canagarajah, B. ve Friedberg E.C., Interactions involving the human RNA polymerase II transcription/nucleotide excision repair complex TFIIH, the nucleotide excision repair protein XPG, and Cockayne syndrome group B (CSB) protein, *Biochemistry*, 35 (7), 2157-2167, 1996.
55. Licht, C.L., Stevens, T., Bohr, V.A., Cockayne syndrome group B cellular and biochemical functions, *Am. J. Hum. Genet.*, 73 (6), 1217–1239, 2003.
56. Selby, C.P., Sancar, A., Cockayne's syndrome Group B protein enhances elongation by RNA polymerase II, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 94, 11205-11209, 1997.
57. Henning, K. A., Li, L., Iyer, N., McDaniel, L. D., Reagan, M. S., Legerski, R., Schultz, R. A., Stefanini, M., Lehmann, A. R., Mayne, L. V., and Friedberg, E. C., The Cockayne syndrome group A gene encodes a WD repeat protein that interacts with CSB protein and a subunit of RNA polymerase II TFIIH, *Cell*, 82, 555-564, 1995.
58. Boyer, J.C., Kauffmann, W.K., Brylawsky, B.P., Cordeiro Stone, M., Defective postreplication repair in xeroderma pigmentosum variant fibroblasts, *Cancer Res.*, 50, 2593-2598, 1990.

59. Kraemer, K.H., Sunlight and skin cancer: another link revealed, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 94, 11-14, 1997.
60. Fujiwara, Y., Uehara, Y., Ichihashi, M., Yamamata, Y., ve ark., Assignment of two with xeroderma pigmentosum to complementation group E, *Mutat. Res.*, 141, 55-61, 1995.
61. Kondo, S., Fukuro, S., Mamada, M., Kwada, A., ve ark., Assignment of three patients with xeroderma pigmentosum to complementation group E and their characteristics, *J. Invest. Dermatol.*, 90, 152-157, 1998.
62. Feldberg, R.S. ve Grossman., L., A DNA binding protein from human placenta specific for ultraviolet damaged DNA, *Biochemistry*, 15, 2402-2408, 1976.
63. Takao, M., Abramic, M., Moos, M.Jr., Otrin, V.R., Wooton, J.C. ve ark., A p127 kDa compenent of a UV-damaged DNA-binding complex, which is defective in some xeroderma pigmentosum group E patients, is homologuous to a slime mold protein, *Nucleic Acids Res.*, 21, 4111-118, 1993.
64. Stary, A, Sarasin, A., XPE (Xeroderma pigmentosum complementation group E) Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol URL: <http://www.infobiogen.fr/services/Chromcancer/genes/XPEID298.html>, 2001.
65. Dualan, R, Brody, T., Keeney, S., Nichols, A., Linn, S., Chromosomal localization and cDNA cloning of the genes (DDB1 and DDB2) for the p127 and p48 subunits of a human damage specific DNA-binding protein, *Genomics*, 29, 62-69, 1995.
66. Neuwald, A., Poleksik, A., PSI-Blast searches using hidden Markov models of structural repeats: prediction of unusual sliding DNA clamp snd of β -propellers in UV-damaged DNA-binding protein, *Nucleic Acids Res.*, 28 (18), 3570-3580, 2000.
67. Liu, W., Nichols, A., Graham, J., Dualan, R., Abbas, A. ve ark., Nuclear transport of human DDB protein induced by UV-light, *J. Biol. Chem.*, 275, 21429-21334, 2000.

68. Nelson, D.L., M Cox, M., Lehninger Principles of Biochemistry, 3.baskı, Worth Publisher, NY, 1066-67, 2000.
69. Payne, A., Chu, G., Xeroderma pigmentosum group E binding factor recognizes a broad spectrum of DNA damage, *Mutat. Res.*, 310, 89-112, 1994.
70. Fujiwara, Y., Masutani, C., Mizukoshi, T., Kondo, J. ve ark., Characterization of DNA recognition by the human UV-damaged DNA-binding protein, *J. Biol. Chem.*, 274 (28), 20027-33, 1999.
71. Keeney, S., Eker, A., Brody, T., Vermeulen, W., Bootsma, D. ve ark., Correction of the DNA repair defect in xeroderma pigmentosum group E by injection of a DNA-damage binding protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 91, 4053-56, 1994.
72. İtoh, T., Linn, S., Onno, T., Yamaizumi, M., Reinvestigation of the classification of the five cell strains of xeroderma pigmentosum group E with reclassification of three of them, *J. Invest. Dermatol.*, 114, 1022-1029, 2000.
73. Tang, J.Y., Hwang, B.J., Ford, J.M., Hanawalt, P.C., Xeroderma pigmentosum p48 gene enhances global genomic repair and suppress UV-induced mutagenesis, *Mol. Cell*, 5(4), 737-744, 2000.
74. Wakasugi, M., Kawashima, A., Morioka, H., Linn, S., Sancar, A. ve ark., DDB accumulates at DNA damage sites immediately after UV irradiation and directly stimulates nucleotide excision repair, *J. Biol. Chem.*, 277(3), 1637-1640, 2002.
75. Kazantsev, A., Mu, D., Nichols, A.F., Zhao, X. ve ark., Functional complementation of xeroderma pigmentosum complementation group E by replication protein A in an in vitro system, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 93 (10), 5014-5018, 1996.
76. Ura, K., Kurumizaka, H., Dimitrov, S., Almouzni, G. ve ark. Histone acetylation; influence on transcription, nucleosome mobility and positioning, and linker histone dependent transcriptional repression, *EMBO Journal*, 16(8), 2096-107, 1997.
77. Kingston, R.E., Narlikar, G.J., ATP dependent remodeling and acetylation as regulators of chromatin fluidity, *Genes Dev.*, 13, 2339-52, 1999.

78. Le Roy, G., Layola, A., Lane, W.S., Reinberg, D., Purification and characterization of a human factor that assembles and remodels chromatin, *J. Biol. Chem.*, 275 (20), 14787-14790, 2000.
79. Narlikar, G.J., Fan, H.Y., Kingston, R.E., Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription, *Cell*, 108, 475-487, 2002.
80. Datta, A., Bagchi, S., Shiyanov, A.N., Adami, G.R., Yoon, T. ve ark., The p48 subunit of the damaged DNA binding protein DDB associates with the CBP/p300 family of histone acetyl transferase, *Mutat. Res.*, 486, 89-97, 2001.
81. Martinez, E., Palhan, V.B., Tjenberg, A., Lyman, S., ve ark., Human STAGA complex is a chromatin – acetylating transcription co-activator that interacts with pre-mRNA splicing and damage-binding factors in vivo, *Mol. Cell*, 21, 6782-6795, 2001.
82. Gomez-Lazarro, M., Fernandez-Gomez, F.J., Jordan, J., p53: twenty five years understanding the mechanism of genome protection, *J Physiol. Biochem.*, 60 (4), 287-307, 2004.
83. Ford, J.M., Regulation of DNA damage recognition and nucleotide excision repair: Another role for p53, *Mutat. Res.*, 577 (1-2), 195-202, 2005.
84. Hwang, B.J., Ford, J.M., Hanawalt, P.C. ve Chu, G., Expression of the p48 xeroderma pigmentosum gene is p53-dependent and is involved in global genomic repair, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 96(2), 424-428, 1999.
85. Itoh, T., O'Shea, C. ve Linn, S., Impaired regulation of tumor suppressor p53 caused by mutations in the xeroderma pigmentosum DDB2 gene: mutual regulatory interactions between p48(DDB2) and p53, *Mol. Cell. Biol.*, 23(21), 7540-7553, 2003.
86. Itoh, T., D. Cado, R., Kamide, and Linn, S., DDB2 gene disruption leads to skin tumors and resistance to apoptosis after exposure to ultraviolet light but not a chemical carcinogen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 101, 2052-2057, 2004.
87. Lee, T.H., Elledge, S.J., Butel, J.S., Hepatitis B virus X protein interacts with a probable cellular DNA repair protein, *J. Virol.*, 69, 1107-1114, 1995.

88. Takimoto, R., MacLachan, T.K., Dicker, D.T., Niitsu, Y. ve ark., BRCA1 transcriptionally regulates damaged DNA binding protein (DDB2) in the DNA repair response following UV-irradiation, *Cancer Biol. Ther.*, 1, 177-186, 2002.
89. Hartman, A.R., Ford, J.M., BRCA1 induces DNA damage recognition factors and enhances nucleotide excision repair, *Nat. Genet.*, 32(1), 180-184, 2002.
90. Itoh, T., Linn, S., Ono, T., Yamaizumi, M., Reinvestigation of the classification of five cell strains of xeroderma pigmentosum group E with reclassification of three of them, *J. Invest. Dermatol.*, 114, 1022-1029, 2000.
91. Kipreos, E.T., Lander, L.E., Wing, J.P., He, W-W. ve ark., Cul-1 is required for cell cycle exit in *C.elegans* and identifies a novel gene family, *Cell*, 85(6), 829-839, 1996.
92. Pickart, C.M., Mechanisms underlying ubiquitination, *Annu. Rev. Biochem.*, 70, 503-533, 2001.
93. Bergametti, H., Sitterlin, D., Transy, C., Turnover of Hepatitis B virus X protein is regulated by damaged DNA-binding complex, *J. Virol.*, 76 (13), 6495-6501, 2002.
94. Watanabe, T., Sukesawa, J., Sukegawa, I., Tomita, S. ve ark., A 127 kDa protein (UV-DDB) binds to the cytoplasmic domain of the Alzheimer's amyloid precursor protein, *J. Neurochem.*, 72, 549-556, 1999.
95. Mathews, C.K., Van Holde, K.E., *Biochemistry*, İkinci baskı, The Benjamin/Cummings Publishing Company, CA, s: 712-715, 1995.
96. Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A., Rodwell, V.W., *Harper's Biochemistry*. (25. baskı), 314-15. Mc Graw Hill USA, 2001.
97. Hershlo, A., Ciechanover, A., The Ubiquitin system, *Biochemistry*, 67, 425-79, 2001.
98. <http://www.nottingham.ac.uk/biochemcourses/students/ub/ubenz.html>
99. Yu, H., Peters, J.M., King, R., Page, E.M. ve ark., Identification of a cullin homology region in a subunit of the anaphase-promoting complex. 279(5354),1219-1222, 1998.

100. Zachehariae, W., Shevchenko, A., Andrews, P.D., Ciosk, R. ve ark., Mass spectrometric analysis of the anaphase-promoting complex from yeast: identification of a subunit related to cullins, *Science*, 279 (5354), 1216-1219, 1998.
101. Mc Call, C.M., Hu, J., Xiong, Y., Recruiting substrates to Cullin 4 dependent ubiquitin ligases by DDB1, *Cell Cycle*, 4 (1), 27-29, 2005.
102. Min, K.W., Hwang, J.W., Lee, J.S., Park, Y. ve ark., Tip 120A associates with Cullins and modulates ubiquitin ligase activity, *J. Biol. Chem.*, 278(18), 15905-15910, 2003.
103. Goldenberg, S.J., Cascio, T.C., Shumway, S.D., Garbutt, K.C. ve ark., Structure of the CAND1-Cul1-ROC1 complex reveals regulatory mechanisms for the assembly of the multisubunit cullin dependent ubiquitin ligases, *Cell*, 119(4), 517-528, 2004.
104. Hochstrasser, M., Biochemistry:All in the ubiquitin family, *Science*, 289, 563-564, 2000.
105. Zhong, W., Feng, H., Santiago, F.H., Kipreos, E.T., Cul-4 ubiquitin ligase maintain genome stability by restraining DNA replication licensing, *Nature*, 423, 885-889, 2003.
106. Hu, J., Mc Call C.M., Ohta, T., Siong, Y., Targeted ubiquitination of CTD1 by the DDB1-CUL4A-ROC1 1 Ligase in response to DNA damage, *Nat. Cell. Biol.*, 1003-1009, 2004.
107. Lin, B., Ruiz, J.C., Chun, K.T., Cul-4A is critical for early embryonic development, *Mol. Cell. Biol.*, 22(14), 4997-5005, 2002.
108. Yasui, K., Arii, S., Zhao, C., Imoto, I. ve ark., TFDP1, CUL4A, and CDC16 identified as targets for amplification at 13q34 in hepatocellular carcinomas, *Hepatology*, 35(6), 1476-1484, 2002.
109. Chen, L.C., Manjeshwer, J., Lu, Y., Moore, D. ve ark., The human homolog for the *Caenorhabditis elegans* Cul-4 gene is amplified and overexpressed in primary breast cancers, *Cancer Res.*, 58, 3677-3683, 1998.

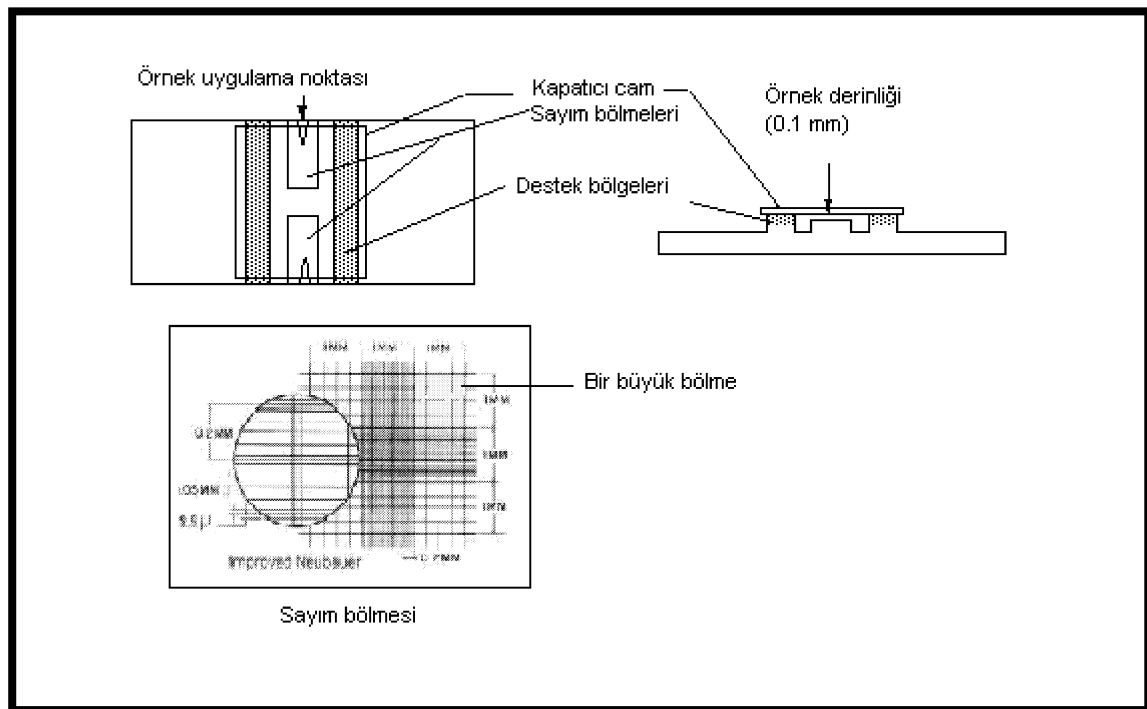
110. Chen, X., Zhang, Y., Douglas, L., Zhou, P., UV-damaged DNA-binding proteins are targets of Cul-4A mediated ubiquitination and degradation, *J. Biol. Chem.*, 51 (21), 48175-48182, 2001.
111. Sugasawa, K., Okuda, Y., Saijo, M., Nishi, M., Matsuda, N., Chu, G., Mori, T., Iwai, K., Tanaka, K. ve Hanaoka, F., UV-induced ubiquitylation of XPC protein mediated by UV-DDB-ubiquitin ligase complex, *Cell*, 121, 387-400, 2005.
112. Wei, N., Peng, X.W., Making sense of the COP9 signalosome. A regulatory protein complex conserved from Arabidopsis to human, *Trends Genet.*, 15, 98-103, 1999.
113. Vierstra, R.D. The ubiquitin/26S proteasome pathway, the complex last chapter in the life of many plant proteins, *Trends in Plant Science*, 8 (3), 136-42, 2003.
114. Patterson, R.M., Selkirk, J.K., Merrick, B.A., Baculovirus and insect cell gene expression: review of baculovirus biotechnology, *Environ. Health Perspect.*, 103 (7-8), 756-759, 1995.
115. Invitrogen Life Technologies, Instruction Manual, Guide to Baculovirus Expression Vector Systems.
116. Einhaeur, A., Jungbaeur, A., The Flag™ peptide, a versatile fusion tag for the purification of recombinant proteins, *J. Biochem. Biophys. Methods*, 49 (1-3), 455-465, 2001.
117. Alberts B, Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walker P., *Molecular Biology of the Cell*, 4. baskı, Garland Science, 459-546, USA, 2003.
118. Dilsiz, N., *Moleküler Biyoloji*, Palme Yayıncılık, 42-64, Ankara, 2004.
119. Fairall L., Muttinelli M., Pinetta G. (Editör: Travers, A., Buckle, M.), *DNA Protein Interactions*, Oxford Press, 65-75, U.S.A., 2000.
120. <http://www.piercenet.com/Proteomics/browse.cfm?fldID=7EDAC33E-3981-4E58-8A57-057A8280C68F>

121. deVries, A., van Oostrom, C.T., Hofhius, F.M., Dortant, P.M. ve diğ., Increased susceptibility to ultraviolet-B and carcinogens of mice lacking the DNA excision repair gene XPA, *Nature*, 14, 377(6545), 169-173, 1995.
122. Wakasugi, M., Shimizu, M., Morioka, H., Linn., S., ve ark., Damaged DNA-binding protein DDB stimulates the excision of cyclobutane pyrimidine dimers in vitro in concert with XPA and replication protein A, *J. Biol. Chem.*, 276(18), 15434-15440, 2001.
123. Fitch, M.E., Nakajima, S., Yasui, A., Ford, J.M., In vivo recruitment of XPC to UV-induced cyclobutane pyrimidine dimers by the DDB2 gene product, *J. Biol. Chem.*, 278, 46906-46910, 2003.
124. Wang, Q.E., Zhu, Q., Wani, G., El-Mahdy, M.A., Li, J. ve ark., DNA repair factor XPC is modified by SUMO-1 and ubiquitin following UV-radiation, *Nucleic Acids Res.*, 33, 4023-4034, 2005.
125. Itoh, T., Mori, T., Ohkubo, H., ve Yamaizumi, M., A newly identified patient with clinical xeroderma pigmentosum phenotype has a non-sense mutation in the DDB2 gene and incomplete repair in (6-4) photoproducts, *J. Invest. Dermatol.*, 113, 215-257, 1999.
126. Mitchell, D.L., Haipek, C.A., ve Clarkson, J.M., (6-4) photoproducts are removed from the DNA of UV-irradiated mammalian cells more efficiently than cyclobutane pyrimidine dimmers, *Mutation Res.*, 143, 109-112, 1985.
127. Inoki, T.S., Yamagami, Y., Inoki, T., Tsuru, T., Hamamoto, Y., Kagawaka, Y. ve ark., Human spicing variants are dominant negative inhibitors of UV-damaged DNA repair, *Bioch. Biophys. Res. Comm.*, 314, 1036-1043, 2004.

7. EKLER

7.1. Neubauer hemositometresi ile hücrelerin sayılması

Hücre hatlarında bulunan hücre sayısının Neubauer hemositometre ile sayılması Şekil 7.1’de gösterilmiştir. Hemositometrede her bir sayım bölmesi 9 büyük kareden oluşmaktadır. Her bir kare 1 mm^2 ’lik yüzey alanına ve 0.1 mm ’lik derinliğe sahiptir. Bu duruma göre her bir kare 0.1 mm^3 ’lük hacmi temsil etmektedir. Sayım işlemi sırasında $10 \text{ }\mu\text{l}$ örnek sayım bölmesine uygulanmakta, dış köşelerdeki dört büyük karede bulunan hücre sayısı sayıldıktan sonra ortalamaları alınmakta, ml ’deki hücre sayısı, 1 büyük karedeki ortalama hücre sayısı x sulandırma faktörü x 10^4 formülüyle hesaplanmaktadır.

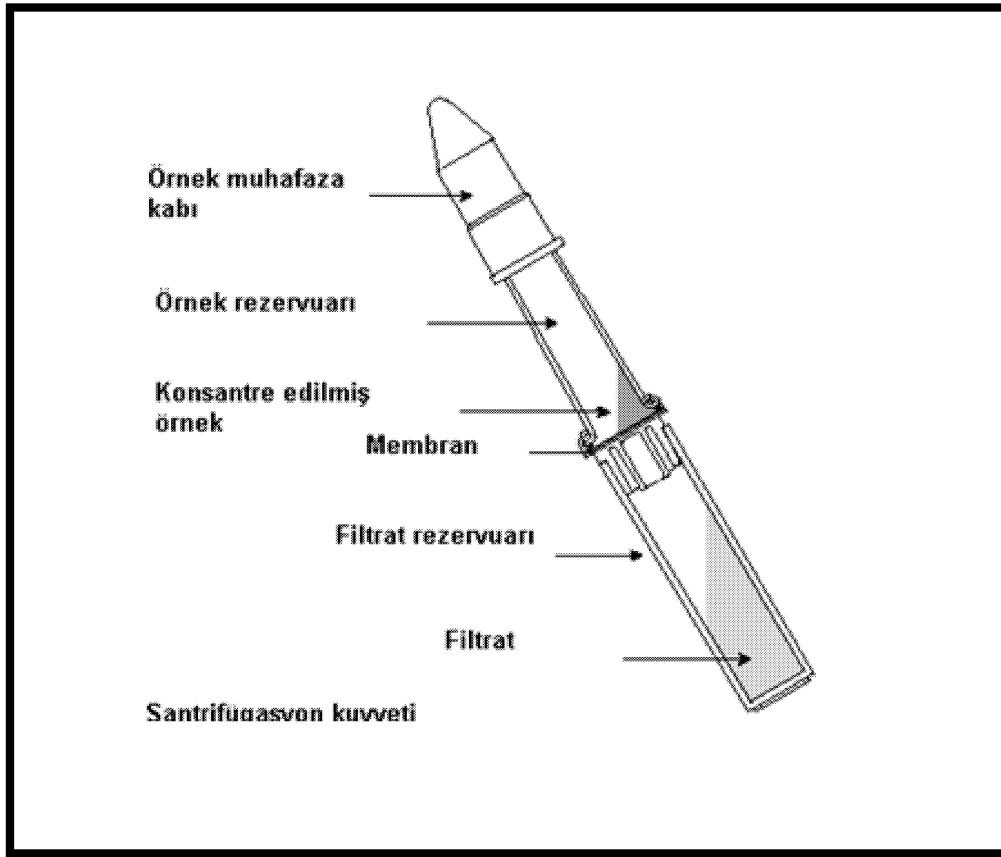


Şekil 7.1. Neubauer hemositometre düzeneği.

7.2. Centricon-30 filtrenin çalışma prensibi

Centricon-30, düşük bağlama kapasitesine sahip rejenere sellüloz filtredir. Molekül ağırlığı 30.000 Da ve üstü moleküllerin deriştirilmesi için kullanılmaktadır. Örnek önce örnek rezervuarına konulmakta ve şekilde görülen yönde santrifüj edilmektedir. Bu işlem sonucunda üstte konsantre olmuş örnek, altta da filtrat bulunacaktır. Daha sonra filtrat rezervuarı çıkartılarak düzenek bu sefer baş aşağı

çevrilerek yeniden santrifüj edilmekte, böylece değiştirilmiş örnek muhafaza kabına aktarılmaktadır (Şekil 7.2).



Şekil 7.2. Centricon-30 filtrenin çalışma prensibi.