

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DESMİNİN ÇEKİRDEĞE TAŞINIMININ POTANSİYEL
MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI**

Uzm.Biyolog Ecem KURAL MANGIT

**Tıbbi Biyoloji Programı
DOKTORA TEZİ**

**ANKARA
2024**

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DESMİNİN ÇEKİRDEĞE TAŞINIMININ POTANSİYEL
MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI

Uzm.Biyolog Ecem KURAL MANGIT

Tıbbi Biyoloji Programı
DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Pervin R. DİNÇER

ANKARA
2024

**DESMİNİN ÇEKİRDEĞE TAŞINIMININ POTANSİYEL MEKANİZMALARININ
ARAŞTIRILMASI**

Ecem Kural Mangıt

Danışman: Prof.Dr. Pervin Dinçer

Bu tez çalışması 06.02.2024 tarihinde jürimiz tarafından "Tıbbi Biyoloji Programı" nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: *Prof.Dr.Atiye Seda Yar Sağlam*
Gazi Üniversitesi

Üye: *Prof.Dr. Banu Peynircioğlu*
Hacettepe Üniversitesi

Üye: *Doç.Dr.Oya Sena Aydos*
Ankara Üniversitesi

Üye: *Dr.Öğr.Üyesi Nihal Terzi Çizmecioğlu*
Orta Doğu Teknik Üniversitesi

Üye: *Dr.Öğr.Üyesi Murat Alper Cevher*
Brooklyn College

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

22 Şubat 2024

Prof. Dr. Müge YEMİŞCİ ÖZKAN
Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

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

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

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

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

09/02/2024
Ecem Kural Mangıt

¹ “Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

(1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.

(2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.

(3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, **tezin yapıldığı kurum** tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, **ilgili kurum ve kuruluşun önerisi** ile enstitü veya fakültenin uygun görüşü üzerine **üniversite yönetim kurulu** tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.
Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

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

ETİK BEYAN

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

(İmza)

Uzm.Biyolog Ecem Kural Mangıt

TEŞEKKÜR

“Young fool. Only now, at the end, do you understand.”

Emperor Sheev Palpatine,

Dark Lord of the Sith, Senator of Naboo, Supreme Chancellor of the Galactic Republic, Emperor of the Galactic Empire, Mastermind behind the First Order

Doktora eğitimim süresince yanımda olan danışmanım Prof. Dr. Pervin Dinçer’e, başta çalışmalarım boyunca sağladıkları katkılarla ilerlememe yardımcı olan tez izleme komitesi üyeleri Dr.Öğr. Üyesi Nihal Terzi Çizmecioğlu ve Dr.Öğr.Üyesi Alper Murat Cevher olmak üzere savunma jürimde yer alan hocalarım Prof.Dr.Banu Peynircioğlu, Prof.Dr.Atiye Seda Yar Sağlam ve Doç.Dr. Oya Sena Aydos’a, değerli zamanlarını ayırarak benimle çalışan hocalarım Prof.Dr.Ebru Bodur ve Prof.Dr. Turgut Baştuğ’a teşekkür ederim.

Benim için büyük, uzmanı için küçük biyokimyasal sorunlarımı çözmem için zaman ayıran Onur Aktan ve Kübra Şener’e teşekkür ederim.

Çalışmalarım süresince deniz aşırı ülkelerden neşeleri ve destekleriyle yanımda olduklarını her daim hissettiren sevgili arkadaşlarım Gülsüm Kayman Kürekçi, Gizem Önal ve Nazlı Eskici’ye ve yükümü, derdimi, yolumu paylaşan Evrim Aksu Mengeş’e teşekkür ederim.

Karanlık bir Ankara sabahında, sıkıcı bir kimya dersinde tanıştığım ve 17 yıldır her ihtiyacım olduğunda yanımda olan, aynı bunaltıları dinlemekten asla sıkılmayan ve muhteşem dans hareketleriyle beni her zaman etkileyen, sallanan sandalyemde gülerek hatırlayacağım muhteşem anılarımın ortakları Yiğit, Uğurcan, Başak, Eylül ve Selin’e minnetlerimi sunarım.

Küçük bir çocukken su içme bahanesiyle uyku saatini geciktirmeye çalıştığımı anlamamış gibi yapan ve bana her zaman bir kitap daha okumaya zaman ayıran Annem ve Babam’a,

Yol boyunca elimi sımsıkı tutan, beni göğsünde yumuşatan Eşim Fatih’e,

Hayatıma girdiği andan itibaren ismi gibi şansım olan küçük findığım, oğlum Fikret Uras’a...

ÖZET

Kural Mangıt, E., Desminin Çekirdeğe Taşınımının Potansiyel Mekanizmalarının Araştırılması, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Programı Doktora Tezi, Ankara, 2024. Yapılan çalışmalar temel olarak sitoplazmada konumlanan ara filament proteinlerinin çekirdeğe taşınabildiğini ve çekirdek içerisinde de önemli görevler üstlendiklerini göstermiştir. Çekirdek sitoplazma arası taşınım çekirdek por kompleksi aracılığı ile gerçekleşir. Proteinler çekirdek por kompleksinden üzerlerinde bulunan özel bir sinyal dizisi aracılığı ile taşınabileceği gibi (karyoferin bağımlı taşınım), yapısal değişime uğramak suretiyle doğrudan çekirdek por kompleksi elemanlarıyla etkileşime girerek de geçiş sağlayabilirler (karyoferin bağımsız taşınım). Desmin çoğunlukla yapısal görevler üstlenen bir ara filament proteindir. *In silico* analizler desmin üzerinde çekirdek-sitoplazma arasında taşınımından sorumlu olabilecek sinyal dizileri olabileceğini göstermektedir. Tüm ara filament proteinleri gibi desmin de amfifilik özellikte bir proteindir ve çekirdek por kompleksinde konumlanan, taşınımından sorumlu proteinler ile de etkileşim halindedir.

Tez çalışmasında desminin çekirdek-sitoplazma arası taşınım mekanizmaları araştırılmıştır. Desmin üzerinde bulunan aday sinyal dizilerinin desmin dizisinden çıkarılmasıyla oluşturulan mutant ifade vektörleri ile insan ve fare iskelet kası hücrelerine transfeksiyon gerçekleştirilmiş ve konfokal mikroskop görüntülerinin analiz edilmesi ile sitoplazmadan çekirdeğe taşınımından sorumlu sinyal dizilerinin işlevsel olduğu gösterilmiştir. Ardından karyoferin bağımlı taşınım yolağı bir küçük molekül (ivermektin) aracılığıyla baskılanarak desminin çekirdek içerisine karyoferin bağımlı olarak taşındığı gösterilmiştir. Taşınımın karyoferin bağımsız olarak gerçekleşip gerçekleşmediğinin anlaşılması amacıyla çekirdek içine taşınım deneyleri gerçekleştirilmiş ve desminin sitoplazmadan çekirdeğe taşınımında karyoferin bağımsız yolağı tercih ettiğine dair bulgu elde edilememiştir. Ancak, desminin amfifilik özelliği dolayısıyla çekirdek por kompleksi gibi hidrofobik ortamlarda yapısal değişim geçirebildiği yüzey hidrofobiklik tayini deneyleri ile gösterilmiştir.

Sonuç olarak bu tez kapsamında desminin çekirdek ve sitoplazma arasındaki taşınım mekanizmaları araştırılmıştır. Bu mekanizmaların aydınlatılması, desminin çekirdekteki işlevlerinin belirlenmesi yanında, hastalıklarla ilgili yeni tedavi hedeflerinin geliştirilmesi açısından da önem taşımaktadır.

Anahtar Kelimeler: Desmin, iskelet kası, çekirdek, sitoplazma, taşınım, karyoferin

Bu tez çalışması Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) ARDEB-1001 (120Z946) ARDEB-1002 (120Z351, 222Z281) ve Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: THD-2022-19971).

ABSTRACT

Kural Mangit E., Investigation of Potential Mechanisms for Nuclear Transport of Desmin. Hacettepe University, Graduate School of Health Sciences, Ph.D. Thesis in Medical Biology, Ankara, 2024. Studies have shown that cytoskeletal proteins, which are primarily located at the cytoplasm, can be transported to the nucleus and play significant roles within the nucleus. The nucleocytoplasmic transport occurs with different mechanisms through the nuclear pore complex. Proteins can be transported through the nuclear pore complex via a specific signal sequence on their surface (karyopherin-dependent transport) or by directly interacting with elements of the nuclear pore complex through structural changes (karyopherin-independent transport). Desmin is an intermediate filament protein specific to muscle cells that mostly have structural functions. *In silico* analyzes showed that desmin has special signal sequences that are necessary for nucleocytoplasmic transport. In addition, desmin is an amphiphilic protein that interacts with proteins responsible for transport in the nuclear pore complex.

Within the scope of this thesis, the nucleocytoplasmic transport mechanisms of desmin were investigated. Mutant expression vectors created by removing the potential signal sequences on desmin were transfected into the human and mouse skeletal muscle cells, and the signal sequences responsible for nucleocytoplasmic transport were proven to be functional via confocal imaging. Subsequently, the karyopherin-dependent transport pathway was inhibited by a small molecule (ivermectin), and it was shown that desmin can be transported into the nucleus in a karyopherin-dependent manner. The findings of nuclear import assay did not substantiate a preference for a karyopherin independent mechanism for the translocation of desmin into the nucleus. However, hydrophobicity measurements have shown that desmin can undergo conformational changes in order to adapt hydrophobic environments, such as nuclear pore complex.

In conclusion, the transport mechanisms of desmin have been investigated. Illuminating these mechanisms is not only important for elucidating the nuclear functions of desmin but also for developing novel treatment targets related to diseases.

Key Words: Desmin, skeletal muscle, nucleus, cytoplasm, transport, karyopherin

This study was supported by the Scientific and Technological Research Council of Turkey (TÜBİTAK) ARDEB-1001 Scientific and Technological Research Projects Support Program (Project No: 120Z946), the ARDEB-1002 Rapid Support Program (Project No: 120Z351, 222Z281), and the Scientific Research Projects Coordination Unit of Hacettepe University (Project No: THD-2022-19971).

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xvi
TABLolar	xx
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Çekirdek por kompleksi	3
2.2 Çekirdek-sitoplazma arası taşınım	5
2.3 Çekirdek-sitoplazma arası taşınımın biyolojik önemi	10
2.4 Desmin proteinin işlevi ve yapısı	11
2.5 Tez çalışmasının temel aldığı hipotez ve amaçları	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM	20
3.1 Gereç	20
3.1.1 Hücre kültürü	20
3.1.2 Hücre döngüsü senkronizasyonu ve analizi	21
3.1.3 İmmünfloresans Boyama ve Görüntüleme	21
3.1.4 Transfeksiyon	22
3.1.5 Canlılık testi	22
3.1.6 Protein izolasyonu ve <i>western blot</i>	22
3.1.7 Transport baskılanması	24
3.1.8 Çekirdek içerisine taşınım deneyleri	24
3.1.9 Yüzey hidrofobikliği ölçümü	25

3.1.10	Moleküler dinamik simülasyonları	25
3.1.11	Antikorlar	25
3.2	Yöntem	26
3.2.1	Hücre kültürü	26
3.2.2	Hücre döngüsü senkronizasyonu	26
3.2.3	İmmünfloresan boyama ve görüntüleme	27
3.2.4	Farklılaşma ve füzyon oranlarının hesaplanması	27
3.2.5	Transfeksiyon çalışmaları	29
3.2.1	Protein izolasyonu ve <i>western blot</i>	30
3.2.2	Çekirdek içerisine taşınım deneyleri	32
4.	BULGULAR	34
4.1	Desminin Karyoferin Bağımlı Mekanizma ile Çekirdek ve Sitoplazma Arasında Taşınımının Araştırılması	34
4.1.1	Hücre döngüsü senkronizasyonu	34
4.1.2	İmmünfloresan boyama ile farklılaşma ve füzyon oranlarının hesaplanması	36
4.1.3	Transfeksiyon çalışmaları	39
4.1.4	Desminin çekirdek ve sitoplazma arasında taşınımının incelenmesi	46
4.1.5	Çekirdek ve sitoplazma arasında taşınım mekanizmalarının baskılanması	49
4.2	Desminin karyoferin bağımsız mekanizma ile taşınımının araştırılması	55
4.2.1	Çekirdek içerisine taşınım deneyleri	55
4.2.2	Desminin yüzey hidrofobikliğinin araştırılması	59
5.	TARTIŞMA	62
6.	SONUÇ VE ÖNERİLER	72
6.1	Sonuçlar	72
6.2	Öneriler	72
7.	KAYNAKLAR	74
8.	EKLER	

EK-1: Tez Çalışması Orijinallik Raporu

9. ÖZGEÇMİŞ



SİMGELER ve KISALTMALAR

%	Yüzde
°C	Santigrat derece
Å	Angström
ANN	<i>Artificial neural network</i>
APS	Amonyum persülfat
ARM	Armadillo tekrarları
ATP	Adenozin trifosfat
BCA	<i>Bicinchoninic Acid Assay</i>
BCA	<i>Bicinchoninic acid assay</i>
bFGF	<i>Basic Fibroblast Growth Factor</i>
BioGRID	<i>The Biological General Repository for Interaction Datasets</i>
Bis-ANS	<i>4,4'-Dianilino-1,1'-binaphthyl-5,5'-disulfonic acid</i>
BSA	Sığır serum albümini
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
CPK	<i>Creatine Phosphokinase</i>
CREB	<i>cyclic AMP-response element binding protein</i>
CRM1	<i>Chromosomal Maintenance 1</i>
DAPI	<i>4',6-Diamidino-2-Phenylindole</i>
DES	Desmin
dH₂O	Distile su
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit

DTT	<i>Dithiothreitol</i>
EBV DNase	<i>Epstein-Barr virüs DNase</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
EGTA	<i>Ethylene Glycol-Bis(β-Aminoethyl Ether)-N,N,N',N'-Tetraacetic Acid</i>
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
FG	<i>Fenilalanin-glisin</i>
GAP	<i>Guanine activating protein</i>
GDP	<i>Guanozin difosfat</i>
GFP	<i>Yeşil floresan protein</i>
GTP	<i>Guanozin trifosfat</i>
HCl	<i>Hidroklorik asit</i>
HEAT	<i>Huntingtin, Elongation Factor 3, Protein Phosphatase 2A, and TOR1</i>
hEGF	<i>Human Epidermal Growth Factor</i>
HEPES	<i>4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazineethanesulfonic Acid</i>
HIV-1	<i>Human immunodeficiency virus 1</i>
HMM	<i>Hidden Markov Model</i>
INO80	<i>INO80 kompleksi ATPase alt ünitesi</i>
INTERFIL	<i>The Intermediate Filament Database</i>
LB	<i>Lysogeny broth</i>
MARs	<i>Matrix attachment regions</i>
MDa	<i>Mega dalton</i>
mg	<i>miligram</i>
MHC	<i>Miyozin ağır zincir proteini</i>
mHLH	<i>Myogenic helix-loop-helix</i>

mL	mililitre
mM	Milimolar
MRF4	<i>Myogenic regulatory factor</i>
MYOD	<i>Myoblast determination protein 1</i>
MYOG	<i>Myogenin</i>
NaCl	Sodyum klorür
NAMD	<i>Nanoscale Molecular Dynamics</i>
NES	<i>Nuclear export signal</i>
ng	Nanogram
NLS	<i>Nuclear localization signal</i>
Nup	<i>Nucleoporin</i>
p	Olasılık
PANTHER	<i>Protein Analysis Through Evolutionary Relationships</i>
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PFA	Paraformaldehit
pH	Hidrojen potansiyeli
PTM	Translasyon sonrası modifikasyon
Ran	RAs-related Nuclear protein
RFU	Bağıl floresans birimi
RIPA	<i>Radio-immunoprecipitation assay buffer</i>
RMSD	<i>Root-mean-square deviation</i>
RNA	Ribonükleik asit
RPM	<i>Round per minute</i>
SDS	Sodyum dodesil sülfat
STAT1	<i>Signal transducer and activator of transcription 1</i>

TBS-T	<i>Tris-buffered saline with 0.1% Tween 20 detergent</i>
TEMED	<i>N,N,N',N'-Tetramethyl ethylenediamine</i>
TRUBA	Türk Ulusal Bilim e-Altyapısı
U	Ünite
V	Volt
VMD	<i>Visual Molecular Dynamics</i>
Wnt	<i>Wingless-related integration site</i>
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Çekirdek por kompleksi mimarisi. A. Sitoplazmik bölgeden üst bakış genel görünüm. B. Merkezi kanalın kesit görüntüsü. Lin ve ark. (25)'tan uyarlanmıştır (25).	4
2.2. Çekirdek-sitoplazma arası protein taşınımını gösteren şema. A. Sitoplazmadan çekirdeğe taşınım. NLS dizisine sahip kargo proteinler (NLS) importin α (α) ve importin β (β) ile sitoplazmada bir kompleks oluşturur. Kargo çekirdek por kompleksinden geçtikten sonra RanGTP'nin importin β 'ya bağlanması ile kompleks dağılır ve importin- α , çekirdekten sitoplazmaya taşınımında görevli bir protein aracılığıyla sitoplazmaya geri taşınırken importin β RanGTP'ye bağlı olarak taşınır. Sitoplazmada RanGAP, RanGTP'nin RanGDP'ye dönüşmesini sağlar ve importin β 'nın serbest kalmasıyla α ve β importinler yeni bir kargo döngüsüne hazır olur. B. Çekirdekten sitoplazmaya taşınım. Çekirdek içinde exportin'e RanGTP bağlanır ve ardından exportin-RanGTP kompleksi NES dizisi taşıyan kargo proteine (NES) bağlanır. Kompleks çekirdek pro kompleksinden geçtikten sonra RanGAP, RanGTP'nin RanGDP'ye dönüşmesini sağlar ve kompleks dağılır.	7
2.3. Desmin yapılanmasının şematik görüntüsü. Desmin dört segmentten oluşan (1A, 1B, 2A ve 2B) merkezi bir <i>rod</i> domaini ile amino ve karboksil uçlarından oluşur. Bu domainlerin arasında 3 adet bağlayıcı (<i>linker</i>) domain (L1, L12 ve L2) bulunur. 2 monomer paralel bir şekilde bir araya gelerek dimer yapısını ve iki dimer antiparalel şekilde bir araya gelerek tetramer yapısını oluşturur (Tang'dan uyarlanmıştır (2008) (85)).	12
2.4. Desminin bağlanma partnerlerinin proteomik analizi. A. EnrichR'de desminin çekirdekteki bağlanma partnerlerinin hücresel lokalizasyonunu temsil eden ontoloji analizi. X eksen (çubuğun uzunluğu) ontoloji analizinde öne çıkan terimlerin önemini temsil etmektedir. Daha açık kırmızı tonları daha anlamlı sonuçları gösterir. En üstten başlayarak p değerleri sırasıyla: 7,87E-04; 3.50E-03; 4.89E-03; 6.28E-03; 7.67E-03; 1.25E-02; 1.39E-02; 1.39E-02; 1.53E-02; 1.60E-02. B. Desmin ve nupların ilişkisi. Kırmızı kesikli çizgiler tarafımızca tanımlanan etkileşimleri göstermektedir (17,101).	15
2.5. Çevrimiçi veri tabanları kullanılarak tespit edilen NLS ve NES dizileri. A. cNLS Mapper veri tabanında insan desmin dizisi kullanılarak yapılan taramada tespit edilen NLS dizileri. Desmin için α -sarmal <i>rod</i> domaininde 3 skorunu aşan olası bir sinyal dizisi olduğu görülmüştür. Aynı zamanda amino terminalinde eşik değerin hemen altında (2.9) potansiyel bir sinyal daha bulunmaktadır B. NetNES 1.1 veri tabanında desmin için olası NES.	17

- 2.6. Expasy- ProtScale'de desmin için oluşturulan Abraham & Leo hidrofobiklik ölçeği (114–116). 0'ın üzerinde skora sahip bölgeler hidrofobik olarak değerlendirilmektedir. Desminin 109-412. amino asitler arasına tekabül eden α -sarmal *rod* domaini kırmızı dikey çubuklar ile sınırlandırılmıştır. 18
- 4.1. Hücre döngüsü senkronizasyonu sonrası hücreler. **A.** Senkronizasyon yapılmayan hücrelerin ve senkronizasyonu yapılan hücrelerin farklı yoğunluklarda, ışık mikroskobu görüntüleri. Üstte insan iskelet kası hücreleri, aşağıda fare iskelet kası hücreleri. Ölçek: 1 cm. **B.** Akım sitometrisi sonuçları. Üstte senkronizasyonu yapılan hücrelere, altta kontrol hücrelere ait histogramlar görünmektedir. Histogramlar hücrelerin başarılı bir şekilde senkronize olduğunu göstermektedir. 36
- 4.2. Farklılaşma sonrası T0033 hücreleri. **A.** Farklılaşma ve füzyon oranlarını gösteren histogramlar. Farklılaşma besi yeri eklendikten sonra füzyon ve farklılaşma oranı düzenli bir artış göstermektedir. **B.** Farklılaşma besi yeri eklendikten sonraki 24, 28, 32 ve 48. saatlerde MHC boyaması. Fotoğrafın sol alt köşesinde yer alan rakamlar farklılaşma besi yeri eklendikten sonra geçen süreyi saat olarak ifade etmektedir. Ölçek 10 μ M. 38
- 4.3. eGFP etikenin desminin amino ve karboksi uçlarında yer aldığı tasarımlar kullanılarak yapılan transfeksiyon çalışmasına ait görüntüler. Hücreler transfeksiyondan sonra 72 saat boyunca takip edilmiştir. Fotoğraflar 10X objektif kullanılarak çekilmiştir. S: Saat, DES-eGFP: eGFP etikenin desminin karboksi ucunda yer aldığı tasarım, eGFP-DES: eGFP etikenin desminin amino ucunda yer aldığı tasarım. 40
- 4.4. Transfeksiyon sonrası desmin proteininin ifadesi. Üstte des antikoru işaretlenen membran. Altta, yükleme kontrolü olarak membranın *ponceau S* boyaması. %60: Ekim sonrası %60 yoğunlukta olup transfeksiyon yapılmayan hücrelerden toplanan protein lizati; %90: Ekim sonrası %90 yoğunlukta olup transfeksiyon yapılmayan hücrelerden toplanan protein lizati; D_24: eGFP işaretli desmin kodlayan vektör ile transfeksiyonu yapılan hücrelerden transfeksiyon sonrası 24 saatte toplanan protein lizati. D_48: eGFP işaretli desmin kodlayan vektör ile transfeksiyonu yapılan hücrelerden transfeksiyon sonrası 48 saatte toplanan protein lizati. G_24: yalnızca eGFP ifade eden vektör ile transfeksiyonu yapılan hücrelerden transfeksiyon sonrası 24 saatte toplanan protein lizati. G_48: yalnızca eGFP ifade eden vektör ile transfeksiyonu yapılan hücrelerden transfeksiyon sonrası 48 saatte toplanan protein lizati. 42
- 4.5. İnsan (A) ve fare (B) iskelet kası hücrelerinde desminin çekirdekte konumlanmasını gösteren fotoğraflar. Desmin, çekirdekte erken farklılaşma döneminde görülmüştür. Görüntüler konfokal mikroskopta, 63X objektif kullanılarak çekilmiştir. Ölçek 10 μ M 45
- 4.6. NLS ve NES dizileri çıkarılmış mutant desmin dizileri ile yabancı tip desmin dizisi ile transfeksiyon yapılan hücrelere ait konfokal

- görüntüsü. **A.** İnsan miyoblast hücreleri. **B.** Fare miyoblast hücreleri. Yabancı tip hücrelerde desmin yoğun şekilde DAPI sınırları için konumlanırken, mutant dizilerin çok az ya da hiç konumlanmadığı gözlenmektedir. NLS 2.9 ve NLS 3.2 sırasıyla skorları 2.9 ve 3.2 olan NLS'leri dizileri ifade etmektedir. 47
- 4.7.** NLS ve NES dizileri çıkarılmış mutant desmin dizileri ile yabancı tip desmin dizisi ile transfeksiyon yapılan hücrelerde eş lokalizasyon değerlendirilmesi. **A.** İnsan iskelet kası hücre hattı. **B.** Fare iskelet kası hücre hattı. Yabancı tip ve mutant diziler ile transfeksiyonun gerçekleştirildiği hücrelerin *Pearson* değerlerinin karşılaştırılması için *Mann-Whitney U* testi kullanılmıştır. (*: $p<0.05$; **: $p<0.01$; ***: $p<0,001$) 48
- 4.8.** İnsan miyoblast hücrelerinde farklı konsantrasyonlarda ivermektin uygulaması sonrası E2F (yeşil) ve DAPI (mavi) boyaması. 51
- 4.9.** Ivermektin uygulaması sonrası eş lokalizasyon analizi sonuçlarını gösteren grafikler. **A.** İnsan iskelet kası hücre hattında uygulama sonrası *Pearson* değerlerinin karşılaştırılması ($n_{\text{kontrol}}=89$; $n_{\text{ivermektin}}=93$) **B.** Fare iskelet kası hücre hattında uygulama sonrası *Pearson* değerlerinin karşılaştırılması ($n_{\text{kontrol}}=61$; $n_{\text{ivermektin}}=64$). (Kontrol: ivermektin uygulaması yapılmayan hücreler) **C.** İnsan iskelet kası hücrelerinde ivermektin uygulanan ve uygulanmayan hücrelerin görüntüsü. **D.** Fare iskelet kası hücrelerinde ivermektin uygulanan ve uygulanmayan hücrelerin görüntüsü. İstatistiki olarak anlamlılığın karşılaştırılması için *Mann-Whitney U* testi kullanılmıştır. (**: $p<0.01$; ***: $p<0,001$). Ölçek: 5 μM . 54
- 4.10.** Digitonin ile permeabilizasyonu yapılan (Digitonin +) ve yapılmayan (Digitonin -) hücrelerde emerinin boyaması. 56
- 4.11.** Çekirdek içerisine taşınım deneyleri. Solda rekombinant desmin ve dekstran uygulaması yapılan hücrelere ait kesitler, sağda desmin ve dekstran için eş yerleşim analizi sonuçları. **A.** İnsan iskelet kası hücreleri (T0033) ($n_{\text{desmin}}=60$; $n_{\text{dekstran}}=53$), **B.** Fare iskelet kası hücreleri (C2C12), ($n_{\text{desmin}}=57$; $n_{\text{dekstran}}=65$), **C.** İnsan servikal kanser hücre hattı (HeLa), ($n_{\text{desmin}}=53$; $n_{\text{dekstran}}=41$). Karşılaştırmada *Mann-Whitney U* testi kullanılmıştır. Yeşil: desmin veya dekstran, Mavi: DAPI ile çekirdek boyaması. 58
- 4.12.** Hidrofobik ortamda desminin yapısal değişimi. **A.** %0 ve %55 etanol varlığında desmin ve BSA için floresan sinyal yoğunlukları (RFU*). Üç farklı ölçümün değerleri ortalama $\pm$ sd olarak temsil edilmiştir. **B.** Desmin sarmallarının sarmal tekerlek gösterimleri* (RFU: Bağlı floresans birimi). Hidrofobik amino asitler sarı renkle gösterilmiştir. Gri, kırmızı ve mavi sırasıyla polar, asidik ve bazik amino asitleri temsil etmektedir. 59
- 4.13.** Desminin fizyolojik koşullarda ve artan alkol konsantrasyonlarında RMSD değerleri. 61

- 5.1.** Desmin üzerinde NLS'lerin, NES'in ve PTM'lerin konumlanması. Desmin 470 amino asitten oluşur ve α -sarmal *rod* domaini ile amino ve karboksil uçları olmak üzere üç bölgeden oluşur. α -sarmal *rod* domaini sarmal 1A, sarmal 1B, sarmal 2A ve sarmal 2B ile sarmallar arası bağlayıcı bölgelerden (L1, L12, L2) oluşur. Alt simge numaraları amino ucu, α -sarmal *rod* domaini ve karboksil uçlarının hangi amino asitte başlayıp bittiğini göstermektedir. Şekilde açık gri üçgenler NLS'lerin, mavi üçgen ise NES'in desmin proteini üzerindeki lokalizasyonunu göstermektedir. Aşağıya uzanan gri çizgiler fosforilasyonu, mavi çizgiler asetilasyonu ve yeşil çizgiler übikütilenme bölgelerini göstermektedir. PTM verileri PhosphoSitePlus veri tabanından elde edilmiştir (157). A: Alanin; E: Glutamat; G: Glisin; K: Lizin; L: Lösin; P: Prolin; R: Arjinin; S: Serin; T:treonin; Y: Tirozin. Kural-Mangıt ve ark. (158)'dan uyarlanmıştır.

TABLÖLAR

Tablo		Sayfa
3.1.	Protein konsantrasyonları.	31
4.1.	Floresan yoğunluk analizi sonucu p değerlerinin karşılaştırılması.	49



1. GİRİŞ

Yaygın olarak sitoplazmada konumlanan ara filament proteinlerinin (1) çekirdek içerisinde de konumlanabilecekleri ve burada önemli görevler üstlenebilecekleri pek çok farklı çalışmada gösterilmiştir (1,2).

Ara filament proteinleri sitoplazmada, çevreden gelen sinyallerin algılanmasını ve iletilmesini sağlayan bir sensör görevi görürken, bu proteinlerin çekirdek ve sitoplazma arası dinamik taşınımının hücresel yanıtların başarılı bir şekilde düzenlenmesinde önemli olduğu düşünülmektedir. Hücrede devamlı olarak çekirdekte bulunan proteinlerin aksine, çekirdek ve sitoplazma arası taşınan sinyal moleküllerinin hücresel yerleşimleri gelen sinyale göre sürekli değişmek zorundadır. Bu nedenle, bu biyomoleküllerin yerleşimleri sıkı denetim altında olmalıdır. Çekirdek ve sitoplazma arasında gidip gelen proteinlerin hücresel dağılımının dengesi, bu proteinlerin çekirdek içerisine ve çekirdekten sitoplazmaya taşınımı ile ilişkili proteinler ile etkileşimde olup olmaması gibi faktörler tarafından etkilenir. Hücresel dağılım dengesinin değişmesiyle çekirdek-sitoplazma arasında taşınan protein çekirdek içinde birikebilir ya da çekirdek içerisinde hiç bulunmayabilir ki bu durum proteinin çekirdekteki işlevinin artmasına ya da baskılanmasına sebebiyet verebilir (2).

Çekirdek-sitoplazma arasında protein taşınımı için birden fazla yol olmakla beraber, en iyi tanımlanan karyoferin bağımlı taşınımıdır. Karyoferin bağımlı taşınımında kargo proteinler, karyoferinler tarafından tanınan özel bir sinyal dizisi aracılığı ile (*nuclear localization signal*, NLS ve *nuclear export signal*, NES) çekirdeğe ya da sitoplazmaya taşınır.

Son yıllarda çekirdek-sitoplazma arası taşınımında öne çıkan mekanizmalardan bir diğeri de karyoferin bağımsız taşınımıdır. Karyoferin bağımsız taşınımında proteinler, herhangi bir aracıya ihtiyaç duymadan, tıpkı karyoferinler gibi, doğrudan çekirdek por kompleksi ile etkileşime girer ve yüzey hidrofobikliğini değiştirerek çekirdek-sitoplazma arasında taşınırlar (3–6).

Kas hücrelerine özgül bir ara filament proteini olan desmin iskelet kasında Z-disklerde yerleşim gösterir ve bağlantılı olduğu diğer ara filament proteinleri ile ağ yapısı oluşturarak miyofibrillerin çekirdeğe, mitokondriye ve sarkolemmaya bağlantısını sağlayarak hücrenin kasılıp gevşemesi esnasında hücresel bütünlüğün

korunmasını sağlar ve güç aktarımını kolaylaştırır (7,8). Desminin sitoplazmik görevlerine ek olarak çekirdek içerisinde de görev aldığını gösteren bulgular mevcuttur (9–16). Desminin çekirdekte görev alabileceğini ve konumlanabileceğini gösteren literatür verileri olsa da desmin için henüz çekirdek-sitoplazma arasında bir taşınım yolağı tanımlanmamıştır.

In silico analizlere göre desmin, iki farklı NLS ve bir NES dizisi taşımaktadır. Bu dizilerin işlevsel olması, desminin çekirdek sitoplazma arasında karyoferin bağımlı olarak taşınabileceğini gösterir.

Desminin çekirdek-sitoplazma arası taşınımın kontrolünü sağlayan çekirdek por kompleksi elemanlarından nup88, nup153 ve nup214 ile etkileşimde olduğu gösterilmiştir (17,18) ve amfifilik özellikte bir *rod* domainine sahiptir. Amfifilik özellikteki proteinler ortam hidrofobisitesi arttığında, yapısal değişim geçirerek değişen hidrofobik koşullara uyum sağlayabilirler. Desmin çekirdek-sitoplazma arasında taşınmak için doğrudan çekirdek por kompleksi elemanları ile etkileşime girerek, yapısal değişim (*conformational change*) geçirerek yüzey hidrofobikliğini artırır ve çekirdek-sitoplazma arasında taşınabilir.

Tüm bu bilgiler ışığında bu tez çalışmasının amacı desminin çekirdek-sitoplazma arası taşınım mekanizmalarının aydınlatılmasıdır. Bu bağlamda tez çalışmaları kapsamında NLS ve NES dizileri desmin dizisinden çıkarılarak oluşturulan mutant desmin dizilerinin taşınım örüntüleri incelenmiş ve desmin üzerindeki NLS dizilerinin işlevsel olduğu ve desminin sitoplazmadan çekirdeğe karyoferin bağımlı bir mekanizma ile taşındığı gösterilmiştir. Desminin çekirdek-sitoplazma arasında taşınım için yapısal değişim geçirip geçirmediğinin incelenmesi için desmin proteini davranışları yüksek ve düşük hidrofobisite koşullarında incelenmiş ve desminin yapısal değişimler geçirebileceği gösterilmiştir. Bu yapısal değişimlerin sitoplazmadan çekirdeğe değil, çekirdekten sitoplazmaya taşınım ile ilişkili olduğuna işaret eden en önemli veri desminin çekirdekten-sitoplazmaya karyoferin bağımsız taşınımında görev aldığı bilinen çekirdek por kompleksi elemanlarıyla olan etkileşimidir (17,18).

Sonuç olarak tez kapsamında desminin sitoplazmadan çekirdeğe karyoferin bağımlı mekanizmayla, taşındığı gösterilmiştir.

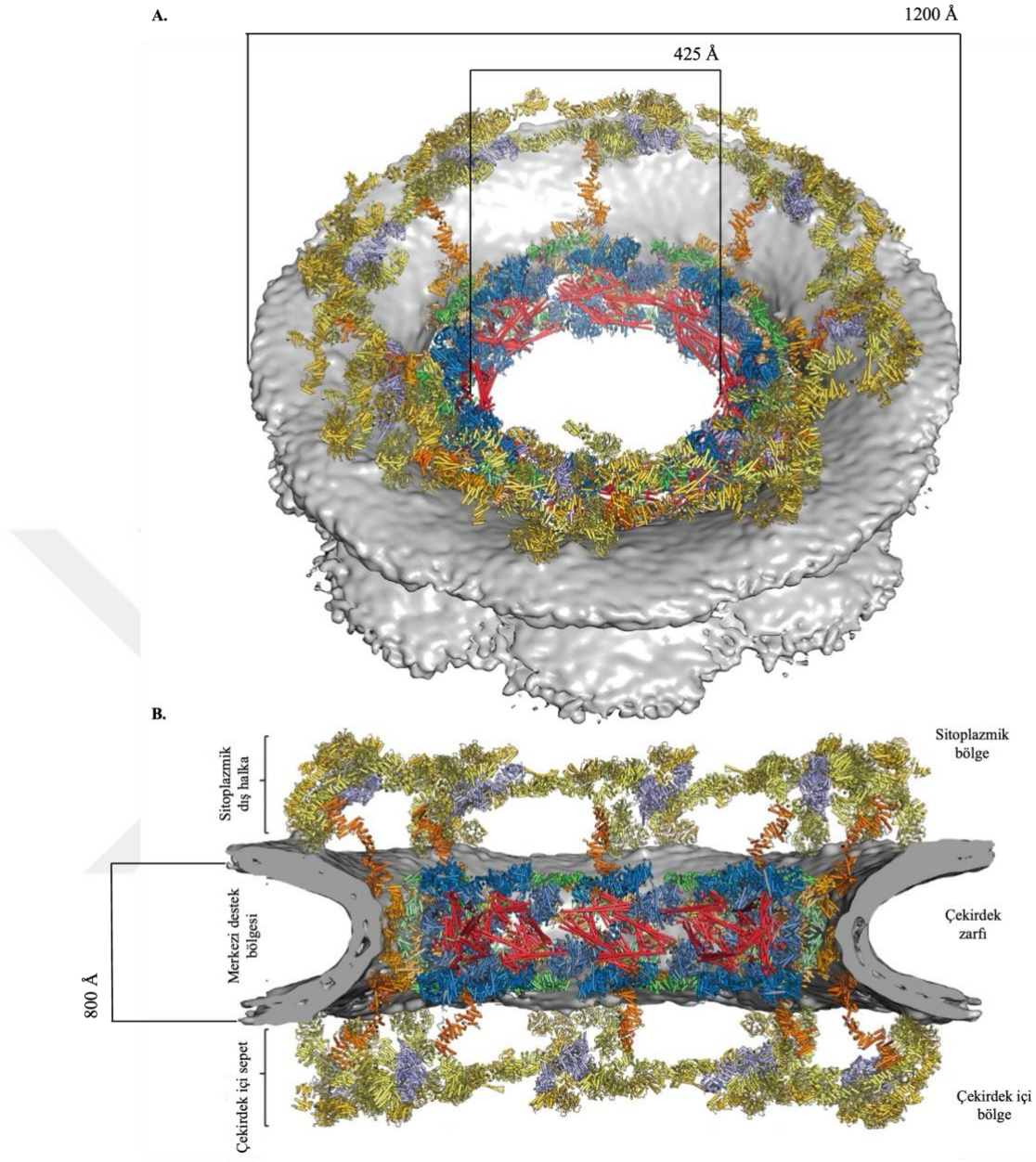
2. GENEL BİLGİLER

2.1 Çekirdek por kompleksi

Çekirdek por kompleksi çekirdek zarfında konumlanan ve çekirdek-sitoplazma arasında büyük moleküllerin taşınımını kontrol eden büyük bir protein kompleksidir. Çekirdek-sitoplazma arasında taşınım hücre döngüsü ve gen ifadesi kontrolü gibi önemli görevlerin idame ettirilmesinde önem taşımaktadır (19,20). Çekirdek-sitoplazma arası taşınımın yanı sıra çekirdek por kompleksinin DNA tamiri, gen ifadesi, yaşlanma ve apoptoz gibi hücreysel olaylarda da görev aldığı belirtilmiştir (21). Yaşlanma, kanser, otoimmün hastalıklar ve viral enfeksiyonlarda çekirdek por kompleksi elemanlarında görülen işlevsel bozukluklar da, çekirdek por kompleksinin hücre sağkalımı için önemini vurgulamaktadır (22,23).

İnsanlarda, çekirdek por kompleksi nükleoporin (nup) adı verilen, evrimsel olarak korunmuş yaklaşık 1000 adet protein alt ünitesinden oluşmaktadır (24). Tüm nupların bir arada olduğu bir çekirdek por kompleksi yaklaşık 110 MDa boyutuyla en büyük moleküler oluşumlardan biridir (24). Çekirdek por kompleksinin dış çapı yaklaşık 1200 Å, iç çapı 425 Å ve yüksekliği ise 800 Å'dur (25,26) (Şekil 2.1).

Çekirdek por kompleksi dört temel yapısal kısımdan oluşmakla beraber bu yapılar literatürde farklı isimlerle anılmaktadır. Gu ve ark. (27) bu yapısal kısımları merkezi destek bölgesi (*core scaffold*), çekirdek kısmında yer alan sepet yapısı (*nuclear basket*), çekirdek zarfı halkası (*membrane ring*) ve seçici geçirgen bariyer (*selective barrier*) olarak adlandırırken (27), Beck ve ark. (28) por iç halkası (*inner pore ring*), çekirdek ve sitoplazmik halkalar (*nuclear and cytoplasmic rings*), çekirdek kısmında yer alan sepet yapısı ve sitoplazmik filamentler (*cytoplasmic filaments*) olarak tanımlamaktadır (28). Yapıların adlandırılması farklı olsa da atfedilen işlevler arasında bir farklılık bulunmamaktadır.



Şekil 2.1. Çekirdek por kompleksi mimarisi. **A.** Sitoplazmik bölgeden üst bakış genel görünüm. **B.** Merkezi kanalın kesit görüntüsü. Lin ve ark. (25)'tan uyarlanmıştır (25).

Merkezi destek bölgesi iç ve dış halka komplekslerini (*inner and outer ring complexes*) içermektedir. İç halka kompleksi çekirdek por kompleksinin orta kısmında yer alır ve büyük yapısal nuplardan oluşur. Dış halka kompleksi Y-şekilli, türler arası korunmuş Nup107/160 kompleksinden oluşur ve iç halka kompleksini çevreler (27). Çekirdek kısmında yer alan sepet yapısı merkezi destek bölgesinden çekirdek içine doğru uzanan sekiz adet filamentten oluşur. Çekirdek zarfı halkası, bazıları merkezi

destek bölgesi ile etkileşim halinde olan, membranı boylu boyunca geçen (*transmembrane*) nuplardan oluşmaktadır. Seçici geçirgen bariyeri oluşturan nuplar fenilalanin-glisin (FG) amino asitlerince zengin proteinlerdir ve bu sebeple FG nuplar olarak adlandırılırlar. FG nuplar, çekirdek por kompleksinin merkezi kısmında yer alır ve dinamik bir bariyer oluşturarak taşınımın seçici geçirgenliğini sağlar. FG nupların yapısal esnekliği ve çoklu bağlanma bölgesine sahip olmaları, taşınımından sorumlu proteinlerle etkileşimlerini kolaylaştırır ve çekirdek-sitoplazma arası taşınımın düzenlenmesini sağlar (29–32).

2.2 Çekirdek-sitoplazma arası taşınım

Çekirdek por kompleksinden taşınım farklı şekillerde gerçekleşmektedir. 45 kDa'dan daha küçük moleküller çekirdek por kompleksinden pasif taşımayla geçebilmektedir (33). 45 kDa'dan daha büyük proteinlerin çekirdek-sitoplazma arası taşınımı, kargo proteinler üzerindeki çekirdek lokalizasyon sinyali (NLS) ve çekirdekten çıkış sinyalinin (NES) karyoferin ailesi taşıyıcı proteinler tarafından tanınması ile gerçekleşir (34). Bu tip taşınım karyoferin bağımlı taşınım olarak da adlandırılmaktadır.

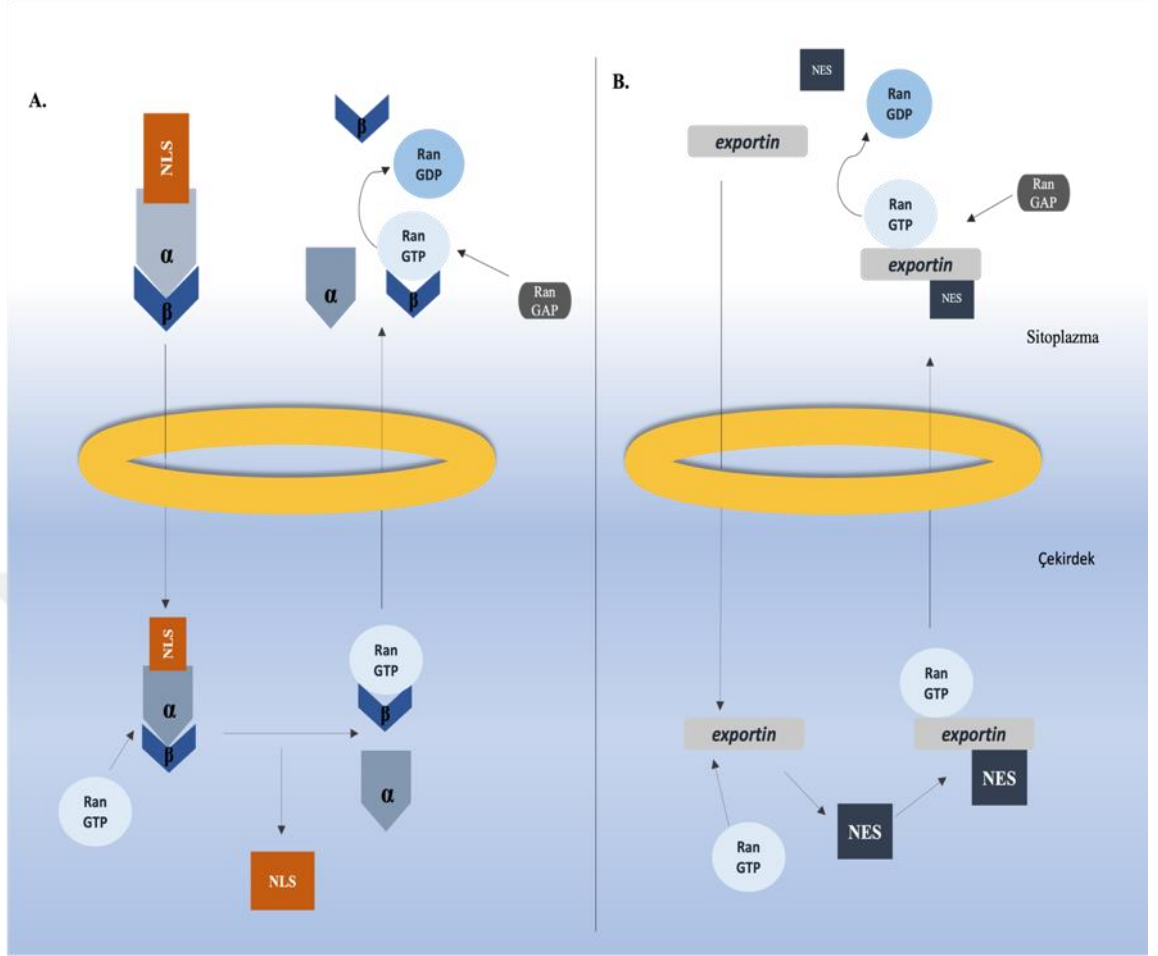
Karyoferin ailesi iki alt gruptan oluşmaktadır: karyoferin α ailesi ve karyoferin β ailesi (34). Karyoferin ailesi proteinler, genetik programlamada ve hücre adaptasyonunda rol oynayan temel proteinlerin çekirdek-sitoplazma arasında taşınımından sorumludur (35–38). Karyoferinler bir yandan kargo proteinleri taşıırken, diğer yandan FG nuplarla etkileşime girerek çekirdek-sitoplazma arasındaki trafiğin devamlılığını sağlarlar.

β -karyoferin ailesi üyelerinden ve çekirdekten sitoplazmaya taşınımında görevli CRM1, ardışık HEAT tekrarlarından oluşmaktadır (39). HEAT tekrarları bir tarafı hidrofobik, diğer tarafı hidrofilik amino asitlerce zengin iki amfifilik α -sarmal oluşturan yaklaşık 30-40 amino asitten oluşan motiflerdir (29). HEAT tekrarları çekirdek-sitoplazma arası taşınımında oldukça önemlidir. β -importin taşıdığı kargo proteinle beraber çekirdek por kompleksinden geçerken, bir yandan FG nuplarla etkileşime girer, diğer yandan kargo proteini taşır. HEAT tekrarları proteine dinamiklik ve esneklik sağlayarak bu zorlu görevin gerçekleştirilmesini sağlar (39). Karyoferin ailesi taşıyıcı proteinler yapısal değişimlere (*conformational change*) ek

olarak, bulundukları ortam koşullarına bağlı şekilde artan hidrofobisiteyle uyumlu olarak hidrofobik yüzeylerini açığa çıkardıkları biçimsel değişkenliğe (*structural fluctuation*) de giderler (40). Bu esneklik sitoplazma ve çekirdek por kompleksinin değişken koşullarına adaptasyonu kolaylaştırabilir.

Karyoferin ailesi üyelerinden importin- α ise armadillo (ARM) tekrarları taşımaktadır (41). ARM tekrarları da tıpkı HEAT tekrarları gibi çok sayıda hidrofobik rezidüye sahiptir ve importin- α üzerinde çekirdek por kompleksinden geçişi kolaylaştıracak bir alan oluşmasını sağlar.

Çekirdek içerisine taşınım esnasında bir por kompleksinden 1 dakika içinde yaklaşık 100-1000 protein geçer (42). Klasik bir NLS taşıyan kargo proteinler karyoferin ailesi üyelerinden importin- α /importin- β heterodimer kompleksi aracılığıyla çekirdek içerisine taşınır. Çekirdek içinde RanGTP, importin- β 'ya bağlanarak kompleksin dağılmasını sağlar ve kargo serbest kalır. RanGTP ile kompleks oluşturan importin- β , sitoplazmaya geri dönerken, importin- α ise çekirdekten sitoplazmaya taşınımında görevli yardımcı proteinler ile kompleks oluşturarak sitoplazmaya taşınır (30,43–45) (Şekil 2.2). Çekirdekten sitoplazmaya taşınımında ise *exportin* ailesi proteinler, kargo protein üzerinde yer alan NES dizisini tanır ve RanGTP ile bir kompleks oluşturarak sitoplazmaya taşınırlar (Bkz. Şekil 2.2). Sitoplazmada RanGTP'nin RanGDP'ye dönüştürülmesiyle kompleks dağılır. Karyoferin bağımlı taşınım olarak bilinen bu mekanizmada taşınımın yönü hücredeki Ran gradiyentine bağlıdır. RanGDP sitoplazmada yoğun olarak bulunurken RanGTP çekirdekte daha yoğun olarak bulunmaktadır.



Şekil 2.2 Çekirdek-sitoplazma arası protein taşınımını gösteren şema. **A.** Sitoplazmadan çekirdeğe taşınım. NLS dizisine sahip kargo proteinler (NLS) importin α (α) ve importin β (β) ile sitoplazmada bir kompleks oluşturur. Kargo çekirdek por kompleksinden geçtikten sonra RanGTP'nin importin β 'ya bağlanması ile kompleks dağılır ve importin- α , çekirdekten sitoplazmaya taşınımında görevli bir protein aracılığıyla sitoplazmaya geri taşınırken importin β RanGTP'ye bağlı olarak taşınır. Sitoplazmada RanGAP, RanGTP'nin RanGDP'ye dönüşmesini sağlar ve importin β 'nın serbest kalmasıyla α ve β importinler yeni bir kargo döngüsüne hazır olur. **B.** Çekirdekten sitoplazmaya taşınım. Çekirdek içinde exportin'e RanGTP bağlanır ve ardından exportin-RanGTP kompleksi NES dizisi taşıyan kargo proteine (NES) bağlanır. Kompleks çekirdek pro kompleksinden geçtikten sonra RanGAP, RanGTP'nin RanGDP'ye dönüşmesini sağlar ve kompleks dağılır.

Çekirdek lokalizasyon sinyali (NLS) ve çekirdekten çıkış sinyali (NES)

Endoplazmik retikulum ya da mitokondride yerleşim gösteren proteinlerin hedef organelle varınca kesilip atılan sinyal dizilerinin aksine NLS ve NES dizileri, protein çekirdeğe taşındıktan sonra kesilip atılmaz ve proteinin herhangi bir yerinde

konumlanabilir (46). Bu durum çekirdek-sitoplazma arası taşınımın birden fazla defa gerçekleştiğinin göstergesidir (46).

En iyi tanımlanan NLS'ler, klasik NLS'lerdir. Klasik NLS'ler, importin- α tarafından tanınabilen tek parçalı (*monopartite*) veya iki parçalı (*bipartite*) diziye sahiplerdir (47). Tek parçalı sinyal dizileri 4-8 bazik amino asitten oluşur ve 4 ya da daha çok pozisyonda arjinin (R) veya lizin (K) amino asitlerinden birine sahiptir. Karakteristik NLS motifi K(K/R)X(K/R) olarak tanımlanmaktadır ve sinyal dizisinde 'X' bu pozisyonda herhangi bir amino asitin konumlanabileceği anlamına gelmektedir (48). Tek parçalı NLS ilk defa mutant simian virüsü 40 (SV40) üzerinde tanımlanmıştır ve yedi amino asitten oluşmaktadır (PKKKRKV) (49). İki parçalı sinyal dizileri ise 9-12 amino asitlik bir bağlayıcı bölge ile birbirinden ayrılan 2-3 adet pozitif yüklü amino asitten oluşan iki farklı grup olarak karakterize olmaktadır ve çok sayıda proline (P) rezidüsü mevcuttur (47). Karakteristik motifi R/K(X)₁₀₋₁₂KRXX şeklinde gösterilmektedir (48).

Ancak, literatürde klasik bir NLS taşımayan (50) ya da alternatif uçbirleştirme ile (*alternative splicing*) ile gen dizisinde var olan NLS dizilerini kodlamayan proteinlerin de (51) çekirdek içerisine taşınabildiğine dair örnekler mevcuttur. Prolin-tirozin NLS (PY-NLS), klasik olmayan NLS'ler arasında en çok çalışılanlardan biridir. PY-NLS, amino ucunda hidrofobik ya da bazik amino asitler taşıyan, karboksi ucunda ise R/K/H(X)₂₋₅PY motifine sahip, 20 ile 30 amino asit dizisinden oluşan düzensiz yapıya sahip bir dizidir (52). Literatürde bahsi geçen bir diğer klasik olmayan NLS, dimerizasyon sonrası her bir alt ünitenin katkısı ile klasik bir NLS oluşturan STAT1 proteinine aittir (53,54). STAT1'in klasik bir NLS dizisi yoktur. Protein-protein etkileşimleri ile ikizleşme sonrası her bir alt ünitenin bazik amino asitleri bir araya gelerek, çekirdek içerisine taşınımından sorumlu proteinler tarafından tanınabilen bir NLS dizisi oluşturur (53). Bir diğer klasik olmayan NLS, kriptik NLS'dir. Kriptik NLS taşıyan proteinler çekirdek içerisine taşınımından sorumlu proteinlere özel bir sinyal aktivasyonu olmadan bağlanamazlar. Sinyal aktivasyonu ile birlikte, kriptik NLS taşınımından sorumlu proteinler tarafından tanınacak şekilde teşhir edilir ve protein taşınımı gerçekleşir (55). Son olarak, bazı proteinler birden fazla NLS ya da çoklu NLS taşımaktadır. Ancak bir molekülün neden birden fazla NLS dizisine sahip olduğu belirsizliğini korumaktadır. Literatürde çoklu NLS'nin çekirdeğe taşınım etkinliğini

arttırmaya yönelik olduğuna dair çalışmalar mevcut olmakla beraber (56,57) farklı çalışmalarda farklı NLS dizilerinin değişik hücre tiplerinde, farklı şekilde ifade edilen sitozolik reseptörler tarafından tanınan bağlanma özellikleri sergileyebileceğini belirtmektedir (58).

NES'ler kargo proteinlerin çekirdekten sitoplazmaya taşınımı için gerekli sinyal dizileridir. İlk olarak HIV-1 *Rev* ve *cyclical AMP-dependent protein kinase inhibitor* (PKIa) proteinlerinde tanımlanmıştır (59,60). İlk tanımlanan sinyal dizileri lösün açısından zengin olduğu için bu diziler lösünce zengin sinyaller olarak da bilinmektedir. Yıllar içerisinde yapılan çalışmalarda 200'den fazla proteinde NES dizisi tanımlanmıştır ve bu proteinlerin çoğu, lösün açısından zengin dizilere sahip olmamakla beraber genellikle hidrofobik bir örüntüye sahiptirler. NES dizileri 8-15 amino asit içermektedir ve çoğunluğu klasik örüntü modeline (*pattern*) uyum sağlamazlar. NES dizileri için klasik örüntü modeli: $\Phi 1-X_{2,3}-\Phi 2-X_{2,3}-\Phi 3-X-\Phi 4$ 'tür ve ' Φ ' ile gösterilen pozisyonda lösün, valin, izolösün, fenilalenin veya metiyonin gibi polar olmayan bir amino asit bulunurken, ' X ' ile temsil edilen pozisyonda herhangi bir amino asit bulunabilir (61–65). NES dizileri direkt olarak çekirdekten sitoplazmaya taşınımında sorumlu karyoferin olan CRM1'e (*exportin 1* olarak da bilinir) bağlanır (66–71).

Ancak, karyoferin bağımlı taşınım çekirdekte bulunan tüm proteinlerin çekirdeğe nasıl taşındıklarının açıklanabilmesi için yeterli değildir. Biyoinformatik analizler bira mayasında (*Saccharomyces cerevisiae*) yalnızca çekirdekte yerleşim gösteren yaklaşık 1500 proteinden yalnızca %57'sinin klasik bir NLS'ye sahip olduğunu göstermektedir (53). Özgül olarak çekirdekte yerleşen proteinlerin yanı sıra, sitoplazmik proteinlerin de çekirdek ve sitoplazma arasında gidip geldiği gösterilmiştir. İlginç biçimde hücre iskeleti proteinlerinin çekirdekte görev yaptığına dair pek çok kanıt bulunmaktadır (2). Örneğin *actinin-4*, INO80 kromatin düzenleyici kompleks (*chromatin remodelling complex*) ile etkileşime girmekte ve gen ifadesinin düzenlenmesinde görev almaktadır (3). β -catenin bir fokal adezyon bileşeni olmasına rağmen *Wingless-related integration* site (*Wnt*) yolağının düzenlenmesinde görev almaktadır (72). Bahsi geçen proteinlerin ortak noktası, tıpkı karyoferin ailesi üyelerinde bulunan HEAT ve ARM tekrarları gibi amfifilik özellikte bir tekrar dizisi taşıyor olmalarıdır. Normalde çekirdek içerisinde bulunmayan, moleküler ağırlığı yaklaşık 69 kDa olan sıgır serum

albümini (BSA, *bovine serum albumin*) yapısında hidrofobik bir amino asit taşıyacak şekilde kimyasal olarak değiştirildiğinde moleküler yüzey hidrofobikliğindeki artışın, BSA'nın çekirdek por kompleksinin seçici geçirgen bariyerinden geçmesini sağlayabileceği gösterilmiştir (73). Farklı bir çalışmada *actinin-4*, *β -catenin*, ve *β -spectrin* proteinlerinin amfifilik özellikleri sayesinde hidrofobik ortamda bölgesel olarak yapısal değişime uğrayıp yüzey hidrofobikliklerini arttırarak çekirdek por kompleksinden karyoferin bağımsız bir şekilde taşınabildiği gösterilmiştir (4). Yukarıda bahsi geçen örneklerde görüldüğü üzere, amfifilik özelliğe sahip proteinler çekirdek-sitoplazma arasında karyoferin'lere ihtiyaç duyulmaksızın taşınabilir. Bu tip taşınım karyoferin bağımsız taşınım olarak adlandırılmaktadır.

2.3 Çekirdek-sitoplazma arası taşınımın biyolojik önemi

Hücrede devamlı olarak çekirdekte bulunan proteinlerin aksine, çekirdek ve sitoplazma arası taşınan sinyal moleküllerinin hücre içi dağılımları gelen sinyale göre sürekli değişmek zorundadır. Bu nedenle, bu biyomoleküllerin yerleşimleri sıkı denetim altında olmalıdır. Çekirdek ve sitoplazma arasında gidip gelen proteinlerin hücre içi dağılımlarının dengesi, bu proteinlerin çekirdek içerisine ve çekirdekten sitoplazmaya taşınımı ile ilişkili proteinler ile etkileşimde olup olmaması gibi faktörler tarafından etkilenir. Nükleositoplazmik dağılım dengesinin değişmesiyle taşınan protein çekirdek içinde birikebilir ya da çekirdek içerisinde hiç bulunmayabilir ki bu durum proteinin çekirdekteki işlevinin artmasına ya da baskılanmasına sebebiyet verebilir (2). Çekirdek-sitoplazma arasında taşınımın gen ifadesini nasıl düzenlediğinin anlaşılması kas büyümesi ve idamesinin nasıl olduğunun anlaşılmasına yardımcı olabilir.

Her dokuda olduğu gibi kasta da proteinlerin hücre içi konumlanmaları önemlidir zira konumlanmadaki sorunlar kas işlevlerinin normal şekilde devam ettirilmesini engeller. Kas işlevinin sağlıklı şekilde devam edebilmesi transkripsiyon faktörleri gibi çekirdek-sitoplazma arası taşınan proteinler tarafından kontrol edilen gen ifadesinin mekânsal ve zamansal kontrolüyle ilişkilidir. İskelet kası hücreleri çok çekirdeklidir ve aynı hücre içindeki farklı çekirdeklerin gen ifade aktiviteleri ve protein dağılımlarının birbirinden farklı olduğu bilinmektedir. Ancak ortak bir sitoplazma paylaşan bu çekirdeklerin gen ifade aktivitesi ve protein dağılımları

arasındaki farklılıkların sebebi bilinmemektedir (74). Bu farklılıkların açıklanması için öne sürülen teorilerden bir tanesi çekirdek-sitoplazma arası taşınımın kontrolüdür (74). Nitekim Cutler ve ark. (74) tarafından yapılan çalışmalar bir iskelet kası hücresinde farklı pozisyonlarda bulunan çekirdeklerde farklı taşınım mekanizmalarının kullanıldığını ve hatta iskelet kası gelişiminin farklı aşamalarında da çekirdek-sitoplazma arası taşınımında farklılıklar olduğunu göstermektedir (74).

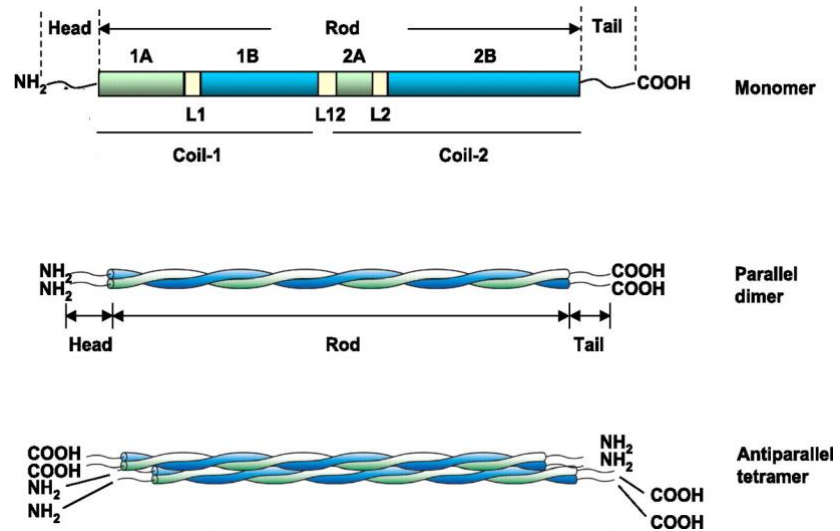
İskelet kası hücrelerinde çekirdek-sitoplazma arası taşınım mekanizmalarının aydınlatılması yönünde yapılacak çalışmalar iskelet kası biyolojisinin anlaşılmasına yardımcı olacaktır.

2.4 Desmin proteinin işlevi ve yapısı

Ara filament proteinleri 10 nm çapında fibröz yapılı bir protein ailesidir. Ara filament protein ailesi, dokuya özgü ifade edilen 70'ten fazla farklı proteine sahiptir (75–78). Ara filament proteinleri temel olarak hücre ve doku bütünlüğünün korunmasında görev almakla birlikte, geleneksel atfedilen işlevleri dışında hücre içi organel ve protein dağılımında da görev alırlar (79,80). *Human Intermediate Filament Database* (INTERFIL)'in 2021 verilerine (81) göre ara filament proteinlerindeki mutasyonlar 119 farklı hastalık ile ilişkilendirilmiştir.

Desmin kas hücrelerine özgül, sarkoplazmada Z-disklerde yerleşim gösteren 53 kDa ağırlığında bir tip III ara filament proteinidir. 2q35'te yerleşim gösteren *DES* tarafından kodlanır. Sitoiskelet mimarisinin korunmasını ve hücrenin kasılıp gevşemesi esnasında hücresel bütünlüğün korunmasını sağlar ve güç aktarımını kolaylaştırır (7,8). Desmin aynı zamanda yapısal proteinler ve sinyal proteinler arasında etkileşim kurulmasına yardımcı olur, organelleri sitoplazmik konumlanmalarını destekler ve mekanotransdüksiyonda görev alır (82).

Tipik bir ara filament proteini gibi desmin de amino ve karboksil uçlarında bulunan baş ve kuyruk domainleri ile bunların arasında korunmuş, amfifilik özellikte bir α -sarmal *rod* domainine sahiptir (Şekil 2.3). Amino ucunda yer alan baş domaini ara filament proteinlerinin bir araya gelmesi için gerekliken karboksil ucunda yer alan kuyruk domaini yatay etkileşimlerde ve ara filament ağının organizasyonunda görev almaktadır (83). Baş ve kuyruk domainleri ara filament proteinlerinin bir araya gelmesi-dağılması ve hücre içi konumlanmasında görevlidir (84).



Şekil 2.3 Desmin yapılandırmasının şematik görüntüsü. Desmin dört segmentten oluşan (1A, 1B, 2A ve 2B) merkezi bir *rod* domaini ile amino ve karboksil uçlarından oluşur. Bu domainlerin arasında 3 adet bağlayıcı (*linker*) domain (L1, L12 ve L2) bulunur. 2 monomer paralel bir şekilde bir araya gelerek dimer yapısını ve iki dimer antiparalel şekilde bir araya gelerek tetramer yapısını oluşturur (Tang'dan uyarlanmıştır (2008) (85)).

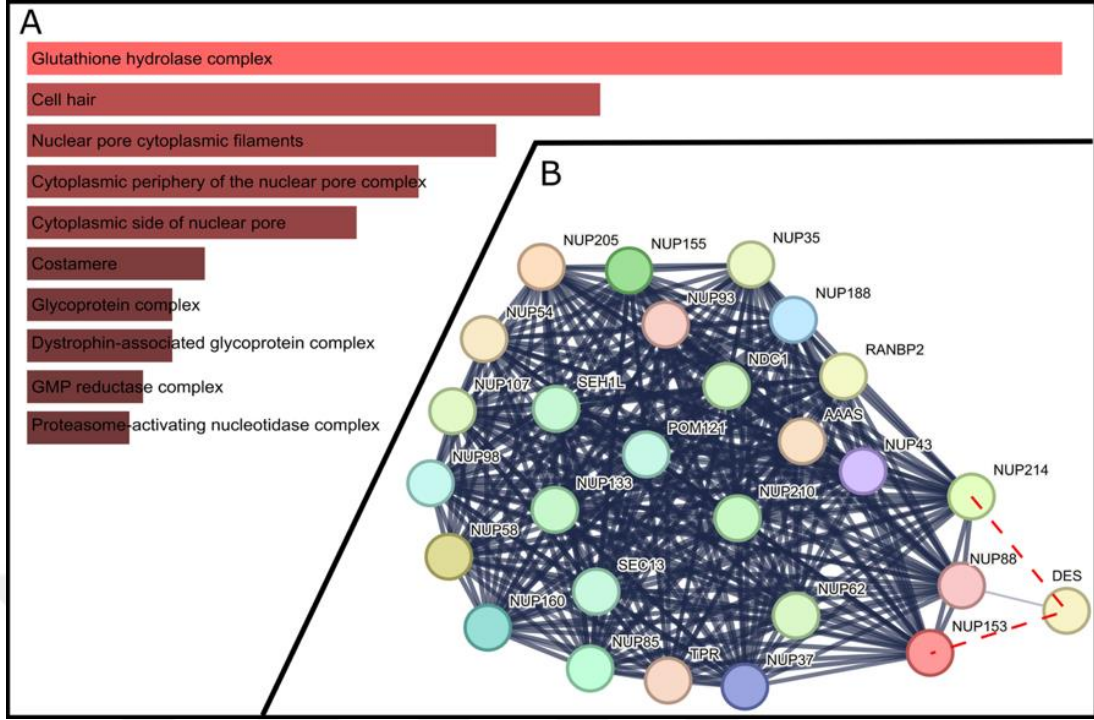
Memelilerde erken iskelet ve kalp kası farklılaşmasında desmin, vimentin ve nestin ile birlikte ifade olurken ileri gelişimsel evrelerde ise sinemin ve paranemin ile birlikte konumlanmaktadır (86–89). Somitlerde ve kalpte bilinen en erken miyojenik belirteçlerden biridir (90–93). Kasa özgül pek çok genin aksine desmin, satelit hücrelerde (94) ve çoğalan iskelet kası hücrelerinde de (91) düşük seviyede ifade edilmektedir. Gelişim esnasında desmin ifadesi, kasa özgül diğer yapısal genlerden ve *Myoblast determination protein 1 (MYOD)*, *Myogenin (MYOG)*, *Myogenic regulatory factor 4 (MRF4)* gibi *myogenic helix-loop-helix (mHLH)* düzenleyicilerden önce başlar (13). Desmin genindeki mutasyonlar iskelet kası miyopatileri ve kalp kası miyopatilerine (desminopatiler) neden olur. Desmin genindeki yaklaşık 70 farklı mutasyon, desminopatilerle ilişkilendirilmiştir.

Sitoplazmik görevleri iyi tanımlanmış olan desminin ve farklı ara filament proteinlerinin çekirdekte konumlandığını gösteren ve burada işlev gördüğü ile ilgili çalışmalar da mevcuttur. Desmin, bebek hamster böbreği hücrelerinin çekirdeğinde, başka bir ara filament proteini olan nestin ise beyin tümörü hücrelerinin çekirdeğinde gözlenmiştir (9,95). Georgatos ve ark. (10) desminin kuyruk domaininde, çekirdekte konumlanan bir ara filament proteini olan lamin B'ye bağlanma bölgesi taşıdığını

göstermiştir (10). Desmin ve başka bir tip III ara filament protein olan vimentinin *in vitro* koşullarda DNA ile etkileşimde olduğu gösterilmiştir (11,12). Desminin mHLH ailesi üyeleri ve jun, fos, *cyclic AMP-response element binding protein* (CREB) gibi transkripsiyon faktörlerinin lözün fermuar (*leucine zipper*) domainleri ile kayda değer oranda dizi benzerliği gösterdiği belirlenmiş ve bu benzerliğin desminin sinyal iletimindeki görevleri ve iskelet kası ile ilişkili faktörlerin çekirdek içerisine taşınımı ya da kromatin yapısının düzenlenmesiyle ilişkili olabileceği öne sürülmüştür (93). Başka bir yayında, desminin lamin B ile etkileşim aracılığıyla mHLH faktörlerini aktive edebileceği belirtilmiştir (13). Lamin B, tıpkı desmin gibi, *matrix attachment region* (MARs) bağlayıcı protein olarak tanımlanmıştır (96,97). MARs bölgeleri, kromozom üzerinde çekirdek matrisinin (*nuclear matrix*) bağlandığı DNA dizileridir. MARs bölgeleri ve matris proteinleri arasındaki etkileşimin kromatinin transkripsiyonel olarak aktif durumunun korunması veya transkripsiyon ve replikasyon komplekslerine tutunma bölgesi oluşturabileceği belirtilmiştir (97). Ayrıca, laminlerin sinyal iletiminde transkripsiyon faktörleri için bir bağlama noktası olarak rol aldığını gösteren kanıtlar bulunmaktadır (98,99). Tüm bu verilerin desminin lamin B aracılığı ile transkripsiyon faktörlerini aktive edebileceğine işaret etmektedir. Yakın dönemdeki çalışmalarda ise desminin amino-terminalinin silinmesi ya da serin rezidülerinin alanine dönüşmesi durumunda *embryoid body*'lerde kalp oluşumunda görevli bir transkripsiyon faktörü olan nkx2.5' in erken ifadesinin kayda değer oranda azaldığı ve kalp kası oluşum sürecinde hasar olduğu tespit edilmiştir (14,15). Bu veriler değerlendirildiğinde desminin erken kalp kası oluşum sürecinde yer alan genlerin ifadesini düzenleyebileceği düşünülmüş ve 2016 yılında yapılan bir çalışmada desminin kalp kası öncül hücrelerinde nkx2.5 ile eş zamanlı olarak ifade olduğu, nkx2.5 bildirici (*reporter*) gen ifadesini aktive ettiği ve nkx2.5' in erişkin kalp kası kök hücre popülasyonunda düzgün ifade olmasını sağladığı tespit edilmiştir (16).

2013 yılında grubumuzca yapılan bir çalışma kapsamında herhangi bir kas hastalığına sahip olmadığı bilinen bireye ait iskelet kası kesitlerinde inceleme yapıldığında desmin ve lamin B'nin çekirdekte birlikte konumlandıkları görülmüştür (100). Grubumuzca gerçekleştirilen, TÜBİTAK tarafından desteklenen (214S174) farklı bir çalışmada, zebra balığı iskelet kas dokusunda desmin ve çekirdekte yerleşim gösteren tip V ara filament proteini olan lamin B'nin etkileşimde olduğu birlikte-

immünçöktürme ile gösterilmiştir (17,101). Sonuçlar *proximity ligation assay* (101) ve kütle spektroskopisi ile doğrulanmıştır. Çalışmamızda ayrıca çekirdek por kompleksinde konumlanan ve çekirdek-sitoplazma arası taşınımında görev aldığı bilinen FG grubu bir nup olan nup214 ve desmin arasında da bir etkileşim olduğu birlikte-immünçöktürme yöntemiyle tespit edilmiştir (17,101). Kütle spektroskopisi sonuçları incelendiğinde desminin çekirdekte konumlanan histon proteinleri, bazı transkripsiyon faktörleri (*zinc finger and btb domain-containing protein 17*, *zinc finger protein 827*, *remodeling and spacing factor 1*) ve başka bir FG grubu nup olan nup153 ile de beraber çöktüğü tespit edilmiştir. Kütle spektroskopi sonucu elde edilen protein listesi *ProteomeXchange Consortium* (PXD047121)'a yüklenerek *Protein Analysis Through Evolutionary Relationships* (PANTHER) veri tabanında (102–104) *Gene Ontology-Cellular component* 'te analiz edildikten sonra hücre içi konumlanması çekirdek (*nuclear*) olarak belirlenen proteinler Enrich R'de analiz edilmiştir (105–107). Desminin çekirdekteki bağlanma partnerlerinin, çekirdek por kompleksi sitoplazmik filamentleri, çekirdek por kompleksinin sitoplazmik çevresi ve çekirdek por kompleksinin sitoplazmik tarafı başlıkları altında toplanan, çoğunlukla çekirdek por kompleksi elemanları olduğu tespit edilmiştir (Şekil 2.4A).



Şekil 2.4. Desminin bağlanma partnerlerinin proteomik analizi. **A.** EnrichR’de desminin çekirdekteki bağlanma partnerlerinin hücresel lokalizasyonunu temsil eden ontoloji analizi. X eksenini (çubuğun uzunluğu) ontoloji analizinde öne çıkan terimlerin önemini temsil etmektedir. Daha açık kırmızı tonları daha anlamlı sonuçları gösterir. En üstten başlayarak p değerleri sırasıyla: 7,87E-04; 3.50E-03; 4.89E-03; 6.28E-03; 7.67E-03; 1.25E-02; 1.39E-02; 1.39E-02; 1.53E-02; 1.60E-02. **B.** Desmin ve nupların ilişkisi. Kırmızı kesikli çizgiler tarafımızca tanımlanan etkileşimleri göstermektedir (17,101).

Tüm bu çalışmalara ek olarak *The Biological General Repository for Interaction Datasets* (BioGRID) veri tabanında (108) desminin bağlanma partnerleri incelendiğinde desminin çekirdek por kompleksi elemanlarından olan nup88 ile de etkileşimde olduğu görülmüştür (18). Ardından, desmin ve nuplar arasındaki etkileşim ağının anlaşılması için STRING veri tabanı (109) kullanılmıştır. Beklenildiği üzere nuplar arasında yoğun bir etkileşim gözlenirken, desminin de bu etkileşimde yer alabileceği görülmüştür (Şekil 2.4B). Bu sonuçlar desminin iskelet kasında çekirdek içerisine girerek burada bir görev üstlendiği ihtimalini güçlendirmiştir.

Literatürde desminin çekirdekte konumlanması ve üstlenebileceği görevlerle ilişkili bilgiler mevcut olsa da çekirdek-sitoplazma arasında nasıl taşındığını gösteren bir veri bulunmamaktadır.

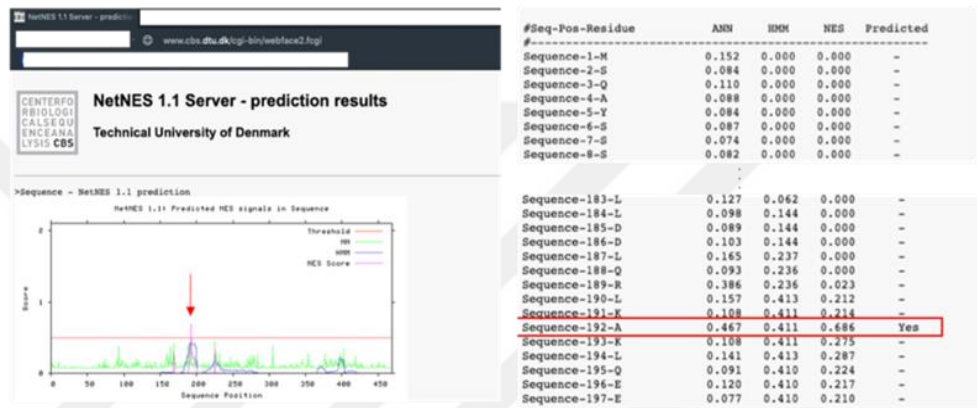
Çevrimiçi veri tabanları incelendiğinde desminin potansiyel NLS ve NES dizilerine sahip olduğu görülmüştür (Şekil 2.5). Potansiyel NLS dizileri için tarama cNLS Mapper veri tabanında gerçekleştirilmiştir (110–112). Bu veri tabanında yalnızca çekirdekte konumlanan proteinler için skorun 8-10 arası olması gerektiği belirtilmiştir. Skorun proteinler kısmen çekirdekte konumlandığı durumda 7-8, proteinler hem çekirdek hem sitoplazmada konumlandığında 3-5 arası ve yalnızca sitoplazmada konumlandığında ise 1-2 arasında olduğu belirtilmiştir (111). Desmin dizisi üzerinde, 282.pozisyondaki glutamat ve 313.pozisyondaki alanin amino asitlerini kapsayan, skoru 3 olan bir dizi olduğu tespit edilmiştir (Bkz. Şekil 2.5). Ek olarak 10.pozisyondaki arjinin ve 42.pozisyonundaki serin amino asitleri arasında skoru 2.9 olan bir dizi daha tespit edilmiştir (Bkz. Şekil 2.5). Bu ikinci dizinin skoru çekirdek sitoplazma arası taşınım için belirlenen limitin (3) altında kalmakla (skor: 2.9) birlikte Fuchs ve ark. (16) tarafından yapılan çalışmada, desminin amino ucundaki ilk 48 amino asitin silinmesi durumunda, çekirdekte konumlanmadığı gösterilmiştir (16). Dolayısıyla bu sinyal dizisinin de işlevsel olması olasıdır. NetNES 1.1 veri tabanında (61) ise desmin üzerinde NES dizisi olup olmadığı araştırılmıştır. Bu veri tabanı yapay nöral ağ (ANN) ve gizli Markov modelleri (HMM) kullanarak ökaryotik hücrelerde lösine zengin NES dizilerinin tahmin edilmesini sağlamaktadır (61). Desmin dizisi NetNES 1.1 taratıldığında üzerinde potansiyel bir NES dizisi olduğu görülmüştür (Bkz. Şekil 2.5). Desminin potansiyel NLS dizilerine sahip olması karyoferin bağımlı mekanizma ile çekirdek içerisine girebileceğini ve üzerinde potansiyel bir NES bulunması karyoferin bağımlı olarak çekirdekten sitoplazmaya taşınabileceğini düşündürmüştür.

A. cNLS Mapper Result

Predicted NLSs in query sequence	
MSQAYSSSQRVSSYRRTFGGAPGFLGSPVFPFPRAGFGSKGSSSVT	50
SRVYQVSRSTGGAGGLSLRASRLGTRTPSSYGAGELDFSLADAVNQ	100
FLTTRTEKVELQELNDRFANYIEKVRFLQQNAALAEVNLKGREPTR	150
VAELYEEELRELRRQVEVLTNQARVDVERDNLDDLQRLKAKLQEEIQL	200
KEEAENNLAAFRADVDAATLARIDLERRIESLNEETIAFLKKVHEEEIREL	250
QAQLQEQVQVEMDMSPDLTAALRDIRAQYETIAAKNISEAEWYKSKV	300
SDLTQAAKNNDALRQAKQEMMEYRHOIQSYTCEIDALKGTNDSLMRQMR	350
ELEDRFASASGYQDNIRLEEEIRHLKDEMARHLREYQDLLNVKMLDV	400
EIATYRKLEGEESRINLPQTYSALNFRETSPEQRGSEVHTKTKVMKT	450
IETRDGEVSEATQQQHEVL	470

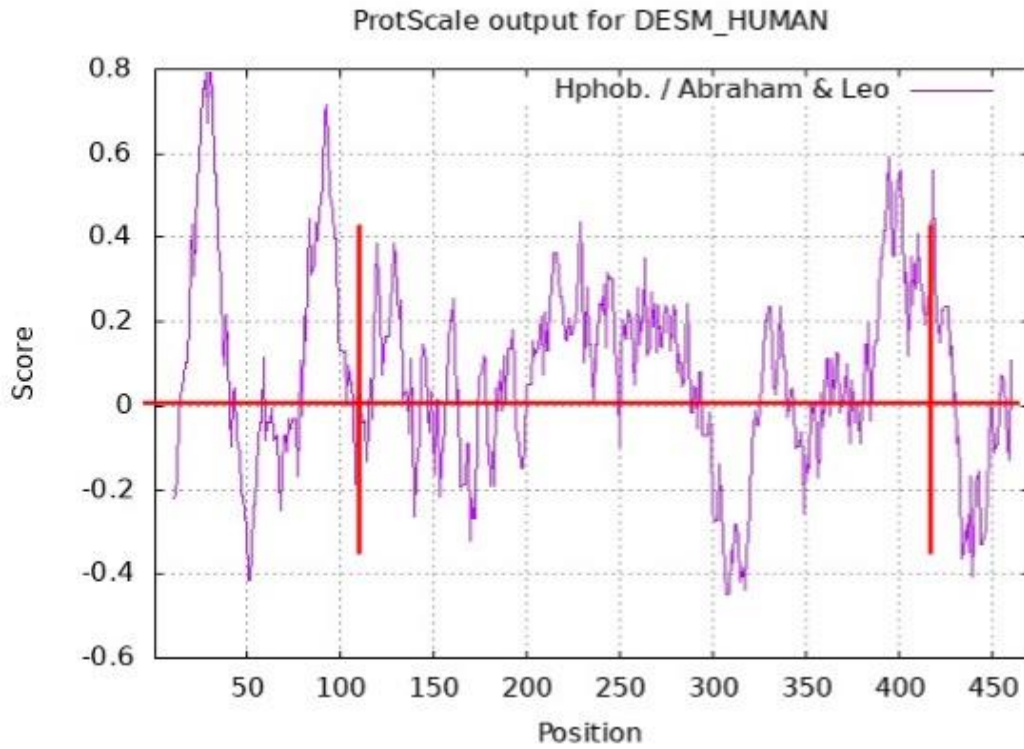
Predicted bipartite NLS		
Pos.	Sequence	Score
10	RVSSYRRTFGGAPGFLGSPVFPFPRAGFGS	2.9
139	EVNRLKGREPTRVAELYEEELRELRRQVEVLT	2.1
142	RLKGREPTRVAELYEEELRELRRQVEVLTNQARVD	2.2
186	DLQRLKAKLQEEIQLKEEAENNLAAFRADVDA	2.2
282	ETIAAKNISEAEWYKSKVSDLTQAAKNNDAL	3.2
375	RHLKDEMARHLREYQDLLNVKMLDVEIATYRKLE	2.5
390	DLLNVKMLDVEIATYRKLEGEESRINLPQT	2.2

B.



Şekil 2.5. Çevrimiçi veri tabanları kullanılarak tespit edilen NLS ve NES dizileri. **A.** cNLS Mapper veri tabanında insan desmin dizisi kullanılarak yapılan taramada tespit edilen NLS dizileri. Desmin için α -sarmal rod domaininde 3 skorunu aşan olası bir sinyal dizisi olduğu görülmüştür. Aynı zamanda amino terminalinde eşik değerinin hemen altında (2.9) potansiyel bir sinyal daha bulunmaktadır **B.** NetNES 1.1 veri tabanında desmin için olası NES.

Desmin için olası taşınım mekanizmalarından bir diğeri ise karyoferin bağımsız taşınımıdır. Diğer ara filament proteinleri gibi desmin de amino ve karboksil uçlarında bulunan baş ve kuyruk domainleri ile bunların arasında bulunan oldukça korunmuş amfifilik bir α -sarmal rod domaini içermektedir (113) (Şekil 2.6). Desminin amfifilik özellikte olması, çekirdek içerisine tıpkı *actinin-4* ve β -*catenin* gibi moleküler yüzey hidrofobikliğini değiştirerek karyoferin bağımsız bir mekanizma ile taşınabileceğini (4) düşündürmüştür. Ayrıca desminin çekirdek por kompleksinin sitoplazmik halkasında konumlanan nup214 ve çekirdek içerisinde konumlanan nup153 ile beraber çöktüğünün gösterilmesi ve nup88 ile etkileşimde olması bu ihtimali güçlendirmektedir.



Şekil 2.6. Expasy- ProtScale’de desmin için oluşturulan Abraham & Leo hidrofobiklik ölçeği (114–116). 0’ın üzerinde skora sahip bölgeler hidrofobik olarak değerlendirilmektedir. Desminin 109-412. amino asitler arasında tekabül eden α -sarmal *rod* domaini kırmızı dikey çubuklar ile sınırlandırılmıştır.

2.5 Tez çalışmasının temel aldığı hipotez ve amaçları

Çekirdek içerisinde konumlanması ve üstlenebileceği görevlerle ilgili pek çok araştırma olmasına rağmen desminin çekirdek-sitoplazma arasında nasıl taşındığına dair bir veri bulunmamaktadır. Desminin potansiyel NLS dizisilerine sahip olması (Bkz. Şekil 2.5) çekirdek-sitoplazma arasında karyoferin bağımlı mekanizma ile taşınabileceğine işaret ederken, yapılanma özelliği (monomerlerin bir araya gelmesiyle başlayan daha üst bir yapı oluşması) (117), amfifilik niteliği (113), birlikte-immünöktürme (17,101) ve kütle spektroskopisi sonuçları (Kural, Yayınlanmamış veri) ile çevrimiçi veri tabanlarında yer alan olası bağlanma partnerleri (nup214, nup153 ve nup88) göz önüne alındığında ise taşınımın karyoferin bağımsız bir mekanizma ile olabileceği öngörülmüştür. Hücre iskeleti proteinlerinin birden fazla mekanizma ile içeri girmesi olası bir durum olduğundan (1) desminin çekirdek içerisine taşınması için elde edilen veriler ışığında iki aday mekanizma olduğu

düşünülmüş ve bu tez kapsamında desminin çekirdek-sitoplazma arasında bu mekanizmalardan biri veya her ikisiyle taşınıp taşınmadığının araştırılması planlanmıştır.

Bu bilgiler ışığında tez çalışmasının hipotezi: desmin karyoferin bağımlı ya da karyoferin bağımsız bir moleküler mekanizma ile çekirdek-sitoplazma arasında taşınmaktadır.

Bu doğrultuda tez çalışmasının amacı sitoplazmada görevli desmin ara filament proteininin çekirdek içerisine taşınma mekanizmasının aydınlatılmasıdır.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Gereç

3.1.1 Hücre kültürü

- İnsan iskelet kası hücre hattı (T0033) (ABM)
- Fare iskelet kası hücre hattı (C2C12) (ATCC)
- İnsan servikal kanser hücre hattı (HeLa) (ATCC)
- 1X Tripsin-EDTA (Capricorn)
- İnsan iskelet kası hücreleri için çoğaltma besi yeri
 - *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), *high glucose* (Capricorn): %64
 - Medium-199 (Sigma-Aldrich): %16
 - *Fetal bovine serum* (FBS) (Capricorn): %20
 - Fetuin (Sigma): 25 ug/mL
 - *Human Epidermal Growth Factor* (hEGF) (Gibco): 5 ng/mL
 - *Basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF) (Gibco) 0.5 ng/mL
 - İnsülin (Sigma-Aldrich): 5 ng/mL
 - Deksametazon (Sigma-Aldrich): 0.2 ug/mL
 - Gentamisin (Biowest): 50 µg/mL
 - Amfoterisin B (Biowest): 2.5 µg/mL
- Fare iskelet kası hücreleri ve insan servikal hücreleri için çoğaltma besi yeri
 - FBS: %10
 - DMEM, *high glucose*: %89
 - Gentamisin (Biowest): 50 µg/mL
 - Amfoterisin B (Biowest): 2.5 µg/mL
- İnsan ve fare iskelet kası hücreleri için farklılaşma besi yeri
 - *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), *high glucose* (Capricorn): %60
 - Medium-199 (Sigma-Aldrich): %20
 - At serumu (Biowest): %2

- Gentamisin (Biowest): 50 µg/mL
- Amfoterisin B (Biowest): 2.5 µg/mL
- 1X *phosphate buffered saline* (PBS) (Biowest)
- Dimetilsülfoksit (DMSO) (Appllichem)

3.1.2 Hücre döngüsü senkronizasyonu ve analizi

- Senkronizasyon besi yeri
 - DMEM, *high glucose, no glutamine, no methionine, no cystine* (Gibco)
 - L-cystine (Sigma): 40 mg/mL
 - L-glutamine 100x (Serox): %1
 - FBS: %1
- *Muse Cell Cycle Kit* (Luminex Corporation)
- CytoFLEX Akım sitometri cihazı (Beckman Coulter)
- Kaluza yazılımı (Beckman Coulter)

3.1.3 İmmünfloresans boyama ve görüntüleme

- Triton X-100 (Sigma-Aldrich)
- 4',6-diaminodino-2-phenylindole (DAPI) (Sigma-Aldrich)
- *Mounting medium* (Ibidi)
- %4 paraformaldehit (PFA) (Sigma-Aldrich)
- Etanol (Carlo Erba)
- Sığır serum albümini (BSA)

3.1.4 Transfeksiyon çalışmalarında kullanılacak vektörlerin çoğaltılması

- pCMV3-C-GFPspark® (eGFP işaretli desmin ifade vektörü) (Sinobiological HG13865-ACG)
- pMAX-GFP™ (yalnızca eGFP ifade eden vektör) (Lonza Bio)
- pCMV3-C-GFPspark® üzerinde mutasyon aracılıklı oluşturulan NLS ve NES dizilerinin silindiği vektörler

- Sıvı bakteri besi yeri (*Lysogeny Broth (LB) Medium*), pH 7,0 (1L):

Trypton (Applichem)	: 10 g
Maya özütü (Applichem)	: 5 g
Sodyum klorür (NaCl) (Sigma)	: 5 g
- Katı Bakteri Besiyeri (1 L):

Trypton (Applichem)	: 10 g
Maya özütü (Applichem)	: 5 g
NaCl (Sigma)	: 5 g
Agar (Sigma)	: 15 g
Ampisilin (100 mg/ml) (Gibco)	: 1 ml
- Midi-prep plazmid saflaştırma kiti (Thermo-Scientific)
- Mini-prep plazmid saflaştırma kiti (Macherey-Nagel)
- KpnI enzimi (NEB)
- *NanoDrop™ 1000* spektrofotometre (Thermo Scientific)

3.1.5 Transfeksiyon

- *Lipofectamine 3000 Transfection Reagent* (ThermoFisher Scientific)
- OPTİ-MEM (ThermoFisher Scientific)
- pCMV3-C-GFPspark® (eGFP işaretli desmin ifade vektörü) (Sinobiological HG13865-ACG)
- pMAX-GFP™ (yalnızca eGFP ifade eden vektör) (Lonza Bio)
- pCMV3-C-GFPspark® üzerinde mutasyon aracılıklı oluşturulan NLS ve NES dizilerinin silindiği vektörler

3.1.6 Canlılık testi

- *Trypan mavisi* (BIOFROX)
- Hemositometre

3.1.7 Protein izolasyonu

- 1X *phosphate buffered saline* (PBS)
- *Radio-immunoprecipitation assay buffer* (RIPA) (GeneAll)

- *Cell scraper* (Greiner)
- Soğutmalı santrifüj (Eppendorf)
- 1X Tripsin-EDTA (Capricorn)
- *Pierce™ BCA Protein Assay Kit* (Thermo Scientific)

3.1.8 Western blot

- *Mini Protean II* elektroforez seti (Bio-Rad)
- *Laemmli* yükleme tamponu (4x) (Bio-Rad)
- SDS (Thermo Scientific)
- %12'lik ayırıcı jel:
 - 1.5 M Tris; pH 8.8
 - %30 Akril-bisakril
 - %10 sodyum dodesil sülfat (SDS)
 - %0.1 N, N,N',N'-tetrametil etilendiamin (TEMED)
 - %10 amonyum persülfat (APS),
 - dH₂O.
- %5'lik toplayıcı jel:
 - 1 M Tris; pH 6.8
 - %30 Akril-bisakril
 - 10% SDS
 - %0.1 TEMED
 - 10% APS
 - dH₂O
- *Precision Plus Protein™ Dual Color Standarts* (mol wt 10-250 kDa) (Bio-Rad)
- Yürütme tamponu (pH 8,3)
 - 25 mM Tris base
 - 192 mM glisin
 - % 0.1 SDS
- Yarı kuru elektroforetik transfer cihazı (Bio-Rad, *TransBlot Turbo Transfer System*)

- Nitroselüloz membran (0,45µm kalınlığında) (Thermo Scientific)
- *Whatmann* filtre kâğıdı
- Yarı kuru transfer tamponu (pH 8,3)
 - Tris baz: 25 mM,
 - Glisin: 192 mM,
 - Metanol: %20
- *Ponceau S* çözeltisi (Thermo Scientific)
- Yıkama tamponu (1X TBS-T) (pH 7,4):
 - Tris baz: 20 mM,
 - NaCl: 150 mM,
 - *Tween*-20: % 0.1 (w/v),
 - dH₂O
- Bloklama tamponu:
 - Yağsız süt tozu(%5,
 - TBS-T

3.1.9 Transport baskılanması

- İvermektin (Sigma-Aldrich)
- Dimetil sülfoksit (DMSO) (Merck)

3.1.10 Çekirdek içerisine taşıma deneyleri

- Digitonin (Sigma-Aldrich)
- *Import buffer*
 - 4-(2-hidroksietil)-1-piperazineetansulfonik asit (HEPES) (Sigma-Aldrich): 20 mM , pH 7.3
 - Potasyum asetat (Sigma-Aldrich): 110 mM
 - Sodyum asetat (Sigma-Aldrich): 5 mM
 - Magnezyum asetat (Sigma-Aldrich): 2 mM
 - *Ethylene glycol-bis (β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid* (EGTA) (Sigma-Aldrich): 0.5 mM
 - *Dithiothreitol* (DTT) (Thermofisher Scientific): 2 mM DTT

- Proteaz inhibitör kokteyli
- *Import cocktail*
 - Import buffer
 - Sıçan karaciğer sitozolü (Gibco): %50
 - Fosfokreatin kinaz (Sigma-Aldrich): 20 U/mL
 - Adenozin trifosfat (ATP) (Sigma-Aldrich): 1 mM
 - Kreatin fosfat (Sigma-Aldrich): 5 mM
- Rekombinant desmin (Cusabio)
- Floresan konjuge dekstran (Invitrogen)
- 4',6-diaminodino-2-phenylindole (DAPI) (Sigma-Aldrich)

3.1.11 Yüzey hidrofobikliği ölçümü

- Rekombinant desmin (Cusabio)
- BSA (Sigma-Aldrich)
- 4,4'-Dianilino-1,1'-Binaphthyl-5,5'-Disulfonic Acid, Dipotassium Salt (Bis-ANS) (R&D Systems)
- 1X phosphate buffered saline (PBS) (Biowest)
- 96 kuyucuklu hücre kültürü kabı
- Spectramax M2 spektrofotometre (Molecular Devices)

3.1.12 Moleküler dinamik simülasyonları

- *Visual Molecular Dynamics Software* (VMD)
- *Nanoscale Molecular Dynamics* (NAMD)

3.1.13 Antikorlar

- Fare monoklonal anti-MF20, IgG2b (Developmental Studies Hybridoma Bank)
- Keçi anti-fare sekonder antikor, Alexa Fluor 488 konjuge (Invitrogen)
- Tavşan poliklonal anti-Emerin (Sigma-Aldrich)
- Keçi Anti-Tavşan IgG (H+L) Alexa Fluor 488 konjuge (Invitrogen)

- Fare monoklonal anti-E2F (Santa Cruz Biotechnology)
- Tavşan poliklonal anti-desmin (Sigma-Aldrich)
- Keçi anti-tavşan sekonder antikor (Invitrogen)

3.2 Yöntem

3.2.1 Hücre kültürü

İnsan iskelet kası hücre hattı (T0033) ABM firmasından satın alınmıştır. Fare iskelet kası hücre hattı (C2C12) ve insan servikal kanser hücre hattı (HeLa) hücreleri %10 oranında FBS, 50 µg/mL gentamisin ve 2.5 µg/mL amfoterisin B içeren yüksek glikozlu DMEM içerisinde çoğaltılmıştır. T0033 hücreleri %16 Medium 199, %64 DMEM, %20 FBS, 25 µg/mL fetuin, 5 ng/mL hEGF, 0.5 ng/mL bFGF, 5 ng/mL insülin, 0.2 µg/mL deksametazon, 50 µg/mL gentamisin ve 2.5 µg/mL amfoterisin B içeren yüksek glikozlu DMEM içerisinde çoğaltılmıştır.

Miyoblast hücrelerinin farklılaştırılması için %80-%90 yoğunluğa ulaşmaları beklenmiş ardından farklılaşma besiyeri (%20 Medium 199, %60 DMEM, %2 at serumu 50 µg/mL gentamisin ve 2.5 µg/mL amfoterisin B) eklenmiştir.

Hücreler %5 karbondioksit içeren ortamda 37°C’de büyütülmüşlerdir. Hücreler, ihtiyaç halinde, %90 FBS ve %10 DMSO içeren besiyeri içerisinde dondurularak, sıvı azot içinde saklanmıştır.

3.2.2 Hücre döngüsü senkronizasyonu

Hücre döngüsü senkronizasyonu insan (T0033) ve fare (C2C12) iskelet kası hücre hatlarında gerçekleştirilmiştir. Senkronizasyon için hücreler 10 cm çapındaki petri kaplarına ekilmiştir. Ekimden 24 saat sonra 1X PBS ile yıkanmış ve açlık (*starvation*) besiyerine (metiyonin içermeyen DMEM, %1 FBS, %1 L-glutamin, 40 mg/mL L-cystine) alınmıştır. T0033 hücreleri 40 saat ve C2C12 hücreleri 24 saat boyunca açlık besiyerinde bırakılmış ve hücre döngüsünün tekrar başlaması için standart büyüme besiyerine alınmışlardır. Standart büyüme besiyeri içerisinde 24 saat tutulan hücrelerin senkronizasyon durumlarının anlaşılması için hücre döngüsü analizine tabi tutulmuştur. Trypsin ile kaldırılan hücreler 300 g’de beş dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Pelet 1XPBS ile yıkandıktan sonra vortekslenmeyi takiben, 1 ml soğuk saf etanol damla damla eklenerek tespit edilmiştir. -20 °C’de bir gece bekletilen

hücreler 17000 g'de sekiz dakika santrifüjlenmiştir. Daha sonra örnekler propidyum iyodür boyaması için *Muse Cell Cycle Kit* ile 30 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Örnekler CytoFlex akım sitometresi cihazı ile her örnek için en az 10000 okuma (*event*) olacak şekilde analiz edilmiştir.

3.2.3 İmmünfloresan boyama ve görüntüleme

Miyozin ağır zincir (MHC) proteininin boyanması için insan iskelet kası hücreleri %100 etanol ile -20°C'de tespit edilmiştir. Hücreler 1X PBS ile yıkandıktan sonra %1 FBS, %0,5 Triton-X içeren PBS çözeltisinde 45 dakika boyunca oda sıcaklığında bloklanmıştır. Hücreler 1X PBS ile yıkanmış ve PBS içerisinde 1:20 oranında sulandırılan MHC proteinini tanıyan primer antikor (anti-MF20, IgG2b, Developmental Studies Hybridoma Bank) ile 2 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Primer antikor uygulaması sonrasında hücreler 1X PBS ile yıkanmış ve *Alexa Fluor* konjuge sekonder antikor 1:750 oranında 1X PBS içinde sulandırılarak 1 saat boyunca oda sıcaklığında muamele edilmiştir. Hücreler 1X PBS ile yıkanmış ve çekirdek boyaması için DAPI uygulaması yapıldıktan sonra kapatılmıştır.

Emerin ve E2F boyaması için hücreler %4 PFA ile oda sıcaklığında 10 dakika fikse edilmiştir. Permeabilizasyon için PBS içerisinde %0.1 oranında *Triton-X* ile muamele edilmiştir. Hücreler PBS içinde %2 BSA ile 1 saat oda sıcaklığında bloklandıktan sonra primer antikor 1:300 oranında %0.1 BSA içeren PBS içerisinde sulandırılarak gece boyu +4°C'de inkübe edilmiştir. Ertesi sabah hücreler 1XPBS ile yıkandıktan sonra sekonder antikor 1:500 oranında sulandırılmış ve bir saat oda sıcaklığında muamele edilmiştir. Hücreler 1XPBS ile yıkandıktan sonra DAPI uygulaması yapılmış ve kapatılmıştır.

Görüntülemeler *Zeiss-Axio Plan Upright Fluorescence microscope with AxioCam Erc5 5Mp* ile yapılmıştır.

3.2.4 Farklılaşma ve füzyon oranlarının hesaplanması

Farklılaşma ve füzyon oranları hesaplanırken yalnızca insan iskelet kası hücreleri kullanılmıştır. Elimizde bulunan MHC antikoruna farede üretildiği için fare kökenli C2C12 hücrelerinde özgül olmayan boyamalar sebebiyle kantitasyon yapmak mümkün olmamıştır. Açlık sonrası C2C12 hücrelerinde morfolojik olarak bir abnormalite, hücre döngüsünün herhangi bir şekilde yeniden başlamadığını gösteren

bir emare bulunmaması nedeniyle bu çalışma yalnızca insan iskelet kası hücreleri için gerçekleştirilmiştir. İnsan iskelet kası hücreleri farklılaşma besi yerine alındıktan sonra 24, 28, 32 ve 48. saatlerde Kısım 3.2.3'te detaylı şekilde belirtildiği üzere tespit edilmiş ve MHC boyaması sonrasında rastgele alanlar seçilerek fotoğraf çekilmiştir. Fotoğraf çekilen alanlarda en az 93 çekirdek bulunmaktadır.

Farklılaşma oranı hesaplanırken miyozin ağır zincir MHC (+) hücrelerdeki çekirdek sayısı alandaki toplam çekirdek sayısına bölünmüştür (118).

Füzyon oranı hesaplanırken iki veya daha fazla çekirdek içeren MHC (+) hücrelerdeki çekirdek sayısı alandaki toplam çekirdek sayısına bölünmüştür (118).

3.2.5 Transfeksiyon çalışmalarında kullanılacak vektörlerin çoğaltılması

pCMV3-C-GFPspark® (eGFP işaretli desmin ifade vektörü, HG13865-ACG) Sinobiological firmasından satın alınmıştır. NES ve NLS dizilerinin silindiği mutant desmin ifadesi olan vektörler *GenScript* firmasından hizmet alımı yoluyla temin edilmiştir. pMAX-GFP™ vektörü Lonza Bio firmasından satın alınmıştır.

Transformasyon çalışmaları için 50 µl kompetan hücre buz üzerinde çözölmüş, ardından vektörler kompetan bakterilere (*E.Coli* DH5α) 1:10 oranında eklenmiştir. 5 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra karışım steril cam boncuk yardımı ile 100 µg/ml amfisilin içeren LB agar petri kaplarına ekilmiş ve 37°C etüvde bir gece boyunca bekletilmiştir. 5 adet koloni seçildikten sonra bu koloniler amfisilin içeren önceden ısıtılmış 4 mL LB içerisinde, 37°C, 250 rpm çalkalama ile 14 saat boyunca kültür edilmiştir. Son olarak üreticinin talimatları doğrultusunda miniprep kiti kullanılarak plasmid izolasyonu yapılmıştır. Plasmid konsantrasyonları 260 nm dalga boyunda *NanoDrop 1000* spektrofotometre yardımıyla ölçölmüştür.

Tarafımıza Sanger dizileme ile kontrol edilerek gönderilen vektörlerin mutasyon taşıyıp taşımadığı KpnI enzimi ile kesim yapılarak da kontrol edilmiştir. Enzim kesim protokolü aşağıda belirtildiği gibidir.

	Miktar
Restriksiyon enzimi	20 U
DNA	1 µg
10X NEBuffer	1X
Reaksiyon hacmi	50 µl

Enzim kesim reaksiyonu yukarıda belirtildiği üzere hazırlandıktan sonra 15 dakika boyunca 37°C’de inkübe edilmiştir. Ardından enzim inaktivasyonu için 20 dakika 65°C’de inkübe edilmiş ve enzim kesim ürünleri %1’lik agaroz jelde yürütülmüştür.

3.2.6 Transfeksiyon çalışmaları

Senkronize edilen insan ve fare iskelet kası hücreleri %80-%90 yoğunluğa ulaştığında transfeksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Transfeksiyon için *lipofectamine 3000* (Thermo Fisher Scientific, L3000008) kiti kullanılmıştır. Üreticinin talimatları doğrultusunda transfeksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Kısaca, kit içerisinde bulunan *lipofectamine reagent*, opti-mem (düşük serumlu besi yeri) içerisinde sulandırılmıştır. Kit protokolü içerisinde opti-mem besi yeri kullanılması önerildiği için transfeksiyon karışımları hazırlanırken opti-mem kullanılmıştır. Ayrı bir tüpte plazmidler (200 ng), opti-mem ve yine kit içerisinde bulunan p3000 *reagent* ile dilüe edilmiştir. İki tüpün içerikleri karıştırılmış ve oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edilmiştir. Ardından karışım kuyucuklara eklenmiştir. 24 saat sonra hücreler GFP ifadesi için kontrol edilmiş ve farklılaşma besi yerine (yüksek glikoz içeren DMEM, %2 at serumu, %1 insülin) alınmıştır. Hücreler farklılaşma besi yerine alındıktan 24, 28, 32 ve 48 saat sonra %4 PFA kullanılarak fikse edilmiş, çekirdek boyaması için DAPI uygulaması yapılmış ve kapatıldıktan sonra *Zeiss LSM 880 laser scanning confocal microscope equipped with a 63×/1.4 Apochromat Oil DIC objective* ile görüntüleme yapılmıştır.

Yabanıl tip desmin ve yalnızca eGFP ifadesi sağlayan vektörler ile yapılan transfeksiyon sonrası 24. saatte canlılık testi yapılmıştır. Hücreler kaldırıldıktan sonra, hücrelerin bulunduğu besi yeri ile 1:1 oranında karıştırılıp *trypan blue* uygulaması

yapılmıştır. *Trypan blue* uygulaması yapılan hücreler hemasitometre ile mikroskop altında sayılmıştır. Transfeksiyon sonrası canlılık testi üç tekrar olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

Desminin çekirdek konumlanmasının belirlenmesi için konfokal mikroskop ile çekilen görüntüler kullanılarak *Pearson* korelasyon katsayısı hesaplanmıştır. *Pearson* korelasyon katsayısı, -1 ile +1 arasında bir değer olarak ifade edilir. -1 mükemmel negatif korelasyonu, +1 ise mükemmel pozitif korelasyonu ifade etmektedir (119). 0 değeri ise eş lokalizasyon olmadığını ifade etmektedir (119). Konfokal mikroskop ile çekilen görüntüler FIJI-*Coloc2* yazılımı kullanılarak desmin (yeşil sinyal) ve çekirdek (DAPI sinyali) açısından değerlendirilerek *Pearson* korelasyon katsayısı hesaplanmıştır. Sonuçlar *Mann-Whitney U* testi ile değerlendirilmiştir. Testlerin yapılmasında ve grafiklerin çizilmesinde *GraphPad Prism* programı kullanılmış ve veriler değerlendirilirken $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Floresan yoğunluk analizi

Desminin çekirdekte konumlanması değerlendirilirken sonuçların transfeksiyon etkinliğinden bağımsız olarak değerlendirilebilmesi için floresan yoğunluk (*fluorescence intensity*) analizi gerçekleştirilmiştir. Transfeksiyon sonrası insan ve fare iskelet kası hücreleri konfokal mikroskopta çekilmiş ve görüntüler FIJI programı kullanılarak değerlendirilmiştir (120). Sitoplazma ve çekirdekten gelen floresan sinyaller ölçüldükten sonra sitoplazmik sinyal (desmin kaynaklı/yeşil), çekirdek sinyaline (DNA boyaması/DAPI/mavi) oranlanarak normalize edilmiştir. Ardından yabancıl tip ve mutant vektörler arasında farklılık olup olmadığı t-test ile kontrol edilmiştir. Testlerin yapılmasında ve grafiklerin çizilmesinde *GraphPad Prism* programı kullanılmış ve veriler değerlendirilirken $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

3.2.7 Protein izolasyonu ve western blot

Protein izolasyonu için insan iskelet kası hücreleri soğuk 1XPBS ile yıkanmıştır. Ardından üzerine 30 ul RIPA eklenmiş ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildikten sonra hücre kazıyıcı (*cell scraper*) kullanılarak hücreler tüpler içine toplanmıştır. Hücreler +4°C'de, 13000 rpm'de 10 dakika boyunca döndürülmüş ve süpernatant temiz bir ependorfa alınmıştır. Protein konsantrasyonu *Bicinchoninic acid*

assay (BCA) ile tayin edilmiştir. Protein konsantrasyonları Tablo 3.1’de belirtildiği gibidir.

Tablo 3.1. Protein konsantrasyonları.

Örnek adı	Konsantrasyon (mg/mL)	Açıklama
%60	1.637	Ekim sonrası %60 yoğunluktaki transfekte edilmeyen hücrelerden toplanan protein lizatı
%90	1.79	Ekim sonrası %90 yoğunluktaki transfekte edilmeyen hücrelerden toplanan protein lizatı
D_24	4	eGFP etiketli desmin ifade vektörü ile transfekte edilen hücrelerden transfeksiyon sonrası 24 saatte toplanan protein lizatı
D_48	9.04	eGFP etiketli desmin ifade vektörü ile transfekte edilen hücrelerden transfeksiyon sonrası 48 saatte toplanan protein lizatı.
G_24	1.648	eGFP vektörü ile transfekte edilen hücrelerden transfeksiyon sonrası 24 saatte toplanan protein lizatı
G_48	0.991	eGFP vektörü ile transfekte edilen hücrelerden transfeksiyon sonrası 48 saatte toplanan protein lizatı

Western blot için %12’lik ayırıcı jel ve %5’lik toplayıcı jel dökülmüştür. 10 ug protein örneği 4X Laemmli yükleme tamponu ile karıştırıldıktan sonra 100°C suyun içerisinde 4 dakika denatürasyonu takiben jele yüklenmiştir. Örnekler 80 V’de 20 dakika ardından 120 V’de 1 saat yürütülmüştür. Yarı-kuru transfer 25 V’de 30 dakika yapılmıştır. Membran *ponceau S* çözeltisi ile boyanmıştır. Fotoğrafı çekildikten sonra TBS-T ile yıkanmıştır. 1 saat oda sıcaklığında TBS-T içinde hazırlanan %5 süt tozu ile bloklama yapıldıktan sonra membran %5 süt tozu içeren TBS-T içerisinde 1/400 oranında sulandırılan desmin (Sigma, D8281, 1/400) antikoru ile işaretlenmiştir. Membran TBS-T ile yıkandıktan sonra TBS-T içinde 1/1000 oranında sulandırılan sekonder antikor ile oda sıcaklığında 1 saat muamele edilmiş ve TBS-T ile yıkanarak görüntülemeye hazır hale getirilmiştir. Görüntüleme için SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate, Thermo Scientific kit kullanılmıştır. Kit içeriğinde bulunan Luminol/Enhancer ve stabil peroksit solüsyonları 1:1 oranında karıştırılarak membrana uygulanmış ve membran karanlık bir ortamda bu karışım ile 5 dakika

boyunca muamele edilmiştir. *GeneGnome* 5 kemilüminesans görüntüleme cihazı (Syngene) kullanılarak görüntüleme yapılmıştır.

Transfeksiyon ile ekzojen olarak hücrelere gönderilen eGFP işaretli desminin endojen desmin ifadesini etkilemediğinin gösterilmesi için *ponceau S* boyaması normalizatör olarak kullanılmıştır. FIJI programı kullanılarak, dansitometrik analizler ile transfeksiyon yapılan ve transfeksiyon yapılmayan hücrelerdeki endojen desmin oranları karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir. Sonuçlar *Mann-Whitney U* testi ile değerlendirilmiştir. Testlerin yapılmasında ve grafiklerin çizilmesinde *GraphPad Prism* programı kullanılmış ve veriler değerlendirilirken $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

3.2.8 Çekirdek içerisine taşınım deneyleri

Çekirdek içerisine taşınım deneyleri için insan ve fare iskelet kası hücreleri ile insan servikal kanser hücreleri cam lamel üzerine ekilmiştir. Tez önerisinde deneylerin farklılaşmayı tamamlayan hücrelerde yapılması planlanmıştır ancak farklılaşan hücrelerin cam yüzeye iyi tutunamaması ve desminin erken iskelet kası farklılaşması aşamasında çekirdek içine girdiği de göz önüne alınarak deneyler hücreler ekim sonrası yaklaşık %80 yoğunluğa ulaştığında gerçekleştirilmiştir. Hücreler soğuk *import buffer* (20 mM HEPES, pH 7.3; 110 mM potasyum asetat; 5 mM sodyum asetat; 2 mM magnezyum asetat; 0.5 mM EGTA, 2mM DTT; proteaz inhibitör kokteyli) ile 3 defa yıkandıktan sonra 40 ug/mL oranında digitonin içeren *import buffer* ile buz üstünde 4 dakika muamele edilmiştir. Optimizasyon aşamasında digitonin ile permeabilizasyon sonrası hücreler bir çekirdek zarfı proteini olan emerin ile boyanarak çekirdek zarfı bütünlüğü kontrol edilmiştir. Permeabilizasyon sonrası hücreler soğuk *import buffer* ile 3 defa yıkanmıştır. Hücreler *import cocktail* (%50 sitozol, rekombinant protein veya dekstran, fosfokreatin kinaz, ATP, kreatin fosfat, *import buffer*) ile 30 dakika boyunca 37°C’de inkübe edilmiştir. 4 kere daha soğuk *import buffer* ile yıkandıktan sonra örnekler *import buffer* içerisinde %4 PFA ile fikse edilmiş ve konfokal mikroskop ile görüntüleme yapılmıştır.

Desminin çekirdek konumlanmasının belirlenmesi için konfokal mikroskop ile çekilen görüntüler kullanılarak rekombinant desmin ve dekstran için ayrı ayrı *Pearson* korelasyon katsayısı hesaplanmıştır. Konfokal mikroskop ile çekilen görüntüler FIJI-

Coloc2 yazılımı kullanılarak desmin (yeşil sinyal) ve çekirdek (DAPI sinyali) açısından değerlendirilerek *Pearson* korelasyon katsayısı hesaplanmıştır. Sonuçlar *Mann-Whitney U* testi ile değerlendirilmiştir. Testlerin yapılmasında ve grafiklerin çizilmesinde *GraphPad Prism* programı kullanılmış ve veriler değerlendirilirken $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Deneyler insan servikal hücre hattı için üç tekrar, iskelet kası hücre hatları için iki tekrar olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

Moleküler dinamik simülasyonları

Desminin üç boyutlu yapısı, henüz kristal yapısı olmadığı için, *AlphaFold Protein Structure Database*'den alınmıştır (121,122). Analiz için AF-P17661-F1 modeli seçilmiştir. Simülasyon, TÜBİTAK-TRUBA alt yapısı kullanılarak NAMD ve VMD programları kullanılarak gerçekleştirilmiştir (123,124). Yörüngeler 50 ns'ye kadar hesaplanmıştır. Farklı konsantrasyonlarda alkol bulunan ortamlarda gerçekleştirilen simülasyonlarda, protein üzerinde yapısal bir farklılık oluşup oluşmadığının incelenmesi için *Root Mean Square Deviation* (RMSD) değerleri hesaplanmıştır. Grafikler Grace (125) yazılımında oluşturulmuştur.

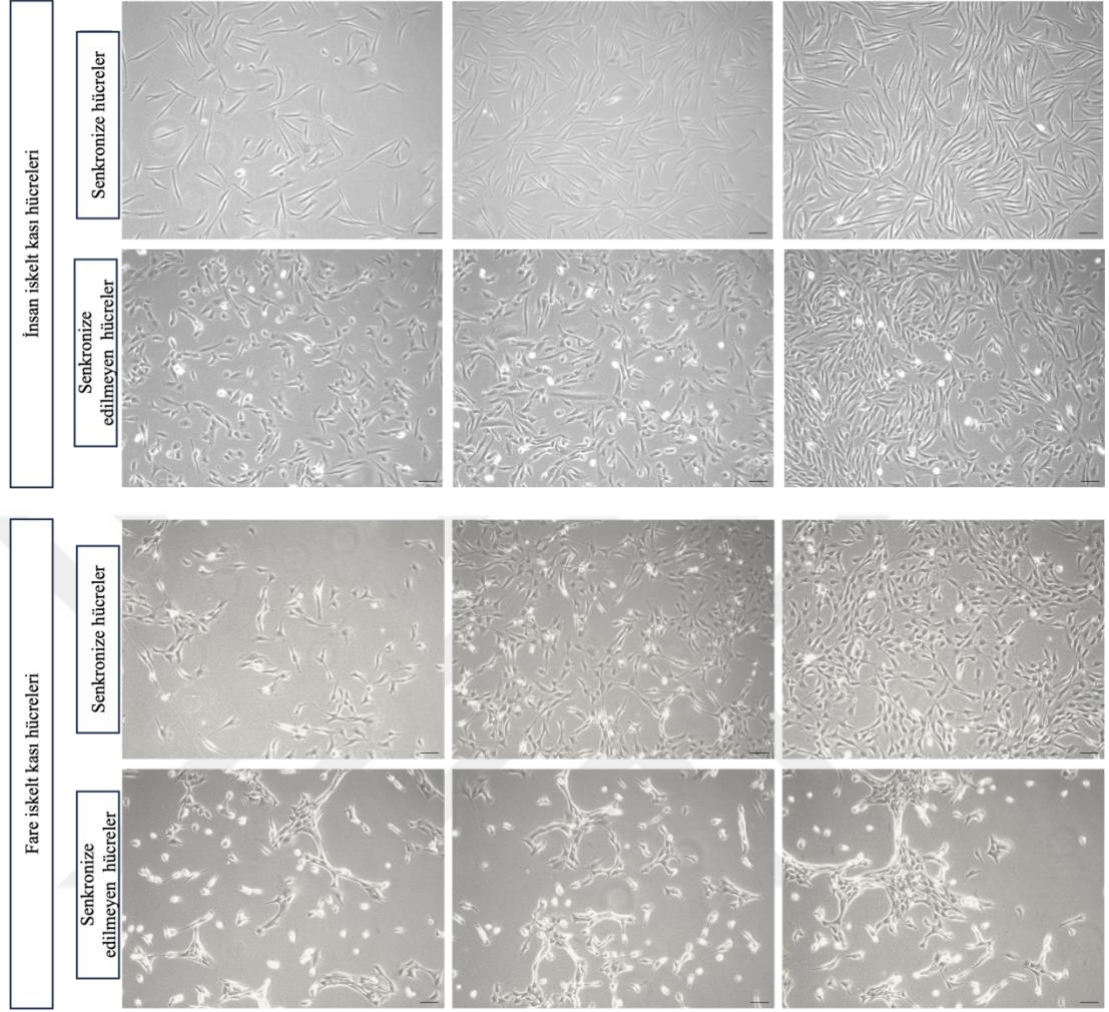
4. BULGULAR

4.1 Desminin Karyoferin Bağımlı Mekanizma ile Çekirdek ve Sitoplazma Arasında Taşınımının Araştırılması

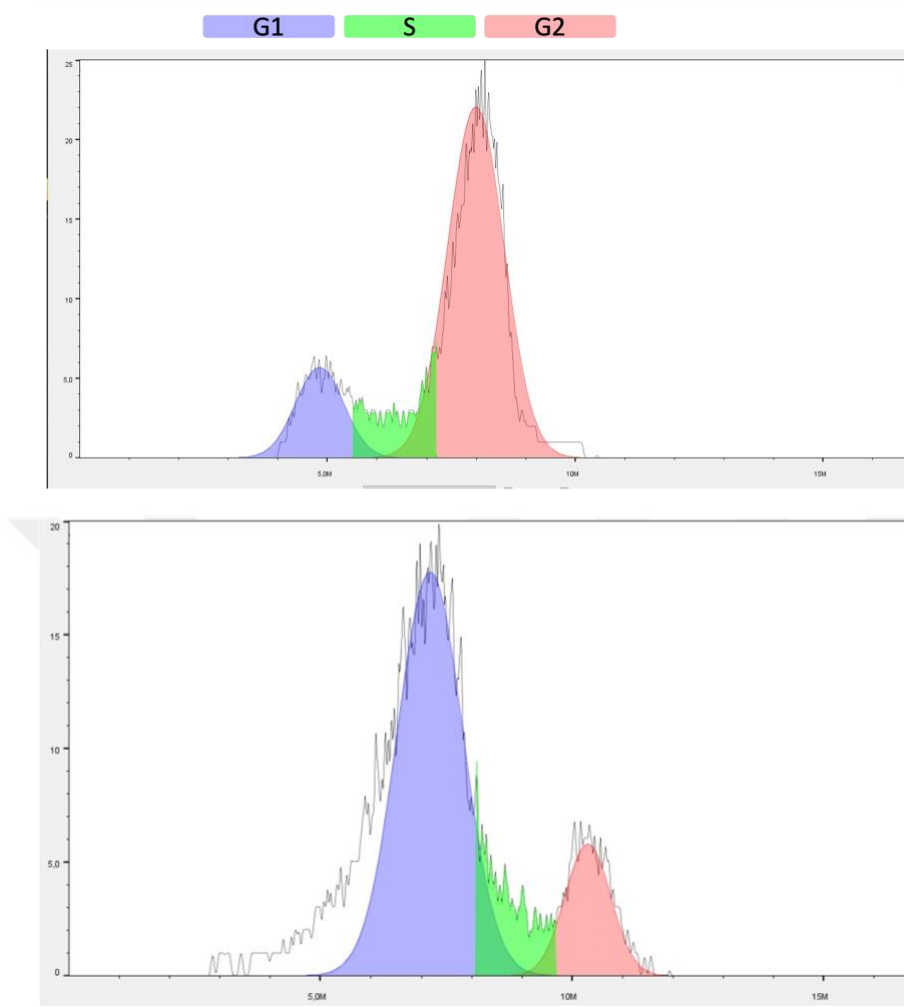
4.1.1 Hücre döngüsü senkronizasyonu

Hücre döngüsü senkronizasyonu için açlık süresi, hücre sayısının iki katına çıkma süreleri göz önüne alınarak belirlenmiştir. Bu süre T0033 hücre hattı için 40 saattir (126–128). Senkronizasyon için hücreler açlık besi yerinde (metiyonin içermeyen besi yeri) 40 saat boyunca bekletildikten sonra açlık besi yeri ortamdan uzaklaştırılmış ve standart büyüme besi yeri eklenerek 24 saat boyunca tekrar hücre döngüsüne girmeleri için beklenmiştir (Şekil 4.1). Ardından örnekler akım sitometresi cihazı ile analiz edilmiştir. Senkronizasyon sonuçları Şekil 4.1’de gösterildiği gibidir. Akım sitometrisi sonuçları hücrelerin büyük bir kısmının G1 evresinde senkronize olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar açlık koşullarının hücre döngüsünün senkronizasyonunda etkili olduğunu göstermiştir.

A.



B.



Şekil 4.1. Hücre döngüsü senkronizasyonu sonrası hücreler. **A.** Senkronizasyon yapılmayan hücrelerin ve senkronizasyonu yapılan hücrelerin farklı yoğunluklarda, ışık mikroskobu görüntüleri. Üstte insan iskelet kası hücreleri, aşağıda fare iskelet kası hücreleri. Ölçek: 1 cm. **B.** Akım sitometrisi sonuçları. Üstte senkronizasyonu yapılan hücrelere, altta kontrol hücrelere ait histogramlar görünmektedir. Histogramlar hücrelerin başarılı bir şekilde senkronize olduğunu göstermektedir.

4.1.2 İmmüno Floresan boyama ile farklılaşma ve füzyon oranlarının hesaplanması

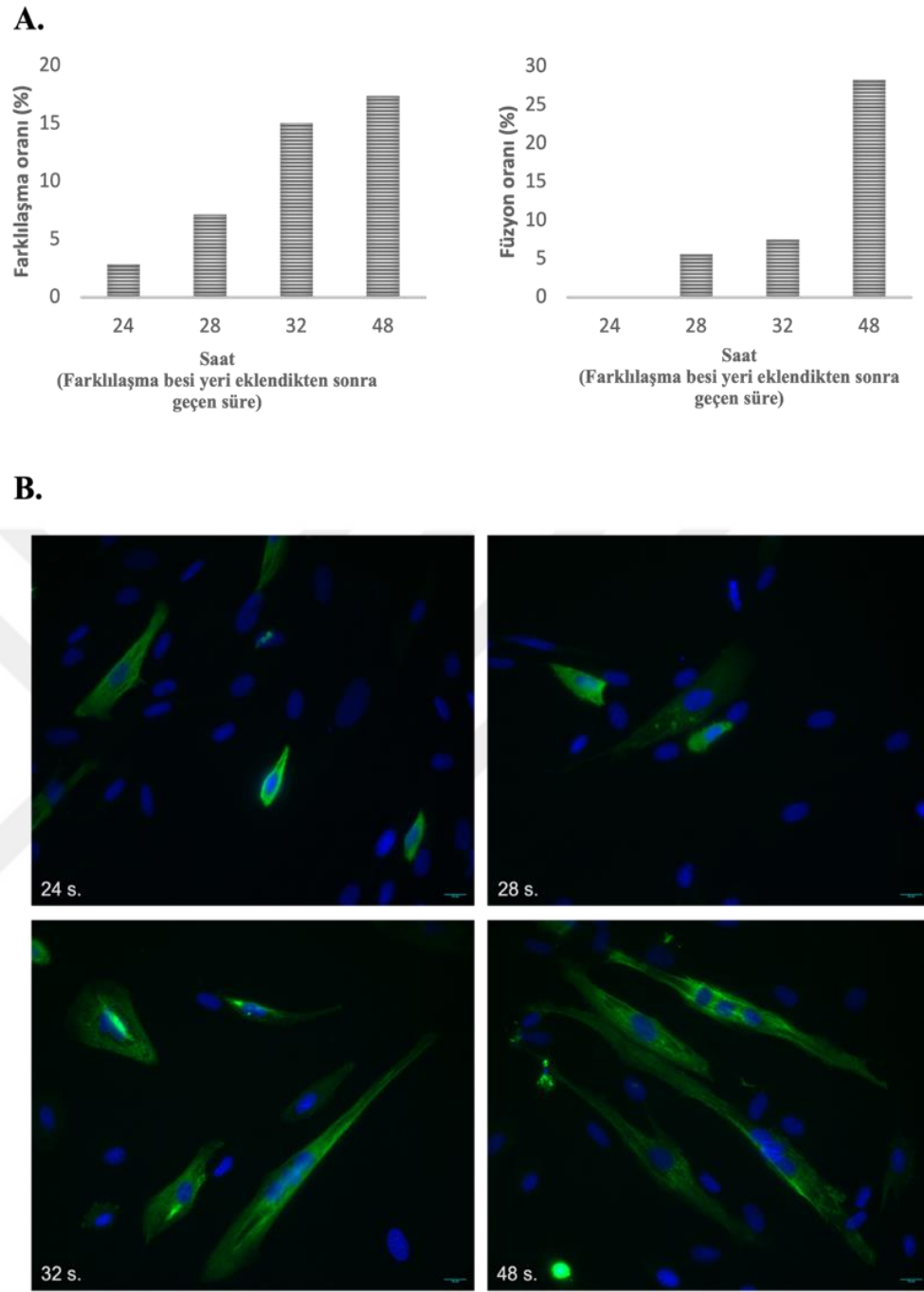
Hücre döngüsü senkronizasyonu için aç bırakılan hücrelerin, açlık sonrasında farklılaşma ve miyotüp oluşturma kapasitelerinin etkilenmediğinin gösterilmesi için hücrelerde miyozin ağır zincir (MHC) boyaması gerçekleştirilmiş ve farklılaşma ile füzyon oranları hesaplanmıştır.

Farklılaşma oranı hesaplanırken MHC antikoruyla boyanan hücrelerdeki çekirdekler sayılmış ve bu değer alandaki toplam çekirdek sayısına bölünmüştür (118). T0033 insan miyoblast hücre hattı için farklılaşma oranı, farklılaşma besi yerine alındıktan sonraki 24. saatte %3, 28. saatte %7, 32. saatte %15 ve ve 48. saatte %17 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.2A). MHC boyama sonuçlarını gösteren fotoğraflar Şekil 4.2B’de sunulmuştur.

Füzyon oranı hesaplanırken ise iki veya daha fazla çekirdek içeren, MHC antikoruyla boyanan hücrelerdeki çekirdekler sayılmış ve alandaki toplam çekirdek sayısına bölünmüştür (118). Hücreler farklılaşma besi yerine alındıktan sonra füzyon oranı; 24. saatte %0, 28. saatte %6, 32. saatte %8 ve ve 48. saatte %28 olarak hesaplanmıştır (Bkz. Şekil 4.2A).

Şekil 4.2A’da sunulan grafiklerde görüldüğü üzere farklılaşma ve füzyon oranlarında düzenli olarak artış görülmesi hücrelerin açlık sonrasında farklılaşma ve füzyon kapasitelerinin etkilenmediğini yani bir iskelet kası hücresinin yapması gerektiği gibi büyümeye ve farklılaşmaya devam ettiğini göstermektedir.

Desminin çekirdekte bulunduğu miyojenik farklılaşma aşamasının belirlenmesi için hücrelerin senkronizasyonundan sonra transfeksiyon çalışmalarına başlanmıştır.

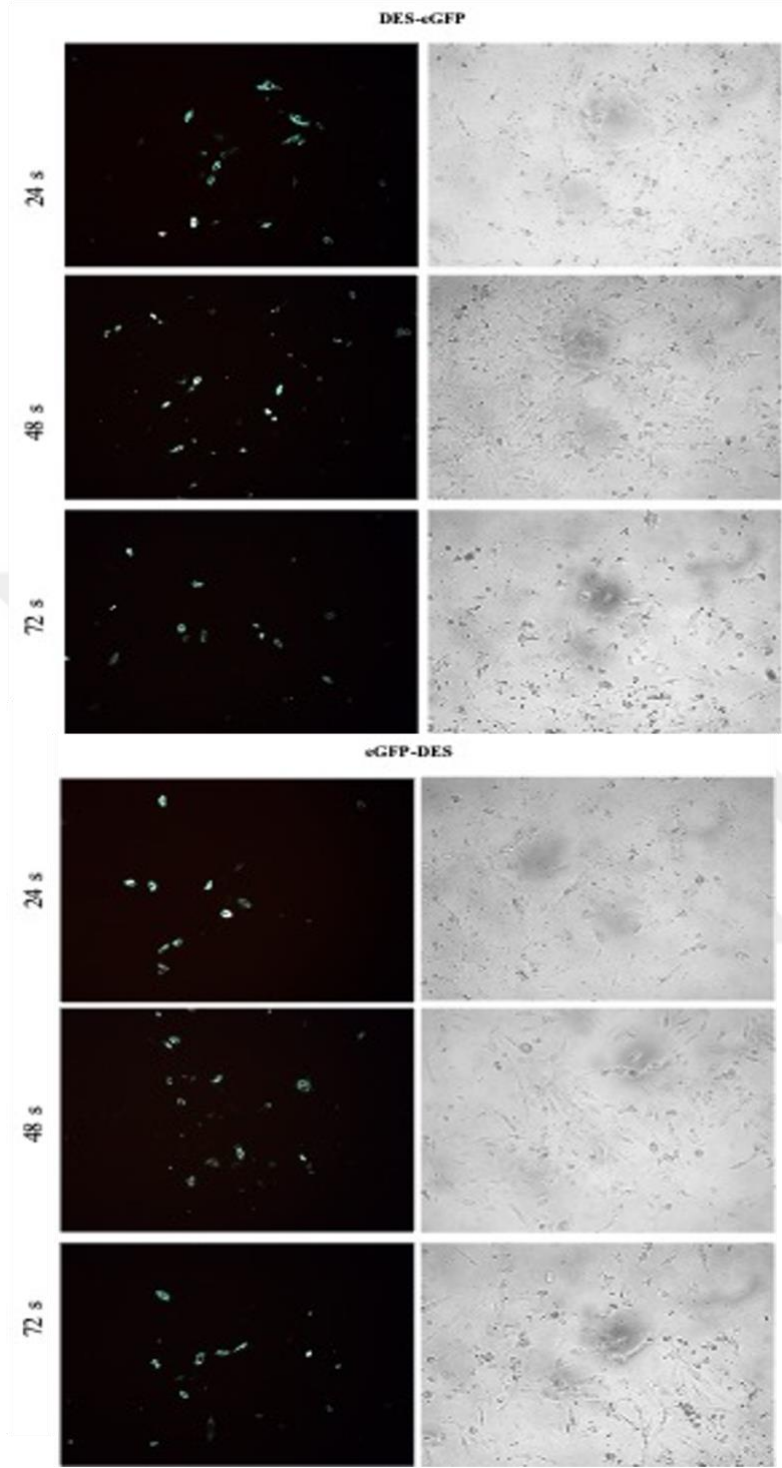


Şekil 4.2. Farklılaşma sonrası T0033 hücreleri. **A.** Farklılaşma ve füzyon oranlarını gösteren histogramlar. Farklılaşma besiyeri eklendikten sonra füzyon ve farklılaşma oranı düzenli bir artış göstermektedir. **B.** Farklılaşma besiyeri eklendikten sonraki 24, 28, 32 ve 48. saatlerde MHC boyaması. Fotoğrafın sol alt köşesinde yer alan rakamlar farklılaşma besiyeri eklendikten sonra geçen süreyi saat olarak ifade etmektedir. Ölçek 10 μ M.

4.1.3 Transfeksiyon çalışmaları

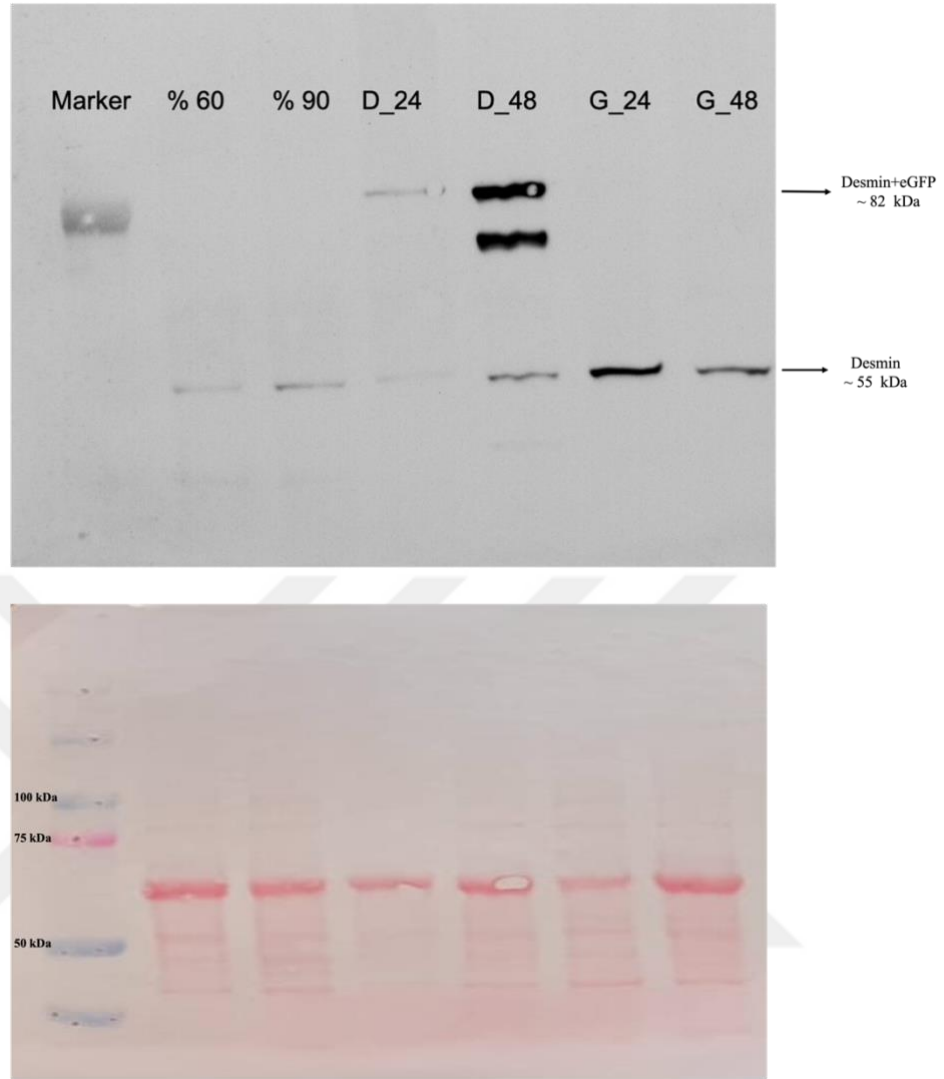
Transfeksiyon optimizasyon çalışmaları hem fare iskelet kası hücrelerinde (C2C12) hem de T0033insan iskelet kası hücrelerinde gerçekleştirilmiştir. Transfeksiyon başarısının hesaplanması için canlılık testi yapılmıştır. Transfeksiyon yapılmayan, 200 ng desmin vektörü ile transfeksiyonun yapıldığı ve eGFP vektörü ile transfeksiyonun yapıldığı insan iskelet kası hücreleri için ölüm oranları sırasıyla %18, %24 ve %2 olarak belirlenmiştir. Fare iskelet kası hücrelerinde ise bu oran %17, %17 ve %7 olarak belirlenmiştir. Deneyler üç tekrar olarak gerçekleştirilmiş ve sonuçlar üç tekrarın ortalaması olarak sunulmuştur. Transfeksiyonun yapıldığı ve yapılmadığı hücreler arasında ölüm oranı açısından bir farklılık olmaması nedeniyle transfeksiyon başarılı kabul edilmiştir.

Transfeksiyon etkinliğinin %48 olduğu ideal vektör konsantrasyonu belirlendikten sonra (200 ng vektör), GFP etiketinin konumlanmasının desmin protein işlevi üzerinde bir etkisi olup olmadığının anlaşılması için eGFP'nin desminin hem amino hem de karboksi terminaline eklendiği vektörler ve vektör kaynaklı bir ölüm olup olmayacağının kontrolü olarak yalnızca eGFP ifade eden vektör ile transfeksiyon gerçekleştirilmiştir. Hücreler transfeksiyon sonrası 3 gün (72 saat) boyunca takip edilmiş ve deney sonlandırılmıştır. Sonuçlar eGFP dizisinin desminin amino ya da karboksil ucunda olmasının desmin ifadesini etkilemediğini göstermiştir (Şekil 4.3). eGFP konumunun desmin ifadesine bir etkisi olmaması nedeniyle eGFP'nin desminin karboksil terminalinde olduğu tasarım ile çalışmalara devam edilmiştir.



Şekil 4.3. eGFP etikenin desminin amino ve karboksi uçlarında yer aldığı tasarımlar kullanılarak yapılan transfeksiyon çalışmasına ait görüntüler. Hücreler transfeksiyondan sonra 72 saat boyunca takip edilmiştir. Fotoğraflar 10X objektif kullanılarak çekilmiştir. S: Saat, DES-eGFP: eGFP etikenin desminin karboksi ucunda yer aldığı tasarım, eGFP-DES: eGFP etikenin desminin amino ucunda yer aldığı tasarım.

Ekzojen desmin ifadesinin, endojen desmin ifadesini etkilemediğinin doğrulanması için transfeksiyon sonrası 24 ve 48. saatlerde toplanan protein lizatları ve transfeksiyonun yapılmadığı, çoğalma aşamasındaki hücreler kullanılarak *western blot* yapılmıştır (Şekil 4.4). Membran desmini tanıyan bir antikor ile işaretlendiğinde kuyucuklarda hem endojen desmin ifadesinin olduğunu gösteren 55 kDa'lık desmin bandı hem de ekzojen olarak gönderilen eGFP etiketli desminin ifade olduğunu gösteren moleküler ağırlığı desmin ve eGFP proteinlerinin toplamına tekabül eden yaklaşık 82 kDa civarında, (D_24 ve D_48 kuyucuklarında) bir bant görülmüştür. Kontrol olarak yalnızca eGFP ile transfekte edilen hücrelerde de desmin ifadesi olduğu görülmüştür (G_24 ve G_48). Transfeksiyon yapılmayan hücreler ve hem eGFP işaretli desmin ile hem de yalnızca eGFP ifade eden vektör ile transfeksiyonun yapıldığı hücrelerde desmin ifadesi açısından istatistiki olarak anlamlı bir fark yoktur (*Mann-Whitney U*, $p>0.05$). Bu durum transfeksiyon işleminin hücrelerde desmin ifadesini etkilemediğinin göstergesidir.



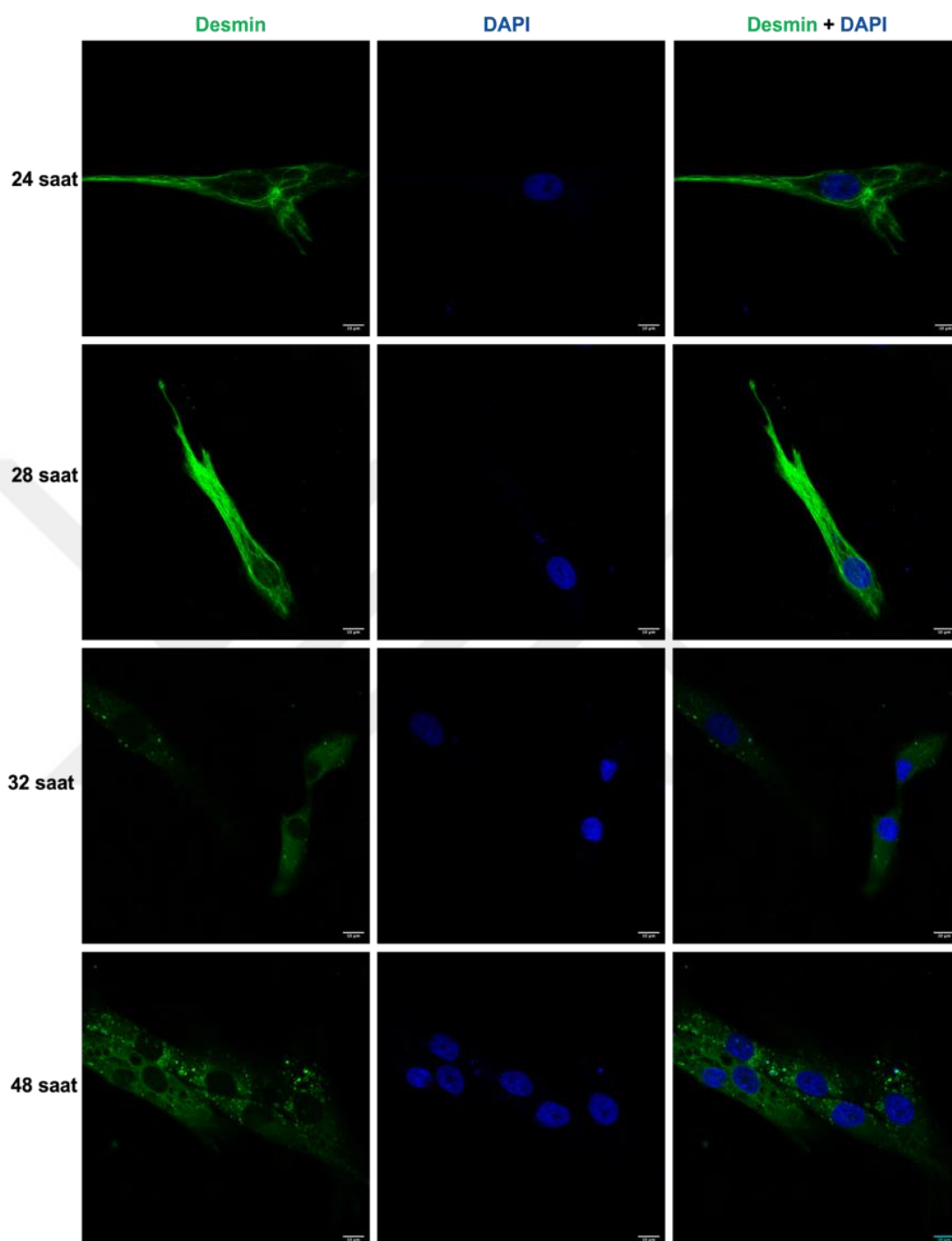
Şekil 4.4. Transfeksiyon sonrası desmin proteininin ifadesi. Üstte desmin antikoru ile işaretlenen membran. Altta, yükleme kontrolü olarak membranın *ponceau S* boyaması. %60: Ekim sonrası %60 yoğunlukta olup transfeksiyon yapılmayan hücrelerden toplanan protein lizatı; %90: Ekim sonrası %90 yoğunlukta olup transfeksiyon yapılmayan hücrelerden toplanan protein lizatı; D_24: eGFP işaretli desmin kodlayan vektör ile transfeksiyonu yapılan hücrelerden transfeksiyon sonrası 24 saatte toplanan protein lizatı. D_48: eGFP işaretli desmin kodlayan vektör ile transfeksiyonu yapılan hücrelerden transfeksiyon sonrası 48 saatte toplanan protein lizatı. G_24: yalnızca eGFP ifade eden vektör ile transfeksiyonu yapılan hücrelerden transfeksiyon sonrası 24 saatte toplanan protein lizatı. G_48: yalnızca eGFP ifade eden vektör ile transfeksiyonu yapılan hücrelerden transfeksiyon sonrası 48 saatte toplanan protein lizatı.

Transfeksiyon optimizasyonu tamamlandıktan sonra, literatürde yapılan çalışmalar incelendiğinde desminin çekirdek içerisine iskelet kasının erken farklılaşma aşamasında, yani miyotüp oluşumu esnasında girdiğine işaret eden verilere

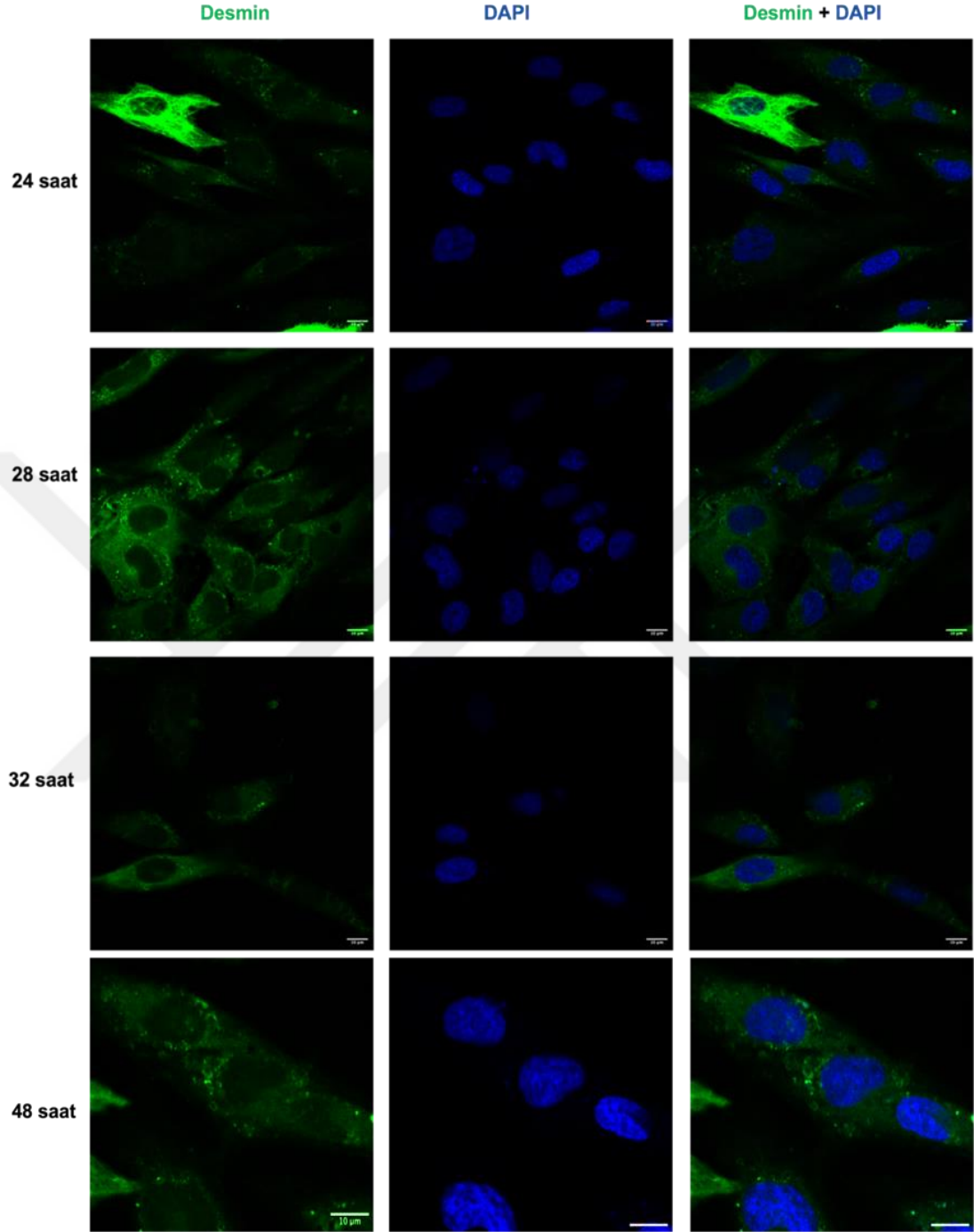
rastlanmıştır (16,90,93,129). Desminin iskelet kası farklılaşmasının hangi aşamasında çekirdek içerisinde olduğunun anlaşılması için hücrelerin eGFP işaretli desmin ifadesi sağlayan vektör ile transfeksiyonu gerçekleştirilmiştir. Transfeksiyon sonrası hücrelerin, erken farklılaşma başlangıcında (farklılaşma besisi yerine geçiş yapıldıktan 24, 28, 32 ve 48 saat sonra) %4 PFA ile fiksasyonu yapıldıktan sonra DAPI ile çekirdek boyaması yapılarak konfokal mikroskop ile incelenmiştir. Çekimlerde 0.5-1.0 mikron aralığında değişen boyutlarda 11-15 kesit alınmıştır (Şekil 4.5). Desminin çekirdekte konumlanması değerlendirilirken eş lokalizasyon analizleri gerçekleştirilmiştir. Eş lokalizasyon analizleri desmin (yeşil sinyal) ve çekirdek (DAPI sinyali) için Fiji (120) programında *Coloc 2* eklentisi kullanılarak yapılmıştır. Eş lokalizasyon belirteci olarak *Pearson* korelasyon katsayısı kullanılmıştır (130). T0033 insan iskelet kası hücrelerinde desmin ve DAPI ışınları için *Pearson* korelasyon katsayıları, 24. saat için 0.32, 28. saat için 0.3, 32. saat için 0.26 ve 48. saat için 0.24 olarak hesaplanırken C2C12 fare iskelet kası hücrelerinde 24. saat için 0.26, 28. saat için 0.7, 32.saat için 0.6 ve 48. saat için 0.25 olarak hesaplanmıştır. *Pearson* korelasyon katsayısının 0'dan yüksek bir değerde olması desminin çekirdek içerisinde konumlandığını göstermektedir.

Analizler desminin farklılaşma besisi yerine geçiş sonrası 24.saatten itibaren çekirdek içerisinde bulunduğunu göstermektedir (Şekil 4.5).

A.



B.



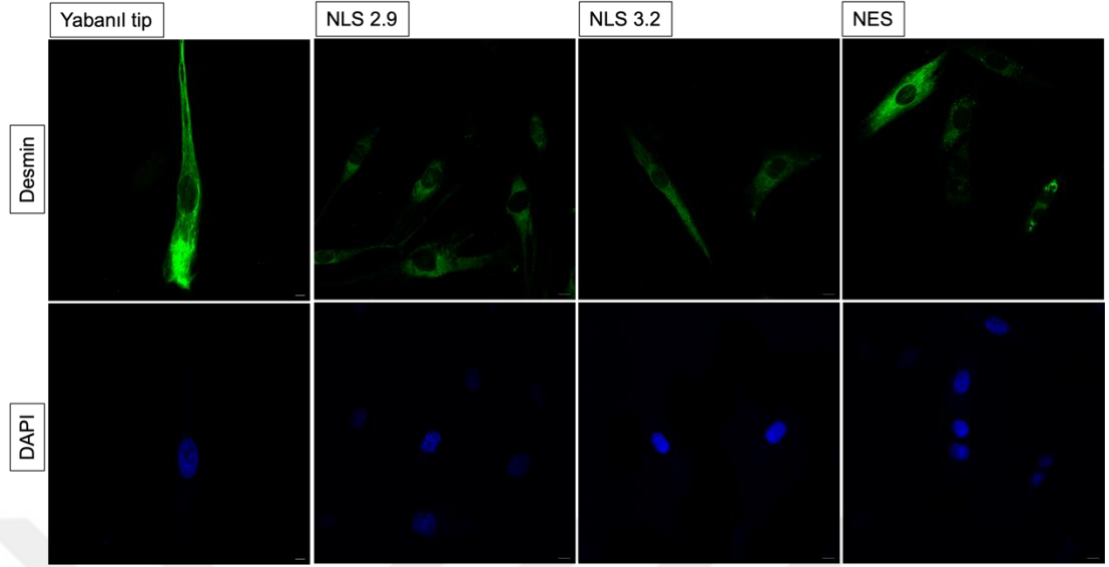
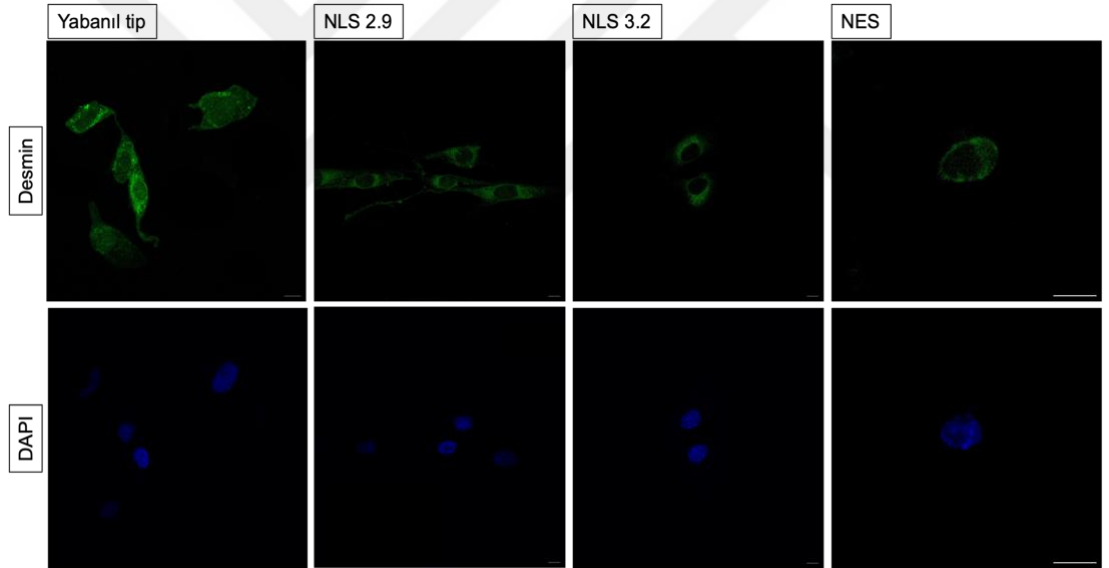
Şekil 4.5. İnsan (A) ve fare (B) iskelet kası hücrelerinde desminin çekirdekte konumlanmasını gösteren fotoğraflar. Desmin, çekirdekte erken farklılaşma döneminde görülmüştür. Görüntüler konfokal mikroskopta, 63X objektif kullanılarak çekilmiştir. Ölçek 10 µm

4.1.4 Desminin çekirdek ve sitoplazma arasında taşınımının incelenmesi

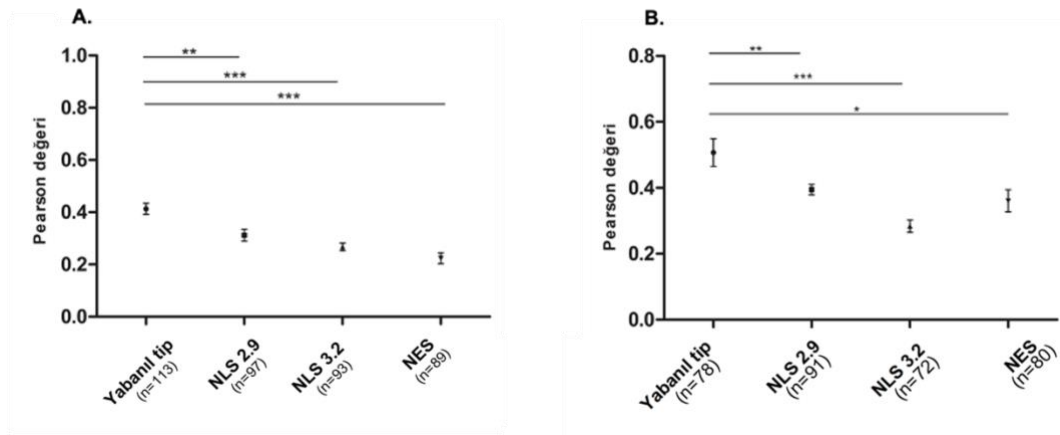
Desmin üzerinde bulunan NLS dizileri ve NES'in işlevsel olup olmadığının ve desminin çekirdek-sitoplazma arasındaki taşınımının karyoferin bağımlı olup olmadığının anlaşılabilmesi için insan ve fare iskelet kası hücrelerinin sinyal dizileri çıkarılan mutant vektörler ile transfeksiyonu gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.6).

Şekil 4.6'da görüldüğü üzere yabancı tip desmin ifade eden plazmitlerle transfeksiyonu yapılan hücrelerde desmin DAPI sınırları içerisinde yoğun olarak gözlenirken, mutant vektörlerle transfeksiyonu yapılan hücrelerde desmin çekirdek içerisinde ya hiç görülmemektedir ya da çok düşük sinyal vermektedir. Yabancı tip ve mutant desmin dizilerinin çekirdek içerisindeki konumlarının değerlendirilmesi için eş lokalizasyon analizleri yapılmıştır. Eş lokalizasyon belirteci olarak *Pearson* korelasyon katsayısı kullanılmıştır (130) (Şekil 4.7).

NLS dizilerinin silindiği mutant vektörlerle transfeksiyonu yapılan hücrelerde desmin-DAPI eş lokalizasyon katsayısı (*Pearson* değeri) istatistiksel olarak anlamlı biçimde, yabancı tip desmin ile transfeksiyonu yapılan hücrelere göre daha düşüktür. Bu veriler desmin üzerindeki her iki potansiyel NLS'nin de işlevsel olduğunu göstermektedir. Öte yandan, *in silico* analizlerle belirlenen potansiyel NES dizisinin işlevsel olması durumunda NES dizisi çıkarılan mutant vektörün çekirdek içerisinde birikimi beklenmekteydi. Ancak hem insan hem de fare miyoblast hücre hatlarında yapılan çalışmaların sonuçları NES mutasyonu taşıyan vektörle transfeksiyonu yapılan hücrelerde eş lokalizasyon oranının yabancı tipe oranla daha düşük olduğunu göstermektedir. Bu durum NES dizisinin desminin çekirdekten sitoplazmaya taşınmasında etkili olmadığını göstermektedir. Ancak çekirdeğe girişinin azalmasını açıklayacak bir veri elde edilememiştir. NES dizisi desminin *rod* domaininde, sarmal 1B'de konumlanmaktadır. Eğer bu bölge desminin çekirdek içindeki görevleri ile ilişkili ise, bölgedeki mutasyon işlevini engellediği için desminin çekirdekten seçici olarak çıkarılmasına sebep olabilir. Ancak desminin çekirdekte düşük miktarda gözlenmesinin nedeni kesin olarak bilinmemektedir.

A.**B.**

Şekil 4.6 NLS ve NES dizileri çıkarılmış mutant desmin dizileri ile yabanıl tip desmin dizisi ile transfeksiyon yapılan hücelere ait konfokal görüntüsü. **A.** İnsan miyoblast hücreleri. **B.** Fare miyoblast hücreleri. Yabanıl tip hücrelerde desmin yoğun şekilde DAPI sınırları için konumlanırken, mutant dizilerin çok az ya da hiç konumlanmadığı gözlenmektedir. NLS 2.9 ve NLS 3.2 sırasıyla skorları 2.9 ve 3.2 olan NLS'leri dizileri ifade etmektedir.



Şekil 4.7. NLS ve NES dizileri çıkarılmış mutant desmin dizileri ile yabancı tip desmin dizisi ile transfeksiyon yapılan hücrelerde eş lokalizasyon değerlendirilmesi. **A.** İnsan iskelet kası hücre hattı. **B.** Fare iskelet kası hücre hattı. Yabancı tip ve mutant diziler ile transfeksiyonun gerçekleştirildiği hücrelerin *Pearson* değerlerinin karşılaştırılması için *Mann-Whitney U* testi kullanılmıştır. (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$)

Desminin mutant hücrelerde çekirdekte daha az görülmesinin sebebinin transfeksiyon ve hücre içi ifade edilme etkinliğinden bağımsız olduğunun gösterilmesi için floresan yoğunluk analizleri yapılmıştır. Floresan yoğunluk analizlerine göre insan ve fare iskelet kası hücrelerinde, yabancı tip ve mutant desmin vektörlerinin ışıma yoğunlukları açısından anlamlı bir farklılık yoktur (Tablo 4.1). Sonuçlar desminin, mutant vektörlerin ifade edildiği hücrelerde çekirdekte daha az gözlenmesinin deneysel koşullardan bağımsız olduğunu göstermektedir. Tablo 4.1’de yabancı tip ve NLS/NES dizileri silinen desmin vektörleri ile transfeksiyonu gerçekleştirilen hücrelerde floresan yoğunlukların karşılaştırılması sunulmuştur. Amino ucundaki NLS dizisi silinen vektör (NLS29) ve yabancı tip vektör (YT) ile transfeksiyonu gerçekleştirilen hücrelerin floresan yoğunlukları arasında anlamlı bir fark yoktur (Bkz. Tablo 4.1). Karboksil ucundaki NLS dizisi silinen vektör (NLS32) ve yabancı tip vektör (YT) ile transfeksiyonu gerçekleştirilen hücrelerin floresan yoğunlukları arasında da istatistiki olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (Bkz. Tablo 4.1). Yine tablo 4.1’te görüldüğü üzere NES dizisi silinen vektör (NES) ve yabancı tip vektörün (YT) ile transfeksiyonu gerçekleştirilen hücrelerin floresan yoğunlukları arasında da istatistiki olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır.

Tablo 4.1. Floresan yoğunluk analizi sonucu *p* değerlerinin karşılaştırılması.

	p değeri	
	İnsan hücreleri	Fare hücreleri
YT-NLS29	0.7595	0.2111
YT-NLS32	0.499	0.8567
YT-NES	0.0517	0.1819

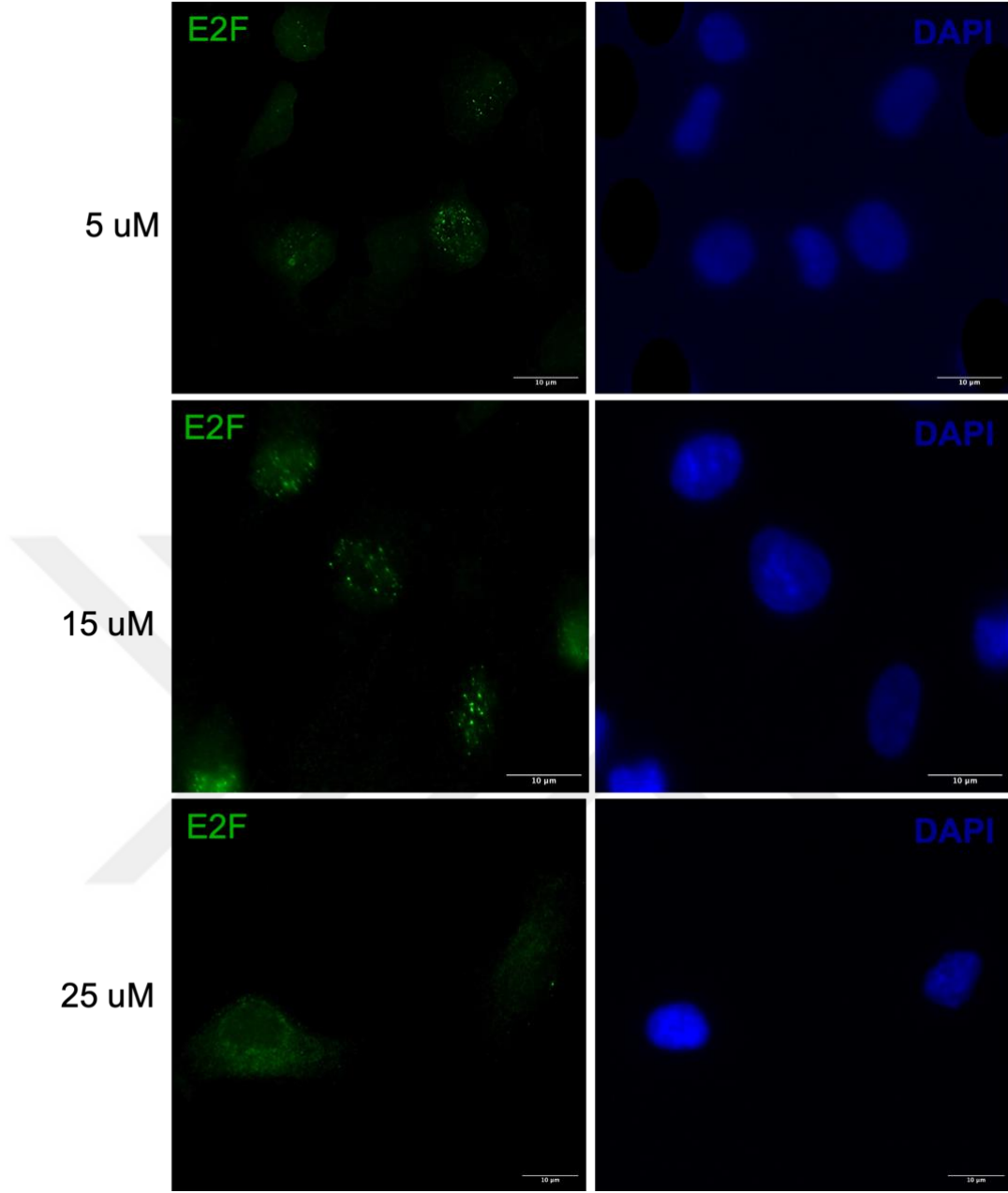
4.1.5 Çekirdek ve sitoplazma arasında taşınım mekanizmalarının baskılanması

Tez çalışmasının hipotezi, desmin üzerindeki NLS ya da NES dizilerinin işlevsel olması durumunda çekirdek ve sitoplazma arasındaki taşınımının karyoferin bağımlı mekanizma ile gerçekleşeceğidir. Potansiyel NLS dizilerinin işlevsel olduğunun kanıtlanmasını takiben verilerin doğrulanması için eGFP işaretli yabancı tip desmin ifade eden vektörle transfekte edilen hücrelere, çekirdek içerisine taşınım mekanizmasının baskılanması için importin α/β ' yi inhibe eden, ivermektin ajanı uygulanmıştır (131).

Çekirdek içerisine taşınım mekanizmasının baskılanması için, hücrelere 4 saat boyunca ivermektin uygulaması yapılmış ve takiben E2F proteini için boyama yapılmıştır. E2F hücre döngüsünde görev alan bir transkripsiyon faktörüdür ve çekirdekte konumlanmaktadır (132). Ivermektinin çekirdek içerisine taşınımı başarılı şekilde baskıladığı durumda E2F'nin çekirdekte konumlanmaması beklenmektedir. Literatürde ivermektinin uygulama süresi ve konsantrasyonu sırasıyla 4 saat ve 25 uM olarak belirtilmiştir (133). Çalışmalara başlamadan önce insan iskelet kası hücre hattında optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Elimizde hali hazırda bulunan E2F antikoru fare kökenli olduğu için, fare iskelet kası hücre hattında arka plan ışımasının deney sonuçlarını etkileme ihtimali göz önüne alınarak E2F immüno floresan boyama çalışmaları yalnızca insan iskelet kası hücre hattında gerçekleştirilmiştir. Hücrelere 4 saat boyunca dört farklı konsantrasyonlarda (5 uM, 15 uM, 25 uM ve 50 uM) ivermektin uygulaması yapılmış ardından hücreler tespit edilerek E2F boyaması

yapılmıştır (Şekil 4.8). 5 uM ve 15 uM uygulama yapılan hücrelerde E2F çekirdek içerisinde konumlanırken 25 uM uygulama yapıldığında E2F'nin çekirdekte olmadığı gözlenmiştir (Bkz. Şekil 4.8). Bu sonuçlar ivermektinin 4 saat süreyle 25 uM uygulandığı durumda hücrede çekirdek içerisine taşınımı baskıladığını doğrulamıştır (Bkz. Şekil 4.8). 50 uM ivermektin uygulandığı durumda hücrelerde yüksek oranda ölüm olduğundan ötürü, lamel üzerinde hücre kalmaması nedeniyle E2F boyaması yapılmamıştır.



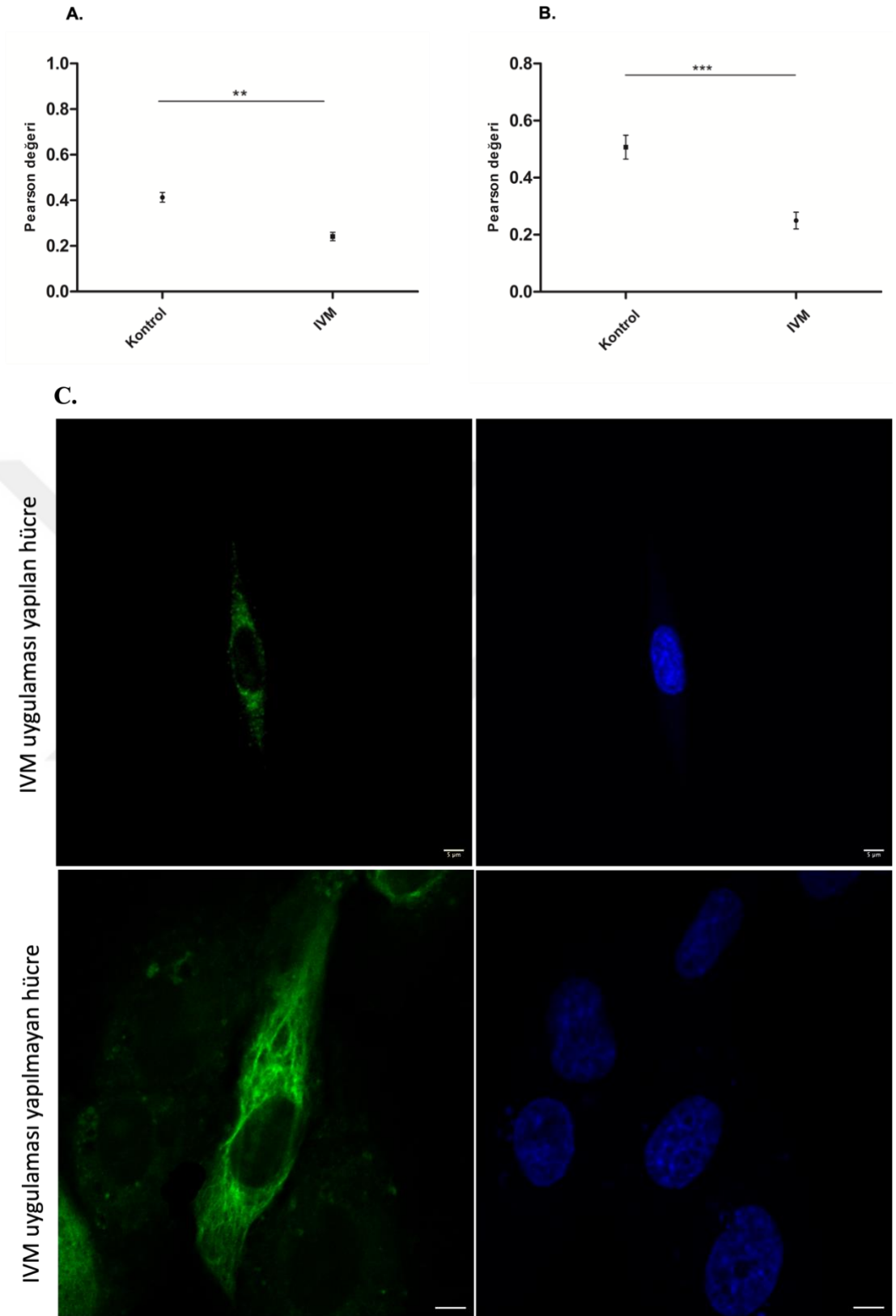


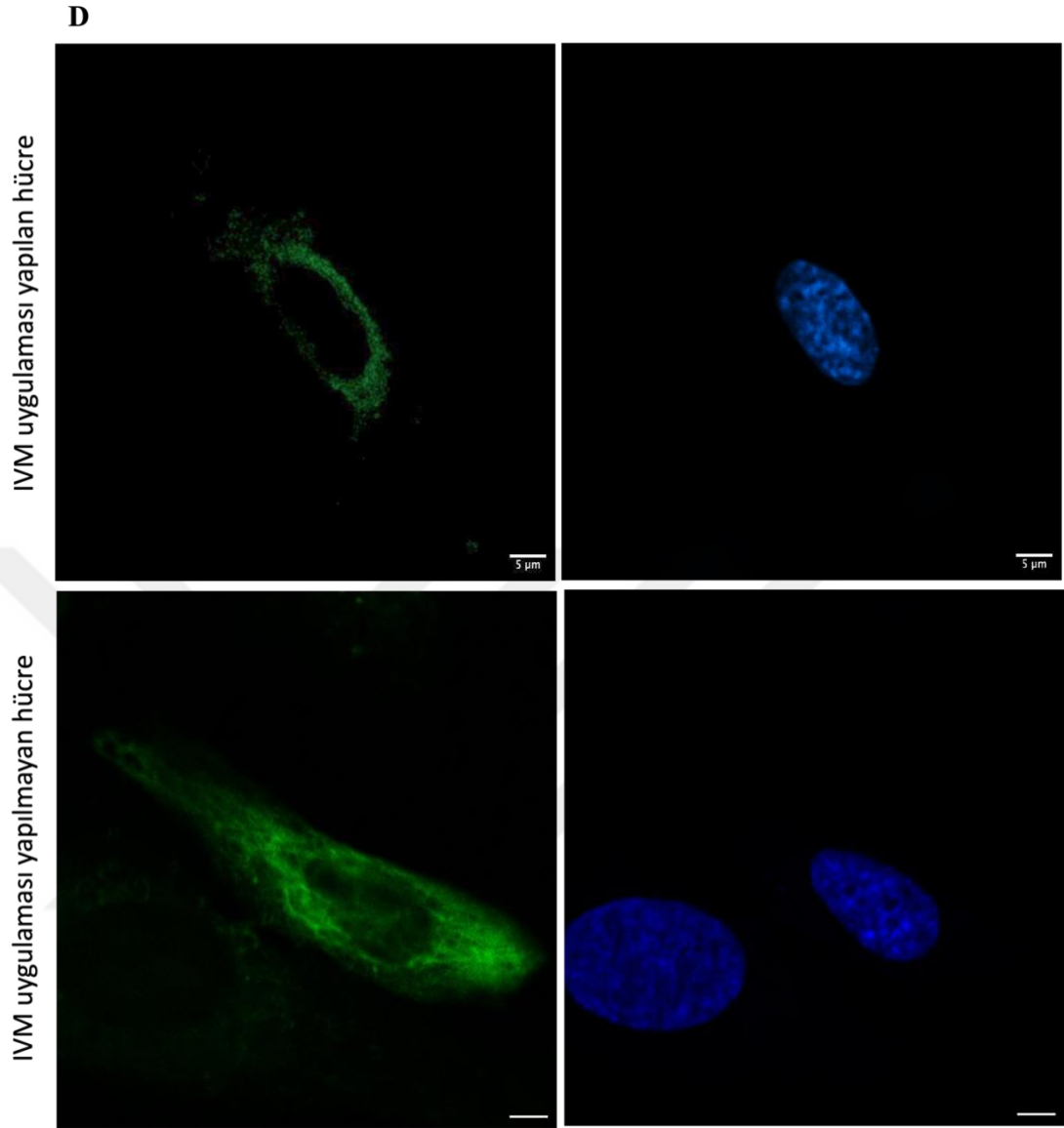
Şekil 4.8 İnsan miyoblast hücrelerinde farklı konsantrasyonlarda ivermektin uygulaması sonrası E2F (yeşil) ve DAPI (mavi) boyaması.

İvermektin uygulama süresi ve konsantrasyonunun optimizasyonundan sonra insan ve fare iskelet kası hücrelerinde yabancı tip desmin ifadesi sağlayan vektörlerle transfeksiyon gerçekleştirilmiş ve transfeksiyon sonrası ivermektin uygulaması yapılmıştır. Konfokal mikroskopla görüntüleme yapıldıktan sonra eş lokalizasyon analizi gerçekleştirilmiştir. *Pearson* eş lokalizasyon değerleri ivermektin uygulanan hücrelerde, çekirdek içerisine taşınımın, uygulanmayan hücrelere oranla istatistiksel olarak anlamlı biçimde düşük olduğunu göstermiştir (Şekil 4.9).

Bu sonuçlar desmin üzerindeki NLS'lerin işlevsel olduğunu gösteren sonucu desteklemektedir.







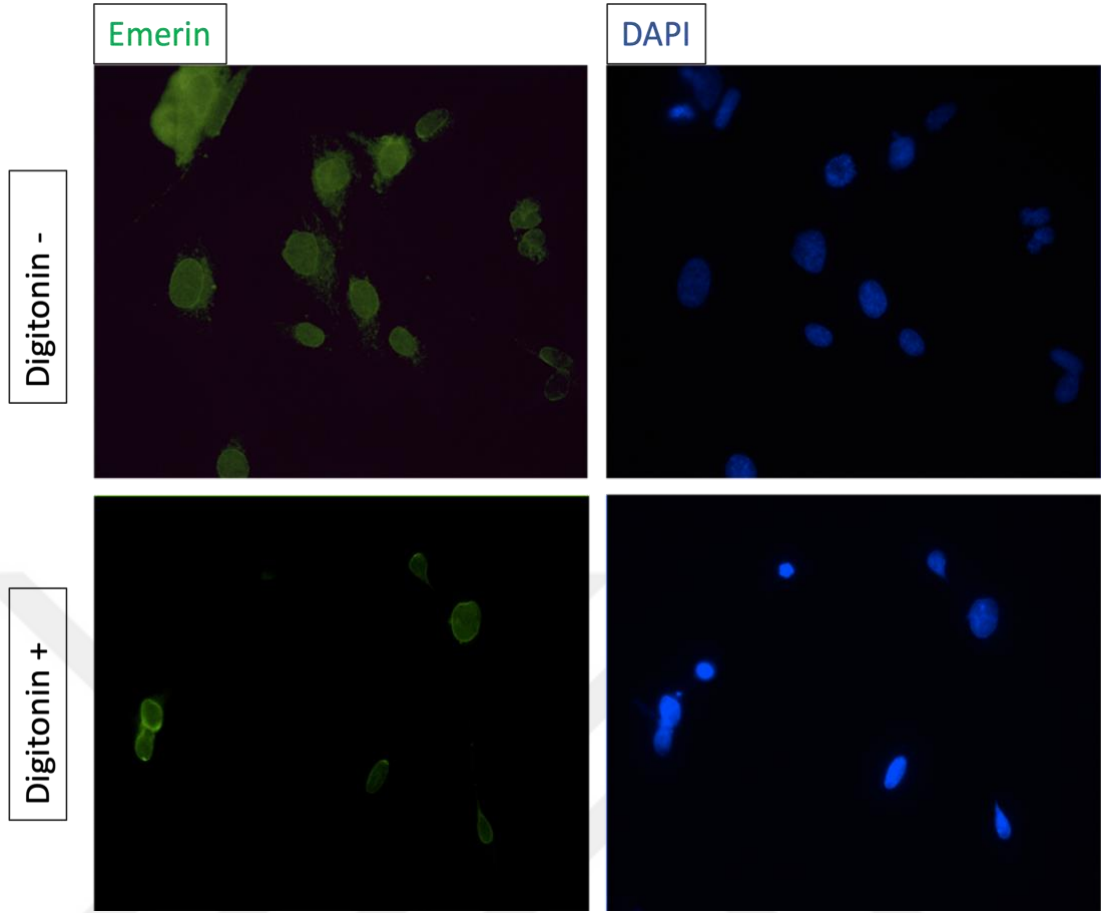
Şekil 4.9. Ivermektin uygulaması sonrası eş lokalizasyon analizi sonuçlarını gösteren grafikler. **A.** İnsan iskelet kası hücre hattında uygulama sonrası *Pearson* değerlerinin karşılaştırılması ($n_{\text{kontrol}}=89$; $n_{\text{ivermektin}}=93$) **B.** Fare iskelet kası hücre hattında uygulama sonrası *Pearson* değerlerinin karşılaştırılması ($n_{\text{kontrol}}=61$; $n_{\text{ivermektin}}=64$). (Kontrol: ivermektin uygulaması yapılmayan hücreler) **C.** İnsan iskelet kası hücrelerinde ivermektin uygulanan ve uygulanmayan hücrelerin görüntüsü. **D.** Fare iskelet kası hücrelerinde ivermektin uygulanan ve uygulanmayan hücrelerin görüntüsü. İstatistiki olarak anlamlılığın karşılaştırılması için *Mann-Whitney U testi* kullanılmıştır. (**; $p<0.01$; ***; $p<0,001$). Ölçek: 5 μ m.

4.2 Desminin karyoferin bağımsız mekanizma ile taşınımının araştırılması

4.2.1 Çekirdek içerisine taşınım deneyleri

Desminin çekirdek içerisine karyoferin bağımsız mekanizma ile taşınım taşınamadığının aydınlatılması için çekirdek içerisine taşınım deneyleri gerçekleştirilmiştir (4,134). Çekirdek içerisine taşınım deneyleri temel olarak taşınımından sorumlu faktörleri içeren plazma, hücre zarı ve sitozol ortamdan uzaklaştırılırken, çekirdek zarfının bütünlüğünün korunmasına ve taşınım mekanizmasının sitozolik faktörlerin ortama kontrollü eklenmesiyle geri kazanımı prensibine dayanır.

Çalışmada öncelikli olarak hücre zarının permeabilizasyonu için uygulanacak olan digitonin konsantrasyonu ve uygulama süresinin çalışmada kullanılan hücreler için optimizasyonu yapılmıştır. Bu amaçla digitonin uygulaması yapılan hücrelerde çekirdek zarfı bütünlüğünün kontrolü amacıyla, çekirdek zarfı proteini olan emerin için immünfloresan boyama yapılmıştır (Şekil 4.10). Şekil 4.10'da görüldüğü üzere digitonin ile permeabilizasyonu yapılmayan hücrelerde çekirdek etrafında emerin boyaması gözlenirken, permeabilizasyon yapılan hücrelerde görülmemektedir. Bu veriler uygulanan süre ve konsantrasyonun uygun olduğunu göstermektedir. Digitonin için uygun konsantrasyon ve uygulama süresi belirlendikten sonra çekirdek içerisine taşınım deneyleri gerçekleştirilmiştir.



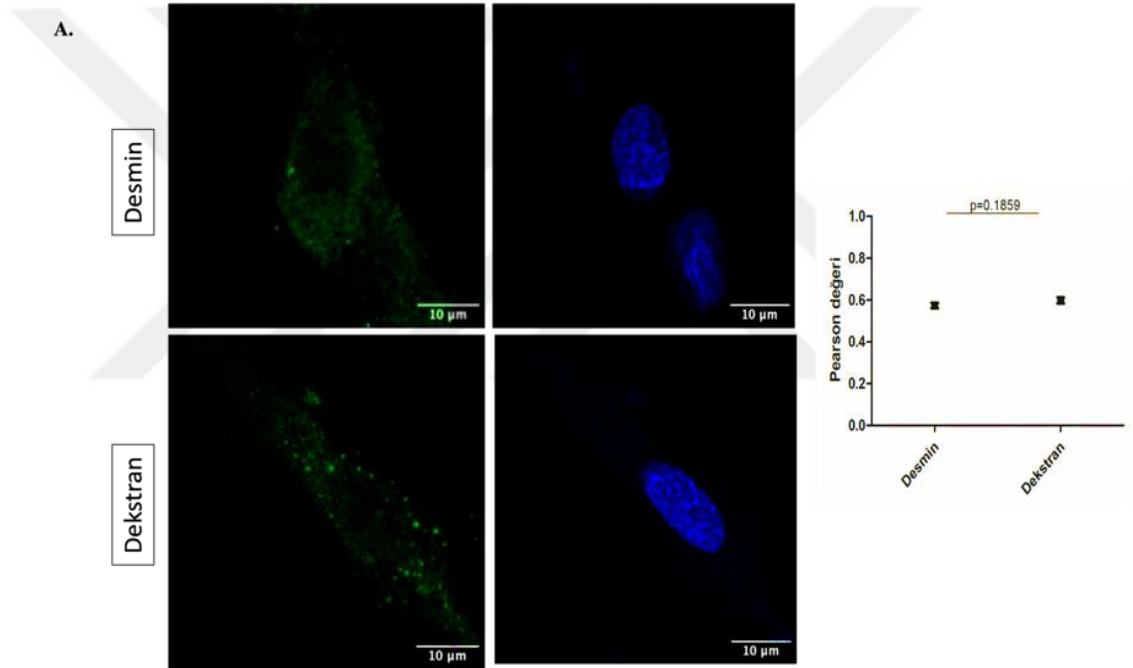
Şekil 4.10. Digitonin ile permeabilizasyonu yapılan (Digitonin +) ve yapılmayan (Digitonin -) hücrelerde emerinin boyanması.

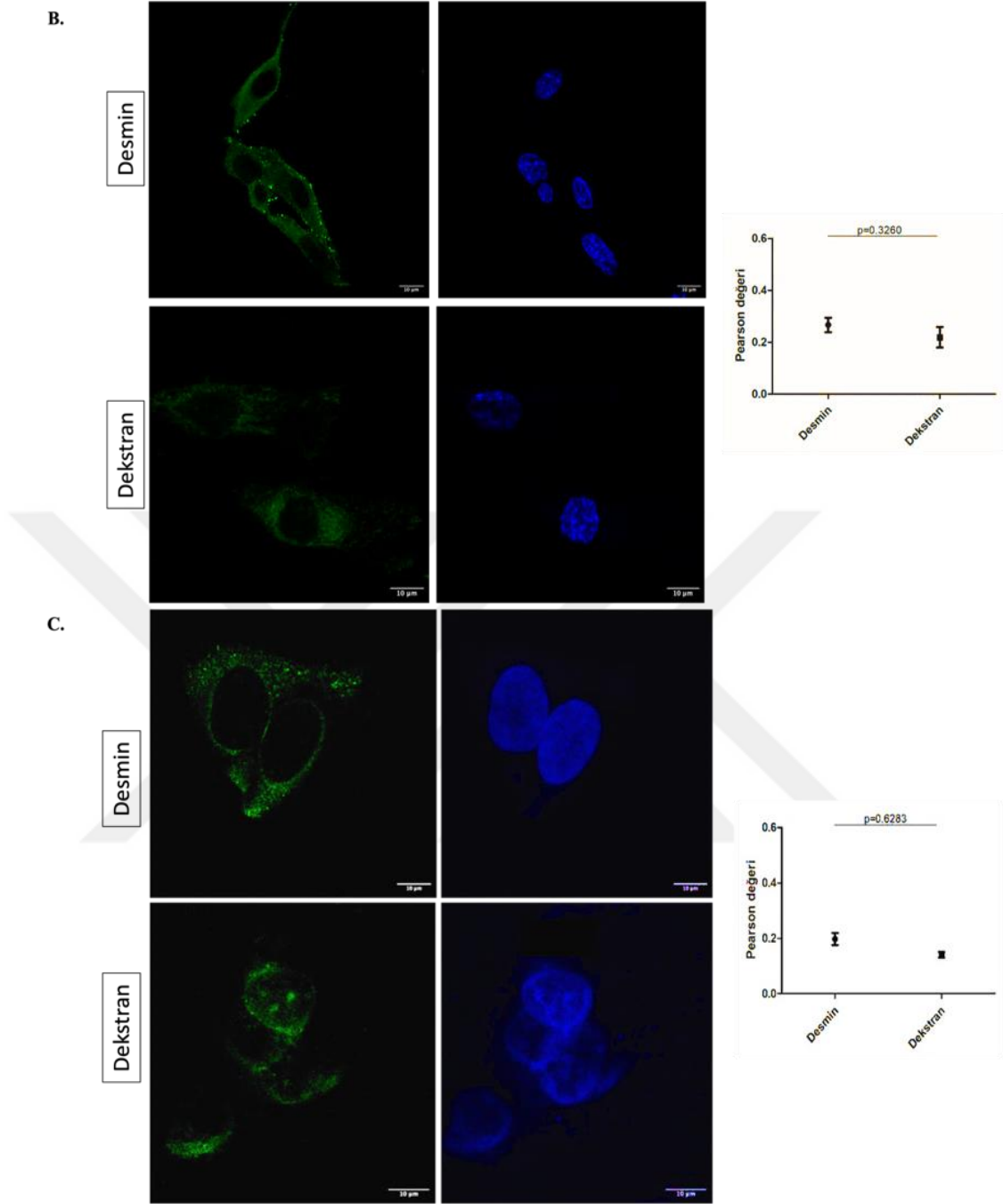
Çekirdek içerisinde taşınım deneyleri için floresan füzyon proteinler (FFP) kullanılması planlanmış ancak rekombinant proteinler floresan işaretli olarak sentezlenememiştir. Bu nedenle 10X His etiketi ile saflaştırılan rekombinant desmin kullanılmıştır.

Rekombinant proteinlerin 10X-His etiketi ile sentezlenmesi sebebiyle proteinlerin floresan mikroskop altında doğrudan gözlenmesi mümkün olmadığından proteinlerin işaretlenmesi için bir antikor kullanılması gerekliliği doğmuştur. Fakat uygun bir 10X-His *tag* antikorunu bulunamamıştır. Bu sebeple çekirdek taşınım deneyleri sonrasında rekombinant desminin, desmin antikorunu ile işaretlenmesine karar verilmiştir. Ancak insan ve fare iskelet kası hücreleri endojen olarak desmin sentezledikleri için, endojen desmin kaynaklı olabilecek bir ışımanın deney sonuçlarını etkilemediğinden emin olmak için, deneyler insan ve fare miyoblast hücre hatlarına ek olarak desmini endojen olarak sentezlemeyen insan adenokarsinoma epitel

hücre hattında da (HeLa) gerçekleştirilmiştir. Desmin ve çekirdeğe taşınmadığı bilinen bir polisakkarit olan dekstran, kontrol olarak kullanıldığında (4), her üç hücre hattında da dekstran ve desmin çekirdekte görülmemiştir (Şekil 4.11). Desminin ve dekstranın çekirdek içerisindeki varlığının değerlendirilmesi için eş lokalizasyon analizleri Fiji (120) programında *Coloc 2* eklentisi kullanılarak yapılmıştır. Eş lokalizasyon belirteci olarak *Pearson* korelasyon katsayısı kullanılmıştır (130). Şekil 4.11’de görüldüğü üzere desmin ve dekstranın *Pearson* korelasyon katsayıları arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır.

Çekirdek içerisine taşınım deneyleri desminin karyoferin bağımsız olarak çekirdek içerisine taşınmadığını göstermektedir.

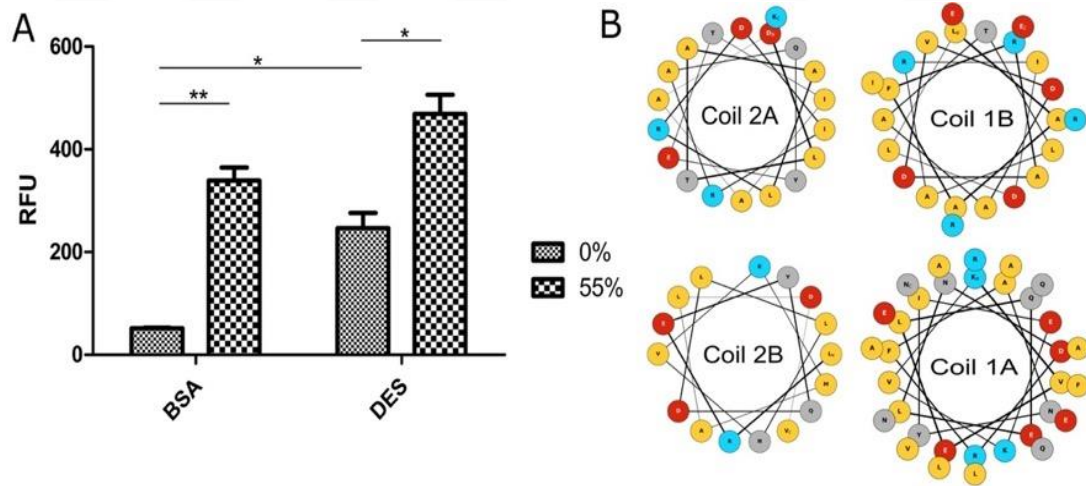




Şekil 4.11. Çekirdek içerisine taşınım deneyleri. Solda rekombinant desmin ve dekstran uygulaması yapılan hücrelere ait kesitler, sağda desmin ve dekstran için eş yerleşim analizi sonuçları. **A.** İnsan iskelet kası hücreleri (T0033) ($n_{\text{desmin}}=60$; $n_{\text{dekstran}}=53$), **B.** Fare iskelet kası hücreleri (C2C12), ($n_{\text{desmin}}=57$; $n_{\text{dekstran}}=65$), **C.** İnsan servikal kanser hücre hattı (HeLa), ($n_{\text{desmin}}=53$; $n_{\text{dekstran}}=41$). Karşılaştırmada *Mann-Whitney U* testi kullanılmıştır. Yeşil: desmin veya dekstran, Mavi: DAPI ile çekirdek boyaması.

4.2.2 Desminin yüzey hidrofobikliğinin araştırılması

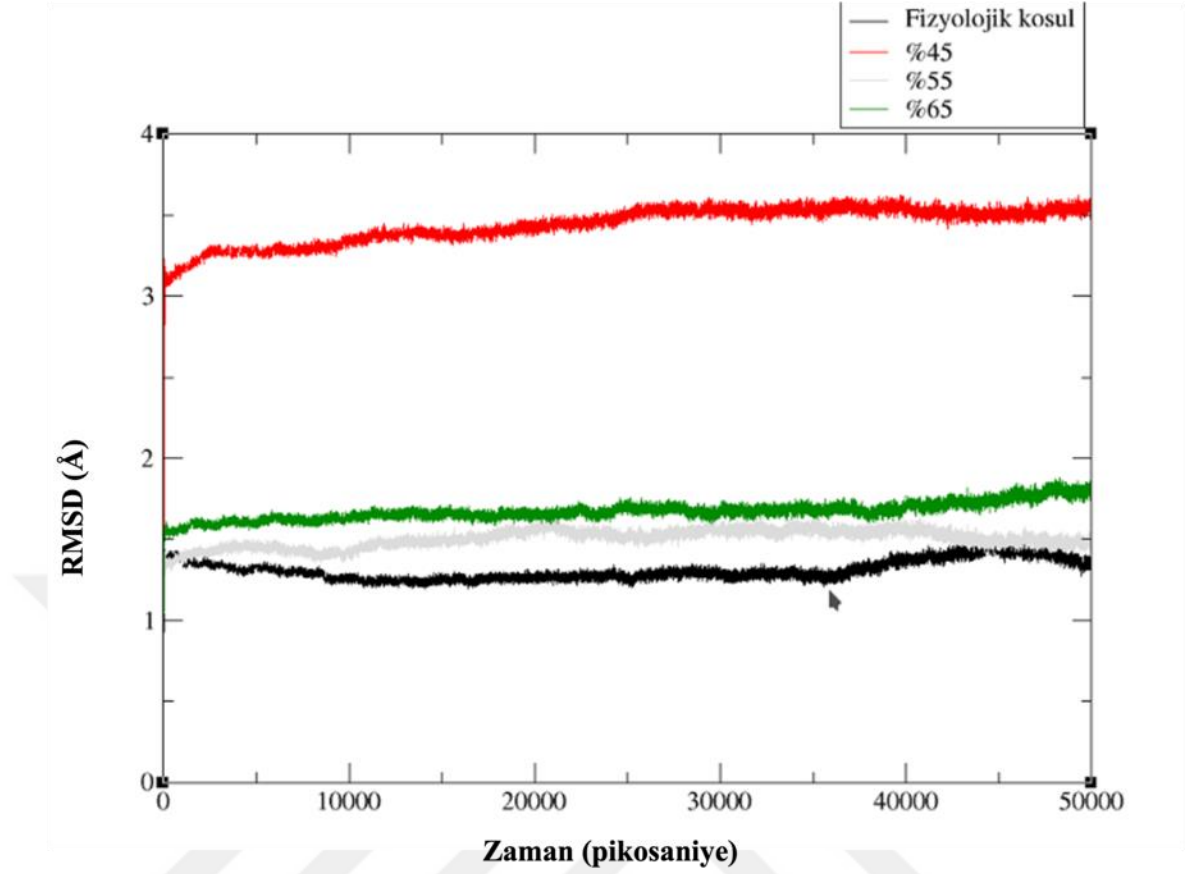
Desmin amfifilik özellikte bir *rod* domainine sahiptir ve çekirdek por kompleksinden yapısal değişimlerle yüzey hidrofobikliğini değiştirerek geçebilmesi beklenmektedir. Bu hipotezi test etmek amacıyla rekombinant desmin, floresan 4,4'-bis-1-anilinonaphthalene 8-sulfonate (bis-ANS) probuyla muamele edilmiştir. bis-ANS moleküller üzerinde hidrofobik bir yüzeye bağlandığı durumda floresan ışıma yapmaktadır. Kontrol olarak hidrofobik özellikte olduğu bilinen BSA kullanılmıştır (135,136). Eşit miktarda BSA ve rekombinant desmin, %55 etanol varlığında ve yokluğunda 10 μ M bis-ANS içeren PBS içerisinde çözülendiğinde, desmin sinyal yoğunluğunun BSA'dan istatistiksel olarak anlamlı oranda daha yüksek olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.12A). Bu veriler, desminin çekirdek por kompleksinin hidrofobik ortamına uyum sağlamak ve nuplar ile etkileşime girmek için yapısal değişime uğrayabileceği anlamına gelmektedir. Ek olarak alkol eklenmeyen koşullarda desminin sinyal yoğunluğunun BSA'ya oranla önemli ölçüde daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir; bu durum muhtemelen yüzeyde açıkta kalan ve antijenik olma potansiyeli taşıyan hidrofilik bölgelerden kaynaklanmaktadır.



Şekil 4.12. Hidrofobik ortamda desminin yapısal değişimi. **A.** %0 ve %55 etanol varlığında desmin ve BSA için floresan sinyal yoğunlukları (RFU*). Üç farklı ölçümün değerleri ortalama $\pm$ sd olarak temsil edilmiştir. **B.** Desmin sarmallarının sarmal tekerlek gösterimleri* (RFU: Bağlı floresans birimi). Hidrofobik amino asitler sarı renkle gösterilmiştir. Gri, kırmızı ve mavi sırasıyla polar, asidik ve bazik amino asitleri temsil etmektedir.

Desmin amfifilik özellikte bir *rod* domainine sahiptir (113) ve bu domain, sarmal 1a, sarmal 1b, sarmal 2a ve sarmal 2b şeklinde adlandırılan dört sarmaldan oluşmaktadır. Çekirdek por kompleksinden taşınımından sorumlu olabilecek hidrofobik amino asitlerin, desmin *rod* domaini üzerlerindeki konumlarını göstermek ve desminin yapısal değişimini *in silico* verilerle desteklemek amacıyla desmin sarmallarının sarmal çark temsili (*helical wheel representation*) oluşturulmuştur (137). Sarmal çark temsili oluşturmak için, sarmal 1a ve sarmal 2a'nın tam amino asit dizisi ve sarmal 1b (208-230. amino asitler) ve sarmal 2b'nin hidrofobik bölgeleri (385-400. amino asit) kullanılmıştır. Şekil 4.12'de gösterildiği üzere desmin sarmallarının hidrofobik bölgeleri bir koridor oluştururcasına içeriye doğru pozisyon almıştır. Sarmal içinde gizlenen bu bölgeler, çekirdek por kompleksinden taşınım sırasında nuplarla etkileşime girebilir.

Son olarak desminin yapısal değişimlerinin analizi için, *Nanoscale Molecular Dynamics* (NAMD) ve *Visual Molecular Dynamics* (VMD) yazılımları kullanılarak moleküler dinamik simülasyonları gerçekleştirilmiştir. Desminin hidrofobik bir ortamda yapısal değişim geçirip geçirmediğinin anlaşılması için desminin fizyolojik koşullarda ve %45, %55 ve %65 alkol içeren ortamdaki davranışı 50 nano saniye boyunca takip edilmiştir. Analizler TÜBİTAK-TRUBA alt yapısı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Desminin fizyolojik koşullar ve %45, %55 ve %65 alkol içeren koşullardaki davranışı *Root Mean Square Deviation* (RMSD) değeri kullanılarak değerlendirilmiştir. RMSD, bir protein omurgasındaki ilk yapısal durumdan son konumuna kadar olan farkı ölçmek için kullanılır. Birebir aynı olan yapılarda RMSD değeri 0'a eşitken iki yapı birbirinden farklılaştıkça değer yükselir (138). Şekil 4.13'te görüldüğü üzere desmin, ortam hidrofobikliği arttıkça yapısal değişime uğramaktadır. Özellikle %45 oranında alkol, ciddi yapısal değişimlere sebep olmaktadır. Tüm bu veriler desminin hidrofobik bir ortamda yapısal değişim geçirdiğini doğrulamaktadır.



Şekil 4.13. Desminin fizyolojik koşullarda (su) ve artan alkol konsantrasyonlarında RMSD değerleri.

5. TARTIŞMA

Bu tez kapsamında desminin çekirdek-sitoplazma arası taşınım mekanizmalarının aydınlatılması amaçlanmıştır.

Desmin üzerinde bulunan aday NLS ve NES dizileri (Bkz. Şekil 2.5) desminin çekirdek-sitoplazma arası karyoferin bağımlı bir mekanizma ile taşınabileceğini önerirken amfifilik özelliği ve çekirdek-sitoplazma arası taşınımın gerçekleştiği çekirdek por kompleksini oluşturan nup proteinleri ile etkileşimde olması, desminin çekirdekten sitoplazmaya ya da sitoplazmadan çekirdeğe taşınımında karyoferin bağımsız bir mekanizmayı tercih edebileceğine işaret etmektedir.

Tez kapsamında desmin üzerinde bulunan NLS ve NES dizilerinin işlevselliği, insan ve fare iskelet kası hücrelerinde incelenmiştir. Bu amaçla öncelikli olarak hücre döngüsü senkronizasyonu gerçekleştirilmiştir. Çekirdeğe taşınan proteinlerin hücre içi davranışları hücre döngüsü ve/veya dışarıdan gelen sinyaller ile ilişkilidir (139). Örneğin bir transkripsiyon faktörü *c-jun*'un çekirdek içerisine taşınımı, hücre döngüsü ile ilişkili değilken, *v-jun*'un taşınımı hücre döngüsüne bağımlıdır (140). Benzer şekilde çekirdek içi membranı ile ilişkili ara filament proteini lamin B2'nin hücre döngüsünün interfaz aşamasında çekirdek içerisine taşınımı, NLS yakınındaki serin rezidülerinin fosforilasyonu ile ilişkilidir (141). Hücre döngüsünün belirli bir aşamasında desminin çekirdeğe taşınması gerekebilir. Bu durumda desmin üzerindeki NLS'ye ihtiyaç olacaktır. Gerek desminin çekirdeğe taşınmasının hücre döngüsünün belirli bir aşamasında olması gerekse desminin iskelet kası farklılaşmasında da görev alabileceğine dair bulguların varlığı göz önüne alınarak (13–16), hücrelerin senkronize edilmesine gerek duyulmuştur. Hücre kültürü çalışmalarında, hücre döngüsü senkronizasyonu için çok çeşitli yöntemler bulunmakla birlikte, hücre bölünmesini durdurmak için kullanılan bu yöntemler genellikle besi yerinden serumun çekilmesi yaklaşımını temel alır. Ancak serum açlığı iskelet kası hücrelerinde farklılaşmayı tetiklediği için tercih edilen bir yöntem değildir (142). Bu sebeple hücre büyümesi için gerekli ancak canlılık için zaruri olmayan metiyonin amino asiti besi yerinden çekilerek hücreler amino asit açlığına baruz bırakılmıştır. Hücreler sayılarını iki katına çıkarma süreci boyunca metiyonin içermeyen besi yerinde tutularak aç bırakılmış ve hücre döngüsü G0/G1 evresinde durdurulmuştur (Bkz. Şekil 4.1). Ardından, stres sonrası hücrelerin herhangi bir olumsuzluğa maruz kalıp kalmadığının incelenmesi

için iskelet kası farklılaşma belirteci olan MHC proteini için boyama yapılarak, hücrelerin farklılaşma ve füzyon kabiliyetlerini koruyup korumadığı incelenmiştir. Hücrelerin açlık sonrası farklılaşma ve füzyon yeteneklerinin korunması açlık gibi önemli bir stres faktöründen negatif etkilenmediklerini göstermiştir (Bkz. Şekil 4.2).

Ardından desminin çekirdekte bulunduğu iskelet kası farklılaşma dönemi araştırılmıştır. Literatürde desminin çekirdekte konumlanması ve görevleri ile ilgili çok sayıda çalışma (9–16) mevcut olmakla beraber, bu çalışmaların hiçbirinde desminin çekirdekte konumlandığı iskelet kası farklılaşma aşaması ile ilişkili somut bir bilgi bulunmamaktadır. İskelet kası farklılaşması farklı aşamalardan oluşmaktadır. Bu aşamalar, adanmışlık (*commitment*), hücre döngüsünden çıkış, farklılaşmanın başlangıcı (erken farklılaşma) ve miyotüp oluşumudur (geç farklılaşma). Her aşamada özgül sinyal yolları ve transkripsiyon faktörleri hücre kaderinin belirlenmesinde görev alır (143). Eğer desmin, çekirdek içerisinde bir transkripsiyon faktörü olarak görev alıyorsa erken farklılaşma döneminde çekirdek içerisinde olması beklenebileceği gibi, farklılaşmanın tamamlandığı olgun miyotüplerde de desminin kas işlevinin devamlılığının sağlanması açısından (sinyal iletimi, transkripsiyonel kontrol vb.) çekirdek içerisine girmesi beklenebilir. Literatürde iskelet kası hücrelerinin çoğalma, farklılaşma, stres, hastalık gibi farklı hücresel koşullarda çekirdek içerisine taşınım için değişiklik gösteren ihtiyaçlara uyum sağlamak amacıyla çekirdek-sitoplazma arası taşınımında değişiklikler yaptığı bildirilmiştir (144). Yani çekirdek-sitoplazma arasındaki taşınım hücresel koşullarla doğrudan ilişkilidir. Bu doğrultuda insan iskelet kası hücrelerinin floresan etiketli desmin ifade eden bir vektör ile transfeksiyonu gerçekleştirilmiş ve iskelet kası farklılaşmasının farklı aşamalarındaki hücreler konfokal mikroskopi ile incelenerek desminin erken farklılaşma döneminde çekirdekte olduğu gösterilmiştir (Bkz. Şekil 4.5). Desminle ilgili yapılan önceki çalışmalar desminin kas ile ilişkili transkripsiyon faktörlerini lamin B ile etkileşerek aktive edebileceğini (13), kalp kası hücrelerinde, kalp kası farklılaşmasının temel öğeleriyle birlikte aynı transkripsiyon faktörü kompleksinde yer aldığını (16) ve bazı transkripsiyon faktörlerinin çekirdek içine taşınmasına yardımcı olduğunu (93) göstermektedir. Dolayısıyla, desminin çekirdek içine taşınımının erken farklılaşma döneminde olduğuna dair elde edilen bulgular literatür ile uyumludur.

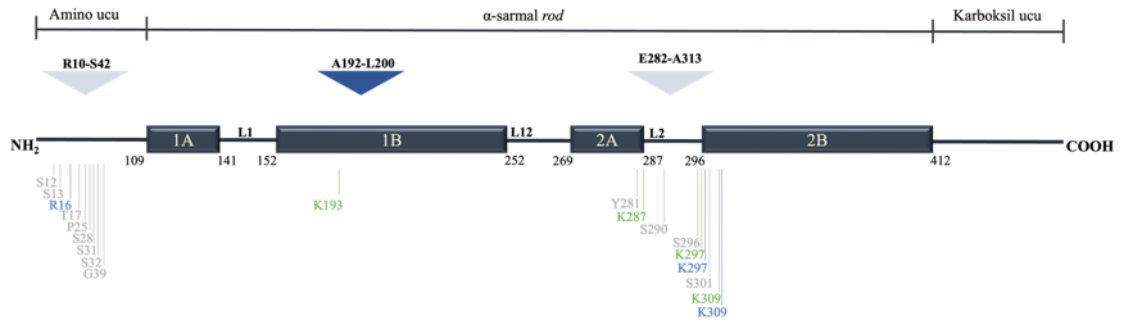
In silico analizler desmin üzerinde iki adet potansiyel NLS ve bir adet NES dizisi bulunduğunu göstermektedir (Bkz. Şekil 2.5). Dizilerin işlevselliğinin araştırılması için, bu bölgeler desmin dizisinden çıkarılarak mutant desmin ifadesi sağlayan vektörler oluşturulmuştur. Oluşturulan vektörlerin insan ve fare iskelet kası hücrelerine transfeksiyonu gerçekleştirilmiştir. Çekirdek işaretlemesi ve çekirdekteki desmin sinyali için eş lokalizasyon analizleri gerçekleştirildiğinde, NLS dizisi silinen vektörlerle transfekte edilen hücrelerde, desminin çekirdekteki konumlanmasının istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı görülmüştür (Bkz. Şekil 4.6 ve 4.7). Sonuçlar her iki NLS dizisinin de işlevsel olduğuna işaret etmektedir. Literatürde bir protein üzerinde birden fazla işlevsel NLS'nin bulunduğu örnekler mevcuttur (145–149). Tez kapsamında elde edilen veriler NLS dizilerinden herhangi birinin silinmesinin desminin çekirdeğe taşınımını önemli ölçüde azalttığını göstermiştir (Bkz. Şekil 4.6 ve Şekil 4.7). Tez kapsamında eş zamanlı olarak NLS dizilerinin ikisi birden silinmemiştir. Bu nedenle bu tez kapsamında elde edilen veriler bu sinyallerin birbirinden bağımsız olarak mı yoksa birlikte mi çalıştığına dair bir veri sağlayamamıştır. Literatürde birden fazla işlevsel NLS dizisi taşıyan proteinin varlığı bildirilmiş olmakla beraber, tek bir protein için neden birden fazla NLS dizisi olduğu belirsizliğini korumaktadır. Bazı çalışmalar, farklı NLS dizilerinin çekirdeğe taşınım etkinliği arttırmak için birlikte çalıştığını ileri sürerken (56,57) bazı çalışmalar da farklı NLS dizilerinin değişik hücre tiplerinde, farklı karyoferin ailesi üyeleri tarafından tanınabileceklerini göstermektedir (58).

Desmin üzerindeki NLS'lerden bir tanesi (skoru 2.9 olan) proteinin amino ucunda konumlanırken, ikinci NLS *rod* domaininde konumlanmaktadır (Şekil 5.1). Ara filament proteinlerinin amino ucu, filamentlerin bir araya gelmesi ve ayrılmasından (polimerizasyon-depolimerizasyon) sorumluyken *rod* domaini sarmal yapının oluşmasından sorumludur (150–153). Desminin amino ucu aynı zamanda yoğun bir PTM bölgesidir (Bkz. Şekil 5.1). Sinyal dizilerinin protein üzerindeki konumlanmaları (Bkz. Şekil 5.1), amino ucunda konumlanan sinyal dizisinin, hücrede o anda aktif olan sinyal yolları aracılığı ile etkinleşebileceğine işaret etmektedir zira bu bölgede yer alan PTM'ler hücre döngüsü süresince ara filamentlerin organizasyonu ve yapılması ile ilişkilidir (151). Desmin üzerinde yer alan PTM bölgeleri Şekil 5.1'de gösterilmiştir. Desminin tüm PTM'leri arasında, amino ucu fosforilasyonunun

desminin hücre içi konumlanmasında en önemli yere sahip olan PTM olduğu düşünülmektedir. Amino ucunun fosforilasyon durumu ara filament proteinlerinin polimerizasyon-depolimerizasyon durumlarının belirlenmesi ile ilişkilidir (154–156). Hobbs ve ark. (1) tarafından yayınlanan bir çalışmada çekirdeğe gidecek ara filament proteinlerinin küçük boyutlu olmaları (örneğin yeni sentezlenmiş olmak) ve protein-protein etkileşimleri ya da PTM'ler aracılığıyla işaretlenmelerinin beklendiği belirtilmektedir (1). Amino ucundaki PTM'lerin desminin polimerizasyon-depolimerizasyon durumuyla ilişkili olduğu göz önüne alındığında, amino ucunda konumlanan NLS'nin polimerizasyon-depolimerizasyon döngüsü esnasında aktifleşebileceğini ve çekirdek içerisine taşıyacak olan desmin filamentlerinin bu aşamada fosforilasyon ile işaretlenebileceğini düşündürmektedir.

Literatürde desminin amino ucunun işlevleriyle ilişkili olarak yapılan farklı çalışmalar da mevcuttur. Höllrigl ve ark. (2007) tarafından gerçekleştirilen çalışmalarda desminin amino ucunda, 31 ve 32. pozisyonlarda bulunan serin amino asitinin alanine dönüştürülmesi durumunda kalp kası hücrelerinde farklılaşma oranında azalma tespit edilmiştir (150). Amino ucunda yerleşim gösteren NLS dizisi 31 ve 32. pozisyonlardaki amino asit dizilerini de kapsamaktadır. Bu veriler bu bölgede yer alan NLS'nin işlevsel olduğu verisini desteklemektedir.

α -sarmal *rod* domaininde konumlanan NLS ve NES dizilerinin konumlandığı bölgelerde asetilasyon ve übikütilinlenme olduğu da görülmektedir (Bkz. Şekil 5.1). Übikütilinlenme protein yıkımı ile ilişkilirken, asetilasyon protein çözünürlüğü (*solubility*) ile ilişkilidir. Dolayısıyla bu PTM'lerin sinyal aktivasyonu ile doğrudan ilişkisi görünmemektedir.



Şekil 5.1. Desmin üzerinde NLS'lerin, NES'in ve PTM'lerin konumlanması. Desmin 470 amino asitten oluşur ve α -sarmal *rod* domaini ile amino ve karboksil uçları olmak üzere üç bölgeden oluşur. α -sarmal *rod* domaini sarmal 1A, sarmal 1B, sarmal 2A ve sarmal 2B ile sarmallar arası bağlayıcı bölgelerden (L1, L12, L2) oluşur. Alt simge numaraları amino ucu, α -sarmal *rod* domaini ve karboksil uçlarının hangi amino asitte başlayıp bittiğini göstermektedir. Şekilde açık gri üçgenler NLS'lerin, mavi üçgen ise NES'in desmin proteini üzerindeki lokalizasyonunu göstermektedir. Aşağıya uzanan gri çizgiler fosforilasyonu, mavi çizgiler asetilasyonu ve yeşil çizgiler übikütilinlenme bölgelerini göstermektedir. PTM verileri PhosphoSitePlus veri tabanından elde edilmiştir (157). A: Alanin; E: Glutamat; G: Glisin; K: Lizin; L: Lösin; P: Prolin; R: Arjinin; S: Serin; T:treonin; Y: Tirozin. Kural-Mangıt ve ark. (158)'dan uyarlanmıştır.

NLS dizilerinin silinmesi durumunda eş lokalizasyon analizi sonuçlarına göre desminin çekirdekte daha düşük oranda görülmesi üzerine, dizilerin işlevsel olduğunun doğrulanması için hücrelere importin α/β aracılıklı taşınım mekanizmasını baskılayan ivermektin uygulaması yapılmıştır (159). Uygulama sonrasında desminin çekirdek içerisinde konumlanmasının istatistiksel olarak kayda değer oranda azalması da NLS dizilerinin işlevsel olduğunu doğrulamıştır (Bkz. Şekil 4.9).

Desminin çekirdekten sitoplazmaya karyoferin bağımlı mekanizma ile taşınıp taşınmadığının anlaşılması için aday olarak belirlenen NES dizisi, desmin dizisinden çıkarılmış ve mutant vektörün hücrelere transfeksiyonu gerçekleştirilmiştir (Bkz. Şekil 4.6 ve Şekil 4.7). NES dizisinin işlevsel olması durumunda desminin çekirdekte birikmesi beklenmektedir. Eğer desmin çekirdekten NES dizisi aracılığı ile çıkıyorsa, NES dizisi olmadığı durumda desmin dışarı çıkamayacak ve hücre içinde kalacaktır. Ancak çalışmalarımız sonucunda NES'in desmin dizisinden çıkarıldığı durumda çekirdekte birikimi gözlenmemiştir (Bkz. Şekil 4.6 ve Şekil 4.7). Bu durum *in silico* analizlerde NES dizisi olarak tanımlanan bölgenin aktif olmadığına işaret etmektedir. Ancak mutasyon sebebiyle desminde gerçekleşebilecek işlev kaybı sebebiyle

desminin çekirdekten çıkıyor olması ve/veya hiç giremiyor olması ihtimalleri göz ardı edilmemelidir.

İlginç biçimde, çekirdekte birikim gözlenmemesine ek olarak NES dizisi silinen desminin çekirdekte daha düşük oranda bulunduğu tespit edilmiştir (Bkz. Şekil 4.6 ve Şekil 4.7). NES dizisi silinen mutant desminin çekirdekte daha az gözlenmesinin farklı nedenleri olabilir. İlk olarak, desmin üzerindeki aday NLS ve NES dizileri değerlendirilirken çevrimiçi veri tabanları kullanılmıştır. İlgili bölgenin NES dizisi özelliği olup olmadığının tahmini amacıyla NetNES (61) veri tabanından faydalanılmıştır. NetNES ve NES tahmini yapan diğer veri tabanları çoğunlukla klasik örüntüye sahip NES dizilerini eğitim veri seti olarak kullanan makine öğrenmesi (*machine learning*) algoritmalarını kullanır ve protein dizisi temellidir (160,161). Ne yazık ki, NES örüntüleri proteomun büyük bir bölümünde oldukça yaygın olarak gözlemlendiğinden, bu klasik örüntüye dayalı tahminler yüksek oranda yanlış pozitif sonuç alınmasına neden olur. Dolayısıyla aslında desmin dizisi üzerinde aday olarak belirlenen NES dizisi, uygun bir aday olmayabilir. İkinci olarak NES dizisinin silinmesi ile oluşturulan mutasyon desminin çekirdekten ‘seçici’ olarak çıkarılmasına sebep olabilir. Oluşturulan mutasyon proteinin üçüncül yapısının bozulmasına sebebiyet verebilir ve bu durumda artık çekirdek içerisindeki görevlerini yerine getiremeyeceği için desmin seçici olarak çekirdekten çıkarılıyor olabilir. Bir diğer olasılık desminin çekirdekten sitoplazmaya taşınımının, sitoplazmadan çekirdeğe taşınımına müdahale etmesidir. Tıpkı desmin gibi bazı proteinler hem NES hem de NLS dizilerine sahiptir. NES dizisinin silinmesi çekirdek içine ve çekirdekten sitoplazmaya taşınım arasındaki dengenin bozulmasına sebep olarak proteinin hücre içi konumlanmasını etkileyebilir (57). Literatürde benzer bir örnek mevcuttur. Epstein-Barr virüs DNase (EBV DNase) iki adet işlevsel NLS dizisine sahiptir. Protein üzerinde bu dizilerin yakınında iki adet hidrofobik bölge olduğu belirlenmiş ve bu hidrofobik bölgelerin NLS işlevine etkisi olup olmadığının anlaşılması için bu hidrofobik dizileri içermeyen mutant vektörler kullanılarak EBV DNase üzerindeki NLS’lerin aktivitelerine bakılmıştır. Bölgedeki mutasyonun EBV DNase NLS dizilerinden bir tanesinin işlevini bozarken diğerini etkilememiştir (57). Sonuç olarak, desmin dizisi üzerinde NES olarak tanımlanan bölge aslında NLS dizisi için düzenleyici görevleri olan bir bölge olabilir ve bu bölgenin silinmesi aslında desminin

çekirdekten ‘atılması’ ile ilişkili değil, desminin çekirdek içerisine girişini engelliyor olabilir. Aday NES dizisi silinen desminin çekirdekteki konumlanmasındaki azalış ile ilgili farklı teoriler mevcut olmakla birlikte, desminin çekirdekte düşük miktarda gözlenmesinin nedeni kesin olarak bilinmemektedir.

Sonuç olarak bu tez kapsamında desmin üzerinde bulunan NLS dizilerinin aktif olduğu ve desminin karyoferin bağımlı bir mekanizma ile çekirdek içerisine taşındığı gösterilmiştir.

Desminin çekirdek-sitoplazma arasında taşınımı için aday mekanizmalardan bir diğeri karyoferin bağımsız mekanizmadır. Bir proteinin çekirdek ve sitoplazma arasında birden fazla farklı yolla taşınması ihtimali olasılık dışı değildir ve literatürde daha önce tartışılmıştır. Başka bir ara filament proteini olan keratin karyoferin bağımlı mekanizma ile çekirdek ve sitoplazma arasında taşınabildiği gibi (162) çekirdek ve sitoplazma arası gidip gelen, karyoferin ailesi üyelerinden farklı proteinlerle de (*shuttling proteins*) etkileşim halindedir (162–165). Keratinin karyoferin ailesi üyelerinden farklı proteinler aracılığı ile çekirdek-sitoplazma arası taşıyor olması ihtimali (*piggybacking*) hücrenin farklı fizyolojik koşullara adaptasyon kabiliyetini artırma yetisi sağladığı ve/veya regülasyon sınırlarını genişlettiği şeklinde yorumlanmaktadır (1). Desmin tüm ara filament proteinleri gibi amfifilik bir bölgeye sahiptir (113). Literatürde amfifilik özellikteki proteinlerin çekirdek içerisine tıpkı karyoferin ailesi üyeleri gibi, çekirdek por kompleksi elemanları ile doğrudan etkileşime girerek taşınabileceğini gösteren farklı çalışmalar mevcuttur (4,5). Bu proteinler çekirdek por kompleksine ulaştıklarında hidrofobik yüzeylerini açığa çıkararak nuplarla doğrudan etkileşime girer ve çekirdek-sitoplazma arasında taşınabilirler (4–6,40). Desminin de çekirdek-sitoplazma arasında bağımsız bir şekilde taşınıp taşınmadığının araştırılması için literatürde benzer çalışmalar için kullanılan çekirdek içerisine taşınım deneyleri yapılmıştır (4,134).

Çekirdek içerisine taşınım deneylerinde hem desmin ifadesi olan insan ve fare iskelet kası hücre hatları hem de desmin ifadesi olmayan servikal kanser hücre hattı kullanılmıştır. Hücre zarı permeabilize edilen hücrelere rekombinant desmin ve çekirdek içine girmediği bilinen floresan işaretli dekstran uygulaması yapıldığında desminin çekirdek içerisinde konumlanmadığı görülmüştür (Bkz. Şekil 4.11). Ancak, daha önceki çalışmalarımızdan elde ettiğimiz veriler ve literatür verileri desminin

çekirdek por kompleksini oluşturan nup proteinlerinden, nup153, nup214 ve nup88 ile etkileşimde olduğunu göstermektedir (17,18,101). Bu nedenle desminin çekirdek içerisine karyoferin bağımsız bir mekanizmayla taşınmadığı gösterilmesine rağmen desminin nuplarla etkileşiminin kapsamının anlaşılması için yüzey hidrofobikliği ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Rekombinant desmin proteininin, hidrofobik koşullarda floresan bir işaretleyici varlığında, floresan ışıması değerlendirilmiştir. Analiz sonuçları desminin hidrofobik koşullara adaptasyon sağlamak amacıyla yüzey hidrofobikliğini değiştirdiğini göstermektedir (Bkz. Şekil 4.12). Ardından çekirdek-sitoplazma arası taşınımından sorumlu olabilecek hidrofobik amino asitlerin, desmin *rod* domaini üzerlerindeki konumlarını göstermek ve desminin yapısal değişimini *in silico* verilerle desteklemek amacıyla desmin sarmallarının sarmal çark temsili (*helical wheel representation*) oluşturulmuştur (137) (Bkz. Şekil 4.12). Sarmal çark temsili yapısı desminin hidrofobik amino asitlerinin, bir koridor oluştururcasına, α -sarmal yapısının iç kısmında yoğunlaştığını göstermektedir (Bkz. Şekil 4.12). Literatürde bu tip yapıya sahip proteinlerin çekirdekten sitoplazmaya taşındığına dair örnekler bulunmaktadır (5,6). Desminin çekirdekten sitoplazmaya protein taşınımında görev aldığı bilinen nup88, nup214 ve nup153 (5,166,167) ile etkileşimde olduğu da değerlendirildiğinde, desminin işlevsel bir NES aracılığı ile karyoferin bağımlı olarak değil, yüzey hidrofobikliğini değiştirerek karyoferin bağımsız olarak çekirdekten sitoplazmaya taşınabileceği yorumu yapılmıştır.

Son olarak desminin hidrofobik ortamda yapısını değiştirebileceğinin gösterilmesi için moleküler dinamik simülasyonları yapılmıştır. NAMD ve VMD programları kullanılarak, desminin yükselen alkol konsantrasyonlarında yapı değişimini gösteren simülasyonlar gerçekleştirilmiş ve RMSD değerleri kıyaslanmıştır. Desminin artan alkol konsantrasyonunda yapısal değişime uğradığı *in silico* analizlerle de gösterilmiştir (Bkz. Şekil 4.13).

Sonuç olarak tez çalışması kapsamında desmin üzerindeki NLS dizilerinin aktif olduğu ve çekirdeğe NLS dizilerini tanıyan karyoferinler tarafından tanınarak yani karyoferin bağımlı mekanizma ile taşındığı gösterilmiştir. NES dizisi olarak tanımlanan bölgenin ise işlevsel olduğunu gösteren bir veri elde edilememiştir. Bu da desminin çekirdekten sitoplazmaya NES dizisini tanıyan karyoferinler tarafından taşınmadığına işaret etmektedir. Ancak NES dizisi açısından elde edilen veriler ön

bulgu niteliği taşımaktadır. Çünkü, NES dizisi için aday bölgelerin belirlenmesini sağlayan veri tabanları her zaman yüksek doğruluklu tahminler yapmamaktadır. Bu sebepten ötürü aday olarak belirlenen NES dizisi bölgesinin silinmesi durumunda desminin çekirdek içerisinde birikmemesi nedeniyle bu dizinin işlevsel olmadığına dair veriler elde edilmiş olmakla beraber, desmin üzerinde başka bir NES olup olmadığının bilinmemesi ve çekirdekten sitoplazmaya taşınımında karyoferin bağımlı yolağın baskılanması durumunda desminin bu durumdan nasıl etkilendiğine dair veriler bulunmaması nedeniyle bu alanda çalışmalara devam edilmesi gerekmektedir.

Tez çalışması kapsamında çekirdekten sitoplazmaya taşınımının karyoferin bağımsız olduğuna dair önemli veriler elde edilmiştir. Desminin ortam hidrofobikliği arttığında yapısal değişime uğraması ve çekirdekten sitoplazmaya taşınımında görev aldığı bilinen nuplarla etkileşimde olması desminin çekirdekten sitoplazmaya karyoferin bağımsız olarak taşındığına işaret etmektedir.

Desmin genindeki mutasyonlar, desminopatiler olarak bilinen iskelet ve kalp kası miyopatilerine neden olur. Desmin genindeki 70'ten fazla mutasyon desminopatilerle ilişkilendirilmiştir (168). Desminopatiler için henüz bir tedavi seçeneği bulunmamaktadır (169). Desmin mutasyonlarının neden olduğu patolojinin genellikle desmin agregasyonu ya da miyofibriller dejenerasyon nedeniyle bozulmuş desmin ağı veya mutasyonun PTM ya da protein-protein etkileşim bölgelerini etkilemesi nedeniyle ortaya çıktığı belirtilmektedir (168). Ancak, mutasyonların tanımlandığı çalışmalarda bu mutasyonların desmin taşınımını etkileyip etkilemediği, etkiliyorsa nasıl bir sonuca sebep olabileceğine odaklanılmamıştır. Mutasyonların desmin taşınımını nasıl etkilediğine dair çalışma yapılmamasının nedeni desminopati üzerinde yapılan çalışmalarda araştırmacıların desminin çekirdek ile ilişkili henüz keşfedilmeyen işlevlerine değil, hastalık patolojisinin birincil nedenine odaklanmış olmasından kaynaklı olabilir.

Desmin geninde yer alan ve desminopati grubu hastalıklarla ilişkilendirilen mutasyonlardan bazıları desminin amino ucunda konumlanan NLS dizisi sınırlarında yer alırken, bir kısmı da amfifilik sarmal *rod* domaini üzerindedir (168,170). NLS sınırları içinde yer alan mutasyonlar doğrudan desminin karyoferin bağımlı taşınımını etkileyebilir. Öte yandan desminin alfa sarmal *rod* domaini üzerinde yer alan mutasyonların bu bölgedeki hidrofobik ve hidrofilik amino asitlerin yapılanmasını

bozarak bölgesel esneklik kaybına neden olabileceği öne sürülmektedir (170). Bu durumda desminin yüzey hidrofobikliğinin etkileneceği ve çekirdek-sitoplazma arası taşınımında sorunlar yaşanacağı öngörülebilir. Nitekim Kreplak ve ark., (171) genel varsayımların aksine bazı desminopati gruplarında hastalık sebebinin mutasyonlar sebebiyle desmin ağı oluşumunun gerçekleşmemesi olmadığını ve desmin birikiminin çok daha karmaşık mekanizmalarla gerçekleşebileceğini belirtmiştir (171). 2013 yılında yayınlanan bir çalışmada ise desmin proteininin karboksil ucunda mutasyon taşıyan bir hastanın iskelet kası kesitlerinde yapılan incelemelerde yoğun kas dejenerasyonu olduğu görülmüştür (100). Ancak hastada desmin ifadesi değişmediği gibi kas dokusunda desmin birikimi de gözlenmemiştir (100). Bu gibi örnekler desmin mutasyonları ile ilişkili hastalıklarda desminin farklı görevlerine odaklanılması gerektiğine ve hastalık patolojilerinin görüldüğünden çok daha karmaşık olduğuna işaret etmektedir.

Farklı ara filament proteinlerinin alışlagelmişin dışında görevler üstlendiği bilinmektedir. Örneğin, saç foliküllerinin büyümesinden sorumlu keratin 17'nin sitoplazmik filament ağından ayrıldıktan sonra üzerindeki NLS aracılığı ile çekirdek içine taşındığı ve tümör baskılayıcı p27^{KIP1} 'in çekirdekten sitoplazmaya taşınımını ve degradasyonunu tetikleyerek kanser hücrelerinde hücre döngüsü sürecine etki ettiği bilinmektedir (162).

Bir ara filament proteini olan desminin de ağırlıklı olarak ifade olduğu kas dokusu ile ilişkili çalışmalara ek olarak kanser gibi çok faktörlü hastalıklarda da, özellikle desmin ifadesinde artış görülen kolorektal kanser gibi (172), taşınımının araştırılması hastalıkların patofizyolojisinin anlaşılması, desminin çekirdekte üstlendiği görevlerin aydınlatılması ve hedeflenebilir yeni tedavi yollarının keşfi açısından önemli veriler elde edilmesini sağlayacaktır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tamamlanan doktora tez çalışmasının amacı sitoplazmada görevli desmin ara filament proteininin çekirdek-sitoplazma arası taşıma mekanizmalarının aydınlatılmasıdır. Tez çalışması sonucunda (1) desminin insan iskelet kası hücrelerinde çekirdek içerisindeki varlığı, (2) sahip olduğu NLS dizilerinin işlevsel olduğu ve (3) hidrofobik koşullarda yapısal değişim geçirerek yüzey hidrofobikliğini arttırdığı ilk kez gösterilmiştir. Bu bağlamda tez kapsamında elde edilen sonuçlar ve öneriler aşağıda sıralanmıştır.

6.1 Sonuçlar

- 1- *In silico* analizlerle desmin üzerinde tespit edilen potansiyel NLS dizilerinin işlevsel olduğu gösterilmiştir. Çekirdek-sitoplazma arası karyoferin bağımlı taşınım yollarının baskılandığı durumda desminin çekirdek içerisinde konumlanmasının azaldığı tespit edilmiş ve desminin sitoplazmadan çekirdeğe karyoferin bağımlı mekanizma ile taşındığı gösterilmiştir.
- 2- *In silico* analizlerle desmin üzerinde tespit edilen potansiyel NES dizisinin işlevsel olmadığı gösterilmiştir.
- 3- Desminin sitoplazmadan çekirdeğe karyoferin bağımsız mekanizma ile taşındığına dair bulgu elde edilememiştir.
- 4- Yüzey hidrofobikliği ölçümleri ve bilgisayar ortamında gerçekleştirilen moleküler dinamik simülasyonlarında uyumlu sonuçlar elde edilmiş ve desminin artan hidrofobik koşullara uyum sağlamak üzere yapısal değişimler geçirerek yüzey hidrofobikliğini arttırdığı tespit edilmiştir.

6.2 Öneriler

1. Desmin üzerinde işlevsel olduğu gösterilen NLS'lerin detaylı karakterizasyonunun yapılması çalışmanın bütünselliği açısından önemli veriler elde edilmesini sağlayacaktır. Karakterizasyon çalışmalarında tüm desmin dizisi üzerinde NLS için kritik olduğu bilinen bazik lizin amino asitleri alanin gibi nötral bir amino asit ile değiştirilerek sinyal dizisinin aktif sinyal bölgeleri tespit edilebilecektir.

2. NLS dizilerinin her ikisinin de silindiği bir mutant vektör oluşturularak dizilerin sinerjik çalışıp çalışmadıkları araştırılmalıdır. Yine NLS dizileri ayrı ayrı, fizyolojik koşullarda çekirdek içine taşınmadığı bilinen bir proteine eklenerek bu dizilerin birbirlerinden bağımsız olarak aktif olup olmadıklarının araştırılması sinyal karakterizasyonu açısından önemli bulgular elde edilmesini sağlayacaktır.

3. NLS dizilerinin detaylı karakterizasyonu var olan NLS tahmin veri tabanlarının geliştirilmesine ve yeni veri tabanlarının oluşturulmasına katkı sağlayacaktır.

4. Yüksek ölçekli analizler (BioID) ya da *in vitro* çalışmalar (kolon bağlanma deneyi) yapılarak desminin bağlanma partnerleri arasında karyoferin ailesi üyeleri olup olmadığının araştırılması da tez çalışması kapsamında erişilen verileri güçlendirecek nitelikte sonuçlar elde edilmesini sağlayacaktır.

5. Literatürdeki ve tarafımızca geçmişte yapılan çalışmalar desminin çekirdek por kompleksi elemanlarıyla ilişkide olduğunu göstermektedir. Bu tez çalışması kapsamında ise desminin hidrofobik koşullarda yapısal değişimler geçirerek yüzey hidrofobikliğini arttırabildiği ancak bu yapısal değişimlerin sitoplazmadan-çekirdeğe taşınım ile ilişkili olmadığı gösterilmiştir. Yapısal değişimlerin çekirdekten sitoplazmaya taşınım ile ilişkili olup olmadığının anlaşılmasını sağlayacak bir deney kurgusu oluşturulması desminin yapısal uğradığı yapısal değişimin biyolojik öneminin de aydınlatılmasına katkı sağlayacaktır.

6. NES dizisinin silindiği durumda, desminin neden çekirdekte konumlanmasının azaldığı araştırılmalıdır. Bu bölgenin sinyal dizilerinin aktifleşmesi ile ilişkisinin aydınlatılması ve/veya mutant dizinin çekirdekten seçici olarak çıkarılıp çıkarılmadığının incelenmesi hem taşınım yolları hakkında daha çok bilgi edinilmesini sağlayacak hem de desminin biyolojisi ile ilişki bilgi birikimini derinleştirecektir.

7. Moleküler dinamik simülasyonları ile sinyal dizileri silinen desmin mutantlarının davranışlarının incelenmesi desmin yapısının anlaşılmasına katkı sağlayacaktır.

7. KAYNAKLAR

1. Hobbs RP, Jacob JT, Coulombe PA. Keratins Are Going Nuclear. *Dev Cell*. 2016;38(3):227–33.
2. Kumeta M, Yoshimura SH, Hejna J, Takeyasu K. Nucleocytoplasmic shuttling of cytoskeletal proteins: Molecular mechanism and biological significance. *Int J Cell Biol*. 2012;2012.
3. Kumeta M, Yoshimura SH, Harata M, Takeyasu K. Molecular mechanisms underlying nucleocytoplasmic shuttling of actinin-4. *J Cell Sci*. 2010;123(7):1020–30.
4. Kumeta M, Yamaguchi H, Yoshimura SH, Takeyasu K. Karyopherin-independent spontaneous transport of amphiphilic proteins through the nuclear pore. *J Cell Sci*. 2012;125(21):4979–84.
5. Xu L, Kang Y, Çöl S, Massagué J. Smad2 nucleocytoplasmic shuttling by nucleoporins CAN/Nup214 and Nup153 feeds TGF β signaling complexes in the cytoplasm and nucleus. *Mol Cell*. 2002;10(2):271–82.
6. Xu L, Alarcón C, Çöl S, Massagué J. Distinct Domain Utilization by Smad3 and Smad4 for Nucleoporin Interaction and Nuclear Import. *J Biol Chem*. 2003;278(43):42569–77.
7. Lazarides E. Intermediate Filaments as Mechanical Integrators of Cellular Space. *Nature*. 1980;283:249–56.
8. Fuchs E, Weber K. Intermediate Filaments: Structure, Dynamics, Function and Disease. *Annu Rev Biochem*. 1994;63:345–82.
9. Kamei H. A Monoclonal Antibody to Chicken Gizzard Desmin that Recognizes Intermediate Filaments and Nuclear Granules in BHK21 / C13 Intermediate filaments. *Cell Struct Funct*. 1986;11:367–77.
10. Georgatos SD, Webert K, Geisler N, Blobel G. Binding of two desmin derivatives to the plasma membrane and the nuclear envelope of avian erythrocytes: Evidence for a conserved site-specificity in intermediate filament-membrane Interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84:6780–4.
11. Tolstonog G V., Li G, Shoeman RL, Traub P. Interaction In Vitro of Type III Intermediate Filament Proteins with Higher Order Structures of Single-Stranded DNA, Particularly with G-Quadruplex DNA. *DNA Cell Biol*. 2005;24(2):85–110.
12. Traub P, Shoeman RL. Intermediate Filament Proteins: Cytoskeletal Elements with Gene-Regulatory Function? *Int Rev Cytol*. 1994;154:1–103.
13. Capetanaki Y, Milner DJ, Weitzer G. Desmin in muscle formation and maintenance : knockouts and consequences. *Cell Struct Funct*. 1997;22(1):103–16.
14. Hofner M, Höllrigl A, Puz S, Stary M, Weitzer G. Desmin stimulates differentiation of cardiomyocytes and up-regulation of brachyury and nkx2.5. *Differentiation*. 2007;75(7):605–15.

15. Höllrigl A, Puz S, Al-Dubai H, Kim JU, Capetanaki Y, Weitzer G. Amino-terminally truncated desmin rescues fusion of des^{-/-} myoblasts but negatively affects cardiomyogenesis and smooth muscle development. *FEBS Lett.* 2002;523(1–3):229–33.
16. Fuchs C, Gawlas S, Heher P, Nikouli S, Paar H, Ivankovic M, et al. Desmin enters the nucleus of cardiac stem cells and modulates Nkx2.5 expression by participating in transcription factor complexes that interact with the nkx2.5 gene. *Biol Open.* 2016;5(2):140–53.
17. Kural-Mangıt E, Dinçer PR. Physical evidence on desmin–lamin B interaction. *Cytoskeleton.* 2021;(December 2020):1–4.
18. Huttlin EL, Bruckner RJ, Navarrete-Perea J, Cannon JR, Baltier K, Gebreab F, et al. Dual proteome-scale networks reveal cell-specific remodeling of the human interactome. *Cell.* 2021 May;184(11):3022–3040.e28.
19. Matsuda A, Mofrad MRK. On the nuclear pore complex and its emerging role in cellular mechanotransduction. *APL Bioeng.* 2022;6(1):1–13.
20. Paci G, Caria J, Lemke EA. Cargo transport through the nuclear pore complex at a glance. *J Cell Sci.* 2021;134(2).
21. Jahed Z, Soheilypour M, Peyro M, Mofrad MRK. The LINC and NPC Relationship – It’s Complicated! *J Cell Sci.* 2016;129:3219–29.
22. Capelson M, Hetzer MW. The role of nuclear pores in gene regulation, development and disease. *EMBO Rep.* 2009;10(7):697–705.
23. Sakuma S, D’Angelo MA. The roles of the nuclear pore complex in cellular dysfunction, aging and disease. *Semin Cell Dev Biol.* 2017;68:72–84.
24. Lin DH, Hoelz A. The Structure of the Nuclear Pore Complex (An Update). *Annu Rev Biochem.* 2019;88:725–83.
25. Lin DH, Stuwe T, Schilbach S, Rundlet EJ, Perriches T, Mobbs G, et al. Architecture of the symmetric core of the nuclear pore. *Science (80-).* 2016;352(6283).
26. Kosinski J, Mosalaganti S, Appen A Von, Teimer R, Diguilio L, Wan W, et al. Molecular architecture of the inner ring scaffold of the human nuclear pore complex. *Science (80-).* 2016;352(6283):363–5.
27. Gu Y. The nuclear pore complex: a strategic platform for regulating cell signaling. *New Phytol* [Internet]. 2017; Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/nph.14756>
28. Beck M, Hurt E. The nuclear pore complex: Understanding its function through structural insight. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2017;18(2):73–89.
29. Aramburu IV, Lemke EA. Floppy but not sloppy: Interaction mechanism of FG-nucleoporins and nuclear transport receptors. *Semin Cell Dev Biol* [Internet]. 2017;68:34–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.06.026>
30. Dirk G, Kutay U. Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1999;15:607–60.

31. Lim RYH, Huang NP, Köser J, Deng J, Aaron Lau KH, Schwarz-Herion K, et al. Flexible phenylalanine-glycine nucleoporins as entropic barriers to nucleocytoplasmic transport. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(25):9512–7.
32. Wentz SR, Rout MP, Blobel G. A new family of yeast nuclear pore complex proteins. *J Cell Biol*. 1992;119(4):705–23.
33. Poon IKH, Jans DA. Regulation of nuclear transport: Central role in development and transformation? *Traffic*. 2005;6(3):173–86.
34. Wagstaff KM, Jans DA. Importins and beyond: Non-conventional nuclear transport mechanisms. *Traffic*. 2009;10(9):1188–98.
35. Quensel C, Friedrich B, Sommer T, Hartmann E, Kohler M. In vivo analysis of importin α proteins reveals cellular proliferation inhibition and substrate specificity. *Mol Cell Biol*. 2004;24(23):10246–55.
36. Talcott B, Moore MS. The nuclear import of RCC1 requires a specific nuclear localization sequence receptor, karyopherin $\alpha 3$ /Qip. *J Biol Chem* [Internet]. 2000;275(14):10099–104. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.275.14.10099>
37. Köhler M, Speck C, Christiansen M, Bischoff FR, Prehn S, Haller H, et al. Evidence for distinct substrate specificities of importin α family members in nuclear protein import. *Mol Cell Biol*. 1999;19(11):7782–91.
38. Yasuhara N, Shibasaki N, Tanaka S, Nagai M, Kamikawa Y, Oe S, et al. Triggering neural differentiation of ES cells by subtype switching of importin- α . *Nat Cell Biol*. 2007;9(1):72–9.
39. Yoshimura SH, Hirano T. HEAT repeats - versatile arrays of amphiphilic helices working in crowded environments? *J Cell Sci*. 2016;129(21):3963–70.
40. Yoshimura SH, Kumeta M, Takeyasu K. Structural mechanism of nuclear transport mediated by importin β and flexible amphiphilic proteins. *Structure*. 2014;22(12):1699–710.
41. Görlich D, Prehn S, Laskey RA, Hartmann E. Isolation of a protein that is essential for the first step of nuclear protein import. *Cell*. 1994;79(5):767–78.
42. Ribbeck K, Görlich D. Kinetic analysis of translocation through nuclear pore complexes. *EMBO J* [Internet]. 2001;20(6):1320–30. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=145537&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
43. Macara IG. Transport into and out of the Nucleus. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2001;65(4):570–94.
44. Yuh MC, Blobel G. Karyopherins and nuclear import. *Curr Opin Struct Biol*. 2001;11(6):703–15.
45. Stewart M. Molecular mechanism of the nuclear protein import cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(3):195–208.
46. Martoglio B, Dobberstein B. Signal sequences: More than just greasy peptides. *Trends Cell Biol*. 1998;8(10):410–5.

47. Bradley KJ, Bowl MR, Williams SE, Ahmad BN, Partridge CJ, Patmanidi AL, et al. Parafibromin is a nuclear protein with a functional monopartite nuclear localization signal. *Oncogene*. 2007;26(8):1213–21.
48. Nguyen Ba AN, Pogoutse A, Provart N, Moses AM. NLStradamus: A simple Hidden Markov Model for nuclear localization signal prediction. *BMC Bioinformatics*. 2009;10:1–11.
49. Adam SA, Lobl TJ, Mitchell MA, Gerace L. Identification of specific binding proteins for a nuclear location sequence. *Nature*. 1989;337.
50. Cingolani G, Bednenko J, Gillespie MT, Gerace L. Molecular basis for the recognition of a nonclassical nuclear localization signal by importin β . *Mol Cell*. 2002;10(6):1345–53.
51. Korlimarla A, Bhandary L, Prabhu JS, Shankar H, Sankaranarayanan H, Kumar P, et al. Identification of a non-canonical nuclear localization signal (NLS) in BRCA1 that could mediate nuclear localization of splice variants lacking the classical NLS. *Cell Mol Biol Lett*. 2013;18(2):284–96.
52. Wang L, Li M, Cai M, Xing J, Wang S, Zheng C. A PY-nuclear localization signal is required for nuclear accumulation of HCMV UL79 protein. *Med Microbiol Immunol*. 2012;201(3):381–7.
53. Lange A, Mills RE, Lange CJ, Stewart M, Devine SE, Corbett AH. Classical Nuclear Localization Signals: Definition, Function, and Interaction with Importin α . *J Biol Chem*. 2007;282(8):5101–5.
54. Fagerlund R, Mélen K, Kinnunen L, Julkunen I. Arginine/lysine-rich nuclear localization signals mediate interactions between dimeric STATs and importin alpha 5. *J Biol Chem*. 2002;277(33):30072–8.
55. Gu Y, Hinnerwisch J, Fredricks R, Kalepu S, Mishra RS, Singh N. Identification of cryptic nuclear localization signals in the prion protein. *Neurobiol Dis*. 2003;12(2):133–49.
56. Roberts BL, Richardson WD, Smith AE. The effect of protein context on nuclear location signal function. *Cell*. 1987;50(3):465–75.
57. Liu MT, Hsu TY, Chen JY, Yang CS. Epstein-Barr virus DNASE contains two nuclear localization signals, which are different in sensitivity to the hydrophobic regions. *Virology*. 1998;247(1):62–73.
58. Nadler SG, Tritschler D, Haffar OK, Blake J, Bruce AG, Cleaveland JS. Differential expression and sequence-specific interaction of karyopherin α with nuclear localization sequences. *J Biol Chem* [Internet]. 1997;272(7):4310–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.272.7.4310>
59. Fischer U, Huber J, Boelens WC, Mattajt LW, Lührmann R. The HIV-1 Rev Activation Domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs. *Cell*. 1995;82(3):475–83.
60. Wen W, Meinkoth JL, Tsien RY, Taylor SS. Identification of a signal for rapid export of proteins from the nucleus. *Cell*. 1995;82(3):463–73.
61. La Cour T, Kierner L, Mølgaard A, Gupta R, Skriver K, Brunak S. Analysis and

- prediction of leucine-rich nuclear export signals. *Protein Eng Des Sel*. 2004;17(6):527–36.
62. Kutay U, Güttinger S. Leucine-rich nuclear-export signals: Born to be weak. *Trends Cell Biol*. 2005;15(3):121–4.
 63. Henderson BR, Eleftheriou A. A comparison of the activity, sequence specificity, and CRM1-dependence of different nuclear export signals. *Exp Cell Res*. 2000;256(1):213–24.
 64. Bogerd HP, Fridell RA, Benson RE, Hua J, Cullen BR. Protein Sequence Requirements for Function of the Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Rex Nuclear Export Signal Delineated by a Novel In Vivo Randomization-Selection Assay. *Mol Cell Biol*. 1996;16(8):4207–14.
 65. Engelsma D, Bernad R, Calafat J, Fornerod M. Supraphysiological nuclear export signals bind CRM1 independently of RanGTP and arrest at Nup358. *EMBO J*. 2004;23(18):3643–52.
 66. Fukuda M, Asano S, Nakamura T, Adachi M, Yoshida M, Yanagida M, et al. CRM1 is responsible for intracellular transport mediated by the nuclear export signal. *Nature*. 1997;390(6657):308–11.
 67. Neville M, Stutz F, Lee L, Davis LI, Rosbash M. The importin-beta family member Crm1 p bridges the interaction between Rev and the nuclear pore complex during nuclear export. *Curr Biol*. 1997;7(10):767–75.
 68. Ossareh-Nazari Ba, Bachelerie F, Dargemont C. Evidence for a Role of CRM1 in Signal-Mediated Nuclear Protein Export. *Science* (80-) [Internet]. 1997;278:141–4. Available from: www.sciencemag.org
 69. Fornerod M, Ohno M, Yoshida M, Mattaj IW. CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell*. 1997;90(6):1051–60.
 70. Richards SA, Carey KL, Macara IG. Requirement of guanosine triphosphate-bound ran for signal-mediated nuclear protein export. *Science* (80-). 1997;276(5320):1842–4.
 71. Stade K, Ford CS, Guthrie C, Weis K. Exportin 1 (Crm1p) is an essential nuclear export factor. *Cell*. 1997;90(6):1041–50.
 72. Kikuchi A. Regulation of β -catenin signaling in the Wnt pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;268(2):243–8.
 73. Naim B, Zbaida D, Dagan S, Kapon R, Reich Z. Cargo surface hydrophobicity is sufficient to overcome the nuclear pore complex selectivity barrier. *EMBO J* [Internet]. 2009;28(18):2697–705. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2009.225>
 74. Cutler AA, Jackson JB, Corbett AH, Pavlath GK. Non-equivalence of nuclear import among nuclei in multinucleated skeletal muscle cells. *J Cell Sci*. 2018;131(3):jcs207670.
 75. Hesse M, Magin TM, Weber K. Genes for intermediate filament proteins and the draft sequence of the human genome: Novel keratin genes and a suprisingly high number of pseudogenes related to keratin genes 8 and 18. *J Cell Sci*.

- 2001;114(14):2569–75.
76. Rogers MA, Winter H, Langbein L, Bleiler R, Schweizer J. The human type I keratin gene family: Characterization of new hair follicle specific members and evaluation of the chromosome 17q21.2 gene domain. *Differentiation*. 2004;72(9–10):527–40.
 77. Rogers MA, Edler L, Winter H, Langbein L, Beckmann I, Schweizer J. Characterization of new members of the human type II keratin gene family and a general evaluation of the keratin gene domain on chromosome 12q13.13. *J Invest Dermatol*. 2005;124(3):536–44.
 78. Oshima RG. Intermediate filaments: A historical perspective. *Exp Cell Res*. 2007;313(10):1981–94.
 79. Brunet S, Sardon T, Zimmerman T, Wittmann T, Pepperkok R, Karsenti E, et al. Characterization of the TPX2 Domains Involved in Microtubule Nucleation and Spindle Assembly in *Xenopus* nucleation around chromatin and functions in a network of other molecules , some of which also are regulated by. *Mol Biol Cell*. 2004;15(December):5318–28.
 80. Toivola DM, Tao GZ, Habtezion A, Liao J, Omary MB. Cellular integrity plus: Organelle-related and protein-targeting functions of intermediate filaments. *Trends Cell Biol*. 2005;15(11):608–17.
 81. Szeverenyi I, Cassidy AJ, Cheuk WC, Lee BTK, Common JEA, Ogg SC, et al. The human intermediate filament database: Comprehensive information on a gene family involved in many human diseases. *Hum Mutat*. 2008;29(3):351–60.
 82. Smolina N. Role of intermediate filament desmin in development of desmin-related myopathy. Karolinska Institutet; 2015.
 83. Goldman RD, Cleland MM, Murthy P, Mahammad S, Kuczmarski ER. Inroads into the Structure and Function of Intermediate Filament Networks Robert. *J Struct Biol*. 2012;177(1):14–23.
 84. Eriksson JE, He T, Trejo-Skalli A V., Härmälä-Braskén AS, Hellman J, Chou YH, et al. Specific in vivo phosphorylation sites determine the assembly dynamics of vimentin intermediate filaments. *J Cell Sci*. 2004;117(6):919–32.
 85. Tang DD. Intermediate Filaments in Smooth Muscle. *Am J Cell Physiol*. 2008;294(4):869–78.
 86. Sejersen T, Lendahl U. Transient expression of the intermediate filament nestin during skeletal muscle development. *J Cell Sci*. 1993;106(4):1291–300.
 87. Capetanaki YG, Ngai J, Lazarides E. Characterization and regulation in the expression of a gene coding for the intermediate filament protein desmin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984;81(22 I):6909–13.
 88. Carlsson L, Li ZL, Paulin D, Price MG, Breckler J, Robson RM, et al. Differences in the distribution of synemin, paranemin, and plectin in skeletal muscles of wild-type and desmin knock-out mice. *Histochem Cell Biol*. 2000;114(1):39–47.

89. Gard DL, Lazarides E. The synthesis and distribution of desmin and vimentin during myogenesis in vitro. *Cell*. 1980;19(1):263–75.
90. Herrmann H, Fouquet B, Franke WW. Expression of intermediate filament proteins during development of *Xenopus laevis*. *Development*. 1989;105(2):299–307.
91. Kaufman SJ, Foster RF. Replicating myoblasts express a muscle-specific phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85(24):9606–10.
92. Van der Ven PFM, Schaart G, Croes HJE, Jap PHK, Ginsel LA, Ramaekers FCS. Titin aggregates associated with intermediate filaments align along stress fiber-like structures during human skeletal muscle cell differentiation. *J Cell Sci*. 1993;106(3):749–59.
93. Li H, Choudhary SK, Milner DJ, Munir MI, Kuisk IR, Capetanaki Y. Inhibition of desmin expression blocks myoblast fusion and interferes with the myogenic regulators myoD and myogenin. *J Cell Biol*. 1994;124(5):827–41.
94. Allen RE, Rankin LL, Greene EA, Boxhorn LK, Johnson SE, Taylor RG, et al. Desmin is present in proliferating rat muscle satellite cells but not in bovine muscle satellite cells. *J Cell Physiol*. 1991;149(3):525–35.
95. Krupkova O, Loja T, Redova M, Neradil J, Zitterbart K, Sterba J, et al. Analysis of nuclear nestin localization in cell lines derived from neurogenic tumors. *Tumor Biol*. 2011;32:631–9.
96. Luderus MEE, De Graaf A, Mattia E, Grande MA, de Jong L, van Driel R. Binding of Matrix Attachment Regions to Lamin B1. *Cell*. 1992;70(18):949–59.
97. Ludérus MEE, Den Blaauwen JL, De Smit OJB, Compton DA, Van Driel R. Binding of matrix attachment regions to lamin polymers involves single-stranded regions and the minor groove. *Mol Cell Biol*. 1994;14(9):6297–305.
98. Heessen S, Fornerod M. The inner nuclear envelope as a transcription factor resting place. *EMBO Rep*. 2007;8(10).
99. Osmanagic-Myers S, Dechat T, Foisner R. Lamins at the crossroads of mechanosignaling. *Genes Dev*. 2015;225–37.
100. Çetin N, Balci-Hayta B, Gundesli H, Korkusuz P, Purali N, Talim B, et al. A novel desmin mutation leading to autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy: Distinct histopathological outcomes compared with desminopathies. *J Med Genet*. 2013;50:437–43.
101. Kural E. Desmin ve Lamin B Etkileşimin Zebra Balığında Araştırılması. Hacettepe University; 2017.
102. Thomas PD, Ebert D, Muruganujan A, Mushayahama T, Albou LP, Mi H. PANTHER: Making genome-scale phylogenetics accessible to all. *Protein Sci*. 2022;31(1):8–22.
103. Mi H, Muruganujan A, Huang X, Ebert D, Mills C, Guo X, et al. Protocol Update for large-scale genome and gene function analysis with the PANTHER classification system (v.14.0). *Nat Protoc*. 2019;14(3):703–21.

104. Thomas PD, Campbell MJ, Kejariwal A, Mi H, Karlak B, Daverman R, et al. PANTHER: A library of protein families and subfamilies indexed by function. *Genome Res.* 2003;13(9):2129–41.
105. Kuleshov M V., Jones MR, Rouillard AD, Fernandez NF, Duan Q, Wang Z, et al. Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(1):W90–7.
106. Chen EY, Tan CM, Kou Y, Duan Q, Wang Z, Meirelles G V., et al. Enrichr: Interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. *BMC Bioinformatics.* 2013;14.
107. Xie Z, Bailey A, Kuleshov M V., Clarke DJB, Evangelista JE, Jenkins SL, et al. Gene Set Knowledge Discovery with Enrichr. *Curr Protoc.* 2021;1(3):1–51.
108. Oughtred R, Rust J, Chang C, Breitkreutz BJ, Stark C, Willems A, et al. The BioGRID database: A comprehensive biomedical resource of curated protein, genetic, and chemical interactions. *Protein Sci.* 2021;30(1):187–200.
109. Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, Junge A, Wyder S, Huerta-Cepas J, et al. STRING v11: Protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res.* 2018;47:D607–13.
110. Kosugi S, Hasebe M, Tomita M, Yanagawa H. Systematic identification of cell cycle-dependent yeast nucleocytoplasmic shuttling proteins by prediction of composite motifs. *PNAS* [Internet]. 2009;106(25):1–6. Available from: [papers2://publication/uuid/E23E550B-DBA1-4C46-AE6D-01589C17DEF9](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19250000/)
111. Kosugi S, Hasebe M, Matsumura N, Takashima H, Miyamoto-Sato E, Tomita M, et al. Six classes of nuclear localization signals specific to different binding grooves of importin α . *J Biol Chem.* 2009;284(1):478–85.
112. Kosugi S, Hasebe M, Entani T, Takayama S, Tomita M, Yanagawa H. Design of Peptide Inhibitors for the Importin α/β Nuclear Import Pathway by Activity-Based Profiling. *Chem Biol.* 2008;15(9):940–9.
113. Weber K, Geisler N. Intermediate Filaments: Structural Conservation and Divergence. *Ann N Y Acad Sci.* 1985;455:126–43.
114. Kyte J, Doolittle RF. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol.* 1982;157(1):105–32.
115. Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, et al. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In: Walker JM, editor. *The Proteomics Protocols Handbook*. Humana Press Inc.; 2005. p. 571–607.
116. Abraham DJ, Leo AJ. Extension of the fragment method to calculate amino acid zwitterion and side chain partition coefficients. *Proteins Struct Funct Bioinforma.* 1987;2(2):130–52.
117. Clemen CS, Kley RA, Schröder R, Vicart P, Goudeau B, Vorgerd M, et al. Pathogenic effects of a novel heterozygous R350P desmin mutation on the assembly of desmin intermediate filaments in vivo and in vitro. *Hum Mol Genet.* 2005;14(10):1251–60.

118. Lowe M, Jacob Lage, Paatela E, Munson D, Hostager R, Yuan C, et al. Cry2 Is Critical for Circadian Regulation of Myogenic Differentiation by Bclaf1-Mediated mRNA Stabilization of Cyclin D1 and Tmem176b. *Cell Rep.* 2018;22(8):2118–32.
119. Dunn KW, Kamocka MM, McDonald JH. A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy. 2023;46202:723–42.
120. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods.* 2012;9(7):676–82.
121. Varadi M, Anyango S, Deshpande M, Nair S, Natassia C, Yordanova G, et al. AlphaFold Protein Structure Database: Massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic Acids Res.* 2022;50(D1):D439–44.
122. Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* [Internet]. 2021;596(7873):583–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
123. Phillips JC, Hardy DJ, Maia JDC, Stone JE, Ribeiro J V., Bernardi RC, et al. Scalable molecular dynamics on CPU and GPU architectures with NAMD. *J Chem Phys* [Internet]. 2020;153(4). Available from: <https://doi.org/10.1063/5.0014475>
124. Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD: Visual Molecular Dynamics. *J Mol Graph* [Internet]. 1996;14(October 1995):33–8. Available from: <https://www.tapbiosystems.com/tap/products/index.htm>
125. Turner PJ. XMGRACE, Version 5.1.19. Center for Coastal and Land-Margin Research, Oregon Graduate Institute of Science and Technology, Beaverton. Version 5.1.19. 2005. p. 2005.
126. Robin T, Capes-Davis A, Bairoch A. CLASTR: The Cellosaurus STR similarity search tool - A precious help for cell line authentication. *Int J Cancer.* 2020;146(5):1299–306.
127. Bairoch A. Cellosaurus micro-review 1: cellonauts, spacefaring cell lines. *OSF Prepr.* 2019;1–13.
128. Bairoch A. The cellosaurus, a cell-line knowledge resource. *J Biomol Tech.* 2018;29(2):25–38.
129. Schultheiss T, Lin Z, Ishikawa H, Zamir I, Stoeckert CJ, Holtzer H. Desmin/vimentin intermediate filaments are dispensable for many aspects of myogenesis. *J Cell Biol.* 1991;114(5):953–66.
130. Pearson K. Mathematical contributions to the theory of evolution-III. Regression, heredity and panmixia. *Philos Trans R Soc London.* 1896;187:253–318.
131. Wagstaff KM, Rawlinson SM, Hearps AC, Jans DA. An AlphaScreen®-based assay for high-throughput screening for specific inhibitors of nuclear import. *J Biomol Screen.* 2011;16(2):192–200.

132. Degregori J, Leone G, Miron A, Jakoi L, Nevins JR. Distinct roles for E2F proteins in cell growth control and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(14):7245–50.
133. Majewski L, Nowak J, Sobczak M, Karatsai O, Havrylov S, Lenartowski R, et al. Myosin VI in the nucleus of neurosecretory PC12 cells: Stimulation-dependent nuclear translocation and interaction with nuclear proteins. *Nucleus*. 2018 Dec 31;9(1).
134. Fagotto F, Glück U, Gumbiner BM. Nuclear localization signal-independent and importin/karyopherin-independent nuclear import of β -catenin. *Curr Biol*. 1998;8:181–90.
135. Cardamone M, Puri NK. Spectrofluorimetric assessment of the surface hydrophobicity of proteins. *Biochem J*. 1992;282(2):589–93.
136. Themistou E, Singh I, Shang C, Balu-Iyer S V., Alexandridis P, Neelamegham S. Application of fluorescence spectroscopy to quantify shear-induced protein conformation change. *Biophys J* [Internet]. 2009;97(9):2567–76. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2009.08.023>
137. Müller AT, Gabernet G, Hiss JA, Schneider G. modLAMP: Python for antimicrobial peptides. *Bioinformatics*. 2017;33(17):2753–5.
138. Carugo O, Pongor S. A normalized root-mean-square distance for comparing protein three-dimensional structures. *Protein Sci*. 2001;10(7):1470–3.
139. Yoneda Y. How proteins are transported from cytoplasm to the nucleus. *J Biochem*. 1997;121(5):811–7.
140. Tagawa T, Kuroki T, Vogt PK, Chida K. The cell cycle-dependent nuclear import of v-Jun is regulated by phosphorylation of a serine adjacent to the nuclear localization signal. *J Cell Biol*. 1995;130(2):255–63.
141. Hennekes H, Peter M, Weber K, Nigg EA. Phosphorylation on protein kinase C sites inhibits nuclear import of lamin B2. *J Cell Biol*. 1993;120(6):1293–304.
142. Krek W, DeCaprio JA. Cell Synchronization. In: *Methods in Enzymology*. 1995. p. 114–24.
143. Bentzinger CF, Wang YX, Rudnicki MA. Building muscle: molecular regulation of myogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012;4(2).
144. Hall MN, Corbett AH, Pavlath GK. Regulation of Nucleocytoplasmic Transport in Skeletal Muscle. *Curr Top Dev Biol*. 2015;
145. Lu J, Wu T, Zhang B, Liu S, Song W, Qiao J, et al. Types of nuclear localization signals and mechanisms of protein import into the nucleus. *Cell Commun Signal* [Internet]. 2021;19(60):1–10. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12964-021-00741-y>
146. Krauer K, Buck M, Flanagan J, Belzer D, Sculley T. Identification of the nuclear localization signals within the Epstein-Barr virus EBNA-6 protein. *J Gen Virol*. 2004;85(1):165–72.
147. Do HJ, Song H, Yang HM, Kim DK, Kim NH, Kim JH, et al. Identification of multiple nuclear localization signals in murine Elf3, an ETS transcription factor.

- FEBS Lett. 2006;580(7):1865–71.
148. Jones SM, Luo M, Peters-Golden M, Brock TG. Identification of two novel nuclear import sequences on the 5-lipoxygenase protein. *J Biol Chem* [Internet]. 2003;278(12):10257–63. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M211021200>
 149. Vandromme M, Cavadore JC, Bonniieu A, Froeschlé A, Lamb N, Fernandez A. Two nuclear localization signals present in the basic-helix 1 domains of MyoD promote its active nuclear translocation and can function independently. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(10):4646–50.
 150. Höllrigl A, Hofner M, Stary M, Weitzer G. Differentiation of cardiomyocytes requires functional serine residues within the amino-terminal domain of desmin. *Differentiation*. 2007;75:616–26.
 151. Mavroidis M, Panagopoulou P, Kostavasili I, Weisleder N, Capetanaki Y. A missense mutation in desmin tail domain linked to human dilated cardiomyopathy promotes cleavage of the head domain and abolishes its Z-disc localization. *FASEB J*. 2008;22(9):3318–27.
 152. Hnia K, Ramspacher C, Vermot J, Laporte J. Desmin in muscle and associated diseases: beyond the structural function. *Cell Tissue Res* [Internet]. 2015 Jun;360(3):591–608. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00441-014-2016-4>
 153. Fischer B, Dittmann S, Brodehl A, Unger A, Stallmeyer B, Paul M, et al. Functional characterization of novel alpha-helical rod domain desmin (DES) pathogenic variants associated with dilated cardiomyopathy, atrioventricular block and a risk for sudden cardiac death. *Int J Cardiol*. 2021;329:167–74.
 154. Geisler N, Weber K. Phosphorylation of desmin in vitro inhibits formation of intermediate filaments; identification of three kinase A sites in the aminoterminal head domain. *EMBO J*. 1988;7(1):15–20.
 155. Inagaki M, Gonda Y, Matsuyama M, Nishizawa K, Nishi Y, Sato C. Intermediate filament reconstitution in vitro. The role of phosphorylation on the assembly-disassembly of desmin. *J Biol Chem*. 1988;263(12):5970–8.
 156. Agnetti G, Herrmann H, Cohen S. New roles for desmin in the maintenance of muscle homeostasis. *FEBS J*. 2021;1–16.
 157. Hornbeck P V., Zhang B, Murray B, Kornhauser JM, Latham V, Skrzypek E. PhosphoSitePlus, 2014: Mutations, PTMs and recalibrations. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(Database Issue).
 158. Kural-Mangıt E, Boustanabadimaralan-Düz N, Dinçer P. A cytoplasmic escapee: desmin is going nuclear. *Turkish J Biol*. 2021;45:711–9.
 159. Wagstaff KM, Sivakumaran H, Heaton SM, Harrich D, Jans DA. Ivermectin is a specific inhibitor of importin α/β -mediated nuclear import able to inhibit replication of HIV-1 and dengue virus. *Biochem J*. 2012;443(3):851–6.
 160. Lee Y, Pei J, Baumhardt JM, Chook YM, Grishin N V. Structural prerequisites for CRM1-dependent nuclear export signaling peptides: accessibility, adapting conformation, and the stability at the binding site. *Sci Rep* [Internet].

- 2019;9(1):1–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-43004-0>
161. Wing CE, Fung HYJ, Chook YM. Karyopherin-mediated nucleocytoplasmic transport. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2022;23(5):307–28.
 162. Escobar-Hoyos LF, Shah R, Roa-Peña L, Vanner EA, Najafian N, Banach A, et al. Keratin-17 promotes p27KIP1 nuclear export and degradation and offers potential prognostic utility. *Cancer Res*. 2015;75(17):3650–62.
 163. Kim S, Wong P, Coulombe PA. A keratin cytoskeletal protein regulates protein synthesis and epithelial cell growth. *Nature*. 2006;441(7091):362–5.
 164. Chung BM, Arutyunov A, Ilagan E, Yao N, Wills-Karp M, Coulombe PA. Regulation of C-X-C chemokine gene expression by keratin 17 and hnRNP K in skin tumor keratinocytes. *J Cell Biol*. 2015;208(5):613–27.
 165. Hobbs RP, Depianto DJ, Jacob JT, Han MC, Chung BM, Batazzi AS, et al. Keratin-dependent regulation of Aire and gene expression in skin tumor keratinocytes. *Nat Genet*. 2015;47(8):933–8.
 166. Bernad R, Engelsma D, Sanderson H, Pickersgill H, Fornerod M. Nup214-Nup88 nucleoporin subcomplex is required for CRM1-mediated 60 S preribosomal nuclear export. *J Biol Chem* [Internet]. 2006;281(28):19378–86. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M512585200>
 167. Wiechens N, Fagotto F. CRM1- and Ran-independent nuclear export of Beta-catenin. *Curr Biol*. 2001;11(1):18–28.
 168. Capetanaki Y, Papathanasiou S, Diokmetzidou A, Vatsellas G, Tsikitis M. Desmin related disease: A matter of cell survival failure. *Curr Opin Cell Biol* [Internet]. 2015;32(Dcm):113–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceb.2015.01.004>
 169. Langer HT, Mossakowski AA, Willis BJ, Grimsrud KN, Wood JA, Lloyd KCK, et al. Generation of desminopathy in rats using CRISPR-Cas9. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2020;11(5):1364–76.
 170. Hong D, Wang Z, Zhang W, Xi J, Lu J, Luan X, et al. A series of Chinese patients with desminopathy associated with six novel and one reported mutations in the desmin gene. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2011;37(3):257–70.
 171. Kreplak L, Bär H. Severe myopathy mutations modify the nanomechanics of desmin intermediate filaments. *J Mol Biol* [Internet]. 2009;385(4):1043–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2008.10.095>
 172. Ma Y, Peng J, Liu W, Zhang P, Huang L, Gao B, et al. Proteomics identification of desmin as a potential oncofetal diagnostic and prognostic biomarker in colorectal cancer. *Mol Cell Proteomics* [Internet]. 2009;8(8):1878–90. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/mcp.M800541-MCP200>

8. EKLER

EK-1: Tez Çalışması Orijinallik Raporu



Digital Receipt

This receipt acknowledges that Turnitin received your paper. Below you will find the receipt information regarding your submission.

The first page of your submissions is displayed below.

Submission author: Ecem Kural Mangit
 Assignment title: Ecem Kural Mangit_Doktora Tez
 Submission title: Desminin çekirdeğe tasinininin potansiyel mekanizmalarini...
 File name: Ecem_Kural_Mang_t_Doktora_Tez.docx
 File size: 24.78M
 Page count: 114
 Word count: 21,858
 Character count: 151,018
 Submission date: 21-Feb-2024 03:00PM (UTC+0300)
 Submission ID: 2300501831



DESMİNİN ÇEKİRDEĞE TAŞINIMININ POTANSİYEL
MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI
ECEM KURAL MANGİT
114 SAYFA

Desminin çekirdeğe tasnımının potansiyel mekanizmalarının araştırılması

ORIGINALITY REPORT

12%	11%	5%	5%
SIMILARITY INDEX	INTERNET SOURCES	PUBLICATIONS	STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1	Submitted to Hacettepe University Student Paper	3%
2	acikbilim.yok.gov.tr Internet Source	1%
3	avesis.hacettepe.edu.tr Internet Source	1%
4	openaccess.hacettepe.edu.tr Internet Source	1%
5	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 Internet Source	1%
6	openaccess.ogu.edu.tr:8080 Internet Source	1%
7	openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 Internet Source	<1%
8	huzf.hacettepe.edu.tr Internet Source	<1%
9	adudspace.adu.edu.tr:8080 Internet Source	<1%

9. ÖZGEÇMİŞ

Ecem KURAL MANGIT, MSc



