

**T.C.  
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ssDNA ve TIMELESS-TİPİN KOMPLEKSİ İLE ATR-DNA  
HASAR KONTROLÜ**

**Hazırlayan  
Seçil YILMAZ**

**Danışmanlar  
Prof. Dr. Halit CANATAN  
Prof. Dr. Hamiyet DÖNMEZ ALTUNTAŞ**

**Doktora Tezi**

**Temmuz 2012  
KAYSERİ**

**T.C.  
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ssDNA ve TIMELESS-TİPİN KOMPLEKSİ İLE ATR-DNA  
HASAR KONTROLÜ**

**Hazırlayan  
Seçil YILMAZ**

**Danışmanlar  
Prof. Dr. Halit CANATAN  
Prof. Dr. Hamiyet DÖNMEZ ALTUNTAŞ**

**Doktora Tezi**

**Temmuz 2012  
KAYSERİ**

## **BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK**

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

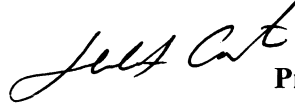
**Adı-Soyadı: Seçil YILMAZ**

**İmza:**

**YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI**

**“ssDNA ve Timeless-Tipin Kompleksi İle ATR-DNA Hasar Kontrolü”** adlı **Doktora Tezi**, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

**Tezi Hazırlayan**  
**Seçil YILMAZ**



**Danışmanlar**  
**Prof. Dr. Halit CANATAN**

**Prof. Dr. Hamiyet DÖNMEZ ALTUNTAŞ**



**Anabilim Dalı Başkanı**  
**Prof. Dr. Hamiyet DÖNMEZ ALTUNTAŞ**



**Prof. Dr. Halit CANATAN ve Prof .Dr. Hamiyet DÖNMEZ ALTUNTAŞ** danışmanlığında **Seçil YILMAZ** tarafından hazırlanan “**ssDNA ve Timeless-Tipin Kompleksi İle ATR-DNA Hasar Kontrolü**” konulu bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü **Tıbbi Biyoloji** Anabilim Dalında **Doktora** tezi olarak kabul edilmiştir.

18/07/2012

**JÜRİ****İmza**

Danışman (I) : Prof.Dr.Halit CANATAN (Tıbbi Biyoloji AD)



Danışman (II) : Hamiyet DÖNMEZ ALTUNTAŞ (Tıbbi Biyoloji AD)



Üye : Prof.Dr.Salih ŞANLIOĞLU (Akdeniz Ün.Tıbbi Biyoloji AD)



Üye : Prof.Dr.Saim ÖZDAMAR (Histoloji-Embriyoloji AD)



Üye : Prof.Dr.Yusuf ÖZKUL (Tıbbi Genetik AD)

**ONAY**

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun .....tarih ve.....sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../.....

**Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR**  
Enstitü Müdürü

## TEŞEKKÜR

Akademik hayatımın her döneminde bana inan ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, tez çalışmam sürecinde Amerikada beni yalnız bırakmayan eşim Görkem YILMAZ'a ve aileme en derin duygularıyla tesekkür ederim. Doktora tez çalışmamda bana her türlü desteği ve imkanı sunan sayın rektörümüz Prof. Dr. Fahrettin KELEŞTEMUR'a teşekkürü bir borç bilirim. Bana her zaman inanan ve akademik hayatın içinde olmama sebep olan, çok sevgili hocam Prof. Dr. Halil DEMİRTAŞ'a burdan minnetlerimi ve sevgilerimi sunarım. Amerikadaki çok değerli ve saygıdeğer hocam Prof.Dr. Aziz SANCAR'a beni her zaman onure ettiği ve inandığı için burdan sevgi ve saygılarımla sonsuz kere teşekkür ederim. İki yıl boyunca laboratuvarında beni hiç yalnız bırakmayan ve tez projemi oluşturan öğretmenim Dr. Michael George KEMP'e çok teşekkür ederim. Bölüm başkanımız ve danışmanım Prof.Dr. Hamiyet DÖNMEZ ALTUNTAŞ, Prof. Dr. Halit CANATAN'a ve Tıbbi Biyoloji anabilim dalındaki bütün hocalarıma destekleri için teşekkür ederim.

Seçil YILMAZ

# ssDNA ve TIMELESS-TİPİN KOMPLEKSİ İLE ATR-DNA HASAR KONTROLÜ

Seçil YILMAZ

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Doktora Tezi Temmuz 2012

Danışmanlar: Prof. Dr. Halit CANATAN

Prof. Dr. Hamiyet DÖNMEZ-ALTUNTAŞ

## KISA ÖZET

İnsan hücrelerinde genomik DNA; sürekli olarak, DNA hasar kontrol noktasındaki sinyal yollarını aktive eden ve DNA hasarına neden olan içsel ve dışsal ajanların baskısı altındadır. DNA hasar kontrol noktaları, DNA onarımı ve DNA replikasyonun tamamlanması için yeterli zamanı tanımak üzere hücre siklus progresyonunu durdurarak veya geciktirerek DNA yapısındaki değişiklikleri yanıtlayan ve tanıyan; hücrel sinyal iletim yolları tarafından kontrol edilir. Memeli Timeless`ının biyolojik saat, DNA replikasyonu ve DNA hasarı kontrol noktaları da dahil olmak üzere birden fazla rolde oynadığı bildirilmektedir. İnsan Timeless`ı Tipin (Timeless ile etkileşime giren) olarak adlandırılan daha küçük bir protein ile kompleks bir yapı oluşturmaktadır. Timeless-Tipin kompleksi insan hücrelerinde ATR-bağımlı DNA replikasyonu kontrol noktasında bir araçtır. DNA hasar cevabı sırasında ATR'nin Chk1 ile nasıl temas ettiğinin ve Chk1'i nasıl fosforile ettiğinin moleküler mekanizması açıkça tanımlanmamıştır. Bu çalışmanın ana amacı ATR→Chk1 DNA hasar kontrol yollarında Timeless-Tipin kompleksinin hangi mekanizma ile aracılık görevi yaptığını araştırmaktır. Bu çalışmada biz, DNA hasar ve replikasyon stresi cevabında Chk1'in ATR tarafından fosforilasyonun özellikle Timeless-Tipin kompleksi ile iletildiğini gösterdik. Bu, hem Timeless-Tipin kompleksini hem de Claspin'ni RPA kaplı ssDNA üzerinde stabilize eden, Tipin ve RPA'nın 34-kDa'luk alt birimi (RPA2) arasındaki etkileşimi ile gerçekleşmektedir. Bu yolaktaki inhibitörlerin hücre döngüsü kontrol noktasındaki fonksiyonunun yok edilmesi ile kanser hücrelerinin kemoterapötik ajanlara karşı duyarlı hale gelmesi beklenir. Bu teoriye dayanarak, bugünlerde geleneksel kemoterapötikler ile kombinasyon tedavilerinin kullanımı için Chk1 kinaz aktivitesini inhibe etme kapasitesi ile küçük moleküller geliştirilmektedir. Kanser tedavisinde ATR→Chk1 sinyal yolağı potansiyel bir hedef olduğu için Tipin-RPA etkileşim bölgesinin önemli bir faktör olduğu ileri sürülmektedir. Mevcut bulgular RPA ile Tipin etkileşimini engelleyen bir peptid inhibitörünün veya kimyasal bileşiğin, kanser hücrelerini DNA hasar-indükleyici kemoterapik ilaçlara karşı duyarlı hale getirmek için potansiyel olarak yararlı olabileceğini desteklemektedir.

**Anahtar kelimeler:** Timeless-Tipin, DNA Hasar Kontrol Noktası, ATR

**CONTROL OF THE ATR-DNA DAMAGE RESPONSE BY ssDNA AND THE  
TIMELESS-TIPIN COMPLEX**

**Seçil YILMAZ**

**Erciyes University, Graduate School of Health Sciences**

**Department of Medical Biology**

**Ph.D. Thesis, July 2012**

**Supervisors: Prof.Dr.Halit CANATAN**

**Prof.Dr.Hamiet DÖNMEZ-ALTUNTAŞ**

**ABSTRACT**

Genomic DNA is constantly under stress of endogenous and exogenous DNA damaging agents activating DNA damage checkpoint signaling pathways in human cells. DNA damage checkpoints are controlled by cellular signal transduction pathways that recognize and respond to alterations in DNA structure by halting or delaying cell cycle progression to allow sufficient time for DNA repair and the completion of DNA replication. Mammalian Timeless has been implicated in multiple roles including the circadian clock, DNA replication, and DNA damage checkpoints. The human Timeless form a complex with a smaller protein called Tipin (Timeless interacting protein). Timeless-Tipin complex is a mediator of the ATR-dependent DNA replication checkpoint in human cells. Molecular mechanism of how ATR contacts and phosphorylates Chk1 during the DNA damage response is not well documented. The main aim of the present study was to investigate the mechanism by which the Timeless-Tipin complex functions as a mediator in the ATR→Chk1 DNA damage checkpoint pathway. In this study we demonstrate that Chk1 phosphorylation by ATR in response to DNA damage and replication stress is specifically mediated by the Timeless-Tipin complex. This is achieved by an interaction of Tipin with the 34-kDa subunit of RPA (RPA2) which stabilizes both the Timeless-Tipin complex and Claspin on RPA-coated ssDNA. Through abrogation of cell cycle checkpoint function, inhibitors of this pathway are expected to sensitize cancer cells to chemotherapeutic agents. Based on this theory, currently small molecules with capacity to inhibit Chk1 kinase activity for use in combination therapies with traditional chemotherapeutics are being developed. Tipin-RPA interaction site has been proposed to be a key factor because The ATR→Chk1 signaling pathway is a potential target for cancer therapy. Our current findings suggest that a peptide inhibitor or chemical compound that prevents the interaction of Tipin with RPA could be potentially useful to sensitize cancer cells to DNA damage-inducing chemotherapeutic drugs.

**Keywords:** Timeless-Tipin, DNA damage checkpoint, ATR

## İÇİNDEKİLER

|                                                                   | <u>Sayfa no</u> |
|-------------------------------------------------------------------|-----------------|
| İÇ KAPAK .....                                                    | I               |
| BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....                                      | II              |
| YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI.....                                     | III             |
| KABUL ONAY SAYFASI .....                                          | IV              |
| TEŞEKKÜR .....                                                    | V               |
| ÖZET .....                                                        | VI              |
| ABSTRACT .....                                                    | VII             |
| İÇİNDEKİLER.....                                                  | VIII            |
| KISALTMALAR.....                                                  | X               |
| TABLO, ŞEKİL ve GRAFİK LİSTESİ.....                               | XII             |
| 1. GİRİŞ VE AMAÇ.....                                             | 1               |
| 2. GENEL BİLGİLER .....                                           | 5               |
| 2.1. DNA HASARI ve YANITLARI .....                                | 5               |
| 2.2. DNA HASAR KONTROL NOKTALARI VE SİNYALLERİ .....              | 7               |
| 2.3. DNA HASAR KONTROL NOKTALARI .....                            | 8               |
| 2.4. DNA HASAR KONTROL NOKTALARININ MOLEKÜLER<br>BİLEŞENLERİ..... | 10              |
| 2.4.1. Sensörler .....                                            | 12              |
| 2.4.2. Aracılar .....                                             | 14              |
| 2.4.3. Sinyal İleticiler .....                                    | 15              |
| 2.4.4. Effektörler .....                                          | 15              |
| 2.5. G1/S KONTROL NOKTASI .....                                   | 16              |
| 2.6. S EVRESİ KONTROL NOKTASI.....                                | 18              |
| 2.7. G2/M KONTROL NOKTASI.....                                    | 19              |
| 2.8. REPLİKASYON KONTROL NOKTASI (S/M Kontrol Noktası).....       | 21              |
| 2.9. RPA (Replikasyon Protein A) .....                            | 22              |
| 2.10. TİMELESS .....                                              | 24              |
| 2.11. TİPİN.....                                                  | 25              |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM .....                                          | 29              |
| 3.1. ÇALIŞMANIN YAPILDIĞI YER .....                               | 29              |
| 3.2. GEREÇLER .....                                               | 29              |
| 3.3. YÖNTEMLER .....                                              | 34              |

|                                                                                                                                                                  |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.3.1. Hücre Hatlarının Ve Böcek Hücrelerinin Elde Edilmesi Ve Kültüre Edilmesi.....                                                                             | 34 |
| 3.3.2. Rekombinant Protein Üretimi İçin Yapılan Çalışmalar .....                                                                                                 | 35 |
| 3.3.2.1.Bakülovirüs/Böcek Hücre Sisteminde Rekombinant Protein Üretimi .....                                                                                     | 35 |
| 3.3.2.2. <i>E.coli</i> `den Rekombinant Protein Üretimi .....                                                                                                    | 36 |
| 3.4.SDS-PAGE UYGULAMALARI.....                                                                                                                                   | 37 |
| 3.5.ELEKTROFOREZ JELLERİNDEKİ BANTLARIN BELİRLENMESİ.....                                                                                                        | 38 |
| 3.6. WESTERN BLOTTİNG.....                                                                                                                                       | 38 |
| 3.7.TRANSFEKSİYON.....                                                                                                                                           | 41 |
| 3.7.1.Lipofektamin ile siRNA Transfeksiyonu .....                                                                                                                | 42 |
| 3.7.2. Kalsiyum Fosfat ile Transfeksiyon: .....                                                                                                                  | 42 |
| 3.7.3.Tipin ve Timeless`ın DNA Hasarında ve Replikasyon Stresinde Chk1`nın Fosforilasyonundaki Görevinin İncelenmesi için Yapılan Transfeksiyon Çalışmaları..... | 42 |
| 3.7.4.Tipin ve Timeless`ın Ekspresyonun ve Nükleer Lokalizasyonun Belirlenmesi için Yapılan Transfeksiyon Çalışmaları.....                                       | 43 |
| 3.7.5.“Tetrasiklin”le İndüklenen Promotor Kontrolü Altında WTL/195A Tipin ve Timeless İnteraksiyonun İncelenmesi için Yapılan Transfeksiyon Çalışmaları .....    | 43 |
| 3.7.6. Tipin (WT-L195A) ve Timeless ile siRNA ko-transfeksiyon Çalışmaları.....                                                                                  | 43 |
| 3.7.7. Neocarzinostatin (NCS)`in Chk1 Fosforilasyonuna Etkisinin Tipin (WT-L195A) ve Timeless ile siRNA ko-transfeksiyonu ile Araştırılması :.....               | 43 |
| 3.7.8. Flp-In™ T-REx™-293/FLAG-Tipin-L195A Hücre Hattında Chk1 Fosforilasyonun siRNA-Tipin ile İncelenmesi: .....                                                | 44 |
| 3.7.9. Claspin Kinetiğinin Flp-In™ T-REx™-293/FLAG-Tipin-L195A Hücre Hattında siRNA-Tipin ile İncelenmesi: .....                                                 | 44 |
| 3.8.TRANSFORMASYON .....                                                                                                                                         | 44 |
| 3.9.DNA PULL-DOWN TESTİ REAKSİYONLARI .....                                                                                                                      | 45 |
| 3.9.1. Timeless,Tipin ve Claspin Proteinlerinin RPA ve ssDNA ile İnteraksiyonun Karakterize Edilmesi için yapılan Pull-Down Assay Çalışmalar .....               | 47 |
| 3.9.2. Rekombinant Tipin`in RPA ve aRPA kaplı ssDNA`ya Bağlanmasının incelenmesi için Yapılan Pull-Down Assay Çalışmalar .....                                   | 47 |
| 3.9.3. Rekombinant Claspin`in ssDNA`ya Bağlanmasında RPA ve Tipin`nin Etkisinin incelenmesi için Yapılan Pull-Down Assay Çalışmalar .....                        | 47 |

|                                                                                                                                                                               |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.9.4. Claspin'in RPA kaplı ssDNA'ya Bağlanması Tipin-WT ve Tipin-L195A'nın Etkisinin incelenmesi için Yapılan Pull-Down Assay                                                |    |
| Çalışmalar .....                                                                                                                                                              | 47 |
| 3.10. İMMÜNOPRESİPİTASYON .....                                                                                                                                               | 48 |
| 3.10.1. Tipin'in RPA ve aRPA ile Olan İnteraksiyonun İncelenmesi için Yapılan İmmünopresipitasyon Çalışmaları: .....                                                          | 48 |
| 3.10.2. Tipin'in Claspin ile Olan İnteraksiyonun İncelenmesi için Yapılan İmmünopresipitasyon Çalışmaları:.....                                                               | 48 |
| 3.10.3. Mutant Form Tipinlerin (E185A, E190A ve L195A) ve WT-Tipin'in RPA ile olan İnteraksiyonun İncelenmesi için Yapılan İmmünopresipitasyon Çalışmaları:.....              | 49 |
| 3.10.4. Tipin-WT ve Tipin-L195A formlarının RPA ile olan İnteraksiyonun Böcek Hücrelerinde İncelenmesi için Yapılan İmmünopresipitasyon Çalışmaları:.....                     | 49 |
| 3.10.5. Timeless ve Tipin kompleksindeki WT ve L195A Tipin formlarının RPA kaplı ssDNA ile olan İnteraksiyonun İncelenmesi için Yapılan İmmünopresipitasyon Çalışmaları:..... | 49 |
| 3.10.6. WT ve L195A Tipin formlarının Claspin ile olan İnteraksiyonun İncelenmesi için Yapılan İmmünopresipitasyon Çalışmaları .....                                          | 49 |
| 3.11. ÇALIŞMADA KULLANILAN ÇÖZELTİ VE TAMPONLAR .....                                                                                                                         | 50 |
| 4. BULGULAR .....                                                                                                                                                             | 53 |
| 4.1. REKOMBİNANT PROTEİNLERİN BAKÜLOVİRÜSLE İNFEKTE EDİLMİŞ BÖCEK HÜCRELERİNDEN VE <i>E.coli</i> 'DEN SAFLAŞTIRILARAK, COOMASSİE-BLUE BOYASI İLE KARAKTERİZE EDİLMESİ.....    | 53 |
| 4.2. TİMELESS/TİPİN KOMPLEKSİNİN DNA'YA BAĞLANMASINDA RPA GÖREV YAPMAKTADIR.....                                                                                              | 54 |
| 4.3. DNA HASARINDA VE REPLİKASYON STRESİNDE OLUŞAN Chk1 FOSFORİLASYONUNDA TİMELESS VE TİPİN PROTEİNLERİ SPESİFİK OLARAK GÖREV YAPMAKTADIR .....                               | 55 |
| 4.4. RPA VE aRPA, ssDNA'YA BENZER AFFİNİTE İLE BAĞLANMAKTADIR ..                                                                                                              | 57 |
| 4.5. TİPİN, TİMELESS OLMADAN DA RPA KAPLI ssDNA'YA BAĞLANMA KAPASİTESİNE SAHİPTİR .....                                                                                       | 58 |
| 4.6. TİPİN VE ssDNA BAĞLANMASINDA aRPA, RPA GİBİ GÖREV YAPMAMAKTADIR .....                                                                                                    | 58 |
| 4.7. RPA'NIN TİPİN İLE KARARLI YAPI OLUŞTURMASINDA RPA2 ALTBİRİMİ PRİMER GÖREV YAPMAKTADIR .....                                                                              | 58 |
| 4.8. TİPİN, HİS-FLAG-CLASPİNE DOĞRUDAN BAĞLANMAKTADIR VE TİMELESS, TİPİN-CLASPİN BAĞLANMASI İÇİN GEREKLİ DEĞİLDİR.....                                                        | 59 |
| 4.9. CLASPİN ssDNA'YA ZAYIF BİR ŞEKİLDE BAĞLANMAKTADIR .....                                                                                                                  | 60 |

|                                                                                                                                                                                                                                       |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.10. ssDNA, RPA İLE KAPLANDIĞI ZAMAN CLASPİN DNA'YA BAĞLANAMAMAKTADIR .....                                                                                                                                                          | 61 |
| 4.11. CLASPİN'İN RPA KAPLI ssDNA'YA BAĞLANABİLMESİ İÇİN TİPİN GEREKLİDİR.....                                                                                                                                                         | 61 |
| 4.11. TİPİN İLE NÜKLEOTİD EKZİSYON TAMİR PROTEİNİ OLAN XPA PROTEİNLERİNİN AMİNOASİT SEKANS LARI ÖNEMLİ ÖLÇÜDE BENZERLİK GÖSTERMEKTEDİR.....                                                                                           | 61 |
| 4.12. HEK293T HÜCRELERİNDEN EKSPRESE EDİLEN TİPİN- E185A VE E190A MUTANTLARI TİPİN VE RPA İNTERAKSİYONUNU ENGELLEMEZKEN, TİPİN-L195A MUTANTI TİPİN VE RPA İNTERAKSİYONUNU ENGELLEMEKTEDİR .....                                       | 62 |
| 4.13. BAKÜLOVİRÜSLE İNFEKTE EDİLEN BÖCEK HÜCRELERİNDEN ELDE EDİLEN TİPİN-L195A İLE RPA BAĞLANAMAMAKTADIR .....                                                                                                                        | 63 |
| 4.14. TİPİN-L195A İÇEREN TİMELESS-TİPİN KOMPLEKSİ, RPA KAPLI ssDNA'YA BAĞLANMA ÖZELLİĞİNE SAHİP DEĞİLDİR .....                                                                                                                        | 63 |
| 4.15. WT-TİPİN VE TİPİN-L195A MUTANTI HİS-FLAG-CLASPİN'E BENZER AFFİNİTE İLE BAĞLANMAKTA DİR .....                                                                                                                                    | 64 |
| 4.16. MUTANT TİPİN L195A, CLASPİN İLE RPA KAPLI ssDNA'NIN BİRLEŞMESİNDE GÖREV YAPAMAMAKTADIR. ....                                                                                                                                    | 65 |
| 4.17. TİPİN PROTEİNİN STABİLİTESİ VE TİMELESS İLE HETERODİMERİK YAPI OLUŞTURMASI, ORTAMDA YETERLİ MİKTARDA SERBEST TİMELESS BULUNMASINA BAĞLI OLABİLİR.....                                                                           | 66 |
| 4.18. ENDOJEN TİMELESS VE TİPİN PROTEİNLERİNİN HEK293T HÜCRELERİNDEKİ LOKALİZASYONU BELİRLENDİ .....                                                                                                                                  | 67 |
| 4.19. TİMELESS/TİPİN KOMPLEKSİNİN NÜKLEER LOKALİZASYONU VE KARARLI YAPI OLUŞTURMASI İÇİN TİPİN'İN TİMELESS İLE BİRLİKTE EKSPRESE EDİLMESİ GEREKMEKTEDİR. ....                                                                         | 68 |
| 4.20. TETRASİKLİNLE İNDÜKLENEBİLEN PROMOTOR KONTROLÜ ALTINDA, FLAG ETİKETLİ WT-TİPİN VE TİPİN-L195A EKSPRESE EDEN FLP-IN <sup>TM</sup> T-REX <sup>TM</sup> -293 HÜCRE HATLARI ELDE EDİLMİŞTİR.....                                    | 69 |
| 4.21. DNA HASARINDA VE REPLİKASYON STRESİNDE HELA HÜCRELERİNDE OLUŞAN CHK1 FOSFORİLASYONUNU TİPİN-L195A MUTANTI DESTEKLEYEMEMEKTEDİR. ....                                                                                            | 70 |
| 4.22. ÇOKLU GENOTOKSİK STRES DURUMUNDA DA RPA-TİPİN İNTERAKSİYONU, Chk1 FOSFORİLASYONU İÇİN ÖNEMLİDİR. ....                                                                                                                           | 72 |
| 4.23. siRNA DİRENÇLİ FLP-IN <sup>TM</sup> T-REX <sup>TM</sup> -293 –FLAG-TİPİN-L195A HÜCRE HATLARINDA siRNA-TİPİN TRANSFEKSİYONU İLE ENDOJEN TİPİN SEVİYESİ DÜŞÜRÜLDÜĞÜ ZAMAN CHK1 FOSFORİLASYONU ÖNEMLİ ÖLÇÜDE YOK OLMAKTA DİR ..... | 72 |
| 4.24. siRNA DİRENÇLİ FLP-IN <sup>TM</sup> T-REX <sup>TM</sup> -293 –FLAG-TİPİN-L195A HÜCRE HATLARINDA siRNA-TİPİN TRANSFEKSİYONU İLE ENDOJEN TİPİN SEVİYESİ DÜŞÜRÜLDÜĞÜ ZAMAN CHK1 FOSFORİLASYONU ÖNEMLİ ÖLÇÜDE YOK OLMAKTA DİR.....  | 74 |
| 4.25. CLASPİN KAYBI, CHK1 FOSFORİLASYONUNDAKİ AZALMANIN BİR SONUCU OLABİLİR .....                                                                                                                                                     | 75 |

|                           |    |
|---------------------------|----|
| 5. TARTIŞMA VE SONUÇ..... | 76 |
| 6. KAYNAKLAR .....        | 80 |
| ÖZGEÇMİŞ                  |    |

## KISALTMALAR

|               |                                                                                   |
|---------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| A-T           | Ataksi- Telanjektaziye (Ataxia-Telangiectesia)                                    |
| ATM           | Ataksi- Telanjektaziye mutant (Ataxia telangiectasia mutated)                     |
| ATR           | ATM ve Rad3 ilişkili (ATM- and rad3-related)                                      |
| ATRIP         | ATR ile etkileşen protein (ATR-interacting protein)                               |
| BRCA1         | Meme Kanseri 1 proteini (Breast cancer type 1 susceptibility protein)             |
| BSA           | Sığır serum albümini                                                              |
| CDK           | Siklin-bağımlı kinaz (Cyclin-dependent kinase)                                    |
| Cdc25         | Hücre bölünmesi döngüsü 25 (Cell division cycle 25)                               |
| Cdc45         | Hücre bölünmesi döngüsü 45 (Cell division cycle 45)                               |
| Chk1          | Kontrol noktası kinaz 1 (Checkpoint kinase 1)                                     |
| Chk2          | Kontrol noktası kinaz 2 (Checkpoint kinase 2)                                     |
| DNA           | Deoksiribonükleik asit                                                            |
| dsDNA         | Çift ipilikli DNA (double stranded DNA)                                           |
| DNA-PKcs      | DNA-bağımlı protein kinaz katalitik alt birim                                     |
| DPBS          | Dulbecco's Tuzlu fosfat tamponu (Dulbecco's phosphate buffered saline)            |
| <i>E.coli</i> | <i>Escherichia coli</i>                                                           |
| HEK293T       | İnsan embriyonik böbrek hücresi (Human Embryonic Kidney 293 cells)                |
| His           | Hexa histidin                                                                     |
| HU            | Hydroxyurea                                                                       |
| IB            | Immunoblotting                                                                    |
| IgG           | Immunoglobulin G                                                                  |
| IP            | İmmünopresipitasyon                                                               |
| IR            | İyonize Radyasyon                                                                 |
| kDa           | Kilodalton                                                                        |
| MCM           | Minikromozom İdame Proteinleri (Minichromosome maintenance )                      |
| MDC1          | DNA Hasar Kontrol Noktası Aracısı 1 (Mediator of DNA damage checkpoint protein 1) |
| MEK2          | Mitogen-activated protein kinase 2                                                |
| Mrc1          | Replikasyon Kontrol Noktası Aracısı (Mediator of replication checkpoint)          |
| MRN           | Mre11, Rad50 and Nbs1                                                             |
| NBS1          | Nijmegen Kırık Sendromu 1(Nijmegen Breakage Syndrome 1)                           |
| ORC2          | Orijin Tanıma Kompleksi (Origin Recognition Complex)                              |
| PCNA          | Çoğalan hücre nükleer antijeni (Proliferating cell nuclear antigen)               |
| PIKK          | Fosfoinosit 3-kinaz-benzeri kinaz (Phosphoinositide 3-kinase-like kinase)         |
| RNA           | Ribonükleik Asit                                                                  |

|          |                                                                 |
|----------|-----------------------------------------------------------------|
| RPA      | Replikasyon protein A                                           |
| RPC      | Replikasyon protein C                                           |
| pRb      | Protein Retinoblastoma                                          |
| PZR      | Polimeraz Zincir Reaksiyonu                                     |
| PS       | Penisilin Streptomisin                                          |
| Sf2      | <i>Spodoptera frugiperde</i> yumurta hücresi                    |
| ssDNA    | Tek iplikli DNA (single stranded DNA)                           |
| SDS      | Sodyum dodesil sülfat                                           |
| SDS-PAGE | Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi           |
| SMC1     | Kromatin Yapısal Bakım 1 (Structural Maintenance of Kromatin 1) |
| TBS      | Tris-buffered saline                                            |
| TFIIH    | Transkripsiyon faktörü IIH                                      |
| Tim      | Timeless                                                        |
| Tipin    | Timeless ile etkileşen protein (Timeless interacting protein)   |
| TopBP1   | Topoizomeraz Bağlanma Proteini (Topoizomeraz binding protein 1) |
| UV       | Ultraviyole                                                     |
| WB       | Western Blotting                                                |
| WT       | Wild Type (Yaban tip)                                           |
| XPA      | Xeroderma Pigmentosum A                                         |
| 9-1-1    | Rad9-Rad1-Hus1                                                  |
| µl       | Mikrolitre                                                      |
| µM       | Mikromolar                                                      |
| ml       | Mililitre                                                       |
| mM       | Millimolar                                                      |

## TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ

|                                                                                                                                                                           | <u>Sayfa No</u> |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| <b>Tablo 3.1.</b> Deneylerde kullanılan antikorlar ve temin edildikleri yerler. ....                                                                                      | 31              |
| <b>Şekil 2.1.</b> Memelilerdeki DNA hasar yanıtları.....                                                                                                                  | 6               |
| <b>Şekil 2.2</b> Hücre Döngüsü .....                                                                                                                                      | 9               |
| <b>Şekil 2.3.</b> İnsan hücresindeki DNA hasar kontrol noktası bileşenleri.....                                                                                           | 11              |
| <b>Şekil 2.4.</b> G1/S Kontrol Noktası .....                                                                                                                              | 17              |
| <b>Şekil 2.5.</b> G2/M Kontrol Noktası .....                                                                                                                              | 20              |
| <b>Şekil 3.1.</b> Spodoptera frugiperda IPLB-Sf21 hücreleri.....                                                                                                          | 30              |
| <b>Şekil 3.2.</b> Vektör olarak kullanılan İnvitrogen firmasına ait pcDNA3. ....                                                                                          | 32              |
| <b>Şekil 3.3.</b> SDS-PAGE Metodu .....                                                                                                                                   | 37              |
| <b>Şekil 3.4.</b> ECL (Enhanced Chemiluminescent ) Substrat Uygulanması .....                                                                                             | 41              |
| <b>Şekil 3.5.</b> DNA Pull-down Assay Prensibi .....                                                                                                                      | 46              |
| <b>Şekil 4.1.</b> Bakülovirüsle infekte edilmiş böcek hücrelerinden ve E. coli'den saflaştırılan proteinlerin Coomassie-Blue boyası ile karakterize edilmesi. ....        | 54              |
| <b>Şekil 4.2.</b> Timeless/Tipin(Tim/Tip) Kompleksinin, RPA ile pre-inkübe Edilmiş 80-mer ssDNA'ya Bağlanmasının Pull-Down Assay ile İncelenmesi .....                    | 55              |
| <b>Şekil 4.3.</b> Timeless ve Tipin'in Chk1 Fosforilasyonunda Görevi .....                                                                                                | 56              |
| <b>Şekil 4.4.</b> ssDNA'nın RPA ve aRPA ile pre-inkübe edilmesi ve Pull-Down Assay ile Tipin Bağlanmasının İncelenmesi.....                                               | 57              |
| <b>Şekil 4.5.</b> RPA ve aRPA'nın His-FLAG- Tipin ile FLAG etiketli İmmünopresipitasyonu (Flag-IP).....                                                                   | 58              |
| <b>Şekil 4.6.</b> Tipin-His ile His-FLAG- Claspin'in FLAG Etiketli İmmünopresipitasyonu (Flag-IP).....                                                                    | 59              |
| <b>Şekil 4.7.</b> RPA ile pre-inkübe edilmiş ve edilmemiş ssDNA'nın ilk önce Tipin sonra Claspinle inkübasyonu ve Pull-Down Assay ile İnteraksiyonların İncelenmesi. .... | 60              |
| <b>Şekil 4.8.</b> XPA ve Tipin Aminoasit Sekanslarının Karşılaştırılması. ....                                                                                            | 61              |
| <b>Şekil 4.9.</b> RPA'in Wild Tip (WT) ve Mutant Form Tipinlerle (E185A, E190A ve L195A) FLAG etiketli İmmünopresipitasyonu (Flag-IP).....                                | 62              |

**Sayfa No**

|                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |    |
|--------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 4.10.</b> | Bakülovirüsle İnfekte Edilen Böcek Hücrelerinden Elde Edilen WT-Tipin ve Tipin-L195A Mutantının RPA ile FLAG etiketli İmmünopresipitasyonu (Flag-IP).....                                                                                                                                          | 63 |
| <b>Şekil 4.11.</b> | RPA ile pre-inkübe edilmiş ssDNA'nın Tipin-WT veya Mutant Tipin-L195A içeren Timeless/Tipin (Tim/Tip) kompleksi ile inkübasyonu ve Pull-Down Assay ile İnteraksiyonların İncelenmesi.....                                                                                                          | 64 |
| <b>Şekil 4.12.</b> | Bakülovirüsle Enfekte Edilen Böcek Hücrelerinden Elde Edilen His-FLAG-Claspin ile <i>E.coli</i> ' den elde edilen WT-Tipin ve Tipin-L195A Mutantının FLAG etiketli İmmünopresipitasyonu (Flag-IP).....                                                                                             | 65 |
| <b>Şekil 4.13.</b> | RPA ile pre-inkübe edilmiş ssDNA'nın WT-Tipin, Mutant Tipin-L195A ve/veya His-FLAG-Claspin ile inkübasyonu ve Pull-Down Assay ile İnteraksiyonların İncelenmesi.....                                                                                                                               | 66 |
| <b>Şekil 4.14.</b> | Boş vektör ve FLAG-Timeless (sol panel) veya FLAG-Tipin(sağ panel) kodlayan vektörlerle transfekte edilen HEK293T hücrelerinde İmmünopresipitasyon (IP) yöntemi ile protein miktarlarının karşılaştırılması .....                                                                                  | 67 |
| <b>Şekil 4.15.</b> | Hipotonik Ortamda Sitozolik ve Nükleer Fraksiyonlarına ayrılan HEK293T hücrelerindeki proteinlerin SDS-PAGE ile ayrılması ve westernblotting ile belirlenmesi.....                                                                                                                                 | 68 |
| <b>Şekil 4.16.</b> | Boş vektör, FLAG-Tipin ve artan miktarda FLAG-Timeless vektörleri ile transfekte edilen HEK293T Hücrelerinin Sitozolik ve Nükleer Fraksiyonlarına ayrılması, proteinlerin SDS-PAGE ve Western blotting yöntemleri ile belirlenmesi. .                                                              | 69 |
| <b>Şekil 4.17.</b> | Tetrasiklinle İndüklenebilen Promotor Kontrolü Altında, FLAG Etiketli Tipin-WT ve Tipin-L195A İfade Eden Flp-In™ T-REx™-293 Hücre Hatlarında Timeless ve Tipin Miktarlarının FLAG İmmünopresipitasyonu (FLAG-IP) ile belirlenmesi .....                                                            | 70 |
| <b>Şekil 4.18.</b> | FLAG-Timeless ve siRNA-dirençli FLAG-Tipin (WT veya L195A) ile transfekte edilen HeLa Hücrelerinde siRNA (Kontrol veya Tipin) ile genlerin susturulması ve +/-HU durumunda Chk1 Fosforilasyon düzeylerinin SDS-PAGE ve Westernblotting yöntemleri ile belirlenmesi.....                            | 71 |
| <b>Şekil 4.19.</b> | Tipin siRNA ve FLAG-Timeless ile siRNA dirençli FLAG-Tipin (WT veya L195A) kodlayan vektörlerle transfekte edilen HeLa hücrelerinde NCS muamelesi ile oluşan Chk1 Fosforilasyonun SDS-PAGE ve Western blotting yöntemleri ile belirlenmesi.....                                                    | 72 |
| <b>Şekil 4.20.</b> | Kontrol ve siRNA-Tipin ile transfekte edilen siRNA Dirençli Flp-In™ T-REx™-293 – FLAG-Tipin-L195A Hücre Hatlarında (+/- Tetrasiklin ) HU muamelesi ile oluşan Chk1 Fosforilasyonun SDS-PAGE ve Western blotting yöntemleri ile belirlenmesi.....                                                   | 73 |
| <b>Şekil 4.21.</b> | Kontrol ve siRNA-Tipin ile transfekte edilen, tetrasiklinle indüklenmiş siRNA Dirençli Flp-In™ T-REx™-293 –FLAG-Tipin-L195A Hücre Hatlarında zamana bağlı HU inkübasyonu ile oluşan Chk1 Fosforilasyonun ve Claspin seviyesinin SDS-PAGE ve Western blotting yöntemleri ile karşılaştırılması..... | 74 |

## 1.GİRİŞ VE AMAÇ

Bütün canlılar sürekli olarak genomlarının bütünlüğünü ve kararlılığını etkileyen genotoksik etkilerin tehlikesi altındadır. DNA hasarı hem dış kaynaklı hem de iç kaynaklı olabilir. DNA hasarına neden olan başlıca hücre dışı etkiler ultraviyole ışık (UV), iyonize radyasyon, yüksek enerjili fotonlar ve reaktif kimyasallardır. DNA hasarı oluşturan başlıca iç etkenler ise, hücre metabolizması tarafından oluşturulan ürünler, DNA replikasyonunda, tamirinde ve rekombinasyonunda oluşan hatalardır (1). Bu değişimler basit baz değişikliklerine yol açabileceği gibi translokasyonlar veya anöploidi gibi kompleks değişikliklere de neden olabilmektedir. Bu değişiklikler tek hücreli organizmalarda hücreSEL ölümlere, çok hücreli organizmalarda ise dejeneratif değişikliklere ve yaşlanmaya sebep olabilmektedir (2). DNA hasarları hücreSEL dengeyi bozabilir ve bunun sonucunda belirli bazı biyokimyasal yollar aktive olur. DNA hasarı ile dört ana yolak aktifleşir, DNA tamiri, DNA hasar kontrol noktaları, transkripsiyonel yanıt ve apoptoz (3). Bu dört yolak birbirinden bağımsız olarak fonksiyon gösterse de, bir yolakda primer görev yapan bir protein diğer yolakta da iş görebilir (2). DNA hasar kontrol noktaları, DNA hasara uğradığı zaman hücre döngüsünü durduran ya da geciktiren biyokimyasal yollardır (4). Kontrol noktası terimi G1/S, S ve G2/M kontrol noktaları gibi evreler arası geçişin DNA hasarı ile inhibe edilmesine dayalı olarak tanımlanır. DNA'daki hasar, sensörler tarafından tanınır ve araçlar yardımı ile sinyal iletilicilere taşınır. Sinyal iletiliciler, G1/S geçişinin, S fazın

devam etmesinin veya G2/M geçişinin doğrudan inhibisyonuna katılan ve efektör olarak isimlendirilen diğer proteinleri aktive veya inaktive ederler. Fosfoinosit 3-kinaz-benzeri kinaz (Phosphoinositide 3-kinase-like kinase; PIKK) ailesi üyeleri olan Ataksi-Telanjektaziye mutant protein (*Ataxia Telangiectesia Mutated*; ATM) ve ATM ve Rad3 ilişkili (*ATM and Rad3 related*; ATR) proteinleri DNA kontrol noktasında hasar sensörleri olarak görev yaparlar ve hücre döngüsünün durdurulmasında, DNA tamirinin düzenlenmesinde iş gören p53, Kontrol noktası kinaz 1 (Checkpoint Kinase 1; Chk1) ve Kontrol noktası kinaz 2 (Checkpoint Kinase 2; Chk2) gibi proteinlerin fosforilasyonunda ve aktivasyonunda görev yaparlar (2).

Farklı DNA hasarlarında oluşan kontrol noktası cevaplarında hem ATM hem de ATR aktifleşebilir. Buna rağmen, aktivasyonun mekanizmasının ve kinetiğinin, DNA hasar ajanları ile indüklenen DNA lezyon çeşitleri bağlı olduğu düşünülür. ATM öncelikli olarak iyonize radyasyon ve bazı kimyasallar tarafından oluşan açık çift-zincir DNA kırıklarında aktive olur (5). İyonize radyasyona maruz kalan hücrelerde ATM, Chk2, p53 (6,7) dahil olmak üzere, Nijmegen kırık sendromu 1 proteini (Nijmegen breakage syndrome; NBS1) (8), Meme Kanseri 1 proteini (Breast cancer 1; BCRA1) (9) gibi bir çok proteini ve kendini (10) SQ veya TQ sekans bölgesindeki Serin ve Treonin'i fosforile ederek fosforilasyonu gerçekleştirmektedir. ATM proteinindeki mutasyon insanlarda Ataksi- Telanjektaziye (*Ataxia-Telangiectesia*; A-T)' ya neden olmaktadır. Ataksi- Telanjektaziye öncelikle serebellar dejenerasyon, bağışıklık yetmezliği, genom kararsızlığı, klinik radiosensitivite ve kansere yatkınlık ile karakterize bir hastalıktır (11).

ATR ise, replikasyon çatalı gecikmesi boyunca, nükleotid ekzisyon tamirinde, çift-zincir kırık işlemlerinde ve telomerin yeniden korunması gibi daha çok fazla sayıdaki genom kararsızlığı durumlarında aktive olmaktadır (2, 12, 13). ATR'yi aktive eden genotoksik ajanların çeşitliliğinden dolayı, ATR'nin ATR sinyal ileti yollarının başlamasında ve devamlılığında görev yapabilen genel bir DNA aracı olduğu ileri sürülmüştür. (12, 14, 15). Farelerde ATR'nin inaktive edilmesinin embriyonik ölümle sonuçlandığı bildirilmiştir (16). İnsanlarda ise, ATR aktivitesinin kısmi kaybına neden olan mutasyonlar insan otozomal resesif hastalık olan Seckle sendromu ile ilişkilendirilmiştir (17).

İnsanlarda Chk1 ve Chk2 hücre döngüsünün düzenlenmesinde ve kontrol noktası yanıtlarındaki sinyal iletiminde görev yapan iki kinaz proteindir (18,19,20). Chk1 ve Chk2 proteinlerinin her ikisi de Serin/Treonin kinaz özelliğine sahiptir. Memeli hücrelerinde UV ile hasarlanmış DNA'daki sinyal ATR tarafından algılanır ve Chk1 tarafından iletilir (21). Memeli hücrelerindeki çift zincir kırıkları ise ATM tarafından algılanır ve sinyal Chk2 tarafından iletilir (22).

Replikasyon çatalında oluşabilecek DNA helikaz ve polimeraz aktivitesindeki aksaklıklarda, çift-zincir kırıklarındaki DNA'da oluşan yapılarda ve nükleotid ekzisyon tamirinde büyük DNA parçalarının uzaklaştırılmasında, ökaryotlarda tek zincirli DNA (single stranded DNA; ssDNA) oluşur ve ssDNA'ya Replikasyon Protein A (RPA) bağlanır (23,24). Yüksek bağlanma kapasitesi ile ssDNA'ya (25) ve daha az bir bağlanma kapasitesi ile çift zincirli DNA (double stranded DNA; dsDNA)'ya ve RNA'ya bağlanmaktadır (26). RPA insan hücrelerinde en fazla bulunan tek zincirli DNA'ya bağlanan proteindir (27). RPA, hücre için çok önemli olaylarda örneğin DNA tamirinde (28) ve DNA rekombinasyonunda (29) iş yapmaktadır.

ATR'nin yapısal bağlanma ortağı olan ATR ile etkileşen protein (ATR-interacting protein; ATRIP) ile RPA'nın 70kDa'luk alt birimi olan RPA1'in spesifik bir etkileşiminden dolayı (15,30,31), ATR-ATRIP'in DNA hasar bölgesi ile kararlı yapı oluşturmasını RPA'nın düzenlediği düşünülür. Bununla birlikte, ATR kinaz aktivitesinin tam olarak uyarılması için, DNA hasar bölgelerinde ve geç kalmış replikasyon çatallarında da bulunan, öncül-kalıp birleşim yerine çoğalan hücre nükleer antijeni (Proliferating Cell Nuclear Antigen; PCNA) benzeri 9-1-1 (Rad9-Hus1-Rad1) kıskacını yükleyen Rad17-Replikasyon faktör C (Replication Factor C; RFC) kompleksi dahil ilave faktörlere gerek vardır (2). Rad9'un C uç kuyruğu ile olan bir etkileşiminden dolayı, daha sonra ATR-aktive eden protein topoizomeraz bağlanma proteini (Topoizomeraz binding protein 1; TopBP1) (32) ,ATR kinaz aktivitesini uyarabileceği ATR'ın yakınındaki yere getirilebilir (33).

DNA hasar cevabında, çok sayıda proteinin ATR ile potansiyel olarak fosforile edilmesine rağmen (34,35), temel kontrol noktası substratı kinazı Chk1'dır (36, 37, 38). Chk1'in C-terminal düzenleyici bir bölgesindeki iki birimin (Ser317 and Ser345) fosforilasyonu, Chk1'nin kinaz aktivitesini (37, 38) ve sub-nükleer lokalizasyonunu (39), hücre döngüsünün ilerlemesi için doğrudan siklin-bağımlı kinaz aktivitesini

düzenleyen Cdc25 fosfataz ailesi gibi DNA tamiri ve hücre döngüsünün ilerleyişi için önemli olan proteinlerin fosforile edilebilmesini değiştirmektedir (40).

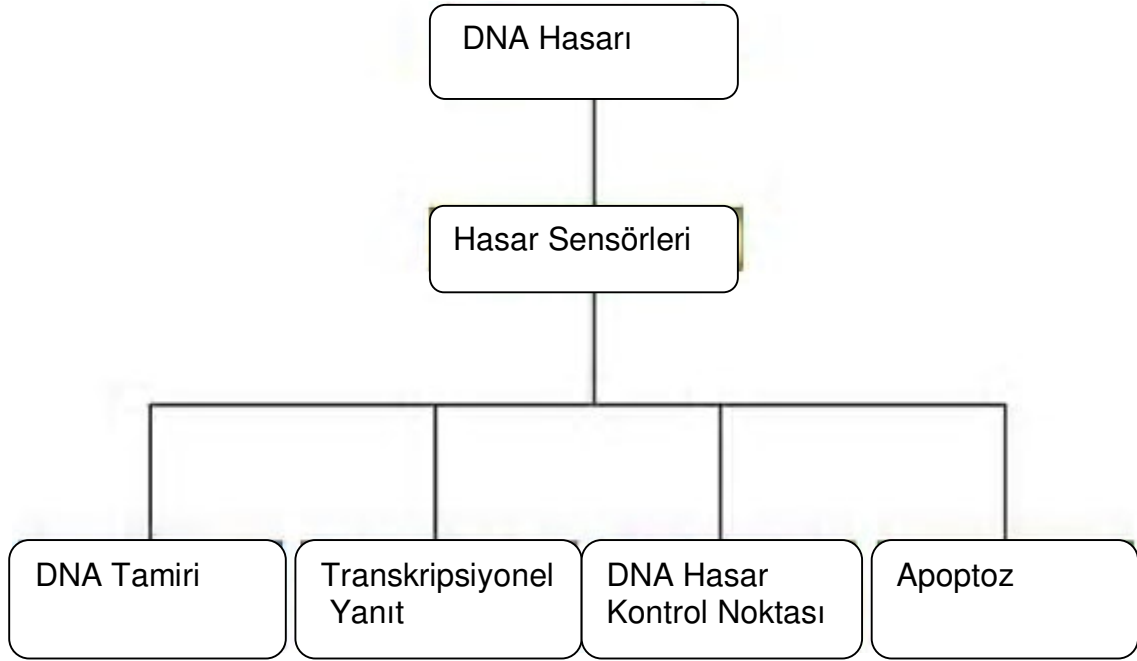
Timeless, hücre döngüsü kontrol noktasında görev alan çok fonksiyonel bir proteindir (41). Timeless, Chk1'ı regüle ederek kontrol noktasında görev yapar (41). Timeless'ın, hem ATR hem de ATR bağlanma ortağı olan ATRIP ile etkileşime girdiği gösterilmiştir (41). Timeless ve Timeless ile etkileşen protein (Timeless interacting protein; Tipin) etkileşir ve bu iki protein Timeless-Tipin heterodimer kompleks yapı oluşturarak fonksiyon gösterirler (42).

DNA hasarı kontrol noktasındaki cevaplarda görev yapan genlerin bozulması, kanser dahil bir çok insan hastalığı ile bağlantılıdır (43). Bu çalışmanın amacı genel olarak insan hücrelerinin DNA hasarına karşı oluşturdukları DNA hasar kontrol noktalarının aydınlatılmasına katkıda bulunmaktır. Chk1, DNA hasar kontrol noktasında oluşan yanıtlarda ve genom kararlılığını düzenlemede kritik bir rol oynar. DNA hasarına yol açan geleneksel kemoterapötik yöntemlerle birlikte Chk1 inhibitörlerinin kanser terapisi için klinik kullanımındaki son gelişmeleri, Chk1'nın insan sağlığı ve hastalıklarla olan bağlantısı üzerine yoğunlaşmaktadır (44). Bu çalışma ile insanlarda ATR-Chk1 DNA hasarı kontrol noktası yolağında Timeless-Tipin kompleksinin nasıl bir mekanizma ile aracılık ettiğinin aydınlatılması amaçlanmıştır.

## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1. DNA HASARI ve YANITLARI**

Günümüzdeki moleküler biyolojinin temelini oluşturacak olan DNA'nın üç boyutlu yapısı James Watson ve Francis Crick tarafından 1953 yılında belirlenmiştir. DNA'nın polimer yapısını fosfatlanmış şeker molekülleri ile bağlantılı iki primidin (Sitozin ve Timin) ve iki pürin (Adenin ve Guanin) bazları oluşturmaktadır. DNA, birbirini tamamlayan karşılıklı iki iplikten oluşur, iç tarafında bazlar ve dış tarafta ise şeker-fosfat iskeletinden oluşan heliks şeklinde bir çift sarmaldır. Canlılarda genetik bilgi DNA ile aktarılır (45). DNA'nın temel yapısı sürekli olarak hücresel metabolitler ve eksojen DNA hasar ajanları tarafından değişime maruz kalmaktadır. Bu değişimler basit baz değişikliklerine yol açabileceği gibi translokasyonlar veya anöploidi gibi kompleks değişikliklere de neden olabilmektedir. Bu değişiklikler tek hücreli organizmalarda hücresel ölümlere, çok hücreli organizmalarda ise dejeneratif değişikliklere ve yaşlanmaya sebep olabilmektedir (2). DNA hasarları hücresel dengeyi bozabilir ve bunun sonucunda belirli bazı biyokimyasal yollar aktive olur. DNA hasarı ile DNA tamiri, DNA hasar kontrol noktaları, transkripsiyonel yanıt ve apoptoz olmak üzere dört ana yolak aktifleşir (3). Bu dört yolak birbirinden bağımsız olarak fonksiyon gösterse de, bir yolakta primer görev yapan bir protein diğer yolda da iş görebilmektedir (2).



**Şekil 2.1.** Memelilerdeki DNA hasar yanıtları . DNA hasarı sonrasında hasar sensörleri ile DNA tamiri, DNA hasar kontrol noktaları, transkripsiyonel yanıt ve apoptoz olmak üzere dört ana yolak aktifleşir (2).

DNA hasarları, DNA'daki kovalent değişiklikler ile baz çifti yanlış eşleşmeleri, ilmekler ve bir dizi yanlış eşleşmenin oluşturduğu kabarcıklar gibi kovalent olmayan değişiklikleri kapsamaktadır (46,47). DNA hasarları, replikasyon, rekombinasyon ve tamir süreçlerinde oluşabileceği gibi, baz düzeyinde, DNA omurgasında ya da çapraz bağlar şeklinde de olabilir. Replikasyon, rekombinasyon ve tamir süreçlerinde DNA'da çatal yapıları, kabarcıklar, Holliday yapısı ve diğer dubleks olmayan yapılar oluşur. Bu yapılar tamir ve kontrol noktası proteinleri için yüksek affiniteli bağlanma bölgeleri oluşturur. O<sup>6</sup>-metilguanin, timin glikol ve reaktif oksijen birimleri ya da iyonize radyasyon ile oluşmuş indirgenmiş, okside olmuş ya da parçalanmış bazlar DNA baz hasarına örnektir. Ultraviyole (UV) radyasyon ile siklobütan primidin dimerleri ve 6-4 foto ürünleri oluşabileceği gibi, indirekt olarak reaktif oksijen birimlerini artırarak hasar oluşturabilir. Çok çeşitli kimyasallar da, büyük polisiklik hidrokarbon birimleri ya da basit alkil birimler oluşturabilir. Cisplatin, mitomisin C, psoralen, nitrojen mustard ve adriamisin dahil olmak üzere yaklaşık olarak kemotropik ilaçların yarısı baz düzeyinde hasar oluşturur. Kemoterapideki en önemli sorun, kanser hücrelerinde DNA tamirini veya kontrol noktası yanıtını devre dışı bırakabilecek ilaçların bulunmasıdır. DNA hasar ajanları ve iyonize radyasyon DNA'da çift zincir kırıklarına sebep olur. DNA'da oluşan

tek zincir kırıkları ve çift zincir kırıkları DNA omurgası düzeyinde oluşabilecek hasarlara örnektir. Cisplatin gibi bazı hasar ajanları bifonksiyoneldir DNA’da iplikler arası çapraz bağlar ve DNA ile protein arasında çapraz bağlar oluşturarak hasar meydana getirirler (2) .

## **2.2. DNA HASAR KONTROL NOKTALARI VE SİNYALLERİ**

Hasar tanıma mekanizması genellikle çok basamaklı bir reaksiyondur. Enzimlerle basit substratlarının aksine, DNA’da spesifik bir diziye veya yapıya bağlanan proteinler, hedeflerini ilgili yapıların çok geniş bir alanında tanımak zorundadırlar. Hasar sensörleri sadece hasarı ararken değil aynı zamanda spesifik bir bağlanma süresince de hasarsız DNA ile kontakt kurar. Bundan dolayı proteinler, genellikle hasarsız DNA için göz ardı edilmeyecek bir affiniteye sahiptirler. Hasarsız DNA miktarı hasarlı DNA miktarını fazlasıyla geçeceği için, DNA hasar sensörleri hasarsız DNA ile birleşmek için hasarlı DNA’ya göre daha fazla zaman harcamaktadır. DNA hasar sensörleri spesifik fonksiyonlarını ancak non-spesifik DNA’nın yüksek konsantrasyonda olduğu zaman gerçekleştirirler çünkü hasar tanıma mekanizması genellikle çok basamaklı bir reaksiyondur. Bu nedenle bütün basamakların hasarsız DNA ile temasın başlamasından sonra gerçekleşmesi çok düşük bir olasılıktır. Ancak çok basamaklı tanımalarda, hasarlı ve hasarsız DNA arasındaki ayırım net değildir. Bundan dolayı ne DNA tamirinin ne de DNA hasar kontrol noktaları moleküler anahtarlar tarafından kontrol edilen reaksiyonlar gibi düşünülmemelidir. Daha da fazlası, her iki süreç de her zaman devam eder ama tamirin veya kontrol noktasının önemi DNA hasarı ile artmaktadır (2).

Hücre DNA hasarına karşı cevap oluşturmayı başlatmak için çeşitli stratejilerle hasarı tanıma özelliğine sahiptir: doğrudan hasarı tanıma (bimoleküler), çok basamaklı hasar tanıma (moleküler eşleştiriciler ve kombinasyonel yapılar), başka bir aracı ile tanıma ve DNA tamir araçlarının tanınması. Doğrudan hasarı tanıma sistemi belirli bir DNA hasarı ve ona özgü bir protein arasında oluşan tamamlayıcı bir sisteme dayanmaktadır. Bu protein genellikle bir enzimdir. Fotoliaz ve DNA glikoliaz doğrudan hasar tanıma sistemine sahip enzimlerdir. Enzim veya enzim-substrat yapılarının uygun olduğu durumlarda, tanıma işlemi yüzey komplementerini içeren basit bir mekanizma ile değil, *Escherichia coli* (*E. coli*) fotoliazda gösterildiği gibi uygun bir mekanizmanın indüklenmesini de gerektirmektedir (48, 49). *E. coli* fotoliaz, flavin kofaktöründen DNA dupleksindeki pirimidin dimerine elektron transfer sistemi ile siklobütan pirimidin

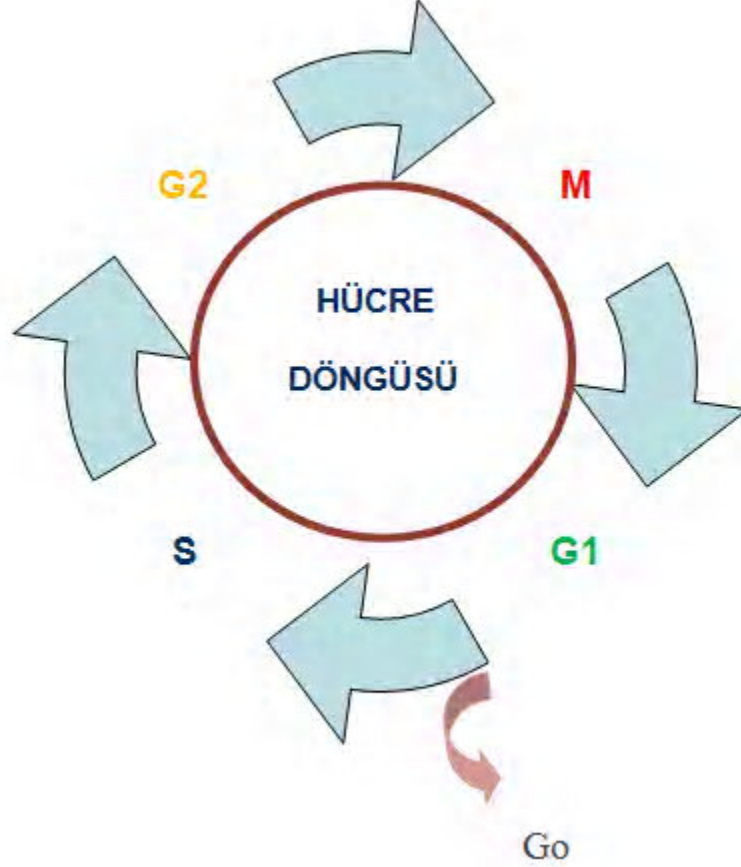
dimerlerini tamir eder. Bu tamirde görev yapan elektron transferi ışıkla indüklenir. Etkili bir elektron transferi için flavin ve pirimidin dimerinin doğrudan temas kurması gerekmektedir. Böyle bir kontakt için, enzim ilk önce pirimidin dimerinin rastgeldiği DNA omurgası ile etkileşir sonra yapısı bozulmuş omurga ile enzimin iyonik birimi yada H bağı yapısı arasında spesifik bir kontakt kurulur (50).

### **2.3. DNA HASAR KONTROL NOKTALARI**

DNA hasar kontrol noktaları, DNA hasara uğradığı zaman hücre döngüsünü durduran ya da geciktiren biyokimyasal yolaklardır (4). Kontrol noktası ilk olarak, DNA bütünlüğünün, hücre döngüsü boyunca sürecin devam etmesine izin vermek için test edildiği hücre döngüsündeki spesifik bir nokta olarak tanımlanmıştır (51, 52). Kontrol noktası terimi sonradan, DNA hasarına karşılık verilen, hücre döngüsünün durdurulması, tamir genlerinin indüklenmesi ve apoptoz de dahil hücrel cevapların hepsini içeren daha büyük anlamlar kazanmıştır. Bu tanımın daha kapsamlı hale gelmesi için bazı sebepler vardır, çünkü hücre döngüsünün durdurulmasında görev yapan proteinlerin aktivasyonu aynı zamanda DNA tamiri ve apoptoz katılan genlerin indüksiyonuna neden olur. Bununla birlikte DNA tamir yolları hasarla indüklenmiş hücre döngüsü duraklamalarının olmadığı zamanlarda fonksiyoneldir ve apoptoz hücre döngüsü duraklamalarından bağımsız meydana gelebilir. Buna göre, DNA hasar kontrol noktaları terimi, DNA hasarında hücre döngüsünün durdurulması veya yavaşlamasındaki olayları da kapsamalıdır (2). Daha önemli bir soru da, kontrol noktalarının hücre döngüsü boyunca genomik bütünlüğünün değerlendirildiği spesifik noktalar olup olmadığıdır. Kontrol noktasındaki cevaplar biyokimyasal olarak daha iyi tanımlandıkça, kontrol noktalarının sadece kontrol noktası geçişleri ile sınırlı olmadığı ve genomun bütünlüğünü hücre döngüsü boyunca sürekli gözetleyen bir sistem olduğu daha da netleşmiştir (21).

Hücre siklusunda iki önemli faz vardır, biri DNA'nın replike olduğu S fazı diğeri ise M fazıdır. M fazı tipik olarak iki önemli olayı içermektedir. Nükleer bölünmenin olduğu mitoz ve sitoplazma bölünmesinin olduğu sitokinezdir. Bir M fazının bitip diğeri M fazının başladığı peryotların arasındaki evre İnterfaz olarak adlandırılır. Hücrelerin çoğunluğu S ve M evresi arasında aralık evresi "gap" olarak tanımlanan geçiş evrelerini içermektedir. S fazından önce meydana gelen G1 evresi ve M fazından önce meydana gelen G2 evresi vardır (Şekil 2.2). Aralık evreleri genel olarak hücreye büyümesi ve

gerekli olan hazırlıkların yapılması için zaman tanır. Hücreler bazen bölünmenin gerçekleşmediği evreye girerler ki, bu evre G0 evresi olarak adlandırılır (53).



**Şekil 2.2.** Hücre Döngüsü. İnsanlar hücre döngüsü G1, S, G2 ve M olmak üzere dört ana evreden oluşmaktadır (53).

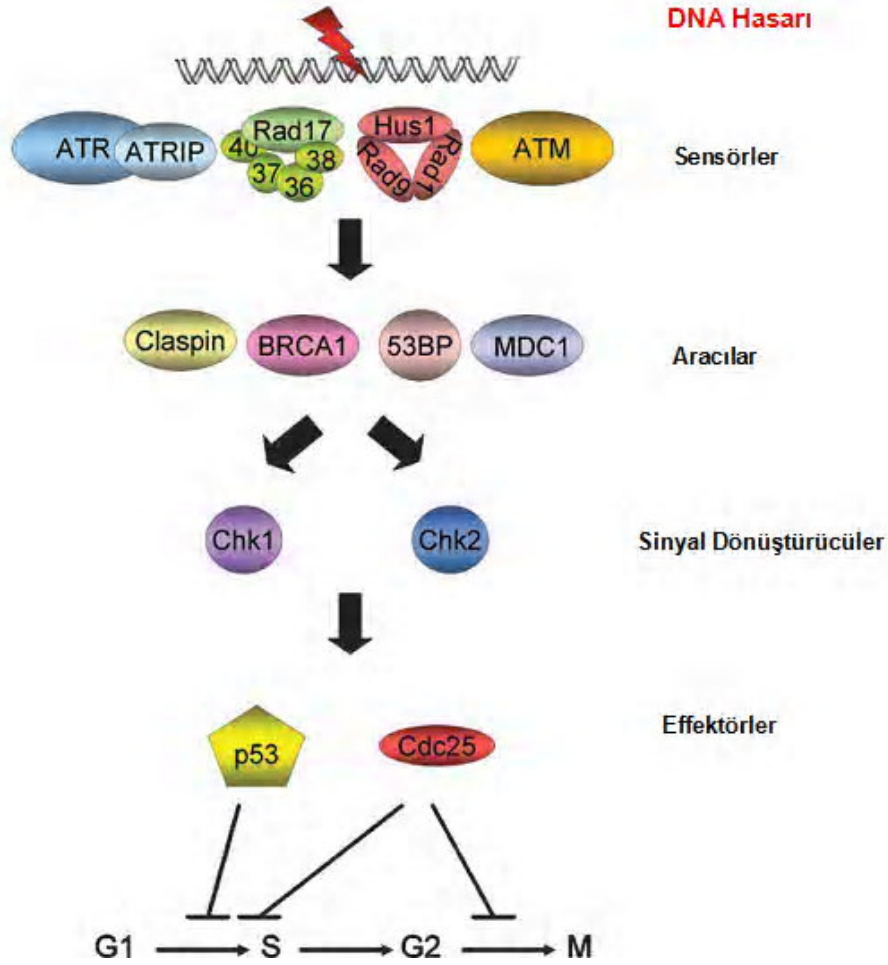
G1 evresi mitoz ile DNA replikasyonu arasındaki süreç olduğundan, hücre G1 boyunca aktiftir ve sürekli olarak ana hücre hacmine kadar büyümeye devam eder. G1 evresi DNA replikasyonun gerçekleştiği S evresi ile son bulur. DNA sentezinin tamamlanmasından sonra, mitoz evresi için protein sentezinin gerçekleştiği ve hücrenin büyümeye devam ettiği G2 evresi gerçekleşir. Bazı hücreler G1'den çıkarak hücre döngüsünün G0 evresine yani sessiz evreye girerler. G0 evresinde hücreler metabolik olarak aktiftir ve uygun hücre dışı sinyalleri gelmediği sürece çoğalmazlar. Hücre tiplerine göre hücre döngüsünün evre süreleri değişiklik göstermektedir. Tipik bir insan hücresinde toplam döngü süresi 24 saattir. Erken embriyo döneminde yani yumurta döllelenmesinden hemen sonra hücre döngüsü 30 dakika veya daha azdır (45).

Bazı tek hücrelilerde G1 veya G2 evleri çok kısa olur ve gözlemlemek çok zordur ama memeli somatik hücrelerinde fazlar çok iyi tanımlanmıştır ve farklı biyokimyasal olayların gerçekleştiği hücrelerin yaşam döngüsündeki evreler belirlenmiştir. Tipik bir hücre siklusunda, S fazı kadar geçiş noktaları olan G1/S ve G2/M noktaları da çok sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir. Kontrol noktasındaki yanıtlarda görev yapan proteinlerin, aynı zamanda hücre siklusu boyunca düzenli bir ilerlemenin gerçekleşmesini sağlayan proteinlerle aynı olduğunu gösteren mevcut kanıtlar vardır. Böylece, DNA hasar kontrol noktaları sadece DNA hasarı ile aktiveleşen özgün yollar olmayıp aynı zamanda DNA hasarında artan normal büyüme koşullarındaki biyokimyasal yollardır. Kontrol noktası yanıtlarının ortaya çıkması için gerekli olan hasar seviyesine ait bir eşik değerinin olup olmadığı henüz bilinmemektedir. Kontrol noktalarının bütün hücre siklusu boyunca işlevsel olmasına ve bundan dolayı dört evrenin herhangi bir noktasında hücre döngüsünü yavaşlatabilmesine rağmen, bir evreden diğer evreye geçişin durdurulması ya da yavaşlaması evrelerin içinde gerçekleşen nicel değişimlere zıt olarak niteliksel değişiklikler gözlenir. Kontrol noktası terimi G1/S, S ve G2/M kontrol noktaları gibi evreler arası geçişin DNA hasarı ile inhibe edilmesine dayalı olarak tanımlanır (2).

#### **2.4. DNA HASAR KONTROL NOKTALARININ MOLEKÜLER BİLEŞENLERİ**

DNA hasar kontrol noktaları, diğer sinyal transdüksiyon yolları gibi, kavramsal olarak 3 bileşen içerir. I-Sensörler, II- Sinyal Dönüştürücüler ve III-Effektörler (2).

Oldukça sınırlı biyokimyasal çalışmalar ile birlikte maya ve daha yakın zamandaki kapsamlı genetik analizlerle insan hücrelerinde, DNA hasar kontrol noktalarının, hasar algılayan, sinyal dönüştüren ve efektörler proteinleri tanımlanmıştır (Şekil 2.3).



**Şekil 2.3.** İnsan hücreesindeki DNA hasar kontrol noktası bileşenleri. DNA’da oluşan hasar, ilk basamakta sensörler tarafından algılanır ve aracılara iletilir. Sinyal daha sonra sinyal dönüştürücüleri tarafından hücre döngüsünü durduracak olan efektörlere iletilir (2).

Hasar sensörler tarafından belirlenir ve aracılar yardımı ile sinyal dönüştürücülere taşınır. Sinyal ileticiler, G1/S geçişini, S fazın devam etmesinin veya G2/M geçişinin doğrudan inhibisyonuna katılan ve efektör olarak isimlendirilen diğer proteinleri aktive veya inaktif ederler (2).

Bununla birlikte, insan hücreesindeki DNA hasar kontrol noktası bileşenleri arasında kesin bir ayrım yoktur. Örneğin hasar sensörü olan ATM, aynı zamanda sinyal dönüştürücü olarak görev yapmaktadır. Hatta dördüncü ayrı bir sınıf olarak “Aracılar” tanımlanmıştır. Bu aracı sınıfa BRCA1, Claspin, 53BP ve MDC1 gibi proteinler dahildir ve görev olarak sensörler ve sinyal dönüştürücüleri arasında yer almaktadır. ATM’in hem bir sensör hem de bir sinyal dönüştürücü gibi görev yapması, bu aracılarda kontrol noktası yanıtında bir basamaktan daha çok basamakta görev yaptığı düşünülmektedir (2).

G1/S, S ve G2/M kontrol noktalarının farklı olmasına rağmen, hasar sensör molekülleri ya tüm üç kontrol noktası tarafından paylaşıyor gibi ya da yolların birinde birincil görev yapıp diğerinde yedek olarak görev yapıyor gibi görünmektedir. Benzer şekilde, kinaz ve fosfataz olan sinyal dönüştürücü moleküller farklı oranlarda değişik kontrol noktalarında görev yapar (3, 21). Evreler arası geçişi inhibe eden kontrol noktasının efektör bileşenleri, kontrol noktalarına özgün bir karakter kazandırmaktadır. Bununla birlikte, çeşitli araçlar ve sinyal dönüştürücüler özellikle bir kontrol noktasında diğerlerinden farklı olarak belirgin bir görev üstlenirler (54, 55).

#### 2.4.1. Sensörler

RPA, hem nükleotid ekzisyon tamirinde (56, 57) hem de DNA hasar kontrol noktasında görev yapan çok önemli bir hasar sensör proteinidir. PIKK ailesi üyeleri olan ATM and ATR proteinleri kontrol noktası spesifik hasar sensörü olarak tanımlanmıştır (58).

DNA tamirinde olduğu gibi, DNA hasar kontrol noktaları için de DNA hasarının daha sonraki işlemler için tanınması gerekir. Genel olarak tamir için ve kontrol noktası yanıtları için olan sensörlerin farklı olduğuna inanılmasına rağmen, ilerdeki çalışmalar hasar tespit aşamasındaki önemli örtüşmeleri ortaya çıkaracaktır (2).

#### *ATM ve ATR Proteinleri*

ATM proteinindeki mutasyon insanlarda Ataksi Telanjektazi'ye neden olmaktadır. Ataksi Telanjektazi, öncelikle serebellar dejenerasyon, bağışıklık yetmezliği, genom kararsızlığı, klinik radiosensitivity ve kansere yatkınlık ile karakterizedir (11). 350 kDa'luk oligomerik bir protein olan ATM, çok sayıda HEAT motifleri içermektedir (10, 59). Fosfoinosit 3-kinazlar ile anlamlı bir dizi homolojisine sahip olmasına rağmen lipit kinaz aktivitesi yoktur (10, 11). ATM'in en önemli özelliği protein kinaz aktivitesine sahip olmasıdır ve bu aktivite *in vivo* olarak çift zincir kırıklarına yol açan ajanlar tarafından uyarılmaktadır (6). Aynı zamanda *in vitro* olarak doğrusal DNA oluşmasına neden olan ajanlar tarafından da uyarılmaktadır (60, 61). Atomik elektronik mikroskobu sonuçları ATM'nin monomerik görünüşüne göre DNA'nın uç kısmına bağlandığını göstermiştir. İyonize radyasyona maruz kalan hücrelerde ATM, Chk2, p53 (6, 7) dahil olmak üzere, NBS1 (8), BCRA1 (9) gibi bir çok proteini ve kendini (10) SQ veya TQ sekans bölgesindeki Serin ve Treonin'i fosforile ederek fosforilasyonu sağlamaktadır. Ancak komşu dizilerin özgünlüğü de fosforilasyon için önemlidir, örneğin P53'ün S<sub>15</sub>Q dizisi ATM tarafından fosforile olurken S<sub>37</sub>Q dizisi fosforile olmamaktadır. Gerçekten

de sentetik peptidlerle yapılan daha kapsamlı çalışmalar göstermiştir ki, ATM fosforile etmek için substratlarını bir hiyerarşi ile tercih etmektedir (62). ATM'nin otofosforilasyonu oligomer yapıyı kontrol noktası cevabı için enzimin aktif formu olan monomerlere dönüştürür (10).

### **ATR**

ATR insan genom veritabanına göre ATM ve SpRad3 genlerine olan dizi homolojisi ile keşfedilmiştir, bundan dolayı ATR, ATM and Rad3 ilişkili olarak isimlendirilmiştir (63). ATR gen bölgesi 303 kDa'luk bir protein kodlamaktadır, bu protein C-ucunda kinaz bölgesi içermektedir ve bu alan PIKK aile üyesi proteinleri ile homoloji göstermektedir. Farelerde ATR'in inaktive edilmesi embriyonik ölümle sonuçlanmıştır (16, 64). İnsanlarda ise, ATR aktivitesinin kısmi kaybına neden olan mutasyonlar insan otozomal resesif hastalık olan Seckle sendromu ile ilişkilendirilmiştir (17). Seckle sendromu Ataksi Telanjektazi ile ortak özelliklere sahiptir. ATM gibi, ATR da SQ/TQ dizisindeki S ve T birimlerini fosforile eden bir kinazdır ve ATM tarafından fosforile edilen bütün proteinleri fosforile eder. ATR, ATM'in aksine iyonize radyasyondan ziyade UV ışığı ile aktive olmaktadır. ATR, PIKK familyasına ait UV ışınları ile sinyal iletimini başlatan esas proteindir (21).

ATR'in UV ışınlarla karşı özgülüğü, enzimin doğrudan ajanlar tarafından oluşan spesifik hasarları tanıyabileceği ihtimalini ortaya koymuştur (2). Elektroforetik mobility shift testi, immobilize olmuş ATR ile pulldown testi, immobilize olmuş DNA ile pulldown testi ve UV ile indüklenmiş DNA-protein cross-linking testi ATR'in doğrudan DNA'ya bağlandığını göstermektedir (65). Enzimin, 50bc'lik 6-4 fotoürün içeren bölgeye, hasar içermeyen bölgeye oranla iki daha fazla bağlandığı gözlenmiştir. Elektron mikroskobu ile yapılan daha detaylı araştırmalar göstermiştir ki, artan UV maruziyeti ile birlikte DNA'ya bağlanma artmaktadır. Daha da fazlası, lineer DNA kullanıldığı zaman ATM'nin aksine, ATR'nin çift iplikli DNA kırıklarını tanıyamadığı gözlenmiştir. P53'ün ATR ile fosforilasyonu ölçüldüğü zaman, hasarlı DNA'nın kinaz aktivitesini uyardığı görülmüştür (66, 67). UV'ye maruz kalmış DNA, fosforilasyonu kısmen artırmaktadır ve UV dozuna bağlı olarak fosforilasyon gerçekleşmektedir (65) Böylelikle, ATM'in çift zincir kırıklarında bir sensör ve sinyal iletici olarak görev yaptığını, ATR'in ise en azından UV ile oluşacak baz düzeyindeki hasarlara cevapta görev yaptığını söyleyebiliriz (2).

PIKK ailesinin prototipi olan DNA-PK heterotrimer bir proteindir. Ku70 ve Ku80 dimer yapısı ve 450kDa'luk katalitik alt birimden (DNA-PKcs) oluşur. Ku70 ve Ku80 dimer yapısı DNA'nın uç bölgesine bağlanır ve DNA-PKcs'in gelmesini sağlar ancak bu durumda aktif olarak görev yapabilen DNA bağımlı bir protein kinazdır (68). ATM ve ATR'ın da benzer DNA bağlanma ortakları ile DNA'ya getirildiği düşünülmüştür ve gerçekten de hem *S. cerevisiae* hem de *S. pombe*'deki ATR homologları olan scMec1 and spRad3'ün scDcd2 ve spRad3 ile kompleks oluşturmaktadır. ATM'in bir bağlanma partnerinin olduğu henüz bildirilmemiştir, ama ATR'ın ATRIP ile bir etkileşimi vardır. ATRIP 86 kDa'luk bir proteindir. scDcd2 ve spRad26 ile sınırlı bir homoloji göstermektedir (69). ATRIP, ATR'ın çıplak DNA'ya ya da RPA kaplı tek zincirli veya çift zincirli DNA'ya bağlanmasında gerekli değildir (15, 65). Bununla birlikte, ATRIP, ATR-ATRIP kompleksinin RPA kaplı DNA'ya bağlanmasına çıplak DNA'ya göre bir özgünlük vermektedir (15).

#### 2.4.2. Aracılar

Aracı proteinler hücre döngüsünün belirli aşamalarında hasar sensörleri ve sinyal iletiler ile ilişki içindedir ve sonuç olarak sinyal iletimine yardım ederler (2). Prototip aracı protein scRad9'dur (70). scRad9 sinyal iletim yolağında scMec1 (ATR)'den scRad53 (Chk2)'ye sinyal iletimini gerçekleştirir. Bir başka aracı olan Replikasyon Kontrol Noktası Aracısı (*Mediator of Replication Checkpoint*; Mrc1) hem *S. cerevisiae* hem de *S. pombe*'de bulunmuştur (54, 55) ve sadece S evresinde ekspresyonu gerçekleştirir. 53BP1 (71), TopBP1 (72), ve DNA Hasar Kontrol Noktası Aracısı 1 (the *Mediator of DNA Damage Checkpoint 1*; MDC1) (73) insanlarda aracı olarak görev yapan proteinlerdir. Bu proteinler ATM gibi hasar sensör proteinleri ile, BRCA1 ve M/R/N kompleks gibi tamir proteinleri ile, Chk2 gibi sinyal iletiler proteinleri ile ve p53 gibi efektör proteinlerle ilişki halindedir. Bu proteinlerin seviyelerinin azalması ya da tamamen yok olması durumunda DNA hasar kontrol noktası yanıtları işlevsiz kalmaktadır (2).

Bu araçların yanı sıra, H2AX, BRCA1, M/R/N kompleksi ve Kromatin Yapısal Bakım 1 proteini (Structural Maintenance of Chromatin 1; SMC1) gibi proteinler kontrol noktası kinazların aktifleşmesinde önemli roller oynamaktadır. Bu proteinler aynı zamanda DNA tamirinde, kardeş kromatid eşleşmesinde ve ayrılmasında doğrudan bir rol oynamaktadırlar, bu yüzden sadece arabulucu olarak kabul edilemezler (2). *Xenopus*

Claspin yumurta ekstraktları ile yapılan çalışma sonuçlarına göre, maya Mrc1 ile sekans homolojisi gösteren insan Claspin proteininin de bir aracı olarak görev yaptığı düşünülmüştür (74). Fakat xChk1'in ( *Xenopus* Chk1) ATR ile fosforilasyonu için xClaspin'nin ( *Xenopus* Claspin) gerekli olması ve xATR ( *Xenopus* ATR) ve xRad17'den ( *Xenopus* Rad17) bağımsız olarak geri kalmış replikasyon çatalına getirilmesi, Claspin'in daha çok sensör olarak görev yaptığını göstermiştir (75).

#### 2.4.3. Sinyal İleticiler

İnsanlarda Chk1 ve Chk2 olmak üzere hücre döngüsünün düzenlenmesinde ve kontrol noktası yanıtlarındaki sinyal iletiminde görev yapan iki kinaz protein vardır (18, 19, 20). Bu kinazlar sırasıyla maya scChk1 (76) ve scRad53/spCds1 (22) proteinleri ile olan homolojileri temel alınarak tespit edilmiştir. Chk1 ve Chk2 proteinlerinin her ikisi de S/T kinaz özelliğine sahiptir. Memeli hücrelerinde UV ile hasarlanmış DNA'daki sinyal ATR tarafından algılanır ve Chk1 tarafından iletilir (21). Memeli hücrelerindeki çift zincir kırıkları ise ATM tarafından algılanır ve Chk tarafından sinyal iletilir (22, 77) Buna rağmen bu iki proteinin fonksiyonlarında bazı örtüşmeler vardır. Chk1 eksikliği farelerde embriyonik ölüme sebep olmaktadır (78), ama Chk2 eksikliğinde fareler yaşamaktadır ve normale yakın kontrol noktası yanıtı vermektedir (79). İnsanlardaki Chk2 mutasyonu ise Li-Fraumeni-benzeri kansere yatkınlık sendromuna sebep olmaktadır (80).

#### 2.4.4. Effektörler

Hücre döngüsü DNA hasar kontrol noktasındaki başlıca görev yapan efektörler Cdc25A ve p53 proteinleridir (2). İnsandaki Cdc25A, B ve C fosfotirozin fosfataz olarak görev yapmaktadır ve hücre döngüsündeki geçişlerde görev yapan siklin-bağımlı kinazları defosforile etmektedir. Cdc25 proteinlerinin fosforilasyonu, proteinlerin nükleusdan çıkarılması proteolitik degradasyonu yada her iki şekilde de proteinlerin inaktive olmasına neden olur. Fosforile olmamış Cdc25, Cdk2'nin defosforilasyonu ile G1/S geçişini düzenlemektedir. Yine aynı şekilde fosforile olmamış Cdc25, Cdc2 fosfotirozini defosforile ederek G2/M geçişini düzenlemektedir (81).

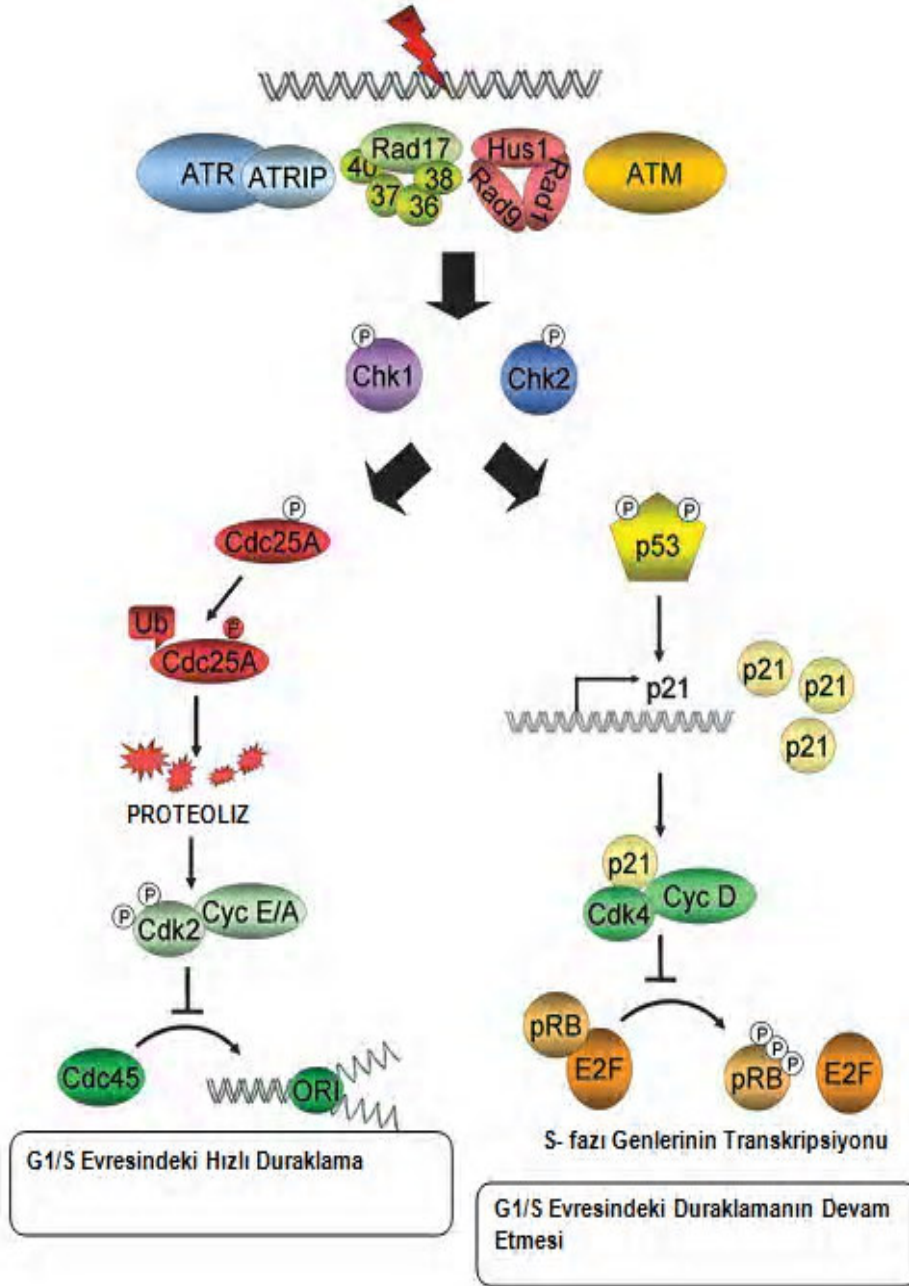
Son zamanlarda yapılan çok sayıda çalışma ile hücre döngüsü DNA hasar kontrol noktasında görev yapan sensörler, araçlar, sinyal ileticileri ve efektörler araştırılmaktadır. Bu basamaklarda görev yapan yeni proteinlerin ortaya çıkması ve tanımlanması ve karakterize edilmesi beklenmektedir.

## 2.5. G1/S KONTROL NOKTASI

G1/S kontrol noktası, DNA hasarı olduğu zaman replikasyonun başlamasını inhibe ederek S fazına geçişi engellemektedir (Şekil 2.4). Normal koşullarda , hücre döngüsünün G1 fazındaki hücreler S fazına girmek için memeli hücrelerindeki özel noktaya gelirler (82). Bu özel nokta insan hücrelerinde, DNA sentezinin tam olarak başlamasından 2 saat önceki noktadır. Eğer DNA hasarı varsa, S fazına geçiş engellenir hatta bu engelleme için özel noktayı geçip geçmediği dikkate alınmaz. Mevcut kanıtlar insan hücrelerinde G1 / S fazı geçişi için aşağıdaki olay dizisini önermektedir. Eğer DNA hasarı iyonize radyasyon veya radiomimetik ajanlar tarafından çift zincir kırıkları şeklindeyse, ATM aktive olur ve öncelikle P53 ve Chk2 olmak üzere çok sayıda hedef molekülü fosforile eder. Bu fosforilasyon iki sinyal iletin yolağını aktive eder, G1/S duraklamasının başlatılması ya da G1/S duraklamasının devam ettirilmesi (81). G1/S geçişinin durdurulması reaksiyonun başlaması Chk2'nin fosforilasyonudur. Daha sonra Cdc25A fosfataz fosforile olur. Cdc25A , nükleer yapıdan çıkarılır ve ubiquitin aracılı proteolitik yıkım ile inaktive edilir (83). Eğer DNA hasarı UV ışığı veya UV-mimetik ajanlar tarafından gerçekleştirildiyse, sinyal ATR, Rad17-RFC ve the 9-1-1 kompleks tarafında algılanır ve Chk1, ATR tarafından fosforile olur. Daha sonra G1 evresindeki duraklama için Cdc25A, aktive olmuş Chk1 tarafından fosforile edilir (2).

Duraklamanın başlamasına sebep olan ATM-Chk2-Cdc25A veya ATR-Chk1-Cdc25A yollarının her ikisinde de, G1/S'deki duraklamanın devamı için p53 aracılı cevap gerçekleşmektedir (Şekil 2.4). Bu duraklama DNA hasar tespitinden birkaç saat sonra tam olarak faaliyettedir (81). Bu aşamaların gerçekleşmesinde, ATM veya ATR p53'ü Ser15 den doğrudan fosforile eder veya Chk2 ve Chk1 aktivasyonu ile Ser20'den aktive eder. p53'ün fosforilasyonu kendisinin nükleer taşınmasını ve yıkımını inhibe eder ve p53 seviyesinin artmasına neden olur (84). p53, p21 dahil olmak üzere hedef genleri aktive eder. p21 ise S evresi düzenleyicisi olan Cdk2-SiklinE kompleksini inhibe eder, böylelikle G1/S geçişindeki duraklamanın devam etmesi sağlanmış olur (85). S fazını devam ettirmek için S fazı genlerinin transkripsiyonun gerçekleşmesi gerekir. Bunun için de Rb'nin E2F transkripsiyon faktöründen ayrılması gerekir. Rb'nin fosforilasyonu E2F transkripsiyon faktöründen ayrılması ile sonuçlanır (81). p21 aynı zamanda Cdk4-SiklinD kompleksine bağlanır ve Rb'nin fosforilasyonunu engeller (85).

G1/S kontrol noktasındaki işlemlerin başlaması için başlatıcı sinyallerin tanımlanması çok önemlidir. Mayalarda yapılan çok sayıda çalışma göstermiştir ki, kontrol noktasındaki yanıtın başlaması için eksizyon tamiri tarafında hasarın işlenmesi gerekli olabilir (86, 87).



**Şekil 2.4.** G1/S Kontrol Noktası . ATM-Chk2-Cdc25A veya ATR-Chk1-Cdc25A yolları aktive olması ile G1/S'deki duraklama gerçekleşir. Chk2 tarafından p53'ün fosforile olmasıyla devam eden diğer yolak ile duraklamanın devam etmesi sağlanır (2).

G1/S'deki duraklamanın gerçekleşmesi için ATM-Chk2-Cdc25A veya ATR-Chk1-Cdc25A yolları aktive olur, duraklamanın devam etmesi için ise Chk2 tarafından p53'ün fosforile olmasıyla devam eden diğer yolak aktive olur (Şekil 2.4).

## 2.6. S EVRESİ KONTROL NOKTASI

S evresi kontrol noktası aslında tam olarak kontrol noktası tanımına uymamaktadır. Çünkü kontrol noktasının orijinal tanımı bir sonraki evreye geçmeden önce bir önceki evreye ait olan reaksiyonların eksiksiz gerçekleşmesini sağlayan biyokimyasal bir yolaktır (88). Ancak kontrol noktalarının moleküler temelleri daha açık hale gelerek, evrelerin geçişinden daha çok hücre döngüsü olaylarının bir düzen içinde gerçekleşmesi ve hücre içindeki belirli bir biyokimyasal olayın diğeri bitmeden başlamasını engellemesini sağlayan biyokimyasal bir düzenleyici kontrol noktası olarak tanımlanmıştır (89). Bu tanımlama ile S evresi kontrol noktası tanımıyla örtüşmektedir. S evresindeki kontrol noktası S fazı süresince meydana gelen hasarlar veya G1/S kontrol noktasında tamir edilmemiş hasarlar tarafından aktive olmaktadır. S fazındaki kontrol noktası, replikasyonun engellenmesi ile sonuçlanır (90).

S evresi kontrol noktasında görev alan çok sayıda kontrol noktası proteinleri ve tamir proteinleri vardır (Şekil 2.5). Çıplak veya aralıklı bir DNA'nın replikasyonundan kaynaklanan çift iplik kırıklarında oluşan hasarlarda, ATM, M/R/N (Mre11/Rad50/Nbs1) kompleks ve BRCA1 kontrol noktasının aktivasyonu için gereklidir (91). ATM çift zincir kırıklarına, M/R/N kompleks, BRCA1, BRCA2 özel dallanmış DNA yapılarına bağlanmaktadır, bundan dolayı bütün bu tamir proteinlerinin sensör olarak görev yaptığı tahmin edilmektedir (92). Aynı zamanda bu proteinler kinaz sinyal kaspaz yolu ile S kontrol noktasını aktive etmektedir. S evresi kontrol noktasının, iki yolakla devam eden çift zincir kırıkları ile başladığı düşünülmektedir. ATM-Chk2-Cdc25A-Cdk2 yolağı bir kontrol noktası cevabı olarak daha iyi tanımlanmıştır. Diğer yolak ise SMC1 proteinin ATM tarafından fosforilasyonuna bağlı olarak başlamaktadır ve BRCA1, FANCD2, and NBS1 proteinleri yardımcı olarak iş görmektedir. Bu yolak daha çok kurtarma işlemi olarak aktifleşen bir ve çok sayıda rekombinasyon proteinlerinin aracı olduğu bir yolaktır (93).

İyonize radyasyonla uyarılmış S fazı kontrol noktasının en önemli özelliği Radio Dirençli DNA Sentezi (*radioresistant DNA synthesis*; RDS) olarak adlandırılmasıdır. RDS, kontrol noktası ve çift zincir kırıklarının tamiri arasındaki çok yakın bir ilişki ile

karakterize edilmektedir. Yaban tip (Wild-type; WT) hücrelerde, iyonize radyasyon devam eden DNA sentezinin aniden durmasına neden olmaktadır. Buna karşılık, Ataksi Telanjektazi hastalarına ait hücrelerde yani iyonize radyasyona çok fazla hassas olan hücrelerde, DNA sentezi radyasyon ile inhibe olmaz ve S fazı gecikmesiz devam eder (94).

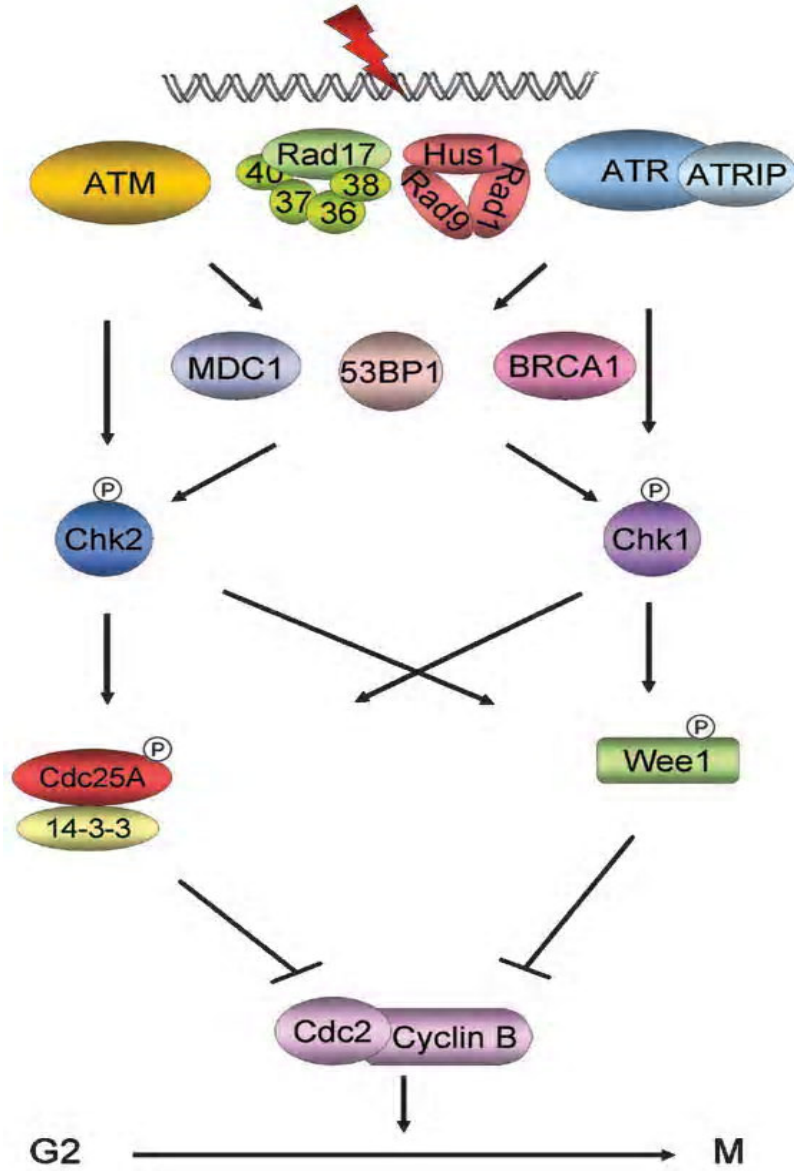
Çift zincir kırıklarında sensör olan ATM'nin aksine, büyük baz lezyonlarına neden olan UV veya kimyasal ajanlar tarafından DNA hasar gördüğünde, PIKK ailesi üyesi olan ATR hasar sensörü olarak görev yapar. ATR, ATR-ATRIP heterodimeri halindedir (21). ATR kromatine (95) bağlanır, UV ile doğrudan indüklenmiş lezyonlara (65) ve RPA kaplı tek zincirli DNA'ya da bağlanma özelliğine sahiptir (15), daha sonra ATR aktifleşir. Aktifleşmiş ATR, Chk1'i fosforile eder ve daha sonra Cdc25 fosforile olur, böylece replikasyon orijininde inhibisyon gerçekleşir (96). *Xenopus* yumurta özütleri ile yapılan çalışmalar, S fazı boyunca tek zincirli DNA'nın olmasının ATR'a bağlı kontrol noktasını aktive ettiğini göstermektedir. ATR kontrol noktası, Cdc45'in kromatine bağlanması için gerekli olan Cdc7-Dbf4 protein kinaz aktivitesinin düzenlenmesi ile replikasyonu inhibe eder (97). Cdk2/Siklin E (CDK kompleksi) veya Cdc7/Dbf4 (DDK kompleksi)'in düzenlenmesi S evresi kontrol noktası boyunca geç replikasyon orijinin inhibe edilmesine neden olmaktadır. ATR ile başlatılan sinyal yolağı, ATM sinyal yolağında olduğu gibi BRCA1'in fosforilasyonu ile sonuçlanmaktadır (98).

*S. cerevisiae* ve *S. pombe* ile yapılan çalışmalarda, replike olan DNA'daki lezyonların replikasyon çatalının durdurulmasına sebep olduğu gösterilmiştir (99). S fazı kontrol noktası mutant olanlar, replikasyon çatalının düzenli bir şekilde durdurulmasından ve yeniden düzenlenmesinden yoksundurlar. Uzun tek zincirli bölge aralıklarının birikmesi bu mutantlarda DNA hasarı ile sonuçlanmaktadır (100).

## 2.7. G2/M KONTROL NOKTASI

G2/M kontrol noktası, DNA hasarı olduğu zaman hücrelerin mitozu girmesini önler (Şekil 2.5). G2 evresindeki hasarı takiben, hasar çeşidinin tipine bağlı olarak ATM-Chk2-Cdc25 sinyal ileti yolağı ve/veya ATR-Chk1-Cdc25 sinyal ileti yolağı aktive olur (101). Diğer kontrol noktalarında olduğu gibi, UV ışığı ile oluşmuş belirli tip DNA lezyonlarında ATR-Chk1 sinyal yolağı başlar, ama ATM-Chk2 sinyal yolağı ile duraklamanın devamlılığı sağlanır (21). Aynı şekilde, iyonize radyasyon ile oluşmuş çift zincir kırıkları gibi diğer tip lezyonlarda da, işlem tamamen tersine işler (101).

Kontrol noktası kinazları Cdc25 ve Wee1 proteinlerinin düzenlenmesi ile mitozaya girişi engellemektedir. Cdc25 ve Wee1 proteinleri Cdc2/SiklinB'nin aktivitesini kontrol eder (102). Chk1-Cdc25A yolağının engellenmesi iyonize radyasyonun neden olduğu S ve G2 kontrol noktasını ortadan kaldırmaktadır (103). Bu sonuçlar G2/M kontrol noktası için Cdc25 fosfatazın temel bir efektör olduğunu göstermektedir (2).



**Şekil 2.5.** G2/M Kontrol Noktası . ATR-Chk1-Cdc25 sinyal ileti yolağı ve/veya ATM-Chk2-Cdc25 sinyal ileti yolağının aktive olması ile G2/M geçişindeki kontrol noktası aktive olur (2).

G2/M geçişindeki kontrol noktası ATR-Chk1-Cdc25 sinyal ileti yolağı ve/veya ATM-Chk2-Cdc25 sinyal ileti yolağı aktive olur (Şekil 2.5)

## 2.8. REPLİKASYON KONTROL NOKTASI (S/M Kontrol Noktası)

S/M kontrol noktası olarak da tanımlanan replikasyon kontrol noktası, DNA replikasyonu devam ederken ya da durdurulduğu zaman mitozun inhibe olmasıdır (4). Replikasyon kontrol noktası mayalar (88) ve memeli hücreleri (104) dahil olmak üzere bütün model sistemlerde gözlenmiştir. Her iki kontrol noktası farklı da olsa, hem G2/M hem de replikasyon kontrol noktasında ATR-Chk1-Cdc25 sinyal yolağı mitozun inhibe olmasını gerçekleştirir. DNA hasarı veya nükleotid yokluğu ile durdurulmuş replikasyon çatalında ve devam eden replikasyonda replikasyon kontrol noktası başlar. *Xenopus* yumurta hücreleri ile yapılan *in vitro* çalışmaları, başlangıç sinyalinin replikasyon çatalının bir bileşeni olduğunu ve çeşitli replikasyon inhibitörleri ile yapılan çalışmalar da sinyalin Okazaki parçalarının RNA primerleri olduğunu göstermiştir (105).

DNA hasarı belirli bazı biyokimyasal yolakları aktive eder. ilk olarak DNA tamir enzimleri hasarı tanır ve yok eder. İkincisi DNA hasarı, hücre döngüsünü durduran DNA hasar kontrol noktasını aktive eder. Üçüncüsü, transkripsiyonel cevaptır yani DNA hasarı belirli bazı genlerin transkripsiyonunu aktive eder. Transkripsiyonel cevabın hücrenin hayatta kalmasındaki rolü tam olarak bilinmemektedir. Son olarak da, programlı hücre ölümü DNA hasarı sonucu aktive olur (2).

Belirli durumlar altında bu dört DNA hasar yolakları birbirinden bağımsız olarak fonksiyon göstermektedir ama çoğu durumda da bu cevap reaksiyonları arasında çok geniş bir etkileşim vardır. DNA hasarına kontrol noktasında verilen cevaplarda görev yapan proteinlerin sadece hücre döngüsünü durdurmakla sınırlı olmayan, DNA tamirine doğrudan yada dolaylı olarak aracılık eden fonksiyonlarının olduğu çok açıktır. Bu fonksiyonların nasıl gerçekleştiği, DNA hasar ajanlarının nitelik ve nicelik olarak nasıl hasar verdiği ve buna bağlı olarak hücrenin nasıl DNA tamirini ya da apoptozu seçtiği çok önemli çalışma alanlarıdır. Hücrenin genotoksik ajanlara nasıl cevap verdiği ve nasıl bir strateji izlediği kanserin önlenmesinde ve kemoterapinin geliştirilmesinde çok önemlidir. Bu nedenle DNA hasar cevap yolakları gelecekteki çalışmalar için daha da fazla dikkate alınmalıdır.

## 2.9. RPA (Replikasyon Protein A)

RPA proteini literatürde birden fazla isim ile anılmaktadır, bunlar Replikasyon Protein A (RPA), Replikasyon Faktör A (RFA), ve insan veya HeLa ssDNA bağlanma proteinidir (human, HeLa ssDNA binding protein; HSSB) (106). RPA en fazla kullanılan ortak bir adlandırmadır (24). RPA ilk olarak insan hücre özütlerinden Simian virus 40 (SV40)'un DNA replikasyonu için gerekli bir bileşen olarak izole edilmiştir (107). Daha önce çok sayıdaki ökaryotik tek iplikli DNA'ya bağlanan (single-stranded DNA-binding protein;SSBs) proteinler hem virüslerde hem de hücrelerde tanımlanmasına rağmen (108), RPA, DNA metabolizmasına doğrudan dahil olan ilk hücreSEL SSB protein olarak gösterilmiştir (24). Heterotrimerik ssDNA bağlanma proteinleri bütün ökaryotlarda tanımlanmıştır (109). Bu araştırmalar insan RPA'nın (human RPA; hsRPA)'in ökaryotik tek zincirli DNA'ya bağlanan protein ailesi üyelerinden biri olduğunu göstermiştir. RPA tek iplikli DNA'ya bağlanan bir proteindir, yüksek bağlanma kapasitesi ile tek iplikli DNA'ya (107) ve daha az bir bağlanma kapasitesi ile çift zincirli DNA'ya ve RNA'ya bağlanmaktadır (110). RPA insan hücrelerinde en fazla bulunan tek zincirli DNA'ya bağlanan proteindir (27).

RPA, hücre için çok önemli olaylarda görev almaktadır. RPA, DNA tamirinde (28) ve DNA rekombinasyonunda(29) iş yapmaktadır. RPA, DNA işlenmesi ile ilgili yollarda görev alan önemli ve genel bir proteindir. DNA helikaz veya nükleaz tarafından tek zincirli DNA oluşturulduğu zaman ssDNA üzerinde, çift iplikli DNA tekrar oluşana kadar bulunur. (23). Hücre içinde RPA ssDNA'ya bağlandığı zaman fosforile olmaktadır (111). RPA'nın aynı zamanda spesifik dsDNA regülör dizilerine bağlanarak, transkripsiyonun düzenlenmesinde de görev aldığı düşünülmektedir (112). RPA'nın protein-protein etkileşimleri ve hücre döngüsünde sırasındaki fosforilasyonu DNA metabolizmasının düzenlemesi için çok önemlidir.(113) RPA'nın insan hücrelerindeki immünolokalizasyonu, RPA'in nükleusda ve replikasyon merkezinde bulunduğunu göstermiştir (114). Siklin-bağımlı kinazların üyeleri de, replikasyon merkezinde lokalize olmuştur ve DNA sentezi için gereklidir. Bu çalışmalar RPA'nın replikasyonun başlangıcında ve DNA sentezi boyunca lokalize olduğunu göstermiştir (115). Hücre ekstraktları kullanılarak yapılan DNA tamir testlerinde, ilk olarak RPA'nın DNA tamiri için gerekli olduğu gösterilmiştir (28). DNA hasarlandığı zaman RPA fosforlanmaktadır (116). RPA nükleotid ekzisyon tamirinde çok basamaklı görev

yapmaktadır. RPA hasarlı DNA'ya bağlanır ve hasar tanımlamasında ve ekzisyon tamirinde görev alan üç proteinle etkileşime girer ki bunlar, XPA, XPG ve ERCC1/XPF'dir (117-118). XPA'nın hasarlı DNA'ya bağlanmasını, RPA önemli ölçüde uyarmaktadır (117).

İnsan RPA'sı (human RPA; hsRPA) 70, 32 ve 14kDa'luk 3 alt birimlerden oluşan kararlı bir komplekstir (107). RPA70, RPA32 ve RPA14 üç alt birimi ile RPA ökaryotlar arasında korunmuş kararlı bir proteindir. (23).

hsRPA, heterotrimerik yapısı ile bilinen tüm tek iplikli DNA'ya bağlanan proteinlerden farklılık göstermektedir. RPA'nın üç alt birimi için insanlarda 3 gen tanımlanmıştır, RPA1, RPA2 ve RPA3 (119).

RPA, ssDNA'ya heterotrimerik kompleks olarak bağlanır (120) ve bağlanma aktivitesi 70kDa'luk alt birimde lokalize olmuştur (26). Fizyolojik tuz konsantrasyonu şartlarında, RPA genel olarak 30 nükleotitik bir bölgeye bağlanmaktadır. Bununla birlikte özel koşullar altında ise hsRPA'sı 8 ila 10 nükleotitik bir alana da bağlanabilmektedir (121). hsRPA, ssDNA'ya bağlandığı zaman konformasyonel bir değişikliğe uğrar. Bu değişiklik RPA kompleksinin görüntülenme ve proteolitik duyarlılık çalışmaları ile gösterilmiştir. Bu konformasyonel değişiklik hem RPA70 hem de RPA32'yi içermektedir. Bu değişiklikler RPA'nın fosforilasyon için daha iyi bir substrata dönüşmesine neden olmaktadır (122, 123).

RPA'nın bağlanma fonksiyonu ile yapılan bir çalışmada, RPA ve çift iplikli DNA (double stranded DNA; dsDNA) ile yapılmıştır. RPA non-spesifik bir dsDNA'ya ssDNA'ya göre üç ila dört kat daha az bir affinite ile bağlanmaktadır (26).

### **Rpa'nın Diğer Proteinler İle Olan Etkileşimleri**

RPA çeşitli proteinlerle özel olarak etkileşime girmektedir. Bu proteinleri genel olarak üç sınıfta toplamak mümkündür; DNA replikasyonundaki proteinler, DNA tamirindeki proteinler ve diğer proteinler.

RPA, DNA replikasyonundaki uzama evresi için gereklidir ve DNA polimeraz alfa-primaz kompleksi ile etkileşime girmektedir, bu etkileşim replikasyon için gerekli olabilir (24). Böylelikle RPA proteinin replikasyon proteinleri ile etkileşime girdiği söylenebilir.

RPA aynı zamanda nükleotid eksizyon tamiri için gerekli olan proteinlerle etkileşime girmektedir. RPA, XPA (xeroderma pigmentosa group A protein) ve XPG (xeroderma pigmentosa group G protein) proteinleri ile doğrudan etkileşime girer (24). Bu iki proteinin de hasar tanımlanmasında ve ekzisyonunda görev yapmaktadır (117).

RPA'nın p53 ile etkileşime girdiği ve bu etkileşimin RPA'nın tek iplikli DNA'ya bağlanmasını engellediği gösterilmiştir (113). RPA, insan hücrelerinde (124) ve mayalarda (125) DNA Helikaz aktivitesini uyarmaktadır.

## 2.10. TIMELESS

Timeless hücre döngüsü kontrol noktası proteindir. Timeless ilk olarak Drosofilada memeli sirkedyan protein homoloğu olarak keşfedilmiştir (126). Buna rağmen, memeli Timeless proteinine en yakın filogenetik yakınlık gösteren protein aslında hücre döngüsü ile ilgili mayalarda Tof1 ve Swi1(127) ve *C.elegans*'da TIM-1'dir (128). İnsan Timeless proteini Chk1'in ATR tarafından fosforile olması ve aktive olması için gereklidir (41). Bundan dolayı Timeless, hasar sensörleri ve sinyal iletilicileri arasında kontrol noktası aktivasyonu için aracı olarak görev yapmaktadır. Bununla birlikte Timeless'ın mayalardaki homoloğu olan Swi1 geç kalmış replikasyon çatalının stabilize olması için görev yapmaktadır (127). Bu hem Swi1 hem de insan homoloğu olan Timeless'ın aynı zamanda hasar sensör proteini olarak görev yapabileceği gösterilmiştir (41).

Timeless *C. elegans*'da kromozom kohezyonunun düzenlenmesinde de görev yapmaktadır (128). Timeless miktarının azalması, replikasyon kontrol noktasında aksamaya sebep olmaktadır (41). Timeless mutant hücreler embriyonik ölüme sebep olmaktadır ve Timeless'ın doğrudan hücre döngüsü kontrol noktasında görev yapması bu ölümün bir nedeni olabilir (33). Timeless'ın çok fonksiyonlu bir protein olduğuna bir başka kanıt ise, Timelessın Clock (Cry2) ve Checkpoint (Chk1) proteinlerine bağlanmasıdır (41). Timeless, Chk1 ile etkileşime girmektedir. Hem UV ve hem de Hidroksiürea (HU) muamelesi yapılan hücrelerde Timeless-Chk1 etkileşimi anlamlı bir şekilde artmaktadır. Bu etkileşim Timeless'ın, Chk1'ı regüle ederek kontrol noktasında görev aldığını ve kontrol noktası düzenlenmesinde kilit bir göreve sahip olduğunu göstermektedir (41). Fare Timeless'ı (mTim), Drosofila Timeless'la (dTim) olan homolojisi temel alınarak sekanslanmış, klonlanmış ve isimlendirilmiştir. dTim biyolojik saatin moleküler mekanizması için gereklidir. Sirkedyan döngünün geç

evrelerinde dTim artar ve başka bir sirkedyan proteini olan PERIOD ile fiziksel bir etkileşime girer (42).

Chk1, HU etkisi altındaki kontrol noktası cevabında Ser345 (Serin345) de ATR tarafından fosforile olmaktadır (129). Timeless ile ATR ve ATRIP arasındaki immünopresipitasyon çalışmaları, Timeless'ın, hem ATR hem de ATR bağlanma ortağı olan ATRIP ile etkileşime girdiğini göstermiştir . Bu sonuçlar Timeless'ın ATR ve Chk1 arasında kontrol noktası aracısı olarak görev yaptığını göstermektedir. HeLa hücrelerinde siRNA ile Timeless'ın indirgenmesi çalışmalarının sonucu Ser345 -anti-fosfo-Chk1 antikoru ile kontrol edilmiş ve Timelessın indirgenmesinin belirgin bir şekilde Chk1 fosforilasyonunu azalttığı görülmüştür (41). Sonuç olarak Timeless Chk1 için çok kritik bir fonksiyona sahiptir.

## 2.11. TIPIN

Timeless proteinin çok önemli görevlere sahip olması bu proteinin daha fazla araştırılmasına sebep olmuştur. Memeli Timeless proteinin olası biyokimyasal yollardaki fonksiyonunu araştırmak amacı ile memeli Timeless (mTim) proteini ile interakt eden proteinler araştırılmıştır. Tipin protein, mTim proteinin etkileştiği ettiği protein olarak karakterize edilmeden önce gen bankası memeli veritabanında hipotetik protein olarak tanımlanmıştır (GenBank accession numbers: fare, AK011357; insan, BC000870). Daha sonra yapılan çalışmalar sonucunda Tipin, Timeless ile etkileşen eden protein olarak olarak adlandırılmıştır (42).

İnsan Tipin geni 15. kromozomda, 15q22.31 şeklinde lokalize olmuştur. Fare Tipin geni ise 9. kromozomda yer almaktadır.

DNA replikasyon kontrol noktası için Tipin gereklidir. Yapılan çalışmalar daha ayrıntılı incelemeler ile Tipin'in nükleer bir protein olduğu ve sadece sentez evresinde kromatin ile birleştiği gösterilmiştir (130). Tipin'in indirgenmesi hem DNA hasarına hem de replikasyon stresine karşı daha fazla hassasiyete yol açmaktadır. Tipin DNA hasarı kontrol noktası G<sub>2</sub>/M için gereklidir (131). HU veya UV ışığına etki olarak oluşan Chk1 fosforilasyonu Tipin indirgenmiş hücrelerde, serin317 de azalmış veya serin345'de tamamen yok olmuştur. Chk2 için treonin 68'de Tipin indirgenmesine bağlı olarak bir etki gözlenmemiştir (130). Tipin, ayrıca oksidatif stresde görev yapan peroxiredoxin 2 ile de etkileşime girmektedir ve oksidatif stress Chk1, Chk2 ve p53 fosforilasyonunu indüklemektedir (131).

Yapılan *in vivo* çalışmalarda Tipin'in mTim ile birlikte eksprese olduğu gösterilmiştir. İki proteinin birlikte ekspresyonu embriyonik dokularda yapılan northern blot sonuçları ile gösterilmiştir. Embriyonik gelişim sürecinde, potansiyel olarak etkileşen bu proteinlerin , insan beyinde benzer bölgelerde eksprese edildiğini göstermek için, mTim ve Tipin proteinlerinin mRNA ekspresyonları *in situ* hibridizasyon ile araştırılmıştır. Elde edilen birlikte ekspresyon örnekleri, mTim ve Tipin proteinlerinin fizyolojik olarak etkileşime girdiğini desteklemektedir (42) ve Tipin, Timeless ile *in vivo* olarak eksprese olmaktadır. Timeless proteini SCN (suprachiasmatic nucleus) nöronlarında nükleer protein olarak tanımlanmıştır (132). Timeless'ın nükleer translokator olarak görev yapabileceği düşünülmüştür ve Yapılan çalışmalarda Timeless'ın Tipin'in nükleer lokalizasyonunu düzenlediği bildirilmiştir. Tipin Timeless ile etkileşen ana protein olarak görülmektedir. Mayalarda ve NIH3T3 hücrelerinde *in vitro* etkileşim gösterilmiştir. Bu genlerin gelişmiş dokularda ve embriyonik gelişim sürecindeki birlikte ekspresyonu, *in vivo* olarak da etkileşimi doğrulamaktadır (42).

Flag etiketli Timeless'ı ve His etiketli Tipini memeli hücrelerinden eksprese ettirmek için plasmidler oluşturulmuş ve HEK293T hücrelerindeki ko-transfeksiyon ile insan Timeless ve Tipin proteinlerinin arasındaki ilişki incelenmiş ve sonuç olarak Tipin'in Timeless ile kompleks oluşturduğu gözlenmiştir (133). TIM-TIPIN Timeless'ın HeLa hücrelerinde inaktive edilmesi , HU ile oluşan replikasyon kontrol noktası cevabında ve UV ile oluşan S evresi kontrol cevabında olumsuz şekilde bir azalmaya neden olmuştur. Bu sonuçlar Timeless ve Tipin'in kontrol noktası cevabı için gerekli olduğunu göstermiştir (130).

Tipin eksprese eden hücrelerde siRNA ile Tipin'in inaktive edilmesi, anlamlı bir şekilde Timeless'ın inaktive edilmesi ile sonuçlanmıştır. Bu sonuçlar Timeless ve Tipin'in kararlı bir şekilde kompleks oluşturduğunu ve Tipin olmadığı zaman Timeless'ın da kararsızlaştığını göstermektedir. Tipin miktarının azalması hem Timeless'ın ekspresyon seviyesinin azalmasına hem de Chk1 aktivasyonunun indirgenmesine neden olmaktadır. Tipin ve Timeless'ın kontrol noktası yanıtındaki görevini incelemek için yapılan çalışmada, HeLa hücreleri Tim ve Tipin siRNA ile transfekte edilip, HU ile replikasyon stresi oluşturup kontrol noktası sinyalleri incelenmiştir. Bu sonuçlara göre hem Timeless'ın ve hem de Tipin'in hücrede azaltılması ile Chk1 fosforilasyonu azalmıştır. Timeless'ın hücrede indirgenmesi DNA sentezinin %33 azalması ile sonuçlanmıştır.

Aynı şekilde Tipin'in hücrede indirgenmesi DNA sentezinin %59 azalması ile sonuçlanmıştır . Timeless ve Tipin hücrede indirgendiği zaman DNA replikasyonu bozulmaktadır. HEK293T hücrelerinde ko-transfeksiyon ile yapılan deneylerde Timeless ve Tipin proteinlerinin 1:1 oranında kompleks oluşturduğu gösterilmiştir. siRNA kullanılarak genlerin inaktive edilmesi ile genlerin fonksiyonları araştırılmıştır. Bulgulara göre Timeless ve Tipin S evresi kontrol noktası için gereklidir. Timeless ve Tipin kararlı bir kompleks oluşturmaktadır ve insan hücrelerinde Tipin olmadığı zaman endojen Timeless karasızlaşmaktadır(133).

Tipin DNA üzerine RPA ile etkileşime girmektedir. Tipindeki korunmuş bölgelerin araştırılması ile 34 amino asitlik bir alanın, nükleotid eksizyon tamiri için gerekli olan XPA protein ile benzerlik gösterdiği bulunmuştur (134). Tipin ile homoloji gösteren XPA proteinin N ucundaki 53 aminoasitlik bölgesi RPA'nın 34kDa'luk alt birimine bağlanmaktadır (135). Bu bilgiden yola çıkılarak Tipin RPA etkileşimi incelenmiştir. HEK293T hücrelerini transfekte ederek yapılan araştırmalar sonucunda DNA replikasyonu ve tamiri için gerekli olan RPA proteini ile Tipin arasında etkileşim olduğu gösterilmiştir. Tipin ve RPA arasındaki direkt etkileşim Sf21 böcek hücrelerinden elde edilen Tipin ve bütün alt birimleri *E. coli*'den saflaştırılan RPA ile doğrulanmıştır. RPA Tipin ile doğrudan bir etkileşime girmesine rağmen Timeless ile aynı etkileşimi göstermemektedir. Yapılan *in vitro* deneylerde RPA Tipin'e spesifik olarak bağlanırken, Timeless'a bağlanmamaktadır. Bu sonuçlar Tipin-RPA etkileşiminin Timeless ve RPA etkileşimine aracılık edebileceği sonucunu doğurmuştur (133).

Timeless tek başına RPA'ye bağlanamazken, Timeless ve Tipin kompleksi RPA'ye bağlanmaktadır. Timeless-Tipin-RPA üçlü kompleksinin oluşması için RPA ve Tipin etkileşimi çok önemlidir. DNA hasar kontrol noktasında aracı olarak görev yapan Timeless insan hücrelerinde Tipin ile kompleks oluşturmakta ve Tipin, Timeless'ın ekspresyonunu dengelemektedir. Timeless ve Tipin kompleks halinde DNA hasarı S evresi kontrol noktasında aracı olarak görev yapmaktadır (131). Timeless ortamda olmadığı zaman RPA, DNA üzerine serbest Tipin yüklüyor olabilir ve bu Tipin yüklenmesi DNA zincir uzamasını inhibe edebilir. Tipin ssDNA üzerinde RPA ile DNA sentezini yavaşlatıyor olabilir ve Timeless Tipin'in bu aktivitesini DNA hasarı olmadığı zaman baskılıyor olabilir (133). Tipin ve Timeless'ın azaltılması, Sentez fazının

işleyişini yavaşlatmaktadır ve DNA sentez oranını azaltmaktadır (j-58).Replikasyon stresi altında kromatine Claspın yüklenmesini Tipin ve Timeless kompleksinin gerçekleştirebileceği tahmin edilmiştir. Tipin'in fonksiyonunu incelemek için RNA ile yapılan çalışmalarda, Tipin siRNA ile muamele edilen hücrelerde, hücre büyümesinin azaldığı görülmüştür. Timeless siRNA muamelesinde ise hücrelerin büyümesi üzerine anlamlı bir etki gözlenmemiştir (130). Timeless ve Tipin doğru kardeş kromatid kohezyonu için gerekli proteinlerdir (136).

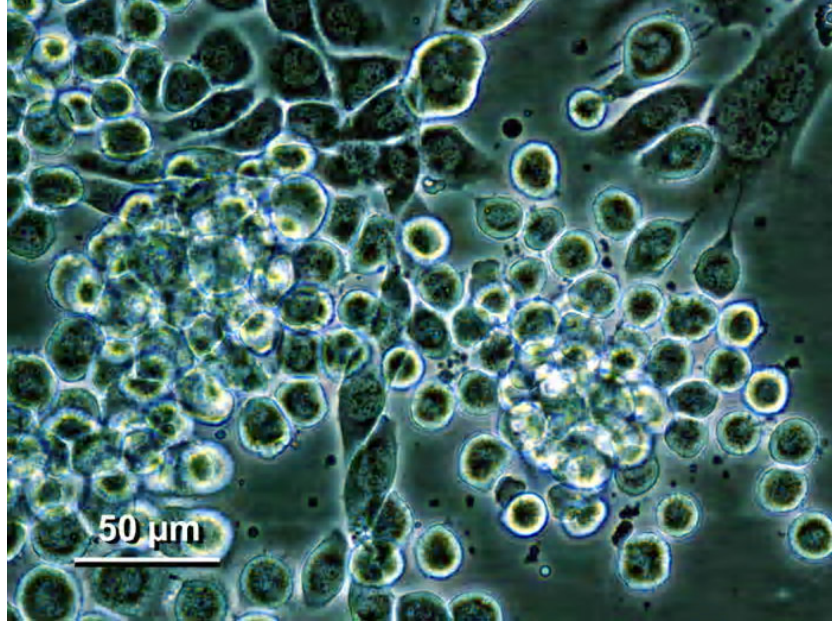
### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. ÇALIŞMANIN YAPILDIĞI YER

Bu çalışma Ocak/2009-Ocak/2011 yılları arasında Amerika Birleşik Devletleri, Kuzey Karolina Üniversitesi Biyokimya Bölümünde Prof. Dr. Aziz Sancar ve ekibinden (Dr. Michael G.Kemp ve Dr. Zafer Akan) ile yapılmıştır (137).

#### 3.2. GEREÇLER

**Hücre Hatları:** Deneylerde kullanılan hücre hatları HeLa, HEK293T ve Flp<sup>TM</sup>-In T-REx<sup>TM</sup>-293 hücreleri Invitrogen`den (Grand Island, New York, Amerika) temin edildi. Hücrelerin büyütülmesi ve bakımı için medyum olarak `Dulbecco's Minimal Essential Medium (DMEM)` kullanıldı. Medium için gerekli olan Fötal Dana Serum (Fetal Bovine Serum; FBS) ve Penisilin-Streptomisin (PS)100X Gibco`dan (Grand Island, New York, Amerika) temin edildi. Sf21 (IPLB-Sf21AE) (Şekil 3.1) ve Hi5 hücreleri Invitrogen`den ve böcek hücrelerinin yetiştirilmesi için Grace`in böcek besiyeri Gibco`dan elde edildi. Flp-In<sup>TM</sup> T-REx<sup>TM</sup>-293 hücre hattı ve bu hücre hattının elde edilmesi için kullanılan Flp-In<sup>TM</sup> sistemi Invitrogen`den temin edildi.



Şekil 3.1. *Spodoptera frugiperda* IPLB-Sf21 hücreleri.

(<http://www.insectscience.org/2.9/ref/figure3.html>)

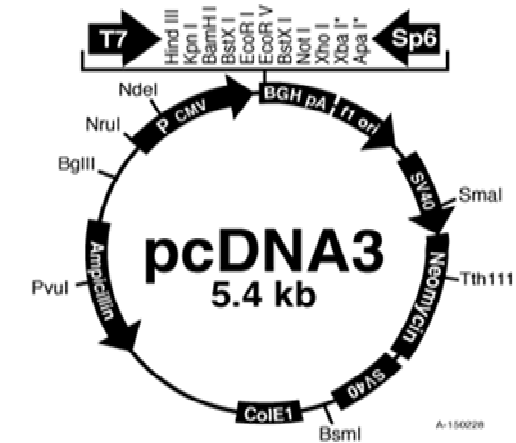
**İmmüno blotting:** Çalışmada kullanılan antikorların listesi Tablo 3.1’de verilmiştir.

**Tablo 3.1.** Deneylerde kullanılan antikorlar ve temin edildikleri kaynaklar.

| Antikor               | Kaynak                                                                                 |
|-----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|
| Timeless              | Anthony Gotter and Hisao Masai<br>(846 Yoshizawa-Sugata,N. 2007; 844 Gotter,A.L. 2007) |
| Tipin                 | Anthony Gotter and Hisao Masai<br>(846 Yoshizawa-Sugata,N. 2007; 844 Gotter,A.L. 2007) |
| Tipin (Rabbit)        | Covance (Princeton, New Jersey, Amerika)                                               |
| ATR (N-19)            | Santa Cruz (Kaliforniya, Amerika)                                                      |
| Claspin (H-300)       | Santa Cruz (Kaliforniya, Amerika)                                                      |
| Chk1 (G-4)            | Santa Cruz (Kaliforniya, Amerika)                                                      |
| Chk2 (H-300)          | Santa Cruz (Kaliforniya, Amerika)                                                      |
| RPA1 (B-6)            | Santa Cruz (Kaliforniya, Amerika)                                                      |
| XPB (S-19)            | Santa Cruz (Kaliforniya, Amerika)                                                      |
| RPA1                  | Calbiochem (Darmstadt, Germany)                                                        |
| RPA2                  | Calbiochem (Darmstadt, Germany)                                                        |
| Phospho-RPA2 (Ser33)  | Bethyl (Montgomery, TX, Amerika)                                                       |
| phospho-MCM2 (Ser108) | Bethyl (Montgomery, TX, Amerika)                                                       |
| anti-Flag             | Sigma (Taufkirchen, German)                                                            |
| anti-His              | Abgent (San Diego, Kaliforniya, Amerika)                                               |
| ORC2                  | BD Biosciences(Bedford, Massachusetts, Amerika)                                        |
| MEK2                  | BD Biosciences (Bedford, Massachusetts, Amerika)                                       |
| ATRIP                 | Zymed (San Francisco, Kaliforniya)                                                     |
| Phospho-Chk1 (Ser345) | Cell Signaling Technology (Massachusetts, Amerika)                                     |

**Plazmidler:** pcDNA3-Flag-Tipin pcDNA4-Flag-Timeless, ve pcDNA3-Flag-RPA2 için pcDNA3 (Şekil 3.2) ve pcDNA4 vektörleri Invitrogen'den temin edilmiştir. Flag-Tipin E185A, Flag-Tipin E190A ve Flag-Tipin L195A mutantları elde edildi ve pcDNA3 içine klonlandı (137). siRNA-resistant Tipin oluşturmak için Dharmacon (Kolorado, Amerika) siRNA kullanıldı. Gen klonlamak için gerekli vektörler ve Platinum Pfx DNA

polimerazı Invitrogen'den, New England Biolabs'dan (Massachusetts, Amerika) restriksiyon tamponları ve restriksiyon enzimleri, 100X sığır serum albumin (Bovine Serum Albumine, BSA, 10mg/ml) New England Biolabs'dan ve hızlı DNA bağlama kiti (Rapid Ligation Kit, katalog no 1635379) Roche'dan temin edildi. Plazmid saflaştırılmasında kullanılan Miniprep Kiti (QIAprep Spin Miniprep Kit, katalog no 27104), Maksiprep Kiti (Qiagen Qiafilter Midi-Maxi Kit, katalog no 12163) ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) saflaştırma kiti (QIAquick PCR Purification Kit, katalog no 28104) Qiagen'e (Valensiya, Kaliforniya) aittir.



**Şekil 3.2.** pcDNA3 Vektörü (Invitrogen, New York, Amerika). pcDNA3, 5.4kb büyüklüğünde bir plazmidir. Ampisilin ve Neomisin antibiyotik direnç geni ve BamHI, EcoRI, EcoRV, Hind III başta olmak üzere çok sayıda enzim kesim bölgesi içermektedir.

Plazmidlerin saflaştırılması için miniprep kiti (QIAprep Spin Miniprep Kit, catalog no: 27104) Maksiprep kiti (Qiagen Qiafilter Midi-Maxi Kit) Qiagen'den temin edilmiştir.

PZR saflaştırma kiti (QIAquick PCR Purification Kit) Qiagen'den temin edilmiştir. DNA için Promega'ya (Madison, Wisconsin, Amerika) ait "1kb DNA ladder" ve jel yükleme boyası kullanıldı.

**Rekombinant Proteinlerin Saflaştırılması:** RPA ve aRPA daha önce tanımlandığı şekilde *E.coli*'den saflaştırıldı (111). His-Flag-Tipin and the Flag-Timeless/His-Tipin heterodimer proteinleri bakülo-virüsle infekte edilen Sf21 hücrelerinden izole edilmiştir. Pürifikasyon için kullanılan Sf21 (*Spodoptera frugiperda*) böcek hücreleri ve Hi5 High Five™ hücresi Invitrogen'den temin edilmiştir. His etiketli Tipin (WT and L195A) proteinleri de *E. coli* (BL21-Codon Plus (DE3)-RIPL)'den Ni-NTA agaroz (Qiagen) kullanılarak pürifiye edilmiştir. Ayrıca Flag ile saflaştırma işlemleri sırasında “Anti-Flag (M2) antibody affinity resin “ ve Flag peptid Sigma'dan temin edildi.

**Transfeksiyon:** HeLa hücrelerinin ve Flp-In™ T-REx™-293 hücrelerinin, DNA ve siRNA ile transfekte edilmesi Lipofectamine 2000 veya Lipofectamine RNAiMAX ile yapıldı ve Invitrogen'den temin edildi. HEK293T hücrelerinin Kalsiyum Fosfat ile transfekte edilmesi için “Calcium Phosphate Transfection Kit” Invitrogen'den elde edildi.

Timeless ve Tipin siRNA daha önce tanımlandığı şekilde elde edildi (41, 48). Tipin için siRNA “ siRNA targeting Tipin” (Dharmacon) ve kontrol için siRNA “non-targeting control siRNA” (Dharmacon) kullanılmıştır. Transfeksiyon için kullanılan OPTI-MEM medium Gibco'dan (Invitrogen-Grand Island, New York, Amerika) temin edilmiştir.

İmmobilize edilmiş DNA pull-down assay için kullanılan Dynabeads® M-280 Streptavidin Invitrogen'den temin edilmiştir.

**İmmünopresipitasyon:** İmmünopresipitasyon reaksiyonları için gerekli olan anti-Flag agaroz ve FLAG peptid Sigma'dan temin edilmiştir.

**SDS-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE):** SDS-PAGE için kullanılan akrilamid ve poliakrilamid Sigma'dan temin edildi. Jel yürütmek için BIO-RAD (Kaliforniya, Amerika) firmasına ait özel camlar ve tanklar kullanıldı.

Western Blotting için Amersham'a ait Hybond 20 cm x 30 cm nitrosellüloz membrane kullanılmıştır. Western blot için Bio-Rad'ın transfer cihazı kullanıldı.

Proteinlerin bağlı molekül kütlelerini belirlemek için New England Biolabs'a ait “Prestained protein marker (10-250kDa) ” kullanıldı. Proteinin derişiminin ölçümü için Bradford yöntemine dayalı olarak ölçüm yapan Bio-Rad protein ölçüm kitinden (Bio-Rad protein assay kit, kalatog no: 500-0002) yararlanıldı.

Deneyler sırasında PZR için Perkin-Elmer Gene Amp 2400, spektrofotometrik ölçümler için Shimadzu UV1601 kullanılmıştır. Protein ve DNA'ların Nano-drop ölçümleri için Nanodrop ND-100 UV-Vis spektrofotometre kullanılmıştır.

### 3.3. YÖNTEMLER

#### 3.3.1. Hücre Hatlarının Ve Böcek Hücrelerinin Elde Edilmesi Ve Kültüre Edilmesi

Deneylerde kullanılan hücre hatları HeLa, HEK293T ve Flp<sup>TM</sup>-In T-REx<sup>TM</sup>-293 hücrelerinin büyütülmesi ve bakımı için `Dulbecco's Minimal Essential Medium` (DMEM) içine %10 Fötal Dana Serum (Fetal Bovine Serum , FBS) ve 100x Penicilin-Streptomisin (PS) ilave edilerek kullanıldı. Hücrelerin pasajlanması, besiyerinin değiştirilmesi, ilavesi, transfeksiyon işlemleri "Laminar flow" kabinde steril bir ortamda gerçekleştirildi. Sf21 ve Hi5 hücrelerinin büyütülmesi ve bakımı için böcek besiyeri (Grace's Insect medium, Invitrogen), %10 FBS ilave edilerek kullanıldı. Böceklerin büyütülmesi ve bakımı için, böceklerin optimum büyüme sıcaklığı olan 27°C'ye ayarlanmış özel inkübatörler kullanıldı. HeLa ve HEK293T hücreleri için özel petri kapları ve plateler kullanılırken, böcek hücreleri için magnetik karıştırıcıların bulunduğu özel flasklar kullanıldı. Bu magnetik karıştırıcıların amacı besiyerindeki oksijen derişimini ayarlamak ve hücrelerin çökelti oluşturmasını engellemektir.

Hücreler hangi amaçla kullanılacaksa, o amaca uygun olarak bakımı ve pasajlama işlemleri yapıldı. Kullanılan petri kabının büyüklüğüne bağlı olarak besiyerinin miktarı aşağıdaki gibi ayarlandı.

#### **Petrinin Büyüklüğü Besiyeri Miktarı**

|               |              |
|---------------|--------------|
| 35mm          | 2.5-3.0 ml   |
| 60mm          | 6.0-7.0 ml   |
| 100mm         | 16.0-17.5 ml |
| 150mm         | 45.0-50.0 ml |
| 6-well plate  | 2.5-3.0 ml   |
| 12-well plate | 1.5-2.2 ml   |
| 24-well plate | 0.8-1.0 ml   |

Hücreleri Tripsin ile petri kabından kaldırmadan önce artık maddeleri ve ölü hücreleri ortamdaki uzaklaştırmak için PBS, yıkama işlemi için kullanıldı. Daha sonra Tripsin ile muamele edilerek hücrelerin petri kabından ayrılması sağlandı.

#### **Petri Kabının Büyüklüğü Tripsin Miktarı**

|               |              |
|---------------|--------------|
| 35mm          | 0.2-0.3 ml   |
| 60mm          | 0.5-0.6 ml   |
| 100mm         | 1.0 ml       |
| 150mm         | 1.5 ml       |
| 6-well        | 0.20-0.30 ml |
| 12-well plate | 0.10-0.20 ml |
| 24-well plate | 0.08-0.10 ml |

### **3.3.2. Rekombinant Protein Üretimi İçin Yapılan Çalışmalar**

#### **3.3.2.1. Bakülovirüs/Böcek Hücre Sisteminde Rekombinant Protein Üretimi**

His-FLAG-Tipin proteini ve FLAG-Timeless/His-Tipin heterodimer proteini Bakülovirüsle enfekte edilmiş Sf21 böcek hücrelerinden saflaştırılmıştır. Bakülovirüs ekspresyon vektör sisteminde (İnvitrogen) bu proteinlerin çok miktarda üretilmesi ve saflaştırılması başarı ile gerçekleştirildi. Bakülovirüs ekspresyon vektör sisteminde ilgilenilen gen, bakülovirüs taşıyıcı vektöre (bakülovirüs promotörü içeren) klonlandıktan sonra homolog rekombinasyon ile ana virüsün genomuna yerleştirilmektedir. Elde edilen bu rekombinant virüsle hücre hatları enfekte edilerek çok miktarda protein üretimi sağlanmaktadır. Rekombinant protein üretilmesi için böcek hücre hatlarının kullanılması, ucuz ve kolay olması, bu hücre hatlarında proteinlerin doğru katlanmasına ve fizyolojik olarak gerçekleşen pek çok posttranslasyonel modifikasyonlara izin vermesi yönünden tercih edilmektedir (138).

Hücre başına düşen ortalama virus sayısı (Multiplicity of Infection-MOI) 10 olacak şekilde enfekte edildikten sonra hücre hatları 48 saat süreyle 27°C’de inkübe edildi. Hücreler toplanarak ses dalgaları ile çalışan sonikatör ile hücre zarları parçalandı. Proteinler daha sonra elde edilen lizattan “Flag” veya “His” etiketine karşı oluşturulmuş

antikor-affinite kolonu yöntemi ile saflaştırıldı. Flag etiketi ile protein protein pröfukasyonu yapılırken proteinin uç bölgesine sekiz aminoasitlik - AspTryLysAspAspAspAspLys- “Flag” adı verilen bir protein eklenmektedir. Flag proteini immünolojik özellikte olup, suda çözünebilir küçük bir proteindir. Bu Flag proteinine karşı özel olarak “Anti-Flag” antikorları oluşturulur. Suda çözünmeyen bir matrikse de “anti-Flag” antikorlar kovalent olarak bağlanarak reçine oluşturulmaktadır. Protein karışımı, bu reçineyi içeren kolondan geçirildiğinde Flag işaretli protein affinite özelliğinden anti-Flag antikorunu bulunduran reçineye bağlanmaktadır. Daha sonra yıkama işlemi ile reçineye bağlanmayan proteinler uzaklaştırılır. Flag etiketli protein flag peptid içeren elüsyon tamponuyla saf olarak elde edilir. Flag peptidi Flag işaretli protein ile yarışmaya girerek hedef proteinin matriksten ayrılmasını sağlamaktadır. Eğer var ise Flag işaretli proteinlerle etkileşime giren diğer proteinler de ana hedef proteine bağlı olarak saflaştırılabilir. Eğer gerekli ise Flag etiketi proteinin ana yapısından uzaklaştırılabilir. Flag etiketinde Tripsinojen ön dizisinin bulunması bu işleme olanak sağlamaktadır. Saflaştırma işleminden sonra enterokinazla muamele edilerek etiketin proteinden uzaklaştırılması sağlanır. Antikor-affinite kolon kromatografi yöntemi proteini tek basamakta saflaştırmaya ve proteinin tanımlanmasını kolaylaştırmaya olanak vermektedir (139).

### **3.3.2.2. *E.coli*`den Rekombinant Protein Üretimi**

His-Tipin (WT) ve His-Tipin (L195A) proteinleri ise *E.coli*`den (BL21-Codon Plus(DE3)-RIPL) saflaştırılmıştır. Antikor-affinite kolon kromatografi yöntemi ile “His” etiketine uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Nikel saflaştırılması sayesinde bu proteinler *E.coli*`den çok miktarda elde edilmiştir. “His” etiketi ( 6xHis tag-Polihistidine tag) altı adet histidin aminoasittinden oluşmaktadır. His etiketli proteinlerin saflaştırılmasında Ni-NTA agaroz (nikel-nitrilotriaseti asit-agaroz) kullanılmaktadır. İmidazol içeren elüsyon solüsyonu ile His etiketli proteinlerin eldesi tamamlanır. Protein izolasyonu Ni-NTA’nın temin edildiği firma olan Qiagen’in tavsiye ettiği gibi yapıldı.

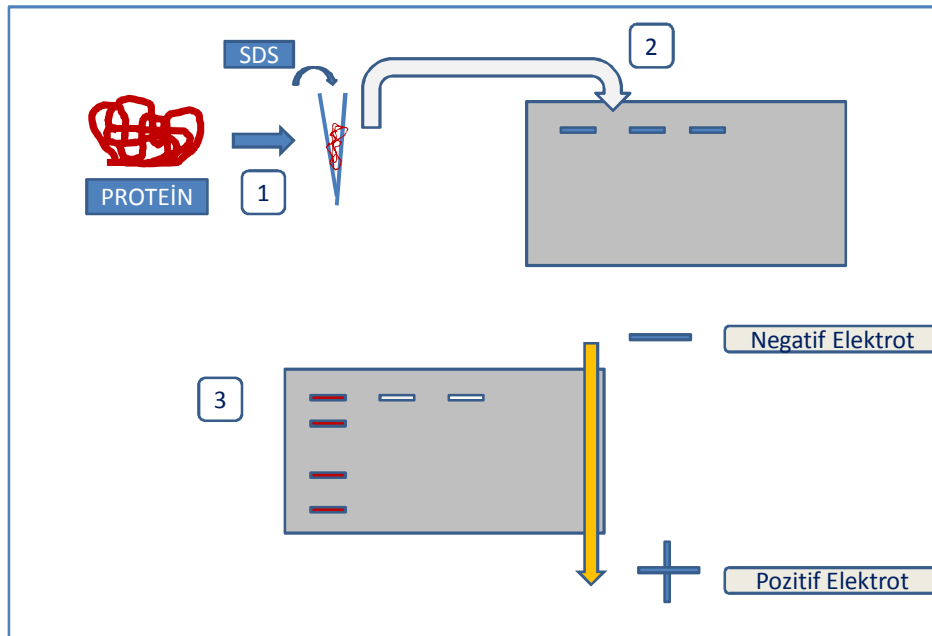
### 3.4. SDS-PAGE UYGULAMALARI

SDS (Sodyum dodesil sülfat) proteinleri denature eden ve negative yük veren bir deterjandır. PAGE proteinleri sahip oldukları yüklerine göre ayıran moleküler biyolojik bir tekniktir. SDS-PAGE genellikle proteinlerin moleküler ağırlıklarını belirlemek için kullanılır (140). Elektrik akımının olduğu bir ortamda, proteinler sahip oldukları eksi elektrik yükünden dolayı katotdan anoda doğru hareket eder. Böylelikle proteinler moleküler ağırlıklarına göre ayrılmış olur (Şekil 3.3).

Saflaştırma işleminden sonra elde edilen proteinler SDS-PAGE'e yüklenir ve yürütülür. SDS-poliakrilamid jellerin yüzde oranları saflaştırılan proteinlerin büyüklüklerine göre aşağıdaki gibi ayarlanır.

#### %SDS-PAGE Jel Moleküler Kütle Aralığı

|     |                |
|-----|----------------|
| %5  | 60 ile 200 kDa |
| %10 | 16 ile 70 kDa  |
| %15 | 12 ile 45 kDa  |



**Şekil 3.3.** SDS-PAGE Metodu. Ayrımı yapılacak protein'in SDS ile “-“ yük kazanması sağlanır (1), Jele yüklenir (2), elektrik akımı ile proteinlerin negatif elektrottan pozitif elektrota hareketi sağlanır (3), böylelikle proteinlerin büyüklüklerine göre ayrımı yapılmış olur (140).

### 3.5. ELEKTROFOREZ JELLERİNDEKİ BANTLARIN BELİRLENMESİ

PAGE'den sonra proteinlerin görünür hale gelmesi için rutinde iki metod uygulanır. Bunlar “Coomassie Parlak Mavisi, Coomassie brilliant blue R-250” ve “Gümüş Boya” boyamalarıdır. Coomassie boyası 1µg'a kadar proteinleri belirliyebilme özelliğine sahipken, Gümüş boyama daha hassas olup 0.1µg düzeyindeki proteinleri de boyayabilmektedir (141).

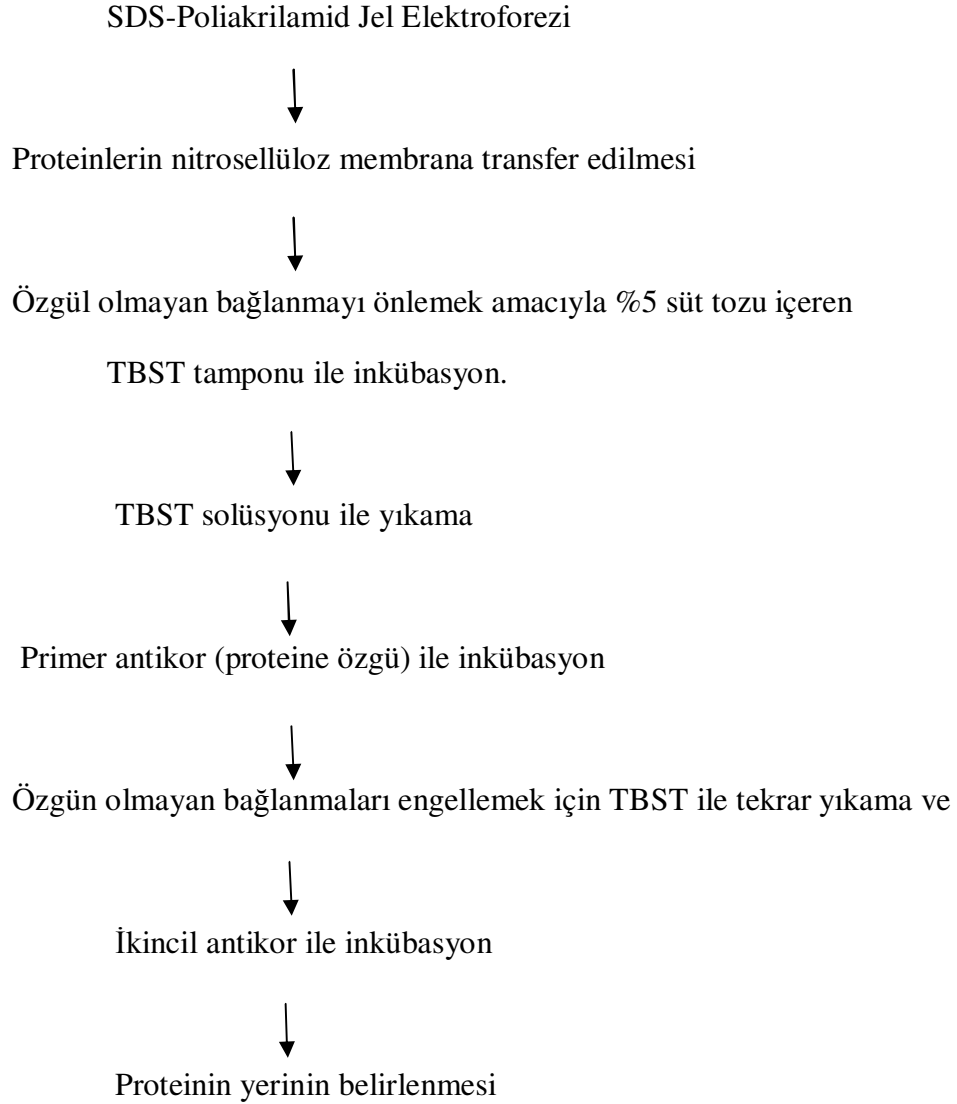
SDS-PAGE jeli camdan uzaklaştırılır ve ddH<sub>2</sub>O ile yıkanır. En az bir saat Coomassie Boyası ile boyama işlemi yapılır. En az bir saat de de-stain solüsyonu ile muamale edilerek bağlanmayan fazla boyanın uzaklaştırılması işlemi yapılır. Gerek boyama işlemi gerekse boyanın uzaklaştırılma işlemi en az bir saatten bir geceye kadar duruma göre uzatılabilir.

RPA2 ve Tipin'nin interaksiyonun RPA kaplı ssDNA üzerindeki Timeless-Tipin ve Claspın stabilizasyonuna etkisini araştırmak için protein saflaştırılması yapıldı. RPA, aRPA(alternatif) Tipin-His E.coli'den, His-FLAG-Tipin, His-FLAG-Timeless/His-Tipin ve His-FLAG-Claspın bakulovirüsle enfekte edilen böcek hücrelerinden saflaştırıldı . Saflaştırılan proteinler Coomassie Boyası ile boyandı (Şekil 4.1)

Protein miktarları ise Bradford yöntemi ile Bio-Rad protein ölçüm kiti kullanılarak yapıldı. Bradford yöntemi protein-boya bağlanma prensibi ile mikrogram miktarlarda protein tayini için kullanılan hızlı duyarlı bir yöntemdir.

### 3.6. WESTERN BLOTTING

Western Blotlama tekniği spesifik proteinlerin belirlenmesinde ve karakterizasyonunda yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Western Blotting birbirini izleyen 3 basamaktan oluşur : SDS-PAGE ile proteinlerin ayrılması, proteinlerin nitrosellüloz bir membrana ya da başka bir membrana transfer edilmesi ve immobilize olmuş proteinin spesifik antibody ile reaksiyonu ve bu antijen-antikor kompleksinin ikincil antikor (genellikle peroksidaz bağlı) ile belirlenmesi (142).

**WESTERN BLOTTİNG TEKNİĞİNİN UYGULAMA BASAMAKLARI:****TBST (Tris Tamponlu Tuz; Tris-Buffered Saline+Tween):**

50 mM Tris-HCl, pH:7.5, 135 mM NaCl, %0.1 Tween-20

**Bloklama süt tozunun kullanılması:**

%5'lik yağsız süt tozu içeren TBST çözeltisi ile bloklama işlemi yapılır. Süt tozu ile inkübasyon genel olarak oda sıcaklığında 1 saat süre ile gerçekleştirilir. Bloklama işleminde de karıştırıcı kullanılır.

**Primer Antikor Uygulaması**

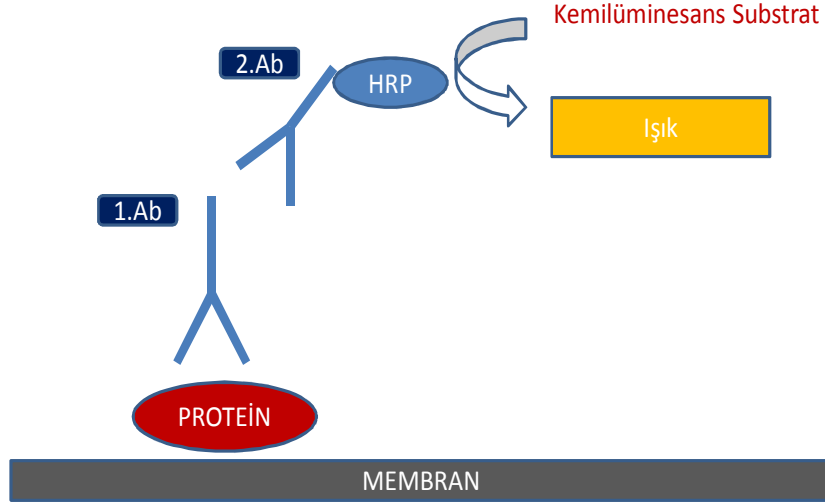
Bakterial kontaminasyonu önlemek için %0.02 Sodyum Azid kullanıldı. Primer antikorlar TBST içinde seyreltilerek kullanıldı. Kullanılan antibodinin özelliğine bağlı olarak 1:500 ile 1:5000 arasında seyreltilir. Genel olarak oda ısısında 1-2 saat ya da 4°C’de bir gece primer antikor ile karıştırıcı üzerinde inkübasyon işlemi yapılır.

**Sekonder Antikor Uygulaması**

Primer antikordan sonra sekonder antikora geçmeden önce TBST ile yıkama işlemi yapılır. Böylelikle özgün olmayan primer antikor bağlanmaları engellenmiş olur. Sekonder antikor için 1 saat oda sıcaklığı yeterliydi, ama daha uzun inkübasyonlar da yapılabilir. Sekonder antibodi, %5 süt içeren TBST içinde dilue edilerek kullanılır. Tipik dilüsyon oranları ise 1:5000 ile 1:20000 arasında değişmektedir.

**ECL (Enhanced Chemiluminescent ) Substrat Uygulanması**

Sekonder antikora bağlı peroksidaz enzimi (HRP:Horseradish Peroxidase) ile kemilüminesans substratın reaksiyonu ile primer antibodinin bağlı olduğu spesifik proteinin yeri tespit edilir. (Şekil 3.4) Işığın fotoğraf filmi üzerine yapmış olduğu yansıma sonucu, filmde proteinin yeri tespit edilir (143).



**Şekil 3.4.** ECL (Enhanced Chemiluminescent) Substrat Uygulanması. Membran üzerindeki proteinin belirlenmesi için primer ve sekonder antikör uygulaması, HRP ve kemilüminesans substrat ile ışımaya reaksiyonun elde edilmesi (143).

### 3.7. TRANSFEKSİYON

HeLa hücrelerine ve Flp<sup>TM</sup>-In T-REx<sup>TM</sup>-293 hücrelerine DNA ve siRNA (short interfering RNA) transfeksiyonu Lipofektamin (Lipofectamine 2000 veya Lipofectamine RNAiMAX) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Lipofektamin 2000 veya Lipofektamin RNAiMAX ile transfeksiyon işlemi temin edilen firma olan Invitrogen'in protokolüne göre gerçekleştirildi. HEK293T hücrelerinin transfeksiyonu ise kalsiyum fosfat kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Timeless ve Tipin için hem daha önce laboratuvarımızda tanımlanmış ve kullanılmış siRNA'lar hem de bu çalışma için ilave olarak Dharmacon'dan Tipin siRNA'lar temin edilmiştir. İki çeşit siRNA da kullanılmıştır; Tipin'i hedef alan Tipin siRNA ve Tipin'i hedef almayan kontrol siRNA.

### 3.7.1. Lipofektamin ile siRNA Transfeksiyonu

Transfeksiyon yapılacak hücreler bir gün önceden, transfeksiyonun yapılacağı gün hücrelerin petride %30-50 yoğunluğunda olacak şekilde pasajlama işlemi yapılır. Bu pasajlama işleminde antibiyotik içermeyen DMEM besiyeri kullanılır. siRNA'lar Opti-MEM (Opti-MEM® I Reduced Serum Medium) içinde dilue edilir. Hücrelere ekleneceği zaman son konsantrasyonu 33 nM olacak şekilde siRNA miktarı hesaplanır. Lipofektamin de Opti-MEM içinde dilue edilir ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilir. Oligomer ve Lipofektamin karışımı 20 dakika oda sıcaklığında tekrar inkübe edilir. Son inkübasyon süresinden sonra Oligomer-Lipofektamin karışımı hücrelere eklenir. 48 saat 37°C de CO<sub>2</sub>'li etüvde inkübe edilir.

### 3.7.2. Kalsiyum Fosfat ile Transfeksiyon:

Transfeksiyon yapılacak HEK293T hücreleri bir gün önceden, transfeksiyonun yapılacağı gün hücrelerin petride %30-50 yoğunluğunda olacak şekilde pasajlama işlemi yapılır. Bu pasajlama işleminde antibiyotik içermeyen besiyeri (DMEM) kullanılır. DNA'lar 2.5 M CaCl<sub>2</sub> ile su içeren ortamda inkübe edilir. 2XHBS çözeltisi CaCl<sub>2</sub> ve DNA içeren tüpe yavaş yavaş eklenir. Karışım 5-10 dakika oda sıcaklığında inkübe edilir. İnkübasyondan sonra CaCl<sub>2</sub> içeren DNA'lar damla damla HEK293T hücrelerine eklenir. Transfeksiyondan 16 saat sonra hücrelerinin besiyeri değiştirilir. Yaklaşık 48 saat sonra HEK293T hücreleri toplanır.

### 3.7.3. Tipin ve Timeless'in DNA Hasarında ve Replikasyon Stresinde Chk1'nin Fosforilasyonundaki Görevinin İncelenmesi için Yapılan Transfeksiyon Çalışmaları

Timeless ve Tipin'in DNA hasarında ve replikasyon stresinde spesifik olarak Chk1'nin fosforilasyonunda görev aldığını göstermek için HeLa hücreleri siRNA ile transfekte edildi. Transfeksiyonda Tipin siRNA, Timeless siRNA ve Lipofektamin RNAiMAX kullanıldı. Lipofektaminle transfekte edilen hücreler 48 saat inkübe edildi. DNA sentezinde stres oluşturmak için HU kullanıldı. HU ribonükleotid redüktaz inhibitörüdür ve DNA sentezini bloke eder (Şekil 4.3).

### **3.7.4. Tipin ve Timeless'in Ekspresyonun ve Nükleer Lokalizasyonun Belirlenmesi için Yapılan Transfeksiyon Çalışmaları**

HEK293T hücreleri FLAG-Tipin ve FLAG-Timeless vektörleri ile transfekte edildi. Kontrol için ise hücreler boş vektörle transfekte edildi. Anti-FLAG ile immünopresipitasyon yapıldıktan sonra SDS-PAGE ve western blotting basamakları takip edildi.

### **3.7.5. "Tetrasiklin"le İndüklenen Promotor Kontrolü Altında WTL/195A Tipin ve Timeless İnteraksiyonun İncelenmesi için Yapılan Transfeksiyon Çalışmaları**

Flp-In™ T-REx™-293 hücre hatları tetrasiklin indüklenen promotor kontrolünde FLAG-Tipin-WT ve FLAG- Tipin-L195A eksprese edecek şekilde oluşturuldu. Her iki hücre hattında hücreler -tetrasiklin ve + tetrasiklin olmak üzere iki gruba daha ayrıldı. + Tetrasiklin hücreleri tetrasiklin ile 3 gün boyunca inkübe edilerek rekombinant proteinlerin ekspresyonları indüklendi. Anti-FLAG ile immünopresipitasyon yapılarak WT-Tipin ve L195A-Tipin ile Timeless arasındaki ilişki incelendi (Şekil 4.17).

### **3.7.6. Tipin (WT-L195A) ve Timeless ile siRNA ko-transfeksiyon Çalışmaları**

HeLa hücreleri Lipofektamin yöntemi kullanılarak FLAG-Timeless ile siRNA-rezistanslı FLAG-Tipin (WT veya L195A) ve siRNA-Tipin /siRNA-kontrolle ko-transfekte edildi. 30 dakika HU ile inkübe edilen ayrı ayrı hücre gruplarında Chk1 fosforilasyonu kontrol edildi. SDS-PAGE ile western blotting uygulanan örneklerde Chk1 fosforilasyonunu belirlemek için Chk1-Ser345-P ve Chk1 antikorları kullanıldı (Şekil 4.19).

### **3.7.7. Neocarzinostatin (NCS)'in Chk1 Fosforilasyonuna Etkisinin Tipin (WT-L195A) ve Timeless ile siRNA ko-transfeksiyonuyla Araştırılması :**

HU yerine başka bir genotoksik ajan olan Neocarzinostatin (NCS) kullanıldı. Tipin siRNA ile FLAG-Timeless ve FLAG-Tipin (WT veya L195A) kodlayan vektörlerle transfekte edilen hücreler neocarzinostatine maruz bırakıldı. 1 saat 100 ng/ml NCS ile inkübe edildi. SDS-PAGE ile western blotting uygulanan örneklerde Chk1 fosforilasyonunu belirlemek için Chk1-Ser345-P, Chk1 ve Chk2 antikorları kullanıldı (Şekil 4.21).

### 3.7.8. Flp-In™ T-REx™-293/FLAG-Tipin-L195A Hücre Hattında Chk1 Fosforilasyonunun siRNA-Tipin ile İncelenmesi:

siRNA-Tipin veya siRNA-kontrol, Flp-In™ T-REx™-293/FLAG-Tipin-L195A hücre hattına lipofektamin ile transfekte edildi. Bir grubun rekombinant protein ekspresyonu indüklemek için tetrasiklin kullanıldı. -tetrasiklin ve + tetrasiklin olmak üzere iki grup oluşturuldu. -/+HU olmak üzere de tekrar alt gruplar oluşturuldu. +HU grupları 2 saat 1mM HU ile inkübe edildi. SDS-PAGE ile western blotting uygulanan örneklerde Chk1 fosforilasyonunu belirlemek için Chk1-Ser345-P, Chk1, RPA2-Ser33-P ve RPA2 antikorları kullanıldı (Şekil 4.22)

### 3.7.9. Claspin Kinetiğinin Flp-In™ T-REx™-293/FLAG-Tipin-L195A Hücre Hattında siRNA-Tipin ile İncelenmesi:

Flp-In™ T-REx™-293-FLAG-Tipin-L195A hücre hattından siRNA-dirençli FLAG-Tipin-L195A proteinleri tetrasiklinle indüklenerek eksprese edildi. Hücreler lipofektamin RNAiMAX kullanılarak transfekte edildi. Kontrol-siRNA ve Tipin-siRNA ile transfekte edilen iki ayrı grup oluşturuldu. Claspin'in kinetiğini belirlemek için farklı zaman aralıklarında genotoksik ajan olan HU ile muamele edildi. Her iki grup için de aynı zaman dilimleri kullanıldı. Aşağıda belirtilen zaman aralıklarında 1mM HU kullanıldı. Bütün örnekler SDS-PAGE ve western blotting uygulandı. Claspin, ATR, Chk1-Ser-345 ve Chk1 antikorları ile proteinler belirlendi (Şekil 4.23).

HU ile inkübasyon zaman aralıkları: 0,15, 30, 60, 120, ve 240 dakika

## 3.8. TRANSFORMASYON

### A-Transformasyon için Ultra-Competent *E.coli* Hücrelerinin Hazırlanması:

Yapılan Transformasyon işlemi, Inoue ve ark.'nın yöntemi (1990), Gene, 96:23-28 temel alınarak yapılmıştır. LB (Luria-Bertani) Agar petrilерinde hücreler 37°C'de bir gece kültüre edilir. 10-12 tane büyük koloni seçilir ve 250ml Super Optimal Broth (SOB) 'de 19°C'de 24-36 saat inkübe edilir. 10 dakika buzun üstünde bekletilir. Hücreler 4000 rpm'de 4°C'de 10 dakika çevrilir. Pellet olan hücreler 80 ml soğuk Tris-Borate (TB) içinde 10 dakika süspansiyon haline getirilir. Tekrar 4000 rpm'de 4°C'de 10 dakika çevrilir. Pellet daha sonra 20 ml soğuk TB ve 1.4 ml Dimethylsulfoxide (DMSO) içinde süspansiyon haline getirilir ve -80°C'de saklanır.

### **B- *E.coli* Hücrelerinin Transformasyonu:**

80°C’de donmuş olan *E.coli* hücreleri buzun üstünde 10 dakika eritilir.\_25 µl-100 µl arası bakteri kullanılır.\_Plazmid DNA’sı 100 ng’dan fazla olmamak üzere bakteriye eklenir.\_30 dakika buzun üstünde inkübe edilir.\_42°C’de 45 saniye ısı şoku yapılır.

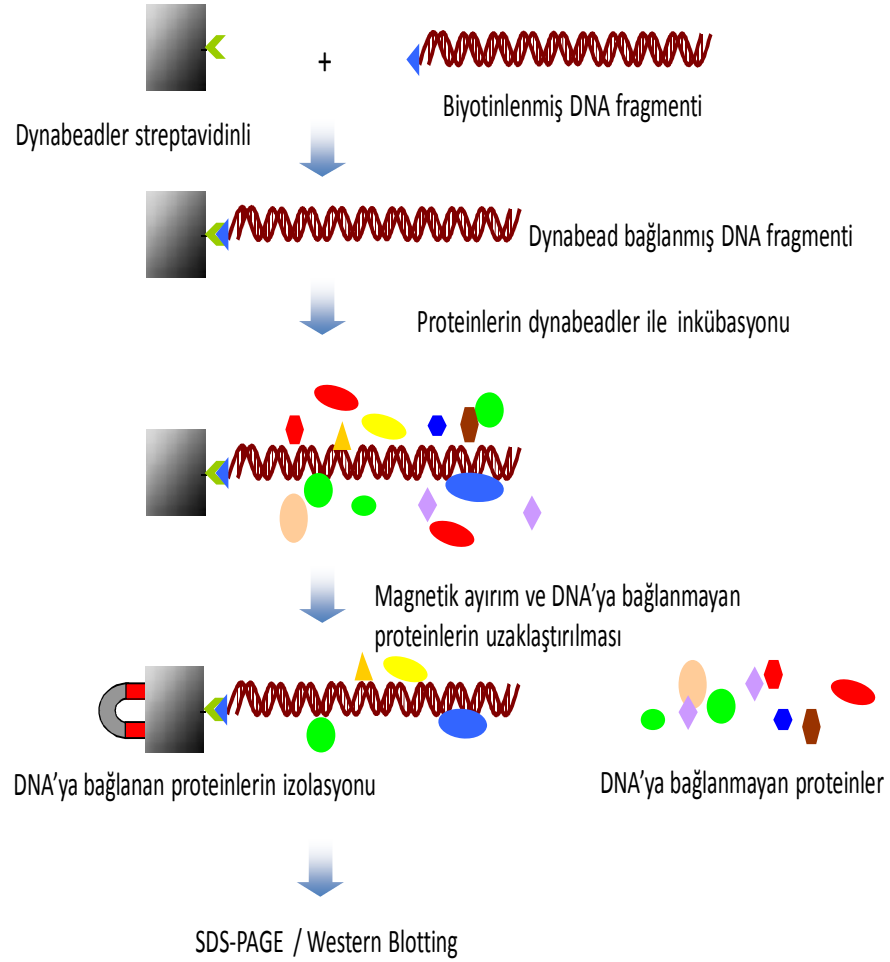
Tekrar buz üstünde 2 dakika inkübe edilir.\_Besiyeri içinde büyütülür.

Plazmidlerin çoğaltılması için *E.coli*’nin DH5-alfa olan suşu kullanılır. Transformasyon sonrası kültüre edilen hücrelerden, plazmidler izole edildi. Protein pürifikasyon amaçlı transformasyon yapıldığı zaman ise BL21-Codon Plus (DE3)-RIPL olan *E.coli* kullanıldı.

### **3.9. DNA PULL-DOWN TESTİ REAKSİYONLARI**

DNA pull-down reaksiyonları için biyotinlenmiş 80-mer ssDNA kullanılmıştır. Biyotinlenmiş ssDNA Streptavidin kaplı Dynabeadler (M-208) üzerinde immobilize edilir. Mikrolitre magnetik dynabead başına tipik olarak 1 pmol DNA kullanıldı. İlk olarak ssDNA ile RPA proteini pre-inkübasyon işlemine tabi tutuldu. Böylelikle öncelikli olarak ssDNA’nın RPA proteini ile kaplanması sağlanmış olur. 20-30 dakika oda sıcaklığında inkübasyon işlemi gerçekleştirildikten sonra bağlanmayan RPA proteinlerinin uzaklaştırılması için yıkama işlemi yapılır. Standart reaksiyonlar belirtilen proteinlerle 30 dakika oda sıcaklığında 50 µl bağlama solüsyonu içinde inkübasyonu içermektedir. Daha sonra boncuklar mıknatıs (Şekil 3.5) üzerinde toplanır ve 200 µl bağlama solüsyonu ile 3 kere yıkama işlemine tabi tutulur. Böylelikle RPA kaplı ssDNA’ya spesifik olarak bağlanmayan proteinler uzaklaştırılır. Bağlanan proteinler ise 1XSDS-PAGE örnek solüsyonu içinde elüsyon işlemi ile ayrıştırılır. SDS-PAGE ile bağlanan proteinlerin ayrımı gerçekleştirilip, immunoblotting ile analizi yapılır.

### DNA Pull-Down Assay



**Şekil 3.5.** DNA Pull-down Assay Prensibi. Sterptavidinli boncuklar (dynebeadler), biyotinlenmiş DNA fragmentine bağlanır. DNA fragmenti protein kompleksleri ile inkübe edilir ve magnetik bir ortamda DNA'ya bağlanmayan proteinler uzaklaştırılır. Daha sonra DNA'ya bağlanan proteinler SDS-PAGE ve Western Blotting ile belirlenir (24).

### **3.9.1. Timeless, Tipin ve Claspin Proteinlerinin RPA ve ssDNA ile İnteraksiyonun Karakterize Edilmesi için yapılan Pull-Down Assay Çalışmalar**

Proteinlerin rekombinant formları bakteriyal veya böcek ekspresyon sistemleri kullanılarak elde edildi. Biotinlenmiş 80-mer ssDNA'nın Streptavidin kaplı magnetik boncuklar üzerinde immobilize edildi. 5 pmol 80-mer ssDNA ile RPA (0, 2.5 ve 5 pmol) ile pre-inkübe edildi. His-FLAG-Timeless/His-Tipin kompleksi (10 pmol) ile 5pmol immobilize edilmiş, RPA kaplı 80-mer ssDNA inkübe edildi. RPA kaplı 80-mer ssDNA'ya bağlanan proteinler magnetik ortamda ayrıştırıldı. SDS-PAGE ve immüno blotlama uygulandı.

### **3.9.2. Rekombinant Tipin'in RPA ve aRPA kaplı ssDNA'ya Bağlanmasının incelenmesi için Yapılan Pull-Down Assay Çalışmalar**

Rekombinant olarak Tipin-His'in saflaştırıldı. Biotinlenmiş 80-mer ssDNA'nın Streptavidin kaplı magnetik boncuklar üzerinde immobilize edildi. 1pmol 80-mer ssDNA ile RPA ve aRPA (0, 0.2,0.5 ve 1.25pmol) ile pre-inkübe edildi. RPA ve aRPA bağlı 1 pmol ssDNA ayrı ayrı 20 pmol Tipin-His ile inkübe edildi. Bağlanan proteinler magnetik ortamda ayrıştırıldı. SDS-PAGE ve immüno blotlama yapıldı.

### **3.9.3. Rekombinant Claspin'in ssDNA'ya Bağlanmasında RPA ve Tipin'nin Etkisinin incelenmesi için Yapılan Pull-Down Assay Çalışmalar**

Bakülovirüsle enfekte edilmiş böcek hücrelerinden His-FLAG-Claspin ve His-FLAG-Tipin saflaştırıldı. 10 pmol His-FLAG-Claspin ve ssDNA ile, 10 pmol His-FLAG-Claspin 10pmol RPA kaplı ssDNA ile, 10 pmol His-FLAG-Claspin 10pmol RPA kaplı ssDNA ve His-FLAG-Tipin ile inkübe edildi. Bağlanan proteinler magnetik ortamda ayrıştırıldı daha sonra SDS-PAGE ve immüno blotlama gerçekleştirildi.

### **3.9.4. Claspin'in RPA kaplı ssDNA'ya Bağlanmasında Tipin-WT ve Tipin-L195A'nın Etkisinin incelenmesi için Yapılan Pull-Down Assay Çalışmalar**

Bakülovirüsle enfekte edilmiş böcek hücrelerinden His-FLAG-Claspin ve His-FLAG-Tipin-WT ve His-FLAG-Tipin-L195A saflaştırıldı. RPA içeren ve içermeyen olmak üzere 2 grup ssDNA hazırlandı. His-FLAG-Claspin tek başına ya da His-FLAG-Tipin-WT, His-FLAG-Tipin-L195A proteinleri ile ayrı ayrı inkübe edildi. Magnetik boncuklar yıkandı ve ssDNA'ya bağlanan proteinler SDS-PAGE ve immüno blotlama ile analiz edildi

### 3.10. İMMÜNOPRESİPİTASYON

İmmünopresipitasyon bir proteine spesifik olarak bağlanan bir antikoru kullanarak proteinin çökeltmesi tekniğidir. Bu teknik belirli bir proteini binlerce farklı protein örneği içeren bir örnekten izole etmek ve konsantre etmek için kullanılabilir (144).

İmmünopresipitasyon reaksiyonları anti-FLAG-agaroz ile gerçekleştirildi. İmmünopresipitasyon reaksiyonları belirlenen bir protein için gerçekleştirilirken anti-FLAG-agaroz içeren solüsyon ile en az 5 saat 4°C derecede inkübasyon işlemine tabi tutuldu. Presipitasyon olmayan proteinlerin uzaklaştırılması için inkübasyondan sonra 3 kere yıkama işlemi gerçekleştirildi. Yıkama işleminde 500 µl bağlama çözeltisi kullanıldı. Bağlanan proteinlerin elüsyonu 200 µg/ml FLAG peptide veya 2XSDS-PAGE örnek solüsyonu ile yapıldı.

Hücre ekstraktları için ile yapılan immünopresipitasyon reaksiyonlarında anti-FLAG-agaroz ile hücre lizatı bir gece 4°C’de inkübe edildi. Yıkama işleminde TBS kullanıldı. Hücre lizatları ile yapılan immünopresipitasyonda elüsyon işlemi için yine FLAG peptide veya 2XSDS-PAGE örnek solüsyonu kullanıldı.

#### 3.10.1. Tipin’in RPA ve aRPA ile Olan İnteraksiyonun İncelenmesi için Yapılan İmmünopresipitasyon Çalışmaları:

Bakülovirüsle enfekte edilmiş böcek hücrelerinden His-FLAG-Tipin saflaştırıldı. His-FLAG etiketli Tipin, anti-FLAG-agaroz üzerinde immobilize edildi. 1 µg aRPA ve RPA ile bir gece 4°C’de inkübe edildi. FLAG İmmünopresipitasyonu yapıldı. SDS-PAGE ve İmmünoblotting işlemleri ile proteinler belirlendi.

#### 3.10.2. Tipin’in Claspın ile Olan İnteraksiyonun İncelenmesi için Yapılan İmmünopresipitasyon Çalışmaları:

E.coli’den Tipin-His saflaştırıldı. Bakülovirüsle enfekte edilmiş böcek hücrelerinden His-FLAG-Claspın saflaştırıldı. Tipin’in anti-FLAG rezinle ve His-FLAG Claspınle ayrı ayrı inkübasyonu yapıldı. Bir gece 4°C’de inkübe edildi. FLAG İmmünopresipitasyonu yapıldı. SDS-PAGE ve İmmünoblotting işlemleri ile proteinler belirlendi.

### **3.10.3. Mutant Form Tipinlerin (E185A, E190A ve L195A) ve WT-Tipin'in RPA ile olan İnteraksiyonun İncelenmesi için Yapılan İmmünopresipitasyon Çalışmaları:**

FLAG-Tipin, WT, E185A, E190A ve L195A HEK293T hücrelerinde geçici olarak eksprese edilip saflaştırıldı. Anti-FLAG-agaroz ile inkübe edildi. FLAG İmmünopresipitasyonu yapıldı. SDS-PAGE ve takiben FLAG, RPA1 ve RPA2 antikorları ile immüno blotting işlemleri yapıldı.

### **3.10.4. Tipin-WT ve Tipin-L195A formlarının RPA ile olan İnteraksiyonun Böcek Hücrelerinde İncelenmesi için Yapılan İmmünopresipitasyon Çalışmaları:**

His-FLAG-Tipin-WT ve Tipin-L195A proteinleri bakülovirüsle enfekte edilmiş böcek hücrelerinden saflaştırıldı. Anti-FLAG-agarozunda immobilize edildi. RPA ile inkübe edildi. Rezin ile yıkanarak bağlanan proteinler SDS-PAGE ve immüno blotting ile analiz edildi.

### **3.10.5. Timeless ve Tipin kompleksindeki WT ve L195A Tipin formlarının RPA kaplı ssDNA ile olan İnteraksiyonun İncelenmesi için Yapılan İmmünopresipitasyon Çalışmaları:**

FLAG-Timeless ve His-Tipin protein kompleksini elde etmek için bakülovirüsle böcek hücrelerine ko-transfeksiyon işlemi yapıldı. Anti-FLAG-agaroz ile Timeless/Tipin kompleksi saflaştırıldı. WT ve L195A Tipin içeren Timeless/Tipin protein kompleksleri ayrı ayrı RPA kaplı immobilize edilmiş ssDNA ile inkübe edildi. Pull-down assay yöntemi uygulandı. Bağlanmış proteinler SDS-PAGE ve immüno blotting ile analiz edildi.

### **3.10.6. WT ve L195A Tipin formlarının Claspın ile olan İnteraksiyonun İncelenmesi için Yapılan İmmünopresipitasyon Çalışmaları**

Bakülovirüsle enfekte edilmiş böcek hücrelerinden His-FLAG-Claspın saflaştırıldı. Tipin-His-WT ve Tipin-His-L195A E.coli'den rekombinant olarak saflaştırıldı. His-FLAG-Claspın 1.5 µg Tipin-His-WT ve Tipin-His-L195A ile bir gece 4°C'de inkübe edildi. Claspın içermeyen Anti-FLAG rezin de negatif kontrol olarak kullanıldı ve 1.5 µg Tipin-His-WT ve Tipin-His-L195A ile bir gece 4°C'de inkübe edildi. FLAG İmmünopresipitasyonu yapıldı. SDS-PAGE ve immüno blotting ile proteinler analiz edildi.

### 3.11. ÇALIŞMADA KULLANILAN ÇÖZELTİ VE TAMPONLAR

Çalışmada kullanılan bazı çözelti ve tamponlar aşağıdaki gibidir (140-145);

#### Coomassie Boyası - 1 L

%0.1 Coomassie R250, %10 asetik asit, %40 Metanol

- 1) 100 ml glacial asetik asit, 500 ml bidistile H<sub>2</sub>O'ya eklenir.
- 2) 400 ml metanol eklenir ve karıştırılır.
- 3) 1g Coomassie R250 boya eklenir.
- 4) Filtre edilir ve partiküller uzaklaştırılır.
- 5) Oda ısısında saklanır.

#### Coomassie Boya için De-Stain - 1 L

%20 metanol, % 10 glacial asetik asit

- 1) 100 ml glasiyal Asetik Asit, 700 ml bidistile H<sub>2</sub>O'ya eklenir.
- 2) 200 ml metanol eklenir ve karıştırılır.
- 3) Oda ısısında saklanır.

#### TBST (Tris-Tamponlu Tuz+Tween ; Tris-Buffered Saline+Tween):

50 mM Tris-HCl, pH:7.5

135 mM NaCl

%0.1 Tween-20

**Kullanılan SDS-PAGE Jel Yüzde Formülleri:**

|                                     | <b>5%</b> | <b>8%</b> | <b>10%</b> | <b>12%</b> | <b>15%</b> |
|-------------------------------------|-----------|-----------|------------|------------|------------|
| <b>%29 Akrilamid/%1Bisakrilamid</b> | 5 ml      | 8 ml      | 10 ml      | 12 ml      | 15 ml      |
| <b>4XTris-HCl pH:8.8</b>            | 7.5 ml    | 7.5 ml    | 7.5 ml     | 7.5 ml     | 7.5 ml     |
| <b>%10 SDS</b>                      | 300 µl    | 300 µl    | 300 µl     | 300 µl     | 300 µl     |
| <b>Distile Su</b>                   | 17 ml     | 14 ml     | 12 ml      | 10 ml      | 7 ml       |
| <b>TEMED</b>                        | 15 µl     | 15 µl     | 15 µl      | 15 µl      | 15 µl      |
| <b>%10 APS</b>                      | 150 µl    | 150 µl    | 150 µl     | 150 µl     | 150 µl     |

**2XHBS:**

50 mM HEPES, pH:7.05

- 10 mM KCl
- 12 mM Dekstroz
- 280 nM NaCl
- 1.5 mM Na<sub>2</sub>P0<sub>4</sub>

**SOB (Super Optimal Broth) Çözültisi:**

%0.5 maya ekstraktı

%2 Tripton

10 mM NaCl

2.5 mM KCl

10 mM MgCl<sub>2</sub>

10 mM MgSO<sub>4</sub>

TB (Tris-Borate) Çözeltisi:

10 mM PIPES

15 mM CaCl<sub>2</sub>

250 mM KCl

55 mM MnCl<sub>2</sub>

(pH 6.7'ye KOH veya HCl ile ayarlanır)

Bağlama Solüsyonu (24):

10 mM Tris, PH 7.4

100 mM NaCl

%10 Gliserol

10 µg/ml Sığır Serum Albümini

%0.01 Nonidet P-40

1XSDS-PAGE Örnek Solüsyonu

50 mM Tris, PH:6.8

100 mM Dithiothreitol

%1 SDS

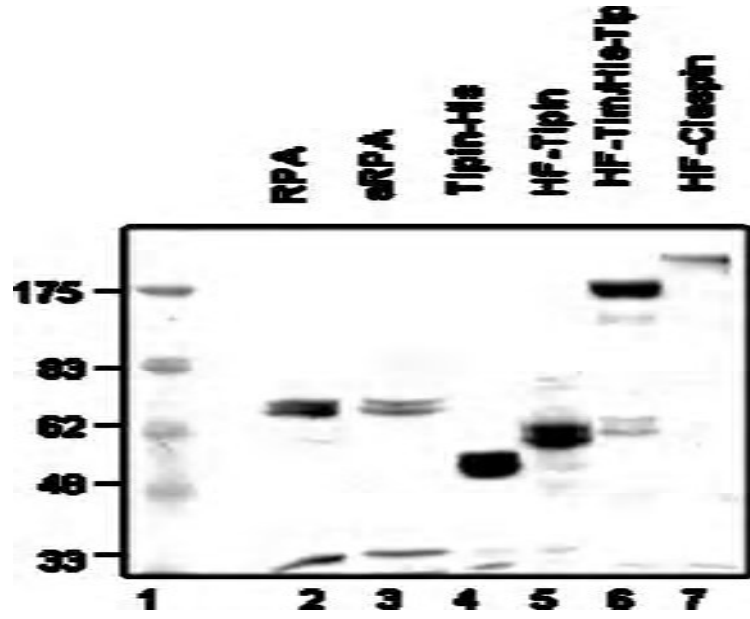
%5 Gliserol

%0.005 Bromofenol Mavisi

## **4. BULGULAR**

### **4.1. REKOMBİNANT PROTEİNLERİN BAKÜLOVİRÜSLE İNFEKTE EDİLMİŞ BÖCEK HÜCRELERİNDEN VE *E.coli*'DEN SAFLAŞTIRILARAK, COOMASSİE-BLUE BOYASI İLE KARAKTERİZE EDİLMESİ**

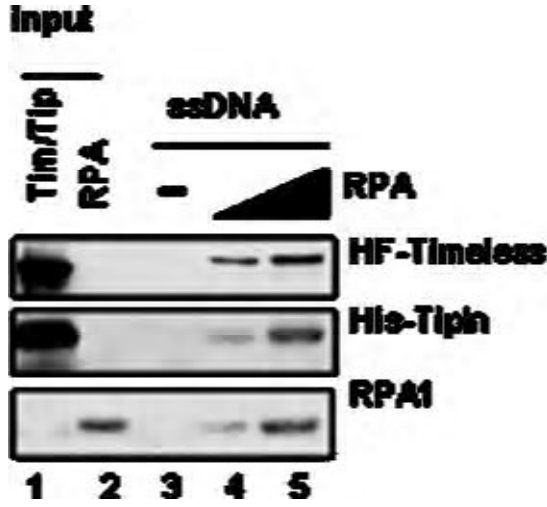
Tipin, Timeless/Tipin (Tim/Tip) heterodimeri ve Claspın proteinlerinin RPA, Alternatif RPA (aRPA) ve ssDNA ile olan interaksıyonlarını incelemek için rekombinant formları saflaştırıldı. Tipin-His, RPA ve aRPA proteinleri *E.coli*'den saflaştırılırken, His-FLAG-Timeless/His-Tipin (HF-Tim/His-Tip), His-FLAG-Tipin(HF-Tipin ) ve His-FLAG-Claspın (HF-Claspın) proteinleri ise bakülovirüsle infekte edilen böcek hücrelerinden saflaştırılmıştır (Şekil 4.1).



**Şekil 4.1.** Bakülovirüsle infekte edilmiş böcek hücrelerinden ve *E. coli*'den saflaştırılan proteinlerin Coomassie-Blue boyası ile karakterize edilmesi. 1 numaralı kolon Moleküler Ağırlık belirteçidir ve rakamlar kiloDalton (kDa) olarak moleküler ağırlıkları göstermektedir. 2 numaralı kolon RPA'nın 70-kDa'luk (RPA1) ve 34-kDa'luk (RPA2) alt birimlerini göstermektedir. RPA3 (17-kDa) alt birimi çok küçük olduğu için elektroforetik jelde gösterilememiştir. 3 numaralı sırada ise aRPA'nın 70-kDa'luk (RPA1) ve 34-kDa'luk(RPA4) alt birimlerini gösterilirken aynı şekilde 17-kDa'luk RPA3 alt birimi elektroforetik jelde gösterilememiştir. 4 ve 5 numaralı kolonda ise farklı etiketlere sahip bakteriyal ve böcek Tipinler gösterilmektedir. 6 numaralı sırada heterodimer olarak elde edilen Timeless (138.5kDa) ve Tipin (34.3kDa) kompleksi, 7'de ise Claspin'in (150.9kDa) moleküler ağırlığı gösterilmiştir.

#### 4.2. TIMELESS/TİPİN KOMPLEKSİNİN DNA'YA BAĞLANMASINDA RPA GÖREV YAPMAKTADIR

Timeless/Tipin kompleksinin DNA'ya bağlanmasını test etmek için ssDNA ve RPA kaplı ssDNA ile Timeless/Tipin Kompleksinin Pull-Down Assay reaksiyonları gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.2).



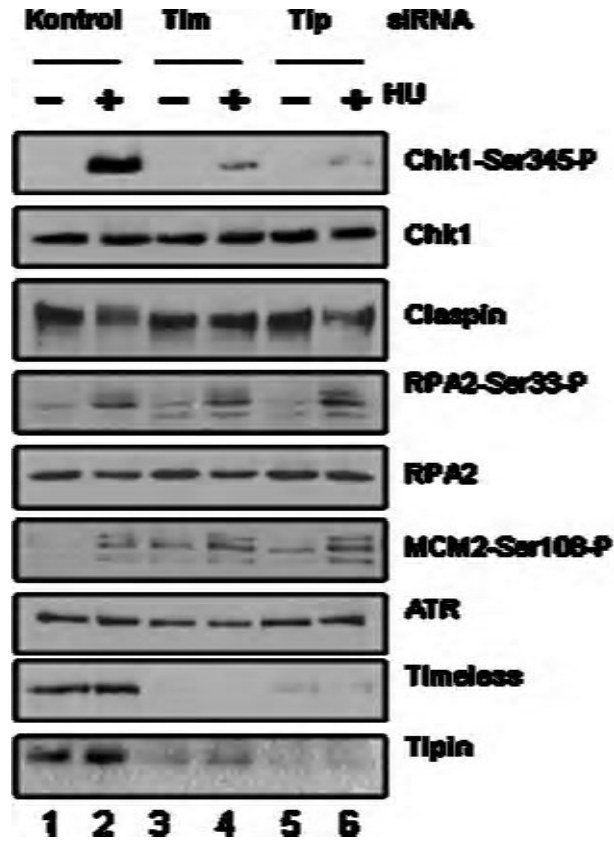
**Şekil 4.2.** Timeless/Tipin(Tim/Tip) Kompleksinin, RPA ile pre-inkübe Edilmiş 80-mer ssDNA'ya Bağlanmasının Pull-Down Assay ile İncelenmesi. 1 numaralı kolonda 5pmol His-FLAG-Timeless/His-Tipin (HF-Tim/His-Tip) ve 2 numaralı kolonda ise 5pmol RPA proteinleri input olarak gösterilmiştir . 3 ve 5 kolonlar arasında ise RPA yokluğunda ve artan RPA miktarına bağlı olarak ssDNA'ya bağlanma miktarı karşılaştırılmıştır.

10 pmol Timeless/Tipin kompleksi, 5pmol ssDNA ile inkübe edildiği zaman DNA'ya bağlanmamaktadır (3 numaralı kolon) ssDNA , 2.5pmol ve 5pmol RPA ile pre-inkübe edildiği zaman (4 ve 5 numaralı kolonlar) Timeless/Tipin kompleksi RPA'ye bağlı olarak ssDNA'ya karşı artan bir bağlanma aktivitesi göstermektedir.

Sonuç olarak şekil 4.2, Timeless/Tipin kompleksinin ssDNA'ya bağlanma aktivitesinde RPA'nın önemli bir göreve sahip olduğunu göstermektedir.

#### **4.3. DNA HASARINDA VE REPLİKASYON STRESİNDE OLUŞAN Chk1 FOSFORİLASYONUNDA TIMELESS VE TİPİN PROTEİNLERİ SPESİFİK OLARAK GÖREV YAPMAKTADIR**

Timeless ve Tipin proteinlerinin Chk1 fosforilasyonundaki görevini test etmek için siRNA teknolojisi kullanılarak Timeless ve Tipin proteinlerinin seviyeleri azaltıldı ve genotoksik ajan olan HU ile inkübe ederek Chk1 fosforilasyon miktarları karşılaştırıldı.



**Şekil 4.3.** Timeless ve Tipin'in Chk1 Fosforilasyonunda Görevi. HeLa Hücreleri Kontrol, Timeless (Tim) ve Tipin (Tip) siRNA ile transfekte edildi ve 48 saat sonra 1mM HU ile 30 dakika inkübe edildi. 1 ve 2. kolonlar Kontrol siRNA ile, 3 ve 4. kolonlar Timeless siRNA ile, 5 ve 6. kolonlar ise Tipin siRNA ile transfekte edilmiş HeLa hücrelerindeki protein miktarlarını göstermektedir.

Claspin, RPA2 ve MCM2 sentez fazındaki checkpointin önemli bileşenleri olduğu için fosforilasyon seviyeleri test edildi. Timeless ve Tipin siRNA ile Timeless ve Tipin protein seviyeleri azaltıldığı zaman RPA2-Ser33-P ve MCM2-Ser108-P seviyeleri Timeless ve Tipin'e bağlı olarak azalmamıştır (Şekil 4.3'de 2, 4 ve 6. kolonda).

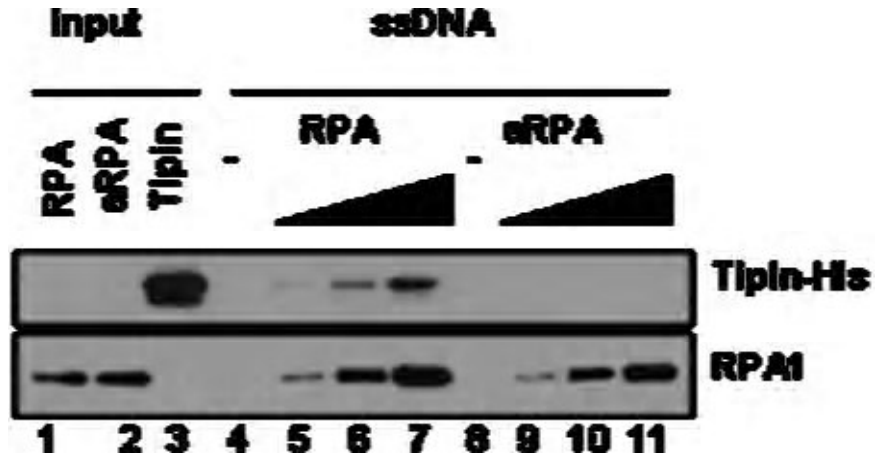
Chk1 fosforilasyonu ise Timeless-siRNA ve Tipin-siRNA ile Timeless ve Tipin protein seviyeleri azaltıldığı zaman Timeless ve Tipin'e bağlı olarak azalmıştır (Şekil 4.3'de 2, 4, ve 6. kolonda- Chk1-Ser345-P). Chk1 proteinin seviyesinin aynı kalması Chk1-Ser345-P seviyesindeki düşüşün Chk1 miktarından bağımsız olduğunu göstermektedir.

Şekil 4.3'e göre, Timeless ve Tipin proteinleri, DNA hasarında ve replikasyon stresinde oluşan Chk1 fosforilasyonunda spesifik olarak görev yapmaktadır.

#### 4.4. RPA VE aRPA, ssDNA'YA BENZER AFFİNİTE İLE BAĞLANMAKTA DİR

RPA ve aRPA proteinlerinin ssDNA'ya bağlanma kapasitelerini karşılaştırmak ve Tipin'in ssDNA'ya bağlanmasını karakterize etmek için RPA ve aRPA kaplı ssDNA ile Pull-down assay reaksiyonları gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.4).

Daha önce yapılan çalışmada da gösterildiği gibi (145) RPA ve aRPA, ssDNA'ya karşı benzer bağlanma kapasitesine sahiptir (Şekil 4.4).



**Şekil 4.4.** ssDNA'nın RPA ve aRPA ile pre-inkübe edilmesi ve Pull-Down Assay ile Tipin Bağlanmasının İncelenmesi. 1-3 kolonlar RPA,aRPA ve Tipin için reaksiyonlara giren proteinleri, 3-7 kolonlar RPA kaplı ssDNA ile Tipin'in Pull-Down testi sonuçlarını, 9-11 kolonlar aRPA kaplı ssDNA ile Tipin'in Pull-Down testi sonuçlarını göstermektedir.

1pmol ssDNA 0, 0.2, 0.5 ve 1.25 pmol RPA veya aRPA ile pre-inkübe edildikten sonra, 20 pmol Tipin eklenmiştir. Inputlar 0.5 pmol RPA ve aRPA ile 1 pmol Tipin miktarını göstermektedir.

5-7 ile 8-10 numaralı kolonlarda RPA1 miktarları karşılaştırıldığı zaman RPA ve aRPA'nın ssDNA'ya eşit miktarda bağlandığı görülmektedir.

#### 4.5. TİPİN, TIMELESS OLMADAN DA RPA KAPLI ssDNA'YA BAĞLANMA KAPASİTESİNE SAHİPTİR

Tipin, RPA kaplı ssDNA'ya, bağlanma eşi olan Timeless olmadan da bağlanabilmektedir. Artan RPA miktarına bağlı olarak Tipin'in ssDNA'ya bağlanma miktarı artmaktadır (Şekil 4.4'de 5., 6. ve 7. kolonlar).

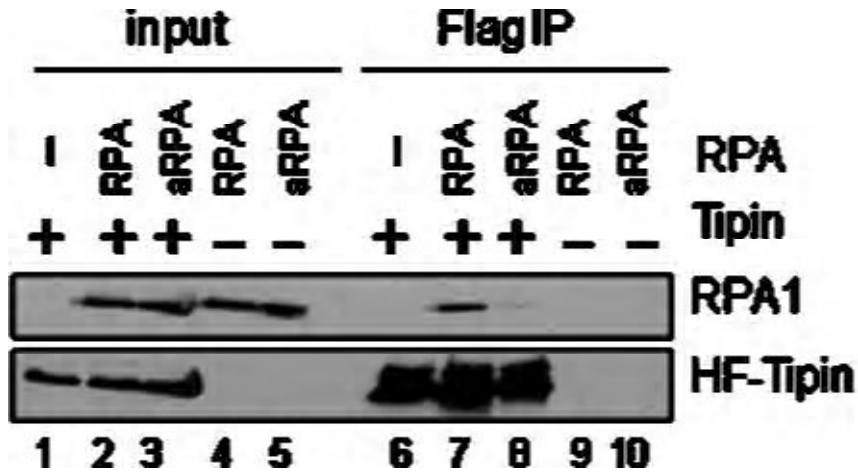
#### 4.6. TİPİN VE ssDNA BAĞLANMASINDA aRPA, RPA GİBİ GÖREV YAPMAMAKTADIR

Tipin ssDNA'ya artan RPA miktarı artarken doğru orantılı olarak bağlanma affinitesi gösterirken (Şekil 4.4'de 5., 6. ve 7. kolonlar), artan aRPA miktarına rağmen ssDNA'ya bağlanmamaktadır (Şekil 4.4'de 9,10 ve 11. kolonlar).

Tipin'in ssDNA'ya bağlanmasında aRPA, RPA gibi aracılık edememektedir (Şekil 4.4).

#### 4.7. RPA'NIN TİPİN İLE KARARLI YAPI OLUŞTURMASINDA RPA2 ALTBİRİMİ PRİMER GÖREV YAPMAKTADIR

RPA'nın Tipin-ssDNA etkileşimindeki fonksiyonunu karakterize etmek için RPA ve aRPA ile His-FLAG- Tipin'in immünopresipitasyon reaksiyonları gerçekleştirildi (Şekil 4.5).



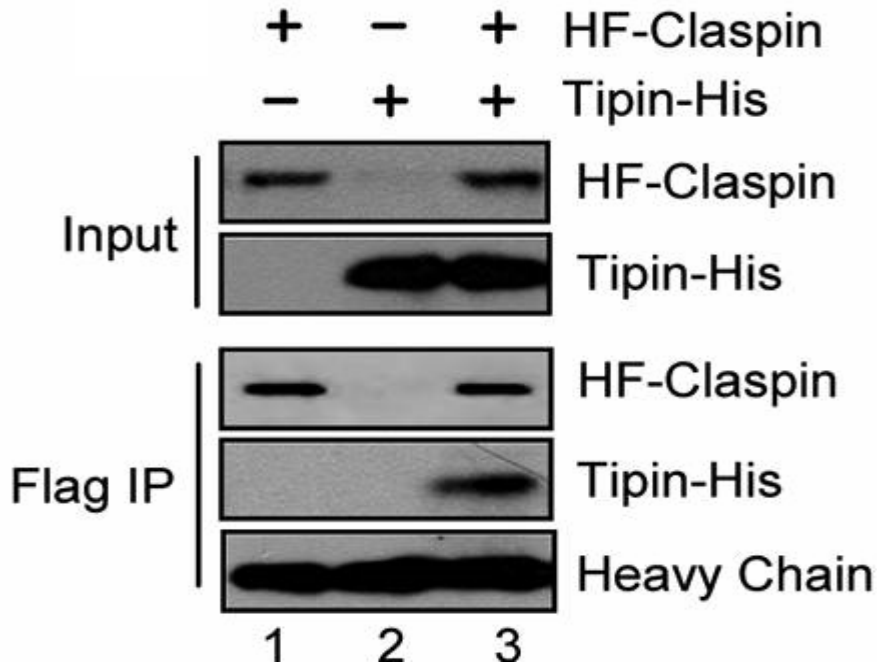
**Şekil 4.5.** RPA ve aRPA'nın His-FLAG- Tipin ile FLAG etiketli İmmünopresipitasyonu (Flag-IP). 1-5 kolonlar immünopresipitasyon reaksiyonlarına giren proteinleri gösterirken, 6-10 kolonlar FLAG-IP sonuçlarındaki Tipin, RPA ve aRPA varlığına göre değişen RPA ve Tipin proteinlerini göstermektedir.

İnputlar, reaksiyona giren miktarların %5'ni göstermektedir (Şekil 4.5'de 1-5 kolonlar). Bakülovirüsle infekte edilmiş böcek hücrelerinden elde edilen His-FLAG-Tipin ile 1ug RPA veya aRPA bir gece 4°C'de inkübe edildikten sonra FLAG-IP yapıldı (Şekil 4.5'de 6-10 kolonlar).

Şekil 4.5'de 7. ve 8. kolonlar karşılaştırıldığı zaman RPA'nın HF-Tipin'e yüksek bir bağlanma affinitesi ile bağlandığı ama buna karşılık aRPA'nın HF-Tipin'e çok zayıf bir şekilde bağlandığı görülmektedir. Bu sonuçlar, RPA2 alt biriminin, kararlı bir RPA-Tipin yapısının oluşmasında öncelikli bir rol oynadığını göstermektedir.

#### 4.8. TIPİN, HIS-FLAG-CLASPİNE DOĞRUDAN BAĞLANMAKTADIR VE TIMELESS, TIPİN-CLASPİN BAĞLANMASI İÇİN GEREKLİ DEĞİLDİR

Tipin'in Claspinle olan interaksyonunu araştırmak için His-FLAG-Claspinle Tipin-His'in Flag-IP reaksiyonları gerçekleştirildi (Şekil 4.6).

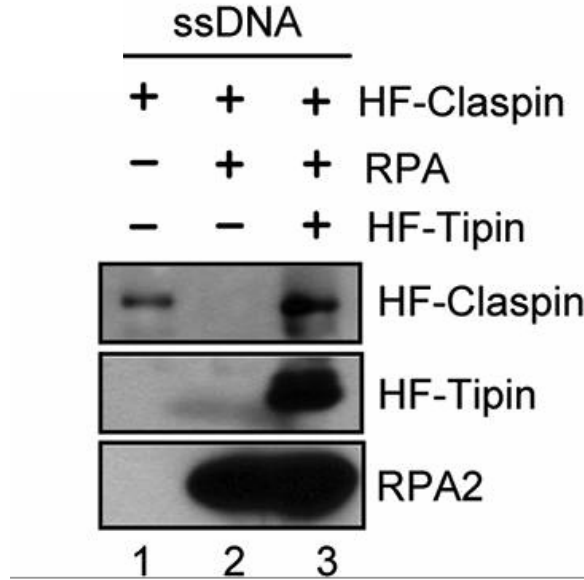


**Şekil 4.6.** Tipin-His ile His-FLAG- Claspin'in FLAG Etiketli İmmünopresipitasyonu (Flag-IP). 1.kolonda HF-Claspin varlığında ve Tipin-His yokluğunda, 2.kolon ise Tipin-His varlığında ve HF-Claspin yokluğunda, 3.kolon ise hem gerçekleşen HF-Claspin hem de Tipin-His varlığında gerçekleşen Flag-IP reaksiyonu sonucundaki protein miktarlarını göstermektedir.

Tipin direkt olarak Claspin'e bağlanmaktadır (Şekil 4.6'da 3.kolon). Diğer bir sonuç ise, Tipin'in Claspin'e bağlanması için bağlanma eşi Timeless'a gerek duymamasıdır. Timeless'ın olmadığı bir ortamda da Tipin Claspin'le doğrudan bir etkileşime girmektedir.

#### 4.9. CLASPİN ssDNA'YA ZAYIF BİR ŞEKİLDE BAĞLANMAKTADIR

Claspin'in ssDNA'ya bağlanmasını test etmek ve varsa Tipin'in görevini tanımlamak için ssDNA ile Claspin için Pull-down assay reaksiyonları gerçekleştirildi. Daha önceki çalışmalar (146) ile tutarlı olarak Claspin ssDNA'ya zayıf olarak bağlanmaktadır (Şekil 4.7).



**Şekil 4.7.** RPA ile pre-inkübe edilmiş ve edilmemiş ssDNA'nın ilk önce Tipin sonra Claspinle inkübasyonu ve Pull-Down Assay ile İnteraksiyonların İncelenmesi. 1. kolonda sadece HF-Claspin, 2. kolonda HF-Claspin ve RPA varlığında, 3. kolonda ise HF-Claspin ve RPA ve Tipin varlığında ssDNA'ya bağlanma kapasiteleri Pull-Down testi ile gösterilmektedir.

5 pmol ssDNA ile 10pmol RPA ile pre-inkübe edildi sonra 10 pmol His-FLAG-Tipin ve 10 pmol His-FLAG-Claspin ile inkübe edildi ve magnetik ortamda Pull-down assay reaksiyonları gerçekleştirildi (Şekil 4.7).

Claspin ssDNA'ya ortamda RPA ve Tipin olmadan zayıf bir affinite ile bağlanmaktadır. (Şekil 4.7'de 1.kolon)

#### 4.10. ssDNA, RPA İLE KAPLANDIĞI ZAMAN CLASPİN DNA'YA BAĞLANAMAMAKTADIR

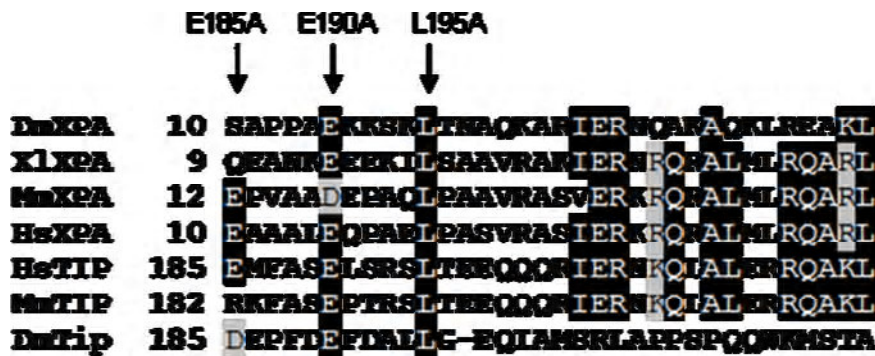
Şekil 4.7 kolon 2'de gösterildiği gibi ssDNA 10 pmol RPA ile pre-inkübe edildiği zaman Claspın ssDNA'ya bağlanamamaktadır. Claspın RPA olmadığı zaman ssDNA'ya zayıf da olsa bağlanmaktadır ama ssDNA, RPA ile kaplandığı zaman Claspın ssDNA'ya bağlanamamaktadır (Şekil 4.7'de 1 ve 2. kolonlar).

#### 4.11. CLASPİN'İN RPA KAPLI ssDNA'YA BAĞLANABİLMESİ İÇİN TİPİN GEREKLİDİR

ssDNA RPA ile pre-inkübe edildiği zaman Claspın ssDNA'ya bağlanamamaktadır. ssDNA, RPA pre-inkübasyonundan sonra Tipinle inkübe edilir ve sonra Claspın'ın DNA'ya bağlanması incelenirse, Claspın'ın Tipin aracılı olarak ssDNA'ya bağlandığı gözlenir (Şekil 4.7'de, 3. kolon). Bu sonuçlar Claspın'ın RPA kaplı ssDNA'ya bağlanması için Tipin'in gerekli olduğunu ve önemli bir fonksiyona sahip olduğunu göstermektedir.

#### 4.12. TİPİN İLE NÜKLEOTİD EKZİSYON TAMİR PROTEİNİ OLAN XPA PROTEİNLERİNİN AMİNOASİT SEKANSLARI ÖNEMLİ ÖLÇÜDE BENZERLİK GÖSTERMEKTEDİR

Nükleotid ekzisyon tamir proteini olan XPA ile Tipin'in proteinlerinin aminoasit sekansları arasında anlamlı bir benzerlik vardır (Şekil 4.8).

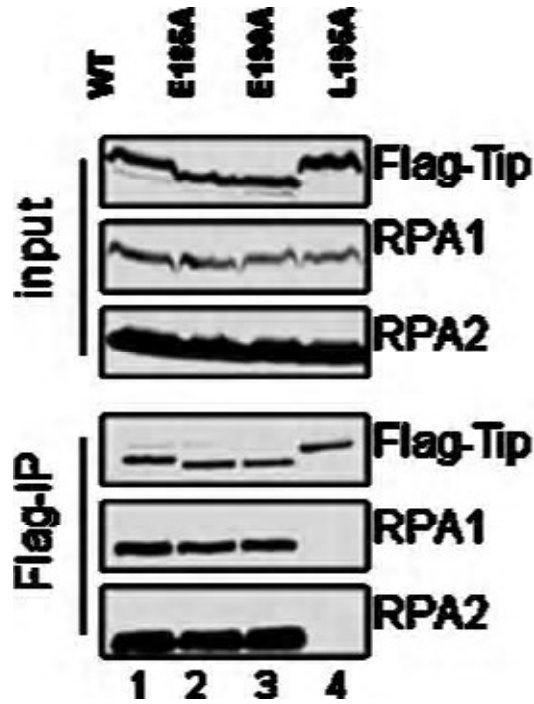


Şekil 4.8. XPA ve Tipin Aminoasit Sekanslarının Karşılaştırılması.

(Dm, *Drosophila melanogaster*; Hs, *Homo sapiens*; Mm, *Mus musculus*; Xl, *Xenopus laevis*. Alanin= ala, A; Lösin =leu, L; Glutamik Asit= glu, E) Siyah olarak gösterilen bölgeler XPA ve Tipin arasında tanımlanmış alanları gösterirken, gri olarak gösterilen bölgeler ise benzerliğe sahip bölgeleri göstermektedir.

#### 4.13. HEK293T HÜCRELERİNDEN EKSPRESE EDİLEN TİPİN- E185A VE E190A MUTANTLARI TİPİN VE RPA İNTERAKSİYONUNU ENGELLEMEZKEN, TİPİN-L195A MUTANTI TİPİN VE RPA İNTERAKSİYONUNU ENGELLEMEDİR

DNA hasar kontrol noktası sinyalinde RPA-Tipin interaksyonun önemini anlamak için, insan XPA'inde tanımlanmış üç aminoasit bölgesinde mutasyon olan mutant Tipin'ler kullanılmıştır. Mutant Tipinlerin RPA ile oluşturdukları yapılar incelenmiştir (Şekil 4.9).

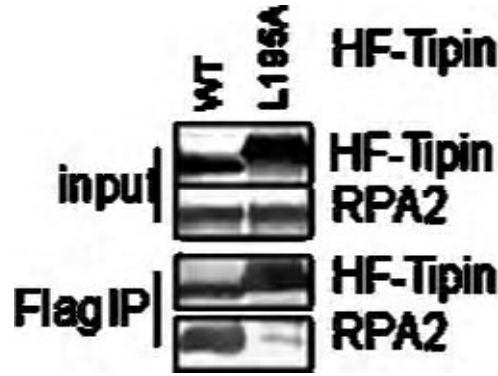


**Şekil 4.9.** RPA'nın Wild Tip (WT) ve Mutant Form Tipinlerle (E185A, E190A ve L195A) FLAG etiketli İmmünopresipitasyonu (Flag-IP). 1.kolon WT , 2.kolon E185A-Tipin,3.kolon E190A ve 4.kolon L195A Tipin'in RPA ile olan etkileşimleri gösterilmiştir.

HEK293T hücrelerinden eksprese edilen Tipin-E185A, Tipin- E190A ve Tipin- L195A Mutantları (Mutant form Tipinler Michael G.Kemp, PhD tarafından elde edilmiştir) ile WT-Tipin'in, RPA ile FLAG etiketli immünopresipitasyonu incelendi. Tipin- E185A ve Tipin- E190A mutantlarının WT-Tipin ile aynı şekilde davrandığı gözlemlendi. (Şekil 4.9'da 1-3 kolonlar) Tipin- L195A mutantında 195.aminoasit olan Lösin'in Alanin'e dönüştürülmesi, Tipin ile RPA etkileşimini tamamen yok etmektedir (Şekil 4.9'da 4.Kolon).

#### 4.14. BAKÜLOVİRÜSLE İNFEKTE EDİLEN BÖCEK HÜCRELERİNDEN ELDE EDİLEN TİPİN-L195A İLE RPA BAĞLANAMAMAKTADIR

Mutant Tipin-L195A formunun RPA ile olan interaksyonunu bakülovirüsle infekte edilen böcek hücrelerinden elde edilen Tipin-L195A ile test ettik ve L195A mutasyonunun RPA bağlanmasını tamamen yok ettiğini doğruladık (Şekil 4.10).



**Şekil 4.10.** Bakülovirüsle İnfekte Edilen Böcek Hücrelerinden Elde Edilen WT-Tipin ve Tipin-L195A Mutantının RPA ile FLAG etiketli İmmünopresipitasyonu (Flag-IP). HF-Tipin WT ve HF-Tipin L195A formlarının RPA2 ile olan etkileşimleri immünopresipitasyon reaksiyonu sonucu proteinlerin miktarı ayrı ayrı gösterilmiştir.

RPA2, WT-Tipin'e bağlanırken, L195A mutantına bağlanamamaktadır (Şekil 4.10).

#### 4.15. TİPİN-L195A İÇEREN TIMELESS-TİPİN KOMPLEKSİ, RPA KAPLI ssDNA'YA BAĞLANMA ÖZELLİĞİNE SAHİP DEĞİLDİR

Bakülovirüsle infekte edilen böcek hücrelerinde Timeless ve Tipin proteinleri kompleks halinde heterodimer olarak eksprese edildi. WT-Tipin ve Tipin-L195A içeren Timeless-Tipin kompleksinin RPA kaplı ssDNA'ya bağlanabilme kabiliyeti test edildi (Şekil 4.11).

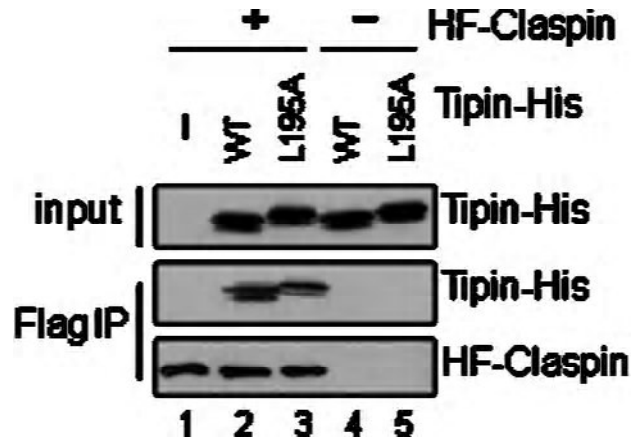


**Şekil 4.11.** RPA ile pre-inkübe edilmiş ssDNA'nın Tipin-WT veya Mutant Tipin-L195A içeren Timeless/Tipin (Tim/Tip) kompleksi ile inkübasyonu ve Pull-Down Assay ile İnteraksiyonların İncelenmesi. 1. ve 2. Kolonlardaki inputlar, reaksiyonda kullanılan Timeless-Tipin kompleksinin %50'sini içermektedir. 3. kolonda WT-Tipin içeren Timeless-Tipin kompleksinin, 4. kolonda ise Tipin-L195A içeren Timeless-Tipin kompleksinin RPA kaplı ssDNA'ya bağlanması Pull-Down Assay ile incelenmiştir.

Bakülovirüsle infekte edilen böcek hücrelerinden elde edilen WT-Tipin içeren Timeless-Tipin kompleksi RPA kaplı ssDNA'ya bağlanmaktadır (Şekil 4.11'de 3.kolon) ama beklenildiği gibi Tipin-L195A içeren Timeless-Tipin kompleksi RPA kaplı ssDNA'ya bağlanamamaktadır. (Şekil 4.11'de 4.kolon)

#### **4.16. WT-TİPİN VE TİPİN-L195A MUTANTI HİS-FLAG-CLASPİN'E BENZER AFFİNİTE İLE BAĞLANMAKTADIR**

E.coli'den saflaştırılan Tipin-His-WT ve Tipin-His-L195A proteinlerinin, bakülovirüsle infekte edilen böcek hücrelerinde elde edilen His-FLAG-Claspin'le olan ilişkileri test edildi (Şekil 4.12).

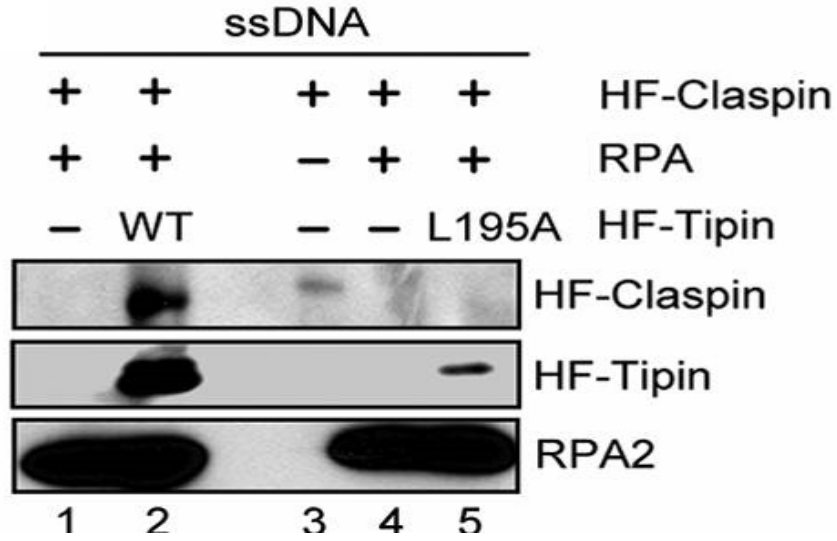


**Şekil 4.12.** Bakülovirüsle Enfekte Edilen Böcek Hücrelerinden Elde Edilen His-FLAG-Claspin ile *E.coli*'den elde edilen WT-Tipin ve Tipin-L195A Mutantının FLAG etiketli İmmünopresipitasyonu (Flag-IP). İntutlarda bağlanma reaksiyonlarında kullanılan Tipin'lerin %5'lik miktarı gösterilmiştir. (2. ve 3. kolonlar) IP için her iki formdan da 1.5 ug Tipin kullanılmıştır. WT-Tipin'in Claspin'e bağlanma oranı kolon 2'de gösterilmiştir. Tipin-L195A mutantının Claspin'e bağlanma oranı ise kolon 3'de gösterilmiştir.

Kolon 2 ve 3'deki Tipin miktarı karşılaştırıldığı zaman WT-Tipin ve Tipin-L195A mutantının His-FLAG-Claspin'e benzer affinite ile bağlandığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.12).

#### **4.17. MUTANT TİPİN L195A, CLASPİN İLE RPA KAPLI ssDNA'NIN BİRLEŞMESİNDE GÖREV YAPAMAMAKTADIR**

Tipindeki L195A mutasyonun, Claspin ve ssDNA bağlanmasındaki Tipin'in görevini engelleyip engellemediğini belirlemek için WT-Tipin veya Tipin-L195A olan ortamlarda Claspin'in DNA'ya bağlanmaları test edildi (Şekil 4.13).



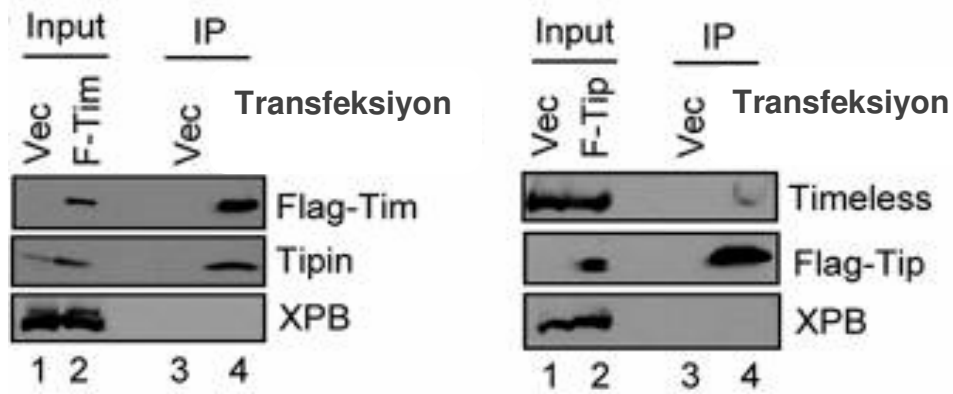
**Şekil 4.13.** RPA ile pre-inkübe edilmiş ssDNA'nın WT-Tipin, Mutant Tipin-L195A ve/veya His-FLAG-Claspin ile inkübasyonu ve Pull-Down Assay ile İnteraksiyonların İncelenmesi. 1 ve 2.kolonlar WT-Tipin,RPA ve Claspin etkileşimini gösterirken, 3-5 kolonlar ise L195A mutant form Tipin ile RPA ve Claspin etkileşimini göstermektedir. RPA ile kaplanmış veya kaplanmamış 80-mer ssDNA ile Claspin tek başına ya da Tipin-WT/ Tipin-L195A olan ortamda inkübe edildi, ve ssDNA'ya bağlanan proteinler belirlendi.

Claspin RPA kaplı ssDNA'ya WT-Tipin olmadan bağlanamamaktadır (Şekil 4.13'de 1. kolon). Ortamda WT-Tipinin olduğu zaman Claspin ssDNA'ya bağlanmaktadır (Şekil 4.13'de 2. kolon) Ortamda Tipin-L195A olduğu ve olmadığı zaman her iki durumda da Claspin ssDNA'ya bağlanamamaktadır (Şekil 4.13'de 4. ve 5.kolonlar)

Tipin-L195A, Claspin'in RPA kaplı ssDNA'ya bağlanmasında görev yapamamaktadır.

#### **4.18. TIPİN PROTEİNİN STABİLİTESİ VE TIMELESS İLE HETERODİMERİK YAPI OLUŞTURMASI, ORTAMDA YETERLİ MİKTARDA SERBEST TIMELESS BULUNMASINA BAĞLI OLABİLİR**

Rekombinant FLAG form olan Timeless ve Tipin'in, hücre içi endojen bağlanma eşiyle oluşturdukları yapıları test etmek için HEK293T hücreleri FLAG-Timeless ve FLAG-Tipin ile transfekte edilip, protein seviyeleri karşılaştırıldı (Şekil 4.14).



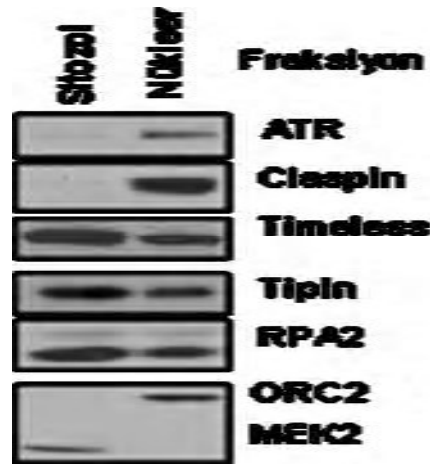
**Şekil 4.14.** Boş vektör ve FLAG-Timeless (sol panel) veya FLAG-Tipin(sağ panel) kodlayan vektörlerle transfekte edilen HEK293T hücrelerinde İmmünopresipitasyon (IP) yöntemi ile protein miktarlarının karşılaştırılması. 1 ve 2.kolonlar boş vektör ve F-Tim/F-Tip ile transfekte edilen HEK293T hücrelerine ait proteinleri, 3 ve 4.kolonlar ise FLAG-IP sonucundaki proteinlerin seviyelerini göstermektedir.

FLAG-Timeless ile HEK293T hücreleri transfekte edildiği zaman, endojen Tipin miktarı artmaktadır (Şekil 4.14’de sol panel- 4.kolon). Buna karşılık FLAG-Tipin ile HEK293T hücreleri transfekte edildiği zaman çok az miktarda Timeless Tipin ile birleşmektedir (Şekil 4.14’de sağ panel- 4.kolon). Negatif kontrol olarak XPB (Xeroderma Pigmentosum B) protein miktarı test edilmiştir.

Sağ ve sol paneldeki 4.kolonlar karşılaştırıldığı zaman, Tipin proteinin stabilitesi ve Timeless ile heterodimerik yapı oluşturması, ortamda yeterli miktarda serbest Timeless bulunmasına bağlı olabileceğini göstermektedir.

#### 4.19. ENDOJEN TIMELESS VE TIPIN PROTEİNLERİNİN HEK293T HÜCRELERİNDEKİ LOKALİZASYONU BELİRLENDİ

İnsan hücrelerindeki Timeless ve Tipin proteinlerinin hücre içi lokalizasyonu belirlemek için HEK293T hücreleri fraksiyonlara ayrıldı ve proteinlerin sitozoldeki ve nükleerdeki miktarları karşılaştırıldı (Şekil 4.15).



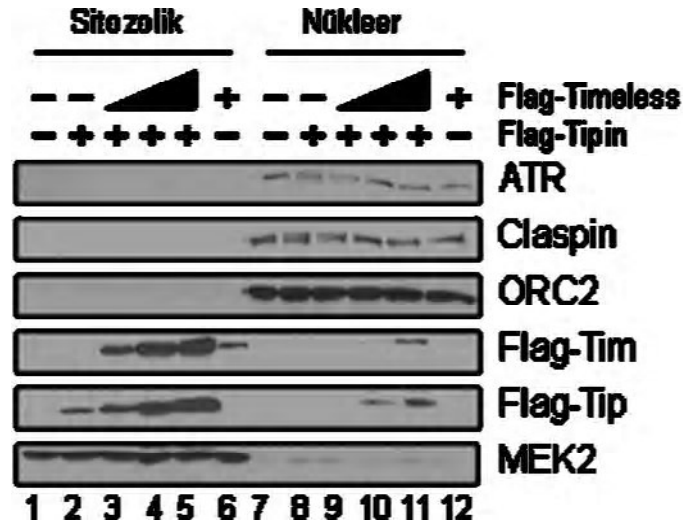
**Şekil 4.15.** Hipotonik Ortamda Sitolitik ve Nükleer Fraksiyonlarına ayrılan HEK293T hücrelerindeki proteinlerin SDS-PAGE ile ayrılması ve westernblotting ile belirlenmesi. HEK293T hücrelerini sitozolük ve nükleer yapılarına ayırdıktan sonra ATR, Claspin, Timeless, Tipin, RPA2, ORC2 ve MEK2 proteinlerinin sitozoldeki ve nükleerdeki miktarları karşılaştırılmıştır.

Şekil 4.15’de ORC(Origin recognition Complex) ve MEK2 (Mitogen-activated Protein Kinase) sitozolük ve nükleer proteinleri belirlerken pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

HEK293T hücrelerini sitozolük ve nükleer yapılarına ayırdıktan sonra proteinlerin sitozoldeki ve nükleerdeki miktarları karşılaştırılınca, Timeless ve Tipin miktarlarının sitozolde daha fazla olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.15).

#### **4.20. TIMELESS/TİPİN KOMPLEKSİNİN NÜKLEER LOKALİZASYONU VE KARARLI YAPI OLUŞTURMASI İÇİN TİPİN’İN TIMELESS İLE BİRLİKTE EKSPRESE EDİLMESİ GEREKMEKTEDİR**

FLAG-Timeless ve FLAG-Tipin’i ayrı ayrı ve birlikte HEK293T hücrelerinde eksprese edilip protein düzeylerini ve buna bağlı olarak nükleer lokalizasyonunu inceledik (Şekil 4.16).

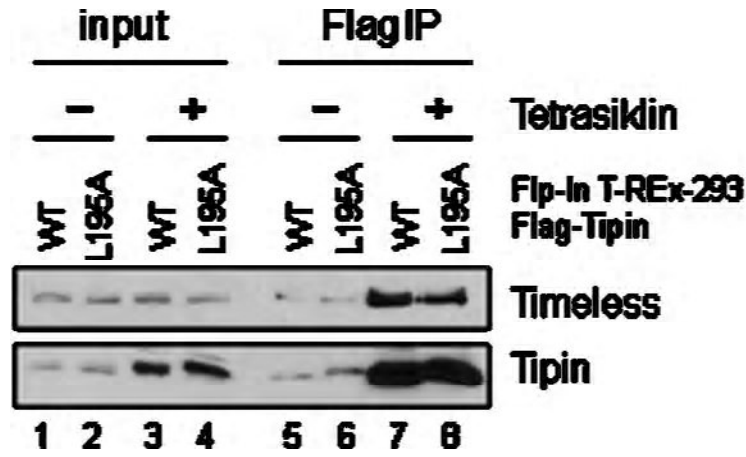


**Şekil 4.16.** Boş vektör, FLAG-Tipin ve artan miktarda FLAG-Timeless vektörleri ile transfekte edilen HEK293T Hücrelerinin Sitozolik ve Nükleer Fraksiyonlarına ayrılması, proteinlerin SDS-PAGE ve Western blotting yöntemleri ile belirlenmesi. ORC (Origin recognition Complex) ve MEK2 (Mitogen-activated Protein Kinase) sitozolik ve nükleer proteinleri belirleme için pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. HEK293T hücreleri boş vektörle (1. ve 7. kolonlar), FLAG-Tipin eksprese eden ve artan miktarda FLAG-Timeless eksprese eden vektörlerle (2-5 ve 8-11. kolonlar) veya tek başına FLAG-Timeless eksprese eden vektörle (6 ve 12. kolonlar), toplamda 15 µg plazmid DNA'sı olacak şekilde transfekte edildi. Hücreler nükleer ve sitozolik bölümlerine ayrılıp protein seviyeleri karşılaştırıldı.

En yüksek düzeyde FLAG-Timeless ve FLAG-Tipin nükleer lokalizasyonu için FLAG-Timeless ve FLAG-Tipin'in birlikte ekspresyonu gerekmektedir (Şekil 4.16'da 11. kolon).

#### 4.21. TETRASİKLİNLE İNDÜKLENEBİLEN PROMOTOR KONTROLÜ ALTINDA, FLAG ETİKETLİ WT-TİPİN VE TİPİN-L195A EKSPRESE EDEN FLP-IN™ T-REX™-293 HÜCRE HATLARI ELDE EDİLMİŞTİR

Tipin'in Timeless'la ve diğer kontrol noktası faktörleriyle etkileşimini incelemek için FLAG etiketli WT-Tipin ve Tipin-L195A eksprese eden Flp-In™ T-REx™-293 hücre hatları elde ettik. Bu hücre hatları Tetrasiklinle indüklenebilen promotora sahiptir (Şekil 4.17).

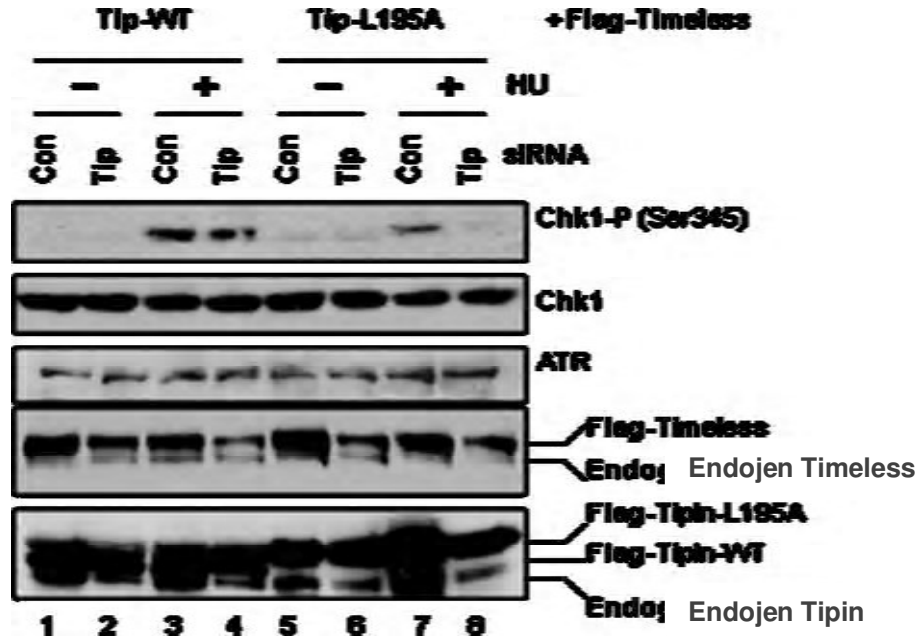


**Şekil 4.17.** Tetrasiklinle İndüklenebilen Promotor Kontrolü Altında, FLAG Etiketli Tipin-WT ve Tipin-L195A İfade Eden Flp-In™ T-REx™-293 Hücre Hatlarında Timeless ve Tipin Miktarlarının FLAG İmmünopresipitasyonu (FLAG-IP) ile belirlenmesi. FLAG etiketli WT-Tipin ve Tipin-L195A eksprese eden Flp-In™ T-REx™-293 hücre hatlarının protein ekspresyonunun kontrol edilmesi için Tetrasiklinle inkübe edildi. 1-4 kolonlar FLAG etiketli immünopresipitasyon reaksiyonları için +/- Tetrasiklin için ayrı ayrı reaksiyonlara giren proteinler verilmiştir. 5-8 kolonlar +/- Tetrasiklin durumunda hem WT hem de L195A mutanları için FLAG IP sonucundaki protein seviyelerini göstermektedir.

Tetrasiklinle indüklenen Flp-In™ T-REx™-293 hücre hatlarında Timeless ve Tipin proteinlerinin kontrollü bir şekilde eksprese edildiği gözlemlendi (Şekil 4.17’de 7. ve 8. kolonlar).

#### 4.22. DNA HASARINDA VE REPLİKASYON STRESİNDE HELA HÜCRELERİNDE OLUŞAN CHK1 FOSFORİLASYONUNU TIPİN-L195A MUTANTI DESTEKLEYEMEMEKTEDİR

HeLa hücrelerinde siRNA transfeksiyonu ile endojen Tipin miktarını indirgeyip, Tipin-WT ve Tipin-L195A’nın DNA hasarında ve replikasyon stresindeki Chk1 fosforilasyon seviyelerine etkisini test ettik (Şekil 4.18).



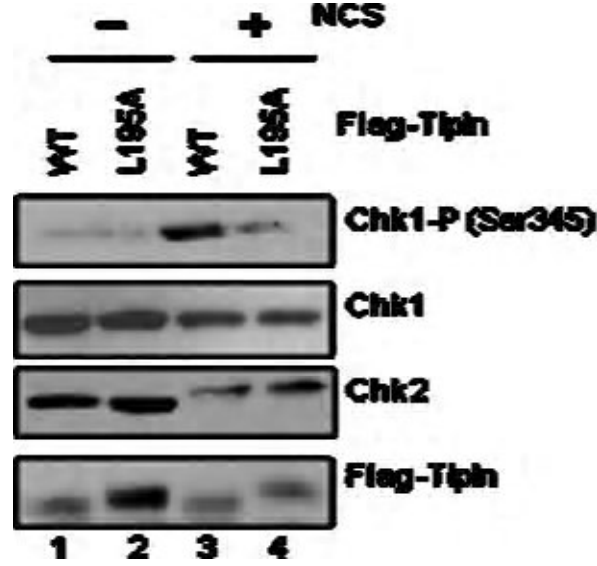
**Şekil 4.18.** FLAG-Timeless ve siRNA-dirençli FLAG-Tipin (WT veya L195A) ile transfekte edilen HeLa Hücrelerinde siRNA (Kontrol veya Tipin) ile genlerin susturulması ve +/-HU durumunda Chk1 Fosforilasyon düzeylerinin SDS-PAGE ve Westernblotting yöntemleri ile belirlenmesi. 1-4 kolonlar Tipin-WT, 5-8 kolonlar Tipin-L195A ile transfekte edilen hücrelerde, HU etkisine bağlı olarak siRNA-kontrol ve siRNA-Tipin'in transfeksiyon etkisindeki Chk1-P(Ser345), Chk1, ATR, Flag-Timeless, Endojen Timeless, Flag-Tipin-L195A, Flag-Tipin-WT ve endojen Tipin proteinlerinin miktarları gösterilmiştir.

siRNA ile hücre içi Tipin miktarının indirgenebilirliğini test ettik ve Tipin-siRNA ile kontrol-siRNA transfeksiyonundaki endojen Tipin seviyelerini karşılaştırdık. Tipin-siRNA transfeksiyonlarının çalıştığını doğruladık.

siRNA transfeksiyonu ile endojen Tipin miktarını HeLa hücrelerinde indirdedik. Böylece WT ve L195A mutant Tipin formların Chk1 fosforilasyonundaki etkilerini hücre içi Tipin miktarından bağımsız olarak karşılaştırdık. FLAG-Tipin-L195A ile transfekte edilen HeLa hücrelerinde, siRNA -Tipin ile hücre içi Tipin miktarı indirgendiği zaman DNA hasarında ve replikasyon stresindeki Chk1 fosforilasyonun (Şekil 4.18'de 8.kolon), kontrol-siRNA ile transfekte edilen grupla karşılaştırıldığı zaman (Şekil 4.18'de 7.kolon) anlamlı bir şekilde azaldığı gözlenmiştir.

#### 4.23. ÇOKLU GENOTOKSİK STRES DURUMUNDA DA RPA-TİPİN İNTERAKSİYONU, Chk1 FOSFORİLYASYONU İÇİN ÖNEMLİDİR

Farklı bir genotoksik etki altında WT ve L195A'nın Chk1 fosforilasyonuna etkisini test ettik. Genotoksik ajan olarak NCS kullanıldı (Şekil 4.19).

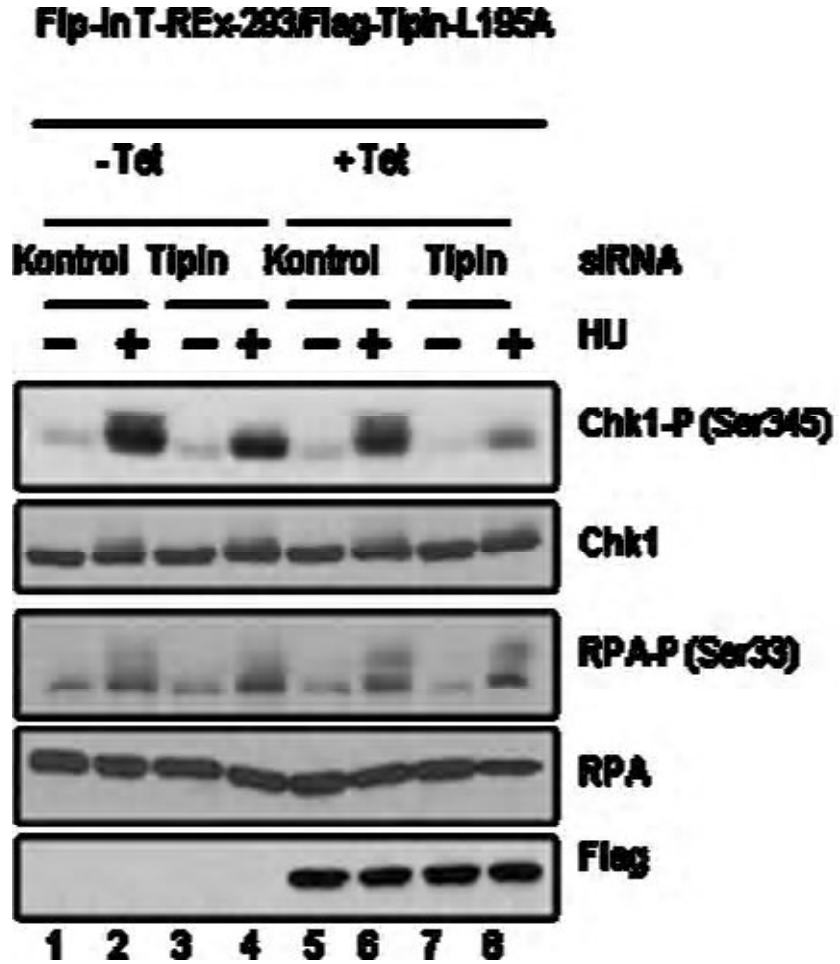


**Şekil 4.19.** Tipin siRNA ve FLAG-Timeless ile siRNA dirençli FLAG-Tipin (WT veya L195A) kodlayan vektörlerle transfekte edilen HeLa hücrelerinde NCS muamelesi ile oluşan Chk1 Fosforilasyonun SDS-PAGE ve Western blotting yöntemleri ile belirlenmesi. 1.ve 2. kolonlarda WT ve L195A Flag-Tipin'in NCS ortamda olmadığı zamanki Chk1-P (345), Chk1, Chk2 ve Flag Tipin protein miktarları, 3. ve 4. kolonlarda ise WT ve L195A Flag-Tipin'in NCS'nin etkisi altındaki Chk1-P (345), Chk1, Chk2 ve Flag Tipin protein miktarları gösterilmektedir.

NCS ile inkübe edilen HeLa hücrelerinde, WT ve L195A eksprese eden gruplar karşılaştırıldığı zaman, Chk1-P seviyesinin mutant Tipin-L195A'da belirgin bir şekilde azaldığı gözlemlendi. Mutant Tipin-L195A'da Chk1-P seviyesinin azalması, NCS gibi farklı genotoksik ajanların etkisinde de azalmaktadır. Şekil 4.19, Chk1 fosforilasyonuna Tipin-RPA interaksyonunun etkisi olduğunu göstermektedir.

#### 4.24. siRNA DİRENÇLİ FLP-IN™ T-REX™-293 –FLAG-TİPİN-L195A HÜCRE HATLARINDA siRNA-TİPİN TRANSFEKSİYONU İLE ENDOJEN TİPİN SEVİYESİ DÜŞÜRÜLDÜĞÜ ZAMAN CHK1 FOSFORİLASYONU ÖNEMLİ ÖLÇÜDE YOK OLMAKTADIR

RPA-Tipin etkileşiminin Chk1 fosforilasyonuna etkisini, siRNA Dirençli Flp-In™ T-REx™-293 –FLAG-Tipin-L195A hücre hatları elde ederek inceledik. siRNA-Tipin transfeksiyonu ile Tipin seviyesi düşürüldüğü zaman FLAG-Tipin-L195A eksprese edilen Flp-In™ T-REx™-293 –FLAG-Tipin-L195A hücrelerindeki Chk1 fosforilasyonu düzeyleri incelendi (Şekil 4.20).



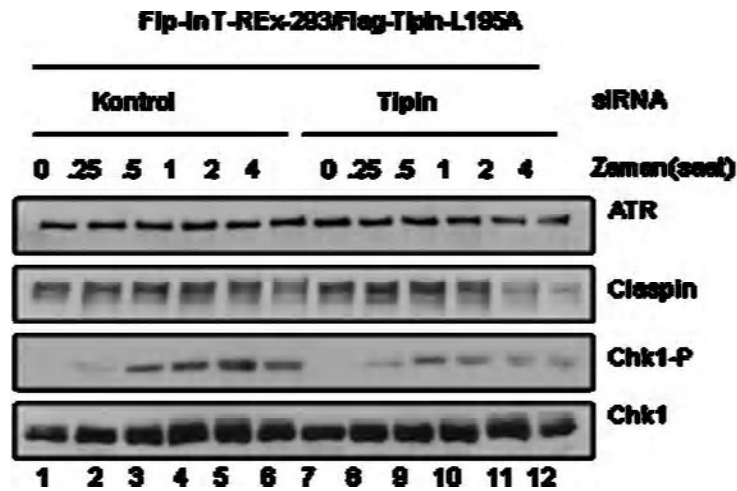
**Şekil 4.20.** Kontrol ve siRNA-Tipin ile transfekte edilen siRNA Dirençli Flp-In™ T-REx™-293 –FLAG-Tipin-L195A Hücre Hatlarında (+/- Tetrasiklin ) HU muamelesi ile oluşan Chk1 Fosforilasyonun SDS-PAGE ve Western blotting yöntemleri ile belirlenmesi. 1-4.kolonlar arası siRNA dirençli Flp-In™ T-REx™-293 –FLAG-Tipin-L195A hücre hatlarında – Tetrasiklin durumunda +/-HU muamelesine göre, 5-8.kolonlar arası siRNA dirençli Flp-In™ T-REx™-293 –FLAG-Tipin-L195A hücre hatlarında +Tetrasiklin durumunda +/-HU muamelesine göre değişen protein miktarları gösterilmiştir.

Flp-In™ T-REx™-293 –FLAG-Tipin-L195A hücrelerinde de benzer sonuçlar elde ederek bulgularımızı doğruladık. Kontrol ve siRNA-Tipin ile transfekte edilen siRNA Dirençli Flp-In™ T-REx™-293 –FLAG-Tipin-L195A hücreleri karşılaştırıldığı zaman (6. ve 8. kolonlar), Chk1-P seviyesinin anlamlı bir şekilde azaldığı gözlemlendi. Buna karşılık RPA'nın Serin 33. amino asitindeki fosforilasyonunda bir azalma gözlenmemiştir.

#### 4.25. CLASPİN KAYBI, CHK1 FOSFORİLASYONUNDAKİ AZALMANIN BİR SONUCU OLABİLİR

Claspin'in RPA kaplı ssDNA ile yapı oluşturması için Tipin'in gerekli olduğunu gözlemlediğimiz için Claspin kaybının Chk1 fosforilasyonuna etkisini araştırdık.

Tetrasiklinle indüklenmiş kontrol ve siRNA-Tipin ile transfekte edilen, siRNA dirençli Flp-In™ T-REx™-293 –FLAG-Tipin-L195A hücre hattında zamana bağlı olarak Claspin ve Chk1 seviyelerini değerlendirdik (Şekil 4.21).



**Şekil 4.21.** Kontrol ve siRNA-Tipin ile transfekte edilen, tetrasiklinle indüklenmiş siRNA Dirençli Flp-In™ T-REx™-293 –FLAG-Tipin-L195A Hücre Hatlarında zamana bağlı HU inkübasyonu ile oluşan Chk1 Fosforilasyonun ve Claspin seviyesinin SDS-PAGE ve Western blotting yöntemleri ile karşılaştırılması. 1-6. kolonlar siRNA dirençli Flp-In™ T-REx™-293 –FLAG-Tipin-L195A hücre hatlarında kontrol siRNA transfeksiyonu ile , 7-12. kolonlar ise siRNA-Tipin transfeksiyonu ile zamana bağlı HU inkübasyonu sonucu ATR, Claspin, Chk1-P ve Chk1 proteinlerinin miktarlarını göstermektedir.

Belirtilen zaman aralıklarında HU inkübasyonu yapılarak Chk1 fosforilasyonu indüklendi. Tipin-siRNA ile hücre içi Tipin miktarı indirgenerek, L195A ekspresyonun Chk1 ve Claspin seviyesine etkisi gözlemlendi. Kolon 9 ve 12 arasındaki Claspin azalmasına bağlı olarak Chk1-P seviyesi de kolon 3 ve 7 arasındaki Chk-P seviyesine göre bağlı bir azalma göstermiştir (Şekil 4.21).

**Not:** Bu çalışma Ocak/2009-Ocak/2011 yılları arasında Amerika Birleşik Devletleri, Kuzey Karolina Üniversitesi Biyokimya Bölümünde Prof. Dr. Aziz Sancar ve ekibinden Dr. Michael G.Kemp ve Dr. Zafer Akan ile yapılmıştır (137).

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Hücre döngüsündeki, DNA hasar ve replikasyon kontrol noktaları, DNA'yı tanıyan ve yapısındaki değişikliklere cevap veren hücresel sinyal ileti yolları ile kontrol edilmektedir. Bu kontrol noktaları hücre döngüsünü durdurarak ya da geciktirerek DNA tamiri ve DNA replikasyonun tamamlanması için yeterli zamanın oluşmasını sağlarlar. Memeli hücrelerindeki DNA hasar kontrol noktalarında tanımlanan iki büyük sinyal ileti yolağı vardır. Çift zincir kırıkları ile aktive olan ATM-Chk2 yolağı ve primer olarak UV ve UV-mimetik kimyasal ajanlarla aktive olan ATR-Chk1 yolağıdır (2). Farklı DNA hasarı cevaplarında hem ATM hem de ATR'ın aktifleşmesine rağmen, aktivasyonun mekanizmasının ve kinetiğinin, DNA hasar ajanları ile indüklenen DNA lezyon çeşitleri ile ilişkili olduğu düşünülür. ATM öncelikli olarak iyonize radyasyon (IR) ve ilgili kimyasallar tarafından oluşan açık çift-zincir DNA kırıklarında aktive olurken (147), ATR, replikasyon çatalı gecikmesi boyunca, nükleotid ekzisyon tamirinde, çift-zincir kırık işlemlerinde ve telomerin yeniden korunması gibi daha çok sayıdaki genom karasızlığı durumlarında uyarılmaktadır (2, 12, 13). ATR'ı aktive eden genotoksik ajanların çeşitliliğinden dolayı, ATR'ın ATR sinyal ileti yollarının başlamasında ve devamlılığında görev yapabilen genel bir DNA aracı olduğu öne sürülmüştür (13-15).

Bu çalışmanın yapıldığı Prof. Dr. Aziz Sancar ve grubunca daha önce yapılan çalışmalarda Timeless-Tipin kompleksinin RPA'ye bağlandığı gösterilmiş ve ATR sinyal ileti yolağını düzenleme amacı ile Timeless-Tipin kompleksinin DNA hasar bölgesine getirilebileceği ihtimali öne sürülmüştür (133). Yaptığımız bu çalışma ile Timeless-Tipin kompleksinin spesifik olarak Chk1 fosforilasyonuna aracılık ettiği gösterilmiştir. Timeless-Tipin kompleksi, ATR tarafından Chk1'nın fosforilasyonuna aracılık ederken, RPA'nın 34kDa'luk alt birimi Tipin ile etkileşime girmektedir. Bu etkileşim hem Timeless-Tipin kompleksini kararlı hale getirdiği hem de Claspin'in RPA kaplı tek zincirli DNA'ya bağlanmasında görev yaptığı için çok önemlidir.

Bu çalışma sonunda bulduğumuz sonuçlar, daha önceki çalışmalarla tutarlı olarak, DNA hasar kontrol noktası uyarıldığı zaman Chk1'nın ATR tarafından fosforilasyonu için Timeless-Tipin kompleksinin gerekli olduğunu göstermiştir (41, 126, 130, 131, 133). Fakat daha önce yapılan çalışmalarda Chk1 dışındaki diğer ATR substratları için Timeless-Tipin kompleksinin fonksiyonu test edilmemiştir. HeLa hücrelerinde siRNA teknolojisi kullanarak yapmış olduğumuz deneylerde, HU tarafından replikasyon stresi oluşturulduğunda, diğer ATR substratlarına karşı Timeless-Tipin kompleksinin Chk1 fosforilasyonuna etkisine oranla, anlamlı bir etki gözlenmemiştir (Şekil 4.3). Ayrıca, siRNA-Tipin ve siRNA-Timeless ile Tipin ve Timeless genleri susturularak, Chk1 fosforilasyon seviyesi kontrol-siRNA kullanılan grup ile karşılaştırıldı. S evresi kontrol noktası yanıtında RPA'nın fonksiyonun düzenlenmesinde ATR tarafından fosforile olan RPA2'nin fosforilasyon seviyesi de, bu fosforilasyonun Chk1'a özgü olup olmadığını anlamak amacı ile test edildi. RPA2-Ser33 bölgesindeki fosforilasyonda anlamlı bir değişim gözlenmedi. Aynı şekilde kontrol-siRNA ve Timeless/Tipin- siRNA ile transfekte edilen HeLa hücrelerinde ATR substratı olarak bilinen MCM-Ser108 bölgesine ait fosforilasyon seviyelerinin benzer düzeyde çıkması ile bu çalışmaya özgün olarak Timeless-Tipin aktivitesinin Chk1-Claspin substratına spesifik olduğu sonucuna varıldı (Şekil 4.3). Fosforilasyon seviyeleri test edilerek yapılan çalışmalarda dikkat edilmesi gereken en önemli noktalardan biri de, fosforilasyon düzeyindeki değişimin proteinin miktarındaki değişimden bağımsız olduğunu göstermektir. HeLa hücrelerinde siRNA transfeksiyonu ile Chk1 fosforilasyonunu incelemek için yaptığımız çalışmalarda, fosforilasyon düzeyindeki değişimin Chk1 miktarından bağımsız olduğunu göstermek için kontrol olarak Chk1 miktarını da ölçtük. Sonuç olarak, Chk1 protein miktarı sabit kaldığı için Chk1 fosforilasyonundaki azalmanın Timeless-Tipin'e bağlı olduğunu

şüphesiz olarak doğruladık. Daha önceki çalışmalarda, benzer bir fenotip Claspin için de gösterilmiştir (148, 149). Bu sonuçlar, Timeless-Tipin ve Claspin proteinleri için ATR tarafından Chk1'in ortak bir yolak tarafından fosforile edildiğine işaret edebilir.

Timeless ve Tipin proteinlerinin DNA hasar kontrol noktasındaki fonksiyonlarını araştıran bu çalışmamızdaki bir diğer önemli nokta ise, kompleks oluşturan bu proteinleri heterodimer olarak elde edebilmektir. Timeless ve Tipin proteinleri heterodimer oluşturduğu için ve kompleks halindeki fonksiyonlarıyla da sonuçlarımızı doğrulamak için Timeless ve Tipin proteinlerini hem ayrı ayrı hem de heterodimer olarak pürifiye etmek istedik. *E.coli*'den Timeless-Tipin kompleksini heterodimer halinde pürifiye edemedik ama bakülovirüsle enfekte edilmiş Sf21 böcek sisteminden başarılı bir şekilde protein kompleksi elde edildi (Şekil 4.1).

Proteinlerin DNA'ya bağlanma özelliklerini araştırmak için streptavidin kaplı magnetik boncukların olduğu ssDNA kullanıldı. Daha önce RPA ve ATRIP'nın ssDNA üzerindeki etkileşimini gözlemlemek için uygulanan yöntem gibi (15,150) proteinler DNA ile inkübe edilerek fonksiyonları araştırıldı. Daha önce yapılan ve Tipin'in Timeless-Tipin kompleksinin RPA ile olan etkileşimini düzenlediğini gösteren çalışma (133) ile tutarlı olarak, biz de Tipin'in RPA kaplı ssDNA ile birleşmesi için Timeless'in gerekli olmadığını gösterdik (Şekil 4.4).

Şimdiye kadar ortaya konan bilgiler, DNA hasarında ATR kinazın, tamir proteinlerinin hasar olan bölgeye getirilmesi ve kontrol faktörleri tarafından DNA hasarının doğrudan tanınması gibi çok basamaklı mekanizmalar ile aktive olduğunu göstermektedir (151-154). Bundan dolayı ATR kinazın hangi mekanizmalarla ve nasıl aktive olduğu, bu yollarda görev yapan proteinlerin fonksiyonları hakkındaki kilit sorular moleküler ve genetik çalışmalarla daha detaylı olarak aydınlatılmayı beklemektedir. ATR, RPA kaplı tek zincirli DNA'ya ATR-ATRIP heterodimerin ATRIP alt birimi ve RPA'nın RPA1 alt birimi arasındaki etkileşim sayesinde getirilmektedir (14, 15). İlk olarak *Xenopus* yumurta ekstraktlarında Chk1-interaksiyon proteini olarak bulunan Claspin, (74), insan hücrelerinde de gösterilmiştir. Claspin, diğer ATR substrat proteinlerini değil ama spesifik olarak Chk1 fosforilasyonunu uyarmak için ATR kinaz reaksiyonlarını düzenlemektedir (148, 149). Yaptığımız bu çalışmada, Claspin'in RPA kaplı ssDNA'ya bağlanabilmesi için Tipin'in gerekli olduğunu gösterdik (Şekil 4.7). Claspin'in Tipin aracılığıyla ssDNA'ya bağlanması sonucu, insan hücrelerinde ve *Xenopus* yumurta

ekstraktında, Claspinin geç kalmış Replikasyon Çatalı içeren kromatinle birleşmesi için Tipin'in neden gerekli olduğunu açıklayabilmektedir (39, 145, 155). Sinyalleşme olayının gerçekleşmesi için Claspin proteinin bir aracı olarak gerekliliğini gösteren çeşitli model sistemlerdeki bilgilere rağmen, DNA hasar cevabı boyunca ATR'ın Chk1'la nasıl ilişki kurduğu ve Chk1'ı nasıl fosforile ettiği belirsizdir (74, 75, 128, 148, 149). Önemli olarak, Claspin'nin ATR gibi çeşitli formlardaki DNA hasarlarını indükleyen ajanlara olan cevabında, Chk1 fosforilasyonu ve DNA hasar kontrol noktası sinyali için gerekli olması, ATR-Chk1 sinyali ile DNA hasar ve replikasyon stres alanlarına getirilmesindeki fonksiyonu için genel bir mekanizmanın var olduğunu gösterir (127, 149, 156). Chk1'nın Claspin aracılı olarak ATR tarafından fosforile edildiği *in vitro* sistemde gösterilmiştir (148). Fakat henüz ATR'ın nasıl bir mekanizma ile DNA'daki hasarlı DNA'ya getirildiği çok detaylı bir şekilde açıklanamamıştır. Yapmış olduğumuz bu çalışma ile, Timeless-Tipin kompleksinin alt birimi Tipin'in, RPA'nın alt birimi olan RPA2 ile doğrudan gerçekleştireceği bir etkileşim ile Timeless-Tipin kompleksinin ATR-Claspin interaksiyonunun gerçekleşmesine aracılık edebileceğini gösterdik. ATR-Chk1 sinyal mekanizmasının daha iyi anlaşılabilmesi için daha detaylı çalışmalar gerekliliği çok açıktır.

Diğer taraftan, geleneksel kemoterapiye ilave olarak Chk1 kinaz aktivitesini inhibe eden küçük moleküllerin geliştirilmesi, kemoterapi etkinliğini artıracak bir faktör olarak görülmektedir (44). Bundan dolayı ATR-Chk1 sinyal yolağı kanser terapisinde kullanılabilir potansiyel bir hedefi oluşturur. Hücre döngüsü kontrol noktalarındaki fonksiyonların bozulmasına neden olabilecek inhibitörlerin kullanılması ile kanser hücrelerinin kemoterapik ajanlara karşı daha hassas olması beklenir. Günümüzde Chk1 inhibitörlerinin kemoterapi ile birleştirilmesi moleküler biyoloji ile yapılan klinik amaçlı ortak çalışmaları için çok dikkat çekici bir konudur. Yaptığımız çalışmada Tipin-RPA etkileşiminin önemini açığa çıkardık ve ayrıca Tipin-RPA bağlanma bölgesini belirledik, bundan dolayı yapılan bu çalışma sonuçları Tipin'in RPA ile etkileşimini engelleyecek peptid inhibitörlerin ve kimyasal bileşenlerin, DNA hasarını indükleyen kemoterapik ilaçlara karşı hücrenin daha hassas olması amacı ile kullanılabileceğini önermektedir.

## **6. KAYNAKLAR**

1. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144: 646-674
2. Sancar A, Lindsey-Boltz L.A, Unsal-Kacmaz K, et al. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem* 2004; 73: 39-85
3. Zhou BB, Elledge SJ. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* 2000; 408: 433–439
4. Nyberg KA, Michelson RJ, Putnam CW, et al. Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints. *Annu Rev Genet* 2002; 36: 617–656
5. Daniels DS, Tainer JA. Conserved structural motifs governing the stoichiometric repair of alkylated DNA by O(6)-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Mutat Res* 2000; 460: 151–163
6. Banin S, Moyal L, Shieh S, et al. Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science* 1998; 281: 1674–1677
7. Canman CE, Lim DS, Cimprich KA, et al. Activation of ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science* 1998; 281: 1677–1679
8. Lim DS, Kim ST, Xu B, et al. ATM phosphorylation p95/nbs1 in an S-phase checkpoint pathway. *Nature* 2000; 404: 613–617

9. Cortez D, Wang Y, Qin J, et al. Requirement of ATM-dependent phosphorylation of brca1 in the DNA damage response to double-strand breaks. *Science* 1999; 286: 1162–1166
10. Bakkenist CJ, Kastan MB. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 2003; 421: 499–506
11. Shiloh Y. Ataxia-telangiectasia and the Nijmegen breakage syndrome: related disorders but genes apart. *Annu Rev Genet* 1997; 31: 635–662
12. Cimprich KA, Cortez D. ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9: 616–627
13. Palm W, de Lange T. How shelterin protects mammalian telomeres. *Annu Rev Genet* 2008; 42: 301–334
14. You Z, Kong L, Newport J. The role of single-stranded DNA and polymerase alpha in establishing the ATR, Hus1 DNA replication checkpoint. *J Biol Chem* 2002; 277: 27088–27093
15. Zou L, Elledge SJ. Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science* 2003; 300: 1542–1548
16. Brown EJ, Baltimore D. ATR disruption leads to chromosomal fragmentation and early embryonic lethality. *Genes Dev* 2000; 14: 397–402
17. O’Driscoll M, Ruiz-Perez VL, Woods CG, et al. A splicing mutation affecting expression of ataxia-telangiectasia and Rad3-related protein (ATR) results in Seckel syndrome. *Nat Genet* 2003; 33: 497–501
18. Melo J, Toczyski D. A unified view of the DNA-damage checkpoint. *Curr Opin Cell Biol* 2002; 14: 237–245
19. Rhind N, Russell P. Chk1 and Cds1: linchpins of the DNA damage and replication checkpoint pathways. *J Cell Sci* 2000; 113: 3889–3896
20. McGowan CH. Checking in on Cds1 (Chk2): A checkpoint kinase and tumor suppressor. *Bio Essays* 2002; 24: 502–511
21. Abraham RT. Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev* 2001; 15: 2177–2196
22. Hirao A, Kong YY, Matsuoka S, et al. DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2. *Science* 2000; 287: 1824–1827

23. Fanning E, Klimovich V, Nager AR. A dynamic model for replication protein A (RPA) function in DNA processing pathways. *Nucleic Acids Res* 2006; 34: 4126-4137
24. Wold MS. Replication protein A: a heterotrimeric, single-stranded DNA-binding protein required for eukaryotic DNA metabolism. *Annu Rev Biochem* 1997; 66: 61-92
25. Wobbe CR, Weissbach L, Borowiec JA, et al. Replication of simian virus 40 origin-containing DNA in vitro with purified proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 1834–1838
26. Wold MS, Weinberg DH, Virshup DM, et al. Identification of cellular proteins required for simian virus 40 DNA replication. *J Biol Chem* 1989; 264: 2801–2809
27. Seroussi E, Lavi S. Replication protein A is the major single-stranded DNA binding protein detected in mammalian cell extracts by gel retardation assays and UV cross-linking of long and short single-stranded DNA molecules. *J Biol Chem* 1993; 268: 7147–7154
28. Coverley D, Kenny MK, Munn M, et al. Requirement for the replication protein SSB in human DNA excision repair. *Nature* 1991; 349: 538–541
29. Heyer WD, Rao MRS, Erdile LF, et al. An essential *Saccharomyces cerevisiae* single-stranded DNA binding protein is homologous to the large subunit of human RP-A. *EMBO J* 1990; 9: 2321–2329
30. Ball HL, Ehrhardt MR, Mordes DA, et al. Function of a conserved checkpoint recruitment domain in ATRIP proteins. *Mol Cell Biol* 2007; 27: 3367-3377
31. Ball HL, Myers JS, Cortez D. ATRIP binding to replication protein A-single-stranded DNA promotes ATR-ATRIP localization but is dispensable for Chk1 phosphorylation. *Mol Biol Cell* 2005; 16: 2372-2381
32. Kumagai A, Lee J, Yoo HY, et al. TopBP1 activates the ATR-ATRIP complex. *Cell* 2006; 124: 943-955
33. Delacroix S, Wagner JM, Kobayashi M, et al. The Rad9-Hus1-Rad1 (9-1-1) clamp activates checkpoint signaling via TopBP1. *Genes Dev* 2007; 21: 1472-1477
34. Matsuoka S, Ballif BA, Smogorzewska A, et al. ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science* 2007; 316: 1160-1166
35. Stokes MP, Rush J, Macneill J, et al. Profiling of UV-induced ATM/ATR signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 19855-19860

36. Cimprich KA, Cortez D. ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9: 616-627
37. Liu Q, Guntuku S, Cui XS, et al. Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G(2)/M DNA damage checkpoint. *Genes Dev* 2000; 14: 1448-1459
38. Zhao H, Piwnica-Worms H. ATR-mediated checkpoint pathways regulate phosphorylation and activation of human Chk1. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 4129-4139
39. Smits V A, Reaper P. M, Jackson S. P. Rapid PIKK-dependent release of Chk1 from chromatin promotes the DNA-damage checkpoint response. *Curr Biol* 2006; 16: 150-159
40. Stracker TH, Usui T, Petrini JH. Taking the time to make important decisions: the checkpoint effector kinases Chk1 and Chk2 and the DNA damage response. *DNA Repair (Amst)*. 2009; 8: 1047-1054
41. Unsal-Kaçmaz K, Mullen TE, Kaufmann WK, et al. Coupling of human circadian and cell cycles by the timeless protein. *Mol Cell Biol* 2005; 25: 3109-3116
42. Gotter AL. Tipin, a novel timeless-interacting protein, is developmentally co-expressed with timeless and disrupts its self-association. *J Mol Biol* 2003; 331: 167-176
43. Kerzendorfer C, O'Driscoll M. Human DNA damage response and repair deficiency syndromes: linking genomic instability and cell cycle checkpoint proficiency. *DNA Repair (Amst)* 2009; 8: 1139-1152
44. Bucher N, Britten C. D. G2 checkpoint abrogation and checkpoint kinase-1 targeting in the treatment of cancer. *Br J Cancer* 2008; 98: 523-528.
45. Cooper MC, Robert EH. Hücre Moleküler Yaklaşım (3.Baskı ), Sakızlı M, Atabey N. İzmir, 2006; 94
46. Modrich P, Lahue R. Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology. *Annu Rev Biochem* 1996; 65: 101–133
47. Kolodner RD, Marsischky GT. Eukaryotic DNA mismatch repair. *Curr Opin Genet Dev* 1999; 9: 89–96
48. Sancar A. Structure and function of DNA photolyase. *Biochemistry* 1994; 33: 2–9
49. Deisenhofer J. DNA photolyases and cryptochromes. *Mutat Res* 2000; 460: 143–149
50. Park H, Zhang KJ, Ren YJ, et al. Crystal structure of a DNA decamer containing a cis-syn thymine dimer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 15965–15970

51. Weinert TA, Hartwell LH. The RAD9 gene controls the cell cycle response to DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 1988; 241: 317–322
52. Hartwell LH, Weinert TA. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 1989; 246: 629–634
53. Morgan DO. The cell cycle: principles of control. Lawrence E. New Science Press, Sunderland, 2007: 4
54. Alcasabas AA, Osborn AJ, Bachant J, et al. Mrc1 transduces signals of DNA replication stress to activate Rad53. *Nat Cell Biol* 2001; 3: 958–965
55. Tanaka K, Russell P. Mrc1 channels the DNA replication arrest signal to checkpoint kinase Cds1. *Nat Cell Biol* 2001; 3: 966–972
56. Sancar A. DNA excision repair. *Annu Rev Biochem* 1996; 65: 43–81
57. Wood RD. Nucleotide excision repair in mammalian cells. *J Biol Chem* 1997; 272: 23465–23468
58. Durocher D, Jackson SP. DNA-PK, ATM and ATR as sensors of DNA damage: variations on a theme? *Curr Opin Cell Biol* 2001; 13: 225–231
59. Perry J, Kleckner N. The ATRs, ATMs, and TORs are giant HEAT repeat proteins. *Cell* 2003; 112: 151–155
60. Gately DP, Hittle JC, Chan GK, et al. Characterization of ATM expression, localization, and associated DNA-dependent protein kinase activity. *Mol Biol Cell* 1998; 9: 2361–2374
61. Chan DW, Son SC, Block W, et al. Purification and characterization of ATM from human placenta. A manganese-dependent, wortmannin-sensitive serine/threonine protein kinase. *J Biol Chem* 2000; 275: 7803–7810
62. Kim ST, Lim DS, Canman CE, et al. Substrate specificities and identification of putative substrates of ATM kinase family members. *J Biol Chem* 1999; 274: 37538–37543
63. Cimprich KA, Shin TB, Keith CT, et al. cDNA cloning and gene mapping of a candidate human cell cycle checkpoint protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 2850–2855
64. de Klein A, Muijtjens M, van Os R, et al. Targeted disruption of the cell-cycle checkpoint gene ATR leads to early embryonic lethality in mice. *Curr Biol* 2000; 10: 479–482
65. Unsal-Kacmaz K, Makhov MA, Griffith JD, et al. Preferential binding of ATR protein to UV-damaged DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 6673–6678.

66. Hall-Jackson CA, Cross DA, Morrice N, et al. ATR is a caffeine-sensitive, DNA-activated protein kinase with a substrate specificity distinct from DNA-PK. *Oncogene* 1999; 18: 6707–6713
67. Lakin ND, Hann BC, Jackson SP. The ataxia-telangiectasia related protein ATR mediates DNA-dependent phosphorylation of p53. *Oncogene* 1999; 18: 3989–3995
68. Gottlieb TM, Jackson SP. The DNA-dependent protein kinase: requirement for DNA ends and association with Ku antigen. *Cell* 1993; 72: 131–142
69. Cortez D, Guntuku S, Qin J, et al. ATR and ATRIP: partners in checkpoint signaling. *Science* 2001; 294: 1713–1716
70. Vialard JE, Gilbert CS, Green CM, et al. The budding yeast Rad9 checkpoint protein is subjected to Mec1/Tel1-dependent hyperphosphorylation and interacts with Rad53 after DNA damage. *EMBO J* 1998; 17: 5679–5688
71. Schultz LB, Chehab NH, Malikzay A, et al. p53 binding protein 1 (53BP1) is an early participant in the cellular response to DNA double-strand breaks. *J Cell Biol* 2000; 151: 1381–1390
72. Yamane K, Wu XL, Chen JJ. A DNA damage-regulated BRCT-containing protein, TopBP1, is required for cell survival. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 555–566
73. Goldberg M, Stucki M, Falck J, et al. MDC1 is required for the intra-S-phase DNA damage checkpoint. *Nature* 2003; 421: 952–956
74. Kumagai A, Dunphy WG. Claspin, a novel protein required for the activation of Chk1 during a DNA replication checkpoint response in *Xenopus* egg extracts. *Mol Cell* 2000; 6: 839–849
75. Lee J, Kumagai A, Dunphy WG. Claspin, a Chk1-regulatory protein, monitors DNA replication on chromatin independently of RPA, ATR, and Rad17. *Mol Cell* 2003; 11: 329–340
76. Walworth N, Davey S, Beach D. Fission yeast chk1 protein kinase links the rad checkpoint pathway to cdc2. *Nature* 1993; 363: 368–371
77. Matsuoka S, Rotman G, Ogawa A, et al. Ataxia telangiectasia-mutated phosphorylates Chk2 in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 10389–10394
78. Takai H, Tominaga K, Motoyama N, et al. Aberrant cell cycle checkpoint function and early embryonic death in Chk1(-/-) mice. *Genes Dev* 2000; 14: 1439–1447

79. Jack MT, Woo RA, Hirao A, et al. Chk2 is dispensable for p53-mediated G1 arrest but is required for a latent p53-mediated apoptotic response. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 9825–9829
80. Bell DW, Varley JM, Szydlo TE, et al. Heterozygous germ line hCHK2 mutations in Li-Fraumeni syndrome. *Science* 1999; 286: 2528–2531
81. Bartek J, Lukas J. Mammalian G1- and S-phase checkpoints in response to DNA damage. *Curr Opin Cell Biol* 2001; 13: 738–747
82. Pardee AB. Regulation, restriction, and reminiscences. *J Biol Chem* 2002; 277: 26709–26716
83. Molinari M, Mercurio C, Dominguez J, et al. Human Cdc25 A inactivation in response to S phase inhibition and its role in preventing premature mitosis. *EMBO Rep* 2001; 1: 71–79
84. Zhang YP, Xiong Y. A p53 amino-terminal nuclear export signal inhibited by DNA damage-induced phosphorylation. *Science* 2001; 292: 1910–1915
85. Harper JW, Adami GR, Wei N, et al. p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 1993; 75: 805–816
86. Siede W, Friedberg AS, Dianova I, et al. Characterization of G1 checkpoint control in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* following exposure to DNA-damaging agents. *Genetics* 1994; 138: 271–281
87. Gerald JN, Benjamin JM, Kron SJ. Robust G1 checkpoint arrest in budding yeast: dependence on DNA damage signaling and repair. *J Cell Sci* 2002; 115: 1749–1757
88. Boddy MN, Russell P. DNA replication checkpoint. *Curr Biol* 2001; 11: R953–56
89. Nasmyth K. Viewpoint: putting the cell cycle in order. *Science* 1996; 274: 1643–1645
90. Paulovich AG, Hartwell LH. A checkpoint regulates the rate of progression through S phase in *S. cerevisiae* in response to DNA damage. *Cell* 1995; 82: 841–847
91. Howlett NG, Taniguchi T, Olson S, et al. Biallelic inactivation of BRCA2 in Fanconi anemia. *Science* 2002; 297: 606–609
92. D'Amours D, Jackson SP. The Mre11 complex: at the crossroads of dna repair and checkpoint signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3: 317–327
93. Kim ST, Xu B, Kastan MB. Involvement of the cohesin protein, Smc1, in Atm-dependent and independent responses to DNA damage. *Genes Dev* 2002;16: 560–570

94. Painter RB, Young BR. Radiosensitivity in ataxia-telangiectasia: a new explanation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77: 7315–7317
95. Hekmat-Nejad M, You ZS, Yee MC, et al. Xenopus ATR is a replication-dependent chromatin-binding protein required for the DNA replication checkpoint. *Curr Biol* 2000; 10: 1565–1573
96. Heffernan TP, Simpson DA, Frank AR, et al. An ATR- and Chk1-dependent S checkpoint inhibits replicon initiation following UVC-induced DNA damage. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 8552–8561
97. Costanzo V, Shechter D, Lupardus PJ, et al. An ATR- and Cdc7-dependent DNA damage checkpoint that inhibits initiation of DNA replication. *Mol Cell* 2003; 11: 203–213
98. Tibbetts RS, Cortez D, Brumbaugh KM, et al. Functional interactions between BRCA1 and the checkpoint kinase ATR during genotoxic stress. *Genes Dev* 2000; 14: 2989–3002
99. Haber JE, Heyer WD. The fuss about Mus81. *Cell* 2001; 107: 551–554
100. Sogo JM, Lopes M, Foiani M. Fork reversal and ssDNA accumulation at stalled replication forks owing to checkpoint defects. *Science* 2002; 297:599–602
101. Xu B, Kim ST, Lim DS, Kastan MB. Two molecularly distinct G(2)/M checkpoints are induced by ionizing irradiation. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 1049–1059
102. Yarden RI, Pardo-Reoyo S, Sgagias M, et al. BRCA1 regulates the G2/M checkpoint by activating Chk1 kinase upon DNA damage. *Nat Genet* 2002; 30: 285–289
103. Zhao H, Watkins JL, Piwnicka-Worms H. Disruption of the checkpoint kinase 1/cell division cycle 25A pathway abrogates ionizing radiation-induced S and G2 checkpoints. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 14795–14800
104. Brown EJ, Baltimore D. Essential and dispensable roles of ATR in cell cycle arrest and genome maintenance. *Genes Dev* 2003; 17: 615–628
105. Michael WM, Ott R, Fanning E, et al. Activation of the DNA replication checkpoint through RNA synthesis by primase. *Science* 2000; 289: 2133–2137
106. Ishimi Y, Claude A, Bullock P, et al. Complete enzymatic synthesis of DNA containing the SV40 origin of replication. *J Biol Chem* 1988; 263: 19723–19733
107. Fairman MP, Stillman B. Cellular factors required for multiple stages of SV40 DNA replication in vitro. *EMBO J* 1988; 7: 1211–1218

108. Meyers ML, Keating KM, Roberts WJ, et al. Purification and functional characterization of adenovirus ts111A DNA-binding protein. Fluorescence studies of protein-nucleic acid binding. *J Biol Chem* 1990; 265: 5875-5882.
109. Luche RM, Smart WC, Marion T, et al. *Saccharomyces cerevisiae* BUF protein binds to sequences participating in DNA replication in addition to those mediating transcriptional repression (URS1) and activation. *Mol Cell Biol* 1993; 13: 5749–5761
110. Kim C, Snyder RO, Wold MS. Binding properties of replication protein A from human and yeast cells. *Mol Cell Biol* 1992; 12: 3050–3059
111. Henricksen LA, Umbricht CB, Wold MS. Recombinant replication protein A: expression, complex formation, and functional characterization. *J Biol Chem* 1994; 269: 11121–11132
112. Tang C-M, Tomkinson AE, Lane WS, et al. Replication protein A is a component of a complex that binds the human metallothionein IIA gene transcription start site. *J Biol Chem* 1996; 271: 21637–21644
113. Dutta A, Ruppert JM, Aster JC, et al. Inhibition of DNA replication factor RPA by p53. *Nature* 1993; 365: 79–82
114. Br'enot-Bosc F, Gupta S, Margolis RL, et al. Changes in the subcellular localization of replication initiation proteins and cell cycle proteins during G1- to S-phase transition in mammalian cells. *Chromosoma* 1995; 103: 517– 527
115. Yan H, Newport J. An analysis of the regulation of DNA synthesis by cdk2, Cip1, and licensing factor. *J Cell Biol* 1995; 129: 1–15
116. Carty MP, Zernik-Kobak M, McGrath S, et al. UV light-induced DNA synthesis arrest in HeLa cells is associated with changes in phosphorylation of human single-stranded DNA-binding protein. *EMBO J* 1994; 13: 2114–2123
117. He Z, Henricksen LA, Wold MS, et al. RPA involvement in the damage-recognition and incision steps of nucleotide excision repair. *Nature* 1995; 374: 566–569
118. Matsunaga T, Park CH, Bessho T, et al. Replication protein A confers structure-specific endonuclease activities to the XPF-ERCC1 and XPG subunits of human DNA repair excision nuclease. *J Biol Chem* 1996; 271: 11047–11050
119. Umbricht CB, Erdile LF, JabsEW, et al. Cloning, overexpression, and genomic mapping of the 14-kDa subunit of human replication protein A. *J Biol Chem* 1993; 268: 6131–6138

120. Kim C, Paulus BF, Wold MS. Interactions of human replication protein A with oligonucleotides. *Biochemistry* 1994; 33: 14197–14206
121. Blackwell LJ, Borowiec JA. Human replication protein A binds single-stranded DNA in two distinct complexes. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 3993–4001
122. Blackwell LJ, Borowiec JA, Mastrangelo IA. Single-stranded-DNA binding alters human replication protein A structure and facilitates interaction with DNA-dependent protein kinase. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 4798–4807
123. Gomes XV, Henricksen LA, Wold MS. Proteolytic mapping of human replication protein A: evidence for multiple structural domains and a conformational change upon interaction with single-stranded DNA. *Biochemistry* 1996; 35: 5586–5595
124. Seo Y-S, Hurwitz J. Isolation of helicase alpha, a DNA helicase from HeLa cells stimulated by a fork structure and signal-stranded DNA-binding proteins. *J Biol Chem* 1993; 268: 10282–10295
125. Biswas EE, Chen P-H, Leszyk J, et al. Biochemical and genetic characterization of a replication protein A dependent DNA helicase from the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 206: 850–856
126. Gotter AL, Suppa C, Emanuel BS. Mammalian TIMELESS and Tipin are evolutionarily conserved replication fork-associated factors. *J Mol Biol* 2007; 366: 36-52.
127. Lin SY, Li K, Stewart GS, et al. Human Claspin works with BRCA1 to both positively and negatively regulate cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 6484-6489
128. Chini CC, Chen J. Human claspin is required for replication checkpoint control. *J Biol Chem* 2003; 278: 30057-30062
129. Guo Z, Kumagai A, Wang SX, et al. Requirement for Atr in phosphorylation of Chk1 and cell cycle regulation in response to DNA replication blocks and UV-damaged DNA in *Xenopus* egg extracts. *Genes Dev* 2000; 14: 2745-2756
130. Yoshizawa-Sugata N and Masai H. Human Tim/Timeless-interacting protein, Tipin, is required for efficient progression of S phase and DNA replication checkpoint. *J Biol Chem* 2007; 282: 2729-2740.
131. Chou DM and Elledge SJ. Tipin and Timeless form a mutually protective complex required for genotoxic stress resistance and checkpoint function. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 18143-18147

132. Hastings MH, Field MD, Maywood ES, et al. Differential regulation of mPER1 and mTIM proteins in the mouse suprachiasmatic nuclei: new insights into a core clock mechanism. *J Neurosci* 1999; 19: RC11
133. Unsal-Kaçmaz K, Chastain PD, Qu PP, et al. The human Tim/Tipin complex coordinates an Intra-S checkpoint response to UV that slows replication fork displacement. *Mol Cell Biol* 2007; 27: 3131-3142
134. Foss EJ. Tof1p regulates DNA damage responses during S phase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 2001; 157: 567-577
135. Mayer ML, Pot I, Chang M, et al. Identification of protein complexes required for efficient sister chromatid cohesion. *Mol Biol Cell* 2004; 15: 1736-1745
136. Tanaka H, Kubota Y, Tsujimura T, et al. Replisome progression complex links DNA replication to sister chromatid cohesion in *Xenopus* egg extracts. *Genes Cells* 2009; 14: 949-963
137. Kemp MG, Akan Z, Yilmaz S, et al. Tipin-replication protein A interaction mediates Chk1 phosphorylation by ATR in response to genotoxic stress. *J Biol Chem*. 2010; 285: 16562-16571
138. Patterson RM, Selkirk JK, Merrick BA. Baculovirus and insect cell gene expression: review of baculovirus biotechnology. *Environ Health Perspect*. 1995; 103: 756-759
139. Einhauer A, Jungbauer A. The FLAG<sup>TM</sup> peptide, a versatile fusion tag for the purification of recombinant proteins. *J Biochem Biophys Methods* 2001; 49: 3455-3465
140. Sambrook J, William R. *Molecular Cloning A Laboratory Manual* (3<sup>rd</sup> ed), New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001, Appendix 8. A8.1
141. Simon R. *Protein Purification techniques: A practical approach* (2<sup>nd</sup> ed), Oxford University Press, 2001: 40
142. B. D. Hames, S. J. Higgins. *Gene probes: a practical approach*. Oxford University Press, 1995: 117
143. Farrell SO, Taylor LE. *Experiments in biochemistry: a hands-on approach* (2<sup>nd</sup> ed), Belmont, 2006: 279
144. Miller FP, Vandome AF, McBrewster J. Immunoprecipitation. 2010:116
145. Mason AC, Haring SJ, Pryor JM, et al. An alternative form of replication protein A prevents viral replication in vitro. *J Biol Chem* 2009; 284: 5324-5331

146. Sar F, Lindsey-Boltz LA, Subramanian D, et al. Human claspin is a ring-shaped DNA-binding protein with high affinity to branched DNA structures. *J Biol Chem* 2004; 279: 39289-39295
147. Lee JH, Paull TT. Activation and regulation of ATM kinase activity in response to DNA double-strand breaks. *Oncogene* 2007; 26: 7741-7748
148. Lindsey-Boltz LA, Serçin O, Choi JH, et al. Reconstitution of human claspin-mediated phosphorylation of Chk1 by the ATR (ataxia telangiectasia-mutated and rad3-related) checkpoint kinase. *J Biol Chem* 2009; 284: 33107-33114
149. Liu S, Bekker-Jensen S, Mailand N, et al. Claspin operates downstream of TopBP1 to direct ATR signaling towards Chk1 activation. *Mol Cell Biol* 2006; 26: 6056-6064
150. Unsal-Kacmaz K and Sancar A. Quaternary structure of ATR and effects of ATRIP and replication protein A on its DNA binding and kinase activities. *Mol Cell Biol* 2004; 24: 1292-1300
151. Choi JH, Lindsey-Boltz LA, Sancar A. Cooperative activation of the ATR checkpoint kinase by TopBP1 and damaged DNA. *Nucleic Acids Res* 2009; 37: 1501-1509
152. Choi JH, Lindsey-Boltz LA, Sancar A. Reconstitution of a human ATR-mediated checkpoint response to damaged DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 13301-13306
153. Jiang G. and Sancar A. Recruitment of DNA damage checkpoint proteins to damage in transcribed and nontranscribed sequences. *Mol Cell Biol* 2006; 26: 39-49
154. Unsal-Kaçmaz K, Makhov AM, Griffith JD, et al. Preferential binding of ATR protein to UV-damaged DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 6673-6678
155. Lupardus PJ, Cimprich KA. Phosphorylation of *Xenopus* Rad1 and Hus1 defines a readout for ATR activation that is independent of Claspin and the Rad9 carboxy terminus. *Mol Biol Cell* 2006; 17: 1559-1569
156. Yoo HY, Jeong SY, Dunphy WG. Site-specific phosphorylation of a checkpoint mediator protein controls its responses to different DNA structures. *Genes Dev* 2006; 20: 772-783

## ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Seçil YILMAZ

Uyruğu: Türkiye Cumhuriyeti (TC)

Doğum Tarihi ve Yeri: 1 Mayıs 1979, Sivas

Medeni Durumu: Evli

Tel: 0 352 4374937

Email: [secililhan@hotmail.com](mailto:secililhan@hotmail.com)

Yazışma Adresi: Erciyes Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Talas/ KAYSERİ

### EĞİTİM

| Derece        | Kurum                                               | Mezuniyet Tarihi |
|---------------|-----------------------------------------------------|------------------|
| Doktora       | Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü    | 2012             |
| Yüksek Lisans | Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü    | 2006             |
| Yüksek Lisans | Ankara Üniversitesi, Eğitim Bilimleri Enstitüsü     | 2003             |
| Lisans        | Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü | 2002             |

### İŞ DENEYİMLERİ

| Yıl         | Kurum                                | Görev               |
|-------------|--------------------------------------|---------------------|
| 2006- Halen | EÜ Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ABD | Araştırma Görevlisi |
| 2009-2011   | University of North Carolina, USA    | Araştırma Görevlisi |

### YABANCI DİL

İngilizce

### YAYINLAR

1. Yılmaz S, Sancar A, Kemp MG Multiple ATR-Chk1 Pathway Proteins Preferentially Associate with Checkpoint-Inducing DNA Substrates, PLoS One. 2011; 6 (7): e22986
2. Kemp MG, Akan Z, Yılmaz S et al. Tipin-Replication Protein A Interaction Mediates Chk1 Phosphorylation by ATR in Response to Genotoxic Stress, J Biol Chem. 2010; 285 (22): 16562–16571
3. Yılmaz SI, Demirtas H. AgNOR increase in buccal epithelial cells of trisomy 21 infants, Micron. 2008;39 (8):1262-1265

4. Dönmez-Altuntaş H, Öztürk F, Yılmaz Sİ et al. Asbest ve Erionite Bağlı Mezotelyomalı Hastaların Parafin Bloklarında p53 Tümör Supressör ve Ras Onkogen Mutasyonlarının Araştırılması, Erciyes Tıp Dergisi. 2008; 31 (1): 001-008
5. Yılmaz SI, Demirtas H. The increase of nors expression in Buccal Mucosa cells of Down's syndrome (trisomy 21) infants. 2007 Chromosome Research 2007; 15: 86-86