



**T.C.
RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI**

**p53-TAD'nin DNA-PK ENZİMİ TARAFINDAN
FOSFORİLASYONUNUN İNCELENMESİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

Merve ATEŞ

**Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Serap PEKTAŞ**

**RİZE
2023**

KABUL VE ONAY

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalında, Dr. Öğr. Üyesi Serap PEKTAŞ danışmanlığında, Merve ATEŞ tarafından hazırlanan *p53-TAD'nin DNA-PK Enzimi Tarafından Fosforilasyonunun İncelenmesi* adlı bu tez çalışması, 28/11/2023 tarihinde yapılan savunma sınavı sonucunda oy birliğiyle/oy çokluğuyla başarılı bulunarak jürimiz tarafından **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri	Unvanı, Adı SOYADI	İmza
Başkan	: Dr. Öğr. Üyesi Serap PEKTAŞ	
Üye	: Prof. Dr. Özlem FAİZ	
Üye	: Prof. Dr. Ali Osman KILIÇ	

ETİK BEYAN

Kimya Tezli Yüksek Lisans Programından mezun olmak üzere teslim ettiğim “p53-TAD’nin DNA-PK Enzimi Tarafından Fosforilasyonunun İncelenmesi” adlı tezim, bilim ve araştırma etiği prensiplerine riayet edilerek tarafımdan yazılmıştır.

Tez çalışmamda, başka kaynaklardan aktarılan bütün bilgi ve alıntılar, Enstitünüz Tez Yazım Kılavuzuna uygun olarak açıkça gösterilmiştir. Kaynağı gösterilenler dışında kalan bütün bilgiler uygun araştırma yöntemi kullanılarak tarafımdan edinilmiş ve esere bu şekilde yansıtılmıştır. Şahsıma ait olmayan hiçbir bilgi, kasıt veya kusurlar, şahsıma aitmiş gibi gösterilmemiştir. İnternet kaynakları dâhil, sahibine/kaynağına atıf yapılmaksızın hiçbir bilgi kullanılmamıştır. Aksinin ortaya çıkması halinde doğacak bütün hukuki, idari, akademik ve etik sorumluluk tarafıma ait olacaktır. Eserin tesliminden sonra herhangi bir zamanda, bilim etiğine aykırılık tespit edilmesi ve / veya eserimle ilgili intihal veya intihal şeklinde anlaşılabilecek bir durumun ortaya çıkması halinde; Üniversiteniz ve eğitim kadronuzun hiçbir şekilde sorumlu tutulmayacağını hür irademle kabul, beyan ve taahhüt ederim.

28/11/2023

Merve ATEŞ

ÖN SÖZ

“p53-TAD’nin DNA-PK Enzimi Tarafından Fosforilasyonunun İncelenmesi” başlıklı bu çalışma, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı’nda “Yüksek Lisans Tezi” olarak hazırlanmıştır.

Lisansüstü eğitimim süresince emeğini, bilgisini, desteğini eksik etmeyen çalışmamın her aşamasında emeği geçen danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Serap PEKTAŞ’a teşekkür ederim.

Bu çalışmada mutasyonların oluşturulmasında ve DNA dizi analizinin yapılması konusunda destek olan Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Ali Osman KILIÇ ve Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Osman Birol ÖZGÜMÜŞ’e teşekkür ederim.

Son olarak bu zamana kadar hep yanımda olan, destekleyen aileme ve eşime en içten sevgi ve saygılarımı sunarım.

Bu çalışma Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü birimince desteklenmiştir. Proje Numarası: FYL-2021-1239

Merve ATEŞ
RİZE/2023

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	I
ETİK BEYAN	II
ÖN SÖZ	III
ÖZET	VI
ABSTRACT.....	VII
KISALTMALAR	VIII
TABLolar LİSTESİ	X
ŞEKİLLER LİSTESİ	XI
GİRİŞ	1
1. p53 PROTEİNİ	2
1.1. Mutasyon.....	5
1.2. TP53 Gen Mutasyonları	7
1.3. DNA'ya Bağımlı Protein Kinaz (DNA-PK).....	9
1.4. DNA-PKcs'nin NHEJ Onarımındaki Rolü	11
1.5. DNA-PK'nın Hücre Döngüsü İlerlemesindeki Rolü	12
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR	14
2.1. Materyal	14
2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler	14
2.1.2. Kullanılan Cihazlar.....	16
2.2. Yöntem	17
2.2.1. Vahşi Tür p53 Plazmid İzolasyonu.....	17
2.2.2. Mutasyonların Oluşturulması	18
2.2.3. DNA Dizi Analizi ile Oluşturulan Mutasyonların Doğrulanması.....	21
2.2.4. Mutant Plazmidlerin <i>E. Coli</i> BL21 Hücrelerine Transformasyonu	22
2.2.5. Mutantların ve Vahşi Tür p53'ün Saflaştırılması	22
2.2.6. Vahşi tip p53 ve Leu22Gln-Trp23Ser, Phe19Ala Mutasyonlarının DNA- PK Tarafından Fosforilasyonunun Belirlenmesi	23
2.2.7. Mutasyonların TAD'nin İkincil Yapı İçeriğine Etkisi	24
2.2.8 Mutasyonların DNA-PKcs ile Etkileşiminin Moleküler Kenetlenme Sunucusu HADDOCK 2.4 ile Belirlenmesi	25

3. BULGULAR.....	27
3.1. Vahşi Tür p53 Plazmid AgaroZ Jel Elektroforezi	27
3.2. Vahşi Tür, Phe19Ala ve Leu22Gln-Trp23Ser Mutantlarının T7 Primer Dizi Analizi	28
3.3. Phe19Ala ve Leu22Gln-Trp23Ser Mutantlarının Plazmidini İÇeren <i>E. coli</i> BL21 Kolonileri	28
3.4. Vahşi Tür, Phe19Ala ve Leu22Gln-Trp23Ser Mutantlarının Safıaştırma Jel Görüntüleri	29
3.5. DNA-PK Fosforilasyonunun Western Blotlama ile Belirlenmesi.....	30
3.6. Mutasyonların İkincil Yapı İÇeriğine Etkisi	36
3.7. Mutasyonların DNA-PKcs ile TAD'nin Etkileşimine Etkisi	40
4. TARTIŞMA VE SONUÇLAR	50
5. ÖNERİLER.....	53
KAYNAKÇA.....	54

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Anabilim Dalı : Kimya Anabilim Dalı
Tez Türü : Yüksek Lisans Tezi
Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Serap PEKTAŞ
Hazırlayan : Merve ATEŞ
Yıl : 2023
Sayfa Sayısı : 62

ÖZET

**p53-TAD’NİN DNA-PK ENZİMİ TARAFINDAN FOSFORİLASYONUNUN
İNCELENMESİ**

TP53 geni insan kanserlerinde en sık mutasyon rapor edilen genlerden biridir (%30-50). p53’ün hücrel düzeyi, HDM2’ya (Mouse Double Minute 2 Homolog, MDM2’nun insan homologu) bağlı olarak düzenlenir. Normal fizyolojik koşullarda TAD, HDM2 proteini ile etkileşir ve p53’ü proteozomal parçalanmaya yönlendirir. TAD’nin Ser15 ve Ser37 amino asit kalıntıları DNA-PK (DNA’ya bağımlı protein kinaz) tarafından fosforilasyona uğrar. Bu fosforilasyon olayı, p53’ün HDM2 ile etkin etkileşimini önler ve böylece p53 stabilize olur. Stabilize olan p53 bir transkripsiyon faktörü olarak çeşitli genlerin aktivasyonunu başlatır. Önceki çalışmalarda, p53’ün TAD domaininde oluşturulan Leu22Gln-Trp23Ser mutasyonunun p53’ün transaktivasyon işlevini farklı derecelerde azalttığı rapor edilmiştir. Ayrıca Phe19’un arjinine mutasyonunun p53’ün transaktivasyon işlevini olumsuz etkilediği de rapor edilmiştir. Rapor edilen bu mutasyonlar, DNA-PK enziminin fosforile ettiği Ser15 ve Ser37 pozisyonlarına yakın bölgede yer almaktadır. Bu çalışmada, p53’ün Leu22Gln-Trp23Ser ve Phe19Ala mutasyonları bölgeye yönlendirilmiş mutagenез ile oluşturularak bu mutasyonların Ser15 ve Ser 37’nin DNA-PK tarafından fosforilasyonuna etkisi western blotlama yöntemi ile Ser15^P ve Ser37^P için spesifik antikorlar kullanılarak belirlendi. Ser15 fosforilasyonunu vahşi türe kıyasla Phe19Ala mutantının 2,3 kat, Leu22Gln-Trp23Ser mutantının ise 1,6 kat azalttığı belirlendi. Ser37 fosforilasyonunu ise Phe19Ala mutantı vahşi türe kıyasla 1,6 kat, Leu22Gln-Trp23Ser mutantı ise 2,0 kat azaltmıştır. Vahşi tür Ser15 ve Ser37 fosforilasyonu kıyaslandığında ise DNA-PK’nın Ser37’yi 1,9 kat daha hızlı fosforile ettiği tespit edildi. Ayrıca, I-TASSER ile mutantların TAD’de konformasyonel değişime neden olduğu, bu konformasyonel değişimin ise TAD - (DNA-PKcs) etkileşiminin oryantasyonunu değiştirdiği HADDOCK 2.4 ile belirlendi. De novo tasarım verileri, mutantlardaki fosforilasyon azalmasının, mutantların neden olduğu konformasyonel değişim sebebiyle enzim-substrat etkileşiminin oryantasyonunun değişmesi olduğu öngörüldü.

Anahtar Kelimeler: DNA-PK, p53, Protein ekspresyonu ve saflaştırma, Western blotlama, Kinaz aktivite tayini, Mutasyon.

Recep Tayyip Erdogan University Institute of Graduate Studies

Department : Department of Chemistry
Thesis Type : Master's Thesis
Supervisor : Assist. Prof. Dr. Serap PEKTAŞ
Author : Merve ATEŞ
Year : 2023
Pages : 62

ABSTRACT

INVESTIGATION OF PHOSPHORYLATION OF p53-TAD BY DNA-PK ENZYME

TP53 gene is one of the most frequently mutated genes in human cancers (30-50%). The cellular level of p53 is regulated depending on HDM2 (Mouse Double Minute 2 Homolog, human homolog of MDM2). Under normal physiological conditions, TAD interacts with the HDM2 protein and directs p53 to proteasomal degradation. Ser15 and Ser37 residues of TAD are phosphorylated by DNA-PK (DNA-dependent protein kinase). This phosphorylation event prevents the effective interaction of p53 with HDM2, and thus p53 is stabilized. Stabilized p53 initiates the activation of various genes as a transcription factor. Previous studies have reported that the Leu22Gln-Trp23Ser mutation in the TAD domain of p53 reduces the transactivation function of p53 to different degrees. It has also been reported that mutation of Phe19 to arginine negatively affects the transactivation function of p53. These reported mutations are located close to the Ser15 and Ser37 phosphorylation sites, which are phosphorylated by the DNA-PK enzyme. In this study, Leu22Gln-Trp23Ser and Phe19Ala mutations of p53 were generated by site-directed mutagenesis, and the effect of these mutations on the phosphorylation of Ser15 and Ser 37 by DNA-PK was determined by western blotting using antibodies specific for Ser15^P and Ser37^P. It was determined that the Phe19Ala mutant reduced Ser15 phosphorylation by 2.3 times and the Leu22Gln-Trp23Ser mutant by 1.6 times compared to the wild type. The Phe19Ala mutant reduced Ser37 phosphorylation by 1.6 times compared to the wild type, and the Leu22Gln-Trp23Ser mutant decreased by 2.0 times. When comparing wild-type Ser15 and Ser37 phosphorylation, it was determined that DNA-PK phosphorylates Ser37 1.9 times faster. Besides, it was predicted by I-TASSER that the mutants caused conformational changes in the TAD. In addition, it was determined by HADDOCK 2.4 that this conformational change changed the orientation of the TAD - (DNA-PKcs) interaction. De novo design data suggest that the decrease in phosphorylation in the mutants is due to the conformational change caused by the mutations, which changes the orientation of the enzyme-substrate interaction.

Keywords: DNA-PK, p53, Protein expression and purification, Western blot, Kinase assay, Mutation.

KISALTMALAR

APS	: Amonyum Persülfat
ANP	: Fosfoaminofosfonik Asit-Adenlat Ester
ATM	: Ataksi Telenjektazi Mutasyona Uğramış
ATP	: Adenozin Trifosfat
ATR	: Ataksi Telenjektazi ve Rad3-İlişkili Protein
CBP	: CREB-Bağlayıcı Protein
CD	: Dairesel Dikroizm
CTD	: C-terminal Düzenleyici Domain
DBD	: DNA Bağlanma Domaini
ddH ₂ O	: Deiyonize Su
DNA	: Dezoksiribonükleik Asit
DNA-PK	: DNA Bağımlı Protein Kinaz
DNA-PKcs	: DNA'ya Bağımlı Protein Kinaz Katalitik Alt Birim
DSB	: DNA Çift Sarmal Kırığı
DTT	: 1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i> BL21	: <i>Escherichia Coli</i> BL21 Hücre Hattı
EDTA	: Etilendiamin Tetraasetik Asit
FAT	: Bağlı Odağı Hedefleme
FATC	: Bağlı Odağı Hedefleme C-terminal
HADDOCK	: Yüksek Belirsizlik Odaklı Protein - Protein Kenetlenme Sunucusu
HDM2	: Fare Çift Dakika 2'nin İnsan İzofomu
HR	: Homolog Rekombinasyon
IPTG	: İzopropil β -d-1-tiyogalaktopiranosid
IR	: İyonizan Radyasyon
I-TASSER	: Amino Asit Diziliminden 3D Yapı Tahmini Sunucusu
MDM2	: Fare Çift Dakika 2, E3 Ubikuitin Ligaz Enzimi
NHEJ	: Homolog Olmayan Uç Birleştirme
p53	: Tümör Protein 53
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PDB	: Protein Data Bankası
PMSF	: Fenil Metil Sülfonil Florid
PR	: Prolince Zengin Domain
PTM	: Post-Translasyonel Modifikasyon
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SOC	: Süper Optimal Katabolit Baskılamalı Besi Ortamı
TAD	: Transaktivasyon Domaini
TEMED	: Tetrametilendiamin
TP53	: Tümör Protein 53'ü Kodlayan Gen



TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1. Kullanılan laboratuvar ekipmanları.....	16
Tablo 2. Mutasyonlar için tasarlanan primer dizilimleri.	18
Tablo 3. PCR reaksiyon karışımları.	20
Tablo 4. Birinci aşama PCR koşulları.	20
Tablo 5. İkinci aşama PCR koşulları.	21
Tablo 6. Vahşi tür ve Phe19Ala, Leu22Gln-Trp23Ser'nin DNA-PK'nın ünitesi başına zamana dayalı Ser ^P fosforilasyonu.	36
Tablo 7. HADDOCK 2.4 ile tahmin edilen en olası etkileşim için hesaplanan parametreler.	42
Tablo 8. Ser15'e göre HADDOCK 2.4'den elde edilen yapılarda etkileşime giren amino asit kalıntıları.	43
Tablo 9. Ser37'e göre HADDOCK 2.4'den elde edilen yapılarda etkileşime giren amino asit kalıntıları.	44

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. p53 domain yapısı.	3
Şekil 2. TAD domain yapısı.....	4
Şekil 3. p53'ün HDM2 ile etkileşimi.....	5
Şekil 4. Sessiz (silent) mutasyon.	6
Şekil 5. Anlamsız (nonsense) mutasyon.	6
Şekil 6. Yanlış anlamlı (missense) mutasyon.	7
Şekil 7. Çerçeve kayması (frameshift) mutasyonu.	7
Şekil 8. p53-(TAD)'nin I-TASSER ile oluşturulan tahmini katlanmış yapısı. DNA-PK tarafından fosforilasyona uğrayan Ser15 ve Ser37 amino asit kalıntısı ve mutasyon oluşturulması planlanan Leu22-Trp23 ve Phe19Ala'nin konumları gösterilmiştir (Şekil UCSF Chimera ile hazırlanmıştır).....	9
Şekil 9. DNA-PKcs domain yapısı.	10
Şekil 10. DNA tek zincir ve çift zincir kırıkları.	11
Şekil 11. DNA-PKcs'nin NHEJ onarım mekanizması.	12
Şekil 12. Tekli primerli bölge yönlendirilmiş mutagenез aşamaları. (a) Metillenmiş ana plazmid. (b) İleri-primer PCR reaksiyonu. (c) Geri-primer PCR reaksiyonu. (d) İleri ve geri PCR reaksiyonunun birleştirilip, 95°C'de denature edilmesi. (e) Kademeli sıcaklık düşürülmesiyle plazmid dimerizasyonu. (f) DpnI ile metillenmiş ana plazmid DNA'nın uzaklaştırılması ve sonrasında T4 DNA ligaz ile plazmid uçlarının birleştirilmesi (g) Mutant plazmidlerin E. coli hücrelerine aktarılması (h) Mutant plazmid (Şekil Edelheit vd. 2009'den esinlenilerek uyarlanmıştır).	19
Şekil 13. p53-TAD ikincil katlanma elementleri (Şekil UCSF Chimera ile hazırlanmıştır).....	25
Şekil 14. DNA-PKcs ve TAD'nin 7-mer'lik fragmanı ile etkileşimini gösteren 3D yapı (PDB ID: 8OXO, şekil UCSF ChimeraX ile oluşturulmuştur).....	26
Şekil 15. Vahşi tür p53 plazmidine ait agaroz jeli. 1. sırada markör, 2. sırada izole edilen plazmid yer almaktadır.....	27
Şekil 16. Vahşi tür ve mutantların T7 primer ile dizi analizleri (a) Vahşi tür, (b) Phe19Ala ve (c) Leu22Gln-Trp23Ser mutantlarının T7 primer ile dizi analizleri. ...	28

Şekil 17. Mutant plazmidleri içeren E. Coli BL21 koloni görüntüleri. (a) Phe19Ala'ya ait plazmidi içeren E. Coli BL21 kolonileri, (b) Leu22Gln-Trp23Ser'ye ait plazmidi içeren E. Coli BL21 kolonileri.....	29
Şekil 18. Vahşi Tür, Phe19Ala ve Leu22Gln-Trp23Ser mutantlarının saflaştırma jelleri. (a) Vahşi tür p53 jeli. (b) Leu22Gln-Trp23Ser mutantının saflaştırılmasına ait SDS jel. (c) Phe19Ala mutantının saflaştırılmasına ait SDS jel (1. sırada markör, 2. sırada lizat, 3. sırada kolona tutunmadan akan lizat, 3. sırada yıkama ve 4. sırada saf protein yer almaktadır.).....	30
Şekil 19. Vahşi tür p53'ün, Leu22Gln-Trp23Ser ve Phe19Ala mutantının Ser15 ^P fosfospesifik antikor için western blotlama membran görüntüsü.	31
Şekil 20. Vahşi tür p53, Phe19Ala ve Leu22Gln-Trp23Ser'nin zamana karşı Ser15 ^P fosforilasyon eğrisi. (a) 3-20 dk zaman aralığı Ser15 ^P fosforilasyon eğrisi, (b) 3-6 dk zaman aralığı Ser15 ^P fosforilasyon eğrisi.	32
Şekil 21. Vahşi tür p53'ün, Leu22Gln-Trp23Ser ve Phe19Ala mutantının Ser37 ^P fosfospesifik antikor için western blotlama membran görüntüsü.	33
Şekil 22. Vahşi tür p53, Phe19Ala ve Leu22Gln-Trp23Ser'nin zamana karşı Ser37 ^P fosforilasyon eğrisi. (a) 3-20 dk zaman aralığı Ser37 ^P fosforilasyon eğrisi, (b) 3-6 dk zaman aralığı Ser37 ^P fosforilasyon eğrisi.	34
Şekil 23. Vahşi tür p53'de Ser15 ve Ser37'nin zamana dayalı fosforilasyon eğrisi. a) 3-20 dk zaman aralığı fosforilasyon eğrisi, b) 3-6 dk zaman aralığı fosforilasyon eğrisi.	35
Şekil 24. 3D yapı tahminleri. (a)Vahşi tür 3D yapı modeli, (b) Phe19Ala 3D yapı modeli, (c) Leu22Gln-Trp23Ser 3D yapı modeli, (d) Vahşi tür ve Phe19Ala örtüşmesi, (e) Leu22Gln-Trp23Ser ve vahşi tür örtüşmesi, (f) Phe19Ala ve Leu22Gln-Trp23Ser örtüşmesi (Şekiller UCSF Chimera ile oluşturulmuştur).	37
Şekil 24 (Devam). 3D yapı tahminleri. (a)Vahşi tür 3D yapı modeli, (b) Phe19Ala 3D yapı modeli, (c) Leu22Gln-Trp23Ser 3D yapı modeli, (d) Vahşi tür ve Phe19Ala örtüşmesi, (e) Vahşi – Tür ve Leu22Gln-Trp23Ser örtüşmesi f) Phe19Ala ve Leu22Gln-Trp23Ser örtüşmesi (Şekiller UCSF Chimera ile oluşturulmuştur).	38
Şekil 24 (Devam). 3D yapı tahminleri. (a)Vahşi tür 3D yapı modeli, (b) Phe19Ala 3D yapı modeli, (c) Leu22Gln-Trp23Ser 3D yapı modeli, (d) Vahşi tür ve Phe19Ala	

örtüşmesi, (e) Vahşi – Tür ve Leu22Gln-Trp23Ser örtüşmesi f) Phe19Ala ve Leu22Gln-Trp23Ser örtüşmesi (Şekiller UCSF Chimera ile oluşturulmuştur).	39
Şekil 25. I-TASSER'in oluşturduğu Vahşi tür p53, Phe19Ala ve Leu22Gln-Trp23Ser'in ikincil yapı içeriği ve dizilimleri (S: fosforilasyona uğrayan Ser15 ve Ser37 amino asit kalıntıları, A: Phe19, QS: Gln22-Ser23).	40
Şekil 26. Ser15 ve Ser37'ye göre oluşturulan kenetlenme modelinde, TAD'nin DNA-PKcs ile etkileşime giren amino asit kalıntılarını gösteren dizilimler. VT; vahşi tür TAD, gri vurgular etkileşimde bulunan amino asit kalıntıları ve koyu ile gösterilenler hem vahşi tür hem de her iki mutant da etkileşime giren amino asit kalıntılarıdır....	41
Şekil 27. HADDOCK 2.4'ün Ser15'e göre oluşturduğu en olası (DNA-PKcs) -TAD etkileşim modelleri. (a) DNA-Pkcs, VT-TAD modeli, (b) DNA-PKcs, Phe19Ala modeli, (c) DNA-PKcs, Leu22Gln-Trp23Ser modeli, (d) DNA-PKcs, Phe19Ala, Leu22Gln-Trp23Ser modeli (Şekiller UCSF ChimeraX ile oluşturulmuştur).	45
Şekil 27 (Devam). HADDOCK 2.4'ün Ser15'e göre oluşturduğu en olası (DNA-PKcs) - TAD etkileşim modelleri. (a) DNA-Pkcs, VT-TAD modeli, (b) DNA-PKcs, Phe19Ala modeli, (c) DNA-PKcs, Leu22Gln-Trp23Ser modeli, (d) DNA-PKcs, Phe19Ala, Leu22Gln-Trp23Ser modeli (Şekiller UCSF ChimeraX ile oluşturulmuştur).	46
Şekil 28. HADDOCK 2.4'ün Ser37'ye göre oluşturduğu en olası (DNA-PKcs) -TAD etkileşim modelleri. (a) DNA-Pkcs, VT-TAD modeli, (b) DNA-PKcs, Phe19Ala modeli, (c) DNA-PKcs, Leu22Gln-Trp23Ser modeli, (d) DNA-PKcs, Phe19Ala, Leu22Gln-Trp23Ser modeli (Şekiller UCSF ChimeraX ile oluşturulmuştur).	47
Şekil 28 (Devam). HADDOCK 2.4'ün Ser37'ye göre oluşturduğu en olası (DNA-PKcs) - TAD etkileşim modelleri. (a) DNA-Pkcs, VT-TAD modeli, (b) DNA-PKcs, Phe19Ala modeli, (c) DNA-PKcs, Leu22Gln-Trp23Ser modeli, (d) DNA-PKcs, Phe19Ala, Leu22Gln-Trp23Ser modeli (Şekiller UCSF ChimeraX ile oluşturulmuştur).	48

GİRİŞ

DNA genetik bilgi deposudur ve sürekli olarak hücrelerde gerçekleşen biyokimyasal tepkimelerin yan ürünü olarak üretilen serbest radikaller, reaktif oksijen türleri (ROS) gibi bazı maddeler DNA'ya hasar verir. Ayrıca kimyasallar, iyonizan radyasyon (IR) gibi çevresel faktörlerde DNA da hasara neden olur. Bu hasarlardan en tehlikelisi DNA çift zincir kırıklarıdır (DSB). Çünkü, onarılmadığında hücre ölümüne, yanlış onarıldığında kromozomal translokasyona neden olur ki bu da kanser oluşumunda başlangıç aşamasıdır (Kim vd., 2002; Jeggo vd., 2007). Hücrelerde DNA hasarının onarımı için farklı mekanizmalar vardır. Bu onarım mekanizmalarında çeşitli enzimler ve proteinler görev alır. Onarım mekanizmasının, apoptozun veya hücre döngüsü tutuklanmasının başlatılabilmesi için p53 tümör baskılayıcı proteinin (p53), transkripsiyon faktörü olarak ilgili genlerin aktivasyonunu başlatması gerekir. p53'ün transkripsiyon faktörü işlevini yerine getirebilmesi için ise N-terminal bölgesinde yer alan amino asit kalıntılarının fosforilasyona uğraması ve buna bağlı olarak hücrede stabilize olması, daha sonra hem DNA ile hem de ilgili koaktivatörlerle etkileşmesi gerekir (Ashcroft vd., 1999; MacLaine ve Hupp, 2011; Yadahalli vd., 2019). Bugüne kadar yapılan çalışmalar, p53'ün etkin bir şekilde fosforilasyonunun transkripsiyon faktörü işlevi için gerekli olduğunu göstermiş olup mutasyonlar/delesyonlar sebebiyle fosforilasyonun gerçekleşmemesinin işlev kaybına neden olduğunu göstermiştir (Kato vd., 2003). p53'ün çeşitli mutasyonlar sebebiyle işlevsizleşmesi tümör gelişimine neden olmakta olup, p53'ü kodlayan *TP53* geni insan kanserlerinde en fazla mutasyon rapor edilen genlerden biridir (Soussi ve Lozano, 2005; Vaddavalli ve Schumacher, 2022). Bu sebeple, p53 kanser tedavisinde ilaç hedefi bir proteindir. Bugüne kadar p53'ü hedef alan, FDA tarafından onaylanmış ve de halen klinik çalışmaları devam eden ilaçlar bulunmaktadır. Bu ilaçlardan bir kısmı p53'ü stabilize eden, bir kısmı aktif konformasyonunu düzenleyen ve bir kısmı da p53'ün DNA ile etkileşimini arttırmayı hedefleyen ilaçlardır (Nishikawa ve Iwakuma, 2023). p53 mutasyonlarının biyokimyasal sonuçlarının aydınlatılması ilaç tasarım çalışmalarına katkı sağlayacaktır.

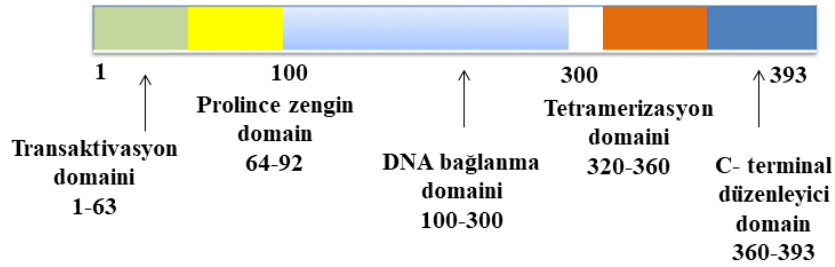
1. p53 PROTEİNİ

p53 ilk defa 1979 yılında SV-40 (Simian Virus) büyük-T antijenine bağlanan bir protein olarak keşfedilmiştir (Lane ve Crawford, 1979; Linzer ve Levine, 1979). İlk zamanlarda p53'ün kansere neden olan bir gen olduğu düşünülmüştü, ancak 1980'lerin sonunda p53'ün tümör baskılayıcı etkiye sahip olduğu ve insan kanserlerinde en çok mutasyona uğrayan *TP53* geni tarafından kodlandığı belirlendi (Fields ve Jang, 1990; Raycroft vd., 1990; Scharer ve Lggo, 1992). Bugüne kadar yapılan çalışmalarda, p53'e bağlı aktive edilmiş çok sayıda gen tanımlanmış ve bu genlerin hücre döngüsü tutuklanması, apoptoz, metabolizma düzenlemesi, DNA onarımı ve angiogenez gibi çeşitli işlevlerde görev aldığı belirlenmiştir (Vousden ve Prives 2009; Bieging vd., 2014).

p53 proteini 17. kromozomun kısa kolunda yer alan (17p13) *TP53* geni tarafından kodlanır. İnsan p53 proteini yaklaşık 43,7 kDa büyüklüğündedir ve 393 amino asitten oluşmaktadır. p53 izoformu olarak adlandırılan *TP53* geninin kodladığı daha küçük boyutta proteinler de vardır. p53, N-terminal bölgesinde transkripsiyonel işlevinden sorumlu asidik transaktivasyon domaini (1-63 amino asit (aa)) ve prolinece zengin domain (64-92 aa), orta kısımda p53'ün DNA ile etkileştiği DNA bağlanma domaini (100-300 aa), C-terminal bölgesinde ise tetramerizasyon domaini (320-360 aa) ve lizin amino asidine zengin C-terminal düzenleyici domain (360-393 aa) olmak üzere beş domainden oluşmaktadır (Şekil 1).

Prolin bakımından zengin domain (PR), p53'ün stabilitesi ve proapoptotik aktivitesi için gereklidir (Zhu vd., 2000). DNA bağlanma domaini (DBD) ise p53'ün DNA ile etkileşip transkripsiyon faktörü işlevini yerine getirmesini sağlayan domainidir. DNA bağlanma domaini aynı zamanda insan kanserlerinde en fazla mutasyonun rapor edildiği domainidir. Tetramerizasyon domaini veya diğer bir adıyla oligomerizasyon domaini ise p53'ün işlevsel formu olan tetramer oluşumunun gerçekleştiği kısımdır. C-terminal düzenleyici domaini (CTD) ise DNA bağlanma işlevini düzenleyen domainidir. Her ne kadar ilk zamanlarda CTD'nin dizilim spesifik olmayacak şekilde DNA ile etkileştiği düşünülse de daha sonra yapılan çalışmalar CTD'nin DNA ile dizilim spesifik olarak etkileştiğini ve bu etkileşimin DBD'nin

dizilim-spesifik DNA bağlanma işlevini düzenlediğini göstermiştir (Hamard vd., 2012; Kim vd., 2012; Labtenko vd., 2015).



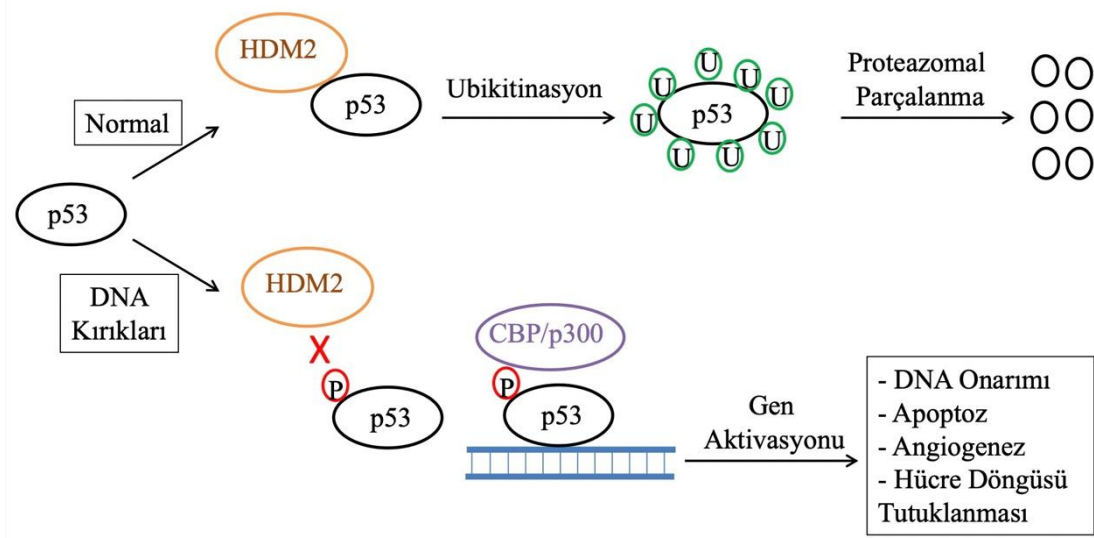
Şekil 1. p53 domain yapısı.

p53'ün transaktivasyon domaini (TAD), negatif regülatörler ve transkripsiyonel düzenleyiciler ile etkileşerek p53'ün apoptoz, DNA onarımı, angiogenez, hücre döngüsü tutuklanması vb. ile ilişkili genleri transaktive edebilmesini sağlar. TAD transkripsiyonel koaktivatörler CREB bağlanma proteini (CBP) ve p300 ile doğrudan etkileşir. p53-TAD'nin CBP/p300 ile doğrudan etkileşimi, p53'e duyarlı genlerin transkripsiyon aktivasyonu için gereklidir (Avantaggiati vd., 1997; Ferreone vd., 2009). p53-TAD'de yer alan Thr18, Ser15 ve Ser37'nin fosforilasyonunun CBP/p300 ile etkileşimi arttırdığı bilinmektedir (Uhrinova vd., 2005; Ferreone vd., 2009). p53'ün transaktivasyonundan sorumlu olan TAD, çeşitli delesyon ve mutasyon çalışmaları sonucunda TAD1 (1-42) ve TAD2 (42-63) olmak üzere iki kısma ayrılmıştır (Cress ve Triezenberg, 1991; Unger vd., 1992; Regier vd., 1993; Candau vd., 1997) (Şekil 2). TAD1'in delesyonu ve mutasyonu ile ilgili yapılan çalışmalar bu domainin apoptoz için gerekli olmadığını ancak hücre döngüsü tutuklanması için gerekli olduğunu göstermiş olup, TAD2 mutasyonları ile yapılan bir çalışmada ise mutant TAD2'nin apoptoz için gerekli olduğunu ancak hücre döngüsü tutuklanmasını büyük oranda koruduğunu bildirilmiştir (Zhu vd., 1998; Chao vd., 2000). TAD1 ve TAD2 ile gerçekleştirilen çalışmalarda birbiriyle örtüşmeyen sonuçlar rapor edilmiş olup bu farklılıkların sebebinin hücre türüne göre gerçekleşen mekanizmal farklılıklar olduğu düşünülmektedir.



Şekil 2. TAD domain yapısı.

p53'ün hücresel düzeyi ise büyük oranda HDM2'ye (Mouse Double Minute 2 Homolog, MDM2'nun insan homologu) bağlı olarak düzenlenir (Oliner vd., 1993; Picksley vd., 1994; Haupt vd., 1997) (Şekil 3). HDM2 p53'ün proteozomlarda parçalanmasına aracılık ederek transkripsiyonel aktivitesini baskılar. HDM2'nin 25-109 aa aralığındaki p53 bağlanma domaini ile p53-TAD'nin 18-26 aa aralığındaki bölgenin etkileştiği bilinmektedir (Böttger vd.,1997; Chi vd., 2005; Uhrinova vd., 2005). HDM2'nin aşırı ekspresyonunun eksprese edilen p53 miktarının azalmasına neden olduğu, p53-HDM2 etkileşiminin mutasyonla bozulmasının ise p53'ün hem aktivasyonunu etkilediği hem de birikmesiyle sonuçlandığı ortaya koyulmuştur (Haupt vd., 1997). Yapılan bölge yönlendirilmiş mutasyon çalışmaları p53'ün Leu14, Phe19, Leu22, Trp23 ve Leu26 amino asit kalıntılarının HDM2 etkileşimi için önemli olduğunu, bunlardan Phe19, Trp23 ve Leu26'nın bu etkileşimde en kritik amino asit kalıntıları olduğu belirlenmiştir (Böttger vd.,1997; Freedman vd., 1999; Moll vd., 2003; Chi vd., 2005). TAD domaininin HDM2 ile etkileşimi sonucu p53'ün CTD domaininde yer alan altı lizin amino asit kalıntısına (Lys370, Lys372, Lys373, Lys381, Lys382 ve Lys386) ubikuitin eklenir ve bu olay p53'ü proteozomal parçalanmaya yönlendirir (Rodriguez vd., 2000; Lai vd., 2001). Böylelikle p53'ün hücresel düzeyi HDM2 onkoproteini tarafından kontrol edilir (Lees-Miller vd., 1992). Ancak, TAD'nin HDM2 etkileşim bölgesine yakın konumda fosforilasyonu p53 - HDM2 etkileşimini engeller ve p53 hücrede stabilize olup transkripsiyon faktörü işlevini yerine getirir (Şekil 3).



Şekil 3. p53'ün HDM2 ile etkileşimi.

p53-TAD'de yer alan Ser6 (CK1), Ser9 (CK1, HIPK4), Ser15 (ATM, ATR, DNA-PK), Thr18 (CK1), Ser20 (Chk1, Chk2, JNK, MAPKAPK2, PLK3), Ser33 (CAK, p38, GSK-3beta), Ser37(ATR, DNA-PK, JNK), Ser46 (HIPK2, DYRK2) ve Thr55 (TAF1) amino asit kalıntıları da belirtilen kinazlar tarafından hücresel süreçlerde bir tür post-translasyonel modifikasyon (PTM) olan fosforilasyona uğrar (Boehme ve Blattner, 2010). TAD'nin Ser15'i üç PIKK ailesi kinazları; DNA'ya bağımlı protein kinaz (DNA-PK), ATR (ataksi – telanjektazi ve Rad3 ile ilişkili protein) ve ATM (ataksi – telanjektazi mutasyona uğramış) enzimleri tarafından DNA hasar yanıtı olarak fosforile edilirken Ser37, DNA-PK ve ATR tarafından fosforile edilir (Lees Miller vd., 1992; Shieh vd., 1997). TAD'de fosforile olan amino asitlerden Ser15, Ser20 ve Ser37 pozisyonu HDM2 etkileşim bölgesinde yer almakta olup bu bölgenin fosforilasyonu p53-TAD'de konformasyonel değişime neden olarak, p53-HDM2 etkileşimini önler ve böylelikle p53 stabilize olarak transkripsiyon faktörü işlevini yerine getirir (Shieh vd., 1997, 1999; Dumaz ve Meek, 1999; Unger vd., 1999).

1.1. Mutasyon

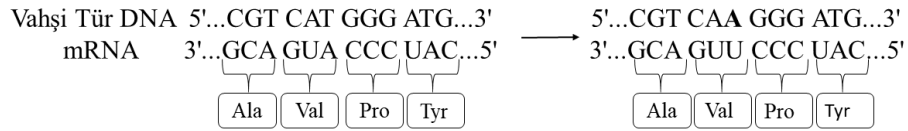
Mutasyon canlı genomunda meydana gelen dizilimsel değişikliklerdir. Mutasyonlar germ hattı mutasyonları ve somatik mutasyonlar olmak üzere hücre türüne göre ikiye ayrılırlar. Germ hattı mutasyonları gamette, yumurta, sperm

hücrelerinde meydana gelir ve nesilden nesile aktarılan mutasyonlardır. Vücudun diğer hücrelerinde görülen mutasyonlar ise somatik mutasyonlardır. Somatik mutasyonlar nesilden nesile aktarılmaz. Ancak mutasyona uğrayan gene göre tümör oluşumuna yol açabilirler.

Mutasyonlar genetik materyalin değişme şekli açısından da farklılık gösterirler. Mutasyonlar bir veya daha fazla nükleotidin eklenmesi, silinmesi ya da değişmesi ile gerçekleşir. Değişimin tek bir nükleotidde gerçekleştiği mutasyonlar nokta mutasyonu olarak da adlandırılır.

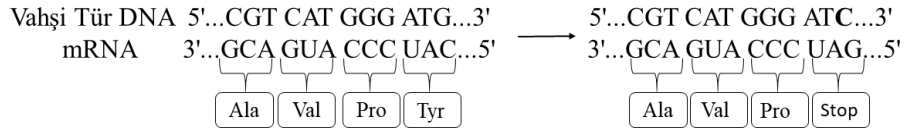
Mutasyon türleri;

- **Sessiz (silent) mutasyon :** Bu tür mutasyonda bir baz çifti değişir ve bunun sonucu olarak mRNA'da yeni bir kodon oluşur. Yeni oluşan kodon ve vahşi tip kodon aynı amino asiti kodlar (Şekil 4). Bu tür mutasyonda kodlanan protein diziliminde değişiklikliğe neden olmaz.



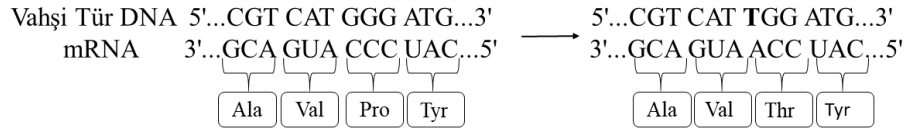
Şekil 4. Sessiz (silent) mutasyon.

- **Anlamsız (nonsense) mutasyon:** Baz çifti değişimi sonucu mRNA'da normalde bir amino asiti kodlayan bir kodonun yerine bir stop kodonunun (UAG, UAA, UGA) oluşması ile sonuçlanan mutasyondur (Şekil 5). Anlamsız mutasyonlar proteinlerin daha küçük, işlevsiz veya kısmi işlevli olarak sentezlenmesine neden olurlar.



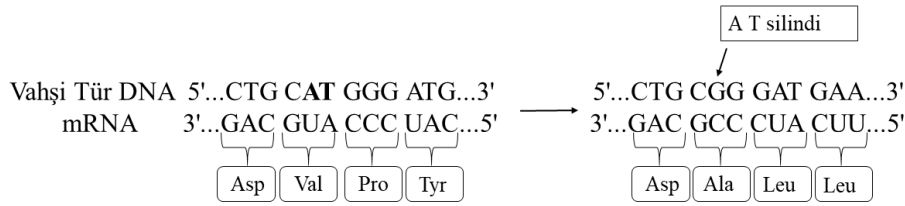
Şekil 5. Anlamsız (nonsense) mutasyon.

- **Yanlış anlamlı (missense) mutasyon:** Fenotipik değişikliğe neden olan mutasyonda, bir baz çifti değişimi sonucu mRNA üzerinde farklı bir amino asiti kodlayan farklı bir kodon oluşur (Şekil 6).



Şekil 6. Yanlış anlamlı (missense) mutasyon.

- **Çerçeve kayması (frameshift) mutasyonları:** Bir genden bir veya daha fazla baz çiftinin silinmesi (delesyon) veya eklenmesi (insersiyon) ile oluşan mutasyonlardır (Şekil 7). Bu mutasyonlar tamamen farklı dizilimde bir protein kodlanmasına neden olurlar.



Şekil 7. Çerçeve kayması (frameshift) mutasyonu.

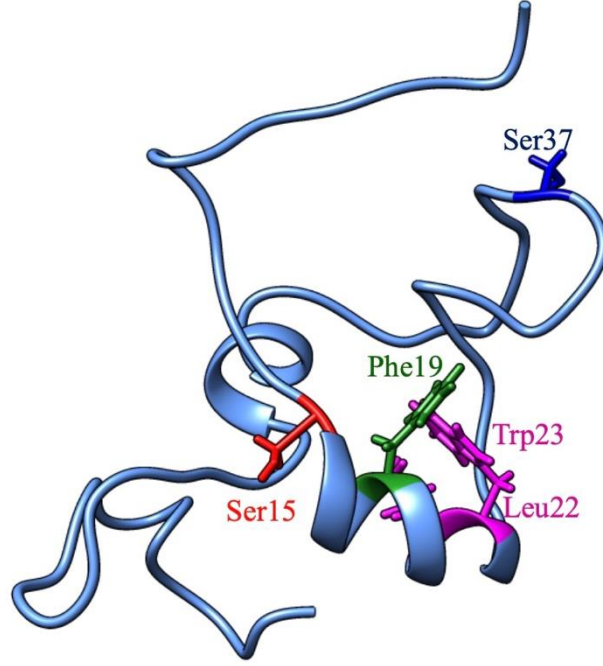
1.2. TP53 Gen Mutasyonları

TP53 geninin tümör baskılayıcı işlevini yanlış anlamlı mutasyonlar sonucu kaybettiği ve insan kanserlerinin %50'sinde TP53 gen mutasyonlarının olduğu rapor edilmiştir (Soussi ve Lozano, 2005; Vaddavalli ve Schumacher, 2022).

TP53 mutasyonları büyük oranda yanlış anlamlı mutasyonlardır (Chiang vd., 2021). Ayrıca bu mutasyonların büyük çoğunluğunun p53'ün DNA'ya bağlanma ve hedef genlerin transkripsiyonunu aktive etme yeteneğini kaybetmesine neden olduğu bilinmektedir (Kandoth vd., 2013). Yapılan çalışmalar p53 proteinin DNA ile nasıl etkileştiğini ortaya çıkardığı gibi p53 geninde meydana gelen bazı mutasyonların rollerini de ortaya koymuştur (Ho vd., 2006). DNA - p53 kompleksinin kristal yapısının incelenmesi, DBD'de yer alan Ala280, Arg281, Arg283, Ser241 ve Arg248'in DNA etkileşimine katıldığı gösterilmiştir (Ho vd., 2006). Farklı tümörlerde gerçekleştirilen DNA dizi analiziyle p53 geni üzerinde kanser türüne özgü

mutasyonların meydana geldiği 6 kodon (Arg175, Gly245, Arg248, Arg249, Arg273 ve Arg282) sıcak bölge olarak adlandırılmıştır (Rivlin vd., 2011; Gupta, vd., 2019; Chasov vd., 2020). Belirtilen bu sıcak bölge mutasyonları p53'ün DBD'de yer almakta olup p53'ün DNA ile etkileşimini etkilemektedirler.

p53'ün N-terminal bölgesinde bulunan TAD domaininde transaktivasyon işlevini olumsuz etkilediği rapor edilen mutasyon çalışmaları da bulunmakta olup Phe19, Leu22, Trp23, Leu25, Leu26, Phe53 ve Trp54'ün p53'ün transaktivasyon işlevi için önemli olduğu rapor edilmiştir (Chang vd., 1995; Venot vd., 1999; Zhu vd., 1998, 2000). Jimenez ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, TAD domaininde Leu25Gln-Trp26Ser oluşturulan fare modellerinde, farelerin tümör gelişme meyilli olduğu rapor edilmiştir (Jimenez vd., 2000). Ayrıca, fare embriyonik kök hücreleri (ES) hücreleri ve fare timositlerinde Leu25Gln-Trp26Ser mutasyonu oluşturulan hücrelerde DNA hasar yanıtı olarak apoptozun gerçekleşmediği gözlemlenmiştir (Chao vd., 2000). Yapılan bir başka çalışmada, fare Leu25Gln-Trp26Ser varyantının DNA hasarı ile ilgili gen yanıtı oluşturmalarını azalttığı ve apoptozu engellediği belirlenmiştir (Johnson vd., 2005; Brady vd., 2011). Ayrıca benzer mutantlarla, H1299 hücreleri ile yapılan bir çalışmada Leu22Gln-Trp23Ser-Arg273His üçlü mutasyonunun, PLK3 kinazının fosforile ettiği Ser20 fosforilasyonunda önemli oranda azalmaya neden olduğu, buna karşılık Ser9 ve Ser15 fosforilasyonunda artışa neden olduğu rapor edilmiştir (Vaughan vd., 2021). Bugüne kadar yapılan çalışmalarda bahsedilen TAD mutasyonlarının p53'ün transaktivasyon faktörü işlevini azalttığı hücresel düzeyde gen ekspresyonu incelenerek tespit edilmiştir. Bu mutasyonlar aynı zamanda p53 - HDM2 etkileşim bölgesinde yer almakta olup HDM2 ile etkileşimi azalttığı rapor edilmiştir (Haupt vd., 1997). Bu mutasyonların, p53'ün HDM2 ile etkileşimini azaltması sebebiyle p53'ü stabilize etmesi dolayısıyla transkripsiyon faktörü işlevini gerçekleştirebilmesi öngörülmürken, aksine p53'ün işlevini azalttıkları rapor edilmiştir. p53'ün işlevindeki bu azalmanın moleküler düzeyde temeli ise henüz tam olarak aydınlatılamamakla beraber, p53'ün CBP/p300 koaktivatörlerle etkileşimini engellediği öngörülmektedir.



Şekil 8. p53-(TAD)'nin I-TASSER ile oluşturulan tahmini katlanmış yapısı. DNA-PK tarafından fosforilasyona uğrayan Ser15 ve Ser37 amino asit kalıntısı ve mutasyon oluşturulması planlanan Leu22-Trp23 ve Phe19Ala'nın konumları gösterilmiştir (Şekil UCSF Chimera ile hazırlanmıştır).

Mutasyonların TAD'nin DNA-PK enzimi tarafından fosforile edilen Ser15 ve Ser37 pozisyonlarına yakın bir konumda yer alması sebebiyle, oluşturulan bu mutasyonların fosforilasyonu etkilemesi oldukça muhtemeldir. Bu çalışmada, Leu22Gln-Trp23Ser, Phe19Ala mutasyonları oluşturulup DNA-PK tarafından Ser15 ve Ser37 pozisyonlarının fosforilasyonuna etkisi belirlenerek p53'ün transaktivasyon faktörü işlevindeki azalmanın fosforilasyon ile ilişkisi aydınlatılmaya çalışılmıştır. TAD'nin tahmini 3D yapısında hem DNA-PK fosforilasyona uğrayan Ser15 ve Ser37'nin pozisyonları hem de bu çalışmada mutasyon gerçekleştirilen Phe19, Leu22 ve Trp23'ün pozisyonları Şekil 8'de gösterilmiştir.

1.3. DNA'ya Bağımlı Protein Kinaz (DNA-PK)

Memeli hücrelerinde eksprese edilen DNA'ya bağımlı protein kinaz (DNA-PK) katalitik alt birimi DNA-PKcs, protein kinazların fosfatidilinositol 3-kinaz ile ilişkili (PIKK) ailesinin altı üyesinden biridir. DNA-PKcs, PIKK üyesi kinazlardan ATM ve ATR gibi DNA hasar yanıtında önemli rol oynar. Bu üç kinaz enzimide substratlarında yer alan S/TQ motifinin fosforilasyonundan sorumludur. DNA-PKcs,

PRKDC geni tarafından kodlanan 469 kDa büyüklüğünde, birkaç farklı fonksiyonel domainden oluşun bir proteindir. N-terminal bölgesinden orta kısma doğru oldukça büyük ve helikal bir katlanmaya sahip olan; N-HEAT domaini ve M-HEAT domaini, C-terminal tarafında ise FAT domaini, katalitik kinaz domaini ve FATC domaini yer almaktadır (Dobbs vd., 2010). FAT ve FATC domainleri, yüksek oranda korunmuş olan katalitik kinaz domainini çevreleyerek konformasyonel değişiklikleri stabilize etmeye ve kinaz aktivitesini düzenlemeye katkı sağlar (Rivera-Calzada vd., 2005; Sharif vd., 2017) (Şekil 9).



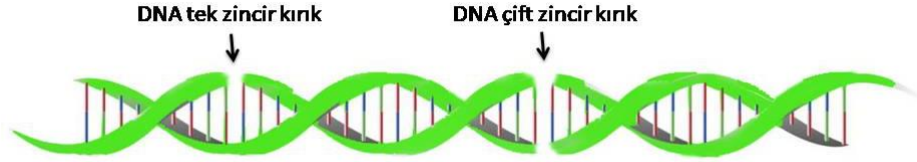
Şekil 9. DNA-PKcs domain yapısı.

DNA-PKcs ekspresyonunun bazı tümörlerde düşük bazılarında ise yüksek olarak rapor edilmiştir. Radyoterapi gören 224 meme kanseri hastası ile yapılan bir çalışmada, DNA-PKcs ekspresyonunda hastaların %57'sinde azalma rapor edilirken yumurtalık epital kanser hücreleri ile yapılan bir çalışmada, test edilen 190 tümörden %70,5'inde DNA-PKcs hücresel ekspresyonunda artış, %29,5'inde ise düşük hücresel ekspresyon rapor edilmiştir (Söderlund Leifler vd., 2010; Abdel-Fatah vd., 2014). 279 mide kanseri hastasından alınan örneklerle yapılan bir başka çalışmada ise hastaların %22,6'sında DNA-PKcs ekspresyonunda azalma rapor edilmiştir (Lee vd., 2005).

DNA-PKcs'nin en bilinen işlevi DNA hasar yanıtı ve onarımında görev alması ve bunun sonucu olarak genomik dayanıklılıkta rol oynamasıdır. Ancak DNA-PKcs DNA onarımındaki rolü dışında, hücre döngüsü ilerlemesinde, transkripsiyon ve telomer bakımında da görev almaktadır (Kong vd., 2011). Ayrıca, DNA-PKcs'nin hipoksiyada DNA kırıklarından bağımsız olarak aktive olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiş ve hipoksiyada da görev aldığı öngörülmüştür (Bouquet vd., 2011). DNA-PKcs'nin en iyi anlaşılmış işlevi ise DNA çift zincir kırıklarının onarımındaki rolüdür.

1.4. DNA-PKcs'nin NHEJ Onarımındaki Rolü

DNA'da meydana gelen en ciddi hasarlar DNA kırıklarıdır. Tek zincir kırıkları ve çift zincir kırıkları olmak üzere iki tür DNA kırığı vardır (Şekil 10). DNA tek zincir kırıkları (SSB) ve çift zincir kırıkları (DSB) iyonize radyasyon, UV ışınları gibi fiziksel mutajenlere bağlı oluşabileceği gibi, baz hasarının onarımı sırasında kimyasal mutajen kaynaklı olarak da oluşabilmektedir. DNA çift zincir kırıkları, DNA hasarlarının en zararlı şeklidir, eğer onarım gerçekleşmezse gelişimsel kusurlara, kısırlığa ve kansere yol açabilirler (Jackson ve Bartek, 2009). DNA tek zincir kırıkları, çift zincir kırıkları kadar zararlı olmasa da DNA replikasyonu ve transkripsiyonunu bloke edebileceğinden hücre için istenmeyen bir durumdur ve tek zincir kırıkları çeşitli kalıtsal nörodejeneratif hastalıklarla da ilişkilendirilmiştir (Polo ve Jackson, 2011).

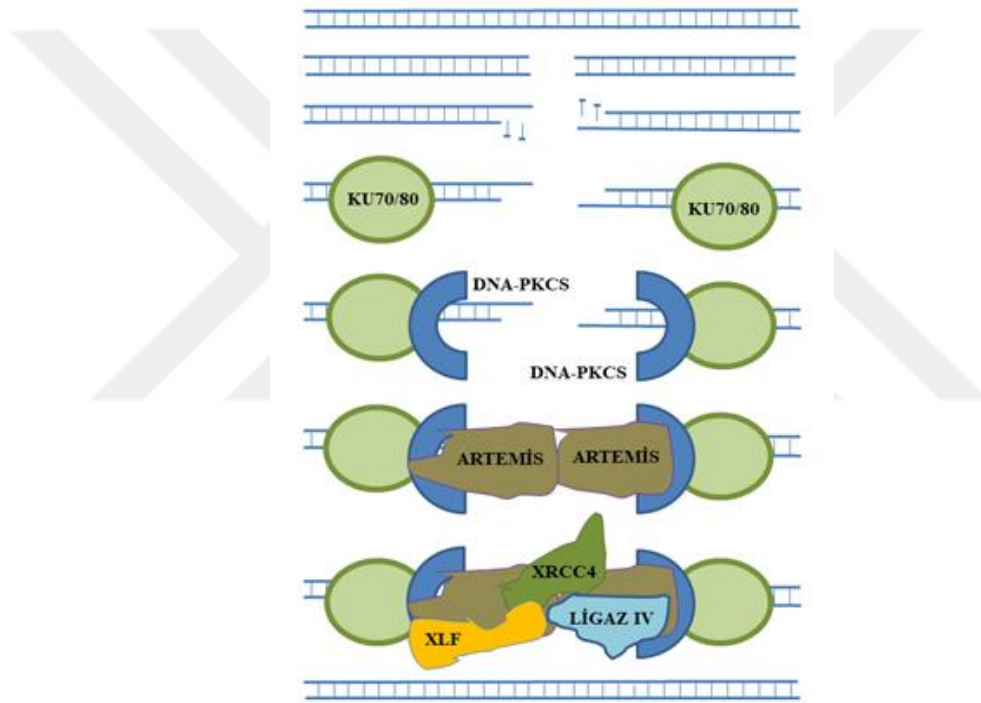


Şekil 10. DNA tek zincir ve çift zincir kırıkları.

DSB ökaryotik hücrelerde görülen ve DNA'da meydana gelen en ciddi hasar türlerinden biridir. DSB birbirinden bağımsız iki farklı mekanizma ile onarılır. Bu mekanizmalardan biri homolog rekombinasyon (HR) diğeri ise homolog olmayan DNA uç birleştirmesi (NHEJ) olarak adlandırılır (Sipley vd., 1995). DNA'da kırık meydana geldiğinde onarımın NHEJ mekanizmasıyla daha fazla gerçekleştiği bilinmektedir. Hangi mekanizmanın seçileceği hücre döngüsü veya her iki mekanizmanın bileşenlerinin seviyesine bağlı olarak gerçekleştiği düşünülmektedir (Hsu vd., 2002; Burma ve Chen, 2004; Collis vd., 2005; Neal vd., 2011). DNA-PKcs'nin en iyi karakterize edilen işlevi hem endojen hem de ekzojen olarak meydana gelen DNA DSB kırık uçlarının doğrudan ligasyonuna aracılık yapmasıdır (Jeggo 1997; Schwartz vd., 2005; Goodwin ve Knudsen, 2014).

Homolog olmayan DNA uç birleştirmesi (NHEJ) onarım mekanizması ile gerçekleşen onarım çift zincir kırık uçlarında birkaç nükleotid kaybı ile gerçekleşir. NHEJ'in ilk aşamasında DNA çift zincir kırık uçlarına Ku70 ve Ku80 heterodimerik

protein kompleksi bağlanarak DNA ile kompleks oluşur (Spagnolo vd., 2006; Goodwin ve Knudsen, 2014; Sharif vd., 2017). Daha sonra DNA-PKcs Ku kompleksi aracılığı ile kırık uçlara yönelir ve kinaz aktivitesine sahip DNA-PK oluşur (Iyama ve Wilson, 2013; Slupphaug vd., 2003). DNA - Ku70/Ku80 kompleksi ile kinaz aktif hale gelen DNA-PK endonükleaz olan Artemis'i fosforile eder ve fosforilasyona uğrayan Artemis nükleotid uzantılarını ortaya çıkarmak için kırık 3' ve 5' tek zincir çıkıntılarını düzeltir (Ma vd., 2002; Goodarzi vd., 2006; Gu vd., 2010). Daha sonra XLF/XRCC4/Ligaz4 kompleksi ligasyonu gerçekleştirir ve NHEJ onarımı tamamlanır (Iyama ve Wilson, 2013; Slupphaug vd., 2003), (Şekil 11).



Şekil 11. DNA-PKcs'nin NHEJ onarım mekanizması.

1.5. DNA-PK'nın Hücre Döngüsü İlerlemesindeki Rolü

Hücrede genomik stres durumlarında, G1'de hücre döngüsü tutuklanmasına neden olan p53'ün hücre düzeyi büyük oranda HDM2 tarafından düzenlenir. p53 - HDM2 etkileşimi, p53'ün ubiquitine olmasına ve sonrasında proteazomal degradasyona uğramasına neden olur. p53 - HMD2 etkileşiminin engellenmesi p53 stabilizasyonu dolayısıyla G1 hücre döngüsü tutuklanması ile sonuçlanır. DNA-PK, p53'ün hücre düzeyini HDM2 üzerinden dolaylı olarak iki farklı şekilde etkiler ve

böylece hücre döngüsü ilerlemesinde rol oynamış olur. DNA-PK, HDM2'nin Ser17 amino asit kalıntısını fosforile eder ve bu fosforilasyon, p53 - HDM2 etkileşimini engelleyip p53'ü stabilize eder. DNA-PK, HDM2'ya ek olarak p53'ün TAD domanindeki Ser15 ve Ser37 amino asit kalıntılarını da fosforile eder ve bu fosforilasyon olayının neden olduğu konformasyonel değişim p53 - HDM2 etkileşimini olumsuz etkiler ve p53 stabilize edilmiş olur. DNA-PK'nin hücre döngüsü ilerlemesindeki rolü yalnızca, HDM2 ve p53 fosforilasyonu ile sınırlı olmayıp, ek olarak hücre döngüsü düzenlenmesinde rol oynayan RPA32'yi Ser8 ve Chk2'yi Thr68 pozisyonunda fosforile eder (Li vd., 2005; Cruet vd., 2006; Asheley vd., 2014).

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda p53'ün HDM2'ye dayalı düzenlenmesinde önemli olduğu rapor edilen Phe19, Leu22 ve Trp23 amino asit kalıntılarının mutasyonunun HDM2 ile etkileşimi olumsuz etkilediği gösterilmiştir (Böttger vd., 1997; Freedman vd., 1999; Moll vd., 2003; Chi vd., 2005). Bu çalışmada, DNA-PK'nin fosforilasyon bölgesi olan Ser15 ve Ser37'ye yakın konumda yer alan Phe19Ala ve Leu22Gln-Trp23Ser mutasyonlarının HDM2 ile etkileşimi azaltmasına ek olarak, Ser15 ve Ser37 amino asit kalıntılarının fosforilasyonu etkileyebileceği öngörülmüştür. Bu hipotezi test etmek için ilk olarak bölge yönlendirilmiş mutasyon yöntemiyle bu varyantlar oluşturulup, DNA-PK tarafından Ser15 ve Ser37 fosforilasyonu ilgili amino asit kalıntıları için fosfo-spesifik antikorlar kullanılarak western blotlama yöntemiyle belirlendi. Oluşturulan mutasyonların neden olabileceği olası konformasyonel değişim ise üç boyutlu (3D) protein yapı tahmini sunucusu I-TASSER ile belirlendi (Yang ve Zhang, 2015; Zheng vd., 2021; Zhou vd., 2022). Ayrıca, TAD mutasyonlarının DNA-PKcs ile etkileşimi nasıl etkilediği moleküler kenetlenme sunucusu HADDOCK 2.4 kullanılarak belirlendi (Zundert vd., 2015; Honorato vd., 2021).

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler

LB besi yeri: 10 g LB Broth (Miller), 400 mL ddH₂O'da çözüldü. 30 dk otoklav ile sterilize edildi.

Denge tampon çözeltisi: 1,95 g NaH₂PO₄ (50 mM), 4,38 g NaCl (300 mM) ve 25 mL gliserol (%10) ddH₂O'da çözülüp pH 8,00'a ayarlandı. Hacim ddH₂O ile 250 mL'ye tamamlandı.

Elüsyon tampon çözeltisi: 272,32 mg imidazole (200 mM) 20 mL denge tampon çözeltisinde çözülüp pH 8,00'a ayarlandı.

Lizis tampon çözeltisi: 13,60 mg imidazole (10 mM), 3,09 mg DTT (1mM), 20 µL Tween (%0,1) ve 25 µL PMSF (1 mM) 20 mL denge tampon çözeltisinde çözüldü.

Yıkama tampon çözeltisi: 34,04 mg imidazole (25 mM), 55,11 mg ATP (5 mM), 5,71 mg MgCl₂ (3 mM), 818,16 mg NaCl (700 mM) 20 mL denge tampon çözeltisinde çözüldü.

SDS-PAGE çözeltileri

18,17 g Tris-Base (1,5 M) ddH₂O'da çözülüp pH 8,80'a ayarlandı. ddH₂O ile hacim 50 mL'ye tamamlandı.

6,06 g Tris-Base (0,5 M) ddH₂O'da çözülüp pH 6,80'a ayarlandı. ddH₂O ile hacim 50 mL'ye tamamlandı.

%10 SDS-PAGE

ddH ₂ O	2,15 mL
%33 Acrylamide	1,5 mL
1,5 M Tris-Base (pH 8.80)	1,25 mL
%10 SDS	50 µL
%10 APS	25 µL
TEMED	5 µL

%5 SDS-PAGE

ddH ₂ O	1,375 mL
%33 Acrylamide	300 µL
0,5 M Tris-Base (pH 6.80)	250 µL
%10 SDS	25 µL
%10 APS	25 µL
TEMED	5 µL

10X Jel yürütme tampon çözeltisi: 30,29 g Tris-Base (0,25 M), 144,13 g glisin (1,92 M) ve 10 g SDS (%1) ddH₂O çözülüp son hacmi 1 L'ye tamamlandı.

SDS jel boya yıkama çözeltisi: 2 L metanol, 0,4 L asetik asit, 1,6 L su (%40) karıştırıldı.

SDS jel boyama çözeltisi: 1,25 g commassie parlak mavi R-250, 500 mL %20 metanol, %10 asetik asit içeren çözeltide çözüldü.

Diyaliz tampon çözeltisi: 7,88 g Tris-HCl (50 mM) ve 17,53 g NaCl (0,3 M) ddH₂O'da çözülüp pH 8'e ayarlandı. Hacim 1 L'ye tamamlandı.

10X TBS: 24 g Tris-Base (200 mM) ve 88 g NaCl (1,5 M) ddH₂O'da çözülüp pH'ı 7,65'a ayarlandı ve hacim ddH₂O ile 1 L'ye tamamlandı.

1X TBS-T: 50 mL 10X TBS, 0,5 mL Tween20 (%0,1) ddH₂O ile hacim 500 mL'ye tamamlandı.

Western Blot transfer tampon çözeltisi: 1,51 g Tris-Base (25 mM), 7,20 g glisin (192 mM) ve 50 mL %10 metanol ddH₂O'da çözülüp hacim 500 mL'ye tamamlandı.

Kinaz durdurma çözeltisi: 25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 250 mM EDTA, %10 DMSO.

2.1.2. Kullanılan Cihazlar

Tablo 1. Kullanılan laboratuvar ekipmanları.

Kuruluştaki Bulunan Altyapı/Ekipman Türü, Modeli (Laboratuvar, Araç, Makine-Teçhizat, vb.)	Kullanım Amacı
Çalkalayıcılı inkübatör	Hücre üretme ve çoğaltma
İnkübatör	Hücre üretme ve çoğaltma
Soğutmalı santrifüj	Örnek çöktürme
Biorad jel elektroforez sistemi	SDS ve agaroz jel elektroforezi
Biorad Trans-Blot Semi-Dry Transfer Cell	SDS jeldeki proteinlerin membrana transferi
UV-Vis spektrometresi	Protein derişim ölçümü
Bio-Rad ChemiDoc görüntüleme sistemi	Jel ve membran görüntüleme
Bio-Rad Gradient Pump	Protein saflaştırma işlemleri
Buzdolabı	Örnek saklama
Vorteks	Örnek karıştırma
Otoklav	Sterilizasyon işlemleri
pH metre	Çözeltilerin pH'larının ayarlanması
PCR cihazı	Mutasyonların oluşturulması
Su banyosu	İstenilen sıcaklık koşulunun sağlanması
Rotator karıştırıcı	Karıştırma işlemleri
Sonikatör	Hücrelerin parçalanması
Hassas terazi	Tartım işlemleri
Nanodrop	DNA derişim ölçümü
Isıtıcı manyetik karıştırıcı	Isıtma ve karıştırma işlemleri

2.2. Yöntem

2.2.1. Vahşi Tür p53 Plazmid İzolasyonu

Addgene'den temin edilen vahşi tür human-p53 plazmidi kullanıldı (Ayed vd., 2001). Kullanılan plazmid Cheryl Arrowsmith tarafından üretilip Addgene'e depozit edilmiştir (Addgene plasmid # 24859; <http://n2t.net/addgene:24859>; RRID:Addgene_24859). Mutasyonları oluşturmak için His-tagged p53 plazmidi içeren *E. coli* DH5-alpha hücrelerinden aşağıda özetlendiği gibi çoğaltılıp QIAprep Spin Miniprep Kit (#27106) kullanılarak kit talimatlarına göre izole edildi.

Hücrelerin Çoğaltılması: p53 plazmidini içeren *E. coli* DH5-alpha hücreleri ampicilin antibiyotigini içeren 5 mL LB broth (Miller) besi yerinde gece boyunca 37 °C sıcaklık ve 137 rpm çalkalama hızında çoğaltıldı. 8000 rpm'de hücreler santrifüj edildi. Çöktürülen hücrelerden plazmid izolasyonu QIAprep Spin Miniprep Kit protokolüne göre aşağıdaki gibi gerçekleştirildi.

QIAprep Spin Miniprep Kit Protokolü

Kit'de yer alan ve P1, P2, N3, PB, PE ve EB olarak adlandırılan çözeltiler kullanıldı.

- Çöktürülen hücre peletine 250 µL P1 tampon eklendi. Yaklaşık 5 dakika inkübe edilip steril tüplere alındı.
- 250 µL P2 tampon çözeltisi ekleyerek karışması sağlandı.
- 350 µL N3 tampon çözeltisi eklendi ve karışması sağlandı.
- 10 dakika 13000 rpm'de santrifüj edildi.
- Pipetle supernatant alınarak QIAprep 2.0 tüplere koyuldu.
- 1 dakika 13000 rpm'de santrifüj yapıldı.
- Alttaki sıvılar döküldü ve 500 µL PB tampon çözeltisi eklendi.
- 1 dakika 13000 rpm'de santrifüj yapılır.
- Sıvılar uzaklaştırıldı.
- 750 µL PE tampon çözeltisi eklendi.
- 13000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapıldı.
- Sıvılar dökülür ve 13000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapıldı.
- Filtre mikrosantrifüj tüpe alındı.
- 50 µL EB tampon çözeltisi eklendi ve 1 dakika beklendi.

- 13000 rpm’de 1 dakika santrifüj yapıldı.
- DNA elde edildi.

Saflaştırılan plazmidin derişimi 260 nm dalga boyunda nano-drop ile belirlendi.

Plazmid saflığını ve boyutunu belirlemek için agaroz jel elektroforezi uygulandı.

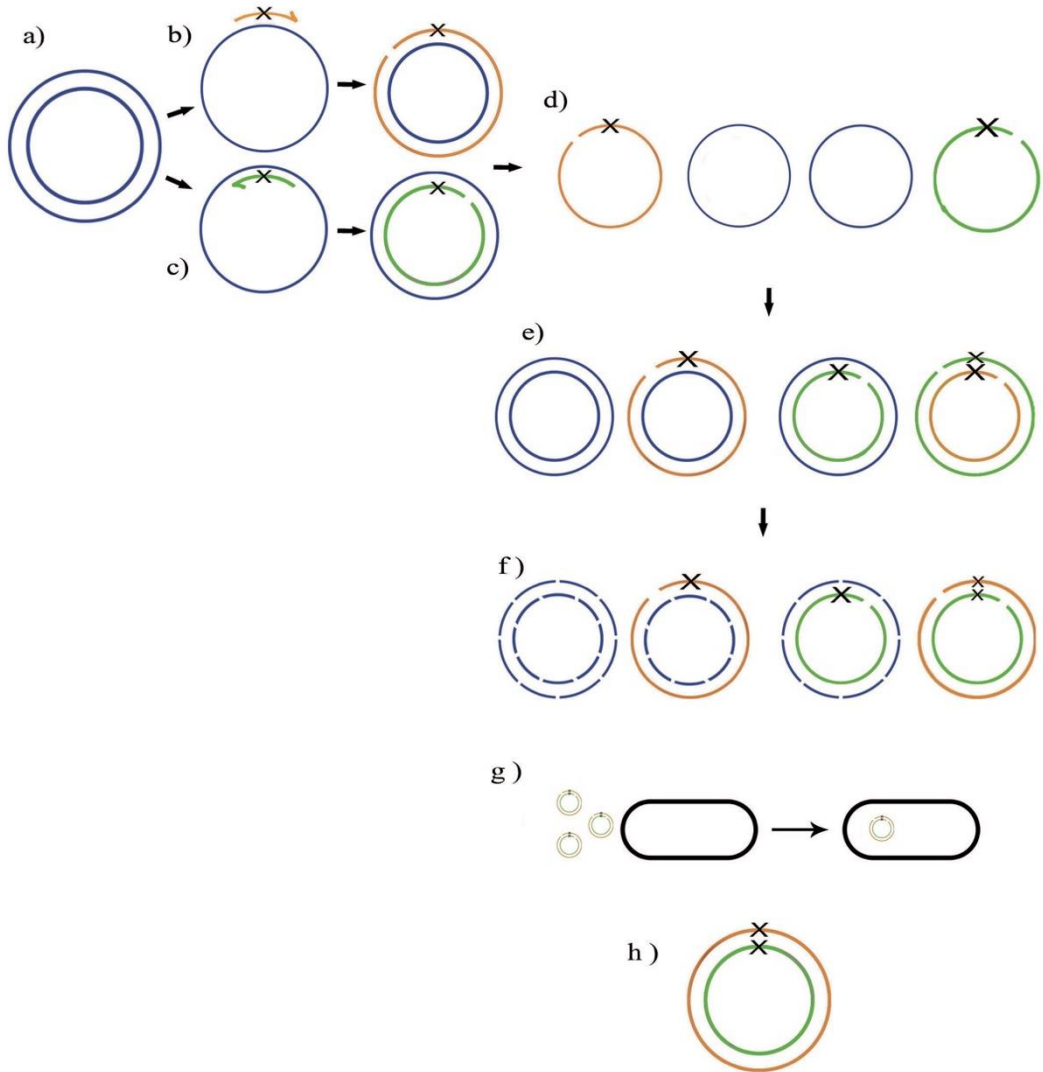
2.2.2. Mutasyonların Oluşturulması

Phe19Ala ve Leu22Gln-Trp23Ser mutasyonlarının oluşturulması için gerekli primerler QuickChange Primer Design sürücüsü kullanılarak mutasyona uğrayacak amino aside ait kodon dizilimin ortasına gelecek şekilde tasarlanmış ve ilgili primerlere ait dizilimler Tablo 2’de verilmiştir. Primerlerin erime noktası Phe19Ala varyantı için 76,2 °C, Leu22Gln-Trp23Ser varyantı için 74,4 °C olarak hesaplanmıştır. Primerlerin erime noktası 72 °C’den yüksek olduğu için mutasyonların oluşturulması tekli primerli PCR’a dayalı bölge yönlendirilmiş mutasyon yöntemiyle gerçekleştirildi (Şekil 12).

Tablo 2. Mutasyonlar için tasarlanan primer dizilimleri.

Mutasyon	Primer dizilimi
Phe19Ala	İleri: ^P 5’-gtagtttccataggtctgaagctgttcctgactcagagggg-3’ Geri: ^P 5’-cccctctgagtcaggaaacagcttcagacctatggaaactac-3’
Leu22Gln-Trp23Ser	İleri: ^P 5’-gttggtttcaggaagtagtttcgattggtctgaaaatgttcctgact-3’ Geri: ^P 5’-agtcaggaaacattttcagaccaatcgaaactacttcctgaaaacaac-3’

Mutasyonların oluşturulması için Phusion Site Directed Mutagenesis Kit’i (Thermo Scientific, #F541) kullanılmış olup kit protokolüne göre HPLC ile saflaştırılmış, 5’ ucu fosforile edilmiş primerler kullanılmıştır. Tablo 3’de verilen sıralama ile ürünler karıştırılarak tek primer içeren iki ayrı PCR reaksiyon karışımı hazırlandı. Primerlerin erime noktası dikkate alınarak Tablo 4’de ve Tablo 5’de verilen PCR koşulları sırasıyla uygulandı.



Şekil 12. Tekli primerli bölge yönlendirilmiş mutagenез aşamaları. (a) Metillenmiş ana plazmid. (b) İleri-primer PCR reaksiyonu. (c) Geri-primer PCR reaksiyonu. (d) İleri ve geri PCR reaksiyonunun birleştirilip, 95°C’de denature edilmesi. (e) Kademeli sıcaklık düşürülmesiyle plazmid dimerizasyonu. (f) DpnI ile metillenmiş ana plazmid DNA’nın uzaklaştırılması ve sonrasında T4 DNA ligaz ile plazmid uçlarının birleştirilmesi (g) Mutant plazmidlerin E. coli hücrelerine aktarılması (h) Mutant plazmid (Şekil Edelheit vd. 2009’dan esinlenilerek uyarlanmıştır).

Tablo 3. PCR reaksiyon karışımları.

	Reaksiyon 1	Reaksiyon 2
ddH ₂ O	-	-
5X Phusion HF tampon çözeltisi	1X	1X
p53 plazmid DNA	100 ng	100 ng
İleri primer	0,5µM	-
Geri primer	-	0,5 µM
dNTPs	0,2 mM	0,2 mM
Phusion Hot Start DNA Polimeraz	0,2 unite	0,2 unite
Son hacim	25 µL	25 µL

Tablo 4. Birinci aşama PCR koşulları.

Aşama	Sıcaklık, °C	Zaman	Döngü Sayısı
Başlangıç Denatürasyonu	95	2 dakika	1
Denatürasyon	95	40 saniye	30
Annealing	55	40 saniye	
Ekstensiyon	72	7 dakika	
Son ekstensiyon	72	7 dakika	1
	4	Devamlı	

Tablo 5. İkinci aşama PCR koşulları.

Aşama	Sıcaklık, °C	Zaman, dakika
1	95	5
2	90	1
3	80	1
4	70	0,5
5	60	0,5
6	50	0,5
7	40	0,5
8	37	Devamlı

Tablo 4 ve Tablo 5’de oluşturulan protokol iki aşamalı tekli primer ile bölge yönlendirilmiş mutagenез yöntemine göre uygulandı (Edelheit vd., 2009). İleri ve geri primerler ile gerçekleştirilen iki ayrı PCR reaksiyon karışımı birleştirildi. Tablo 5’de verilen PCR protokolü uygulanarak 95 °C’de plazmid denatüre edildi ve 37 °C’ye kademeli olarak soğutularak dimerik plazmid oluşması sağlandı. Mutasyona uğramayan metile edilmiş vahşi tür plazmidi uzaklaştırmak için son PCR ürünü DpnI ile 37 °C’de bir saat inkübe edildi. Ana plazmid DpnI ile kesilip uzaklaştırıldıktan sonra plazmid uçları T4 DNA ligaz ile birleştirildi. Daha sonra mutanta ait plazmid *E. coli* XL1 Blue hücrelerine ısı şoku yöntemiyle aktarıldı ve vahşi tür plazmid de olduğu gibi izole edildi.

2.2.3. DNA Dizi Analizi ile Oluşturulan Mutasyonların Doğrulanması

İzole edilen p53 plazmidi T7 terminatör bölge içerdiği için dizileme T7 primeri kullanılarak, Karadeniz Teknik Üniversitesi’nde Tıbbi Biyoloji Bölümü tarafından dizi analizi yapıldı.

2.2.4. Mutant Plazmidlerin *E. Coli* BL21 Hücrelerine Transformasyonu

İlgili plazmidin transformasyonu için ısı şoku yöntemi aşağıda belirtilen şekilde gerçekleştirildi (Protokol, New England Biolabs'dan alınmıştır).

10 ng plazmid buzda bekletilen *E. coli* BL21 competent hücrelerine eklendi ve 30 dakika buzda bekletildi.

Hücre-plazmid karışımı 42 °C'ye ısıtılan su banyosunda 10 saniye bekletildi, sonrasında hemen buza alındı ve 5 dakika da buzda bekletildi.

950 µL SOC besi yeri hücre plazmid karışımına eklendi.

Hücreler 37 °C sıcaklık ve 175 rpm çalkalama hızına sahip inkübatörde 1 saat inkübe edildi.

Ampisilin antibiyotiği içeren LB besi yeri ile hazırlanan petri kaplarına 20-200 µL aralığında hacimlerde çoğaltılan hücre ekildi ve plateler 37 °C sıcaklığında bir gece inkübe edildi.

2.2.5. Mutantların ve Vahşi Tür p53'ün Saflaştırılması

Plazmid His-tag içerdiği için saflaştırma Ni-NTA afinite rezini kullanılarak gerçekleştirildi. Mutantların üretimi ve saflaştırma işlemi aşağıda özetlendiği şekilde gerçekleştirildi.

Mutasyonların ve vahşi tür p53'ün üretimi;

Mutant plazmidin transfer edildiği hücreler ampisilin içeren LB broth (Miller) besi (200 mL) yerinede gece boyu çoğaltıldı.

Ertesi gün gece kültüründen 5'er mL alınıp ampisilin içeren 400 mL LB broth (Miller) besi yerine ilave edildi.

OD₆₀₀ değeri 0,7-0,8 civarına ulaştığında 1 mM IPTG (izopropilβ-D-1-tiyogalaktopiranosid) eklenerek hücreler indüklendi ve sıcaklık 25 °C'ye düşürüldü.

IPTG ilavesinden yaklaşık 6 saat sonra hücreler 8500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve çöktürülerek ve -20 °C'de saflaştırma işlemine kadar muhafaza edildi.

Vahşi tür p53'ün ve Phe19Ala, Leu22Gln-Trp23Ser mutantlarının saflaştırılması;

Üretilen hücreler lizis tampon çözeltisinde sonikatör yardımıyla parçalandı (sonikasyon, %30 amplitude, 10 saniye pulse on, 10 saniye pulse off).

Hücrelerin parçalanması ile elde edilen lizat daha sonra 30 dk, 1300 rpm’de santrifüj edildi.

Proteini içeren süpernatant daha sonra Ni-NTA resinini içeren kolondan geçirildi.

Lizat kolona yüklendikten sonra 25 mM imidazol içeren tampon çözelti (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 25 mM imidazol, pH 8,00, %10 gliserol) ile yıkama işlemi yapıldı.

Yıkama işleminden sonra protein kolondan 200 mM imidazol içeren tampon çözelti ile elute edildi.

Saflaştırılan proteinden imidazolu uzaklaştırmak için diyaliz tampon çözeltisinde (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, pH 8,00) diyaliz işlemi uygulandı.

Elde edilen proteinin saflığı %10’luk SDS jel elektroforezi ile belirlendi.

2.2.6. Vahşi tip p53 ve Leu22Gln-Trp23Ser, Phe19Ala Mutasyonlarının DNA-PK Tarafından Fosforilasyonunun Belirlenmesi

DNA-PK’ nın Ser15 ve Ser37 amino asitlerinin zamana dayalı fosforilasyon oranı Ser15^P ve Ser37^P için fosfo spesifik antikorlar kullanılarak hem vahşi tür p53 hem de oluşturulan mutantlar için western blotlama yöntemiyle belirlendi. İlk olarak aşağıda özetlendiği şekilde kinaz reaksiyonları hazırlanıp 20 dk’lık zaman dilimlerinde fosforilasyon gerçekleştirildi.

Kinaz reaksiyonu;

- 50 mM Tris-HCl pH 8,00
- 50 ünite DNA-PK enzimi (Promega #V4106)
- DNA-PK aktivasyon tampon çözeltisi (Promega#V4106)
- 25 µM Vahşi tür p53 / Leu22Gln-Trp23Ser / Phe19Ala
- Mg²⁺, Mn²⁺, Adenozin trifosfat (ATP) karışımı

Reaksiyon karışımı, farklı zaman dilimlerinde (0-20 dk) %10’luk DMSO içeren tampon çözeltide durduruldu.

Western blotlama yönteminin uygulanması;

İlk olarak %10 ayırma ve %5 yükleme jelinden oluşan SDS jeli hazırlandı.

Farklı zaman dilimlerinde durdurulan kinaz reaksiyon karışımları hazırlanan SDS jele yüklendi ve yükleme jelinde 20 mA, ayırma jelinde ise 25 mA akımda yürütüldü.

Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra SDS jel'deki örnek nitroselüloz membrana "Biorad Trans-Blot Semi-Dry Transfer Cell" cihazıyla transfer edildi.

Membrana transfer işleminden sonra membran 4 °C'de %7 süt tozu içeren TBS-T tamponunda gece boyu inkübe edildi.

Daha sonra TBS-T (TBS + %0,1 tween) çözeltisiyle membran 5 kez 5'er dakika boyunca yıkandı.

Yıkama işleminden sonra 1 saat 15 dakika rotator üzerinde birincil antikorda (fosfo-Ser15 antikoru veya fosfo-Ser37 antikoru) inkübe edildi.

İnkübasyondan sonra membran TBS-T ile 5 kez 5'er dakika boyunca yıkandı.

Yıkama işleminden sonra membran ikincil antikor (HPR-conjugated goat anti-mouse antibody) ile 1 saat 15 dakika rotator üzerinde inkübe edildi.

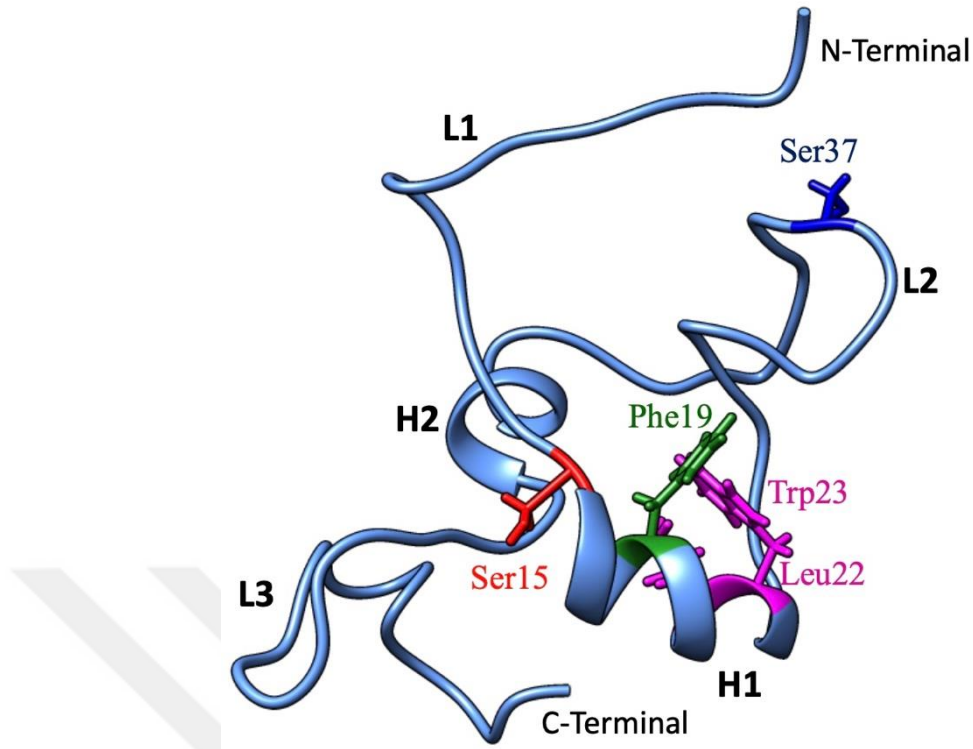
1 saat inkübasyondan sonra membran tekrar TBS-T ile yıkandı.

Yıkama işleminden sonra membran Pierce ECL substratı ile 5 dakika inkübe edildi ve "Bio-Rad ChemiDoc görüntüleme cihazı" ile membran görüntülendi.

Fosforilasyon oranı Bio-Rad ChemiDoc görüntüleme cihazı ile ölçülen bant yoğunluğuna (intensity) göre belirlendi.

2.2.7. Mutasyonların TAD'nin İkincil Yapı İçeriğine Etkisi

Mutasyonların proteinlerde konformasyonel değişime neden olmaları olası bir durumdur. p53'ün oldukça esnek bir yapıya sahip olan TAD domaininde oluşturulan mutasyonların, domainin konformasyonunu değiştirmesi beklenen bir durumdur. Şekil 13'de TAD domaininde olası konformasyonel değişime uğrayabilecek bölgelerin konumları verilmiş olup N-terminal loop'u: L1; Phe19, Leu22, Trp23'ün yer aldığı heliks: H1; Ser37'nin yer aldığı bir diğer loop: L2; L2'den sonra yer alan kısa heliks: H2 ve son olarak C-termina loop: L3 ile gösterilmiş olup şekil UCSF Chimera ile hazırlanmıştır (Pettersen vd., 2004).



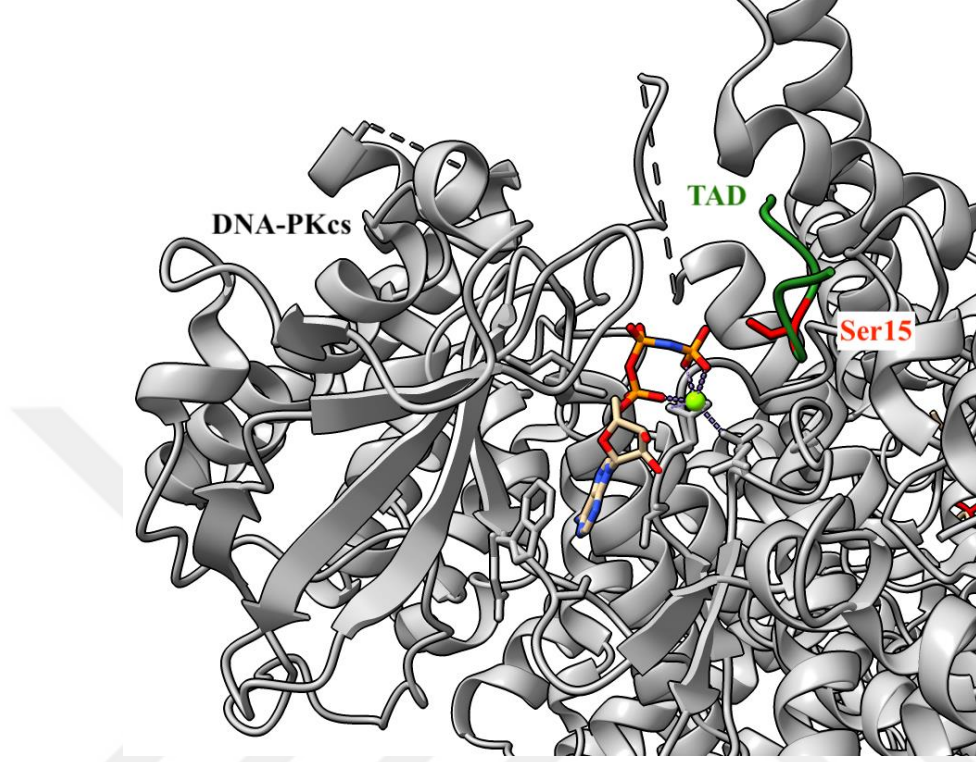
Şekil 13. p53-TAD ikincil katlanma elementleri (Şekil UCSF Chimera ile hazırlanmıştır).

Mutasyonların neden olabileceği olası konformasyonel değişim üç boyutlu (3D) protein yapı tahmini sunucusu I-TASSER kullanılarak öngörüldü. Bu amaçla, insan p53 proteininin 393 amino asitlik dizilimi NCBI’den alındı. Hem vahşi tür hem de Phe19Ala ve Leu22Gln-Trp23Ser mutasyonları için üç boyutlu yapı modeli oluşturuldu.

2.2.8 Mutasyonların DNA-PKcs ile Etkileşiminin Moleküler Kenetlenme Sunucusu HADDOCK 2.4 ile Belirlenmesi

Mutasyonların neden olduğu öngörülen konformasyonel değişimin TAD’nin DNA-PKcs ile etkileşimi nasıl etkilediğini belirleyebilmek için HADDOCK 2.4 moleküler kenetlenme sunucusu kullanıldı (Dominguez vd., 2003; Vries vd., 2010; Zundert vd., 2015; Honorato vd., 2021; Charitou vd., 2022). Bu amaçla, DNA-PKcs ve TAD’nin 7-mer (12-18 aa) dizilimi ile etkileşimini gösteren ‘PDB 8OXO’ kodlu yapı PDB’den alınmıştır. DNA-PKcs ile 7-mer TAD fragmentının etkileşimi Şekil 14’de gösterilmiştir. HADDOCK 2.4’a yapıyı yüklemeyen önce içeriğindeki 7-mer

TAD, Mg atomu ve ‘B zinciri’ yapıdan çıkarılmıştır. TAD yapıları için ise I-TASSER tarafından oluşturulan tahmini 3D yapılar herhangi bir modifikasyon yapılmadan kullanılmıştır.



Şekil 14. DNA-PKcs ve TAD’nin 7-mer’lik fragmanı ile etkileşimini gösteren 3D yapı (PDB ID: 8OXO, şekil UCSF ChimeraX ile oluşturulmuştur).

PDB 8OXO yapısında TAD’nin Ser15’nin His2872 ve ATP mimiği ANP (fosfoaminofosfonik asit-adenlat ester) ile etkileşirken, Leu14; Phe3049, Gly3051 ve Lys3053 ile, Gln16; Val2696, Leu2900, Pro2901 ve Thr2902 ile, Gln17’nin ise Val2697 ile etkileştiği görülmektedir. HADDOCK 2.4’de aktif amino asit kalıntısı olarak, DNA-PKcs için Ser15 ile etkileşen His2872, TAD’de ise aktif amino asit kalıntısı olarak fosforilasyon dolayısıyla etkileştiği kesin olarak bilinen Ser15 ve Ser37 seçilerek iki ayrı kenetlenme modeli oluşturulmuştur. PDB 8OXO’da etkileştiği görülen diğer amino asit kalıntıları mutasyonlarda etkileşimleri değişebileceği için daha esnek bir model sağlamak amacıyla aktif olarak seçilmemiştir.

3. BULGULAR

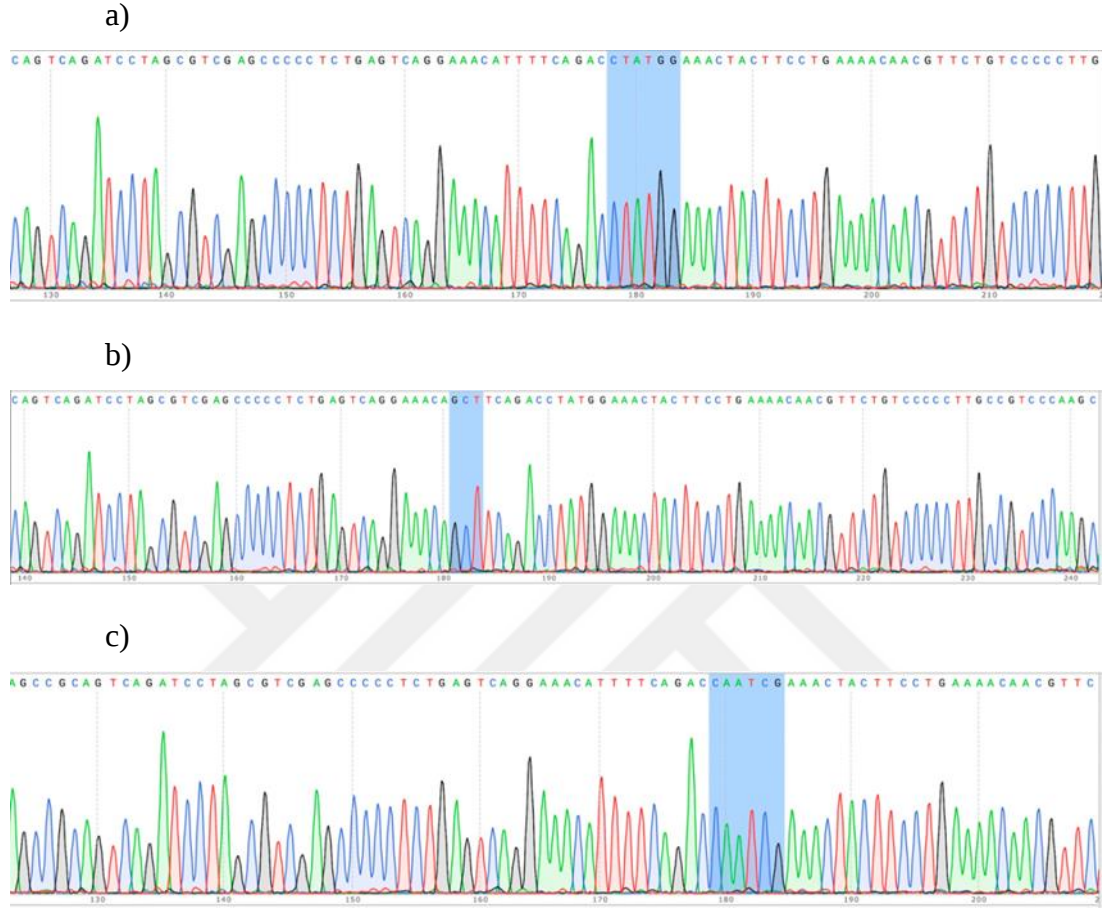
3.1. Vahşi Tür p53 Plazmid Agaroz Jel Elektroforezi

QIAprep Spin Miniprep Kit (#27106) ile izole edilen vahşi tür p53'e ait plazmidin saflığı %10'luk agaroz jel elektroforezi ile belirlendi (Şekil 15). Saflaştırılan vahşi tür p53'e ait plazmid mutasyon işlemleri için kullanıldı. Saflaştırılan plazmidin miktarı nano-drop cihazı ile 260 nm absorbans değerine göre 67,66 ng/μL olarak belirlendi.



Şekil 15. Vahşi tür p53 plazmidine ait agaroz jeli. 1. sırada markör, 2. sırada izole edilen plazmid yer almaktadır.

3.2. Vahşi Tür, Phe19Ala ve Leu22Gln-Trp23Ser Mutantlarının T7 Primer Dizi Analizi



Şekil 16. Vahşi tür ve mutantların T7 primer ile dizi analizleri (a) Vahşi tür, (b) Phe19Ala ve (c) Leu22Gln-Trp23Ser mutantlarının T7 primer ile dizi analizleri.

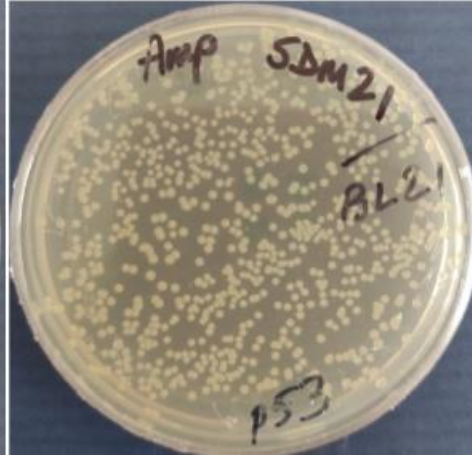
3.3. Phe19Ala ve Leu22Gln-Trp23Ser Mutantlarının Plazmidini İçeren *E. coli* BL21 Kolonileri

Bölge yönlendirilmiş PCR ile oluşturulan mutant plazmidin dizi analizi, T7 primer ile doğrulandıktan (Şekil 16) sonra protein ekspresyonu için *E. coli* BL21 hücrelerine aktarıldı ve Şekil 17’deki mutantlara ait koloniler elde edildi.

a)



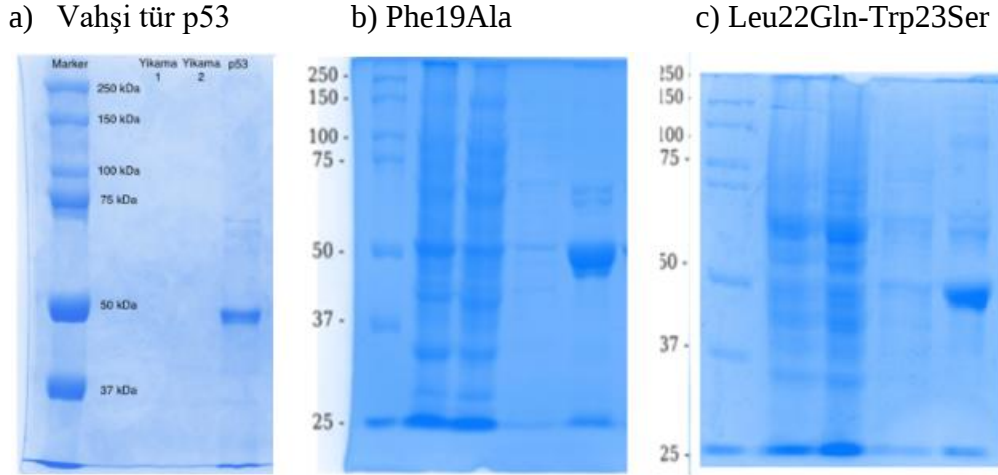
b)



Şekil 17. Mutant plazmidleri içeren E. Coli BL21 koloni görüntüleri. (a) Phe19Ala'ya ait plazmidi içeren E. Coli BL21 kolonileri, (b) Leu22Gln-Trp23Ser'e ait plazmidi içeren E. Coli BL21 kolonileri.

3.4. Vahşi Tür, Phe19Ala ve Leu22Gln-Trp23Ser Mutantlarının Saflaştırma Jel Görüntüleri

Vahşi tür p53, Phe19Ala ve Leu22Gln-Trp23Ser mutanları Ni-NTA afinite rezini kullanılarak ve son aşamada ise diyaliz işlemi uygulanarak saflaştırıldı (Şekil 18). Yıkama aşamasında 25 mM imidazol ve elüsyonda ise 250 mM imidazol içeren tampon çözelti kullanıldı.

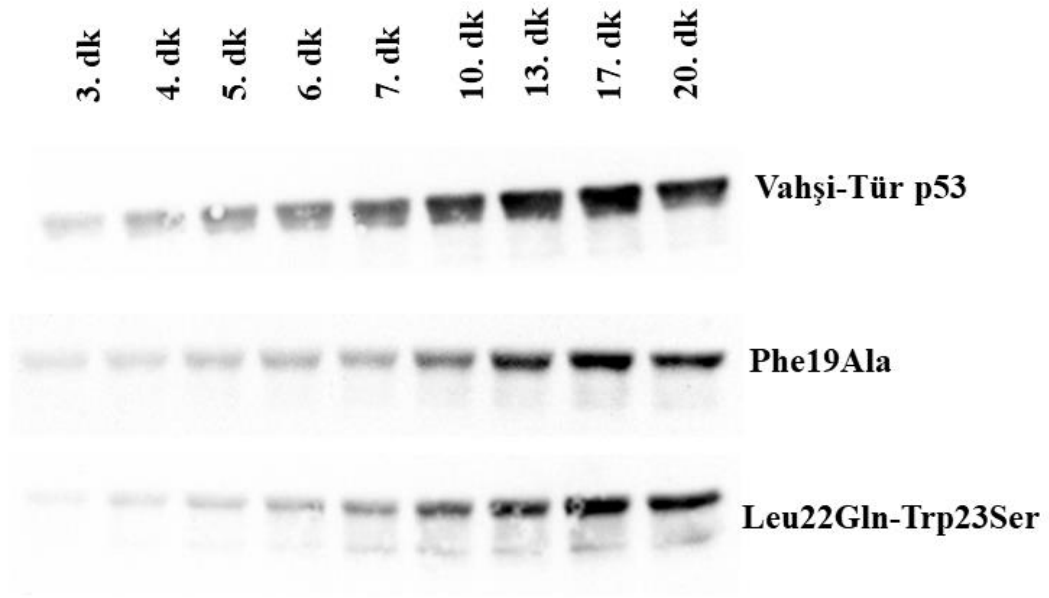


Şekil 18. Vahşi Tür, Phe19Ala ve Leu22Gln-Trp23Ser mutantlarının saflaştırma jelleri. (a) Vahşi tür p53 jeli. (b) Leu22Gln-Trp23Ser mutantının saflaştırılmasına ait SDS jel. (c) Phe19Ala mutantının saflaştırılmasına ait SDS jel (1. sırada markör, 2. sırada lizat, 3. sırada kolona tutunmadan akan lizat, 3. sırada yıkama ve 4. sırada saf protein yer almaktadır.)

Protein saflığı SDS jel elektroforezi ile kontrol edildi (Şekil 18). İmidazolü uzaklaştırmak için saflaştırılan proteinler Thermo Scientific’den temin edilen “snakeskin dialysis tubing” kullanılarak 50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, pH 8,00 tampon çözeltisinde diyaliz işlemi uygulandı. Diyaliz sonrası saf protein derişimi 280 nm’de absorbans ölçülerek belirlendi.

3.5. DNA-PK Fosforilasyonunun Western Blotlama ile Belirlenmesi

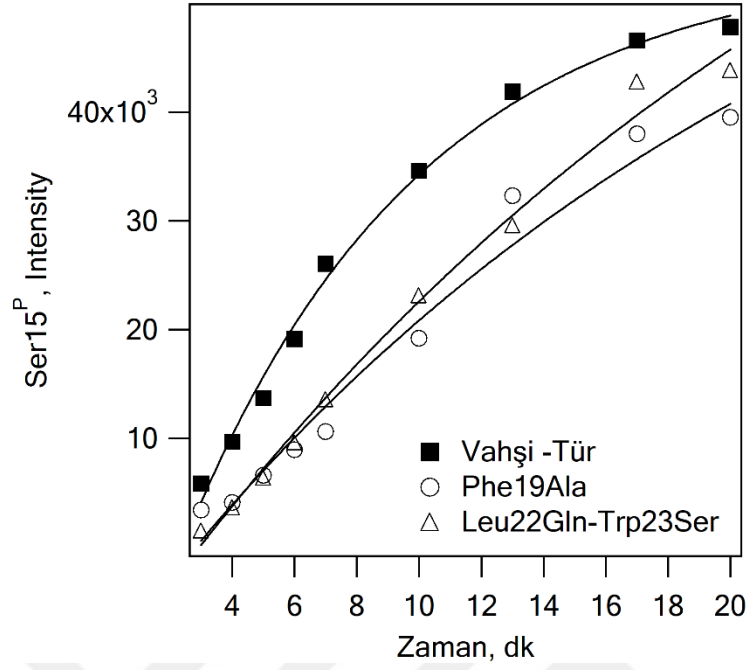
Saflaştırılan Phe19Ala, Leu22Gln-Trp23Ser mutantı ve vahşi tür p53’ün DNA-PK tarafından fosforilasyonu birincil antikor olarak Ser15^P fosfospesifik antikor (Human Phospho-p53 (S15) Antibody #AF1043-SP), ikincil antikor olarak ise HRP-konjuge antikor (Rabbit IgG HRP-conjugated Antibody #HAF008) kullanılarak western blotlama yöntemiyle belirlendi (Şekil 19).



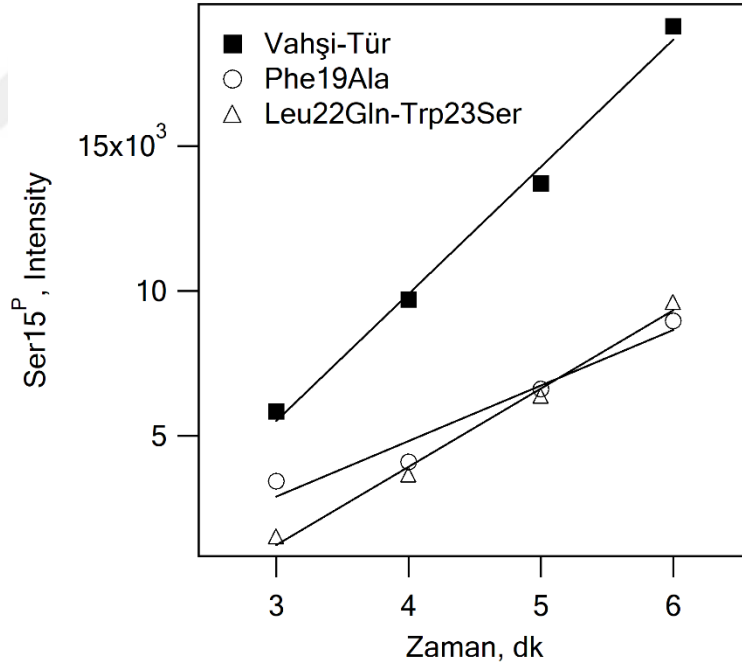
Şekil 19. Vahşi tür p53'ün, Leu22Gln-Trp23Ser ve Phe19Ala mutantının Ser15^P fosfospesifik antikor için western blotlama membran görüntüsü.

Vahşi tür p53, Phe19Ala ve Leu22Gln-Trp23Ser'in Ser15^P fosforilasyon oranını belirlemek için Şekil 19'deki bantların intensity değerlerinin enzimatik reaksiyonun 3-20 dakika ve 3-6 dakika zaman aralıklarına karşı grafikleri oluşturuldu (Şekil 20, a, b). Hem Phe19Ala hem de Leu22Gln-Trp23Ser mutasyonunda vahşi türe göre Ser15 fosforilasyonunda azalma gerçekleşmiş olup Phe19Ala'daki azalma daha fazladır.

a)



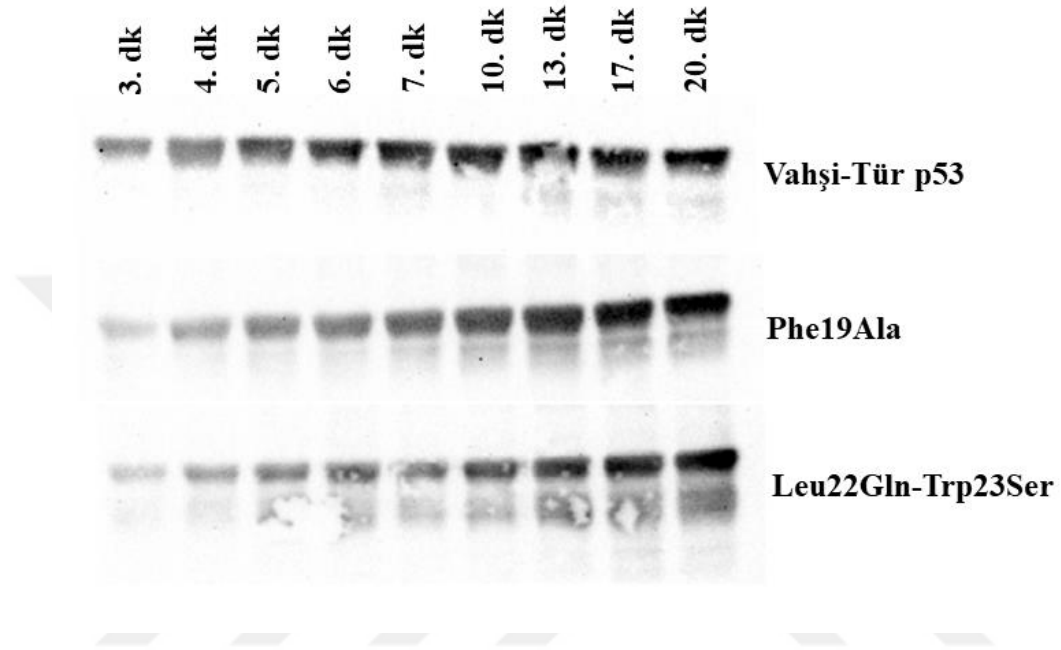
b)



Şekil 20. Vahşi tür p53, Phe19Ala ve Leu22Gln-Trp23Ser'nin zamana karşı Ser15^P fosforilasyon eğrisi. (a) 3-20 dk zaman aralığı Ser15^P fosforilasyon eğrisi, (b) 3-6 dk zaman aralığı Ser15^P fosforilasyon eğrisi.

Benzer şekilde, saflaştırılan Phe19Ala ve Leu22Gln-Trp23Ser mutanları ve vahşi tür p53'ün Ser37 konumunda DNA-PK tarafından fosforilasyonu, birincil antikor

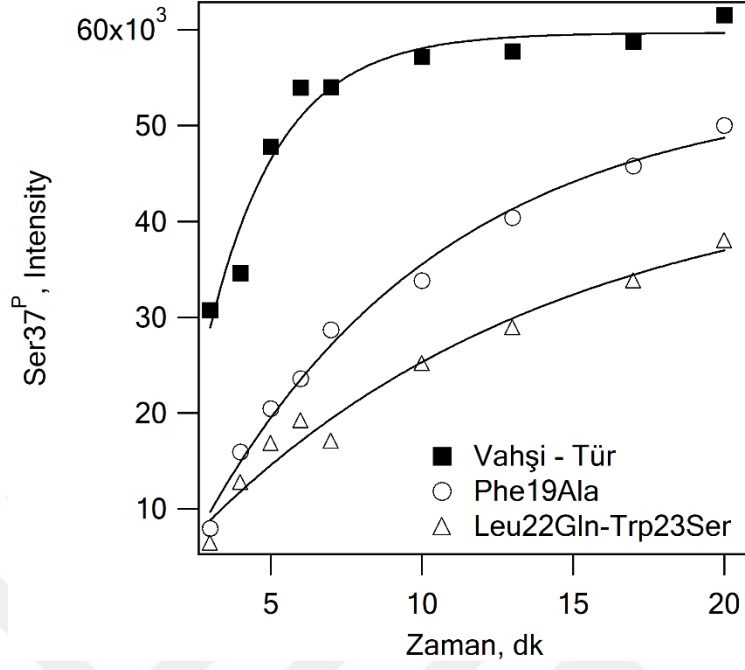
olarak Ser37^P fosfo spesifik antikoru (Human Phospho-p53 (S37) Antibody #AF1043-SP), ikincil antikor olarak ise HPR-konjuge antikoru (Rabbit IgG HRP-conjugated Antibody #HAF008) kullanılarak western blotlama yöntemiyle belirlendi (Şekil 21).



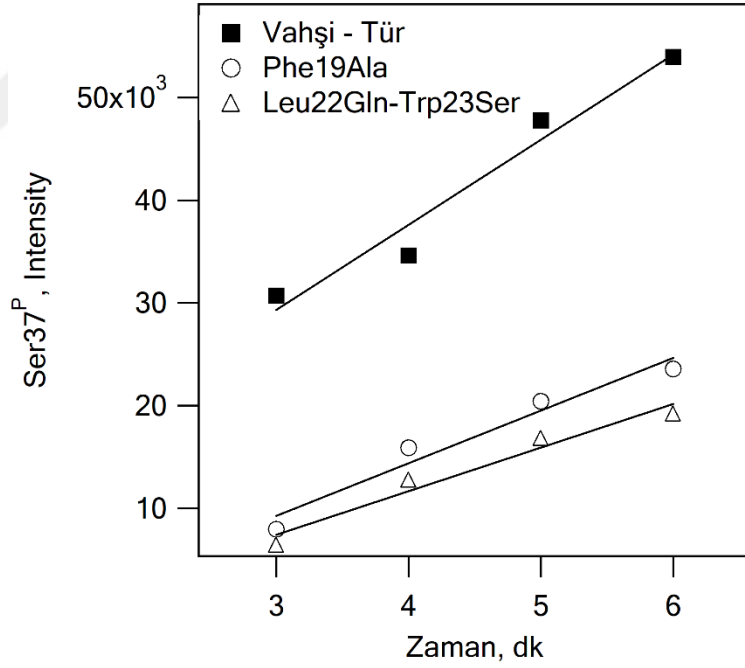
Şekil 21. Vahşi tür p53'ün, Leu22Gln-Trp23Ser ve Phe19Ala mutantının Ser37^P fosfospesifik antikor için western blotlama membran görüntüsü.

Vahşi tür p53, Phe19Ala ve Leu22Gln-Trp23Ser'in Ser37^P fosforilasyon oranını belirlemek için Şekil 21'deki bantların intensity değerlerinin zamana karşı grafiği oluşturuldu (Şekil 22, a). Enzimatik aktivite kıyaslaması doğrusal olan başlangıç zaman dilimi (3-6 dk) ile gerçekleştirildi (Şekil 22, b). Hem Phe19Ala hem de Leu22Gln-Trp23Ser mutasyonunda vahşi türe göre Ser37 fosforilasyonunda azalma gerçekleşmiş olup Leu22Gln-Trp23Ser'deki azalma daha fazladır.

a)

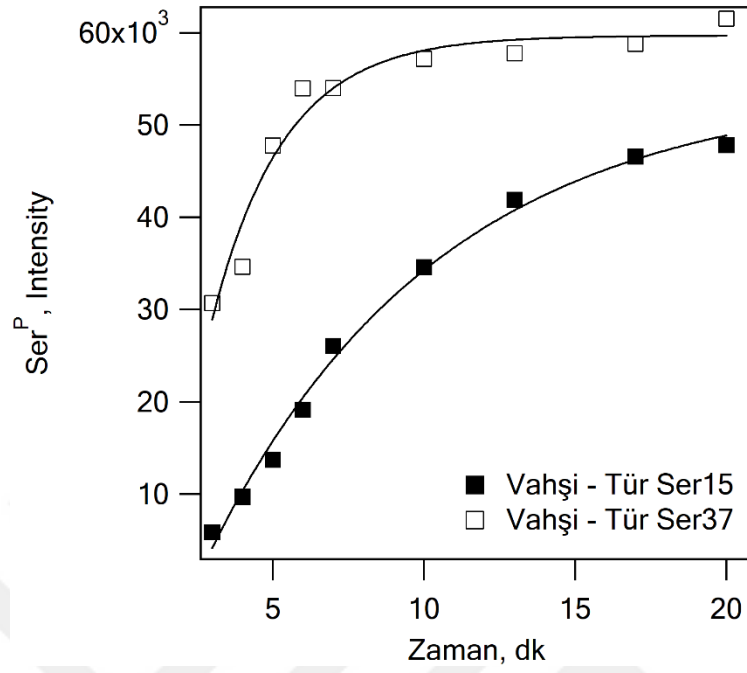


b)

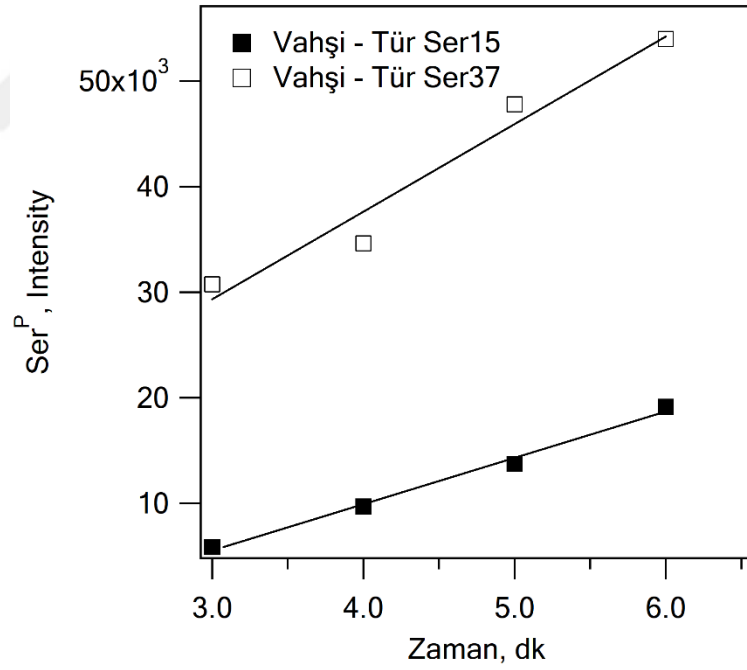


Şekil 22. Vahşi tür p53, Phe19Ala ve Leu22Gln-Trp23Ser'nin zamana karşı Ser37^P fosforilasyon eğrisi. (a) 3-20 dk zaman aralığı Ser37^P fosforilasyon eğrisi, (b) 3-6 dk zaman aralığı Ser37^P fosforilasyon eğrisi.

a)



b)



Şekil 23. Vahşi tür p53’de Ser15 ve Ser37’nin zamana dayalı fosforilasyon eğrisi. a) 3-20 dk zaman aralığı fosforilasyon eğrisi, b) 3-6 dk zaman aralığı fosforilasyon eğrisi.

Şekil 23’deki grafikte vahşi tür p53’ün Ser15 ve Ser37 fosforilasyon oranları kıyaslanmış olup DNA-PK’nın Ser37’yi Ser15’e göre daha hızlı fosforile ettiği belirlenmiştir.

Vahşi tür, Phe19Ala ve Leu22Gln-Trp23Ser mutantlarının aktivitenin doğrusal olarak arttığı 3-6 dk aralığındaki zaman dilimine göre Ser15 ve Ser37 fosforilasyon oranları, bir ünite enzim başına dakikada okunan “Ser^P intensity” cinsinden Tablo 6’da verilmiştir.

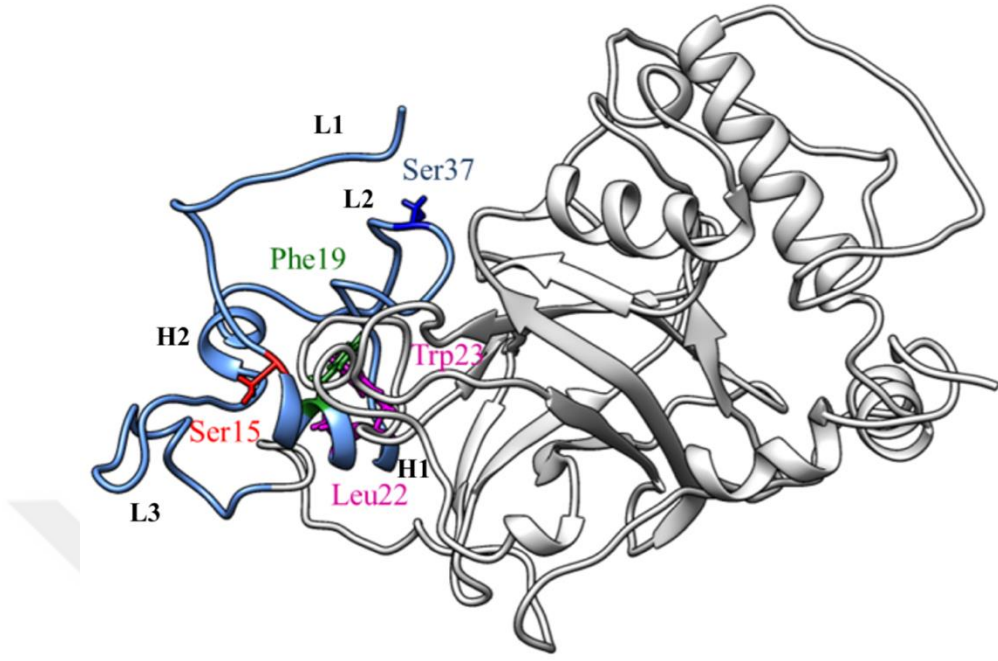
Tablo 6. Vahşi tür ve Phe19Ala, Leu22Gln-Trp23Ser’nin DNA-PK’nın ünitesi başına zamana dayalı Ser^P fosforilasyonu.

Ser ^P	Vahşi - Tür, Ser ^P dk ⁻¹	Phe19Ala Ser ^P dk ⁻¹	Leu22Gln-Trp23Ser Ser ^P dk ⁻¹
Ser15 ^P	87,76 ± 5,26	38,27 ± 6,04	54,02 ± 3,5
Ser37 ^P	165,85 ± 24,2	102,74 ± 15,52	84,80 ± 12,50

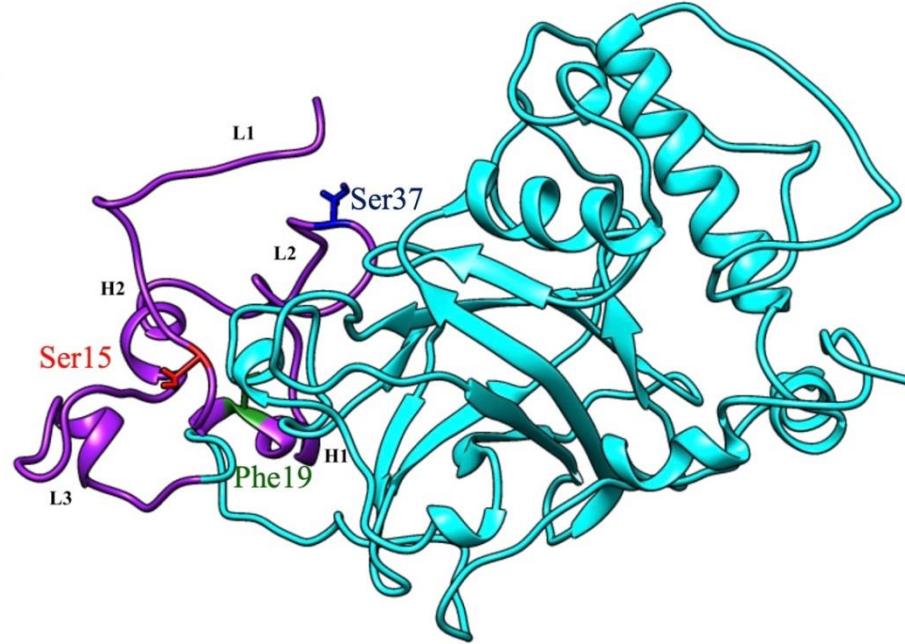
3.6. Mutasyonların İkincil Yapı İçeriğine Etkisi

I-TASSER sunucusundan vahşi tür ve mutasyonlar için elde edilen 3D yapı modeli, Chimera programında örtüştürülerek kıyaslandığında her iki mutasyonun da TAD’de konformasyonel değişime neden olduğu gözlemlendi (Şekil 24, a, b, c, d, e). Şekil 13’de L3 olarak adlandırılan bölgede, Phe19Ala’da 51-53 amino asit aralığında, Leu22Gln-Trp23Ser’de ise 51-54 amino asit aralığında vahşi tür TAD’de olmayan bir kısa heliks yapısının oluştuğu belirlendi (Şekil 25). Phe19Ala’da, L3’ün heliks katlanmasına ek olarak Şekil 13’de H1 olarak gösterilen alfa heliksin katlanmasının değiştiği de gözlemlendi.

a)

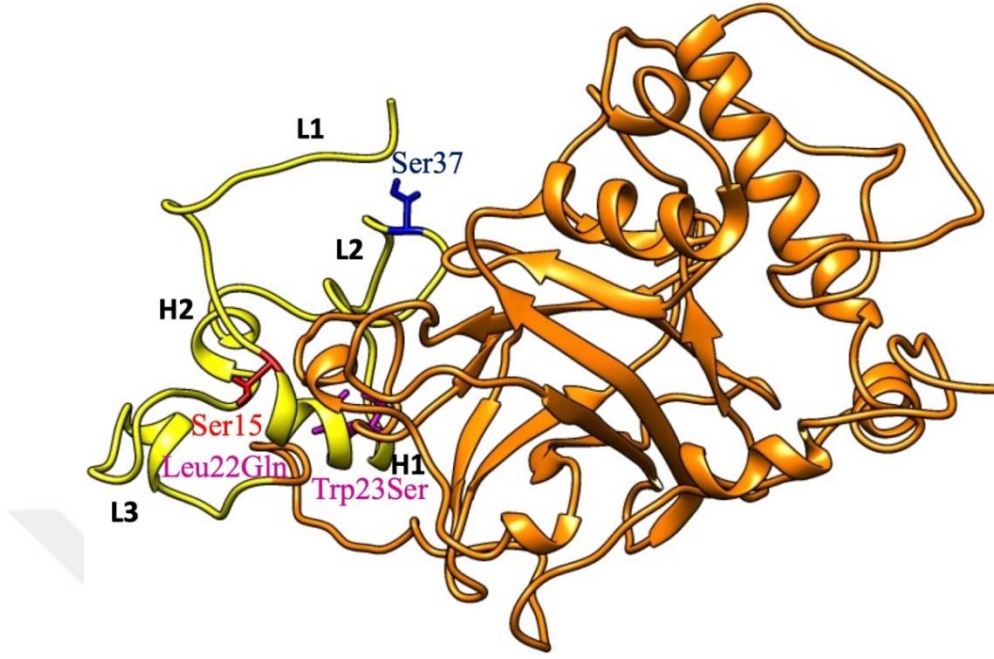


b)

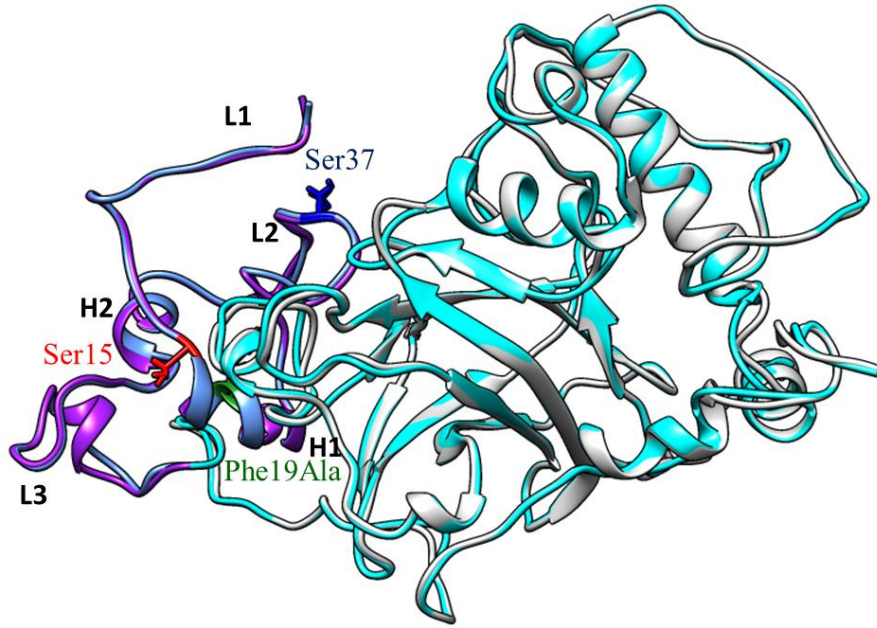


Şekil 24. 3D yapı tahminleri. (a)Vahşi tür 3D yapı modeli, (b) Phe19Ala 3D yapı modeli, (c) Leu22Gln-Trp23Ser 3D yapı modeli, (d) Vahşi tür ve Phe19Ala örtüşmesi, (e) Leu22Gln-Trp23Ser ve vahşi tür örtüşmesi, (f) Phe19Ala ve Leu22Gln-Trp23Ser örtüşmesi (Şekiller UCSF Chimera ile oluşturulmuştur).

c)

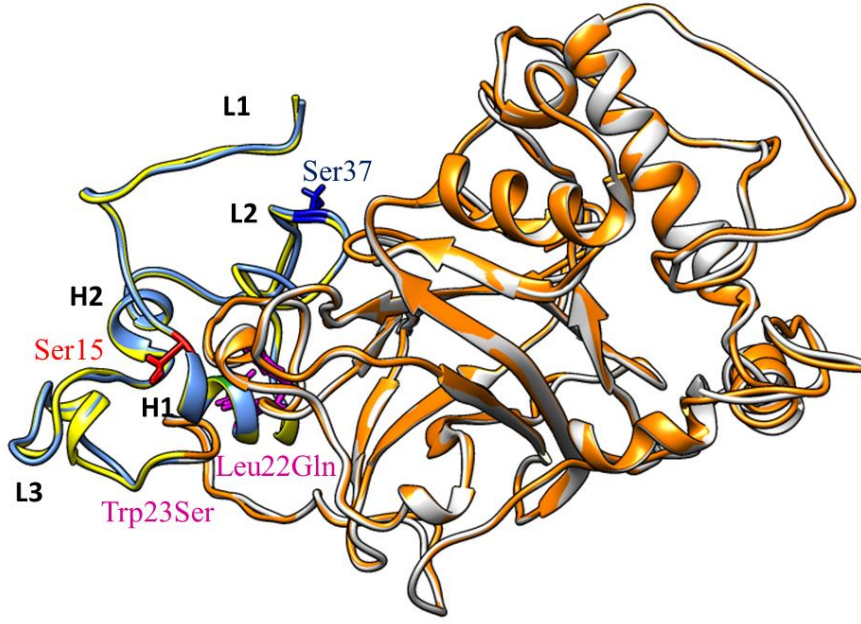


d)

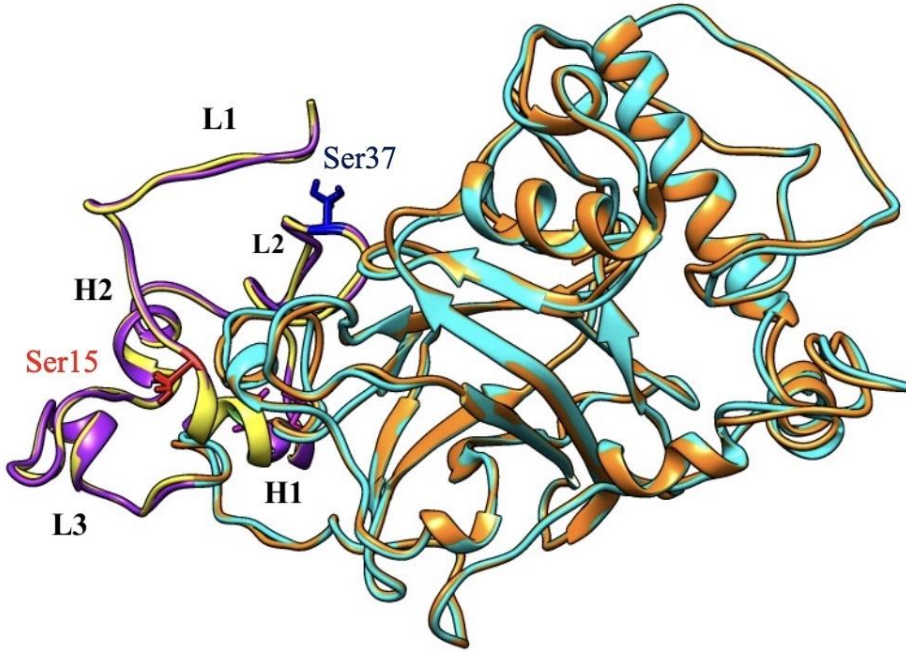


Şekil 24 (Devam). 3D yapı tahminleri. (a)Vahşi tür 3D yapı modeli, (b) Phe19Ala 3D yapı modeli, (c) Leu22Gln-Trp23Ser 3D yapı modeli, (d) Vahşi tür ve Phe19Ala örtüşmesi, (e) Vahşi – Tür ve Leu22Gln-Trp23Ser örtüşmesi f) Phe19Ala ve Leu22Gln-Trp23Ser örtüşmesi (Şekiller UCSF Chimera ile oluşturulmuştur).

e)



f)



Şekil 24 (Devam). 3D yapı tahminleri. (a)Vahşi tür 3D yapı modeli, (b) Phe19Ala 3D yapı modeli, (c) Leu22Gln-Trp23Ser 3D yapı modeli, (d) Vahşi tür ve Phe19Ala örtüşmesi, (e) Vahşi – Tür ve Leu22Gln-Trp23Ser örtüşmesi f) Phe19Ala ve Leu22Gln-Trp23Ser örtüşmesi (Şekiller UCSF Chimera ile oluşturulmuştur).

VT
Dizilim : ¹MEEPQSDPSVEPPL**S**QETFSDLWKLLPENNVLSPLP**S**QAMDDLMLSPDDIEQWFTEDPGPDEA⁶³
Tahmin : ¹CCCCCCCCCCCCCCCC**HHHHHHHHHH**CCCCCCCCCCCCCCCC**HHHHH**CCCCCCCCCCCCCCCC⁶³

F19A
Dizilim : ¹MEEPQSDPSVEPPL**S**QET**A**SDLWKLLPENNVLSPLP**S**QAMDDLMLSPDDIEQWFTEDPGPDEA⁶³
Tahmin : ¹CCCCCCCCCCCCCCCC**HHHHHHHHHH**CCCCCCCCCCCCCCCC**HHHH**CCCC**HHH**CCCCCCCC⁶³

L22Q-W23S
Dizilim : ¹MEEPQSDPSVEPPL**S**QETFS**Q**SKLLPENNVLSPLP**S**QAMDDLMLSPDDIEQWFTEDPGPDEA⁶³
Tahmin : ¹CCCCCCCCCCCCCCCC**HHHHHHHH**CCCCCCCCCCCCCCCC**HHH**CCCC**HHH**CCCCCCCC⁶³

H:Heliks, C: Coil

Şekil 25. I-TASSER'in oluşturduğu Vahşi tür p53, Phe19Ala ve Leu22Gln-Trp23Ser'in ikincil yapı içeriği ve dizilimleri (S: fosforilasyona uğrayan Ser15 ve Ser37 amino asit kalıntıları, A: Phe19, QS: Gln22-Ser23).

3.7. Mutasyonların DNA-PKcs ile TAD'nin Etkileşimine Etkisi

Vahşi tür, Phe19Ala ve Leu22Gln-Trp23Ser'in DNA-PKcs ile HADDOCK 2.4 tarafından hesaplanan en olası etkileşim enerjisi parametreleri Tablo 7 'da verilmiştir. Hem yan zincirler hem de ana zincir ile gerçekleşen maksimum 4,00 Å'luk mesafeler dikkate alınarak etkileşimde yer alan amino asit kalıntıları belirlenmiş ve listesi Tablo 7'de verilmiştir. Ayrıca, TAD dizilimlerinde DNA-PK ile etkileşime giren TAD amino asit kalıntılarının dizilimdeki yerleri Şekil 26'de gösterilmiştir. HADDOCK 2.4'ün oluşturduğu DNA-PKcs - TAD etkileşim modelleri ve etkileşimdeki vahşi türle olan konformasyonel farklılıkları göstermek için bu modellerin vahşi türle örtüşmesi Şekil 27 ve Şekil 28'de verilmiştir.

HADDOCK 2.4'de Ser15 ve Ser37'ye göre elde edilen moleküler kenetlenme sonuçlarına göre hem DNA-PKcs'de hem de TAD'de etkileşime giren amino asit kalıntılarının dizilimdeki konumları, sırasıyla Tablo 8 ve 9'de verilmiş olup her üç varyantta da etkileşime giren amino asit kalıntıları koyu olarak gösterilmiştir.

Ser15
VT MEEPQSDPSVEPPLSQETASDLWKLLPENNVLSPPLSQAMDDLMLSPDDIEQWFTEDPGPDEAPRMPEAAPRV
F19A MEEPQSDPSVEPPLSQETASDLWKLLPENNVLSPPLSQAMDDLMLSPDDIEQWFTEDPGPDEAPRMPEAAPRV
L22Q-W23S MEEPQSDPSVEPPLSQETFSQSKLLPENNVLSPPLSQAMDDLMLSPDDIEQWFTEDPGPDEAPRMPEAAPRV

Ser37
VT MEEPQSDPSVEPPLSQETASDLWKLLPENNVLSPPLSQAMDDLMLSPDDIEQWFTEDPGPDEAPRMPEAAPRV
F19A MEEPQSDPSVEPPLSQETASDLWKLLPENNVLSPPLSQAMDDLMLSPDDIEQWFTEDPGPDEAPRMPEAAPRV
L22Q-W23S MEEPQSDPSVEPPLSQETFSQSKLLPENNVLSPPLSQAMDDLMLSPDDIEQWFTEDPGPDEAPRMPEAAPRV

Şekil 26. Ser15 ve Ser37’ye göre oluşturulan kenetlenme modelinde, TAD’nin DNA-PKcs ile etkileşime giren amino asit kalıntılarını gösteren dizilimler. VT; vahşi tür TAD, gri vurgular etkileşimde bulunan amino asit kalıntıları ve koyu ile gösterilenler hem vahşi tür hem de her iki mutant da etkileşime giren amino asit kalıntılarıdır.



Tablo 7. HADDOCK 2.4 ile tahmin edilen en olası etkileşim için hesaplanan parametreler.

	WT	Phe19Ala	Leu22Gln-Trp23Ser
HADDOCK Score	-89.7 +/- 7.3* -93.6 +/- 2.6 [#]	-89.5 +/- 2.0* -81.6 +/- 2.2	-94.0 +/- 4.4* -74.7 +/- 5.0 [#]
RMSD from the overall lowest-energy structure	6.0 +/- 0.1* 0.7 +/- 0.8 [#]	5.5 +/- 0.2* 3.9 +/- 0.1 [#]	5.6 +/- 0.1* 5.2 +/- 0.2 [#]
Van der Waals energy	-31.5 +/- 7.8* -42.1 +/- 10.1 [#]	-40.6 +/- 5.0* -43.8 +/- 3.7 [#]	-38.8 +/- 7.4* -33.9 +/- 2.5 [#]
Electrostatic energy	-327.4 +/- 95.3* -236.3 +/- 70.4 [#]	-177.8 +/- 27.9* -162.9 +/- 17.9 [#]	-265.0 +/- 38.7* -183.8 +/- 30.8 [#]
Desolvation energy	3.3 +/- 4.8* -4.9 +/- 6.9 [#]	-15.1 +/- 1.6* -5.8 +/- 2.9 [#]	-4.2 +/- 4.1* -4.9 +/- 3.4 [#]
Restraints violation energy	39.7 +/- 1.6* 6.2 +/- 0.4 [#]	17.8 +/- 18.7* 6.7 +/- 0.3 [#]	19.9 +/- 13.2* 8.0 +/- 0.9 [#]
Buried Surface Area	1753.1 +/- 175.3* 1594.2 +/- 155.8 [#]	1732.0 +/- 102.8* 1642.6 +/- 51.5 [#]	1849.0 +/- 99.1* 1399.8 +/- 74.5 [#]

*Ser15 HADDOCK 2.4’de aktif amino asit kalıntısı olarak gösterilmiştir.

[#]Ser37 HADDOCK 2.4’de aktif amino asit kalıntısı olarak gösterilmiştir.

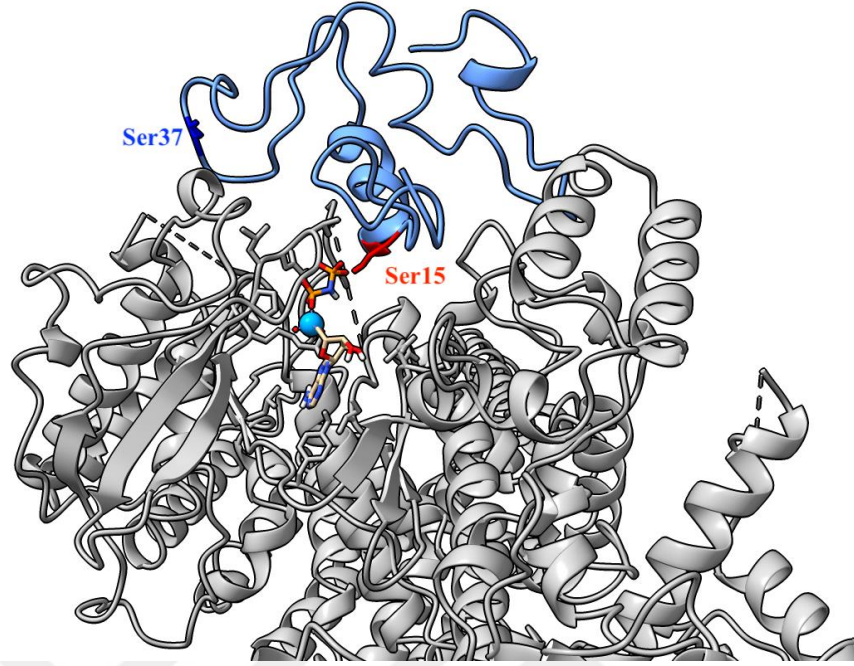
Tablo 8. Ser15'e göre HADDOCK 2.4'den elde edilen yapılarda etkileşime giren amino asit kalıntıları.

DNA-PKcs	Vahşi tür	Phe19Ala	Leu22Gln- Trp23Ser
Q2637	X	P8	X
W2638	X	X	1M
K2639	P8, E11	E11, P12, P13, L14	E11, P12, L14
T2640	X	S6, E11	X
Q2641	X	X	E2
G2695	X	X	16Q
V2696	E11, Q16	S15, E56, D57	S15
N2697	E17	X	X
R2719	Q16, 34P	P58, G59, D61	X
N2783	X	X	K24
F2799	X	L35	K24
Q2802	P4	X	D21, K24
K2803	X	L35	K24
M2806	X	W23	X
E2807	X	X	V73
K2810	D56, E68	L25	E68, A69
K2816	G59	X	X
H2872	X	Q16	E17
L2895	E17	X	X
L2900	E17	X	P60
P2901	P58, D61	D21, K24	P60
T2902	P58, G59, P60	X	X
F2958	X	P60	X
D2959	X	P60	X
R3047	P60	X	X
F3049	L14	S20	X
P3050	X	X	D21
K3053	E3	X	X

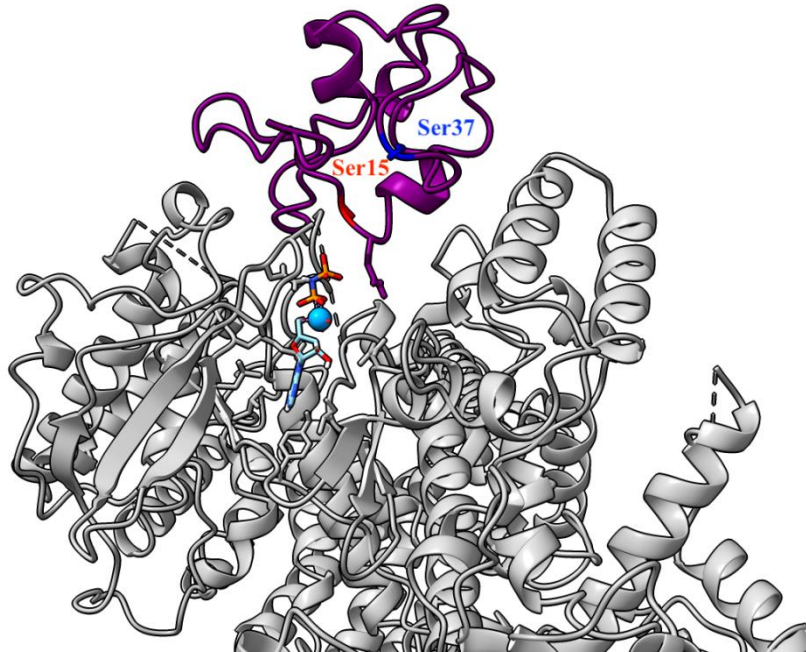
Tablo 9. Ser37'e göre HADDOCK 2.4'den elde edilen yapılarda etkileşime giren amino asit kalıntıları.

DNA-PKcs	Vahşi tür	Phe19Ala	Leu22Gln- Trp23Ser
T2636	X	P47	X
K2639	D41	M44, L45	E11, L14
T2640	M44	X	X
R2642	M44	D41, D42, M44	X
G2694	D41	D41	X
G2695	D41	X	X
N2697	X	X	Q16
R2719	X	X	S15, Q16, E17
R2763	X	X	E17
V2781	L35, P36	X	X
N2783	P34, L35, P36	X	X
A2798	P36	X	X
F2799	W23, K24, P34	L35	Q38
Q2802	S37, M40	L35	S37, Q38
K2803	K24	X	X
M2806	X	L35	Q38, D41, D42
Q2809	X	X	D41
K2810	X	X	D41
D2870	Q38	M1, E2, Q38	P36
H2872	X	E2	P36
V2873	P36	X	X
V2892	X	M1	X
L2900	X	M1	X
P2901	X	E3	X
F3049	Q38	E2, S37	L35, P36, S37, A39
G3050	X	S37	X
G3051	X	X	S37
W3052	X	E2	X
K3053	P36, S37, Q38	S37	S37

a)

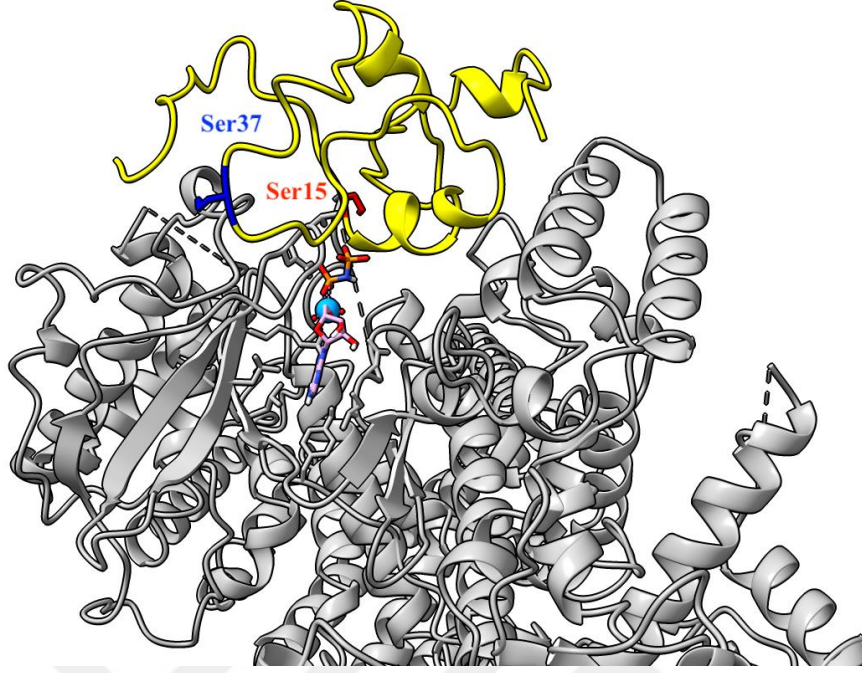


b)

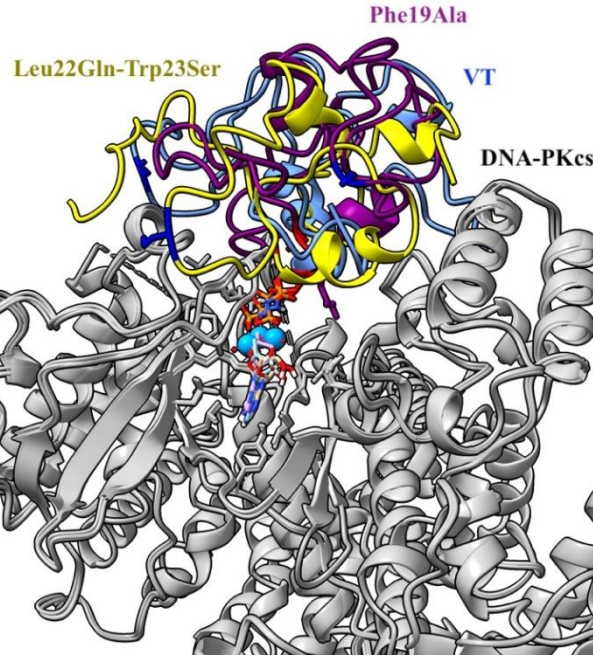


Şekil 27. HADDOCK 2.4'ün Ser15'e göre oluşturduğu en olası (DNA-PKcs) -TAD etkileşim modelleri. (a) DNA-PKcs, VT-TAD modeli, (b) DNA-PKcs, Phe19Ala modeli, (c) DNA-PKcs, Leu22Gln-Trp23Ser modeli, (d) DNA-PKcs, Phe19Ala, Leu22Gln-Trp23Ser modeli (Şekiller UCSF ChimeraX ile oluşturulmuştur).

c)

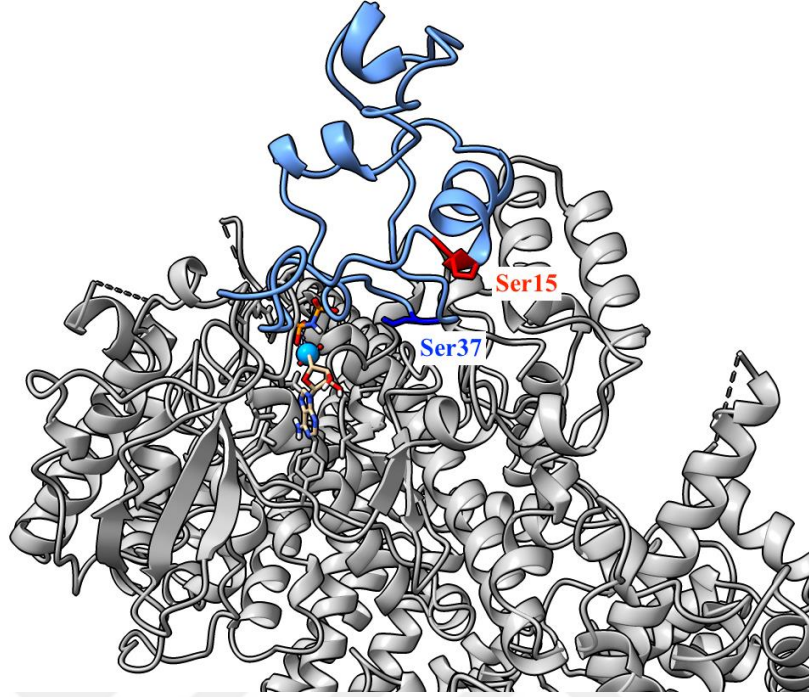


d)

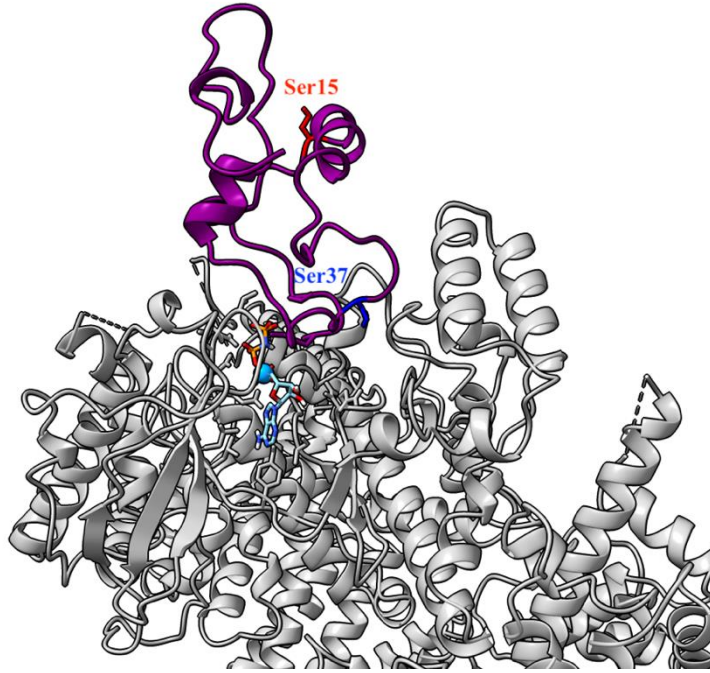


Şekil 27 (Devam). HADDOCK 2.4'ün Ser15'e göre oluşturduğu en olası (DNA-PKcs) - TAD etkileşim modelleri. (a) DNA-PKcs, VT-TAD modeli, (b) DNA-PKcs, Phe19Ala modeli, (c) DNA-PKcs, Leu22Gln-Trp23Ser modeli, (d) DNA-PKcs, Phe19Ala, Leu22Gln-Trp23Ser modeli (Şekiller UCSF ChimeraX ile oluşturulmuştur).

a)

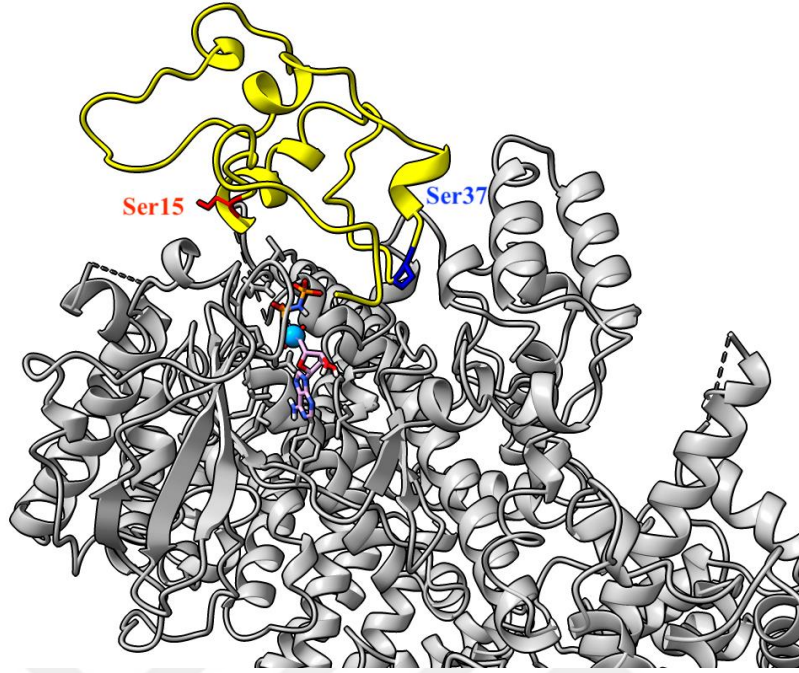


b)

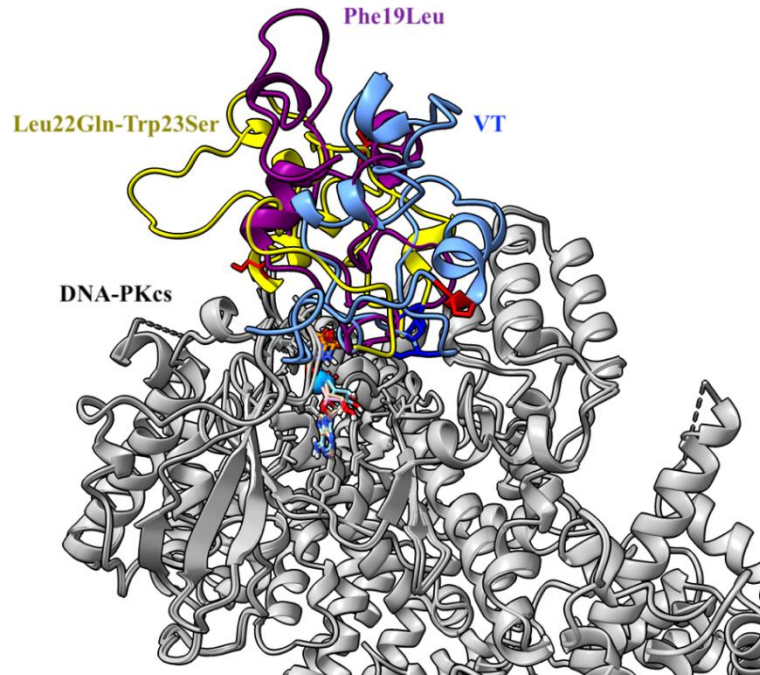


Şekil 28. HADDOCK 2.4'ün Ser37'ye göre oluşturduğu en olası (DNA-PKcs) –TAD etkileşim modelleri. (a) DNA-Pkcs, VT-TAD modeli, (b) DNA-PKcs, Phe19Ala modeli, (c) DNA-PKcs, Leu22Gln-Trp23Ser modeli, (d) DNA-PKcs, Phe19Ala, Leu22Gln-Trp23Ser modeli (Şekiller UCSF ChimeraX ile oluşturulmuştur).

c)



d)



Şekil 28 (Devam). HADDOCK 2.4'ün Ser37'ye göre oluşturduğu en olası (DNA-PKcs) - TAD etkileşim modelleri. (a) DNA-Pkcs, VT-TAD modeli, (b) DNA-PKcs, Phe19Ala modeli, (c) DNA-PKcs, Leu22Gln-Trp23Ser modeli, (d) DNA-PKcs, Phe19Ala, Leu22Gln-Trp23Ser modeli (Şekiller UCSF ChimeraX ile oluşturulmuştur).

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir:

- Ser15 fosforilasyonunu vahşi türe kıyasla Phe19Ala mutasyonunun yaklaşık 2,3 kat azalttığı, Leu22Gln-Trp23Ser mutantının ise vahşi türe kıyasla 1,6 kat azalttığı belirlendi.
- Ser37 fosforilasyonunu Phe19Ala mutantının vahşi türe kıyasla yaklaşık 1,6 kat azalttığı, Leu22Gln-Trp23Ser mutantı ise vahşi türe kıyasla yaklaşık 2,0 kat azalttığı belirlendi.
- Vahşi tür p53'ün Ser15 ve Ser37'nin DNA-PK tarafından fosforilasyonu kıyaslandığında ise DNA-PK'nın Ser37'yi 1,9 kat daha hızlı fosforile ettiği belirlendi.
- Phe19Ala ve Leu22Gln-Trp23Ser mutantlarının konformasyonel değişime neden olduğu I-TASSER sunucusu ile öngörüldü. Buna göre, Phe19Ala varyantında H1 heliksinde bir kısalma gözlemlenirken, L3'de vahşi tür TAD'de olmayan yeni kısa bir heliks oluşumu belirlendi. Leu22Gln-Trp23Ser mutantında ise I-TASSER sunucusu verilerine göre H1 vahşi türe kıyasla kısalmış olup, vahşi tür TAD'deki L3 bu varyantta da kısa bir heliks formuna katlanmıştır.
- Mutasyonların neden olduğu konformasyonel değişimin (DNA-PK) - TAD etkileşiminin oryantasyonunu /konformasyonunu değiştirdiği HADDOCK 2.4 ile belirlendi.
- HADDOCK 2.4 Ser15'e göre elde edilen kenetleme sonuçlarına göre; DNA-PK'nın Lys2639, Val2696, Lys2810 ve Pro2901'inin hem vahşi tür hem de her iki mutantla etkileştiği ancak etkileşimin farklı amino asit kalıntıları ile gerçekleştiği belirlendi.
- Ser37'ye göre elde edilen kenetlenmede ise DNA-PK'nın Lys2639, Phe2799, Gln2802, Asp2870, Phe3049 ve Lys3053 amino asit kalıntılarının hem vahşi tür hem de mutant TAD'ler ile etkileştiği ancak etkileşimin farklı amino asit kalıntıları ile gerçekleştiği belirlendi.

4. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Tümör baskılayıcı protein olarak da bilinen p53 proteinini kodlayan *TP53* geni insan kanserlerinde en sık mutasyona uğrayan genlerden biri olarak rapor edilmektedir. Bu mutasyonların çoğu DBD domaininde olmakla birlikte diğer kısımlarda da rapor edilen mutasyonlar bulunmaktadır. Gerçekleştirilen bu çalışmada TAD bölgesinde Ser15 ve Ser 37 fosforilasyon bölgesine yakın konumda yer alan ve p53 - HDM2 etkileşimi için önemli olduğu rapor edilen Phe19, Leu22 ve Trp23 amino asit kalıntılarının, Ser15 ve Ser 37 fosforilasyonuna katkısının belirlenebilmesi amacıyla bu bölgede uygun primerler kullanılarak bölge yönlendirilmiş mutasyon ile Phe19Ala ve Leu22Gln-Trp23Ser mutasyonları oluşturuldu. Mutant plazmidlerin oluşumu, T7 primeri kullanılarak dizi analizi ile doğrulandı (Şekil 16). Protein ekspresyonu için dizilimi doğrulanan mutant plazmitler *E. Coli* BL21 hücrelerine ısı şoku yöntemiyle transform edildi ve transformasyon ampisilin içeren LB-agar petri kaplarında koloni oluşumuyla doğrulandı (Şekil 17). *E. Coli* BL21 hücrelerinde ekspres edilen p53 afinite kromatografisi ile saflaştırıldı (Şekil 18). Vahşi tür TAD ve mutantların Ser15 ve Ser37 fosforilasyonu ilgili antikolar ile western blotlama yöntemiyle belirlendi (Şekil 19, 21). DNA-PK'nın ünitesi başına 3-6 dk.'lik zaman dilimini kapsayan başlangıç hızı verilerine göre mutantların hem Ser15 hem de Ser37 fosforilasyon oranını azalttığı belirlendi (Tablo 6). Ser15 fosforilasyonunu vahşi türe kıyasla Phe19Ala mutasyonunun yaklaşık 2,3 kat, Leu22Gln-Trp23Ser mutantının ise 1,6 kat azalttığı belirlendi. Ser37 fosforilasyonunu ise Phe19Ala mutantının vahşi türe kıyasla yaklaşık 1,6 kat, 2,0 kat azalttığı belirlendi. Vahşi türün, Ser15 ve Ser37 fosforilasyonu kıyaslandığında ise DNA-PK'nın Ser37'yi 1,9 kat daha hızlı fosforile ettiği belirlendi (Tablo 6).

Mutasyonların neden olduğu fosforilasyondaki azalmanın nedeninin konformasyonel değişimler olup olmadığı I-TASSER sunucusu ile test edildi. I-TASSER 3D yapı tahmini verileri, her iki mutant varyantının konformasyonel değişime neden olduğunu ve vahşi türe kıyasla ikincil yapı içeriğinde artış olduğu göstermiştir. Özellikle Phe19Ala varyantında H1'de bir azalma gözlemlenirken L3'de kısa bir heliks oluşumu görülmektedir (Şekil 24, b). Leu22Gln-Trp23Ser mutantında ise H1 vahşi türdeki gibi olup L3 bu varyantda da kısa bir heliks formuna katlanmıştır (Şekil

24, c). L3'nin Ser15 fosforilasyon bölgesine yakın olması sebebiyle bu bölgede meydana gelen konformasyonel değişimin TAD - (DNA-PKcs) etkileşimini etkilemesi muhtemeldir. Yine Ser15'e yakın olan H1 heliksi Phe19Ala'da değişime uğramış olup etkin bir fosforilasyon için gerekli olan TAD - (DNA-PKcs) etkileşimini etkilemiş olması beklenmektedir. Phe19Ala ve Leu22Gln-Trp23Ser varyantları birbiri ile kıyaslandığında ise Phe19Ala'nın TAD'de daha fazla konformasyonel değişime neden olduğu görülmektedir (Şekil 24, f).

Proteinlerdeki konformasyonel değişimler, protein-protein etkileşimlerini etkileyen bir durumdur. I-TASSER sunucusu ile konformasyonel değişime uğradığı öngörülen Phe19Ala ve Leu22Gln-Trp23Ser mutantlarının DNA-PKcs ile etkileşimlerine etkisi HADDOCK 2.4 moleküler kenetlenme sunucusu kullanılarak belirlendi. HADDOCK 2.4 sonuçlarına göre; Lys2639, Val2696, Lys2810 ve Pro2901 hem vahşi tür hem de her iki mutantla etkileşmektedir. Ancak etkileşime giren amino asit kalıntıları Lys2639 - Glu11 etkileşimi hariç farklı amino asitlerle gerçekleşmiştir. TAD'de ise Glu11, Leu14 ve Gln16 etkileşime girdikleri amino asit kalıntıları farklı olmakla birlikte her üç varyantta da ortak olarak etkileşmektedir. Dolayısıyla, DNA-PKcs etkileşiminde bu üç amino asit kalıntısının önemli olduğu öngörülmüştür. Ser37'ye göre elde edilen kenetlenmede ise DNA-PK'nın Lys2639, Phe2799, Gln2802, Asp2870, Phe3049 ve Lys3053 amino asit kalıntılarıyla hem vahşi tür hem de mutant TAD'ler etkileşmektedir. Üç varyantta da ortak etkileşim Lys3053 ve Ser37 arasında gerçekleşmiştir. TAD'de ise Leu35, Ser37, Gln38 ve Asp41, vahşi tür ve mutantlarla etkileşmekte olup Ser37 dışında etkileştikleri amino asit kalıntıları farklılık göstermektedir. Bu sebeple, bahsedilen bu dört amino asit kalıntısının TAD'nin DNA-PKcs ile etkileşiminde önemli olduğu öngörülmüştür. TAD - (DNA-PKcs) etkileşiminde yer alan amino asit kalıntılarına ek olarak vahşi tür ve mutantların etkileştiği yüzeylerin büyüklüğü kıyaslandığında da farklılıklar gözlemlendi. Etkileşim yüzey alanı, Ser15 için 1732,0-1849,0 aralığında, Ser37 için ise 1399,8-1642,6 aralığında olduğu belirlendi (Tablo 7). Ser15 eşleşmesinin tüm varyantlarda Ser37'ye kıyasla görece daha fazla alan kapladığı, Ser37 eşleşmesinde Leu22Gln-Trp23Ser mutantının kapladığı alanın Ser15 eşleşmesinde en fazla, Ser37 eşleşmesinde ise en az olduğu belirlendi. Tablo 7'de ayrıca etkileşimin kimyasal

doğasının da değiştiği, özellikle elektrostatik etkileşimlerin mutasyonlarda azaldığı belirlendi.

Bu mutantlarla daha önce gerçekleştirilen çalışmalar, p53'ün HDM2 ile etkileşiminin azalmasına ve buna bağlı olarak hücresel düzeyde stabilize olmasına rağmen, mutantların p53'ün transkripsiyon faktörü işlevini tam olarak yerine getiremediğini göstermiştir (Chang vd., 1995; Venot vd., 1999; Zhu vd., 1998, 2000; Jimenez vd., 2000; Chao vd., 2000; Johnson vd., 2005; Brady vd., 2011; Vaughan vd. 2021). Mutantların neden olduğu hücresel stabilizasyona rağmen gözlemlenen işlev kaybı, bu mutantların HDM2 etkileşimini etkilemek dışında başka biyokimyasal sonuçlarının olduğunu önermektedir. p53'ün transkripsiyon faktörü işlevi için stabilize olmasının yanı sıra hem DNA ile etkileşmesi hem de TAD domaininin CBP/p300 koaktivatörler ile etkileşmesi gerekir. TAD - CBP/p300 etkileşiminin mutasyon veya kimyasal modifikasyonlarla ile bloke edilmesinin p53'ün transaktivasyonunu engellemesi beklenir. Dolayısıyla, bu çalışmada elde edilen verilerden p53'deki işlev kaybının fosforilasyondaki azalmaya bağlı olarak TAD - CBP/p300 etkileşiminin etkilenmesi olabileceğini öngörmektedir.

5. ÖNERİLER

Bu tezde çalışılan Phe19Ala ve Leu22Gln-Trp23Ser mutasyonlarının DNA-PK ile aynı sınıfa giren ATM ve ATR kinazları tarafından fosforilasyonun nasıl etkilendiği belirlenebilir. Ayrıca, oluşturulan mutasyonların I-TASSER sunucusu ile tahmin edilen 3D yapı tahmininde, TAD domaininin ikincil yapı içeriğini arttırdığı belirlenmişti ve bu veri deneysel olarak proteinlerin ikincil yapı analizlerinde kullanılan CD (Dairesel Dikroizm) Spektroskopisi ile belirlenebilir.



KAYNAKÇA

- Abdel-Fatah, T. M., Arora, A., Moseley, P., Coveney, C., Perry, C., Johnson, K. ve Madhusudan, S. (2014). ATM, ATR and DNA-PKcs expressions correlate to adverse clinical outcomes in epithelial ovarian cancers. *BBA clinical*, 2, 10-17.
- Ashcroft, M., Kubbutat, M. H., ve Vousden, K. H. (1999). Regulation of p53 function and stability by phosphorylation. *Molecular and cellular biology*, 19(3), 1751-1758.
- Ashley, A. K., Shrivastav, M., Nie, J., Amerin, C., Troksa, K., Glanzer, J. G., ... & Nickoloff, J. A. (2014). DNA-PK phosphorylation of RPA32 Ser4/Ser8 regulates replication stress checkpoint activation, fork restart, homologous recombination and mitotic catastrophe. *DNA repair*, 21, 131-139.
- Attardi, L. D., Lowe, S. W., Brugarolas, J., ve Jacks, T. (1996). Transcriptional activation by p53, but not induction of the p21 gene, is essential for oncogene-mediated apoptosis. *The EMBO journal*, 15(14), 3693-3701.
- Avantaggiati, M. L., Ogryzko, V., Gardner, K., Giordano, A., Levine, A. S. ve Kelly, K. (1997). Recruitment of p300/CBP in p53-dependent signal pathways. *Cell*, 89(7), 1175-1184.
- Ayed, A., Mulder, F. A., Yi, G. S., Lu, Y., Kay, L. E. ve Arrowsmith, C. H. (2001). Latent and active p53 are identical in conformation. *Nature structural biology*, 8(9), 756-760.
- Bieging, K. T., Mello, S. S. ve Attardi, L. D. (2014). Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. *Nature Reviews Cancer*, 14(5), 359-370.
- Blier, P. R., Griffith, A. J., Craft, J. ve Hardin, J. A. (1993). Binding of Ku protein to DNA. Measurement of affinity for ends and demonstration of binding to nicks. *Journal of Biological Chemistry*, 268(10), 7594-7601.
- Brady, C. A., Jiang, D., Mello, S. S., Johnson, T. M., Jarvis, L. A., Kozak, M. M. ve Attardi, L. D. (2011). Distinct p53 transcriptional programs dictate acute DNA-damage responses and tumor suppression. *Cell*, 145(4), 571-583.
- Bouchaert P., Guerif S., Debiais C., Irani J. ve Fromont G. (2012). "DNA-PKcs expression predicts response to radiotherapy in prostate cancer". *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 84 (5): 1179–85.
- Bouquet, F., Ousset, M., Biard, D., Fallone, F., Dauvillier, S., Frit, P., Salles B. ve Muller, C. (2011). A DNA-dependent stress response involving DNA-PK occurs in hypoxic cells and contributes to cellular adaptation to hypoxia. *Journal of cell science*, 124(11), 1943-1951.

- Böttger, A., Böttger, V., Garcia-Echeverria, C., Chène, P., Hochkeppel, H. K., Sampson, W., Ang K., Howard S.F., Picksley S.M. ve Lane, D. P. (1997). Molecular characterization of the hdm2-p53 interaction. *Journal of molecular biology*, 269(5), 744-756.
- Böttger, A., Böttger, V., Sparks, A., Liu, W. L., Howard, S. F. ve Lane, D. P. (1997). Design of a synthetic Mdm2-binding mini protein that activates the p53 response in vivo. *Current Biology*, 7(11), 860-869.
- Burma, S. ve Chen, D. J. (2004). Role of DNA–PK in the cellular response to DNA double-strand breaks. *DNA repair*, 3(8-9), 909-918.
- Candau, R., Scolnick, D. M., Darpino, P., Ying, C. Y., Halazonetis, T. D. ve Berger, S. L. (1997). Two tandem and independent sub-activation domains in the amino terminus of p53 require the adaptor complex for activity. *Oncogene*, 15(7), 807-816.
- Chan, H. M., & La Thangue, N. B. (2001). p300/CBP proteins: HATs for transcriptional bridges and scaffolds. *Journal of cell science*, 114(13), 2363-2373.
- Chang, J., Kim, D. H., Lee, S. W., Choi, K. Y. ve Sung, Y. C. (1995). Transactivation Ability of p53 Transcriptional Activation Domain Is Directly Related to the Binding Affinity to TATA-binding Protein (*). *Journal of Biological Chemistry*, 270(42), 25014-25019.
- Chao, C., Saito, S. I., Kang, J., Anderson, C. W., Appella, E. ve Xu, Y. (2000). p53 transcriptional activity is essential for p53-dependent apoptosis following DNA damage. *The EMBO journal*, 19(18), 4967-4975.
- Chasov, V., Mirgayazova, R., Zmievskaya, E., Khadiullina, R., Valiullina, A., Stephenson Clarke, J., Rizvanov A. ve Bulatov, E. (2020). Key players in the mutant p53 team: Small molecules, gene editing, immunotherapy. *Frontiers in Oncology*, 10, 1460.
- Charitou, V., Van Keulen, S. C. ve Bonvin, A. M. (2022). Cyclization and docking protocol for cyclic peptide–protein modeling using HADDOCK2. 4. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 18(6), 4027-4040.
- Chi, S. W., Lee, S. H., Kim, D. H., Ahn, M. J., Kim, J. S., Woo, J. Y. ve Han, K. H. (2005). Structural details on mdm2-p53 interaction. *Journal of Biological Chemistry*, 280(46), 38795-38802.
- Chiang, Y. T., Chien, Y. C., Lin, Y. H., Wu, H. H., Lee, D. F. ve Yu, Y. L. (2021). The function of the mutant p53-R175H in cancer. *Cancers*, 13(16), 4088.
- Collis, S. J., DeWeese, T. L., Jeggo, P. A. ve Parker, A. R. (2005). The life and death of DNA-PK. *Oncogene*, 24(6), 949-961.

- Cruet-Hennequart, S., Coyne, S., Glynn, M. T., Oakley, ve Carty, M. P. (2006). UV-induced RPA phosphorylation is increased in the absence of DNA polymerase η and requires DNA-PK. *DNA repair*, 5(4), 491-504.
- Dobbs, T. A., Tainer, J. A. ve Lees-Miller, S. P. (2010). A structural model for regulation of NHEJ by DNA-PKcs autophosphorylation. *DNA repair*, 9(12), 1307-1314.
- Dominguez, C., Boelens, R. ve Bonvin, A. M. (2003). HADDOCK: a protein– protein docking approach based on biochemical or biophysical information. *Journal of the American Chemical Society*, 125(7), 1731-1737.
- Dumaz, N. ve Meek, D. W. (1999). Serine 15 phosphorylation stimulates p53 transactivation but does not directly influence interaction with HDM2. *The EMBO journal*, 18(24), 7002-7010.
- Edelheit, O., Hanukoglu, A. ve Hanukoglu, I. (2009). Simple and efficient site-directed mutagenesis using two single-primer reactions in parallel to generate mutants for protein structure-function studies. *BMC biotechnology*, 9(1), 1-8.
- Ferreon, J. C., Lee, C. W., Arai, M., Martinez-Yamout, M. A., Dyson, H. J., ve Wright, P. E. (2009). Cooperative regulation of p53 by modulation of ternary complex formation with CBP/p300 and HDM2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(16), 6591-6596.
- Flavell, R. A., Sabo, D. L., Bandle, E. F. ve Weissmann, C. (1975). Site-directed mutagenesis: effect of an extracistronic mutation on the in vitro propagation of bacteriophage Qbeta RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 72(1), 367-371.
- Fields, S., ve Jang, S. K. (1990). Presence of a potent transcription activating sequence in the p53 protein. *Science*, 249(4972), 1046-1049.
- Freedman, D. A., Wu, L. ve Levine, A. J. (1999). Functions of the MDM2 oncoprotein. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 55, 96-107.
- Goodarzi, A. A., Yu, Y., Riballo, E., Douglas, P., Walker, S. A., Ye, R., Harer C., Marchetti C., Morrice N., Jeggo P.A. ve Lees-Miller, S. P. (2006). DNA-PK autophosphorylation facilitates Artemis endonuclease activity. *The EMBO journal*, 25(16), 3880-3889.
- Goodwin, J. F. ve Knudsen, K. E. (2014). Beyond DNA repair: DNA-PK function in cancer. *Cancer discovery*, 4(10), 1126-1139.
- Gu, J., Li, S., Zhang, X., Wang, L. C., Niewolik, D., Schwarz, K., Legerski R.J., Zandi E. ve Lieber, M. R. (2010). DNA-PKcs regulates a single-stranded DNA endonuclease activity of Artemis. *DNA repair*, 9(4), 429-437.

- Gupta, A., Shah, K., Oza, M. J. ve Behl, T. (2019). Reactivation of p53 gene by MDM2 inhibitors: a novel therapy for cancer treatment. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 109, 484-492.
- Hamard, P. J., Lukin, D. J., ve Manfredi, J. J. (2012). p53 basic C terminus regulates p53 functions through DNA binding modulation of subset of target genes. *Journal of Biological Chemistry*, 287(26), 22397-22407.
- Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A. ve Oren, M. (1997). Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature*, 387(6630), 296-299.
- Ho, W. C., Fitzgerald, M. X. ve Marmorstein, R. (2006). Structure of the p53 Core Domain Dimer Bound to DNA. *Journal of Biological Chemistry*, 281(29), 20494-20502.
- Honorato, R. V., Koukos, P. I., Jiménez-García, B., Tsaregorodtsev, A., Verlato, M., Giachetti, A., ... & Bonvin, A. M. (2021). Structural biology in the clouds: the WeNMR-EOSC ecosystem. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8, 729513.
- Hsu, H. L., Yannone, S. M. ve Chen, D. J. (2002). Defining interactions between DNA-PK and ligase IV/XRCC4. *DNA repair*, 1(3), 225-235.
- Hutchison III, C. A. ve Edgell, M. H. (1971). Genetic assay for small fragments of bacteriophage ϕ X174 deoxyribonucleic acid. *Journal of virology*, 8(2), 181-189.
- Iyama, T. ve Wilson III, D. M. (2013). DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. *DNA repair*, 12(8), 620-636.
- Jackson S.P. ve Bartek J. 2009. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 461: 1071–1078.
- Jeggo, P. A. (1997). DNA-PK: at the cross-roads of biochemistry and genetics. *Mutation Research/DNA Repair*, 384(1), 1-14.
- Jimenez, G. S., Nister, M., Stommel, J. M., Beeche, M., Barcarse, E. A., Zhang, X. Q., O’Gorman S. ve Wahl, G. M. (2000). A transactivation-deficient mouse model provides insights into Trp53 regulation and function. *Nature genetics*, 26(1), 37-43.
- Johnson, T. M., Hammond, E. M., Giaccia, A., ve Attardi, L. D. (2005). The p53^{QS} transactivation-deficient mutant shows stress-specific apoptotic activity and induces embryonic lethality. *Nature genetics*, 37(2), 145-152.
- Kandoth, C., McLellan, M. D., Vandin, F., Ye, K., Niu, B., Lu, C. ve Ding, L. (2013). Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature*, 502(7471), 333-339.

- Kim, H., Kim, K., Choi, J., Heo, K., Baek, H. J., Roeder, R. G., ve An, W. (2012). p53 requires an intact C-terminal domain for DNA binding and transactivation. *Journal of molecular biology*, 415(5), 843-854.
- Kong, X., Shen, Y., Jiang, N., Fei, X. ve Mi, J. (2011). Emerging roles of DNA-PK besides DNA repair. *Cellular signalling*, 23(8), 1273-1280.
- Kurtoğlu, E. L. ve Tekedereli, İ. (2015). DNA Onarım Mekanizmaları. *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi*, 4(3), 169-177.
- Lai, Z., Ferry, K. V., Diamond, M. A., Wee, K. E., Kim, Y. B., Ma, J. ve Auger, K. R. (2001). Human mdm2 mediates multiple mono-ubiquitination of p53 by a mechanism requiring enzyme isomerization. *Journal of Biological Chemistry*, 276(33), 31357-31367.
- Lane, D. P. ve Crawford, L. V. (1979). T antigen is bound to a host protein in SY40-transformed cells. *Nature*, 278(5701), 261-263.
- Laptenko, O., Shiff, I., Freed-Pastor, W., Zupnick, A., Mattia, M., Freulich, E., Shamir I., Kadouri N., Kahn T., Manfredi J., Simon I. ve Prives, C. (2015). The p53 C terminus controls site-specific DNA binding and promotes structural changes within the central DNA binding domain. *Molecular cell*, 57(6), 1034-1046.
- Lee, H. S., Yang, H. K., Kim, W. H. ve Choe, G. (2005). Loss of DNA-dependent protein kinase catalytic subunit (DNA-PKcs) expression in gastric cancers. *Cancer Research and Treatment: Official Journal of Korean Söderlund Leifler, K., Queseth, S., Fornander, T., & Askmalm, M. S. (2010). Low expression of Ku70/80, but high expression of DNA-PKcs, predict good response to radiotherapy in early breast cancer. International journal of oncology*, 37(6), 1547-1554. *Cancer Association*, 37(2), 98-102.
- Lees-Miller, S. P., Sakaguchi, K., Ullrich, S. J., Appella, E., ve Anderson, C. W. (1992). Human DNA-activated protein kinase phosphorylates serines 15 and 37 in the amino-terminal transactivation domain of human p53. *Molecular and cellular biology*, 12(11), 5041-5049.
- Li, M., Luo, J., Brooks, C. L., & Gu, W. (2002). Acetylation of p53 inhibits its ubiquitination by Mdm2. *Journal of Biological Chemistry*, 277(52), 50607-50611.
- Li, J., ve Stern, D. F. (2005). Regulation of CHK2 by DNA-dependent protein kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 280(12), 12041-12050.
- Linzer, D. I., Maltzman, W., & Levine, A. J. (1979). The SV40 A gene product is required for the production of a 54,000 MW cellular tumor antigen. *Virology*, 98(2), 308-318.
- Ma, Y., Pannicke, U., Schwarz, K., & Lieber, M. R. (2002). Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V (D) J recombination. *Cell*, 108(6), 781-794.

- MacLaine, N. J. ve Hupp, T. R. (2011). How phosphorylation controls p53. *Cell Cycle*, 10(6), 916-921.
- M Devlin, T. (2006). *Textbook of biochemistry: with clinical correlations*. Wiley-Less.
- Moll, U. M. ve Petrenko, O. (2003). The MDM2-p53 interaction. *Molecular cancer research*, 1(14), 1001-1008.
- Müller, W., Weber, H., Meyer, F., & Weissmann, C. (1978). Site-directed mutagenesis in DNA: Generation of point mutations in cloned β globin complementary DNA at the positions corresponding to amino acids 121 to 123. *Journal of molecular biology*, 124(2), 343-358.
- Neal, J. A. ve Meek, K. (2011). Choosing the right path: does DNA-PK help make the decision?. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 711(1-2), 73-86.
- Nishikawa, S., ve Iwakuma, T. (2023). Drugs targeting p53 mutations with FDA approval and in clinical trials. *Cancers*, 15(2), 429.
- Oliner, J. D., Pieterpol, J. A., Thiagalingam, S., Gyuris, J., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (1993). Oncoprotein MDM2 conceals the activation domain of tumour suppressor p53. *Nature*, 362(6423), 857-860.
- Picksley, S. M., Vojtesek, B., Sparks, A., & Lane, D. P. (1994). Immunochemical analysis of the interaction of p53 with MDM2;--fine mapping of the MDM2 binding site on p53 using synthetic peptides. *Oncogene*, 9(9), 2523-2529.
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C. ve Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of computational chemistry*, 25(13), 1605-1612.
- Polo, S. E., & Jackson, S. P. (2011). Dynamics of DNA damage response proteins at DNA breaks: a focus on protein modifications. *Genes & development*, 25(5), 409-433.
- Raj, N., ve Attardi, L. D. (2017). The transactivation domains of the p53 protein. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 7(1), a026047.
- Rajalakshmi, S. (2017). Different types of pcr techniques and its applications. *International Journal of Pharmaceutical, Chemical & Biological Sciences*, 7(3)
- Raycroft, L., Schmidt, J. R., Yoas, K., Hao, M. ve Lozano, G. (1991). Analysis of p53 mutants for transcriptional activity. *Molecular and cellular biology*, 11(12), 6067-6074.

- Rivera-Calzada, A., Maman, J. P., Spagnolo, L., Pearl, L. H. ve Llorca, O. (2005). Three-dimensional structure and regulation of the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit (DNA-PKcs). *Structure*, 13(2), 243-255.
- Rivlin, N., Brosh, R., Oren, M. ve Rotter, V. (2011). Mutations in the p53 tumor suppressor gene: important milestones at the various steps of tumorigenesis. *Genes & cancer*, 2(4), 466-474.
- Rodriguez, M. S., Desterro, J. M., Lain, S., Lane, D. P. ve Hay, R. T. (2000). Multiple C-terminal lysine residues target p53 for ubiquitin-proteasome-mediated degradation. *Molecular and cellular biology*, 20(22), 8458-8467.
- Schärer, E. ve Lggo, R. (1992). Mammalian p53 can function as a transcription factor in yeast. *Nucleic acids research*, 20(7), 1539-1545.
- Schwartz, M., Zlotorynski, E., Goldberg, M., Ozeri, E., Rahat, A., Le Sage, C., Chen B.P.C, Chen D.J., Agami R. ve Kerem, B. (2005). Homologous recombination and nonhomologous end-joining repair pathways regulate fragile site stability. *Genes & development*, 19(22), 2715.
- Sharif, H., Li, Y., Dong, Y., Dong, L., Wang, W. L., Mao, Y. ve Wu, H. (2017). Cryo-EM structure of the DNA-PK holoenzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(28), 7367-7372.
- Shieh, S. Y., Ikeda, M., Taya, Y., & Prives, C. (1997). DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell*, 91(3), 325-334.
- Slupphaug, G., Kavli, B., & Krokan, H. E. (2003). The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 531(1-2), 231-251.
- Sipley, J. D., Menninger, J. C., Hartley, K. O., Ward, D. C., Jackson, S. P., & Anderson, C. W. (1995). Gene for the catalytic subunit of the human DNA-activated protein kinase maps to the site of the XRCC7 gene on chromosome 8. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(16), 7515-7519.
- Soussi, T., & Lozano, G. (2005). p53 mutation heterogeneity in cancer. *Biochemical and biophysical research communications*, 331(3), 834-842.
- Söderlund Leifler K, Queseth S, Fornander T, Askmalms MS (2010). "Low expression of Ku70/80, but high expression of DNA-PKcs, predict good response to radiotherapy in early breast cancer". *Int. J. Oncol.* 37 (6): 1547–54.
- Spagnolo, L., Rivera-Calzada, A., Pearl, L. H. ve Llorca, O. (2006). Three-dimensional structure of the human DNA-PKcs/Ku70/Ku80 complex assembled on DNA and its implications for DNA DSB repair. *Molecular cell*, 22(4), 511-519.

- Uhrinova, S., Uhrin, D., Powers, H., Watt, K., Zheleva, D., Fischer, P., McInnes C. ve Barlow, P. N. (2005). Structure of free MDM2 N-terminal domain reveals conformational adjustments that accompany p53-binding. *Journal of molecular biology*, 350(3), 587-598.
- Unger, T., Nau, M. M., Segal, S., & Minna, J. D. 1992. p53: "A transdominant regulator of transcription whose function is ablated by mutations occurring in human cancer". *The EMBO journal*, 11(4), 1383-1390.
- Vaddavalli, P. L., ve Schumacher, B. (2022). The p53 network: Cellular and systemic DNA damage responses in cancer and aging. *Trends in Genetics*, 38(6), 598-612.
- Van Der Burg, M., IJspeert, H., Verkaik, N. S., Turul, T., Wiegant, W. W., Morotomi-Yano, K., ... & Van Gent, D. C. (2009). A DNA-PKcs mutation in a radiosensitive T-B-SCID patient inhibits Artemis activation and nonhomologous end-joining. *The Journal of clinical investigation*, 119(1), 91-98.
- Van Zundert, G. C. P., Rodrigues, J. P. G. L. M., Trellet, M., Schmitz, C., Kastitis, P. L., Karaca, E., Melquiond A.S.J, Dijk, M., Vries S.J. ve Bonvin, A. M. J. J. (2016). The HADDOCK2. 2 web server: user-friendly integrative modeling of biomolecular complexes. *Journal of molecular biology*, 428(4), 720-725.
- Varley, J. M., Evans, D. G., & Birch, J. M. (1997). Li-Fraumeni syndrome--a molecular and clinical review. *British journal of cancer*, 76(1), 1.
- Venot, C., Maratrat, M., Sierra, V., Conseiller, E., & Debussche, L. (1999). Definition of a p53 transactivation function-deficient mutant and characterization of two independent p53 transactivation subdomains. *Oncogene*, 18(14), 2405-2410.
- Vousden, K. H., & Prives, C. (2009). Blinded by the light: the growing complexity of p53. *Cell*, 137(3), 413-431.
- De Vries, S. J., Van Dijk, M. ve Bonvin, A. M. (2010). The HADDOCK web server for data-driven biomolecular docking. *Nature protocols*, 5(5), 883-897.
- Yadahalli, S., Neira, J. L., Johnson, C. M., Tan, Y. S., Rowling, P. J., Chattopadhyay, A., Verma C.S. ve Itzhaki, L. S. (2019). Kinetic and thermodynamic effects of phosphorylation on p53 binding to MDM2. *Scientific Reports*, 9(1), 693.
- Yang, J. ve Zhang, Y. (2015). I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions. *Nucleic acids research*, 43(W1), W174-W181.
- Yamaguchi, Y., Watanabe, H., Yrdiran, S., Ohtsubo, K., Motoo, Y., Okai, T. ve Sawabu, N. (1999). Detection of mutations of p53 tumor suppressor gene in pancreatic juice and its application to diagnosis of patients with pancreatic cancer: comparison with K-ras mutation. *Clinical cancer research*, 5(5), 1147-1153.

- Zheng, W., Zhang, C., Li, Y., Pearce, R., Bell, E. W. ve Zhang, Y. (2021). Folding non-homologous proteins by coupling deep-learning contact maps with I-TASSER assembly simulations. *Cell reports methods*, 1(3).
- Zhou, X., Zheng, W., Li, Y., Pearce, R., Zhang, C., Bell, E. W., Zhang G. ve Zhang, Y. (2022). I-TASSER-MTD: a deep-learning-based platform for multi-domain protein structure and function prediction. *Nature Protocols*, 17(10), 2326-2353.
- Zhu, J., Zhou, W., Jiang, J. ve Chen, X. (1998). Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for mediating apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 273(21), 13030-13036.
- Zhu, J., Zhang, S., Jiang, J. ve Chen, X. (2000). Definition of the p53 functional domains necessary for inducing apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 275(51), 39927-39934.
- Zhuang, L., Yu, S. Y., Huang, X. Y., Cao, Y. ve Xiong, H. H. (2007). Potentials of DNA-PKcs, Ku80, and ATM in enhancing radiosensitivity of cervical carcinoma cells. *Ai Zheng= Aizheng= Chinese Journal of Cancer*, 26(7), 724-729.