

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KANSER KÖKENLİ HÜCRE HATLARINDA
GÖZLENEN SESSİZ TÜMÖR SÜPRESÖR GEN
MUTASYONLARININ mRNA İŞLEMLENMESİ
ÜZERİNE OLASI ETKİLERİNİN SAPTANMASI**

ALİ YÜKSEL

**TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

İZMİR-2017

TEZ KODU:DEU.HSI.MSc-2010970094

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KANSER KÖKENLİ HÜCRE HATLARINDA
GÖZLENEN SESSİZ TÜMÖR SÜPRESÖR GEN
MUTASYONLARININ mRNA İŞLEMLENMESİ
ÜZERİNE OLASI ETKİLERİNİN SAPTANMASI**

**TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

Ali YÜKSEL

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Oğuz ALTUNGÖZ

(Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından 2015.KB.SAG.035 proje numarası ile desteklenmiştir.)

TEZ KODU:DEU.HSI.MSc-2010970094

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2010970094

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Yüksek Lisans programı öğrencisi Ali YÜKSEL “Kanser Kökenli Hücre Hatlarında Gözlenen Sessiz Tümör Süpresör Gen Mutasyonlarının mRNA İşlenmesi Üzerine Olası Etkilerinin Saptanması” konulu Yüksek Lisans tezini 24.10.2017 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.

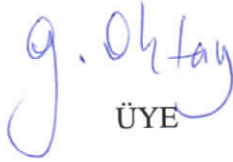


BAŞKAN

Prof. Dr. Oğuz ALTUNGÖZ

Dokuz Eylül Üniversitesi

(Tıp Fak. Tıbbi Biyoloji ve Genetik ABD)



ÜYE

Prof. Dr. Gülgün OKTAY

Dokuz Eylül Üniversitesi

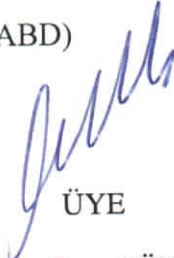
(Tıp Fak. Biyokimya ABD)

ÜYE

Prof. Dr. Sultan CİNGÖZ

Dokuz Eylül Üni. Tıp Fak.

(Tıp Fak. Tıbbi Biyoloji ve Genetik ABD)



ÜYE

Prof. Dr. Cemal ÜN

Ege Üniversitesi Fen Fak.

(Moleküler Biyoloji ABD)

ÜYE

Doç. Dr. SAVAŞ İZZETOĞLU

Ege Üniversitesi Fen Fak.

(Moleküler Biyoloji ABD)

İÇİNDEKİLER

Tablolar Dizini	VI
Şekiller dizini.....	VII
Kısaltmalar.....	IX
Teşekkür.....	XI
Özet.....	1
Abstract.....	3
1. GİRİŞ ve AMAÇ	5
1.2 Araştırma Hipotezi	6
2. GENEL BİLGİLER.....	7
2.1 Transkripsiyon Aşamasında Pre-mRNA ve Modifikasyonları	7
2.2 Klasik Kesip-Ekleme Sinyalleri ve Alternatif Kesip-Ekleme Modelleri	8
2.3 <i>Splicing</i> Mekanizması	10
2.3.1 <i>Splicing</i> Mekanizması Düzenleyicileri	10
2.3.1.1 <i>Cis-etkili Splicing</i> Düzenleyici Elementler	10
2.3.1.2 Trans Etkili <i>Splicing</i> Düzenleyici Faktörler	11
2.4 <i>Splicing</i> 'i Etkileyen Mutasyonlar	12
2.5 Kanser	13
2.6 <i>Splicing</i> Minigen Analizi Sistemi	14
3. GEREÇ VE YÖNTEM	16
3.1 Araştırmanın Tipi	18
3.2 Araştırmanın Yeri ve Zamanı	18

3.3 Araştırma Evreni ve Örneklemi	18
3.4 Çalışma Materyali	19
3.5 Veri Toplama Araçları	19
3.5.1 Periferik Kandan Genomik DNA İzolasyonu	19
3.5.2 Gradient PCR Protokolü	20
3.5.3 Klonlama Aşaması	22
3.5.3.1 Exontrap Vektör pET01 Özellikleri	22
3.5.3.2 Plazmid ve İnsert DNA'ların Enzim Kesimleri	24
3.5.3.3 Enzim Kesimi Yapılan Plazmid ve İnsert-DNA'ların Safılaştırma Protokolü	24
3.5.3.4 Ligasyon Basamağı	25
3.5.3.5 Bakteri Transformasyonu	25
3.5.3.6 Koloni PCR	26
3.5.3.7 Bakteri Kültürü ve Mini Prep Plazmid İzolasyonu	27
3.5.3.8 Plazmidlerin Çift Enzim Kesimleri	28
3.5.3.9 Site-Directed Mutagenesis ile Mutasyonların Oluşturulması	29
3.5.4 Dizi Analizi	32
3.5.5 Hücre Hattı Çalışmaları	32
3.5.5.1 HeLa Hücre Hatlarının Kültürü ve Transfeksiyon	32
3.5.5.2 HeLa Hücrelerinden Total RNA İzolasyonu	32
3.5.5.3 İzole edilen RNA'dan DNA'nın Uzaklaştırılması	33
3.5.5.4 Total RNA'dan cDNA Sentezi	34
3.5.5.5 cDNA'dan PCR ile İlgili Gen Bölgelerinin Çoğaltılması	34

3.6 Tamponların ve Besi Ortamlarının Hazırlanması	36
3.6.1 Tris-Asetat-EDTA (TAE) Tamponu	36
3.6.2 LB Broth ve LB Agar Hazırlama	36
3.7 Araştırma Sınırlılıkları	37
3.7.1 Primer Duplikasyon Sorunu	37
3.7.2 Primer Duplikasyon Sorununun Giderilmesi	37
3.8 Etik Kurul Onayı	37
4 BULGULAR	38
4.1 Referans ve Mutant Grubu Analiz Sonuçlarının Karşılaştırması	38
4.1.1 <i>CDKN2A</i> c.273G>A Mutasyonu.....	38
4.1.2 <i>CDK N2A</i> c.339G>T Mutasyonu.....	39
4.1.3 <i>CDKN2A</i> c.342C>G Mutasyonu.....	39
4.1.4 <i>TP53</i> c.793C>T Mutasyonu.....	40
4.1.5 <i>TP53</i> c.801G>T Mutasyonu.....	41
4.1.6 <i>BAI3</i> c.1419C>T Mutasyonu.....	41
4.1.7 <i>CABLES2</i> c.1002C>T Mutasyonu	42
4.1.8 <i>PTCH2</i> c.249A>G Mutasyonu	43
4.2 PCR Örneklerinin DNA Dizi Analizi Sonuçları	43
4.2.1 <i>CDKN2A</i> Kontrol ve Mutant Örneklerin cDNA Dizilerinin Karşılaştırılması....	44
4.2.1.1 <i>CDKN2A</i> Kontrol ve Referans cDNA Dizilerinin Karşılaştırılması.....	44
4.2.1.2 Mutant <i>CDKN2A</i> (c.273G>A) cDNA Dizilerinin Referans diziler ile Karşılaştırılması	45

4.2.1.3 Mutant <i>CDKN2A</i> (c.339G>T) cDNA Dizilerinin Referans diziler ile Karşılaştırılması	46
4.2.1.3 Mutant <i>CDKN2A</i> (c.342C>G) cDNA Dizilerinin Referans diziler ile Karşılaştırılması	47
4.2.2 <i>TP53</i> Kontrol ve Mutant Örneklerin cDNA Dizilerinin Karşılaştırılması	48
4.2.2.1 <i>TP53</i> Kontrol ve Referans cDNA Dizilerinin Karşılaştırılması	48
4.2.2.2 Mutant <i>TP53</i> (c.793C>T) ve Referans cDNA Dizilerinin Karşılaştırılması	49
4.2.2.3 Mutant <i>TP53</i> (c.801G>T) ve Referans cDNA Dizilerin Karşılaştırılması	50
4.2.3 <i>BAI3</i> Kontrol ve Mutant cDNA Dizilerinin Karşılaştırılması	50
4.2.3.1 <i>BAI3</i> Kontrol ve Referans cDNA Dizilerinin Karşılaştırılması	50
4.2.3.2 Mutant <i>BAI3</i> ve Referans cDNA Dizilerin Karşılaştırılması	51
4.2.4 <i>CABLES2</i> Kontrol ve Mutant cDNA Dizilerinin Karşılaştırılması	52
4.2.4.1 <i>CABLES2</i> Kontrol ve Referans cDNA Dizilerinin Karşılaştırılması	52
4.2.4.2 Mutant <i>CABLES2</i> ve Referans cDNA Dizilerinin Karşılaştırılması	53
4.2.5 <i>PTCH2</i> Kontrol ve Mutant cDNA Dizilerinin Karşılaştırılması	54
4.2.5.1 <i>PTCH2</i> Kontrol ve Referans cDNA Dizilerinin Karşılaştırılması	54
4.2.5.2 <i>PTCH2</i> Mutant ve Referans cDNA Dizilerin Karşılaştırılması	55
5.TARTIŞMA	56
6.SONUÇ ve ÖNERİLER	61
Kaynaklar	62
Ekler	68
Ek-1 Etik Kurul Raporu.....	68
Ek-2 Özgeçmiş	69

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo-1: Çalışma konusu mutasyonlar ve gözlemlendikleri hücreler	17
Tablo-2: Çalışmadaki TGS mutasyonlarının HSF analiz sonuçları özeti	17
Tablo-3: Klonlama için tasarlanmış kesim enzim motiflerini taşıyan PCR primerleri	20
Tablo-4: Gradient PCR reaksiyonu bileşenleri	21
Tablo-5: Gradient PCR koşulları	21
Tablo-7: Plazmid ve insert-DNA'ların restriksiyon enzim kesimi reaksiyonu bileşenleri	24
Tablo-8: T ₄ Ligaz enzimi ligasyon basamağına ait reaksiyonu bileşenleri	25
Tablo-9: Koloni PCR reaksiyon bileşenleri	26
Tablo-10: Koloni PCR koşulları	27
Tablo-11: İnsert içeren plazmidlerin çift enzimi kesimi reaksiyon bileşenleri	28
Tablo-12: SDM PCR reaksiyon bileşenleri	29
Tablo-13: SDM PCR koşulları	30
Tablo-14: Site-Directed Mutagenesis Primerleri.....	30
Tablo-15: Total RNA'daki DNA'nın Dnase I ile yıkımının reaksiyon bileşenleri	33
Tablo-16: cDNA sentezi reaksiyon bileşenleri	34
Tablo-17: Kalıp olarak cDNA'nın kullanıldığı PCR reaksiyonu bileşenleri	35
Tablo-18: Kalıp olarak cDNA'nın kullanıldığı PCR Koşulları	35
Tablo-19: 50X TAE tampon içeriği	36
Tablo-20: LB broth ve LB agar içeriği	36

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil-1	Transkripsiyon ve mRNA işlemlenmesi gösterimi	7
Şekil-2	Klasik splicing sinyal ve alternatif splicing modelleri	9
Şekil-3	Splicing mekanizması ve ESR elementlerinin etkileri	11
Şekil-4:	Gradient PCR Ürünlerinin %1'lik Agaroze jel görüntüleri	22
Şekil-5:	pET01 plazmidin şematik gösterimi.....	23
Şekil-6:	pET01 plazmidin çoklu klonlama bölgesi.....	23
Şekil-7:	insert içeren plazmidlerin Xho1 ve Xba1 enzimleri ile kesim sonrası garoz jel görüntüleri	29
Şekil-8:	NEB Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit Protokolü Şematik Özeti	31
Şekil-9:	Kalıp olarak cDNA'nın kullanıldığı PCR örneklerinin jelde görüntüleri	35
Şekil-10:	CDKN2A c.273G>A Mutasyonu DNA dizi analiz sonuçlarının referans diziyle karşılaştırılması	38
Şekil-11:	CDKN2A c.339G>T Mutasyonu DNA dizi analiz sonuçlarının referans diziyle karşılaştırılması	39
Şekil-12:	CDKN2A c.342C>G Mutasyonu DNA dizi analiz sonuçlarının referans diziyle karşılaştırılması	39-40
Şekil-13:	TP53 c.793 C>T Mutasyonu DNA dizi analiz sonuçlarının referans diziyle karşılaştırılması	40
Şekil-14:	TP53 c.801G>T Mutasyonu DNA dizi analiz sonuçlarının referans diziyle karşılaştırılması	41
Şekil-15:	BAI3 c.1419C>T Mutasyonu DNA dizi analiz sonuçlarının referans diziyle karşılaştırılması	41-42
Şekil-16:	CABLES2 c.1002C>T Mutasyonu DNA dizi analiz sonuçlarının referans diziyle karşılaştırılması	42
Şekil-17:	PTCH2 c.249A>G Mutasyonu DNA dizi analiz sonuçlarının referans diziyle karşılaştırılması	43
Şekil-18	CDKN2A kontrol cDNA örneğine ait referans diziler, <i>forvard</i> ve <i>reverse</i> -primerle yapılan dizi analizi sonuçlarının referans dizilerle karşılaştırılması	44-45
Şekil-19	CDKN2A c.273G>A Mutant cDNA örneğinin <i>forvard</i> ve <i>reverse</i> -primerle yapılan dizi analizi sonuçlarının referans diziyle karşılaştırılması	45-46

Şekil-20 <i>CDKN2A</i> c.339G>T mutant cDNA örneğinin <i>forvard</i> ve <i>reverse</i> primerle yapılan dizi analizi sonuçlarının referans dizilerle karşılaştırılması	46-47
Şekil-21 <i>CDKN2A</i> c.342C>G mutant cDNA örneğinin <i>forvard</i> ve <i>reverse</i> -primerle yapılan dizi analizi sonuçlarının referans dizilerle karşılaştırılması	47-48
Şekil-22 <i>TP53</i> (8. Ekzon) kontrol cDNA örneğine ait referans diziler, <i>forvard</i> ve <i>reverse</i> -primerle yapılan dizi analizi sonuçlarının referans dizilerle karşılaştırılması	48-49
Şekil-23 <i>TP53</i> c.793C>T mutant cDNA örneğinin <i>forvard</i> ve <i>reverse</i> -primerle yapılan dizi analizi sonuçlarının referans dizilerle karşılaştırılması	49
Şekil-24 <i>TP53</i> c.801G>T mutant cDNA örneğinin <i>forvard</i> ve <i>reverse</i> -primerle yapılan dizi analizi sonuçlarının referans dizilerle karşılaştırılması	50
Şekil-25 <i>BAI3</i> (8. Ekzon) kontrol cDNA örneğine ait referans diziler, <i>forvard</i> ve <i>reverse</i> -primerle yapılan dizi analizi sonuçlarının referans dizilerle karşılaştırılması	50-51
Şekil-26 <i>BAI3</i> 1419C>T mutant cDNA örneğinin <i>forvard</i> ve <i>reverse</i> primerle yapılan dizi analizi sonuçlarının referans dizilerle karşılaştırılması	51-52
Şekil-27 <i>CABLES2</i> (8. Ekzon) kontrol cDNA örneğine ait referans diziler, <i>forvard</i> ve <i>reverse</i> primerle yapılan dizi analizi sonuçlarının referans dizilerle karşılaştırılması	52-53
Şekil-28 <i>CABLES2</i> c.1002C>T mutant cDNA örneğinin <i>forvard</i> ve <i>reverse</i> -primerle yapılan dizi analizi sonuçlarının referans dizilerle karşılaştırılması	53
Şekil-29 <i>PTCH2</i> (2. Ekzon) kontrol cDNA örneğine ait referans diziler, <i>forvard</i> ve <i>reverse</i> -primerle yapılan dizi analizi sonuçlarının referans dizilerle karşılaştırılması	54
Şekil-30 <i>PTCH2</i> c.249A>G mutant cDNA örneğinin <i>forvard</i> ve <i>reverse</i> -primerle yapılan dizi analizi sonuçlarının referans dizilerle karşılaştırılması	55

KISALTMALAR

A	: Adenin
Amp	: Ampisilin
BAI3	: Brain-Specific Angiogenesis Inhibitor 3
BIN1	: Bridging integrator 1
C	: Sitozin (Cytosine)
CABLES2	: Cdk5 and Abl Enzyme Substrate 2
CDKN2A	: Cyclin-Dependent Kinase inhibitor 2A (Siklin Bağımlı Kinaz inhibitör 2A)
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagles Medium
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
dNTP	: Deoksiribonükleotid trifosfat
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
EIE	: Exon-Identity Element
ESE	: Exonic Splicing Enhancer
ESR	: Exonic Regulatory Element
ESS	: Exonic Splicing Silencer
FBS	: Fetal Bovine Serum
G	: Guanin
hnRNP	: Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein
IIE	: Intron-Identity Element
ISE	: Intronic Splicing Enhancer
ISS	: Intronic Splicing Silencer
KLD	: Kinaz Ligaz Dpn1 enzim karışımı
OD	: Optical Density (Optik Yoğunluk)
PESE	: Putative Exonic Splicing Enhancer

PESS	: Putative Exonic Splicing Silencer
PCR	: Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
PBS	: Phosphate Buffered Saline (fosfat tamponlu tuz çözeltisi)
PTCH2	: Patched 2
RE	: Restriksyon Enzimi
SDM	: Site-Directed Mutagenesis
SNP	: Single Nucleotide polymorphism (Tek Nükleotid Polimorfizm'i)
snRNP	: Small Nuclear Ribonucleo Protein
T	: Timin
TAE	: Tris-Asetik Asit-EDTA Tamponu
TBE	: Tris-Borik Asit-EDTA Tamponu
TE	: Tris-EDTA Tamponu
TSG	: Tümör Süpresör Gen
TP53	: Tumor protein p53

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisan öğrenimim süresince katkılarını esirgemeyen ve her zaman yol gösteren değerli hocam Prof. Dr. Oğuz ALTUNGÖZ'e, her ihtiyacım olduğunda yardımlarını esirgemeyen arkadaşım Dr. Hasan Onur ÇAĞLARA'a, deneysel aşamalarda yardımlarından dolayı Dr. Ayşim GÜNEŞ ve Öykü GÖNÜL'e teşekkür ederim. Katkılardan ötürü başta Prof. Dr. Neşe ATABEY ve Doç. Dr. Zeynep YÜCE olmak üzere anabilim dalımızın tüm çalışanlarına teşekkür ederim.

Çalışmalarımın büyük bölümünü yürüttüğüm laboratuvarımız çalışanları Elif KUTLU ÖZEN ve Züleyha KURAN'a teşekkür ederim. Son olarak yaşam boyu desteklerini esirgemeyen değerli Aileme teşekkür ederim.

KANSER KÖKENLİ HÜCRE HATLARINDA GÖZLENEN SESSİZ TÜMÖR SÜPRESÖR GEN MUTASYONLARININ mRNA İŞLENMESİ ÜZERİNE OLASI ETKİLERİNİN SAPTANMASI

Ali YÜKSEL

Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Narlıdere-İzmir

ÖZET

Memeli genlerinin transkript ürünleri öncü bir mRNA (pre-mRNA) olarak sentezlenir ve genelde alternatif kesip ekleme mekanizması ile tek pre-mRNA biriminden çok sayıda mRNA oluşturulur. Doğru mRNA işlenmesi klasik kesip ekleme sinyal motiflerine ilave olarak; kesip eklemeyi güçlendiren, ‘*exonic-intronic splicing enhancers*’ (*ESEs-ISEs*) ve engelleyen ‘*exonic-intronic splicing silencers*’ (*ESSs-ISSs*) düzenleyici elementlere ihtiyaç duyar. *ESE* ve *ESS* dizilerini bozan mutasyonlar hatalı mRNA ürünlerinin oluşumuna yol açabilirler. mRNA işlenmesini bozan mutasyonlar genelde güdük ve işlevsel olmayan ürünler oluştururlar ve tümör süpresör genlerde (TSG) işlev kaybına yol açan bu tarz mutasyonlar kanser gelişimine katkı sunan sürücü mutasyonlar olarak işlev görebilir. TSG’lerde gözlenen mutasyonların sürücü veya yolcu mutasyonlar olduklarını belirlemek bu genlerin karsinogenez’e etkisini anlamak bakımından önem taşımaktadır. Bu çalışmada TSG’lerde *ESE* ve *ESS* dizilerinde gözlenen sessiz mutasyonların hatalı mRNA ürünlerinin oluşmasına yol açarak kanser gelişiminde rol oynayabilecekleri öngörüldü. COSMIC veri tabanında kayıtlı kültürü yapılmış kanser hücrelerinde belirlenmiş sessiz TSG mutasyonlarını taradık ve pre-mRNA işlenmesi üzerine olası etkilerini test etmek amacı ile HSF biyoinformatik analiz sistemini kullandık. Analiz sonucu beş farklı TSG ve bu genlerde gözlenen sekiz farklı sessiz ekzonik mutasyon seçtik. Beş gene ait normal DNA dizileri kontrol grubunu oluşturmak üzere pET01 plazmid’i içerisine paketlenildi. Elde edilen kontrol örnekleri kalıp olarak kullanıldı ve SDM protokolü ile mutasyon oluşturuldu. Kontrol ve mutant plazmid örnekleri HeLa hücreleri içerisine transfekte edildi. Transfekte hücrelerden *total*-RNA izole edildi ve cDNA sentezlendi. Mutasyon içeren cDNA bölgeleri PCR ile çoğaltıldı ve ürünlerinin dizi analizleri yapıldı.

Yapılan DNA dizi analizleri sonucunda *CDKN2A* (2. Ekzon), *TP53* (8. Ekzon), *BAI3* (8. Ekzon), *CABLES2* (8. Ekzon) ve *PTCH2* (2. Ekzon) genlerine ait kontrol örneklerinde

mRNA'nın doğru şekilde işlendiği görüldü. Çalışmada, *CDKN2A* (2. Ekzon; c.273G>A, c.339G>T, c.342C>G), *TP53* (8. Ekzon; c.793C>T ve c.801G>T), *BAI3* (8. Ekzon; c.1419C>T), *CABLES2* (8. Ekzon; c.1002C>T) ve *PTCH2* (2. Ekzon; c.249A>G) genlerine ait sessiz mutasyonların DNA analiz sonuçları hiçbir örneğin hatalı mRNA ürünü oluşumuna neden olmadığını göstermiştir. Bu çalışmada, mutasyonların mRNA işlemlenmesi üzerine olan etkisinin araştırılmasında *minigene splicing assay* sistemi kullanımının primer olarak temini zor olan dokular için faydalı bir model olabileceği görülmektedir. Seçtiğimiz sekiz TSG mutasyonun *minigene splicing assay* sonuçları, hiçbir mutasyonun mRNA işlemlenmesini bozmadığını göstermektedir. Dolayısıyla seçilen sekiz mutasyonunda kanser gelişiminde etkisi olmayan yolcu (*passenger*) mutasyon gibi davranabileceği yönünde sonuçlar elde edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Splicing Düzenleyici Elementler, Sessiz mutasyon, Kanser, Tümör Süpresör Gen

PROBABLE EFFECTS OF SILENT MUTATIONS OBSERVED IN TUMOR SUPPRESSORS GENES ON mRNA SPLICING IN CANCER ORIGINATED CELL LINES

Ali Yüksel

Dokuz Eylül University, Medical School, Department of Medical Biology, Narlidere-Izmir

ABSTRACT

Transcription of mammalian genes is synthesized as a pre-mRNA unit and generally forms several isoform from the same transcription unit by alternative splicing mechanisms. In addition to classical splicing signal patterns, the accuracy of mRNA splicing is depended on such additional splicing regulatory elements as exonic-intronic splicing enhancers (ESEs-ISEs) and exonic-intronic splicing silencers (ESSs-ISSs). The mutations disrupting the ESE and ESS motifs may result in aberrant splicing products. The mutations that alter mRNA splicing generally generate short and unfunctional products, and such mutations leading to the loss of function in tumor suppressor genes (TSG) may act as driver mutations contributing to the cancer development. Identification of whether the mutations observed in TSGs is driver or passenger mutation is important to understand their effects on carcinogenesis. We suggest that mutations in ESE and ESS motifs result in defective pre-mRNA splicing corresponding to inactivation in TSG model and contribute the cancer progression. We searched for the silence mutations in TSG adopted from COSMIC database which are identified in cultured cancer cells and HSF analysis was used to test for the determination of probable effects of mutations on mRNA splicing. We chose the eight different silence exonic mutations in the five different TSGs after bioinformatic analysis. Normal DNA sequences of the five different gene were independently packed in the plasmid, pET01 in order to create control groups. Control samples we obtained were used as molds and mutations were obtained via site directed mutagenesis (SDM) protocol. Plasmids, for both control and mutated, were transfected to HeLa cells. Total RNA was isolated from transfected cells and converted to cDNA. The regions harbouring mutations in cDNA were amplified via PCR and PCR products were sequenced. The DNA sequence analysis revealed that mRNA splicing was correctly processed for *CDKN2A* (2nd exon), *TP53* (8th exon), *BAI3* (8th exon), *CABLES2* (8th exon) ve *PTCH2* (2nd exon) in control samples. In the current study, the results of DNA analysis showed that

silence mutations of *CDKN2A* (2nd exon; c.273G>A, c.339G>T, c.342C>G), *TP53* (8th exon; c.793C>T, c.801G>T), *BAI3*(8th exon; c.1419C>T), *CABLES2* (8th exon; c.1002C>T) and *PTCH2* (2nd exon; c.249A>G) did not cause to aberrant mRNA products. In this study, it is shown that minigene splicing assay may be useful model to test effects of mutations on the mRNA processing for primer tissues that are difficult to obtain. The results of minigene splicing assay showed that the eight different mutations did not disrupt mRNA processing. Therefore, these result were obtained from selected eight mutations may act as a passenger mutation that had no effect on the development of cancer.

Keywords: Splicing Regulatory Elements, Silent mutation, Cancer, Tumor Suppressor Genes



1. GİRİŞ ve AMAC

Memeli genlerinin transkript ürünü genelde öncü bir mRNA (pre-mRNA) olarak sentezlenir ve alternatif kesip ekleme ile tek pre-mRNA biriminden çok sayıda mRNA oluşturulur. Doğru mRNA işlemlenmesi klasik kesip ekleme sinyal motiflerine ilave olarak kesip eklemeyi güçlendiren, ‘*exonic-intronic splicing enhancers*’ (ESEs-ISEs) ve engelleyen ‘*exonic-intronic splicing silencers*’ (ESSs-ISSs) düzenleyici elementlere (SREs: *splicing regulatory elements*) ihtiyaç duyar. ESE ve ESS dizilerini bozan mutasyonlar; mRNA’da bütün veya kısmi ekzon kayıpları, intron içerilmesi, kararsız mRNA ürünlerinin oluşması ile sonuçlanabildiğinden genelde tek aminoasit değişimi ile sonuçlanan mutasyonlardan daha büyük değişimlere neden olur.

Bu projede TSG’lerde ESE ve ESS dizilerinde gözlenen sessiz mutasyonların hatalı mRNA ürünlerinin oluşmasına yol açarak kanser gelişiminde rol oynayabilecekleri öngördük. Bu öngörümüzün paralelinde kanser hücrelerinde saptanan somatik mutasyonları kataloglayan COSMIC (Catalogue of somatic mutations in cancer) veri tabanında kayıtlı hücre hatlarında, tümör süpresör genlerindeki tanımlanmış mevcut sessiz mutasyonlar tarandı ve mutasyonların pre-mRNA işlemlenmesi üzerine olası etkisi konusunda analiz yapan HSF (Human Splicing Finder) biyoinformatik analiz sistemi kullanıldı. Beş farklı TSG’de, ESE dizilerini bozan ve/veya yeni ESS dizilerinin oluşmasına yol açarak Pre-mRNA işlenmesini etkileme olasılığı olan 8 farklı sessiz ekzonik mutasyon seçilmiştir (Tablo-2).

Sağlıklı bir bireyden elde edilen DNA kalıp olarak kullanıldı ve PCR ile ilgili beş TSG bölgesi çoğaltıldı. Çoğaltılan gen bölgeleri kontrol gurubunu oluşturmak üzere pET01 plazmid’i içerisine paketlenildi (Çoklu klonlama bölgesindeki Xho1 ve Xba1 enzim kesim motifleri arasına). Mutant gurubu oluşturmak üzere beş kontrol plazmid kalıp olarak kullanıldı ve yüksek doğrulukta DNA sentezleyen Q5 polimeraz enzimi (NEB Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit bileşeni Catalog No: E0554S) ile sekiz mutant primer çifti kullanılarak çoğaltıldı. Bakteri transformasyonu ile *E.coli* (DH5alpha) içerisine aktarılan kontrol ve mutant guruba ait plazmidler çoğaltıldı.

HeLa hücreleri elde edilen kontrol ve mutant gurubu plazmidler ile transforme edildi. Transformasyon sonrası RNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen RNA’dan RT-PCR (*Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*) ile cDNA sentezi yapıldı. İnsert-DNA’yı içeren

cDNA dizileri özgül primer çifti ile çoğaltıldı. Mutasyonların mRNA işlemlenmesi üzerine etkilerinin belirlemek amacı ile PCR ürünlerinin DNA dizi analizleri yapıldı.

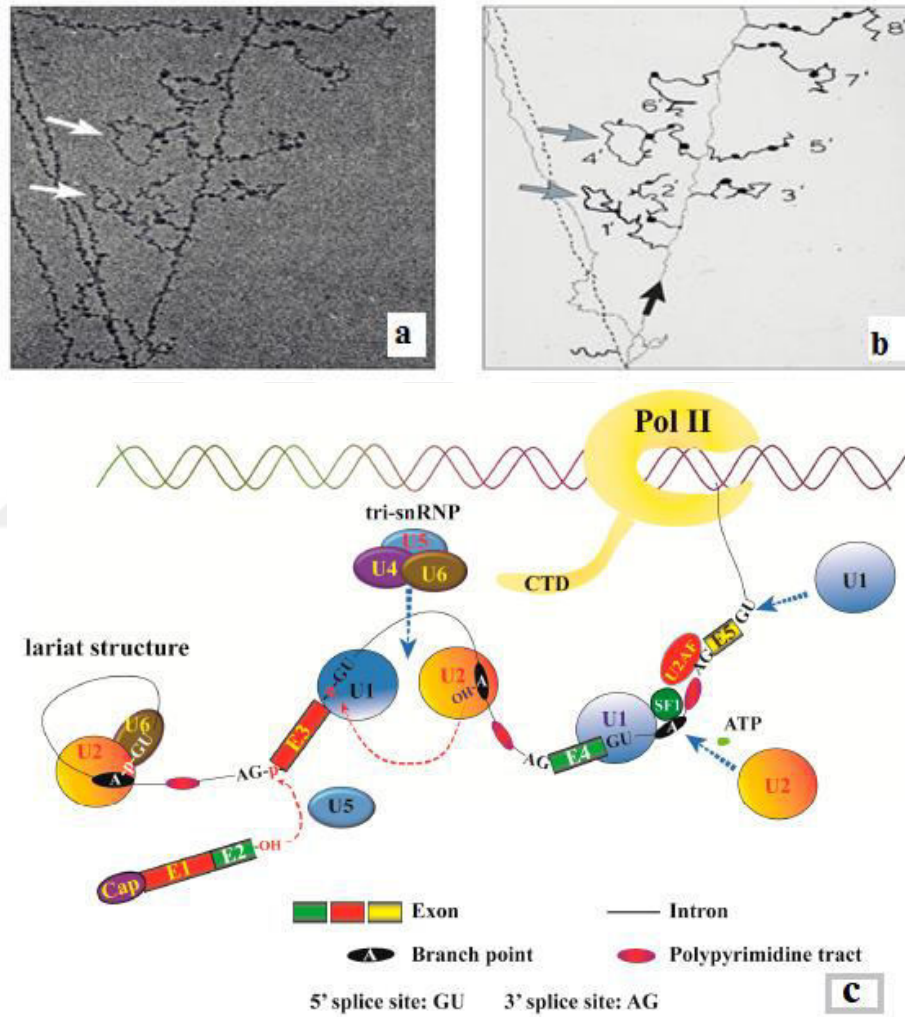
1.2 Araştırma Hipotezi

Kanserlerde görülen TSG mutasyonlarının genelde protein düzeyinde büyük değişimlere neden olmaktadır. mRNA işlemlenmesini bozan mutasyonlarda protein düzeyinde büyük değişimlere yol açma potansiyeline sahiptirler. Hatalı pre-mRNA işlemlenmesine neden olan *ESE* ve *ESS* dizi mutasyonlarının karakteristik olarak TSG (Tümör Süpresör Gen) inaktivasyon modeline uyduklarını düşünmekteyiz. Sessiz mutasyonların genelde etkisiz olduğu varsayımının her zaman doğru olmadığını, *ESE* ve *ESS* dizilerini hedef alan sessiz TSG mutasyonlarının hatalı mRNA ürünlerinin oluşmasına neden olarak kanser gelişimine katkı sunabileceklerini düşündük.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Transkripsiyon Aşamasında Pre-mRNA ve Modifikasyonları

Yüksek ökaryotlarda protein kodlayan genler tipik olarak büyük intronlarla bölünmüş çok sayıda ekzondan oluşur¹⁻³. Pre-mRNA (öncü veya prekürsör Messenger RNA: pre-mRNA) işlenmesi; intronların uzaklaştırılması ve ekzonların birbirine eklenmesi(*splicing*) ile olgun mRNA'nın oluşturulması sürecidir³⁻⁵.



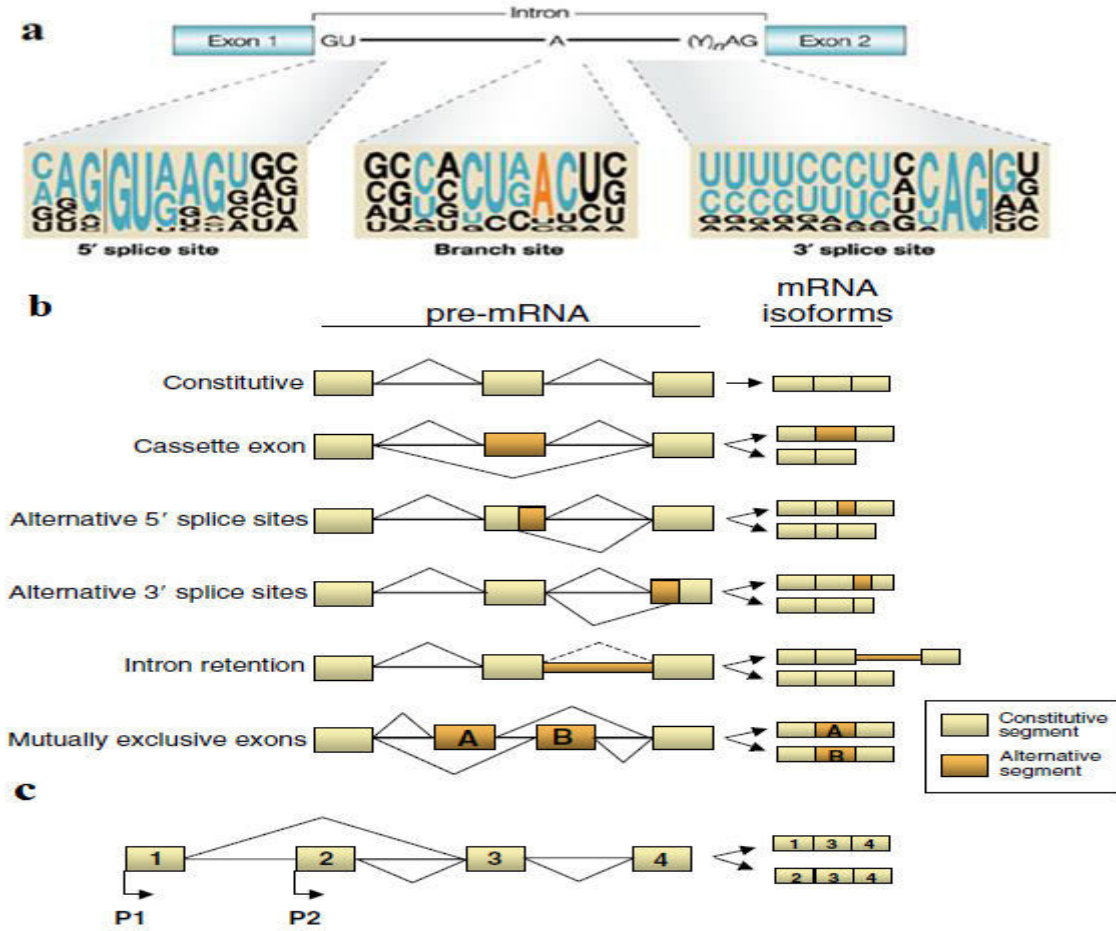
Şekil-1 a) Ökaryotik bir hücreye ait transkripsiyon ve mRNA işlenmesinin eş zamanlı gerçekleştiğini gösteren elektron mikroskop görüntüsü, **b)** Elektron mikroskop görüntüsünün daha net göstermek amacı ile şematik olarak gösterilmiştir⁶. **c)** Transkripsiyon ile eş zamanlı mRNA işlenmesi; U1, SF1(Splice factor 1) ve U2AF 5' kesim bölgesine bağlanır. U2 SnRNP SF1 ile yer değiştirilerek dallanma bölgesine bağlanır. U4-U5 ve U6 snRNP üçlüsünün komplekse katılması ile spliceosome kurulumu tamamlanır. Spliceosome kompleksi tarafından kement benzeri intronik yapı uzaklaştırılarak iki ekzon birleştirilir⁷.

Öncü mRNA (pre-mRNA) üç temel aşama sonrasında translasyona hazır olgun mRNA'ya dönüştürülür; ilk olarak RNA Polimeraz-II transkripsiyonla kalıp DNA'dan pre-mRNA sentezler, ikinci adımda işlemlenme faktörleri ile pre-mRNA işlenerek olgunlaştırılır ve son adımda proteinlerle paketlenen mRNA translasyon için çekirdekten sitoplazmaya taşınır^{6,8}. Pre-mRNA'nın olgunlaşması için 5' ucuna 7-metilguanozin eklenmesi gereklidir ve transkript 20-30 nükleotid uzunluğa ulaştığında eklenir. İntronların uzaklaştırılması ve ekzonların birleştirilmesi transkripsiyonla eş zamanlı olarak yürür ancak transkript genden ayrıldıktan sonra tamamlanır⁶(Şekil-1). Memeli genlerinde pre-mRNA'nın 3' ucundaki konsensüs AAUAAA dizilerinden yaklaşık 25 baz aşağıdan kesilir ve poli(A) polimeraz(PAP) enzimi ile poli-A kuyruk eklenir⁶.

2.2 Klasik Kesip-Ekleme Sinyalleri ve Alternatif Kesip-Ekleme Modelleri

Pre-mRNA'dan intronların doğru ve etkin bir şekilde uzaklaştırılması, gen ifadesinin doğru yapılması için zorunludur^{1,9}. Alternatif pre-mRNA işlemlenmesi ("*splicing*") farklı ekzon içeriklerine sahip, yapısal ve işlevsel olarak birbirinden farklı mRNA ve proteinler üretir^{4,10}. Protein kodlayan insan genlerinin %90'ından fazlası tek bir pre-mRNA biriminin alternatif işlemlenmesi ile çok sayıda izoform oluşturur^{4,7,10-14}. Genom projesinin 2004'te tamamlanması ile insan genomunun beklenenden çok daha düşük, yaklaşık 23.000 protein kodlayan gen içerdiği ortaya konmuştur⁴. Alternatif pre-mRNA işlemlenmesi, genomun işlevsel çeşitliliğine yol açan temel mekanizmalardan biridir^{1,4,15-18}. Muhtemelen pre-mRNA alternatif işlemlenmesinin en çarpıcı örneği tek pre-mRNA'dan olası 38.016 olgun mRNA üreten *Drosophila melanogaster*'e ait *Down syndrome cell-adhesion molecule (Dscam)* genidir^{5,19}. Her ne kadar bu alternatif ürünlerin sadece bir kısmı hücre içerisinde üretilse de *Drosophila*'nın genomunun ~14.000 genden oluştuğu düşünülürse alternatif pre-mRNA işlemlenmesinin çeşitlilik için inanılmaz bir kaynak oluşturduğu görülür^{1,15,17}. Yüksek ökaryotlarda doğru pre-mRNA işlemlenmesi için klasik konsensüs splice dizileri; 3', 5' kesip ekleme bölgeleri ve dallanma bölgesindeki az korunmuş^{2,20} intronik *cis*-elementlerin eşlik etmesine gereksinim duyar^{5,1} (Şekil 2). Bu diziler ekzon-intron sınırlarının belirlenmesi için zorunlu, ancak tek başına yeterli değildir^{1,9,11,21,22}. Alternatif pre-mRNA işlemlenmesi ile farklı ekzon içeriklerine sahip ürünler, alternatif 5' ve 3' splice dizileri seçilerek alternatif

ekzon segmentlerini içeren ürünler ve intron içerilmesi veya farklı promotör diziler kullanılarak değişik içeriğe sahip mRNA ürünleri oluşturulabilir²³ (Şekil-2).



Şekil-2 Klasik splicing sinyalleri ve alternatif splicing modelleri. **a)** Dallanma bölgesi, 3' ve 5' kesim bölgesine ait korunmuş dizi motifleri gösterilmiştir. (Y)n: poliprimidin bölgeyi ifade etmektedir, motiflerde gösterilen harf yükseklikleri nükleotidin motif içerisindeki belirtilen pozisyonda bulunma olasılığı ile doğru orantılı olarak ifade edilmiştir ve 1683 insan intronu verilerine dayanmaktadır¹. **b)** Yaygın altı alternatif splicing modeli gösterilmiştir²³ **c)** Alternatif promotör kullanılarak farklı mRNA ürünleri oluşturulmaktadır²³.

İntronlar çok sayıda doğal konsensüs kesim (*splice*) bölgesi sinyalleri ile iyi eşleşme gösteren yalancı (*pseudo*) diziler içerirler ve bunlar bir takım *pseudo* ekzonu belirlerler. *Pseudo* ekzonlar genelde gerçek ekzonlardan daha fazla bulunurlar ancak normalde olgun mRNA da bulunmazlar^{1,20-22,24}. Yüksek hata riskine karşın *splicing* mekanizması genelde yüksek bir doğrulukla gerçekleşir²⁴. Bu doğruluğun büyük ölçüde klasik splice sinyallerine ilave *cis*-düzenleyici elementler (*splicing cis-regulatory elements: SRE*) olan işlemlenme güçlendirici (*splicing enhancer*) ve susturucusu (*silencer*) dizilerinin etkisi ile sağlandığı düşünülmektedir^{1,24,25}.

2.3 Splicing Mekanizması

Pre-mRNA işlenmesi *spliceosome* olarak ifade edilen beş snRNP (*small nuclear ribonucleoprotein*) (U1, U2, U4/U6 ve U5)^{17,23,24,26-28} ve 170 civarı snRNP olmayan proteini içeren hücredeki en karmaşık²⁴ makro-molekül yapılardan biri tarafından gerçekleştirilir^{5,18}. Pre-mRNA intronları iki ardışık *trans* esterleştirme reaksiyonu sonucu uzaklaştırılır^{18,29-32}. İlk olarak intronun 5' ucunun dallanma noktasındaki adenozin'in 2'-OH gurubuna nükleofilik katılma tepkimesi gerçekleştirilir. Bu reaksiyon ile intronun 5' ucunun kesilerek dallanma noktasındaki adenozine bağlanması sonucu kement benzeri yapı oluşturulur. İkinci reaksiyon adımı ile intronun 3' ucunun kesilerek uzaklaştırılması ve ekzonların 3'-5' uçlarının birbirine bağlanması sağlanır^{7,18,29}. *Splice donor site* olarak bilinen 5'-SS intronun 5' ucunda genelde sabit GU di-nükleotidleri bulunur²² ve U1 snRNP ile etkileşir^{4,11,23,28,31}. *Splice acceptor site* olarak bilinen 3'-SS intronun 3' ucu, genelde sabit AG dinükleotidlerini taşır ve dallanma noktasında yer alan A nükleotidini takip eden poli-primidin bölgeden sonra gelir^{4,22,23,28}. Dallanma bölgesi dizileri çoğunlukla 3'SS'nin 18-40 nükleotid önünde yer alırlar^{8,29,33}. Bu diziler U2 tip konsensüs kesim bölgeleri olarak ifade edilirler. Bunun nedeni U2 snRNP içeren '*spliceosome*' kompleksi tarafından tanınıyor olmalarıdır. U2 tip konsensüs splice dizileri 1683 insan intronunun verilerine dayanır⁴.

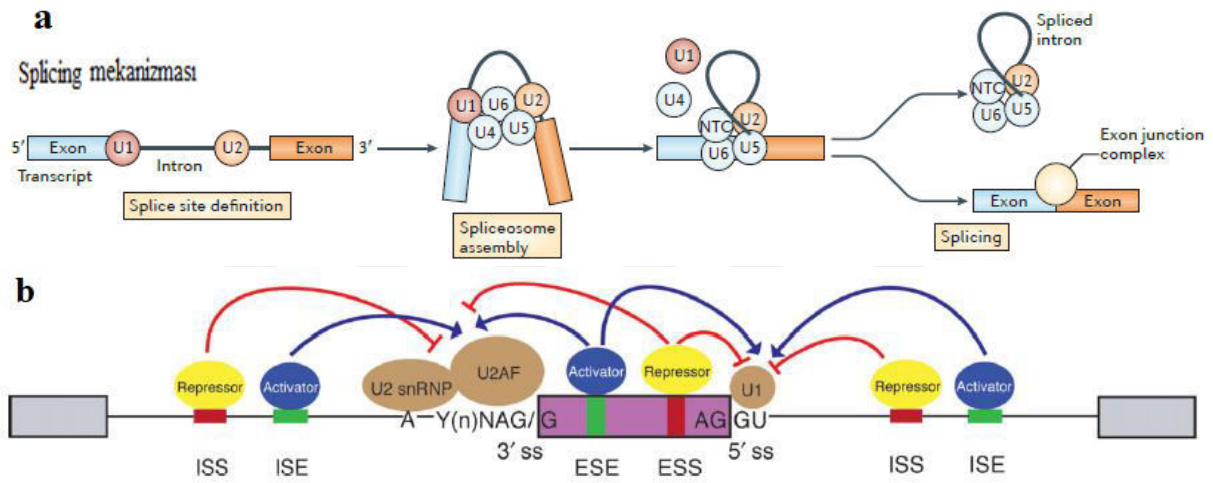
2.3.1 Splicing Mekanizması Düzenleyicileri

Pre-mRNA işlenmesi büyük ölçüde cis-etkili splice dizileri olarak ifade edilen primer pre-mRNA dizileri ve bu dizilere bağlanan trans etkili efektörler olarak ifade edilen proteinler tarafından düzenlenir¹⁰. Trans etkili efektörlerin derişimleri ve varyasyonları ile cis-etkili dizilerde oluşan değişimler, kanser ve birçok hastalığın gelişimine katkı sunan hatalı mRNA ürünlerinin oluşmasına neden olurlar^{5,10}.

2.3.1.1 Cis-etkili Splicing Düzenleyici Elementler

Pre-mRNA üzerinde yer alan dizileri ifade eden *Cis-etkili Splicing* düzenleyici elementler; ekzon-intron sınırlarının belirlenmesinde klasik kesip-ekleme sinyallerine katkı sunarlar. Pre-mRNA işlenmesinde ekzon sınırlarının belirlenmesine katkısı olan güçlendiriciler ve aksi etkiye sahip olan susturucular ekzon veya intron içerisinde bulunabilirler. Güçlendirici(*enhancer*) elementlerin ekzon veya intron içerisinde

bulunmalarına bağlı olarak *exonic splicing enhancer* (ESE) ve *intronic splicing enhancer* (ISE) olarak ifade edilirler. Aynı şekilde susturucu elementler ekzon veya intron içerisinde bulunmalarına bağlı olarak *exonic splicing silencer* (ESS) *intronic splicing silencer* (ISS) olarak ifade edilirler^{1,2,4,11,22}. Güçlendirici dizi motifleri az korunmuş, 6-8 nükleotitik kısa öncül mRNA dizilerinden oluşur ve özel arjinin-serin aminoasitleri yönünden zengin protein ailesi (SR protein ailesi) üyeleri için özgül bağlanma bölgeleri sağlarlar^{11,18,30,34,35}. Susturucu motifler hnRNP'ler (*heteronuclear ribonucleoprotein*) için özgül bağlanma dizileri sağlarlar. SR proteinleri etkiledikleri ekzonların olgun mRNA içerisinde yer almalarına, hnRNP'ler ise etkiledikleri ekzonunların atlanmasına (*exon skipping*) katkı sunarlar^{1,4,7,10,11,18,36}.



Şekil-3 Splicing mekanizması ve SRE elementlerinin etkileri **a)** Pre-mRNA'dan intronun 5' ucuna U1 snRNP dallanma noktasına U2 snRNP bağlanır. U1 ve U2 snRNP'ler tarafından 5' - 3' splice motiflerini tanımlanmalarını takiben *spliceosome* kompleksi oluşur ve intronun uzaklaştırılmasının ile komşu ekzonların birleştirilmesini katalizler³⁷. 'NineTeen Complex' (NTC) intron uzaklaştırılmasında önemlidir³⁸. **b)** ESE ve ISE dizilerine (yeşil) bağlanan aktivatörler (SRp) ekzonun içerilmesine, ESS ve ISS dizilerine (kırmızı) inhibitörler (hnRNP'ler) bağlanarak ekzonun atlanmasına katkı sunarlar³⁹.

2.3.1.2 Trans Etkili *Splicing* Düzenleyici Faktörler

SR proteinleri özgül dizilerine bağlanarak etkiledikleri ekzonların olgun mRNA içerisinde yer almasına katkıda bulunur. Bunun aksine, hnRNP'ler etkiledikleri ekzonunların atlanmasına (*exon skipping*) katkıda sunarlar^{1,4,11,18}. Hücre veya dokudaki SR proteinleri ve hnRNP miktarları arasındaki denge alternatif işlemlenmede kesim merkezi seçimini etkiler^{11,18,20}. SR proteinleri, N-terminallerinde RNA'ya özgül bağlanmalarını sağlayan bir veya iki RNA tanıma motifli (*RNA Recognition Motif: RRM*) barındırırlar^{17,24,26,30,31}. Bu

proteinler, C-terminallerinde serin-arjinin di-peptid tekrarları yönünden zengin bölge (*RS domain*) içerirler ve bu bölgeler etkilerini, *trans*-etkili işlemlenme faktörleri ile protein-protein etkileşimleri şeklinde gösterirler^{5,17,31}. RS domainlerinin *spliceosom* kompleksinin kurulumu ve kesim faktörlerinin kesim dizileri ile eşleşmesine yardımcı olduğu düşünülmektedir^{17,30}. SR proteinlerinin RS bölgelerini fosfatlayan çok sayıda kinaz enzimi belirlenmiştir ve bu olay RS bölgelerinin etkinliği için önemlidir^{5,17,23,26,30,39}.

2.4 *Splicing*'i Etkileyen Mutasyonlar

Kesim sinyal dizileri genetik hastalıklar ve kanserde mutasyonlar için sıklıkla hedef olurlar¹. Birçok kanserde yaygın bir şekilde tekrarlayan '*Spliceosom*' kompleksi temel proteinleri ve '*splicing*' faktörlerini kodlayan gen mutasyonları gözlenmektedir^{10,13,39}. Artan kanıtlar pre-mRNA'nın hatalı işlemlenmesi ile oluşturulan hatalı pteinlerin tümör gelişimine katkı sunduğuna işaret etmektedir. Hücrel *splicing* düzenleyici elementlerin (SREs: *Splicing Regulatory Elements*) derişimlerdeki değışimler ve çekirdek *spliceosome* kompleksindeki bileşenlerde oluşan mutasyonlar kanserdeki hatalı pre-mRNA regölasyonuna en temel sebeptir⁵. Tüm genomu kapsayan ve 27 kanser türünü içeren çalışmalarda, kanserle ilişkili 15.000'den fazla *splice varyantı* tespit edilmiştir¹⁰. Diğer bir çalışmada insanlarda genetik hastalıklara neden olan tüm nokta mutasyonların %15'inden fazlasının mRNA işlemlenmesinde hatalara neden olabileceği tahmin edilmiştir³³. Ancak bu çalışma sadece klasik kesim dizilerini etkileyen mutasyonlar dikkate alındığından, belirtilen oran gerçek oranın altında gibi görünmektedir³². Bazı kaynaklar, hastalıklara neden olan mutasyonların %50 kadarının işlemlenmeyi etkilediğini belirtmiştir^{11,17}. Nörofibromatoz tip1 (*NFI*)⁴⁰ ve Ataxia telangiectasia (*ATM*)⁴¹ genleri ile yapılan mRNA ve DNA düzeyindeki çalışmalarda, hastaların yaklaşık %50'sinde mRNA işlemlenmesindeki hatalara yol açan mutasyonların tespit edildiği ifade edilmektedir^{1,5,22,42}. Eğer bu mutasyonlar sadece genomik analizlerle sınırlandırılmış olsaydı (yalnızca DNA analizine dayandırılmış olsaydı), *NFI* mutasyonlarının %13'ü ve *ATM* mutasyonlarının %11'i çerçeve kayması, *nonsense*, *missence* veya *silence* mutasyonlar olarak yanlış sınıflandırılmış olacaktı^{1,22}. *Nonsense*, *missence* ve *silence* mutasyonlardan oluşan 50 nokta mutasyonu içeren, ekzon atlanması ile sonuçlanan *in-vivo* çalışmalarda, bu mutasyonların %50'sinden fazlasının ASF/SF2, SRp40, SRp55 veya SC35 SR proteinleri için hedef bağlanma dizileri olan ESE motiflerinden en az birini bozdukları

belirtilmiştir¹⁷. *Cis*-elementlerdeki mutasyonlar, ekzon atlanması, intron içerilmesi veya yeni bir kesim bölgesinin oluşmasına neden olarak hatalı pre-mRNA oluşumuna sebep olabilirler^{4,43}.

Yapılan bir çalışmada, *MCAD* (*Medium-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase*) geninin 5. ekzonunda yer alan c.362C>T *missence* mutasyonu ekzondaki bir ESE dizisini bozduğu ve bu sebeple 5. ekzonun atlanmasına neden olduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmada 5. ekzondaki c.351A>C sessiz mutasyonunun ekzondaki bir ESS dizisini bozarak c.362C>T mutasyonun olumsuz etkisinin ortadan kaldırarak ekzon 5'in içerilmesini sağladığı deneysel olarak gösterilmiştir⁴⁴. *SMN2* geninin 7. ekzonun 6. pozisyonunda yer alan bir sessiz mutasyon (ekzon7 6C>T) büyük ölçüde ekzon7'yi içermeyen (%80) mRNA ürününün oluşmasına neden olduğu belirtilmiştir^{1,11,32,44}. Diğer bir çalışma *BRCA2* genin 6. ekzonunda bulunan 744G>A *silence* mutasyonu (K172K) ekzon 6 ve ekzon 5-6'nın atlanması ile sonuçlanan iki farklı mRNA ürününün oluşmasına neden olduğu gösterilmiştir⁴⁵. *APC* geni ile yapılan bir çalışmada, 14. ekzonun orta bölgesinde 1869G>T *silence* mutasyonunu (R623R) barındıran genin mRNA ürününün ekzon 14'ten yoksun olduğu gösterilmiştir⁴⁶. *PAH* geninin 11. ekzonunda yer alan 1197A>T sessiz mutasyonunun (V399V) mRNA ürününde ekzon 11'in atlandığı gözlenmiştir⁴⁷.

2.5 Kanser

Kanser dünyadaki başlıca ölüm sebeplerinden biridir^{48,49}. Kanseri temelde hücresel DNA hasarı sonucu, hücre bölünmesi kontrolünün bozulmasına neden olan genetik bir hastalıktır⁵⁰. Somatik hücrelerin kansere evrimleşme süreçleri, peş peşe gelişen somatik hücre mutasyonlarından kaynaklı oluşan alt klonların seçilime uğraması ile gerçekleşir^{49,51}. Kanserin bu özelliği Darwinist seçim kuramına çok açık bir örnek teşkil etmektedir⁴⁹. Bir tümördeki edinsel mutasyonlar az sayıda (10-20) olabileceği gibi yüzlerce veya binlerce sayıda olabilir. Ancak bu mutasyonların küçük bir bölümü bulundukları hücrelere çoğalma⁵¹ ve kansere evrimleşme sürecinde seçim avantajı sağlayan sürücü (*driver*) mutasyonlar olup geri kalan büyük çoğunluk öncü klonlarda bulunmalarına rağmen hücrelere çoğalma avantajı sağlamayan yolcu (*passenger*) mutasyonlardır^{48,49,51}. Normal hücrelerin kanser hücrelerine transformasyonu genelde proto-onkogen veya tümör süpresör genlerde (TSG'ler) mutasyonların oluşmasını gerektirir^{52,53}. Bu nedenle oluşan somatik mutasyonların genom içerisine rastgele dağılması esnasında, proto-onkogen ve tümör süpresör genler de

mutasyonlara maruz kalabilirler. Bu mutasyonların bazıları sürücü mutasyonlar olarak rol oynar⁵¹.

Kanser genleri proto-onkogenler ve tümör-süpresör genler olmak üzere iki temel sınıfa ayrılır⁵⁰. Proto-onkogenler insan kanserlerinde işlev kazanma (*gain of function*) veya aktive olacak şekilde değişime uğrarlar^{50,51,54}. Genetik değişim, nokta mutasyonlar veya gen yeniden düzenlenmesi sonucu kodlanan proteinde kontrol edilemeyen aktivite artışı veya proteinin ifade düzeyinin artması ile sonuçlanabilir. Tümör süpresör genler kanser genlerinin ikinci sınıfını oluşturur⁵⁰. Tümör süpresörler; hücre bölünmesinin kontrolü, apoptozun uyarılması ve metastazın baskılanması gibi kanser engelleyici yeteneklere sahip geniş bir molekül grubunu ifade eder⁵³. İnsan kanserlerinde tümör süpresör gen mutasyonları işlev kaybı veya gen inaktivasyonuna neden olur^{50,51,54}. TSG'lerde işlev kaybı hücrelerin kontrolsüz bölünmesine ve sonuçta kanserleşmeye neden olabilir⁵³. TSG inaktivasyonuna neden olan mutasyonlar; gen ürününün aktivitesi için çok önemli role sahip gen bölgelerinde oluşan missens mutasyonlar, güdükleşmiş protein ürünlerini oluşumu ile sonuçlanan mutasyonlar, değişen boyutlarda bazı dizi eklenmesi veya silinmesine neden olan mutasyonlar⁵⁰ ve gen susturulması ile sonuçlanan epigenetik değişimler olabilir^{51,54}. *ATM*⁴¹, *NF1*⁵⁵, ve *APC*⁵⁶ genlerinde hastalığa neden olan mutasyonların büyük bölümünün protein güdükleşmesi ile sonuçlandığı belirtilmiştir^{41,55,56}. *BRCA1* ve *BRCA2* genlerindeki kalıtsal veya somatik mutasyonların çoğunluğu büyük genomik değişimlerden oluştuğu belirtilmiştir⁵⁷. Genel olarak onkogenlerin dominant, tümör süpresörlerin resesif kalıtıldığı⁵⁰ ve çift vuruş modeline göre tümör süpresör genlerin inaktivasyon için her iki alelinde mutasyona uğramasına gereksinim duyduğu ifade edilir⁵⁸. Ancak günümüzde bütün tümör süpresörlerin tamamen resesif olmadığı açıktır. Bazı TSG'ler için tek alel normal protein aktivitesi için yetersiz kalabilir (Haploinsufficiency). Diğer bazı TSG mutasyonları; dominant kalıtım özelliği⁵⁶ gösterebileceği gibi işlev kazanımı (*gain of function*) veya dominant-negatif özellikte gösterebilir⁵⁸.

2.6 Splicing Minigen Analizi Sistemi

Canlılarda mevcut olan genetik varyasyonların mRNA işlenmesi üzerine etkisini test etmek için bireyden doku veya organa özgü hücrelerin alınması çoğu zaman mümkün değildir. Çeşitli gen varyasyonlarının mRNA işlenmesi üzerine etkilerini test etmek amacı ile minigen analiz sistemi model olarak uygulanmaktadır. Minigen analiz sisteminde ilgili gen segmentleri uygun vektörler içerisine klonlanır, mutasyon oluşturulur, oluşturulan kontrol ve

mutant örnekler ökaryotik hücrelere transfeke edilir. Transfeke edilen hücrelerden RNA izolasyonu ve cDNA sentezlenir. PCR ile ilgili cDNA bölgeleri çoğaltıldıktan sonra DNA dizi analizi yapılır. Bu deneysel analiz sistemi genetik varyasyonların mRNA işlenmesi üzerine etkisini deneysel olarak analiz ederek anlamamıza katkı sunar^{43,59-64}. Bu amaçla bizimde kullandığımız ‘*exontrap*’ vektörü pET01 (MoBiTec) birçok çalışmada kullanılmıştır⁶⁰⁻⁶⁴.

Splicing minigen analiz sistemi kullanılarak birçok faydalı çalışma yapılmıştır. Konjenital miyastenik sendromlu hastalarında *GMPPB* geninde tespit edilen c.130-3C>G mutasyonunun (ENSEMBL transcript ID ENST00000480687) mRNA işlenmesi üzerine etkisini tespit etmek üzere genin 2-3-4. ekzonlarını içeren segmenti pET01 plazmidi (MoBiTec) içerisine klonlanmış ve SDM protokolü ile mutasyon oluşturulmuştur. Kontrol ve mutant plazmidler TE671 hücre hattı içerisine transfeke edilmiş kontrol plazmid normal şekilde splice olurken mutant plazmid örneklerinde ekzon2’yi içermeyen ve 2 ve 3. Ekzonların ikisini de içermeyen normalden kısa iki ürünün oluştuğu gözlenmiştir⁶⁴. *Stickler* sendromlu bir hastada *COL1A1* geninde gözlenen c.3168+5G>A (NM_001854.3) mutasyonu için pET01 plazmidi ile yapılan minigen analizi, kontrol örneğinin doğru şekilde splice olduğu, mutant örnekte ise ekzon 41’in tamamen atlandığı gösterilmiştir⁶³. Oküler albinizm görülen Japon bir ailede *GPR143* geninde (Gene ID: 4935, OMIM: #300808) tespit edilen c.659-131 T>G intronic mutasyonunu test etmek üzere, ekzon 5-6 ve intron 5’i içeren gen segmentinin pET01 plazmidi içerisine klonlanması ile minigen analizi yapılmıştır. Analiz sonucunda kontrolün normal şekilde splice olduğu mutant örneğin ise kriptik bir *splice-site*’nin aktivasyonu sonucu ekzon 5’in 5’ ucunda 41bp’lik ilave intronik dizi içerecek şekilde hatalı ürün oluşumuna neden olduğu tespit edilmiştir⁶¹. Benzer bir çalışma ile Fare *Tmem48* geninin 6. ekzonunda gözlenen (4:107053225–107053226) di-nükleotid (GG>TT) değişiminin tek aminoasit değişimine(R>L) neden olduğu düşünülmüştür. Ancak *Tmem48* geninin 6. ekzonunun pET01 içerisine klonlanması ile yapılan minigen analiz kontrolün normal şekilde splice olduğu mutant örnekte ise 6. ekzonun tamamen atlandığı gösterilmiştir⁶⁰.

3. GEREK VE YÖNTEM

Bu çalışmada, kanser hücrelerinde saptanmış somatik mutasyonları kataloglayan COSMIC (*Catalogue of somatic mutations in cancer*) veri tabanında kayıtlı hücre hatlarında, tümör süpresör genlerindeki mevcut sessiz mutasyonlar taranmış ve bu mutasyonların pre-mRNA işlemlenmesi üzerine olası etkisi konusunda analiz yapan HSF (*Human Splicing Finder*) biyoinformatik analiz sistemi kullanılmıştır. Pre-mRNA işlemlenmesini etkileme olasılığı anlamlı düzeyde yüksek olan mutasyonlar transkript düzeyinde analiz yapılmak üzere seçilmiştir. Bu hücre hatlarındaki mutasyonların pre-mRNA işlemlenmesi üzerine etkisini deneysel olarak analiz etmek üzere aşağıdaki adımlar uygulanmıştır.

- Sağlıklı bir bireyden periferik kan alınarak DNA izolasyonu yapıldı.
- Kontrol gurubu oluşturulmak üzere beş gen segmentleri restriksiyon enzim kesim motiflerini (XhoI ve XbaI) taşıyan özgül primerler kullanılarak PCR ile çoğaltıldı.
- PCR ürünleri ve pET01 plazmid'i XhoI ve XbaI enzimleri ile kesildikten sonra, insert-DNA'lar plazmid içerisine paketlenildi.
- *Competent E.coli* hücreleri (DH5-Alpha) insert-DNA içeren plazmidlerle transforme edildi.
- Dizayn edilen mutant primerler kullanılarak SDM protokolü ile mutasyonlar oluşturuldu ve *Competent E.coli* hücreleri mutant plazmidlerle transforme edildi.
- DNA dizi analizleri ile klonlama ve mutasyonların doğru şekilde oluşturulduğu doğrulandı.
- Kontrol ve mutant örnekler HeLa hücreleri içerisine transfekte edildi.
- Transfeksiyon sonrası hücre hatlarından total RNA izolasyonu yapıldı
- Elde edilen RNA'dan cDNA sentezlendi
- Elde edilen cDNA'larda klonlanan gen segmentleri ve içerdikleri mutasyonların etkisini test etmek üzere pET01 plazmidinin 3' ve 5' uçtaki ekzonlarla eşleşen primerler kullanılarak PCR ile çoğaltıldı.
- Jelde PCR ürünlerinin varlığı kontrol edildikten sonra dizi analizleri yapıldı.
- Dizi analiz sonuçlarının normal cDNA dizileri ile karşılaştırılması ve çalışma kapsamındaki mutasyonların pre-mRNA işlemlenmesi üzerine olası etkileri ortaya kondu.

Çalışılmak üzere seçilen TSG mutasyonların Tablo1'de gösterilmiştir. Çalışma konusu sessiz TSG mutasyonların HSF analiz sonuçları Tablo2'de özetlenmiştir.

Tablo-1: Çalışma konusu mutasyonlar ve gözlemlendikleri hücreler

Kod	Gen	Ekzon	Mutasyon(cDNA/ Peptid)	Mutasyon taşıyan Hücreler (COSMIC veri tabanından alınmıştır)*
1.1	CDKN2A 1. Mut	Ekzon2	c.273G>A / p.L91L	S88513 (hematopoetik ve lenfosit doku kültürü)
1.2	CDKN2A 2. Mut	Ekzon2	c.339G>T / p.L113L	639-V
1.3	CDKN2A 3. Mut	Ekzon2	c.342C>G / p.P114P	Pa155X
2.1	TP53 1. Mut	Ekzon8	c.793C>T / p.L265L	BxPC-3
2.2	TP53 2. Mut	Ekzon8	c.801G>T / p.R267R	CHE04-49/ ICC001T/ ICC001T/ Pa204X
3	BAI3(ADGRB3)	Ekzon8	c.1419C>T / p.G473G	8062306/Pa18C/CPCG0369-F1/EOPC-07_tumor
4	CABLES2	Exon8	c.1002C>T / p.Y334Y	Pankreas primer kanser dokusu
5	PTCH2	Exon2	c.249A>G / p.E83E	Br04X / D-542MG

*: <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>

Tablo-2: Çalışmadaki TGS mutasyonlarının HSF analiz sonuçları özetlenmiştir.

Gen- Mutasyon	Hücreler	Ekzon- Boyut	HSF Analizine Göre Etkilendiği Düşünülen Motifler (cDNA)
CDKN2A 1. Mutasyon c.273G>A / p.L91L	S88513 (hematopoetik ve lenfoid doku kültürü)	Ekzon2	-PESEx3 (268_278) -EIE (272_277) +9G8 (271_276) -9G8 (273_278) -ESSx2 (268_274) -IIEx2 (268_274) -hnRNP A1 (272_277) -ESRx3 (268_276)
CDKN2A 2. Mutasyon (c.339G>T p.L113L)	639-V (DSMZ no:ACC 413)	Ekzon2	-SRp40 (334_340) -SF2/ASF (337_343) -EIE (337_342) +IIE (335_340) +ESR (335_340)
CDKN2A 3. Mutasyon c.342C>G / p.P114P	Pa155x (pankreas doku kültürü)	Ekzon 2	+SC35 (335_342) +PESE (341_348) -EIE (337_342) +IIE (342_347) +ESR (342_347)
TP53 1. Mutasyon (c.793C>T p.L265L)	(ATCC CRL-1687) BxPC-3	Ekzon8	-SC35(789_796) -EIE(790_795) +EIE(792_797) +IIE x 3 (791_798) -ESR x2 (789-797)
TP53 2. Mutasyon c.801G>T p.R267R	Kanser primer doku kültürleri K022_C01(akciğer)/ Pa204X(pankreas)	Ekzon8	+SRp40(802_808) -EIEx5(789_807) -9G8(802_807) -hnRNP A1 (789_804)

BAI3(ADGRB3) c.1419C>T / p.G473G	Pankreas ve prostat kanseri primer doku kültürleri 8062306(pankreas)/ CPCG0369-F1 (prostat)/ EOPC-07_tumor (prostat)	Ekzon8	-SC35 (1417_1424) -SF2/ASF (1419_1425) -ESE (1415_1420) +EIE (1416_1421) +ESS (1416_1421) +IIEx6 (1414_1424)
CABLES2 c.1002C>T /p.Y334Y	Pankreas kanseri (primer doku)	Exon8	-SRp55 (1000_1005) -ESE (998_1003) +EIE (998_1003) +IIEx4 (999_1007) +ESR (1002_1007)
PTCH2 c.249A>G / p.E83E	Glioma (merkezi sinir sistemi primer doku)	Exon2	+SRp55 (248_253) -ESEx2 (244_250) -PESE (243_250) +PESEx2 (247_255) -EIE (248_253) -9G8 (247_252) -Tra2-β (248_252) +ESR (246_251) -ESR (248_253)

- : merkezin bozulduğunu ifade eder

+ : yeni merkez oluşumunu ifade eder

ESE: *Exonic splicing enhancer*, ESS: *Exonic splicing silencer*, PESE: *putative exonic splicing enhancer*, PESS: *putative exonic splicing silencer*, EIE: *Exonic-identity element*, IIE: *intron-identity element*, ESR: *Exonic Splicing regulatory element*, hnRNP: *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein*

3.1 Araştırmanın Tipi

Bu çalışma, COSMIC veri tabanında tümör süpresör genler için tanımlanmış bazı mutasyonların mRNA işlenmesi üzerine olan etkisini belirlemeye yönelik tanımlayıcı girişimsel olmayan bir deneysel araştırmadır.

3.2 Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Çalışmamız Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi-Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında Ocak 2016- Haziran 2017 tarihleri arasında gerçekleştirilmiştir.

3.3 Araştırma Evreni ve Örneklemi

Bu araştırmada, COSMIC (Catalogue of somatic mutations in cancer) veri tabanında kayıtlı sessiz TSG mutasyonlarının HSF(Human Splicing Finder) biyoinformatik analizi ile

ESE dizilerini bozan ve/veya yeni ESS dizilerinin oluşmasına yol açarak Pre-mRNA işlenmesini etkileyebilecek sekiz farklı sessiz ekzonik mutasyon seçilmiştir. Çalışmada sağlıklı bir insandan elde edilmiş DNA örneği, DH5α kompetent *E. Coli* hücreleri ve HeLa (ATCC® CCL-2™) hücre hattı (serviks kanseri hücreleri) kullanılmıştır.

3.4 Çalışma Materyali

Çalışmada insan DNA örneği, DH5α kompetent *E.coli* hücreleri ve HeLa hücre hattı kullanılmıştır.

3.5 Veri Toplama Araçları

Bu çalışmada, sessiz TSG mutasyonları belirlemek amacı ile COSMIC veritabanı, mutasyonların pre-mRNA işlenmesi üzerine olası etkisini analiz etmek için HSF (Human Slicing Finder version 2.4.1, <http://www.umd.be/HSF/#>) biyoinformatik analiz sistemi kullanıldı. Deneysel aşamada; PCR, Site-Directed Mutagenesis (SDM) protokolü, klonlama, transfeksiyon, bakteri transformasyonu, cDNA sentezi, DNA dizi analizi gibi yöntemlere başvurulmuştur.

3.5.1 Periferik Kandan Genomik DNA İzolasyonu

Periferik kandan DNA izolasyonu MACHEREY-NAGEL (*NucleoSpin® blood cat:740951.50*) kit protokolüne uygun şekilde aşağıda belirtildiği gibi yapıldı.

- Nükleaz içermeyen 1,5 mL ependorf içerisine alınan 200 µL periferik kan üzerine 25 µL proteinaz K ve 200 µL B3 tamponu eklendi 70°C’de 10-15 dakika bekletildi
- 210 µL etanol (%96-100) eklendi ve kuvvetlice karıştırıldı.
- Her bir DNA kolonu (NucleoSpin Tissue Column) bir toplama tüpüne yerleştirildi ve karışım kolona yüklendi. 11.000xg’de 1 dakika santrifüj edildi.
- Kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi ve 500µL yıkama tamponu (BW) eklendi, 11.000xg’de 1 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpü atıldı.

- Yeni bir toplama tüpüne yerleştirilen kolona 600µL B5 tamponu eklendi. 11.000xg'de 1 dakika santrifüj edildi ve alttaki faz atıldı.
- Yeni bir tüpe alınan slika-membran 11.000xg'de 1 dakika santrifüjlenerek etanol kalıntıları uzaklaştırıldı.
- Kolon 1.5mL ependorf tüpüne yerleştirildi ve önceden 70°C'ye ısıtılmış 50 µl BE tamponu kolona tatbik edildi. Oda sıcaklığında 1 dakika bekletildikten sonra 11.000xg'de 1 dakika santrifüj edilerek DNA ependorf tüpüne aktarıldı.

Elde edilen DNA'nın saflığı ve derişimi NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) ile spektrofotometrik olarak ölçüldü. Derişim 82ng/µl ve A_{260/280} oranı 1.82 olarak ölçüldü.

3.5.2 Gradient PCR Protokolü

Doğru PCR koşullarını belirlemek amacı ile üç farklı *annealing* sıcaklık seçilerek (55-57,5-60°C) gradient PCR yapıldı. CDKN2A dışındaki tüm örneklerde seçilen her üç annealing sıcaklığında ürün oluştuğu gözlemlendi. CDKN2A'ya ait örneğin PCR reaksiyonunda GC zengin diziler için geliştirilmiş reaksiyon tamponu (*New England Biolabs, OneTaq® 5XGC Reaction Buffer cat:B9023S,UK*) kullanılarak ürün elde edildi.

Tablo-3: Klonlama için tasarlanmış restriksiyon enzim motiflerini taşıyan PCR primerleri.

1 CDKN2A(118 bp intron - Ekzon2 - 190 bp intron, PCR ürünü:631 bp)

1 F: ATctcgagAATTAGACACCTGGGGCTTGTG

1 R: GGtctagaGGGATTATTTCCCATTTGCCGC

2 TP53(216 bp intron - Ekzon8 - intron 62 bp, PCR ürünü: 431 bp)

2 F: ATctcgagCGGCGGGGAATCTCCTTAC

2 R: GGtctagaGTGAATCTGAGGCATAACTGCAC

3BAI3 (210 bp intron - Ekzon8 – intron 158 bp, PCR ürünü: 549 bp)

3 F: ATctcgagAAGTTTAGCACTGAGCTTGAC

3 R: GGtctagaGGGATGCCCCACATAGTACAG

4 CABLES2(118 bp intron - Ekzon8 – intron 348 bp, PCR ürünü: 589 bp)

4 F: ATctcgagAAGCCACACCGTATGCATGT

4 R: GGtctagaAGGGCCACGGAATCTACTCA

5 PTCH2(173 bp intron - Ekzon2 – intron 151 bp, PCR ürünü: 534 bp)

5 F: ATctcgagGGGATGGTGGGTGTTACATCTT

5 R: GCtctagaGTTCTAGATGCCAGGTGTAG

Primerler Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>) ve Primer-blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) programları kullanılarak tasarlanmıştır. Forward primerlerin 5' uçlarına XhoI kesim dizileri (ctcgag), Reverse primerlerin 5' ucuna XbaI kesim dizileri (tctaga) eklenmiştir.

PCR reaksiyonunda kullanılan primerler tablo-3’de verilmiştir. Çalışılan gen bölgeleri seçilirken PCR ürünü DNA dizilerinin Xho I ve Xba I enzimleri tarafından kesilip-kesilmedikleri *Serial Cloner 2.6* programı ile kontrol edildi ve PCR ürünlerinin bu iki enzim tarafından kesilmediği görüldü. PCR reaksiyonu toplam hacmi 25 µl olacak şekilde kuruldu. PCR reaksiyonu için 0.2 µl’lik DNase ve RNase içermeyen steril PCR tüpleri kullanılmıştır. Reaksiyon kurulurken kalıp DNA ve su haricindeki bileşenler ana karışım halinde hazırlanıp toplam hacimden gerekli miktarlar PCR tüplerine dağıtılmıştır. Tüpler “Thermal Cycler” cihazına (96 Universal Gradient Pqstar, Thermal Cycler) zaman kaybedilmeden yerleştirilerek PCR reaksiyonu başlatıldı. PCR reaksiyonu bileşenleri ve termal koşullar tablo-4 ve tablo-5’te belirtilmiştir.

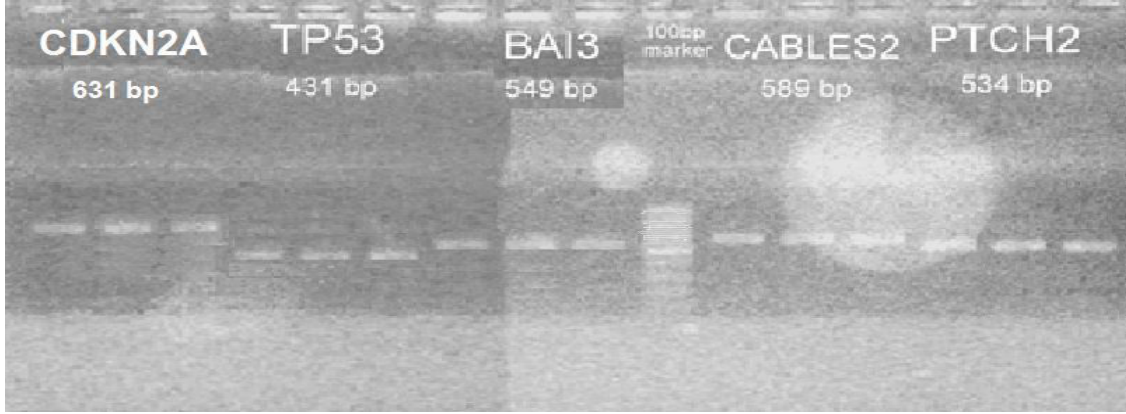
Tablo-4 Gradient PCR reaksiyonu bileşenleri

Bileşenler	25 µl Hacim için	Son derişim
OneTaq Hot Start 2X Master Mix (NEB Cat:M0484S)	12.5 µl	1X
10 µM Forward Primer	0.5 µl	0.2 mM
10 µM Reverse Prime	0.5 µl	0.2 mM
Kalıp DNA	2 µl (100 ng/ µl)	200 ng
Nükleaz İçermeyen Su	9.5 µl	

Tablo-5: Gradient PCR koşulları

Adımlar	Sıcaklık	Süre
Başlangıç denatürasyon	94 °C	5 dakika
	94 °C	25 saniye
35 döngü	59±1,5 °C	40 saniye
	68 °C	45 saniye
Final uzama	68 °C	5 dakika

Gradient PCR ürünleri %1’lik agaroz jelde yürütüldü (şekil-4).



Şekil-4: Insert DNA'lara ait Gradient PCR Ürünlerinin %1'lik Agaroz jel görüntüleri. Her bir gen için soldan-sağa sırası ile 55-57,5 ve 60°C annealing sıcaklıklarında elde edilmiş PCR ürünleri jele yüklenmiştir.

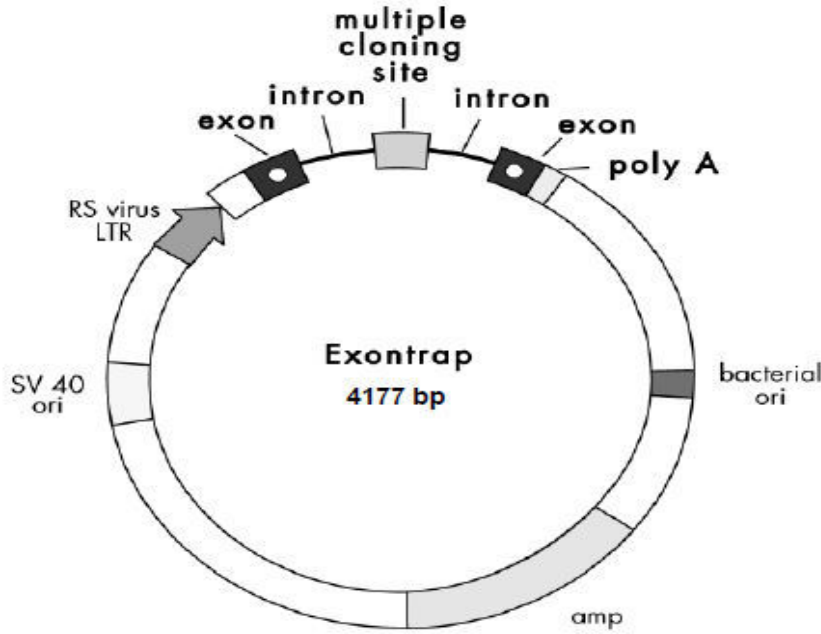
3.5.3 Klonlama Aşaması

Bu çalışmada mRNA işlemlenmesini test etmemize olanak sağlayan pET01 exon-trap (MoBiTec) vektörü kullanıldı. PCR ile çoğaltılan insert DNA'lar ve pET01 plazmid Xho I ve Xba I enzimleri ile iki noktadan kesildi. Kesilmiş plazmid ve PCR örnekleri jelde yürütüldükten sonra jelden izole edildi. Kesilen insert DNA T4 ligaz enzimi (Thermo Scientific Cat: EL0014) ile doğrusal plazmid içerisine paketlenildi. *Competent E. Coli* hücreleri (DH5-Alpha) ligasyon ürünü DNA ile transforme edildi. Ampisilin pozitif LB agar üzerinde kültürü yapılan bakterilerin oluşturdukları kolonilerden örnek alınarak Koloni-PCR yapıldı. Koloni-PCR sonucu pozitif olan örneklerin Amp (+) LB içerisinde kültürü yapıldı. Kültürden sonra *E. Coli*'lerden plazmid izolasyonu yapıldı. Klonlamanın doğruluğunu test etmek amacı ile izole edilen plazmidler aynı enzim çifti ile kesildi ve jele yüklenerek beklenen bantların varlığı kontrol edildi. Beklenen bant özelliği gösteren örneklerin DNA dizi analizleri yapıldı.

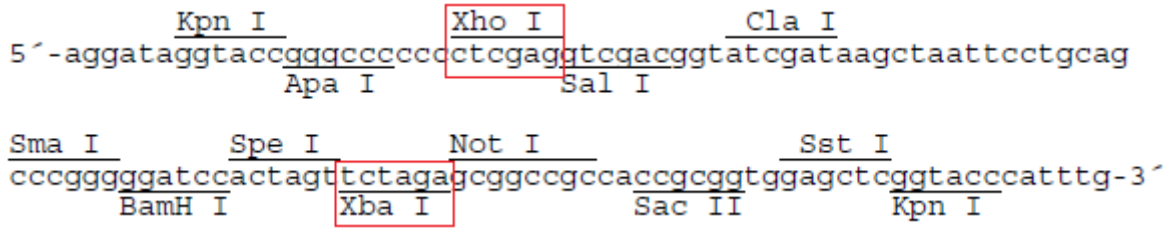
3.5.3.1 Exontrap Vektör pET01 Özellikleri

Exontrap vektörü 5' ve 3' ekzonları birbirinden ayıran ve çoklu klonlama bölgesi içeren 600 bazlık intronik bölge ile ayrılmış bir mini gen barındırır. Bu mini-gen bölgesi güçlü bir ökaryotik gen promotörü olan *Rous Sarcoma Virus* (RSV) 'Long Terminal Repeat' (LTR) kontrolünde eksprese olur. Plazmidin içerdiği mini genin 3' ucundaki ekzonun devamında poly-A bölgesi ve Ampisilin direnç geni taşır. Eğer plazmid içerisine klonlanan DNA parçası ekzon içeriyor ve doğru şekilde yerleştirilmişse plazmitten üretilen mRNA ekzonu içerecek,

klonlanan DNA ekzon içermiyor ise mRNA işleme sırasında kesilip uzaklaştırılacaktır. pET01 plazmidi içerdiği prokaryotik (Bakteriyel Ori) ve ökaryotik(SV40 Ori) replikasyon orjinleri sayesinde her iki hücre tipinde de replike olur. Plazmid içerisindeki 5' ve 3' ekzonlar RAT insülin2 geninin 1 ve 2. ekzon dizilerine aittir⁶⁵. pET01 plazmidinin şematik olarak gösterimi şekil-5'te verilmiştir, çoklu klonlama bölgesi şekil-6'de verilmiştir.



Şekil-5: pET01 plazmidin şematik gösterimi



Şekil-6: pET01 plazmidin çoklu klonlama bölgesi.

Gen segmentleri plazmidin çoklu klonlama bölgesi içerisinde Xho1 ve Xba1 restriksiyon enzim kesim motifleri arasına paketlenmiştir.

3.5.3.2 Plazmid ve İnsert DNA'ların Enzim Kesimleri

Xho I ile Xba I enzimleri kullanılarak çift kesim yapılmak üzere her bir örnek ve boş plazmid nükleaz içermeyen 200 µL ependorf tüpünde tablo-7'de belirtildiği gibi hazırlandı.

Tablo-7: Restriksyon enzim kesimi reaksiyonu bileşenleri.

İçerik	Plazmid DNA	PCR Ürünü
Nükleaz içermeyen su	14µL	15µL
10X FastDigest Green Buffer	2µL	3µL
DNA	2µL(1µg'a kadar)	10µL (~0.2 µg)
FastDigest Xba I Enzimi (Thermo Scientific Cat: FD0684)	1µL	1 µL
FastDigest Xho I Enzimi (Thermo Scientific Cat: FD0694)	1µL	1µL
Toplam Hacim	20µL	30 µL

Tablo-7'de belirtilen karışımı içeren tüpler vortekslenerek iyice karıştırıldı. Tüpler 5 dakika 37 °C'de inkübe edilerek ürünler kesime uğratıldı ve 20 dakika 65 °C'de inkübe edilerek enzim inaktive edildi. Örnekler %1 agaroz jelde yürütüldü.

3.5.3.3 Enzim Kesimi Yapılan Plazmid ve İnsert-DNA'ların Saflaştırma Protokolü

Saflaştırma için MN kiti (*MACHEREY-NAGEL Cat: 740609.50*) kullanıldı. Enzim kesimi sonrası ürünlerin saflaştırılmasında aşağıdaki protokol uygulanmıştır.

1. 20µL reaksiyon karışımı üzerine 50 µL NT1 tamponu eklendi ve iyice karıştırıldı.
2. Karışım kolona yüklendi 11.000xg'de 30 saniye santrifüj edildi ve elüat uzaklaştırıldı
3. Kolona 700 µL NT3 tamponu eklendi, 11.000xg'de 30 saniye santrifüj edildi ve elüat uzaklaştırıldı.
4. Kolon 11.000xg'de 1dakika santrifüj edilerek membran kurutuldu.
5. Kolon 1,5 mL steril bir ependorf tüpüne yerleştirildikten sonra 20 µL elüsyon tamponu eklendi. Bir dakika oda sıcaklığında bekletildi ve 11.000xg'de 60 saniye santrifüj edilerek DNA elde edildi.

3.5.3.4 Ligasyon basamağı

Enzimatik kesim sonrası doğrusal plazmid ve insert DNA'lar ligasyon için 1:2, 1:3 ve 1:5 molar oranlarında bir araya getirildi. Reaksiyon için T₄ DNA Ligaz (*Thermo Scientific, EL0014*) kullanıldı. Reaksiyon içeriği Tablo-8'de verilmiştir.

Tablo-8: T₄ Ligaz enzimi ligasyon basamağına ait reaksiyonu bileşenleri

DNA'lar	DNA miktarları (Belirtilen molar oranları için)			10x T ₄ DNA Ligaz buffer	T ₄ DNA Ligaz 5U/ µL	Toplam Hacim Su* ile 20µL'ye tamamlandı
	1:2	1:3	1:5			
pET01plazmid(liner)	45ng	45ng	45ng	2µL	0, 2µL	20µL
CDKN2A (insert DNA)	21ng	31,5ng	52,5ng	2µL	0,2µL	20µL
TP53(insert DNA)	14ng	21ng	35ng	2µL	0,2µL	20µL
BAI3 (insert DNA)	18ng	27ng	45ng	2µL	0,2µL	20µL
CABLES2 (insert DNA)	20ng	30ng	50ng	2µL	0,2µL	20µL
PTCH2 (insert DNA)	17,6ng	26,4ng	44ng	2µL	0,2µL	20µL
Oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildikten sonra bakteri transformasyonu için direkt kullanıldı.						

* Nükleaz içermeyen su kullanıldı.

3.5.3.5 Bakteri Transformasyonu

T₄ ligaz enzimi (*Thermo Scientific Cat: EL0014*) ile insert DNA'lar doğrusal plazmid içerisine paketleni. Paketlenen plazmid yapısı kompetant *E. Coli* hücrelerine aşağıdaki protokole göre aktarıldı.

1. Her biri 50µL hacme sahip *DH5-Alpha (Competent E.coli)* hücreleri -80 °C'den çıkarılarak 30 dakika süreyle buz içerisine gömüldü. Bu süre içerisinde tüpler 3-4 kez hafifçe vurularak hücrelerin karışması sağlandı.
2. Her bir ligasyon reaksiyonu örneğinden 5µL buz içerisindeki *DH5-Alpha* hücre süspansiyonu içerisine alındı 30 dakika süreyle 3-4 kez hafif tüplere vurularak tüp içeriğinin karışması sağlandı
3. DNA ve Hücre karışımı içeren tüpler 42 °C'ye ısıtılmış su içerisinde 50 saniye süreyle gömüldü, sonrasında tüpler hızlı bir şekilde buz içerisine gömüldü.

4. Bek alevine yakın konumda hücreler 250 µL Ampisilin (-) LB içerisine alındı ve bir saat süreyle 200 rpm ve 37°C’de çalkalayıcı inkübatörde kültürü yapıldı.
5. Kültür sonrası hücreler bek alevine yakın bir konumda Amp (+) LB-Agar içeren petrilere yaygın ekim yöntemi ile ekildi ve 37°C’de 16 saat süreyle inkübe edildi. En iyi sonuçlar 1:3 plazmid insert DNA (molar oran) ligasyon örneklerinden elde edildi.
6. Ampisilin pozitif LB-Agar üzerinde bakterilerin oluşturdukları koloniler pipet ucu ile alınarak Koloni-PCR yapıldı.
7. Koloni-PCR sonucu pozitif olan örneklerin Amp (+) LB içerisinde kültürü yapıldı. Kültürden sonra *E. Coli*’lerden plazmid izolasyonu yapıldı.

3.5.3.6 Koloni PCR

Ampisilin (+) LB-agar üzerinde oluşan koloniler 10µL pipet ucu ile bek alevine yakın bir konumda dikkatlice alınarak önceden hazırlanmış PCR tüpleri içerisine alınmış 50µL nükleaz içermeyen su içerisinde süspanse edildi. Hücre süspansiyonundan 35µL alınarak 1,5mL amp(+) LB içerisine alınarak çalkalayıcı inkübatörde 200 rpm 37 °C kültürü yapıldı. Hücre süspansiyonları kalıp DNA kaynağı olarak direk kullanıldı. Koloni PCR yapılırken ilk denatürasyon süresi uzatılarak hücre bütünlüklerinin bozulması ve DNA’nın reaksiyon karışımına geçmesi sağlanmaktadır. Koloni PCR reaksiyon bileşenleri ve reaksiyon koşulları tablo-9 ve tablo-10’de verilmiştir.

Koloni PCR örnekleri %1 agaroz jelde yürütüldü, jel elektroforez sonucu pozitif olan örneklerin bakteri kültürü yapıldı ve hücrelerden plazmid DNA izolasyonu yapıldı.

Tablo-9: Koloni PCR reaksiyon bileşenleri

Bileşenler	30 µl Hacim için	Son derişim
OneTaq Hot Start 2X Master Mix (<i>NEB</i> Cat:M0484S)	15 µl	1X
5 µM Forward Primer	1,2 µl	0,2 µM
5 µM Reverse Prime	1,2 µl	0,2 µM
Hücre süspansiyonu	12,6 µl	

Tablo-10: Koloni PCR koşulları

Adımlar	Sıcaklık	Süre
Başlangıç denatürasyon	98 °C	8'
35 döngü	94 °C	25''
	57,5 °C	40''
	68 °C	45''
Final uzama	68 °C	5'

3.5.3.7 Bakteri Kültürü ve Mini Prep Plazmid İzolasyonu

Koloni PCR sonucu pozitif çıkan örnekler daha önce 1,5 ml ependorf tüpünde kültürü yapılan bakteriler daha büyük ölçekte kültüre alındı. Bek alevine yakın pozisyonunda, her biri 20 ml ampicilin (+) LB içeren 50 ml steril falkon tüpü içerisine alındı(her örnek için ikişer tüp kullanıldı). Bakteriler 16 saat süreyle 200 rpm ve 37 °C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası plazmid izolasyonu için mini-prep izolasyon kiti kullanıldı (*MACHEREY-NAGEL, NucleoSpin® Plasmid, Cat: 740588.50*). Mini-prep plazmid DNA izolasyonu için aşağıda belirtilen deney basamakları uygulandı.

1. Kültürü yapılan hücreler 15 ml falkon tüpe alındı ve 2500xg'de 15 dakika santrifüj edildi. Sıvı faz uzaklaştırıldı hücre pelleti re-süspanse edildi ve hücre süspansiyonu 1,5 ml ependorf tüpüne alındı.
2. Tüpe 250µl soğuk A₁ (+4 °C) solüsyonu eklendi ve hiç hücre kümesi kalmayana kadar sıkıca vortekslendi.
3. Karışıma 250µL A₂ solüsyonu eklendi, 6-8 kez alt üst edilerek karışması sağlandı. Oda sıcaklığında karışım berrak mavi renk alana kadar 5-10 dakika bekletildi.
4. Karışıma 300µL A₃ solüsyonu eklendi 6-8 kez alt üst edildi karışımdaki mavi renk tamamen gidene kadar 10-12 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
5. Tüpler 11000xg'de 10 dakika santrifüj edildi.
6. Süpernatant kolona yüklendi (her defasında 750 µL'yi aşmayacak şekilde ve tüm süpernatant bitene kadar bu adım tekrarlandı) ve 11000xg'de 1 dakika santrifüj edildi.
7. Önceden 50 °C'ye ısıtılmış AW solüsyonundan 500µL kolona yüklendi ve 11000xg'de 1 dakika santrifüj edildi. A₄ tamponundan 600µL kolona yüklendi ve 11000xg'de 1 dakika santrifüj edildi.
8. Membrandan kalıntıları uzaklaştırmak amacı ile kolon 11000xg'de 2 dakika santrifüj edildi.

9. Kolon 1,5 mL steril yeni bir ependorf tüpüne alındı ve önceden 70°C'ye ısıtılmış 100µL EA tamponu kolona yüklendi. Kolon 11000xg'de 1 dakika santrifüj edilerek plazmid DNA tüpe aktarıldı.

Elde edilen plazmid DNA'lar insert-DNA varlığı yönünden test edilmek üzere Xho I ve Xba I enzimleri ile kesildi. Enzim kesimi sonrasında elektroforez ile %2 agaroz jelde yürütüldü.

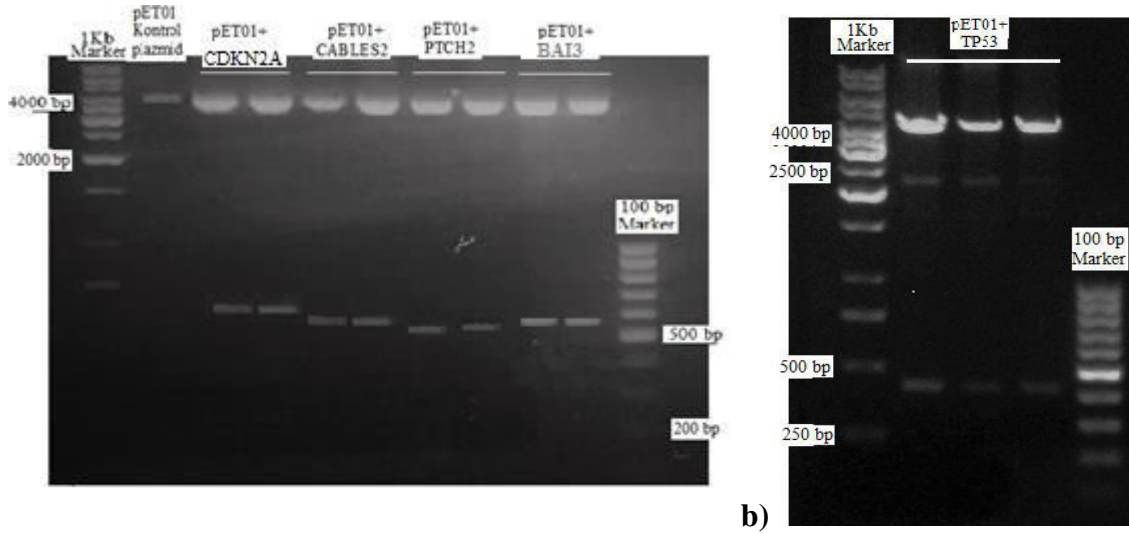
3.5.3.8 Plazmidlerin Çift Enzim Kesimleri

Elde edilen plazmidler Xho I ve Xba I çift enzim kesimi yapılmak üzere tablo-11'de belirtilen reaksiyon bileşenlerini içerecek şekilde oda sıcaklığında hazırlandı.

Tablo-11: İnsert içeren plazmidlerin çift enzimi kesimi reaksiyon bileşenleri

İçerik	Plazmid DNA
Nükleaz içermeyen su	14µL
10X FastDigest Green Buffer	2µL
DNA	2µL(1µg'a kadar)
FastDigest Xba I Enzimi (Thermo Sci. Cat: FD0684)	1µL
FastDigest Xho I Enzimi (Thermo Sci. Cat: FD0694)	1µL
Toplam Hacim	20µL

Tüp içerikleri vortekslenerek iyice karıştırıldı. Tüpler 5 dakika 37 °C'de inkübe edildi ve 20 dakika 65 °C'de inkübe edilerek enzim inaktive edildi. Örnekler Elektroforez ile %2'lik agaroz jelde yürütüldü. Kontrol plazmidlerin çift restriksiyon enzim kesim sonrası jel görüntüleri şekil-7'de gösterilmiştir. Restriksiyon kesim ürünleri %2'lik agaroz jel de yürütüldü ve insert varlığı doğrulandı. Elde edilen beş kontrol örneğine ait plazmidler mutasyon oluşturma aşamasında kalıp olarak kullanıldı.



Şekil-7: Xho1 ve Xba1 enzimleri ile kesim yapılan ürünlerin %2 agaroz jel görüntüsü. **a)** Sırası ile 1kb marker DNA, pET01 (boş plazmid), pET01+CDKN2A insert(+), pET01+CABLES2 insert(+), pET01+PTCH2 insert(+), pET01+BAI3 insert(+), 100bp Marker, **b)** Sırası ile 1kb marker, pET01+TP53 insert(+)(3 farklı koloniye ait örnekler), 100bp marker DNA. İnsert DNA boyutları; CDKN2A-631 bp, CABLES2-589 bp, PTCH2-534 bp, BAI3-549 bp, TP53-431 bp ve çift enzim kesimi sonrası pET01 plazmidinin büyük segmenti; 4122bp.

3.5.3.9 Site-Directed Mutagenesis ile Mutasyonların Oluşturulması

Mutasyon oluşturulması aşamasında kontrol plazmidler kalıp olarak kullanıldı. Yüksek doğrulukta DNA sentezleyen Q5 polimeraz enzimi (*NEB Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit* bileşeni) ile mutant primerler (tablo –14) kullanılarak uygun termal koşullarda (tablo-13) ve aşağıda belirtilen reaksiyon bileşenleri (tablo-12) kullanılarak PCR ile çoğaltıldı.

Tablo-12 SDM PCR reaksiyon bileşenleri

Bileşenler	25 µl Hacim için	Son derişim
Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase 2X Master Mix (<i>NEB</i> Cat: E0554S)	12.5 µl	1X
10 µM SDM Forward Primer	1.25 µl	0.5 mM
10 µM SDM Reverse Prime	1.25 µl	0.5 mM
Kalıp DNA(kontrol plazmid)	1 µl (20 ng/ µl)	20 ng
Nükleaz İçermeyen Su	9.0 µl	

Tablo-13: SDM PCR koşulları

Adımlar	Sıcaklık	Süre
Başlangıç denatürasyon	98 °C	5 dakika
25 döngü	98 °C 72 °C	60 saniye 7 dakika
Final uzama	72 °C	5 dakika

Mutant primerlerin yüksek GC oranı ve Tm değerlerine sahip olmasından dolayı (yapılan çok sayıda deneme sonrası) Ta sıcaklığı 72 °C olarak belirlendi ve iki aşamalı PCR yapıldı.

Tablo-14: Site-Direkted Mutagenesis Primerleri

CDKN2A(Ekzon2; c.273G>A) Mutant Primerler	
F: GGAGGGCTTCCTAAGACACGCTGGTG	R: CACCAGCGTGTCTAGGAAGCCCTCC
CDKN2A(Ekzon2; c.339G>T) Mutant Primerler	
F: CTGGGGCCGTCTTCCCGTGGACCTG	R: CAGGTCCACGGGAGACGGCCCCAG
CDKN2A(Ekzon2; c.342C>G) Mutant Primerler	
F: GGGCCGTCTGCCGTGGACCTGGCTG	R: CAGCCAGGTCCACCGGCAGACGGCCC
TP53(Ekzon8; c.793C>T) Mutant Primerler	
F: CTGAGTAGTGGTAATCTATTGGGACGGAACAGCTTTG	R: CAAAGCTGTTCCGTCCCAATAGATTACCAC TACTCAG
TP53(Ekzon8; c.801G>T) Mutant Primerler	
F: GGTAATCTACTGGGACGTAAACAGCTTTGAGG TGC	R: GCACCTCAAAGCTGTTACGTCCCAGTAGAT TACC
BAI3(ADGRB3) (Ekzon8; c.1419C>T) Mutant Primerler	
F: CAAGTCCTGTGATGGTGGCTGGGAAAGGCG	R: CGCCTTTCCCAGCCACCATCACAGGACTTG
CABLES2(Ekzon8; c.1002C>T) Mutant Primerler	
F: GACCACAGTGATAGAATAAGTGAAGCCCTCAGACCTC	R: GAGGTCTGAGGGCTTCACATATTCTATCAC TGTGGTC
PTCH2(Ekzon2; c.249A>G) Mutant Primerler	
F: CATTATTGAGACAACTTGGAAGCAGCTCTGG GTAGAAGGTAAG	R: CTTACCTTCTACCCAGAGCTGCTCCAAGTTT GTCTCAATAATG

Altı çizili Kırmızı harfler mutasyonu ifade etmektedir.

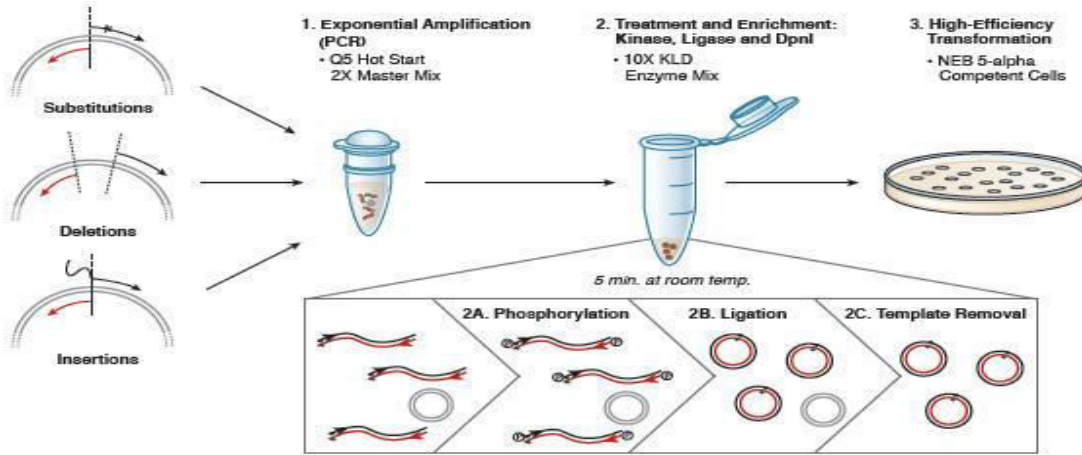
PCR ürünleri %1 agaroz jelde yürütülerek liner plazmidler jelden izole edildi. NEB Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit (Cat: E0554S) bileşenlerinden biri olan KLD enzim karışımı (Kinaz-Ligaz-Dpn1) ile aşağıda belirtilen içerikler kullanılarak reaksiyona sokuldu.

KLD enzim karışımı reaksiyon bileşenleri;

KLD Enzim karışımı(10X)	:	1µL
PCR ürünü	:	2µL
KLD Reaction Buffer(2X)	:	5µL
Nükleaz içermeyen su	:	2µL

Tüp içerikleri vorteks ile iyice karıştırıldı, oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildikten sonra transformasyon aşamasında direkt kullanıldı.

Kinaz yeni sentezlenen mutant liner plazmidin uçlarını fosfatlar, ligaz fosfatlanan liner plazmid uçları birleştirerek halkasal yapı oluşturur. DpnI bir restriksiyon enzimi ve metile/yarı metile DNA dizilerini özgül motiflerden (Gm6A^TC) keserek kalıp DNA'nın uzaklaştırılmasını sağlar (şekil-8).



Şekil-8: NEB Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit Protokolü Şematik Özeti. Dizayn edilen primerler %100 komplementer olmaları nedeni ile PCR ile çoğaltılmaları üstel değildir.

Kompetent *E.coli* hücreleri KLD enzim karışımı ile reaksiyona sokulan DNA ile transforme edildi.

Ampisilinli LB agarda oluşan koloniler seçilerek PCR yapıldı. Koloni PCR sonrası jel elektroforezi sonucu (+) olan hücreler çoğaltıldı ve DNA izolasyonu yapıldı.

➤ SDM protokolünde değişiklik yapıldı

Dizi analiz sonuçları yedi mutant örnekte primer duplikasyonu olduğunu gösterdi. Bu sorunu gidermek amacı ile KLD enzim karışımı yerine DpnI enzimi (*NEB cat: R0176S*) kullanıldı ve mutant plazmidler direkt olarak kullanıldı (jelden izole edilmeden).

DpnI enzim kesimi reaksiyon bileşenleri;

DpnI Enzimi	:	1µL
DNA(PCR ürünü)	:	0,8-1µg (8µL)
10X NEBuffer	:	5µL

Toplam hacim nükleaz içermeye distile su ile 50 µL'ye tamamlandı ve 1 saat 37 °C'de inkübe edildi. DpnI (*NEB cat: R0176S*) enzim kesimi sonrasında mutant plazmidler kompetent *E.coli* hücrelerine (*NEB 5-alpha*) transforme edildi.

3.5.4 Dizi Analizi

Kontrol ve mutant örneklerle ait plazmidlerin (beş kontrol, sekiz mutant örnek) dizi analizi yapıldı. Analiz sonuçları beş kontrol örneğinde de insert DNA'nın pET01 plazmid'i içerisine doğru şekilde paketlenildiği görüldü. Mutant örneklerin analiz sonuçları (SDM protokolünde yapılan değişiklik sonrası) bütün mutasyonların doğru şekilde oluşturulduğu görüldü.

3.5.5 Hücre Hattı Çalışmaları

3.5.5.1 HeLa Hücre Hatlarının Kültürü ve Transfeksiyon

Hücreler kültürü ortam bileşenleri, son hacimde; 2 mM L-glutamin (Biochrom, K0282) 100 U penisilin-Streptomisin (Biological Industries 03-031-1B) ve %10 FBS (Biochrom, S0613) içerecek şekilde RPMI 1640 (Biochrom, FG1235) kullanılarak hazırlandı. Hücre kültürü 37 °C ve %5 CO₂'li ortamda yapıldı. Tek tabaka şeklinde besi kabının zeminine tutunarak çoğalan HeLa hücrelerinin transfeksiyon için çoğalarak besi kabının (12-well plate) zeminini %70-90 düzeyinde kaplamaları beklendi.

Kültür ve transfeksiyon basamağı dâhil tüm uygulamalar biyogüvenlik kabinde (*MN 120 Nüve*) yapıldı. Transfeksiyon için her bir kuyucuk için 2µg plazmid DNA 200µL serum içermeyen RPMI 1640 içerisinde seyreltildi (1,5mL nükleaz içermeyen ependorf içerisinde) hazırlandı. Seyreltilen her bir DNA çözeltisine 4µL turbofect transfeksiyon kiti (Thermo Scientific, TurboFect Transfection Reagent#R0531) eklendi ve hafifçe vortekslenip 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Karışım hücre kültürü ortamına her yere eşit dağılacak şekilde damlatıldı ve iyice karışması için besi yeri hafif çalkalandı. Transfeksiyon sonrası hücreler 37 °C ve %5 CO₂'li ortamda 48 saat inkübe edildikten sonra RNA izolasyonu yapıldı.

3.5.5.2 HeLa Hücrelerinden Total RNA İzolasyonu

Bu işlem için RNA izolasyon kiti (Thermo Scientific GeneJET RNA Purification, K0731) kullanılarak total-RNA elde edildi.

- Transfeksiyon sonrası 48 saat inkübe edilen hücrelerden ortam uzaklaştırıldı ve PBS ile hücre yüzeyleri yıkandı ve besi kabına tutunan hücreleri kaldırmak için 200µL 1X Tripsin-EDTA solüsyonu eklendi ve 37 °C 1-2 dakika beklendi.
- Hücreler 1,5 mL ependorf tüpüne kondu 5 dakika 250xg'de santrifüj edildi, süpernatant uzaklaştırıldı, hücre pelleti PBS ile yıkandı ve tekrar santrifüj edildi.
- Hücre pelleti üzerine 600µL β-mercaptoetanol içeren lizis tamponu eklendi ve bir dakika süreyle iyice vortekslendi.
- Karışıma 360µL %96 etanol eklendi ve pipetle iyice karıştırıldı ve her defasında 700µL'yi aşmayacak şekilde lizat kolona eklendi
- 12500xg'de bir dakika santrifüj edildi elüat uzaklaştırıldı. Tüm lizat kolona yüklenene kadar işlem tekrarlandı.
- Kolona 700µL Wash Buffer-1 eklendi 12500xg'de bir dakika santrifüj edildi elüat uzaklaştırıldı.
- Kolona 600µL Wash Buffer-2 eklendi 12500xg'de bir dakika santrifüj edildi elüat uzaklaştırıldı.
- Kolona 250µL Wash Buffer-2 eklendi 12500xg'de iki dakika santrifüj edildi elüat uzaklaştırıldı.
- Kolona yeni bir nükleaz içermeyen mikro santrifüj tüpüne yerleştirildi. Kolona 50µL nükleaz içermeyen su eklendi ve 12500xg'de bir dakika santrifüj edilerek Total RNA elde edildi.

3.5.5.3 İzole edilen RNA'dan DNA'nın Uzaklaştırılması

RNA izolasyonu sırasında ortamda bulunabilecek genomik DNA'nın uzaklaştırılması amacı ile DNase I, RNase-free (*Thermo Fisher, EN0521*) enzimi kullanıldı. Reaksiyon bileşenleri tablo-15'te belirtilen hacimlerde nükleaz içermeyen tüplerde hazırlandı.

Tablo-15: Total RNA'daki DNA'nın DNase I ile yıkımının reaksiyon bileşenleri

Reaksiyon bileşenleri	Hacim
Total RNA	Değişen hacimlerde (1 µg)
10X reaksiyon tamponu	1 Ml
DNase I, RNase-free(EN0521)	1 µL

Toplam hacim 10 µL'ye tamamlandı 37 °C'de 30 dakika inkübe edildi. Tüpe 1 µL 50 mM EDTA eklendi ve 65 °C'de 10 dakika inkübe edilerek DNase I inaktive edildi.

3.5.5.4 Total RNA'dan cDNA Sentezi

RNA'dan cDNA sentezlemek amacı ile 'abm' firmasının(*Applied Biological Materials Inc*) Kit'i (*EasyScript PlusTM cDNA Synthesis, G236*) kullanıldı (Tablo-16). Tüm bileşenler buz üzerinde hazırlandı.

Tablo-16: cDNA sentezi reaksiyon bileşenleri:

Bileşenler	Hacim
Total RNA	3 µL (200-500 ng)
Oligo dT (10 µM)	1 µL
dNTP mix (10 mM)	1 µL
Nükleaz İçermeyen Su	9,5 µL
Toplam hacim	14.5 µl
Karışım 65°C'de 5 dakika inkübe edildi ve 2 dakika buz içerisine gömüldü. Aşağıdaki bileşenler karışıma eklendi;	
5X RT buffer	4 µL
RNaseOFF Ribonuclease Inhibitor (40 U/µl)	0,5 µL
EasyScript Plus TM RTase (200 U/µl)	1 µL

Tüp içeriği kısa süreli santrifüj ile dibe toplandı ve 50 °C'de 50 dakika inkübe edildi. Reaksiyonun durdurmak için örnekler 5 dakika boyunca 85 °C'de inkübe edildi.

3.5.5.5 cDNA'dan PCR ile İlgili Gen Bölgelerinin Çoğaltılması

Tüm kontrol ve mutant örneklerin ilgili cDNA dizileri pET01 plazmidindeki ekzonlara özgül 5'-CGTGGATTCTTCTACACACCC-3' ileri (forward) ve 5'-TCCACCCAGCTCCAGTTG-3' geri (Reverse) primerler kullanılarak tablo-17 ve tablo-18'de belirtilen reaksiyon bileşenleri ve termal koşullarda PCR ile çoğaltıldı. PCR örnekleri %1,5'lik agaroz jelde yürütülerek ürün varlığı doğrulandı (şekil-9).

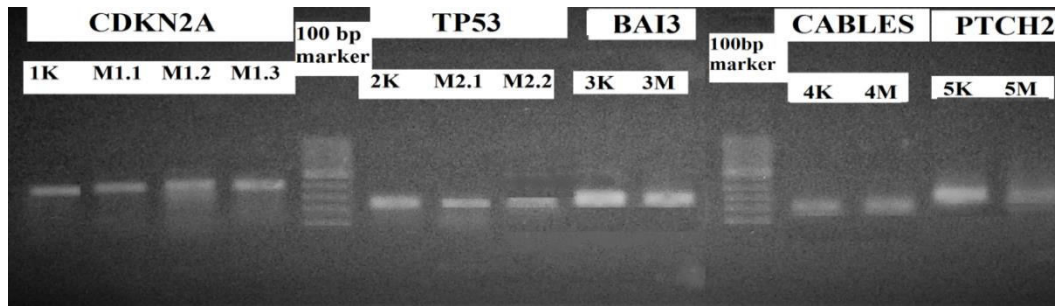
Tablo-17: Kalıp olarak cDNA'nın kullanıldığı PCR reaksiyonu bileşenleri

Bileşenler	25 µl Hacim için	Son derişim
OneTaq Hot Start 2X Master Mix (<i>NEB</i> Cat:M0484S)	12.5 µl	1X
10 µM Forward Primer	0.5 µl	0.2 µM
10 µM Reverse Prime	0.5 µl	0.2 µM
Kalıp DNA	2 µl (200-300 ng/ µl)	400-600 ng
Nükleaz İçermeyen Su	9.5 µl	

Tablo-18: Kalıp olarak cDNA'nın kullanıldığı PCR Koşulları

Adımlar	Sıcaklık	Süre
Başlangıç denatürasyon	98 °C	3'
35 döngü	98 °C	25''
	52,5 °C	40''
	68 °C	45''
Son uzama	68 °C	3'

PCR ürünleri elektroforez ile %1,5 agaroz jelde yürütüldü. Jel görüntüsünde (Şekil-9) sırası ile kontrol ve mutant örnekler tablo-1'de belirtilen kodları ile ifade edilmiştir. Pre-mRNA işlemlenmesini test etmek amacı ile elde edilen kontrol ve mutant örneklere ait PCR ürünlerinin dizi analizleri yapıldı.

**Şekil-9:** Kalıp olarak cDNA'nın kullanıldığı PCR örneklerinin jelde görüntüleri. Kontroller K ile mutant örnekler M ile gösterilmiştir(örnekler tablo-1 deki kodları ile belirtilmiştir).

3.6 Tamponların ve Besi Ortamlarının Hazırlanması

3.6.1 Tris-Asetat-EDTA Tamponu

Ana stok 50X derişimde hazırlandı. Stok çözelti tablo-19’da belirtilen bileşenleri içerecek şekilde distile su ile bir litreye tamamlandı. Karışım iyice karıştırıldı ve 15 dakika 121°C’de otoklavlandı⁶⁶. Elektroforez için her defasında 1X TAE tamponu kullanıldı.

Tablo-19: 50X TAE tampon içeriği

İçerik	Miktar
Tris bazı	242 g
Glasiyel asetikasit	57,1 mL
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	37,2 g

Toplam hacim distile su ile bir litreye tamamlandı.

3.6.2 LB Broth ve LB Agar Hazırlama

Ampisilinli (*AppliChem*, A0839) LB Agar (*AppliChem*, 402303) hazırlanırken ampisilin (çalışma derişimi 100 µg/mL) aseptik koşullarda besi ortamı 50 °C veya daha düşük sıcaklığa indikten sonra eklendi. İyice karıştırıldıktan sonra petrilere döküldü. LB Broth tamamen soğuduktan sonra ihtiyaç duyulduğu zaman aseptik koşullarda Ampisilin (çalışma derişimi 100 µg/mL) eklendi. LB broth ve LB agar besi ortamlarının içerikleri tablo-20’de belirtildiği şekilde hazırlandı⁶⁷.

Tablo-20: LB broth ve LB agar içeriği

LB Broth		LB Agar	
Pepton(<i>AppliChem</i> , A2210)	: 10g	Pepton	: 10g
Maya ekstraktı(<i>AppliChem</i> , A1552)	: 5g	Maya ekstraktı:	5g
NaCl(<i>AppliChem</i> , 381659)	: 5g	NaCl	: 5g
1 N NaOH	:1 ml	Agar	: 15g
Distile su ile 1 litreye tamamlandı ve 15 dakika 121°C’de otoklavlandı			

3.7 Araştırma Sınırlılıkları

3.7.1 Primer Duplikasyon Sorunu

Çalışmada mutasyon oluşturma aşamasında yedi mutant plazmid örneğinde primer duplikasyonu olduğu görüldü. Çalışmada kullanılan mutant primer çiftleri 25-43 nükleotid uzunlukta ve tamamen komplementer dizilerden oluşmaktadır. Mutant primerler kullanılarak sentezlenen yeni DNA dizileri bir sonraki termal döngüde kalıp olarak kullanılamaz. Yeni sentezlenen doğrusal plazmidlerin 5' uçlarında birbirine komplementer yapışkan diziler (mutant primer dizileri) taşır. KLD enzim karışımı ile bu PCR ürünleri reaksiyona sokulduğunda ortamda serbest halde bulunan primerler yapışkan tek iplikli uçlarla eşleştiği, ligazın yarığı onarması ile küt uç oluştuğunu düşündük. Oluşan küt uçlu doğrusal plazmidlerin kinaz aktivitesi ile fosfatlanması ve uçların yine ligaz ile birbirine bağlanması sonucu primer duplikasyonunun oluştuğunu düşündük.

3.7.2 Primer Duplikasyon Sorununun Giderilmesi

Primer duplikasyon sorununu gidermek üzere SDM protokolünde KLD enzim karışımı yerine sadece DpnI enzim kullanılmasına karar verdik. Aynı zamanda PCR ürünlerinin jelde yürütülmesi ve jelden izole edilmesinden vazgeçtik. SDM protokolü ile mutant plazmid oluşturulurken kalıp olarak kullanılan metile ve yarı metile plazmidler DpnI enzimi ile yıkıma uğratılır. Yeni sentezlenen mutant plazmidlerden sirküler olanların 5' ve 3' uçları arasında bulunan yarı, transformasyon sonrası bakteri enzim sistemi ile onararak sorunun giderilebileceğini düşündük.

DNA dizi analizi sonuçları ile tüm örneklerde primer duplikasyonu sorununun giderildiği ve mutasyonun doğru şekilde olduğu görüldü.

3.8 Etik Kurul Onayı

Dokuz Eylül Üniversitesi girişimsel olmayan klinik araştırmalar etik kurulundan 21.08.2014 tarih ve 2014/27-15 karar numarası ile alınmıştır. Çalışmada HeLa tümör hücre hattı ve *E. Coli* (DH5alpha) hücreleri kullanıldı (Ek1).

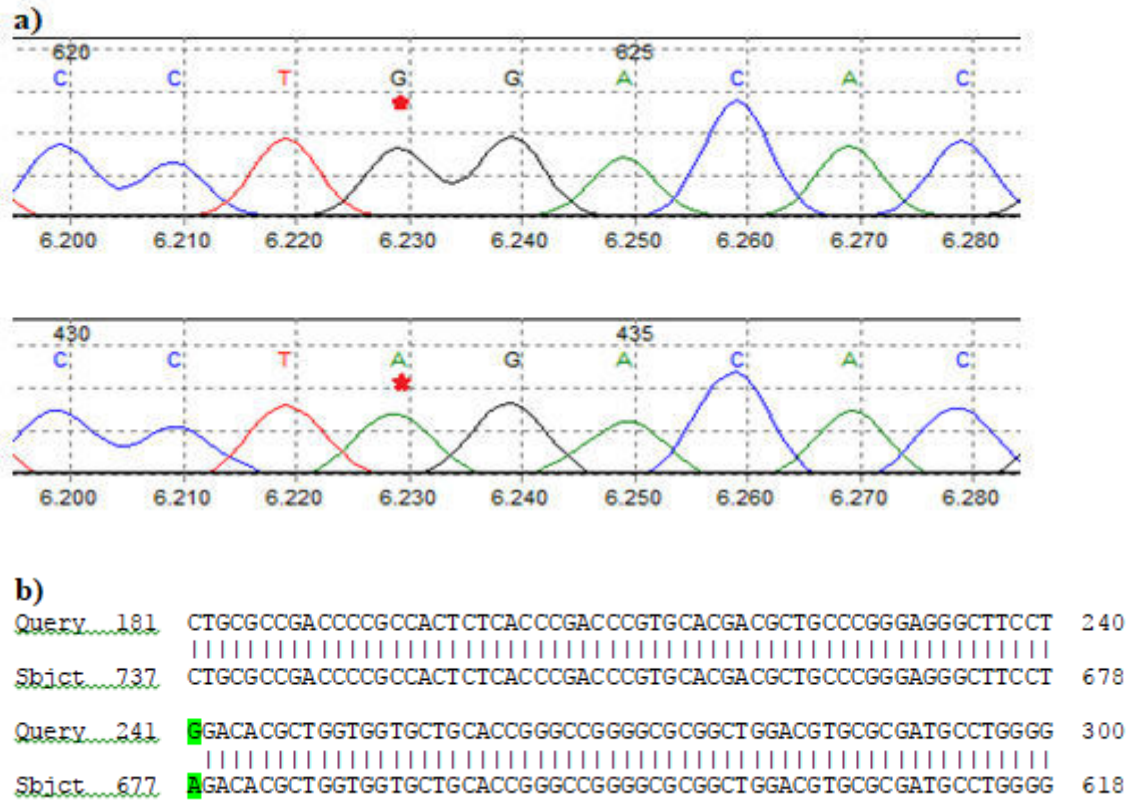
4. BULGULAR

4.1 Referans ve Mutant Grup DNA Dizi Analiz Sonuçlarının Karşılaştırması

Dizi analizi sonuçları kontrol ve mutant örnekler için plazmidlerin (beş kontrol, sekiz mutant örnek) dizi analizi yapıldı. Analiz sonuçları beş kontrol örneğinde de insert DNA'nın pET01 plazmid'i içerisine doğru şekilde paketlenildiğini ve bütün mutasyonların doğru şekilde oluşturulduğunu göstermiştir.

4.1.1 *CDKN2A* c.273G>A Mutasyonu

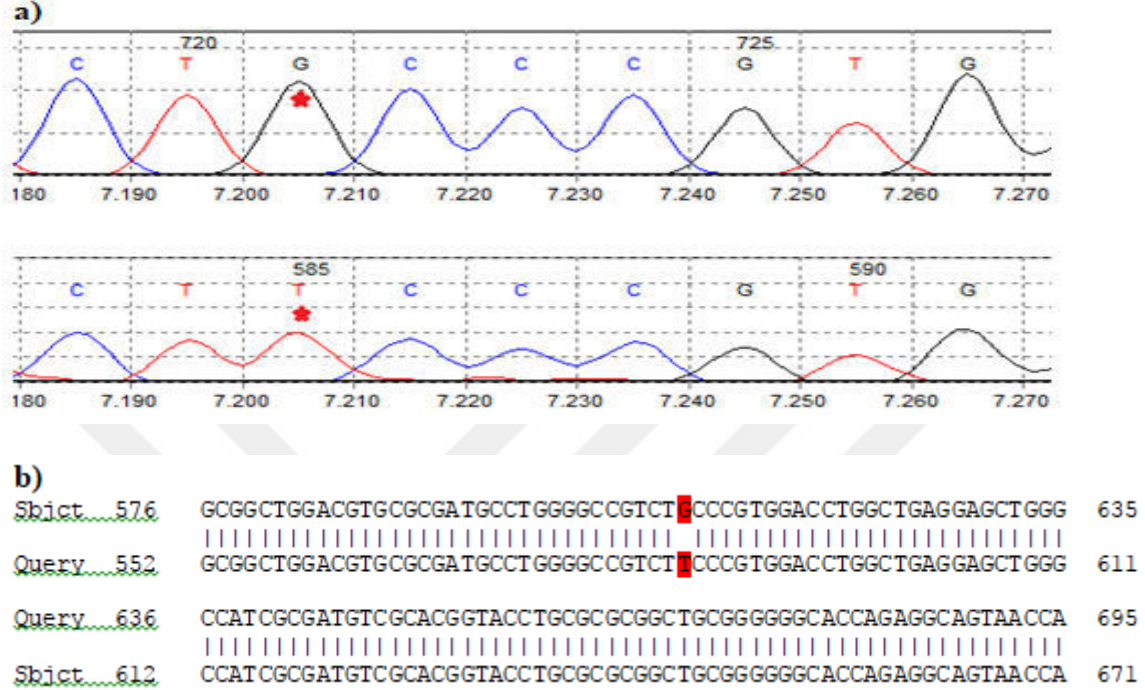
CDKN2A geninin (2. Ekzon) c.273G>A mutasyonunu taşıyan plazmid referans diziyle karşılaştırıldığında mutasyonun doğru şekilde oluşturulduğu görülmektedir (Şekil-10).



Şekil-10: *CDKN2A* (Ekzon2) c.273G>A mutant örneğin DNA dizi analiz sonuçlarının referans diziyle karşılaştırılması a) mutasyon varlığı DNA analizi *electropherogram* pikleri ile gösterilmiştir b) Nucleotide BLAST (NCBI) programı ile karşılaştırarak gösterilmiştir.

4.1.2 CDKN2A c.339G>T Mutasyonu

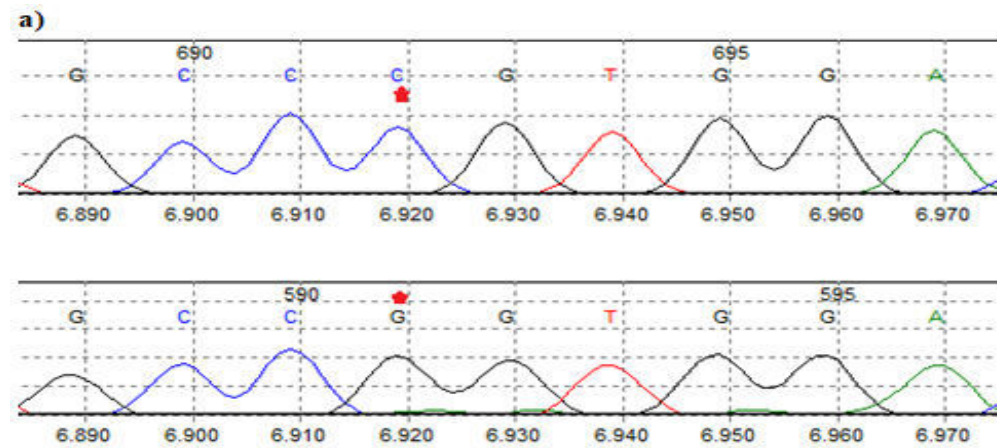
CDKN2A geninin (2. Ekzon) c.339G>T mutasyonunu taşıyan plazmid referans diziyle karşılaştırıldığında mutasyonun doğru şekilde oluşturulduğu görülmektedir (Şekil-11).



Şekil-11: CDKN2A (Ekzon2) c.339G>T mutant örneğin DNA dizi analiz sonuçlarının referans diziyle karşılaştırılması a) mutasyon varlığı DNA analizi *electropherogram* pikleri ile gösterilmiştir b) Nucleotide BLAST (NCBI) programı ile karşılaştırarak gösterilmiştir.

4.1.3 CDKN2A c.342C>G Mutasyonu

CDKN2A geninin (2. Ekzon) c.342C>G mutasyonunu taşıyan plazmid referans diziyle karşılaştırıldığında mutasyonun doğru şekilde oluşturulduğu görülmektedir (Şekil-12).



b)

```

Query_241  GGACACGCTGGTGGTGCTGCACCGGGCCGGGCGCGGCTGGACGTGCGCGATGCCTGGGG 300
          |||
Sbict_675  GGACACGCTGGTGGTGCTGCACCGGGCCGGGCGCGGCTGGACGTGCGCGATGCCTGGGG 616

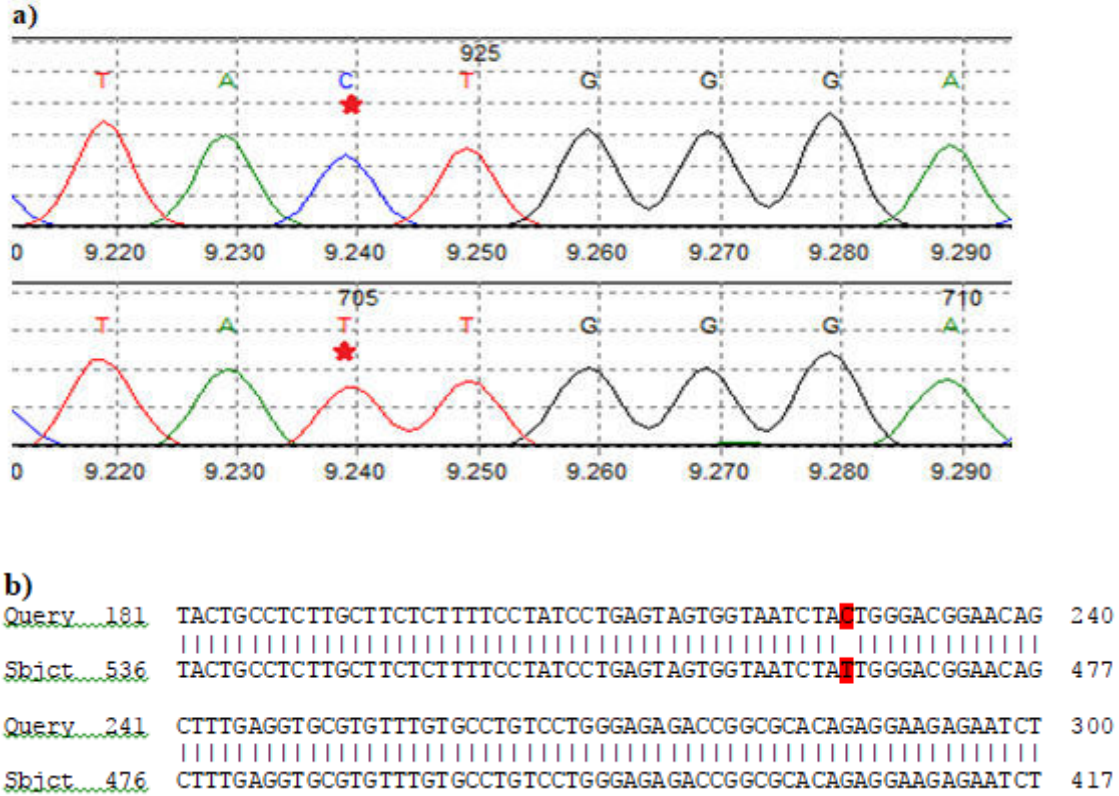
Query_301  CCGTCTGCCGTGGACCTGGCTGAGGAGCTGGGCCATCGCGATGTGCGACGGTACCTGCG 360
          |||
Sbict_615  CCGTCTGCCGTGGACCTGGCTGAGGAGCTGGGCCATCGCGATGTGCGACGGTACCTGCG 556

```

Şekil-12: *CDKN2A* (Ekzon2) c.342C>G mutant örneğin DNA dizi analiz sonuçlarının referans diziyle karşılaştırılması **a)** mutasyon varlığı DNA analizi *electropherogram* pikleri ile gösterilmiştir **b)** Nucleotide BLAST (NCBI) programı ile karşılaştırarak gösterilmiştir.

4.1.4 *TP53* c.793C>T Mutasyonu

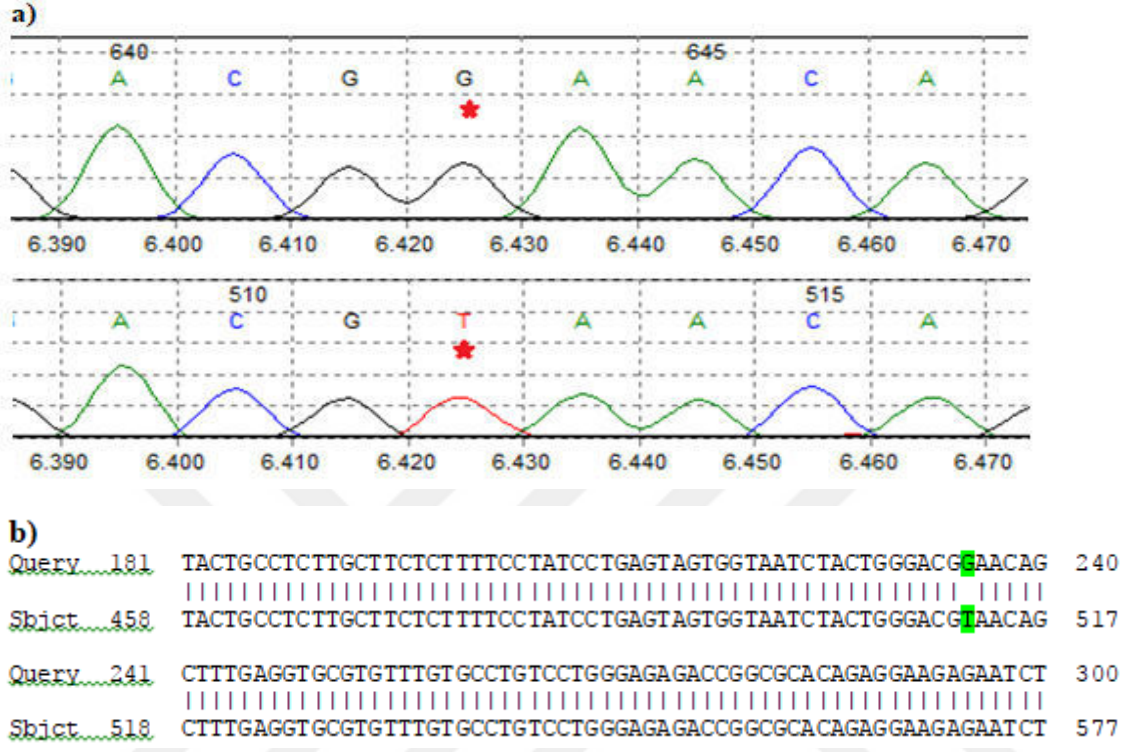
TP53 geninin (8. Ekzon) c.793C>T mutasyonunu taşıyan plazmid referans diziyle karşılaştırıldığında mutasyonun doğru şekilde oluşturulduğu görülmektedir (Şekil-13).



Şekil-13: *TP53*(Ekzon 8) c.793C>T mutant örneğin DNA dizi analiz sonuçlarının referans diziyle karşılaştırılması **a)** mutasyon varlığı DNA analizi *electropherogram* pikleri ile gösterilmiştir **b)** Nucleotide BLAST (NCBI) programı ile karşılaştırarak gösterilmiştir.

4.1.5 TP53 c.801G>T Mutasyonu

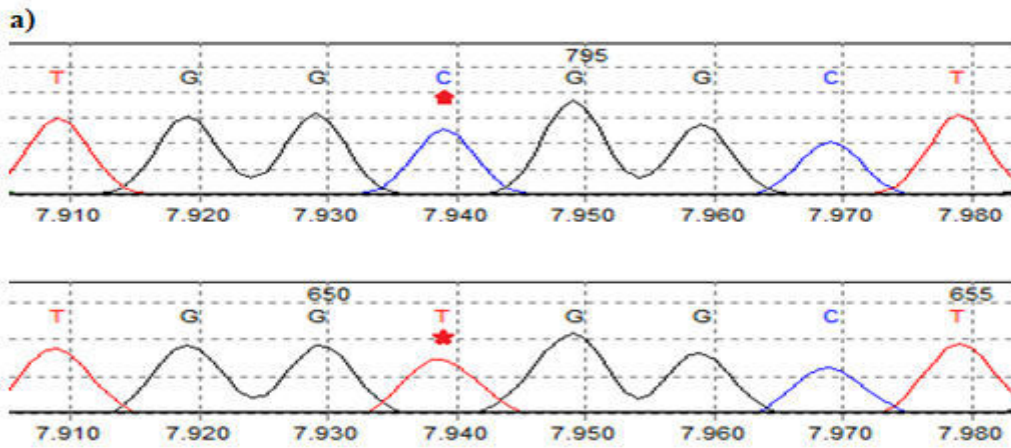
TP53 geninin (8. Ekzon) c.801G>T mutasyonunu taşıyan plazmid referans diziyle karşılaştırıldığında mutasyonun doğru şekilde oluşturulduğu görülmektedir (Şekil-14).



Şekil-14: TP53(ekzon 8) c.801G>T mutant örneğin DNA dizi analiz sonuçlarının referans diziyle karşılaştırılması a) mutasyon varlığı DNA analizi *electropherogram* pikleri ile gösterilmiştir b) Nucleotide BLAST (NCBI) programı ile karşılaştırarak gösterilmiştir.

4.1.6 BAI3 c.1419C>T Mutasyonu

BAI3 geninin (8. Ekzon) c.1419C>T mutasyonunu taşıyan plazmid referans diziyle karşılaştırıldığında mutasyonun doğru şekilde oluşturulduğu görülmektedir (Şekil-15).



b)

```
Query_181 CTGACATTGACCATGAAACATTTCTTTTCAGCCAATGGTCAATGGAATCAGTGGGGTCATT 240
|||||
Sbict_654 CTGACATTGACCATGAAACATTTCTTTTCAGCCAATGGTCAATGGAATCAGTGGGGTCATT 595

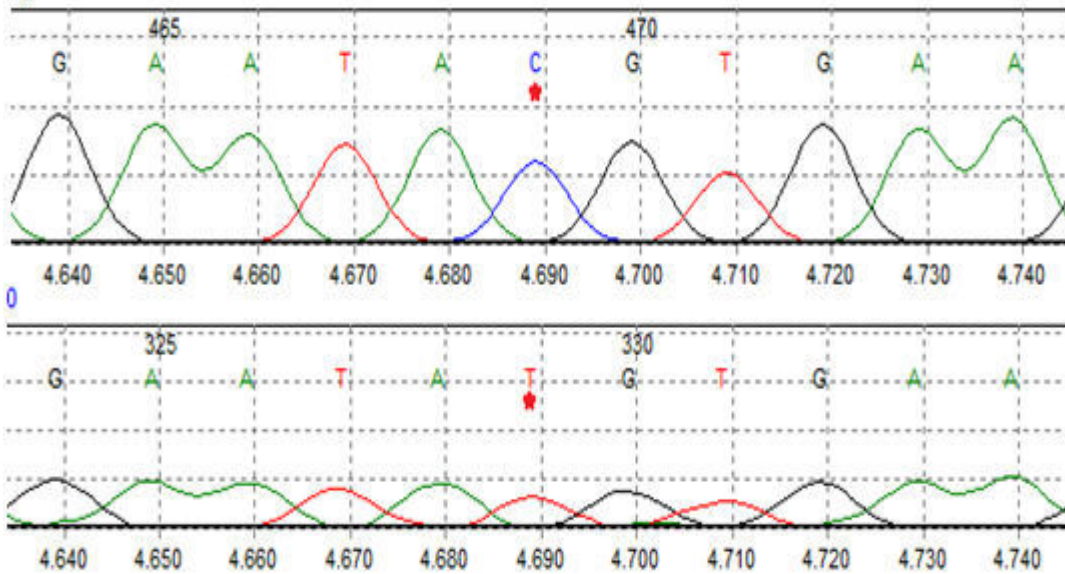
Query_241 GGAGTGGTTGTTCCAAGTCCTGTGATGGGGCTGGGAAAGGCGAATAAGGACCTGTCAGG 300
|||||
Sbict_594 GGAGTGGTTGTTCCAAGTCCTGTGATGGGGCTGGGAAAGGCGAATAAGGACCTGTCAGG 535
```

Şekil-15: *BAI3*(ekzon 8) c.1419C>T mutant örneğin DNA dizi analiz sonuçlarının referans diziyle karşılaştırılması a) mutasyon varlığı DNA analizi *electropherogram* pikleri ile gösterilmiştir b) Nucleotide BLAST (NCBI) programı ile karşılaştırarak gösterilmiştir.

4.1.7 *CABLES2* c.1002C>T Mutasyonu

CABLES2 geninin (8. Ekzon) c.1002C>T mutasyonunu taşıyan plazmid referans diziyle karşılaştırıldığında mutasyonun doğru şekilde oluşturulduğu görülmektedir (Şekil-16).

a)



b)

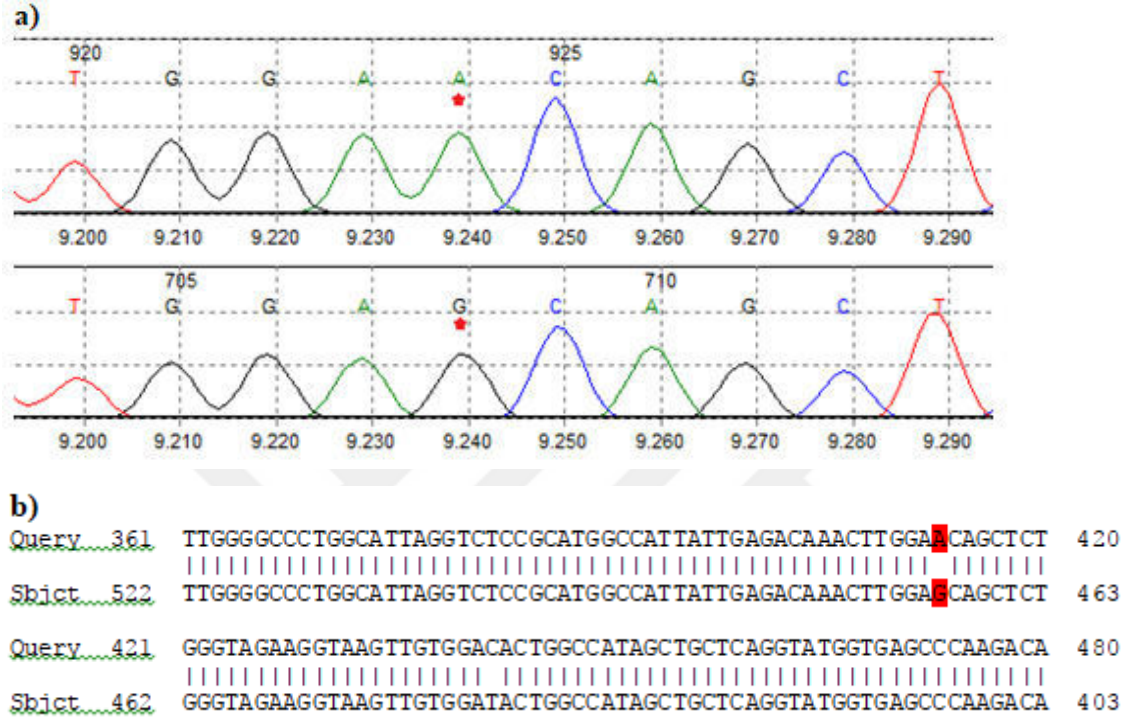
```
Query_78 GGCAGGACCCATGGACTGTGCGAGGGGCCGGCCCAACCCTGCCCACTCTCTGTTCAGAC 137
|||||
Sbict_815 GGCAGGACCCATGGACTGTGCGAGGGGCCGGCCCAACCCTGCCCACTCTCTGTTCAGAC 756

Query_138 CACAGTGATAGAATA GTGAAGCCCTCAGACCTCAAAAAGGACATGAACGAGACCTTCAG 197
|||||
Sbict_755 CACAGTGATAGAATA GTGAAGCCCTCAGACCTCAAAAAGGACATGAACGAGACCTTCAG 696
```

Şekil-16: *CABLES2*(ekzon 8) c.1002C>T mutant örneğin DNA dizi analiz sonuçlarının referans diziyle karşılaştırılması a) mutasyon varlığı DNA analizi *electropherogram* pikleri ile gösterilmiştir b) Nucleotide BLAST (NCBI) programı ile karşılaştırarak gösterilmiştir.

4.1.8 PTCH2 c.249A>G Mutasyonu

PTCH2 geninin (2. Ekzon) c.249A>G mutasyonunu taşıyan plazmid referans diziyle karşılaştırıldığında mutasyonun doğru şekilde oluşturulduğu görülmektedir (Şekil-17).



Şekil-17: PTCH2(ekzon 2) c.249A>G mutant örneğin DNA dizi analiz sonuçlarının referans diziyle karşılaştırılması a) mutasyon varlığı DNA analizi *electropherogram* pikleri ile gösterilmiştir b) Nucleotide BLAST (NCBI) programı ile karşılaştırarak gösterilmiştir.

4.2 PCR Örneklerinin DNA Dizi Analizi Sonuçları

Sentezlenen cDNA'lardan elde edilen PRC örneklerinin iki yönlü okuması yapıldı. Elde edilen DNA dizi analizi sonuçları, referans cDNA dizileri ile Nucleotide BLAST(NCBI) programı (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) kullanılarak karşılaştırıldı. Referans cDNA dizileri; hazırlanan her kontrol plazmid örneği için, hata oluşmaksızın mRNA işlemlenmesi sonrası elde edilmesi beklenen plazmide ait 3' ve 5' ekzonik diziler ve klonlama ile plazmide eklenen ekzonik dizileri ifade etmektedir. Analizi yapılan tüm kontrol ve mutant örneklerde pre-mRNA'nın doğru şekilde işlemlendiği görüldü. Mutasyon taşıyan örneklerin kontrollerle kıyaslanması neticesinde, hiçbir örnekte pre-mRNA' işlemlenmesinde hata oluşmadığı tespit

edildi. Yeşil ile gösterilen diziler plazmid'e ait ilk ekzonu (3' ekzon), gri renkle gösterilen diziler son ekzonu(5' ekzon) sarı renk ile gösterilen diziler ise plazmid içerisine paketlenen ekzonları göstermektedir.

4.2.1 *CDKN2A* Kontrol ve Mutant Örneklerin cDNA Dizilerinin Karşılaştırılması

Referans dizilerin kontrol ve mutant dizilerin karşılaştırılması Nucleotide BLAST(NCBI) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) programı kullanılarak karşılaştırıldı.

4.2.1.1 *CDKN2A* Kontrol ve Referans cDNA Dizilerinin Karşılaştırılması

Transfeksiyon sonrası *CDKN2A* geninin 2. ekzonunu içeren kontrol cDNA örneğine ait iki yönlü dizi analizi sonuçları referans cDNA dizileriyle karşılaştırıldı. Analiz sonuçları kontrol plazmide ait intronların doğru şekilde uzaklaştırıldığı ve kontrolün beklendiği gibi *splice* olduğu tespit edildi. (Şekil-18).

a)

CGTGGATTCTTCTACACACCCATGTCCCGCCGCGAAGTGGAGGACCCACAAGGTCATGATGATGGG
CAGCGCCCCGAGTGGCGGAGCTGCTGCTGCTCCACGGCGCGGAGCCCCAACTGCGCCGACCCCGCCA
CTCTCACCCGACCCGTGCACGACGCTGCCCGGGAGGGCTTCCTGGACACGCTGGTGGTGTGCTGCACC
GGGCCGGGGCGCGGCTGGACGTGCGCGATGCCTGGGGCCGTCTCCGTGGACCTGGCTGAGGAG
CTGGGCCATCGCGATGTCGCACGGTACCTGCGCGCGGCTGCGGGGGGCACCAGAGGCAGTAACCA
TGCCCGCATAGATGCCGCGGAAGGTCCCTCAGTGGCACAACCTGGAGCTGGGTGGA

b-1)

Query	151	GGACACGCTGGTGGTGCTGCACCGGGCCGGGGCGCGGCTGGACGTGCGCGATGCCTGGGG	210
Shict	175	GGACACGCTGGTGGTGCTGCACCGGGCCGGGGCGCGGCTGGACGTGCGCGATGCCTGGGG	234
Query	211	CCGTCTGCCCGTGGACCTGGCTGAGGAGCTGGGCCATCGCGATGTCGCACGGTACCTGCG	270
Shict	235	CCGTCTGCCCGTGGACCTGGCTGAGGAGCTGGGCCATCGCGATGTCGCACGGTACCTGCG	294
Query	271	CGCGGCTGCGGGGGGCACCAGAGGCAGTAACCATGCCCGCATAGATGCCGCGGAAGGC	330
Shict	295	CGCGGCTGCGGGGGGCACCAGAGGCAGTAACCATGCCCGCATAGATGCCGCGGAAGGT	354
Query	331	CTCAGTGGCACAACCTGGAGCTGGGTGG	357
Shict	355	CTCAGTGGCACAACCTGGAGCTGGGTGG	381

b-2)

```

Query_88      TGGCC CAGCTCCTCAGCCAGGTCCACGGGCAGACGGCCCCAGGCATCGCGCACGTCCAGC 147
              |||
Sbict_270     TGGCC CAGCTCCTCAGCCAGGTCCACGGGCAGACGGCCCCAGGCATCGCGCACGTCCAGC 211
              |||

Query_148     CGCGC CCGCGCCCGGTGCAGCACCACCAGCGTGTCCAGGAAGCCCTCCC GGGCAGCGT CG 207
              |||
Sbict_210     CGCGC CCGCGCCCGGTGCAGCACCACCAGCGTGTCCAGGAAGCCCTCCC GGGCAGCGT CG 151
              |||

Query_208     TGCAC GGGTCGGGTGAGAGTGGCGGGGTCGGCGCAGTTGGGCTCCGCGCCGTGGAGCAGC 267
              |||
Sbict_150     TGCAC GGGTCGGGTGAGAGTGGCGGGGTCGGCGCAGTTGGGCTCCGCGCCGTGGAGCAGC 91
              |||

Query_268     AGCAGCTCCGCCACTCGGGCGCTGCCCATCATCATGACCTTGTTGGGTCTCCACTTCGCG 327
              |||
Sbict_90      AGCAGCTCCGCCACTCGGGCGCTGCCCATCATCATGACCTTGTTGGGTCTCCACTTCGCG 31
              |||

Query_328     GCGGGACATGGGTGTGTAGAAGAATCCACG 357
              |||
Sbict_30      GCGGGACATGGGTGTGTAGAAGAATCCACG 1
              |||

```

Şekil-18 a) *CDKN2A* (2. Ekzon) kontrol cDNA örneğine ait referans diziler (382 bp), **b-1)** *CDKN2A* kontrol cDNA örneğinin *forward*-primerle yapılan dizi analizi sonuçlarının referans dizilerle karşılaştırılması, **b-2)** *CDKN2A* kontrol cDNA örneğinin *reverse*-primerle yapılan dizi analizi sonuçlarının referans dizilerle karşılaştırılması.

4.2.1.2 Mutant *CDKN2A* (c.273G>A) cDNA Dizilerinin Referans diziler ile Karşılaştırılması

CDKN2A (2. Ekzon c.273G>A) geninin 2. ekzonunu içeren mutant cDNA örneğine ait iki yönlü dizi analizi sonuçları referans cDNA dizileriyle karşılaştırıldı. Analiz sonuçları mutant plazmide ait intronların doğru şekilde uzaklaştırıldığı ve kontrode olduğu gibi *splice* olduğu tespit edildi. (Şekil-19).

a)

```

Query_93      GCCGACCCCGCCACTCTCACCCGACCCGTGCACGACGCTGCCCGGGAGGGCTTCCTGAC 152
              |||
Sbict_119     GCCGACCCCGCCACTCTCACCCGACCCGTGCACGACGCTGCCCGGGAGGGCTTCCTGAC 178
              |||

Query_153     ACGCTGGTGGTGCTGCACCGGGCCGGGGCGCGGCTGGACGTGCGCGATGCTGGGGCCGT 212
              |||
Sbict_179     ACGCTGGTGGTGCTGCACCGGGCCGGGGCGCGGCTGGACGTGCGCGATGCTGGGGCCGT 238
              |||

Query_213     CTGCCCGTGGACCTGGCTGAGGAGCTGGGCCATCGCGATGTCGCACGGTACCTGCGCGG 272
              |||
Sbict_239     CTGCCCGTGGACCTGGCTGAGGAGCTGGGCCATCGCGATGTCGCACGGTACCTGCGCGG 298
              |||

Query_273     GCTGCGGGGGGACCCAGAGGCAGTAACCATGCCCCGATAGATGCCGCGGAAGGCCCTCA 332
              |||
Sbict_299     GCTGCGGGGGGACCCAGAGGCAGTAACCATGCCCCGATAGATGCCGCGGAAGGCCCTCA 358
              |||

Query_333     GTGGCACAACTGGAGCTGGGTGGA 356
              |||
Sbict_359     GTGGCACAACTGGAGCTGGGTGGA 382
              |||

```

b)

```

Query_109 CCACGGGCAGACGGCCCCAGGCATCGCGCACGTCCAGCCGCGCCCGGCCCGGTGCAGCA 168
          |||
Sbict_248 CCACGGGCAGACGGCCCCAGGCATCGCGCACGTCCAGCCGCGCCCGGCCCGGTGCAGCA 189

Query_169 CCACCAGCGTGTCTAGGAAGCCCTCCCGGGCAGCGTCGTGCACGGGTGCGGTGAGAGTGG 228
          |||
Sbict_188 CCACCAGCGTGTCTAGGAAGCCCTCCCGGGCAGCGTCGTGCACGGGTGCGGTGAGAGTGG 129

Query_229 CGGGGTCGGCGCAGTTGGGCTCCGCGCCGTGGAGCAGCAGCAGCTCCGCCACTCGGGCGC 288
          |||
Sbict_128 CGGGGTCGGCGCAGTTGGGCTCCGCGCCGTGGAGCAGCAGCAGCTCCGCCACTCGGGCGC 69

Query_289 TGCCCATCATCATGACCTTGTGGGTCTCCACITCGCGGCGGGACATGGGTGTGTAGAAG 348
          |||
Sbict_68 TGCCCATCATCATGACCTTGTGGGTCTCCACITCGCGGCGGGACATGGGTGTGTAGAAG 9

Query_349 AATCCACG 356
          |||
Sbict_8 AATCCACG 1

```

Şekil-19 a) Mutant *CDKN2A* (2. Ekzon; c.273G>A) cDNA örneğinin *forward*-primerle yapılan dizi analizi sonuçlarının referans dizilerle karşılaştırılması, **b)** Mutant *CDKN2A* (2. Ekzon; c.273G>A) cDNA örneğinin *reverse*-primerle yapılan dizi analizi sonuçlarının referans dizilerle karşılaştırılması

4.2.1.3 Mutant *CDKN2A* (c.339G>T) cDNA Dizilerinin Referans Diziler ile Karşılaştırılması

CDKN2A (2. ekzon; c.339G>T) geninin 2. ekzonunu içeren mutant cDNA örneğine ait iki yönlü dizi analizi sonuçları referans cDNA dizileriyle karşılaştırıldı. Analiz sonuçları mutant plazmide ait intronların doğru şekilde uzaklaştırıldığı ve kontrolde olduğu gibi *splice* olduğu tespit edildi. (Şekil-20).

a)

```

Query_61 GACACGCTGGTGGTGCTGCACCGRGCCGGGGCGCGGCTGGACGTGCGCGATGCCTGGGGC 120
          |||
Sbict_176 GACACGCTGGTGGTGCTGCACCGGGCCGGGGCGCGGCTGGACGTGCGCGATGCCTGGGGC 235

Query_121 CGTCTCCCCTGGACCTGGYTGAAGAGCTGGGCCATCGCGATGTGCGACGGTACCTGCRG 180
          |||
Sbict_236 CGTCTCCCCTGGACCTGGCTGAGGAGCTGGGCCATCGCGATGTGCGACGGTACCTGCGC 295

Query_181 SCGGMGTGCKRGGKGCACCARAGGCAGTAACCATGCCGCATAGATGCCGCGGAAGGCCCC 240
          |||
Sbict_296 GCGGCTGCGGGGGGCACCAAGAGGCAGTAACCATGCCGCATAGATGCCGCGGAAGGTCCC 355

Query_241 TCAGTGGCACAACCTGGAGCTGGGTGGA 267
          |||
Sbict_356 TCAGTGGCACAACCTGGAGCTGGGTGGA 382

```

b)

```

Query_94  ACATCGCGATGGCCAGCTCCTCAGCCAGGTCCACGGGAGACGGCCCCAGGCATCGCGC 153
          |||
Sbict_279  ACATCGCGATGGCCAGCTCCTCAGCCAGGTCCACGGGAGACGGCCCCAGGCATCGCGC 220
          |||

Query_154  ACGTCCAGCCGCGCCCCGGCCCCGGTGACAGCACCAGCGTGTCCAGGAAGCCCTCCCGG 213
          |||
Sbict_219  ACGTCCAGCCGCGCCCCGGCCCCGGTGACAGCACCAGCGTGTCCAGGAAGCCCTCCCGG 160
          |||

Query_214  GCAGCGTCGTGCACGGGTGCGGTGAGAGTGGCGGGGTCGGCGCAGTTGGGCTCCGCGCCG 273
          |||
Sbict_159  GCAGCGTCGTGCACGGGTGCGGTGAGAGTGGCGGGGTCGGCGCAGTTGGGCTCCGCGCCG 100
          |||

Query_274  TGGAGCAGCAGCAGCTCCGCCACTCGGGCGCTGCCCATCATCATGACCTTGTGGGTCTCT 333
          |||
Sbict_99   TGGAGCAGCAGCAGCTCCGCCACTCGGGCGCTGCCCATCATCATGACCTTGTGGGTCTCT 40
          |||

Query_334  CACTTCGCGCGGGACATGGGTGTGTAGAAGAATCCACG 372
          |||
Sbict_39   CACTTCGCGCGGGACATGGGTGTGTAGAAGAATCCACG
          |||

```

Şekil-20 a) Mutant *CDKN2A* (2. Ekzon; c.339G>T) cDNA örneğinin *forward*-primerle yapılan dizi analizi sonuçlarının referans dizilerle karşılaştırılması, **b)** Mutant *CDKN2A* (2. Ekzon; c.273G>T) cDNA örneğinin *reverse*-primerle yapılan dizi analizi sonuçlarının referans dizilerle karşılaştırılması.

4.2.1.3 Mutant *CDKN2A* (c.342C>G) cDNA Dizilerinin Referans diziler ile Karşılaştırılması

CDKN2A(2. ekzon; c.342C>G) geninin 2. ekzonunu içeren mutant cDNA örneğine ait iki yönlü dizi analizi sonuçları referans cDNA dizileriyle karşılaştırıldı. Analiz sonuçları plazmide ait intronların doğru şekilde uzaklaştırıldığı ve kontrolde olduğu gibi *splice* olduğu tespit edildi. (Şekil-21).

a)

```

Query_144  GGGCTTCCTGGACACGCTGGTGGTGCTGCACCGGGCGGGCGCGGCTGGACGTGCGCGA 203
          |||
Sbict_166  GGGCTTCCTGGACACGCTGGTGGTGCTGCACCGGGCGGGCGCGGCTGGACGTGCGCGA 225
          |||

Query_204  TGCCTGGGGCCGTCTGCCGTGGACCTGGCTGAGGAGCTGGGCCATCGCGATGTCGCACG 263
          |||
Sbict_226  TGCCTGGGGCCGTCTGCCGTGGACCTGGCTGAGGAGCTGGGCCATCGCGATGTCGCACG 285
          |||

Query_264  GTACCTGCGCGCGGCTGCGGGGGGCACCAAGAGGCAGTAACCATGCCCGCATAGATGCCGC 323
          |||
Sbict_286  GTACCTGCGCGCGGCTGCGGGGGGCACCAAGAGGCAGTAACCATGCCCGCATAGATGCCGC 345
          |||

Query_324  GGAAGGCCCCCTCAGTGGCACAACCTGGAGCTGGGTGGA 360
          |||
Sbict_346  GGAAGGTCCCTCAGTGGCACAACCTGGAGCTGGGTGGA 382
          |||

```

b)

Query_74	GTGCGACATCGCGATGGCCAGCTCCTCAGCCAGGTCCACGGCAGACGGCCCCAGGCAT	133
Sbict_284	GTGCGACATCGCGATGGCCAGCTCCTCAGCCAGGTCCACGGCAGACGGCCCCAGGCAT	225
Query_134	CGCGCACGTCCAGCCGCGCCCGGCCCGGTGCAGCACCACCAGCGTGTCCAGGAAGCCCT	193
Sbict_224	CGCGCACGTCCAGCCGCGCCCGGCCCGGTGCAGCACCACCAGCGTGTCCAGGAAGCCCT	165
Query_194	CCCGGGCAGCGTCGTGCACGGGTCGGGTGAGAGTGGCGGGGTCGGCGCAGTTGGGCTCCG	253
Sbict_164	CCCGGGCAGCGTCGTGCACGGGTCGGGTGAGAGTGGCGGGGTCGGCGCAGTTGGGCTCCG	105
Query_254	CGCCGTGGAGCAGCAGCAGCTCCGCCACTCGGGCGCTGCCATCATCATGACCTTGTGGG	313
Sbict_104	CGCCGTGGAGCAGCAGCAGCTCCGCCACTCGGGCGCTGCCATCATCATGACCTTGTGGG	45
Query_314	TCCTCCACTTCGCGGGGGACATGGGTGTGTAGAAGAATCCACG	357
Sbict_44	TCCTCCACTTCGCGGGGGACATGGGTGTGTAGAAGAATCCACG	1

Şekil-21 a) Mutant *CDKN2A* (2. Ekzon; c.342C>G) cDNA örneğinin *forward*-primerle yapılan dizi analizi sonuçlarının referans dizilerle karşılaştırılması, b) Mutant *CDKN2A* (2. Ekzon; c.342C>G) cDNA örneğinin *reverse*-primerle yapılan dizi analizi sonuçlarının referans dizilerle karşılaştırılması.

4.2.2 *TP53* Kontrol ve Mutant Örneklerin cDNA Dizilerinin Karşılaştırılması

4.2.2.1 *TP53* Kontrol ve Referans cDNA Dizilerinin Karşılaştırılması

Transfeksiyon sonrası *TP53* geninin 2. ekzonunu içeren kontrol cDNA örneğine ait iki yönlü dizi analizi sonuçları referans cDNA dizileriyle karşılaştırıldı ve kontrolün doğru şekilde *splice* olduğu görüldü (Şekil-22).

a)

CGTGGATTCTTCTACACACCCATGTCCC GCCGCGAAGTGGAGGACCCACAAGTGGTAATCTAATG
GGACGGAACAGCTTTGAGGTGCGTGTGTGCTGTCTGGGAGAGACCGGCGCACAGAGG
AAGAGAATCTCCGCAAGAAAGGGGAGCCTCACCACGAGCTGCCCCCAGGGAGCACTAAGCG
AGTGGCACAACCTGGAGCTGGGTGGA

b-1)

Query_4	CCACAWGTGGTAATCTACTGGGACGGAACAGCTTTGAGGTGCGTGTTTGTGCCCTGKCCTG	63
Sbict_46	CCACAAGTGGTAATCTACTGGGACGGAACAGCTTTGAGGTGCGTGTTTGTGCCCTGTCCTG	105
Query_64	GGAGAGACCGGCGCACAGAGGAAGAGAATCTCCGCAAGAAAGGGGAGCCTCACCACGAGC	123
Sbict_106	GGAGAGACCGGCGCACAGAGGAAGAGAATCTCCGCAAGAAAGGGGAGCCTCACCACGAGC	165
Query_124	TGCCCCCAGGGAGCACTAAGCGAGTGGCACAACCTGGAGCTGGGTGGA	170
Sbict_166	TGCCCCCAGGGAGCACTAAGCGAGTGGCACAACCTGGAGCTGGGTGGA	212

b-2)

Query...16 CCTGGGGGCAGCTTCGTGGTGAGGCTCCCTTTCTTGCGGAGATTCTCTTCCTCTGTGGMG 75
 |||||
 Sbict...175 CCTGGGGGCAGCT-CGTGGTGAGGCTCCCTTTCTTGCGGAGATTCTCTTCCTCTGTGCG 117
 Query...76 CCGGTCTCTCCCAGGACAGGCACAAACACGCACCTCAAAGCTGTTCGGTCCCAGTAGATT 135
 |||||
 Sbict...116 CCGGTCTCTCCCAGGACAGGCACAAACACGCACCTCAAAGCTGTTCGGTCCCAGTAGATT 57
 Query...136 ACCACTTGTGGGTCTCCACTTCGCGGCGGGACATGGGTGTGTAGAAGAATCCACG 191
 |||||
 Sbict...56 ACCACTTGTGGGTCTCCACTTCGCGGCGGGACATGGGTGTGTAGAAGAATCCACG 1

Şekil-22 a) *TP53* (8. Ekzon) kontrol cDNA örneğine ait referans diziler(212bp), **b-1)** *TP53* kontrol cDNA örneğinin *forward*-primerle yapılan dizi analizi sonuçlarının referans dizilerle karşılaştırılması, **b-2)** *TP53* kontrol cDNA örneğinin *reverse*-primerle yapılan dizi analizi sonuçlarının referans dizilerle karşılaştırılması.

4.2.2.2 Mutant *TP53* (c.793C>T) ve Referans cDNA Dizilerinin Karşılaştırılması

Mutant *TP53* (8. Ekzon; c.793C>T) cDNA örneğine ait iki yönlü dizi analizi sonuçları referans cDNA dizileriyle karşılaştırıldı ve mutasyonun *splicing* 'de hataya neden olmadığı görüldü (Şekil-23).

a)

Query...13 AKTGTAGGACC-ACAAGTGGTAATCTA TGGGACGGAACAGCTTTGAGGTGCGTGTITGT 71
 |||||
 Sbict...36 AGTGGAGGACCCACAAGTGGTAATCTA TGGGACGGAACAGCTTTGAGGTGCGTGTITGT 95
 Query...72 GCCTGTCTCTGGGAGAGACC GGCGCACAGAGGAAGAAGAATCTCCGCAAGAAAGGGGAGCCT 131
 |||||
 Sbict...96 GCCTGTCTCTGGGAGAGACC GGCGCACAGAGGAAGAAGAATCTCCGCAAGAAAGGGGAGCCT 155
 Query...132 CACCACGAGCTGCCCCCAGGGAGCACTAAGCGAGTGGCACAACTGGAGCTGGGTGGA 188
 |||||
 Sbict...156 CACCACGAGCTGCCCCCAGGGAGCACTAAGCGAGTGGCACAACTGGAGCTGGGTGGA 212

b)

Query...16 GGGGGCAGCTCGTGGTGAGGCTCCCTTTCTTGCGGAGATTCTCTTCCTCTGTGCGCCGG 75
 |||||
 Sbict...172 GGGGGCAGCTCGTGGTGAGGCTCCCTTTCTTGCGGAGATTCTCTTCCTCTGTGCGCCGG 113
 Query...76 TCTCTCCCAGGACAGGCACAAACACGCACCTCAAAGCTGTTCGGTCCCA TAGATTACCA 135
 |||||
 Sbict...112 TCTCTCCCAGGACAGGCACAAACACGCACCTCAAAGCTGTTCGGTCCCA TAGATTACCA 53
 Query...136 CTTGTGGGTCTCCACTTCGCGGCGGGACATGGGTGTGTAGAAGAATCCACG 187
 |||||
 Sbict...52 CTTGTGGGTCTCCACTTCGCGGCGGGACATGGGTGTGTAGAAGAATCCACG 1

Şekil-23 a) Mutant *TP53* (8. Ekzon; c.793C>T) cDNA örneğinin *forward*-primerle yapılan analizi sonuçlarının referans dizilerle karşılaştırılması, **b)** Mutant *TP53* (8. Ekzon; c.793C>T) cDNA örneğinin *reverse*-primerle yapılan dizi analizi sonuçlarının referans dizilerle karşılaştırılması.

4.2.2.3 Mutant *TP53* (8. Ekzon; c.801G>T) ve Referans cDNA Dizilerin Karşılaştırılması

Mutant *TP53* (8. Ekzon; c.801G>T) cDNA örneğine ait iki yönlü dizi analizi sonuçları referans cDNA dizileriyle karşılaştırıldı ve mutasyonunu *splicing*'de hataya neden olmadığı tespit edildi (Şekil-24).

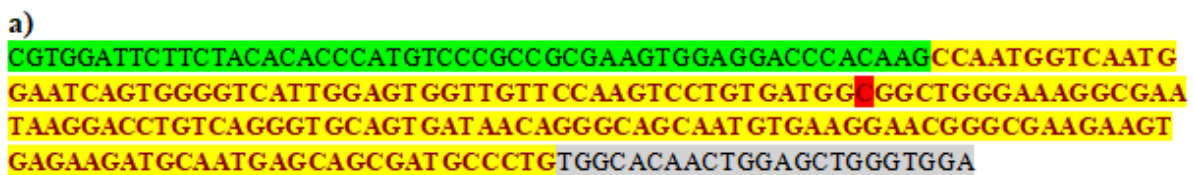


Şekil-24 a) Mutant *TP53* (8. Ekzon; c.801G>T) cDNA örneğinin *forward*-primerle yapılan analizi sonuçlarının referans dizilerle karşılaştırılması, **b)** Mutant *TP53*(8. Ekzon; c.801G>T) cDNA örneğinin *reverse*-primerle yapılan dizi analizi sonuçlarının referans dizilerle karşılaştırılması.

4.2.3 *BAI3* Kontrol ve Mutant cDNA Dizilerinin Karşılaştırılması

4.2.3.1 *BAI3* Kontrol ve Referans cDNA Dizilerinin Karşılaştırılması

Transfeksiyon sonrası *BAI3* geninin 8. ekzonunu içeren kontrol cDNA örneğine ait iki yönlü dizi analizi sonuçları referans cDNA dizileriyle karşılaştırıldı ve kontrolün doğru şekilde *splice* olduğu görüldü (Şekil-25).



b-1)

```

Query_1  AAGCCAATGGTCAATGGAATCAGTGGGGTCATTGGAGTGGTTGTTCCAAGTCTGTGATG 60
          |||||
Sbict_50  AAGCCAATGGTCAATGGAATCAGTGGGGTCATTGGAGTGGTTGTTCCAAGTCTGTGATG 109

Query_61  GCGGCTGGGAAAGGCGAATAAGGACCTGTCAGGGTGCAAGTACAGGGCAGCAATGTG 120
          |||||
Sbict_110 GCGGCTGGGAAAGGCGAATAAGGACCTGTCAGGGTGCAAGTACAGGGCAGCAATGTG 169

Query_121 AAGGAACGGGCGAAGAAGTGAGAAGATGCAGTGAGCAGCGATGCCCTGTGGCACAACCTGG 180
          |||||
Sbict_170 AAGGAACGGGCGAAGAAGTGAGAAGATGCAGTGAGCAGCGATGCCCTGTGGCACAACCTGG 229

Query_181 AGCTGGGTGGA 191
          |||||
Sbict_230 AGCTGGGTGGA 240

```

b-2)

```

Query_1  CACAKTGCTGCCCTGTTAWCACTGCACCCCTGACAGGTCCCTTATTGCGCTTTCCAGCCGC 60
          |||||
Sbict_169 CACATTGCTGCCCTGTTATCACTGCACCCCTGACAGGTCCCTTATTGCGCTTTCCAGCCGC 110

Query_61  CATCACAGGACTTGAACAACCACTCCAAATGACCCCACTGATTCCATTGACCATTGGCTT 120
          |||||
Sbict_109 CATCACAGGACTTGAACAACCACTCCAAATGACCCCACTGATTCCATTGACCATTGGCTT 50

Query_121 GTGGGTCCTCCACTTCGCGGCGGGACATGGGTGTGTAGAAGAATCCACG 169
          |||||
Sbict_49  GTGGGTCCTCCACTTCGCGGCGGGACATGGGTGTGTAGAAGAATCCACG 1

```

Şekil-25 a) *BAI3* (8. Ekzon) kontrol cDNA örneğine ait referans diziler(240bp), **b-1)** *BAI3* kontrol cDNA örneğinin *forward*-primerle yapılan dizi analizi sonuçlarının referans dizilerle karşılaştırılması, **b-2)** *BAI3* kontrol cDNA örneğinin *reverse*-primerle yapılan dizi analizi sonuçlarının referans dizilerle karşılaştırılması.

4.2.3.2 Mutant *BAI3* ve Referans cDNA Dizilerin Karşılaştırılması

Mutant *BAI3* (8. Ekzon; c.1419C>T) cDNA örneğine ait iki yönlü dizi analizi sonuçları referans cDNA dizileriyle karşılaştırıldı ve sonuçlar mutasyonun *splicing*'de hataya neden olmadığını göstermektedir (Şekil-26).

a)

```

Query_13  TGGTCTATGGAATCAGTGGGGTCATTGGAKTGKTTGTTCCWAGTCCTGTGATGGTGGCTG 72
          |||||
Sbict_57  TGGTCAATGGAATCAGTGGGGTCATTGGAGTGGTTGTTCCAAGTCCTGTGATGGTGGCTG 116

Query_73  GGAAAGGCGAATAAGGACCTGTGAGGGTKYWGTGATAACAGGGCAGCAATGTGAAGGAAC 132
          |||||
Sbict_117 GGAAAGGCGAATAAGGACCTGTGAGGGTGCAAGTACAGGGCAGCAATGTGAAGGAAC 176

Query_133 GGGCGAAGAAGTGAGAAGATGCAGTGAGCAGCGATGCCCTGTGGCACAACCTGGAGCTGGG 192
          |||||
Sbict_177 GGGCGAAGAAGTGAGAAGATGCAGTGAGCAGCGATGCCCTGTGGCACAACCTGGAGCTGGG 236

Query_193 TGGA 196
          |||||
Sbict_237 TGGA 240

```

b)

Query_19	TGCATCTTCTCACTTCTTCGCCCGTTCTTCACATTGCTGCCCTGTTATCACTGCACCCT	78
Sbict_199	TGCATCTTCTCACTTCTTCGCCCGTTCTTCACATTGCTGCCCTGTTATCACTGCACCCT	140
Query_79	GACAGGTCCTTATTTCGCTTTCCAGCCG	138
Sbict_139	GACAGGTCCTTATTTCGCTTTCCAGCCG	80
Query_139	GACCCCACTGATTCCATTGACCATTGGCTTGTGGGTCTCCACTTCGCGCGGGGACATGG	198
Sbict_79	GACCCCACTGATTCCATTGACCATTGGCTTGTGGGTCTCCACTTCGCGCGGGGACATGG	20
Query_199	GTGTGTAGAAGAATCCACG	217
Sbict_19	GTGTGTAGAAGAATCCACG	1

Şekil-26 a) Mutant *BAI3* (8. Ekzon; c.1419C>T) cDNA örneğinin *forward*-primerle yapılan dizi analizi sonuçlarının referans dizilerle karşılaştırılması, **b)** Mutant *BAI3* (8. Ekzon; c.1419C>T) cDNA örneğinin *reverse*-primerle yapılan dizi analizi sonuçlarının referans dizilerle karşılaştırılması.

4.2.4 *CABLES2* Kontrol ve Mutant cDNA Dizilerinin Karşılaştırılması

4.2.4.1 *CABLES2* Kontrol ve Referans cDNA Dizilerinin Karşılaştırılması

Transfeksiyon sonrası *CABLES2* geninin 8. ekzonunu içeren kontrol cDNA örneğine ait iki yönlü dizi analizi sonuçları referans cDNA dizileriyle karşılaştırıldı ve kontrolün doğru şekilde *splice* olduğu görüldü (Şekil-27).

a)

CGTGGATTCTTCTACACACCCATGTCCCGCCGCGAAGTGGAGGACCCACAAGACCACAGTGATAG
AATA GTGAAGCCCTCAGACCTCAAAAAGGACATGAACGAGACCTTCAGGGAGAAGTTCCCC
CATGTCAAACCTGACGCTGAGCAAAATCAGGAGTGGCACAACTGGAGCTGGGTGGA

b-1)

Query_1	AGCCCTCAGACCTCAAAAAGGACATGAACGAGACCTTCAGGGAGAAGTTCCCCATGTCA	60
Sbict_75	AGCCCTCAGACCTCAAAAAGGACATGAACGAGACCTTCAGGGAGAAGTTCCCCATGTCA	134
Query_61	AACTGACGCTGAGCAAAATCAGGAGTGGCACAACTGGAGCTGGGTGGA	108
Sbict_135	AACTGACGCTGAGCAAAATCAGGAGTGGCACAACTGGAGCTGGGTGGA	182

b-2)

```

Query_19  TCAGTTTGACATGGGGGA-CITCTCCCTGAAGGTCTCGTTCATGTCCTTTTTGAGGCTCTG 77
          |||
Sbict_140 TCAGTTTGACATGGGGGAACCTTCTCCCTGAAGGTCTCGTTCATGTCCTTTTTGAGGCTCTG 81
          |||

Query_78  AGGGCTTCACGTATTCTATCACTGTGGTCTTGTTGGGTCCTCCACTTCGCGGGCGGGACATG 137
          |||
Sbict_80  AGGGCTTCACGTATTCTATCACTGTGGTCTTGTTGGGTCCTCCACTTCGCGGGCGGGACATG 21
          |||

Query_138  GGTGTGTAGAAGAATCCACG 157
          |||
Sbict_20  GGTGTGTAGAAGAATCCACG 1
          |||

```

Şekil-27 a) *CABLES2* (8. Ekzon) kontrol cDNA örneğine ait referans diziler (182bp), **b-1)** *CABLES2* kontrol cDNA örneğinin *forward*-primerle yapılan dizi analizi sonuçlarının referans dizilerle karşılaştırılması, **b-2)** *CABLES2* kontrol cDNA örneğinin *reverse*-primerle yapılan dizi analizi sonuçlarının referans dizilerle karşılaştırılması.

4.2.4.2 Mutant *CABLES2* ve Referans cDNA Dizilerinin Karşılaştırılması

Mutant *CABLES2* (8.Ekzon; c.1002C>T) cDNA örneğine ait iki yönlü dizi analizi sonuçları referans cDNA dizileriyle karşılaştırıldı ve mutant örneğin kontrolle aynı şekilde *splice* olduğu görüldü (Şekil-28).

a)

```

Query_16  CCACAGGACCTCAGAGAGARAATA GGGGAAGCCCTCCACCTCAAMAAGGACGCGACCGA 75
          |||
Sbict_46  CCACAAGACACAGTGATAGAATA GTGAAGCCCTCAGACCTCAAAAAGGACATGAACGA 105
          |||

Query_76  GACCTTCCGGGAGAAAGTTCCCCATGTCAAATTGACGCTGAGCAAAATCAGGAGAGGMAC 135
          |||
Sbict_106 GACCTTCAGGGAGAAAGTTCCCCATGTCAAAGTACGCTGAGCAAAATCAGGAGTGGCAC 165
          |||

Query_136 AACTGGAGCTGGGTGGA 152
          |||
Sbict_166 AACTGGAGCTGGGTGGA 182
          |||

```

b)

```

Query_23  ACATGKTGGGAACCTTCTCCMTGAAGGWCTCGTTTCATGTCCTTTTGTAGGCTCTGAGGGCTT 82
          |||
Sbict_132 ACATGG-GGGAACCTTCTCCCTGAAGGTCTCGTTTCATGTCCTTTTGTAGGCTCTGAGGGCTT 74
          |||

Query_83  CAC TATTCTATCACTGTGGTCTTGTTGGGTCCTCCACTTCGCGGGCGGGACATGGGTGTGT 142
          |||
Sbict_73  CAC TATTCTATCACTGTGGTCTTGTTGGGTCCTCCACTTCGCGGGCGGGACATGGGTGTGT 14
          |||

Query_143 AGAAGAATCCACG 155
          |||
Sbict_13  AGAAGAATCCACG 1
          |||

```

Şekil-28 a) Mutant *CABLES2* (8.Ekzon; c.1002C>T) cDNA örneğinin *forward*-primerle yapılan dizi analizi sonuçlarının referans dizilerle karşılaştırılması, **b)** Mutant *CABLES2* (8.Ekzon; c.1002C>T) cDNA örneğinin *reverse*-primerle yapılan dizi analizi sonuçlarının referans dizilerle karşılaştırılması.

4.2.5 *PTCH2* Kontrol ve Mutant cDNA Dizilerinin Karşılaştırılması

4.2.5.1 *PTCH2* Kontrol ve Referans cDNA Dizilerinin Karşılaştırılması

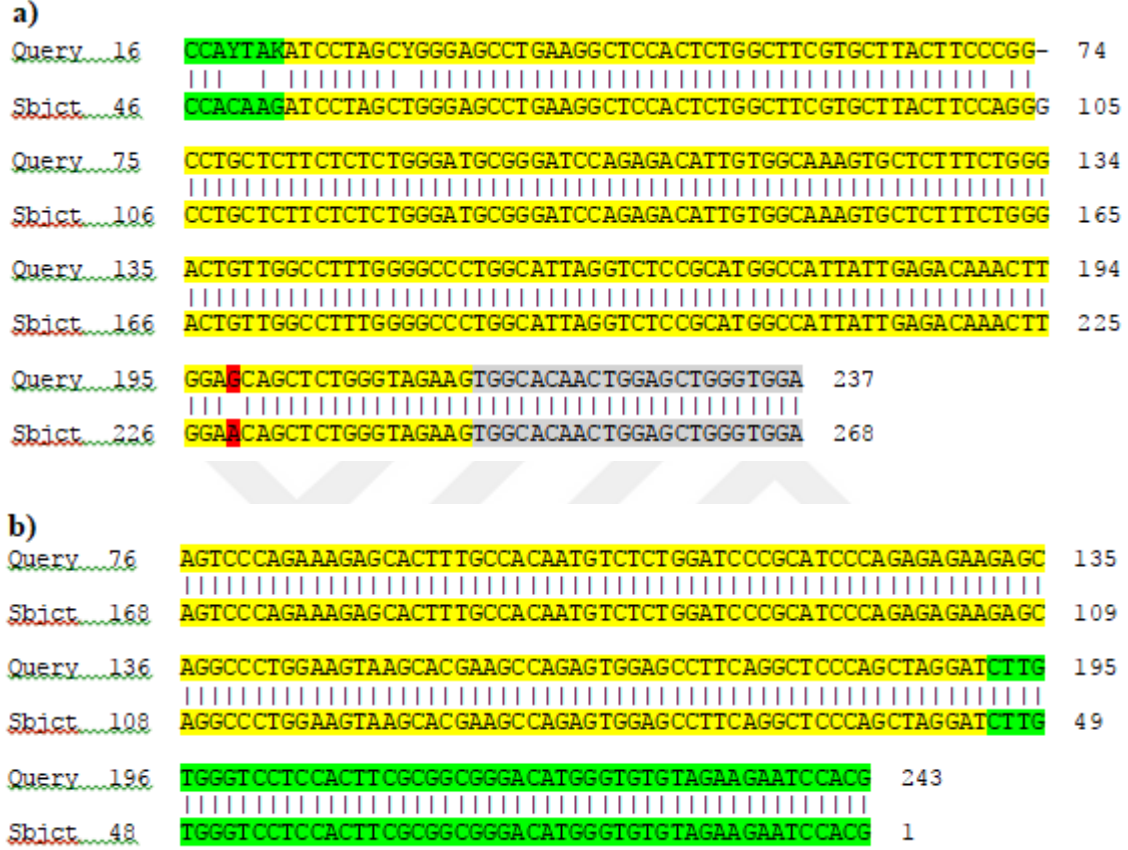
Transfeksiyon sonrası *PTCH2* geninin 2. ekzonunu içeren kontrol cDNA örneğine ait iki yönlü dizi analizi sonuçları referans cDNA dizileriyle karşılaştırıldı ve kontrolün doğru şekilde splice olduğu görüldü (Şekil-29).



Şekil-29 a) *PTCH2* (2. Ekzon) kontrol cDNA örneğine ait referans diziler(268bp), **b-1)** *PTCH2* kontrol cDNA örneğinin *forvard*-primerle yapılan dizi analizi sonuçlarının referans dizilerle karşılaştırılması, **b-2)** *PTCH2* kontrol cDNA örneğinin *reverse*-primerle yapılan dizi analizi sonuçlarının referans dizilerle karşılaştırılması.

4.2.5.2 *PTCH2* Mutant ve Referans cDNA Dizilerin Karşılaştırılması

Mutant *PTCH2* (2. Ekzon; c.249A>G) cDNA örneğine ait iki yönlü dizi analizi sonuçları referans cDNA dizileriyle karşılaştırıldı ve mutant örneği kontrolde olduğu gibi doğru şekilde *splice* olduğu görüldü (Şekil-30).



Şekil-30 a) Mutant *PTCH2* (2. Ekzon; c.249A>G) cDNA örneğinin *forward*-primerle yapılan dizi analizi sonuçlarının referans dizilerle karşılaştırılması, b) Mutant *PTCH2* (2. Ekzon; c.249A>G) cDNA örneğinin *reverse*-primerle yapılan dizi analizi sonuçlarının referans dizilerle karşılaştırılması.

5. TARTIŞMA

Pre-mRNA alternatif işlemlenmesi bir genin farklı fonksiyonlara sahip çok sayıda protein üretmelerine olanak sağlar. Normal koşullar altında bu mekanizma insanlarda farklılık gösteren kompleks dokuların fonksiyonel gereksinimlerini karşılamak için sıkı bir şekilde düzenlenir¹⁰. Hücrel cis etkili, trans etkili ‘splicing’ düzenleyici elementlerle ile çekirdek ‘spliceosome’ kompleksi bileşenlerinin derişimleri ve bu bileşenlerde oluşan mutasyonlar kanser gelişimindeki hatalı mRNA ürünlerinin en temel sebebidir¹⁰. Cis-etkili splice düzenleyici pre-mRNA dizilerinde oluşan mutasyonlar ekzon atlanmasına¹⁷, yeni bir *splicing* sinyalinin oluşmasına veya kriptik bir *splice* sinyalinin aktive olmasına neden olarak mRNA içeriğini değiştirebilirler⁶⁸. Mutasyon etkisi ile oluşan *splicing* defektleri genelde okuma çerçevesinde kaymaya ve erken sonlanma kodonu oluşumuna yol açarak proteinin C-terminalinde kısalmaya, sonuç olarak güdükleşmiş proteinlerin oluşmasına yol açar. Erken sonlanma kodonu oluşması ‘Erken Sonlanma Kodonu Aracılıklı mRNA Yıkımı’ (*Nonsense-mediated mRNA decay: NMD*) yolu ile mRNA ürünün yıkımı ile sonuçlanabilmektedir^{69,70}. Yakın zamandaki çalışmalar alternatif splicing’e neden olan durumların yaklaşık %35’i NMD ile yıkıma uğratılabilecek erken sonlanma kodonu içeren mRNA’lar ürettikleri belirtilmiştir⁵. Bir diğer olgu ise *Nonsense-associated altered splicing (NAS)* mekanizması henüz bütünüyle aydınlatılmamış; erken sonlanma kodonunun oluşmasına neden olan mutasyonlar ekzonun atlanması veya mRNA içeriğinin çeşitli şekillerde değişimine neden olabilir¹. Belirtilen bu durumlarda mRNA işlemlenmesini olumsuz etkileyen mutasyonlar sıklıkla hatalı ve işlevsel olmayan protein ürünlerinin oluşmasına neden olurlar. Pre-mRNA işlemlenmesini bozan mutasyonlar kanser gelişiminde kilit öneme sahip TSG’lerde işlev kaybı veya onkogenlere işlev kazandırabilirler⁵. Kanser klonal evriminde kanser gelişimine katkı sunan mutasyonlar sürücü (*Driver*) mutasyonlar, katkısı olmayan mutasyonlar yolcu (*Passenger*) mutasyonlar olarak ifade edilirler. Kanser gelişiminde önleyici role sahip olan TSG’lerde gözlenen ve *splicing*’i bozan mutasyonların gende işlev kaybına yol açma olasılıkları yüksektir. Bu nedenle TSG’lerde mRNA işlemlenmesini bozan mutasyonlar kanser gelişimine katkı sunan sürücü mutasyon olarak işlev görebilirler.

Komşu dokularla kıyaslandığında kanser dokularının *splice* varyantı yönünden daha zengin olduğu görülmüştür^{5,11}. Artan kanıtlar pre-mRNA’nın hatalı işlemlenmesi ile oluşturulan hatalı proteinlerin tümör gelişimine katkı sunduğuna işaret etmektedir¹⁰. Kanser

tüm evrelerinde alternatif *splicing* ile farklı ürünlerin Oluşumları gözlenir³⁹. Tüm genomu kapsayan ve birçok kanser türünü içeren çalışmalar kanserle ilişkili 15.000'den fazla *splice* varyantı tespit edilmiştir¹⁰. Özellikle miyelodisplastik sendrom ve miyelodisplazi hastalarının %45-85'inde *splicing* mekanizmasında rol alan bileşenlerde mutasyon olduğu belirtilmektedir³⁹. Bir çalışma kronik miyelod lösemili (KML) olgulara ait hücreler, normal hücrelerle kıyaslandığında 2000 kadar genin farklı izoformunun olduğu tespit edilmiştir⁷¹. Embriyonik gelişim aşamasında birçok kanserle ilişkilendirilen *splicing* izoformları eksprese olurken normal yetişkin bireylerde eksprese olmaz³⁶. Genom ve RNA dizi analizi verileri birçok yeni alternatif *splicing* varyantını tanımlamamızı sağlamış ancak bu varyantların çoğunun fonksiyonu bilinmediğinden ileri analizler gerektirmektedir^{7,72}. Kanser gelişiminde etkili genler ve hatalı mRNA ürünleri tedavide hedef moleküller olarak seçilebilir⁷¹ bu nedenle ileri analizlerle kanserlerde özgül moleküllerin tanımlanması tedavide çok önemlidir.

Çalışmamızda seçilen sekiz mutasyona ait HSF analiz tahminleri mutasyonların *splicing* düzenleyici elementlerde (*SRE*) bozulmalara neden oldukları ve *splicing*'de değişime neden olabileceklerine işaret etmektedir. Yapılan DNA dizi analizleri sonucunda *CDKN2A* (Ekzon 2), *TP53* (Ekzon 8), *BAI3* (Ekzon 8), *CABLES2* (Ekzon 8) ve *PTCH2* (Ekzon 2) genlerine ait kontrol örneklerinde mRNA'nın doğru şekilde işlendiği görüldü. *CDKN2A*(Ekzon 2; c.273G>A, c.339G>T, c.342C>G), *TP53* (Ekzon 8; c.793C>T, c.801G>T), *BAI3*(Ekzon 8; c.1419C>T), *CABLES2* (Ekzon 8; c.1002C>T) ve *PTCH2* (Ekzon 2; c.249A>G) sessiz mutasyonların cDNA dizi analiz sonuçlarının kontrolle uyumlu olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak hiçbir örnekte hatalı mRNA ürününün oluşmadığı, tüm örneklerin doğru şekilde işlendiği görüldü. hMLH1 ve hMSH2 genlerinde görülen 99 mutasyon ile ilgili beş farklı biyoinformatik tahmin programı ile yapılan analiz sonucunda 20 missense mutasyon seçilmiştir. Seçilen mutasyonların mRNA üzerine etkisini belirlemek üzere üç farklı hücre hattı kullanılarak minigen analizleri yapılmıştır. Çalışmada biyoinformatik tahmin analiz programı sonuçlarına göre *splice* defekti oluşumuna işaret eden 20 mutasyondan sekizinde *splice* defekti tespit edilmiştir. Bu durum deneysel sonuçlarla biyoinformatik analizlerin her zaman uyumlu olmadığını göstermektedir⁷³.

Tek aminoasit değişimi, baz eklenmesi, baz silinmesi, erken sonlanma mutasyonları ve sessiz mutasyonları içeren birçok çalışma ESR dizilerini (Exonic Splicing Regulatory element) bozarak mRNA işlenmesini etkilediklerini gösterilmiştir. ESE dizilerini bozan mutasyonlar ekzon atlanması veya hatalı mRNA ürünlerinin oluşmasına neden olabilir^{17,39}.

Bu konuda çok sayıda çalışma yapılmıştır. Örneğin, *MCAD* (*Medium-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase*) geninde c.362C>T *missence* mutasyonunun 5. ekzonda bir ESE dizisini bozarak ekzonun atlanmasına neden olduğu gösterilmiştir⁴⁴. Benzer şekilde *SMN2* geninde bir sessiz mutasyonun (Ekzon 7'de) mRNA ürünlerinin %80'inin ekzon 7'yi içermediğini gösterilmiştir^{1,11,32,44}. *BRCA2* genindeki (Ekzon 6) 744G>A *sessiz* mutasyonunun ekzon 6 ve ekzon 5-6'nın atlanması ile sonuçlanan iki farklı mRNA ürünü oluşturduğu gösterilmiştir⁴⁵. *APC* geninde 1869G>T (R623R) (Ekzon 14) sessiz mutasyonunun ekzon 14'ün atlanması ile sonuçlandığı gösterilmiştir⁴⁶. *PAH* geninde yer alan 1197A>T sessiz mutasyonunun mRNA ürününde ekzon 11'in atlanmasına neden olduğu gösterilmiştir⁴⁷. Bir tümör süpresör gen olan *KLF6* geninin 1. intronunda görülen tek nükleotid (G>A) polimorfizmi SRSF5 (SRp40) için bir bağlanma motifi oluşturarak *KLF6* genin 2. ekzonunda kriptik bir *splice-site* oluşumuna neden olur. Oluşan splice varyantı prostat kanseri gelişimine katkı sunar³⁹. Akraba olmayan üç HNPCC (Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer) hastasında gözlenen *MLH1* geninin 12. ekzonunun 461. kodonunda yer alan AAG>TAG anlamsız mutasyonun ESE dizisini bozduğu COS-1 hücre hattı kullanılarak yapılan minigen analizi ile ekzon atlanması ile sonuçlandığı ortaya konmuştur⁷⁴. *MLH1* geninin 3. ekzonunda c.213_215delAGA (okuma çerçevesi içerisinde), c.214G>T ve c.216T>C sessiz mutasyonlarını kapsayan minigen analizleri, üç örnekte de cDNA ürününün 3. ekzonu içermediğini göstermiştir. Bu üç mutasyonun Ekzon içerisindeki bir ESE dizisini bozduğu öngörülmüştür⁷⁵. Meme kanseri görülen bir ailede *BRCA2* geninin 18. ekzonunda bulunan T2722R (8393C>G) mutasyonunun cDNA analizleri ekzon 18'in atlandığını gösterilmiştir. Mutasyon okuma çerçevesini bozmakta ve erken sonlanmaya neden olmaktadır. Mutasyonun potansiyel üç ESE dizisini bozduğu öngörülmüştür⁷⁶. Başka bir çalışmada *LAMA2* geninin 15.ekzonunda gözlenen c.2230C>T (R744X) anlamsız mutasyonun cDNA analiz sonucu gen ürünün ekzon 15'i içermediğini gösterilmiştir⁷⁷. *BRCA1* geninin 18. ekzonunda belirlenmiş E1694X anlamsız mutasyonunun cDNA düzeyindeki analizleri mutasyonun ekzon 18'in atlanması ile sonuçlandığı ve mutasyonun erken sonlanmadan ziyade okuma çerçevesinin korunduğu 26 aminoasitlik bir kısaltmaya neden olduğunu göstermiştir⁷⁸. Yukarıda belirtildiği gibi çok sayıda farklı mutasyonun mRNA işlenmesi üzerine etkilerini test etmek için splicing hibrit minigen analiz sistemleri kullanılarak başarılı sonuç elde edilmiştir.

MLH1 ve *MSH2* genlerine ait 87 genetik varyasyonun test edildiği bir çalışmada, direkt periferik kandan izole edilen RNA kullanılarak ve hücre hatları ile yapılan *splicing* hibrit

minigen analiz sonuçları karşılaştırmalı olarak ele alınmıştır. Çalışmada aynı mutasyonlar için farklı minigen sistemleri kullanılarak mRNA işlemlenmesinde farklı ürünler oluşabileceği gösterilmiştir. Örneğin pCAS ve pSPL3 vektörleri ile aynı mutasyonlarla yapılan bir çalışmada farklı sonuçlar alınmıştır. *MLH1* geninin 10. ekzonda yer alan c.794G>A mutasyonunun mRNA üzerine etkisini test etmek için pCAS vektörü kullanılarak HeLa, DLD1 ve COS-7 hücre hatları ile yapılan minigen analizi transkriptin ekzon 10'u içeren ve içermeyen iki ürün oluştuğunu göstermiştir. Aynı kontrol ve mutasyon için pSPL3 vektörü kullanıldığında mutant örnek ile benzer şekilde kontrol örneğinde de ekzon 10'u içeren ve içermeyen iki transkript ürünü oluştuğu tespit edilmiştir. Bu durum farklı transkripsiyon minigen analiz sistemlerinin farklı sonuçlara neden olabileceğini göstermektedir³⁵.

Genlerdeki genetik varyasyonların farklı hücre tiplerinde transkript düzeyinde etkileri farklılık gösterebilir. Örneğin Japon bir Duchenne muscular dystrophy (DMD, MIM 310200) hastası çocukta *DMD* geninin 42. ekzonunda gözlenen c.5985T>G anlamsız mutasyonun (p.Y1995X) yapılan invitro hibrit minigen deneyleri ve cDNA dizi analiz sonuçları, mutasyonun değişik dokularda farklı sonuçlara neden olduğu belirlenmiştir⁷⁹. Mutasyonun lenfosit hücrelerinde mRNA'da 42. ekzonun 5' ucunda 63bp kısaltmaya neden olan bir ürün ve ekzon 42'nin içerilmediği bir başka ürün oluşturduğu belirlenmiştir. Aynı çalışmada mutasyonun iskelet kası hücrelerinde herhangi bir *splice* defektine neden olmadığı, HeLa hücrelerinde ise 63bp kısalan ürün ve normal splice olan iki ürün oluştuğu tespit edilmiştir⁷⁹.

Trans etkili splicing faktörleri mRNA işlemlenmesinin düzenlenmesi başta olmak üzere hücrede hayati öneme sahip işlevleri vardır. Bir SR proteini olan SF2/ASF tavuk DT40 hücre hatlarında hayatta kalma açısından zorunlu ve miktarındaki azalma diğer SR proteinlerinin fazla ifadesi ile giderilememektedir. SRp20 fare gelişiminde önemli olduğu, *SC35* gen delesyonu T hücre olgunlaşmasında kusura neden olur. SRp55/B52 geninin bozulması meyve sineğinde (*Drosophila*) gelişim aşamasında ölümcüldür¹⁷. Bazı SR proteinleri hücre büyümesi, hücre çoğalması, apoptoz, senesens ve genom stabilitesi ile ilişkilendirilmiştir^{7,39,80}. SR proteinleri transkripsiyon, translasyon, mRNA taşıması, NMD ve translasyon gibi diğer biyolojik olaylarda rol oynarlar⁷.

Trans etkili splicing faktörlerinin birçok kanserde miktarlarının arttığı ve bu genlerdeki genetik varyasyonların kanserlerle ilişkisi tespit edilmiştir. Birçok çalışma bazı trans etkili splicing faktörlerinin onkogen etkiye sahip olduğunu gösterilmiştir. Bazı SR proteinlerindeki

(SRSF2;SC35, SRSF3;SRp20, SRSF5;SRp40 ve SRSF6;SRp55) yapısal ve miktarsal değişimler, birçok kanserle ilişkilendirilmiştir^{7,39,80}. *HNRNPL* (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L) oral skuamöz hücre kanserlerinde çok sentezlenir ve SRSF3 (SRp20) genini onkogenik olan uzun formunun ekspresyonunu uyarır. Bir tümör süpresör gen olan *BIN1* normalde MYC'ye bağlanarak proliferatif aktivitesini baskılar. *SRSF1* geninin fazla ekspresyonu *BIN1* genin ekzon 12a'yı içeren MYC'ye bağlanamayan ürününün oluşmasına neden olduğu gösterilmiştir⁷. Meme ve kolorektal kanserde *SRP55* (*SFR6*) geninde mutasyon tespit edilmiştir. İnsan miksoid liposarkomlarının %90'ında *hnRNP P2* geninin füzyonuna neden olan t(12;16)(q13;p11) translokasyonu görülmektedir. *hnRNP-CHOP* kimerik geninin nude-farelerde aşırı ekspresyonu tümör oluşumu ile sonuçlanmıştır⁵. Kemirgen fibroblast hücrelerinde *ASF/SF2* gen ekspresyonunda çok az artışın immortal fibroblast transformasyonu için yeterli olduğu ve nude farelerde sarkom oluşumuna neden olduğu gösterilmiştir^{71,81}. Ayrıca SRSF1'in fazla miktarda ekspresyonun apoptozu geciktirdiği ve farelerde meme kanseri gelişimi için yeterli olduğu gösterilmiştir⁸². SR proteinlerinden SFRS1'in (ASF/SF2) miktarının birçok insan tümöründe arttığı, SRSF6 ve PRPF6'nın akciğer ile kolon kanserinde onkogenik özellik gösterdiği belirlenmiştir⁷¹. *SFRS1* 'in transformasyona neden olması ve devamlılığını sağlaması gibi rollerinden ötürü bir onkogen olduğu ifade edilmektedir^{7,10,81,82}.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Yapılan cDNA dizi analizleri sonucunda *CDKN2A* (Ekzon 2), *TP53* (Ekzon 8), *BAI3* (Ekzon 8), *CABLES2* (Ekzon 8) ve *PTCH2* (Ekzon 2) genlerine ait kontrol örneklerinde mRNA'nın doğru şekilde işlendiği saptanmıştır. Yapılan deneyler sonrası, *CDKN2A* (Ekzon 2; c.273G>A, c.339G>T, c.342C>G), *TP53* (Ekzon 8; c.793C>T, c.801G>T), *BAI3* (Ekzon 8; c.1419C>T), *CABLES 2* (Ekzon 8; c.1002C>T) ve *PTCH2* (Ekzon 2; c.249A>G) sessiz mutasyonlarının cDNA dizi analiz sonuçlarının kontrolle uyumlu olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak hiçbir örnekte hatalı mRNA ürününün oluşmadığı, tüm örneklerin doğru şekilde işlemlendiği görüldü. Bu çalışmada mutasyonların mRNA işlemlenmesi üzerine etkisini analiz etmek üzere her zaman elde edilmesi mümkün olmayan dokular için alternatif olarak 'splicing' minigen analiz sistemlerinin model olarak kullanılmasının faydalı olabileceği görülmektedir. Çalışmamızda HSF tahmin sonuçları mutasyonların *splicing* düzenleyici elementlerde (*SRE*) bozulmalara neden oldukları ve mRNA işlemlenmesini bozabileceklerine işaret etmelerine rağmen seçilen sekiz mutasyona ait cDNA analiz sonuçları *splice* defekti oluşmadığını göstermiştir. Bizim çalışmamız ve benzer deneysel çalışmalar ile genetik varyasyonların mRNA işlemlenmesi üzerine etkisinin deneysel sonuçlarının bu alandaki biyoinformatik araçların geliştirilmesine katkı sunacağını düşünüyoruz.

Deneysel analiz sonuçları, biyoinformatik tahmin analizleri ile uyumlu olsun veya olmasın bu tarz biyoinformatik araçlarının geliştirilerek daha doğru tahmin yapmalarına katkı sunacaklardır. TSG'lerde gözlenen mutasyonların sürücü veya yolcu mutasyonlar olduklarını belirlemek kanserle mücadelede büyük öneme sahiptir. Genom ve cDNA düzeyinde yapılan analizlerle, kanserlerde özgül genetik varyasyonların veya hatalı mRNA ürünlerinin tanımlanması önemlidir. Kanserlerde özgül moleküllerin tespit edilmesi ve hedef seçilmeleri kanser tedavisine katkı sunacaktır.

Çalışmamızda seçtiğimiz sekiz sessiz TSG mutasyonunun mini-gen analiz sonuçları, hiçbir mutasyonun mRNA işlemlenmesini bozmadığı, dolayısıyla kanser gelişiminde etkisi olmayan yolcu (*passenger*) mutasyonlar olabileceklerini düşündürmektedir.

Kaynaklar

1. Cartegni, L., Chew, S.L. & Krainer, A.R. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat Rev Genet* **3**, 285-98 (2002).
2. Zhang, C., Li, W.H., Krainer, A.R. & Zhang, M.Q. RNA landscape of evolution for optimal exon and intron discrimination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 5797-802 (2008).
3. Shin, C. & Manley, J.L. Cell signalling and the control of pre-mRNA splicing. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 727-738 (2004).
4. Miura, K., Fujibuchi, W. & Sasaki, I. Alternative pre-mRNA splicing in digestive tract malignancy. *Cancer Sci* **102**, 309-16 (2011).
5. Ghigna, C., Valacca, C. & Biamonti, G. Alternative splicing and tumor progression. *Curr Genomics* **9**, 556-70 (2008).
6. Bentley, D.L. Coupling mRNA processing with transcription in time and space. *Nat Rev Genet* **15**, 163-175 (2014).
7. Tian, N., Li, J., Shi, J. & Sui, G. From General Aberrant Alternative Splicing in Cancers and Its Therapeutic Application to the Discovery of an Oncogenic DMTF1 Isoform. *Int J Mol Sci* **18**(2017).
8. Wessagowit, V., Nalla, V.K., Rogan, P.K. & McGrath, J.A. Normal and abnormal mechanisms of gene splicing and relevance to inherited skin diseases. *J Dermatol Sci* **40**, 73-84 (2005).
9. Cartegni, L., Wang, J., Zhu, Z., Zhang, M.Q. & Krainer, A.R. ESEfinder: A web resource to identify exonic splicing enhancers. *Nucleic Acids Res* **31**, 3568-71 (2003).
10. Zhang, J. & Manley, J.L. Misregulation of pre-mRNA alternative splicing in cancer. *Cancer Discov* **3**, 1228-37 (2013).
11. Ward, A.J. & Cooper, T.A. The pathobiology of splicing. *J Pathol* **220**, 152-63 (2010).
12. Scotti, M.M. & Swanson, M.S. RNA mis-splicing in disease. *Nat Rev Genet* **17**, 19-32 (2016).
13. Dvinge, H., Kim, E., Abdel-Wahab, O. & Bradley, R.K. RNA splicing factors as oncoproteins and tumour suppressors. *Nat Rev Cancer* **16**, 413-430 (2016).
14. Wang, E.T. *et al.* Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature* **456**, 470-6 (2008).

15. Graveley, B.R. Alternative splicing: increasing diversity in the proteomic world. *Trends Genet* **17**, 100-7 (2001).
16. Garcia-Blanco, M.A., Baraniak, A.P. & Lasda, E.L. Alternative splicing in disease and therapy. *Nat Biotechnol* **22**, 535-46 (2004).
17. Caceres, J.F. & Kornblihtt, A.R. Alternative splicing: multiple control mechanisms and involvement in human disease. *Trends Genet* **18**, 186-93 (2002).
18. Wahl, M.C., Will, C.L. & Luhrmann, R. The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell* **136**, 701-18 (2009).
19. Matlin, A.J., Clark, F. & Smith, C.W.J. Understanding alternative splicing: towards a cellular code. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 386-398 (2005).
20. Srirangalingam, U. *et al.* Multiple tandem splicing silencer elements suppress aberrant splicing within the long exon 26 of the human Apolipoprotein B gene. *BMC Mol Biol* **14**, 5 (2013).
21. Desmet, F.O. *et al.* Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res* **37**, e67 (2009).
22. Baralle, D. & Baralle, M. Splicing in action: assessing disease causing sequence changes. *J Med Genet* **42**, 737-48 (2005).
23. Srebrow, A. & Kornblihtt, A.R. The connection between splicing and cancer. *J Cell Sci* **119**, 2635-41 (2006).
24. Wang, Z. & Burge, C.B. Splicing regulation: from a parts list of regulatory elements to an integrated splicing code. *RNA* **14**, 802-13 (2008).
25. Zhang, C., Hastings, M.L., Krainer, A.R. & Zhang, M.Q. Dual-specificity splice sites function alternatively as 5' and 3' splice sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 15028-33 (2007).
26. Graveley, B.R. Sorting out the complexity of SR protein functions. *RNA* **6**, 1197-211 (2000).
27. Schellenberg, M.J., Ritchie, D.B. & MacMillan, A.M. Pre-mRNA splicing: a complex picture in higher definition. *Trends Biochem Sci* **33**, 243-6 (2008).
28. Li, Q., Lee, J.-A. & Black, D.L. Neuronal regulation of alternative pre-mRNA splicing. *Nat Rev Neurosci* **8**, 819-831 (2007).
29. Will, C.L. & Luhrmann, R. Spliceosome structure and function. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**(2011).

30. Blencowe, B.J. Exonic splicing enhancers: mechanism of action, diversity and role in human genetic diseases. *Trends Biochem Sci* **25**, 106-10 (2000).
31. Lopez, A.J. Alternative splicing of pre-mRNA: developmental consequences and mechanisms of regulation. *Annu Rev Genet* **32**, 279-305 (1998).
32. Faustino, N.A. & Cooper, T.A. Pre-mRNA splicing and human disease. *Genes Dev* **17**, 419-37 (2003).
33. Krawczak, M., Reiss, J. & Cooper, D.N. The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences. *Hum Genet* **90**, 41-54 (1992).
34. Hrstka, R., Coates, P.J. & Vojtesek, B. Polymorphisms in p53 and the p53 pathway: roles in cancer susceptibility and response to treatment. *J Cell Mol Med* **13**, 440-53 (2009).
35. Tournier, I. *et al.* A large fraction of unclassified variants of the mismatch repair genes MLH1 and MSH2 is associated with splicing defects. *Hum Mutat* **29**, 1412-24 (2008).
36. Bonomi, S. *et al.* Oncogenic alternative splicing switches: role in cancer progression and prospects for therapy. *Int J Cell Biol* **2013**, 962038 (2013).
37. Carpenter, S., Ricci, E.P., Mercier, B.C., Moore, M.J. & Fitzgerald, K.A. Post-transcriptional regulation of gene expression in innate immunity. *Nat Rev Immunol* **14**, 361-376 (2014).
38. Hogg, R., McGrail, J.C. & O'Keefe, R.T. The function of the NineTeen Complex (NTC) in regulating spliceosome conformations and fidelity during pre-mRNA splicing. *Biochem Soc Trans* **38**, 1110-5 (2010).
39. Liu, S. & Cheng, C. Alternative RNA splicing and cancer. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **4**, 547-66 (2013).
40. Ars, E. *et al.* Mutations affecting mRNA splicing are the most common molecular defects in patients with neurofibromatosis type 1. *Hum Mol Genet* **9**, 237-47 (2000).
41. Teraoka, S.N. *et al.* Splicing defects in the ataxia-telangiectasia gene, ATM: underlying mutations and consequences. *Am J Hum Genet* **64**, 1617-31 (1999).
42. Lopez-Bigas, N., Audit, B., Ouzounis, C., Parra, G. & Guigo, R. Are splicing mutations the most frequent cause of hereditary disease? *FEBS Lett* **579**, 1900-3 (2005).

43. Zatkova, A. *et al.* Disruption of exonic splicing enhancer elements is the principal cause of exon skipping associated with seven nonsense or missense alleles of NF1. *Hum Mutat* **24**, 491-501 (2004).
44. Nielsen, K.B. *et al.* Seemingly neutral polymorphic variants may confer immunity to splicing-inactivating mutations: a synonymous SNP in exon 5 of MCAD protects from deleterious mutations in a flanking exonic splicing enhancer. *Am J Hum Genet* **80**, 416-32 (2007).
45. Hansen, T.V. *et al.* The silent mutation nucleotide 744 G --> A, Lys172Lys, in exon 6 of BRCA2 results in exon skipping. *Breast Cancer Res Treat* **119**, 547-50 (2010).
46. Montera, M. *et al.* A silent mutation in exon 14 of the APC gene is associated with exon skipping in a FAP family. *J Med Genet* **38**, 863-7 (2001).
47. Chao, H.K., Hsiao, K.J. & Su, T.S. A silent mutation induces exon skipping in the phenylalanine hydroxylase gene in phenylketonuria. *Hum Genet* **108**, 14-9 (2001).
48. Stratton, M.R., Campbell, P.J. & Futreal, P.A. The cancer genome. *Nature* **458**, 719-24 (2009).
49. Greaves, M. & Maley, C.C. Clonal evolution in cancer. *Nature* **481**, 306-13 (2012).
50. Lief W. Ellison & Haber, D.A. Mechanisms of Tumor Suppressor Genes. Vol. 5 26-35 (Science & Medicine, 1998).
51. Stratton, M.R. Exploring the genomes of cancer cells: progress and promise. *Science* **331**, 1553-8 (2011).
52. Komarova, N.L., Sengupta, A. & Nowak, M.A. Mutation-selection networks of cancer initiation: tumor suppressor genes and chromosomal instability. *J Theor Biol* **223**, 433-50 (2003).
53. Sun, W. & Yang, J. Functional mechanisms for human tumor suppressors. *J Cancer* **1**, 136-40 (2010).
54. Vogelstein, B. & Kinzler, K.W. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* **10**, 789-99 (2004).
55. Park, V.M. & Pivnick, E.K. Neurofibromatosis type 1 (NF1): a protein truncation assay yielding identification of mutations in 73% of patients. *J Med Genet* **35**, 813-20 (1998).
56. Hodgson, S. Mechanisms of inherited cancer susceptibility. *J Zhejiang Univ Sci B* **9**, 1-4 (2008).

57. Welsh, P.L. & King, M.C. BRCA1 and BRCA2 and the genetics of breast and ovarian cancer. *Hum Mol Genet* **10**, 705-13 (2001).
58. Payne, S.R. & Kemp, C.J. Tumor suppressor genetics. *Carcinogenesis* **26**, 2031-45 (2005).
59. Hinzpeter, A. *et al.* Alternative splicing at a NAGNAG acceptor site as a novel phenotype modifier. *PLoS Genet* **6**(2010).
60. Akiyama, K. *et al.* A mutation in the nuclear pore complex gene Tmem48 causes gametogenesis defects in skeletal fusions with sterility (sks) mice. *J Biol Chem* **288**, 31830-41 (2013).
61. Naruto, T. *et al.* Deep intronic GPR143 mutation in a Japanese family with ocular albinism. *Sci Rep* **5**, 11334 (2015).
62. Xiao, J. *et al.* Mutations in CIZ1 cause adult onset primary cervical dystonia. *Ann Neurol* **71**, 458-69 (2012).
63. Kohmoto, T. *et al.* A novel COL11A1 mutation affecting splicing in a patient with Stickler syndrome. *Hum Genome Var* **2**, 15043 (2015).
64. Belaya, K. *et al.* Mutations in GMPPB cause congenital myasthenic syndrome and bridge myasthenic disorders with dystroglycanopathies. *Brain* **138**, 2493-504 (2015).
65. Boichard, A. *et al.* Two silent substitutions in the PDHA1 gene cause exon 5 skipping by disruption of a putative exonic splicing enhancer, 323-30 (2008).
66. Moore, D.D. Commonly Used Reagents and Equipment. in *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons, Inc., 2001).
67. Elbing, K. & Brent, R. Media Preparation and Bacteriological Tools. in *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons, Inc., 2001).
68. Cartegni, L. ESEfinder: a web resource to identify exonic splicing enhancers. *Nucleic Acids Research* **31**, 3568-3571 (2003).
69. Lykke-Andersen, S. & Jensen, T.H. Nonsense-mediated mRNA decay: an intricate machinery that shapes transcriptomes. *Nat Rev Mol Cell Biol* **16**, 665-677 (2015).
70. Brogna, S. & Wen, J. Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) mechanisms, 107-13 (2009).
71. Sveen, A., Kilpinen, S., Ruusulehto, A., Lothe, R.A. & Skotheim, R.I. Aberrant RNA splicing in cancer; expression changes and driver mutations of splicing factor genes. *Oncogene* **35**, 2413-27 (2016).

72. Cote, J., Dupuis, S., Jiang, Z. & Wu, J.Y. Caspase-2 pre-mRNA alternative splicing: Identification of an intronic element containing a decoy 3' acceptor site. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 938-43 (2001).
73. Lastella, P., Surdo, N.C., Resta, N., Guanti, G. & Stella, A. In silico and in vivo splicing analysis of MLH1 and MSH2 missense mutations shows exon- and tissue-specific effects. *BMC Genomics* **7**, 243 (2006).
74. Stella, A. *et al.* A nonsense mutation in MLH1 causes exon skipping in three unrelated HNPCC families. *Cancer Res* **61**, 7020-4 (2001).
75. McVety, S., Li, L., Gordon, P.H., Chong, G. & Foulkes, W.D. Disruption of an exon splicing enhancer in exon 3 of MLH1 is the cause of HNPCC in a Quebec family. *J Med Genet* **43**, 153-6 (2006).
76. Fackenthal, J.D., Cartegni, L., Krainer, A.R. & Olopade, O.I. BRCA2 T2722R is a deleterious allele that causes exon skipping. *Am J Hum Genet* **71**, 625-31 (2002).
77. Di Blasi, C. *et al.* Mild muscular dystrophy due to a nonsense mutation in the LAMA2 gene resulting in exon skipping. *Brain* **124**, 698-704 (2001).
78. Mazoyer, S. *et al.* A BRCA1 nonsense mutation causes exon skipping. *Am J Hum Genet* **62**, 713-5 (1998).
79. Tran, V.K. *et al.* A nonsense mutation-created intraexonic splice site is active in the lymphocytes, but not in the skeletal muscle of a DMD patient. *Hum Genet* **120**, 737-42 (2007).
80. Twyffels, L., Gueydan, C. & Kruys, V. Shuttling SR proteins: more than splicing factors. *FEBS J* **278**, 3246-55 (2011).
81. Karni, R. *et al.* The gene encoding the splicing factor SF2/ASF is a proto-oncogene. *Nat Struct Mol Biol* **14**, 185-93 (2007).
82. Anczukow, O. *et al.* The splicing factor SRSF1 regulates apoptosis and proliferation to promote mammary epithelial cell transformation. *Nat Struct Mol Biol* **19**, 220-8 (2012).

Ekler

Ek-1 Etik Kurul Raporu

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2014/27-15	Tarih: 21.08.2014
	Doç.Dr.Oğuz ALTUNGÖZ'ün sorumlusu olduğu "Kanser Kökenli Hücre Hatlarında Gözlenen Sessiz Tümör Süpresör Gen Mutasyonlarının mRNA İşlememesi Üzerine Olası Etkilerinin Saptanması" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, etik açıdan çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.	

ETİK KURUL BİLGİLERİ	
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu

ETİK KURUL ÜYELERİ					
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsi yet	Araştırma ile ilişkili mi?	İmza
Prof.Dr.Banu ÖNVURAL (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Ş.Reyhan UÇKU (Başkan Yardımcısı)	Halk Sağlığı	DEU Tıp Fakültesi Halk Sağlığı A.D.	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Ece BÖBER	Pediyatrik Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	Katılmadı
Prof.Dr.Hüseyin BASKIN	Tıbbi Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	Katılmadı
Prof.Dr.Vesile ÖZTÜRK	Nöroloji	DEU Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Bilgin CÖMERT	İç Hastalıkları (Yoğun Bakım B.D)	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Mukaddes GÜNELİ	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK	Tıbbi Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Nihal GELECEK	Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.İşıl TEKMEK	Histoloji ve Embriyoloji	DEU Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	Katılmadı
Doç.Dr.Müge KIRAY	Fizyoloji	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
Doç.Dr.Şeyda Seren İNTEPELER	Hemşirelik Yönetimi	DEU Hemşirelik Fakültesi Hemşirelik Yönetimi A.D	Kadın	E ☐ H ☒	Katılmadı
Uzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN	Hukuk	DEU Tıp Tarihi ve Etik A.D	Erkek	E ☐ H ☒	
Mehmet Erhan ÖZKUL	Sağlık mensubu olmayan üye	D.E.U Tıp Fakültesi İdari Mali İşler	Erkek	E ☐ H ☒	

Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Karar Formu



ALİ YÜKSEL

Kişisel Bilgiler

İletişim Bilgileri

Kimlik Numarası	10259112270
Doğum Tarihi	01/01/1978
İletişim Adresi	VATAN MAH. MIZRAKLI CAD. NO:146/9 YEŞİLYURT KARABAĞLAR
Telefon	(505) 385 50 76
E-posta	aliyuksell@gmail.com
Web Adresi	

Eğitim Bilgileri

01 Eylül 2001 - 30 Haziran 2006 (4 yıl 10 ay)
Lisans, İkinci Öğrenim, EGE ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
FEN FAKÜLTESİ, BİYOKİMYA BÖLÜMÜ
Diploma Numarası: 12217
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 66.22 / 100.0

Deneyim / İşyeri Bilgileri

01 Ocak 2001 - Şu Anda (16 yıl 10 ay) (Tam Zamanlı)
TEKNİK PERSONEL, DİĞER (İzmir Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi)

Yabancı Dil Bilgileri

İNGİLİZCE (Okuma: İyi, Yazma: İyi, Konuşma: İyi)

TÜRKÇE (Okuma: İyi, Yazma: İyi, Konuşma: İyi)