

T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI



SMN2 GENİ PROMOTORUNUN
KLONLANMASI ve KARAKTERİZASYONU

MERVE DEMİR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Jüri Üyeleri : Doç. Dr. Esra TOKAY (Tez Danışmanı)
Prof. Dr. Feray KÖÇKAR (Eş Danışman)
Prof. Dr. Nilüfer ÇİNKILIÇ
Dr. Öğr. Üyesi Nelin HACIOĞLU

BALIKESİR, HAZİRAN - 2023

ETİK BEYAN

Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak tarafımda hazırlanan “**SMN2 GENİ PROMOTORUNUN KLONLANMASI VE KARAKTERİZASYONU**” başlıklı tezde;

- Tüm bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Kullanılan veriler ve sonuçlarda herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Tüm bilgi ve sonuçları bilimsel araştırma ve etik ilkelere uygun şekilde sunduğumu,
- Yararlandığım eserlere atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,

beyan eder, aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Merve DEMİR

ÖZET

SMN2 GENİ PROMOTORUNUN KLONLANMASI VE KARAKTERİZASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MERVE DEMİR

BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

(TEZ DANIŞMANI:DOÇ.DR. ESRA TOKAY)

(EŞ DANIŞMAN:PROF.DR. FERAY KÖÇKAR)

BALIKESİR, HAZİRAN - 2023

Spinal Müsküler Atrofi (SMA) omurilikte bulunan alfa motor nöronların dejenerasyonu ile meydana gelen ve beraberinde simetrik kas zayıflıklarına yol açan otozomal resesif kalıtsal bir hastalıktır. SMN geni 20 kb uzunluğunda 8 ekzondan oluşmakta ve 294 aminoasitlik SMN proteini kodlamaktadır. Bu genin telomerik (SMN1) ve sentromerik (SMN2) olmak üzere iki kopyası bulunmakta, kopyalar birbirinin homoloğu olup aralarında ekzon 7 de yer alan 5 nükleotitlik bir fark bulunmaktadır. SMA hastalarının %95'inden fazlasında SMN1 geninin 7. ekzonunun homozigot delesyonu söz konusudur. SMN2 geni tam uzunlukta ancak işlevsel olmayan SMN protein sentezi yapabilmektedir. Literatürde, mutant SMN1 geni taşıyan SMA hastalığının tedavisi için, SMN2 ekspresyon seviyelerini arttırarak hastalık şiddetini azaltmak ya da seyri yavaşlatmak gibi çözümler ortaya sunulmuştur. Bu tez çalışması, SMN2 geninin ifadesinin arttırılmasını sağlamak amacıyla SMN2 geninin promotor bölgesi tespit edilerek detaylı biyoinformatik analizi gerçekleştirildi. Promotor bölgesinde spesifik primerler belirlendi. 4 adet GC adası belirlendi. Sekonder yapının $\Delta G = -375.95$ kcal/mol olarak belirlendi. Muhtemel transkripsiyon bağlanma bölgeleri SP1, AP2, CEBP ve E2F belirlendi. Tezin ikinci aşamasında, SMN2 geninin promotor bölgesi 5 adet 5' delesyonlu parçaları oluşturmak üzere (888 bp, 618 bp, 457 bp, 223 bp ve 116 bp'lik) promotor parçası pGEM-T Easy vektörüne ve akabinde pMetLuc vektörüne alt klonlandı ve dizi analizi ile doğruluğu teyit edildi. Midi prep izolasyonları yapılarak promotor parçaları tezin ikinci aşamasında hücre kültürüne taşınmış olup Hep3B hücrelerine transfekte edildi. Lusiferaz ve SEAP aktivite yöntemleri kullanılarak promotorların bazal aktivitesine bakıldı. SMN2 promotor bölgesine ait 5 konstraktan en yüksek olarak 223 bp'lik konstrakt belirlendi.

ANAHTAR KELİMELER: SMN2, SMN1, promotor, SMA

Bilim Kodları: 20316, 20326

Sayfa Sayısı:76

ABSTRACT

CLONING AND CHARACTERIZATION OF THE SMN2 GENE PROMOTER

MSC THESIS

MERVE DEMİR

BALIKESİR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

(SUPERVISOR:ASSOC. PROF. DR. ESRA TOKAY)

(CO-SUPERVISOR:PROF.DR. FERAY KÖÇKAR)

BALIKESİR, JUNE - 2023

Spinal Muscular Atrophy (SMA) is an autosomal recessive inherited disease that occurs with the degeneration of alpha motor neurons in the spinal cord and causes symmetrical muscle weakness. It is known that there are 5 types of SMA disease. Type 0 is the type where patients are most severely affected. They die before birth or within the first 6 months of their life. The SMN gene consists of 8 exons with a length of 20 kb and encodes the SMN protein of 294 amino acids. There are two copies of this gene, telomeric (SMN1) and centromeric (SMN2), the copies are homologous to each other, with a difference of 5 nucleotides located in exon 7. More than 95% of SMA patients have homozygous deletion of exon 7 of the SMN1 gene. The SMN2 gene can synthesize full-length but non-functional SMN protein. In the literature, solutions have been presented for the treatment of SMA, such as reducing the severity of the disease or slowing its course by increasing the SMN2 expression levels. In this thesis, in order to increase the expression of the SMN2 gene, the promoter region of the SMN2 gene was determined and detailed bioinformatics analysis was performed. Specific primers were identified in the promoter region. 4 GC islands were determined. The secondary structure was determined as $\Delta G = -375.95$ kcal/mol. Possible transcription binding sites SP1, AP2, CEBP and E2F were identified. In the second step of the thesis, the promoter region of the SMN2 gene was cloned into the pGEM-T Easy vector and then subcloned into the pMetLuc vector to form 5' deletion fragments (888 bp, 618 bp, 457 bp, 223 bp and 116 bp) and verified using sequence analysis with accuracy. Midi prep isolations were made and the promoter parts were transferred to cell culture in the second stage of the thesis, transfected to Hep3B cell line and basal activity of the promoters was examined by using Luciferase and SEAP activity methods. It was determined that 223 bp construct of SMN2 promoter region was the highest basal activity.

KEYWORDS: SMN2, SMN1, promotor, SMA

ScienceCodes: 20316, 20326

Page Number : 76

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİL LİSTESİ	v
TABLO LİSTESİ	vii
SEMBOL LİSTESİ	viii
ÖNSÖZ	ix
1. GİRİŞ	1
1.1 SMA Hastalığı ile İlişkili Genler	2
1.2 SMN Geni	3
1.3 NAIP Geni	5
1.4 P44 Geni.....	5
1.5 H4F5	6
1.6 SMA Hastalığı ve Mekanizması	6
1.7 SMN Proteininin Üretildiği ve Ekspre olduğu Yerler	7
1.8 SMA Hastalığı Tedavisinde Kullanılan Yöntem ve İlaçlar	8
1.8.1 Spinraza.....	9
1.8.2 Zolgensma	10
1.8.3 Risdiplam	10
1.8.4 SMN2 Geni Promotoru Üzerinde Yapılan Ekspresyon Çalışmaları.....	11
1.9 Karaciğer Kanseri ve SMN2 Geni Arasındaki İlişki	13
1.10 Çalışmanın Amacı	13
2. MATERYAL VE METOT	17
2.1 Kullanılan Makine ve Teçhizat	17
2.2 Materyal	18
2.3 Klonlama ile İlgili Teknikler	22
2.3.1 Biyoinformatik Analizler	22
2.3.2 Hücreden Genomik DNA izolasyonu	22
2.3.3 DNA Miktarının Spektrofotometrik Olarak Belirlenmesi	23
2.3.4 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	24
2.3.5 Agaroz Jel Elektroforezi Üzerinde DNA'nın Görüntülenmesi	24
2.3.6 Jelden DNA'yı Geri Saflaştırma	25
2.3.7 Ligasyon.....	26
2.3.8 Kanamisinli ve Amfisilinli Nutrient Broth ve Agar Petrilerinin Hazırlanması	26
2.3.9 XL-1 Blue Hücrelerinin Kompetant Hücre Haline Getirilmesi	27
2.3.10 Transformasyon	27
2.3.11 Gliserol Stok Hazırlama	28
2.3.12 Restriksiyon Endonükleaz Kesimi	28
2.3.13 Küçük Ölçekli Plazmit İzolasyonu	28
2.3.14 Orta Ölçekli Plazmit İzolasyonu.....	29
2.4 Hücre Kültürü ile İlişkili Teknikler	30
2.4.1 Hücre Kültürü Besiyerinin Hazırlanması	30

2.4.2 FCS veya FBS (Fetal Sığır Serum)'nin Hazırlanması	30
2.4.3 -80°C Derin Dondurucuda Saklanan Hücrelerin Açılması	30
2.4.4 Hücrelerin Pasajlanması.....	31
2.4.5 Hücre Sayımı yapılması	31
2.4.6 Transfeksiyon Çalışmalar.....	32
2.4.7 Lusiferaz Aktivitesi.....	33
2.4.8 SEAP Aktivitesi	33
3. BULGULAR.....	34
3.1 SMN2 Geni Promotorunun Biyoinformatik Analizi.....	34
3.2 SMN2 Gen Promotorunun Klonlanması.....	37
3.2.1 Genomik DNA İzolasyonu.....	37
3.2.2 116 bp'lik Promotor Bölgesinin Klonlanması	38
3.2.2.1 116 bp'lik Promotor Parçasının PCR Reaksiyonu ile Çoğaltılması	38
3.2.2.2 116 bp'lik Promotör Bölgesi PCR Ürünlerinin pGEM-T Easy Vektörüne Klonlanması	39
3.2.2.3 116 bp'lik Promotör Bölgesinin pMetLuc Vektörüne Alt Klonlanması	40
3.2.3 223 bp'lik Promotor Bölgesinin Klonlanması	42
3.2.3.1 223 bp'lik Promotor Parçasının PCR Reaksiyonu ile Çoğaltılması	42
3.2.3.2 223 bp'lik Promotor Bölgesi PCR Ürünlerinin pGEM-T Easy Vektörüne Klonlanması	43
3.2.3.3 223 bp'lik Promotör Bölgesinin pMetLuc Vektörüne Alt Klonlanması	44
3.2.4 457 bp'lik Promotor Parçasının Klonlanması	45
3.2.4.1 457 bp'lik Promotör Parçasının PCR Reaksiyonu ile Çoğaltılması	45
3.2.4.2 457 bp'lik Promotör Bölgesi PCR Ürünlerinin pGEM-T Easy Vektörüne Klonlanması	46
3.2.4.3 457bp'lik Promotör Bölgesinin pMetLuc Vektörüne Alt Klonlanması	47
3.2.5 618 bp'lik Promotor parçasının klonlanması	48
3.2.5.1 618 bp'lik Promotör Parçasının PCR Reaksiyonu ile Çoğaltılması	48
3.2.5.2 618 bp'lik Promotör Bölgesi PCR Ürünlerinin pGEM-T Easy Vektörüne Klonlanması	49
3.2.5.3 618 bp'lik Promotör Bölgesinin pMetLuc Vektörüne Alt Klonlanması	50
3.2.6 888 bp'lik Promotor Bölgesinin Klonlanması	51
3.2.6.1 888 bp'lik Promotör Parçasının PCR Reaksiyonu ile Çoğaltılması	51
3.2.6.2 888 bp'lik Promotor Bölgesi PCR Ürünlerinin pGEM-T Easy Vektörüne Klonlanması	52
3.2.6.3 888 bp'lik Promotor Bölgesinin pMetLuc Vektörüne Alt Klonlanması	53
3.2.6.4 SMN2 Geni Promotor Parçalarının Orta Ölçekli İzolasyonu	54
3.3 Hücre Kültürü ile İlgili Teknikler	55
3.3.1 Hep3B Hücrelerinin Büyütülmesi.....	55
3.3.2 Kalsiyum-Fosfat Yöntemi ile Geçici Transfeksiyon Yapılması	55
3.3.3 Lusiferaz Aktivitesinin Belirlenmesi	56
3.3.4 SEAP Aktivitesinin Belirlenmesi.....	56
4. TARTIŞMA ve SONUÇ	58
3. KAYNAKLAR (IEEE)	61
EKLER	71
EK A: SMN2 promotor bölgesinin restriksiyon kesim haritası	71
EK B: Promotor Parçalarının Dizi Analizi	75
ÖZGEÇMİŞ	76

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1:Kromozomun 5q lokusundaki SMA ilişkili genlerin yerleşimi [16].	3
Şekil 1.2:Kromozomun 5q kolunda SMA hastalığına neden olan 35 cm'lik gen bölgesi [22]......	4
Şekil 1.3: SMN1 ve SMN2 mRNA'ları arasındaki farklar [29].	4
Şekil 1.4: SMN1 ve SMN2 genleri tarafından üretilen proteinler arasındaki farklar [30]. ..	5
Şekil 1.5: Tez kapsamında yapılan çalışma basamaklarını özetleyen iş diyagramı.....	16
Şekil 2.1: pGEM-T Easy vektörünün şematik gösterimi.	19
Şekil 2.2: SEAP2 vektörünün şematik gösterimi.	20
Şekil 2.3: pMetLuc Kontrol vektörünün şematik gösterimi.	20
Şekil 2.4: pMetLuc Reporter Gösterimi.	21
Şekil 2.5: Toma Lamı görüntüsü.....	32
Şekil 3.1: SMN2 geni promotor bölgesine ait 116 bç, 223 bç, 457bç, 618 bç ve 888bç'lik promotor primerlerinin SMN2 promotörü üzerinde gösterimi.	34
Şekil 3.2: SMN2 geni promotor bölgesine ait guanin sitozin oranının, gözlenen oranı ile beklenen oranının karşılaştırılması ve guanin sitozin oranının bazlara yüzdelik değişiminin gösterimi.	36
Şekil 3.3: SMN2 geninin promotor bölgesini ait saç tokası yapısının gösterimi.....	36
Şekil 3.4: Muhtemel transkripsiyon bağlanma bölgeleri; CEBP α , AP2, E2P ve SP1.	37
Şekil 3.5: %1'lik Agoroz Jel Elektrofrez görüntüsü.	38
Şekil 3.6:116 bç promotor gen bölgesi polimeraz zincir reaksiyonu jel elektrofrez görüntüsü.	39
Şekil 3.7: SMN2 116 bç promotör gen bölgesi içeren 3 adet kolonin pGEM-T Easy Vektörü Restriksiyon Enzimleri ile Kesim sonucu.	40
Şekil 3.8: pMetLuc vektörü vektörüne ait mini prep izolasyonunun XhoI ve HindIII kesim sonucu jel elektrofrez görüntüsü.	41
Şekil 3.9: M: SM0311; 1-2: 116bç'lik promotor bölgesine ait pMetLuc vektörü XhoI ve HindIII kesim sonucu jel elektrofrez görüntüsü.	42
Şekil 3.10: SMN2 223 bç promotor bölgesinin PCR reaksiyonuna ait jel elektrofrez görüntüsü.	42
Şekil 3.11: SMN2 223 bç promotor gen bölgeleri içeren 1 adet kolonin pGEM-T Easy Vektörü Restriksiyon Enzimleri ile Kesim sonucu.	44
Şekil 3.12: SMN2 223bç, kolonin pMetLuc alt vektörü Restriksiyon Enzimleri ile Kesim sonucu.	45
Şekil 3.13: 223 bç promotor gen bölgesi polimeraz zincir reaksiyonu jel elektrofrez görüntüsü.	46
Şekil 3.14: SMN2 geni 457 bç promotör gen bölgesine ait pGEM-T Easy Vektörü klonlama yapılan kolonin restriksiyon enzimleri XhoI ve HinIII ile kesim sonucu jel elektrofrez görüntüsü.....	47
Şekil 3.15: SMN2 457 bç, promotor gen bölgeleri içeren 4 adet kolonin pMetLuc alt vektörü restriksiyon enzimleri XhoI ve HindIII ile kesim sonucunun jel elektrofrez görüntüsü.	48
Şekil 3.16: 618 bç promotör gen bölgesi polimeraz zincir reaksiyonu jel elektrofrez görüntüsü.	49

Şekil 3.17: SMN2 geni 618 bç promotor gen bölgei içeren kolonin pGEM-T Easy vektörü restriksiyon enzimleri XhoI ve HindIII ile kesim sonucunun jel elektroforez görüntüsü.	50
Şekil 3.18: SMN2 geni 618 bç promotor gen bölgesi içeren 5 adet kolonin pMetLuc alt vektörü klonlanması restriksiyon enzimleri XhoI ve HindIII ile kesim sonucunun jel elektroforezi görüntüsü.....	51
Şekil 3.19: SMN2 geni 888 bç promotor gen bölgesi polimeraz zincir reaksiyonu jel elektroforezi görüntüsü.	52
Şekil 3.20: SMN2 geni 888 bç promotor gen bölgeleri içeren kolonilerin pGEM-T Easy Vektörü Restriksiyon Enzimleri ile Kesim sonucu.	53
Şekil 3.21: SMN2 geni 888 bç promotor gen bölgeleri içeren 2 adet kolonin pMetLuc alt vektörüne klonlanamsı restriksiyon enzimleri XhoI ve HindIII ile kesim sonucunun jel elektroforez görüntüsü.....	54
Şekil 3.22: SMN2 geni 116 bç, 223 bç, 457 bç 618 bç ve 888 bç'ye ait promotor gen bölgelerinin orta ölçekli izolasyonunun restriksiyon enzimleri XhoI ve HindIII kesim sonucunun jel elektroforezi görüntüsü.	55
Şekil 3.23: pMetLuc vektörü içerisine klonlanan 116 bç, 223 bç, 457 bç, 618 bç ve 888 bç SMN promotor bölgelerine ait şema.....	56
Şekil 3.24: pMetLuc kontrol ve pMetLuc Reporter vektöre ait luminometrede alınan lusiferaz aktivite sonuçları.	57
Şekil 3.25: SMN2 promotor parçalarına ait Luc/SEAP sonuçları	57

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1: Kullanılan araç-gereçler ve markaları.	17
Tablo 2.2: Klonlama teknikleri aşamasında kullanılan kimyasallar ve kitler	18
Tablo 2.3: Klonlama teknikleri aşamasında kullanılan vektörler ve temin edikleri.....	19
Tablo 2.4: Transformasyon basamağında kullanılan bakteri soyları.....	21
Tablo 2.5: Hücre Kültür basamağında kullanılan kimyasallar ve kitler.	21
Tablo 2.6: Kullanılan hücre hattı ve elde edilmiş olduğu kaynak.	22
Tablo 2.7: Hücreden genomik DNA izolasyonu için kullanılan çözeltiler	22
Tablo 2.8: Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)'da kullanılan dNTP karışımının hazırlanışı.....	24
Tablo 2.9: SMN2 Promotoru PCR döngü koşulları	24
Tablo 2.10: Agaroz jel elektroforezi sırasında kullanılan çözeltiler ve kimyasallar.	24
Tablo 2.11: Hücre Kültürü çalışmalarında kullanılan çözeltiler.	30
Tablo 2.12: Transfeksiyon basamağında kullanılan çözeltiler ve kimyasallar.....	32
Tablo 3.1: SMN2 gen promotoru için oluşturulan Primer adı ve dizileri.....	35

SEMBOL LİSTESİ

ASO	: Antisens Olügonükleotit
AVV	: Adeno Viral Vektör
dNTP	: Deoksiribo nükleozit tri fosfat
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
mRNA	: Mesajcı Ribonükleik Asit
ng	: Nanogram
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Rpm	: Rotary Per Minute
SMA	: Spinal Müsküler Atrofi
SMN	: Survival Motor Neuron
SMN1	: Survival Motor Neuron 1
SMN2	: Survival Motor Neuron 2
UV	: Ultraviyole Işık
µL	: Mikrolitre
µg	: Nanogram
dk	: Dakika
cm	: Santimetre
NAIP	: Nöral Apoptazis İnhibitör Protein
V	: Volt
ESE	: Exonic Splicing Enhancer
HDAC	: Histon

ÖNSÖZ

Hayat denilen bu uzun yol da her zaman hayallerimin peşinden gittim. Ve beni hayallerimin getirdiği bir durak olan FK LAB’da tez çalışması sürecim boyunca bana gerek bilgi ve yol göstericiliği ile yoluma ışık olan, gerek ise şevkat ve özverisi ile her zaman yanımda desteğini hissettiğim eş danışmanım Sevgili Hocam, Prof. Dr. Feray KÖÇKAR’a yürekten teşekkür ediyorum. Gecesini gündüzüne katarak desteğini ve emeğini benden eksik etmeyen Sevgili Danışmanım Doç. Dr. Esra TOKAY’a canı gönülden bir teşekkürü borç bilirim. Her zaman hayattaki en büyük şansımın ailem olduğunu söylemişimdir. Bu zorlu süreç de maddi ve manevi desteğini her zaman yanımda hissettiğim canım aileme teşekkür ediyorum. Özellikle ben bana inanmadığım zamanlar da bile bana inanmaktan ve güvenmekten hiçbir zaman vazgeçmeyen, hatırası ve sevgisi kalbimde sonsuza dek yaşayacak olan Canım Babam, Muammer DEMİR’e teşekkür ediyorum. Bana desteği ve emeği büyük olan kıymetli anneciğim, Sultan DEMİR’e teşekkür ediyorum. Ayrıca maddi ve manevi desteklerini asla eksik etmeyen bir abladan çok bana can dost olan canım ablalarım Emine DEMİR, Dilek DEMİR ve Suzan DEMİR’e sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum. Bu süreç de gerek manevi gerek ise bilgi açısından destek olan, yardımlarını esirgemeyen saygıdeğer hocam, Ehed AYMAZ’a teşekkür ediyorum. Üzüntülerimi ve sevinçlerimi benim ile paylaşan, varlığını yanımdan asla eksik etmeyen sevgili Dr. Öymen Kutbay YAŞAR’a teşekkür ediyorum.

Bu tez çalışmasını CANIM ANNEME ithaf ediyorum.

Balıkesir, 2023

Merve DEMİR

1. GİRİŞ

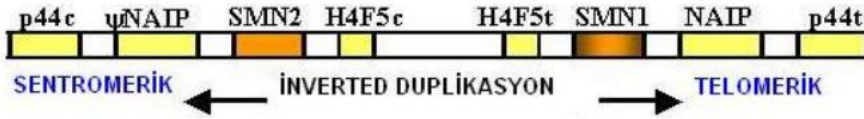
Spinal Müsküler Atrofi (SMA) omurilikte yer alan alfa motor nöronların dejenerasyonu sonucu meydana gelen ve beraberinde simetrik kas zayıflıklarına yol açan otozomal resesif kalıtsal bir hastalıktır. Dünya da Kistik Fibrozisten sonra çocukluk çağında en ikinci olarak en sık görülen otozomal resesif kalıtsal hastalıktır [1,2]. İlk olarak Avusturyalı nörolog Guido Werdnig tarafından SMA 'dan etkilenen iki kardeşin otopsi sonuçlarından yararlanılarak tanımlanmıştır. 1893'den 1900 yılına kadar ki geçen 7 yıllık süreç içerisinde Johan Hoffman tarafından yeni veriler elde edilmiş bu yeni veriler ışığında da Werdnig-Hoffman hastalığı adı verilmiştir [3,4]. Bu nöromüsküler hastalığa SMN1 geninde meydana gelen çeşitli mutasyonların sebep olduğu bilinmektedir. Bu mutasyonların neden olduğu genetik kusur, SMN protein seviyelerinde azalmaya neden olmaktadır ve bu azalma motor nöronların dejenerasyonuna, kas zayıflığına ve atrofiye neden olmaktadır [5]. SMA hastalarında omurilik ve beyin sapındaki ikincil motor nöronlar dejenere olmakta ve bu durum proksimal kaslarda yorgunluk, felç ve atropi ile sonuçlanmaktadır [6]. SMA hastalığı üzerinde yapılan klinik çalışmalar da SMA hastalığının 5 tipi olduğu aydınlatılmıştır. Hastalığın başlangıç yaşı, ortalama yaşam süresi, hastalığın şiddeti ve hastanın kazanabileceği motor beceriler her tip için farklı bir seyir izlemektedir [7].

SMA hastalığının 5 tipi içerisinde hastaların en şiddetli olarak etkilendiği tip 0'dır. SMA hastalık tipi olan tip 0'da doğum öncesinde veya yaşamlarının ilk 6 ayı içerisinde ölmektedirler [8]. SMA hastalık tipleri içerisinde ise en ağır seyreden Tip I olarak bilinmektedir. Hastalık 6 aydan önceki dönemde belirti göstermeye başlamaktadır ve bu belirtiler bazı hastalarda ise doğum öncesi dönemde de başlayabilmektedir. Tip I SMA hastası bebeklerinin büyük bir çoğunluğunu oluşturan kısmında baş kontrolü olmamakla birlikte bacak ve kol hareketi de bulunmamaktadır. Motor becerileri zayıftır ve desteksiz oturamamaktadırlar. Bu bebekler yutma ve emme gibi temel gereksinimli becerilere sahip değildir ve refleksler gelişmemiştir. Solunum kaslarının etkilenmesi, öksürmede güçlük oluşturmakta ve solunum yolları enfeksiyonlarından dolayı solunum desteğine ihtiyaç duymaktadırlar. Hastaların büyük bir kısmı 2 yaşından önce ölmektedir. Hastalığın bu tipine sahip bebeklerin yüz hareketleri normal, mimikleri anlamlı olmakla birlikte bakışları canlıdır. İletişim becerileri güçlüdür, göz teması kurabilmektedirler, çevreye karşı duyarlı olmakla beraber tepki de vererek geri dönüt oluşturabilmektedirler [9]. Tip II SMA hastalarında ise belirtiler 6. ayın bitimindeki dönemden sonra görülmeye başlamaktadır.

Daha öncesindeki dönemde bebeğin gelişimin normal seyrinde devam ettiği görülmüştür. Bu dönemde omurga eğrilikleri, zayıf kemik gelişimi gibi iskelet yapısı bozuklukları görülmektedir. Yutma ve çiğnemenen sorumlu kasların zayıflığı az da olsa görülmekle birlikte solunum etkilenmesi Tip 0 ve Tip I'e nazaran şiddetli seyretmemektedir [10]. SMA Tip III hastalarında ise belirtiler daha geç bir süreçte 18. aydan sonra kendini göstermektedir. Bebekler doğum esnasında normal olsalar bile hafif de olsa ilk belirtiler görülebilmektedir. Hastalığın tanısının koyulması gençlik yıllarını bulabilmektedir. Hasta bireyler yaşlılarıyla benzer fiziksel aktiviteler göstermekte güçlük çekmekle beraber ilerleyen süreçte benzer aktiviteler gösterememektedirler. Hasta bireyler yürüyebilmelerine rağmen kas güçsüzlükleri mevcuttur. Hastalık arttıkça kalça ve bacak kaslarındaki güçsüzlük koşmayı engellemekte, düşmeler sık yaşanmaya başlanıp yürüme güçleşmektedir [11]. Tip IV SMA hastalığı yetişkinlik döneminde ortaya çıkmaktadır. Hastalığın başlangıcı ve ilerlemesi yavaştır. Tip IV SMA 'ya sahip hastalar genellikle yürüyebilmektedirler ancak çok az bir kısmı tekerlekli sandalyeye ihtiyaç duyabilmektedir. Tip IV SMA hastalarında yutkunma ve solunum fonksiyonlarına sahip kaslar nadir olarak etkilenmektedirler. Kas güçsüzlüğü, kas erimesi ve kasları kontrol edememe gibi durumlar, kollar ve bacakların gövdeye yakın kısımlarında daha fazla görülmektedirler [9,10].

1.1 SMA Hastalığı ile İlişkili Genler

Genel olarak SMA hastalığının oluşmasında 4 adet genin etken rol aldığı düşünülmektedir. Bu 5 adet gen kromozomun 5q lokusunda lokalize konumda bulunmaktadır [12]. 1995 yılında yapılan çalışmalarda SMA hastalığına neden olan en önemli etkenin SMN1 geninin delesyonu olduğu tespit edilmiştir [13]. Bunun yanı sıra Nöral Apoptazisin İnhibitör Protein (NAIP) geninin de hastalarda delesyona uğradığı saptanmıştır [14]. 1997 yılında yapılan bir diğer çalışmada ise p44 geninin de SMA hastalarında mutasyona uğradığı saptanmıştır. Henüz tam olarak fonksiyonu bilinmemekle birlikte SMA hastalığı ile ilişkisi olduğu düşünülen H4F5 adı verilen bir gen daha tespit edilmiştir [15]. SMA hastalığı ile ilişkilendiren bu 4 genden her biri duplikasyon ve inversiyona uğrayarak 500 kb'lık bir alanda birbirine ters yönde uzanan telomerik ve sentromerik kopyaları bulunmaktadır [12,15]. Kromozomun lokusundaki SMA ilişkili genlerin yerleşimi aşağıdaki şekilde özetlenmiştir.

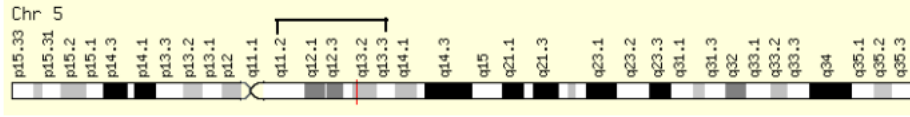


Şekil 1.1:Kromozomun 5q lokusundaki SMA ilişkili genlerin yerleşimi [16].

1.2 SMN Geni

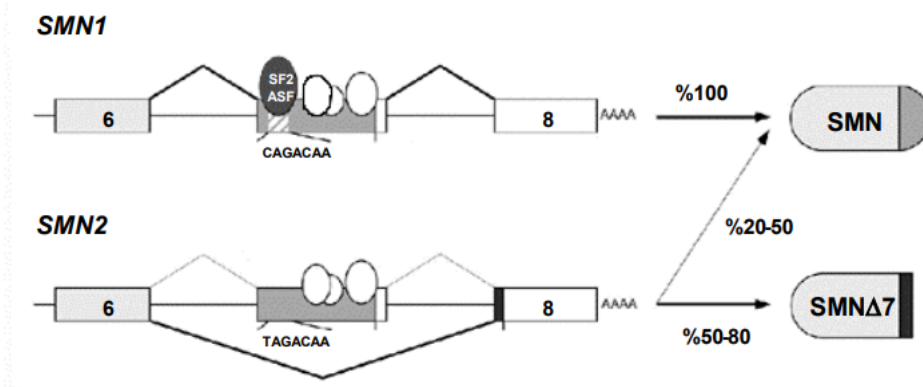
Survival Motor Nöron (SMN) geni SMN proteininin sentezinden sorumludur. Genomik uzunluğu 20 kb uzunluğunda olmakla birlikte 9 ekzondan oluşmaktadır. Bununla birlikte SMN geninin ilk olarak 8 ekzona sahip olduğu tespit edilmiştir. Ancak daha sonraki süreçte yapılan çalışmalar ekzon 2'nin sanılan aksine tek değil iki ekzondan oluştuğu gözlenmiştir. Bu ekzonlar 2a, 2b olmak üzere adlandırılmıştır [17]. Bununla birlikte SMN geni 294 aminoasitten meydana gelen 32 kDa'luk SMN proteini kodlamaktadır. SMN proteini, sitoplazma ve çekirdekte lokalize olmuş bir proteindir [18]. SMA hastalığından sorumlu olan etken SMN1 geninin homozigot yokluğudur. Buna karşın yapılan diğer çalışmalarda görülmektedir ki SMN2 geninin homozigot yokluğu fenotipte herhangi bir etkiye sebep olmamakla beraber SMA hastalığına da yol açmamaktadır [19]. SMA hastalarının %96'sı kromozomun 5q13 kolunda meydana gelen mutasyondan kaynaklı iken, %4'ünün bu kromozom bölgesindeki mutasyonla alakası yoktur [20]. Bu %4'lük kesimdeki mutasyonun sebebinin ise gen dönüşümü, duplikasyon, delesyon gibi birçok mutasyondan kaynaklandığı düşünülmektedir. Yaklaşık olarak 23 farklı yanlış anlamalı mutasyon tespit edilmiştir [19].

SMN1 geni 5. Kromozomun q13 kolunda lokalize olarak bulunmaktadır. SMA hastalarının %95'inden fazlasında SMN1 geninin 7. Ekzonunun homozigot delesyonu söz konusudur. Bu delesyonun neden olduğu bu mutasyon SMA hastalığına neden olmaktadır [21]. 1990 yılında yapılan bir çalışmaya göre ise SMA hastalığına neden olan gen bölgesinin 5q11-13.3 lokasyonunda ve 35 cm uzunluğundaki bir bölge aralığında bulunduğu tespit edilmiştir [22]. Şekil 1.2 'de 5q kolunda SMA hastalığına neden olan gen bölgesi aralığı özetlenmiştir.



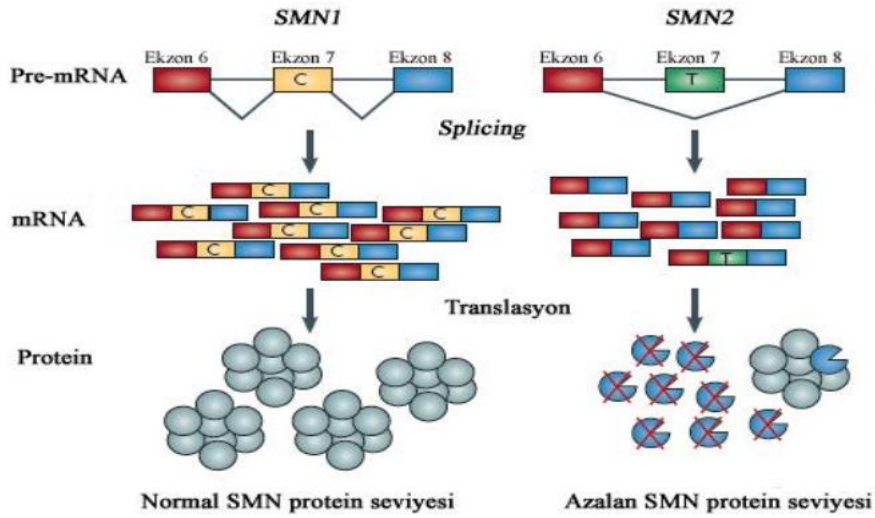
Şekil 1.2:Kromozomun 5q kolunda SMA hastalığına neden olan 35 cm'lik gen bölgesi [22].

SMN geninin, telomerik (SMN1) ve sentromerik (SMN2) olmak üzere birbirinin homoloğu olan iki adet kopyası bulunmaktadır [23]. Bu genin telomerik (SMN1; SMNt) ve sentromerik (SMN2; SMNc) olmak üzere iki farklı formu bulunmaktadır [24]. SMN geninin telomerik ve sentromerik dizileri benzer olmakla beraber sadece ekzon 7 ve 8 de yer alan 5 nükleotitlik bir bölgede farklılık bulunmaktadır [25]. Bu 5 nükleotitin oluşturduğu farklılık yakından ele alınacak olursa intronlar arasında 3 nükleotitlik ekzonlar arasında ise 2 nükleotitlik bir fark söz konusudur [26]. SMN2 geninde SMN1 geninden farklı olarak 7. ekzonda sitozin yerine timin bazı bulunurken buna ek olarak 8. Ekzonda ise guanin yerine adenin bulunmaktadır. Bu farklılık SMN1 geni transkripsiyonu sonucunda 9 ekzonlu mRNA'lar oluşturmasını sağlarken, SMN2'deki nükleotitsel farklılıklar sonucu transkripsiyon sırasında ekzon 7'nin atlanmasına neden olmaktadır. Bunun sonucunda ise olgun mRNA üretimi sağlanamamaktadır [27]. Bu durum ise SMN1 geninden tam ve fonksiyonel bir SMN proteini üretilmesini sağlarken, SMN2 geninden %85-90 oranında fonksiyonel olarak işlevsiz ve kısa ömürlü olan SMNDELTA7 proteini sentezlenmesine neden olmaktadır [28]. SMN1 ve SMN2 mRNA'ları arasındaki farklar şekil 1.3 de özetlenmiştir.



Şekil 1.3: SMN1 ve SMN2 mRNA'ları arasındaki farklar [29].

Sonuç olarak SMN2 geni tarafından kodlanan mRNA'nın transkripsiyonu sonucunda elde edilen ürünlerin %60'ında ekzon 7 atlaması söz konusu olup işlevsel olmayan ve hızla bozulan bir proteine çevrilmektedir. Diğer %40 gibi bir kısmında ise nispeten işlevsel olan SMN proteini sentezlenebilmektedir [30]. Ancak bu durum SMA hastalığını önlemeye yetkin olmamakla beraber hastalık şiddetini azalttığı gözlenmektedir [31]. SMN2 kopyası sayısı hastalarda çeşitlilik gösterebilmektedir. Kopya sayısı 1 ila 4 arasında değişebilmekte ve bu değişkenlikle hastalığın şiddetinin azalması arasında doğru orantılı bir korelasyon söz konusudur [32]. SMN1 geni ve SMN2 geninin ürettiği proteinler arasındaki farklar Şekil 1.4' de özetlenmiştir.



Şekil 1.4: SMN1 ve SMN2 genleri tarafından üretilen proteinler arasındaki farklar [30].

1.3 NAIP Geni

Nöronal Apoptozis İnhibitör Protein (NAIP), 60 kb uzunluğunda 16 ekzona sahiptir [33]. 1232 aminoasit uzunluğunda 140 kDa büyüklüğünde bir proteini kodlamaktadır [34]. 1995 yapılan bir çalışma sonucunda SMA hastalarında delesyona uğradıkları tespit edilmiştir. NAIP geninin bir tam ve birden fazla sayı da kesikli kopyası bulunmaktadır [35].

1.4 P44 Geni

1997 yılında Melki ve grubu tarafından keşfedilmiştir [24]. Transkripsiyon Faktör 2 H'nin (TF2H) alt birimlerinden biri olduğu bilinmektedir [36]. Bu gen 44 kDa'luk bir proteini

kodlamaktadır. TF2H'nin DNA tamiri, hücre döngüsünün düzenlenmesi ve RNA polimeraz 2 transkripsiyonu gibi görevleri bulunmaktadır [37]. P44 geninin de telomerik ve sentromerik olmak üzere iki kopyası bulunmaktadır. Bu iki kopya arasında 3 kodonluk bir farklılık bulunmaktadır. P44 genindeki mutasyonların hastalığın esas nedeni olmadığı düşünülmektedir [38]. P44 geninde delesyon bulunduran bütün hastalarda SMN geninde delesyon, bir kısmında da hem SMN genin de hem de NAIP geninde delesyon bulunması fakat sırf p44 delesyonu bulunduran hiçbir SMA hastasının bulunmaması bunu kanıtlar niteliktedir [39].

1.5 H4F5

1998 de Scharf ve arkadaşları tarafından yürütülen bir çalışma da çok kopyalı mikrosatellit marker'dan (C212) yararlanarak TipI SMA hastalarında H4F5 gen bölgesinin delesyona uğradığı belirlenmiştir [40]. SMA hastalığı yol açmamakta fakat SMA hastalığının şiddetini arttırdığı bilinmektedir [41].

1.6 SMA Hastalığı ve Mekanizması

SMN1 geninin homozigot delesyonundan birden fazla mekanizmanın neden olduğu bilinmektedir. Bunların bir örneği olarak de novo mutasyonları örnek verilebilir [24]. De novo mutasyonları inversiyon ve duplikasyonla oluşmuş tekrarlayan dizilerin arasında meydana gelen hatalı krosingoverdan kaynaklanan paternal mayoz bölünmeler sonucunda ortaya çıktıkları bilinmektedir [42].

SMN1 ve SMN2 genleri arasındaki en önemli yapısal fark ise 7. ekzonda 840. pozisyonda SMN1 geninde sitozin bulunurken, SMN2 geninde aynı ekzonda aynı pozisyona karşılık gelen bölgede timin bazı bulunmaktadır [43]. Bu durum 7. ekzonun 6. pozisyonunda meydana gelen sitozin timin transisyonundan kaynaklanmaktadır [44]. Ekzonun 7'nin atlanması sonucu premRNA 7. ekzondan yoksun olduğu olgun mRNA üretimi gerçekleşmemektedir [45]. Normal şartlar altında RNA üzerinde bulunan ve splicing doğruluğunu kontrol eden ve var olduğu ekzonun olgun mRNA içinde bulunmasına olanak sağlayan Exonic Splicing Enhancer (ESE) diziler bulunmaktadır [46]. Sonuç olarak bu

farklılık ESE dizisinin işleyişini bozarak etkisini göstermektedir. Bundan dolayı ise tam uzunlukta ve işlevsel SMN proteini üretimi gerçekleştirilememektedir [47].

Exonik Splicing Enhancer (ESE) dizileri genel olarak adenin guanin (AG) tekrarlarından oluşan pürin miktarı bakımından yoğun motiflerden ya da sitozin adenin (CA) tekrarlarından oluşan motiflerden meydana gelmektedirler [12]. Bu diziler arjinin ve serin aminoasitlerini içlerinde bol miktarda bulundukları için ASF/SF2, SC35, 9G8, SRP20, Htra2- β gibi üyeleri içeren SR adı verilen bir protein ailesine bağlanmaktadır. SR protein ailesi splicing şeklini değiştirebilmekte ve böylelikle alternatif splicing aracılığı ile farklı ekzonları içeren mRNA'ların sentezi ve bu sentezin regülasyonu gerçekleştirilmektedir [12, 26].

SMA hastalığındaki asıl mekanizmaya gelecek olursak eğer delesyona uğramamış bir SMN1 geninin 7. ekzonunda Exonik Splicing Enhancer (ESE) dizisi olan CAGACAA bölge korunmuş olarak bulunmaktadır. Korunan bu bölge 7. ekzonun mRNA'ya dahil olmasını sağlayarak olgun mRNA'nın üretilmesine katkı sağlamaktadır [48]. SMN2 geninde ise bu dizisi korunmaktadır. Fakat SMN2 geninde bu dizi UAGACAA şeklinde Urasil nükleotidi ile başladığı için ESE dizisi inaktif hale geçerek 7. Ekzonun atlanmasına neden olmaktadır [49]. Bu durumda yine istenen olgun mRNA'nın oluşumunu engelleyerek tam ve istenen uzunlukta SMN proteininin üretilmesini engellemektedir [50].

Başka bir görüşe göre ise Heteronükleer Ribonükleoproteinlerin (hnRNP), grubunun bağlandığı ESE dizilerinin de içinde bulduklarını ekzonun atlanmasına neden oldukları bilinmektedir. Bu yolla da splicingi kontrol etmektedirler [51]. Bu durumun da 7. ekzonun atlanmasına neden olabileceği düşünülmektedir. Sonuç olarak kalıtsal hastalıkların oluşmasından sorumlu olan mutasyonların %15'lik bir kısmını RNA Splicing mutasyonları sonucu ortaya çıkmaktadır [52].

1.7 SMN Proteininin Üretildiği ve Ekspre olduğu Yerler

SMN proteini bütün somatik hücrelerde ekspre olmakla birlikte çoğunlukla spinal kord motor nöronlarında ekspre olmaktadır. Evrimsel olarak ökaryotlar arasında korunmaktadır ve tamamen yokluğu söz konusu değildir. Belirli miktarlarda somatik hücrelerde

üretilmektedir [53]. SMN proteini motor nöronlarda nöritlerde ribonükleoprotein granülleri içerisinde Q proteinleri ve Heteronükleer Ribonükleoprotein (hnRNP) R proteinleri ile etkileşim içinde bulunmaktadır [54].

Hücre tipine göre SMN proteinin lokalizasyonu farklılık göstermektedir. Nöronlarda hücre gövdesi, akson ve dentritlerde bulunmaktadırlar. Ek olarak bu uzantıların dallanma noktalarında ve uç kısımlarında bulunan büyüme bölgelerinde; iskelet ve kalp kası hücrelerinde ise farklı olarak, sarkomerik z-diskler çoğunluklu olarak SMN proteininin yoğun olarak görülen bölgeler oldukları bilinmektedir [55]. Ayrıca dokuya özgü ifade edilen SMN proteini böbrek, omurilik, beyin ve karaciğerde yüksek; iskelet ve kalp kasında orta, fibroblast ve lenfositlerde düşük düzeyde ifade edilmektedirler [56].

Çekirdek ve nöronal sitoplazma da bol miktarda üretilmekte olup sitoplazma da üretilen SMN proteinin sinapsta aksonlar, vezikül salınımı ve aktin dinamikleri aracılığıyla mRNA taşınması hayati açıdan önem arz etmektedir [57]. Çekirdeğe gelindiğinde ise SMN proteini küçük nükleer RNA'lar (snRNA) oluşturmaktadır. Bu durum da pre-mRNA'nın mRNA'ya dönüşmesinde kilit rol oynayarak spliceosome oluşumunda kilit rol oynamaktadır [58]. Spliceosome oluşumu ise daha çok splicing aşamasında gerekli dizileri tanıyarak intronların çıkarılmasını kontrol eden bir oluşumdur [59]. Bu kompleks genel olarak sayıları 50 ila 100 arasında değişen polipeptitlerden ve üredin bazı bakımından zengin U1, U2, U4, U5 ve U6 Small Nuclear Ribonükleoproteinlerden (snRNP)'den oluşmaktadır [60].

1.8 SMA Hastalığı Tedavisinde Kullanılan Yöntem ve İlaçlar

Şu an halihazırda SMA hastalığı için kullanılan başlıca yöntemler genel olarak kısıtlı hareketlerin kullanım artışını amaçlayan fizik tedavi, omurga tedavisi, solunum desteği, beslenme tüpü, konuşma terapisi ve ilaçlar olarak sınıflandırılmaktadır. Yapılan çalışmalarca SMA semptomlarını azaltmaya yönelik mekanik destekler ve fizik tedavi çalışmalarının aşırı etkili olmamakla birlikte genel olarak bakıldığında fayda sağladığı görülmektedir. Görüşme yapılan bazı ebeveyn gruplarında ise uygulanan destekleyici tedavilerin kısıtlı hareketlerin kullanımını artırmakta olduğu ve beraberinde kilo alımı ve rahat bir uyku sürmeyi kolaylaştırdığı ifade edilmiştir. Başka bir aile ise çocuklarının iki

seviyeli pozitif hava yolu basıncı tedavisine olumlu dönüt sağladığı yönünde bilgi verdiği bilinmektedir. Buna rağmen uygulanan yöntem ve tedaviler tam bir iyileşme sağlamamakla birlikte sadece yaşam kalitesinin artışına yardımcı olmaktadır [61].

1.8.1 Spinraza

SMA hastalığı tedavisinde genel olarak Spinraza adı verilen bir ilaç kullanılmaktadır. Yaşam kalitesini arttırdığı düşünülmektedir. Solunum ve fonksiyonunu ve kas gücünü eski durumuna ve normal işleyişine dönüştürebileceğinin yanı sıra hastalığın ilerleyiş seyrini yavaşlatacağı hatta iyileştirebileceği yönünde düşüncelerin söz konusu olduğu bilinmektedir. Üzerinde yapılan çalışmaya göre Spinraza'nın SMA hastalarında geri dönüşümsüz nöron kayıplarını ve ek olarak solunum desteğine olan ihtiyacı azaltma yönünde etki edebileceği ve yine fonksiyonel hareket kayıplarını bununla birlikte artık daha güçlü nefes alma, eklemlerde büzüşmede azalma, başı ve vücudu daha dik tutabilme, yeme düzeylerinde artış, oturabilme kabiliyetinde iyileme ve bedeni daha etkin kullanımın arttığı gözlenmiştir. Ayrıca Spinraza'nın hastalarda ruh halleri ve özgüvenleri konusunda da olumlu etki yarattığı gözlenmiştir. Spinraza ve uygulama yolları ile alakalı çok az olumsuz etki ve yan etki gözlenmiştir. Yan etki olarak ise genel olarak kabızlık ve baş ağrısı en yaygın olanlar olarak bilinmektedir. Genel problem olarak bakıldığında ise hastaların daha çok açlık ve sedasyondan kaynaklı enjeksiyon problemleri yaşadıkları tespit edilmiştir. Ancak bu olumsuz etkilerin en aza indirgenebileceği düşünülmektedir [62].

Spinraza (Nursinersen) çalışma mekanizmasının temeli antisens oligonükleotid (ASO) tedavisine odaklanmaktadır. ASO'lar genellikle 15-20 nükleotit uzunluğuna sahip tek iplikli yapıda küçük moleküllerdir. Spesifik hedef olan mRNA molekülüne komplementer olarak bağlanma özelliğine sahip olan DNA ve RNA iplikleridir [63]. Lipozomlar aracılığı ile *in vitro* ve *in vivo* olarak hücre içine verilirler. Antisens oligonükleotitlerin hedef mRNA molekülü ile moleküler baz eşleşmesi RNA-ASO heterodubleks yapısının oluşmasına, dolayısıyla RNaz-H aracılı transkripsiyon engellemesi ve modifikasyonu sağlanabilmektedir [64]. Antisens oligonükleotit (ASO) olarak, Nursinersen kullanılmıştır. Nursinersen C234H340N61O128P17S18 formülüne sahip ribofurasil halkalarının 2'-hidroksi gruplarının 2'-O-2-Metoksietil gruplarıyla ve fosfat bağlarıyla değiştirilmesiyle modifiye edilmişlerdir [65]. Amaç SMN1'in yokluğunun telafi edilemediği noktalarda SMN2 geninde

7. ekzon atlamasını engelleyerek olgun mRNA üretimini sağlayarak işlevsel ve tam uzunlukta SMN proteini üretimini sağlamaktadır [66].

1.8.2 Zolgensma

Bu ilaç tasarlanırken kullanılan temel metot Adeno ilişkili bir virüs olan AAV vektörü kullanılarak gen transferi denenmiş yapılan çalışmalar sonucunda da SMN gen ekspresyon seviyelerinde artış olduğu gözlenmiştir. AAV, basit bir protein kapsülü bulunan tek zincirli bir DNA virüsüdür [67]. AAV virüsünün avantajı transfer edilen genin yenilenme hızı yüksek olmayan karaciğer, veyin, kalp, palevra ve retina gibi doku organlarda da ekspre olmasıdır [68]. Adeno Assosiyeye Viral Vektör (AAV), Pavovirüs ailesinin Dependovirüs koluna bağlı küçük, zarfsız, tek sarmallı bir DNA virüsüdür. 4.7 kb büyüklüğüne kadar rekombinant genom taşıma kapasitesine sahiptir. Patojen özellik göstermemektedir. AAV *in vivo* gen transferi için en güçlü vektör olduğu bilinmektedir [69].

AAV ile yapılan çalışmaların olumlu olması nedeniyle SMA Tip 1 ve SMA Tip 2'li hastalar için tek doz AAV9 içeren Zolgensma (Onasemgene Abeparanove-xbi) isimli ilaç Avexis firması tarafından geliştirilmiştir. SMA Tip 1 hastaları için intravenöz olarak uygulanırken, SMA Tip 2 hastaları için ise intratekal olarak uygulanmak üzere tasarlanmıştır. Mayıs 2019'da FDA onayı almıştır. Mart 2020'de ise EMA onayı almıştır. Amerika da 2 yaşından küçük çocuklara uygulanırken Avrupa da 21 kilogramın altındaki çocuklara uygulanmaktadır [70].

1.8.3 Risdiplam

2 aydan küçük SMA hastalarında oral yolla kullanılabilen ilk ve tek ilaçtır. Günde bir defa olmak üzere ve ağız yoluyla alınmaktadır [71]. Risdiplam SMN2 genindeki splicing mekanizmasını değiştirmeyi amaçlayarak SMN2 de ekzon 7'nin dahil edilmesini amaçlayan bir piridazin türevi ilaçtır [72]. Ekzon 7'nin dahil edilebilmesi için splicing işleminin doğru olarak gerçekleşmesi gerekmektedir. SMN1 geninde korunmuş olan ESE dizisi (CAGACAA) 7. ekzonun m RNA'ya dahil olmasını sağlamaktadır. SMN2 de ise korunmuş olan dizi Urasil nükleotidi ile başladığı için UAGACAA, ESE dizisi inaktif hale gelerek ekzon 7'nin atlanmasına neden olmaktadır. Bu bilgiden yola çıkarak splicing

mekanizmasının düzeltilmesi dahilinde ekzon 7'nin dahil edildiği pre m RNA ve ardından olgun m RNA üretilebilecektir. Bu durumda beraberinde de tam uzunlukta ve işlevsel SMN proteini üretimini sağlayabilecektir [73]. Yapılan klinik çalışmalarda SMA Tip 1, Tip 2 ve Tip 3 hastalarında hareket kabiliyetlerinde iyileşmeler gözlenmiştir. Faz-3 deneme çalışmalarında ise %41 oranında iyileşme saptanmıştır. Temmuz 2020 de FDA onayı almıştır. Mart 2021 de ise EMA tarafından kullanım onayı alınmıştır [74].

1.8.4 SMN2 Geni Promotoru Üzerinde Yapılan Ekspresyon Çalışmaları

İnsan ve fare SMN çekirdek promotorleri üzerinde yapılmış olan çalışmaya göre fare ve insan promotorleri arasında yüksek oranda benzerlik gösteren 7 bölge belirlenmiştir. Ek olarak bu bölgelerin konsensüs sekansı içerdiği görülmüştür. Konsensüs dizileri türler arası korunmuş bölgelerde bulunan spesifik dizilerdir ve transkripsiyon faktörlerinin bağlanma bölgelerini tanımlarına yardımcı olmaktadır. Bu çalışma ile SMN2 geninin promotorinde 7 özel korunmuş bölgedeki başlıca önemli olan AhR, HNF-3, N-oct3 transkripsiyon faktörlerinin kolayca bağlanabileceği konsensüs dizileri ilk kez haritalandırılmıştır. Ayrıca çalışmada SMN1 ve SMN2 genlerinin transkripsiyonel olarak nasıl bir yapıya sahip oldukları açığa çıkarılmıştır. Splicing mekanizması konusunda önemli bilgiler edinilmiştir. Dolayısıyla bu çözülen splicing mekanizması ve SMN2 geninin promotor bölgesinde keşfedilen konsensüs dizilerinin haritalandırılmasından da yola çıkılarak SMN2 geninin regülasyonunu artırma ve dolayısıyla SMN2 gen ekspresyonunu artırarak SMA hastalığını tedavi etmek amacıyla çeşitli çalışmalar yapılmıştır [75].

Promotor çalışmaları kapsamında, splicing mekanizmasının aydınlatılmasının ardından 7. ekzonun dahil edilmesi amacıyla ekzon atlanmasını engelleyecek bileşikler araştırılmaya başlanmıştır. Histon Deasetilaz (HDAC) inhibitörlerinin histon asetilasyonunu sağlayarak bazı genlerin ekspresyonunu değiştirebileceği bilinmektedir [76]. Beraberinde transkripsiyonel faktörlerin asetilasyonunu arttırmak yoluyla da bu faktörlerin aktivitelerini etkileyebilmektedir. Bu nedenle HDAC inhibitörlerinin kısa zincirli yağ asitleri grubuna giren valpronik asit kullanılmıştır [77]. Valpronik asitin SMN2 geninde bulunan splicing hatasını düzelttiği ve bununla birlikte 7. ekzonun atlanmasını önleyerek olgun mRNA oluşumuna katkı sağlayıp tam uzunlukta ve işlevsel SMN proteini üretimi sağlayarak SMN2 geninin protein ve mRNA seviyesini 2 ila 4 kat arasında arttırdığı gözlenmiştir [78]. Bunu ESE dizilerinden

olup splicing doğruluğunu kontrol eden ve SMN transkripsiyon aktivasyonunu kolaylaştıran Htra2-21 miktarlarını arttırmak suretiyle yaptığı düşünülmektedir [79].

SMN2 geninin ekspresyonunu aktivitesini arttırabilmek ve tam uzunlukta işlevsel SMN proteini üretebilmek amacıyla piridinin ve onun aromatik bileşik türevleri kullanılarak splicing hatası düzenlenmesi amaçlanmış olup pridinin türevi maddeler uygulandığında SMN2 ekspresyonunda çeşitli düzeylerde artışlar gözlenmiştir. Devamında SMN proteinin üretimini arttıracak olan bir dizi arilpiperidinin keşfi yapılmış olup SMA hastalığı tedavisinde umut vaad etmektedir [80].

Diğer bir çalışmaya göre ise araştırma grubu olarak SMA Tip I ve SMA Tip II hastalarının fibroblastları kullanılmıştır. Suberoilanolide hidroksumik asit (SAHA) ve yeni bir HDAC inhibitörü olan Dacinostat'ın SMN2 ekspresyonu üzerindeki etkileşimlerini karşılaştırmayı ve beraberinde bu maddelerin SMN2'nin metilasyonu üzerindeki asetilasyon etkilerini ortaya çıkarmayı amaçlayan bir çalışma yapılmıştır. Böylelikle bu çalışmadaki asıl amaç splicing hatasını düzenleyip ekzon 7'nin transkripsiyon da atlanmasını engellemektir [81]. Bu engellemenin yanı sıra SAHA ve Dacinostat'ın etkilerinin karşılaştırılmasıdır. SMN protein seviyeleri ve SMN2 mRNA protein seviyeleri, her iki tip SMA hastası deneklerden alınan hücrelerde öncelikli olarak her iki madde de ayrı ayrı denenmiş olup kaydedeğer etkilere görülmekle beraber maddeler aynı hücrelere beraber uygulandıklarında ise SMN2 ekspresyon seviyesi ve SMN proteini üretim miktarının tek tek uygulamaya nazaran düşüş yaşandığı çalışma tarafından test edilmiştir. Bu durum neticesinde kombine bileşik maruziyetleri SMN2 transkriptinde ve SMN protein miktarlarında daha az belirgin artış yarattığı gözlenmiştir. Sonuç olarak iki bileşikte SMN2 ekspresyon seviyelerini arttırmaktadır [82].

Başka bir çalışmaya göre SMA hastalığına sahip bireylerden türetilen hücrelerle hücre kültür ortamı oluşturulmuştur. Oluşturulan kültür ortamında SMN-AS1 yani antisens olügonükleotitler (ASO'lar) ile fare merkezi sinir sistemini hedef alan bir çalışma yapılmış yapılan çalışmada kaydedilen bozunma sonucu SMN ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir [83]. Böylelikle bir lncRNA'nın SMN2'yi transkripsiyonel olarak aktive etmesi amaçlanmış olup SMA hastalığını iyileştirmesi SMN2 ekleme modifikasyonu ile birleştirilebileceğinin ilk kanıtı olarak ortaya çıkmıştır. Bu durumda beraberinde nörojenetik hastalıkların tedavisi için kombinasyonlu ASO'ların böylece işe yarayabileceğine dair bir ışık tutmuştur [84].

SMN promotöründe cAMP- yanıt elemanı- bağlanma bölgeleri görülmektedir. Aynı zaman da SMN2 de cAMP-yanıt elemanı-bağlanma olarak CREII görülmektedir. Bu da kalıtsal açıdan SMN protein seviyesinde bir artışa neden olmamaktadır. Fakat fareler kullanılarak tasarlanan başka bir çalışmada ise CREBI proteininin artışının etkileri izlenmiştir [85]. Ancak yapılan çalışmada elektroforetik mobilite kaydırma deneyi ve UV kaynaklı DNA-Protein çapraz bağlanma deneyi yardımıyla cAMP-yanıt elemanı-bağlanma mekanizmasında SMN2'ye CREII yerine CREBI bağlandığı gözlenmiştir.Bu da SMN promotör aktivitesinde 4 kat artışla sonuçlanmıştır. Ve bu gözlem sonucunda ise geçici olarak CREBI'in aşırı ekspresyonunun insan SMN2 geninin iki kopyasını ifade eden farelerde intraperitoneal epinefrin enjeksiyonu ile yapılan uygulama sonucunda genin karaciğerde tam uzunluktaki SMN2 transkriptinde 2 kat artışa neden olduğu ve SMN promotör aktivitesinde 4 kat artışa neden olduğu gözlenmiştir [86].

1.9 Karaciğer Kanseri ve SMN2 Geni Arasındaki İlişki

Kanser türlerinden meme kanser türleri olan MCF-7 ve MDA-MB-231, ovaryum kanseri (SKOV-3 ve NIH: OVCAR-3), prostat kanseri (PC-3) ve ciltten izole edilen normal fibroblastik hücreleri ile yapılan bir çalışmaya göre, RBM10 (RNA bağlanma proteini) ile ilişkili olarak SMN2 gen ifadesinin kanser hücre hatlarında arttığı belirlenmiştir. Alternatif splicing mekanizmasından görevli olan RBM10 proteini tümör supresör özellikte olup kanserli hücrelerden ifadesinin azaldığı ve beraberinde SMN2 ifadesinin arttığı tespit edilmiştir [87].

1.10 Çalışmanın Amacı

Spinal Müsküler Atrofi (SMA) omurilikte yer alan alfa motor nöronların dejenerasyonu sonucu meydana gelen ve beraberinde simetrik kas zayıflıklarına yol açan otozomal resesif kalıtsal bir hastalık olarak bilinmektedir. Dünyada Kistik Fibrozisten sonra çocukluk çağında en ikinci olarak en sık görülen otozomal resesif kalıtsal hastalıktır. Bu nöromüsküler hastalığa SMN1 geninde meydana gelen çeşitli mutasyonların sebep olduğu bilinmekle bu mutasyonların neden olduğu genetik mutasyon, SMN protein seviyelerinde azalmaya neden olmaktadır ve bu azalma motor nöronların dejenerasyonuna, kas zayıflığına ve atrofiye neden olmaktadır. SMN geninin birbirinin homoloğu olan telomerik (SMN1) ve sentromerik (SMN2) olmak üzere iki kopyası bulunmaktadır. SMN1 geni işlevsel ve tam uzunlukta SMN proteini sentezlemektedir. Fakat SMA hastalarında SMN1 geninin homozigot delesyonu söz

konusudur. SMN2 gen kopya sayısı ise hastalığın prognozu ve şiddeti üzerine oldukça etkilidir. SMA tedavisinde sıklıkla kullanılan stratejiler; SMN1 yoksunluğu gidermek, SMN2 kalıbını kullanarak işlevsel ürün oluşması için düzenleme yapmak ya da SMN2 gen kopya sayısını arttırmak olarak sayılabilir. Bu tez çalışması, bu stratejilerden yola çıkarak SMN2 gen kopya sayısını arttırmak prensibi üzerinden SMN2 geni promotor bölgesi üzerine yoğunlaşmıştır.

Tezin genel amacı; SMN2 gen promotor bölgesinin klonlanması ve transkripsiyonel aktivitenin belirlenmesidir. Bu çerçevede alt amaç ve hedefler oluşturulmuştur.

ALT AMAÇ 1: Promotor bölgesinin detaylı biyoinformatik analizi gerçekleştirilmiştir. Biyoinformatik analiz ile genin promotor bölgesi NCBI genome walker üzerinde belirlenerek %GC içeriği, TATA kutusu içerip içermediği, saç tokası yapısı analizleri ve muhtemel transkripsiyon faktörü bağlanma bölgeleri çeşitli biyoinformatik web tabanlı araçlar kullanılarak belirlenmiştir. Bu bölgenin 5'delesyonlu promotor parçalarının klonlanması için çeşitli primer tasarımları manuel olarak gerçekleştirilmiştir. Promotor bölgesine ait restriksiyon enzimleri kesim haritası Restriction mapper 3 programı kullanılarak çıkartılmıştır. Kesim enzimleri vektöre yerleşimin doğru yönde olması için ve pMetLuc vektöründe olan enzimler ile ortak olarak seçilmiştir. Primerlerin baş bölgelerine kesim enzimlerinin tanıma dizileri eklenmiştir.

ALT AMAÇ 2: Çalışmamızda SMN2 promotoruna ait 5'delesyonlu parçaların klonlanması ikinci alt amacımızdır. Bu amaç için tasarladığımız spesifik primerler kullanılarak PCR tekniği ile çoğaltılması sağlanmıştır. PCR basamağında Hep3B hücre hattından izole etmiş olduğumuz genomik DNA kullanıldı. Jel Elektroforezi yardımı ile UV ışık altında görüntülenip elde edilmiş olan bantlardan jelden DNA geri saflaştırma yöntemi kullanılarak saflaştırıldı. Promotör bölgelerini içerisinde bulunduran DNA içeriği ile ligasyon kuruldu. Promotör bölgelerini içeren ligasyon içeriğimiz XL-1 Blue kompetant hücresi kullanılarak önce pGEM-T Easy vektörüne klonlandı. Restriksiyon enzimleri yardımıyla kesilip mini i'prep plazmit izolasyon yöntemiyle izole edildi. Ardından pMetLuc vektörüne alt klonlama

yapıldı. Dizi analizi ile rekombinant kolonilerin doğruluğu ve mutasyon içerip içermediği tespit edildi.

ALT AMAÇ 3: pMetLuc vektörü içerisinde klonlanmış olan 5 adet promotor parçasına ait rekombinant kolonilerden Midi prep izolasyon kiti aracılığıyla orta ölçekli endotoksin free plazmit izolasyonu sağlandı. Hücre kültürü çalışmaları kapsamında, Hep3B hücrelerine geçici transfeksiyon deneyi kalsiyum fosfat yöntemiyle gerçekleştirildi. Lusiferaz ve SEAP aktivite ölçümleri ile bazal aktivite sonuçları belirlendi. Ölçüm sonuçları Microsoft Excel programında grafiklendirilip istatistik olarak anlamlı olup olmadıkları yorumlandı. Şekil 1.5’de Teze ait iş akış diyagramı verilmiştir.



Şekil 1.5: Tez kapsamında yapılan çalışma basamaklarını özetleyen iş diyagramı

2. MATERYAL VE METOT

2.1 Kullanılan Makine ve Teçhizat

Tez çalışması sırasında kullanılan araç-gereçler ve markaları Tablo 2.1 de gösterildiği şekildedir.

Tablo 2.1:Kullanılan araç-gereçler ve markaları

Cihazın Adı	Markası
Elektronik tartı	Sartorius, Almanya
Elektroforez tankı	Apelex, İngiltere
Elektroforez için güç kaynağı	Consort/İngiltere
pH metre	WTW/Almanya
Isıtıcı blok	FALC/İtalya
Isıtmalı manyetik karıştırıcı	Velp Scientifica/İspanya
Mikro santrifüj	Sigma laborzentrifügen, Almanya
Vorteks	Elektromag/Türkiye
Sıcak su banyosu	Elektromag/Türkiye
Buz makinesi	Fiocchetti, İtalya
Buz dolabı (-20) ve (+4)	Profilo/Türkiye
Santrifüj	Hettich Zentrifügen, Almanya
Luminometre	Thermo
Isı kontrollü Çalkalamalı etüv	GFL, Almanya
Saf su cihazı	Destilasyon 3.1/ (Comecta Sa)
Otoklav	Hirayama/Japonya
Soğutmalı santrifüj	Sigma
CO ₂ 'li inkübatör	Nuair
-80 derin dondurucu	Thermo
Jel görüntüleme sistemi	Biomaging
Laminar air flow	TelstarBİOII/İspanya
Mikroskop	Nikon eclipse
Horizontal Çalkalayıcı	GFL/Almanya
48 well cell culture cluster	costar
Petri	BIOFIL

2.2 Materyal

Klonlama teknikleri aşamasında kullanılmış olan kimyasallar ve kitler Tablo 2.2’de verildiği şekilde kullanılmış olup Tablo 2.3 de ise bu aşamada kullanılmış olan vektörler ile bu vektörlerin temin edildiği firmaların adları bulunmaktadır. Transformasyon aşamasında kullanılmış olan bakteri soyları ise Tablo 2.4’de gösterildiği şeklindedir.

Tablo 2.2: Klonlama teknikleri aşamasında kullanılan kimyasallar ve kitler

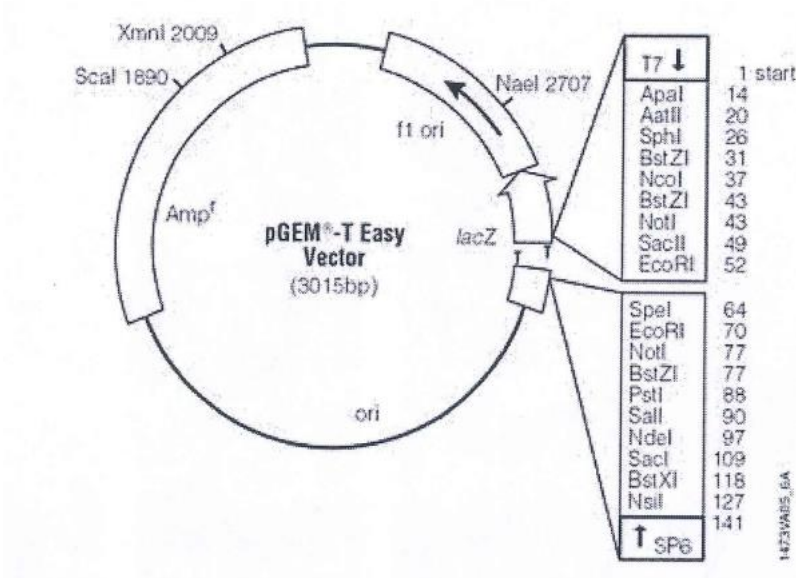
Malzemenin Adı	Firmanın Adı
Ligaz Tampon	Thermo Scientific
Restriksiyon endonükleazlar (XhoI, HindIII)	Thermo Scientific
T4 DNA ligaz	Thermo Scientific
50 ml ve 15 ml falkonlar	İsolab
Amfisilin antibiyotiği	Sigma
Kanamisin antibiyotiği	Sigma
LB broth	MILLER
Agar	caisson
Mini prep küçük ölçekli plazmit izolasyon kiti	MACHEREY-NAGEL
Proteinaz K	Sigma
Sodyum klorür (NaCl)	Sigma
Tris Base	Sigma
EDTA	Sigma
Agaroz	BIOMAX
Jelden geri geri kazanım kiti	MACHEREY-NAGEL
Kuvartz 48 Kuyulu Plaka	Sigma
Etidyum bromür	Sigma
Taq polimeraz	Thermo Scientific
Taq+KCl tamponu	Thermo Scientific
MgCl ₂	Fermantes
6X yükleme boyası	BioLabs
Sature Amonyum asetat (NaAc)	Sigma
Midi prep izolasyon kiti	MACHEREY-NAGEL

Tablo 2.2'nin devamı: Klonlama teknikleri aşamasında kullanılan kimyasallar ve kitler

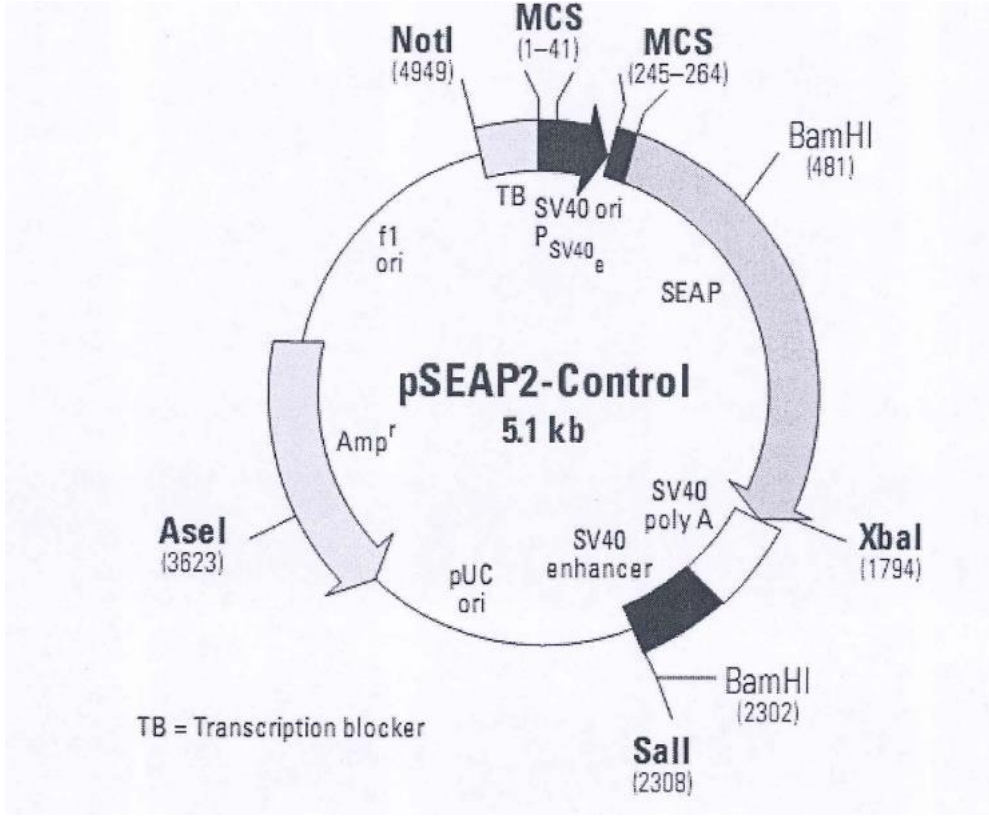
dATP, dTTP, dGTP, dCTP	BioLabs
DMEM	Sigma
FCS	Sigma
PBS	Sigma
FastDigest Yeşil Tampon	Thermo Scinetific

Tablo 2.3: Klonlama teknikleri aşamasında kullanılan vektörler ve temin edikleri

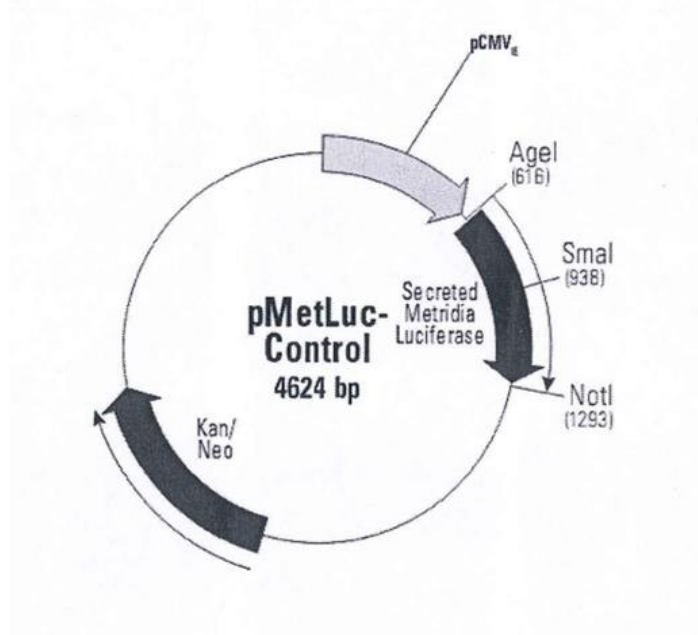
Vektörün Adı	Temin Edilen Firmanın Adı
pGEMTeasy	Promega
pMetLuc Reporter	Clontech Laboratories
pMetLuc Kontrol	Clontech Laboratories
Seap-2 Kontrol	Clontech Laboratories



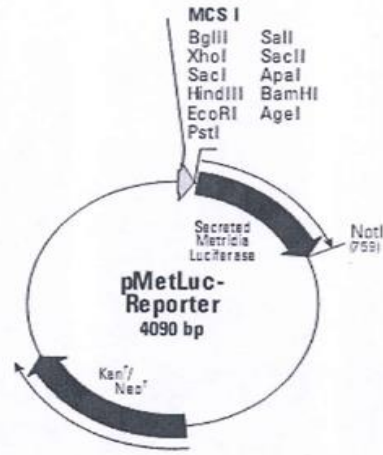
Şekil 2.1: pGEM-T Easy vektörünün şematik gösterimi.



Şekil 2.2: SEAP2 vektörünün şematik gösterimi.



Şekil 2.3: pMetLuc Kontrol vektörünün şematik gösterimi.



Şekil 2.4:pMetLuc Reporter Gösterimi.

Tablo 2.4:Transformasyon basamağında kullanılan bakteri soyları.

Bakteri suşları	Genotip
DH5- α	DlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(rK-mK+) supE44 thi-1 gryA96 re1A1
XL-1 Blue	recA endA gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 re1A1lacgryA96[F'proAB lac1q Z Δ M15 Tn10(Tetr)]

Tablo 2.5: Hücre Kültür basamağında kullanılan kimyasallar ve kitler.

Malzemenin Adı	Firmannın Adı
FCS (Fetal Sığır Serum)	Sigma
50 ml ve 15 ml	Isolab
Tripan Mavisi	Sigma
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Sigma
Pbs (Fosfat Tampon Solüsyonu)	Sigma
Bovin serum albumin	Sigma
0.22 mikron filtre	Sartorius
10 ml ve 25 ml Serolojik pipetler	Isolab

Tablo 2.6:Kullanılan hücre hattı ve elde edilmiş olduğu kaynak.

Hücre Adı	Temin Edilen Kaynak
Hep3B (Human Hepatoma Cell Line)	Dr. Dipak Ramji, Cardiff Üniversitesi, İngiltere

2.3 Klonlama ile İlgili Teknikler

2.3.1 Biyoinformatik Analizler

SMN2 geninin mRNA özellikleri, başlama ve bitiş kodonları, ekzon ve intron bölgeleri ve SMN2 genine ait promotör parçalarının muhtemelen bulunan bölgelerini belirlemek için <https://www.ncbi.nlm.nih.gov> adresi üzerinden analiz edildi. 5 promotör parçasının konstraktlarının oluşturulması amacıyla manuel olarak dizayn edilmiş olan primerlerin spesifik olup olmadığını <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> adresi üzerinden kontrol edildi. Restriksiyon mapper version 3 programı kullanılarak restriksiyon haritası belirlendi. Promotör bölgelerinde bulunan % GC oranının belirlenmesi ise https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/ adresi üzerinden yapıldı. <http://www.mfold.rna.albany.edu/?q=mfold/DNA-Folding-Form> adresi kullanılarak oluşturduğu sekonder yapıların analizi yapılarak bu bölgeye bağlanabilecek muhtemel transkripsiyon faktörleri ise Mathinspector programı kullanılarak belirlendi [88].

2.3.2 Hücreden Genomik DNA izolasyonu

Tablo 2.7’de hücreden genomik DNA izolasyonu için kullanılan çözelti ve içerikleri verildiği gibidir.

Tablo 2.7: Hücreden genomik DNA izolasyonu için kullanılan çözeltiler

Çözelti Adı	Çözelti İçeriği
Proteinaz K	0.01 g proteinaz K 1 mL dH ₂ O da çözülür ve -20 °C de saklanır.
Sature Amonyum Asetat	74 g NH ₄ Ac, dH ₂ O ile 100 mL tamamlanır. Yaklaşık 40 °C manyetik karıştırıcı da çözülür. Filtrasyon ile steril edilip +4 °C de saklanır.
Nüklei Lizis Tampon	10 mM Tris Base, 400 mM NaCl, 2 mM Na ₂ EDTA (pH:8.2) 20 dakika 121 °C’de 1,02 atm basınçta otoklav da sterilizasyon yapıldıktan sonra +4 °C ‘de saklanır.

Genomik DNA izolasyonu için Hep3B hücre hattından izolasyon yapıldı. Hücre santrifüjlenerek çöktürülerek pelet elde edildi. Hücre peleti 1.5 mL'lik ependorflara alınarak üzerine 1 mL distile su ilave edildi. Ependorflar 5 dk boyunca alt üst edilerek çalkalama işlemi yapıldı. 10 dk 13.500 rpm'de santrifüj edildi. Üst kısım uzaklaştırıldı. Hücreler tam olarak çökmediği için tekrar 10 dk 13.500 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı. Yeterli pelet elde edildi. Pelet üzerine 250 µL nüklei lizis tamponundan eklenildi. 20 µL proteinaz K ilave edildi. Ek olarak %10'luk SDS'ten 20 µL eklendi. 3-5 dakika alt üst edilerek çalkalandı. Öncesinde 72 °C'ye ısıtılan su banyosunda 10 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda 175 µL doymuş amonyum asetat eklendi. Ependorflar 3-5 defa alt üst edildi. Oda sıcaklığında 15 dk bekletildi. Ardından 13.500 rpm'de 20 dk santrifüj edildi. Süpernatant kısım steril bir mL'lik ependorfa alındı. Ependorfların üzerine içinde bulunan sıvı miktarınının 2 katı oranında absolu etanol eklemesi yapıldı. Ependorf 3-5 defa alt üst edilmek suretiyle çalkalandı. Ardından gözlem yoluyla DNA'nın belirmesi yapıldı. 13000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. DNA'nın çökmesi sağlandı. Süpernatant kısım atılarak çökelti üzerine 250 µL %75 etanol ilave edilip yıkma işlemi yapıldı. 13000 rpm'de 10 dk santrifüj yapıldı. Ve üst kısım uzaklaştırılarak DNA hava ortamında kurutuldu. Son aşama olarak 50 µL steril saf su suda mikropipet yardımıyla çözülerek elüsyon alındı. 5 tüp elde edildi. -20 °C dondurucuda saklandı [88].

2.3.3 DNA Miktarının Spektrofotometrik Olarak Belirlenmesi

İzole etmiş olduğumuz genomik DNA mikrodrop sistemi kullanılarak A_{260} ve A_{280} dalga boylarında absorbans alındı. Spektrofotometreye ait cihaz da seçtiğimiz kuyulardan ilkinde kör olarak 2 µL saf su ekledik diğer kuyucuğa ise hücreden izole ettiğimiz genomik DNA'dan 2 µL ekledik ve ölçüm alındı. Genomik DNA miktarı belirlemek amacıyla aşağıdaki formül kullanılarak DNA konsantrasyonu hesaplandı [89].

$$\text{DNA Miktarı} = (\text{Örnek-Kör}) \times 50 \times 20,408 = \mu\text{g/ml DNA}$$

2.3.4 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Tablo 2.8: Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)'da kullanılan dNTP karışımının hazırlanışı.

Malzemenin Adı	Hazırlanışı
dNTP Karışımı (10 mM)	Her bir nükleotitten (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 10 µL alınarak steril su ekleyip 100 µL ye tamamlanır.

PCR son hacim olarak 50 µL olacak şekilde hazırlandı. PCR tüpü içerisinde gerçekleştirdiğimiz reaksiyon içeriği ise; 100 pmol/µL olarak sulandırılmış olan SMN2 promotör primerlerden 1µL olacak şekilde kullanıldı. 1 ve 2 mM olacak biçimde MgCl₂ konsantrasyonları denendi. En son olarak 2 mM MgCl₂ kullanıldı. Taq+ KCl tamponundan 5 µL ve 10 mM dNTP stoğundan (Tablo 2.8) ise 1 µL kullanıldı. Hücreden izole ettiğimiz genomik DNA 'dan (100 ng/µL) 1 µL ve son olarak da 0.5 µL Taq Polimeraz enziminden kullanıldı [88].

Tablo 2.9: SMN2 Promotörü PCR döngü koşulları

Başlangıç denatürasyonu	95°C 5 dk	1 döngü
Denatürasyon	95°C 45sn	35 döngü
Primer Bağlanma	58°C 45sn	
Uzama	72°C 45sn	
Son uzama	72°C 10dk	1 döngü

2.3.5 Agaroz Jel Elektroföresi Üzerinde DNA'nın Görüntülenmesi

Tablo 2.10'de bu aşamada kullanılan çözeltiler ve kimyasallar verilmiştir.

Tablo 2.10: Agaroz jel elektroföresi sırasında kullanılan çözeltiler ve kimyasallar.

Çözeltilinin Adı	Hazırlanışı
5X/L TBE Tamponu pH:8.0	54 g Tris Base, 27.5 g Borik Asit 20 mL 0.5 M EDTA (pH:8) tartılır. Üzeri su ile 1 L tamamlanır.
DNA ladder 500µL DNA ladder (0.5 µg/µL)	100 µL DNA ladder (50µg) (1 hacim), 200 µL yükleme boyası (2 hacim) 200 µL steril suda (2 hacim) çözülür.
%1'lik Agaroz Jel	Tartılan 0.5 g agaroz 50 mL 0.5X TBE tampon içerisinde çözülür. Daha sonra 40-45 °C arası soğuduktan sonra 2.5 µL etidyum bromür eklenerek tanka dökülür.
Et-Br Stok Solüsyonu (10mg/ml)	10 mg/mL olacak şekilde steril distile su ile hazırlanır ve ışık geçirmeyen koyu bir şişede muhafaza edilmelidir.

DNA elektroforezi için kullanılan taraklara uygun olarak yatay jeller kullanıldı. Kullanılan jelleri elde etmek amacı ile %1'lik jel döküldü. %1'lik jel için BİOMAX'den alınmış olan agarozdan hassas terazi yardımı ile 1 gram tartıldı. Önceden hazırlanmış olan 0.5X TBE'den 100 mL mezür yardımıyla ölçülerek agaroz ile beraber 250 mL'lik beher içerisinde çözüldü. 3 dk mikrodalga fırında kaynatıldı. 15 dk steril kabin içerisinde uygun kıvama gelene kadar bekletildi. Karışım üzerine 2.5 µL etidyum bromür eklendi. Tanka dökülerek jel steril kabin içerisinde soğutuldu. Örnekler yüklenerek 90 V elektrik akımı ile 40 dk boyunca örnekler yürütüldü. DNA'yı görüntülemek için örneklere 6X yükleme boyası eklemesi yapıldı. Klonlama çalışmalarında kullanılan agaroz jelin son konsantrasyonu %0.8, %1 ve %2 olacak şekilde kullanıldı. Promotor parça büyüklüklerine göre konsantrasyon belirlendi. Elektroforezde ayrışan DNA parçalarının büyüklüğünün tayin edilmesi için marker olarak 1 kb DNA marker ve 100 kb DNA marker yardımı ile kıyaslama yapıldı. Jel Elektroforez sonuçları bilgisayarlı sistem ile görüntülenerek fotoğrafları alındı. DNA bantları UV transilluminator üzerinde görüntüledi [88].

2.3.6 Jelden DNA'yı Geri Saflaştırma

Bu basamakta Thermo Scientific marka GeneJet Gel Extraction kiti kullanıldı. Öncelikle PCR sonucunda elde edilmiş olan ve jel Elektroforezinde görüntülenmiş olan içerisinde DNA içeriği barındıran bantlar, fazla UV ışığa fazla maruz bırakmamak şartıyla UV ışık altında ince bir hat oluşturacak şekilde kesildiler. Daha sonra önceden hassas tartı ile tartılarak ağırlıkları belirlenmiş olan 2 mL ependorfların içerisine alınarak tekrar tartımları gerçekleştirildi. Ardından yapılan basit bir çıkarma işlemi ile içerisine DNA parçaları içeren ependorfların tartım sonundan boş iken elde edilen tartım sonucu çıkarıldı. 2 mL ependorfların içerisine aradaki fark oranında kit de belirtildiği şekliyle Binding Buffer eklendi. Önceden 60 °C sıcaklığa getirmiş olduğumuz su banyosunda 10 dk inkübasyona bırakıldı. Jelin tamamen erimesi sağlandı. Eriyen solüsyondan kit içerisindeki kolona 700 µL hacminde eklendi. Kolon 1 dk boyunca 13.500 rpm'de santrifüj edildi. Bu işlem solüsyon bitene kadar tekrar edildi. Kolon altında biriken süzüntü atıldı. Aynı kolon içerisine 700 µL yıkama tamponu eklendi ve 1 dk 13.500 rpm de santrifüj edildi. Kolonun altında kalan süzüntü uzaklaştırıldı. 2dk boyunca kolon boş bir şekilde santrifüj edildi. Kolon üzerine 50

μL saf su eklenerek 2 dk beklendi ve 1 dk 13.500 rpm de santrifüj edildi. Böylece saf su kullanılarak elüsyon alınmış oldu [89].

2.3.7 Ligasyon

Jelden saflaştırma yolu ile geri kazandığımız promotör parçalarının 3' ucuna kullandığımız Taq Polimeraz enzimi poliA kuyruğu eklemesinden dolayı lineer bir vektör olan ve 3' ucunda PoliT kuyruğu bulunduran pGEM-T Easy (Promega) vektörüne ligasyon aracılığı ile klonlama işlemi gerçekleştirildi. PCR ürünlerinin pGEM-T Easy vektörüne ligasyonu için son hacim 20 μL olacak şekilde hazırlandı. Ligasyon içeriği olarak 100 ng/ μL jelden kazanılmış olan DNA 'dan 15 μL , 10X ligasyon tamponundan 2 μL , 50 ng/ μL p GEM-T Easy vektöründen 2 μL ve 3U/ μL 'lik T4 DNA ligaz enziminden 1 μL olacak şekilde reaksiyon kuruldu. 16°C de 16 saat inkübasyona bırakıldı. pMetLuc (CLONTECH) vektörüne alt klonlama yapmak için spesifik enzimlerle kesilmiş promotör fragmentleri 20 μL 'lik son hacimde reaksiyon ortamına, DNA parçası yani klonlanmak istenen SMN2 promotör gen parçası (insert), pMetLuc vektörü (minimum 3/1 oranında olacak şekilde) ile 1X T4 DNA Ligaz tamponu, 0.3 U/ μL T4 DNA ligaz enzimi eklenerek 16 °C ayarlanmış olan PCR cihazı içinde bir 16 saat inkübasyona bırakılmıştır [88].

2.3.8 Kanamisinli ve Amfisilinli Nutrient Broth ve Agar Petrilerinin Hazırlanması

LB agar üretici firma tarafından belirlenen miktarda su da çözülerek hazırlandı. Sterilizasyon için 121 °C 20 dk otoklavlandı. İlk olarak 50 °C'ye kadar soğuması beklendi ve sonrasında 50 mg/mL Kanamisin stoğundan son konsantrasyonu 50 mg/mL olacak şekilde ayarlandı. Yine aynı şekilde 100 mg/mL olan Ampisilin stoğundan yine son konsantrasyon 50 mg/mL olarak eklendi. Köpürmeyi engelleyecek şekilde karışması sağlandıktan sonra bek alevi yanından uzaklaşmadan petri kaplarına dökülerek polimerleşmesi sağlandı. Petrilerin etrafi parafilmledikten sonra petriler ters çevrilerek ışıktan muhafaza olacak bir şekilde +4 °C saklandı. Nutrient Broth firmanın belirlediği miktarda hassas terazide tartılarak 1 litre su da çözüldü ve 121°C'de 20 dk otoklavlanarak sterilizasyon sağlandı [88].

2.3.9 XL-1 Blue Hücrelerinin Kompetant Hücre Haline Getirilmesi

Klonlama aşamasında kullanılacak olan XL-1 Blue bir gece önceden 10 mL LB sıvı besiyeri içerisine tek koloni ekimi yapılmak suretiyle 37 °C’de 16 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 100 mL taze LB besiyeri içerisine inkübe edilen 10 mL besiyerinden 5 mL alınıp ilave edilerek inoküle olması sağlandı. OD değeri 0.5-0.6 arasında bir değere ulaştığında bakteri süspansiyonu 50 mL falkonlara alınıp +4 °C derecede 3000 rpm de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatantın uzaklaştırılmasının ardından bakteri süspansiyonu ile eş hacim de olacak şekilde 0.1 M kalsiyum klorür çözeltisinden eklendi. Pastör pipeti yardımıyla dikkatlice pelet çözüldü. Buz üzerinde 25 dk bekletildikten sonra 3000 rpm de +4 °C de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırılarak hücre peleti başlangıç hacminin onda biri oranı kadar 0.1 M kalsiyum klorür içerisinde tekrar çözüldü. 1 ila 4 saat aralığında buz üzerinde bekletildi. Eş hacim de %40’lık gliserol ekleyip dikkatlice karıştırıldı. Buz üzerinde bekletilmiş olan 2 mL ependorflara dikkatlice paylaştırıldı. – 80 °C ‘de saklandı [88].

2.3.10 Transformasyon

Her promotor parçası için ayrı ligasyon reaksiyonu kuruldu. Her bir ligasyon için ayrı ayrı amfisilin LB Agar petri hazırlanıp kenara bırakıldı. XL-1 Blue kompetant hücreler -80 °C dereceden dikkatle çıkarılarak buz üzerinde yaklaşık 20 dk çözünmesi beklendi. Sonrasın da 200 µL kompetant hücre buz üzerinde soğutulan ependorfa alındı. Üzerine ise 5 µL transforme edilmek istenen plazmit eklendi. Daha sonra buzda 40 dk inkübe edilerek hücreler 42 °C su banyosunda 2 dk bekletildi ve 2dk buz üzerinde bekletilerek ısı şoku yapıldı. Isı şokunu tamamlamış olan hücrelere, 37 °C’ye ısıtılacak olan LB medyumdan 800 µL eklenerek çalkalamalı inkübatörde 2 saat bekletildi. İki saatlik süre esnasında Ampisilinli petri için Mavi-Beyaz koloni seçebilmek amacıyla Ampisilinli petri öncelikli olarak bek alevinin yanında bir süre bekletildiler. Önce 40 mg/mL XGAL’den 40 µL olacak şekilde petriye eklendi ardından eş hacimde 100 mg/mL IPTG’den 40 µL olacak şekilde eklendi. Eklenen maddelerin petri tarafından emilimi için petri ters çevrilerek 15 dk inkübatörde bekletildi. İki saatin ardından çoğalan kültür 5 dk 5000 rpm’de santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırılarak pelet 100 µL LB medyumda çözüldü ve bek alevi yanında plastik steril öze ile petriye yayılma işlemi yapıldı. 15 dk süreyle inkübatörde düz olarak bekletildi. Hücrelerin büyümesi için süre sonunda petri ters çevrilerek 37 °C 16 saat inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Antibiyotik aracılığıyla seçilimi yapılacak olan petri içinde oluşacak kolonilerinden beyaz koloniler seçilerek izole edildi. pMetLuc vektörü kullanıldığında ise

Kanamisinli petri kullanıldığı için mavi beyaz koloni seçimi yapılmadı. Mavi-Beyaz koloni seçimi basamağı haricinde transformasyon basamakları aynı şekilde izlendi ve oluşan koloniler izole edildiler [88].

2.3.11 Gliserol Stok Hazırlama

100 µg/mL Ampisilin içeren LB medyuma tek koloni ekimi yapıldı ve ön kültür oluşturuldu. %40'luk steril gliserol çözeltisi hazırlandı. Bek alevinden uzaklaşmadan eş hacim de ön kültür ve %40'luk gliserol çözeltisi 2 mL ependorflara paylaştırılıp saklanmak üzere -80 °C dereceye kaldırıldı. Uygulanan basamaklar 30 µg/mL Kanamisin içeren LB mededyuma tek koloni ekimi yapılan ön kültürde de tekrarlandı [88].

2.3.12 Restriksiyon Endonükleaz Kesimi

Son hacim 50 µL olacak şekilde 4.4 µL plazmit, Thermo Scificent'den temin edilmiş olan Fast Digest Xho1 ve Hind3 enzimleri 1 U/µL, Fast Digest Yeşil Tampon'dan 5 µL eklendi. Son olarak 38.6 µL steril su ilave edilerek reaksiyon hacmi 50 µL 'ye tamamlandı. 37 °C'de 16 saat boyunca bırakıldı [88].

2.3.13 Küçük Ölçekli Plazmit İzolasyonu

Miniprep DNA izolasyonu yapmak amacıyla MACHEREY-NAGEL'den temin edilen NucleoSpin Plasmid Isolation Kit kullanıldı. Kit tarafından belirlenmiş olan oranlara göre µbir gece boyunca 37 °C çalkalamalı etüv de inkübe etmiş olduğumuz ön kültür 10.000 g de, +4 °C 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant kısım dikkatlice uzaklaştırılarak 250 µL tampon A1 pelet üzerine eklenerek pelet çözüldü. 250 µL A2 Solüsyonu eklendi ve 5-6 defa alt üst edildi ve rengi maviye dönüştürüldü. Ardından oda sıcaklığında 5 dk bekletildi. Bu aşamadan sonra lizis gerçekleştirilerek sümüksü bir yapı oluşması sağlandı. 300 µL A3 Solüsyonu eklendi ve nötralizasyon sağlandı. 13.500 rpm de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant kısmı pelete dokunmadan 700 µL olacak şekilde dikkatlice alınarak kolona eklendi. 13.500 rpm'de 1dk santrifüj edildi. Bu işlem süpernatant bitene kadar tekrarlandı. Yıkama tamponundan 500 µL eklendi, 13.500 rpm de 1 dk santrifüj ve böylece yıkama işlemine başlandı. Ardından 2. yıkama tamponu 600 µL eklendi ve 13.500 rpm de 1 dk santrifüj edildi. Kolon 13.500 rpm de 2 dk boş bir şekilde santrifüj edildi. Son olarak kolon

temiz bir ependorfa alındı ve 50 µL ve 35 µL steril su içerisinde 1. ve 2. elüsyonlar alındı [88].

2.3.14 Orta Ölçekli Plazmit İzolasyonu

Orta ölçekli plazmit izolasyonu yapılmadan önce kolonilerin rekombinant olup olmadığı BM labosis dizi analizi firmasına gönderilerek tespit edildi. Büyük miktarda ve transfekte edilebilecek saflıkta rekombinant plazmit DNA izolasyonu için midiprep kiti olarak MACHEREY-NAGEL'den alınmış olan NucleoBond Xtra EF Plasmid Purification Kit kullanıldı. Kit protokolüne uygun davranılarak gerekli konsantrasyonda seçici antibiyotik içeren 10 mL LB besiyeri içerisine tek koloni ekimi yapıldı. Bu besiyeri 37 °C 16 saat çalkalamalı etüvde inkübe edilmek üzere bırakıldı. 16 saatlik süre sonunda başlangıç kültürü 1/500-1/1000 arasında seçici antibiyotik içeren LB medyumda dilue edildi. Yüksek kopyalı plazmitler için 100 mL medyum kullanıldı. Yine 37 °C 16 saat inkübe edildi ve bakterilerin büyümesi beklendi. Bakteriler yeterli OD değeri 0.5-0.6 aralığındaki bir değere ulaştığında ise sonrasında +4 °C'de 5000 rpm'de 20 dk santrifüj yapıldı. Sonrasında süpernatant uzaklaştırılmış olup 8 mL Resuspension solüsyon eklenerek çözülmesi sağlandı. Lys-EF tampondan 8 mL eklenip, 5-6 defa alt üst edildi. 5 dk oda sıcaklığında bekletildi. Kit tarafından önerilen filtre temiz bir falkona yerleştirildi. Pastör pipeti yardımı ile EQE-EF tampondan 15 mL eklemek suretiyle filtre ıslatıldı. 5 dk oda sıcaklığında bekletilen çözeltimizin üzerine 8 mL Neu-EF tampondan 8 mL eklendi. 5-6 dk alt üste edilerek renk değişimi gözlemlendi ve 5 dk buz üzerinde inkübe edildi. 15 dk süresince 5000 rpm de santrifüj edildi. Elde edilen süzüntü damla damla olacak şekilde önceden ıslatılmış olan filtre üzerine eklenip süzülmesi beklendi. Süzüntü uzaklaştırıldı. Filtre üzerine 5 mL FIL-EF Tampon kolona eklendi, süzülmesi beklendi ve süzüntü uzaklaştırıldı. Kolon içerisinden fitre kısmı çıkarıldı. Filtresiz kolon üzerine 35 mL ENDO-EF tampon eklenip, süzülmesi beklendi ve süzüntü uzaklaştırıldı. 15 mL Wash-EF Buffer eklenip süzülmesi beklendi ve süzüntü uzaklaştırıldı. Kolon temiz bir falkon tüpe alındı. Önceden su banyosun da 50 °C ısıtılmış olan 5 mL ELU-EF tampon eklenerek konsantrasyonu ölçüldü. 5 mL elüsyon için 3.5 mL izopropanol olacak şekilde, elüsyona eklendi. Sıvı enjektöre aktarılıp yavaş yavaş kuvvet uygulamak suretiyle süzüntü alındı. Filtreden mevcut alkolü uzaklaştırmak amacı ile filtre ve pistonu çıkarıp tekrar takılıp kuvvet uygulandı ve bu işlem alkol uzaklaştırılana kadar devam edildi. %70 Endotoksin Free Etanol'den 2 mL enjektöre aktarılıp yavaş yavaş kuvvet uygulayarak süzüntü uzaklaştırıldı. Son olarak finalizatör kuru bir enjektöre takılarak yavaş

yavaş kuvvet uygulanarak hava geçişi sağlanır ve bu işlem var olan tamamen uzaklaştırılıncaya kadar devam edildi. Filtre 1 mL'lik enjektöre takılarak elüsyon alındı [88].

2.4 Hücre Kültürü ile İlişkili Teknikler

Hücre kültürü ile ilgili çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler ve temin edildikleri firmaların adları Tablo 2.5 'de özetlendiği gibi olup hücrelerin büyütülmesi ve pasajlanması işlemlerinde kullanılan çözeltiler Tablo 2.11 de gösterildiği gibidir.

Tablo 2.11: Hücre Kültürü çalışmalarında kullanılan çözeltiler.

Çözeltilerin Adı	Hazırlanışı
Tripsin-EDTA	0.2 g EDTA 0.25 g tripsin 100 mL su içerisinde 1X PBS çözülür. 0.22 µL filtre yardımıyla süzülür. -20 °C'de saklanır.
1X PBS	Belirtilen miktar da PBS tableti su içerisinde çözülüp hazırlanır. 21 dk 121°C'de otoklavlanarak steril edilir.

2.4.1 Hücre Kültürü Besiyerinin Hazırlanması

Bu basamak da hücre kültürü deneylerinde kullanılmış olan hücre hatları için ticari olarak Sigma'dan alınan DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) kullanılmış olup besiyeri içerisinde %10 FCS (Fetal Sığır Serum) bulunacak şekilde kullanıldı [88].

2.4.2 FCS veya FBS (Fetal Sığır Serum)'nin Hazırlanması

İlk kullanımından önce stok serum 56 °C 1 saat boyunca ısı ile inaktive edildi. Sterilizasyon amacıyla 0.22 µL'lik filtreden geçirildi. Sonrasında kullanım gerçekleştirildi ve -20 °C saklandı. Gibco firmasından temin edilen FCS (Fetal Sığır Serum), +4°C de bir gece bekletilerek eritildi. Ardından 56 °C 1 saat ısı ile inaktive edildi [89].

2.4.3 -80°C Derin Dondurucuda Saklanan Hücrelerin Açılması

Öncesinde 37°C ayarlanarak ısıtılan su banyosunda çalışmada kullanılacak olan FCS ve DMEM ısıtıldı. Steril kabin hücre hattı ile çalışılmaya başlanmadan en az yarım saat önce

çalıştırıldı. Kabinin içerisi %70'lik teknik alkol ile silindi. Daha sonra FCS ve DMEM'in dış yüzeyleri de %70'lik teknik alkol kullanılarak silindi ve steril kabin içerisine alındı. 45 mL DMEM içerisine 5 mL FCS eklenerek medyum olarak kullanılmak üzere %10'luk FCS'li DMEM hazırlandı. -80 °C derin dondurucudan çıkarılan Hep3B hücre hatları su banyosunda çözünmesi saklandıktan sonra pastör pipeti aracılığı ile 50 mL'lik falkon içerisinde hazırlanmış olan medyum içerisine aktarıldı. 5 dk 1000 rpm de santrifüj edildikten son süpernatant kısmı uzaklaştırılarak dipte kalan hücre peleti pelet durumuna göre belli bir miktar taze hazırlanmış medyum içerisinde çözülerek eşit oranda petrilere dağıtıldı. Dağıtılan hücrelerin durumuna göre ise kalan miktar medyumla beraber 10 mL'ye tamamlandı. Hücreler %5 oranında karbondioksit içeren 37 °C sıcaklıktaki inkübatörde büyümeye bırakıldı [88].

2.4.4 Hücrelerin Pasajlanması

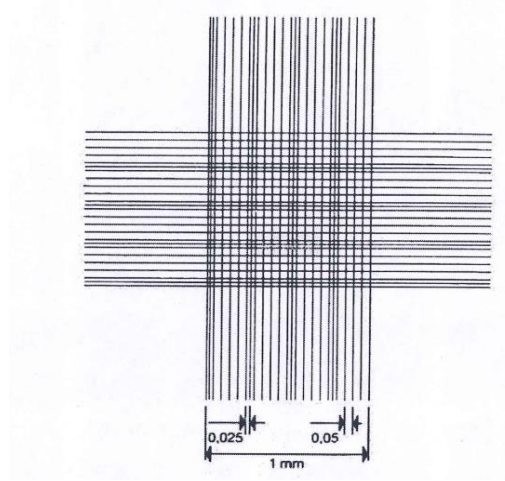
Petri içerisinde bulunan hücrelerden %80 oranında doluluk oranına ulaşan hücreler pasajlandı. Petri içerisindeki medyum steril kabin içerisinde falkona aktarılarak 1000 rpm de 5 dk santrifüj edildi. Üstte kalan medyum uzaklaştırıldı. Dip de kalan pelet ise taze hazırlanan %10'luk FCS'li DMEM içerisinde çözüldü. Eşit hacimde steril petrilere dağıtıldı. Hücre durumuna miktar durumuna göre taze medyum kullanılarak son hacim 10 mL'ye tamamlandı [88].

2.4.5 Hücre Sayımı yapılması

Yeterli miktarda hücre ile Transfeksiyon deneyi kurabilmek için Brom Fenol Mavisive Toma Lamı yardımıyla hücre sayımı yapıldı. Steril kabin içerisinde petri içerisindeki medyum uzaklaştırıldı. Petri içerisine 2.5 mL PBS eklenerek yıkama yapılarak içerik uzaklaştırıldı. Petri içerisine 2.5 mL Tripsin EDTA eklenerek 5 dk inkübatör içerisinde inkübe edilerek hücrelerin kalkması sağlandı. 5 mL FCS'li DMEM eklenerek inaktive edildi. 15'lik falkona alındı. 1000 rpm de 5 dk santrifüj edildi. Üst taraf uzaklaştırıldı. Dip kısımda kalan pelet miktarına göre 8 mL FCS'li DMEM ile çözüldü. Çözdüğümüz hücrelerden 1 mL alıp bir ependorf içine ayrıldı. Daha sonra ayrı bir ependorf da 30 µL Brom Fenol Mavisinden 30 µL de alarak ependorf içerisinde pipetaj yaparak karışması sağlandı. Şekil 2.6'da gösterilmiş olan önceden hazırlanmış Toma Lamı içerisine karışımdan 10 µL

eklenerek boyandı. Mikroskop altında yapılan gözlen sonucu 1 mL'ye düşen toplam hücre sayısı aşağıdaki formül kullanılarak hücre sayımı yapıldı [88].

$$\text{Toplam Hücre Sayısı} = (\text{Hücre Sayısı}) \times 2 \times 10000$$



Şekil 2.5:Toma Lamı görüntüsü.

2.4.6 Transfeksiyon Çalışmalar

Tablo 2.12: Transfeksiyon basamağında kullanılan çözeltiler ve kimyasallar

Adı	İçerik	Marka
2 mM Kalsiyum Klorür	14.7 g tartılarak 50 mL saf su içerisinde çözülür. Otoklav işlemiyle steril edilerek filtreden geçirilir. +4 °C de saklanır.	J.T Baker
2X HEPES	1g Hepes tartılır, 1.6 g NaCl tartımı yapılır ve bir miktar su içerisinde çözülür. Balon joje yardımı ile 100 mL su le tamamlanır. Steril kabin içerisinde 0.22 mm'lik filtreden geçirilerek steril edilir.	Sigma
Ready to glow Dual Secreted Reporter Assay Kiti™	10X Substrat stok solüsyon, Reaksiyon Tamponu 5X, 1X'e sulandırılır. Seap Substrat Solüsyonu	Clontech Laboratories
Seap	Midi prep izolasyon kiti kullanılarak hazırlandı.	MACHEREY-NAGEL
100X Fosfat (PO₄) Tampon	70 mM Na ₂ PO ₄ ve 70 mM NaH ₂ PO ₄ birebir oranında karıştırılır. Su ile çözülür.	Merck

Tablo 2.12’de transfeksiyon çalışmalarında kullanılan çözelti ve kimyasallar özetlenmiştir. Bu çalışmada öncelikli olarak Hep3B hücreleri her kuyucuğa 60.000 hücre düşecek şekilde 48 kuyulu plakaya paylaştırıldı. Bir gece boyunca inkübatörde bekletildi. 5 konstraktın her biri için üçer tekrar yapılmış olup bu amaç doğrultusunda her bir promotör parçası için ayrı ayrı olmak üzere 250 µL HEPES ve 7.2 µL Fosfat 15 mL’lik falkon içerisinde karıştırıldı. Diğer bir 15 mL’lik falkon içerisinde ise 40 µL Seap (1000 ng/µL), 30 µL kalsiyum klorür, 1 µL DNA (500 ng/µL) ve son olarak 179.2 µL su tamamlanarak iki tüpün de son hacmi birbirlerine eşitlenip HEPES-Fosfat karışımı DNA içeren tüpün içerisine pastör pipeti aracılığı ile kabarcık oluşturmak suretiyle Mikropipet aracılığı ile içeriğinde DNA bulunan karışım damla damla eklendi. Presipitasyon için steril kabin içerisinde bir saat beklenir. Bir saat sonunda steril kabil içerisinde de 48 kuyuya sahip plaka içerisinde bulunan hücrelere her kuyucuğa 128.6 µL transfeksiyon içeriği her biri için ayrı ayrı olmak üzere ilgili promotör parçası kuyucuğuna paylaştırıldı. 1 gün sonunda Transfeksiyon medyumunu değiştirildi. Transfeksiyonun 48. saatinde 100’er µL medyum ependorf içine alınarak -20 °C de saklanır. Aynı işlem 72. saatte de gerçekleştirildi [88].

2.4.7 Lusiferaz Aktivitesi

İnsan SMN2 genine ait 5’ ucu kısaltılarak oluşturulacak promotor parçalarının bazal aktivitesini belirlemek QUANTI-luc™ Gold Kiti kullanıldı. Lüsiferaz saptama reaktifi hazırlamak için 50 mL’lik falkon içerisinde 2 koelenterazin bazlı reaktif toz 25 mL steril su içerisinde çözüldü. 1.5 mL’lik ependoflara paylaştırılıp saklanmak üzere -20 °C’ye kaldırıldı. Lüsiferaz tespiti için ise 10 µL hazırlanan lüsiferaz reaktifi ve 20 µL Transfeksiyon medyumunu olacak şekilde plakaya eklenerek ölçüm alındı [88].

2.4.8 SEAP Aktivitesi

SEAP aktivitesi için, 96 kuyucuklu plakalara 5 µL transfeksiyon medyumdan alınarak plakaya koyuldu. Üzerine sulandırılan 1X solüsyondan 15 µL eklendi veparafilmlemiş plaka etrafı alüminyum folyo ile sarılarak önceden 65 °C’ye ısıtılan su banyosunda 30 dk bekletildi. Ardından 2-3 dk buz üzerinde inkübe edildi. 5 dk oda sıcaklığında bekletildi. Her bir kuyucuğa 20 µL Seap Substrat Solüsyon eklendi. 30 dk oda sıcaklığında bekletildi. Son olarak 5 limünometrede sonuçlar okundu. Elde edilen sonuçlar Microsoft Excel programı kullanılarak değerlendirildi. İstatistik analiz için Minitab 14 programı kullanıldı.[88]

3. BULGULAR

3.1 SMN2 Geni Promotorunun Biyoinformatik Analizi

NM_017411 kayıt numarası ile SMN2 varyant D'nin ön kısmına NCBI Sequence viewer sitesi üzerinden ilerlenmiştir. 5. kromozomda bulunan SMN2 genine ait varyantD; 7 ekzondan oluşmakta ve 70.049686-70.076571 bç'lik alanı kapsamaktadır. SMN2 varyant d'nin ATG kodonu 18. bazdan başlamaktadır. Promotor bölgesi ATG'nin ön kısmından yaklaşık 1000 bç geri gidilerek seçilmiştir. Şekil 3.1'de +1 TSS (Transcriptional Start Site) bölgesi ve ATG (+18) bölgesi gösterilmiştir.



Şekil 3.1: SMN2 geni promotor bölgesine ait 116 bç, 223 bç, 457bç, 618 bç ve 888bç'lik promotor primerlerinin SMN2 promotoru üzerinde gösterimi.

1: SMN2 pro Reverse. 2: 116 bç'lik promotor primeri. 3: 223 bç'lik promotor primeri. 4: 457 bç'lik promotor primeri. 5: 618 bç'lik promotor primeri. 6: 888 bç'lik promotor primeri.

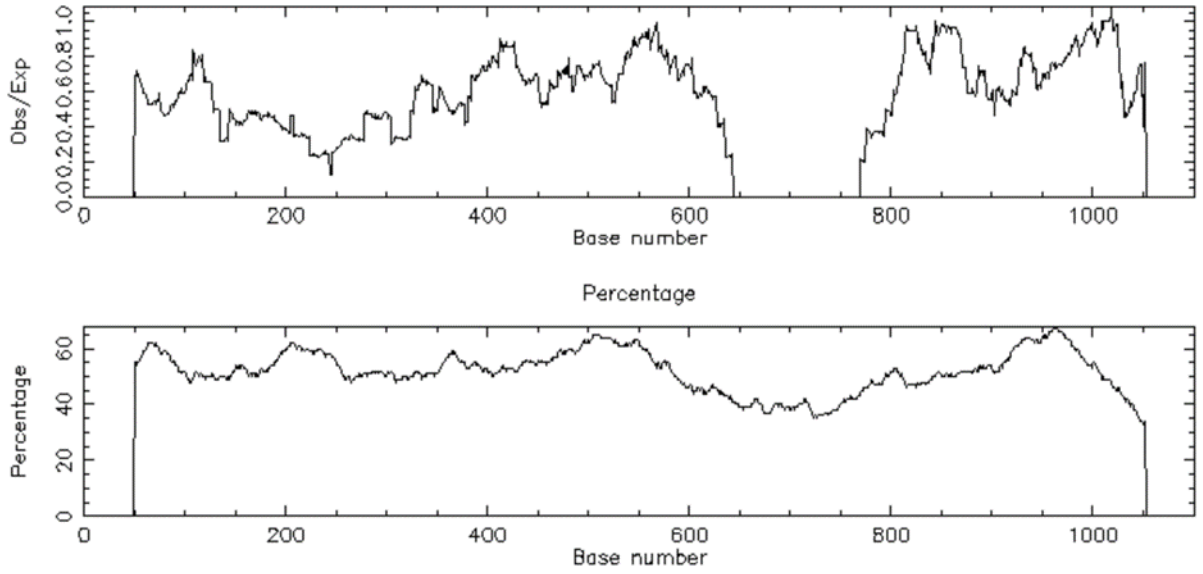
Alınan bölgeye çeşitli büyüklüklerde promotor parçalarının oluşturulması için primerler tasarlanmıştır. Restriction mapper 3 programı kullanarak geni içerden kesmeyen ve pMetLuc vektörü ile ortak olan XhoI (ileri primerine) ve HindIII (geri primerine) enzimleri seçilmiş ve tanıma dizileri primerlerin baş kısımlarına eklenmiştir. 888 bç, 618 bç, 457 bç, 223 bç ve

116 bç'lik promotor bölgesini oluşturacak Primerler Tablo 3.1'de gösterildiği gibidir. Aynı zamanda primer bölgeleri promotor bölgesi üzerinde Şekil 3.1'de 1, 2, 3, 4, ve 5 rakamları ile gösterilmiştir.

Tablo 3.1: SMN2 gen promotoru için oluşturulan Primer adı ve dizileri.

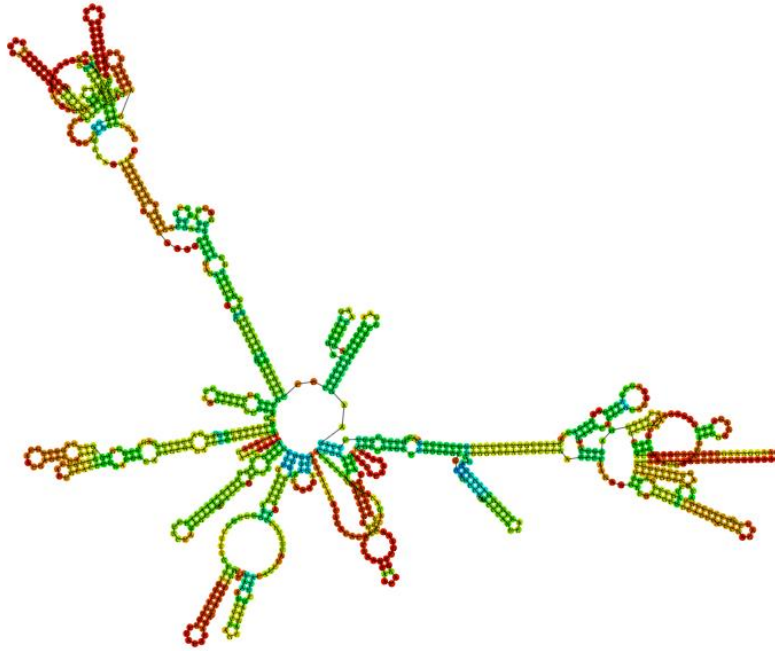
Primer Adı	Primer Dizisi (5'-3')
SMN2pro reverse (1)	AAGCTTGCCGCTGCTCATCGCCATAG
SMN2pro116bç forw (2)	CTCGAGTACTACAAGCGGTCCTCCC
SMN2pro223bç forw (3)	CTCGAGAAGGAAAGGAAATATAACAC
SMN2 pro457bç forw (4)	CTCGAGACACTGGAGTTCGAGACGAG
SMN2 pro618bç forw (5)	CTCGAGAAGGATCTGCCTTCCTTC
SMN2pro888bç forw (6)	CTCGAGGGAATATCTTGAGCTCAGGA

Promotorun %GC içeriği ve sekonder yapıları Bölüm 2.3.1'de anlatıldığı şekilde tespit edilmiştir. SMN2 promotor bölgesinin guanin sitozin bazlarınca zengin olduğu tespit edilmiştir. SMN2 geni promotor bölgesinin çoğaltılmasında karşılaşılan güçlüklerden de anlaşılacağı üzere genomda yüksek sekonder yapı gösteren guanin sitozin oranının fazlalığından kaynaklanmaktadır. Guanin sitozin oranının %60'ın üzerinde olduğu analiz edilmiştir. Guanin sitozin bölgeleri muhtemel GC adalarının tespitinde kullanılmaktadır. GC adaları DNA metilizasyonu ve promotorun transkripsiyonel regülasyonunda rol oynadığı için GC adalarının tespiti önem arz etmektedir. GC adalarının tespitinde ise obs/exp oranından yararlanılmaktadır. Bu oranın 0.6'dan büyük olduğu bölgeler muhtemel GC adaları olarak bilinmektedir. Bu bilgilerden yola çıkarak SMN2 geni promotor bölgesine ait 50 bç-100 bç, 400 bç-450 bç, 550 bç-600 bç ve 800-900 bç aralığında muhtemel GC adaları bulunduğu tespit edilmiştir. Bölüm 3.1 bahsedilen program kullanılarak GC adalarının tespiti yapılmıştır. Şekil 3.2'de GC adaları ve %GC içeriği gösterildiği gibidir.



Şekil 3.2: SMN2 geni promotor bölgesine ait guanin sitozin oranının, gözlenen oranı ile beklenen oranının karşılaştırılması ve guanin sitozin oranının bazlara yüzdelik değişiminin gösterimi.

SMN2 promotor bölgesi sekonder yapı analizi Bölüm 2.3.1’de anlatıldığı şekilde yapılmıştır. Yapılan analiz sonucunda Saç tokası yapısına ait $\Delta G = -375.95$ kcal/mol olarak tespit edilmiştir. Promotor bölgesinin sekonder yapısı Şekil 3.3’de gösterilmiştir.



Şekil 3.3: SMN2 geninin promotor bölgesini ait saç tokası yapısının gösterimi.

Muhtemel transkripsiyon bağlanma bölgeleri Bölüm 2.3.1’de anlatıldığı şekilde belirlendi. SMN2 promotoru bölgesine CEBP α , SP1, AP2 ve E2F gibi transkripsiyon faktörlerinin yoğunluklu olarak bağlandığı tespit edilmiştir. İleriki çalışmalar sitokinlerin bu bölgedeki regülasyonunu aydınlatmaya yönelik olacaktır. Bu çalışma ile bazal biyoinformatik veriler elde edilmiştir (Şekil 3.4).

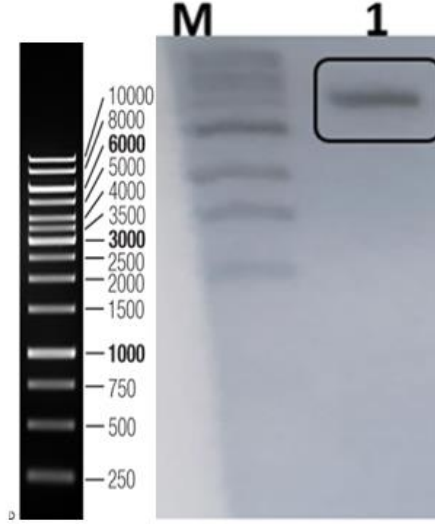


Şekil 3.4: Muhtemel transkripsiyon bağlanma bölgeleri; CEBP α , AP2, E2F ve SP1.

3.2 SMN2 Gen Promotorunun Klonlanması

3.2.1 Genomik DNA İzolasyonu

İnsan SMN2 geni promotor parçalarının klonlanması amacı ile Bölüm 2.3.2’de Belirtilen yöntem kullanılarak hücreden genomik DNA izolasyonu yapıldı. DNA Bölüm 2.3.3 de anlatıldığı şekilde Jel Elektrofrezinde %1’lik agoroz jelde 90 V’da yürütülerek görüntüldü. gDNA miktarı 639 ng/ μ L olarak tespit edilmiştir. Şekil 3.5’ de gDNA agoroz jel fotoğrafı gösterilmiştir.

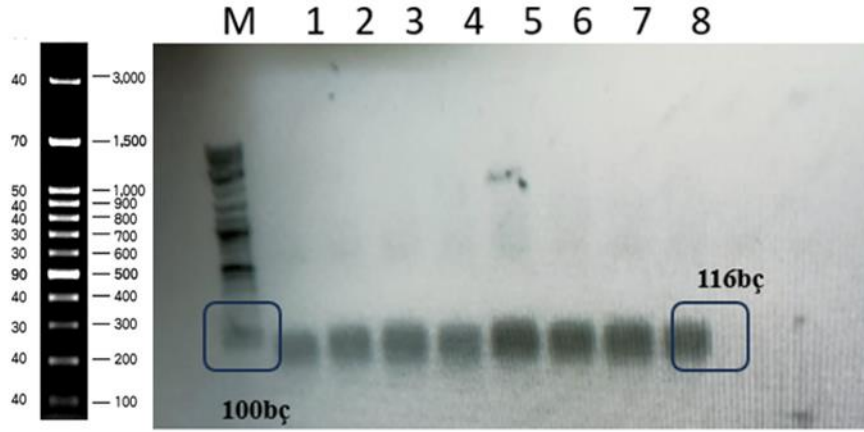


Şekil 3.5: %1'lik Agoroz Jel Elektroforezi görünüşü. M: 1kb marker (SM0311) 1: g DNA görüntüsü.

3.2.2 116 bç'lik Promotor Bölgesinin Klonlanması

3.2.2.1 116 bç'lik Promotor Parçasının PCR Reaksiyonu ile Çoğaltılması

SMN2 genine ait olan 116 bç'lik promotör bölgesi Bölüm 2.3.4 'de anlatıldığı şekil de 4 tüp reaksiyon hazırlarak PCR cihazında çoğaltıldı. DNA Bölüm 2.3.3 'de anlatıldığı gibi Jel Elektroforezinde %1'lik Agoroz jelde 90 V'da yürütülerek görüntüledi. Her bir kuyuya 25 µL PCR ürünü yüklenerek 8 kuyu gözlemlendi. Şekil 3.6 'de gözlemlendiği üzere kuyularda amplifikasyon söz konusudur.



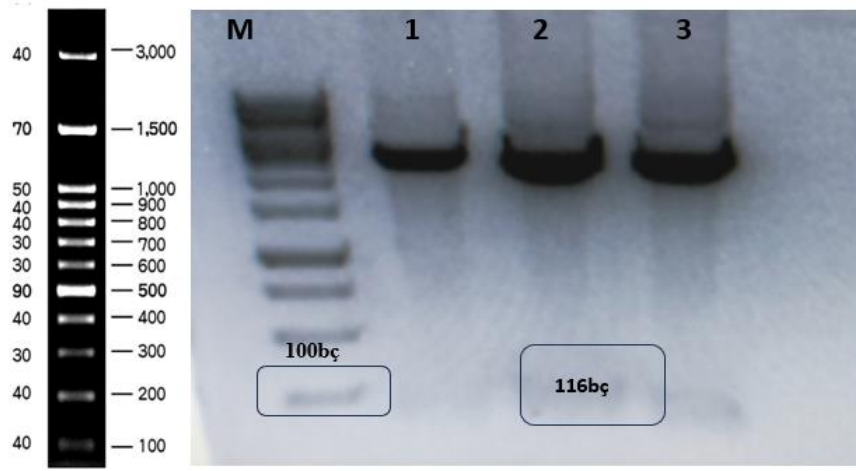
Şekil 3.6: 116 bç promotör gen bölgesi polimeraz zincir reaksiyonu jel elektroforezi görüntüsü. M: 1kb marker (SM0311) 1-2-3-4-5-6-7-8: SMN2 116 bç promotör gen bölgesi primer amplikasyon sonucu.

3.2.2.2 116 bç'lik Promotör Bölgesi PCR Ürünlerinin pGEM-T Easy Vektörüne

Klonlanması

SMN2 genin 116 bç'lik promotör bölgesi Bölüm 2.3.4'de belirtildiği gibi polimeraz zincir yöntemiyle çoğaltılmasının ardından Bölüm 2.3.3'de anlatıldığı şekilde Jel elektroforezinde %1'lik Agoroz jelde 90 V'da yürütülerek görüntülenmiş olup UV ışık altında kesilen bantlar Bölüm 2.3.6'da anlatıldığı gibi Jelden DNA saflaştırma yöntemi ile jelden geri kazanıldı. Saflaştırılan DNA Bölüm 2.3.7'de anlatıldığı şekli ile ligasyon reaksiyonu gerçekleştirildi. Elde edilen ligasyon ürünü Bölüm 2.3.10'da anlatıldığı gibi XL-1 Blue kompetant hücresi ile transformasyonu gerçekleştirildi. XL-1 Blue kompetant hücresi Bölüm 2.3.9'da anlatıldığı şekliyle hazırlandı. Transformasyonun ertesi günü beyaz koloniler seçilerek sıvı besiyerine ekildi ve 16 saat çalkalamalı inkübatörde inkübe edildikten sonra Bölüm 2.3.13'de anlatıldığı şekliyle mini prep izolasyonu yapıldı. Rekombinant kolonileri belirleyebilmek amacıyla XhoI ve HindIII restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanılarak Bölüm 2.3.12'de anlatıldığı şekilde kesimleri gerçekleştirildi. Bölüm 2.3.3 'de anlatıldığı şekliyle agaroz jel elektroforeziyle görüntülendi. Şekil 3.7'e göre 1,2 ve 3 numaralı kolonilerin pGEM-T Easy vektörüne klonlandıkları ve rekombinant oldukları görülmektedir.

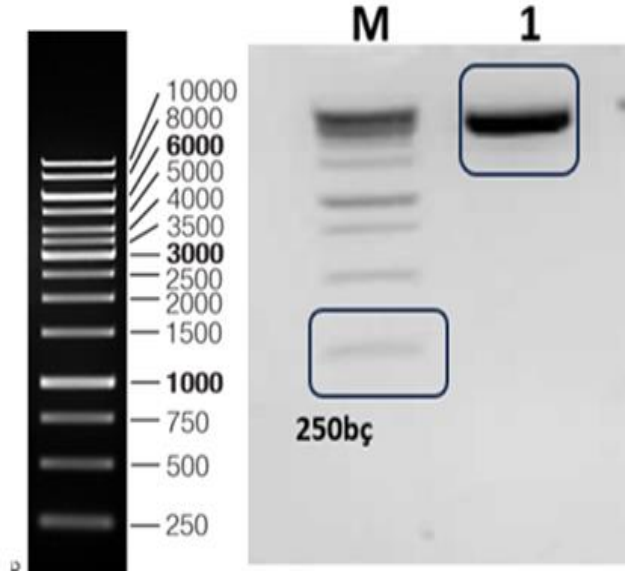
Şekil



3.7:SMN2 116 bç promotör gen bölgesi içeren 3 adet kolonin pGEM-T Easy Vektörü Restriksiyon Enzimleri ile Kesim sonucu. M: N32005 1-2-3: SMN2 116 bç promotör bölgesi içeren pGEM-T Easy vektörü XhoI ve HindIII ile kesilmesi sonucu oluşan rekombinant koloniler.

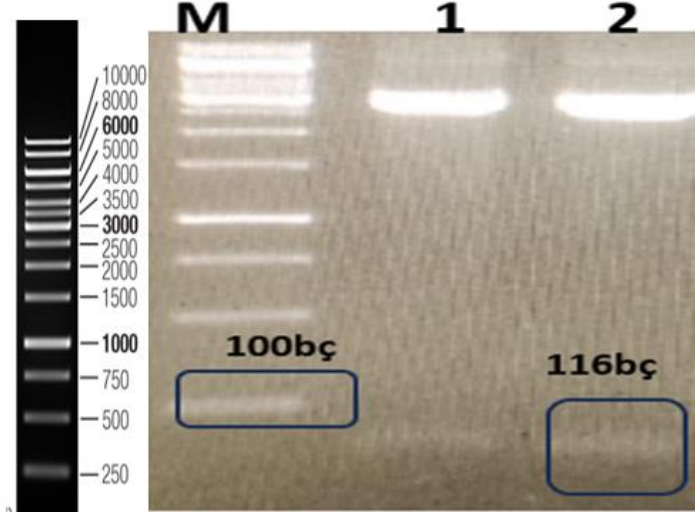
3.2.2.3 116 bç'lik Promotör Bölgesinin pMetLuc Vektörüne Alt Klonlanması

pMetLuc vektörü ait gliserol stok -80°C 'den çıkarılarak bir gece önceden tek koloni ekimi yapıldı. Bölüm 2.3.13 'de anlatıldığı şekliyle mini prep izolasyonu yapıldı. pMetLuc vektörüne ait plazmit Bölüm 2.3.12'de anlatıldığı şekilde XhoI ve HindIII restriksiyon endonükleaz enzimleriyle kesim reaksiyonu gerçekleştirildi. Şekil 3.8'de pMetLuc vektörüne ait kesim sonucu gösterilmiştir. XhoI/HindIII enzimleri ile kesilmiş pMetLuc vektörü Bölüm 2.3.6'da belirtildiği şekilde jelden geri kazanıldı.



Şekil 3.8: pMetLuc vektörü vektörüne ait mini prep izolasyonunun XhoI ve HindIII kesim sonucu jel elektroforez görüntüsü. (M: 1kb marker (SM0311) 1: pMetLuc vektörü.

pGEM-T Easy vektörüne ait rekombinant kolonilere ait olan Şekil 3.7’de gösterilen jel elektroforez sonucu elde edilmiş olan bantlar UV altında kesilerek Bölüm 2.3.6’da anlatıldığı gibi Jelden DNA saflaştırma yöntemi ile jelden geri kazanıldı. Saflaştırılan DNA Bölüm 2.3.7’de anlatıldığı şekli ile Şekil 3.8’de gösterilen pMeTLuc vektörüne ait jelden geri kazanımı ile ligasyon reaksiyonu gerçekleştirildi. Elde edilen ligasyon ürünü Bölüm 2.3.10’da anlatıldığı gibi DH5 α kompetant hücresi ile transformasyonu gerçekleştirildi. DH5 α kompetant hücresi Bölüm 2.3.9’da anlatıldığı şekliyle hazırlandı. Transformasyonun ertesi günü koloni seçilerek sıvı besiyerine ekildi ve 16 saat çalkalamalı inkübatörde inkübe edildikten sonra Bölüm 2.3.13 ’de anlatıldığı şekliyle mini prep izolasyonu yapıldı. Rekombinant kolonileri belirleyebilmek amacıyla XhoI ve HindIII restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanılarak Bölüm 2.3.12’de anlatıldığı şekilde kesimleri gerçekleştirildi. Bölüm 2.3.3 ’de anlatıldığı şekliyle agaroz jel elektroforeziyle görüntülendi. Şekil 3.9 ‘da 116 bç’ye ait rekombinant koloni gösterilmiştir.

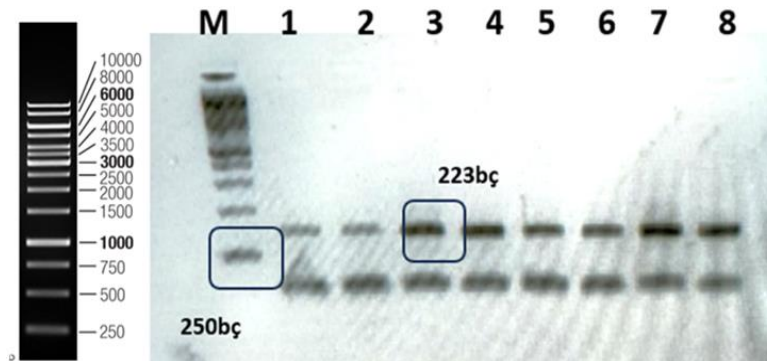


Şekil 3.9:M: SM0311; 1-2: 116bç'lik promotor bölgesine ait pMetLuc vektörü XhoI ve HindIII kesim sonucu jel elektroforez görüntüsü.

3.2.3 223 bç'lik Promotor Bölgesinin Klonlanması

3.2.3.1 223 bç'lik Promotor Parçasının PCR Reaksiyonu ile Çoğaltılması

SMN2 genine ait olan 223 bç'lik promotör bölgesi Bölüm 2.3.4 'de anlatıldığı şekilde 4 tüp reaksiyon hazırlanarak PCR cihazında çoğaltıldı. DNA Bölüm 2.3.3 'de anlatılan yol izlenmiş olup Herbir kuyuya 20'şer μ L yüklenerek 8 kuyu Jel Elektroforezinde %1'lik Agoroz jelde 90 V'da yürütülerek görüntülendi. Şekil 3.10'da gösterildiği gibi 223 bç'lik bölge çoğaltılmıştır.

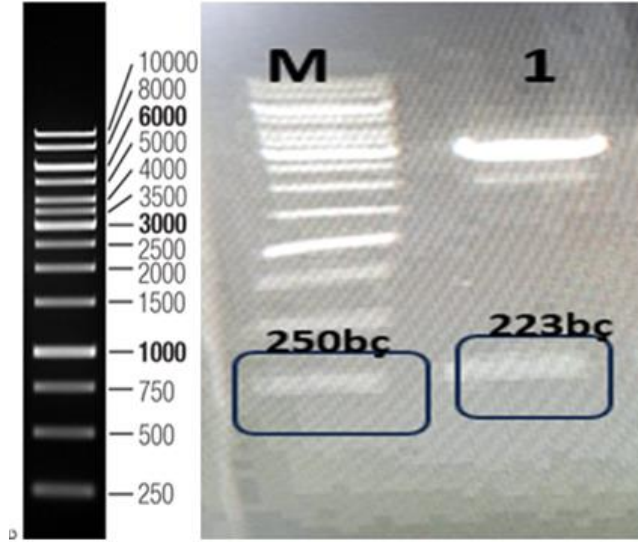


Şekil 3.10:SMN2 223 bç promotor bölgesinin PCR reaksiyonuna ait jel elektroforezi görüntüsü. (M:1kb marker (SM0311); 1-2-3-4-5-6-7-8-9-10-11-12: SMN2 223 bç promotör bölgesi amplikasyon sonucu.

3.2.3.2 223 bç'lik Promotor Bölgesi PCR Ürünlerinin pGEM-T Easy Vektörüne

Klonlanması

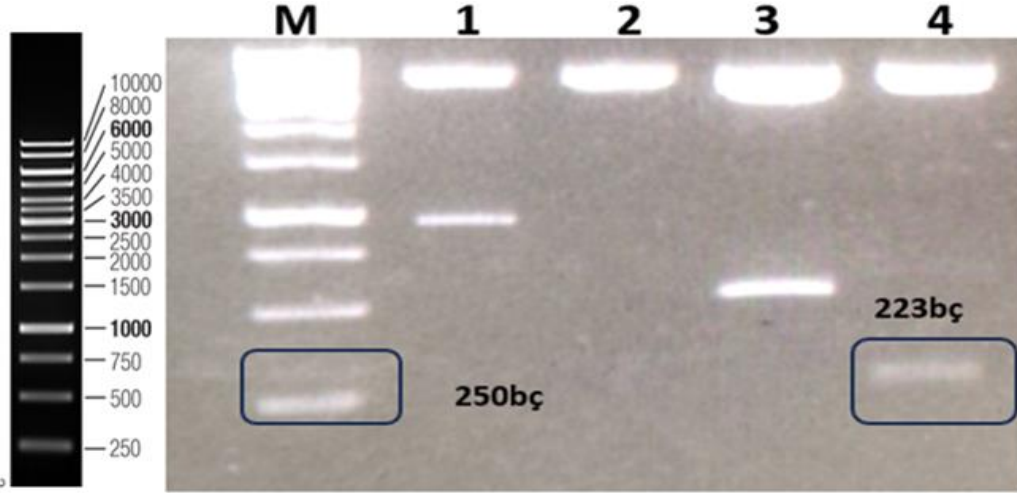
SMN2 genin 223 bç'lik promotör bölgesi Bölüm 2.3.4 de belirtildiği gibi polimeraz zincir reaksiyonu yöntemiyle çoğaltılmasının ardından Bölüm 2.3.3' de anlatıldığı şekilde Jel Elektroforezinde %1'lik Agoroz jelde 90 V'da yürütülerek görüntülenmiş olup UV ışık altında kesilen bantlar Bölüm 2.3.6'da anlatıldığı gibi Jelden DNA Saflaştırma Yöntemi ile jelden DNA saflaştırıldı. Saflaştırılan DNA Bölüm 2.3.7'de anlatıldığı şekli ile ligasyon reaksiyonu gerçekleştirildi. Elde edilen ligasyon ürünü Bölüm 2.3.10' da anlatıldığı gibi XL-1 Blue kompetant hücresi ile transformasyonu gerçekleştirildi. XL-1 Blue kompetant hücresi Bölüm 2.3.9'da anlatıldığı şekliyle hazırlandı. Transformasyonun ertesi günü beyaz koloniler seçilerek sıvı besiyerine ekildi ve 16 saat çalkalamalı inkübatörde inkübe edildikten sonra Bölüm 2.3.13 'de anlatıldığı şekliyle mini prep izolasyonu yapıldı. Rekombinant kolonileri belirleyebilmek amacıyla XhoI ve HindIII restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanılarak Bölüm 2.3.12'de anlatıldığı şekilde kesimleri gerçekleştirildi. Bölüm 2.3.3 'de anlatıldığı şekliyle Jel Elektroforeziyle görüntülendi. Şekil 3.11'de görüldüğü gibi 1 numaralı koloninin 223 bç vektörüne pGEM-T Easy vektörüne klonlandığı ve rekombinant koloni olduğu görülmektedir.



Şekil 3.11:SMN2 223 bç promotör gen bölgeleri içeren 1 adet koloninin pGEM-T Easy Vektörü Restriksiyon Enzimleri ile Kesim sonucu. (M: 1kb marker (SM0311);1: SMN2 223 bç promotör gen bölgesi içeren pGEM-T Easy vektörü XhoI ve HindIII ile kesilmesi sonucu oluşan rekombinant koloni.

3.2.3.3 223 bç'lik Promotör Bölgesinin pMetLuc Vektörüne Alt Klonlanması

pGEM-T Easy vektörüne ait rekombinant kolonilere ait olan Şekil 311'de gösterilen jel elektroforez sonucu elde edilmiş olan bant UV altında kesilerek Bölüm 2.3.6'da anlatıldığı gibi Jelden DNA saflaştırma yöntemi ile jelden geri kazanıldı. Saflaştırılan DNA ile pMetLuc vektörü xhoI/HindIII geri kazınımı Bölüm 2.3.7'de anlatıldığı şekli ile ligasyon reaksiyonu gerçekleştirildi. Elde edilen ligasyon ürünü Bölüm 2.3.10'da anlatıldığı gibi DH5 α kompetant hücresi ile transformasyonu gerçekleştirildi. DH5 α kompetant hücresi Bölüm 2.3.9'da anlatıldığı şekliyle hazırlandı. Transformasyonun ertesi günü koloni seçilerek sıvı besiyerine ekildi ve 16 saat çalkalamalı inkübatörde inkübe edildikten sonra Bölüm 2.3.13 'de anlatıldığı şekliyle mini prep izolasyonu yapıldı. Rekombinant kolonileri belirleyebilmek amacıyla XhoI ve HindIII restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanılarak Bölüm 2.3.12'de anlatıldığı şekilde kesimleri gerçekleştirildi. Bölüm 2.3.3 'de anlatıldığı şekliyle agaroz jel elektroforeziyle görüntülendi. Şekil 3.12 'de 223 bç'ye ait rekombinant koloni gösterilmiştir.

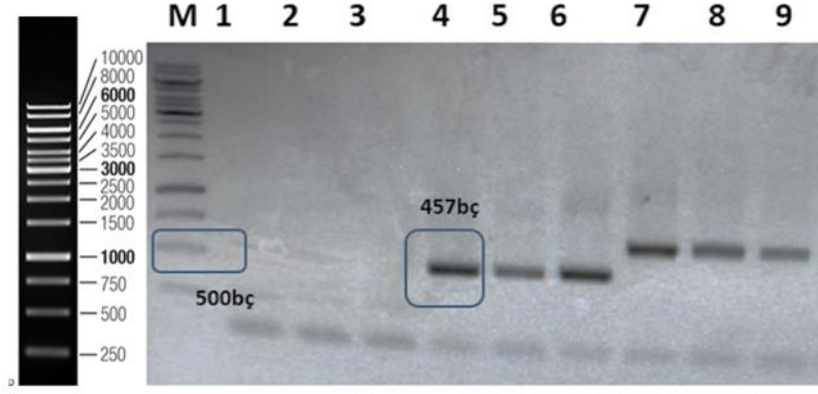


Şekil 3.12:SMN2 223bç, kolonin pMetLuc alt vektörü Restriksiyon Enzimleri ile Kesim sonucu. (M: 1kb marker (SM0311) 1: SMN2 888 bç promotör gen bölgesi içeren pMetLuc alt vektörü XhoI ve HindIII ile kesilmesi sonucu oluşan rekombinant koloniler.2: SMN2 618 bç promotör gen bölgesi içeren pMetLuc alt vektörü XhoI ve HindIII ile kesilmesi sonucu oluşan koloni. 3: SMN2 457 bç promotör gen bölgesi içeren pMetLuc alt vektörü XhoI ve HindIII ile kesilmesi sonucu oluşan koloni.4: SMN2 223 bç promotör gen bölgesi içeren pMetLuc alt vektörü XhoI ve HindIII ile kesilmesi sonucu oluşan rekombinat koloni.

3.2.4 457 bç'lik Promotor Parçasının Klonlanması

3.2.4.1 457 bç'lik Promotör Parçasının PCR Reaksiyonu ile Çoğaltılması

SMN2 genine ait olan 457 bç'lik promotör bölgesi Bölüm 2.3.4 'de anlatıldığı şekilde reaksiyon hazırlanarak PCR cihazında çoğaltıldı. DNA Bölüm 2.3.3' de anlatıldığı şekilde Jel Elektroforezinde %1'lik Agoroz jelde 90 V'da yürütülerek görüntülendi. Şekil 3.13.'de görüldüğü şekli ile 457 bç'ine ait 3 kuyu gözlenmektedir. Reaksiyon sonucu amplifikasyon gerçekleşmiştir. Şekil 3.13 'de görüldüğü şekliyle bantlar elde edilmiştir.

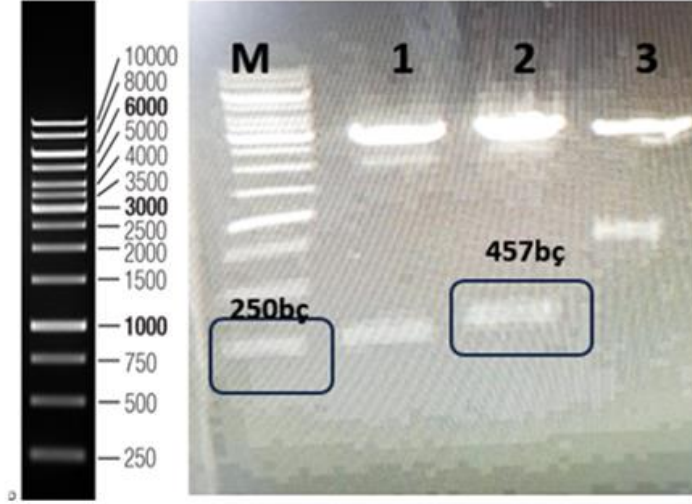


Şekil 3.13:223 bç promotör gen bölgesi polimeraz zincir reaksiyonu jel elektroforezi görüntüsü. (M: B7025S.1-2-3-: SMN2 geni 223 bç'lik promotör gen bölgesi amplikasyon sonucu.5-6-7: SMN2 geni 457 bç'lik promotör gen bölgesi amplikasyon sonucu.7-8-9: SMN2 geni 618 bç'lik promotör gen bölgesi amplikasyon sonucu.

3.2.4.2 457 bç'lik Promotör Bölgesi PCR Ürünlerinin pGEM-T Easy Vektörüne

Klonlanması

Şekil 3.13'de gösterilen bantların jelden geri kazanımı ile elde edilen DNA ve pGEMT-easy vektörü Bölüm 2.3.7'de anlatıldığı gibi ligasyon reaksiyonu gerçekleştirildi. Elde edilen ligasyon ürünü Bölüm 2.3.10' da anlatıldığı gibi XL-1 Blue kompetant hücresi ile transformasyonu gerçekleştirildi. XL-1 Blue kompetant hücresi Bölüm 2.3.9'da anlatıldığı şekliyle hazırlandı. Transformasyonun ertesi günü beyaz koloniler seçilerek sıvı besiyerine ekildi ve 16 saat çalkalamalı inkübatörde inkübe edildikten sonra Bölüm 2.3.13 'de anlatıldığı gibi mini prep izolasyonu yapıldı. Rekombinant kolonileri belirleyebilmek amacıyla XhoI ve HindIII restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanılarak Bölüm 2.3.12 'de anlatıldığı şekilde kesimleri gerçekleştirildi. Bölüm 2.3.3 'de anlatıldığı gibi Jel Elektroforeziyle görüntüledi. Şekil 3.14'e göre 2. koloni 457 bç'ye ait olup rekombinat koloni olup pGEM-T Easy vektörüne klonlanmıştır. Şekil 3.14'de özetlenmiştir.

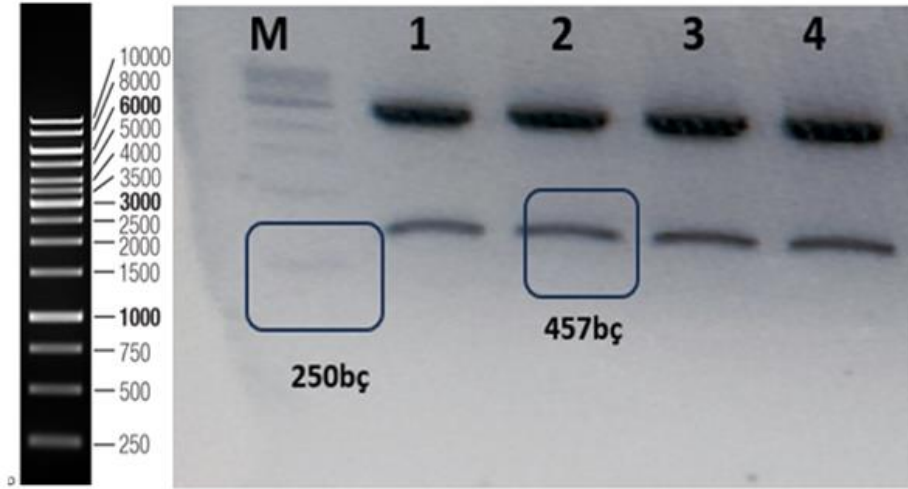


Şekil 3.14: SMN2 geni 457 bç promotör gen bölgesine ait pGEM-T Easy Vektörü klonlama yapılan kolonin restriksiyon enzimleri XhoI ve HindIII ile kesim sonucu jel elektroforez görüntüsü. (M: 1kb marker (SM0311) 1: SMN2 223 bç promotör gen bölgesi içeren pGEM-T Easy vektörü XhoI ve HindIII ile kesilmesi sonucu oluşan rekombinat koloni. 2: SMN2 457 bç promotör gen bölgesi içeren pGEM-T Easy vektörü XhoI ve HindIII ile kesilmesi sonucu oluşan rekombinat koloni.3: SMN2 618 bç promotör gen bölgesi içeren pGEM-T Easy vektörü XhoI ve HindIII ile kesilmesi sonucu oluşan rekombinat koloni.

3.2.4.3 457bç'lik Promotör Bölgesinin pMetLuc Vektörüne Alt Klonlanması

pGEM-T Easy vektörüne ait rekombinant kolonilere ait olan Şekil 314'de gösterilen jel elektroforez sonucu elde edilmiş olan bantlar UV altında kesilerek Bölüm 2.3.6'da anlatıldığı gibi Jelden DNA saflaştırma yöntemi ile jelden geri kazanıldı. Saflaştırılan DNA ve pMetLuc XhoI/HindIII geri kazanılmış vektörü Bölüm 2.3.7'de anlatıldığı şekli ile ligasyon reaksiyonu gerçekleştirildi. Elde edilen ligasyon ürünü Bölüm 2.3.10'da anlatıldığı gibi DH5 α kompetant hücresi ile transformasyonu gerçekleştirildi. DH5 α kompetant hücresi Bölüm 2.3.9'da anlatıldığı şekliyle hazırlandı. Transformasyonun ertesi günü koloni seçilerek sıvı besiyerine ekildi ve 16 saat çalkalamalı inkübatörde inkübe edildikten sonra Bölüm 2.3.13 'de anlatıldığı şekliyle mini prep izolasyonu yapıldı. Rekombinant kolonileri belirleyebilmek amacıyla XhoI ve HindIII restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanılarak Bölüm 2.3.12'de anlatıldığı şekilde kesimleri gerçekleştirildi. Bölüm 2.3.3 'de anlatıldığı

şekliyle agaroz jel elektroforeziyle görüntüledi. Şekil 3.12 'de 457 bç'ye ait rekombinant koloniler gösterilmiştir.

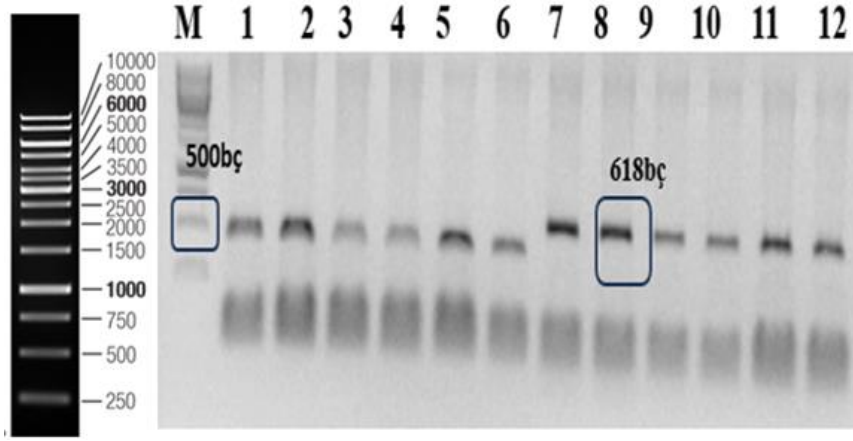


Şekil 3.15:SMN2 457 bç, promotor gen bölgeleri içeren 4 adet kolonin pMetLuc alt vektörü restriksiyon enzimleri XhoI ve HindIII ile kesim sonucunun jel elektroforez görüntüsü. (M: 1kb marker (SM0311), 1-2-3-4: SMN2 457 bç promotör gen bölgesi içeren pMetLuc alt vektörü XhoI ve HindIII ile kesilmesi sonucu oluşan rekombinant koloniler.

3.2.5 618 bç'lik Promotor parçasının klonlanması

3.2.5.1 618 bç'lik Promotör Parçasının PCR Reaksiyonu ile Çoğaltılması

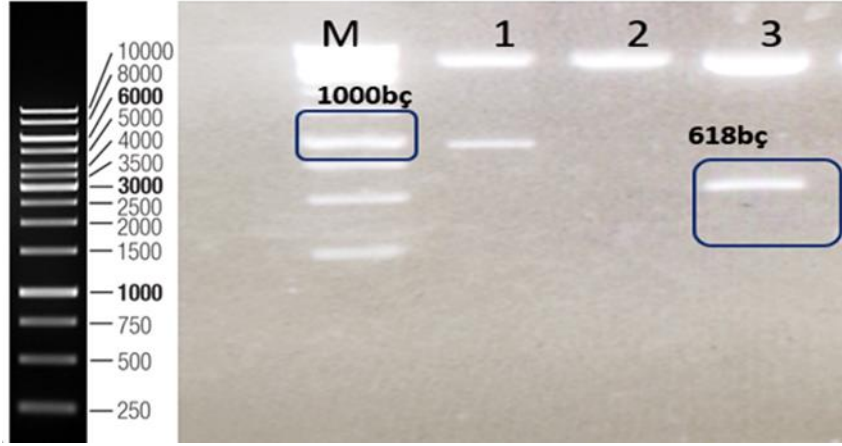
SMN2 genine ait olan 618 bç'lik promotör bölgesi Bölüm 2.3.4 'de anlatıldığı şekil de 6 tüp eş koşullarda hazırlanarak reaksiyon PCR cihazında çoğaltıldı. 20'şer μ L olmak üzere herbir kuyuya yüklendi. DNA Bölüm 2.3.3' de anlatıldığı şekilde Jel Elektroforezinde %1'lik Agoroz jelde 90 V'da yürütülerek görüntüledi. 618 bç'ye ait hazırlanan reaksiyonlar sonucunda ise amplikasyon gerçekleşmiş olup Şekil 3.16'da özetlenmiştir.



Şekil 3.16:618 bç promotör gen bölgesi polimeraz zincir reaksiyonu jel elektroforezi görüntüsü. (M: 1kb marker (SM0311), 1-2-3-4-5-6-7-8-9-10-11-12: 618 bç'lik promotör gen bölgesi amplikasyon sonucu.

3.2.5.2 618 bç'lik Promotör Bölgesi PCR Ürünlerinin pGEM-T Easy Vektörüne Klonlanması

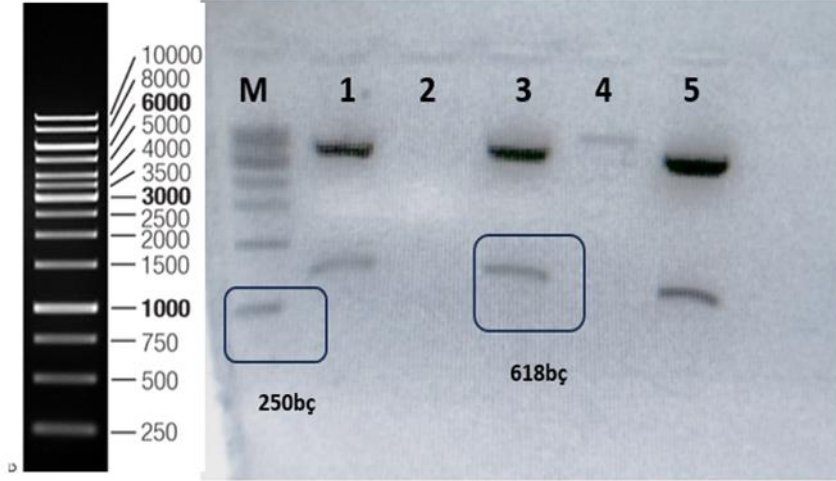
SMN2 genin 618 bç'lik promotör bölgesi Bölüm 2.3.4 'de belirtildiği gibi polimeraz zincir yöntemiyle çoğaltılmasının ardından Bölüm 2.3.3' de anlatıldığı gibi Jel Elektroforezinde %1'lik Agoroz jelde 90 V'da yürütülerek görüntülenmiş olup UV ışık altında kesilen bantlar Bölüm 2.3.6'da anlatıldığı gibi Jelden DNA Saflaştırma Yöntemi ile jelden DNA saflaştırıldı. Saflaştırılan DNA Bölüm 2.3.7'de anlatıldığı gibi ligasyon reaksiyonu gerçekleştirildi. Elde edilen ligasyon ürünü Bölüm 2.3.10' da anlatıldığı gibi XL-1 Blue kompetant hücresi ile transformasyonu gerçekleştirildi. XL-1 Blue kompetant hücresi Bölüm 2.3.9'da anlatıldığı şekliyle hazırlandı. Transformasyonun ertesi günü beyaz koloniler seçilerek sıvı besiyerine ekildi ve 16 saat çalkalamalı inkübatörde inkübe edildikten sonra Bölüm 2.3.13 'de anlatıldığı şekliyle mini prep izolasyonu yapıldı. Rekombinant kolonileri belirleyebilmek amacıyla XhoI ve HindIII restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanılarak Bölüm 2.3.12 'de anlatıldığı şekilde kesimleri gerçekleştirildi. Bölüm 2.3.3 'de anlatıldığı gibi Jel Elektroforeziyle görüntülendi. 3 numaralı koloni 618 bç'ye ait olup pGEM-T Easy vektörüne klonlandığı ve rekombinant olduğu Şekil 3.17'de özetlenmiştir.



Şekil 3.17:SMN2 geni 618 bç promotor gen bölgesi içeren kolonin pGEM-T Easy vektörü restriksiyon enzimleri XhoI ve HindIII ile kesim sonucunun jel elektroforez görüntüsü. (M: 1kb marker (SM0311)1: SMN2 888 bç promotor gen bölgesi içeren pGEM-T Easy vektörü XhoI ve Hind3 ile kesilmesi sonucu oluşan rekombinat koloni. 2: SMN2 888 bç promotor gen bölgesi içeren pGEM-T Easy vektörü XhoI ve Hind3 ile kesilmesi sonucu oluşan rekombinat olmayan koloni 3: SMN2 618 bç promotor gen bölgesi içeren pGEM-T Easy vektörü XhoI ve Hind3 ile kesilmesi sonucu oluşan rekombinat koloni.

3.2.5.3 618 bç'lik Promotör Bölgesinin pMetLuc Vektörüne Alt Klonlanması

pGEM-T Easy vektörüne ait rekombinant kolonilere ait olan Şekil 3.17'de gösterilen jel elektroforez sonucu elde edilmiş olan bantlar UV altında kesilerek Bölüm 2.3.6'da anlatıldığı gibi Jelden DNA saflaştırma yöntemi ile jelden geri kazanıldı. Saflaştırılan DNA Bölüm 2.3.7'de anlatıldığı şekli ile ligasyon reaksiyonu gerçekleştirildi. Elde edilen ligasyon ürünü Bölüm 2.3.10'da anlatıldığı gibi DH5 α kompetant hücresi ile transformasyonu gerçekleştirildi. DH5 α kompetant hücresi Bölüm 2.3.9'da anlatıldığı şekliyle hazırlandı. Transformasyonun ertesi günü koloni seçilerek sıvı besiyerine ekildi ve 16 saat çalkalamalı inkübatörde inkübe edildikten sonra Bölüm 2.3.13 'de anlatıldığı şekliyle mini prep izolasyonu yapıldı. Rekombinant kolonileri belirleyebilmek amacıyla XhoI ve HindIII restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanılarak Bölüm 2.3.12'de anlatıldığı şekilde kesimleri gerçekleştirildi. Bölüm 2.3.3 'de anlatıldığı şekliyle agaroz jel elektroforeziyle görüntülendi. Şekil 3.18 'de 618 bç'ye ait rekombinant koloniler gösterilmiştir.

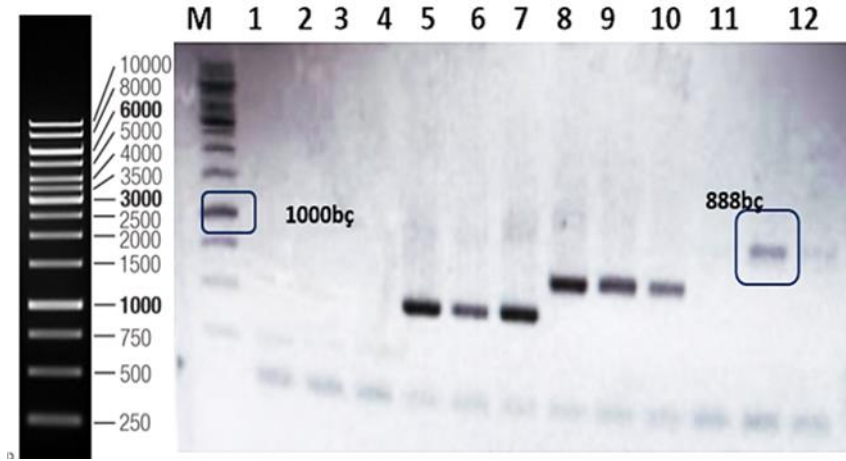


Şekil 3.18:SMN2 geni 618 bç promotor gen bölgesi içeren 5 adet kolonin pMetLuc alt vektörü klonlanması restriksiyon enzimleri XhoI ve HindIII ile kesim sonucunun jel elektroforezi görüntüsü. (M: 1kb marker (SM0311)1-3-5: 1: SMN2 618 bç promotör gen bölgesi içeren pMetLuc alt vektörü XhoI ve HindIII ile kesilmesi sonucu oluşan rekombinant koloniler.2-4: SMN2 618 bç promotör gen bölgesi içeren pMetLuc alt vektörü XhoI ve HindIII ile kesilmesi sonucu oluşan rekombinant olmayan koloniler.

3.2.6 888 bç'lik Promotor Bölgesinin Klonlanması

3.2.6.1 888 bç'lik Promotör Parçasının PCR Reaksiyonu ile Çoğaltılması

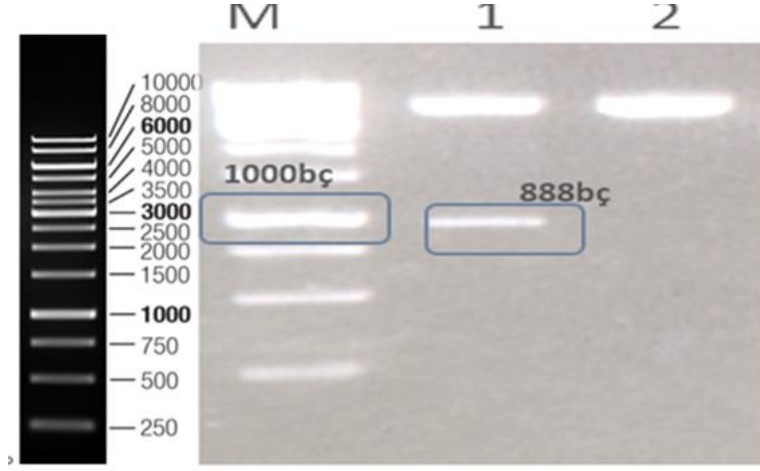
SMN2 genine ait olan 888 bç'lik promotör bölgesi Bölüm 2.3.4 'de anlatıldığı gibi reaksiyon hazırlanarak PCR cihazında çoğaltılmıştır. DNA Bölüm 2.3.3' de anlatıldığı gibi Jel Elektroforezinde %1'lik Agoroz jelde 90 V'da yürütülerek görüntülendi. 2 tüpler polimeraz zincir reaksiyonu hazırlanmış olup reaksiyon sonucu bant elde edilmiştir. 888 bç'ye ait hazırlanan reaksiyon sonucunda ise amplikasyon gerçekleşmiş olup Şekil 3.19'da özetlenmiştir.



Şekil 3.19:SMN2 geni 888 bç promotor gen bölgesi polimeraz zincir reaksiyonu jel elektroforezi görüntüsü. (M: 1kb marker (SM0311)1-2-3-4: SMN2 geni 223 bç'lik promotor gen bölgesi amplikasyon sonucu.5-6-7: SMN2 geni 457 bç'lik promotor gen bölgesi amplikasyon sonu. 8-9-10: SMN2 geni 618 bç'lik promotor gen bölgesi amplikasyon sonucu. 11-12: SMN2 geni 888 bç'lik promotor gen bölgesi amplikasyon sonucu.

3.2.6.2 888 bç'lik Promotor Bölgesi PCR Ürünlerinin pGEM-T Easy Vektörüne Klonlanması

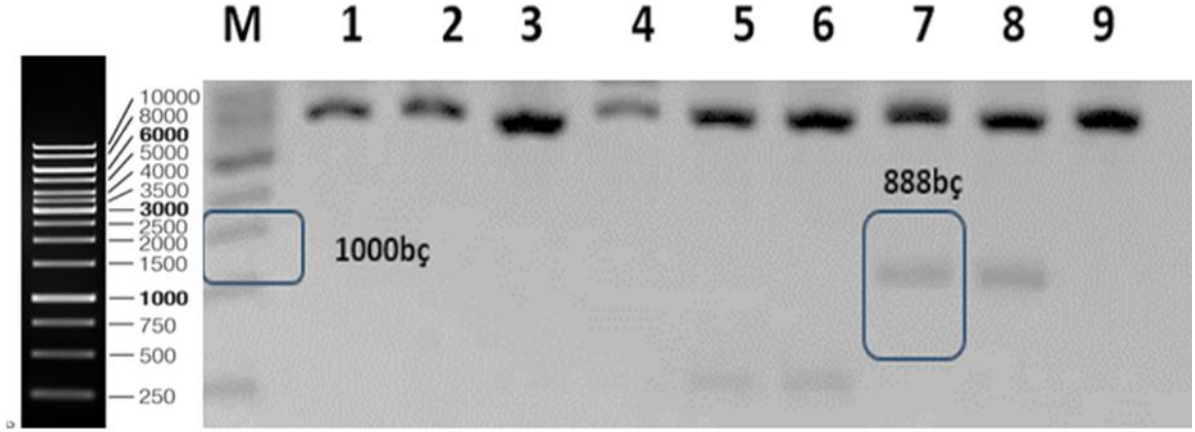
SMN2 genin 888bç'lik promotör bölgesi Bölüm 2.3.4 'de belirtildiği gibi polimeraz zincir yöntemiyle çoğaltılmasının ardından Bölüm 2.3.3' de anlatıldığı gibi jel elektroforezinde %1'lik Agoroz jelde 90 V'da yürütülerek görüntülenmiş olup UV ışık altında kesilen bantlar Bölüm 2.3.6 'da anlatıldığı gibi Jelden DNA Saflaştırma Yöntemi ile jelden DNA saflaştırıldı. Saflaştırılan DNA Bölüm 2.3.7'de anlatıldığı gibi ligasyon reaksiyonu gerçekleştirildi. Elde edilen ligasyon ürünü Bölüm 2.3.10' da anlatıldığı gibi XL-1 Blue kompetant hücresi ile transformasyonu gerçekleştirildi. XL-1 Blue kompetant hücresi Bölüm 2.3.9'da anlatıldığı şekliyle hazırlandı. Tarsformasyonun ertesi günü beyaz koloniler seçilerek sıvı besiyerine ekildi ve 16 saat çalkalamalı inkübatörde inkübe edildikten sonra Bölüm 2.3.13 'de anlatıldığı şekliyle mini prep izolasyonu yapıldı. Rekombinant kolonileri belirleyebilmek amacıyla XhoI ve HindIII restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanılarak Bölüm 2.3.12 'de anlatıldığı gibi kesimleri gerçekleştirildi. Bölüm 2.3.3 'de anlatıldığı şekliyle Jel Elektroforeziyle görüntüledi. 1ve 2 numaralı koloniler 888 bç' ait olup 1 numaralı rekombinant olup pGEM-T Easy vektörüne klonlandığı Şekil 3.20'de özetlenmiştir.



Şekil 3.20:SMN2 geni 888 bç promotor gen bölgeleri içeren kolonilerin pGEM-T Easy Vektörü Restriksiyon Enzimleri ile Kesim sonucu. (M: 1kb marker (SM0311), 1: SMN2 888 bç promotör gen bölgesi içeren pGEM-T Easy vektörü XhoI ve Hind3 ile kesilmesi sonucu oluşan rekombinat koloni. 2: SMN2 888 bç promotör gen bölgesi içeren pGEM-T Easy vektörü XhoI ve HindIII ile kesilmesi sonucu oluşan rekombinat olmayan koloni.

3.2.6.3 888 bç'lik Promotor Bölgesinin pMetLuc Vektörüne Alt Klonlanması

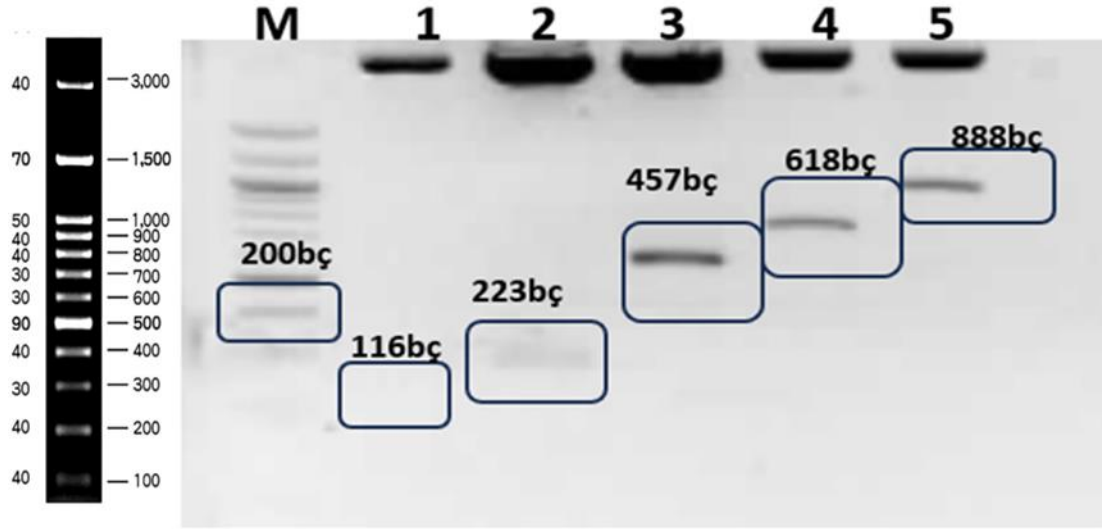
pGEM-T Easy vektörüne ait rekombinant kolonilere ait olan Şekil 3.20'de gösterilen jel elektroforez sonucu elde edilmiş olan bant UV altında kesilerek Bölüm 2.3.6'da anlatıldığı gibi Jelden DNA saflaştırma yöntemi ile jelden geri kazanıldı. Saflaştırılan DNA Bölüm 2.3.7'de anlatıldığı şekli ile ligasyon reaksiyonu gerçekleştirildi. Elde edilen ligasyon ürünü Bölüm 2.3.10'da anlatıldığı gibi DH5α kompetant hücresi ile transformasyonu gerçekleştirildi. DH5α kompetant hücresi Bölüm 2.3.9'da anlatıldığı şekliyle hazırlandı. Transformasyonun ertesi günü koloni seçilerek sıvı besiyerine ekildi ve 16 saat çalkalamalı inkübatörde inkübe edildikten sonra Bölüm 2.3.13 'de anlatıldığı şekliyle mini prep izolasyonu yapıldı. Rekombinant kolonileri belirleyebilmek amacıyla XhoI ve HindIII restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanılarak Bölüm 2.3.12'de anlatıldığı şekilde kesimleri gerçekleştirildi. Bölüm 2.3.3 'de anlatıldığı şekliyle agaroz jel elektroforeziyle görüntülendi. Şekil 3.21 'de 888 bç'ye ait rekombinant koloniler gösterilmiştir.



. **Şekil 3.21:**SMN2 geni 888 bç promotör gen bölgeleri içeren 2 adet kolonin pMetLuc alt vektörüne klonlanamsı restriksiyon enzimleri XhoI ve HindIII ile kesim sonucunun jel elektroforez görüntüsü. (M: 1kb marker (SM0311), 1-2-3: SMN2 223 bç promotör gen bölgesi içeren pMetLuc alt vektörü XhoI ve Hind3 ile kesilmesi sonucu oluşan rekombinat olmayan koloni. 4: SMN2 618 bç promotör gen bölgesi içeren pMetLuc alt vektörü XhoI ve Hind3 ile kesilmesi sonucu oluşan rekombinat olmayan koloni. 5-6: SMN2 618 bç promotör gen bölgesi içeren pMetLuc alt vektörü XhoI ve HindIII ile kesilmesi sonucu oluşan rekombinat koloniler. 7-8: SMN2 888 bç promotör gen bölgesi içeren pMetLuc alt vektörü XhoI ve HindIII ile kesilmesi sonucu oluşan rekombinat koloniler. 9: SMN2 888 bç promotör gen bölgesi içeren pMetLuc alt vektörü XhoI ve Hind3 ile kesilmesi sonucu oluşan rekombinat olmayan koloni

3.2.6.4 SMN2 Geni Promotor Parçalarının Orta Ölçekli İzolasyonu

Büyük miktarda ve transfekte edilebilecek saflıkta plazmit DNA izolasyonu Bölüm 2.3.14 'de anlatıldığı şekilde yapıldı. Kit olarak MACHEREY-NAGEL'den alınmış olan NucleoBond Xtra EF Plasmid Purification Kit kullanıldı. Kit protokolüne uygun davranılarak 5 konstraktın herbiri için ayrı ayrı midi prep izolasyonu gerçekleştirildi. Konstraktlara ait DNA içeriği Bölüm 2.3.3' de anlatıldığı gibi jel elektroforezinde %1'lik Agoroz jelde 90 V'da yürütülerek görüntülendi. 5 konstrakta ait olan midi prep izolasyonunun restriksiyon enzimleri XhoI ve HindIII ile kesim sonucunun jl elektroforez görüntüsü Şekil 3.22'de özetlenmiştir.



Şekil 3.22:SMN2 geni 116 bç, 223 bç, 457 bç 618 bç ve 888 bç'ye ait promotor gen bölgelerinin orta ölçekli izolasyonunun restriksiyon enzimleri XhoI ve HindIII kesim sonucunun jel elektroforezi görüntüsü. (M: B7025S1: SMN2 116 bç promotor gen bölgesi 2: SMN2 223 bç promotor gen bölgesi 3: SMN2 457 bç promotor gen bölgesi 4: SMN2 618 bç promotor gen bölgesi 5: SMN2 888 bç promotor gen bölgesi.

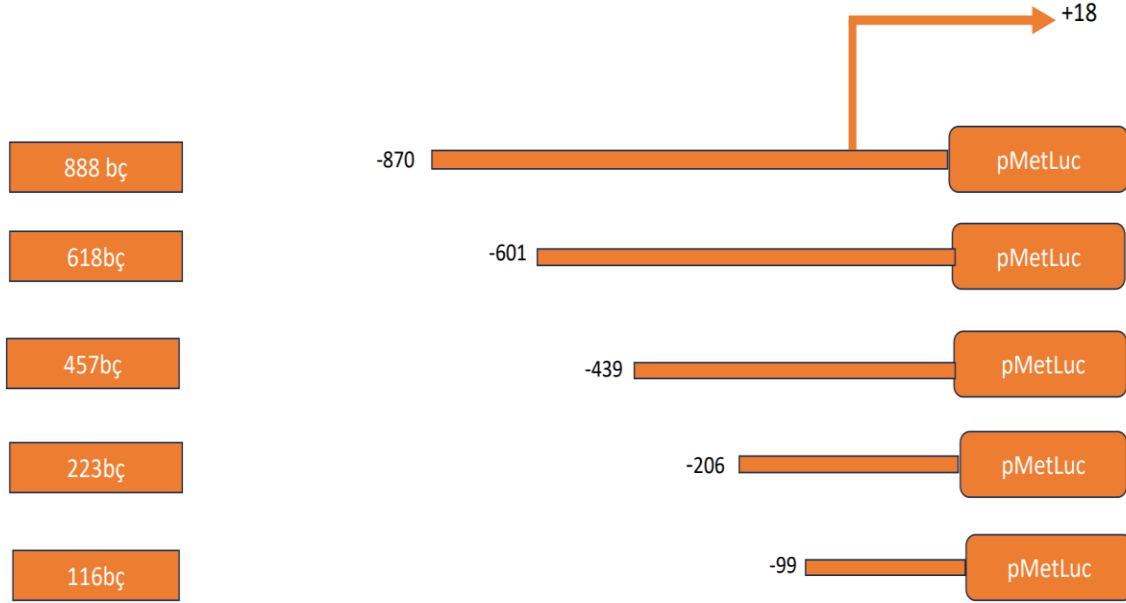
3.3 Hücre Kültürü ile İlgili Teknikler

3.3.1 Hep3B Hücrelerinin Büyütülmesi

Çalışmanın ilk aşaması olarak Bölüm 2.4.1 de anlatıldığı şekilde hücre kültürü besiyerleri ve Bölüm 2.4.2'da anlatılan şekilde FCS hazırlandı. Bölüm 2.4.3 'de anlatıldığı şekilde -80 derin dondurucuda saklanan hücreler açıldı. Açılan hücreler Bölüm 2.4.4 'de anlatıldığı şekilde pasajlamaları gerçekleştirildi. Son olarak Bölüm 2.4.5 'de anlatılan şekilde hücre sayımı gerçekleştirilerek 48'lik Well plate aktarımı gerçekleştirildi.

3.3.2 Kalsiyum-Fosfat Yöntemi ile Geçici Transfeksiyon Yapılması

Bölüm 2.4.6'da anlatıldığı şekil de transfeksiyon basamakları takip edilerek Kalsiyum-Fosfat Yöntemiyle geçici transfeksiyon gerçekleştirildi. pMetLuc vektörü içerisine klonlaması gerçekleştirilen 116 bç, 223 bç, 457 bç, 618 bç ve 888 bç promotor konstraktları Şekil 3.21'de şematize edilmiştir. Konstraktlar 1µg olacak şekilde tranfekte edilmiştir.



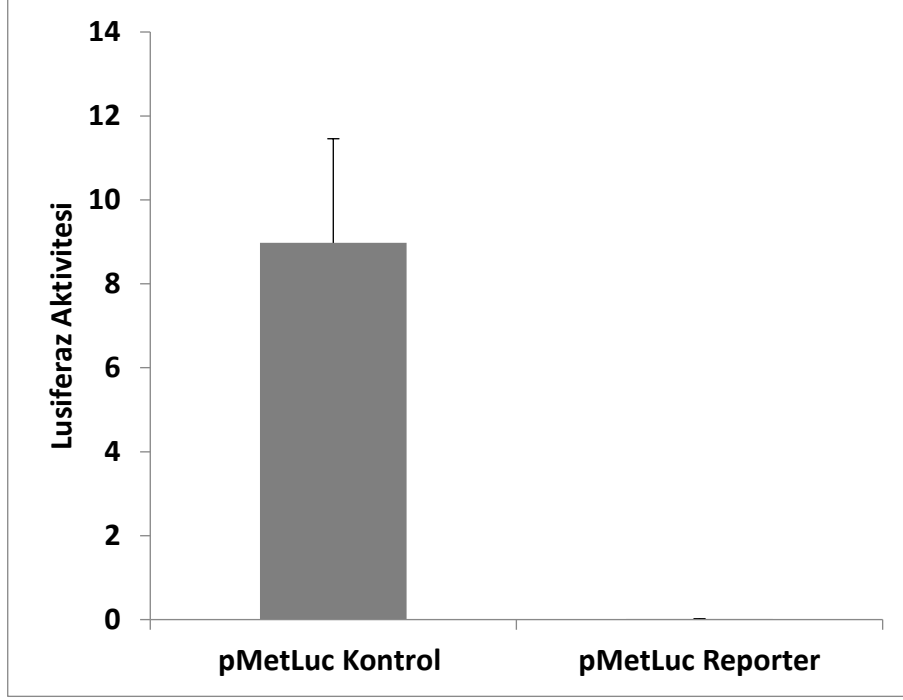
Şekil 3.23: pMetLuc vektörü içerisine klonlanan 116 bç, 223 bç, 457 bç, 618 bç ve 888 bç SMN promotor bölgelerine ait şema.

3.3.3 Lusiferaz Aktivitesinin Belirlenmesi

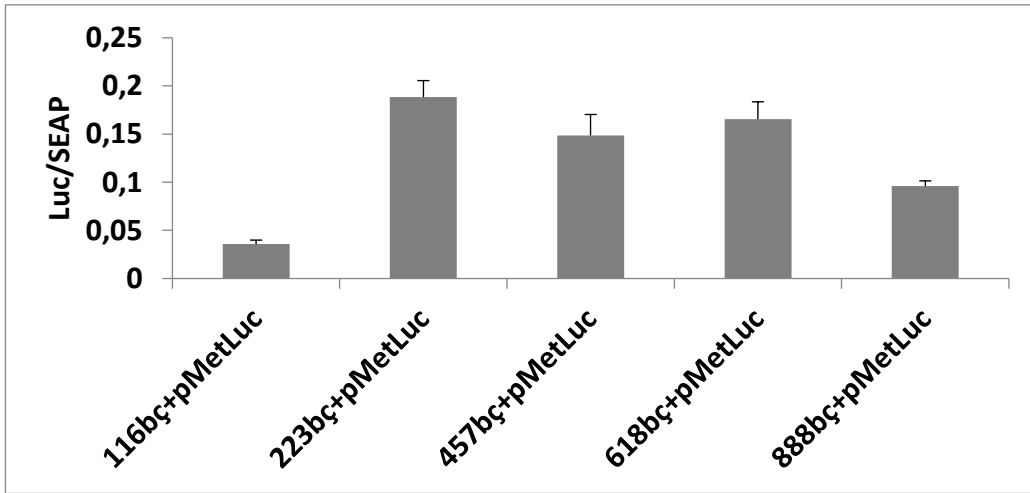
SMN2 genine ait promotor parçalarının bazal aktivitesini belirlemek amacı ile Bölüm 2.4.6’da anlatılan şekilde yapılmış olan Kalsiyum-Fosfat Geçici Transfeksiyon sistemi içerisine salınan sistem Bölüm 2.4.7’de anlatılan şekilde yaptığımız Lusiferaz yöntemi kullanılarak ölçümler alınmış olup sonuçlar grafikize edilmiştir.

3.3.4 SEAP Aktivitesinin Belirlenmesi

Bölüm 2.4.6’da anlatılan şekilde yapılmış olan Kalsiyum-Fosfat Geçici Transfeksiyon sistemi içerisine salınan sistem Bölüm 2.4.8 anlatılan şekli ile yapılmış olan SEAP aktivitesi yöntemi ile ölçüm alınarak SEAP aktiviteleri belirlenmiş olup değerler Luminometrede ölçülmüştür. Lusiferaz aktivitesinin SEAP aktivitesine bölünmesi ile relatif bazal aktivite belirlenmiştir. Yapılan çalışmalarda 48 saatte transkfeziyonun çalıştığı alınan pMetLuc kontrol ve reporter lusiferaz sonuçları üzerinden yorumlanmıştır. pMetLuc kontrol vektörü ve pMetLuc reporter lusiferaz aktivitesine ait sonuçlar Şekil 3.18’de gösterildiği gibidir. Promotor parçalarının bazal aktivite sonuçları Şekil 3.19’da gösterildiği gibidir. Yapılan analiz sonucunda en yüksek aktivitenin 223 bç’lik promotor parçasına ait olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 3.24:pMetLuc kontrol ve pMetLuc Reporter vektöre ait luminometrede alınan lusiferaz aktivite sonuçları.



Şekil 3.25: SMN2 promotor parçalarına ait Luc/SEAP sonuçları

Herbir konstrakta ait bazal aktivite gözlenmiş olup en yüksek bazal aktivite 2. konstrakta aittir. İlerleyen aşamalarda muhtemel transkripsiyon bağlanma bölgeleri ilişkili deneylere devam edilecektir.

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Spinal Müsküler Atrofi (SMA) omurilikte yer alan alfa motor nöronların dejenerasyonu sonucu meydana gelen otozomal resesif kalıtsal bir hastalıktır. Dünya da Kistik Fibrozisten sonra çocukluk çağında görülen en yaygın ikinci otozomal resesif kalıtsal hastalık olarak bilinmektedir. [1]. Bu otozomal resesif nöromüsküler hastalığa SMN1 geninde meydana gelen çeşitli mutasyonların sebep olduğu bilinmekle beraber bu mutasyonların neden olduğu bozukluk, SMN protein seviyelerinde azalmaya neden olmaktadır. Yapılan çalışmalarda SMA hastalığına neden olan en önemli etken genin SMN1 geninin delesyonu olduğu tespit edilmiştir [6].

Esas hastalık etmeni olan SMN1'in homozigot yokluğu ve SMN2 kopya sayısının artması hastalığın iyi prognoz seyri ile ilişkisinin olması çalışmaları SMN2 gen ifadesini arttırmaya yöneltmiştir. Nitekim yapılan çalışmalarda SMN2 gen sayısının 1 ila 4 arasında değiştiği ve gen kopya sayısı arttıkça hastalık seyrinin hafiflediği gözlenmiştir [15].

Yapılan bir çalışmaya göre insan ve fare SMN promotorları üzerinde biyoinformatik olarak yüksek oranda benzerlik gösteren 7 bölge belirlenmiştir. Ek olarak bu bölgelerin konsensüs sekansı içerdiği görülmüştür. Konsensüs dizileri türler arası korunmuş bölgelerde bulunan spesifik dizilerdir ve transkripsiyon faktörlerinin bağlanma bölgelerini tanımlarına yardımcı olmaktadır [75].

Tezin ilk aşamasında, ilk defa SMN2 gen promotor bölgesi detaylı biyoinformatik analize tabii tutulmuştur. NM_017411 kayıt numarası ile SMN2 varyant D'nin ön kısmına NCBI Sequence viewer sitesi üzerinden ilenmiştir. SMN2 geninin mRNA özellikleri, başlama ve bitiş kodonları, ekzon ve intron bölgeleri ve SMN2 genine ait promotor parçalarını çoğaltmak üzere 5 ileri ve bir geri primer dizayn edilmiştir. Manuel olarak dizayn edilmiş olan primerlerin spesifik olup olmadığını <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> adresi üzerinden kontrol edildi. Restriksiyon mapper version 3 programı kullanılarak restriksiyon haritası belirlendi. XhoI ve HindIII enzimleri restriksiyon endonükleaz enzimleri olarak kullanıldı.

Promotor bölgelerinde bulunan GC oranının belirlenmesi amacıyla https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/ adresi üzerinden yapıldı. Guanin sitozin oranının %60'ın üzerinde olduğu analiz edildi. Guanin sitozin bölgeleri muhtemel GC adalarının tespitinde kullanılmaktadır. GC adalarının tespitinde ise obs/exp oranından yararlanılmaktadır. Bu oranın 0.6'dan büyük olduğu bölgeler muhtemel GC adaları olarak bilinmektedir. Bu bilgilerden yola çıkarak SMN2 geni promotor bölgesine ait 50 bç-100 bç, 400 bç-450 bç, 550 bç-600 bç ve 800-900 bç aralığında muhtemel GC adaları bulunduğu tespit edildi.

<http://www.mfold.rna.albany.edu/?q=mfold/DNA-Folding-Form> adresi kullanılarak oluşturduğu sekonder yapıların analizi yapıldı. Yapılan analiz sonucunda saç tokası yapısına ait $\Delta G = -375.95$ kcal/mol olarak tespit edildi.

Bu bölgeye bağlanabilecek muhtemel transkripsiyon faktörleri ise Allgen Promo programı kullanılarak belirlendi. SMN2 promotoru bölgesine CEBP α , SP1, AP2 ve E2F gibi transkripsiyon faktörlerinin yoğunluklu olarak bağlandığı tespit edilmiştir. İleriki çalışmalar sitokinlerin bu bölgedeki regülasyonunu aydınlatmaya yönelik olacaktır. Bu çalışma ile bazal biyoinformatik veriler elde edilmiştir.

Tezin ikinci aşamasında ise ilk defa, 5 adet SMN2 promotor 5' delesyonlu konstraktlar pMetLuc vektörü üzerine klonlanarak oluşturulmuştur. SMN2 promotoruna ait 888bç, 618bç, 457bç, 223bç, 116bç olmak üzere beş adet gen bölgesi için tasarlanan primerler baz alınarak PCR yöntemi aracılığı ile promotor gen bölgeleri çoğaltıldı. Çoğaltılan gen bölgeleri Jel elektroforezi yöntemi aracılığı ile yürütüldü. Elde edilen bantlar UV ışık altında kesildi. Jelden DNA saflaştırma yöntemi kullanılarak DNA fragmentleri izole edildi. Ligasyon kuruldu. XL-1 Blue kompetant hücreleri kullanılarak pGEM-T Easy vektörüne klonlama yapıldı. Restriksiyon endonükleaz enzimleri olan HinIII ve XhoI kullanılarak kesim gerçekleştirilerek rekombinant koloniler belirlendi. Rekombinant kolonilerin mini prep izolasyonu yapıldı. Daha sonra pMetLuc alt vektörüne klonlama yapılarak midi prep izolasyonu yapıldı. Oluşturulan konstraktlar Hep3B hücrelerine transfekte edilerek bazal promotor aktiviteleri belirlenmiştir. Yapılan çalışma sonucunda

ikinci kontrat (223bç) core promotor bölgesi olarak belirlenmiştir. En yüksek aktiviteye sahiptir.

Litraturdeki çalışmalar genellikle alternatif splicing mekanizmasının düzenlenmesine yönelik çalışmalardır. Özellikle bu kapsamda HDAC inhibitörleri kullanılarak splicing mekanizmasının aydınlatılabileceğinin tespit edilmesinin ardından SMN2 promotor çalışmaları başlamış olup 7. ekzonun dahil edilmesi amacıyla ekzon atlanmasını engelleyecek bileşikler araştırılmaya başlanmıştır. HDAC inhibitörlerinin histonasetilasyonunu sağlayarak bazı genlerin ekspresyonunu değiştirebileceği bilinmesi ile çalışmalarda kullanılmaya başlanmıştır. Beraberinde transkripsiyonel faktörlerin asetilasyonunu arttırmak yoluyla da bu faktörlerin aktivitelerini etkileyebilmektedir. Bu neden HDAC inhibitörlerinin kısa zincirli yağ asitleri grubuna giren valpronik asit kullanılmıştır. Valpronik asitin SMN2 geninde bulunan splicing hatasını düzelttiği ve bununla birlikte 7. ekzonun atlanmasını önleyerek olgun mRNA oluşumuna katkı sağlayıp tam uzunlukta ve işlevsel SMN proteini üretimi sağlayarak SMN2 geninin protein ve mRNA seviyesini 2 ila 4 kat arasında arttırdığı gözlenmiştir. Ve bunu ESE dizilerinden olup splicing doğruluğunu kontrol eden ve SMN transkripsiyon aktivasyonunu kolaylaştıran Htra2-21 miktarlarını arttırmak suretiyle yaptığı düşünülmektedir [36].

Bu tez kapsamında yapılan SMN2 protor bölgesine ait 5' delesyonlu konstraktlar temel bir çalışma olup, ileride bu parçaların aktivitelerini arttırmayı sağlayacak yeni moleküllerin keşfedilmesi hedefimizdir. Bu hedef çerçevesinde, SMA hastalağının terapötik iyileştirilmesine yönelik çalışmalar detaylandırılacaktır.

3. KAYNAKLAR (IEEE)

- [1] Pearn. J, “Classification of spinal muscular atrophies”, *Lancet I*, pp. 919-922,1980.
- [2] Thieme. A, Mitulla. B, Schulze. F. Spiegler, A.W, “Chronic childhood spinal muscular atrophy in Germany (West Thüringen): *An epidemiological study*”, *Hum. Genet*, pp. 344-346, 1994.
- [3] Dubowitz. V, “Ramblings in the history of spinal muscular atrophy”, *Neuromuscul Disord*, 19-69, 2008.
- [4] Munsat. T. L, “The Spinal Muscular Atrophies.” *Curr Neurology*, pp.55-71, 1994.
- [5] Barkats. M, “Amyotrophie spinale infantile- De la découverte du gène à la thérapie génique SMA: from gene discovery to gene therapy.” *Med Sci*, 137-140. French, 2020.
- [6] Hensel. N, Kubinski. S, Claus. P, “The Need for SMN-Independent Treatments of Spinal Muscular Atrophy (SMA) to Complement SMN-Enhancing Drugs.”, *Front Neurol*, pp. 11-45, 2020.
- [7] Wirth. B, Herz. M.Wetter. A, Moskau. S, Hahnen. E, Rudnik. Schöneborn, S. Wienker, T. Zerres. K, “Quantitative analysis of survival motor neuron copies: identification of subtle SMN1 mutations in patientswith spinal muscular atrophy, genotype-phenotype correlation, and implication for genetic counseling”, *Am. J. Hum. Genet*, 1340–1356, 1999.
- [8] Simic. G, “Pathogenesis of proximal autosomal recessive spinal muscular atrophy”, *Acta Neuropathol*, pp. 223-234, 2008.
- [9] Lunn. M. R, Wang. C.H, “Spinal muscular atrophy”, *Lancet*, pp.2120-2133, 2008.
- [10] Wirth. B, Brichta, L, Hahnen. E, “Spinal muscular atrophy: from gene to therapy”, *Semin Pediatr Neurol*, pp. 121-131,2006.
- [11] Farrar. Ma and Kiernan. Mc, “The Genetics of Spinal Muscular Atrophy: Progress and Challenges.” *Neurotherapeutics*, pp. 290-302, 2015.
- [12] Sumner. C.J, “Molecular mechanisms of spinal muscular atrophy”, *J Child Neurol*, pp.979-989, 2002.
- [13] Roy. N, Mahadevan. M.S, McLean. M, Shutler. G, Yaraghi. Z, Farahani. R, Baird. S, Besner-Johnston. A, Lefebvre. C, Kang. X, Salih. M, Aubry. H, Tamai. K, Guan. X,

- Jannou. P, Crawford. T.O, de Joug. P.J, Surh. L, Jkeda. J.E, Korueluk. R.G, MacKenzie. A, “The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein (NAIP), a novel protein with homology to baculoviral inhibitors of apoptosis, is partially deleted in individuals with type 1, 2 and 3 spinal muscular atrophy (SMA)”, *Cell*, pp. 167–178, 1995.
- [14] Lefebvre. S, Burglen. L, Frezal. J, Munnich A, Melki. J, “The role of th SMN gene in proximal spinal muscular atrophy”, *Hum. Mol. Genet*, 1531-1536,1998.
- [15] Prior. T.W, “Spinal muscular atrophy diagnostics”, *J Child Neurol*, pp. 952-956, 2007.
- [16] Wirth. B, “Spinal muscular atrophy: state-of-the-art and therapeutic perspectives. Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord”, pp. 87-95, 2002.
- [17] Ogino. S, Wilson. R. B, “Spinal muscular atrophy: molecular genetics and diagnostics”, *Expert Rev Mol Diagn*, pp.15-29, 2004.
- [18] Kolb. SJ, Battle. DJ, and Dreyfuss. G, ”Molecular functions of the SMN complex.” *J Child Neurol*’, 4-8, 2007.
- [19] Erdem. H, Pehlivan. S, Topaloglu. H, Ozguc. M, “Deletion analysis in Turkish patients with spinal muscular atrophy”, *Brain Dev*, pp. 86-89, 1999.
- [20] Verhaart. Iec, Robertson. A, Wilson. Ij, ‘Prevalence, incidence and carrier frequency of 5q-linked spinal muscular atrophy-a literature review”, *Orphanet J Rare Dis*, 12-124, 2017.
- [21] McAndrew. PE, Parsons. DW, Simard. LR, et al, “Identification of proximal spinal muscular atrophy carriers and patients by analysis of SMNT and SMNC gene copy number”, *Am J HumGenet*, 1997.
- [22] Gilliam. TC, Brzustowicz. L.M, Castilla. LH. Lehner, T. Penchaszadeh, G.K, Daniels. R.J, Byth. B.C, Knowles. J, Hislop. J.E, Shapira. Y, Dubowitz. V. Munsat. TL, Ott. J. Davies, K.E, “Genetic homogeneity between acute and chronic forms of spinal muscular atrophy”, *Nature 345*, 823–825, 1990.
- [23] Ogino. S, and Wilson. RB, “Spinal muscular atrophy: molecular genetics and diagnostics.”, *Expert Rev Mol Diagn*, 15-29, 2007.
- [24] Melki. J, Lefebvre. S, Burglen. L, et al, “De novo and inherited deletions of the 5q13 region in spinal muscular atrophies”, *Science*, 1994.

- [25] Frugier. T, Nicole. S, Cifuentes-Diaz. C, et al, “The molecular bases of spinal muscular atrophy”, *Curr Opin Genet Dev*, 2002.
- [26] Lunn. MR, and Wang. CH, “Spinal kas atrofisi,” *Neşter*, 2008.
- [27] Majumder. S, Varadharaj. S, Ghoshal. K, Monani. U, Burghes. AHM, and Jacob. ST, “Identification of a novel cyclic AMP-response element (CRE-II) and the role of CREB-1 in the cAMP-induced expression of the survival motor neuron (SMN) gene.” *J Biol Chem*, 2018.
- [28] Oprea. G.E, Krober. S, Mc Whorter. M.L, Rossoll. W, Muller. S, Krawczak. M, and et all, “Plastin 3 is a protective modifier of autosomal recessive spinal muscular atrophy”, *Science*, pp. 524-527, 2008.
- [29] Lorson. C.L, Strasswimmer. J., Yao. L.M, Baleja. J, Hahnen. E, Wirth. B, Le. T, Burghes. A.H, Androphy. E.J, “SMN oligomerization defect correlates with spinal muscular atrophy severity”, *Nat. Genet*, pp. 63–67, 1998.
- [30] Wirth. B, “An update of the mutation spectrum of the survival motor neuron gene (SMN1) in autosomal recessive spinal muscular atrophy (SMA)”, *Hum Mutat*, 2000.
- [31] Burghes. AH, “When is a deletion not a deletion? When it is converted”, *Am J Hum Genet*, pp. 9–15, 1997.
- [32] Nurputra. Dk, Lai. Ps, Harahap. Ni, “Spinal muscular atrophy: from gene discovery to clinical trials”, *Ann Hum Genet*, 435-63, 2013.
- [33] Chen. Q, Baird. S.D, Mahadevan. M, Besner-Johnston. A, Farahani. R, Xuan. J.Y, Kang. X, Lefebvre. C, Jkeda. J.E, Korneluk. R.G, Mackenzie. A.E, “Sequence of a 131-kb region of 5q13.1 containing the spinal muscular atrophy candidate genes SMN and NAIP, Genomics”, 121–127, 1998.
- [34] Brahe. C and Bertini. E, “Spinal muscular atrophies: recent insights and impact on molecular diagnosis”, *J Mol Med*, 1996.
- [35] Zheleznyakova. GY, Kiselev. AV, Vakharlovsky. VG, Rask-Andersen. M, Chavan. R, Egorova. AA, Schiöth. HB, and Baranov. VS, “Genetic and expression studies of SMN2 gene in Russian patients with spinal muscular atrophy type II and III”, *BMC Med Genet*, 15;12:96, 2011.

- [36] Akutsu. T, Nishio. H, Sumino. K, et alL, “Molecular genetics of spinal muscular atrophy: contribution of the NAIP gene to clinical severity”, *Kobe J Med Sci*, 25-31, 2002.
- [37] Parsons. DW, McAndrew. PE. Iannaccone ST, et all, “Intragenic telSMN Mutations: frequency, distribution, evidence of a founder effect, and modification of the spinal muscularatrophy phenotype by cenSMN copy number”, *Am J Hum Genet*, 1998.
- [38] Erdem. H, “Spinal mskler atrofinin moleküler biyolojik zellikleri”, *Katkı Pediatri Dergisi*, 1999.
- [39] Zat’kova. A, Hahnen. E, Wirth. B, “Analysis of the SMN and NAIP genes in Slovak spinal muscular atropy patients”, *Human Heredity*, 171-74, 2000.
- [40] Scharf. JM, Endrizzi. MG, Wetter. A, Huang. S, Thompson. TG, Zerres. K, Dietrich. WF, Wirth. B, Kunkel. LM, “Identification of a candidate modifying gene for spinal muscular atrophy by comparative genomics”, *Nat Genet*, Sep, 1998.
- [41] Zheleznyakova. GY, Kiselev. AV, Vakharlovsky. VG, Rask-Andersen. M, Chavan. R, Egorova. AA, Schith. HB, and Baranov. VS, “Genetic and expression studies of SMN2 gene in Russian patients with spinal muscular atrophy type II and III”, *BMC Med Genet*,15;12:96, 2011.
- [42] Ogino. S, and Wilson. RB, “SMN Genetic testing and risk assessment for spinal muscular atrophy (SMA)”, *Hum Genet*, 477-500, 2002.
- [43] Lunn.MR, and Wang. CH, “Spinal kas atrofisi” *Neşter*, 2008.
- [44] Labrum. R, Rodda. J, Krause. A, “The molecular basis of Spinal Muscular Atrophy (SMA) in South African black patients”, *Neuromuscular Disorders*, 2007.
- [45] Alberts. B, Johnson. A, Lewis. J, Raff. M, Roberts. K, Walter. P, “Molecular biology of the cell”. *Garland Science*, 2002.
- [46] Faustino. N. A, Cooper. T.A, “Pre-mRNA splicing and human disease”, *Genes Dev*, pp. 419-437, 2002.
- [47] Caceres. J. F, Kornbliht. A.R, “Alternative splicing: multiple control mechanisms and involvement in human disease”, *Trends Genet*, pp.186-193, 2002.

- [48] Lorson. C.L, Hahnen. E, Androphy. E. J, Wirth. B, “A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy”, *Proc. Natl. Acad. Sci, U S A*, pp. 6307–6311, 1999.
- [49] Young. P.J, Di Donato. C.J, Hu. D, Kothary. R, Androphy. E.J, Lorson. C.L, “SRp30c-dependent stimulation of survival motor neuron (SMN) exon 7 inclusion is facilitated by a direct interaction with hTra2 β 1”, *Hum. Mol. Genet*, pp. 577–87, 2002.
- [50] Cartegni. L, Krainer. A.R, “Disruption of an SF2/ASF-dependent exonic splicing enhancer in SMN2 causes spinal muscular atrophy in the absence of SMN1”, *Nat Genet*, pp. 377–84, 2002.
- [51] Lorson. C.L, Androphy. E. J, “An exonic enhancer is required for inclusion of an essential exon in the SMA- determining gene SMN”, *Hum. Mol. Genet*, pp. 259-265, 2000.
- [52] Kornblihtt. A.R, Cáceres. J.F, “Alternative splicing: Multiple control mechanisms and involvement in human disease”, *Trends in Genet*, pp. 186-193, 2002.
- [53] Schrank. B, Götz. R, Gunnensen. JM, Ure. JM, Toyka. KV, Smith. AG, and Sendtner. M, “Inactivation of the survival motor neuron gene, a candidate gene for human spinal muscular atrophy, leads to massive cell death in early mouse embryos”, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997.
- [54] Rossoll. W, Kröning. AK, Ohndorf. UM, Steegborn. C, Jablonka. S, and Sendtner. M, “Specific interaction of Smn, the spinal muscular atrophy determining gene product, with hnRNP-R and gry-rbp/hnRNP-Q: a role for Smn in RNA processing in motor axons?”, *Hum Mol Genet*, 93-105, 2002.
- [55] Liu. Q, and Dreyfuss. G, “A novel nuclear structure containing the survival of motor neurons protein.”, *EMBO J*, 1996.
- [56] Schmid. A, and DiDonato. CJ, “Animal models of spinal muscular atrophy.” *J Child Neurol*”, 22(8):1004-12, 2007.
- [57] Strachan. T, Read. A, “Human gene expression, “Human Molecular Genetics 3”, 3rd Ed., Garland Science”, *London-New York*, pp. 276-300, 2004.
- [58] Graveley. B.R, “Alternative splicing: Increasing diversity in the proteomic world”, *Trends in Genet*, pp. 100-107, 2001.

- [59] Strachan. T, Read. A, “Human gene expression, Human Molecular Genetics 3”, 3rd Ed”, *Garland Science*, London-New York, pp. 276-300, 2004.
- [60] Cooper. GM, Hausman. RE, “The flow of genetic information, “*The Cell, aMolecular Approach*”, pp. 150-272, 2004.
- [61] Keinath. Mc, Prior. De, and Prior.Tw, “Spinal Muscular Atrophy: Mutations, Testing, and Clinical Relevance”, *Appl Clin Genet*, pp. 11-25, 2020.
- [62] Swoboda. KJ, Kissel. JT, Crawford. TO, Bromberg. MB, Acsadi. G, D'Anjou. G, Krosschell. KJ., Reyna. SP, Schroth. MK, Scott. CB, and Simard. LR, “Perspectives on clinical trials in spinal muscular atrophy”, *J Child Neurol*, 957-66, 2007.
- [63] Liang. XH, Sun. H, Shen. W, Wang. S, Yao. J, Migawa. MT, Bui. HH, Damle. SS, Riney. S, Graham. MJ, Crooke. RM, Crooke. ST, “Antisense oligonucleotides targeting translation inhibitory elements in 5' UTRs can selectively increase protein levels”, *Nucleic Acids Res*, pp. 9528-9546, sep, 2017.
- [64] Rouleau. SG, Beaudoin. JD, Bisailon. M, Perreault. JP, “Small antisense oligonucleotides against G-quadruplexes: specific mRNA translational switches”, *Nucleic Acids Res*, pp. 595-606, Jun, 2015.
- [65] d'Ydewalle. C, Ramos. DM, Pyles. NJ, Ng. SY, Gorz. M, Pilato. CM, Ling. K, Kong. L, Ward. AJ, Rubin. LL, Rigo. F, Bennett, CF. and Sumner. “The Antisense Transcript SMN-AS1 Regulates SMN Expression and Is a Novel Therapeutic Target for Spinal Muscular Atrophy”, *Neuron*, pp. 66-79, 2017.
- [66] Pagani. F, Baralle. F.E, “Genomic variants in exons and introns: Identifying the splicing spoilers”, *NatRev Genet*, pp. 389–396, 2004.
- [67] Naso. MF, Tomkowicz. B, Perry. WL. 3rd, Strohl. WR, “Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy”, *BioDrugs*, 2017.
- [68] Wu. Z, Asokan. A, Samulski. RJ, “Adeno-associated virus serotypes: vector toolkit for human gene therapy”, *Mol Ther*, sep, 2006.
- [69] Nurputra. Dk, Lai. Ps, Harahap. Ni, et all, “Spinal muscular atrophy: from gene discovery to clinical trials”, *Ann Hum Genet*, 2013.

[70] He. X, Urip. BA, Zhang. Z, Ngan. CC, Feng. B, “Evolving AAV-delivered therapeutics towards ultimate cures”, *J Mol Med (Berl)*, May, pp. 593-617, 2021.

[71] Menduti. G, Rasà. DM, Stanga. S. Boido. M, “Drug Screening and Drug Repositioning as Promising Therapeutic Approaches for Spinal Muscular Atrophy Treatment”, *Front Pharmacol*, Nov, 2020.

[72] Naryshkin. NA, Weetall. M, Dakka. A, Narasimhan. J, Zhao. X, Feng. Z, Ling. KK, Karp. GM, Qi. H, Woll. MG, Chen. G, Zhang. N, Gabbeta. V, Vazirani. P, Bhattacharyya. A, Furia. B, Risher. N, Sheedy. J, Kong. R, Ma. J, Turpoff A, Lee CS, Zhang X, Moon YC, Trifillis P, Welch EM, Colacino JM, Babiak J, Almstead NG, Peltz SW, Eng. LA, Chen. KS, Mull. JL, Lynes. MS, Rubin. LL, Fontoura. P, Santarelli. L, Haehnke. D, McCarthy. KD, Schmucki. R, Ebeling. M, Sivaramakrishnan. M, Ko. CP, Paushkin. SV, Ratni. H, Gerlach. I, Ghosh. A, Metzger F, “Motor neuron disease SMN2 splicing modifiers improve motor function and longevity in mice with spinal muscular atrophy”, *Science*, 2014.

[73] Paik. J, “Risdiplam: Spinal Musküler Atrofide Bir İnceleme”, *CNS ilaçları*, Nisan, 2022.

[74] Hjartarson. HT, Nathorst-Böös. K, Sejersen. T, “Disease Modifying Therapies for the Management of Children with Spinal Muscular Atrophy (5q SMA): An Update on the Emerging Evidence”, *Drug Des Devel Ther*, Jun, 2022.

[75] Germain-Desprez. D, Brun. T, Rochette. C, Semionov. A, Rouget. R, and Simard. LR, “The SMN genes are subject to transcriptional regulation during cellular differentiation.”, *Gene*, 2001.

[76] Tatar. G. B, Dayangaç-Erden. D, Erdem- Yurter. H, “Spinal musküler atrofi tedavisinde histon deasetilaz inhibitörlerinin rolü”, *Hacettepe Tıp Dergisi*, 2010.

[77] Bora-Tatar. G, Dayangac-Erden. D, Demir. A.S, Dalkara. S, Yelekci. K, Erdem-Yurter. H, “Molecular modifications on carboxylic acid derivatives as potent histone deacetylase inhibitors: Activity and docking

Studies”, *Bioorg Med Chem*, pp. 5219-522, 2009.

[78] Lunke. S, El-Osta. A, “The emerging role of epigenetic modifications and chromatin remodeling in spinal muscular atrophy” *J Neurochem*, pp. 1557-1569, 2009.

[79] Brichta. L, Hofmann. Y, Hahnen. E, Siebzehrubl. FA, Raschke. H, Blumcke. I, Eyupoglu. IY, and Wirth. B,” Valproic acid increases the SMN2 protein level: a well-known drug as a potential therapy for spinal muscular atrophy”, *Hum Mol Genet*, 2003.

[80] Xiao. J, Marugan. JJ, Zheng. W, Titus S, Southall. N, Cherry. JJ, Evans. M, Androphy. EJ, and Austin. CP, “Discovery, synthesis, and biological evaluation of novel SMN protein modulators”, *J Med Chem*, 2011.

[81] Wolffe. A.P, Pruss. D, “Deviant nucleosomes: The functional specialization of chromatin”, *Trends in Genet*, pp. 58–62, 1996.

[82] Mohseni. J, Al-Najjar. BO, Wahab. HA, Zabidi-Hussin. ZA, and Sasongko. TH, “Transcript, methylation and molecular docking analyses of the effects of HDAC inhibitors, SAHA and Dacinostat, on SMN2 expression in fibroblasts of SMA patients”, *J Hum Genet*, 2016.

[83] d'Ydewalle. C, Ramos. DM, Pyles. NJ, Ng. SY, Gorz. M, Pilato. CM, Ling. K, Kong. L, Ward. AJ, Rubin. LL, Rigo. F, Bennett. CF, Sumner. CJ, “The Antisense Transcript SMN-AS1 Regulates SMN Expression and Is a Novel Therapeutic Target for Spinal Muscular Atrophy”, *Neuron*, jan, 2017.

[84] Zhang. ML, Lorson. CL, Androphy. EJ, Zhou. J, “An in vivo reporter system for measuring increased inclusion of exon 7 in SMN2 mRNA: potential therapy of SMA”, *Gene Ther*, 2001

[85] Branchu. J, Biondi. O, Chali. F, Collin. T, Leroy. F, Mamchaoui. K, Makoukji. J, Pariset. C, Lopes. P, Massaad. C, Chanoine. C, Charbonnier. F, “Shift from extracellular signal-regulated kinase to AKT/cAMP response element-binding protein pathway

increases survival-motor-neuron expression in spinal-muscular-atrophy-like mice and patient cells”, *J Neurosci*, 2013.

[86] Majumder. S, Varadharaj. S, Ghoshal. K, Monani. U, Burghes. AHM, and Jacob. ST, “Identification of a novel cyclic AMP-response element (CRE-II) and the role of CREB-1 in the cAMP-induced expression of the survival motor neuron (SMN) gene”, *J Biol Chem*, 2018.

[87] Sutherland. LC, Thibault. P, Durand. M, Lapointe. E, Knee. JM, Beauvais. A, Kalatskaya. I, Hunt. SC, Loiselle. JJ, Roy. JG, Tessier. SJ, Ybazeta. G, Stein. L, Kothary. R, Klinck. R, Chabot. B, “Splicing arrays reveal novel RBM10 targets, including SMN2 pre-mRNA”, *BMC Mol Biol*, Jul, 2017.

[88] Esra. Tokay, “İnsan URG-4 Geninin Transkripsiyonel Regülasyonu”, *Fen Bilimleri Enstitüsü*, Balıkesir Üniversitesi, 2014.

[89] Derya. Okuyan, “İnsan Karbonikanhidraz Geninin Transkripsiyonel Regülasyonu”, *Fen Bilimleri Enstitüsü*, Balıkesir Üniversitesi

EKLER

EKLER

EK A: SMN2 promotor bölgesinin restriksiyon kesim haritası

Name: Untitled

Conformation: linear

Overhang: five_prime, three_prime, blunt

Minimum Site Length: 5 bases

Maximum Number of Cuts: all

Included: all commercial, prototypes only

Noncutters: AarI, AatII, AbsI, AccI, AclI, AflIII, AgeI, AgsI, AjuI, AlfI, Aloi, AlwNI, ApaLI, ArsI, AscI, AsuII, AvrII, BaeI, Ball, BamHI, BarI, BcgI, BciVI, BclI, BdaI, BglI, BglII, BsaAI, BsaBI, BsaXI, BsePI, BseRI, BsmI, Bsp1407I, BspHI, BstEII, BtrI, Cfr10I, ClaI, CspCI, DraIII, DrdI, Eam1105I, Eco47III, Eco57I, EcoNI, EcoP15I, EcoRI, EcoRV, Fall, FseI, FspAI, HaeII, HindII, HindIII, HpaI, Hpy99I, KpnI, MauBI, MfeI, MluI, MmeI, NaeI, NarI, NcoI, NdeI, NheI, NotI, NruI, PacI, PasI, PflMI, PfoI, PmaCI, PmeI, PpiI, PpuMI, PshAI, PsiI, PI-PspI, PspXI, PsrI, PvuI, PvuII, RsrII, Sall, SanDI, SapI, ScaI, PI-SceI, SexAI, SfiI, SgfI, SgrAI, SgrDI, SnaBI, SpeI, SphI, SrfI, Sse8387I, SspI, SwaI, TaqII, TatI, TfiI, VspI, XbaI, XcmI, XhoI, XmnI

Name	Sequence	Site Length	Overhang	Frequency	Cut Positions
BsrBI	CCGCTC	6	blunt	1	924
MslI	CAYNNNNRTG	6	blunt	1	846
OliI	CACNNNNGTG	6	blunt	1	846
SmaI	CCCGGG	6	blunt	1	938
StuI	AGGCCT	6	blunt	1	567
AcyI	GRCGYC	6	five_prime	1	1035
AflII	CTTAAG	6	five_prime	1	959
ApoI	RAATTY	6	five_prime	1	458
BbvCI	CCTCAGC	7	five_prime	1	659
BccI	CCATC	5	five_prime	1	289
BspMI	ACCTGC	6	five_prime	1	440

Name	Sequence	Site Length	Overhang	Frequency	Cut Positions
BtgZI	GCGATG	6	five_prime	1	1022
CfrI	YGGCCR	6	five_prime	1	906
Eco31I	GGTCTC	6	five_prime	1	135
EcoRII	CCWGG	5	five_prime	1	8
FokI	GGATG	5	five_prime	1	113
HgaI	GACGC	5	five_prime	1	1024
PleI	GAGTC	5	five_prime	1	321
SfaNI	GCATC	5	five_prime	1	91
StyI	CCWWGG	6	five_prime	1	489
Tth111I	GACNNNGTC	6	five_prime	1	330
XhoII	RGATCY	6	five_prime	1	388
ApaI	GGGCCC	6	three_prime	1	977
BfiI	ACTGGG	6	three_prime	1	659
BsrDI	GCAATG	6	three_prime	1	290
HaeIV	GAYNNNNNRTC	6	three_prime	1	388
HphI	GGTGA	5	three_prime	1	25
MboII	GAAGA	5	three_prime	1	365
NspI	RCATGY	6	three_prime	1	580
PstI	CTGCAG	6	three_prime	1	701
SacII	CCGCGG	6	three_prime	1	994
TsoI	TARCCA	6	three_prime	1	877
TspGWI	ACGGA	5	three_prime	1	320
AvaI	CYCGRG	6	five_prime	2	266, 936
AvaII	GGWCC	5	five_prime	2	223, 898
BseYI	CCCAGC	6	five_prime	2	60, 88
DraII	RGGNCCY	6	five_prime	2	973, 974
Tsp45I	GTSAC	5	five_prime	2	13, 952
BseSI	GKGCMC	6	three_prime	2	217, 977
BsgI	GTGCAG	6	three_prime	2	290, 706
BstXI	CCANNNNNNTGG	6	three_prime	2	96, 848

Name	Sequence	Site Length	Overhang	Frequency	Cut Positions
EciI	GGCGGA	6	three_prime	2	130, 959
NmeAIII	GCCGAG	6	three_prime	2	316, 732
SacI	GAGCTC	6	three_prime	2	131, 267
TspDTI	ATGAA	5	three_prime	2	822, 840
TstI	CACNNNNNTCC	6	three_prime	2	69, 101
Esp3I	CGTCTC	6	five_prime	3	338, 553, 596
BsrI	ACTGG	5	three_prime	3	58, 554, 654
BtsI	GCAGTG	6	three_prime	3	302, 706, 1030
Eco57MI	CTGRAG	6	three_prime	3	75, 571, 711
GsuI	CTGGAG	6	three_prime	3	75, 571, 711
Bpu10I	CCTNAGC	6	five_prime	4	130, 569, 659, 733
FauI	CCCGC	5	five_prime	4	104, 241, 986, 998
SmlI	CTYRAG	6	five_prime	4	124, 260, 676, 959
BplI	GAGNNNNNCTC	6	three_prime	4	11, 43, 312, 344
BseMII	CTCAG	5	three_prime	4	144, 606, 650, 724
BbvI	GCAGC	5	five_prime	5	267, 683, 707, 969, 1026
TseI	GCWGC	5	five_prime	5	280, 696, 720, 982, 1014
SduI	GDGCHC	6	three_prime	5	131, 217, 267, 683, 977

Name	Sequence	Site Length	Overhang	Frequency	Cut Positions
<u>TspRI</u>	CASTG	5	three_prime	5	309, 554, 706, 806, 1030
<u>BsmAI</u>	GTCTC	5	five_prime	6	135, 319, 338, 553, 596, 760
<u>TauI</u>	GCSGC	5	three_prime	6	173, 720, 944, 1020, 1023, 1035
<u>Hin4I</u>	GAYNNNNNVTC	6	three_prime	12	316, 318, 348, 350, 355, 387, 695, 727, 738, 770, 850, 882

EK B: Promotor Parçalarının Dizi Analizi

116bç'ye Ait Dizi Analizi Sonucu

```
116Bç Dizi   AGCCCCGGGCGGCGGAAGTCGTCACTCTTAAGAAGGGACGGGGCCCCACGCTGCGCACCC   84
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
NCBI Pro     AGCCCCGGGCGGCGGAAGTCGTCACTCTTAAGAAGGGACGGGGCCCCACGCTGCGCACCC   992
```

```
116bç Dizi   GCGGGTTTGCTATGGCGATGAGCAGCGGC   113
              ||||||||||||||||||||||||||||
NCBI Pro     GCGGGTTTGCTATGGCGATGAGCAGCGGC   1021
```

223bç'ye ait dizi analiz sonucu

```
223bç Dizi   aaGGAAAGGAAATATAACACAGTCAAATGAAAGGATTGAGAGAAATGAAAAATATACACG   982
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
NCBI Pro     AAGGAAAGGAAATATAACACAGTCAAATGAAAGGATTGAGAGAAATGAAAAATATACACG   143
```

457bç'ye Ait Dizi Analiz Sonucu

```
457bç Dizi   AAACAAACAAACAAAAAAAAAAGGAAAGGAAATATAACACAGTCAAATGAAAGGATTGAG   962
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
NCBI Pro     AAACAAACAAACAAAAAAAAAAGGAAAGGAAATATAACACAGTCAAATGAAAGGATTGAG   251
```

618bç'ye Ait Dizi Analiz Sonucu

```
618bç Dizi   GGAGGCTGAGGTGGGAGGATCGCTTGAGCCCAAGAAGTCGAGGCTGCAGTGAGCCGAGAT   855
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
NCBI Pro     GGAGGCTGAGGTGGGAGGATCGCTTGAGCCCAAGAAGTCGAGGCTGCAGTGAGCCGAGAT   299
```

```
618bç Dizi   CGCGCCGCTGCACTCCAGCCTGAGCGACAGGGCGAGGCTCTGTCTCAAAACAAACAAACA   915
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
NCBI Pro     CGCGCCGCTGCACTCCAGCCTGAGCGACAGGGCGAGGCTCTGTCTCAAAACAAACAAACA   359
```

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı: Merve DEMİR

Doğum tarihi ve yeri : 15.06.1994

Öğrenim Bilgileri

Derece	Okul/Program	Yıl
Yüksek Lisans	Balıkesir Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik	2023
Lisans	Balıkesir Üniversitesi/Moleküler Biyoloji ve Genetik	2019
Lise	İrfan Ataseven Fen Lisesi	2013