

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



SMA HASTALIĞININ TEDAVİSİNDE KULLANILMAK ÜZERE
REKOMBİNANT SMN1 PROTEİNİNİN ÜRETİLMESİ VE
SAFLAŞTIRILMASI

HASAN ÇAPRAZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Feray KÖÇKAR (Tez Danışmanı)
Doç. Dr. Esra TOKAY (Eş Danışman)
Prof. Dr. Berrin TUNCA
Doç. Dr. Hatice YILDIRIM

BALIKESİR, HAZİRAN - 2024

ETİK BEYAN

Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak tarafımda hazırlanan “**SMA Hastalığının Tedavisinde Kullanılmak Üzere Rekombinant SMN1 Proteininin Üretilmesi ve Saflaştırılması**” 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.

Hasan ÇAPRAZ

**Bu alışması Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma (TÜBİTAK) 2210300 1512
Teknogirişim Desteği Projesi ile desteklenmiştir.**

**Bu tez alışması Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)
tarafından 2210/C ncelikli Alanlar Yurtiçi Yüksek Lisans Burs Programı
(1649B022204981) tarafından desteklenmiştir.**

ÖZET

**SMA HASTALIĞININ TEDAVİSİNDE KULLANILMAK ÜZERE
REKOMBİNANT SMN1 PROTEİNİNİN ÜRETİLMESİ VE SAFLAŞTIRILMASI
YÜKSEK LİSANS TEZİ
HASAN ÇAPRAZ
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK
(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. FERAY KÖÇKAR)
(EŞ DANIŞMAN: DOÇ. DR. ESRA TOKAY)
BALIKESİR, HAZİRAN - 2024**

Spinal Musküler Atrofi, omurilikteki anteriyör horn hücrelerinin kalıcı bozulmasıyla oluşan kas zayıflığı ve atrofi olarak tanımlanan hastalıktır. 10000 doğumda bir çocuğu etkileyen otozomal resesif olan SMA, bebek ölümlerindeki en yaygın genetik nedendir. SMA hastalığı SMN1 genindeki defektlerle ortaya çıkmaktadır. SMA'nın, 4 tipi bulunmaktadır. Dünyada tedavi stratejileri oldukça kısıtlı ve çok pahalıdır. Bu tez çalışmasında rekombinant SMN1 proteini TAT peptidi ile birlikte oluşturulacaktır ve ilaç oluşturma potansiyeli *in vitro* olarak değerlendirilmesi hedeflenmiştir. Yapılan çalışmalar 3 iş paketinden oluşmaktadır. İlk olarak, SMN1 geni pEGFP/N2 vektörü içerisinde restriksiyon enzimler ile kesilerek, pET-21a vektörüne klonlanmıştır. Bu klon SMN1-pET-21a olarak isimlendirildi. İkinci aşamada bu klonun yanına SMN1 proteininin hücre membranından geçişini sağlaması amacıyla hücre geçiş protein dizileri (TAT dizisi) klonlanmıştır. Bu klonun adı TAT-SMN1-pET21-a olarak isimlendirildi. Kontrol amaçlı boş pET-21a plasmidi kullanılmıştır. Tüm plazmitler *E.coli* BL21(DE)3 bakteri soylarına transforme edilmiştir. İkinci iş paketinde ise, *E.coli* BL21(DE)3 bakterileri IPTG ile indüklenmiştir. Ardından Ni-Nta yöntemiyle üretilen protein lizatından histidin kuyruğuna sahip TAT-SMN proteini saflaştırıldı. Saflaştırma Western blot ve SDS-Page ile doğrulanmıştır. dı. Üçüncü iş paketinde ise rekombinant protein aktivitesinin *in vitro* koşullarda etkisinin incelenmesi için SH-SY5Y hücrelerinde SMN1 gen ifadesi lentiviral pLKO1 plasmidi ile shRNA sistemi ile susturulmuştur. Tek koloni seçiminden sonra, elde edilen kolonilerde susturmanın gerçekleştiği, mRNA ve protein seviyesinde doğrulanmıştır. Ardından, saflaştırılan rekombinant protein farklı konsantrasyonda ve zamanlarda hücrelere uygulanmıştır. Rekombinant proteinin hücre canlılığına etkisi MTT analizi ile belirlenmiştir. Hücre içerisine girip girmediği immunofloresan tekniği kullanılarak belirlendi. Daha sonra, SH-SY5Y ve SMN1 ifadesi susturulmuş hücrelere farklı konsanstrasyonlarda rekombinant TAT-SMN proteini uygulanarak, hücrelerdeki SMN protein seviyeleri immunofloresan tekniğiyle belirlendi. Üretilen ilaç adayının *in vitro* aktivite deneylerinde başarılı olduğu belirlenmiştir.

ANAHTAR KELİMELELER: SMA, SMN, Rekombinant, Protein, Saflaştırma

Bilim Kod / Kodları : 20603, 20606, 20610

Sayfa Sayısı : 113

ABSTRACT

PRODUCTION AND PURIFICATION OF RECOMBINANT SMN1 PROTEIN FOR USING IN THE TREATMENT OF SMA DISEASE

MSC THESIS

HASAN ÇAPRAZ

BALIKESIR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

(SUPERVISOR: PROF. DR. FERAY KÖÇKAR)

(CO-SUPERVISOR: DOÇ. DR. ESRA TOKAY)

BALIKESİR, JUNE - 2024

Spinal Muscular Atrophy is a disease characterized by muscle weakness and atrophy caused by permanent deterioration of the anterior horn cells in the spinal cord. Affecting one child in 10000 births, autosomal recessive SMA is the most common genetic cause of infant mortality. SMA is caused by defects in the SMN1 gene. There are 4 types of SMA. Treatment strategies are very limited and very expensive in the world. In this thesis study, recombinant SMN1 protein will be created together with TAT peptide and its drug-forming potential will be evaluated *in vitro*. The studies consist of 3 work packages. Firstly, SMN1 gene was cloned from pEGFP/N2 vector by restriction enzymes and cloned into pET-21a vector. This clone was named SMN1-pET-21a. In the second stage, cell transit protein sequences (TAT sequence) were cloned next to this clone to enable the SMN1 protein to pass through the cell membrane. This clone was named as TAT-SMN1-pET21-a. The empty pET-21a plasmid was used as a control. All plasmids were transformed into *E.coli* BL21(DE)3 bacterial strains. In the second work package, *E.coli* BL21(DE)3 bacteria were induced with IPTG. TAT-SMN protein with histidine tail was then purified from the protein lysate produced by Ni-Nta method. Purification was confirmed by Western blot and SDS-Page. In the third work package, SMN1 gene expression in SH-SY5Y cells was silenced by lentiviral pLKO1 plasmid and shRNA system to examine the effect of recombinant protein activity under *in vitro* conditions. After single colony selection, silencing was confirmed at the mRNA and protein level. Then, the purified recombinant protein was applied to the cells at different concentrations and times. The effect of the recombinant protein on cell viability was determined by MTT assay. Whether it enters into the cell was determined using immunofluorescence technique. Then, SH-SY5Y and SMN1 expression silenced cells were treated with recombinant TAT-SMN protein at different concentrations and SMN protein levels in the cells were determined by immunofluorescence technique. The produced drug candidate was found to be successful in *in vitro* activity assays.

KEYWORDS: SMA, SMN, Recombinant, Protein, Purification

Science Code / Codes : 20603, 20606, 20610

Page Number : 113

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİL LİSTESİ	vi
TABLO LİSTESİ	viii
SEMBOL ve KISALTMA LİSTESİ	ix
ÖNSÖZ	x
1. GİRİŞ	1
1.1 SMA Hastalığı.....	1
1.2 SMA TIPLERİ	2
1.2.1 SMA TİP 1	2
1.2.2 SMA TİP 2	3
1.2.3 SMA TİP 3	3
1.2.4 SMA TİP 4	3
1.3 SMN Proteini ve Görevleri	3
1.3.1 DNA Metabolizmasındaki Görevleri.....	6
1.3.2 Aktin Hücre İskeletini Düzenleyen Sinyal Mekanizmalarındaki Görevleri	8
1.3.3 Endositoz Mekanizmasındaki Görevleri	10
1.3.4 Otofaji Mekanizmasındaki Görevleri	10
1.3.5 RNA Metabolizmasındaki Görevleri	11
1.3.5.1 SMN Proteininin Transkripsiyonun Düzenlenmesindeki Görevi	11
1.3.5.2 SMN Proteininin U7 Biyogenezindeki Görevi.....	12
1.3.5.3 SMN Proteininin SRP Biyogenezindeki Görevi.....	13
1.3.5.4 SMN Proteininin Splayozomal RNA ile İlişkisi	13
1.3.5.5 SMN Proteininin Telomeraz Biyogenezindeki Görevi	14
1.3.5.6 SMN Proteininin Selenoprotein Translasyonundaki Rolü	14
1.3.5.7 SMN Proteininin snoRNP Kompleksleri ile İlişkisi	15
1.3.5.8 SMN Proteininin RNA Aktarımındaki Rolü	16
1.3.5.9 SMN Proteininin Stres Granül Oluşumundaki Görevi.....	16
1.3.5.10 SMN Proteininin Translasyondaki Görevi	16
1.4 SMA Hastalığının Tedavi Stratejileri.....	17
1.4.1 Spinraza.....	17
1.4.2 Risdiplam	18
1.4.3 Zolgensma	18
1.5 Rekombinant Proteinlerin Hastalıkların Tedavisindeki Yeri.....	19
1.5.1 Rekombinant proteinlerin hedef hücreye taşınması	19
1.5.1.1 Genetik modifikasyon	19
1.5.1.2 Geçici Transfeksiyon.....	20
1.5.1.3 Peptid Dağıtım Sistemleri.....	20
1.5.1.3.1 Tat (HIV-1 Transkriptif Aktivasyonun Trans-Aktivatörü).....	20
1.6 SH-SY5Y Hücre Hattının Özellikleri.....	21
1.6.1 SH-SY5Y Hücrelerinin Nörona Farklılaştırılması	22
1.6.1.1 Retinok Asit ile Farklılaştırma.....	23

1.6.1.2	Dibütiril Siklik Adenozin Monofosfat (dbcAMP) ile Farklılaştırma.....	24
1.6.1.3	Forbol Ester ile Farklılaştırma	25
2.	TEZİN AMACI.....	26
3.	MATERYAL VE YÖNTEMLER.....	28
3.1	Materyaller	28
3.1.1	Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Laboratuvar Cihazları.....	28
3.1.2	Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kitler / Kimyasallar.....	29
3.1.3	Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Vektörler.....	31
3.1.4	Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Hücreler	34
3.1.5	Klonlama Çalışmalarında Kullanılan Primerler	35
3.2	Yöntemler	35
3.2.1	Laboratuvar Ortamının Temizliği ve Malzemelerin Sterilizasyonu.....	35
3.2.2	Klonlama Çalışmalarında Kullanılan Teknikler.....	36
3.2.2.1	Bakteri Besiyerlerinin Hazırlanması	36
3.2.2.2	Kompetent Hücrelerin Hazırlanması.....	36
3.2.2.3	Kompetent Hücresinin Etkinliğinin Belirlenmesi	37
3.2.2.4	Gliserol Stok Hazırlanışı	37
3.2.2.5	Primer Tasarımı.....	37
3.2.2.6	TAT Dizilerinin Bağlanma Reaksiyonu	37
3.2.2.7	Küçük Ölçekli Plazmit DNA İzolasyonu	38
3.2.2.8	DNA Miktar Tayini.....	38
3.2.2.9	Restriksiyon Endonükleaz Kesimi	39
3.2.2.10	DNA Agaroz Jel Elektroforezi.....	39
3.2.2.11	Agaroz Jelden DNA'nın Geri Kazanılması	40
3.2.2.12	PCR Pürifikasyonu.....	40
3.2.2.13	Ligasyon Reaksiyonu	40
3.2.2.14	Transformasyon	41
3.2.3	Rekombinant Protein Üretme ve Saflaştırma Çalışmalarında Kullanılan Malzemeler ve Teknikler.....	41
3.2.3.1	Rekombinant TAT-SMN Proteininin Üretilmesi.....	41
3.2.3.2	Rekombinant Protein Saflaştırma	42
3.2.4	<i>In Vitro</i> Çalışmalarda Kullanılan Teknikler.....	44
3.2.4.1	-80°C'den Alınan Hücre Soyunun Başlatılması	44
3.2.4.2	Hücre Kültürü Besiyerinin Hazırlanması	44
3.2.4.3	Hücre Soyunun Pasajlanması.....	45
3.2.4.4	Hücrelerin -80°C'de Stoklanması	45
3.2.4.5	Hücrelerin Sayımı ve Hücre Deneyinin Kurulması	45
3.2.4.6	shRNA Kullanarak Gen İfadesi Susturma.....	46
3.2.4.7	Hücreden Toplam RNA İzolasyonu.....	51
3.2.4.8	RNA Miktarının Belirlenmesi.....	52
3.2.4.9	RNA'dan Komplementer DNA (cDNA) Sentezi.....	52
3.2.4.10	Real-Time PCR	53
3.2.4.11	Hücreden Protein İzolasyonu.....	53
3.2.4.12	Bradford Yöntemi	54
3.2.4.13	SDS-Page (Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi).....	55
3.2.4.14	Western Blot	57
3.2.4.15	Sitotoksosite Testi.....	59
3.2.4.16	SH-SY5Y Hücrelerinin Nörona Farklılaştırılması.....	60
3.2.4.17	İmmünofloresan (IFC).....	60

3.2.5 İstatistiksel Analiz.....	62
4. BULGULAR	63
4.1 Klonlama Çalışmaları	63
4.1.1 SMN1 Gen Varyant Seçimi.....	63
4.1.2 SMN1 Geninin pET-21a Vektörüne Alt Klonlaması	63
4.1.3 TAT Dizisinin SMN1-pET-21a Vektörüne Klonlanması	66
4.2 Rekombinant TAT-SMN Proteinini Üretme ve Saflaştırma Çalışmaları.....	68
4.2.1 Rekombinant Proteinin Üretilmesi	68
4.2.2 Protein Lizatının Oluşturulması ve Saflaştırılması.....	69
4.3 SMN1 Geni Susturma Çalışmaları.....	70
4.3.1 SH-SY5Y Hücrelerinde SMN1 Geninin Susturulması (shRNA-SH-SY5Y Hücresinin Oluşturulması)	70
4.3.2 shRNA-SH-SY5Y Hücrelerinde SMN1 İfadesinin mRNA ve Protein Seviyesinde Doğrulanması	75
4.4 Rekombinant TAT-SMN Proteininin Sitotoksitesinin Belirlenmesi	80
4.5 Rekombinant TAT-SMN Proteininin Aktivitesinin Belirlenmesi	82
4.5.1 Farklılaştırılmamış SH-SY5Y ve shRNA-SH-SY5Y Hücrelerinde TAT-SMN uygulaması ve IFC	82
4.5.2 Farklılaştırılmış SH-SY5Y ve shRNA-SH-SY5Y Hücrelerinde TAT-SMN uygulaması.....	85
5. SONUÇ VE TARTIŞMA	88
6. KAYNAKLAR.....	93
EKLER.....	106
EK A.1: SMN1 Geni Transkript Varyant d Nükleotit Dizisi	106
EK A.2: SMN1 Geni Transkript Varyant a Nükleotit Dizisi	106
EK A.3: SMN1 Geni Transkript Varyant b Nükleotit Dizisi	107
EK A.4: SMN1 Varyant d mRNA'sının Restriksiyon Haritası.....	107
EK B.1: SMN1 Geninin pET-21a Vektörüne Alt Klonlama Dizi Analizi Sonuçlarının Karşılaştırılması.....	110
EK B.2: TAT Dizisinin SMN1-pET-21a Vektörüne Alt Klonlama Dizi Analizi Sonuçlarının Karşılaştırılması.....	111
EK C.1: SMN1 shRNA Primerlerinin siRNA Selection ProgramıylaTasarlanması	112
EK C.2: SMN1 shRNA 210 Dizisinin pLKO.1-TRC Vektörüne Klonlanmasının Dizi Analizi Sonuçları ile Karşılaştırılması.....	112
EK C.3: SMN1 shRNA 522 Dizisinin pLKO.1-TRC Vektörüne Klonlanmasının Dizi Analizi Sonuçları ile Karşılaştırılması.....	112
ÖZGEÇMİŞ	113

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1: Kromozomun 5q13. bölgesinin yerleşim düzeni.....	2
Şekil 1.2: SMN proteininin şematik gösterimi.....	3
Şekil 1.3: Nöronal hücrelerde SMN'nin lokalizasyonu ve fonksiyonları	5
Şekil 1.4: SMN1 ve SMN2 tarafından üretilen SMN proteinlerinin farkı	6
Şekil 1.5: SMN proteininin RNA metabolizmasındaki çeşitli görevleri	11
Şekil 1.6: 10 µM RA ile farklılaştırılmış SH-SY5Y hücreleri.....	24
Şekil 2.1: Tez iş akış şeması	27
Şekil 3.1: pEGFP-N2 vektörünün şematik gösterimi.....	31
Şekil 3.2: pET-21a vektörünün şematik gösterimi.....	31
Şekil 3.3: pLKO.1-TRC vektörünün şematik gösterimi.....	32
Şekil 3.4: pLKO.1-shSCR vektörünün şematik gösterimi.....	32
Şekil 3.5: Lentivirüs üretiminde rol oynayan pMD2.G plazmidinin şematik gösterimi.	33
Şekil 3.6: Lentivirüs üretiminde rol oynayan psPAX2 plazmidinin şematik gösterimi.....	33
Şekil 3.7: HEK293T hücre hattının 40x büyütme ile mikroskop görüntüleri (ATCC).....	34
Şekil 3.8: SH-SY5Y hücre hattının 40x büyütme ile mikroskop görüntüleri (ATCC).....	34
Şekil 3.9: Tek koloni seçimi için dilüsyonun şematik gösterimi.	51
Şekil 3.10: Bradford Eğrisi ve protein miktarı hesaplama formülü	55
Şekil 3.11: MTT tuzunun kimyasal reaksiyonu	59
Şekil 4.1: SMN1 genini pEGFP-N2 vektöründen, pET-21a vektörüne alt klonlama basamakları.....	64
Şekil 4.2: SMN1 pEGFP-N2 vektörünün <i>EcoRI</i> - <i>Sall</i> enzimleri ile kesiminin agaroz jel elektroforezi görüntüsü	65
Şekil 4.3: Boş pET-21a vektörünün <i>EcoRI</i> - <i>Sall</i> enzimleri ile kesiminin agaroz jel elektroforezi görüntüsü	65
Şekil 4.4: Rekombinant olduğu düşünülen (SMN1-pET-21a) 3 koloninin, <i>EcoRI</i> - <i>Sall</i> enzimleri ile kontrol kesiminin agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	66
Şekil 4.5: TAT dizisinin, SMN1-pET-21a vektörüne klonlanma basamakları.....	67
Şekil 4.6: Rekombinant TAT-SMN proteininin üretilme ve saflaştırma basamakları.....	68
Şekil 4.7: TAT-SMN proteini saflaştırılırken alınan örneklerden yapılan SDS-Page jeli ..	69
Şekil 4.8: TAT-SMN proteini saflaştırılırken alınan örneklerden yapılan Western blot	70
Şekil 4.9: SMN1-shRNA 210 ve SMN1-shRNA 522 dizilerinin, pLKO.1-TRC vektörüne klonlanma basamaklarının şematik gösterimi.	71
Şekil 4.10: pLKO.1-TRC vektörünün <i>EcoRI</i> ve <i>AgeI</i> kesiminin agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	72
Şekil 4.11: Rekombinant shRNA-pLKO.1-TRC plazmitlerinin <i>EcoRI</i> ve <i>NcoI</i> kesiminin agaroz jel elektroforezi görüntüsü. (M: Marker, 1: SMN1-shRNA210 1.koloni, 2: SMN1-shRNA210 2.koloni; 3: SMN1-shRNA522 1.koloni).....	73
Şekil 4.12: shRNA klonlanan pLKO.1-TRC vektörü ile SMN1 geninin susturulmasının şematik gösterimi.....	74
Şekil 4.13: Lentivirüs uygulanan SH-SY5Y hücrelerinde SMN1 ifadesinin mRNA seviyesinde gösterilmesi	76
Şekil 4.14: Kontrol grubu ve 4 koloninin Western blot sonucu.....	77
Şekil 4.15: Kontrol grubu ve 6 koloninin Western blot sonucu.....	77
Şekil 4.16: Lentivirüs uygulanan SH-SY5Y hücrelerinde SMN1 ifadesinin protein seviyesinde gösterilmesi.	78
Şekil 4.17: SH-SY5Y hücrelerinde SMN1 ifadesinin susturulmasının immunofloresan yöntemiyle gösterilmesi.....	79

Şekil 4.18: SH-SY5Y ve SMN1 ifadesi susturulan SH-SY5Y (shRNA-SH-SY5Y) hücrelerinde SMN1 geninin floresans sinyal yoğunluğunun grafiği.....	80
Şekil 4.19: SH-SY5Y ve shRNA-SH-SY5Y hücrelerinde, rekombinant TAT-SMN proteininin hücre proliferasyonuna 24 saatte etkisinin MTT Testi ile gösterilmesi.	81
Şekil 4.20: SH-SY5Y ve shRNA-SH-SY5Y hücrelerinde, rekombinant TAT-SMN proteininin hücre proliferasyonuna 48 saatte etkisinin MTT analizi.....	81
Şekil 4.21: Kontrol grubu SH-SY5Y hücrelerinde ve SMN1 ifadesi susturulmuş shRNA-SH-SY5Y hücrelerinde 10 µg/mL ve 20 µg/mL rekombinant TAT-SMN protein uygulamasının İmmunofloresan yöntemiyle etkisinin gösterilmesi.	83
Şekil 4.22: shRNA-SH-SY5Y hücrelerinde 10 µg/mL ve 20 µg/mL rekombinant TAT-SMN proteini uygulandıktan sonra hücredeki floresans sinyal yoğunluğunun grafiği.....	84
Şekil 4.23: SH-SY5Y ve shRNA-SH-SY5Y hücrelerinin nörona farklılaştırılmalarının inverted mikroskop altındaki görüntüleri.....	86
Şekil 4.24: SH-SY5Y ve shRNA-SH-SY5Y hücrelerinin nörona farklılaştırılması ve 20 µg TAT-SMN proteininin uygulanarak 24 saat sonraki inverted mikroskop görüntüleri.....	87

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1.1: Spinal Musküler Atrofi Sınıflandırması	2
Tablo 3.1: Deneysel çalışmalarda kullanılan cihazların listesi.....	28
Tablo 3.2: Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasalların listesi.....	29
Tablo 3.3: Deneysel çalışmalarda kullanılan primer dizileri ve %GC oranları.....	35
Tablo 3.4: TAT dizisi ileri ve geri primer bağlanma bileşenleri.....	38
Tablo 3.5: DNA agaroz jel elektroforezinde kullanılan malzemeler.....	39
Tablo 3.6: Ligasyon bileşenleri.....	41
Tablo 3.7: Saflaştırma için kullanılan solüsyonlar.....	44
Tablo 3.8: shRNA primerlerinin bağlama bileşenleri.....	47
Tablo 3.9: pLKO.1 TRC kesim planı.....	47
Tablo 3.10: shRNA oligoları ve pLKO.1-TRC ligasyon planı.....	47
Tablo 3.11: Rekombinant shRNA içeren vektörlerin belirlenmesi için restriksiyon endonükleaz kesim reaksiyonu.....	48
Tablo 3.12: shRNA transfeksiyon bileşenleri.....	49
Tablo 3.13: Kontrol grubu olarak kullanılacak transfeksiyon bileşenleri.....	49
Tablo 3.14: Gen ifadesi susturma çalışmalarında kullanılan solüsyonlar.....	50
Tablo 3.15: RT reaksiyonu bileşenleri ve yapılan işlemler.....	52
Tablo 3.16: Real-Time PCR bileşenleri.....	53
Tablo 3.17: Real-Time PCR döngü şartları.....	53
Tablo 3.18: RIPA çözeltilisinin bileşenleri.....	54
Tablo 3.19: Bradford Reaktifinin Hazırlanışı	55
Tablo 3.20: %10'luk ayırma (alt) jel hazırlanışı (2 jel için miktarlar).....	56
Tablo 3.21: Yığıma (üst) jel hazırlanışı (2 jel için miktarlar).....	57
Tablo 3.22: Western blot deneyinde kullanılan çözeltiler.....	58
Tablo 3.23: MTT deneyi için kullanılan kimyasallar.....	59
Tablo 3.24: SH-SY5Y hücrelerinin nörona farklılaştırılmasında kullanılan solüsyonlar... 60	
Tablo 3.25: İmmüofloresans çalışmalarında kullanılan çözeltiler.....	61

SEMBOL ve KISALTMA LİSTESİ

APS	: Amonyum Persülfat
bç	: Baz Çifti
BDNF	: Beyin Türevli Nörotrofik Faktör,
β	: Beta
CARM1	: Koaktivatör İlişkili Arjinin Metiltransferaz 1
CC	: Cajal Cisimcikleri
cDNA	: Komplementer DNA
Ct	: Cycle Threshold
CTCF	: Düzeltilmiş Toplam Hücre Floresansı
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
ECL	: Enhanced Chemiluminescence
eIF3	: Ökaryotik Başlatma Faktörü 3
ER	: Endoplazmik Retikulum
hTERT	: (İnsan Telomeraz Ters Transkriptaz)
Hβ-2-M	: İnsan Beta-2-Mikroglobulin
IFC	: İmmünofloresan
μg	: Mikrogram
μL	: Mikrolitre
μM	: Mikromolar
mM	: Milimolar
MTT	: [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid]
ng	: Nanogram
OD	: Optik Densite
PAGE	: Poliakrilamid Jel Elektroforezi
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
pmol	: Pikomol
PVDF	: Povinilidin Diflorid
RA	: Retinoik Asit
rpm	: Dkdaki Dönüş Sayısı
scaRNA	: Küçük Cajal Cisimciği Özgül RNA
shRNA	: Small Hairpin RNA
SMN1	: Yaşamsal Motor Nöron 1 Geni
SMN2	: Yaşamsal Motor Nöron 2 Geni
snoRNP	: Küçük nükleolar Ribonükleoprotein
snRNP	: Küçük Nükleer Ribonükleoproteinler
TEMED	: Tetrametiletildiamin

ÖNSÖZ

Bu tez, yüksek lisans yolculuğum boyunca edindiğim bilgi ve deneyimlerin bir ürünüdür. Tez çalışmasını gerçekleştirirken öncelikle, danışmanım Prof. Dr. Feray KÖÇKAR'a sabrı, bilgisi ve tecrübesiyle yoluma ışık olduğu için minnettarım. Ayrıca, her konuda ihtiyaç duyduğum desteği ve yardımını hiçbir zaman benden esirgemeyen eş danışmanım Doç. Dr. Esra TOKAY'a ve kıymetli hocam Dr. Öğr. Üyesi Nelin HACIOĞLU'na minnettarım.

Bilgi ve tecrübeleriyle bana her zaman yardımcı olan hocalarım Doç. Dr. Hatice YILDIRIM ve Doç. Dr. Sümeyye AYDOĞAN TÜRKÖĞLU'na teşekkürlerimi sunarım.

Her koşulda tecrübeleriyle ve güler yüzleriyle yanımda olan Veteriner Hekim Dr. Mustafa Hilmi YARANOĞLU ve Arş. Gör. Dr. Serhad ONAT'a teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım süresince laboratuvarında birlikte çalışma şansı bulduğum ekip arkadaşlarım; Aslınur MÜZELLEFOĞLU, Aylin TÜRKÖĞÜ, Büşra UZUN, Canberk TOPRAK, Feyza Nur SAV, İpek Ece KÖÇKAR, Merve DEMİR, Şevin AVŞAR, Ufuk MÜLHİM ve Yasemin KELEŞ'e destekleri için teşekkür ediyorum.

Son olarak, beni bilime, araştırmaya ve keşfetmeye meraklı, çağdaş bir birey olarak yetiştiren, hayatım boyunca her zaman benimle birlikte olan tüm aileme sonsuz teşekkür ediyorum.

Balıkesir, 2024

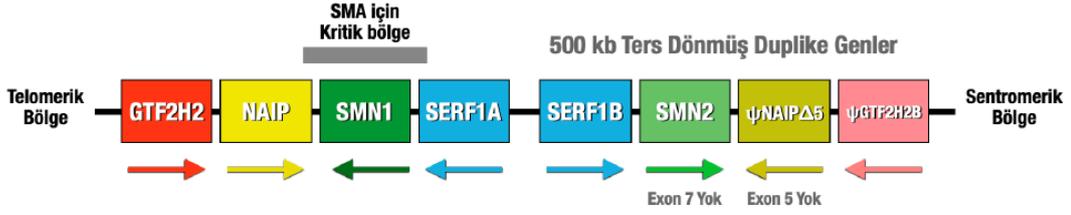
Hasan ÇAPRAZ

1. GİRİŞ

1.1 SMA Hastalığı

Spinal Musküler Atrofi (SMA), kas hareketlerini kontrol eden omurilik ve alt beyin sapında α -motor nöronlarının dejenerasyonu ile buna bağlı güçsüzlük ve kas atrofisi ile karakterize, felce ve ölüme yol açan ciddi bir nöromusküler hastalıktır. Hastalığın ilerleyişi, diğer dejeneratif motor nöron hastalıklarına kıyasla farklı bir patern izler. SMN proteini eksikliğinin sebep olduğu, yaşamsal kaslardaki güç kaybı ve motor fonksiyonlarının azalışı hastalığın başlangıcında en fazla görülür. Bu hızlı düşüşün ardından, hastalık daha yavaş ilerler ve genellikle erken yaşta ölümle sonuçlanır [1]. Bebek ölümlerinin en önde gelen genetik nedeni olan SMA hastalığı [2], her 10.000 canlı doğumda bir hasta ve her 60 yetişkin bireyden birinde taşıyıcı olduğu gözlemlenmiştir [3].

SMA, ilk olarak 1891'de Guido Werdnig tarafından iki erkek kardeş üzerinde yapılan çalışmalar sırasında orta ve şiddetli formlarıyla tanımlanmıştır [4]. Daha sonra, Johan Hoffmann, yedi farklı vaka üzerindeki incelemeleri sırasında bu hastalığı daha da belirginleştirmiştir. Bir yüzyıl sonra, hastalığın kaynağının 5q11.2-q13.3 lokasyonunda bulunan bir gen olduğu keşfedilmiştir. Hastalığa neden olan bu gene, 1995 yılında SMN adı verilmiştir [1]. Bu konumda, dört farklı gen bulunmaktadır ve her biri belirli bir protein kodlar: SMN1 geni, SMN olarak bilinen proteini kodlar. NAIP geni, Nöronal Apoptozis inhibitör proteini kodlar. GTF2H2A geni, genel transkript faktörü 2H, p44'ü kodlar. SERF1A geni, küçük EDRK-zengin Faktör1A'yı kodlar. İnsan genomunun 5. kromozomunda, yalnızca insanlara özgü olan ve yaklaşık 500 kilobaz (kb) büyüklüğünde bir ters dönmüş duplikasyonlar bulunmaktadır. Bu duplikasyonlar içerisinde yer alan genlerden SERF1B, orijinal genin tam bir kopyasıdır. Diğer genler ise, SMN2, Ψ GTF2H2B ve Ψ NAIP Δ 5 genleri, orijinal genlerine göre çok az sayıda nükleotid farklılığına sahiptir. Bu farklılıklar Şekil 1.1'de gösterilmiştir. SMN proteini, SMN1 ve SMN2 olmak üzere iki gen tarafından kodlanır. Ancak, alternatif sprints nedeniyle SMN2, ağırlıklı olarak %90 işlevsiz SMN proteini üretir. Bu durum, genlerin ve proteinlerin karmaşık etkileşimlerini ve işlevlerini gösterir [5, 6].



Şekil 1.1: Kromozomun 5q13. bölgesinin yerleşim düzeni [6].

1.2 SMA TİPLERİ

En sık rastlanan otozomal resesif hastalıklardan biri olan SMA [3], kaslardaki motor fonksiyonlarının bozukluğu, kas zayıflığı ve progresif sakatlık, tüm SMA fenotiplerinin karakteristiğidir [7]. SMA'nın şiddeti, başlangıç yaşına ve SMN2 geninin kopya sayısına göre farklı gruplar arasında önemli ölçüde değişkenlik gösterir [8]. SMA daha sonra semptomların başlama yaşı ve elde edilen maksimum motor fonksiyona göre 4 klinik tipte sınıflandırılmıştır. SMA tipleri tablo 1'de özetlenmiştir [9].

Tablo 1.1: Spinal Musküler Atrofi Sınıflandırması [9].

SMA Tipi	Başlama Yaşı	Motor Yetiler	Ölüm
I (Werdnig- Hoffmann Hast)	0-6 ay	Yardımsız oturamaz	<2 yaş
II (İntermediate form)	<18 ay	Oturabilir, yürüyemez	>2 yaş
III (Kugelberg-Welander Hast.)	1.5- 18 yaş	Belirli bir yaşa kadar yürüyebilir.	Yetişkin
IV (Yetişkin tip)	30- 40 yaşlar	Yürüme kusuru	Normal yaşam

1.2.1 SMA TİP 1

SMA Tip 1, aynı zamanda Werdnig-Hoffmann hastalığı olarak bilinir, Spinal Musküler Atrofinin en yaygın çeşidini oluşturur. SMA hastalarının yaklaşık %50 ila %60'ını kapsar [10]. 6 aydan önce başlayan bağımsız oturamama en temel göstergesidir. (Wadman ve ark., 2014). Bebeklik döneminde derin kas zayıflığı [11] ve solunum yetmezliği oluşturarak, 2 yaşından önce ölüme yol açar [12]. Araştırmalar, SMA tip 1 hastalarının ciddiyete göre daha da alt gruplara ayrılabilceğini göstermiştir [11].

1.2.2 SMA TİP 2

Ara form SMA olarak da bilinen SMA tip 2, tipik olarak SMA tip 1’de görülenlerden daha az şiddetli olan kas güçsüzlüğü ve motor zorluklar gibi semptomlarla kendini gösterir [13]. SMA tip 2 hastaları dik oturma becerisi ile karakterize edilir ancak hastalar bağımsız olarak yürüyemez [14, 15]. Bu hastalarda kreatinin seviyeleri tip 1’e kıyasla daha yüksek bulunmuştur [16]. Ayrıca, SMA tip 2’de zaman içinde kas kalınlığının azalması tip 1’e kıyasla daha az şiddetlidir [17].

1.2.3 SMA TİP 3

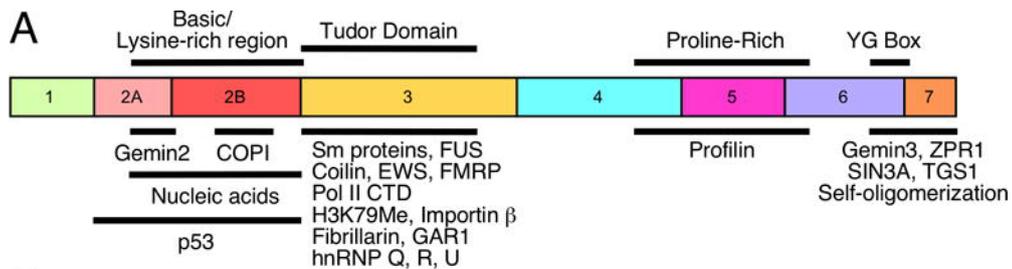
Hafif form SMA olarak da bilinen Spinal Musküler Atrofi tip 3, tip 1 ve 2’ye kıyasla hastalığın daha hafif bir formunu temsil eder. SMA tip 3 hastalarında tipik olarak semptomlar daha geç başlar [18]. Hastalarda çeşitli derecelerde kas güçsüzlüğü ve atrofi görülebilir [19], ancak tip 1 ve 2’ye kıyasla kas güçsüzlüğünde daha az şiddetli bir ilerleme görülür [18].

1.2.4 SMA TİP 4

SMA hastalarının yalnızca %5’ini oluşturan Tip 4 SMA hastaları, hastalığın en hafif formuna sahiptir ve ayakta tedavi görürler. Bu formun belirtileri, Tip 3 SMA ile büyük ölçüde benzerlik gösterir ve yalnızca yetişkinlik döneminde daha geç başlamasıyla ayrılır [20].

1.3 SMN Proteini ve Görevleri

SMN genleri, 294 amino asitlik 38 kDa büyüklüğünde bir protein kodlar [21]. İnsan SMN proteini, merkezi bir Tudor domaini, C-terminal prolin zengini bölge, YG bölgeleri, N-terminal Gemin2- ve nükleik asit bağlayıcı bölgeler içerir. Bu bölgeler Şekil 1.2’de gösterilmiştir [21].



Şekil 1.2: SMN proteininin şematik gösterimi. Rakamlar ekzonları göstermektedir [22].

SMN proteini için yapılan filogenetik analizler sonucu evrimsel süreç boyunca yüksek düzeyde korunduğu ve şempanze genomunda SMN1 geninin birden fazla kopyasının olduğu keşfedilmiştir. Bu çalışmalar, SMN proteininin evrimsel süreçteki önemini ve biyolojik işlevinin kritik olduğunu göstermektedir. [23].

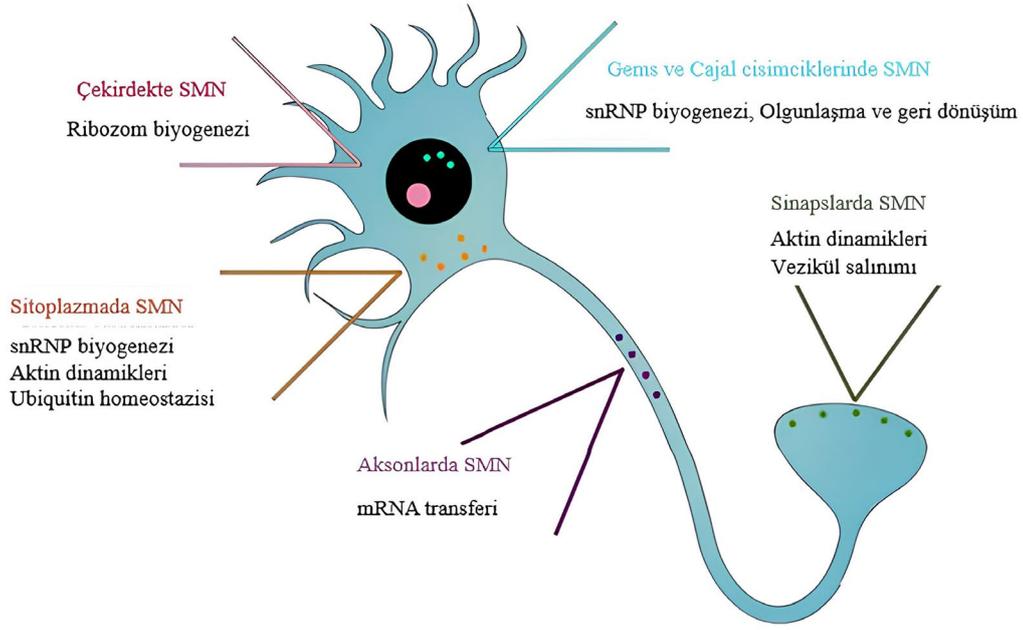
SMN proteini her yerde ifade edilir ve RNA ekleme, transkripsiyon, sitoplazmik taşıma, apoptoz ve ribozomal işlemede çeşitli işlevleri vardır [24]. Sitoplazma, nükleoplazma ve nükleer Cajal Cisimcikleri (CC) dahil olmak üzere çeşitli hücresel bölmelere lokalize olur [25].

Somatik hücrelerde, çekirdekte ve sitoplazmada bulunan SMN proteininin ana işlevi, RNA metabolizmasında önemli bir rol oynayan ve snRNP'ler olarak bilinen küçük nükleer ribonükleoprotein parçacıklarının birleştirilmesini düzenlemektir [21]. SMN proteini, Gemin alt birimleri içerir ve splayozomal snRNP'lerin birleştirilmesinde kritik öneme sahiptir. Bu kompleks, snRNP'lerin ve potansiyel olarak diğer ribonükleoprotein partiküllerinin sitoplazmik birleşimine dahil olurken, aynı zamanda pre-mRNA splayzına ve transkriptozomların oluşumuna katkı sağlar [26-28].

SMN, ayrıca U snRNP'lerin biyogenezi için de gereklidir ve bu süreçteki kusurlar pre-mRNA'ların spesifik splayz inhibisyonu ile ilişkilendirilmiştir [26, 29]. Ayrıca SMN proteinleri aksogenezde, akson büyümesi ve bakımı ile ilgili spesifik nöronal mekanizmalarda ve telomeraz biyogenezinde rol oynadığı keşfedilmiştir [30, 31].

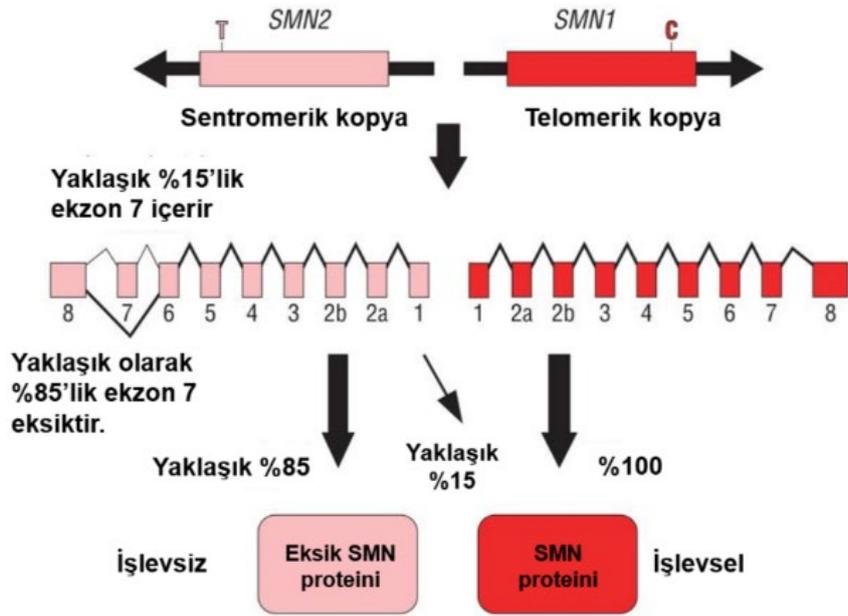
SMN proteini; snRNP'lerin moleküler etkileşimleri ve fonksiyonları, RNA işleme, pre-mRNA birleştirme, hücre homeostaz, hücre yaşamının sürdürülmesi ve nöronların stabilitesi için gereklidir.

SMN sitoplazmada, nöronal büyüme konilerinde, nöronal uzantılarda ve çekirdekte bulunan her yerde ifade edilen bir proteindir. Çekirdekte SMN, geminler adı verilen subnükleer cisimler oluşturur. SMN proteininin çeşitli görevleri Şekil 1.3'te gösterilmiştir. SMN proteini, aktin hücre iskeleti dinamiklerinde, RNA metabolizmasında, mRNA taşınmasında, ubiquitin homeostazında, biyoenerjetik yolda ve sinaptik vezikül salınımında rolü vardır, ancak SMA'dan tek başına sorumlu değildir [32].



Şekil 1.3: Nöronal hücrelerde SMN'nin lokalizasyonu ve fonksiyonları [32].

SMA'nın genetik temeli, SMN1 genindeki mutasyonları içerir ve bu da motor nöronun hayatta kalması için gerekli olan SMN proteininin eksikliğine yol açar. Ayrıca SMA'nın şiddeti, SMN2 geninin kopya sayısından etkilenir; daha fazla kopya, daha hafif hastalık belirtileriyle ilişkilendirilir. İnsanlarda, her bir alel üzerinde Sağkalım Motor Nöron (SMN) geninin iki farklı formu mevcuttur. Birincisi telomerik form olarak bilinen tek bir gen olan SMN1. Diğeri ise sentromerik olan ve birden fazla kopyası bulunan SMN2 geni [33]. SMN1 ve SMN2 genleri arasında sadece 5 baz çifti farklıdır. Kodlama sekansları ise sadece tek bir nükleotid farklılık gösterir. SMN2'nin tek bir kodlayıcı varyant değişikliği c.840C>T, (Sitozin>Timin sübstitüsüyonu) bir ekzonik ekleme artırıcıyı (ESE) etkisiz hale getirir ve aynı anda transkripsiyon sırasında ekzon 7'nin atlanmasına ve dolayısıyla eksik ve hızla bozulabilen SMN proteinine yol açar [34]. Bu etki, SMN2'den elde edilen transkriptlerin yaklaşık %90'unda ekzon eksikliğine yol açar [35]. SMN1 ve SMN2 genlerinin ürettiği SMN proteini farklılıkları Şekil 1.4'te gösterilmiştir.



Şekil 1.4: SMN1 ve SMN2 tarafından üretilen SMN proteinlerinin farkı [35].

Sentromerik SMN (SMNc-SMN2) geni, %90 SMN Δ 7 adı verilen stabil olmayan bir proteinin ve %10 verimli çalışabilen SMN proteini, üretimlerini gerçekleştirir [32]. SMN2 geninin intron 7 bölgesinde bulunan ve ISS-N1 olarak adlandırılan önemli bir sekans, transkripsiyon sırasında ekzon 7'nin atlanmasına katkıda bulunur [36]. Telomerik SMN (SMNt-SMN1) tam uzunlukta %100 stabil SMN proteini üretir [37].

SMN1'in homozigot delesyonu ölümcüldür. SMN1'deki delesyonlar veya intragenik mutasyonlar SMA'nın tüm formlarında bulunur [33]. SMA hastalarının yaklaşık %95'i SMN1 ekzon 7'nin homozigot delesyonuna sahipken; geriye kalan %5'i SMN1 heterozigot delesyonuna ve nokta mutasyonuna sahiptir [38]. SMA hastalarındaki fenotipik değişkenlik, SMN2 geninin kopya sayısı ile ilişkilidir. SMN2'nin kopya sayısı hastalığın şiddeti ile doğru orantılıdır [39]. SMN2 kopya sayısı azaldıkça hastalığın şiddeti artar. SMN2'nin 5 veya daha fazla kopyasına sahip bireylerde hiçbir semptom görülmeyebilir [40].

1.3.1 DNA Metabolizmasındaki Görevleri

RAD51 tarafından yönlendirilen DNA rekombinasyonu olarak da adlandırılan homolog rekombinasyon (HR), DNA çift iplik kopmalarının (DSB'ler) onarımında, genomik

stabiliteyi korumada ve DNA onarımını desteklemede kritik bir rol oynar. Bu mekanizma, hücrenin yaşamını sürdürebilmesi için, özellikle genomik hasarın uygun bir şekilde onarılmaması durumunda mutasyonlara, kansere ve diğer hastalıklara neden olabileceği için önemlidir [41].

SMN-GEMIN2 kompleksinin yapısal incelemesi, SMN ve GEMIN2 arasındaki özel tuz köprüleri ve hidrojen bağlarını açığa çıkararak, bu iki bileşen arasındaki yoğun ilişkiyi göstermiştir [42]. Bu sıkı ilişki, GEMIN2'nin SMN proteininin işleyişinde gerekli olduğu ve kompleksin genel işlevselliği üzerindeki önemini vurgulayan sonuçlarla daha da kanıtlanmıştır [43].

SMN ve GEMIN2 arasındaki etkileşim, özellikle RAD51 tarafından yönlendirilen DNA rekombinasyon reaksiyonlarına bağlı olarak çeşitli hücresel işlemlerde kritik bir rol oynar. Çalışmalar, SMN ve GEMIN2'nin bir kompleks oluşturduğunu ve bu kompleksin içinde SMN'nin DNA'ya bağlanma yeteneklerini sergileyebileceğini, GEMIN2'nin ise RAD51'e bağlanma yeteneklerini gösterdiğini belirtmiştir [44].

DNA uçlarının rezeksiyonu ile başlayan bu süreç tek sarmallı DNA'nın oluşumunu içerir. RAD51, tek sarmallı DNA üzerinde bir nükleoprotein filamenti oluşturmak üzere çalışmaya başlar [45]. Bu filament, homolog bir DNA dizisini tanımlayıp üzerine gelir, bu da DNA polimerazın homolog diziyi şablon olarak kullanarak yeni DNA sentezlemesine olanak tanıyan bir yer değiştirme döngüsü oluşturur [46]. Rekombinasyon ara ürünlerinin çözülmesi, onarılmış DNA'ya yol açar ve bu DNA, kromozomal bütünlüğü yeniden sağlamak için bağlanır. Bu süreç, genomik stabilitenin korunması için hayati öneme sahiptir ve özellikle kardeş kromatitlerin bulunduğu hücre döngüsünün S ve G2 fazları sırasında kritiktir [47].

SMN proteini, özellikle sık sık kırılmaya eğilimli olan ribozomal DNA (rDNA) lokusunda DNA bütünlüğünün korunmasında da rol oynar. SMN eksikliği rDNA hasarının artmasına yol açarak ribozomal RNA sentezi ve translasyonunun bozulmasına neden olur. Bu durum özellikle düşük SMN proteini seviyelerinin motor nöron dejenerasyonu ile bağlantılı olduğu Spinal Musküler Atrofi bağlamında önemlidir [48].

Ayrıca, SMN proteininin, DNA hasarı varlığında histon H3 ile sentromerlere etkileşim yoluyla toplanması ve indüklenen Sentromerik Hasar Tepkisine (iCDR) katılımı, DNA hasar yanıtı ve onarım süreçlerinde kritik bir rol oynar. Histon H3, DNA hasarı yanıtını ve onarımını etkileyebilecek çeşitli post-translasyonel modifikasyonlara tabidir. Örneğin, histon H3'ün treonin 45'teki (pH3T45) fosforilasyonu DNA hasarına bir yanıtıdır ve kaybı, DNA onarım proteinlerini işe almak için önemli olan başka bir modifikasyon olan H3K36me3'ü azaltabilir. Bu durum, pH3T45'in özellikle homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ) yolu aracılığıyla DNA hasarının uygun şekilde onarılması için çok önemli olduğunu ve yokluğunun apoptozun artmasına ve hücre sağkalımının azalmasına yol açabileceğini göstermektedir [49].

Ek olarak histon H2AX miktarı, SMN seviyesine bağlıdır [50]. Histon H2AX, DNA çift iplikçik kırılmalarına yanıt olarak γ H2AX oluşturmak için serin 139'da hızla fosforile edilir, hasarlı bölgeleri işaretler ve DNA onarım makinelerini göreve getirir [51]. Bu fosforilasyon, DNA hasarına verilen en erken hücre tepkilerden biridir ve hücre döngüsü kontrol noktaları, genomik stabilite ve apoptoz dahil olmak üzere çeşitli hücre işlevlerinde rol oynar. H2AX'ın fosforile formu, DNA hasar yanıtının (DDR) önemli bir bileşenidir ve hem DNA'nın onarımında hem de DNA hasarına karşı hücre yanıtı kontrol eden sinyal yollarında rol oynar [52].

1.3.2 Aktin Hücre İskeletini Düzenleyen Sinyal Mekanizmalarındaki Görevleri

Aktin Bağlayıcı Proteinler (ABP'ler), aktin hücre iskeletinin dinamik yapısını düzenleyen, hücre sinyalizasyonunda ve hücre yapısının korunmasında kritik roller üstlenir. Bu proteinlerin çeşitli hücre süreçlerinde önemli bir etkisi olduğu kanıtlanmıştır. Mikrotübül bazlı organeller olan ve birçok hücre tipinin yüzeylerinde bulunan siliaların işleyişi, ABP'lerin varlığına bağlıdır. Bu hücre tipleri arasında kardiyak fibroblastlar, vasküler endotel hücreleri, insan retinal pigment epitelyal-1 (RPE-1) hücreleri ve alveolar epitel hücreleri bulunmaktadır. ABP'ler, filamentli aktin (F-aktin) morfolojisini düzenleyerek siliaların normal işleyişine katkı sağlarlar. Ayrıca, siliyer yapısal yeniden modelleme ve sinyalleme süreçlerinde de etkin bir rol oynarlar [53]. Spinal Musküler Atrofi bağlamında, aktin bağlayıcı proteinlerin, SMA hastalarında SMN proteininin azalmış seviyelerine bağlı olarak bozulan Rho-kinaz (ROCK) yolunda rol oynadığı gösterilmiştir [54].

ROCK yolu, hücre adhezyonu, proliferasyon, hareketlilik ve kasılma dahil olmak üzere hücresel süreçlerin düzenlenmesinde önemli rol oynayan bir sinyal yoludur. Sinir sisteminde ROCK proteinleri, gelişim sırasında ve yaralanma sonrasında aksonal büyümeyi, sinaptik plastisitenin altında yatan dendritik büyümeyi ve omurga yeniden şekillenmesini, diğer sinyal iletim yollarıyla çapraz konuşma yoluyla hücre sağkalımını ve nöroinflamasyon da dahil olmak üzere glial aktivasyon ve işlevi düzenleyen çok çeşitli iletim moleküllerini fosforile eder [55]. Bu yol, nörolojik bozukluklar, osteoartrit ve kanser dahil olmak üzere çeşitli hastalıklarda rol oynar [56].

Aktin bağlayıcı proteinler olan profilin1 ve profilin2a aktin düzeneğini destekler. Profilin2a, profilinin nöronal izoformudur [57]. Profilin2a, bir SMA hastasından türetilen bir SMN2 yanlış anlam mutasyonu (S230L) tarafından büyük ölçüde bozulan SMN'deki bir prolin rezidülerine bağlanır. ROCK yolunda önemli işlevi bulunan profilin2a, SMN proteinini ROCK yolağına doğrudan bağlar [53, 58]. SMN ile aktin bağlayıcı protein olan profilin2a arasındaki etkileşim, nöronal hücrelerde nörit büyümesi için çok önemlidir ve profilin2a'nın hiper-fosforilasyonunun, SMN ile ROCK yolu arasındaki moleküler bağlantı olduğu ve nörit büyümesini baskıladığı bulunmuştur [53].

ABP'ler tarafından düzenlenen F-aktin'in dinamik yapısı, hücrelerin çeşitli işlevlerinin gerçekleştirilmesinde kritik bir rol oynar. Bu işlevler arasında aksonların oluşumu, hücrenin polaritesinin belirlenmesi, hücre göçü, vezikül taşımacılığı ve endositoz gibi süreçler bulunmaktadır. F-aktin bağlama ve demetleme yeteneklerine sahip olan Platin3 (PLS3), bir Ca^{2+} bağımlı proteindir [59].

PLS3 proteininin mevcudiyeti, SMN1 geni silinmiş ve 3-4 kopya SMN2 geni taşıyan bireylerde SMA semptomlarının ortaya çıkmasını engeller. PLS3 proteininin aşırı ekspresyonu ağır SMA fare modelinde hayatta kalma süresini 14 günden 250 güne çıkarabilir. Bu durum, SMA belirtisi göstermeyen SMN1 geni silinmiş bireylerin durumunu yansıtır. PLS3 proteininin aşırı ekspresyonu, endositozun normal düzeylere geri dönmesini sağlar ve bu, SMA'da bozulan nörotransmisyon ve nöromusküler bileşke bakımının altında yatan temel hücresel mekanizmalardan biri olabilir [60].

Ancak, bazı çalışmalar PLS3'ün SMA fenotipini insanlarda değiştirmek için uygun bir terapötik hedef olmadığını belirtmiştir [61]. Bu yüzden PLS3 ve SMA ilişkisi daha fazla çalışılması gereken bir konudur.

1.3.3 Endositoz Mekanizmasındaki Görevleri

SMN, endositozda görevli proteinlerle etkileşime girer çünkü nöronal sinyalleşme, aksonal ve dendritik büyüme için bu süreç gereklidir. Bu süreç için aktin hücre iskeleti ve PLS3 gereklidir [62]. SMA hastalarından elde edilen hücrelerde yapılan çalışmalar, SMN proteininin eksikliğinin, sinaptik veziküllerin endositik geri dönüşüm sürecini etkileyerek sinaptik iletimin bozulmasına yol açtığını ortaya koymuştur [22]. Bu bozukluk, endozomal proteinlerin anormal lokalizasyonu, nöronal ve nöronal olmayan dokuda endozomal eksikliklere yol açar. Ayrıca, şiddetli SMA tipi olan farelerde, elektrik stimülasyonuna maruz bırakılan transversus abdominis kasındaki endositozun bozulduğu bulunmuştur [62]. Sonraki çalışmalar, SMN proteininin azalmış fonksiyonunun endositozu bozduğunu, endozomal bölmelerde ve sinaptik vezikül kenetlenmesinde kusurlara yol açtığını göstermiştir [63]. Bütün bu çalışmalara rağmen SMN'nin endositoza doğrudan etkilediği mekanizmalar henüz bilinmemektedir.

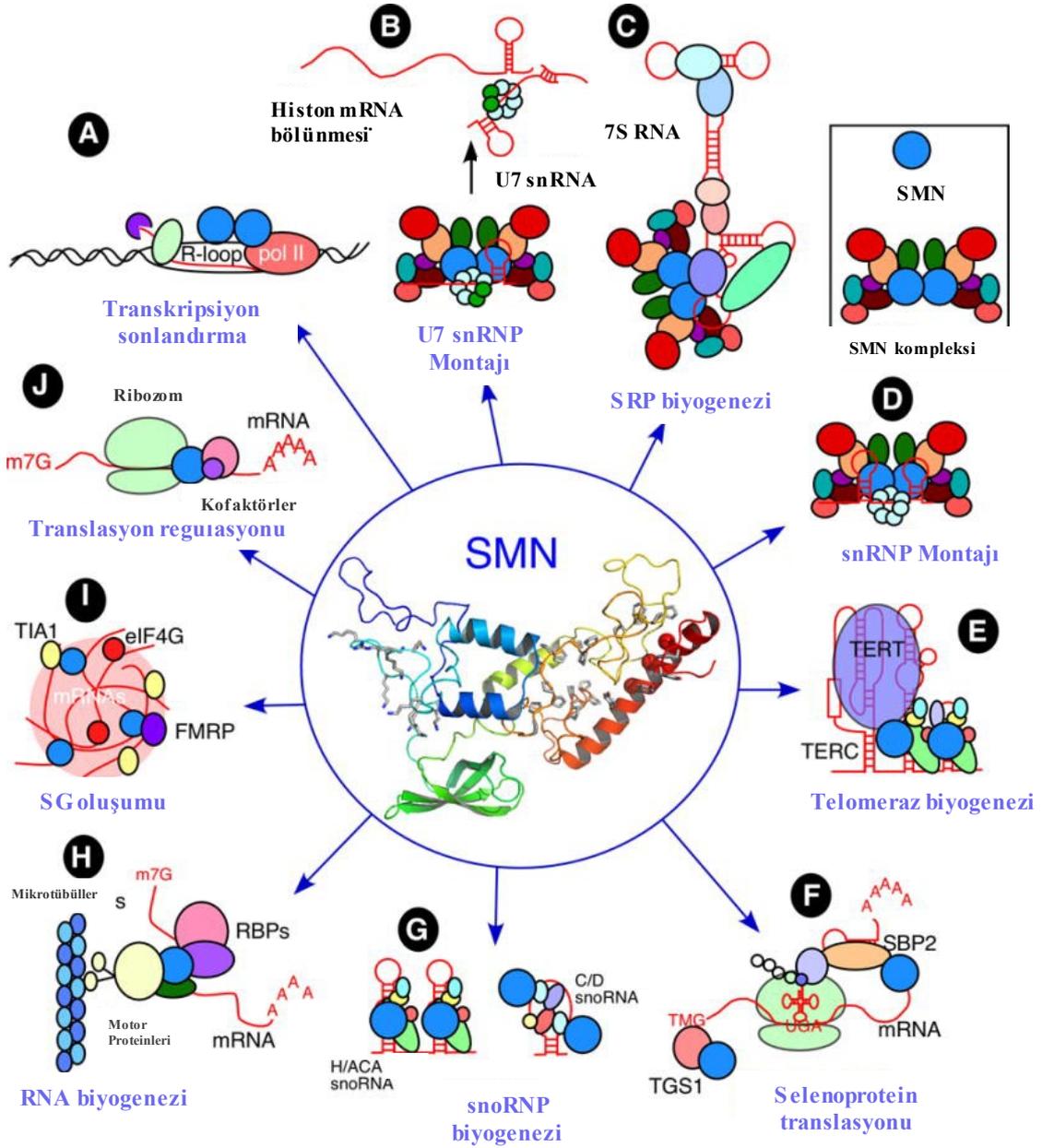
1.3.4 Otofaji Mekanizmasındaki Görevleri

Otofaji, hücrelerin hasar görmüş organellerini ve proteinlerini parçalayarak geri dönüştürdüğü bir süreçtir ve bu süreç, hücrel homeostazın ve nöron sağlığının korunmasında kritik bir rol oynar [64]. Araştırmalar, SMA hastalarında otofajinin değiştiğini ortaya koymuştur. SMA hastalarından alınan kas biyopsileri, fibroblastlar ve lenfoblast hücre dizilerinde, otofaji belirteci olan LC3-II proteininde bir azalma olduğunu göstermiştir. Ayrıca, SMA'ya sahip farelerin gastrocnemius kaslarında, hastalığın semptomları henüz ortaya çıkmadan önce LC3-II, Beclin 1 ve p62/SQSTM1 protein seviyelerinde bir düşüş gözlemlenmiştir. Ancak hem farelerde hem de insanlarda kültüre alınmış SMA motor nöronlarında, mTOR'un fosforilasyonu ve LC3-II seviyelerinde bir artış tespit edilmiştir. Bu bulgular, SMA'nın patogenezinde otofajinin önemli bir rol oynadığını göstermektedir [65].

SMN proteininin azalmış seviyeleri, otofajinin düzgün çalışmasını engeller. Bu durumda, otofagozomların otofaji sürecinde oluşan ve hücre içindeki atıkları toplayan yapıların temizlenmesinde bozulmaya yol açar. Sonuç olarak, p62 ve ubiquitlenmiş proteinler gibi atıklar hücre içinde birikir. Bu birikim, hücrelerin işlevini bozar ve hastalığın semptomlarına yol açar [66]. Ek olarak, otofajinin engellenmesinin, SMA hastalığının fare modellerinde nöronların bozulmasını yavaşlattığı ve yaşam süresini artırdığı belirlenmiştir [67].

1.3.5 RNA Metabolizmasındaki Görevleri

SMN proteininin RNA metabolizmasındaki çeşitli görevleri Şekil 1.5’de özetlenmiştir [32].



Şekil 1.5: SMN proteininin RNA metabolizmasındaki çeşitli görevleri (Tüm RNA’lar kırmızı, tüm DNA’lar siyah ve tüm proteinler renkli ovaler veya daireler olarak temsil edilmiştir) [22].

1.3.5.1 SMN Proteininin Transkripsiyonun Düzenlenmesindeki Görevi

SMN, nöronlarda nükleer mimarinin düzenlenmesinde, lokal aksonal translasyonunda [68] ve transkripsiyonunda düzenlemede rol oynar [69]. SMN, Cajal Cisimciklerine (CC) özgü

bir proteini olan koilin (arginin metillenmiş) ile etkileşim kurar [70]. CC, hücre çekirdeğinde bulunur ve çeşitli nükleer süreçlerin düzenlenmesinde rol oynar. SMN ve koilin arasındaki etkileşime WRAP53 proteini aracılık ederek, SMN proteininin nükleer mimariyi düzenlemesini kolaylaştırır [71]. SMN'nin ayrıca nöronlarda miR-183/mTOR yolu üzerinden lokal aksonal translasyonu düzenlediği keşfedilmiştir [68]. Özellikle, SMN eksikliği olan nöronlarda miR-183 seviyesi artmış ve mTor'un lokal aksonal translasyonu azalmıştır. SMA'lı motor nöronlarda miR-183 ekspresyonunun baskılanması motor fonksiyonu güçlendirerek ve SMN-mutant hücrelerin sağkalımını artırabileceği düşünülmektedir [72].

Bunlara ek olarak SMN proteini Tudor alanı aracılığıyla, RNA polimeraz II'nin (RNAP II) alt birimi POLR2A'nın C-terminal domain (CTD) bulunan ve simetrik olarak dimetillenmiş R1810 (R1810me₂s-POLR2A) ile etkileşime girdiği ve transkripsiyonun sonlandırılmasında rol oynadığı bulunmuştur[72].

RNA polimeraz II ile olan etkileşiminin yanı sıra, SMN proteininin transkripsiyon faktörleri ve kromatin yeniden modelleme kompleksleri ile de bağlantılı olduğu belirlenmiştir [73, 74]. Örnek olarak, SMN proteininin, papillomavirüs tarafından kodlanan E2 transkripsiyon faktörü ile etkileşime girdiği ve bu etkileşimin E2'ye bağımlı transkripsiyonel aktivasyonu artırdığı gözlemlenmiştir [73]. Ayrıca SMN proteininin, farklı nükleer lokalizasyonlarda, DNA bağlama ve işlem alanlarına sahip olan p53 transkripsiyon faktörüne de bağlanarak transkripsiyonun başlatılmasında görevli olduğu kanıtlanmıştır [75].

1.3.5.2 SMN Proteininin U7 Biyogenezindeki Görevi

U7 snRNP, splaysozomal snRNP'lerle bazı yapısal özellikleri paylaşmasına rağmen, pre-mRNA splayz'da değil, histon mRNA 3' uçlarının işlenmesinde görev alır [76, 77]. U7 snRNP 60-70 nükleotidlik uzunluğunda, Sm proteinleri ve kendine özgü Lsm10 ve Lsm11 proteinlerini içerir [78, 79]. U7'ye özgü bu proteinler, U7 snRNP montajı ve histon mRNA 3'-uç oluşumu için gereklidir [50, 80]. Ayrıca, U7 snRNP, S fazına özgü gen ifadesi için çok önemli bir süreç olan poliadenillenmemiş histon mRNA'larının 3'-uç işlenmesinde rol oynar [81].

SMN proteininin bu süreçlerdeki rolü, Lsm10 ve Lsm11 proteinlerini içermesidir ve bu sayede U7 snRNP montajında rol oynamasıdır [82]. SMN'deki mutasyonlar U7 snRNP'nin stabilitesini ve işlevini etkileyerek histon pre-mRNA işlemede aksaklıklara yol açar [83]. U7 snRNP, hücre döngüsü durdurulmuş hücrelerde histon gen transkripsiyonunun baskılanmasına sebep olabilir. Bu bulgular U7 snRNP'nin dolayısıyla SMN'nin transkripsiyon düzeyindeki düzenleyici rolünü göstermektedir [81].

1.3.5.3 SMN Proteininin SRP Biyogenezindeki Görevi

Sinyal tanıma parçacığı (SRP), ökaryotik hücrelerde proteinlerin endoplazmik retikuluma (ER) hedeflenmesinde ve translokasyonunda önemli bir rol oynayan bir ribonükleoprotein kompleksidir. SRP, bir protein bileşeni olan SRP54 ve bir RNA bileşeni olan 7S RNA'dan oluşur. SRP54 ve 7S RNA arasındaki uygun etkileşim, SRP kompleksinin yeni oluşan polipeptitler üzerindeki sinyal dizilerini tanıma ve bunları ko-translasyonel translokasyon için ER membranına yönlendirmedeki işlevselliği için gereklidir [26]. SMN proteini, SRP biyogenezinin son birleşimini yönetir, SRP54'ün erken aşama 7S RNP kompleksine entegrasyonundan sorumlu olduğu keşfedilmiştir [84]

Ayrıca *S. pombe* hücrelerinde SMN proteininin 7S RNA ile etkileşime girdiği ve SRP'nin stabilitesinin korunmasında kritik bir işlevi olduğu da bildirilmiştir [85]. Sonuç olarak SMN proteini, SRP biyogenezinin montajını ve stabilitesini sağlayarak bu süreçte hayati bir rol oynar. SMN proteininin tükenmesi veya işlevsizliği, SRP biyogenezinde kusurlara yol açar, yeni oluşan polipeptitler ER'ye ulaşamaz [86].

1.3.5.4 SMN Proteininin Splayozomal RNA ile İlişkisi

SMN proteini ve ilişkili faktörlerden oluşan SMN, pre-mRNA splay mekanizmasında yer alan splayozomal küçük nükleer ribonükleoproteinlerin (snRNP) oluşumunda rol oynayan bir moleküler şaperon olarak görev yapar [83, 87]. Bu snRNP'ler, pre-mRNA'dan intronların çıkarılmasından sorumlu olan splayozomun hayati bileşenleridir. snRNP'ler, U snRNA'ları ve Sm proteinleri gibi çekirdek proteinlerden meydana gelir [26]. SMN, Sm proteinleri ile doğrudan bağlanır ve bunları U snRNA'ları üzerinde düzenler. SMN proteini, Sm proteinlerinin U snRNA'lar üzerinde etkili bir şekilde birleştirilmesi için gerekli bir özgüllük faktörü olarak işlev görür. Yedi Sm proteininin çekirdeğinin üridin açısından zengin snRNA'lar üzerinde ATP'ye bağımlı toplanmasına aracılık eder, Sm çekirdeklerinin yalnızca doğru RNA hedeflerinde toplanmasını sağlar ve diğer RNA'larla

karışık ilişkileri önler [88]. Bu şekilde, snRNP'lerin çekirdeğe girişi ve splayzozomun montajı sağlanır [62]. SMN, ayrıca, snRNP'lerin sitoplazmaya taşınmasında ve splayz işleminde yer alan diğer proteinlerle de etkileşime girdiği keşfedilmiştir [88].

1.3.5.5 SMN Proteininin Telomeraz Biyogenezindeki Görevi

Telomeraz biyogenezi, SMN proteini de dahil olmak üzere çeşitli proteinleri içeren karmaşık bir süreçtir. SMN, telomeraz biyogenezinde, telomeraz ribonükleoproteinlerin (RNP'ler) toplanmasına ve işlevine katkıda bulunan önemli bir şaperon olarak işlev görür. [30].

SMN, telomeraz RNA'sı (TR) ile doğrudan bağlanır ve TR'nin katlanmasını ve olgunlaşmasını sağlar [89]. Ayrıca, telomerazın diğer protein bileşenleri olan hTERT (İnsan Telomeraz Ters Transkriptaz) ve dyskerin ile de etkileşir. SMN, hTERT ile RNA-aracılı olmayan bir şekilde bağlanır ve telomeraz aktivitesini artırır [22]. SMN, dyskerin bağlandığında dyskerin'in TR üzerindeki modifikasyon işlemini kolaylaştırır [90]. SMN, telomeraz RNP'nin çekirdekte sitoplazmaya ve oradan da Cajal Cisimciklerine (CC) taşınmasında da rol oynar. SMN, telomeraz RNP'nin CC'ye girişini ve çıkışını düzenler ve böylece telomerazın hücre döngüsüne bağlı olarak erişilebilirliğini sağlar[62].

Son çalışmalarda, SMN immünopresipitasyonlarında telomeraz aktivitesi tespit edilmiş, bu da SMN'nin telomeraz holoenzimi ile ilişkili olduğunu kanıtlamaktadır [30]. Ayrıca SMN, Koilin (CC marker proteini) ve yalancı gen tarafından kodlanan yeni tanımlanmış bir protein olan Coilp1 ile telomeraz RNA ve Küçük Cajal Cisimciğine Özgül RNA (scaRNA) 'ların bir alt kümesi ile ilişkili olduğu kanıtlanmıştır Bu ilişki, CC proteinleri ile telomeraz ve kutu C/D scaRNP'lerin biyogenezi arasındaki bağlantıyı göstermektedir [89].

1.3.5.6 SMN Proteininin Selenoprotein Translasyonundaki Rolü

Selenoproteinler, selenosistein amino asidinin bir veya daha fazla konumunda bulunduğu özgün bir protein ailesidir. Bu proteinler, antioksidan koruma, metabolik düzenleme ve tiroid hormonu sentezi gibi çeşitli fizyolojik işlevlere katılırlar. Selenoproteinlerin translasyonu, selenosistein kodlamasının eşsiz özelliği nedeniyle spesifik bir mekanizma gerektirir. Bu mekanizmanın ana unsurlarından biri SMN proteindir [91].

SMN proteini, selenoprotein translasyonunda, selenosistein kodlayan snRNP'lerin oluşumunu ve aktivitesini sağlayarak, özellikle selenosistein yerleştirilmesinde önemli bir rol oynar. Ayrıca, SMN proteini, eIF3 ve selenoprotein translasyonunda gerekli olan proteinlerle etkileşerek, selenoprotein mRNA'larının translasyonunu destekler [92].

SMN proteini, selenoprotein mRNA'larının 3' UTR'sinde yer alan SECIS adlı özğün bir RNA motifinin tanınmasını ve bağlanmasını sağlar [93]. SMN, SECIS motifini algılayan SBP2 proteini ile doğrudan bağlanır ve SECIS-SBP2 kompleksinin kurulmasını sağlar [94]. Ayrıca, selenoprotein sentezinde kullanılan Sec-tRNA adlı spesifik bir tRNA'nın olgunlaşmasında ve modifikasyonunda da kritik bir rol oynamaktadır. SMN, Sec-tRNA'nın metilasyonunu katalize eden metylosom adlı bir protein kompleksi ile etkileşerek, metylosomun işlevini arttırır [95]. Selenoprotein translasyonunda elongasyon faktörü olan eEFSec adlı özel bir faktöre bağlanarak, SMN, eEFSec'in Sec-tRNA'yı tanınmasını ve UGA kodonuna yerleştirmesini kolaylaştırır [93].

1.3.5.7 SMN Proteininin snoRNP Kompleksleri ile İlişkisi

snoRNP'ler (küçük nükleolar ribonükleoproteinler), snoRNA'lar (küçük nükleolar RNA'lar) ve proteinlerden oluşan komplekslerdir. SnoRNP'ler, rRNA'lar ve snRNA'lar gibi diğer RNA'ların transkripsiyon sonrası modifikasyonunda önemli bir rol oynarlar [96].

SMN proteini, snoRNA'ları ve snoRNP çekirdek proteinlerini (fibrilların, Nop58, Nhp2 ve Gar1) tanıyan ve birleştiren kritik bir moleküler şaperon olarak işlev görür [62]. SMN ayrıca, snoRNP'lerin çekirdekten sitoplazmaya ve oradan da Cajal Cisimciklerine taşınmasını sağlar ve böylece snoRNP'lerin hücre döngüsüne bağlı olarak erişilebilirliğini düzenler [97]. SMN, snoRNP biyogenezinde özğüllük katar, çünkü snoRNA'ların ve snoRNP çekirdek proteinlerinin farklı tipleri arasında ayırım yapabilir. snoRNA'ların Y/G kutusu adı verilen bir RNA motifini tanır ve bu motif, snoRNA'ların snoRNP çekirdek proteinleri ile etkileşimini belirler [98]. SMN, ayrıca, snoRNP çekirdek proteinlerinin RG-zengin bölgelerini tanıyarak, snoRNP çekirdek proteinlerinin SMN ile etkileşimini belirlediği keşfedilmiştir [99].

1.3.5.8 SMN Proteininin RNA Aktarımındaki Rolü

RNA moleküllerinin hücre içindeki ilgili yerlere ulaştırılmasını sağlayan kritik bir süreç olan RNA aktarımında, SMN proteini ana faktörlerden biridir. SMN, RNA'nın işlenmesi, modifikasyonu, stabilizasyonu ve fonksiyonu için gerekli olan RNA-protein kompleksleri (RNP'ler) oluşturulmasında önemli bir rol oynar [100]. SMN, snRNA'lar ve miRNA'lar gibi diğer RNA moleküllerinin taşınmasına katkıda bulunur [101]. SMN, RNA trafiğinde farklı RNA türleri ve RNP'ler arasında seçicilik gösterir. SMN, mRNA, rRNA, snRNA, snoRNA, miRNA ve diğer RNA'ları tanımlayarak bunları uygun proteinlerle eşleştirir. SMN, ayrıca RNA bağlayıcı proteinler (RBP'ler) ve RNA taşıma granülleri (RTG'ler) ile etkileşerek RNA'nın hedeflenmesi, nakli ve lokal translasyonu için gereklidir [102].

1.3.5.9 SMN Proteininin Stres Granül Oluşumundaki Görevi

Stres granül (SG) oluşumu, oksidatif stres, ısı şoku ve viral enfeksiyon gibi çeşitli hücrel strese tepki olarak mRNA'ları ve RNA bağlayıcı proteinleri (RBP) geçici olarak bir araya getirerek oluşturdukları dinamik sitoplazmik yapılardır [103]. Stres granülleri, mRNA'ların translasyonunu inhibe ederek hücrenin enerji tasarrufu yapmasını ve stres koşullarının ortadan kalkmasını beklemesini sağlar [104]. Çeşitli patolojik koşullarda, kanser ve nörodejeneratif hastalıklar gibi, SG oluşumu bozulmaktadır [105]. SG'ler, SMN proteinini içeren sitoplazmik yapılar olup, SMN eksikliği SG oluşum kapasitesini azaltmaktadır. Bu durum, hücrelerin stres faktörlerine karşı hassasiyetini artırmaktadır [106]. SMN, stres granülü oluşumunda önemli bir rol oynar, çünkü stres granüllerin çekirdek bileşenlerinden biri olan G3BP1 ile etkileşime girer ve onun oligomerizasyonunu ve aktivasyonunu düzenler. SMN eksikliği, G3BP1'in aşırı oligomerizasyonuna ve stres granülü oluşumunun bozulmasına yol açar [107].

SMN'nin stres granülü oluşumundaki özgüllüğü, SMN'nin sadece belirli mRNA'ları stres granüllerine taşıdığını gösteren çalışmalarla desteklenmektedir. Örneğin, SMN, β -aktin mRNA'sını stres granüle taşırken, GAPDH mRNA'sını taşımaz. Bu, SMN'nin mRNA seçiciliğinin, hücrenin stres altındaki sitoskeleton dinamiğini ve nöronal farklılaşmayı etkileyebileceğini düşündürmektedir [6].

1.3.5.10 SMN Proteininin Translasyondaki Görevi

SMN proteini, mRNA'nın olgunlaşması ve translasyonu için gerekli olan küçük nükleer ribonükleoprotein (snRNP) parçacıklarının montajında rol oynar. Ayrıca, translasyon

başlatma faktörü eIF4G ile doğrudan etkileşir. eIF4G, mRNA'nın 5' ucunu tanıyan ve ribozomun bağlanmasını sağlayan bir proteindir. SMN proteininin eksikliği veya bozukluğu hem snRNP hem de eIF4G üretimini ve aktivitesini azaltır. Bu da mRNA'nın translasyonunu ve protein sentezini düşürür [108]. Özellikle, nöronlarda, sinir kas kavşağındaki sinyal iletimini sağlayan asetilkolin reseptörü (AChR) gibi önemli proteinlerin translasyonu engellenir [109]. Başka bir çalışmada, SMN'nin aşağı regülasyonunun CARM1 seviyesini arttırdığı keşfedilmiştir [110]. CARM1, bir histon metiltransferaz enzimidir. Bu enzim, histon proteinlerinin arginin pozisyonlarında metillenmesini sağlayarak, kromatin yapısını ve gen ifadesini modüle eder [111]. Ayrıca, otofaji sürecini de etkileyen CARM1, otofajik vakuollerin oluşumunu ve füzyonunu düzenleyen ATG8 ailesi proteinlerinin metillenmesini sağlar [112].

1.4 SMA Hastalığının Tedavi Stratejileri

Spinal Musküler Atrofi hastalığının yönetimi ve tedavisi, çeşitli disiplinlerin bir araya gelerek beslenme, solunum, gastroenteroloji, ortopedi ve psikososyal konuları ele almasını gerektirir. İlk genel bakım ve tedavi önerileri 2007 yılında yayınlanan bir konsensüs beyanında belirlenmiştir [113]. Ancak, bu standartların uygulanması, kültürel perspektifler, sosyoekonomik faktörler ve bölgesel kaynakların varlığı gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak önemli ölçüde değişkenlik gösterir [114]. SMA için kesin tedavi stratejileri arasında antisens oligonükleotid tedavisi, küçük molekül tedavisi ve gen replasman tedavisi yer almaktadır. Bu tedaviler, motor nöron işlevini ve hayatta kalmayı iyileştirmek için işlevsel SMN proteini seviyelerini artırmayı amaçlamaktadır. Ayrıca, SMA tedavisini daha da ilerletmek için ilaç taraması ve ilacın yeniden konumlandırılması gibi diğer umut verici stratejiler de araştırılmaktadır [115]. Şu anda FDA onaylı üç tedavi bulunmaktadır: Bir antisens oligonükleotid, nusinersen (Spinraza), küçük molekül tedavisi risdiplam (Evrysdi) ve bir adeno-ilişkili virüs 9 aracılı gen değiştirme tedavisi onasemnogene abeparvovec (Zolgensma) [116].

1.4.1 Spinraza

Nusinersen (Spinraza), SMN2 geninin öncül haberci RNA'sının (premRNA) eklenmesini düzenleyerek, bu genin tam uzunlukta olgun bir haberci RNA (mRNA) oluşturmasını sağlar. Bu işlem, SMN proteininin ekspresyonunu artırır. Ekzon 7 ile intron 6 ve intron 7 arasındaki belirli bölgeler, antisens oligonükleotidler (ASO) tarafından hedeflendiğinde ekzon 7'nin dahil edilmesini teşvik eder [117].

Antisens oligonükleotidler (ASO'lar), belirli RNA bölgelerine hedeflenerek işlevlerini düzenlemek veya engellemek amacıyla oluşturulan, tek sarmallı ve sentetik DNA veya RNA molekülleridir [118]. Spinraza (nusinersen) ise, SMN2 pre-mRNA'yı bağlamak ve olgun bir mRNA üretilen ve tam uzunlukta SMN proteini olarak çevrilecek şekilde splicing'i değiştirmek üzere tasarlanmış tamamen modifiye edilmiş 2'-O-(2-metoksietil) (2'-MOE) bir ASO'dur [119].

Spinraza, her uygulamada 12 mg olarak verilir, ilk üç doz 14 günlük aralıklarla ve dördüncü doz üçüncü dozdan 30 gün sonra verilmesi şeklinde 4 yükleme dozu ile başlar. Yükleme dozlarından sonra, her 4 ayda bir bakım dozu verilir. Spinraza, SMA'nın herhangi bir alt tipi olan pediatrik ve yetişkin hastalar için onaylanmıştır ve tedavi, hastanın SMA tanısı aldıktan mümkün olduğunca kısa süre sonra başlaması gerekmektedir [120].

1.4.2 Risdiplam

Risdiplam, ağızdan alınan bir tedavi olup, SMN proteininin işlevsel üretimini artırmak amacıyla Sağkalım Motor Nöron 2 (SMN2) pre-mRNA'sının eklenmesini düzenler. Bu süreç, SMN2 ön-mRNA'sının, olgun mRNA'ya ekzon 7'nin dahil edilmesini teşvik edecek şekilde modifiye edilmesini içerir. SMN proteini seviyelerini artırarak motor nöronların işlevini ve hayatta kalmasını iyileştirmeye yardımcı olur [121].

SMA hastalığının tüm çeşitlerinde, en hafif seviyesinden (SMA tip 1) en ağır seviyesine (SMA tip 3) kadar olan durumlarda, tedavi protokolü onaylanmıştır [122]. Tedavi, günlük olarak oral yolla uygulanır, bu da kullanım kolaylığı sağlar ve invazif bir prosedür gerektirmez [123].

1.4.3 Zolgensma

Zolgensma (onasemnogene abeparvovec-xioi), gen terapisi yöntemiyle, motor nöron hücrelerine işlevsel bir SMN geni sağlar ve bu sayede SMN üretimi sağlanır. Bu işlem, hücrelerin motor nöronların sağlığını destekleyen ve temel kas işlevinin korunmasına yardımcı olan SMN proteinini üretmesine olanak sağlar. Bu terapi, SMA hastalığının ilerlemesini durdurmayı hedefler. Zolgensma'nın tasarımı, vücutta sürekli aktif kalacak şekildedir ve adeno-ilişkili virüs 9 (AAV9) adı verilen bir vektör aracılığıyla hücrelere ulaştırılır. Bu tedavi, tek bir doz olarak uygulanır ve genellikle yaklaşık 4 aylıkken tedaviye başlanan SMA hastası çocuklar için tavsiye edilir [124].

1.5 Rekombinant Proteinlerin Hastalıkların Tedavisindeki Yeri

Rekombinant protein tedavileri, genetik bozuklukların ve eksikliklerin tıbbi tedavilerini önemli ölçüde etkileyerek spesifik protein eksikliklerini giderir. Bu tedaviler, gen mühendisliği ile üretilen proteinlerin kullanımını içerir ve gen terapisi mümkün olmadığında eksik proteinleri doğrudan temin ederek fonksiyonel protein üretimini sağlar [125]. Bu çalışmalara örnek olarak, Rekombinant Faktör VIII (FVIII), hemofili A'nın tedavisinde önemli bir rol oynamış ve klinik öncesi modellerde normal pıhtılaşma fonksiyonunun geri kazanılmasında ve kanama ataklarının azaltılmasında terapötik etkinlik göstermiştir [126]. Ayrıca, Beta-talasemi gibi monogenetik bozuklukların tedavisinde protein replasman tedavisi, ciddi protein eksikliklerinin tedavisinde umut vaat etmektedir. Eksik endojen proteinlerin yerini almak üzere rekombinant beta-globin zincirleri sağlayarak, bu terapi genetik bozukluklara hedefe yönelik bir yaklaşım sunmaktadır [127]. Bu sonuçlardan hareketle, protein replasman tedavisi gen terapisi mümkün olmayan hastalıkların tedavisinde önemli rol oynamaktadır. Bu sebeple, daha fazla araştırmaya ve kullanılmaya ihtiyacı olan bir alandır.

1.5.1 Rekombinant proteinlerin hedef hücreye taşınması

Protein replasman tedavisinde en önemli sorunlardan biri, üretilen rekombinant proteinlerin hedef hücreye taşınması ve hücrenin içerisinde aktif rol almasıdır. Rekombinant proteinlerin insan hücrelerine dahil edilmesine yönelik teknikler arasında genetik modifikasyon, geçici transfeksiyon ve hücreye nüfuz eden peptit dağıtım sistemleri yer alır.

1.5.1.1 Genetik modifikasyon

Bu yöntem, rekombinant proteinin hedef hücrelere iletilmesi için adenovirüs, lentivirüs ve adeno-ilişkili virüs (AAV) gibi viral vektörlerin kullanımını içerir [128]. Viral vektörler, rekombinant proteini spesifik bir promotörün kontrolü altında eksprese edecek şekilde tasarlanabilir, böylece proteinin hücreler içinde kontrollü ekspresyonuna ve düzenlenmesine olanak sağlanır [129]. Bu yöntem yaygın olarak gen terapisi için kullanılır ve kanser tedavisi ve gen terapisi gibi çeşitli terapötik uygulamalar için rekombinant proteinlerin sağlanmasında başarıyla kullanılmıştır [130].

1.5.1.2 Geçici Transfeksiyon

Bu yöntem, rekombinant protein kodlayan plazmidin hedef hücrelere sokulması için polietilenimin (PEI) gibi kimyasal transfeksiyon ajanlarının kullanımını içerir. Plazmid hücreler tarafından alınır ve rekombinant protein plazmidten eksprese edilir [131]. Bu yöntem, protein ekspresyon çalışmaları ve protein kristalografisi³ gibi araştırma amaçlı rekombinant proteinlerin üretiminde yaygın olarak kullanılır [132].

1.5.1.3 Peptid Dağıtım Sistemleri

Bunlar, hücre zarına nüfuz edebilen ve rekombinant proteini hedef hücrelere iletebilen sentetik peptitlerdir [133]. Peptitler rekombinant proteine konjuge edilebilir, böylece proteinin hücreler içinde hedeflenen dağıtımına ve kontrollü salınımına olanak sağlar. Bu yöntem, gen terapisi ve ilaç dağıtımını gibi terapötik uygulamalar için rekombinant proteinlerin dağıtımında yaygın olarak kullanılır [134]. Protein dağıtım sistemleri, taşıyıcı olarak protein transdüksiyon alanları (PTD'ler) olarak da adlandırılan hücreye nüfuz eden peptitler (CPP'ler) içerir [135].

1.5.1.3.1 Tat (HIV-1 Transkriptif Aktivasyonun Trans-Aktivatörü)

İlk Hücre Penetre Edici Peptit (CPP), 1980'lerin sonlarında, İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü (HIV) üzerindeki çalışmalarda, transkriptif aktivatör Tat'ın Protein Transdüksiyon Alanının (PTD) kanıtlanmasıyla bulundu [136, 137]. TAT, HIV-1 tarafından kodlanan Tat proteininin 11 amino asitli arginin ve lizin açısından zengin bir dizisidir [138]. TAT, HIV-1 virüsünün gen ifadesinin düzenlenmesinde kritik bir rol oynayan bileşenlerinden biridir ve transkriptif aktivasyonun tetikleyicisi olarak işlev görür [139]. Tat proteini, alt tipe bağlı olarak 86 ila 101 amino asitten oluşur [140]. Tat, HIV-1 transkriptlerinin 5' uçlarında bulunan ve trans-aktivasyon yanıt elemanı (TAR) olarak adlandırılan bir RNA kök döngü yapısına bağlanır. Bu bağlantı, yeni sentezlenen HIV-1 transkriptlerini etkiler. Tat'ın TAR'a bağlanması, transkripsiyon kompleksinin özelliklerini değiştirir ve hücresel CDK9 ve siklin T1'i içeren pozitif transkripsiyon uzama kompleksini (P-TEFb) işe alır. Bu işlem, tam uzunlukta viral RNA üretimini artırır [141]. TAT proteininin genetik değişiklikleri, hücre içi yerleşimini ve diğer hücre içi ve hücre dışı işlevlerini belirleyebilir. Özellikle, TAT proteininin transkriptif aktivasyon yeteneği, TAT'ın TAR RNA elementine bağlanmasıyla tetiklenir ve bu etkileşim, HIV-1'in transkriptif uzamasını harekete geçirir. TAT proteininin alt tipine özgü dizilim varyasyonları, TAT'ın TAR RNA elementine bağlanma afinitesini belirler [142]. TAT ve TAT kargoları, kan-beyin bariyerini (BBB)

geçebilirler. Proteinlerin dokulara ve esas olarak beyine iletilmesinde son derece faydalıdır [143].

TAT peptidinin içselleştirilmesinin, klatriine bağımlı endositozu ve hücre yüzeyindeki heparan sülfat reseptörleri ile etkileşimleri içerdiği keşfedilmiştir [144]. Ayrıca TAT peptidinin hücre içine alınması, hücre dışı moleküllerin endositozu için makropinositoz veziküllerinin oluşumu ile ilişkilendirilmiştir. Bu mekanizma, TAT peptidlerinin hücre içi dağılımını, biyolojik etkinliğini artırır ve bu peptidlerin hücrelere etkin bir şekilde girmesini sağlar [145]. TAT peptidinin, lipid membranlar üzerinde hareket ettiği ve heparan sülfat proteoglikanlar gibi çeşitli hücresel bileşenlerle etkileşim kurarak içselleştirilmesini kolaylaştırdığı da belirlenmiştir [146].

Bu etkileşimler, TAT peptidinin hücresel girişinde önemli bir rol oynar ve farklı kargolar için bir dağıtım vektörü olarak etkinliğine katkıda bulunur. Sonuç olarak, TAT peptidi, klatriin, heparan sülfat reseptörleri ve makropinositoz ile etkileşimleri içeren karmaşık bir hücre alım mekanizması sergiler. Tüm bu mekanizmalar tam olarak aydınlatılmamasına rağmen, TAT peptidi hücrelere girebilir ve füzyon olarak sahip olduğu proteinleri hücreye taşıyabilir.

1.6 SH-SY5Y Hücre Hattının Özellikleri

SH-SY5Y, 4 yaşındaki bir kadın nöroblastoma hastasının kemik iliği biyopsisinden elde edilen ana hücre hattı olan SK-N-SH'nin bir alt klonudur [147]. Elde edilen SH-SY5Y hücre hattı, sinir bilimi ve nöroblastoma araştırmalarında sıkça tercih edilmektedir, çünkü işlevsel olarak olgun nöron fenotiplerine farklılaşma yeteneğine sahiptir [148]. SH-SY5Y hücreleri ölümsüz, proliferatif ve nöroblastom hücrelerine özgü heterojen bir hücre popülasyonundan oluşur [149]. Bu hücreler, kanserli kökenlerinden kaynaklanan genetik sapmalar sergiler ancak çoğu nörodejeneratif hastalığın patogeneziyle ilgili çoğu gen ve yolu korur [150]. Nörotoksisite, oksidatif stres ve nörodejeneratif hastalıklarla ilgili çalışmalarda yaygın olarak kullanılırlar [147]

SH-SY5Y hücre hatlarının üç boyutlu (3B) kültür sistemleri ile mikrodoku oluşturma yetenekleri, *in vivo* koşulları taklit etme açısından önemlidir. Ayrıca bu hücrenin bazı özellikleri onun tercih edilmesinde göz önünde bulundurulmuştur. Nöroblastom kökenli olması, farklılaşma yetenekleri (bu hücreler, çeşitli nöronal fenotiplere farklılaşabilirler),

retinoidlere verdikleri yanıt (SH-SY5Y hücreleri, retinoidler gibi farklılaştırıcı ajanlara yanıt verebilirler) [151]. Bazı çalışmalarda bu hücrelerin kültür koşullarına bağlı olarak kolinerjik, adrenerjik veya dopaminerjik fenotiplere farklılaştığı bildirilmiştir [152]. Ek olarak, SH-SY5Y hücrelerinin diğer hücre hatlarına kıyasla çeşitli RNA türlerinin belirgin stabilite kontrolü gösterdiği bulunmuştur, bu da sinir hücrelerinde eşsiz bir RNA metabolizması bulunduğuna işaret etmektedir [153].

1.6.1 SH-SY5Y Hücrelerinin Nörona Farklılaştırılması

SH-SY5Y hücreleri farklılaşmamış bir durumda tutulabilir ve gerektiğinde nöron benzeri fenotiplere farklılaşmak üzere uyarılabilir [154]. Farklılaşmamış hücreler normal bir metabolik hız sergiler ve metabolizmalarını mevcut substratlara göre uyarlayabilir [155]. Farklılaşmamış SH-SY5Y hücreleri, olgunlaşmamış katekolaminerjik nöronların özelliklerine sahiptir ve nöronal farklılaşma sırasında uzun nöritlere sahip birincil nöronlara benzeyen bir morfoloji sergiler [156]. Ancak, farklılaşmamış durumlarında bile tirozin hidroksilaz, dopamin beta hidroksilaz ve dopamin taşıyıcıları gibi katekolaminerjik nöronlara özgü belirteçleri eksprese edebilir [157]. Farklılaşmamış SH-SY5Y hücreleri polarize değildir, hızla çoğalır ve olgun nöronal belirteçlerin ekspresyonundan yoksundur [158]. Sonuç olarak, farklılaşmamış SH-SY5Y hücreleri, nöronal farklılaşma, oksidatif stres yanıtları ve nörodejeneratif hastalıklar dahil olmak üzere nörobiyolojinin çeşitli yönlerini incelemek için değerli bir model sistemi sunar ve farklılaşmamış bir durumdaki hücresel davranış ve yanıtlara ilişkin birçok amaç için kullanılabilir.

Farklılaşmış SH-SY5Y hücreleri, indüksiyon sonrası benzersiz özellikleri nedeniyle nörobiyoloji araştırmalarında kullanılan bir sistemdir [151]. Farklılaştırılmış SH-SY5Y'nin avantajları arasında farklılaşma sırasında G1 fazında hücre döngüsü senkronizasyonu, hücre bakımının kolaylığı, birincil nöronlara kıyasla düşük maliyet ve ayrıca insan nöron kültürleri kullanıldığında ortaya çıkan etik komplikasyonlardan kaçış yer alır [159].

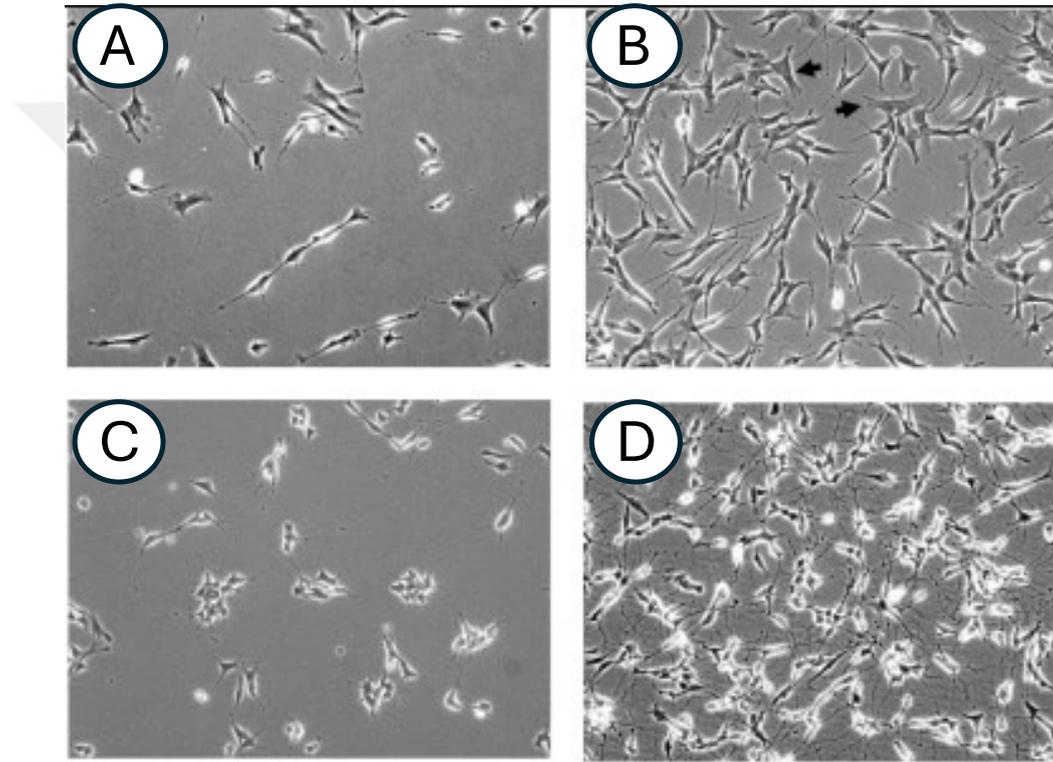
İndükleyici ajanlarla yapılan uygulamalar, SH-SY5Y hücrelerinin olgun primer nöronlara morfolojik olarak benzer olmasını sağlamaktadır. Retinoik asit, forbol ester, dibutil siklik adenosin mono fosfat gibi ajanlar kolinerjik, dopaminerjik, noradrenerjik gibi çeşitli nöronal fenotiplerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır [147].

Hücreler farklılaştığında, mitokondriyal membran potansiyelinde bir azalmaya ve oksidatif strese karşı duyarlılığın artmasına neden olduğu bildirilmiştir [155]. Ayrıca, fonksiyonel sinapslar oluşur, nörofilamentler ve büyümeyle ilişkili protein-43 (GAP-43) gibi olgun nöronların spesifik belirteçlerini de eksprese eder [153, 160]. Farklılaşma süreci aynı zamanda SH-SY5Y hücrelerinde hayatta kalma ve stres sinyal yollarını da etkiler [158]. Üstelik farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerin, nöron farklılaşması, hücre yapışması, göç ve nörit büyümesine odaklanan çeşitli çalışmalarda etkili olduğu da kanıtlanmıştır [161]. SH-SY5Y hücreleri, nöronal farklılaşmayı, oksidatif stres yanıtlarını, nörodejeneratif hastalıkları ve çeşitli hücresel süreçleri keşfetmek için önemli bir araç görevi görür ve olgun nöron hücrelerinin davranışı ve özelliklerine ilişkin amaçlar doğrultusunda kullanılır. Hücreler, Retinoik asit, forbol ester, dibutil siklik adenosin mono fosfat gibi ajanlar kolinerjik, dopaminerjik, noradrenerjik gibi çeşitli nöronal fenotiplerin ortaya çıkmasına neden oldukları için farklılaştırmada kullanılır [147].

1.6.1.1 Retinok Asit ile Farklılaştırma

Hücre farklılaşması, içsel hücresel programlar, hücre-substrat, hücre-hücre etkileşimleri, hormonlar, büyüme faktörleri, sitokinler, trofik faktörler ve morfojenler dahil olmak üzere çok sayıda çözünebilir hücre dışı sinyal molekülü arasındaki etkileşimle düzenlenen karmaşık bir süreçtir. A vitamininin biyolojik olarak aktif formu olan retinoik asit (RA), sinir sisteminde önemli bir rol oynar [162]. Hücresel büyümeyi inhibe eden ve hücre farklılaşmasını destekleyen özelliklere sahiptir. Ayrıca, hücre döngüsünün düzenlenmesi ve hücre morfolojisindeki değişiklikler dahil olmak üzere çeşitli hücresel süreçleri modüle eder. Bu özellikler, retinoik asidin, özellikle kanser ve nörolojik hastalıklar gibi çeşitli patolojik durumların tedavisinde potansiyel bir terapötik ajan olarak kullanılmasını sağlar [163, 164]. RA tedavisinin SH-SY5Y hücrelerindeki çeşitli hücresel süreçleri etkilediğini göstermiştir. Örneğin, RA kaynaklı farklılaşma, PI3K/Akt sinyal yolunu aktive eder, bu da PI3K aktivitesinin artmasına ve Ser-473'te Akt'nin fosforilasyonunda hızlı bir artışa neden olur [165]. Ayrıca, antiapoptotik Bcl-2 proteininin yukarı regülasyonunu sağlayarak SH-SY5Y hücrelerinin hayatta kalmasını teşvik ettiği de gösterilmiştir [166]. RA ile farklılaşma sürecinin nörit uzunluğunu ve MAP2 gibi nöronal belirteçlerin ifadesini arttırdığı da gösterilmiştir [167]. Artan nörit büyümesi ve Alox15 gibi spesifik genlerin yukarı regülasyonu ile de ilişkilendirilmiştir; bu sonuçlar RA'nın farklılaşmayla ilişkili süreçlerdeki rolünü göstermektedir [168]. Bunlara ek olarak, SH-SY5Y hücrelerinin RA ile farklılaşması, nöronal farklılaşma için önemli bir nörotrofik faktör olan BDNF'nin

ekspresyonu arttırdığı kanıtlanmıştır [169]. Hücresel elastikiyette de önemli değişikliklerle ilişkilendirilmiştir; farklılaşmış hücreler, farklılaşmamış hücelere kıyasla daha büyük bir elastik modül sergilediği gözlemlenmiştir [170]. Retinoik asit tedavisi ile nöroblastoma farklılaşmasına, nöritik süreçlerin oluşumu ve yayılması ve nörona özgü enzimlerin, nörotransmitterlerin ve nörotransmitter reseptörlerinin indüksiyonu eşlik eder [151]. Ayrıca, RA tedavisi, asidik iyon kanallarının (ASIC) ekspresyonunu artırarak hücrenin fenotipini değiştirir [159]. Şekil 1.6'da 2 SH-SY5Y hücre tipinin farklılaşmamış ve RA ile farklılaşmış fenotipleri gösterilmiştir [165]



Şekil 1.6 : SH-SY5Y-E hücreleri (A-B), SH-SY5Y-A hücreleri (C-D), farklılaşmamış hücreler (A-C), 5 gün boyunca 10 μM RA ile farklılaşmış hücreler (B-D) [165].

1.6.1.2 Dibütiril Siklik Adenozin Monofosfat (dbcAMP) ile Farklılaştırma

Retinoik asit ve forbol esterlerin yanı sıra dbcAMP, SH-SY5Y hücrelerinin nöronlara farklılaşması için yaygın olarak kullanılır [171]. dbcAMP, farklılaştırma mekanizmasında yer alan spesifik hücresel sinyal yollarını aktive ederek nöronal farklılaşmayı sağlar [172]. Bu yöntemle, SH-SY5Y hücrelerinde oksidatif fosforilasyonun artan etkinliği kanıtlanmış, hücresel biyoenerjeticin düzenlenmesini içerdiği anlaşılmıştır [173]. Çalışmalar, 1 mM konsantrasyonda dbcAMP uygulamasının, üç günlük bir süre zarfında, farklılaşmamış

hücre kültürlerinde meydana gelen hücre kümelenmesini önemli ölçüde azalttığını ve belirgin bir nörit uzaması ve dallanma oluşturduğunu ortaya koymuştur [174].

1.6.1.3 Forbol Ester ile Farklılaştırma

Bu farklılaşma süreci, SH-SY5Y türevi nöronlar olarak bilinen ve çeşitli maddeler kullanılarak elde edilebilen nöron benzeri hücrelerin gelişmesine yol açar [175]. SH-SY5Y hücreleri 12-0-tetradekanoil-forbol-13 asetat (TPA) gibi forbol esterlerle farklılaştığında, katekolaminlerin alımı, salınımı ve üretimi dahil olmak üzere çeşitli özellikler sergilerler [176]. SH-SY5Y hücreleri, forbol esterleri ve büyüme faktörleriyle tedavi edildiğinde dopaminerjik nöronlarla benzerlikler gösterdiği için çoğunlukla Parkinson hastalığı çalışmalarında kullanılır [177]. Bazı çalışmalar, forbol esterlerin protein kinaz C'nin aktivasyonunda, dolayısıyla SH-SY5Y hücrelerinin nöronal farklılaşmasını indüklemeye anahtar bir faktör olduğunu göstermiştir [178].

2. TEZİN AMACI

Spinal Musküler Atrofi 10.000 doğumda 1 sıklığı olan, bebek ölümlerinin en yaygın genetik nedenidir. SMA hastalığı, SMN proteini eksikliğinden kaynaklanmaktadır. SMN, proteini hücrelerde 2 kopya halinde bulunur. Telomerik kopya olan SMN1'deki mutasyonlar sonucu SMN proteini üretilmez. Sentromerik kopya SMN2 ise yalnızca %10 işlevsel protein üretebilir, %90 SMN Δ 7 adlı işlevsiz protein üretir.

SMA hastalığının, faz 3 çalışmasında olan tedavi stratejileri ve FDA onaylı güncel 3 tedavisi vardır. SMN proteini eksikliğinin yüksek oranda ölümcül olması ve henüz tam tedavisinin olmaması sebebiyle araştırmaların yapılması gereken bir alandır.

Tez çalışması kapsamında, SMN proteini üreten SMN1 geni ve hücreye girişini sağlayacak TAT peptid dizisi prokaryotik ekspresyon vektöründe üretilen proteinin *in vitro* aktivitesi tespit edilerek SMA hastalığı için ilaç ön adayı oluşturulacak.

Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen araştırmalar Şekil 2.1'de verilmiştir.

Birinci basamakta, klonlama çalışmaları yapıldı. Bu amaç doğrultusunda;

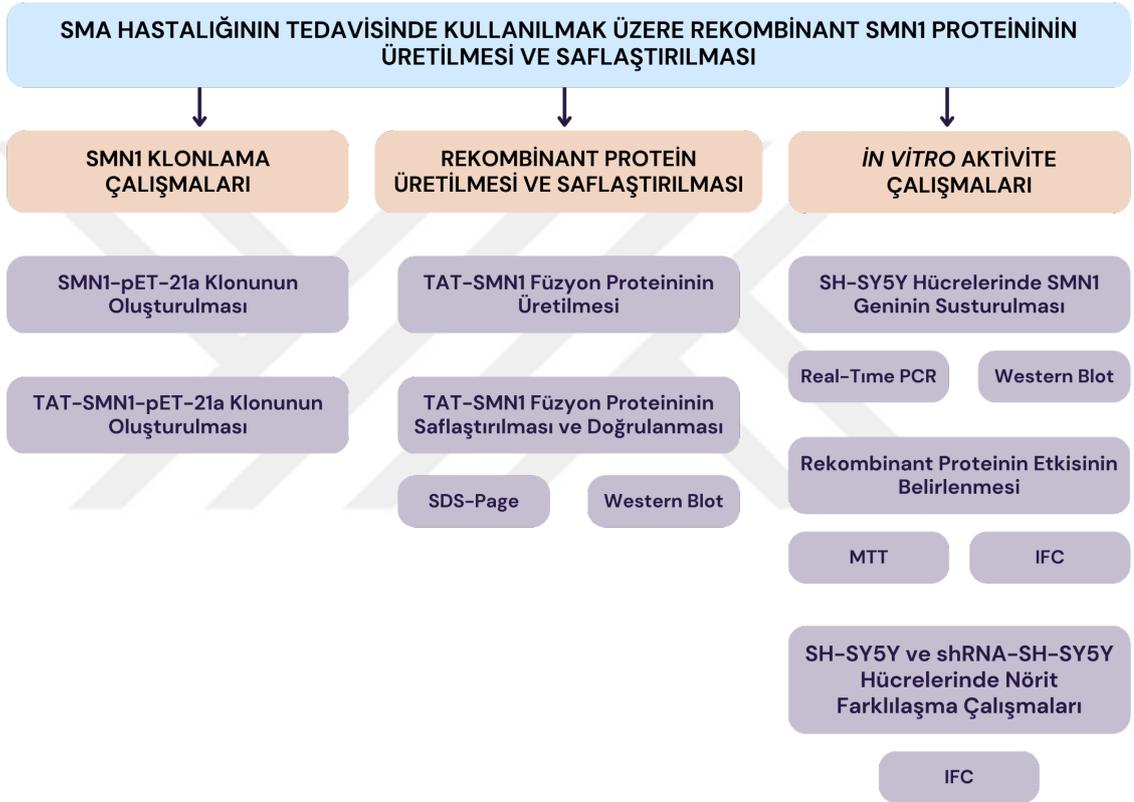
- SMN1 geni pET-21a vektörüne klonlandı.
- TAT dizisi, SMN1-pET-21a vektörü içerisine, SMN1'in hemen önüne gelecek şekilde klonlandı.

İkinci basamakta, TAT-SMN1 füzyon proteininin üretimi ve üretilen proteinin saflaştırılma deneyleri yapıldı. Bu amaca uygun olarak aşağıdaki çalışmalar yapıldı.

- TAT-SMN1 klonu, protein ekspresyon için BL21(DE3) codon plus bakterisine klonlandı.
- TAT-SMN1-pET-21a in BL21(DE3) codon plus klonu IPTG ile indüklenerek protein üretimi gerçekleştirildi.
- Bakteriler lizis edilerek tüm proteini lizat olarak elde edildi.
- His-Tag metodu kullanılarak üretilen TAT-SMN proteini saflaştırıldı.
- Saflaştırılan protein, protein seviyesinde hem SDS-Page hem de Western blot teknikleriyle doğrulandı

Üçüncü basamakta, saflaştırılan proteinin *in vitro* aktivitesi belirlendi.

- SH-SY5Y hücrelerinde SMN1 geni, shRNA tabanlı lentivirüs sistemiyle susturma çalışmaları yapıldı.
- Saflaştırılan TAT-SMN1 proteininin nöroblastoma hücre modeli olan SH-SY5Y hücrelerindeki proliferatif etkisi belirlendi.
- SH-SY5Y hücreleri nörona farklılaştırılarak, üretilen rekombinant proteinin *in vitro* aktivitesi protein düzeyinde IFC deneyi ile belirlendi



Şekil 2.1: Tez iş akış şeması

3. MATERYAL VE YÖNTEMLER

3.1 Materyaller

3.1.1 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Laboratuvar Cihazları

Deneysel süreç boyunca farklı cihazlar, kitler ve solüsyonlar kullanılmıştır. Cihazların kalibrasyonları ve bakımı düzenli olarak yapılarak, deneyin doğruluğu ve güvenilirliği sağlanmıştır. Kullanılan cihazlar ve markaları Tablo 3.1’de verilmiştir.

Tablo 3.1: Deneysel çalışmalarda kullanılan cihazların listesi.

Cihaz İsmi	Marka
Görüntüleme Sistemi	UVP BioSpectrum
Isıtıcı Blok	FALC/ İtalya
Vorteks, Isıtmalı Manyetik Karıştırıcı	Velp Scientifica
Hassas Terazı	Sartorius / Almanya
Otoklav	Hirayama / Japonya
Etüv	WTB / Almanya
Otomatik Pipetler	Thermo, Eppendorf
Elektrikli Pipet Pompası	IsoLab
DNA Elektroforez Sistemi	Minicell Primo
RNA Elektroforez Sistemi	Apelex / İngiltere
SDS PAGE Aparatları	BioRad
PCR Cihazı	Techne Progene / İngiltere
Real Time PCR Cihazı (Light-Cycler 480)	Roche Life Science
Elektroforez Güç Kaynağı	Thermo Scientific
Luminometre (Luminoskan™ Microplate)	Thermo / ABD
Döner Hareketli Çalkalayıcı	Thermo / ABD
Horizontal Çalkalayıcı	GFL / Almanya
Saf Su Cihazı	Human Corporation
UV Görüntüleme Sistemi	Vilber Lourmat
Spektrofotometre, µDrop™ Plate	Multiskango, Thermo
CO ₂ İnkübatör	Nuaire / ABD
Inverted Mikroskop, Floresan Mikroskobu	Nikon / Japonya
-80 °C Derin Dondurucu	Thermo / ABD
Buzdolabı (+4 °C / -20°C), Mikrodalga	Arçelik / Türkiye
Buz Makinesi	Hoshizaki / Japonya
pH Metre	Hanna / ABD
Su Banyosu	Elektromag / Türkiye
Ultrasonik Su Banyosu	PlusLab
Çalkalamalı İnkübatör (Isı Ayarlı)	GFL / Almanya
Soğutmalı Santrifüj	Sigma / Almanya
Mikro Santrifüj	Thermo / ABD
Soğutmalı Mikro Santrifüj	Hanil Science
Laminar Air Flow	Telstar Bio II / İspanya

3.1.2 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kitler / Kimyasallar

Deneysel çalışmalar için birçok kimyasal malzeme ve hazır kit kullanılmıştır. Kullanılan kimyasal malzemeler risk faktörleri dikkate alınarak, uygun koşullarda hazırlanarak muhafaza edilmiştir. Kullanılan kitler üreticinin talimatları doğrultusunda kullanılmıştır.

Tablo 3.2: Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasalların listesi.

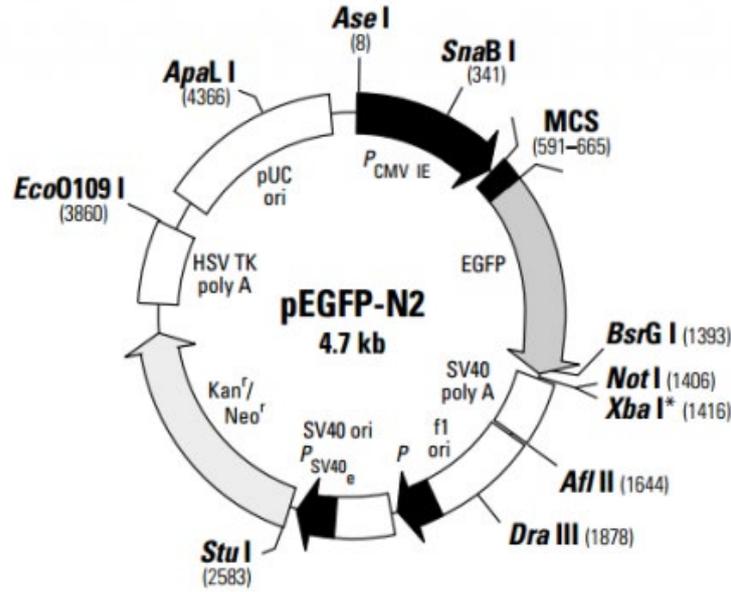
Malzeme Adı	Marka
Bakteri Kültüründe Kullanılan Malzemeler	
Petri Kutuları (Steril)	IsoLab
50 mL ve 15 mL Falkonlar (Steril)	IsoLab
GeneJET Plasmid Miniprep™ Kit	Thermo Scientific
Midi-NucleoBond® Xtra™ Kit	Macherey-Nagel
LB Agar Besiyeri	Pronadisa
LB Broth Besiyeri	Pronadisa
Ampisilin ve Kanamisin Antibiyotikleri	Sigma
Gliserol	Sigma
CaCl ₂	Sigma
IPTG	Sigma
DNA Deneyslerinde Kullanılan Malzemeler	
Agaroz, Etidyum Bromür (Et-Br)	Sigma
1 kb DNA Ladder, 6X Yükleme Boyası	Thermo Scientific
Tris Base, Borik Asit	Sigma
GeneJET Gel Extraction™ Kit	Thermo Scientific
Restriksiyon Endonükleaz Enzimleri	Thermo Scientific, NEB
T4 DNA Ligaz	Thermo Scientific, NEB
Taq DNA Polimeraz Enzimi (5 U/μL)	Thermo Scientific
10X Taq Tamponu (+KCl)	Thermo Scientific
dNTP Karışım (10 mM)	Thermo Scientific
MgCl ₂ (25 mM)	Thermo Scientific
RNA Deneyslerinde Kullanılan Malzemeler	
innuPREP RNA Mini Kit 2.0	Analytik Jena
MOPS (3-(N-morpholino) propansülfonik asit)	Merck
Reverse Transkriptaz Tamponu (5X)	Thermo Scientific
SYBR® Green PCR Master Karışımı	Ampliqon
Oligo(dT)	Thermo Scientific
dNTP Karışım	Thermo Scientific
RiboLock RNaz İnhibitörü	Thermo Scientific
RevertAid Reverse Transkriptaz Enzimi	Thermo Scientific
96 Kuyucuklu PCR Plakası	Roche Life Science
DEPC (Diethyl Pirokarbonat)	Sigma
β-merkaptoetanol, Formaldehit	Merck
İnsülin Enjektörü (Steril)	Bd Micro-Fine
Etanol	Merck
NaAc (Sodyum Asetat), EDTA	Sigma

Tablo 3.2 (devam)

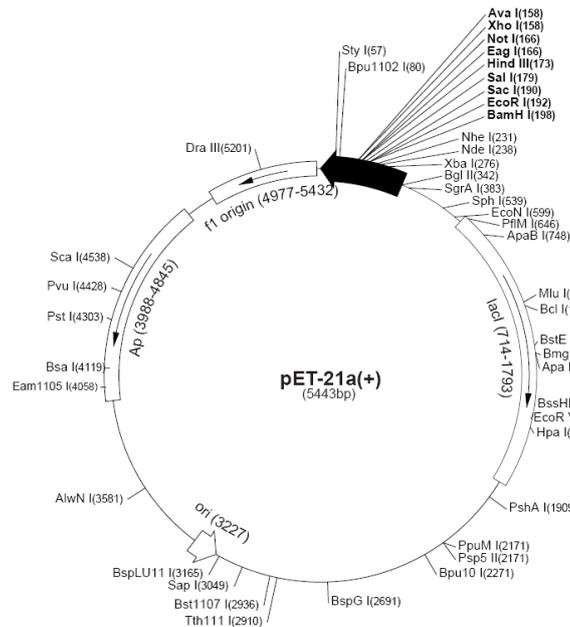
Kimyasal Malzeme / Kit Adı	Marka
Protein Deneylerinde Kullanılan Malzemeler	
Proteaz İnhibitör Tabletleri	Roche
Akrilamid/Bisakrilamid (37.5/1)	Sigma
APS (Amonyum Persülfat)	Merck
TEMED (Tetrametiletildiamin)	Sigma
4X Laemmlı Örnek Boyası	BoRad
EGTA, SDS, Glisin, NaCl	Sigma
PageRuler™ Plus Prestained Protein Belirteci	Thermo
PVDF Membranı	Millipore
Pierce™ ECL	Thermo
Etanol ve Metanol	Merck
Tween®-20	Thermo
Tris, Borik Asid, EDTA	Sigma
Amonyum Persülfat (APS)	Merck
Tetrametiletildiamin (TEMED)	Sigma
β-aktin Mouse mAb	Santa Cruz
m-IgGK BP-HRP (Sekonder Antikor)	Santa Cruz
Coomassie Brilliant Blue G-250	Sigma
Resin	Sigma
Ni-NTA Kolon	Sigma
His-Tag Protein Saflaştırma Kiti	Sigma
Hücre Kültürü Deneylerinde Malzemeler	
FCS (Fetal Calf Serum)	Gibco
EDTA (Etilendiaminetetraasetik Asit)	Sigma
L-Glutamin, Tripsin	Sigma
DMSO (Dimetil sülfoksit)	Sigma
Tripan Mavisı	Sigma
Ependorflar (1,5 mL'lik ve 2 mL'lik, Steril)	IsoLab
PBS (Phosphate Buffered Salin)	Sigma
Pastör Pipeti (3 mL, Steril)	IsoLab
Serolojik Pipetler (10 mL ve 25 mL, Steril)	Sarstedt
Flasklar (25 cm ² ve 75 cm ² , Steril)	Sarstedt
Steril Filtreler (0,22 µm ve 0,45 µm)	Sartorius
BSA (Bovine Serum Albumin)	Sigma
Penisilin-Streptomisin Solüsyon (100X)	Gibco
Antibiyotik-Antimikotik Solüsyon (100X)	Gibco
Hücre Kültürü Plaka (96, 24, 12, 6 Kuyucuklu)	Sarstedt
MTT	Sigma
HCl, İzopropanol	Sigma
Paraformaldehit	Sigma
DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol)	Sigma
Antifade Reagent	Invitrogen
Metanol, Kristal Viyole	Sigma
Protamin Sülfat	Sigma
Puromisin	Sigma

3.1.3 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Vektörler

Rekombinant TAT-SMN proteininin üretimi için ilk olarak SMN1-pEGFP-N2 (Şekil 3.1) klonu yurtdışından temin edildi. Daha sonra, SMN1 geni restriksiyon enzimlerle kesilerek pET-21a (Novagen) vektörüne klonlandı (Şekil 3.2) ve SMN1-pET21a klonu elde edildi. Sonraki aşamada ise TAT dizisi oligoları birbirine bağlandıktan sonra SMN1-pET21a vektörüne klonlanarak TAT-SMN1-pET21a vektörü elde edildi.

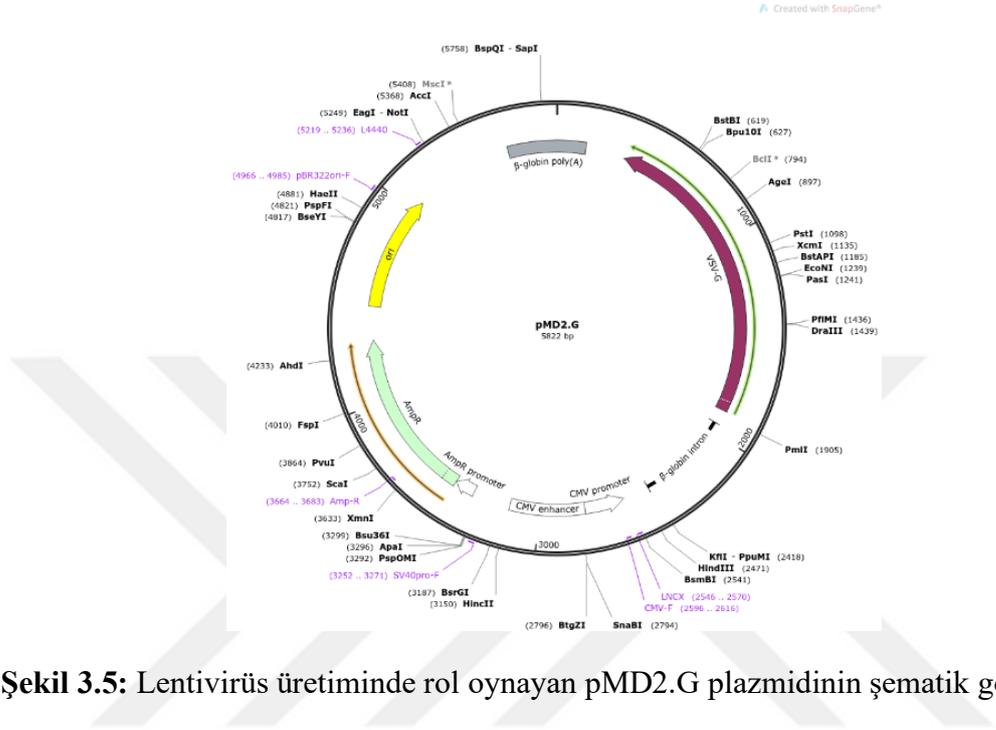


Şekil 3.1: pEGFP-N2 vektörünün şematik gösterimi.

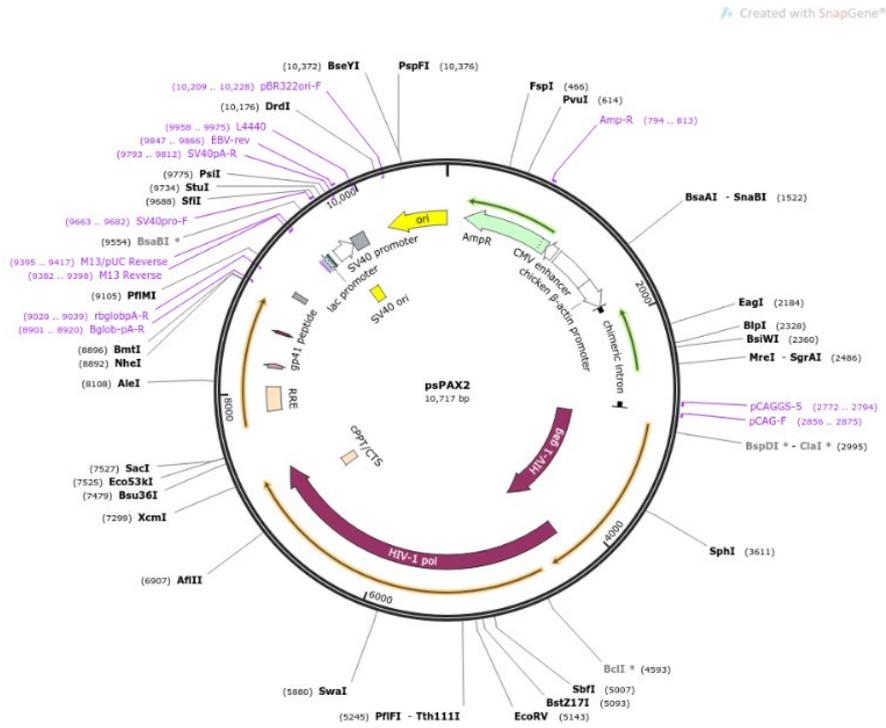


Şekil 3.2: pET-21a vektörünün şematik gösterimi.

SMN1 genini susturmak amacıyla pLKO.1-TRC vektörüne klonlama çalışmalarından sonra HEK293T hücrelerine transfeksiyon gerçekleştirilmiştir. Bu transfeksiyon esnasında, lentivirüslerin üretiminde gerekli olan pMD2.G ve psPAX2 plazmidleri de kullanıldı. Bu vektörler Şekil 3.5 ve Şekil 3.6’da gösterilmiştir.



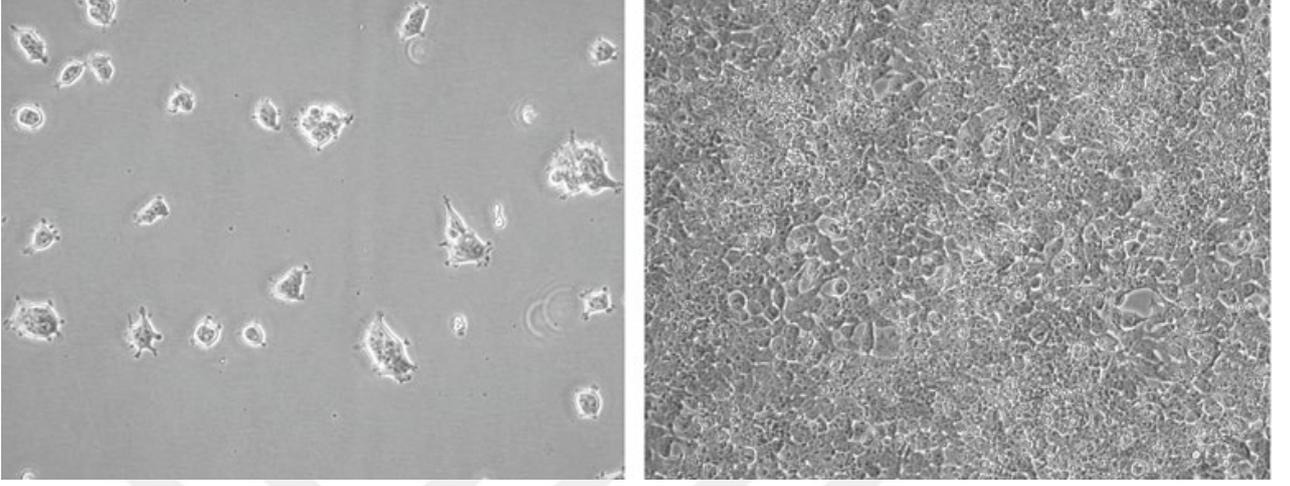
Şekil 3.5: Lentivirüs üretiminde rol oynayan pMD2.G plazmidinin şematik gösterimi.



Şekil 3.6: Lentivirüs üretiminde rol oynayan psPAX2 plazmidinin şematik gösterimi.

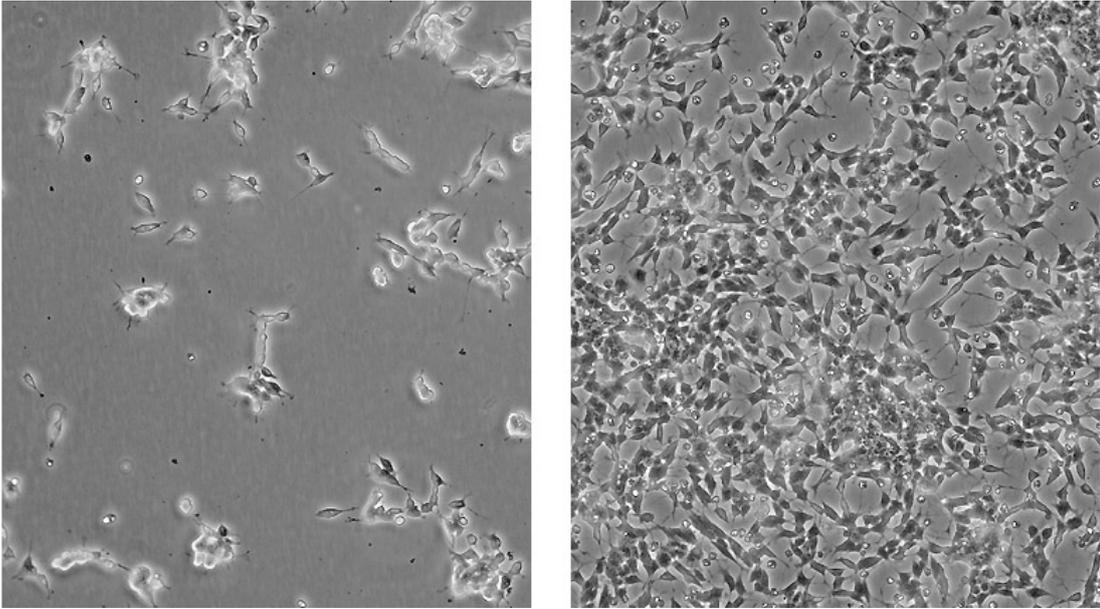
3.1.4 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Hücreler

ATTC'den HEK293T hücreleri, lentivirüs üretiminde kullanılmak için satın alınmıştır. Hücrenin inverted mikroskop altındaki görüntüsü Şekil 3.7'de verilmiştir.



Şekil 3.7: HEK293T hücre hattının 40x büyütme ile mikroskop görüntüleri (ATCC).

ATTC'den satın alınan SH-SY5Y, insan nöroblastoma hücre hattı SMN1 geni susturulduktan sonra rekombinant TAT-SMN proteininin *in vitro* aktivite deneylerini belirlemek için kullanılmıştır. Hücrenin inverted mikroskop altındaki görüntüsü Şekil 3.8'de verilmiştir.



Şekil 3.8: SH-SY5Y hücre hattının 40x büyütme ile mikroskop görüntüleri (ATCC).

3.1.5 Klonlama Çalışmalarında Kullanılan Primerler

Tez çalışması kapsamında öncelikle klonlama basamaklarında TAT dizisinin oligoları birbirine bağlanarak SMN1-pET-21a vektörüne klonlandı. Daha sonra SMN1 shRNA klonlama deneylerinde SMN1 shRNA 210 ve SMN1 shRNA 522 oligolarının ileri ve geri primerleri birbirlerine bağlanarak pLKO.1-TRC vektörüne klonlandı. Tez çalışması kapsamında kullanılan klonlama primerleri ve %GC oranı Tablo 3.3'te verilmiştir.

Tablo 3.3: Klonlama çalışmalarında kullanılan primer dizileri ve %GC oranları.

Primer Adı	Nükleotit Dizisi (5'→3')	%GC
SMN1 Ekspresyon İleri	AGGAGGATTCCGTGCTGTTCC	57,14
SMN1 Ekspresyon Geri	CAATTGAAGCAATGGTAGCTGGG	47,83
Hβ-2- Ekspresyon İleri	TTTCTGGCCTGGAGGCTATC	55
Hβ-2- Ekspresyon Geri	CATGTCTCGATCCCACTTAACT	45,5
TAT Dizisi Sense	AAAGGATCCGGCTATGGCCGTAAAAACG TCGTCAGCGTCGTCGTGGCGAATTCAA	50,88
TAT Dizisi Anti-Sense	TTTGAATTCGCCACGACGACGCTGACGAC GTTTTTTACGGCCATAGCCGGATCCTT	50,88
SMN1 shRNA 210 İleri	CCGGAAGAAGAATACTGCAGCTTCCCTCG AGGGAAGCTGCAGTATTCTTCTTTTTTTG	46,5
SMN1 shRNA 210 Geri	AATTCAAAAAAAGAAGAATACTGCAGCTT CCCTCGAGGGAAGCTGCAGTATTCTTCTT	36,6
SMN1 shRNA 522 İleri	CCGGAATCTGCTCCATGGAACTCTCTCG AGAGAGTTCCATGGAGCAGATTTTTTTTG	46,5
SMN1 shRNA 522 Geri	AATTCAAAAAAATCTGCTCCATGGAACT CTCTCGAGAGAGTTCCATGGAGCAGATT	39,6

3.2 Yöntemler

3.2.1 Laboratuvar Ortamının Temizliği ve Malzemelerin Sterilizasyonu

Laboratuvar, haftalık periyotlarla çamaşır suyu, %70'lik etil alkol ve virkon içeren dezenfektanlarla temizlendi. Hücre kültürü laboratuvarında, sterilizasyon ve dezenfeksiyon için çeşitli yöntemler kullanıldı.

Ultraviyole lamba, bakteri, virüs, mantar ve diğer mikroorganizmaları UV ışınlarına maruz bırakarak, ortam dezenfeksiyonu için kullanıldı. Çalışmalar başlamadan önce, laboratuvarın ve laminar flow kabininin UV lambası yaklaşık 30 dk açılarak sterilizasyon

sağlandı. Hücre kültürü laboratuvarında, havadan kaynaklanan kontaminasyonu önlemek amacıyla HEPA Filtre cihazı kullanıldı. Ayrıca ortam, haftalık olarak virkonlu su ve Sodyum Hipoklorit ile steril edildi.

Sıcaklıktan etkilenmeyen malzemeler ve solüsyonlar 121°C’de 20 dk süreyle otoklav cihazı kullanılarak sterilize edildi. Bu malzemeler arasında ependorf tüpler, pipet uçları ve çeşitli solüsyonlar bulunmaktadır. Otoklavın ardından, bu malzemeler 80°C’lik etüvde kurumaya bırakıldı. Otoklavlanmaya uygun olmayan çözeltiler ise 0.22-0.45 µm’lik filtrelerden geçirilerek steril hale getirildi.

RNA çalışmalarında, ortam ve malzemelerdeki RNaz’ların inaktive olması için %0.1 DEPC’li su kullanıldı. Çalışma alanı ve gerekli araç gereçler, Biokon A dezenfektanı ve %70’lik Etil alkol ile muamele edildikten sonra kurutulur ve steril hale getirildi.

3.2.2 Klonlama Çalışmalarında Kullanılan Teknikler

3.2.2.1 Bakteri Besiyerlerinin Hazırlanması

Luria Broth (LB) hem katı hem de sıvı besiyeri için kullanılmıştır. Üretici talimatına göre katı besiyeri için LB Agar, önerilen miktarda dH₂O içinde çözülerek otoklavlanmıştır. Daha sonra 40-45°C’ye kadar soğuması beklenmiştir. Soğuyan besiyerine, son konsantrasyonu 100 µg/mL ampisilin veya 30 µg/mL kanamisin olacak şekilde eklenmiştir. Hazırlanan LB agar karışımı, petri kaplarına dökülerek katılacağı için bekletilmiştir. Petri kapları 4°C’de ışıktan korunarak saklanmıştır.

Sıvı besiyeri hazırlığı için ise, üretici talimatı doğrultusunda 1 Litre için gerekli LB broth tartılarak, dH₂O içinde çözülmüştür. Çözünen LB broth, 121°C’de 20 dk süreyle otoklav cihazında sterilize edilmiştir. Ardından, sıvı besiyeri 4°C’de saklanmıştır.

3.2.2.2 Kompetent Hücrelerin Hazırlanması

Kompetent hücre deneyine başlamadan önce 0.1 M CaCl₂, 1 Litrelik erlen, 200 ependorf, %40’lık gliserol hazırlandı ve otoklavda steril edildi. *E. coli* suşlarından (*XL-1 Blue*, *DH5a*) hücreler, gliserol stoktan antibiyotiksiz petrilere tek koloni ekimi yapılarak bir gece 37°C’de inkübe edildi. Sonraki gün, tek kolonilerden bir tanesi seçilerek 10 mL LB sıvı besiyerine ekim yapıldı ve bir gece 37°C’deki çalkalamalı etüvde inkübe edildi. 1 Litrelik erlene 95 mL LB sıvı besiyeri eklendi ve ön kültürden 5 mL inoküle edilerek 37°C’deki çalkalamalı etüvde inkübasyona bırakıldı. Düzenli olarak absorbans ölçümleri kontrol edildi. OD₆₀₀ değeri 0.5-0.6 arasına ulaşınca bakteri kültürü, 50 mL’lik steril falkonlara

paylaştırıldı. Daha sonra 4°C’de 5.000 rpm’de 5 dk. santrifüj yapıldı ve süpernatant uzaklaştırıldı. Kalan pellete 25 mL 0.1 M CaCl₂ eklendi ve yavaşça pellet çözüldü. Hücre süspansiyonu 45 dk. boyunca buz üzerinde bekletildikten sonra 4°C’de 5.000 rpm’de 5 dk. santrifüj yapıldı ve süpernatant uzaklaştırıldı. Kalan pellete 10 mL 0,1 M CaCl₂ çözeltisi eklenerek tekrar yavaşça çözüldü. 1-4 saat kadar buz üzerinde bekletildi. Son aşamada, 10 mL %40’lık soğuk gliserol eklenerek karıştırıldı. Bu karışım, 2 mL’lik ependorflara 200’er µL olacak şekilde bölündü ve -80°C’de saklandı.

3.2.2.3 Kompetent Hücrenin Etkinliğinin Belirlenmesi

Klonlama çalışmaları için oluşturulan kompetent hücreler, halkasal plazmitlerle 100 ng, 10 ng ve 0.1 ng konsantrasyonlarında transforme edildi. Transformasyon sonrası, seçici antibiyotik içeren petri kaplarında koloniler sayıldı. Transformasyon etkinliği 95-100 cfu/µg olan kompetent hücreler bu çalışmalarda tercih edildi. Kompetent hücre etkinliği formül kullanılarak hesaplandı.

$$\frac{\text{Koloni sayısı (cfu)}}{\text{DNA konsantrasyonu}} \times \frac{1 \times 10^3}{\mu\text{g}}$$

3.2.2.4 Gliserol Stok Hazırlanışı

Bakteri ön kültürü, bek alevi yanında etiketlenmiş ependorf tüplere 200 µL olacak şekilde paylaştırıldı. Üzerine %40’lık steril gliserolden 200µL eklendi ve -80°C’ye kaldırılarak bakteri soyu sonraki çalışmalar için saklandı.

3.2.2.5 Primer Tasarımı

Tez çalışmasında klonlama, ekspresyon, amacıyla kullanılan primerler, www.ncbi.nlm.nih.gov, www.restrictionmapper.org ve www.idtdna.com gibi internet siteleri kullanılarak tasarlandı. Primerler tasarlanırken; ileri ve geri primerlerin T_m değerlerinin birbirine yakın olmasına, saç tokası yapısı oluşmamasına ve nükleotit dağılımının eşit olmasına, G-C bakımından az olmasına özen gösterildi. Tasarlanan primerlerin kontrolü NCBI Blast kullanılarak analiz edildi.

3.2.2.6 TAT Dizilerinin Bağlanma Reaksiyonu

TAT peptid dizisinin ileri ve geri primer uçlarına *EcoRI*- *BamHI* kesim bölgeleri eklenerek sense ve antisense olarak tasarlandı. Primerlerin birbirine bağlanması için Tablo 3.4’te verilen koşullarda reaksiyon hazırlandı ve 95°C’de 5 dk inkübe edildi. Daha sonra *EcoRI*-

BamHI enzimleri ile kesildi ardından PCR pürifikasyonu yapılarak, SMN1-pET-21a vektörüne klonlandı.

Tablo 3.4: TAT dizisi ileri ve geri primer bağlanma bileşenleri.

Bileşenler	Miktar
TAT ileri primer (50pmol)	1 µL
TAT geri primer (50pmol)	1 µL
dH ₂ O	48 µL
Son hacim	50 µL

3.2.2.7 Küçük Ölçekli Plazmit DNA İzolasyonu

Gliserol stoktan ampisilin veya kanamisin antibiyotiği içeren 10 mL LB besiyerine ekim yapıldı. Bir gece 37°C'deki çalkalamalı etüvde inkübe edildi ve plazmit izolasyonu GeneJET Plasmid Miniprep™ kitinin önerdiği şekilde yapıldı. Ön kültür 11.000 g'de 10 dk. santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Pellet 250 µL resüspanسیون ile süspanse hale getirildi. Süspanse pellet, 2 mL'lik ependorf tüplere alınarak 250 µL lizis tamponu eklendi. Tüpler 3-6 kez alt üst edilerek lizis olması beklendi. Daha sonra 350 µL nötralizasyon solüsyonu eklendi ve tüpler 3-6 kez alt üst edilerek örneğin kirli beyaz olması beklendi. Ependorflar, 11.000 g'de 10 dk. santrifüjü yapıldı. Süpernatant GenJET™ kolona 700 µL olacak şekilde transfer edildi ve kolon 11.000 g'de 1 dk. santrifüj yapıldı. Alt kısım atıldı ve kolonun üzerine 600 µL yıkama solüsyonu 1 eklenerek 11.000 g'de 1 dk. santrifüj edildi. Alt kısım atıldı ve kolonun üzerine 500 µL yıkama solüsyonu 2 eklenerek 11.000 g'de 1 dk. santrifüj edildi. Son olarak kolonun altı atılarak üzerine ekleme yapılmadan 2 dk 11.000 g'de santrifüj yapıldı. Kolon temiz ependorf tüpüne alınarak üzerine 42°C'ye ısıtılmış 50 µL dH₂O eklendi ve 5 dk. oda sıcaklığında bekletildi. Kolon 11.000 g'de 1 dk. santrifüj edilerek elüsyon alındı. Plazmit DNA miktarı belirlendi ve -20°C'de saklandı.

3.2.2.8 DNA Miktar Tayini

DNA konsantrasyonu, µDrop™ Plate cihazı ile 260 nm'de absorbans değerleri ölçülerek belirlendi. Protein kirliliğini belirlemek amacıyla 280 nm'de absorbans alındı. Her DNA örneğinden 2 µL ve kör olarak 2 µL dH₂O kullanıldı. DNA miktarı ve saflığı aşağıdaki formül yardımıyla hesaplandı.

$$\text{DNA miktarı (ng/µL)} = A_{260} \times 50 \text{ ng/µL} \times (10 \text{ mm}/0.49 \text{ mm})$$

$$\text{Saflık} = A_{260} / A_{280}$$

3.2.2.9 Restriksiyon Endonükleaz Kesimi

Klonlama çalışmalarında vektör içerisinde çıkarılmak istenen bölge veya rekombinantların tespiti için vektörlerin iki ucunda (tek enzim kesimi de olabilir) bulunan restriksiyon kesim bölgeleri kullanıldı. Restriksiyon endonükleaz enzimlerinin çalışabilmesi için üreticinin aynı markalı ürünleri kullanılarak, son hacim 1 µg veya 3 µg olacak şekilde DNA örneği eklenerek kesim reaksiyonları hazırlandı. 37°C’de 1 saat, 3 saat veya 16 saat kesim reaksiyonları gerçekleştirildi. Thermo Scientific™ FastDigest™ ve NEB marka enzimler Kesim sonuçları agaroz jel elektroforezinde yürütülüp UV ışık altında analiz edildi.

3.2.2.10 DNA Agaroz Jel Elektroforezi

Kesim sonuçlarını analiz edebilmek ve DNA’yı jelde görüntülemek amacıyla %1, %1.5, %2’lik agaroz jeller hazırlandı. Yüzde orana denk gelecek şekilde agaroz tartıldı ve erlene eklenerek 0.5X TBE tamponunda çözüldü. Daha sonra mikrodalgada 3 dk kaynatıldı. Biraz soğuduktan sonra, agaroz jelle konsantrasyonu 0.5 µg/mL olacak şekilde etidyum bromür eklenerek hafifçe çalkalandı. Elektroforez kasetine döküldü ve donması beklendi. Daha sonra. Elektroforez tankı 0.5X TBE tamponu ile dolduruldu ve örnekler 6X yükleme boyası ile boyanarak (10:1 oranında) kuyucuklara yüklendi. 1 kb DNA büyüklük belirteci (marker) kullanılarak örneğin büyüklüğü belirlendi. 90 volt akımda 50 dk yürütülen jeller UV görüntüleme ile analiz edilerek sonuçlar kaydedildi. Bu deneysel aşamada kullanılan ürünler Tablo 3.5’te belirtilmiştir.

Tablo 3.5: DNA agaroz jel elektroforezinde kullanılan malzemeler.

Çözelti	Bileşimi ve Hazırlanışı
5X TBE Tamponu	54g Tris Base (Sigma), 27.5g Borik asit (Sigma), 20 mL 0.5M’lık EDTA (pH:8) tartıldı. 1 L steril dH ₂ O ile manyetik karıştırıcıda çözüldü. pH’ı 8.0’e ayarlandı. Otoklavlanıp kullanıldı.
0.5X TBE Tamponu	1 L 0.5X TBE için 100 mL 5X TBE, mezürle ölçüldü ve üzeri 900 mL steril dH ₂ O ile tamamlandı.
Et-Br Stok Çözelti	Son derişimi 10 mg/mL olarak steril dH ₂ O ile çözümlenerek hazırlandı ve folyo ile kaplı falkonda saklandı. (4°C).
6X Yükleme Boyası	0.25 g bromofenol mavisi, 30 ml gliserol ile çözülür daha sonra filtreden geçirilerek kullanılır.
1 kb DNA Marker	1 µL (DNA ladder): 1 µL (Yükleme boyası): 4 µL (dH ₂ O) oranında karıştırılarak hazırlandı.

3.2.2.11 Agaroz Jelden DNA'nın Geri Kazanılması

Jelden geri kazanılacak insert DNA veya vektör steril bıçak yardımıyla küçük parçalara ayrılır. Daha önceden boş ağırlığı belirlenmiş 2 mL'lik ependorflara konulur. Bundan sonraki prosedür GeneJET Gel Extraction™ kitinin önerdiği şekilde gerçekleştirilmiştir. 1:1 oranda bağlama tamponu (sarı renkli) solüsyon eklenir ve 55°C'de jel tamamen eriyinceye kadar inkübe edilir. Jel tamamen eridikten sonra GeneJET kolonuna 700 µL eklenir. Bir kolona maksimum 1000 µL yüklenmelidir. Daha sonra 1 dk. 13.500 rpm'de santrifüj edildi. Alta geçen süpernatant atıldı ve 600 µL yıkama tamponu eklenerek 1 dk. 13.500 rpm'de santrifüj edildi. Tekrar süpernatant atıldı ve bu kez boş olarak 2 dk. 13.500 rpm'de santrifüj edildi. Son aşamada, kolon temiz bir ependorfa alınarak üzerine yaklaşık 40°C'ye ısıtılmış 50 µL dH₂O eklendi ve 5 dk oda sıcaklığında bekletildi. 1 dk. 13.500 rpm'de santrifüj yapıldıktan sonra DNA -20°C'de saklandı.

3.2.2.12 PCR Pürifikasyonu

Jelde gözükmeyecek kadar küçük DNA parçaları için PCR pürifikasyonu yapıldı. PCR pürifikasyonu QIA quick PCR Purification Kiti kullanılarak yapıldı. Her 50 µL kesim ürününe 250 µL PBI eklendi ve biraz pipetaj yapıldı. Daha sonra bütün karışım kitin kolonuna alındı. 1 dk 13.500 rpm'de santrifüj yapılarak alttaki süpernatant kısım atıldı. 750 µL PE eklenerek tekrar 1 dk 13.500 rpm'de santrifüj yapıldı ve süpernatant atıldı. Elüsyon için kolon temiz bir ependorfa alınarak üzerine yaklaşık 42°C'ye ısıtılmış 50 µL dH₂O eklendi ve 5 dk oda sıcaklığında bekletildi. 1 dk. 13.500 rpm'de santrifüj yapıldı.

3.2.2.13 Ligasyon Reaksiyonu

Klonlanması yapılacak DNA (insert) ile lineer vektörü birbirine bağlamak için ligasyon deneyi gerçekleştirildi. Thermo Scientific™ markalı T4 Ligaz enzimi ve uygun tampon kullanılarak 16°C'de 1 gece inkübasyona bırakıldı, reaksiyon koşulları Tablo 3.6'da verilmiştir. Sonraki gün ligasyon ürünleri kompetent hücrelere transforme edildi.

Tablo 3.6: Ligasyon bileşenleri.

Bileşenler	Miktar
İnsert DNA	12 µL
Lineer vektör	5 µL
T4 DNA ligaz tampon (10X)	2 µL
T4 DNA ligaz (5 U/µL)	1 µL
Son hacim	20 µL

3.2.2.14 Transformasyon

Kompetent hücreler, -80°C'den alındı ve 10 dk buz üzerinde bekletildi. Daha sonra, 200 µL kompetent hücreye, ligasyon ürünü veya halkasal plazmit DNA'sından 1-10 µL eklendi. Bu kompetent hücre-plazmit karışımı, 40 dk boyunca buz üzerinde bekletildi. Daha sonra ependorf, 42°C'deki bir su banyosunda 2 dk bekletildi. Ardından 2 dk daha buz üzerinde bekletildi ve 800 µL LB besiyeri eklendi. 3 saat boyunca 37 °C'deki çalkalama etüvünde inkübe edildi. Bu sürenin sonunda, transformasyon kültürü, 5 dk boyunca 5.000 rpm'de santrifüj edildi ve elde edilen pellet, 60 µL LB besiyerinde süspanse hale getirilerek uygun antibiyotiği içeren petri kabına yayıldı. Petri kutuları, besiyerinin yayılan kültürü emmesi için 15 dk boyunca düz bir şekilde 37°C'deki inkübatöre konuldu. Daha sonra, petri kutuları ters çevrildi ve 16 saat inkübasyona bırakıldı. Sonraki gün petri kabındaki kolonilerden sıvı kültüre ekim yapılarak, gliserol stoklar, plazmit izolasyonu ve restriksiyon kesimler yapıldı.

3.2.3 Rekombinant Protein Üretme ve Saflaştırma Çalışmalarında Kullanılan Malzemeler ve Teknikler

3.2.3.1 Rekombinant TAT-SMN Proteininin Üretilmesi

Protein ekspresyonu için TAT-SMN1-pET-21a klonu BL21 (DE3) Codon Plus bakterisine klonlandı. Bu soyun kullanılmasının bazı avantajları şunlardır;

Kodon Yanlılığını Aşma: BL21 (DE3) Codon Plus, E. coli'de nadiren ifade edilen kodonları içeren bir genin zorla yüksek seviyede ifadesi durumunda iç tRNA havuzlarının tükenmesi durumunda meydana gelen kodon yanlılığını aşar.

Yüksek Seviyede İfade: Bu hücreler, birçok heterolog rekombinant genin yüksek seviyede ifadesini kolaylaştırır.

Zaman ve Emek Tasarrufu: Kodon yanlılığını aşmak, proteinin bir ökaryotik ifade sisteminde ifade edilmesi gerektiği durumlarda zaman ve emek tasarrufu sağlar.

TAT-SMN1-pET-21a BL21 (DE3) Codon Plus gliserol stoktan ön kültür ekimi yapıldı ve 16 saat 37°C'de çalkalamalı etüve inkübasyona bırakıldı. Sonraki gün, ön kültür 1 L'lik erlen içerisinde Ampisilin ve 240 mL LB broth üzerine eklendi ve OD₆₀₀'de 0.6- 0.7 aralığına gelmesi takip edildi. OD₆₀₀'değeri 0.6'ya ulaştığında erlenden 50 mL kültür bir falkona alındı ve 4000 g'de 20 dk santrifüjlendi pellet halinde -20°C'de saklandı (TAT-SMN – olarak isimlendirildi). Geriye kalan 200 mL kültür 15 dk buz üzerinde bekletilerek

bakterilerin üremesi durduruldu. Daha sonra son konsantrasyon 1 mM olacak şekilde IPTG (İzopropil-β-D-tiyogalaktopiranozit) eklenerek 4 saat 37°C’de 150 rpm hızda çalkalamalı etüve protein üretimi için bırakıldı. 4 saatin sonunda 200 mL kültür falkonlara alınarak 4000 g’de 20 dk santrifüjlendi. Pelletler -20°C’de 1 gece saklandı (TAT-SMN + olarak isimlendirildi). Bu aşamaya kadar alınan bütün pelletler, boş ağırlığı daha önce tartılan falkonlara alındı. Ardından sonraki aşamalarda kullanmak üzere pellet ağırlığı hesaplandı.

Sonraki gün tüm pelletler (TAT-SMN- ve TAT-SMN+ birbirine karıştırılmadan aynı işlemler yapıldı) 15 dk buz üzerinde bekletildi. Ardından pellet ağırlığının 5 katı olacak şekilde 1X Yükleme Tamponu eklenerek pellet süspansiyon haline getirildi. Ardından, son konsantrasyonu 0.1 M olacak şekilde Lizozim Enzimi eklendi ve yavaşça pipetaj yapıldı. Örnekler hafif yapışkan kıvama geldiğinde, son konsantrasyon 10 µg/mL RNase A ve 5 µg/mL olacak şekilde DNase I uygulandı. 15 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 1 mL’lik insülin iğnesi yardımıyla tüm lizatlar yeni bir falkona aktarıldı (İğne ucundan çıkarılıp karışım çekilir ve iğne takılarak lizat yeni falkona boşaltılır). Yeni falkonlardaki lizat 4°C’de 10000 g’de 30 dk santrifüj yapıldı. Süpernatanttan His-Tag protein saflaştırması yapıldı ve pellet atıldı.

3.2.3.2 Rekombinant Protein Saflaştırma

Protein saflaştırma işlemi His-Tag metodu ile yapılmıştır. His-Tag, bir proteinin C-terminaline veya N-terminaline eklenen küçük bir amino asit dizisidir, genellikle 6 ila 10 histidin kalıntısından oluşur. His-Tag metodu, proteinin Ni²⁺ gibi divalent metal iyonlarına bağlanma yeteneğini kullanır. Bu bağlanma, histidinlerin imidazol halkasının metal iyonları ile etkileşime girmesi sonucu oluşur. Bu etkileşim, nötr ila hafif bazik bir pH (genellikle 7.5- 8) aralığında gerçekleşir. His-Tag metodunun bazı avantajları şunlardır:

Küçük boyutu: His-Tag’ın boyutu genellikle dört ila on amino asit arasında değişir. Bu küçük boyutu, hedef proteinin işleviyle nadiren çakışır.

Düşük immünojeniklik: His-Tag, düşük bir immünojenikliğe sahiptir, yani bağışıklık sistemini çok az uyarır.

Çok yönlülük: His-Tag, hem doğal hem de denatüre koşullar altında çalışabilir.

Yüksek saflaştırma verimi: His-Tag metodu, yüksek kaliteli bir saflaştırma reçenesi ile kullanılır (mL başına 80 mg’a kadar protein verimi sağlayabilir).

Bu metotta Sigma marka kit, kolon ve imidazol içeren rezin reçinesi kullanıldı. Bu sayede daha efektif ve saf TAT-SMN proteini elde edildi. His-Tag metodunun kullanılabilmesi için Ni-NTA (Nikel-Nitrilotriasetik asit) afinite kromatografisi matrisi kullanıldı.

Histidin kalıntıları, His-Tag'da, immobilize edilmiş nikel iyonlarının koordinasyon küresindeki boş pozisyonlara yüksek özgülük ve afinite ile bağlanır. Hücre lizatları, matrislere yüklenir. His-Tag'li proteinler bağlanır ve diğer proteinler matrisin içinden geçer.

Bölüm 3.2.3.1'de anlatıldığı gibi son santrifüjün ardından, Ni-NTA kolonları hazırlandı. Bu işlem 300 µL rezin eklenerek başladı. Ardından 1000 g'de 1dk santrifüj ile rezin kolona tamamen yerleşti. Lizattan 200 µL alınarak SDS-Page ve Western blot deneylerinde kullanılmak üzere (TAT-SMN+) etiketlenerek 4°C'de saklandı Daha sonra üzerine 9 mL protein lizati eklendi. 8-10 kez pipetaj yapıldıktan sonra oda sıcaklığında 200 rpm'de çalkalamalı etüve bırakıldı. 1 saat boyunca belirli aralıklarla pipetaj yapılmaya devam edildi. 1 saatin sonunda 2000 g'de 5 dk santrifüj yapıldı.

Bu aşamada histidin etiketli TAT-SMN proteini kolonda kaldı, histidin içermeyen proteinler kolonun altında süpernatant olarak kaldı. Bu aşamadan sonra 0.5X Yıkama Tamponundan kolona 500 µL eklenerek pipetaj yapıldıktan sonra 1000 g'de 1 dk santrifüj yapıldı. Alttaki süpernatanttan 200 µL alınarak SDS-Page ve Western blot deneylerinde kullanılmak üzere (TAT-SMN-wash) etiketlenerek 4°C'de saklandı.

Son aşamada ise elüsyon alındı. 1X Elüsyon Tamponundan 600 µL eklenerek pipetaj yapıldı ardından 4000 g'de 15 dk santrifüj yapıldı (TAT-SMN-1.el olarak isimlendirildi). Daha sonra 500 µL 1X Elüsyon Tamponundan eklendi ve 2.elüsyon alındı (TAT-SMN-2.el olarak isimlendirildi).

Üretilen rekombinant protein, hücre kültürü kabininde 0.45 µM filtreden geçirilerek Bradford Yöntemi ile protein miktarı belirlendi. Ardından, rekombinant protein stoklama tamponu ile 1:1, 2:1 ve 3:1 oranda karıştırılarak -20°C'de saklandı. Kullanılan solüsyonlar Tablo 3.7'de verilmiştir.

Tablo 3.7: Safılaştırma için kullanılan solüsyonlar

Çözelti	İçeriği
IPTG (1 M) (Mw= 238.30 g/mol)	0.2383 g tartılarak 1 mL dH ₂ O ile çözüldü. 0.22-µM filtreden geçirilerek -20°C’de saklandı.
1X Yükleme Tamponu	4X Yükleme Tamponuna 1:3 oranda dH ₂ O eklendi.
Lizozim (0.5 M)	0.0072 g lizozim tozu, 1 mL dH ₂ O ile çözüldü. Bu çözelti daha sonra 0.22 µM filtreden geçirilerek hemen kullanıldı 1-2 gün 4°C’de saklanabilir.
RNase A (10 µg/mL)	100 mg/mL ana stoktan 1 µL alınarak 9 µL dH ₂ O ile pipetaj yapıldı (10 mg/ mL). Daha sonra bu stoktan 1 µL alınarak 9 µL dH ₂ O ile pipetaj yapıldı (1 mg/ mL). Daha sonra bu stoktan 1 µL alınarak 9 µL dH ₂ O ile pipetaj yapıldı (100 µg/ mL). Daha sonra bu stoktan 1 µL alınarak 9 µL dH ₂ O ile pipetaj yapıldı, -20°C’de saklandı.
DNase I (5 µg/mL)	33300 µg/mL ana stoktan 1.5 µL alınarak üzerine 73.5 µL DNase I Bağlama Tamponu eklenerek hazırlandı (666 µg/mL). Bu dilüsyondan 1 mL lizata 7.5 µL eklenerek kullanıldı.
1X Yıkama Tamponu	Kit içerisindeki 4X Yıkama Tamponu.1:3 oranda dH ₂ O eklenerek hazırlandı.
1X Elüsyon Tamponu	Kit içerisindeki 4X Elüsyon Tamponu.1:3 oranda dH ₂ O eklenerek hazırlandı.
Stoklama Tamponu	25 mM Tris HCl (pH: 7.3), 100 mM Glisin, %10 Gliserol

3.2.4 *İn Vitro* Çalışmalarda Kullanılan Teknikler

3.2.4.1 -80°C’den Alınan Hücre Soyunun Başlatılması

Donuk haldeki hücreler 37°C’de eritilir. Eriyen hücrelere, %10 FCS içeren DMEM eklenerek 15 mL’lik falkona alınır. 1000rpm’de 1dk santrifüj yapılır. Süpernatant atılır, pellet 2 mL %10 FCS ve %1 antibiyotik içeren DMEM ile çözülür. Daha sonra, petri kabına 8 mL besiyeri eklenir. Besiyerinin her tarafına 2 mL’lik hücre süspansiyonundan damla damla eklenir. Petri kabı etiketlenerek 37°C’de %5 CO₂ içeren inkübatöre bırakılır.

3.2.4.2 Hücre Kültürü Besiyerinin Hazırlanması

Hücre kültürü çalışmalarında SH-SY5Y hücreleri için 4°C’de saklanan 200 mM L-Glutamin içeren DMEM (Dulbecco’s Modified Eagles Medium) kullanıldı. SH-SY5Y hücreleri için, hacimce %10 FCS içeren DMEM hazırlandı ve içerisine penisilin streptomisin solüsyonundan son konsantrasyonu 1X olacak şekilde ilave edilerek kullanıldı.

Fosfat Tamponlu Tuzlu Su (10X PBS) Hazırlanması

PBS tablet, üreticinin talimatına göre, bir tablet 100 mL dH₂O (10X) ile çözülerek hazırlandı. Sterilizasyonu 20 dk 121°C'de otoklav ile yapıldı. Daha sonra 1X'e dH₂O ile sulandırılarak, 4°C'de buzdolabında muhafaza edildi.

Tripsin-EDTA (TE) Hazırlanması

%0.25 (w/v) tripsin ve 0.53 mM EDTA, 1X PBS içerisine eklendi ve 0.22 µm'lik filtreden geçirilerek hazırlandı. Daha sonra -20°C'de saklandı.

Tripan Mavisi Boyasının Hazırlanması

%0.4 (w/v) olacak şekilde tripan mavisi 1X PBS içinde hazırlandı. 0.4 g tripan mavisi 100 mL PBS'de çözüldü. Boya oda sıcaklığında saklandı.

3.2.4.3 Hücre Soyunun Pasajlanması

Petri kabındaki hücre yoğunluğu %90'a ulaştığında, üzerindeki %10 FCS'li DMEM uzaklaştırıldı. 1X PBS'den 2 mL eklenerek hafifçe hücreler yıkandı. Daha sonra üzerine Tripsin-EDTA solüsyonundan 2 mL eklenerek, inkübatörde 5 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonunda hücrelerin yüzeyden ayrıldığı görüldü. Bu aşamada üzerine 4 mL %10FCS'li DMEM eklenerek, 15 mL'lik falkona alındı. 5 dk 1000rpm'de santrifüj yapıldı. Süpernatant atıldı, alttaki pellet üzerine 6 mL %10FCS'li DMEM eklendi ve çözüldü. 3 yeni petriye 8 mL %10 FCS'li DMEM eklendi ve üzerine hücre süspansiyonundan 2 mL eklenerek pasajlanmış oldu.

3.2.4.4 Hücrelerin -80°C'de Stoklanması

Petri kabındaki yoğunluğu %90'a ulaştığında hücreler bölüm 3.2.4.3'te anlatıldığı gibi Tripsin-EDTA yardımıyla kaldırıldı. Pellet son aşamada %10 (v/v) DMSO içeren 1 mL FCS ile çözülerek cryovial tüpe veya ependorf tüpüne aktarıldı. Gerekli etiketlemeler yapıldıktan sonra hücreler hızlıca -80°C'ye kaldırıldı.

3.2.4.5 Hücrelerin Sayımı ve Hücre Deneyinin Kurulması

Hücreleri saymak için tripan mavi boyası ve Thoma Lamı kullanıldı. Bölüm 3.2.4.3'te anlatıldığı gibi hücreler pellet haline getirildi. Daha sonra pellet büyüklüğüne göre 4-8 mL %10FCS'li DMEM eklenerek pellet süspansiyonuna hale getirildi. Bu hücreden 1 mL alınarak ependorfa koyuldu. Daha sonra ependorftan başka bir ependorfa 50 µL hücre süspansiyonu alındı ve üzerine 50 µL tripan mavisi boyası eklenerek pipetaj yapıldı. Homojen olduktan

sonra 10 µL Thoma lamına aktarıldı ve inverted mikroskop ile hücrelerin sayım işlemi gerçekleştirildi. Beyaz hücreler canlı, mavi boyanan hücreler ise ölü olarak kabul edildi. Sayılan canlı hücrelerin mililitredeki toplam sayısı hesaplama yapılarak bulunur.

Toplam canlı hücre sayısı/Hücreye eklenen DMEM (mL) = Sayılan Beyaz Hücre x 2 x 10⁴

$$\% \text{ Canlılık} = \frac{\text{Canlı hücre sayısı}}{\text{Toplam hücre sayısı}} \times 100$$

3.2.4.6 shRNA Kullanarak Gen İfadesi Susturma

shRNA (short hairpin RNA), gen ifadesini susturmak için kullanılan yapay bir RNA molekülüdür. shRNA, gen susturma sürecinde, hedef genin mRNA'sını tanıyarak ve bağlanarak işlevini durdurur. Bu bağlanma, mRNA'nın protein kodlama yeteneğini engeller. Sonuç olarak, hedef genin ifadesi 'susturulmuş' olur. Bu deney dört kısımdan oluşmaktadır. İlki shRNA oligolarını birbirine bağlayarak pLKO.1-TRC vektörüne klonlanmasını içermektedir. İkincisi, klonlanan vektörün hücre kültüründe Lentiviral Sıvı üretmek için HEK293T hücrelerine transfeksiyonunu içerir. Üçüncüsü HEK293T hücrelerinden elde edilen Lentiviral sıvının, geni susturulacak hücreye uygulanmasını içermektedir. Dördüncü basamakta ise Lentivirüs uygulanan hücrelerin 96'lık plakalarda tek koloni gelecek şekilde dilüsyonunu içermektedir.

shRNA Primerlerinin Tasarlanması

shRNA primerleri <https://sirna.wi.mit.edu> internet adresinden tasarlandı. Bu primerler tasarlanırken ilk olarak, siRNA'ların ATG'nin en az 25 baz çifti olmasına dikkat edildi. İkinci olarak, özellikle AAN19 pateni kullanıldı. Ayrıca, shRNA'nın GC içeriğinin %36-52 arasında olması sağlandı. 15 ve 19 pozisyonlarında en az bir adenin (A) nükleotidinin bulunmasına özen gösterildi. Son olarak, timin (T) nükleotid tekrarlarından kaçınıldı ve intronları hedeflemeye dikkat edilerek shRNA primerleri tasarlandı.

shRNA Oligolarının Bağlanması

Tasarlanan shRNA oligolarının ileri ve geri primerleri 95°C'de 4 dk ardından 75°C'de 4 dk inkübe edilerek, oda sıcaklığında soğumaya bırakılmıştır. Bağlama reaksiyonu Tablo 3.8'de belirtilen koşullarda hazırlanmıştır.

Tablo 3.8: shRNA primerlerinin bağlama bileşenleri.

Bileşenler	Miktar
shRNA ileri primer (20pmol)	5 µL
shRNA geri primer (20pmol)	5 µL
10X NEB Tampon 2	5 µL
dH ₂ O	20 µL
Son hacim	35 µL

pLKO.1-TRC Vektörünün Kesilmesi

Oligolar birbirlerine bağlandıktan sonra, bu oligoların klonlanacağı pLKO.1-TRC vektörü *EcoRI* ve *AgeI* enzimleriyle 37°C’de 2 saat kesilerek lineer hale getirildi. Kesim ürünleri %2’lik agaroz jelde yürütüldü. 7 kb ve 1.9 kb olan 2 banttandır, büyük olan 7 kb’lik bant jelden geri kazanıldı. pLKO.1-TRC vektörünün kesim reaksiyonu Tablo 3.9’da verilmiştir.

Tablo 3.9: pLKO.1 TRC kesim planı

Bileşenler	Miktar
pLKO.1 TRC	6 µg
10X CutSmart Tampon (NEB)	5 µL
<i>EcoRI</i> (NEB)	1 µL
<i>AgeI</i> (NEB)	1 µL
dH ₂ O (Son Hacime Tamamlanır)	50 µL

pLKO.1-TRC Vektörün ve shRNA Oligolarının Ligasyonu

shRNA oligoları ve lineer pLKO.1-TRC vektörü ile ligasyon 22°C’de 30 dk süreyle Tablo 3.10’da belirtilen koşullarda kuruldu. Ligasyon ürünlerinin, dH5α kompetent hücrelerine transformasyonu gerçekleştirildi. pLKO.1-TRC ampisiline dirençli olduğu için bu petriyeler kullandı.

Tablo 3.10: shRNA oligoları ve pLKO.1-TRC ligasyon planı

Bileşenler	Miktar
Lineer pLKO.1 TRC (<i>EcoRI</i> ve <i>AgeI</i>)	3 µL
shRNA bağlanma ürünü	2 µL
T4 Ligaz Tamponu	2 µL
T4 Ligaz Enzimi	1 µL
dH ₂ O (Son Hacime Tamamlanır)	20 µL

Rekombinant pLKO.1-TRC Vektörünün Belirlenmesi

Petride üreyen kolonilerden sıvı kültüre ekim yapılarak plazmit DNA izolasyonları yapıldı. Rekombinant kolonilerin tespiti için *EcoRI* ve *NcoI* enzimleriyle 37°C’de 45 dk kesim reaksiyonları Tablo 3.11’de belirtildiği gibi kurulmuştur. Kesim sonuçları agaroz jelde görüntülendi. 5kb ve 2kb’de 2 bant veren koloniler rekombinant olduğu varsayılarak BM Laboratuvar Hizmetleri firmasına dizi analizine gönderildi.

Tablo 3.11: Rekombinant shRNA içeren vektörlerin belirlenmesi için restriksiyon endonükleaz kesim reaksiyonu.

Bileşenler	Miktar
Koloni plazmit DNA’sı	1 µg
10X CutSmart Tampon (NEB)	2 µL
<i>EcoRI</i> (NEB)	0.8 µL
<i>AgeI</i> (NEB)	0.8 µL
dH ₂ O (Son Hacime Tamamlanır)	20 µL

Büyük Ölçekli Plazmit DNA İzolasyonu

Transfeksiyon deneylerinde kullanmak amacıyla büyük ölçekli ve gliserol stoklarından ön kültür ekimi yapıldı. Sonraki gün yeni gliserol stoklar yapılarak -80°C’de saklandı. 5mL ön kültür ampisilin içeren 95 mL LB Broth’a eklendi. 1 gece 37°C inkübe edilerek plazmitin üretimi sağlandı. Daha sonra, Macharey-Nagel NucleoBond® Xtra Plus kit kullanılarak büyük ölçekli plazmit DNA izolasyonu gerçekleştirildi. İzole edilen plazmit DNA miktarı belirlendikten sonra örnekler -20°C’de saklandı.

Transfeksiyon ve Lentivirüs Üretimi

shRNA klonlama çalışmasından sonra Lentiviral Sıvı üretmesi amacıyla HEK293T hücreleri büyütüldü. Ayrıca paketleme vektörleri (pMD2.G ve psPAX2) ve klonlanan shRNA vektörlerinin büyük ölçekli DNA izolasyonu yapıldı. HEK293T hücreler antibiyotiksiz bir şekilde Bölüm 3.2.4.5’te belirtildiği gibi 2 adet 6’lık plakaya 400.000 hücre olacak şekilde bölündü.

Ertesi gün, hücrelerin tutunmasının ardından, SMN1 geninin susturulması için Tablo 3.12’de verilen oranlarda ve kontrol olarak kullanılacak pLKO.1-shSHSCR plazmidinin transfeksiyon karışımı Tablo 3.13’deki gibi hazırlandı. Hazırlanan karışımlar 30-40 dk oda sıcaklığında bekletildi. Ardından hücrelere damla damla eklendi. 48 saat sonra HEK293T hücrelerinin medyumları alınarak 1000 rpm’de 5 dk santrifüjlenerek süpernatant 4°C’de

saklanır. Hücreye taze medyum eklenir ve 72.saatte bu medyum da alınarak santrifüjlenir. Ardından 48 ve 72. Saat medyumları birleştirilerek 0.45 µm filtreden geçirilerek -80°C’de saklanır.

pMD2.G: Bu plazmit, shRNA’ların hedef hücelere teslim edilmesini sağlayan viral kabuk proteinlerini kodlayan bir plazmittir. Özellikle lentiviral vektörlerle birlikte kullanılır. Lentivirüsler, genetik materyali hedef hücreye teslim etmek için sıkça kullanılan viral vektörlerdir. *pMD2.G* plazmidi, lentiviral partiküllerin yüzeyine zararlı hedef hücreye girerken gerekli olan kabuk proteini (env) sağlar. Bu, hedef hücrelerin lentivirüsle enfekte olmasını sağlar.

psPAX2: Bu plazmid, lentiviral partiküllerin oluşturulması için gerekli olan diğer viral proteinleri (Gag, Pol ve Rev) kodlar. Lentivirüslerin hedef hücelere entegrasyonunu kolaylaştırır ve viral parçacıkların olgunlaşmasını sağlar.

Bu 3 plazmidin birlikte kullanılması, hedeflenen genin ifadesini baskılamak için shRNA’ları içeren lentiviral vektörlerin üretilmesini sağlar. Lentiviral vektörler, genetik materyali etkin bir şekilde hedef hücelere taşıyabilir ve uzun süreli ifadeyi sağlayabilir, bu da shRNA’ların uzun süreli etkisini sağlar.

Tablo 3.12: shRNA transfeksiyon bileşenleri.

Bileşenler	Miktar
pMD2.G	300 ng
psPAX2	1400 ng
Rekombinant shRNA pLKO.1-TRC	1400 ng
TurboFect™ Transfection Reagent	6 µL
DMEM (Son Hacime Tamamlanır)	400 µL

Tablo 3.13: Kontrol grubu olarak kullanılacak transfeksiyon bileşenleri.

Bileşenler	Miktar
pMD2.G	300 ng
psPAX2	1400 ng
Boş pLKO.1-shSCR	1400 ng
TurboFect™ Transfection Reagent	6 µL
DMEM (Son Hacime Tamamlanır)	400 µL

Hücrelere Lentivirüslerin Uygulanması

Lentivirüsler HEK293T hücreleri tarafından üretildikten sonra, hücre (SH-SY5Y) Bölüm 3.2.4.5'te belirtildiği gibi 6'lık plakalara 400.000 hücre (hücreler için optimize edilmeli) olacak şekilde bölünmüştür. Ertesi gün, %10 FCS'li DMEM içerisinde 8 µg/mL olacak şekilde protamin sülfat bulunan medyum hazırlanmıştır. Hücre medyumları 1.200 µL ve 1.600 µL olacak şekilde tamamlanmıştır. Medyum değişikliğinden sonra, 400 µL ve 800 µL gen susturmak için pLKO.1-TRC'li, kontrol grubu olarak kullanılacak pLKO.1-shSCR'li lentiviral sıvılar damla damla eklenerek tüm kuyular 2 mL' ye tamamlandı (400 µL ve 800 µL, farklı çalışmalarda değişkenlik gösterebilir). 48 saat sonunda, 1 µg/mL olacak şekilde puromisin antibiyotiği uygulanmıştır (Her hücrenin direnci farklıdır, puromisin miktarı literatür taraması veya 96'lık plakada farklı dozlar uygulanarak seçilmelidir). 48 saatte bir puromisin doz hatırlatması yapılmıştır. Her puromisin uygulamasından önce, medyumlar çekilmiş, bütün kuyular PBS ile yıkanmış ve medyum %10 FCS'li DMEM ile değiştirilmiştir. Bu işlemler sırasında, transfeksiyonun yapılmadığı kontrol grubuna da 1 µg/mL puromisin uygulandı ve kontrol grubunda bulunan bütün hücrelerin ölmesi beklendi, öte yandan pLKO.1-TRC ve kontrol grubu olarak kullanılacak pLKO.1-shSCR'li hücrelerin bu plazmitleri alarak puromisine dirençli olması beklendi. Bu deneyde kullanılan solüsyonların hazırlığı Tablo 3.14'de verilmiştir.

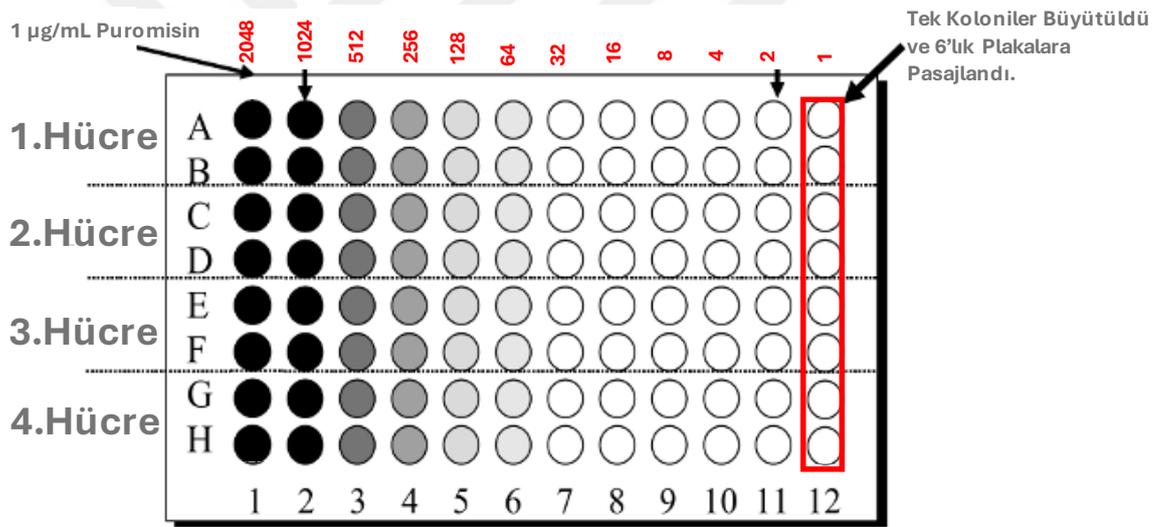
Protamin sülfat, lentiviral vektörlerin hedef hücrelere bağlanmasını ve enfekte olmasını kolaylaştırır. Hücre dışında lentiviral vektörlerin stabilizasyonunu sağlar ve hedef hücrelere yönlendirilmesine yardımcı olur. Ayrıca, protamin sülfatın negatif yüklü hedef hücre zarlarıyla etkileşime girmesi, lentiviral vektörlerin hücreye girişini artırır.

Tablo 3.14: Gen ifadesi susturma çalışmalarında kullanılan solüsyonlar.

Çözelti	İçeriği
Protamin Sülfat (1 mg /mL)	0.001 g protamin sülfat tozu, 1 mL 6M HCl ile çözüldü. Bu çözelti daha sonra 8 µg/mL olacak şekilde dH ₂ O ile sulandırılarak -20°C'de saklandı.
6M HCl	10 mL son hacimde 5012 µL %100 HCl, 4988 µL dH ₂ O eklenerek oda sıcaklığında saklandı.
Puromisin (1 mg /mL)	0.001 g puromisin tozu, 1 mL dH ₂ O ile çözüldü. Bu çözelti daha sonra 0.5 µg/mL olacak şekilde dH ₂ O ile sulandırılarak -20°C'de saklandı.

Susturulmuş Tek Koloni Seçimi

Lentiviral sıvı uygulaması yapılmamış kontrol hücrelerinin tamamı puromisin ile öldükten ve pLKO.1-TRC ile kontrol grubu olarak kullanılacak pLKO.1-shSCR'li hücrelerin doz hatırlatmaları yapıldıktan sonra, sadece gen ifadesini susturacak olan pLKO.1-TRC uygulanan hücreler, gen ifadesi susturulmuş kolonilerin ayırt edilmesi amacıyla 96 plakalara bölünmüştür. Hücreler sayılarak Şekil 3.9'da gösterildiği gibi ilk kuyuda 2048, ikinci kuyuda 1024 gibi azalacak ve son kuyulara sadece 1 hücre gelecek şekilde Bölüm 3.2.4.5'te belirtildiği gibi sayılarak yapıldı. 96'lık plaka bulunan hücrelere de puromisin uygulanarak medyumları düzenli olarak 3 günde 1 defa olacak şekilde değiştirilmiştir. Tek hücreler çoğalarak koloni olduğunda önce 6'lık plakalara daha sonra petri kabına alınarak, 1 hücreden 1 petri hücre üretildi. Gen ifadesi susturulmuş hücre soyu böylelikle başlatılabilir.



Şekil 3.9: Gen ifadesi susturulmuş tek koloni seçmek amacıyla yapılan dilüsyonun şematik gösterimi.

3.2.4.7 Hücreden Toplam RNA İzolasyonu

Bölüm 3.2.4.3'te anlatıldığı gibi TE ile kaldırılan hücreler, 2 mL 1X PBS eklenerek çözülür ve 1000 rpm'de 5 dk santrifüj yapıldı. Ardından, süpernatant atıldı ve pelletten innuPREP RNA Mini Kit 2.0 kitinin önerdiği şekilde RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Öncelikle Lizis tamponundan 400 µL eklenir ve 2 dk oda sıcaklığında bekletilir. Daha sonra pipetaj yapılır pelletin tamamı çözülür ve 3dk daha oda sıcaklığında bekletilir. Ardından kit içeriğinde bulunan D kolonuna RNA örneği yüklenerek 11.000g'de 2 dk santrifüj yapılır. Santrifüjden sonra kolon altına inen süpernatantın üzerine %70'lik soğuk

etanol eklenir. 4-5 kez pipetaj yapıldıktan sonra kolon içerisinde bulunan R kolonuna bu karışım yüklenir. 11.000g'de 2 dk santrifüj yapılır. Santrifüj sonrası süpernatant atılır, kolon temiz bir ependorfa alınarak üzerine Yıkama Tamponu HS'den 600 µL eklenerek 11.000g'de 1 dk santrifüj yapılır. Daha sonra yine süpernatant atılır, kolon temiz bir ependorfa alınarak üzerine Yıkama Tamponu LS'den 700 µL eklenerek 11.000g'de 1 dk santrifüj yapılır. Ardından, tekrar süpernatant atılır, kolon temiz bir ependorfa alınarak üzerine %80'lik etanolden 700 µL eklenerek 11.000g'de 1 dk santrifüj yapılır. Daha sonra yine süpernatant atılır, kolon temiz bir ependorfa alınarak üzerine hiçbir şey eklenmeden 11.000g'de 2 dk santrifüj yapılır. Son olarak kolon temiz ependorfa alınır, kolon içerisine 35 µL dH₂O eklenir 1 dk 11.000g'de santrifüj yapılarak elüsyon alınır. RNA miktarı belirlenerek sonraki çalışmalar için -80°C'de saklanır.

3.2.4.8 RNA Miktarının Belirlenmesi

İzolasyonu yapılan RNA, µDropTM ile 260 ve 280 nm'de ölçüldü. RNA örneğinden 2 µL ve kör olarak 2 µL dH₂O kullanıldı. RNA'nın miktarı ve saflığı formüller ile hesaplandı.

$$\text{RNA miktarı (ng/}\mu\text{L)} = A_{260} (\text{Örnek-Kör}) \times 40 \times 40 \text{ Saflık} = A_{260} (\text{Örnek-Kör}) / A_{280} (\text{Örnek-Kör})$$

3.2.4.9 RNA'dan Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

İzolasyonu yapılan RNA'ların miktarları belirlendikten sonra Revers Transkriptaz Enzimi ile 2 basamakta cDNA sentezlendi. İlk basamak; oligo-dT primerinin mRNA'ların polyA kuyruğuna eklenmesini içermektedir. İkinci basamakta RNA'nın okunarak Komplementer DNA üretimi gerçekleştirilir. Kullanılan ürünler Tablo 3.15'te verilmiştir.

Tablo 3.15: RT reaksiyonu bileşenleri ve yapılan işlemler.

Ürünler	Miktar
RNA	1 µg
Oligo-dT-primer (0,5 µg/µL)	1 µL
dH ₂ O	12,5 µL'ye tamamlandı.
5 dk 65 °C'de inkübasyon.	
5X RT tampon	4 µL
RiboLock RNaz inhibitör (20 U/µL)	0,5 µL
dNTP (10 mM)	2 µL
Reverse Transkriptaz (200 U/µL)	1 µL
Son hacim	20 µL
42 °C'de 60 dk. ardından 72 °C'de 10 dk.	

3.2.4.10 Real-Time PCR

LightCycler® 480 cihazı kullanılarak Gerçek Zamanlı PCR yapıldı. Bu çalışmada ekspresyon nicel olarak elde edildi. RNA izolasyonlarının ardından yapılan cDNA'ların kalıp olarak kullanıldığı bu sistemde, her örnek en az 3 tekrarlı olacak şekilde çalışılmıştır. Deney sonucunun daha sağlıklı olması için cDNA'ların hepsi 1000 ng/μL olacak şekilde sulandırıldı. Kontrol olarak Hβ-2-M ekspresyon primerleri kullanıldı. Tablo 3.16'da verilen bileşenler 96 kuyucuklu Real-Time plakasına eklendikten sonra üzeri şeffaf jelatin (seal) ile kapatıldı. Ardından Tablo 3.17'de verilen döngülerde cihaz çalıştırıldı. Sonuçlar Livak metoduna göre analiz edildi. Elde edilen gen Ct değerlerinin ortalaması alındı. Hβ-2-M ortak değerinden gen ortak değeri çıkarıldı ve sonuç 2'nin kuvveti olacak şekilde hesaplandı. Ardından her grup kendi kontrol grubuna bölündü, kontrol grubu ise 1 olarak alındı. Grafik hazırlama işlemi GraphPad programı ile yapıldı.

Tablo 3.16: Real-Time PCR bileşenleri.

Bileşenler	Miktar
cDNA (1 μg)	1 μL
RealQ Plus 2X Green Master Mix	6,25 μL
İleri primer (10 pmol/μL)	0,5 μL
Geri primer (10 pmol/μL)	0,5 μL
dH ₂ O	4,25 μL
Son Hacim	= 12,5 μL

Tablo 3.17: Real-Time PCR döngü şartları.

Segment	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süre
Ön inkübasyon	1	95 °C	10 dk.
Amplifikasyon	40	95 °C	30 sn.
		55 °C	30 sn.
		72 °C	30 sn.
Erime Eğrisi	1	95 °C	5 sn.
		65 °C	1 dk.
Soğutma	1	40°C	30 sn.

3.2.4.11 Hücreden Protein İzolasyonu

Bölüm 3.2.4.5'te belirtildiği gibi 6'lık plakalara kurulan deneylerde protein ifadesine bakmak için RIPA tamponu ile protein izolasyonu yapıldı. RIPA tamponu, hücre ve dokuların lizisinde kullanılan bir çözeltilidir. Bu tampon, proteinlerin hücrelerden ve

dokulardan verimli bir şekilde ekstrakte edilmesini kolaylaştırır. Özellikle, nükleer zarların parçalanması ve nükleer özütlerin elde edilmesi süreçlerinde kullanılır. RIPA tamponunun bileşenleri tablo 3.18’de verilmiştir.

6’lık plakalar önce 3 kez soğuk 1X PBS ile yıkanır. Ardından 60 µL RIPA tamponundan eklenir (farklı hücre hatlarında farklı miktarda kullanılması gerekebilir). Buz üzerinde 10 dk inkübe edilir. Daha sonra plastik bir kazıyıcı spatül ile mekanik olarak hücreler yüzeyden parçalanarak ayrılır. Daha sonra lizat ependorfa alınır. Ardından ependorf buz dolu sonikasyon cihazında 2 dk bekletildi. Sonikasyon işleminden sonra 2 dk buz üzerinde bekletildi. Bu 2 aşama toplam 3 kez yapıldı. Ardından ependorf buz üzerinde 10 dk bekletildi. Son olarak 13.500 rpm’de 15 dk santrifüj yapıldı. Süpernatant temiz ve soğuk bir ependorfa alındı. Daha sonra Bradford Yöntemi ile proteinlerin miktarı belirlenerek örnekler -80°C’de saklandı.

Tablo 3.18: RIPA çözeltisinin bileşenleri

Çözelti	İçeriği
RIPA	Çözelti, 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, %0,1 (w/v) sodyum deoksikolat, %0,1 (w/v) SDS ve %1 (v/v) Triton X-100 içermektedir. Proteaz inhibitörü eklenerek ve son hacim tamamlanmıştır. Bu çözelti, -20°C’de saklanmak üzere 2 mL’lik ependorflara dağıtılmıştır.

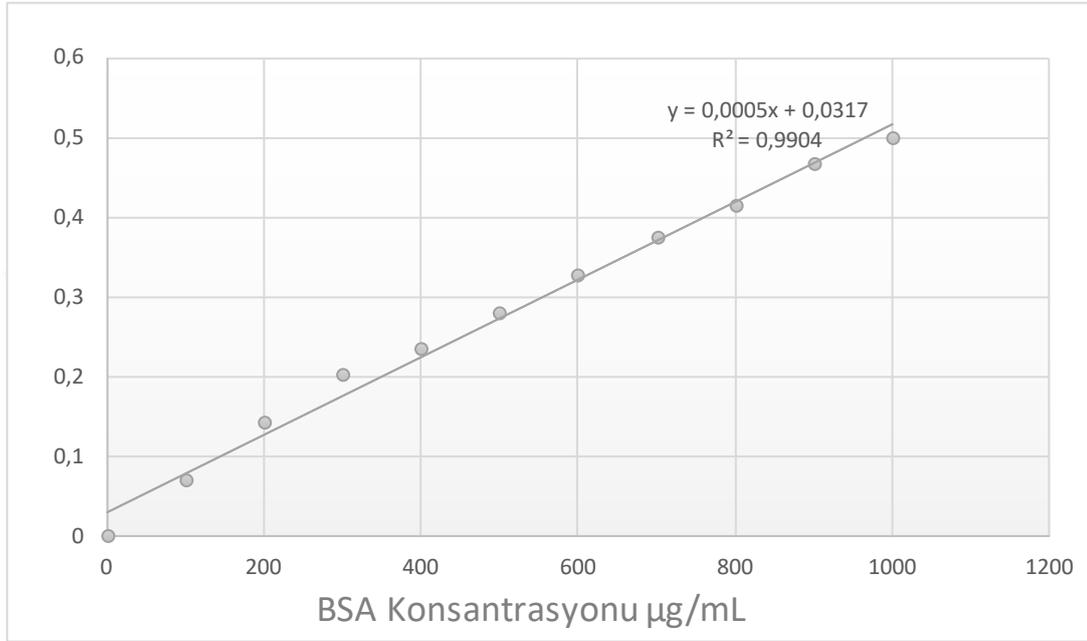
3.2.4.12 Bradford Yöntemi

Bradford yöntemi, bir çözeltide bulunan protein miktarını belirlemek için kullanılan hızlı ve etkili bir analiz tekniğidir. Bu metot, proteinlerle etkileşime giren Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının oluşturduğu renk değişikliğini 595 nm dalga boyunda ölçerek çalışır.

Öncelikle Tablo 3.19’a göre Bradford Boyası hazırlandı. Daha sonra standart eğri oluşturmak için kuyulara örnek yerine konsantrasyonları belli olan BSA (Bovine Serum Albümin) kullanıldı. Stok BSA’dan derişimi 0, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 ve 1000 µg/mL olan standart çözeltiler hazırlandı. 595 nm’de absorbans okutularak konsantrasyona karşı absorbans grafiği çizildi. Şekil 3.10’da Bradford Standart eğri grafiği verilmiştir.

Tablo 3.19: Bradford Reaktifinin Hazırlanışı

Çözelti	Hazırlanışı
Bradford	0.1 g Coomassie brilliant blue (G-250), 50 mL %95'lik etil alkol içinde çözüldü ve 100 mL %85 (w/v) fosforik asit eklendi. Son hacim dH ₂ O ile 1 L'ye tamamlandı. Çözelti filtre kağıdından geçirilip ışık almayan bir şişede 4°C'de saklandı.



Şekil 3.10: Bradford Eğrisi ve protein miktarı hesaplama formülü

Formül hazırlandıktan sonra, 96 kuyulu plakaya her protein örneğinden 2.5 µL eklendi. Protein örneklerinin üzerine 2.5 µL dH₂O eklenerek 2 kat sulandırılmış oldu. Kör olarak 5 µL dH₂O kullanıldı. Tüm kuyulara 250 µL Bradford Solüsyonundan eklenerek, 10 dk karanlıkta ve oda sıcaklığında bekletilir. Ardından 595 nm'de ölçüm alındı ve protein miktarı Şekil 3.10'daki formül ile hesaplandı. Örnek absorbansı – kör absorbansı yapılarak y yerine yazıldı, ardından x değeri bulundu ve 2 ile çarpılarak protein miktarı bulundu.

3.2.4.13 SDS-Page (Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi)

SDS (Sodyum Dodesil Sülfat), proteinlerin hidrofobik yapılarına bağlanarak proteinlerin elektrik yüklerini maskeleyen bir deterjandır. Bu sayede, proteinlerin sadece moleküler büyüklüklerine bağlı olarak ayrışmasını sağlar. Ayrıca, SDS aynı zamanda proteinlerin denatürasyonunu da sağlar, böylece proteinlerin ikincil ve tersiyer yapıları etkisiz hale gelir ve yalnızca primer yapılarına dayalı olarak elektrik akımıyla ayrışırlar. Bu elektrik alanı, SDS içeren tamponun içinden geçerken proteinlerin jelin içinde hareket etmesini sağlar.

Daha küçük proteinler büyük proteinlere göre daha hızlı hareket ederler, bu nedenle proteinler moleküler büyüklüklerine göre jelin içinde ayrılırlar.

Jel hazırlanması için, ilk önce camlar ve kasetler yerleştirildi. Daha sonra Tablo 3.20’de verilen oranlarda %10’luk veya %12’lik (dH₂O ve Akrilamid/Bisakrilamid oranı değişir) küçük beher içerisinde ayırma jeli hazırlandı ve iki cam arasına en üstte 4 cm boşluk kalacak şekilde döküldü. Alt jelin düz olması için, jelin üzeri izopropanol ile tamamen dolduruldu. Jel donduktan sonra, izopropanol kurutma kâğıdı ile alındı. Ardından Tablo 3.21’de verilen oranlarda yığma jeli hazırlandı ve ayırma jelinin üzerine döküldü. Jel tarağı takılarak polimerleşmeye bırakıldı. Ardından örnek hazırlığına başlandı. Bradford yöntemi ile miktarı belirlenen proteinler her kuyuda 40 µg/mL protein olacak şekilde hesaplandı, her örnek 20 µL’ye yığma tamponu ile tamamlandı. Örneklerin üzerine %10 β - merkaptotanol içeren 4X Laemmli Örnek Tamponundan 5 µL eklenerek, örnekler boyandı. Bu boya örneğin kuyuya girmesini ve jel üzerinde hareketini gözlemlememizi sağladı.

Örnekler hazırlandıktan sonra 95°C’de 5 dk denatüre edildi. Ardından yürütme tankı 1X yürütme tamponu ile dolduruldu ve jel tanka takıldı. Daha sonra örnekler kuyulara 20 µL olacak şekilde yüklendi. Son olarak proteinlerin büyüklüğünü analiz etmek için PageRuler™ Prestained Protein Ladder belirtecinden 5 µL yüklenerek, 80V’da 4 saat yürütüldü. Proteinler büyüklüklerine göre ayrıldıktan sonra, jel tanktan çıkarılarak jel boyama boyasına 1 gece bırakıldı. Sonraki gün boya tekrar kullanılmak üzere saklandı. Jelden boyanın uzaklaşması için üzerine saf su veya boya giderici çözelti eklendi ve sonuçlar analiz edildi.

Tablo 3.20: %10’luk ayırma (alt) jel hazırlanışı (2 jel için miktarlar).

Solüsyon	Miktar
Lower Buffer	2.5 mL
Akrilamid-Bisakrilamid (37.5:1)	2.5 mL
%10 APS	100 µL
ddH ₂ O	5 mL
TEMED	10 µL

Tablo 3.21: Yığıma (üst) jel hazırlanışı (2 jel için miktarlar).

Solüsyon	Miktar
Upper Buffer	1.25 mL
Akrilamid-Bisakrilamid (37.5:1)	0.625 mL
%10 APS	3.07 mL
ddH ₂ O	50 µL
TEMED	5 µL

3.2.4.14 Western Blot

Western blot, hücre ekstraktındaki proteinlerden belirli bir proteinin tespit edilmesi için kullanılan bir tekniktir. İşlem, proteinlerin bir SDS jel üzerinde büyüklüklerine göre ayrılmasını, bir membrana transfer edilmesini ve daha sonra belirli bir proteinin varlığını tespit etmek için bir antikor kullanılmasını içerir. Western blot deneyinde kullanılan solüsyonlar tablo 3.22’de verilmiştir.

Poliviniliden Florür (PVDF) Membrana Blotlama

Bölüm 3.2.4.13’te anlatıldığı gibi proteinler jelde 80V’da 4 saat yürütüldükten sonra, jel üzerindeki proteinler Poliviniliden Florür (PVDF) membrana transfer edildi. Bu işlem için Bio-Rad Trans Blot sistemi kullanıldı. İlk önce 2 cam arasındaki jel soğuk transfer tamponu içerisine alındı. Ardından PVDF membran kenarları 6 ve 8 cm olacak şekilde kesildi. Kesilen membran 2 dk metanolde bekletilerek aktifleşmesi sağlandı ardından soğuk transfer tamponuna alındı ve 5 dk bekletildi. Daha sonra sandviç hazırlandı. Bunun için sünger- 3 kâğıt- jel (- kutba yakın olacak)- membran (+ kutba yakın olacak)- 3 kâğıt-sünger olacak şekilde hazırlanarak cihaza yerleştirildi. Tank soğuk transfer tamponu ile ağzına kadar dolduruldu. Elektrik kabloları uygun şekilde takılarak, 4°C’de 16 saat 90 mA’da transfer işlemi gerçekleştirildi.

İmmünoblotlama

İmmünoblotlama, proteinlerin bir jel üzerinde büyüklüklerine göre ayrıldığı, bir membrana transfer edildiği ve belirli bir proteinin varlığını tespit etmek için bir antikor kullanıldığı bir tekniktir.

İlk olarak membrana spesifik olmayan bağlanmaları önlemek için 20 mL bloklama solüsyonu ile 1,5 saat çalkalandı. Ardından 4 kez 1X TBST ile 5’er dk yıkandı. Daha sonra

membran, belirtece göre kesilerek antikorlar hazırlandı. Antikorlar, SMN1 (35 kDa) ve β -aktin (43 kDa) ikisi birlikte kullanıldı. Antikor hazırlanırken 15 mL'lik falkona 6 mL bloklama tampon eklendi. İçerisine 1/1000 oranda olacak şekilde SMN1 ((2F1) Mouse mAb #12976) antikoru eklendi. Ayrıca 1/5000 oranda olacak şekilde β -aktin ((C4): sc-47778) antikor eklendi. 4°C'de 16 saat çalkalanarak inkübe edildi. Sonraki gün membran 3 kez 1X TBST ile 5'er dk yıkandı. Daha sonra, anti Mouse antikoru 1/5000 oranda hazırlandı ve membran 1 saat inkübe edildi. 1 saatin sonunda, membran 4 kez 1X TBST ile 5'er dk yıkandı ve görüntüleme yapıldı.

Proteinlerin Görüntülenmesi ve Analizi

Görüntüleme işlemi için ECL (Pierce™) substratı kullanıldı. Folyo ile sarılı bir ependorfta 1:1 oranda Reagent A ve Reagent B karıştırıldı. Membran üzerine 300 μ L karışımdan eklenerek 1 dk karanlık ortamda bekletildi. Arından UVP BioSpectrum™ görüntüleme sisteminde sonuçlar kaydedildi. Daha sonra ImageJ programıyla SMN1 görüntüsü β -aktin'e oranlanarak sonuçlar analiz edildi ve GraphPad programıyla grafiklendirildi.

Tablo 3.22: Western blot deneyinde kullanılan çözeltiler.

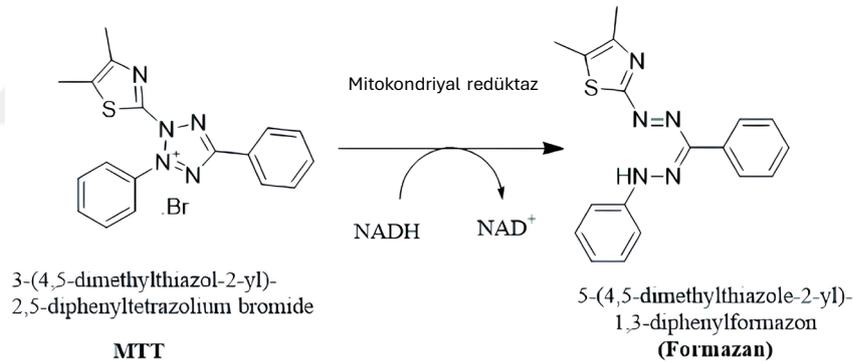
Çözelti	Hazırlanışı
10X TBS (Tris-Buffered Saline)	24,22 g Tris-base (MW:121,14) ve 87,66 g NaCl (MW:58,44) 700 mL dH ₂ O'da çözüldü. pH 7,5'e ayarlanıp son hacim 1 L'ye tamamlandı.
10X Yürütme Tamponu	30,3 g Tris-base (MW:121,14) ve 144,4 g glisin (MW:75,07) ~700 mL dH ₂ O'da çözüldü. pH 8,3'e ayarlanıp son hacmi 1 L'ye tamamlandı. Kullanılırken 1X'e sulandırıldı.
Ayırma (Alt) Jel Tamponu	18,17 g Tris-base (MW:121,14) ve 0,4 g SDS 80 mL içerisinde çözüldü. pH 8,8'e ayarlandı ve son hacim 100 mL'ye tamamlandı. 4°C'de saklandı.
Yığıma (Üst) Jel Tamponu	6 g Tris-base (MW:121,14) ve 0,4 g SDS 80 mL dH ₂ O'da çözüldü. pH 6,8'e ayarlanıp hacim 100 mL'ye tamamlandı. 4°C'de saklandı.
4X Laemmli Örnek Boyası	277.8 mM Tris-HCl (pH:6.8), %44.4 (v/v) Gliserol, %4.4 LDS (veya SDS), %0.02 Bromfenol Mavisi
Transfer Tamponu	200 mL methanol, 100 mL 10X yürütme tamponu, ile karıştırılıp son hacim dH ₂ O ile 1 L'ye tamamlandı. Çözeltiye 500 μ L %10 (w/v) SDS eklendi.
Jel Boyama Çözeltisi	0,1 g Coomassie brilliant blue R-250, 50 mL metanolde çözüldü ve 10 mL asetik asit eklenerek karıştırıldı. Son hacmi dH ₂ O ile 100 mL'ye tamamlandı.
Ponceau Boyası	0,1 g ponceau-S, 100 mL % 5 (v/v) asetik asit çözeltisinde çözüldü.
1X TBST Çözeltisi	100 mL 10X TBS ile 1 mL Tween-20 karıştırıldı ve son hacim dH ₂ O ile 1 L'ye tamamlandı.

Tablo 3.22:(devam)

Bloklama	40 mL 1X TBST çözeltisi içinde 2 g yağsız süt tozu çözünerek
Tamponu	hazırlandı.
%10 (w/v) SDS	10 g SDS (Sodyum dodesil sülfat) dH ₂ O'da çözülerek son hacmi 100 mL'ye tamamlandı.
Jelden Boya	7,5 mL asetik asit, 5 mL metanol, ve 87,5 mL dH ₂ O karıştırılarak
Giderici Çözelti	hazırlandı.

3.2.4.15 Sitotoksite Testi

Hücrelerin canlılığını ve metabolik aktivitelerini belirlemek için MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid] testi yapıldı. MTT testi, sarı renkli tetrazolium tuzunun (MTT) sadece canlı hücrelerin mor renkli formazan kristallerine indirgenmesi esasına dayanan, kolorimetrik bir yöntemdir. MTT deneyinde gerçekleşen kimyasal değişim Şekil 3.11'de verilmiştir. Tablo 3.23'te MTT testi için kullanılan kimyasalların hazırlanışı verilmiştir.



Şekil 3.11: MTT tuzunun Formazan kristallerine dönüşümü

Tablo 3.23: MTT deneyi için kullanılan kimyasallar

Çözelti	İçeriği
MTT (5 mg/mL)	0.05 g MTT tozu, 10 mL 1X PBS'de ile çözüldü. Bu çözelti, 0.22 µm filtreden geçirilerek steril edildi. -20°C'de saklandı.
4 mM HCl içeren izopropanol	500 mL son hacimde 210 µL HCl, izopropanole eklenerek hazırlandı.

MTT testi için SH-SY5Y hücreleri 96 kuyucuklu plakalara 4'er tekrarlı ve her kuyuda 1x10⁴ hücre olacak şekilde bölündü. Sonraki gün kontrol gruplarına uygulama yapılmazken, rekombinant proteininin etkisine bakılacak hücelere 250 ng/mL, 500 ng/mL,

1 µg/mL, ve 2 µg/mL son konsantrasyon olacak şekilde rekombinant TAT-SMN proteinini uygulandı. 24. ve 48. saat dilimlerinde MTT uygulaması gerçekleştirildi. MTT her kuyuya 0.5 mg/mL son konsantrasyonda uygulandı. MTT uygulamasının ardından plaka inkübatörde 3 saat inkübe edildi. Ardından kuyularda bulunan DMEM uzaklaştırılarak, 4 mM HCl içeren izopropanolden 200 µL eklenerek çözüldü. Son aşamada spektrofotometrede 550 nm’de absorbans alınarak, gerekli hesaplamalar yapıldı.

$$\% \text{ Hücre Canlılığı} = \frac{\text{Örnek absorbansı}}{\text{Kontrol absorbansı}} \times 100$$

3.2.4.16SH-SY5Y Hücrelerinin Nörona Farklılaştırılması

Petri veya plakanın zemini hücre bölünmeden önce %10 Kollajen tip 1 içeren PBS’den 500 µL eklenerek 15 dk bekletildi. Ardından, kuyulardan kollajen çekilerek daha sonra kullanılmak üzere 4°C’de saklandı. Ardından hücreler paylaştırıldı ve 1 gece inkübasyona bırakıldı. Sonraki gün %2.5 FCS içeren DMEM ile hücre medyumunu değiştirildi ve 1 gece inkübasyona bırakıldı. Ardından %1 FCS içeren DMEM ile medyum değiştirildi ve her kuyuya derişimi 10 µM olacak şekilde Retinoik Asit (RA) uygulandı ve 2 gece inkübasyona bırakıldı. Daha sonra %1 FCS içeren DMEM ile medyum değiştirildi ve 10 µM Retinoik Asit (RA) uygulandı. RA uygulama işlemi toplam 3 kez yapıldı. Hücrelerin nörona farklılaştığı inverted mikroskop ile gözlemlendi. Kullanılan solüsyonların hazırlanışı tablo 3.24’te verilmiştir.

Tablo 3.24: SH-SY5Y hücrelerinin nörona farklılaştırılmasında kullanılan solüsyonlar.

Çözelti	Hazırlanışı
Retinoik Asit (RA) 1mg/mL	0.001 g RA tartılarak, 1 mL DMSO içerisinde çözüldü. Ardından -20°C’de saklandı.
%10 Kollajen Tip 1	4500 mL 1X PBS üzerine 500 µL Kollajen eklenerek hazırlandı.

3.2.4.17İmmünofloresan (IFC)

İmmünofloresans, hücrelerde spesifik proteinleri veya antijenleri görselleştirmek için kullanılan bir tekniktir. Bu yöntem, floresanla işaretlenmiş antikörlerin hedef moleküllere bağlanmasıyla çalışır. En az 6 kez pasajlanan hücrelerin sayım işlemi yapılır. Daha sonra 24 kuyucuklu plakaların içerisine yuvarlak lameller eklenir. Her kuyuda 5x10⁴ hücre olacak şekilde hücreler bu lamellerin üzerine bölünür ve 37°C’deki %5 CO₂ inkübatörde bir gece bekletilir. Rekombinant olarak üretilen TAT-SMN proteininden 48 saatte 2 kez

olacak şekilde 10 µg/mL ve 20 µg/mL konsantrasyon olacak şekilde 3 gün boyunca uygulandı. 24. saat tamamlandıktan sonra hücre medyumuna tekrar rekombinant protein uygulandı. 48. saatin sonunda hücrelerin medyumunu uzaklaştırıldı ve 1X PBS ile 2 kez yıkandı. Ardından 250 µL %4 (w/v) paraformaldehit kuyucuklara eklenerek 15 dk inkübe edildi böylece hücrelerin fiksasyonu sağlandı. 15dk sonra hücreler 2 kez 1X PBS ile yıkandı. Daha sonra hücre çekirdeğine DAPI boyasının ulaşabilmesi için, hücrelere 250 µL %0,25 (v/v) Triton X-100 içeren PBS eklendi ve on dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Ardından hücreler 2 kez 1X PBS ile yıkandı ve %1 (w/v) BSA içeren PBS'ten 250 µL eklenerek 90 dk boyunca bloklanması sağlandı. Ardından hücreler 2 kez 1X PBS ile yıkandı ve hücrelere %1 BSA'lı PBS ile 1/300 oranında seyreltilmiş SMN1 primer antikorundan 250 µL eklendi. Nemli bir ortam hazırlandı ve hücre plakası yerleştirilerek 4°C'de 1 gece inkübasyona bırakıldı. Sonraki gün primer antikor daha sonra kullanılmak üzere ependorfa alındı ve -20°C'de saklandı. Hücre kuyuları 2 kez 1X PBS ile yıkandı bu aşamadan sonrası tamamen karanlık ortamda gerçekleştirildi. Kuyucuklara 1/400 oranında %1 BSA'lı PBS ile sulandırılmış Alexa Fluor™ 488(green) anti-mouse antikorundan 150 µL eklendi ve 45 dk inkübasyona bırakıldı. Daha sonra hücreler 1X PBS ile 3 kez yıkandı. Ardından, 75 mM DAPI'den 150 µL eklenerek 10 dk oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra hücreler 4 kez 1X PBS ile yıkandı. Son olarak, kuyulara 200 µL PBS eklendi ve yuvarlak lameller ısıtılmış steril iğne yardımıyla aşağıdan yukarı doğru çıkartıldı. Steril lam üzerine %90 gliserol damlatıldıktan sonra hücre gliserole gelecek şekilde yerleştirildi. Yuvarlak lamın 4 köşesine şeffaf oje damlatılarak sabitlendi. Sonraki gün preparatlar floresan mikroskobu kullanılarak görüntülendi ve kaydedildi. Analiz için ImageJ programı kullanıldı ve CTCF (Düzeltilmiş Toplam Hücre Floresansı) hesaplandı ve grafik haline getirildi. Kullanılan solüsyonların hazırlanışı Tablo 3.25'te verilmiştir.

Tablo 3.25: İmmüofloresans çalışmalarında kullanılan çözeltiler.

Çözelti	Hazırlanışı
4X (w/v) PFA (%4 Paraformaldehit)	30 mL 1X PBS üzerine 2g paraformaldehit eklenip karıştırıldı. pH 7.2'ye ayarlanıp son hacim 50 mL'ye tamamlandı. Daha sonra 0.45 µm filtreden geçirilerek -20°C'de saklandı.
DAPI Boyası (75 nM)	5 mg/mL olarak 1X PBS ile hazırlandı. Ardından, 300 µM DAPI (2.1 µL DAPI + 97.9 µL 1X PBS). Daha sonra 300 nM olacak şekilde 1X PBS ile sulandırıldı. 75 nM olması için 300 nM DAPI 4 kat sulandırılarak -20°C'de saklandı.

Tablo 3.25:(devam)

%0.25 (v/v) Triton X-100	İlk olarak 12.500 µL Triton X-100 50 mL'ye PBS ile tamamlandı(%25). Daha sonra bu %25'lik ara dilüsyondan 500 µL alınarak 50 mL'ye PBS ile tamamlandı(%0.25).
--------------------------	---

3.2.5 İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler için GraphPad (v10.2.0.392) programı kullanıldı. Tüm nicel veriler, ortalama değerler \pm S.D veya s.e.m olarak ifade edildi. İki ortalama arasındaki farklar, t testi (two-tailed) kullanılarak analiz edildi. İki'den fazla ortalama arasındaki farklar one-way ANOVA testiyle analiz edildi ve *p* değeri 0.05 küçük olan sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1 Klonlama Çalışmaları

4.1.1 SMN1 Gen Varyant Seçimi

SMN1 geni, insanlarda 5. kromozomun uzun (q) kolunun 13.2 lokasyonunda bulunmaktadır. NCBI veri tabanında 3 izoformu bulunmaktadır (bk. EK A.1, A.2 ve A.3).

Transkript Varyantı d: Bu varyant (d), en uzun transkripttir ve en uzun izoformu (d) kodlar. Bu varyantın, SMN1 tarafından üretilen baskın transkript olduğu düşünülmektedir.

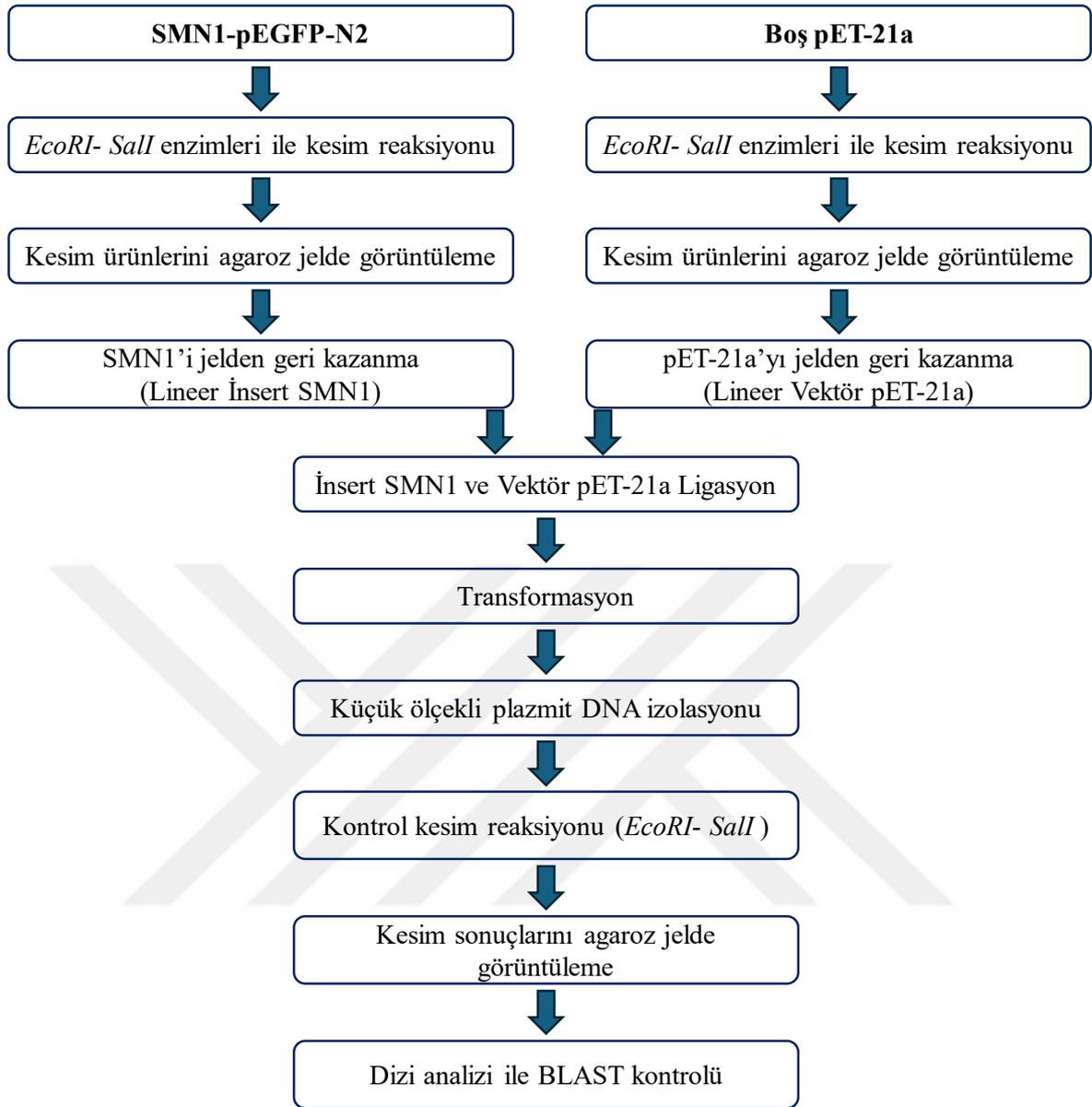
Transkript Varyantı a: Bu varyant (a), sondan bir önceki ekzondan yoksundur ve bu, d varyantı ile karşılaştırıldığında alternatif bir çeviri durdurma kodonuyla sonuçlanır. Ortaya çıkan izoform (a), izoform d'ye kıyasla daha kısadır ve belirgin bir C terminaline sahiptir.

Transkript Varyantı b: Bu varyant (b), d varyantına kıyasla 3' CDS'de alternatif bir çerçeve içi ekzondan yoksundur. Ortaya çıkan protein (izoform b) daha kısadır ancak izoform d ile karşılaştırıldığında aynı N- ve C-terminallerine sahiptir.

SMN1 geninin protein ekspresyonu amacıyla, transkript varyant d (NM_000344.4) kullanılarak primer dizisi tasarlandı. SMN1 gen dizisinin restriksiyon kesim bölgeleri analiz edildi. Geni kesen ve kesmeyen enzimler Restriction Mapper 3 programı ile belirlendi (bk. EK A.4 ve Tablo A.1). Ardından, ekspresyon vektörü pET-21a'yı kesen enzimler belirlendi. Daha sonra SMN1 genini kesmeyen, ancak pET-21a vektörünü kesen *EcoRI* ve *Sall* enzimleri klonlama için seçildi. pEGFP-N2 vektörü, içerisinde SMN1 geni yurtdışından Prof. Dr. Claus Peter'dan temin edildi. Ardından, pET-21a vektörüne klonlanması yapıldı.

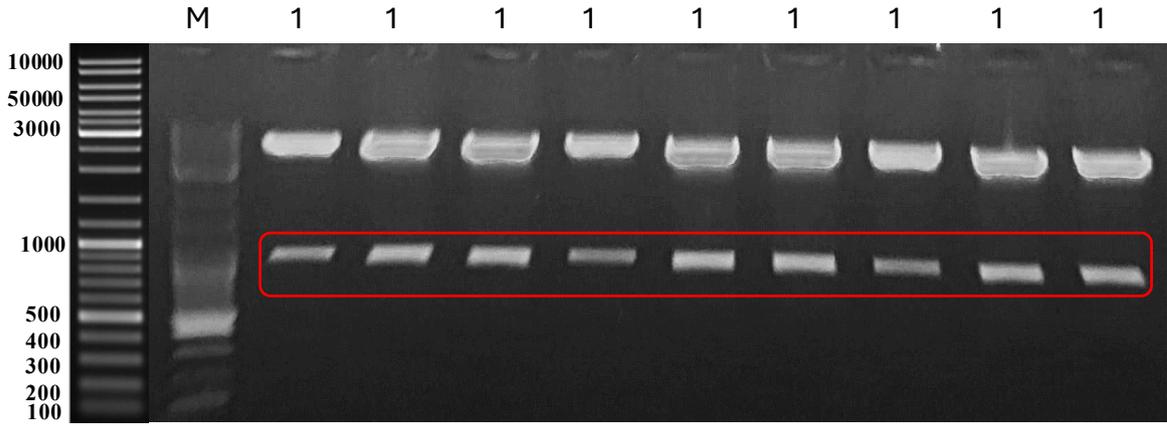
4.1.2 SMN1 Geninin pET-21a Vektörüne Alt Klonlaması

SMA hastalığındaki eksik SMN proteinini üretecek olan SMN1 geni prokaryotik ekspresyon vektörü olan pET-21a'ya klonlandı. Şekil 4.1'de SMN1 geninin klonlama çalışmasına ait iş akış diyagramı gösterilmektedir.

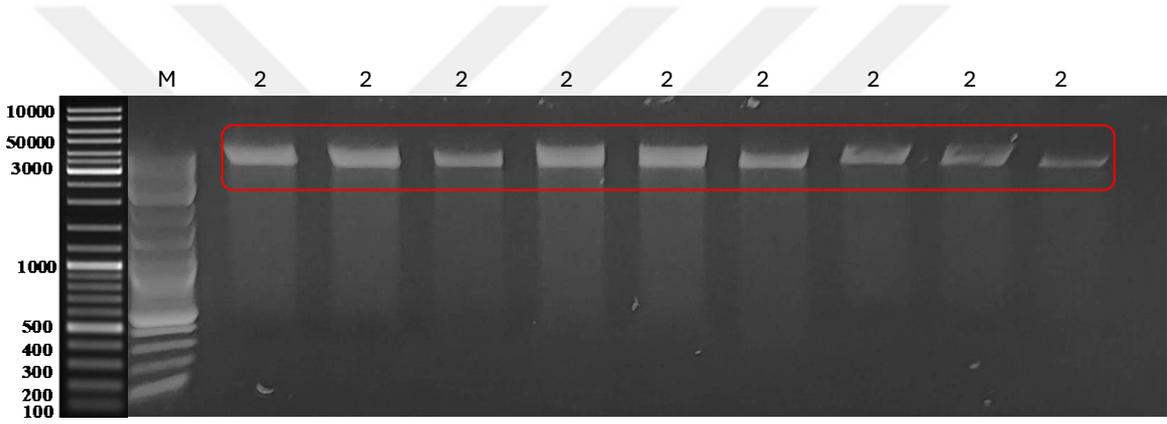


Şekil 4.1: SMN1 genini pEGFP-N2 vektöründen, pET-21a vektörüne alt klonlama basamakları.

İlk önce SMN1-pEGFP-N2 ve Boş pET-21a gliserol stoklarından 10'ar mL ön kültür ekimi yapıldı. Sonraki gün Bölüm 3.2.2.7'de belirtildiği gibi küçük ölçekli plazmit DNA izolasyonu yapıldı. Daha sonra hem insert (SMN1) hemde vektör (pET-21a) *EcoRI- Sall* restriksiyon enzimleri ile Bölüm 3.2.2.9'da açıklandığı gibi kesim reaksiyonu kurularak kesildi. 37°C'de 16 saat inkübe edilerek reaksiyon gerçekleştirildi. SMN1-pEGFP-N2 (Şekil 4.2) ve pET-21a (Şekil 4.3) kesimleri Bölüm 3.2.2.10'da belirtildiği gibi %2'lik agaroz jel elektroforezinde yürütüldü.

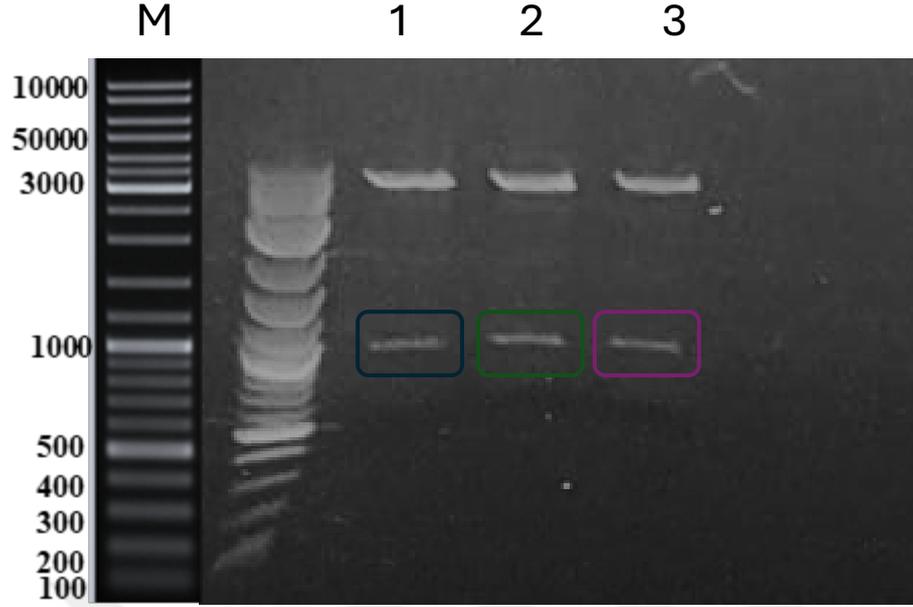


Şekil 4.2: SMN1 pEGFP-N2 vektörünün *EcoRI*- *Sall* enzimleri ile kesiminin agaroz jel elektroforezi görüntüsü. (M: Marker, 1: SMN1 geni (İnsert))



Şekil 4.3: Boş pET-21a vektörünün *EcoRI*- *Sall* enzimleri ile kesiminin agaroz jel elektroforezi görüntüsü. (M: Marker, 2: pET-21a (Vektör))

Şekillerdeki 1 (Lineer İnsert SMN1) ve 2 (Lineer Vektör pET-21a) numaralı bantlar Bölüm 3.2.2.11’de anlatıldığı gibi jelden kesilerek geri kazanıldı. Jelden geri kazanılan lineer insert ve lineer vektör ile Bölüm 3.2.2.13’te belirtilen prosedüre uygun olarak 16°C’de 16 saat ligasyon reaksiyonu gerçekleştirildi. Ligasyon ürünlerinin Bölüm 3.2.2.14’te anlatılan protokol ile DH5 α kompetan hücrelere transformasyonu yapıldı. Transformasyonda Amp⁺ petriler kullanıldı, petriler 37°C’de 16 saat inkübe edildi. Ardından, petrilerde koloni oluşumları gözlemlendi. Bu kolonilerden 3 tanesi seçilerek Amp⁺ LB sıvı besiyerine ekimleri yapıldı. Ön kültürlerden Bölüm 3.2.2.4’te belirtildiği gibi gliserol stoklar hazırlanıp plazmit DNA izolasyonu yapıldı. Bölüm 3.2.2.8’de anlatıldığı gibi DNA miktarları belirlenerek rekombinant koloni tespiti için *EcoRI* – *Sall* enzimleriyle kontrol kesim reaksiyonları kuruldu. Kesim ürünleri %2’lik agaroz jel elektroforezinde yürütülüp rekombinant koloniler ayrt edildi.

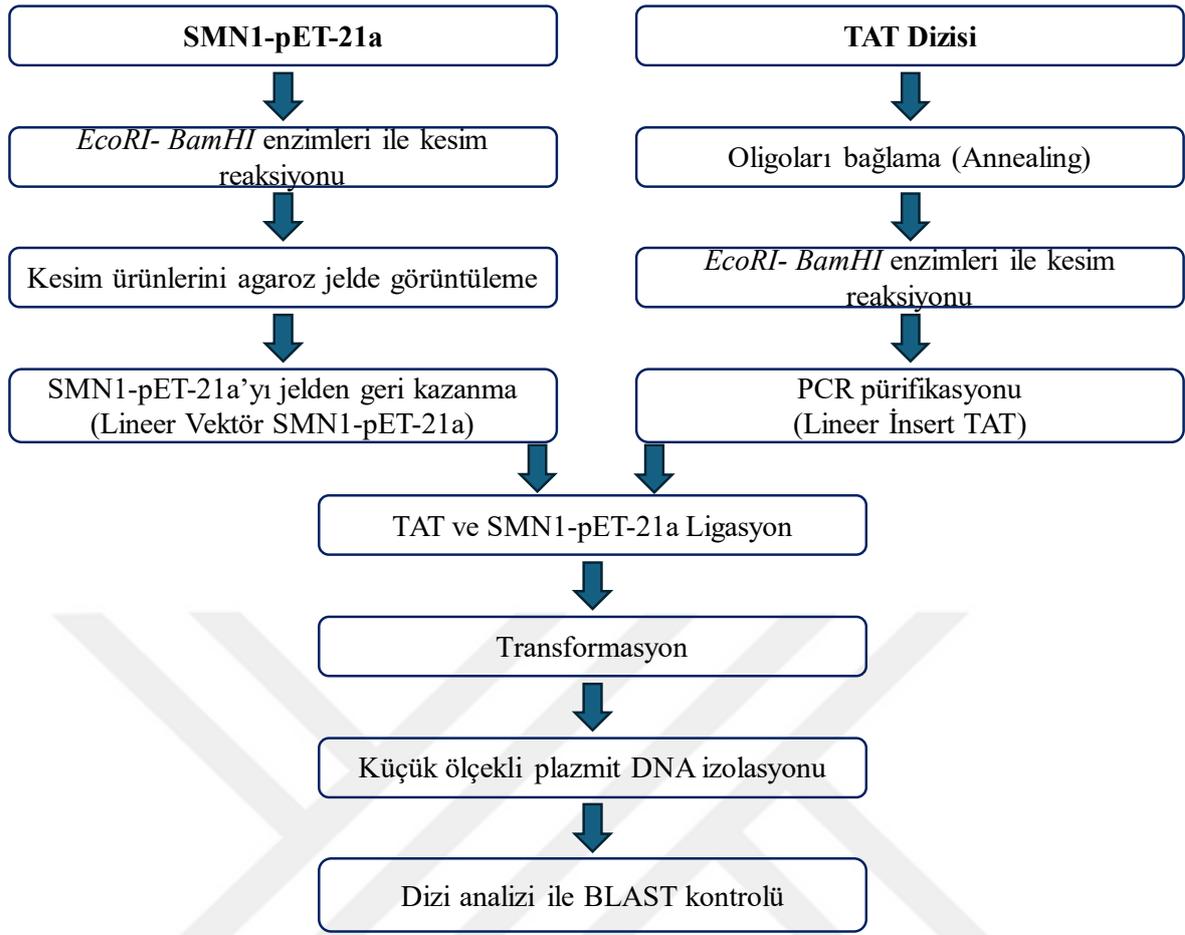


Şekil 4.4: Rekombinant olduğu düşünülen (SMN1-pET-21a) 3 koloninin, *EcoRI-Sall* enzimleri ile kontrol kesiminin agaroz jel elektroforezi görüntüsü. (M: Marker, 1:1.koloni, 2:2.koloni, 3:3.koloni)

Şekil 4.4'te insert veren 3 koloni de dizi analizi için BM Laboratuvar Sistemleri firmasına gönderildi. Dizileme sonuçları Bioedit programıyla NCBI'dan alınan SMN1 dizisiyle karşılaştırılarak analiz edildi (bk. EK B.1)

4.1.3 TAT Dizisinin SMN1-pET-21a Vektörüne Klonlanması

Rekombinant SMN proteininin hedef hücreye girişini sağlayacak olan TAT peptit dizisi rekombinant SMN1-pET-21a'ya *EcoRI-BamHI* enzimleri ile klonlandı. TAT dizisi oligoları sense ve anti-sense olacak şekilde ve uç kısımlarında *EcoRI-BamHI* kesim bölgeleri eklenerek tasarlandı. Şekil 4.5'te TAT dizisinin SMN1-pET-21a vektörüne klonlama çalışmasına ait iş akış diyagramı gösterilmektedir.



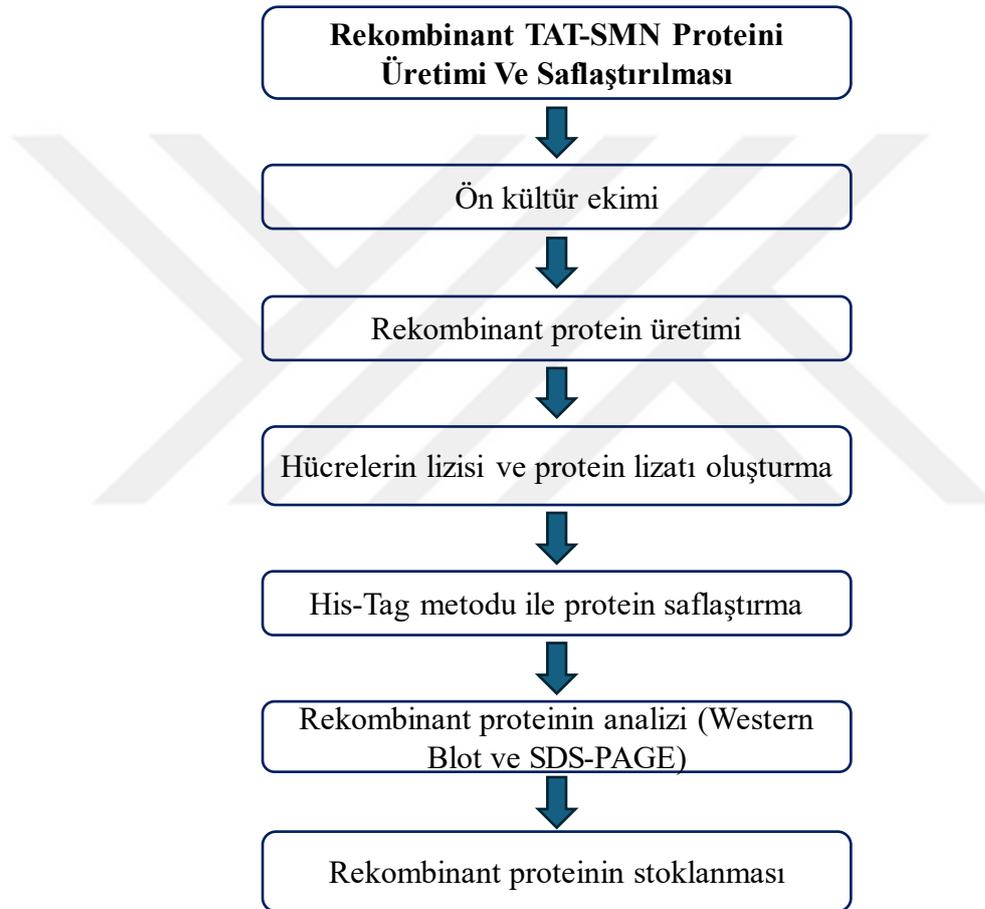
Şekil 4.5: TAT dizisinin, SMN1-pET-21a vektörüne klonlanma basamakları.

Dizi analizi ile tamamen doğrulanan SMN1-pET-21a klonu *EcoRI*– *BamHI* restriksiyon enzimleri ile Bölüm 3.2.2.9’da belirtildiği gibi kesim reaksiyonu kuruldu. Aynı zamanda TAT oligoları Bölüm 3.2.2.6’ da belirtildiği gibi birbirine bağlandı. TAT dizisi de lineer hale getirilmek için *EcoRI*– *BamHI* enzimleriyle kesildi. SMN1-pET-21a kesimi %2’lik agaroz jel elektroforezinde yürütüldü ve jelden geri kazanıldı. TAT dizisi ise kesim reaksiyonundan sonra Bölüm 3.2.2.12’de belirtildiği gibi PCR pürifikasyon ile saflaştırıldı. Jelden geri kazanılan lineer vektör ve PCR pürifikasyonu yapılan lineer TAT dizisi ile Bölüm 3.2.2.13’te belirtilen prosedüre uygun olarak 16°C’de 16 saat ligasyon reaksiyonu gerçekleştirildi. Ligasyon ürünlerinin Bölüm 3.2.2.14’te anlatılan protokol ile DH5α kompetan hücrelere transformasyonu yapıldı. Transformasyonda Amp⁺ petriker kullanıldı, petriker 37°C’de 16 saat inkübe edildi. Ardından, petrikerde koloni oluşumları gözlemlendi. Bu kolonilerden 3 tanesi seçilerek Amp⁺ LB sıvı besiyerine ekimleri yapıldı. Ön kültürlerden Bölüm 3.2.2.4’te belirtildiği gibi gliserol stoklar hazırlanıp plazmit DNA izolasyonu yapıldı. TAT dizisi içeren kolonilerin belirlenmesi amacıyla, TAT dizisi agaroz

jelde gözükmeyeceğinden DNA ürünleri doğrudan dizi analizi için BM Laboratuvar Sistemleri firmasına gönderildi. Dizileme sonuçları Bioedit programıyla NCBI'dan alınan SMN1 ve TAT dizisiyle karşılaştırılarak analiz edildi (bk. EK B.2). Rekombinant proteini üretecek TAT-SMN1-pET-21a klonu belirlendi.

4.2 Rekombinant TAT-SMN Proteini Üretme ve Saflaştırma Çalışmaları

In-vitro deneylerde kullanılacak olan TAT-SMN proteininin üretimi ve saflaştırılması Şekil 4.6'da verilen sıralamayla gerçekleştirildi.



Şekil 4.6: Rekombinant TAT-SMN proteininin üretilme ve saflaştırma basamakları

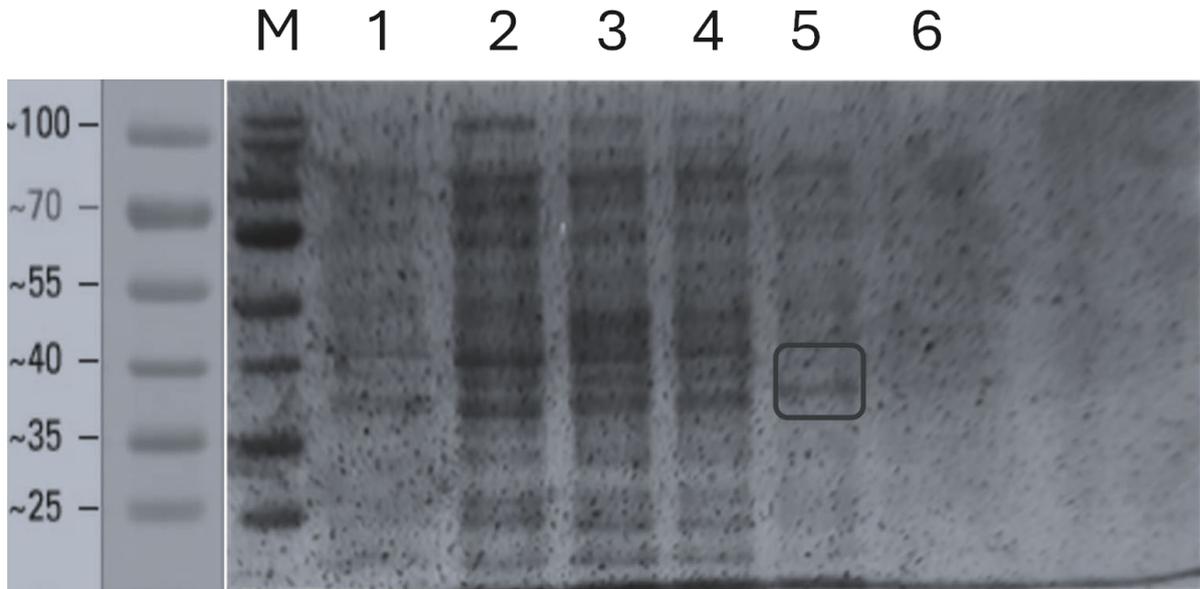
4.2.1 Rekombinant Proteinin Üretilmesi

Rekombinant proteinin üretilmesi amacıyla ilk önce TAT-SMN1-pET-21a plazmidini içeren BL-21 (DE3) codon plus bakterisinin gliserol stoktan ön kültür ekimi yapıldı. Sonraki gün, ön kültür 250 mL'lik Ampisilin antibiyotiği içeren büyük hacime alındı. OD₆₀₀ değeri 0.6'ya ulaşınca, Bölüm 3.2.3.1'de belirtildiği gibi 50 mL ayrılarak (TAT-SMN indüklenmemiş lizat) 4000 g'de 20 dk santrifüjle çöktürülerek, kalan kültüre 1 mM son

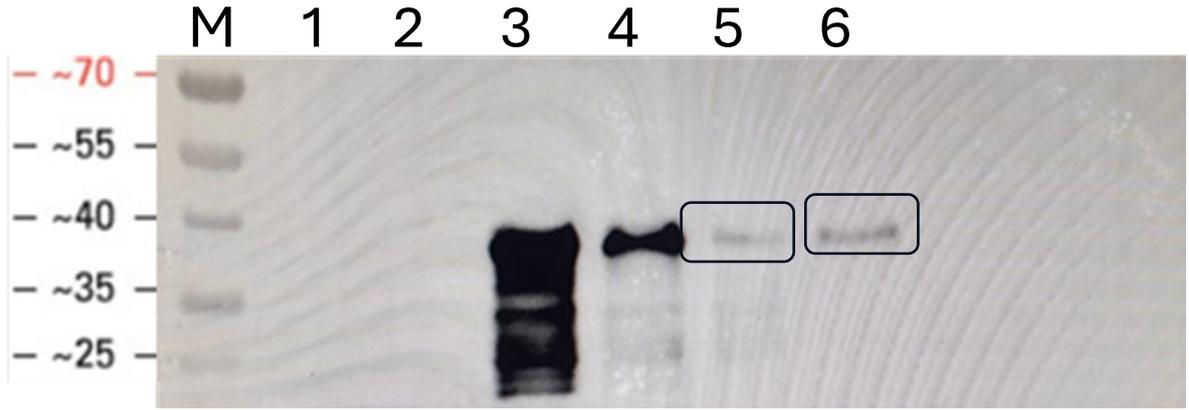
konsantrasyonda IPTG ile indüklenerek bakterinin sadece protein üretmesi sağlandı. 4 saat boyunca protein üretimi 200 rpm ile çalkalanan oda sıcaklığındaki etüvde sağlandıktan sonra bakteriler, 50 mL'lik falkonlara ayrıldı ve 4000g'de 20 dk santrifüjlenerek çöktürüldü. Pelletler -20°C'de 1 gece bekletildi.

4.2.2 Protein Lizatının Oluşturulması ve Saflaştırılması

Bakterilerin parçalanarak protein lizatının oluşturulması amacıyla, -20°C'de bulunan pelletler Bölüm 3.2.3.2'de belirtilen yöntemle parçalanarak bakterilerdeki proteinler, hücre dışına çıkartıldı. Protein lizatı oluşturulduktan sonra Bölüm 3.2.3.2'de belirtilen yöntemle histidin etiketli TAT-SMN proteinini His-Tag metodu ile saflaştırıldı. Protein saflaştırılırken her eklenen solüsyondan sonra protein analizinde kullanılmak üzere alikot alındı. Rekombinant protein saflaştırıldıktan sonra sterilizasyonunun sağlanması amacıyla 0.45 µm'luk filtreden geçirildi ve Bölüm 3.2.4.12'de belirtilen yöntemle protein miktarı belirlendi. Miktarı belirlendikten sonra Bölüm 3.2.3.2'de belirtilen Stoklama Tamponu ile 1:3, 1:2, 1:1 oranda karıştırılarak -20°C'de saklandı. Saflaştırılan proteinin kontrolü için alınan lizat örnekleri ile Bölüm 3.2.4.13'te belirtilen %12'lik SDS jelinde SDS-PAGE ve Bölüm 3.2.4.14'te belirtilen Western blot ile analiz edildi. SDS-PAGE ve Western blot sonuçları Şekil 4.7 ve 4.8'de verilmiştir.



Şekil 4.7: TAT-SMN proteinini saflaştırılırken alınan örneklerden yapılan SDS-Page jeli. (M: marker (26616 ThermoScientific) 1: Boş pET-21a, 2: TAT-SMN – (indüklenmemiş lizat), 3: TAT-SMN + (indüklenmiş lizat), 4: Yıkamadan sonra alınan örnek, 5: TAT-SMN 1.elüsyon, 6: TAT-SMN 2.elüsyon)



Şekil 4.8: TAT-SMN proteini saflaştırılırken alınan örneklerden yapılan Western blot sonucu. (M: marker (26616 ThermoScientific) 1: Boş pET-21a, 2: TAT-SMN – (indüklenmemiş lizat), 3: TAT-SMN + (indüklenmiş lizat), 4: Yıkamadan sonra alınan örnek, 5: TAT-SMN 1.elüsyon, 6: TAT-SMN 2.elüsyon)

Protein düzeyindeki analizlerde TAT-SMN proteininin varlığı ve saflaştırıldığı kanıtlandı. Üretilen rekombinant protein daha sonra hücre deneylerinde kullanılması amacıyla protein konsantrasyonu Bradford yöntemiyle belirlendikten sonra stoklama tamponu ile karıştırılarak -20°C 'de saklandı.

4.3 SMN1 Geni Susturma Çalışmaları

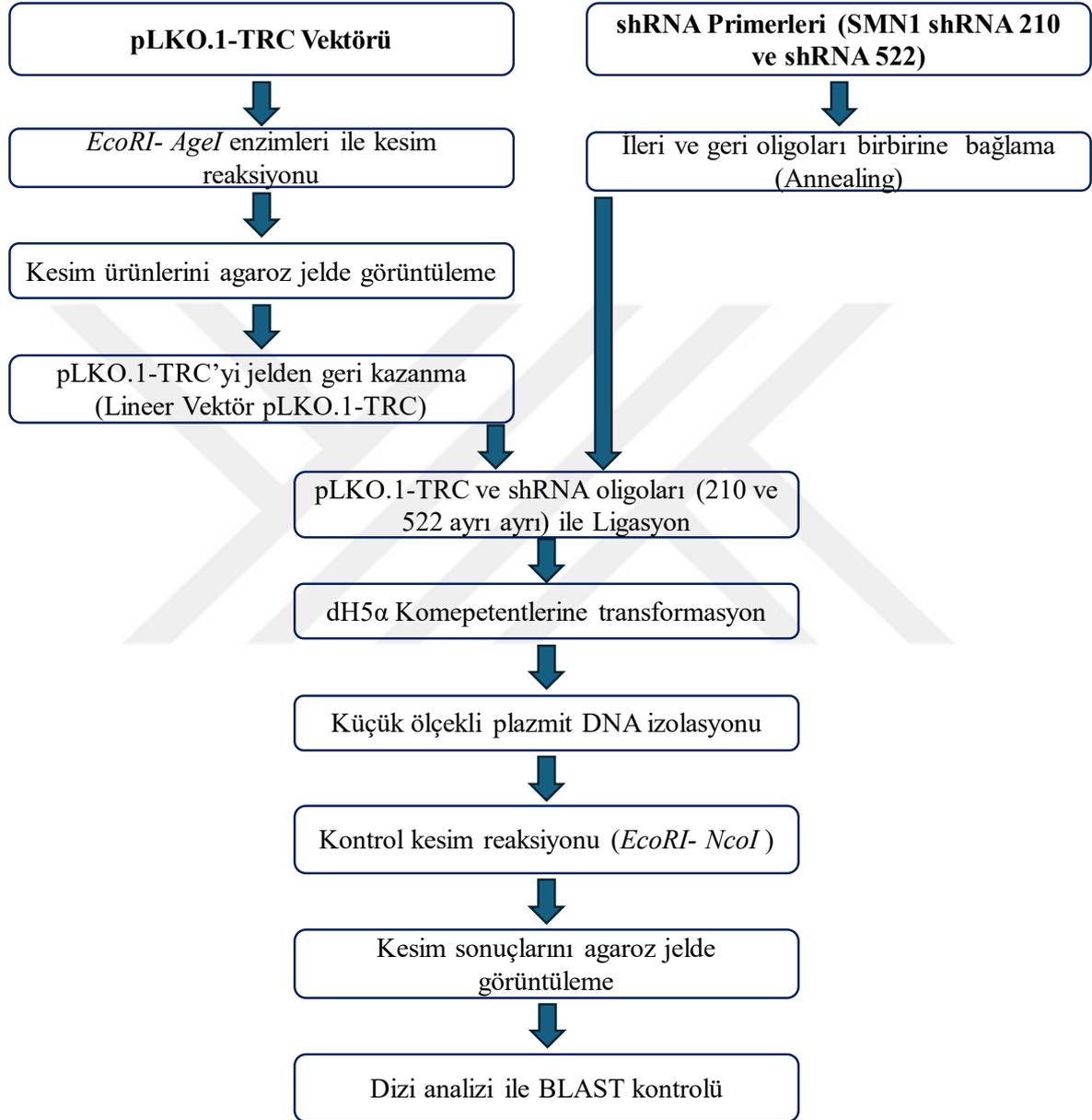
SH-SY5Y hücrelerinde, rekombinant TAT-SMN proteininin etkisinin belirlenmesi amacıyla, SMN1 gen ifadesi shRNA oligoları kullanılarak lentiviral tabanlı sistemle susturuldu ve SMN1 ifadesi susturulan bu hücreye shRNA-SH-SY5Y ismi verildi. Sonraki aşamalarda rekombinant TAT-SMN proteininin hücre proliferasyonuna etkisi, shRNA-SH-SY5Y hücreleri ve SH-SY5Y hücrelerinde belirlendi. Ardından, TAT-SMN proteininin shRNA-SH-SY5Y hücreleri içerisine girdiği IFC tekniği ile gösterildi.

4.3.1 SH-SY5Y Hücrelerinde SMN1 Geninin Susturulması (shRNA-SH-SY5Y

Hücrenin Oluşturulması)

SMN1 genini susturma çalışmalarında, SMN1 geninin hedefleyecek 2 farklı oligo seti tasarlandı. Bu oligolar tasarlanırken Bölüm 3.2.4.6'da belirtilen öneriler dikkate alındı. <https://sirna.wi.mit.edu> internet adresi kullanılarak SMN1 geninin 210. pozisyonuna ve 522. pozisyonuna bağlanacak primerler belirlendi (bk. EK C.1). Bu primerler, SMN1 shRNA 210 (210.pozisyondan SMN1 genine bağlanabilen primer) ve SMN1 shRNA 522 (522.pozisyondan SMN1 genine bağlanabilen primer) olarak isimlendirildi ve klonlama

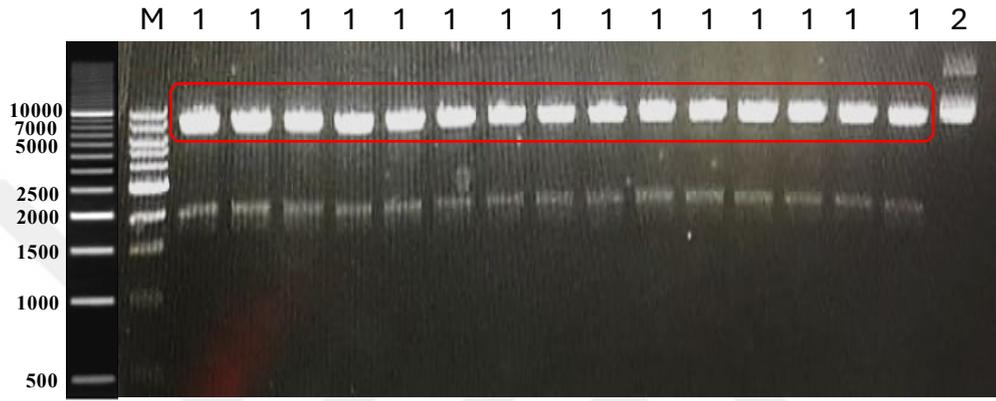
çalışmaları yapıldı. Ardından, bu vektör HEK293T hücrelerine transfekte edildi. Daha sonra HEK293T hücrelerinden lentivirüsler elde edildi. Elde edilen lentivirüsler SH-SY5Y hücrelerine uygulandı. Şekil 4.9’da shRNA dizilerinin pLKO.1-TRC vektörüne klonlama çalışmasına ait iş akış diyagramı gösterilmektedir.



Şekil 4.9: SMN1-shRNA 210 ve SMN1-shRNA 522 dizilerinin, pLKO.1-TRC vektörüne klonlanma basamaklarının şematik gösterimi.

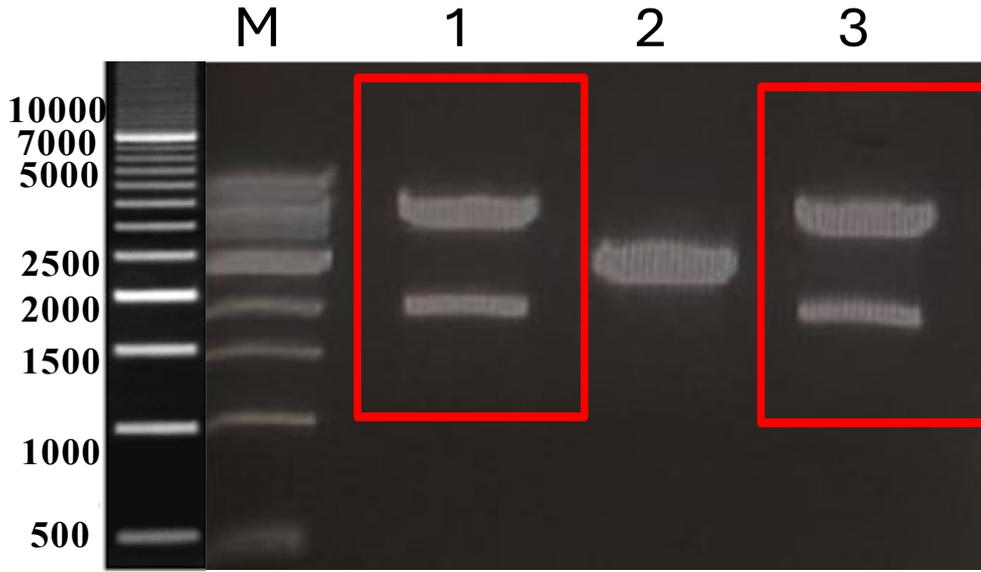
shRNA primerleri tasarlandıktan sonra, Bölüm 3.2.4.6’da belirtildiği gibi pLKO.1-TRC vektörü *EcoRI* ve *AgeI* restriksiyon enzimleri ile kesilerek lineer hale getirildi. Kesim ürünleri Şekil 4.10’da gösterildiği gibi %1’lik agaroz jel elektroforezinde yürütüldü ve

büyük parça (7kb) jelden geri kazanıldı. Temin edilen shRNA primerleri öncelikle 20 pmol/ μ L olacak şekilde sulandırıldı. Daha sonra Bölüm 3.2.4.6’da belirtildiği şekilde bağlama reaksiyonu gerçekleştirildi. 5 μ L ileri ve 5 μ L geri primer, 5 μ L 10X NEB Tamponu 2 ve 35 μ L dH₂O eklenerek PCR cihazında 95°C’de 5 dk ve ardından 75°C’de 10 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonunda oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı. Daha sonra hazırlanan pLKO.1-TRC vektörü ile ligasyon reaksiyonu Bölüm 3.2.4.6’da belirtildiği gibi kuruldu. Sonraki gün DH5 α kompetent hücrelerine transformasyonu gerçekleştirildi.



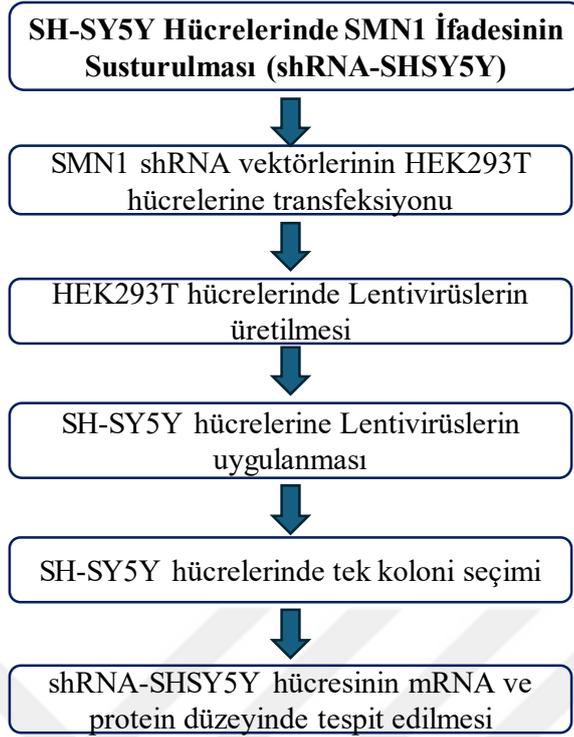
Şekil 4.10: pLKO.1-TRC vektörünün *EcoRI* ve *AgeI* kesiminin agaroz jel elektroforezi görüntüsü. (M: Marker, 1: plazmit kesim ürünü, 2: kesilmemiş plazmit)

Transformasyon sonucu 2 petride (SMN1-shRNA 210-pLKO.1-TRC, SMN1-shRNA 522-pLKO.1-TRC) üreyen koloniler (toplam 3 koloni) sıvı besiyerine ekildi. Ardından Bölüm 3.2.2.7’de belirtildiği gibi plazmit DNA izolasyonu yapıldı ve DNA miktarı belirlendi. Daha sonra rekombinant kolonilerin tespiti için *EcoRI* ve *NcoI* restriksiyon enzimleriyle kesim reaksiyonu Bölüm 3.2.4.6’da belirtildiği gibi gerçekleştirildi. Kesim ürünleri %1’lik agaroz jel elektroforezinde yürütüldü, Şekil 4.11’de gösterilmiştir. Yaklaşık 2 kb’de bant veren koloniler rekombinant shRNA dizisi içerdiği düşünüldüğü için dizi analizine BM Laboratuvar Hizmetleri firmasına U6 promotor ileri primeri ile gönderilmiştir. Dizi analizi sonuçları Bioedit programıyla analiz edilerek rekombinant koloniler seçilmiştir (bk. EK C.2 ve C.3).



Şekil 4.11: Rekombinant shRNA-pLKO.1-TRC plazmitlerinin *EcoRI* ve *NcoI* kesiminin agaroz jel elektroforezi görüntüsü. (M: Marker, 1: SMN1-shRNA210 1.koloni, 2: SMN1-shRNA210 2.koloni; 3: SMN1-shRNA522 1.koloni).

Rekombinant shRNA taşıyan pLKO.1-TRC plazmitleri belirlendikten sonra Bölüm 3.2.4.6'da anlatıldığı gibi büyük ölçekli plazmit DNA izolasyonları yapıldı. Aynı zamanda shRNA'ların hücrelere teslim edilmesinde aracı olan pMD2.G ve psPAX2 plazmitleri ve negatif kontrol olarak kullanılacak pLKO.1-shSCR plazmitinin de büyük ölçekli DNA izolasyonları gerçekleştirildi. Tüm plazmit DNA'lar hazır olduktan Şekil 4.12'deki iş akış diyagramında belirttiği gibi hücre kültürü çalışmaları yapılarak SH-SY5Y hücresinde SMN1 geni susturuldu.



Şekil 4.12: shRNA klonlanan pLKO.1-TRC vektörü ile SMN1 geninin susturulmasının şematik gösterimi.

HEK293T hücrelerine Bölüm 3.2.4.6 belirtildiği gibi transfeksiyon işlemi gerçekleştirildi. Bu amaçla HEK293T hücrelerinin Bölüm 3.2.4.5'te anlatıldığı gibi sayımı yapıldı. Ardından, 6 kuyulu plakalara hücreler bölündü ve 1 gece zemine tutunmaları için 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatöre kaldırıldı. Sonraki gün Transfeksiyon için Bölüm 3.2.4.6'da belirtilen ürünler belirtilen miktarlarda TurboFect™ Transfeksiyon ajanıyla karıştırıldı. Karışım bir süre oda sıcaklığında bekletildikten sonra HEK293T hücrelerine damla damla uygulandı. 48 ve 72. saatlerde medyumlar alınarak birleştirildi ve 0.45 µm filtreden geçirilerek -80°C'de saklandı.

HEK293T hücrelerinde üretilen lentivirüsler farklı miktarlarda SH-SY5Y hücrelerine uygulandı. Bu amaç doğrultusunda Bölüm 3.2.4.6'da belirtilen protokol gerçekleştirildi. Toplam 2 adet 6 kuyulu plakaya, 3 kuyuya SMN1-shRNA210'dan 400 µL, 3 kuyuya SMN1-shRNA210'dan 800 µL, 3 kuyuya SMN1-shRNA522'den 400 µL ve 3 kuyuya SMN1-shRNA522'den 800 µL uygulandı. Protamin Sülfat ile hazırlanan medyumlara eklenen bu oranlar ile deney gerçekleştirildi.

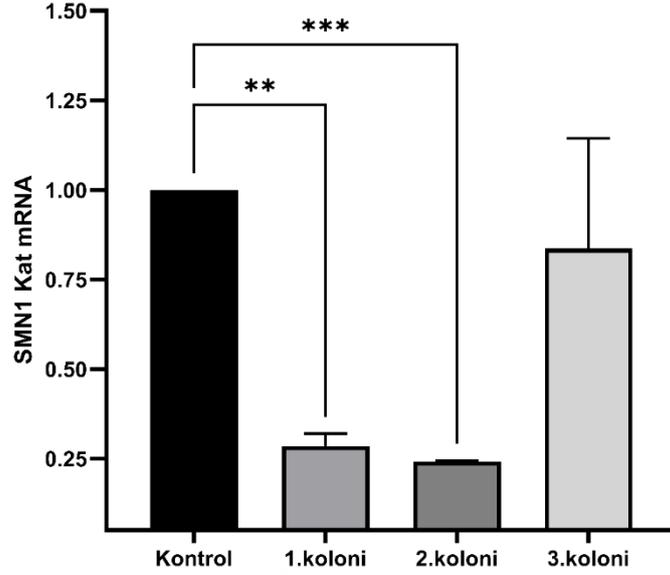
Lentivirüsler SH-SY5Y hücrelerine uygulandıktan sonra, hücreler 96'lık plakaya Bölüm 3.2.4.6'da belirtildiği gibi bölündü. 2 hafta boyunca tek koloniler takip edildi. 72 saatte 1 medyumları değiştirilerek 1 µg/mL puromisin uygulanarak, pLKO.1-TRC veya pLKO.1-shSCR plazmitlerinden birine sahip olmayan kontrol kolonilerinin ölmesi beklendi. pLKO.1-TRC plazmiti geni susturacak asıl vektör olarak, pLKO.1-shSCR plazmiti boş vektör olduğu için transdüksiyon kontrolü olarak kullanıldı.

96'lık plakalarda büyüyen koloniler farklı olduğu için 3 koloni diğerlerinden hızlı büyüdüğü için, bu 3 koloninin mRNA düzeyinde SMN1 ifadesi diğerlerinden önce kontrol edildi.

4.3.2 shRNA-SH-SY5Y Hücrelerinde SMN1 İfadesinin mRNA ve Protein Seviyesinde Doğrulanması

SMN1 ifadesinin belirlenebilmesi için büyüyen 3 pLKO.1-TRC kolonilerinden ve boş plazmit olan pLKO.1-shSCR lentivirüslerinin uygulandığı hücreden (kontrol), RNA izolasyonları Bölüm 3.2.4.7'de anlatıldığı gibi gerçekleştirildi. Daha sonra Bölüm 3.2.4.8'de belirtildiği gibi RNA miktarları belirlendi ve Bölüm 3.2.4.9'da gösterildiği gibi cDNA sentezi gerçekleştirildi.

Deney sonuçlarının daha doğru olması için cDNA'ların hepsi 1 µg olacak şekilde sulandırıldı. Ardından, Bölüm 3.2.4.10'da belirtildiği şekilde Real-Time PCR yapıldı. Bu deneyde her örnek 3 tekrarlı olacak şekilde çalışıldı ve SMN1 ekspresyon primerleri kullanıldı. Normalizasyon amaçlı ise H β -2 ekspresyon primerleri ile çalışıldı. Real-Time PCR sonuçları Livak metoduna göre değerlendirildi. Sonuçlar GraphPad programında one-way ANOVA ile analiz edilerek Şekil 4.13'te gösterilmiştir.



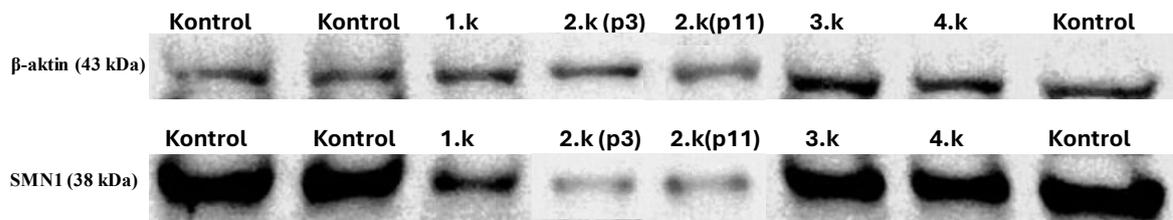
Şekil 4.13: Lentivirüs uygulanan SH-SY5Y hücrelerinde SMN1 ifadesinin mRNA seviyesinde gösterilmesi. (p <0.05 (*), <0.01 (**), <0.001 (***))

Bu sonuçla birlikte SMN1 ifadesinin SMN1 shRNA 522 kolonisinden 400 µL Lentiviral Sıvı uygulanan koloninin 3.57 kat ve SMN1 shRNA 522 kolonisinden 800 µL Lentiviral Sıvı uygulanan koloninin 4.16 kat, kontrol grubuna (pLKO.1-shSCR) kıyasla anlamlı olarak susturulduğu gösterildi. Daha sonra bu kolonilerdeki SMN1 ifadesinin susturulduğu protein düzeyinde de gösterildi.

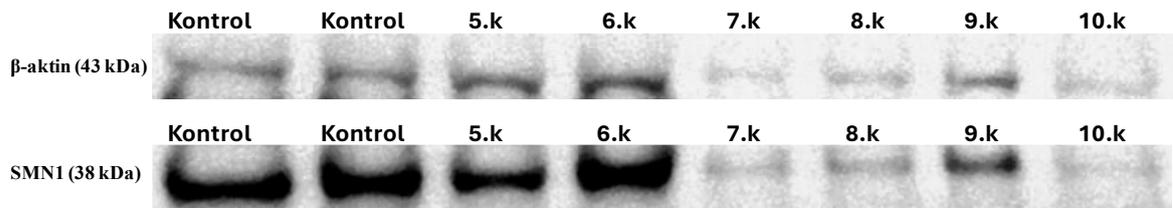
Hızlı büyüyen 3 koloniden 2'sinde gen ifadesinin sustuğu görüldüğü için, bu koloniler ve diğer kolonilerin SMN1 ifadesi protein düzeyinde gösterildi. Bu amaçla Bölüm 3.2.4.14'te belirtildiği gibi Western blot yapıldı. İlk olarak, Bölüm 3.2.4.11'de belirtilen RIPA ile protein izolasyonu 10 koloni ve kontrol grubu (pLKO.1-shCR) için yapıldı. mRNA seviyesinde 2.koloninin önemli ölçüde sustuğu görüldüğü için protein düzeyinde bu koloninin hem pasaj 3'ten hemde pasaj 11'den protein izolasyonu yapılarak sonraki pasajlarda gen ifadesinin geri gelip gelmediğinin kontrolü amaçlandı. Protein izolasyonundan sonra, proteinlerin miktarı Bölüm 3.2.4.12'de belirtilen Bradford Yöntemi ile belirlendi. Western blot için %10'luk SDS jeli Bölüm 3.2.4.13'te belirtildiği gibi hazırlandı. Örnekler en düşük protein konsantrasyonu baz alınarak, her protein örneği 20 µL hacimde 40 µg protein konsantrasyonu olacak şekilde hazırlandı. 20 µL hacime upper tamponu ile tamamlandı. Daha sonra protein örneklerine %10 β-merkaptoetanol içeren 4X Laemmli örnek tamponundan 5 µL eklenerek 95°C'de 5 dk inkübe edilerek denatüre

edildi. Denatürasyon sonrası örnekler 2 ve 3. kuyuya kontrol grubu (pLKO.1-shSCR) ardından kolonilerden izole edilen proteinler gelecek şekilde kuyulara 20'şer μ L olarak yüklendi. İlk kuyuya ThermoScientific (#26619) marka protein büyüklük belirtecinden 5 μ L yüklenerek jel 80V'da 4 saat yürütüldü.

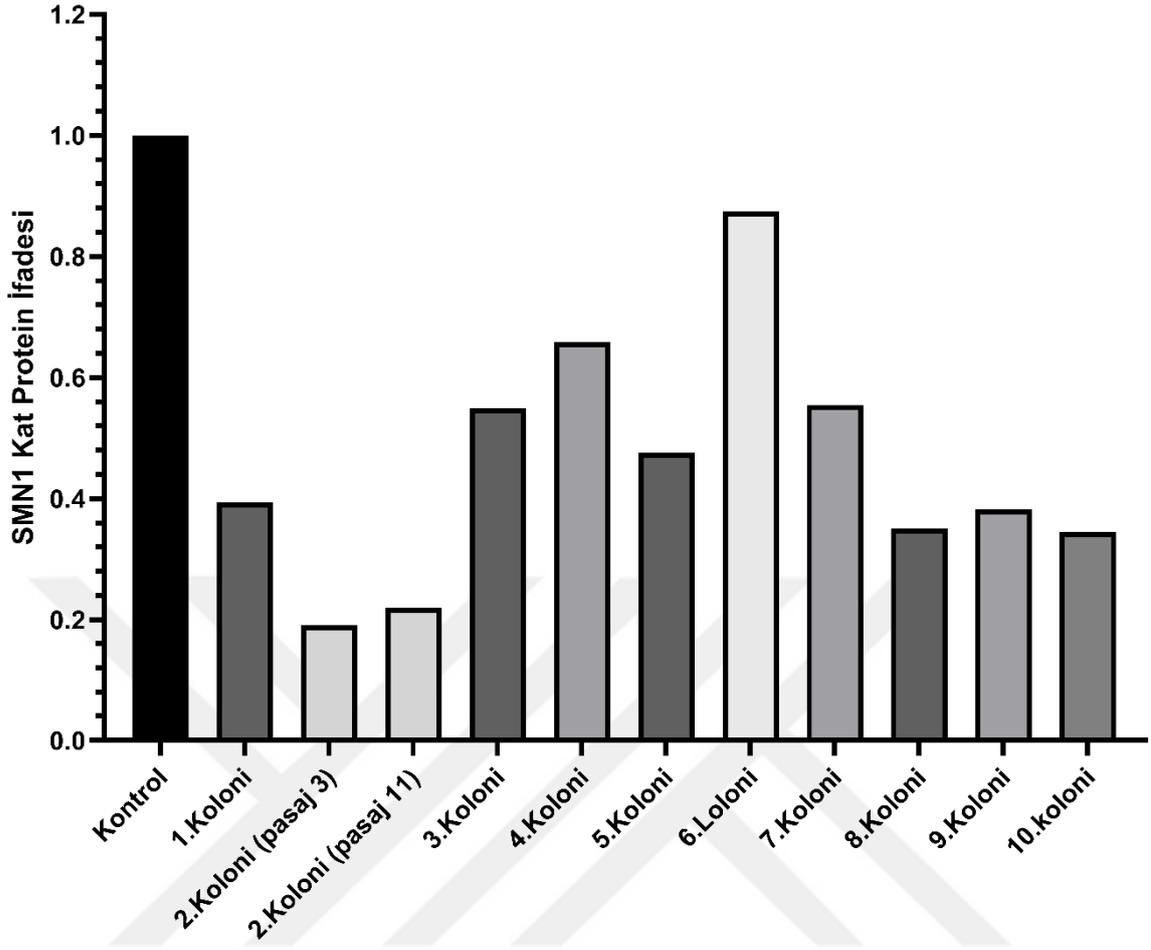
4 saatin sonunda jel Bölüm 3.2.4.14'te belirtildiği gibi PVDF membrana transfer işlemine alındı. Sonraki gün membran spesifik olmayan bağlanmaların önlenmesi amacıyla bloklama tamponu ile bloklandı. Ardından Bölüm 3.2.4.14'te belirtildiği gibi İmmünoablottlama yapıldı. SMN1 38 kDa ve Beta-Aktin 43 kDa büyüklüklerinde bant verdikleri ve her ikisi de mouse antikor olduğu için, SMN1 ve Beta-Aktin primer antikorları birlikte kullanıldı. Bu amaç doğrultusunda, 6 mL bloklama tamponu hazırlandı içerisine 1/1000 olacak şekilde SMN1 primer antikor, 1/10000 olacak şekilde Beta-Aktin primer antikor eklendi. Ardından membran 70 kDa ve 25 kDa belirteçlerinden kesildi ve hazırlanan antikora yatırıldı. 1 gece 4°C'de primer antikorlar uygulandı. Ardından 1X TBST ile yıkama işlemleri yapılarak 1/5000 oranında hazırlanmış anti mouse antikorunda 1 saat inkübe edildi. Daha sonra tekrar yıkama adımları gerçekleştirilerek Bölüm 3.2.4.14'te belirtildiği gibi ECL solüsyonu ile görüntü alındı. Alınan sonuçlar Şekil 4.14 ve Şekil 4.15'te gösterilmiştir. Sonuçlar ImageJ programıyla normalizatöre oranlanarak densitometrik olarak analiz edildi. Ardından GraphPad programında grafik oluşturuldu (Şekil 4.16).



Şekil 4.14: Kontrol grubu ve 4 koloninin Western blot sonucu.



Şekil 4.15: Kontrol grubu ve 6 koloninin Western blot sonucu.

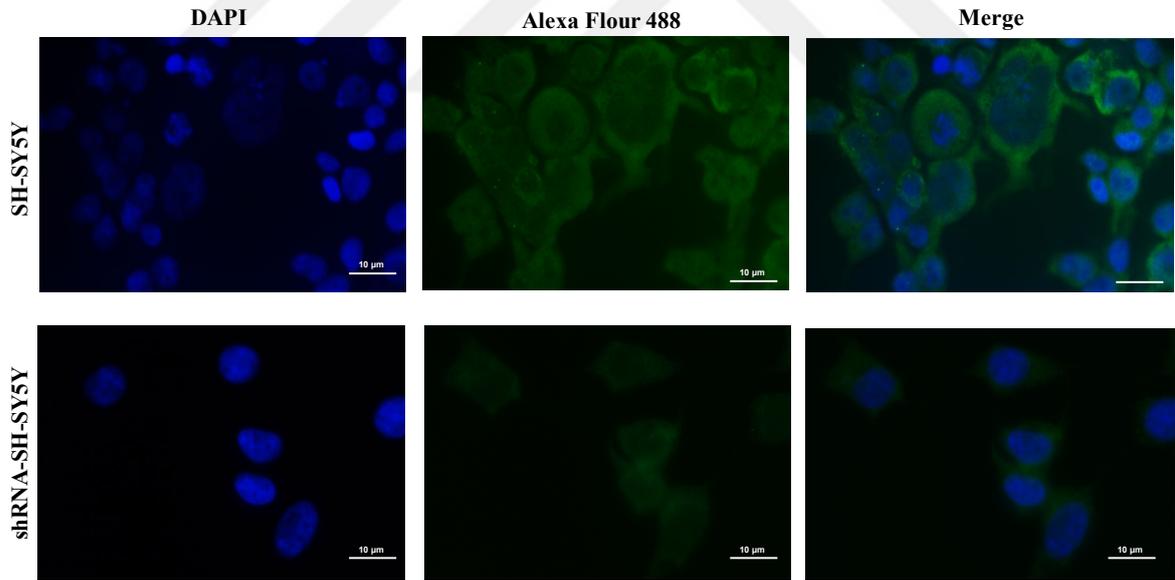


Şekil 4.16: Lentivirüs uygulanan SH-SY5Y hücrelerinde SMN1 ifadesinin protein seviyesinde gösterilmesi.

Bu sonuçlar ile birlikte tüm kolonilerde SMN1 ifadesinde azalış olduğu görüldü. Ancak, 1.koloni isimli SMN1 shRNA 522 400 μ L transdüksiyonda 2.56 kat, 2. Koloni isimli SMN1 shRNA 522 800 μ L transdüksiyonun 3.pasaj hücrelerinde 5.26 kat ve aynı hücrenin 11.pasajında 4.34 kat SMN1 ifadesinin susturulduğu yani shRNA-SH-SY5Y hücrelerinin oluşturulduğu gösterilmiştir. Buradan hareketle *in vitro* çalışmalarda SMN1 shRNA 522 800 μ L lentiviral sıvı uygulanan 2. koloni (shRNA-SH-SY5Y) kullanılmıştır.

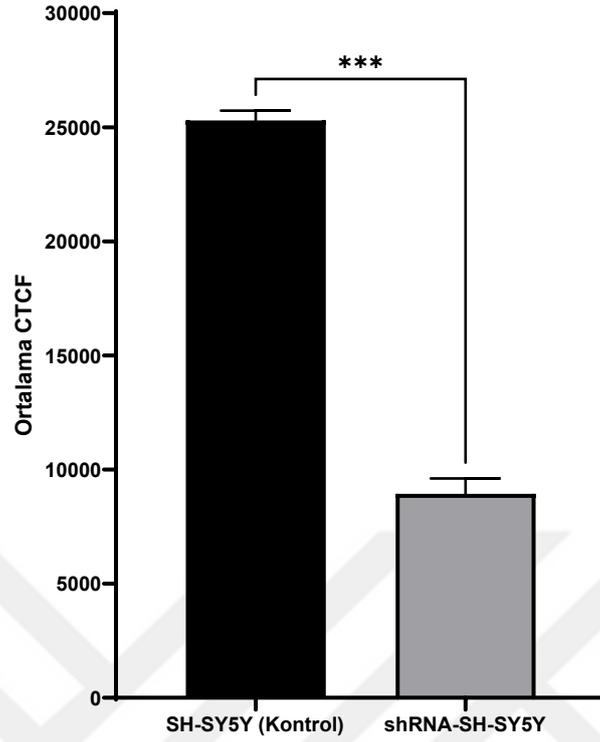
Real-Time PCR ve western blot deneylerine ek olarak İmmunofloresans ile de SMN1 geninin susturulduğu protein seviyesinde gösterildi. Bu amaç doğrultusunda Bölüm 3.2.4.17’de belirtilen protokole uygun olarak IFC deneyi kuruldu. Yuvarlak lameller üzerine bölünen hücreler tutunduktan sonra fiksasyon işlemi yapıldı. Bunun için 250 μ L %4 (w/v) paraformaldehit kuyucuklara eklenerek 15 dk inkübe edildi böylece hücrelerin

fiksasyonu sağlandı. Ardından hücrelere Triton X-100 içeren PBS eklenerek DAPI boyasının hücre çekirdeğine ulaşabilmesi sağlandı. Daha sonra spesifik olmayan bağlanmaları önlemek için %1 (w/v) BSA içeren PBS'ten 250 µL eklenerek 90 dk boyunca bloklandı. Ardından hücreler %1 BSA'lı PBS ile 1/300 oranında seyreltilmiş SMN1 primer antikorundan 250 µL eklendi. Nemli bir ortam hazırlandı ve hücre plakası yerleştirilerek 4°C'de 1 gece inkübasyona bırakıldı. Sonraki gün kuyucuklara 1/400 oranında %1 BSA'lı PBS ile sulandırılmış Alexa Fluor™ 488(green) sekonder antikorundan 150 µL eklendi ve 45 dk inkübasyona bırakıldı. Daha sonra 75 mM DAPI'den 150 µL eklenerek 10 dk oda sıcaklığında bekletildi. Son olarak, kuyulara 200 µL PBS eklendi ve yuvarlak lameller ısıtılmış steril iğne yardımıyla aşağıdan yukarı doğru çıkartıldı. Steril lam üzerine %90 gliserol damlatıldıktan sonra hücreler gliserole gelecek şekilde yerleştirildi. Yuvarlak lamelin 4 kenarına şeffaf oje damlatılarak sabitlendi. Sonraki gün preparatlar floresan mikroskobu kullanılarak görüntüledi ve kaydedildi (Şekil 4.17). Analiz için ImageJ programı kullanıldı ve CTCF (Düzeltilmiş Toplam Hücre Floresansı) hesaplanarak, Şekil 4.18'de ki gibi one-way ANOVA analizi yapılarak GraphPad programında grafiklendirildi.



Şekil 4.17: SH-SY5Y hücrelerinde SMN1 ifadesinin susturulmasının immunofloresan yöntemiyle gösterilmesi.

Şekil 4.17'de gösterilen floresan görseller ImageJ programı kullanılarak, görüntülerin aynı alanda gri değer ortalaması ve integre yoğunluğu ölçüldü. Düzeltilmiş toplam hücre floresansı hesaplanarak, sonuçlar GraphPad programında grafik haline getirildi. Ardından sonuçlar one-way ANOVA ile istatistiksel olarak analiz edildi.



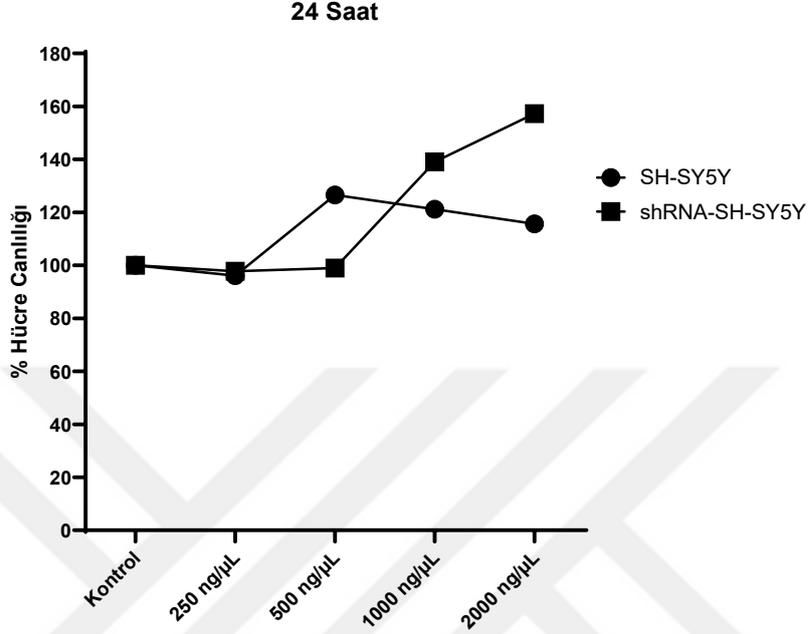
Şekil 4.18: SH-SY5Y ve SMN1 ifadesi susturulan SH-SY5Y (shRNA-SH-SY5Y) hücrelerinde SMN1 geninin floresans sinyal yoğunluğunun grafiği. (p değeri <0,001 (***) ile gösterildi.)

CTCF analizi sonucuna göre SH-SY5Y hücrelerinde SMN1 ifadesinin %65 oranında azaldığı gösterildi. İmmunofloresan sonuçları, Real-Time PCR ve Western blot sonuçlarıyla uyumlu olduğu ve SMN1 ifadesinin susturulduğu doğrulandı.

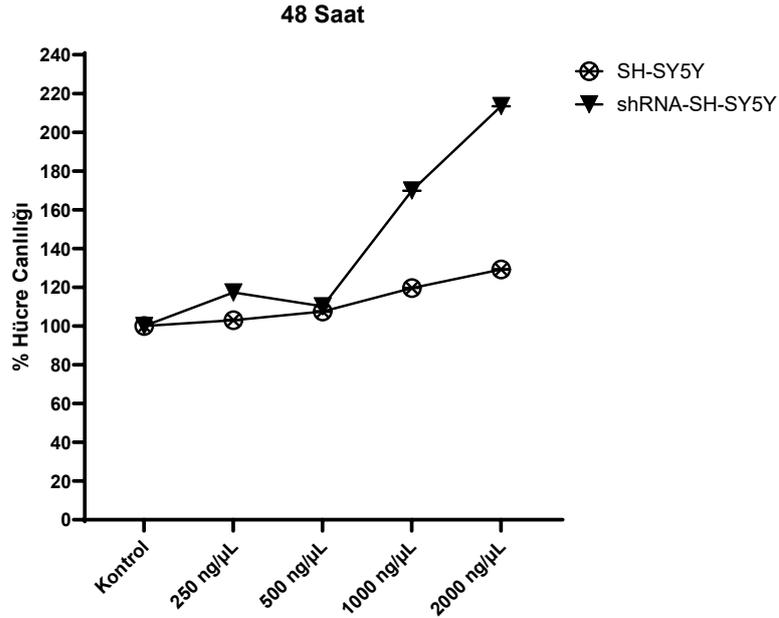
4.4 Rekombinant TAT-SMN Proteininin Sitotoksitesinin Belirlenmesi

Rekombinant üretilen TAT-SMN proteininin hücre canlılığına etkisinin belirlenebilmesi amacıyla MTT Testi yapıldı. Bu amaç doğrultusunda, SH-SY5Y hücreleri ve SMN1 ifadesi susturulmuş SH-SY5Y hücreleri 1×10^4 hücre olacak şekilde 96 kuyuluk plakaya bölündü. Sonraki gün kontrol grupları hariç, diğer kuyulara rekombinant TAT-SMN proteininden 250 ng/mL, 500 ng/mL, 1 µg/mL, ve 2 µg/mL son konsantrasyon olacak şekilde uygulandı. 24. ve 48. saat dilimlerinde Bölüm 3.2.4.17’de belirtildiği gibi MTT uygulandı. Son konsantrasyonu 0.5 mg/mL olacak şekilde tüm kuyulara uygulandı. MTT uygulamasının ardından plaka 3 saat inkübe edildi. Ardından kuyularda bulunan DMEM uzaklaştırılarak, 4 mM HCl içeren izoproponolden 200 µL eklenerek çözüldü. Son

aşamada spektrofotometrede 550 nm’de absorbans alınarak, % hücre canlılığı hesaplaması yapıldı. Her deney grubu 4 tekrarlı çalışıldı, sonuçlar GraphPad programında grafik haline getirildi (Şekil 4.19 ve Şekil 4.20).



Şekil 4.19: SH-SY5Y ve shRNA-SH-SY5Y hücrelerinde, rekombinant TAT-SMN proteininin hücre proliferasyonuna 24 saatte etkisinin MTT Testi ile gösterilmesi.



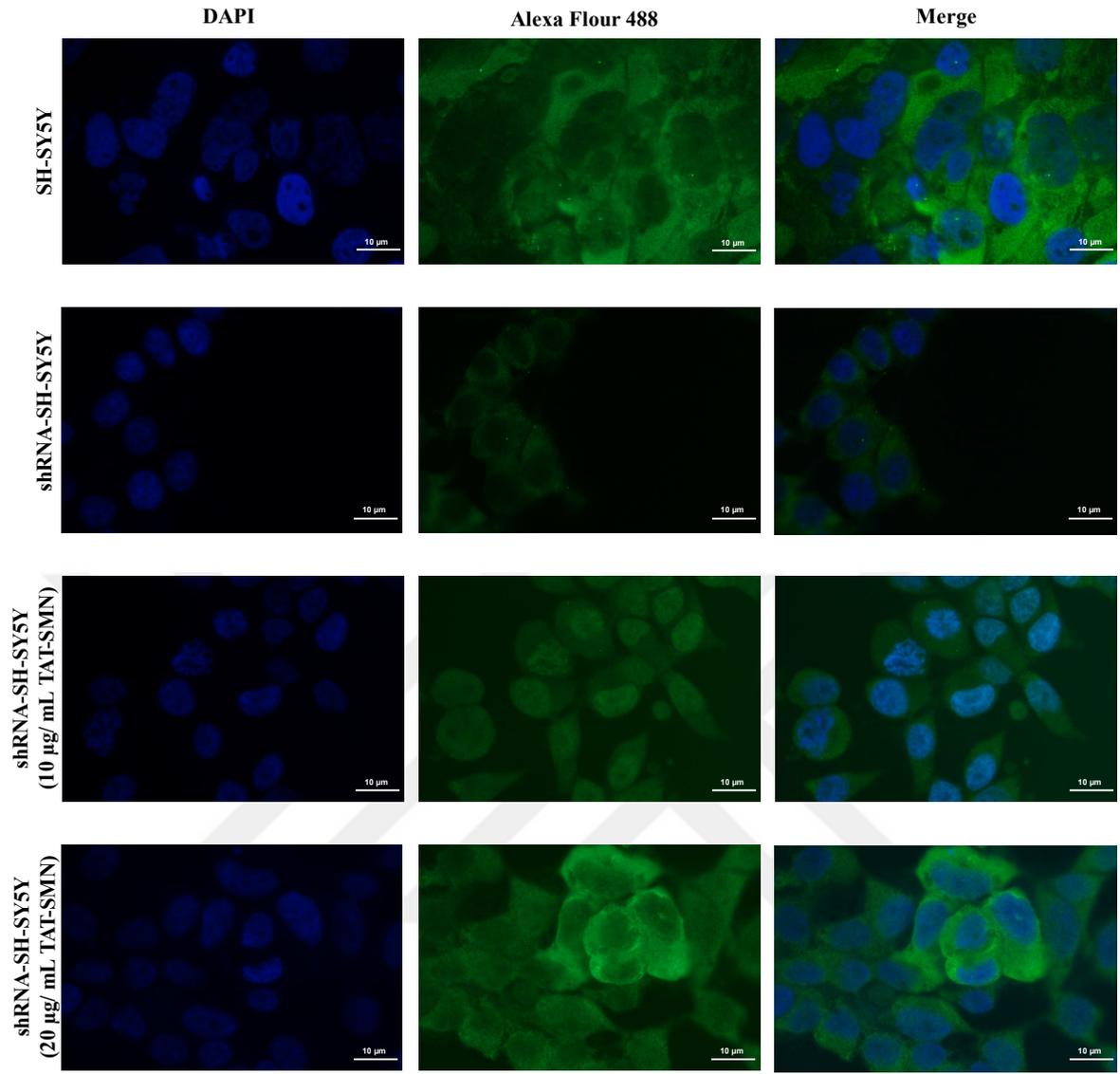
Şekil 4.20: SH-SY5Y ve shRNA-SH-SY5Y hücrelerinde, rekombinant TAT-SMN proteininin hücre proliferasyonuna 48 saatte etkisinin MTT analizi.

Bu sonuçlarla birlikte, rekombinant olarak üretilen TAT-SMN proteininin 24 ve 48. saatlerde hem SH-SY5Y hücreleri hem de shRNA-SH-SY5Y hücrelerinde toksik etkisinin olmadığı, aksine hücre proliferasyonuna pozitif yönde etkide bulunduğu gösterilmiştir. 24. saate SMN1 ifadesi susturulmuş shRNA-SH-SY5Y hücrelerinde proliferasyonun %60 oranında arttığı gözlemlenmiştir. 48. saatte ise hücre proliferasyonunun yaklaşık %120 oranında arttığı görülmüştür. Bu sebeple, TAT-SMN proteininin toksik etkisinin olmadığı ve özellikle shRNA-SH-SY5Y hücrelerinde proliferatif etkiyi arttırdığı tespit edilmiştir.

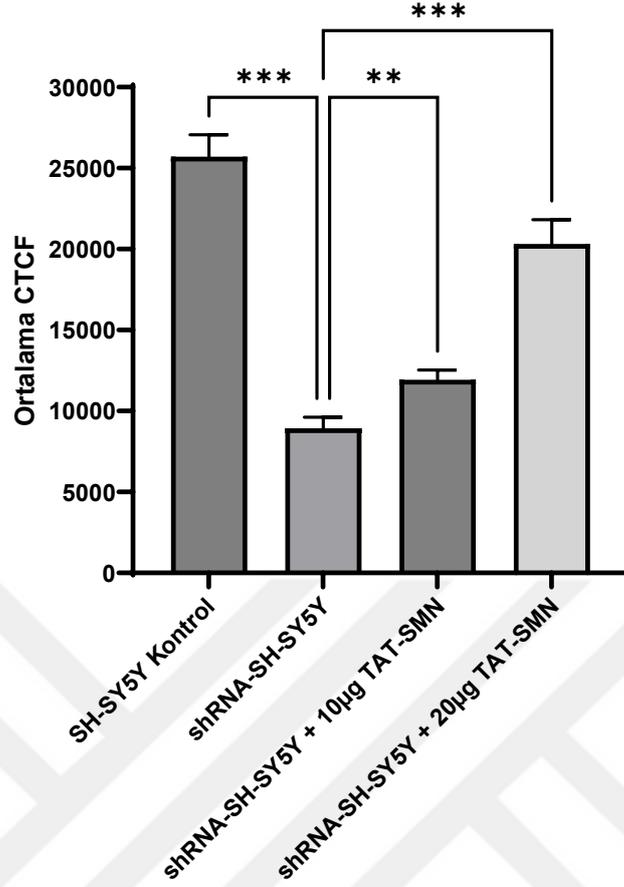
4.5 Rekombinant TAT-SMN Proteininin Aktivitesinin Belirlenmesi

4.5.1 Farklılaştırılmamış SH-SY5Y ve shRNA-SH-SY5Y Hücrelerinde TAT-SMN uygulaması ve IFC

En az 4.pasaja gelen SH-SY5Y ve shRNA-SH-SY5Y hücreleri TE ile kaldırıldı. Ardından 24 kuyulu plakaların içerisine 6 mm çapındaki yuvarlak lameller konularak, her kuyuya 5×10^4 hücre olacak şekilde paylaştırıldı. 1 gece inkübatörde hücrelerin yüzeye tutunması için bekletildi. Hücreler tutunduktan sonra 3 kuyu kontrol grubu olarak bırakıldı, 3 kuyuya 10 µg/mL, 3 kuyuya 20 µg/mL rekombinant TAT-SMN proteini uygulandı. 24 saat sonra aynı kuyulara 10 µg/mL ve 20 µg/mL rekombinant TAT-SMN proteini uygulandı. Daha sonra Bölüm 3.2.4.17’de anlatıldığı gibi IFC (İmmunofloresans) tekniği gerçekleştirildi. Hazırlanan preparatlar floresans mikroskopunda incelendi ve kaydedildi. Floresan mikroskopunda görüntülenen hücreler Şekil 4.21’de verilmiştir. Görüntüler kaydedildikten sonra ImageJ programıyla CTCF hesaplanarak, one-way ANOVA ile analiz edilmiştir. Şekil 4.22’de analiz sonucu gösterilmiştir.



Şekil 4.21: Kontrol grubu SH-SY5Y hücrelerinde ve SMN1 ifadesi susturulmuş shRNA-SH-SY5Y hücrelerinde 10 µg/mL ve 20 µg/mL rekombinant TAT-SMN protein uygulamasının İmmunofloresan yöntemiyle etkisinin gösterilmesi.



Şekil 4.22: shRNA-SH-SY5Y hücrelerinde 10 µg/mL ve 20 µg/mL rekombinant TAT-SMN proteini uygulandıktan sonra hücredeki floresans sinyal yoğunluğunun grafiği. (p değeri <0.001 (***) ile gösterildi.)

CTCF analizlerine göre, SMN1 ifadesi susturulmuş hücrelerde 10 µg/mL ve 20 µg/mL dozda uygulanan rekombinant TAT-SMN proteini, bu hücreler tarafından hücre içerisine alınmış ve hücre tarafından kullanılmaya başlandığı kanıtlanmıştır.

Özellikle, 20 µg uygulanan hücrelerde SMN1 ifadesi susturulan hücreye kıyasla SMN protein seviyesi istatistiksel olarak %127 oranında artmıştır. 10 µg uygulanan hücrelerde ise SMN1 ifadesi susturulan hücreye kıyasla bu artış istatistiksel olarak anlamlı ancak %33 olmuştur.

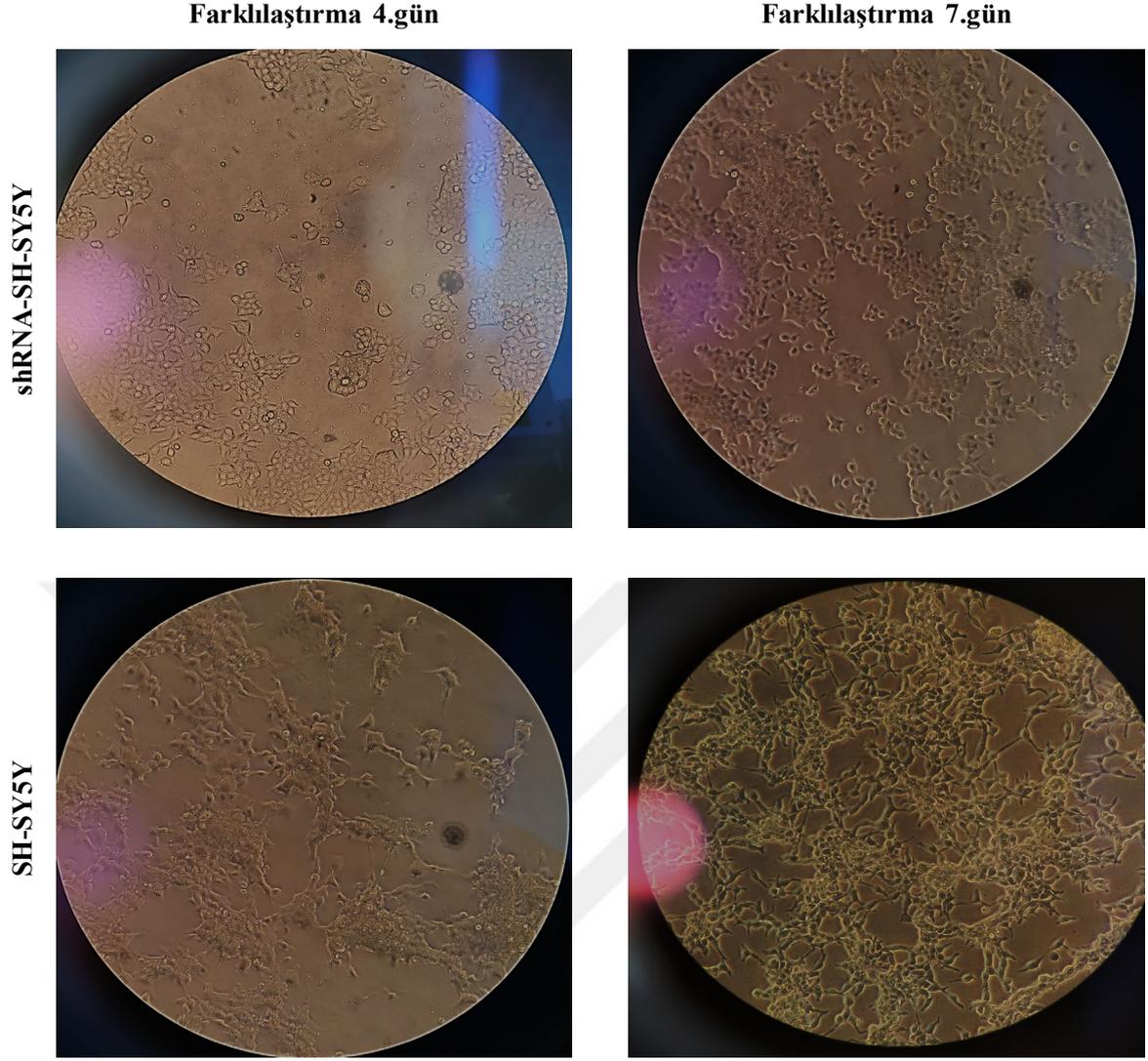
Elde edilen bulgular anlamlı olmakla birlikte, rekombinant olarak üretilen TAT-SMN proteininin hücrelere uygulandığında, hücre içerisine girdiği ve işlevsel olduğu gösterilmiştir. Ayrıca sonraki çalışmalar için 20 µg TAT-SMN proteini kullanılması daha uygun görülmüştür.

4.5.2 Farklılaştırılmış SH-SY5Y ve shRNA-SH-SY5Y Hücrelerinde TAT-SMN uygulaması

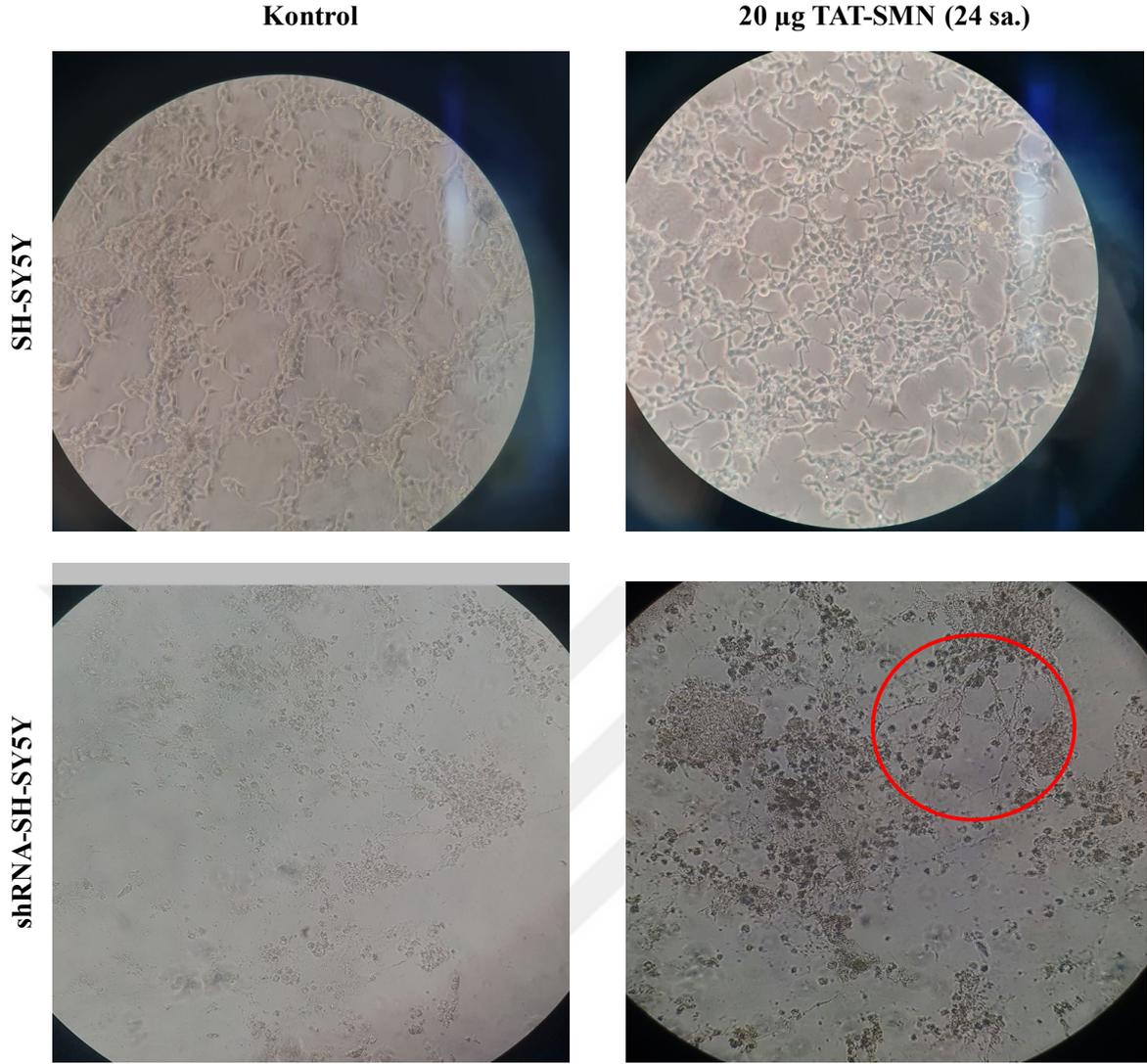
Elde edilen bulgular rekombinant olarak üretilen TAT-SMN proteininin hücre içerisine girdiğini, efektif olarak hücrede rol aldığını ve hücrenin yaşam süresini uzattığını göstermiştir. Bu sonuçlardan sonra, SMN proteininin en kritik olduğu kısımlardan biri olan nöronlarda, rekombinant ilaç adayı uygulandığında nasıl tepki vereceği araştırıldı. Bu amaçla, SH-SY5Y ve shRNA-SH-SY5Y hücreleri Retinoik Asit ile nörona farklılaştırılarak ardından rekombinant TAT-SMN proteini uygulanarak inverted mikroskopta analiz edilmiştir. İlk olarak, Bölüm 3.2.4.17’de belirtildiği gibi 24 kuyulu plakaya her kuyuda 2×10^4 hücre olacak şekilde SH-SY5Y ve shRNA-SH-SY5Y hücreleri %10 FCS içeren DMEM ile bölündü. Sonraki gün, Bölüm 3.2.4.16’da belirtildiği gibi %2.5 FCS içeren DMEM ile medyum değişimi yapılarak 1 gece daha inkübatörde bekletildi. Ardından, %1 FCS içeren DMEM ile medyum tekrar değiştirildi ve her kuyuya son konsantrasyonu 10 μ M olacak şekilde Retinoik Asit (RA) uygulandı. Bu aşamadan sonra medyum değiştirme ve RA uygulama işlemi toplam 3 kez yapıldı. Hücrelerin nörona farklılaştığı Şekil 4.23’te gösterildiği gibi inverted mikroskop ile gözlemlendi.

SMN1 genine sahip SH-SY5Y hücreleri nörona farklılaştırıldığında birbirleri ile ağ yapısı oluşturarak nöronlara fiziksel olarak dönüşürken, SMN1 geni susturulmuş shRNA-SH-SY5Y hücreleri daha yuvarlak ve ayırık halde kaldıkları gözlemlendi.

Nörona farklılaştırıldıktan sonra SH-SY5Y ve shRNA-SH-SY5Y hücrelerine rekombinant TAT-SMN proteininden 20 μ g olacak şekilde uygulandı. 24 saatin sonunda hücre morfolojisindeki değişimler inverted mikroskop ile kayıt altına alındı (Şekil 4.24).



Şekil 4.23: SH-SY5Y ve shRNA-SH-SY5Y hücrelerinin nörona farklılaştırılmalarının inverted mikroskop altındaki görüntüleri.



Şekil 4.24: SH-SY5Y ve shRNA-SH-SY5Y hücrelerinin nörona farklılaştırılması ve 20 µg TAT-SMN proteininin uygulanarak 24 saat sonraki inverted mikroskop görüntüleri (shRNA-SH-SY5Y hücreesindeki nöron benzeri yapılar kırmızı yuvarlak ile gösterilmiştir).

SH-SY5Y ve shRNA-SH-SY5Y hücrelerine 20 µg TAT-SMN proteini uygulandıktan 24 saat sonra, shRNA-SH-SY5Y hücrelerinin bazı grupları SH-SY5Y hücrelerine benzediği gözlemlendi. Bu çalışma ile, SMN1 geni susturulan ve dolayısıyla SMN proteini üretemeyen shRNA-SH-SY5Y hücreleri nöron hücrelerine farklılaşmadığı belirlendi. Ancak, shRNA-SH-SY5Y hücrelerine 20 µg TAT-SMN proteini uygulandığında ise bazı hücre gruplarında nöron benzeri yapılar gözlemlendi. Elde edilen bulgular kapsamında, rekombinant TAT-SMN proteininin, SMN proteini üretemeyen hücrelere dışarıdan verildiğinde hücrelerin SH-SY5Y kontrol hücreleri gibi davrandığını göstermektedir. Bu sonuçlar ile birlikte, rekombinant TAT-SMN proteininin, SH-SY5Y hücrelerindeki SMN proteininin yerine geçebileceği ve onun görevlerini yerine getirebildiği belirlenmiştir.

5. SONUÇ VE TARTIŞMA

Spinal Musküler Atrofi, omurilikteki motor nöronların dejenerasyonu ile karakterize, kas güçsüzlüğüne ve atrofiye yol açan genetik bir hastalıktır [179]. SMA, bebek ölümlerinin önde gelen genetik nedenidir ve yaklaşık 10.000 canlı doğumda 1'i etkilemektedir [180]. SMA'nın şiddeti, başlangıç yaşına ve klinik gidişata göre farklılık gösterir [181]. Bulgular, SMA'nın omurga ve nöromusküler devrelerdeki sinaptik kusurlarla ilişkili olduğunu ve motor bozulmaya yol açtığını göstermiştir [179].

SMA, 5q11.2-q13.3 kromozomunda yer alan SMN1 genindeki mutasyonlardan [182], aslında mutasyonlar nedeniyle fonksiyonel SMN proteininin eksikliğinden kaynaklanmaktadır [183].

Bugüne kadar ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından SMA için üç ilaç onaylanmıştır; bunlar Biogen'den nusinersen (Spinraza®), Novartis'ten onasemnogene abeparvovec-xioi (Zolgensma®) ve risdiplamdır [184].

Risdiplam yakın zamanda SMA tedavisine yönelik seçici bir SMN2 gen birleştirme modülatörü olarak geliştirildi. Risdiplam, SMA tedavisi için FDA tarafından onaylanan ilk küçük moleküllü birleştirme değiştiricisidir. Risdiplam, bir SMN2 ekleme modülatörü olarak görev yapar, iki bölgede, bir ekson arttırıcı sekansta ve ekson 7'nin 5' birleştirme bölgesinde doğrudan SMN2 öncül mRNA'ya bağlanarak stabil SMN protein seviyesini arttırmayı amaçlar [185].

Onasemnogene abeparvovec olarak da bilinen Zolgensma, iki yaşına kadar SMA olan pediatrik hastaların tedavisi için 24 Mayıs 2019'da ABD FDA tarafından onaylanan bir gen terapisi. Bu terapi, insan SMN1 geninin fonksiyonel bir kopyasının, kan-beyin bariyerinin geçebilen adeno-ilişkili bir virüs 9 (AAV9) vektörü kullanılarak SMA hastalarına uygulanmasını içerir [186].

Nusinersen olarak da bilinen Spinraza, SMA tedavisi için FDA tarafından onaylanmış bir antisens oligonükleotid (ASO) ilacıdır. SMN2 geninin RNA eklenmesini hedefleyerek etki eder ve bu da fonksiyonel SMN proteininin üretiminin artmasına neden olur. Spinraza, merkezi sinir sistemine intratekal enjeksiyon yoluyla uygulanır [187]. Özellikle Tip I SMA

olmak üzere SMA hastalarında motor fonksiyonu iyileştirmede ve sağkalımı uzatmada etkinliği kanıtlanmış bir tedavidir [188].

Bu tedavilerin yanı sıra, rekombinant proteinler kullanılarak hedefe yönelik ve etkili terapötik seçenekler ile çeşitli hastalıkların tedavisinde önemli ölçüde çalışmalar mevcuttur. Bu proteinler, kanser, otoimmün hastalıklar, genetik bozukluklar ve bulaşıcı hastalıklar dahil olmak üzere çok çeşitli durumların tedavisinde çok önemli bir rol oynamaktadırlar. Özellikle diyabetin tedavisinde, pankreasın yeterli insülin üretmediği durumlarda kan şekeri seviyesini kontrol etmek için rekombinant insülin kullanılmıştır [189]. Benzer şekilde, Hemofili A ve B hastalarının tedavisinde kullanılan rekombinant faktör VIII ve IX, bu hastalarda eksik olan pıhtılaşma faktörlerini sağlar [190]. Ayrıca, MS tedavisinde kullanılan rekombinant protein olan Interferon beta, bağışıklık sisteminin aktivitesini düzenler ve hastalığın ilerlemesini yavaşlatır [191]. Kanserde ise monoklonal antikor olan Trastuzumab (Herceptin), HER2-pozitif meme kanseri hücrelerinin büyümesini durdurmuştur [192]. Bunlara ek olarak, Paratiroid hormonun (PTH) rekombinant formu olan ve osteoporoz tedavisinde kemik oluşumunu teşvik eden Teriparatid (Forteo), osteoporozun tedavisinde kullanılan rekombinant bir proteindir [193]. Bu tedavilere ek olarak diğer hastalıklar için rekombinant protein üreterek tedavi stratejileri geliştirilmeye devam etmektedir. Örneğin, rekombinant TSG-6 proteininin kullanımı, kollajen kaynaklı artrit hafifletilmesinde umut verici sonuçlar göstermiştir [194]. Ek olarak, rekombinant insan TIGIT-Ig, lupus nefrit gibi otoimmün hastalıkların tedavisinde etkili sonuçlar göstermiştir [195]. Ayrıca, hücreye nüfuz eden rekombinant Foxp3 proteini, Treg fonksiyonunu artırma ve artriti iyileştirme potansiyeli sergilemiştir [196].

Protein replasman tedavilerinin az olmasının başlıca sebebi, hedef hücreye rekombinant proteini ulaştırmaktır. Bu tez çalışması kapsamında üretilen rekombinant SMN proteini TAT füzyon proteini kullanılarak hedeflenmenin sağlanması amaçlanmıştır.

TAT füzyon proteinlerini kullanan protein replasman tedavileri, çeşitli biyomedikal uygulamalarda önemli sonuçlar göstermiştir. TAT füzyon proteinleri, biyolojik olarak aktif proteinleri hücrelere etkili bir şekilde iletme yeteneğine sahiptir [127]. TAT füzyon proteinleri, TAT-MTS füzyon proteinlerinin verilmesi yoluyla mitokondriyal fonksiyonu geri kazandırarak metilmalonik asidemi (MMA) gibi hastalıklar için potansiyel bir tedavi

yaklaşımı olarak önerilmiştir [197]. Ayrıca çeşitli hastalık modellerinde TAT füzyon proteinlerinin transdüksiyon etkinliği ve terapötik potansiyeli çalışılmıştır. Bu çalışmalarda, TAT füzyon proteinlerinin, hücre zarı lipid sallarından kaynaklanan endositik yollar yoluyla hücreler tarafından içselleştirilebileceğini gösterilmiş ve hedefli dağıtım potansiyelleri vurgulanmıştır [198]. Bu sonuçlara ek olarak, TAT füzyon proteinlerinin kanserde gen terapisindeki potansiyelleri araştırılmıştır ve TAT peptidinin, hücreler arasındaki terapötik protein trafiğini artırarak kanserde gen tedavisinin etkinliğini artırdığı bulunmuştur [199]. Genel olarak, protein replasman tedavilerinde TAT füzyon proteinleri üzerine yapılan araştırmalar, terapötik proteinlerin verilmesinde, hücre alımının artırılmasında ve çeşitli hastalıklar için hedefe yönelik tedaviler sağlanmasında potansiyellerini gösteren çalışmalarla etkinliği gösterilmiştir.

Literatürdeki bulgular sayesinde, rekombinant protein tedavilerinin çeşitli hastalıklarda umut vaat eden sonuçları gözlemlenmiştir. Ancak SMA hastalığında hedefleme sistemi ile rekombinant protein içeren bir tedavi stratejisi yoktur.

Bu bilgiler doğrultusunda, güncel FDA onaylı tedavi stratejileri oldukça kısıtlı ve pahalı olan SMA hastalığının, ülkemizde ise ilaç üretimi yapılmamakta ve bu konuda tamamen yurt dışına bağımlı kalınmaktadır. Bu tez çalışması kapsamında SMA hastalığında kullanılacak, rekombinant SMN proteini üretimi amaçlanmış, hücreye girişi ise SMN ile füzyon oluşturacak şekilde tasarlanan TAT peptidi ile sağlanmış ve SMA hastalarının kullanabileceği ilaç adayı oluşturulmuştur.

Bu amaçla çalışma 3 iş paketinden oluşmaktadır. Birinci iş paketinde, pEGFP-N2 vektörü içerisinde bulunan SMN1 geni restriksiyon enzimlerle kesilerek çıkartıldı, ardından aynı enzimlerle kesilmiş prokaryotik ekspresyon vektörü olan pET-21a ile ligasyonu gerçekleştirildi. Oluşturulan rekombinant klona SMN1-pET-21a ismi verildi. Ardından, SMN proteininin hücre membranından geçişi için uygun hale getirilmesi amacıyla hücre geçiş protein dizileri denen TAT dizisi SMN1-pET-21a vektörüne klonlandı. Bu klon TAT-SMN1-pET-21a olarak isimlendirildi.

İkinci aşamada pET vektörü sisteminde bulunan histidin kuyruğundan faydalanılarak TAT-SMN proteini ve kontrol amaçlı boş pET-21a vektörü BL21(DE)3 Codon Plus bakteri soylarında üretilerek saflaştırıldı. Bu amaç doğrultusunda, ilaç adayı rekombinant

prorein olan TAT-SMN'yi içeren pET-21a ve kontrol boş pET-21a ön kültür olarak ekimleri yapıldı. Ardından, büyük hacimde yeterli yoğunluğa ulaşan bakterilere IPTG uygulanarak protein üretmeleri sağlandı. Üretilen proteinler lizat haline getirildi ve ardından His-tag metodu ile saflaştırıldı. Üretilen ve saflaştırılan proteinlerden her aşamada örnek alınarak, bu örnekler ile SDS-Page ve Western blot yapılarak proteinin saflığı kontrol edildi.

Üçüncü aşamada ise üretilen proteinin *in vitro* aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla, SMA hastalığı *in vitro* ortamda oluşturuldu. Bu doğrultuda insan nöroblastoma hücre hattı olan SH-SY5Y hücrelerinde SMN1 geni lentiviral sistem yardımıyla susturuldu. İlk olarak, SMN1 genine spesifik shRNA dizileri tasarlandı ve pLKO.1-TRC vektörüne klonaldı. Ardından HEK293T hücrelerine bu klonun transfeksiyonu yapıldı, ayrıca kontrol olarak gen içermeyen boş pLKO.1-shSCR vektörünün de transfeksiyonu gerçekleştirildi. Daha sonra, 48 ve 72. saatte HEK293T hücrelerinin ürettiği lentivirüs içeren medyumlar toplandı. Toplanan medyumlar farklı oranlarda SH-SY5Y hücrelerine verilerek lentivirüslerin hücreye nüfuz etmesi beklendi. Lentivirüs uygulanan hücrelerin seçimi için puromisin antibiyotiği kullandı ve hücreler tek koloni kalacak şekilde 96 kuyulu plakaya bölündü. Tek kolonilerden büyütülen shRNA-SH-SY5Y (SMN1 geni susturulmuş SH-SY5Y) hücrelerinden RNA ve protein izolasyonları yapılarak, Real-Time PCR ve western blot yapıldı. Ayrıca, hücrelerin SMN proteinleri İmmünofloresan ile görüntülenerek sonuçlar tekrar kanıtlandı. Bu deneyler sonucunda SMN1 ifadesi susturulmuş olan hücre ayırt edildi ve sonraki çalışmalarda kullanıldı.

Üretilen TAT-SMN proteininin hücreye toksik etkisinin belirlenmesi amacıyla farklı konsantrasyonda ve zaman dilimlerinde shRNA-SH-SY5Y ve SH-SY5Y hücrelerine uygulandı ve sitotoksik etkisi MTT analizi ile belirlendi. Daha sonra, TAT-SMN proteininin ilaç olarak uygulanması amacıyla shRNA-SH-SY5Y hücrelerine farklı dozlarda uygulanarak İmmünofloresan deneyi gerçekleştirildi. Sonuçlar, artan doz miktarı ile istatistiksel olarak anlamlı şekilde hücrede SMN proteininin arttığını gösterdi.

Sonuç olarak, dünya çapında yalnızca üç adet bulunan FDA onaylı SMA tedavileri oldukça pahalı ve erişim kısıtlıdır. Özellikle ülkemizde genetik hastalıkların başında gelen SMA için uygun maliyetli ve yerli bir tedavi üretmeyi amaçladık. Bu amaç doğrultusunda üretilen TAT-SMN proteini bir ilaç adayı olarak, gerçekleştirilen tüm *in vitro* aktivite

deneylerinin hepsinde umut vadeden olumlu sonuçlar göstermiştir. Bu sebeple SMA hastalığının yerli ve milli tedavisi için güçlü bir aday olmuştur. Bundan sonraki aşamalarda bu ilaç adayının *in vivo* çalışmalarının gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Bu sebeple, öncelikle SMA hastalığına sahip deney hayvanlarına bu ilaç adayının farklı dozlarda verilerek, hayvanların takip edilmesi gerekmektedir. Tedavi uygulanan bu hayvanların, yaşam sürelerindeki artış, motor becerilerindeki değişim ve fenotiplerinin gözlemlenmesi gerekmektedir. Deney hayvanlarında olumlu sonuçlar gözlemlenirse, SMA'lı insanlarda uygulama deneyleri yapılabilir.



6. KAYNAKLAR

- [1] W. D. Arnold, D. Kassar, and J. T. Kissel, "Spinal muscular atrophy: diagnosis and management in a new therapeutic era," *Muscle & nerve*, vol. 51, no. 2, pp. 157-167, 2015.
- [2] D. Roberts and J. Chavez, "The genetic component in child mortality," *Archives of disease in childhood*, vol. 45, no. 239, pp. 33-38, 1970.
- [3] J. Pearn, "Incidence, prevalence, and gene frequency studies of chronic childhood spinal muscular atrophy," *Journal of medical genetics*, vol. 15, no. 6, pp. 409-413, 1978.
- [4] A. D'Amico, E. Mercuri, F. D. Tiziano, and E. Bertini, "Spinal muscular atrophy," *Orphanet journal of rare diseases*, vol. 6, pp. 1-10, 2011.
- [5] A.-F. Bruns *et al.*, "Fibroblast growth factor-2 regulates the stability of nuclear bodies," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 106, no. 31, pp. 12747-12752, 2009.
- [6] J. J. Cherry, M. C. Evans, J. Ni, G. D. Cuny, M. A. Glicksman, and E. J. Androphy, "Identification of novel compounds that increase SMN protein levels using an improved SMN2 reporter cell assay," *Journal of biomolecular screening*, vol. 17, no. 4, pp. 481-495, 2012.
- [7] S. J. Kolb and J. T. Kissel, "Spinal muscular atrophy: a timely review," *Archives of neurology*, vol. 68, no. 8, pp. 979-984, 2011.
- [8] R. Wadman *et al.*, "Muscle strength and motor function throughout life in a cross-sectional cohort of 180 patients with spinal muscular atrophy types 1c-4," *European journal of neurology*, vol. 25, no. 3, pp. 512-518, 2018.
- [9] T. W. Prior, M. E. Leach, and E. Finanger, "Spinal muscular atrophy," 2020.
- [10] A. Pechmann, T. Langer, and J. Kirschner, "Decision-making regarding ventilator support in children with SMA type 1—a cross-sectional survey among physicians," *Neuropediatrics*, vol. 50, no. 06, pp. 359-366, 2019.
- [11] D. Buonsenso *et al.*, "Ultrasound assessment of diaphragmatic function in type 1 spinal muscular atrophy," *Pediatric pulmonology*, vol. 55, no. 7, pp. 1781-1788, 2020.
- [12] M. K. Schroth, "Special considerations in the respiratory management of spinal muscular atrophy," *Pediatrics*, vol. 123, no. Supplement_4, pp. S245-S249, 2009.
- [13] A. Chabanon *et al.*, "Prospective and longitudinal natural history study of patients with type 2 and 3 spinal muscular atrophy: baseline data NatHis-SMA study," *PLoS One*, vol. 13, no. 7, p. e0201004, 2018.
- [14] C. D. Wurster *et al.*, "Neurochemical markers in CSF of adolescent and adult SMA patients undergoing nusinersen treatment," *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, vol. 12, p. 1756286419846058, 2019.
- [15] F. Trucco *et al.*, "Respiratory trajectories in type 2 and 3 spinal muscular atrophy in the iSMAC cohort study," *Neurology*, vol. 96, no. 4, pp. e587-e599, 2021.
- [16] H. Yang *et al.*, "Assessment of motor function and nutritional status in children with spinal muscular atrophy treated with nusinersen after loading period in Western China: a retrospective study," *BMC neurology*, vol. 23, no. 1, p. 35, 2023.
- [17] K. W. Ng, A. M. Connolly, and C. M. Zaidman, "Quantitative muscle ultrasound measures rapid declines over time in children with SMA type 1," *Journal of the neurological sciences*, vol. 358, no. 1-2, pp. 178-182, 2015.
- [18] S. A. Al-Zaidy and J. R. Mendell, "From clinical trials to clinical practice: practical considerations for gene replacement therapy in SMA type 1," *Pediatric neurology*, vol. 100, pp. 3-11, 2019.

- [19] S. T. Iannaccone, B. S. Russman, R. H. Browne, C. R. Buncher, M. White, and F. J. Samaha, "Prospective analysis of strength in spinal muscular atrophy," *Journal of child neurology*, vol. 15, no. 2, pp. 97-101, 2000.
- [20] K. Zerres and S. Rudnik-Schöneborn, "Natural history in proximal spinal muscular atrophy: clinical analysis of 445 patients and suggestions for a modification of existing classifications," *Archives of neurology*, vol. 52, no. 5, pp. 518-523, 1995.
- [21] Q. Liu and G. Dreyfuss, "A novel nuclear structure containing the survival of motor neurons protein," *The EMBO journal*, vol. 15, no. 14, pp. 3555-3565, 1996.
- [22] R. N. Singh, M. D. Howell, E. W. Ottesen, and N. N. Singh, "Diverse role of survival motor neuron protein," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, vol. 1860, no. 3, pp. 299-315, 2017.
- [23] C. Rochette, N. Gilbert, and L. Simard, "SMN gene duplication and the emergence of the SMN2 gene occurred in distinct hominids: SMN2 is unique to Homo sapiens," *Human genetics*, vol. 108, pp. 255-266, 2001.
- [24] R. Morse, D. J. Shaw, A. G. Todd, and P. J. Young, "Targeting of SMN to Cajal bodies is mediated by self-association," *Human molecular genetics*, vol. 16, no. 19, pp. 2349-2358, 2007.
- [25] H. R. Fuller *et al.*, "The SMN interactome includes Myb-binding protein 1a," *Journal of proteome research*, vol. 9, no. 1, pp. 556-563, 2010.
- [26] D. Bühler, V. Raker, R. Lührmann, and U. Fischer, "Essential role for the tudor domain of SMN in spliceosomal U snRNP assembly: implications for spinal muscular atrophy," *Human molecular genetics*, vol. 8, no. 13, pp. 2351-2357, 1999.
- [27] C. Carissimi *et al.*, "Unrip is a component of SMN complexes active in snRNP assembly," *FEBS letters*, vol. 579, no. 11, pp. 2348-2354, 2005.
- [28] S. Massenet, L. Pellizzoni, S. Paushkin, I. W. Mattaj, and G. Dreyfuss, "The SMN complex is associated with snRNPs throughout their cytoplasmic assembly pathway," *Molecular and cellular biology*, vol. 22, no. 18, pp. 6533-6541, 2002.
- [29] L. Wan *et al.*, "The survival of motor neurons protein determines the capacity for snRNP assembly: biochemical deficiency in spinal muscular atrophy," *Molecular and cellular biology*, vol. 25, no. 13, pp. 5543-5551, 2005.
- [30] F. Bachand, F.-M. Boisvert, J. Co[^]té, S. Richard, and C. Autexier, "The product of the survival of motor neuron (SMN) gene is a human telomerase-associated protein," *Molecular biology of the cell*, vol. 13, no. 9, pp. 3192-3202, 2002.
- [31] V. Setola, M. Terao, D. Locatelli, S. Bassanini, E. Garattini, and G. Battaglia, "Axonal-SMN (a-SMN), a protein isoform of the survival motor neuron gene, is specifically involved in axonogenesis," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 104, no. 6, pp. 1959-1964, 2007.
- [32] M. Bowerman *et al.*, "Therapeutic strategies for spinal muscular atrophy: SMN and beyond," *Disease models & mechanisms*, vol. 10, no. 8, pp. 943-954, 2017.
- [33] S. J. Kolb and J. T. Kissel, "Spinal muscular atrophy," *Neurologic clinics*, vol. 33, no. 4, pp. 831-846, 2015.
- [34] E. Mercuri, C. J. Sumner, F. Muntoni, B. T. Darras, and R. S. Finkel, "Spinal muscular atrophy," *Nature Reviews Disease Primers*, vol. 8, no. 1, p. 52, 2022.
- [35] L. Cartegni and A. R. Krainer, "Disruption of an SF2/ASF-dependent exonic splicing enhancer in SMN2 causes spinal muscular atrophy in the absence of SMN1," *Nature genetics*, vol. 30, no. 4, pp. 377-384, 2002.
- [36] M. D. Howell, E. W. Ottesen, N. N. Singh, R. L. Anderson, and R. N. Singh, "Gender-specific amelioration of SMA phenotype upon disruption of a deep intronic structure by an oligonucleotide," *Molecular Therapy*, vol. 25, no. 6, pp. 1328-1341, 2017.

- [37] V. L. McGovern *et al.*, "SMN expression is required in motor neurons to rescue electrophysiological deficits in the SMN Δ 7 mouse model of SMA," *Human Molecular Genetics*, vol. 24, no. 19, pp. 5524-5541, 2015.
- [38] E. A. Sugarman *et al.*, "Pan-ethnic carrier screening and prenatal diagnosis for spinal muscular atrophy: clinical laboratory analysis of > 72 400 specimens," *European journal of human genetics*, vol. 20, no. 1, pp. 27-32, 2012.
- [39] M. Gennarelli *et al.*, "Survival motor-neuron gene transcript analysis in muscles from spinal muscular-atrophy patients," *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 213, no. 1, pp. 342-348, 1995.
- [40] T. W. Prior, K. J. Swoboda, H. D. Scott, and A. Q. Hejmanowski, "Homozygous SMN1 deletions in unaffected family members and modification of the phenotype by SMN2," *American journal of medical genetics Part A*, vol. 130, no. 3, pp. 307-310, 2004.
- [41] G. Matos-Rodrigues *et al.*, "In vivo inactivation of RAD51-mediated homologous recombination leads to premature aging, but not to tumorigenesis," *bioRxiv*, p. 2022.01.17.476609, 2022.
- [42] W. Li, "How do SMA-linked mutations of SMN1 lead to structural/functional deficiency of the SMA protein?," *PLoS One*, vol. 12, no. 6, p. e0178519, 2017.
- [43] W. Feng *et al.*, "Gemins modulate the expression and activity of the SMN complex," *Human molecular genetics*, vol. 14, no. 12, pp. 1605-1611, 2005.
- [44] M. Takaku *et al.*, "Purification of the human SMN–GEMIN2 complex and assessment of its stimulation of RAD51-mediated DNA recombination reactions," *Biochemistry*, vol. 50, no. 32, pp. 6797-6805, 2011.
- [45] A. Sinha *et al.*, "RAD51-mediated DNA homologous recombination is independent of PTEN mutational status," *Cancers*, vol. 12, no. 11, p. 3178, 2020.
- [46] F. Schipani *et al.*, "The mechanistic understanding of RAD51 defibrillation: A critical step in BRCA2-mediated DNA repair by homologous recombination," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 23, no. 15, p. 8338, 2022.
- [47] O. Da Ines, J. Bazile, M. E. Gallego, and C. I. White, "DMC1 attenuates RAD51-mediated recombination in Arabidopsis," *PLoS Genetics*, vol. 18, no. 8, p. e1010322, 2022.
- [48] E. Karyka *et al.*, "SMN-deficient cells exhibit increased ribosomal DNA damage," *Life Science Alliance*, vol. 5, no. 8, 2022.
- [49] K. Parwani, J. Spangle, L. McSwain, R. H. S. Javadi, A. Kenney, and D. Yu, "DNAR-06. LOSS OF HISTONE H3 THREONINE 45 PHOSPHORYLATION DECREASES H3K36ME3 TO ABROGATE THE RADIATION-INDUCED DNA DAMAGE IN GLIOBLASTOMA MULTIFORME," *Neuro-Oncology*, vol. 24, no. Suppl 7, p. vii91, 2022.
- [50] S. Tisdale *et al.*, "SMN is essential for the biogenesis of U7 small nuclear ribonucleoprotein and 3'-end formation of histone mRNAs," *Cell reports*, vol. 5, no. 5, pp. 1187-1195, 2013.
- [51] A. Merighi, N. Gionchiglia, A. Granato, and L. Lossi, "The phosphorylated form of the histone H2AX (γ H2AX) in the brain from embryonic life to old age," *Molecules*, vol. 26, no. 23, p. 7198, 2021.
- [52] T. Tanaka, A. Kurose, X. Huang, W. Dai, and Z. Darzynkiewicz, "ATM activation and histone H2AX phosphorylation as indicators of DNA damage by DNA topoisomerase I inhibitor topotecan and during apoptosis," *Cell proliferation*, vol. 39, no. 1, pp. 49-60, 2006.
- [53] S. Wang *et al.*, "Functions of actin-binding proteins in cilia structure remodeling and signaling," *Biology of the Cell*, vol. 115, no. 11, p. e202300026, 2023.

- [54] A. M. Hudson and L. Cooley, "Understanding the function of actin-binding proteins through genetic analysis of *Drosophila* oogenesis," *Annual review of genetics*, vol. 36, no. 1, pp. 455-488, 2002.
- [55] E. Benarroch, "What Is the Role of the Rho-ROCK Pathway in Neurologic Disorders?," *Neurology*, vol. 101, no. 12, pp. 536-543, 2023.
- [56] Z. Deng *et al.*, "RhoA/ROCK pathway: implication in osteoarthritis and therapeutic targets," *American Journal of Translational Research*, vol. 11, no. 9, p. 5324, 2019.
- [57] M. Bowerman, C. L. Anderson, A. Beauvais, P. P. Boyl, W. Witke, and R. Kothary, "SMN, profilin IIa and plastin 3: a link between the deregulation of actin dynamics and SMA pathogenesis," *Molecular and Cellular Neuroscience*, vol. 42, no. 1, pp. 66-74, 2009.
- [58] H. Ren and Y. Xiang, "The function of actin-binding proteins in pollen tube growth," *Protoplasma*, vol. 230, pp. 171-182, 2007.
- [59] T. D. Pollard and G. G. Borisy, "Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments," *Cell*, vol. 112, no. 4, pp. 453-465, 2003.
- [60] M. B. Walsh *et al.*, "Genetic modifiers ameliorate endocytic and neuromuscular defects in a model of spinal muscular atrophy," *BMC biology*, vol. 18, pp. 1-19, 2020.
- [61] V. L. McGovern *et al.*, "Plastin 3 expression does not modify spinal muscular atrophy severity in the $\Delta 7$ SMA mouse," *PloS one*, vol. 10, no. 7, p. e0132364, 2015.
- [62] H. Chaytow, Y.-T. Huang, T. H. Gillingwater, and K. M. Faller, "The role of survival motor neuron protein (SMN) in protein homeostasis," *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 75, pp. 3877-3894, 2018.
- [63] M. Dimitriadi *et al.*, "Decreased function of survival motor neuron protein impairs endocytic pathways," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 113, no. 30, pp. E4377-E4386, 2016.
- [64] N. Mizushima, "Autophagy: process and function," *Genes & development*, vol. 21, no. 22, pp. 2861-2873, 2007.
- [65] A. Sansa *et al.*, "Spinal Muscular Atrophy autophagy profile is tissue-dependent: differential regulation between muscle and motoneurons," *Acta Neuropathologica Communications*, vol. 9, pp. 1-15, 2021.
- [66] A. Garcera, N. Bahi, A. Periyakaruppiyah, S. Arumugam, and R. Soler, "Survival motor neuron protein reduction deregulates autophagy in spinal cord motoneurons in vitro," *Cell death & disease*, vol. 4, no. 6, pp. e686-e686, 2013.
- [67] A. Piras *et al.*, "Inhibition of autophagy delays motoneuron degeneration and extends lifespan in a mouse model of spinal muscular atrophy," *Cell death & disease*, vol. 8, no. 12, p. 3223, 2017.
- [68] M. J. Kye *et al.*, "SMN regulates axonal local translation via miR-183/mTOR pathway," *Human molecular genetics*, vol. 23, no. 23, pp. 6318-6331, 2014.
- [69] D. Yanling Zhao *et al.*, "SMN and symmetric arginine dimethylation of RNA polymerase II C-terminal domain control termination," *Nature*, vol. 529, no. 7584, pp. 48-53, 2016.
- [70] M. D. Hebert, P. W. Szymczyk, K. B. Shpargel, and A. G. Matera, "Coilin forms the bridge between Cajal bodies and SMN, the spinal muscular atrophy protein," *Genes & development*, vol. 15, no. 20, pp. 2720-2729, 2001.
- [71] S. Mahmoudi *et al.*, "WRAP53 is essential for Cajal body formation and for targeting the survival of motor neuron complex to Cajal bodies," *PLoS biology*, vol. 8, no. 11, p. e1000521, 2010.

- [72] Y. Liu *et al.*, "A small molecule antagonist of SMN disrupts the interaction between SMN and RNAP II," *Nature communications*, vol. 13, no. 1, p. 5453, 2022.
- [73] J. Strasswimmer *et al.*, "Identification of survival motor neuron as a transcriptional activator-binding protein," *Human molecular genetics*, vol. 8, no. 7, pp. 1219-1226, 1999.
- [74] J. Zou, F. Barahmand-pour, M. L. Blackburn, Y. Matsui, H. A. Chansky, and L. Yang, "Survival motor neuron (SMN) protein interacts with transcription corepressor mSin3A," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, no. 15, pp. 14922-14928, 2004.
- [75] P. J. Young, P. M. Day, J. Zhou, E. J. Androphy, G. E. Morris, and C. L. Lorson, "A direct interaction between the survival motor neuron protein and p53 and its relationship to spinal muscular atrophy," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, no. 4, pp. 2852-2859, 2002.
- [76] Z. Dominski and W. F. Marzluff, "Formation of the 3' end of histone mRNA," *Gene*, vol. 239, no. 1, pp. 1-14, 1999.
- [77] B. Müller and D. Schümperli, "The U7 snRNP and the hairpin binding protein: key players in histone mRNA metabolism," in *Seminars in cell & developmental biology*, 1997, vol. 8, no. 6: Elsevier, pp. 567-576.
- [78] Z. Dominski, L.-X. Zheng, R. Sanchez, and W. F. Marzluff, "Stem-loop binding protein facilitates 3'-end formation by stabilizing U7 snRNP binding to histone pre-mRNA," *Molecular and cellular biology*, vol. 19, no. 5, pp. 3561-3570, 1999.
- [79] A. Gadgil and K. D. Raczyńska, "U7 snRNA: a tool for gene therapy," *The journal of gene medicine*, vol. 23, no. 4, p. e3321, 2021.
- [80] A. C. Godfrey *et al.*, "U7 snRNA mutations in *Drosophila* block histone pre-mRNA processing and disrupt oogenesis," *Rna*, vol. 12, no. 3, pp. 396-409, 2006.
- [81] T. Ideue, S. Adachi, T. Naganuma, A. Tanigawa, T. Natsume, and T. Hirose, "U7 small nuclear ribonucleoprotein represses histone gene transcription in cell cycle-arrested cells," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 109, no. 15, pp. 5693-5698, 2012.
- [82] S. Tisdale, M. Van Alstyne, C. M. Simon, G. Z. Mentis, and L. Pellizzoni, "SMN controls neuromuscular junction integrity through U7 snRNP," *Cell reports*, vol. 40, no. 12, 2022.
- [83] L. Pellizzoni, B. Charroux, and G. Dreyfuss, "SMN mutants of spinal muscular atrophy patients are defective in binding to snRNP proteins," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 96, no. 20, pp. 11167-11172, 1999.
- [84] A. J. Blatnik III, V. L. McGovern, and A. H. Burghes, "What genetics has told us and how it can inform future experiments for spinal muscular atrophy, a perspective," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 22, no. 16, p. 8494, 2021.
- [85] N. Piazzon *et al.*, "Implication of the SMN complex in the biogenesis and steady state level of the signal recognition particle," *Nucleic acids research*, vol. 41, no. 2, pp. 1255-1272, 2013.
- [86] Q. Liu, U. Fischer, F. Wang, and G. Dreyfuss, "The spinal muscular atrophy disease gene product, SMN, and its associated protein SIP1 are in a complex with spliceosomal snRNP proteins," *Cell*, vol. 90, no. 6, pp. 1013-1021, 1997.
- [87] F. Gabanella, M. E. Butchbach, L. Saieva, C. Carissimi, A. H. Burghes, and L. Pellizzoni, "Ribonucleoprotein assembly defects correlate with spinal muscular atrophy severity and preferentially affect a subset of spliceosomal snRNPs," *PLoS one*, vol. 2, no. 9, p. e921, 2007.

- [88] L. Pellizzoni, J. Yong, and G. Dreyfuss, "Essential role for the SMN complex in the specificity of snRNP assembly," *Science*, vol. 298, no. 5599, pp. 1775-1779, 2002.
- [89] A. R. Poole, I. I. Enwerem, I. A. Vicino, J. B. Coole, S. V. Smith, and M. D. Hebert, "Identification of processing elements and interactors implicate SMN, coilin and the pseudogene-encoded coilp1 in telomerase and box C/D scaRNP biogenesis," *RNA biology*, vol. 13, no. 10, pp. 955-972, 2016.
- [90] M. A. Viviescas, M. I. Cano, and M. Segatto, "Chaperones and their role in telomerase ribonucleoprotein biogenesis and telomere maintenance," *Current Proteomics*, vol. 16, no. 1, pp. 31-43, 2019.
- [91] A. M. Pickering and K. J. Davies, "Degradation of damaged proteins: the main function of the 20S proteasome," *Progress in molecular biology and translational science*, vol. 109, pp. 227-248, 2012.
- [92] H. Hayek, G. Eriani, and C. Allmang, "eIF3 Interacts with Selenoprotein mRNAs," *Biomolecules*, vol. 12, no. 9, p. 1268, 2022.
- [93] A.-S. Gribling-Burrer *et al.*, "SECIS-binding protein 2 interacts with the SMN complex and the methylosome for selenoprotein mRNP assembly and translation," *Nucleic Acids Research*, vol. 45, no. 9, pp. 5399-5413, 2017.
- [94] M. T. Howard and P. R. Copeland, "New directions for understanding the codon redefinition required for selenocysteine incorporation," *Biological trace element research*, vol. 192, pp. 18-25, 2019.
- [95] E. Varlamova, M. Goltyaev, and E. Fesenko, "Protein partners of selenoprotein SELM and the role of selenium compounds in regulation of its expression in human cancer cells," in *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 2019, vol. 488: Springer, pp. 300-303.
- [96] K. Pachler *et al.*, "Functional interaction in establishment of ribosomal integrity between small subunit protein rpS6 and translational regulator rpL10/Grc5p," *FEMS yeast research*, vol. 5, no. 3, pp. 271-280, 2004.
- [97] K. W. Jones *et al.*, "Direct interaction of the spinal muscular atrophy disease protein SMN with the small nucleolar RNA-associated protein fibrillarin," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, no. 42, pp. 38645-38651, 2001.
- [98] L. Pellizzoni, J. Baccon, B. Charroux, and G. Dreyfuss, "The survival of motor neurons (SMN) protein interacts with the snoRNP proteins fibrillarin and GAR1," *Current Biology*, vol. 11, no. 14, pp. 1079-1088, 2001.
- [99] W. Rossoll, A.-K. Kröning, U.-M. Ohndorf, C. Steegborn, S. Jablonka, and M. Sendtner, "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?," *Human molecular genetics*, vol. 11, no. 1, pp. 93-105, 2002.
- [100] I. Faravelli, G. M. Riboldi, P. Rinchetti, and F. Lotti, "The SMN Complex at the Crossroad between RNA Metabolism and Neurodegeneration," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 24, no. 3, p. 2247, 2023.
- [101] B. Lacar *et al.*, "Nuclear RNA-seq of single neurons reveals molecular signatures of activation," *Nature communications*, vol. 7, no. 1, p. 11022, 2016.
- [102] G. M. Riboldi, I. Faravelli, P. Rinchetti, and F. Lotti, "SMN post-translational modifications in spinal muscular atrophy," *Frontiers in Cellular Neuroscience*, vol. 17, p. 1092488, 2023.
- [103] C. McCormick and D. A. Khapersky, "Translation inhibition and stress granules in the antiviral immune response," *Nature Reviews Immunology*, vol. 17, no. 10, pp. 647-660, 2017.

- [104] A. Tweedie and T. Nissan, "Hiding in plain sight: formation and function of stress granules during microbial infection of mammalian cells," *Frontiers in Molecular Biosciences*, vol. 8, p. 647884, 2021.
- [105] P. Anderson, N. Kedersha, and P. Ivanov, "Stress granules, P-bodies and cancer," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, vol. 1849, no. 7, pp. 861-870, 2015.
- [106] T. Zou, X. Yang, D. Pan, J. Huang, M. Sahin, and J. Zhou, "SMN deficiency reduces cellular ability to form stress granules, sensitizing cells to stress," *Cellular and molecular neurobiology*, vol. 31, pp. 541-550, 2011.
- [107] J. Sadasivan, A. Hyrina, R. DaSilva, and E. Jan, "An Insect Viral Protein Disrupts Stress Granule Formation in Mammalian Cells," *Journal of Molecular Biology*, p. 168042, 2023.
- [108] M. Briese *et al.*, "Deletion of *smn-1*, the *Caenorhabditis elegans* ortholog of the spinal muscular atrophy gene, results in locomotor dysfunction and reduced lifespan," *Human molecular genetics*, vol. 18, no. 1, pp. 97-104, 2009.
- [109] H. L. Zhang, F. Pan, D. Hong, S. M. Shenoy, R. H. Singer, and G. J. Bassell, "Active transport of the survival motor neuron protein and the role of exon-7 in cytoplasmic localization," *Journal of Neuroscience*, vol. 23, no. 16, pp. 6627-6637, 2003.
- [110] G. Sanchez *et al.*, "A novel role for CARM1 in promoting nonsense-mediated mRNA decay: potential implications for spinal muscular atrophy," *Nucleic acids research*, vol. 44, no. 6, pp. 2661-2676, 2016.
- [111] D. Cheng, J. Côté, S. Shaaban, and M. T. Bedford, "The arginine methyltransferase CARM1 regulates the coupling of transcription and mRNA processing," *Molecular cell*, vol. 25, no. 1, pp. 71-83, 2007.
- [112] W. Zhang *et al.*, "Autophagosome membrane expansion is mediated by the N-terminus and cis-membrane association of human ATG8s," *Elife*, vol. 12, p. e89185, 2023.
- [113] C. H. Wang *et al.*, "Consensus statement for standard of care in spinal muscular atrophy," *Journal of child neurology*, vol. 22, no. 8, pp. 1027-1049, 2007.
- [114] C. L. Bladen *et al.*, "Mapping the differences in care for 5,000 spinal muscular atrophy patients, a survey of 24 national registries in North America, Australasia and Europe," *Journal of neurology*, vol. 261, pp. 152-163, 2014.
- [115] E. W. Ottesen and R. N. Singh, "Synergistic Effect of an Antisense Oligonucleotide and Small Molecule on Splicing Correction of the Spinal Muscular Atrophy Gene," *Neuroscience Insights*, vol. 19, p. 26331055241233596, 2024.
- [116] Y. Li, H. Zeng, Y. Wei, X. Ma, and Z. He, "An Overview of the Therapeutic Strategies for the Treatment of Spinal Muscular Atrophy," *Human Gene Therapy*, vol. 34, no. 5-6, pp. 180-191, 2023.
- [117] Y. Hua, T. A. Vickers, B. F. Baker, C. F. Bennett, and A. R. Krainer, "Enhancement of SMN2 exon 7 inclusion by antisense oligonucleotides targeting the exon," *PLoS biology*, vol. 5, no. 4, p. e73, 2007.
- [118] P. Jafar-Nejad *et al.*, "The atlas of RNase H antisense oligonucleotide distribution and activity in the CNS of rodents and non-human primates following central administration," *Nucleic Acids Research*, vol. 49, no. 2, pp. 657-673, 2021.
- [119] T. Ohmura, S. Saeki, K. Ogiwara, K. Tobita, Y. Ling, and S. Torii, "Pharmacological and clinical profile of spinal muscular atrophy (SMA) therapeutic drug nusinersen (Spinraza®)," *Nihon Yakurigaku zasshi. Folia Pharmacologica Japonica*, vol. 152, no. 3, pp. 147-159, 2018.
- [120] S. M. Hoy, "Nusinersen: a review in 5q spinal muscular atrophy," *CNS drugs*, vol. 32, pp. 689-696, 2018.

- [121] E. Mercuri *et al.*, "Risdiplam in types 2 and 3 spinal muscular atrophy: A randomised, placebo-controlled, dose-finding trial followed by 24 months of treatment," *European journal of neurology*, vol. 30, no. 7, pp. 1945-1956, 2023.
- [122] M. Oskoui *et al.*, "Guidance on Gene Replacement Therapy in Spinal Muscular Atrophy: A Canadian Perspective," *Canadian Journal of Neurological Sciences*, vol. 49, no. 3, pp. 398-401, 2022.
- [123] T. Markati, G. Fisher, S. Ramdas, and L. Servais, "Risdiplam: an investigational survival motor neuron 2 (SMN2) splicing modifier for spinal muscular atrophy (SMA)," *Expert Opinion on Investigational Drugs*, vol. 31, no. 5, pp. 451-461, 2022.
- [124] H. A. Blair, "Onasemnogene Apeparvovec: A review in spinal muscular atrophy," *Cns Drugs*, vol. 36, no. 9, pp. 995-1005, 2022.
- [125] L. Sanchez-Garcia, L. Martín, R. Mangues, N. Ferrer-Miralles, E. Vázquez, and A. Villaverde, "Recombinant pharmaceuticals from microbial cells: a 2015 update," *Microbial cell factories*, vol. 15, pp. 1-7, 2016.
- [126] S. Bunting *et al.*, "Gene therapy with BMN 270 results in therapeutic levels of FVIII in mice and primates and normalization of bleeding in hemophilic mice," *Molecular Therapy*, vol. 26, no. 2, pp. 496-509, 2018.
- [127] L. C. Papadopoulou *et al.*, "Production and Transduction of a Human Recombinant β -Globin Chain into Proerythroid K-562 Cells To Replace Missing Endogenous β -Globin," *Molecular Pharmaceutics*, vol. 15, no. 12, pp. 5665-5677, 2018.
- [128] M. Y. Bilal, A. Vacaflares, and J. C. Houtman, "Optimization of methods for the genetic modification of human T cells," *Immunology and cell biology*, vol. 93, no. 10, pp. 896-908, 2015.
- [129] U. Nagaich, "Recombinant DNA technology: A revolutionizing outlook," vol. 6, ed: Medknow, 2015, p. 147.
- [130] L. Xiang, L. Ma, Y. He, N. Wei, and P. Gong, "Osteogenic differentiation of human periodontal ligament cells after transfection with recombinant lentiviral vector containing follicular dendritic cell secreted protein," *Journal of Periodontal Research*, vol. 49, no. 5, pp. 554-562, 2014.
- [131] Y. Durocher, S. Perret, and A. Kamen, "High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells," *Nucleic acids research*, vol. 30, no. 2, pp. e9-e9, 2002.
- [132] G. P. Subedi, R. W. Johnson, H. A. Moniz, K. W. Moremen, and A. W. Barb, "High yield expression of recombinant human proteins with the transient transfection of HEK293 cells in suspension," *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, no. 106, p. e53568, 2015.
- [133] M. Remelia, B. Bela, S. T. Widyaningtyas, R. D. Antarianto, N. F. Mazfufah, and J. A. Pawitan, "The use of cell-penetrating peptide for delivery of recombinant transcription factor DNA into primary human fibroblast," *Molecular and Cellular Biomedical Sciences*, vol. 7, no. 1, pp. 28-37, 2023.
- [134] L. Shams, M. K. Shahraky, and M. S. Mirtaleb, "Transdermal Co-Delivery of Urea and Recombinant Human Growth Hormone," *Iranian Journal of Biotechnology*, vol. 19, no. 4, p. e2891, 2021.
- [135] Y. Tian and S. Zhou, "Advances in cell penetrating peptides and their functionalization of polymeric nanoplatfoms for drug delivery," *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, vol. 13, no. 2, p. e1668, 2021.
- [136] M. Green and P. M. Loewenstein, "Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein," *Cell*, vol. 55, no. 6, pp. 1179-1188, 1988.

- [137] E. Vives, P. Brodin, and B. Lebleu, "A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 272, no. 25, pp. 16010-16017, 1997.
- [138] A. D. Frankel and C. O. Pabo, "Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus," *Cell*, vol. 55, no. 6, pp. 1189-1193, 1988.
- [139] C. Spector, A. R. Mele, B. Wigdahl, and M. R. Nonnemacher, "Genetic variation and function of the HIV-1 Tat protein," *Medical Microbiology and Immunology*, vol. 208, pp. 131-169, 2019.
- [140] K.-T. Jeang, "HIV-1 Tat: structure and function," *Human Retroviruses and AIDS 1996: A Compilation and Analysis of Nucleic Acid and Amino Acid Sequences*, pp. 11-26, 1996.
- [141] A. Mujeeb, K. Bishop, B. M. Peterlin, C. Turck, T. G. Parslow, and T. L. James, "NMR structure of a biologically active peptide containing the RNA-binding domain of human immunodeficiency virus type 1 Tat," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 91, no. 17, pp. 8248-8252, 1994.
- [142] A. Gatignol, M. Duarte, L. Daviet, Y.-N. Chang, and K.-T. Jeang, "Sequential steps in Tat trans-activation of HIV-1 mediated through cellular DNA, RNA, and protein binding factors," *Gene expression*, vol. 5, no. 4-5, p. 217, 1996.
- [143] M. Lichtenstein *et al.*, "TAT for enzyme/protein delivery to restore or destroy cell activity in human diseases," *Life*, vol. 11, no. 9, p. 924, 2021.
- [144] J. P. Richard, K. Melikov, H. Brooks, P. Prevot, B. Lebleu, and L. V. Chernomordik, "Cellular uptake of unconjugated TAT peptide involves clathrin-dependent endocytosis and heparan sulfate receptors," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, no. 15, pp. 15300-15306, 2005.
- [145] I. A. Khalil, K. Kogure, S. Futaki, and H. Harashima, "High density of octaarginine stimulates macropinocytosis leading to efficient intracellular trafficking for gene expression," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 281, no. 6, pp. 3544-3551, 2006.
- [146] P. Zhang, L. L. Lock, A. G. Cheetham, and H. Cui, "Enhanced cellular entry and efficacy of tat conjugates by rational design of the auxiliary segment," *Molecular pharmaceutics*, vol. 11, no. 3, pp. 964-973, 2014.
- [147] A. Krishna *et al.*, "Systems genomics evaluation of the SH-SY5Y neuroblastoma cell line as a model for Parkinson's disease," *BMC genomics*, vol. 15, pp. 1-21, 2014.
- [148] M. Yusuf, K. Leung, K. J. Morris, and E. V. Volpi, "Comprehensive cytogenomic profile of the in vitro neuronal model SH-SY5Y," *Neurogenetics*, vol. 14, pp. 63-70, 2013.
- [149] M. M. Khazeem *et al.*, "TOP2B is required to maintain the adrenergic neural phenotype and for ATRA-Induced differentiation of SH-SY5Y neuroblastoma cells," *Molecular neurobiology*, vol. 59, no. 10, pp. 5987-6008, 2022.
- [150] H. Xicoy, B. Wieringa, and G. J. Martens, "The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review," *Molecular neurodegeneration*, vol. 12, pp. 1-11, 2017.
- [151] J. Kovalevich and D. Langford, "Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology," *Neuronal cell culture: methods and protocols*, pp. 9-21, 2013.
- [152] A. O. Pires, A. Neves-Carvalho, N. Sousa, and A. J. Salgado, "The secretome of bone marrow and Wharton jelly derived mesenchymal stem cells induces differentiation and neurite outgrowth in SH-SY5Y cells," *Stem cells international*, vol. 2014, 2014.

- [153] A. Guvenek *et al.*, "Neuronal cells display distinct stability controls of alternative polyadenylation mRNA isoforms, long non-coding RNAs, and mitochondrial RNAs," *Frontiers in genetics*, vol. 13, p. 840369, 2022.
- [154] L. Schneider *et al.*, "Differentiation of SH-SY5Y cells to a neuronal phenotype changes cellular bioenergetics and the response to oxidative stress," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 51, no. 11, pp. 2007-2017, 2011.
- [155] J. Forster *et al.*, "Characterization of differentiated SH-SY5Y as neuronal screening model reveals increased oxidative vulnerability," *Journal of biomolecular screening*, vol. 21, no. 5, pp. 496-509, 2016.
- [156] A. A. Dayem *et al.*, "Biologically synthesized silver nanoparticles induce neuronal differentiation of SH-SY5Y cells via modulation of reactive oxygen species, phosphatases, and kinase signaling pathways," *Biotechnology journal*, vol. 9, no. 7, pp. 934-943, 2014.
- [157] H. Jiang *et al.*, "Proteomic study of a Parkinson's disease model of undifferentiated SH-SY5Y cells induced by a proteasome inhibitor," *International Journal of Medical Sciences*, vol. 16, no. 1, p. 84, 2019.
- [158] P. Riegerova *et al.*, "Expression and localization of A β PP in SH-SY5Y cells depends on differentiation state," *Journal of Alzheimer's Disease*, vol. 82, no. 2, pp. 485-491, 2021.
- [159] A. P. Kalinovskii *et al.*, "Retinoic Acid-Differentiated Neuroblastoma SH-SY5Y Is an Accessible In Vitro Model to Study Native Human Acid-Sensing Ion Channels 1a (ASIC1a)," *Biology*, vol. 11, no. 2, p. 167, 2022.
- [160] B. S. Serdar, T. Erkmen, B. U. Ergür, P. Akan, and S. Koçtürk, "Which Medium and Ingredients Provide Better Morphological Differentiation of SH-SY5Y Cells?," in *Proceedings*, 2018, vol. 2, no. 25: MDPI, p. 1557.
- [161] S. Dwane, E. Durack, and P. A. Kiely, "Optimising parameters for the differentiation of SH-SY5Y cells to study cell adhesion and cell migration," *BMC research notes*, vol. 6, pp. 1-11, 2013.
- [162] G. López-Carballo, L. Moreno, S. Masiá, P. Pérez, and D. Baretino, "Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway by retinoic acid is required for neural differentiation of SH-SY5Y human neuroblastoma cells," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, no. 28, pp. 25297-25304, 2002.
- [163] R. Lotan, "Retinoids in cancer chemoprevention," *The FASEB Journal*, vol. 10, no. 9, pp. 1031-1039, 1996.
- [164] G. Melino, C. J. Thiele, R. A. Knight, and M. Piacentini, "Retinoids and the control of growth/death decisions in human neuroblastoma cell lines," *Journal of neuro-oncology*, vol. 31, pp. 65-83, 1997.
- [165] Y. Nishida, N. Adati, R. Ozawa, A. Maeda, Y. Sakaki, and T. Takeda, "Identification and classification of genes regulated by phosphatidylinositol 3-kinase-and TRKB-mediated signalling pathways during neuronal differentiation in two subtypes of the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y," *BMC research notes*, vol. 1, pp. 1-11, 2008.
- [166] F. M. Lopes *et al.*, "Comparison between proliferative and neuron-like SH-SY5Y cells as an in vitro model for Parkinson disease studies," *Brain research*, vol. 1337, pp. 85-94, 2010.
- [167] M. Lv *et al.*, "Effect of graphene oxide on undifferentiated and retinoic acid-differentiated SH-SY5Y cells line," *Nanoscale*, vol. 4, no. 13, pp. 3861-3866, 2012.
- [168] C. F.-Y. Ho *et al.*, "Expression of DHA-metabolizing enzyme Alox15 is regulated by selective histone acetylation in neuroblastoma cells," *Neurochemical Research*, vol. 43, pp. 540-555, 2018.

- [169] S. Yamaguchi *et al.*, "Silver Nanoparticles Suppress Retinoic Acid-Induced Neuronal Differentiation in Human-Derived Neuroblastoma SH-SY5Y Cells," *ACS Applied Nano Materials*, vol. 5, no. 12, pp. 19025-19034, 2022.
- [170] S. Zhao, A. Stamm, J. S. Lee, A. Gruverman, J. Y. Lim, and L. Gu, "Elasticity of differentiated and undifferentiated human neuroblastoma cells characterized by atomic force microscopy," *Journal of Mechanics in Medicine and Biology*, vol. 15, no. 05, p. 1550069, 2015.
- [171] M. J. Hovde, G. H. Larson, R. A. Vaughan, and J. D. Foster, "Model systems for analysis of dopamine transporter function and regulation," *Neurochemistry international*, vol. 123, pp. 13-21, 2019.
- [172] E. A. M. Alabed, M. Engel, Y. Yamauchi, M. S. A. Hossain, and L. Ooi, "DC and AC magnetic fields increase neurite outgrowth of SH-SY5Y neuroblastoma cells with and without retinoic acid," *RSC advances*, vol. 9, no. 31, pp. 17717-17725, 2019.
- [173] M. L. Matrella *et al.*, "High OXPHOS efficiency in RA-FUdr-differentiated SH-SY5Y cells: involvement of cAMP signalling and respiratory supercomplexes," *Scientific Reports*, vol. 14, no. 1, p. 7411, 2024.
- [174] S. Sánchez, C. Jiménez, A. C. Carrera, J. Diaz-Nido, J. Avila, and F. Wandosell, "A cAMP-activated pathway, including PKA and PI3K, regulates neuronal differentiation," *Neurochemistry international*, vol. 44, no. 4, pp. 231-242, 2004.
- [175] M. Bell and H. Zempel, "SH-SY5Y-derived neurons: A human neuronal model system for investigating TAU sorting and neuronal subtype-specific TAU vulnerability," *Reviews in the Neurosciences*, vol. 33, no. 1, pp. 1-15, 2022.
- [176] S. Pålman, L. Odelstad, E. Larsson, G. Grotte, and K. Nilsson, "Phenotypic changes of human neuroblastoma cells in culture induced by 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate," *International journal of cancer*, vol. 28, no. 5, pp. 583-589, 1981.
- [177] L. A. Dokas, A. M. Malone, F. E. Williams, S. M. Nauli, and W. S. Messer Jr, "Multiple protein kinases determine the phosphorylated state of the small heat shock protein, HSP27, in SH-SY5Y neuroblastoma cells," *Neuropharmacology*, vol. 61, no. 1-2, pp. 12-24, 2011.
- [178] U. Trollér, R. Zeidman, K. Svensson, and C. Larsson, "A PKC β isoform mediates phorbol ester-induced activation of Erk1/2 and expression of neuronal differentiation genes in neuroblastoma cells," *FEBS letters*, vol. 508, no. 1, pp. 126-130, 2001.
- [179] K. K. Ling, M.-Y. Lin, B. Zingg, Z. Feng, and C.-P. Ko, "Synaptic defects in the spinal and neuromuscular circuitry in a mouse model of spinal muscular atrophy," *PloS one*, vol. 5, no. 11, p. e15457, 2010.
- [180] M. E. Butchbach, "Genomic variability in the survival motor neuron genes (SMN1 and SMN2): Implications for spinal muscular atrophy phenotype and therapeutics development," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 22, no. 15, p. 7896, 2021.
- [181] J. Montes, A. M. Gordon, S. Pandya, D. C. De Vivo, and P. Kaufmann, "Clinical outcome measures in spinal muscular atrophy," *Journal of child neurology*, vol. 24, no. 8, pp. 968-978, 2009.
- [182] E. Mercuri *et al.*, "Diagnosis and management of spinal muscular atrophy: Part 1: Recommendations for diagnosis, rehabilitation, orthopedic and nutritional care," *Neuromuscular disorders*, vol. 28, no. 2, pp. 103-115, 2018.
- [183] T. Gidaro and L. Servais, "Nusinersen treatment of spinal muscular atrophy: current knowledge and existing gaps," *Developmental Medicine & Child Neurology*, vol. 61, no. 1, pp. 19-24, 2019.

- [184] L. C. Chong, G. Gandhi, J. M. Lee, W. W. Y. Yeo, and S.-B. Choi, "Drug discovery of spinal muscular atrophy (SMA) from the computational perspective: a comprehensive review," *International journal of molecular sciences*, vol. 22, no. 16, p. 8962, 2021.
- [185] J. Paik, "Risdiplam: a review in spinal muscular atrophy," *CNS drugs*, vol. 36, no. 4, pp. 401-410, 2022.
- [186] T.-H. Chen, "New and developing therapies in spinal muscular atrophy: from genotype to phenotype to treatment and where do we stand?," *International journal of molecular sciences*, vol. 21, no. 9, p. 3297, 2020.
- [187] M. Lin *et al.*, "Advances of antisense oligonucleotide technology in the treatment of hereditary neurodegenerative diseases," *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2021, pp. 1-9, 2021.
- [188] R. Masson, C. Brusa, M. Scoto, and G. Baranello, "Brain, cognition, and language development in spinal muscular atrophy type 1: a scoping review," *Developmental Medicine & Child Neurology*, vol. 63, no. 5, pp. 527-536, 2021.
- [189] L. L. Brunton, "Goodman & Gilman's. The Pharmacological Basic of Therapeutics," 2011.
- [190] M. Franchini and P. M. Mannucci, "Past, present and future of hemophilia: a narrative review," *Orphanet journal of rare diseases*, vol. 7, pp. 1-8, 2012.
- [191] D. S. Goodin, E. Frohman, G. Garmany, J. Halper, W. Likosky, and F. Lublin, "Disease modifying therapies in multiple sclerosis," *Neurology*, vol. 58, no. 2, pp. 169-78, 2002.
- [192] D. J. Slamon *et al.*, "Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2," *New England journal of medicine*, vol. 344, no. 11, pp. 783-792, 2001.
- [193] R. M. Neer *et al.*, "Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis," *New England journal of medicine*, vol. 344, no. 19, pp. 1434-1441, 2001.
- [194] C. Mindrescu, G. Thorbecke, M. Klein, J. Vilček, and H. G. Wisniewski, "Amelioration of collagen-induced arthritis in DBA/1J mice by recombinant TSG-6, a tumor necrosis factor/interleukin-1-inducible protein," *Arthritis & Rheumatism*, vol. 43, no. 12, pp. 2668-2677, 2000.
- [195] S. Liu *et al.*, "Treatment of murine lupus with TIGIT-Ig," *Clinical immunology*, vol. 203, pp. 72-80, 2019.
- [196] K. Yomogida *et al.*, "Cell penetrating recombinant Foxp3 protein enhances Treg function and ameliorates arthritis," *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 434, no. 2, pp. 263-267, 2013.
- [197] T. Erlich-Hadad, R. Hadad, A. Feldman, H. Greif, and H. Lorberboum-Galski, "TAT-MTS-MCM fusion proteins reduce MMA levels and improve mitochondrial activity and liver function in MCM-deficient cells," *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, vol. 22, no. 3, pp. 1601-1613, 2018.
- [198] A. Fittipaldi *et al.*, "Cell membrane lipid rafts mediate caveolar endocytosis of HIV-1 Tat fusion proteins," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, no. 36, pp. 34141-34149, 2003.
- [199] O. Rautsi, S. Lehmusvaara, A. Ketola, A. Määttä, J. Wahlfors, and R. Pellinen, "Characterization of HIV-1 TAT peptide as an enhancer of HSV-TK/GCV cancer gene therapy," *Cancer Gene Therapy*, vol. 15, no. 5, pp. 303-314, 2008.



EKLER

EKLER

EK A.1: SMN1 Geni Transkript Varyant d Nükleotit Dizisi

>NM_000344.4 Homo sapiens survival of motor neuron 1, telomeric (SMN1), transcript variant d, mRNA

```
GCACCCGCGGGTTTGCTATGGCGATGAGCAGCGGGCGGCGAGTGGTGGCGCGTCCC GGAGCAGGAGGATTC
CGTGCTGTTCCGGCGCGGCACAGGCCAGAGCGATGATTCTGACATTTGGGATGATACAGCACTGATAAAA
GCATATGATAAAGCTGTGGCTTCATTTAAGCATGCTCTAAAGAATGGTGACATTTGTGAACTTCGGGTA
AACCAAAAACACACCTAAAAGAAAACCTGCTAAGAAGAATAAAAGCCAAAAGAAGAATACTGCAGCTTC
CTTACAACAGTGGAAAGTTGGGGACAAAATGTTCTGCCATTTGGTCAGAAGACGGTTGCATTTACCCAGCT
ACCATTGCTTCAATTGATTTTAAAGAGAGAAACCTGTGTTGTGGTTTACTGGATATGGAAATAGAGAGG
AGCAAAATCTGTCCGATCTACTTTCCCAATCTGTGAAGTAGCTAATAATATAGAACAAAATGCTCAAGA
GAATGAAAATGAAAGCCAAGTTTCAACAGATGAAAGTGAGAAGTCCAGGTCTCCTGGAAATAAATCAGAT
AACATCAAGCCCAATCTGCTCCATGGAAGTCTTTTCTCCCTCCACCACCCCATGCCAGGGCCAAGAC
TGGGACCAGGAAAGCCAGGTCTAAAATTCAATGGCCACCACCACCACCACCACCACCACCACCACCCTT
ACTATCATGCTGGCTGCCTCCATTTCTTCTGGACCACCAATAATTCCCCACCACCTCCCATATGTCCA
GATTCTCTTGATGATGCTGATGCTTTGGGAAAGTATGTTAATTTTATGGTACATGAGTGGCTATCATACTG
GCTATTATATGGGTTTCAGACAAAATCAAAAAGAAGGAAGGTGCTCACATTCCTTAAATTAAGGAGAAAT
GCTGGCAGATAGCAGCACTAAATGACACCACTAAAGAAACGATCAGACAGATCTGGAATGTGAAGCGTTA
TAGAAGATAACTGGCCTCATTTCTTCAAAATATCAAGTGTGGGAAAGAAAAAGGAAGTGAATGGGTA
ACTCTTCTTGATTAAGTATGTAATAACCAATGCAATGTGAAATATTTACTGGACTCTATTTTGAA
AAACCATCTGTAAGAACTGGGGTGGGGTGGGAGGCCAGCACGGTGGTGGAGCAGTTGAGAAAATTTGA
ATGTGGATTAGATTTTGAATGATATTGGATAATTATTGGTAATTTTATGAGCTGTGAGAAGGGTGTGTA
GTTTATAAAGACTGTCTTAATTTGCATACTTAAAGCATTAGGAATGAAGTGTAGAGTGTCTTAAATG
TTTCAAATGGTTTAAACAAAATGTATGTGAGGCGTATGTGGCAAAATGTTACAGAATCTAACTGGTGGACA
TGGCTGTTTCTGACTGTTTTTTCTATCTTCTATATGTTTAAAGTATATAATAAAAATATTTAATTT
TTTTTAAATTA
```

EK A.2: SMN1 Geni Transkript Varyant a Nükleotit Dizisi

>NM_001297715.1 Homo sapiens survival of motor neuron 1, telomeric (SMN1), transcript variant a, mRNA

```
CCACAAATGTGGGAGGGCGATAACCACTCGTAGAAAGCGTGAGAAGTTACTACAAGCGGTCTCCCGGCC
ACCGTACTGTTCCGCTCCAGAAAGCCCGGGCGCGGAAAGTCTGACTCTTAAGAAGGGACGGGGCCCA
CGCTGCGCACCCGCGGGTTTGCTATGGCGATGAGCAGCGGGCGGCAAGTGGTGGCGCGTCCC GGAGCAGGA
GGATTCCGTGCTGTTCCGGCGCGGCACAGGCCAGAGCGATGATTCTGACATTTGGGATGATACAGCACTG
ATAAAGCATATGATAAAGCTGTGGCTTCATTTAAGCATGCTCTAAAGAATGGTGACATTTGTGAACTT
CGGGTAAACCAAAAACACACCTAAAAGAAAACCTGCTAAGAAGAATAAAAGCCAAAAGAAGAATACTGC
AGCTTCTTACAACAGTGGAAAGTTGGGGACAAAATGTTCTGCCATTTGGTCAGAAGACGGTTGCATTTAC
CCAGCTACCATTGCTTCAATTGATTTTAAAGAGAGAAACCTGTGTTGTGGTTTACTGGATATGGAAATA
GAGAGGAGCAAAATCTGTCCGATCTACTTTCCCAATCTGTGAAGTAGCTAATAATATAGAACAAAATGC
TCAAGAGAATGAAAATGAAAGCCAAGTTTCAACAGATGAAAGTGAGAAGTCCAGGTCTCCTGGAAATAAA
TCAGATAACATCAAGCCCAAATCTGCTCCATGGAAGTCTTTTCTCCCTCCACCACCCCATGCCAGGGC
CAAGACTGGGACCAGGAAAGCCAGGTCTAAAATTCAATGGCCACCACCACCACCACCACCACCACCACC
CCACTTACTATCATGCTGGCTGCCTCCATTTCTTCTGGACCACCAATAATTCCCCACCACCTCCCATAT
TGTCAGATTCTTGTGATGATGCTGATGCTTTGGGAAAGTATGTTAATTTTATGGTACATGAGTGGCTATC
ATACTGGCTATTATATGGAAATGCTGGCATAGAGCAGCACTAAATGACACCACTAAAGAAACGATCAGAC
AGATCTGGAATGTGAAGCGTTATAGAAGATAACTGGCCTCATTTCTTCAAAATATCAAGTGTGGGAAAG
AAAAAAGGAAGTGAATGGGTAAGTCTTCTTGTGATTAAGTATGTAATAACCAATGCAATGTGAAATA
TTTTACTGGACTCTATTTGAAAAACCTCTGTAAAAGACTGGGGTGGGGTGGGAGGCCAGCACGGTGG
TGAGGCAGTTGAGAAAATTTGAATGTGGATTAGATTTTGAATGATATTGGATAATTATTGGTAATTTTAT
GAGCTGTGAGAAGGGTGTGTAGTTTATAAAGACTGTCTTAATTTGCATACTTAAAGCATTAGGAATGA
AGTGTAGAGTGTCTTAAATGTTTCAAATGGTTTAAACAAAATGTATGTGAGGCGTATGTGGCAAAATGT
TACAGAATCTAACTGGTGGACATGGCTGTTTCTGACTGTTTTTTCTATCTTCTATATGTTTAAAGT
ATATAATAAAAATATTTAATTTTTTTTTTAA
```

EK A.3: SMN1 Geni Transkript Varyant b Nükleotit Dizisi

>NM_022874.2 Homo sapiens survival of motor neuron 1, telomeric (SMN1), transcript variant b, mRNA

```
CCACAAATGTGGGAGGGCGATAACCACTCGTAGAAAGCGTGAGAAGTTACTACAAGCGGTCTCCCGGCC
ACCGTACTGTTCCGCTCCCAGAAGCCCGGGCGGCGGAAGTCGTCACCTTAAGAAGGGACGGGGCCCCA
CGCTGCGCACCCGCGGTTTTGCTATGGCGATGAGCAGCGGGCGCAAGTGGTGGCGGCGTCCCGGAGCAGGA
GGATTCCGTGCTGTTCCGGCGCGGCACAGGCCAGAGCGATGATTCTGACATTTGGGATGATACAGCACTG
ATAAAGCATATGATAAAGCTGTGGCTTCATTTAAGCATGCTCTAAAGAATGGTGACATTTGTGAACTT
CGGGTAAACCAAAAACCACTTAAAGAAAACCTGCTAAGAAGAATAAAAGCCAAAAGAATACTGC
AGTTCCTTACAACAGTGGAAAGTTGGGGACAAATGTTCTGCCATTTGGTCAGAAGACGGTTGCATTTAC
CCAGTACCATTGCTTCAATTGATTTAAGAGAGAAACCTGTGTTGTGGTTTACTGGATATGGAAATA
GAGAGGAGCAAAATCTGTCCGATCTACTTTCCCAATCTGTGAAGTAGCTAATAATATAGAACAAAATGC
TCAAGAGAATGAAAATGAAAGCCAAGTTTCAACAGATGAAAGTGAGAACTCCAGGTCTCCTGGAAATAAA
TCAGATAACATCAAGCCCAAATCTGCTCCATGGAACCTTTTTCTCCCTCCACCACCCCATGCCAGGGC
CAAGACTGGGACCAGGAAAGATAATCCCCCACCACCTCCCATATGTCCAGATTCTCTTGATGATGCTGA
TGCTTTGGGAAGTATGTTAATTTTCATGGTACATGAGTGGCTATCATACTGGCTATTATATGGGTTTCAGA
CAAAATCAAAAAGAAGGAAGGTGCTCACATTCCTTAAATTAAGGAGAAATGCTGGCATAGAGCAGCACTA
AATGACACCACTAAAGAAACGATCAGACAGATCTGGAATGTGAAGCGTTATAGAAGATAACTGGCCTCAT
TTCTTCAAAATATCAAGTGTGGGAAAGAAAAGGAAAGTGGAAATGGGTAACCTTTCTTGATTAAGTGT
ATGTAATAACCAAAATGCAATGTGAAATATTTTACTGGACTCTATTTTAAAAACCATCTGTAAGAACTG
GGGTGGGGTGGGAGGCCAGCACGGTGGTGAGGCAGTTGAGAAAATTTGAATGTGGATTAGATTTTGAAT
GATATTGGATAAATTATTTGGTAAATTTATGAGCTGTGAGAAAGGGTGTGTAGTTTATAAAAGACTGTCTTA
ATTTGCATACTTAAGCATTTAGGAATGAAGTGTAGAGTGTCTTAAAATGTTTCAAATGGTTTAAACAAA
TGTATGTGAGGCGTATGTGGCAAAATGTTACAGAATCTAACTGGTGGACATGGCTGTTTCATTGTACTGTT
TTTTCTATCTTCTATATGTTTAAAAGTATATAATAAAAATATTTAATTTTTTTTTAAAAAAAAAAAAAA
AAAAA
```

EK A.4: SMN1 Varyant d mRNA'sının Restriksiyon Haritası

Kesmeyen Enzimler: AarI, AatII, AbsI, AccI, AclI, AflIII, AgeI, AjuI, AlfI, Aloi, AlwNI, ApaI, ApaLI, ArsI, AscI, AsuII, AvaI, AvrII, Ball, BamHI, BarI, BbvCI, BcgI, BciVI, BclI, BdaI, BglI, BpII, Bpu10I, BsaAI, BsaBI, BsaXI, BseMII, BsePI, BseSI, BsgI, BsmI, Bsp1407I, BspHI, BsrBI, BstEII, BtrI, CfrI, Cfr10I, ClaI, CspCI, DraII, DraIII, DrdI, Eam1105I, EciI, Eco47III, Eco57I, EcoNI, EcoP15I, EcoRI, EcoRV, Esp3I, FseI, FspAI, HaeII, HaeIV, HindII, HindIII, HpaI, Hpy99I, KpnI, MauBI, MluI, MmeI, NaeI, NarI, NheI, NmeAIII, NotI, NruI, PacI, PasI, PflMI, PmaCI, PmeI, PpiI, PpuMI, PshAI, PI-PspI, PspXI, PsrI, PvuI, PvuII, RsrII, SacI, SalI, SanDI, SapI, Scal, PI-SceI, SexAI, SfiI, Sgfi, SgrAI, SgrDI, SmaI, SnaBI, SpeI, SrfI, Sse8387I, StuI, SwaI, TaqII, TstI, Tth111I, VspI, XbaI, XcmI, XhoI, XmnI

Tablo A. 1: SMN1 varyant d mRNA'sını kesen enzimler.

Name	Sequence	Site Length	Overhang	Frequency	Cut Positions
MslI	CAYNNNNRTG	6	blunt	1	1165
OliI	CACNNNNGTG	6	blunt	1	1165
PsiI	TTATAA	6	blunt	1	1265
AcyI	GRCGYC	6	five_prime	1	49

Tablo A.1 (devam)

Name	Sequence	Site Length	Overhang	Frequency	Cut Positions
AflII	CTTAAG	6	five_prime	1	1290
BccI	CCATC	5	five_prime	1	1132
BglII	AGATCT	6	five_prime	1	959
BseYI	CCCAGC	6	five_prime	1	344
BsmAI	GTCTC	5	five_prime	1	544
BspMI	ACCTGC	6	five_prime	1	245
Eco31I	GGTCTC	6	five_prime	1	544
FokI	GGATG	5	five_prime	1	132
HgaI	GACGC	5	five_prime	1	38
MfeI	CAATTG	6	five_prime	1	361
NcoI	CCATGG	6	five_prime	1	582
PleI	GAGTC	5	five_prime	1	1101
StyI	CCWWGG	6	five_prime	1	582
TatI	WGTACW	6	five_prime	1	1412
Tsp45I	GTSAC	5	five_prime	1	186
XhoII	RGATCY	6	five_prime	1	959
BseRI	GAGGAG	6	three_prime	1	432
BstXI	CCANNNNNTGG	6	three_prime	1	1164
BtsI	GCAGTG	6	three_prime	1	44
Eco57MI	CTGRAG	6	three_prime	1	518
GsuI	CTGGAG	6	three_prime	1	518
NspI	RCATGY	6	three_prime	1	174
PstI	CTGCAG	6	three_prime	1	275
SacII	CCGCGG	6	three_prime	1	8
SduI	GDGCHC	6	three_prime	1	885
SphI	GCATGC	6	three_prime	1	174
TspGWII	ACGGA	5	three_prime	1	59
SspI	AATATT	6	blunt	2	1097, 1461
ApoI	RAATTY	6	five_prime	2	654, 1183
AvaII	GGWCC	5	five_prime	2	633, 732
BtgZI	GCGATG	6	five_prime	2	36, 115
FauI	CCCGC	5	five_prime	2	12, 1482

Tablo A.1 (devam)

NdeI	CATATG	6	five_prime	2	143, 762
PfoI	TCCNGGA	6	five_prime	2	52, 542
SfaNI	GCATC	5	five_prime	2	773, 779
SmlI	CTYRAG	6	five_prime	2	484, 1290
BaeI	ACNNNNGTAYC	7	three_prime	2	809, 842
BfiI	ACTGGG	6	three_prime	2	639, 1147
BsrDI	GCAATG	6	three_prime	2	352, 1093
FaeI	AAGNNNNNCTT	6	three_prime	2	1260, 1292
Hin4I	GAYNNNNNVTC	6	three_prime	2	815, 847
HphI	GGTGA	5	three_prime	2	198, 1179
TsoI	TARCCA	6	three_prime	3	829, 1093
BbvI	GCAGC	5	five_prime	4	40, 285, 700, 934
TfiI	GAWTC	5	five_prime	4	66, 105, 771, 1383
TseI	GCWGC	5	five_prime	4	28, 273, 713, 922
TauI	GCSGC	5	three_prime	4	34, 37, 49, 88
TspRI	CASTG	5	three_prime	4	44, 136, 294, 404
EcoRII	CCWGG	5	five_prime	5	534, 542, 617, 635,
BsrI	ACTGG	5	three_prime	7	404, 634, 842, 995, 1108, 1142,
MboII	GAAGA	5	three_prime	7	275, 339, 994, 995, 1045, 1421
TspDI	ATGAA	5	three_prime	7	151, 508, 514, 535, 802, 1320, 1397

EK B.1: SMN1 Geninin pET-21a Vektörüne Alt Klonlama Dizi Analizi Sonuçlarının

Karşılaştırılması

SMN1	113	ATGGCGATGAGCAGCGGGCGGCAGTGGTGGCGGCGTCCCGGAGCAGGAGGATTCCGTGCTG	172
NCBI	18	ATGGCGATGAGCAGCGGGCGGCAGTGGTGGCGGCGTCCCGGAGCAGGAGGATTCCGTGCTG	77
SMN1	173	TTCCGGCGCGGCACAGGCCAGAGCGATGATTCTGACATTTGGGATGATACAGCACTGATA	232
NCBI	78	TTCCGGCGCGGCACAGGCCAGAGCGATGATTCTGACATTTGGGATGATACAGCACTGATA	137
SMN1	233	AAAGCATATGATAAAGCTGTGGCTTCATTTAAGCATGCTCTAAAGAATGGTGACATTTGT	292
NCBI	138	AAAGCATATGATAAAGCTGTGGCTTCATTTAAGCATGCTCTAAAGAATGGTGACATTTGT	197
SMN1	293	GAAACTTCGGGtaaaccaaaaaccacacctaanaagaaaacctgctaagaagaataaaaagc	352
NCBI	198	GAAACTTCGGGTAAACCAAAAACCACACCTAAAAGAAAACCTGCTAAGAAGAATAAAAAGC	257
SMN1	353	caaaagaagaaTACTGCAGCTTCCTTACAACAGTGGAAAGTTGGGGACAAATGTTCTGCC	412
NCBI	258	CAAAAGAAGAATACTGCAGCTTCCTTACAACAGTGGAAAGTTGGGGACAAATGTTCTGCC	317
SMN1	413	ATTTGGTCAGAAGACGGTTGCATTTACCCAGCTACCATTGCTTCAATTGATTTTAAGAGA	472
NCBI	318	ATTTGGTCAGAAGACGGTTGCATTTACCCAGCTACCATTGCTTCAATTGATTTTAAGAGA	377
SMN1	473	GAAACCTGTGTTGTGGTTTACTACTGGATATGGAAATAGAGAGGAGCAAAATCTGTCCGAT	532
NCBI	378	GAAACCTGTGTTGTGGTTTACTACTGGATATGGAAATAGAGAGGAGCAAAATCTGTCCGAT	437
SMN1	533	CTACTTTCCCAATCTGTGAAGTAGCTAATAATATAGAACAGAATGCTCAAGAGAATGAA	592
NCBI	438	CTACTTTCCCAATCTGTGAAGTAGCTAATAATATAGAACAAAATGCTCAAGAGAATGAA	497
SMN1	593	AATGAAAGCCAAGTTTCAACAGATGAAAGTGAGAACTCCAGGTCTCCTGGAAATAAATCA	652
NCBI	498	AATGAAAGCCAAGTTTCAACAGATGAAAGTGAGAACTCCAGGTCTCCTGGAAATAAATCA	557
SMN1	653	GATAACATCAAGCCCAAATCTGCTCCATGGAACCTCTTTTCTCCCTCCACCACCCCATG	712
NCBI	558	GATAACATCAAGCCCAAATCTGCTCCATGGAACCTCTTTTCTCCCTCCACCACCCCATG	617
SMN1	713	CCAGGGCCAAGACTGGGACCAGGAAAGCCAGGTCTAAAATTCAATGGCCcaccaccgcca	772
NCBI	618	CCAGGGCCAAGACTGGGACCAGGAAAGCCAGGTCTAAAATTCAATGGCCcaccaccgcca	677
SMN1	773	ccgccaccaccaccaccacttactatcatgctggctgcctccatttccttctggacca	832
NCBI	678	CCGCCACCACCACCACCCACTTACTATCATGCTGGCTGCCTCCATTTCCTTCTGGACCA	737
SMN1	833	ccaataattccccaccacctccCATATGTCCAGATTCTCTTGATGATGCTGATGCTTTG	892
NCBI	738	CCAATAATTCCCCACCACCTCCCATATGTCCAGATTCTCTTGATGATGCTGATGCTTTG	797
SMN1	893	GGAAGTATGTTAATTTTCATGGTACATGAGTGGCTATCATACTGGCTATTATATGGGTTTT	952
NCBI	798	GGAAGTATGTTAATTTTCATGGTACATGAGTGGCTATCATACTGGCTATTATATGGGTTTT	857
SMN1	953	AGACAAAATCAAAAAGAAGGAAGGTGCTCACATTCCTTAAATT	995
NCBI	858	AGACAAAATCAAAAAGAAGGAAGGTGCTCACATTCCTTAAATT	900

EK B.2: TAT Dizisinin SMN1-pET-21a Vektörüne Alt Klonlama Dizi Analizi

Sonuçlarının Karşılaştırılması

pSMN1	102	GGATCCGGCTATGGCCGTAAAAAACGTCGTCAGCGTCGTCGTGGCGAATTCA	153
TATseq	4	GGATCCGGCTATGGCCGTAAAAAACGTCGTCAGCGTCGTCGTGGCGAATTCA	55
pSMN1	156	ATGGCGATGAGCAGCGGGCGGCAGTGGTGGCGGGCTCCCGGAGCAGGAGGATTCCGTGCTG	215
NCBI	18	ATGGCGATGAGCAGCGGGCGGCAGTGGTGGCGGGCTCCCGGAGCAGGAGGATTCCGTGCTG	77
pSMN1	216	TTCCGGCGCGGCACAGGCCAGAGCGATGATTCTGACATTTGGGATGATACAGCACTGATA	275
NCBI	78	TTCCGGCGCGGCACAGGCCAGAGCGATGATTCTGACATTTGGGATGATACAGCACTGATA	137
pSMN1	276	AAAGCATATGATAAAGCTGTGGCTTCATTTAAGCATGCTCTAAAGAATGGTGACATTTGT	335
NCBI	138	AAAGCATATGATAAAGCTGTGGCTTCATTTAAGCATGCTCTAAAGAATGGTGACATTTGT	197
pSMN1	336	Gaaacttcgggtaaaccaaaaaaccacacctaataaagaaaacctgctaagaagaataaaaagc	395
NCBI	198	GAAACTTCGGGTAAACCAAAAACCACACCTAAAAGAAAACCTGCTAAGAAGAATAAAAAGC	257
pSMN1	396	Caaaagaagaataactgcagcttccttacaacagtggaagttggggacaaatgcttctgccc	455
NCBI	258	CAAAAGAAGAATACTGCAGCTTCCTTACAACAGTGGAAAGTTGGGGACAAATGTTCTGCC	317
pSMN1	456	ATTTGGTCAGAAGACGGTTGCATTTACCCAGCTACCATTGCTTCAATTGATTTTAAGAGA	515
NCBI	318	ATTTGGTCAGAAGACGGTTGCATTTACCCAGCTACCATTGCTTCAATTGATTTTAAGAGA	377
pSMN1	516	GAAACCTGTGTTGTGGTTTACACTGGATATGGAAATAGAGAGGAGCAAAATCTGTCCGAT	575
NCBI	378	GAAACCTGTGTTGTGGTTTACACTGGATATGGAAATAGAGAGGAGCAAAATCTGTCCGAT	437
pSMN1	576	CTACTTTCCTCCCAATCTGTGAAGTAGCTAATAATATAGAACAGAATGCTCAAGAGAATGAA	635
NCBI	438	CTACTTTCCTCCCAATCTGTGAAGTAGCTAATAATATAGAACAAAATGCTCAAGAGAATGAA	497
pSMN1	636	AATGAAAGCCAAGTTTCAACAGATGAAAGTGAGAACTCCAGGTCTCCTGGAAATAAATCA	695
NCBI	498	AATGAAAGCCAAGTTTCAACAGATGAAAGTGAGAACTCCAGGTCTCCTGGAAATAAATCA	557
pSMN1	696	GATAACATCAAGCCCAAATCTGCTCCATGGAACCTCTTTCTCCCTCCACCACCCCCCATG	755
NCBI	558	GATAACATCAAGCCCAAATCTGCTCCATGGAACCTCTTTCTCCCTCCACCACCCCCCATG	617
pSMN1	756	Ccagggccaagactgggaccaggaagccaggtctagaattcaatggcccaccaccgcca	815
NCBI	618	CCAGGGCCAAGACTGGGACCAGGAAAGCCAGGTCTAAAATTCAATGGCCCACCACCGCCA	677
pSMN1	816	Ccgccaccaccaccaccacttactatcatgctggctgcctccatttccttctggacca	875
NCBI	678	CCGCCACCACCACCACCCACTTACTATCATGCTGGCTGCCCTCCATTCCTTCTGGACCA	737
pSMN1	876	CCAATAATTCCCCACCACCTCCCATATGTCCCGATTCTCTTGATGATGCTGATGCTTTG	935
NCBI	738	CCAATAATTCCCCACCACCTCCCATATGTCCAGATTCTCTTGATGATGCTGATGCTTTG	797
pSMN1	936	GGAAGTATG 944	
NCBI	798	GGAAGTATG 806	

EK C.1: SMN1 shRNA Primerlerinin siRNA Selection Programıyla Tasarlanması

- * Enter your sequence in [Raw or FASTA format](#) below,

```
CGTGCTGTTCCGGCGCGGCACAGGCCAGAGCGATGATTCTGACATTTGGGATGATACAGCACTGATAAAA
GCATATGATAAAGCTGTGGCTTCATTTAAGCATGCTCTAAAGAATGGTGACATTTGTGAACTTCGGGTA
AACCAAAAACCACACCTAAAAGAAAACCTGCTAAGAAGAATAAAAGCCAAAAGAAGAATACTGCAGCTTC
CTTACAACAGTGAAAGTTGGGGACAATGTCTGCCATTTGGTCAGAAGACGGTTGCATTTACCCAGCT
ACCATTGCTTCAATTGATTTAAGAGAGAAACCTGTGTTGTGGTTTACACTGGATATGGAAATAGAGAGG
AGCAAAATCTGTCGGATCTACTTTCCCAATCTGTGAAGTAGCTAATAATATAGAACAAAATGCTCAAGA
```

- * [Choose the siRNA pattern:](#)

Recommended patterns	custom
<input type="radio"/> N2[CG]N8[AUT]N8[AUT]N2	<input type="radio"/> <input type="text"/> <p>Enter pattern with 23 bases</p>
<input checked="" type="radio"/> AAN19TT	
<input type="radio"/> NAN21	

- Filter criteria:

- * GC percentage: from to
- * [exclude a run of](#) [or more T or A in a row](#)
- * [exclude a run of](#) [or more Gs in a row](#)
- * include less than consecutive GC in a row.
- equal %(+/-) for all 4 bases.

- * [End your siRNAs with](#)

-

Note: *: required parameters.

EK C.2: SMN1 shRNA 210 Dizisinin pLKO.1-TRC Vektörüne Klonlanmasının Dizi Analizi Sonuçları ile Karşılaştırılması

Okuma	185	CCGGAAGAAGAATACTGCAGCTTCCCTCGAGGGAAGCTGCGGTATTCA	tttttttttG	242
shRNA1	1	CCGGAAGAAGAATACTGCAGCTTCCCTCGAGGGAAGCTGCGGTATTCT	TTTTTTT	58

EK C.3: SMN1 shRNA 522 Dizisinin pLKO.1-TRC Vektörüne Klonlanmasının Dizi Analizi Sonuçları ile Karşılaştırılması

Okuma	176	CCGGAATCTGCTCCATGGAACCTCTCTCGAGAGAGTTCCATGGAGCAG	AttttttttG	233
shRNA2	1	CCGGAATCTGCTCCATGGAACCTCTCTCGAGAGAGTTCCATGGAGCAG	ATTTTTTTT	58

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı :

Doğum tarihi ve yeri :

e-posta :

Öğrenim Bilgileri

