



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**CCDC84'ÜN RNA KIRPILMASI (*SPLICING*)
SÜRECİNDEKİ ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI**

İdris ER

DOKTORA TEZİ

Prof. Dr. Ersan KALAY

TRABZON-2022

BEYAN

Bu tez çalışmasının Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Hazırlama ve Yazım Kılavuzu standartlarına uygun olarak hazırlanarak yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kullanılan kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.



İdris ER

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY	
BEYAN	
İthaf	
TEŞEKKÜR	
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
RESİMLER DİZİNİ	xii
KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ	xiv
ÖZET	xviii
ABSTRACT	xix
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. RNA Kırılması (<i>Splicing</i>)	3
2.1.1. İntron Çeşitleri: U2 Tip ve U12 Tip İntronlar	4
2.1.2. İntron Hedeflenmesi ve Alternatif RNA Kırılması	5
2.2. Kırılma Kompleksi (Splaysozom)	6
2.2.1. Splaysozom Yapısında Yer Alan snRNA'lar	7
2.2.2. Splaysozom Yapısında Yer Alan snRNP'ler ve snRNP Biyogenezi	9
2.3. Splaysozomun Yapılanması	13
2.3.1. Majör Splaysozom ve Yapılanması	14
2.3.2. Minör Splaysozom ve Yapılanması	16
2.4. Tez Çalışması Öncesinde Elde Edilen Ön Veriler	18
2.5. Pre-mRNA Processing Factor 4 (PRPF4) ve Fonksiyonu	20
2.6. Thioredoxin-Like Protein 4B (TXNL4B) ve Fonksiyonu	21
2.7. Spliceosome Associated Factor 1 (SART1) ve Fonksiyonu	21
2.8. Spliceosome Associated Factor 3 (SART3) ve Fonksiyonu	22
2.9. Splaysozom Bileşenleri ile İlişkilendirilen Hastalıklar	23
3. GEREÇ ve YÖNTEM	26
3.1. Gereç	26

3.1.1. Kimyasallar	26
3.1.2. Polimerazlar	27
3.1.3. DNA Markırlar	27
3.1.4. Antikorlar	28
3.1.4.1. Primer Antikorlar	28
3.1.4.2. Sekonder Antikorlar	28
3.1.5. Rezinler	28
3.1.6. Besiyeri ve Antibiyotikler	28
3.1.7. Kitler ve Enzimler	29
3.1.8. siRNA'lar	29
3.1.9. Diğer Sarf Malzemeler	29
3.1.10. Cihazlar	30
3.1.11. Bakteri Suşları	31
3.1.12. Klonlamada Kullanılan Boş Vektörler	32
3.1.13. Çözeltiler, Tampon ve Besiyerleri	32
3.1.13.1. Bakteri Kültürleri İçin Kullanılan Besiyerleri	32
3.1.13.2. Bakteri İndüklemeye Kullanılan Ajanlar	32
3.1.13.3. Agaroze Jel Elektroferezinde Kullanılan Çözeltiler	33
3.1.13.4. SDS-PAGE Solüsyonları	33
3.1.13.5. Western Blot Solüsyonları	34
3.1.13.6. İmmünpresipitasyonda Kullanılan Solüsyonlar	35
3.1.13.7. İmmünofloresanda Kullanılan Solüsyonlar	37
3.1.13.8. Memeli Hücre Kültüründe Kullanılan Solüsyonlar	37
3.1.13.9. Transfeksiyon Solüsyonları	37
3.2. Yöntem	38
3.2.1. Gateway Sistemi ile Klonlama	38
3.2.1.1. Klonlanması Hedeflenen Gen ve Domainlerin PCR ile Amplifikasyonu	38
3.2.1.2. PCR Ürünlerinin Agaroze Jelde Yürütülmesi ve Saflaştırılması	39
3.2.1.3. Giriş (Entry) Klonların Oluşturulması	39
3.2.1.4. <i>E. coli</i> Transformasyonu	40
3.2.1.5. Plazmit İzolasyonu	41
3.2.1.6. Çalışmada Kullanılacak Plazmitlerin Dizilenerek Kontrolü	41
3.2.2. Ekspresyon Vektörlerinin Oluşturulması	43

3.2.3. Flag Etiketli Bakteri Ekspresyon Vektörlerinin Oluşturulması	44
3.2.4. SART3 Domainlerine Ait Dizilerin Bakteri Ekspresyon Vektörlerinin Oluşturulması	45
3.2.5. Hücre Kültürü	47
3.2.5.1. Kullanılan Hücreler	47
3.2.5.2. Kültür Edilme Şartları	48
3.2.6. HEK293 Hücrelerinin Kalsiyum Fosfat Yöntemi ile Transfeksiyonu	49
3.2.7. Protein İzolasyonu ve Fazladan Eksprese Ettirilen Proteinlerin İmmünblot ile Analizi	49
3.2.8. CCDC84'ün Etkileştiği Proteinlerin <i>in vivo</i> Analizi	50
3.2.8.1. Anti-FLAG M2 Rezinlerin Hazırlanması	51
3.2.8.2. İzole Edilen Proteinlerin Ön Temizliği (Pre-clearing)	51
3.2.8.3. Anti-FLAG İmmünpresipitasyon Yöntemi	52
3.2.8.4. Protein Kompleksinin Elüsyonu	52
3.2.9. SDS-PAGE ve İmmünblot (Western Blot) Analizi	53
3.2.9.1. SDS-PAGE Jelinin Hazırlanması	53
3.2.9.2. Proteinlerin SDS-PAGE ile Ayırıştırılması	54
3.2.9.3. Proteinlerin Membranlara Aktarılması (İmmünblot) ve Görüntüleme	54
3.2.10. CCDC84 ile SART3, SART1, PRPF4 ve TXNL4B Arasındaki <i>in vivo</i> Etkileşimlerin RNA'ya Bağımlı Olup Olmadığının Analizi	55
3.2.11. CCDC84 ile SART3, SART1, PRPF4 ve TXNL4B Arasındaki Etkileşimlerin <i>in vitro</i> Analizi	56
3.2.11.1. Bakterilerin İndüklenmesi ve Protein Lizatlarının Hazırlanması	57
3.2.11.2. Fare-ANTI-FLAG M2 Antikorumun Kovalent Olarak Bağlı Olduğu Agaroza Boncuk ile Pull Down	58
3.2.11.3. GST Trap Rezin ile Pull Down	58
3.2.12. CCDC84'ün Etkileştiği Proteinlerle Hücre İçi Birlikte Yerleşimlerinin İmmünfloresan ile Analizi	59
3.2.12.1. HeLa hücrelerinin Lipozoma Dayalı Transfeksiyonu	60
3.2.12.2. İmmünfloresan Görüntüleme	61
3.2.13. CCDC84'ün RNA Kırılması Üzerine Etkisinin Minigen Yaklaşımı ile Analizi	62
3.2.13.1. HEK293 Hücrelerinde siRNA ile Gen Sessizleştirilmesi	63

3.2.13.2. RNA İzolasyonu ve RT-PCR	65
3.2.13.3. cDNA Sentezi	65
3.2.14. CCDC84'ün Eksikliğinin U12 Tip İntronların Kırpılması Üzerine Etkisinin Analizi	66
4. BULGULAR	67
4.1. CCDC84 ile SART3, SART1, PRPF4 ve TXNL4B Arasındaki Etkileşimlerin Analizi	67
4.1.1. CCDC84'ün SART3 ile Etkileşiminin <i>in vivo</i> ve <i>in vitro</i> Analizi	68
4.1.1.1. CCDC84'ün SART3 ile Etkileşimine Aracılık Eden SART3 Domainin Belirlenmesi	70
4.1.2. CCDC84'ün SART1 ile Etkileşiminin <i>in vivo</i> ve <i>in vitro</i> Analizi	71
4.1.3. CCDC84'ün PRPF4 ile Etkileşiminin <i>in vivo</i> ve <i>in vitro</i> Analizi	73
4.1.4. CCDC84'ün TXNL4B ile Etkileşiminin <i>in vivo</i> ve <i>in vitro</i> Analizi	75
4.1.5. CCDC84'ün SART3, SART1, PRPF4 ve TXNL4B ile <i>in vivo</i> Etkileşimlerine RNaz'ın Etkisi	77
4.2. CCDC84 ile U1/U2 di-snRNP Bileşeni SF3A3 ve SF3B4 Arasındaki Etkileşimin Analizi	78
4.3. CCDC84 ile U11/U12 di-snRNP Bileşeni RNPC3 Arasındaki Etkileşimin Analizi	79
4.4. CCDC84 ile Etkileşen Proteinlerin Hücre İçi Yerleşimi ve Mutant CCDC84'ün Proteinlerin Yerleşimi Üzerine Etkisi	80
4.5. CCDC84 Eksikliğinin Cajal Cisimciği Oluşumu Üzerine Etkisinin İncelenmesi	82
4.6. CCDC84'ün RNA Kırpılması Üzerine Etkisinin Minigen ile Analizi	83
4.7. CCDC84'ün U12 Tip İntronların Kırpılması Üzerine Genişletilmiş Analizi	86
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	88
6. KAYNAKLAR	94
ÖZGEÇMİŞ	113

TABLÖLER DİZİNİ

Tablo No	Sayfa
Tablo 1. Hastalıklarla ilişkilendirilmiş splayozom bileşenleri	25
Tablo 2. Kullanılan bakteri suşları ve genotipleri	31
Tablo 3. Kullanılan boş vektörlere ait bilgiler	32
Tablo 4. PRPF4, SART1, TXNL4B, SART3, SF3A3, SF3B4, RNPC3, SART3 domainleri ve minigenlerin Gateway sistemi ile klonlanmasında kullanılan attB kuyruklu primer dizileri	39
Tablo 5. Oluşturulan vektörlerin dizilenmesinde kullanılan primer listesi	43
Tablo 6. Çalışmada kullanılan memeli ekspresyon vektörlerine ait bilgiler	47
Tablo 7. Çalışmada kullanılan bakteri ekspresyon vektörlerine ait bilgiler	47
Tablo 8. Farklı konsantrasyonlardaki ayırma jeli içeriği	53
Tablo 9. %5'lik yükleme jeli içeriği	53
Tablo 10. İmmünblot ve görüntüleme koşulları	55
Tablo 11. İmmünfloresan koşulları	62
Tablo 12. Hek293 hücrelerinin siRNA ile transfeksiyonunda kullanılan ajanların miktarı	64
Tablo 13. cDNA sentezi- karışım 1	65
Tablo 14. cDNA sentezi- karışım 2	65
Tablo 15. <i>IPO5</i> , <i>DNA2</i> , <i>IPO11</i> , <i>NR2CAP</i> ve <i>GAPDH</i> genlerinin kırılmaya uğramamış mRNA'larının çoğaltılmasında kullanılan primer listesi	66

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No		Sayfa
Şekil 1.	RNA kırpılma sürecindeki transesterifikasyon reaksiyonları	4
Şekil 2.	Major ve minör introna sahip pre-mRNA üzerindeki korunmuş diziler	4
Şekil 3.	Kırpılma düzenleyici elemanlarının şematik gösterimi	6
Şekil 4.	Majör ve minör splaysozomal snRNA'ların baz dizilimleri ve ikincil yapıları	8
Şekil 5.	Majör splaysozomal snRNP'lerin yapılarındaki RNA'ların sekonder yapıları ve ilgili kor proteinleri	9
Şekil 6.	Minör splaysozomal snRNP'lerin yapılarındaki RNA'ların sekonder yapıları ve ilgili kor proteinleri	10
Şekil 7.	RNA Polimeraz II tarafından sentezlenen snRNP'lerin sitoplazma ve çekirdekteki olgunlaştırılma aşamaları	11
Şekil 8.	Splaysozomal snRNA'da modifiye edilmiş iki nükleotidin şematik gösterimi	12
Şekil 9.	U4/U6·U5 tri-snRNP'nin şematize gösterimi	13
Şekil 10.	Majör splaysozomun oluşum basamakları	15
Şekil 11.	Majör splaysozomun kurulumunda non-snRNP kırpılma kompleksi NTC/Prp19C'nin splaysozom ile ilişkisi	16
Şekil 12.	Minör splaysozomun oluşum basamakları	17
Şekil 13.	U12 tip intron barındıran genlerde ekspresyonun kontrolü	18
Şekil 14.	CCDC84'ün <i>in silico</i> analizi	19
Şekil 15.	CCDC84 ile etkileşimi yönünde ön veriler bulunan proteinler	20
Şekil 16.	SART3'ün U6 ve U6atac snRNA üzerindeki bağlanma bölgesi	23

RESİMLER DİZİNİ

Resim No	Sayfa
Resim 1. Gateway klonlama teknolojisi kullanılarak Flag etiketli yabancı tip ve mutant CCDC84 eksprese eden bakteri vektörlerinin oluşturulma stratejisi	45
Resim 2. Tam uzunluktaki SART3 proteinin ve aktif bölgelerinin şematik gösterimi	46
Resim 3. Oluşturulan minigenler	63
Resim 4. CCDC84'ün SART3 ile etkileşiminin <i>in vivo</i> analizi	68
Resim 5. CCDC84 ile SART3 arasındaki etkileşimin FLAG-Pull down yaklaşımı ile belirlenmesi-1	69
Resim 6. CCDC84 ile SART3 arasındaki etkileşimin FLAG-Pull down yaklaşımı ile belirlenmesi-2	69
Resim 7. CCDC84 ile SART3 arasındaki etkileşimin GST-Pull down yaklaşımı ile belirlenmesi	70
Resim 8. CCDC84 ile SART3 arasındaki etkileşime aracılık eden SART3 domainin GST-Pull down yaklaşımı ile belirlenmesi	71
Resim 9. CCDC84'ün SART1 ile etkileşiminin <i>in vivo</i> analizi	72
Resim 10. CCDC84 ile SART1 arasındaki etkileşimin FLAG-Pull down yaklaşımı ile belirlenmesi	72
Resim 11. CCDC84'ün PRPF4 ile etkileşiminin <i>in vivo</i> analizi	74
Resim 12. CCDC84 ile PRPF4 arasındaki etkileşimin FLAG-Pull down yaklaşımı ile belirlenmesi	74
Resim 13. CCDC84'ün TXNL4B ile etkileşiminin <i>in vivo</i> analizi	76
Resim 14. CCDC84 ile TXNL4B arasındaki etkileşimin FLAG-Pull down yaklaşımı ile belirlenmesi	76
Resim 15. CCDC84'ün PRPF3, SART3, SART1, PRPF4 ve TXNL4B ile <i>in vivo</i> etkileşimlerine RNaz'ın etkisi	77
Resim 16. CCDC84'ün SF3A3 ve SF3B4 ile etkileşiminin <i>in vivo</i> analizi	78
Resim 17. CCDC84'ün RNPC3 ile etkileşiminin <i>in vivo</i> analizi	79
Resim 18. HeLa hücrelerinde CCDC84 ve SART3'ün hücresel lokalizasyonlarının gösterilmesi	80

Resim 19.	HeLa hücrelerinde CCDC84 ve PRPF4'ün hücresel lokalizasyonlarının gösterilmesi	81
Resim 20.	HeLa hücrelerinde CCDC84 ve TXNL4B'nin hücresel lokalizasyonlarının gösterilmesi	81
Resim 21.	HeLa hücrelerinde CCDC84 ve SART1'in hücresel lokalizasyonlarının gösterilmesi	82
Resim 22.	CCDC84'ün eksikliğinin HEK293 hücrelerinde Cajal cisimciği sayısı ve yapısı üzerine etkisinin analizi	83
Resim 23.	CCDC84'ün eksikliğinin HeLa hücrelerinde Cajal cisimciği sayısı ve yapısı üzerine etkisinin analizi	83
Resim 24.	CCDC84'ün U2 tip intron kırılması üzerine etkisinin minigen ile analizi	84
Resim 25.	CCDC84'ün U2 tip intron alternatif RNA kırılması üzerine etkisinin minigen ile analizi	85
Resim 26.	CCDC84'ün U12 tip intron kırılması üzerine etkisinin minigen ile analizi	86
Resim 27.	Seçilen minör intronların kırılmasında CCDC84, SART3 ve PRPF3'ün rolünün RT-PCR ile analizi	87

KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

Amp	Ampisilin
APS	Amonyum persülfat
BME	β -mercaptoethanol
Brr2	Pre-mRNA-splicing helicase BRR2
CBCs	Cap-binding complexes
CCDC84	Coiled-coil domain-containing protein 84
Cy3	Cyanin 3
dk	Dakika
Del	Delesyon
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DNA	Deoksiribo nükleik asit
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ESE	Exonic splicing enhancer
ESS	Exonic splicing silencer
FBS	Fetal bovin serum
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GPAA1	Glycosylphosphatidylinositol Anchor Attachment 1
GST	Glutatyon S transferaz
HCl	Hidroklorik asit
HEK	İnsan embriyonik böbrek hücre hattı
HeLa	Henrietta Lacks servikal kanser hücre hattı
hnRNP	Heterojen nükleer ribonükleer protein
HRP	Horse radish peroksidaz
IB	İmmünblot
IF	İmmünfloresan
IP	İmmünpresipitasyon
IPTG	Isopropyl β - d-1-thiogalactopyranoside
ISE	Intronic splicing enhancer
ISS	Intronic splicing silencer
Kan	Kanamisin

LB	Luria Bertani
M	Mutant tip
MPD	Microcephalic Primordial Dwarfism
MOPD1	Microcephalic Osteodysplastic Primordial Dwarfism, Type I
mRNA	Mesajcı RNA
MST1R	Macrophage Stimulating 1 Receptor
m7G	7-Methylguanosine
NLS	Nükleer lokalizasyon sinyali
NTC	NineTeen Complex
NTR	NineTeen Complex Related
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PBS	Fosfatla tamponlanmış tuz çözeltisi
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
Pen	Penisilin
PFA	Paraformaldehit
PMSF	Fenil metil sülfonil florür
PRPF3	Pre-mRNA processing faktör 3
PRPF4	Pre-mRNA processing faktör 4
PRPF6	Pre-mRNA processing faktör 6
PRPF8	Pre-mRNA processing faktör 8
PVDF	Polivinilidenflorid
RNA	Ribonükleik asit
s	Saniye
SART1	Spliceosome Associated Factor 1
SART3	Spliceosome Associated Factor 3
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SF3b	Splicing Factor 3b
scaRNA	Small Cajal body-specific RNAs
siRNA	Small interfering RNA
Slu7	SLU7 Homolog Splicing Factor
SnRNA	Küçük nükleer ribonükleik asit
SnRNP	Küçük nükleer ribonükleoprotein

SMA	Spinal muscular atrophy
SMN	Survival of motor neuron
Strep	Streptomisin
TAE	Tris asetat EDTA
TBS	Tris tamponlanmış tuz çözeltisi
TBST	Tris tamponlanmış tuz çözeltisi-tween 20
TEMED	Tetrametiletildiamin
TNTE	Tris sodyum triton EDTA
TXNL4A	Thioredoxin like 4A
TXNL4B	Thioredoxin like 4B
T/E	Tripsin/EDTA
USP4	Ubiquitin Specific Peptidase 4
USP15	Ubiquitin Specific Peptidase 15
UV	Ultraviyole
W	Wild (yabanıl) tip
Simgeler	
α	Alfa
β	Beta
λ	Lamda
γ	Gama
g	Gram
kDa	Kilodalton
L	Litre
M	Molar
Mw	Moleküler ağırlık
μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre
mL	Mililitre
μm	Mikrometre
N	Normal
ng	Nanogram
°C	Santigrad derece
∞	Sonsuz

Formüller

CaCl₂	Kalsiyum klorür
C₂H₄O₂	Glasiyel asetik asit
C₂H₅OH	Etanol
C₄H₁₀O₂S₂	Dithiothreitol
C₄H₁₁NO₃	Tris baz
C₄H₁₂ClNO₃	Tris HCl
C₆H₁₂O₆	Glukoz
C₆H₁₆N₂	TEMED
C₈H₁₈N₂O₄S	HEPES
C₁₂H₂₀N₃Br	Etidyum bromür
C₁₉H₁₀Br₄O₅S	Bromofenol mavisi
ddH₂O	Ultra saflıkta su
HCl	Hidroklorik asit
HO(CH₂O)_nH	Paraformaldehit
H₂O	Su
KH₂PO₄	Potasyum fosfat monobazik
NaCl	Sodyum klorür
NaF	Sodyum florür
NaOH	Sodyum hidroksit
Na₂CO₃	Sodyum karbonat
Na₂EDTA.2H₂O	EDTA disodyum dihidrat
Na₂HPO₄.2H₂O	Di-sodyum hidrojen fosfat
Na₃VO₄	Sodyum orthovanadate
Na₄O₇P	Sodyum pirofosfat
(NH₄)₂S₂O₈	Amonyum persülfat

ÖZET

CCDC84'ün RNA Kırılması (*Splicing*) Sürecindeki Rolünün Araştırılması

Ökaryotlarda pre-mRNA'ların olgun mRNA'lara dönüşmeleri için yapılarında yer alan intronların çıkartılması ve ekzonların birleştirilmesi gerekmektedir. RNA Kırılması (*Splicing*) olarak adlandırılan bu süreç, küçük ribonükleoprotein komplekslerden oluşan splaysozom ile yürütülmektedir. Her bir snRNP bir küçük RNA ve kor protein olarak adlandırılan proteinlerden oluşmaktadır. Splaysozomun yapılanmasında, snRNP'lerin yapısındaki kor proteinlerle birlikte 300'den fazla farklı proteinin görev aldığı bilinmekle birlikte bu proteinlerin fonksiyonları ve RNA kırılmasının tam olarak nasıl gerçekleştiği bilinmemektedir. Splaysozomda yer alan snRNP'lerin kor bileşenleri ve yapılanmalarını yöneten proteinleri kodlayan genlerin bir kısmının mutasyonları hastalıklarla ilişkilendirilmiştir. Grubumuz tarafından *Microcephalic Primordial Dwarfism* ile ilişkilendirilen ve RNA kırılması sürecinde yer aldığı gösterilmiş olan CCDC84'ün fonksiyonu hakkında sınırlı bilgi bulunmaktadır. Bu tez çalışması kapsamında, CCDC84'ün fonksiyonunu aydınlatmaya yönelik olarak *in vivo* ve *in vitro* etkileştiği proteinlerin immüblot ve immüfloresan yaklaşımlarıyla aydınlatılması, eksikliğin Cajal cisimciği oluşumu üzerine etkisinin immüfloresan yaklaşımıyla gösterilmesi, CCDC84'ün eksikliğinde RNA kırılmasının fonksiyonu üzerine etkisi minigen ve RT-PCR ile belirlenmesi hedeflendi. Sonuç olarak, CCDC84'ün SART3 ile doğrudan etkileştiği, bu etkileşimin SART3'ün RNA bağlama motifleri üzerinden olduğu, tri-snRNP yapılanmasının erken aşamalarında yer aldığı, eksikliğinde Cajal cisimciklerin yapı ve sayısında değişiklik olmadığı, minör intronların bir kısmının kırılmasının bozulduğu görüldü. Elde ettiğimiz bu veriler, hem U2 tip hem de U12 tip tri-snRNP'nin yapılanmasında kritik rol oynayan SART3'ün U12 tip tri-snRNP yapılanmasına CCDC84 tarafından yönlendirildiğini işaret etmektedir.

Anahtar Kelimeler: Cajal cisimciği, CCDC84, RNA kırılması, snRNP, Splaysozom

ABSTRACT

Investigation of the Role of CCDC84 in Splicing Process

In eukaryotes, production of mature mRNAs from pre-mRNA needs to remove introns and subsequent exons joining. This process which is called splicing is carried out by the spliceosome that includes small ribonucleoprotein complexes. Each snRNP consists of a small RNA and proteins called core proteins. Although it is known that more than 300 different proteins, including the core proteins of snRNP, are involved in the assembly of the spliceosome, the functions of these proteins and the exact mechanism of splicing are not known. The mutations of some of the genes encoding the proteins involved in the assembly of spliceosome, including the core subunits of snRNP, have been associated with diseases. There is limited information about the function of CCDC84, which was shown to be involved in the splicing process and associated with Microcephalic Primordial Dwarfism by our group. This thesis aimed to elucidate the function of CCDC84 through the identification of the proteins that interact with CCDC84 at *in vivo* and *in vitro* conditions with immunoblot and immunofluorescence approaches, showing the effect of its deficiency on Cajal body formation with immunofluorescence and analyzing the effect of CCDC84 deficiency on splicing by minigene and RT-PCR approaches. As a result, our data showed that CCDC84 interacts directly with SART3 through the RNA binding motifs of SART3, takes place in the early stages of tri-snRNP construction, while its deficiency does not change the structure and the number of Cajal bodies, impairs the splicing of some of the minor introns. Our data indicate that SART3, which plays a crucial role in the U2 and U12 type tri-snRNP assembly, is directed to the U12 type tri-snRNP assembly by CCDC84.

Keywords: Cajal body, CCDC84, snRNP, Spliceosome, Splicing

1. GİRİŞ ve AMAÇ

İnsan genomunda yaklaşık 21000 gen bulunmaktadır. Ancak bu sayıdaki genden yaklaşık 70000 protein kodlanmaktadır (1, 2). Gen sayısına kıyasla daha fazla protein üretilmesi, genlerin yapısında yer alan kodlayan diziler olan ekzonların arasında kodlamayan intronların bulunması ve pre-mRNA'dan mRNA oluşturma sürecinde intronların farklı kombinasyonla çıkartılabiliyor olması ile sağlanmaktadır (3-5). Bu durum intronların pre-mRNA'nın yapısından çıkartılma süreci olan RNA kırılma (*splicing*) mekanizmasının aydınlatılmasına yönelik araştırmaları öncelikli alanlar arasına taşımıştır.

Intronlar, dizilimleri ve kırılmaları dikkate alındığında “U2 tip (majör)” ve “U12 tip (minör)” intronlar olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. pre-mRNA yapısından U2 tip intronların çıkartılması “majör splaysozom”, U12 tip intronların çıkartılması ise “minör splaysozom” olarak adlandırılan kırılma kompleksleri ile gerçekleştirilmektedir (6, 7).

Splaysozom, snRNA olarak adlandırılan küçük kodlamayan RNA'lar ile proteinlerin bir araya gelerek oluşturduğu küçük nüklear ribonükleoproteinlerin (snRNP) belli bir düzen ve sıra ile bir araya gelmesi sonucu yapılanmaktadır (8-10). RNA kırılma mekanizması ile elde edilen ilk bilgiler mutant mayalarda yapılan çalışmalardan elde edilmiş olup sonrasında kalıtsal hastalıklarla ilişkilendirilen genlerin fonksiyonlarını araştırmaya yönelik çalışmalar da sürecin anlaşılmasında önemli katkılar sağlamıştır (11). snRNP'lerin dışında 300'den fazla proteinin katılımı ile yapılandırılan megadalton boyutlarındaki splaysozomlar hakkındaki bilgilerin önemli bir kısmı majör splaysozomlar ile yapılan çalışmalardan elde edilmiş olmakla birlikte bu süreçte yer alan tüm proteinler ve mekanizma henüz tam olarak aydınlatılamamıştır (12-14). Minör splaysozom hakkındaki bilgi daha az olmakla birlikte oluşumları bakımından majör splaysozom ile büyük oranda benzerlikler barındırmaktadırlar (15-17).

Prekürsör mRNA (pre-mRNA) kırılması, tek bir genden birden fazla proteinin kodlanabilmesine imkan tanıyan post-transkripsiyonel bir modifikasyondur (3, 4, 18). Splaysozomda yer alan snRNP'lerin kor proteinlerini (SNRPB, SNRPE, PRPF31, PRPF3 ve PRPF4 gibi) ve splaysozom yapılanmasında rol alan proteinleri (SF3B1, SF3B4, SMN1, SART3, TXNL4A, PRPF6, PRPF8 gibi) kodlayan genlerin mutasyonları çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilmiştir (19-30). Bu hastalıkların önemli bir kısmı dominant kalıtım gösterirken daha az bir kısmı otozomal resesif olarak kalıtılmaktadır. Dominant kalıtım gösteren hastalıkların fare modeli oluşturulduğunda bu modellerin homozigot mutantlarının yaşama

bağdaşmadığı gösterilmiştir (27, 31-33). Splaysozomun protein bileşenlerinin yanı sıra RNA bileşenlerinden olan U4atac snRNP'yi kodlayan *RNU4ATAC* üzerindeki mutasyonların da otozomal resesif kalıtım gösteren ve prenatal ve postnatal gelişme geriliği, mikrosefali, iskelet anomalileri gibi fenotipik bulgularla ve yaşamın ilk yıllarında ölümle karakterize Microcephalic Osteodysplastic Primordial Dwarfism Type 1 (MOPD1)'e neden olduğu gösterilmiştir (34, 35).

CCDC84'ün homozigot mutasyonu ilk kez grubumuz tarafından Microcephalic Primordial Dwarfism (MPD) ile ilişkilendirilmiş ve kodladığı proteinin RNA kırılmasının temel bileşenlerinden biri olan PRPF3 ile doğrudan etkileştiği gösterilmiştir (36). PRPF3, U4/U6·U5 tri-snRNP kompleksinin yapısında bulunan U4'ün kor proteini olması (37, 38) ve *CCDC84*'ün PRPF3 ile etkileşimi *CCDC84*'ün RNA kırılma sürecindeki rol aldığını göstermektedir. Ancak, bu veri, *CCDC84*'ün snRNP'lerin yapılanmasından transesterifikasyon reaksiyonu ile intronların çıkartılarak ekzonların birleştirilmesine kadar olan çok basamaklı RNA kırılma sürecinin hangi aşamasında yer aldığını ve tam olarak ne iş yaptığını göstermemektedir. Bu tez çalışması ile *CCDC84*'ün snRNP, di-snRNP, tri-snRNP yapılanması, pre-katalitik splaysozom kompleksini oluşumu, katalitik splaysozom kompleksi ile intronların kırılması gibi süreçlerden hangisinde nasıl bir rol oynadığının belirlenmesi ve RNA kırılma mekanizmasının anlaşılmasına katkı sağlayacak verilere ulaşılması amaçlanmıştır. Bu kapsamda, öncelikle BioGRID (The Biological General Repository for Interaction Datasets/ Etkileşim Veri Kümeleri için Biyolojik Genel Depo) verilerine göre *CCDC84* ile *in vivo* etkileşebilecekleri önerilmiş olan ve RNA kırılması sürecinde rol alan PRPF4, TXNL4B, SART1 ve SART3'ün *CCDC84* ile olan olası etkileşimlerinin immünpresipitasyon, immünblot, pull down ve immünfloresan yaklaşımları ile araştırılması, *CCDC84*'ün üzerinde tanımlanan mutasyonun bu etkileşimler üzerine etkisinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Sonrasında, birebir etkileşim gösteren proteinlerin hangi domaini üzerinden *CCDC84* ile etkileştiğinin gösterilmesi, *CCDC84*'ün splaysozomun hangi aşamasında rol oynadığının aydınlatılması ve *CCDC84* siRNA ile susturulduğu hücrelerde Cajal cisimciğinin yapılanmasının nasıl etkilendiğinin belirlenmesi hedeflendi. Son olarak, *CCDC84*'ün siRNA ile susturulduğu hücrelerden, minigen yaklaşımı ve endojen genlerin cDNA'ları kullanılarak yapılan RT-PCR ile U2 tip ve U12 tip intronlardan hangisinin kırılmasının etkilendiğinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

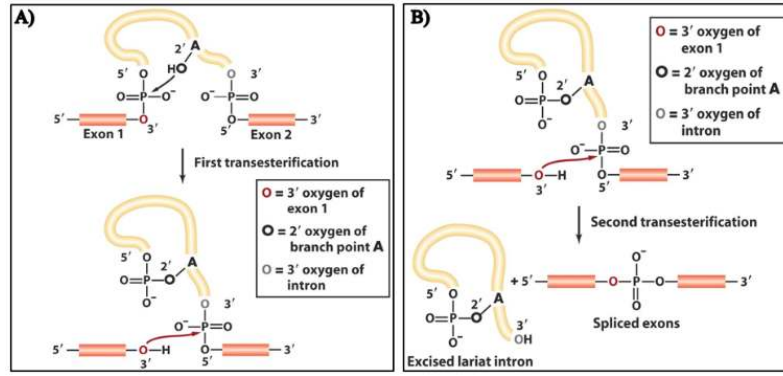
2. GENEL BİLGİLER

İnsan Genom Projesi (Human Genom Project/HGP) ile insan genomunda yaklaşık 21000 protein kodlayan gen olduğu gösterilmiştir (2, 39) ve bu genlerden 70000 civarında protein üretilmektedir (1). Gen sayısına göre protein üretimindeki bu çeşitlilik henüz her yönü ile aydınlatılamamış olan RNA kırılma (*splicing*) mekanizması ile sağlanmaktadır.

2.1. RNA Kırılması (*Splicing*)

Ökaryotik organizmalarda, protein kodlayan genlerin neredeyse tamamında intron olarak adlandırılan kodlamayan diziler bulunmaktadır. Fonksiyonel bir proteinin üretilmesi için protein kodlayan genden transkribe edilen pre-mRNA çekirdekten sitoplazmaya çıkmadan önce bu intronların yüksek hassasiyetle pre-mRNA'nın yapısından çıkartılıp, kodlayan bölgelerin (ekzonlar) birleştirilerek olgun mRNA'ların oluşturulması gerekmektedir (3, 40, 41). Pre-mRNA'ların yapısından intronların çıkartılarak olgun mRNA'ların oluşturulması çok basamaklı bir süreç olup RNA kırılması olarak adlandırılır (4, 42).

Kimyasal olarak pre-mRNA'dan transesterifikasyon (fosfodiester bağının bir başka yer ile değiştirilmesi) reaksiyonu ile intronlar her iki uçlarından kesilerek uzaklaştırılır ve ekzonlar birleştirilir (Şekil 1). İlk olarak 5' kırılma bölgesindeki fosfodiester bağı, dallanma noktasındaki adenosinin 2' hidroksiline saldırır ve 5' ekzonun introndan ayrılması ile intronun kement benzeri bir yapı kazanmasına sebep olur. Daha sonra, 5' ekzonun 3' hidroksili, 3' ucundaki fosfodiester bağına saldırarak ekzon ligasyonuna ve kement benzeri intronun ayrılmasına yol açar (43). Çok benzer diziler içindeki kırılma yerlerinin doğru tanınması ve transesterifikasyon reaksiyonlarının ilerlemesini sağlayan atomik mesafe içinde konumlandırılması muntazam bir düzen gerektirmektedir (44). Bu da çok sayıda protein ve snRNA olarak adlandırılan kodlamayan küçük RNA'lardan oluşan splaysozom ile sağlanmaktadır (8, 14, 45, 46). Splaysozomun yapısında bulunan proteinler ve snRNA'lar intronlara kimlik kazandıran, pre-mRNA yapısındaki korunmuş intronik dizilerin tanınmasına aracılık etmektedir.



Şekil 1. RNA kırılma sürecindeki transesterifikasyon reaksiyonları. A) Birinci transesterifikasyon reaksiyonu (kement benzeri intronun oluşması). B) İkinci transesterifikasyon reaksiyonu (ekzonların birleştirilmesi) (Griffiths'den, 47).

2.1.1. İntron Çeşitleri: U2 Tip ve U12 Tip İntronlar

Pre-mRNA yapısındaki intronların 5' kırılma verici bölge tarafında (*splicing* verici bölge) ve 3' kırılma alıcı bölge tarafında (*splicing* alıcı bölge) yer alan çok yüksek düzeyde korunmuş diziler bulunmaktadır (Şekil 2). Ayrıca, intronların 3' ucunun yaklaşık 20-40 nükleotid yukarı (upstream) bölgesinde yer alan ve “dallanma bölgesi” olarak adlandırılan dizinin de intronların belirlenmesinde kritik önemi vardır (46). İntronlar, üzerlerindeki korunmuş bu dizilere göre U2 tip (majör) ve U12 tip (minör) olmak üzere temelde iki alt gruba ayrılmaktadır.

	Splicing verici bölge	Dallanma noktası	Splicing alıcı bölge
Majör İntronlar	Ekzon 1 gt	a	pY ag Ekzon 2
Minör İntronlar	Ekzon 1 at	a	pY ac Ekzon 2
	at		ag
	at		aa
	at		at
	gt		ag
	gc		ag
	gt		at
	gt		tg

Şekil 2. Majör ve minör introna sahip pre-mRNA üzerindeki korunmuş diziler

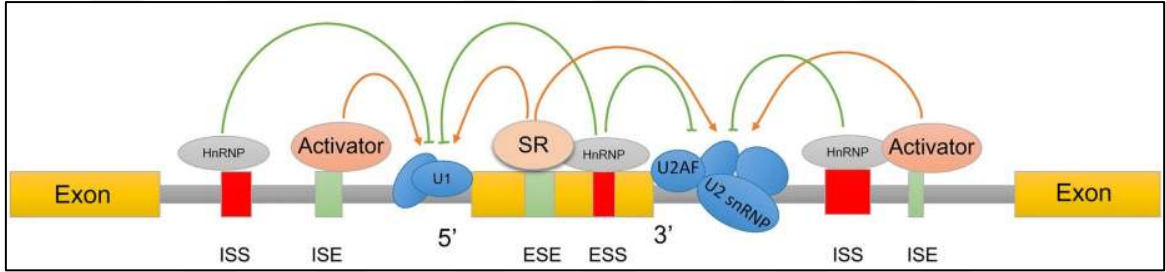
U2 tip intronlar, tüm ökaryotlarda bulunurken U12 tip intronlar sadece omurgalılarda, böceklerde, denizanasında ve bitkilerde tanımlanmıştır (48, 49). İnsanlarda U2 tip intronlar bütün genlerde görülürken, U12 tip intronlar genomundaki genlerin yaklaşık 700'ünde görülmektedir ve insan genomundaki tüm intronların %0.35'ini oluşturmaktadır (49, 50). Genel olarak bir gende tek bir U12 tip intron bulunmakla birlikte, insanlarda yaklaşık 50 gende iki U12 tip intron ve birkaç gende ise üç U12 tip intron bulunmaktadır. U12 tip intronlar DNA replikasyonu ve onarımı, transkripsiyon, RNA işlenmesi ve translasyonu, hücre iskeleti organizasyonu, veziküler taşıma, voltaj-kapılı iyon kanalı aktivitesi ve Ras-Raf sinyal yolağı gibi temel mekanizmalarda görevli proteinleri kodlayan genlerde bulunmaktadır (48, 51, 52).

U2 tip intronların 5' ve 3' uçlarından %100 korunmuş olan sırası ile "GT" ve "AG" dizileri bulunmaktadır. Buna karşın U12 tip intronların 5' ve 3' uçlarında sırası ile "AT" ve "AC" veya "GT" ve "AG" dizileri görülebilmektedir (53, 54). Ancak, minör intronların uçlarında AT-AC (54) ve GT-AG dizilerinin yerine AT-AG, GT-AT, CT-AC, GG-AG ve GA-AG dizileri de bulunabilmektedir (55, 56). Buna karşın bazı AT-AC dizilerine sahip intronun majör splayozom tarafından kırılmaya uğradığı da gösterilmiştir (55, 57). Bu nedenle minör intronları tanımlamak için sadece terminal dinükleotidler değil, tüm 5' ve 3' kırılma bölgeleri ve ayrıca dallanma noktasının da içinde bulunduğu diziler dikkate alınmaktadır (48, 54, 58).

2.1.2. İtron Hedeflenmesi ve Alternatif RNA Kırılması

Bir pre-mRNA'nın yapısından çıkartılacak intronların sınırlarının belirlenmesinde intron/ekzon bağlantı bölgeleri ve dallanma bölgesinde yer alan korunmuş diziler belirleyici rol oynamaktadır (46). Ancak bu korunmuş diziler RNA kırılmasının düzenlenmesi için tek başlarına yeterli değildir (59, 60). Pre-mRNA üzerindeki intronların hedeflenmesini güçlü bir şekilde etkileyen birçok farklı (non-splice) düzenleyici ekzonik ve intronik diziler bulunmaktadır. Bunlar cis-acting elemanlar olarak adlandırılırlar ve ilgili intronun kırılmasını teşvik ederler veya baskırlarlar. Ekzonların üzerinde bulunan ve kırılmayı teşvik eden diziler ESE'ler (*Exon Splicing Enhancer*), intronların üzerinde bulunan ve kırılmayı teşvik eden diziler ISE'ler (*Intron Splicing Enhancer*) olarak adlandırılır. Buna karşın, ekzonların üzerinde bulunan ve kırılma baskılayan diziler ESS'ler (*Exon Splicing Silencer*), intronlar üzerinde bulunan ve kırılmayı baskılayan diziler ISS'ler (*Intron Splicing Silencer*) olarak adlandırılır (Şekil 3) (61). ESE dizileri tarafından kırılmanın

teşvik edilmesinde bu dizilere bağlanan ve trans-acting elemanlar olarak betimlenen serin ve arjinin amino asitlerince zengin “SR proteinleri” önemli bir rol oynamaktadır (62). Ekzonlarda olduğu gibi intronlarda bulunan ISE dizilerine bağlanan ve kırılmanın teşvik edilmesinde rol alan aktivatör proteinlerin gösterilmiş olmasına rağmen bu proteinler ESE’lere bağlanan SR proteinleri kadar karakterize edilmemiştir. Ekzon ve intronların üzerinde yer alan ve kırılmanın baskılanmasında rol oynayan sırası ile ESS ve ISS dizilerine ise heterojen nükleer ribonükleer protein (hnRNP) ailesinin üyeleri bağlanmakta ve bu proteinler kırılmayı baskılamaktadır. Trans-acting eleman olan bu proteinlerin yaklaşık 20’si (hnRNPA-hnRNPU) tanımlanmıştır ve intronların alternatif RNA kırılmasında etkili oldukları gösterilmiştir (61).



Şekil 3. Kırılma düzenleyici elemanlarının şematik gösterimi. Ekzonik RNA kırılma teşvik ediciler (*ESE*) ve ekzonik RNA kırılma baskılayıcılar (*ESS*), intronik RNA kırılma teşvik ediciler (*ISE*) ve intronik RNA kırılma baskılayıcılar (*ISS*). SR proteinleri ve hnRNP'ler pozitif veya negatif düzenlemeler için cis-acting elemanlara bağlanır (Liu'dan, 63).

Alternatif RNA kırılması, bir pre-mRNA'dan farklı işlevlere sahip protein izoformlarının üretimine imkan tanıyacak şekilde farklı mRNA'ların oluşturulmasıdır (64). Alternatif olarak eklenmiş ekzonlar genellikle, 5' ve 3' kırılma dizi motiflerine sahiptir ve bu ekzonların belirlenmesinde cis-acting ESE, ISE, ESS ve ISS dizileri ile bu dizilere bağlanan trans-acting proteinler (SR protein, aktivatör, hnRNP) önemli rol oynamaktadır (62).

2.2. Kırılma Kompleksi (Splaysozom)

İntronların çıkartılarak ekzonların hatasız bir şekilde birleştirilmesinde pre-mRNA üzerinde yer alan korunmuş diziler önemli rol oynamakla birlikte RNA kırılma sürecinin başlatılması ve tamamlanması için bu diziler yeterli değildir. Kimyasal olarak basit görünmesine rağmen, RNA kırılma mekanizması çok daha karmaşıktır. RNA kırılması,

çeşitli kodlamayan küçük RNA (snRNA) ve bu RNA'larla ilişkili spesifik proteinlerin birleşimi ile oluşan snRNP'lerin belli bir sırayla pre-mRNA üzerinde bir araya gelmesiyle oluşan ve splaysozom adı verilen kompleks bir makine ile yürütülmektedir (8, 14).

Splaysozom, yapısına katılan snRNA'ya ve snRNP'ye bağlı olarak U2-tipi ve U12-tipi intronların kırılmasından sorumludur. U2 tip intronların çıkartılmasından majör splaysozom, U12 tip intronların çıkartılmasından ise minör splaysozom sorumludur (65). Majör ve minör splaysozomun yapısında yer alan proteinlerin bir kısmı farklılık gösterse de ortak kullanılan proteinler de bulunmaktadır. Bunula birlikte hem majör hem de minör splaysozomun yapılanmasına katılan proteinlerin tamamı henüz tam olarak bilinmemektedir. (6, 15)

2.2.1. Splaysozom Yapısında Yer Alan snRNA'lar

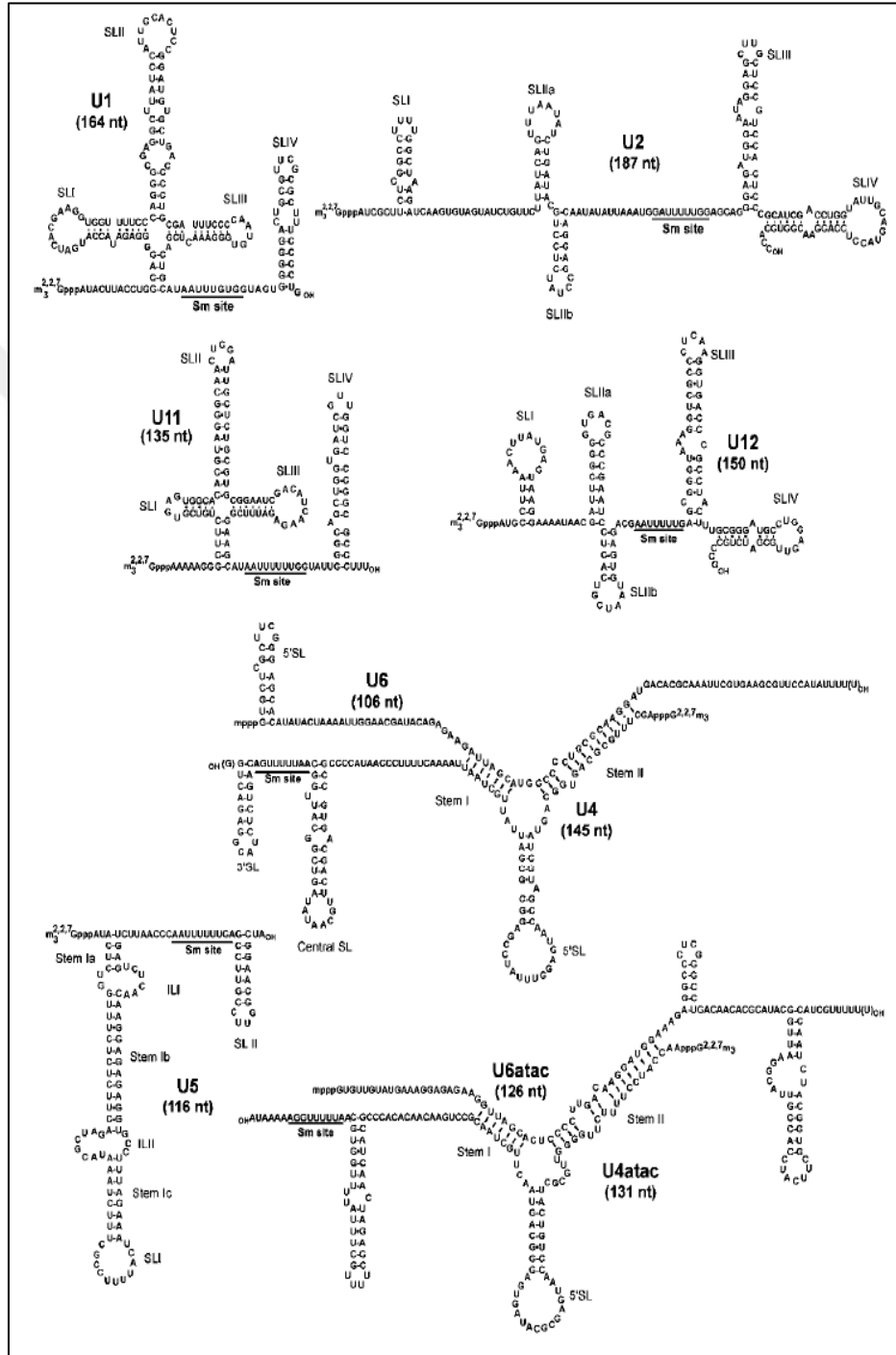
Majör ve minör splaysozomun ana bileşenleri olan snRNP'lerin temel yapısını snRNA olarak adlandırılan üridin bakımından zengin ve yaklaşık 100-187 nükleotit uzunluğunda olan küçük RNA dizileri (Şekil 4) oluşturmaktadır (66). Genomda bulunan intronların çok büyük bir kısmını U2 tip majör intronlar oluşturduğu için splaysozom ve splaysozom bileşenleri ile ilgili bilgilerin önemli bir kısmı majör splaysozom ile ilgili çalışmalardan elde edilmiştir.

Majör splaysozomların yapısında U1, U2, U4, U5 ve U6 olarak adlandırılan snRNA'lar yer almaktadır. Buna karşın minör splaysozomların yapısında U11, U12, U4atac, U5 ve U6atac snRNA'lar yer almaktadır. Görüldüğü gibi U5 snRNA hem majör hem de minör splaysozomun yapısında bulunmaktadır (67, 68).

U1, U2, U4, U11, U12, U4atac ve U5 snRNA'lar RNA Polimeraz II tarafından transkribe edilirler ve 5' uçlarına sitoplazmaya çıkışlarına aracılık edecek olan 2,2,7-trimetil guanosin (m^7G) şapka eklenir (69, 70). Bu snRNA'lar, genelde 3' uca daha yakın olacak şekilde yerleşmiş olan ve Sm dizisi olarak adlandırılan korunmuş bir diziye (AUUUUUG) sahiptirler ve bu nedenle Sm snRNA'lar olarak da adlandırılırlar (Şekil 4) (71).

U6 ve U6atac snRNA'lar ise RNA'nın 5' ucuna γ -metil trifosfat (γ -m-P3) şapka ekleyen RNA Polimeraz III tarafından transkribe edilmektedir (72, 73) ve böylece bu snRNA'lar olgunlaşma/yapılanma sürecinde sitoplazmaya çıkartılmayarak çekirdekte tutulmaktadır (74). Benzer şekilde, U6 ve U6atac snRNA'lar da Sm dizisine benzer bir

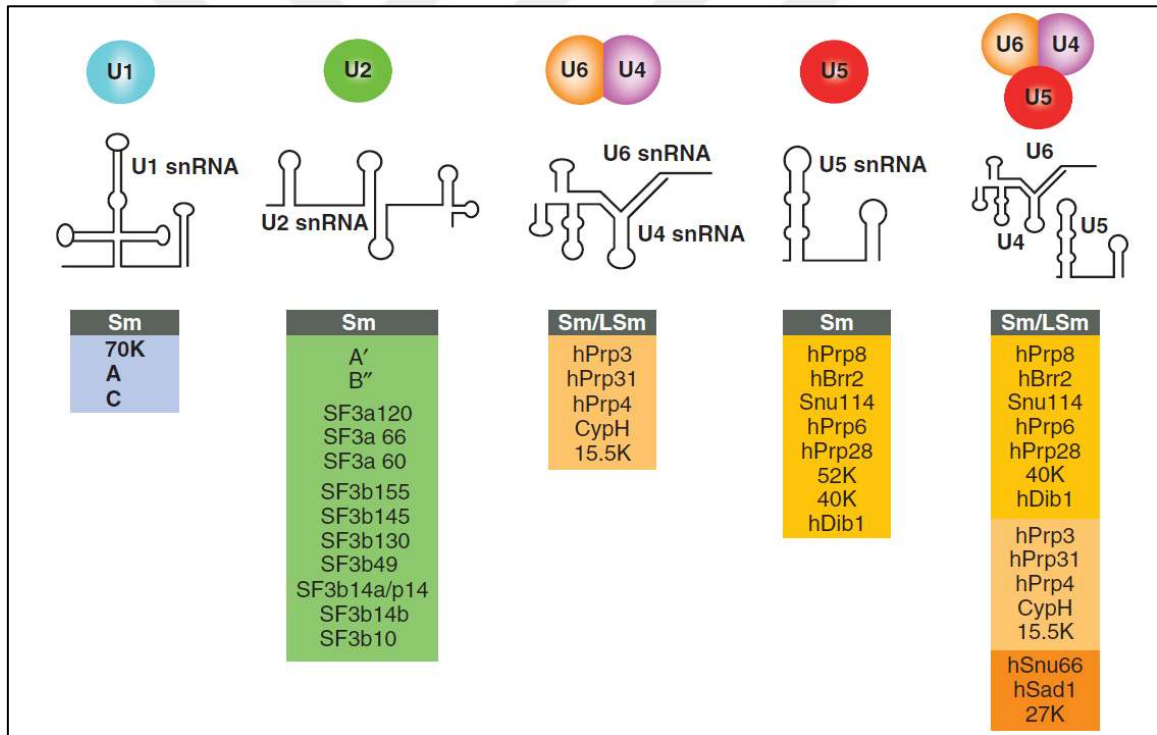
diziye sahiptirler ve bu nedenle Sm-like snRNA'lar olarak da adlandırılırlar (71). snRNA'lar, yapısına katıldıkları ve splaysozomun alt bileşenleri olan snRNP'lere adlarını verirler.



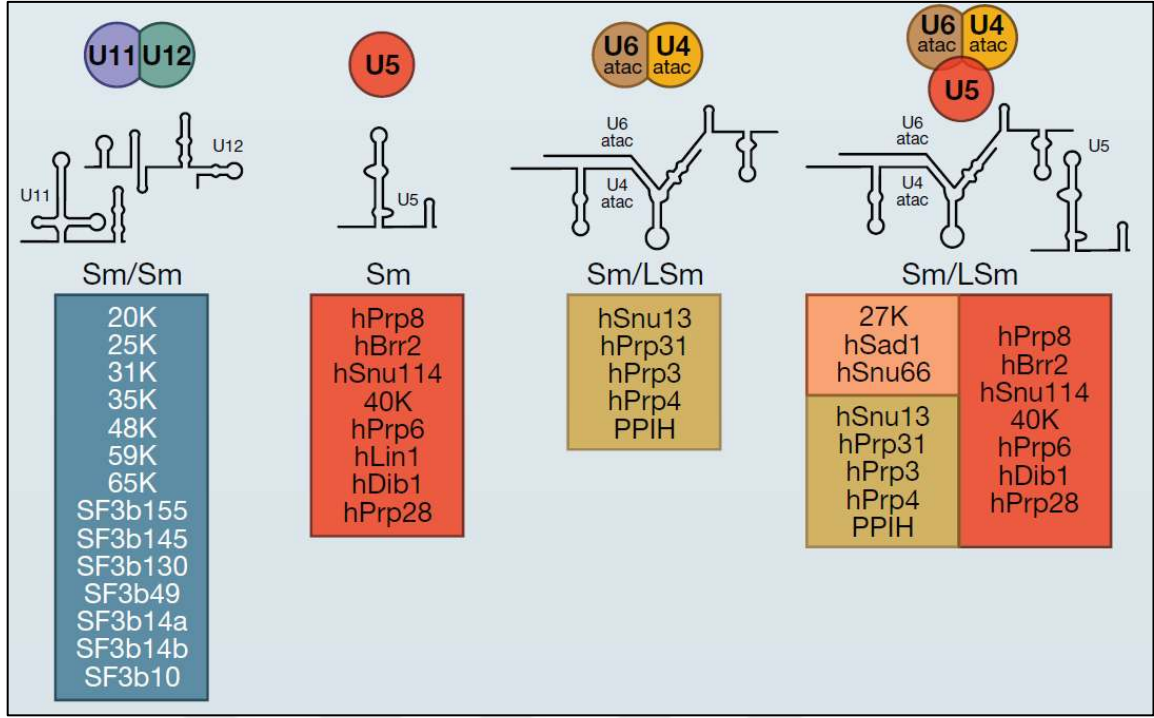
Şekil 4. Majör ve minör splaysozomal snRNA'ların baz dizilimleri ve ikincil yapıları (Will'den, 66)

2.2.2. Splaysozom Yapısında Yer alan snRNP'ler ve snRNP Biyogenezi

Majör ve minör splaysozomun yapısında bulunan her bir snRNP, özgün sekonder yapı kazanmış snRNA ve bu snRNA ile bir araya gelen ve kor protein olarak adlandırılan proteinlerden oluşmaktadır (10). Splaysozomun yapılanmasına katılan snRNP'ler yapılarında yer alan snRNA'lara göre adlandırılmaktadır. U2 tip intronların kırılmasından sorumlu majör splaysozomun yapılanmasına katılan snRNP'lerin yapısında U1, U2, U4, U5 ve U6 snRNA'lar bulunur ve bu snRNP'ler sırası ile U1, U2, U4, U5 ve U6 snRNP olarak adlandırılır (Şekil 5). U12 tip intronların kırılmasından sorumlu minör splaysozomun yapılanmasına katılan snRNP'lerin yapısında U11, U12, U4atac, U6atac snRNA'lar bulunur ve bu snRNP'ler de sırası ile U11, U12, U4atac ve U6atac snRNP olarak adlandırılır (Şekil 6) (34). U5 snRNP her iki splaysozomun da yapısında yer almaktadır.

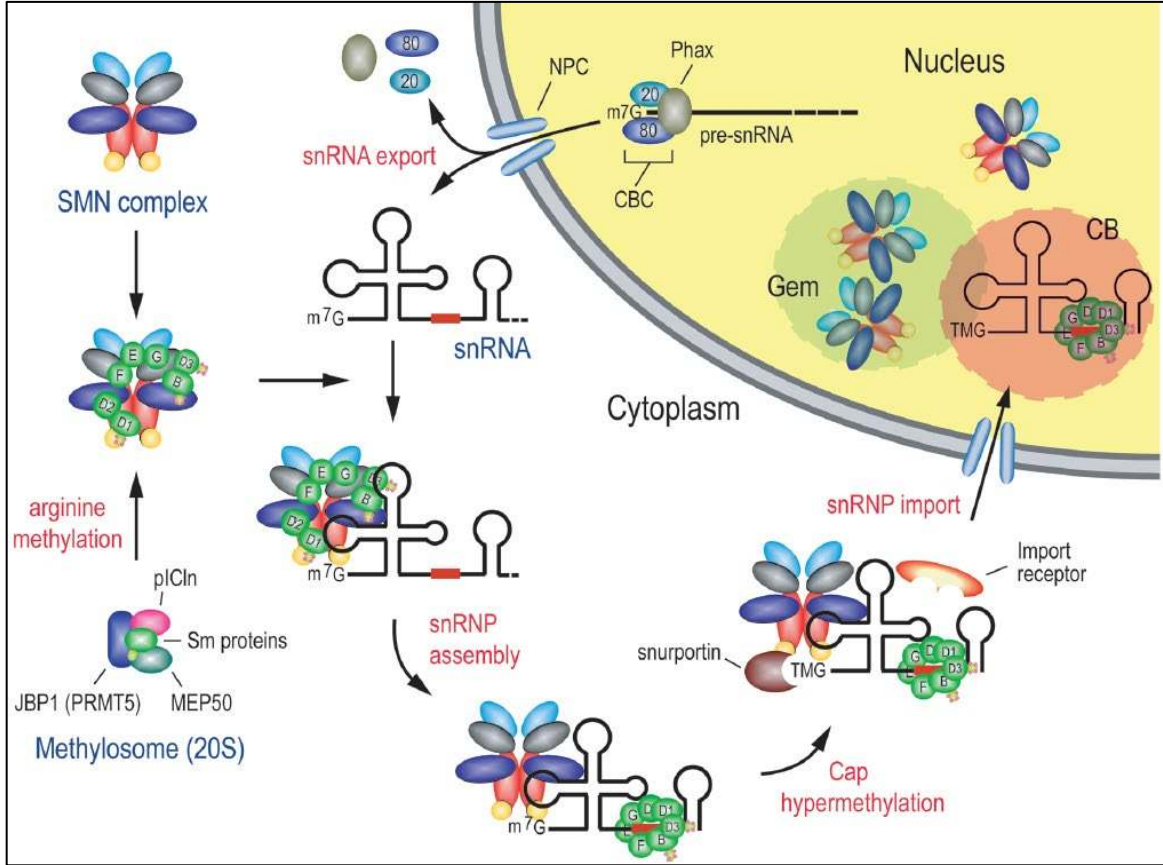


Şekil 5. Majör splaysozomal snRNP'lerin yapılarındaki RNA'ların sekonder yapıları ve ilgili kor proteinler (Will'den, 14)



Şekil 6. Minör splaysozomal snRNP'lerin yapılarındaki RNA'ların sekonder yapıları ve ilgili kor proteinler (Wahl'den, 75)

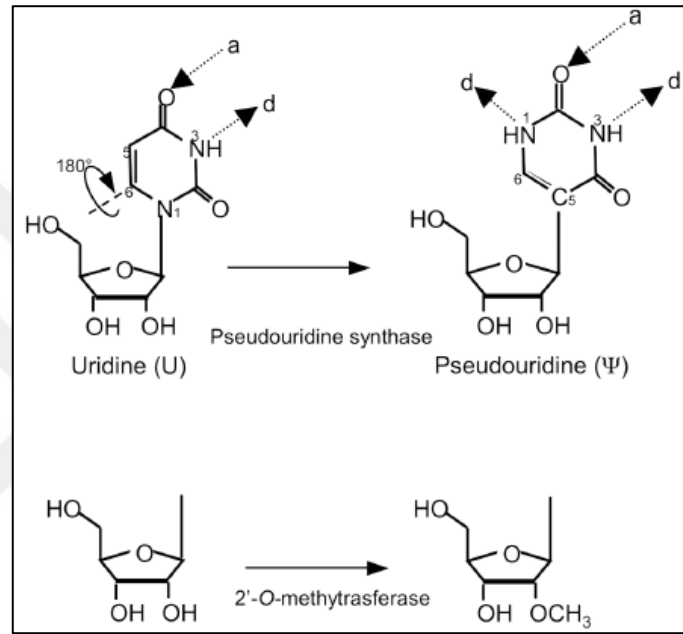
snRNP'lerin oluşumları sitoplazma ve çekirdeği kapsayan çok basamaklı bir süreçle tamamlanmaktadır (71, 76, 77). U1, U2, U4, U11, U12, U4atac ve U5 snRNA'lar sentezlendikten sonra sitoplazmaya gönderilir ve burada sahip oldukları Sm dizisine, Sm proteinleri olarak adlandırılan ve yedi proteinden (B/B', D1, D2, D3, E, F ve G) oluşan hetero-heptamerik bir halka bağlanarak, çekirdeğe gönderilecek kor snRNP oluşturulur (Şekil 7) (72, 78, 79). U6 ve U6atac kor snRNP'lerin yapılanmasında ise Sm proteinlerine benzer olan ve LSm (Like-Sm) proteinler olarak adlandırılan yedi farklı protein (LSm2, LSm3, LSm4, LSm5, LSm6, LSm7 ve LSm8) yer alır. İlk aşamada LSm proteinleri sitoplazmada LSm halkası oluşturur ve sonrasında bu halka çekirdeğe gönderilir. Çekirdeğe taşınan LSm halkaları U6 ve U6atac snRNA'lar ile çekirdekte bir araya gelerek kor U6 snRNP ve U6atac snRNP oluşturulur (74, 80, 81).



Şekil 7. RNA Polimeraz II tarafından sentezlenen snRNP'lerin sitoplazma ve çekirdekteki olgunlaştırılma aşamaları (Battle'den, 71)

Sitoplazmada oluşup çekirdeğe taşınan U1, U2, U4, U11, U12, U4atac ve U5 kor snRNP'ler ile çekirdekte oluşturulan U6 ve U6atac kor snRNP'lerin daha ileri düzeyde yapılanmaları nükleer bir alt bölge olan Cajal cisimciğinde (Cajal body) tamamlanır (82). Her bir snRNP'ye özgü olan proteinler, kor snRNP'lerin yapısına Cajal cisimciklerinde eklenir (83). Bu proteinlerin kor snRNP'lerin yapısına eklenmesinde çeşitli şaperon proteinlerinin rol aldığı gösterilmiş olmakla birlikte bu süreç tam olarak bilinmemektedir (16). Yaklaşık 100 yıl önce nöronlardaki bir nükleolar aksesuar olarak Santiago Ramón y Cajal tarafından tanımlanan Cajal cisimcikleri, daha sonra coilin proteininin keşfi ile belirginlik kazanmıştır. Cajal cisimcikleri coilinlerin bir araya gelmesiyle oluşan ve zarla çevrili olmayan yaklaşık 0.5-1.0 μm 'lik nükleolar bölgelerdir. Kor snRNP'lerin çekirdeğe aktarılmasından hemen sonra ortaya çıkan, dinamik bir yapı olan Cajal cisimciği nöronal, kanser ve embriyonik hücreler gibi yüksek oranda bölünen veya metabolik olarak aktif hücre tiplerinde gözlenebilmektedir (84). Bununla birlikte snRNP olgunlaştırılmasındaki temel aşamaların hem coilin proteininin hem de Cajal cisimciklerinin yokluğunda hala

gerçekleşebildiği gösterilmiştir (85). Bu da Cajal cisimciklerinin işlevinin RNA kırılması verimliliğini artırmak olabileceği şeklinde değerlendirilmektedir. Cajal cisimciklerinde gerçekleştirilen diğer bir olgunlaşma adımı da snRNA'larda yapılan baz modifikasyonlarıdır. Bu modifikasyonlar psödoüridinasyon ve 2'-O-riboz metilasyonudur (Şekil 8) (86, 87). Bu modifikasyonlar değiştirici enzimleri doğru hedef dizilere yönlendiren Cajal cisimciğine özgü RNA'lar (scaRNAs) tarafından yürütülür (88, 89).



Şekil 8. Splaysozomal snRNA'da modifiye edilmiş iki nükleotidin şematik gösterimi (Karijolic'den, 86)

Bu değişikliklerin işlevsel etkilerinin çoğu iyi bilinmemekle birlikte psödoüridinasyona uğrayan bölgelerin snRNA'ların aktif bölgelerini oluşturduğu ve RNA'ların konformasyonlarının stabilitesini artırdığı anlaşılmıştır (90).

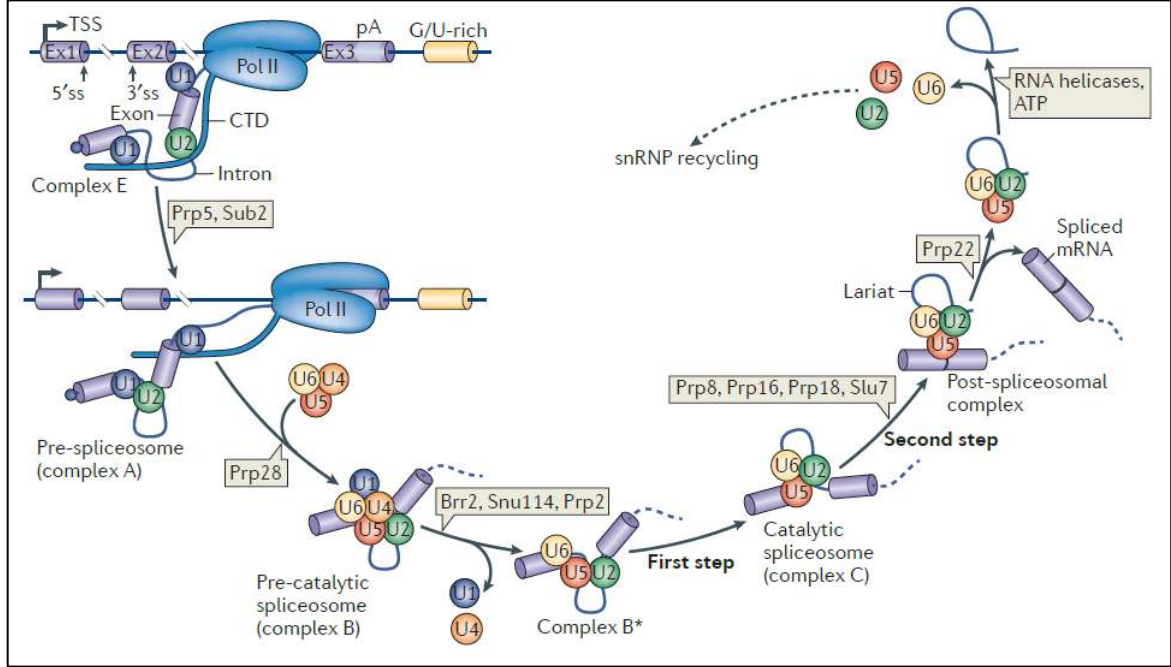
U1, U2, U11 ve U12 snRNP'lerin biyogenezi Cajal cisimciklerinde tamamlanarak nükleoplazmaya salınırlar. Buna karşın U4, U6, U4atac, U6atac ve U5 daha ileri düzeyde yapılandırılarak önce U4/U6 ve U4atac/U6atac di-snRNP'ler oluşturulur. Daha sonra U5snRNP'nin de bu di-snRNP yapılarına eklenmesiyle U4/U6·U5 tri-snRNP ve U4atac/U6atac·U5 tri-snRNP Cajal cisimciklerinde oluşturulur (72, 91-93). U4/U6·U5 tri-snRNP kompleksinin yapılandırılma sürecinin ilk aşaması olan U4 ile U6 snRNP'lerin bir araya gelmeleri LSm halkası ve SART3 proteini tarafından gerçekleştirilmektedir (94). Sonrasında, U4/U6 ile U5'in bir araya getirilerek U4/U6·U5 tri-snRNP'nin yapılandırılması

2.3.1. Majör Splaysozom ve Yapılanması

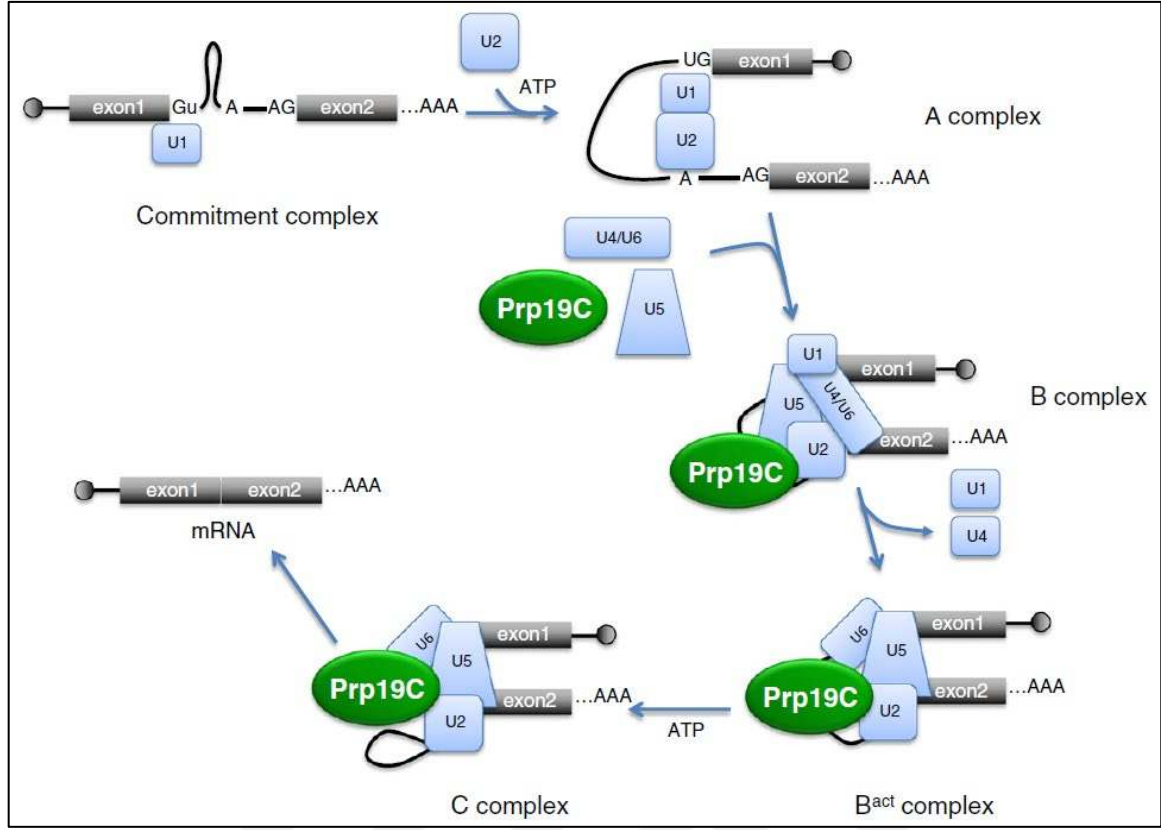
U2 tip intronların pre-mRNA yapısından çıkartılması sürecinde ilk olarak, U1 ve U2 snRNP'lerin yapısındaki snRNA'lar sırasıyla intronun 5' kırpılma bölgesine ve 3' kırpılma bölgelerindeki korunmuş dallanma bölgesine baz eşleşmesi ile bağlanır ve erken splaysozom (Kompleks E) oluşturulur. RNA'ya bağımlı ATPaz/helikaz olan Prp5 ve Sub2 proteinlerinin yardımıyla, dallanma noktasındaki adenozine bağlanan U2 snRNP ve intronun 5' ucuna bağlanan U1 snRNP etkileşerek öncü splaysozom kompleksi (Kompleks A) oluşturulur. Kompleks A'nın oluşumundan sonra, bağımsız olarak yapılan U4/U6·U5 tri-snRNP kompleksi Prp28 yardımıyla sürece dahil olur ve öncü-katalitik splaysozom (Kompleks B) oluşturulur. Sonrasında Kompleks B, çok sayıda konformasyonel ve farklı proteinlerin katılımıyla değişikliğe uğrayarak; Brr2, Snu114, Prp2 RNA helikazların da aracılığıyla U1 ve U4 snRNP'ler yapıdan ayrılır ve katalitik olarak aktif kompleks olan "Kompleks B*" oluşturulur. Ardından ilk aşamada U2, U5 ve U6 snRNP'ler yeniden düzenlenerek katalitik olarak aktif splaysozom kompleksi olan "Kompleks C" oluşturulur. İkinci aşamada ise Prp8, Prp16, Prp18 ve Slu7 proteinlerinin katkısıyla Kompleks C'den post splaysozom kompleksi oluşturulur ve intronların uzaklaşmasını sağlayan iki transesterifikasyon reaksiyonu katalizlenerek ekzonlar birleştirilir. Post splaysozom kompleksi kesilen intronla birlikte Prp22 yardımıyla yapıdan ayrılırken snRNP'ler tekrar kullanılmak üzere nükleoplazmaya salınır (Şekil 10) (43, 46, 97).

Splaysozomun yapılanması aşamasında, konformasyonunun oluşumu ve ilerleyişini düzenleyen non-snRNP kırpılma kompleksleri de kritik önem taşımaktadır. Bunlardan biri olan NTC (nineteen complex) diğer adıyla Prp19C kompleksi ve NTR (Prp19C ile ilişkili proteinler)'dir. NTC/Prp19C, *Saccharomyces cerevisiae*'da sekiz kor ve 19 adet ilişkili proteinden, yüksek ökaryotlarda ise 30'dan fazla proteinden oluşan büyük bir protein kompleksidir (98). NTC/Prp19C ve Prp19 ile ilişkili proteinler, U4/U6 ile U5'in bir araya gelerek U4/U6·U5 tri-snRNP'nin yapılanmasında ve devamında U1/U2 ile bir araya gelen tri-snRNP'nin yapısından U4 ve U1'in ayrılmasında etkili olmakla birlikte bu mekanizma tam olarak bilinmemektedir (Şekil 11). Mayada, U5 ve U6 snRNP'lerin kararlı etkileşimleri için NTC/Prp19C'nin gerekli olduğu gösterilmiştir (99). Ayrıca, NTC/Prp19C ve Prp19 ile ilişkili proteinler U5 snRNP'yi yeniden düzenleyerek splaysozomun aktif formunu kazanmasını sağlamaktadırlar. Sonuç olarak, NTC/Prp19C, splaysozomun içindeki yeniden

düzenlenmeleri kolaylaştırmak suretiyle, splaysozomun katalitik aktivasyonunda önemli rol oynar (98).



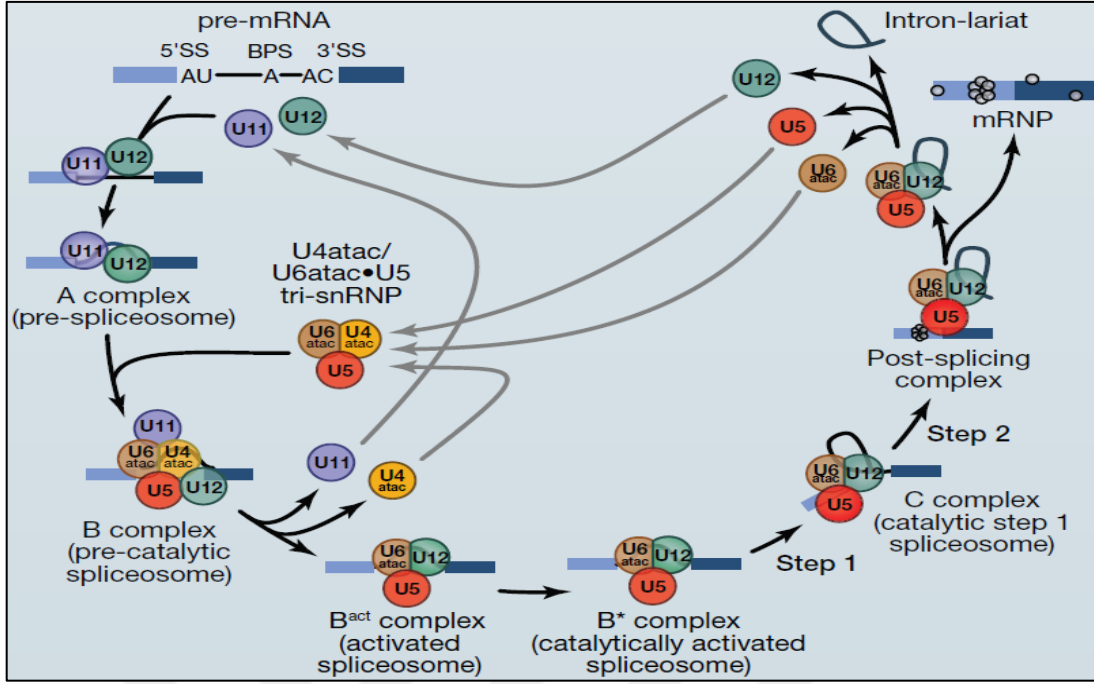
Şekil 10. Majör splaysozomun oluşum basamakları (Matera'dan, 46)



Şekil 11. Majör splaysozomun yapılanmasında non-snRNP kırılma kompleksi NTC/Prp19C'nin splaysozom ile ilişkisi (Chanarat'dan, 98)

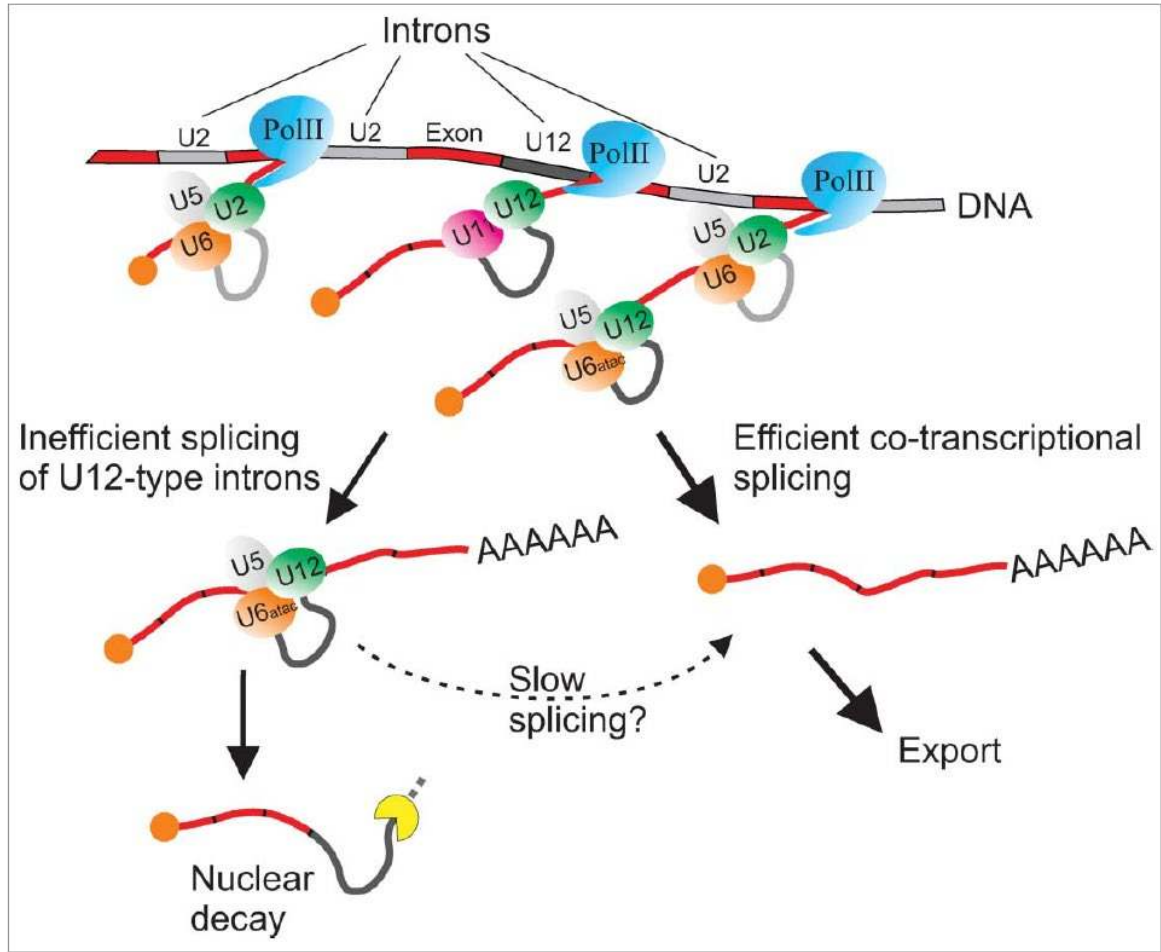
2.3.2. Minör Splaysozom ve Yapılanması

Minör splaysozomu majör splaysozomdan ayıran önemli karakteristik özelliklerden biri majör splaysozomlarda yer alan U1 ve U2 snRNP'lerin yerine kullanılan U11 ve U12 snRNP'lerin sırası ile 5' kırılma ve dallanma bölgesine bağlanmadan önce U11/U12 di-snRNP kopleksini oluşturmaları ve di-snRNP olarak pre-mRNA'ya bağlanmalarıdır (100, 101). İntron tanınmasının ardından bağımsız olarak yapılanan U4atac/U6atac·U5 tri-snRNP komplekse dahil edilerek "B Kompleksi" oluşturulur. U11 ve U4atac snRNP'lerin ayrılıp U6atac, U12 ve U5 snRNP'lerin düzenlenmesi ile "B* kompleksi" oluşturulur. Bu aşamayı takiben "Kompleks C" ve post splaysozom kompleksi oluşur. Ardından intronlar uzaklaştırılarak ekzonların birleştirilmesi gerçekleştirilir (Şekil 12) (7).



Şekil 12. Minör splaysozomun oluşum basamakları (Wahl'den, 75)

Bununla birlikte U11-U12 di-snRNP'lerin yapısında bulunan ve moleküler ağırlıklarına göre isimlendirilen 7 protein [65K (RNPC3), 48K (SNRNP48), 59K (PDCD7), 35K (SNRNP35), 31K (ZCRB1), 25K (SNRNP25) ve 20K (ZMAT5)] minör splaysozom kompleksine spesifiktir (7, 102). Ayrıca hem *in vivo* hem de *in vitro* RNA kırılma çalışmalarında U12 tip intronların çıkartılmasının U2 tip intronların kırılmasına oranla 3-5 kat daha yavaş olduğu belirlenmiştir (67, 103, 104). Bu durum, U12 tip intronların, ilgili gen ekspresyonunun düzenlenmesinde rol aldıkları şeklinde değerlendirilmiştir (103-105). U12 tip intronun daha yavaş çıkartılması, U2 tip intronların çıkartılmasına rağmen U12 tip intronun pre-mRNA üzerinde kalmasına neden olurken bu durum kırılması tamamlanmamış pre-mRNA'yı nükleer yıkılıma (nuclear decay) yönlendirmektedir (Şekil 13) (106). Bu sistem aracılığıyla olgun mRNA'ların hücresel seviyelerinin ve post-transkripsiyonel düzeyde gen ekspresyonunun kontrol edildiği düşünülmektedir (104).



Şekil 13. U12 tip intron barındıran genlerde ekspresyonun kontrolü (Niemela'dan, 106)

2.4. Tez Çalışması Öncesinde Elde Edilen Ön Veriler

Microcephalic Primordial Dwarfism (MPD), çeşitli iskelet anomalileri, karakteristik dismorfik bulgular, beyin gelişim malformasyonları, mental gelişim bozuklukları ve değişen yaşam süreleri gibi bulgulara sahip otozomal resesif kalıtım gösteren bir hastalık grubudur. Bu hastalık grubu; Seckel sendromu (OMIM: 210600), Microcephalic Osteodysplastic Primordial Dwarfism tip I/III (MOPD I/III) (OMIM: 210710), Microcephalic Osteodysplastic Primordial Dwarfism tip II (MOPD II) (OMIM: 210720) ve Meier-Gorlin sendromundan (OMIM: 224690) oluşmaktadır. Seckel sendromu tanısı konulmuş bir hastanın ailesi üzerinden gerçekleştirdiğimiz genetik haritalama çalışmaları sonucu, hastalığın 332 amino asitlik bir protein kodlayan *CCDC84* geni (NG_050577.1) üzerinde dokuzuncu intronun splice bölgesinde meydana gelen dört nükleotitik homozigot bir delesyona (g.25734_25737del; p.Lys269Serfs10Stop) bağlı olarak geliştiği gösterilmiştir.

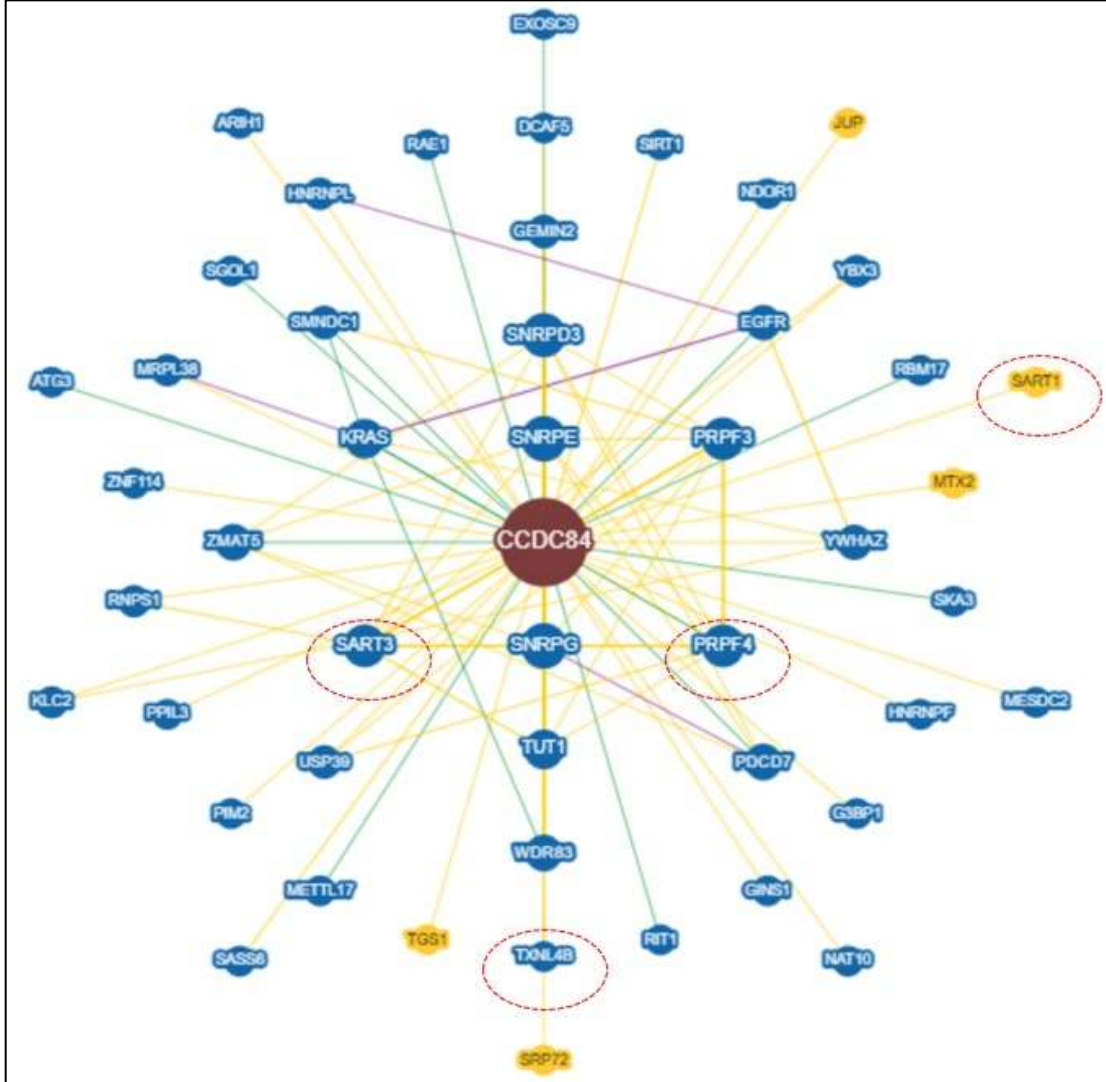
CCDC84 (Coiled-coil domain containing 84) 332 aminoasitlik bir protein (Q86UT8) olup cNLS Mapper protein üzerinde 18-50'nci amino asit kalıntıları arasında bir adet çekirdek lokalizasyon sinyal dizisi olduğunu, coiled-coil prediction programı ise protein üzerinde 23-55 ve 131-171'inci amino asit kalıntıları arasında olmak üzere iki adet coiled-coil domaini olduğunu göstermiştir (Şekil 14). CCDC84 omurgalılarda, böceklerde, denizanasında ve bitkilerde ortoloğu bulunan oldukça korunmuş bir proteindir (107, 108). Coiled-coil domaini içeren protein ailesinin üyeleri tüm proteinlerin yaklaşık %3-5'ini oluşturmaktadır (109). İki veya daha fazla α -heliksten oluşan coiled-coil domain içeren proteinlerin hücre sinyali düzenlenmesinde (110, 111), DNA tamir mekanizmasının düzenlenmesinde (112, 113), mikrotübül organizasyonu (114), hücre proliferasyonu (115) ve gen ekspresyonunun düzenlenmesi (116) gibi çok çeşitli temel hücrel mekanizmalarda rol oynadıkları gösterilmiştir.

```
MAPAQRCPLCRQTFFCGR18GHVYS23RKHQRQLKEALERLLPQVEAARKAIRA50AQV  
ER55YVPEHERCCWCLCCGCEVREHLSHGNLTVLYGGLLEHLASPEHKKATNKF  
WWENKAEVQMKEKFLVTPQDYARFKK131SMVKGLDSYEEKEDKVIKEMAAQIREVEQS  
RQEVVRSVLE171PQAVPDPEGSSAPRSWKGMNSQVASSLQQPSNLDLPPAPELDWM  
ETGPSLTFIGHQDIPGVGNIHSGATPPWMIQDEEYIAGNQEIGPSYEEFLKEKEKQKLK  
KLPPDRVGANFDHSSRTSAGWLPSFGRVWNNGRRWQSRHQFKTEAAAMKKQSHT  
EKS
```

Şekil 14: CCDC84'ün *in silico* analizi. Protein üzerinde tespit edilen çekirdek lokalizasyon sinyal dizisi kırmızı ile, coiled-coil domainleri oluşturan diziler ise sarı ile renklendirildi. İlgili bölgelerin başlangıç ve bitiş pozisyonları alt simge olarak rakamla gösterildi.

Anabilim dalımızda gerçekleştirilen bir doktora tez çalışması kapsamında CCDC84'ün, U4 snRNP'nin kor proteini olan PRPF3 ile doğrudan etkileştiği ve RNA kırılma mekanizmasının bir bileşeni olduğu gösterildi (36). Bununla birlikte, protein-protein etkileşim bilgilerinin yer aldığı BioGRID veri tabanında yapılan analizde, CCDC84'ün RNA kırılmasında görevli 20 den fazla proteinle *in vivo* etkileşiminin tanımlandığı görüldü (Şekil 15) (117). Bu tez çalışması kapsamında BioGRID verilerine göre CCDC84 ile etkileşebilecekleri önerilmiş olan splaysozomun kurulumunda görev alan PRPF4, TXNL4B, SART3 ve SART1 (Snu66)'in CCDC84 ile *in vitro* ve *in vivo* etkileşimlerinin araştırılması ve CCDC84'ün üzerinde tanımlanan mutasyonun bu

etkileşimler üzerine etkisi analiz edilerek MPD ile ilk kez ilişkilendirmiş olduğumuz CCDC84'ün RNA kırılma sürecindeki rolünün araştırılması amaçlanmıştır.



Şekil 15. CCDC84 ile etkileşimi yönünde ön veriler bulunan proteinler (BIOGRID, 117)

2.5. Pre-mRNA Processing Factor 4 (PRPF4) ve Fonksiyonu

PRPF4'ün ortoloğu olan Prp4, mRNA RNA kırılmasında görevli olduğu ilk defa *Schizosaccharomyces pombe* maya suşunda tanımlanmış bir serin/arjinine zengin spesifik kinazdır. Sıcaklığa duyarlı Prp4 mutant maya suşunda, RNA kırılma defektlerinin olduğu ve eksikliğinde pre-mRNA'ların yapısından intronların çıkarılamadığı görülmüştür (118). Daha sonraları HeLa cDNA kütüphanesinden, maya Prp4'ün homoloğu olan insan *PRPF4*'ü klonlanmıştır (119). *PRPF4* tarafından kodlanan bu proteinin U4/U6 di-snRNP'nin

kararlılığını düzenlediği gösterilmiştir (23, 120). U4/U6 di-snRNP kararlılığı, proteinin C terminalindeki yedi adet WD40 domain tekrarının diğer proteinlerle etkileşimi ile sağlanmaktadır (121). PRPF4, U4/U6 di-snRNP'nin kor proteinlerinden olan PRPF3 ile doğrudan etkileşmektedir (122). Aynı zamanda, mayalarda Prpf4'ün kinaz aktivitesi sayesinde Prp1p ve Prp5p RNA kırılma faktörlerini aktive ederek aktif splaysozom oluşumunu teşvik etmektedir (123). *PRPF4* üzerinde tanımlanan mutasyonlar, otozomal dominant olarak kalıtılan Retinos Pigmentosa'ya (RP) sebep olmaktadır (Tablo 1) (23).

2.6. Thioredoxin-Like Protein 4B (TXNL4B) ve Fonksiyonu

TXNL4B, 156 amino asitten oluşan küçük bir protein olup Dim2 olarak da adlandırılmaktadır (124). Son yıllarda yapılan çalışmalarla TXNL4B'nin PRP6 ile doğrudan etkileştiği ve bu etkileşim engellendiğinde U2 tip intronların kırılmasında ve hücre döngüsünde S/G2 geçişinin bozulduğu gösterilmiştir (125). Ancak, TXNL4B'nin rolü hakkında daha ileri düzeyde bilgi bulunmamaktadır. TXNL4B ile aynı aileden olan ve TXNL4B'ye yüksek oranda homoloji gösteren TXNL4A (Dim1) splaysozom kompleksinde U5 snRNP'nin yapısında bulunan ve bu nedenle U5-15 kD olarak adlandırılan 142 amino asitlik küçük bir proteindir (126). TXNL4A ilk kez *S. pombe*'de tanımlanmış, ardından kardeş kromatitlerin ayrılması ve Anaphase-Promoting Complex (APC) ile ilişkilendirilerek mitozaya giriş için gerekli olduğu anlaşılmıştır (127). Ardından *S. cerevisiae*'de TXNL4A'nın, U4/U6·U5 tri-snRNP yapılanmasında rol aldığı ve Prp6 ile doğrudan etkileştiği belirlenmiştir (92, 128). TXNL4B herhangi bir hastalıkla ilişkilendirilmemiştir. TXNL4A'nın eksikliği ise otozomal resesif kalıtılan Burn-McKeown sendromu ile ilişkilendirilmiştir (Tablo 1) (129, 130).

2.7. Spliceosome Associated Factor 1 (SART1) ve Fonksiyonu

SART1 ilk defa *Squamous* hücrelerinden gelişen karsinomlarda, sitotoksik T lenfositler tarafından tanınan tümör-reddi antijeni kodlayan bir gen olarak tanımlanmıştır (131). *SART1* geni, 800 ve 259 amino asitlik olmak üzere iki farklı protein kodlamaktadır (131). Daha sonra bu iki proteinin, splaysozomun yapılanma aşamasında U4/U6·U5 tri-snRNP yapılanmasında gerekli olduğu anlaşılmıştır (132). Yapılan çalışmalarda 800 amino asitlik izoformunun yokluğunda U4/U6·U5 tri-snRNP yapılanmasının gerçekleşmediği, ilave çalışmalarla da U6 ve U4/U6 snRNP'nin bir bileşeni olduğu anlaşılmıştır. Bu proteinin, U6 snRNA'yı tanıyıp bağlandığına ve U6 snRNA'nın olgunlaşma ve modifikasyon aşamasının bir bileşeni olabileceğine dair kanıtlar bulunmaktadır (132). U4 snRNP'nin kor

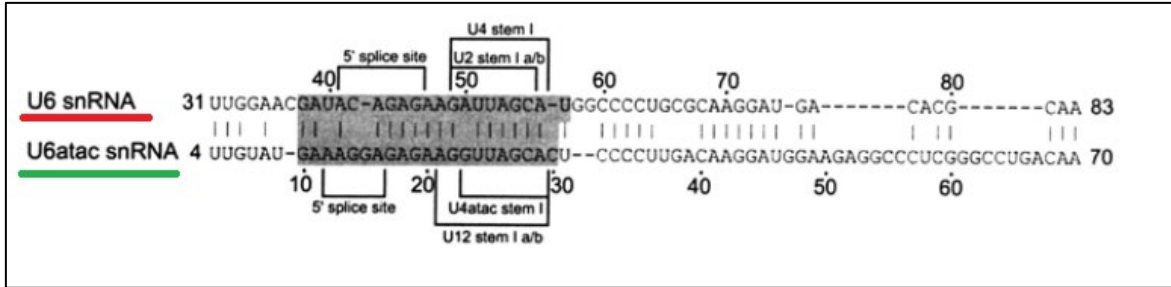
proteini olan PRPF3, U4/U6·U5 tri-snRNP yapılanmasında etkili olan SART1 ve PRPF6 ile doğrudan etkileşerek stabilizasyonu arttırmaktadır (133).

2.8. Spliceosome Associated Factor 3 (SART3) ve Fonksiyonu

Diğer bir adıda Squamous Cell Carcinoma Antigen Recognized By T-Cells 3 olan SART3 proteinin maya ortoloğu olan Prp24'ün ilk olarak U4 ve U6 snRNA ile etkileştiği ve PRP24/U4/U6 kompleksini oluşturduğu aynı zamanda U4 ile U6 snRNP'nin yeniden kullanılmak üzere kompleksi ayırır (134-137). *SART3* geni 963 amino asitlik protein kodlamaktadır ve ilk olarak herhangi bir spesifik fonksiyon olmaksızın KIAA0156 olarak keşfedilen (138) bu protein daha sonraları SART3, p110, p110^{mr} ve Tip110 gibi değişik isimlerle adlandırıldı (139). Ardından U6 snRNA izolasyonları sırasında bu proteine rastlanmış ve karboksi ucunda bulunan iki adet RNA tanıma motifi ile *in vitro* koşullarda mRNA'ya bağlanabildiği tespit edilmiştir (140). Proteinin N-ucunda yedi adet HAT (half-a-tetratricopeptide) tekrarının ardından iki nükleer lokalizasyon sinyal dizisi, iki RRM (RNA tanıma motifi) ve karboksi ucunda yüksek düzeyde korunmuş LSm (C10) bağlanma domaini bulunmaktadır (Resim 3) (140). Yapılan çalışmalarda organizmanın genelinde eksprese edilen bu proteinin, viral-konakçı gen ekspresyonu (141), hücre canlılığı, proliferasyonu ve farklılaşması (142-144), protein yıkımı (145, 146), mRNA RNA kırılması (94, 139) gibi birçok farklı biyolojik süreçte rol aldığı gösterildi. SART3 kanser immünterapisi için potansiyel bir antijen olarak önerilmekte ve mutasyonları cilt hastalıklarıyla ilişkilendirilmektedir (147, 148). Ayrıca SART3'ün *Drosophila* ve *Zebrafish*'te embriyonik gelişim için gerekli olduğu gösterilmiştir. İnsan embriyonik ve hematopoetik kök hücrelerinin *in vitro* koşullarda kök hücre popülasyonunun korunmasında ve hayatta kalmasında önemli olduğu bulunmuştur. Bununla birlikte transgenik fare çalışmalarında *SART3*^{-/-} farelerin yaşama bağdaşamadığı tespit edilmiştir (27).

SART3'ün majör splaysozomun yapılanmasında gerekli olan U4/U6·U5 tri-snRNP ve minör splaysozomun yapılanmasında gerekli olan U4atac/U6atac·U5 tri-snRNP'nin oluşturulmasının başlatılmasında hayati bir önemi vardır (95, 139). Cajal cisimciklerinde yapılandırılan bu kompleksin oluşumundaki ilk adım olarak nitelendirebileceğimiz U4/U6 di-snRNP oluşması, U6 snRNA'daki yedi LSm (LSm2-LSm8) proteini ve SART3 tarafından yürütülen bir adım ile sağlanır (139). SART3 bu işlemi gerçekleştirmek üzere RRM domaini aracılığıyla U6 snRNA'nın G38-ACAGAG-U57 bölgesiyle, U6atac snRNA'nın ise G10-C30 bölgesiyle etkileşime girmektedir (Şekil 16) (95, 139). Ardından

U4 snRNP'nin kor proteini olan PRPF31 ile U5 snRNP'nin kor proteini olan Prpf6 arasındaki etkileşim sonucu U4/U6·U5 tri-snRNP oluşturulur (Şekil 9A) (94). Bu süreçte SART3'ün diğer bir önemli görevi ise deubikütinaz olan USP4 ve USP15'i ortama getirerek U4/U6 di-snRNP kompleksinin bileşenleri olan ve ubikütinlenmiş olan PRPF3 ve PRPF31 üzerindeki ubikütinlerin uzaklaştırılmasını sağlamaktır. PRPF31'in ubikütinlenmesi ve deubikütinlenmesi U5 snRNP'nin bileşeni olan PRPF8 ile olan etkileşimini artırarak ve sonrasında azaltarak splaysozomun kurulumunda ve katalitik olarak aktif splaysozomun oluşumunda önemli bir yere sahiptir (149). Özetle bu aşamada, SART3, deubikütinazları substrata hedefleyerek splaysozom oluşumunda önemli bir rol üstlenmektedir.



Şekil 16. SART3'ün U6 ve U6atac snRNA üzerindeki bağlanma bölgesi (Damianov'dan, 95)

2.9. Splaysozom Bileşenleri ile İlişkilendirilen Hastalıklar

snRNP'lerin temel bileşenleri olan kor proteinleri, snRNA'ları ve snRNP'lerin yapılanmalarında görev alan proteinleri kodlayan genlerin bir kısmının mutasyonları çeşitli nadir hastalıklarla ilişkilendirilmiştir (Tablo 1) (17, 23, 133, 150-152). Bu hastalıklardan en iyi bilineni, snRNP'lerin sitoplazmada başlayan yapılanmasının ilk aşamasında kritik öneme sahip olan SMN (*Survival of Motor Neuron*) kompleksinin bileşenlerinden biri olan ve *SMN1* geni tarafından kodlanan SMN proteininin eksikliği sonucu gelişen, otozomal resesif kalıtılan SMA (Spinal Muscular Atrophy)'dır (OMIM: 253300) (153).

snRNP'lerin kor bileşenleri (protein ve snRNA) ve yapılanmalarını yöneten proteinleri kodlayan genler üzerinde gösterilen mutasyonların büyük bir çoğunluğu dominant kalıtım göstermektedir. Buna karşın, bu genlerden PRPF3 (31), SART3 (27), PRPF6, PRPF8, SART1 (32) ve PRPF31'in (33) knock-out fare modellerinden homozigot mutant genotipe sahip olanların yaşama bağdaşmadıkları görülmüştür. Bu genlerden

SART3, PRPF6, PRPF8 ve PRPF31'in heterozigotluğunda ise farelerde herhangi bir anomali gözlenmezken, heterozigot *knock out* SART1 farelerde metabolik ve immün fonksiyon bozuklukları görülmüştür (32). Bu nedenle, insanlarda heterozigotluk durumunda görülen fenotipik bulgular tek allelin yetersizliği (haploinsufficiency) şeklinde değerlendirilmektedir. Bu bulgular, splaysozom bileşenlerinin tamamen yokluğunun tolere edilemediğini, heterozigotluğunun ise fenotipik değişikliklere neden olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, RNA kırılma mekanizmasında rol oynayan proteinlerin henüz tamamı tanımlanmamış ve tanımlanmış olan proteinleri kodlayan genlerin de önemli bir kısmı hastalıklarla ilişkilendirilmemiştir (23, 133, 150-152).

Splaysozomu oluşturan snRNP'lerin temel bileşenleri olan kor proteinlerin eksikliği başta göz olmak üzere çeşitli organlarda tutulumlara sebep olmaktadır. Bu bileşenlerin splaysozomun temel elamanları olmalarına rağmen, özellikle RP'ye sebep olmasının altında yatan mekanizma henüz açıklanamamıştır. Aynı durum kor proteinler dışında kalan düzenleyici proteinler için de geçerlidir. Bütün bu veriler, dokuya özgü olabilecek bir aktivitenin varlığını düşündürmektedir. Diğer taraftan, SMA hastalığının tedavisinde kullanılan ajanın, RNA kırılma mekanizmasını hedeflemesi ve RNA kırılma sürecinin daha ayrıntılı bir şekilde araştırılmasına dikkat çekmektedir.

Tablo 1. Hastalıklarla ilişkilendirilmiş splaysozom bileşenleri. AD: Otozomal Dominant, AR: Otozomal Resesif

Gen Adı	snRNP	Hastalık	Kalıtım	OMIM
SNRPB	U1, U2, U4 ve U5	<i>Cerebrocostomandibular syndrome</i>	AD	117650
SNRPE	U1, U2, U4 ve U5	<i>Hypotrichosis 11</i>	AD	615059
SF3B1	U2	<i>Myelodysplastic syndrome</i>		614286
SF3B4	U2, U11/U12 di-snRNP	<i>Nager syndrome</i>	AD	154400
SART3	U4/U6 di-snRNP	<i>Disseminated superficial actinic porokeratosis type 1</i>	AD	(27)
PRPF31	U4/U6 di-snRNP	<i>Retinitis Pigmentosa 11</i>	AD	600138
PRPF3	U4/U6 di-snRNP	<i>Retinitis Pigmentosa 18</i>	AD	601414
PRPF4	U4/U6 di-snRNP	<i>Retinitis Pigmentosa 70</i>	AD	615922
TXNL4A	U5	<i>Burn-Mckeown Syndrome</i>	AR	611595
Brr2/snRNP	U5	<i>Retinitis pigmentosa 33</i>	AD	610359
PRPF6	U5	<i>Retinitis pigmentosa 60</i>	AD	613983
EFTUD2/ SNU114	U5	<i>Mandibulofacial dysostosis, Guion-Almeida type</i>	AD	610536
PRPF8	U5	<i>Retinitis Pigmentosa 18</i>	AD	600059
CWC27		<i>Metaphyseal Chondrodysplasia With Retinitis Pigmentosa</i>	AR	250410
EIF4A3		<i>Richieri-Costa-Pereira Syndrome</i>	AR	268305
SMN1		<i>Spinal Muscular Atrophy</i>	AR	253300
FUS/TLS		<i>Amyotrophic Lateral Sclerosis</i>	AD/AR	608030
USB1		<i>Poikiloderma with neutropenia</i>	AR	604173
RNU4ATAC	U4atac snRNA	<i>Microcephalic Osteodysplastic Primordial Dwarfism Type 1 (MOPD1)</i>	AR	210710
RNU12	U12 snRNA	<i>Cerebellum Ataxia</i>	AR	(154)

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Kimyasallar

Agar	Merck, 1.016.130.500
Agaroz	Lonza, 50004
Akrilamid (29:1) %40	Bio-Rad, 161-0146
Amonyumpersülfat (APS) (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈)	Sigma, A9164
Ampisilin	Sigma, A9518-5G
Bacto Tripton	Conda, 1612
Beta merkaptotanol	Merck, 8.057440.0250
Bromofenol mavisi	Merck, 1.08122.005
Coomasie Brilliant Mavisi R-250	Sigma, 112553
Deoksiniükleotit trifosfat (dNTPs)	Promega, U1420
Dithiothreitol (DTT- C ₄ H ₁₀ O ₂ S ₂)	Thermo scientific, R0861
Di-sodyum hidrojen fosfat dihidrat (Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O)	Merck, M1065801000
Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM)	Thermo, 41965-039
EDTA disodyum dihidrat (Na ₂ EDTA.2H ₂ O)	AppliChem, A2937.0500
Etidyum bromid (C ₁₂ H ₂₀ N ₃ Br)	Sigma, E-7637
Etil alkol (C ₂ H ₅ OH)	AppliChem, A 8075,1000
Fetal bovine serum (FBS)	Gibco, 10500064
Glasiyel asetik asit (C ₂ H ₄ O ₂)	Merck, 1.00056.2500
Glisin	Chemcruz, sc-29096
HEPES (C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S)	Sigma, H0887
Hidroklorik asit (HCl)	Merck, 1.00314.2500
IPTG	Sigma, I6758
İzopropanol	Appllichem, A3928,0500PE
Kalsiyum klorür (CaCl ₂)	Merck, 910TA654681
Kanamisin	Sigma, 60615-5G
L-Arabinoz	BioShop Canada, ARB222
Orange G	Sigma, O-1625
Oligonükleotit primer	Macrogen
Paraformaldehit (HO(CH ₂ O) _n H)	Sigma, P6148

Penisilin/Streptomisin	Thermo, 15140-122
PMSF (Phenylmethylsulfonyl fluoride)	Sigma, 1741932998611
Potasyum hidrojen karbonat (KHCO ₃)	AppliChem, A2375.1000
Potasyum fosfat monobazik	Sigma, NIST200B
Prolong GOLD Antifade mounting media	Thermo Fisher, P36935
Proteinaz K	Promega, V3021
Sephadex®G-50	Sigma, S5897-25G
SigmaFAST Protease inhibitör karışımı	Sigma, S8830-20TAB
Sodium phosphate dibasic (KH ₂ PO ₄)	Sigma, NIST200B
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Merck, 822050
Sodyum florür (NaF)	Sigma, S7920
Sodyum hidroksit (NaOH)	Merck, 1.06462
Sodyum klorür (NaCl)	Merck, 1.01540.0500
Sodyum orthovanadate (Na ₃ VO ₄)	Sigma, S6508
Sodyum pyrophosphate (NaPPi-Na ₄ O ₇ P)	Sigma, P8010
Sodyum karbonat (Na ₂ CO ₃)	Merck, 106392
TEMED	AppliChem, A1148
Tris-Baz (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	Sigma, T6791
Tris-HCl (C ₄ H ₁₂ N ₄ O ₃)	Sigma, 93363
Triton X 100	Sigma, 9002-93-1
Tween 20	J.T.Baker, 73-74
Yeast extract	Merck, VM445253 224

3.1.2. Polimerazlar

GoTaq® Flexi DNA polymerase	Promega, M8305
Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA polymerase	Thermo, F549S
Pwo DNA polymerase	Roche, 11644947001

3.1.3.DNA markırlar

100 bp DNA ladder	NEB, N3231L
Gene ruler 1 kb DNA ladder	Thermo scientific, SM0311

3.1.4. Antikorlar

3.1.4.1. Primer Antikorlar

Goat-Anti-CCDC84 polyclonal	Santa Cruz, sc246197
Mouse-Anti Coilin monoclonal	Santa Cruz sc55594
Mouse-Anti-FLAG M2 monoclonal	Sigma-Aldrich, F3165-1MG
Mouse-Anti-Myc- monoclonal	Sigma-Aldrich, M4439
Rabbit-Anti-CCDC84 polyclonal	Abcam, ab150860
Rabbit-Anti-CCDC84 polyclonal	Abcam, ab212858
Rabbit-Anti-GST polyclonal	Santa Cruz, sc-459
Rabbit-Anti-PRPF4 polyclonal	Abcam, ab198998
Rabbit-Anti SART1 polyclonal	Abcam, ab181867
Rabbit-Anti SART3 polyclonal	Abcam, ab155765
Rabbit-Anti TXNL4B polyclonal	Abcam, ab213536

3.1.4.2. Sekonder Antikorlar

Anti- Mouse-Alexa Fluor 488	Abcam, ab150117
Anti-Mouse-Cy3	Abcam, ab97035
Anti-Mouse-HRP	Bio-Rad, 170-5047
Anti-Rabbit- Alexa Fluor 488	Abcam, ab150061
Anti- Rabbit -Cy3	Abcam, ab6939
Anti-Rabbit-HRP	Bio-Rad, 170-5045
Prolong Gold Mounting Media (DAPI)	Life Technologies, P36935

3.1.5. Rezinler

Anti-FLAG M2 Affinity Gel	Sigma, A2220
GST-Trap_Agarose	Chromotek, sta-20
Mouse IgG Agarose	Sigma, A0919

3.1.6. Besiyeri ve Antibiyotikler

DMEM (4.5 g/L Glukoz)	Thermo, 41966029
DMEM (1 g/L Glukoz)	Thermo, 31885023
Penisilin/streptomisin	Thermo, 1514022
Puromisin	Thermo, A1113803

3.1.7. Kitler ve Enzimler

BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Thermo, 4337455
Clarity™ Western ECL Substrate	BIORAD, 1705060
DreamFect Gold Transfection Reagent	Ozbiosciences, DG81000
E.Z.N.A.® Endo-free Plasmid DNA Mini Kit	Omegabiotek, D6950-01
E.Z.N.A.® Plasmid DNA Mini Kit I	Omegabiotek, D6943-01
Gateway® BP Clonase® II Enzyme mix	Thermo, 11789-020
Gateway® LR Clonase® II Enzyme mix	Thermo, 11791-100
Lipofectamine RNAiMAX Transfection Reagent	Thermo, 13778
PCR clean-up Gel Extraction Kit	Macherey-Nagel, 740609.50
Precision Plus Protein™ Dual Color Standards	BIORAD, 1610374
RNeasy Mini Kit	Qiagen, 74104
SuperScript® III First System	Thermo, 18080-051
Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit	Roche, 04896866001

3.1.8. siRNA'lar

siRNA-CCDC84	Thermo, siRNA ID:s50369
siRNA-SART3	Thermo, siRNA ID:s18772
siRNA-PRPF3	Thermo, siRNA ID:s17434
Silencer™ Select Negative Control No. 1 siRNA	Thermo, 4390843

3.1.9. Diğer Sarf Malzemeler

Falkon tüpler (15 ve 50 mL)	Isolab, Fransa
Kültür flaskı (25 ve 75 cm ²)	Corning, ABD
Mikrosantrifüj tüpler (1.5 mL)	Ependorf, Almanya
Pipet uçları	Axygene, ABD
PVDF membran	BIORAD, 1620177
Serolojik pipetler (5, 10 ve 25 mL)	SPL, Güney Kore
Steril pastör pipeti	Isolab, Fransa
Whatman kağıdı 3mm	GE-Healthcares, 3030-861
6 kuyulu tabak	Corning, ABD
60 mm petri kabı	Corning, ABD
100 mm petri kabı	Corning, ABD

3.1.10. Cihazlar

Accuri C6 Flow Sitometri	Becton Dickinson, ABD
Bulaşık makinesi	Bosch, Almanya
Buzdolabı (4 °C)	Bosch, Almanya
Buz makinesi	Hoshaizaki, Japonya
ChemiDoc MP görüntüleme sistemi	BIO-RAD, ABD
CO ₂ 'li Etüv	Heraeus, Almanya
Çalkalayıcı inkübatör	GFL, Almanya
Derin dondurucu (-20 °C)	Bosch, Almanya
Dikey elektroforez ve immünblot sistemi	BIORAD, ABD
Distile su cihazı	GFL, Almanya
Doğru akım güç kaynağı (300 volt)	BIORAD, ABD
Floresan mikroskop	Nikon E80, Japonya
Genetik analizör cihazı	ABI 3130, ABD
Hassas terazi	OHAUS, ABD
İnverted mikroskop	Nikon, Japonya
Jel görüntüleme sistemi	Gel Logic 2000, ABD
Lazer Taramalı Konfokal mikroskop sistemi	Leica, Germany
Manyetik karıştırıcı	IKA, ABD
Merdaneli karıştırıcı	Stuart, İngiltere
Mikrodalga fırın	Arçelik MD554, Türkiye
Mikrosantrifüj	Hettich, Almanya
Mikrosantrifüj	Thermo IEC, ABD
Orbital karıştırıcı	Nüve SL 350, Türkiye
Otoklav	Tutnauer 3150 ELV, İtalya
Pastör fırını	Memmert, Almanya
pH metre	Hanna, Portekiz
Santrifüj	Eppendorf 5810, Almanya
Sıcak su banyosu	Stuart, İngiltere
Sınıf II steril kabinler	Metisafe, Türkiye
Sıvı azot tankı	Thermo Scientific, ABD
Soğutmalı santrifüj	Eppendorf 5804R, Almanya
Sonikatör VCX500	Sonics-Vibracell, ABD

Spektrofotometre	Eppendorf, Almanya
Termomikser	Eppendorf, Almanya
Thermal Cycler	Gene Amp 9700, ABD
Thermal Cycler	Techne TC512, İngiltere
Vakum pompası	Isolab, Fransa
Vorteks	IKA, ABD
Yatay elektroforez düzeneği	HU13, İngiltere
Zaman ve hız ayarlı döner çember	Stuart, İngiltere
-80 °C dondurucu	Thermo Scientific, ABD

3.1.11. Bakteri Suşları

Tez çalışmasında plazmitlerin oluşturulması ve çoğaltılması esnasında transformasyon işlemi için *E. coli*'nin çeşitli suşları kullanıldı (Tablo 2). DNA giraz inhibitörü olan *ccdB* geni taşıyan boş plazmitlerin çoğaltılması için DB3.1 bakteri suşu kullanılırken klonlanması istenen dizileri taşıyan plazmitlerin çoğaltılması için DH5α suşu kullanıldı. pDEST17-6XHis ve pGEX-KG-DEST-GST vektörleri kullanılarak *in vitro* ekspresyon gerçekleştirmek için sırası ile L-arabinozla indüklenebilen BL21-AI ve IPTG ile indüklenebilen BL21-DE3 *E. coli* suşları kullanıldı.

Tablo 2. Kullanılan bakteri suşları ve genotipleri

Bakteri Suşu	Genotip
DH5α	F- recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+) supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1
DB3.1	F- gyrA462 endA1 Δ(sr1-recA) mcrB mrr hsdS20(rB-, mB-) supE44 ara14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(Smr) xyl5 Δleu mtl1
BL21-DE3	fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] ΔhsdS λ DE3 = λ sBamHIo ΔEcoRI-B int::([lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21 Δnin5
BL21-AI	F- ompT gal dcm lon hsdSB(rB-mB-) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5]) [malB+]K-12(λS)

3.1.12. Klonlamada Kullanılan Boş Vektörler

Tez çalışmasında klonlanması hedeflenen gen ve gen bölgelerine ait diziler Gateway klonlama (Gateway Cloning) sistemi plazmitleri kullanılarak giriş ve ekspresyon klonları oluşturuldu (Tablo 3).

Tablo 3. Kullanılan boş vektörlere ait bilgiler

Vektör İsmi	Hedef Organizma	Antibiyotik Direnci	N-ucu Etiket	Vektör Uzunluğu
3XFLAG-p3XFLAG-CMV/DEST	Memeli	Ampisilin-	FLAG	8025 bp
pcDNA3myc/DEST	Memeli	Ampisilin -	Myc	7260 bp
pDEST27-GST	Memeli	Ampisilin -	GST	7860 bp
pGEX-KG/DEST/GST	Bakteri	Ampisilin -	GST	7000 bp
pDEST17/6XHis	Bakteri	Ampisilin -	His	6360 bp
pDEST14	Bakteri	Ampisilin -	-	6422 bp
pDNOR201	Bakteri	Kanamisin	-	4470 bp

3.1.13. Çözeltiler, Tampon ve Besiyerleri

3.1.13.1. Bakteri Kültürleri İçin Kullanılan Besiyerleri

Luria Bertani (LB) Sıvı Besiyeri (1 L)

800 mL ddH₂O içinde 10 g sodyum klorür, 5 g maya özütü ve 10 g tripton çözüldü. Çözelti, pH'sı 7'ye ayarlandıktan sonra 1000 mL'ye tamamlandı ve 121 °C'de otoklavlandı.

Luria Bertani Agar (LB Agar) Besiyeri

200 mL LB sıvı besiyerine 3 g (%1.5) agar eklenerek 121 °C'de 20 dakika süre ile otoklavdı. Otoklavlanan LB agar 50-55 °C'ye ayarlı su banyosunda soğutulduktan sonra üzerine uygun miktarda antibiyotik (50 µg/mL kanamisin veya 100 µg/mL ampisilin) ilave edilerek karıştırıldıktan sonran petri kaplarına dağıtıldı.

3.1.13.2. Bakteri İndüklemeye Kullanılan Ajanlar

100 mM Stok Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) (10 mL)

10 mL otoklavlanmış ddH₂O içerisinde 0.238 g IPTG çözüldü ve 0.22 µm'lik filtreden geçirildi. Çözelti -20 °C'de saklanmak üzere 1 mL olacak şekilde eppendorf tüplere dağıtıldı.

%20 Stok L-Arabinoz (100X, 10 mL)

10 mL steril ddH₂O içinde 2 g L-Arabinoz çözüldü. Çözelti 0.22 µm'lik filtreden geçirilerek steril edildi ve -20 °C'de saklanmak üzere 1 mL olacak şekilde eppendorf tüplere dağıtıldı.

3.1.13.3. Agaroz Jel Elektroferezinde Kullanılan Çözeltiler

Tris-Asetat-EDTA (TAE) Tamponu (50X, 1 L)

800 mL ddH₂O üzerine 242 g Tris baz (Mw: 121.14 g/mol), 100 mL 0.5 M EDTA (pH:8.0) ve 57.1 mL glasiyal asetik asit eklendikten sonra manyetik karıştırıcıda Tris baz çözünene kadar karıştırıldı. Sonrasından pH 8.5'e ayarlandı ve son hacmi ddH₂O ile bir litreye tamamlandı.

Etidyum Bromür (1 mL)

10 mL steril ddH₂O'de 0.1 g etidyum bromür çözüldü. Kullanılmak üzere ışıktan korunmasını sağlayacak renkli bir plastik kap içinde muhafaza edildi.

Orange G DNA Yükleme Tamponu (10X, 25 mL)

20 mL ddH₂O'da 10 g süktroz çözüldü ve üzerine 0.05 g Orange G çözüldükten sonra hacim 25 mL'ye tamamlandı.

3.1.13.4. SDS-PAGE Solüsyonları

SDS-PAGE Yürütme Tamponu (1X, 1 L)

890 mL ddH₂O'ya 100 mL 10X Tris-Glisin tamponu ve 10 mL %10'luk SDS çözeltisi eklenerek hazırlandı.

1.5 M Tris-HCl (pH 8.8, 200 mL)

180 mL ddH₂O'da 36.33 g Tris baz (Mw:121.14 g/mol) çözüldü ve pH'sı 8.8'e ayarlandı. Çözeltinin son hacmi ddH₂O ile 200 mL'ye tamamlandı. 0.2 µm'lik filtreden geçirilen çözelti kullanılmak üzere oda sıcaklığında tutuldu.

0.5 M Tris-HCl (pH 6.8, 100 mL)

90 mL ddH₂O'da 6.057 g Tris baz (Mw:121.14 g/mol) çözüldü ve pH'sı 6.8'e ayarlandı. Çözeltinin son hacmi ddH₂O ile 100 mL'ye tamamlanarak 0.22 µm'lik filtreden geçirildi ve kullanılmak üzere oda sıcaklığında muhafaza edildi.

%10 Sodyum Dodesil Sulfat (SDS) (200 mL)

150 mL ddH₂O'da 20 g SDS (Mw: 288.37 g/mol) çözülerek son hacim ddH₂O ile 200 mL'ye tamamlandı. Çözelti kullanılmak üzere oda sıcaklığında muhafaza edildi.

Tris Glisin Tamponu (10X, 1 L)

1000 mL ddH₂O'da 30.3 g Tris baz (Mw:121.14 g/mol) ve 144 g glisin (Mw: 75.07 g/mol) çözülerek hazırlandı ve kullanılmak üzere oda sıcaklığında saklandı.

%10 Amonyum Persülfat (APS) (1 mL)

1 mL ddH₂O'da 100 mg APS (Mw: 228.18 g/mol) çözüldü ve 4 °C'de en fazla yedi gün saklandı.

SDS-PAGE Yükleme Tamponu (5X, 10 mL)

2.5 mL 1M Tris-HCl (pH: 6.8) üzerine 5 mL Gliserol ve 0.001 g bromofenol mavisi eklenerek son hacim ddH₂O ile 10 mL'ye tamamlanır. Hazırlanan tampon 1 mL olacak şekilde eppendorf tüplere bölündü ve -20 °C'de saklandı. Kullanılmadan önce, 1 mL tamponun üzerine son konsantrasyonu 0.5 M olacak şekilde 0.077 g DTT eklendi.

3.1.13.5. Western Blot Solüsyonları

SDS-PAGE Transfer Tamponu (1 L)

800 mL ddH₂O üzerine 100 mL 10X Tris-Glisin tamponu ve 100 mL metanol eklenerek hazırlandı.

%20 Tween-20 (100 mL)

80 mL ddH₂O içinde 20 mL Tween 20 eklenerek hazırlandı. Hazırlanan çözelti 4 °C'de saklandı.

PBS Stoğu (10X, 1L)

800 mL ddH₂O içinde 80.06 g NaCl (Mw:58.44 g/mol), 1,99 g KCl (Mw 74.56 g/mol), 14.196 g Na₂HPO₄ (Mw 141.96 g/mol), 2.395 g KH₂PO₄ (Mw 136.09 g/mol) çözüldü. 1 N HCl ile pH 7.4'e ayarlandı ve son hacim ddH₂O ile 1000 mL'ye tamamlandı.

1X PBS-Tween 20 (PBST) (1X, 500 mL)

450 mL ddH₂O üzerine 50 mL 10X PBS tamponu ve 1250 µL %20'lik Tween 20 solüsyonu eklenerek (Tween-20'nin son konsantrasyonu %0.05 olur) hazırlanan çözelti oda sıcaklığında saklanır.

TBS Stoğu (10X, 1 L, pH 7.6)

800 mL ddH₂O içinde 24 g Tris HCl (Mw: 157.60 g/mol), 5.6 g Tris-baz (Mw:121.14 g/mol), 88 g NaCl (Mw: 58.44 g/mol) çözüldü. Oluşan çözeltini pH'sı 12 N HCl ile 7.6'ya ayarlandı ve son hacim ddH₂O ile 1000 mL'ye tamamlandı.

1X TBS-Tween 20 (TBST) (1X, 500 mL)

450 mL ddH₂O üzerine 50 mL 10X TPBS tamponu ve 1250 µL %20'lik Tween 20 solüsyonu eklenerek (Tween-20'nin son konsantrasyonu %0.05 olur) hazırlanan çözelti oda sıcaklığında saklanır.

3.1.13.6. İmmünpresipitasyonda Kullanılan Solüsyonlar

1M Tris-HCl (200 mL, pH 7.2)

180 mL ddH₂O içinde 24.22 g Tris baz (Mw:121.14 g/mol) çözüldü. 12 N HCl ile pH 7.2'ye ayarlandı ve son hacim ddH₂O ile 200 mL'ye tamamlandı. Otoklavlanan çözelti oda sıcaklığında saklandı.

5M NaCl (100 mL)

90 mL ddH₂O içinde 29.22 g NaCl (Mw: 58.44 g/mol) çözüldü ve ddH₂O ile son hacim 100 mL'ye tamamlandı. Otoklavlanan çözelti oda sıcaklığında saklandı.

0.5 M Na₂EDTA (100 mL, pH 8.0)

60 mL ddH₂O üzerine 16.81 g Na₂EDTA (Mw: 336.24 g/mol) eklendi ve 10 M'lık NaOH ile pH 8'e ayarlanarak çözelti hazırlandı. ddH₂O ile çözeltinin son hacmi 100 mL'ye tamamlandı ve otoklavlanarak oda sıcaklığında saklandı.

%20 Triton X-100 (10 mL)

8 mL ddH₂O üzerine 2 mL Triton X-100 eklendi ve 37 °C'ye ayarlı su banyosunda bekletilerek homojen hale gelmesi sağlandı. Homojen hale gelen çözelti oda sıcaklığında saklandı.

Sodyum Orthovanadate (NaVan) 200 mM (100X, 100 mL)

90 mL ddH₂O içinde 3.68 g Na₃VO₄ (Mw: 183.91 g/mol) çözüldü ve 1 N NaOH veya 1 N HCL ile çözeltinin pH'sı 10.0'a ayarlandı. pH 10'a ayarlandığından rengi sarı olan çözelti tekrar kaynatılarak oda sıcaklığına kadar soğutuldu ve pH'sı 10'a ayarlandı. Bu işlem oda sıcaklığında pH'sı 10 olup berrak kalana kadar devam edildi. Oda sıcaklığına kadar soğutulup pH'sı 10'a ayarlandıktan sonra da berrak kalan çözeltinin son hacmi ddH₂O ile 100 mL'ye tamamlandı. Sonrasından çözelti eppendorf tüplere alikotlanarak -20 °C'de saklandı.

Sodyum Florür (NaF) 1M (50X, 100 mL)

100 mL ddH₂O içinde 4.2 g NaF (Mw: 41.99 g/mol) çözüldü. Sonrasından, 1 mL'lik eppendorf tüplere alikotlanan çözelti -20 °C'de stoklandı.

Sodyum PyroPhosphate (NaPPi) 100 mM (10X, 100 mL)

100 mL ddH₂O içinde 4.44 g NaPPi (Mw: 444.06 g/mol) çözüldü. Sonrasından, 1 mL'lik eppendorf tüplere alikotlanan çözelti -20 °C'de stoklandı.

PMSF 100 mM (100X, 10 mL)

10 mL etanol içinde 0.174 g PMSF (Mw: 174.19 g/mol) çözüldü. Sonrasından, 1 mL'lik eppendorf tüplere alikotlanan çözelti -20 °C'de stoklandı.

Proteaz İnhibitör Kokteyli (10X, 20 mL)

20 mL ddH₂O içinde iki adet SigmaFast Proteaz İnhibitor Kokteyl tableti (Sigma-Aldrich, S8830) çözüldü. Sonrasından, 1 mL'lik eppendorf tüplere alikotlanan çözelti -20 °C'de stoklandı.

TNTE Hücre Patlatma Tamponu (1X, 10 mL)

TNTE hücre patlatma tamponu; 50 mM Tris-Cl (pH 7.4), 150 mM sodyum klorür, 1 mM EDTA (pH 7.0), %0.5 Triton X-100, 5 mM NaPPi, 1X proteaz inhibitör kokteyli (PI), 2 mM NaVan, 20 mM NaF, 1 mM PMSF olacak şekilde hazırlandı.

İmmünpresipitasyon Yıkama Tamponu (10 mL)

Yıkama tamponu; 50 mM Tris-Cl (pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 8.0, %0.1 Triton X-100 olacak şekilde hazırlandı.

0.2 M Glisin-HCl (100 mL, pH 2.5)

60 mL ddH₂O içerisinde 1.5 g glisin çözüldü. Çözeltinin pH'sı 12 N HCl kullanılarak 2.5'e ayarlandı. Çözeltinin son hacmi, ddH₂O ile 100 mL'ye tamamlandı ve sonrasında otoklavlanarak steril edildi.

3.1.13.7. İmmünfloresanda Kullanılan Solüsyonlar

%4 Paraformaldehit (PFA) (100 mL, pH 7.2)

Beher içerisinde 80 mL PBS ve 4 g paraformaldehit (Mw: 30.03) manyetik karıştırıcı yardımıyla 60 °C'de karıştırıldı. Çözülmenin gerçekleşmesi için çözeltiliye 100 µL 1N NaOH eklendi. Paraformaldehit çözüldükten sonra, 1 N HCl ile pH 7.2'ye ayarlandı. PBS ile son hacim 100 mL'ye tamamlandı. Çözelti steril edilmek için 0.2 µm'lik filtreden geçirildi.

İmmünfloresan Bloklama Solüsyonu (10 mL)

9 mL PBS üzerine 1 mL ticari keçi serumu ilave edilerek %10'luk 10 mL keçi serumu bloklama solüsyonu hazırlandı.

İmmünfloresan Permeabilizasyon Solüsyonu (%0.02 Triton X 100)

9.9 mL PBS çözeltisi üzerine daha önceden hazırlanmış %20'lik Triton X 100'den 0.1 mL eklenerek hazırlandı.

3.1.13.8. Memeli Hücre Kültüründe Kullanılan Solüsyonlar

%10 FBS-DMEM-Penisillin/Streptomisin Besiyeri (100 mL)

90 mL DMEM besiyerine 10 mL FBS ve %1 pen/strep (100 U/mL penisilin-100 U/mL streptomisin) eklenerek hazırlandı.

3.1.13.9. Transfeksiyon Solüsyonları

HEPES (2X, 100 mL, pH 7.05)

90 mL ddH₂O içinde 0.8 g NaCl, 0.027 g Na₂HPO₄.2H₂O ve 1.2 g HEPES çözüldü. 0.5 N NaOH ile pH 7.05'e ayarlandı ve ddH₂O ile son hacim 100 mL'ye tamamlandı. Çözelti 0.2 µm'lik filtreden geçirilerek 10 mL'lik alikotlara bölünerek kullanılabilecek kadar -20 °C'de saklandı.

2.5 M CaCl₂ (200 mL)

200 mL ddH₂O içinde 73.5 g CaCl₂ (Mw: 147.02 g/mol) çözüldü. 0.2 µL'lik filtreden geçirilerek steril edildikten çözelti alikotlar halinde kullanılabilecek kadar -20 °C'de saklandı.

3.2. Yöntem

3.2.1. Gateway Sistemi ile Klonlama

3.2.1.1. Klonlanması Hedeflenen Gen ve Gen Bölgelerinin PCR ile Amplifikasyonu

Genlerin klonlama çalışmalarında Gateway klonlama sistemi kullanıldı (155). Klonlamada ilk olarak SART3, SART1, PRPF4, TXNL4B, SF3A3, SF3B4 ve RNPC3, SART3-domainleri cDNA kütüphanesinden, minigenler ise genomik DNA'dan amplifiye edildi. Amplifikasyonda, hedef dizinin 5' ucuna özgü olan ve attB1 kuyruk dizisi (ggggacaagttgtacaaaaagcaggcttc atg) taşıyan ileri primer ve 3' ucuna özgü olan attB2 kuyruk dizisi (ggggaccactttgtacaagaaagctgggtc tca) taşıyan geri primer dizileri kullanıldı (Tablo 4). Belirlenen her bir bölgenin amplifikasyonu, proofreading aktivitesi olan Phusion Hot Start Taq polimeraz kullanılarak aşağıda verildiği şekilde gerçekleştirildi. Kalıp olarak, gen amplifikasyonda cDNA, gen bölgesi için daha önceden oluşturulmuş plazmitler, minigen çalışmaları için genomik DNA kullanıldı.

PCR Karışımı

	<u>1X (µL)</u>
5X HF veya GC tamponu	5
dNTP karışımı (10 mM)	0.5
Pr F (10 pmol/µL)	1
Pr R (10 pmol/µL)	1
Phusion hot start taq pol.	0.25
cDNA (200ng/µL) veya gDNA (500ng/µL)	2
dH ₂ O	15.25
Toplam	25

PCR Koşulları

	<u>Sıcaklık (°C)</u>	<u>Süre</u>	
Başlangıç denatürasyonu	98	30 s	
Denatürasyon	98	10 s	
Bağlanma	61-68	1 dk	} 30 Döngü
Sentez	72	1.5 dk	
Son sentez	72	10 dk	

Tablo 4. PRPF4, SART1, TXNL4B, SART3, SF3A3, SF3B4, RNPC3, SART3 domainleri ve minigenlerin Gateway sistemi ile klonlanmasında kullanılan *attB* kuyruklu primer dizileri.

Pr. no	Primer dizisi (5'-3')	Primer adı
1026	ggggacaagttgtacaaaaagcaggct tc atggcgccggcgagcgcgtgccctc	<i>CCDC84_GW_attB1</i>
1027	ggggaccactttgtacaaaaagctgggt c tca ttagctttttctgtatgtgactgtcttc	<i>CCDC84_GW_attB2</i>
1263	ggggacaagttgtacaaaaagcaggct tc atggcttctcgcgagcctcttc	<i>PRPF4_GW_attB1</i>
1264	ggggaccactttgtacaaaaagctgggt c tca ctattcagcatccacagcttgaaggtc	<i>PRPF4_GW_attB2</i>
1265	ggggacaagttgtacaaaaagcaggct tc atggggtcgtccaagaagcatc	<i>SART1_GW_attB1</i>
1266	ggggaccactttgtacaaaaagctgggt c tca tcacttggtgatgtgttcg	<i>SART1_GW_attB2</i>
1267	ggggacaagttgtacaaaaagcaggct tc atggcgactcggccgaaacctc	<i>SART3_GW_attB1</i>
1268	ggggaccactttgtacaaaaagctgggt c tca tcaattctcagaacagcttgcaaatcg	<i>SART3_GW_attB2</i>
1269	ggggacaagttgtacaaaaagcaggct tc atgagcttctactgcccaag	<i>TXNL4B_GW_attB1</i>
1270	ggggaccactttgtacaaaaagctgggt c tca ctgagcttctgtagagaaggtcatattg	<i>TXNL4B_GW_attB2</i>
1340	ggggacaagttgtacaaaaagcaggct tc atggactacaaagacatgac	<i>Flag_attB1</i>
1413	ggggacaagttgtacaaaaagcaggct tc gcgactcggccgaaacctc	<i>SART3 (1-365aa)- GW_attB1</i>
1414	ggggaccactttgtacaaaaagctgggtc tcatgcttgatattctgccagcttg	<i>SART3 (1-365aa)_attB2</i>
1415	ggggacaagttgtacaaaaagcaggct tc gctgctggcttgagaaagtc	<i>SART3 (241-702aa)_attB1</i>
1416	ggggacaagttgtacaaaaagcaggct tc catggtgacaccagcactg	<i>SART3 (521-963aa)_attB1</i>
1417	ggggaccactttgtacaaaaagctgggtc tca gctgctgctgctgctgctgcagcac	<i>SART3 (241-702aa)_attB2</i>
1515	ggggacaagttgtacaaaaagcaggct tc cgagatccctccaaaatcaagt	<i>GAPDH_MiniGen_attB1</i>
1516	ggggaccactttgtacaaaaagctgggt c tca tcatagagtcctccacgataccaaag	<i>GAPDH_MiniGen_attB2</i>
1541	ggggacaagttgtacaaaaagcaggct tc atggagacaatactggagcagcag	<i>SF3A3_GW_attB1</i>
1546	ggggaccactttgtacaaaaagctgggt c tca ctgagcagtcctgtctttcagatcctc	<i>SF3A3_GW_attB2</i>
1547	ggggacaagttgtacaaaaagcaggct tc atggctgcccggcgatcccgagcggaatcag	<i>SF3B4_GW_attB1</i>
1548	ggggaccactttgtacaaaaagctgggt c tca ttactgagggagaggcctcgaagtggcctc	<i>SF3B4_GW_attB2</i>
1553	ggggacaagttgtacaaaaagcaggct tc aagctttggagggcattgttc	<i>GPA1_MiniGen_attB1</i>
1554	ggggaccactttgtacaaaaagctgggt c tca ctgtgatggggaggggtac	<i>GPA1_MiniGen_attB2</i>
1691	ggggacaagttgtacaaaaagcaggct tc tctgagagcagctccagagcag	<i>MSTIR_MiniGen_attB1</i>
1692	ggggaccactttgtacaaaaagctgggt c tca tagctgcttctccgccaccagtag	<i>MSTIR_MiniGen_attB2</i>
1740	ggggacaagttgtacaaaaagcaggct tc ccttccaaacgcagaagggtcag	<i>SART3 (641-963aa)_attB1</i>
1741	ggggacaagttgtacaaaaagcaggct tc tcatcaaatggcaatcagcaac	<i>SART3 (870-963aa)_attB1</i>
1743	ggggacaagttgtacaaaaagcaggct tc gccgcggtcctcagttgc	<i>SART3 (935-963aa)_attB1</i>
1744	ggggaccactttgtacaaaaagctgggt c tca ctaagggttgctgattgccactttgatg	<i>SART3 (641-878aa)_attB2</i>
1853	ggggacaagttgtacaaaaagcaggct tc atggcagctcccgagcagc	<i>RNPC3_GW_attB1</i>
1854	ggggaccactttgtacaaaaagctgggt c tca ttaacactttcttctcctcc	<i>RNPC3_GW_attB2</i>

Başlama (atg) ve stop kodonları (tca, tta) koyu, *attB1* ve *attB2* dizileri italik olarak gösterildi.

3.2.1.2. PCR Ürünlerinin Agaroza Jelde Yürütülmesi ve Saflaştırılması

PCR ile elde edilen ampliconlar agaroz jelde yürütüldü. Yürütme sonrasında ampliconlar jelden kesilerek PCR Clean-up Gel Extraction kiti kullanılarak saflaştırıldı.

3.2.1.3. Giriş (Entry) Klonların Oluşturulması

Klonlanması hedeflenen genleri ve gen bölgelerini pDONR201 donör vektörüne aktarmak için *attB* uçlu PCR ürünleri agaroz jelden saflaştırıldıktan sonra *attB* x *attP* (BP) rekombinasyon reaksiyonu üretici firmanın talimatları doğrultusunda BP Clonase enzimi kullanılarak yapıldı (155). BP reaksiyon karışımı kısaca aşağıda gösterildiği şekliyle oluşturuldu.

BP Reaksiyonu**Miktar (μL)**

pDONR201 donör vektörü (35 ng/μL)	1
PCR Ürünü (25 ng/μL)	3
BP Clonase II enzimi	1
Toplam	5

BP rekombinasyon reaksiyonu buz üzerinde hazırlandı. İlk olarak, pDONR201 donör vektörü ve PCR ürünü PCR tüpünde karıştırıldı. Ardından karışımın üzerine nazikçe vortekslenen BP Clonase enzim karışımından yukarıda belirtilen miktardaki hacim eklendi. Tüp hafifçe vortekslenildikten sonra santrifüj ile çöktürülerek 90 dakika 25 °C’de bekletildi. BP reaksiyonunu sonlandırmak için her bir örneğe 1 μL Proteinaz K eklenerek 10 dakika 37 °C’de inkübe edildi. Süre sonunda, oluşturulan rekombinant giriş vektörlerinin tamamı DH5α suşunu transforme etmek için kullanıldı (Bkz. Başlık: 3.2.1.4.). Antibiyotik (Kanamisin, 50 μg/mL) içeren petrilere ekilen transforme edilmiş bakteriler 37 °C’ye ayarlanmış inkübatörde 12-16 saat inkübasyona bırakıldı. Petride oluşan kolonilerden seçim yapılarak kanamisin antibiyotiği içeren sıvı besiyerinde 12-16 saat inkübe edildi. Sıvı besiyerinde çoğaltılan bakterilerden 5 mL alınarak plazmit izolasyonu yapıldı (Bkz. Başlık: 3.2.1.5.). İzole edilen plazmitler %0.8’lik agaroz jelde yürütüldü ve dizilenerek kontrol edildi (Bkz. Başlık: 3.2.1.6.).

3.2.1.4. *E. coli* Transformasyonu

Süperkompetan *E. coli* DH5α suşu buz üzerine transfer edildi ve “ısı şoku” yöntemi ile transformasyonu gerçekleştirildi (156). Transformasyon için 50 μL *E. coli* DH5α kompetan bakteri üzerine 0.1 μg vektör eklendi ve hafifçe karıştırılarak her 10 dakikada bir nazikçe karıştırılmak üzere 30 dakika buz üzerinde bekletildi. Süre sonunda eppendorf tüpler içindeki bakteriler 60 saniye 42 °C’de bekletildi. Bakteriler 1-2 dakika buz üzerinde bekletildikten sonra her bir örneğin üzerine 1 mL S.O.C veya LB besiyeri ilave edildi. Örnekler 60 dakika süreyle 220 rpm’e ayarlı çalkalayıcı etüvde 37 °C’de inkübe edildi. Ardından bakteriler 10000 rpm’de 30 saniye santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı ve pelleti 1mL LB besiyeri ile yıkandı. Yıkama ikinci kere tekrarlandı. İkinci yıkamadan sonra pellet üzerine 50 μL LB besiyeri eklenerek bakteriler resüspanse edildi ve uygun antibiyotik içeren (50 μg/mL kanamisin veya 100 μg/mL ampicilin) LB-Agara ekildi. Bakterilerin ekildiği petrilere, transforme olan bakterilerin koloni oluşturabilmesi için 14-15 saat 37 °C’de inkübe edildi.

3.2.1.5. Plazmit İzolasyonu

Yaklaşık 15 saat 37 °C’de imkûbe edilen petrilerde büyüyen kolonilerden 4-5’i öze ile seçilerek çoğaltılmak üzere uygun antibiyotik eklenmiş (50 µg/mL kanamisin veya 100 µg/mL ampisilin) ve 15 ml’lik falkon tüplere dağıtılmış 6 mL LB besiyerine transfer edildi. 220 rpm’de 14-15 saat 37 °C’de çoğalmaya bırakılan bakterilerin 600 nm dalga boyunda OD (optical density) değerlerinin 2.0-3.0 arasında olması beklendi. OD değeri 2.0-3.0 arasında olan kültüründen plazmid izolasyonu için 5-4 mL kullanıldı. Memeli hücrelerinin transfeksiyonu için kullanılacak plazmidlerin izolasyonu E.Z.N.A. Endo-free Plasmid DNA Mini Kit kullanılarak gerçekleştirildi. Bakteri transformasyonu için kullanılacak plazmidlerin izolasyonu E.Z.N.A. Plasmid DNA Mini Kit I kullanılarak gerçekleştirildi (157, 158).

3.2.1.6. Çalışmada Kullanılacak Plazmitlerin Dizilenerek Kontrolü

Oluşturulan giriş vektörleri ve ekspresyon vektörleri %0.8’lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edildi. Referans olarak boyutu yaklaşık 3200 baz çifti olan 200 ng/µL konsantrasyondaki pGEM vektörü kullanıldı. Her bir dizileme reaksiyonunda kullanılacak plazmid miktarı, referansa göre 400-800 ng arasında olacak şekilde ayarlandı. Oluşturulan rekombinant vektörlere yerleştirilen DNA’ların dizisinin ve oryantasyonunun doğruluğu Sanger dizileme ile belirlendi. Dizileme için 3130 Genetik Analizör (ABI) cihazı kullanıldı. Dizileme reaksiyonu, klonlanan her bir genin tamamını ve plazmit ile birleşim noktalarının görülmesine imkan verecek şekilde tasarlanmış ilgili gene ve plazmide özgü primerler (Tablo 5) kullanılarak BigDye Terminatör v3.1 Cycle Sequencing kiti ile üretici firmanın önerileri doğrultusundan aşağıda belirtilen şekilde gerçekleştirildi.

<u>Dizileme PCR Karışımı</u>	<u>1X (µL)</u>
Big Dye	1
5X Bufer	1.5
İleri ya da Geri Primer (10 pmol/µL)	0.32
Kalıp Vektör (400-800 ng/µL)	1.5
dH ₂ O	5.68
Toplam	10

<u>Döngüsel Dizileme Reaksiyonu Koşulları</u>	<u>Sıcaklık (°C)</u>	<u>Süre</u>	
Başlangıç denatürasyonu	96	2 dk	} 25 Döngü
Denatürasyon	96	15 s	
Bağlanma	50	15 s	
Sentez	60	2 dk	
Son sentez	10	5 dk	

Döngüsel dizileme reaksiyonu ile elde edilen ampliconlar Sephadex G-50 boncukları kullanılarak saflaştırıldı. Dizileme sonucunda elde edilen diziler referans genom ile karşılaştırılarak değerlendirildi. Dizileme sonuçlarının incelenmesinde Chromas 2.32 ve referans genomla karşılaştırılmasında SeqScape® software v2.5 ve Clustal Omega programları kullanıldı.

Tablo 5. Oluşturulan vektörlerin dizilenmesinde kullanılan primer listesi

Pr. No	Primer Sekansı (5'-3')	Primer Adı
976	tcgcgttaacgctagcatggatctc	pDNOR201_F
977	gtaacatcagagatttgagacac	pDNOR201_R
1056	gtgtacgggtgggaggtcta	pCMV5'_F
1029	aacacctgagccatggaac	CCDC84_F1
1030	accttcacatggatttcttg	CCDC84_R
1024	gaccatctctgacattcattgg	CCDC84_F2
1276	tgggattttggggaagacg	PRPF4_F1
1277	gccaaactctctgcctgtcg	PRPF4_R1
1278	cacaagtctctccggtcttg	PRPF4_F2
1279	tatgacattgccttccatcaag	PRPF4_F3
1280	atgcctcctcactcagcatc	SART1_F1
1281	ctcgatgctgagtgaggagg	SART1_R1
1282	ttctaccctcaaggacaaagg	SART1_F2
1283	gaaggaggtagtagtgcggg	SART1_F3
1284	aggaggagctcatggacttg	SART1_F4
1285	caagatgaagacagagcggc	SART1_F5
1286	actttcatatgctgccattg	TXNL4B_R1
1287	agagactggaggagcagttg	SART3_F1
1288	cctcaccttggttaagctccc	SART3_R1
1289	gccacatttgacagtatgaag	SART3_F2
1290	ccttgattacctgaggagaagg	SART3_F3
1291	taaagagctggaggagttgagg	SART3_F4v2
1292	aagaagaaaaggctgaacaacg	SART3_F5
1293	aatgtttgtttcccctgtg	SART3_F6
1542	aggagtctctcaaattccactg	SF3A3_R1
1543	cttgacctctctgcattctc	SF3A3_F1
1544	cctttggtactgaatagtctctg	SF3A3_R2
1545	ggcaaacctattccctactg	SF3A3_F2
1549	cagcagccgaacgacttctggcag	SF3B4_F1
1550	gtggacctcctccactgatg	SF3B4_F2
1551	gatgataccacaggattgggagcag	SF3B4_R2
1552	tgactctatcctttggcatgtg	SF3B4_R1
1670	cagcagagaagcagacagttatg	MiniGen GAPDH_Int5_R
1671	aggcattgctgcaagaag	MiniGen GAPDH_Int6_R
1693	gatggagctgctggctttac	MSTIR_F1
1694	ggagcatgccattaagtgttgag	MSTIR_F2
1695	gcaccacttaccaggatgatg	MSTIR_R1
1855	gctcttttgcaaatcaacgac	RNPC3_R1
1856	ataagggcgactgaacatac	RNPC3_F1
1857	ccagacgaggatgaggaattatc	RNPC3_F2
1858	tggacatcacagaggagattaaag	RNPC3_F3

3.2.2. Ekspresyon Vektörlerinin Oluşturulması

pDONR201 giriş vektörüne klonlanılan *SART3*, *PRPF4*, *SART1*, *TXNL4B*, *SF3A3*, *SF3B4* ve *RNPC3* genleri, *SART3* geninin alt bölgeleri ve minigenler için oluşturulan gen bölgeleri *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda kullanılmak üzere farklı etiketler ekleyen memeli ve bakteri ekspresyon vektörlerine aktarıldı. İlgilenilen genin/gen bölgelerinin giriş vektörlerinden ekspresyon vektörlerine aktarılması *attL-attR* dizileri (LR) arasında

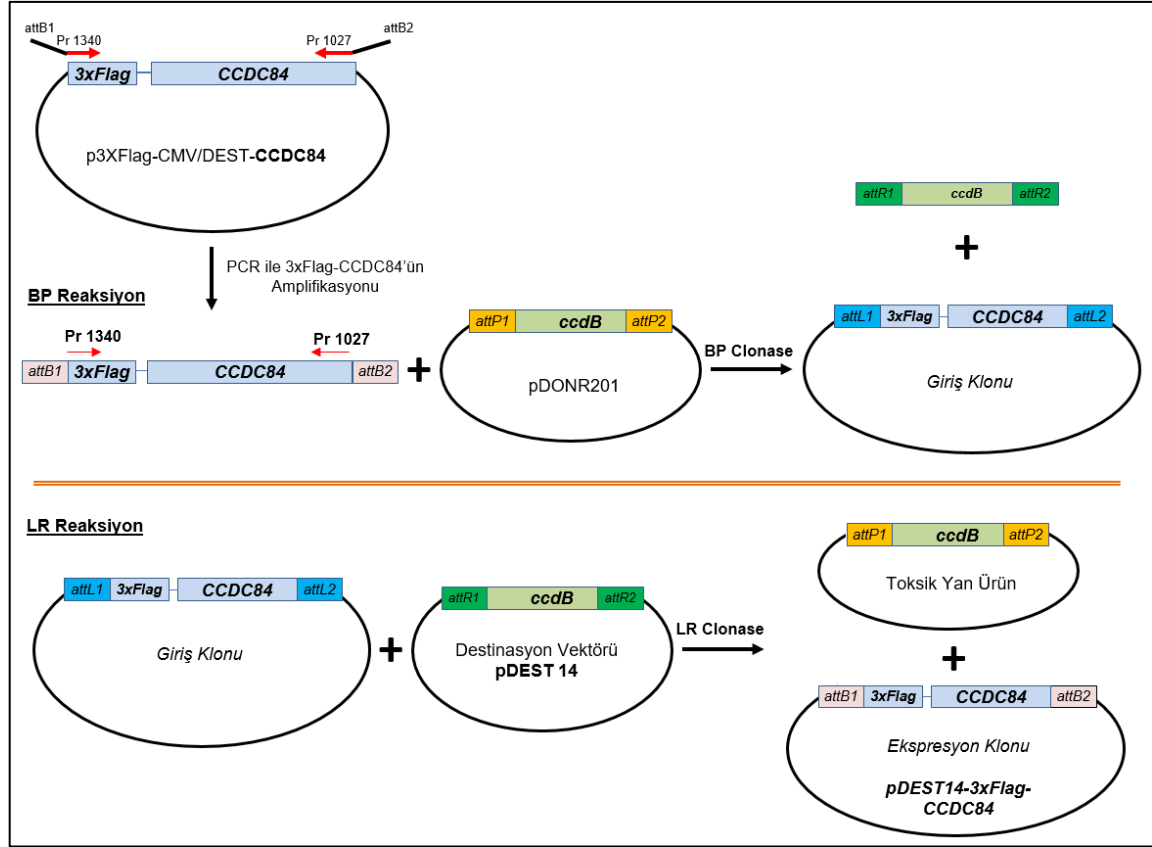
rekombinasyon yapabilen LR Clonase enzimi kullanılarak aşağıda gösterilen reaksiyon ile gerçekleştirildi (155).

<u>LR Rekombinasyon Reaksiyonu</u>	<u>Miktar (μL)</u>
Giriş vektörü (25 ng/μL)	1
Destinasyon vektörü (25 ng/μL)	1
LR Clonase II enzim karışımı	0.5L
Toplam	2.5

Reaksiyon özetle şu şekilde gerçekleştirildi. Öncelikle giriş vektörü ve hedef (destination) vektör yukarıda belirtilen miktarlarda olacak şekilde PCR tüpünde karıştırıldı. Karışımın üzerine nazikçe vortekslenen LR Clonase enziminden belirtilen miktardaki hacim ilave edildi. Karışım vorteks ile kısa süreli olarak hafifçe karıştırılarak homojen hale getirildikten sonra kısa süreli santrifüj ile çöktürüldü ve 25 °C’de 90 dakika inkübe edildi. LR reaksiyonunu sonlandırmak için her bir örneğe 0.5 μL Proteinaz K eklenerek 10 dakika 37 °C’de inkübe edildi. Süre sonunda, oluşturulan rekombinant ekspresyon vektörlerinin tamamı uygun suşa transforme etmek için kullanıldı (Bkz. Başlık: 3.2.1.4.). Ampisilin içeren (100 μg/mL) petrilere ekilen transforme edilmiş bakteriler 37 °C’ye ayarlanmış inkübatörde 12-16 saat inkübasyona bırakıldı. Petride oluşan kolonilerden seçim yapılarak ampisilin içeren sıvı besiyerinde 12-16 saat inkübe edildi. Sıvı besiyerinde çoğaltılan bakterilerden 5 mL alınarak plazmit izolasyonu yapıldı (Bkz. Başlık: 3.2.1.5.). İzole edilen plazmitler %0.8’lik agaroz jelde yürütüldü ve dizilenerek kontrol edildi (Bkz. Başlık: 3.2.1.6.). Dizileri doğrulanan plazmitler etiketlendi ve -20 °C’ye kaldırıldı (Tablo 6 ve 7).

3.2.3. Flag Etiketli Bakteri Ekspresyon Vektörlerinin Oluşturulması

Gateway sisteminde Flag etiketleyen bakteri ekspresyon vektörü bulunmamaktadır. Bu nedenle bakterilerde etiketsiz protein ekspresyonu yapan pDEST14 vektörüne, ihtiyaç duyulan proteinler Flag etiketli olarak klonlandı. İlk aşamada, ilgilenilen Flag etiketli CCDC84_W ve CCDC84_M dizilimi (FLAG-CCDC84) daha önce oluşturulan memeli ekspresyon vektörleri üzerinden “attB” dizileri ekli primerler (Pr.1340 ve Pr.1027) (Tablo 5) kullanılarak Flag etiketiyle birlikte PCR ile amplifiye edildi. Ardından, bu dizi BP reaksiyonu ile pDONR201 vektörüne ve sonrasında da oluşturulan giriş vektörlerinden LR reaksiyonu ile pDEST14 destinasyon vektörüne aktararak Flag etiketli CCDC84_W ve CCDC84_M eksprese eden bakteri ekspresyon vektörleri oluşturuldu (Resim 1) (Tablo 7).



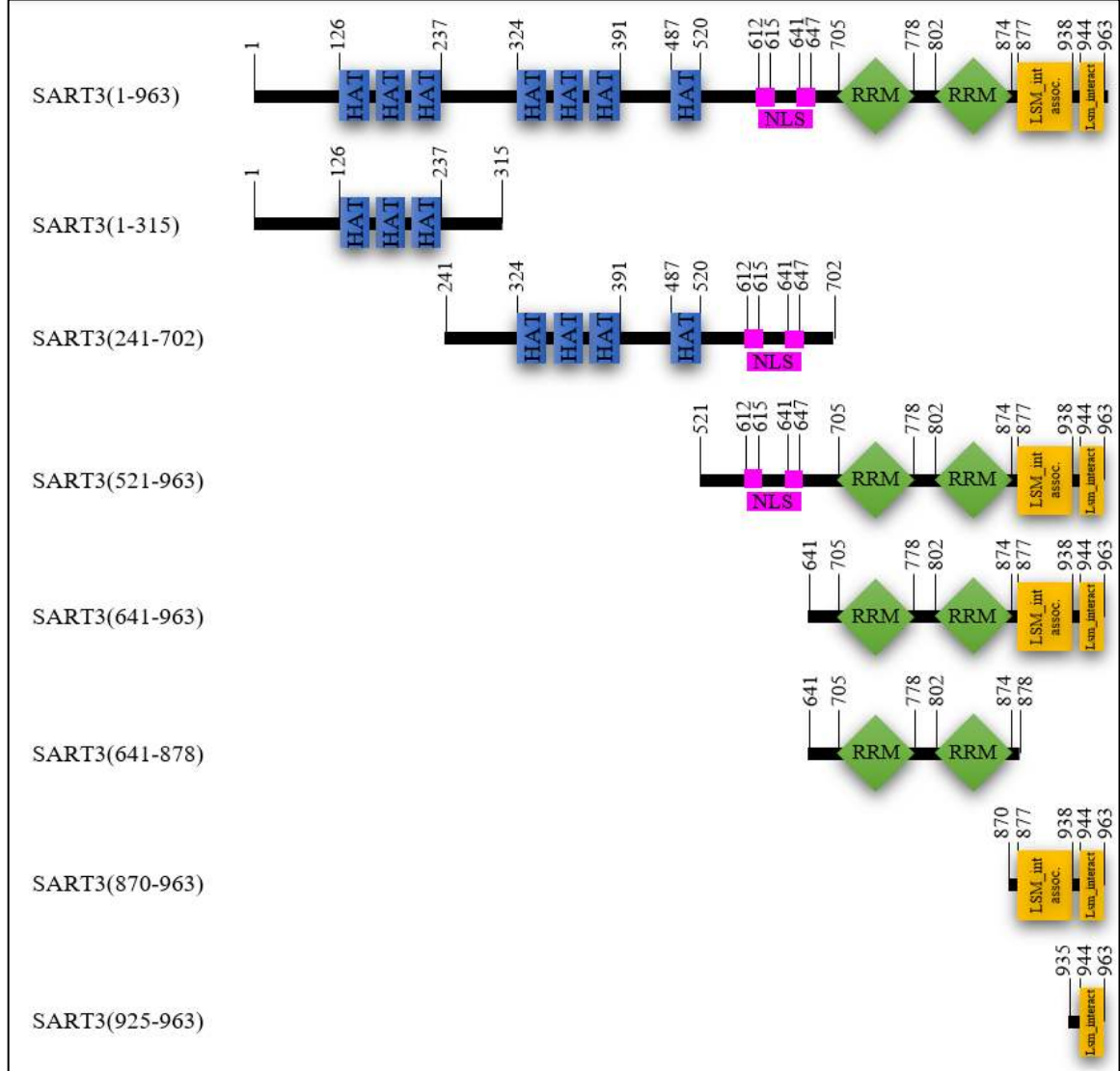
Resim 1. Gateway klonlama teknolojisi kullanılarak Flag etiketli yabancı tip ve mutant CCDC84 eksprese eden bakteri vektörlerinin oluşturulma stratejisi

3.2.4. SART3 Domainlerine Ait Dizilerin Bakteri Ekspresyon Vektörlerinin Oluşturulması

SART3 geninden kodlanan SART3 proteininin aktif bölgeleri SMART (*Simple Modular Architecture Research Tool*) programı kullanılarak belirlendi (159). Proteinin N-terminalinden C-terminaline doğru 7 adet HAT domain tekrarı (126-520 aa), ardından NLS olarak adlandırılan bir çekirdek lokalizasyon sinyal dizisi (559-619 aa), iki adet RNA tanıma motifi (705-778 ve 802-884 aa) ile LSM ilişkili bir motif (877-938 aa) ve LSM etkileşim motifi (944-963) bulundurmaktadır (Resim 2). SART3'ün CCDC84 ile etkileştiği domaini belirlemek üzere SART3'ün domainleri 7 farklı şekilde klonlandı (1-315aa, 241-702aa ve 521-963aa 641-963aa, 641-878aa, 870-963aa ve 925-963aa) (Resim 2).

SART3'ün belirlenen aktif bölgelerinin amplifikasyonu için kalıp olarak daha önce oluşturulmuş olan giriş vektörü kullanıldı. Klonlanacak SART3 fragmanlarının sınırlarını belirlemek üzere *attB* dizileri ekli amplifikasyon primerleri tasarlandı (Tablo 4). PCR sonrası BP reaksiyonu ile pDONR201 vektörüne (Bkz. Başlık: 3.2.1.3.) ve sonrasında da

oluşturulan giriş vektörlerinden LR reaksiyonu ile GST etiketleyen pGEX-KG/DEST destinasyon vektörüne aktarılarak (Bkz. Başlık: 3.2.2.) GST etiketli ekspresyon vektörleri oluşturuldu.



Resim 2. Tam uzunluktaki SART3 proteinin ve aktif bölgelerinin şematik gösterimi. Tam proteinin ve fragmanların ilk ve son amino asitler ile aktif bölgelerin sınırlarını gösteren amino asitlerin pozisyonları şemaların üstünde gösterildi.

Tablo 6. Çalışmada kullanılan memeli ekspresyon vektörlerine ait bilgiler

Varış Vektörü	Klonlanan Gen	Kodlanan Proteinlerin Yaklaşık Moleküler Ağırlıkları (kDa)
3XFLAG-p3XFLAG-CMV/DEST	<i>CCDC84_W</i>	45
	<i>CCDC84_M</i>	40
	<i>Minigen_GAPDH</i>	-
	<i>Minigen_GPAA1</i>	-
	<i>Minigen_MST1R</i>	-
pcDNA3myc/DEST	<i>SART3</i>	140
	<i>SART1</i>	110
pDEST27-GST	<i>PRPF4</i>	80
	<i>TXNL4B</i>	40
	<i>SF3A3</i>	75
	<i>SF3B4</i>	70
	<i>RNPC3</i>	80

Tablo 7. Çalışmada kullanılan bakteri ekspresyon vektörlerine ait bilgiler

Varış Vektörü	Klonlanan Gen	Sentezlenen Proteinlerin Yaklaşık Moleküler Ağırlıkları (kDa)
pGEX-KG/DEST/GST	<i>CCDC84_W</i>	60
	<i>CCDC84_M</i>	55
pDEST17/6XHis	<i>SART3</i>	140
	<i>SART1</i>	110
	<i>PRPF4</i>	60
	<i>TXNL4B</i>	20
Modifiye_pDEST14/p3XFLAG	<i>CCDC84_W</i>	40
	<i>CCDC84_M</i>	35
pGEX-KG/DEST/GST	<i>SART3</i> (1-315aa)	70
	<i>SART3</i> (241-701aa)	75
	<i>SART3</i> (641-961aa)	70
	<i>SART3</i> (641-878aa)	60
	<i>SART3</i> (870-963aa)	35
	<i>SART3</i> (935-963aa)	30

3.2.5. Hücre Kültürü

3.2.5.1. Kullanılan Hücreler

Tez kapsamında gerçekleştirilen ekspresyon, immünlott, immünpresipitasyon ve minigen deneylerinde immortal insan embriyonik böbrek hücreleri olan HEK293 (ATCC® CRL-1573™) ve kalıcı transfeksiyon için uyarlanmış Flp-In-293 hücre hatları kullanıldı. Etkileşimleri aranan proteinlerin immünlott deneylerinde ve Cajal cisimciği görüntüleme deneylerinde servikal kanser hücrelerinden köken alan HeLa (ATCC® CCL-

2TM) hücre hattı kullanıldı. Cajal cisimciklerin immünfloresan deneylerinde de hem HEK293 hem de HeLa hücre hattı kullanıldı.

3.2.5.2. Kültür Edilme Şartları

Tez çalışmasında kullanılan tüm hücre hatları %1 Penisilin/Streptomisin (Pen/Strep) ve %10 Fetal Bovin Serum (FBS) eklenmiş yüksek glukozlu DMEM (4.5 g/L Glukoz) besiyerinde çoğaltıldı. Hücrelerin inkübasyonları 37 °C’de %5 CO₂ içeren nemlendirilmiş inkübatörde gerçekleştirildi (160).

Hücrelerin Çözülmesi

Sıvı azot tankı içerisinde muhafaza edilen hücreler çıkarılmadan önce, %10 FBS, %1 Pen/Strep-DMEM içeren besiyeri hazırlandı ve buz üzerinde bekletildi. Hücre sıvı azottan çıkarıldı ve içerisinde bir miktar buz kalana kadar 37 °C su banyosunda hızlıca çözüldü. Çözülen hücreler önceden hazırlanmış ve buz üzerinde bekletilen 15 mL falkondaki 5 mL besiyerine aktarıldı. Hücreler 5 dakika süreyle 1200 rpm’de santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet ikinci kez yıkandı. Son olarak hücreler %20 FBS, %1 Pen/Strep-DMEM içerisinde süspanse edilerek uygun büyüklükteki kültür flasklarına ekildi. Bir gün sonra flastaki besiyeri %10 FBS ve %1 Pen/Strep içeren taze besiyeri ile değiştirildi.

Hücrelerin Pasajlanması

Flasklardaki hücre yoğunluğu %80-90 düzeylerine çıktığında pasajlama işlemi yapıldı. Pasajlama için flasklardaki besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreler PBS ile bir kere dikkatlice yıkandı. Hücreler tripsin-EDTA ile kaldırıldı. Yüzeyden ayrılan hücrelerin üzerine enzimin aktivitesini durdurmak amacıyla %10 FBS içeren besiyeri eklendi. Hücreler 15 mL’lik falkon tüpe toplandı ve 1200 rpm’de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı. Hücre pelleti taze besiyeri ile süspanse edilerek yeni flasklara dağıtıldı.

Hücrelerin Dondurulması

Dondurulması planlanan hücreler tripsin ile kaldırılarak toplandıktan sonra santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı. Hücre pelleti daha önceden hazırlanmış ve buz üzerindeki %10 FBS içeren antibiyotiksiz besiyeri ile yıkandı santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı. Sonrasında pellet üzerin buzda bekletilen ve %20 FBS içeren antibiyotikli 900 µL besiyeri eklenerek süspanse edildi. Hücre süspansiyonu vida kapaklı tüplere (cryo-vial) aktarıldı. Tüpler buz üzerinde 10 dakika bekletildikten sonra üzerlerine 100 µL DMSO

eklenerek 20 dakika daha buzda bekletildi. Süre sonunda tüpler önce -70 °C’de 24 saat bekletildi sonra sıvı azot tankına transfer edildi.

3.2.6. HEK293 Hücrelerinin Kalsiyum Fosfat Yöntemi ile Transfeksiyonu

HEK293 hücre hatlarının transfeksiyonda “Kalsiyum Fosfat Transfeksiyon” yaklaşımı kullanıldı (161). Hücreler, 14-16 saat sonunda %30-40 konfluent olacak şekilde 6 kuyulu tabaklara 1.8 mL besiyeri içine pasajlandı. Bir eppendorf tüpü içinde maksimum 2 µg plazmit 20 µL steril ddH₂O içinde çözüldü. İkinci bir eppendorf tüp alınarak içine 2.5 M CaCl₂’den 10 µL konulur ve üzerine 70 µL steril ddH₂O eklendi (CaCl₂’nin son konsantrasyon 12.5 mM). Sonrasında 20 µL DNA-su karışımı üzerine 80 µL CaCl₂-su karışımı eklenerek 100 µL DNA-CaCl₂ karışımı hazırlandı ve karışım oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi. Süre sonunda, hazırlanan DNA-CaCl₂ karışımı düşük hızla vortekslenirken üzerine 100 µL 2X HEPES damla damla eklenir. Hazırlanan 200 µL DNA-CaCl₂-HEPES karışımının oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildikten sonra tamamı hücrelerin üzerine damla damla eklendi. DNA-CaCl₂-HEPES karışımının eklendikten sonra 6 kuyulu tabak hafifçe çalkalanarak etüve kaldırıldı. Altı saat sonra hücrelerin üzerindeki besiyeri, %10 FBS içeren antibiyotiksiz taze besiyeri ile değiştirildi. Klonlanarak hücrelere transfekte edilen genlerin ekspresyonu transfeksiyondan 27 saat sonra analiz edildi.

3.2.7. Protein İzolasyonu ve Fazladan Eksprese Ettirilen Proteinlerin İmmünblot ile Analizi

Fazladan eksprese edilen proteinlerin izole edileceği hücrelerin besiyeri transfeksiyondan 27 saat sonra dikkatlice uzaklaştırıldı. Hücreler, tripsin/EDTA ile kaldırılıp 15 mL’lik falkon tüpte toplandıktan sonra buz üzerinde bekletilen PBS ile bir kez yıkandı. Hazırlanan hücre pelleti, buz üzerinde bekletilen TNTE patlatma tamponu ile patlatıldı. Patlatma tamponu eklendikten sonra buz üzerinde 30 dakika boyunca orbital çalkalayıcıda çalkalanarak bekletildi. Patlatılan hücreler %50 genlikte (amplitude) 5 saniye puls, 20 saniye bekleme olacak şekilde beş kere sonike edildi. Sonikasyon sonrasında örnekler 4 °C’de 14000 g’de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında, süpernatantlar buz üzerinde bekletilen temiz eppendorf tüplere aktarıldı ve analiz edilmek üzere kullanıldı. İzole edilen proteinler uygun yoğunluktaki jellere yüklenerek SDS-PAGE yapıldı. PVDF membrana aktarılan proteinler füzyon oluşturdıkları etiketlere ya da endojen proteinlere özgü antikorlar ile analiz edildi.

3.2.8. CCDC84'ün Etkileştiği Proteinlerin *in vivo* Analizi

CCDC84 ile SART3, SART1, PRPF4 ve TXNL4B'nin aralarındaki etkileşimlerini immünpresipitasyon yöntemiyle test etme çalışmalarında daha önce 114Z883 No'lu Tübitak Projesi kapsamında kalıcı olarak transfecte edilen FLAG-CCDC84_W'ı ve FLAG-CCDC84_M'ı ihtiva eden Flp-In-293/*FLAG-CCDC84* hücreleri kullanıldı. Etkileşimler iki farklı yaklaşım kullanılarak test edildi.

Birinci yaklaşımda, etkileşimleri araştırılan CCDC84 ile SART3, SART1, PRPF4 ve TXNL4B ayrı ayrı fazladan eksprese ettirilerek kontrolleriyle birlikte aşağıda belirtilen yedi koşul kullanılarak IP deneyi gerçekleştirildi. Her bir koşul için 100 mm'lik petri kullanıldı. Transfeksiyondan 27 saat sonra hücreler TNTE liziz tampon ile patlatıldı ve protein izolasyonu yapıldı.

1. Transfecte edilmemiş Flp-In-293 hücreleri,
2. GST veya Myc eksprese eden boş vektör ile transfecte Flp-In-293 hücreleri,
3. Yalnızca etiketli protein eksprese eden vektör ile transfecte Flp-In-293 hücreleri,
4. Etiket eksprese eden boş vektör ile transfecte edilen, yabancı tip FLAG-CCDC84'ü kalıcı olarak eksprese eden Flp-In-293/*FLAG-CCDC84_W* hücreleri,
5. Etiketli protein eksprese eden vektör ile transfecte edilen, yabancı tip FLAG-CCDC84 eksprese eden Flp-In-293/*FLAG-CCDC84_W* hücreleri,
6. Etiket eksprese eden boş vektör ile transfecte edilen, mutant tip FLAG-CCDC84'ü kalıcı olarak eksprese eden Flp-In-293/*FLAG-CCDC84_M* hücreleri,
7. Etiketli protein eksprese eden vektör ile transfecte edilen ve mutant tip FLAG-CCDC84'ü eksprese eden Flp-In-293/*FLAG-CCDC84_M* hücreleri kullanıldı.

İkinci yaklaşımda ise etkileşimi aranan her iki proteinin fazladan eksprese ettirilerek gerçekleştirilen immünpresipitasyon deneylerini tekrarlamak ve transfectiyon aşamasını ortadan kaldırmak adına, FLAG-CCDC84_W ve FLAG-CCDC84_M ile immünpresipitasyon yapılarak endojen SART3, PRPF4, TXNL4B ve SART1 proteinleri test edildi. Bu deney kapsamında;

- i. Negatif kontrol olarak, CCDC84'ün fazladan eksprese ettirilmediği Flp-In-293 hücreleri,
- ii. Etkileşimi sorgulamak için Flag etiketli CCDC84_W'ın kalıcı olarak transfecte edildiği Flp-In-293/*FLAG-CCDC84_W* hücreleri,

iii. CCDC84 üzerinde tanımlanmış olduğumuz mutasyonun etkileşimler üzerine etkisini sorgulamak için Flp-In-293/*FLAG-CCDC84*_M hücreleri kullanıldı.

Bu deneyde, bir gece kültüre edilen ve logaritmik fazda patlatılan hücrelerde PRPF4, TXNL4B, SART1 ve SART3 proteinleri ayrıca fazladan eksprese ettirilmedi. Her bir koşul için 4 adet 100 mm'lik petri kabı kullanıldı.

İmmünpresipitasyon deneylerinde Anti-FLAG antikorlarının kovalent olarak bağlı olduğu rezinler (ANTI-FLAG M2 Affinity Gel) kullanıldı. Pre-clearing için ise üzerinde fare immünglobülin G antikorunun kovalent bağlı olduğu rezinler (Mouse IgG–Agarose) kullanıldı.

3.2.8.1. Anti-FLAG M2 Rezinlerin Hazırlanması

Rezinlerin hazırlanması (rezinlerin dengelenmesi) üretici firmanın önerdiği protokol ile 2-8 °C'de gerçekleştirildi. Buz dolabından çıkartılan rezin alt-üst edilerek homojen hale getirildi. Rezinlerin hazırlanacağı ependorf tüplere 20 µL rezin süspansiyonu için 1 mL TBS konuldu. Rezinlerin zarar görmemesi için, transferinde kullanılan pipet ucu kesildi ve 20 µL süspansiyon (10 µL rezin) TBS konulmuş tüpe aktarıldı. Rezin 1000 g'de bir dakika santrifüj edildi ve süpernatant pipetle uzaklaştırıldı. Bu şekilde rezin soğuk TBS ile 3 kere yıkanarak gliserol uzaklaştırıldı. Rezinler 2 kere de 1 mL 0.1 M Glisin-HCL (pH 3.5) ile yıkanarak boncuklara tutunmayan serbest antikorlar uzaklaştırıldı. Sonrasında rezin 5 kere daha soğuk TBS ile yıkandı. Son yıkamadan sonra rezin üzerine rezin miktarı kadar TBS eklenerek rezin süspanse edildi ve kullanılmak üzere 1.5 mL'lik ependorf tüplere aktarıldı.

3.2.8.2. İzole Edilen Proteinlerin Ön Temizliği (Pre-clearing)

İmmünpresipitasyon deneyi öncesi proteinlerin anti-FLAG M2 rezinlere spesifik olmayan etkileşimler ile bağlanmasının engellenmesi için ilgili protein lizatları fare IgG–agaroz ile muamele edildi. Her bir örnek için 20 µL IgG kaplı rezin (Sigma) süspansiyonu (10 µL saf rezin) üretici firmanın önerileri doğrultusunda hazırlandı. Öncelikle rezinin dengeleneceği tüp TBS (pH 7.4) ile yıkandı. Dengelemenin yapılacağı tüpün içine 20 µL rezin süspansiyonu için 1 mL TBS konuldu. Stok rezin alt-üst edilerek iyice homojen hale getirildi. Rezin transferinde kullanılan pipet ucu kesildi ve TBS ile yıkandıktan sonra 1 mL protein lizatı için 20 µL süspansiyon (10 µL rezin) rezin TBS konulmuş tüpe aktarıldı. Rezin 1000 g'de 1 dakika santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı. Bu şekilde rezin 5 kere TBS ile ve bir kere de patlatma tamponu ile yıkandı. 'Pre-clearing' için her bir 1 mL protein

lizatı üzerine 10 µL saf rezin eklendi ve ependorf tüplerin kapakları iyice kapatılarak parafin ile sarıldı. Hazırlanan tüpler 4 °C’de, döner çember üzerinde 8 rpm’de 1 saat döndürüldü. Bir saat sonrasında tüpler 1000 g’de bir dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında tüpler buz üzerine alınarak rezin dağıtılmadan, pre-clearing yapılan protein lizatı yeni bir ependorf tüpe alındı.

3.2.8.3. Anti-FLAG İmmünpresipitasyon Yöntemi

Her bir koşul için 10 µL saf Anti-FLAG M2 boncuk izole edilen protein lizatı üzerine eklendi ve tüplerin kapakları kapatıldıktan sonra parafilm ile iyice sarıldıktan sonra 4 °C’de 8 rpm’de döner çember üzerinde 1 saat döndürülerek inkübe edildi. Bir saatlik inkübasyon sonunda eppendorf tüpler 1000 g’de 1 dakika santrifüj edildi. Tüpün çeperindeki rezinin çökmesi için tüpler buz üzerinde 1-2 dakika bekletildi. Tüplerdeki süpernatanın tamamı dikkatlice uzaklaştırıldı. Rezinin üzerine buzda bekletilen %0.1 Triton X-100 içeren yıkama tamponu eklendi. Boncuklar bu şekilde yıkama tamponu ile 5 kere yıkandı. Yıkama sonrasında boncuklar ucu kesilmiş 200 µL’lik bir pipet ucu ile kolonlara transfer edildi. Bu şekilde, spesifik olmayan bağlanmaları uzaklaştırmak için rezin, yıkama tamponu ile 4 kere daha yıkandı. Son aşamada kolonlar 1000 g’de 1 dakika daha santrifüj edilerek yıkama solüsyonu iyice uzaklaştırıldı.

3.2.8.4. Protein Kompleksinin Elüsyonu

İşlem oda sıcaklığında yapıldı. Temiz bir tüpe aktarılan kolonlarda bulunan rezin üzerine 15 µL 0.2 M Glisin-HCl (pH 2.5) eklendi. Kolonlar bekletilmeden 1000 g’de 1 dakika santrifüj edildi. İkinci aşamada rezin üzerine 75 µL 0.2 M Glisin-HCl (pH 2.5) eklendikten sonra boncuklar hafifçe karıştırılarak oda sıcaklığında 4 dakika bekletildi. Süre sonunda örnekler 1000 g’de 1 dakika santrifüj edildi. Toplanan elüsyon üzerine 10 µL 150 mM NaCl içeren 0.5 M Tris-HCl, (pH 9) eklendi. Toplanan örnekler daha sonra kullanılmak üzere sıvı azotta dondurulduktan sonra -70 °C’de saklandı. Elüsyondaki proteini konsantre etmek için örnekler liyofilizatörde yaklaşık bir saat bekletilerek suyun fazlası uçuruldu.

3.2.9. SDS-PAGE ve İmmünblot (Western Blot) Analizi

3.2.9.1. SDS-PAGE Jelinin Hazırlanması

Fazladan eksprese ettirilen proteinlerin görüntülenmesi, immünpresipitasyon ve pull down deneylerinin analizi için proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre uygun ayırma jelleri (%7.5, %10, %12 ve %15) hazırlandı. Poliakrilamid jeller yoğunluklarına göre belirtilen miktarlarda sırasına uygun bir şekilde 50 mL falkon tüplerde hazırlandı (Tablo 8). Hazırlanan ayırma jeli jel standına yerleştirilmiş olan camların arasına kısa camın 1 cm altına gelene kadar hava kabarcığı bırakılmadan döküldü ve üzerine soğuk izopropanol eklendi. Ayırma jelinin polimerleşmesi için 50-60 dakika beklendi. Sürenin sonunda ayırma jelinin üzerine eklenen izopropanol uzaklaştırıldı ve jelin üzeri distile su ile çok iyi bir şekilde yıkandı. Öncesinde hazırlanmış olan yükleme jeli APS ve TEMED eklenerek (Tablo 9) polimerleşmiş ayırma jelinin üzerine, kalan boşluk dolana kadar döküldü ve uygun tarak camlar arasına hava kabarcığı bırakılmadan yerleştirildi. Yükleme jelinin polimerleşmesi için 50-60 dakika beklendi (162, 163).

Tablo 8. Farklı konsantrasyonlardaki ayırma jeli içeriği

İçerik (1 mm cam için)	%7.5 (mL)	%10 (mL)	%12 (mL)	%15 (mL)
ddH ₂ O	2.73	2.43	2.17	1.80
Acrylamid (%40 acrylamid mix)	0.94	1.25	1.50	1.87
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	1.25	1.25	1.25	1.25
%10 SDS	0.05	0.05	0.05	0.05
%10 APS	0.05	0.05	0.05	0.05
TEMED	0.005	0.005	0.005	5
Toplam	5	5	5	5

Tablo 9. %5'lik yükleme jeli içeriği

İçerik (1 mm cam için)	1X (mL)
ddH ₂ O	1.57
Acrylamid (%40 acrylamid mix)	0.25
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	0.625
10% SDS	0.025
10% APS	0.025
TEMED	0.0015
Toplam	2.5

3.2.9.2. Proteinlerin SDS-PAGE ile Ayrıştırılması

Elektroforezi yapılacak protein lizatları, son konsantrasyon 1X olacak şekilde 0.5 mM DTT eklenmiş yükleme tamponu ile karıştırıldıktan sonra 99 °C'de 5 dakika kaynatıldı. Kaynatılan proteinler oda sıcaklığında 20 saniye maksimum hızda santrifüj edildi. Hazırlanan jellerin tarakları çıkarılarak distile su ile temizlendi. Jeller tanka yerleştirildikten sonra tank yürütme tamponu ile dolduruldu. Örneklerden 10-30 µL (15 µg protein) kadarı kuyucuklara yüklendi. Proteinlerin boyutlarının analizi için 1 µL protein markır (Precision Plus Protein Dual Color Standards) örneklerin yanına yüklendi. Elektroforez işlemi 75 Volt'da 15 dakika ve 100 Volt'da 80 - 100 dakika olacak şekilde gerçekleştirildi (164).

3.2.9.3. Proteinlerin Membranlara Aktarılması (İmmünblot) ve Görüntüleme

Elektroforez tankından çıkartılan camlar distile su ile yıkanarak yürütme solüsyonu uzaklaştırıldı. Önceden hazırlanmış ve 4 °C'de soğutulmuş transfer tamponu içinde dört adet ince Whatman kağıdı ve iki adet sünger yatak dengelendi. Blotlama kasetinin siyah yüzüne öncelikle sünger yatak yerleştirildi. Islak Whatman kağıtlardan bir tanesi, sünger yatağın üzerine yerleştirildi. Elektroforez tankından çıkartılarak temizlenen camlar spatula ile birbirinden ayrılarak jel kısa cam üzerinde bırakıldı. Yükleme jeli ve fazlalık jel dikkatlice kesilerek uzaklaştırıldı. Daha önceden hazırlanan uygun büyüklükte PVDF membran metanol içinde 50-60 saniye aktive edildi ve sonrasında transfer tamponunda dengelendi. Transfer tamponu ile ıslatılmış Whatman kağıdı, kısa cam üzerindeki akrilamid jeli dört kenarından ortalayacak şekilde üzerine yerleştirildi. Kısa cam dikkatli bir şekilde kaldırılarak jel ıslak Whatman kağıdına aktarıldı. Whatman kağıdı üzerindeki jel bu şekilde sünger yatağındaki Whatman kağıdının üzerine yerleştirildi. Aktive edilen membran, jelin üzerine aralarında hava kabarcığı kalmayacak şekilde yerleştirildi. Ardından yine transfer tamponu ile ıslatılmış iki adet Whatman kağıdı jel üzerine yerleştirilmiş olan membran üzerine hava kabarcığı kalmayacak şekilde yerleştirildi. Whatman kağıdının üzerine ise sünger yatak yerleştirildi ve kaseti kapatıldı. Blotlama 100 voltta ve 300 miliamperde 60 dakika olarak gerçekleştirildi. Transfer işlemi sonrası membran kasetten alındı ve transferin olduğu yüzey işaretlenerek %0.05 Tween 20 içeren TBST solüsyonu bulunan bir kaba konuldu. TBST solüsyonu uzaklaştırılarak membranın üzerine bloklama solüsyonu eklendi. Bloklama solüsyonu TBST'ye %5 oranında yağsız süt tozu eklenerek hazırlandı. Membran oda sıcaklığında 60 dakika veya 4 °C'de bir gece orbital karıştırıcıda inkübe edilerek bloklandı. Süre sonunda bloklama solüsyonu uzaklaştırıldı. Membrana transfer edilen

proteinlerin arasında ilgilenilen proteinlerin görüntülenmesi için kullanılacak primer ve sekonder antikor üretici firmanın önerisi doğrultusunda TBST solüsyonu ile hazırlanmış %2.5'lik yağsız süt tozu içerisinde hazırlandı (Tablo 10). Primer antikorla inkübasyondan sonra, membran TBST solüsyonu ile 4 kez, HRP konjuge sekonder antikorla inkübasyon sonrası 5 kez 5'er dakika beklenerek yıkandı. Ardından membran üzerine 1:1 hacimde hazırlanan Clarity™ Western ECL Substrate eklendi ve kemilüminesan ışıma Bio-Rad ChemiDoc MP Görüntüleme Sistemi ile görüntülendi (165, 166).

Tablo 10. İmmünblot ve görüntüleme koşulları

Jel konsantrasyonu	%7.5, %10, %12, %15
Membran tipi	PVDF, 0.2 µm
Bloklama	%5 yağsız süt tozu içeren 1xTBST ile oda sıcaklığında 1 saat veya 4 °C'de 12-16 saat
Primer (1°) antikorlar	Rabbit Polyclonal Anti_GST, (Santa cruz, sc-459), 1:1000 Rabbit Polyclonal Anti_CCDC84, (Abcam, ab150860), 1:1000 Mouse Monoclonal Anti_FLAG, (Sigma, A2220), 1:1000 Rabbit Polyclonal Anti_CCDC84, (Abcam, ab221858), 1:1000 Mouse Monoclonal Anti_cMyc, (SantaCruz, sc-40), 1:1000 Rabbit Polyclonal Anti_PRPF4, (Abcam, ab 198998), 1:1000 Rabbit Polyclonal Anti_SART1, (Abcam, ab 181867), 1:1000 Rabbit Polyclonal Anti_SART3, (Abcam, ab 155765), 1:1000 Rabbit Polyclonal Anti-α_Tübülün, (Abcam, ab15246), 1:5000
1°Antikor inkübasyonu	TBST içinde oda sıcaklığında 1 saat veya 4 °C'de 12-16 saat
Yıkama	TBST ile 4x5 dakika
Sekonder (2°) antikorlar	Goat Anti_Mouse IgG-HRP Goat Anti_Rabbit IgG-HRP
2° Antikor inkübasyonu	TBST içinde 1:8000 oranında oda sıcaklığında 1 saat
Yıkama	TBST ile 4x5 dakika
Görüntüleme	0.5 mL Clarity™ Western ECL Substrate (1:1 oranda Luminol Enhancer+Peroksit)

3.2.10. CCDC84 ile SART3, SART1, PRPF4 ve TXNL4B Arasındaki *in vivo* Etkileşimlerin RNA'ya Bağımlı Olup Olmadığının Analizi

Gözlemlenen *in vivo* etkileşimler üzerine RNA'nın varlığının etkisinin olup olmadığı araştırıldı. Bu bağlamda FLAG-CCDC84_W hücrelerinden elde edilen protein izolatları ikiye ayrıldı. RNaz muamelesi yapılan ve yapılmayan protein izolatları ile Anti-FLAG antikoruna bağlı boncuklar kullanılarak immünpresipitasyon yapıldı ve CCDC84'ün endojen SART3, SART1, PRPF4 ve TXNL4B proteinleri ile etkileşimleri test edildi. Bu deney kapsamında;

- Negatif kontrol olarak, Flp-In-293 hücreleri,

- ii. Etkileşimi sorgulamak için Flag etiketli CCDC84_W'ın kalıcı olarak eksprese eden Flp-In-293/*FLAG-CCDC84_W* hücreleri kullanıldı.

Her bir koşul için 8 adet 100 mm'lik petri kabı kullanıldı. Bu deneyde, bir gece kültüre edilen ve logaritmik fazda patlatılan hücrelerden protein izolasyonu (Bkz. Başlık 3.2.7.) gerçekleştirildi. İzolasyondan sonra elde edilen protein izolatları iki set olacak şekilde ayrıldı. Setlerden bir tanesine son konsantrasyon 5 mg/mL olacak şekilde RNaz A eklendi ve oda sıcaklığında 15 dakika inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda protein lizatları önce pre-clearing yapılacak boncuklarla (Bkz. Başlık 3.2.8.2.) ardından immünpresipitasyonun yapılacağı boncuklarla (Bkz. Başlık 3.2.8.3.) 1'er saat 4 °C'de inkübe edildi. İmmünpresipitasyon sonrasında boncuklar yıkama solüsyonu ile yıkandı ve sonrasında protein kompleksi boncuklardan ayrıştırıldı (Bkz. Başlık 3.2.8.4.). Uygun yoğunluktaki jellerde yapılan SDS-PAGE sonrası Anti-FLAG, Anti-PRPF3, Anti-SART3, Anti-SART1, Anti-PRPF4 ve Anti-TXNL4B antikorları ile immünblot analizleri gerçekleştirildi.

3.2.11. CCDC84 ile SART3, SART1, PRPF4 ve TXNL4B Arasındaki Etkileşimlerin *in vitro* Analizi

CCDC84 ile *in vivo* koşullarda etkileşimi görülen SART3, SART1, PRPF4 ve TXNL4B proteinleri arasındaki etkileşimin doğrudan olup olmadığını ve CCDC84 üzerinde tanımlanan mutasyonun bu etkileşimler üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla *in vitro* pull down deneyleri yapıldı. Etkileşimlerin *in vitro* araştırılmasında yaygın olarak GST-Pull Down ve Ni-NTA yöntemleri kullanılmaktadır. Ancak çalıştığımız proteinler, bu amaç doğrultusunda temin edilen Pierce™ GST Protein Interaction Pull-Down Kit ve Ni-NTA (HisPur Ni-NTA Magnetic Beads) içeriğindeki rezinlere yüksek düzeyde, özgül olmayan affinite göstermiş ve etkileşimlerin verimli bir şekilde araştırılması mümkün olmamıştır. Bu nedenle, immünpresipitasyon deneylerinde kullanılan ve Fare-ANTI-FLAG M2 antikorunun kovalent olarak bağlı olduğu agaroz rezinler Pull Down deneylerinde de kullanıldı. Ancak, *in vitro* etkileşim görülen proteinlerin, düşük düzeyde de olsa bu rezinlere de özgül olmayan şekilde bağlandığı görüldü. Bu sorunun giderilmesi için CCDC84 ile birebir etkileştiği tespit edilen SART3, bir kez de GST'ye karşı geliştirilmiş bir rekombinant antikorun kovalent olarak bağlı olduğu agaroz rezin (GST-Trap_A, ChromoTek GmbH, sta-20) kullanılarak test edildi. Ayrıca SART3'ün domainleri ile CCDC84 arasındaki olası etkileşim bu boncuk sistemi kullanılarak test edildi.

3.2.11.1. Bakterilerin İndüklenmesi ve Protein Lizatlarının Hazırlanması

Pull down deneylerinde kullanılmak üzere; GST ve Flag etiketli yabancı tip ve mutant CCDC84 eksprese eden vektörler (Tablo 8) *E. coli* BL21 DE3 suşunda ve His etiketli SART3, SART1, PRPF4 ve TXNL4B eksprese eden vektörler (Tablo 8) ise *E. coli* BL21 AI suşlarına transforme edildi. BL21-DE3 *E. coli* suşu IPTG ile, BL21-AI *E. coli* suşu ise L-arabinoz ile indüklenerek ekspresyon gerçekleştirildi.

Özetle; transforme edilen BL21 AI ve BL21-DE3 *E. coli* suşları ampisilin içeren LB-agar besiyerine ekildi. Büyüyen koloniler öze ile seçilerek ampisilin içeren LB sıvı besiyerine transfer edildi. 37 °C’de çalkalamalı inkübatörde bir gece boyunca inkübe edilen kültürler doyumluğa ulaştıktan sonra 100 mL alt kültür yapılarak 600 nm dalga boyunda OD’si 0.2’ye ayarlandı. Alt kültürlerin OD’si 0.4 - 0.6’ya ulaştığında 1 mL kontrol kültür ayrılarak santrifüj edilip süpernatant atıldı ve pellet -70 °C’de saklandı. OD’si 0.4-0.6 aralığındaki BL21-DE3 suşu son konsantrasyonu 150 µM IPTG, BL21AI suşu ise son konsantrasyonu %0.2 olacak şekilde L-arabinoz ile indüklendi. Bakterilerin IPTG ile indüklenmesi 19 °C’de çalkalamalı inkübatörde gerçekleştirildi. Bakteriler indüklendikten sonra, her 1 saatte kültürden 1 mL bakteri alınarak 4 °C’de 5000 g’de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı. Bakteri pelleti 1 mL soğut TBS ile yıkandı. Yıkama sonrası aynı şartlarda santrifüj edilerek pelletler -70 °C’de saklandı.

Toplanan bakteri pelletleri TNTE liziz tamponu ile patlatılarak protein izolasyonu yapıldı. İzole edilen protein lizatları yükleme boyası ile uygun yoğunluktaki jellere yüklendi ve SDS-PAGE yapıldı. Ardından akrilamid jeller Coomassie Brillinat Blue ile boyanarak proteinlerin optimum ekspresyon saatleri belirlendi.

Pull down deneyi yapılacağı zaman, proteinlerin optimum ekspresyon saatleri için yukarıda tarif edildiği gibi hazırlanan 1 mL kültür pelleti çıkarıldı. Bakteri pelletlerine, patlatılmak üzere 200 µL TNTE liziz tamponu eklendi. Örnekler buz üzerinde 30 dakika orbital çalkalayıcıda çalkalanarak patlatıldı. Süre sonunda bakteri lizatları 5 saniye puls ve 20 saniye bekleme olacak şekilde beş döngü halinde sonike edildi. Sonikasyon sonrasında lizatlar 14.000 rpm’de 4 °C’de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant buz üzerinde bekletilen temiz bir eppendorf tüpe alındı ve protein ekspresyonunun kontrolü için 40 µL’si üzerine SDS yükleme tamponu eklenerek SDS-PAGE analizi yapıldı. Kullanılmayan örnekler -20 °C’de saklandı.

3.2.11.2. Fare-ANTI-FLAG M2 Antikorumun Kovalent Olarak Bağlı Olduğu Agaroz Boncuk ile Pull Down

Her bir Pull Down deneyi için 20 µL saf rezin kullanıldı. Rezinlerin deney için hazırlanması kullanım kılavuzunun önerisi doğrultusunda (Bkz. Başlık: 3.2.8.1.) yapıldı. Hazırlanan rezin üzerine öncelikle yem protein lizatı eklendi ve 4 °C’de döner çemberde 8 rpm’de bir saat inkübasyona bırakıldı. Sonrasında tüpler 1000 g’de bir dakika santrifüj edildi ve rezinlerin 1-2 dakika buz üzerinde beklendikten sonra süpernatant uzaklaştırıldı. Sonrasında her bir tüpteki rezinin üzerine 400 µL yıkama solüsyonu (50 mM Tris-HCl, (pH 7,4), 150 mM NaCl, %0.1 Triton X-100, 1 mM EDTA) eklenerek rezinler yıkandı. Yıkama işlemi beş kere tekrarlandı. Son yıkamadan sonra rezinlerin üzerine “av” proteinini içeren lizat eklendi ve 4 °C’de döner çember üzerinde 8 rpm’de bir saat inkübe edildi. Süre sonunda, tüpler santrifüj edilerek yukarıda verildiği şekilde süpernatant uzaklaştırıldı ve yıkama solüsyonu ile her seferinde 5 dakika bekletilmek üzere yedi kere yıkandı. Son yıkamadan sonra süpernatant tamamen uzaklaştırıldı ve kolonlar temiz tüplere alındı. Her bir kolon içinde bulunan rezin üzerine önce 20 µL 0.2 M Glisin-HCl (pH 2.5) eklendi ve 1000 g’de bir dakika santrifüj edilerek elüsyon ependorf tüpte toplandı. Sonrasında boncuklar üzerine 70 µL daha 0.2 M Glisin-HCl, (pH 2.5) eklendi. Boncuklara hafifçe karıştırılarak oda sıcaklığında 4 dakika bekletildikten ve sonrasında 1000 g’de 1 dakika santrifüj edildi. Boncuklardan ayrılan proteinler aynı ependorf tüpe toplandı. Her bir protein elüsyonu üzerine 10 µL 150 mM NaCl içeren 0.5 M Tris-HCl (pH 9) eklenerek elüsyonun nötralizasyonu sağlandı. Her bir elüsyon üzerine 0.5 mM DTT içeren yükleme tamponu eklenerek 99 °C’de 5 dakika kaynatıldıktan sonra uygun yoğunluktaki SDS-PAGE’de yürütüldü. Sonrasında, “yem” olarak seçilen protein Anti-FLAG primer antikoru ve primer antikora uygun HRP konjuge sekonder antikorla görüntülendi. Sonrasında “av” olarak seçilen protein ise protein-spesifik primer antikor ve bu antikora özgü HRP konjuge sekonder antikor kullanılarak analiz edildi.

3.2.11.3. GST-Trap Boncuk ile Pull Down

Her bir Pull Down deneyi için 10 µL saf rezin kullanıldı. GST-Trap_Agaroz (sta-20) rezinlerin deney için hazırlanması üretici firmanın önerisi doğrultusunda 2-8 °C’de gerçekleştirildi. Rezin, içerisinde 1 mL yıkama tamponu (10 mM Tris-Cl pH 7.5, 150 mM NaCl) bulunan ependorf tüplere aktarıldı. Yıkama işlemi 2500 g’de 2 dakika olacak şekilde 2 kez yapıldı. Her bir eppendorf tüpte hazırlanan 10 µL rezin üzerine; GST,

GST_CCDC84_W ve GST_CCDC84_M eksprese ettirilen bakterilerden izole edilen protein lizatu yem olarak konuldu. Tüplerin kapakları kapatılıp parafilm ile kapatıldıktan sonra rezin-yem karışımı 4 °C'de 8 rpm'de 1 saat boyunca döner çemberde inkübe edildi. Bir saatlik inkübasyondan sonra tüpler 2500 g'de 2 dakika santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Ardından GST, GST_CCDC84_W ve GST_CCDC84_M proteinlerinin bağlandığı rezinler 10 mM Tris-Cl (pH 7.5), 300 mM NaCl, %0.1 TritonX-100 içeren buz üzerinde bekletilen yıkama tamponuyla her seferinde 5 dakika bekletilerek 5 kere yıkandı. Her seferinde tüpler 2500 g'de 2 dakika santrifüj edildi ve boncuklar kaldırılmadan süpernatant uzaklaştırıldı. Sonrasında etkileşimi analiz edilecek olan bakterilerde eksprese edilmiş olan His-SART3 (av) yen proteinlerin bağlı olduğu rezinler üzerine eklendi ve karışım 4 °C'de döner çemberde 8 rpm'de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra rezinler, yıkama tamponu ile yukarıda tarif edildiği şekilde 4 °C'de her seferinde 5 dakika beklenerek 5 kez yıkandı. Sonrasında boncuklar ucu kesik bir pipet ucuyla kolonlara taşındı. Kolonlar 2500g'de 2 dakika santrifüj edilerek yıkama tamponu iyice uzaklaştırıldı. Kolonlardaki rezinlerin üzerine 40 µL 0.2 M Glisin-HCl, (pH 2.5) eklenerek oda sıcaklığında 4 dakika bekletildi. Sonrasında kolanlar 2500 g'de 2 dakika santrifüj edilerek protein temiz bir tüpte toplandı. Toplanan elüsyonun üzerine 5 µL 1 M Tris (pH 10.4) eklenerek dengelendi. Ardından örnekler immünblot yöntemi ile Anti-GST, Anti-His ve proteinlere özgü primer antikör ve primer antikora uygun HRP konjuge uygun sekonder antikör ile görüntülendi.

3.2.12. CCDC84'ün Etkileştiği Proteinlerle Hücre İçi Birlikte Yerleşiminin İmmüno Floresan ile Analizi

CCDC84 ile SART3, PRPF4, SART1 ve TXNL4B proteinlerinin hücre içi birlikte yerleşimleri ve CCDC84 üzerinde tanımlanan mutasyonun birlikte yerleşimi üzerine olası etkisi immüno floresan yaklaşımı ile araştırıldı. Ayrıca, CCDC84'ün si-RNA ile susturulduğu HeLa ve HEK293 hücre hatlarında tri-snRNP yapılanmasında görev alan Cajal cisimciğinin sayısı ve boyutu üzerine etkisi immüno floresan yaklaşımla analiz edildi.

CCDC84 ile SART3, PRPF4, SART1 ve TXNL4B proteinlerinin hücre içi birlikte yerleşimlerini ve CCDC84 üzerinde tanımlanan mutasyonun birlikte yerleşimi üzerine olası etkisini araştırmak için HeLa hücre hatları kullanıldı. Bu hücreler Flag etiketli CCDC84 eksprese eden 3xFLAG-CNV/DEST_CCDC84_W ve 3xFLAG-CNV/DEST_CCDC84_M vektörleri ile transfekte edildi (Bkz. Başlık: 3.2.12.1.). Bu hücrelerde, CCDC84 proteini, Anti-FLAG primer antikörü ve endojen SART3, PRPF4, SART1 ve TXNL4B proteinleri ise

her bir proteine özgü primer antikorları ile işaretlendikten sonra bu antikorlara özgü uygun florofofor-konjuge sekonder antikorlar kullanılarak görüntülendi (Bkz. Başlık: 3.2.12.2.).

CCDC84 eksikliğini Cajal cisimciğinin sayısı ve boyutu üzerine etkisi HeLa ve HEK293 hücre hatlarında incelendi. Bu kapsamda, HeLa ve HEK293 hücreleri si-CCDC84 ile transfekte edildi (Bkz. Başlık: 3.2.13.1.) transfeksiyondan beş gün sonra hücreler fiks edilerek Cajal cisimciği markırı olan Coilin proteinine özgü mouse-anti-Coilin primer antikoru ile ve florofofor konjuge anti-mouse IgG sekonder antikoru ile işaretlendi. Aynı hücrelerde endojen CCDC84 ise rabbit-anti-CCDC84 primer antikoru ve uygun florofofor konjuge anti-rabbit-IgG sekonder antikoru kullanılarak görüntülendi (Bkz. Başlık: 3.2.12.2.). si-Kontrol ile transfekte edilen hücreler (Bkz. Başlık: 3.2.13.1.) ise kontrol olarak kullanıldı.

3.2.12.1. HeLa hücrelerinin Lipozoma Dayalı Transfeksiyonu

Oluşturulan ekspresyon vektörlerinin HeLa hücrelerine transfeksiyonu sonrası eksprese edilen proteinler immünfloresan yöntemi kullanılarak görüntülendi (167, 168). İmmünfloresan deneyleri için, 6-kuyulu tabakların her bir kuyusuna daha önceden hazırlanmış lameller yerleştirildi. Her bir kuyuda bulunan lamel üzerine %10 FBS içeren antibiyotiksiz 2 mL besiyeri içinde $1.5-2 \times 10^5$ hücre ekildi. CO₂'li etüvde bir gece inkübe edilen hücrelerin besiyeri transfeksiyon öncesinde 1.8 mL serumsuz ve antibiyotiksiz DMEM besiyeri ile değiştirildi. DreamFect Gold transfeksiyon ajanı transfeksiyondan 30 dakika önce -20 °C'den çıkarılarak oda sıcaklığına bekletildi ve kullanımdan önce çok hafif vortekslendi. DNA ve DreamFect GOLD karışımları ayrı ayrı aşağıda verilen şekilde hazırlandı ve DNA karışımı DreamFect GOLD karışımının üzerine eklendi.

Karışım 1: 1.5 µg plazmid DNA DMEM ile 100 µL'ye tamamlandı

Karışım 2: 3 µL DreamFect Gold transfeksiyon ajanı (1 µg DNA'ya 3 µL DreamFect Gold) DMEM ile 100 µL'ye tamamlandı.

Karışım 3: Karışım 1 ve Karışım 2 bir tüpte toplanarak 2-3 kez yavaşça pipetlendi ve 20 dakika oda sıcaklığında bekletildi.

Karışım 3, 1.8 mL serumsuz ve antibiyotiksiz DMEM besiyeri içindeki hücrelerin üzerine damla damla olacak şekilde dağıtıldı. Transfeksiyondan 24 saat sonra kuyular iki kez PBS ile yıkandı ve immünfloresan protokolü uygulandı.

3.2.12.2. İmmüfloresan Görüntüleme

Lameller üzerinde çoğaltılan HeLa hücrelerindeki endojen ya da fazladan eksprese ettirilen proteinlerin görüntülenmesi için transfeksiyondan 24 saat sonra HeLa hücrelerinin besiyerleri uzaklaştırıldı ve lameller 2 kez PBS ile yıkandı. Fiksasyon için hücrelerin üzerine taze hazırlanmış 1 mL %4 PFA eklenerek 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Sonrasında lameller 5 kere 3'er dakika beklemek üzere PBS ile yıkandı. Permeabilizasyon için, hücrelerin üzerine %0.2 Triton X-100'den 1 mL konularak 6 dakika oda sıcaklığında bekletildi ve sonrası, hücreler 5 kere 3'er dakika olacak şekilde PBS ile yıkandı. Yıkama sonrasında lameller %10 FBS içeren PBS 1.5 mL blokama solüsyonu ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Primer antikor blokama solüsyonu içerisinde önerilen oranda dilüe edilerek hazırlandı. Petriye parafilm yerleştirildi ve uçlarından bastırılarak zemine sabitlendi. Parafilm bölmelere ayrılarak üzerine 125 µL dilüe antikor konuldu. Hücreler antikor ile temas edecek şekilde, lameller hazırlanan antikorların üzerine kapatılarak Tablo 11'de belirtilen koşullara (süre, sıcaklık, vb.) göre inkübe edildi. İnkübasyon sonunda hücreler 8 kez PBS ile yıkandı. Sekonder antikor önerilen dilüsyonda blokama solüsyonu içerisinde hazırlandı (Tablo 11). Aynı şekilde hazırlanan parafilm üzerine, 125 µL dilüe sekonder antikor konularak lameller yerleştirildi ve 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Kuyular 8 kez PBS ile yıkandı. Daha önceden %70 etil alkol ile silinerek temizlenen lam üzerine bir damla DABCO-DAPI kapatma solüsyonu damlatıldı. Ardından hücrelerin olduğu lamel yüzeyi lamın üzerindeki DABCO solüsyonuna gelecek şekilde lamel lam üzerine yerleştirildi ve kurumaya bırakıldı. Preparat kuruduktan sonra kenarları şeffaf oje ile kapatılarak sabitlendi ve floresan mikroskobunda analiz edildi.

Tablo 11. İmmünofloresan koşulları

Fiksasyon	%4 Paraformaldehit - oda sıcaklığında 10 dakika
Permeabilizasyon	%0.2 TritonX_100 (PBS içinde) - oda sıcaklığında 5 dakika
Bloklama	%10 Fetal Bovin Serum, (PBS içinde)
Primer antikörler	Rabbit Polyclonal Anti_SART3 (Abcam, ab155765), 1:100 Mouse Monoclonal Anti_FLAG (Sigma, F3165), 1:300 Rabbit Polyclonal Anti_SART1 (Abcam, ab181867), 1:400 Rabbit Polyclonal Anti_PRPF4 (Abcam, ab198998), 1:400 Rabbit Polyclonal Anti_CCDC84 (Abcam, ab150860), 1:400 Rabbit Polyclonal Anti_TXNL4B (Abcam, ab213536), 1:100 Mouse Monoclonal Anti_Coilin (Santa cruz, sc55594), 1:400
Primer Antikör inkübasyonu	Bloklama solüsyonu kullanılır. Etiketli proteinler için oda sıcaklığında 1 saat, endojen proteinler için 4 °C’de 15 saat
Yıkama	PBS ile 8X
Sekonder antikörler	Goat Anti_Mouse IgG H&L, (Cy3) (Abcam, ab97035), 1:1000 Donkey Anti_Rabbit IgG H&L (AF 488) (ab150061), 1:1000 Donkey Anti_Goat IgG H&L, (Cy3) (Abcam, ab6949), 1:1000 Goat Anti_Rabbit IgG H&L, (Cy3) (Abcam, ab6939), 1:1000 Goat Anti_Mouse_IgG H&L (AF488) (Abcam, ab150117), 1:1000
Sekonder Antikör inkübasyonu	Bloklama solüsyonunda oda sıcaklığında 60 dakika
Yıkama	PBS ile 6X
Kapatma Medyumu	Prolong GOLD Antifade Mounting Media DAPI

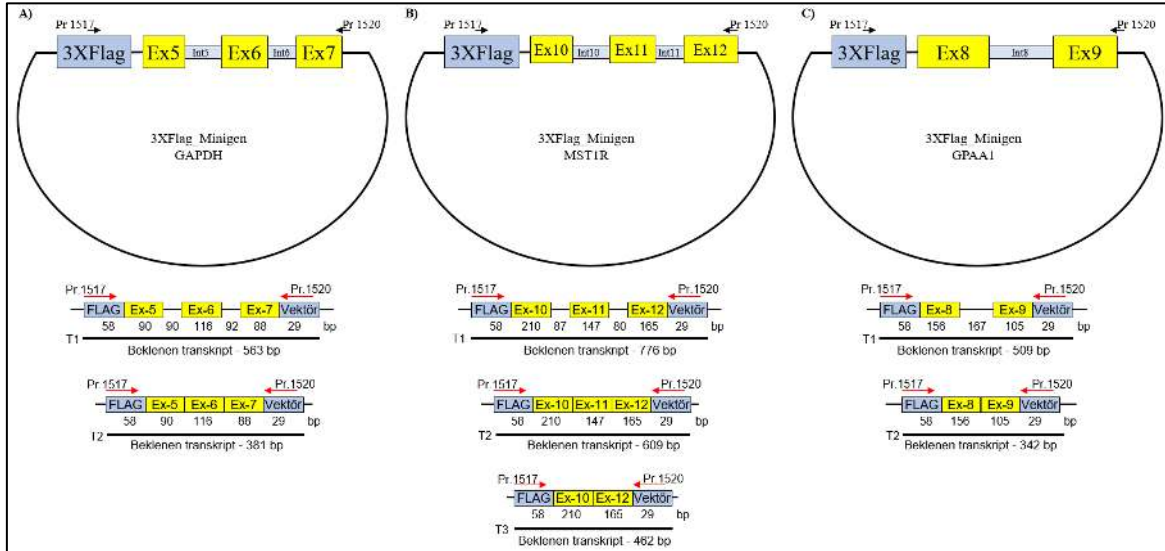
3.2.13. CCDC84’ün RNA Kırılması Üzerine Etkisinin Minigen Yaklaşımı ile Analizi

CCDC84’ün RNA kırılmasında etkisinin olup olmadığını test edebilmek için “minigen” stratejisi uygulandı (169-172). Bu kapsamda aşağıda belirtilen memeli ekspresyon vektörleri oluşturuldu.

1. U2 tip intron grubuna ait *GAPDH* geninin Ex5-Int5-Ex6-Int6-Ex7 bölgesi,
2. U2 tip intron grubuna ait ve alternatif RNA kırılması ile farklı transkriptler verebilen *MST1R* geninin Ex8-Int8-Ex9-Int9-Ex10 bölgesi,
3. Son olarak U12 tip intron grubuna ait *GPAA1* geninin Ex8-Int8-Ex9 bölgesi memeli hücrelerinde eksprese olabilen Flag etiketleyen p3XFLAG-CMV/DEST vektörüne klonlandı (Resim 3).

Oluşturulan memeli minigen ekspresyon vektörü, CCDC84’ün si-RNA ile transfekte edildiği hücrelere (Bkz. Başlık 3.2.13.1) transfeksiyonun 4. 5. 6. 7. ve 8. gününde Kalsiyum-Fosfat yaklaşımı ile transfekte edildi. Transfeksiyondan 24 saat sonra hücreler Tripsin-EDTA ile toplanarak bekletilmeden RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Aynı zamanda protein analizi için yeterli miktar hücre pelleti -80 °C’ye kaldırıldı. RNA izolasyonundan 4 saat önce hücreler son konsantrasyon 3 µg/mL olacak şekilde protein sentezini baskılayan puromisin

antibiyotiği ile muamele edildi (173, 174). Elde edilen RNA'dan RT-PCR ile minigen üzerinden üretilen transkriptlerin analizi gerçekleştirildi.



Resim 3. Oluşturulan minigenler A) Minigen *GAPDH* B) Minigen *MST1R* C) Minigen *GPAA1*

3.2.13.1. HEK293 Hücrelerinde siRNA ile Gen Sessizleştirilmesi

HEK293 hücrelerinde ilgili genlerin susturulması için,

1. *CCDC84*'ün susturulması için *CCDC84* mRNA'sının 3 ve 4. ekzonlarının birleşim bölgesine karşılık gelen bir siRNA (Thermo-Fisher, *CCDC84* siRNA, Assay ID: s50369, Cat No: 4392420, 5 pmol),
2. *SART3*'ün susturulması için *SART3* mRNA'sının 7. ve 8. ekzonlarının birleşim bölgesine karşılık gelen bir siRNA (Thermo-Fisher, *SART3* siRNA, Assay ID: s18772, Cat No: 4392420, 5 pmol),
3. *PRPF3*'ün susturulması için *PRPF3* mRNA'sının 6. ve 7. ekzonlarının birleşim bölgesine karşılık gelen bir siRNA (Thermo-Fisher, *PRPF3* siRNA, Assay ID: s17434, Cat No: 4392420, 5 pmol),
4. Kontrol si-RNA olarak ise yine aynı firmadan temin edilen Silencer Select Negative Control No 1 siRNA (Cat No: 4390843, 5 nmol) kullanıldı.

Liyofilize olarak gelen siRNA'lar, kapağı açılmadan önce kısa süre santrifüj edilerek çöktürüldü. 5 nmol olarak gelen siRNA'lar, üretici tarafından sağlanan 50 µL nükleaz içermeyen su kullanılarak son konsantrasyonu 100 µM olacak şekilde sulandırıldı.

Çalışmalarda kullanılmak üzere stok solüsyonundan 10 µM'lık çalışma solüsyonu hazırlandı. Hazırlanan stok ve çalışma solüsyonu üretici firmanın önerileri doğrultusunda kullanılana kadar -80 °C'de saklandı.

Transfeksiyon, üretici firmanın önerileri doğrultusunda düşük serumlu Opti-MEM ve Lipofectamine RNAiMAX Transfection Reagent (Thermo-Fisher, Cat No: 13778030) ile *Reverse Transfeksiyon* yaklaşımı kullanılarak gerçekleştirildi (175). Transfeksiyon yapılacak tabağın yüzey alanı ile orantılı olarak ekilecek hücre sayısı ve besiyeri üretici firmanın önerisi doğrultusunda ölçeklendirildi (Tablo 12). Revers transfeksiyonda öncelikle ependorf tüpte 98 µL Opti-MEM besiyeri üzerine 2 µL siRNA eklendi. İkinci bir ependorf tüpte ise 97.5 µL Opti-MEM üzerine 2.5 µL Lipofectamine RNAiMAX ajanı eklendi. Sonrasında birinci tüpte hazırlanan Opti-MEM-siRNA karışımı ikinci tüpteki Opti-MEM-Lipofectamine RNAiMAX karışımı üzerine eklendi. 200 µL olan bu karışım oda sıcaklığında 20 dakika bekletildikten sonra hücrelerin üzerine ekileceği boş kuyuya ve üzerine %10 FBS içeren 1800 µL antibiyotiksiz besiyeri içinde 1×10^5 HEK293 hücresi eklendi. Hücreler eklendikten sonra tabak sağa-sola hareket ettirilerek içeriğin homojen hale gelmesi sağlandı. Transfeksiyondan 24 saat sonra besiyeri antibiyotikli besiyeri ile değiştirildi. Sessizleştirilmenin etkinliğini ve kaç gün devam ettiğini belirlemek adına kontrol ve gene özgü siRNA ile 3, 4, 5, 6, 7, 8, ve 9 gün süre ile muamele edilen hücrelerden izole edilen protein lizatları Western ile analiz edildi.

Tablo 12. Hek293 hücrelerinin siRNA ile transfeksiyonunda kullanılan ajanların miktarı.

İçerik	1x12 well	1x6 well	1x60 mm
Besiyeri hacmi	900 µL	1800 µL	4.5 mL
Yüzey alanı (cm ²)	3.8	9,5	21
Hücre sayısı	5×10^4	1×10^5	2.5×10^5
Opti-MEM	49 µL	98 µL	245 µL
siRNA (10 µM)	1 µL (10 pmol)	2 µL (20 pmol)	5 µL (50 pmol)
Opti-MEM	49 µL	97.5 µL	254 µL
Lipofectamine RNAiMAX Ajanı	1 µL	2.5 µL	5 µL

3.2.13.2. RNA İzolasyonu ve RT-PCR

siRNA'lar ile 4, 5, 6, 7 ve 8 gün süre ile muamele edilen hücrelerden RNA izolasyonu RNeasy Mini kiti ile üretici firmanın talimatları doğrultusunda gerçekleştirildi. Elüsyon 30-50 µL RNaz içermeyen su ile yapıldı. RNA konsantrasyonu Nanodrop cihazı ile belirlendikten sonra, her bir örneğin konsantrasyonu 100 ng olacak şekilde ayarlandı ve bekletilmeden cDNA sentezine geçildi.

3.2.13.3. cDNA Sentezi

İzole edilen RNA dan cDNA sentezi “Transcriptor First Strand cDNA Synthesis” kiti kullanılarak yapıldı. Sentez üretici firmanın talimatları doğrultusunda gerçekleştirildi. Reaksiyonda anchored oligo (dT)18 primeri ve random hexamer primerlerinin her ikisi de kullanıldı. Her bir reaksiyonda 100 ng RNA kullanıldı. Öncelikle RNA ve primer karışımı PCR tüpünde hazırlandı (Tablo 13). Hazırlanan bu karışım hızlıca vortekslendikten sonra santrifüj yapılarak karışım tüpün dibine indirildi. RNA ikincil yapısının denatürasyonu için tüpler 65 °C’de 10 dakika inkübe edildi. Süre sonunda tüpler hızlıca buz üzerine alındı. Reaksiyon tamponu, RNaz inhibitörü, dNTP karışımı ve reverse transkriptaz enziminden oluşan karışım buz üzerinde ependorf tüp içerisinde hazırlandı (Tablo 14). Son hacim 20 µL olacak şekilde ilk hazırlanan karışım üzerine dağıtıldı. Reaksiyon 25 °C’de 10 dakika, 55 °C’de 30 dakika ve 85 °C’de 5 dakika tek döngü olacak şekilde thermocycler cihazında gerçekleştirildi.

Tablo 13. cDNA sentezi-karışım 1

İçerik	Hacim (1X için)	Son Konsantrasyonu
Total RNA (100 ng)	1 µL	1µg total RNA
Anchored-oligo(dT)18 Primer, 50 pmol/µL	1 µL	2.5 µM
Random Hexamer Primer, 600 pmol/µL	2 µL	60 µM
Water, PCR Grade	9 µL	-

Tablo 14. cDNA sentezi-karışım 2

İçerik	Hacim (1X için)	Son Konsantrasyonu
Reverse Transcriptase Reaction Buffer, 5X.	4 µL	1x 8 mM MgCl ₂
RNase Inhibitor, 40 U/µL	0,5 µL	20 U
Deoxynucleotide Mix, 10 mM each	2 µL	1 mM each
Reverse Transcriptase, 20 U/µL	0,5 µL	10 U

3.2.14. CCDC84'ün Eksikliğinin U12 Tip İntronların Kırpılması Üzerine Etkisinin Analizi

CCDC84'ün eksikliğinin U12 tip intron barındıran genlerden *IPO5*, *DNA2*, *IPO11*, *NR2CAP* üzerine etkisinin analizi için ilgili intronların çıkartılıp çıkartılamadığı RT-PCR ile analiz edildi. Bu bağlamda 5 gün süreyle siRNA'lar ile muamele edilen (Bkz. Başlık: 3.2.13.1.) hücrelerden RNA izole edildi (Bkz. Başlık: 3.2.13.2.). cDNA sentezinden (Bkz. Başlık: 3.2.13.3.) sonra ilgili primerler (Tablo 15) ile *IPO5*, *DNA2*, *IPO11*, *NR2CAP* genlerindeki minör intronların çıkartılıp çıkartılamadığı PCR ile analiz edildi.

Tablo 15. *IPO5*, *DNA2*, *IPO11*, *NR2CAP* ve *GAPDH* genlerinin kırılmaya uğramamış mRNA'larının çoğaltılmasında kullanılan primer listesi

Pr. no	Primer dizisi (5'-3')	Primer adı
1748	GGAGTACACCGAACAGGTTGTC	<i>IPO5</i> _Ex21_F
1751	atgcagagaaccgagttatcac	<i>IPO5</i> _Int21_R
1765	AAAGATTGGCGACGTCTTAATG	<i>DNA2</i> _Ex20_F
1766	tgagcccaggagttcaagac	<i>DNA2</i> _Int20_R
1829	TGATTGGCTCATCGGTCAGTG	<i>IPO11</i> _Ex16_F2
1830	agtgttaaagttcttgaatgaag	<i>IPO11</i> _Int16_R1
1833	tctgttgagaggcttagaggg	<i>NR2CAP</i> _Int4_F
1834	CATCCTCAAACGTCACCTTCAG	<i>NR2CAP</i> _Ex5_R
1847	agccttcagttgcagccatg	<i>GAPDH</i> _Int2_F
1848	TTACCAGAGTTAAAAGCAGCCC	<i>GAPDH</i> _Ex3_R
1664	CATGTTTCGTCATGGGTGTGAAC	<i>GAPDH</i> _Ex6_F
1665	GATGAGTATGCCTGCCGTGTG	<i>GAPDH</i> _Ex8_R

4. BULGULAR

4.1. CCDC84 ile SART3, SART1, PRPF4 ve TXNL4B Arasındaki Etkileşimlerin Analizi

CCDC84'ün etkileşim partnerlerini bulmaya yönelik olarak, RNA kırılması (*splicing*) sürecinde rolü olduğu bilinen SART3, SART1, PRPF4 ve TXNL4B ile etkileşimi *in vivo* ve *in vitro* olarak test edildi. *in vivo* etkileşimlerin araştırılmasında immünpresipitasyon, *in vitro* etkileşimlerin araştırılmasında ise pull down yaklaşımları kullanıldı.

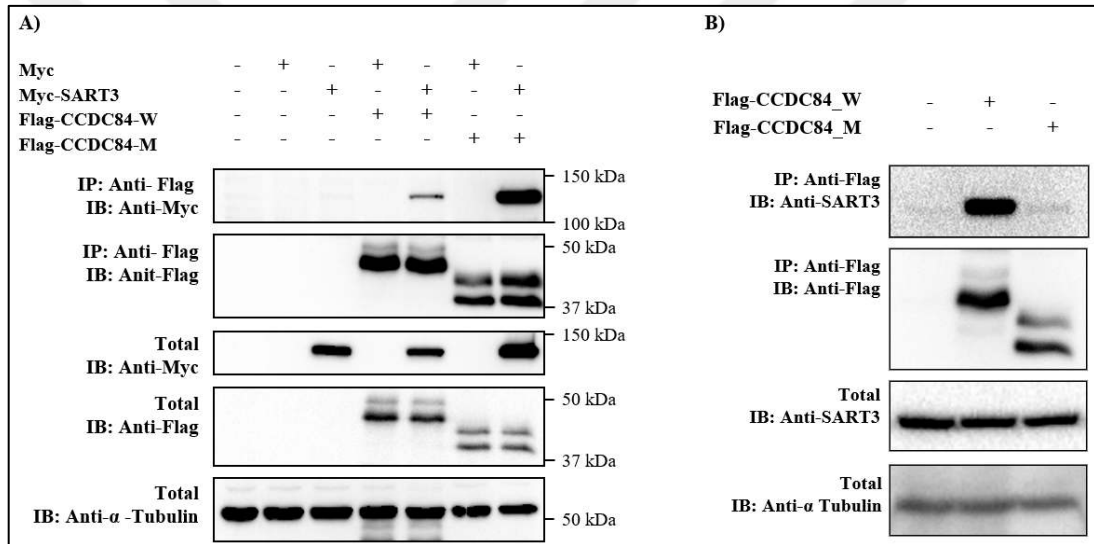
İmmünpresipitasyon çalışmalarında, laboratuvarımızda daha önceden oluşturulmuş olan, Flag etiketli yabancı tip CCDC84'ü (FLAG-CCDC84_W) ve Seckel sendromu ile ilişkilendirilmiş olan p.Lys269Serfs10* mutasyonlu CCDC84'ü (FLAG-CCDC84_M) kalıcı olarak eksprese eden sırası ile Flp-In-293/FLAG-CCDC84-W ve Flp-In-293/FLAG-CCDC84-M hücreleri kullanıldı. İmmünpresipitasyon iki farklı yaklaşımla gerçekleştirildi. Bu yaklaşımların ilkinde, Myc-SART3, Myc-SART1, GST-PRPF4 ve GST-TXNL4B proteinlerini geçici olarak fazladan eksprese eden Flp-In-293/FLAG-CCDC84_W ve Flp-In-293/FLAG-CCDC84_M hücrelerinden elde edilen protein izolatları kullanıldı. Anti-FLAG M2 boncukları kullanılarak gerçekleştirilen immünpresipitasyon ile elde edilen proteinler Anti-FLAG, Anti-Myc ve Anti-GST antikoru kullanılarak immünbloet ile analiz edildi. İkinci yaklaşımda ise yine Flp-In-293/FLAG-CCDC84_W ve Flp-In-293/FLAG-CCDC84_M hücrelerinden elde edilen protein izolatları kullanılarak Anti-FLAG M2 boncukları ile immünpresipitasyon gerçekleştirildi. FLAG-CCDC84'ün çektiği proteinler Anti-FLAG, Anti-SART3, Anti-SART1, Anti-PRPF4 ve Anti-TXNL4B antikoru kullanılarak immünbloet ile incelendi.

CCDC84 ile SART3, SART1, PRPF4 ve TXNL4B arasında doğrudan bir etkileşim olup olmadığı pull down yaklaşımı kullanılarak araştırıldı. Pull down deneyleri Anti-FLAG antikoru bağlı agaroz boncuklar (Anti-FLAG M2) ve rekombinant anti-GST antikoru bağlı boncuklar (GST-Trap_A) kullanılarak gerçekleştirildi. Bu deneyler kapsamında; GST ve Flag etiketli protein eksprese eden bakteri vektörleri BL21-DE3 *E. coli* suşunda, 6XHis etiketleyen bakteri vektörü ise BL21-AI *E. coli* suşunda eksprese ettirildi. Anti-FLAG M2 boncukları kullanılarak yapılan pull down ile elde edilen proteinler Anti-FLAG, Anti-SART3, Anti-SART1, Anti-PRPF4 ve Anti-TXNL4B antikoru kullanılarak immünbloet ile

analiz edildi. Anti-GST_Trapp_A boncukları kullanılarak yapılan pull down ile elde edilen proteinler ise Anti-GST ve Anti-SART3 antikorları kullanılarak immünblot ile incelendi.

4.1.1. CCDC84'ün SART3 ile Etkileşiminin *in vivo* ve *in vitro* Analizi

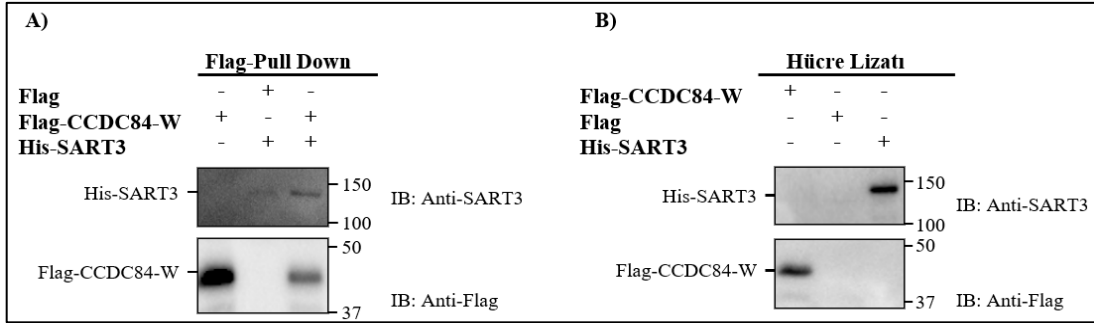
In vivo etkileşim çalışmalarının sonucunda hem yabanıl tip hem de mutant CCDC84'ün fazladan eksprese ettirilen Myc-SART3 ile güçlü bir şekilde etkileştiği görüldü (Resim 4A). Bunu karşın, endojen SART3'ün hedeflendiği ikinci yaklaşımda yabanıl tip CCDC84 ile SART3 güçlü bir şekilde etkileşirken CCDC84'ün üzerinde tanımlanmış olan mutasyonun bu etkileşimi çok belirgin bir şekilde azalttığı gözlemlendi (Resim 4B). Yapılan tekraralarda da mutasyonun etkileşimi bozduğu gözlemlendi.



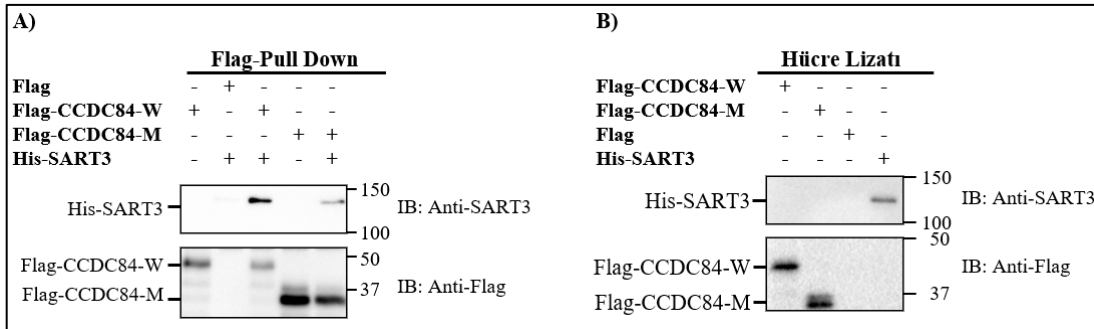
Resim 4. CCDC84'ün SART3 ile etkileşiminin *in vivo* analizi A) Myc-SART3'ün fazladan eksprese ettirildiği Flp-In-293/FLAG-CCDC84_W ve Flp-In-293/FLAG-CCDC84_M stabil hücrelerinde Anti-FLAG M2 boncukları ile gerçekleştirilen IP sonrası Anti-Myc, Anti FLAG ve Anti-α-tübülin antikorları kullanılarak IB analizi. B) Flp-In-293/FLAG-CCDC84_W ve Flp-In-293/FLAG-CCDC84_M stabil hücreleri kullanılarak Anti-FLAG M2 boncukları ile gerçekleştirilen IP sonrası Anti-SART3, Anti-FLAG ve Anti-α-tübülin antikorları kullanılarak IB analizi. IP çalışmaları kullanılmak üzere hücrelerden izole edilen proteinlerin (Total) eşit miktarda olduğu Anti-α-tübülin antikoruyla yapılan IB ile doğrulandı. IP: İmmünpresipitasyon, IB: İmmünblot.

CCDC84 ile SART3 arasındaki etkileşimin doğrudan olup olmadığının araştırılmasının ilk aşamasında Anti-FLAG M2 boncukları kullanıldı. Sonuç olarak CCDC84'ün SART3 ile birebir etkileştiği görülürken His-SART3'ün boncuklara az da olsa özgün olmayacak şekilde bağlandığı gözlemlendi (Resim 5). Sonucun doğrulanması ve

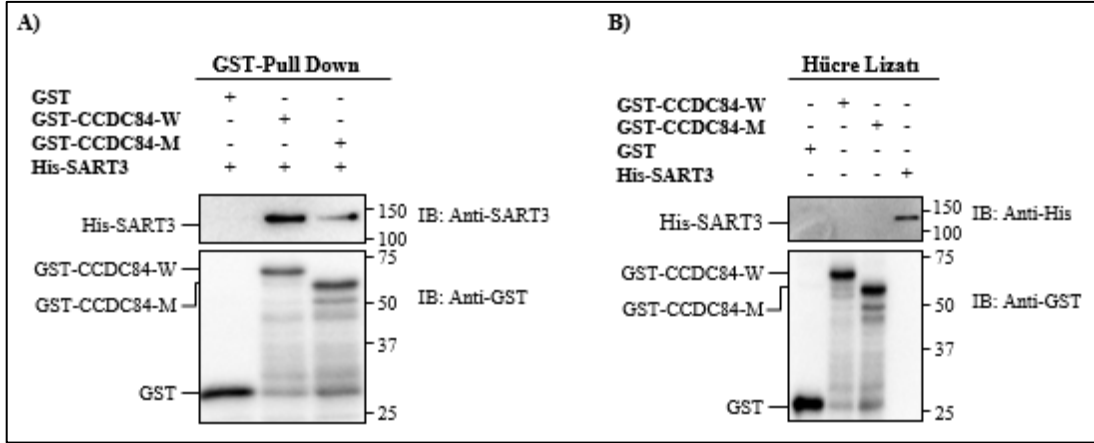
tanımlamış olan mutasyonun bu etkileşim üzerine etkisinin belirlenmesi için pull down deneyi bir kere daha aynı boncuklarla tekrarlandı ve mutasyonun birebir etkileşimi belirgin bir şekilde bozduğu gözlemlendi. Ancak His-SART3'ün boncuklara düşük miktarda da olsa özgün olmayan bağlantısı engellenemedi (Resim 6). His-SART3'ün Anti-FLAG M2 agaroz boncuklarına özgün olmayan bağlanmasından kaynaklı sorunu dışlamak için deney bir kere de rekombinant alpaka-Anti-GST atikoru bağlı olan GST-Trap_A boncukları ile tekrarlandı. GST-CCDC84'ün yem olarak kullanıldığı pull down sonucunda yabancı tip CCDC84'ün SART3 ile birebir etkileştiği ve CCDC84'ün karboksi ucundaki 63 amino asitlik delesyonun bu etkileşimi belirgin bir şekilde azalttığı görüldü (Resim 7).



Resim 5. CCDC84 ile SART3 arasındaki etkileşimin FLAG-Pull down yaklaşımı ile belirlenmesi-1 **A)** FLAG-CCDC84_W'ın yem ve His-SART3'ün av olarak kullanıldığı pull down yaklaşımında çekilen proteinlerin Anti-FLAG ve Anti-SART3 antikorları kullanılarak immünblot analizi. **B)** Pull down deneyinde kullanılan protein izolatlarındaki FLAG-CCDC84_W ve His-SART3'ün ekspresyonları.



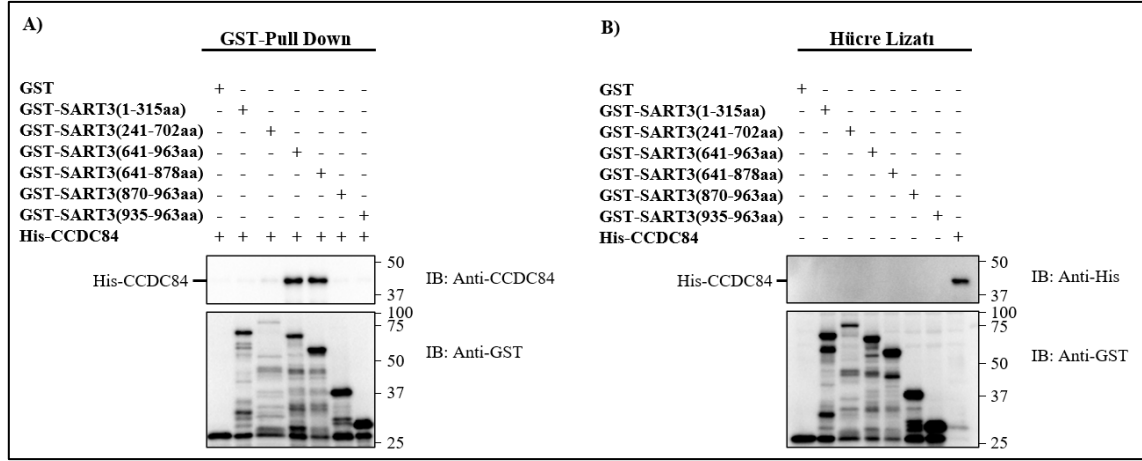
Resim 6. CCDC84 ile SART3 arasındaki etkileşimin FLAG-Pull down yaklaşımı ile belirlenmesi-2 **A)** FLAG-CCDC84_W, FLAG-CCDC84_M proteinlerinin yem ve His-SART3'ün av olarak kullanıldığı pull down yaklaşımında çekilen proteinlerin Anti-FLAG ve Anti-SART3 antikorları kullanılarak immünblot analizi. **B)** Pull down deneyinde kullanılan protein izolatlarındaki FLAG-CCDC84_W, FLAG-CCDC84_M ve His-SART3'ün ekspresyonları.



Resim 7. CCDC84 ile SART3 arasındaki etkileşimin GST-Pull down yaklaşımı ile belirlenmesi **A)** GST-CCDC84_W, GST-CCDC84_M proteinlerinin yem ve His-SART3'ün av olarak kullanıldığı pull down yaklaşımında çekilen proteinlerin Anti-GST ve Anti-SART3 antikorları kullanılarak immünblot analizi. **B)** Pull down deneyinde kullanılan protein izolatlarındaki GST, GST-CCDC84_W, GST-CCDC84_M ve His-SART3'ün ekspresyonları.

4.1.1.1. CCDC84'ün SART3 ile Etkileşimine Aracılık Eden SART3 Domaininin Belirlenmesi

CCDC84 ile doğrudan etkileşen SART3'ün bu etkileşimini hangi domaini üzerinden gerçekleştirdiği *in vitro* koşullarda rekombinant GST antikoruna bağlı olan GST-Trap_A boncukları kullanılarak araştırıldı. GST etiketli SART3 domain fragmanlarının (Resim 2) yem olarak kullanıldığı pull down sonucunda yabancı tip CCDC84'ün SART3'ün 641 ile 878. amino asit kalıntıları arasında kalan RRM (RNA bağlanma motifleri) ile birebir etkileştiği tespit edildi (Resim 8).

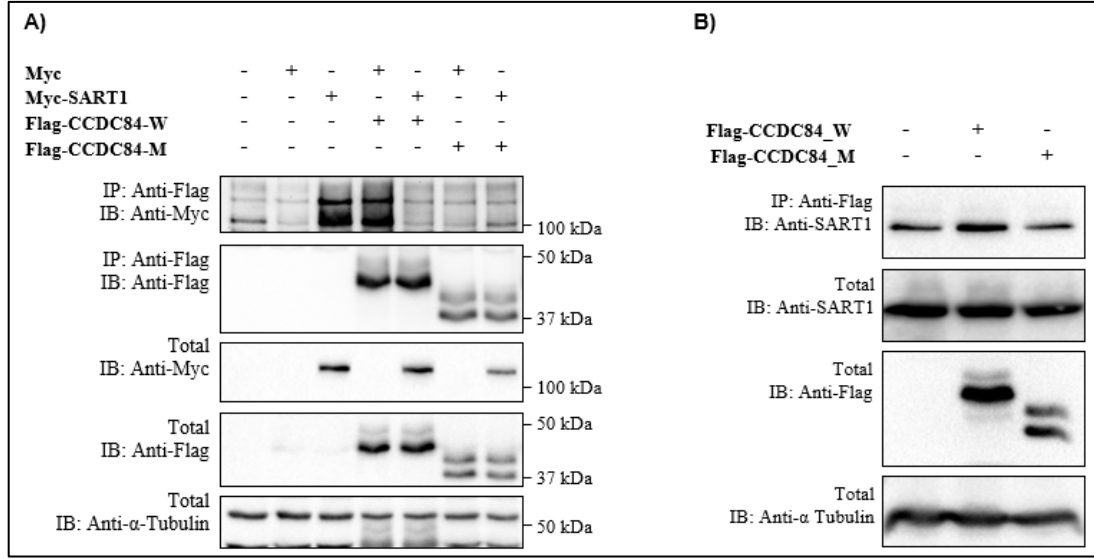


Resim 8. CCDC84 ile SART3 arasındaki etkileşime aracılık eden SART3 domainin GST-Pull down yaklaşımı ile belirlenmesi **A)** GST etiketli proteinlerinin yem, His-CCDC84'ün av olarak kullanıldığı pull down yaklaşımında çekilen proteinlerin Anti-GST ve Anti-CCDC84 antikorları kullanılarak immünblot analizi. **B)** Pull down deneyinde kullanılan protein izolatlarındaki proteinlerin ekspresyonları.

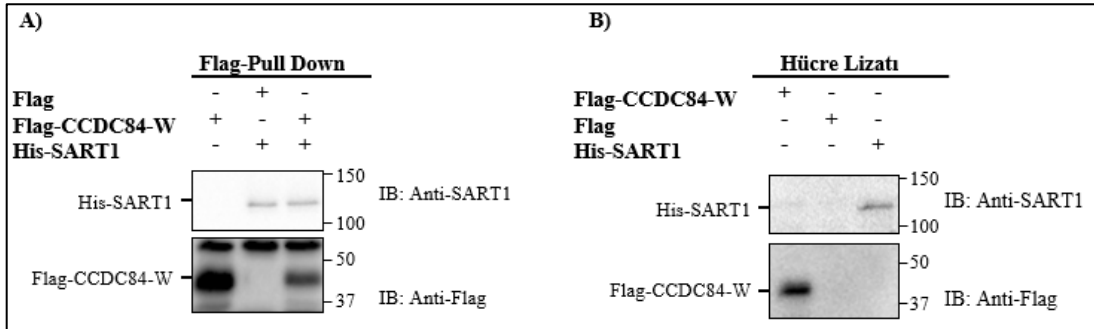
4.1.2. CCDC84'ün SART1 ile Etkileşiminin *in vivo* ve *in vitro* Analizi

CCDC84 ile SART1 proteinleri arasındaki *in vivo* etkileşimin sorgulandığı çalışmanın sonucunda FLAG-CCDC84-W'in Myc-SART1 ile oldukça zayıf bir şekilde etkileştiği görülürken FLAG-CCDC84-M ile SART1 arasında etkileşim gözlenmedi (Resim 9A). FLAG-CCDC84'ün endojen SART1 ile etkileşiminin analiz edildiği çalışmada ise SART1'in özgün olmayan bir şekilde Anti-FLAG M2 agaroz boncuklarına bağlandığı görüldü. Bununla birlikte hem negatif kontrolün hem de mutant CCDC84'ün bulunduğu koşula kıyasla, FLAG-CCDC84'ün endojen SART1'i daha fazla çektiği gözlemlendi (Resim 9B). Bu durum CCDC84 ile SART1 arasında bir etkileşim olabileceği şeklinde değerlendirildi.

CCDC84 ile SART1 arasındaki olası etkileşimin doğrudan olup olmadığı *in vitro* koşullarda analiz edildi. Av olarak kullanılan SART1'in, FLAG-CCDC84 ve FLAG'in yem olarak kullanıldığı koşulda aynı düzeyde çekilmiş olması, FLAG-CCDC84 ile His-SART1'in arasında doğrudan bir etkileşim olmadığı şeklinde değerlendirildi (Resim 10). Yabancı tip CCDC84 ile SART1 arasında bir etkileşim görülmediği için karboksi ucunda 63 amino asitlik delesyon taşıyan mutant CCDC84 ile SART1 arasındaki birebir etkileşim ayrıca sorgulanmadı.



Resim 9. CCDC84'ün SART1 ile etkileşiminin *in vivo* analizi **A)** Myc-SART1'in fazladan eksprese ettirildiği FIp-In-293/FLAG-CCDC84_W ve FIp-In-293/FLAG-CCDC84_M stabil hücrelerinde Anti-FLAG M2 boncukları ile gerçekleştirilen IP sonrası Anti-Myc, Anti FLAG ve Anti-α-tübülin antikorları kullanılarak IB analizi. **B)** FIp-In-293/FLAG-CCDC84_W ve FIp-In-293/FLAG-CCDC84_M stabil hücreleri kullanılarak Anti-FLAG M2 boncukları ile gerçekleştirilen IP sonrası Anti-SART1, Anti-FLAG ve Anti-α-tübülin antikorları kullanılarak IB analizi. IP çalışmalarında kullanılmak üzere hücrelerden izole edilen proteinlerin (Total) eşit miktarda olduğu Anti-α-tübülin antikoruyla yapılan IB ile doğrulandı. IP: İmmünpresipitasyon, IB: İmmünblot.

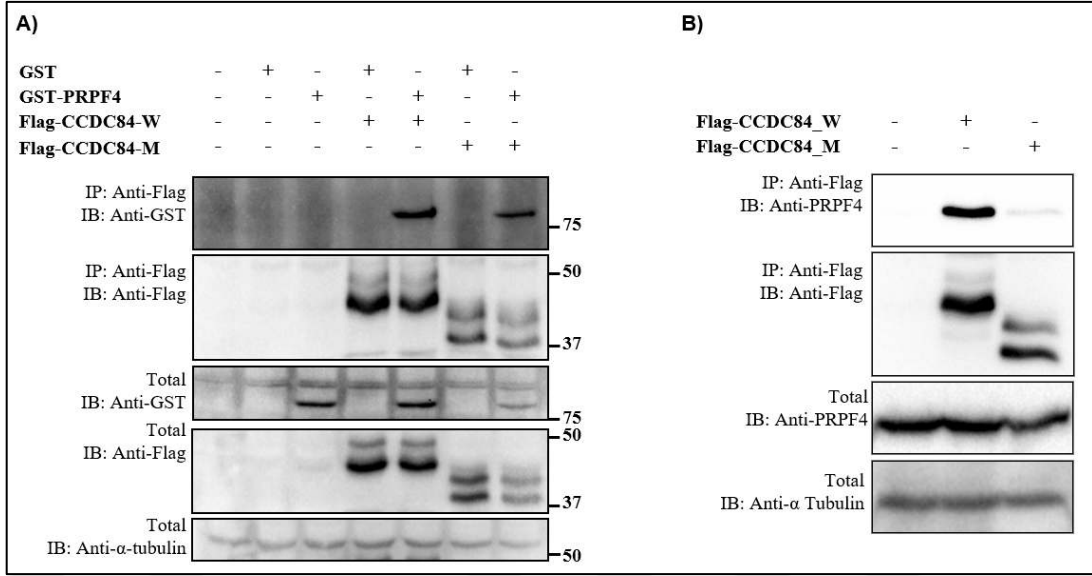


Resim 10. CCDC84 ile SART1 arasındaki etkileşimin FLAG-Pull down yaklaşımı ile belirlenmesi **A)** FLAG-CCDC84_W'ın yem ve His-SART1'in av olarak kullanıldığı pull down yaklaşımında çekilen proteinlerin Anti-FLAG ve Anti-SART1 antikorları kullanılarak immünblot analizi. **B)** Pull down deneyinde kullanılan protein izolatlarındaki FLAG-CCDC84_W ve His-SART1'in ekspresyonları.

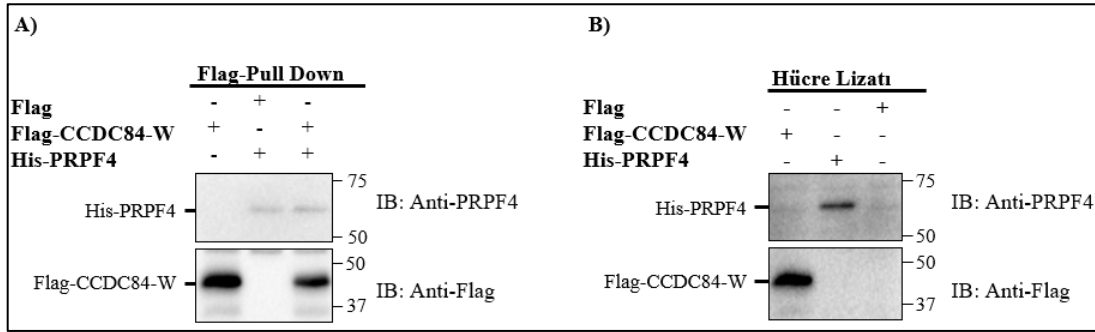
4.1.3. CCDC84'ün PRPF4 ile Etkileşiminin *in vivo* ve *in vitro* Analizi

CCDC84 ile PRPF4 proteinleri arasındaki *in vivo* etkileşimin sorgulandığı çalışmanın sonucunda FLAG-CCDC84_W'nun GST etiketli PRPF4 ile güçlü bir şekilde etkileştiği, CCDC84'ün karboksi ucunda tanımlanmış olan 63 amino asitlik delesyonun bu etkileşimi belirgin bir şekilde azalttığı görüldü (Resim 11A). Bu sonuçlarla uyumlu olarak, Flp-In-293/*FLAG-CCDC84* hücrelerinden elde edilen protein izolatlarında Anti-FLAG M2 boncukları kullanılarak yapılan immünpresipitasyon çalışmaları sonucunda yabancı tip FLAG-CCDC84'ün endojen PRPF4'ü güçlü bir şekilde çektiği, CCDC84'ün karboksi ucunda tanımlanmış olan 63 amino asitlik delesyonun bu etkileşimi belirgin bir şekilde azalttığı gözlemlendi (Resim 11B).

CCDC84 ile PRPF4 arasındaki etkileşimin doğrudan olup olmadığının sorgulandığı *in vitro* analiz sonucunda ise FLAG-CCDC84'ün çekmiş olduğu His-PRPF4 miktarının, kontrol boncuklar tarafından çekilen His-PRPF4 ile aynı miktarda olduğu gözlemlendi (Resim 12). Her iki koşulda da gözlenen bu düşük miktardaki His-PRPF4, boncuklara özgün olmayan bağlanma olarak değerlendirilirken *in vitro* koşullarda bu iki protein arasında etkileşim gözlenmedi. Yabancı tip CCDC84 ile PRPF4 arasında bir etkileşim görülmediği için karboksi ucunda 63 amino asitlik delesyon taşıyan mutant CCDC84 ile PRPF4 arasındaki birebir etkileşim ayrıca sorgulanmadı.



Resim 11. CCDC84'ün PRPF4 ile etkileşiminin *in vivo* analizi **A)** GST-PRPF4'ün fazladan eksprese ettirildiği FIp-In-293/*FLAG-CCDC84_W* ve FIp-In-293/*FLAG-CCDC84_M* stabil hücrelerinde Anti-FLAG M2 boncukları ile gerçekleştirilen IP sonrası Anti-GST, Anti FLAG ve Anti-α-tübülin antikorları kullanılarak IB analizi. **B)** FIp-In-293/*FLAG-CCDC84_W* ve FIp-In-293/*FLAG-CCDC84_M* stabil hücreleri kullanılarak Anti-FLAG M2 boncukları ile gerçekleştirilen IP sonrası Anti-PRPF4, Anti-FLAG ve Anti-α-tübülin antikorları kullanılarak IB analizi. IP çalışmaları kullanılmak üzere hücrelerden izole edilen proteinlerin (Total) eşit miktarda olduğu Anti-α-tübülin antikoruyla yapılan IB ile doğrulandı. IP: İmmünpresipitasyon, IB: İmmünblot.

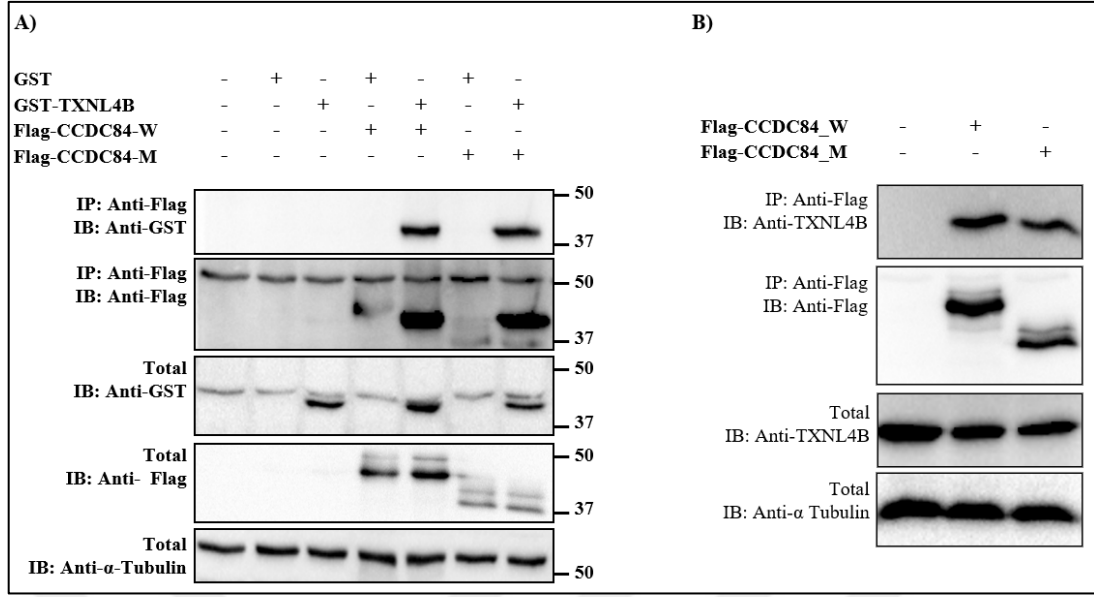


Resim 12. CCDC84 ile PRPF4 arasındaki etkileşimin FLAG-Pull down yaklaşımı ile belirlenmesi **A)** FLAG-CCDC84_W'nin yem ve His-PRPF4'ün av olarak kullanıldığı pull down yaklaşımında çekilen proteinlerin Anti-FLAG ve Anti-PRPF4 antikorları kullanılarak immünblot analizi. **B)** Pull down deneyinde kullanılan protein izolatlarındaki FLAG-CCDC84_W ve His-SART1'in ekspresyonları.

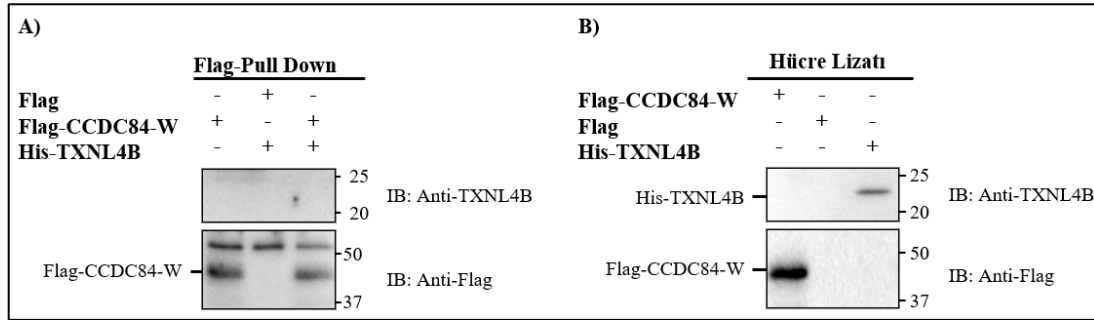
4.1.4. CCDC84'ün TXNL4B ile Etkileşiminin *in vivo* ve *in vitro* Analizi

CCDC84 ile TXNL4B proteinleri arasındaki etkileşimin sorgulandığı *in vivo* immünpresipitasyon yaklaşımıyla, Flag etiketli yabancı tip CCDC84'ün GST-TXNL4B ile güçlü bir şekilde etkileştiği görüldü. CCDC84'ün karboksi ucunda tanımlanan 63 amino asitlik delesyon bu etkileşimi belirgin bir şekilde etkilememektedir (Resim 13A). Benzer şekilde, Flag etiketli yabancı tip CCDC84 ile endojen TXNL4B arasındaki etkileşimin sorgulandığı çalışma sonucunda da iki protein arasında güçlü bir etkileşim gözlenirken CCDC84 üzerinde tanımlanmış olan 63 amino asitlik delesyonun bu etkileşimi belirgin bir şekilde değiştirmediği görüldü (Resim 13B).

CCDC84 ile TXNL4B arasında gözlenen *in vivo* etkileşimin doğrudan olup olmadığı *in vitro* yaklaşımla sorgulandığında FLAG-CCDC84'ün yem ve His-TXNL4B'nin av olarak kullanıldığı pull down deneyi sonucunda Flag etiketli yabancı tip CCDC84 ile TXNL4B arasında doğrudan bir etkileşimin olmadığı görüldü (Resim 14). Bu aşamada, CCDC84'ün karboksi ucunda 63 amino asitlik delesyon taşıyan mutant CCDC84 ile TXNL4B arasındaki etkileşim ayrıca test edilmedi.



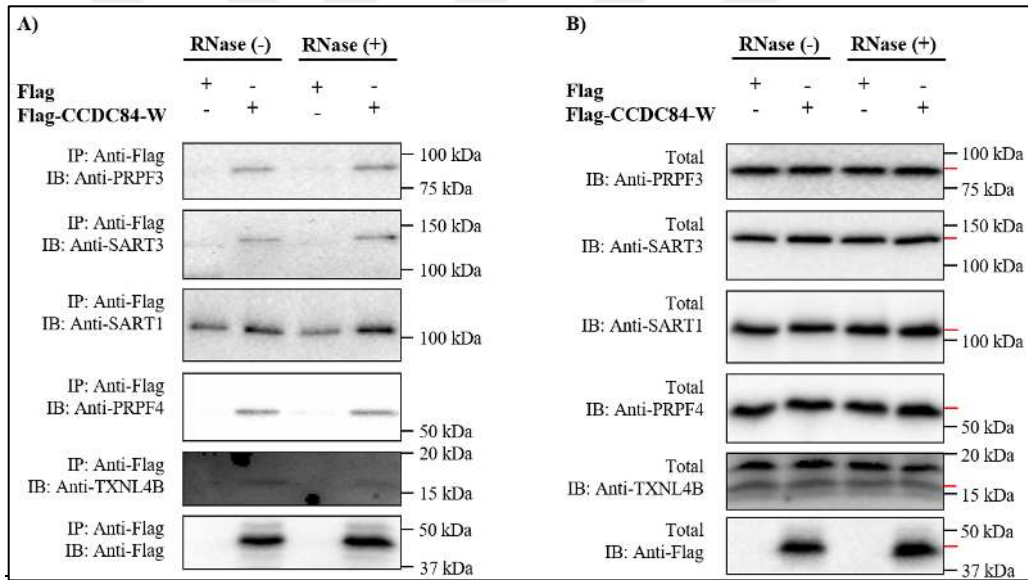
Resim 13. CCDC84'ün TXNL4B ile etkileşiminin *in vivo* analizi **A)** GST-TXNL4B'nin fazladan eksprese ettirildiği Flp-In-293/*FLAG-CCDC84_W* ve Flp-In-293/*FLAG-CCDC84_M* stabil hücrelerinde Anti-FLAG M2 boncukları ile gerçekleştirilen IP sonrası Anti-GST, Anti FLAG ve Anti- α -tübulin antikorları kullanılarak IB analizi. **B)** Flp-In-293/*FLAG-CCDC84_W* ve Flp-In-293/*FLAG-CCDC84_M* stabil hücreleri kullanılarak Anti-FLAG M2 boncukları ile gerçekleştirilen IP sonrası Anti-TXNL4B, Anti-FLAG ve Anti- α -tübulin antikorları kullanılarak IB analizi. IP çalışmalarında kullanılmak üzere hücrelerden izole edilen proteinlerin (Total) eşit miktarda olduğu Anti- α -tübulin antikoruyla yapılan IB ile doğrulandı. IP: İmmünpresipitasyon, IB: İmmünblot.



Resim 14. CCDC84 ile TXNL4B arasındaki etkileşimin FLAG-Pull down yaklaşımı ile belirlenmesi **A)** FLAG-CCDC84_W'nin yem ve His-TXNL4B'nin av olarak kullanıldığı pull down yaklaşımında çekilen proteinlerin Anti-FLAG ve Anti-TXNL4B antikorları kullanılarak immünblot analizi. **B)** Pull down deneyinde kullanılan protein izolatlarındaki FLAG-CCDC84_W ve His-TXNL4B'nin ekspresyonları.

4.1.5. CCDC84'ün SART3, SART1, PRPF4 ve TXNL4B ile *in vivo* Etkileşimlerine RNaz'ın Etkisi

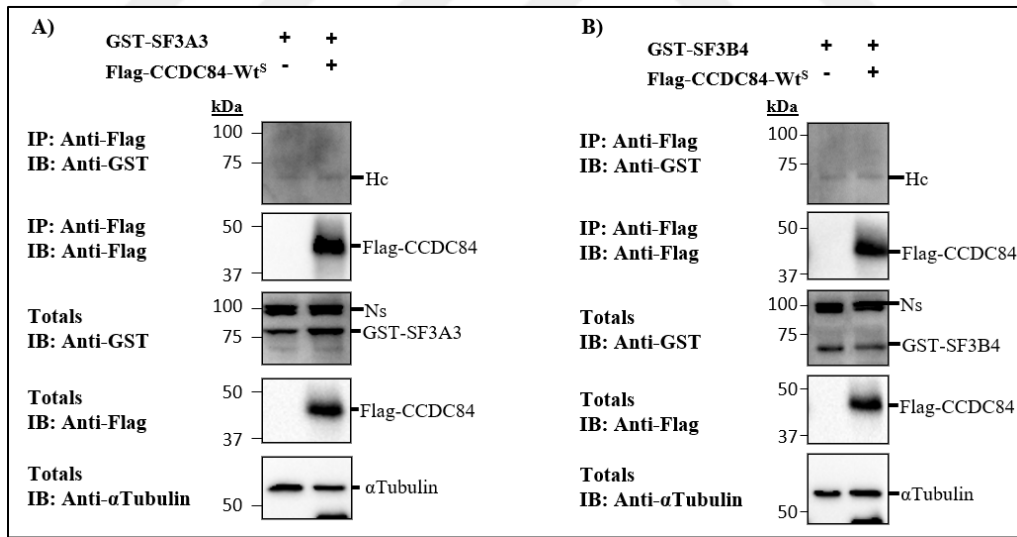
CCDC84 ile ilgili proteinler arasındaki etkileşimin RNA'ya bağımlı olup olmadığını belirlemek için immünpresipitasyon deneyi protein izolatları RNaze ile muamele edildikten sonra yeniden tekrarlandı. Bu kapsamda Flp-In-293/*FLAG-CCDC84_W* hücrelerinden elde edilen protein izolatları immünpresipitasyon öncesi RNaz ile muamele edildi. İmmünpresipitasyon sonrası FLAG-CCDC84'ün çektiği proteinler Anti-FLAG, Anti-PRPF3, Anti-SART3, Anti-SART1, Anti-PRPF4 ve Anti-TXNL4B antikorları kullanılarak immünblot ile incelendi. Deney sonucunda FLAG-CCDC84 ile endojen PRPF3, SART3, SART1, PRPF4 ve TXNL4B arasındaki *in vivo* etkileşiminin RNA'ya bağımlı olmadığı görüldü (Resim 15).



Resim 15. CCDC84'ün PRPF3, SART3, SART1, PRPF4 ve TXNL4B ile *in vivo* etkileşimlerine RNaz'ın etkisi **A)** RNaz muamelesi yapılmayan ve yapılan FLAG-CCDC84_W hücrelerinden elde edilen protein izolatları ile yapılan IP sonrası çekilen proteinlerin Anti-FLAG, Anti-PRPF3, Anti-SART3, Anti-SART1, Anti-PRPF4 ve Anti-TXNL4B antikorları kullanılarak immünblot analizi. **B)** IP çalışmalarında kullanılan hücrelerden izole edilen protein izolatlarında (Total) etkileşimi aranan proteinlerin ekspresyonları.

4.2. CCDC84 ile U1/U2 di-snRNP Bileşeni SF3A3 ve SF3B4 Arasındaki Etkileşimin Analizi

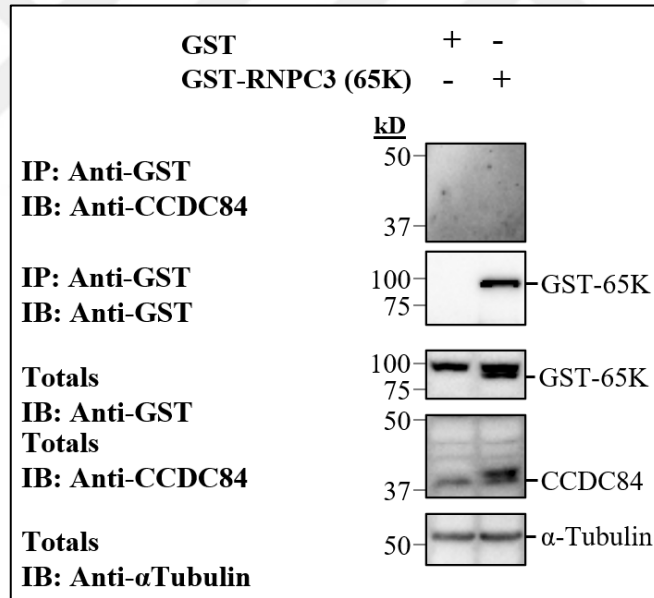
CCDC84'ün U2 tip RNA kırılma sürecindeki yerini sorgulamaya yönelik olarak, U4/U6·U5 tri-snRNP'nin sürece dahil olması ile kompleks B'nin oluşması ve sonrasında U1 ve U4 snRNP'lerin yapıdan ayrılması ile kompleks B*'ın oluşması (Şekil 10) dikkate alınarak, CCDC84 ile U1 snRNP'nin kor proteinleri olan SF3A3 ve U2 snRNP'nin kor proteini olan SF3B4'ün *in vivo* etkileşimi test edildi. Bu kapsamda, Flp-In-293 hücreleri, pDEST27-GST-SF3A3 ve pDEST27-GST-SF3B4 plazmitleri ile geçici olarak transfekte edildi. Transfeksiyondan 27 saat sonra hücrelerden elde edilen protein izolatları kullanılarak GST-trap boncukları ile immünpresipitasyon gerçekleştirildi. İmmünpresipitasyon sonucu elde edilen proteinler Anti-CCDC84 ve Anti-GST antikorları kullanılarak immünblot ile incelendi. Analiz sonucunda CCDC84 ile SF3A3 ve SF3B4 proteinleri ile *in vivo* etkileşim içinde olmadığı (Resim 16) ve dolayısı ile CCDC84'ün kompleks B ve kompleks B*'ın yapısında yer almadığı görüldü.



Resim 16. CCDC84'ün SF3A3 ve SF3B4 ile etkileşiminin *in vivo* analizi. A) GST-SF3A3'ün fazladan eksprese ettirildiği Flp-In-293/FLAG-CCDC84_W stabil hücrelerinde FLAG M2 boncukları ile gerçekleştirilen IP sonrası Anti-GST ve Anti-FLAG antikorları kullanılarak IB analizi. B) GST-SF3B4'ün fazladan eksprese ettirildiği Flp-In-293/FLAG-CCDC84_W stabil hücrelerinde FLAG M2 boncukları ile gerçekleştirilen IP sonrası Anti-GST ve Anti-FLAG antikorları kullanılarak IB analizi. IP çalışmalarında kullanılmak üzere hücrelerden izole edilen proteinlerin (Total) eşit miktarda olduğu Anti-α-tübülin antikoruyla yapılan IB ile doğrulandı. IP: İmmünpresipitasyon, IB: İmmünblot. Hc: Heavy chain/ağır zincir, Ns: non-spesifik

4.3. CCDC84 ile U11/U12 di-snRNP Bileşeni RNPC3 Arasındaki Etkileşimin Analizi

CCDC84'ün U12 tip RNA kırılma sürecindeki yerini sorgulamaya yönelik olarak, U4atac/U6atac·U5 tri-snRNP'nin sürece dahil olması ile B kompleksin oluşması ve sonrasında U11 ve U4atac snRNP'lerin yapıdan ayrılması ile B* kompleksin oluşması (Şekil 12) dikkate alınarak, CCDC84 ile U12 snRNP'nin kor proteini olan RNPC3'ün (65K) *in vivo* etkileşimi test edildi. Bu kapsamda, Flp-In-293 hücreleri, pDEST27-GST- RNPC3 plazmiti ile geçici olarak transfekte edildi. Transfeksiyondan 27 saat sonra hücrelerden elde edilen protein izolatları kullanılarak GST-trap boncukları ile immünpresipitasyon gerçekleştirildi. GST-trap boncuklarından ayrıştırılan proteinler Anti-CCDC84 ve Anti-GST antikorları kullanılarak immünbloet ile incelendi. Analiz sonucunda CCDC84'ün RNPC3 proteini ile *in vivo* etkileşim içinde olmadığı (Resim 17) ve dolayısı ile CCDC84'ün B kompleks ve B* kompleksin yapısında yer almadığı görüldü.

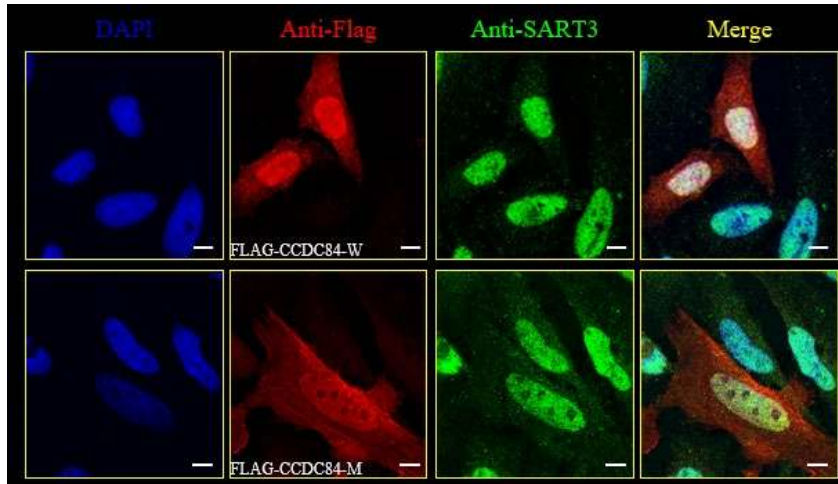


Resim 17. CCDC84'ün RNPC3 ile etkileşiminin *in vivo* analizi. GST-RNPC3'ün fazladan eksprese ettirildiği Flp-In-293 hücrelerinde GST-Trap boncukları ile gerçekleştirilen IP sonrası Anti CCDC84 ve Anti-GST antikorları kullanılarak IB analizi. IP çalışmalarında kullanılmak üzere hücrelerden izole edilen proteinlerin (Total) eşit miktarda olduğu Anti-α-tübülin antikoruyla yapılan IB ile doğrulandı. IP: İmmünpresipitasyon, IB: İmmünbloet.

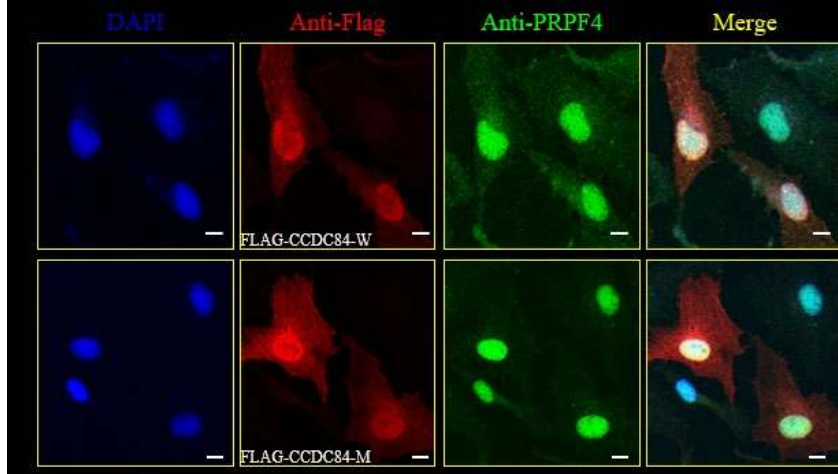
4.4. CCDC84 ile Etkileşen Proteinlerin Hücre İçi Yerleşimi ve Mutant CCDC84'ün Proteinlerin Yerleşimi Üzerine Etkisi

CCDC84 ile etkileşimi gösterilen SART3, PRPF4, SART1 ve TXNL4B proteinlerinin hücre içi yerleşimi, bu proteinlerin CCDC84 ile lokalize olup olmadığı ve CCDC84 üzerinde tanımlanan mutasyonun bu proteinlerin hücre içi yerleşimi üzerine etkisi immünofloresan yöntemiyle incelendi. Bu kapsamda Flag etiketli yabanıl tip ve mutant CCDC84 HeLa hücrelerinde fazladan eksprese ettirildi. Fazladan eksprese ettirilen FLAG-CCDC84_W ve FLAG-CCDC84_M proteinleri Anti-FLAG antikoru ile görüntülenirken SART3, PRPF4, SART1 ve TXNL4B proteinleri bu proteinlerin her birine özgü antikorlar ile görüntülendi (Resim 18, 19, 20 ve 21).

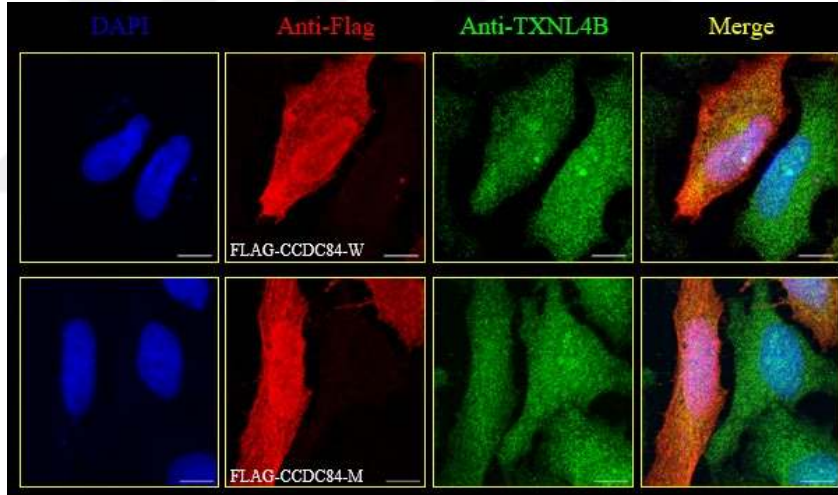
Yapılan analizler sonucunda fazladan eksprese ettirilen Flag etiketli yabanıl tip CCDC84 belirgin bir şekilde çekirdekte yerleşim gösterirken sitoplazmada da hafif bir şekilde yerleşimi görüldü. Grubumuz tarafından tanımlanan karboksi ucunda 63 amino asitlik delesyon taşıyan mutant CCDC84'ün ise bu yerleşime belirgin bir etkisi görülmedi. CCDC84 ile etkileşimi sorgulanan SART3, PRPF4, SART1 ve TXNL4B proteinlerinden SART3, PRPF4 ve SART1'in CCDC84 ile çekirdekte birlikte yerleşim gösterdiği görüldü. Ancak TXNL4B'nin belirgin bir çekirdek yerleşimi gözlenmedi.



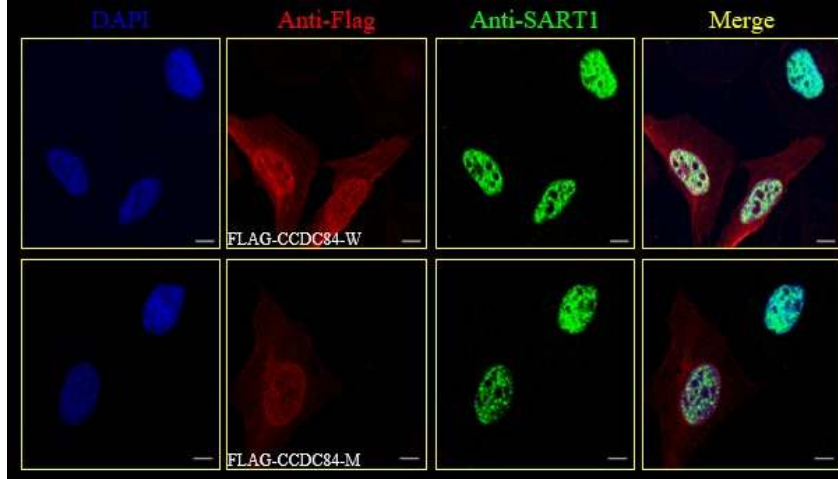
Resim 18. HeLa hücrelerinde CCDC84 ve SART3'ün hücresel lokalizasyonlarının gösterilmesi. FLAG-CCDC84_W ve endojen SART3 çekirdekte birlikte lokalize olmaktadır. FLAG-CCDC84_M, CCDC84'ün hücresel lokalizasyonunu ve SART3 ile birlikte lokalizasyonunu değiştirmemektedir. DAPI: Mavi, Cy3: Kırmızı, Alexa Fluor 488: Yeşil. Ölçek çubuğu: 10 µm.



Resim 19. HeLa hücrelerinde CCDC84 ve PRPF4'ün hücresel lokalizasyonlarının gösterilmesi. FLAG-CCDC84_W ve endojen PRPF4 çekirdekte birlikte lokalize olmaktadır. FLAG-CCDC84_M, CCDC84'ün hücresel lokalizasyonunu ve PRPF4 ile birlikte lokalizasyonunu değiştirmemektedir. DAPI: Mavi, Cy3: Kırmızı, Alexa Fluor 488: Yeşil. Ölçek çubuğu: 10 μm.



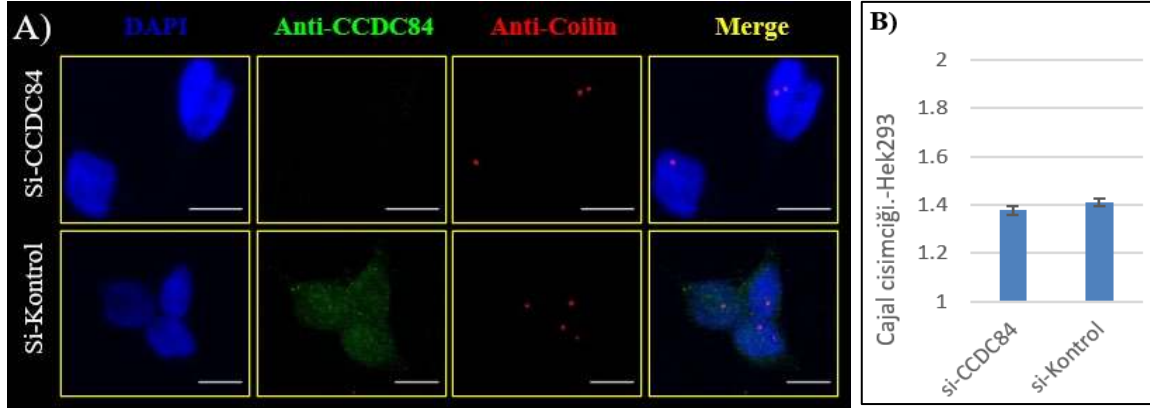
Resim 20. HeLa hücrelerinde CCDC84 ve TXNL4B'nin hücresel lokalizasyonlarının gösterilmesi. FLAG-CCDC84_W ve endojen TXNL4B çekirdekte birlikte lokalize olmaktadır. FLAG-CCDC84_M, CCDC84'ün hücresel lokalizasyonunu ve TXNL4B ile birlikte lokalizasyonunu değiştirmemektedir. DAPI: Mavi, Cy3: Kırmızı, Alexa Fluor 488: Yeşil. Ölçek çubuğu: 10 μm.



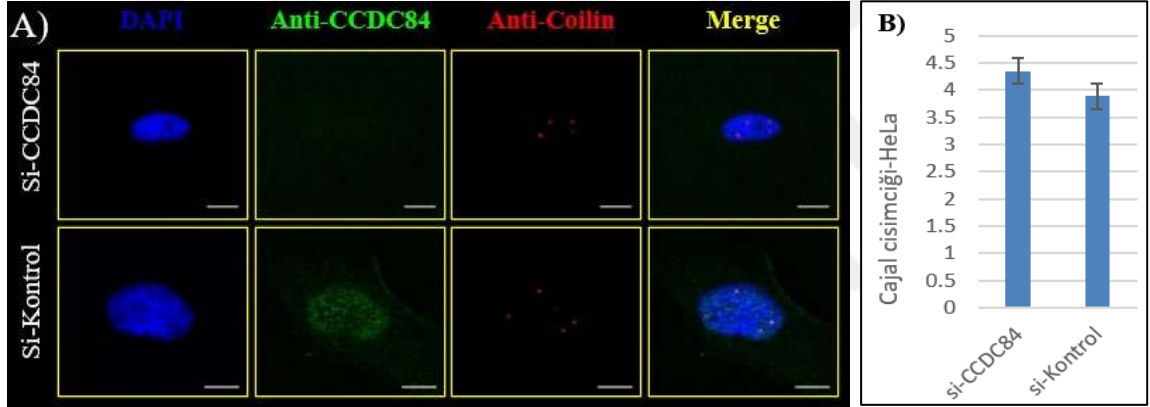
Resim 21. HeLa hücrelerinde CCDC84 ve SART1'in hücresel lokalizasyonlarının gösterilmesi. FLAG-CCDC84_W ve endojen SART1 çekirdekte birlikte lokalize olmaktadır. FLAG-CCDC84_M, CCDC84'ün hücresel lokalizasyonunu ve SART1 ile birlikte lokalizasyonunu değiştirmemektedir. DAPI: Mavi, Cy3: Kırmızı, Alexa Fluor 488: Yeşil. Ölçek çubuğu: 10 μ m.

4.5. CCDC84 Eksikliğinin Cajal Cisimciği Oluşumu Üzerine Etkisinin İncelenmesi

CCDC84'ün eksikliğinin Cajal cisimciğinin sayı ve boyutuna etkisi CCDC84'ün siRNA ile susturulduğu HeLa ve HEK293 hücrelerinde analiz edildi. Bu kapsamda Cajal cisimcik markırı olan Coilin proteini immünfloresan yöntemiyle görüntülenerek Cajal cisimcikler sayısal ve boyut olarak değerlendirildi. Her bir deney 3 kez tekrarlandı ve hazırlanan her bir preparattan 100 hücrede Cajal cisimcik sayıldı. Sayılan Cajal cisimciklerin aritmetik ortalaması hesaplanarak Student-T testi uygulandı. Sonuç olarak CCDC84'ün siRNA ile susturulduğu hücrelerde Cajal cisimcik sayısında anlamlı bir fark bulunmazken ($p>0.05$) Cajal cisimciklerin boyut ve yapılarında ayırt edilebilir bir fark gözlenmedi (Resim 22 ve 23).



Resim 22. CCDC84'ün eksikliğinin HEK293 hücrelerinde Cajal cisimciği sayısı ve yapısı üzerine etkisinin analizi. **A)** Cajal cisimciklerinin immüno Floresan ile gösterimi. **B)** Cajal cisimciklerinin istatistiksel analizi. DAPI: Mavi, Cy3: Kırmızı, Alexa Fluor 488: Yeşil. Ölçek çubuğu: 10 μ m.



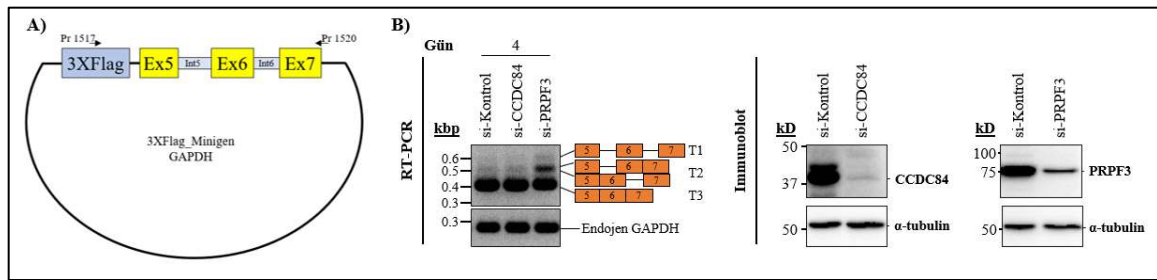
Resim 23. CCDC84'ün eksikliğinin HeLa hücrelerinde Cajal cisimciği sayısı ve yapısı üzerine etkisinin analizi. **A)** Cajal cisimciklerinin immüno Floresan ile gösterimi. **B)** Cajal cisimciklerinin istatistiksel analizi. DAPI: Mavi, Cy3: Kırmızı, Alexa Fluor 488: Yeşil. Ölçek çubuğu: 10 μ m.

4.6. CCDC84'ün RNA Kırılması Üzerine Etkisinin Minigen ile Analizi

CCDC84'ün RNA kırılması ve alternatif RNA kırılma mekanizmasında rolünün olup olmadığı minigen yaklaşımı kullanılarak araştırıldı. Bu amaçla U2 tip intronu temsilen *GAPDH* geninin 6 ve 7. intronlarını eksprese etmek üzere tasarlanan *GAPDH*-minigeni kullanıldı (Resim 24A). U2 tip intronlarda RNA kırılması ve alternatif RNA kırılma test etmek üzere ise *MSTR1* geninin 10 ve 11. intronlarını eksprese etmek üzere tasarlanan *MSTR1*-minigen kullanıldı (Resim 25A). Ayrıca, U12 tip intronların kırılmasını test etmek üzere de *GPAAL* geninin 8. intronunu içeren bir mRNA eksprese etmek üzere tasarlanan *GPAAL*-minigeni kullanıldı (Resim 26A). Oluşturulan minigenler, CCDC84'ün siRNA ile

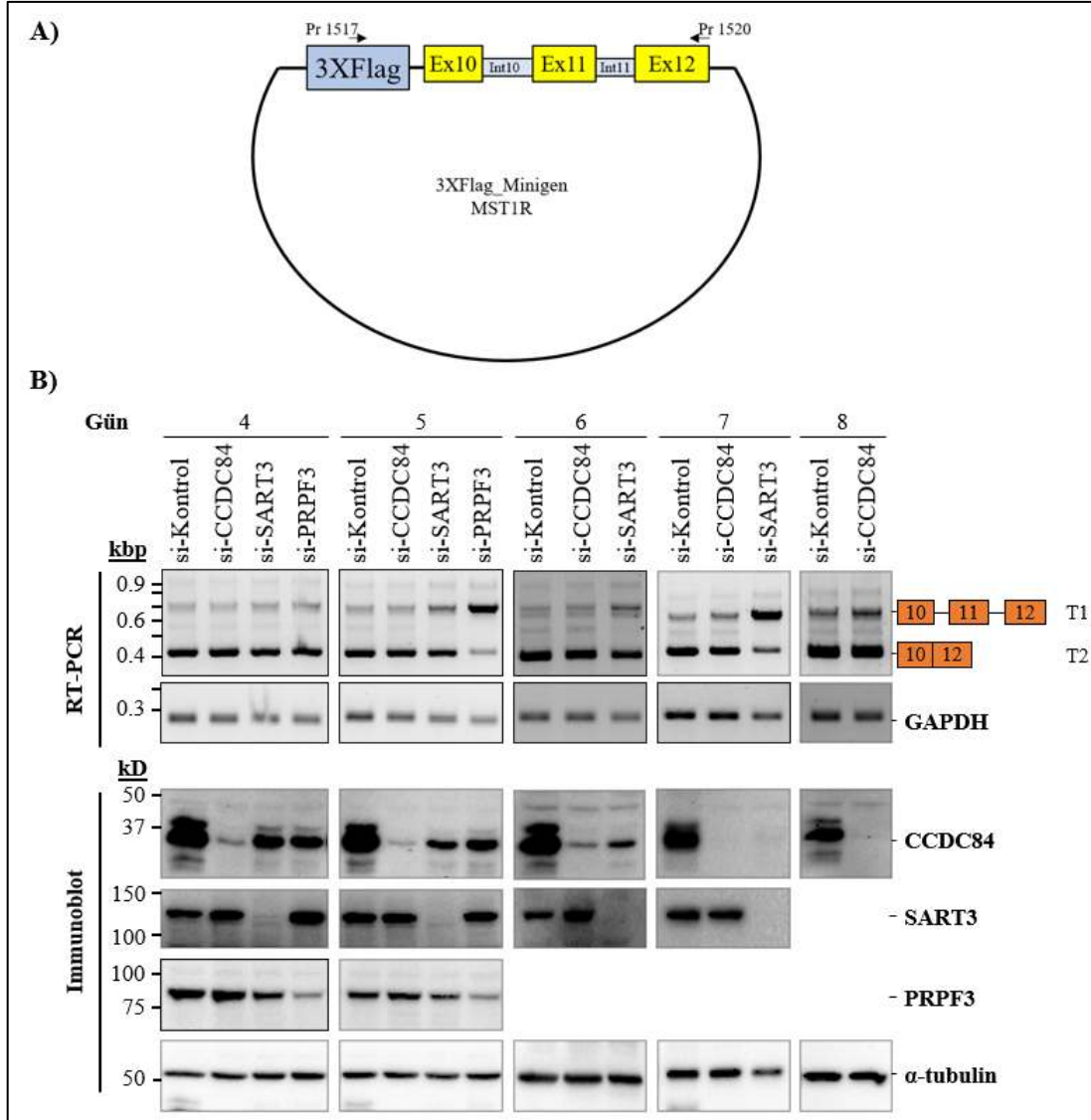
susturulduğu HEK293 hücrelerinde eksprese ettirildikten sonra izole edilen RNA kullanılarak, minigenlerden eksprese olan RNA'ların kırılması RT-PCR ile analiz edildi. si-Kontrolün yanında, PRPF3 ve SART3'ün siRNA ile susturulduğu koşullar kontrol olarak kullanıldı.

Sonuç olarak, PRPF3'ün susturulduğu durumda minigen tarafından eksprese edilen mRNA yapısında yer alan *GAPDH*'e ait 5 ve 6'ncı intronların kırılmasının negatif kontrole kıyasla belirgin bir şekilde bozulduğu gözlenirken CCDC84'ün siRNA ile susturulduğu durumda kırılmanın etkilenmediği görüldü (Resim 24B).



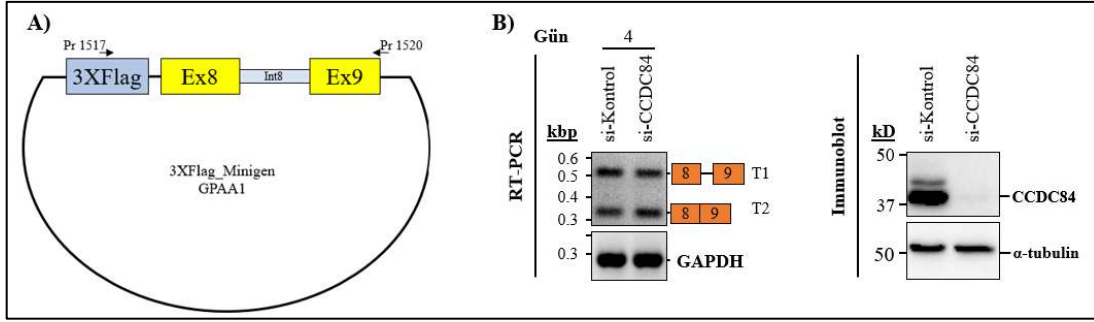
Resim 24. CCDC84'ün U2 tip intron kırılması üzerine etkisinin minigen ile analizi. A) Tasarlanan GAPDH minigeninin şeması. B) Minigen üzerinden eksprese edilen mRNA'nın yapısından intronların çıkartılıp çıkartılmadığının RT-PCR ile analizi ve siRNA ile susturulan CCDC84 ve PRPF3'ün protein düzeylerinin immünblot ile gösterimi. RT-PCR analizinde kullanılan RNA miktarının eşit olduğunun gösterilmesi için GAPDH, immünblot çalışmasında protein miktarlarının eşit olduğunun gösterilmesi için alfa (α)-tübülin kullanıldı.

Aynı şekilde, CCDC84'ün U2 tip intronların ve alternatif RNA kırılması üzerine etkisinin sorgulandığı deney sonucunda; PRPF3 ve SART3'ün susturulduğu koşullarda negatif kontrole kıyasla belirgin bir şekilde RNA kırılması bozulurken CCDC84'ün susturulduğu koşullarda RNA kırılmasının bozulmadığı görüldü (Resim 25B).



Resim 25. CCDC84'ün U2 tip intron alternatif RNA kırılması üzerine etkisinin minigen ile analizi. **A)** Tasarlanan *MST1R* minigeninin şeması. **B)** Minigen üzerinden eksprese edilen mRNA'nın yapısından intronların çıkartılıp çıkartılmadığının RT-PCR ile analizi ve siRNA ile susturulan CCDC84, PRPF3 ve SART3'ün protein düzeylerinin immünblot ile gösterimi. RT-PCR analizinde kullanılan RNA miktarının eşit olduğunun gösterilmesi için GAPDH, immünblot çalışmasında protein miktarlarının eşit olduğunun gösterilmesi için α -tübulin kullanıldı.

U12 tip intron çıkarılmasında CCDC84'ün rolünün sorgulandığı çalışmada da benzer şekilde CCDC84'ün susturulmasına bağlı olarak RNA kırılmasının bozulmadığı gözlemlendi (Resim 26B).

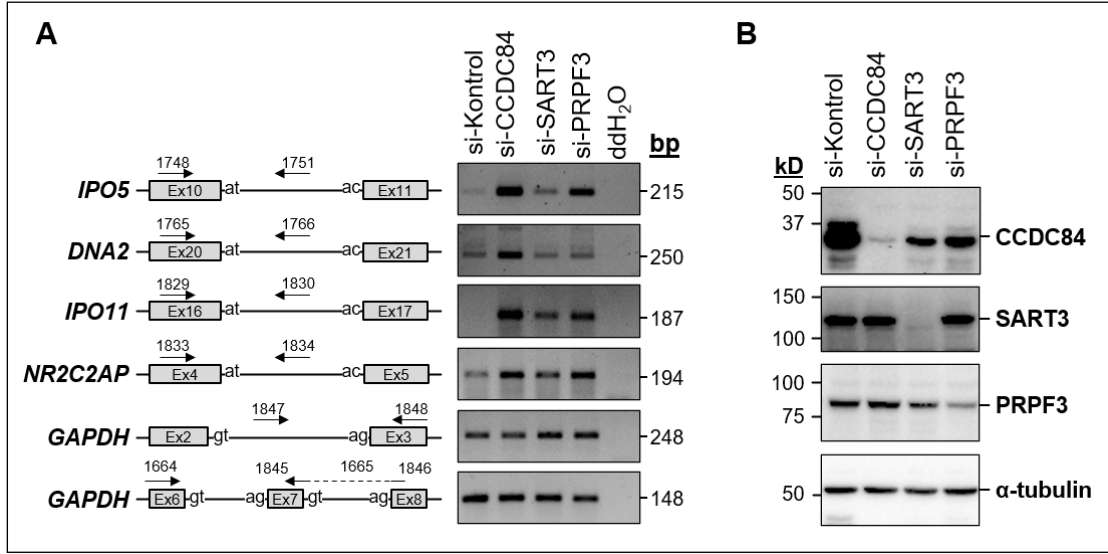


Resim 26. CCDC84'ün U12 tip intron RNA kırılması üzerine etkisinin minigen ile analizi.

A) Kullanılan minigenin şematize hali. **B)** Minigen üzerinden eksprese edilen mRNA'nın yapısından intronların çıkartılıp çıkartılmadığının RT-PCR ile analizi ve siRNA ile susturulan CCDC84'ün protein düzeylerinin immünblot ile gösterimi. RT-PCR analizinde kullanılan RNA miktranın eşit olduğunun gösterilmesi için GAPDH, immünblot çalışmasında protein miktarlarının eşit olduğunun gösterilmesi için α -tübulin kullanıldı.

4.7. CCDC84'ün U12 Tip İntronların Kırılması Üzerine Genişletilmiş Analizi

de Wolf B. ve ark. tarafından Mayıs 2021'de CCDC84'ün susturulduğu HEK293 hücrelerinde, yalnızca 700 minör introndan 100'ünün kırılmasının bozulurken diğer majör ve minör intronların transkript üzerinden çıkartılmasının etkilenmediği gösterildi (176). Bu noktadan hareketle *de Wolf B. ve ark.* tarafından belirlenen minör intronların çıkartılma düzeyleri CCDC84, SART3 ve PRPF3 genlerinin susturulduğu koşullarda karşılaştırıldı. Sonuç olarak, CCDC84'ün susturulduğu koşullarda, seçilen minör intronların kırılmasının SART3 ve PRPF3'e kıyasla daha ileri düzeyde bozulduğu görüldü (Resim 27).



Resim 27. Seçilen minör intronların kırılmasında CCDC84, SART3 ve PRPF3'ün rolünün RT-PCR ile analizi. **A)** Seçilen genlerdeki minör intronların ve kırılmaya uğramamış mRNA'ların amplifikasyonunda kullanılan RT-PCR primerlerinin yerleşimi sol tarafta şematize edilmiştir. Her bir gen için yapılan RT-PCR ürünlerinin agaroz jel elektoroforez görüntüsü ilgili genin karşısında kalacak şekilde sağ tarafta gösterildi. İleri primerler sağa yönelik oklar ile geri primerler sola yönelik oklarla gösterildi. Her bir primerin kayıt numarası karşılık geldiği okun üzerinde verildi. **B)** siRNA ile susturulan CCDC84, SART3 ve PRPF3'ün protein düzeylerinin immünblot ile gösterimi. RT-PCR analizinde kullanılan RNA miktranın eşit olduğunun gösterilmesi için GAPDH, immünblot çalışmasında protein miktarlarının eşit olduğunun gösterilmesi için α -tübülin kullanıldı

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu tez çalışmasında, ilk kez grubumuz tarafından mutasyonu MPD ile ilişkilendirilen ve RNA kırılma (*splicing*) mekanizmasında rol oynayan U4 snRNP kor proteinlerinden PRPF3 ile doğrudan etkileşimi gösterilen CCDC84'ün (36) çok basamaklı bir süreç olan RNA kırılmasındaki rolünü aydınlatmaya yönelik olarak diğer etkileşim partnerleri ve RNA kırılma sürecindeki yeri ve işlevi araştırıldı.

CCDC84'ün PRPF3 ile *in vivo/in vitro* etkileşimi ve CCDC84'ün C-terminalinden 63 amino asitlik delesyonuna yol açan erken sonlanma mutasyonunun (g.25734_25737del; p.Lys269Serfs10Stop) bu etkileşimi bozması CCDC84'ün tanımlanan hastalıktan sorumlu olduğunu desteklerken, RNA kırılması mekanizmasında da rol oynadığına işaret etmektedir (36). Diğer taraftan, yine grubumuz tarafından yürütülen immünpresipitasyon-kütle spektrometresi analizi sonucunda CCDC84 ile etkileştiği gösterilmiş olan ROA1'in (Tablo 1) RNA kırılma mekanizması ile ilişkili olması (177-179) ve BioGRID veri bankasında paylaşılan kırılmada görevli SART3, SART1, PRPF4 ve TXNL4B'nin CCDC84 ile *in vivo* etkileşimleri (117) bu proteinin RNA kırılma mekanizmasında rol aldığı fikrini desteklerken, süreçteki görevinin ne olduğuna açıklık getirmemektedir.

CCDC84'ün SART3, SART1, PRPF4 ve TXNL4B ile etkileşimlerinin ileri düzeyde araştırıldığı bu çalışmada; CCDC84'ün, SART3'ün karboksi ucuna yakın ardışık olarak yerleşimli iki RNA tanıma motifi (RRM) ile doğrudan etkileştiği ve CCDC84 üzerinde tanımlanan erken sonlanma mutasyonunun bu etkileşimi belirgin bir şekilde bozduğu görüldü (Resim 7, 8 ve 9). Buna karşın SART1, PRPF4 ve TXNL4B'nin CCDC84 ile aynı kompleks içinde yer aldığı (Resim 10, 12 ve 14) ancak doğrudan etkileşim içinde olmadığı gösterildi (Resim 11, 13 ve 15). mRNA yokluğunda gözlemlenen etkileşimlerin bozulmaması (Resim 16) CCDC84 ile SART3, SART1, PRPF4 ve TXNL4B arasındaki etkileşimin mRNA bağımlı olmadığını gösterdi. Bununla birlikte, CCDC84 üzerinde tanımlanan erken sonlanma mutasyonunun yalnızca PRPF4 ile kompleks üzerinden olan etkileşimi olumsuz olarak etkilediği, kompleks üzerinden görülen SART1 ve TXNL4B ile etkileşimi etkilemediği belirlendi (Resim 10, 12 ve 14). CCDC84'ün SART3, SART1 ve PRPF4 proteinleriyle birlikte çekirdekte lokalizasyonu tanımlanan etkileşimleri destekledi (Resim 19, 20, 21 ve 22).

CCDC84'ün RNA kırılması üzerine etkisini belirlemeye yönelik yapılan minigen çalışmaları gerek majör intronların gerekse minör intronların kırılmasında bu proteinin

etkisini ortaya koyamamıştır (Resim 24, 25 ve 26). Ancak de Wolf ve ark. (176) tarafından yapılan çalışmalar dikkate alınarak gerçekleştirilen cDNA amplifikasyonları, CCDC84'ün susturulduğu hücrelerde minör intronların bir kısmının kırılmasının bozulduğunu göstermiştir (Resim 27).

SART3/p110/Tip110'un maya ortoloğu olan Prp24 ilk olarak, U4-U6 snRNA'larının eşleşmesini ve ayrışmasını yönetmek üzere U6 snRNA ile etkileşerek PRP24/U4/U6 kompleksini oluşturduğu, U4 ve U6 snRNP'lerin yeniden kullanılmasını sağladığı gösterilmiştir (134-137). Maya Prp24 proteini, 444 amino asitten oluşurken N-terminalinde dört adet RRM domaini ve C-terminalinde LSM etkileşim motifi bulunmaktadır (134, 180). Buna karşın, 963 amino asitten oluşan insan SART3 proteinin N-terminalinde yedi HAT (TRP) domaini, bu domainleri takip eden iki NLS motifi, iki adet RRM domaini ve C-terminalinde LSM etkileşim motifi (C10) yer almaktadır (Resim 3) (139, 140, 180).

U2 tip intronların kırılmasının U1, U2, U4, U5, U6 snRNP'lerin bir düzen içinde splayozom yapısına dahil olması ve ayrılması ile gerçekleştirilirken U12 tip intronların kırılması U11, U12, U4atac, U5, U6atac snRNP'ler tarafından oluşturulan splayozom ile benzer şekilde gerçekleştirilmektedir (3, 4, 181-183). Bu snRNP'ler arasında en dinamik olanı U6 ve U6atac snRNP'lerdir. U6 snRNP'nin yapısında diğer snRNP'lerden farklı olarak transkripsiyonu RNA polimeraz III tarafından gerçekleştirilen U6 snRNA'lar bulunmaktadır (184). U6 snRNP'nin yapılanma sürecinde ilk olarak transkribe edilen U6'nın 3' ucunda yer alan polyU ucuna stabilizasyonu sağlamak üzere şaperon benzeri La proteini bağlanır (185). Olgunlaşma sürecinin devamında La proteini uzaklaştırılır ve terminal uridyl transferaz olan TUT proteini U6 snRNA'nın 3' ucuna, yaklaşık 20 uridin ekler. On iki uridin kalacak şekilde U6 snRNA'nın 3' üridinleri uzaklaştırılır ve 2'-3' siklik fosfat oluşturulur. Oluşan 3' terminaldeki 2'-3' siklik fosfat yapısı LSm2-8 proteinleri için bağlanma bölgesi sağlar. U6 snRNA'nın 3' ucuna bağlanan LSm2-8 kompleksi SART3'ün karboksi ucunda yer alan yüksek düzeyde korunmuş C10 (LSm interaction) dizisi (Resim 3) ile doğrudan etkileşirken (186), SART3 üzerindeki RRM domainleri aracılığıyla U6 snRNA'nın G38-ACAGAG-U57 bölgesi ile etkileşime girmektedir (Şekil 17) (139). SART3 aynı zamanda HAT domaini üzerinden PRPF3/90K ile de doğrudan etkileşmesiyle U4 ve U6 snRNA'ları bir araya getirerek gerek *de novo* U4/U6 di-snRNP yapılanmasında gerekse daha önce kullanılmış olan U4 ve U6 snRNP'lerin U4/U6 di-snRNP yapılanmasında tekrar kullanılmasını sağlamaktadır (139, 187). SART3'ün di-snRNP yapılanmasındaki bu rolü, SART3 ile

doğrudan etkileşim içinde olduğunu göstermiş olduğumuz CCDC84'ün de U4/U6 di-snRNP yapılanmasında görev alabileceğine işaret etmektedir. CCDC84'ün U4 snRNP'nin kor bileşeni olan PRPF3 ile de doğrudan etkileşim içerisinde olması (36) U4/U6 di-snRNP yapılanmasında CCDC84'ün de rol oynayabileceği fikrini desteklemektedir.

SART3, U4/U6 di-snRNP kompleksinin yapısında görülürken U4/U6·U5 tri-snRNP ve splaysozom kompleksinin yapısında yer almamaktadır (139, 188). Buna karşın, CCDC84 ile doğrudan etkileşen ve U4 snRNP'nin kor bileşeni olan PRPF3 (36) di-snRNP ve tri-snRNP'nin yapısında bulunurken katalitik splaysozomun yapısında yer almamaktadır (43). Bu durum PRPF3 ile doğrudan etkileşen CCDC84'ün U4/U6·U5 tri-snRNP'nin yapısında da yer alırken katalitik splaysozom kompleksinin yapısında yer almadığına ve tri-snRNP yapılanmasının ardından sistemden ayrıldığına işaret etmektedir. Özetle, CCDC84'ün doğrudan etkileştiği SART3 ve PRPF3'ün katalitik splaysozom (Complex B*) yapısında yer almaması, CCDC84'ün de katalitik olarak aktif splaysozom yapısında yer almadığı fikrini desteklemektedir. Katalitik splaysozomun yapısında kalan U2 snRNP'nin kor bileşenlerinden olan SF3A3'ün ve SF3B4'ün (189, 190) *in vivo* koşullarda CCDC84 ile etkileşmediğini gösteren bulgumuz da (Resim 17) CCDC84'ün katalitik olarak aktif splaysozom yapısında yer almadığının diğer bir kanıtını oluşturmaktadır.

de Wolf ve ark. tarafından Mayıs 2021'de CCDC84'ün minör splaysozomun bileşeni olduğu ve eksikliğinin yaklaşık 100 minör intronun kırılmasını bozduğu gösterilmiştir (176). U2 tip majör splaysozom ile U12 tip minör splaysozomların protein bileşenleri büyük ölçüde benzerlik gösterirken, aralarındaki en belirgin fark, sürece dahil olan snRNA'ların benzer iki boyutlu yapıya sahip olmakla birlikte farklı baz dizilimlerinin olmasıdır (54, 68, 81, 105). SART3, U4/U6·U5 tri-snRNP yapılanmasında olduğu gibi U4atac/U6atac·U5 tri-snRNP yapılanmasında ve U4atac/U6atac snRNP'lerin yeniden kullanılmasında da rol almaktadır. Bu süreçlerde SART3, baz dizilimleri birbirinden farklı olan U6 snRNA ve U6atac snRNA ile etkileşimini üzerindeki iki RRM bölgeleri ile gerçekleştirmektedir (95). CCDC84'ün SART3 ile tanımladığımız etkileşiminin de SART3'ün RRM'leri üzerinden olması (Resim 9) ve CCDC84'ün eksikliğinde özellikle U12 tip intronların kırılmasının bozulması (Resim 27) (176), CCDC84'ün, U4atac/U6atac·U5 tri-snRNP yapılanmasına katılmak üzere SART3'ün yönlendirilmesinde rol aldığını düşündürmektedir. CCDC84'ün, katalitik minör splaysozomun yapısında yer alan U12 snRNP'nin kor bileşenlerinden olan

RNPC3 (15) ile *in vivo* koşullarda etkileşmediğini gösteren bulgumuz (Resim 18) ise CCDC84'n minör splaysozomun katalitik aktivitesi için gerekli olmadığını göstermektedir.

U12 tip splaysozomun bileşenleri olan U11, U12, U4atac ve U6atac snRNA'lar U2 tip snRNA analoglarına kıyasla hücrelerde çok daha düşük miktarlarda bulunmasına karşın (105, 191) SART3'n U6atac snRNA'ya karşı olan affinitesi U6 snRNA'ya oranla 25 kat daha yüksektir (95). Bütün bunların yanında, U12 tip intronların kırılması U2 tip intronlara kıyasla 3-5 kat daha yavaş gerçekleşmesi, U12 tip intronların gen ekspresyonunun post-transkripsiyonel seviyede düzenlenmesinde rol alıyor olabilecekleri şeklinde değerlendirilmektedir (103-105). Bu noktadan bakıldığında, SART3 ile etkileşerek minör splaysozomun yapılanmasını destekleyen CCDC84'n, post-transkripsiyonel seviyede gen ekspresyonunun düzenlenmesi için de önemli bir bileşen olabileceği düşünülmektedir.

Splaysozomun yapılanma ve ayrışması, snRNP'lerin belli bir düzen içerisinde sisteme dahil edilmesi ve/veya uzaklaştırılması ile sağlanırken post-translasyonel modifikasyonlar bu süreçlerde önemli rol oynamaktadır (192-194). Ubiktinasyon ve deubiktinasyon bu süreçte etkili olmaktadır. U4 snRNP'nin bir bileşeni olan PRPF3'n ve PRPF31'in Prp19 kompleksi tarafından proteolitik olmayan K63-bağlı ubiktin zincirleri ile modifikasyonu, bu proteinlerin U5 snRNP'nin bileşeni PRPF8'e olan afinitelerini arttırarak U4/U6·U5 tri-snRNP'nin yapılanmasını ve kararlılığını desteklemektedir (146, 149, 193). USP4 ve USP15 ise sırasıyla PRPF3 ve PRPF31 zerindeki K63-bağlı ubiktin zincirlerini uzaklaştırmakta, U4/U6·U5 tri-snRNP'nin kararlılığını bozarak yapıdan U4'n uzaklaştırılmasını ve katalitik splaysozomun oluşmasını sağlamaktadır (146, 149, 195). USP4 ve USP15'in ubiktinlenmiş PRPF3 ve PRPF31'e hedeflenmesi SART3 tarafından gerçekleştirilmektedir ve bu süreçlerde SART3 N-terminal HAT domainleri üzerinden PRPF3 ile, C-terminalindeki HAT domainleri üzerinden USP4 ve USP15 ile doğrudan etkileşmektedir (145, 146, 196). SART3'n N-terminal HAT domainleri ile PRPF31 *in vivo* koşullarda etkileşmektedir (149). Bu durum, PRPF3 ve PRPF31'in deubiktinasyonu için USP4 ve USP15'in SART3 tarafından yönlendirilmesinde CCDC84'n de rolünün olabileceğini düşündürmektedir.

SART3, hem di-snRNP'lerin (U4/U6 ve U4atac/U6atac) yapılandırılmasında (139, 187) hem de tri-snRNP'nin pre-mRNA üzerine taşınmasından sonra U4 snRNP'nin kompleksten ayrılması için gerekli deubiktine edici USP4 ve USP15'i PRPF3 ile PRPF31'e yönlendirmesinde görev almaktadır (146, 149, 193). Buna karşın SART3'n tri-snRNP'nin

ve katalitik splaysozomun yapısında olmaması (139, 188) bir çelişki olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu durum ilk bakışta, SART3'ün rolü hakkındaki bilgilerin yetersizliği olarak görülürken, protein ve RNA'ların katıldığı çok dinamik bir süreç olan splaysozomun yapılandırılmasının karmaşıklığından da kaynaklanmış olabileceğini düşündürmektedir. Bu aşamada, SART3'ün gerek tri-snRNP gerekse splaysozomun yapısında gösterilememiş olması (139, 188) pre-splaysozom, pre-katalitik splaysozom, katalitik splaysozom ve post-splaysozom olarak aşamalara (Şekil 7) ayrılan sürecin çok hızlı ilerlemesi ile açıklanabilir. Ancak bu durumun daha ileri düzeyde araştırılmaya ihtiyacı vardır.

snRNP'lerin yapılanmaları sitoplazma ve çekirdeği kapsayan çok basamaklı bir süreçle gerçekleştirilmektedir (76, 77, 197). U6 snRNA ve U6atac snRNA hariç diğer snRNA'lar sitoplazmaya gönderilerek SMN kompleksi tarafından 3' ucuna yakın bir bölgeye Sm halkası yerleştirildikten sonra çekirdeğe yönlendirilmektedir (Şekil 11, 12 ve 13) (71). U6 ve U6atac snRNP'lerin sitoplazmadan çekirdeğe taşınan diğer kor snRNP'ler ile bir araya getirilerek daha ileri düzeyde yapılanmaları ve U5 snRNP'nin eklenmesiyle tri-snRNP'nin oluşturulması Cajal cisimciklerinde gerçekleştirilir (72, 83, 91, 93, 198). snRNP'lerin bir araya getirilerek hem majör hem de minör di-snRNP'nin yapılandırılmasının başlatılmasında SART3 belirleyici bir rol oynarken Cajal cisimciklere getirilmiş olan di-snRNP ve U5 snRNP'nin birleştirilerek tri-snRNP'nin oluşturulması PRP6, PRP31, PRP8 ile mümkün olmaktadır. PRP6, PRP31 ve PRP8'in eksikliğinde tri-snRNP oluşum süreci bozulmakta ve sonuç olarak Cajal cisimciklerinin sayısında ve boyutunda artış gözlenmektedir (94, 199). Buna karşın, SART3 eksikliğinde Cajal cisimciklerinin sayısında ve boyutunda değişiklik olmamaktadır (94). SART3'ün eksikliğine benzer şekilde, CCDC84'ün eksikliğinde de Cajal cisimciklerinin sayısında ve boyutunda değişiklik gözlenmemesi (Resim 23 ve 24), SART3 ile CCDC84 arasındaki etkileşimin, Cajal cisimciklere gelmeden önceki bir aşamada olduğunu göstermektedir. Bu durum, CCDC84'ün, SART3'ün RRM'leri ile doğrudan etkileşerek SART3'ü U4atac/U6atac di-snRNP yapılanmasını başlatmak üzere U6atac snRNA'ya yönlendirdiği yönündeki çıkarımımızı desteklemektedir. Aynı zamanda, CCDC84'ün U6atac ve U4atac/U6atac di-snRNP yapısında yoğun şekilde bulunduğu ancak U4atac/U6atac·U5 tri-snRNP yapısında çok düşük miktarda gösterilmiş olması (176), CCDC84'ün özellikle U4atac/U6atac di-snRNP yapılanması öncesinde SART3'ün U6atac üzerine yönlendirilmesinde sorumlu olduğunu ortaya koymaktadır.

CCDC84 ile *in vivo* koşullarda etkileşen ancak *in vitro* koşullarda etkileşmeyen SART1 (Snu 66), PRPF4 (60 kDa) ve TXNL4B proteinlerinden SART1 proteini PRPF3, PRPF6, Brr2 proteinleri ile, PRPF4 proteini RPF3 ve CypH ile, TXNL4B proteini ise PRPF6 ile doğrudan etkileşmektedir. PRPF3, PRPF6, Brr2 proteinlerinin tamamı tri-snRNP yapısında yer almakta ve bunlardan SART1 ve PRP6 proteinleri hem U4/U6 di-snRNP hem de U5 snRNP'nin kor proteinleri ile doğrudan etkileşerek tri-snRNP yapılanmasında/stabilizasyonunda kilit rol oynamaktadır (96). Bu etkileşim ağı, CCDC84'ün tri-snRNP yapılanması tamamlanana kadar kompleks üzerinde kaldığını gostermektedir.

Sonuç olarak, bu tez çalışması kapsamında grubumuz tarafından MPD ile ilk kez ilişkilendirilmiş olan CCDC84'ün RNA kırılma mekanizmasının temel bileşenlerinden olan tri-snRNP'nin yapılandırılmasında rol alan SART3 ile etkileştiği ve bu etkileşimin SART3'ün RRM domaini üzerinden doğrudan olduğu, CCDC84'ün üzerinde tanımlanan 63 amino asitlik delesyonun bu etkileşimi belirgin düzeyde bozduğu gosterilmiştir. Ayrıca, elde ettiğimiz veriler U4/U6·U5 tri-snRNP ve U4atac/U6atac·U5 tri-snRNP yapılanma sürecinin başlatılmasında görev alan SART3'ün, U4atac/U6atac·U5 tri-snRNP yapılanması için yönlendirilmesinden CCDC84'ün sorumlu bir bileşen olduğunu gosterir kanıtlar ortaya koymuştur.

Bununla birlikte CCDC84 minör intron iktiva eden 100 civarında genin RNA kırılmasında görevli olduğu ve eksikliğinde sadece bu genlerin kırılmasının bozulduğu bilinmektedir. Bu genlerin dışında kalan yaklaşık 500-600 minör intron barındıran genin RNA kırılmasında ise hangi protein ya da protein kompleksi tarafından düzenlendiği sorusu cevap beklemektedir. Bu minör intronların kırılmasını aydınlatmaya yönelik araştırmaların, hakkında fazla bilgi bulunmayan minör splayozom mekanizmasının anlaşılmasına önemli katkılar sağlayacağı kanaatindeyiz.

6. KAYNAKLAR

1. Pertea M, Shumate A, Pertea G, Varabyou A, Chang Y-C, Madugundu AK, Pandey A, Salzberg SL (2018). Thousands of large-scale RNA sequencing experiments yield a comprehensive new human gene list and reveal extensive transcriptional noise. *bioRxiv*: 332825-332846.
2. Salzberg SL (2018). Open questions: How many genes do we have? *BMC Biol* 16(1): 94.
3. Sharp PA (1985). On the origin of RNA splicing and introns. *Cell* 42(2): 397-400.
4. Sharp PA (1988). RNA splicing and genes. *JAMA* 260(20): 3035-3041.
5. Wang Y, Liu J, Huang BO, Xu YM, Li J, Huang LF, Lin J, Zhang J, Min QH, Yang WM, Wang XZ (2015). Mechanism of alternative splicing and its regulation. *Biomed Rep* 3(2): 152-158.
6. Turunen JJ, Niemela EH, Verma B, Frilander MJ (2013). The significant other: splicing by the minor spliceosome. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 4(1): 61-76.
7. Verma B, Akinyi MV, Norppa AJ, Frilander MJ (2018). Minor spliceosome and disease. *Semin Cell Dev Biol* 79: 103-112.
8. Lerner MR, Boyle JA, Mount SM, Wolin SL, Steitz JA (1980). Are snRNPs involved in splicing? *Nature* 283(5743): 220-224.
9. Jurica MS, Moore MJ (2002). Capturing splicing complexes to study structure and mechanism. *Methods* 28(3): 336-345.
10. Jurica MS, Moore MJ (2003). Pre-mRNA splicing: awash in a sea of proteins. *Mol Cell* 12(1): 5-14.
11. Hartwell LH (1967). Macromolecule synthesis in temperature-sensitive mutants of yeast. *J Bacteriol* 93(5): 1662-1670.
12. Hegele A, Kamburov A, Grossmann A, Sourlis C, Wowro S, Weimann M, Will CL, Pena V, Luhrmann R, Stelzl U (2012). Dynamic protein-protein interaction wiring of the human spliceosome. *Mol Cell* 45(4): 567-580.
13. Akerman M, Fregoso OI, Das S, Ruse C, Jensen MA, Pappin DJ, Zhang MQ, Krainer AR (2015). Differential connectivity of splicing activators and repressors to the human spliceosome. *Genome Biol* 16: 119.

14. Will CL, Luhrmann R (2011). Spliceosome structure and function. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3(7): 1-25.
15. Benecke H, Luhrmann R, Will CL (2005). The U11/U12 snRNP 65K protein acts as a molecular bridge, binding the U12 snRNA and U11-59K protein. *EMBO J* 24(17): 3057-3069.
16. Stanek D (2017). Cajal bodies and snRNPs - friends with benefits. *RNA Biol* 14(6): 671-679.
17. Vazquez-Arango P, O'Reilly D (2018). Variant snRNPs: New players within the spliceosome system. *RNA Biol* 15(1): 17-25.
18. Merkhofer EC, Hu P, Johnson TL (2014). Introduction to cotranscriptional RNA splicing. *Methods Mol Biol* 1126: 83-96.
19. Bacrot S, Doyard M, Huber C, Alibeu O, Feldhahn N, Lehalle D, Lacombe D, Marlin S, Nitschke P, Petit F, Vazquez MP, Munnich A, Cormier-Daire V (2015). Mutations in SNRPB, encoding components of the core splicing machinery, cause cerebro-costomandibular syndrome. *Hum Mutat* 36(2): 187-190.
20. Pasternack SM, Refke M, Paknia E, Hennies HC, Franz T, Schafer N, Fryer A, van Steensel M, Sweeney E, Just M, Grimm C, Kruse R, Ferrandiz C, Nothen MM, Fischer U, Betz RC (2013). Mutations in SNRPE, which encodes a core protein of the spliceosome, cause autosomal-dominant hypotrichosis simplex. *Am J Hum Genet* 92(1): 81-87.
21. Waseem NH, Vaclavik V, Webster A, Jenkins SA, Bird AC, Bhattacharya SS (2007). Mutations in the gene coding for the pre-mRNA splicing factor, PRPF31, in patients with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48(3): 1330-1334.
22. Chakarova CF, Hims MM, Bolz H, Abu-Safieh L, Patel RJ, Papaioannou MG, Inglehearn CF, Keen TJ, Willis C, Moore AT, Rosenberg T, Webster AR, Bird AC, Gal A, Hunt D, Vithana EN, Bhattacharya SS (2002). Mutations in HPRP3, a third member of pre-mRNA splicing factor genes, implicated in autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Hum Mol Genet* 11(1): 87-92.

23. Chen X, Liu Y, Sheng X, Tam PO, Zhao K, Chen X, Rong W, Liu Y, Liu X, Pan X, Chen LJ, Zhao Q, Vollrath D, Pang CP, Zhao C (2014). PRPF4 mutations cause autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Hum Mol Genet* 23(11): 2926-2939.
24. Papaemmanuil E, Cazzola M, Boultwood J, Malcovati L, Vyas P, Bowen D, Pellagatti A, Wainscoat JS, Hellstrom-Lindberg E, Gambacorti-Passerini C, Godfrey AL, Rapado I, Cvejic A, Rance R, McGee C, Ellis P, Mudie LJ, Stephens PJ, McLaren S, Massie CE, Tarpey PS, Varela I, Nik-Zainal S, Davies HR, Shlien A, Jones D, Raine K, Hinton J, Butler AP, Teague JW, Baxter EJ, Score J, Galli A, Della Porta MG, Travaglino E, Groves M, Tauro S, Munshi NC, Anderson KC, El-Naggar A, Fischer A, Mustonen V, Warren AJ, Cross NC, Green AR, Futreal PA, Stratton MR, Campbell PJ, Chronic Myeloid Disorders Working Group of the International Cancer Genome C (2011). Somatic SF3B1 mutation in myelodysplasia with ring sideroblasts. *N Engl J Med* 365(15): 1384-1395.
25. Petit F, Escande F, Jourdain AS, Porchet N, Amiel J, Doray B, Delrue MA, Flori E, Kim CA, Marlin S, Robertson SP, Manouvrier-Hanu S, Holder-Espinasse M (2014). Nager syndrome: confirmation of SF3B4 haploinsufficiency as the major cause. *Clin Genet* 86(3): 246-251.
26. D'Amico A, Mercuri E, Tiziano FD, Bertini E (2011). Spinal muscular atrophy. *Orphanet J Rare Dis* 6: 71.
27. Whitmill A, Liu Y, Timani KA, Niu Y, He JJ (2017). Tip110 Deletion Impaired Embryonic and Stem Cell Development Involving Downregulation of Stem Cell Factors Nanog, Oct4, and Sox2. *Stem Cells* 35(7): 1674-1686.
28. Wicczorek D, Newman WG, Wieland T, Berulava T, Kaffe M, Falkenstein D, Beetz C, Graf E, Schwarzmayer T, Douzgou S, Clayton-Smith J, Daly SB, Williams SG, Bhaskar SS, Urquhart JE, Anderson B, O'Sullivan J, Boute O, Gundlach J, Czeschik JC, van Essen AJ, Hazan F, Park S, Hing A, Kuechler A, Lohmann DR, Ludwig KU, Mangold E, Steenpass L, Zeschnigk M, Lemke JR, Lourenco CM, Hehr U, Prott EC, Waldenberger M, Bohmer AC, Horsthemke B, O'Keefe RT, Meitinger T, Burn J, Ludecke HJ, Strom TM (2014). Compound heterozygosity of low-frequency promoter deletions and rare loss-of-function mutations in TXNL4A causes Burn-McKeown syndrome. *Am J Hum Genet* 95(6): 698-707.

29. Tanackovic G, Ransijn A, Ayuso C, Harper S, Berson EL, Rivolta C (2011). A missense mutation in PRPF6 causes impairment of pre-mRNA splicing and autosomal-dominant retinitis pigmentosa. *Am J Hum Genet* 88(5): 643-649.
30. Maubaret CG, Vaclavik V, Mukhopadhyay R, Waseem NH, Churchill A, Holder GE, Moore AT, Bhattacharya SS, Webster AR (2011). Autosomal dominant retinitis pigmentosa with intrafamilial variability and incomplete penetrance in two families carrying mutations in PRPF8. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52(13): 9304-9309.
31. Graziotto JJ, Inglehearn CF, Pack MA, Pierce EA (2008). Decreased levels of the RNA splicing factor Prpf3 in mice and zebrafish do not cause photoreceptor degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49(9): 3830-3838.
32. Koh MY, Gagea M, Sargis T, Lemos R, Jr., Grandjean G, Charbono A, Bekiaris V, Sedy J, Kiriakova G, Liu X, Roberts LR, Ware C, Powis G (2016). A new HIF-1alpha/RANTES-driven pathway to hepatocellular carcinoma mediated by germline haploinsufficiency of SART1/HAF in mice. *Hepatology* 63(5): 1576-1591.
33. Bujakowska K, Maubaret C, Chakarova CF, Tanimoto N, Beck SC, Fahl E, Humphries MM, Kenna PF, Makarov E, Makarova O, Paquet-Durand F, Ekstrom PA, van Veen T, Leveillard T, Humphries P, Seeliger MW, Bhattacharya SS (2009). Study of gene-targeted mouse models of splicing factor gene Prpf31 implicated in human autosomal dominant retinitis pigmentosa (RP). *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50(12): 5927-5933.
34. He H, Liyanarachchi S, Akagi K, Nagy R, Li J, Dietrich RC, Li W, Sebastian N, Wen B, Xin B, Singh J, Yan P, Alder H, Haan E, Wieczorek D, Albrecht B, Puffenberger E, Wang H, Westman JA, Padgett RA, Symer DE, de la Chapelle A (2011). Mutations in U4atac snRNA, a component of the minor spliceosome, in the developmental disorder MOPD I. *Science* 332(6026): 238-240.
35. Edery P, Marcaillou C, Sahbatou M, Labalme A, Chastang J, Touraine R, Tubacher E, Senni F, Bober MB, Nampoothiri S, Jouk PS, Steichen E, Berland S, Toutain A, Wise CA, Sanlaville D, Rousseau F, Clerget-Darpoux F, Leutenegger AL (2011). Association of TALS developmental disorder with defect in minor splicing component U4atac snRNA. *Science* 332(6026): 240-243.
36. Budak G (2019). Mikrosefalik primordial dwarfism'in etiyolojisiinde rol alan CCDC84'ün mRNA kırılmasında görevli PRPF3 ile etkileşiminin araştırılması.

Doktora Tezi. Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Trabzon.

37. Liu S, Mozaffari-Jovin S, Wollenhaupt J, Santos KF, Theuser M, Dunin-Horkawicz S, Fabrizio P, Bujnicki JM, Luhrmann R, Wahl MC (2015). A composite double-/single-stranded RNA-binding region in protein Prp3 supports tri-snRNP stability and splicing. *Elife* 4: e07320.
38. Comitato A, Spampanato C, Chakarova C, Sanges D, Bhattacharya SS, Marigo V (2007). Mutations in splicing factor PRPF3, causing retinal degeneration, form detrimental aggregates in photoreceptor cells. *Hum Mol Genet* 16(14): 1699-1707.
39. Pertea M, Shumate A, Pertea G, Varabyou A, Breitwieser FP, Chang YC, Madugundu AK, Pandey A, Salzberg SL (2018). CHES: a new human gene catalog curated from thousands of large-scale RNA sequencing experiments reveals extensive transcriptional noise. *Genome Biol* 19(1): 208.
40. Mishra SK, Thakran P (2018). Intron specificity in pre-mRNA splicing. *Curr Genet* 64(4): 777-784.
41. Montes M, Sanford BL, Comiskey DF, Chandler DS (2018). RNA Splicing and Disease: Animal Models to Therapies. *Trends Genet* 35 (1): 68-87.
42. Alpert T, Herzel L, Neugebauer KM (2017). Perfect timing: splicing and transcription rates in living cells. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 8(2): 1-12.
43. Wahl MC, Will CL, Luhrmann R (2009). The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell* 136(4): 701-718.
44. Toor N, Keating KS, Taylor SD, Pyle AM (2008). Crystal structure of a self-spliced group II intron. *Science* 320(5872): 77-82.
45. Nilsen TW (2003). The spliceosome: the most complex macromolecular machine in the cell? *Bioessays* 25(12): 1147-1149.
46. Matera AG, Wang Z (2014). A day in the life of the spliceosome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15(2): 108-121.
47. Griffiths AJF (2015). *An Introduction to Genetic Analysis*. 5th ed W. H. Freeman, New York, 269.

48. Burge CB, Padgett RA, Sharp PA (1998). Evolutionary fates and origins of U12-type introns. *Mol Cell* 2(6): 773-785.
49. Sheth N, Roca X, Hastings ML, Roeder T, Krainer AR, Sachidanandam R (2006). Comprehensive splice-site analysis using comparative genomics. *Nucleic Acids Res* 34(14): 3955-3967.
50. Alioto TS (2007). U12DB: a database of orthologous U12-type spliceosomal introns. *Nucleic Acids Res* 35(Database issue): D110-115.
51. Yeo GW, Van Nostrand EL, Liang TY (2007). Discovery and analysis of evolutionarily conserved intronic splicing regulatory elements. *PLoS Genet* 3(5): e85.
52. Wu Q, Krainer AR (1999). AT-AC pre-mRNA splicing mechanisms and conservation of minor introns in voltage-gated ion channel genes. *Mol Cell Biol* 19(5): 3225-3236.
53. Jackson IJ (1991). A reappraisal of non-consensus mRNA splice sites. *Nucleic Acids Res* 19(14): 3795-3798.
54. Hall SL, Padgett RA (1994). Conserved sequences in a class of rare eukaryotic nuclear introns with non-consensus splice sites. *J Mol Biol* 239(3): 357-365.
55. Dietrich RC, Incorvaia R, Padgett RA (1997). Terminal intron dinucleotide sequences do not distinguish between U2- and U12-dependent introns. *Mol Cell* 1(1): 151-160.
56. Lin CF, Mount SM, Jarmolowski A, Makalowski W (2010). Evolutionary dynamics of U12-type spliceosomal introns. *BMC Evol Biol* 10: 47.
57. Wu Q, Krainer AR (1997). Splicing of a divergent subclass of AT-AC introns requires the major spliceosomal snRNAs. *RNA* 3(6): 586-601.
58. Dietrich RC, Peris MJ, Seyboldt AS, Padgett RA (2001). Role of the 3' splice site in U12-dependent intron splicing. *Mol Cell Biol* 21(6): 1942-1952.
59. Black DL (2005). A simple answer for a splicing conundrum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(14): 4927-4928.
60. Berget SM (1995). Exon recognition in vertebrate splicing. *J Biol Chem* 270(6): 2411-2414.
61. De Conti L, Baralle M, Buratti E (2013). Exon and intron definition in pre-mRNA splicing. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 4(1): 49-60.

62. Black DL (2003). Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu Rev Biochem* 72: 291-336.
63. Liu Y, Liu X, Lin C, Jia X, Zhu H, Song J, Zhang Y (2021). Noncoding RNAs regulate alternative splicing in Cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 40(1): 11.
64. Grabowski PJ, Black DL (2001). Alternative RNA splicing in the nervous system. *Prog Neurobiol* 65(3): 289-308.
65. Shukla GC, Padgett RA (2004). U4 small nuclear RNA can function in both the major and minor spliceosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(1): 93-98.
66. Will CL, Luhrmann R (2005). Splicing of a rare class of introns by the U12-dependent spliceosome. *Biol Chem* 386(8): 713-724.
67. Tarn WY, Steitz JA (1996). A novel spliceosome containing U11, U12, and U5 snRNPs excises a minor class (AT-AC) intron in vitro. *Cell* 84(5): 801-811.
68. Tarn WY, Steitz JA (1997). Pre-mRNA splicing: the discovery of a new spliceosome doubles the challenge. *Trends Biochem Sci* 22(4): 132-137.
69. Visa N, Izaurralde E, Ferreira J, Daneholt B, Mattaj IW (1996). A nuclear cap-binding complex binds Balbiani ring pre-mRNA cotranscriptionally and accompanies the ribonucleoprotein particle during nuclear export. *J Cell Biol* 133(1): 5-14.
70. Ohno M, Segref A, Bachi A, Wilm M, Mattaj IW (2000). PHAX, a mediator of U snRNA nuclear export whose activity is regulated by phosphorylation. *Cell* 101(2): 187-198.
71. Battle DJ, Kasim M, Yong J, Lotti F, Lau CK, Mouaikel J, Zhang Z, Han K, Wan L, Dreyfuss G (2006). The SMN complex: an assembly machine for RNPs. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 71: 313-320.
72. Stanek D, Rader SD, Klingauf M, Neugebauer KM (2003). Targeting of U4/U6 small nuclear RNP assembly factor SART3/p110 to Cajal bodies. *J Cell Biol* 160(4): 505-516.
73. Reddy R, Henning D, Das G, Harless M, Wright D (1987). The capped U6 small nuclear RNA is transcribed by RNA polymerase III. *J Biol Chem* 262(1): 75-81.
74. Achsel T, Brahms H, Kastner B, Bachi A, Wilm M, Luhrmann R (1999). A doughnut-shaped heteromer of human Sm-like proteins binds to the 3'-end of U6 snRNA, thereby facilitating U4/U6 duplex formation in vitro. *EMBO J* 18(20): 5789-5802.

75. Wahl MC, Luhrmann R (2015). SnapShot: Spliceosome Dynamics II. *Cell* 162(2): 456-456 e451.
76. Patel SB, Bellini M (2008). The assembly of a spliceosomal small nuclear ribonucleoprotein particle. *Nucleic Acids Res* 36(20): 6482-6493.
77. Sleeman J (2013). Small nuclear RNAs and mRNAs: linking RNA processing and transport to spinal muscular atrophy. *Biochem Soc Trans* 41(4): 871-875.
78. Golembe TJ, Yong J, Dreyfuss G (2005). Specific sequence features, recognized by the SMN complex, identify snRNAs and determine their fate as snRNPs. *Mol Cell Biol* 25(24): 10989-11004.
79. Raker VA, Plessel G, Luhrmann R (1996). The snRNP core assembly pathway: identification of stable core protein heteromeric complexes and an snRNP subcore particle in vitro. *EMBO J* 15(9): 2256-2269.
80. Bouveret E, Rigaut G, Shevchenko A, Wilm M, Seraphin B (2000). A Sm-like protein complex that participates in mRNA degradation. *EMBO J* 19(7): 1661-1671.
81. Schneider C, Will CL, Makarova OV, Makarov EM, Luhrmann R (2002). Human U4/U6.U5 and U4atac/U6atac.U5 tri-snRNPs exhibit similar protein compositions. *Mol Cell Biol* 22(10): 3219-3229.
82. Strzelecka M, Trowitzsch S, Weber G, Luhrmann R, Oates AC, Neugebauer KM (2010). Coilin-dependent snRNP assembly is essential for zebrafish embryogenesis. *Nat Struct Mol Biol* 17(4): 403-409.
83. Stanek D, Neugebauer KM (2006). The Cajal body: a meeting place for spliceosomal snRNPs in the nuclear maze. *Chromosoma* 115(5): 343-354.
84. Morris GE (2008). The Cajal body. *Biochim Biophys Acta* 1783(11): 2108-2115.
85. Tucker KE, Berciano MT, Jacobs EY, LePage DF, Shpargel KB, Rossire JJ, Chan EK, Lafarga M, Conlon RA, Matera AG (2001). Residual Cajal bodies in coilin knockout mice fail to recruit Sm snRNPs and SMN, the spinal muscular atrophy gene product. *J Cell Biol* 154(2): 293-307.
86. Karijolich J, Yu YT (2010). Spliceosomal snRNA modifications and their function. *RNA Biol* 7(2): 192-204.

87. Jady BE, Kiss T (2001). A small nucleolar guide RNA functions both in 2'-O-ribose methylation and pseudouridylation of the U5 spliceosomal RNA. *EMBO J* 20(3): 541-551.
88. Tycowski KT, Shu MD, Kukoyi A, Steitz JA (2009). A conserved WD40 protein binds the Cajal body localization signal of scaRNP particles. *Mol Cell* 34(1): 47-57.
89. Cioce M, Lamond AI (2005). Cajal bodies: a long history of discovery. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21: 105-131.
90. Yu YT, Shu MD, Steitz JA (1998). Modifications of U2 snRNA are required for snRNP assembly and pre-mRNA splicing. *EMBO J* 17(19): 5783-5795.
91. Carmo-Fonseca M, Pepperkok R, Carvalho MT, Lamond AI (1992). Transcription-dependent colocalization of the U1, U2, U4/U6, and U5 snRNPs in coiled bodies. *J Cell Biol* 117(1): 1-14.
92. Makarov EM, Makarova OV, Achsel T, Luhrmann R (2000). The human homologue of the yeast splicing factor prp6p contains multiple TPR elements and is stably associated with the U5 snRNP via protein-protein interactions. *J Mol Biol* 298(4): 567-575.
93. Stanek D, Neugebauer KM (2004). Detection of snRNP assembly intermediates in Cajal bodies by fluorescence resonance energy transfer. *J Cell Biol* 166(7): 1015-1025.
94. Novotny I, Malinova A, Stejskalova E, Mateju D, Klimesova K, Roithova A, Sveda M, Knejzlik Z, Stanek D (2015). SART3-Dependent Accumulation of Incomplete Spliceosomal snRNPs in Cajal Bodies. *Cell Rep* 10(3): 429-440.
95. Damianov A, Schreiner S, Bindereif A (2004). Recycling of the U12-type spliceosome requires p110, a component of the U6atac snRNP. *Mol Cell Biol* 24(4): 1700-1708.
96. Liu S, Rauhut R, Vornlocher HP, Luhrmann R (2006). The network of protein-protein interactions within the human U4/U6.U5 tri-snRNP. *RNA* 12(7): 1418-1430.
97. Chen Z, Gui B, Zhang Y, Xie G, Li W, Liu S, Xu B, Wu C, He L, Yang J, Yi X, Yang X, Sun L, Liang J, Shang Y (2017). Identification of a 35S U4/U6.U5 tri-small nuclear ribonucleoprotein (tri-snRNP) complex intermediate in spliceosome assembly. *J Biol Chem* 292(44): 18113-18128.
98. Chanarat S, Strasser K (2013). Splicing and beyond: the many faces of the Prp19 complex. *Biochim Biophys Acta* 1833(10): 2126-2134.

99. Chan SP, Kao DI, Tsai WY, Cheng SC (2003). The Prp19p-associated complex in spliceosome activation. *Science* 302(5643): 279-282.
100. Wassarman KM, Steitz JA (1992). The low-abundance U11 and U12 small nuclear ribonucleoproteins (snRNPs) interact to form a two-snRNP complex. *Mol Cell Biol* 12(3): 1276-1285.
101. Frilander MJ, Steitz JA (1999). Initial recognition of U12-dependent introns requires both U11/5' splice-site and U12/branchpoint interactions. *Genes Dev* 13(7): 851-863.
102. Will CL, Schneider C, Hossbach M, Urlaub H, Rauhut R, Elbashir S, Tuschl T, Luhrmann R (2004). The human 18S U11/U12 snRNP contains a set of novel proteins not found in the U2-dependent spliceosome. *RNA* 10(6): 929-941.
103. Wu Q, Krainer AR (1996). U1-mediated exon definition interactions between AT-AC and GT-AG introns. *Science* 274(5289): 1005-1008.
104. Patel AA, McCarthy M, Steitz JA (2002). The splicing of U12-type introns can be a rate-limiting step in gene expression. *EMBO J* 21(14): 3804-3815.
105. Tarn WY, Steitz JA (1996). Highly diverged U4 and U6 small nuclear RNAs required for splicing rare AT-AC introns. *Science* 273(5283): 1824-1832.
106. Niemela EH, Frilander MJ (2014). Regulation of gene expression through inefficient splicing of U12-type introns. *RNA Biol* 11(11): 1325-1329.
107. Zdobnov EM, Kuznetsov D, Tegenfeldt F, Manni M, Berkeley M, Kriventseva EV (2021). OrthoDB in 2020: evolutionary and functional annotations of orthologs. *Nucleic Acids Res* 49(D1): D389-D393.
108. Cunningham F, Allen JE, Allen J, Alvarez-Jarreta J, Amode MR, Armean IM, Austine-Orimoloye O, Azov AG, Barnes I, Bennett R, Berry A, Bhai J, Bignell A, Billis K, Boddu S, Brooks L, Charkhchi M, Cummins C, Da Rin Fioretto L, Davidson C, Dodiya K, Donaldson S, El Houdaigui B, El Naboulsi T, Fatima R, Giron CG, Genev T, Martinez JG, Gujjarro-Clarke C, Gymer A, Hardy M, Hollis Z, Hourlier T, Hunt T, Juettemann T, Kaikala V, Kay M, Lavidas I, Le T, Lemos D, Marugan JC, Mohanan S, Mushtaq A, Naven M, Ogeh DN, Parker A, Parton A, Perry M, Pilizota I, Prosovetskaia I, Sakthivel MP, Salam AIA, Schmitt BM, Schuilenburg H, Sheppard D, Perez-Silva JG, Stark W, Steed E, Sutinen K, Sukumaran R, Sumathipala D, Suner MM, Szpak M,

- Thormann A, Tricomi FF, Urbina-Gomez D, Veidenberg A, Walsh TA, Walts B, Willhoft N, Winterbottom A, Wass E, Chakiachvili M, Flint B, Frankish A, Giorgetti S, Haggerty L, Hunt SE, GR II, Loveland JE, Martin FJ, Moore B, Mudge JM, Muffato M, Perry E, Ruffier M, Tate J, Thybert D, Trevanion SJ, Dyer S, Harrison PW, Howe KL, Yates AD, Zerbino DR, Flicek P (2022). Ensembl 2022. *Nucleic Acids Res* 50(D1): D988-D995.
109. Mason JM, Arndt KM (2004). Coiled coil domains: stability, specificity, and biological implications. *Chembiochem* 5(2): 170-176.
 110. Yamamoto S, Yamazaki T, Komazaki S, Yamashita T, Osaki M, Matsubayashi M, Kidoya H, Takakura N, Yamazaki D, Kakizawa S (2014). Contribution of calumin to embryogenesis through participation in the endoplasmic reticulum-associated degradation activity. *Dev Biol* 393(1): 33-43.
 111. Zhang M, Yamazaki T, Yazawa M, Treves S, Nishi M, Murai M, Shibata E, Zorzato F, Takeshima H (2007). Calumin, a novel Ca²⁺-binding transmembrane protein on the endoplasmic reticulum. *Cell Calcium* 42(1): 83-90.
 112. Merolla F, Luise C, Muller MT, Pacelli R, Fusco A, Celetti A (2012). Loss of CCDC6, the first identified RET partner gene, affects p^{H2AX} S139 levels and accelerates mitotic entry upon DNA damage. *PLoS One* 7(5): e36177.
 113. Feng L, Huang J, Chen J (2009). MERIT40 facilitates BRCA1 localization and DNA damage repair. *Genes Dev* 23(6): 719-728.
 114. Barenz F, Kschonsak YT, Meyer A, Jafarpour A, Lorenz H, Hoffmann I (2018). Ccdc61 controls centrosomal localization of Cep170 and is required for spindle assembly and symmetry. *Mol Biol Cell* 29(26): 3105-3118.
 115. Iwai A, Hijikata M, Hishiki T, Isono O, Chiba T, Shimotohno K (2008). Coiled-coil domain containing 85B suppresses the beta-catenin activity in a p53-dependent manner. *Oncogene* 27(11): 1520-1526.
 116. Arslan O, Soyulu NK, Akillilar PT, Tazebay UH (2021). Coiled-coil domain-containing protein-124 (Ccdc124) is a novel RNA binding factor up-regulated in endometrial, ovarian, and urinary bladder cancers. *Cancer Biomark* 31(2): 149-164.

117. (Princeton University 2019). Biological General Repository for Interaction Datasets (BioGRID) [online]. Available from: <https://thebiogrid.org/130775/summary/homo-sapiens/ccdc84.html>. [Accessed 01.01 Princeton University 2019].
118. Kojima T, Zama T, Wada K, Onogi H, Hagiwara M (2001). Cloning of human PRP4 reveals interaction with Clk1. *J Biol Chem* 276(34): 32247-32256.
119. Gross T, Lutzelberger M, Weigmann H, Klingenhoff A, Shenoy S, Kaufer NF (1997). Functional analysis of the fission yeast Prp4 protein kinase involved in pre-mRNA splicing and isolation of a putative mammalian homologue. *Nucleic Acids Res* 25(5): 1028-1035.
120. Lauber J, Plessel G, Prehn S, Will CL, Fabrizio P, Groning K, Lane WS, Luhrmann R (1997). The human U4/U6 snRNP contains 60 and 90kD proteins that are structurally homologous to the yeast splicing factors Prp4p and Prp3p. *RNA* 3(8): 926-941.
121. Xu C, Min J (2011). Structure and function of WD40 domain proteins. *Protein Cell* 2(3): 202-214.
122. Gonzalez-Santos JM, Wang A, Jones J, Ushida C, Liu J, Hu J (2002). Central region of the human splicing factor Hprp3p interacts with Hprp4p. *J Biol Chem* 277(26): 23764-23772.
123. Schwelnus W, Richert K, Opitz F, Gross T, Habara Y, Tani T, Kaufer NF (2001). Fission yeast Prp4p kinase regulates pre-mRNA splicing by phosphorylating a non-SR-splicing factor. *EMBO Rep* 2(1): 35-41.
124. Zhang YZ, Gould KL, Dunbrack RJ, Cheng H, Roder H, Golemis EA (1999). The evolutionarily conserved Dim1 protein defines a novel branch of the thioredoxin fold superfamily. *Physiol Genomics* 1(3): 109-118.
125. Sun X, Zhang H, Wang D, Ma D, Shen Y, Shang Y (2004). DLP, a novel Dim1 family protein implicated in pre-mRNA splicing and cell cycle progression. *J Biol Chem* 279(31): 32839-32847.
126. Reuter K, Nottrott S, Fabrizio P, Luhrmann R, Ficner R (1999). Identification, characterization and crystal structure analysis of the human spliceosomal U5 snRNP-specific 15 kD protein. *J Mol Biol* 294(2): 515-525.

127. Berry LD, Gould KL (1997). Fission yeast *dim1(+)* encodes a functionally conserved polypeptide essential for mitosis. *J Cell Biol* 137(6): 1337-1354.
128. Stevens SW, Abelson J (1999). Purification of the yeast U4/U6.U5 small nuclear ribonucleoprotein particle and identification of its proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(13): 7226-7231.
129. Burn J, McKeown C, Wagget J, Bray R, Goodship J (1992). New dysmorphic syndrome with choanal atresia in siblings. *Clin Dysmorphol* 1(3): 137-144.
130. Wieczorek D, Teber OA, Lohmann D, Gillessen-Kaesbach G (2003). Two brothers with Burn-McKeown syndrome. *Clin Dysmorphol* 12(3): 171-174.
131. Shichijo S, Nakao M, Imai Y, Takasu H, Kawamoto M, Niiya F, Yang D, Toh Y, Yamana H, Itoh K (1998). A gene encoding antigenic peptides of human squamous cell carcinoma recognized by cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 187(3): 277-288.
132. Makarova OV, Makarov EM, Luhrmann R (2001). The 65 and 110 kDa SR-related proteins of the U4/U6.U5 tri-snRNP are essential for the assembly of mature spliceosomes. *EMBO J* 20(10): 2553-2563.
133. Ruzickova S, Stanek D (2017). Mutations in spliceosomal proteins and retina degeneration. *RNA Biol* 14(5): 544-552.
134. Shannon KW, Guthrie C (1991). Suppressors of a U4 snRNA mutation define a novel U6 snRNP protein with RNA-binding motifs. *Genes Dev* 5(5): 773-785.
135. Jandrositz A, Guthrie C (1995). Evidence for a Prp24 binding site in U6 snRNA and in a putative intermediate in the annealing of U6 and U4 snRNAs. *EMBO J* 14(4): 820-832.
136. Ghetti A, Company M, Abelson J (1995). Specificity of Prp24 binding to RNA: a role for Prp24 in the dynamic interaction of U4 and U6 snRNAs. *RNA* 1(2): 132-145.
137. Raghunathan PL, Guthrie C (1998). A spliceosomal recycling factor that reanneals U4 and U6 small nuclear ribonucleoprotein particles. *Science* 279(5352): 857-860.
138. Nagase T, Seki N, Tanaka A, Ishikawa K, Nomura N (1995). Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. IV. The coding sequences of 40 new genes (KIAA0121-KIAA0160) deduced by analysis of cDNA clones from human cell line KG-1. *DNA Res* 2(4): 167-174, 199-210.

139. Bell M, Schreiner S, Damianov A, Reddy R, Bindereif A (2002). p110, a novel human U6 snRNP protein and U4/U6 snRNP recycling factor. *EMBO J* 21(11): 2724-2735.
140. Gu J, Shimba S, Nomura N, Reddy R (1998). Isolation and characterization of a new 110 kDa human nuclear RNA-binding protein (p110nrb). *Biochim Biophys Acta* 1399(1): 1-9.
141. Liu Y, Kim BO, Kao C, Jung C, Dalton JT, He JJ (2004). Tip110, the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Tat-interacting protein of 110 kDa as a negative regulator of androgen receptor (AR) transcriptional activation. *J Biol Chem* 279(21): 21766-21773.
142. Liu Y, Timani K, Ou X, Broxmeyer HE, He JJ (2013). C-MYC controlled TIP110 protein expression regulates OCT4 mRNA splicing in human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev* 22(5): 689-694.
143. Liu Y, Timani K, Mantel C, Fan Y, Hangoc G, Cooper S, He JJ, Broxmeyer HE (2011). TIP110/p110nrb/SART3/p110 regulation of hematopoiesis through CMYC. *Blood* 117(21): 5643-5651.
144. Liu Y, Lee MR, Timani K, He JJ, Broxmeyer HE (2012). Tip110 maintains expression of pluripotent factors in and pluripotency of human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev* 21(6): 829-833.
145. Timani KA, Liu Y, Suvannasankha A, He JJ (2014). Regulation of ubiquitin-proteasome system-mediated Tip110 protein degradation by USP15. *Int J Biochem Cell Biol* 54: 10-19.
146. Song EJ, Werner SL, Neubauer J, Stegmeier F, Aspden J, Rio D, Harper JW, Elledge SJ, Kirschner MW, Rape M (2010). The Prp19 complex and the Usp4Sart3 deubiquitinating enzyme control reversible ubiquitination at the spliceosome. *Genes Dev* 24(13): 1434-1447.
147. Ito M, Shichijo S, Miyagi Y, Kobayashi T, Tsuda N, Yamada A, Saito N, Itoh K (2000). Identification of SART3-derived peptides capable of inducing HLA-A2-restricted and tumor-specific CTLs in cancer patients with different HLA-A2 subtypes. *Int J Cancer* 88(4): 633-639.

148. Zhang ZH, Niu ZM, Yuan WT, Zhao JJ, Jiang FX, Zhang J, Chai B, Cui F, Chen W, Lian CH, Xiang LH, Xu SJ, Liu WD, Zheng ZZ, Huang W (2005). A mutation in SART3 gene in a Chinese pedigree with disseminated superficial actinic porokeratosis. *Br J Dermatol* 152(4): 658-663.
149. Das T, Park JK, Park J, Kim E, Rape M, Kim EE, Song EJ (2017). USP15 regulates dynamic protein-protein interactions of the spliceosome through deubiquitination of PRP31. *Nucleic Acids Res* 45(8): 4866-4880.
150. Fourmann JB, Tauchert MJ, Ficner R, Fabrizio P, Luhrmann R (2017). Regulation of Prp43-mediated disassembly of spliceosomes by its cofactors Ntr1 and Ntr2. *Nucleic Acids Res* 45(7): 4068-4080.
151. Fortes P, Longman D, McCracken S, Ip JY, Poot R, Mattaj IW, Caceres JF, Blencowe BJ (2007). Identification and characterization of RED120: a conserved PWI domain protein with links to splicing and 3'-end formation. *FEBS Lett* 581(16): 3087-3097.
152. Favaro FP, Alvizi L, Zechi-Ceide RM, Bertola D, Felix TM, de Souza J, Raskin S, Twigg SR, Weiner AM, Armas P, Margarit E, Calcaterra NB, Andersen GR, McGowan SJ, Wilkie AO, Richieri-Costa A, de Almeida ML, Passos-Bueno MR (2014). A noncoding expansion in EIF4A3 causes Richieri-Costa-Pereira syndrome, a craniofacial disorder associated with limb defects. *Am J Hum Genet* 94(1): 120-128.
153. Lefebvre S, Burglen L, Reboullet S, Clermont O, Burlet P, Viollet L, Benichou B, Cruaud C, Millasseau P, Zeviani M, et al. (1995). Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell* 80(1): 155-165.
154. Elsaid MF, Chalhoub N, Ben-Omran T, Kumar P, Kamel H, Ibrahim K, Mohamoud Y, Al-Dous E, Al-Azwani I, Malek JA, Suhre K, Ross ME, Aleem AA (2017). Mutation in noncoding RNA RNU12 causes early onset cerebellar ataxia. *Ann Neurol* 81(1): 68-78.
155. Hartley JL, Temple GF, Brasch MA (2000). DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome Res* 10(11): 1788-1795.
156. Sambrook J, Russell DW (2006). The inoue method for preparation and transformation of competent e. Coli: "ultra-competent" cells. *CSH Protoc* 2006(1).

157. Feliciello I, Chinali G (1993). A modified alkaline lysis method for the preparation of highly purified plasmid DNA from *Escherichia coli*. *Anal Biochem* 212(2): 394-401.
158. Grimm S, Voss-Neudecker F (2003). High-purity plasmid isolation using silica oxide. *Methods Mol Biol* 235: 83-87.
159. Schultz J, Copley RR, Doerks T, Ponting CP, Bork P (2000). SMART: a web-based tool for the study of genetically mobile domains. *Nucleic Acids Res* 28(1): 231-234.
160. Phelan MC (2006). Techniques for mammalian cell tissue culture. *Curr Protoc Hum Genet* Appendix 3: Appendix 3G.
161. Jordan M, Schallhorn A, Wurm FM (1996). Transfecting mammalian cells: optimization of critical parameters affecting calcium-phosphate precipitate formation. *Nucleic Acids Res* 24(4): 596-601.
162. Garfin DE (1990). One-dimensional gel electrophoresis. *Methods Enzymol* 182: 425-441.
163. Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-685.
164. Smith BJ (1994). SDS polyacrylamide gel electrophoresis of proteins. *Methods Mol Biol* 32: 23-34.
165. Litovchick L (2018). Immunoblotting: Transfer of Proteins from Gels to Membranes. *Cold Spring Harb Protoc* 2018(10).
166. Lal A, Haynes SR, Gorospe M (2005). Clean Western blot signals from immunoprecipitated samples. *Mol Cell Probes* 19(6): 385-388.
167. Donaldson JG (2001). Immunofluorescence staining. *Curr Protoc Cell Biol* Chapter 4: Unit 4 3.
168. Maity B, Sheff D, Fisher RA (2013). Immunostaining: detection of signaling protein location in tissues, cells and subcellular compartments. *Methods Cell Biol* 113: 81-105.
169. Alvarez-Satta M, Castro-Sanchez S, Pousada G, Valverde D (2017). Functional analysis by minigene assay of putative splicing variants found in Bardet-Biedl syndrome patients. *J Cell Mol Med* 21(10): 2268-2275.

170. Smith SA, Lynch KW (2014). Cell-based splicing of minigenes. *Methods Mol Biol* 1126: 243-255.
171. Yan XB, Tang CH, Huang Y, Fang H, Yu ZQ, Wu LM, Liu RY (2010). Alternative splicing in exon 9 of glucocorticoid receptor pre-mRNA is regulated by SRp40. *Mol Biol Rep* 37(3): 1427-1433.
172. Gaildrat P, Killian A, Martins A, Tournier I, Frebourg T, Tosi M (2010). Use of splicing reporter minigene assay to evaluate the effect on splicing of unclassified genetic variants. *Methods Mol Biol* 653: 249-257.
173. Darken MA (1964). Puromycin Inhibition of Protein Synthesis. *Pharmacol Rev* 16: 223-243.
174. Pick E, Lau OS, Tsuge T, Menon S, Tong Y, Dohmae N, Plafker SM, Deng XW, Wei N (2007). Mammalian DET1 regulates Cul4A activity and forms stable complexes with E2 ubiquitin-conjugating enzymes. *Mol Cell Biol* 27(13): 4708-4719.
175. Bulkescher R, Starkuviene V, Erfle H (2017). Solid-phase reverse transfection for intracellular delivery of functionally active proteins. *Genome Res* 27(10): 1752-1758.
176. de Wolf B, Oghabian A, Akinyi MV, Hanks S, Tromer EC, van Hooff JJE, van Voorthuijsen L, van Rooijen LE, Verbeeren J, Uijttewaal ECH, Baltissen MPA, Yost S, Piloquet P, Vermeulen M, Snel B, Isidor B, Rahman N, Frilander MJ, Kops G (2021). Chromosomal instability by mutations in the novel minor spliceosome component CENATAC. *EMBO J* 40(14): e106536.
177. Mayeda A, Krainer AR (1992). Regulation of alternative pre-mRNA splicing by hnRNP A1 and splicing factor SF2. *Cell* 68(2): 365-375.
178. Mayeda A, Helfman DM, Krainer AR (1993). Modulation of exon skipping and inclusion by heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 and pre-mRNA splicing factor SF2/ASF. *Mol Cell Biol* 13(5): 2993-3001.
179. Jean-Philippe J, Paz S, Caputi M (2013). hnRNP A1: the Swiss army knife of gene expression. *Int J Mol Sci* 14(9): 18999-19024.
180. Rader SD, Guthrie C (2002). A conserved Lsm-interaction motif in Prp24 required for efficient U4/U6 di-snRNP formation. *RNA* 8(11): 1378-1392.

181. Berget SM, Moore C, Sharp PA (1977). Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74(8): 3171-3175.
182. Krainer AR, Maniatis T, Ruskin B, Green MR (1984). Normal and mutant human beta-globin pre-mRNAs are faithfully and efficiently spliced in vitro. *Cell* 36(4): 993-1005.
183. Konarska MM, Grabowski PJ, Padgett RA, Sharp PA (1985). Characterization of the branch site in lariat RNAs produced by splicing of mRNA precursors. *Nature* 313(6003): 552-557.
184. Kunkel GR, Maser RL, Calvet JP, Pederson T (1986). U6 small nuclear RNA is transcribed by RNA polymerase III. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(22): 8575-8579.
185. Wolin SL, Cedervall T (2002). The La protein. *Annu Rev Biochem* 71: 375-403.
186. Licht K, Medenbach J, Luhrmann R, Kambach C, Bindereif A (2008). 3'-cyclic phosphorylation of U6 snRNA leads to recruitment of recycling factor p110 through LSm proteins. *RNA* 14(8): 1532-1538.
187. Medenbach J, Schreiner S, Liu S, Luhrmann R, Bindereif A (2004). Human U4/U6 snRNP recycling factor p110: mutational analysis reveals the function of the tetratricopeptide repeat domain in recycling. *Mol Cell Biol* 24(17): 7392-7401.
188. Vidal VP, Verdone L, Mayes AE, Beggs JD (1999). Characterization of U6 snRNA-protein interactions. *RNA* 5(11): 1470-1481.
189. Das R, Zhou Z, Reed R (2000). Functional association of U2 snRNP with the ATP-independent spliceosomal complex E. *Mol Cell* 5(5): 779-787.
190. Zhang X, Yan C, Zhan X, Li L, Lei J, Shi Y (2018). Structure of the human activated spliceosome in three conformational states. *Cell Res* 28(3): 307-322.
191. Montzka KA, Steitz JA (1988). Additional low-abundance human small nuclear ribonucleoproteins: U11, U12, etc. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(23): 8885-8889.
192. Staley JP, Guthrie C (1999). An RNA switch at the 5' splice site requires ATP and the DEAD box protein Prp28p. *Mol Cell* 3(1): 55-64.
193. Bellare P, Small EC, Huang X, Wohlschlegel JA, Staley JP, Sontheimer EJ (2008). A role for ubiquitin in the spliceosome assembly pathway. *Nat Struct Mol Biol* 15(5): 444-451.

194. Mathew R, Hartmuth K, Mohlmann S, Urlaub H, Ficner R, Luhrmann R (2008). Phosphorylation of human PRP28 by SRPK2 is required for integration of the U4/U6-U5 tri-snRNP into the spliceosome. *Nat Struct Mol Biol* 15(5): 435-443.
195. Kuhn AN, Li Z, Brow DA (1999). Splicing factor Prp8 governs U4/U6 RNA unwinding during activation of the spliceosome. *Mol Cell* 3(1): 65-75.
196. Zhang Q, Harding R, Hou F, Dong A, Walker JR, Bteich J, Tong Y (2016). Structural Basis of the Recruitment of Ubiquitin-specific Protease USP15 by Spliceosome Recycling Factor SART3. *J Biol Chem* 291(33): 17283-17292.
197. Fischer U, Englbrecht C, Chari A (2011). Biogenesis of spliceosomal small nuclear ribonucleoproteins. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2(5): 718-731.
198. Makarova OV, Makarov EM, Liu S, Vornlocher HP, Luhrmann R (2002). Protein 61K, encoded by a gene (PRPF31) linked to autosomal dominant retinitis pigmentosa, is required for U4/U6*U5 tri-snRNP formation and pre-mRNA splicing. *EMBO J* 21(5): 1148-1157.
199. Schaffert N, Hossbach M, Heintzmann R, Achsel T, Luhrmann R (2004). RNAi knockdown of hPrp31 leads to an accumulation of U4/U6 di-snRNPs in Cajal bodies. *EMBO J* 23(15): 3000-3009.

2. Dinçer T, Boz Er AB, **Er I**, Toraman B, Yıldız G, Kalay E, RIPK4 suppresses the TGF- β 1 signaling pathway in HaCaT cells. Cell Biology International 44: 848-860.
3. Dinçer T, Yorgancıoğlu-Budak G, Ölmez A, **Er I**, Dodurga Y, Özdemir Ö.M.A, Toraman B, Yıldırım A, Sabir N, Akarsu A.N, Semerci C.N, Kalay E, Analysis of centrosome and DNA damage response in PLK4 associated Seckel syndrome. European Journal of Human Genetics 25: 1118-1125.

BİLDİRİLER

1. **Er I**, Boz A.B, Eyüpoglu C.F. (2017). Fare ince bağırsak kriptlerinden elde edilen kök hücrelerden 3-boyutlu kültür ile organoid oluşturulması. XV. Tıbbi Biyoloj ve Genetik Kongresi, MUĞLA, 26-29 Ekim 2017, 223.
2. Sümer C, Boz A.B., **Er I**, Toraman B, Kalay E, Dinçer T.(2017). Epidermal farklılaşmanın iki önemli proteini; reseptörle etkileşen serin-treonin kinaz 4 (RIPK4) ve keratin 14 (KRT14)'ün etkileşiminin gösterilmesi. XV. Tıbbi Biyoloj ve Genetik Kongresi, MUĞLA, 26-29 Ekim 2017, 036.
3. Dinçer T, Boz A.B, **Er I**, Budak G. Toraman B, Kalay E, (2017). Reseptörle etkileşen serin/treonin kinaz 4 (RIPK4) ve pleiomorfik adenoma gen benzeri 2 (PLAGL2) proteinlerinin etkileşimlerinin incelenmesi. XV. Tıbbi Biyoloj ve Genetik Kongresi, MUĞLA, 26-29 Ekim 2017, 037.
4. Boz A.B, **Er I**, Toraman B, Kalay E, Dinçer T.(2017). TGF β sinyal yolağının Reseptörle Etkileşen serin/treonin Kinaz 4 (RIPK4) tarafından baskılanması. XV. Tıbbi Biyoloj ve Genetik Kongresi, MUĞLA, 26-29 Ekim 2017, 038.

ÖDÜLLER

1. Dinçer T, Yorgancıoğlu-Budak G, Ölmez A, **Er I**, Dodurga Y, Özdemir Ö.M.A, Toraman B, Yıldırım A, Sabir N, Akarsu A.N, Semerci C.N, Kalay E. Analysis of centrosome and DNA damage response in PLK4 associated Seckel syndrome. XV. Tıbbi Biyoloj ve Genetik Kongresi, MUĞLA, 26-29 Ekim 2017.