



**SPİNAL MÜSKÜLER ATROFİ TEDAVİSİNDE
KULLANILMA POTANSİYELİNE SAHİP VE HÜCRE
MEMBRANINDAN GEÇEBİLEN MODİFİYE
REKOMBİNANT SMN1 PROTEİNİN ÜRETİLMESİ VE
SAFLAŞTIRILMASI**

Büşra Melike ALP

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Ahmet KOÇ**

Yüksek Lisans Tezi - 2024

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SPİNAL MÜSKÜLER ATROFİ TEDAVİSİNDE KULLANILMA
POTANSİYELİNE SAHİP VE HÜCRE MEMBRANINDAN GEÇEBİLEN
MODİFİYE REKOMBİNANT SMN1 PROTEİNİN ÜRETİLMESİ VE
SAFLAŞTIRILMASI

Büşra Melike ALP

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Ahmet KOÇ

Jüri Üyeleri
Prof. Dr. Ahmet KOÇ
Doç. Dr. Ayşe Banu DEMİR
Dr. Öğr. Üyesi. Muhammed DÜNDAR

Bu Araştırma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından TYL-
2022-3085 Proje numarası ile desteklenmiştir.

MALATYA
2024

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne

ETİK BEYANI

İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak “Prof. Dr. Ahmet KOÇ” danışmanlığında hazırlayıp sunduğum “Spinal Musküler Atrofi Tedavisinde Kullanılma Potansiyeline Sahip ve Hücre Membranından Geçebilen Modifiye Rekombinant Smn1 Proteinin Üretilmesi ve Saflaştırılması” başlıklı Yüksek Lisans tezim içinde elde ettiğim verileri, bilgileri, belgeleri akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tezimde yararlandığım eserlere bilimsel kurallara uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, tezimin özgün olduğunu, tezimin çalışma ve yazımında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim./...../20...

Büşra Melike ALP

İÇİNDEKİLER

ÖZET	viii
ABSTRACT	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
TABLolar DİZİNİ.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Spinal Müsküler Atrofi Hastalığı ve Tarihçesi	3
2.2. Spinal Müsküler Atrofi Hastalığı Tipleri.....	4
2.2.1. SMA Tip 1	5
2.2.2. SMA Tip 2	5
2.2.3. SMA Tip 3	6
2.2.4. SMA Tip 4	6
2.2.5. SMA Tip 0	6
2.3. SMN Proteini ve Görevleri	7
2.3.1. SMN2'nin SMA Üzerindeki Hastalık Modifiye Edici Etkisi.....	9
2.4. SMA Hastalığının Tedavi Yaklaşımları.....	12
2.4.1. SMN2'nin Splicing Modifikasyonu	12
2.5. SMN1 Geni Replasman Tedavisi.....	14
2.6. SH-SY5Y Hücre Hattının Özellikleri	14
2.7. Tezin Amacı.....	15
3. MATERYAL VE METOD	18
3.1. Materyal.....	18
3.1.1. Cihazlar ve Kimyasallar	18
3.1.2. Deneyde Kullanılan Kimyasallar ve Kitler	19
3.1.3. Deneyde Kullanılan Vektörler	20
3.2. Metot.....	22
3.2.1. Laboratuvar Ortamının Sterilizasyonu	22
3.2.2. Klonlama Aşamasında Uygulanan Teknikler Bakteri Besiyerlerinin Hazırlanması.....	22
3.2.3. Rekombinant Protein Üretme ve Saflaştırma Çalışmalarında Kullanılan Malzemeler ve Teknikler.....	26

3.2.4. İn Vitro Uygulamalarda Kullanılan Yöntemler	30
4. BULGULAR	36
4.1. Klonlama Çalışmaları	36
4.1.1. Plazmit Tasarımı	36
4.2. Plazmit DNA İzolasyonu ve Miktar Belirlenmesi	36
4.3. Restrüksiyon Enzimleri ile Klonlanan Plazmitin Kesimi ve DNA Agaroz Jel Elektroforezinde Görüntülenmesi	37
4.4. Rekombinant PEP1-SMN1 Protein Üretimi ve Saflaştırılması	37
4.4.1. Protein Lizatının Hazırlanması ve His-Tag Yöntemi ile Saflaştırılması....	37
4.5. Rekombinant PEP1-SMN Proteininin Etkinliğinin Değerlendirilmesi	40
4.5.1. Hücre Soyuna Protein Uygulanması	40
5. TARTIŞMA	43
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	47
KAYNAKLAR	48
EKLER	57
EK-1. Özgeçmiş	57
EK-2. Etik Kurul Onayı	58

TEŞEKKÜR

Bu tez yüksek lisans eğitimim boyunca edindiğim bilgilerin ve deneyimin bir ürünüdür. Yüksek Lisans eğitimim boyunca engin bilgi ve deneyiminden yararlandığım, tez danışmanım olmasından dolayı derin bir sevinç duyduğum tez konusunun belirlenmesinden metodoloji dizaynına, laboratuvar işlemlerindeki aksaklıkların giderilmesinden tez yazımına kadar her konuda her zaman beni yönlendirerek yol gösteren kıymetli hocam sayın Prof. Dr. Ahmet KOÇ'a, yüksek lisans eğitimim boyunca her anlamda bana yol gösteren engin bilgileri ile eğitim hayatıma ışık tutan sayın hocalarım Prof. Dr. Şengül YÜKSEL, Prof. Dr. Elif YEŞİLADA ve Prof. Dr. Yılmaz ÇİĞREMİŞ'e, değerli jüri üyem Doç. Dr. Ayşe Banu DEMİR'e

Yüksek lisans eğitimim boyunca her türlü olumsuzluklarımda her şeyi çözen, hiç sıkılmadan yorulmadan yardımcı olan değerli hocam ve arkadaşım Dr. Öğr. Üyesi Muhammed DÜNDAR ve Öğr. Görevlisi Nazmi ÖZGEN başta olmak üzere tüm anabilim dalı öğretim üyelerine,

Laboratuvarda beraber çalıştığımız ve güzel anılar paylaştığımız dostluklarıyla eğitim sürecime huzur ve neşe katan, stresli anlarımda bana yol gösteren değerli ekip arkadaşlarım Edanur UĞUR, Nefsun DANIŞ, İrem Nur MENEVŞE, İlayda ŞEKEROĞLU'na,

TDK-2022-3085 nolu yüksek lisans tez projeme maddi destek sağlayan İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne,

Bu zorlu ve macera dolu süreçte benim her an yanımda olarak beni cesaretlendiren, güven veren, desteğini esirgemeyen aileme,

Sonsuz teşekkürlerimi sunmaktan mutluluk duyarım.

ÖZET

Spinal Musküler Atrofi Tedavisinde Kullanılma Potansiyeline Sahip ve Hücre Membranından Geçebilen Modifiye Rekombinant SMN1 Proteininin Üretilmesi ve Saflaştırılması

Amaç: PEP1-SMN1 proteinini modifiye rekombinant şekilde üretilip hücre membranından geçişini sağlamak. Fakat bu çalışma kapsamında prelinik ya da klinik çalışma bulunmamaktadır sadece proteinin üretimi ve hücre kültürü ortamında hücre membranından geçme potansiyeli araştırılmıştır.

Materyal Metod: Çalışmada temel olarak PEP1 (sinyal peptidi) + SMN1 proteinini + 6x histidin yapısında rekombinant protein üretimi yapıldı. Vektörün hazırlanması gen sentezi yollarından birisi ile yapıldı. Oluşturulan vektör DNA sekans analizi ile doğrulandıktan sonra E. coli BL21 suşuna aktarılıp ilgili proteinin bakteride ifade edilmesi sağlandı. Protein üretimi IPTG ile indüklendi ve sonrasında 6XHis işareti kullanılarak ticari bir metal afinite kromatografisi kiti ile saflaştırıldı. Saflaştırılan proteinin miktar tayini Bradford testi ile ve saflık derecesi SDS-PAGE analizi incelendi. Çalışmada İnsan nöron kökenli hücre hatları kullanıldı. (SHSY5Y). Besiyeri olarak nöron hücreleri için uygun olan DMEM ve Ham's F12 ortamı ve %10 ek fetal bovine serum kullanıldı. Farklı miktarlarda hücre kültürüne eklenen proteinin farklı zaman aralıklarında hücre içine girişi 6XHis spesifik antikor kullanılarak Western blotlama analizleri ile gösterildi.

Bulgular: Yapılan analizler sonucunda, PEP1-SMN1 rekombinant proteininin hücre membranından geçme potansiyelinin başarılı bir şekilde doğrulandığı gözlemlendi. İndüksiyon sürecinde 0.5 mM IPTG ve 30°C'de 4 saatlik inkübasyonun en uygun şartlar olduğu belirlendi. Western blot analizleri, proteinin teorik ağırlığına yakın bir bant gösterdi. Hücre kültür deneylerinde, proteinin hücre yapışmasını ve membran geçişini destekleyen olumlu sonuçlar elde edildi.

Sonuçlar: Bu çalışmada, PEP1-SMN1 rekombinant proteininin hücre membranından geçebilen potansiyel bir terapötik ajan olarak başarılı bir şekilde üretildiği ve saflaştırıldığı gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlar, protein indüksiyonu ve saflığı için optimize edilen yöntemlerin etkili olduğunu göstermektedir. Bu bulgular, Spinal Musküler Atrofi tedavisi için gelecekteki prelinik araştırmaların temelini oluşturabilecek nitelikte önemli katkılar sunmaktadır.

Anahtar kelimeler: SMN1, IPTG, BL21, SMA, DMEM, FBS, PEP1

ABSTRACT

Production and Purification of Modified Recombinant SMN1 Protein with Potential Use in Spinal Muscular Atrophy Treatment and Ability to Cross the Cell Membrane

Aim: Producing Modified Recombinant SMN1 Protein and Ensuring Its Passage Through the Cell Membrane. However, this study does not include preclinical or clinical trials; it will only investigate the production of the protein and its potential to cross the cell membrane in a cell culture environment.

Material and Method: The study primarily involved the production of a recombinant protein composed of PEP1 (signal peptide) + SMN1 protein + 6x histidine. The vector was prepared through either molecular cloning or gene synthesis methods. After the vector was confirmed by DNA sequencing analysis, it was transferred into E. coli BL21 strain to facilitate the expression of the target protein in bacteria. Protein production was induced with IPTG, and the protein was subsequently purified using a commercial metal affinity chromatography kit with the 6xHis tag. The amount of the purified protein was determined using the Bradford assay, and its purity was assessed by SDS-PAGE analysis. Human neuronal cell lines (SHSY5Y) were used in the study. The cells were cultured in a medium suitable for neuronal cells, consisting of DMEM and Ham's F12 with 10% fetal bovine serum. The entry of the protein into the cells, added in varying amounts, was examined at different time intervals using Western blotting with a 6xHis specific antibody.

Results: Based on the analysis results, it was observed that the potential of the PEP1-SMN1 recombinant protein to pass through the cell membrane was successfully confirmed. The induction process determined that the optimal conditions were incubation with 0.5 mM IPTG at 30°C for 4 hours. Western blot analyses showed a band close to the theoretical weight of the protein, and protein purity was enhanced using urea buffers. In cell culture experiments, positive results were obtained, supporting cell adhesion and membrane translocation of the protein.

Conclusion: In this study, it was demonstrated that the PEP1-SMN1 recombinant protein was successfully produced and purified as a potential therapeutic agent capable of crossing the cell membrane. The findings indicate that the optimized methods for protein induction and purity were effective, supporting the in vitro activity of the protein. These results provide significant contributions that could form the basis for future preclinical studies on Spinal Muscular Atrophy treatment.

Key words: SMN1, IPTG, BL21, SMA, DMEM, FBS, PEP1

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AAV9	: Adeno-İlişkili Viral Serotip 9 Vektörü
ABP	: Aktin Bağlayıcı Proteinler
ALS	: Amyotrofik Lateral Skleroz
APS	: Amonyum Peroksidisülfat
ASO	: Antisens Oligonükleotit
BME	: Beta-Mercaptoethanol
BSA	: Bovine Serum Albumin
CARM1	: Coactivator Associated Arginine Methyltransferase 1
CB	: Cajal Cisimcikleri
CCL2	: Kemokin Ligand 2
CCL7	: Kemokin Ligand 2
CORO1C	: Aktin Bağlayıcı Protein
CSF	: Serebrospinal Sıvı
CTD	: C-Terminal Bölgesi
DDR	: DNA Hasar Yanıtı
DMEM	: Dulbecco'nun Modifiye Edilmiş Eagle Besiyeri
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DNA	: Deoksiribobükleik Asit
DSB	: DNA Çift Sarmal Kırığı
DTT	: Dithiothreitol
ECL	: Elektrokemilüminesans
EDTA	: Etilendiamintetraasetik
EFsec	: Sec-Özgöl Çeviri Uzatma
FBS	: Fetal Sığır Serumı
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi
FMRP	: Fragile X Messenger Ribonucleoprotein 1
FUS	: Sarkomda Füzyon Proteini
GAR1	: Glisin Arjinin Zengin Protein 1
GEMIN 2	: Gem İlişkiliprotein 2
GTF2H2	: Genel Transkripsiyon Faktörü IIH
HCL	: Hidroklorik Asit

hnRNP	: Heterojen Nükleer Ribonükleoprotein
HR	: Homolog Rekombinasyon
ID	: İnositol Gerektiren Enzim 1
IGF1	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü 1
IMAC	: Metal İyonları Afinite Kromatografisi
IMP1	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü II mRNA Bağlayıcı Protein 1
IPTG	: İzopropil- β -D-Tiogalaktopiranosid
KSRP	: K Homoloji Bölgesi İçeren RNA Bağlayıcı Protein
LB	: Luria-Bertani Besiyeri
LC3	: Mikrofilament İlişkili Protein 1A/1B Hafif Zincir 3
MINX	: Minimal İntron Eksikliği Yapılandırması
NaCl	: Sodyum Klorür
NAIP	: Nöronal Apoptosis Engelleyici Protein
NBR1	: Nükleer Beden Reseptörü 1
NCBI	: Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi
NF-Y	: Nükleer Transkripsiyon Faktörü Y
NHEJ	: Homolog Olmayan Uç Birleştirme
NHP2	: Nükleolar Heliks Protein 2
Ni-NTA	: Nikel-Nitrilotriasetik Asit
NLS	: Nükleer Lokalizasyon Sinyali
NMD	: Otozomal Dominant
NMDA	: N-Metil-D-Aspartat
OD	: Optik Densite
PB	: Fosfat Tamponu
PBS	: Fosfat Tamponlu Salin
PH	: Potansiyel Hidrojen
PLSF3	: Polipeptid Uzun Zincirli Faktör 3
PMSF	: Fenilmetilsulfonil Florür
PRMT4	: Protein Arginin Metiltransferaz 4
PVDF	: Poliviniliden Florür
RBS	: Ribozom Bağlanma Bölgesi
RPM	: Dakikadaki Devir Sayısı
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SECIS	: Selenosistein Yerleştirme Dizisi

SERF1A	: Küçük EDRK-Zengin Faktör 1A
SG	: Stres Granülleri
SMA	: Spinal Müsküler Atrofi
SMN	: Motor Nöronların Yaşamını Sürdürme Proteini
snoRNP	: Küçük Nükleolar Ribonükleoprotein
snRNP	: Küçük Nükleer Ribonükleoprotein
TAE	: Tris Asetat Edta
TBS	: Tris Tamponlu Tuzlu Çözelti
TBST	: Tris-Tamponlu Tuzlu Çözelti ve Tween 20
TCAB1	: Telomer Cajal Cisim Proteini 1
TERC	: Telomeraz RNA Komponenti
TERT	: Telomeraz Ters Transkriptaz
TGS1	: Trimetilguanozin Sentaz 1
TH	: Tirozin Hidroksilaz
TIA1	: T Hücresi İçindeki Antijen 1
TMG	: Trimetilguanozin
UV	: Ultraviyole
ZBP1	: Çinko Parmak Bağlayıcı Protein

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa No
Şekil 2.1. Kromozomun 5q13. bölgesinin yerleşim.	4
Şekil 2.2. SMN proteininin yapısına ilişkin diyagram.....	7
Şekil 2.3. SMN1 ve SMN2 genlerinden türeyen öncül mRNA'ların şematik gösterimi.	10
Şekil 2.4. SMN genlerinin alternatif splicing'i ve bu genlerden türetilen protein ürünleri.	11
Şekil 2.5. Tez iş akış şeması.....	17
Şekil 3.1. Tasarlanan rekombinant terapötik PEP1-SMN1 protein yapısı	20
Şekil 3.2. Pet28a vektörüne klonlanan PEP1-SMN1-pet28a rekombinant protein	20
Şekil 3.3. SMN1 proteininin üretimini sağlayan DNA sekansının detaylı gösterimi.	21
Şekil 4.1. Plazmit DNA izolasyonu sonrası DNA miktarı.....	36
Şekil 4.2. Enzimler ile rekombinant SMN1 protein kesimi sonrası agaroz jel elektroforezi	37
Şekil 4.3. PEP1-SMN1 proteini saflaştırılırken alınan örneklerden yapılan SDS jel analizi.....	38
Şekil 4.4. PEP1-SMN1 proteini saflaştırılırken alınan örneklerden yapılan SDS jel analizi	39
Şekil 4.5. Saflaştırma sonrası alınan PEP1-SMN1 proteini örnekleri ile western blot sonucu.	39
Şekil 4.6. Yıkamadan alınan örneğe diyaliz protokolü uygulanması.....	40
Şekil 4.7. Sh-SY5Y hücre soyuna protein uygulaması	41
Şekil 4.8. Western analizi ile proteinin membrandan geçme potansiyelini gözlemleme.	42

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No	Sayfa No
Tablo 2.1. Spinal müsküler atrofi sınıflandırması (18).	5
Tablo 3.1. Deneyde kullanılan cihazlar	18
Tablo 3.2. Kimyasal listesi.....	19
Tablo 3.3. Kit listesi.....	20
Tablo 3.4. Saflaştırma ve kromatografi sırasında kullanılan solüsyonlar	29
Tablo 3.5. Yürütme jeli hazırlanışı	33
Tablo 3.6. Yükleme jeli hazırlanışı.....	33
Tablo 3.7. Western blot deneyinde kullanılan çözeltiler.....	35

1. GİRİŞ

Spinal kas atrofisi (SMA), çocukluk çağında başlayan bir motor nöron hastalığıdır ve tarihsel olarak bebek ölümlerinin en sık genetik nedeni olarak kabul edilmiştir. Ancak, son dönemdeki tedavi gelişmeleri bu durumun değişmesine yol açabilir. SMA, Survival Motor Nöron 1 (SMN1) genindeki mutasyonlar nedeniyle ortaya çıkar ve bu mutasyonlar SMN proteininin üretiminde azalmaya neden olur (1). Bu kayıp, paralog olan SMN2 geninden sağlanan protein ile kısmen telafi edilir. SMN2, SMN1'den exon 7'deki tek bir nükleotid değişikliği ile farklılık gösterir (2, 3). Bu değişiklik, SMN2 transkriptlerinin yaklaşık %90'ında exon 7'nin dışlanmasına yol açar ve bu durum, stabil olmayan ve hızla parçalanan SMN Δ 7 proteininin üretimiyle sonuçlanır (4).

SMN proteini, hücre içinde yaygın olarak ifade edilir ve hücresel homeostazın sağlanmasında temel bir rol oynar; bu rolün tam mekanizması ise henüz ayrıntılı olarak anlaşılmamıştır (5). SMN proteini, splicing makinesi assemble edilmesi, endositoz ve protein sentezi gibi çeşitli hücresel süreçlerde yer alır. SMN'nin geniş spektrumlu görevleri ve yaygın ifadesi, SMN kaybının motor nöronların ötesinde sistemik patolojilere yol açabileceğini gösterir. Bu geniş etki alanı, yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesinde dikkate alınması gereken bir faktördür (6).

Spinal kas atrofisi (SMA) hastalığında, hastalığın şiddeti, kısmen, hastanın taşıdığı SMN2 gen kopyalarının sayısına bağlı olarak değişiklik göstermektedir (7). SMA'nın en yaygın formu olan tip 0/1'de, SMN2'nin yalnızca bir kopyasını taşıyan tedavi edilmemiş çocuklar, bağımsız olarak oturma yeteneğine asla sahip olamazlar ve yaşam beklentileri yaklaşık iki yıl civarındadır. SMN2 kopya sayısının artmasıyla birlikte hastalığın şiddeti azalmakta olup, SMA tip 4'te genellikle erken yetişkinlikte klinik başlangıç görülmekte ve yaşam beklentisi genellikle normal düzeylerde olmaktadır (1). Ancak, çoğu hastanın en az bir hastalık değiştiren tedavi alacağı göz önüne alındığında, hastalığın bu doğal seyri muhtemelen geçerliliğini yitirecektir.

Monojenik nörodejeneratif hastalıklar arasında nadir bir örnek teşkil eden SMA, SMN üretimini artırmayı hedefleyen üç tedavinin yakın zamanda onaylanması ile gen hedefli tedavi alanında öncülük etmiştir. Ancak, bu tedavi dönüşümüne rağmen, mevcut yeni tedavilerin henüz tam anlamıyla bir iyileşme sağlamadığı açıktır.

Günümüzde SMA beş ana alt tipe ayrılmaktadır: tip 0 (en ağır form, prenatal dönemde başlayan ve doğum sonrası ciddi solunum sorunları gelişen), tip I (Werdnig–

Hoffmann hastalığı; 6 aydan önce başlayan ve destek olmadan oturma yeteneği olmayan şiddetli bir form), tip II (Dubowitz hastalığı; 18 aydan önce başlayan, destek olmadan oturabilen fakat ayakta durma veya yürüme yeteneği olmayan ara bir form), tip III (Kugelberg–Welander hastalığı; 18 aydan sonra başlayan ve destek almadan ayakta durup yürüyebilen hafif bir form) ve tip IV (en hafif form, 30 yaşından sonra başlayan) (8).

Spinal kas atrofisi (SMA) ile ilişkilendirilen SMN1 geni, 1995 yılında tanımlanmıştır. Aynı dönemde, SMA'nın etkileniminde rol oynayan SMN2 geni de keşfedilmiştir. Bu iki genin bulunması, SMA araştırmalarında önemli bir ilerleme sağlamıştır. SMN1 geni keşfedilmeden önce, SMA'nın tanısı kas biyopsileriyle elde edilen histolojik bulgulara dayanıyordu. Teşhis, kas örneklerinde görülen denervasyon, kas liflerinde gruplar halinde atrofi ve/veya açılı kas lifleri gibi karakteristik bulgulara dayandırılıyordu. Ancak, SMN1 geninin keşfi sonrasında, SMA'nın teşhis yöntemlerinde köklü bir değişiklik yaşanmıştır. Artık SMA'nın teşhisi kas biyopsisi ile değil, SMN1 genindeki silinmeler veya mutasyonlar için yapılan genetik testlerle konulmaktadır(9).

Spinal müsküler atrofi (SMA), ilk olarak 19. yüzyılın sonlarında tanımlandığından bu yana tedavi edilemez bir hastalık olarak kabul edilmektedir. 21. yüzyılın başında yeni ilaçların klinik kullanıma girmesiyle birlikte hastalığın seyrinde önemli iyileşmeler sağlanmış olsa da SMA hâlâ kesin bir tedaviye kavuşturulamamıştır. Yeni tedavi yöntemleri, hastalığın semptomlarını ve prognozunu belirgin şekilde iyileştirse de tam bir iyileşme sunmamaktadır. Bununla birlikte, SMA araştırmalarında son 132 yıl içerisinde kaydedilen önemli ilerlemeler bilim dünyası açısından kayda değer başarılar olarak değerlendirilmektedir (9).

2016 yılında nusinersen, ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından SMA tedavisinde onaylanan ilk ilaç olmuştur. Bunu takiben, onasemnogene abeparvovec ve risdiplam adlı iki başka ilaç daha FDA onayı alarak klinik uygulamaya sunulmuştur. Bu tedavi seçenekleri, SMA'nın yönetiminde önemli yenilikler sunmuş ve hastalığın seyrinde büyük gelişmeler sağlamıştır (10).

Bu tez çalışması kapsamında, literatür bilgileri doğrultusunda rekombinant SMN1 proteinini üretilen uygun şartlar ve koşullar altında hücre membranından geçme potansiyeli araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Spinal Müsküler Atrofi Hastalığı ve Tarihçesi

Spinal kas atrofi (SMA), proksimal kas zayıflığı ve iskelet kası atrofi ile karakterize edilen otozomal resesif geçişli bir alt motor nöron hastalığıdır. SMA'nın prevalansı, canlı doğumlarda yaklaşık 10.000 ila 20.000'de bir olarak bildirilmiş olup, genel nüfustaki taşıyıcı sıklığı ise 1/40 ile 1/70 arasında değişmektedir (1). SMA'nın, bebekler arasında genetik nedenlere bağlı ölümler açısından önde gelen bir etken olduğu kabul edilmektedir (11).

Spinal kas atrofi (SMA), omurilikteki alfa motor nöronların dejenerasyonu ile kendini gösteren ciddi bir nöromüsküler hastalıktır. Bu motor nöronların kaybı, proksimal kaslarda giderek artan güçsüzlük ve paralizi ile sonuçlanır. SMA'nın ilerleyici doğası nedeniyle, hastalar zamanla kas kontrolünü yitirirler, bu da hem hareket kabiliyetini hem de solunum gibi hayati fonksiyonları etkileyebilir (12).

SMA'nın ilk kez tanımlanması, 1891 yılında Avusturyalı nörolog Guido Werdnig tarafından gerçekleştirilmiştir. Werdnig'in rapor ettiği vakaların fenotipleri, mevcut SMA sınıflamasına göre SMA tip II'ye uymaktadır. Ancak, Werdnig'in tanımladığı fenotiplerden farklı özellikler taşıyan birçok yeni vaka zamanla ortaya çıkmıştır (12).

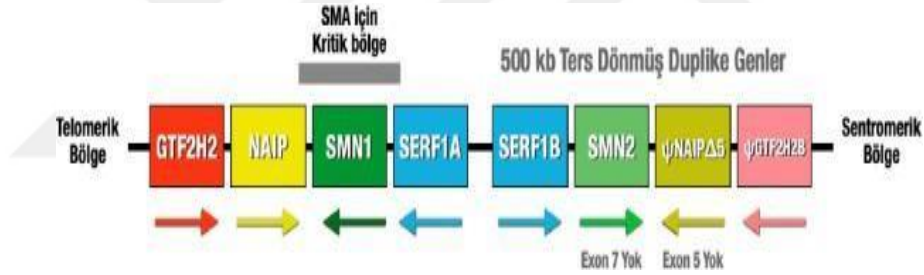
1980'lere kadar SMA, birkaç klinik grubun adı altında sınıflandırılmıştır. Bu gruplardan iki ana kategori, akut infantil SMA (SMA tip I veya Werdnig–Hoffmann hastalığı olarak da adlandırılır) ve kronik çocukluk SMA'sı (SMA tip II ve III, tutulan Werdnig–Hoffmann hastalığı, Kugelberg–Welander hastalığı veya kronik genel SMA olarak da bilinir) şeklindedir (13).

1990 yılında, SMA hastalık lokuslarının 5q13 kromozom bölgesine yerleştirildiği ve bu hastalıkların tek bir klinik birim olarak sınıflandırıldığı bildirilmiştir (9). SMA'nın monojenik bir hastalık olarak tanımlanmasıyla birlikte, en ciddi fetal başlangıçlı formu ve en hafif erişkin başlangıçlı formu (tip 0 ve tip IV) da SMA'nın varyantları olarak kabul edilmiştir (14).

SMA araştırmalarının tarihi üç ana dönemde incelenebilir. İlk dönem (1891–1994), SMA'lı hastaların ilk kez tanımlanmasıyla başlamış ve bu dönemde klinik alt tiplerin sınıflandırılması ile SMA'nın genetik lokusunun kromozomal haritalanması gerçekleştirilmiştir. Bu dönemde, SMA'nın klinik özellikleri ve kalıtsal doğası üzerine önemli keşifler yapılmıştır. İkinci dönem (1995–2015) ise SMN genlerinin klonlanması

ile başlamış ve SMA tedavisine yönelik büyük ilerlemeler kaydedilmiştir. Bu süreçte, SMA'nın moleküler düzeyde anlaşılmasıyla ilaç yeniden konumlandırma çalışmaları ve hastalığı tedavi etme hedefiyle yeni ilaçlar geliştirilmiştir. Üçüncü dönem (2016–günümüz), SMA tedavisinde devrim yaratan FDA onaylı ilaçların klinik uygulamalara girmesiyle başlamış, bu dönemde ayrıca yeni doğan taramaları sayesinde SMA'nın erken teşhis edilmesi mümkün hale gelmiştir (9).

4 protein kodlayan gen içerir: GTF2H2 (genel transkripsiyon faktörü IIH), NAIP (nöronal hücre ölümünü önleyici protein), SMN1 (motor nöronların hayatta kalmasını sağlayan 1. gen) ve SERF1A (küçük EDRK-zengin faktör 1A). Bu genler, kromozom 5'in uzun kolundaki (5q13.2) 500 kilobazlık ters duplikasyon bölgesinde yer alır. Çoğaltılmış genler ise GTF2H2 pseudogeni (Ψ GTF2H2B), ekzon 5'i eksik olan NAIP pseudogeni (Ψ NAIP Δ 5), SMN2 ve SERF1B olarak sıralanır. SMA kritik bölgesi gri çubuk ile işaretlenmiştir. C, sentromerik ucu; T, telomerik ucu temsil eder (15). Bu durum Şekil 2.1' de verilmiştir.



Şekil 2.1. Kromozomun 5q13. bölgesinin yerleşim (15).

2.2. Spinal Müsküler Atrofi Hastalığı Tipleri

Spinal Müsküler Atrofi (SMA), en yaygın görülen otozomal resesif hastalıklardan biridir (16). Bu hastalık, motor işlevlerin bozulması, kas zayıflığı ve ilerleyici sakatlık gibi belirtilerle kendini gösterir ve bu özellikler tüm SMA fenotiplerinde ortaktır (17). SMA'nın şiddeti, hastalığın başlangıç yaşı ile SMN2 geninin kopya sayısına bağlı olarak farklı gruplar arasında önemli ölçüde değişir. SMA, semptomların ortaya çıkış zamanı ve ulaşılabilen maksimum motor fonksiyon dikkate alınarak dört farklı klinik tipe sınıflandırılmıştır. Bu klinik tiplerin özeti tablo 1'de sunulmuştur (18).

Tablo 2.1. Spinal müsküler atrofi sınıflandırması (18).

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

2.2.1. SMA Tip 1

Tip 1 SMA'lı bebekler, aynı zamanda Werdnig-Hoffman hastalığı olarak bilinen bu durumla, genellikle 6 aydan önce hipotoni (kas gevşekliliği), baş kontrolünde yetersizlik ve azalmış veya kaybolmuş tendon refleksleri belirtileri gösterir. Bu tanıya sahip bebekler, bağımsız oturma becerisini geliştiremezler. Yoğun hipotoni, bebeklerin yatar pozisyondayken "kurbağa bacak" duruşu almasına ve baş kontrolünün zayıf veya hiç olmamasına neden olabilir. Diyaframın görece sağlam kalması, kaburgalar arası kas zayıflığının bir sonucu olarak "çan şekilli" bir gğğs yapısı ve "karın nefesi" adı verilen paradoksal solunumla ilişkilidir. Tip 1 SMA'da dil ve yutma güçsüzlüğü sık görülür, ayrıca dilde titreme (fasikülasyon) belirtileri de yaygındır. Yüz kaslarının zayıflaması hastalığın ilerleyen dönemlerinde ortaya çıksa da, başlangıçta bu durum fark edilmeyebilir. Dil ve yutak kaslarının zayıflaması, aspirasyon riskini ve gelişim geriliğini beraberinde getirir. Tip 1 SMA'lı bebeklerde, genellikle 2 yaşına gelmeden önce solunum yetmezliği görülür (19-21). Şiddetli kas zayıflığına rağmen, Tip 1 SMA'lı bebekler genellikle bilişsel ağıdan normaldir; teşhis aşımasında dikkatli, uyanık ve canlı bir izlenim verirler.

2.2.2. SMA Tip 2

Tip 2 SMA'lı çocuklar, gelişim süreçlerinde bir aşamada bağımsız oturabilme yeteneği kazanırlar; ancak, bağımsız yürüme yeteneğine sahip olamazlar. Bu orta düzey SMA türü, genellikle bacaklarda, kollarla karşılaştırıldığında daha fazla görülen ilerleyici proksimal zayıflıkla karakterizedir. Muayene sırasında hipotoni (kas tonusunun düşüklüğü) ve arefleksi (refleks kaybı) gözlemlenir. Bu hasta grubunda sıkça görülen ek

hastalıklar, kas zayıflığına bağlı olarak ortaya çıkan kemik ve eklem gelişimindeki ortopedik sorunlarla ilgilidir; ilerleyici skolyoz, eklem kontraktürleri ve çene eklemlerinde ankiloz gibi durumlar gelişebilir. Skolyoz ve interkostal kas zayıflığının bir araya gelmesi, ciddi kısıtlayıcı akciğer hastalığına yol açabilir. Bu çocukların bilişsel yetenekleri ise genellikle normaldir (22).

2.2.3. SMA Tip 3

Tip 3 SMA, Kugelberg-Welander hastalığı olarak bilinen bir formdur. Bu hastalığa sahip bireyler, yaşamlarının belirli bir döneminde bağımsız olarak yürüme yeteneği kazanabilirler. Tip 3 SMA'da, kollarla karşılaştırıldığında bacaklarda daha belirgin bir proksimal zayıflık gelişir. Zayıflığın ilerlemesi, bazı durumlarda tekerlekli sandalye kullanımını gerektirebilir. Tip 2 SMA'dan farklı olarak, bu bireyler skolyoz gibi ek hastalıklardan genellikle etkilenmezler ve solunum kaslarındaki zayıflık nadirdir. Ayrıca, bu grup içinde bilişsel işlevler ve yaşam beklentisi normal seviyelerde kalmaktadır (23, 24).

2.2.4. SMA Tip 4

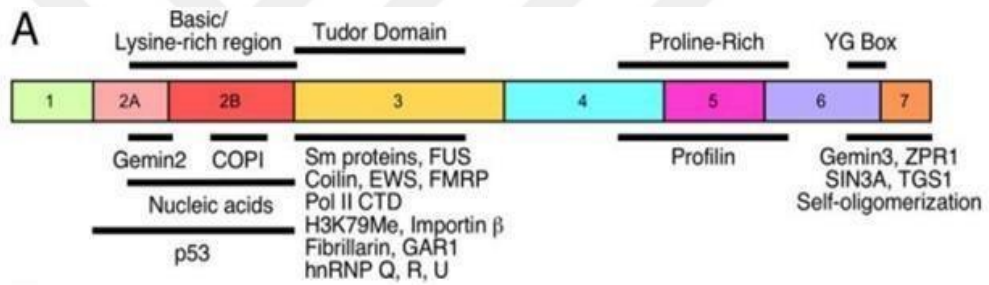
SMA'nın en hafif formu, tip 4 olarak sınıflandırılan bireylerde gözlemlenmektedir. Bu grup, SMA vakalarının %5'inden daha azını temsil eder ve hastalığın en hafif seyrine sahip olanlardır. Tip 4 SMA'ya sahip bireyler, yürüyebilme yeteneğine sahiptir ve tip 3 ile benzerlikler taşımaktadır. Ancak, bu hastalığın başlangıcı genellikle yetişkinlik dönemine, çoğunlukla 30 yaş veya sonrasında denk gelmektedir; bununla birlikte, bazı vakalarda ergenlik döneminde de ortaya çıkabilmektedir (21, 25).

2.2.5. SMA Tip 0

Spinal müsküler atrofi tip 0, doğumdan hemen sonra ortaya çıkan, şiddetli zayıflık ve hipotoni ile birlikte azalmış fetal hareket öyküsü bulunan yenidoğanlar için kullanılan bir tanımdır. Bu durumda, kas zayıflığının muhtemelen prenatal dönemde başladığı düşünülmektedir. Muayene sırasında tip 0 SMA'lı bebeklerde arefleks, yüz diplegisi, atriyal septal defektler ve eklem kontraktürleri gibi bulgular gözlemlenebilir. Erken dönemde solunum yetmezliği, bu bireyler için önemli bir risk oluşturmaktadır. Hayat beklentisi genellikle kısalmış olup, bu bebeklerin çoğu 6 aydan fazla hayatta kalmaz. (13, 26).

2.3. SMN Proteini ve Görevleri

Hayatta Kalma Motor Nöronu (SMN), hayvanlar âleminin tüm hücre tiplerinde eksprese edilen çok işlevli bir proteindir. İnsanlarda SMN'nin önemi, SMN1 genindeki delesyon ya da mutasyonların, çocuklar ve bebeklerde en yaygın genetik hastalık olan Spinal Musküler Atrofiye (SMA) yol açtığına anlaşılmaya başlanmıştır (2, 27). Gen duplikasyonu ve inversiyon sonucu, insanlarda SMN geninin sentromerik bir kopyası olan SMN2 de bulunmaktadır (27). SMN1, tam uzunlukta SMN proteini kodlarken, SMN2 genellikle ekzon 7'nin atlanması sonucu kısaltılmış bir protein izoformu (SMN Δ 7) üretir. Bu sebeple SMN2, SMN1'in kaybını tam anlamıyla telafi edemez (3, 28). SMN Δ 7 daha az kararlı olup yalnızca kısmi işlevsellik gösterse de (28-30), bu izoformun aşırı eksprese edilmesi, yapılan çalışmalarda hastalık şiddetini azalttığı görülmüştür (31). SMN proteininin yapısına ilişkin diyagram Şekil 2.2'de verilmiştir.



Diyagramda, SMN ile etkileşime giren proteinler ve SMN'in işlevsel bölgeleri işaretlenmiştir (32).

Şekil 2.2. SMN proteininin yapısına ilişkin diyagram, eksonların numaralarını gösteren renkli kutularla birlikte sunulmuştur.

İnsan SMN proteini, 294 amino asitten oluşmakta olup N-terminalde Gemin2 ve nükleik asit bağlanma bölgeleri, merkezi bir Tudor bölgesi ve C-terminalde prolin açısından zengin YG bölgeleri gibi farklı alanları barındırır. Bu alanlarda gözlenen mutasyonların SMA ile ilişkilendirilmiş olması, proteinin yapısının işlevselliği açısından büyük önem taşıdığını göstermektedir. SMN proteini, hem çekirdek hem de sitoplazma bölmelerinde bulunur. Özellikle, SMN proteini çekirdekteki Cajal cisimcikleri (CB) ile bazı bileşenleri paylaşan nükleer gemlerin oluşumunda kritik bir rol üstlenmektedir. CB'ler, ribonükleoprotein (RNP) komplekslerinin depolanma ve olgunlaşma merkezi olarak işlev görür ve küçük nükleer RNP'ler (snRNP), küçük nükleolar RNP'ler (snoRNP), CB'ye özgü RNP'ler (scaRNP) ile telomeraz RNP komplekslerini içerir. SMN, CB'lerin karakteristik bileşenlerinden olan coilin proteiniyle etkileşime girer. Bu etkileşim, WD40 domainine sahip olan ve SMN kompleksinin CB'lerde toplanmasına

katkı sağlayan WRAP53 proteini tarafından desteklenmektedir. SMN'in hücresel bölmelerdeki dağılım yoğunluğu hücre tipine göre değişiklik gösterebilir. Sitoplazmada ise SMN; sarkomerik Z diskleri, mikrotübüller, golgi ağı ve sitoplazmik stres granülleri (SG) gibi yapılarda lokalize olmaktadır (32).

SMN1 ve SMN2 genlerinin alternatif ekleme (splicing) süreçleri, hem normal hem de oksidatif stres koşullarında çeşitli transkriptlerin üretilmesine olanak tanımaktadır (33-35).

Bu alternatif ekleme mekanizmalarından biri, intron 3'ün tutulmasıyla oluşan aksonal-SMN (a-SMN) izoformunu kapsamaktadır; bu izoform, memeli beynindeki gelişimsel süreçlerde önemli bir rol oynamaktadır (33).

Akson büyümesini teşvik etmekte olan a-SMN hücre motilitesini artırmakta ve kemokinlerin (CCL2, CCL7) ve insülin benzeri büyüme faktörü-1'in (IGF-1) ekspresyonunu düzenlemektedir (36). Alpha-SMN transkriptleri, yetişkin dokularda genellikle tespit edilmemektedir; bunun nedeni, bu transkriptlerin gereksiz mRNA parçalarının parçalanmasını sağlayan saçma aracılı bozunma (NMD) yolları tarafından degradasyona uğramasıdır.

Başka bir SMN proteini izoformu olan SMN6B, intron 6 içinde yer alan Alu benzeri bir dizinin eksonlaştırılması yoluyla elde edilmektedir (35). SMN6B splice izoformu NMD'ye tabi olmasına rağmen, SMN6B proteinine ilişkin çalışmalar, bu proteinin SMN Δ 7'ye kıyasla daha yüksek bir stabilite sergilediğini göstermiştir (35). Bununla birlikte, SMN6B'nin biyolojik işlevleri ve ekson 5 ve/veya 3'ün atlanmasıyla üretilen diğer SMN izoformlarının fonksiyonları hâlâ belirsizliğini korumaktadır.

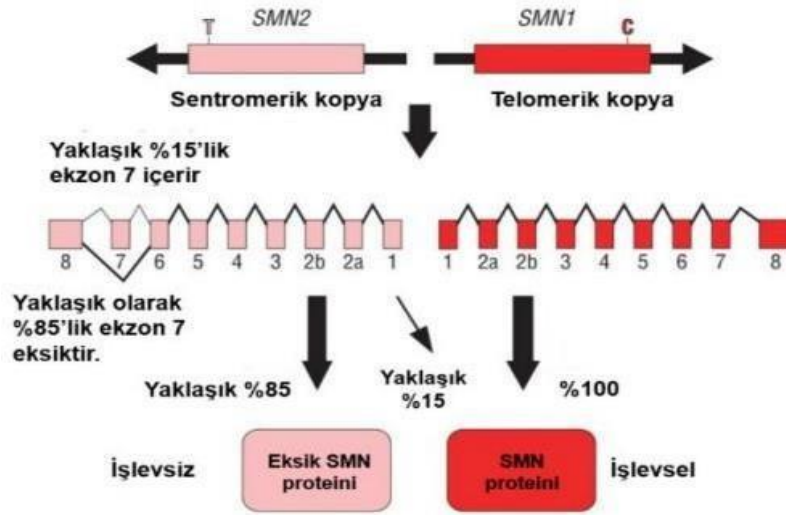
SMN'nin SMA dışında diğer patolojik durumlarda da rolü gösterilmiştir. Örneğin, SMN'nin inklüzyon cisimciği myoziti, amyotrofik lateral skleroz (ALS) ve osteoartrit ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (37-39). SMN'nin memeli testis gelişimi ve erkek fertilitesinde rol oynadığına dair bulgular mevcuttur; testislerdeki SMN seviyeleri, SMN2 pre-mRNA'sının splicing işlemi sırasında ekson 7'nin baskın bir şekilde dahil edilmesi nedeniyle diğer organlar ve dokulara kıyasla oldukça yüksektir (40, 41). SMN seviyelerinin düşmesi durumunda, erkek farelerde testis gelişiminde bozukluk, sperm üretiminde azalma ve fertilitede düşüklük gözlemlenmiştir (42). İlginç bir şekilde, osteoartrit kıkırdağında normal kıkırdağa kıyasla anormal derecede yüksek SMN ekspresyonu kaydedilmiştir (39). Ancak, osteoartrit kıkırdağındaki yüksek SMN ekspresyonunun osteoartritin bir nedeni mi yoksa sonucu mu olduğu henüz belirlenmemiştir.

2.3.1. SMN2'nin SMA Üzerindeki Hastalık Modifiye Edici Etkisi

İnsan genomunda SMN2 kopya sayısının 0 ile 8 arasında değişkenlik gösterdiği bilinmektedir. Araştırmalar, SMN2 kopya sayısının spinal müsküler atrofi (SMA) şiddeti ile ters bir ilişki içinde olduğunu göstermektedir; hafif seyreden SMA vakaları daha fazla SMN2 kopyasına sahipken, ağır vakalarda kopya sayısı daha düşüktür (2, 43, 44). SMN2 kopya sayısı, farklı SMA fenotipleri için hem tedavi stratejilerinin hem de bakım planlarının belirlenmesinde önemli bir prognostik gösterge olarak kullanılmaktadır (45, 46). SMN2 kopya sayısındaki bu varyasyon ve hastalık şiddeti ile olan ilişkisi, onu tedavi geliştirme açısından dikkate değer bir hedef haline getirmektedir.

Zebra balığı, meyve sineği ve fare gibi çeşitli hayvan modelleri, insan SMN1 geninin tek bir ortoloğu olan Smn genine sahiptir (47, 48). Farelerde Smn geninin eksikliği (mSmn), embriyonik dönemde ölüme yol açmakta; ayrıca bu genin belirli hücrelerde şartlı olarak silinmesi, hücre ölümünü tetiklemektedir (49, 50). SMN2 geninin transgenik olarak fare genomuna eklenmesi, mSmn yetersizliğinin neden olduğu embriyonik ölümün önüne geçebilmektedir (51-53). İki SMN2 kopyası embriyonik ölümü kısmen engelleyebilmekte, ancak doğum sonrası gözlenen spinal müsküler atrofi (SMA) semptomlarının tamamen ortadan kalkmasını sağlayamamaktadır (51, 52). Tek bir Smn kopyasına sahip farelerde SMA semptomları daha ağır seyrederken, artan SMN2 kopya sayısı SMA semptomlarını hafifletmektedir (52, 53). Özellikle sekiz SMN2 kopyasına sahip fareler, fenotipik olarak sağlıklı kabul edilmektedir (52). Zebra balıklarında da benzer bir durum gözlenmiş; Smn eksikliği olan bireylerde SMN2 geni kopya sayısı arttırıldığında embriyonik ölüm engellenmiştir (54, 55). Bu bulgular doğrultusunda, SMN2 kopya sayısının SMA şiddetinin belirleyici unsurlarından biri olarak kabul edildiği anlaşılmaktadır.

Lefebvre ve ekibi, SMN1 geninin keşfi üzerine yaptıkları çalışmada, SMN2 eksikliğinin kontrol grubundaki bireylerin %5'inde ve SMA hastalarının %0'ında gözlemlendiğini rapor etmiştir (2). Bugüne kadar, SMN1 ve SMN2 genlerinin 0 kopyasına sahip bireylerde SMA vakasına rastlanmamıştır. SMA model farelerle yapılan deneysel çalışmalarda, Smn (-/-) eksikliğinin embriyonik ölümle sonuçlandığı, ancak insan SMN2 geninin eklenmesiyle embriyonun kurtarıldığı gözlemlenmiştir (51, 52). Bu bulgular, SMN2 geninin SMA hastalarının embriyonik döneminde bir miktar fonksiyonel SMN proteini üretebileceğini ve böylece embriyonik veya fetal ölümü engelleyebileceğini göstermektedir. SMN1 ve SMN2 genlerinin ürettiği proteinler Şekil 2.3'de verilmiştir.



Şekil 2.3. SMN1 ve SMN2 genlerinin yanı sıra bu genlerden türeyen öncül mRNA'ların (pre-mRNA) şematik gösterimi (56).

SMA hastalarında, her iki SMN1 kopyasında ya silinme ya da mutasyonlar oluşmuştur. SMN2 geni ifade edilmesine rağmen, çoğunlukla SMN2'den üretilen öncül mRNA ekzon 7'yi içermez; bu durum ekzon 7'nin 6. pozisyonundaki C'den T'ye geçiş nedeniyle ortaya çıkar. Bu eksiklik, üretilen kısaltılmış SMN proteininin kararsız ve işlevsiz olmasına yol açmaktadır. Bununla birlikte, SMN2 öncül mRNA'sından elde edilen az miktarda tam uzunlukta mRNA ekzon 7'yi içerdiği için, bu tam uzunlukta SMN proteini işlev görebilmektedir (56).

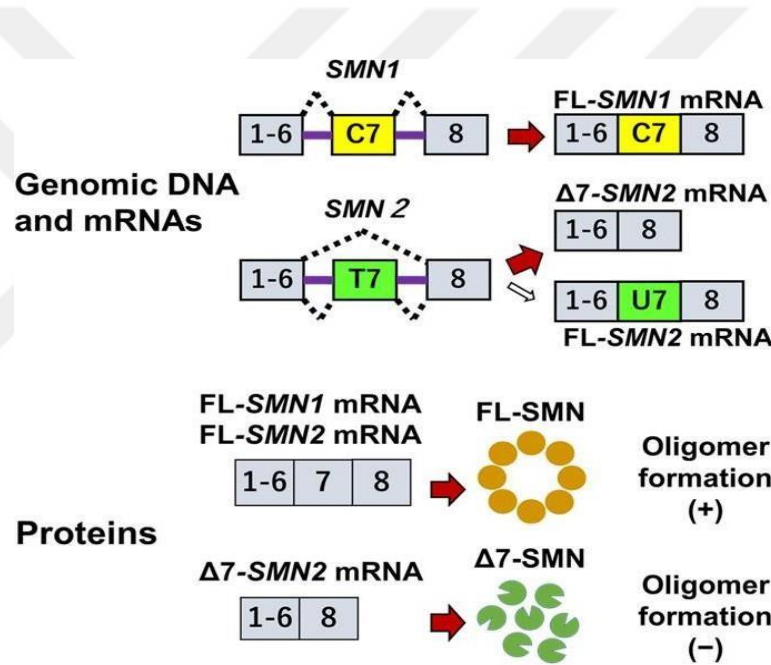
Alternatif Ekson Dizilimi Mekanizması

SMN2 varlığı, SMA hastalarında SMN1 eksikliğini tam olarak telafi edememektedir. Her ne kadar SMN2'deki C'den T'ye geçiş eşanlamlı bir mutasyon olsa da, bu SMN1 ve SMN2'nin aynı şekilde işlev gördüğü anlamına gelmez.

SMN1, tam uzunlukta mRNA transkriptleri üretirken, SMN2 genellikle ekzon 7'yi içermeyen mRNA üretir. SMN2'deki C'den T'ye geçiş (veya pre-mRNA'daki C'den U'ya geçiş), ekzon 7'nin alternatif bir şekilde dışlanması engelleyerek, ekzonun tam olarak dahil edilmemesine yol açar. SMN2'nin ana ürünü, ekzon 7'yi içermeyen kısaltılmış bir mRNA'dır ($\Delta 7$ -SMN2 mRNA) ve ikincil ürünü ise tam uzunlukta SMN2 mRNA'sıdır. Böylece, SMN2'nin ana protein ürünü eksik SMN iken, ikincil protein ürünü tam uzunlukta SMN proteini olmaktadır.

SMA hastalarına ait kan verileri doğrultusunda yapılan hesaplamalara göre (57, 58), SMN2 geni, ürettiği mRNA'nın yaklaşık %80 ile %90'ını $\Delta 7$ -SMN mRNA'sı şeklinde, geri kalan %10 ile %20'sini ise tam uzunlukta SMN mRNA'sı olarak

sunmaktadır. SMN2, yeterli miktarda tam uzunlukta SMN mRNA'sı üretiminde yetersiz kaldığından, bu durum tam uzunlukta SMN protein seviyelerinin de düşük olmasına yol açmaktadır. Bununla birlikte, $\Delta 7$ -SMN proteini protein düzeyinde kararsız ve neredeyse tespit edilemeyecek düzeyde bulunmaktadır (28, 30). Ayrıca, SMN2 transkriptinin kesim sürecini düzenleyen bir geri besleme döngüsü mevcuttur; tam uzunlukta SMN proteininin düşük seviyeleri, SMN2 ekzon 7'nin atlanmasını artırarak, tam uzunlukta SMN proteininin daha da azalmasına sebep olabilir (59). Bu nedenle, SMA hastalarında SMN1 geninin eksikliğini tamamen telafi edecek bir SMN2 varlığı sağlanamamaktadır. Ancak, SMN2 kopya sayısındaki bir artış, daha fazla tam uzunlukta SMN proteini üretilmesine katkı sağlayarak SMA fenotipinin iyileşmesine olanak tanıyabilir. Bu durum Şekil 2.4'de verilmiştir.



Şekil 2.4. SMN genlerinin alternatif splicing'i ve bu genlerden türetilen protein ürünleri (28).

SMN2 mRNA'sının ekzon 7'yi içermesi durumunda (tam uzunlukta FL-SMN2 mRNA), işlevsel bir tam uzunlukta SMN proteini (FL-SMN) sentezlenir. Ekzon 7'nin SMN2 mRNA'sından dışlanması halinde ise ($\Delta 7$ -SMN2 mRNA), kısaltılmış bir SMN proteini ($\Delta 7$ -SMN) ortaya çıkar. $\Delta 7$ -SMN proteini, oligomer oluşum yeteneğinin olmaması (öz-oligomerizasyon eksikliği) nedeniyle kararsızdır ve dolayısıyla neredeyse işlevsel değildir (60).

2.4. SMA Hastalığının Tedavi Yaklaşımları

SMA, tek gen mutasyonuna bağlı bir nöromusküler hastalık olmasına rağmen, fenotipik yelpazesi oldukça karmaşıktır ve sıklıkla sistemik bir hastalık olarak kabul edilmektedir (62). Bu doğrultuda, SMA hastalarının yönetimi solunum, beslenme, gastroenterolojik, ortopedik ve psikososyal sorunların çok disiplinli bir yaklaşımla ele alınmasını gerektirir. SMA'daki bakım standartlarına ilişkin ilk kapsamlı tedavi önerileri, 2007 yılında yayımlanan bir konsensüs raporunda sunulmuştur (63). Ancak bu standartların uygulanması, kültürel yaklaşımlar, sosyoekonomik durum ve bölgesel kaynakların ulaşılabilirliği gibi çeşitli etkenlerden dolayı önemli ölçüde farklılık gösterebilmektedir (64). Son on yılda bakım hizmetlerinde kaydedilen ilerlemeler ve yenilikler doğrultusunda, SMA tanısı ve hasta bakımına yönelik güncellenmiş önerileri içeren bir rehber yakın zamanda yayımlanmıştır (65, 66).

Spinal Musküler Atrofi (SMA) hastalığında hastalık şiddeti, hastanın taşıdığı SMN2 kopya sayısına bağlı olarak değişiklik göstermektedir (6). SMA tip 0/1, yalnızca bir SMN2 kopyasına sahip olan en sık görülen form olup, tedavi edilmediğinde bu hastalarda desteksiz oturma yetisi gelişmemekte ve yaşam süresi yaklaşık 2 yıl ile sınırlı kalmaktadır. Taşınan SMN2 kopya sayısının artması ile birlikte hastalığın şiddeti azalarak tip 4 seviyesine kadar ilerler; tip 4, genellikle erken yetişkinlik döneminde klinik belirtilerin ortaya çıkması ve tipik olarak normal bir yaşam süresi ile karakterizedir. Ancak, bu hastalığın doğal seyri, hastaların büyük çoğunluğunun en az bir hastalık modifiye edici tedavi alacak olması nedeniyle muhtemelen geçerliliğini yitirecektir. Nadir görülen bir monogenetik nörodejeneratif hastalık örneği olarak SMA araştırmaları, SMN üretimini artırmak amacıyla geliştirilen üç tedavinin onayı ile gen-hedefli tedavide öncü olmuştur. SMA tedavisindeki bu dönüşüme rağmen, bu yeni tedavilerin henüz kesin bir tedavi olmadığı anlaşılmıştır (1).

Güncel tedavi yaklaşımları, SMN2 splicing'ini düzenlemeye, SMN1 geninin yerine geçmeye veya kas büyümesini artırmaya yönelik tedaviler olarak üç ana grupta sınıflandırılabilir.

2.4.1. SMN2'nin Splicing Modifikasyonu

Nusinersen

SMA, 5q kromozomundaki SMN1 geninde meydana gelen mutasyonlar sonucunda ortaya çıkan bir hastalıktır (67), ancak insanlarda SMN1'e ek olarak SMN2 adı verilen başka bir SMN geni daha bulunmaktadır. SMN1 ve SMN2 genlerinin kodlama

dizilerinde yalnızca tek bir nükleotid farklılığı mevcuttur. SMN2 tarafından üretilen protein miktarı, SMN1'in ürettiği proteine göre daha az olsa da, bu düşük miktar SMA'nın şiddetini SMN2 kopya sayısına bağlı olarak hafifletecek düzeydedir (61, 68). Bu nedenle, SMN2 geni, SMN protein üretimini artırmak amacıyla antisens oligonükleotitler (ASO'lar) gibi terapötik tedavilerin hedefi olarak seçilmiştir (61, 68).

Klinik denemeler sonucunda, ABD Gıda ve İlaç Dairesi'nin (FDA) nusinersen'i, SMA'nın hastalık seyrini değiştiren ilk tedavi ajanı olarak onaylaması için gereken bilimsel kanıtları sunmuştur. Aralık 2016'da FDA, nusinersen'in tüm SMA tiplerinde kullanımına onay vermiştir (67, 69). Nusinersen, SMN2 genini hedefleyen bir antisens oligonükleotit (ASO) olarak geliştirilmiştir (69). SMA tedavisinde kullanılan antisens oligonükleotitler, pre-mRNA'ya bağlandıklarında splicing sürecini bloke ederek işlev gösterir (70). Bu mekanizma, SMN1 ve SMN2 arasındaki temel farkı oluşturan ekzon 7'nin mRNA'ya dahil edilmesini sağlayarak daha fazla tam uzunlukta SMN proteini üretimine olanak tanır (69, 70).

Nusinersen, antisens oligonükleotitlerin (ASO) kan-beyin bariyerini geçememesi nedeniyle doğrudan serebrospinal sıvıya (CSF) uygulanmaktadır. Nusinersen için önerilen doz, hasta boyutundan bağımsız olarak 12 mg (5 mL) renksiz çözeltinin intratekal yolla uygulanmasıdır (67). Genellikle intratekal uygulama lomber ponksiyon yoluyla gerçekleştirilse de, bu yöntemin uygun olmadığı durumlarda (örneğin, ciddi skolyoz varlığında) yüksek servikal veya intraventriküler uygulama alternatif olarak önerilmektedir. İlacın etkili olduğu bölgeye optimal ulaşımı sağlamak amacıyla nusinersen intratekal olarak uygulanmaktadır (70, 71). Antisens oligonükleotitler kan-beyin bariyerini yeterince geçemediği için, sistemik yolla uygulandığında merkezi sinir sisteminde terapötik konsantrasyona ulaşmak için yaklaşık 100 kat daha yüksek doz gerekecektir. Hastanın tam olarak yüklenmesi için toplam dört yükleme dozu uygulanmalıdır. İlk üç yükleme dozu 14 günlük aralıklarla verilir. Son yükleme dozu ise üçüncü dozdan 30 gün sonra uygulanmalıdır (67).

Risdiplam

SMN2'nin splicing sürecini değiştirerek fonksiyonel SMN proteini miktarını artırmayı hedefleyen bir diğer yaklaşım, RG7916 (risdiplam) ve LMI070 (branaplam) gibi küçük moleküller ile sağlanmaktadır. Bu bileşikler ağız yoluyla alınmakta, kan-beyin bariyerini geçebilmekte ve tam uzunlukta SMN proteini üretimini artırdığı gösterilmiştir (72). Risdiplam, oral yolla uygulanır. Bu tedavi yönteminde amaç fonksiyonel SMN proteini üretimini arttırmaktır. Bu ilaç, Sağkalım Motor Nöron 2 (SMN2) pre-

mRNA'sının splicing sürecini düzenleyerek, ekzon 7'nin olgun mRNA'ya dahil edilmesini destekler. Bu mekanizma, SMN proteini seviyelerini artırarak motor nöronların işlevselliğini ve hayatta kalma oranını iyileştirmeye katkıda bulunur (73). Risdiplam, en hafif form olan SMA tip 3'den en ağır form olan SMA tip 1'e kadar geniş bir hasta yelpazesi için tedavi onayı almıştır (74). Günlük oral doz şeklinde uygulanması, invaziv prosedür gerektirmemesi tedavinin avantajlarından biridir (75).

2.5. SMN1 Geni Replasman Tedavisi

SMA'nın gen tedavisi, doğrudan işlev bozukluğu gösteren SMN1 genini hedefleyen en ileri düzey tıbbi yaklaşımdır. Fare modellerinde vahşi tip SMN geninin sağlam bir kopyasını Adeno-İlişkili Viral serotip 9 (AAV9) vektörü ile taşıyan çalışmalar, bu yapının kan-beyin bariyerini geçebildiğini ve tedavi edilen SMA farelerinde yaşam süresini uzattığını göstermiştir (76-78).

Zolgensma (onasemnogene abeparvovec-xioi), gen terapisi aracılığıyla motor nöron hücrelerine işlevsel SMN geni taşır ve bu yolla SMN protein sentezinin artırılmasını hedefler. Bu tedavi sayesinde hücreler, motor nöronların sağlığını destekleyen ve temel kas fonksiyonlarının korunmasına yardımcı olan SMN proteini üretebilir. Zolgensma, SMA hastalığının ilerleyişini durdurmak amacıyla geliştirilmiştir. Sürekli etki sağlamak üzere tasarlanmış olan bu tedavi, adeno-ilişkili virüs 9 (AAV9) adı verilen bir vektör ile hücrelere iletilir. Genellikle 4 aylık SMA hastası çocuklarda tek doz uygulanması önerilmektedir (79).

2.6. SH-SY5Y Hücre Hattının Özellikleri

SH-SY5Y hücre hattı, sinir hücresi biyolojisi araştırmalarında yaygın olarak kullanılan bir insan hücre hattıdır. Bu hücre hattı, 1970'lerde, nöroblastoma (sinir kristası kökenli bir tümör) teşhisi konmuş 4 yaşındaki bir kız çocuğunun metastatik kemik iliği biyopsisinden elde edilen SK-N-SH hücre hattının üç kez klonlanmış bir alt hattıdır (80). SK-N-SH hücre hattı, nöroblast benzeri (N-tipi) ve epitel benzeri (S-tipi) olmak üzere iki farklı hücre tipi içerir; bu hücreler arasında dönüşüm gerçekleşebilir (81).

Kültürde SH-SY5Y hücreleri sürekli çoğalma yeteneğine sahiptir ve çoğunlukla yapışkan nöroblast benzeri hücrelerden oluşur. Bununla birlikte, hücre popülasyonu az miktarda epitel benzeri hücre de içerir. SH-SY5Y nöroblast benzeri hücreler, kısa uzantılara sahip çokgen hücre gövdeleri sergiler ve tirozin hidroksilaz (TH) ile dopamin-β-hidroksilaz enzim aktivitelerini gösterir. Bu özellikler, hücrelerin sempatik adrenerjik

gangliyon kökenine işaret eder (80, 81, 83). Ancak, bu hücreler tam olarak olgun nöronların morfolojik, biyokimyasal ve fonksiyonel özelliklerini taşımamaktadır.

SH-SY5Y hücreleri ayrıca, immatür nöronal belirteçler olan nestin ve ID ailesinin (DNA-bağlayıcı protein inhibitör ailesi) ID1, ID2, ID3 gibi transkripsiyonel düzenleyicilerini ifade eder (84). Asetilkolin ve potasyuma yanıt olarak uyarılabilirlik gösterirler; ancak, farklılaşmamış SH-SY5Y hücreleri, primer nöron kültürleri ve diğer katekolaminerjik hücre hatlarına kıyasla NMDA reseptör duyarlılığına düşük yanıt verir (85, 86). Bu özelliklerinden dolayı, farklılaşmamış SH-SY5Y hücreleri nörotoksosite veya nörogelişimsel toksisite çalışmaları için her zaman en uygun model olmayabilir. Ancak, farklılaştırılmış SH-SY5Y hücreleri, sinir sistemi üzerinde nörotoksinlerin etkilerini incelemek için iyi bir model sağlayabilir (86).

SH-SY5Y hücre hattı, nöroblastoma kökenli bir insan hücre hattı olup, sinir sistemi hastalıklarının patofizyolojisini anlamak, hastalık mekanizmalarını incelemek ve potansiyel tedavi yaklaşımlarını test etmek amacıyla sıklıkla kullanılan bir model sistemdir. SMA (Spinal Musküler Atrofi) gibi nörolojik hastalıklar üzerine yapılan araştırmalarda bu hücre hattı, SMN (Survival Motor Neuron) proteini seviyelerini artırmaya yönelik tedavi stratejilerini değerlendirmede önemli bir araç olarak kullanılmaktadır. SMN proteininin eksikliği, motor nöronların dejenerasyonuna yol açarak SMA hastalığında görülen kas güçsüzlüğü ve motor fonksiyon kaybına sebep olmaktadır. Bu bağlamda, SH-SY5Y hücreleri, SMN proteini eksikliğine bağlı olarak gelişen sinir hücre kaybını modellemekte kullanılabilecek uygun bir hücre hattı olarak öne çıkmaktadır (2).

SH-SY5Y hücre hattı, özellikle motor nöron dejenerasyonu ve nöroprotektif stratejiler üzerinde yapılan çalışmalarda potansiyel terapötik moleküllerin etkinliğini test etmek için elverişli bir model sağlamaktadır. Bu hücre hattının genetik manipülasyon yoluyla SMN eksikliği modeline dönüştürülmesi veya SMN protein seviyelerinin kasıtlı olarak azaltılması, SMA hastalığının hücresel düzeydeki etkilerini detaylı bir şekilde incelemek için önemli bir platform sunmaktadır. Bu tür modeller, SMN protein seviyelerini artırmayı hedefleyen gen terapisi yaklaşımlarının ve farmakolojik ajanların etkinliğini değerlendirmeye yönelik temel araştırmalarda kullanılmaktadır (87).

2.7. Tezin Amacı

Spinal müküler atrofi (SMA), omurilikteki alfa motor nöronların dejenerasyonu ile karakterize, ilerleyici proksimal kas güçsüzlüğü ve felç ile sonuçlanan otozomal

resesif geçişli bir nöromüsküler hastalıktır. Bu hastalığa SMN1 genini defekt olması ya da yokluğu yol açar. *SMN1* geni SMA oluşumuna yol açarken, *SMN2* geni ise hastalığın şiddetini ve seyrini belirler. Bu hastalığa, hayatta kalma motor nöron 1 (*SMN1*) geninin homozigot mutasyonları neden olur ve tanı testi çoğu hastada *SMN1* geninin homozigot silinmesini gösterir, genellikle *SMN1* ekson 7'nin yokluğunu gösterir. Bu sebepler göz önüne alındığından hastalığın asıl tedavisinin tamamıyla *SMN1* ve *SMN2* proteinlerinin işlevleri üzerine olduğu açıkça görülmektedir. *SMN1* proteininin yeterli ve sağlam bir şekilde üretilmesi durumunda bu hastalık baskılanabilmektedir. Günümüz de diyet, solunum desteği gibi tedavilerin yetersiz kalmasından dolayı moleküler tedavi teknikleri, gen replasmanı ve farmakolojik yaklaşımlar ile SMA hastalığına kesin bir çözüm sunmaya çalışan tedaviler denenmeye başlanmıştır.

Tez alışmasında, *SMN* proteinini sentezleyen *SMN1* geni ve hücreye alımını kolaylaştırıcı PEP1 peptid dizisi, prokaryotik ekspresyon vektörü kullanılarak bir füzyon protein olarak  retiliecektir. Üretilen proteinin in vitro ortamda hücre membranından geçişi analiz edilerek, SMA hastalığı için potansiyel bir tedavi ajanı adayı oluşturulması hedeflenmiştir.

Tez alışması kapsamında gerçekleştirilen araştırmalar şekil 2.5'de verilmiştir. İlk basamakta, klonlama çalışmaları yapıldı. Bu amaç doğrultusunda;

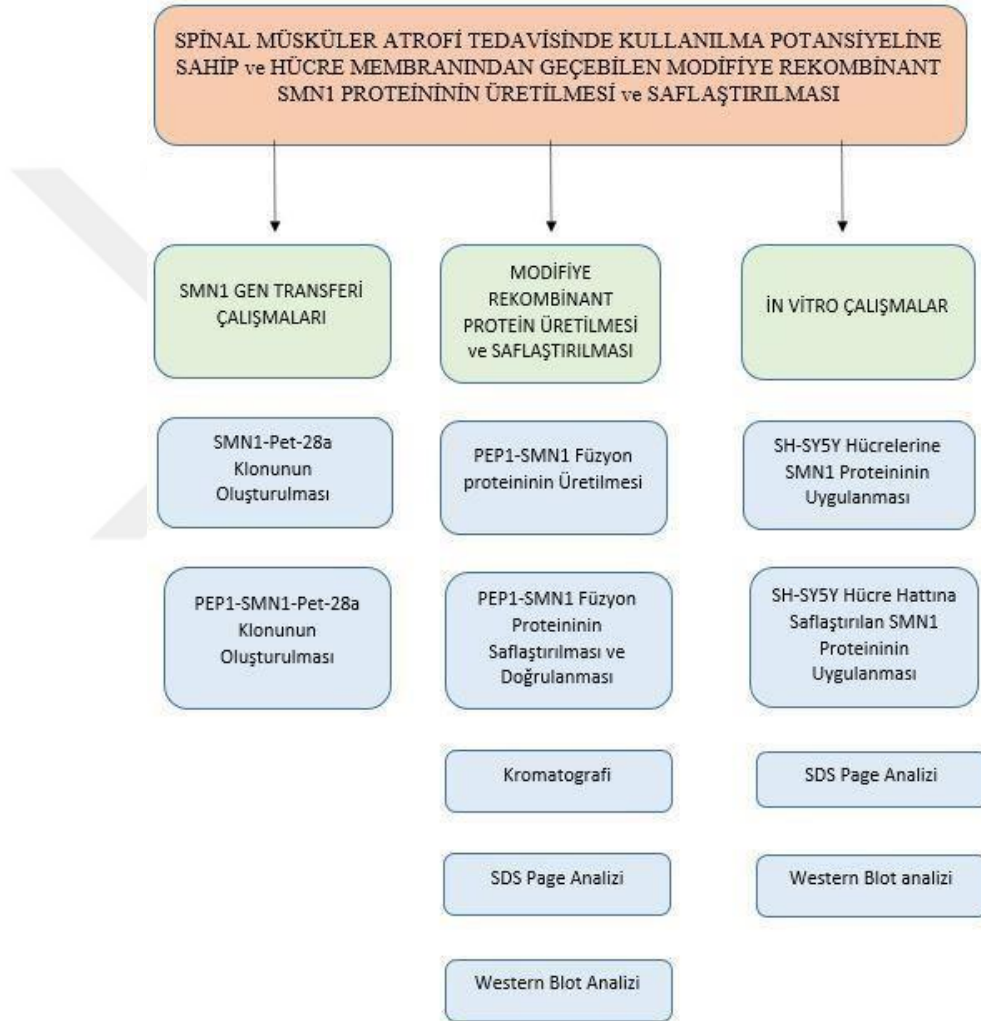
- *SMN1* geni pET-28a vektörüne klonlandı.
- Pep1 sinyal peptid dizisi, *SMN1*-pET-28a vektörü içerisine, *SMN1*'in önüne gelecek şekilde klonlandı.

İkinci aşamada, PEP1-*SMN1* füzyon proteininin sentezi ve elde edilen proteinin saflaştırılmasına yönelik deneyler gerçekleştirilmiştir. Bu hedef doğrultusunda, aşağıda sıralanan çalışmalar uygulanmıştır.

- PEP1-*SMN1* klonu, protein ekspresyonu amacıyla BL21(DE3) codon plus bakteriyel hücresine aktarıldı.
- BL21(DE3) codon plus hücresinde yer alan PEP1-*SMN1*-pET-28a klonu, IPTG indüksiyonu ile protein üretimi için aktive edildi.
- Bakteriyel hücreler lizise uğratılarak, tüm protein lizat formunda izole edildi.
- Üretilen PEP1-*SMN* proteini, His-Tag saflaştırma yöntemi ile ayrıştırıldı.
- Saflaştırılan proteinin istenmeyen küçük moleküllerden arındırılması amacıyla diyaliz işlemi uygulandı.
- Elde edilen saflaştırılmış proteinin doğrulaması, SDS-PAGE ve Western blot analizleri kullanılarak gerçekleştirildi.

Üçüncü basamakta, saflaştırılan proteinin in vitro aktivitesi belirlendi.

- SH-SY5Y hücrelerine saflaştırılmış proteinden farklı dozlarda uygulandı ve membrandan geçişi için uygun doz kontrolü yapıldı.
 - Protein uygulanan hücreler Western Blot analizi ile doğrulandı.
- Tez iş akış şeması Şekil 2.5'te verilmiştir.



Şekil 2.5. Tez iş akış şeması

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Cihazlar ve Kimyasallar

Deney süreci boyunca çeşitli cihazlar, kitler ve solüsyonlar kullanılmıştır. Deneyin doğruluğunu ve güvenilirliğini sağlamak amacıyla cihazların düzenli kalibrasyon ve bakımları gerçekleştirilmiştir. Kullanılan cihazlar ve bunların markaları Tablo 3.1’de sunulmuştur.

Tablo 3.1. Deneyde kullanılan cihazlar

Cihazlar	Marka
Hassas terazi	Ohaus Pioneer
Elektronik terazi	Ohaus Scout
Vorteks	Dlab
Mikrosantrifüj	Sigma
Soğutmalı Santrifüj Cihazı	Nüve- NF 800R
pH ölçer	Mettler Toledo
Agaroz Jel elektroforez Ekipmanları	BIORAD, VWR
Güç kaynakları	VWR
Jel Görüntüleme Cihazı	G:BOX Syngene
İnkübatör	Nüve
- 80 °C Buz Dolabı	Thermo Scientific
Distile Deiyonize Su Ünitesi	Millipore
Otoklav	Nüve
- 20 °C Buzdolabı	Uğur-Arçelik
Nanodrop	DeNovix
Mikrodalga fırın	Vestel
UltraSaf Su Cihazı	Shimadzu
Isı Bloğu	Thermo Scientific
İnkübatör	Memmert
Su banyosu	Nüve
Buz makinesi	İzmak
Çalkalamalı inkübatör	DAIHAN Scientific
Soğutmalı santrifüj	Nüve NF-800R
Sonikasyon cihazı	Bandelin Sonopuls
Pipetler	Thermo Scientific
Mikroskop	JuLIBr NanoEntek
Roller	DLAB MX-T6-S

3.1.2. Deneyde Kullanılan Kimyasallar ve Kitler

Deney süresince kullanılan kimyasal malzemeler analitik saflıkta olup risk faktörleri dikkate alınmıştır. Kimyasallar uygun ve steril koşullarda muhafaza edilmiştir. Çalışmamızda kullanılan tüm kimyasallar Tablo 3.2’de verilmiştir. Ayrıca, çalışma kapsamında hazırlanan tüm sulu çözeltiler ultra saf su kullanılarak hazırlanmıştır. Kitler protokole uygun olarak kullanılmıştır.

Tablo 3.2. Kimyasal listesi

Kimyasallar	Firma
Agaroz	Fisher Scientific
FBS	Gibco
Trypsin-EDTA	Cabricorn
DMSO tific	Fisher Scientific
Pen/Strep	Gibco
PBS	BioShop
Trypan Blue	BI
DMEM (Low Glukoz)	Sigma
DMEM (High Glukoz)	Multicell
Proteinaz K	Qiagene
EtBr	Sigma
EDTA	Panreac Applichem
HCl	IsoLab
NaOH	Panreac Applichem
Etil Alkol	Sigma
1 kb DNA marker	Termo
L-Glutamin	Gibco
Tris base	Sigma
Glacial acetic acid	Sigma
NaCl	Panreac
Triton X	Panreac
Tween 20	Sigma
SDS	Panreac
Imizdazole	Panreac
Urea	Sigma
Goat Anti-rabbit antikor	Bioassay Technology
Milk Powder	Serva
Lizozim	Biofroxx
Protein Marker	Thermo
Kanamisin Sülfat	Panreac
Glycerol	Panreac
Nikel Reçinesi	GenScript
ECL	Eco-Tech
IPTG	Roth
Beta-Mercaptoethanol	Panreac
Temed	Panreac
BamHI	Thermo

Sall	Thermo
Etanol	Sigma
PMSF	Panreac
LB broth	Panreac

Tablo 3.3. Kit LİSTESİ

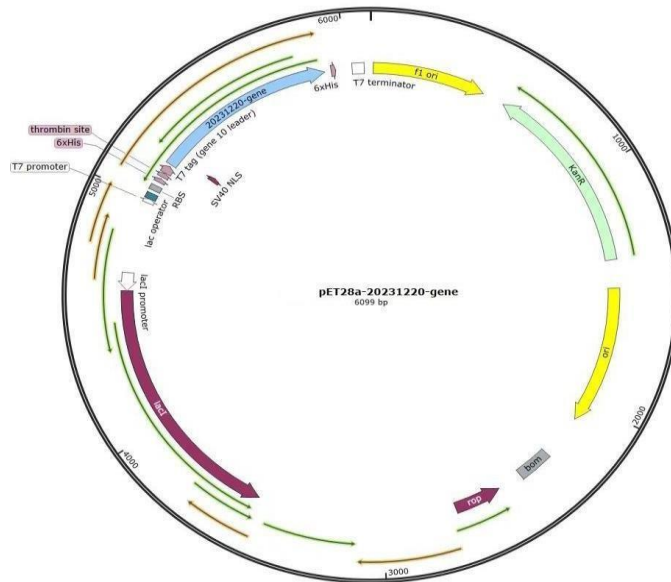
Kit Adı	Marka
MiniPREP Kit	GeneJET
Diyaliz Kiti	Sigma

3.1.3. Deneyde Kullanılan Vektörler

PEP1-SMN1 proteini tasarlandı. Gen sentezi işlemi SUGENOMICS Biotechnology firması tarafından yapıldı. Şekil 3.1. de tasarlanan teröpotik rekombinant PEP1-SMN1 proteini verilmiştir. Şekil 3.2’de proteinin klonlanmış hali verilmiştir.

PEP1-2Ala-SMN1-2Ala-6XHis

Şekil 3.1. Tasarlanan rekombinant terapötik PEP1-SMN1 protein yapısı



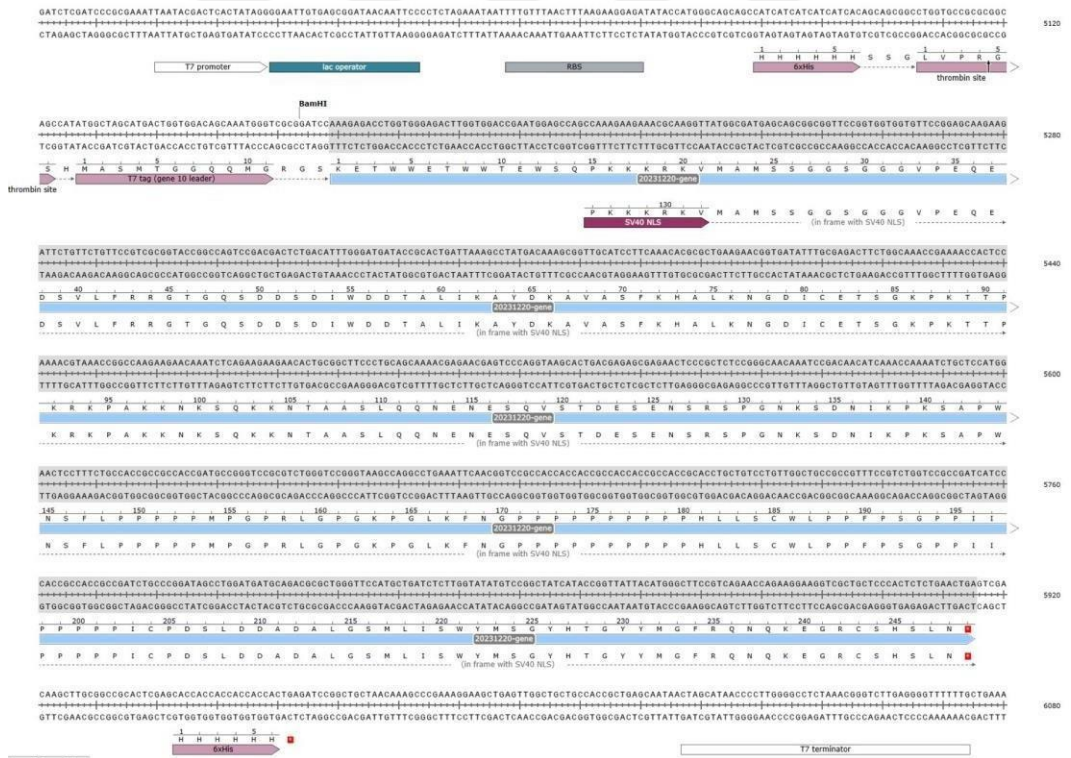
Şekil 3.2. Pet28a vektörüne klonlanan PEP1-SMN1-pet28a rekombinant protein

SMN1 geni, rekombinant protein üretimi için PET28α vektörüne klonlanmıştır.

Bu klonlama, BamH1 ve SalI restriksiyon enzimleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu enzimler, vektördeki çoklu klonlama bölgesindeki uyumlu kesim bölgelerine denk gelmekte ve genin vektöre spesifik ve verimli bir şekilde eklenmesini sağlamaktadır. Klonlama süreci, SMN proteininin yüksek verimli ekspresyonunu ve saflaştırılmasını hedeflemiştir.

Bu çalışmada, hedef genin yüksek verimli ekspresyonunu sağlamak amacıyla pET28a vektörü kullanılmıştır. pET28a, E. coli gibi prokaryotik sistemlerde rekombinant protein üretimi için uygun bir ekspresyon vektörüdür. Vektörde bulunan T7 promotörü, T7 RNA polimeraz tarafından tanınarak transkripsiyonu başlatır ve bu sayede yüksek miktarda protein sentezi gerçekleştirilir.

Promotörden sonra yer alan ribozom bağlanma bölgesi (RBS), mRNA'nın ribozomlar tarafından tanınmasını sağlayarak translasyonun etkin bir şekilde başlatılmasını destekler. Bu yapı, hedef genin verimli bir şekilde eksprese edilmesine olanak tanır. Şekil 3.3'te rekombinant proteinin DNA sekans gösterimi verilmiştir.



Şekil 3.3. SMN1 proteininin üretimini sağlayan DNA sekansının detaylı gösterimi.

N-terminalinde bulunan 6X His etiketi, rekombinant proteinin saflaştırılmasını kolaylaştıran bir elementtir. His etiketi, nikel afinite kromatografisi gibi yöntemlerle proteinin saflaştırılmasını sağlar. Bunun yanı sıra, proteinin saflaştırma sonrasında

etiketli kısmını kesmek amacıyla bir thrombin kesim bölgesi eklenmiştir. Bu düzenleme, proteinin doğal formunun korunarak izole edilmesine yardımcı olur.

Transkripsiyon, T7 terminatör ile sonlandırılır. Bu terminatör, mRNA sentezinin doğru uzunlukta olmasını ve mRNA'nın stabil kalmasını sağlar. Ayrıca, vektörde bulunan kanamisin direnç geni, genetik seleksiyon için kullanılarak vektör taşıyan hücrelerin seçilmesini mümkün kılar.

3.2. Metot

3.2.1. Laboratuvar Ortamının Sterilizasyonu

Deney öncesinde, tezgâhlar, laboratuvar masaları, kullanılan cihazlar ve tüm yüzeyler %70 etanol veya uygun bir dezenfektan ile silinerek temizlendi. Kontaminasyon riski ortadan kaldırıldı. Deney sırasında kullanılacak olan mikropipetler, cam eşyalar ve diğer ekipmanlar, kullanımdan önce sterilize edildi.

Laboratuvar ortamı yeterli düzeyde havalandırıldı steril çalışma kabinlerde HEPA filtreli hava temizleyiciler kullanarak havadaki partiküller ve mikroorganizmaların azaltılması sağlandı. Deney başlamadan önce UV lambası açılarak ortam havasındaki ve yüzeylerdeki mikroorganizma miktarı azaltıldı. Bu işlem, laboratuvarın boş olduğu bir sırada gerçekleştirildi ve böylece UV ışınına maruz kalınmadı.

Cam malzemeler, pipetler ve metal ekipmanlar otoklavda yüksek sıcaklık ve basınç altında sterilize edildi ve mikroorganizmalar yok edildi.

Otoklavlanamayan ekipmanlar, %70 etanol veya uygun bir dezenfektan ile temizlendi. Pipet uçları ve tüpler gibi tek kullanımlık malzemeler steril paketler içinde bulunduruldu ve sadece kullanım sırasında açıldı.

3.2.2. Klonlama Aşamasında Uygulanan Teknikler Bakteri Besiyerlerinin Hazırlanması

Bu çalışmada hem katı hem de sıvı ortam olarak LB besiyeri (Luria-Bertani) kullanıldı. LB agar ve LB broth besiyerleri, üretici firmanın protokolüne uygun şekilde hazırlandı. Öncelikle, LB agar üretici firmanın belirttiği miktarda tartılarak distile su içinde çözüldü. Hazırlanan çözelti otoklavda sterilize edildi. Sterilizasyon sonrasında çözelti 45-50°C'ye kadar soğuması için bekletildi. Soğuyan besiyerine, son konsantrasyon 50 µg/mL olacak şekilde kanamisin eklendi. Hazırlanan LB agar karışımı

petri kaplarına döküldü ve katılaşması için oda sıcaklığında bekletildi. Katılaşan petri kapları +4°C’de muhafaza edildi.

LB broth besiyeri, üretici firmanın talimatları doğrultusunda belirlenen miktarda hazırlandı. 3 litre için mililitre başına gereken LB broth tozu tartılarak distile su içerisinde çözüldü. Çözelti, 120°C’de yirmi dakika süreyle otoklavda sterilize edildi. Sterilizasyon sonrası, hazırlanan sıvı besiyerinin bir kısmı +4°C’de saklandı. Diğer kısmına ise son konsantrasyon 50 µg/mL olacak şekilde kanamisin eklendi.

Kompetent Hücre Stoğu Hazırlanması

DH5a ve BL21 hücrelerinden tek koloni seçilerek 10 mL sıvı LB besiyerine inoküle edildi. Hücreler, 37°C’de 8-12 saat çalkalamalı inkübatörde bir gece boyunca inkübe edildi. Gece kültüründen büyütülen hücreler, 100 mL S-O-B ortamına alındı. SOB ortamı, 1 mM magnezyum solüsyonu (MgSO₄ ve MgCl₂ içeren) ile zenginleştirildi. Kültür, 25°C’de, 4-6 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon, OD₆₀₀ değeri 0.4-0.6 aralığına ulaştığında sonlandırıldı. Kültür, 10 dakika buzda bekletildi. Ardından, kültür iki adet 50 mL’lik Falcon tüpüne bölündü ve dört bin G’de beş dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırıldı. Her bir Falcon tüpüne 15 mL soğuk CMG buffer eklendi ve hücreler hafifçe çözündürüldü. Bu işlem üç kez tekrarlandı. Her yıkama sonrası tüpler buzda 15 dakika bekletildi ve ardından dört derece, üç bin G’de yedi dakika santrifüj edildi. Son yıkama sonrasında, her Falcon tüpüne 5 mL CMG buffer eklendi ve hücreler çözündürüldü. İki tüp birleştirildi ve beş dakika buzda bekletildi. Ardından, 252 µL DMSO eklendi. Karışım tekrar beş dakika buzda bekletildi. Hazırlanan hücre süspansiyonu, 100 µL’lik alikotlar halinde Eppendorf tüplerine bölündü ve -80°C’de saklandı.

Kompetent Hücre Verimliliğinin Hesaplanması

Bu çalışmada, SMN1 terapötik rekombinant protein tase, kanamisin direnci taşıyan besiyerinde büyütölmek üzere DH5α ve BL21 kompetan hücrelerine transformasyon yoluyla aktarıldı. SMN1 plazmitinden 1 µL alındı ve -80°C’den çıkarılmış olan DH5α ve BL21 kompetan hücrelerine ayrı ayrı eklendi. Plazmit eklenmiş hücreler 30 dakika boyunca buz üzerinde bekletildi. Ardından, hücreler 42°C’de 45 saniye süreyle su banyosuna konularak ısı şoku uygulandı. Isı şoku sonrası, hücreler hemen çıkarılarak buz üzerinde 5 dakika daha bekletildi. Hücrelerin üzerine, antibiyotiksiz 250 µL LB broth eklendi. Karışım, 37°C’de 30 dakika boyunca inkübe edilerek hücrelerin toparlanması sağlandı.

İnkübasyon sonrası, daha önceden hazırlanmış kanamisin içeren katı LB agar (albi agar) petri kaplarına hücreler ekildi. Plakalar, 37°C'de bir gece inkübe edilerek kolonilerin gelişimi gözlemlendi. Ertesi gün, petri kapları üzerinde gelişen koloniler sayılarak koloni sayımı gerçekleştirildi. Bu çalışmalarda, transformasyon verimliliği 95-100 cfu/μg düzeyinde olan kompetent hücreler kullanılmıştır.

Primer Dizaynı

Bu tez kapsamında klonlama ve ekspresyon işlemlerinde kullanılacak primerler www.ncbi.nlm.nih.gov ve www.idtdna.com gibi çevrimiçi araçlar kullanılarak geliştirilmiştir. Primerlerin dizayn sürecinde, ileri ve geri primerlerin Tm değerlerinin uyumuna, saç tokası yapısı oluşturmamalarına, nükleotit dağılımının dengeli olmasına ve düşük G-C içeriğine sahip olmalarına dikkat edilmiştir. Tasarlanan primerlerin doğrulaması ise NCBI BLAST aracılığıyla yapılmıştır.

Plazmit DNA İzolasyonu

Kanamisin içeren 10 mL LB besiyerine, plakadan alınan tek bir koloni inoküle edilerek bir gece boyunca 37°C'de çalkalamalı etüvde inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün büyümüş olan kültür santrifüj ile çöktürüldü. Plazmit izolasyonu, GeneJET Plasmid Miniprep™ kitinin üretici talimatlarına uygun şekilde gerçekleştirildi. Gece kültürü, 11.000 g'de 10 dakika süreyle santrifüj edilerek hücre pelleti elde edilmiş ve süpernatant uzaklaştırıldı. Pelletli süspansiyon etmek için 250 μL resüspansiyon çözeltisi eklendi, ardından süspansiyon edilen hücreler 2 mL'lik ependorf tüplerine aktarıldı ve 250 μL lizis tamponu ilave edildi. Tüpler, lizisin gerçekleşmesi için 3-6 kez alt üst edildi. Daha sonra 350 μL nötralizasyon çözeltisi eklenmiş ve örneğin homojen, kirli beyaz bir görünüm alması sağlandı. Ependorf tüpleri, 11.000 g'de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant 700 μL olarak GenJET™ kolona aktarıldı ve kolon 11.000 g'de 1 dakika santrifüj edildi; alt faz uzaklaştırıldı. Kolon üzerine 600 μL yıkama çözeltisi 1 eklenerek 11.000 g'de 1 dakika santrifüj uygulandı ve alt faz uzaklaştırıldı. İkinci yıkama için, kolon üzerine 500 μL yıkama çözeltisi 2 eklenerek 11.000 g'de 1 dakika santrifüj yapıldı. Kolon, alt faz uzaklaştırıldıktan sonra ekleme yapılmadan 2 dakika boyunca 11.000 g'de santrifüj edildi. Temiz bir ependorf tüpe yerleştirilen kolonun üzerine, 42°C'de ısıtılmış 50 μL dH₂O eklenmiş ve oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi. Kolon, 11.000 g'de 1 dakika santrifüj edilerek elüsyon toplandı ve plazmit DNA miktarı ölçülerek -20°C'de saklandı.

DNA Miktar Belirlenmesi

Protein kontaminasyonunu analiz etmek için 280 nm’de absorbans değerleri alınmıştır. Her bir DNA örneği için 1 µL kullanılmış, kontrol amaçlı 1 µL dH₂O eklenmiştir. DNA miktarı ve saflığı, aşağıdaki formüller ile hesaplanmıştır:

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

$$\text{Saflık} = A_{260} / A_{280}$$

Restrüksiyon Enzimleri ile Plazmit Kesimi

Klonlama çalışmalarında vektör içerisinde çıkarılmak istenen bölge veya rekombinantların tespiti için vektörlerin iki ucunda bulunan restriksiyon kesim bölgeleri kullanıldı. Son hacim 1 µg veya 3 µg olacak şekilde DNA örneği eklenerek kesim reaksiyonları hazırlandı. Thermo Scientific™ üretici firmalı SalI ve BamHI enzimleri ile kesim yapıldı. 37°C’de 1 saat inkübasyona bırakıldı. Kesim sonuçları agaroz jel elektroforezinde yürütülüp UV ışık altında analiz edildi. Rekombinant terapötik SMN1 plazmitinin ana stoğundan 1 µl alındı. Bu örneğe, 1’er µl BamHI ve SalI enzimleri eklendi. Ardından, 10x’lik Tango buffer’dan 4 µl eklenerek, toplam 20 µl ‘lik çözelti içinde tango 2x konsantrasyonu elde edildi. 0.5 mikrolitre DTT ve 9 mikrolitre µl eklendi. Toplam hacim 20 µl olacak şekilde tamamlandı. Tüm bu işlem buz üzerinde yapıldı. Hazırlanan karışım, 37 °C de inkübatörde yarım saat bekletildi. İnkübasyonun ardından, 10 µl plazmit örneği ve 6x’yükleme boyasından 2 µl alınıp karıştırılarak hazırlanmış olan jele yüklendi.

DNA Agaroz Jel Elektroforezi

Kesim sonucunda elde edilen genomik DNA’nın kalitatif değerlendirilmesi için ve DNA’nın jel üzerinde görüntülenmesini sağlamak amacıyla %1 lik agaroz jel hazırlandı. Bu oranlara uygun miktarda agaroz tartılarak, 50 ml TAE (Tris Asetic Asit-EDTA) tamponu içinde çözülmek üzere erlene eklendi ve mikrodalgada 3 dakika kaynatılarak eritildi. Eritilen karışım ılıdıktan sonra, agaroz çözeltisine 0.5 µg/mL konsantrasyonunda etidyum bromür eklendi ve homojen bir karışım elde etmek için hafifçe çalkalandı. Karışım, elektroforez kasetine döküldü ve donması için beklendi. Jel polimerleşmesi sağlandıktan sonra 2 µl DNA bağlanma tamponu ve 10 µl DNA örneği karıştırılarak kuyucuklara yüklendi. Dna fragment ayrımı yapmak için ilk kuyucuğa 1kb lık DNA markeri yüklendi. Örnekler 95 Volt 45 dk yürütüldü ve görüntüleme cihazında görüntü alındı. Kontrol edilen genomic DNA -20 °C’de saklandı.

Bakteri Transformasyonu

Kompetent hücreler -80°C'den çıkarıldı ve buz üzerinde çözdürüldü. Çözölmüş BL-21 kompetent hücrelerinin üzerine 1 µL terapötik rekombinant olarak üretilmiş SMN1 pET-28a(+) plazmidi eklendi. Tüp, parmakla alt kısmına birkaç kez hafifçe vurularak nazikçe karıştırıldı. Hücre-DNA karışımı buz üzerinde 20-30 dakika boyunca inkübe edildi. Agar plakaları önceden 37°C'de ısıtıldı. transformasyon tüpü, 42°C'de 30-60 saniye süreyle ısı şokuna tabi tutuldu (su banyosu kullanılarak). Tüpler, 5 dakika boyunca tekrar buza konuldu. 5 dakika sonunda, hücrelere 250 µL antibiyotiksiz LB ortamı eklendi ve tüpler 37°C'de sallanan inkübatörde 30 dakika süreyle inkübe edildi. Transformasyon karışımından 100 µL, kanamisin içeren uygun bir LB agar plakasına yayıldı. Plakalar, 37°C'de bir gece boyunca inkübe edildi.

3.2.3. Rekombinant Protein Üretme ve Saflaştırma Çalışmalarında Kullanılan Malzemeler ve Teknikler

Rekombinant PEP1-SMN1 Proteininin Üretilmesi ve IPTG ile İndüklenmesi

Protein ekspresyonu için PEP1-SMN1-pET-28a klonu BL21 (DE3) Codon Plus bakterisine klonlandı.

10 mL kanamisin içeren LB besiyerine, önceden +4°C'de saklanmış olan pET28a-SMN1 terapötik rekombinant hücre kolonilerinden bir koloni eklendi. 37°C'de bir gece çalkalayıcı inkübatörde inkübasyon yapıldı. OD600'de 0.6- 0.7 aralığına gelmesi takip edildi. OD600 değeri 0.6'ya ulaştığında hücreler önceden ısıtılmış sıcaklığı 30°C'de olan taze LB kanamisin besiyerine alındı. Toplamda 3 litre olacak şekilde her biri 1 litrelik hacimlerle hazırlandı. Belirli bir oranda büyütölmüş hücre stoğundan, her bir litrelik besiyerine ekim yapıldı. Hücreler, 1 litrelik taze besiyerlerinde 3 saat boyunca büyütöldü. 3 saat sonunda, yaklaşık 2 mL költür örneğı alındı ve geri kalanına IPTG (İzopropil-β-D-tiyogalaktopiranozit) ile indüksiyon yapıldı. IPTG, her bir litreye 0.5mM olacak şekilde eklendi. Hücreler, 30°C'de çalkalayıcı inkübatörde 4 saat inkübe edildi. 4 saat sonunda, hücreler 50 ml'lik Eppendorf tüplerde santrifüj edilerek çöktüröldü ve peletler -20°C'de saklandı.

Ni-NTA Agaroz Reçinesi ile Üre Kullanarak Protein Saflaştırma

Anti-His-tag yöntemi, rekombinant proteinlerin saflaştırılması için yaygın ve etkili bir tekniktir. Bu yöntem, hedef proteinin ucuna eklenmiş his-tag dizisinin, genellikle nikel bağılı reçineler kullanılarak spesifik bağlanması yoluyla saflaştırılmasını sağlar. His-tag, seçici bağlanma özelliğı sayesinde yüksek saflıkta protein elde edilmesini

mümkün kılar. Anti-His-tag yöntemi, protein saflaştırma ve tespiti amacıyla kullanılan yaygın bir immünolojik tekniktir. Bu teknikte, rekombinant proteinlerin N veya C uçlarına eklenen kısa his-tag dizisi, proteinlerin seçici olarak saflaştırılmasını ve tanımlanmasını kolaylaştırır. His-tag dizisi, histidin kalıntılarından oluşur ve nikel veya kobalt gibi metal iyonlarına güçlü bir bağlanma gösterir.

Yöntem, his-tag içeren proteinlerin immobilize metal afinitesi kromatografisi (IMAC) ile seçici bir şekilde tutulmasını ve saflaştırılmasını sağlar. Elüsyon ise genellikle imidazol gibi maddeler kullanılarak gerçekleştirilir.

Bu metodun avantajı, proteinin biyolojik aktivitesini genellikle koruyarak hızlı ve yüksek saflıkta protein izolasyonu sağlamasıdır. Ancak, bazı durumlarda, his-tag proteinin işlevsel özelliklerinde hafif değişikliklere neden olabilir ya da ek saflaştırma adımları gerektirebilir.

Bu çalışmada, Sigma marka kit, kolon ve imidazol içeren reçine kullanılarak daha verimli ve saf PEP1-SMN proteini elde edilmiştir. His-Tag yönteminin uygulanması amacıyla Ni-NTA (Nikel-Nitrilotriasetik Asit) afinite kromatografisi matrisi tercih edilmiştir. His-Tag'deki histidin kalıntıları, immobilize nikel iyonlarının koordinasyon bölgesindeki boşluklara yüksek özgüllük ve bağlanma kapasitesi ile tutunur. Hücre lizatları matrise yüklendiğinde, His-Tag taşıyan proteinler bu matrise bağlanırken, diğer proteinler serbestçe geçiş yapar.

-20°C'den çıkarılan 2.75 mg lizozim enzimi tartıldı ve 20 ml PBS (Phosphate Buffered Saline) eklenerek çözdürüldü. Daha önce IPTG ile indüksiyon yapılmış ve protein çöktürülmüş rekombinant PEP1 proteini -20°C'den çıkarıldı. Elde edilen çözelti, protein peletinin üzerine eklendi ve karışım buz üzerine yerleştirildi. Numune vortexlenerek homojen hale getirildi, ardından buz üzerine tekrar konuldu. Karışıma 1 ml EDTA eklendi. Numune 15-20 dakika boyunca buzda bekletildi ve her 5 dakikada bir vorteks yapılarak karıştırıldı. Üzerine PMSF (fenilmetilsulfonil florür) eklendi. Örneğe 5 dakika boyunca, 30 saniye aralıklarla, bir döngü durup bir döngü devam ederek sonikasyon uygulandı. Sonikasyon işleminden sonra örnekten 100 µl alındı ve -20°C de stoklandı. Sonikasyon sonrası ürün 20 dakika boyunca, 4°C'de, 9000 RPM'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası supernatant (sup) kısmı alındı ve -20°C'ye stoklandı. Pellet üzerine PBS eklendi ve aynı şekilde 20 dakika, 4°C'de, 9000 RPM'de ikinci bir santrifüj işlemi yapıldı ve tekrar 100 µl stok alındı. Üçüncü yıkama için de aynı santrifüj koşulları (20 dakika, 4°C, 9000 RPM) kullanılarak işlem tamamlandı. Son olarak, pelet ve supernatant kısımlarından ayrı ayrı 100 µl örnek alındı ve -20°C'ye kaldırıldı. Kalan

pelleti ise Ni-NTA agaroz reçinesi ile üre kullanarak protein saflaştırma metodunda kullanmak üzere stoklandı.

Çözücü Tampon ile Proteini Çözme

8 Molar ürelik çözücü tampon ile protein çözme ve saflaştırma metodu uygulandı. Çözücü Tampon Hazırlığı yapıldı. 20 ml PBS (pH 8) içine 24 gram üre eklendi ve karışım homojen hale getirildi. 1.6 ml DTT (1 mM) eklendi. 3 ml NaCl (300 mM) eklendi. Toplam hacim 50 ml'ye tamamlanacak şekilde PBS ile dolduruldu. 1 mM olacak şekilde PMSF eklendi. Yaklaşık 1 ml EDTA eklendi. -20°C'den çıkarılan protein peleti üzerine hazırlanan çözücü tampon eklendi. Numune oda sıcaklığında rollerda gece boyunca çözülmeye bırakıldı. Çözülme sonrası numune 15 dakika boyunca, oda sıcaklığında, 9000 RPM'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası supernatant ve pellet ayrıştırıldı. Pellet -20°C ye kaldırıldı.

Supernatant üzerine Ni-NTA reçinesinden 4 ml eklendi ve tekrar oda sıcaklığında rollerda 1 saat boyunca çalkalandı. Kromatografi için kolon kuruldu ve saflaştırma işlemi başlatıldı. Kromatografi sırasında, ilk çözücü solüsyonundan daha sonra western analizinde kullanılmak üzere stok alındı.

Yıkama Tamponu ile Çözülen Proteini Temizleme

25 ml'lik bir yıkama tamponu hazırlandı. 15 ml 10 mM imidazol çözeltisi içine 12 gram üre eklendi. (8 molar üre olacak şekilde). Üzerine 1.5 ml 300 mM sodyum klorür eklendi. 800 µl DTT eklendi. Yaklaşık 1 ml EDTA eklendi. PBS ile toplam hacim 25 ml'ye tamamlandı. Ve yıkama işlemi başlatıldı. Kolondan solüsyon aktarıldı. Ve yıkama gerçekleştirildi. Yıkama sonrası örnekten daha sonra western analizinde kullanılmak üzere stok alındı.

Elüsyon Tamponu ile Proteini Kolon Yüzeyinden Ayrıştırma

Yıkama işleminden sonra proteinin elüsyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Elüsyon tamponunu hazırlamak için gereken malzemeler şunlardır: 8 M üre, PBS (fosfat tamponlu salin), 300 mM sodyum klorür, 250 mM imidazol, 1 mM DTT (ditiotreitol) ve 1 mM EDTA. 15 ml 250 mM imidazol çözeltisi bir 50 ml hacimli eppendorf tüpe eklendi, üzerine 12 gram üre ilave edildi. Daha sonra, 1,5 ml 300 mM sodyum klorür ve 0,8 ml 1 mM DTT eklendi. Karışıma, toplam hacim 25 ml'ye ulaşana kadar PBS ilave edildi. Son olarak, 1 mM EDTA eklenerek elüsyon tamponu tamamlandı. Hazırlanan tampon, protein elüsyon işlemi için kullanıma hazır hale getirildi. Örneklerden daha sonra western analizinde kullanılmak üzere stok alındı. Tablo 3.4'te kullanılan solüsyonlar verilmiştir.

Tablo 3.4. Saflaştırma ve kromatografi sırasında kullanılan solüsyonlar

Çözelti	İçeriği
IPTG	0.2383 g tartılarak 1 mL dH ₂ O ile çözüldü. 0.22- μ M filtreden geçirilerek -20°C'de saklandı
PMSF	4.3 gram PMSF 250 μ L DMSO içerisinde çözüldü.
Lizozim	2.75 mg Lizozim enzimi 20 ml PBS içinde çözüldü.
Çözücü Tampon	.20 ml PBS (pH 8) içine 24 gram üre eklendi ve karışım homojen hale getirildi. 1.6 ml DTT (1 mM) eklendi. 3 ml NaCl (300 mM) eklendi. Toplam hacim 50 ml'ye tamamlanacak şekilde PBS ile tamamlandı.
Yıkama Tamponu	15 ml 10 mM imidazol çözeltisi içine 12 gram üre eklendi. (8 molar üre olacak şekilde). Üzerine 1.5 ml 300 mM sodyum klorür eklendi. 800 μ l DTT eklendi. Yaklaşık 1 ml EDTA eklendi. PBS ile toplam hacim 25 ml'ye tamamlandı.
Elüsyon Tamponu	15 ml 250 mM imidazol çözeltisine 12 gram üre ilave edildi. 1,5 ml 300 mM NaCl ve 0,8 ml 1 mM DTT eklendi. Hacim 25 ml'ye ulaşana kadar PBS ilave edildi. Son olarak, 1 mM EDTA eklendi.

Diyaliz İşlemi ile Proteini İstenmeyen Moleküllerden Arındırma

Diyaliz işlemi, kromatografi sonrası örneğin saflaştırılarak sonraki analizler için uygun hale getirilmesi amacıyla gerçekleştirildi. İşleme başlamadan önce, Pure-A-Lyzer kitine 3 ml ultra saf su eklendi ve membranın ıslanması için en az 5 dakika bekletildi. Daha sonra tüp boşaltıldı ve membran üzerinde su kaçağı olmadığından emin olmak için dikkatlice kontrol edildi. Kuru membranın suyu emmesi, su seviyesinde azalmaya neden olabileceği için bu kontrol önem taşımaktadır. Kromatografi sırasında kullanılan yıkama tamponundan yaklaşık 3 ml'lik bir örnek alınarak diyaliz kitine aktarıldı. Örnek tüpe yüklendi ve verilen kapaklar zorlanmadan kapatıldı. Örneğin hacmi 3 ml olarak belirlendi. Diyaliz kiti, örnek yüklenmeden önce PBS ile yıkanmış ve su kaçağı kontrolü gerçekleştirilmiştir. Bu kontrol, işlem sırasında olası kayıpları önlemek için önemlidir. Daha sonra, diyaliz kiti bir behere alındı ve behere tampon olarak PBS eklendi. Örneğin yüklendiği diyaliz kiti, behere yerleştirildi. Kiti, yumuşak bir köpüğün ortası daire şeklinde kesilerek oraya oturtuldu ve kapak kısmı yukarıda kalacak şekilde sabitlendi, membran PBS içerisinde kaldı. Bu düzenek, yaklaşık 30 rpm hızla çalışan bir çalkalayıcı cihazına yerleştirildi. Bir saat sonra PBS değiştirildi ve taze PBS eklendi. Örnek, çalkalayıcıda bir iki saat daha kaldı ve bu sürenin sonunda PBS tekrar değiştirildi. Tüm işlem 4 °C derecede gerçekleştirildi. Son olarak, üçüncü kez PBS eklendi ve gece boyunca yıkama işlemi yapıldı. Ertesi gün, kit içerisindeki solüsyon çıkarılarak -20 °C derecede saklandı ve sonraki Western analizine hazır hale getirildi.

3.2.4. İn Vitro Uygulamalarda Kullanılan Yöntemler

-80 °C de Dondurulmuş Olan Hücre Soyunun Aktifleştirilmesi

+4°C'den çıkarılmış %10 FBS içeren DMEM besiyeri, 37°C inkübatöre koyuldu ve ısınması sağlandı. Üç adet 25 mL'lik hücre kültürü kabı steril çalışma ortamında alındı. Üzerine deney tarihi ve hücre hattı adı (SH-SY5Y) yazıldı. -80°C'de depolanan SH-SY5Y hücre stoğu çıkarıldı. 15 mL'lik Falcon tüpüne 3 mL ısıtılmış besiyeri eklendi. Her bir kültür tüpüne 5 mL besiyeri eklendi. -80°C'den çıkarılan hücre stoğu, 1 mL besiyeri ile çözdürüldü. Çözdürülen hücre stoğu, içerisinde 2 mL besiyeri bulunan 15 mL'lik Falcon tüpüne alındı ve 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atıldı ve pellet üzerine 3 mL taze besiyeri eklendi. Hazırlanan 3 mL hücre süspansiyonundan 1 mL, her bir 25 mL'lik flask içinde bulunan 5 mL besiyerine eklendi. Total hacim 6 mL oldu. Hafif pipetaj ile hücre süspansiyonu homojenize edildi. Hücre kültürü, 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatöre konularak inkübasyona bırakıldı.

Hücre Kültüründe Kullanılan Besiyerinin Hazırlanması

Hücre kültürü deneylerinde, 200 mM L-Glutamin içeren ve 4°C'de saklanan DMEM (Dulbecco'nun Modifiye Edilmiş Eagle Besiyeri) kullanıldı. SH-SY5Y hücreleri için %10 FBS (Fetal Bovine Serum) eklendi ve DMEM hazırlandı. Bu karışıma, son konsantrasyonu 1X olacak şekilde penisilin-streptomisin çözeltisi eklenerek kullanıldı.

Pasajlama

Hücre yoğunluğu mikroskop altındagörüntülendi ve yoğunluk %80'e ulaştığında, üzerindeki %10 FBS içeren DMEM ortamından arındırıldı. Hücreler 1X PBS 1.5 mL eklenerek hafifçe yıkandı. Sonrasında, 1.5 mL Tripsin-EDTA çözeltisi ilave edilerek hücreler 2 dakika inkübatörde bekletildi. Inkübasyon sonunda hücrelerin yüzeyden ayrıldığı gözlemlendi. Bu aşamada, hücre süspansiyonuna 3 mL %10 FBS'li DMEM eklenip, Tripsinin etkinliğinin durdurulması sağlandı. 15 mL'lik bir falkon tüpüne alındı ve 5 dakika boyunca 1200 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve kalan pellet üzerine 3 mL %10 FBS'li DMEM eklenerek çözündürüldü. Son olarak, 3 yeni flaska her birine 5 mL %10 FBS içeren DMEM konuldu ve her birine 1 mL hücre süspansiyonu eklenerek pasajlama işlemi gerçekleştirildi. Tekrardan hücreler 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatöre konularak inkübasyona bırakıldı.

Hücre Soyuna Safılaştırılan Protein Uygulanması

Bir gece boyunca 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatöre bırakılan hücreler, elektronik mikroskop altında incelendi ve %50 hücre yoğunluğuna ulaştığı

gözlemlendi. Hücrelerden bir grup kontrol grubu olarak inkübatörde bırakıldı. Diğer hücre gruplarına ise, daha önce diyaliz yöntemi ile saflaştırılan ve BSA yöntemi ile konsantrasyonu 1 µg/mL olarak belirlenen protein, son konsantrasyonu 100 µg/mL olacak şekilde uygulandı. Uygulanan hücreler, biri 6 saat diğeri 12 saat süreyle 37°C’de %5 CO₂ inkübatörde inkübasyona bırakıldı. 6 saatlik inkübasyon süresinin ardından flask inkübatörden çıkarıldı ve besiyeri uzaklaştırıldı. Hücreler 2 mL PBS ile hafifçe yıkanarak PBS döküldü ve üzerine 1.5 mL tripsin eklendi. Flask 2 dakika boyunca inkübatöre konuldu ve ardından 3 mL %10 FBS’li DMEM besiyeri eklenerek tripsinin aktivitesi durduruldu. Hücre süspansiyonu 15 mL’lik Falcon tüpüne alındı ve santrifüj yapıldı. Supernatant atıldı ve oluşan pellet -20 °C de stoklandı. Aynı işlem 12.saat sonunda diğer hücrede uygulandı. Hücreler daha sonra western protokolü için -20°C ye kaldırıldı.

SDS-Page Analizi (Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez)

SDS jeli, laboratuvar ortamında proteinlerin ayrıştırılması ve analizinde kullanılan bir poliakrilamid jel türüdür. SDS, sodyum dodesil sülfat anlamına gelir ve proteinlerin denatüre edilmesinde önemli bir görev üstlenir. Bu jel, proteinlerin boyutlarına göre ayrılmasını sağlayan elektroforez yönteminde kullanılır. SDS, proteinlere bağlanarak onların doğal yapısını bozup negatif yük kazanmalarını sağlar. Böylece proteinler, poliakrilamid jel içinde elektriksel alan altında yalnızca moleküler ağırlıklarına göre hareket ederler.

Bu yöntem, SDS-PAGE (SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrez) olarak bilinir ve proteinlerin saflaştırılması, moleküler ağırlıklarının belirlenmesi ve çeşitli analizlerde yaygın olarak kullanılır.

İlk adım olarak, cam plakalar ve kasetler uygun şekilde yerleştirildi. Yürütme jeli karışımı, Tablo 3.5 de verilen oranlarda 15 mL’lik Falcon tüpünde hazırlandı. Elde edilen karışım, iki cam plaka arasına dökülerek üst kısımda yaklaşık 4 cm boşluk kalacak şekilde bırakıldı. Jelin yüzeyinin düzgün olması ve hava kabarcıklarının oluşmaması amacıyla, yürütme jelinin üzerine bir miktar izopropanol eklendi. Jel polimerleşip donduktan sonra, izopropanol uzaklaştırıldı ve kurutma kağıdı kullanılarak temizlendi.

Ardından, yükleme jeli karışımı Tablo 3.6 da belirtilen oranlara göre hazırlandı ve polimerleşmiş yürütme jelinin üzerine döküldü. Yükleme jeli üzerine jel tarağı yerleştirildi ve jelin polimerleşmesi için uygun süre beklenildi. Jel tamamen donduktan sonra, örneklerin yüklenmesi için sonraki aşamalar uygulamaya hazır hale getirildi. Totalde 2 jel hazırlandı. SDS işlemi deneyde 2 farklı yerde yapıldı.

-20 de Stoklanan Lizatların SDS analizi ile Protein Varlığı Tespiti

Daha önceden izolasyon ve saflaştırma işlemi yapılan olan proteinler stoktan çıkartıldı.. Bu proteinler SDS-PAGE'de yürütülmek üzere hazırlandı. Toplamda 10 örnek mevcuttu. Bu örnekler sırasıyla: IPTG'siz olan birinci örnek, IPTG pozitif 0.5 mM konsantrasyonda alınan ikinci örnek, Sonikasyon sonrası alınan ham ekstraktan elde edilen üçüncü örnek, Çözücü solüsyon sonrası pelletten alınan dördüncü örnek, PBS ile yıkama sonrası SUP1 (üst faz 1) beşinci örnek, SUP2 (üst faz 2) altıncı örnek, SUP3 yedinci örnek, Flow through sekizinci örnek, yıkama tamponu (Wash buffer) dokuzuncu örnek ve elüsyon örneği olan onuncu örnek olacak şekilde numaralandırıldı.

SDS-PAGE protokolü için her bir örnekten 20 µL alındı. Bu örneklerin her biri, 4 µL BME (beta-mercaptoethanol) içeren 5X yükleme boyası ile karıştırıldı. Ardından her örneğe 60 µL PBS eklendi ve hafif bir vortex işleminden sonra 10 saniye süreyle sonikasyon uygulandı. Örnekler 96°C'de 5 dakika kaynatıldı ve bu esnada her 2 dakikada bir hafifçe vortex yapılarak tekrar kaynatma işlemine devam edildi. Kaynatma işleminin ardından örnekler, 14000 rpm'de 5 dakika süreyle mikrosantrifüj işlemine tabi tutuldu.

JEL 1X yürütme tamponu ile 2 jel seviyesine gelene kadar dolduruldu. Kaset oturtuldu Tarak çıkartıldı. Kuyucuklar temizlendi. Daha sonra örnekler kuyulara 12 µL olacak şekilde yüklendi. Son olarak proteinlerin büyüklüğünü analiz etmek için ABCAM Prestained Protein Ladder belirtecinden 5 µL yüklenerek, 100V'da 2 saat yürütüldü. Proteinler büyüklüklerine göre ayrıldıktan sonra, jel tanktan çıkarılarak jel boyama boyasına 1 gece bırakıldı. Sonraki gün boya tekrar kullanılmak üzere saklandı. Jelden boyanın uzaklaşması için üzerine saf su veya boya giderici çözelti eklendi ve sonuçlar analiz edildi.

Sh-SY5Y Hücre Soyuna Protein Uygulanması Sonrası SDS Page Analizi

Jel aynı protokole göre hazırlandı. Jel polimerleştikten sonra tanka yerleştirildi, kuyucuklar temizlendi ve örnek yüklenmesi için hazırlandı SDS page analizinde önceden uygulama yapılan ve stoklanan SH-SY5Y hücre soyu kullanıldı. Jele yükleme yapmak için dört örnek hazırlandı. İlki, diyaliz aşamasında elde edilen saf SMN1 proteini, ikincisi protein içermeyen kontrol örneği SH-SY5Y hücre hattı. Üçüncüsü SMN1 protein uygulamasından sonraki 6. Saat ve dördüncü örnek ise protein uygulama sonrası 12. saat örneklerinden oluşturuldu. Her bir örnek, toplamda 20 µl olacak şekilde ikili ependorf tüplerine yerleştirildi ve bu örneklerle 140 µl RIPA buffer eklendi. Ardından, her bir tüpe içerisinde BME bulunan 5X loading boyası ilave edildi. Boya miktarı 40 µl ve BME miktarı ise 8 µl olarak ayarlandı. Örnekler hafifçe vortexlenerek homojen hale getirildi.

Donmuş halde olan örnekler, -20 °C den çıkarıldıktan sonra hafif vortexleme işlemiyle çözündürüldü ve ardından 10 saniye boyunca sonikasyona tabi tutularak hücreler daha da homojenleştirildi. Bu işlemin ardından örnekler 96 °C de 5 dakika boyunca kaynatıldı; kaynama sırasında her 2 dakikada bir örnekler hafifçe vortexlenerek işlem tekrarlandı. Son aşamada, örnekler 14.000 rpm'de 5 dakika boyunca sentrifüj edildi. Sentrifüj sonrası süpernatant kısım dikkatlice alınıp jele yüklendi. JEL 1X yürütme tamponu ile 2 jel seviyesine gelene kadar dolduruldu. Kaset oturtuldu Tarak çıkartıldı. Kuyucuklar temizlendi. Daha sonra örnekler kuyulara 12 µL olacak şekilde yüklendi. Son olarak proteinlerin büyüklüğünü analiz etmek için ABCAM Prestained Protein Ladder belirtecinden 5 µL yüklenerek, 100V'da 2 saat yürütüldü. Proteinler büyüklüklerine göre ayrıldıktan sonra, jel tanktan çıkarılarak jel boyama boyasına 1 gece bırakıldı. Sonraki gün boya tekrar kullanılmak üzere saklandı. Jelden boyanın uzaklaşması için üzerine saf su veya boya giderici çözelti eklendi ve sonuçlar analiz edildi.

Tablo 3.5. Yürütme jeli hazırlanışı

Solüsyon	Miktar
1.5 M Tris-HCl PH:8.8	1250 µL
ddH ₂ O	2 mL
%40 Akrilamid	1670 µl
%20 SDS	25 µl
%10 APS	25 µl
Temed	2.5 µl

Tablo 3.6. Yükleme jeli hazırlanışı

Solüsyon	Miktar
1 M Tris-HCl PH:6.8	375
ddH ₂ O	2088 µl
%40 Akrilamid	506 µl
%20 SDS	15 µl
%10 APS	15 µl
Temed	1.5 µl

Western Blot Analizi

Western blot, proteinlerin tespiti ve analizi için kullanılan bir laboratuvar tekniğidir. Bu yöntem, bir numunedeki spesifik proteinlerin varlığını belirlemek, miktarını ölçmek ve moleküler ağırlığını tespit etmek amacıyla kullanılır. Western blot deneyinde kullanılan solüsyonlar tablo 3.7'de verilmiştir.

Jeli, PVDF Membranına Transfer Etme İşlemi

SDS page analizinde yürütülen jeller, western blot analizi için hazırlık aşamasına alındı. İlk adımda, Poliviniliden Florür membranı (PVDF) 6 cm ve 8 cm boyutlarında kesildi ve ıslatılacak kadar metanol döküldü. Membranı ıslatma işleminin ardından, western analizinde kullanılacak alt ve üst yataklar yani transfer pedleri transfer buffer içinde 5 dk bekletildi. Transfer buffer, 45 ml transfer buffer solüsyonu ve 5 ml metanol eklenerek hazırlandı. Alt ve üst yataklar ile membran ıslatıldıktan sonra, western cihazına önce iki adet alt yatak yerleştirildi ve roller yardımıyla ıslaklığı belli oranda azaltıldı. Bu işlemten sonra, membran dikkatlice alt yatakların üzerine yerleştirildi ve yürütülen jel membranın üstüne konuldu.

Membran ve jel üzerine üst yataklar yerleştirildi ve western üst kapağı kapatılarak sandviç modeli oluşturuldu. Son olarak, sandviç yapı western cihazına yerleştirildi ve 25 volt, 1.3 amperde 7 dakika boyunca transfer işlemi gerçekleştirildi.

İmmünoblotlama İşlemi

İmmünoblotlama, belirli proteinlerin tespiti ve analizini sağlayan bir biyokimyasal yöntemdir ve antijen-antikor etkileşimine dayanır. Bu teknik, proteinlerin karmaşık karışımlar içerisindeki varlığını ve miktarını belirlemek için yaygın olarak kullanılır.

Transfer edilen membran, %5'lik TBST ile hazırlanmış süt tozu solüsyonuna (bloklama solüsyonu) yerleştirildi ve +4 °C de çalkalayıcı inkübatörde 40 RPM'de gece boyunca çalkalandı. Bloklama işlemi sonrasında solüsyondan membrane arındırıldı ve önceden hazırlanan 10 ml TBST-süt tozu ve 5 µl Afinitipure Rabbit Anti-His Tag primer antikoru karışım solüsyonu membrane eklendi. Oda sıcaklığında 2 saat boyunca 50 RPM'de çalkalandı. Bu sürenin sonunda membran, TBST solüsyonu ile üç kez, her biri 15 dakika sürecek şekilde yıkandı.

Ardından sekonder antikor hazırlandı. 10 ml TBST içerisinde 10 µl Goat Anti-Rabbit sekonder antikor eklenerek hazırlandı ve yıkanan membranın üzerine eklendi. Membran, oda sıcaklığında 2 saat boyunca 50 RPM'de çalkalandı. İkinci çalkalama süresinin ardından, membran üç kez, her biri 15 dakika sürecek şekilde TBST solüsyonu ile yıkandı. ECL solüsyonu hazırlandı ve membranın üzerine dökülerek görüntüleme cihazında sonuçlar alındı.

Proteinlerin Görüntülenmesi ve Analiz

Görüntüleme işlemleri için ECL (Pierce™) substratı kullanılmıştır. Solüsyon A ve Solüsyon B, 1:1 oranında karıştırılarak alüminyum folyo ile sarılı bir ependorf tüpünde birleştirildi. Hazırlanan 1 mL'lik karışım, membranın üzerine uygulanarak karanlık bir

ortamda 1 dakika inkübe edildi. Sonrasında, görüntüleme G:BOX Syngene sistemi ile yapılarak veriler kaydedildi. Görüntüler değerlendirildi.

Tablo 3.7. Western blot deneyinde kullanılan çözeltiler

Çözelti	Hazırlanışı
10X TBS (Tris-Buffered Saline):	24,22 g Tris-base (MW: 121,14) ve 87,66 g NaCl (MW: 58,44) 700 mL dH ₂ O'da çözülür. pH 7,5'e ayarlandı ve son hacim 1 L'ye tamamlandı
10 X Yürütme Tamponu:	30,3 g Tris-base (MW: 121,14) ve 144,4 g glisin (MW: 75,07) 700 mL dH ₂ O'da çözülür. pH 8,3'e ayarlanarak son hacim 1 L'ye tamamlandı. Kullanılırken 1X'e sulandırıldı.
Transfer Tamponu:	200 mL metanol, 100 mL 10X yürütme tamponu, ile karıştırılıp son hacim dH ₂ O ile 1 L'ye tamamlandı. Çözeltiye 500 µL %10 (v/v) SDS eklendi
Jel Boyama Çözeltisi:	0,1 g Coomassie brilliant blue R-250, 50 mL metanolde çözülür ve 10 mL asetik asit eklenerek karıştırıldı. Son hacim dH ₂ O ile 100 mL'ye tamamlandı.
1X TBST Çözeltisi:	100 mL 10X TBS ile 1 mL Tween-20 karıştırıldı ve son hacim dH ₂ O ile 1 L'ye tamamlandı.
Bloklama Tamponu:	100 ml 1X TBST çözeltisi içinde 5 g yağsız süt tozu çözünerek hazırlandı
%10 (w/v) SDS	10 g SDS dH ₂ O'da çözülerek son hacmi 100 mL'ye tamamlandı.

4. BULGULAR

4.1. Klonlama Çalışmaları

4.1.1. Plazmit Tasarımı

SMN1 geninin protein ekspresyonu amacıyla primer dizisi tasarlandı. SMN1 gen dizisinin restriksiyon kesim bölgeleri analiz edildi. Geni kesen enzimler belirlendi. Ardından, ekspresyon vektörü pET-28a'yı kesen enzimler belirlendi. Daha sonra SMN1 genini kesmeyen, ancak pET-28a vektörünü kesen BamHI ve SalI enzimleri klonlama için seçildi. Ardından, pET-28a vektörüne SUGENOMICS Biotechnology şirketinden tarafından yapıldı.

4.2. Plazmit DNA İzolasyonu ve Miktar Belirlenmesi

3.3.3. de belirtilen protokol uygulandı. GeneJET Plasmid Miniprep™ kitinin üretici talimatlarına uygun şekilde gerçekleştirildi. İzolasyon sonrası Nanodrop da dna miktarı ölçüldü. DNA konsantrasyonu, 260 nm dalga boyunda absorbans ölçümleri ile Denovix DS-11 FX+ cihazı kullanılarak tespit edildi. Şekil 4.1'de ölçülen DNA miktarı verilmiştir.

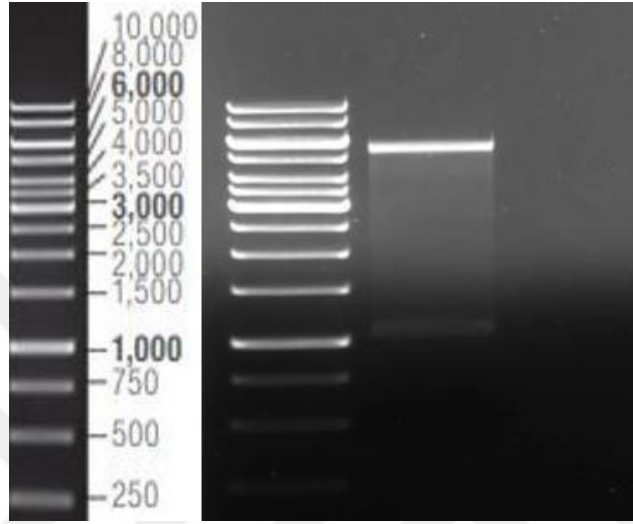


Şekil 4.1. Plazmit DNA izolasyonu sonrası DNA miktarı

İzolasyon sonucunda ölçülen DNA miktarı 82.501 ng/μl olarak belirlenmiştir.

4.3. Restrüksiyon Enzimleri ile Klonlanan Plazmitin Kesimi ve DNA Agaroz Jel Elektroforezinde Görüntülenmesi

Rekombinant SMN1 proteinine kesim işlemi yapıldı. Klonlanan vektör uygun enzimler ile kesildi. DNA agaroz jel elektroforezi yapılarak enzimlerin doğruluğu kanıtlandı. Şekil 4.2’de kesim sonrası görüntü verilmiştir.



Şekil 4.2. BamHI ve SalI enzimleri ile rekombinant SMN1 protein kesilmesi sonrası agaroz jel elektroforezi görüntüsü

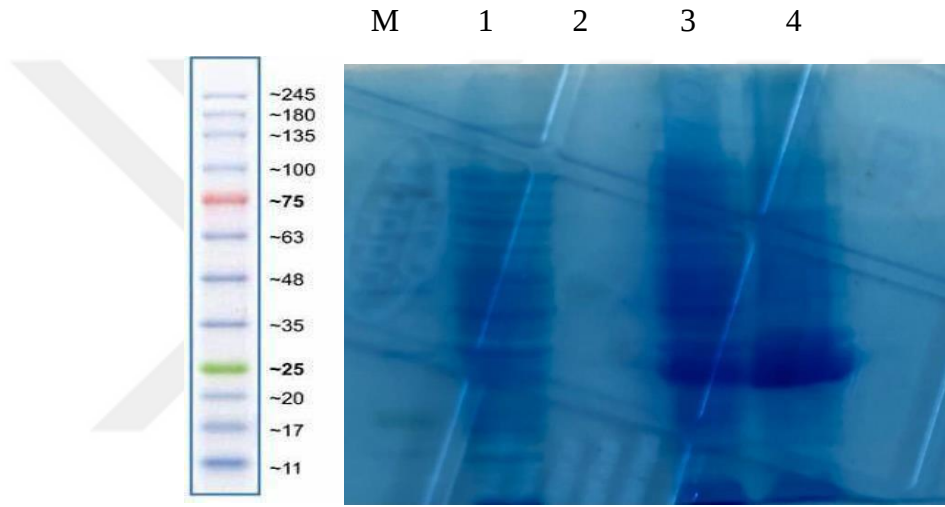
4.4. Rekombinant PEP1-SMN1 Protein Üretilmesi ve Saflaştırılması

Rekombinant protein üretimi için, daha önceden transformasyonu sağlanmış olan PET28 α -SMN1 ve BL21 kolonisinden bir koloni alındı ve 10 ml’lik LB kanamisin içeren besiyerine ekim yapıldı. Hücre kültürü, 37 °C de 116 rpm’de çalkalayıcı inkübatöre yerleştirilerek bir gece boyunca hücrelerin büyümesi sağlandı. Ertesi gün, besiyeri değiştirildi. Bu işlemde, 2991 ml taze LB Kanamisin besiyerine toplamda 9 ml önceden büyütülmüş olan kültürden eklendi. Kalan 1 ml’lik örnek ise santrifüj edilip -20 dereceye kaldırıldı, çünkü bu kısımda IPTG kullanılmamıştı.

Taze besiyerine ekilen hücreler yaklaşık 4 saat boyunca aynı sıcaklık ve çalkalama hızında çalkalandı. Hücrelerin OD600 değeri 0.6-0.7 aralığına ulaştığında, IPTG solüsyonu eklenerek indükleme yapıldı. İndükleme, 0.5 mM konsantrasyonda IPTG ile 30 °C 4 saat boyunca gerçekleştirildi. İndükleme sonrası, örnek alındı ve çöktürüldü. Pelletler -20 °C ye kaldırıldı.

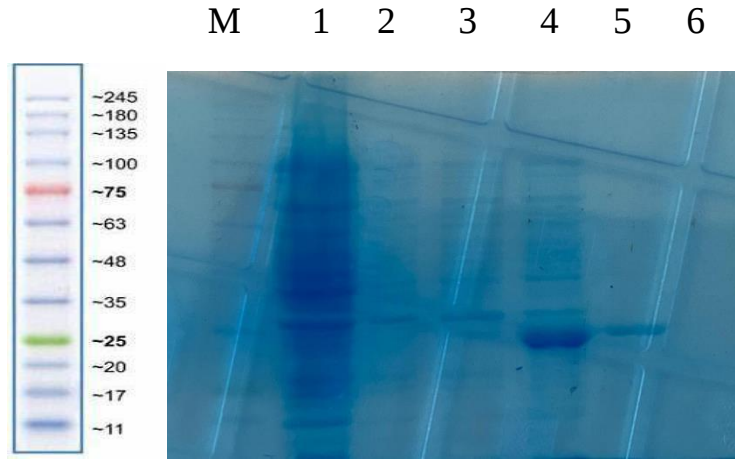
4.4.1. Protein Lizatının Hazırlanması ve His-Tag Yöntemi ile Saflaştırılması

Bakteriyel pelletler, -20°C’de saklanmış numunelerden elde edilerek, bölüm 3.2. başlığında belirtilen yöntem doğrultusunda parçalanmış ve hücre içi proteinlerin ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen protein lizatı, aynı bölümde detaylandırılan His-Tag yöntemi kullanılarak histidin etiketli PEP1-SMN1 proteininin saflaştırılması için işleme alınmıştır. Saflaştırma süresince, her bir çözeltinin eklenmesi sonrasında protein analizi için örnekler toplanmıştır. Saflaştırılmış proteinin doğrulama analizi için alınan lizat örnekleri, %12 SDS lik SDS jeli kullanılarak bölüm 3.2. başlığında anlatılan SDS-PAGE ve bölüm 3.2. de açıklanan Western blot yöntemi ile incelenmiş, sonuçlar Şekil 4.3, 4.4 ve 4.5 de gösterilmiştir.



M: marker, 1 İndüklenmemiş lizat, 2: İndüklenmiş lizat, (deneysel hatadan dolayı yükleme kayboldu) 3: Sonikasyon sonrası ham ekstrakt, 4: Çözücü solüsyon sonrası pellet.

Şekil 4.3. PEP1-SMN1 proteini saflaştırılırken alınan örneklerden yapılan SDS jel analizi



M: Marker, 1: sonikasyon ve santrifüj sonrası 1. supernant 2: PBS ile yıkama sonrası supernatant, 3: PBS ile ikinci yıkama sonrası supernatant, 4: Flow through, 5: Yıkama solüsyonu sonrası alınan örnek, 6: elüsyon5.

Şekil 4.4. PEP1-SMN1 proteini saflaştırılırken alınan örneklerden yapılan SDS jel analizi

Bu SDS analizine göre proteinlerin varlığı kanıtlandı ama nerede olduğunu doğrulamak için western analizinde örnekler yeniden farklı sırayla yüklendi.



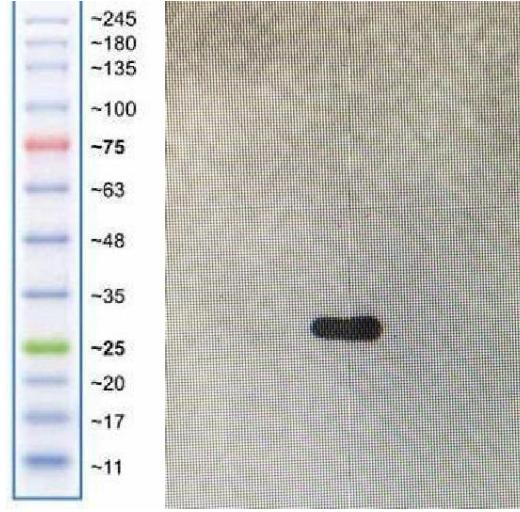
M: Marker, 1: İndüklenmemiş lizat, 2: Sonikasyon sonrası alınan ham ekstrakt, 3: Flow through, 4: Yıkama sonrası alınan örnek, 5: Elüsyon5

Şekil 4.5. Saflaştırma sonrası alınan PEP1-SMN1 proteini örnekleri ile western blot sonucu.

Saflaştırılan Proteine Diyaliz uygulaması

Bölüm 3.2. de bahsedilen protokol uygulanarak yıkama solüsyonunda varlığı tespit edilen protein daha saf hale getirildi. BSA ile konsantrasyonu hesaplandı.

Doğruluğu kanıtlamak için diyaliz sonrası western blot yapıldı. Şekil 4.6 da western sonucu gösterilmiştir.



Şekil 4.6. Yıkamadan alınan örneğe diyaliz protokolü uygulanması.

Üretilen PEP1-SMN1 protein ağırlığı 28kda olduğu bilindiğinden çıkan görüntü marker ile kontrol edildi ve proteinin varlığı doğrulandı.

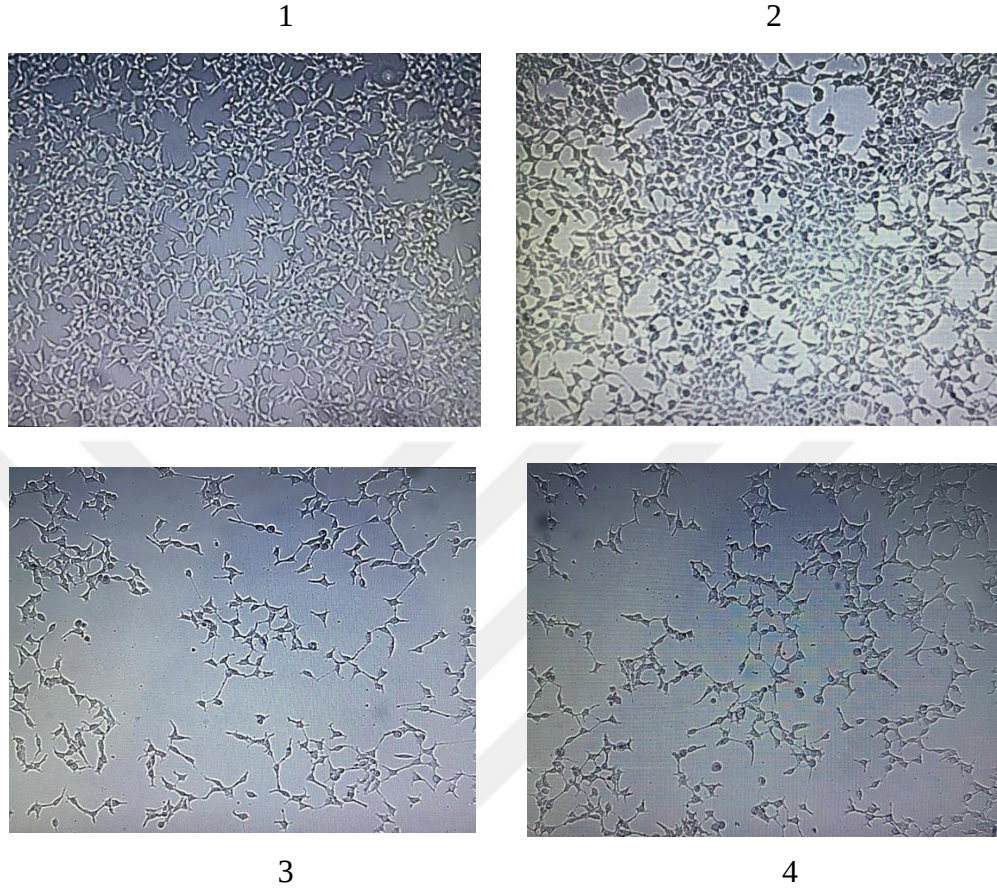
4.5. Rekombinant PEP1-SMN Proteininin Etkinliğinin Değerlendirilmesi

4.5.1. Hücre Soyuna Protein Uygulanması

37°C ve %5 CO₂ bulunan inkübatörde bir gece boyunca bekletilen hücreler mikroskopla incelendi ve %50 yoğunluğa ulaştıkları tespit edildi. Hücre gruplarından biri kontrol amacıyla inkübatörde tutuldu.

Diğer gruplara ise, diyaliz yöntemi ile saflaştırılmış ve BSA yöntemiyle konsantrasyonu 1 µg/mL olarak belirlenmiş protein, total de 6 mL olan kültüre 151.5 µl eklenerek son konsantrasyon 100 µg/mL ulaşacak şekilde uygulandı. Protein uygulanan hücreler, 37°C ve %5 CO₂ koşullarında biri 6 saat, diğeri 12 saat süreyle inkübatörde bekletildi. 6 saatlik sürenin sonunda, flask inkübatörden çıkarılarak besiyeri uzaklaştırıldı. Hücreler, 2 mL PBS ile hafifçe yıkanıp PBS döküldü ve üzerine 1.5 mL tripsin eklendi. Flask, 2 dakika süreyle inkübatörde bekletildi ve ardından tripsin aktivitesini durdurmak için 3 mL %10 FBS içeren DMEM besiyeri eklendi. Hücre süspansiyonu, 15 mL'lik falcon tüpüne alındı ve santrifüj işlemi yapıldı. Supernatant atıldı ve oluşan pellet -20 °C ye western protokolünde kullanılmak üzere stoklandı. Aynı şekilde 12. saat sonunda protein uygulanmış ve uygulanmamış olan kontrol grubu hücrelerden protokole uygun şekilde pellet stoğu alındı ve -20°C ye saklandı.

Şekil 4.7. de hücrelerin protein uygulanmadan önceki görüntüsü, protein uygulandıktan sonra 6. Saat ve 12. Saat sonrası mikroskop altında ki görüntüsü verilmiştir.



1: SH-SY5Y hücre ekiminden sonra 24. saat, 2: Protein uygulanmayan kontrol grubu 24. saat, 3: Son konsantrasyon 100 µg/mL protein uygulanması sonrası 6. saat, 4: Son konsantrasyon 100 µg/mL protein uygulanması sonrası 12. Saat.

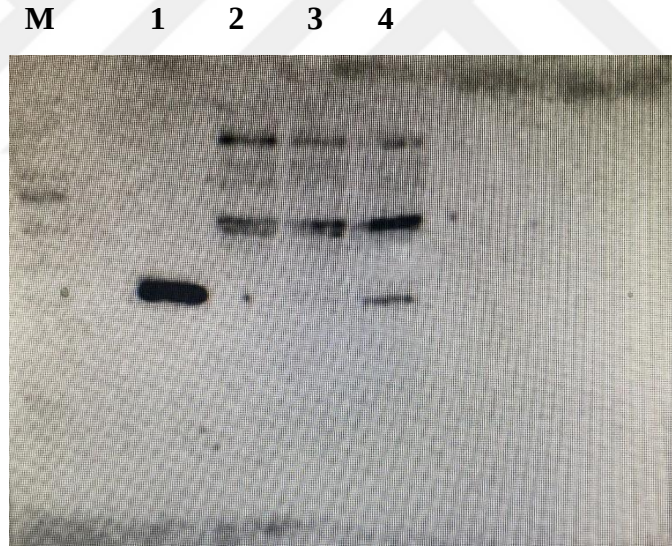
Şekil 4.7. Sh-SY5Y hücre soyuna protein uygulaması

Protein Uygulama Sonrası Western Analizi ile Doğrulama

Bölüm 3.2. de verilmiş olan SDS-page protokolü uygulandı. SDS-PAGE işleminden sonra proteinlerin transferi amacıyla 6 cm x 8 cm boyutlarında PVDF membran kesildi. Membran, Western blot analizinde kullanılmak üzere metanol ile ıslatıldı. Transfer için alt ve üst pedler, 45 ml transfer buffer ve 5 ml metanol içeren çözeltide 5 dakika bekletildi. Islatma işlemi tamamlandıktan sonra membran ve petlerin fazla sıvısı roller yardımıyla alındı. Western cihazına önce iki alt pet yerleştirildi, ardından membran dikkatlice bu petlerin üstüne konumlandırıldı ve SDS-PAGE jeli membranın üzerine yerleştirildi. Jel üzerine üst pedler yerleştirilerek cihazın üst kapağı kapatıldı ve sandviç yapısı oluşturuldu. Transfer işlemi, Western blot cihazında 25 volt ve 1.3 amperde 7 dakika boyunca gerçekleştirildi.

Transfer işleminin ardından membran, %5'lik süt tozu çözeltisi içeren TBST çözeltisine konularak, 4°C'de 40 rpm hızında çalışan çalkalayıcıda gece boyunca bloklama işlemi için bekletildi. Bloklama işlemi sonrası membran, çözeltiden çıkarılarak, 10 ml TBST içinde çözölmüş 5 µL Affinipure-Rabbit-Anti histag primer antikoru içeren çözelti ile oda sıcaklığında 2 saat boyunca 50 rpm'de çalkalandı. Bu sürenin ardından membran, TBST çözeltisi ile üç kez, her biri 15 dakika süren yıkama işlemine tabi tutuldu. Sekonder antikor çözeltisi, 10 ml TBST içine 10 mikrolitre Goat-Anti-Rabbit sekonder antikor eklenerek hazırlandı. Yıkanmış membran, bu çözelti ile oda sıcaklığında 2 saat boyunca 50 rpm'de inkübe edildi. İnkübasyon süresi bittikten sonra membran, her biri 15 dakika süren üç ardışık yıkama işlemi ile TBST çözeltisi kullanılarak yıkandı. Son aşamada, membranın üzerine ECL solüsyonu dökülerek, görüntüleme cihazında analiz işlemi yapıldı.

Üretilen PEP1-SMN1 proteinin hücre membranından geçtiği gözlemlendi. Şekil 4.8'de western analiz sonucu verilmiştir.



M: Marker, 1: Diyaliz sonrası elde edilen saf protein, 2: Protein uygulanmayan kontrol grubu, 3: Hücre soyuna 100 µg/ML protein uygulanması sonrası 6. saat, 4: Hücre soyuna 100 µg/ mL protein uygulanması sonrası 12. Saat

Şekil 4.8. Western analizi ile proteinin membrandan geçme potansiyelini gözlemlene.

Sonuç olarak saflaştırılan teröpatik SMN1 proteininin 100 µg/ ML konsantrasyonda 12. saatte 37°C de hücre membranından geçtiği gözlemlendi.

5. TARTIŞMA

Spinal müsküler atrofi (SMA), 5q kromozomunda bulunan *SMN1* genindeki mutasyonların neden olduğu otozomal resesif bir genetik hastalıktır. Bu mutasyonlar, motor nöron kaybına yol açarak kas zayıflığı ve atrofisine neden olur (88, 89). SMA, genellikle maksimum motor fonksiyonuna göre alt tiplere ayrılır ve çocukluk çağında başlayan tip I, II ve III en sık görülen formlardır.

Tip I SMA, yaşamın ilk 6 ayında ortaya çıkar ve hastalar bağımsız oturma yeteneğine ulaşamaz. Tip II SMA, 6 ila 18 ay arasında başlar; bu hastalar oturma yetisine sahip olsa da bağımsız yürüme kabiliyetine erişemezler. Tip III SMA ise 18 aydan sonra başlar ve bu hastalar bağımsız yürüyebilir (57, 90, 91).

Tipik klinik belirtiler nedeniyle tanı süreci genellikle kolay kabul edilir. Bacaklarda kollara kıyasla daha belirgin olan kas güçsüzlüğü, proksimal bölgede distale oranla daha fazla zayıflık, yüz kaslarının korunması, yaygın hipotoninin varlığı, reflekslerin kaybı ve karakteristik solunum paterni tip I SMA için belirgin ipuçlarıdır ve bu durumda kas biyopsisi gibi ileri tetkiklere gerek olmadan genetik testler önerilir (19, 92, 93). Tip II hastalarında da benzer motor ve solunum paternleri gözlemlenmekle birlikte, daha hafif seyreden bu bulgular tanının düşünülmesi ve genetik testlerin yapılması için yeterli kabul edilir. Tip III hastalarında ise belirtiler daha hafif ve özgüllüğü az olabileceğinden, tanının doğrulanması için genellikle elektromiyografi gibi ek incelemeler kullanılır (24, 94). Genetik testler nispeten kolaydır ve vakaların yaklaşık %95'inde ekzon 7 ve 8'deki delesyonlarla tanı konur.

Klinik bulgular ve genetik analizlerin kolaylığına rağmen, SMA tanısının her zaman hızlı bir şekilde konulamadığı ve tanı sürecinde gecikmeler yaşanabildiği bildirilmiştir (95). Tanının konması, genetik danışmanlığın sağlanması yanısıra, hastalığa özel bakım standartlarının uygulanması açısından da önem taşır (65, 66, 96). Yeni tedavi seçeneklerinin ticari olarak erişilebilir hale gelmesi, erken tanının doğrulanmasının önemini artırmış, çünkü erken müdahalenin daha iyi sonuçlarla ilişkili olduğu gösterilmiştir (97-99).

İnsan SMN proteini 294 amino asitten oluşur, 38 kDa moleküler ağırlığa sahiptir (44). *SMN1* genindeki kusurların sonucu, *SMN2* tarafından üretilen tam uzunlukta ve stabil SMN protein seviyelerinin azalmasıdır. Tamamen SMN eksikliği embriyonik dönemde ölümcül iken, düşük SMN seviyeleri, n boynuz hücrelerinin dejenerasyonuna

neden olarak motor nöron kaybına ve buna bağlı olarak iskelet kası atrofi ve güçsüzlüğe yol açar (56). SMN2 geni, az miktarda tam uzunlukta SMN transkripti üretebilmesine rağmen, bireyler arasında değişkenlik gösteren SMN2 kopya sayısı, hastalığın şiddetini belirler; daha fazla SMN2 kopyası genellikle daha hafif bir hastalık seyri ile ilişkilidir (100).

Son dönemde, antisens oligonükleotid (ASO) nusinersen ve onasemnogene abeparvovec ile yapılan gen tedavisi SMA hastaları için kullanıma sunulmuştur. Bunun yanı sıra, faz II ve III klinik çalışmalarından elde edilen olumlu sonuçlar, diğer tedavi seçeneklerinin de yakında klinik pratiğe girebileceği umudunu artırmıştır (101).

Mevcut tedavi yaklaşımları, iki ana kategoriye ayrılabilir: SMN'ye Bağımlı Gen Terapileri ve SMN'den Bağımsız Faktörleri hedefleyen tedaviler. SMN'ye bağımlı gen terapileri, SMN2'nin ekson dizilimini düzenleyen (nusinersen ve küçük moleküller) veya SMN1 geninin yerini alan (onasemnogene abeparvovec) tedavileri içerir. SMN'den bağımsız tedaviler ise kas güçlendirme terapileri ve nöroprotektif yaklaşımları kapsamaktadır (102).

Bu tedavilerle beraber modern ilaç keşfi ve geliştirme (Ar-Ge) çağında, protein bazlı tedaviler birçok ilaç firması için öncelikli bir odak noktası olmaya devam etmektedir. Rekombinant biyolojik ajanlar, hastalıkla ilişkili yolları yüksek özgüllükle tanımlayıp modifiye edebilme yetenekleri nedeniyle, çeşitli hastalıkların tedavisinde tercih edilen ilaçlar olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (103). Protein bazlı terapötikler, farmakoloji endüstrisinde en hızlı büyüyen ilaç kategorilerindendir. Bu terapötiklerin büyük bir bölümü rekombinant proteinlerden oluşmakta olup, dünya genelinde tıbbi uygulamalarda 170'ten fazla çeşidi kullanılmaktadır. Ayrıca, bu proteinler kanser teşhisi ve önleyici tedavisi, bağışıklık sistemi bozuklukları, enfeksiyonlar ve hastalık yönetimi gibi farklı alanlarda klinik denemelerde değerlendirilmektedir. Protein bazlı terapötikler, farmasötik endüstrinin önemli bir parçası haline gelmiş olup, ilaç şirketleri bu proteinleri kullanarak yeni ve etkili tedaviler geliştirmeye yönelik araştırmalara yoğunlaşmaktadır (104).

Bu çalışmada, PEP1-SMN1 proteininin terapötik amaçla modifiye rekombinant üretimi membrandan geçiş potansiyelinin incelenmesi hedeflenmiştir. Bu süreçte karşılaşılan deneysel zorluklar, elde edilen bulguların değerlendirilmesi ve literatürle karşılaştırılması çalışmanın bilimsel katkısını anlamak açısından önemlidir.

PEP1-SMN1 proteininin üretim ve hücre membranından geçiş sürecinde elde edilen sonuçlar, proteinin hücre içi taşınabilirliği açısından olumlu bir potansiyel

göstermiştir. IPTG indüksiyonu sırasında yapılan deneylerde, proteinin üretim verimliliğini artırmak için farklı konsantrasyonlar, sıcaklıklar ve süreler test edilmiş ve en uygun koşullar 0.5 mM IPTG ile 30°C'de 4 saat olarak belirlenmiştir. Bu bulgular, literatürde benzer çalışmaların sınırlı olması nedeniyle önemli bir bilgi açığını kapatmaktadır.

İndüksiyon sırasında yaşanan zorluklar, çalışma sürecinde önemli bir yer tutmuştur. Literatürde yeterli bilginin bulunmaması nedeniyle bu süreç, deneme yanılma yöntemiyle optimize edilmiştir ve bu da zaman kaybına neden olmuştur. Benzer şekilde, proteinlerin SDS-PAGE analizine yüklenmesi sırasında ortaya çıkan jelleşme sorunu, proteinin analiz sürecini zorlaştırmıştır. Bu sorun başlangıçta buffer kaynaklı olarak düşünülmüş ve PBS yerine RIPA buffer kullanılmıştır. Ancak, jelleşmenin buffer ile ilgili olmadığı, peletin aşırı yoğunluğundan kaynaklandığı anlaşılmış ve peletin daha az miktarda yüklenmesiyle bu sorun giderilmiştir.

Protein saflaştırma süreci, çalışmanın en karmaşık aşamalarından biri olmuştur. Kromatografi yöntemleri kullanılarak yapılan denemelerde, protein sürekli pelet kısmında kalmış ve elüsyon aşamasına geçememiştir. Kobalt ve nikel reçineleri gibi farklı koşullar denenmiş, ancak sonuç alınamamıştır. Üre bazlı tamponlar kullanılarak proteinin çözünürlüğü artırılmış ve saflaştırma işlemi başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Ancak, proteinin elüsyonu ek bir sorun yaratmış ve dializ işlemi uygulanarak saf bir protein elde edilmiştir. Bu deneysel süreçler, SMA tedavisine yönelik protein üretimi sırasında karşılaşılan zorlukları ve çözüm stratejilerini göstermektedir.

Üre, proteinlerin çözünürlüğünü artırmak için yaygın olarak kullanılan güçlü bir denatüran olarak bilinir. Ancak, hücre ve protein için bazı dezavantajları vardır:

Üre, proteinin ikincil ve üçüncül yapısını bozarak denatüre olmasına neden olabilir. Bu, proteinin biyolojik aktivitesini kaybetmesine veya yanlış katlanmasına yol açabilir. Özellikle, denatüre olmuş proteinlerin tekrar doğal formuna dönmesi zor olabilir. Üre, hücreler üzerinde toksik etkilere sahip olabilir. Hücre kültüründe yüksek konsantrasyonlarda üre kullanımı, hücrelerin metabolik aktivitesini bozabilir ve hücrel stres yanıtlarını tetikleyebilir. Bu da hücre büyümesini ve canlılığını olumsuz etkileyebilir.

Üre ile çözünmüş proteinler, fonksiyonel analizler için tekrar katlanma işlemi gerektirebilir. Bu işlem, proteinin tam fonksiyonunu kazanmasını sağlamak için zor ve zaman alıcı olabilir. Eğer uygun koşullar sağlanmazsa, proteinler yanlış katlanarak agregat oluşturabilir.

Saflaştırılan proteinin SH-SY5Y hücre hattına uygulanması, literatürde benzer çalışmaların bulunmaması nedeniyle tamamen deneysel olarak optimize edilmiştir. Farklı konsantrasyonlar ve uygulama süreleri test edilerek, proteinin en etkili geçişini sağlayan şartlar belirlenmiştir. Hücre kültürü oluşturmanın uzun sürmesi, özellikle hücre pasajlaması ve hücrelerin y zeyeye yapışması gibi işlemler nedeniyle zaman alıcı olmuştur. SDS ve Western blot aşamalarına geçildiğinde, hücrelerin jelleşmesi gibi bir sorun yaşanmış ve bu sorun sonikasyon işlemi ile hücrelerin homojen hale getirilmesiyle     lm ştir.

Bu çalışmada elde edilen bulgular, SMA tedavisine yönelik terapötik proteinlerin üretim ve hücre uygulama süreçlerinin optimize edilmesine dair yeni stratejiler sunmaktadır. Literatürde bu konuda sınırlı bilgi bulunması, bu çalışmanın literatüre önemli bir katkı yapmasını sağlamaktadır. Elde edilen bulgular, PEP1-SMN1 proteininin hücre içi taşınabilirliği ve terapötik potansiyeli açısından umut verici sonuçlar ortaya koymuştur.

Çalışmanın bazı sınırlamaları, yalnızca belirli bir hücre hattının kullanılması ve bu hücre hattında yapılan testlerin kapsamı ile sınırlı kalmasıdır. Gelecekte yapılacak çalışmalar, farklı hücre hatları ve in vivo çalışmalar ile bu proteinin etkinliğini daha kapsamlı bir şekilde değerlendirebilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, PEP1-SMN1 proteininin modifiye rekombinant üretimi ve SH-SY5Y hücre hattında membran geçişinin incelenmesi gerçekleştirilmiştir. Deneysel süreçte, protein üretim ve saflaştırma aşamalarında çeşitli zorluklar yaşanmış ve bu zorluklar, literatürdeki sınırlı bilgi nedeniyle deneme yanılma yöntemiyle aşılmıştır. IPTG indüksiyonu sırasında en uygun konsantrasyon ve koşullar belirlenmiş, protein saflaştırma sırasında üre kullanılarak proteinin çözünürlüğü artırılmıştır. Elde edilen sonuçlar, proteinin hücre membranından geçişinin başarılı olduğunu ve bu tür terapötik proteinlerin SMA tedavisinde potansiyel taşıdığını göstermiştir. Bu bulgular, SMA tedavisine yönelik protein temelli yaklaşımların geliştirilmesine katkıda bulunmakta ve literatüre yeni bilgiler eklemektedir.

Gelecek çalışmalarda, PEP1-SMN1 proteininin farklı hücre hatlarında test edilmesi ve bu proteinin hücre içi etkinliğinin daha kapsamlı bir şekilde değerlendirilmesi önerilmektedir. Ayrıca, *in vivo* çalışmalarla proteinin biyolojik etkinliğinin ve güvenilirliğinin araştırılması, klinik uygulamalara yönelik daha fazla bilgi sağlayacaktır. Üre kullanımıyla ilgili deneylerde, proteinin fonksiyonelliğini koruyacak alternatif tampon ve yöntemlerin araştırılması, protein çözünürlüğünü artırırken olumsuz etkileri en aza indirmek için önemlidir. Sonuç olarak, bu çalışmanın sunduğu bulgular, terapötik proteinlerin üretiminde ve SMA tedavisine yönelik araştırmalarda rehberlik edecek niteliktedir ve daha geniş kapsamlı çalışmaların temelini oluşturabilir.

KAYNAKLAR

1. Verhaart IE, Robertson A, Wilson IJ, Aartsma-Rus A, Cameron S, Jones CC, et al. Prevalence, incidence and carrier frequency of 5q-linked spinal muscular atrophy: a literature review. *Orphanet J Rare Dis.* 2017;12:1-15.
2. Lefebvre S, Bürglen L, Reboullet S, Clermont O, Burlet P, Viollet L, et al. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell.* 1995;80(1):155-65.
3. Monani UR, Lorson CL, Parsons DW, Prior TW, Androphy EJ, Burghes AH, et al. A single nucleotide difference that alters splicing patterns distinguishes the SMA gene SMN1 from the copy gene SMN2. *Hum Mol Genet.* 1999;8(7):1177-83.
4. Lorson CL, Androphy EJ. An exonic enhancer is required for inclusion of an essential exon in the SMA-determining gene SMN. *Hum Mol Genet.* 2000;9(2):259-65.
5. Chaytow H, Huang YT, Gillingwater TH, Faller KM. The role of survival motor neuron protein (SMN) in protein homeostasis. *Cell Mol Life Sci.* 2018;75:3877-94.
6. Wadman RI, Jansen MD, Stam M, Wijngaarde CA, Curial CA, Medic J, et al. Intragenic and structural variation in the SMN locus and clinical variability in spinal muscular atrophy. *Brain Commun.* 2020;2(2):fcaa075.
7. Arnold WD, Kassar D, Kissel JT. Spinal muscular atrophy: diagnosis and management in a new therapeutic era. *Muscle Nerve.* 2015;51(2):157-67.
8. Nishio H, Niba ETE, Saito T, Okamoto K, Takeshima Y, Awano H. Spinal muscular atrophy: the past, present, and future of diagnosis and treatment. *Int J Mol Sci.* 2023;24(15):11939.
9. Chaytow H, Faller KM, Huang Y-T, Gillingwater TH. Spinal muscular atrophy: from approved therapies to future therapeutic targets for personalized medicine. *Cell Rep Med.* 2021;2(7):100346.
10. Lunn MR, Wang CH. Spinal muscular atrophy. *Lancet.* 2008;371(9630):2120- 33.
11. Werdnig G. Zwei frühinfantile hereditäre Fälle von progressiver Muskelatrophie unter dem Bilde der Dystrophie, aber anf neurotischer Grundlage. *Arch Psychiatr Nervenkr.* 1891;22(2):437-80.
12. Pearn J. Classification of spinal muscular atrophies. *Lancet.* 1980;315(8174):919-22.
13. Dubowitz V. Very severe spinal muscular atrophy (SMA type 0): an expanding clinical phenotype. *Eur J Paediatr Neurol.* 1999;3(2):49-51.

14. Clermont O, Burlet P, Lefebvre S, Bürglen L, Munnich A, Melki J. SMN gene deletions in adult-onset spinal muscular atrophy. *Lancet*. 1995;346(8991):1712-3.
15. Butchbach ME. Copy number variations in the survival motor neuron genes: implications for spinal muscular atrophy and other neurodegenerative diseases. *Front Mol Biosci*. 2016;3:7.
16. Pearn J. Incidence, prevalence, and gene frequency studies of chronic childhood spinal muscular atrophy. *J Med Genet*. 1978;15(6):409-13.
17. Kolb SJ, Kissel JT. Spinal muscular atrophy: a timely review. *Arch Neurol*. 2011;68(8):979-84.
18. Singh A, Jain M, Kapadia R, Mahawar DK, Kakkar S, Dadhich J, et al. Review of therapeutic options for spinal muscular atrophy. *Scripta Med*. 2021;52(2):151-9.
19. Finkel RS, McDermott MP, Kaufmann P, Darras BT, Chung WK, Sproule DM, et al. Observational study of spinal muscular atrophy type I and implications for clinical trials. *Neurology*. 2014;83(9):810-7.
20. Thomas N, Dubowitz V. The natural history of type I (severe) spinal muscular atrophy. *Neuromuscul Disord*. 1994;4(5-6):497-502.
21. Zerres K, Rudnik-Schöneborn S. Natural history in proximal spinal muscular atrophy: clinical analysis of 445 patients and suggestions for a modification of existing classifications. *Arch Neurol*. 1995;52(5):518-23.
22. Von Gontard A, Zerres K, Backes M, Laufersweiler-Plass C, Wendland C, Melchers P, et al. Intelligence and cognitive function in children and adolescents with spinal muscular atrophy. *Neuromuscul Disord*. 2002;12(2):130-6.
23. Zerres K, Davies KE. 59th ENMC international workshop: spinal muscular atrophies: recent progress and revised diagnostic criteria 17–19 April 1998, Soestduinen, The Netherlands. *Neuromuscul Disord*. 1999;9(4):272-8.
24. Zerres K, Rudnik-Schöneborn S, Forrest E, Lusakowska A, Borkowska J, Hausmanowa-Petrusewicz I. A collaborative study on the natural history of childhood and juvenile onset proximal spinal muscular atrophy (type II and III SMA): 569 patients. *J Neurol Sci*. 1997;146(1):67-72.
25. Piepers S, Van Den Berg L, Brugman F, Scheffer H, Ruitkamp-Versteeg M, Van Engelen B, et al. A natural history study of late onset spinal muscular atrophy types 3b and 4. *J Neurol*. 2008;255:1400-4.
26. Macleod MJ, Taylor JE, Lunt PW, Mathew CG, Robb SA. Prenatal onset spinal muscular atrophy. *Eur J Paediatr Neurol*. 1999;3(2):65-72.

27. McAndrew P, Parsons D, Simard L, Rochette C, Ray P, Mendell J, et al. Identification of proximal spinal muscular atrophy carriers and patients by analysis of SMNT and SMNC gene copy number. *Am J Hum Genet.* 1997;60(6):1411-22.
28. Vitte J, Fassier C, Tiziano FD, Dalard C, Soave S, Roblot N, et al. Refined characterization of the expression and stability of the SMN gene products. *Am J Pathol.* 2007;171(4):1269-80.
29. Burnett BG, Munoz E, Tandon A, Kwon DY, Sumner CJ, Fischbeck KH. Regulation of SMN protein stability. *Mol Cell Biol.* 2009;29(5):1107-18
30. Cho S, Dreyfuss G. A degron created by SMN2 exon 7 skipping is a principal contributor to spinal muscular atrophy severity. *Genes Dev.* 2010;24(5):438-42.
31. Le TT, Pham LT, Butchbach ME, Zhang HL, Monani UR, Coover DD, et al. SMN Δ 7, the major product of the centromeric survival motor neuron (SMN2) gene, extends survival in mice with spinal muscular atrophy and associates with full-length SMN. *Hum Mol Genet.* 2005;14(6):845-57.
32. Singh RN, Howell MD, Ottesen EW, Singh NN. Diverse role of survival motor neuron protein. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Gene Regul Mech.* 2017;1860(3):299-315.
33. Setola V, Terao M, Locatelli D, Bassanini S, Garattini E, Battaglia G. Axonal-SMN (a-SMN), a protein isoform of the survival motor neuron gene, is specifically involved in axonogenesis. *Proc Natl Acad Sci.* 2007;104(6):1959-64.
34. Singh NN, Seo J, Rahn SJ, Singh RN. A multi-exon-skipping detection assay reveals surprising diversity of splice isoforms of spinal muscular atrophy genes. *PLoS ONE.* 2012;7(11):e49595.
35. Seo J, Singh NN, Ottesen EW, Sivanesan S, Shishimorova M, Singh RN. Oxidative stress triggers body-wide skipping of multiple exons of the spinal muscular atrophy gene. *PLoS ONE.* 2016;11(4):e0154390.
36. Locatelli D, Terao M, Fratelli M, Zanetti A, Kurosaki M, Lupi M, et al. Human axonal survival of motor neuron (a-SMN) protein stimulates axon growth, cell motility, CC motif ligand 2 (CCL2), and insulin-like growth factor-1 (IGF1) production. *J Biol Chem.* 2012;287(31):25782-94.
37. Cox RH, White AH, Gaylord CK. A video lesson series is effective in changing the dietary intakes and food-related behaviors of low-income homemakers. *J Am Diet Assoc.* 2003;103(11):1488-93.
38. Achsel T, Barabino S, Cozzolino M, Carri MT. The intriguing case of motor neuron

- disease: ALS and SMA come closer. *Biochem Soc Trans.* 2013;41(6):1593-7.
39. Cucchiari M, Madry H, Terwilliger EF. Enhanced expression of the central survival of motor neuron (SMN) protein during the pathogenesis of osteoarthritis. *J Cell Mol Med.* 2014;18(1):115-24.
 40. Chen HH, Chang JG, Lu RM, Peng TY, Tarn WY. The RNA binding protein hnRNP Q modulates the utilization of exon 7 in the survival motor neuron 2 (SMN2) gene. *Mol Cell Biol.* 2008;28(22):6929-38.
 41. Chen YC, Chang JG, Jong YJ, Liu TY, Yuo CY. High expression level of Tra2- β 1 is responsible for increased SMN2 exon 7 inclusion in the testis of SMA mice. *PLoS ONE.* 2015;10(3):e0120721.
 42. Ottesen EW, Howell MD, Singh NN, Seo J, Whitley EM, Singh RN. Severe impairment of male reproductive organ development in a low SMN expressing mouse model of spinal muscular atrophy. *Sci Rep.* 2016;6(1):20193.
 43. Swoboda KJ, Prior TW, Scott CB, McNaught TP, Wride MC, Reyna SP, et al. Natural history of denervation in SMA: relation to age, SMN2 copy number, and function. *Ann Neurol.* 2005;57(5):704-12.
 44. Coovert DD, Le TT, McAndrew PE, Strasswimmer J, Crawford TO, Mendell JR, et al. The survival motor neuron protein in spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet.* 1997;6(8):1205-14.
 45. Müller-Felber W, Vill K, Schwartz O, Gläser D, Nennstiel U, Wirth B, et al. Infants diagnosed with spinal muscular atrophy and 4 SMN2 copies through newborn screening—opportunity or burden. *J Neuromuscul Dis.* 2020;7(2):109-17.
 46. Cuscó I, Bernal S, Blasco-Pérez L, Calucho M, Alias L, Fuentes-Prior P, et al. Practical guidelines to manage discordant situations of SMN2 copy number in patients with spinal muscular atrophy. *Neurol Genet.* 2020;6(6):e530.
 47. DiDonato CJ, Chen XN, Noya D, Korenberg JR, Nadeau JH, Simard LR. Cloning, characterization, and copy number of the murine survival motor neuron gene: homolog of the spinal muscular atrophy-determining gene. *Genome Res.* 1997;7(4):339-52.
 48. Viollet L, Bertrand S, Brunialti ALB, Lefebvre S, Burlet P, Clermont O, et al. cDNA isolation, expression, and chromosomal localization of the mouse survival motor neuron gene (*Smn*). *Genomics.* 1997;40(1):185-8.
 49. Schrank B, Götz R, Gunnersen JM, Ure JM, Toyka KV, Smith AG, et al. Inactivation of the survival motor neuron gene, a candidate gene for human spinal muscular

- atrophy, leads to massive cell death in early mouse embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(18):9920-5.
50. Vitte JM, Davoult B, Roblot N, Mayer M, Joshi V, Courageot S, et al. Deletion of murine *Smn* exon 7 directed to liver leads to severe defect of liver development associated with iron overload. *Am J Pathol*. 2004;165(5):1731-41.
 51. Monani UR, Sendtner M, Coover DD, Parsons DW, Andreassi C, Le TT, et al. The human centromeric survival motor neuron gene (*SMN2*) rescues embryonic lethality in *Smn*^{-/-} mice and results in a mouse with spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet*. 2000;9(3):333-9.
 52. Hsieh-Li HM, Chang J-G, Jong Y-J, Wu M-H, Wang NM, Tsai CH, et al. A mouse model for spinal muscular atrophy. *Nat Genet*. 2000;24(1):66-70.
 53. Michaud M, Arnoux T, Bielli S, Durand E, Rotrou Y, Jablonka S, et al. Neuromuscular defects and breathing disorders in a new mouse model of spinal muscular atrophy. *Neurobiol Dis*. 2010;38(1):125-35.
 54. Boon KL, Xiao S, McWhorter ML, Donn T, Wolf-Saxon E, Bohnsack MT, et al. Zebrafish survival motor neuron mutants exhibit presynaptic neuromuscular junction defects. *Hum Mo Genet*. 2009;18(19):3615-25.
 55. Hao LT, Burghes AH, Beattie CE. Generation and Characterization of a genetic zebrafish model of SMA carrying the human *SMN2* gene. *Mol Neurodegen* 2011;6:1-9.
 56. Kolb SJ, Kissel JT. Spinal muscular atrophy. *Neuro Clin*. 2015;33(4):831-46.
 57. Crawford TO, Paushkin SV, Kobayashi DT, Forrest SJ, Joyce CL, Finkel RS, et al. Evaluation of *SMN* protein, transcript, and copy number in the biomarkers for spinal muscular atrophy (BforSMA) clinical study. *PLoS ONE*. 2012;7(4):e33572.
 58. Wadman RI, Stam M, Jansen MD, van der Weegen Y, Wijngaarde CA, Harschnitz O, et al. A comparative study of *SMN* protein and mRNA in blood and fibroblasts in patients with spinal muscular atrophy and healthy controls. *PLoS ONE*. 2016;11(11):e0167087.
 59. Jodelka FM, Ebert AD, Duelli DM, Hastings ML. A feedback loop regulates splicing of the spinal muscular atrophy-modifying gene, *SMN2*. *Hum Mol Genet*. 2010;19(24):4906-17.
 60. Lorson CL, Hahnen E, Androphy EJ, Wirth B. A single nucleotide in the *SMN* gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(11):6307-11.
 61. Hua Y, Vickers TA, Baker BF, Bennett CF, Krainer AR. Enhancement of *SMN2*

- exon 7 inclusion by antisense oligonucleotides targeting the exon. *PLoS Biol.* 2007;5(4):e73.
62. Lipnick SL, Agniel DM, Aggarwal R, Makhortova NR, Finlayson SG, Brocato A, et al. Systemic nature of spinal muscular atrophy revealed by studying insurance claims. *PLoS ONE.* 2019;14(3):e0213680.
 63. Wang CH, Finkel RS, Bertini ES, Schroth M, Simonds A, Wong B, et al. Consensus statement for standard of care in spinal muscular atrophy. *J Child Neurol.* 2007;22(8):1027-49.
 64. Bladen CL, Thompson R, Jackson JM, Garland C, Wegel C, Ambrosini A, et al. Mapping the differences in care for 5,000 spinal muscular atrophy patients, a survey of 24 national registries in North America, Australasia and Europe. *J Neurol.* 2014;261:152-63.
 65. Mercuri E, Finkel RS, Muntoni F, Wirth B, Montes J, Main M, et al. Diagnosis and management of spinal muscular atrophy: Part 1: Recommendations for diagnosis, rehabilitation, orthopedic and nutritional care. *Neuromuscul Dis.* 2018;28(2):103-15.
 66. Finkel RS, Mercuri E, Meyer OH, Simonds AK, Schroth MK, Graham RJ, et al. Diagnosis and management of spinal muscular atrophy: Part 2: Pulmonary and acute care; medications, supplements and immunizations; other organ systems; and ethics. *Neuromuscul Dis.* 2018;28(3):197-207.
 67. Claborn MK, Stevick DL, Walker CK, Gildon BL. Nusinersen: a treatment for Spinal muscular atroph. *Ann Pharmacother.* 2019;53(1):61-9.
 68. Passini MA, Bu J, Richards AM, Kinnecom C, Sardi SP, Stanek LM, et al. Antisense oligonucleotides delivered to the mouse CNS ameliorate symptoms of severe spinal muscular atrophy. *Sci Transl Med.* 2011;3(72):72ra18-72ra18.
 69. Hoy SM. Nusinersen: first global approval. *Drugs.* 2017;77:473-9.
 70. Goyal N, Narayanaswami P. Making sense of antisense oligonucleotides: a narrative review. *Muscle Nerve.* 2018;57(3):356-70.
 71. Luu KT, Norris DA, Gunawan R, Henry S, Geary R, Wang Y. Population pharmacokinetics of nusinersen in the cerebral spinal fluid and plasma of pediatric patients with spinal muscular atrophy following intrathecal administrations. *The J Clin Pharmacol.* 2017;57(8):1031-41.
 72. Poirier A, Weetall M, Heinig K, Bucheli F, Schoenlein K, Alsenz J, et al. Risdiplam distributes and increases SMN protein in both the central nervous system and peripheral organs. *Pharmacol Res Perspect.* 2018;6(6):e00447.

73. Mercuri E, Baranello G, Boespflug-Tanguy O, De Waele L, Goemans N, Kirschner J, et al. Risdiplam in types 2 and 3 spinal muscular atrophy: a randomised, placebo-controlled, dose-finding trial followed by 24 months of treatment. *Eur J Neurol*. 2023;30(7):1945-56.
74. Oskoui M, Gonorazky H, McMillan HJ, Dowling JJ, Amin R, Gagnon C, et al. Guidance on Gene Replacement Therapy in Spinal Muscular Atrophy: A Canadian Perspective. *Can J Neurol Sci*. 2022;49(3):398-401.
75. Markati T, Fisher G, Ramdas S, Servais L. Risdiplam: an investigational survival motor neuron 2 (SMN2) splicing modifier for spinal muscular atrophy (SMA). *Expert Opin Investig Drugs*. 2022;31(5):451-61.
76. Dayton RD, Wang DB, Klein RL. The advent of AAV9 expands applications for brain and spinal cord gene delivery. *Expert Opin Biol Ther*. 2012;12(6):757-66.
77. Valori CF, Ning K, Wyles M, Mead RJ, Grierson AJ, Shaw PJ, et al. Systemic delivery of scAAV9 expressing SMN prolongs survival in a model of spinal muscular atrophy. *Sci Transl Med*. 2010;2(35):35ra42-35ra42.
78. Foust KD, Wang X, McGovern VL, Braun L, Bevan AK, Haidet AM, et al. Retracted Article: Rescue of the spinal muscular atrophy phenotype in a mouse model by early postnatal delivery of SMN. *Nat Biotechnol*. 2010;28(3):271-4.
79. Blair HA. Onasemnogene Apeparvovec: A review in spinal muscular atrophy. *CNS Drugs*. 2022;36(9):995-1005.
80. Biedler JL, Helson L, Spengler BA. Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res*. 1973;33(11):2643-52.
81. Ross RA, Spengler BA, Biedler JL. Coordinate morphological and biochemical interconversion of human neuroblastoma cells. *J Nat Cancer Inst*. 1983;71(4):741-7.
82. Encinas M, Iglesias M, Liu Y, Wang H, Muhaisen A, Cena V, et al. Sequential treatment of SH-SY5Y cells with retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor gives rise to fully differentiated, neurotrophic factor-dependent, human neuron-like cells. *J Neurochem*. 2000;75(3):991-10CELL03.
83. Biedler JL, Roffler-Tarlov S, Schachner M, Freedman LS. Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. *Cancer Res*. 1978;38(11):3751-7.
84. López-Carballo G, Moreno L, Masiá S, Pérez P, Barettino D. Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway by retinoic acid is required for

- neural differentiation of SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *J Biol Chem*. 2002;277(28):25297-304.
85. Heusinkveld HJ, Westerink RH. Comparison of different in vitro cell models for the assessment of pesticide-induced dopaminergic neurotoxicity. *Toxicol In Vitro*. 2017;45:81-8.
 86. Jantas D, Pytel M, Mozrzymas J, Leskiewicz M, Regulska M, Antkiewicz-Michaluk L, et al. The attenuating effect of memantine on staurosporine-, salsolinol- and doxorubicin-induced apoptosis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Neurochem Int*. 2008;52(4-5):864-77.
 87. Shipley MM, Mangold CA, Szpara ML. Differentiation of the SH-SY5Y human neuroblastoma cell line. *J Vis Exp JoVE*. 2016(108):53193.
 88. D'Amico A, Mercuri E, Tiziano FD, Bertini E. Spinal muscular atrophy. *Orphanet J Rare Dis*. 2011;6:1-10.
 89. Mercuri E, Bertini E, Iannaccone ST. Childhood spinal muscular atrophy: controversies and challenges. *The Lancet Neurol*. 2012;11(5):443-52.
 90. Darras BT, Markowitz JA, Monani UR, Darryl C. Spinal muscular atrophies. *Neuromuscul Disord Infancy Childhood Adolesc*. 2015:117-45.
 91. TL M. International SMA consortium meeting.(26-28 June 1992, Bonn, Germany). *Neuromuscul Disord*. 1992;2:423-8.
 92. Bach JR, Baird JS, Plosky D, Navado J, Weaver B. Spinal muscular atrophy type 1: management and outcomes. *Pediatr Pulmonol*. 2002;34(1):16-22.
 93. Oskoui M, Levy G, Garland C, Gray J, O'hagen J, De Vivo D, et al. The changing natural history of spinal muscular atrophy type 1. *Neurology*. 2007;69(20):1931-6.
 94. Zerres K. Natural history in proximal spinal muscular atrophy (SMA). Clinical analysis of 445 patients and suggestions for a modification of existing classifications. *Arch Neurol*. 1995;52:18-23.
 95. Lin CW, Kalb SJ, Yeh WS. Delay in diagnosis of spinal muscular atrophy: a systematic literature review. *Pediatr Neurol*. 2015;53(4):293-300.
 96. Lawton S, Hickerton C, Archibald AD, McClaren BJ, Metcalfe SA. A mixed methods exploration of families' experiences of the diagnosis of childhood spinal muscular atrophy. *Eur J Hum Genet*. 2015;23(5):575-80.
 97. Finkel RS, Mercuri E, Darras BT, Connolly AM, Kuntz NL, Kirschner J, et al. Nusinersen versus sham control in infantile-onset spinal muscular atrophy. *N Engl J Med*. 2017;377(18):1723-32.

98. Mercuri E, Darras BT, Chiriboga CA, Day JW, Campbell C, Connolly AM, et al. Nusinersen versus sham control in later-onset spinal muscular atrophy. *N Engl J Med*. 2018;378(7):625-35.
99. Mendell J, Al-Zaidy S, Shell R, Arnold W, Rodino-Klapac L, Prior T, et al. AVXS-101 phase 1 gene therapy clinical trial in SMA type 1: end-of-study event free survival and achievement of developmental milestones. *Neuromuscul Disord*. 2017;27(2):S208.
100. Monani UR. Spinal muscular atrophy: a deficiency in a ubiquitous protein; a motor neuron-specific disease. *Neuron*. 2005;48(6):885-95.
101. Finkel RS, Chiriboga CA, Vajsar J, Day JW, Montes J, De Vivo DC, et al. Treatment of infantile-onset spinal muscular atrophy with nusinersen: a phase 2, open-label, dose-escalation study. *Lancet*. 2016;388(10063):3017-26.
102. Chen TH. New and developing therapies in spinal muscular atrophy: from genotype to phenotype to treatment and where do we stand? *Int J Mol Sci*. 2020;21(9):3297.
103. Walsh G. Biopharmaceutical benchmarks 2018. *Nat Biotechnol*. 2018;36(12):1136-45.
104. Kintzing JR, Interrante MVF, Cochran JR. Emerging strategies for developing next-generation protein therapeutics for cancer treatment. *Trends Pharmacol Sci*. 2016;37(12):993-1008.

EKLER

EK-1. Özgeçmiş



EK-2. Etik Kurul Onayı

