



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**MİKROSEFALİK PRİMORDİAL
DWARFİSM'İN ETİYOLOJİSİNDE ROL ALAN
CCDC84'ÜN mRNA KIRPILMASINDA
GÖREVLİ PRPF3 İLE ETKİLEŞİMİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Güliden BUDAK

DOKTORA TEZİ

Prof. Dr. Ersan KALAY

TRABZON-2019



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**MİKROSEFALİK PRİMORDİAL
DWARFİSM'İN ETİYOLOJİSİNDE ROL ALAN
CCDC84'ÜN mRNA KIRPILMASINDA
GÖREVLİ PRPF3 İLE ETKİLEŞİMİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Güliden BUDAK

DOKTORA TEZİ

Prof. Dr. Ersan KALAY

TRABZON-2019

ONAY

Bu tez Doktora Tezi Standartlarına Uygun Bulunmuştur

Prof. Dr. Ersan KALAY

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı



Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Doktora öğrencisi Gülden BUDAK'ın hazırladığı "MİKROSEFALİK PRİMORDİAL DWARFİSM'İN ETİYOLOJİSİNDE ROL ALAN CCDC84'ÜN mRNA KIRPILMASINDA GÖREVLİ PRPF3 İLE ETKİLEŞİMİNİN ARAŞTIRILMASI" başlıklı tez KTÜ Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman Prof. Dr. Ersan KALAY



Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

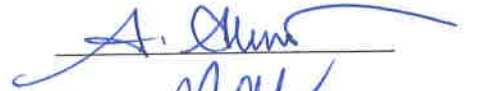
Prof. Dr. Ersan KALAY



Dr. Öğr.Üyesi Tuba DİNÇER



Prof. Dr. Ahmet ALVER



Prof. Dr. Ayşe Nurten AKARSU



Prof. Dr. Murat KASAP



Tarih: 26 / 04 /2019

Bu tez KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/....../.... tarih ve ... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Ersan KALAY

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzu standartlarına uygun olarak yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağılı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarda patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

26 /04/2019

Gülden BUDAK

İthaf

*Çalışmamı doktora eğitimim boyunca gücünü ve desteğini esirgemeyen değerli Ailem'e
ithaf ediyorum*

TEŞEKKÜR

Çalışmam süresince bilgi ve tecrübesini paylaşarak ufkumu genişleten ve yol gösteren değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. Ersan KALAY'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimim sürecinde bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım Tıbbi Biyoloji Anabilim dalı öğretim üyeleri Prof.Dr. Figen CELEP EYÜPOĞLU'na, Dr. Öğr. Üyesi Tuba DİNÇER'e, Dr. Öğr. Üyesi Bayram TORAMAN'a ve Dr. Öğr. Üyesi Gökhan YILDIZ'a teşekkür ederim. Doktora tez çalışmamın ilerlemesinde katkılarını esirgemeyen Prof. Dr. Ahmet ALVER'e teşekkür ederim.

Tez çalışmamın öncesindeki ön verilerin elde edilmesi aşamasında desteğini esirgemeyen Kocaeli Üniversitesi Tıbbi Biyoloji AbD Öğretim Üyesi Prof. Dr. Murat KASAP'a teşekkür ederim. Tez çalışmam sürecinde kıymetli tecrübe ve önerilerinden istifade etme şansına sahip olduğum Hacettepe Üniversitesi Tıbbi Genetik AbD Öğretim Üyesi Prof. Dr. Ayşe Nurten AKARSU'ya teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmaları esnasında desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen değerli arkadaşlarım Arş. Gör. İdris ER'e ve Asiye Büşra BOZ ER'e, Arş. Gör. İhsan NALKIRAN'a, diğer bölüm arkadaşlarıma ve enstitüdeki tüm hocalarıma ve mesai arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım. Laboratuvar çalışmaları dışında da desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen ve hep yanımda olan kıymetli arkadaşlarım Dr. Ceren SÜMER'e, Arş. Gör. Ceren SARI'ya ve ailelerine teşekkür ederim.

Doktora çalışmam boyunca hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan ve bana daima inanan annem ve babam Yasemin–Ender YORGANCIOĞLU'na teşekkür ederim. Kendi kariyerinden ödün vererek beni destekleyen kıymetli eşim Sefa Cihan BUDAK'a ve kıymetli yavrum Defne Berra BUDAK'a varlıklarından dolayı sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışmayı Prof. Dr. Ersan KALAY'ın yürütücülüğünde 114Z883 no'lu proje ile destekleyen TÜBİTAK'a, 10121 ve TDK-2017-7010 no'lu projeler ile destekleyen KTÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne ve YÖK-Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı'na teşekkür ederim.

Arş. Gör. Gülden BUDAK

İÇİNDEKİLER

BEYAN

İthaf

TEŞEKKÜR

İÇİNDEKİLER

vi

TABLolar DİZİNİ

ix

ŞEKİLLER DİZİNİ

x

RESİMLER DİZİNİ

xi

KISALTMA, SİMGE ve FORMÜLLER DİZİNİ

xii

1. ÖZET

1

2. SUMMARY

2

3. GİRİŞ ve AMAÇ

3

4. GENEL BİLGİLER

5

4.1. Mikrosefali Primordial Dwarfism

5

4.1.2. Seckel Sendromu

6

4.1.3. Mikrosefali Osteodisplastik Primordial Dwarfism Tip II (MOPDII)

7

4.1.4. Mikrosefali Osteodisplastik Primordial Dwarfism Tip I/III

7

4.2. RNA Kırılması (Splicing)

7

4.2.1. Majör ve Minör Kırılma Kompleksleri

10

4.2.2. snRNP Biyogenezi ve Cajal Cisimciği

12

4.2.3. Majör ve Minör Kırılma Kompleksinin Aktivasyonu

14

4.3. RNA Kırılma Kompleksi Bileşenleri ile İlişkilendirilen Hastalıklar

17

4.4. Tez Çalışması Öncesinde Elde Edilen Ön Veriler

18

4.5. Pre-mRNA Processing Factor 3 (PRPF3) ve Fonksiyonu

24

5. GEREÇ ve YÖNTEM

27

5.1. Gereç

27

5.1.1. Kimyasallar

27

5.1.2. Antikorlar

28

5.1.2.1. Primer Antikorlar

28

5.1.2.2. Sekonder Antikorlar

29

5.1.3. Boncuklar

29

5.1.4. Kitler, Enzimler ve Markırlar

29

5.1.5. Sarf Malzemeler	29
5.1.6. Cihazlar	30
5.1.7. Bakteri Suşları	31
5.1.8. Solüsyon, Tampon ve Besiyerleri	32
5.1.8.1. Bakteri Kültürleri İçin Kullanılan Besiyerleri	32
5.1.8.2. Bakteri İndüklemeye Kullanılan Ajanlar	32
5.1.8.3. Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Çözeltiler	32
5.1.8.4. SDS-PAGE Solüsyonları	33
5.1.8.5. Western Blot Solüsyonları	34
5.1.8.6. Immunopresipitasyonda Kullanılan Solüsyonlar	35
5.1.8.7. İmmüno Floresanda Kullanılan Solüsyonlar	37
5.1.8.8. Memeli Hücre Kültüründe Kullanılan Solüsyonlar	37
5.1.8.9. Transfeksiyon Solüsyonları	37
5.2. Yöntem	37
5.2.1. CCDC84 ve PRPF3 Genlerinin Klonlanması	37
5.2.2. PRPF3 Domainlerine Ait Dizilerin PCR ile Çoğaltılması	38
5.2.3. PRPF3 Domainlerine Ait PCR Ürünlerinin Agaroz Jelden Saflaştırılması	40
5.2.4. PRPF3 Domainlerine Ait Giriş Vektörlerinin Oluşturulması	40
5.2.5. PRPF3 Domainlerine Ait Ekspresyon Vektörlerinin Oluşturulması	41
5.2.6. Çalışmada Kullanılacak Plazmidlerin Dizilenmesi	42
5.2.7. <i>E. coli</i> Transformasyonu	44
5.2.8. Plazmid İzolasyonu	44
5.2.8.1. Endotoksin İçermeyen Plazmid İzolasyonu	44
5.2.8.2. Standart Plazmid İzolasyonu	45
5.2.9. Hücre Kültürü	46
5.2.10. HEK293 Hücrelerinin Kalsiyum Fosfat Yöntemi ile Transfeksiyonu	47
5.2.11. Memeli Hücrelerinden Protein İzolasyonu	47
5.2.12. Anti-FLAG M2 Bağlı Boncukların Hazırlanması	48
5.2.13. İzole Edilen Proteinin Ön Temizliği (Pre-clearing)	48
5.2.14. Anti-FLAG İmmünopresipitasyon Yöntemi	48
5.2.15. Elüsyon	49
5.2.16. Bakterilerin İndüklenmesi ve Protein Lizatlarının Hazırlanması	49

5.2.17. Pull Down Yöntemi ile Etkileşimlerin Test Edilmesi	50
5.2.17.1. GST Trap Boncukları	50
5.2.17.2. GST Trap Boncuklarının Hazırlanması	51
5.2.17.3. GST Pull Down	51
5.2.18. Western Blotlama	52
5.2.18.1. Ayırma ve Yükleme Jelinin Hazırlanması	52
5.2.18.2. SDS-PAGE Jel Elektroforezi	53
5.2.18.3. Membrana Transfer İşlemi ve Görüntüleme	53
5.2.19. HeLa Hücrelerinde Dreamfect Yöntemi ile Transfeksiyon	54
5.2.20. İmmünofloresan Yöntemi	55
6. BULGULAR	57
6.1. CCDC84 ile PRPF3 Arasındaki Etkileşiminin İmmünopresipitasyon Yöntemi ile Doğrulanması	57
6.2. CCDC84-PRPF3 Etkileşiminin <i>Pull Down</i> ile Araştırılması	59
6.3. CCDC84 ile PRPF3'ün Hücre İçi Birlikte Lokalizasyonlarının Araştırılması	60
6.4. CCDC84 Mutasyonunun PRPF3 ile Etkileşimi Üzerine Etkisinin İmmünofloresan Yöntemiyle Araştırılması	61
6.5. PRPF3 ile CCDC84 Arasındaki Etkileşime Aracılık Eden PRPF3 Domaininin Belirlenmesi	63
6.6. CCDC84 ve PRP3 domaini Arasındaki Etkileşimin <i>In Vitro</i> Pull-Down ile Araştırılması	65
6.7. PRPF3 Domainlerinin Hücre İçindeki Lokalizasyonunun Araştırılması	66
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	68
8. KAYNAKLAR	74
9. ÖZGEÇMİŞ	90

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo No.	Sayfa
Tablo 1. Hastalıkla ilişkilendirilen kırılma kompleksi bileşenleri	18
Tablo 2. MALDI-TOF kütle analizinden elde edilen sonuçlar	23
Tablo 3. Çalışmada kullanılan bakteri suşları ve genotipleri	31
Tablo 4. PRPF3 ve domainlerinin çoğaltılmasında kullanılan attB kuyruklu primerler	39
Tablo 5. PRPF3 domainleri ekspresyon vektörlerinin dizileme primerleri	43
Tablo 6. Çalışmada kullanılan memeli ve bakteri ekspresyon vektörlerine ait bilgiler	43
Tablo 7. % 5'lik yükleme jeli içeriği	52
Tablo 8. %7.5 ve %10'luk ayırma jeli içeriği	52
Tablo 9. Western blotlama koşulları	54
Tablo 10. İmmünofloresan koşulları	56

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No.	Sayfa
Şekil 1. Pre-mRNA'dan intronların çıkarılması	8
Şekil 2. Kırpılma mekanizmasının düzenleyicileri	9
Şekil 3. Majör kırpılma kompleksinin bileşenleri	10
Şekil 4. Minör kırpılma kompleksinin bileşenleri	11
Şekil 5. Çekirdek ve sitoplazmada snRNA'ların yapılandırılması	13
Şekil 6. U4/U6•U5 tri-snRNP'nin Cajal cisimciklerinde yapılandırılması	14
Şekil 7. Majör kırpılma kompleksi aracılığıyla intronların çıkartılması	15
Şekil 8. Minör kırpılma kompleksinin bileşenleri ve oluşum basamakları	16
Şekil 9. BioGRID tarafından CCDC84 ile etkileşimi gösterilen proteinler	24
Şekil 10. PRPF3 domainlerinin şematik gösterimi ve PRP3 domaini üzerinde tanımlanan mutasyonlar	25

RESİMLER DİZİNİ

Resim No.	Sayfa
Resim 1. Homozigotluk taraması ve mutasyon analizi	19
Resim 2. CCDC84 üzerinde in silico analizler	20
Resim 3. CCDC84'ün hücre içi lokalizasyonunun gösterilmesi	21
Resim 4. İmmünopresipitasyon ile elde edilen proteinlerin SDS-PAGE ile analizi	22
Resim 5. Tam uzunlukta PRPF3 ve domainlerinin şematik gösterimi	38
Resim 6. PRPF3 ile CCDC84 etkileşiminin HEK293 hücrelerinde immünopresipitasyon ile gösterilmesi	57
Resim 7. CCDC84 üzerinde tanımlanan mutasyonun PRPF3 ile etkileşim üzerine etkisi	58
Resim 8. CCDC84 ile PRPF3 arasındaki in-vitro etkileşimin GST-pull down yaklaşımı ile belirlenmesi ve CCDC84 üzerinde tanımlanmış mutasyonun etkileşime etkisinin analizi	60
Resim 9. Fibroblast hücrelerinde endojen CCDC84 ve endojen PRPF3'ün hücrel lokalizasyonları	61
Resim 10. HeLa hücrelerinde CCDC84 ve PRPF3'ün hücrel lokalizasyonlarının geçici transfeksiyonla gösterilmesi	62
Resim 11. FLAG-CCDC84-Wt ve PRPF3 domainleri arasındaki etkileşiminin IP ile gösterilmesi	64
Resim 12. CCDC84 ile PRP3 domaini arasındaki in-vitro etkileşimin GST-pull down yaklaşımı ile belirlenmesi	66
Resim 13. PRPF3 domainlerinin hücre içi lokalizasyonlarının görüntülenmesi	67

KISALTMA, SİMGE ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

Amp	Ampisillin
APS	Amonyum persülfat
CB	Cajal cisimcikleri
CCDC84	Coiled coil domain containing 84
CEP152	Sentrozomal protein 152
Cy3	Cyanin 3
del	Delesyon
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DNA	Deoksiribo nükleik asit
DUF1115	Domain of unknown function 1115
E14	Embriyonik gün 14
EDTA	Etilden diamin tetra asetik asit
EJC	Ekzon bağlanma kompleksi
ESE	Ekzonik kırpılma etki artırıcı
ESS	Ekzonik kırpılma susturucu
FBS	Fetal bovin serum
GST	Glutasyon S transferaz
HCl	Hidroklorik asit
HEK	İnsan embriyonik böbrek hücre hattı
HeLa	Henrietta Lacks servikal kanser hücre hattı
His	Histidin
HRP	Horse radish peroksidaz
IB	İmmünoblot
IF	İmmünofloresan
İGP	İnsan genom projesi
IP	İmmünopresipitasyon
IPTG	İzopropil-β-D-tiyogalaktopiranozit
ISE	İntronik kırpılma etki artırıcı
ISS	İntronik kırpılma susturucu
Kan	Kanamisin

LB	Luria Bertani
M	Molar
Mut	Mutant tip
MALDI	Matris destekli lazer desorpsiyon / iyonizasyon
MGS	Meier-Gorlin sendromu
MOPD	Mikrosefalik osteodisplastik dwarfism
MPD	Mikrosefalik primordial dwarfism
mRNA	mesajcı RNA
MS	Kütle spektrometrisi
NLS	Nükleer lokalizasyon sinyali
ORC	Orijin tanıma kompleksi
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PBS	Fosfatla tamponlanmış tuz çözeltisi
PCNT	Perisentrin
PD	Primordial dwarfism
Pen/Strep	Penisilin/Streptomisin
PFA	Paraformaldehit
PLK4	Polo benzeri kinaz 4
PMSF	Fenilmetilsülfonil florür
PRC	Pre replikasyon kompleksi
PRPF3	Pre-mRNA processing faktör 3
PVDF	Polivinilidenflorid
PWI	Prolin triptofan izolösün
Py	Primidin
RNA	Ribonükleik asit
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SCKL	Seckel sendromu
snRNA	small nuclear ribonükleik asit
snRNP	small nuclear ribonükleoprotein
SRS	Silver-Russel sendromu
ss	Kırılma (splicing) bölgesi
T/E	Tripsin/EDTA

TAE	Tris asetik asit EDTA
TALS	Taybi-Linder sendromu
TBS-T	Tris tamponlanmış tuz çözeltisi-tween 20
TEMED	Tetrametiletilediamin
TGP	Türkiye genom projesi
TNTE	Tris sodyum triton EDTA
TOF	Time of flight
TÜSEB	Türkiye Sağlık Enstitüleri Başkanlığı
U	Uridin
VIGENOS	Visual genom stüdyo
Wt	Wild (yabanıl) tip
Simgeler	
μ	mikro
μg	mikrogram
μl	mikrolitre

1. ÖZET

Mikrosefalik Primordial Dwarfism'in Etiyolojisinde Rol Alan CCDC84'ün mRNA Kırılmasında Görevli PRPF3 ile Etkileşiminin Araştırılması

Mikrosefalik Primordial Dwarfism (MPD); kısa boy, merkezi sinir sistemi anomalileri, mikrosefali gibi klinik bulgularla karakterize, genellikle otozomal resesif kalıtılan doğum öncesi ve doğum sonrası büyüme geriliğinin görüldüğü bir hastalık grubudur. Anabilim dalımızda yürütülen genetik haritalama çalışmaları sonucunda MPD ile ilişkilendirilen bireyin bulunduğu bir ailede *CCDC84* geni üzerinde mutasyon tanımlandı. *CCDC84*'ün fonksiyonunun araştırılmasına yönelik yürütülen çalışmalar kapsamında ise afinite pürifikasyon-kütle spektrometresi yaklaşımıyla *CCDC84*'ün mRNA kırılmasında kritik rolü olan ve U4/U6 di-snRNP yapısında kor protein olarak yer alan Pre-mRNA Processing Factor 3 (PRPF3) ile etkileştiği ön verisine ulaşıldı. Bu tez çalışması kapsamında *CCDC84* ile PRPF3 arasındaki etkileşimin daha ileri düzeyde araştırılması ve *CCDC84* üzerinde tanımlanan mutasyonun etkileşim üzerine etkisi belirlenerek *CCDC84*'ün rolünün aydınlatılmasına yönelik verilere ulaşılması amaçlanmıştır. Bu kapsamda yürütülen immünopresipitasyon-immünoblot, immünofloresan ve *in-vitro* pull down yaklaşımları ile *CCDC84* ile PRPF3'ün doğrudan etkileştiği ve çekirdekte birlikte yerleşim gösterdiği, *CCDC84* üzerinde tanımlanan mutasyonun PRPF3 ile etkileşimi belirgin düzeyde bozduğu gösterildi. Ayrıca, *CCDC84* ile PRPF3 arasındaki etkileşimin PRPF3'ün PRP3 domaini üzerinden olduğu gösterildi. Sonuç olarak bu tez çalışması ile MPD ile tarafımızdan ilişkilendirilmiş olan *CCDC84*'ün, pre-mRNA'nın yapısından intronların çıkartılmasında rol alan ve U4/U6 di-snRNP'nin kor proteini olan PRPF3 ile doğrudan etkileştiği gösterilerek *CCDC84*'ün RNA kırılmasında kritik öneme sahip bir protein olduğu gösterilmiştir.

Anahtar Sözcükler: *CCDC84*, Mikrosefali, Protein-protein etkileşimi, PRPF3, RNA kırılması

2. SUMMARY

Investigation of the Interaction of Microcephalic Primordial Dwarfism Associated Protein CCDC84 with mRNA Splicing Protein PRPF3

Microcephalic Primordial Dwarfism (MPD) is a group of diseases characterized by clinical findings such as short stature, central nervous system anomalies, microcephaly and prenatal and postpartum growth retardation, which is usually inherited autosomal recessively. A mutation was identified on the CCDC84 gene in an individual of MPD-related family by genetic mapping studies conducted in our department. Within the scope of the studies carried out to investigate the function of CCDC84, preliminary data was obtained by using affinity purification-mass spectrometry approach that CCDC84 interacts with Pre-mRNA Processing Factor 3 (PRPF3), which is a core protein of U4/U6 di-snRNP and plays a critical role in mRNA splicing. In this thesis study, it was aimed to further investigate the interaction between CCDC84 and PRPF3 and to reach the data by determining the effect of mutation identified on CCDC84 in order to elucidate the role of CCDC84. In this context, immunoprecipitation-immunoblot, immunofluorescence and in-vitro pull down approaches showed that CCDC84 and PRPF3 interact directly and they are co-localized in the nucleus. It was also shown that the mutation identified on CCDC84 disrupts the interaction with PRPF3 significantly. Furthermore, the direct interaction between CCDC84 and PRPF3 was shown to be via PRP3 domain of PRPF3. As a result; it was shown with this thesis study that CCDC84, which was associated with MPD by our group, interacts directly with PRPF3, the core protein of U4/U6 di-snRNP involved in pre-mRNA splicing. In conclusion, CCDC84 has been shown to be a critically important protein in RNA splicing.

Key Words: CCDC84, Microcephaly, Protein-protein interaction, PRPF3, RNA splicing

3. GİRİŞ ve AMAÇ

İnsan Genom Projesi (İGP)'nin 2003 yılında tamamlanması ile insan genomunda 20 719 adet protein kodlayan genin ve çok sayıda kodlamayan RNA kodlayan genin bulunduğu belirlenmiştir (1, 2). İGP'nin devamında, hastalıkların genlerle ilişkilendirilmesini amaçlayan genetik haritalama çalışmaları büyük hız kazanmıştır (3). Geline aşamada, tanımlanan genlerden 5488'i bilinen bir hastalık ile ilişkilendirilmiştir (4). Hastalıkların genlerle ilişkilendirilmesi, ailelere doğum öncesi tanı imkanından yararlanma yönünde önemli fırsatlar sunarken, tanımlanan genlerin kodladığı proteinlerin fonksiyonlarının aydınlatılmasına yönelik yürütülen çalışmalar ile temel hücrel mekanizmaların aydınlatılmasına ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine fayda sağlayabilecek önemli verilerin ortaya çıkmasına katkı sağlamaktadır.

Mikrosefalik Primordial Dwarfism (MPD); doğum öncesi ve doğum sonrası dönemde gelişme geriliği ile karakterize Seckel sendromu, Meier-Gorlin sendromu, Mikrosefalik Osteodisplastik Primordial Dwarfism Tip II (MOPDII) ve Mikrosefalik Osteodisplastik Primordial Dwarfism Tip I/III (MOPDI/III) olmak üzere dört farklı hastalıktan oluşmaktadır (5). Bugüne kadar Seckel sendromu'ndan sorumlu 11 gen tanımlanmıştır ve bu genler tarafından kodlanan proteinler DNA tamiri, sentriol biyogenezi ve mikrotübül organizasyonu süreçlerinde rol oynamaktadır. Meier-Gorlin sendromundan sorumlu olarak sekiz gen tanımlanmıştır ve bu genlerden kodlanan proteinler ise DNA replikasyonunun başlatılması sürecinde rol almaktadır. MOPDII ile ise bir gen ilişkilendirilmiştir ve ilişkilendirilen gen tarafından kodlanan protein mikrotübül organizasyonunda rol almaktadır. Bu grup içerisindeki en ağır olan ve yaşamın ilk yıllarında kaybedilen MOPDI/III ile ilgili olarak da bir gen tanımlanmış ve bu gen, pre-mRNA'ların yapısından minör intronların çıkartılmasına rol oynayan U4atac snRNP'nin yapısındaki snRNA'yı kodlamaktadır (6).

Ökaryotların protein kodlayan genlerinin neredeyse tamamının primer transkripti (pre-mRNA) intron olarak adlandırılan çok sayıda kodlamayan ara bölgelere sahiptir. Bu bölgeler büyük bir hassasiyetle pre-mRNA'ların yapısından çıkartılır, ekzonlar birleştirilerek olgun mRNA'lar oluşturulur (7). Pre-mRNA'ların yapısından intronların çıkartılarak olgun mRNA'ların oluşturulması süreci RNA kırılması (splicing) olarak adlandırılır. İtronların çıkarılması, snRNP komplekslerinin bir sıra halinde katılıp

ayrıldığı kırılma kompleksi (spliceosome) ile gerçekleştirilir. Kırılma kompleksinin yapısında kor protein ve düzenleyici proteinler olmak üzere çok sayıda protein ve çok sayıda snRNA yer almaktadır (8). Kırılma kompleksinde yer alan snRNP'lerin kor bileşenlerini (protein ve snRNA) ve yapılandırılmalarını yöneten proteinleri kodlayan genlerin bir kısmının mutasyonları çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilmiştir (9). Ancak, halen fonksiyonları tanımlanmamış ve hastalıkla ilişkilendirilmemiş çok sayıda protein var olduğu düşünülmektedir.

Anabilim dalımızda Mikrosefalik Primordial Dwarfism tanısı alan hastaların bulunduğu bir aile üzerinde yürütülen genetik haritalama çalışmaları sonucunda, hastalıktan sorumlu mutasyon *CCDC84* geni üzerinde tespit edilmiştir. *CCDC84*'ün fonksiyonunu tanımlamayı amaçlayan TÜBİTAK tarafından desteklenen 114Z883 no'lu proje kapsamında ise büyük ölçek immunopresipitasyon-kütle spektrometresi yaklaşımları ile *CCDC84*'ün, mRNA kırılması mekanizmasında rol aldığı bilinen PRPF3 (Precursor mRNA-Processing Factor 3) proteini ile etkileşim içerisinde olabileceği yönünde ön veriye ulaşıldı. Bu tez çalışmasıyla ilk etapta, *CCDC84* ile PRPF3 arasındaki etkileşimin immünopresipitasyon yaklaşımı ile doğrulanması, *CCDC84* mutasyonunun etkileşime etkisinin belirlenmesi, *CCDC84* ve PRPF3'ün hücre içinde birlikte yerleşiminin analiz edilmesi, tanımlanan mutasyonun PRPF3'ün hücre içi yerleşimi üzerine etkisinin belirlenmesi ve ayrıca iki protein arasındaki etkileşimin doğrudan olup olmadığının *in-vitro* yaklaşımla belirlenmesi hedeflenmiştir. Çalışmanın ikinci basamağında ise *CCDC84* ile PRPF3 arasındaki etkileşimin PRPF3'ün hangi domaini üzerinden olduğunun immünopresipitasyon ve *in vitro* pull down yaklaşımlarıyla belirlenmesi hedeflenmiştir.

4. GENEL BİLGİLER

Hastalıkların etiyolojisinde genetik bozukluklar önemli bir yere sahiptir ve DNA üzerinde meydana gelen değişikliklere bağlı olarak genetik hastalıklar; kromozomal hastalıklar, multifaktöriyel hastalıklar ve tek gen hastalıkları olarak ortaya çıkmaktadır. İnsan Genom Projesi'nin 2003 yılında tamamlanmasıyla birlikte insan genomunda yaklaşık 20 719 protein kodlayan gen tanımlanmıştır (10). İnsan genomunda çok sayıda genin varlığı biliniyor olmasına rağmen henüz 6000 gen nadir hastalıklarla ilişkilendirilmiştir. Nadir hastalıklar, Amerika'da 1/200 000 ve Avrupa'da ise 1/2000'den daha az bireyi etkileyen hastalıklar olarak tanımlanmış olup %85'ini tek gen hastalıkları oluşturmaktadır. Nadir tek gen hastalıklarının %84'ünün sorumlu genleri belirlenmiş olmakla birlikte geri kalan %16'sından sorumlu genler halen keşfedilmeyi beklemektedir (4). Genom üzerindeki genlerin biliniyor olması gerek genetik hastalıkların tanısının konulmasında, gerekse hastalıkların bir sonraki kuşağa aktarılmasının önlenmesinde tek başına istenen katkıyı sağlamamaktadır. Tek gen hastalıklarının tanı konulma süresinin 5-30 yıl arasında değiştiği göz önüne alındığında, sağlıklı nesillerin oluşturulması yönünde İGP'den azami faydanın sağlanabilmesi için insan genomunda tanımlanan genlerin hastalıklarla ilişkilendirilmesi, tedaviye ve ilaç geliştirmeye altyapı oluşturacak şekilde genler tarafından kodlanan proteinlerin rollerinin aydınlatılması ve hastalardaki mutasyonların belirlenmesi gerekmektedir (11). Bu doğrultuda, belli bir popülasyonda görülen kalıtsal hastalıklar için klinik ve genetik endekslerin oluşturulması ve risk faktörlerinin tanımlanarak nadir hastalıklara neden olan genlerin ortaya çıkarılmasını ve kişiye özgü tedavilerin geliştirilmesini amaçlayan ulusal genom projeleri geçtiğimiz son 10 yılda hayata geçirilmiş (12) ve ülkemizde de kısa bir süre önce Boğaziçi Üniversitesi tarafından başlatılan Türk Genom Projesi (TGP) çalışmaları (13) Türkiye Sağlık Enstitüleri Başkanlığı (TÜSEB) bünyesinde devam etmektedir.

4.1. Mikrosefalik Primordial Dwarfism

Mikrosefalik Primordial Dwarfism (MPD), genellikle otozomal resesif kalıtım gösteren ve doğum öncesi ve doğum sonrasında gelişme geriliği ve dismorfik bulgularla seyreden bir nadir hastalıklar grubudur. Bu grup içerisinde; Meier-Gorlin sendromu (OMIM:224690), Seckel sendromu (OMIM:210600), Mikrosefalik Osteodisplastik

Primordial Dwarfism Tip II (OMIM:210720) ve Mikrosefali Osteodisplastik Primordial Dwarfism Tip I/III (Taybi-Linder Sendromu) (OMIM:210710) olarak adlandırılan dört farklı hastalık yer almaktadır (5).

4.1.1. Meier-Gorlin Sendromu

Meier-Gorlin Sendromu (MGS); mikrotia, patella eksikliği, boy kısalığı, doğum öncesi ve sonrası gelişme geriliği ve mikrosefali ile karakterize olup mikrotia ve patella eksikliği ile grup içindeki diğer hastalıklardan ayrılmaktadır ve hem klinik hem de genetik olarak heterojen bir hastalıktır (14). Bazı hastalarda, solunum stresine bağlı olarak konjenital emphysema (akciğer loblarının genişlemesi) bildirilmiştir. Hastalığın sağkalım süresi bilinmemekle birlikte 5-25 yaş aralığında ilk kez tanı alan hastalar bulunmaktadır (15). Hastalığın etiyolojisini belirlemeye yönelik çalışmalarla; otozomal resesif kalıtılan formunda DNA replikasyon orijini üzerinden replikasyonun başlatılmasında görevli pre-replikasyon kompleksinde yer alan ORC1, ORC4, ORC5, ORC6, CDT1, CDC6, CDC45 proteinlerini kodlayan genlerin mutasyona uğradığı gösterilmiştir (15-17). Otozomal dominant kalıtılan formunda ise, DNA replikasyonunun inhibisyonunda görevli Geminin proteinini kodlayan *GMNN* geni üzerinde *de-novo* mutasyonlar tanımlanmıştır (18).

4.1.2. Seckel Sendromu (SCKL)

MPD'nin en geniş grubunu oluşturan Seckel sendromu (OMIM:210600); orantılı kısa boy, mikrosefali, arkaya eğimli alın, gaga şeklinde çıkıntılı burun, küçük çene, beşinci parmağın klinodaktilisi ve mental retardasyon ile karakterize otozomal resesif kalıtım gösteren hem klinik hem de genetik olarak oldukça heterojen bir nadir hastalıktır (18, 19). Seckel sendromu ile ilgili olarak bugüne kadar *ATR* (21), *CENPJ* (22), *RBBP8* (*CtIP*) (23), *CEP152* (24), *NIN* (25), *CEP63* (26), *TRAIP* (27), *DNA2* (28), *NSMCE2* (29), *CDK5RAP2* (30) ve *PLK4* (31-33) olmak üzere 11 gen tanımlanmıştır. Bu genler tarafından kodlanan proteinler fonksiyonlarına bağlı olarak; i) DNA hasarına cevapta rol oynayanlar (*ATR*, *ATIP*, *RBBP8* ve *DNA2*) ve ii) sentrozom ile ilişkili olanlar (*CENPJ*, *CEP152*, *CEP63* ve *NIN*, *PLK4*) olmak üzere iki grup altında toplanmaktadır.

4.1.3. Mikrosefalik Osteodisplastik Primordial Dwarfism Tip II (MOPDII)

MOPDII; doğum öncesi gelişme geriliği, şiddetli boy kısalığı ve mikrosefali ile karakterize otozomal resesif bir hastalıktır. Orantısız boy kısalığı, radyolojik anormallikler ve hafif mental gerilik veya normal mental gelişim, küçük ve seyrek sekonder diş gibi bulgular ile Seckel sendromu'ndan ayrılmaktadır (34, 35). Sentrozomal bir protein kodlayan *PCNT*'nin mutasyonları MOPD II'ye neden olmaktadır (36). Perisentriolar matrikste yer alan PCNT; DNA hasarına cevapta, mikrotübül oluşumu ve iğ ipliklerinin organizasyonunda rol almaktadır (37).

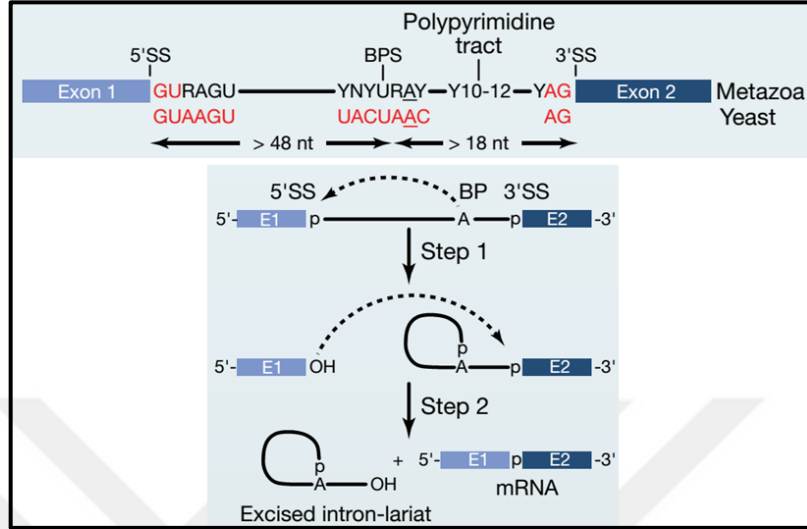
4.1.4. Mikrosefalik Osteodisplastik Primordial Dwarfism Tip I/III

MOPDI/III (Taybi-Linder Sendromu, TALS); Osteodisplastik primordial dwarfism'in ölümcül formudur (38). Ayırıcı bulguları arasında; kuru cilt, seyrek saç ve yaşamın erken döneminde ölüm görülmektedir. Diğer karakteristik bulguları arasında doğum öncesi ve sonrasında şiddetli büyüme geriliği, iskelet displazileri, çıkıntılı göz yapısı, işitme ve görme kaybı, korpus kallosum agenezi, serebral korteks gelişimi bozuklukları (pakigiri/agiri), mikrosefali ve epileptik nöbetler yer almaktadır (39). MOPDI'in genetik etiyolojisini aydınlatmaya yönelik yapılan çalışmalara göre, U12 tip intronların çıkarılmasında rol oynayan minör kırılma kompleksinin yapısında yer alan U4atac küçük nükleer RNA (snRNA; small nuclear RNA) kodlayan *RNU4ATAC* geninde tanımlanan homozigot mutasyonların U4atac snRNA'nın fonksiyonu üzerindeki yıkıcı etkisine bağlı olarak hastaların yaşam süreleri 1-4 yıl arasındadır (40).

4.2. RNA Kırılması (Splicing)

Gelişmiş organizmalarda protein kodlayan genlerin neredeyse tamamının yapısında intron olarak adlandırılan kodlamayan diziler bulunmaktadır. İntron içeren genlerden kodlanan RNA'ların (pre-mRNA) yapısındaki intronların çıkartılarak, kodlayan dizilerin (ekzon) birleştirilmesi ile olgun mRNA'ların oluşturulması RNA kırılması (splicing) olarak adlandırılmaktadır (8). RNA kırılması, çok sayıda protein ile snRNA'ların bir araya gelmesi ile oluşan ve RNA kırılma kompleksi (spliceosome) olarak adlandırılan makromoleküler bir makine ile gerçekleştirilen çok basamaklı karmaşık bir süreçtir. RNA kırılması sürecinde, ekzon-intron sınırlarının yüksek doğrulukla belirlenmesi; **1)** intronun 5' kırılma verici bölgesi (5'ss), **2)** dallanma bölgesi (branch-point (BP) dizisi), **3)** polipirimidin (Py) dizileri (Py tract) ve **4)** 3'

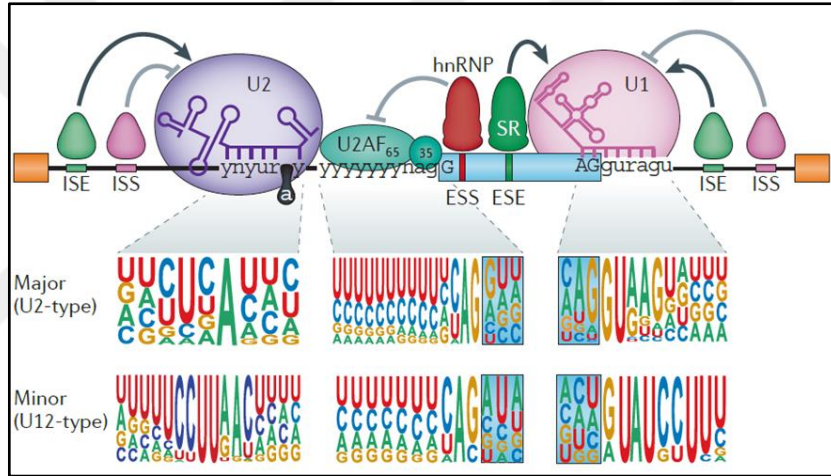
kırılma alıcı bölgesi (3'ss) olarak adlandırılan korunmuş diziler ile gerçekleştirilir (Şekil 1) (41).



Şekil 1. Pre-mRNA'dan intronların çıkarılması. Kırılma kompleksi bileşenleri tarafından intronların kesilerek çıkartılması ve ekzonların birleştirilmesi, 5'kırılma bölgesi (SS), adenosin dallanma noktası (BPS), polipirimidin (Py) dizileri ve 3' SS dizisinin yer aldığı iki ardışık transesterifikasyon reaksiyonu ile elde edilir (Wahl'den, 42)

İntronlar 5' ve 3' uçlarında bulunan kırılma verici ve alıcı bölgelerdeki korunmuş dizilerine göre "U2-tip" ve "U12-tip" intronlar olarak iki alt gruba ayrılmaktadır. U2-tip intronların 5' ve 3' kırılma uçlarında sırası ile "GT" ve "AG" korunmuş dizileri bulunurken, bu grup tüm intronların büyük bir kısmını oluşturmaktadır. U12-tip intronlar ise tüm intronların yaklaşık % 0.5'ini oluştururken 5' ve 3' kırılma uçlarında sırası ile "AT" ve "AC" korunmuş dizileri bulundurulur (43, 44). U2-tip intronların ve U12-tip intronların heterojen nüklear RNA (hnRNA) yapısından çıkartılması sırasıyla "majör" (U2 bağımlı) ve "minör" (U12 bağımlı) RNA kırılma kompleksleri tarafından gerçekleştirilir (8, 43, 45). Minör kırılma kompleksi tarafından çıkarılan U12 tip intronlar, insan genlerinin yaklaşık 800 tanesinde mevcut olup bu genlerin kodladığı proteinler DNA replikasyonu ve tamiri, transkripsiyon, RNA işlenmesi, translayon ve hücre iskeleti organizasyonu gibi kritik mekanizmalarda görev almaktadırlar (38, 40). Bu sebeple, U12-aracılı kesilme mekanizmasında meydana gelen defektler hücre proliferasyonu, hücre farklılaşması ve hücre büyümesi gibi hayati fonksiyonları aksatmaktadır (46).

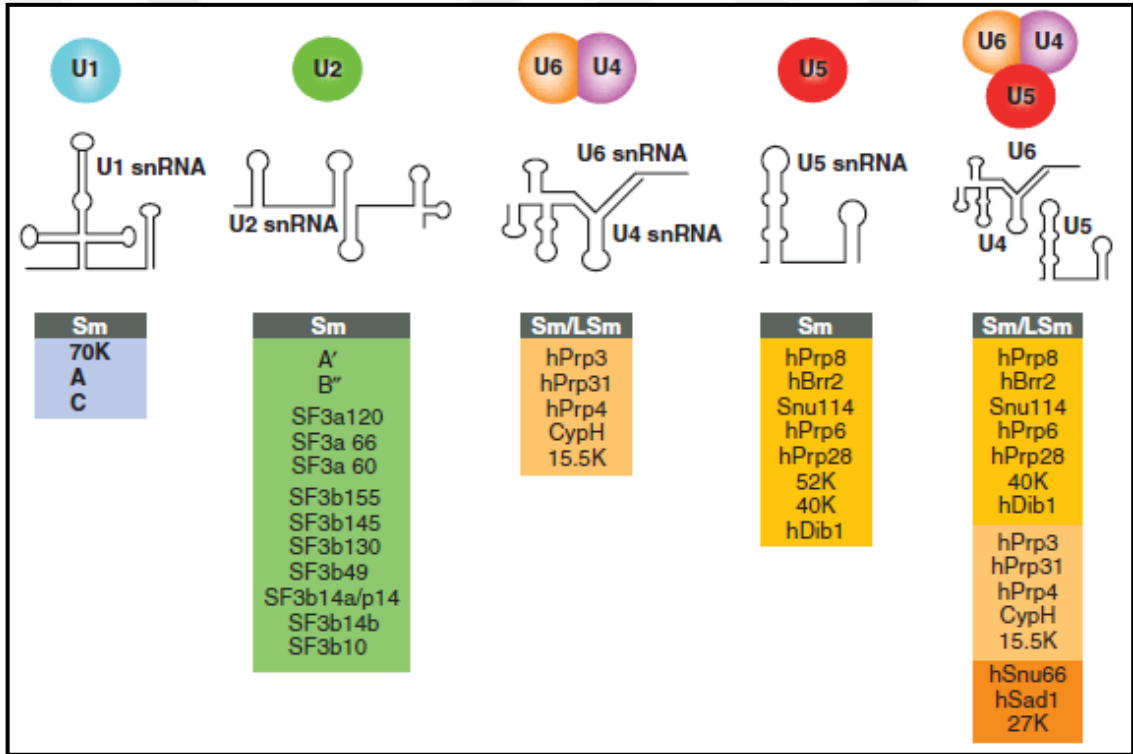
RNA kırılmasının yüksek doğrulukla düzenlenmesinde, snRNP'ler dışında pre-mRNA üzerinde bulunan kırılma bölgelerine yakın yerleşimli ekzonik ve intronik kırılma arttırıcı (ESE: Exonic Splicing enhancer/ISE: Intronic Splicing Enhancer) ve susturucu (ESS: Exonic Splicing Silencer/ISS: Intronic Splicing Silencer) diziler de rol almaktadır (43). Ayrıca, bu süreçte kırılma bölgesinin belirlenmesinde kritik öneme sahip olan ESE dizilerine bağlanarak kırılmayı teşvik eden serin ve arjinin amino asitlerince zengin “SR proteinleri”, ESS ve ISS dizilerine bağlanarak kırılmayı baskılayan “hnRNP proteinleri” de rol almaktadır (Şekil 2) (47). Antagonist olarak çalışan “SR proteinleri” ve “hnRNP proteinleri” alternatif kırılmanın düzenlenmesinde kritik öneme sahiptir (48).



Şekil 2. Kırılma mekanizmasının düzenleyicileri. Kırılmanın düzenlenmesi esnasında cis-acting elemanlar (ESE, ISE, ESS ve ISS'ler), Ser/Arg zengin SR proteinleri ve heterojen nükleer ribonükleoproteinler (hnRNP)'leri gibi yardımcı kırılma faktörleri tarafından tanınırlar (Scotti'den, 43)

4.2.1. Majör ve Minör Kırılma Kompleksleri

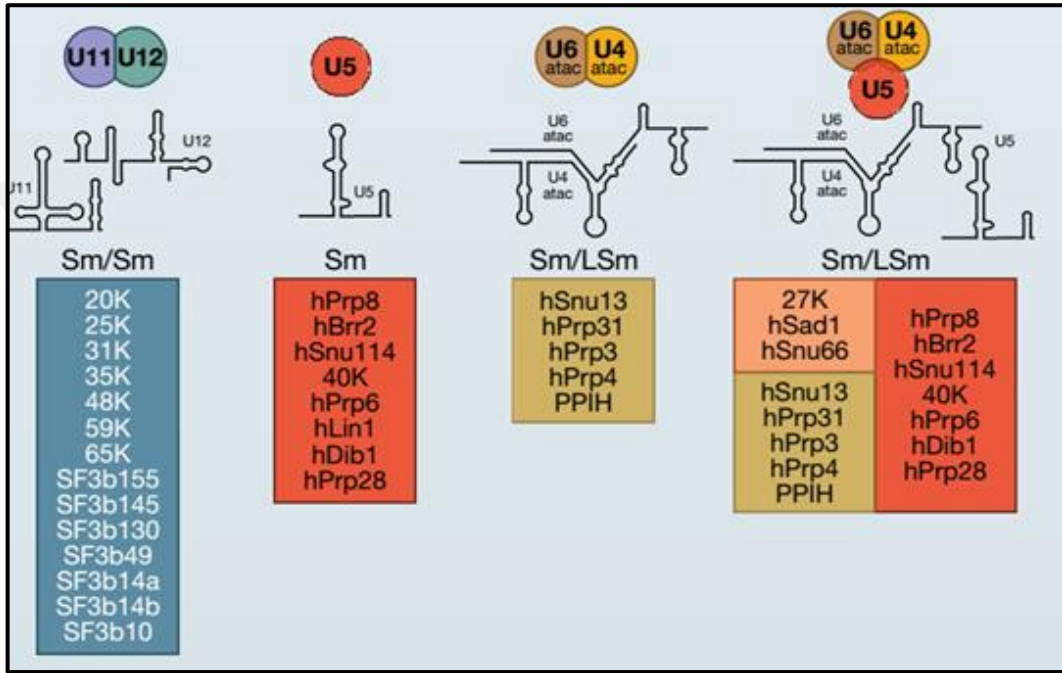
Kırılma kompleksleri, yapılarında protein ve snRNA molekülleri içeren ve snRNP'ler (small nuclear Ribonuclear Protein: Küçük Nükleer Ribonükleer Protein) olarak adlandırılan kompleksler ve ilave proteinlerden oluşmaktadır. Bu snRNP'lerin her birinin yapısında "kor protein" olarak adlandırılan bir grup protein ve birer snRNA bulunmaktadır (8, 49). Bu snRNP'ler yapılarında bulunan ve üridince zengin (U) snRNA'lar ile aynı isimle adlandırılmaktadır. U2 tip intronların pre-mRNA'dan çıkartılmasından sorumlu olan majör kırılma kompleksinin yapısında U1, U2, U4, U5 ve U6 snRNP'ler yer almaktadır (Şekil 3).



Şekil 3. Majör kırılma kompleksinin bileşenleri. Majör kırılma kompleksine katılan U1, U2, U4, U6 ve U5 snRNP'ler ve bu snRNP'lerin yapısında yer alan kor proteinler ile snRNA'lar ve bu snRNA'ların sekonder yapıları (Will'den, 8)

U12 tip intronların pre-mRNA'dan çıkartılmasından sorumlu minör kırılma kompleksinin yapısında ise majör kırılma kompleksinden farklı olarak U11, U12, U4atac ve U6atac snRNP'ler yer almaktadır. Bu snRNP'lerin yapısında yer alan snRNA'lar U2-bağımlı kırılma kompleksindeki karşılığı ile aynı görevi yapmakta

ancak tamamen farklı dizilere sahiptirler. Minör kırılma komplekslerini oluşturan bu snRNP'lerin yapısında yer alan proteinlerin bir kısmı majör kırılma komplekslerini oluşturan snRNP'ler ile ortak olarak kullanılsa da bu komplekslerin protein içerikleri birbirinden farklılık göstermektedir (Şekil 4). Majör kırılma kompleksi yapısına katılan U5 snRNP ise minör kırılma kompleksinin yapısında da aynen kullanılmaktadır (44).



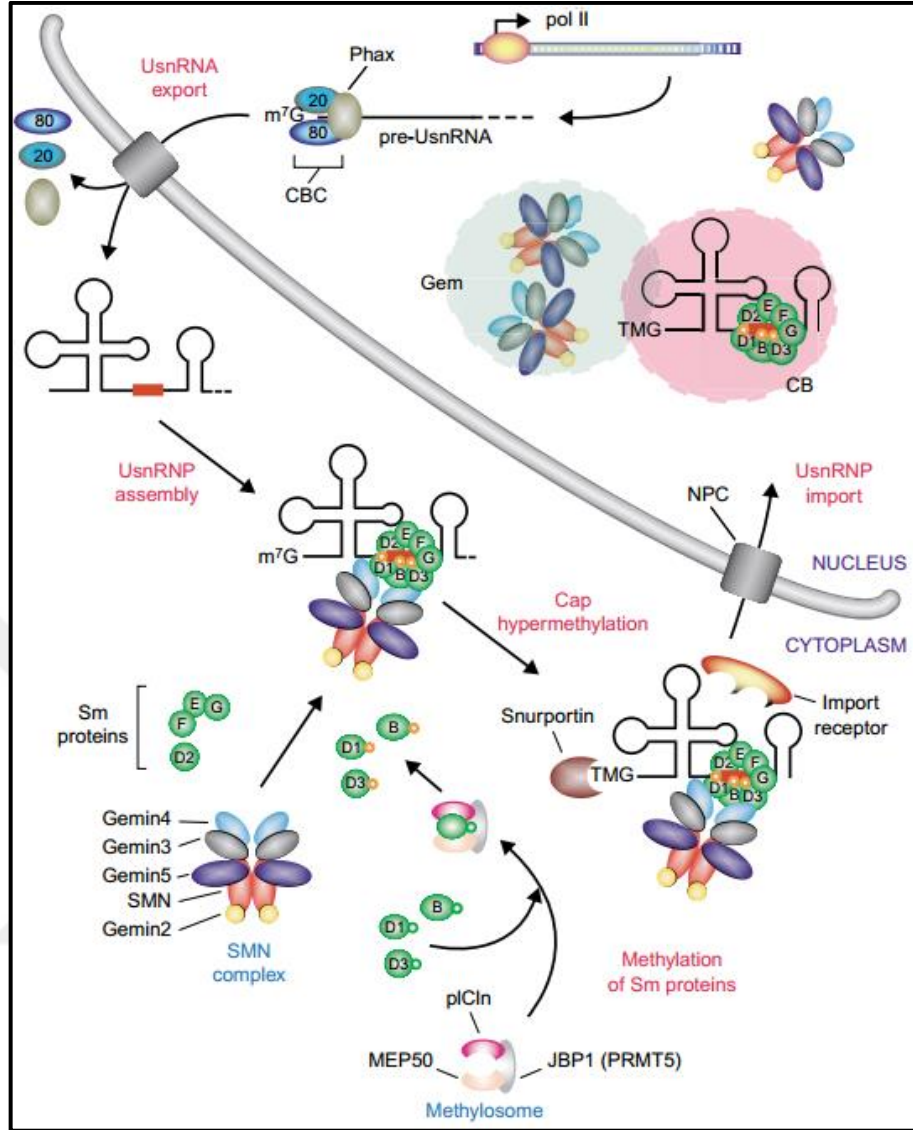
Şekil 4. Minör kırılma kompleksinin bileşenleri. Minör kırılma kompleksine katılan U11, U12, U4atac ve U6atac snRNP'ler ve bu snRNP'lerin yapısında yer alan kor proteinler ile snRNA'lar ve bu snRNA'ların sekonder yapıları (Wahl'den, 50)

4.2.2. snRNP Biyogenezi ve Cajal Cisimciği

Majör ve minör kırılma kompleksinin temel bileşenleri olan U1, U2, U4, U5, U11, U12 ve U4atac snRNP'lerin yapılanması sitoplazma ve çekirdekte çoklu basamaklar halinde gerçekleşirken, U6 ve U6atac snRNP'lerin yapılanması yalnızca çekirdekte gerçekleşmektedir (49).

U1, U2, U4, U5, U11, U12 ve U4atac snRNP'lerin yapılarında, aynı isimle adlandırılan yaklaşık 200 nükleotid (nt) uzunluğunda snRNA'lar bulunur. Bu snRNA'lar, RNA Polimeraz II tarafından transkribe edilirler ve 5' uçlarına 7-metil-guanozin (m₇G) şapkası takılır. Ancak, bu snRNA'lar poliadenilasyona uğramazlar (51).

Transkripsiyonun sonlanmasıyla birlikte pre-snRNA'ların 3' uç kısmı proteolitik kesime uğrar ve 7-metil-guanozin yapısı eklenen bu snRNA'lar eksportin kompleksi aracılığıyla çekirdekten sitoplazmaya taşınır (52, 53). Ardından, SMN kompleksi ve PRMT5 kompleksi tarafından bir araya getirilen 7 adet Sm protein halka kompleksi snRNA'ya takılarak kor snRNP oluşturulur. SMN ve PRMT5 komplekslerinin snRNA'lar üzerine taşınması, SMN kompleksinin yapısında bulunan SMN proteininin snRNA üzerinde yer alan Sm dizisini tanıması ile sağlanır (7). Oluşan kor snRNP üzerindeki m₇G-şapkası ve Sm halka kompleksi çekirdeğe taşınma için sinyal görevi görür ve import kompleksi aracılığıyla bu kor yapı daha ileri düzeyde yapılandırılmak üzere çekirdekte bulunan Cajal cisimciğine taşınır (54, 55). Cajal cisimciğine gelen kor snRNP'lere diğer kor proteinler de eklenerek snRNP'ler yapılandırılır (Şekil 5). Ancak, U6 ve U6atac snRNP'lerin biyogenez süreci farklılık arz etmektedir. U6 ve U6atac snRNA'lar RNA polimeraz III tarafından transkribe edilir ve 5' uçlarında m₇G-şapkası bulunmamaktadır. Bu nedenle, yapılanma sürecinde sitoplazmaya çıkmazlar ve çekirdekte kalan U6 ve U6atac snRNA'lara Sm halkasına benzer bir yapı olan Lsm halkası takılarak bu yapılar doğrudan Cajal cisimciklerine yönlendirilir (56).

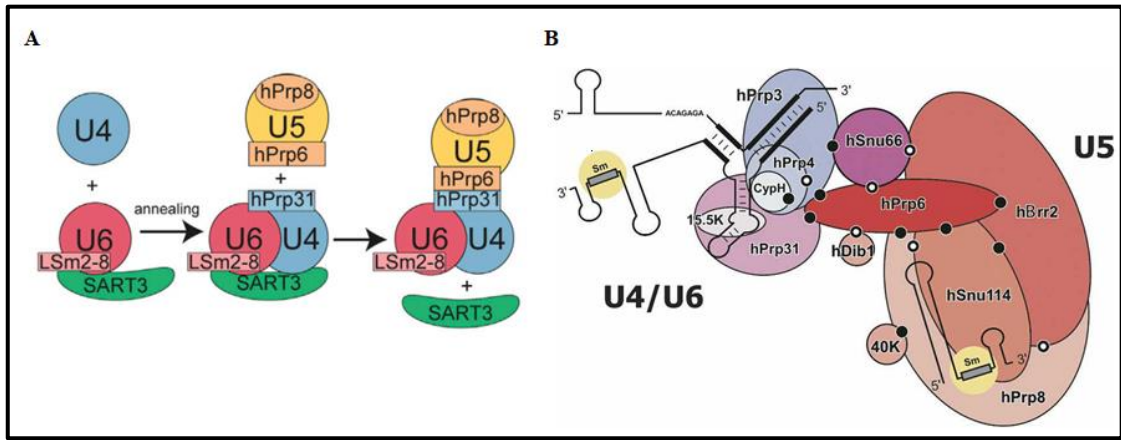


Şekil 5. Çekirdek ve sitoplazmada snRNA'ların yapılandırılması (Paushkin'den, 57)

Majör kırılma kompleksinin bileşenleri olan snRNP'lerden U1 ve U2 nükleoplazmaya tek tek salınırken U4, U5 ve U6 snRNP'ler Cajal cisimciğinde daha ileri düzeyden yapılandırılarak U4/U6·U5 tri-snRNP olarak nükleoplazmaya salınır (58). U4/U6·U5 tri-snRNP'nin yapılandırılması sürecinde öncelikle SART3 proteini U6 snRNP'ye bağlanır. Ardından SART3, U4 snRNP ile de etkileşerek U4 ve U6'yı bir araya getirir ve U4/U6 di-snRNP kompleksi oluşturulur. Sonrasında, U5'in kor proteini olan hPrp6 ve U4/U6'nın kor proteini olan hPrp31 arasındaki etkileşimle U5 ile U4/U6 di-snRNP bir araya getirilerek U4/U6·U5 tri-snRNP kompleksi oluşturulur ve SART3

kompleksten ayrılır (Şekil 6A). Oluşturulan U4/U6·U5 tri-snRNP kompleksi (Şekil 6B) kırılmada görev almak üzere Cajal cisimciğinden nükleoplazmaya salınır (59).

Minör kırılma kompleksinin bileşenleri olan snRNP'lerin Cajal cisimcikteki yapılanma süreçleri biraz daha farklı seyretmektedir. U11 ve U12 snRNP'ler Cajal cisimcikte U11/U12 di-snRNP şeklinde bir araya getirildikten sonra nükleoplazmaya salınmaktadır. Bununla birlikte U4atac, U6atac ve U5 ise U4/U6·U5 tri-snRNP kompleksinin yapılandırılmasına benzer şekilde U4atac/U6atac·U5 tri-snRNP kompleksi olarak yapılandırılır ve nükleoplazmaya salınırlar (60).



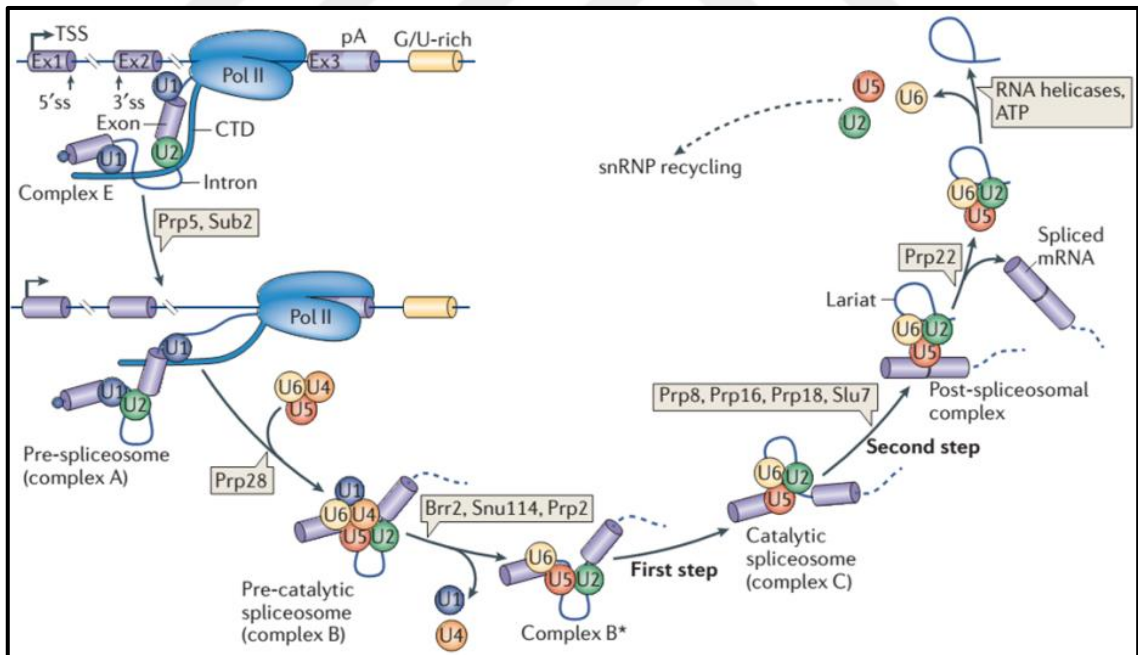
Şekil 6. U4/U6·U5 tri-snRNP'nin Cajal cisimciklerinde yapılandırılması A) Cajal cisimciğinde U4/U6 di-snRNP ve U4/U6·U5 tri-snRNP yapılandırılması B) U4/U6·U5 tri-snRNP spesifik protein-protein etkileşimlerinin şematik gösterimi (Novotny'den, 59; Liu'dan, 61)

4.2.3. Majör ve Minör Kırılma Kompleksinin Aktivasyonu

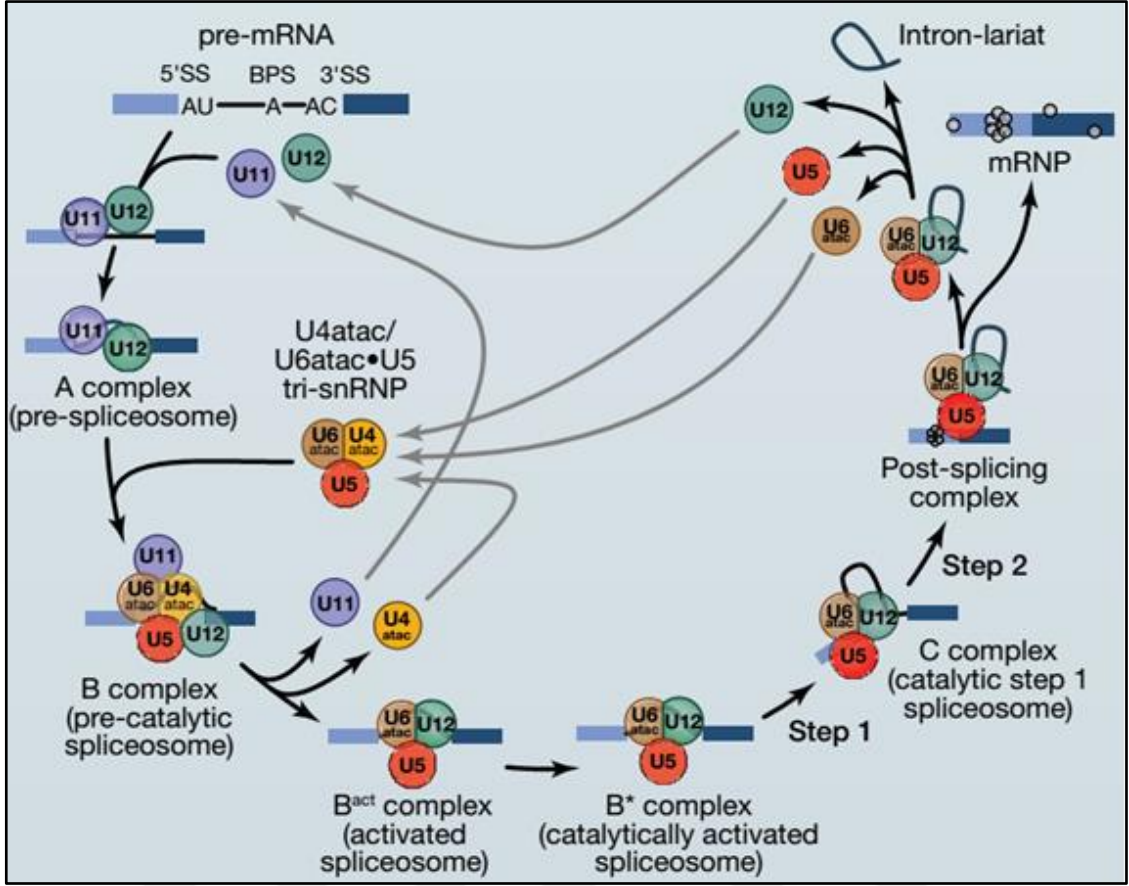
Kırılma komplekslerinin aktivasyonu, snRNP'lerin sıralı bir şekilde pre-mRNA üzerine bağlanmaları ve kırılma komplekslerinden snRNP'lerin ayrılmaları ile düzenlenir. Majör intronların (U2 tip) pre-mRNA'ların yapısından çıkartılması majör kırılma kompleksinin bileşenleri ile gerçekleştirilir (7). Bu süreçte ilk olarak U1 snRNP intronun 5' kırılma verici bölgesine, U2 snRNP ise intronun 3' kırılma alıcı bölgesine bağlanarak Kompleks E oluşturulur. Prp5 ve Sub2 gibi proteinlerin varlığında U1 ve U2 snRNP'ler bir araya gelerek ekzon tanımlama kompleksi olarak görev yapan Kompleks A oluşturulur. Kompleks A'nın oluşumundan sonra, U4/U6·U5 tri-snRNP kompleksi sürece katılır ve pre-katalitik Kompleks B oluşur. Pre-katalitik Kompleks

B'nin yapısından Brr2, Snu114 ve Prp2 gibi RNA helikazlar aracılığıyla U4 ile U1 snRNP'leri uzaklaştırılarak kompleksten salınır ve katalitik Kompleks B* oluşur. Takip eden birinci aşamada; U2, U5 ve U6 snRNP'ler yeniden düzenlenir ve Kompleks C olarak adlandırılan aktif U2/U5/U6 snRNP yapısı oluşur. İkinci aşamda ise Prp8, Prp16, Prp18 ve Slu7 gibi proteinlerin varlığında intron uzaklaştırılarak ekzonlar birleştirilir. Intronun uzaklaştırılıp ekzonların birleştirilmesi ile birlikte post-spliceosomal kompleks oluşur. Sonrasında, Prp22 ile Intron-U2/U5/U6 kompleksi ekzonların üzerinden ayrılır. Son olarak, U2/U5/U6 snRNP'ler RNA helikazların katkısı ile intronun üzerinden ayrılarak bir sonraki kırılma döngüsüne katılmak üzere nükleoplazmaya salınır (Şekil 7) (7, 62-66).

Minör intronların (U12 tip) pre-mRNA'ların yapısından çıkartılması ise minör kırılma kompleksi ile gerçekleştirilir. Hakkında daha az bilgi bulunan minör kırılma da majör kırılmaya benzer basamaklarda gerçekleştirilerek intronlar pre-mRNA'nın yapısından uzaklaştırılarak ekzonlar birleştirilir (Şekil 8) (50).



Şekil 7. Majör kırılma kompleksi aracılığıyla intronların çıkartılması (Matera'dan, 7)



Şekil 8. Minör kırılma kompleksinin bileşenleri ve oluşum basamakları. Minör spliceosomda U11, U12, U4atac ve U6atac snRNP'leri yer almaktadır. U5 snRNP, hem majör hem de minör spliceosomun ortak parçasıdır. U11 ve U12 snRNP'lerinin di-snRNP olarak introna yerleşmesi haricinde minör ve majör kırılma kompleksleri benzer prensiplere göre çalışmaktadır (Wahl'den, 50)

4.3. RNA Kırılma Kompleksi Bileşenleri ile İlişkilendirilen Hastalıklar

Pre-mRNA'lerden intronların doğru bir şekilde çıkartılması, genlerden fonksiyonel ürünlerin elde edilmesi sürecinde büyük öneme sahiptir (7). RNA kırılma kompleksinin yapısında yer alan snRNP'lerin kor proteinlerini, snRNA'larını ve ilişkili proteinlerini kodlayan genlerde meydana gelen mutasyonlar, yaygın kırılma defektlerine yol açarak çeşitli nadir hastalıklara neden olmaktadır (Tablo 1) (67). Bu hastalıklardan en sık karşılaşılan otozomal çekinik kalıtılan ve nörodejeneratif bir hastalık olan Spinal Musküler Atrofi (SMA)'dır (68). SMA, yapılanma süreci sitoplazmada başlayan snRNP'lerin yapısına Sm halkasını taşıyan SMN kompleksinde yer alan SMN proteinin kodlayan *SMN1* geni üzerindeki fonksiyon kaybına neden olan mutasyonlar sonucu oluşmaktadır (69). Nörodejeneratif bir hastalık olan Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) ile ilişkilendirilmiş olan FUS geni tarafından kodlanan protein, transkripsiyon sürecinde RNA polimeraz II ile U1 snRNP'nin etkileşimini sağlayarak U1 snRNP'nin pre-mRNA üzerine yerleştirilmesine aracılık etmektedir (70). Nörogelişimsel hastalıklar olan MOPDI/III ve Cerebellum Ataxia ile ilişkilendirilmiş olan sırası ile *RNU4ATAC* ve *RNU12* genleri tarafından kodlanan U4atac ve U12 snRNA'ları minör snRNP'lerin kor bileşenlerini oluşturmaktadır (38, 71). Retinal pigment epitel hücrelerinin ilerleyen dejenerasyonu ile karakterize Retinitis Pigmentosa ile ilişkilendirilmiş olan *PRPF3*, *PRPF4*, *PRPF31*, *PRPF6*, *PRPF8* ve *BRR2* genleri tarafından kodlanan proteinler, U4/U6·U5 tri-snRNP'nin bileşenleri olan snRNP'lerin kor proteini olarak veya U4/U6·U5 tri-snRNP'nin yapılanması için gerekli proteinler olarak rol oynamaktadır (9). Benzer şekilde, bu grup içerisindeki hastalıklarla ilişkilendirilen diğer genler tarafından kodlanan proteinler de RNA kırılma kompleksinin yapılanmasında rol oynamaktadır (Tablo 1).

RNA kırılma kompleksi tüm hücrelerde sürekli olarak ihtiyaç duyulan bir yapı olmasına rağmen bu kompleksin bileşenlerini kodlayan genlerde meydana gelen mutasyonların, doku spesifik etki göstermesinin altında yatan mekanizma henüz bilinmemektedir. Bu noktada, hücrelerde az miktarda üretilen fonksiyonel kırılma bileşenlerinin, özellikle belli genlerin fazladan üretildiği dokularda yetersiz kaldığı ve buna bağlı olarak da doku spesifik sorunların görüldüğü düşünülmektedir (9, 72-76).

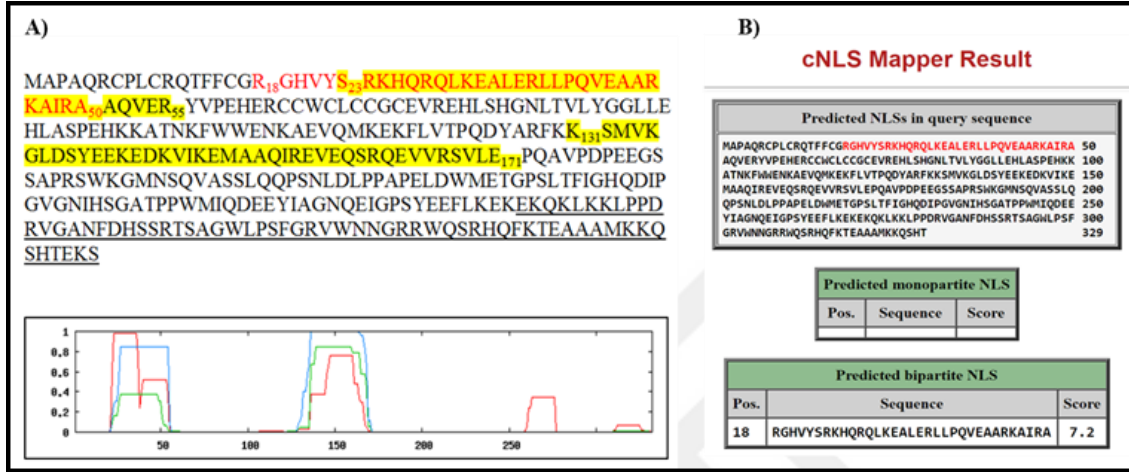
Tablo 1. Hastalıkla ilişkilendirilen kırılma kompleksi bileşenleri

Gen	snRNP	Hastalık	Kalıtım	OMIM
<i>SNRPB</i>	U1, U2, U4 ve U5	Cerebrocostomandibular syndrome	AD	117650
<i>SNRPE</i>	U1, U2, U4 ve U5	Hypotrichosis 11	AD	615059
<i>SF3B1</i>	U2	Myelodysplastic syndrome		614286
<i>SF3B4</i>	U2, U11/U12 di-snRNP	Nager syndrome	AD	154400
<i>SART3</i>	U4/U6 di-snRNP	Disseminated superficial actinic porokeratosis type 1	AD	(77)
<i>PRPF31</i>	U4/U6 di-snRNP	Retinitis Pigmentosa 11	AD	600138
<i>PRPF3</i>	U4/U6 di-snRNP	Retinitis Pigmentosa 18	AD	601414
<i>PRPF4</i>	U4/U6 di-snRNP	Retinitis Pigmentosa 70	AD	615922
<i>TXNL4A</i>	U5	Burn-Mckeown Syndrome	AR	611595
<i>Brr2/snRNP200</i>	U5	Retinitis pigmentosa 33	AD	610359
<i>PRPF6</i>	U5	Retinitis pigmentosa 60	AD	613983
<i>EFTUD2/SNU114</i>	U5	Mandibulofacial dysostosis Guion-Almeida type	AD	610536
<i>PRPF8</i>	U5	Retinitis Pigmentosa 18	AD	600059
<i>SMN1</i>	snRNP-ilişkili	Spinal Muscular Atrophy	AR	253300
<i>FUS/TLS</i>	snRNP ilişkili	Amyotrophic Lateral Sclerosis	AD/AR	608030
<i>USB1</i>	U6 snRNA ilişkili	Poikiloderma with neutropenia	AR	615426
<i>RNU4_{ATAC}</i>	U _{atac} snRNA	Microcephalic Osteodysplastic Primordial Dwarfism Type 1 (MODP1)	AR	604173
<i>RNU12</i>	U12 snRNA	Cerebellum Ataxia	AR	210710
				(71)

4.4. Tez Çalışması Öncesinde Elde Edilen Ön Veriler

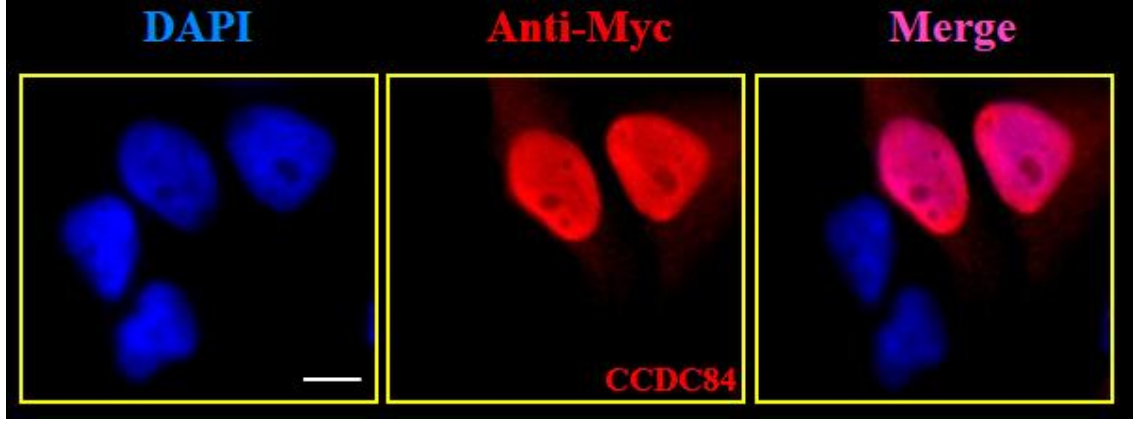
Mikrosefali Primordial Dwarfism tanısı konulan bireylerin bulunduğu bir ailede, Anabilim Dalımızda gerçekleştirilen genetik haritalama çalışması sonucunda, hastalığın 11. kromozom üzerinde D11S1992-D11S4132 STRP markırlarının sınırladığı 4.3 Mb'lık bir bölge ile kalıtıldığı gösterildi (Resim 1A-B). TÜBİTAK-BİLGEM'den alınan Illumina ekzom dizileme hizmeti sonucunda bölge içinde kalan *CCDC84 (DLNB14)* geninin dokuzuncu intronunun kırılma verici bölgesinde dört nükleotidlik homozigot bir delesyon (g.17185_17188delAAGT) tespit edildi ve bu delesyon Sanger dizileme ile doğrulandı (Resim 1C). Hastanın taşıyıcı olan anne ve babasından alınan periferik kandan izole edilen RNA'dan oluşturulan cDNA kullanılarak, RT-PCR ve dizi analizi ile mutasyonun çerçeve kaymasına neden olacak şekilde dokuzuncu introndan dokuzuncu ekzona 60 nükleotidlik bir dizi eklenerek protein sentezinin erken sonlanmasına (p.Lys269Serfs10Stop) neden olduğu belirlendi (Resim 1D).

Mikrosefalik Primordial Dwarfism ile ilişkilendirilen CCDC84'ün etkileştiği proteinler hakkında literatürde veri bulunmamaktadır (78). CCDC84 proteini 332 aminoasitlik bir protein olup, *in-silico* analizler sonucunda üzerinde iki adet Coiled-coil domaini ve bir adet çekirdek lokalizasyon sinyal dizisi bulunduğu gösterildi (Resim 2) (79).



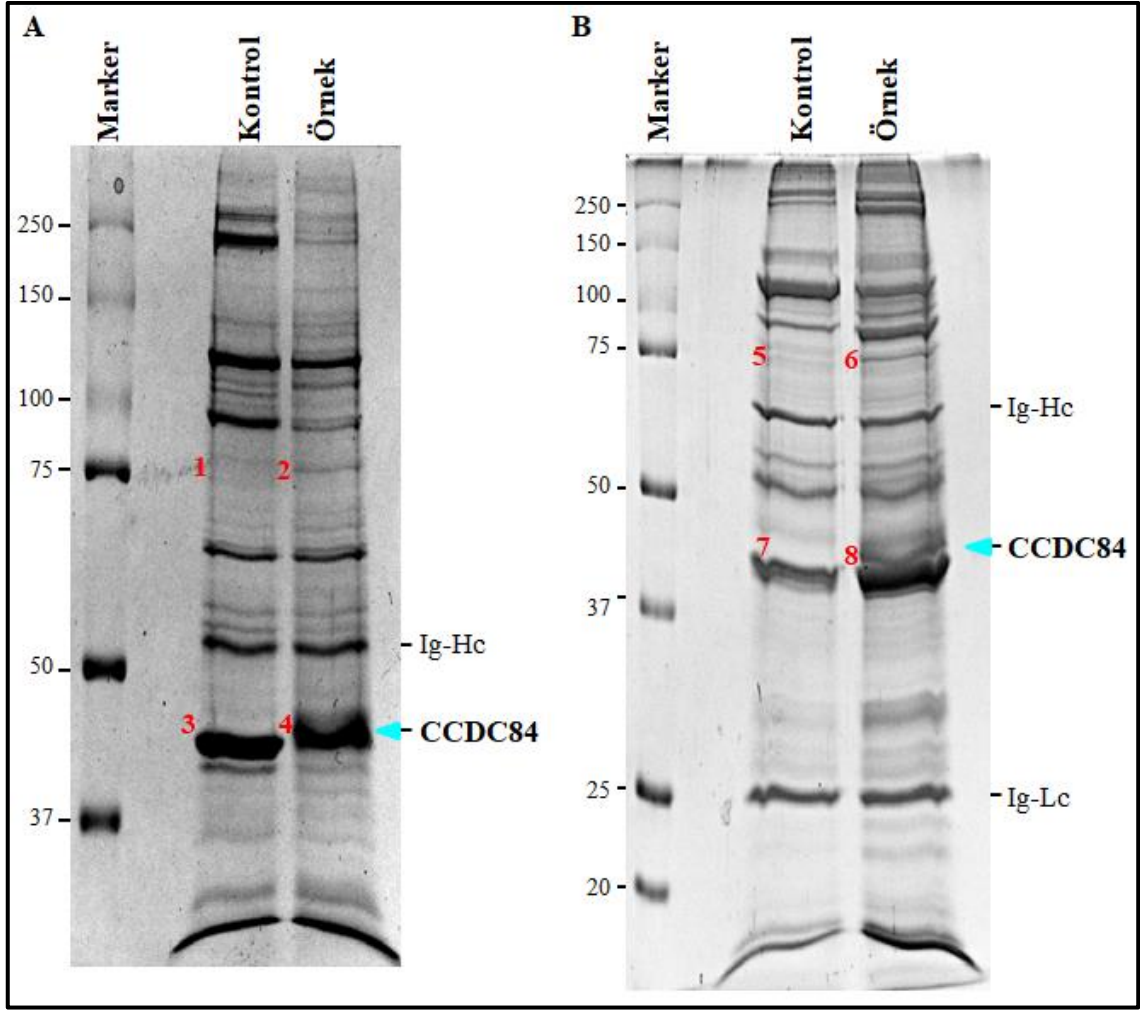
Resim 2. CCDC84 üzerinde in silico analizler. A) COILS analizi ile CCDC84 üzerinde iki adet Coiled-coil domaini görüldü (sarı). Altı çizili dizi korunmuş C terminalini göstermektedir. B) cNLS Mapper analizi ile CCDC84 üzerinde bir adet aday NLS (kırmızı) belirlendi

CCDC84'ün fonksiyonunu tanımlamayı amaçlayan TÜBİTAK tarafından desteklenen 114Z883 no'lu proje kapsamında, homolog rekombinasyona dayalı Gateway klonlama sistemi kullanılarak CCDC84-Wt geni pcDNA-3xMyc-DEST ekspresyon vektörüne klonlandı. Elde edilen ekspresyon vektörü HeLa hücrelerine transfeke edildi ve Anti-Myc primer antikoru kullanılarak immüno Floresan yöntemiyle Myc-CCDC84'ün çekirdekte lokalize olduğu gösterildi (Resim 3).



Resim 3. CCDC84'ün hücre içi lokalizasyonunun gösterilmesi. Myc-CCDC84 hücre içinde çekirdekte lokalize olmaktadır. DAPI:Mavi, Cy3: Kırmızı. Ölçek çubuğu: 10µm

Söz konusu proje kapsamında, CCDC84'ün fonksiyonunu araştırmaya yönelik olarak etkileştiği proteinlerin tanımlanması hedeflendi. Bu kapsamda öncelikle Flag etiketli yabancı tip CCDC84 (Flag-CCDC84-Wt ve mutant CCDC84 (Flag-CCDC84-Mut) HEK293 Flp-In hücrelerine kalıcı olarak transfekte edildi. Sonrasında ise, kontrol ve Flag-CCDC84-Wt eksprese eden HEK293 Flp-In hücreleri çoğaltılarak elde edilen hücre lizatı Anti-FLAG M2 agaroz boncuklarının üzerinden geçirildi. Boncuklara tutunan proteinler düşük pH'da Glisin (pH: 2.5) ile ayrıştırıldı. Ardından elüsyonlar %7,5 ve %10'luk SDS-PAGE jellerinde yürütülerek Coomassie Blue ile görüntülendi. Flag-CCDC84 eksprese olmayan kontrol koşulunda görülmezken, Flag-CCDC84 eksprese eden hücre lizatlarından çöktürülen protein bantları belirlendi (Resim 4). Numaralandırıldıktan sonra jelden kesilerek alınan protein bantları, MALDI-TOF MS kütle spektrofotometresi ile analiz edildi. MALDI-TOF MS analizi için Kocaeli Üniversitesi öğretim üyesi Prof. Dr. Murat KASAP'dan (DEKART Proteomiks Laboratuvarı) hizmet alındı.



Resim 4. İmmünopresipitasyon ile elde edilen proteinlerin SDS-PAGE ile analizi. A) %7.5 ve B) %10'luk jel. Kontrol: HEK293-Flp-In hücrelerden elde edilen proteinler. Örnek: Flag-etiketli CCDC84'ün kalıcı olarak transfecte edildiği HEK293-Flp-In hücrelerden elde edilen proteinler. Kütle spektrometresi için analize gönderilmek üzere seçilen ve CCDC84 ile etkileştiği düşünülen bandlar jel üzerinde 2 ve 6 ile, kontrole karşılık gelen bandlar 1 ve 5 ile gösterildi. CCDC84'e karşılık gelen bandlar 4 ve 8 (turkuaz ok), kontrole karşılık gelen bandlar 3 ve 7 olarak numaralandırıldı. IgHc; immünglobülün ağır zincir, IgLc; immünglobülün hafif zincir

Kütle analizi sonucunda bantlardan tanımlanan proteinlerden “Best Protein Score” değeri yüksek ve “Expect” değeri küçük olan proteinler anlamlı olarak değerlendirildi. Örnekten kesilen bantlarda görülen proteinlerin, aynı banta karşılık gelen kontrol bandında da görülmesi durumunda bu proteinler nonspesifik olarak değerlendirildi ve dikkate alınmadı. Sonuç olarak, mRNA'ların yapısından intronların çıkartılmasında rol

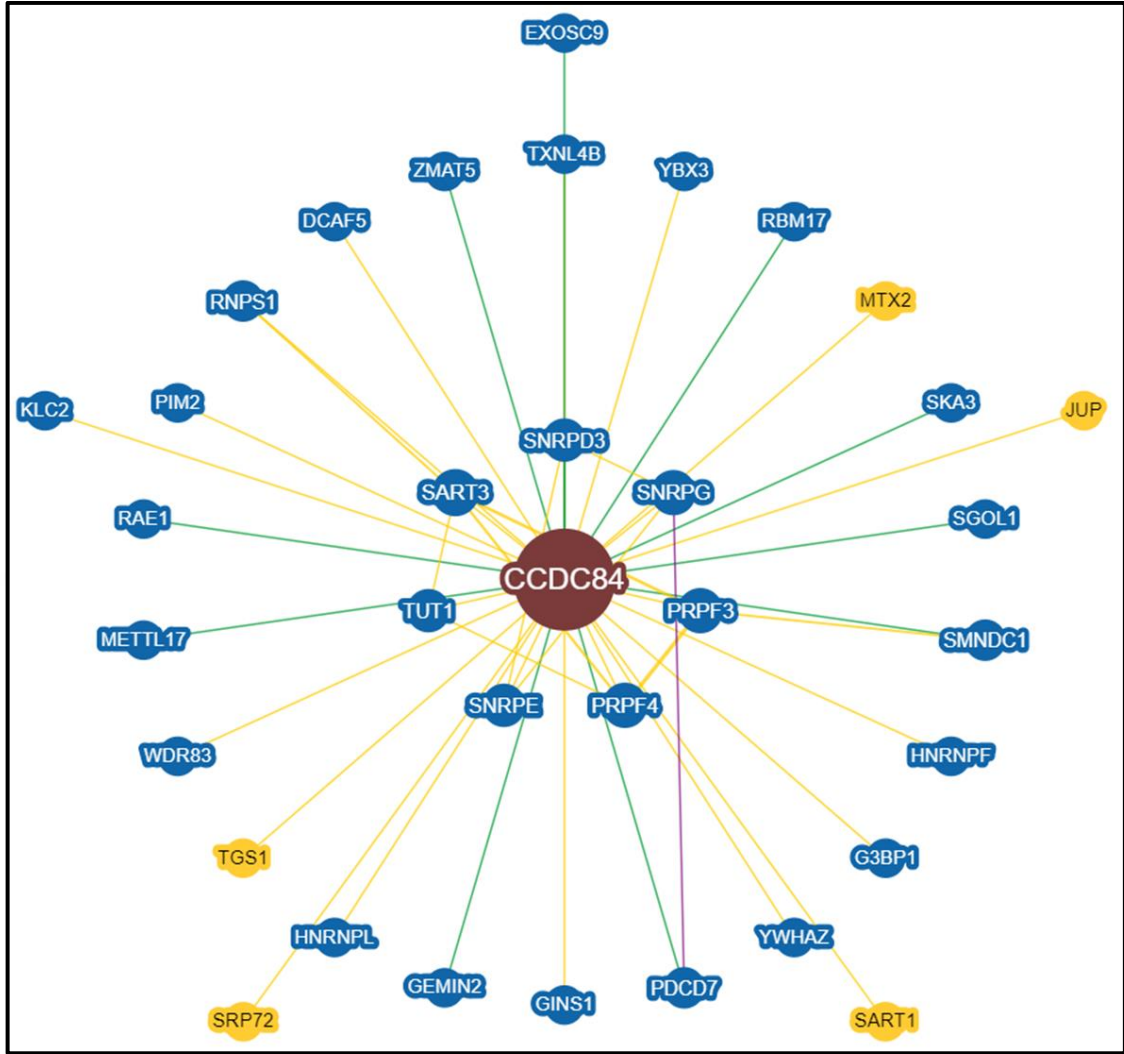
oynayan PRPF3'ün CCDC84'ün etkileşim partneri olabileceği ön verisine ulaşıldı (Tablo 2).

Tablo 2. MALDI-TOF kütle analizinden elde edilen sonuçlar

Band No	Best Protein	Best Protein Mass	Best Protein Score	Expect	Best Protein Description
1	ACTB	41710	74	0,00081	Actin, cytoplasmic 1
1	ACTG	41766	74	0,00081	Actin, cytoplasmic 2
2	PRPF3	77481	202	1,30E-16	U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein Prp3
3	ACTB	41710	433	1,00E-39	Actin, cytoplasmic 1
3	ACTG	41766	433	1,00E-39	Actin, cytoplasmic 2
4	CCDC84	37950	449	2,60E-41	Coiled-coil domain-containing protein 84
5	KIF11	119085	101	1,60E-06	Kinesin-like protein KIF11
6	PRPF3	77481	166	5,10E-13	U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein Prp3
6	ACTB	41710	91	1,70E-05	Actin, cytoplasmic 1
7	ACTB	41710	138	3,20E-10	Actin, cytoplasmic 1
7	ACTG	41766	138	3,20E-10	Actin, cytoplasmic 2
8	CCDC84	37950	493	1,00E-45	Coiled-coil domain-containing protein 84

Siyah satırlar, FLAG ile çöktürülen kontrolden alınan protein bantlarını (1, 3, 5 ve 7) ve hem kontrol hem de örnekte görülen spesifik olmayan protein bandını (6) göstermektedir. Kırmızı ile renklendirilen satırlar Flag etiketli CCDC84 ile çöktürülen proteinlere ait bantları (2 ve 6) göstermektedir. Mavi satırlar, Flag-CCDC84'ün yer aldığı bantları (4 ve 8) göstermektedir.

Ön verilerimizin eldesinin hemen ardından, protein etkileşim bilgilerinin verildiği BioGRID: Biological General Repository for Interaction Datasets web sayfasında, insan proteinlerinin etkileşimlerini sistematik olarak araştırmayı hedefleyen The BioPlex Network çalışmaları ve farklı gruplar tarafından yürütülen etkileşim çalışmaları kapsamında sunulan verilere göre, bizim tarafımızdan gösterilmiş olan PRPF3'ün de dahil olduğu 20'si mRNA'ların yapısından intronların çıkartılmasında görevli 34 farklı proteinin CCDC84 ile etkileşim içerisinde olabileceği gösterildi (80-85) (Şekil 9).



Şekil 9. BioGRID tarafından CCDC84 ile etkileşimi gösterilen proteinler. İnsan hücrelerinde gösterilen etkileşimler mavi baloncuklar içinde, fare hücrelerinde gösterilen etkileşimler sarı baloncuklar içinde gösterilmektedir. PRPF3, PRPF4, SART3, SART1, TXNL4B, TUT1, SNRPE, SNRPG, RNPS1 ve HNRNPL kırılma mekanizmasında görev almaktadır (Huttlin'den, 80; Fei'den, 81; Hein'den, 82; Horlbeck'ten, 83; Hart'dan, 84)

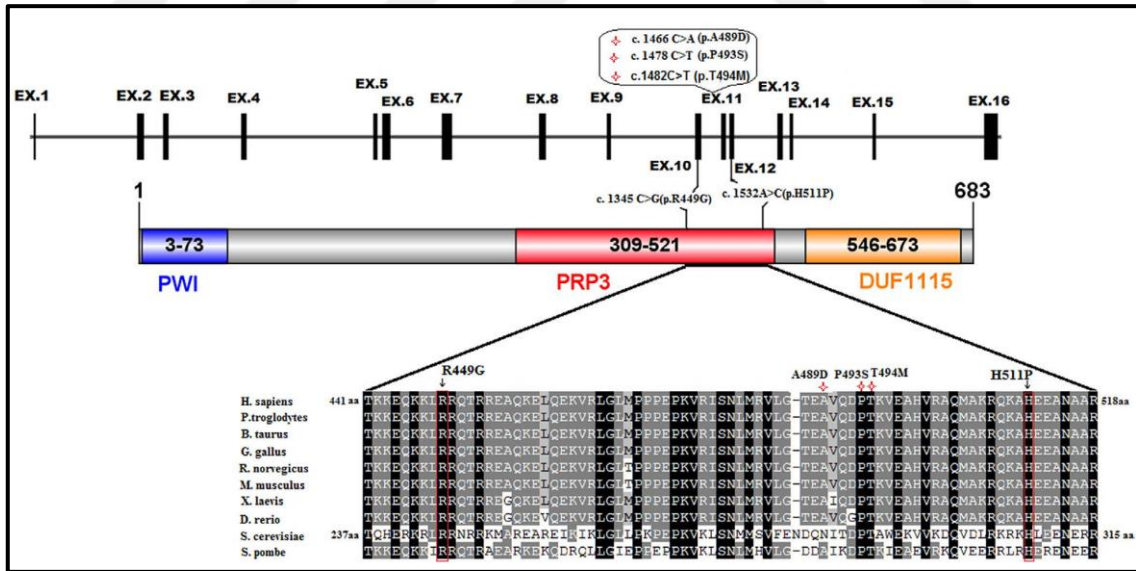
4.5. Pre-mRNA Processing Factor 3 (PRPF3) ve Fonksiyonu

PRPF3'ün maya ortoloğu olan *Prp3* geni ilk olarak, *Saccharomyces cerevisiae*'de RNA kırılma defektlerinin görüldüğü sıcaklığa duyarlı mutanlarda (Ts^-) tanımlanmış ve eksikliğinde intronların çıkarılamadığı pre-mRNA'lar görülmüştür (86-88). Ardından, Maya *Prp3p* proteininin U4/U6 di-snRNP ve U4/U6•U5 tri-snRNP'nin ana bileşeni olduğu belirlenmiştir (89). Sonrasında ise, snRNP komplekslerinin protein

bileşenlerini belirlemeye yönelik HeLa hücreleri ile yürütülen çalışmalarla öncelikle PRPF3 proteini ve sonrasında bu proteini kodlayan *PRPF3* geni tanımlanmıştır (90).

Birinci kromozomun q21.1 lokusunda lokalize olan *PRPF3* geni (NM_004698), 15'i kodlayan olmak üzere 16 ekzon içermektedir ve yaklaşık 78 kDa ağırlığında 683 amino asitlik bir protein kodlamaktadır. İlk olarak HeLa hücrelerinde çalışılan PRPF3'ün U4/U6 di-snRNP ve U4/U6•U5 tri-snRNP'nin kor bileşeni olduğu gösterilmiştir (91). PRPF3 proteini (Uniprot ID: O43395) üzerinde PWI, PRP3 ve DUF1115 olmak üzere üç domainden oluşmaktadır (Şekil 10) (90, 91). Bu domainlerden PWI (3-76 aa) RNA bağlayıcı bölge olarak görev yaparken (92), PRP3 domaini (308-521 aa) protein-protein etkileşiminde görev almaktadır (93). PRPF3'ün C-terminalinde bulunan DUF1115 domaininin (544-673 aa) fonksiyonu hakkında ise net bir bilgi bulunmamaktadır.

PRPF3 geni üzerinde bugüne kadar beş farklı heterozigot mutasyon tanımlanmıştır ve tamamı PRP3 domaini üzerinde olan bu mutasyonlar Retinitis Pigmentosa tip18 (RP18) ile ilişkilendirilmiştir (Şekil 10) (94-98).



Şekil 10. PRPF3 domainlerinin şematik gösterimi ve PRP3 domaini üzerinde tanımlanan mutasyonlar (Zhong'dan, 98)

Bu tez çalışması kapsamında, MPD ile ilişkilendirmiş olduğumuz ve fonksiyonu hakkında herhangi bir bilgi bulunmayan CCDC84'ün fonksiyonunun aydınlatılma

sürecine katkı sağlayacak verilere ulaşılması amaçlanmıştır. Bu kapsamda kırılma mekanizmasının temel bileşenlerinden olan U4 snRNP'nin kor proteinlerinden olan PRPF3 ile CCDC84 arasındaki etkileşime yönelik ön verinin immünopresipitasyon-immünblot ve immünfloresan yöntemleri ile doğrulanması hedeflendi.



5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Gereç

5.1.1. Kimyasallar

Agar	Merck, 1.016.130.500
Akrilamid (29:1) %40	Bio-Rad, 161-0146
Amonyumpersülfat (APS) (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈)	Sigma, A9164
Ampisillin	Sigma, A9518-5G
Bactotripton	Conda, 1612
Beta Merkaptotetanol	Merck, 8.057440.0250
Bromofenol Blue	Merck, 1.08122.005
Coomassie Brilliant Blue R-250	Sigma, 112553
Prolong GOLD Antifade Mounting Media	Thermo Fisher, P36935
Deoksinukleotid triphosphates (dNTPs)	Promega, U1420
Dithiothreitol (DTT- C ₄ H ₁₀ O ₂ S ₂)	Thermo scientific, R0861
Di-sodyum Hidrojen Fosfat (Na ₂ HPO ₄ . 2 H ₂ O)	Merck, M1065801000
Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM)	Thermo, 41965-039
EDTA disodyum dihidrat (Na ₂ EDTA.2H ₂ O)	AppliChem, A2937.0500
Etidyum bromide (C ₁₂ H ₂₀ N ₃ Br)	Sigma, E-7637
Etil alkol (C ₂ H ₅ OH)	AppliChem, A 8075,1000
Fetal Bovine Serum (FBS)	Gibco, 10500064
Glasiyel asetik asit (C ₂ H ₄ O ₂)	Merck, 1.00056.2500
Glisin	Chemcruz, sc-29096
HEPES (C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S)	Sigma, H0887
IPTG	Sigma, I6758
İzopropanol	Appllichem, A3928,0500PE
Hidroklorik asit (HCl)	Merck, 1.00314.2500
Kalsiyum Klorür (CaCl ₂)	Merck, 910TA654681
Kanamisin	Sigma, 60615-5G
L-Arabinoz	BioShop Canada, ARB222
Orange G	Sigma, O-1625
Paraformaldehit (HO(CH ₂ O) _n H)	Sigma, P6148

Penisilin/Streptomisin	Thermo, 15140-122
PMSF (Phenylmethylsulfonyl fluoride)	Sigma, 1741932998611
Potasyum hidrojen karbonat (KHCO ₃)	AppliChem, A2375.1000
Proteinaz K	Promega, V3021
SeaKem® LE Agaroz	Lonza, 50004L
Sephadex®G-50	Sigma, S5897-25G
SigmaFAST Protease inhibitör kokteyli	Sigma, S8830-20TAB
Sodium Phosphate dibasic (KH ₂ PO ₄)	Sigma, NIST200B
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Merck, 822050
Sodyum Florür (NaF)	Sigma, S7920
Sodyum hidroksit (NaOH)	Merck, 1.06462
Sodyum klorür (NaCl)	Merck, 1.01540.0500
Sodyum Orthovanadate (Na ₃ VO ₄)	Sigma, S6508
Sodyum Pyrophosphate (NaPPi-Na ₄ O ₇ P)	Sigma, P8010
Sodyumkarbonat (Na ₂ CO ₃)	Merck, 106392
TEMED	AppliChem, A1148
Tris-Baz (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	Sigma, T6791
Tris-HCl (C ₄ H ₁₂ N ₄ O ₃)	Sigma, 93363
Triton X 100	Sigma, 9002-93-1
Tween20	J.T.Baker, 73-74
Yeast Extract	Merck, VM445253 224

5.1.2. Antikorlar

5.1.2.1. Primer Antikorlar

Mouse-Anti-Myc- Monoclonal	Sigma-Aldrich, M4439
Rabbit-Anti-GST Polyclonal	Santa Cruz, sc-459
Mouse-Anti-Flag M2 Monoclonal	Sigma-Aldrich,F3165-1MG
Goat-Anti-CCDC84 Polyclonal	Santa Cruz, sc246197
Rabbit-Anti-CCDC84 Polyclonal	Abcam,ab150860
Rabbit-Anti-PRPF3 Polyclonal	Abcam, ab187535
Rabbit-Anti PRPF3 Polyclonal	Abcam, ab50860

5.1.2.2. Sekonder Antikorlar

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

5.1.3. Boncuklar

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

5.1.4. Kitler, Enzimler ve Markırlar

100 bp Plus Markır	Thermo, SM0321
BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Thermo, 4337455
Clarity™ Western ECL Substrate	BIORAD, 1705060
DreamFect Gold Transfection Reagent	Ozbiosciences, DG81000
E.Z.N.A Total RNA İzolasyon Kiti	Omegabiotek, R6934-01
E.Z.N.A.® Endo-free Plasmid DNA Mini Kit	Omegabiotek, D6950-01
E.Z.N.A.® Plasmid DNA Mini Kit I	Omegabiotek, D6943-01
Gateway® BP Clonase® II Enzyme mix	Thermo, 11789-020
Gateway® LR Clonase® II Enzyme mix	Thermo, 11791-100
PCR clean-up Gel Extraction Kit	Macherey-Nagel, 740609.50
Precision Plus Protein™ Dual Color Standards	BIORAD, 1610374
SuperScript® III First System	Thermo, 18080-051
Thermo Phusion Hot Start Taq Polimeraz	Thermo, F-549L

5.1.5. Sarf Malzemeler

Pipet uçları	Axygene, ABD
Mikrosantrifüj tüpler (1.5 ml)	Eppendorf, Almanya
Falkon tüpler (15 ve 50 ml)	Isolab, Fransa

Kültür flaskı (25 ve 75 cm ²)	Corning, ABD
6 kuyucuklu tabak	Corning, ABD
60 mm petri kabı	Corning, ABD
100 mm petri kabı	Corning, ABD
PVDF membran	BIORAD,1620177
Whatmann kağıdı 3MM	GE-Healthcares, 3030-861
Steril pastör pipeti	Isolab, Fransa
Serolojik pipetler (5,10 ve 25 ml)	SPL, Güney Kore

5.1.6. Cihazlar

-80°C dondurucu	Thermo Scientific, ABD
Accuri C6 Flow Sitometri	Becton Dickinson, ABD
Buz makinası	Hoshizaki, Japonya
Buzdolabı (+4°C)	Bosch, Almanya
ChemiDoc MP Görüntüleme Sistemi	BIO-RAD, ABD
CO ₂ 'li Etüv	Heraeus, Almanya
Çalkalayıcı inkübatör	GFL, Almanya
Derin dondurucular (-20°C)	Bosch, Almanya
Dikey elektroforez ve immünoblot sistemi	BIORAD, ABD
Distile su cihazı	GFL, Almanya
Doğru akım güç kaynağı (300 volt)	BIORAD, ABD
Floresan mikroskop	Nikon E80, Japonya
Genetik Analizör Cihazı	ABI 3130, ABD
Hassas terazi	ASHAUS, ABD
İnverted mikroskop	Nikon, Japonya
Jel görüntüleme sistemi	Gel Logic 2000, Kodak
Klas II steril kabinler	Metisafe, Türkiye
Manyetik karıştırıcı	IKA, ABD
Merdaneli karıştırıcı	Stuart, İngiltere
Mikrodalga fırın	Arçelik MD554, Türkiye
Mikrosantrifüj	Hettich, Almanya
Mikrosantrifüj	Thermo IEC, ABD
Orbital karıştırıcı	Nüve SL 350, Türkiye

Otoklav	Tutnauer 3150 ELV, İtalya
Pastör fırını	Memmert, Almanya
pH metre	Hanna, Portekiz
Sıcak su banyosu	Stuart, İngiltere
Sıvı azot tankı	Thermo Scientific, ABD
Soğutmalı yüksek devirli santrifüj	Eppendorf 5804R
Sonikatör VCX500	Sonics-Vibracell, ABD
Spektrofotometre	Eppendorf, Almanya
Thermal Cycler	Gene Amp 9700, ABD
Thermal Cycler	Techne TC512, İngiltere
Termomikser	Eppendorf, Almanya
Vakum pompası	Isolab, Fransa
Vorteks	IKA, ABD
Yatay elektroforez düzeneği	HU13, İngiltere
Yüksek devirli santrifüj	Eppendorf 5810, Almanya
Zaman ve hız ayarlı rotator	Stuart, İngiltere

5.1.7. Bakteri Suşları

Farklı tip plazmidlerin çoğaltılması esnasında transformasyon işlemi için *E. coli*'nin çeşitli suşları kullanıldı. Gateway sisteminde boş plazmidlerin çoğaltılması için *ccdB* genine dirençli DB3.1 bakteri suşu kullanılırken klonlanan gene ait dizi taşıyan Gateway vektörlerinin çoğaltılması için DH5α suşu kullanıldı. pDEST17-6xHis ve pGEX-KG-DEST-GST etiketli proteinlerin bakteride ekspresyonu için sırasıyla BL21-AI ve BL21-DE3 bakteri suşları kullanıldı (Tablo 3) (99-101).

Tablo 3. Çalışmada kullanılan bakteri suşları ve genotipleri

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

5.1.8. Solüsyon, Tampon ve Besiyerleri

5.1.8.1. Bakteri Kültürleri İçin Kullanılan Besiyerleri

Luria Bertani (LB) Sıvı Besiyeri

10 g tripton (Bacto), 5 g maya özütü (Bacto) ve 10 g sodyum klorür 800 ml deiyonize distile suda çözüldü. 1N NaOH çözeltisi ile pH 7.0'a ayarlandı ve hacim 1 litreye tamamlandı. 1.2 atmosfer basınçta, 121 °C'da 20 dakika otoklavlanarak steril edildi (102).

Luria Bertani Agar (LBA) Besiyeri

Erlenmayer içerisindeki LB sıvı besiyerine %1.5 oranında agar eklenerek hazırlandı (103). LB agar besiyeri 1,2 atmosfer basınçta, 121°C'de 20 dakika otoklavda steril edildi. Kullanılacağı zaman mikrodalganın defrost ayarında 10 dakika eritildi. Ardından, su banyosunda soğutulurak 55°C'ye getirildi. Çoğaltılacak vektörün antibiyotik seçiciliğine göre besiyerine 100 µg/ml ampisilin veya 50 µg/ml kanamisin eklendikten sonra, her bir 60 mm petri kabına 10 ml dağıtıldı.

5.1.8.2. Bakteri İndüklemeye Kullanılan Ajanlar

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

0.238 g IPTG tartılarak 10 ml steril su içinde çözüldü. 0.22 µm'lik filtreden geçirilerek steril edildi. 1 ml olacak şekilde tüplere dağıtılarak -20°C'de saklandı.

%20 Stok L-Arabinoz (100 X)

2 g L-Arabinoz tartılarak 10 ml çift distile steril suda çözüldü. 0.22 µm'lik filtreden geçirilerek steril edildi. 1 ml olacak şekilde tüplere dağıtılarak -20°C'de saklandı. Kullanılacağı zaman final konsantrasyon %0.2 (1X) olacak şekilde bakteri kültürüne eklendi.

5.1.8.3. Agaroz Jel Elektrofrezinde Kullanılan Çözeltiler

50x Tris-Asetat-EDTA (TAE) Tamponu

242 g Tris base (Tris base Mw: 121.14 g/mol) 800 ml deiyonize distile su içerisinde çözüldü. Çözelti üzerine 57 ml glasiyal asetik asit ve 100 ml 0.5 M EDTA çözeltisi (pH:8.0) eklendikten sonra, hacim 1000 ml'ye tamamlandı. Çalışma solüsyonu deiyonize su ile 1:50 oranında seyreltilerek kullanıldı.

Etidyum Bromid Solüsyonu

Toz halindeki ana stoktan 10 mg/ml olacak şekilde deiyonize su kullanılarak hazırlandı. Işıktan korunarak muhafaza edildi.

10X Orange G DNA Yükleme Tamponu

20 g süktroz 40 ml deiyonize distile su içerisinde çözöldü. 100 mg Orange G solüsyona eklenerek son hacim dH₂O ile 50 ml'ye tamamlandı.

5.1.8.4. SDS-PAGE Solüsyonları

Ayırma Jel Tamponu, 1.5 M pH 8.8

36.33 g Tris (Tris-baz Mw:121.14 g/mol) 180 ml deiyonize suda çözöldü, 12 N HCl ile pH 8.8'e ayarlanarak toplam hacim deiyonize su ile 200 ml'ye tamamlandı ve 0.2 mikrometre filtreden geçirilerek oda sıcaklığında saklandı.

Yükleme Jel Tamponu, 0.5 M Tris-HCl pH 6.8

6.057 g Tris (Tris baz Mw:121.14 g/mol) 90 ml deiyonize distile suda çözöldü, 12 N HCl ile pH 6.8'e ayarlanarak toplam hacim deiyonize su ile 100 ml'ye tamamlandı ve 0.2 mikrometre filtreden geçirilerek oda sıcaklığında saklandı.

%10 Sodyum Dodesil Sulfat (SDS) (20 mL)

10 g SDS (MW: 288.37 g/mol) 100 ml deiyonize distile suda çözölerek oda sıcaklığında saklandı.

10X Tris Glisin Tamponu

30.3 g Tris base (Tris baz Mw:121.14 g/mol) ve 144 g glisin (Glisin Mw:75.07 g/mol) 1 litre deiyonize suda çözölerek oda sıcaklığında saklandı.

SDS-PAGE Yürütme Tamponu (1 L) (1 X)

10X Tris-Glisin tamponundan 100 ml alınarak üzerine 890 ml deiyonize su ve 10 ml %10'luk SDS (final konsantrasyon %0.01) eklenerek son hacim 1 litreye tamamlandı.

%10 Amonyum Persülfat (APS) (1 mL)

100 mg APS (APS Mw: 228.18 g/mol) 1 ml deiyonize suda çözöldü. Bir iki güne kadar solüsyon 4°C'de saklandı. İhtiyaç duyuldukça taze solüsyon hazırlandı.

5X SDS-PAGE Yükleme Tamponu (10 ml)

Toplam hacim 10 ml’de final konsantrasyonları 0.25 M Tris-CI pH: 6.8, %10 SDS %50 Gliserol, %0.01 Bromofenol mavisi olacak şekilde hazırlandı ve -20 °C’de saklandı. Kullanmadan önce son konsantrasyonu 0.5 M olacak şekilde DTT eklendi.

5.1.8.5. Western Blot Solüsyonları

SDS-PAGE Transfer Tamponu (10 X)

10X Tris-Glisin tamponundan 100 ml alınarak 700 ml dH₂O eklendi. Üzerine 200 ml Metanol eklenerek 1X olacak şekilde son hacim bir litreye tamamlandı.

%20 Tween-20

20 ml stok Tween 20, 80 ml deiyonize su içinde çözöldü ve 4°C’de saklandı.

10X PBS Stoğı

1.37 M NaCl (Mw:58.44 g/mol), 26.8 Mm KCl (Mw 74.56 g/mol), 0.1 M Na₂HPO₄ (Mw 141.96 g/mol) 17.6 mM KH₂PO₄ (Mw 136.09 g/mol) 800 ml distile su içerisinde hazırlandı ve 1N HCl ile pH:7.4’e ayarlandı. Hacim deiyonize su ile bir litreye tamamlandı.

1X PBS-Tween 20 (PBST)

10XPBS’den 50 ml alınarak 450 ml deiyonize su ile 1X PBS hazırlandı. Ardından son konsantrasyon %0.05 olacak şekilde % 20’lik Tween 20 solüsyonundan 1250 µl eklendi ve oda sıcaklığında saklandı.

10X TBS Stoğı (1 L)

24 g Tris HCl (Mw: 157.60 g/mol), 5.6 g Tris-base (Mw:121.14 g/mol), 88 g NaCl (Mw: 58.44 g/mol) 800 ml distile su içerisinde hazırlandı ve 12N HCl ile pH: 7.6’ya ayarlandı. Toplam hacim deiyonize su ile 1000 ml’ye tamamlandı

1X TBS-Tween 20 (TBST)

10X TBS’den 50 ml alınarak 450 ml deiyonize su ile 1X TBS hazırlandıktan sonra, son konsantrasyon %0.05 olacak şekilde % 20’lik Tween 20 solüsyonundan 1250 µl eklendi ve oda sıcaklığında saklandı.

5.1.8.6. Immunopresipitasyonda Kullanılan Solüsyonlar

1M Tris-HCl pH: 7.2

24.22 g Tris baz (Mw:121.14 g/mol) 180 ml deiyonize distile suda çözüldü, 12N HCl ile pH 7.2'ye e ayarlanarak toplam hacim deiyonize su ile 200 ml'ye tamamlandı. Otoklavlanan solüsyon oda sıcaklığında saklandı.

5M NaCl

58.44 g NaCl (Mw: 58.44 g/mol) deiyonize su ile 200 ml'ye tamamlandı ve otoklavlanarak oda sıcaklığında saklandı.

0.5 M Na₂EDTA, pH 8.0

16.81 g Na₂EDTA (Mw: 336.24 g/mol) 60 ml deiyonize su içinde çözüldü. 10 M'lık NaOH pH 8'e ayarlandı. Deiyonize su ile son hacim 100 ml'ye tamamlandı ve otoklavlanarak oda sıcaklığında saklandı.

%20 Triton X-100

2 ml Triton X-100 8 ml deiyonize su içinde çözüldü ve homojen hale gelmesi için 37°C su banyosunda bekletildi. Tamamen çözüldükten sonra +4°C'de saklandı.

100X Sodyum Orthovanadate (NaVan) 200 mM

3.68 g Na₃VO₄ (Na₃VO₄ Mw: 183.91 g/mol) 90 ml çift distile steril su içinde çözüldü. 1N NaOH ile pH 10.0'a ayarlandı. Sarı renge dönüşen solüsyon renksiz olana kadar kaynatıldı. Oda sıcaklığına gelene kadar soğutuldu. pH'sı tekrar kontrol edildi ve 10.0'a ayarlandı. Deiyonize su ile hacim 100 ml'ye tamamlandı ve alikotlanarak -20°C'de saklandı. Liziz tamponu içinde çalışma konsantrasyonu 2mM olacak şekilde 1X final konsantrasyona seyreltilti.

50X Sodyum Florür (NaF) 1M

4.2 g NaF (NaF Mw: 41.99 g/mol) 100 ml çift distile steril su içinde çözüldü. Solüsyon alikotlanarak -20 °C'de saklandı. Liziz tamponu içinde çalışma konsantrasyonu 20 mM olacak şekilde 1X final konsantrasyona seyreltilti.

20X Sodyum PyroPhosphate (NaPPi) 100 mM

4.44 g NaPPi (NaPPi Mw: 444.06 g/mol) 100 ml çift distile steril su içinde çözüldü ve 4°C’de saklandı. Liziz tamponu içinde çalışma konsantrasyonu 5 mM olacak şekilde 1X final konsantrasyona seyreltilti.

100X PMSF 100 mM

0.174 g PMSF (Mw: 174.19 g/mol) 10 ml ethanol içinde sulandırıldı. Solüsyon alikotlanarak -20 °C’de saklandı. Liziz tamponu içinde çalışma konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde 1X final konsantrasyona seyreltilti.

10X Proteaz İnhibitör Kokteyli

Bir adet SigmaFast Proteaz Inhibitor Kokteyl tableti (Sigma-Aldrich, S8830) 10 ml steril çift distile su içinde çözüldü ve -20°C’de saklandı.

1XTNTE Hücre Patlatma Tamponu (10 ml)

Hücre patlatma tamponu TNTE hazırlanırken 50 mM Tris-Cl (pH 7.4), 150 mM sodyum klorür, %0.5 Triton X-100, 1 mM EDTA (pH 7.0), 5 mM NaPPi, 1x PI, %10 gliserol, 2 mM NaVan, 20 mM NaF, 1 mM PMSF olacak şekilde solüsyonlar eklenerek ultra saflıkta ddH₂O ile hacim 10 ml’ye tamamlandı.

1X Immünpresipitasyon Yıkama Tamponu

Daha önce hazırlanmış olan solüsyonlar aşağıda belirtildiği oranlarda karıştırılır. Steril edilmiş ultra saflıkta ddH₂O ile son hacim 10 ml’ye tamamlanır ve solüsyon oda sıcaklığında saklandı.

Son konsantrasyonları 50 mM Tris-Cl (pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA pH: 8.0, %0.1 Triton X-100 olacak şekilde ultra saflıkta ddH₂O ile hazırlandı.

0.2 M Glisin-HCl (pH 2.5)

1.5 g Glisin, 60 ml steril dH₂O içerisinde çözüldü. 12 N HCl ile pH 2.5’e ayarlandı. Steril edilmiş ultra saflıkta ddH₂O ile son hacim 100 ml’ye tamamlandı. Otoklavlanarak sterilize edildi.

5.1.8.7. Immüno Floresanda Kullanılan Solüsyonlar

%4 Paraformaldehit (PFA)

4 g paraformaldehit (Mw: 30.03) 80 ml PBS içerisinde 60 °C’de ısıtılarak çözüldü. 1N HCl ile pH: 7.2’ye ayarlandı. Son hacim deiyonize su ile 100 ml’ye tamamlandı ve 0.45 mikron filtreden geçirilerek sterilize edildi.

Immüno Floresan Bloklama Solüsyonu

PBS9 ml PPS üzerine 1 ml FBS ilave edilerek 10 ml %10’luk FBS hazırlandı.

Immunofloresan Permeabilizasyon Solüsyonu (%0.02 Triton X 100)

100 µl %20 Triton X 100, 1X PBS ile 10 ml’ye tamamlandı.

5.1.8.8. Memeli Hücre Kültüründe Kullanılan Solüsyonlar

100 ml %10 FBS-DMEM-Penisillin/Streptomisin Besiyeri

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

5.1.8.9. Transfeksiyon Solüsyonları

2X HEPES

0.8 g NaCl , 0.027 g Na₂HPO₄.2H₂O ve 1.2 g HEPES 90 ml deiyonize distile su içinde çözüldü. 0.5 N NaOH ile pH 7.05’e ayarlandı ve hacim 100 ml’ye tamamlandı. Solüsyon 0.2 mikrometrelik filtreden geçirilerek steril edildi ve 15 ml’lik falkonlara dağıtılarak -20 °C’de saklandı.

2,5 M CaCl₂

36.75 g CaCl₂ (Mw: 147.02 g/mol) 100 ml steril çift distile su içinde çözüldükten sonra 0.2 mikrometrelik filtreden geçirilerek steril edildi. 15 ml’lik falkonlara dağıtılarak -20 °C’de saklandı.

5.2. Yöntem

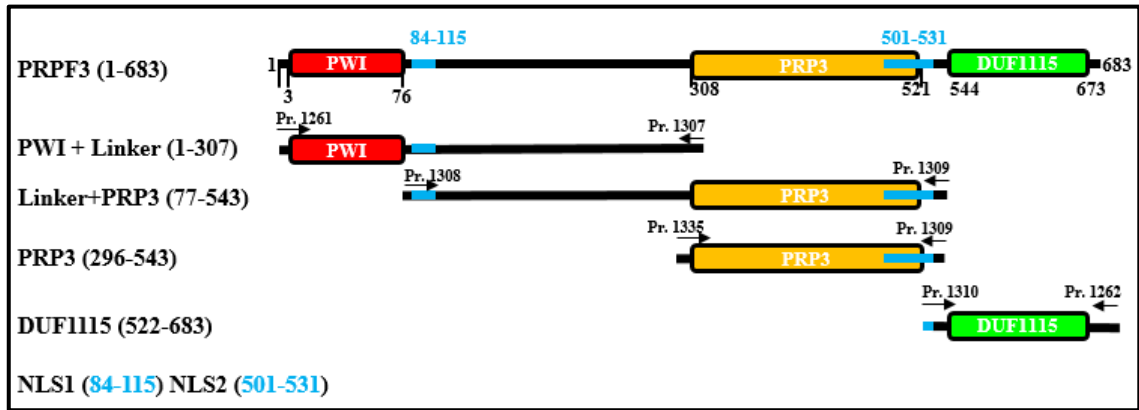
5.2.1. CCDC84 ve PRPF3 Genlerinin Klonlanması

Tez çalışmalarında kullanılan CCDC84 ve PRPF3 ekspresyon vektörlerinin oluşturulması için daha önce 114Z883 no’lu proje kapsamında, yabancı tip CDC84, mutant CCDC84 ile PRPF3’ün pDONR201’e klonlanması ile oluşturulmuş olan giriş

vektörleri kullanıldı. Bu giriş vektörlerindeki yabancı tip CCDC84 ve mutant CCDC84 genleri Flag etiketleyen 3xFLAG-p3xFLAG-CMV/DEST ve Myc etiketleyen pcDNA3Myc/DEST memeli ekspresyon vektörlerine aktarılırken, PRPF3 ise GST etiketleyen pDEST27 memeli ekspresyon vektörüne aktarıldı. Ayrıca, yine aynı giriş vektörleri kullanılarak yabancı tip CCDC84 geni GST ve His etiketleyen bakteri ekspresyon vektörlerine, mutant tip CCDC84 geni ise GST etiketleyen bakteri ekspresyon vektörüne aktarılırken PRPF3 ise herhangi bir etiket eklemeyen pDEST14 bakteri ekspresyon vektörüne aktarıldı (Tablo 6). Genlerin giriş vektöründen ekspresyon vektörlerine aktarılmasında homolog rekombinasyona dayalı Gateway klonlama sistemi kullanıldı (104).

5.2.2. PRPF3 Domainlerine Ait Dizilerin PCR ile Çoğaltılması

PRPF3 geninden kodlanan PRPF3 proteinin N-terminalinde PWI domaini (3-76 aa), orta kısmında PRP3 domaini (308-521 aa), PWI ve PRP3 domainlerini bağlayan bağlantı bölgesi (179-307 aa), C-terminalinde DUF1115 domaini (544-673 aa) ile PRP3 ve DUF1115 domainlerini bağlayan kısa linker bölgesi (522-543 aa) bulunmaktadır. PRPF3 üzerinde ayrıca, NLS1 (84-115 aa) ve NLS2 (501-531 aa) olarak adlandırılan iki adet çekirdek lokalizasyon sinyal dizisi bulunmaktadır (Resim 5).



Resim 5. Tam uzunlukta PRPF3 ve domainlerinin şematik gösterimi. Domainlerin ilk ve son amino asitleri şematize edilmiş proteinin altında verilmiştir. Pr.: domainlerin amplifikasyonunda kullanılan primerler, NLS: Çekirdek lokalizasyon sinyali (mavi).

Belirlenen domainlerin klonlanması sürecinde *PRPF3* için oluşturulmuş olan giriş vektörü kalıp olarak kullanıldı. Klonlanacak olan her bir PRPF3 domaininin sınırlarını

belirlemek üzere amplifikasyon primerleri tasarlandı ve tasarlanan ileri ve geri primerlerinin 5' uçlarına sırası ile *attB1* ve *attB2* dizileri eklendi (Tablo 4).

Tablo 4. *PRPF3* ve domainlerinin çoğaltılmasında kullanılan *attB* kuyruklu primerler

Primer No	Primer Dizisi (5'-3')	Primer Adı
1261	ggggacaagttgtacaaaaagcaggcttc atggcactgtcaaagaggagc	PRPF3_attB1
1262	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtc tcattcaatcagtggtacttaacacagattcac	PRPF3_attB2_ws
1307	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtc tcattaggattccatgtcttctgatggc	PW1_attB2_ws
1308	ggggacaagttgtacaaaaagcaggcttc atgaggcattccaagtctagcagtg	PRP3_attB1
1309	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtc tcattatgtgtaccccctgtgaaatg	PRP3_attB2_ws
1310	ggggacaagttgtacaaaaagcaggcttc atggcagaacagagaaaggtaag	DUF1115_attB1
1335	ggggacaagttgtacaaaaagcaggcttc ctaaaggaaaagccatcagaag	PRP3_attB1

Klonlama primerlerinde bakteriyofaj lamda (λ) rekombinasyon bölgesine ait *attB* dizileri normal, gene özgü kısımlar koyu tonda gösterildi. Başlama kodonu (atg) ve stop kodonları (tca, tta) koyu ve altı çizili gösterildi. ws: N-terminale etiket ekleyen ekspresyon vektörlerinin oluşturulmasında kullanılan ve stop kodonu taşıyan primer.

Belirlenen her bir bölgenin amplifikasyonu hata düzeltme (proofreading) aktivitesi olan *Phusion Hot Start Taq Polimeraz* (Thermo) ile üretici firmanın önerisi doğrultusunda aşağıda belirtilen PCR karışımı kullanılarak ilgili primerler ile (Resim 5) gerçekleştirildi.

PCR Karışımı

1X

5X GC Tamponu (Thermo)	: 5 μ l
dNTP Karışımı (10 mM)	: 0.5 μ l
Pr F (10 pmol/ μ l)	: 1 μ l
Pr R (10 pmol/ μ l)	: 1 μ l
Phusion Hot Start Taq Pol	: 0.25 μ l
PCR ürünü (100ng/ μ l)	: 1.5 μ l
dH ₂ O	: 15.75 μ l
Toplam	: 25 μ l

PCR Koşulları

98°C 30"	Başlangıç denatürasyonu	} 30 döngü
98°C 10'	Denatürasyon	
62°C 1'	Bağlanma	
72°C 1,5'	Sentez	
72°C 7'	Son sentez	
10°C ∞	Bekleme	

5.2.3. PRPF3 Domainlerine Ait PCR Ürünlerinin Agaroz Jelden Saflaştırılması

Elde edilen PCR ürünlerinin tamamı %1'lik agaroz jelde 70 voltta 45 dakika yürütüldü ve jelden kesilen PCR ürünleri Macherey-Nagel PCR clean-up Gel Extraction Kit kullanılarak üretici firmanın önerisi doğrultusunda pürifiye edildi. Özetle; kesilen jelin üzerine 2 hacim (yaklaşık 200 µl) NTI Buffer eklendi. Ependorflar termomikserde 50 °C'de 10 dakika inkübe edilerek jel sıvı hale getirildi. Karışım, temiz pipet ucu ile kit içerisinde bulunan silika membranlı kolona aktararak 11 000 g'de 30 saniye santrifüj edildi. Ardından, 700 µl NTI Buffer eklenerek 11 000 g'de 30 saniye santrifüj edildi. Bu işlem iki kez tekrarlandı. Sonrasında kolon 11 000 g'de 30 saniye santrifüj edilerek sıvı kalıntıları uzaklaştırıldı. Temiz ependorf tüplere alınan kolonların üzerine 20-40 µl DNA elüsyon tamponu olan Buffer NE eklendi ve oda sıcaklığında iki dakika bekletildi. Sonrasında kolonlar 11 000 x g'de 1 dakika santrifüj edilerek elüsyon yapıldı.

5.2.4. PRPF3 Domainlerine Ait Giriş Vektörlerinin Oluşturulması

Agaroz jelden pürifiye edilen *PRPF3* domainlerine ait PCR ürünleri üretici firmanın önerileri doğrultusunda aşağıda verildiği şekilde Gateway BP clonase enzim karışımı kullanılarak pDONR201 giriş vektörüne yerleştirildi (104, 105).

BacterioPhage (BP) Rekombinasyon Reaksiyonu

Giriş vektörü (25 ng/µl)	1 µl
PCR Ürünü (25 ng/µl)	1 µl
BP Clonase II enzim karışımı	0.5 µl
Toplam	2.5 µl

BP clonase enzim karışımı buz üzerinde hazırlandı. Giriş vektörü ve PCR ürünü karışımın üzerine eklendikten sonra hazırlanan tüp 25°C'de 1.5 saat inkübe edildi. Süre sonunda her bir örneğe 0.35 µl Proteinaz K eklenerek 37°C'de 10 dakika daha inkübe edildi ve reaksiyon sonlandırıldı. Oluşturulan giriş vektörleri *E.coli* DH5α suşuna transforme edildi (*Bkz. Başlık: 5.2.7.*). Transformasyon ürünü 50 µg/ml Kanamisin içeren LB agar besiyerinde, 37°C'de bir gece büyütüldü. Büyüyen kolonilerden üçü seçilerek Kanamisin içeren LB sıvı besiyerine aktarıldı ve bir gece büyüyen bakteri kültüründen 5 ml kullanılarak plazmid izolasyonu yapıldı (*Bkz. Başlık 5.2.8.2.*). Elde edilen plazmidler agaroz jelde kontrol edildi. Beklenen boyuttaki plazmidlerin

doğruluğu ve oryantasyonu Sanger DNA dizi analizi ile kontrol edildi (*Bkz. Başlık 5.2.6.*). Dizileri doğrulanan plazmidler etiketlendi ve -20 °C'ye kaldırıldı. Sıvı kültürlerden bakterilerin gliserol stokları oluşturuldu ve -80°C'ye kaldırıldı (106).

5.2.5. PRPF3 Domainlerine Ait Ekspresyon Vektörlerinin Oluşturulması

PRPF3'ün domainlerine ait giriş vektörleri oluşturulduktan sonra, her bir domain GST etiketleyen pDEST27 memeli ve pGEX-KG/DEST bakteri ekspresyon vektörlerine Gateway LR clonase enzim karışımı kullanılarak aktarıldı (105, 106).

LeftRight (LR) Rekombinasyon Reaksiyonu

Giriş vektörü (25 ng/μl)	1 μl
Destinasyon vektörü (25 ng/μl)	1 μl
LR Clonase II enzim karışımı	0.5 μl
Toplam	2.5 μl

LR clonase enzim karışımı buz üzerinde hazırlandı. Giriş vektörü ve destinasyon vektörü karışımın üzerine eklendikten sonra hazırlan tüp 25°C'de 1.5 saat inkübe edildi. Süre sonunda her bir örneğe 0.35 μl Proteinaz K eklenerek 37°C'de 10 dakika daha inkübe edilerek reaksiyon sonlandırıldı. Oluşturulan ekspresyon vektörleri *E.coli* DH5α suşuna transforme edildi (*Bkz. Başlık: 5.2.7.*) Transformasyon ürünü 100 μg/ml Ampisilin içeren LB agar besiyerinde, 37°C'de bir gece büyütüldü. Büyüyen kolonilerden üçü seçilerek Ampisilin içeren LB sıvı besiyerine aktarıldı ve bir gece büyüyen bakteri kültüründen 5 ml kullanılarak plazmid izolasyonu yapıldı (*Bkz. Başlık 5.2.7.1 ya da 5.2.7.2.*). Elde edilen plazmidler agaroz jelde kontrol edildi. Beklenen boyuttaki plazmidlerin doğruluğu ve oryantasyonu Sanger DNA dizi analizi ile kontrol edildi (*Bkz. Başlık 5.2.6.*). Dizileri doğrulanan plazmidler etiketlendi ve -20 °C'ye kaldırıldı. Sıvı kültürlerden bakterilerin gliserol stokları oluşturuldu ve -80°C'ye kaldırıldı (106).

5.2.6. Çalışmada Kullanılacak Plazmidlerin Dizilenmesi

Çalışmada kullanılan giriş ve ekspresyon vektörleri boyutlarına göre %0.8-1'lik agaroz jelde, 3.2 kb ve 200 ng/ul konsantrasyondaki pGEM vektörüyle (2 µl/kuyu) birlikte yürütüldü. Her bir dizileme reaksiyonuna konulacak kalıp DNA miktarı, referans plazmide göre 400-800 ng arasında olacak şekilde ayarlandı. Döngüsel dizileme reaksiyonu, BigDye® Terminatör v3.1 Cycle Sequencing kitinin önerdiği şekilde aşağıdaki gibi gerçekleştirildi. Dizileme her bir domain için belirlenen dizileme primerleri kullanılarak gerçekleştirildi (Tablo 5) (107).

<u>Dizileme PCR Karışımı</u>	<u>1X</u>
BigDye	1 µl
5X Buffer	1.5 µl
İleri ya da Geri Primer (10 pmol/µl)	0.32 µl
Kalıp Vektör (400-800 ng/ul)	1,5 µl
dH ₂ O	5,68 µl
Toplam	10 µl

Döngüsel dizileme reaksiyonu, Applied Biosystems 9700 Thermocycler cihazında gerçekleştirildi. PCR koşulları; başlangıç denatürasyonu 96°C'de 2 dakika, denatürasyon 25 döngü olmak üzere 96°C'de 15 saniye, bağlanma 50°C'de 20 saniye, sentez 60°C'de 2 dakika olarak ayarlandı.

Dizileme sonucunda elde edilen PCR ürünleri Sephadex®G-50 boncuklarından geçirilerek saflaştırıldı. PCR ürünleri 96 kuyulu platelere transfer edilerek ABI 3130 genetik analiz cihazına yüklendi ve dizileme işlemi gerçekleştirildi. Dizileme sonuçları Chromas 2.32 ve SeqScape® software v2.5 programları ile analiz edildi. Elde edilen veriler Human Genome Browser'dan alınan referans *PRPF3* dizisi ile karşılaştırıldı. Oluşturulan ekspresyon vektörleri -20°C'de saklandı (Tablo 6).

Tablo 5. PRPF3 domainleri ekspresyon vektörlerinin dizileme primerleri

Primer No	Primer Dizisi (5'-3')	Primer Adı
1261	ggggacaagttgtacaaaaagcaggcttcattggcactgtcaagaggagc	PRPF3_GW_attB1
1262	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtctcatcaatcaggacttaacacagattcac	PRPF3_GW_attB2_ws
1271	TCTAGCAGTGACAGGAGCAG	PRPF3_F1
1272	ACCTCTGGCTCTTCTTCCAC	PRPF3_R1
1273	ACTGCAAGCTCGAATCCAAG	PRPF3_F2
1274	AAGGTAGAAGCCCACGTCAG	PRPF3_F3
1275	TTCTGCTGTGAGTTTTCGGG	PRPF3_R2
1307	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtctcattaggattccatgtctctgatggc	PRPF3_PWI_R
1308	ggggacaagttgtacaaaaagcaggcttcattggcattccaagtctagcagt	PRPF3_PRPF_F
1309	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtctcattatgtgtacccctgtgaaatg	PRPF3_PRPF_R
1310	ggggacaagttgtacaaaaagcaggcttcattggcagacagagaaaggtcaag	PRPF3_DUF1115_F
1311	TCTTGTTGAACATCCAGCCAG	PRPF3_PRPF3_Seq_F
1335	ggggacaagttgtacaaaaagcaggcttcctaaaggaaaagccatcagaag	PRPF3_PRPF_F2

Klonlama primerlerinde bakteriyofaj lamda (λ) rekombinasyon bölgesine ait attB dizileri normal, gene özgü kısımlar koyu tonda gösterildi. Başlama kodonu (atg) ve stop kodonları (tca, tta) koyu ve altı çizili gösterildi. ws: N-terminale etiket ekleyen ekspresyon vektörlerinin oluşturulmasında kullanılan ve stop kodonu taşıyan primer. Forward (F): İleri primer, Reverse (R): Geri primer.

Tablo 6. Çalışmada kullanılan memeli ve bakteri ekspresyon vektörlerine ait bilgiler

Hedef Organzima	Varış Vektörü	Klonlanan Gen	Sentezlenen Proteinlerin Moleküler Ağırlıkları
Memeli	3xFLAG-p3xFLAG-CMV/DEST	CCDC84-Wt	42 kDa
Memeli	3xFLAG-p3xFLAG-CMV/DEST	CCDC84-Mut	37 kDa
Memeli	pcDNA3Myc/DEST	CCDC84-Wt	40 kDa
Memeli	pcDNA3Myc/DEST	CCDC84-Mut	34 kDa
Memeli	pcDNA-3Myc-DEST	PRPF3	80 kDa
Memeli	pDEST27-GST	GST	25 kDa
Memeli	pDEST27-GST	CCDC84-Wt	65 kDa
Memeli	pDEST27-GST	CCDC84-Mut	60 kDa
Memeli	pDEST27-GST	PRPF3	106 kDa
Memeli	pDEST27-GST	PWI	62.6 kDa
Memeli	pDEST27-GST	PRP3 (77-543)	79.6 kDa
Memeli	pDEST27-GST	DUF1115	43.9 kDa
Bakteri	pGEX-KG-DEST-GST	GST	25 kDa
Bakteri	pGEX-KG-DEST-GST	CCDC84-Wt	65 kDa
Bakteri	pGEX-KG-DEST-GST	CCDC84-Mut	60 kDa
Bakteri	pGEX-KG-DEST-GST	PRP3 (77-543)	78.5 kDa
Bakteri	pGEX-KG-DEST-GST	PRP3 (292-543)	53.6 kDa
Bakteri	pDEST14-Native	PRPF3	78 kDa
Bakteri	pDEST17-6xHis	CCDC84-Wt	40 kDa

5.2.7. *E. coli* Transformasyonu

Rekombinant plazmidler Inoue yöntemiyle kompetan hale getirilen *E.coli DH5α* suşuna aşağıda verdiği şekilde ısı şoku ile transforme edildi (108).

1. *E.coli DH5α* suşu -80°C'den çıkarılarak buz üzerinde çözündü.
2. 0.05 µg/µl plazmid 50 µl *DH5α* suşuna pipetle eklendi ve 5 dakikada bir hafifçe karıştırılacak şekilde 30 dakika buz üzerinde bekletildi.
3. Süre sonunda, 42°C'de 30-45 saniye ısı şokuna maruz bırakıldı ve buz üzerine kaldırılarak 2 dakika buz üzerinde bekletildi.
4. Bakterilerin üzerine 1 ml antibiyotiksiz LB besiyeri eklendi ve 37°C çalkalamalı inkübatörde 250 rpm hızda 1 saat inkübe edildi.
5. Süre sonunda bakteriler 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet üzerine 1 ml LB besiyeri eklenerek tekrar 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
6. Süpernatant uzaklaştırılarak bakteri pelleti üzerine 150 µl LB eklenerek pipet ile iyice karıştırıldı ve 100 µl'si uygun antibiyotiği içeren (50 µg/ml kanamisin ya da 100 µg/ml ampicilin) LB-Agar katı besiyerine yayıldı ve 37°C'deki bir gece büyümeye bırakıldı.

5.2.8. Plazmid İzolasyonu

Transformasyon sonrası petride büyüyen kolonilerden üç adet seçilerek antibiyotikli sıvı 6 ml LB besi yerine inoküle edildi ve 37°C çalkalayıcı inkübatörde 200 rpm'de bir gece büyütüldü. Büyütülen bakterilerden 4-5 ml alınarak plazmid izolasyonu gerçekleştirildi. Bakteri kaynaklı endotoksinler memeli hücreleri için toksik etki gösterdiğinden memeli hücrelerine transfekte edilecek ekspresyon vektörleri endotoksinleri uzaklaştıracak şekilde izole edilirken, bakterilere transforme etmek üzere izole edilen plazmidler standart yöntemle izole edildi (109, 110).

5.2.8.1. Endotoksin İçermeyen Plazmid İzolasyonu

Memeli hücrelerine transfekte edilecek ekspresyon plazmidlerinin izolasyonu E.Z.N.A.® Endo-free Plasmid DNA Mini Kit (Omegabiotek, D6950-01) kullanılarak üretici firmanın önerisi doğrultusunda aşağıdaki şekilde oda sıcaklığında gerçekleştirildi. Kit içerisinde bulunan N3 solüsyonu izolasyon öncesinde buz üzerine alındı. Gece boyu 37°C'de 250 rpm'de çalkalanmaya bırakılan sıvı kültürlerin

spektrofotometrede OD₆₀₀ değerleri ölçüldü. OD₆₀₀ değerleri 2.0-3.0 arasında olan kültürden 4.5 ml alınarak ependorf tüplere transfer edildi. Hücreler 10 000 g'de 1 dakika santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet üzerine 250 µl Solüsyon I/RNase A (10mg/ul) eklenerek pipetaj ve vortex yardımı ile pelletin tamamen süspanse hale getirilerek parçalanması sağlandı. Karışıma solüsyon II'den 250 µl eklenerek tüpler 3-4 kez nazikçe alt üst edildi ve berrak bir lizat oluşması sağlandı. Lizatlar 2-3 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Bu aşamada DNA'nın kırılmasını önlemek için şiddetli çalkalamadan ve inkübasyon süresini aşmadan kaçınıldı. Süre sonunda lizatlara N3 Solüsyonundan 125 µl eklendi. Örnekler bekletilmeden 3-4 kez alt üst edilerek beyaz presipitatların oluşumu gözlemlendi. Sonrasında tüpler maksimum hızda (14 000 g) 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant yeni bir ependorf tüpe alındı ve hacmi ölçüldü. Bu esnada, 2 ml'lik DNA kolonları 100 µl 3M NaOH solüsyonu eklenerek maksimum hızda (14 000 g) 1 dakika santrifüj edilerek dengelendi. Hacmi ölçülen süpernatant üzerine 1:1 oranda ETR Binding Solüsyonu eklendi ve tüp 10 kere alt üst edildi. Elde edilen sıvı karışımdan 500 µl alınarak kolonlara transfer edildi ve maksimum hızda (14 000 g) 1 dakika santrifüj edildi. Flowthrough kısmı atıldı. Bu işlem tüm sıvı karışım kolondan geçirilene kadar tekrarlandı. Kolona tutturulan plazmid üzerinden 500 µl ETR Wash Solüsyonu geçirilerek maksimum hızda (14 000 g) oda sıcaklığında 1 dakika santrifüj edildi. 500 µl HBC Solüsyonu kolonlardan geçirilerek maksimum hızda (14 000 g) oda sıcaklığında 1 dakika santrifüj edildi. Filtre edilen kısım atıldı ve 700 µl DNA Wash solüsyonu (%70 Etanol) kolonlardan eklenerek maksimum hızda (14 000 g) oda sıcaklığında 1 dakika santrifüj edildi. Bu işlem 2 kere uygulandı. Kolonlar, rezidüel alkolü uzaklaştırmak amacıyla maksimum hızda (14 000 g) 2 dakika santrifüj edildi. Kolonlar temiz tüplere transfer edilerek üzerlerine endotoksin içermeyen elüsyon solüsyonundan 50-100 µl eklendi ve 1 dakika inkübe edildi. Kolonlar maksimum hızda (14 000 g) oda sıcaklığında 1 dakika santrifüj edildi. Elde edilen plazmidlerden 2 µl alınarak %0.8'lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edildi. Plazmidlerin konsantrasyonu Nanodrop cihazında ölçülerek kullanılabilecek kadar -20°C'de saklandı.

5.2.8.2. Standart Plazmid İzolasyonu

In vitro pull down deneylerinde *E. coli* suşlarına transforme edilecek olan plazmidlerin eldesinde ise endotoksin arındırma işleminin yapılmadığı E.Z.N.A.® Plazmid DNA Mini Kit I (Omegabiotek, D6943-01) kullanıldı. Gece boyu 37°C'de 250

rpm’de çalkalanmaya bırakılan kültürlerin spektrofotometrede OD₆₀₀ değerleri ölçüldü. OD₆₀₀ değerleri 2.0-3.0 arasında olan kültürden 4.5 ml alınarak ependorf tüpe transfer edildi. Hücreler, 10 000 g’de 1 dakika santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet üzerine 250 µl Solüsyon I / RNaz A (10mg/ul) eklenerek pipetaj ve vortex işlemi ile tamamen süspanse hale getirilerek parçalanması sağlandı. Karışıma Solüsyon II’den 250 µl eklenerek, tüpler 3-4 kez nazıkçe alt üst edildi ve berrak bir lizat oluştu. Lizatlar 2-3 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Bu aşamada DNA’nın kırılmasını önlemek için şiddetli çalkalamadan ve inkübasyon süresine aşmadan kaçınıldı. Lizatlara 350 µl Solüsyon III eklenerek, beklemeden 4-5 kez alt-üst edilerek beyaz topaklar şeklinde presipitat oluşması sağlandı. Örnekler maksimum hızda (14 000 g) 10 dakika santrifüj edildi ve beyaz pellet oluştuğu gözlemlendi. Bu esnada, 2 ml’lik DNA kolonları 100 µl 3M NaOH solüsyonu eklenerek maksimum hızda (14 000 g) 1 dakika santrifüj edilerek dengelendi. Elde edilen süpernatanın tamamı dengelenen kolnlara alınarak maksimum hızda santrifüj edildi. Kolon üzerine 500 µl HBC solüsyonu eklendi. Sonrasında kolonlar maksimum hızda (14 000 g) 1 dakika santrifüj edildi. Filtre edilen kısım atıldı ve 700 µl DNA Wash solüsyonu (%70 Etanol) kolonlardan geçirilerek maksimum hızda (14 000 g) 1 dakika santrifüj edildi. Bu işlem iki kere yapıldı. Kolonlar, alkol kalıntılarını uzaklaştırmak için maksimum hızda (14 000 g) 2 dakika santrifüj edildi. Kolonlar temiz tüplere transfer edilerek üzerlerine 50-100 µl elüsyon solüsyonu eklendi ve 1 dakika inkübe edildi ve sonrasında tüpler maksimum hızda (14 000 g) 1 dakika santrifüj edildi. Elde edilen plazmidlerden 2 µl alınarak %0.8’lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edildi ve konsantrasyonları Nanodrop cihazında ölçülerek kullanılabilecek kadar -20°C’de saklandı.

5.2.9. Hücre Kültürü

Çalışmamızda protein ekspresyonu, immunoblot ve immünopresipitasyon deneylerinde insan embriyonik böbrek hücreleri olan HEK293 (ATCC® CRL-1573™), HEK293 FlpIn ve immünofloresan deneylerinde servikal kanser hücrelerinden köken alan HeLa (ATCC® CCL-2™) hücre hatları ve primer fibroblastlar kullanıldı. Tüm hücreler %1 Penisilin ve streptomycine (Pen/Strep) antibiyotiklerini ve %10 Fetal Bovin Serum (FBS) içeren DMEM (4.5 g/L Glukoz) besiyerinde 37°C’de %5 CO₂ içeren nemlendirilmiş etüvde kültüre edildi. Primer fibroblastlar için DMEM (1 g/L Glukoz) besi yeri kullanıldı (111).

5.2.10. HEK293 Hücrelerinin Kalsiyum Fosfat Yöntemi ile Transfeksiyonu

Memeli ekspresyon vektörlerinin kontrolü için, HEK293 hücrelerine memelide eksprese olan plazmidlerin transfeksiyonu kalsiyum fosfat yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi (112). Hücreler, altı kuyucuklu tabaklara (6-well) yaklaşık %30-40 konfluent olacak şekilde 1.8 ml besiyeri içine ekildi ve hücrelerin tutunması için bir gece bekletilmek üzere etüve kaldırıldı. Toplamda 1-2 µg plazmid steril su ile 20 µl'ye tamamlandı. Diğer taraftan 2.5 M CaCl₂'den 10 µl alınarak (final konsantrasyon 12.5 mM CaCl₂) 70 µl steril distile suyun içinde seyreltildi. Final hacim 100 µl olacak şekilde 20 µl DNA-su karışımına 80 µl CaCl₂-su karışımı eklendi. DNA-CaCl₂ karışımı düşük hızda vortekslenirken üstüne damla damla 100 µl 2xHEPES eklenerek, toplam hacim 200 µl'ye tamamlandı. DNA- CaCl₂-HEPES karışımı 20 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra hücrelerin üzerine damla damla eklendi ve plate hafifçe çalkalanarak etüve kaldırıldı. Altı saat sonra kuyular, %10 FBS ve antibiyotik içeren DMEM (4.5g/L glukoz) besiyeri ile tazelendi. Transfeksiyondan 27 saat sonra protein ekspresyon analizi gerçekleştirildi.

5.2.11. Memeli Hücrelerinden Protein İzolasyonu

İmmünopresipitasyon deneyi için, HEK293 FlpIn ve HEK293 FlpIn Wt ve Mutant CCDC84 kalıcı transfekte hücreleri 2x100 mm platelerde büyütülerek ilgili vektörlerle kalsiyum fosfat yöntemi ile transfekte edildi edildi (Bkz. 5.2.10) ve protein izolasyonu gerçekleştirildi (113). Transfeksiyondan 27 saat sonra protein izole edilecek plateler öncelikle buz üzerine alındı. Hücrelerin üzerindeki besiyeri dikkatlice çekildikten sonra soğuk PBS ile yıkandı. Hücrelerin üzerine 1xTNTE patlatma tamponu eklendikten sonra 30 dakika boyunca orbital çalkalayıcı üzerinde bekletildi. Süre sonunda hücreler kazıyıcı ile zeminden kaldırılarak temiz ependorf tüplere toplandı. Genomik DNA'nın parçalanması için %50 genlikte (amplitude) beş döngü sonikasyon (8 saniye puls, 30 saniye bekleme) gerçekleştirildi. Sonike edilen örnekler 4°C'de 13 000 g'de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında, süpernatantlar temiz ependorf tüplere aktarıldı ve analiz edilmek üzere kullanıldı. Daha sonra kullanılacak protein - 20°C'ye kaldırıldı. IP işlemine başlamadan önce, her bir genin eksprese olup olmadığını

kontrol etmeye olanak sağlayacak olan total protein analizi için 1 ml hücre lizatından 80 µl ayrıldı.

5.2.12. Anti-FLAG M2 Bağlı Boncukların Hazırlanması

İmmünopresipitasyon işlemi ANTI-FLAG® M2 Affinity Gel (A220-Sigma) kullanılarak üretici firmanın önerisi doğrultusunda gerçekleştirildi. ANTI-FLAG boncukların dengelenmesi 2-8 °C'de yapıldı. Dengelenmenin yapılacağı tüp TBS (pH 7.4) ile yıkandı. Dengelenmeni yapılacağı tüpün içine her 40 µl rezin süspansiyonu için 0.5 ml TBS'den az olmayacak şekilde 150 µl rezin süspansiyonu için 5 ml TBS konuldu. Stok rezin alt-üst edilerek iyice homojen hale getirildikten sonra her 1 ml lizat için 40 µl süspansiyon (20 µl rezin) olacak şekilde 1 ml TBS konulmuş tüplere aktarıldı. Boncukların transferinde kullanılan pipet TBS ile yıkandıktan sonra rezin 1000 g'de 1 dakika santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı. Bu şekilde rezin 3 kere yıkanarak gliserol uzaklaştırıldı. Ardından boncuklar 2 kere 1 ml 0.1 M Glycine-HCL (pH 3.5) ile 20 dakika içinde yıkanarak serbest antikörler uzaklaştırıldı. Sonrasında rezin 5 kere TBS ile yıkandı. Son yıkamadan sonra rezin miktarı kadar TBS eklenerek boncuklar süspansiyon haline getirildi ve 24 saat içinde kullanıldı (114).

5.2.13. İzole Edilen Proteinin Ön Temizliği (Pre-clearing)

Her bir örnek için 40 µl Mouse IgG kontrol agaroz rezin (A0919, Sigma) süspansiyonu (20 µl saf boncuk) daha önce 1ml soğuk TBS konulmuş ependorf tüplere alındı. Transferde kullanılan pipet TBS ile yıkandıktan sonra, rezin 1000 g'de 1 dakika santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı. Sonrasında rezin 5 kere 5 ml TBS ile yıkanarak gliserol uzaklaştırıldı. Ardından boncuklar bir kere de Liziz solüsyonu ile yıkandı. Her bir 1 ml lizat üzerine 'pre-clearing' için 20 µl Protein G bağlı sepharose beads konuldu ve ependorflar parafin ile sarılarak +4 °C de, dönen çember üzerinde 1 saat, 10 rpm'de döndürüldü. İnkübasyon sonrasında lizatlar 1.000 g de 1 dakika santrifüj edildi ve boncuklar kaldırılmadan, temizlenen lizat yeni bir ependorf tüpe alındı (114).

5.2.14. Anti-FLAG İmmünpresipitasyon Yöntemi

Protein lizatı, her bir koşul için 20 µl saf boncuk kullanılacak şekilde dengelenen Anti-FLAG M2 boncuklar ile 4 °C'de 1 saat 10 rpm'de dönen çember üzerinde karıştırılarak inkübe edildi. İnkübasyon sonrası tüpler 500 g'de 1 dakika olacak şekilde

santrifüj edildi. Rezinin tamamen dibe çökmesi için 1-2 dakika beklendi. Tüplerdeki süpernatanın tamamı başka bir tüpe alınarak -20 °C’de saklandı. Rezinin üzerine yıkama tamponu eklendi ve ucu kesilmiş bir pipet ucu ile kolonlara aktarıldı. Tüpe ikinci kere yıkama tamponu eklenerek geride kalan rezin de kolona aktarıldı. Kolonun tepesine bir enjektör yerleştirilerek piston ile hafifçe basınç uygulanarak sıvının kolondan geçmesi sağlandı. Bu şekilde, nonspesifik bağlanan proteinleri uzaklaştırma için rezin, %0.1 Triton X-100 içeren yıkama tamponu ile 4 kere yıkandı. Yıkama ile rezinden uzaklaştırılan proteinin miktarı Nanodrop cihazında 280 nm dalga boyunda absorbans değeri okunarak takip edildi. Yıkama solüsyonu (blank) ile akan solüsyon arasındaki fark 0.05’e düşene kadar yıkamaya devam edildi. Son aşamada kolonlar 1 000 g’de 1 dakika santrifüj edilerek yıkama solüsyonu iyice uzaklaştırıldı (114).

5.2.15. Elüsyon

İşlem oda sıcaklığında yapıldı. 40 µl rezin üzerine 15 µl 0.1 M Glycine-HCl, (pH 2.5) eklendi ve 1000 g’de 1 dakika santrifüj edilerek temiz bir eppendorf tüpe toplandı. Rezin üzerine 75 µl 0.2 M Glisin-HCl (pH 2.5) eklendi ve örnek hafifçe karıştırılarak oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. Örnek 1000 g’de 1 dakika santrifüj edildi ve protein temiz eppendorf tüpe toplandı. Toplanan protein üzerine 10 µl 150 mM NaCl içeren 0.5 M Tris-HCl, (pH 7.4) solüsyonu eklendi. Elde edilen proteinin absorbansı 280 nm dalga boyunda okundu ve immunoblot için elüsyondan 5 µl ayrılarak -80°C’de saklandı. Geride kalan örnek sıvı azotta hızlıca dondurularak -80’e kaldırıldı. Sonrasında ise proteini konsantre etmek için örneklerin fazla hacmi liyofilizatörde bir saat süre ile uçuruldu. Elde kalan protein üzerine 0.5 mM DTT içeren yükleme tamponu eklenerek 99°C’de 5 dakika kaynatılarak uygun konsantrasyondaki poliakrilamid jelde yürütüldü (114).

5.2.16. Bakterilerin İndüklenmesi ve Protein Lizatlarının Hazırlanması

Çalışmamızda CCDC84 ve PRPF3’ün doğrudan etkileşip etkileşmediğini ve CCDC84 mutasyonunun etkileşime etkisini belirlemek amacıyla GST-pull down deneyi gerçekleştirildi (115). Pull down deneylerinde kullanılmak üzere GST etiketli yabancı tip ve mutata CCDC84 eksprese eden vektörler ve etiketsiz PRPF3 eksprese eden vektörler *E. coli* BL21 DE3 suşlarına transforme edildi. Transforme edilen bakteriler ampisilin içeren LB agar besiyerine yayıldı. Ertesi gün seçilen koloniler ampisilin

içeren LB sıvı besiyerine aktarıldı. Bir gece boyunca 37°C’de çalkalamalı inkübatörde kalan kültürler doygunluğa ulaştıktan sonra 100 ml alt kültür yapılarak OD₆₀₀ 0.2’ye ayarlandı. Alt kültürlerin OD₆₀₀ değeri 0.4-0.6 aralığına ulaştığında 1ml kontrol kültür alındı ve santrifüj edilerek süpernatant atıldı ve pellet -80°C’de saklandı. OD₆₀₀ değeri 0.4-0.5 aralığında olan kültürler 150 µM IPTG ile indüklendi. İndükleme işlemi 19°C’de çalkalamalı inkübatörde yapıldı.

GST etiketli vektörleri taşıyan bakteriler indüklendikten 2 saat sonra, etiketsiz PRPF3 vektörü taşıyan bakteriler ise indüklendikten 4 saat sonra 50 ml’lik falkona aktarıldı ve kültürün hacmi ölçüldü. Ardından falkonlar 5 000 g’de beş dakika santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra bakteri pelleti 1 ml TBS (25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.2) ile yıkandı. Sonrasında her 5ml pellet için 200 µl TBS eklenerek pellet çözöldü ve alikotlandı. Alikotlama sonrasında pelletler santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Pelletler -80°C’de saklandı. Pull-down deneyi yapılacağı zaman, her bir protein için 5 ml kültür pelleti çıkarıldı. Pelletlere, 10 mM Tris-Cl pH 7.5, 150 mM NaCl, %0.5 NP-40, 1x PI içeren bakteri patlatma tamponu 200 µl eklendi. Örnekler buz üzerinde 20 dakika orbital çalkalayıcı üzerinde bekletildi. Patlatma sonrası bakteri lizatları, %50 amplitude 10 sn pulse 20 sn bekleme 5 döngü olacak şekilde sonike edildikten sonra yüksek devirde 15 dakika +4 °C’de santrifüj edildi. Temiz tüpe alınan 200 µl süpernatant üzerine 300 µl yıkama solüsyonu eklenerek NP-40 dilue edildi. Protein ekspresyonunun kontrolü için 50 µl hücre lizatı üzerine 10 µl 5X SDS yükleme tamponu eklendi ve analiz edilinceye kadar -20°C’de saklandı.

His-CCDC84-Wt ile GST etiketli PRPF3 domainleri arasındaki etkileşim de Pull down yöntemiyle analiz edildi. His-CCDC84, *E.coli* BL21 AI suşunda %0.2 L-Arabinos ile üç saat indüklendi. Pull down deneyinde 1.5 ml kültürden elde edilen pelletler kullanıldı.

5.2.17. Pull Down Yöntemi ile Etkileşimlerin Test Edilmesi

5.2.17.1. GST Trap Boncukları

GST-Trap_Agaroz boncukları üzerinde yer alan antijen bağlama bölgesi, *Camelidae* ailesinin üyelerinde (Ör: Alpaka, Lama ve Develer) bulunan ikicil tip antikor yapılarından elde edilmiş olup, hafif zincir taşımamaktadır. Antijen bağlama işlemi ağır zincirin V_{HH} bölgesi ile yapılmakta ve bu yapılar nanobody olarak adlandırılmaktadır.

Nanobodyler oldukça düşük konsantrasyondaki protein içeriğini bağlamaktadır. Ayrıca nanobodyler (Chromotek, sta-20), immünoiblot analizlerinde ağır ve hafif zincir antikorlarının IP elüsyonuyla birlikte gelirken aynı moleküler ağırlıktaki proteinleri maskeleyen problemi elimine etmektedir (116).

5.2.17.2. GST Trap Boncuklarının Hazırlanması

Pull Down deneylerinde Chromotek firmasından satın alınan GST-Trap_Agaroz (sta-20) boncukları kullanıldı. Her bir koşul için 1.5 ml kültürden elde edilen bakteri kullanılırken deney başına 10 µl saf boncuk kullanıldı. Her bir deneyde üç koşul bulunduğu için her bir deney için 30 µl boncuk içerecek şekilde 60 µl slurry (bulamaç) kullanıldı. Boncuklar ependorfa transfer edilirken 200 µl'lik ucu kesik pipet ucu kullanıldı. Boncuklar ependorfa aktarıldıktan sonra üzerine 1 ml 10 mM Tris-Cl pH 7.5, 150 mM NaCl içeren 1ml yıkama tamponu eklendi. Yıkama aşamasında örnekler 2500g'de 2 dakika santrifüj edildi. Yıkama işlemi 3 kez tekrarlandı. 30 µl saf boncuk üzerine 270 µl yıkama tamponu konularak, boncuk karışım üç adet ependorfa eşit hacimde (100 µl) paylaştırıldı. Ardından örnekler 2500g'de 2 dakika santrifüj edildi. Süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı ve tüpte 10 µl saf boncuk bırakıldı.

5.2.17.3. GST Pull Down

Hazırlanan her bir tüpteki 10 µl boncuk üzerine, bakterilerde ürettirilen GST etiketi, GST etiketli yabancı tip ve mutant CCDC84 protein lizatları (yem) konularak, +4°C'de 1 saat boyunca dönen çemberde 9 rpm'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında tüpler 2500g'de 2 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırıldı. Ardından GST ve GST etiketli proteinlerin bağlandığı boncuklar 10 mM Tris-Cl (pH 7.5), 300 mM NaCl, %0.1 NP-40 yıkama tamponuyla +4°C'de 5 kez 5 dakika boyunca yıkılarak boncuklara özgün olarak bağlanmayan proteinler uzaklaştırıldı. Her yıkamada boncuklar 2500g'de 2 dakika santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı. Yıkama işleminden sonra etkileşimi analiz edilecek etiketsiz PRPF3'ü (av) içeren bakteri lizatı boncukların üzerine eklenerek 1 saat boyunca +4°C'de dönen çemberde 9 rpm'de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra boncuklar, yıkama tamponu ile +4°C'de 5 kez 5 dakika boyunca yıkandı ve ucu kesik pipet ucuyla kolonlara aktarıldı. Kolonlar 2500g'de 2 dakika santrifüj edilerek yıkama tamponu uzaklaştırıldı. Elüsyon iki aşamada gerçekleştirildi. Birinci aşamada kolonlardaki boncukların üzerine 40 µl 0.2 M

Glisin-HCl, (pH 2.5) eklenerek oda sıcaklığında 4 dakika bekletildi ve 2 dakika süre ile 2500g'de santrifüj edilerek protein temiz bir tüpe toplandı ve elüsyon üzerine 1M Tris (pH 10.4) eklenerek dengelendi. İkinci aşamada, kolonda kalan boncukların üzerine, 40 µl 2XSDS yükleme tamponu eklenerek 95°C'de 10 dakika kaynatıldı ve 2500g'de 2 dakika santrifüj edilerek boncuklara bağlı kalan proteinler elüt edildi. Ardından örnekler immünoblot yöntemi ile analiz edildi (117).

5.2.18. Western Blotlama

5.2.18.1. Ayırma ve Yükleme Jelinin Hazırlanması

Çalışmada, etkileşimi aranan proteinlerin görüntülenebilmesi için ayırma jelleri ilgili proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre %7.5 ve %10 olarak belirlendi. SDS-PAGE ayırma jeli hazırlandıktan sonra (Tablo 7-8) kısa camın yaklaşık 1 cm altına gelene kadar döküldü. Ayırma jelinin hava ile temasını kesmek ve düzgün polimerleşmesini sağlamak için üzerine izopropanol eklendi ve yaklaşık 60 dakika beklendi. Sürenin sonunda öncelikle jelin üzerindeki izopropanol uzaklaştırıldı ve jelin üzeri distile su ile yıkandı. Hazırlanan yükleme jeli (Tablo 6) ayırma jelinin üzerine döküldü. 10 veya 15 kuyucuklu taraklar %70 Etanol ile silinerek temizlendi ve camlar arasına dikkatlice yerleştirildi. Polimerizasyon için yaklaşık 60 dakika beklendi (118).

Tablo 7. %5'lik yükleme jeli içeriği

İçerik	1 x (1 mm)
ddH ₂ O	3.14 ml
Acrylamid (40% acrylamid mix)	0.50 ml
0.5 M Tris-HCl pH 6.8	1.25 ml
10% SDS	0.05 ml
10% APS*	0.05 ml
TEMED	3 µL
Toplam	5 ml

*Taze hazırlanmalıdır.

Tablo 8. %7.5 ve %10'luk ayırma jeli içeriği

İçerik	%7.5 (1 mm)	%10 (1 mm)
ddH ₂ O	2.73 ml	2.43 ml
Acrylamid (40% acrylamid mix)	0.94 ml	1.25 ml
1.5 M Tris-HCl pH 8.8	1.25 ml	1.25 ml
%10 SDS	0.05 ml	0.05 ml
%10 APS*	0.05 ml	0.05 ml
TEMED	5 µL	5 µL
Toplam	5 ml	5 ml

*Taze hazırlanmalıdır.

5.2.18.2. SDS-PAGE Jel Elektroforezi

Protein lizatları -20°C buzdolabından çıkarılarak buz üzerine alındı ve çözüldü. Yükleme boyası içermeyen lizatların üzerine, 5X yükleme tamponundan son konsantrasyonu 1X olacak şekilde eklenerek 99°C'de 5 dakika kaynatıldı. Kaynatılan örnekler oda sıcaklığında hızlı santrifüj edildi. +4°C'den çıkarılan jellerin taraklar çıkarılarak kuyular distile su ile yıkandı. Jel, yükleme standı içine yerleştirildikten sonra tank içerisine konuldu. Tank yürütme tamponu ile doldurulduktan sonra ilk kuyuda 1 µl protein markır olmak üzere örneklerden 20-30 µl yüklendi. Jel 75 Volt'da 15 dakika, sonrasında 100 Volt'da 90-100 dakika yürütüldü (119).

5.2.18.3. Membrana Transfer İşlemi ve Görüntüleme

SDS-PAGE jeli yürütme tankından alındı ve iki cam arasında kalan boşluklar distile su ile yıkanarak yürütme solüsyonu uzaklaştırıldı. Spatula yardımı ile camlar birbirinden yavaş ve dikkatlice ayrıldı. Kısa cam jelin üzerinden kaldırıldıktan sonra, jelin artık kısımları (yükleme jeli, jelin örnek içermeyen kenarları) spatula ile kesilerek uzaklaştırıldı. Blotlama için dört adet ince Watmann kağıdı ve iki adet sünger yatak 1X Transfer Buffer içinde tutularak dengelendi. Blotlama kasetinin beyaz yüzüne 1 adet sünger yatak yerleştirildi. Islak Whatmann kağıtlardan ikisi, sünger yatağın üzerine düzgün bir şekilde yerleştirildi. Jele uygun büyüklükte PVDF membran kesildi ve soğuk Metanol'de 30 saniye aktive edildi. Aktive edilen membran blotlama kasetine serilen whatman kağıdının üzerine aralarında hava kabarcığı kalmayacak şekilde yerleştirildi. Jel membran üzerine yerleştirildi. Islatılmış iki Whatman kağıdı, jelin üzerine hava kabarcığı kalmayacak şekilde yerleştirildi. Son olarak sünger yatak, Whatman kağıdının üzerine koyuldu ve blotlama kaseti kapatıldı. Transfer işlemi 100 Voltta 1 saat 10

dakika (300 mA) akım verilerek gerçekleştirildi. Proteinlerin immünoiblot işlemlerinde primer ve sekonder antikorları üreten firmaların önerdiği koşullara göre dilüsyon hazırlandı (Tablo 9). Yıkama işlemlerinden sonra membran üzerine, üretici firmanın önerisi doğrultusunda hazırlanan Clarity™ Western ECL Substrate eklendi ve ChemiDoc MP Görüntüleme Sistemi (BIO-RAD) kullanılarak membranlar görüntülendi (120).

Tablo 9. Western blotlama koşulları

Jel konsantrasyonu	%7.5-%10
Membran tipi	PVDF 0.2 µm
Bloklama	%5 yağsız süt tozu içeren 1xTBST ile oda sıcaklığında 1 saat
Primer (1^o) antikorlar	Rabbit Polyclonal-Anti-GST, (Santa cruz, sc-459) 1:1000 Rabbit Polyclonal Anti-PRPF3 (Abcam, ab187535) 1:1000 Rabbit Polyclonal Anti-PRPF3 (Abcam, ab50386) 1:1000 Mouse Monoclonal Anti- FLAG (Sigma A2220) 1:1000 Rabbit Polyclonal Anti CCDC84 (Abcam, ab150860) 1:5000
1^oAntikor inkübasyonu	1xTBST içinde oda sıcaklığında 1 saat
Yıkama	1xTBST ile 4x5 dakika
Sekonder (2^o) antikorlar	Goat Anti-Rabbit IgG-HRP Goat Anti-Mouse IgG-HRP
2^o Antikor inkübasyonu	1xTBST içinde 1:8000 oranında oda sıcaklığında 1 saat
Yıkama	1xTBST ile 4x5 dakika
Görüntüleme	1 ml Clarity™ Western ECL Substrate (1:1 oranda Luminol Enhancer+Peroksit)

5.2.19. HeLa Hücrelerinde Dreamfect Yöntemi ile Transfeksiyon

İmmünofloresan analizi öncesinde HeLa hücreleri DreamFect GOLD ajanı (DG81000) ile üretici firmanın protokolü doğrultusunda CCDC84 ve PRPF3'e ait ekspresyon vektörleri ile geçici olarak transfecte edildi (121). Özetle, 6-kuyucuklu tabakların her bir kuyusuna 0,1 N HCl ile muamele edilen lameller yerleştirildi. HeLa hücreleri T25 flasktan tripsinize edilerek kaldırıldı ve sayıldı. Sayım sonucunda, yoğunluğu yaklaşık %50 olacak şekilde her bir kuyuya 1.5×10^5 hücre ekilerek son hacim %10 FBS ve antibiyotik içeren DMEM (4.5 g/L Glukoz) ile 2 ml'ye tamamlandı. Ertesi gün, transfeksiyon işlemi öncesinde hücrelerin besiyerleri değiştirilerek serumsuz ve antibiyotiksiz 1.8 ml DMEM (4.5 g/L glukoz) besiyeri konuldu. Transfeksiyondan 30 dakika önce DreamFect Gold ajanı -20°C'den çıkarılarak oda sıcaklığına gelmesi sağlandı ve kullanımdan önce çok hafif vortekslendi. DreamFect GOLD ve DNA karışımları ayrı ayrı hazırlandı ve DNA karışımı DreamFect GOLD karışımına eklendi.

Karışım 1: 1.5 µg vektör DNA, DMEM ile 100 µl'ye tamamlandı (En geç 5 dak içinde kullanıldı).

Karışım 2: 6 µl DreamFect Gold (1:4 DNA:Ajan oranında) DMEM ile 100 µl'ye tamamlandı.

Karışım 3: Karışım 1, Karışım 2'nin üzerine eklenerek 2-3 kez yavaşça pipetlendi ve 15-20 dakika oda sıcaklığında (21-22 °C) inkübe edildi.

Karışım 3, %50 yoğunlukta olan ve üzerinde 1.8 ml DMEM besi yeri olan kuyuya damla damla dağıtıldı. Transfeksiyondan 24 saat sonra kuyular iki kez PBS ile yıkandı ve İmmünofloresan protokolü uygulandı.

5.2.20. İmmünofloresan Yöntemi

HeLa hücrelerinde gerek endojen, gerekse transfeksiyon sonrasında aşırı eksprese edilen proteinlerin görüntülenmesi için immünofloresan yaklaşımı kullanıldı (122). Özetle, 6 kuyucuklu tabaklara yerleştirilen lamellere ekilen hücrelerin besiyeri aspire edildi. Lameller 2 kez PBS ile yıkandı. Fiksasyon için kuyulara taze hazırlanmış 1 ml %4 PFA eklenerek 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Sonrasında kuyular 8 kez PPS ile yıkandı. Permeabilizasyon için, kuyulara PBS içerisinde hazırlanan %0.2 Triton X-100'den 1ml konularak 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Ardından, kuyular 5 kez PBS ile yıkandı. Yıkama sonrasında lameller 1.5 ml bloklama solüsyonu (PBS+%10 FBS) ile bir saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Primer antikör önerilen dilüsyonda bloklama solüsyonu içerisinde hazırlandı (Tablo 10). Ardından lameller parafilm üzerine damlatılan 125 µl antikör üzerine kapatılarak bir Tablo 10'da belirtilen koşullara göre inkübe edildi. İnkübasyon bitiminde kuyular 8 kez PBS ile yıkandı. Sekonder antikör ilgili dilüsyonda bloklama solüsyonu içerisinde hazırlandı (Tablo 10). Lameller, 125 µl sekonder antikör üzerine kapatılarak 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Kuyular 8 kez PBS ile yıkandı. Son olarak, lamalar %70 Etil Alkol ile silinerek temizlendi. DABCO-DAPI kapatma solüsyonundan her bir lamel için lamaların üzerine bir damla damlatıldı. Ardından hücrelerin olduğu lamel yüzeyi lamine üzerindeki DABCO solüsyonuna kapatıldı ve karanlıkta kurumaya bırakıldı. Preparat kuruduktan sonra kenarları sabitlendi ve floresan mikroskopunda analiz edildi.

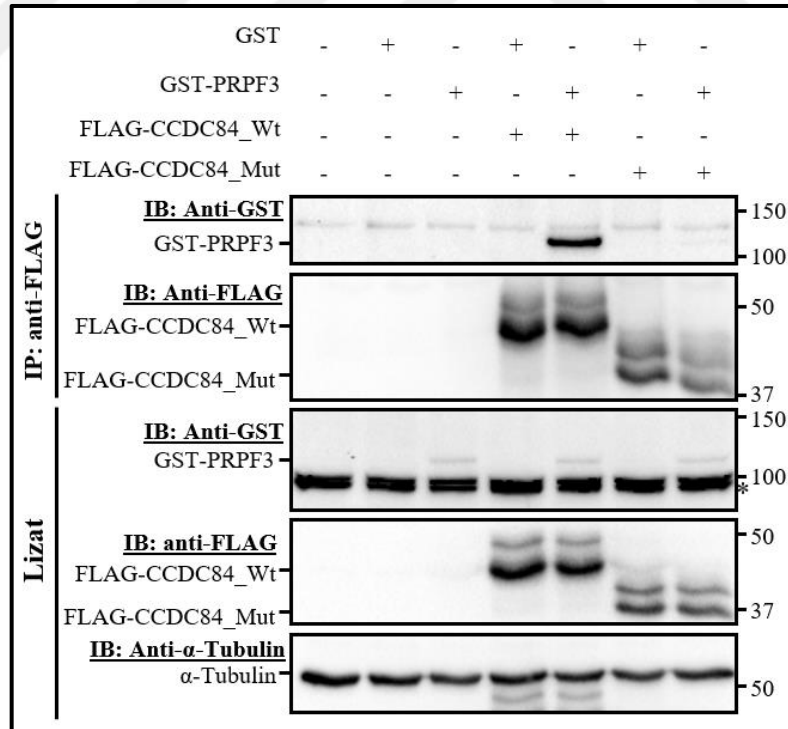
Tablo 10. İmmünofloresan koşulları

Fiksasyon	%4 Paraformaldehit oda sıcaklığında 10 dakika
Permeabilizasyon	%0,2 Triton-X-100 (PBS içinde) oda sıcaklığında 5 dakika
Bloklama	%10 Fetal Bovin Serum (PBS içinde)
Primer (1⁰) antikorlar	Rabbit Polyclonal-Anti-GST, (Santa cruz, sc-459) 1:1000 Mouse Monoclonal Anti- Myc 9E10 (Sigma M4439) 1:1000 Goat Polyclonal Anti CCDC84 (Santa Cruz , sc246197) 1:250 Rabbit Polyclonal Anti-PRPF3 (Abcam, ab187535) 1:250
1⁰Antikor inkübasyonu	Bloklama solüsyonunda hazırlanır. Oda sıcaklığında etiketli proteinler için 1 saat / +4 ⁰ C’de endojen proteinler için 16 saat
Yıkama	PBS ile 8 kez
Sekonder (2⁰) antikorlar	Donkey Anti-Goat IgG H&L (Cy3) (ab6949), 1:1000 Donkey Anti-Rabbit IgG H&L (AF 488) (ab150061), 1:1000 Goat-Anti-Mouse IgG H&L (Cy3) (ab97035)1:1000 Goat-Anti- Mouse IgG H&L (AF488) (ab150117)1:1000 Goat-Anti-Rabbit IgG H&L (Cy3) (ab6939) 1:1000
2⁰ Antikor inkübasyonu	Oda sıcaklığında Bloklama solüsyonunda 1 saat
Yıkama	PBS ile 8 kez
Kapatma Medyumu	Prolong GOLD Antifade Mounting Media DAPI

6. BULGULAR

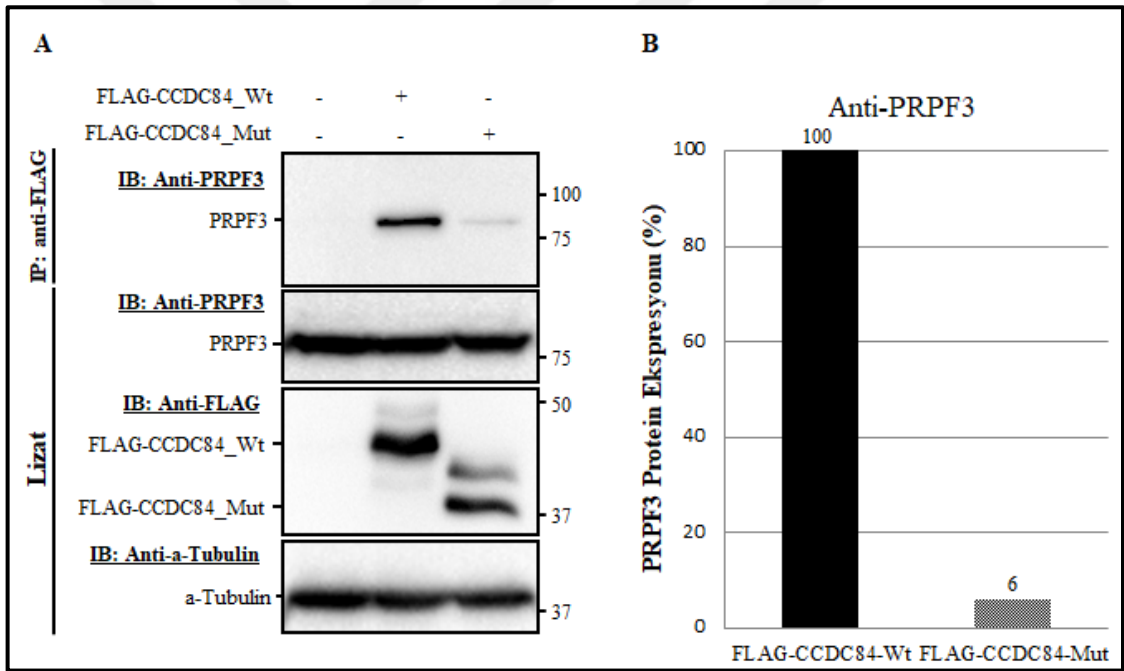
6.1. CCDC84 ile PRPF3 Arasındaki Etkileşiminin İmmünopresipitasyon Yöntemi ile Doğrulanması

Afinite pürifikasyon-kütle spektrometrisi (AP-MS) yaklaşımı ile tespit edilen CCDC84-PRPF3 etkileşimini doğrulamak ve CCDC84 mutasyonunun etkileşime etkisini belirlemek amacıyla, CCDC84'ün yabanıl (Wt) ve mutant formunun (Mut) Flag etiketiyle kalıcı olarak transfekte edildiği HEK293-FlpIn hücreleri, daha önce laboratuvarımızda klonlanmış olan GST-PRPF3 ile geçici transfekte edildi. Transfeksiyon sonrasında Anti-FLAG M2 boncuklarıyla immünopresipitasyon yapılarak CCDC84 ve etkileştiği proteinler çekildi. Anti-FLAG (A2220) ve Anti-GST (sc-459) antikorlarıyla yapılan immünoiblot analizleri sonucunda FLAG-CCDC84-Wt'nin GST etiketli PRPF3 ile güçlü ve özgün bir şekilde etkileştiği görüldü. Buna karşın, FLAG-CCDC84-Mut ile PRPF3 arasındaki etkileşimin belirgin bir şekilde azaldığı görüldü (Resim 6).



Resim 6. PRPF3 ile CCDC84 etkileşiminin HEK293 hücrelerinde immünopresipitasyon ile gösterilmesi. HEK293 hücrelerinde Flag etiketli yabanıl ve mutant CCDC84 ile GST etiketli PRPF3 fazladan eksprese ettirilerek gerçekleştirilen immünopresipitasyonu sonrasında membranlar Anti-FLAG, Anti-GST ve Anti-α-Tubulin antikorları ile görüntülendi. IP: İmmünopresipitasyon, IB: İmmünoiblot. *: spesifik olmayan bant

CCDC84 ile PRPF3 etkileşimin doğrulanmasının amaçlandığı *in vivo* ko-immünopresipitasyon yaklaşımı ile FLAG-CCDC84-Wt ve FLAG-CCDC84-Mut ile kalıcı transfecte edilmiş HEK293 FlpIn hücrelerinde transfeksiyon basamağı ortadan kaldırılarak Anti-FLAG boncuklarla yeni bir immünopresipitasyon yapıldı. Ardından SDS-PAGE’de yürütülen elüsyonlar anti-PRPF3 (ab187535) antikoru kullanılarak immünoblot analizi ile endojen PRPF3 değerlendirildi. FLAG-CCDC84-WT ile endojen PRPF3’ün etkileştiği, CCDC84’ün C- terminalindeki 63 aminoasitlik delesyonun bu etkileşimi belirgin bir şekilde azalttığı gözlemlendi (Resim 7A). ChemiDoc MP görüntüleme sistemi üzerindeki “Image Lab” yazılımı kullanarak yaptığımız kantitasyon analizi sonucunda, CCDC84 üzerindeki mutasyonun etkileşimi %94 oranında azalttığı belirlendi (Resim 7B).



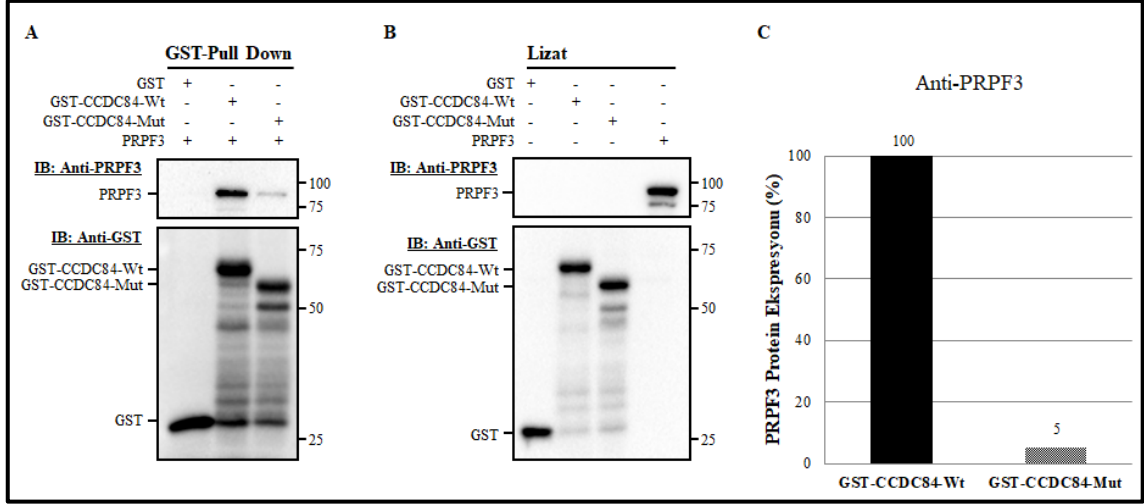
Resim 7. CCDC84 üzerinde tanımlanan mutasyonun PRPF3 ile etkileşim üzerine etkisi. A) Flag etiketli CCDC84-Wt ve CCDC84-Mut ile endojen PRPF3 arasındaki etkileşimin HEK293 hücrelerinde immünopresipitasyon ile gösterilmesi. B) PRPF3 ekspresyonunun kantitatif analizi. IP: İmmünopresipitasyon, IB: İmmünoblot

6.2. CCDC84-PRPF3 Etkileşiminin *Pull Down* ile Araştırılması

CCDC84 ile PRPF3 arasındaki etkileşimi belirlemeye yönelik olarak yapılan immünopresipitasyon çalışmalarında insan embriyonik böbrek hücre hattı olan HEK293 hücreleri kullanıldı. *In vivo* koşullarda gerçekleştirilen bu çalışma, CCDC84 ile PRPF3 arasındaki etkileşimin doğrudan olup olmadığı hakkında bilgi vermemektedir (123). CCDC84 ile PRPF3 arasındaki etkileşimin doğrudan olup olmadığını belirlemek üzere bu etkileşim bir kez de *in-vitro* koşullarda sorgulandı.

Bu amaçla ilk aşamada, etkileşimi sorgulanacak olan CCDC84-Wt ve CCDC84-Mut genlerini taşıyan giriş vektörleri kullanılarak, homolog rekombinasyona dayalı Gateway klonlama stratejisi ile GST etiketleyen pGEX-KG/DEST bakteri ekspresyon vektörleri oluşturuldu. PRPF3 geni ise eksprese ettiği proteine herhangi bir etiket eklemeyen ve proteini doğal hali ile eksprese eden pDEST14 bakteri ekspresyon vektörüne aynı yaklaşımla klonlandı. Tüm vektörler, ayrı ayrı BL21-DE3 *E. Coli* suşuna transforme edildikten sonra IPTG ile indüklenerek eksprese ettirildi. İki saat süre ile 18 °C’de indüklenen bakterilerden 5 ml alınarak TNTE buffer ile patlatıldı ve protein izolasyonu gerçekleştirildi. Ardından, GST-Trap_A (Chromotek, sta-20) boncuklarının üzerinden öncelikle GST etiketli CCDC84-Wt ve GST-CCDC84-Mut proteinlerini içeren bakteri lizatları (yem) geçirildi. Sonrasında bu boncukların üzerinden pDEST14 vektöründe dört saat eksprese ettirilen etiketsiz PRPF3 proteini içeren 5 ml bakteri kültüründen elde edilen lizat (av) geçirildi.

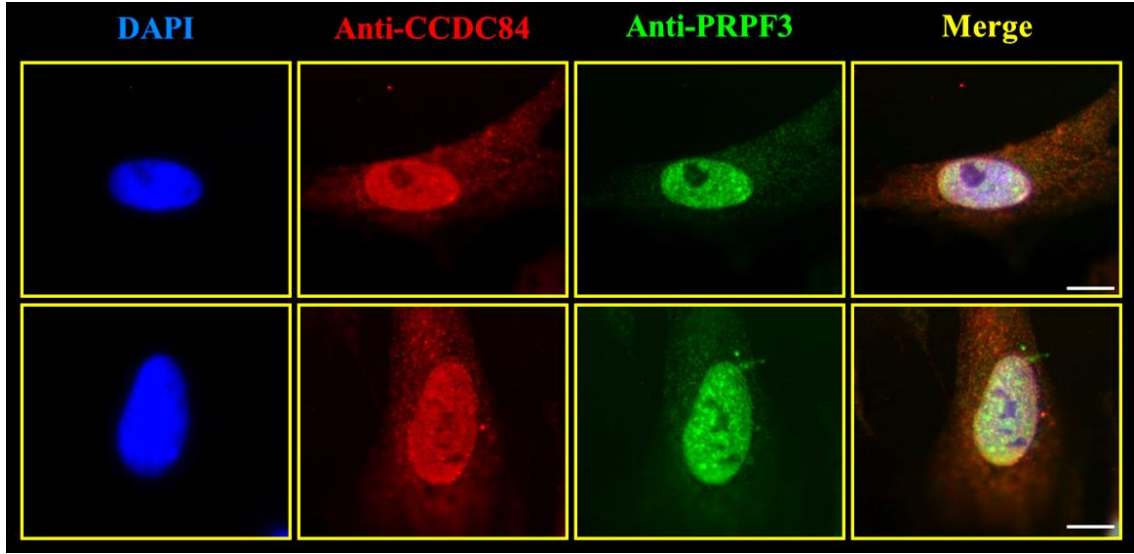
Boncuklar yıkandıktan sonra 2xSDS yükleme tamponu ile boncuklardan kopartılan proteinler SDS-PAGE’de yürütülerek ayrıştırıldı. PRPF3 proteini anti-PRPF3 (ab50386) antikoru, GST etiketli CCDC84 ise anti-GST (sc-459) antikoru kullanılarak immünoblot yöntemiyle analiz edildi. *In vitro* koşullarda gerçekleştirilen bu GST Pull-Down yaklaşımı sonucunda CCDC84’ün PRPF3 ile doğrudan etkileşim içerisinde olduğu görülürken CCDC84 üzerinde tanımlanmış olan 63 amino asitlik delesyonun bu etkileşimi belirgin bir şekilde azalttığı görüldü (Resim 8A-B). Image Lab yazılımı kullanarak yapılan kantitasyon analizi sonucunda CCDC84 üzerinde tanımlanan 63 amino asitlik delesyonun CCDC84 ile PRPF3 arasındaki doğrudan etkileşimi %95 oranında azalttığı belirlendi (Resim 8C).



Resim 8. CCDC84 ile PRPF3 arasındaki in-vitro etkileşimin GST-pull down yaklaşımı ile belirlenmesi ve CCDC84 üzerinde tanımlanmış mutasyonun etkileşime etkisinin analizi. A) Pull-down resimleri. B) Proteinlerin ekspresyon düzeyleri. C) PRPF3 ekspresyonunun kantitatif analizi. CCDC84_Wt: yabancıl tip CCDC84, CCDC84_Mut: Mutant CCDC84, IB: İmmünoiblot

6.3. CCDC84 ile PRPF3'ün Hücre İçi Birlikte Lokalizasyonlarının Araştırılması

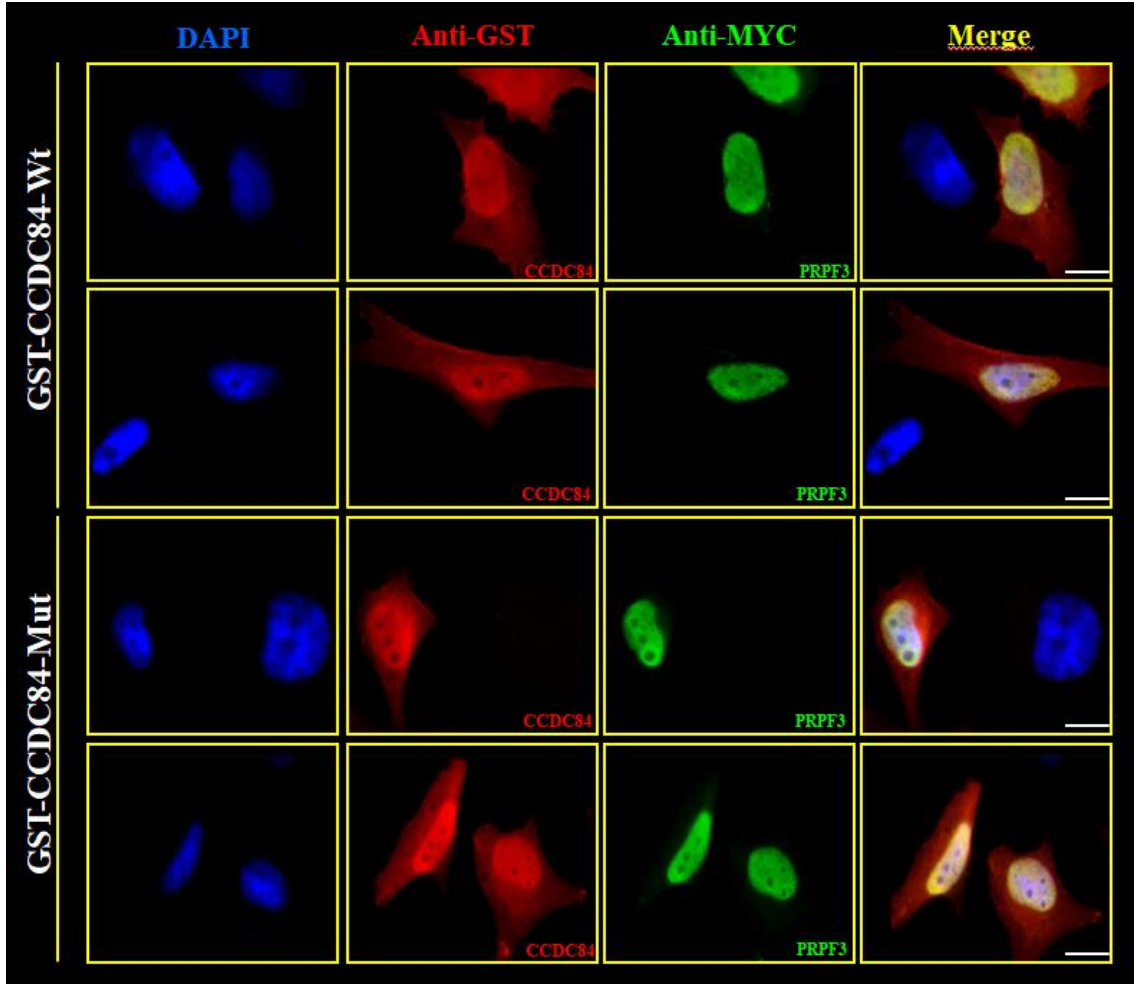
Hücre içi birlikte lokalizasyon, bir hücrede aynı fiziksel konumda bulunan iki veya daha fazla proteinin varlığı olarak tanımlanır. Eğer iki protein *in vivo* koşullarda hücre içinde etkileşiyorsa bu proteinlerin hücre içerisinde birlikte lokalize olması ya da hücre içinde örtüşen bir dağılım göstermeleri beklenir (123). Bu doğrultuda İmmünopresipitasyon ve GST-Pull Down deneyleri ile doğrudan etkileştiği gösterilen CCDC84 ile PRPF3'ün hücre içerisinde birlikte lokalize olup olmadıkları endojen CCDC84 ve endojen PRPF3'e özgü sırası ile Anti-CCDC84 (sc-246197) ve Anti-PRPF3 (ab187535) primer antikorlar kullanılarak immünofloresan yöntemi ile fibroblast hücrelerinde incelendi. Floresan mikroskopunda yapılan analizler sonucuna endojen CCDC84 ve endojen PRPF3'ün çekirdekte birlikte lokalize oldukları görüldü (Resim 9).



Resim 9. Fibroblast hücrelerinde endojen CCDC84 ve endojen PRPF3'ün hücresel lokalizasyonları. CCDC84 çoğunlukla çekirdekte olmak üzere hem çekirdek hem de sitoplazmada lokalize görüldü (kırmızı). PRPF3 çekirdekte lokalize görüldü (yeşil). Endojen CCDC84 ve Endojen PRPF3 çekirdekte birlikte lokalize görüldü (sarı). Çekirdek DAPI (mavi) ile boyandı. Ölçek çubuğu: 10µm

6.4. CCDC84 Mutasyonunun PRPF3 ile Etkileşimi Üzerine Etkisinin İmmüno Floresan Yöntemiyle Araştırılması

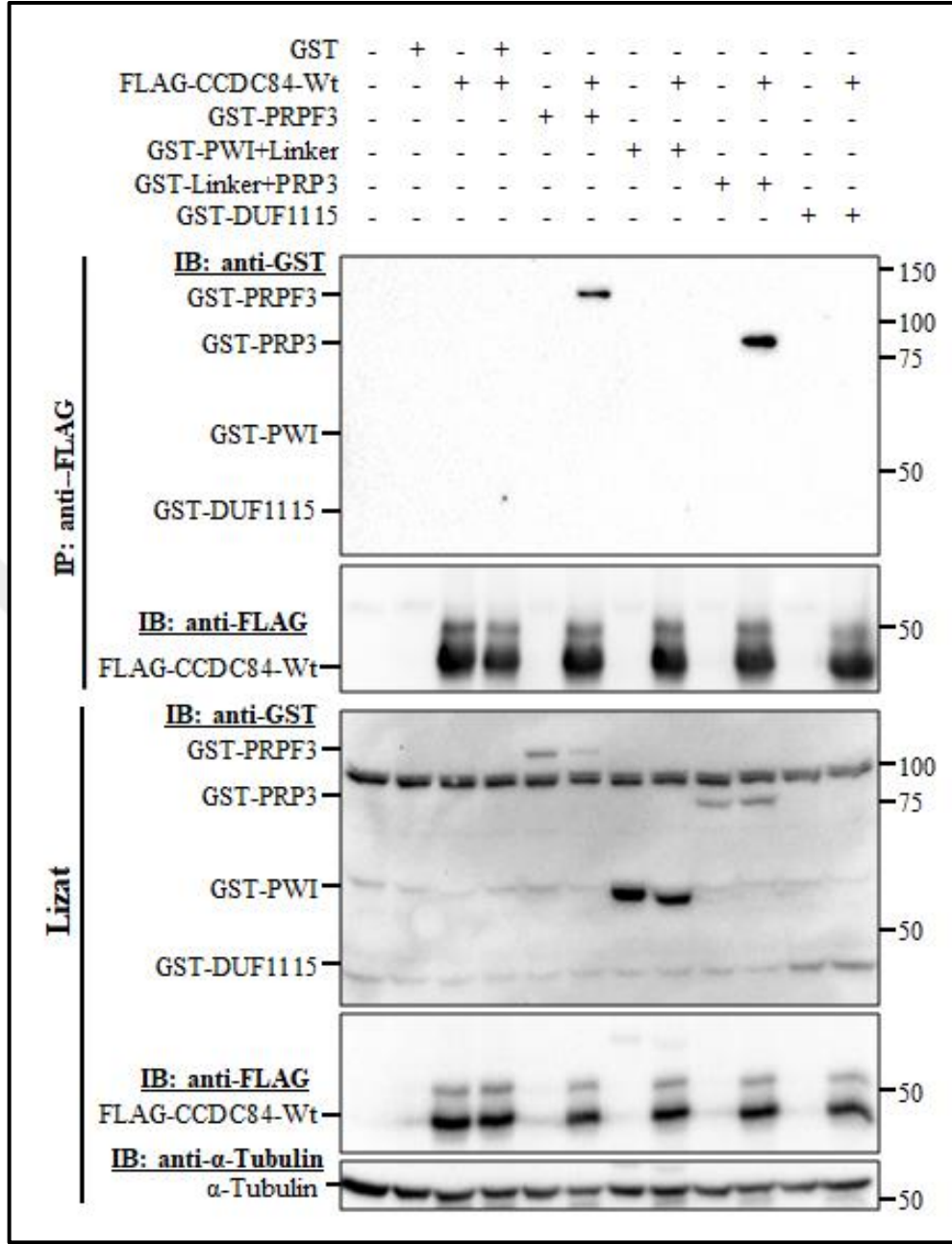
İmmünopresipitasyon ve GST-Pull Down deneyleriyle, PRPF3 ile etkileşimi azalan mutant CCDC84'ün PRPF3 ile hücresel lokalizasyonunu değiştirip değiştirmediğini belirlemek amacıyla HeLa hücrelerine sırasıyla GST etiketli yabancı tip ve mutant CCDC84 Myc-PRPF3 eksprese eden memeli ekspresyon vektörleri ile geçici olarak transfekte edildi. Transfeksiyondan 24 saat sonra %4 PFA ile fikse edilen hücreler Anti-GST (sc-459) ve Anti-Myc (M4439) primer antikorları ve uygun sekonder antikorları ile işaretlenerek floresan mikroskopunda analiz edildi. Yabancı tip CCDC84 ve PRPF3'ün çekirdekte birlikte lokalize olduğu ve CCDC84 üzerinde tanımlanmış olan 63 amino asitlik delesyonun ise PRPF3 ile çekirdekte lokalizasyon üzerine belirgin bir etkisinin olmadığı görüldü (Resim 10).



Resim 10. HeLa hücrelerinde CCDC84 ve PRPF3'ün hücresel lokalizasyonlarının geçici transfeksiyonla gösterilmesi. GST-CCDC84-Wt ve Myc-PRPF3 çekirdekte birlikte lokalize olmaktadır (üst iki sıra). CCDC84 mutasyonu (GST-CCDC84-Mut), CCDC84'ün hücresel lokalizasyonunu ve PRPF3 ile birlikte lokalizasyonunu değiştirmemektedir (alt iki sıra). DAPI: Mavi, Cy3: Kırmızı, Alexa Fluor 488: Yeşil. Ölçek çubuğu: 10µm

6.5. PRPF3 ile CCDC84 Arasındaki Etkileşime Aracılık Eden PRPF3 Domaininin Belirlenmesi

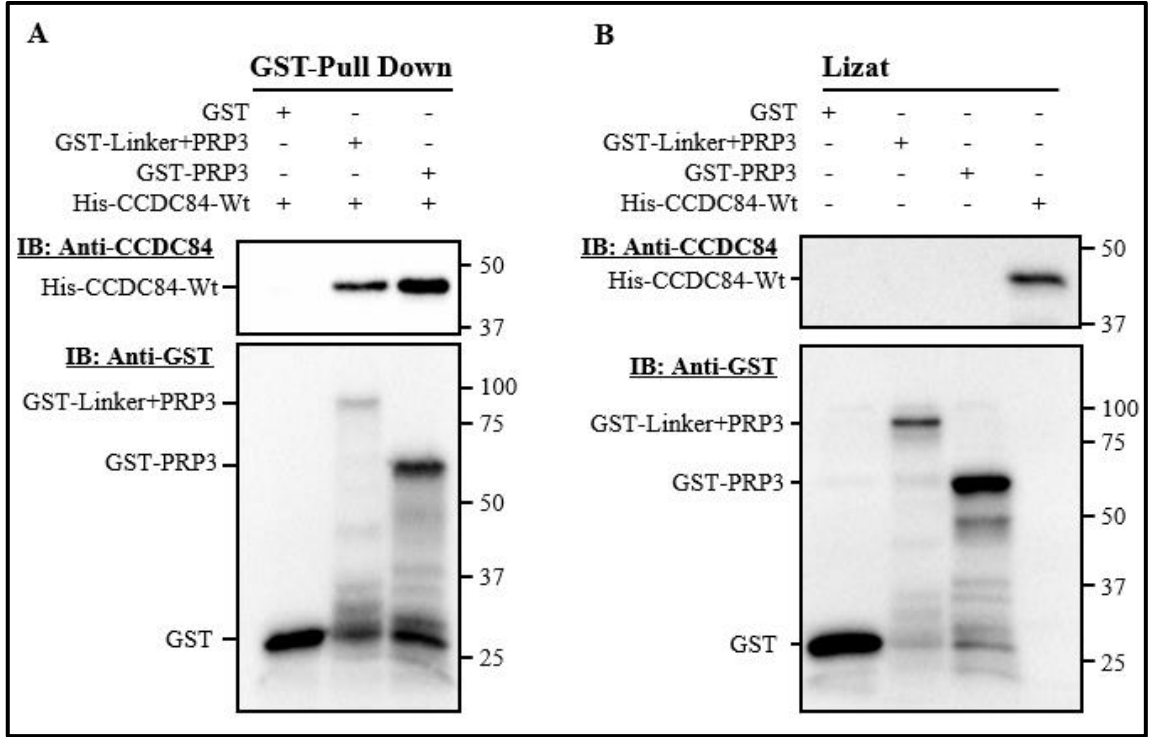
In silico analiz sonuçları, CCDC84 üzerinde 23-55. aa ve 131-171. aa'ler arasında olmak üzere iki adet Coiled-coil domaini ve 18-50. aa arasında ise bir adet çekirdek lokalizasyon sinyal dizisi olduğunu göstermektedir (Resim 2). PRPF3 proteininin üzerinde ise sırasıyla N-terminalinde PWI domaini (3-76 aa), orta kısmında PRP3 domaini (308-521 aa) ve C-terminalinde DUF1115 domaini (544-673 aa) bulunmaktadır (Resim 5). PRPF3'ün bugüne kadar tanımlanmış olan etkileşim partnerleriyle, bu etkileşimlerini PRP3 domaini üzerinden yürüttüğü bilinmektedir. CCDC84 ile PRPF3 arasındaki etkileşimin, PRPF3'ün hangi domaini üzerinden gerçekleştirdiğini belirlemek için ilk aşamada PRPF3'ün her bir domaini (Resim 5) GST etiketleyen memeli ekspresyon vektörü pDEST-27'ye klonlandı. Oluşturulan bu ekspresyon vektörleri FLAG etiketli yabancı tip CCDC84'ü kalıcı olarak eksprese eden HEK293 hücrelerine transfekte edildi. Transfeksiyondan 24 saat sonra parçalanan hücreler TNTE buffer ile patlatılarak protein izolasyonu yapıldı. Elde edilen protein izolatları Anti-FLAG M2 boncuklarının üzerinden geçirilerek immünopresipitasyon yapıldı. Elüsyon sonrası elde edilen proteinler SDS-PAGE ile yürütüldükten sonra Anti-GST ve Anti-FLAG antikorları kullanılarak immünoblot analizi ile görüntülendi. Sonuç olarak, yabancı tip CCDC84'ün, PRPF3'ün yalnızca PRP3 domainini içeren ve 77-543. aa'leri arasında kalan kısmı ile etkileştiği görüldü (Resim 11).



Resim 11. FLAG-CCDC84-Wt ve PRPF3 domainleri arasındaki etkileşiminin IP ile gösterilmesi. GST-PRPF3 ve domainleri, Flag-CCDC84-Wt ile kalıcı transfekte HEK293 Flp-In hücrelerine transfekte edildi. GST-PRP3 domaininin (77-543 aa), FLAG-CCDC84-Wt ile etkileştiği görüldü. IP: İmmünopresipitasyon, IB: İmmünoblot

6.6. CCDC84 ve PRP3 domaini Arasındaki Etkileşimin *In Vitro* Pull-Down ile Araştırılması

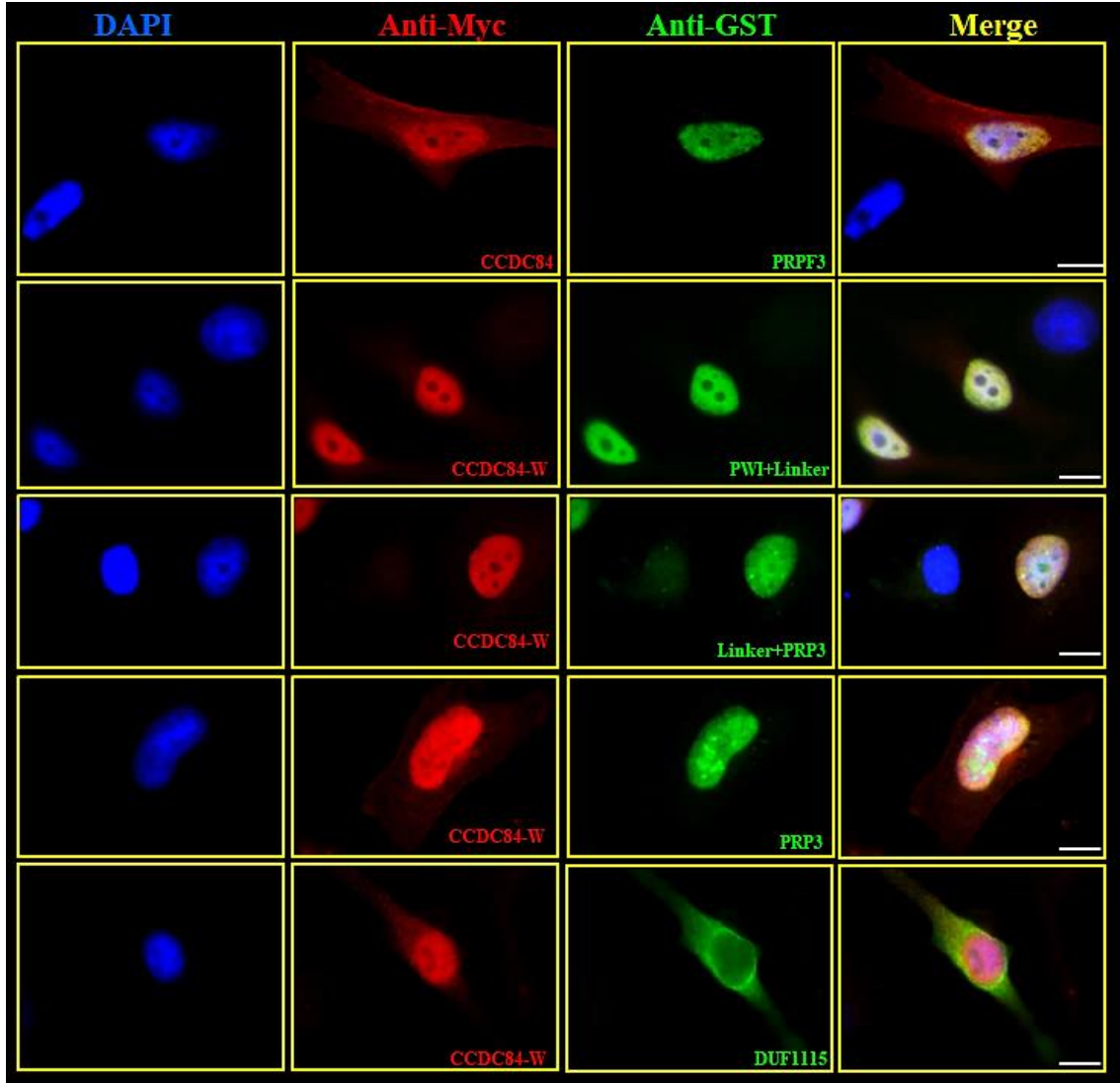
CCDC84 ile etkileşim içerisinde olan PRPF3'ün bu etkileşimini PRP3 domaini üzerinden gerçekleştirdiği *in-vivo* koşullarda belirlendi. Bu aşamada, CCDC84 ile PRP3 domaini arasındaki etkileşimin *in-vitro* koşullarda da devam edip etmediği ve PRP3 domaini haricinde PWI ile PRP3 domaini arasında kalan 77-296. aa'ler arasındaki linker dizisinin bu etkileşime etkisinin olup olmadığı sorgulandı. Bu doğrultuda PRPF3'ün 77-543. aa'leri arasındaki kalan Linker+PRP3 domainini ve yalnızca PRP3 domainini içeren ve 296-543. aa'ler arasında kalan bölgeler yem olarak kullanılmak üzere GST etiketleyen pGEX-KG/DEST bakteri ekspresyon vektörüne klonlandı. Av olarak kullanılmak üzere yabancı tip CCDC84 ise 6xHis etiketleyen pDEST17 bakteri ekspresyon vektörüne klonlandı. GST etiketli PRP3 domainleri eksprese eden pGEX-KG/DEST vektörleri BL21-DE3 *E. coli* suşuna, 6xHis etiketli CCDC84 eksprese eden pDEST17 vektörü BL21-AI *E. coli* suşuna transforme edildi ve sırası ile IPTG ve L-arabinoz ile indüklendi. İki saatin sonunda GST etiketli PRP3 domaini eksprese eden BL21-DE3 bakterilerinden 1 ml alınarak protein izolasyonu yapıldı. 6xHis etiketli CCDC84 eksprese BL21-AI bakterilerinden ise dört saatin sonunda 1 ml alınarak protein izolasyonu yapıldı. GST Pull Down deneyinde kullanılan GST-Trap A boncuklarının üzerinden öncelikle yem olarak GST etiketli PRP3 domainleri sonrasında ise 6xHis etiketli yabancı tip CCDC84 av olarak geçirildi. Yıkama sonrasında boncuklara tutunan proteinler 2x yükleme tamponu ile elüsyon gerçekleştirildi. Elde edilen örnekler SDS-PAGE ile ayrıştırıldı ve Anti-GST (sc-459) antikor ve Anti-CCDC84 (ab150860) antikorları kullanılarak immüno blot ile analiz edildi. Analiz sonucunda sonucunda 6xHis etiketli yabancı tip CCDC84 ile her iki PRP3 domaininin doğrudan etkileştiği ve bu etkileşimin 296-543. aminoasitler arasında kalan PRP3 domaininin kendisi aracılığıyla gerçekleştiği ve 77-296. aa'ler arasında kalan bağlantı bölgesinin bu etkileşime bir etkisinin olmadığı görüldü (Resim 12).



Resim 12. CCDC84 ile PRP3 domaini arasındaki in-vitro etkileşimin GST-pull down yaklaşımı ile belirlenmesi. A) Pull down sonucunda CCDC84 ile PRPF3 arasındaki doğrudan etkileşim PRPF3'ün 296-543 aa'lık kısmında yer alan PRP3 domaini üzerinden gerçekleşmektedir B) Proteinlerin ekspresyon düzeyleri. CCDC84_Wt: yabanıl tip CCDC84, CCDC84_Mut: Mutant CCDC84, IB: İmmünoblot

6.7. PRPF3 Domainlerinin Hücre İçindeki Lokalizasyonunun Araştırılması

PRPF3 üzerinde tanımlanan domainlerin hücre içi lokalizasyonları ve PRPF3 üzerinde öngörülen iki adet çekirdek lokalizasyon sinyalinin detaylı analizine yönelik literatürde yapılan çalışmalar sınırlıdır. PRPF3 domainlerinin hücre içi lokalizasyonlarını tespit etmek amacıyla; GST etikekli PWI+Linker, Linker+PRP3 (77-543 aa), PRP3 (296-543 aa) ve DUF1115 (522-683 aa) domainleri Myc-CCDC84-Wt ile birlikte HeLa hücrelerinde aşırı eksprese ettirildi. Transfeksiyondan 24 saat sonra hücreler İmmüno Floresan yöntemi ile boyanarak floresan mikroskopunda analiz edildi. Analiz sonucunda Myc-CCDC84-Wt'nin çekirdekte PWI+Linker, Linker+PRP3 (77-543 aa) ve PRP3 (296-543 aa) domainleri ile birlikte lokalize olduğu görüldü. PRP3 domainin (296-543 aa) çekirdek içerisinde nükleolusta da yoğun noktalı yapılar olarak yerleşim gösterdiği tespit edildi. Ancak DUF1115'in CCDC84 ile çekirdekte birlikte lokalize olmadığı aksine sitoplazmada lokalize görüldü (Resim 13).



Resim 13. PRPF3 domainlerinin hücre içi lokalizasyonlarının görüntülenmesi. Myc-CCDC84-Wt (kırmızı) GST-PWI+Linker ve GST-Linker+PRP3 ve GST-PRP3- domainleri (yeşil) ile çekirdekte birlikte lokalizedir. GST-DUF1115 domaini (yeşil) Myc-CCDC84-Wt ile birlikte çekirdekte yerleşim göstermemektedir. DAPI: Mavi, Cy3:Kırmızı, Alexa Fluor 488:Yeşil. Ölçek çubuğu: 10µm

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu tez çalışmasında, ilk kez grubumuz tarafından eksikliği Mikrosefalik Primordial Dwarfism (MPD) ile ilişkilendirilen CCDC84'ün RNA kırılmasında rol oynayan PRPF3 ile olası etkileşimi detaylı olarak araştırıldı. CCDC84 ile PRPF3 ilişkisine ait ön verilere CCDC84'ün fonksiyonel karakterizasyonuna yönelik yürütülen ve TÜBİTAK tarafından desteklenen 114Z883 no'lu proje ile ulaşıldı.

CCDC84 ile PRPF3 arasındaki etkileşimi gösteren ön veri, Afinite Pürifikasyon (AP) ve sonrasında uygulanan Kütle Spektrometrisi (MS) analizi ile elde edilmiştir. AP ve sonrasında uygulanan MS yaklaşımı, proteinlerin etkileşim partnerlerinin ve bileşeni oldukları komplekslerin belirlenmesi yönünde yaygın olarak tercih edilen güçlü bir stratejidir. Bu yaklaşımda, AP ile proteinler elde edilirken MS ile bu proteinlerin kimliklendirilmesi gerçekleştirilmektedir. CCDC84 ile PRPF3 arasındaki etkileşimi gösteren ön verilerimizin elde edilmesi ile eş zamanlı olarak, insan proteomundaki etkileşim ağlarını ortaya koymayı amaçlayan büyük ölçekli AP-MS çalışmalarında da CCDC84-PRPF3 etkileşiminin tespit edilmiş olması (80, 82, 83), ön verilerimizin özgünlüğünü desteklemektedir. Ancak, MS ile kimliklendirme süreci proteinlerin peptidlerine parçalanarak analizine dayalı olduğundan, tanımlanan etkileşimlerin daha ileri düzeyde doğrulanma gerekliliğini ortadan kaldırmamaktadır (124).

Bu doğrultuda, bu tez çalışması kapsamında CCDC84 ile PRPF3 arasındaki olası etkileşimi doğrulamak üzere ilk aşamada iki farklı *in-vivo* ko-immünopresipitasyon yaklaşımı kullanıldı. Her iki yaklaşım sonucunda da CCDC84'ün PRPF3 ile güçlü etkileşim içinde olduğu tespit edildi (Resim 6-7). Elde edilen bu sonuç, CCDC84 ile PRPF3'ün etkileşim içerisinde olduğunu doğrularken, bu etkileşimin doğrudan mı ya da üçüncü bir protein aracılığı ile gerçekleştiği sorusuna açıklık getirmemektedir (123, 125). *In-vivo* yaklaşımlar kapsamında gözlemlediğimiz etkileşimin doğrudan olup olmadığını belirlemeye yönelik olarak gerçekleştirdiğimiz *in-vitro* pull down yaklaşımı sonucunda ise CCDC84 ile PRPF3 arasındaki etkileşimin üçüncü bir bileşene ihtiyaç duymadan doğrudan olduğu ve bu etkileşimin PRPF3 üzerindeki PRP3 domaini üzerinden olduğu gözlemlendi (Resim 8). Ayrıca, CCDC84 üzerinde grubumuz tarafından tanımlanmış olan ve CCDC84'ün translasyonunun erken sonlanmasına

(p.Lys269Serfs*10) neden olan mutasyonunun ise hem *in-vivo* hem de *in- vitro* koşullarda iki protein arasındaki etkileşimi ileri düzeyde azalttığı belirlendi.

MPD ile ilişkilendirdiğimiz ve fonksiyonunu tanımlamaya yönelik olarak etkileşim partnerlerini belirlemeyi hedeflediğimiz CCDC84'ün PRPF3 ile güçlü etkileşim göstermesi, CCDC84'ün de splicing mekanizmasının önemli bir bileşeni olduğunu ve 300'ün üzerinde proteinin katıldığı splicing mekanizmasında CCDC84'ün de rol oynadığını göstermiştir. PRPF3, splicingden sorumlu spliceosome bileşeni olan U4/U6 di-snRNP'nin kor proteinlerinden biri olup, hem bu kompleksin hem de bu komplekse U5 snRNP'nin eklenmesi ile oluşan U4/U6•U5 tri-snRNP'nin yapılanmasında rol almaktadır (61). Oluşan U4/U6•U5 tri-snRNP, daha sonrasında U1 ve U2 snRNP'lerin hnRNA üzerine yerleşmesi ile oluşan pre-spliceosome kompleksi (Kompleks A) ile etkileşime geçmek suretiyle hnRNA üzerine yerleşir ve pre-katalitik spliceosome oluşur (7, 126, 127). Bu aşamada, U4 ve U1 snRNP'ler hnRNA üzerindeki U2, U5 ve U4'den oluşan pre-katalitik spliceosome kompleksini (Kompleks B*) terk ederek yeniden kullanılmak üzere nükleoplazmaya salınır (şekil 7). Özetle, PRPF3 proteini, U4/U6 di-snRNP'nin yapılanması ile sürece dahil olurken, pre-katalitik spliceosome kompleksinin oluşmasından sonra süreçten ayrılmakta ve intronların çıkartılarak ekzonların birleştirilmesi sürecinde yer almamaktadır. CCDC84'ün PRPF3 ile göstermiş olduğu güçlü etkileşim ise CCDC84'ün de, U4/U6•U5 tri-snRNP'nin yapılanması ve/veya U4/U6•U5 tri-snRNP'nin pre-spliceosome kompleksi (Kompleks A) ile etkileşime geçerek pre-katalitik spliceosome kompleksinin oluşması süreçlerinde rol oynadığını işaret etmektedir. Bugüne kadar PRPF3 ile doğrudan etkileşimi gösterilmiş olan PRPF4, CypH, SART3, SART1, PRPF6 ve SPF30 olmak üzere altı protein bulunmaktadır (61, 128, 129). Bunlardan PRPF4, CypH, SART3, SART1 ve PRPF6 proteinleri U4/U6•U5 tri-snRNP'nin yapılanmasında görev alırken, SPF30 proteini U4/U6•U5 tri-snRNP kompleksi ile U2 snRNP arasında köprü görevi görerek pre-katalitik spliceosome kompleksinin (Kompleks B) yapılanmasına aracılık etmesi de CCDC84 aynı süreçlerde rol oynuyor olabileceği fikrini desteklemektedir. Diğer taraftan, tri-snRNP ve pre-katalitik spliceosome kompleksinin yapılanması süreçlerinde kritik rol oynayan PRPF4, CypH, SART3, SART1, PRPF6 ve SPF30 proteinleri PRPF3 ile PRP3 domaini üzerinden etkileşime geçerken, CCDC84'ün de PRPF3 ile aynı şekilde PRP3 domaini üzerinden etkileşmesi CCDC84'ün U4/U6•U5 tri-snRNP

yapılanması ve pre-katalitik spliceosome kompleksinin oluşması süreçleri için kritik öneme sahip olabileceği fikrini daha da güçlendirmektedir.

Biyoinformatik araçlar kullanarak yapılan *in silico* analizler sonucunda, CCDC84 üzerinde iki adet coiled-coil motif öngörülmektedir (Resim 2). Coiled-coil motifler, yapısal olarak korunmuş olan ve tipik olarak 2-5 alfa heliksin birbirine sarılması ile oluşan yaygın süper sarmal yapılardır. Bu yapılar, protein-protein etkileşiminde rol oynayarak homodimer veya heterooligomerik komplekslerin yapılanmasına katılırlar. Bu motifleri taşıyan proteinler; sentrozom, kinetokor ve spliceosome gibi büyük makromoleküler komplekslerin yapısında yer alan proteinleri bir arada ve belli bir mesafede tutarak protein-protein etkileşimlerini düzenleyen moleküler aralayıcılar olarak görev yapmaktadır (130). CCDC84'ün üzerinde de iki adet coiled-coil motif dışında bilinen başka bir domainin olmayışı, bu proteinin doğrudan intronların çıkartılmasında görev almaktan ziyade U4/U6•U5 tri-snRNP veya pre-katalitik spliceosome yapılanması sürecinde kompleks bileşenlerinin bir araya getirilmesinde rol alabileceğini işaret etmektedir.

CCDC84 ile PRPF3 arasındaki güçlü etkileşimi şiddetli bir şekilde azaltan ve CCDC84'ün translasyonunun erken sonlanmasına (p.Lys269Serfs*10) neden olan mutasyon, 332 amino asitten oluşan proteinin N-terminalindeki 63 amino asitlik bir bölgenin kaybına neden olmaktadır. *In-silico* analizler, CCDC84 üzerindeki coiled-coil motiflerin bu bölgenin dışında kaldığını gösterirken, delesyona uğrayan bölgenin oldukça korunmuş bir diziye sahip olduğunu ve üzerinde SUMO-1 modifikasyon motifi (316-319) ve fosforilasyon dizisi (324-330) taşıdığını öngörmektedir (131). Bununla birlikte, bakterilerde ürettirilen CCDC84 ile PRPF3'ün etkileşimlerinin bozulmaması, bu bölgenin post-translasyonel modifikasyonlardan bağımsız olarak etkileşim için kritik öneme sahip olduğunu göstermektedir.

İmmünofloresan yaklaşımına dayalı ko-lokalizasyon çalışmalarımız sonucunda CCDC84'ün ve PRPF3'ün çekirdekte yaygın bir yerleşim gösterirken, bu yerleşimler bazı noktalarda belirgin bir birliktelik göstermemektedir.

CCDC84'ün PRPF3 ile benzer şekilde çekirdekte yaygın yerleşimi PRPF3 ile etkileşim içinde olduğu yönündeki bulgularımızı desteklerken, grubumuz tarafından tanımlanmış ve PRPF3 ile etkileşimi şiddetli düzeyde bozan CCDC84'ün C-

terminalindeki 63 amino asitlik delesyonun proteinin çekirdek lokalizasyonunu etkilememesi, bu taşınmanın PRPF3'e bağımlı olmadığı şeklinde yorumlanmaktadır. *In-silico* analiz sonucuna göre CCDC84'ün N-terminaline yakın yerleşimli bir çekirdek lokalizasyon sinyali dizisinin bulunması (Resim 2) ise CCDC84'ün PRPF3'den bağımsız olarak çekirdeğe taşındığı düşüncesini desteklemektedir. CCDC84 ile PRPF3'ün çekirdekte belli bölgelerde örtüşen bir yerleşim göstermemesi ise CCDC84'ün PRPF3'ün uzun ve çok evreli yaşam döngüsünün sınırlı bir sürecinde yer alıyabileceğini işaret etmektedir. Bu durum ise, CCDC84'ün sınırlı sayıda pre-mRNA'nın splicing veya alternatif splicing sürecinde yar alıyor olabileceğini, bu nedenle sınırlı zaman aralıklarında ve bölgelerde spliceosomun kor bileşeni olan PRPF3 ile bir araya geliyor olabileceği fikrini desteklemektedir.

PRPF3'ün birbirinden bağımsız olarak PWI ve PRP3 domainlerinin çekirdeğe yerleşim göstermesi ise dikkat çekici diğer bir husus olarak görülmektedir. Ancak, *in-silico* analizler sonucunda sonuçlarımızla uyumlu olarak PRPF3 üzerinde biri PWI ve diğeri PRP3 domaini üzerinde olmak üzere iki farklı çekirdek lokalizasyon sinyali dizisi görülmektedir. Her ne kadar bazı proteinlerin üzerinde birden fazla NLS bulunmasının nedeni tam bilinmese de, kırılmanın aktif olduğu dokularda PRPF3'ün çekirdeğe translokasyonu esnasında iki çekirdek lokalizasyon sinyali ile daha etkin bir taşınmaya ihtiyaç duyulduğunu düşündürmektedir (132, 133).

PRPF3'ün eksikliğinde hnRNA'ların yapısındaki intronların çıkartılması yaygın bir şekilde bozulmakta, *Prpf3*^{-/-} konck-out fareler yaşamla bağdaşmamakta ve insanlarda PRPF3'ün heterozigot mutasyonları Retinitis Pigmentoza'ya neden olurken homozigot mutasyonlarının gösterilmemiş olması bu proteinin splicing için çok kritik bir öneme sahip olduğunu göstermektedir (9, 134, 135). Benzer şekilde, *Prpf3*^{-/-} zebra balıklarında küçük kafa ve anormal vücut yapısı görülmekte ve bu balıklar transkripsiyonun aktifleştiği mid-blastuladan geçiş sürecinde (E4.5) ölmektedir (17). Diğer taraftan, snRNP'lerin yapısında yer alan 16'sı proteini kodlayan ve ikisi snRNA kodlayan toplam 18 genin mutasyonu başta Retinitis pigmentosa olmak üzere çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilmiştir (Tablo 1) (135-138). Bu hastalıklardan 12'si otozomal dominant ve beşi otozomal resesif kalıtılırken, otozomal resesif kalıtılan gruptaki hastalıklarla ilişkilendirilen mutasyonların tamamı, düşük düzeyde de olsa fonksiyonel ürün oluşmasına imkan tanıyan hipomorfik mutasyonlardır (21, 33, 139). snRNP'lerin

yapısında yer alan ve hastalıklarla ilişkilendirilmiş olan bu genlerden *SART3*, *PRPF6*, *PRPF8*, *PRPF31*, *SART1* ve *SMN*'nin fare knock-out modelleri oluşturulmuş ve ilginç bir şekilde, oluşturulan modellerin homozigot mutant genotipe sahip olanları aynen *PRPF3*'de olduğu gibi doğuma kadar gelemeden prenatal dönemde ölmektedir (136, 139-141). Bu durum RNA splicing mekanizmasının temel bileşenlerinin eksikliğinin tolere edilemediğini gösterirken snRNP kor proteini olan PRPF3 ile etkileştiğini göstermiş olduğumuz CCDC84'ün üzerindeki mutasyonların otozomal çekinik olarak kalıtılması ilk aşamada dikkati çeken bir bulgu olarak görülmektedir. Ancak, CCDC84 üzerinde tanımlanmış olan mutasyon sonucu oluşan mutant proteinin bir miktarda olsa PRPF3 ile etkileşmeye devam ediyor olması düşük seviyede de olsa fonksiyonunu yerine getiriyor olduğunu düşündürmektedir. Diğer taraftan, CCDC84 üzerinde tanımlanan ve genin dokuzuncu intronunun kırpılma verici bölgesindeki dört nükleotitik delesyonun, taşıyıcı bireylerin cDNA'sı üzerinden yapılan RT-PCR ile splicingi bozduğu gösterilirken, homozigot mutant hastaya ait cDNA'ya ulaşılammış olmasından dolayı tüm transkriptlerin mutant olup olmadığı belirlenememiştir. Bununla birlikte, splicing bölge mutasyonlarının düşük düzeyde de olsa normal transkript vermeleri sıkça karşılaşılan bir durumdur (75, 87). Bu durum, çalışmaya konu olan hastalarda da bir miktar fonksiyonel CCDC84 üretiliyor olabileceğini düşündürmekte ve homozigot mutant hastaların 3-4 yıl gibi kısa süreli de olsa yaşamla bağdaşmalarının altında yatan neden olarak düşünülmektedir.

Sonuç olarak, bu tez çalışması kapsamında grubumuz tarafından MPD ile ilk kez ilişkilendirmiş olan CCDC84'ün, mRNA kırpılma mekanizmasının temel bileşenlerinden olan U4/U6 di-snRNP'nin kor proteinlerinden biri olan PRPF3 ile etkileştiği ve bu etkileşimin PRPF3'ün PRP3 domaini üzerinden doğrudan olduğu gösterilirken CCDC84 üzerinde tanımlanmış ve CCDC84'ün C-terminalindeki 63 amino asitlik delesyonun bu etkileşimi şiddetli bir şekilde bozduğu gösterilmiştir. Bu veriler ile, çok sayıda proteinin katılımı ile yürüyen ve dinamik bir süreç olan RNA kırpılma mekanizmasında coiled-coil motife sahip CCDC84'ün rol aldığı ilk kez gösterilirken, RNA kırpılma mekanizmasının global gelişme geriliği ile karakterize MPD'in etiyolojisindeki önemi ortaya konulmuştur. Bu tez çalışmasından elde edilen bulgulardan yola çıkılarak, ileride yapılacak RNA-Seq analizleri ile CCDC84'ün hangi

pre-mRNA'ların kırılmasını düzenlediğinin aydınlatılmasının RNA splicing sürecinde CCDC84'ün tam rolünün belirlenmesine detaylı katkı sağlayacağı kanaatindeyiz.



8. KAYNAKLAR

1. Clamp M, Fry B, Kamal M, Xie X, Cuff J, Lin MF, Kellis M, Lindblad-Toh K, Lander ES (2007). Distinguishing protein-coding and noncoding genes in the human genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 19428-19433.
2. Ezkurdia I, Juan D, Rodriguez JM, Frankish A, Diekhans M, Harrow J, Vazquez J, Valencia A, Tress ML (2014). Multiple evidence strands suggest that there may be as few as 19,000 human protein-coding genes. *Hum Mol Genet* 23: 5866-5878.
3. Collins FS, Morgan M, Patrinos A (2003). The Human Genome Project: lessons from large-scale biology. *Science* 300: 286-290.
4. Johns Hopkins University OMIM (2018, 2 Kasım 2018). Available from <https://www.omim.org/statistics/geneMap>. (Accessed 2 Kasım, 2018).
5. Klingseisen A, Jackson AP (2011). Mechanisms and pathways of growth failure in primordial dwarfism. *Genes Dev* 25: 2011-2024.
6. Alkuraya FS (2015). Primordial dwarfism: an update. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 22: 55-64.
7. Matera AG, Wang Z (2014). A day in the life of the spliceosome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15: 108-121.
8. Will CL, Luhrmann R (2011). Spliceosome structure and function. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3:1-23.
9. Ruzickova S, Stanek D (2017). Mutations in spliceosomal proteins and retina degeneration. *RNA Biol* 14: 544-552.
10. Pogue RE, Cavalcanti DP, Shanker S, Andrade RV, Aguiar LR, de Carvalho JL, Costa FF (2018). Rare genetic diseases: update on diagnosis, treatment and online resources. *Drug Discov Today* 23: 187-195.
11. Chong JX, Buckingham KJ, Jhangiani SN, Boehm C, Sobreira N, Smith JD, Harrell TM, McMillin MJ, Wiszniewski W, Gambin T, Coban Akdemir ZH, Doheny K, Scott AF, Avramopoulos D, Chakravarti A, Hoover-Fong J, Mathews D, Witmer PD, Ling H, Hetrick K, Watkins L, Patterson KE, Reinier F, Blue E, Muzny D, Kircher M, Bilguvar K, Lopez-Giraldez F, Sutton VR, Tabor HK, Leal

- SM, Gunel M, Mane S, Gibbs RA, Boerwinkle E, Hamosh A, Shendure J, Lupski JR, Lifton RP, Valle D, Nickerson DA, Centers for Mendelian G, Bamshad MJ (2015). The Genetic Basis of Mendelian Phenotypes: Discoveries, Challenges, and Opportunities. *Am J Hum Genet* 97: 199-215.
12. An JY (2017). National human genome projects: an update and an agenda. *Epidemiol Health* 39: e2017045.
 13. Alkan C, Kavak P, Somel M, Gokcumen O, Ugurlu S, Saygi C, Dal E, Bugra K, Gungor T, Sahinalp SC, Ozoren N, Bekpen C (2014). Whole genome sequencing of Turkish genomes reveals functional private alleles and impact of genetic interactions with Europe, Asia and Africa. *BMC Genomics* 15: 963.
 14. de Munnik SA, Hoefsloot EH, Roukema J, Schoots J, Knoers NV, Brunner HG, Jackson AP, Bongers EM (2015). Meier-Gorlin syndrome. *Orphanet J Rare Dis* 10: 114.
 15. Bicknell LS, Bongers EM, Leitch A, Brown S, Schoots J, Harley ME, Aftimos S, Al-Aama JY, Bober M, Brown PA, van Bokhoven H, Dean J, Edrees AY, Feingold M, Fryer A, Hoefsloot LH, Kau N, Knoers NV, Mackenzie J, Opitz JM, Sarda P, Ross A, Temple IK, Toutain A, Wise CA, Wright M, Jackson AP (2011). Mutations in the pre-replication complex cause Meier-Gorlin syndrome. *Nat Genet* 43: 356-359.
 16. Bicknell LS, Walker S, Klingseisen A, Stiff T, Leitch A, Kerzendorfer C, Martin CA, Yeyati P, Al Sanna N, Bober M, Johnson D, Wise C, Jackson AP, O'Driscoll M, Jeggo PA (2011). Mutations in ORC1, encoding the largest subunit of the origin recognition complex, cause microcephalic primordial dwarfism resembling Meier-Gorlin syndrome. *Nat Genet* 43: 350-355.
 17. Fenwick AL, Kliszczak M, Cooper F, Murray J, Sanchez-Pulido L, Twigg SR, Goriely A, McGowan SJ, Miller KA, Taylor IB, Logan C, Bozdogan S, Danda S, Dixon J, Elsayed SM, Elsobky E, Gardham A, Hoffer MJ, Koopmans M, McDonald-McGinn DM, Santen GW, Savarirayan R, de Silva D, Vanakker O, Wall SA, Wilson LC, Yuregir OO, Zackai EH, Ponting CP, Jackson AP, Wilkie AO, Niedzwiedz W, Bicknell LS (2016). Mutations in CDC45, Encoding an

- Essential Component of the Pre-initiation Complex, Cause Meier-Gorlin Syndrome and Craniosynostosis. *Am J Hum Genet* 99: 125-138.
18. Burrage LC, Charng WL, Eldomery MK, Willer JR, Davis EE, Lugtenberg D, Zhu W, Leduc MS, Akdemir ZC, Azamian M, Zapata G, Hernandez PP, Schoots J, de Munnik SA, Roepman R, Pearing JN, Jhangiani S, Katsanis N, Vissers LE, Brunner HG, Beaudet AL, Rosenfeld JA, Muzny DM, Gibbs RA, Eng CM, Xia F, Lalani SR, Lupski JR, Bongers EM, Yang Y (2015). De Novo GMNN Mutations Cause Autosomal-Dominant Primordial Dwarfism Associated with Meier-Gorlin Syndrome. *Am J Hum Genet* 97: 904-913.
 19. Shanske A, Caride DG, Menasse-Palmer L, Bogdanow A, Marion RW (1997). Central nervous system anomalies in Seckel syndrome: report of a new family and review of the literature. *Am J Med Genet* 70: 155-158.
 20. Faivre L, Le Merrer M, Lyonnet S, Plauchu H, Dagoneau N, Campos-Xavier AB, Attia-Sobol J, Verloes A, Munnich A, Cormier-Daire V (2002). Clinical and genetic heterogeneity of Seckel syndrome. *Am J Med Genet* 112: 379-383.
 21. O'Driscoll M, Ruiz-Perez VL, Woods CG, Jeggo PA, Goodship JA (2003). A splicing mutation affecting expression of ataxia-telangiectasia and Rad3-related protein (ATR) results in Seckel syndrome. *Nat Genet* 33: 497-501.
 22. Al-Dosari MS, Shaheen R, Colak D, Alkuraya FS (2010). Novel CENPJ mutation causes Seckel syndrome. *J Med Genet* 47: 411-414.
 23. Qvist P, Huertas P, Jimeno S, Nyegaard M, Hassan MJ, Jackson SP, Borglum AD (2011). CtIP Mutations Cause Seckel and Jawad Syndromes. *PLoS Genet* 7: e1002310.
 24. Kalay E, Yigit G, Aslan Y, Brown KE, Pohl E, Bicknell LS, Kayserili H, Li Y, Tuysuz B, Nurnberg G, Kiess W, Koegl M, Baessmann I, Buruk K, Toraman B, Kayipmaz S, Kul S, Ikbali M, Turner DJ, Taylor MS, Aerts J, Scott C, Milstein K, Dollfus H, Wieczorek D, Brunner HG, Hurles M, Jackson AP, Rauch A, Nurnberg P, Karaguzel A, Wollnik B (2011). CEP152 is a genome maintenance protein disrupted in Seckel syndrome. *Nat Genet* 43: 23-26.

25. Dauber A, Lafranchi SH, Maliga Z, Lui JC, Moon JE, McDeed C, Henke K, Zonana J, Kingman GA, Pers TH, Baron J, Rosenfeld RG, Hirschhorn JN, Harris MP, Hwa V (2012). Novel microcephalic primordial dwarfism disorder associated with variants in the centrosomal protein ninein. *J Clin Endocrinol Metab* 97: E2140-2151.
26. Sir JH, Barr AR, Nicholas AK, Carvalho OP, Khurshid M, Sossick A, Reichelt S, D'Santos C, Woods CG, Gergely F (2011). A primary microcephaly protein complex forms a ring around parental centrioles. *Nat Genet* 43: 1147-1153.
27. Ogi T, Walker S, Stiff T, Hobson E, Limsirichaikul S, Carpenter G, Prescott K, Suri M, Byrd PJ, Matsuse M, Mitsutake N, Nakazawa Y, Vasudevan P, Barrow M, Stewart GS, Taylor AM, O'Driscoll M, Jeggo PA (2012). Identification of the first ATRIP-deficient patient and novel mutations in ATR define a clinical spectrum for ATR-ATRIP Seckel Syndrome. *PLoS Genet* 8: e1002945.
28. Shaheen R, Faqueh E, Ansari S, Abdel-Salam G, Al-Hassnan ZN, Al-Shidi T, Alomar R, Sogaty S, Alkuraya FS (2014). Genomic analysis of primordial dwarfism reveals novel disease genes. *Genome Res* 24: 291-299.
29. Payne F, Colnaghi R, Rocha N, Seth A, Harris J, Carpenter G, Bottomley WE, Wheeler E, Wong S, Saudek V, Savage D, O'Rahilly S, Carel JC, Barroso I, O'Driscoll M, Semple R (2014). Hypomorphism in human NSMCE2 linked to primordial dwarfism and insulin resistance. *J Clin Invest* 124: 4028-4038.
30. Yigit G, Brown KE, Kayserili H, Pohl E, Caliebe A, Zahnleiter D, Rosser E, Bogershausen N, Uyguner ZO, Altunoglu U, Nurnberg G, Nurnberg P, Rauch A, Li Y, Thiel CT, Wollnik B (2015). Mutations in CDK5RAP2 cause Seckel syndrome. *Mol Genet Genomic Med* 3: 467-480.
31. Martin CA, Ahmad I, Klingseisen A, Hussain MS, Bicknell LS, Leitch A, Nurnberg G, Toliat MR, Murray JE, Hunt D, Khan F, Ali Z, Tinschert S, Ding J, Keith C, Harley ME, Heyn P, Muller R, Hoffmann I, Cormier-Daire V, Dollfus H, Dupuis L, Bashamboo A, McElreavey K, Kariminejad A, Mendoza-Londono R, Moore AT, Saggar A, Schlechter C, Weleber R, Thiele H, Altmuller J, Hohne W, Hurles ME, Noegel AA, Baig SM, Nurnberg P, Jackson AP (2014). Mutations in

- PLK4, encoding a master regulator of centriole biogenesis, cause microcephaly, growth failure and retinopathy. *Nat Genet* 46: 1283-1292.
32. Shaheen R, Al Tala S, Almoisheer A, Alkuraya FS (2014). Mutation in PLK4, encoding a master regulator of centriole formation, defines a novel locus for primordial dwarfism. *J Med Genet* 51: 814-816.
 33. Dincer T, Yorgancioglu-Budak G, Olmez A, Er I, Dodurga Y, Ozdemir OM, Toraman B, Yildirim A, Sabir N, Akarsu NA, Semerci CN, Kalay E (2017). Analysis of centrosome and DNA damage response in PLK4 associated Seckel syndrome. *Eur J Hum Genet* 25: 1118-1125.
 34. Majewski F, Ranke M, Schinzel A (1982). Studies of microcephalic primordial dwarfism II: the osteodysplastic type II of primordial dwarfism. *Am J Med Genet* 12: 23-35.
 35. Hall JG, Flora C, Scott CI, Jr., Pauli RM, Tanaka KI (2004). Majewski osteodysplastic primordial dwarfism type II (MOPD II): natural history and clinical findings. *Am J Med Genet A* 130A: 55-72.
 36. Rauch A, Thiel CT, Schindler D, Wick U, Crow YJ, Ekici AB, van Essen AJ, Goecke TO, Al-Gazali L, Chrzanowska KH, Zweier C, Brunner HG, Becker K, Curry CJ, Dallapiccola B, Devriendt K, Dorfler A, Kinning E, Megarbane A, Meinecke P, Semple RK, Spranger S, Toutain A, Trembath RC, Voss E, Wilson L, Hennekam R, de Zegher F, Dorr HG, Reis A (2008). Mutations in the pericentrin (PCNT) gene cause primordial dwarfism. *Science* 319: 816-819.
 37. Griffith E, Walker S, Martin CA, Vagnarelli P, Stiff T, Vernay B, Al Sanna N, Saggarr A, Hamel B, Earnshaw WC, Jeggo PA, Jackson AP, O'Driscoll M (2008). Mutations in pericentrin cause Seckel syndrome with defective ATR-dependent DNA damage signaling. *Nat Genet* 40: 232-236.
 38. He H, Liyanarachchi S, Akagi K, Nagy R, Li J, Dietrich RC, Li W, Sebastian N, Wen B, Xin B, Singh J, Yan P, Alder H, Haan E, Wieczorek D, Albrecht B, Puffenberger E, Wang H, Westman JA, Padgett RA, Symer DE, de la Chapelle A (2011). Mutations in U4atac snRNA, a component of the minor spliceosome, in the developmental disorder MOPD I. *Science* 332: 238-240.

39. Pierce MJ, Morse RP (2012). The neurologic findings in Taybi-Linder syndrome (MOPD I/III): case report and review of the literature. *Am J Med Genet A* 158A: 606-610.
40. Edery P, Marcaillou C, Sahbatou M, Labalme A, Chastang J, Touraine R, Tubacher E, Senni F, Bober MB, Nampoothiri S, Jouk PS, Steichen E, Berland S, Toutain A, Wise CA, Sanlaville D, Rousseau F, Clerget-Darpoux F, Leutenegger AL (2011). Association of TALS developmental disorder with defect in minor splicing component U4atac snRNA. *Science* 332: 240-243.
41. Wahl MC, Will CL, Luhrmann R (2009). The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell* 136: 701-718.
42. Wahl MC, Luhrmann R (2015). SnapShot: Spliceosome Dynamics I. *Cell* 161: 1474-e1471.
43. Scotti MM, Swanson MS (2016). RNA mis-splicing in disease. *Nat Rev Genet* 17: 19-32.
44. Turunen JJ, Niemela EH, Verma B, Frilander MJ (2013). The significant other: splicing by the minor spliceosome. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 4: 61-76.
45. Havens MA, Duelli DM, Hastings ML (2013). Targeting RNA splicing for disease therapy. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 4: 247-266.
46. Kilic E, Yigit G, Utine GE, Wollnik B, Mihci E, Nur BG, Boduroglu K (2015). A novel mutation in RNU4ATAC in a patient with microcephalic osteodysplastic primordial dwarfism type I. *Am J Med Genet A* 167a: 919-921.
47. De Conti L, Baralle M, Buratti E (2013). Exon and intron definition in pre-mRNA splicing. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 4: 49-60.
48. Kedzierska H, Piekietko-Witkowska A (2017). Splicing factors of SR and hnRNP families as regulators of apoptosis in cancer. *Cancer Lett* 396: 53-65.
49. Stanek D, Neugebauer KM (2006). The Cajal body: a meeting place for spliceosomal snRNPs in the nuclear maze. *Chromosoma* 115: 343-354.
50. Wahl MC, Luhrmann R (2015). SnapShot: Spliceosome Dynamics II. *Cell* 162: 456-456 e451.

51. Stanek D (2017). Cajal bodies and snRNPs - friends with benefits. *RNA Biol* 14: 671-679.
52. Baillat D, Hakimi MA, Naar AM, Shilatifard A, Cooch N, Shiekhattar R (2005). Integrator, a multiprotein mediator of small nuclear RNA processing, associates with the C-terminal repeat of RNA polymerase II. *Cell* 123: 265-276.
53. Andersen PR, Domanski M, Kristiansen MS, Storvall H, Ntini E, Verheggen C, Schein A, Bunkenborg J, Poser I, Hallais M, Sandberg R, Hyman A, LaCava J, Rout MP, Andersen JS, Bertrand E, Jensen TH (2013). The human cap-binding complex is functionally connected to the nuclear RNA exosome. *Nat Struct Mol Biol* 20: 1367-1376.
54. Huber J, Dickmanns A, Luhrmann R (2002). The importin-beta binding domain of snurportin1 is responsible for the Ran- and energy-independent nuclear import of spliceosomal U snRNPs in vitro. *J Cell Biol* 156: 467-479.
55. Narayanan U, Ospina JK, Frey MR, Hebert MD, Matera AG (2002). SMN, the spinal muscular atrophy protein, forms a pre-import snRNP complex with snurportin1 and importin beta. *Hum Mol Genet* 11: 1785-1795.
56. Singh R, Reddy R (1989). Gamma-monomethyl phosphate: a cap structure in spliceosomal U6 small nuclear RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 8280-8283.
57. Paushkin S, Gubitza AK, Massenet S, Dreyfuss G (2002). The SMN complex, an assemblysome of ribonucleoproteins. *Curr Opin Cell Biol* 14: 305-312.
58. Stanek D, Rader SD, Klingauf M, Neugebauer KM (2003). Targeting of U4/U6 small nuclear RNP assembly factor SART3/p110 to Cajal bodies. *J Cell Biol* 160: 505-516.
59. Novotny I, Malinova A, Stejskalova E, Mateju D, Klimesova K, Roithova A, Sveda M, Knejzlik Z, Stanek D (2015). SART3-Dependent Accumulation of Incomplete Spliceosomal snRNPs in Cajal Bodies. *Cell Rep* 10:429-440.
60. Pessa HK, Will CL, Meng X, Schneider C, Watkins NJ, Perala N, Nymark M, Turunen JJ, Luhrmann R, Frilander MJ (2008). Minor spliceosome components are predominantly localized in the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 8655-8660.

61. Liu S, Rauhut R, Vornlocher HP, Luhrmann R (2006). The network of protein-protein interactions within the human U4/U6.U5 tri-snRNP. *RNA* 12: 1418-1430.
62. Sun JS, Manley JL (1995). A novel U2-U6 snRNA structure is necessary for mammalian mRNA splicing. *Genes Dev* 9: 843-854.
63. Raghunathan PL, Guthrie C (1998). RNA unwinding in U4/U6 snRNPs requires ATP hydrolysis and the DEIH-box splicing factor Brr2. *Curr Biol* 8: 847-855.
64. Ilagan JO, Chalkley RJ, Burlingame AL, Jurica MS (2013). Rearrangements within human spliceosomes captured after exon ligation. *RNA* 19: 400-412.
65. Schwer B, Gross CH (1998). Prp22, a DExH-box RNA helicase, plays two distinct roles in yeast pre-mRNA splicing. *EMBO J* 17: 2086-2094.
66. Fourmann JB, Schmitzova J, Christian H, Urlaub H, Ficner R, Boon KL, Fabrizio P, Luhrmann R (2013). Dissection of the factor requirements for spliceosome disassembly and the elucidation of its dissociation products using a purified splicing system. *Genes Dev* 27: 413-428.
67. Krausova M, Stanek D (2018). snRNP proteins in health and disease. *Semin Cell Dev Biol* 79: 92-102.
68. Lefebvre S, Burglen L, Reboullet S, Clermont O, Burlet P, Viollet L, Benichou B, Cruaud C, Millasseau P, Zeviani M, et al. (1995). Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell* 80: 155-165.
69. Lorson CL, Hahnen E, Androphy EJ, Wirth B (1999). A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 6307-6311.
70. Kwiatkowski TJ, Jr., Bosco DA, Leclerc AL, Tamrazian E, Vanderburg CR, Russ C, Davis A, Gilchrist J, Kasarskis EJ, Munsat T, Valdmanis P, Rouleau GA, Hosler BA, Cortelli P, de Jong PJ, Yoshinaga Y, Haines JL, Pericak-Vance MA, Yan J, Ticozzi N, Siddique T, McKenna-Yasek D, Sapp PC, Horvitz HR, Landers JE, Brown RH, Jr. (2009). Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 323: 1205-1208.

71. Elsaid MF, Chalhoub N, Ben-Omran T, Kumar P, Kamel H, Ibrahim K, Mohamoud Y, Al-Dous E, Al-Azwani I, Malek JA, Suhre K, Ross ME, Aleem AA (2017). Mutation in noncoding RNA RNU12 causes early onset cerebellar ataxia. *Ann Neurol* 81: 68-78.
72. Silverman FN, Streffling AM, Stevenson DK, Lazarus J (1980). Cerebro-costomandibular syndrome. *J Pediatr* 97: 406-416.
73. Bacrot S, Doyard M, Huber C, Alibeu O, Feldhahn N, Lehalle D, Lacombe D, Marlin S, Nitschke P, Petit F, Vazquez MP, Munnich A, Cormier-Daire V (2015). Mutations in SNRPB, encoding components of the core splicing machinery, cause cerebro-costomandibular syndrome. *Hum Mutat* 36: 187-190.
74. Palomeque A, Pastor X, Ballesta F (1990). Nager anomaly with severe facial involvement, microcephaly, and mental retardation. *Am J Med Genet* 36: 356-357.
75. Czeschik JC, Voigt C, Alanay Y, Albrecht B, Avci S, Fitzpatrick D, Goudie DR, Hehr U, Hoogeboom AJ, Kayserili H, Simsek-Kiper PO, Klein-Hitpass L, Kuechler A, Lopez-Gonzalez V, Martin M, Rahmann S, Schweiger B, Splitt M, Wollnik B, Ludecke HJ, Zeschnigk M, Wieczorek D (2013). Clinical and mutation data in 12 patients with the clinical diagnosis of Nager syndrome. *Hum Genet* 132: 885-898.
76. Lines MA, Huang L, Schwartzentruber J, Douglas SL, Lynch DC, Beaulieu C, Guion-Almeida ML, Zechi-Ceide RM, Gener B, Gillissen-Kaesbach G, Nava C, Baujat G, Horn D, Kini U, Caliebe A, Alanay Y, Utine GE, Lev D, Kohlhase J, Grix AW, Lohmann DR, Hehr U, Bohm D, Consortium FC, Majewski J, Bulman DE, Wieczorek D, Boycott KM (2012). Haploinsufficiency of a spliceosomal GTPase encoded by EFTUD2 causes mandibulofacial dysostosis with microcephaly. *Am J Hum Genet* 90: 369-377.
77. Zhang ZH, Niu ZM, Yuan WT, Zhao JJ, Jiang FX, Zhang J, Chai B, Cui F, Chen W, Lian CH, Xiang LH, Xu SJ, Liu WD, Zheng ZZ, Huang W (2005). A mutation in SART3 gene in a Chinese pedigree with disseminated superficial actinic porokeratosis. *Br J Dermatol* 152: 658-663.

78. National Center for Biotechnology Information (2019). Available from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>. (Accessed 13 April, 2019).
79. Kosugi S, Hasebe M, Matsumura N, Takashima H, Miyamoto-Sato E, Tomita M, Yanagawa H (2009). Six classes of nuclear localization signals specific to different binding grooves of importin alpha. *J Biol Chem* 284: 478-485.
80. Huttlin EL, Ting L, Bruckner RJ, Gebreab F, Gygi MP, Szpyt J, Tam S, Zarraga G, Colby G, Baltier K, Dong R, Guarani V, Vaites LP, Ordureau A, Rad R, Erickson BK, Wuhr M, Chick J, Zhai B, Kolippakkam D, Mintseris J, Obar RA, Harris T, Artavanis-Tsakonas S, Sowa ME, De Camilli P, Paulo JA, Harper JW, Gygi SP (2015). The BioPlex Network: A Systematic Exploration of the Human Interactome. *Cell* 162: 425-440.
81. Fei T, Chen Y, Xiao T, Li W, Cato L, Zhang P, Cotter MB, Bowden M, Lis RT, Zhao SG, Wu Q, Feng FY, Loda M, He HH, Liu XS, Brown M (2017). Genome-wide CRISPR screen identifies HNRNPL as a prostate cancer dependency regulating RNA splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114: E5207-E5215.
82. Hein MY, Hubner NC, Poser I, Cox J, Nagaraj N, Toyoda Y, Gak IA, Weisswange I, Mansfeld J, Buchholz F, Hyman AA, Mann M (2015). A human interactome in three quantitative dimensions organized by stoichiometries and abundances. *Cell* 163: 712-723.
83. Horlbeck MA, Xu A, Wang M, Bennett NK, Park CY, Bogdanoff D, Adamson B, Chow ED, Kampmann M, Peterson TR, Nakamura K, Fischbach MA, Weissman JS, Gilbert LA (2018). Mapping the Genetic Landscape of Human Cells. *Cell* 174: 953-967.e922.
84. Hart T, Chandrashekhar M, Aregger M, Steinhart Z, Brown KR, MacLeod G, Mis M, Zimmermann M, Fradet-Turcotte A, Sun S, Mero P, Dirks P, Sidhu S, Roth FP, Rissland OS, Durocher D, Angers S, Moffat J (2015). High-Resolution CRISPR Screens Reveal Fitness Genes and Genotype-Specific Cancer Liabilities. *Cell* 163: 1515-1526.
85. Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM, Haussler D (2002). The human genome browser at UCSC. *Genome Res* 12: 996-1006.

86. Rosbash M, Harris PK, Woolford JL, Jr., Teem JL (1981). The effect of temperature-sensitive RNA mutants on the transcription products from cloned ribosomal protein genes of yeast. *Cell* 24: 679-686.
87. Last RL, Stavenhagen JB, Woolford JL, Jr. (1984). Isolation and characterization of the RNA2, RNA3, and RNA11 genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 4: 2396-2405.
88. Lustig AJ, Lin RJ, Abelson J (1986). The yeast RNA gene products are essential for mRNA splicing in vitro. *Cell* 47: 953-963.
89. Anthony JG, Weidenhammer EM, Woolford JL, Jr. (1997). The yeast Prp3 protein is a U4/U6 snRNP protein necessary for integrity of the U4/U6 snRNP and the U4/U6.U5 tri-snRNP. *RNA* 3: 1143-1152.
90. Lauber J, Plessel G, Prehn S, Will CL, Fabrizio P, Groning K, Lane WS, Luhrmann R (1997). The human U4/U6 snRNP contains 60 and 90kD proteins that are structurally homologous to the yeast splicing factors Prp4p and Prp3p. *RNA* 3: 926-941.
91. Wang A, Forman-Kay J, Luo Y, Luo M, Chow YH, Plumb J, Friesen JD, Tsui LC, Heng HH, Woolford JL, Jr., Hu J (1997). Identification and characterization of human genes encoding Hprp3p and Hprp4p, interacting components of the spliceosome. *Hum Mol Genet* 6: 2117-2126.
92. Blencowe BJ, Ouzounis CA (1999). The PWI motif: a new protein domain in splicing factors. *Trends Biochem Sci* 24: 179-180.
93. Gonzalez-Santos JM, Wang A, Jones J, Ushida C, Liu J, Hu J (2002). Central region of the human splicing factor Hprp3p interacts with Hprp4p. *J Biol Chem* 277: 23764-23772.
94. Chakarova CF, Hims MM, Bolz H, Abu-Safieh L, Patel RJ, Papaioannou MG, Inglehearn CF, Keen TJ, Willis C, Moore AT, Rosenberg T, Webster AR, Bird AC, Gal A, Hunt D, Vithana EN, Bhattacharya SS (2002). Mutations in HPRP3, a third member of pre-mRNA splicing factor genes, implicated in autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Hum Mol Genet* 11: 87-92.

95. Gonzalez-Santos JM, Cao H, Duan RC, Hu J (2008). Mutation in the splicing factor Hprp3p linked to retinitis pigmentosa impairs interactions within the U4/U6 snRNP complex. *Hum Mol Genet* 17: 225-239.
96. Martinez-Gimeno M, Gamundi MJ, Hernan I, Maseras M, Milla E, Ayuso C, Garcia-Sandoval B, Beneyto M, Vilela C, Baiget M, Antinolo G, Carballo M (2003). Mutations in the pre-mRNA splicing-factor genes PRPF3, PRPF8, and PRPF31 in Spanish families with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44: 2171-2177.
97. Wada Y, Itabashi T, Sato H, Tamai M (2004). Clinical features of a Japanese family with autosomal dominant retinitis pigmentosa associated with a Thr494Met mutation in the HPRP3 gene. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 42: 956-961.
98. Zhong Z, Yan M, Sun W, Wu Z, Han L, Zhou Z, Zheng F, Chen J (2016). Two novel mutations in PRPF3 causing autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Sci Rep* 6: 37840.
99. Bernard P, Couturier M (1992). Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. *J Mol Biol* 226: 735-745.
100. Casali N (2003). *Escherichia coli* host strains. *Methods Mol Biol* 235: 27-48.
101. Maloy SR, Hughes KT (2007). Strain collections and genetic nomenclature. *Methods Enzymol* 421: 3-8.
102. Bertani G (1951). Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 62: 293-300.
103. Lennox ES (1955). Transduction of linked genetic characters of the host by bacteriophage P1. *Virology* 1: 190-206.
104. Hartley JL, Temple GF, Brasch MA (2000). DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome Res* 10: 1788-1795.
105. Landy A (1989). Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. *Annu Rev Biochem* 58: 913-949.

106. Hanahan D, Jessee J, Bloom FR (1991). Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods Enzymol* 204: 63-113.
107. Kretz K, Callen W, Hedden V (1994). Cycle sequencing. *PCR Methods Appl* 3: S107-112.
108. Sambrook J, Russell DW (2006). The inoue method for preparation and transformation of competent *E. coli*: "ultra-competent" cells. *CSH Protoc*; doi: 10.1101/pdb.prot3944.
109. Feliciello I, Chinali G (1993). A modified alkaline lysis method for the preparation of highly purified plasmid DNA from *Escherichia coli*. *Anal Biochem* 212: 394-401.
110. Grimm S, Voss-Neudecker F (2003). High-purity plasmid isolation using silica oxide. *Methods Mol Biol* 235: 83-87.
111. Sandell L, Sakai, D. (2011). Mammalian Cell Culture. *Curr Protoc Essent Lab Tech*. 5: 1-32.
112. Jordan M, Schallhorn A, Wurm FM (1996). Transfecting mammalian cells: optimization of critical parameters affecting calcium-phosphate precipitate formation. *Nucleic Acids Res* 24: 596-601.
113. Tang Z, Takahashi Y (2018). Analysis of Protein-Protein Interaction by Co-IP in Human Cells. *Methods Mol Biol* 1794: 289-296.
114. Brizzard BL, Chubet RG, Vizard DL (1994). Immunoaffinity purification of FLAG epitope-tagged bacterial alkaline phosphatase using a novel monoclonal antibody and peptide elution. *Biotechniques* 16: 730-735.
115. Schafer F, Seip N, Maertens B, Block H, Kubicek J (2015). Purification of GST-Tagged Proteins. *Methods Enzymol* 559: 127-139.
116. Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hamers C, Songa EB, Bendahman N, Hamers R (1993). Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* 363: 446-448.

117. Einarson MB, Pugacheva EN, Orlinick JR (2007). Identification of Protein-Protein Interactions with Glutathione-S-Transferase (GST) Fusion Proteins. CSH Protoc; doi: 10.1101/pdb.top11.
118. Garfin DE (2009). One-dimensional gel electrophoresis. Methods Enzymol 463: 497-513.
119. Sambrook J, Russell DW (2006). SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins. CSH Protoc; doi: 10.1101/pdb.prot4540.
120. Westermeier R, Marouga R (2005). Protein detection methods in proteomics research. Biosci Rep 25: 19-32.
121. Varkouhi AK, Scholte M, Storm G, Haisma HJ (2011). Endosomal escape pathways for delivery of biologicals. J Control Release 151: 220-228.
122. Donaldson JG (2015). Immunofluorescence Staining. Curr Protoc Cell Biol 69: 4.3.1-7.
123. Berggard T, Linse S, James P (2007). Methods for the detection and analysis of protein-protein interactions. Proteomics 7: 2833-2842.
124. Snider J, Kotlyar M, Saraon P, Yao Z, Jurisica I, Stagljar I (2015). Fundamentals of protein interaction network mapping. Mol Syst Biol 11: 848.
125. Phizicky EM, Fields S (1995). Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. Microbiol Rev 59: 94-123.
126. Fischer U, Englbrecht C, Chari A (2011). Biogenesis of spliceosomal small nuclear ribonucleoproteins. Wiley Interdiscip Rev RNA 2: 718-731.
127. Patel SB, Bellini M (2008). The assembly of a spliceosomal small nuclear ribonucleoprotein particle. Nucleic Acids Res 36: 6482-6493.
128. Little JT, Jurica MS (2008). Splicing factor SPF30 bridges an interaction between the prespliceosome protein U2AF35 and tri-small nuclear ribonucleoprotein protein hPrp3. J Biol Chem 283: 8145-8152.
129. Medenbach J, Schreiner S, Liu S, Luhrmann R, Bindereif A (2004). Human U4/U6 snRNP recycling factor p110: mutational analysis reveals the function of the tetratricopeptide repeat domain in recycling. Mol Cell Biol 24: 7392-7401.

130. Truebestein L, Leonard TA (2016). Coiled-coils: The long and short of it. *Bioessays* 38: 903-916.
131. Gouw M, Michael S, Samano-Sanchez H, Kumar M, Zeke A, Lang B, Bely B, Chemes LB, Davey NE, Deng Z, Diella F, Gurth CM, Huber AK, Kleinsorg S, Schlegel LS, Palopoli N, Roey KV, Altenberg B, Remenyi A, Dinkel H, Gibson TJ (2018). The eukaryotic linear motif resource - 2018 update. *Nucleic Acids Res* 46: D428-D434.
132. Lehnert S, Gotz C, Kartarius S, Schafer B, Montenarh M (2008). Protein kinase CK2 interacts with the splicing factor hPrp3p. *Oncogene* 27: 2390-2400.
133. Pozzi B, Mammi P, Bragado L, Giono LE, Srebrow A (2018). When SUMO met splicing. *RNA Biol* 15: 689-695.
134. Graziotto JJ, Inglehearn CF, Pack MA, Pierce EA (2008). Decreased levels of the RNA splicing factor Prpf3 in mice and zebrafish do not cause photoreceptor degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49: 3830-3838.
135. Tanackovic G, Ransijn A, Ayuso C, Harper S, Berson EL, Rivolta C (2011). A missense mutation in PRPF6 causes impairment of pre-mRNA splicing and autosomal-dominant retinitis pigmentosa. *Am J Hum Genet* 88: 643-649.
136. Koh MY, Gagea M, Sargis T, Lemos R, Jr., Grandjean G, Charbono A, Bekiaris V, Sedy J, Kiriakova G, Liu X, Roberts LR, Ware C, Powis G (2016). A new HIF-1alpha/RANTES-driven pathway to hepatocellular carcinoma mediated by germline haploinsufficiency of SART1/HAF in mice. *Hepatology* 63: 1576-1591.
137. Verma M (2012). Personalized medicine and cancer. *J Pers Med* 2: 1-14.
138. Vithana EN, Abu-Safieh L, Allen MJ, Carey A, Papaioannou M, Chakarova C, Al-Maghtheh M, Ebenezer ND, Willis C, Moore AT, Bird AC, Hunt DM, Bhattacharya SS (2001). A human homolog of yeast pre-mRNA splicing gene, PRP31, underlies autosomal dominant retinitis pigmentosa on chromosome 19q13.4 (RP11). *Mol Cell* 8: 375-381.
139. Schrank B, Gotz R, Gunnarsen JM, Ure JM, Toyka KV, Smith AG, Sendtner M (1997). 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* 94: 9920-9925.

140. Whitmill A, Liu Y, Timani KA, Niu Y, He JJ (2017). Tip110 Deletion Impaired Embryonic and Stem Cell Development Involving Downregulation of Stem Cell Factors Nanog, Oct4, and Sox2. *Stem Cells* 35: 1674-1686.
141. Graziotto JJ, Farkas MH, Bujakowska K, Deramaudt BM, Zhang Q, Nandrot EF, Inglehearn CF, Bhattacharya SS, Pierce EA (2011). Three gene-targeted mouse models of RNA splicing factor RP show late-onset RPE and retinal degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52: 190-198.



9. ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Gülden (YORGANCIOĞLU) BUDAK
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 02.09.1987, Şişli / İSTANBUL
E-Posta : gulden.yorgancioglu@gmail.com
Yazışma adresi : KTÜ SABE Tıbbi Biyoloji AD 61080 TRABZON

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora	: Karadeniz Teknik Üni. Tıbbi Biyoloji AbD	halen
Yüksek Lisans	: Karadeniz Teknik Üni. Tıbbi Biyoloji AbD	2014
Lisans	: Marmara Üniversitesi, Biyoloji (FEF)	2008

AKADEMİK/MESLEKİ DENEYİMİ

Görevi	Kurum	Süre
ÖYP Arş. Gör.	KTÜ Tıbbi Biyoloji AbD	2011-halen
ERASMUS	Freiburg Üniversitesi Nöropatoloji Enstitüsü	10 ay

YABANCI DİL

Almanca: Deutsches SprachDiplom (DSD) KMK Stufe II, YÖKDİL; 71.25

İngilizce: YÖKDİL Sağlık Bilimleri; 92.50, YDS; 83.75

ESERLER

A. SCI-E Kapsamına Giren Hakemli Dergilerde Yayımlanan Makaleler

A1. Dinçer T, Yorgancıoğlu-Budak G, Ölmez A, Er İ, Dodurga Y, Özdemir ÖMA, Toraman B, Yıldırım A, Sabir N, Akarsu AN, Semerci CN, Kalay E (2017). Analysis of centrosome and DNA damage response in PLK4 associated Seckel syndrome. *EJHG* 25: 1118-1125.

A2. Hagemeyer N, Kierdorf K, Frenzel K, Xue J, Ringelhan M, Abdullah Z, Godin İ, Wieghofer P, Costa-Jordao MJ., Ulas T, **Yorgancioglu G**, Rosenbauer F, Knolle PA, Heikenwaelder M, Schultze JL, Prinz M (2016). Transcriptome-Based Profiling of Yolk Sac-Derived Macrophages Reveals A Role For Irf8 in Macrophage Maturation. *EMBO J* 35(16):1730-44.

A3. Şahin S, Cansu A, Kalay E, Dinçer T, Kul S, Çakır İ, Kamaşak T, **Budak GY**. Leukoencephalopathy with thalamus and brainstem involvement and high lactate caused by novel mutations in the EARS2 gene in two siblings (2016). *J Neurol Sci* 365: 54-58.

B. Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında Basılan Bildiriler

B1. Dinçer T, **Budak G**, Semerci C, Ölmez A, Dodurga Y, Özmert M, Toraman B, Yıldırım A, Ergin H, Alver A, Akarsu N, Kalay E. A novel splicing site mutation of PLK4 that is required for centriole biogenesis and genomic stability causes Seckel Syndrome (2016). European Society of Human Genetics Congress (ESHG), Barcelona-İSPANYA Poster Bildiri, ss.354.

C. Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında Basılan Bildiriler

C1. Dinçer T, Boz AB, Er İ, **Budak Yorgancıoğlu G**, Toraman B, Kalay E. TGFβ sinyal yolağının Reseptörle Etkileşen serin/treonin Kinaz 4 (RIPK4) tarafından baskılanması. XV. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Sözlü Bildiri, ss.97, MUĞLA, 26-29 Ekim 2017.

C2. Toraman B, Livaoğlu M, Dinçer T, **Budak G**, Nalkiran İ, Ünsal S, Yıldız G, Akarsu AN, Kalay E. Kalıtsal nonsendromik yarı dudak/damak hastalığında genetik etiyolojinin araştırılması", XV. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Poster Bildiri, ss.225, MUĞLA, 26-29 Ekim 2017.

C3. **Budak Yorgancıoğlu G**, Şahin S, Dinçer T, Kamaşak T, Toraman B, Cansu A, Kalay E. Mitokondriyal Bir Hastalık Olan Kombine Oksitatif Fosforilasyon Eksikliği 12'ye Neden Olan İki Yeni EARS2 Mutasyonu. XIV. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Poster Bildiri, ss.373, MUĞLA, 27-30 Ekim 2015.

- C4.** Toraman B, Sümer C, **Yorgancıoğlu G**, Dinçer T, Tural Hesapçıoğlu S, Bilginer SÇ, Karakuş M, Kandil S, Kalay E. Dengeli Resiprokal Translokasyonun Segregasyonu Sonucu Meydana Gelen İki farklı Genetik Fenotip: Otizm Spektrum Bozukluğu ve Mental Retardasyon. XIV. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Poster Bildiri, ss.354, MUĞLA, 27-30 Ekim 2015.
- C5.** **Yorgancıoğlu G**, Kayserili H, Toraman B, Dinçer T, Kandil S, Bilginer SÇ, Sezgin O, Cansu A, Akarsu AN, Kalay E, Sendromik Mental Retardasyonlu Bir Ailede De Novo *PQBP1* Mutasyonu. XIII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Sözlü Bildiri, ss.112, AYDIN, 27-30 Ekim 2013.
- C6.** Öztürk B, Tural Hesapçıoğlu S, Toraman B, Bilginer SÇ, Göker Z, Dinçer T, **Yorgancıoğlu G**, Sümer C, Yıldırım A, Sezgin O, Seymen F, Köseahmet T, Yenisey F, Kandil S, Kalay E. Otizm Spektrum Bozukluklarının Etiyolojisinde Kromozomal Anomaliler. XIII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Poster Bildiri, ss.338, AYDIN, 27-30 Ekim 2013

D. Ödüller

D1. Prof. Dr. Altan GÜNALP Araştırma İkincilik Ödülü

Dinçer T, **Yorgancıoğlu-Budak G**, Ölmez A, Er İ, Dodurga Y, Özdemir ÖMA, Toraman B, Yıldırım A, Sabir N, Akarsu AN, Semerci CN, Kalay E. Analysis of centrosome and DNA damage response in PLK4 associated Seckel syndrome. XV. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, MUĞLA, 26-29 Ekim 2017.

D2. Poster Birincilik Ödülü

Toraman B, Livaoğlu M, Dinçer T, **Budak G**, Nalkıran İ, Ünsal S, Yıldız G, Akarsu NA, Kalay E. Kalıtsal nonsendromik yarık dudak/damak hastalığında genetik etiyolojinin araştırılması. XV. Tıbbi Biyoloj ve Genetik Kongresi, ss.225, MUĞLA, 26-29 Ekim 2017.

D3. Sözlü Bildiri Birincilik Ödülü

Yorgancıoğlu G, Kayserili H, Toraman B, Dinçer T, Tanrıöver Kandil S, Bilginer Ç, Sezgin O, Cansu A, Akarsu AN, Kalay E. Sendromik Mental Retardasyonlu Bir Ailede De Novo *PQBP1* Mutasyonu. XIII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, ss.112, AYDIN, 27-30 Ekim 2013.

E. Kurslar

- E1.** Deney Hayvanları Kullanımı Kursu, Karadeniz Teknik Üniversitesi, 2015
- E2.** Biyoinformatik Omik Veri Analiz Yöntemleri ve Kişisel Tıp Uygulamaları Kursu, XIV. Ulusal Tıbbi Biyoloji Ve Genetik Kongresi, Muğla, 25 Ekim 2015.
- E3.** BD Accuri C6 Flow Sitometri Kullanıcı Eğitimi, KTÜ, 2014.
- E4.** Konfokal Mikroskopi Teknikleri, Uygulamaları ve Gelişen Teknolojiler, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, 23-24 Eylül 2013.

F. Bilimsel Kuruluşlara Üyelikler

2014 – halen Tıbbi Biyoloji ve Genetik Derneği

2017 – halen Moleküler Biyoloji ve Genetik Derneği