

Sessiz Tümör Süpresör Gen Mutasyonlarının mRNA İşlenmesi Üzerine Olası Etkilerinin *Minigene Splicing* Assay ile Saptanması



Ali Yüksel^{1,*}, Oğuz Altungöz^{1,**}

¹Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

* aliyüksel@gmail.com, ** oguz.altungoz@deu.edu.tr

4. Uluslar Arası Katılımlı Hücre Ölümü Araştırma Derneği Kongresi, Türkiye, 17-19 Mart 2022



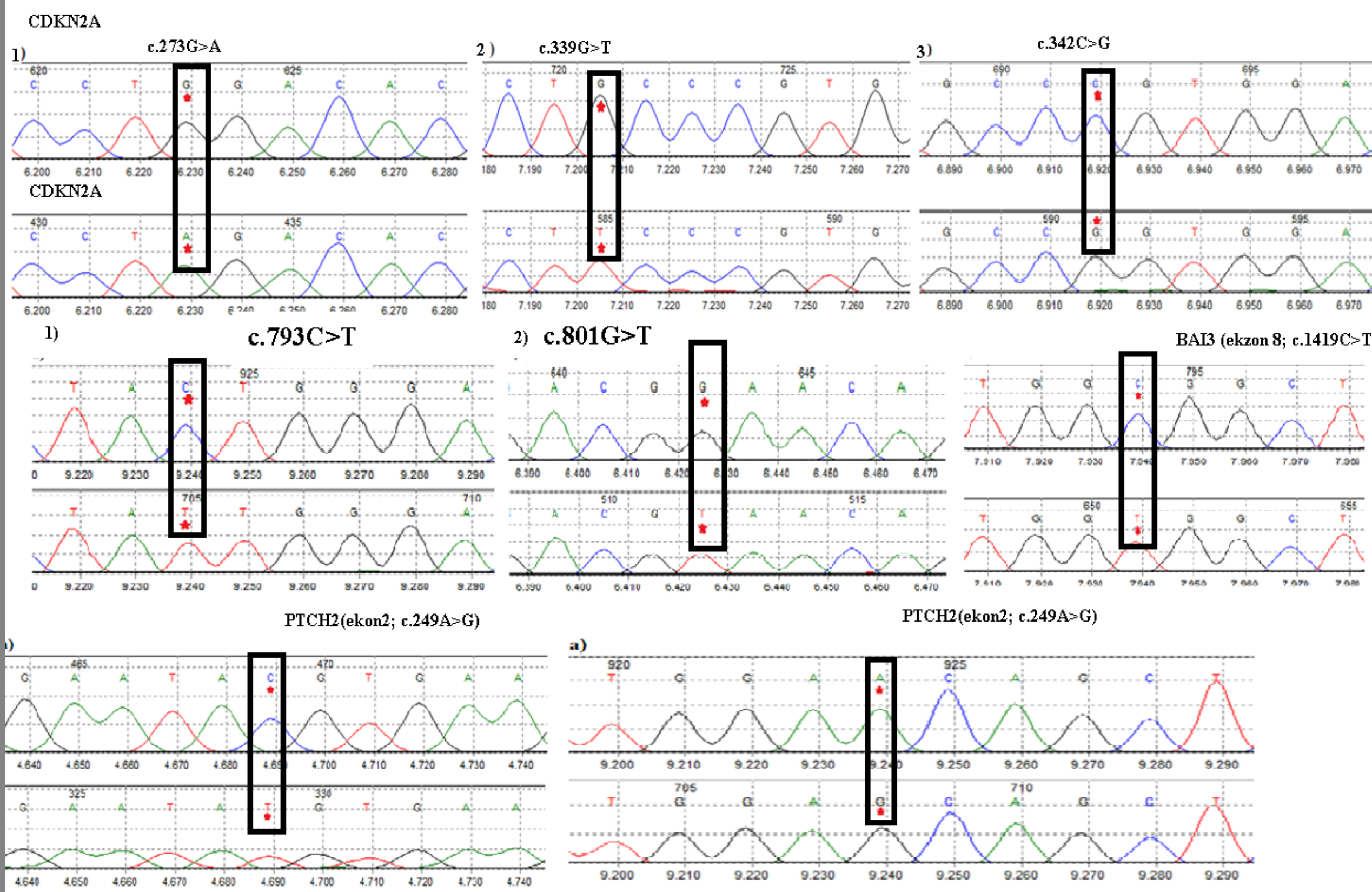
Giriş

Ökaryotik genlerin transkript ürünleri öncü bir mRNA (pre-mRNA) olarak sentezlenir ve ‘*Alternative splicing*’ ile genelde tek pre-mRNA’dan çok sayıda olgun-mRNA oluşturulur. Pre-mRNA’nın işlenmesinde klasik 5’-3’ kesim motifleri ile birlikte diğer cis-etkili *splicing* düzenleyici elementler olan ‘ekzonik veya intronik *splicing enhancer* ve *silencer*’ motiflerinin (*Exonic Splicing Enhancer/Silencer: ESE/ESS; Intronic Splicing Enhancer/Silencer: ISE/ISS*) rolü büyüktür¹. Bu cis-etkili Splicing düzenleyici motifler trans-etkili proteinlerin özgül bağlanma domainleridir ve bu motiflerde oluşan mutasyonlar hatalı mRNA'lara veya pre-mRNA'nın tamamen yıkımına neden olur¹⁻². Kanser türlerinde *splicing* mutasyonları ve anormal *splice* varyantları daha fazla görülür¹. Bu çalışmada tümör süpresör genlerin (TSG) ESE veya ESS dizilerini bozan sessiz mutasyonların da tümör süpresörlerin fonksiyonlarını bozabileceğinden yola çıkarak bu durumun hücre bölünmesi kontrolünü bozabileceği, hasarlı hücrelerin kontrollü ölümden kaçarak çoğalabileceği ve sonuçta kansere evrilebileceğini öngördük.

Gereç ve Yöntem

COSMIC (*Catalogue of somatic mutations in cancer*) veri tabanında kanser hücrelerinde belirlenmiş sessiz TSG mutasyonlarını taradık ve bu mutasyonları *Human Splicing Finder* biyoinformatik analiz sisteminde test ettik. Analiz sonucu beş farklı TSG’de sekiz farklı sessiz ekzonik mutasyonu (CDKN2A: c.273G>A, c.339G>T, c.342C>G; TP53: c.793C>T, c.801G>T; BAI3: c.1419C>T; CABLES2: c.1002C>T; PTCH2: c.249A>G) seçtik. Beş gene ait normal ekzon dizileri (CDKN2A: Ekzon2, TP53: Ekzon8, BAI3: Ekzon8, CABLES2: Ekzon8 ve PTCH2: Ekzon2) kontrol gurubunu oluşturmak üzere ‘*minigene-splicing assay*’ sisteminde kullanılan bir ekzon tutuklama vektörü olan pET01plazmidini içerisine paketledik (şekil 2 a). *Site-directed mutagenesis (SDM)* protokolü ile sekiz mutant plazmid’i oluşturduk (Şekil-2 b). Kontrol ve mutant plazmidlerini HeLa hücreleri içerisine transfekte ettik ve mutasyonların mRNA işlemlenmesi üzerindeki etkilerini cDNA'ların dizi analizi sonuçları üzerinden değerlendirdik (şekil-2 c).

Şekil-1 Site-directed mutagenesis ile oluşturulan mutasyonların DNA analiz sonuçları



Tartışma

Deneysel sonuçların biyoinformatik analiz sonuçları ile uyumlu olmadığı saptanmıştır. Bu durum biyoinformatik tahmin araçlarının geliştirilmeye muhtaç olduklarına işaret etmektedir. Bizim çalışmamız ve benzer deneysel çalışma sonuçları bu tarz araçların geliştirilmesine katkı sunacaktır. Ayrıca, elde edilmesi imkânsız veya zor olan dokularda var olduğu bilinen mutasyonların mRNA işlemlenmesi üzerine etkisinin analizinde ‘*minigene-splicing assay*’ sisteminin kullanımı³ faydalı bir model olabilir.

Sonuç

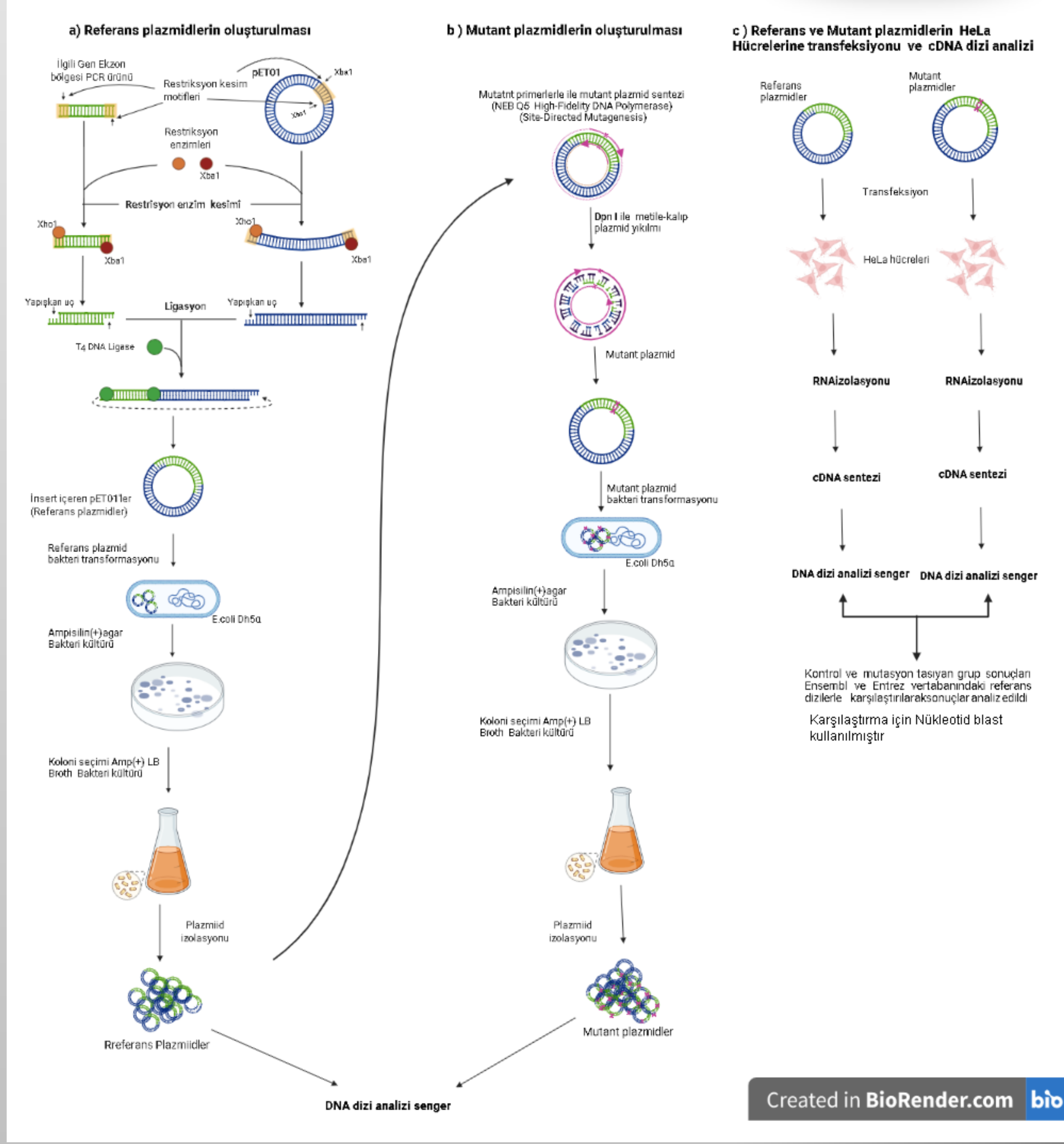
Seçtiğimiz sekiz TSG mutasyonunun ‘*minigene splicing assay*’ sonuçları, hiçbir mutasyonun mRNA işlenmesini bozmadığını göstermektedir. Dolayısıyla bu sekiz mutasyon da yolcu (passenger) mutasyon gibi görünmektedir.

Teşekkür: Bu araştırma DEÜ BAP Şube Müdürlüğü tarafından 2015.KB.SAG.035 proje numarası ile desteklenmiştir

Kaynaklar

- Cartegni, L., Chew, S.L. & Krainer, A.R. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat Rev Genet* 3, 285-98 (2002).
- Liu, S. & Cheng, C. Alternative RNA splicing and cancer. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 4, 547-66 (2013).
- Baralle, D. & Baralle, M. Splicing in action: assessing disease causing sequence changes. *J Med Genet* 42, 737-48 (2005).

Şekil-2 Deneysel Çalışma adımları özet şeması.



Şekil-3 Mutant gruba ait iki yönlü okuma yapılmış cDNA sekanslarının referans dizilerle Karşılaştırmasına ait Nucleotid Blast verileri aşağıda verilmiştir. Sarı ile işaretli diziler mutasyon taşıyan ekzonları, gri ve yeşil diziler ise 3’ ve 5’ uçlardaki ekzonları göstermektedir.

