



EGE ÜNİVERSİTESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**KÖPEK *GULO* GENİNİN PROMOTOR BÖLGESİNDEKİ
POLİMORFİZMLER VE PROMOTOR AKTİVİTESİNE
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Roja Fidel ACAR

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Cemal ÜN

Biyoloji Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi: 08.08.2018

EÜ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**Bornova-İZMİR
2018**

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**KÖPEK *GULO* GENİNİN PROMOTOR
BÖLGESİNDEKİ POLİMORFİZMLER VE
PROMOTOR AKTİVİTESİNE ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Roja Fidel ACAR

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Cemal ÜN

Biyoloji Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi : 08.08.2018

**Bornova-İZMİR
2018**

Roja Fidel ACAR tarafından Yüksek lisans tezi olarak sunulan “Köpek *GULO* Geninin Promotor Bölgesindeki Polimorfizmler ve Promotor Aktivitesine Etkilerinin Araştırılması” başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 08.08.2018 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri :

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Cemal ÜN

Raportör Üye : Dr. Öğr. Üyesi İnci TÜNEY KIZILKAYA

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Gülşah AKGÜL

İmza

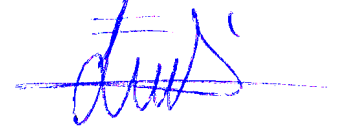


EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI**

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Köpek *GULO* Geninin Promotor Bölgesindeki Polimorfizmler ve Promotor Aktivitesine Etkilerinin Araştırılması” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

08.08.2018

Roja Fidel ACAR



ÖZET**KÖPEK *GULO* GENİNİN PROMOTOR BÖLGESİNDEKİ
POLİMORFİZMLER VE PROMOTOR AKTİVİTESİNE
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

ACAR, Roja Fidel

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Cemal ÜN

Ağustos 2018, 49 sayfa

C vitamini diğer adıyla L-askorbik asit memelilerin sağlığında önemli rolleri olan bir vitamindir. C vitamini sentezinde görevli olan bir enzim, *GULO* olarak adlandırılan bir gen tarafından kodlanır. İnsan, insansı primatlar, bazı meyve yarasaları, kemikli balıklar, ötücü kuşlar (Passeriformes takımı) ve koyalarda *GULO* geni pseudogene dönüştüğünden fonksiyonelliğini yitirmiş olup köpek de dahil diğer tüm memelilerde aktiftir.

Yapılan çalışmanın amacı köpek *GULO* geninin promotor bölgesindeki polimorfizm ve promotor motiflerini saptayıp bu polimorfizmlerin gen aktivitesine etkisini ortaya koymaktır. Bu amaçla 50 adet sokak köpeğinden toplanan kanlardan genomik DNA'ları izole edilmiştir. *GULO* geni promotor bölgesi için tasarlanan primerlerle bu bölge PZR yöntemi ile çoğaltılıp ardından sekanslanmıştır. Mega 7 programı ile elde edilen sekanslar hizalanarak ilgili polimorfizmler ortaya konmuş ve çoğaltılan bölge içerisinde promotor motifleri de aranmıştır. Promotor bölgedeki polimorfizmlerin araştırılmasına ek olarak, 10 köpekte *GULO* geni ekson-intron bağlantı bölgelerinin (intron 1 ve 3'ün ekson 2 ile birleşim bölgeleri) splaying motifleri ve bağlantı bölgelerindeki polimorfizmler de saptanmıştır.

Yapılan analizler sonucunda *GULO* geni promotor bölgesinde 9 farklı pozisyonda polimorfizm ve 10 tane de promotor motifi; ekson-intron bağlantı bölgelerinde ise 3 adet splaying motifi ve 6 adet tek nükleotit polimorfizmi saptanmıştır.

Promotor bölgede saptanan polimorfizmlerden bir tanesinin, birbiriyle çakışan iki promotor motifinin ortak nükleotitlerinin birinde yer aldığı görülmüştür. Bu motiflerdeki olası bir nükleotit değişimi, motiflere özgül olarak bağlanan -transkripsiyon faktörleri ve RNA Pol II gibi- düzenleyici faktörlerin bağlanmasını etkileyebilece-

ğinden, transkripsiyon sürecini etkileyebilir. Yine aynı şekilde promotor bölgede bulunan ancak motiflerin içerisinde yer almayan tek nükleotit polimorfizmlerinin de transkripsiyon seviyesini etkilemesi olasıdır.

Ekzon-intron bağlantı bölgesinde saptanan altı polimorfizmden ikisinin splaysing motifleri üzerinde yer almasından ötürü, *GULO* geni mRNA'sının splaysing mekanizması etkilenebilir.

Anahtar sözcükler: *GULO* geni, promotor bölge, polimorfizm, splaysing, promotor motifi, splaysing motifi.



ABSTRACT**INVESTIGATION OF POLYMORPHISMS IN THE PROMOTER REGION OF THE *GULO* GENE IN DOGS AND THEIR EFFECTS ON PROMOTER ACTIVITY**

ACAR, Roja Fidel

MSc in Department of Biology
Supervisor: Prof. Dr. Cemal ÜN
August 2018, 49 pages

L-ascorbic acid, originally called Vitamin C, is an important vitamin for the health of mammals. The enzyme that catalyzes the terminal step in the biosynthesis of vitamin C is encoded by a gene called *GULO*. While *GULO* gene has become a pseudogene in humans, hominoid primates, bony fishes, perching birds (passeriformes order), guinea-pigs and some of the fruit bats, it is still functional in all other mammals including dogs.

The aim of the study is to detect the polymorphisms and promoter motifs in promoter region of the *GULO* gene in dogs and prove the effect of these polymorphisms on gene activity. For this purpose, genomic DNAs were isolated from blood samples collected from 50 pariah dogs. This region was amplified by the PCR method with the primers designed and sequenced for the *GULO* gene promoter region. Polymorphisms have been detected on the sequences that were aligned by Mega7 software and promoter motifs have also been searched within the amplified region. In addition to the investigation of polymorphisms in promoter regions, the splicing motifs of exon-intron junction region (intron 1 and 3 are joined with exon 2) of *GULO* gene and polymorphisms in this region were determined in 10 dogs.

Upon analysis of results, polymorphism in 9 different positions and 10 promoter motifs in the promoter region were detected. Furthermore, 3 splicing motifs and 6 single nucleotide polymorphisms were detected in exon-intron junction region of *GULO* gene.

One of the polymorphisms detected in the promoter region has been found to be located on the common nucleotides of two overlapping promoter motifs. A potential nucleotide change in these motifs may affect the transcription process, as

it may affect the binding of motif-specific regulatory elements such as transcription factors and RNA Pol II. Similarly, single nucleotide polymorphisms which are found in promoter region but not in motifs may also effect the transcription level.

Since two of the six detected polymorphisms in the exon-intron junction region are located on splicing motifs, the splicing mechanism of the mRNA of *GULO* gene may be affected.

Keywords: *GULO* gene, promoter region, polymorphism, splicing, promoter motif, splicing motif



TEŞEKKÜR

Lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca öncelikle hayat görüşüyle bana yol gösteren ve akademik açıdan bilgi, öneri ve deneyimlerini sunan sevgili danışman hocam Prof. Dr. Cemal Ün'e,

Laboratuar çalışmalarım sırasında yaşadığım zorluk ve sorunlar için bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan ve bu anlamda yol gösteren hocam Doç. Dr. Evren Koban Baştanlar'a,

Çalışmamın şekillenmesinde benden bilimsel destek ve katkılarını esirgemeyen Ahmet Efe Köseoğlu'na,

Tezimin teknik anlamda biçimlenmesine yardımcı olan sevgili Can Umut İleri'ye,
Yüksek lisans eğitim sürecimde bana fikir ve önerileriyle destek veren çalışma arkadaşlarıma,

Çalışmamın ana materyali olan köpek kanlarını temin etmiş olan Bornova Veteriner İşleri Müdürlüğü'nde görev yapan veteriner hekimlere,

Yapmış olduğum çalışmayı 2016-FEN-012 numaralı proje adı altında finanse eden Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne,

Teşekkür ederim.

Roja Fidel ACAR

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
TEŞEKKÜR	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xviii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xix
1. GİRİŞ	1
1.1 C Vitamini'nin Yapısı, Fonksiyonları ve Biyosentezi	1
1.2 <i>GULO</i> Geni	3
1.3 Pseudogenler ve Oluşum Mekanizmaları	5
1.4 Promotorun Ökaryotik Gen İfadesindeki Önemi	8
1.4.1 Ökaryotik Gen Yapısı ve İfadesi	8
1.4.2 Ökaryotik Gen Regülasyonu	9
1.4.3 Ökaryotlarda Promotor Bölge	10
1.4.4 RNA Polimeraz ve Transkripsiyon Faktörlerinin Promotor ile İlişkisi	12
1.4.5 Enhansörlerin ve Silencerların Promotor ile İlişkisi	13
2. MATERYAL VE METOT	16

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2.1 Hayvanlar ve Örnekler	16
2.2 Kandan Genomik DNA İzolasyonu	16
2.3 <i>GULO</i> Geni Promotor Bölgesi'nin Çoğaltılması	16
2.3.1 Primer Dizaynı	16
2.3.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	17
2.3.3 Agaroz Jel Elektroforezi	19
2.3.4 Sekanslama	22
2.3.5 Polimorfizmlerin Belirlenmesi	22
2.3.6 Motiflerin Belirlenmesi	22
2.4 <i>GULO</i> Geninin Splicing Motiflerinin Belirlenmesi Amacıyla Ekson 2'nin Çoğaltılması	22
2.4.1 Primer Dizaynı	22
2.4.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	24
2.4.3 Agaroz Jel Elektroforezi	25
2.4.4 Sekanslama	25
2.4.5 Polimorfizmlerin Belirlenmesi	25
2.4.6 Splicing Motiflerinin Belirlenmesi	25
3. SONUÇLAR	26

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
4. TARTIŞMA	37
KAYNAKLAR DİZİNİ	41
ÖZGEÇMİŞ	49



ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 Memelilerde C vitamini biyosentez yolağı	3
1.2 Ensembl veri tabanında bulunan köpek (<i>Canis lupus familiaris</i>) <i>GULO</i> geni	4
1.3 Duplike ve işlenmiş pseudogen oluşum mekanizmaları	7
1.4 İnsan ve fare kromozomlarında <i>GULO</i> genini içeren bölgelerin karşılaştırılması	8
1.5 Tipik bir ökaryotik genin yapısı	10
1.6 Ökaryotik bir genin organizasyonu ve promotor bölgesinde bulunan motifler	11
1.7 Ökaryotik bir genin promotor bölgesine transkripsiyon faktörleri ve RNA Polimeraz II'nin bağlanması	13
2.1 Köpek <i>GULO</i> geni promotor bölgesi primer bağlanma bölgeleri	17
2.2 PZR işlemi sonrası yapılan jel elektroforezi görüntüsü 1	20
2.3 PZR işlemi sonrası yapılan jel elektroforezi görüntüsü 2	21
2.4 PZR işlemi sonrası yapılan jel elektroforezi görüntüsü 3	21
2.5 PZR işlemi sonrası yapılan jel elektroforezi görüntüsü 4	22
2.6 Köpek <i>GULO</i> geninin ekson 2'yi içeren dizisinde primer bağlanma bölgeleri	23
2.7 Jel elektroforezi görüntüsü	25
3.1 Çoğaltılan 450 nükleotitlik bir bölge	26

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.2 Tek nükleotit polimorfizmleri. Pozisyon: -315	27
3.3 Tek nükleotit polimorfizmleri. Pozisyon: -344	28
3.4 Tek nükleotit polimorfizmleri. Pozisyon: -377	29
3.5 Tek nükleotit polimorfizmleri. Pozisyon: -429	30
3.6 Tek nükleotit polimorfizmleri. Pozisyon: -486	31
3.7 Tek nükleotit polimorfizmleri. Pozisyon: -533 ve -540	32
3.8 Tek nükleotit polimorfizmleri. Pozisyon: -573 ve -591	33
3.9 Mega 7 programı ile saptanan tek nükleotit polimorfizmlerinin sekans- lanan 450 nükleotit üzerinde gösterimi	35
3.10 Çoğaltılması hedeflenen promotor bölge ile içerisindeki polimorfizmler ve promotor motifleri	36

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Promotor bölge için dizayn edilen primer çiftleri	16
2.2 <i>Canis lupus familiaris</i> (köpek) <i>GULO</i> geni promotor bölgesinin PZR işlemi ile çoğaltılması için kullanılan reaksiyon bileşenleri ve miktarları.	18
2.3 PZR için sıcaklık, süre ve döngü koşulları	18
2.4 <i>GULO</i> geni intron 1 ve 2'nin,ekson 2 ile ilişkili bölgelerinin amplifikasyonu için dizayn edilen primer çiftleri.	23
2.5 <i>Canis lupus familiaris</i> (köpek) <i>GULO</i> geni intron 1 ve 2'nin ekson 2'yle bağlanma bölgelerinin PZR işlemi ile çoğaltılması için kullanılan reaksiyon bileşenleri ve miktarları.	24
2.6 PZR için sıcaklık, süre ve döngü koşulları	24
3.1 Köpek <i>GULO</i> geni promotor bölgesinde saptanan polimorfizm pozisyonları	34
3.2 Ekson-intron birleşme bölgelerinde bulunan polimorfizmler ve splising motifleri	35

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
$^{\circ}C$	Santigrat derece
V	Volt
Ψ	Psi
P	Pseudogen
pH	Hidrojenin gücü
M	Mol
Fe^{+3}	Ferrik demir
Fe^{+2}	Ferröz demir
μl	Mikrolitre
μM	Mikromol
μmol	Mikromolar
$pmol$	Pikomol
ml	Mililitre
ng	Nanogram

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ (devam)

Kısaltmalar	Açıklama
A	Adenin nükleotidi
C	Sitozin nükleotidi
G	Guanin nükleotidi
T	Timin nükleotidi
B	Sitozin, guanin ve timin nükleotitlerinden biri
D	Adenin, guanin ve timin nükleotitlerinden biri
M	Adenin ya da sitozin nükleotidi
N	Adenin sitozin, guanin ya da timin nükleotidi
R	Adenin ya da guanin nükleotidi
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
DNA	Deoksiribonükleik asit
cDNA	Komplementer DNA
RNA	Ribonükleik asit
RNAP	RNA polimeraz
RNA pol	RNA polimeraz

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ (devam)

Kısaltmalar	Açıklama
mRNA	mesajcı RNA
RNAi	RNA interferaz
siRNA	Küçük interferaz RNA
pre-mRNA	Olgunlaşmamış mRNA
ORF	Açık okuma çerçevesi
ncRNA	Kodlamayan RNA
<i>MYLK</i>	Miyozin hafif zincir kinaz
<i>TNFRSF18</i>	Tümör nekroz faktörü reseptör süper ailesi üyesi 18
<i>GULO/GLO</i>	L-gulono-gamma-lactone oxidase gene
UDP	Üridin difosfat
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
UTR	Untranslated region
SNP	Tek nükleotit polimorfizmi
TF	Transkripsiyon faktörü
TFII	Transkripsiyon Faktörü II

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ (devam)

Kısaltmalar	Açıklama
dNTP	deoksinükleosid trifosfat
TAE	Tris Asetat EDTA
bç	Baz çifti
sn	Saniye
dk	Dakika

1. GİRİŞ

1.1 C Vitamini'nin Yapısı, Fonksiyonları ve Biyosentezi

Vitaminler, vücudun çeşitli biyokimyasal ve fizyolojik süreçleri için esansiyel olan bir besin sınıfıdır. İnsan vücudu vitaminlerin büyük bir kısmını sentezleyemez, bu nedenle besinler veya hazır preparatlar şeklinde gerekli miktarda alınmaları gerekmektedir. Vitaminler; yağda ve suda çözünenler olarak kendi içerisinde ikiye ayrılmaktadır. A, D, E, K vitaminleri yağda çözünme özelliğine sahipken C, B ve B vitamin kompleksleri suda çözünmektedir (Iqbal et al., 2004).

Askorbik asidin L- enantiyomeri olan C vitamini veya diğer adıyla L- askorbik asit; suda eriyebilen bir monosakkarit türevi olup, glikoz ve diğer altı karbonlu monosakkaritlere benzerlik gösterir. Suda erime özelliğine sahip olduğu için de karaciğerde depolanamaz (Bánhegyi and Mandl, 2001), (Naidu, 2003).

Askorbik asit ilk olarak 1933 yılında Nobel ödüllü Macar fizyolog Albert Szent-Gyorgyi tarafından kırmızı biberden izole edilmiştir. Bitkilerde bulunan bir maddenin eksikliği sonucu skorbut hastalığına sebep olduğu düşünüldüğü için C vitamini Antiskorbüt vitamini adı verilmiştir (Svirbely and Szent-Györgyi, 1933).

Kimyasal adı: 2,3-didehydro-L-threo-hexono-1,4-lactone olan C vitamininin moleküler formülü ise $C_6H_8O_6$ 'dır ve 176.124 g/mol moleküler ağırlığa sahiptir. pH 4 ile 6 arasında maksimum kararlılık gösterir (Matei et al., 2008), (PubChem, 2018) (Erişim tarihi: 05.06.2017). Kararsız ve kolay okside olabilen yapısı nedeniyle oksijen, alkali ve yüksek sıcaklık ile degrades edilebilir (Iqbal et al., 2004).

Antioksidant özelliği olan vitamin C (Frei et al., 1989) vitamin E ile birlikte vücuttaki diğer antioksidanları rejenere ettiği de gösterilmiştir (Jacob and Sotoudeh, 2002). Ferrik demiri (Fe+3) ferröz demir (Fe+2) formuna çevirerek demir emilimine de yardımcı olmaktadır (Sayers et al., 1973). C vitamini biyokimyasal özelliği sayesinde biyolojik sistemlerde hem enzim kofaktörü hem de antioksidan olarak rol alır. Bağışıklık sisteminin güçlendirilmesi, dişlerin gelişimi, yaraların daha hızlı iyileşmesi, kanser ve kalp hastalıklarına karşı koruyuculuk gibi görevlere sahiptir (Carr and Frei, 1999). Kollajen, karnitin ve nöradrenalin biyosentezinde rol oynar (Yi and Schellhorn Herb, 2007). Prolin hidroksilaz, lizin hidroksilaz ve dopamin B-monooksijenaz enzimlerinin de kofaktörüdür. C vitamini insanlarda sekiz enzim için elektron vericisi olarak görev yapar, bunlardan üçü, kollajen hidroksilasyonunda (nörepinefrin, peptid hormonu ve tirozin metabolizması da dahil olmak

üzere) ve ikisi de karnitin biyosentezinde görevlidir (Capra et al., 2006). Yapılan araştırmalarda, insan fibroblast kültüründe kollajen geninin (COL29A1) uyarılması için vitamin C'nin gerekli olduğu da kanıtlanmıştır (Pullar et al., 2017). Zira kollajen hareket sisteminin elemanları olan kemik, kıkırdak, lif ve eklemlerin yapı taşı olan bir proteindir (Gelse et al., 2003). Ayrıca, vücudun demir absorbe etmesine ve birçok alerjik reaksiyonun iltihap bileşeni olan histaminin parçalanmasına yardımcı olur (Gaby et al., 1991).

C vitamininin antioksidan aktivitesi serbest radikallerin zararlı etkilerini sınırlandırarak, bazı kanser türlerinin gelişimini önlemeye veya geciktirmeye yardımcı olabileceği gibi kardiyovasküler hastalıklar ve oksidatif stresin neden olduğu bazı hastalıklarda da bu zararlı etkileri sınırlar (Li and Schellhorn, 2007), (Carr and Frei, 1999).

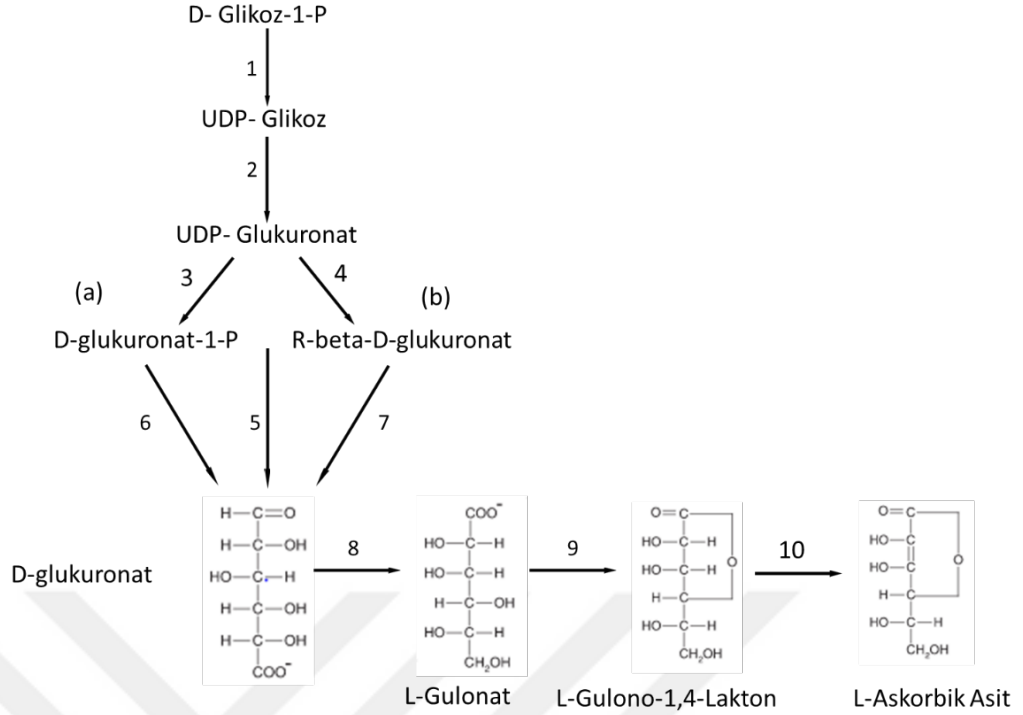
Balıklar, amfibiler, sürüngenler ve kuşlarda (Passeriformes takımı kuşlar hariç) askorbat sentezi böbrekte gerçekleşirken (Chatterjee, 1973), kendi C vitamini sentezleyebilen memelilerde ise C vitamini biyosentezi karaciğerde gerçekleşir (Linster and Van Schaftingen, 2007).

Mayalar, bitkiler ve hayvanlar C vitamini sentezinde farklı yollar kullanmaktadır. Mayalarda C vitamininin bir varyantı olan D-eritroaskorbat, D-arabinozdan üretilirken bitkilerde vitamin C, GDP-D-mannoz'dan omurgalı hayvanlarda ise UDP-D-glucuronat'tan sentezlenmektedir (Tomkins, 2014).

Hayvanlarda askorbat sentezi için genel kabul gören biyosentetik yol, büyük ölçüde sıçan karaciğeri ile yapılan çalışmalara dayalıdır. Memelilerde C vitamini biyosentezi Şekil 1.1 üzerinden anlatılmıştır.

C vitamini bağışıklık sistemini desteklediğinden yeteri kadar alınmadığı takdirde enerji azlığı, burun kanaması, yaraların geç iyileşmesi ve skorbüt adı verilen hastalığı ortaya çıkarır. Skorbüt; uzun süre ve yeterli miktarda C vitamini almayan bireylerde ortaya çıkan halsizlik, zayıflama, diş eti kanaması, ciltte morluğa ve eklemlerde şişliğe yol açan bir hastalıktır. Tarihte, uzun süre denizlerde kalan denizcilerin taze sebze meyve tüketmemesi ve kuru gıda ile beslenmeleri sonucu ortaya çıkan C vitamini eksikliği skorbüt'e neden olmuştur (De Tullio, 2010).

C vitamini sentezinin son basamağında görevli olan bir enzim (L-gulonolactone oksidase), *GULO* olarak adlandırılan bir gen tarafından kodlanır.



Şekil 1.1. Reaksiyonu katalizleyen enzimler sırasıyla: 1. UDP-glikoz pirofosforilaz; 2. UDP-glikoz dehidrogenaz 3. Nükleotit pirofosfotaz/ fosfodiesteraz; 4. UDP-glukurono transferaz; 5. UDP-glukuronadaz; 6. fosfotaz; 7. B-glukuronidaz; 8. Glukuronat redüktaz; 9. Gulono laktonaz; 10. L-gulono laktonoksidaz. Bu şekil Linster ve Schaftingen'in Vitamin C Biosynthesis, Recycling and degradation in Mammals adlı makalesinden alınıp modifiye edilmiştir (Linster and Van Schaftingen, 2007).

1.2 *GULO* Geni

C vitamini biyosentezi, memelilerde başlangıç substratı olarak glikoz ile başlayan çok aşamalı bir süreçtir. Bu sürecin son basamağını katalizleyen ve 'L-gulono- γ -lactone oksidase' (EC 1.1.3.8) olarak adlandırılan enzim *GULO/GLO* adlı bir gen tarafından kodlanır (Tomkins, 2014).

İnsan, insansı primatlar, bazı meyve yarasaları, kemikli balıklar, ötücü kuşlar (Passeriformes takımı) ve kobaylarda *GULO* geni pseudogene dönüştüğünden bu canlılarda C vitamini sentezlenememekte ancak diğer tüm hayvanlar ve bitkiler C vitaminlerini kendileri sentezlemektedirler. (Chinoy et al., 1984).

Günümüze kadar yapılan çalışmalarda insan *GULO* pseudogeni fonksiyonel olan sıçan *GULO* geni ile kıyaslanmıştır (Kawai et al., 1992), (Nishikimi et al., 1994). UCSC Genom Tarayıcısı (genome.ucsc.edu) ve Rat Genom Veritabanı'na (rgd.mcw.edu) göre sıçan *GULO* geni 15. kromozomun p12 bandında, insan *GULO* pseudogeni 8. kromozomun p21.1 bandında ve 28.799 baz çifti uzunluğundadır. Gen

bölgesi 6 ekson ve 5 intron içermektedir (GenBank - National Center for Biotechnology Information (NCBI)).

İnsan *GULO* pseudogeni ilk olarak 1994 yılında Nishikimi ve ekibi tarafından fonksiyonel sıçan *GULO* geni ile karşılaştırarak ortaya çıkarılmıştır (Nishikimi et al., 1994; Kawai et al., 1992). İnsanda *GULO* pseudogenindeki 6 eksonun dördü sıçandaki eksonlarla (7, 9, 10, 12. eksonlar) büyük ölçüde homoloji göstermekte olup, çok fazla konserve olmayan nükleotit değişimi ile iki adet non-sense mutasyon (stop kodona sebep olan) içermektedir. İnsandaki diğer iki ekson (8 ve 11. ekson) sıçandakilerle karşılaştırıldığında delesyona sahiptir. Sekizinci eksondaki delesyonun sebebi geçmişte insan ve diğer primatların ortak atasının genomunda meydana gelen transposable element insersiyonudur.

Ensembl.org veritabanında bulunan bilgilere göre *GULO* geni köpeklerde 25. kromozomda bulunup, 12 ekson ve 11 intron içeren gen bölgesi 32109 nükleotit uzunluğundadır. Gene ait referans dizi, ENSCAFG0000008414 erişim numarası ile Ensembl veri tabanında bulunmaktadır. Veritabanında bulunan köpek *GULO* genine ait promotor bölge ekson 1 ve intron 1'e ait nükleotit dizileri Şekil 1.2'de verilmiştir.

```

>chromosome:CanFam3.1:25:30004612:30040622:-1
ATCCTGCGGCCAGCCAGCTCACAGCTGGGGCAGATGCAAGAGCTTGGGGCAATTTCCAAG
TTCTGTGTGTGTCCTCCATGCTCCTCATCCAGCAGCTCTAACCTTTCGATGGACCCAGAGA
ATTAGGCAAAACGTGCCCCCAACTATCGAGGAGGAAAACGAGGCCCTCAAGTGTATCA
GGCAAAAAGTATAGATAAGGAACCAGCTCTGTCTGCCCTAAAGCCTAGGGAGGGAAGGC
CGCTGCTAGAAGACTCTGCCITGGGCTGAGTGTCCCTTTTCTCCCTCCCCCAACCCCCA
CCCCCACCCTTGTCTGTCTCCTACAGTGATGGCTGGCTTCTGTACCCATCCCCCAAG
TCTGACAAGTGGGCTAACTAGCACAGGTGAGATTCCATTCATGTGGCGTGCCACGTGT
GCCCTCTGCAAGCAGGCACCAAGGGAGGCCCTATGTTAAGACCCCAACAAGCCCCCAC
ATCATAGCCTCCCTGACCTATGGAATCAAGGACCCAGTCTGAAGCAGCGGGGTGTGG
GGTTGGGTCAGAGTGAAGACACTTCCGGAACAGAGCCGCTACCTCTTAAACTCTGCTC
TTCCACCTTCTGCCTGAGAAGGCCCCCGAGGCAGGGGGCAGGCCCTGAGCTGCTGTTTGA
TGGGTGGAGCTTGTGCAACACTGTTTACCCACCTTTGCCAGGGCCAAAGCCCTCGGG
GTATGCGGTACATCAGAGTCAAGCCCTGAGCAGAGGGAGGTCACTGTGCTCCCGTCTGTG
TGCTCCGGGCCCTCGCTCCACCTCGTCCCTGCAGCCCGCTGCCAGTGTCTGTCCCTGA
GGAAGCCACAGTCAAGCCAGGCCACCGACCCACCCCTGGAGCCATGTTAGGCTAACGCCG
CACAGCCCGGCAGCCCGCAGGCTGCGTCCAGGTTGCGCCCATGAACCAGGCAGGGGAGG
ACAAAATTAAGTCAAGTCTGGGACTGCGGGGGGAGGCCACGGGACCCCTTTGAATTGG
ACTTGAGGCTTTAGGGGTGGCACTGGGGTGTGGGGAAAGCTTGGGAGGTGAAAGTCCGG
GTTGGACTCCGGTGTCTTCACTTGATTGCTGTGTGTGCTTGGGGAAGTTACTTCACTCT
CTGAGCTTTGCTTTCTGCTCCTGAAAAGGGCGATAATGTTACCCTTTCTCGGCATTAAT
ATAAGTCTAAATAAGGTGTGATATATAGAGGATCTCAGTACAGTGTCTGATACACAGGC
TTCTCCCTGGGGCTCCCTGCTTGGGCTTCGAGGCCGGGACGGCTGCCGTGGAGTCTCCCA
GACCTGGCCCTCCCTGGCAGGAGGAGCCTGTTGGGAGAGGTGAGAGCCAGCTCCAGGGCC
TCTGGGCCACCAGGCCAGCTCAGGCCACCCCTTCCCAGTCAACCCCAAGAGGTGCCCC
AGACAGAGCAGGGGCCAGGGCCCTGAGGCCCTGCCCTCTCAGCTCCGCCCCGACCCCG
TCCCTTCTACTAAGAAGGGACACACGGTTTCCCGTGCCATCCGCCCCCGTGGCCGCGAGG
GGTCCAGGGAGACAAGCCCTGCACGTAGCTGCTCAGCTTTCAGAGCCCGCCGACGCTTCCA
CCTCCCCCGGGCCCTGAGCGGTGACCGTGACCCGGGCGAGCAGCCTGGCTCCGCGCCCTG
GCCGACGCTCCAGCCACGGCCGCTCAGCCCTGGCCACCCGGCTCTTCGCCCTCG

```

Şekil 1.2. Ensembl veri tabanında bulunan köpek (*Canis lupus familiaris*) *GULO* geni promotor bölge, ekson 1 ve intron 1'in bir kısmı gösterilecek şekilde verilmiştir (Erişim numarası: ENSCAFG0000008414). Genin 25. Kromozomda ve 30004612-30040622 nükleotitleri arasında bulunduğu dizinin en üst kısmında belirtilmektedir.

1.3 Pseudogenler ve Oluşum Mekanizmaları

1953 yılında Watson ve Crick'in ortak çalışmasıyla yapısı ortaya konan deoksiribonükleik asit ya da kısa adıyla DNA, bazı virüslerin ve tüm canlı organizmaların canlılık işlevlerini yerine getiren ve kalıtımı sağlayan nükleik asittir (Watson et al., 1953). DNA, protein ve RNA sentezi için gerekli olan bilgileri taşıyan bir kalıp görevi görür. Bu genetik bilgileri içeren ve bu bilgilerin nerede, nasıl kullanılacağını düzenleyen DNA bölümleri ise gen olarak adlandırılır. Ökaryotik organizmalarda fonksiyonel bir ürünün sentezlenebilmesi için ilgili gen bölgesinin bir regülatör görevi gören promotor bölgeye, ekson bölgesine ve kodlamanın nerede biteceğini belirleyen durdurma kodonuna sahip olması gerekmektedir. Tüm bu bölgelerin dışında yine ökaryot organizmalarda intron bölgesi ve transkripsiyonu düzenleyen enhansır bölgeler de mevcuttur (O'Connor et al., 2010), (Alberts et al., 2013).

Memeli genomunun çoğu protein kodlamayan dizilerden oluşur. Genellikle genomun kodlamayan bölümlerinde bulunan dizilerin yaklaşık %10'u evrimsel olarak korunmuştur ve dolayısıyla işlevsel anlamda önemi olabilecekleri düşünülmektedir. Protein kodlamayan bölgelerden biri de pseudogenlerdir. İnsan genomunda yaklaşık 18.000 pseudogen bulunmaktadır (Patrushev and Kovalenko, 2014).

Pseudogen kelimesi ilk olarak Jacq ve arkadaşları tarafından kullanılmıştır (Jacq et al., 1977). Bu çalışmada kurbağa 5S rRNA'sı için kodlama yaptığı düşünülen genin gerçekte RNA ürününü işlevsiz hale getiren çeşitli dejeneratif özelliklere sahip olduğu tespit edilmiş, bu sekansı tanımlamak için de pseudogen terimi kullanılmıştır. Bu çalışmanın ardından pseudogenler bakteriler, bitki, böcek ve omurgalılar da dahil olmak üzere çeşitli canlı türlerinde keşfedilmiştir (Zheng et al., 2007).

Pseudogenler (Ψ) literatürdeki genel tanımı itibariyle, genomda fonksiyonel genlerle sekans benzerliği gösteren ancak evrimsel süreç içerisinde biriken mutasyonlar ile artık ifade edilmeyen dolayısı ile birçoğu aktif bir protein sentezlemeyen genlerdir. Nadiren de olsa bazı pseudogenlerin fonksiyonel bir promotor aracılığıyla transkribe olduğu ancak translasyonel ve splaysing sinyal sekansları eksikliği nedeniyle protein oluşturamadığı bilinmektedir (Balakirev and Ayala, 2003).

Son yıllarda yapılan pseudogen çalışmalarında, bu genlerin bazı durumlarda, kendi RNA ürünleri aracılığıyla düzenleyici görevi gördükleri belirtilmiştir. Yapılan çalışmalarda bu genlerin farklı türden aktivitelere sahip oldukları saptanmıştır. Bunlardan ilki, fonksiyonel bir genin mRNA stabilitesini, kendi aşırı ekspresyonuyla azaltarak, ana genin ekspresyonunu düşürebilmesidir. Buna örnek olarak ise kanser

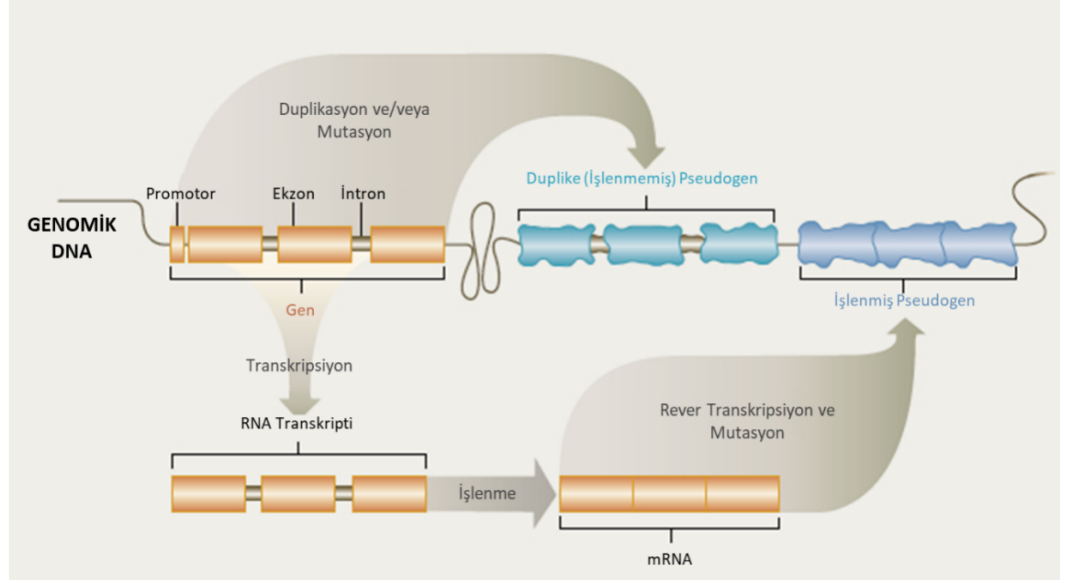
hücrelerini up-regüle eden *MYLKPI* pseudogeni verilmiştir. Pseudogenin transkripsiyonu sonucu oluşan kodlama yapmayan RNA'nın (ncRNA), fonksiyonel *MYLK* geninin mRNA ekspresyonunu engellediği ortaya konmuştur. Bu çalışmalardan bir diğeri ise *Drosophila* ve farelerde yapılmış olup, işlenmiş pseudogenlerin ürünü olan siRNA'ların, RNA interferans (RNAi) mekanizmasıyla gen ekspresyonunu kontrol ettiğini göstermiştir (Pei et al., 2012).

Pseudogenler iki farklı şekilde sembolize edilirler, bunlardan ilki bir Yunan sembolü olup 'Ψ' (Psi) şeklinde ifade edilir (örneğin *GULO* (Ψ)) bir diğeri ise büyük harf ve italik olarak kullanılan 'P' harfidir (örneğin *GULOP*) (Mighell et al., 2000).

Birçoğu aktif olmayan bu genler, omurgalılar ve çiçekli bitkiler gibi kompleks organizmaların genomlarında bol miktarda bulunmaları nedeniyle mutasyon hızı ve nötr evrim kalıplarını incelemek için yararlı bir kaynaktırlar. Sayesinde DNA evrimi hakkında çok şey öğrendiğimiz pseudogenlerin DNA regülasyonundaki rolünün keşfiyle birlikte bu genlerin transkriptom evrimi çalışmalarındaki potansiyel yararları da önem kazanmıştır (Podlaha and Zhang, 2010). Pseudogenler genomun herhangi bir yerinde olabilirler (Zheng et al., 2007).

Pseudogenlerin çoğu, DNA ya da RNA aracılı duplikasyon tarafından üretilen genlerden meydana gelmiştir (Zhang et al., 2010). Literatüre bakıldığı zaman iki çeşit pseudogen bulunmaktadır (Wen et al., 2012). Bunlar: işlenmiş (processed) ve işlenmemiş (unprocessed) pseudogenlerdir. Her iki yol ile meydana gelen pseudogenler de orijinal ana genin ayırt edici birer kopyasıdır ve bu genler genomun herhangi bir yerinde bulunabilirler (Zheng et al., 2007).

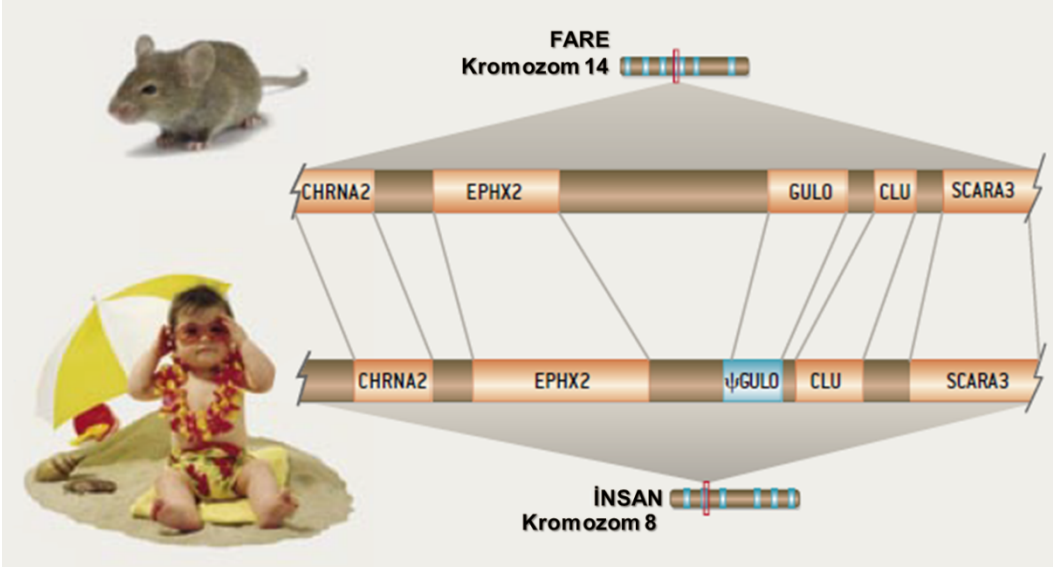
Bir hücre bölünmeden hemen önce kendi genomunu çoğaltır ve bu süreç boyunca bir genin fazladan bir kopyası kromozomda yeni bir lokasyona entegre edilebilir. Bu yolla meydana gelen pseudogen işlenmemiş diğer adıyla duplike pseudogendir (Gerstein and Zheng, 2006). Bu pseudogenlerin ekspresyonları genellikle yanlış yerleşmiş olan stop kodonları ile engellenir (Bergman, 2013). İşlenmiş pseudogenler ise olgun mRNA'nın revers transkripsiyonundan sonra oluşan kopya DNA'nın (cDNA) genomun herhangi bir yerine eklenmesi sonucu yani retrotranspozisyon ile meydana gelmektedir (Fairbanks and Maughan, 2006). Duplike ve işlenmiş pseudogenlere ait oluşum mekanizmaları Şekil 1.3'de verilmiştir. Bu pseudogenlerin ise promotor ve intron bölgeleri yoktur (Zhang et al., 2003). İnsanlarda bulunan pseudogenlerin yaklaşık 2/3'ü işlenmiş pseudogen sınıfına girmektedir (Patrushev and Kovalenko, 2014).



Şekil 1.3. Şekilde duplike ve işlenmiş pseudogen oluşum mekanizmaları gösterilmektedir. Duplike pseudogen oluşumunda duplikasyon olayı gerçekleşir ve böylece gen bir yerden başka bir yere kopyalanır. İşlenmiş pseudogen oluşumunda ise transkripsiyon ile oluşan RNA önce işlenir (splaysing olarak adlandırılan intronların çıkarılıp, eksonların biraraya getirilmesi olayı) ardından elde edilen RNA, revers transkripsiyona uğrayarak pseudogen haline gelir. Dolayısıyla duplike pseudogenlerin intronları içerirken işlenmiş pseudogenler sadece eksonlardan meydana gelmektedir. Her iki olayda da pseudogenlerin yapısında mutasyonlar birikmektedir. Kaynak: (Gerstein and Zheng, 2006) (*Türkçe 'ye çevrilmiştir*).

Sonuç olarak, her iki yol ile meydana gelen pseudogenlerin oluşumunda, kopyalama sırasında meydana gelen hatalar ve evrimsel süreç içerisinde biriken bazı delesyon ve insersiyon, yanlış konumlanmış stop kodonları, nokta ve çerçeve kayması gibi mutasyonların sonucunda bu genler inaktif hale gelir (Tutar, 2012). Yine literatüre bakıldığında zaman zaman bir çeşit işlenmemiş pseudogen olan uniter (tekil) pseudogenler mevcuttur. Bu pseudogenleri işlenmemiş pseudogenlerden ayıran özellik ise: işlevsel bir genin kopyası olmaksızın, evrimsel süreç içerisinde fonksiyonel olan bir genin yani ana genin kendisinin inaktif hale gelmesidir. İnsanlarda pseudogen olarak bulunan *GULO* geni de uniter pseudogen sınıfına girmektedir (Zhang et al., 2010).

Birbirlerine oldukça benzer olan fare ve insan genomu bir dizi ortak fonksiyonel gen taşır. Ancak bu organizmaların evrimsel tarihindeki önemli dönüm noktalarından biri de sahip oldukları pseudogenlerdir. Örneğin farelerde hala aktif olan *GULO* geni insan ve primatlar için bir pseudogendir (Şekil 1.4) (Gerstein and Zheng, 2006).



Şekil 1.4. Şekilde *GULO* geninin de içerisinde bulunduğu bölge insan ve farede karşılaştırılmıştır. C vitamininin sentezlendiği biyokimyasal yolağın son basamağı olan ‘L-gulono- γ -laktoneksidaz’ enziminin sentezinde görevli olan *GULO* geni farelerde hala aktif bir gen iken insan ve primatlarda pseudogen olarak bulunmaktadır. Farelerde 14. kromozomda yer alan *GULO* geni insanlarda 8. kromozomdadır. Memelilerin çoğu aktif *GULO* genine sahipken primat soylarındaki canlılar bu genin 40 milyon yıl önce aktivitesini kaybettiği düşünülmektedir. Bu görsel (Gerstein and Zheng, 2006)’den değiştirilerek alınmıştır.

1.4 Promotorun Ökaryotik Gen İfadesindeki Önemi

1.4.1 Ökaryotik Gen Yapısı ve İfadesi

Tipik bir ökaryotik genin yapısı regülatör sekanslardan ve protein kodlayan açık okuma çerçevesi (ORF) kısmından oluşmaktadır. Protein kodlayan kısmı prokaryotlardaki gibi bütünlük içerisinde olmayıp kodlama yapmayan intron dizileriyle bölünmüş ekson adı verilen parçalar şeklindedir. Ökaryotlarda gen ifadesi (ekspresyonu) transkripsiyon, post-transkripsiyonel modifikasyon ve translasyon aşamalarından oluşur (Lynch, 2005).

Gen ifadesi, transkripsiyonel düzeyde RNA polimerazın genin promotor bölgesine bağlanıp çeşitli transkripsiyon faktörleri ile etkileşime girerek gendeki bilgiyi kalıp olarak kullanıp mRNA sentezmesi sürecidir. Gen ifadesi sürecinde genden transkripsiyon ile önce pre-mRNA oluşur. Oluşan bu mRNA olgun olmayıp, splaysing (splicing), 5’-7-metil-guanozin (5’-Cap) başlığı takılması ve poli-A kuyruğu oluşumu gibi ökaryotlara özgü post-transkripsiyonel modifikasyonlar geçirir. Böylelikle olgun mRNA üretilmiş olur (Picknett and Brenner, 2013).

mRNA’nın 5’ ucuna ve 3’ ucuna sırasıyla 7-metil-guanozin başlığı ve poli-A

kuyruğu bağlanması bu mRNA'nın nükleustan sitoplazmaya taşınırken nükleazlar tarafından parçalanmasını önleyerek yarı ömrünü arttırmış olur. Ayrıca 5'-7-metil guanozin başlığının oluşan mRNA'nın translasyon başlangıcında ribozoma bağlanmasını sağladığı da bilinmektedir (Rimoin et al., 2007).

Splyasing olayı intronların çıkarılıp eksonların bir araya getirildiği süreçtir. Eğer bu süreçte eksonların sayısı ve/veya sıraları değişirse buna alternatif splyasing denir ve böylece bu süreç sonunda aynı genden farklı sayıda eksonlar içeren çeşitli yeni mRNA'lar üretilmiş olur. Dolayısıyla bu mRNA'lardan translasyon ile sentezlenecek proteinler de farklılıklar içerebilir. Bir başka deyişle, splyasing hücre içerisinde bir genden nasıl birden fazla proteinin sentezlendiğini açıklayan süreçlerden biridir (Graveley, 2001), (Holste and Ohler, 2008).

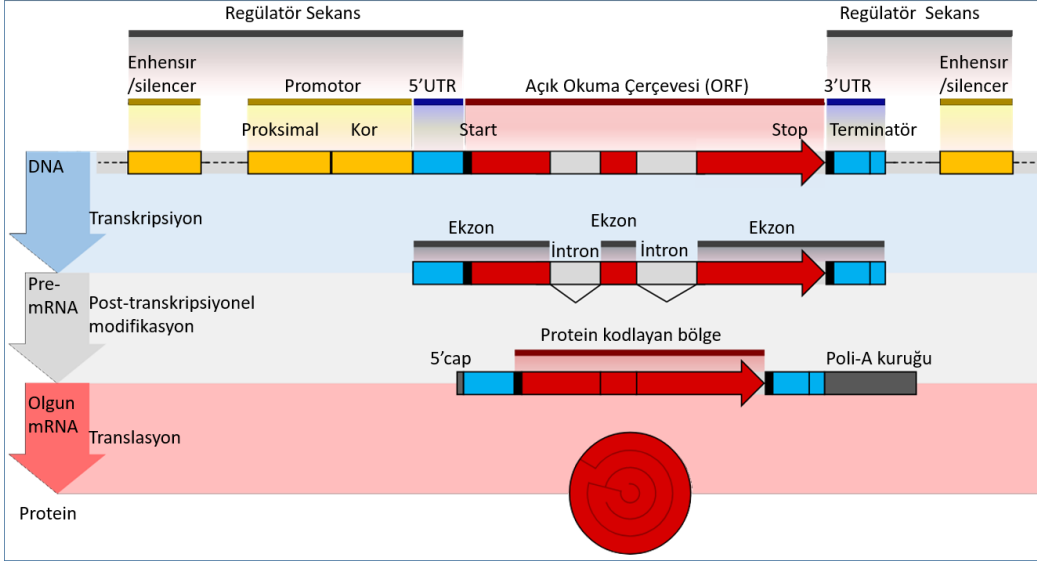
Splyasing olayı splayozom (spliceozom) adı verilen bir protein kompleksi tarafından gerçekleştirilir. Ekson-intron bağlantı bölgelerinde bu kompleksin alt birimlerinin tanıyıp bağlandığı belirli splyasing motifleri vardır. Bu motifler evrimsel süreç içerisinde konserve olduğundan meydana gelen polimorfizmler splyasing olayını engelleyebilir, dolayısıyla oluşan mRNA'nın belirli eksonları içermemesine, böylelikle oluşacak olan proteinin farklı olmasına neden olabilir (Ke and Chasin, 2010), (Ke and Chasin, 2011), (Castle, 2011).

Transkripsiyon ve post-transkripsiyonel modifikasyonlardan sonra oluşan olgun mRNA'lardan protein sentezlendiği süreç olan translasyon gerçekleşir (Clancy and Brown, 2008).

1.4.2 Ökaryotik Gen Regülasyonu

Bir organizmanın her bir hücresi, o organizmaya ait olan genomun bir kopyasını içermesine rağmen, her dokunun kendine özgü bir fonksiyonu ve hücre tipi vardır. Ayrıca genlerin doğru hücre tipinde ve uygun zamanda hücrenin farklılaşması ve gelişmesi için ifade edilmesi oldukça önemlidir. Tüm bunları sağlayan sürece gen regülasyonu denir (Phillips, 2008).

Gen regülasyonu, öncelikle transkripsiyonel düzeyde meydana gelir. Gen ifadesinin ilk basamağı olan transkripsiyon ise, DNA'da depolanan genetik bilginin RNA polimeraz adı verilen enzim tarafından mRNA sentezinin gerçekleştiği süreçtir. Gen ekspresyonu çok basamaklı ve birçok molekülün işbirliği ile gerçekleşen bir süreçtir. Gen ifadesinin karmaşıklığı, yalnızca gen diziliminden değil aynı zamanda DNA, RNA ve proteinler arasındaki geniş etkileşimlerden ve transkripsiyono-



Şekil 1.5. Şekilde tipik bir ökaryotik genin yapısı, ekson ve intronları içerecek şekilde açık okuma çerçevesi etrafındaki regülatör sekanslarla ile birlikte verilmiş olup transkripsiyon, post-transkripsiyonel modifikasyon ve translasyon olayları gösterilmiştir. Bu görsel (Shafee and Lowe, 2017)'den değiştirilerek alınmıştır.

nel düzenleyiciler ve polimorfik varyantlardan kaynaklanmaktadır (Alberts, 2017). Transkripsiyon, post-transkripsiyonel modifikasyon ve translasyon olaylarını da gösterecek şekilde tipik bir ökaryotik genin yapısı Şekil 1.5'te yer almaktadır.

Gen ifadesinin düzenlenmesindeki ilk basamak olan transkripsiyon üç farklı cis- regülasyon dizileri tarafından düzenlenir. Bunlar: promotorlar, sessileştiriciler (saylınsırlar) ve kuvvetlendiriciler (enhansırlar) olarak adlandırılırlar. DNA'nın transkripsiyonu, transkribe edilecek DNA bölgesinin dışındaki DNA dizilerinin de dahil olduğu, 100'den fazla sayıda proteinin etkileşiminin olduğu, kromatin yapının yeniden şekillendiği, DNA dizilerinin bükülerek ilmek şeklini aldığı oldukça karmaşık ve bir o kadar düzenli bir prosestir (Lodish et al., 2011).

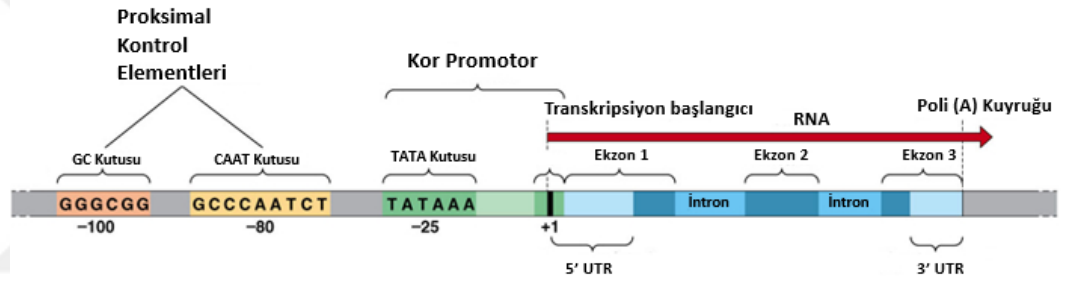
1.4.3 Ökaryotlarda Promotor Bölge

Promotor bölgeler, transkripsiyonun başlaması için tanıma noktası olan bölgelerdir ve transkripsiyon işleminin bazal seviyede başlatılmasını sağlarlar. Bununla birlikte, bir hücredeki düzenleyici proteinlerin miktarı ve/veya konformasyonundaki değişime tepki olarak indüklenirler ve bu da transkripsiyon faktörlerinin RNA polimerazın aktivitesine etki eder (Civas et al., 2006).

Promotor dizileri, transkribe edilecek olan genin hemen üst kısmında (upstream) yer alırlar. Transkripsiyonun başlayacağı bölgeyi ve DNA üzerinde transk-

ripsiyonun ilerleyeceği yönü belirleyen promotor bölgelerin uzunluğu genel olarak 100 ila 1000 baz çifti arasında değişebilmektedir (Segal et al., 2002).

Ökaryotik organizmalarda birçok basamakta gerçekleşen transkripsiyonun aktifleşmesi sürecinde ilk olarak DNA sarmalının açılıp transkripsiyon için uygun hale gelmesi yani kromatinin yeniden şekillenmesi gerekmektedir. DNA sarmalı açıldıktan sonra transkripsiyon faktörleri ve RNA polimeraz promotor bölgeye bağlanarak transkripsiyon başlama kompleksini oluştururlar. Bazal ya da genel transkripsiyon faktörleri adlı proteinler, transkripsiyonun başlamasında trans etki gösterirler. RNA polimeraz II enziminin kendi yapısına ait olmayan bu proteinler transkripsiyonun başlamasını kontrol etmek için gereklidir ve promotor bölge üzerinde spesifik bir biçim ve sırayla bir araya gelerek transkripsiyon ön-başlama kompleksini meydana getirirler. Böylece RNA polimeraz II'nin promotörü tanıyıp bağlanacağı zemin oluşturulmuş olur (Alberts et al., 2002).



Şekil 1.6. Genin organizasyonu ekson, intron, 5' UTR ve 3' UTR olacak şekilde gösterilmektedir. Promotor bölgesinde ise transkripsiyon başlangıç bölgesinden (+1) itibaren -25. pozisyonda TATA kutusu, -80. Pozisyonda CAAT kutusu ve -100.pozisyonda ise GC kutusu bulunmaktadır. TATA kutusu Kor Promotor grubuna girerken, diğerleri Proksimal Kontrol Elementleri grubunda yer almaktadır. Bu görsel (Hardin et al., 2012)'den değiştirilerek alınmıştır.

Ökaryotik genlerin birçoğunun promotor bölgesinde TATA, CAAT ve GC kutuları gibi çok sayıda motif mevcuttur. Bu motifler RNA polimeraz ve transkripsiyon faktörleri gibi protein komplekslerinin bağlanıp transkripsiyonu başlatabilmesi için gereklidir. Promotor motiflerinde meydana gelen SNP'ler motif üzerinde bir değişikliğe sebep olabileceği için proteinlerin motifi tanıyıp bağlanabilmesini dolayısıyla transkripsiyon sürecini etkileyebilir (Marques et al., 2016).

RNA polimeraz II'nin bağlanacağı bölge TATA kutusu olarak adlandırılır, bu bölgenin bir diğer adı ise öz/kor promotor (core promotor) dizisidir (Juven-Gershon and Kadonaga, 2010). Bu kutu genellikle transkripsiyonun başladığı ilk noktanın yaklaşık 25-30 baz yukarısında yer alır ve çoğunlukla her iki yanında da GC bakımından zengin diziler bulunan AT baz çiftlerinin oluşturduğu ortalama 7-8 baz çifti uzunluğundaki bir konsensüs dizidir. TATA kutusu üzerinde yapılan çalışmalar, bu

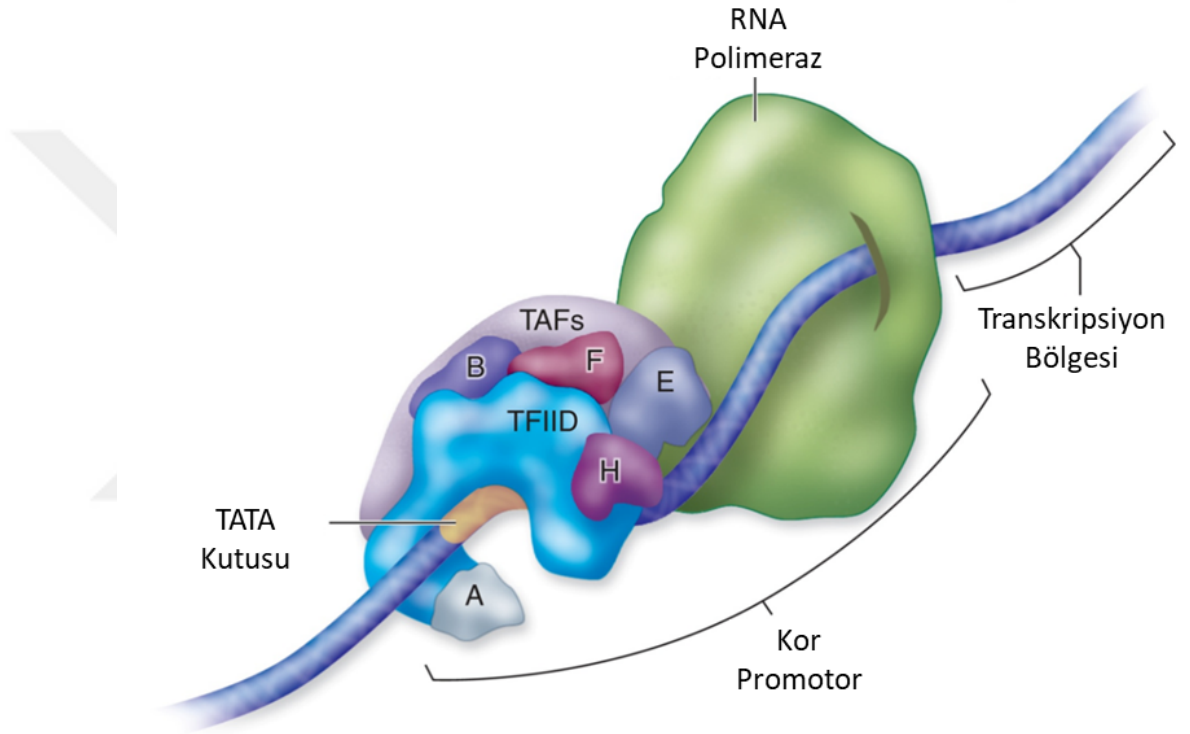
bölgedeki mutasyonların transkripsiyonun etkinliğinin azaltıldığını ve olası delesyonların transkripsiyonun başlama noktasını değiştirebileceğini göstermiştir (Klug et al., 2011).

Birçok promotor bölgede bulunan ve CAAT kutusu olarak adlandırılan bölgeler, CAAT veya CCAAT şeklinde bulunabilen konsensus dizilerdir. Bu motifler çoğunlukla, transkripsiyon başlama noktasının yaklaşık 70 ile 80 baz çifti üst kısmında (-70 ila -80 olarak belirtilir) yer alır. Bu bölge üzerinde yapılan mutasyon analiz çalışmaları, CAAT kutusunun proteinlerin DNA'ya bağlanan bölge olduğunu ve promotor bölgenin transkripsiyonu başlatabilme yetisinde oldukça kritik bir rol aldığını göstermiştir. Zira bu motifin her iki yanında oluşturulan mutasyonların transkripsiyon hızına hiçbir etkisi olmaz iken, CAAT dizisindeki mutasyonların transkripsiyon hızını önemli ölçüde azalttığı görülmüştür. Bazı promotor dizilerinde yer alan bir diğer motif ise GC kutusu olarak adlandırılır. Bu motif GGGCGG konsensus dizisine sahiptir ve genellikle -110 bölgesinde yerleşim gösterir. Şekil 1.6'da verilen tipik bir ökaryotik genin promotorunda bulunan CAAT kutusu, GC kutusu ve TATA kutusu transkripsiyon başlangıç noktasına olan uzaklıkları da içerecek şekilde verilmiştir. CAAT ve GC motifleri daha çok transkripsiyon motiflerini kendilerine bağlayıp kuvvetlendirici (enhansör) rolü oynarlar. Ökaryotik genlerdeki promotor bölgeleri yerleşimi ve organizasyonu değiştirebilen dizilerdir. Yani promotor dizilerinin üniversal bileşenleri bulunmamakla birlikte; genler, promotor motiflerinin tipi, yerleşimi, sayısı ve konumu açısından da farklılıklar gösterirler (Yıldırım et al., 2007).

1.4.4 RNA Polimeraz ve Transkripsiyon Faktörlerinin Promotor ile İlişkisi

Ökaryotik organizmalarda bütün mRNA'ların transkripsiyonundan RNA polimeraz II (RNP II) enzimi sorumludur. RNP II'nin aktivasyonu, genin içindeki cis-acting elementler ve bu elementlere bağlanan trans-acting faktörler tarafından kontrol edilir. Promotor bölge RNA polimerazın bağlanıp transkripsiyonu başlatabilmesi için korunmuş diziler içerir. RNP II'nin transkripsiyonu aktif bir şekilde başlatabilmesi için en az üç tane cis-acting DNA elementi vardır. Bir diğer adıyla kor promotor element olarak adlandırılan bu motiflerden birincisi RNP II'nin DNA'ya nereden bağlanıp DNA'dan RNA kopyalamaya nereden başlayacağını belirler. RNA polimeraz II kendi başına gidip doğrudan ökaryotik promotor bölgeye bağlanamaz, bunun için transkripsiyon faktörleri (TFs) olarak adlandırılan proteinlerin yardımına ihtiyaç duyar. RNA polimeraz II'nin promotor bölgeye bağlanmasına yardımcı olan bu proteinler genel olarak TFII (Transcription Factor for RNA Polymerase II) ismine sahiptirler ve TFIIA, TFIIB, TFIID gibi çeşitleri vardır (Şekil 1.7) (Gill, 2001).

Transkripsiyonu başlatmak için ilk olarak TFIID protein kompleksi TATA kutusuna bağlanır. Bu bağlanma TFIID protein kompleksinin içerisinde bulunan ve TBP (TATA box-binding protein) olarak adlandırılmış polipeptit sayesinde gerçekleşir. TFIID'nin DNA'ya bağlanmasının ardından sırasıyla TFIIA ve TFIIB de DNA'ya bağlanır. Sonrasında RNA Polimeraz II ile kompleks oluşturmuş olan TFIIF de yapıya bağlanır ve bunu da TFIIIE, TFIIF ve TFIIH faktörlerinin bağlanması takip eder. Bu protein kompleksi 'transkripsiyon başlama kompleksi' olarak adlandırılır. Sonrasında RNA polimeraz II TATA kutusundan ayrılır ve genin bazal seviyede transkripsiyonu ilerlemeye başlar (Martinez et al., 1994).



Şekil 1.7. TATA kutusuna bağlanan TFIID ve onunla ilişkili diğer transkripsiyon faktörleri RNA polimeraz ile etkileşerek transkripsiyon başlangıç kompleksini oluşturmaktadır. Transkripsiyon başlangıç kompleksi transkripsiyon bölgesinin önündeki Kor promotor bölgesine bağlanarak transkripsiyonu başlatmaktadır. Bu görsel (Losos et al., 2008)'den değiştirilerek alınmıştır.

1.4.5 Enhansırların ve Silencerların Promotor ile İlişkisi

Ökaryotlarda transkripsiyon sadece promotor bölge tarafından kontrol edilmez, enhansır ve silencer adlı DNA dizileri de bu süreçte rol oynarlar. Bu DNA dizileri, genin üst veya alt kısmında, genden uzakta bir noktada ya da genin bizzat içerisinde bulunabilirler (Alberts et al., 2002).

Enhansır, düzenleyici proteinler ve transkripsiyon faktörleriyle etkileşime girip, promotoru aktifleştirip, transkripsiyonun başlama kapasitesini de arttırabilirler.

Bu diziler, daha çok pozitif regülatörlerin bağlanma bölgelerini içerseler de, negatif regülatör bağlanma bölgesine de sahiplerdir. Enhansır diziler, daha çok promotörün transkripsiyonel aktivitesini arttırmaları ve sabit olmayan yerleri (genin iki tarafında, ya da içinde bulunabilmeleri), işlev üzerinde etkisi olmasa da ters yönlü yerleşim göstermeleri ve genomun bir başka bölgesine taşınsa ya da ilgili olmayan bir genin enhansırının yanına gelse de komşu genin transkripsiyonunu arttırması gibi özellikleriyle promotör bölgeden ayrılırlar. Genin içerisinde bulunup o geni regüle ettiği bilinen enhansıra örnek olarak, immünoglobulin ağır-zincir geni oldukça iyi çalışılmıştır. Bu gende enhansır bir intronun içinde bulunmaktadır ve sadece içinde bulunduğu genlerin aktif olması, dokuya özgü gen ifadesinin enhansır bölge sayesinde yapıldığını gösterir (Featherstone et al., 2010), (Alberts et al., 2002).

Benzer bir şekilde transkripsiyon faktörleri ile etkileşime girerek transkripsiyon aktivitesini düşüren represör proteinlerin bağlandığı silencer diziler de mevcuttur (Ogbourne and Antalis, 1998).

Genlerdeki varyasyonu anlamak, birçok kompleks hastalığa karşı duyarlılığın nedenini ortaya koyabilir. Fonksiyonel DNA varyantlarını belirlemek için yapılan çalışmalar çoğunlukla genlerin kodlama yapan bölgelerinde bulunan tek nükleotit polimorfizmlerine yönelmiştir, zira bu nükleotit değişimleri sentezlenecek olan proteinlerin yapısı ve işlevleri üzerine doğrudan etki edebilirler. Ancak genlerin anormal ifadesi de farklı metabolik yollarda ve/veya biyolojik süreçlerde dengesizliğe yol açabilir. Bu nedenle, genlerin promotör bölgelerindeki tek nükleotit polimorfizmlerinin de araştırılması oldukça önemlidir zira farklı transkripsiyon faktörleri ve diğer biyokimyasal bileşenlerle işbirliği içinde olan promotör bölgeler RNA moleküllerinin sentez frekansını belirlerler (Sinnott et al., 2006).

Velevan ve ark.'nın (2011) yaptığı bir çalışmada, promotör bölgenin transkripsiyonun başlamasına katılması ve gen ekspresyonunu düzenleyen cis-etkili elementlerin çoğunun polimorfizm barındırması bilgisinden yola çıkan araştırmacılar, paraziter hastalıklara maruz kalmış 40 kişilik erkek Gabon bireylerinin insan bağışıklık genlerinden biri olan TNFRSF18 geninin promotör bölgesindeki olası SNP'leri saptayıp, bu nükleotit değişimlerinin gen aktivitesine etkisini araştırdılar.

Birbirleriyle akraba olmayan 40 Gabonlu erkek bireyden alınan DNA örnekleri TNFRSF18 geninin promotör bölgesindeki SNP'lerin saptanması amacıyla öncelikle zincir reaksiyonu ve sonrasında doğrudan sekanslama yöntemi ile ilgili genin promotör dizisi ortaya kondu. Dizilenen promotör bölgede farklı pozisyonlarda 2 yeni SNP bulundu ve bu nükleotit değişikliklerinin her ikisinin de hetero-

zigot olduğu saptandı. Bulunan SNP'lerin gen aktivitesine etkisini saptamak amacıyla araştırıcılar SNP'leri içeren promotor varyantlarını lusiferaz geninin üst kısmına klonlayıp ışımaya miktarını ölçtüler. Her iki promotor varyantının aktivitesi de yine TNFRSF18 geninin herhangi bir SNP içermeyen promotor bölgesi marker olarak kullanılarak ölçüldü. Lusiferaz aktivitesine göre, marker olarak kullanılan bölgeyle kıyaslandığında saptanan ilk SNP promotor bölgenin aktivitesini çok az da olsa arttırmışken ikinci nükleotit değişiminin promotor aktivitesini belirgin olarak azalttığını saptadılar (Velavan et al., 2011).



2. MATERYAL VE METOT

2.1 Hayvanlar ve Örnekler

Bu çalışmada, İzmir- Bornova Veteriner İşleri Müdürlüğü tarafından İzmir'in Bornova ilçesinden rastgele seçilmiş karışık ırklardan, farklı yaş ve cinsiyet gruplarından sokak köpekleri kullanılmıştır. Müdürlük çalışanı veteriner hekimler aracılığıyla, 50 adet köpek kanı 2ml'lik EDTA'lı tüplere alınarak toplanmıştır. Temin edilen köpek kanları izolasyon tarihine kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir. Çalışmanın deneysel kısımları Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

2.2 Kandan Genomik DNA İzolasyonu

Genomik DNA izolasyonu, QIAamp Mini DNA Isolation Kit (QIAGEN) kullanılarak manuel olarak yapılmıştır. Kit prosedürüne uygun olarak yapılan izolasyon işlemi sonucunda, son hacmi 200 μ l olacak şekilde ultrasaf su içerisinde çözülmüş genomik DNA elde edilmiştir. İzole edilen genomik DNA'lar -20 °C'de saklanmıştır. İzolasyon işlemi sonrasında işlem doğruluğunu kanıtlamak üzere genomik DNA'lar %1'lik agaroz jel elektroforezi yöntemiyle incelenmiştir. Bu işlemde 1X'lik TAE (40 mM Tris asetat, 5 mM Sodyum asetat, 1 mM EDTA, pH 7,4) tampon çözeltisinde, 100 V'da 30 dakikada gerçekleştirilmiştir.

2.3 *GULO* Geni Promotor Bölgesi'nin Çoğaltılması

2.3.1 Primer Dizaynı

Yapılan çalışmada kullanılan primerler *GULO* geni (Ensembl aksesyon numarası ENSCAFG00000008414 olan) promotor bölgesine uygun olarak NCBI (National Center of Biotechnology Information) – Primer Blast programı ile tasarlanmıştır (Çizelge 2.1). Dizayn edilen primerlerin bağlanma bölgeleri Şekil 2.1'de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Promotor bölge için dizayn edilen primer çiftleri

Gen Adı	Primerler	Sekanslar (5' → 3')	Sekans uzunluğu (baz çifti)
<i>GULO</i>	Forward Primer	CTGACTCTGATGTACCGCATAC	22bç
	Reverse Primer	CTAGCTAAGGGTTGGCAGTAAG	22bç

TGGGTCGGTGGCCTTGGCTGACTGTGGCTTCCTCAGGGACAGAGCACTGGGCAGCGGGCTGCAG
 GGACGAGGTGGAGCGAGGGCCCGGAGCACACAGCACGGGAGCACAGTGACCTCCCTCTGCTCAG
 GGCTGACTCTGATGTACCGCATACCCCGAGGGGCTTTGGGCCCTGGCAAAGGTGGGTAAACAGT
 GTTGCACAAGCTCCACCCATACAAACAGCAGCTCAGGCCTGCCCCCTGCCTCGGGGGCCTTCT
 CAGGCAGAAGGTGGAA GAGCAGAGTTAAGAGGTAGCGGCTCTGTTCCGGAAGTGTCTTGCACT
 CTGACCCCAACCCCAACACCCCGCTGCTTCAGAACTGGGTCCCTTGATTCCATAGGTCAGGGGAG
 GCTATGATGTGGGGGCTTGTGGGGTCTTAACATAGGGCCTCCCTTGGTGCCTGCTTGCAAGGA
 GGGCACACGTGGCAGCCACATGGAATGGAATCTGCACCTGTGCTAGTTAGCCCACTTGTCAGA
 CTTGGGGGATGGGTACAGGAAGCCAGCCATCACTGTAGGAGACAGGACAAGGTGGGGGGTGGG
 GGGTTGGGGGAGGGGAGAAAAGGGACACTCAGCCCAGGCAGAGTCTTCTAGCAGCGGCCTTCCC
 TTCCCTAGGCTTTAGGGCAGACAGAGCTGGTTCCTTATCTATACTTTTTGCCTGATAACACTTG
 AGGGCCTCGTTTTCTCCTCGATAGTGTGGGGGCACGTTTGCTAATTCTCTGGGTCCATCGA
 AAGGTTAGAGCTGCTGGATGAGGAGCATGGGGACACAACAGGAACCTGGAAATTGCCCAAGCT
 CTTGCATCTGCCCAGCTGTGAGCTGGCTGGCCGAGGATTTCTGGGGACCCTACTGTCTTACTG
 CCAACCCCTTAGCTAGTGTCTGGCACAGAGCCAGTGTCCAAAGCACATTTGTGCAATGAACAAAC
 AAATCAGTCATTGAGCATCTCGGCTTCTCAGATCTCTCCAAGCAGGAAGCATGAGCAACAGCCC
 TGGGGTTTGAAAGGAGGAAAGGCTGG

Şekil 2.1. Köpek *GULO* geni promotor bölgesi primer bağlanma bölgeleri. Çoğaltılması hedeflenen bölge kırmızı kısımlar arasında yer alırken, sarı işaretli olanlar primer bağlanma bölgeleridir.

2.3.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

PZR analizlerinin başlayabilmesi için ilk olarak sentezlenen primerler prose-
 dürde belirttiği miktarda bidistile su ile seyreltilmiştir. Bu sayede liyofilize halde
 olan primerler önce 100 *pmol*'e, daha sonra stok primerler PZR reaksiyonu için uy-
 gun olan 10 *pmol* konsantrasyonuna seyreltilmiştir.

PZR reaksiyonunda her bir örnek için Çizelge 2.2'de verilmiş olan reaksiyon
 karışımları kullanılmıştır. PZR cihaz koşulları Çizelge 2.3'de verilmiştir.

Çizelge 2.2. *Canis lupus familiaris* (köpek) *GULO* geni promotor bölgesinin PZR işlemi ile çoğaltılması için kullanılan reaksiyon bileşenleri ve miktarları.

Kullanılan Malzemeler	Miktarlar
Taq Polimeraz	1.25 μ l
10x HyperSense Reaksiyon Buffer	2.5 μ l
dNTP karışımı	0.5 μ l
5X Tune-Up solüsyonu	3 μ l
Forward primer(10 <i>pmol</i>)	1 μ l
Reverse primer (10 <i>pmol</i>)	1 μ l
Kalıp DNA (100 ng)	5 μ l
Steril Distile su	10.75 μ l

Çizelge 2.3. PZR için sıcaklık, süre ve döngü koşulları

PCR Aşamaları	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyon	95 °C	2dk	1
Denatürasyon	95 °C	20 sn	35
Bağlanma	55 °C	40 sn	35
Uzama	72 °C	55 sn	35
Son Uzama	72 °C	5 dk	1
Bekleme	4 °C	∞	1

2.3.3 Agaroz Jel Elektroforezi

PZR işleminin sonrası elde edilen 781bp uzunluğundaki PZR ürünlerinin doğru şekilde amplifiye olduğunu saptamak için agaroz jel elektroforezi yöntemi kullanılmıştır. Kullanılan tamponlar, jelin hazırlanması ve boyanması, örneklerin jele yüklenmesi, elektroforez cihazı ile jelin yürütülmesi ve son olarak da jelin görüntülenmesi aşağıda anlatılmıştır. Görüntülenen jellere ait fotoğraflar Şekil 2.2-2.5'te verilmiştir.

Agaroz jel elektroforezinde kullanılan tamponlar:

- 0.5 M EDTA (Applichem)
 - * 1000 ml distile suya 146 gr EDTA eklenerek hazırlanmıştır.
- 50X Stok TAE (Tris, Asetik asit, EDTA) tamponu aşağıda verilen tüm kimyasallar son hacim 1000 ml olacak şekilde distile su eklenerek hazırlanmıştır.
 - * 242 gr Tris (AppliChem)
 - * 57.1 ml Glasiyal Asetik asit (AppliChem)
 - * 0.5 M EDTA 100 ml

Agaroz Jel Boyası:

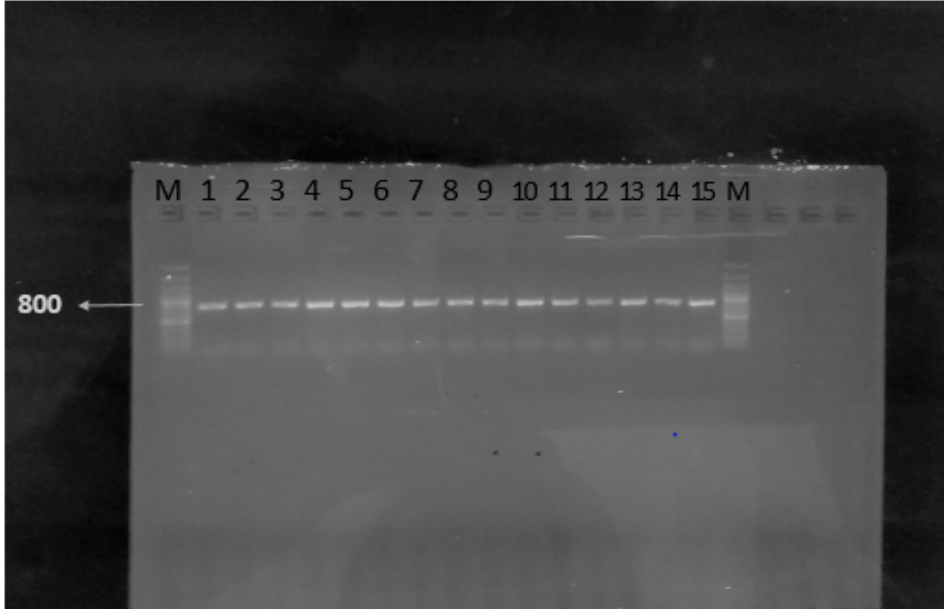
- Jel hazırlığında boya olarak ABM SafeView™ Classic kullanılmıştır.

% 2' lik Agaroz Jel Hazırlığı:

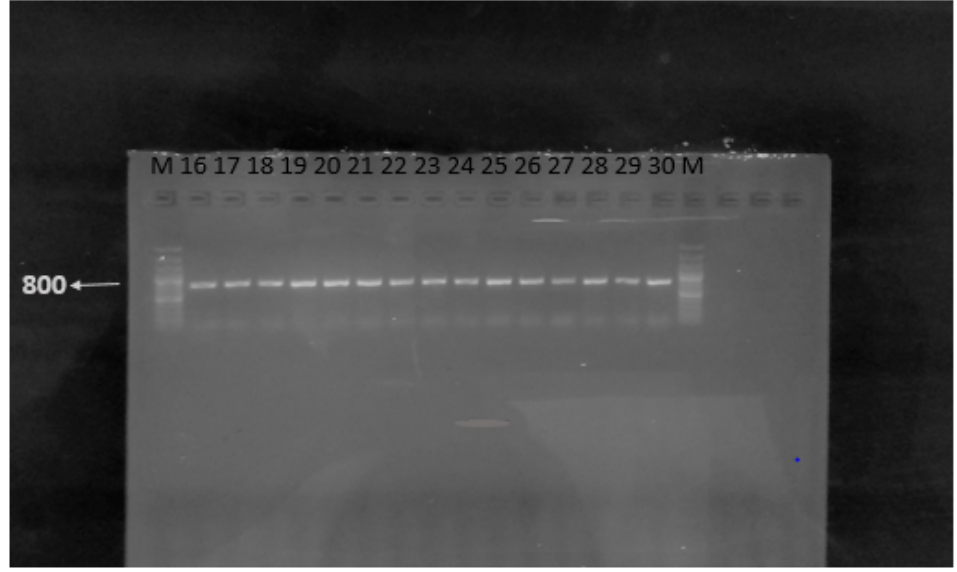
- 2 gr agaroz (AppliChem) hassas terazide tartılıp cam behere aktarılmıştır. Üzerine 100 ml 1X TAE tamponu ilave edilip, mikrodalga fırında yaklaşık 3 dakika kadar ısıtılarak agarozun çözünmesi sağlanmıştır. Çözünen agaroz oda sıcaklığına alınıp, soğuması (yaklaşık 50 °C olana kadar) için bir süre oda sıcaklığında bekletilmiştir. Soğuduğundan emin olduğumuz çözeltiliye 5 µl yükleme boyası ilave edilip, karışımın köpürmemesine dikkat ederek boya homojen olarak dağıtılmıştır. Boyanın da ilave edildiği çözeltili agaroz jel tankına (Sub-Cell GT, BioRad, A.B.D.) yavaş ve dikkatlice dökülerek tankın parçası olan taraklarda yerlerine oturtulmuştur. Donan jelin üzerine 1 cm geçecek kadar 1x TAE tampon eklenerek taraklar jele zarar vermeyecek şekilde çıkarılmıştır.

DNA örneklerin jele yüklenmesi ve jel elektroforezi işleminin gerçekleştirilmesi:

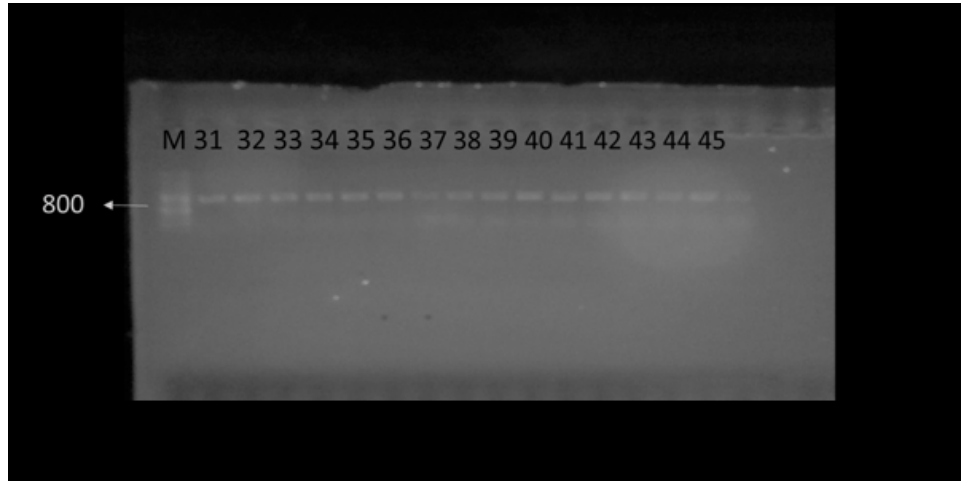
- PZR işlemi sonrasında elde edilen DNA ürünleri jele yüklenmeden önce DNA Gel Loading Dye (6X) (ThermoFisher) ile boyanmıştır (5 μ l PZR ürünü + 1 μ l 6X Loading Dye olacak şekilde).
- PZR ürünlerinin boyutlarını belirleyebilmek için ise 100bç'lik bir DNA Ladder (Fermantas) marker olarak kullanılmıştır.
- Boyanan PZR ürünleri jeli delmeyecek ve taşırmayacak şekilde kuyucuklara aktırılarak 100V, 30 dakika boyunca yürütülmüştür.
- Yürütme işlemi sonrası jel DNR Bio imaging Systems Mini BIS Pro aracılığı ile incelenmiş ve jelin fotoğrafı çekilmiştir (Şekil 2.2-2.5).



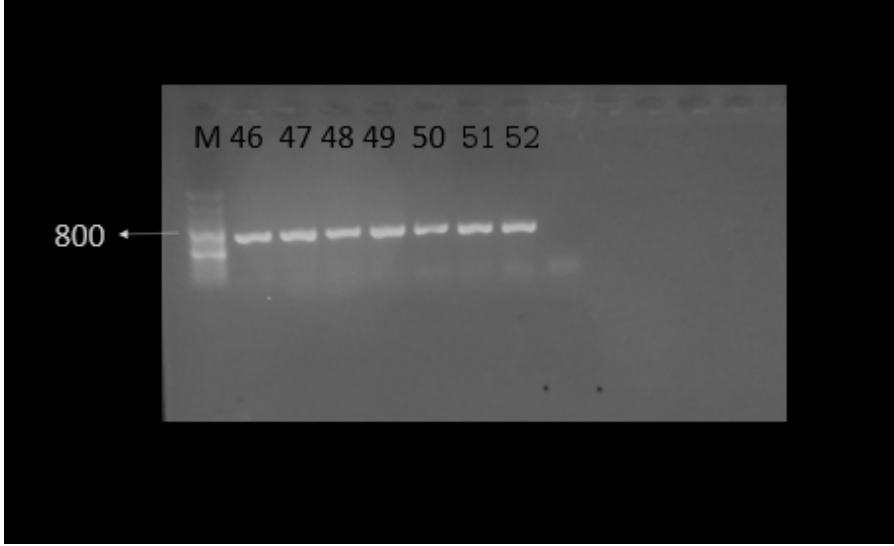
Şekil 2.2. PZR işlemi sonrası yapılan jel elektroforezi görüntüsü. Şekilde 1'den 15'e kadar olan DNA örnekleri ve marker'lar verilmiştir. Çoğaltılan bölgenin uzunluğu 781 bç olup marker büyüklüğü ise görüntüsün sol kısmın 800 bç olarak belirtilmiştir.



Şekil 2.3. PZR işlemi sonrası yapılan jel elektroforezi görüntüsü devamı (1). Şekilde 16'dan 30'a kadar olan örnekler verilmiş.



Şekil 2.4. PZR işlemi sonrası yapılan jel elektroforezi görüntüsü devamı (2). Şekilde 31'den 45'e kadar olan örnekler yer almaktadır.



Şekil 2.5. PZR işlemi sonrası yapılan jel elektroforezi görüntüsü devamı (3). Jel görüntüsünde 46, 47, 48, 49 ve 50 numaralı örnekler yer almaktadır.

2.3.4 Sekanslama

Elde edilen PCR ürünleri, doğrudan sekanslama yöntemi ile mevcut baz dizileri belirlenmiştir.

2.3.5 Polimorfizmlerin Belirlenmesi

Sekanslama sonrası elde edilen köpek *GULO* geni promotor bölgesi dizileri MEGA-7 programı kullanılarak tek nükleotit polimorfizmleri saptanmıştır.

2.3.6 Motiflerin Belirlenmesi

(Van Heeringen et al., 2011), (Minovitsky et al., 2007), (Xie et al., 2005), (O'connor et al., 2005) yayınlarında verilen promotor motifleri köpek *GULO* geni promotor bölgesi içerisinde taranmıştır.

2.4 *GULO* Geninin Splicing Motiflerinin Belirlenmesi Amacıyla Ekson 2'nin Çoğaltılması

2.4.1 Primer Dizaynı

Çalışmaya ek olarak 10 adet köpeğe ait *GULO* geninin ekson 2'nin tamamını intron 1 ve intron 2'nin ise bir kısmını içeren toplam 657 bp uzunluğundaki bölgeye amplifikasyon işlemi için NCBI Primer Blast programı kullanılarak uygun primerler dizayn edilmiştir.

Çizelge 2.4. *GULO* geni intron 1 ve 2'nin,ekson 2 ile ilişkili bölgelerinin amplifikasyonu için dizayn edilen primer çiftleri.

Gen Adı	Primerler	Sekanslar (5' → 3')	Sekans uzunluğu (baz çifti)
<i>GULO</i>	Forward Primer	GAGACAAGCCCTGCACGTA	19bç
	Reverse Primer	GCACCTGGTCACTCAAACCTG	22bç

Intron 1	CCAGGTCCCTCTGTTCTGGGACGTGCATCGACGAGTCAAGTCTCGGCG GCTGCGCAAGGTGGAGGGGGCCCGGACTCGCCACTGGCACTGGCCC GCTCGTCGGACCGAGGCGGGACCGGCGTCGGAGGGTCGGGTGCCGC CGGAGTCGGGACCGGTGGGCCGAGAAGCGGGGAGCGTCCAGGTGCCA TGTTTCCTCAGTTCAAGGTCTTGACCCGGTCCTGGATACCGACGACGG Ekson 2 GTCTTTACATGAAGGTCTGGGTGCAGGCACCTCCTCCAGTCTCTCCACT CACAGGGAGGTCCCGTCCCTCGCCCTGAACGACCCGATCCTTGGGGG GGTGGGGGGTTCTGCGTGGGGGAAGGGTCTAGCGACCGGTCCCCTCT CGGGGTGCTTCCCCGACGCGAGGCCCGAGGACCGGGGTGGAGGGGA CGACGTCGAGGGCCAATGTTGGGTGACACGGTGGTTACTGGCGGTCCG Intron 2 AAAGTGAACGTCGAGTCCGGAGACGAGCCCCGCGTCTCGACGGCCGCT GACGGAGGAACCCCCAGAGCCCGTAGTGTCTGGCTGTGGGGGGCTTGA GGTAAGGGTCACAAGGCCCGAGAAAACCAAAGACTGAAGTTGCAGAAA GATAGGGACAGAGACGTAGCCCGTGGACCAGTGAGTTTGACCTTCGGT CCTTCGCCAGCGACAGAAAAGAGATGGGGGAAAAATTTTTTTTCTAAA
----------	---

Şekil 2.6. Köpek *GULO* geninin ekson 2'yi içeren dizisinde primer bağlanma bölgeleri. Sarı ile işaretli kısımlar primerlerin bağlandığı bölgeler iken kırmızı işaretli nükleotitler ekson 2'yi göstermektedir.

2.4.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Liyofilize halde bulunan primer çiftleri ilk olarak prosedürde belirtildiği üzere bidistile su ile 100 *pmol*'e sonrasında ise PZR işlemi için gerekli olan 10 *pmol*'e seyreltilmiştir.

PZR reaksiyonunda her bir örnek için Çizelge 2.5'de verilmiş olan reaksiyon karışımları kullanılmıştır. PZR cihaz koşulları Çizelge 2.6'de verilmiştir.

Çizelge 2.5. *Canis lupus familiaris* (köpek) *GULO* geni intron 1 ve 2'nin ekson 2'yle bağlanma bölgelerinin PZR işlemi ile çoğaltılması için kullanılan reaksiyon bileşenleri ve miktarları.

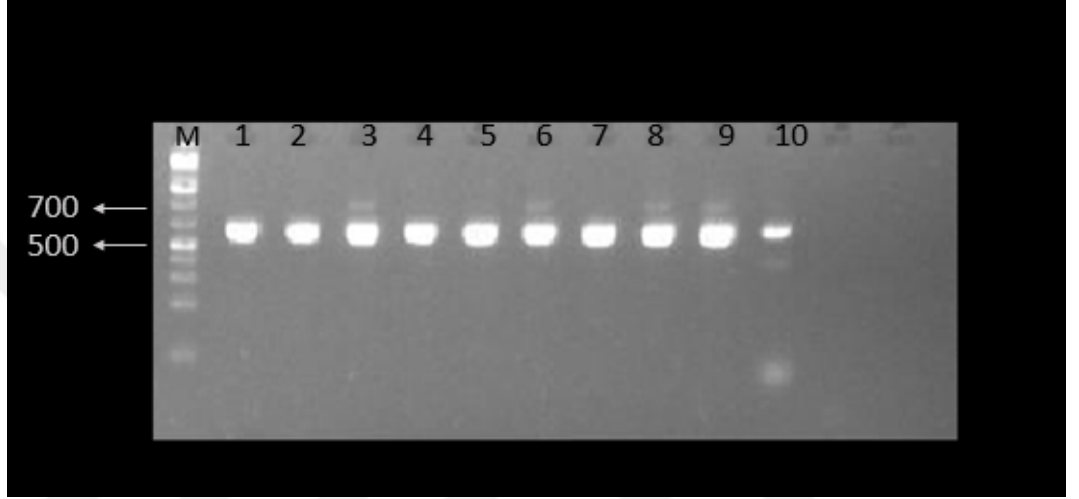
Kullanılan Malzemeler	Miktarlar
Taq Polimeraz	0.5 μ l
10x Buffer	2.5 μ l
dNTP karışımı	0.5 μ l
Forward primer (10 <i>pmol</i>)	1 μ l
Reverse primer (10 <i>pmol</i>)	1 μ l
Kalıp DNA (100 <i>ng</i>)	2 μ l
Steril Distile su	17.5 μ l

Çizelge 2.6. PZR için sıcaklık, süre ve döngü koşulları

PCR Aşamaları	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyon	94 °C	3dk	1
Denatürasyon	94 °C	1 dkn	30
Bağlanma	59 °C	1 dk	30
Uzama	72 °C	1 dk	30
Son Uzama	72 °C	10 dk	1
Bekleme	4 °C	inf	1

2.4.3 Agaroz Jel Elektroforezi

Çoğaltılması hedeflenen bölge için tasarlanmış primer çifti ile yapılan PZR işlemi sonrası elde edilen ürünlerin doğruluğunu kanıtlamak amacıyla agaroz jel elektroforezi yapılmıştır. Elektroforez için tamponlar, jelin hazırlanması ve boyanması, örneklerin jele yüklenmesi, elektroforez cihazı ile jelin yürütülmesi ve son olarak da jelin görüntülenmesi Bölüm 2.3.3'te ayrıntılı olarak anlatılmıştır. Agaroz jel elektroforezi ile görüntülenen PZR ürünlerinin jel görüntüsü Şekil 2.7'te yer almaktadır.



Şekil 2.7. Jel elektroforezi görüntüsü. Çoğaltılan gen bölgesi 657 bp uzunluğunda olup marker bantlarının büyüklüğü görselin sol tarafında verilmiştir.

2.4.4 Sekanslama

Elde edilen PCR ürünleri, doğrudan sekanslama yöntemi ile mevcut baz dizileri belirlenmiştir.

2.4.5 Polimorfizmlerin Belirlenmesi

Sekanslama sonrası elde edilen diziler MEGA-7 programı kullanılarak tek nükleotit polimorfizmleri saptanmıştır.

2.4.6 Splicing Motiflerinin Belirlenmesi

Human Splicing Finder programının 2.4.1 versiyonu online olarak kullanılarak splicing motifleri belirlenmiştir.

3. SONUÇLAR

Çoğaltılması hedeflenen bölge 781 baz çifti (primer bağlanma bölgeleri) uzunluğundayken PZR ve sekanslama esnasında meydana gelen problemler nedeniyle her birey için 450 nükleotitlik bir bölgenin dizisi elde edilebilmiştir. Bu bölge Şekil 3.1’de verilmiştir.

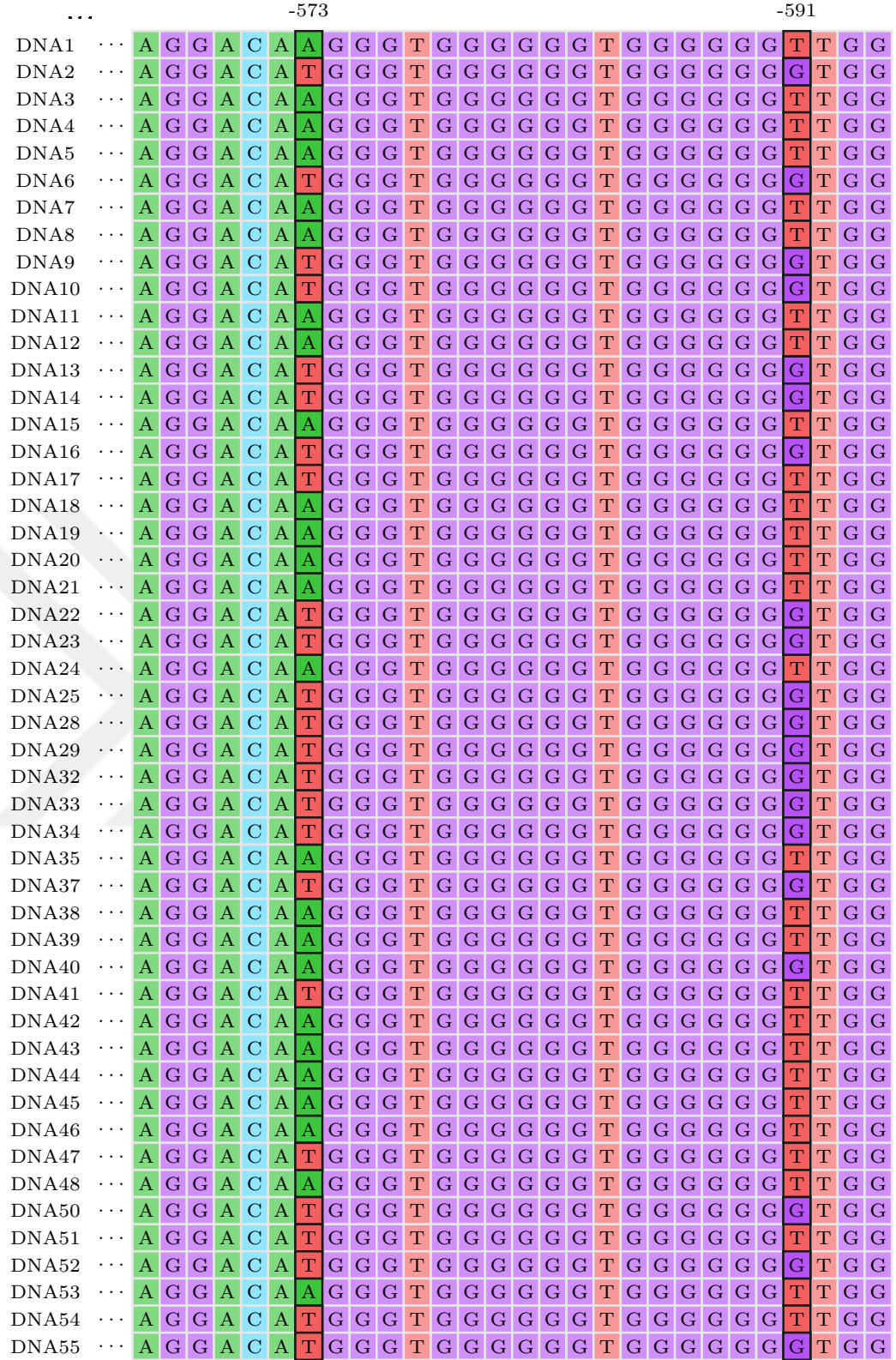
```

CTGACTCTGATGTACCGCATACCCCGAGGGGCTTTGGGCCCTGGCAAAGGTGGGTAAACAGTGTG
CGACAAGCTCCACCCATACAAACAGCAGCTCAGGCCTGCCCCCTGCCTCGGGGGCCTTCTCAGGCA
GAAGGTGGAAGAGCAGAGTTTAAGAGGTAGCGGCTCTGTTCCGGAAGTGCTTGCCTCTGACCCC
AACCCCAACACCCCGTGCTTCAGAACTGGGTCCCTTGATTCCATAGGTCAGGGGAGGCTATGATGT
GGGGGGCTTGTGGGGGTCTTAACATAGGGCCTCCCTTGGTGCCTGCTTGCAGGAGGGCACACGTGG
CACGCCACATGGAATGGAATCTGCACCTGTGCTAGTTAGCCACTTGTGAGACTTGGGGGATGGGT
ACAGGAAGCCAGCCATCACTGTAGGAGACAGGACAAGGGTGGGGGGTGGGGGGTGGGGGAGGGGA
GAAAAGGGACACTCAGCCCAGGCAGAGTCTTCTAGCAGCGGCCTTCCCTTCCCTAGGCTTTAGGGC
AGACAGAGCTGGTTCCTTATCTATACTTTTTGCCTGATAAACTTGAGGGCCTCGTTTTCTCCTC
GATAGTGTGGGGGCAGTTTGCCTAATTCTCTGGGTCCATCGAAAGGTTAGAGCTGCTGGATGAG
GAGCATGGGGACACAACAGGAACTTGAAAATTGCCCCAAGCTCTTGCATCTGCCCCAGCTGTGAGC
TGGCTGGCCGCAGGATTCTGGGGACCCTACTGTCTTACTGCCAACCTTAGCTAG

```

Şekil 3.1. Sarı ile gösterilen bölgeler primer bağlanma bölgesi olup 781 baz çifti uzunluğundadır. Yeşil ile gösterilenler ise sekanslama sonucu elde edilen ve üzerinde analizlerin yapıldığı 450 baz çiftlik bölgedir.

Mega 7 programına yüklenen 50 farklı bireye ait sekanslardan bir tanesi sekansın kalitesiz olması nedeni ile analizlere dahil edilmemiştir. Analiz edilen 49 bireyin Mega 7 programındaki görüntüsü saptanan tek nükleotit polimorfizmlerini gösterecek şekilde Şekil 3.2-3.8’de verilmiştir.



Şekil 3.8. Tek nükleotit polimorfizmleri. Pozisyon: -573 ve -591

Analiz edilen 49 adet bireye ait *GULO* geni promotor bölgesinde toplam 9 adet tek nükleotit polimorfizmi bulunmuştur. Bulunan polimorfizmler Çizelge 3.1’de, bu polimorfizmlerin çoğaltılan alan içerisindeki yerleri ise Şekil 3.9’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Köpek *GULO* geni promotor bölgesinde saptanan polimorfizm pozisyonları. Mega 7 programına yüklenen sekanslar ilk olarak hizalanıp ardından, tek nükleotit polimorfizmleri saptanmıştır. Tabloda polimorfizmlerin bulunduğu bireyler, polimorfizm lokasyonları ve bu polimorfizmlerin homozigot-heterozigot durumları gösterilmektedir.

Örnek Numaraları	Polimorfizmler	Homozigot / Heterozigot
16, 18, 34	C-315T	Heterozigot
2, 16, 18, 34	C-344G	Heterozigot
2, 16, 18, 34	A-377G	Heterozigot
2, 6, 9, 10, 13, 14, 16, 23, 25, 28, 29, 32, 33, 34, 37, 51	A-429G	Homozigot
1, 4, 11, 15, 17, 18, 22, 40, 41, 44, 45, 47, 54, 55		Heterozigot
16, 25, 28, 29, 32, 33, 34, 35, 37	T-486A	Heterozigot
16, 25, 28, 29, 32, 33, 34, 35, 37	T-533A	Homozigot
25, 28	A-540C	Homozigot
2, 6, 9, 10, 13, 14, 16, 23, 25, 28, 29, 32, 33, 34, 37	A-573T	Homozigot
17, 22, 41, 47, 50, 51, 52, 54, 55		Heterozigot
2, 6, 9, 10, 13, 14, 16, 23, 25, 28, 29, 32, 33, 34, 37	T-591G	Homozigot
22, 40, 50, 52, 55		Heterozigot

Çoğaltılması hedeflenen 781 baz çifti uzunluğundaki alan içerisinde toplam 10 adet promotor motifi saptanmıştır. Bunların içerisinde yer alan motiflerin birinden 2 adet mevcuttur. Bu motifler sırasıyla; GTAAACAG, GCAGCT, CCGGAA, CGGA-AGT, GCTGCT (2 tane) , CACATG, GGGAGGGG, CATCTGCC, CAGCTGTG motifleridir. Bu 10 motiften 6’sı sekanslamada karşılaşılan problemlerden dolayı elde edilebilen 450 nükleotit uzunluğundaki bölge içerisinde yer almaktadır. Saptanan motiflerin sekans üzerindeki yerleri Şekil 3.10’te verilmiştir.

```

AGTGTGCGACAAGCTCCACCCATACAAACAGCAGCTCAGGCCTGCCCCCTGCCTCGGGGGCCTTC
TCAGGCAGAAGGTGGAAGAGCAGAGTTTAAGAGGTAGCGGCTCTGTTCGGAAGTGTCTTGCACTC
TGACCCCAACC CAACACCCCGCTGCTTCAGAACTGGGTCCTTGA TTCCATAGGTCAGGGGAGGCT
ATGATGTGGGGGCTTGTGGGGGTCTTAACA TAGGGCCTCCCTTGGTGCCTGCTTGCAGGAGGGCA
CACGTGGCAGCCACATGGAATGGAATCTGCACCTGTGCTAGTTAGCCCACTTGTGCACTTGGGG
GATGGGTACAGGAAGCCAGCCATCACTGTAGGAGACAGGACAA GGGTGGGGGTGGGGGT TGGGG
GAGGGGAGAAAAGGGACTCAGCCAGGCAGAGTCTTCTAG CAGCGGCCTTCC

```

Şekil 3.9. Mega 7 programı ile saptanan tek nükleotit polimorfizmlerinin sekanslanan 450 nükleotit üzerinde gösterimi.

Çalışmaya ek olarak, 10 farklı bireye ait köpek *GULO* geninin ekson 2'nin tamamını, intron 1 ve intron 2'nin de bir kısmını içerecek şekilde bir bölgenin sekanslanması sonucunda elde edilen dizi içerisinde de 6 adet tek nükleotit polimorfizmi saptanmıştır. Ayrıca ekson, intron birleşme bölgelerinde ise GGG, TGC, GG olan 3 tane splicing motifi bulunmuştur. Bulunan polimorfizmler ve splicing motifleri Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Ekson-intron birleşme bölgelerinde bulunan polimorfizmler ve splicing motifleri. 10 adet bireye ait *GULO* geni ekson 2'nin, intron 1 ve 2 ile birleştiği bölgelerde saptanan splicing motifleri, tek nükleotit polimorfizmleri ve bu motiflerin içerisinde yer alan SNP'ler tabloda verilmiştir.

Örnek Numaraları	Polimorfizmler	Homozigot / Heterozigot	Splicing Motifi
2, 4	G 30046144 T	Homozigot	GGG
1, 3, 5, 7	T 30046148 C	Homozigot (3 numaralı birey Heterozigot)	TTGC
8, 9	C 30046178 T	Homozigot	-
8, 9	C 30046178 T	Homozigot	-
2, 4, 9	C 30046197 G	Homozigot	-
2, 4	G 30046244 C	Homozigot	GG

CTGACTCTGATGTACCGCATACCCCGAGGGGCTTTGGGCCCTGGCAAAGGTGG**GTAACA**
GTGTTGCGACAAGCTCCACCATACAAACA**GCAGCT**CAGGCCTGCCCCCTGCCTCGGGG
 CTTTCTCAGGCAGAAGGTGGAAGAGCAGAGTTTAAGAGGTAGCGGCTCTGTT**CCGGAAGT**
 GTCTTGCACTCTGACCCCAACC**C**CAACACCC**GCTGCT**TCAGAACTGGGTCCTTG**A**TTCC
 ATAGGTCAGGGGAGGCTATGATGTGGGGGGCTTGTGGGGGTCTTAAC**A**TAGGGCCTCCCT
 TGGTGCCTGCTTGCAGGAGGGCACACGTGGCACGC**CACATG**GAAT**T**GGAATCTGCACCTGT
 GCTAGTTAGCCCACTTGT**C**CAGACTTGGGGG**T**GGGTAC**A**GGAAGCCAGCCATCACTGTAG
 GAGACAGGACA**A**GGGTGGGGGGTGGGGG**T**TGG**GGGAGGGG**AGAAAAGGGACACTCAGCC
 CAGGCAGAGTCTTCTAG**CAGCGGCCTTCC**CCTCCCTAGGCTTTAGGGCAGACAGAGCTGG
 TTCCTTATCTATACTTTTGCCTGATAACACTTGAGGGCCTCGTTTTCTCCTCGATAGT
 GTTGGGGGCACGTTTGCCTAATTCTCTGGGTCCATCGAAAGGTTAGAG**GCTGCT**GGATGAG
 GAGCATGGGGACACAACAGGA**A**CTTGGAAATTGCCCAAGCTCTTG**CATCTGCC****CAGCT**
GTGAGCTGGCTGGCCGAGGATTCTGGGGACCCTACTGTCTTAC**TGCCAACCCCTTAGCTA**
G

Şekil 3.10. Çoğaltılması hedeflenen promotor bölge ile içerisindeki polimorfizmler ve promotor motifleri. Yeşil ile gösterilen alan çoğaltılması hedeflenen bölge olup toplam uzunluğu 781bç'dir. Kırmızı ile gösterilen alan sekanslamada karşılaşılan problemlerden dolayı elde edilen promotor bölgenin bir kısmı olup, toplam 450 nükleotit uzunluğundadır. 781bç'lik alan içerisinde toplam 10 adet promotor motifi saptanmış olup bu motiflerden 6'sı çoğaltılan 450 nükleotit içerisinde yer almaktadır. Ayrıca pembe işaretli olan her nükleotit, 450 baz çiftlik alanda saptanmış olan tek nükleotit polimorfizmleridir. Bu polimorfizmlerden 1'i saptanan ve aynı zamanda çakışık olarak yer alan her iki motifte (CCGGAA ve CGGAAGT) de ortak olarak bulunmaktadır.

4. TARTIŞMA

Tek nükleotit polimorfizmleri (SNP) genomda protein kodlayan ve kodlamayan kısımlarda görülmektedir (Fucharoen, 2007). Protein kodlayan kısımlardaki SNP'ler fenotipe doğrudan yansıdığından dolayı araştırmacılar uzun süre bunlar üzerinde durmuştur (Zhang and Lupski, 2015).

Genom çalışmaları ilerledikçe protein kodlamayan kısımlarda kodlayan kısımlardan (seleksiyon baskısından dolayı) daha fazla SNP bulunduğu (Murphy et al., 2014) ve bunların da Prion (Oztabak et al., 2009), (Ün et al., 2008), nörodejeneratif hastalıklar (Ramanan and Saykin, 2013), kanser (Hubner and Houlston, 2017), kardiovasküler hastalıklar (Kathiresan and Srivastava, 2012), tip II diyabet ve obezite (Al-Daghri et al., 2014) gibi çeşitli hastalıklara yatkınlık ve direnç ile ilişkileri çalışılmıştır. Belirli bir hastalıkla ilişkili belirli bir genin intron gibi kodlama yapmayan dizilerindeki SNP farklılığı farklı popülasyonlarda o hastalığa genetik yatkınlığı ya da direnci belirlemektedir, böylelikle farklı popülasyonlar arasında genetik varyasyona neden olmaktadır (Ibeagha-Awemu et al., 2008).

Introndan başka, bir popülasyondaki bireylerin belirli bir geninin promotor bölgesindeki polimorfizmler de promotor aktivitesini etkileyerek o genin ifadesinin değişimine neden olduğuna dair yayınlar literatürde mevcuttur (Healy et al., 2009).

Benzer şekilde bu çalışmada da aynı popülasyondaki farklı sokak köpeklerinin *GULO* geni promotor bölgesindeki SNP'ler ortaya konmuştur. Saptanan SNP'lerden bir tanesinin, bulunan 2 promotor motifi içerisinde de olduğu görülmüştür.

Genel olarak, SNP'ler genomda her 1000 nükleotitte 1 karşımıza çıkarken (Novaković et al., 2010) bu çalışmada 450 baz çiftlik alanda toplamda 9 farklı SNP saptanmıştır. Bu durum çalışılan sokak köpeklerinin *GULO* geni promotor bölgesinin polimorfik olduğu gösterir.

Protein kodlayan (ekson) kısımlardaki SNP'ler protein yapısını etkilerken düzenleyici (intron, promotor) bölgelerdeki SNP'ler gen aktivitesini, bir başka deyişle üretilen proteinin miktarını etkilemektedir (Hubner and Houlston, 2017).

Ökaryotik genlerin promotor bölgesinde birbirinden farklı çok sayıda motif mevcuttur. Bu motifler sayesinde RNA polimeraz promotora bağlanır ve transkripsiyon faktörleri ile etkileşerek transkripsiyonu başlatır. Promotor motifleri dokuya özgü gen ekspresyonunu değiştirir (Xie et al., 2005).

RNA polimeraz II ve transkripsiyon faktörleri gibi düzenleyici faktörlerin özgül olarak tanıyıp bağlandığı bu motiflerdeki olası bir tek nükleotit değişimi (SNP) motifi değiştireceğinden transkripsiyon elemanlarının motifi tanıyıp bağlanabilmesini ve böylece transkripsiyon sürecini etkileyebilir (Marques et al., 2016).

Köpek *GULO* geninin promotor bölgesinde saptanan motiflerden CCGGAA, GCTGCT (2 tane), GCAGCT, CGGAAGT motifleri (Van Heeringen et al., 2011) yayınında mevcut olup; GCNGCT ('N' ifadesi herhangi bir nükleotit olabileceği anlamına gelmektedir) kalıbına ait 3 motif saptanmıştır. Bunlar; GCAGCT ve GCTGCT (2 tane) motifleridir. CGGAAGT motifi ise MGGAAGT (M; A ya da C nükleotiti) kalıbına uygundur. Belirtilen yayında geçen bu motiflerin omurgalıların evrimsel süreçte konserve olmuş kor promotor bölgelerinde bulunduğu belirtilmektedir.

Saptanan diğer motiflerden olan GTAAACAG, CATCTGCC, CAGCTGTG motifleri (Minovitsky et al., 2007) yayınında mevcut olup GTAAACAG motifinin kalıbı GTMAACAD (M; A ya da C nükleotiti, D; A, G, T nükleotitlerinden biri), CATCTGCC motifininki CATCTGBN (B; C, G, T nükleotitlerinden biri, N; herhangi bir nükleotit), son olarak CAGCTGTG motifininki ise CAGCTGNN (N; herhangi bir nükleotit) olarak geçmektedir. Ayrıca GTMAACAD (M; A ya da C nükleotiti, D; A, G, T nükleotitlerinden biri) kalıbından yola çıkılarak saptanan GTAACAG motifi aynı zamanda memelilerin kodlama yapmayan dizilerinde evrimsel süreçte konserve olduğu ve omurgalılarda çok yaygın görülen 'Forkhead DNA-binding domain' sınıfına dahil olduğu da yine aynı yayında belirtilmektedir.

GGGAGGGG motifi (Xie et al., 2005) yayında bulunup kalıp motif ise GG-GAGGRR'dir (R; A ya da G nükleotitlerinden birisi). Ayrıca CACGTG motifi de yine aynı çalışmaya dayanarak promotor bölge içerisinde saptanmıştır.

Bu çalışmada, köpek *GULO* geninin promotor bölgesinde saptanan CACATG motifinin (O'connor et al., 2005) yayınında *Arabidopsis thaliana* bitkisinde bulunduğu belirtilmiştir.

5 nükleotidi 'CGGAA' olacak şekilde çakışan ve yukarıda verilen CCGGAA ve CGGAAGT motiflerinin çakışma bölgelerinde ilk nükleotit olan sitozinin bazı bireylerde timin nükleotidinde dönüşmesi şeklinde gerçekleşen polimorfizm her iki promotor motifini de değiştireceğinden dolayı RNA polimeraz ve/veya transkripsiyon faktörlerinin bu motiflere bağlanmasını etkileyebilir. Bunun sonucunda ise *GULO* geninin transkripsiyon seviyesi etkilenebilir. Ayrıca yine bu çalışmada *GULO* geni promotor bölgesinde saptanan ancak yukarıda verilen motifler içinde yer alma-

yan tek nükleotit polimorfizmleri de genel olarak transkripsiyon başlangıç kompleksinin oluşumunu ve transkripsiyon seviyesini etkileyebilir.

Splyasing ökaryotik mRNA'nın olgunlaşmasında ve mRNA çeşitliliğinin oluşumunda çok önemli bir post-transkripsiyonel mekanizmadır. Ekson-intron bağlantı bölgelerinde bu olayı gerçekleştiren splaysozom kompleksinin alt birimlerinin tanıyıp bağlandığı splyasing motifleri bulunmaktadır. Splyasing motifleri evrimsel süreçte konserve olmuş olup bu motiflerdeki SNP'ler splyasing olayının gerçekleşmesini etkileyebilir (Ke and Chasin, 2010), (Ke and Chasin, 2011), (Castle, 2011).

Bu çalışmada köpek *GULO* geni ekson-intron bağlantı bölgeleri ile ilişkili saptanan ve Tablo 3.1'de verilen SNP'lerden 3 tanesi ekson-intron splyasing motifleri ile ilişkilidir. GGG motifinin 3. pozisyon bulunan guanin nükleotidi 2 bireyde timin nükleotidine dönüşmüştür.

Bir diğer ekson-intron motifi olan ve GG olarak geçen motifin 2. pozisyonundaki guanin 2 bireyde sitozin nükleotidine dönüşmüştür.

4 bireyde ise TGC motifinin ilk nükleotidi olan timin bazının bir öncesindeki nükleotit polimorfik olup timin bazı sitozine dönüşmüştür.

İlk iki motifte bulunan polimorfizmler ekson-intron bağlantı bölgelerindeki motiflerin içerisine denk geldiği için *GULO* geni mRNA'sının splyasing mekanizmasını etkileyebileceği düşünülmektedir. Son motifte ise polimorfizm motifin içi yerine ilk nükleotidinin bitişiğinde yer aldığından dolayı, splyasing mekanizmasını diğer 2 polimorfizmin etkisine oranla daha düşük seviyede etkileyebilir.

GULO genine ait promotor ve ekson-intron birleşme bölgelerinde saptanan motifler ve SNP'ler ilk kez bu çalışmada ortaya konmuş olup mevcut literatürde bulunmamaktadır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Al-Daghri, N.M., Alkharfy, K.M., Al-Attas, O.S., Krishnaswamy, S., Mohammed, A.K., Albagha, O.M., Alenad, A.M., Chrousos, G.P. and Alokail, M.S.**, 2014. Association between type 2 diabetes mellitus-related SNP variants and obesity traits in a Saudi population. *Molecular biology reports*, 41(3):1731–1740.
- Alberts, B.**, 2017. *Molecular biology of the cell*. Garland science.
- Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P.**, 2013. *Essential cell biology*. Garland Science.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P.**, 2002. *Molecular Biology of the Cell*, (Garland Science, New York, 2008). *Google Scholar*, pp. 652.
- Balakirev, E.S. and Ayala, F.J.**, 2003. Pseudogenes: are they “junk” or functional DNA? *Annual review of genetics*, 37(1):123–151.
- Bánhegyi, G. and Mandl, J.**, 2001. The hepatic glycogenoreticular system. *Pathology oncology research*, 7(2):107–110.
- Bergman, J.**, 2013. The Origins and Genetic Functions of Pseudogenes. *Creation Research Society Quarterly*, 49(4):308–318.
- Capra, S. et al.**, 2006. Nutrient reference values for Australia and New Zealand: Including recommended dietary intakes. Commonwealth of Australia.
- Carr, A.C. and Frei, B.**, 1999. Toward a new recommended dietary allowance for vitamin C based on antioxidant and health effects in humans—. *The American journal of clinical nutrition*, 69(6):1086–1107.
- Castle, J.C.**, 2011. SNPs occur in regions with less genomic sequence conservation. *PLoS One*, 6(6):e20660.
- Chatterjee, I.**, 1973. Evolution and the biosynthesis of ascorbic acid. *Science*, 182(4118):1271–1272.
- Chinoy, N., Dave, I., Singh, Y., Saxena, O. and Vyas, A.**, 1984. Biogenesis, Detection and Determination of Free and Bound Ascorbic Acid. In *The Role of Ascorbic Acid in Growth, Differentiation and Metabolism of Plants*, Springer, p. 28–67.
- Civas, A., Génin, P., Morin, P., Lin, R. and Hiscott, J.**, 2006. Promoter Organization of the Interferon- α Genes Differentially Affects Virus-induced Expression and Responsiveness to TBK1 and IKK? *Journal of Biological Chemistry*, 281(8):4856–4866.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Clancy, S. and Brown, W.**, 2008. Translation: DNA to mRNA to protein. *Nature Education*, 1(1):101.
- De Tullio, M.**, 2010. The mystery of Vitamin, C. *Nat. Educ*, 3(9):48.
- Fairbanks, D.J. and Maughan, P.J.**, 2006. Evolution of the NANOG pseudogene family in the human and chimpanzee genomes. *BMC evolutionary biology*, 6(1):12.
- Featherstone, K., Wood, A.L., Bowen, A.J. and Corcoran, A.E.**, 2010. The mouse immunoglobulin heavy chain VD intergenic sequence contains insulators that may regulate ordered V (D) J recombination. *Journal of Biological Chemistry*, 285(13):9327–9338.
- Frei, B., England, L. and Ames, B.N.**, 1989. Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(16):6377–6381.
- Fucharoen, S.**, 2007. Genetic polymorphisms and implications for human diseases. *J Med Assoc Thai*, 90(2):394–8.
- Gaby, S., Bendich, A., Singh, V. et al.**, 1991. Vitamin intake and death. A scientific review.
- Gelse, K., Pöschl, E. and Aigner, T.**, 2003. Collagens—structure, function, and biosynthesis. *Advanced drug delivery reviews*, 55(12):1531–1546.
- Gerstein, M. and Zheng, D.**, 2006. The real life of pseudogenes. *Scientific American*, 295(2):48–55.
- Gill, G.**, 2001. Regulation of the initiation of eukaryotic transcription. *Essays in biochemistry*, 37:33–44.
- Graveley, B.R.**, 2001. Alternative splicing: increasing diversity in the proteomic world. *TRENDS in Genetics*, 17(2):100–107.
- Hardin, J., Bertoni, G. and Kleinsmith, L.J.**, 2012. *Becker's World of the Cell*. Benjamin Cummings Boston, Massachusetts.
- Healy, J., Dionne, J., Bélanger, H., Larivière, M., Beaulieu, P., Labuda, D. and Sinnett, D.**, 2009. Functional impact of sequence variation in the promoter region of TGFB1. *International journal of cancer*, 125(6):1483–1489.
- Holste, D. and Ohler, U.**, 2008. Strategies for identifying RNA splicing regulatory motifs and predicting alternative splicing events. *PLoS Computational Biology*, 4(1):e21.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Hubner, R.A. and Houlston, R.S.**, 2017. Single Nucleotide Polymorphisms and Cancer Susceptibility. In *The Molecular Basis of Human Cancer*, Springer, p. 231–239.
- Ibeagha-Awemu, E.M., Kgwatalala, P., Ibeagha, A.E. and Zhao, X.**, 2008. A critical analysis of disease-associated DNA polymorphisms in the genes of cattle, goat, sheep, and pig. *Mammalian Genome*, 19(4):226–245.
- Iqbal, K., Khan, A. and Khattak, M.M.A.K.**, 2004. Biological significance of ascorbic acid (Vitamin C) in human health—a review. *Pakistan Journal of Nutrition*, 3(1):5–13.
- Jacob, R.A. and Sotoudeh, G.**, 2002. Vitamin C function and status in chronic disease. *Nutrition in clinical care*, 5(2):66–74.
- Jacq, C., Miller, J. and Brownlee, G.**, 1977. A pseudogene structure in 5S DNA of *Xenopus laevis*. *Cell*, 12(1):109–120.
- Juven-Gershon, T. and Kadonaga, J.T.**, 2010. Regulation of gene expression via the core promoter and the basal transcriptional machinery. *Developmental biology*, 339(2):225–229.
- Kathiresan, S. and Srivastava, D.**, 2012. Genetics of human cardiovascular disease. *Cell*, 148(6):1242–1257.
- Kawai, T., Nishikimi, M., Ozawa, T. and Yagi, K.**, 1992. A missense mutation of L-gulonogamma-lactone oxidase causes the inability of scurvy-prone osteogenic disorder rats to synthesize L-ascorbic acid. *Journal of Biological Chemistry*, 267(30):21973–21976.
- Ke, S. and Chasin, L.A.**, 2010. Intronic motif pairs cooperate across exons to promote pre-mRNA splicing. *Genome biology*, 11(8):R84.
- Ke, S. and Chasin, L.A.**, 2011. Context-dependent splicing regulation: exon definition, co-occurring motif pairs and tissue specificity. *RNA biology*, 8(3):384–388.
- Klug, W.S., Cummings, M.R., Spencer, C.A. and Öner, C.**, 2011. Genetik kavramlar. Palme Yayıncılık.
- Li, Y. and Schellhorn, H.E.**, 2007. New developments and novel therapeutic perspectives for vitamin C. *The Journal of nutrition*, 137(10):2171–2184.
- Linster, C.L. and Van Schaftingen, E.**, 2007. Vitamin c. *The FEBS journal*, 274(1):1–22.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C.A., Krieger, M., Scott, M.P., Bretscher, A., Ploegh, H. and Matsudaira, P.**, 2011. MOLEKÜLER HÜCRE BİYOLOJİSİ. *Geçkil H, Özmen M, Yeşilada Ö. Palme Yayıncılık, Ankara.*
- Losos, J.B., Mason, K.A., Singer, S.R. and Peter, H.**, 2008. Raven, and George B. Johnson. Biology.
- Lynch, M.**, 2005. The origins of eukaryotic gene structure. *Molecular biology and evolution*, 23(2):450–468.
- Marques, H., Freitas, J., Medeiros, R. and Longatto-Filho, A.**, 2016. Methodology for single nucleotide polymorphism selection in promoter regions for clinical use. An example of its applicability. *International journal of molecular epidemiology and genetics*, 7(3):126.
- Martinez, E., Chiang, C.M., Ge, H. and Roeder, R.**, 1994. TATA-binding protein-associated factor (s) in TFIID function through the initiator to direct basal transcription from a TATA-less class II promoter. *The EMBO journal*, 13(13):3115–3126.
- Matei, N., Birghila, S., Popescu, V., Dobrinas, S., Soceanu, A., Oprea, C. and Magearu, V.**, 2008. Kinetic study of vitamin C degradation from pharmaceutical products. *Rom. J. Phys*, 53(1-2):343–351.
- Mighell, A., Smith, N., Robinson, P. and Markham, A.**, 2000. Vertebrate pseudogenes. *FEBS letters*, 468(2-3):109–114.
- Minovitsky, S., Stegmaier, P., Kel, A., Kondrashov, A.S. and Dubchak, I.**, 2007. Short sequence motifs, overrepresented in mammalian conserved non-coding sequences. *BMC genomics*, 8(1):378.
- Murphy, K., Cooper, A. and Tobias, E.**, 2014. The human genome, gene regulation and genomic variation.
- Naidu, K.A.**, 2003. Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An overview. *Nutrition Journal*, 2(1):7.
- Nishikimi, M., Fukuyama, R., Minoshima, S., Shimizu, N. and Yagi, K.**, 1994. Cloning and chromosomal mapping of the human nonfunctional gene for L-gulonono-gamma-lactone oxidase, the enzyme for L-ascorbic acid biosynthesis missing in man. *Journal of Biological Chemistry*, 269(18):13685–13688.
- Novaković, I., Maksimović, N., Cvetković, S. and Cvetković, D.**, 2010. Gene polymorphisms as markers of disease susceptibility. *Journal of Medical Biochemistry*, 29(3):135–138.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- O’connor, T.R., Dyreson, C. and Wyrick, J.J.**, 2005. Athena: a resource for rapid visualization and systematic analysis of Arabidopsis promoter sequences. *Bioinformatics*, 21(24):4411–4413.
- Ogbourne, S. and Antalis, T.M.**, 1998. Transcriptional control and the role of silencers in transcriptional regulation in eukaryotes. *Biochemical Journal*, 331(Pt 1):1.
- Oztabak, K., Ozkan, E., Soysal, I., Paya, I. and Ün, C.**, 2009. Detection of prion gene promoter and intron1 indel polymorphisms in Anatolian water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 126(6):463–467.
- O’Connor, C.M., Adams, J.U. and Fairman, J.**, 2010. Essentials of cell biology. *Cambridge, MA: NPG Education*, 1.
- Patrushev, L. and Kovalenko, T.**, 2014. Functions of noncoding sequences in mammalian genomes. *Biochemistry (Moscow)*, 79(13):1442–1469.
- Pei, B., Sisu, C., Frankish, A., Howald, C., Habegger, L., Mu, X.J., Harte, R., Balasubramanian, S., Tanzer, A., Diekhans, M. et al.**, 2012. The GENCODE pseudogene resource. *Genome biology*, 13(9):R51.
- Phillips, T.**, 2008. Regulation of transcription and gene expression in eukaryotes. *Nature Education*, 1(1):199.
- Picknett, T. and Brenner, S.**, 2013. Posttranscriptional Modification. In Brenner’s Encyclopedia of Genetics: Second Edition, Elsevier Inc, p. 424–424.
- Podlaha, O. and Zhang, J.**, 2010. Pseudogenes and their evolution. *eLS*.
- PubChem, O.C.D.**, 2018. Compound Summary for Ascorbic Acid. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/ascorbic_acid. Erişim Tarihi: 2018-05-25.
- Pullar, J.M., Carr, A.C. and Vissers, M.**, 2017. The roles of vitamin C in skin health. *Nutrients*, 9(8):866.
- Ramanan, V.K. and Saykin, A.J.**, 2013. Pathways to neurodegeneration: mechanistic insights from GWAS in Alzheimer’s disease, Parkinson’s disease, and related disorders. *American journal of neurodegenerative disease*, 2(3):145.
- Rimoin, D.L., Connor, J.M., Pyeritz, R.E. and Korf, B.R.**, 2007. Emery and Rimoin’s principles and practice of medical genetics. Churchill Livingstone Elsevier.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Sayers, M., Lynch, S., Jacobs, P., Charlton, R., Bothwell, T., Walker, R. and Mayet, F.**, 1973. The effects of ascorbic acid supplementation on the absorption of iron in maize, wheat and soya. *British journal of haematology*, 24(2):209–218.
- Segal, E., Barash, Y., Simon, I., Friedman, N. and Koller, D.**, 2002. From promoter sequence to expression: a probabilistic framework. In Proceedings of the sixth annual international conference on Computational biology. acm, p. 263–272.
- Shafee, T. and Lowe, R.**, 2017. Eukaryotic and prokaryotic gene structure. *Wiki J Med*, 4(1):002.
- Sinnett, D., Beaulieu, P., Bélanger, H., Lefebvre, J.F., Langlois, S., Thériège, M.C., Drouin, S., Zotti, C., Hudson, T.J. and Labuda, D.**, 2006. Detection and characterization of DNA variants in the promoter regions of hundreds of human disease candidate genes. *Genomics*, 87(6):704–710.
- Svirbely, J.L. and Szent-Györgyi, A.**, 1933. The chemical nature of vitamin C. *Biochemical Journal*, 27(1):279.
- Tomkins, J.**, 2014. The Human GULO Pseudogene—Evidence for Evolutionary Discontinuity and Genetic Entropy. *Answers Research Journal*, 7:91–101.
- Tutar, Y.**, 2012. Pseudogenes. *Comparative and functional genomics*, 2012.
- Ün, C., Oztabak, K., Özdemir, N., Tesfaye, D., Mengi, A. and Schellander, K.**, 2008. Detection of bovine spongiform encephalopathy-related prion protein gene promoter polymorphisms in local Turkish cattle. *Biochemical genetics*, 46(11-12):820–827.
- Van Heeringen, S.J., Akhtar, W., Jacobi, U.G., Akkers, R.C., Suzuki, Y. and Veenstra, G.J.C.**, 2011. Nucleotide composition-linked divergence of vertebrate core promoter architecture. *Genome research*, 21(3):410–421.
- Velavan, T., Bechlars, S., Huang, X., Kremsner, P. and Kun, J.**, 2011. Novel regulatory SNPs in the promoter region of the TNFRSF18 gene in a Gabonese population. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 44(5):418–420.
- Watson, J.D., Crick, F.H. et al.**, 1953. Molecular structure of nucleic acids. *Nature*, 171(4356):737–738.
- Wen, Y.Z., Zheng, L.L., Qu, L.H., Ayala, F.J. and Lun, Z.R.**, 2012. Pseudogenes are not pseudo any more. *RNA biology*, 9(1):27–32.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Xie, X., Lu, J., Kulbokas, E., Golub, T.R., Mootha, V., Lindblad-Toh, K., Lander, E.S. and Kellis, M., 2005.** Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3' UTRs by comparison of several mammals. *Nature*, 434(7031):338.
- Yi, L. and Schellhorn Herb, B., 2007.** New developments and novel therapeutic perspectives for vitamin C [Jornal].-[sl]. *Journal of Nutrition*.
- Yıldırım, A., Bardakçı, F., Karataş, M. and Tanyolaç, T., 2007.** Moleküler Biyoloji: Protein Sentezi ve Yıkımı. *Nobel Yayın Dağıtım, Ankara*, pp. 300.
- Zhang, F. and Lupski, J.R., 2015.** Non-coding genetic variants in human disease. *Human molecular genetics*, 24(R1):R102–R110.
- Zhang, Z., Harrison, P.M., Liu, Y. and Gerstein, M., 2003.** Millions of years of evolution preserved: a comprehensive catalog of the processed pseudogenes in the human genome. *Genome research*, 13(12):2541–2558.
- Zhang, Z.D., Frankish, A., Hunt, T., Harrow, J. and Gerstein, M., 2010.** Identification and analysis of unitary pseudogenes: historic and contemporary gene losses in humans and other primates. *Genome biology*, 11(3):R26.
- Zheng, D., Frankish, A., Baertsch, R., Kapranov, P., Reymond, A., Choo, S.W., Lu, Y., Denoeud, F., Antonarakis, S.E., Snyder, M. et al., 2007.** Pseudogenes in the ENCODE regions: consensus annotation, analysis of transcription, and evolution. *Genome research*, 17(6):839–851.

ÖZGEÇMİŞ

Roja Fidel ACAR

Adres: Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü 35100 Bornova/İZMİR
Telefon: (+90) 5538069007
email:fidelacar@gmail.com

Kişisel Bilgiler

Doğum Yeri ve Tarihi: Şanlıurfa, 17.11.1990

Eğitim Durumu

Yüksek Lisans: 2015-2018, Ege Üniversitesi, Biyoloji Bölümü

Lisans: 2009-2015, Ege Üniversitesi, Biyoloji Bölümü

Lise: 2004-2008, Davut Zeki Akpınar Ç.P.L (İngilizce Ağırlıklı Süper Lise)

Yabancı Dil

Türkçe : Anadil

İngilizce : İyi derecede

Projeler

2015 - 2016: Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) : Yüksek Lisans Proje Desteği 'Köpek *GULO* geninin promotör bölgesindeki polimorfizmler ve gen aktivitesine etkilerinin araştırılması'

2014 – 2015: TÜBİTAK 2209/A - Üniversite Öğrencileri Yurt İçi Araştırma Projeleri Destek Programları 'C Vitamini Sentezinde Rol Alan *GULO* (1-gulono-gamma-lactoneoxidase) Geninin Köpeklerde İncelenmesi'

