

BÖLÜM 2

İNSAN PROTEOMU: PROTEİN İZOFORMLARI, OLUŞUM MEKANİZMALARI VE HASTALIKLARLA İLİŞKİSİ

Hülya GÜNDEŞLİ¹

İnsan genom projesinin tamamlanmasından sonra protein kodlayan genlerin 20.000 civarında olduğu (1) ve yaklaşık 150.000 transkript izoformun bulunduğu tespit edildi (2). Elde edilen sonuçlar, bir gen-bir polipeptit hipotezinin doğru olmadığını ancak aynı genden veya tek bir atadan gelen gen ailelerinden sentezlenen çok sayıda protein izoformu olduğunu ortaya çıkardı. Buna göre, bazı durumlarda bir genden iki veya daha fazla izoform kodlanabilmekte ve bir genden sentezlenen protein izoformları hem aynı hem de oldukça farklı biyolojik işlevleri gerçekleştirebilmektedir. İzoformlar hücre içi dağılımları, zamana ve yere bağlı ifadeleri açısından da farklılık gösterebilmektedir (3).

Bilindiği üzere, genomik çalışmalarda hedef molekül DNA'dır ve her bir organizma için bir genom analiz edilmektedir. Ancak proteomun, bir hücre, doku veya organizmadaki tüm proteinleri ifade ettiği düşünülecek olursa her bir organizma için birden fazla proteom olduğunu söyleyebiliriz. İnsan proteomu çok çeşitli protein izoformlarının varlığından dolayı oldukça geniş ve çeşitlidir. Birçok hastalık fenotipte protein aktivitesi düzeyinde ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle proteomun şekillenmesinde önemli bir yere sahip olan izoformların meydana geliş mekanizmaları, dokuya özgül ifadeleri, işlevleri, yerleşimleri, yapıları ve birbirleri ile olan etkileşimlerini tanımlayabilmek bazı hastalıkların moleküler patolojisini daha kapsamlı anlayabilmemizi sağlayacaktır.

Yeni nesil analiz cihazlarının gelişmesi ile birlikte 2010 yılının sonlarına doğru insan proteom mimarisini daha detaylı anlayabilmek amacıyla İnsan Proteom Projesi (HPP; *Human Proteome Project*) aktif olarak başlatılmıştır (4). HPP, İnsan Proteom Organizasyonu (HUPO) tarafından düzenlenen ve dünya çapındaki birçok araştırma laboratuvarının birlikte koordineli bir şekilde çalışmasıyla insan proteomunu anlamamızda devrim yaratmayı amaçlayan uluslararası bir projedir.

¹ Dr. Öğr. Üyesi, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gülhane Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD.,
hulya.gundesli@sbu.edu.tr

Halihazırda mevcut ve gelişmekte olan teknikleri kullanarak sistematik bir çabayla tüm insan proteomunu haritalamak için tasarlanmıştır. Bu projenin tamamlanması ile insan biyolojisinin hücresel düzeyde anlaşılması sağlanacak, tanısallık, prognostik, tedavi edici ve önleyici tıbbi uygulamaların geliştirilmesi için bir temel oluşturulacaktır.

İnsan proteom projesi kapsamında da detaylıca analiz edilmekte olan ve protein çeşitliliğini sağlayan farklı protein izoformlarının üretilmesine sebep olan temel etkenleri bilmek bu faktörlerde meydana gelecek hatalar sonucunda insan fizyolojisinin nasıl bozulduğunu anlayabilmemiz açısından önemlidir. Buna göre, belirtilen bu etkenler a) Alternatif uçbirleştirme (*splicing*), b) Alternatif transkripsiyon başlama bölgesi seçimi, c) Alternatif poliAdenilasyon, d) Alternatif transkripsiyon başlama bölgesi seçimi olarak sınıflandırılabilir (5). Gerçekleştirilen çeşitli çalışmalar, protein çeşitliliğini sağlayan bu faktörlerde meydana gelen hataların veya düzensizliklerin insanda görülen birçok patoloji ile bağlantılı olduğunu göstermiştir.

Bu bölüm kapsamında bir hücrenin proteom mimarisinin şekillenmesini sağlayan protein izoformlarının oluşumuna sebep olan etkenler genel hatları ile açıklanmış ve insan hastalıkları ile olan ilişkileri güncel bilgiler kapsamında değerlendirilmiştir.

ALTERNATİF UÇBİRLEŞTİRME

İlk defa 1977 yılında tanımlanan uçbirleştirme ve daha sonrasında açıklanan alternatif uçbirleştirme mekanizması ile modüler yapısında ekson ve intronların bulunduğu öncül mRNA (pre-mRNA)'da eksonlar farklı konfigürasyonlarda bir araya gelmekte, alternatif transkript izoformları oluşmakta ve sonrasında farklı protein izoformları sentezlenmektedir (6,7).

İnsanlarda çok sayıda eksonu bulunan genlerin %95'inde alternatif uçbirleştirme meydana gelmekte ve ortaya çıkan protein izoformları birbirinden bağımsız olarak hücrede işlev görmektedir (2,8). Buna ilave olarak, insan kalıtsal hastalıklarının ve kanserlerin yaklaşık %15'inin alternatif uçbirleştirme mekanizmasındaki hatalar sonucu geliştiği belirtilmektedir (9,10). Uçbirleştirme olayındaki düzensizlikler ve hatalar sonucu ortaya çıkan patolojileri daha iyi anlayabilmek için mekanizmanın nasıl çalıştığı aşağıda kısaca açıklanmıştır.

Uçbirleştirme reaksiyonu, küçük çekirdek ribonükleoprotein (snRNP) kompleksi bir diğer deyişle spliceosom tarafından pre-mRNA'da bulunan spesifik dizilerin tanınmasıyla başlar (11). Bu işlevde, intron dizileri pre-mRNA'dan kesilir ve

ekson dizileri olgun mRNA'yı oluşturmak üzere biraraya getirilir. Uçbirleştirmenin gerçekleşebilmesi için pre-mRNA üzerindeki bazı diziler oldukça önemlidir. Birçok intronun 5' uçbirleştirme bölgesinde (SS; *splice site*) "GU" nükleotitleri, 3' uçbirleştirme bölgesinde ise "AG" nükleotitleri vardır, buna aykırı sadece birkaç istisna bulunmaktadır (12). Bu dizilere ilave olarak, 3' uçbirleştirme bölgesi yakınında bir "A" nükleotidini içeren dallanma noktası (BP; *branch point*) bulunmaktadır ve ayrıca 3'SS ve BP arasında çoklu pirimidin bölgesi (PPT; *polypyrimidine tract*) yer almaktadır.

Merkezi spliceosom beş temel snRNP'den, U1, U2, U4, U5 ve U6, oluşur ve bunlar sırayla mRNA molekülü üzerinde aktivite gösterir. U1, 5'SS uçbirleştirme bölgesini tanıırken, U2, BP'yi tanıır. İki trans-esterleşme olayı U2, U5 ve U6'nın konformasyonel ve kompozisyonel olarak yeniden düzenlenmesiye gerçekleşir (5). Belirtilen trans-esterifikasyonlardan biri 5'SS ve BP arasında diğeri ise birinci eksonun 5' ucu ile ikinci eksonun 3' ucu arasında meydana gelir (5).

Uçbirleştirme mekanizmasında ekson direk olarak tanınmaz bu nedenle pre-mRNA üzerinde *cis* pozisyonda işlev gören diziler ve *trans* pozisyonda işlev gören proteinlere ihtiyaç duyulmaktadır (13,14). Bu diziler ekson veya intron üzerindeki yerleşimlerine göre ve ayrıca uçbirleştirme işlevini tetikleme veya baskılama rollerine göre sınıflandırılmaktadır. Buna göre, dört ana sınıf vardır: 1) Eksonik uçbirleştirme hızlandırıcısı (ESE; *Exonic Splicing Enhancer*), 2) Eksonik uçbirleştirme baskılayıcısı (ESS; *Exonic Splicing Silencer*), 3) İntronik uçbirleştirme hızlandırıcısı (ISE; *Intronic Splicing Enhancer*), 4) İntronik uçbirleştirme baskılayıcısı (ISS; *Intronic Splicing Silencer*) (15). Bu dizi motifleri genellikle kısadır ve RNA'ya bağlanan proteinler (RBPs; *RNA Binding Proteins*) için bir bağlanma bölgesidir (16). RBP'ler ekson dizisinin tanınmasını sağlayan ve *trans* pozisyonda işlev gören faktörlerdir.

Uçbirleştirmeyi düzenleyen bilinen iki RBP, SR proteinleri ve heterojen çekirdek ribonükleoproteinlerdir (hnRNP). SR proteinlerinin RNA'yı tanıma motifleri vardır ve arjinin/serinden zengin domainleri ile protein-protein interaksyonlarına aracılık ederler (17). SR proteinleri genellikle ekson dizisinin dahil edilmesi işlevini tetiklemek için ESE'lere bağlanır ancak nadiren ISS'lere bağlanarak bir inhibitör görevi de görebilirler (18). hnRNP'ler ise uçbirleştirmeyi baskılamak için ESS'lere bağlanırlar ancak ISE'lere bağlanmak suretiyle uçbirleştirmeyi tetikleme işlevini de gerçekleştirebilirler (19). Farklı fizyolojik ve patolojik durumlarda uçbirleştirme regülasyonunun değiştiği ve bu durumdan çok sayıda farklı RBP'nin sorumlu olduğu tespit edilmiştir (20).

Alternatif Uçbirleştirme ile Farklı Proteinlerin Elde Edilmesi

Dört temel olay ile farklı ürünler oluşabilmektedir.

1. Farklı uzunluklarda ekson oluşumuna sebep olan alternatif uçbirleştirme bölgelerinin seçimi: Bu olay alternatif 5'SS ve alternatif 3'SS uçbirleştirme olayları ile gerçekleşir (5).
2. Uçbirleştirmenin eksonun tamamını etkilediği durumlar: Ekson olgun transkripte dahil olabilir veya olgun transkriptten çıkartılabilir. Eksonun olgun transkriptten çıkarılması olayı ekson atlama (*exon skipping*) olarak bilinir (5).
3. Karşılıklı birbirini dışlayan eksonlar: Yanyana duran iki eksondan birinin atlanması olayıdır. Olgun transkriptte bu iki ekson birarada çok nadir görülür (5).
4. İntron tutma (IR; *Intron Retention*): Olgun transkriptte intron dizisinin çıkarılmayıp tutulması olayıdır (5).

Belirtilen bu dört temel olayın farklı kombinasyonları genin kodlanan dizisini veya UTR (*Untranslated Region*; Kodlanmayan bölge) dizisini değiştirerek tek bir genden sentezlenen transkript izoformu ve sonuç olarak protein izoformu sayısını arttırmaktadır. Ancak bu kompleks regülasyonun işlevsel çeşitliliğe nasıl yol açtığı henüz tüm detayları ile tam olarak açıklanamamıştır ve günümüzün aktif araştırma konularından biridir.

Alternatif Transkripsiyon Başlama Bölgesi Seçimi

Transkripsiyon başlama bölgesi (TSS; *Transcription Start Site*) transkripsiyonu gerçekleştirilen ilk nükleotittir ve bu ilk nükleotidin etrafındaki genomik bölge kor promotör olarak adlandırılır (21). Bazen bu iki terim birbiri yerinede kullanılabilir çünkü TSS ve kor promotör arasında güçlü bir bağlantı vardır. Çalışmalar insan genlerinin %50'den fazlasında alternatif promotör olduğunu ve bir insan geninde ortalama dört TSS bulunduğunu göstermektedir (22,23).

Bir genin transkripsiyonu birkaç TSS'nin birinden başlayabilir ve bu olay alternatif transkripsiyonal başlama olarak bilinir. Böylece farklı veya bir diğer ifadeyle alternatif kor promotörler kullanılabilir ve bu durum bir genden farklı transkript sentezlenmesine sebep olur (24). Transkripsiyonun başlama sürecinde, farklı transkripsiyon faktörlerinin ifade olması ve kromatin durumundaki değişiklikler transkripsiyonun alternatif bir başlama bölgesinden gerçekleşmesini tetikleyen alternatif promotör seçimine neden olabilmektedir (25). Sonuç olarak, ortaya çıkan transkriptin okuma çerçevesi farklılaşabilmekte veya mRNA'nın 5' kodlanmayan bölgesindeki (5'UTR) düzenleyici dizilerin değişmesi sebebiyle translasyon başlama bölgesi de değişebilmektedir ve bir genden farklı protein izoformları sentezlenebilmektedir (26). 5'UTR deki bu değişiklikler translasyon etkinliğini de

değiştirebilmektedir (27). Bununla birlikte, UTR'lerdeki mutasyonlar veya düzenlilikler RNA ve bazı spesifik proteinler arasındaki etkileşimleri değiştirebilir ve böylece fizyolojik denge sağlıktan hastalığa doğru kayabilir.

ALTERNATİF POLİADENİLASYON

RNA'nın işleme basamaklarından biri olan poliAdenilasyon kısaca, pre-mRNA'nın 3' ucundaki poliAdenilasyon bölgesinden endonükleotik kesimin gerçekleşmesi ve arkasından poliAadenozin kuyruğunun eklenmesi işlevidir (28,29). İnsan genlerinin %60'ından fazlasında, RNA polimeraz II tarafından sentezlenen transkriptlerin alternatif poliAdenilasyon bölgesi vardır (30,31). Pre-mRNA'da spesifik dizilere veya yapısal elemanlara bağlanan regülatör faktörlerin ortama bağlı ifadeleri hangi poliA bölgesinin kullanılacağına karar vermektedir (32). Böylece gerçekleşen alternatif poliAdenilasyon ile kodlanan dizisi veya 3'UTR'si farklı yeni izoformlar sentezlenmektedir. Alternatif poliAdenilasyon önemli ölçüde farklı 3' UTR'lerin oluşumuna sebep olabilir ve yeni 3' UTR'ler transkriptin stabilitesini, çekirdekten sitoplazmaya çıkışını ve translasyon oranını etkileyebilir (33). Uzun olan 3' UTR'ler genelde çok daha fazla regülatör yapı içerir ve bu durumda olan mRNA'ların stabilitesi ve translasyon etkinliği düşüktür (34). Bununla birlikte, alternatif poliAdenilasyonun son eksonun yukarı bölgesinde bulunması transkriptin 3' ucundaki ekson kompozisyonunu değiştirir ve böylece kodlanan bölge ile 3' UTR'yi etkileyebilir (5). Kodlanan bölgelerdeki alternatif poliAdenilasyon gen ifadesini de düzenleyebilir (35). Bu nedenle alternatif poliAdenilasyonun kontrolü oldukça önemlidir.

ALTERNATİF TRANSLASYON BAŞLAMA BÖLGESİ SEÇİMİ

Alternatif translasyon başlama bölgeleri (TIS: *Translation Initiation Sites*) ile translasyon regüle edilebilir böylece hem üretilen protein miktarının modülasyonu hem de alternatif protein izoformlarının üretimi sağlanmış olur. Alternatif translasyon başlama bölgeleri genellikle normalde var olan ve bilinen translasyon başlama bölgesinin aşağısında (*downstream*) bulunur ve çeşitli mekanizmalar aracılığıyla seçilir (5). Bu mekanizmalardan biri bölgenin ribozom tarafından etkin bir şekilde taranamamasıdır, ikincisi ise AUG dışında farklı başlama kodonlarının varlığıdır ve üçüncüsü translasyonu yeniden başlatabilmek için yukarı bölgede (*upstream*) bulunan açık okuma çerçeveleridir (uORF; *upstream Open Reading Frame*) (36,37).

Spesifik uORF'lerin aşağı bölgedeki protein kodlayan dizilerin translasyon hızını ayarlayarak protein ifadesini kontrol ettiği bilinmektedir (38,39). Ayrı-

ca, insanlarda bulunan protein kodlayan genlerin yaklaşık %50'sinde potansiyel uORF'lerin tanımlandığı belirtilmektedir (38,39). Bu bulgular, insan genlerinin büyük bir kısmında 5' UTR'de bulunan varyasyonların işlevsel önemini yorumlayabilmek için genom çapında kapsamlı bir çalışma yapılması gerekliliğini ortaya koymuştur (40). Bunun üzerine, gnomAD veri bankasındaki 71.702 tüm genom dizileme verisindeki tek nükleotit varyasyonlarının (SNV; *Single Nucleotide Variation*) alel frekansları kullanılmıştır ve uORF'lerde bulunan SNV'lerin 5' UTR'lerde, yeni dur kodonlarının veya güçlü translasyon sonlanma sinyallerinin oluşumuna sebep olduğu bulunmuştur (40). Aynı çalışmada öncelikle *Penn Medicine* Biyobankası (PMBB) kullanılmış ve uORF'de tespit edilmiş yeni bazı varyantların hastalıklarla bağlantılı olup olmadığı belirlenmiştir. Bu çalışma UK Biyobankası kullanılarak tekrarlanmış ve nadir görülen, işlev kaybına neden olan varyasyonların kümелendiği gen yükü testi yapılmıştır (40). Sonuç olarak, gerçekleştirilen genom kapsamındaki çalışmalarla hastalıklar ve genler arasındaki bağlantıyı kurabilmede uORF'de bulunan ve dur kodonu oluşturan veya güçlü düzeyde dur kodonu oluşturabilme potansiyeli olan varyantların önemi teyit edilebilmiştir.

Bugüne kadar alternatif yoldan translasyona başlama sebebiyle farklı işlevlere sahip yeni protein izoformları üreten bazı ökaryotik mRNA'lar tanımlanmıştır (41,42). Bu duruma örnek teşkil eden birkaç gen ve alternatif translasyon başlama bölgesi kaynaklı bazı patolojiler bu bölüm kapsamında özetlenmiştir.

ALTERNATİF UÇBİRLEŞTİRME HATALARINDAN KAYNAKLI BAZI HASTALIKLAR

Alzheimer

Alzheimer (OMIM #104300) geç dönemde görülen ve zamanla ilerleyen bilişsel zayıflama (kognitif zayıflama) ile karakterizedir. Erken dönemde gelişen ailesel tip ve geç dönemde gelişen sporadik tip olmak üzere iki majör formu bulunmaktadır (43). Hastalığın başlamasına ve ilerlemesine neden olan patofizyolojik süreç hala tam olarak anlaşılammıştır ve bugüne kadar tanımlanmış etkin bir tedavi de bulunmamaktadır.

Sporadik Alzheimer formlarının temel özelliklerinden biri kısa sentezlenmiş toksik Tau proteinlerinin olması ve bu proteinlerin agregat oluşturmalarıdır (44). Yakın zamanda, Alzheimer fare modelinde ve Alzheimer hastalığı olan insan beyinlerinde yapılan bir çalışmada toksik tau fragmentlerinin asparajin endopeptidaz kesimine maruz kaldığı ve böylece 368 amino asitten oluşan bir fragmentin (Tau 1-368) meydana geldiği gösterilmiştir (45). Sonuncu rezidü (368. amino asit) ekson 12'nin sonuna karşılık gelmektedir (46). Gerçekleştirilen başka bir çalışmada ise insan nöroblastoma hücre hattı ve beyinde intron 12'nin mRNA dizisinde

kalmasıyla oluşan insana özgül, kısa yeni bir Tau izoformu belirlenmiştir (46). Keşfedilen bu yeni izoform Tau 1-368 izoformuna benzerdir ancak fazladan 18 amino asit içermektedir. Bu durum yeni oluşan Tau izoformunun agregat oluşturma özelliğini ortadan kaldırmaktadır (46). Yapılan çalışmaya göre, bu yeni izoform özellikle ilerlemiş düzeyde Alzheimer hastalığı olan bireylerin beyinlerinde düşük düzeyde bulunmaktadır (46). Keşfedilen yeni izoform mikrotübüllere bağlanabilmektedir ve agregat oluşturmaya daha az eğilimlidir. Bu durum, Alzheimer hastalığı için sentezlenen yeni kısa Tau izoformuna potansiyel koruyucu faktör özelliği kazandırmaktadır. Bu konu üzerinde yapılacak çalışmalar gelecekte Alzheimer için yeni tedavi stratejilerinin belirlenmesine ışık tutacaktır.

Bilindiği üzere birçok hastalığın karakterizasyonunu sağlayan gen ifadesi değişikliklerini anlamak patolojik süreçlerle bağlantılı hücrel ve moleküler mekanizmaların tanımlanabilmesinde oldukça önemlidir (47,48). Çok yakın zamanda sağlıklı ve Alzheimer hastalığı olan erişkin bireylere ait beyin dokusunun farklı bölgelerindeki gen ifadesi farklılıklarını belirlemek üzere üç büyük transkriptom çalışmasının verileri analiz edilmiştir (49). Belirtilen transkriptom çalışmaları; *Mayo Clinic*, MSBB (*Mount Sinai/JJ Peters VA Medical Center Brain Bank*) ve ROSMAP (*Religious Order Study and Memory and Aging Project*)'e aittir. *Mayo clinic* çalışmasında hem temporal korteks hem de serebellum kullanılmıştır (50). ROSMAP çalışmasında dorsolateral prefrontal korteks kullanılmıştır (51). MSSB çalışmasına ise beynin dört farklı Broadmann (BM) bölgesi (temporal lobdan 22 ve 36. ve frontal lobdan 10 ve 44. bölgeler) dahil edilmiştir (52). Ayrıca, mikroglia, endotel hücreler ve nöronal hücrelerde Alzheimer gen ifadesi imzalarını tanımlayabilmek, özel hücre tiplerinde alternatif uçbirleştirme ve izoform değişimlerini belirleyebilmek için farklı transkript kullanım analizi (DTU; *Differentially Transcript Usage*) ve farklılık gösteren gen ifadesi analizi (DEG; *Differentially Expressed Genes*) gerçekleştirilmiştir (49). Bu yaklaşımla, Alzheimer'ın erken ve geç dönemlerinde etkilenen beyin bölgelerinin gen ifadesinde görülen farklılıkların ayrıntılı bir resmi ortaya çıkarılabilmektedir. Buna göre, Alzheimer beyni temporal lobunda nöronlarda alternatif uçbirleştirmenin kontrolünden sorumlu bazı proteinleri kodlayan gen ifadelerinin farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. Bu genlerden *RBFOX1* ve 2'nin MSBB BM36'da ifadesinin azaldığı ve buna bağlı olarak belirtilen bölgede gözlenen ekson atlama hızının değiştiği belirtilmiştir (53,54). *RBFOX1* ifadesindeki azalma *APP* (*Amyloid Precursor Protein*) gen transkriptindeki ekson 7'nin inklüzyon hızını arttırmaktadır. Böylece, *KPI* (*Kunitz protease inhibitör*) domainine sahip *APP*-770 ve -751 izoformlarının ifadesi artmaktadır (54). *KPI* domainine sahip *APP* izoformu oranındaki artışın nöronlar için oldukça zararlı olduğu ifade edilmektedir (49).

Konjenital Miyastenik Sendrom (CMS; Congenital Myasthenic Syndrome)

Nöromüsküler bağlantı hastalıklarının bir grubudur. Alternatif uçbirleştirme hastalığın patogenezinde önemli bir etkidir (55). Konjenital miyastenik sendromda (OMIM #601462) alternatif uçbirleştirme hatalarının büyük çoğunluğu bilinen uçbirleştirme *cis* bölgesinde bulunan dizilerdeki mutasyonlardan kaynaklanmaktadır (56). Mutasyonlar ya bazı genlerdeki intronların 5' ve 3' uçbirleştirme bölgelerini etkilemekte ve buna bağlı olarak olgun transkriptte intron dizisinin dahil olmasına veya ekson atlanmasına neden olmakta ya da ISE/ESE, ISS/ESS bölgelerinin bozulmasına yol açmaktadır (57). Bazı mutasyonlar da kriptik bir uçbirleştirme bölgesinin aktif olmasını sağlayan *de novo* uçbirleştirme bölgesi oluşumunu tetiklemektedir (58).

CMS patolojisinde, meydana gelen tüm uçbirleştirme kaynaklı mutasyonlar anormal yeni transkriptlerin ve protein izoformlarının sentezlenmesine neden olmakta ve bu durum nöromüsküler bağlantının oluşumu, işlevi ve muhafaza edilmesi süreçlerini etkilemektedir.

Duchenne Kas Distrofisi (DMD ; Duchenne Muscular Dystrophy)

Duchenne Kas Distrofisi (OMIM #310200), *DMD* geninde meydana gelen mutasyonlar sonucu distrofin proteininin sentezlenememesine bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Kas distrofilerinin en yaygın görülen ve en ciddi seyreden formudur (59,60). Distrofin, kas dokusunda sarkolemanın bütünlüğünü koruyabilmesi açısından oldukça önemlidir.

DMD geni insan genomunda uzun intronlar içeren ve ard arda sıralanmış 79 ekson dizisi olan bilinen en uzun gendir (61). *DMD* hastalarında görülen mutasyonların yaklaşık %60-70'i delesyon tipi mutasyonlardır (62). Delesyonların %70'i ekson 45-55 bölgesinde görülmektedir (63). Ekson 45-55 delesyonları hastalığın hafif fenotipi ile ilişkilendirilmiştir ve bu fenotip Becker Müsküler Distrofi (BMD; *Becker Muscular Dystrophy*) olarak bilinmektedir (63). Ekson 45-55 delesyonu okuma çerçevesini bozmamaktadır ve sonuçta kısa ancak kısmen fonksiyonel distrofin proteini izoformları sentezlenmektedir (64). Bununla birlikte, örneğin sadece ekson 44 veya ekson 44-45 delesyonları okuma çerçevesini bozmakta ve işlevsel distrofin proteininin sentezlenmesine engel olmaktadır (65).

DMD geninde tespit edilen birçok intronik mutasyon yeni bir uçbirleştirme bölgesi oluşturmakta ve/veya var olan sub-optimal uç birleştirme bölgesinin gücünü artırarak olgun transkriptte kriptik eksonların tanınmasını sağlamaktadır (66). Ayrıca, hastalıkla bağlantılı kriptik eksonların yarısı genleri yeniden düzenleyen hareketli elemanlar tarafından oluşmaktadır (67). Bunun sonucunda da

normal işlevini yerine getiremeyen alternatif transkriptler meydana gelmekte ve kas dokusu bütünlüğü bozularak DMD patolojisi gelişebilmektedir.

Miyotonik Distrofi Tip 1 (DM1)

Kas zayıflığı, kas kaybı, miyotoni, insülin direnci ve kalsiyum iyon kanalı hasarı ile karakterize DM1 (OMIM #160900) patogenezinde uçbirleştirme hasarı oldukça önemlidir (58). DM1'e DMPK1 (*DM protein kinase*) gen transkriptlerinde bulunan CTG tekrarı sayısındaki artış sebep olmaktadır (68). Çekirdek içinde lezyonlar oluşturan, fazla sayıda CTG tekrarı içeren transkriptlere bir uçbirleştirme regülatörü olan MBLN (*Muscleblind-like 1*) proteini bağlanmakta ancak tekrar dizisindeki artış nedeniyle işlevini yerine getirememektedir (68,69). Örneğin, MBLN proteini INSR (*Insulin receptor*) pre-mRNA'sından alternatif ekson 11'in atlanmasını sağlamakta böylece ekson 11'i içeren ve iskelet kasında ifade olan INSR-B isoformu yerine genellikle beyin, dalak ve lökositlerde ifade olan INSR-A izoformunun oluşmasına neden olmaktadır (70). INSR-A izoformu zayıf çalışan insülin reseptörünü kodlamaktadır, bu durumun özellikle DM1 hastalarındaki insülin direnci ile korelasyon gösterdiği belirtilmektedir (71,72). MBLN proteininin işlevini yerine getirememesi aynı zamanda *DMD* pre-mRNA'sından ekson 78'in çıkarılmasına da sebep olur. Ekson 78 kaybedildiğinde ortaya çıkan mRNA'dan distrofinin embriyonik izoformu kodlanır ve bu durum hatalı bir şekilde organize olmuş Z bandlarını içeren halkalı kas fibrillerinin meydana gelmesine sebep olur ve patolojik sürecin gelişmesini tetikler (73).

Kanserde Uçbirleştirme Faktörleri

Kritik uçbirleştirme kontrol noktalarında (alıcı veya verici bölgeler) görülen bazı mutasyonlar (örneğin; nokta mutasyonları) intronların kısmen veya tamamen mRNA dizisine dahil olmasına neden olmaktadır. Bu durum bazı kanser tipleri ile ilişkilendirilmiştir. Örneğin, kemik iliğinde yapılan kan hücrelerinin olgunlaşmaması ve farklı bir şekilde gelişim göstermesi ile ortaya çıkan Miyelodisplastik Sendromlar (MDS), U2 snRNP'nin ana bileşeni olan *SF3B1* genindeki mutasyonlar sonucu ortaya çıkmaktadır (74,75). Gerçekleştirilen bir çalışmada *SF3B1* ifadesi azaltıldığında (*knockdown*) büyümenin inhibe olduğu ve çok sayıda gen ve yolağın regülasyonunun bozulduğu tespit edilmiştir (74). Ayrıca, 3' uçbirleştirme bölgesinin tanınmasını sağlayan U2AF1 ve SRSF2 gibi proteinleri kodlayan genlerde saptanan somatik mutasyonlarda MDS ile ilişkilendirilmiştir (76).

Tüm bunlara ilave olarak, özellikle son çalışmalar kanser hastalarında sıklıkla IR olayının gerçekleştiğini göstermektedir. Bu duruma bir örnek olarak bazı baş ve boyun kanseri vakalarında *GSTP1* mRNA dizisinde intron 6 dizisinin bir kısmının da tespit edilmesi verilebilir (77). Ayrıca, bazı prostat ve özofagus kanserle-

rinde kısmi olarak intron 4 dizisini içeren *CCND1* mRNA'sından sentezlenen kısa siklin D1b proteini tespit edilmiştir (78,79). Bununla birlikte, mesane, meme, kolon, baş ve boyun, böbrek, prostat, karaciğer, endometrium, akciğer, mide ve akut miyeloid lösemi gibi solid kanserleride içine alan geniş kapsamlı ve yüksek ölçekli bir transkriptom profili belirleme çalışmasında IR olayının belirtilen patolojilerle bağlantılı olduğu gösterilmiştir (80).

Kanser gelişimine sebep olan bir diğer etken gen ifadesi regülasyonunda görülen bozulmalardır. Elde edilen yeni bulgular mRNA izoformlarının relatif oranlarındaki değişikliklerin kanserin de dahil olduğu bazı hastalık gruplarında biyolojik bakımdan oldukça anlamlı olduğunu göstermektedir (81). Bu duruma bir örnek olarak *BCL* geni verilebilir. Buna göre, *BCL*'nin kısa izoformu *BCL-XS*, apoptozu aktive eder ve bir tümör baskılayıcıdır buna rağmen uzun izoformu *BCL-XL*, apoptozu bloke eder ve bir onkogendir (82). Birbirine zıt işleve sahip bu iki izoformun ifade oranları kanser vakalarında değişkenlik göstermekte ve uzun olan izoform kanser hücrelerinin sağkalımını arttırmaktadır (83).

Yakın zamanda gerçekleştirilen bir çalışmada da *in silico* ve *in vitro* yaklaşımlar kullanılarak RNA'ya bağlanan bir protein olan *HNRNPA1* izoformlarının kanser tipine özgül ifade olduğu tespit edilmiştir (81). Normal meme dokusunda *HNRNPA1*'in birbirine benzer dört mRNA izoformu bulunmaktadır ve tüm izoformların temelde 3'UTR'leri farklılık göstermektedir. Mikroarray, RNA dizileme ve tek hücre RNA dizileme çalışması gibi birçok çalışmadan elde edilen verileri *in silico* verilerle birlikte değerlendirmek suretiyle *HNRNPA1*'den sentezlenen izoform 2'nin meme kanseri hücrelerinde çok fazla miktarda bulunduğu ve hastaların sağkalımını negatif yönde etkilediği tespit edilmiştir (81).

ALTERNATİF TSS SEÇİMİNİN BAZI HASTALIKLARLA BAĞLANTISI

Kalp Hastalıkları

Kalp yetmezliği düşük ejeksiyon fraksiyonu ile bir diğer deyişle kalp kasının kanı gerektiği gibi pompalayamaması ile karakterizdir (84).

Yapılan bir çalışmada kalp yetmezliği bulunan vakalarda global gen ifadesi değişiklikleri olduğu tespit edilmiştir (85). Bununla birlikte, başka bir çalışmada insan kalbinde gen ifadesi değişikliklerine sebep olan genomdaki regülatör bölgelerin tanımlanması amacıyla genom boyu promotör ve *enhancer* (hızlandırıcı) kullanımı *CAGE* (*Cap Analysis of Gene Expression*) dizileme çalışması ile belirlenmiştir (84,86,87). *CAGE* yüksek ölçekli dizileme sonucuna göre, insan kalbi sol ventrikülünde aktif olan yaklaşık 23.000 promotör ve yaklaşık 5000 *enhancer* bölge tespit edilmiştir. Yapılan çalışma aynı zamanda diğer hücre tiplerinde ol-

duğu gibi insan sol ventrikülünde aktif olan genlerin %20'sinin birden fazla aktif promotörü olduğunu göstermiştir (84). Çalışmada her iki durumdaki kalpte regülasyon bölgeleri karşılaştırılmış ve yetmezliğin görüldüğü kalp dokusunda alternatif promotör kullanan 129 gen tespit edilmiştir (84).

Aynı çalışmada daha önce bazı mutasyonlarının hipertrofik kardiyomyopati ve aritmilere yol açtığı tespit edilmiş *PRKAG2* geninde alternatif promotör kullanımı ve kalp yetmezliği arasındaki olası bağlantı da değerlendirilmiştir (84). Buna göre, sağlıklı kişilerin sol ventrikülünde transkriptlerin yaklaşık %55'inin $\gamma 2b$ promotöründen kaynaklanan transkriptler, %35'inin $\gamma 2-3b$ promotöründen kaynaklanan transkriptler olduğu tespit edilmiştir (84). Zayıf olan sol ventrikülde *PRKAG2* transkriptlerinin yaklaşık %60'ı $\gamma 2b-3b$ izoformudur. Bu izoformda diğerinde olmayan 32 amino asitlik bir dizi vardır ve bu amino asit dizisinin AMPK (*AMP-activated protein kinase*) kompleksi ve kalp kası kasılmasını regüle eden proteinlerden biri olan troponin I arasındaki interaksiyonu ve sonuç olarak kalp kası kontraksiyonunu etkileyebileceği ifade edilmiştir (88). Bulgular $\gamma 2b-3b$ izoformunun kalp yetmezliğinin önemli bir faktörü olduğu yönündedir (84).

Yakın zamanda yapılan başka bir çalışmada, agresif dilate kardiyomyopati ile ilişkilendirilmiş, kalp dokusuna özgül alternatif uçbirleştirme regülasyonu olan *RBM20* (*RNA Binding Motif 20*) geninde mutasyon olan ve olmayan insan kardiyomyositlerinden elde edilmiş indüklenmiş pluripotent kök hücreler kullanılarak uzun okumalı RNA dizileme çalışması gerçekleştirilmiştir (89). Çalışmada 107 kardiyak geninden ifade olan 121 transkript izoformu ve *RBM20* mutasyonlarına bağlı olarak hatalı uçbirleştirme sonucu meydana gelmiş yeni *IMMT* (*Inner Membrane Mitochondrial Protein*) transkript izoformları tespit edilmiştir (89). Gelecekte yapılacak çalışmalar alternatif uçbirleştirme mekanizmasındaki hatalar sonucu ortaya çıkan bu yeni protein izoformlarının kalp işlevini nasıl etkilediğini açıklayacaktır.

Frajl X Sendromu

Frajl X sendromu (FXS; OMIM #300624) kalıtsal kognitif bozuklukların (zihinsel engellilik) en yaygın görülen formudur (90). FSX, *FMR1* (*Fragile X Mental Retardation 1*) geninin 5'UTR'sinde bulunan üçlü nükleotid dizisi artışına (CGG)n bağlı olarak ortaya çıkmaktadır (91). Normal alellerde yaklaşık olarak 12-44 CGG tekrarı bulunurken tam mutant alellerde >200 tekrar görülmektedir. Ayrıca, tam mutant alellerde genin promotör bölgesinde metilasyon gerçekleşmekte ve bu durum genin sessizleşmesine neden olmaktadır (91). Sonuç olarak, sinaptik stabilizasyon ve plastisite için önemli olan FMRP (*Fragile X mental retardation protein*) proteininin hiç sentezlenmemesi veya düşük düzeyde sentezlenmesi anormal

beyin gelişimi ve işlevine sebep olmaktadır (92,93). Tüm bunlara ilave olarak, FSX'de normal ve mutant aleller ile birlikte CGG tekrarı 55 ila 200 arasında olan, tipik olarak metilasyonun görülmediği ve genellikle gen inaktivasyonuna sebep olmayan premutasyon alelleri de tespit edilmiştir (94). Premutasyon alellerine özgül iki anormal fenotip bulunmaktadır. Bunlar; parkinsonizmin nörodejeneratif bir formu olan Frajil X Tremor Ataksiya Sendromu (FXTAS; OMIM #300623) ve erken dönem (40 yaş öncesi) menopoza sebep olan Frajil X Premature Ovaryum Yetersizliğidir (FXPOI; OMIM #311360) (91).

Yapılan bir çalışmada, iki ciddi nörolojik patolojiden (FXS, FXTAS) sorumlu *FMRI* geninin 5'UTR yapısı analiz edilmiştir (94). Gerçekleştirilen *in silico* ve RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*) analizleri ile fare ve insan beyinlerinde transkripsiyon başlama ve poliAdenilasyon bölgesi seçimlerini anlamak için *FMRI* mRNA'sının 5' ve 3' UTR'leri karakterize edilmiştir. Buna göre, insan beyininde alternatif transkripsiyona başlama ve alternatif poliAdenilasyon bölgesi içeren farklı *FMRI* transkript izoformları tespit edilmiştir. Ayrıca, premutasyon taşıyan bir insanın post-mortem beyin dokusunda ve CGG KI (*knock-in*) fare beyininde *FMRI* varyantları çalışılmıştır (94). Burada özellikle, CGG tekrar sayısının normalin üzerinde olduğu premutasyon taşıyan bireyde ve CGG KI farede transkript varyantlarının değişkenlik gösterdiğini belirtmek gerekir. CGG KI fareleri ve Wt (yabanıl tip) karşılaştırıldığında, CGG KI farelerinin hipokampüsünde en uzun 5'UTR 'ye sahip transkriptin daha fazla ifade olduğu ancak insan dokularında ise en uzun varyant yüzdesinin premutasyon taşıyıcılarda normale göre değişmediği ve bu bölgenin nadiren kullanıldığı belirtilmiştir (94). Bir diğer taraftan, hem serebellum hem de hipokampüste başka bir uzun varyant premutasyon alelli olanlarda önemli düzeyde ifade olurken diğer kısa varyantların daha az ifade olduğu belirtilmiştir (94). Ayrıca çalışma kapsamında *FMRI* mRNA'sının 3'UTR bölgesinde farklı poliAdenilasyon sinyali seçimine bağlı olarak üç farklı varyantının oluştuğu ve *FMRI* izoformlarının hem bilinen hem de bilinmeyen poliAdenilasyon sinyallerinden meydana geldiği tespit edilmiştir. Bununla birlikte, özellikle premutasyon taşıyıcılarda alternatif uçbirleştirme hatalarından kaynaklı yeni izoformların oluştuğu, bazı spesifik *FMRI* mRNA izoformlarının ifadelerinde artış olduğu ve RNA toksisitesine bağlı potansiyel FXTAS patolojisinin geliştiği yönünde bulgular olduğunu da belirtmek gerekir (95).

Bu çalışmada da görüldüğü üzere özellikle dokuya özgül alternatif 5' ve 3'UTR kullanımındaki farklılıklar ve buna bağlı olarak farklı izoformların ortaya çıkması nöron fizyolojisinde ve *FMRI* ile bağlantılı hastalıkların gelişiminde oldukça önemlidir. FXS'de premutasyon alellerinde gözlenen farklı 5'UTR ve 3'UTR kombinasyonlarının kullanımı, protein izoformlarının muhtemel işlevlerinin ve

FMR1 ifadesinin daha kompleks hale gelmesini sağlamakta, translasyon etkinliğini düşürmekte ve hastalık patolojisinin gelişimine sebep olmaktadır.

Alternatif PoliAdenilasyonun İnsan Hastalıklarındaki Rolü

İnsanlarda PoliA bölgesi değişimleri hematolojik, immünolojik, nörolojik ve kanserleri de içeren bazı hastalıklarda görülebilmektedir (96,97). Aşağıda RNA'nın 3' ucunun işlenmesi sürecinde meydana gelen hataların veya düzensizliklerin hastalıklara nasıl yol açtığı ana hatları ile verilmiştir.

Yapılan bir çalışmada, *TP53* geninin poliAdenilasyon sinyal bölgesi (PAS; *Poly-Adenylation Signal*) içinde bulunan tek nükleotit polimorfizminin (SNP) *TP53* transkriptlerinde kesim ve poliAdenilasyon bölgesi kaybına neden olarak 3'ucdaki modifikasyonu bozduğu ve bu durumun kutanöz bazal hücreli karsinomaya, prostat kanseri, glioma ve kolorektal adenoma kanserlerine yatkınlığı arttırdığı tespit edilmiştir (98). PoliA bölgelerinin işlenmesini bozan mutasyonlar, neonatal diyabet, α ve β talasemi ve sistemik lupus eritematozus gibi başka hastalıklarda da tanımlanmıştır (99).

Bununla birlikte, trombofilisi olan bireylerde de yeni poliA bölgesi oluşumu tespit edilmiştir (100). Buna göre, protrombini kodlayan F2 (Faktör II)'de tanımlanmış G20210A varyasyonunun venöz tromboz riskini arttırdığı tespit edilmiştir (101). G20210A mutasyonu F2 transkriptinin 3'ucundaki kesim bölgesini CG'den CA'ya değiştirmektedir. Kesimin en etkin olarak CA dinükleotidinden gerçekleştiği ve normal koşullar altında F2 transkriptinin 3'ucdan kesiminin etkin olmadığı belirtilmektedir (102). Bu durumda G20210A mutasyonu 3'ucdan kesim etkinliğini, mRNA ifadesini ve doğal olarak F2 proteini miktarını arttırmaktadır (103,104). Verilen bu örnekte poliA kuyruğunun uzunluğu ve kesim bölgesi değişmemiş ancak kesim etkinliği değişmiştir (103). Bu çalışma tek bir nokta mutasyonun PoliA bölgesindeki kesim etkinliğini değiştirmek suretiyle insan sağlığını ne ölçüde etkilediğinin açık bir göstergesidir.

Alternatif kesim ve poliAdenilasyon hatalarından kaynaklı çeşitli kanser vakalarında görülmektedir (32). Yapılan çalışmalarda, ilk olarak kanser hücre hatlarında 3'UTR'lerin yeniden şekillendiği gözlenmiş ve daha sonra bu durumdan kaynaklı farklı kanser alt tipleri karakterize edilmiştir (105). İlave olarak, birçok kanser tipinde normal doku ile karşılaştırıldığında kısa 3'UTR'si olan transkriptlerin ve sonuç olarak farklı protein izoformlarının ifade olduğu bilinmektedir (106,107). Bununla birlikte, intronik PoliA bölgesi kullanımı da kanserlerde oldukça yaygındır (32). Örneğin, intronik poliA bölgelerinin kullanımı sıklıkla kronik lenfositik lösemide görülmektedir. İtronik poliA bölgelerinin kullanımı kısa protein ürünlerinin sentezlenmesine yol açarak hastalık patolojilerinin gelişmesine sebep ol-

maktadır (108). Bu mekanizmanın özellikle tümör baskılayıcı genleri hedef aldığı, bu genlerden sentezlenen kısa protein izoformlarının tümör baskılama aktivitesinin kaybolduğu ve onkogenik özellik kazandığı belirtilmektedir (108).

Alternatif Translasyon Başlama Bölgesi Seçimlerinin Patolojik Durumlardaki Rolü

Konuyu açıklayan ilk örnek gap bağlantıları ile ilgilidir. Gap bağlantıları, konneksin proteinlerinden oluşur ve birçok hücre tipinin birbirleriyle direk olarak sitoplazmaları aracılığıyla bağlantı kurmasını sağlayarak hücreler arası iletişimi gerçekleştirir. Gap bağlantının gerçekleşmemesi durumunda birçok patolojik durum ortaya çıkabilmektedir (109,110). En fazla ifade olan konneksin proteinlerinden Cx43'ü kodlayan *GJA1* mRNA'sının alternatif translasyon başlama bölgesinden GJA1-20k adı verilen, normal proteinden daha kısa bir protein izoformunun sentezlendiği tespit edilmiştir (111). Cx43 gap bağlantılarının oluşumu GJA1-20k proteininin ifade miktarına bağlı olarak düzenlenmektedir ve bu regülasyon dinamik olarak büyüme faktörü sinyaliyle gerçekleştirilmektedir (111). Ayrıca yapılan araştırmalar GJA1-20k'nın translasyonu için bir 5'cap ve yukarı bölge ribozom taraması işlevine gereksinim duyulduğunu da göstermektedir (112). Kardiyomiyositlerde, her bir kalp atımını kolaylaştıran elektriksel iletim için Cx43 gap bağlantıları gereklidir ve burada aktin dinamiklerini GJA1-20k'nın ektopik ifadesi düzenler (113). Bu olay gap bağlantısı oluşumunu tetikler ve akut iskemi süresince gap bağlantısı kaybına karşı koruma sağlar. Özellikle hastalık durumunda translasyon başlama bölgesinin hedef alınmasıyla gap bağlantı kaybının önlenmesi önemli bir bulgu olarak değerlendirilmektedir. Burada verilen örnek, alternatif translasyona başlama bölgesinin seçimi ile sentezlenen bir protein izoformunun normal fizyolojik sürecin devamlılığı için ne kadar önemli olduğunu göstermektedir.

Bu konuya verilebilecek bir diğer örnek, *MAVS* (*Mitochondrial Antiviral Signaling*) geninde alternatif translasyon başlama bölgesinin kullanımınıdır. MAVS, RIG-1 tarafından viral RNA'nın tanınmasıyla antiviral cevabın indüklenmesini sağlayan bir adaptör proteindir (113). MAVS proteinini kodlayan mRNA dizisinin içinde bulunan methionin başlama kodonundan alternatif olarak translasyonun başlamasıyla interferon üretimini düzenleyen ve miniMAVS olarak bilinen kısa bir protein izoformu sentezlenmektedir (114). Tam uzunluktaki MAVS proteininin miniMAVS izoformuna oranı interferon üretime karar veren faktördür. Aynı zamanda miniMAVS ifadesinin modülasyonu viral replikasyonu etkilemektedir (113). İnterferon üretiminin çok sayıda koruyucu etkisi vardır ve bunlardan birisi viral replikasyonun baskılanmasıdır ancak kronik enfeksiyon süresince sürekli interferon üretilirse bağışıklık baskılanır ve virüsler vücuttan uzaklaştırılmaz (115). Bu nedenle özellikle interferon üretimi için miniMAVS ve tam uzun-

luktaki MAVS proteini oranı çok iyi ayarlanmalıdır (113). Ancak, bu ince ayarın doğru yapılamaması normal fizyolojik durumdan patolojik duruma hızlı bir geçiş olmasına sebep olacaktır.

Plektin İzoformlarından Kaynaklanan İnsan Hastalıkları

PLEC, 32 eksondan oluşan, iskelet kası, deri ve kalpte önemli ölçüde ifade olan bir genidir (116). Alternatif uçbirleştirme ile meydana gelen sekiz farklı transkriptte sahiptir ve bu transkriptleri birbirinden ayıran sadece ekson 1 dizileridir (117). Ekson 1, proteinin N terminal domainini oluştururken, merkezi rod domaini ve C terminal domaini genin diğer eksonları (ekson 2-32) tarafından kodlanmaktadır. Buna göre, *PLEC* geninden kodlanan sekiz farklı plektin izoformu, plektin 1 (P1), plektin 1a (P1a), plektin 1b (P1b), plektin 1c (P1c), plektin 1d (P1d), plektin 1e (P1e), plektin 1f (P1f) ve plektin 1g (P1g)'dir (117,118). Bilinen tüm izoformlarda ekson 2-32 ortaktır. Plektin izoformları dokuya özgü farklı işlevlere sahiptir. Buna göre, P1a insan epidermisinin dermal-epidermal bağlantısında ifade olmakta ve keratin ara filamentleriyle bağlantı kurmaktadır, P1c nöronal hücrelerin temel izoformudur ve bununla beraber P1, 1b, 1d ve 1f izoformları kas dokusunda önemli düzeyde ifade olmakta ve kas dokusu bütünlüğünün muhafaza edilmesinde işlev görmektedir (119-121). P1e ve P1g izoformları hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır.

Birkaç yıl öncesine kadar *PLEC* geninde tespit edilen mutasyonların sadece çeşitli Epidermolozis bullosa (EB; MIM 131900) tipleri ile bağlantılı olduğu belirtiliyordu (122-125). Bu hastalıklarla ilişkili mutasyonlar tüm izoformlarda bulunan ve genellikle proteinin globular domainini içeren C terminal bölgesine yakın yerleşim göstermektedir. Literatürde ilk kez Gundesli ve ark. (126) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada P1f'i kodlayan *PLEC* ekson 1f'de saptanan patolojik bir varyasyon, c.1_9del (p.Met1_Gly3del), farklı patolojik bulgular olmaksızın sadece kas distrofisi fenotipi (LGMD-R17; MIM#613723, daha önce LGMD2Q olarak adlandırılmaktaydı) ile ilişkilendirilmiştir. Böylece ilk defa bir proteinin dokuya özgül izoformunu kodlayan gen dizisinde saptanan bir mutasyonun bir hastalık patolojisi ile doğrudan bağlantısı gösterilebilmiştir. Yakın zamanda yapılan başka bir çalışmada da *PLEC* ekson 1f'de aynı mutasyon tespit edilmiştir (127). Her iki çalışmadan elde edilen bulgular LGMD-R17 tipi kas distrofisinin ülkemizde atasal bir haplotip ile taşındığını da teyit etmiştir (126,127).

Buna ilave olarak, Deev ve ark. (128) tarafından gerçekleştirilen bir başka çalışmada *PLEC* geni ekson 1f'de patojenik başka bir varyant (c.58G>T, p.Glu20Ter) tespit edilmiştir. Diğer çalışmalardan farklı olarak bu mutasyonu taşıyan hastalarda iskelet kası hasarı ile birlikte ciddi düzeyde akciğer hasarı da rapor edilmiştir (128).

Plektin izoformları ile ilgili bir diğer araştırmada, P1a izoformunun sentezlenmemesine neden olan anlamsız (*nonsense*) bir mutasyon (c.46C>T, p.Arg16X) *PLEC* ekson 1a'da tespit edilmiştir (129). Böylece ilk defa P1a izoformu eksikliğinden kaynaklanan ve otozomal resesif kalıtmımlı EBS'ye neden olan bir vaka rapor edilmiştir (129). Bu vakada da mukoz membranlar, kalp ve kas dokuları korunurken sadece deri dokusu etkilenmiştir.

Dokuya özgül plektin izoformlarının işlev görememesine neden olan mutasyonlar ile birlikte çeşitli protein izoformlarının sentezlenmesine neden olan farklı mekanizmalardaki düzensizlikler, hatalar veya izoform düzeyinde ortaya çıkabilecek ifade değişikliklerinin farklı patolojik durumlarla olan bağlantısı bu bölüm kapsamında tartışılmıştır.

Son yıllarda geniş kapsamlı analizler yapılabilmesine imkan sağlayan laboratuvar teknolojileri ve büyük veri analiz yöntemlerinin geliştirilmiş olması ile özellikle izoform düzeyinde transkriptlerin ve proteinlerin daha detaylı analiz edilebilmesi mümkün hale gelmiştir. Transkriptom ve proteom verilerinden elde edilecek bulgular ve bunların karşılaştırmalı olarak birlikte değerlendirilmesi birçok hastalığın moleküler patogenezindeki karanlık noktaların aydınlatılmasında son derece önemlidir. Bu veriler ilerleyen süreçte kişiye özgü tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde de oldukça anlamlı ve değerli olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Pertea M, Shumate A, Pertea, G, et al. CHES: A new human gene catalog curated from thousands of large-scale RNA sequencing experiments reveals extensive transcriptional noise. *Genome Biology*. 2018; 19, 208.
2. Pan Q, Shai O, Lee LJ, et al. Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nature Genetics*. 2008; 40(12), 1413–1415.
3. Hedman AC, Smith JM, Sacks DB. The biology of IQGAP proteins: beyond the cytoskeleton. *EMBO Reports*. 2015; 16(4), 427–446.
4. HUPO. *Human Proteome Project 2022* (31/01/2022 tarihinde <https://hupo.org/human-proteome-project> adresinden ulaşılmıştır).
5. Reixachs-Solé M, Eyraş E. Uncovering the impacts of alternative splicing on the proteome with current omics techniques. *WIREs RNA*. 2022; e1707. Doi: 10.1002/wrna.1707.
6. Chow LT, Gelinás RE, Broker TR, et al. An amazing sequence arrangement at the 50 ends of adenovirus 2 messenger RNA. *Cell*. 1977; 12, 1–8.
7. Gilbert W. Why genes in pieces? *Nature*. 1978; 271, 501.
8. Barbosa-Morais NL, Irimia M, Pan Q, et al. The evolutionary landscape of alternative splicing in vertebrate species. *Science (New York, N.Y.)*. 2012; 338(6114), 1587–1593.
9. Marquez Y, Brown JW, Simpson C, et al. Transcriptome survey reveals increased complexity of the alternative splicing landscape in Arabidopsis. *Genome Research*. 2012; 22(6), 1184–1195.
10. Cui Y, Cai M, Stanley HE. Comparative analysis and classification of cassette exons and constitutive exons. *Biomed Research International*. 2017; 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/7323508>.
11. Zhan X, Yan C, Zhang X, et al. Structures of the human pre-catalytic spliceosome and its precursor spliceosome. *Cell Research*. 2018; 28, 1129–1140.

12. Thanaraj TA, Clark F. Human GC-AG alternative intron isoforms with weak donor sites show enhanced consensus at acceptor exon positions. *Nucleic Acids Research*. 2001; 29, 2581–2593.
13. Iwata H, Gotoh O. Comparative analysis of information contents relevant to recognition of introns in many species. *BMC Genomics*. 2011; 12, 45.
14. Lander ES, Linton LM, Birren B, et al. International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001; 412, 565–566.
15. Wang ET, Sandberg R, Luo S, et al. Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature*. 2008; 456, 470–476.
16. Fu XD, Ares M. Context-dependent control of alternative splicing by RNA-binding proteins. *Nature Reviews Genetics*. 2014; 15, 689–701.
17. Lovci MT, Ghanem D, Marr H, et al. Rbfox proteins regulate alternative mRNA splicing through evolutionarily conserved RNA bridges. *Nature Structural & Molecular Biology*. 2013; 20, 1434–1442.
18. Bradley T, Cook ME, Blanchette M. SR proteins control a complex network of RNA-processing events. *RNA*. 2015; 21, 75–92.
19. Erkelenz S, Mueller WF, Evans MS, et al. Position-dependent splicing activation and repression by SR and hnRNP proteins rely on common mechanisms. *RNA*. 2013; 19, 96–102.
20. Yee BA, Pratt GA, Graveley BR, et al. RBP-maps enables robust generation of splicing regulatory maps. *RNA*. 2019; 25, 193–204.
21. Sandelin A, Carninci P, Lenhard B. Mammalian RNA polymerase II core promoters: insights from genome-wide studies. *Nature Reviews Genetics*. 2007; 8(6), 424–36.
22. Forrest AR, Kawaji H, Rehli M, et al. A promoter-level mammalian expression atlas. *Nature*. 2014; 507(7493), 462–470.
23. Kimura K, Wakamatsu A, Suzuki Y, et al. Diversification of transcriptional modulation: large-scale identification and characterization of putative alternative promoters of human genes. *Genome Research*. 2006; 16(1), 55–65.
24. de Klerk E, t Hoen PA. Alternative mRNA transcription, processing, and translation: insights from RNA sequencing. *Trends Genetics*. 2015; 31(3), 128–139.
25. Davuluri RV, Suzuki Y, Sugano S, et al. The functional consequences of alternative promoter use in mammalian genomes. *Trends in Genetics*. 2008; 24, 167–177.
26. Tasic B, Nabholz CE, Baldwin KK, et al. Promoter choice determines splice site selection in Protocadherin α and γ pre-mRNA splicing. *Molecular Cell*, 2002, 10, 21–33.
27. Tamarkin-Ben-Harush A, Vasseur JJ, Debart F, et al. Cap-proximal nucleotides via differential eIF4E binding and alternative promoter usage mediate translational response to energy stress. *eLife*. 2017; 6, e21907.
28. Edmonds M, Vaughan MH Jr, Nakazato H. Polyadenylic acid sequences in the heterogeneous nuclear RNA and rapidly-labeled polyribosomal RNA of HeLa cells: possible evidence for a precursor relationship. *Proceedings of National Academy of Sciences USA*. 1971; 68, 1336–1340.
29. Darnell J E, Wall R, Tushinski RJ. An adenylic acid-rich sequence in messenger RNA of HeLa cells and its possible relationship to reiterated sites in DNA. *Proceedings of National Academy of Sciences USA*. 1971; 68, 1321–1325.
30. Tian B, Hu J, Zhang H. & Lutz CS. A large-scale analysis of mRNA polyadenylation of human and mouse genes. *Nucleic Acids Research*. 2005; 33, 201–212.
31. Yuan F, Hankey W, Wagner EJ. Alternative polyadenylation of mRNA and its role in cancer. *Genes & Diseases*. 2021; 8, 61e72.
32. Gruber AJ, Zavolan M. Alternative cleavage and polyadenylation in health and disease. *Nature Reviews Genetics*, 2019 Oct; 20(10), 599–614. Doi: 10.1038/s41576-019-0145-z.
33. Kishor A, Fritz SE, Haque N, et al. Activation and inhibition of nonsense-mediated mRNA decay control the abundance of alternative polyadenylation products. *Nucleic Acids Research*. 2020; 48, 7468–7482.

34. Moqtaderi Z, Geisberg JV, & Struhl K. Extensive structural differences of closely related 30 mRNA isoforms: Links to Pab1 binding and mRNA stability. *Molecular Cell*. 2018, 72, 849–861, e6.
35. Tian B, Manley JL. Alternative polyadenylation of mRNA precursors. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. 2016; 18, 18–30. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27677860/>.
36. Kozak M. Regulation of translation via mRNA structure in prokaryotes and eukaryotes. *Gene*. 2005; 361, 13–37.
37. Kochetov AV. Alternative translation start sites and hidden coding potential of eukaryotic mRNAs. *BioEssays*. 2008; 30, 683–691.
38. Iacono M, Mignone F, Pesole G. uAUG and uORFs in human and rodent 5'untranslated mRNAs. *Gene*. 2005; 349, 97–105. Doi: 10.1016/j.gene.2004.11.041.
39. Calvo SE, Pagliarini DJ, Mootha VK. Upstream open reading frames cause widespread reduction of protein expression and are polymorphic among humans. *Proceedings of National Academy of Sciences USA*. 2009; 106, 7507–7512.
40. Lee DSM, Park J, Kromer A, et al. Disrupting upstream translation in mRNAs is associated with human disease. *Nature Communications*. 2021; 12(1), 1515. Doi: 10.1038/s41467-021-21812-1.
41. Du X, Wang J, Zhu H, et al., Second Cistron in CACNA1A Gene Encodes a Transcription Factor Mediating Cerebellar Development and SCA6. *Cell*. 2013; 154(1), 118–133.
42. Tumbarello DA, Brown MC, Hetey SE et al., Regulation of paxillin family members during epithelial-mesenchymal transformation: a putative role for paxillin delta. *Journal of Cell Science*. 2005; 118(20), 4849–4863.
43. Barber RC. The genetics of Alzheimer's disease. *Scientifica (Cairo)*. 2012; 2012, 246210. Doi: 10.6064/2012/246210.
44. Zilka N, Filipcik P, Koson P, et al. Truncated tau from sporadic Alzheimer's disease suffices to drive neurofibrillary degeneration in vivo. *FEBS Letters*. 2006; 580, 3582–3588.
45. Zhang Z, Song M, Liu X, et al. Cleavage of tau by asparagine endopeptidase mediates the neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease. *Nature Medicine*. 2014; 20, 1254–1262.
46. Garcia-Escudero V, Ruiz-Gabarre D, Gargini R, et al. A new non-aggregative splicing isoform of human Tau is decreased in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica*. 2021; 142, 159–177.
47. Masters CL, Bateman R, Blennow K, et al. Alzheimer's disease. *Nature Reviews Disease Primers*. 2015; 1, 15056. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.56>
48. Lee TI, Young RA. Transcriptional regulation and its misregulation in disease. *Cell*. 2013; 152, 1237–1251.
49. Marques-Coelho D, da Cruz Carvalho Iohan L, Melo de Farias AR, et al. Differential transcript usage unravels gene expression alterations in Alzheimer's disease human brains. *NPJ Aging and Mechanisms of Disease*. 2021; 7(1), 2. Doi: 10.1038/s41514-020-00052-5.
50. Allen M, Carrasquillo MM, Funk C, et al. Human whole genome genotype and transcriptome data for Alzheimer's and other neurodegenerative diseases. *Scientific Data*. 2016; 3, 160089.
51. De Jager PL, Ma Y, McCabe C, et al. Data descriptor: a multi-omic atlas of the human frontal cortex for aging and Alzheimer's disease research. *Scientific Data*. 2018, 5, 180142. <https://doi.org/10.1038/sdata.2018.142>.
52. Wang M, Beckman ND, Roussos P, et al. The Mount Sinai cohort of large-scale genomic, transcriptomic and proteomic data in Alzheimer's disease. *Scientific Data*. 2018; 5, 1–16.
53. Raj B, Blencowe BJ. Alternative splicing in the mammalian nervous system: recent insights into mechanisms and functional roles. *Neuron*. 2015; 87, 14–27.
54. Alam S, Suzuki H, Tsukahara T. Alternative splicing regulation of APP exon 7 by RBFOX proteins. *Neurochemistry International*. 2014; 78, 7–17.
55. Palace J, Beeson D. The congenital myasthenic syndromes. *Journal of Neuroimmunology*. 2008; 201-202, 2–5.
56. Rahman MA, Azuma Y, Nasrin F, et al. SRSF1 and hnRNP H antagonistically regulate splicing of COLQ exon 16 in a congenital myasthenic syndrome. *Scientific Reports*. 2015; 5, 13208.

57. Ohno K, Engel AG. Congenital myasthenic syndromes: gene mutations. *Neuromuscular Disorders*. 2003; 13, 854–857.
58. Verdile V, Guizzo G, Ferrante G, et al. RNA Targeting in Inherited Neuromuscular Disorders: Novel Therapeutic Strategies to Counteract Mis-Splicing. *Cells*. 2021; 10, 2850. <https://doi.org/10.3390/cells10112850>.
59. An J, Xie Z, Jia F, et al. Quantitative coordination evaluation for screening children with Duchenne muscular dystrophy. *Chaos*. 2020; 30(2), 023116.
60. Hoffman EP. Causes of clinical variability in Duchenne and Becker muscular dystrophies and implications for exon skipping therapies. *Acta Myologica*. 2020; 39, 179–186.
61. Den Dunnen JT, Grootsholten PM, Bakker E, et al. Topography of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene: FIGE and cDNA analysis of 194 cases reveals 115 deletions and 13 duplications. *American Journal of Human Genetics*. 1989; 45, 835–847.
62. Bladen CL, Salgado D, Monges S, et al. The TREAT-NMD DMD Global Database: Analysis of more than 7,000 Duchenne muscular dystrophy mutations. *Human Mutation*. 2015; 36, 395–402.
63. Muntoni F, Torelli S, Ferlini A. Dystrophin and mutations: One gene, several proteins, multiple phenotypes. *Lancet Neurology*. 2003; 2, 731–740.
64. Malhotra SB, Hart KA, Klamut HJ, et al. Frame-shift deletions in patients with Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Science*. 1988; 242, 755–759.
65. Dwianingsih EK, Malueka RG, Nishida A, et al. A novel splicing silencer generated by DMD exon 45 deletion junction could explain upstream exon 44 skipping that modifies dystrophinopathy. *Journal of Human Genetics*. 2014; 59, 423–429.
66. Deburgrave N, Daoud F, Lfense S, et al. Protein- and mRNA-based phenotype-genotype correlations in DMD/BMD with point mutations and molecular basis for BMD with nonsense and frameshift mutations in the DMD gene. *Human Mutation*. 2007; 28, 183–195.
67. Sibley CR, Blazquez L, Ule J. Lessons from non-canonical splicing. *Nature Reviews Genetics*. 2016; 17, 407–421.
68. Mankodi A, Logigian E, Callahan L, et al. Myotonic dystrophy in transgenic mice expressing an expanded CUG repeat. *Science*. 2000; 289, 1769–1773.
69. Fardaei M, Larkin K, Brook JD, et al. In vivo co-localisation of MBNL protein with DMPK expanded-repeat transcripts. *Nucleic Acids Research*. 2001; 29, 2766–2771.
70. Mosthaf L, Grako K, Dull TJ, et al. Functionally distinct insulin receptors generated by tissue-specific alternative splicing. *EMBO Journal*. 1990; 9, 2409–2413.
71. Vogt B, Carrascosa JM, Ermel B, et al. The two isoforms of the human insulin receptor (HIR-A and HIR-B) follow different internalization kinetics. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1991; 177, 1013–1018.
72. Savkur RS, Philips AV, Cooper TA. Aberrant regulation of insulin receptor alternative splicing is associated with insulin resistance in myotonic dystrophy. *Nature Genetics*. 2001; 29, 40–47.
73. Rau F, Lainé J, Ramanoudjame L, et al. Abnormal splicing switch of DMD's penultimate exon compromises muscle fibre maintenance in myotonic dystrophy. *Nature Communications*. 2015; 6, 7205.
74. Dolatshad H, Pellagatti A, Fernandez-Mercado M, et al. Disruption of SF3B1 results in deregulated expression and splicing of key genes and pathways in myelodysplastic syndrome hematopoietic stem and progenitor cells. *Leukemia*. 2015; 29(5), 1092–1103.
75. Thol F, Kade S, Schlarmann C, et al. Frequency and prognostic impact of mutations in SRSF2, U2AF1, and ZRSR2 in patients with myelodysplastic syndromes. *Blood, American Society of Hematology*. 2012; 119 (15), 3578–3584.
76. Je EM, Yoo NJ, Kim YJ, et al. Mutational analysis of splicing machinery genes SF3B1, U2AF1 and SRSF2 in myelodysplasia and other common tumors. *International Journal of Cancer*. 2013; 133(1), 260–265.
77. Masood N, Malik FA, Kayani MA. Unusual intronic variant in GSTP1 in head and neck cancer

- in Pakistan. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2012; 13(4), 1683–1686.
78. Solomon DA, Wang Y, Fox SR, et al. Cyclin D1 splice variants Differential effects on localization, RB phosphorylation, and cellular transformation. *Journal of Biological Chemistry*. 2003; 278(32), 30339–30347.
79. Comstock CE, Augello MA, Benito RP, et al. Cyclin D1 splice variants: polymorphism, risk, and isoform-specific regulation in prostate cancer. *Clinical Cancer Research*. 2009; 15(17), 5338–5349.
80. Dvinge H, Bradley RK. Widespread intron retention diversifies most cancer transcriptomes. *Genome Medicine*. 2015; 7(1), 45.
81. Erdem M, Ozgul I, Dioken DN, et al. Identification of an mRNA isoform switch for HNRN-PA1 in breast cancers. *Scientific Reports*. 2021; 11, 24444. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-04007-y>.
82. Cloutier P, Toutant J, Shkreta L, et al. Antagonistic effects of the SRp30c protein and cryptic 5' splice sites on the alternative splicing of the apoptotic regulator Bcl-x. *Journal of Biological Chemistry*. 2008; 283, 21315–21324.
83. Stevens M, Oltean S. Modulation of the apoptosis gene Bcl-x function through alternative splicing. *Frontiers Genetics*. 2019; 10, 804.
84. Gacita AM, Dellefave-Castillo L, Page PGT, et al. Altered Enhancer and Promoter Usage Leads to Differential Gene Expression in the Normal and Failed Human Heart. *Circulation:HeartFailure*. 2020;13,e006926. Doi:10.1161/CIRCHEARTFAILURE.120.006926.
85. Heinig M, Adriaens ME, Schafer S, et al. Natural genetic variation of the cardiac transcriptome in non-diseased donors and patients with dilated cardiomyopathy. *Genome Biology*. 2017; 18, 170. Doi:10.1186/s13059-017-1286-z.
86. Kim TH, Barrera LO, Zheng M, et al. A high-resolution map of active promoters in the human genome. *Nature*. 2005; 436, 876–880. Doi: 10.1038/nature03877.
87. Cooper SJ, Trinklein ND, Anton ED, et al. Comprehensive analysis of transcriptional promoter structure and function in 1% of the human genome. *Genome Research*. 2006; 16, 1–10. Doi: 10.1101/gr.4222606.
88. Oliveira SM, Zhang YH, Solis RS, et al. AMP-activated protein kinase phosphorylates cardiac troponin I and alters contractility of murine ventricular myocytes. *Circulation Research*. 2012; 110, 1192–1201. Doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.259952.
89. Zhu C, Wu J, Sun H, et al. Single-molecule, full-length transcript isoform sequencing reveals disease-associated RNA isoforms in cardiomyocytes. *Nature Communications*. 2021; 12, 4203. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24484-z>.
90. Lightbody AA, Reiss AL. Gene, brain, and behavior relationships in fragile X syndrome: evidence from neuroimaging studies. *Developmental Disabilities Research Reviews*. 2009; 15, 343–352.
91. Nobile V, Pucci C, Chiurazzi P. DNA Methylation, Mechanisms of FMR1 Inactivation and Therapeutic Perspectives for Fragile X Syndrome. *Biomolecules*. 2021, 11, 296. <https://doi.org/10.3390/biom11020296>.
92. De Rubeis S, Bagni C. Fragile X mental retardation protein control of neuronal mRNA metabolism: Insights into mRNA stability. *Molecular and Cellular Neuroscience*. 2010; 43, 43–50.
93. Zukin RS, Richter JD, Bagni C. Signals, synapses, and synthesis: how new proteins control plasticity. *Frontiers Neural Circuits*. 2009; 3, 14.
94. Tassone F, De Rubeis S, Carosi C, et al. Differential usage of transcriptional start sites and polyadenylation sites in FMR1 premutation alleles. *Nucleic Acids Research*. 2011; 39(14), 6172–6185. Doi:10.1093/nar/gkr100.
95. Zafarullah M , Tang HT , DurbinJohnson B, et al. FMR1 locus isoforms: potential biomarker candidates in fragile X associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS). *Scientific Reports*. 2020; 10, 11099. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67946-y>.

96. Curinha A, Oliveira Braz S, Pereira-Castro I, et al. Implications of polyadenylation in health and disease. *Nucleus*. 2014; 5, 508–519.
97. Chang JW, Yeh HS, Yong J. Alternative polyadenylation in human diseases. *Endocrinology and Metabolism*. 2017; 32, 413–421.
98. Stacey SN, Sulem P, Jonasdottir A, et al. A germline variant in the TP53 polyadenylation signal confers cancer susceptibility. *Nature Genetics*. 2011; 43, 1098–1103.
99. Hellquist A, Zucchelli M, Kivinen K, et al. The human GIMAP5 gene has a common polyadenylation polymorphism increasing risk to systemic lupus erythematosus. *Journal of Medical Genetics*. 2007; 44, 314–321.
100. Lane DA, Grant PJ. Role of hemostatic gene polymorphisms in venous and arterial thrombotic disease. *Blood*. 2000; 95, 1517–1532.
101. Ridker PM, Hennekens CH, Miletich JP. G20210A mutation in prothrombin gene and risk of myocardial infarction, stroke, and venous thrombosis in a large cohort of US men. *Circulation*. 1999; 99, 999–1004.
102. Sheets MD, Ogg SC, Wickens MP. Point mutations in AAUAAA and the poly (A) addition site: effects on the accuracy and efficiency of cleavage and polyadenylation in vitro. *Nucleic Acids Research*. 1990; 18, 5799–5805.
103. Gehring NH, Frede U, Neu-Yilik G, et al. Increased efficiency of mRNA 3' end formation: a new genetic mechanism contributing to hereditary thrombophilia. *Nature Genetics*. 2001; 28, 389–392.
104. Ceelie H, Spaargaren-van Riel CC, Bertina RM, Vos HL. G20210A is a functional mutation in the prothrombin gene; effect on protein levels and 3'-end formation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2004; 2, 119–127.
105. Singh P, Alley TL, Wright SM, et al. Global changes in processing of mRNA 3' untranslated regions characterize clinically distinct cancer subtypes. *Cancer Research*. 2009; 69, 9422–9430.
106. Gruber AJ, Schmidt R, Ghosh S, et al. Discovery of physiological and cancer-related regulators of 3' UTR processing with KAPAC. *Genome Biology*. 2018; 19, 44.
107. Xue Z, Warren RL, Gibb EA, et al. Recurrent tumor-specific regulation of alternative polyadenylation of cancer-related genes. *BMC Genomics*. 2018; 19, 536.
108. Lee SH, Singh I, Tisdale S, et al. Widespread intronic polyadenylation inactivates tumour suppressor genes in leukaemia. *Nature*. 2018; 561, 127–131.
109. Green LM, Labue M, Lazarus JP, et al. Reduced cell-cell communication in experimentally induced autoimmune thyroid disease. *Endocrinology*. 1996, 137(7), 2823–2832.
110. Oh S, Ri Y, Bennett MV, et al., Changes in permeability caused by connexin 32 mutations underlie X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuron*. 1997; 19(4), 927–938.
111. Smyth JW, Shaw RM. Autoregulation of connexin43 gap junction formation by internally translated isoforms. *Cell Reports*. 2013; 5(3), 611–618.
112. Salat-Canela C, Sese M, Peula C, et al., Internal translation of the connexin 43 transcript. *Cell Communication and Signaling*. 2014; 12(1), 31.
113. James CC, Smyth JW. Alternative mechanisms of translation initiation: an emerging dynamic regulator of the proteome in health and disease. *Life Science*. 2018; 212, 138–144. Doi:10.1016/j.lfs.2018.09.054.
114. Lakhdari O, McAllister CS, Wang M, et al. TLR3 signaling is downregulated by a MAVS isoform in epithelial cells. *Cellular Immunology*. 2016; 310, 205–210.
115. Marshall HD, Urban SL, Welsh RM. Virus-induced transient immune suppression and the inhibition of T cell proliferation by type I interferon. *Journal of Virology*. 2011; 85(12), 5929–5939.
116. Elliott CE, Becker B, Oehler S, et al. Plectin transcript diversity: identification and tissue distribution of variants with distinct first coding exons and rodless isoforms. *Genomics*. 1997; 42, 115–125.
117. Zhang T, Haws P, Wu Q. Multiple variable first exons: a mechanism for cell- and tissue-specific gene regulation. *Genome Research*. 2004; 14, 79–89.

118. Andrä K, Lassmann H, Bittner R, et al. Targeted inactivation of plectin reveals essential function in maintaining the integrity of skin, muscle and heart cytoarchitecture. *Genes & Development*. 1997; 11, 3143-3156.
119. Andrä K, Kornacker I, Jorgl A, et al. Plectin isoform specific rescue of the hemidesmosomal defects in plectin (-/-) keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology*. 2003; 120, 189-197.
120. Rezniczek GA, Konieczny P, Nikolic B, et al. Plectin 1f scaffolding at the sarcolemma of dystrophic (mdx) muscle fibers through multiple interactions with β -dystroglycan. *Journal of Cell Biology*. 2007; 176, 965-977.
121. Fuchs P, Zörer M, Reipert S, et al. Targeted Inactivation of a Developmentally Regulated Neural Plectin Isoform (Plectin 1c) in Mice Leads to Reduced Motor Nerve Conduction Velocity. *The Journal of Biological Chemistry*. 2009; 284 (39), 26502–26509.
122. Uitto J, Pulkkinen L, Smith FJD, et al. Plectin and human genetic disorders of the skin and muscle. The paradigm of epidermolysis bullosa with muscular dystrophy. *Experimental Dermatology*. 1996; 5, 237–246.
123. Pfindner E, Uitto J. Plectin gene mutations can cause epidermolysis bullosa with pyloric atresia. *Journal of Investigative Dermatology*. 2005; 124, 111–115.
124. Nakamura H, Sawamura D, Goto M, et al. Epidermolysis bullosa simplex associated with pyloric atresia is a novel clinical subtype caused by mutations in the plectin gene (PLEC1). *Journal of Molecular Diagnostics*. 2005; 7, 28–35.
125. Koss-Harnes D, Jahnsen FL, Wiche G, et al. Plectin abnormality in epidermolysis bullosa simplex Onga: non-responsiveness of basal keratinocytes to some anti-rat plectin antibodies. *Experimental Dermatology*. 1997; 6, 41–48.
126. Gundesli H, Talim B, Korkusuz P, et al. Mutation in exon 1f of PLEC, leading to disruption of plectin isoform 1f, causes autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy. *American Journal of Human Genetics*. 2010; 87(6), 834-841.
127. Mroczek M, Durmus H, Töpf A, et al. Four Individuals with a Homozygous Mutation in Exon 1f of the PLEC Gene and Associated Myasthenic Features. *Genes*. 2020; 11, 716.
128. Deev RV, Bardakov SN, Mavlikeev MO, et al. Glu20Ter Variant in PLEC 1f Isoform Causes Limb-Girdle Muscle Dystrophy with Lung Injury. *Frontiers in Neurology*. 2017; 8, 367. Doi: 10.3389/fneur.2017.00367.
129. Gostyńska KB, Nijenhuis M, Lemmink H, et al. Mutation in exon 1a of PLEC, leading to disruption of plectin isoform 1a, causes autosomal-recessive skin-only epidermolysis bullosa simplex. *Human Molecular Genetics*. 2015; 24 (11), 3155–3162. Doi: 10.1093/hmg/ddv066.