

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FARE MİYOBLAST HÜCRE HATTINDA (C2C12 HÜCRE HATTI) *Klf5* GENİ
ÜZERİNDE HEDEFLİ İNSERSİYON GERÇEKLEŞTİRİLMESİ

Duygu Akçay

Tıbbi Biyoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANKARA
2015

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FARE MİYOBLAST HÜCRE HATTINDA (C2C12 HÜCRE HATTI) *Klf5* GENİ
ÜZERİNDE HEDEFLİ İNSERSİYON GERÇEKLEŞTİRİLMESİ

Duygu Akçay

Tıbbi Biyoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Y. Çetin KOCAEFE

ANKARA
2015

Anabilim Dalı : **Tıbbi Biyoloji**
Program : **Tıbbi Biyoloji**
Tez Başlığı : **Fare Miyoblast Hücre Hattında (C2C12 Hücre Hattı) Klf5 Geni Üzerinde Hedefli İnsersiyon Gerçekleştirilmesi**

Öğrenci Adı-Soyadı : **Duygu Akçay**
Savunma Sınavı Tarihi : **17.08.2015**

Bu çalışma jürimiz tarafından yüksek lisans/doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: **Doç.Dr.Mesut Muyan** 
Orta Doğu Teknik Üniversitesi

Tez danışmanı: **Prof.Dr.Y.Çetin Kocaefe** 
Hacettepe Üniversitesi

Üye: **Prof.Dr. Serap Dökmeçi** 
Hacettepe Üniversitesi

Üye: **Prof.Dr.Hayat Erdem Yurter** 
Hacettepe Üniversitesi

Üye: **Yrd.Doç.Dr. Arzu Atalay** 
Ankara Üniversitesi

ONAY

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.


Prof.Dr. Ersin FADİLLİOĞLU
Müdür

TEŐEKKÖR

Çalıőmalarım süresince yardımları ve önerileri için Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'ndaki tüm öğretim üyelerine ve çalışma arkadaşlarıma içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez kapsamında yapılan tüm çalışmalar Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'nin 014 09 101 001-743 numaralı kapsamlı araştırma projesi tarafından desteklenmiştir.

ÖZET

Akçay, D. Fare miyoblast hücre hattında (C2C12 hücre hattı), Klf5 geni üzerinde hedefli insersiyon gerçekleştirilmesi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2015. *Klf5*, embriyonik kök hücreler ve erişkin epitel dokuda yaygın ifadesi olan, doku ve hücre tipine göre farklı işlevler sergileyen çinko parmak yapısında bir transkripsiyon faktörüdür. KLF5, gelişim sürecinde, embriyonik kök hücrelerin kök hücre özelliklerinin sürdürülmesinde görev almaktadır. Ayrıca somatik hücrelerde farklılaşmanın kontrolü, mitoz, apoptoz, hücre göçü, enflamasyon, anjiyogenez ve farklılaşma gibi çok çeşitli temel hücresel işlevleri düzenlediği bilinmektedir. Daha önce yapılan çalışmalar Klf5 transkripsiyon faktörünün, iskelet kası kök hücrelerinin çoğalma ve farklılaşma süreçlerini doğrudan düzenlediğini göstermiştir. Bu çalışmaların devamında yürütülecek olan işlevsel genomik çalışmalar için alınan ticari antikoların büyük kısmının özgüllüğünün sınırlı, afinitesinin düşük olduğu ve Klf5'in işlevselliğinin gerektirdiği "post-translasyonel" modifikasyonları tanımadığı anlaşılmıştır. Western blot, protein immünöktürme, kromatin immünöktürme gibi işlevsel protein çalışmalarında karşılaşılan soruna çözüm oluşturabilecek yaklaşımlardan biri de genom düzenleme araçları yardımı ile hücre genomunda yer alan ve Klf5 proteinini kodlayan genin N-terminaline karşılık gelen kısmına, proteinin tanınmasını kolaylaştıracak yeni bir epitop dizisi yerleştirilmesidir. Bu tezin amacı genom düzenleme araçları aracılığı ile KLF5 proteininin N-terminal kısmına yerleştirilen V5-epitop dizisini ifade eden "*engineered*" bir fare miyoblast hücre hattı oluşturmaktır. V5 epitop dizisi yardımı ile KLF5 proteininin hücre içinde tanınması ve takibi sağlanarak yukarıda bahsedilen sorunlara alternatif bir çözüm oluşturulmuştur. Bu çalışma sonucunda elde edilen model hücre hattı ile işlevsel protein çalışmaları mümkün hale gelmiştir.

Anahtar Sözcükler: Genom düzenleme, genom mühendisliği, hedeflenmiş insersiyon, kök hücre biyolojisi, transkripsiyon faktörü

ABSTRACT

Akçay, D. Generation of targeted insertion in the Klf5 gene of mouse myoblasts (C2C12 Cells). Hacettepe University Institute of Health Sciences, M.Sc. Thesis in Medical Biology, Ankara, 2015. Klf5 is a zinc finger transcription factor that is expressed in early embryonic stem cells as well as adult somatic epithelial tissue. The function of Klf5 is diverging in a context dependent manner in cells and tissues. During development, Klf5 has a role in the maintenance of undifferentiated state in embryonic stem cells. Moreover, Klf5 is also acting on cellular processes such as cell migration, apoptosis, inflammation, angiogenesis and differentiation. Previous studies showed a novel role for Klf5 as a regulator of proliferation and differentiation in skeletal muscle stem cells. Detection of Klf5 at the protein level harbor technical obstacles. Commercially available antibodies exhibit low affinity, low specificity and fail to recognize post-translationally modified forms that is directly relevant to the function. Since these obstacles prevent further functional protein studies such as western blots, protein co-immunoprecipitation and chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays, genome editing applications such as CRISPR/Cas9 system provide solution opportunities. This thesis is conceptualized to establish a stable cell line that express a V5-epitope tag within the N-terminal of Klf5 protein. Targetted insertion via CRISPR/Cas9 system is suggested to overcome the above mentioned obstacles. An N-terminal V5 epitope tag would not interfere with the Klf5 function and enable the use of an anti-V5 antibody in the established C2C12 mouse myoblast cells to identify endogeneous Klf5. This tool will aid in for the advancement of the current functional protein studies.

Key Words: Genome editing, genome engineering, targeted insertion, stem cell biology, transcription factor

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
1 GİRİŞ	1
2 GENEL BİLGİLER	3
2.1 Genombilim Araştırma Yöntemleri	3
2.1.1 <i>Transgenesis</i>	4
2.1.2 İşlev kaybı (Loss of function) Mutasyonları	4
2.1.3 İşlev Kazanımı (Gain of function) Mutasyonları	5
2.2 Hedeflenmiş Mutasyonlar Aracılığı ile Gen işlevinin Araştırılması	5
2.3 <i>Klf5</i> Geni ve Proteini	6
2.4 KLF5 proteinine yönelik hedefli mutasyon oluşturmanın gerekliliği	9
2.5 Genom Düzenleme Araçları Kullanılarak <i>Klf5</i> için bir “işlevsel genombilim aracı” geliştirmenin sağlayacağı yararlar	12
2.6 Genom Düzenleme Araçları	12
2.7 CRISPR/Cas9 Sistemi	14
2.7.1 CRISPR/Cas9 Sisteminin Çalışma Prensibi	14
2.7.2 CRISPR/Cas9 Sisteminin Ökaryotlara Adaptasyonu	17
2.7.3 CRISPR/Cas9 Aracılıklı Genom Düzenleme İşlemi için Seçilen Plazmid Vektör ve Memeli Hücresi Modeli	19
2.8 AMAÇ	20

3 GEREÇ VE YÖNTEM	22
3.1 Gereçler	22
3.1.1 Hücre Kültürü	22
3.1.2 Klonlama	22
3.1.3 Plazmid İzolasyonu	24
3.1.4 Bakteri Kültürü	24
3.1.5 Transfeksiyon	24
3.1.6 DNA izolasyonu	25
3.1.7 Polimeraz Zincir Reaksiyonu	25
3.1.8 DNA Dizi Analizi	25
3.1.9 DNA Agaroz Jel Elektroforezi	26
3.1.10 Modifiye Agaroz Jelden DNA İzolasyonu	26
3.1.11 Protein İzolasyonu ve Kantitasyonu	26
3.1.12 Western Blot	27
3.2 Yöntemler	30
3.2.1 Plazmid Üretimi ve İzolasyonu	30
3.2.2 Klonlama Çalışmaları	30
3.2.3 CRISPR/Cas9 vektörünün ve donör plazmidin DNA dizi analizi ile doğrulanması	33
3.2.4 “Gene-Soeing” Yöntemi ile PZR Aracılıklı Mutageniz Oluşturulması	35
3.2.5 C2C12 Fare Miyoblast Hücre Hattına Gen Transferi	39
3.2.6 C2C12 Hücrelerinin klonlanması	39
3.2.7 Pozitif Hücre Klonlarının PZR ve DNA Dizi Analizi ile Doğrulanması	41
3.2.8 Protein İzolasyonu	42
3.2.9 Western Blot	43
4 BULGULAR	47
4.1 Klonlama ve Vektörlerin Hazırlanması	47

4.1.1 CRISPR/Cas9 Vektörünün Hazırlanması	47
4.1.2 Donor DNA Dizisini İçeren Vektörün Hazırlanması	49
4.2 C2C12 Fare Miyoblast Hücre Hattına Elektroporasyon Aracılığı ile Gen Transferi ve PZR Aracılığı ile Koloni Taranması	53
4.3 Pozitif Hücre Klonunun Western Blot ile Doğrulanması	57
5 TARTIŞMA	61
6 SONUÇ VE ÖNERİLER	67
KAYNAKLAR	69

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

°C	Derece santigrad
Ac	<i>Acetylation</i>
APS	Amonyum persülfat
BSA	<i>Bovine serum albümin</i>
BCA	<i>Bisikoninik asit</i>
bç	<i>Baz çifti</i>
CRISPR/Cas	<i>Clustered, Regularly-Interspaced, Short Palindromic Repeats (CRISPR) -Associated protein system (Cas)</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksiribonükleozid trifosfat
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
g	Standart yerçekimi ivmesi
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
HR	homolog rekombinasyon
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
IgG	İmmünglobulin G
IPTG	İzopropil- β -D-1-tiyogalaktopiranozid
kDa	kiloDalton
kHz	kiloHertz
Klf5	mouse <i>Krüppel-like</i> faktör 5
<i>lacZ</i>	Beta-galaktozidaz
LB	<i>Lysogeny broth</i>

M	Molar
NHEJ	<i>non-homolog end joining</i>
P	<i>Phosphorylation</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PFA	Paraformaldehyt
rpm	<i>Rotations per minute</i>
SDS	Sodyum dodesil sülfat
sn	saniye
Su	SUMO
SUMO	<i>Small ubiquitin-like modifier</i>
TAD	<i>Transactivation domain</i>
TAE	Tris-asetat EDTA
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TBS(T)	<i>TBS with Tween-20</i>
TALEN	<i>Transcription activator-like effector nucleases</i>
TEMED	N,N,N',N'-tetrametil-etan-1,2-diamin
U	Ünite
W	Watt
w/v	<i>weight / volume</i>
X-Gal	5-bromo-4-kloro-3-indolil- β -D-galaktozid
ZFN	<i>Zinc finger nuclease</i>

ŞEKİLLER

	Sayfa
2.1 İnsan KLF5 geni ve protein yapısı	9
2.2 CRISPR/Cas9 sisteminin yapısı ve ifade edildiği hücrede hedef genom dizisini tanıma ve kesme işlemi	15
3.1 pGEM-T Easy vektörünün haritası	23
3.2 pX330 CRISPR/Cas9 vektörünün haritası	23
3.3 PCR aracılığı ile mutagenез yaklaşımı şeması	38
4.1 pX330 vektörünün transformasyonu sonucu elde edilen plazmidlerin EcoRI ile enzim kesimi sonrası agaroz jel elektroforezinde görünümü	47
4.2 pX330 vektör iskeletinin BbsI restriksiyon enzimi ile kesimi sonrası agaroz jel elektroforezinde görünümü	48
4.3 Klf5 okuma çerçevesinde yer alan 4. aminoasidi hedeflemek üzere tasarlanan CRISPR/Cas vektörüne hedef grNA yerleşiminin DNA dizi analizi ile doğrulanması	49
4.4 Klf5 okuma çerçevesinde yer alan 41. aminoasidi hedeflemek üzere tasarlanan CRISPR/Cas vektörüne hedef grNA yerleşimi DNA dizi analizi ile doğrulanması	49
4.5 Klf5 geni üzerinde PCR ile çoğaltılan hedef bölgenin agaroz jel elektroforez görüntüsü	50
4.6 Donor Plazmid için homoloji kollarını oluşturacak DNA parçasının DNA dizi analizi ile doğrulanması	51
4.7 PZR aracılıklı mutagenез ile birleştirilen ampikonların agaroz jel görüntüsü	52
4.8 4. ve 5. aminoasitler arasına yerleştirilen ve V5 epitopunu kodlayan DNA dizisini içeren donor plazmide ait DNA dizi analizi	52
4.9 Yeşil florasan proteini kodlayan diziyi taşıyan donor plazmidin DNA dizi analizi ile doğrulanması	53
4.10 Hücre kolonilerinin PZR aracılığı ile taranması ile elde edilen yalancı-pozitif sonuçlar	54
4.11 Hücre kolonilerinin PZR aracılığı ile taranması ve pozitif koloninin (klon 1.A3) %2'lik agaroz jelde görüntüsü	55
4.12 Pozitif hücre klonunda hedeflenen bölgede (4. ve 5.aminoasitler arasına) V5 epitopunu kodlayan dizinin yerleştiğinin DNA dizi analizi	55

	ile doğrulanması – heterozigot görüntü	
4.13	Pozitif saptanan klonda vektör kalıntısı (kontaminasyonu) bulunmadığını gösteren agaroz jel ile gösterildi.	56
4.14	Klf5 okuma çerçevesi içine (N-terminali) yerleşim gösteren GFP ifade eden C2C12 hücrelerinin florasan mikroskop görüntüsü	57
4.15	GFP ifade eden miyotüp hücrelerinin florasan mikroskop görüntüsü	57
4.16	Anti-V5 antikoru ile endojen Klf5 proteininin tanınması	59
4.17	Anti-V5 antikoru ile endojen Klf5 proteininin tanınması	60

1. GİRİŞ

Krüppel-like faktör 5 (*Klf5*), embryonik kök hücreler ve erişkin epitel dokuda yaygın ifadesi olan, doku ve hücre tipine göre farklı işlevler sergileyen bir transkripsiyon faktörüdür. Erken embriyo gelişiminde kök hücrelerde ve somatik hücrelerde farklılaşmanın kontrolü, mitoz,apoptoz, hücre göçü, enflamasyon ve anjiyogenez gibi çok çeşitli temel hücresel işlevleri düzenlediği bilinmektedir (1). Şimdiye dek bölümümüzde kas hastalıklarının hücresel temellerini araştırmaya yönelik yapılan çalışmalar, *Klf5*'in kas dokusu gelişimi ve tamirinde rol aldığını göstermiştir.Yapılan çalışmalarda C2C12 miyoblast hücre hattının farklılaşma sürecinde, *Klf5* ifadesinin mRNA ve protein düzeyinde 10 kata varan artış gösterdiği belirlenmiştir.*Klf5* transkripsiyon faktörünün, C2C12 hücrelerinde ve sıçan primer miyoblast hücrelerinde farklılaşma sürecinde miyotüp oluşumu ile birlikte çekirdekte yerleşim sergilemektedir. Ayrıca kas dokusu tamiri sürecinde yeni oluşan kas liflerine miyoblastların katılımı ve kas liflerinin olgunlaşması sırasında *Klf5* ifadesinin arttığı gösterilmiştir.Bu bulgular, *Klf5*'in miyojenik farklılaşma ve kas rejenerasyonu süreçlerinde yeni miyotüplerin oluşması ve bunların gelişimi ile ilişkili olduğunu göstermektedir (2, 3). KLF5 proteininin kas dokusundaki rolü ve görevlerinin tanımlanması sürecinde bir sonraki basamak, KLF5 ile etkileşime giren diğer proteinlerin (aktivatör ve represör nitelikte protein-protein ilişkisi) ve genomdaki hedeflerinin anlaşılmasına yönelik işlevsel çalışmalarının gerçekleştirilmesidir.

Şimdiye dek bu yönde yürütülen çalışmalarda, KLF5 proteinini tanıma amacıyla çeşitli ticari kaynaklardan elde edilen antikolar kullanılmıştır. Bu antikoların özgüllüğünün sınırlı, afinitesinin düşük olduğu görülmüş ve KLF5'in işlevselliğinin gerektirdiği "post-translasyonel" modifikasyonları tanımadığı anlaşılmıştır. Bu nedenler, işlevsel protein çalışmalarında yürütülen western blot, kromatin çöktürme, protein çöktürme uygulamalarını sınırlamaktadır. Bu tez kapsamında, bu soruna çözüm olarak önerilen bir yaklaşım denenmiştir. Genom düzenleme araçları kullanımı ile hücre genomunda yer alan ve KLF5 proteinini kodlayan genin okuma çerçevesini ve işlevselliğini bozmayacak şekilde proteinin

tanınmasını kolaylaştıracak yeni bir epitop dizisi yerleştirilmesi planlanmıştır. Tez alışması sonucunda elde edilen “engineered” miyoblast (C2C12) hücre hattı *Klf5* geninde V5 epitop dizisini taşımaktadır. Bu hücrelerde, anti-V5 antikorunu kullanarak endojen KLF5 proteininin tanınması sağlanmış, KLF5’in kas kök hücreleri ve kas dokusundaki protein etkileşimlerinin keşfi ve hedef genlerin belirlenmesi ile ilgili işlevsel çalışmaları engelleyen sınırlamalar ortadan kalkmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Genombilim Araştırma Yöntemleri

Genombilim, DNA dizilerinin ve genlerin işlevlerini, ifade düzeylerini ve ifadeyi düzenleyen koşulları sorgulayan bir disiplin ve çalışma alanıdır. Nükleik asit teknolojilerinin gelişmesi ile birlikte, geçtiğimiz 40 yıl içerisinde, genombilim çalışmaları ve insan sağlığına yönelik uygulamalar hız kazanmış ve yaygınlaşmıştır. Genombilim alanındaki gelişmelerle birlikte insan genomunda yer alan birçok gen ve diğer DNA dizilerinin işlevleri ve hastalıklarla olan ilişkisi aydınlatılmıştır. Hastalıkların temelinde yer alan ve bu süreçte hücrel cevabı belirleyen akut ve kronik olaylar gen ifadesi düzeyinde değişikliklere neden olmaktadır. Bu nedenle, hastalıkların moleküler temellerini anlayabilmek için genom bilim teknolojileri önemli ve değerli yeni bakış açıları sunmaktadır(4). Bu teknolojiler hastalıkların moleküler temellerinin anlaşılması ve yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine olanak sağlamıştır.

DNA dizisinden veya mutant organizmanın fenotipinden yola çıkarak bir genin işlevini aydınlatmak için yapılan genombilim çalışmaları *klasik genetik* yaklaşımının temellerini oluşturmaktadır. Bu yaklaşım, hasta fenotipinden yola çıkarak sorumlu genin belirlenmesi sürecini kapsamaktadır (5). Diğer yönden, aynı yaklaşım, model organizmalarda, oluşturulan rastgele mutasyonlar sonucu gözlenen fenotipten yola çıkarak sorumlu gen ya da gen gruplarının tanımlanması şeklinde uygulama alanı bulmuştur (6). Yeni teknolojilerin ve kullanılan yöntemlerin gelişmesi ve genom projesinin tamamlanması ile birlikte ilgili gen dizisinden yola çıkarak gen işlevini belirlemeye yönelik çalışmalar hız kazanmıştır. 20. Yüzyılın son 10 yılında daha yaygın kullanıma giren bu yaklaşımın temelinde, çeşitli yöntemler aracılığı ile ilgilenilen genin işlevini bozup, ortaya çıkan fenotipten yola çıkarak gen işlevini tanımlamak yer almaktadır. *Transgenesis*, işlev kaybı, işlev kazanımı veya hedeflenmiş mutasyon yöntemleri ile yapılan genombilim çalışmaları ile DNA dizisi bilindiği halde rolü bilinmeyen birçok genin işlevi aydınlatılmıştır(7).

2.1.1 Transgenesis

Transgenesis yaklaşımının temelinde yabancı bir DNA parçasının organizmaya kalıcı olarak aktarımı yer almaktadır. Transfer edilen gene “transgen”, yabancı DNA parçasını genomunda bulunduran model organizmaya ise “transgenik organizma” adı verilir. Bu yaklaşımdaki amaç, çeşitli yöntemler aracılığı ile (viral enfeksiyon, enjeksiyon vb.) hücreye gönderilen DNA dizisinin çekirdeğe taşınarak kalıcı olarak genoma entegre olmasını sağlamaktır. Genoma yerleşim sırasında transgen, homolog rekombinasyon aracılığı ile hedeflenen gen dizisi ile yer değiştirebilir ve böylelikle modifiye gen dizisinin genoma insersiyonu sağlanır. Fakat bu nadir rastlanan bir durumdur. Genellikle transgen dizisinin genoma insersiyonu rastgele gerçekleşir ve genom içerisinde farklı bölgeye veya bölgelere yerleşir. Transgenik organizmanın genomundan ifade edilen yabancı genin oluşturduğu fenotipten yola çıkılarak bu gen dizisinin işlevinin aydınlatılabilmesi mümkündür. Transgenesis teknolojisi, *C. elegans*, *S. cerevisiae*, *M. musculus* başta olmak üzere birçok model organizmada kullanılmaktadır(8, 9).

2.1.2 İşlev kaybı (*Loss of function*) Mutasyonları

Gen işlevinin araştırılması çalışmalarında kullanılan yöntemlerden biri de ilgili gende işlev kaybı mutasyonları oluşturularak gen silinmesi (*knock-out*) aracılığı ile gen ifadesini ortadan kaldırarak veya gen ifadesini baskılayarak (*knock-down*) oluşan mutant fenotipi incelemektir. İlgilenilen genin bulunmadığı durumda hücre veya model organizmanın verdiği cevabı ve ortaya çıkan fenotipi incelemek gen işlevinin aydınlatılması konusunda bilgi verici bir yöntemdir. İşlev kaybı mutasyonları gen işlevi araştırmalarında yaygın kullanılan bir yaklaşım olup aynı zamanda tek gen hastalıklarını da başarı ile modelleyebilmektedir. İlgilenilen genin farklı RNA etkileşim (*RNAi*) mekanizmaları kullanılarak susturulması da işlevsel genombilimin araştırma yöntemleri arasındadır. Bu amaçla kullanılacak teknikler arasında *siRNA* (*small interfering RNAs*) veya *shRNA* (*short hairpin RNAs*) gibi farklı RNA

etkileşim (*RNAi*) mekanizmaları yer almaktadır. İlgilenilen gene ait mRNA molekülünün hedefli olarak yıkılması, işlevsel protein sentezini azaltarak gen işlevi hakkında bilgi vermektedir (10).

2.1.3 İşlev Kazanımı (*Gain of function*) Mutasyonları

Doğal (*Wild-type*) gen ürününün *overexpression* aracılığı ile yüksek miktarda ifade ettirilip ilgilenilen hücre hattı veya model organizmada meydana gelen fenotipik değişikliklerin incelenmesi, gen işlevinin araştırılmasında yaygın olarak kullanılan yöntemlerdendir. Yukarıda da bahsedildiği gibi ilgilenilen genin ifadesini hücre için gereken alt sınırın altına indirerek veya genin ifadesini tamamen engelleyerek oluşan mutant fenotipin incelenmesi değerli bir genomik araştırma yöntemidir. Ancak ilgilenilen genin ifadesini artırarak hücre veya model organizmada meydana gelen hasarın araştırılması da hem genin görev aldığı yolların aydınlatılması hem de gen tedavisi yaklaşımlarının ortaya konabilmesi için gerekli bir yöntemdir. İfade vektörleri aracılığı ile "*wild-type*" genin ifadesi geçici bir süre için artırılabilir gibi, *transgenesis* yöntemi kullanılarak mutant gen dizisinin hücre veya organizma genomuna ilavesi ile ifade ve işlev artışı sağlanabilir(11).

2.2 Hedeflenmiş Mutasyonlar Aracılığı ile Gen İşlevinin Araştırılması

İlgili gende hedeflenmiş mutasyon oluşturulması ile istenilen hücre ya da organizmada söz konusu genin işlevinin araştırılabilmesi mümkündür. Dışarıdan yabancı bir gen dizisinin model hücre veya organizmaya aktarımı ile hedeflenen bölgede istenilen dizinin silinmesi, genin tamamının silinmesi veya istenilen DNA insersiyonunun gerçekleşmesi sağlanabilir. İlgilenilen hücrenin veya model organizmanın genomunda hedeflenen mutasyonun yaratılabilmesi için dışarıdan gönderilen DNA dizisi ile genomdaki hedef bölgenin birbirleri ile dizi homolojisi göstermesi gereklidir ve bu sayede, "homolog rekombinasyon" olarak adlandırılan bir mekanizma aracılığı ile iki özdeş dizinin birbirleri ile yer değiştirebilmesi sağlanır. Prokaryot hücrelerin ve *S. cerevisiae'* in genomuna uygulanan hedefli mutasyonlar etkin bir şekilde uygulanabilmektedir(12). Ancak memeli genomunun daha

kararlı yapısından dolayı homolog rekombinasyon etkinliği çok düşüktür ve bu durum, bu yöntemin yaygın uygulanabilirliğini kısıtlamaktadır.

Fizyolojik şartlarda, homolog rekombinasyonun memeli genomundaki çok düşük etkinliğine rağmen, DNA hasarı tamiri sürecinde memeli hücrelerinde homolog rekombinasyon mekanizmaları harekete geçmektedir(13). Literatürde yapılan çalışmalar istenilen bölgede hedeflenmiş mutasyon oluşturmada önce, o bölgede DNA hasarı oluşturulduğu takdirde, hasarın tamir sürecinde aktive olan homolog rekombinasyon mekanizması ile hedeflenmiş mutasyon etkinliğinin çok daha arttığını göstermiştir (14). Bu yaklaşımdan hareketle 21. yüzyılda geliştirilen ve günümüzde yaygın uygulamaya sunulan genom düzenleme araçlarının çalışma prensibi, öncelikle hedeflenen bölgede çift sarmal kırık oluşturulması ve sonrasında, memeli hücrelerinde aktive olan DNA tamir mekanizmaları ile bu kırığın onarılmasına dayanmaktadır. Bu onarım sürecinde hücrenin izleyeceği yol düzenlenerek, genom üzerinde istenen hedefli değişikliklerin gerçekleştirilmesi sağlanabilmektedir. Bu süreçte düzenlenmesi hedeflenen bölgeye homoloji gösteren bir DNA parçası hücreye dışarıdan gönderildiği takdirde hedef hücre homolog rekombinasyon mekanizmasına yönlendirilerek dışarıdan gönderilen DNA dizisi üzerindeki değişikliğin kalıcı olarak genoma ilavesi sağlanabilmektedir (15). Hücre içinde homolog rekombinasyon için uygun bir “donor” DNA parçasının bulunmadığı durumlarda ise tamir süreci homolog rekombinasyon yerine non-homolog uç birleştirme ile gerçekleşir. Bu durum, hedeflenen bölgeye bir veya birkaç nükleotid ilavesi veya kaybı ile sonuçlanmaktadır. Genomda yer alan protein kodlayan dizilerde meydana gelen non-homolog uç birleştirme aracılığı ile gerçekleşen tamir süreci sıklıkla okuma çerçevesi mutasyonlarına neden olmaktadır. Bu durum, istenilen bölgede hedeflenmiş gen silinmesi, insersiyon veya delesyon mutasyonları oluşturarak knock-out modelleri ile gen işlevi araştırmalarında başvurulacak uygun bir yaklaşım sunmaktadır (15, 16).

2.3 *Klf5* Geni ve Proteini

Klf5, *Krüppel-like factors* (Klfs) ailesinin üyesi bir transkripsiyon faktörüdür. *Krüppel-like* faktörler çinko parmak yapısına sahip, farklılaşmayı, gelişimi, proliferasyonu, ve programlı hücre ölümünü düzenleyen transkripsiyon faktörleridir. Klf aile üyeleri *Drosophila melanogaster* vücut segmentasyonunda görev alan Krüppel proteini ile gösterdiği homoloji nedeniyle bu şekilde adlandırılmıştır. *Krüppel-like* faktör ailesinin farklı üyeleri farklı hedef genlerin transkripsiyonunu kontrol eder ve birbirinden farklı biyolojik süreçlerde görev alır(17).

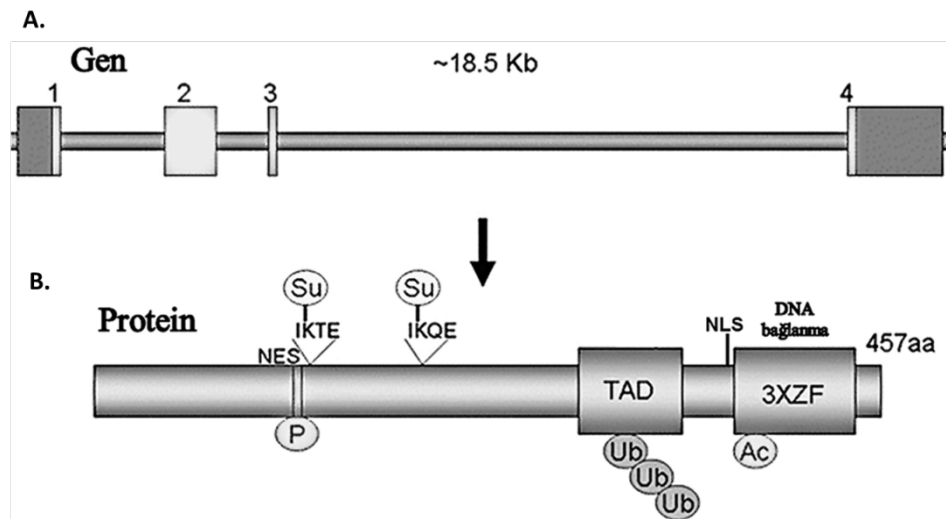
DNA bağlanma bölgesi bakımından *Klf5*, Klf ailesinin diğer üyelerine en az benzerliği gösterir. *Klf5*, hem embriyonel gelişim döneminde hem de erişkin epitel dokuda yaygın ifadeye gösteren bir transkripsiyon faktörüdür. Literatürde yer alan çalışmalar, Northern blot analizi ile insan ve farede mide, pankreas, kalın bağırsak, ince bağırsak, testis, mide, prostat, plasenta, iskelet kası ve akciğerlerde yüksek *Krüppel-like* faktör 5 mRNA ifadesi olduğunu göstermiştir (18). *Krüppel-like* faktör 5 ifadesi çoğu dokuda epitelyal kökenli olmakla birlikte, korneada (19), nöronal hücrelerde (20), lenfoid hücreler (21) ve kardiyovasküler düz kas hücrelerinde (22) de ifade olmaktadır. *Klf5*, hücre ve doku tipine göre çok çeşitli ve zıt işlevler sergileyebilir. Erken embriyo gelişiminde ve somatik hücrelerde farklılaşmanın kontrolü, mitoz, apoptoz, hücre göçü, enflamasyon ve anjiyogenez gibi çok çeşitli temel hücresel işlevleri düzenlediği bilinmektedir. Şimdiye kadar işlevi tanımlanan dokular dışında bölümümüzde yapılan çalışmalar, *Klf5* transkripsiyon faktörünün, iskelet kası kök hücrelerinin çoğalma ve farklılaşma süreçlerinin düzenlenmesinde de rol aldığını göstermiştir. Yapılan çalışmalarda C2C12 miyoblast hücre hattının farklılaşma sürecinde, *Klf5* ifadesinin mRNA ve protein düzeyinde 10 kata varan bir artış gösterdiği belirlenmiştir. Farklılaşma sürecinin başlamasıyla birlikte KLF5'in K151 lizin rezidüsünden SUMOlanmakta ve çekirdek içinde yerleşim göstermektedir. KLF5' in K202 lizinrezidüsünden de ikinci kez SUMOlanması halinde sitoplazmik yerleşim gösterdiği belirlenmiştir. C2C12 hücrelerinin farklılaşma sürecinde *Klf5* ifadesinin susturulması susturulmayan C2C12 hücrelerine göre daha düşük

sayıdamiyotüp (küçük çaplı ve daha az sayıda miyotüp içeren) oluşmasına neden olmaktadır. C2C12 hücrelerinin farklılaşmasından sonra *Klf5* ifadesinin susturulmasının miyotüp olgunlaşmasını engellemediği gözlenmiştir. Bu bulgu, KLF'in olgun miyotüplerin yapı ve işlevini doğrudan etkilemediğini göstermektedir. Yapılan çalışmalar sonucunda KLF5' in miyogenez sürecinde miyoblastların çoğalma, farklılaşma, füzyon ve hücre hareketliliği aşamalarının önemli bir düzenleyicisi olduğunu göstermektedir(2, 3). KLF5, birlikte hareket ettiği diğer düzenleyici proteinlerle beraber çeşitli biyolojik süreçlerde hem aktivatör hem de represör olarak davranabilmektedir. KLF5 farklı dokularda yaygın ifade sergilerken Siklin D1, Siklin B, PDGF α ve FGF-BP gibi önemli transkripsiyonel hedeflerin ifadelerini düzenler (1).

Krüppel-like faktör 5 korunmuş bir gen ve protein yapısına sahiptir. Memelilerde yaklaşık 18kb uzunluğunda ve 4 ekzondan oluşan bir gendir. Farede 14 E2.2, insanda ise 13q21 lokusunda yer almaktadır. Protein ürünü, yaklaşık 45-55 kDa aralığında (insanda 45 kDa, fare de 52 kDa) çinko parmak yapısına sahip bir transkripsiyon faktörüdür. KLF5, ailesinin diğer üyeleri gibi, C-terminalinde üç ardışık çinko parmak (3XZF) bölgesi aracılığı ile genomda yaygın yerleşim gösteren GC kutularını tanır. Çinko parmak kısımlarının önünde prolin amino asitinden zengin transaktivasyon kısmı (TAD) bulunmaktadır. Nükleer lokalizasyon sinyali (NLS) çinko parmak kısımlarının N-terminali yönünde yer almaktadır ve nükleer eksport sinyali (NES) ise, amino terminal uç kısmı ile transaktivasyon sinyali arasında bulunur (Şekil 2.1.) (23).

Klf5 transkripsiyon faktörünün gen ifadesi ve işlevi, Ras/MAPK, PKC ve TGF β gibi farklı sinyal yolları ile düzenlenirken, fosforillenme, asetillenme, ubikutinlenme ve SUMO ilavesi gibi post-translasyonel modifikasyonlar ile aktivitesi kontrol edilmektedir. Bu post-translasyonel modifikasyonlar, KLF5'in hücre içi protein miktarının ve transaktivasyonunun düzenlemesi açısından önemlidir. KLF5'in aktivitesini ubikitinasyon negatif yönde etkilerken fosforilasyon pozitif yönde etkilemektedir. SUMOlanmanın ve asetilasyonun etkileri ise hücrenin bulunduğu

duruma göre farklılık göstermektedir (1). KLF5, K¹⁵¹ ve K²⁰²(lizin) rezidülerinden PIAS1 E3 ligaz aracılığı ile SUMOlanmaktadır. Yapılan çalışmalar, SUMO ilavesinin KLF5'in hücrel yerleşimi açısından önemli olduğunu göstermiştir. 151. Lizin rezidüsünün yakın komşuluğunda bulunan çekirdek eksport sinyali SUMO ilavesi sonrası maskelenir ve bu sayede KLF5'in, çekirdek içerisinde lokalizasyonu sağlanır (24). Asetilasyon ve SUMO ilavesi KLF5'in aktivitesi için birer kontrol mekanizması olarak davranmaktadır. Bu kontrol mekanizmaları sayesinde KLF5, çevresel faktörlerin de etkisiyle hedef genlerinin ifadesini baskılayabilmekte veya artırabilmektedir.



Şekil 2.1 İnsan *KLF5* geni ve protein yapısı. **A.** *KLF5* geni dört ekzondan oluşmaktadır (sırasıyla 1585, 2874, 60 ve 1831 bç) ve yaklaşık 18 Kb uzunluğundadır. **B.** *KLF5* proteini 457 amino asit uzunluğundadır. 1 transaktivasyon bölgesi (TAD) ve 3çinko parmak bölgesi (3XZF) kutularla gösterilmiştir. *KLF5* proteini nükleer eksport sinyali (NES) yakınında S153'te fosforilasyon (P), K162 ve K209'da SUMO ilasyon (Su), transaktivasyon bölgesinde ubikitinasyon (Ub) ve K369'da asetilasyon (Ac) gibi çeşitli translasyon sonrası modifikasyonlara uğrayabilmektedir.

2.4 KLF5 proteinine yönelik hedefli mutasyon oluşturma'nın gerekliliği

Kas hasarı tamiri ve farklılaşma sürecinin moleküler temellerini daha iyi anlamaya yönelik olarak şimdiye dek yürütölen çalışmalar, Klf5 proteininin, kas kök hücrelerinin idamesi ve farklılaşmasında rol aldığını göstermiştir. Erişkin kas dokusunun tamir ve idamesinden sorumlu olan somatik kök hücreler olarak nitelendirilen "satellit" hücreler kas dokusu içinde kas liflerinin yakın komşuluğunda yerleşim göstermektedir. Kas hasarı halinde bu satellit hücreler aktive olarak "miyoblast" hücrelerine dönüşmektedir. Miyoblast hücreleri çoğalarak, hasar bölgesine göç etmektedir. Kas hasarının tamirini gerçekteştirmek üzere miyoblastlar birbirleri ve kas lifleri ile "füzyon" yaparak birleşmektedir(25, 26). Bölümümüzde yapılan çalışmalar, Klf5 transkripsiyon faktörünün kas öncölü miyoblast hücrelerinin çoğalma sürecini durdurduğu ve farklılaşma sürecini idame ettirdiğini ortaya koymuştur(2, 3).

KLF5'in iskelet kası farklılaşma ve dejenerasyon sürecindeki rolünün aydınlatılmasında sonraki adım, bu transkripsiyon faktörünün hedef genlerinin, etkileştiği proteinlerin ve hücre içi trafiğinin anlaşılabilmesi için işlevsel protein çalışmalarının yapılmasıdır. Bu çalışmaların gerçekteştirilebilmesi için KLF5'i etkin şekilde tanıyan ve yüksek özđüllük gösteren bir antikora ihtiyaç vardır. KLF5 proteinini tanımaya yönelik çeşitli ticari kaynaklardan elde edilen poliklonal antikolar işlevsel protein çalışmalarında kullanılmak üzere denenmiştir. Ancak, bu proteini etkin şekilde tanıyan bir antikorun bulunamaması bu süreçte karşılaşılan en önemli sorundur. Ticari antikorların özđüllüđünün sınırlı, afinitesinin düşük olduğu ve KLF5'in "post-translasyonel" modifikasyonlarını tanımadığı anlaşılmıştır. Bu durumun başlıca nedeni, Klf5'i tanıyan ticari poliklonal antikorların hemen hepsinin "N" terminal kısmını hedefliyor olmasıdır. Bu kısım türler arasında en az korunmuş kısım olmakla birlikte, Klf5'in en fazla post-translasyonel modifikasyonlara uğrayan kısmıdır. Bu nedenle antikorların pek çoğunun tanıdığı epitoplar, post-translasyonel modifikasyonlar ile kapatılmakta veyadeğişikliğe uğramaktadır. Satın alınan vedenenen ticari antikorların büyük bir kısmı özellikle SUMO'lanmış formları

tanıyamamaktadır. Bu durum, KLF5'in, etkileşime girdiği diğer proteinlerin (aktivatör ve represör nitelikte protein-protein ilişkisi) ve genomdaki hedeflerinin belirlenmesi gibi çalışmaların güvenilirliğini ve devamını sınırlamaktadır.

Bu soruna çözüm oluşturabilecek alternatif yaklaşımlardan biri de genom düzenleme araçları yardımı ile hücre genomunda yer alan ve KLF5 proteinini kodlayan genin uygun bir kısmına yeni ve etkin bir epitop dizisi yerleştirilmesidir. Bir antikoru mevcut olmadığı durumlarda, genom düzenleme araçları kullanılarak ilgili gen dizisinin uygun bir bölgesine yerleştirilen bir etiket (epitop) yardımıyla bu sorun aşılabılır(27). Protein etiket dizileri (*tag*), monoklonal antikolar aracılığı ile tanınmayı sağlayabilen ve hedef hücre içinde ifadesi bulunmayan epitopları kodlayan 10-14 aminoasit uzunluğunda peptid dizileridir. Bu diziler içinde sıklıkla HA (İnsan influenza virüsü hemagglutinin epitop dizisi), V5 (paramyxovirus V5 kapsid proteini epitop dizisi) ve c-myc (myc onkogeninin mutant formuna ait epitop dizisi) epitopları tercih edilmektedir. Bu tez kapsamında, genom düzenleme araçları aracılığı ile *Klf5* gen dizisi içerisine V5 epitop dizisini kodlayan 42 nükleotidlik dizi ilavesi amaçlanmıştır. KLF5'in post-tranlasyonel modifikasyonları göz önüne alındığında, bu proteinin N-terminal kısmı post translasyonel modifikasyonların en az olduğu kısımdır. Aynı zamanda bu kısım türler arasında en az korunmuş olan kısımdır ve şimdiye dek yapılan çalışmalar, N-terminal kısmına yapılan benzeri modifikasyonların mutant proteinin işlevini bozmadığını göstermiştir(1, 28). Bu nedenle, *Klf5* proteininin N-terminal kısmı, genom düzenleme araçları ile hedeflenmiş mutasyon oluşturulabilecek en uygun kısımdır. Böylece anti-V5 antikoru kullanılarak, endojen KLF5'in hücre içi yerleşimi ve trafiği takip edilebilmektedir.

2.5 Genom Düzenleme Araçları Kullanılarak *Klf5* için bir “işlevsel genombilim aracı” geliştirmenin sağlayacağı yararlar

Kas hastalıkları doğumsal (konjenital) ve edinsel olarak iki ana gruba ayrılır. Doğumsal kas hastalıkları genetik kökenlidir ve ensık rastlanılan Duchenne Kas Distrofisi (DMD) 3300 canlı erkek doğumda bir ortaya çıkmaktadır. DMD dışında konjenital kasdistrofisi, limb girdle kas distrofisi, distroglikanopatiler gibi pek çok genetik kökenli kas hastalıkları toplumda görülmektedir. Gerek DMD gereksediğer genetik kökenli kas hastalıklarının bilinen bir radikal tedavisi yoktur. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda, genetik kökenli kas hastalıklarının tedavisi için hayvan modellerinde etkili olan yaklaşımlar hastalarda başarısız olmuştur. Kas hastalıklarının tedavisi için geliştirilebilecek farklı tedavi yaklaşımları için kas hasarının ve tamir mekanizmalarının daha iyi anlaşılması gerekmektedir. Bu amaçla bölümümüzde yürütölen çalışmalarda, gerek DMD, gerek bu hastalığın hayvan modelleri ve diğör kas dejenerasyonu modellerinde, *Klf5* transkripsiyonfaktörünün ifadesinin değışim sergilediğı görölmüş ve *Klf5*'in kas dokusu gelişimi ve tamirindeki rolü kısmen aydınlatılmıştır. KLF5 proteininin kas dokusundaki rolü ve görevlerinin tanımlanması sürecinde bir sonraki basamak, bu proteinin etkileşime girdiğı diğörproteinlerin (aktivatör ve represör nitelikte protein-protein ilişkisi), hücre içi trafiğinde etkileştiğı proteinlerin ve genomdaki hedeflerine yönelik işlevsel çalışmalarının yürütölmesidir. Genom düzenleme yaklaşımı kullanımı ile *Klf5* genini hedefleyen yeni bir “işlevsel genombilim aracı” geliştirilmesi, KLF5'in kas kök hücreleri ve kas dokusundaki protein etkileşimlerinin keşfi ve hedef genlerin belirlenmesi ile ilgili işlevsel çalışmalara olanak sağlayacaktır.

2.6 Genom Düzenleme Araçları

Genom düzenleme araçları, genomda hedeflenen DNA dizisi üzerinde istenilen değışikliklerin, “hedeflenmiş mutasyonlar” aracılığı ile kalıcı olarak oluşturulmasına olanak sağlayan araçlardır. Bu tekniğintemeline, genomda hedef DNA nükleotid dizisinin değıştirilmesi (editing) yer almaktadır. Bu yaklaşım, iki ardışık basamak ile gerçekleşmektedir. Bunlardan ilki, restriksiyon enzimleri gibi

işlev gören nükleazların hedeflenen bölgeye özgüllük gösterecek şekilde yönlendirilerek hedeflenen bölgede çift zincir kırığı oluşturmaktır. Bu amaçla geliştirilen yaklaşımlar, tarihsel sırasıyla, 1995 yılında kullanılmaya başlanan çinko parmak nükleazlar (hedef bölgeye özgül tasarlanmış çinko-parmak proteinler aracılığı ile non-spesifik nükleazların hedeflenmesi), 2011 yılında kullanıma sunulan TALE nükleazlar (hedef bölgeyi tanıyan protein yapıları aracılığı ile non-spesifik nükleazların hedeflenmesi) ve son olarak 2013 yılında geliştirilen CRISPR/Cas9 sistemidir (hedef bölgeye komplementer olarak tasarlanmış gRNA aracılığı ile özgül olmayan nükleazların hedeflendirilmesi) (29). Çift zincir kırığının oluşumu sonrasında, memeli hücrelerinde aktive olan DNA tamir mekanizmaları ile bu kırık onarılmaktadır. İkinci aşamada ise bu onarım sürecinde hücrenin hangi yolu izleyeceği düzenlenerek, genom üzerinde istenen değişikliklerin gerçekleştirilmesi sağlanabilir. Bu süreçte düzenlenmesi hedeflenen bölgeye homolog gösteren bir DNA parçası da hücreye dışarıdan gönderilebilir. Bu sayede, hücrenin homolog rekombinasyon mekanizmasına yönlendirilmesi ile dışarıdan gönderilen DNA dizisi üzerindeki değişikliğin kalıcı olarak genoma ilavesi sağlanır. Hücre içinde homolog rekombinasyon için uygun bir "donor" DNA parçasının bulunmadığı durumlarda ise tamir süreci non-homolog uç birleştirme ile gerçekleşir. Bu durum, hedeflenen bölgeye bir veya birkaç nükleotid ilavesi veya kaybı ile sonuçlanır. Non-homolog uç birleştirme aracılığı ile gerçekleşen tamir sürecinde sıklıkla okuma çerçevesi mutasyonları meydana gelmektedir. Sonuç olarak, hedeflenmiş genin silinmesi sağlanabilir (15, 16).

Son on yıl içinde gelişim gösteren genom düzenleme araçları (*genome editing tools*), genomda hedeflenmiş kalıcı değişikliklerin yapılabilmesine olanak sağlamaktadır. Bu araçlara duyulan ihtiyacın temelinde, hatalı olduğu düşünülen gen dizilerinin düzeltilmesi yer almaktadır (gen tedavisi). Ancak, zaman içinde gelişim gösteren bu araçlar günümüz bilim dünyasında, hedeflenen bölgede amaçlanan insersiyon veya delesyon mutasyonlarını oluşturarak gen işlevlerinin çalışması, hastalık modellerinin oluşturulması, protein kodlamayan DNA bölgelerinin işlevlerinin araştırılması gibi işlevsel genom-bilim çalışmalarında ve yeni ilaçların

keşfedilmesi ve geliştirilmesi alanlarında yaygın bir araç olarak kullanılmaktadır(30).Ayrıca Klf5 proteinin işlevi ile ilgili araştırmalar sürecinde yaşanan sorunlara benzer şekilde, yeni bir genin protein ürününü çalışmak, protein ürününü tanıyan antikorun elde edilmesindeki kısıtlamalar nedeniyle çoğu zaman mümkün olmamaktadır. Western blot, immün çöktürme ve kromatin immün çöktürme (ChIP) gibi işlevsel araştırmalara yönelik deneylerin yapılabilmesi için gerekli olan antikorun mevcut olmadığı durumlarda, genom düzenleme araçları kullanılarak ilgili gendizisinin uygun bir bölgesine yerleştirilen bir etiket yardımıyla bu sorun aşılabilir (27). Bu basit ama etkili araçlar özellikle tek gen hastalıklarının tedavisinde umut vadetmekle birlikte, kompleks hastalıklar (kanser vb.), infeksiyöz hastalıklar ve kişiselleştirilmiş tıp alanındaki çalışmaların hız kazanmasını sağlamıştır.

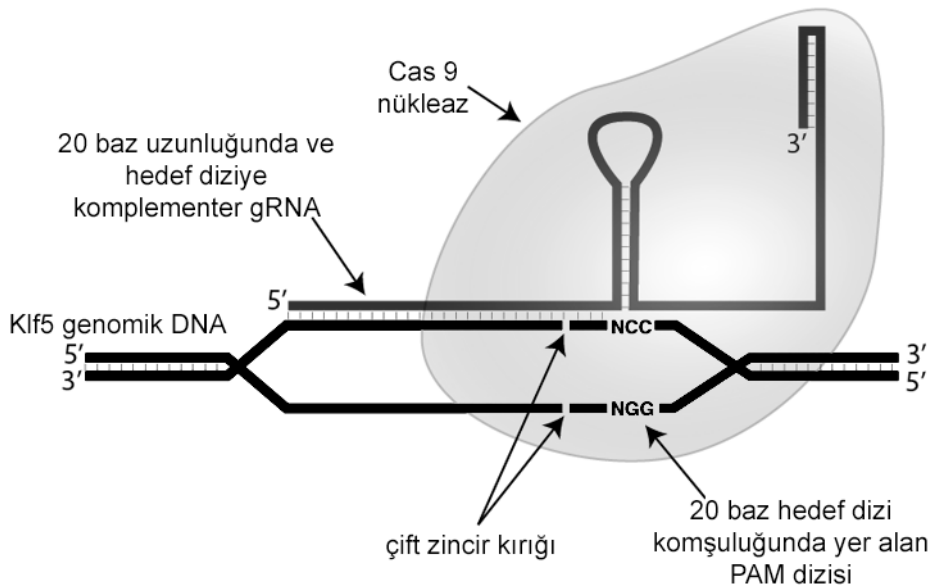
2.7 CRISPR/Cas9 Sistemi

2.7.1 CRISPR/Cas9 Sisteminin Çalışma Prensipleri

CRISPR/Cas9, "*Clustered, Regularly-Interspaced, Short Palindromic Repeats (CRISPR)–Associated protein system (Cas)*", genom düzenleme araçlarının çalışma prensibi, diğer genom düzenleme araçlarında da olduğu gibi, özgül olmayan nükleazların programlanarak hedef bölgeye taşınması ve bu bölgede hedeflenmiş çift sarmal kırık oluşturmaya dayanmaktadır. CRISPR/Cas9 sistemi işlevselliğini iki farklı yapı ile sağlamaktadır. Bunlardan biri RNA (*guide RNA*) diğeri ise proteinyapısındadır (*Cas9 nükleaz*). Bu iki yapı bir araya gelerek işlevsel CRISPR/Cas9 sistemini oluşturmaktadır (gRNA'lar aracılığı ile Cas9 nükleazları istenilen özgül bölgeye yönlendirilebilmektedir). Bu iki yapı, hedef hücrede aynı vektör aracılığı ile aynı anda sentezlenebilmektedir. Vektörden sentezlenen gRNA (*guideRNA*) iki farklı işlev görmektedir; komplementer yapısı ile hedef diziye özgüllüğü belirlemekle birlikte, sekonder yapısı ile Cas9 nükleazını hedef bölgeye taşıyarak çift iplik kırığı oluşturmaya sağlamaktadır (şekil 2.2). Hedef diziye komplementer olarak tasarlanan gRNA dizisi 20 nükleotid uzunluğunda bir diziden oluşmaktadır. CRISPR/Cas9 sisteminin etkin şekilde çalışabilmesi için, bu komplementer dizinin "G" nükleotidi ile başlaması ve hedef dizi özgüllüğünü sağlayan 18 nükleotid sonrasında

“GG” nükleotidleri ile sonlanması gerekmektedir (G-NNNNNNNNNNNNNNNNNN-
GG). Bu komplementer yapının 3’ ucunda yer alan “NGG” dizisine PAM (*protospacer-
adjacent motif*) dizisi adı verilir ve gRNA’nın hedef bölgeyi tanıması için gereklidir.
gRNA PAM dizisi aracılığı ile hedef bölgeyi tanıyarak RNA-DNA hibrid yapısını
oluşturur ve yapıya eşlik eden Cas9 nükleaz, hedeflenen bölgenin 3’ kısmında yer
alan -NGG dizisinin 3-4 nükleotid proksimalinden (5’ kısmından) çift sarmal kırık
oluşturur (16).

CRISPR/Cas9 sistemi, memeli genomunda eş zamanlı olarak birden fazla
bölgenin hedeflenerek istenilen modifikasyonların gerçekleştirilmesine olanak
sağlamaktadır. Diğer yandan, literatürde yer alan çalışmalar, CRISPR/Cas9 sisteminin
etkinliğinin hedeflenen bölge ve hücre tipine bağlı olarak değiştiğini göstermiştir
(15).



Şekil 2.2 CRISPR/Cas9 sisteminin yapısı ve ifade edildiği hücrede hedef genom dizisini tanıma ve kesme işlemi

Hedefli çift zincir kırığının oluşumunu takiben, memeli hücrelerinde aktive olan
DNA tamir mekanizmaları ile bu kırık onarılmaktadır. Hücrenin tamir sürecinde
izleyebileceği birden fazla olası yol vardır. Hücrenin bu süreçte hangi yolu izleyeceği
düzenlenerek, genom üzerinde istenilen değişiklikler gerçekleştirilebilir.

a) Homolog Rekombinasyon (HR)

DNA dizisi üzerinde hedeflenmiş mutasyon yaratmak, istenilen DNA dizisinin ilavesini sağlamak veya hatalı olan gen dizilerini düzeltilmek (gen tedavisi) amacıyla, genom düzenleme araçları ile hedeflenen bölgede çift sarmal kırık oluşturulmasını takiben (*in vitro* ve *in vivo*) hücreye dışarıdan gönderilen donör DNA parçası aracılığı ile tamir sürecinde, homolog rekombinasyon (HR) gerçekleştirilmektedir. Homolog rekombinasyonun etkin bir şekilde işlev görerek hedeflenen bölgede kalıcı bir DNA dizi değişikliği oluşturması için, dışarıdan verilen DNA parçasının hedef bölge ile homoloji gösteren kısımlarının (*homology arms*) bulunması gerekmektedir. Homoloji kolları aracılığı ile dışarıdan gönderilen donör DNA parçası ile hedef dizi arasında parça değişimi meydana gelmektedir (29). Literatürde yer alan çalışmalar, hedef bölgeyle homoloji gösteren kolların uzunluğunun homolog rekombinasyonun etkinliği ile doğrudan ilişkili olduğunu göstermiştir(31).HR tamir sürecinde öncelikle ATM kinaz çift sarmal kırığın meydana geldiği bölgeye bağlanarak aktive olur ve Mre11, Exo1 ve CtIP gibi ekzonükleaz ve endonükleazları aktive ederek DNA sarmallarını birbirinden ayırır. DNA hasarında aktive olan ssDNA *binding* protein Rad51, diğer işlevsel aksesuar proteinler ve nükleoprotein filamentlere bağlanır. Bu sırada ortamda hedef bölgeye homoloji gösteren donör DNA parçasının varlığında istenilen bölge ve donör DNA parçası arasında değişim meydana gelir ve çift sarmal kırık onarılırken hedef bölgeye istenilen insersiyon gerçekleştirilir (32, 33). Fizyolojik şartlarda, hedeflenen bölgede herhangi bir kırığın olmadığı durumlarda, memeli genomunun kararlı yapısında dolayı, donör DNA parçası ile hedef dizi arasında benzerlik ne kadar fazla olursa olsun, homolog rekombinasyon etkinliği yok denecek kadar azdır, bu olasılık, her 10^4 - 10^7 hücrede bir ihtimalle gerçekleşmektedir (14).

Normal koşullarda, homolog rekombinasyonun memeli genomundaki düşük etkinliğine rağmen, DNA hasarı tamiri sürecinde memeli hücrelerinde homolog rekombinasyon mekanizmaları harekete geçmektedir (13). Genom düzenleme araçları aracılığı ile oluşturulan çift sarmal kırık, homolog rekombinasyonun

meydana gelme olasılığını arttırarak hedeflenen bölgede istenilen değışikliğin kalıcı olarak gerçekleşmesine olanak sağlar (14).

b) Non-Homolog Uç Birleştirme (NHEJ)

Genom düzenleme araçları ile hedeflenen bölgede çift sarmal kırık oluşturulmasını takiben, hücreye dışarıdan verilen donör DNA parçasının bulunmadığı durumlarda, hataya çok daha açık bir çift zincir DNA hasarı tamiri seçeneği olan non-homolog uç birleştirme (NHEJ) mekanizması etkinleşir. NHEJ, homolog rekombinasyonun aksine, hasar tamiri sürecinde homoloji gösteren bir diziye ihtiyaç duymamaktadır. NHEJ, nükleaz aktivitesi ile kırılan fosfodiester bağlarını tekrar bir araya getirerek kırık DNA parçalarını birleştirir. Bu süreçte öncelikle kırık uçlar Ku70/80 heterodimeri aracılığı ile bir araya getirilir ve heterodimer yapı DNA bağımlı protein kinazlara (DNA-PKcs) bağlanır. Sonraki adımda nükleazlar veya DNA polimeraz (Pol μ , Pol λ vb.) aracılığı ile her iki sarmalda da birbiriyle uyumlu uçlar oluşturulur. Son olarak *DNA ligase IV*, *X-ray cross-complementation group 4 (XRCC4)* ve *Xrcc4 like factor (XLF)*' den oluşan ligasyon kompleksi ile kırık uçlar birleştirilir (34). Kırık uçların birleşmesi sırasında, hedeflenen bölgede, bir veya birkaç nükleotid ilavesi veya kaybı meydana gelmektedir. Bu süreçte okuma çerçevesi mutasyonlarının oluşması ile hedeflenen bölgede gen silinmesi veya işlev kaybı (*loss-of-function*) mutasyonları yaratılabilir (14).

2.7.2 CRISPR/Cas9 Sisteminin Ökaryotlara Adaptasyonu

Genom düzenleme araçları arasında en son geliştirilen (2013) yaklaşım olan "*Clustered, Regularly-Interspaced, Short Palindromic Repeats (CRISPR)–Associated protein system(Cas)*" bakterilerde ve arkealarda bulunan nükleik asit temelli bir doğal savunma mekanizmasıdır. CRISPR aracılıklı savunma mekanizmasının çalışma prensibi, hücreyi enfekte eden yabancı DNA dizilerinin (virüsler, plazmidler vb.), prokaryot genomundan sentezlenen küçük RNA molekülleri tarafından özgül olarak tanınmasına ve etkisiz hale getirilmesine dayanmaktadır (35). Prokaryot genomunda bulunan CRISPR lokusu (*S. Pyogenes SF370Type II CRISPR*) dört gen içermektedir.

Bunlar; Cas9 nükleaz, iki farklı protein kodlamayan (*non-coding*) CRISPRRNA molekülü (crRNA ve trans-activating crRNA (tracrRNA)) ve öncü crRNA (pre-crRNA)'dır. Cas9 nükleazın yabancı DNA dizilerini tanıyıp etkisiz hale getirmesi için gerekli olan rehber diziler (*spacers*), genomda bulunan özdeş tekrar dizilerinin (*identical direct repeats*) arasında yer almaktadır(36). Bu dizilerden kodlanan RNA moleküllerinin görevi, Cas9 nükleazı hedef bölgeye taşıyarak yabancı DNA dizisi üzerinde çift sarmal kırık yaratmaktır. Bu sayede prokaryotik host hücreleri yabancı DNA'lar tarafından ilk kez enfekte edildiklerinde yabancı DNA dizilerini bir çeşit genetik hafızaya yerleştirmektedir ve aynı DNA dizisi ile tekrar enfeksiyon halinde bu yabancı diziyi tanıyarak etkisiz hale getirmektedir (37).

Yukarıda da bahsedildiği gibi *S.pyogenes Type II* CRISPR sistem iki ana elemandan oluşmaktadır: RNA bileşenleri (crRNA ve tracrRNA) ve Cas9 nükleaz. crRNA ve tracrRNA sentezlendikten sonra bir araya gelerek Cas9 proteinini hedef bölgeye özgül hale gelerek hedefli çift sarmal kırık oluşmasını sağlamaktadır. 2013 yılında bu sistem modifiye edilerek ilk defa ökaryotik hücrelerin genomunda hedefli değişikliklerin gerçekleştirilmesi için kullanılmıştır. Bu yeni yaklaşım, ökaryot hücrelerin genomunda istenilen düzenlemelerin hızlı ve etkili bir şekilde yapılabilmesine olanak sağlamaktadır. 2013 yılının ilk yarısında, Cong ve ark. bakteriyel Tip II CRISPR/Cas9 sisteminin protein ve RNA bileşenlerini modifiye ederek insan genomuna uygulamışlardır(15). Bunun için öncelikle C terminalinde SV40 nükleer lokalizasyon sinyali içeren Cas9 nükleazın insan kodon düzenine uyarlanmış (*human codon-optimized*) şekli memeli ifade vektörüne klonlanmıştır. Daha sonra, insan U6 polimeraz III promoter aracılığı ile crRNA ve tracrRNA elemanlarını birlikte sentezleyen RNA molekülü (*fusion transcript*) geliştirilmiş ve *guide* RNA olarak adlandırılmıştır. Tasarlanan CRISPR vektörü (pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9) aracılığı ile gRNA ve Cas9 nükleaz aynı anda sentezlenebilmektedir. Bu sayede, gRNA komplementer yapısı ile hedef bölgeyi tanımanın (hedef bölgedeki PAM dizilerini tanıyarak) yanı sıra sekonder yapısı aracılığı ile Cas9'u hedef bölgeye taşımaktadır ve RNA aracılıklı genom düzenleme

işlemi ile hedeflenen bölgede istenilen düzenlemenin yapılmasına olanak sağlamaktadır.

2.7.3 CRISPR/Cas9 Aracılıklı Genom Düzenleme İşlemi için Seçilen PlazmidVektör ve Memeli Hücresi Modeli

a)pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 Ekspresyon Plazmidi

Cong ve ark. tarafından yapılan çalışmalar, *tracrRNA*, öncül *crRNA*, *host factor ribonuclease (RNase) III* ve *Cas9* nükleaz ekspresyonu ile birlikte ökaryot hücrelerde (*in-vitro*) DNA düzenlemesinin yapılabileceğini göstermiştir (15). Kodon-optimize *S.pyogenesCas9* (*SpCas9*) ve *RNase III* (*SpRNaseIII*) gen dizilerine nükleer lokalizasyon sinyali eklenerek, sentezlenen moleküllerin çekirdekte yerleşim göstermesi sağlanmıştır. *S. Pyogenes* tip II CRISPR/Cas9 sistemi elemanlarından *tracrRNA* ve öncül *crRNA* moleküllerinin sentezi RNA polimeraz III U6 promoter aracılığı ile sağlanmıştır. Genom düzenleme aracı olarak kullanılan CRISPR sistem elemanlarını oluşturan *SpCas9*, *SpRNase III*, *tracrRNA* ve öncül *crRNA* (*pre-crRNA*)'ın varlığında hedeflenen bölgede istenilen kırığın oluştuğu gösterilmiştir. Aynı grubun yaptığı çalışmaların devamında *SpRNase III* sentezi olmadan da non-coding RNA'ların işlevsel olduğu ve sistemin aynı etkinlik ile çalıştığı gösterilmiştir. Endojen memeli *RNase*'ler sistemin çalışması için yeterli olmaktadır.

Bu çalışmalar sonucunda elde edilen verilerden hareketle tasarlanan px330 ifade vektörü, CRISPR/Cas9 sisteminin etkin bir şekilde çalışabilmesi için gerekli ve yeterli olan guide RNA (gRNA) ve *Cas9* elemanlarını aynı anda sentezleyerek memeli hücrelerinde hedeflenen bölgelere istenilen genom değişikliklerinin yapılabilmesine olanak sağlamaktadır.

b)C2C12 Hücre Hattı

C2C12 hücre hattı, embryonik C3H fare suşundan izole edilmiş ölümsüz ve miyoblast niteliğinde bir hücre hattıdır (38). Hücre kültüründe bu hücreleri idame ettirmek için düşük yoğunlukta (en fazla %50 yoğunluk) çoğaltarak,mitojenlerden

zengin bir besiyeri kullanılması gereklidir. Hücreler yüksek yoğunluğa (%90-100) ulaştıktan sonra çoğalmayı indükleyen faktörlerin bulunduğu serum konsantrasyonu azaltıldığında C2C12 hücreleri bölünmeyi durdurarak farklılaşma sürecini başlatmaktadır. Farklılaşma sırasında birbirleri ile füzyon yapan hücreler kontraktıl proteinlerin sentezlenmesiyle birlikte çok çekirdekli kalın miyotüpleri oluşturur. Miyoblastlardan meydana gelen saf bir hücre hattı olması, çabuk farklılaşması ve karakteristik kas proteinlerini ifade eden kasılabilir kas liflerine dönüşmeleri nedeniyle, C2C12 hücre hattı, iskelet kası farklılaşmasının *in vitro* modeli olarak yaygın olarak kullanılmaktadır(39).

2.8 AMAÇ

Kas hasarı tamiri ve farklılaşma sürecinin moleküler temellerini daha iyi anlamaya yönelik olarak bölümümüzde şimdiye dek yürütülen çalışmalarda, KLF5 proteininin, kas kök hücrelerinin idamesi ve farklılaşmasında rol oynadığı anlaşılmıştır. *Klf5* transkripsiyon faktörünün kas öncülü miyoblast hücrelerinin çoğalma sürecini durdurduğu ve farklılaşma sürecinde rol aldığı ortaya konmuştur. Bu transkripsiyon faktörünün hedef genlerinin, etkileştiği proteinlerin, hücre içi trafiğinin anlaşılabilmesi için işlevsel protein çalışmalarının yapılması gereklidir. Bu çalışmaların gerçekleştirilebilmesi için KLF5'i etkin bir şekilde tanıyacak yüksek özgüllük gösteren antikorlara ihtiyaç vardır. KLF5 proteinini tanımaya yönelik ticari poliklonal antikorlara bağımlılığı ortadan kaldıracak, özgüllük, ve afinite sorunlarını aşarak KLF5'in "post-translasyonel" modifikasyonları tanıyarak işlevsel protein çalışmalarını (western blot, kromatin çöktürme, protein çöktürme vb.) mümkün kılan bir yöntem ihtiyacı vardır.

Bu ihtiyaca çözüm oluşturabilecek yaklaşımlardan biri de genom düzenleme araçları yardımı ile C2C12 hücre hattı genomunda yer alan ve KLF5 proteinini kodlayan genin uygun bir kısmına proteinin tanınabilmesini kolaylaştıran yeni bir epitop dizisi yerleştirilmesidir. Yerleştirilen epitopa hedefli monoklonal antikorlar, amaçlanan protein çalışmalarına olanak sağlayacaktır.

Bu tezin amacı, “Fare kas miyoblast hücre hattı genomunda, Klf5 proteininin N-terminaline, V5 epitop yapısını kodlayan 14 aminoaside karşılık gelen dizinin yerleştirilmesidir.” Bu değişikliğin gerçekleştirilmesi ile hücre hattında, V5 epitopunu tanıyan antikorlar aracılığı ile endojen KLF5 proteininin tanınması mümkün olacaktır. Son iki yıl içinde geliştirilerek kullanımı yaygınlaşan genom düzenleme araçları (*genome editing tools*) bu konuda yeni bir imkân sunmaktadır. Bu tez önerisi, etkinliği ve uygulanabilirliği yüksek bir yöntem olması nedeni ile CRISPR/Cas9 sisteminin kullanımı yönünde çerçeveselendirilmiştir.

3 GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Gereçler

3.1.1 Hücre Kültürü

C2C12 Fare Miyoblast Hücre Hattı

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Biochrome F-0425)

Fötal Dana Serumu (FCS) (Biochrome S0123)

L-Glutamin (Biochrome K0282)

1X PBS (*Phosphate buffered saline*) (pH: 7,4) (Sigma P2194)

At Serumu (Biochrome S9133)

Streptomisin/Penisilin (Biochrome A2210)

Tripsin EDTA (Sigma)

3.1.2.Klonlama

pGEM-T Easy vektörü (Promega, A1360) (bkz. Şekil 3.2.)

pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 vektörü (Addgene plasmid # 42230) (bkz. Şekil 3.2.)

BbsI (Thermo Scientific, #ER1011)

EcoRI (Promega, R6011)

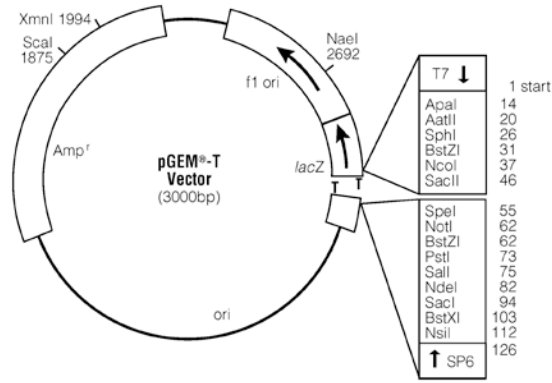
AvaI (NEB, # R0152S)

T4 DNA Ligaz (Promega, M180A)

Ligasyon tamponu: *10x Ligation Buffer* (Promega, C126A)

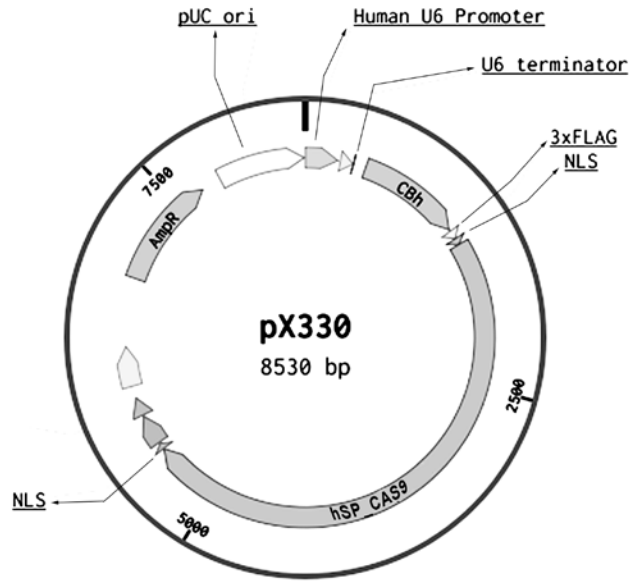
Ligasyon tamponu: *2x Rapid Ligation Buffer* (Promega)

NlaIII (NEB, # R0125S)



Şekil 3.1 pGEM-T Easy vektörünün haritası.

Klonlama bölgesinde yer alan Restriksiyon enzimi tanıma bölgeleri ve DNA dizi analizi uygulamalarında kullanılacak sekans primerleri sağ tarafta gösterilmiştir. pGEM-T Easy vektörü ile transformasyon sonrası bakteri ampisilin direnci kazanmakta ve hedef DNA dizisinin klonlama bölgesine yerleşmesi ile *lacZ* ifadesi bozulmaktadır. Bu sayede mavi-beyaz koloni seçimi yapılabilmektedir.



Şekil 3.2 Px330 CRISPR/Cas9 vektörünün haritası. U6 promoter aracılığı ile hedef bölgeye komplementer olan gRNA ve hedef bölgede çift sarmal kırık oluşturacak Cas9 nükleazın eş zamanlı ifade olmasına olanak sağlamak üzere tasarlanmıştır. Ayrıca SV40 çekirdek lokalizasyon sinyali aracılığı ile sentezlenen Cas9 nükleazın çekirdeğe taşınmasını da sağlamaktadır.

3.1.3 Plazmid İzolasyonu

Plasmid Midi Kit (Qiagen, 12145)

Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System kiti (Promega, A1460)

İzopropanol

Etanol, %70

3.1.4 Bakteri Kültürü

Kompetan JM109 bakteri suşu (Promega, P9751)

Agar, bakteriyoloji kullanımı saflığında (AppliChem)

Sıvı LB besiyeri (pH=7,0-7,5):

Maya özütü	5gr
NaCl	5gr
Tripton	10gr
Distile su ile toplam hacim 1L'ye tamamlanır ve otoklavlanır	

Katı LB besiyeri: %1,5 agar içeren sıvı LB besiyeri

Ampisilin (Ampisina IV flakon)

X-Gal (5-bromo-4-kloro-3-indolil- β -D-galaktozid) stok çözeltisi (dimetilsülfoksit içinde %5'lik çözelti)

IPTG (İzopropil- β -D-1-tiyogalaktopiranozid) stok çözeltisi (su içerisinde 0,1M)

3.1.5 Transfeksiyon

ECM 830 Elektroporasyon Sistemi (BTX Harvard Apparatus)

BTXpress electroporation buffer (BTX Harvard Apparatus)

4mm Gap Cuvettes (BTX Harvard Apparatus)

3.1.6 DNA izolasyonu

Proteinaz K (Sigma, P2308)

Amonyum asetat (Sigma, A1542)

EDTA (Sigma, E9884)

NaCl (Sigma, S9888)

Tris-Base (Sigma, T1503)

SDS (Sigma, L3771)

Etanol (Riedel de Haen)

3.1.7 Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Pfu DNA Polymerase (Fermentas, EP0502)

GoTaq DNA Polymerase (Promega, # 9PIM300)

dNTP Mix, 10mM (Fermentas, R0193)

PZR Aracılıklı Mutageniz Primerleri

V5 epitop dizisi insersiyonu doğrulama primerleri

GeneAmp PCR Systems 9700 (appliedbiosystems)

3.1.8 DNA Dizi Analizi

BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, 4336917)

T7 promoter primeri (Promega, Q5021)

Puc/M13 primeri (Promega, Q5391)

SP6 promoter primeri (Promega, Q5011)

Etanol

Formamid

Sodyum asetat (3M)

3.1.9 DNA Agaroz Jel Elektroforezi:

Agaroz, moleküler biyoloji kullanımı saflığında (Prona)

Tris-asetat-EDTA (TAE) tamponu (pH: 8.0):

Glasiyal asetik asit (Merck)	1,14ml
Na ₂ EDTA (Merck)	0,5M
Tris baz (Merck)	2M

Yükleme tamponu:

Gliserol (Merck)	5,5ml
1X TAE tampon	4,5ml
<i>Orange G</i> boya (Merck)	0,01gr

Etidyum bromür (Sigma): 10mg/ml distile su

Moleküler ağırlık belirleyicisi: *100bpDNA Ladder* (Promega)

3.1.10 Modifiye Agaroz Jelden DNA İzolasyonu

Agaroz, moleküler biyoloji kullanımı saflığında (Prona)

Etidyum bromür (Sigma), 1mg/ml distile su

Moleküler ağırlık belirleyicisi: *1kb DNA Ladder* (Promega)

Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System kiti (Promega, A9282)

Modifiye TAE tamponu konsantresi, 50x (Millipore, LSKG ELO 50)

3.1.11 Protein İzolasyonu ve Kantitasyonu

Proteaz inhibitörü tablet (Roche, *Complete Mini*, 11 836 170 001)

Tris HCl, 0,5M, pH=6,8 2,5ml

Protein izolasyon tamponu (toplam 20ml):

Tris HCl, 0,5M, pH=6,8	2,5ml
EDTA, 0,5M	200µl

SDS, %20	10ml
Proteaz inhibitörü tablet	2adet
Distile su	7,5ml

Sonikatör (Sonics Vibra Cell, işlemci modeli VCX 130, prob modeli CV 18)

BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, #23225):

3.1.12 Western Blot

Elektroforez tamponu (distile su içinde):

Sodyum dodesil sülfat (SDS)	%0.1
Glisin	0,192M
Trizma baz	0,025M

%12'lik ayırıcı jel:

%30 Akrilamid / bisakrilamid	4,0ml
1,5M Tris (pH=8,8)	2.5ml
%10 SDS	0,1ml
%10 APS (amonyum persülfat)	0,1ml
TEMED (N,N,N',N'-tetrametil-etan-1,2-diamin)	0,004ml
Distile su 10ml'ye tamamlanır	

İndirgeyici ajan: NuPAGE 10x Sample Reducing Agent (Invitrogen, NP0004)

Örnek tamponu: LDS 4x Sample Buffer (Invitrogen, NP0008)

%5'lik toplayıcı jel:

%30 Akrilamid / bisakrilamid	0,33ml
1,0M Tris (pH=6,8)	0,25ml
%10 SDS	0,02ml
%10 APS (amonyum persülfat)	0,02ml
TEMED (N,N,N',N'-tetrametil-etan-1,2-diamin)	0,002ml
Distile su 2ml'ye tamamlanır	

Protein ağırlık belirleyicisi:*Novex Sharp Protein Standard (Invitrogen, LC5800)**ColorPlus Prestained Protein Ladder, Broad Range (NEB, P7711S)*

Yarı kuru elektroforetik transfer cihazı (Bio-Rad, 170-3940)

PVDF membran (Immun-Blot PVDF, BioRAD)

Güç kaynağı (Cleaver, CS-3AMP)

Dikey elektroforez sistemi, OmniPAGE Electrophoresis System (Cleaver, VS10WDSYS)

Yarı kuru transfer tamponu:

Trizma baz	5,82g
Glisin	2,93g
SDS (%10)	3,75ml
Metanol	200ml
Distile su ile 1L'ye tamamlanır	

Coomassie Blue çözeltisi:

%0,025 Coomassie Blue R-250

%40 metanol

%7 glacial asetik asit

Stripping çözeltisi:

2-merkapttoetanol	357µl
Tris-HCl, 1M, pH=6,8	3,125ml
SDS (%10)	10ml
Metanol	200ml
Distile su ile 50ml'ye tamamlanır	

Tris tamponlu salin (TBS) (10x) (pH=7,6):

Trizma baz	61g
NaCl	90g
Distile su ile 1L'ye tamamlanır	

Ponceau S çözeltisi (Sigma, P3504)

TBS(T) solüsyonu: 1x TBS içinde %0,05 Tween-20

Whatman filtre kağıdı

Nitrosellüloz membran (0,45µm kalınlığında) (Thermo Scientific, 88018)

Yağsız süt tozu

Primer antikolar:

Rabbit polyclonal to KLF5 (Abcam, ab24331)

Monoclonal Anti-α-Tubulin- – Mouse IgG1 (Sigma, T 6074)

Monoclonal Anti-V5 tag antibody [SV5-Pk1] (Abcam, ab27671)

Sekonder antikolar:

Goat anti-rabbit IgG (H+L) HRP conjugate (Invitrogen, G21234)

Goat anti-mouse IgG (H+L) HRP conjugate (Invitrogen, G21040)

Görüntüleme kiti:

SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific)

3.2 Yöntemler

3.2.1 Plazmid Üretimi ve İzolasyonu

CRISPR/Cas9 sisteminin çalışabilmesi için gerekli olan gRNA ve Cas9 nükleazın sentezini sağlayan pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 ifade vektörü (Addgene plasmid # 42230) bu vektörü tasarlayan araştırmacı Feng Zhang (MIT) tarafından hediye edilmiştir. Öncelikle pX330 vektörünün kompetan JM109 bakteri suşuna transformasyonu yapıldı. Transformasyon sonucu elde edilen bakteri kolonileri seçilerek miniprep yöntemi ile plazmid izolasyonu yapıldı. Miniprep sonrası elde edilen plazmidlere EcoRI enzim kesimi yapıldı (plazmid kalite kontrolü).

EcoRI restriksiyon enzimi	0.5 µl	37°C'de 1 saat inkübasyon
10X tampon	2 µl	
Plazmid DNA'sı	4 µl	
dH2O	13.5 µl	
Toplam hacim	20 µl	

Enzim kesim ürünleri %1'lik agaroz jelde yürütüldü. Kalite kontrol sonucu olumlu sonuçlanan plazmidlerden ikisi midiprep ile çoğaltıldı. Böylece pX330 vektörü klonlama için uygun hale getirildi.

3.2.2 Klonlama Çalışmaları

a) CRISPR/Cas9 vektörü klonlama çalışmaları

CRISPR/Cas9 aracılığı ile istenilen bölgenin hedeflenip Cas9 nükleaz aracılığı ile çift sarmal kırık oluşturabilmesi için pX330 vektörü içerisine hedef bölgeye komplementer gRNA dizisinin klonlanması gerekmektedir. Bu tez kapsamında, *Klf5* gen dizisinin 1. ekzonunda yer alan 4. ve 41. aminoasitleri kodlayan DNA dizilerini hedefleyen iki farklı CRISPR/Cas9 vektörü hazırlanmıştır. CRISPR/Cas9 vektörü içerisine gRNA dizisinin klonlanması için öncelikle pX330 vektörünün *BbsI*

restriksiyon enzimi ile kesilmesi ve uç kısımlarının gRNA oligonükleotidleri ile uyumlu hale getirilmesi gerekmektedir.

1µg pX330 vektörü	1µl	37°C'de gece boyu inkübasyon
Fast digest <i>BbsI</i> restriksiyon enzimi	1µl	
10X Fast Digest Buffer	2µl	
dH ₂ O	16µl	
Toplam Hacim	20µl	

Enzim kesimi sonrası linearize edilen pX330 vektörü %1'lik agaroz jelden pürifiye edildi. PZR ürününün saflaştırılması için *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* kiti kullanıldı. Daha sonra gRNA dizisini oluşturan 22 nükleotidlik oligonükleotid DNA yapıların birbirlerine bağlanması ve çift sarmal yapı oluşturması için *annealing* reaksiyonu kuruldu:

100 µM oligol (sense)	1µl	95°C'de 5 dakika, daha sonra 5°C/dk olacak şekilde 25°C'ye kadar soğutuldu ve hızlıca buza alındı
100 µM oligol (antisense)	1µl	
10X annealing buffer	5µl	
dH ₂ O	43µl	

10X annealing buffer : (alikotaşıp -20°C'de saklandı)

1M Tris pH 8.0	400µl
1M MgCl ₂	200 µl
5M NaCl	100 µl
0.5M EDTA pH 8.0	20µl
dH ₂ O	280 µl

Oligoların bağlanma reaksiyonu sonrasında pX330 vektörü ile ligasyon reaksiyonu kuruldu: (3:1, vektör omurgası: *insert* molar oranı)

BbsI digested pX330 vektör backbone (18 ng/ µl)	4.4µl	160C'de gece boyu inkübasyon
Oligolar (annealing sonrası)	4.1µl	
T4 DNA ligase	0.5 µl	
10X DNA ligase Buffer	1 µl	

14-16 saat inkübasyon sonrası ligasyon ürünlerinin kompetan JM109 E.coli bakterilerine transformasyonu yapıldı. Ertesi gün toplanan bakterilerden miniprep yöntemi ile plazmid izolasyonu yapmak için *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System* kiti kullanıldı. İzole edilen plazmidlerin kalite kontrolü (hedef dizinin plazmid içerisindeki yerleşimi) NlaIII restriksiyon enzim kesimi (4.aminoasidi hedefleyen CRISPR vektörü için)ve BbsI/ AgeI eş zamanlı kesimi (41.aminoasidi hedefleyen CRISPR vektörü için) ile yapıldı. Doğru diziyi içeren kolonilerden ikisi 100 mL LB kültürü içerisinde 14-16 saat çoğaltıldı ve *Plasmid Midi Kit* kullanılarak plazmid izolasyonu yapıldı.

b) “Donor” Plazmid Vektörü Klonlama Çalışması

CRISPR/Cas9 sistemi aracılığı ile hedeflenen bölgede çift sarmal kırık oluşturulmasından sonraki basamak, hücrede istenilen bölgede hedeflenmiş insersiyonun oluşturulabilmesi için dışarıdan gönderilmesi gereken donor DNA yapısının hazırlanmasıdır. Bu amaçla, PZR aracılıklı mutagenез yoluyla hazırlanan DNA parçaları “*Gene-Soeing*” yöntemi ile bir araya getirildi ve donor plazmid klonlama çalışmaları yapay olarak oluşturulan ve hedef diziyeye homoloji gösteren DNA parçasının pGem-T easy vektör içerisine yerleştirilmesi ile başladı. Bunun için öncelikle PZR ürünleri %0,7'lik agaroz jelden purifiye edildi. Purifiye edilen ampikonların saflaştırılması için *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* kiti kullanıldı. T vektör aracılığı ile yapılan ligasyon, Taq polimeraz ile amplifiye edilen DNA parçalarının 3' ucuna eklenen adenin uzantılarının, doğrusal vektörün timin uzantıları ile birleşmesi ile gerçekleşmektedir. Ligasyon reaksiyonu 16⁰C'de O/N yapıldı.

pGem-T easy vektör	1 µl
T4 DNA Ligase	1 µl
2X Rapid Ligase Buffer	5 µl
İnsert (3:1 oranı için)	3 µl

14-16 saat inkubasyon sonrası ligasyon ürünü kompetan E. Coli JM109 hücrelerine aktarıldı ve mavi-beyaz koloni seçimini gerçekleştirmek için 100 µl IPTG (100mM), 20 µL X-Gal (50mg/ml) ve 50µg/ml ampisilin içeren katı LB besiyerine ekildi. Klonlamanın gerçekleştiği beyaz koloniler seçilip çoğaltıldıktan sonra miniprep yöntemi ile plazmid izolasyonu yapmak için *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System* kiti kullanıldı. İzole edilen plazmidlerin kalite kontrolü (hedef dizinin plazmid içerisindeki yerleşimi) restriksiyon enzim kesimi ile yapıldı. Doğru diziyi içeren kolonilerden ikisi 100 mL LB kültürü içerisinde gece boyu çoğaltıldı ve *Plasmid Midi Kit* kullanılarak plazmid izolasyonu yapıldı.

3.2.3 CRISPR/Cas9 vektörünün ve donör plazmidin DNA dizi analizi ile doğrulanması

Restriksiyon enzim kesimi ile doğrulanan plazmidler C2C12 fare miyoblast hücre hattına elektroporasyon aracılığı ile verilmeden önce DNA dizi analizi yapıldı. Plazmidde yer alan hedef dizinin doğru bölgeye yerleştiği ve donör DNA parçasının içerisinde *Klf5*'in işlevini bozacak herhangi bir mutasyon olmadığı T7 ve SP6 primerlerinin kullanıldığı DNA dizi analizi ile doğrulandı. Ayrıca, CRISPR vektörünün içerisine grNA dizisinin doğru bölgeye klonlandığı LKO 1.5 primeri kullanılarak yapılan DNA dizi analizi ile doğrulandı. Böylece px330 CRISPR/Cas9 ve donör DNA parçasını içeren vektörlerin klonlama çalışmaları tamamlandı.

Dizi Analizi Reaksiyonu :

Kalıp DNA (1000ng/ μ l)	1 μ l	94°C 5 dk	X25 döngü
Reaction Premix (RR-100)	4 μ l	94°C 15 sn	
BigDye Sequencing Buffer	2 μ l	50°C 15 sn	
Primer (3,3pmol/ μ l)	1 μ l	60°C 4 dk	
dH2O	12 μ l	60°C 1 dk	

Dizi analizi reaksiyonundan sonra PZR ürünlerinin pürifikasyonu yapıldı:

- Örneklerin üzerine toplam hacmin 1/10'u miktarında 3M NaOAc eklendi ve 1,5ml'lik eppendorfa alındı.
- 2,5 kat soğuk %100 etanol eklendikten sonra 3-4 kez ters yüz yapılarak karıştırıldı ve -20°C'de en az 30 dakika inkübe edildi.
- İnkübasyondan sonra maksimum hızda 30 dakika santrifüj edildi.
- Pelletin üzerine soğuk %70'lik etanol (200 μ l)ilave edildi, hafifçe karıştırıldı.
- Maksimum hızda 10 dakika santrifüj edildi ve pelet kurutuldu.
- Peletin üzerine 20 μ l formamid ilave edildi, peletin çözünmesi sağlandı.

Örnekler 96'lık sekans yükleme plate'ine aktarıldı ve 98°C'de 10 dakika denatüre edildi. Denatürasyon sonrası plate buz üzerinde 5 dakika bekletildi ve fluorimetrik DNA fragman analizi cihazına yüklendi (Applied Biosystems ABI 3110 Genetic analyzer).

3.2.4 “Gene-Soeing” Yöntemi ile PZR Aracılıklı Mutagenез Oluşturulması

Bu tez kapsamında Klf5’in 4. ve 41. Aminoasitlerini hedefleyen bölgelere, PZR aracılıklı mutagenез işlemi kullanılarak oluşturulan donör DNA parçası aracılığı ile V5 epitop dizisini kodlayan 42 nükleotidlik insersiyonun gerçekleştirilmesi hedeflenmiştir. PZR kullanımı ile iki aşamalı mutagenез işlemi, DNA fragmanlarının amplifikasyonu sırasında kullanılan uzun primer dizilerinin gerçekleştirilmek istenen mutasyonu içermesi temeline dayanmaktadır.

Gene-soing yönteminde, kullanılan iki primerden biri, doğal diziyeye komplementer olmayan ve oluşturulmak istenen mutasyonu taşıyan baz dizisini içerir. Bu sayede kalıp görevi gören doğal DNA dizisi kullanılarak yapılacak PZR esnasında, mutant primer sayesinde istenilen mutasyon değişikliğini oluşturulur. Bu amaçla tasarlanan primer dizileri aşağıda verilmiştir:

Oligo	Dizi
KLV5-4MF	5' GGTAAGCCTATCCCTAACCCCTCTCCTCGGTCT CGATTCTACGCGGGTGCTGACCATGAGCGCG-3'
KLV5-4MR	5' CGTAGAATCGAGACCGAGGAGAGGGTTAGGGA TAGGCTTACCCGTGGGCATGGACGGTCAAGCTT-3'
KLV5-41MF	5' GGTAAGCCTATCCCTAACCCCTCTCCTCGGTCT CGATTCTACGGACGCGCGCTCTTCTCCGGAGA-3'
KLV5-41MR	5' CGTAGAATCGAGACCGAGGAGAGGGTTAGGGAT AGGCTTACCCGTGGGCATGGACGGTCTGGGGA-3'

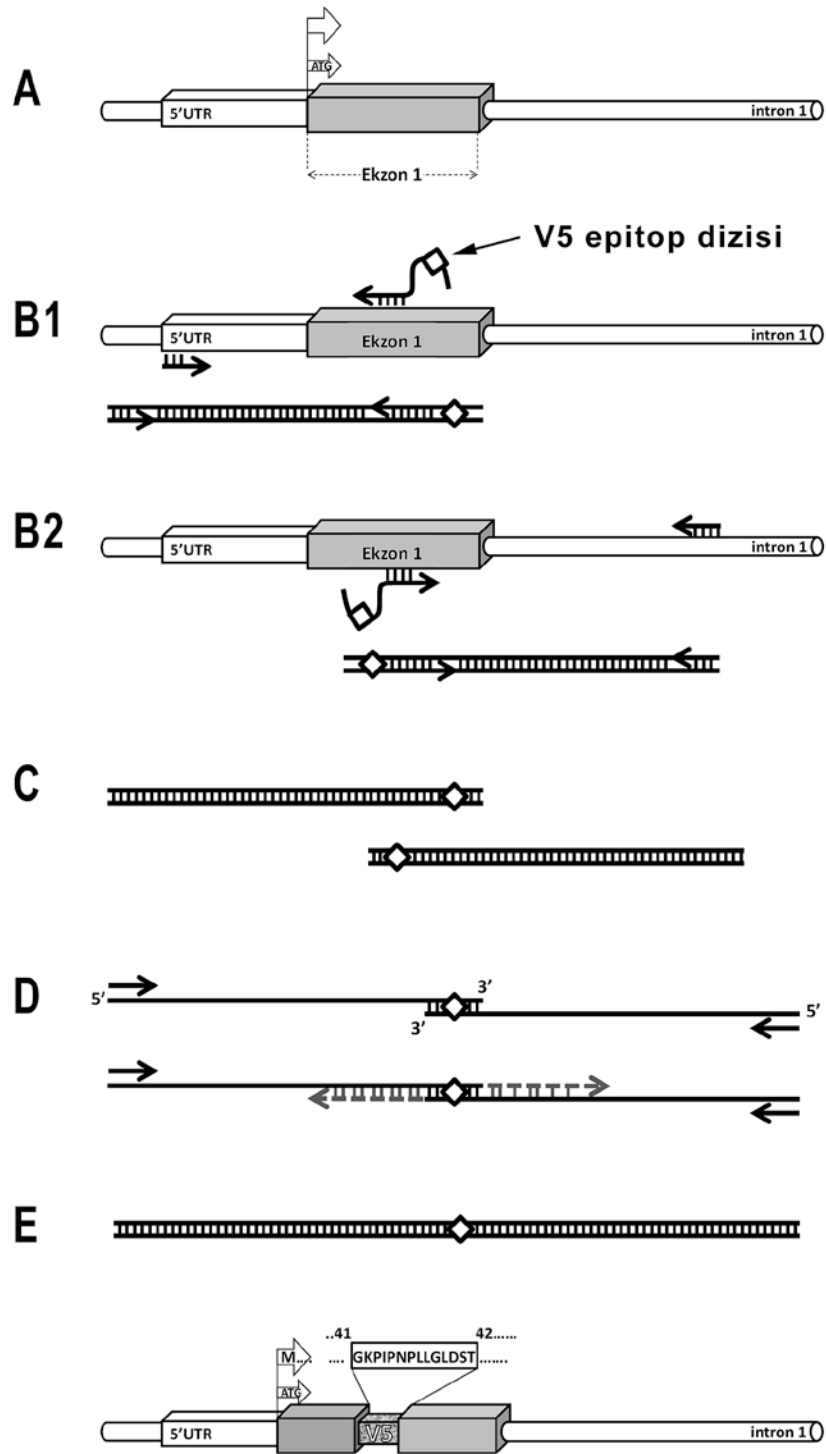
Malzemeler	hacim		
5XgoTaq Polymerase Tampon	10µl		
25Mm MgCl ₂	7µl	94°C	3 dk
10Mm DNTPs	2µl	94°C	30 sn
Primer-F (10pmol)	1µl	63→59°C	40 sn X40 döngü
Primer-R (10pmol)	1µl	72°C	1 dk
DNA kalıp	10µl	72°C	4 dk
DH ₂ O	16.5µl	4°C	∞
Toplam hacim	50µl		

Çift sarmal kırığın tamir sürecinde homolog rekombinasyon mekanizmasını etkinleştirmek için donör plazmid hazırlanması sırasında gerçekleştirilen adımlar aşağıda sıralanmıştır:

- PZR aracılıklı mutagenез çalışmalarında kalıp olarak kullanılacak olan genomik DNA'nın eldesi için fare akciğer dokusu örneklerinden DNA izolasyonu yapıldı.
- Fare *Klf5* gen dizisi üzerinde mutasyon hedeflenen bölge PZR ile çoğaltıldı. Çoğaltılan PCR fragmanının pGem-T easy vektöre klonlanabilmesi için modifiye agaroz jelden saflaştırıldı.
- *Klf5* geni üzerinde hedeflenen ve PZR ile çoğaltıldıktan sonra jelden purifiye edilen PZR ürünleri pGEM-T easy vektör içerisine takıldı. Ligasyon ve transformasyon işlemleri sonrası elde edilen kolonilerden plazmid izolasyonu yapıldı.
- Seçilen kolonilerin doğruluğu DNA dizi analizi yöntemi ile gösterildi. PCR aracılıklı mutagenез ile plazmid içerisinde yer alan; *Klf5* exon1 DNA dizisinin hedef bölgesine, V5 epitopuna karşılık gelen gen dizisi yerleştirildi ("*Gene-soeing*" yöntemi).
- PCR aracılıklı mutagenез yöntemi ve adımları Şekil 3.3'de özetlenmiştir. Bu amaçla öncelikle V5 insersiyonu gerçekleştirilmek istenen nokta ortak olmak üzere doğal (*wild type*) DNA dizisinin (yukarıda hazırlanan plazmid ürünü) 5' ve 3' kısımlarını hedefleyen iki ayrı PZR amplifikasyonu farklı tüplerde gerçekleştirildi ve amplifikasyon ürünlerinden 3' kolunun 5' ucunda, 5' ucunun ise 3' ucunda V5 epitopunu kodlayan DNA dizisini içeren ve kısmen örtüşen (komplementer) iki PCR ürünü elde edildi (Şekil 3.3.B1 ve B2). Bu PZR ürünleri modifiye agaroz jelden saflaştırıldı (Şekil 3.3.C).
- Önceki aşamada saflaştırılan iki PZR ampikonu aynı tüp içine bir ürün diğerinin iki katı molar oranda olacak şekilde ikinci PZR reaksiyonu

gerçekleştirildi. Bu aşamada birbirine komplementer yapıda olan DNA fragmanlarının ortak dizileri “*annealing*” aşamasında birbirleri için primer (*megaprimer*) görevi görür ve kalıp DNA zinciri üzerinde DNA polimeraz enzimi tarafından dizi tamamlanır(Şekil 3.3.D). Bu sayede 5’ ve 3’ uçlarından V5 epitop dizisini kodlayan gen dizisini kapsayan homoloji kolları arasına hedeflenmiş insersiyon oluşturuldu(Şekil 3.3.E). Elde edilen PZR ürünü pGem- T easy vektör içerisine klonlandı. Klonların doğruluğu DNA dizi analizi ile kontrol edildi.

Ayrıca CRISPR/Cas9 sistemi ile oluşturulan kırığın tamir sürecinde hedeflenen bölgeye yeşil florasan proteini (GFP) kodlayan 330 aminoasit büyüklüğünde dizinin yerleştirilebilmesi için yukarıda anlatılan PZR aracılıklı mutagenез yaklaşımı ile yeni bir donör plazmid hazırlandı.



Şekil 3.3. PZR aracılığı ile mutagenез yaklaşımı şeması. A. İlk aşamada birinci tüpte gerçekleştirilen PZR reaksiyonu sonunda *Klf5* geni 1. ekzon üzerinde hedeflenen bölge çoğaltıldı.

B1, B2.Mutasyon gerçekleştirilmek istenilen nokta ortak olmak üzere bir önceki basamakta elde edilen kalıp DNA dizisinin 5' ve 3' uçlarına doğru iki ayrı PZR amplifikasyonu farklı tüplerde gerçekleştirildi.**C.**Amplifikasyon ürünlerinin birinin 5' ucunda, diğerinin ise 3' ucunda mutasyon içeren ve kısmen örtüşen (komplementer) iki PCR ürünü elde edildi. **D.**Kalıp DNA'dan arındırmak üzere bu iki PCR ürünü agaroz jelden saflaştırıldı ve aynı tüp içerisinde biri diğerinin iki katı molar miktarlarda konarak tekrar PZR reaksiyonu gerçekleştirildi. Komplementer dizileri taşıyan DNA fragmanlarının ortak dizileri "*annealing*" aşamasında birbirlerine birer primer görevi oluşturarak 5'→3' yönünde DNA polimeraz enzimi tarafından tamamlandı. **E.** İkinci reaksiyonun sonucunda mutasyon bölgesini bulunduran tam uzunlukta DNA fragmanı elde edildi.

3.2.5 C2C12 Fare Miyoblast Hücre Hattına Elektroporasyon Aracılığı ile GenTransferi

a) C2C12 Fare Miyoblast Hücre Hattının Proliferasyonu

C2C12 Hücreleri için Proliferasyon Besiyeri:

DMEM içinde:

FCS	%10
L-Glutamin	%1
Streptomisin/Penisilin	%1

Sıvı azot tankında %10 DMSO (dimetil sülfoksit) içeren FCS içerisinde saklanan C2C12 hücreleri 37⁰C'deki su banyosu içerisinde hızlıca çözdürülerek proliferasyon besiyerine alındı ve 400g X 5 dakika santrifüj yapılarak çöktürüldü. Hücre peleti proliferasyon besiyeri içerisinde çözüldükten sonra ilk olarak 75cm²'lik filtreli steril hücre kültürü şişesi içerisine alındı. Proliferasyon aşamasındaki hücreler, %50 yoğunluğu geçmeyecek şekilde idame ettirilerek 37⁰C'da %5 CO₂'li etüvde çoğaltıldı ve pasajlandı.

b) Elektroporasyon Aracılığı ile Gen Aktarımı

Literatürdeki çalışmalar CRISPR/ Cas9 sisteminin etkin bir şekilde çalışabilmesi için Crispr/Cas9 vektörünün ve donör DNA'yı içeren vektörün 1:1 molar oranda hücrelere transfer edilmesi gerektiğini bildirmektedir(16). C2C12 hücre hattına gen transferi için bilinen en etkin yol olan elektroporasyon yaklaşımı tercih edilmiştir. Bu amaçla, ECM 830 elektroporasyon sistemi (BTX Harvard) kullanılmıştır. Proliferasyon aşamasındaki C2C12 hücreleri tripsin ile kaldırılıp tripan mavisi ile sayıldıktan sonra 2×10^6 hücre santrifüj ile çöktürülmüştür. Hücre pelleti 200 μ l *BTXpress Electroporation Buffer* (10 μ g px330 ve 10 μ g donör plazmid vektörleri eklenmiş) içerisinde çözünmüş ve 4mm plaka açıklığı bulunan küvetler içerisine alınarak hızlıca elektroporasyon işlemi yapılmıştır. Elektroporasyon tamponu içerisinde hücrelerin 15 dakikadan fazla beklemesi hücre ölümüne neden olmasından dolayı elektroporasyon sonrası hücreler proliferasyon besiyeri içerisine alınmış ve idame ettirilmiştir. Elektroporasyon koşulları aşağıda verilmiştir:

<i>Voltaj</i>	360V
<i>Pulse length</i>	10msec
<i>Pulse sayısı</i>	1
<i>Mode</i>	LV

3.2.6 C2C12 Hücrelerinin Klonlanması

Elektroporasyon aracılığı ile gen aktarımından 72 saat sonra hücreler tripsinle kaldırılmış ve limit dilüsyon yöntemi ile 48 kuyucuklu hücre kültürü kaplarına ekim yapılmıştır (her iki kuyudan birine hücre düşecek şekilde ekim yapılmıştır). Hücrelerin yaklaşık dört, beş gün büyümesi beklenmiştir. Hücreler, DNA izolasyonu için yeterli yoğunluğa ulaştıktan sonra hücre kültürü kaplarında klonlanan hücrelerin yarısı kuyucuk içerisinde bırakıldı, diğer yarısı DNA izolasyonu için ayrıldı. Bu örnekler, DNA izolasyonu sonrası PZR yöntemi ile pozitif klonların belirlenmesi için kullanıldı. Toplanan hücre taraması sonuçlanana kadar kuyucuk içerisinde kalan hücrelerin idamesi sağlandı.

3.2.7 Pozitif Hücre Klonlarının PZR ve DNA Dizi Analizi ile Doğrulanması

a) DNA izolasyonu ve PZR ile doğrulama

DNA izolasyonu protokolü;

- Tripsin ile kaldırıldıktan sonra 400xg'de 5 dakika santrifüj yapılarak çöktürülen hücre peletinin üzerine 500µl nükleer lizis tamponu, 50µl %10 SDS ve 100µl 20mg/ml Proteinaz K eklendi.
- 55°C'de O/N inkübasyona bırakıldı
- Ertesi gün 250µl amoniyum asetat eklendi ve 9-10 kez ters yüz edilerek karıştırıldı
- Oda ısısında 15 dakika inkübe edildi.
- 10000rpm'de 20 dakika 10°C'de santrifüj edildi ve süpernatant farklı bir tüpe aktarıldı.
- Süpernatantın üzerine 2 katı volümde soğuk absolut etanol eklendi ve 20°C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon sonrası 10000rpm'de 20 dakika 10°C'de santrifüj yapıldı.
- Santrifüj sonrası süpernatant atıldı ve DNA pelletinin üzerine %70'lik soğuk etanol eklendi.
- 10000rpm'de 20 dakika 10°C'de santrifüj edildi.
- Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pellet kurumaya bırakıldı.
- Hücre peletlerinin üzerine 40 µl dH₂O eklendi ve 37°C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı.
- PZR öncesi Nanodrop spektrofotometre ile konsantrasyonu ölçüldü, saflık ve miktar tayini yapıldı.

PZR yöntemi ile hücre klonlarının taranması:

DNA izolasyonu sonrası *Klf5* üzerinde hedeflenen bölgeye V5 insersiyonu gerçekleşip gerçekleşmediğini öğrenebilmek için hedef bölgeyi kapsayan primerler

yardımıyla 1.ekzon çoğaltıldı ve 42 nükleotidlik insersiyonun görülebilmesi için PZR ürünleri % 2.5'luk agaroz jelde 1V/cm² elektrik alanında yürütüldü.

F-Primer 5'-CGAGTCCGCGTCCCGTGCCA-3'

R-Primer 5'-ACCAGCTCCTCCGAGGGCAGTCGC-3'

PZR reaksiyonu:

Malzemeler	hacim			
5XgoTaq Polymerase Tampon	10µl			
25Mm MgCl ₂	7µl	94 °C	3dk	X35 döngü
10Mm DNTPs	2µl	94 °C	30sn	
Primer-F (10pmol)	1µl	65 °C	30sn	
Primer-R (10pmol)	1µl	72 °C	40sn	
DNA kalıp	10µl	72 °C	4dk	
DH ₂ O	14.5µl	4 °C	∞	
DMSO	2,5µl			
Toplam hacim	50µl			

b) DNA dizi analizi ile doğrulama

PZR reaksiyonu sonrası elde edilen ampliconlar % 2.5'luk agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. 42 nükleotidlik insersiyonun görüldüğü hücre klonuna aynı primerler ile DNA dizi analizi yapıldı ve hedeflenen bölgedeki insersiyon dizi analizi ile doğrulandı.

3.2.8 Protein İzolasyonu

Hücre pelletinin üzerine 50µl protein izolasyon tamponu eklendi ve izolasyon protokolüne başlandı:

- Sonikatör aracılığı ile örnekler 130W, 20kHz frekans ve %50 genlikte, her döngü sonrasında 20sn ara verilerek 8'er kez 20sn süresince sonike edildi.
- Sonikasyon sonrası örnekler 100C'de maksimum hızda 3 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatant yeni bir tüpe aktarıldı ve -800C'da saklandı.

Protein Konsantrasyonu Ölçümü:

BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, #23225) kullanıldı.

- Ölçüm için gerekli olan kör çözelti %1 SDS kullanılarak hazırlandı. 2mg/ml konsantrasyonundaki albümin standartları %1 SDS ile seyreltildi ve standart çözeltiler hazırlandı.
- Protein örneklerinden 2,5µl alındı ve %1 SDS ile 20 kat seyreltildi.
- 50 hacim *Reagent A* ve 1 hacim *Reagent B* kullanılarak BCA indikatör çözeltisi hazırlandı.
- 1ml BCA indikatörü, standart çözeltiler ve örnekler (50 µl total hacim) üzerine çözeltisi eklendi.
- Karışımlar vorteksledikten sonra 37⁰C'de 30 dakika inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon sonrasında *Molecular Devices Spectramax M2* cihazı kullanılarak standart çözeltilerin ve örnek çözeltilerin 562nm dalgaboyunda verdikleri absorbans ölçüldü ve standard eğri yardımı ile örneklerin konsantrasyonları hesaplandı.
- Bulunan konsantrasyon değerleri, dilüsyon faktörü (20) ile çarpılarak stok protein çözeltilerinin konsantrasyonları elde edildi.

3.2.9 Western Blot

- %12'lik ayırıcı nitelikte jel üzerinde yer alacak şekilde %5 lik toplayıcı SDS-poliakrilamid jeli döküldü.

- Polimerleşen jel elektroforez tankına yerleştirildi, elektroforez tamponu eklendi ve kuyular tampon ile temizlendi.
- Örnekler 6 μ l örnek tamponu (4x) ve 2,4 μ l indirgeyici ajan (10x) ile birlikte toplam 24 μ l hacimde hazırlandı. Kuyulara negatif kontrol olarak C2C12 hücre hattında izole edilen protein örneği, pozitif kontrol olarak Klf5+V5 ifade eden ifade vektörü ile transfekte edilmiş C2C12 hücre hattından izole edilen protein örneği yüklendi.
- Örnekler ve protein ağırlık belirleyici jele yüklendikten sonra toplayıcı jelden ayırıcı jele geçene kadar 80V (yaklaşık 30 dakika) gerilim uygulanarak yürütüldü. Sonrasında protein ağırlık belirleyicisi gözlemlenerek 120V'ta 100-120 dakika boyunca yürütülmeye devam edildi.

Örneklerin PVDF membrana aktarımı:

- Jele uygun boyutta 4 adet Whatman kağıdı ve 1 adet PVDF membran kesildi.
- PVDF membran porlarının açılması için 1 dakika metanol içerisinde bekletildi.
- Elektroforez tamamlandıktan sonra jel tanktan çıkarıldı, toplayıcı jel atıldı. Ayırıcı jel, membran ve Whatman kağıtları 20 dakika yarı kuru transfer tamponu içerisinde bekletildi.
- Yarı kuru blotlama cihazının plaka elektrodları önce distile su ile sonrasında elektrodlar transfer tamponu ile silindi.
- Alttaki plakanın üzerine önce 2 adet Whatman kağıdı, daha sonra membran, jel ve yeniden 2 Whatman kağıdı yerleştirildi.
- Blotlama cihazının üst plakası sıkıca kapatıldıktan sonra güç kaynağı 15V'luk gerilimde sabitlenerek 50 dakika boyunca transfer işlemi yapıldı.
- Transfer bitiminde jel Coomassie Blue çözeltisi içine bırakılarak jelde kalan proteinler boyandı ve transfer etkinliği incelendi.

Protein membranının antikorla işaretlenmesi:

- Membran TBS(T) ile 5 dakika yıkandıktan sonra, %10'luk süt tozu içerisinde oda sıcaklığında 1 saat çalkalayıcı üzerinde bloklandı.
- Bloklama işlemi sonrası TBS(T) içerisinde hazırlanmış %5'lik süt tozu karışımı ile final konsantrasyonu 0.4 mg/ml olacak şekilde seyreltilmiş V5 primer antikor çözeltisi içerisinde +4°C'da 16 saat boyunca membran çalkalandı.
- Primer antikor ile inkübasyon sonrasında membran oda sıcaklığında 3 kez 15 dakika boyunca TBS(T) ile yıkandı.
- Yıkamalar tamamlandıktan sonra TBS(T) içinde hazırlanmış %5'lik süt tozu karışımı ile anti-mouse sekonder antikor (1:8000 oranında seyreltilmiş) çözeltisi içerisinde membran 1 saat oda ısısında inkübe edildi.
- Sekonder antikor ile inkübasyondan sonra membran oda ısısında 3 kez 15'er dakika TBS(T) ile yıkandı.

Membran görüntüleme:

- Görüntüleme kitinin içindeki luminol ve peroksit solüsyonları eşit hacimde karıştırılarak membranı kaplayacak şekilde yayıldı. 4 dakika beklendikten sonra GeneGnome kemilüminesans görüntüleme cihazı kullanılarak 10 dakikalık poz süreleri ile görüntüleme yapıldı.
- V5 proteininin görüntülenmesinin ardından membran TBS(T) içinde 10 dakika çalkalanarak görüntüleme solüsyonları uzaklaştırıldı. Daha sonra, 65°C'da 30 dakika stripping çözeltisi içinde çalkalandı.
- Stripping sonrasında membran 3 kez 10'ar dakika TBS(T) ile yıkandı.
- Klf5 antikor ile görüntüleme yapmak için bloklama, primer antikor ile muamele, yıkama, sekonder antikor inkübasyonu, yıkama ve görüntüleme işlemleri yukarıda anlatıldığı gibi tekrarlandı. Klf5 antikor final konsantrasyonu 2 µg/ml olacak şekilde kullanıldı. Sekonder antikor olarak anti-rabbit antikor (1:3000) kullanıldı.

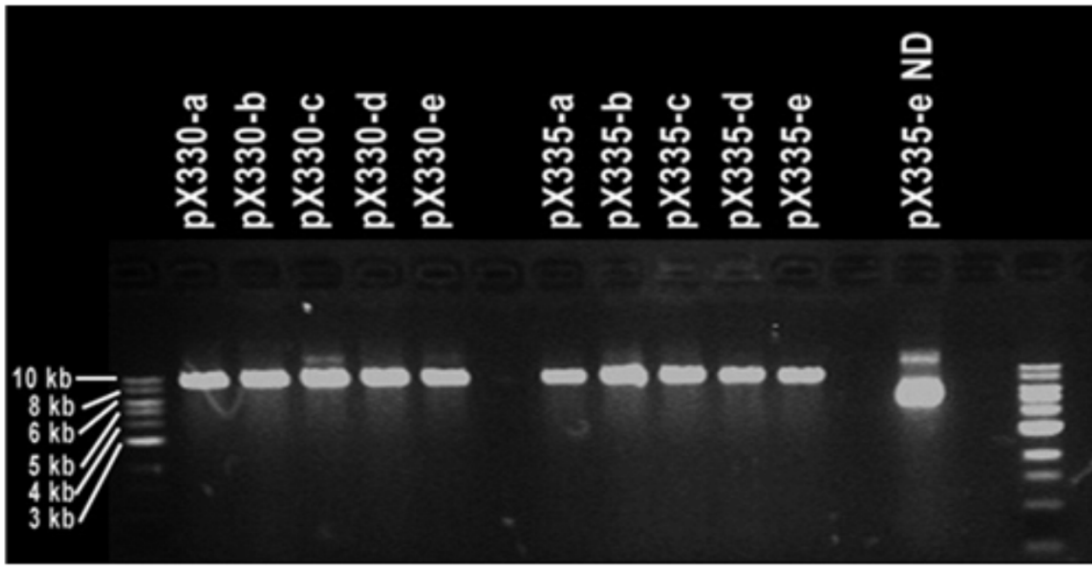
- Daha sonra aynı membrana housekeeping protein olarak α -tübülingörüntüleme yapıldı (PMID:18827022). A-tübülün proteininin görüntülenmesi için de yukarıda anlatılan basamaklar aynı şekilde tekrarlandı. A-tübülün antikorunu 1:2000 derişiminde kullanıldı ve sekonder antikor olarak anti-mouse antikorunu (1:8000) kullanıldı.

4 BULGULAR

4.1 Klonlama ve Vektörlerin Hazırlanması

4.1.1 CRISPR/Cas9 Vektörünün Hazırlanması

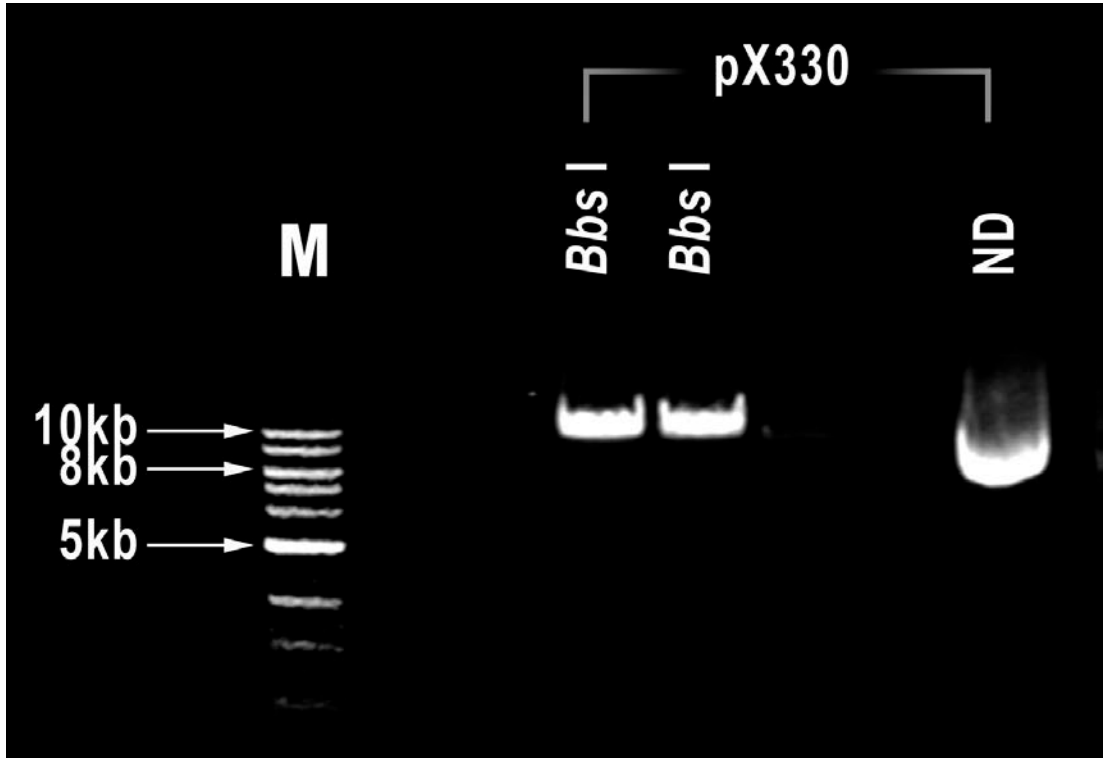
CRISPR/Cas9 vektörünün çoğaltılması amacıyla kompetan JM109 hücrelerine transformasyon yapıldı ve toplanan bakterilerden miniprep ile plazmidler izole edildi. Elde edilen bakteri klonları EcoRI enzimkesimi aracılığı ile doğrulandı. EcoRI, pX330 ve pX335 (*nickase* aktivitesi gösteren mutant pX330 vektör) iskeletini tek bir bölgeden keserek doğrusal bir yapı kazandırmaktadır. Doğrusal vektör iskeletleri ile karşılaştırılmak üzere enzimle muamele edilmemiş çembersel vektör omurgası da agaroz jele yüklenmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 pX330- pX335 plazmidlerinin EcoRI ile enzim kesimi sonrası agaroz jel elektroforezinde görünümü. pX330 ve pX335 klonları enzim kesimi sonrası agaroz jelde yürütüldü ve doğrusal yapı kazanan yaklaşık 10 kb uzunluğunda vektör omurgaları görüntülendi. EcoRI kesimi yapılmamış plazmid [ND] ile gösterilen kuyuya kontrol olarak yüklenmiştir. %1 agaroz jel elektroforezi.

gRNA oligonükleotidlerinin pX330 vektör omurgası içerisine klonlanabilmesi için gerekli olan BbsI enzim kesimi ve jel izolasyonu gerçekleştirildi. BbsI enzim kesimi

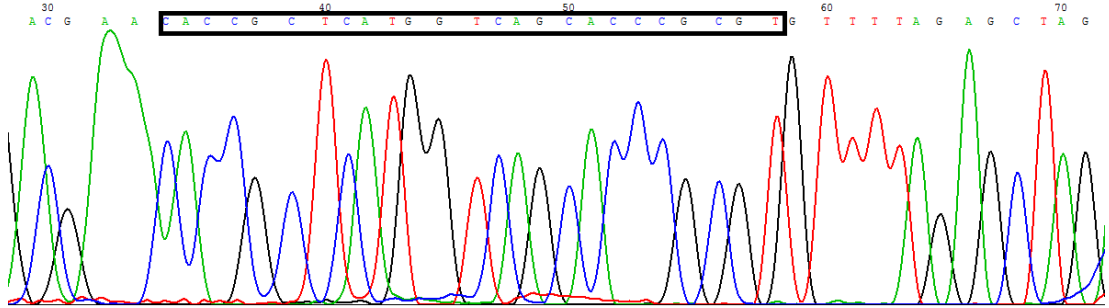
sonrası pX330 vektör omuğası ardışık iki noktadan kesilerek gRNA insersiyonu için uyumlu uçlara sahip doğrusal hale getirildi. Enzim kesimi ürünleri modifiye agaroz jelden purifiye edildi. Kontrol olarak enzim kesimi yapılmamış *non-digest* vektör de agaroz jele yüklendi (Şekil 4.2).



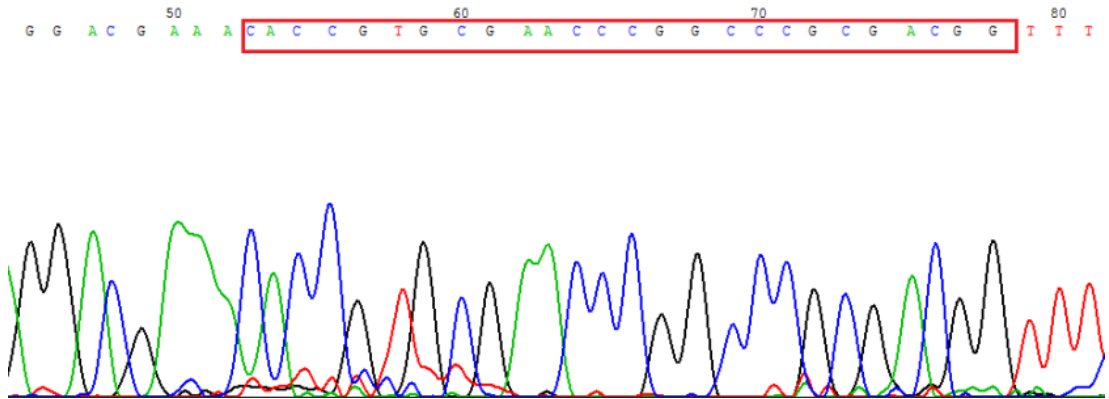
Şekil 4.2 pX330 vektör iskeletinin BbsI restriksiyon enzimi ile kesimi sonrası agaroz jel elektroforezinde görünümü. BbsI enzim kesimi ile doğrusal yapı kazanan pX330 vektörü ve kontrol olarak yüklenen enzim kesimi yapılmamış (ND) pX330 vektörü %1'lik agaroz jelde görüntülendi.

gRNA dizilerini oluşturan oligonükleotidlerin birbirlerine bağlanması ve çift sarmal yapı oluşturması için gerçekleştirilen *annealing* reaksiyonu sonrası gRNA dizisinin pX330 vektör iskeleti içerisine yerleşmesi için ligasyon reaksiyonu yapıldı. Bu aşamada birbirinin alternatifi olarak kullanılmak üzere *Klf5*'in 1. ekzonunda iki ayrı bölgeyi hedefleyen (4. ve 41. aminoasitler) iki farklı CRISPR/Cas9 vektörü hazırlandı. Ligasyon ürünleri kompetan bakterilere aktarıldıktan sonra toplanan

bakterilerden plazmid izolasyonu yapıldı ve DNA dizi analizi uygulanarak klonlama başarısı doğrulandı (Şekil 4.3 ve 4.4).



Şekil 4.3 *Klf5* okuma çerçevesinde yer alan 4. aminoasidi hedeflemek üzere tasarlanan CRISPR/Cas9 vektörüne yerleşen hedef gRNA dizisinin DNA dizi analizi ile gösterimi.

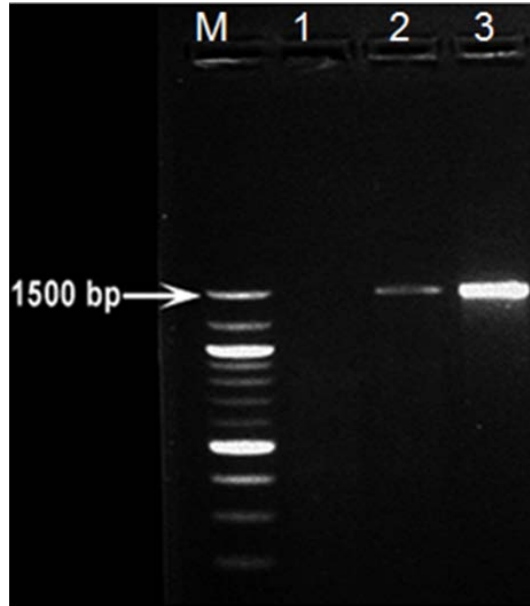


Şekil 4.4 *Klf5* okuma çerçevesinde yer alan 41. aminoasidi hedeflemek üzere tasarlanan CRISPR/Cas9 vektörüne yerleşen hedef gRNA dizisinin DNA dizi analizi ile gösterimi.

4.1.2 Donor DNA Dizisini İçeren Vektörün Hazırlanması

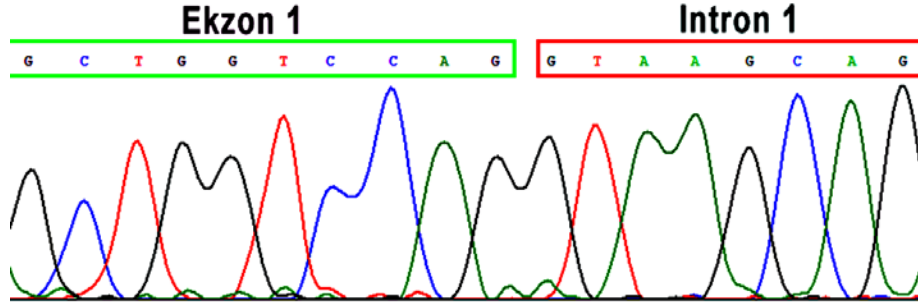
CRISPR/Cas9 sistemi aracılığı ile *Klf5* geni hedef bölgesinde özgül bir çift iplik kırığının oluşması sonrasında DNA hasarının tamiri sürecinde, homolog rekombinasyon aracılığı ile istenen genom değişikliğinin gerçekleştirilmesi için bu bölge ile homoloji gösteren ve hedeflenen bölgede V5 insersiyonunu da gerçekleştirecek donor plazmid hazırlandı. Bu işlemin daha sorunsuzca

ilerleyebilmesi için, oluşturulan çift iplik kırığının tamiri için ekzon 1 gen dizisi içerisinde yer alan 4. ve 5. aminoasitleri kodlayan dizilerin arasına yerleştirilen (ve alternatif yaklaşım olarak 41. aminoasit)V5 epitop dizisini kodlayan DNA dizisini içeren “rekombinasyon donorü” niteliğinde bir DNA dizisine ihtiyaç vardır. Çift iplik kırıklarının tamirinde homolog rekombinasyon etkinliğinin olası en yüksek düzeyde olabilmesi için hazırlanacak olan homoloji kollarının uzunluğunun 600 – 800 baz uzunlukta olması HR etkinliğini artırmaktadır. Bu amaçla hazırlanan donör DNA plazmidi, V5 epitopunu sentezleyen 42 nükleotidlik gen dizisini 3’ ve 5’ yönlerinden 600-800 baz uzunluğundaki iki DNA dizisi ile çevreleyecek şekilde hazırlandı (toplam 1542 bç). Bu amaçla PCR aracılıklı mutagenез tekniği kullanıldı ve homoloji kollarının arasına okuma çerçevesi içinde V5 epitopunu kodlayan 42 nükleotidlik dizi yerleştirildi. Bu amaçla öncelikle fare *Klf5* gen dizisi üzerinde mutasyon hedeflenen bölge PZR ile çoğaltıldı (Şekil 4.5) ve PZR ürünleri pGEM-T easy vektör içerisine takıldı. Ligasyon ve transformasyon işlemleri sonrası elde edilen kolonilerden plazmid izolasyonu yapıldı ve klonlama başarısı DNA dizi analizi ile doğrulandı. Aşağıdaki kromatogramda pGEM-T easy vektöre klonlanan *Klf5* geni üzerindeki ekzon1/intron1 bağlantı bölgesi gösterilmiştir (Şekil 4.6).



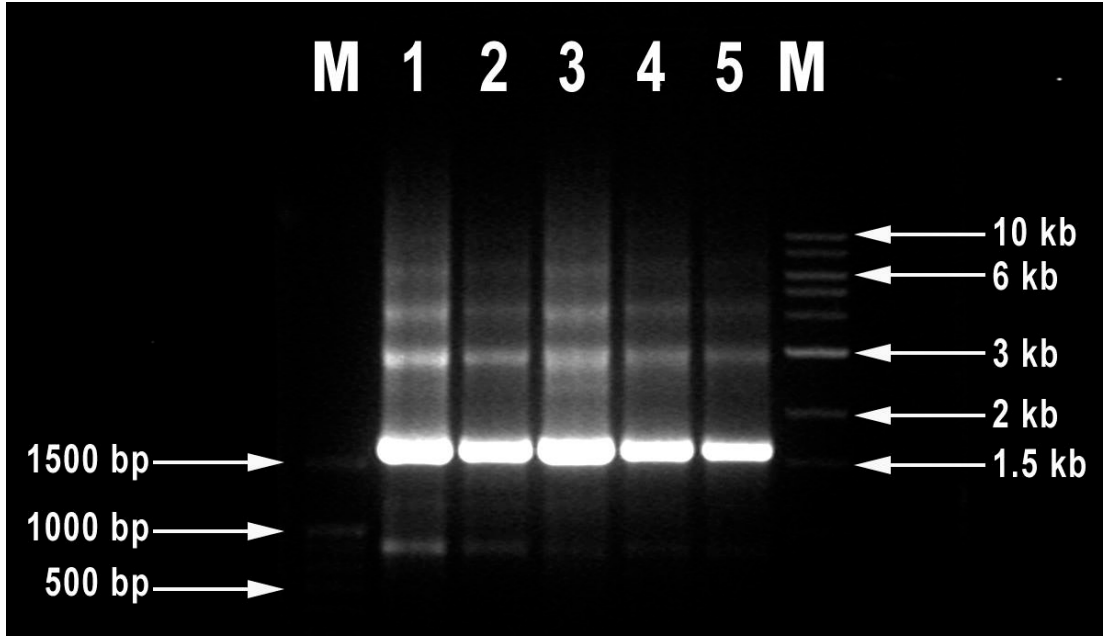
Şekil 4.5 *Klf5* geni üzerinde PZR ile çoğaltılan hedef bölgenin agaroz jel elektroforez görüntüsü. Agaroz jel elektroforezi ile hedef DNA dizisinin çoğaltıldığı

doğrulandı (~1542bç). Tekrarlanan PZR reaksiyonlarının 2. ve 3. kuyulardabaşarılı bir şekilde gerçekleştiği gözlemlendi. 3.kuyuda bulunan band agaroz jelden saflaştırıldı.



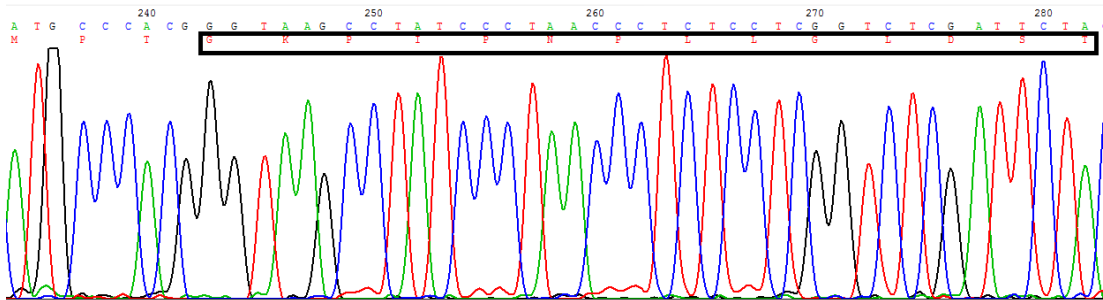
Şekil 4.6 Donor Plazmid için homoloji kollarını oluşturacak DNA parçasının DNA dizi analizi ile gösterimi.

PZR aracılıklı mutagenез ile plazmid içerisinde yer alan; *Klf5* exon1 DNA dizisinin yukarıda gösterilen hedef bölgesine, V5 epitopuna karşılık gelen gen dizisi “Gene-soeing” yöntemi ile yerleştirildi. Bu amaçla öncelikle V5 insersiyonu gerçekleştirilmek istenen nokta ortak olmak üzere doğal (*wild type*) DNA dizisinin yukarıda hazırlanan plazmid ürünü 5’ ve 3’ kısımlarını hedefleyen iki ayrı PZR amplifikasyonu farklı tüplerde gerçekleştirildi ve amplifikasyon ürünlerinden 3’ kısmını 5’ ucunda, 5’ kısmının ise 3’ ucunda V5 epitopunu kodlayan DNA dizisini içeren ve kısmen örtüşen (komplementer) iki PZR ürünü elde edildi. Daha sonra bu PZR ampliconları aynı tüp içine bir ürün diğerinin iki katı molar miktarlarda konarak ikinci aşama PZR reaksiyonu gerçekleştirildi. Bu sayede 5’ ve 3’ uçlarından V5 epitop dizisini kodlayan gen dizisini kapsayan homoloji kolları arasına hedeflenmiş insersiyon oluşturuldu (Şekil 4.7). 3’ ve 5’ uçlarından hedef bölgeye homoloji gösteren DNA dizilerinin arasına V5 epitopunu kodlayan gen dizisi PZR ile çoğaltıldı ve modifiye agaroz jelden saflaştırılarak pGem- T easy vektöre klonlandı.



Şekil 4.7 PZR aracılıklı mutagenез ile birleştirilen amplikonların agaroz jel görüntüsü. Gerçekleştirilen 5 farklı PCR reaksiyonunda (1-5) “Gene soeing” yöntemi ile amplikonların birleştirme işlemi tamamlandı. ~1584 bç’lik bant %1 agaroz jelde görüntülendi.

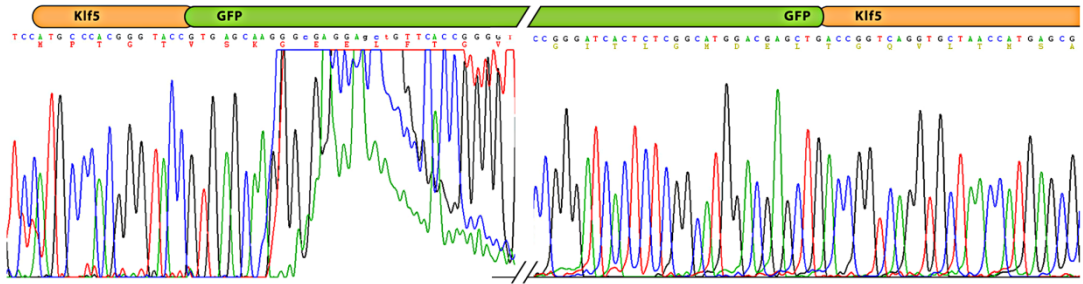
Ligasyon ürünlerinin transformasyonu sonucu elde edilen kolonilerden izole edilen plazmidlerin doğruluğu DNA dizi analizi ile doğrulandı (Şekil 4.8.) . DNA üzerinde oluşturulan yeni okuma çerçevesinin 14 aminoasit uzunluğunda V5 epitop dizisini kodlayacak şekilde yerleştiği doğrulandı.



Şekil 4.8 4. ve 5. aminoasitler arasına yerleştirilen ve V5 epitopunu kodlayan DNA dizisini içeren donor plazmidde aitDNA dizi analizi. DNA dizi analizi ile donor plazmid içerisine 42 bç’lik V5 dizisinin yerleştiği doğrulandı.

DNA dizi analizi aracılığı ile CRISPR/Cas9 vektörünün ve hedeflenen bölgede homolog rekombinasyon ile V5 insersiyonunu gerçekleştirecek olan donör plazmidin hazırlandığı doğrulandıktan sonra bu iki vektörün eş zamanlı olarak C2C12 fare miyoblast hücre hattına verilmesi için gen transferi (elektroporasyon aracılığı ile) çalışmalarına başlandı.

Hedeflenen bölgede V5 epitopunu kodlayan 14 aminoasitlik dizinin insersiyonunu sağlayacak olan donör plazmidin hazırlanmasının yanı sıra, CRISPR/Cas9 sisteminin hedef bölgedeki etkinliğini belirlemek amacıyla hazırlanan ve yeşil floresan proteini kodlayan 330 aminoasitlik diziyi içeren bir diğer donör plazmid *gene soeing* yöntemi ile hazırlandı ve DNA dizi analizi ile doğrulandı (Şekil 4.9)



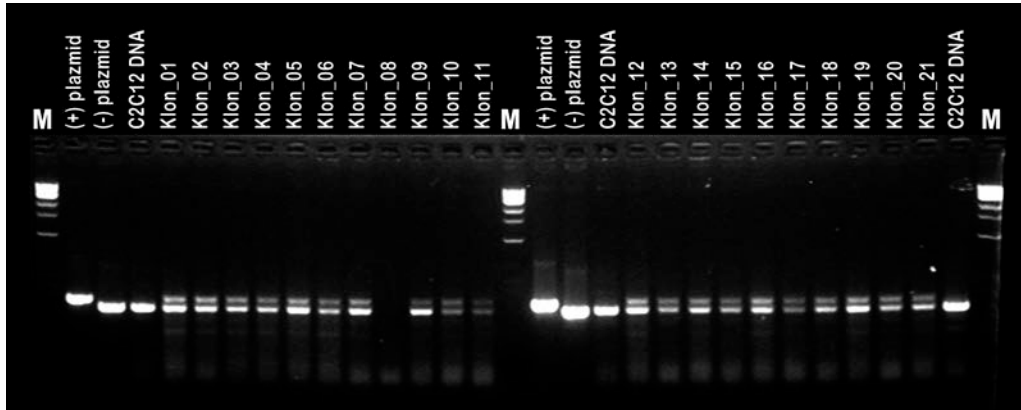
Şekil 4.9 Yeşil floresan proteini kodlayan diziyi taşıyan donör plazmidin DNA dizi analizi ile doğrulanması.

4.2 C2C12 Fare Miyoblast Hücre Hattına Elektroporasyon Aracılığı ile Gen Transferi ve PZR Aracılığı ile Koloni Taranması

CRISPR/Cas9 vektörü ve donör DNA parçasını içeren pGem-T easy vektörleri 1:1 molar oranda elektroporasyon aracılığı ile C2C12 hücrelerine aktarıldı ve CRISPR/Cas9 sisteminin etkin bir şekilde çalışabilmesi için 72 saat beklendi. 72 saatin sonunda limit dilüsyon yöntemi ile hücreler 48 kuyucuklu hücre kültürü kaplarına ekildi. Hücrelerin yaklaşık dört-beş gün büyümesi beklendi. Hücreler, DNA izolasyonu için yeterli yoğunluğa ulaştıktan sonra hücre kültürü kaplarında klonlanan hücrelerin yarısı kuyucuk içerisinde bırakıldı, diğer yarısı DNA izolasyonu için ayrıldı. DNA izolasyonu sonrasında PZR aracılığı ile seçilen koloniler taranarak 42

nükleotidlik insersiyonun gerçekleştiği hücreler % 2'lik agaroz jelde incelendi. Bu aşamada negatif kontrol olarak C2C12 hücrelerinden izole edilen DNA ile yapılan PZR reaksiyonu ürünleri kullanılırken pozitif kontrol olarak donör DNA dizisini içeren plazmid aracılığı ile amplifiye edilen PZR ürünü jele yüklendi. DNA izolasyonu ve PZR aracılığı ile tarama yapılabilmesi için örnek toplanan hücrelerin taraması sonuçlanana kadar kuyucuk içerisinde kalan hücrelerin idamesi sağlandı.

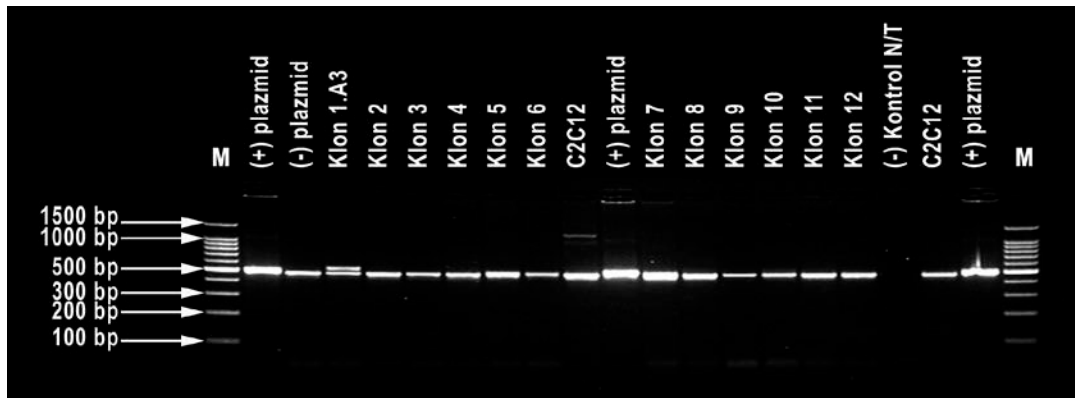
Literatürde yer alan çalışmalar genom düzenleme araçları kullanılarak hedeflenen bölgede yapılan kalıcı değişikliklerin etkinliğinin hücre hattına ve hedeflenen bölgeye göre farklılık gösterdiğini ancak C2C12 hücre hattının genom düzenleme araçları açısından etkinliğinin yüksek olmadığını bildirmektedir(40, 41). Bu bilgilerden hareketle koloni tarama çalışmalarında en düşük %2 etkinlik beklenmekteydi ancak, taranan kolonilerin hemen hepsinin agaroz jelde heterozigot sonuç sergilediği gözlemlendi. Bu durumun elektroporasyon sonrası erken dönem hücreler içinde kalan donör plazmid vektörünün PCR deneylerini kontamine etmesinde kaynaklandığı anlaşıldı (Şekil 4.10.).



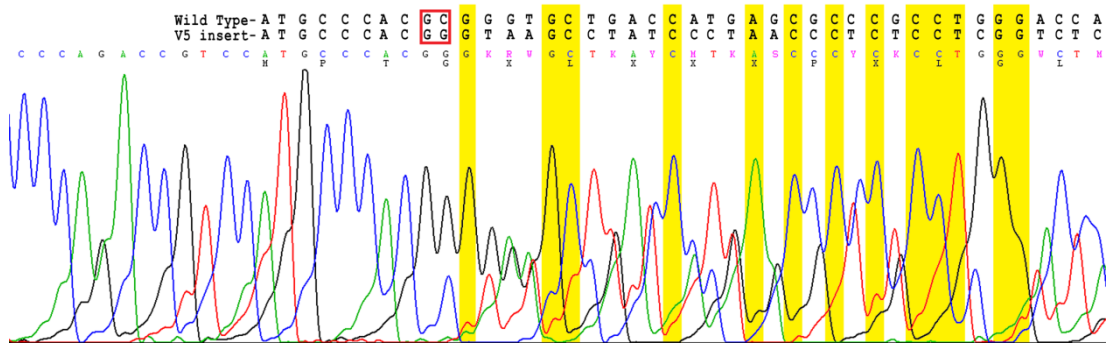
Şekil 4.10 Hücre kolonilerinin PZR aracılığı ile taranması ile elde edilen yalancı-pozitif sonuçlar. PZR aracılığı ile taranan 21 klonun tamamında agaroz jel elektroforezinde heterozigot sonuç görüldü.

Donör plazmidin meydana getirdiği yalancı pozitif yanılsamalardan kurtulmak için yaygın olarak kullanılan bir yöntem olan hücre kolonileri dondurulup tekrar çözülerek pasajlandı ve bu işlem arka arkaya birkaç kez tekrarlandı. PZR aracılığı ile pozitif kolonilerin taranmasına devam edildi. Dondur/çöz aşamalarından

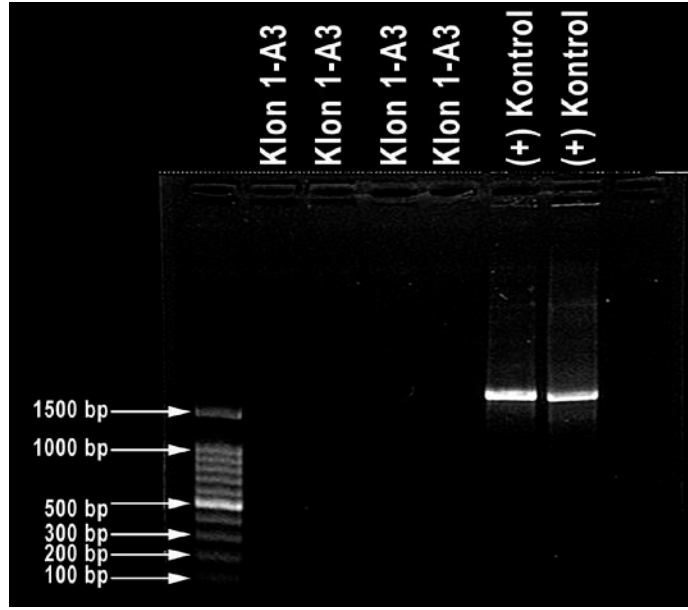
sonra aynı kolonilerin pozitif görüntüsünün kaybolduğu ve doğal C2C12 hücre genomunun PZR ampikonları ile aynı boyda bantlar elde edildiği görüldü. PZR aracılıklı hücre taraması sonucu *Klf5*'in iki alelinden birine V5 insersiyonu gerçekleşen diğer aleline gerçekleşmeyen heterozigot hücre hattının genomunda yer alan 42 nükleotidlik insersiyon agaroz jelde görüntülendi ve V5 epitopunu kodlayan dizinin hedeflenen bölgeye insersiyonu DNA dizi analizi ile doğrulandı (Şekil 4.11, 4.12 ve 4.13).



Şekil 4.11 Hücre kolonilerinin PZR aracılığı ile taranması ve pozitif koloninin (klon 1.A3) %2'lik agaroz jelde görüntüsü.PZR aracılığı ile taranan 12 farklı klon içinde 1.A3 klonu, heterozigot sonuç gösterirken, diğer klonlarda insersiyon gerçekleşmediği saptandı.

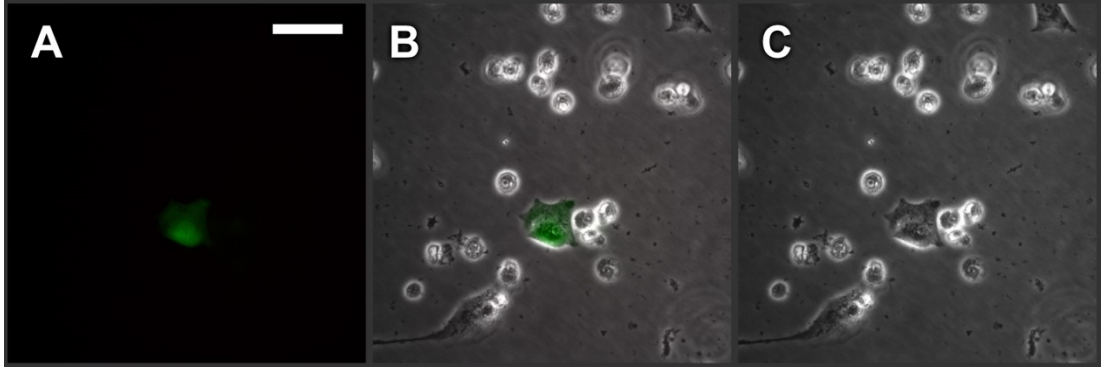


Şekil 4.12 Pozitif hücre klonunda hedeflenen bölgede 4. ve 5.aminoasitler arasında V5 epitopunu kodlayan dizinin heterozigot insersiyonu DNA dizi analizi ile doğrulanması.

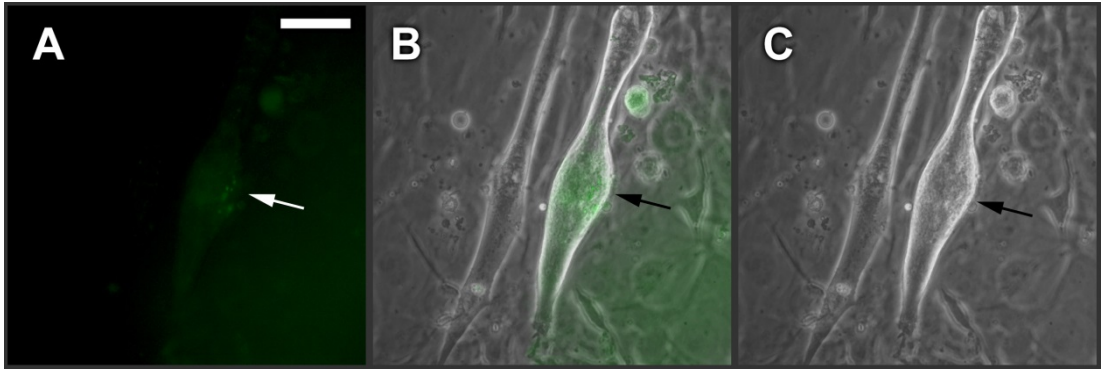


Şekil 4.13 Pozitif saptanan klonda vektör kontaminasyonu bulunmadığını doğrulamak üzere vektöre özgül primerler ile PZR reaksiyonu kurularak herhangi bir amplifikasyon gerçekleşmediği agaroz jel ile gösterildi.

Yukarıda sıralanan çalışma sonuçlarının yanısıra, yeşil florasan protein dizisini içeren donör plasmid de CRISPR/Cas9 vektörü ile 1:1 molar oranda elektroporasyon aracılığı ile C2C12 hücrelerine verildi ve beş gün sonra, yeşil florasan proteini ifade eden hücreler florasan mikroskopta görüntülendi. Bu çalışmada saptanan pozitif hücre sayısı çok az olmakla birlikte, bu hücrelerin tek koloni izolasyon çalışması sonuç vermedi. Bu nedenle, GFP ifade eden hücre klonu saf bir şekilde elde edilemedi. Bu yaklaşım sonucu elde edilen GFP(+) hücreler ve farklılaşmış miyotüp görüntüleri Şekil 4.14 ve 4.15'te verilmiştir.



Şekil 4.14. *Klf5* okuma çerçevesi içine (N-terminali) yerleşim gösteren GFP ifade eden pozitif C2C12 hücresinin görüntüsü. A. Floresan mikroskopi. B. Floresan ve faz kontrast görüntü çakıştırılması C. Faz kontrast görüntüsü. Çubuk = 20 μ m.



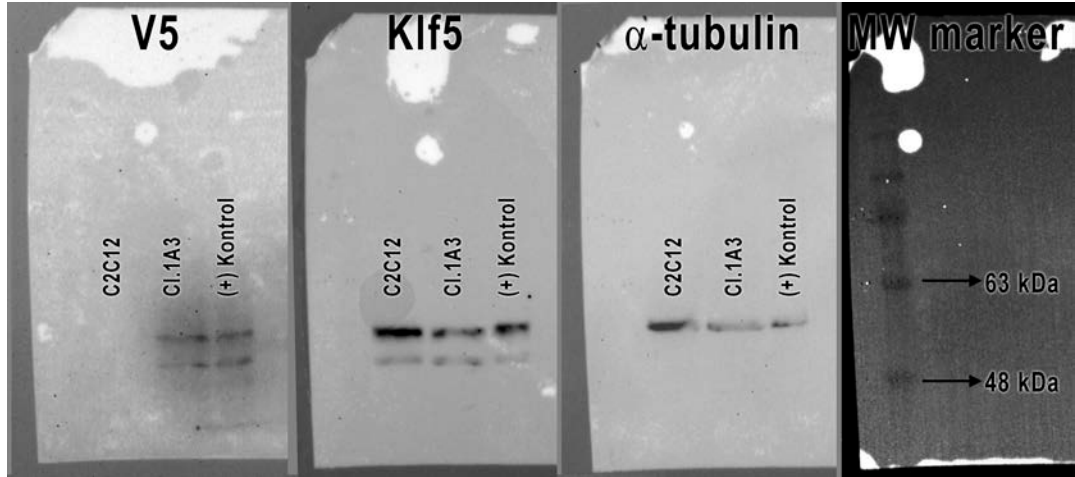
Şekil 4.15 GFP ifade eden miyotüp hücrelerinin floresan mikroskop görüntüsü.

Şekilde görülen iki farklı miyotüpten okla işaretli olanda *Klf5* geni üzerinde hedeflenen bölgeye GFP insersiyonu gerçekleştiği için *Klf5* ifadesi olan miyotüpler yeşil floresan proteini de ifade ederken (sağda yer alan miyotüp), GFP insersiyonu gerçekleşmeyen hücrelerde *Klf5* ifadesi olduğu halde GFP ifade olmamaktadır (solda yer alan miyotüp). A. Floresan mikroskopi. B. Floresan ve faz kontrast görüntü çakıştırılması C. Faz kontrast görüntüsü. Çubuk = 20 μ m.

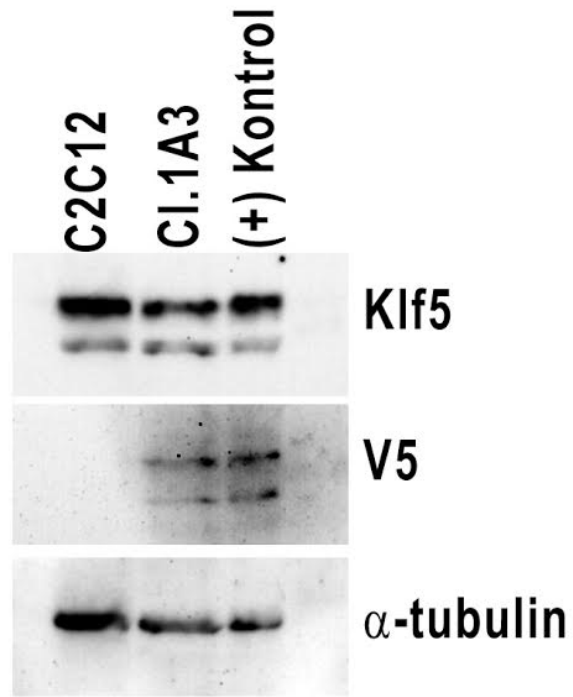
4.3 Pozitif Hücre Klonunun Western Blot ile Doğrulanması

DNA dizi analizi ile hedeflenen bölgede V5 insersiyonunun varlığı gösterildikten sonra amaçlanan insersiyonun protein düzeyinde doğrulanması çalışmaları yapıldı. Bu amaçla, hazırlanan western blot membranının anti-V5 antikoru ve anti-*Klf5* antikoru ile uyumlu ve özdeş western blot sonuçları eldesi

hedeflendi. KLF5 proteinin hücre içinde takibinin yapılması için V5 epitop dizisini tanıyan antikor kullanılarak western blot yapıldı. C2C12 hücre hattı protein örneği negatif kontrol olarak kullanılırken, geçici gen aktarımı ile KLF5+V5 ifadesi sağlanan C2C12 hücre hattı protein örneği pozitif kontrol olarak yüklendi. Bu aşamada membran öncelikle anti-V5 antikoruna ile işaretlendi. Anti-V5 antikorunun, *Klf5* üzerinde hedeflenen bölgede V5 epitopunu kodlayan dizinin yer aldığı hücre hattından (Cl.1A3) izole edilen protein örneğinde bulunan endojen KLF5'i tanıdığı görüldü. Aynı zamanda geçici gen aktarımı ile KLF5+V5 ifadesi sağlanan C2C12 hücre hattından toplanan protein örneği pozitif kontrol olarak kullanıldı ve *Klf5* ifadesi anti-V5 antikoruna ile gösterildi. Ancak, doğal C2C12 hücrelerinden toplanan protein örneğinde bulunan endojen KLF5'in anti-V5 antikoruna ile immunoreaktif sonuç vermediği görüldü. Bu sonucun doğrulanması amacıyla aynı membran strip edildi ve anti-Klf5 antikoruna ile işaretlendi. Anti-V5 antikoruna ile endojen KLF5'in işaretlenemediği doğal C2C12 hücrelerinden toplanan protein örneğinin yüklendiği kuyuda KLF5 proteini ifadesi anti-Klf5 antikoruna ile gösterildi. Aynı şekilde diğer kuyularda bulunan Klf5 proteini ifadesi de anti-Klf5 antikoruna ile gösterildi. Böylelikle protein yüklemesi yapılan bütün kuyularda KLF5 proteini bulunduğu fakat endojen Klf5'in anti-V5 antikoruna aracılığı ile tanınması için KLF5 proteinin ifadesini bozmayacak şekilde 1. ekzon içerisine yerleştirilen V5 epitopunu kodlayan dizinin bulunmasının gerekli ve yeterli olduğu gösterildi. Böylelikle CRISPR/Cas9 sistemi kullanılarak oluşturulan Cl.1A3 hücre klonunun genomunda yer alan V5 epitopu yerleşimi protein düzeyinde doğrulandı (Şekil 4.16 ve 4.17).



Şekil 4.16 Anti-V5 antikorlu ile endojen KLF5 proteininin tanınması. 3 farklı hücre hattından izole edilen protein örnekleri kullanılarak western blot çalışması gerçekleştirilmiştir. Şekilde sırasıyla V5, Klf5 ve α -tübülün antikorları ile elde edilen işaretleme sonuçları, membran görüntüsü ile karşılaştırılarak verilmiştir. Örnekler yükleme sırasıyla; C2C12, PZR taraması sonucunda pozitif sonuç gösteren hücre klonu (Cl.1A3) ve Klf5+V5 ifade eden vektör ile transfekte edilmiş C2C12 hücre hattından izole edilen protein örnekleridir. Cl.1.A3 bulunan kuyuda, anti-V5 antikorlu ile yapılan çalışmada, endojen Klf5 ile uyumlu görüntü elde edilmiştir.



Şekil 4.17 Anti-V5 antikorlu ile endojen Klf5 proteininin tanınması. 3 farklı hücre hattından izole edilen protein örnekleri ile western blot çalışması gerçekleştirilmiştir. Aynı western blot membranı sırasıyla V5, Klf5 ve α -tübülin antikorları ile işaretlenmiştir. Kuyularda yer alan örnekler sırasıyla; C2C12, PZR taraması sonucunda pozitif sonuç gösteren hücre klonu (Cl.1A3) ve Klf5+V5 ifade eden vektör ile transfekte edilmiş C2C12 hücre hattından izole edilen protein örnekleridir.

5 TARTIŞMA

Klf5, ifade olduğu doku ve hücre tipine bağlı olarak farklı işlevler sergileyen bir transkripsiyon faktörüdür. Bölümümüzde yapılan çalışmalar Klf5 transkripsiyon faktörünün, iskelet kası kök hücrelerinin çoğalma ve farklılaşma süreçlerini doğrudan düzenlediğini ortaya koymuştur. Kas hastalıklarının hücresel temellerini araştırmaya yönelik yapılan çalışmalar, Klf5'in kas dokusu gelişimi ve tamirinde rol aldığını göstermiştir (2, 3). Klf5 proteininin kas dokusundaki rolü ve görevlerinin tanımlanması sürecinde bir sonraki basamak işlevsel protein ilişkilerinin belirlenmesidir. KLF5 proteininin etkileşime girdiği aktivatör ve represör nitelikte protein-protein ilişkilerinin tanımlanması, kas farklılaşmasındaki moleküler rolünün aydınlatılabilmesi için gereklidir. Benzer şekilde hücre içi trafiği, ve kas hücresi genomunda transkripsiyonunu düzenlediği hedef genlerin anlaşılabilmesine yönelik işlevsel çalışmaların yürütülmesi gereklidir. Bu amaçla şimdiye dek yapılan çalışmalarda, özgül antikor gerekliliği nedeni ile western blot, kromatin çöktürme, protein çöktürme gibi deneyler sınırlı ölçüde gerçekleştirilebilmiştir. Bu tez kapsamında, bu ihtiyaca cevap verebileceği düşünülen bir yaklaşım olarak genom düzenleme araçları yardımı ile hücre genomunda yer alan ve KLF5 proteinini kodlayan genin uygun bir kısmına proteinin tanınmasını kolaylaştıracak bir epitop dizisi yerleştirilmesi gerçekleştirilmiştir. Bu tez çalışmaları sonucunda elde edilen "engineered" C2C12 hücre hattı aracılığı ile V5 epitop dizisini tanıyan anti-V5 antikorunu kullanarak C2C12 genomu tarafından sentezlenen endojen KLF5'in tanınması sağlanmıştır.

Genom düzenleme tekniği ve kullanımı ile ilgili şimdiye dek yayınlanan çalışmalar, bu tekniğin etkinliğinin kullanılan hücre tipine ve hedeflenen bölgeye bağlı olarak değiştiğini göstermiştir. Mali ve ark. tarafından yapılan çalışmalarda, 19.kromozom üzerinde yer alan *PPP1R12C* geni üzerinde bulunan *AAVS1* lokusu üzerinde farklı bölgeleri hedefleyen gRNA dizilerini içeren iki ayrı CRISPR/Cas9 vektörü tasarlanmış ve bu bölgeler için homolog rekombinasyon aracılığı ile hedeflenmiş mutasyon gerçekleştirme etkinliğinin yaygın değişiklik sergilediği

gösterilmiştir (T1 bölgesi için HR oranı % 3 iken T2 bölgesi için aynı oran % 8'dir). Bu sonuçtan hareketle, tez kapsamında *Klf5*'in 1. ekzonu üzerinde yer alan 4. aminoasidi ve 41.aminoasidi kodlayan bölgeler birbirlerinin alternatifi olarak düşünülerek eş zamanlı olarak her iki bölgeyi de hedefleyen CRISPR/Cas9 vektörleri hazırlandı. Pozitif sonuç elde edilen hücre hattında V5 epitopu insersiyonu için 4.aminoasidi hedefleyen vektör kullanıldı. Yine aynı grubun yaptığı çalışmalarda üç farklı hücre hattı, 293T hücre hattı, insan kronik miyeloid lösemi K562 hücre hattı ve insan indüklenmiş pluripotent kök hücrelerinde, iPS, kullanılarak AAVS1 lokusu üzerinde hedeflenen bölgelerde (T1 ve T2) yeni nesil sekanslama tekniği ile CRISPR/Cas9 etkinliği belirlenmiştir. T1 ve T2 bölgelerindeki NHEJ etkinliği 293T hücrelerinde sırasıyla %10 ve %25, K562 hücrelerinde %13 ve %38, iPS hücrelerinde %2 ve %4 olarak bulunmuştur (16). Bu veriler CRISPR/Cas9 etkinliğinin hücre hattına ve hedeflenen bölgeye bağlı olarak değiştiğini ve kök hücrelerde bu etkinliğinin diğer hücrelere göre daha düşük olduğunu göstermiştir. Ayrıca literatürde yer alan diğer çalışmalar da CRISPR/Cas9 sisteminin insan ve fare embriyonik kök hücrelerinde ve insan pluripotent kök hücrelerinde etkin bir şekilde çalışmakla birlikte uygulanmanın çoklu tekrarlar gerektirdiği ve etkinliğinin diğer hücre hatlarına göre çok daha düşük olduğunu göstermektedir (42-44). Embriyonik kök hücreler, farklılaşmış hücre hatlarına oranla çok daha yüksek bölünme kapasitesine sahip oldukları halde, spontan mutasyon sıklıkları 1000 kat daha düşüktür. Farklılaşmış yapıda olan somatik hücrelerde meydana gelen mutasyonlar bu hücrelerin ve etkileşimde oldukları diğer bazı hücrelerin etkilenebileceği somatik hastalıkları oluşturma riski taşımakla birlikte embriyonik kök hücrelerde meydana gelen mutasyonlar, canlıda birçok farklı hücre çeşidinin etkileneceği ve hatta sonraki nesillere de taşınma olasılığı bulunan katastrofik değişimlerin meydana gelmesine neden olmaktadır. Bu nedenle, kök hücreler özelleşmiş mekanizmalar aracılığı ile genom bütünlüklerini koruyacak kararlı bir yapıya ve savunma mekanizmalarına sahiptir (45, 46). Sıralanan bu gerekçelerden dolayı, kök hücrelerde genom düzenleme araçları kullanılarak hedeflenmiş mutasyon oluşturma etkinliği farklılaşmış hücrelere oranla çok daha düşüktür. Diğer kök hücre modellerine benzer şekilde, C2C12 fare miyoblast hücre

hattı genomuna uygulanan genom düzenleme etkinliğinin de düşük olduğu gösterilmiştir.

Bu tez çalışmasında kullanılan C2C12 hücreleri çoğalma aşamasında somatik kök hücre özelliği göstermekte, farklılaşma ile birlikte çok çekirdekli miyotüplere dönüşmektedir. Bu hücre hattı kullanılarak, çinko parmak nükleaz(ZFN) tekniği ile *Rosa26* lokusunda oluşturulan hedeflenmiş mutasyon oranı %6,5 olarak belirlenmiştir. C2C12 hücre genomunda *prion* geninin CRISPR/Cas9 aracılığı ile (NHEJ) *knock-out* etkinliği ise yaklaşık %2 olarak gösterilmiştir (40, 41). Bu sonuçlar, C2C12 hücre hattının genom düzenleme araçları kullanımı açısından teknik güçlükleri barındıran bir model olduğunu göstermektedir. Literatürde yer alan bu verilere benzer şekilde, bu tez çalışmasında da C2C12 hücre hattında CRISPR/Cas9 kullanımı ile *Klf5* genine hedefli V5 insersiyon etkinliği PZR aracılıklı taramalar göz önüne alındığında ~%5 olarak gözlenmiştir. Diğer bir çalışmada, fare embriyonik kök hücre genomunda *Klf5* geninin (gen üzerinde 2.ekzon hedeflenmiştir) Çinko Parmak Nükleazlar (ZFN) aracılığı ile etkili bir şekilde *knock-out* edildiği gösterilmiş olmakla birlikte bu yayında, etkinlik yüzdesi hakkında bilgi yer almamaktadır (47).

Genom düzenleme araçlarının etkinliği kullanılan hücre hattına veya model organizmaya göre, ayrıca hedeflenen bölgeye göre farklılık göstermekle birlikte literatürde yer alan çalışmalar farklı yaklaşımlar ile etkinliğin arttırılabileceğini göstermiştir. Örneğin, genom düzenleme araçları kullanılarak homolog rekombinasyon aracılığı ile istenilen bölgede yüksek etkinlikte hedeflenmiş insersiyon oluşturmak veya gen düzeltilmesi sağlamak için kullanılan alternatif yaklaşımlardan biri de, çift sarmal kırığın tamir sürecinde non-homolog uç birleştirme mekanizmasını baskılayarak homolog rekombinasyon etkinliğini arttırmaktır. Maruyama ve ark. tarafından yapılan çalışmada, hücrenin tamir sürecinde homolog rekombinasyon mekanizmasını tercih etmesini sağlamak amacıyla, NHEJ mekanizmasının işlevsel olabilmesi için gerekli olan temel enzimlerden birisi olan DNA ligase IV'ün Scr7 inhibitörü aracılığı ile baskılanması

sağlanmıştır. Böylelikle CRISPR/Cas9 sistemi ile hedeflenen bölgede çift sarmal kırık oluşturulduktan sonra tamir sürecinde homolog rekombinasyon etkinliği artırılmıştır. Bu çalışmada memeli hücre hattında ve farede dört farklı gen dizisi hedeflenerek HR etkinliğinin 19 kat arttığı gösterilmiştir (48). Bu yaklaşım genom düzenleme araçları kullanım etkinliği düşük olan hücre ve hayvan modellerinde ve hedef bölgelerde, istenilen insersiyonların yüksek etkinlikte oluşturulması için kullanabilecek bir alternatiftir. Ayrıca, Mali ve ark. tarafından yapılan çalışmalar *nickase* aktivitesine sahip mutant Cas9 nükleaz (Cas9D10A *nickase*) aracılığı ile hedeflenen bölgede oluşturulan tek zincir kırığının tamir sürecinde homolog rekombinasyon etkinliğinin aynı kalmakla birlikte non-homolog uç birleştirme etkinliğinin azaldığını göstermiştir(16).Ancak, diğer bir çalışma, Cas9D10A *nickase* aracılığı ile iki farklı gRNA kullanılarak çift sarmal kırık oluşturulması sonrasında gerçekleşen tamir sürecinde genomdaki *off-target* etkinin azaldığını ve hedeflenmiş mutasyon oluşturma etkinliğinin arttığını göstermiştir(49).Aynı grubun yaptığı çalışmalarda, genom düzenleme araçlarının etkinliğinin belirlenmesinde hedeflenen bölgeye yerleştirilecek olan *insert* boyunun önemli olduğu gösterilmiştir. *Insert* uzunluğu arttıkça hedeflenmiş insersiyon etkinliği azalmaktadır. Örneğin,*Mef2c* lokusunda hedeflenen bölgeye gerçekleştirilecek olan insersiyon uzunluğu 99 baz çiftinden 720 baz çiftine çıkarıldığında etkinlik 9 kat azalmaktadır (% 36.3'dan % 4.3'e düştüğü görülmüştür). Bu durum GFP içeren donor plazmid ile yapılan denemelerde gözlenen düşük etkinliği açıklamaktadır. Diğer yönden, homoloji kollarının uzunluğunun artması homolog rekombinasyon etkinliğini de arttırmaktadır. Oct4 lokusunda istenilen bölgede 720 baz çiftlik insersiyonun oluşturulması için tasarlanan homoloji kollarının uzunluğunun 50 baz çiftinden 200 baz çiftine çıkarılması ile homolog rekombinasyon etkinliğinin 8 kat arttığı gözlemlenmiştir (%0.7'den %5.8'e çıkmıştır). Bu çalışmalar göz önüne alındığında, uygulanacak alternatif yaklaşımlar ile hedeflenen bölgede gerçekleşecek olan CRISPR/Cas9 etkinliğini artırmak mümkündür.

Klf5 geni üzerinde 1.ekzon üzerinde hedeflenen bölgeye bildirici bir etiket takılarak endojen KLF5'in tanınmasını kolaylaştırmak amacıyla, V5 epitop dizisine ek

olarak aynı yaklaşımla 4.aminoasidi kodlayan bölgeye yeşil floresan protein (*GFP*) yerleştirilebilmesi için alternatif bir donör plazmid hazırlanmıştır. Bu yaklaşımın amacı, PZR ve DNA dizi analizi ile taramadan,pozitif kolonilerin, doğrudan floresan mikroskop gözlemlenebilmesi ve seçilebilmesidir. Bu yaklaşımın bir diğer amacı da uygulanan CRISPR/Cas9 yaklaşımı ve araçlarının teknik yönden etkinliğinin kontrol edilmesidir. Bu yaklaşım, hücre tarama çalışmalarını kolaylaştırmak ve alternatif bir hücre hattı elde etmek üzere uygulanmıştır.Bu amaçla floresan mikroskopta yapılan çalışmalarda, *GFP* ifadesi gösteren C2C12 hücreleri ve farklılaşmış, *GFP* (+) miyotüpler gözlenmiştir.Ancak, bu hücreler limit dilüsyon yöntemi ile tek tek izole edilemediği için saf bir hücre klonu elde edilememiştir. *GFP* ifadesi gösteren C2C12 hücrelerinin akım sitometrisi yöntemi ile ayrıştırılması için çalışmalar devam etmektedir. Yukarıda da açıklandığı üzere bu yaklaşım, çalışmada kullanılan CRISPR/Cas9 vektörlerinin etkinliğini ortaya koyma bakımından fayda sağlamıştır. Diğer yönden, endojen KLF5 proteininin N-terminaline yerleşim göstermesi beklenen 330 aa büyüklüğünde, hidrofilik ve globüler *GFP* proteininin KLF5 işlevine ve hücre içi trafiğine olası olumsuz etkileri de göz önüne alınmıştır.

Bu tez çalışmasında oluşturulan V5 insersiyonunu genin işlevsel olmadığı bilinen “N” terminalinde yer almaktadır. Ancak, bu insersiyonun proteinin işlevselliği üzerine olumsuz etkisinin bulunmadığının doğrulanması gereklidir. KLF5 işlevinin ortadan kalkması, miyoblast hücre döngüsünü hızlandırmakta ve farklılaşma süreci de baskılanmaktadır (2, 3). Bu yönden, elde edilen hücre hattının farklılaşma çalışmaları ile işlevselliğin bozulmadığı doğrulanabilir. Benzer şekilde, KLF5’in modifikasyonlarının da etkilenmediği yapılması planlanan işlevsel protein çalışmaları sonucunda ortaya konabilecektir.

Hedefe özgül tasarlanmış nükleazlar aracılığı ile hedeflenen bölgede istenilen mutasyonun oluşturulmasına imkan sağlayan genom düzenleme araçları, temel araştırmalar, biyoteknoloji ve gen tedavisi gibi farklı alanlarda etkin bir şekilde kullanılmakla birlikte genom üzerinde hedeflenmeyen bölgelerde oluşturabilecek *off-target* etki, güvenlik endişelerine neden olmaktadır. Genom

düzenleme araçlarını oluşturan hedefe özgül nükleazlar istenilen bölgede etkin bir şekilde hedeflenen değişikliği oluşturmakla birlikte hedef dışı bağlanmalar ile genom üzerinde meydana getireceği çift sarmal kırıklar aracılığıyla hedeflenmeyen değişikliklere neden olabilmektedir. Özgül olmayan bu aktivitenin yüksek olması nedeni ile tamir mekanizmasının yetersiz kaldığı durumlarda oluşan sitotoksiste, apoptoz ile sonuçlanmaktadır (50). Literatürde yer alan çalışmalar, geliştirilen genom düzenleme araçları içerisinde en etkin çalışan CRISPR/Cas9 sisteminin hedef bölgeye özgüllüğünün ZFN ve TALEN teknolojilerine göre daha yüksek olduğu ve *off-target* etkisinin daha düşük olduğunu göstermiştir(51). Diğer yünden, CRISPR/Cas9 sisteminin *off-target* etkisinin düşük olmakla birlikte göz ardı edilemeyecek kadar yüksek olduğunu gösteren raporlar da yer almaktadır. Lander ve ark. tarafından insan hücreleri üzerinde yapılan çalışma genom üzerinde hedeflenen bölgeye bağlı olarak Cas9 nükleazın *off-target* bağlanma etkinliğinin özgül bağlanmasından daha yüksek olabileceğini göstermiştir(52). Yukarıda sıralanan bilgiler göz önüne alındığında genom düzenleme araçları hastalıkların tedavisinde ve gen düzeltmesi çalışmalarında umut vadetmekle birlikte, insanda ve özellikle embriyo üzerinde yapılacak denemelerden uzaktır.

6 SONUÇ VE ÖNERİLER

- Bu tez kapsamında, C2C12 hücre hattında *Klf5* gen ürününün tanınmasını ve hücre içi takibini kolaylaştırmak amacıyla genom düzenleme araçlarından yararlanılarak Klf5 proteinin N-terminalini kodlayan bölgeye (4.aminoasit ile 5.aminoasit arasına) V5 epitop dizisini kodlayan 14 aminoaside karşılık gelen dizi yerleştirilmiştir.
- V5 epitopunun hedeflenmiş insersiyonu DNA dizi analizi ile doğrulanmış ve endojen Klf5'in işlevselliğini etkilemeyecek bölgesine yerleştirilen bu epitop aracılığı ile endojen Klf5'i tanıdığı gösterilmiştir.
- Klf5'in kas kök hücreleri ve kas dokusundaki protein etkileşimlerinin keşfi ve hedef genlerin belirlenmesi ile ilgili işlevsel çalışmaların C2C12 modelinde devam etmesini engelleyen sınırlamaları ortadan kaldırmaya yönelik bir genom bilim aracı geliştirilmiştir.
- Bu çalışma sonucunda CRISPR/Cas sisteminin hedeflenen bölgede istenilen insersiyonunun gerçekleştirilebilmesi için kullanılacak bir araç olduğu görülmüştür. Klf5 proteini işlevi ile ilgili araştırmalara yönelik olarak yeni bir genin protein ürününü çalışmaya yönelik western blot, immün çökürme, ve kromatin immün çöktürme (ChIP) gibi işlevsel araştırmalar ve deneylerin yapılabilmesi için genom düzenleme araçları kullanılarak ilgili gen dizisinin uygun bir bölgesine bir etiket dizisi ilavesi ile endojen proteinin tanınabileceği gösterilmiştir.
- Bu sonuçlar doğrultusunda bu hücre hattı kullanılarak öncelikli olarak önerilen çalışmalar şunlardır:
- Elde edilen hücre hattının farklılaşma çalışmaları ile V5 insersiyonu sonucunda KLF5 işlevselliğinin bozulmadığının doğrulanması gerekmektedir.
- İmmünçöktürme yöntemi kullanımı ile miyoblastlarda, kas farklılaşma sürecinde KLF5 ile etkileşime giren proteinlerin ve modifikasyonların tanımlanması.

- Kromatin immünoçöktürme yöntemi ve ardışık yüksek ölçekli dizi analizi kullanılarak miyoblastlarda farklılaşma sürecinde KLF5'in etkileştiği genom hedeflerinin belirlenmesi.

KAYNAKLAR

- 1.Dong, J.T.,Chen, C.(2009) Essential role of KLF5 transcription factor in cell proliferation and differentiation and its implications for human diseases. *Cell Mol Life Sci*, 66(16), 2691-2706.
- 2.Akpulat, U.(2014). Fare miyoblast hücre hattında KLF5 geninin farklılaşma sürecine etkilerinin araştırılması.PhD, Hacettepe Üniversitesi, Ankara.
- 3.Yıldız, Y.(2010). Kas dejenerasyonunda ve farklılaşmasında Klf5 geninin rolünün araştırılması. Hacettepe Üniversitesi, Ankara.
- 4.Schadt, E.E., Lamb, J., Yang, X., Zhu, J., Edwards, S., Guhathakurta, D. ve diğerleri.(2005) An integrative genomics approach to infer causal associations between gene expression and disease. *Nat Genet*, 37(7), 710-717.
- 5.Deisseroth, A., Velez, R.,Nienhuis, A.W.(1976) Hemoglobin synthesis in somatic cell hybrids: independent segregation of the human alpha- and beta-globin genes. *Science*, 191(4233), 1262-1264.
- 6.Justice, M.J., Noveroske, J.K., Weber, J.S., Zheng, B.,Bradley, A.(1999) Mouse ENU mutagenesis. *Hum Mol Genet*, 8(10), 1955-1963.
- 7.Aitman, T.J., Boone, C., Churchill, G.A., Hengartner, M.O., Mackay, T.F.,Stemple, D.L.(2011) The future of model organisms in human disease research. *Nat Rev Genet*, 12(8), 575-582.
- 8.Lieschke, G.J.,Currie, P.D.(2007) Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat Rev Genet*, 8(5), 353-367.
- 9.Hardy, J.(1988) Mouse models of human neurogenetic disorders. *Trends Neurosci*, 11(3), 89-90.
- 10.Rytlewski, J.A.,Beronja, S.(2015) RNAi in the mouse: rapid and affordable gene function studies in a vertebrate system. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, 4(1), 45-57.
- 11.Garcia, P.B.,Attardi, L.D.(2014) Illuminating p53 function in cancer with genetically engineered mouse models. *Semin Cell Dev Biol*, 27, 74-85.
- 12.Winzeler, E.A., Shoemaker, D.D., Astromoff, A., Liang, H., Anderson, K., Andre, B. ve diğerleri.(1999) Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science*, 285(5429), 901-906.
- 13.Cai, M.,Yang, Y.(2014) Targeted genome editing tools for disease modeling and gene therapy. *Curr Gene Ther*, 14(1), 2-9.
- 14.Carroll, D.(2011) Genome engineering with zinc-finger nucleases. *Genetics*, 188(4), 773-782.

15. Cong, L., Ran, F.A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N. ve diğerleri.(2013) Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 339(6121), 819-823.
16. Mali, P., Yang, L., Esvelt, K.M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J.E. ve diğerleri.(2013) RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 339(6121), 823-826.
17. Pearson, R., Fleetwood, J., Eaton, S., Crossley, M., Bao, S.(2008) Kruppel-like transcription factors: a functional family. *Int J Biochem Cell Biol*, 40(10), 1996-2001.
18. Conkright, M.D., Wani, M.A., Anderson, K.P., Lingrel, J.B.(1999) A gene encoding an intestinal-enriched member of the Kruppel-like factor family expressed in intestinal epithelial cells. *Nucleic Acids Res*, 27(5), 1263-1270.
19. Chiambaretta, F., De Graeve, F., Turet, G., Marceau, G., Gain, P., Dastugue, B. ve diğerleri.(2004) Cell and tissue specific expression of human Kruppel-like transcription factors in human ocular surface. *Mol Vis*, 10, 901-909.
20. Yanagi, M., Hashimoto, T., Kitamura, N., Fukutake, M., Komure, O., Nishiguchi, N. ve diğerleri.(2008) Expression of Kruppel-like factor 5 gene in human brain and association of the gene with the susceptibility to schizophrenia. *Schizophr Res*, 100(1-3), 291-301.
21. Yang, X.O., Doty, R.T., Hicks, J.S., Willerford, D.M.(2003) Regulation of T-cell receptor D beta 1 promoter by KLF5 through reiterated GC-rich motifs. *Blood*, 101(11), 4492-4499.
22. Watanabe, N., Kurabayashi, M., Shimomura, Y., Kawai-Kowase, K., Hoshino, Y., Manabe, I. ve diğerleri.(1999) BTEB2, a Kruppel-like transcription factor, regulates expression of the SMemb/Nonmuscle myosin heavy chain B (SMemb/NMHC-B) gene. *Circ Res*, 85(2), 182-191.
23. Kaczynski, J., Cook, T., Urrutia, R.(2003) Sp1- and Kruppel-like transcription factors. *Genome Biol*, 4(2), 206.
24. Du, J.X., Yun, C.C., Bialkowska, A., Yang, V.W.(2007) Protein inhibitor of activated STAT1 interacts with and up-regulates activities of the proliferative transcription factor Kruppel-like factor 5. *J Biol Chem*, 282(7), 4782-4793.
25. Buckingham, M., Bajard, L., Daubas, P., Esner, M., Lagha, M., Relaix, F. ve diğerleri.(2006) Myogenic progenitor cells in the mouse embryo are marked by the expression of Pax3/7 genes that regulate their survival and myogenic potential. *Anat Embryol (Berl)*, 211 Suppl 1, 51-56.
26. Zammit, P.S., Partridge, T.A., Yablonka-Reuveni, Z.(2006) The skeletal muscle satellite cell: the stem cell that came in from the cold. *J Histochem Cytochem*, 54(11), 1177-1191.

27. Yang, H., Wang, H., Shivalila, C.S., Cheng, A.W., Shi, L., Jaenisch, R. (2013) One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*, 154(6), 1370-1379.
28. Du, J.X., Bialkowska, A.B., McConnell, B.B., Yang, V.W. (2008) SUMOylation regulates nuclear localization of Kruppel-like factor 5. *J Biol Chem*, 283(46), 31991-32002.
29. Gaj, T., Gersbach, C.A., Barbas, C.F., 3rd. (2013) ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol*, 31(7), 397-405.
30. Akçay, D., Kocaefe, Ç. (2014) The Past, Present and Future of Gene Correction Therapy. *Acta Medica*, 3, 51-64.
31. Pfander, C., Anar, B., Schwach, F., Otto, T.D., Brochet, M., Volkmann, K. ve diğerleri. (2011) A scalable pipeline for highly effective genetic modification of a malaria parasite. *Nat Methods*, 8(12), 1078-1082.
32. Sung, P., Klein, H. (2006) Mechanism of homologous recombination: mediators and helicases take on regulatory functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7(10), 739-750.
33. San Filippo, J., Sung, P., Klein, H. (2008) Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annu Rev Biochem*, 77, 229-257.
34. Lieber, M.R. (2010) The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annu Rev Biochem*, 79, 181-211.
35. Wiedenheft, B., Sternberg, S.H., Doudna, J.A. (2012) RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature*, 482(7385), 331-338.
36. Deltcheva, E., Chylinski, K., Sharma, C.M., Gonzales, K., Chao, Y., Pirzada, Z.A. ve diğerleri. (2011) CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, 471(7340), 602-607.
37. Wiedenheft, B., Lander, G.C., Zhou, K., Jore, M.M., Brouns, S.J., van der Oost, J. ve diğerleri. (2011) Structures of the RNA-guided surveillance complex from a bacterial immune system. *Nature*, 477(7365), 486-489.
38. Yaffe, D., Saxel, O. (1977) Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature*, 270(5639), 725-727.
39. Burattini, S., Ferri, P., Battistelli, M., Curci, R., Luchetti, F., Falcieri, E. (2004) C2C12 murine myoblasts as a model of skeletal muscle development: morpho-functional characterization. *Eur J Histochem*, 48(3), 223-233.
40. Mehrabian, M., Brethour, D., MacIsaac, S., Kim, J.K., Gunawardana, C.G., Wang, H. ve diğerleri. (2014) CRISPR-Cas9-based knockout of the prion protein and its effect on the proteome. *PLoS One*, 9(12), e114594.

41. Perez-Pinera, P., Ousterout, D.G., Brown, M.T., Gersbach, C.A. (2012) Gene targeting to the ROSA26 locus directed by engineered zinc finger nucleases. *Nucleic Acids Res*, 40(8), 3741-3752.
42. Zwaka, T.P., Thomson, J.A. (2003) Homologous recombination in human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*, 21(3), 319-321.
43. Gonzalez, F., Zhu, Z., Shi, Z.D., Lelli, K., Verma, N., Li, Q.V. ve diğerleri. (2014) An iCRISPR platform for rapid, multiplexable, and inducible genome editing in human pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 15(2), 215-226.
44. Hockemeyer, D., Jaenisch, R. (2010) Gene targeting in human pluripotent cells. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 75, 201-209.
45. Tichy, E.D. (2011) Mechanisms maintaining genomic integrity in embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *Exp Biol Med (Maywood)*, 236(9), 987-996.
46. Tichy, E.D., Stambrook, P.J. (2008) DNA repair in murine embryonic stem cells and differentiated cells. *Exp Cell Res*, 314(9), 1929-1936.
47. Long, X., Singla, D.K. (2013) Inactivation of Klf5 by zinc finger nuclease downregulates expression of pluripotent genes and attenuates colony formation in embryonic stem cells. *Mol Cell Biochem*, 382(1-2), 113-119.
48. Maruyama, T., Dougan, S.K., Truttmann, M.C., Bilate, A.M., Ingram, J.R., Ploegh, H.L. (2015) Increasing the efficiency of precise genome editing with CRISPR-Cas9 by inhibition of nonhomologous end joining. *Nat Biotechnol*, 33(5), 538-542.
49. Li, K., Wang, G., Andersen, T., Zhou, P., Pu, W.T. (2014) Optimization of genome engineering approaches with the CRISPR/Cas9 system. *PLoS One*, 9(8), e105779.
50. Hendel, A., Fine, E.J., Bao, G., Porteus, M.H. (2015) Quantifying on- and off-target genome editing. *Trends Biotechnol*, 33(2), 132-140.
51. Veres, A., Gosis, B.S., Ding, Q., Collins, R., Ragavendran, A., Brand, H. ve diğerleri. (2014) Low incidence of off-target mutations in individual CRISPR-Cas9 and TALEN targeted human stem cell clones detected by whole-genome sequencing. *Cell Stem Cell*, 15(1), 27-30.
52. Wang, T., Wei, J.J., Sabatini, D.M., Lander, E.S. (2014) Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system. *Science*, 343(6166), 80-84.