

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**



**CRISPR/dCas9 İLE PANKREATİK TRANSKRİPSİYON FAKTÖRÜ *Pdx1*
GENİNİN AKTİVASYON BÖLGELERİNİN BELİRLENMESİ**

Gamze BADAĞUL

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZİRAN 2019

ANTALYA

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**



**CRISPR/dCas9 İLE PANKREATİK TRANSKRİPSİYON FAKTÖRÜ *Pdx1*
GENİNİN AKTİVASYON BÖLGELERİNİN BELİRLENMESİ**

Gamze BADAĞUL

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZİRAN 2019

ANTALYA

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**CRISPR/dCas9 İLE PANKREATİK TRANSKRİPSİYON FAKTÖRÜ *Pdx1*
GENİNİN AKTİVASYON BÖLGELERİNİN BELİRLENMESİ**

**Gamze BADAĞUL
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZ**

Bu tez Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından FYL-2017-2692 nolu proje ile desteklenmiştir.

HAZİRAN 2019

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**CRISPR/dCas9 İLE PANKREATİK TRANSKRİPSİYON FAKTÖRÜ *Pdx1* GENİNİN
AKTİVASYON BÖLGELERİNİN BELİRLENMESİ**

Gamze BADAĞUL
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez 21/06/2019 tarihinde jüri tarafından oybirliği ile kabul edilmiştir.

JÜRİ: Dr. Öğr. Üyesi Ersin AKINCI (Danışman)

Doç. Dr. Hasan MEYDAN

Dr. Öğr. Üyesi Erdal EROĞLU

ÖZET

CRISPR/dCas9 İLE PANKREATİK TRANSKRİPSİYON FAKTÖRÜ *Pdx1* GENİNİN AKTİVASYON BÖLGELERİNİN BELİRLENMESİ

Gamze BADAĞUL

Yüksek Lisans Tezi, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Ersin AKINCI

Haziran 2019; 49 sayfa

Diabetes mellitus (DM), insülin hormonunun yokluğundan ya da bu hormonun etkisindeki yetersizlik sonucu oluşan metabolik bir hastalıktır. Pankreasın oluşması ve beta hücresinin farklılaşması sırasında rol oynayan birçok gen olduğu bilinmektedir. Bu genler arasında *Pdx1* geni; pankreasın oluşmasında, beta hücre farklılaşmasında ve bu hücrelerin hayatta kalmasında kritik bir role sahiptir. Bu genin düzenlenmesi için pek çok yöntem kullanılmaktadır. Bunların arasında son dönemlerde en çok kullanılan yöntem; bakterilerin immün yanıtta kullandıkları CRISPR/Cas9 sistemidir. Bu sistem, hedef gende istenilen düzenlemelerin yapılmasını sağlar.

CRISPR/Cas9 sisteminde; Cas9 proteinindeki mutasyonla elde edilen CRISPR/dCas9 sistem gende düzenleme yapılmasına olanak tanır. Bu sistem; hedef gende mutasyon yapmadan, genin ekspresyonunun artmasını (aktivasyon) ya da azalmasını (represyon) sağlar. Ancak bu sistemin çalışabilmesi için dCas9 proteinine bir aktivatör domain (genin ekspresyonunun artması için) ya da baskılayıcı bir domainin bağlanması gerekir. CRISPR/dCas9-VPR sistemi memelilerde istenilen genin aktivasyonunda kullanılan sistemdir. Yaptığımız bu çalışmadaki amacımız; CRISPR/dCas9-VPR sistemi kullanarak *Pdx1* geninin aktivasyonunu arttırmayı sağlamaktır. Sonuç olarak; CRISPR/dCas9-VPR sistemi kullanılarak *Pdx1* geninin proksimal promotor bölgesinde bu geninin aktivasyonunu sağlayan önemli bölgeler belirlendi.

ANAHTAR KELİMELELER: Beta Hücre Programlaması CRISPR/dCas9, Diyabet, İnsülin, *Pdx1*, Transaktivatör Domain, VPR

JÜRİ: Dr. Öğr. Üyesi Ersin AKINCI

Doç. Dr. Hasan MEYDAN

Dr. Öğr. Üyesi Erdal EROĞLU

ABSTRACT

DETERMINATION OF ACTIVATION REGIONS OF PANCREATIC TRANSCRIPTION FACTOR *Pdx1* GENE WITH CRISPR/dCAS9

Gamze BADAĞUL

MSc Thesis in The Department of Agricultural Biotechnology

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Ersin AKINCI

June 2019; 49 pages

Diabetes mellitus (DM) is a metabolic disorder caused by the absence of insulin hormone or by the inability to influence this hormone. It is known that many genes play a role in the formation of pancreas and differentiation of beta cells. These cells have the potential to differentiate into other types of cells, such as nerve cells, nerve cells, and blood cells. Many methods are used to regulate this gene. Among these, the most common method in recent times is the CRISPR/Cas9 system used by bacteria in the immune response. This system ensures that the desired arrangements are made in the target gene.

In the CRISPR/Cas9 system, the CRISPR/dCas9 system, obtained by mutation in the Cas9 protein, allows the regulation of genes. This system allows the expression of the gene to increase (activation) or decrease (suppression) without mutating the target gene. In order for this system to work, however, it must be connected to the dCas9 protein to an activator domain (to increase gene expression) or to a suppressor domain. CRISPR/dCas9-VPR system is the system used in the activation of the desired gene in mammals. Our purpose in this study; Using the CRISPR/dCas9-VPR system, it was to increase the activation of the *Pdx1* gene. As a result, significant areas of activation of the *Pdx1* gene in the proximal promoter region were determined using CRISPR/dCas9-VPR system.

KEYWORDS: Beta Cell Programming, Diabetes, Insulin, *Pdx1*, Transactivator Domain, CRISPR/dCas9, VPR

COMMITTEE: Asst. Prof. Dr. Ersin AKINCI

Assoc. Dr. Hasan MEYDAN

Asst. Prof. Dr. Erdal EROĞLU

ÖNSÖZ

Yaptığım tez çalışması boyunca değerli bilgilerini her daim benimle paylaşan, kendisine danıştığım bana vakit ayırıp; sabırla ve özveri ile yararlı olabilmek için elinden gelen herşeyi sunan; bir sorunla karşılaştığım zaman yanına çekinmeden gidebildiğim, güler yüzünü ve samimiyetini benden hiçbir zaman esirgemeyen ve gelecekteki akademik yaşamımda da bana verdiği değerli bilgilerden yararlanacağımı düşündüğüm kıymetli ve danışman hoca statüsünü tam anlamıyla yerine getiren Dr. Öğr. Üyesi Ersin AKINCI'ya teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmam boyunca sürekli yanımda olup, yeri geldiğinde fikirleriyle çözüm yollarına ulaşmamda yol gösteren ve gelecekteki yaşamlarında başarılı basamaklarında çok hızlı ilerleyeceklerine inandığım değerli arkadaşlarım Mehmet YILDIZ, Pelin ÜNAL, Muhammet Ali KARA, Gamze KOÇAK, Adem KABA ve Fatma AKÇAKALE'ye de teşekkür ederim. Staj yaptığı süre boyunca yaptığım çalışmalarda bana yardımcı olmayı hiçbir zaman eksik etmeyen Vedat SARI'ya ve diğer arkadaşlarıma her daim yanımda olduklarını hissettirdikleri için teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca çalışmalarım boyunca benden desteğini ve sahip olduklarıengin bilgileri esirgemeyen tüm değerli hocalarıma teşekkür ederim.

Son olarak eğitim hayatım boyunca desteğini ve güvenini benden hiçbir zaman esirgemeyen, her zaman yanımda olan, beni sevgi ve saygı kelimelerinin anlamlarını bilmemi sağlayarak yetiştiren annem Muazzez BADAKUL'a, Babam Mehmet Şerif BADAKUL'a ve benden hiçbir zaman desteğini esirgemeyen kardeşlerim Aykut Emre BADAKUL, Merve BADAKUL ve Damla BADAKUL'a sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum. Ayrıca beni kendi çocuklarından ayırmayan ve yüksek lisans eğitim hayatım boyunca hep yanımda olan teyzem Yasemin AYANOĞLU ve eniştem Murat AYANOĞLU'na teşekkürlerimi sunmaktan memnuniyet duyarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
AKADEMİK BEYAN	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ.....	1
1.1. <i>Pdx1</i> Geninin Özellikleri.....	2
1.2. <i>Pdx1</i> Geninin Düzenlenmesi	2
1.3. CRISPR/Cas9 Sistem	3
2. KAYNAK TARAMASI.....	6
3. MATERYAL VE METOT	8
3.1. Deneylerde Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması	9
3.2. Kompatent Hücre Hazırlanması	10
3.3. <i>Pdx1</i> Geni İçin Tasarlanılan Primerlerin Aktarıldığı Plazmit.....	10
3.4. Primerlerin Plazmite Aktarılması.....	11
3.4.1. <i>Pdx1</i> geni için primerlerin tasarlanması	12
3.4.2. Primer birleştirilmesi	13
3.4.3. Plazmitin kesim işlemi.....	13
3.4.4. Jelden izolasyon.....	14
3.4.5. Ligasyon	14
3.4.6. Transformasyon basamağı	14
3.4.7. Plazmit izolasyonu.....	14
3.4.8. DNA ölçümü.....	15
3.5. Hücre Kültürü.....	15
3.5.1. Transfeksiyon	15
3.5.2. Hücre çekirdeğinin boyanması	16
3.5.3. RNA izolasyonu.....	16
3.5.4. PZR ve qPZR’de kullanılan primerler	17
3.5.5. DNA örneklerinin yürütülmesi	17
3.5.6. cDNA sentezi.....	17

3.5.7. Kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (kPZR)	18
3.5.8. İstatistiksel Analiz	18
4. BULGULAR.....	19
4.1. gRNA Plazmitlerinin ve CRISPR/dCas9-VPR Plazmitinin Transfeksiyonu	19
4.3. Seçilen gRNA Plazmitlerin Birlikte dCas9- VPR Plazmiti ile Transfeksiyonu..	22
5. TARTIŞMA	26
6.SONUÇLAR	28
6.1. <i>Pdx1</i> Geni için Primerlerin Doğruluğunun Tespit Edilmesi	28
6.2. dCas9-VPR ile gRNA Plazmitlerinin Ayrı Ayrı Hücelere Transfeksiyonu	28
6.3. dCas9-VPR ile gRNA Plazmitlerinin Birlikte Hücelere Transfeksiyonu	28
7. KAYNAKLAR	29
ÖZGEÇMİŞ	

AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “CRISPR/dCas9 İle Pankreatik Transkripsiyon Faktörü *Pdx1* Geninin Aktivasyon Bölgelerinin Belirlenmesi” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

21/06/2019

Gamze BADAĞUL



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

μL : mikrolitre

μm : mikrometre

Amp : Amfisilin

bp : baz çifti

dH₂O : İyondan Arındırılmış Su

ddH₂O : Çift Distile Su

dk : dakika

DM : Diabetes Mellitus

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DNA : Deoksiribo Nükleik Asit

EDTA : Etilendiamin Tetra Asetik Asit

FBS : Fetal Bovin Serum

g : gram

HEK : Human Embriyonic Kidney

kb : kilobaz

Kısaltmalar

LB : Luria-Bertani

M : molar

mg : miligram

mL : mililitre

mM : milimolar

NEB : New England Biolabs

ng : nanogram

nm : nanometre

O.D. : Optik Dansite
°C : santigrat
PBS : Phosphate Buffered Saline
Pdx1 : *Pancreatic Duodenal Homeobox 1*
PZR : Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA : Ribo Nükleik Asit
rpm : dakikadaki devir sayısı
S.O.C : Super Optimal Broth
s : saniye
TAD : Transkripsiyonel Aktivasyon Domaini
TAE : Tris-Asetik Asit-Edta
TF : Transkripsiyon Faktörü
V : volt

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. CRISPR/Cas9 sisteminin bakterideki immün yanıt mekanizması.....	3
Şekil 1.2. DNA tamir mekanizması.....	4
Şekil 1.3. CRISPR/Cas9 sisteminin hedef dizide bağlandıkları yerler.....	5
Şekil 3.1. <i>Pdx1</i> geni için tasarlanmış primerlerin aktarılacağı plazmitin haritası.....	11
Şekil 3. 2. gRNA'ların <i>Pdx1</i> promotor bölgesindeki yerleri.....	13
Şekil 4.1. HEK-293 hücre hattına gRNA ayrı ayrı verildiğinde dCas9-VP64_GFP plazmiti verilmiş ve verilmemiş hücrelerin 24 saat inkübasyon sonundaki görüntüsü...	19
Şekil 4.2. HEK-293 hücre hattına gRNA ayrı ayrı verildiğinde dCas9-VP64_GFP plazmiti verilmiş ve verilmemiş hücrelerin 48 saat sonundaki görüntüsü.....	20
Şekil 4.3. HEK-293 hücre hattına <i>Pdx1</i> geni için seçilen gRNA plazmitlerinin ayrı ayrı CRISPR/dCas9-VPR ile transfeksiyonu sonrası qPZR sonucu.....	21
Şekil 4.4. <i>Pdx1</i> geninin promotor bölgesinde bulunan tekrarlayan dizilerin ve tasarlanan primerlerin bulundukları yerler.....	21
Şekil 4.5. İdeal 4 gRNA'nın <i>Pdx1</i> geninin promotor bölgesinde bulundukları yerler...	22
Şekil 4.6. HEK-293 hücre hattına gRNA birlikte verildiğinde dCas9-VP64_GFP plazmiti verilmiş ve verilmemiş hücrelerin 24 saat inkübasyon sonundaki görüntüsü...	23
Şekil 4.7. AD-293 hücre hattına gRNA birlikte verildiğinde dCas9-VP64_GFP plazmiti verilmiş ve verilmemiş hücrelerin 48 saat sonundaki görüntüsü.....	24
Şekil 4.8. AD-293 hücre hattına <i>Pdx1</i> geni için seçilen 4 gRNA plazmitlerinin bir arada dCas9-VPR ile transfeksiyonu sonrası qPZR sonucu.....	25

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3. 1. Çalışmada kullanılan malzemeler	8
Çizelge 3. 2. Çalışmada kullanılan plazmitler	11
Çizelge 3. 3. <i>Pdx1</i> geni için tasarlanan primerler	12
Çizelge 3. 4. PZR ve qPZR’de kullanılan primerler	17

1. GİRİŞ

Pankreas, vücudumuzda iç ve dış salgı bezlerine sahip bir organdır. Bu nedenle de hem görünüş olarak hem de işlevsel olarak birbirinden farklı iki bölgeden oluşmuştur. Ekzokrin pankreas; sindirim enzimlerinin üretilmesini sağlayan hücrelere sahipken, endokrin pankreas ise hem besinlerin metabolizmasını hem de glukozun dengelenmesini düzenleyen hormonların üretilmesini sağlayan hücreler bulunur. Endokrin pankreasta beş farklı endokrin hücre çeşidi bulunmuştur. Bu hücreler bir araya gelerek Langerhans adacığı denilen hücre topluluğunu oluşturmuşlardır. Endokrin hücrelerinde; alfa hücreleri glukagon hormonu, delta hücreleri somatostatin, epsilon hücreleri ghrelin, PP-hücreleri pankreatik polipeptid ve beta hücreleri insülin üretir (Pan vd. 2011; Shih vd. 2013). İnsülin ile glukagon; hücrede karbonhidrat metabolizmasının düzenlenmesini kontrol eder. Polipeptid yapıdaki insülin hormonu, hücre yüzeyinde glukozun hücreye girişini düzenleyen reseptörlere bağlanır. Böylece glukozun hücre içine alınmasını sağlar. İnsülin hormonunun miktarındaki eksiklik hücrede stres yaratmıştır. Bu durum diyabetin tetiklenmesine neden olmuştur (Ünal 2012). Pankreasın yapısının ve çalışma mekanizmasının bilinmesi; diyabet, akut ve kronik pankreatit gibi pankreas hastalıklarının tedavisinde hücre programlanmasına (hücrelerin farklılaştırılması, gen ekspresyon düzeyinin değiştirilmesi vs.), genetik tanı ve tedavi yöntemlerinin uygulanmasına imkân sağlamıştır.

Diabetes mellitus (DM), insülin hormonunun çalışmaması ya da bu hormonun eksikliği sonucu oluşan bir hastalıktır. DM; insülin bağımlı tip I ve insülin bağımsız tip II diyabeti olmak üzere iki farklı türe sahiptir. Tip I diyabet, pankreastaki beta hücrelerinin oto-immün bir atak sonucu ortadan kalkması nedeniyle oluşur. Tip II diyabet ise pankreastaki beta hücrelerince üretilen insülin hormonuna hedef hücrelerce direnç geliştirilmesi sonucu gelişir. Her iki diyabet tipi de Langerhans adasındaki beta hücrelerinin hasar görmesi sonucunda insülinin miktarının yetersiz olması ya da hiç olmamasından kaynaklanmıştır. Beta hücrelerini farklı kaynaklardan elde etmek için ya da olgun hücrelerin replikasyonlarıyla yeni beta hücrelerini oluşturmak için pek çok hücre tedavisi çalışması yapılmıştır. Üzerinde çalışılan yeni yaklaşımlardan biri; endojen insülin eksikliğini kalıcı olarak gidermek amacıyla uygulanan “beta hücresini yeniden elde etme tedavisidir”. Ancak bu tedavi için ihtiyaç duyulan beta hücrelerinin az olması araştırmacıları yeni beta hücre kaynakları (kök hücre, bir hücrenin başka bir hücreye dönüştürülmesi gibi) bulmaya yöneltmiştir (Mıcıllı vd. 2007). Diyabet hastalarında, hücre farklılaşması yöntemiyle beta hücrelerinin kaybı önlenebilmiştir (Weir 2013). Bu hücre farklılaşması; pluripotent hücrenin, hedeflenen hücre tipinin oluşmasını sağlayacak genleri aktive etmesiyle sağlanabilmiştir (Zhou ve Melton 2008).

Pankreas oluşumu ve beta hücre farklılaşması sırasında rol oynayan birçok transkripsiyon faktörü vardır. Bu transkripsiyon faktörleri arasında olan Pankreatik duodenal homeobox-1 (*Pdx1*) geni; pankreas oluşumu ve beta hücre farklılaşmasında ve beta hücrelerinin gelişiminin sağlanmasında önemli bir role sahiptir. Yani *Pdx1* geni; pankreas gelişimi, pankreatik beta hücre farklılaşması ve olgun beta hücre fonksiyonuna katkıda bulunan bir transkripsiyon faktördür (Keneto vd. 2015; Habener vd. 2005; Kaneto vd. 2008; Guz vd. 1995). *Pdx1* genindeki mutasyon; diyabete ve pankreatik hasarlara yol açmıştır (Cockburn vd. 2004).

1.1. *Pdx1* Geninin Özellikleri

Pankreatik duodenal homeobox-1 (PDX1), pankreas gelişimde önemli rol oynayan homodomain proteindir (Jonsson vd. 1994; Offield vd. 1996). *Pdx1* geninin ekspresyonu, endoderm pankreasın çalışması için gerekli değil iken; endokrin ve ekzokrin hücre tiplerinin gelişimi için önemli olduğu belirlenmiştir (Offield vd. 1996; Ahlgren vd. 1996). Fare ile yapılan çalışmalarda *Pdx1* geninde yaşa bağlı olarak oluşan mutasyonlar sonucunda diyabetin tetiklendiği görülmüştür. Ayrıca bu durum GLUT2 ile insülin ekspresyonunun azalmasıyla da ilişkilendirilmiştir (Ahlgren vd. 1998). Ayrıca yapılan çalışmalarda *Pdx1* geni bakımından heterozigot olan farelerde glukoz intoleransı görülmüştür (Ahlgren vd. 1998; Brissova vd. 2002). *Pdx1* geninin ekspresyonundaki eksiklik hiperglisemiye veya lipid konsantrasyonunda artışa neden olmuştur. Bu durum diyabet hastalığı ile ilişkilendirilmiştir (Melloul vd. 2002). *Pdx1* geni, gelişim sürecindeki primordiyumda ekspre olur ve pankreasın organ görüntüsünün oluşmasında oldukça önemli bir role sahip olduğu bulunmuştur (Offield 1996). Bu çalışmaların sonucunda *Pdx1* geninin pankreastaki hücre tiplerinin oluşmasında ne kadar önemli olduğu görülmüştür.

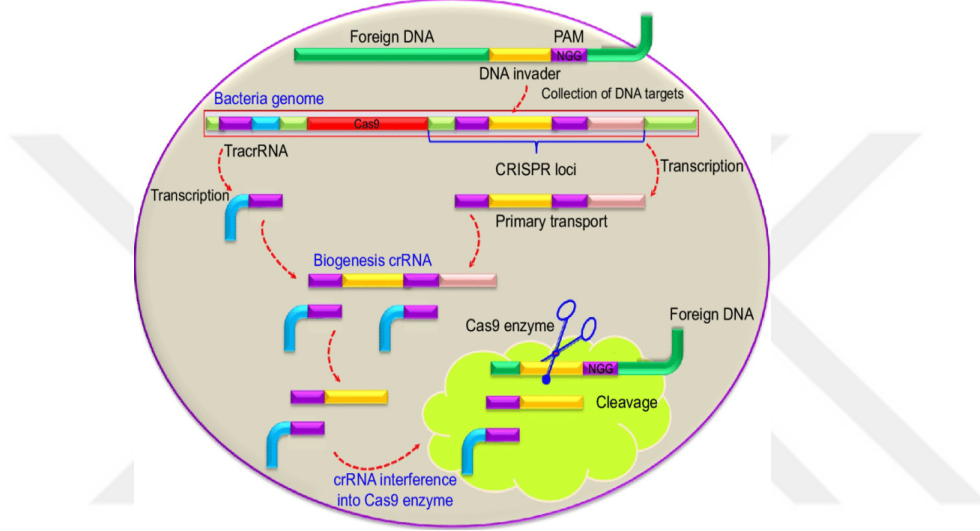
Tip II diyabet hastalarında bir hücrenin normal bir şekilde hayatına devam etmesi için gerekli olan genlerde mutasyon olduğu bulunmuştur. Bu mutasyona uğramış genlerden birini taşıyan gençlerde “Erişkin Başlangıçlı Monogenetik Diyabet” (MODY) olduğu görülmüştür. MODY4, *Pdx1* geni bakımından mutasyona sahip olmasıyla ilişkilidir (Stoffers vd. 1997; Stoffers vd. 1998). MODY’nin diğer monogenik formları transkripsiyon faktörleri için gen kodlayan hepatosit çekirdek faktörü (HNF) ile ilişkilendirilmiştir. Bu faktörler; HNF-1 α , HNF-1 β , HNF-4 α ve β -2 olarak adlandırılmıştır. Bu faktörlerin tamamı *Pdx1* geninin transkripsiyonunun düzenlenmesiyle ilişkilidir (Fajans vd. 2001). *Pdx1* geninin ekspresyonunu kontrol eden diğer transkripsiyonel faktörlerdeki mutasyonlar ya da bu transkripsiyonel faktörlerin fonksiyonel eksikliği MODY’nin alt tiplerinin eklenmesine ya da diyabete duyarlılığa neden olmuştur. Çünkü *Pdx1* geninin ekspresyonu pankreatik düzenleme ya da hücrel farklılaşmada merkezi rol oynamıştır (Sharma vd. 1999).

1.2. *Pdx1* Geninin Düzenlenmesi

Beta hücrelerinde *Pdx1* geninin ekspresyonu için transkripsiyonel faktörlerin ve düzenleyici elementlerin bilinmesi önemli görülmüştür (Ben-Shushan vd. 2001). Yapılan çalışmalar sonucunda *Pdx1* geni ile yüksek oranda homoloji gösteren bölgeler bulunmuştur. Bu bölgelere *Pdx1* homolog bölgeleri denir. Bu bölgeler PH1, PH2 ve PH3 olarak adlandırılır. Bu bölgeler -281 kb ile -167 kb arasındadır (Gerrish vd. 2000; Marshak vd. 2000). İlerleyen zamanlarda yapılan çalışmalarda HNF-3 β transkripsiyon faktörünün *Pdx1* geninin ekspresyonunda önemli olduğu bulunmuştur (Wu vd. 1997). Bu transkripsiyonel faktör, Histon-H5 ile bağlantılıdır. Bunun sayesinde nükleozomal yapının değişmesini sağlamıştır. Açılan kromatin yapı ile *Pdx1* geninin ekspresyonu için gerekli olan öncüller belirlenmiştir (Clark vd. 1993; Shim vd. 1998). Hücrelerde; HNF-3 β *Pdx1* geninin düzenlenmesi için eklenilen faktörlerle (HNF- α , SP1, *Pdx1*’nin kendisi ve tanımlanmayan diğer faktörler) kombinasyon halinde çalışmıştır (Mendel vd. 1991; Bach vd. 1991).

1.3. CRISPR/Cas9 Sistem

Genom düzenlemede kullanılmak üzere en son geliştirilen yaklaşım olan “Düzenli aralıklarla bölünmüş palindromik tekrar (CRISPR)–ilişkili protein (Cas)” bakterilerde ve arkealarda mevcut olan nükleik asit temelli bir doğal savunma yoludur. CRISPR ile savunma mekanizmasının çalışma şekli; hücreye giren yabancı DNA dizilerinin (virüsler, plazmidler vb.), prokaryotik genomda sentezlenen küçük RNA molekülleriyle özgül tanınmasına ve etkisiz hale getirilmesine dayanmıştır. Prokaryot genomunda bulunan CRISPR lokusu (*Streptococcus pyogenes* SF370 Type II CRISPR) dört parçadan oluşur. Bunlar; Cas9 nükleaz, protein kodlamayan (non-coding) CRISPR, RNA molekülü (trans-activating crRNA (tracrRNA)) ve öncü crRNA (precrRNA)’dır (Deltcheva vd. 2011).



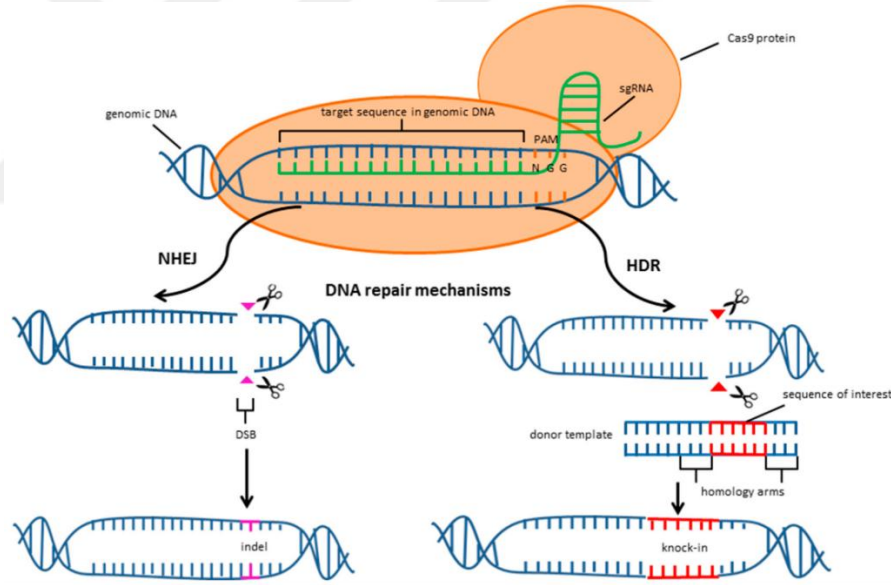
Şekil 1.1. CRISPR/Cas9 sisteminin bakterideki immün yanıt mekanizması (Vo vd. 2018)

Çalışmalarda en yaygın kullanılan CRISPR/Cas9 sistemi; *Streptococcus pyogenes* (*S. pyogenes*) bakterisine ait olan Type II CRISPR sistemidir (Tetsushi vd. 2014). Bu sistem; SpCas9 nükleazı ve guide RNA (gRNA) bileşenlerinden oluşmuştur. Bu sistemin çalışma mekanizması; Cas9 endonükleaz proteininin gRNA aracılığıyla hedef gende çift zincir kırıkları oluşturmaya dayanmıştır (Akçay 2015). Başka bir deyişle; bu sistemdeki gRNA; spesifik dizinin bulunmasını sağlamış ve Cas9 proteininin bu dizinin olduğu bölgeye gelmesini sağlayarak hedef dizide DNA kırıklarının oluşmasına neden olmuştur. Kullanılan gRNA’lar 20 nükleotit uzunluğundadır. Böylece spesifik olmayan bağlanmalar az bir orana indirilmiştir. Ayrıca, guanin ile sitozin arasındaki bağ daha güçlü olduğu için gRNA dizisinin guanin ile başlarsa hedef diziye daha kuvvetli bir bağ ile bağlanacağı bulunmuştur (Akçay 2015). gRNA’ların hedef diziyi bulabilmesi için hedef dizide PAM (ön ara parça ilişkili motif) sekansı bulunmalıdır (Tetsushi vd. 2014). PAM sekansının amacı; hedef dizi ile gRNA arasında RNA-DNA melez bir yapının oluşmasını sağlamak olduğu belirlenmiştir (Mali vd. 2013). CRISPR/Cas9 sistem memeli canlıların genomunda hedef bölgede istenilen çift zincir kırıklarının oluşmasını sağlamıştır (Cong vd. 2013). DNA’da çift zincir kırıkları oluştuğundan sonra hücrede bulunan DNA

tamir mekanizmaları bu kırıkları tamir etmeye çalışmıştır. Hücrelerde iki farklı DNA tamir mekanizması vardır:

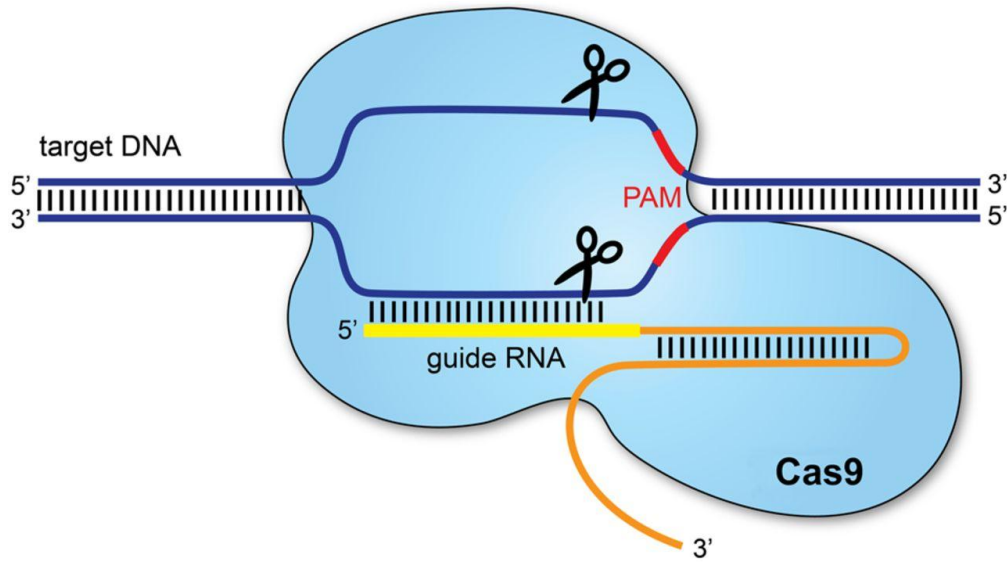
Homolog Rekombinasyon: DNA'daki kırıklar tamir edildiğinde dışarıdan ortama tamir edilen bölgeye homolog olan bir dizi gönderilmiştir. Böylelikle DNA kendini tamir ettiği sırada hedef diziye istenilen gen dizisi eklenmiş olur (Gaj vd. 2013). Homolog rekombinasyonda; ATP kinaz, ekzonükleazlar, endonükleazlar ve birçok protein görev almıştır. Bu tamir mekanizmasında, bir yandan DNA kırığı tamir edilirken bir yandan da istenilen dizinin hedef diziye eklenmesi gerçekleştirmiştir (Sung vd. 2006; San vd. 2008). Normal şartlarda; homolog rekombinasyon, memeli canlıların genomunda düşük oranda etki gösterirken DNA kırıkları tamirinde çeşitli yolları ve mekanizmaları etkilemiştir (Cai vd. 2014).

Homolog Olmayan Uç Birleştirme: Bu mekanizmanın çalışma prensibi; kırık uçların DNA'ya bağlı proteinkinazlar, DNA polimeraz ve ligasyon enzimleri aracılığıyla birleştirilmesine dayanmıştır. Bu uç birleşimi sırasında DNA dizisinde bir ya da birkaç tane baz kaybı gerçekleşmiştir. Bu durum; okuma çerçevesi mutasyonlarına sebep olmuş ve gende istenilen dizinin silinmesine ya da işlev kaybına uğramasına neden olmuştur. Bu tamir mekanizması, homolog rekombinasyona göre daha yüksek oranda hata yaparak DNA kırıklarını tamir etmiştir (Carroll vd. 2011).



Şekil 1.2. DNA tamir mekanizması (Ewa vd. 2018)

Bu DNA tamir mekanizması yollarına müdahale edilerek istenilen genetik değişiklikler yapılmıştır (Akçay 2015). Ancak yapılan çalışmalar doğrultusunda bu sistemin etki oranı hedef gene ve hedef genin bulunduğu hücre tipine göre değişiklik göstermiştir (Cong vd. 2013). Cas9 proteini ile ilişkili çeşitli gRNA'lar programlanmıştır. CRISPR/Cas9 sistemde birden fazla gRNA tasarlanmış ve bu sistem pek çok çalışmada kullanılmıştır (Chave vd. 2015).



Şekil 1.3. CRISPR/Cas9 sisteminin hedef dizide bağlandıkları yerler (Melody vd. 2016)

Ökaryotik canlılarda, bakterilerde bulunan bu sistem, gen düzenlemesi çalışmalarında ilk defa 2013 yılında kullanılmıştır (Akçay 2015). 2013 yılının ilk yarısında, insan genomunda hedeflenen bölgede değişiklik yapabilmek için Cong vd. pek çok çalışma yapmışlardır. Bu çalışmalarda; Bakteriyel Tip II CRISPR/Cas9 sistemine ait protein ile RNA parçalarını modifiye ederek insana ait genetik yapıya uyarlamışlardır. İlk olarak; öncelikle C terminalinde SV40 nükleer bölgesel sinyali içeren Cas9 nükleazını, insan kodon düzenine modifiye etmişlerdir. Ardından insan-kodon en uygun şekle uyarlamak için memeli sisteminde ekspre olan vektöre klonlamışlardır. Daha sonra insan U6 polimeraz III promoter aracılığı ile crRNA ve tracrRNA üyelerini beraber üreten RNA molekülünü (fusion transcript) üretmişlerdir. Üretilen bu RNA molekülü gRNA şeklinde isimlendirilmiştir. Bunun sayesinde, gRNA komplementer yapısı ile hedef bölgedeki dizileri tanımanın (hedef bölgedeki PAM dizilerini tanıyarak) yanı sıra bu gRNA'nın sekonder yapısı aracılığı ile Cas9 endonükleazı hedef bölgedeki diziye ulaştırılmıştır. Böylelikle RNA aracılığıyla insan genomunun düzenlenmesi işlemi ile hedeflenen bölgedeki dizilerde istenilen düzenlemenin yapılmasına olanak sağlamıştır (Cong vd. 2013).

CRISPR/Cas9 sisteminde hedef dizide mutasyon oluşturularak da çalışmalar yapılmıştır. Böylelikle hedef dizide kırıklar oluşturularak mutasyon yapmadan, sadece genin ekspresyonu düzeyinde değişiklikler yapılması sağlanmıştır. Bunun için endonükleaz olan Cas9 proteininde baz mutasyonu yapılarak kesim özelliğini kaybetmiş dCas9 (dead Cas9) proteini üretilmiştir. Bu protein kesim özelliğine sahip olmamasına rağmen hedef diziye bağlanabilmiştir. Ancak CRISPR/dCas9 sisteminin çalışabilmesi için dCas9 proteinine bir aktivatör domaini eklenmiştir. Bu aktivatör domain, hedef genin aktivasyonunu sağlamıştır (Chave vd. 2015).

Bu çalışmadaki amacımız; dCas9-VPK aktivatör domain sistemi ile *Pdx1* geninin aktivasyonunu sağlayan bölgeleri belirleyerek alternatif beta hücresi kaynağı oluşturmayı sağlamaktır.

2. KAYNAK TARAMASI

Diabetes mellitus (DM), insülin hormonunun yetersizliği ya da bu hormonun etkisinin yetersiz olması nedeniyle oluşan metabolik bir hastalıktır. Diyabette; pankreasta bulunan Langerhans adasının beta hücreleri hasar gördüğü için insülin yetmezliği ya da bu hormonun yokluğu gözlenmiştir (Mıcılı vd. 2007). Birçok transkripsiyon faktörü, büyüme faktörleri ve peptidler; ekzokrin ve endokrin hücrelere sahip olan pankreasın oluşumunda, proliferasyonunda ve farklılaşmasında önemli bir etkiye sahiptir. Pankreatektomi modeli ile yapılan çalışmalarda transkripsiyon faktörü olan *Pdx1*'nin beta hücrelerinin farklılaşmasında önemli rolü olduğu bulunmuştur (Öztürk vd. 2014)

Memeli canlılar için tasarlanmış olan transkripsiyonel faktör etmenleri, teknolojinin de yardımıyla hem sağlık hem de bilimsel anlamda ilerlemelere olanak sağlamıştır. Buna örnek olarak; dokuların iyileşmesi için uyarılması ve kök hücre farklılaşmasının düzenlenmesi verilebilmiştir. Burada kullanılan transkripsiyonel faktörler promotör bölgesini ya da enhancer bölgelerini hedef olarak seçmişlerdir (Pablo vd. 2013).

Moleküler çalışmalarda model bir sistem oluşturmak için hedef diziye spesifik olan yapay transkripsiyon faktör (ATFs) kullanılmıştır (Dawson vd. 2012; Falahi vd. 2015). ATFs'ler genellikle hedef dizide promotör ya da enhancer bölgelerine bağlanarak aktivasyon sağlayan DNA bağlama domainlerinden (DBD) oluşmuştur (Ansari vd. 2002; Van vd. 2014). Üç tip ATFs geliştirilmiştir. Bunlar; Çinko- Parmak (ZFs), Transkripsiyon aktivatör benzeri Effektörler (TALEs) ve düzenli aralıklarla bölünmüş palindromik tekrarlar (CRISPR) sistemi ilişkili bakteriyal Cas9 proteindir (Beerli vd. 2002; Maeder vd. 2013; La Russa vd. 2015). CRISPR sistemi, bu sistemi taşımayan canlılara entegre edilmiştir (Jinek vd. 2012; Esvelt vd. 2013). Çinko parmak nükleaz (ZFNs) ve transkripsiyon aktivatör benzeri efektör nükleaz (TALENs) genomik düzenleme metodlarında her bir hedef DNA için büyük bir proteine ihtiyaç duymuştur. Ancak CRISPR/Cas9 sistem hedeflenen bölge için sadece 20 nükleotit kadar kısa bir nükleotid dizisi içeren gRNA yeterli gelmiştir (Li vd. 2013; Shan vd. 2013).

CRISPR temelli sistem yakın zamanda biyoteknolojik uygulamalar için oldukça dikkat çekici olmuştur. CRISPRs prokaryotik canlılarda immün yanıt sisteminden temel almış ve mevcut genomun düzenlenmesiyle olası transkripsiyonel kontrolü amaçlamıştır (Mali vd. 2013a). CRISPR/Cas9 sistem *in vivo* ve *in vitro* koşullarda genomik DNA modifikasyonlarının yapılması ve etkilerinin incelenmesi için kullanılan sistem olmuştur (Cho, S.W ve ark., 2013a). En çok kullanılan CRISPR sistem *S. pyogenes* bakterisinden gelmiştir (Jinek vd. 2012). Sistem; Cas9, olgun crRNA ve tracrRNA olmak üzere üç bileşenden oluşmuştur (Doudna vd. 2014). Genellikle memeli hücre hattına transfeksiyondan önce olgun crRNA ve tracrRNA'lar ya da birleştirilmiş gRNA'lar Cas9 promotörüne uygun olan bir plazmitte çoğaltılmıştır (Cong vd. 2013). gRNA'lar hedef diziye komplementer olacak şekilde tasarlanmıştır (Sternberg vd. 2014). Bu şekilde hedef diziye giden gRNA'lar Cas9 proteininin gelmesini sağlayarak hedef dizide zincir kırıklarının oluşmasını sağlamıştır (Jinek vd. 2012).

Cas9 proteininin önemli katalitik bölgelerinde yapılan mutasyonlarla hedeflenen dizide zincir kırığı oluşturmada sadece genin ekspresyonu üzerinde etki eden Cas9 proteini üretilmiştir (Jinek vd. 2012). Başka bir deyişle, inaktif Cas9 proteini (dCas9) gen ekspresyonunun kontrolünü (yani genin aktivasyonu ya da baskılanmasını) sağlamıştır (Cheng vd. 2013; Gilbert vd. 2013; Bikard vd. 2013; Maeder vd. 2013a; Maeder vd. 2013b; Perez-Pinera vd. 2013; Gilbert vd. 2014). Bu dCas9 proteini gen ekspresyonunun düzenlenmesi için farklı efektör domainlerle bağlantı kurmuştur (Bikard vd. 2013; Farzadfard vd. 2013; Qi vd. 2013; Perez-Pinera vd. 2013). Yakın zamanda, bu sistem fare ve insan hücrelerinin farklılaşması için hedef genin aktivasyonunu ya da baskılanmasında kullanılmıştır (Chakraborty vd. 2014; Chavez vd. 2015). CRISPR/dCas9 sisteminde dCas9 proteininin C terminaline p300, H3K9 asetilaz kor katalitik domain, VPR gibi çeşitli epigenetik efektör domainler hedef genlerin aktivasyonu için eklenmiştir (Gilbert vd. 2013; Maeder vd. 2013; Mali vd. 2013; Perez-Pinera vd. 2013; Cheng vd. 2013; Konermann vd. 2014; Chavez vd. 2015; Hilton vd. 2015).

Chave vd. (2015) CRISPR/dCas9 çalışmalarında; aktivasyonu sağlamak için VP64, SAM, VP16 ve p65 transaktivatör domainleri ve tek bir gRNA kullanmışlardır. 4 farklı transaktivatör domaini CRISPR/dCas9 ile beraber tek bir gene tek bir gRNA ile ayrı ayrı göndermişler ve ayrı ayrı bu transaktivatör domainlerin etkisine bakmışlardır. Daha sonra bu aktivatör domainlerin etkisinin her gende etkisi aynı mı öğrenmek için farklı genlere de bu transaktivatör domainler CRISPR/dCas9 ile beraber tek bir gRNA kullanarak vermişlerdir. Yapılan bu deneylerin sonucunda bu aktivatör domainlerin etkisinin her bir gende farklı olduğunu bulmuşlardır. Ayrıca farklı gRNA'lar da tasarlayarak farklı genlere belirtilen bu 4 farklı transaktivatör domain CRISPR/dCas9 ile hücrelere transfekte edilmiştir. Elde edilen sonuçlara baktıkları zaman; tek bir gRNA ile bu transaktivatör domainlerin farklı genlere verilmesindeki verimin, farklı gRNA tasarlanarak farklı genlere bu transaktivatör domainin verilmesiyle elde edilen verimle kıyaslandığında; tek bir gRNA ile verildiğinde daha yüksek verimlilikte olduğunu bulmuşlardır. Bunu da gene bağlı olarak ekspresyonun değişmesi olarak açıklamışlardır (Chave vd. 2015). Günümüzde aktivasyon modülleri VP64'un p65 (RelA)'nın ve Epstein-Barr R transaktivatör (Rta)'nın dCas9'da hibrit kaynaşması sağlanmıştır (dCas9-VPR) (Chavez vd. 2015).

3. MATERYAL VE METOT

Çizelge.3.1’de tez çalışmasında kullanılan malzemeler ve katalog bilgileri yer almaktadır.

Çizelge 3. 1. Çalışmada kullanılan malzemeler

Kullanılan Materyaller	Firma Bilgileri	Katalog Numarası
Agar Bacteriological	Oxoid, Thermo Fisher Scientifics, Walham, MA	LP0011
Sodium Chloride	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri	31434
Yeast Extract	VWR Life Science AMRESCO, Radnor, Pensilvanya	VWRVJ850-500G
Tryptone	VWR Life Science AMRESCO, Radnor, Pensilvanya	VWRVJ859-500G
Ampicillin	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri	A5354
GeneJet Plazmid Miniprep Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA	K0503
GeneJet Gel Extraction Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA	K0691
GeneJet PCR Purification Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA	K0701
GelStar Nucleic Acid Gel Stain	Lonza, Basel	50535
GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA	SM0311
GeneRuler 100 bp DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA	SM0241
Trizma Base	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri	T1503
EDTA Disodium Salt Dihydrate	Merck Millipore, Burlington, MA	108418
Asetik Asit	Merck Millipore, Burlington, MA	109088
BbsI	NEB, Ipswich, MA	R0539S
Tris Base	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA	BP152
T4 DNA Ligase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA	EL0011
DMEM, High Glucose	Biological Industries, Beit Haemek, IL	01-055-1A
L-Glutamin	Gibco, AU	25030-024
AD-293 Cell Line	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA	51-0036
Lipofectamine 2000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA	12604-21
Opti-MEM	Gibco, AU	31985-62
Antibiotic-Antimycotic	Biowest, Nuaille, FR	L0010-020
DEPC	Gold Biotechnology, Saint Louis, ABD	1609-47-8
PNK	NEB, Ipswich, MA	0951607

Çizelge 3.1'in devamı

GeneJet RNA Purification Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA	00509657
DNA Lader	NEB, Ipswich, MA	N32325
Fetal Bovine Serum	Biological Industries, Beit Haemek, IL	04-007-1A

3.1. Deneylerde Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması

TAE tamponu (10X): 242 gr Tris Base tartıldı. 57.1 ml Asetik Asit ve 18.61 gr 500 mM EDTA (pH:8.0) eklendi ve dH₂O ile 1 litreye tamamlandı.

TAE tamponu (1X): 100 ml 10X TAE stok çözeltisi alınarak 900 ml dH₂O ile 1 litreye tamamlandı.

1M Tris-HCl: 121.1 g Tris tartıldı, 800 ml dH₂O ile çözdürüldü ve pH: 7.4 değerine ayarlandı ve dH₂O ile hacim 1 litreye tamamlandı.

PBS hazırlanması (10X): 10.9 g Na₂HPO₄, 3.2 g NaH₂PO₄ ve 90 g NaCl 900 ml dH₂O'da çözdürüldü. pH:7.4'e ayarlandıktan sonra çözelti dH₂O ile 1 litreye tamamlandı.

PBS hazırlanması (1X): 100 ml 10X PBS stok çözeltisi alınarak 900 ml dH₂O ile 1 litreye tamamlandı.

50 mM CaCl₂ /10 mM Tris (pH:7,4): 5.55 gr CaCl₂ tartıldı, 900 ml dH₂O da çözüldü. 10 ml 1M Tris-HCl (pH: 7.4) eklenerek son hacim dH₂O ile 1 litreye tamamlandı.

%0.8'lik agaroz jel: 3.2 g agaroz tartıldı ve 400 ml 1X TBE tamponunda çözüldü. Agaroz tamamen çözünene kadar yaklaşık olarak 9 dk mikrodalga fırında bekletildi. Çözeltinin sıcaklığı yaklaşık olarak 50°C'ye kadar düştükten sonra 9 µl Et-Br ya da GelStar eklendi. Tarakları önceden yerleştirilmiş yatay elektroforez küvetine kabarcık kalmadan döküldü ve jelin polimerleşmesi beklendi.

%1'lik agaroz jel: 1 g agaroz tartıldı ve 100 ml 1X TAE tamponunda çözüldü. Agaroz tamamen çözünene kadar yaklaşık olarak 3 dk mikrodalga fırında bekletildi. Çözeltinin sıcaklığı yaklaşık olarak 50°C'ye kadar soğuduktan sonra 3 µl Et-Br ya da GelStar boyası eklendi. Tarakları önceden yerleştirilmiş yatay elektroforez küvetine kabarcık kalmadan döküldü ve jelin polimerleşmesi beklendi.

2X dondurma ortamı: 8 ml hücre kültüründe kullanılan besi ortamı, 2 ml DMSO karıştırıldı ve 22 µm'lik filtre yardımıyla sterilize edildi. Daha sonraki kullanımlar için -20°C'de muhafaza edildi.

Antibiyotik: 1g antibiyotik (amfisilin) suda çözdürüldü ve son hacim dH₂O ile 10 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti 22 µm'lik filtre yardımıyla sterilize edildi. Birer ml bölünerek daha sonra kullanılmak üzere -20°C'de muhafaza edildi.

LB-Broth: 2.5 g Tripton, 1.25 g Yeast Extrat, 2.5 g NaCl 150 ml dH₂O içerisinde çözdürüldü. Son hacim dH₂O ile 250 ml'ye tamamlandı. 121°C'de 20 dk otoklavlandı. Daha sonra kullanılmak üzere; hazırlanan çözelti +4°C'de muhafaza edildi. Eğer antibiyotikli ortam kullanılacaksa; daha önce hazırlanmış olan stoktan 250 µl antibiyotik çözeltisi alındı ve soğumuş olan 250 ml LB ortamına eklendi.

LB-Agar: 2.5 g Tripton, 1.25 g Yeast Extrat, 2.5 g NaCl, 3.75 g Agar 150 ml dH₂O içerisinde çözüldü. Son hacim dH₂O ile 250 ml'ye tamamlandı. 121°C'de 20 dk otoklavlandı. Çözeltinin sıcaklığı yaklaşık 50°C'ye düştüğünde steril kabin içerisinde petri kaplarına döküldü. Polimerleşme tamamlandıktan sonra daha sonra kullanılmak üzere parafinle hava almayacak şekilde sıkıca kapatılıp +4°C'de muhafaza edildi.

Eğer antibiyotikli ortam kullanılacaksa; daha önce hazırlanmış olan stoktan 250 µl antibiyotik çözeltisi alındı ve soğumuş olan 250 ml LB ortamına eklendi ve petri kaplarına dökme işlemi gerçekleştirildi.

RNase içermeyen dH₂O : 1 ml DEPC alındı ve dH₂O ile son hacim 1 litreye tamamlandı. Gece boyunca çalkalamalı inkübatörde 25°C'de bekletildi. 121°C'de 20 dk otoklavlandı.

3.2. Kompatent Hücre Hazırlanması

Antibiyotik içermeyen agarlı besiyerinin üzerine önceden -80°C'de dondurulmuş DH5α *Escherichia coli* (*E. Coli*) bakterilerinden 40 µl kadarı yayma işlemi yapılarak ekildi ve 37°C'de gece boyu inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün koloni oluşumu görüldükten sonra tek olan koloniler pipet ucu yardımıyla seçildi ve antibiyotik içermeyen 40 ml LB broth içine eklendi ve 37°C'de 200 rpm çalkalamalı inkübatörde bir gece inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonucunda çoğalan bakterilerden 1 ml alınarak 200 ml LB besiyerine eklendi ve 4 saat 37°C'de inkübatörde çoğaltıldı. Bakterilerin 600 nm dalga boyundaki optik dansitesi 0,4 noktasına ulaştıktan sonra, buz üzerine alınıp 10 dk soğuması için bekletildi. 50 ml'lik falkon tüplere bölünüp, +4°C ve 2000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant atılıp, her bir tüpe 25 ml 50 mM CaCl₂/10mM Tris (pH: 7.4) ilave edildi ve 15 dk buzda bekletildi. Ardından, yine +4°C ve 2000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant atılıp, çökelti üzerine 9 ml 50 mM CaCl₂/10 mM Tris (pH:7.4) ve 1 ml %100 gliserol eklenip homojenize edildi. 100 µl'lik hacimlere ayrılıp -80°C'ye kaldırıldı.

3.3. Pdx1 Geni İçin Tasarlanılan Primerlerin Aktarıldığı Plazmit

Pdx1 geni için tasarlanılan primerler aktarmak için U6 promotörü içeren plazmit kullanıldı (Pablo Perez-Pinera vd. 2013).

**GAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAAG
GCTGTTAGAGAGATAATTGGAATTAATTTGACTGTAACACAAAGATA
TTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAGTAATAATTTCTTGGGTAGTTT
GCAGTTTTTAAAATTATGTTTTTAAAATGGACTATCATATGCTTATCGTAA
CTTGAAAGTATTTTCGATTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGAAAGGAC
GAAACACCGGGTCTTCGAGAAGACCTGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAA
ATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGGCTTTT
TT**

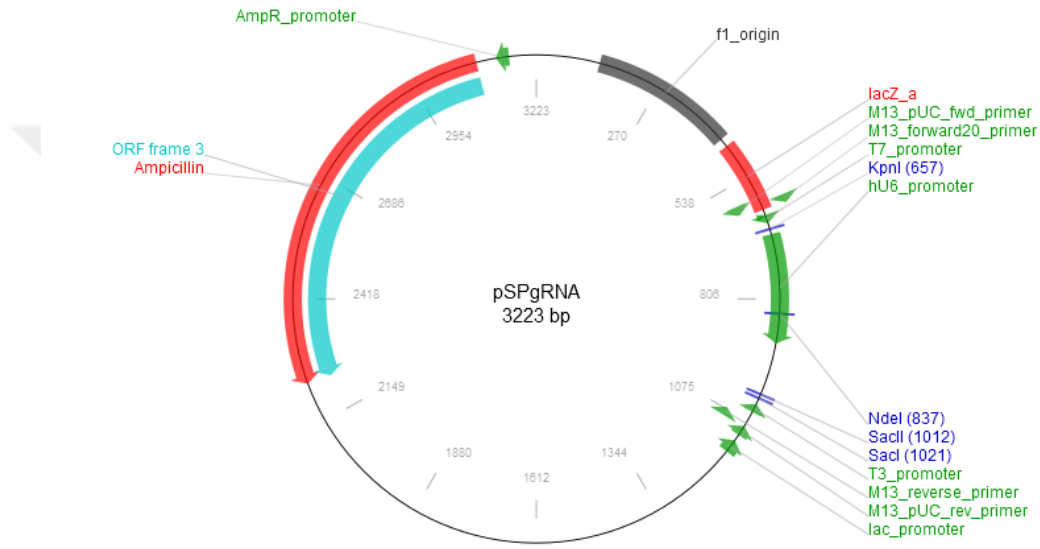
Kalın harflerle yazılan bölge U6 promotörüne aittir. Altı çizili olan diziler ise +1 ifade edilme başlangıç bölgesine aittir.

İtalik ve altı çizili olarak yazılmış olan diziler ise gRNA'yı klonlanması için *BbsI* kesim enzimine ait kesim bölgelerini göstermektedir.

İtalik yazılan diziler kimerik gRNA'dır.

Kalın ve altı çizili yazılmış diziler ise poliT sonlandırıcı dizilerdir.

Şekil.3.1'de *Pdx1* geni için tasarlanılan primerlerin aktarılacağı plazmit yer almaktadır (<https://www.addgene.org/47108/>).



Şekil 3.1. *Pdx1* Geni İçin Tasarlanılmış Primerlerin Aktarılacağı Plazmitin Haritası

3.4. Primerlerin Plazmite Aktarılması

Çalışmalarda Addgene firmasından sipariş edilen pSPgRNA (Perez-Pinera vd. 2013) ve SP-dCas9-VPR (Chavez vd. 2015) plazmitler kullanıldı. Transfeksiyonun gerçekleşip gerçekleşmediğini görmek için de yine aynı firmadan sipariş edilen dCas9-VP64_GFP (Konermann vd. 2014) kullanıldı.

Çalışmada kullanılan plazmitler Çizelge 3.2'de yer almaktadır.

Çizelge 3. 2. Çalışmada kullanılan plazmitler

Plazmitin adı	Firma	Plazmit kodu
pSPgRNA	Addgene	47108

Çizelge 3.2'in devamı

SP-dCas9-VPR	Addgene	63798
dCas9-VP64_GFP	Addgene	61422

3.4.1. *Pdx1* geni için primerlerin tasarlanması

İnsan *Pdx1* geninde aktivasyon için gerekli gRNA'ların tasarlanması için online program olan CRISPR-ERA: CRISPR-mediated editing, repression, and activation (<http://CRISPR-era.stanford.edu/>) ve CRISPRdirect (<http://CRISPR.dbcls.jp/>) programları kullanıldı (Liu vd. 2015; Naito vd. 2015).

Tasarlanılan primerler Çizelge 3.3'de yer almaktadır.

Çizelge 3. 3. *Pdx1* geni için tasarlanan primerler

	Transkripsiyon başlama bölgesine olan uzaklığı	Bulunduğu pozisyon	Nükleotit Dizisi (5'-3')
gRNA 1	-240	Forward (+)	GCACCGCCAGCTGCCCCGTTT
	-240	Reverse (+)	GAACGGGCAGCTGGCGGTGC
gRNA 2	-183	Forward (+)	GAACAAAAGCAGGTGCTCGC
	-183	Reverse (+)	GCGAGCACCTGCTTTTGTTT
gRNA 3	-148	Forward (+)	GCCTCTTAGTGCGGCCAGCC
	-148	Reverse (+)	GGCTGGCCGCACTAAGAGGC
gRNA 4	-22	Forward (+)	GCGGAGCTGTCAAAGCGAGC
	-22	Reverse (+)	GCTCGCTTTGACAGCTCCGC
gRNA 5	-203	Forward (+)	GACTCAGCTGAGAGAGAAAAT
	-203	Reverse (+)	ATTTTCTCTCTCAGCTGAGTC
gRNA 6	-250	Forward (-)	GCTGGCGGTGCTCCCCAAAAT
	-250	Reverse (-)	ATTTTGGGGAGCACCGCCAGC
gRNA 7	-127	Forward (-)	GCCGGGGCCGTGATTGGCC
	-127	Reverse (-)	GGCCAATCACGGCCCCCGGC

Çizelge 3.3'ün devamı

gRNA 8	-100	Forward (-)	GAGGCTCCGCGGGGCCCCACG
	-100	Reverse(-)	CGTGGGGCCCCGCGGAGCCTC
gRNA 9	-79	Forward (+)	GTGGTGC GGCGGCGGCCCCGC
	-79	Reverse (+)	GCGGGCGGCGGCGCGCACCAC
gRNA 10	-57	Forward (-)	GAACCCACAGCCAGCGCGGAC
	-57	Reverse (-)	GTCCGCGCTGGCTGTGGGTTC

Çizelge 3.2'de yer alan primerlerin *hPdx1* geninde bulundukları yerler promotor bölgesinin sol kısmındaki 250 bp lik alan
Şekil.3.2.'de gösterildiği gibidir:

ATTTTGGGGAGCACCGCCAGCTGCCCGTTCAGGAGTGTGCAGCAA^{ACTCG}
TGAGAGAGAAAAAT^{TGGAACAAAAGCAGGTGCTCGC}GGGTACCTGGGCCTA
CTCTTAGTGC GGCGCAGCCAGGCCAATCACGGCCCCCGGCTGAACCA^{CGTG}
GGGCCCCCGCGGAGCCTATGGTGC GGCGGCGGCGGCGCGCGCG^{CGGTCCGCGCTGG}
CTGCCTCTGAGATCAGTGCGGAGCTGTCAAAGCGAGCAGG^{GGTGGCGCC}
GGGGTGGGAACGCCACACAGTGCCAAATCCCCGGCTCCAGCTCCCGA
CTCCCG
GCTCCCGGCTCCCGGCTCCCGGTGCCCAATCCCGGGCGCGCAGCC^{ATG}
hPdx1 -240 hPdx1 -183hPdx1 -148hPdx1 -22hPdx1 -203hPdx1 -250hPdx1 -127hPdx1
-100hPdx1 -79 hPdx1 -57

Şekil 3. 2. gRNA'ların *Pdx1* promotor bölgesindeki yerleri

3.4.2. Primer birleştirilmesi

Primerlerin birleştirilmesi için Zhang protokolü uygulandı (S. Konermann, Zhang lab. SAM target sgRNA cloning protocol 2014) 1 µl oligonükleotit (100 mM) (forward) ve 1 µl oligonükleotit (100 mM) (reverse) hazırlandı. 1 µl 10X T4 Buffer ile 0.5 µl T4 PNK enzimi üzerine eklendi. Total hacim dH₂O ile 10 µl'ye tamamlandı. 37°C'de 30 dk bekletildikten sonra sıcaklık 95°C'ye çıkarıldı. Daha sonra 95°C'den dk'da 5°C sıcaklık düşerek son sıcaklık 25°C olacak şekilde sıcaklık gradiyenti oluşturuldu. Daha sonra oluşan ürünün kantitatif analizleri yapıldı. Primerler birleştirildikten sonra pSPgRNA plazmitine ligasyon yapıldı. Bu işlemde önce plazmitte primerlerin girmesini sağlamak için plazmite kesim işlemi yapıldı.

3.4.3. Plazmitin kesim işlemi

Ligasyon işlemi için sgRNA kesim işlemi yapıldı. Zang Protokolü uygulandı (S. Konermann, Zhang lab, SAM target sgRNA cloning protocol,2014). 1 mg plasmid (jelden kesim yapıp pürifiye yapılacaksa 2 mg örnek kullanılır.) ile 1 µl fastdigest *BbsI* enzimi 2 µl 10X Fast Digest Buffer ortamında karıştırıldı. Total hacim ddH₂O ile 20 µl'ye ayarlandı. 37°C'de 2 saat, 80°C'de 20 dk inkübasyon yapıldı. Kesilen pSP

gRNA plazmiti %0,8'lik jelde yürütüldü. Blue Box cihazında kesim görüntülendi. İstenilen banda sahip olan kesilmiş plazmit jelde sabitlendi. Ardından jelden izolasyon yapıldı. İzolasyon için Thermo GeneJet Gel Extraction Kit kullanıldı.

3.4.4. Jelden izolasyon

İstenilen bant jelden kesilip çıkarıldı ve ependorfa aktarıldı. Üzerine Binding Buffer (1:1 oranında) eklendi. 60°C'de 10 dk agarozun erimesi için beklenildi ve arada vorteks yapıldı. Agaroz eridikten sonra ependorfun tamamı kolona aktarıldı. 1 dk 12.000'de santrifüj yapıldı ve kolonun alt kısmı değiştirildi. Üzerine 700 µl Wash Buffer eklendi. 1dk 10351 rpm'de santrifüj yapıldı. Kolonun alt kısmı döküldü. Ardından hiçbir şey eklemeyen kolon 30 sn 10351 rpm'de santrifüj yapıldı. Kolonun filtre kısmı bir ependorfun üzerine takıldı ve üzerine 50 µl Elution Buffer eklendi. 3 dk oda ısısında inkübasyona bırakıldı ve süre tamamlanınca 2 dk 10351 rpm'de santrifüj yapıldı. -20°C'ye kaldırıldı.

3.4.5. Ligasyon

1 µl kesilmiş pSPgRNA ile 1 µl oligo (10 mM) 1 µl 10X T4 Ligase Buffer bulunduğu ortamda 1 µl T4 DNA Ligase enzimi kullanılarak ligasyon yapıldı. Total hacim ddH₂O ile 10 µl'ye tamamlandı. 37°C'de 30 dk inkübasyon yapıldı.

3.4.6. Transformasyon basamağı

Önceden -80°C'den getirilen DH5α suşunun buz üzerinde çözünmesi sağlandı. Ligasyon yapılan örneğin üzerine 300 µl DH5α kompetent hücre eklendi ve pipetaj yapıldı. 30 dk buz üzerinde bekletildi. 42°C'de 40-50 saniye bekletildi. Ardından 2 dk buz üstünde bekletildi. Üzerine 250 µl SOC medium eklendi ve 37°C'de 220 rpm'de 60 dk inkübasyona bırakıldı. Plazmit amfisilin dirençli olduğu için LB Agar (+Amp) üzerine yayma işlemi yapılarak ekim yapıldı. Çoğalan kolonilerden tek koloni olanlardan ideal büyüklükte olanlar seçildi ve LB Bloth (+Amp) içine atıldı. O.D ölçümü yapıldı ve değer 0.4-0.6 arasına denk geldiği zaman; stok olarak saklamak için 300 µl örnekten alındı ve 300 µl %50'lik gliserol eklendi ve -80°C'ye kaldırıldı. Geri kalan sıvı solusiyona plazmit izolasyonu yapıldı.

3.4.7. Plazmit izolasyonu

Plazmit izolasyonu için Thermo GenJet Plasmid Miniprep Kit kullanıldı.

15 ml tüp içindeki sıvı besiyeri 25°C'de 4000 rpm'de 5 dk santrifüj yapıldı. Üst faz döküldü. Pelete 250 µl Resuspension Solution + RNase A eklendi ve pelet çözdürüldü. Çözünmüş pelet ependorflara aktarıldı. Üzerine 250 µl Liziz Buffer eklendi ve 8 defa alt-üst edildi. Ardından 350 µl Neutralization Solution eklendi. 8 defa alt-üst edildi. 5 dk 10351 rpm'de santrifüj yapıldı. Süpernatant kolona aktarıldı ve 1 dk 10351 rpm'de santrifüj yapıldı. Kolonun alt kısmı değiştirildi ve üzerine 500 µl Wash Bufffer eklendi. 1 dk 10351 rpm'de santrifüj yapıldı. Alt kısım döküldü. Üzerine 500 µl Wash Bufffer eklendi. 1 dk 10351 rpm'de santrifüj yapıldı. Kolonun filtre kısmı ependorfa aktarıldı. 50 µl Elution Buffer eklendi. 2 dk oda ısısında inkübasyona bırakıldı. 2 dk 10351 rpm'de santrifüj yapıldı. -20°C'ye kaldırıldı.

3.4.8. DNA ölçümü

Hazırlanan DNA ve RNA'ların kalitatif ve kantitatif analizleri NanoDrop spektrofotometresi (Thermo Scientific, Waltham, MA) kullanılarak yapıldı. Cihaz öncelikle 1 µl dH₂O ile temizlendi. Ardından DNA ya da RNA'nın çözölmüş olduğu çözeltiden 1 µl alınarak ölçüm değeri sıfırlandı. İzole edilen DNA ya da RNA'dan 1 µl alınarak 230, 260 ve 280 nm dalga boyunda ölçüm yapıldı.

Plazmitler, M13 FORWARD (5' GTA AAA CGA CGG CCA GT 3') primeri ile tek yönlü sekans analizi yapılması için BM firmasına gönderildi.

3.5. Hücre Kültürü

İnvitrogen firmasından satın alınan insan embriyonik böbrek hücreleri (AD-293) kültür işlemine kadar sıvı azotta (-196°C) saklandı. Sıvı azottan alınan hücreler 37°C sıcaklıktaki su banyosunda, tüpün içerisinde küçük bir buz parçası kalacak şekilde eritildi. Tüp %70'lik etil alkol ile sterilize edildi ve steril kabine koyuldu. 2 ml'lik serolojik pipet yardımıyla hücreler tüpün içerisinden alındı ve 15 ml'lik tüpün içerisine aktarıldı. 37°C ve %5 CO₂'li ortamda ısıtılmış, yüksek glukozlu DMEM, 10% FBS, 1X L-glutamin, 1X NEAA ve 1X antibiyotik-antimikotik (anti-anti) içeren besin ortamından 2 ml alındı ve küçük damlalar halinde 15 ml tüpün içerisindeki hücrelerin üzerine bırakıldı. Bu işlem yapılırken tüp yavaşça çalkalandı. Tüpün içerisine son hacim 12 ml olacak şekilde besin ortamı eklendi. 1553 rpm'de 37°C'de 5 dk santrifüj yapıldı. Süpernatant kısmı atıldı. Hücre peleti 12 ml besin ortamı içerisinde çözöldü ve T-75 kültür kabına (Corning, Corning, NY) aktarıldı. Hücre yoğunluğu %60-80 oluncaya kadar her gün, 10 ml PBS ile yıkandıktan sonra hücrelerin besin ortamı değıştirildi. Deneylerin yapılması amacıyla hücreler 12 kuyucuklu kültür kaplarına pasajlandı. Pasaj sırasında T-75 kültür ortamında bulunan hücrelerin besin ortamları pipet yardımıyla alındı. 10 ml PBS ile yıkama işlemi yapıldı. 3 ml Tripsin enzimi eklendi ve 5 dk 37°C ve %5 CO₂'li inkübatörde (Thermo) bekletildi. Mikroskop altında hücrelerin kalktığı göröldükten sonra 10 ml kültür ortamı eklendi ve hücre karışımı serolojik pipet yardımıyla 15 ml tüpe koyuldu. 5 dk 37°C 1890 rpm'de santrifüj yapıldı. Süpernatant atıldı ve hücre peleti besin ortamıyla çözödüröldü. Her kuyusunda 25×10³ hücre olacak şekilde 12 kuyucuklu kültür kaplarına (Corning, Corning, NY) pasaj yapıldı. Geri kalan hücreler alınarak üzerine eşit hacimde 2X dondurma ortamı eklendi ve öncelikle -80°C'de bir gece bekletildi. Ardından uzun süre saklamak amacıyla sıvı azota kaldırıldı.

3.5.1. Transfeksiyon

12 kuyucuklu plakanın kuyucuğuna 25×10³ AD-293 hücreleri ekildi. Ekim işleminden 24 saat sonra hücreler antibiyotiksiz medyuma alındı ve Lipofectamine 2000 aracılığıyla gRNA plazmiti ile dCas9-VPR plazmitleri transfekte edildi. Purifiye edilip konsantrasyonları ölçölen DNA'lardan birinden 1 µl (20 ng/µl) gRNA plazmiti ve 1 µl (200 ng/µl) dCas9-VPR alınarak Opti-MEM (pH:7.6) ile 50 µL'ye tamamlandı ve pipetaj yapıldı. 5 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Aynı bir ependorfta her bir örnek için 0.5 µL Lipofectamine 2000 ve 495.5 µL Opti-MEM (pH:7.6) birleştirilip pipetaj yapıldı ve 5 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. İki ayrı mix birleştirilerek 45 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyondan sonra AD-293

hücrelerinin kültür ortamlarına eklendi. Transfeksiyondan 24 saat sonra hücre kültür ortamı değişimi yapıldı.

qPZR sonuçlarına göre ideal olarak belirlenen dört gRNA plazmiti 3.5.1’de bahsedilen tranfeksiyon protokolüne uyularak hücrelere transfekte edildi. Bunun için; 1 µl (toplam miktar 20 ng/ µl) olacak şekilde alındı 1 µl (200 ng/ µl) dCas9-VPR ile beraber 25×10^3 hücreye sahip olan AD-293 hücrelerine verildi. Ayrıca dört gRNA plazmiti 1 µl (toplam miktar 80 ng/ µl) olacak şekilde alındı ve 1 µl (200 ng/ µl) dCas9-VPR ile beraber 25×10^3 hücreye sahip olan AD-293 hücrelerine verildi. Bu deney için; bir set 12 kuyucuklu kültür ortamı, RNA izolasyonu ve devamında takip eden çalışma süreçleri için hazırlandı. Diğer kültür ortamı ise transfeksiyonun gerçekleşip gerçekleşmediğini göstermek için 1 µl (200 ng/µl) dCas9-VP64_GFP verilecek şekilde kuruldu. Bu transfeksiyonu göstermek için bu kuyucuklardaki hücrelerin bir kısmı 24 saat tamamlandığında, diğer bir kısmı ise 48 saat tamamlandığında bu hücrelerin görüntüleri alındı.

Her iki deney düzeneğinin transfeksiyondan bir gün sonra hücrelerin besin ortamı değiştirildi ve transfeksiyondan 48 saat sonra hücrelerden RNA izolasyonu yapıldı. Ardından qPZR yapılarak *Pdx1* genindeki ekspresyonun miktarındaki artışa bakıldı.

3.5.2. Hücre çekirdeğinin boyanması

dCas9-VP64_GFP verilmiş olan hücrelerin transfeksiyondan 24 saat ve 48 saat sonra besin ortamı uzaklaştırıldı. Hücreler yeni hazırlanmış ve 37°C’de 30 dk ısıtılmış olan kültür ortamıyla yıkandı. Ardından bu kültür ortamı da çekilerek 1:400 oranında olacak şekilde yüksek glukozlu DMEM’de hazırlanmış olan Hoechst boyası bu kuyucuklara verildi ve 20 dk oda ısısında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon tamamlanınca hücrelerin görüntüleri alındı. Böylelikle transfeksiyondan 24 saat ve 48 sonra hücrelerin LEICA DMİB G (Leica microsystems, Germany) mikroskobu ile görüntüleri elde edildi.

3.5.3. RNA izolasyonu

Diğer hücre kültüründen transfeziyondan 48 saat sonra Thermo Scientific GeneJet RNA Purification Kit kullanılarak RNA izolasyonu yapıldı.

İlk olarak hücrelerin üzerine 600 µl Liziz Tampon eklendi ve pipet ucuyla kazıma işlemi yapıldı (1000 µl liziz tampona 20 µl beta merkapt etanol eklendi). Sıvı kısım ependorfa eklendi ve 10 sn vorteks yapıldı. Üzerine 360 µl etanol eklendi ve pipetaj yapıldı. Elde edilen süspansiyon kolona aktarıldı. Santrifüj yapıldı ve alt kısmı döküldü. Kolonun üzerine 700 µl Wash Buffer-1 eklendi. Santrifüj yapıldı. Alt kısım döküldü. 600 µl Wash Buffer-2 eklendi. Santrifüj yapıldı. Alt kısım döküldü. Üzerine 250 µl Wash Buffer-2 eklendi. Santrifüj yapıldı. Kolonun filtre kısmı yeni bir ependorfun üzerine takıldı. Üzerine 100 µl Elution Buffer eklendi. 3 dk oda ısısında inkübasyon yapıldı. İnkübasyon süresi tamamlanınca santrifüj yapıldı ve örnekler -80°C’ye kaldırıldı. İzole edilen RNA’ların kalitatif ve kantitatif analizleri NanoDrop spektrofotometre kullanılarak ölçüldü.

Elde edilen RNA'lar ile cDNA sentezi yapıldı. Bu işlem için ilk olarak Thermo DNase Kiti kullanıldı. RNA örneğinden 1 µl (250 µg-1000 µg olacak şekilde ayarlandı) alındı ve 1 µl 10X Buffer eklendi. Bu karışımın üzerine 1 µl DNase I eklendi ve ddH₂O ile total hacim 10 µl'ye tamamlandı.

DNase Koşulları; 37°C'de 60 dk inkübasyon yapıldı. Üzerine 1 µl 50 mM EDTA eklendi. 65°C'de 10 dk inkübasyon yapıldı. DNase işleminin olup olmadığını kontrol etmek için PCR yapıldı.

3.5.4. PZR ve qPZR'de kullanılan primerler

gRNA plazmitlerinin hücreye transfeksiyon işleminden sonra yapılacak olan PZR ve qPZR için gerekli olan primerler Çizelge 3.4'te yer almaktadır.

Çizelge 3. 4. PZR ve qPZR'de kullanılan primerler

Genler		Dizi
hPdx1	Forward (5'-3')	GGAACCTCCTTCTCCAGCTCTA
hPdx1	Reverse (5'-3')	CCTTTCCCATGGATGAAGTC
hGapdh	Forward (5'-3')	AGGGCTGCTTTTAACTCTGGT
hGapdh	Reverse (5'-3')	CCCCACTTGATTTTGGAGGGA

PZR uygulamasında; 5 µl 10X Tampon, dNTP 0.5 µl, 0.4 µl Forward, 0.4 µl Reverse ve 0.125 µl Taq polimeraz bir ependorf tüpte karıştırıldı ve 1 µl DNA örneğinin üzerine eklendi ve total hacim dH₂O ile 25 µl'ye tamamlandı. PZR koşulları: 95°C 3 dk başlangıç denatürasyonu, 95°C 30 s denatürasyon, 60°C 45 s bağlanma, 68°C 1 dk uzama ve 68°C 5 dk final uzaması protokolü; denatürasyon ve uzama aralığı 38 döngü olacak şekilde PZR tamamlandı.

3.5.5. DNA örneklerinin yürütülmesi

Hazırlanan agaroz jel, 1X TAE tamponuyla doldurulmuş olan küvete yerleştirildi. 20 µl DNA çözeltilerinin üzerine 4 µl 6X yükleme tamponu eklendi. DNA jeldeki kuyucuklara yüklendi. Birinci kuyucuğa referans olarak 3µl 1 kb DNA Lader yüklendi. Örnekler tamamen açılana kadar 90 V'da elektroforez ile yürütüldü.

3.5.6. cDNA sentezi

cDNA Sentezi için Biorad cDNA Sentez Kiti kullanıldı. cDNA sentezi için; 1 µl DNase uygulanmış örnek miktarı (1000 ng/µl) alındı. 2 µl 5X iScript Reaksiyon Tampon ve 0.5 µl iScript Reverse transkriptaz eklendi. Total hacim dH₂O ile 10 µl'ye tamamlandı. cDNA Koşulları; sentezin hazırlığı için 25 °C'de 5 dk, RNA'dan DNA eldesi için 42 °C'de 30 dk ve reverse transkriptaz enziminin durdurulması için 85

°C’de 5 dk inkübe edildi. cDNA elde edilip edilmediğini kontrol etmek için PZR kuruldu.

PZR uygulamasında; 5 µl 10X Tampon, dNTP 0.5 µl, 0.4 µl Forward, 0.4 µl Reverse ve 0.125 µl Taq polimeraz bir ependorf tüpte karıştırıldı ve 1 µl DNA örneğinin üzerine eklendi ve total hacim dH₂O ile 25 µl’ye tamamlandı. PZR koşulları: 95°C 3 dk başlangıç denatürasyonu, 95°C 30 s denatürasyon, 60°C 45 s bağlanma, 68°C 1 dk uzama ve 68°C 5 dk final uzaması protokolü; denatürasyon ve uzama aralığı 30 döngü olacak şekilde PZR yapıldı.

Örnekler 3.5.5.’te açıklanan DNA örneklerinin yürütülmesi protokolüne göre elektroforez ile yürütüldü.

3.5.7. Kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (kPZR)

cDNA örnekleri kantitatif PZR yapılarak Light Cycler 96 system (Roche, Basel, Switzerland) cihazında analiz edildi. Biorad kPZR mix Kiti kullanıldı. Bir örnek için; 5 µl IQ⁺SYBR Green süpermix (2X konsantrasyonlu), 1 µl cDNA örneği (100-300 ng olacak şekilde ayarlandı), 0.2 µl Forward ve 0.2 µl Reverse primer alındı. Total hacim dH₂O ile 10 µl’ye tamamlandı. kPZR koşulları: Başlangıç denatürasyon için 95 °C’de 10 dk, denatürasyon için 95 °C’de 15 sn, bağlanma ve uzama için ise 60 °C’de 60 sn protokolü; denatürasyon ile bağlanma ve uzama aralığı 40 döngü olacak şekilde inkübasyon yapıldı.

Karşılaştırmalı ölçüm $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ile hesaplandı, *Pdx1* için *Gapdh* ekspresyonuyla normalize edildi.

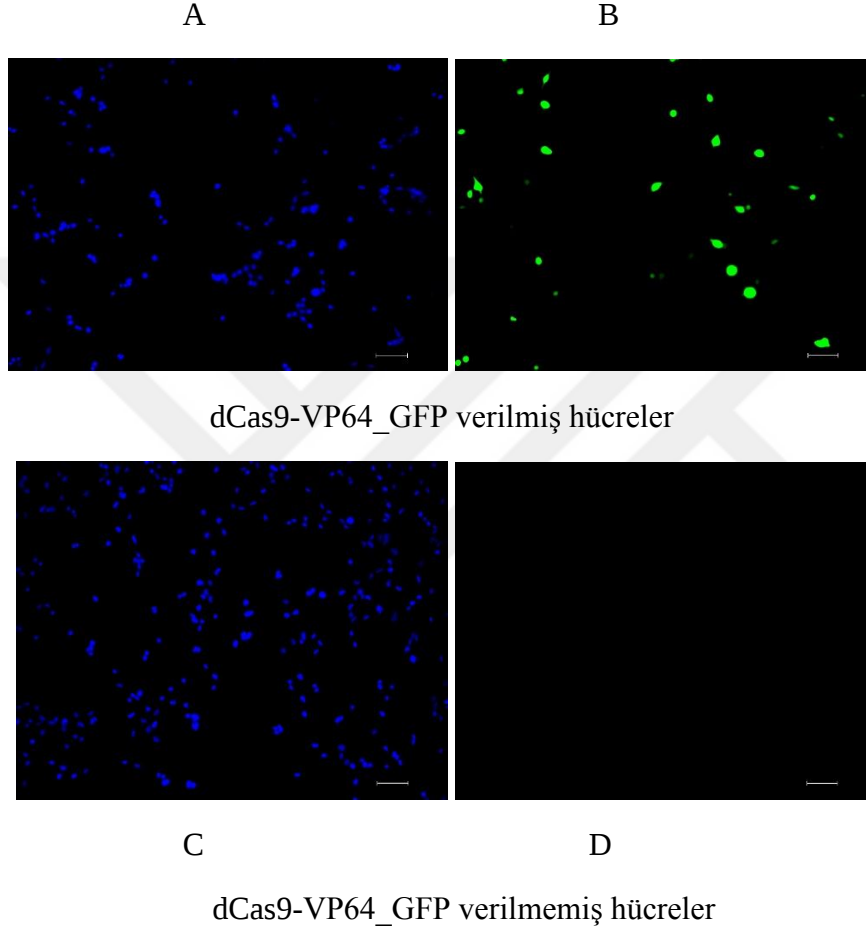
3.5.8. İstatistiksel Analiz

Yapılan qPZR sonucunda elde edilen $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değerlerinin istatistiksel olarak anlamlılıklarını göstermek için Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) testi yapıldı.

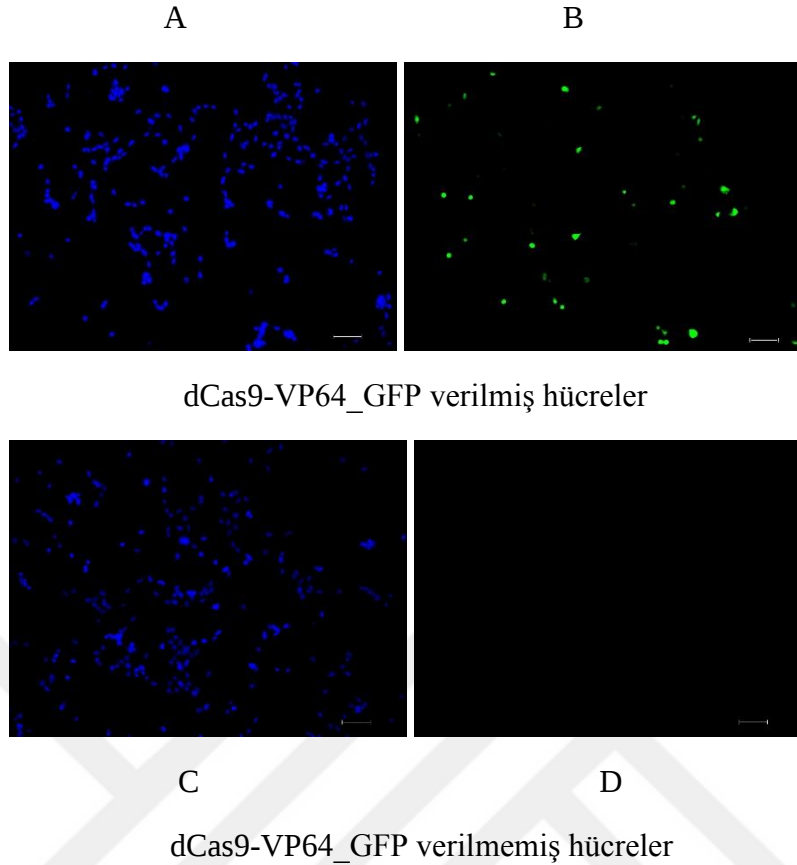
4. BULGULAR

4.1. gRNA Plazmitlerinin ve CRISPR/dCas9-VP64 Plazmitinin Transfeksiyonu

20 ng olacak şekilde alınan gRNA plazmitleri ile 200 ng dCas9-VP64 ile ayrı ayrı verildiği deney düzeneği için pozitif kontrol olarak kullanılan dCas9-VP64-GFP plazmitinin Şekil 4.1 ve Şekil 4.2'de transfeksiyondan 24 saat ve 48 saat sonrası ideal koşulları sağlayan transfeksiyon sonuçları gösterildi.

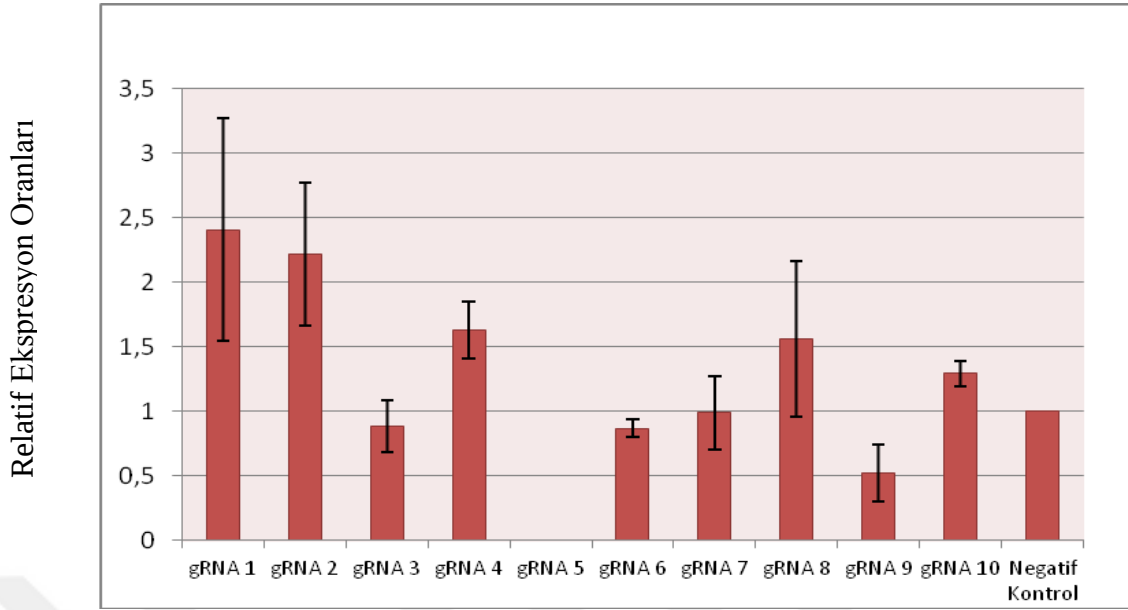


Şekil 4.1. HEK-293 hücre hattına gRNA ayrı ayrı verildiğinde dCas9-VP64_GFP plazmiti verilmiş ve verilmemiş hücrelerin 24 saat inkübasyon sonundaki görüntüsü (Fotoğraflar 10X ile çekildi. A: dCas9-VP64_GFP verilmiş hücrelerin DAPI ile boyanmasını, B: dCas9-VP64_GFP verilmiş hücrelerin GFP ışımalarını, C: negatif kontrol (dCas9-VP64_GFP verilmemiş hücrelerin DAPI ile boyanmasını, D: negatif kontrolün GFP ışımalarını gösteriyor. Cetvel 100 µm'dir.)



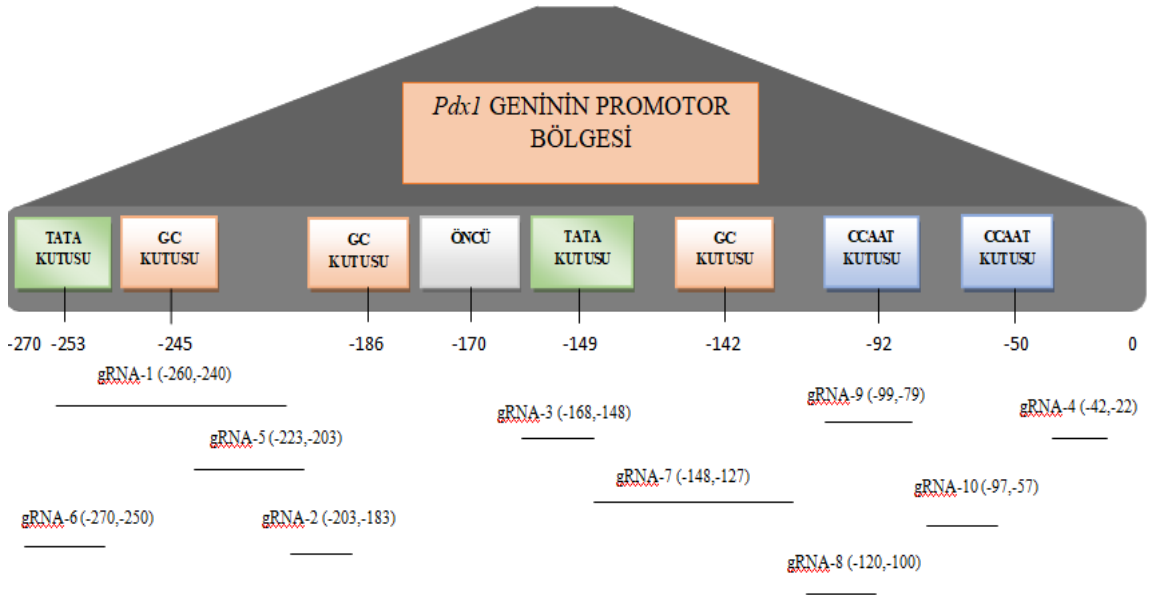
Şekil 4.2. HEK-293 hücre hattına gRNA ayrı ayrı verildiğinde dCas9-VP64_GFP plazmiti verilmiş ve verilmemiş hücrelerin 48 saat sonundaki görüntüsü (Fotoğraflar 10X ile çekildi. A: dCas9-VP64_GFP verilmiş hücrelerin DAPI ile boyanmasını, B: dCas9-VP64_GFP verilmiş hücrelerin GFP ışmasını, C: negatif kontrol (dCas9-VP64_GFP verilmemiş hücrelerin DAPI ile boyanmasını, D: negatif kontrolün GFP ışmasını gösteriyor. Cetvel 100 μ m'dir.)

Transfeksiyonun gösterilmesinin ardından; endogenik *Pdx1* geninin aktivasyonunun sağlanıp sağlanmadığını öğrenmek amacıyla transfeksiyondan 48 saat sonra AD-293 hücre hattından RNA izolasyonu ve RNA'lardan cDNA sentezi yapıldı. Elde edilen cDNA'lara *Pdx1* geni için yapılan qPCR sonuçları negatif kontrolle (plazmit verilmemiş AD-293 hücresi) $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerlerine göre kıyaslama yapıldığı zaman Şekil 4.3'de gösterildiği gibi bir grafik elde edildi. Bu grafiğe göre CRISPR/dCas9-VPR aktivasyon domaini kullanılarak *Pdx1* geninin aktivasyonu için yapılan ANOVA testine göre gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yokken ($p:0.06 > 0.05$) deneysel olarak anlamlı farklılıklar olduğu görüldü. Deneysel sonuçlara bakılarak; 4 adet gRNA plazmiti belirlendi. Bunlar; gRNA-1, gRNA-2, gRNA-4 ve gRNA-8 plazmitleridir.



Şekil 4.3. HEK-293 hücre hattına *Pdx1* geni için seçilen gRNA plazmitlerinin ayrı ayrı CRISPR/dCas9-VPR ile transfeksiyonu sonrası qPCR sonucu

Pdx1 geninin promotor bölgesinde bulunan tekrarlayan diziler ve tasarlanan primerlerin yeri şekil 4.4’de gösterildiği gibidir.



Şekil 4.4. *Pdx1* geninin promotor bölgesinde bulunan tekrarlayan dizilerin ve tasarlanan primerlerin bulundukları yerler

4.3. Seçilen gRNA Plazmitlerin Birlikte dCas9- VPR Plazmiti ile Transfeksiyonu

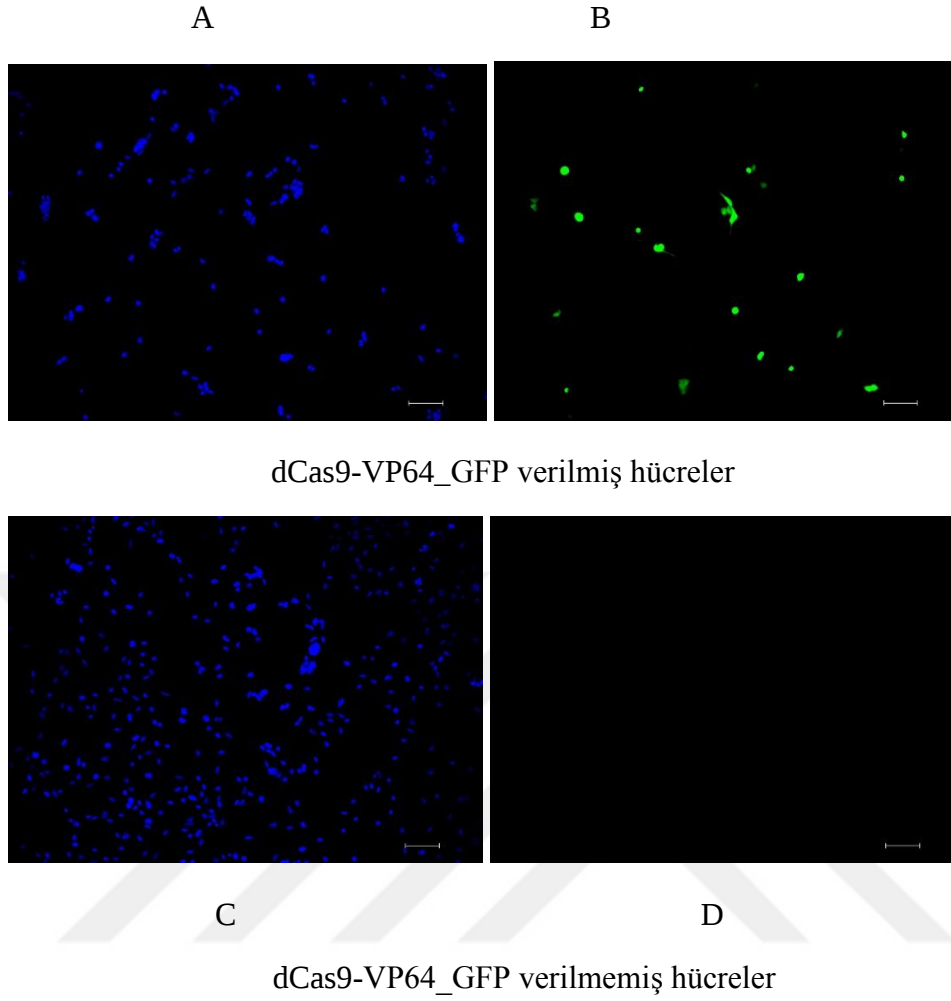
İdeal olarak belirlenen gRNA'ların *Pdx1* geninin promotor bölgesinde bulundukları yerler Şekil 4.5.'te gösterildiği gibidir.

CCATTTTGGGGA **GCACCGCCAGCTGCCCGTTC** AGGAGTGTGCAGCAAATC
 AGCTGAGAGAGAAAATTG **GAACAAAAGCAGGTGCTCGC** GGGTACCTGGGC
 CTAGCCTCTTAGTGCGGCCAGCCAGGCCAATCACGGCCCCCGGCTGAACC
 A **CGTGGGGCCCCGCGGAGCCT** ATGGTGCGGCGGCCGCGCCCGCGGTCCGC
 GCTGGCTGTGGGTTCCCTCTGAGATCAGT **GCGGAGCTGTCAAAGCGAGCA**
GGGGTGGCGCCGGGAGTGGGA

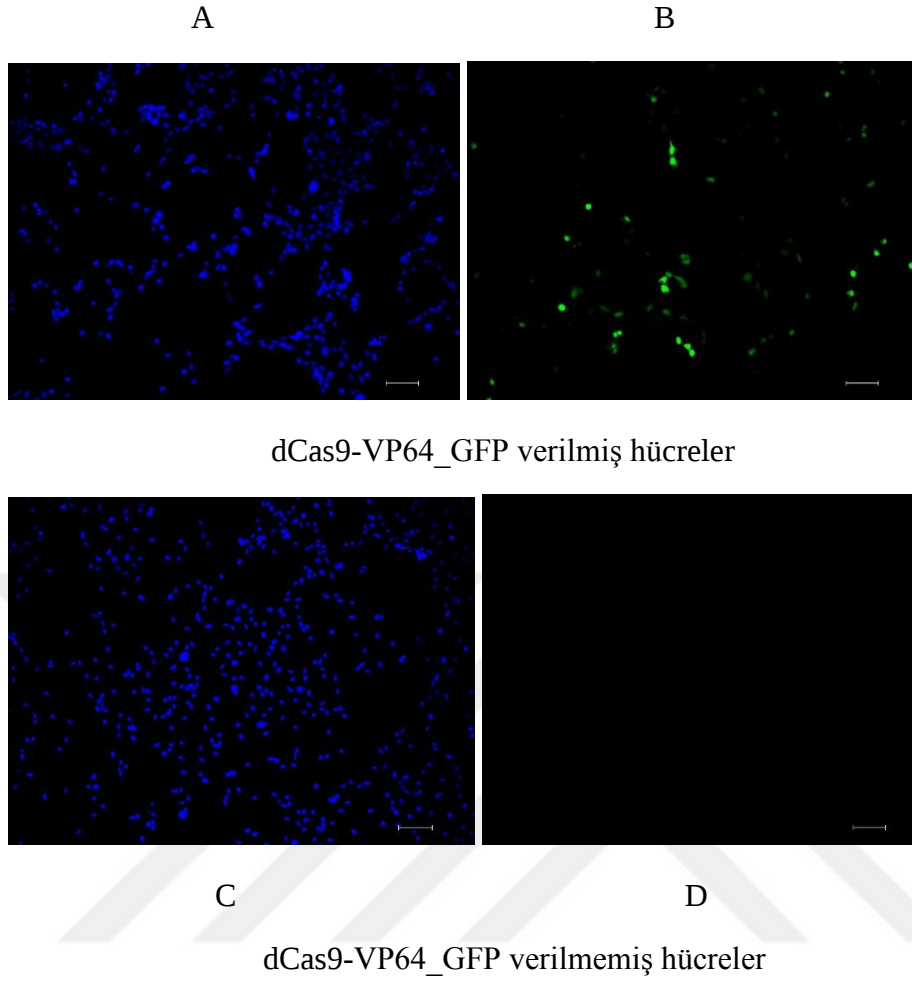
gRNA-1 **gRNA-2** **gRNA-4** **gRNA-8**

Şekil 4.5. İdeal 4 gRNA'nın *Pdx1* geninin promotor bölgesinde bulundukları yerler

Bu 4 gRNA plazmiti (gRNA-1, gRNA-2, gRNA-4 ve gRNA-8) birlikte 12 kuyucuklu kültür kaplarındaki AD-293 hücrelerine verildi. Transfeksiyonun olup olmadığını gözlemlemek için 1 µl (200 ng/µl) VP64-GFP plazmiti de bir kuyucuğa verildi. Transfeksiyonun gerçekleştiği hücrelerde Şekil 4.6 ve Şekil 4.7'de gösterildiği gibi GFP ışıması görüldü.

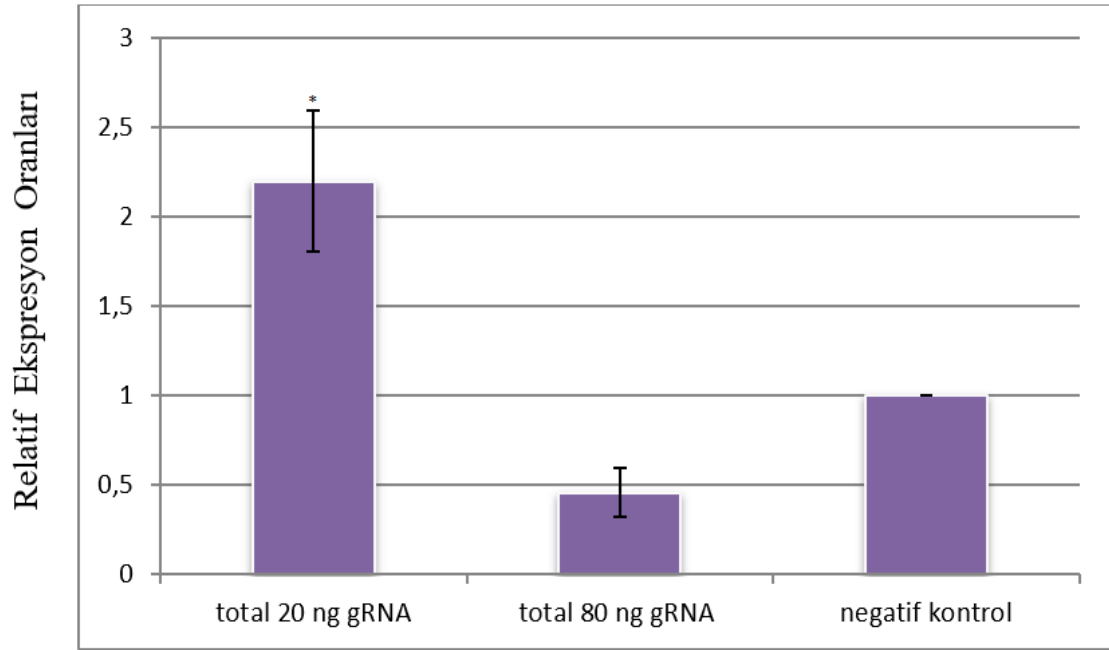


Şekil 4.6. HEK-293 hücre hattına gRNA birlikte verildiğinde dCas9-VP64_GFP plazmiti verilmiş ve verilmemiş hücrelerin 24 saat inkübasyon sonundaki görüntüsü (Fotoğraflar 10X ile çekildi A: dCas9-VP64_GFP verilmiş hücrelerin DAPI ile boyanmasını, B: dCas9-VP64_GFP verilmiş hücrelerin GFP ışmasını, C: negatif kontrol (dCas9-VP64_GFP verilmemiş hücrelerin DAPI ile boyanmasını, D: negatif kontrolün GFP ışmasını gösteriyor. Cetvel 100 μ m'dir.)



Şekil 4.7. AD-293 hücre hattına gRNA birlikte verildiğinde dCas9-VP64_GFP plazmiti verilmiş ve verilmemiş hücrelerin 48 saat sonundaki görüntüsü (Fotoğraflar 10X ile çekildi. A: dCas9-VP64_GFP verilmiş hücrelerin DAPI ile boyanmasını, B: dCas9-VP64_GFP verilmiş hücrelerin GFP ışımalarını, C: negatif kontrol (dCas9-VP64_GFP verilmemiş hücrelerin DAPI ile boyanmasını, D: negatif kontrolün GFP ışımalarını gösteriyor. Cetvel 100 μm 'dir.)

Transfeksiyondan 48 saat sonra hücrelerden RNA izolasyonu, cDNA eldesi ve elde edilen cDNA'larla qPCR yapıldı. qPCR sonuçları Şekil 4.8'deki grafikte gösterildi. Bu grafiğe göre CRISPR/dCas9-VPR aktivasyon domaini için *Pdx1* geninin aktivasyonu için yapılan ANOVA testine göre gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın ($p:0.006 < 0.05$) olduğu görüldü.



Şekil 4.8. AD-293 hücre hattına *Pdx1* geni için seçilen 4 gRNA plazmitlerinin bir arada dCas9-VPR ile transfeksiyonu sonrası qPCR sonucu (*işareti $p: 0.006 < 0.05$)

5. TARTIŞMA

Bakterilerde bulunan CRISPR sistem, hedef genlerin düzenlenmesi RNA aracılı nükleaz teknolojisiyle aracılığıyla yapılmıştır (Cong vd. 2013; Hwang vd. 2013; Jinek vd. 2012; Mali vd. 2013; Shen vd. 2013)

Gen düzenlenmesi; pek çok hastalığın tanımlanması ve tedavi edilmesi için oldukça önemlidir (H Keneto vd. 2015; Habener vd. 2005; Kaneto vd. 2008). Yapmış olduğumuz bu çalışmada; Türkiye’de yaygın hastalıklar arasında görülen diyabet hastalığı üzerine yoğunlaşıldı. Bu hastalığı etkileyen faktörlerden pankreatik hücrelerin düzenlenmesi için önemli bir transkripsiyon faktör olan *Pdx1* geninin düzenlenmesi ile ilgili çalışmalar yapıldı.

Önceki çalışmalarda gen aktivasyonu sağlamak için Çinko-parmak nükleaz (ZFNs) ve transkripsiyon aktivator benzeri efektör nükleaz (TALENs) gibi pek çok farklı teknoloji kullanılmıştır. İlerleyen zamanlarda CRISPR sisteminin keşfedilmesiyle yapılan çalışmalarda bu sistem kullanılmaya başlanmıştır. Çünkü bu sistemde kullanılan dizilerin, hedef dizi dışındaki bölgelere bağlanma olasılıkları daha düşük olduğu görülmüştür. Bu nedenle de bu sistem, diğer sistemlerle kıyaslandığında hedef diziye bağlanma spesifikliğı daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca uygulanma şekli olarak diğer sistemlere göre daha kolay bir yöntem olduğu belirlenmiştir (Li vd. 2013; Shan vd. 2013). Bu yüzden bu çalışmada; CRISPR sistemini kullanarak gen aktivasyonu çalışmaları yapıldı.

VPR üç farklı transkripsiyon aktivatörün kaynaştırılmasıyla (VP64, p65 ve RTA) elde edilmiştir. Önceki çalışmalarda transaktivatör domain olarak VPR domainin yüksek verimlilikte olduğu gösterilmiştir (Cheng vd. 2013; Gilbert vd. 2013; Maeder vd. 2013; Perez-Pinera vd. 2013; Mali vd. 2013). Bu yüzden, bu çalışmada transaktivatör domain olarak VPR domainini üzerine yoğunlaşıldı. Çalışmamızda HEK-293 kullanma nedenimiz; bu hücre hattının deneysel çalışmalarda transfeksiyon çalışmalarında kolayca tranfekte edilebilecek bir hücre hattı olmasıdır.

Morgan vd. (2013) yaptığı bir çalışmada, gRNA plazmit konsantrasyonu için konsantrasyon arttıkça verimin yükseldiğı bulmuştur. Ancak yaptığımız çalışmada tam tersi bir durum gerçekleşti. Bunun nedeni, tasarladığımız primerlerin aktarıldığı plazmitin HEK-293 hücre hattındaki yarattığı stres etmenin daha yüksek olması olabilir.

gRNA plazmitleri ayrı ayrı HEK-293 hücrelerine transfekte edildiğinde; gRNA-5 plazmitinin *Pdx1* geni için kPZR sonucuna bakıldığında bu plazmitin çalışmadığının görüldüğünün nedeni; bu plazmitin hücreye girmemiş olması olabilir. kPZR sonuçlarında gRNA-3 ve gRNA-6 plazmitleri TATA kutusunu, gRNA-7 plazmitini GC kutusunu, gRNA-9 plazmiti CCAAT kutusunu kapsayacak şekilde tasarlanmış olmalarına rağmen verimlerinin düşük olmasının nedeni; bu plazmitlerle CRISPR/dCas9-VPR domaini birlikte hedef diziye bağlanmamış olması olabilir. Başka bir olasılık ise, bu gRNA’ların hedef dışı bölgelere bağlanma oranlarının diğer plazmitlere göre daha yüksek olması olabilir.

gRNA-1, gRNA-2, gRNA-4 ve gRNA-8 numaralı plazmitlerde *Pdx1* geninin TATA kutusu ya da GC kutusu bölgelerin bulunduğu yerlere yakın olacak şekilde tasarlanması ve hedef diziler dışındaki dizilere bağlanma oranının daha düşük olması nedeniyle; bu plazmitler hücreye verildiği zaman *Pdx1* geninin ekspresyonunda yükselmeye neden olmuş olabilir. Ayrıca, diğer plazmitlere kıyasla bu plazmitlerin CRISPR/dCas9-VPR domaini ile beraber hedef diziye daha fazla oranda bağlanmış olması, bunların veriminin daha yüksek olmasına neden olmuş olabilir.

Bununla birlikte; Chave vd. (2015) yapmış oldukları bir çalışmada, her genin ekspresyon düzeyinin kullanılan transaktivatör domaine ve kullanılan hücre hattına göre değişebileceği tespit edildi. Bu yüzden; yaptığımız tez çalışmasında *Pdx1* geninin ekspresyonu etkileme oranı düşük olan gRNA plazmitleri başka bir hücre hattına ya da başka bir transaktivatör domainle beraber hücrelere transfekte edilirse; bu gRNA plazmitlerinin *Pdx1* geninin ekspresyonuna etkisi değişebilir.

İdeal olan bu dört gRNA plazmiti bir arada gRNA plazmit miktarı 20 ng ve 200 ng CRISPR/dCas9-VPR olacak şekilde hücrelere verildi. Ayrıca, total gRNA plazmit miktarı 80 ng olacak şekilde ve 200 ng CRISPR/dCas9-VPR ile beraber hücrelere verildi. Elde edilen $2^{-\Delta\Delta ct}$ oranlarına bakıldığında; total gRNA plazmiti 20 ng olarak verilen hücrelerde, total gRNA plazmiti 80 ng olarak verilen hücrelere göre daha yüksek değerde çıkmasının nedeni; fazla miktarda plazmitin hücrelerde toksit etki yaratıp hücrelerin strese girmesine ve bu durumun hücrelerin ölmesine neden olmuş olması olabilir. Ayrıca bu ideal 4 gRNA ayrı ayrı plazmitler halinde değil de tek bir plazmite aktarılmış olsaydı; hücrelerde bu plazmitlerin yaratmış olduğu toksit etki azalacağı için verim daha yüksek olabilirdi.

Bu çalışma ile dışarıdan herhangi bir virüs kullanılmadan, hücrelere CRISPR/dCas9-VPR aktivatör sistem kullanılarak lipofektamin gibi bir transfeksiyon ajanı ile hedef genin aktivasyonu sağlayacak bazı primerler tespit edilebileceği gösterildi. Ayrıca DNA dizisinde herhangi bir mutasyon yapmadan da gen aktivasyonunu sağlayan primerlerin bulunabileceğini gösterildi. *Pdx1* geninin aktivasyonunu sağlayan en iyi bölgeler tespit edilerek Diabetes mellitus hastalığının tedavisi için ihtiyaç duyulan alternatif beta hücresi kaynaklarının oluşturulmasına katkı sağlayacak sonuçlar elde edildi.

Bu çalışmalara ek olarak; HEK-293 hücrelerine ek olarak başka hücre hatlarına da bu plazmitler ve CRISPR/dCas9- VPR sistemi kullanılarak *Pdx1* geninin aktivasyonuna bakılabilir. *In vitro* koşullarında yapılan bu çalışmalara farelerin üzerinde *in vivo* çalışmalar yapılarak *Pdx1* geninin ekspresyon düzeyindeki değişimlere bakılabilir. *Pdx1* geninde aktivasyon için promotor bölgesinden önce bulunan 250 bp'lik alandan daha geniş bir alanda gRNA tasarlanarak aktivasyona bakılabilir.

6. SONUÇLAR

6.1. *Pdx1* Geni için Primerlerin Doğruluğunun Tespit Edilmesi

Tasarlanan primerlere sekans analizi yapılarak doğru sekanslar oldukları tespit edildi.

6.2. dCas9-VPR ile gRNA Plazmitlerinin Ayrı Ayrı Hücrelere Transfeksiyonu

Transfeksiyon işlemi yapılmadan önce HEK-293 hücre hattına transfeksiyonun gerçekleştirilip gerçekleştirilmediğini göstermek için 200 ng dCas9-VP64_GFP lipofektamin 2000 ile transfeksiyonu yapıldı. Transfeksiyondan 24 saat ve 48 saat sonra elde edilen GFP ışımalarının mikroskop altındaki görüntüleri gösterildi (Şekil 4.1 ve Şekil 4.2).

Transfeksiyonun gerçekleştirildiği gösterildikten sonra 20 ng gRNA plazmitleri ve 200 ng dCas9-VPR pH:7.6 olan optimemli her bir kuyucukta 25×10^3 HEK-293 hücresi olan 12 kuyucuklu hücre kaplarının her bir kuyucuğuna verildi. Transfeksiyondan 48 saat sonra plazmit verilen olan HEK-293 hücrelerinden RNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen bu RNA'lardan cDNA elde edildikten sonra bu cDNA'lara kPZR yapıldı. kPZR sonuçları Şekil.4.3.'de gösterildiği gibi elde edildi. Elde edilen bu kPZR sonuçlarına ANOVA yapıldı. Analiz sonucunda; bu 10 farklı gRNA plazmiti arasında istatistiksel olarak fark yok iken, deneysel olarak fark görüldü. Bu kPZR sonuçlarına deneysel olarak fark olup olmadığına bakılarak ideal olan 4 gRNA plazmiti belirlendi. Bunlar; gRNA-1, gRNA-2, gRNA-4 ve gRNA-8 plazmitleriydi.

6.3. dCas9-VPR ile gRNA Plazmitlerinin Birlikte Hücrelere Transfeksiyonu

İdeal olarak belirlenen 4 gRNA (gRNA-1, gRNA-2, gRNA-4 ve gRNA-8) plazmitleri birlikte HEK-293 hücre hattına transfekte edildi. Bunun için bir kuyucuğunda 25×10^3 HEK-293 hücresi bulunan 12 kuyucuklu hücre kabının bir kuyucuğuna 200 ng dCas9-VPR ile bu 4 gRNA plazmitinin toplam miktarı 20 ng olacak şekilde alınıp pH:7.6'lı optimem ortamında lipofektamin 2000 transfeksiyon ajanı ile transfekte edildi. Diğer bir kuyucukta ise bir kuyucuğunda 25×10^3 HEK-293 hücresi bulunan 12 kuyucuklu hücre kabının bir kuyucuğuna 200 ng dCas9-VPR ile bu 4 gRNA plazmitinin toplam miktarı 80 ng olacak şekilde alınıp pH:7.6'lı optimem ortamında lipofektamin 2000 transfeksiyon ajanı ile transfekte edildi. Transfeksiyonun gerçekleşip gerçekleşmediğini göstermek için bir kuyucuğa da 200 ng CRISPR/dCas9-VP64_GFP lipofektamin 2000 ile transfeksiyonu yapıldı. Transfeksiyonun inkübasyonun 24 saat ve 48 saat sonrasında elde edilen GFP ışımalarının mikroskop altındaki görüntüleri gösterildi (Şekil 4.6 ve Şekil 4.7).

Transfeksiyondan 48 saat sonra plazmit verilmiş olan HEK-293 hücrelerinden RNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen bu RNA'lardan cDNA elde edildikten sonra bu cDNA'lara kPZR yapıldı. kPZR sonuçları Şekil.4.8.'de gösterildiği gibi elde edildi. Bu kPZR ANOVA yapıldığında toplam 20 ng gRNA plazmitleri verilmiş olan hücreler ile toplam 80 ng gRNA plazmitleri verilmiş olan hücreler arasında hem istatistiksel hem de deneysel olarak fark görüldü.

7. KAYNAKLAR

- Ahlgren U, Jonsson J, Edlund H. (1996) The morphogenesis of the pancreatic mesenchyme is uncoupled from that of the pancreatic epithelium in IPF1/PDX1-deficient mice. *Development* 122:1409–1416.
- Ahlgren U, Jonsson J, Jonsson L, Simu K, Edlund H. (1998) Beta-cell-specific inactivation of the mouse *Ip1/Pdx1* gene results in loss of the beta-cell phenotype and maturity onset diabetes. *Genes Dev* 12:1763–1768
- Akçay D. (2015) Fare Miyoblast hücre hattında (C2C12 hücre hattı) *klf5* geni üzerinde hedefli insersiyon gerçekleştirilmesi, Haccettepe Üniversitesi Yüksek Lisans Tezi
- Ansari AZ, Mapp AK. (2002) Modular design of artificial transcription factors. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 6:765-72.
- Beerli RR, Barbas CF. (2002) Engineering polydactyl zinc-finger transcription factors. *Nat. Biotechnol.* 20:135-41.
- Bikard D, Jiang W, Samai P, Hochschild A, Zhang F, Marraffini LA. (2013) Programmable repression and activation of bacterial gene expression using an engineered CRISPR-Cas system. *Nucleic Acids Res* 41:7429-37.
- Bikard, D., Jiang, W., Samai, P., Hochschild, A., Zhang, F., and Marraffini, L.A. (2013) Programmable repression and activation of bacterial gene expression using an engineered CRISPR-Cas system. *Nucleic Acids Res.* 41, 7429–7437.
- Brissova M, Shiota M, Nicholson WE, Gannon M, Knobel SM, Piston DW (2011) Carroll, D. Genome engineering with zinc-finger nucleases. *Genetic.*, 188(4) 773-782.
- Cai, M., Yang, Y. (2002) Targeted genome editing tools for disease modeling and gene therapy. *Curr Gene Ther*, 14(1), 2-9.
- Chakraborty, S., Ji, H., Kabadi, A.M., Gersbach, C.A., Christoforou, N., and Leong, K.W. (2014) A CRISPR/Cas9-based system for reprogramming cell lineage specification. *Stem Cell Reports* 3. 940–947.
- Chavez A, Scheiman J, Vora S, Pruitt BW, Tuttle M, P R Iyer E, Lin S, Kiani S, Guzman CD, Wiegand DJ, Ter- Ovanesyan D, Braff JL, Davidsohn N, et al. (2015). Highly efficient Cas9-mediated transcriptional programming. *Nat. Methods.* 12:326-8.
- Chavez, A, Scheiman, J, Vora, S, Pruitt, BW, Tuttle, M, P R Iyer, E et al. (2015). Highly efficient Cas9-mediated transcriptional programming. *Nat Methods* 12: 326–328
- Chavez, A., Scheiman, J., Vora, S., Pruitt, B.W., Tuttle, M., P R Iyer, E., Lin S., Kiani,

- S., Guzman, C.D., Wiegand, D.J., et al. (2015). Highly efficient Cas9-mediated transcriptional programming. *Nat. Methods* 12, 326–328.
- Cheng, A.W., Wang, H., Yang, H., Shi, L., Katz, Y., Theunissen, T.W., Rangarajan, S., Shivalila, C.S., Dadon, D.B., and Jaenisch, R. (2013) Multiplexed activation of endogenous genes by CRISPRon, an RNA-guided transcriptional activator system. *Cell Res.* 23,1163–1171.
- Cheng, AW, Wang, H, Yang, H, Shi, L, Katz, Y, Theunissen, TW et al. (2013) Multiplexed activation of endogenous genes by CRISPR-on, an RNA-guided transcriptional activator system. *Cell Res.* 23: 1163–1171.
- Cho, S.W., Kim, S., Kim, J.M., Kim, J.S. (2013a) Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat. Biotechnol.* 31 (3), 230–232.
- Cockburn, B.N. et al. (2004) Insulin promoter factor-1 mutations and diabetes in Trinidad: identification of a novel diabetes-associated mutation (E224K) in an Indo-Trinidadian family. *J Clin Endocrinol Metab.* 89, 971-8.
- Cong, L., Ran, F.A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N. et al. (2003) Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 339(6121), 819-823.
- Cong, L., Ran, F.A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P.D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L.A., et al. (2013) Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science.* 339 (6121), 819–823.
- Corritore E. et al. (2016) V-Maf Musculoaponeurotic Fibrosarcoma Oncogene Homolog A Synthetic Modified mRNA Drives Reprogramming of Human Pancreatic Duct-Derived Cells Into Insulin-Secreting Cells. *Stem cells translational medicine.*
- Dawson M a., Kouzarides T. (2012) Cancer epigenetics: From mechanism to therapy. *Cell.* 150:12-27.
- Deltcheva, E., Chylinski, K., Sharma, C.M., Gonzales, K., Chao, Y., Pirzada, Z.A. et al. (2011) CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature.* 471(7340), 602-607.
- Doudna JA, Charpentier E. (2014) The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* (80). 346:1258096-1258096.
- Esvelt KM, Mali P, Braff JL, Moosburner M, Yaung SJ, Church GM. (2013) Orthogonal Cas9 proteins for RNA-guided gene regulation and editing. *Nat. Methods.* 10:1116-21.
- Ewa Kruminis-Kaszkziel, Judyta Juranek, Wojciech Maksymowicz and Joanna

- Wojkiewicz. (2018) CRISPR/Cas9 Technology as an Emerging Tool for Targeting Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS). *International Journal of Molecular Sciences*; 19(3), 906.
- Falahi F, Sgro A, Blancafort P. (2015) Epigenome Engineering in Cancer: Fairytale or a Realistic Path to the Clinic? *Front. Oncol.* 5:1-11.
- Farzadfard F, Perli SD, Lu TK. (2013) Tunable and Multifunctional Eukaryotic Transcription Factors Based on CRISPR/Cas. *ACS Synth. Biol.* 2:604-13.
- Gaj, T., Gersbach, C.A., Barbas, C.F. (2013) 3rd., ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol* 31(7), 397-405.
- Gilbert, L.A., Horlbeck, M.A., Adamson, B., Villalta, J.E., Chen, Y., Whitehead, E.H., Guimaraes, C., Panning, B., Ploegh, H.L., Bassik, M.C., et al. (2014) Genome Scale CRISPR-Mediated Control of Gene Repression and Activation. *Cell* 159, 647–661.
- Gilbert, L.A., Larson, M.H., Morsut, L., Liu, Z., Brar, G.A., Torres, S.E., Stern-Ginossar, N., Brandman, O., Whitehead, E.H., Doudna, J.A., et al. (2013) CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell* 154, 442–451.
- Gilbert, LA, Larson, MH, Morsut, L, Liu, Z, Brar, GA, Torres, SE et al. (2013) CRISPRmediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell* 154: 442–451.
- Guz, Y. et al. (1995) Expression of murine STF-1, a putative insulin gene transcription factor, in beta cells of pancreas, duodenal epithelium and pancreatic exocrine and endocrine progenitors during ontogeny. *Development* 121, 11-8.
- Hilton IB, D'Ippolito AM, Vockley CM, Thakore PI, Crawford GE, Reddy TE, Gersbach CA. Epigenome editing by a CRISPR-Cas9-based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers. *Nat. Biotechnol.* 33:510-7; 2015.
- Hilton, IB, D'Ippolito, AM, Vockley, CM, Thakore, PI, Crawford, GE, Reddy, TE et al. Epigenome editing by a CRISPR-Cas9-based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers. *Nat Biotechnol.* 33: 510–517; 2015.
- Hwang WY, Fu Y, Reyon D, Maeder ML, Tsai SQ, Sander JD, Peterson RT, Yeh JR, Joung JK., Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nat. Biotechnol.* 31, 227–229; 2013.
- J.D., and Joung, J.K., Robust, synergistic regulation of human gene expression using TALE activators. *Nat. Methods* 10, 243–245; 2013b.
- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A

- Programmable Dual-RNA – Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science* (80-); 337:816-22; 2012.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., and Charpentier, E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337,816–821; 2012.
- Joel F., Habener Daniel M., Kemp Melissa K., Thomas. (2005) Minireview: transcriptional regulation in pancreatic development. *Endocrinology* 146, 1025-34.
- Jonsson J, Carlsson L, Edlund T, Edlund H. (1994) Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature* 371:606–609.
- Kaneto, H. et al. (2008) PDX-1 and MafA play a crucial role in pancreatic beta-cell differentiation and maintenance of mature beta-cell function. *Endocrinology* 143, 235-52.
- Keneto H., T. Matsuoka. (2015) Role of Pancreatic Transcription Factors in Maintenance of Mature beta-Cell Function. *Int. J. Mol. Sci.*, 16, 6281-6297.
- Konermann S, Brigham MD, Trevino AE, Joung J, Abudayyeh OO, Barcena C, Hsu PD, Habib N, Gootenberg JS, Nishimasu H, Nureki O, Zhang F. (2014) Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex. *Nature*. 517:583-8.
- La Russa MF, Qi LS. (2015) The New State of the Art: Cas9 for Gene Activation and Repression. *Mol Cell Biol*. 35:3800-9.
- Li JF, Norville JE, Aach J, McCormack M, Zhang D, Bush J, Church GM, Sheen J. (2013) Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. *Nat Biotechnol* 31:688–691.
- Liu H, Wei Z, Dominguez A, Li Y, Wang X, Qi LS (2015) CRISPR-ERA: a comprehensive design tool for CRISPR-mediated gene editing, repression and activation, *Bioinformatics*.
- Maeder ML, Linder SJ, Reyon D, Angstman JF, Fu Y, Sander JD, Joung JK. Robust. (2013) synergistic regulation of human gene expression using TALE activators. *Nat. Methods*. 10:243-5.
- Maeder, M.L., Linder, S.J., Cascio, V.M., Fu, Y., Ho, Q.H., and Joung, J.K. (2013a) CRISPR RNA-guided activation of endogenous human genes. *Nat. Methods* 10, 977–979.
- Maeder, M.L., Linder, S.J., Reyon, D., Angstman, J.F., Fu, Y., Sander, Maeder, ML, Linder, SJ, Cascio, VM, Fu, Y, Ho, QH and Joung, JK. (2013) CRISPR RNA-

- guided activation of endogenous human genes. *Nat Methods* 10: 977–979.
- Mali, P, Aach, J, Stranges, PB, Esvelt, KM, Moosburner, M, Kosuri, S et al. (2013) CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering. *Nat Biotechnol* 31: 833–838.
- Mali, P., Esvelt, K.M., and Church, G.M. (2013a) Cas9 as a versatile tool for engineering biology. *Nat. Methods* 10, 957–963.
- Mali, P., Yang, L., Esvelt, K.M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J.E. et. al. (2013) RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* 339(6121), 823-826.
- Melloul D, Marshak S, Cerasi E. (2002) Regulation of insulin gene transcription. *Diabetologia* 45:309–326.
- Melody Redman, Andrew King, Caroline Watson, David King. (2016) What is CRISPR/Cas9?. *BMJ Journals*.
- Morgan L Maeder, Samantha J Linder, Vincent M Cascio, Yanfang Fu, Quan H Ho, and J Keith Joung. (2013). Author manuscript, CRISPR RNA-guided activation of endogenous human genes. *Nat Methods*.
- Micilli, S, C. Ozoğul, C. (2007) Diyabette Kök Hücreler. DEÜ Tıp Fakültesi Dergisi. 109-117.
- Naito Y, Hino K, Bono H, Ui-Tei K, (2015) CRISPRdirect: software for designing CRISPR/Cas guide RNA with reduced off-target sites, *Bioinformatics*.
- Offield MF, Jetton TL, Labosky PA, Ray M, Stein RW, Magnuson MA, Hogan BL, Wright CV. (1996) PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum. *Development* 122:983–995.
- Öztürk M. (2014) Yenidoğan Streptozotosin diyabet modelinde pankreatik beta hücre rejenerasyonunu kontrol eden genlerin ekspresyonu, Dergipark akademik.
- Pablo P., P, Kocak DD, Vockley CM, Adler AF, Kabadi AM, Polstein LR, Thakore PI, Glass KA, Ousterout DG, Leong KW, Guilak F, Crawford GE, Reddy TE, Gersbach CA. (2013) RNA-guided gene activation by CRISPR- Cas9- based transcription factors, *Nature methods*.
- Pan, F.C., and Wright, C. (2011) Pancreas organogenesis: from bud to plexus to gland. *Dev. Dyn.* 240, 530–565
- Perez-Pinera P, Kocak DD, Vockley CM, Adler AF, Kabadi AM, Polstein LR, Thakore PI, Glass KA, Ousterout DG, Leong KW, Guilak F, Crawford GE, Reddy TE, et al. (2013) RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9-based transcription factors. *Nat. Methods*. 10:973-6.

- Perez-Pinera, P., Kocak, D.D., Vockley, C.M., Adler, A.F., Kabadi, A.M., Polstein, L.R., Thakore, P.I., Glass, K.A., Ousterout, D.G., Leong, K.W., et al. (2013) RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9-based transcription factors. *Nat. Methods* 10, 973–976.
- Qi LS, Larson MH, Gilbert L a, Doudna J a, Weissman JS, Arkin AP, Lim W a. (2013) Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell. Elsevier* 152:1173-83.
- S. Konermann, Zhang lab, SAM target sgRNA cloning protocol, 2014
- San Filippo, J., Sung, P., Klein, H. (2008) Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annu Rev Biochem*, 77, 229-257.
- Shan Q, Wang Y, Li J, Zhang Y, Chen K, Liang Z, Zhang K, Liu J, Xi JJ, Qiu JL, Gao C. (2013) Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas9 system. *Nat Biotechnol* 31:686–688.
- Shih, H.P., Wang, A., and Sander, M. (; 2013) Pancreas organogenesis: from lineage determination to morphogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 29, 81–105.
- Silvana K., Mark D. Brigham, Alexandro E. Trevino, Julia Joung, Omar O. Abudayyeh, Clea Barcena, Patrick D. Hsu, Naomi Habib, Jonathan S. Gootenberg, Hiroshi Nishimasu, Osamu Nureki, and Feng Zhang: (2015) Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR/Cas9 complex, *Nature methods*.
- Sternberg SH, Redding S, Jinek M, Greene EC, Doudna JA. (2014) DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature*. Nature Publishing Group; 507:62-7.
- 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.
- Tetsushi S., Ayami Nishikawa, Satoshi Kume, Kazuaki Chayama & Takashi Yamamoto. (2014) Multiplex genome engineering in human cells using all-in-one CRISPR/Cas9 vector system, *Nature journal*.
- Thomas MK, Devon ON, Lee JH, Peter A, Schlosser DA. Tenser MS, Habener JF. (2001) Development of diabetes mellitus in aging transgenic mice following suppression of pancreatic homeoprotein IDX-1. *J Clin Invest* 108:319–329.
- Ünal, D., Kara, A., Aksak, S., Altunkaynak, B.Z. and Yıldırım, S. (2012) Insulin hormone: Mechanism and effects on the body and relationship with central nervous system. *Dicle Med. J.* 39:310-315.

- Van Tol N, Van Der Zaal BJ. (2014) Review: Artificial transcription factor-mediated regulation of gene expression. *Plant Sci.* 225:58-67.
- Vo Van Giau¹, Hyon Lee², Kyu Hwan Shim¹ Eva Bagyinszky¹ Seong Soo A An. (2018) Genome-editing applications of CRISPR–Cas9 to promote in vitro studies of Alzheimer’s disease. *Dove Press Journal*.
- Weir, G.C. and Bonner-Weir, S. (2013) Islet β cell mass in diabetes and how it relates to function, birth, and death. *Ann. NY. Acad. Sci.*, 1281:92–105.
- Wiedenheft, B., Lander, G.C., Zhou, K., Jore, M.M., Brouns, S.J., van der Oost, J. et. al. (2011) Structures of the RNA-guided surveillance complex from a bacterial immune system. *Nature*. 477(7365), 486-489.
- Wright CV, Powers AC. (2014) Reduction in pancreatic transcription factor PDX-1 impairs glucose-stimulated insulin secretion. *J Biol Chem* 277:11225– 11232,
- Zhou, Q. and Melton, D.A.(2008) Extreme Makeover: Converting One Cell into Another. *Cell Stem Cell*, 3:382.

ÖZGEÇMİŞ

GAMZE BADAKUL

gamzebadakul@gmail.com



ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2016 - 2019	Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı , Antalya
Lisans	Cumhuriyet Üniversitesi
2010-2014	Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Sivas

ESERLER

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makale

Akıncı, E., Yıldız, M., Ünal, P., **Badakul, G.** 2017. In vitro transcription and validation of human pancreatic transcription factors' mRNAs. *Turkish Journal Of Biology*. 41: 708-718-

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiri

CRISPR/dCas9 and gene activation. 2017. European Biotechnology Congress, Dubrovnik, Croatia. VOL.256, pp.S42.

Badakul G., Adıgüzel D., Bakırcıoğlu E., Çelik-Özenci Ç. "NPAS2 ekspresyonunun spermatogenez ile ilişkilendirilmesi. 2016. 13. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, İzmir, TÜRKİYE. Yayın No: P080.